

芒果炭疽菌致病力室内快速测定方法研究

张蕊¹, 杨石有¹, 刘晓妹², 蒲金基³, 张贺³

(1. 海南大学 应用科技学院, 海南 儋州 571737; 2. 海南大学 环境与植物保护学院, 海南 海口 570228; 3. 中国热带农业科学院 环境与植物保护研究所, 海南 海口 571101)

摘要:为研究建立我国芒果炭疽菌室内致病力快速、稳定的测定方法,以芒果炭疽菌为供试菌株,以贵妃芒的离体枝条、叶片和果实为材料,采用不同的方法造成伤口后接种芒果炭疽病菌,在25℃条件下培养5 d后观测各处理的发病程度。结果表明:枝条接种,经烫打和打孔处理的病斑长度显著大于其余7种处理的病斑长度,其差异性达显著水平;叶片正、反面烫伤、10针刺伤处理的病斑长度显著大于3针、6针和割伤3种处理的病斑长度,差异显著;果实接种,经烫打、烫伤、打孔、10针刺伤处理的病斑长度显著大于3针、6针、环割3种处理的病斑长度,差异显著。从试验材料的选取、试验操作的难易度与稳定性及病斑的大小等方面综合分析认为,以直径为5 mm菌饼接种在10针刺伤的古铜叶反面,在相对湿度100%、室温25℃条件下培养5 d后的病斑直径可以作为评价病原菌致病力的依据。

关键词:芒果炭疽菌;致病力;室内测定

中图分类号:S436.67 **文献标识码:**A **文章编号:**1002-2767(2016)08-0051-03 DOI:10.11942/j.issn1002-2767.2016.08.0051

芒果炭疽病是芒果生产中发生最普遍、危害最严重的病害之一,我国及世界各芒果产区均有分布^[1],主要为害芒果嫩叶、花序、果实和枝梢,病害严重时引起落花、落果、果腐、枝枯,严重影响芒果生长和产量^[2],其病原菌为胶孢炭疽菌(*Colletotrichum gloeosporioides* penz.)。由于炭疽病具有潜伏侵染性,往往在采后贮藏和运输时大爆发,造成巨大的经济损失。*C. gloeosporioides*为复合种群,种内的不同类群之间致病力有差异^[3]。因此,选用单一菌株进行芒果品种或种质抗病性鉴定有可能得到不够准确的结果,迫切地需要开展芒果炭疽病菌种群的致病力分化研究,为芒果品种或种质抗病性鉴定提供一批致病力不同的菌株,而建立可靠的致病力快速测定评价体系显得尤为重要。

室内快速测定方法具有快速稳定、操作简单、不受场地限制、节省时间和实验材料的特点,刘荣萍等^[4]、林月莉等^[5]、张美鑫等^[6]、赵丽娜^[7]分别建立了柑橘褐斑病、苹果轮纹病、梨腐烂病、桃流

胶病的室内致病性快速测定方法,韦洁玲^[8]则进行了苹果树腐烂病菌不同分离株致病性差异的研究,构建了致病性测定的快速评价体系,为病原菌致病力分化、抗性资源筛选与创制及药剂生物测定等方面奠定基础。本文在前人研究的基础上,结合芒果产区的发展需求,利用芒果树离体枝条、叶片和果实作为接种材料,研究芒果炭疽病菌室内致病力快速测定方法。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 供试菌株 芒果炭疽菌分离自海南省儋州市宝岛新村环植所基地芒果叶片上,菌株编号:A2。菌株经组织分离、单孢纯化、鉴定后接种于PDA培养基上,25℃下培养5 d,然后在菌落边缘取直径5 mm菌饼作为接种体,用于枝条、叶片、果实的接种,病菌置8℃的环境下保存。

1.1.2 接种材料 从中国热带农业科学院环境与植物保护研究所儋州细胞楼芒果试验基地的贵妃芒上选取枝条、叶片。枝条选取长短均匀、含水量一致的一年生健康枝条;叶片选取完全张开、叶龄一致的健康古铜叶;果实采集于海南省东方市,选取成熟度一致、大小均一、表面光滑无病的健康果。

1.2 方法

1.2.1 枝条伤口接种 用无菌水将枝条洗净晾干,用1.0%次氯酸钠溶液消毒10 min,清水冲洗3次后将其剪成长短一致的小段,两端用石蜡封口。伤口处理设有:无伤,打孔(用灭菌的直径

收稿日期:2016-07-16

基金项目:海南省自然科学基金资助项目(20163063);公益性行业(农业)科研专项资助项目(201203092-2);海南大学应用科技学院基金资助项目(Hyk-1514)

第一作者简介:张蕊(1988-),女,云南省曲靖市人,助教,从事农药研究。E-mail:hndxrui@163.com。

通讯作者:杨石有(1987-),男,云南省曲靖市人,博士,讲师,从事农药学教学与研究工作。E-mail:rndyangshiyou@163.com。

5 mm打孔器取下树皮韧皮部),烫打(用烧热的直径5 mm 打孔器取下树皮韧皮部),烫伤(用烧热的直径5 mm 的铁钉钉帽烫伤),环割(用灭菌的解剖刀环割枝条1周),3针、6针和10针刺伤(用灭菌的解剖针刺伤树皮,针点均匀分布在直径5 mm的圆形区域),叶痕(用灭菌的解剖刀抹去叶片),芽痕(用灭菌的解剖刀抹去芽)。菌株在PDA培养基上培养5 d后,用5 mm 打孔器从菌株最外缘打取菌丝块后,将其接种于以上伤口处,并在菌丝块上覆盖沾有无菌水的脱脂棉保湿,用保鲜膜包裹固定。用空白PDA培养基接种作为对照。接种后的枝条置于白盘中(盘底铺沾有无菌水的灭菌纱布,盘口用保鲜膜覆盖并用灭菌解剖针打适量小孔,使相对湿度稳定在100%),在25℃条件下培养5 d后观察并测定病斑长度。试验重复3次,每一接种处理重复5次。

1.2.2 叶片伤口接种 用无菌水将叶片洗净晾干,用1.0%次氯酸钠溶液消毒10 min,清水冲洗3次。伤口处理设有:无伤、3、6和10针刺伤,烫伤,割伤(用灭菌的解剖刀割叶片表面长1 cm)。叶正面与背面采用相同的处理方式。叶柄基部用灭菌的湿润脱脂棉包裹,再用锡箔纸进行固定。菌株、接种方法、对照设置、病斑观察与测定同1.2.1。试验重复3次,每一接种处理重复3次。

1.2.3 果实伤口接种 用无菌水将果实洗净晾干,用1.0%次氯酸钠溶液消毒10 min,清水冲洗3次。伤口处理设有:无伤、3、6和10针刺伤,环割,烫伤(用烧热的直径5 mm 的铁钉钉帽烫伤),烫打(用烧热的直径5 mm 打孔器取下果实表皮),打孔(用灭菌的直径5 mm 打孔器取下果实表皮)。菌株、接种方法、对照设置、病斑观察与测定同1.2.1。试验重复2次,每一接种处理重复3次。

1.2.4 数据统计分析 统计数据及处理间的差异显著性采用Excel软件和SAS软件进行分析和处理。

2 结果与分析

2.1 枝条接种的测定结果

有伤枝条接种2 d后在伤口处出现褐色病斑,病健部分交界明显,之后逐渐形成外围黑色,中间褐色的病斑,且发病部位向下凹陷,接种7 d后整个枝条软化腐烂,无伤口接种的、空白培养基接种均未发病。

对枝条经不同伤口接种5 d后的病斑长度统计分析结果显示(见图1),经烫打和打孔处理的病斑长度显著大于其余7种处理的病斑长度,差

异达显著水平,而环割、3针、6针、叶痕、芽痕5种处理的病斑长度间差异不大,但明显小于10针处理的病斑长度。

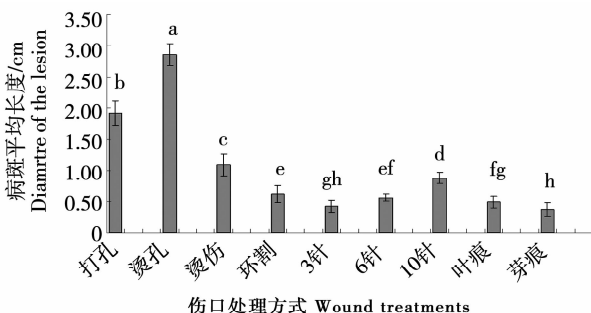


图1 枝条不同伤口接种芒果炭疽菌株5 d后的病斑平均长度
Fig. 1 The average length of lesion produced on twigs wounded by different methods after 5 d of inoculation isolate mango anthracnose pathogen

2.2 叶片接种的测定结果

有伤叶片接种2 d后伤口处均变褐色,经10针刺伤、烫伤和割伤处理的病斑大小超出菌饼,随后病斑逐渐变黑,形成近圆形褐色病斑。叶片背面接种产生的病斑比叶片正面接种产生的病斑大。接种5 d后各种伤口处理产生的病斑均明显超出菌饼,无伤口接种的轻微发病,空白培养基接种未发病。

对叶片经不同伤口处理5 d后病斑直径统计分析结果表明(见图2),接种有伤处理的叶片正面发现经烫伤、10针刺伤处理的病斑长度显著大于3针、6针和割伤3种处理的病斑长度。而6针刺伤和割伤处理的病斑长度间差异不显著。接种有伤处理的叶片背面发病均高于正面,各处理间的差异性和叶片正面相同。

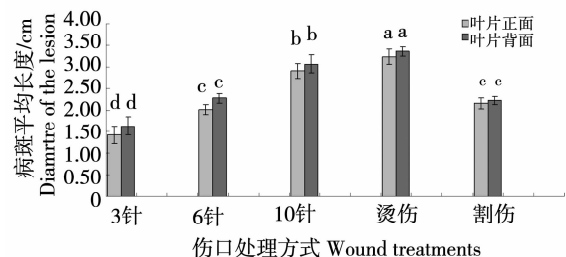


图2 叶片不同伤口接种芒果炭疽菌株5 d后的病斑平均长度
Fig. 2 The average length of lesion produced on leaves wounded by different methods after 5 d of inoculation isolate mango anthracnose pathogen

2.3 果实接种的测定结果

有伤果实接种芒果炭疽菌,接种2 d后烫伤、烫打、10针刺伤和打孔处理均在伤口处出现褐色病斑,经3针刺伤、6针刺伤和环割处理的病斑较

小。接种 5 d 后除 3 针刺伤外的其它伤口处理产生的病斑均超出菌饼,病斑近圆形,黑褐色,无伤口接种的、空白培养基接种均未发病。

对果实经不同伤口处理 5 d 后病斑直径统计分析结果表明(见图 3),随着处理伤口面积的增大,病斑直径也逐渐增大。经烫打、烫伤、打孔、10 针刺伤处理的病斑长度显著大于 3 针、6 针、环割 3 种处理的病斑长度。6 针针刺和环割的病斑长度之间无显著差异。

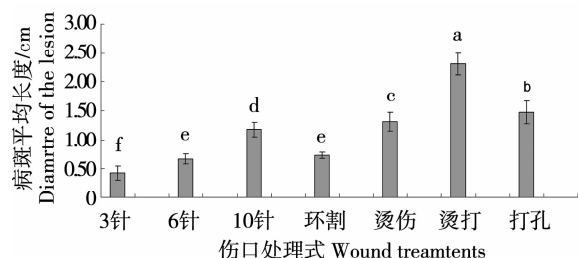


图 3 果实不同伤口接种芒果炭疽菌株 5 d 后的病斑平均长度
Fig. 3 The average length of lesion produced on fruits wounded by different methods after 5 d of inoculation isolate mango anthracnose pathogen

3 结论与讨论

芒果炭疽菌(*Colletotrichum gloeosporioides* penz.)为强致病菌,在田间通过伤口侵入植物组织,因此炭疽病菌致病力的测定,不论是田间活体接种,还是室内离体材料接种,均需在组织部位造成伤口。伤口类型、接种部位和接种材料的不同均可影响到病原菌致病力的测定结果。

本研究采用芒果的果实、叶片和枝条在实验室内通过不同处理进行接种试验,其中叶片上出现病斑最早且扩展速率最快,果实、枝条依次减小。试验发现叶片反面比正面发病快,病斑扩展面积大,这与刘荣萍^[4]等所建立的快速评价体系中的叶片伤口处理结果一致。接种果实,随着处理伤口面积的增大,病斑直径也逐渐增大。经烫打、烫伤、打孔、10 针刺伤处理的病斑长度显著大于 3 针、6 针、环割 3 种处理的病斑长度,其差异性显著,6 针针刺和环割的病斑长度之间无显著性差异,这与韦洁玲等^[8]报道的基本一致。接种

枝条,经烫打和打孔处理的病斑长度显著大于其余 7 种处理的病斑长度,其差异性达显著,而环割、3 针、6 针、叶痕、芽痕 5 种处理的病斑长度间差异性不大,但明显小于 10 针处理的病斑直径。

枝条接种是一种传统的枝干病害鉴定方法,近年来已广泛应用。然而,枝条接种的影响因素较多:如枝龄、伤口程度、接种位置、培养湿度等均对病斑的扩展有所影响,而且在芒果树的生长季节,不易采到枝龄和含水量一致的枝条。果实接种发病迅速,试验周期短,但其成本大,且不同批次果实成熟度的差异易对试验结果造成影响。而叶片接种,材料易得、成本低廉、操作简便,不受接种材料龄期的制约,稳定性较强。

从试验周期、试验材料的获取、操作的难易度等方面考虑,叶片来源广泛、对树体破坏小、较枝条和果实更容易获得、可以周年开展试验,是用于病菌致病力分化研究的最佳选择。综合分析认为以直径为 5 mm 菌饼接种在 10 针刺伤的古铜叶背面,相对湿度 100%、室温 25 ℃ 5 d 后的病斑长度可以作为评价病原菌致病性的依据。所建立的致病性测定快速评价体系可以大规模地用于我国不同芒果产区病菌菌株的致病力分化分析,也为抗性资源评价,药剂筛选等领域的研究奠定基础。

参考文献:

- [1] 王万东,刘光华,尼章光,等.芒果炭疽病的发生规律及综合防治[J].广东农业科学,2008(6):67-69.
- [2] 杨叶,何书海,张淑娟,等.海南芒果炭疽菌对多菌灵的抗药性测定[J].热带作物学报,2008,29(1):73-77.
- [3] Wer B S, Johnston P R, Damm U. The *Colletotrichum gloeosporioides* species complex [J]. Studies in Mycology, 2012,73:115-180.
- [4] 刘荣萍,胡军华,姚廷山,等.柑橘褐斑病室内快速评价方法的研究[J].果树学报,2013,30(5):889-892.
- [5] 林月莉,黄丽丽,索朗拉姆,等.苹果轮纹病室内快速评价体系的建立[J].植物保护学报,2011,38(1):37-41.
- [6] 张美鑫,翟立峰,周玉霞,等.梨腐烂病致病力的室内快速测定方法研究[J].果树学报,2013,30(2):317-322.
- [7] 赵丽娜.桃流胶病菌致病力评价体系的建立[D].武汉:华中农业大学,2012.
- [8] 韦洁玲,黄丽丽,邵佐鹏,等.苹果树腐烂病室内快速评价方法的研究[J].植物病理学报,2010,40(1):14-20.

A Rapid Laboratory Determining Methods of the Pathogenicity of Mango Anthracnose Pathogen

ZHANG Rui¹, YANG Shi-you¹, LIU Xiao-mei², PU Jin-ji³, ZHANG He³

(1. College of Applied Science and Technology, Hainan University, Danzhou, Hainan 571737; 2. College of Environment and Plant Protection, Hainan University, Haikou, Hainan 570228; 3. Environment and Plant Protection Institute, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, Haikou, Hainan 571101)

枯草芽孢杆菌 YB5 对菜豆根腐病菌的抑菌 机制测定及应用

赵长龙¹, 赵慧妍²

(1. 黑龙江省依安县农业技术推广中心, 黑龙江 依安 161500; 2. 东北农业大学食品学院, 黑龙江 哈尔滨 150030)

摘要: 腐皮镰孢引起的菜豆根腐病是一种世界性病害, 在菜豆生产中危害严重。为对其有效的生物防治, 针对菜豆根腐病利用枯草芽孢杆菌进行了拮抗机制及应用的研究。结果表明: YB5 能有效抑制菌丝生长、孢子产生和萌发。YB5 的无菌滤液对高温敏感。YB5 菌液对种子发芽没有抑制作用, 且能促进根系的发育。YB5 菌液及无菌滤液对菜豆腐皮镰孢根腐病的盆栽均具有较好的防效, YB5 菌液防效可达 94.6%。

关键词: 菜豆根腐病; 腐皮镰孢; 枯草芽孢杆菌; 抑菌机制; 防治效果

中图分类号: S476⁺.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1002-2767(2016)08-0054-04 **DOI:** 10.11942/j.issn1002-2767.2016.08.0054

菜豆根腐病是一种土传真菌病害。随着菜豆连续多年种植, 根腐病发生越来越重, 导致菜豆产量、质量下降, 是影响菜豆生产的严重病害^[1], 轻者减产 20% 以上, 重者可导致绝收, 危害巨大。菜豆根腐病早期症状不明显, 开花期植株较矮小, 病株下部叶片从叶缘开始变黄枯萎, 一般不脱落, 病株易拔出, 茎基部和主根变成红褐色, 病部稍凹陷, 有的开裂深达皮层, 茎基部维管束变褐, 侧根脱落或腐烂, 主根全部腐烂, 病株枯死, 湿度大时常在病株基部产生粉红色霉状物^[2]。

目前, 菜豆根腐病主要是依靠化学防治, 化学药剂具有高效、速效、使用方便和经济效益高等优点, 但化学杀菌剂使用不当可对植物产生药害, 引起人畜中毒、污染环境, 诱导病菌抗性增强, 破坏生态平衡, 它的残毒问题也令人担忧, 因此植物病害的生物防治研究越来越受到重视^[3-4]。近年来, 国内外对于芽孢杆菌各方面应用的研究日益增多, 枯草芽孢杆菌作为一种生防细菌越来越引起人们的关注^[5]。

因此, 本研究通过一株对菜豆有很好拮抗作用的枯草芽孢杆菌进行了抑菌机制及应用方面的研究, 为该生防菌的应用奠定了很好的基础, 对今后菜豆根腐病的生物防治有着重要的现实意义。

收稿日期: 2016-07-26
第一作者简介: 赵长龙 (1970-), 男, 黑龙江省依安县人, 学士, 农艺师, 从事植物保护研究。E-mail: yaxzcl@163.com。

Abstract: In order to set up a fast and stable laboratory determining methods for the virulence of the pathogens of mango anthracnose pathogen in China. As with mango anthracnose pathogen strains tested, the mango anthracnose pathogen strains was respectively inoculated on excised twigs, leaves and fruits, which were collected from Guifei mango and wounded by different methods. The inoculated materials were cultured at 25 °C and the pathogenic severity of all treatments was observed. The results showed that in inoculated twigs, the lesion lengths of the twigs wounded by scald holing, holing treatments were significantly bigger than the other inoculated twigs, and there were significant differences among them. In inoculated leaves, the lesion lengths of the leaves upper and under side wounded by scalding and pricking ten times were significantly bigger than three times, six times, and a hearing. In inoculated fruits, the lesion lengths of the fruits wounded by scald holing, scalding, holing and ten times pricking treatments were significantly bigger than three times, six times pricking, and around a hearing. And there were significant differences among them. Summing up all the factors of the difficulty level of the material choice, the size of the lesion, the degree of difficulty, the test operations and the other stability analysis. The lesion lengths of 5 mm diameter bacteria piece inoculated in ten times pricking injuries bronze opposite leaves, a relative humidity of 100% lesion diameter after 5 d, at 25 °C, could be used as a basis for evaluation of pathogenic pathogens.

Keywords: mango anthracnose pathogen; pathogenicity; laboratory determination