

向日葵黄萎病病原鉴定及其生物学特性研究

马立功¹, 张匀华¹, 孟庆林¹, 石凤梅¹, 刘佳¹, 李易初¹, 纪武鹏²

(1. 黑龙江省农业科学院 植物保护研究所, 黑龙江 哈尔滨 150086; 2. 黑龙江省农垦科学院 作物研究所, 黑龙江 佳木斯 154007)

摘要:为更好地研究向日葵黄萎病发病规律及其有效防治方法,对向日葵黄萎病菌的形态和生物学特性进行了研究。结果表明:该病菌在梅干培养基上分生孢子透明无色,孢子梗基部为黑褐色,后期有黑色念珠状菌丝产生,未发现微菌核和厚垣孢子,证实为黄萎轮枝菌(*Verticillium albo-atrum* Reinke et Berthold)。其菌丝生长的最佳条件为 PSC, 25℃, pH5~6, 最适碳氮源为蔗糖和甘氨酸。产孢的最佳条件为 PSC, 25~30℃, pH8, 最适碳氮源为 D-木糖和 L-组氨酸。孢子萌发的最适温度为 25℃, 最适 pH5.9, 偏酸偏碱均可促进萌发, 6 h 以后孢子即可萌发, 12 h 萌发率可达 80% 以上。

关键词:向日葵; 黄萎病; 病原; 生物学特性

中图分类号: S435.655

文献标识码: A

文章编号: 1002-2767(2011)10-0040-04

向日葵黄萎病(*Verticillium wilt*)是威胁向日葵生产的一种重要病害,可大幅度降低向日葵籽粒的产量和品质。近年来,随着向日葵播种面积的不断增加,黄萎病的发生日趋严重。据调查,2009 年东北向日葵主产区黄萎病的发病率在 14.2%~24.8%;2010 年的发病率达到 32%,部分发病田块达到 50% 以上,造成严重危害。该病在向日葵幼苗期至成株期均可发病造成危害^[1]。关于向日葵黄萎病发生和防治的研究仅限于化学防治,而有关病菌的病原学、生理特性及其与寄主相互作用特性等的研究,均未见报道。该研究对向日葵黄萎病的病原及生物学特性进行了较系统的研究,旨在为该病害的发生及其防治提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

病害标本于 2009~2010 年采自黑龙江及吉林向日葵主产区,对典型症状在室内参照方中达^[2]的方法进行病菌分离,然后在 25℃ 下 PDA 上培养,获病原菌纯培养。

1.2 病原菌分离及鉴定

将分离纯化的病原菌扩繁后,用孢子悬浮液

浓度为 1×10^6 个 $\cdot \text{mL}^{-1}$ 灌根接种,经柯赫氏法则验证。并在梅干培养基上培养,观察测定病菌菌丝和分生孢子形态色泽,参照真菌分类学进行病原菌的鉴定^[3]。

1.3 菌丝生长及产孢相关因素测定

1.3.1 培养基 供试培养基 8 种: PDA、PSC、Richard、christen、ceapek、PLYA、向日葵叶煎汁(K)和向日葵叶煎汁+葡萄糖(K+T)。取预培养 15 d 的菌落,无菌条件下打取直径 5 mm 的菌碟分别移入平板中央。25℃ 恒温培养,每处理 3 次重复。15 d 后十字交叉法测量菌落直径;用 5 mm 打孔器每皿菌落对角线打 4 块菌碟放入装有 10 mL 无菌水的三角瓶中,然后放入超声波清洗机冲洗 10 min,用血球板计数法进行产孢量的测定^[4]。

1.3.2 温度 采用 PSC 平板培养基,于 5~35℃ 间隔 5℃ 设 7 个温度梯度,分别移接 5mm 菌碟,每处理设 3 次重复。15 d 后测定菌落直径及产孢量。

1.3.3 pH 采用 PSC 平板培养基,用 $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 HCl 和 NaOH 溶液进行调配,分别调节 pH 为 3、4、5、6、7、8、9、10、11、12 共 10 个处理,接种后于 25℃ 恒温培养,每处理设 3 次重复。15 d 后测定菌落直径及产孢量。

1.3.4 碳源 供试碳源 9 种:葡萄糖、蔗糖、乳糖、麦芽糖、D-果糖、D-木糖、淀粉、甘露醇和山梨醇。用以上碳源置换 PSC 中的蔗糖,配成不同碳源的培养基,调 pH 至 7.0。接种后于 25℃ 恒温培养,每处理设 3 次重复。15 d 后测定菌落直径及产孢量。

收稿日期:2011-04-26

基金项目:国家向日葵现代产业技术体系岗位专项资助项目(nycytx-21)

第一作者简介:马立功(1983-),男,青海省乐都市人,硕士,助理研究员,从事土传病害研究。E-mail: maligong0@163.com。

通讯作者:张匀华(1957-),男,辽宁省建平县人,硕士,研究员,从事植物保护研究,现为国家向日葵产业技术体系东北病虫害岗位专家。

1.3.5 氮源 供试氮源蛋白胨、甘氨酸、硫酸铵、L-丙氨酸、L-组氨酸、L-苯丙氨酸、L-天冬素、硝酸钾和硝酸钠共 9 种。用各氮源置换 PSC 中的蛋白胨,配成不同氮源的培养基,调 pH 至 7.0。接种后 25℃ 恒温培养,每处理 3 次重复。15 d 后测定菌落直径及产孢量。

1.4 孢子萌发相关因素测定

1.4.1 温度 用无菌水配制孢子悬浮液,稀释成浓度为 1×10^5 个 $\cdot \text{mL}^{-1}$ 的孢悬液加入到细胞培养板上,每孔 $400 \mu\text{L}$,于 $5 \sim 35^\circ\text{C}$ 间隔 5°C 设7个温度梯度,12 h后镜检计测萌发率,每次检查孢子100个,每处理设3次重复。

1.4.2 培养时间 用无菌水配制孢子悬浮液,同1.4.1配制。然后置于25℃的恒温静止培养,以后每2 h测定其孢子萌发率,至到孢子不再萌发为止。

1.4.3 pH 用 $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 HCl 和 NaOH 溶液,将无菌水调节 pH 从 2~12 共 11 个梯度溶液,定量加入 1×10^6 个 $\cdot \text{mL}^{-1}$ 的孢子后再测定其

pH。然后将不同 pH 的孢子悬浮液加入到细胞培养板上,每孔 400 μ L,于 25 $^{\circ}$ C 的恒温静止培养,12 h 后镜检计测萌发率,每次检查孢子 100 个,每处理设 3 次重复。

2 结果与分析

2.1 病原菌分离及鉴定

将分离纯化的病原菌,经柯赫氏法则测定,接种发病症状与田间发病症状一致,因此可以确定分离的病菌为向日葵黄萎病的致病菌。该病菌在梅干培养基上,菌丝分隔、膨大,胞壁增厚形成念珠状黑菌丝,病部老熟分生孢子梗基部变暗色,分生孢子透明,长卵形,大小 $(3\sim 7)\mu\text{m}\times(1.5\sim 3.0)\mu\text{m}$,有时具1个隔膜(见图1、图2、图3)。未发现厚垣孢子和微菌核的结构。

根据形态特征,参照有关分类标准^[3],将其病菌确定为半知菌亚门真菌,黄萎轮枝菌(*Verticillium albo-atrum* Reinke et Berthold)。

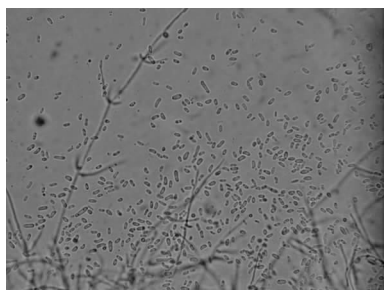


图 1 分生孢子

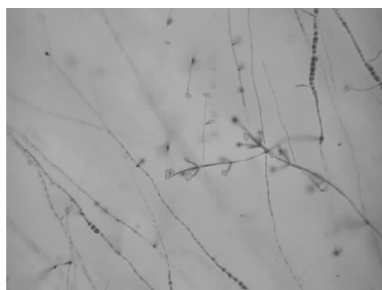


图 2 轮枝状菌丝

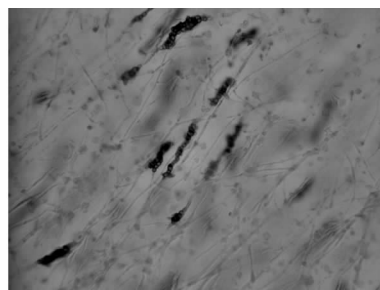


图 3 念珠状黑菌丝

2.2 培养基对病原菌菌丝生长及产孢的影响

结果表明,病原菌菌丝在PSC培养基中生长最好,其次是PLYA、Richard、K+T和K,在christen中生长较差,在ceapek不能生长。病原菌在PSC培养基中产孢量最高,其次是PDA、K、K+T、Richard,在ceapek培养基中不能产孢(见表1)。

表 1 不同培养基对病原菌菌丝生长及产孢的影响

培养基	菌落直径/cm	产孢量/ 10^6 个 \cdot mL ⁻¹
PDA	4.0 c	1.06 b
PLYA	4.8 b	0.29 bc
PSC	5.2 a	3.05 a
K	4.6 b	0.96 bc
K+T	4.8 b	0.72 bc
christen	1.1 d	0.08 bc
ceapek	0 e	0 c
Richard	4.8 b	0.97 bc

2.3 不同温度对病原菌菌丝生长及产孢的影响

从图 4 可以看出,病原菌在 5~35℃ 均能生长,并随着培养温度的不断升高菌丝生长不断增强,至 25℃ 时,菌丝生长达到最高,菌落直径为 6.1 cm。由图 5 可知,病原菌在 5~35℃ 均能产孢,并随着培养温度的不断升高产孢量不断增强,至 25~30℃ 时产孢达到最高为 $2.81 \sim 2.88 \times 10^6$ 个 \cdot mL $^{-1}$ 。由此可知,黄萎病菌菌丝生长的最适温度为 25℃,产孢的最适温度为 25~30℃。

2.4 pH 与病原菌菌丝生长及产孢的关系

从图 6 可知,病原菌 pH 在 4~11 均可以生长,并随培养基 pH 的增高菌丝生长不断增强,当 pH 为 5~6 时菌丝生长达到最高,菌落直径为 4.6 cm,当培养基 pH ≤ 3 或 pH ≥ 12 菌丝不能生长。由图 7 可知,在 pH4~10 病原菌均能产孢,偏酸偏碱均能促进病原菌产孢,当 pH 为 8 时产孢量达到最高,为 2.37×10^6 个 \cdot mL $^{-1}$ 。由此可知,黄萎病菌菌丝生长的最适 pH 为 5~6,产孢的最适 pH 为 8。

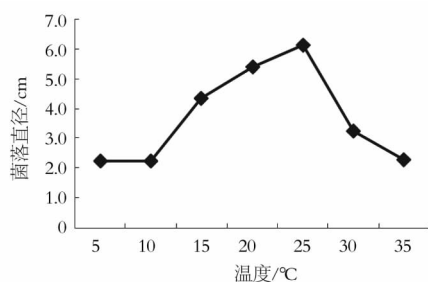


图4 温度对病原菌菌丝生长的影响

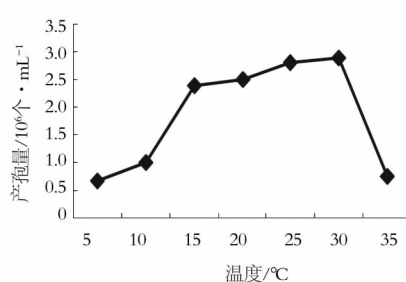


图5 温度对病原菌产孢的影响

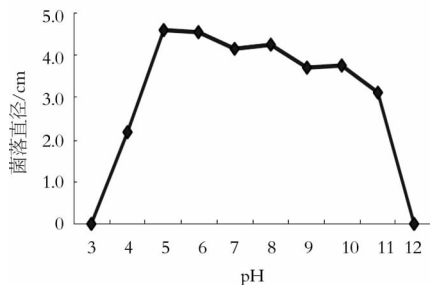


图6 pH对病原菌菌丝生长的影响

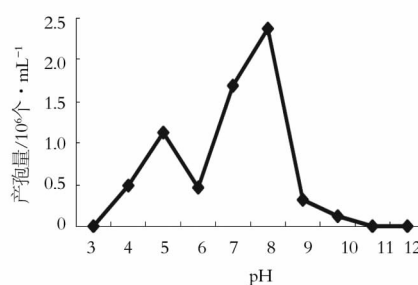


图7 pH对病原菌产孢的影响

2.5 碳源与病原菌菌丝生长及产孢的关系

从表2可知,在供试的9种不同碳源中,病原菌在蔗糖、D-果糖、葡萄糖和D-木糖中菌丝生长较好,在甘露醇、山梨醇和乳糖中菌丝生长较差。在D-木糖中产孢最高为 6.02×10^6 个·mL⁻¹,其次是山梨醇。结果表明,黄萎病菌菌丝生长的最佳碳源是蔗糖,产孢最佳碳源为D-木糖。

表2 不同碳源与病原菌菌丝生长及产孢的关系

碳源	菌落直径/cm	产孢量/10 ⁶ 个·mL ⁻¹
乳糖	3.4 d	2.00 c
蔗糖	4.2 a	1.29 ef
麦芽糖	3.9 abc	1.50 de
D-果糖	4.1 ab	0.97 f
D-木糖	4.0 ab	6.02 a
淀粉	3.9 abc	2.14 c
甘露醇	3.7 bcd	0.36 g
葡萄糖	4.1 ab	1.84 cd
山梨醇	3.6 cd	4.96 b

2.6 氮源与病原菌菌丝生长及产孢的关系

从表3可知,在供试的9种不同氮源中,病原菌在甘氨酸中菌丝生长最好,其次L-天冬素和蛋白胨,再次为硝酸钾、硝酸钠和L-苯丙氨酸。在L-组氨酸中产孢最高为 0.22×10^6 个·mL⁻¹,其次是蛋白胨、甘氨酸和L-苯丙氨酸,在硝酸钾、硝酸钠和L-丙氨酸中产孢最差。结果表明,黄萎病菌菌丝生长的最佳氮源是甘氨酸,产孢最佳氮源为L-组氨酸。

表3 不同氮源与病原菌菌丝生长及产孢的关系

氮源	菌落直径/cm	产孢量/10 ⁶ 个·mL ⁻¹
L-组氨酸	5.7 d	0.22 a
硫酸铵	3.9 e	0.08 bc
硝酸钾	6.6 bc	0.07 c
蛋白胨	6.7 b	0.20 ab
甘氨酸	7.5 a	0.15 abc
硝酸钠	6.4 bcd	0.07 c
L-苯丙氨酸	6.2 bcd	0.15 abc
L-天冬素	6.8 b	0.13 abc
L-丙氨酸	5.9 cd	0.05 c

2.7 温度对病原菌孢子萌发的影响

从图8可知,黄萎病菌孢子低于10℃时不能萌发,以后随着温度增加孢子萌发率增高,至25℃时达到最高,孢子萌发率为79.5%。35℃时孢子萌发率仅为5%。结果表明,黄萎病菌孢子萌发的最佳温度是25℃。

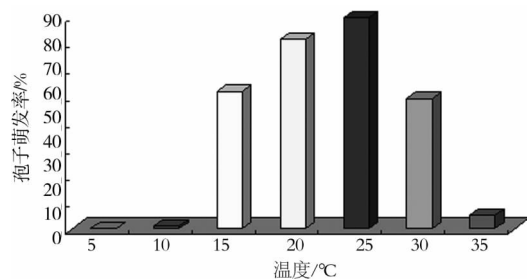


图8 温度对病原菌孢子萌发的影响

2.8 培养时间与孢子萌发的关系

由图9可知,25℃条件下黄萎病原菌孢子在4 h以后开始萌发,至12 h时孢子萌发率达到80%。

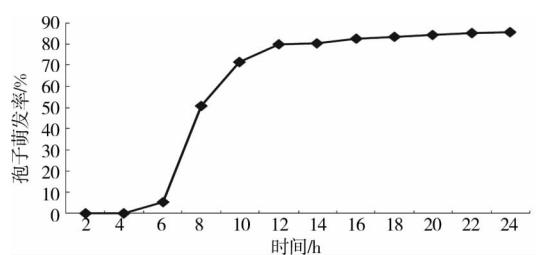


图9 不同时间与病原菌孢子萌发的关系

2.9 pH 对病原菌孢子萌发的影响

从图 10 可知,黄萎病菌孢子 pH 在 2.4~10.4 均能萌发,至 pH5.9 时,孢子萌发率达到最高,为 82%,当 pH7.1 时孢子萌发率为 43.4%,以后随着 pH 的不断升高孢子萌发率又逐渐升高,当 pH8.4 时孢子萌发率达到第二个波峰。当 pH<2.4 或 pH>10.4 孢子不能萌发。结果表明,黄萎病菌孢子萌发的 pH 区间为 2.4~10.4,偏酸偏碱均可促进孢子萌发,孢子萌发的最适 pH 为 5.9。

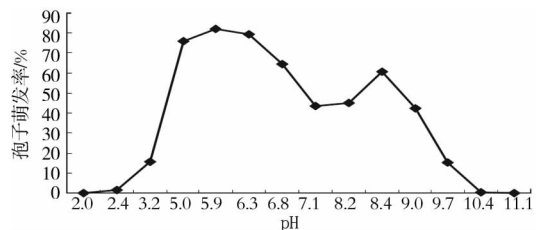


图10 pH 对病原菌孢子萌发的影响

3 结论与讨论

据国外文献报道^[5],引起向日葵黄萎病的主要病原菌为黄萎轮枝菌或黑白轮枝菌 (*Verticillium albo-atrum* Reinke et Berthold),属半知菌

亚门真菌。此外也有报道大丽轮枝菌 (*Verticillium dahliae* Kleb) 也是该病病原。该试验首次通过对我国东北地区向日葵产区 17 个市县、83 个乡镇,150 多个向日葵田块的向日葵黄萎病病原菌分离纯化,并进行了形态学鉴定,初步鉴定结果为黄萎轮枝菌,没有发现大丽轮枝菌。

从该研究中得出的结论:向日葵黄萎病菌菌丝生长的最佳条件为 PSC, 25℃, pH 5~6, 最适碳氮源为蔗糖和甘氨酸。产孢的最佳条件为 PSC, 25~30℃, pH8, 最适碳氮源为 D-木糖和 L-组氨酸。孢子萌发的最适温度为 25℃, 最适 pH5.9, 偏酸偏碱均可促进萌发。研究结果中,菌丝生长最适温度结果与杨家荣等^[6]报道的苜蓿黄萎病原黄萎轮枝菌菌丝生长最适温度为 20~25℃的研究结果有所不同,其原因可能是与寄主不同和测试的菌龄不同有关。

参考文献:

- [1] 曹丽霞,徐利敏,云晓鹏,等. 内蒙古地区向日葵主要病虫害发生现状及研究建议[J]. 内蒙古农业科技, 2009(6): 83-85.
- [2] 方中达. 植物研究方法[M]. 3 版. 北京: 中国农业出版社, 1998.
- [3] 陆家云. 植物病原真菌学[M]. 北京: 中国农业出版社, 2001.
- [4] 许光辉,郑洪元. 土壤微生物生物分析方法手册[M]. 北京: 中国农业出版社, 1986.
- [5] Smith H C. The morphology of *Verticillium albo-atrum*, *V. dahliae* and *V. tricorpus*. [J]. New Zealand Journal of Agricultural Research, 1965, 8(3): 450-478.
- [6] 杨家荣,商鸿生,李仁,等. 苜蓿黄萎病原菌研究(简报)[J]. 草业学报, 1997(3): 42-45.

PathogenIdentify and Biological Characteristics of *Verticillium* wilt of Sunflower

MA Li-gong¹, ZHANG Yun-hua¹, MENG Qing-lin¹, SHI Feng-mei¹, LIU Jia¹, LI Yi-chu¹, JI Wu-peng²

(1. Plant Protection Institute of Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Harbin, Heilongjiang 150086; 2. Crops Institute of Heilongjiang Land Reclamation Academy of Sciences, Jiamusi, Heilongjiang 154007)

Abstract: In order to better study the law of *Verticillium* wilt of sunflower and its effective control method, the morphology and biological characteristics of *Verticillium albo-atrum* of sunflower were studied through cultivation on culture medium PLYA. The results showed that hyaline conidia with conidiophores of dark-brown bases were produced on the medium, and black dormant mycelium appeared later with prolonged time of culturing. Microsclerotia and chlamydospores were not found. It seemed that the mycelium could grow better on PSC medium and the optimum growth conditions of the pathogen were 25℃, pH 5~6, and the optimal carbon and nitrogen sources were sucrose and glycine, respectively. For spore germination of pathogen, the optimum conditions were PSC medium, 25℃ and pH 8, the suitable carbon and nitrogen sources were D-xylose and L-histidine. The optimal conditions for spore germination were 25℃ and pH 5.9, and it could be promoted when the culture medium was partial alkaline acidic or partial base. The spores begin to germinate after 6 hours where it cultured at 25℃ Incubator, and the germination rate would reach above 80% after 12 hours.

Key words: sunflower; *Verticillium* wilt; pathogen; biological characteristic

(该文作者还有王军,单位为黑龙江垦丰种业有限公司)