

不同产区板栗病原菌的种类及其致病力研究*

梁丽松, 王贵禧*
(中国林业科学研究院林业研究所, 北京 100091)

摘要: 从北京、山东、河北、湖南、湖北、江西、安徽、广西等板栗主产区的腐烂栗实中分离出 146 个分离物, 经鉴定归属于 11 个属。不同产区栗实的自然带菌情况各异, 带菌量和带菌种类有所不同, 南方板栗产区的病原菌种类多于北方产区。回接实验研究了其中分布较普遍的 6 个属优势菌的致病力, 表明不同菌的致病力强弱有较大差异, 在相同培养条件下, *Rhizoctonia* 使种仁的发病程度最严重, 致病力最强, *Penicillium* sp. 的致病力最弱。不同接种方式对种仁侵染率的影响不同, 种仁有伤接种的侵染率最高, 达 90% 以上, 而种皮接种和无伤滚动浸涂接种则不会使种仁发病腐烂。研究中还发现, 不同病原菌所致板栗腐烂的病斑特征有所不同。
关键词: 板栗; 腐烂; 病原菌; 致病力
中图分类号: S664. 2 文献标识码: A

腐烂、发芽、失水和虫害等是影响板栗(*Castanea mollissima* Blume) 贮藏效果的主要因素^[1,2]。板栗贮藏期间的腐烂是由微生物侵染所引起, 板栗腐烂后缩短了贮藏保鲜期, 好果率下降, 失去商品价值。这些致病微生物大多在花期即已侵染, 在栗实中潜伏但不发病。当栗实脱离树体后, 若不进行适宜条件的贮藏, 通常会在采后的 2 个月左右达到发病高峰^[3]。要控制板栗在贮藏期间的腐烂, 就要对病原菌的种类及其致病力进行深入细致的研究。本文以我国主要板栗产区的板栗为试材, 分离鉴定引起板栗腐烂的病原菌, 进行回接实验确定不同板栗产区栗实的主要致病菌, 并通过不同的接种方式研究了板栗病原菌采后侵染的可能性, 为防治板栗腐烂提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

腐烂板栗样品分别选自以下板栗主产区: 北京市昌平区、山东省泰安市、河北省唐山市、湖南省怀化市、湖北省罗田县、江西省静安县、安徽省舒城县、广西凭祥市。板栗采自当地正常管理水平的果园, 采后运到中国林科院林业研究所果品保鲜实验室进行实验研究。

1.2 方法

1.2.1 不同产区栗实贮藏期间的腐烂率调查 板栗经挑选、预冷 48 h 后, 分装在 0.04 mm 厚的聚乙烯塑料薄膜保鲜袋中, 在 0℃ 条件下进行自发气调贮藏(MA), 贮藏期间塑料薄膜

收稿日期: 2001-11-09
基金项目: 林业部重点项目“ 几种名特优果品贮藏保鲜技术” 和国家计委重点科技攻关项目“ 经济林产品贮藏保鲜加工技术研究”(1997—2000)
作者简介: 梁丽松(1972—), 女, 北京市人, 助理研究员。
* 中国林业科学研究院森林生态环境与保护研究所刘惠珍老师给予帮助, 特此致谢!
* * 通讯作者, E mail: wanggx@ caf. ac. cn

保鲜袋内的 O_2 浓度为 12.0% ~ 17.2%, CO_2 浓度为 3.8% ~ 7.9%。贮藏前后分别调查栗实腐烂率。

1.2.2 板栗病原菌的分离纯化 取板栗病组织,经表面消毒后于 PDA 培养基上 26~28 °C 恒温培养,并进一步纯化^[4]。分离获得的菌落按不同类型编号、转管,于 4 °C 冰箱保存待鉴定。

1.2.3 病原菌形态鉴定 纯化后的菌株点植于 PDA 培养基上,于 26~28 °C 恒温培养,观察培养性状,镜检形态特征,将分离物鉴定到属,统计病原菌种类及其出现频率。

1.2.4 优势菌的致病力测定(回接实验) 选用 6 种出现频率高的优势菌在 PDA 培养基上培养(26~28 °C) 6 d,将其制成孢子悬浮液(低倍镜下每个视野 30~40 个孢子)。分别选取不同产区健康板栗 10 个,经表面消毒处理后分别采用如下方式接种:(1) 种仁接种(有伤接种):用刀片分别在栗实的顶芽、底座、中腹部作切口(长度约 5 mm,深度约 5 mm),每个板栗 4 个接种点。将制好的孢子悬浮液 20 μ L 滴入切口处,于 26~28 °C 无菌保湿培养。同时以切口处滴入 20 μ L 无菌水为对照。(2) 内种皮接种(有伤接种):用刀片分别在栗实的顶芽、底座、中腹部切开少许外种皮,露出内种皮(不伤及内种皮和种仁),每个板栗 4 个接种点。将制好的孢子悬浮液 20 μ L 滴入切口处,于 26~28 °C 无菌保湿培养。同时以切口处滴入 20 μ L 无菌水为对照。(3) 滚动浸涂接种(无伤接种):将已作表面消毒的栗实放入制好的孢子悬浮液中滚动浸涂,使整个栗实外部均匀接触菌液,取出后于 26~28 °C 保湿培养。以无菌水为对照。以上 3 种接种方式均在 3 d 后开始调查发病情况。

2 结果与分析

2.1 不同产区栗实贮藏腐烂率调查

图 1 表明,北京、河北、山东等北方板栗产区的板栗腐烂率较低,在 5 个月的贮藏过程中,平均腐烂率为 1.3%,而南方产区的板栗在贮藏期间的腐烂率则相对较高,平均腐烂率为 5.4%,二者相差 4.2 倍。

2.2 不同产区板栗病原菌的种类

不同板栗产区的栗实所带病原菌种类不同。从 8 个板栗主产区的腐烂病栗中分离得

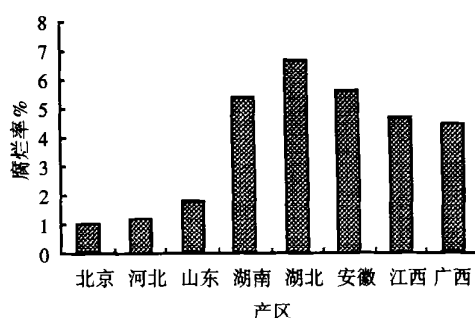


图 1 不同产区栗实贮藏腐烂率调查(贮藏 5 个月)

到 146 个分离株,根据培养性状和形态特征,鉴定分属于 11 个属(表 1)。从中可以看出,安徽和湖北两产区的栗实带菌种类最多,均为 10 种;江西、湖南和广西等产区的带菌种类也达到 7 种之多。就北方产区而言,北京地区的栗实带菌种类最少,仅有 3 种;河北和山东地区分别为 5~6 种,比南方地区少。由此可见,各个不同的板栗产区带菌种类各有不同,南方板栗带菌量明显高于北方。病原菌的种类与当地的气候、土壤条件及管理水平和不同年份有关,南方产区降雨多,环境湿度大,栽培管理相对粗放,因而栗实带菌率和腐烂率高,病原菌的种类也复杂;北方板栗产区相对干旱,栽培管理水平高,栗实的腐烂率低,病原菌的种类也少。

从病原菌的分布来看,同一病原菌会在不同产区出现。其中,*Penicillium* sp. 的分布区域最广,除江西产区的栗实没有分离到外,其余各产区的栗实上均分离到了,说明 *Penicillium* sp. 在各个产区的腐烂栗实中广泛存在。*Fusarium* sp. 和 *Mucor* sp. 的分布也较广,在南北方的 6 个产

区均有分布。*Dothiorella* sp.、*Pestalotiopsis* sp.、*Phomopsis* sp. 和 *Rhizoctonia* sp. 在所取样调查的地区也达到了半数以上,而且 *Dothiorella* sp. 和 *Rhizoctonia* sp. 广泛分布于南方产区的腐烂栗实中,由此说明二者是危害南方产区栗实的主要病原菌之一。其它几种病原菌 *Phoma* sp.、*Macrophoma* sp.、*Alternaria* sp.、*Colletotrichum* sp. 在各地分布不同,未发现明显的分布规律。

表 1 板栗病原菌分离鉴定结果

病原菌名称	产 区								总计
	北京	河北	山东	安徽	江西	湖北	湖南	广西	
<i>Phomopsis</i> sp. (拟茎点霉属)		+	+	+	+		+		5
<i>Phoma</i> sp. (茎点霉属)		+	+		+				3
<i>Fusarium</i> sp. (镰孢菌属)	+		+	+		+	+	+	6
<i>Pestalotiopsis</i> sp. (拟盘多毛孢属)		+		+		+	+		4
<i>Macrophoma</i> sp. (大茎点属)					+	+			2
<i>Dothiorella</i> sp. (小穴壳属)		+		+	+	+	+		5
<i>Alternaria</i> sp. (链格孢属)		+	+		+				3
<i>Rhizoctonia</i> sp. (丝核菌属)				+		+	+	+	4
<i>Colletotrichum</i> sp. (刺盘孢属)				+		+	+		3
<i>Penicillium</i> sp. (青霉菌属)	+	+	+	+		+	+	+	7
<i>Mucor</i> sp. (毛霉属)	+		+	+	+	+		+	6
未确定菌				1	2	1	1	2	7
(总计)	3	5	6	10	7	10	7	7	55

2.3 优势菌的致病力测定(回接实验)

根据上述研究结果,从中选出分布范围较广的 6 种致病菌进行回接实验,测定其致病力。选用的供试菌种为: *Phomopsis* sp.、*Fusarium* sp.、*Dothiorella* sp.、*Alternaria* sp.、*Rhizoctonia* sp.、*Penicillium* sp.。从表 2 可见,不同接种方式所致板栗发病情况不同。3 种接种方式中只有种仁有伤接种可使板栗发病,而其它两种方式则不会使板栗发病。说明栗实采后在不受外伤的情况下,外源病原菌很难侵染板栗。从种仁接种的发病程度看,几种优势菌对板栗致病力强弱不同。用 *Rhizoctoria* sp. 接种的板栗栗实发病程度最严重,在 26~ 28 ℃下无菌保湿培养 5 d,发病率达 100%,栗实几乎全部腐烂。用 *Penicillium* sp. 接种的板栗栗实发病率也为 100%,但发病程度最轻,仅在接种点处发病,病斑基本没有扩散。其余 4 种病原菌对板栗的致病力基本相同,一般都使板栗栗实腐烂达一半以上,发病率均在 90% 以上。分别从回接的发病板栗上进行病原菌的再分离培养,其再分离率均为 100%,未分离到非接种菌,由此说明发病板栗的腐烂是由所接菌株侵染所致。

3 讨论

从不同地区腐烂发病板栗上共分离出 11 个属的病原真菌。不同地区板栗带菌种类有所不同,这可能与各地区的气候、土壤条件有一定关系,同时与当地的生产管理水平密切相关,其中 *Phomopsis* sp.、*Fusarium* sp.、*Dothiorella* sp.、*Alternaria* sp.、*Rhizoctonia* sp.、*Penicillium* sp. 的分布地区较广,广泛存在于各产区的栗实中。

引起板栗腐烂的病原菌大多早在花期即已潜伏侵入其体内,待到采后贮藏不当时发病。通常板栗腐烂是由多种病原微生物复合侵染所致^[8]。由于板栗所带病原微生物的数量和种类不尽相同,使得发病板栗病斑的大小、质地等都有所不同。梅汝鸿等^[9]在研究了板栗干腐病的

表 2 几种优势菌回接实验结果

菌株	接种方式	接种点数/ 个	发病点数/ 个	发病率 %	发病程度	再分离粒数/ 个	再分离率/ %	病斑特征
<i>Phomopsis</i> sp.	种仁	40	39	97. 5	+++	10	100	灰色水渍状
	内种皮	40	0	0	-	-	-	
	滚动浸涂	-	0	0	-	-	-	
<i>Fusarium</i> sp.	种仁	40	40	100. 0	++	10	100	灰白色湿腐
	内种皮	40	0	0	-	-	-	
	滚动浸涂	-	0	0	-	-	-	
<i>Dothiorella</i> sp.	种仁	40	39	97. 5	+++	10	100	黑绿色软烂
	内种皮	40	0	0	-	-	-	
	滚动浸涂	-	0	0	-	-	-	
<i>Alternaria</i> sp.	种仁	40	37	92. 5	+++	10	100	深褐色软腐
	内种皮	40	0	0	-	-	-	
	滚动浸涂	-	0	0	-	-	-	
<i>Rhizoctonia</i> sp.	种仁	40	40	100. 0	++++	10	100	灰黑色软腐
	内种皮	40	0	0	-	-	-	
	滚动浸涂	-	0	0	-	-	-	
<i>Penicillium</i> sp.	种仁	40	40	100. 0	+	10	100	黄褐色干腐
	内种皮	40	0	0	-	-	-	
	滚动浸涂	-	0	0	-	-	-	
对照	种仁	40	0	0	-	-	-	-
	内种皮	40	0	0	-	-	-	-
	滚动浸涂	-	0	0	-	-	-	-

注: 发病程度——“-”未发病,“+”接种点处发病,病斑基本无扩散,病斑直径≤5 mm;“++”接种点处发病,病斑扩散,栗实 1/2 腐烂;“+++”接种点处发病,病斑扩散,栗实 2/3 腐烂;“++++”接种点处发病,病斑扩散,栗实全腐烂。

症状与病原后认为, 病斑的色泽与菌类没有相关性, 每种病斑上都能分离到 3~ 6 种甚至更多的真菌, 而同一种真菌也可在不同的症状类型上分离到。Washington 等^[8, 10]也深入研究了与贮藏期板栗腐烂相关的一种致病菌——*Phomopsis* 对板栗的致病性及其特征, 认为采用单一菌种进行回接实验可以观察其对板栗致病力的强弱, 同时可以观察到由于该病原菌单独侵染所致板栗病斑的特点。但 Noeldeng^[11]认为这样并不能完全模拟多种病原菌复合侵染使板栗发病的实际情况。Turchetti 等^[12]在研究中发现, 虽然从腐烂板栗的病斑上可分离到多种真菌, 但真正导致栗实腐烂的只是某一种或几种被称作优势菌的病原微生物, 而且它们之间也同样存在着竞争关系。

通过采取不同接种方式进行回接实验, 可以进一步证明病原菌对板栗的侵染途径——潜伏侵染。要从根本上解决板栗贮藏期间的腐烂, 就要加强板栗的田间防治工作, 减少病原菌的田间侵染。同时, 在采后贮运保鲜过程中, 病原菌是通过伤口侵染而引起板栗发病腐烂的, 因此一定要减少板栗的机械损伤, 从而减少病原菌的侵染机会。

参考文献:

- [1] 王贵禧, 梁丽松, 宗亦尘. 板栗贮藏保鲜条件及品质变化研究[J]. 林业科学研究, 2000, 13(2): 118~ 122
- [2] 王晓明, 唐时俊, 李昌珠, 等. 板栗贮藏期坚果腐烂机理的研究[J]. 果树学报, 2001, 18(2): 98~ 103
- [3] 陈延熙, 梅汝鸿, 鲁素云, 等. 板栗干腐病研究: I. 树体及果实中真菌区系分析[J]. 中国微生物学杂志, 1991, 3(1): 69~ 74
- [4] 方中达. 植病研究方法(第三版)[M]. 北京: 中国农业出版社, 1998
- [5] 戴芳澜. 中国真菌总汇[M]. 北京: 科学出版社, 1979
- [6] 魏景超. 真菌鉴定手册[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1979
- [7] 王晓峰. 板栗保鲜贮藏概况[J]. 种子, 1993(3): 30~ 33
- [8] Washington W S. Preliminary studies on phomopsis castanea and other organisms associated with healthy and rotted chestnut fruit in storage[J]. Australian Plant Pathology, 1997, 26(1): 37~ 43
- [9] 梅汝鸿, 陈宝琨, 陈璧, 等. 板栗干腐病研究: II. 症状及病原[J]. 中国微生物学杂志, 1991, 3(1): 75~ 79
- [10] Washington W S. Effect of fungicides applied as foliar sprays and trunk injections on nut rot of chestnuts caused by phomopsis castanea in Victoria [J]. Australian Journal of Experimental Agriculture, 1998, 38(3): 295~ 303
- [11] Noel F. Postharvest handling practices and postharvest diseases of fruit [J]. Plant Disease, 1982, 66: 357~ 364
- [12] Turchetti T. Some aspects of the main fungus diseases of chestnut [J]. Informatore Agrario, 1986, 42(2): 51~ 53

Studies on the Varieties and Pathogenic Ability of the Pathogenic Fungi of Chinese Chestnut Seed in Different Production Areas of China

LIANG Li-song, WANG Gui-xi

(Research Institute of Forestry, CAF, Beijing 100091, China)

Abstract: One hundred forty-six isolates were obtained from samples of Chinese chestnut (*Castanea mollissima*) collected from eight different production areas in Beijing, Hebei, Shandong, Anhui, Jiangxi, Hubei, Hunan, Guangxi. They were designated as 11 genera, and the pathogenic ability of 6 popularly distributed genera of 11 was studied through reinoculation experiment. The results showed that the natural fungal flora in chestnut seeds were different among different production areas. The most popularly distributed fungi are *Penicillium* sp., *Fusarium* sp., *Mucor* sp., *Dothiorella* sp., *Pestalotiopsis* sp., *Phomopsis* sp. and *Rhizoctonia* sp.. Reinoculation experiment of several predominant fungi reflected that the pathogenic ability among different fungi has great diversity. At the same condition, the degree of a disease caused by *Rhizoctonia* sp. was the most deeply and the pathogenic ability was the strongest while the pathogenic ability of *Penicillium* sp. was the weakest among these 6 predominant fungi. The effect on the rot of the flesh of chestnut seeds was very different in different methods of inoculation. The incidence of a disease inoculated the flesh was higher than any other ways of inoculation and reached more than 90%. But the flesh did not rot by inoculating the peel of chestnut seeds, or rolling the whole sound seeds in the suspended solution of spores. From the reinoculation experiment by using a single fungus we can see that the characteristic of rotted spot caused by different pathogen microbe has great diversity.

Key words: chestnut; rot; pathogenic fungi; pathogenic ability