

雪松针叶枯斑病原鉴定及其生物学特性研究

雷桂林¹, 刘云龙², 刘雪峰¹, 冯志伟¹

(1. 云南省林业科学院, 云南 昆明 650204; 2 云南农业大学, 云南 昆明 650201)

摘要: 按分离→接种→再分离的柯赫原则对昆明市人工栽培雪松上的一种新病害进行研究, 根据培养性状和形态特征鉴定为极细枝孢(*Cladosporium tenuissimum* Cooke)。对该菌的生物学特性研究结果为: 生长的最佳 C 源为葡萄糖, 对 N 源和维生素均不能很好地利用, 在 PDA 培养基上生长的适宜温度为 15~ 25 ℃, 最佳温度为 25 ℃, 最佳 pH 值为 4, 分生孢子在相对湿度为 100% 才萌发。

关键词: 雪松; 极细枝孢; 针叶枯斑病

中图分类号: S763.1 文献标识码: A

雪松(*Cedrus deodara* (Roxb.) G. Don) 为松科(Pinaceae) 常绿乔木, 是世界三大著名观赏树种之一, 原产喜马拉雅山区西部及喀喇昆仑山海拔 1 200~ 3 300 m 地带, 我国西藏西南部海拔 1 200~ 3 000 m 地带有天然林^[1]。由于雪松适应性强, 病虫害少, 树形优美, 常作为城市庭园和道路绿化树种, 现已发展为云南省庭院和道路的主要观赏树种。

雪松很少发生病害, 目前国内报道有以下几种: (1) 假蜜环菌(*Armillarie mellea* (Vahl.) Karst.) 引起的根朽病^[2]。(2) 异担孔菌(*Heterobasidion annosum* (Fr.) Bref.) 引起的针叶树根白腐病^[2]。(3) 蛛形葡萄孢菌(*Botrysis latebricola* Jaap.) 引起雪松枯梢病^[3,4]。(4) 松球壳孢菌(*Sphaeropsis sapinea* (Fr.) Dyko & Sutton), 异名松色二孢菌(*Diplodia pined* (Desm.) Kickx.) 引起雪松枯梢病^[5]。(5) 聚生小穴壳菌(*Dothiorella gregaria* Sacc.) 引起雪松溃疡病^[6,7]。(6) 樟疫霉菌(*Phytophthora cinnamomi* Rands)、掘氏疫霉菌(*P. drechsleri* Tucker) 和寄生疫霉菌(*P. parasitica*) 引起雪松疫病, 主要症状为根腐、溃疡(干腐)、猝倒和立枯, 造成植株直立枯死^[8]。(7) 葡萄孢菌(*Botrytis* sp.) 引起雪松灰霉病, 造成嫩梢发生溃疡、枯梢及小枝枝枯^[9]。以上病害除蛛形葡萄孢菌和松球壳孢菌引起雪松梢枝枯死外, 其他 5 种病害分别危害根茎和干部皮层。尚未见到引起雪松针叶枯斑状病害的报道^[2~ 15]。

1999 年 5 月, 云南省昆明市万能驾驶学校人工栽培的雪松发生针叶枯斑病, 病叶初期为退绿色黄斑, 后变为红褐色, 逐渐枯死。约有 50% 以上的雪松发病严重, 影响雪松的生长和观赏价值。为此, 对该病的病原菌进行了系统鉴定, 并对病原菌的营养要求、适宜温度、pH 值、孢子萌发的最适温度和湿度等生物学特性进行了研究, 结果报道如下。

收稿日期: 2001-08-27

基金项目: 本研究得到云南省重点基金项目资助(95C004Z)

作者简介: 雷桂林(1965—), 女, 云南省昆明人, 助理研究员。

1 病原菌的鉴定

1.1 材料与方法

1.1.1 供试菌 1999年5月,从3年生雪松病针叶分离并经纯化后获得。

1.1.2 培养基 分离培养用PDA培养基(马铃薯(去皮)200 g,琼脂20 g,葡萄糖20 g,水1 000 mL)^[16]。

1.1.3 病原菌分离 自病株叶部病健交界处切取0.3~0.4 cm的小块组织。在超净工作台内,先将分离块在75%的酒精中浸10 s,取出后在1:14的漂白粉滤液中浸3~5 min,再用灭菌水漂洗3次,接种在PDA培养基上,每一平板放置5块组织,然后置于25℃温箱中培养^[16]。待长出菌落后,进行逐次移植培养,直到菌落完全纯化为止。将纯化菌种移植到斜面培养基上待用。

1.1.4 致病性测定 将3年生的健康雪松针叶经75%酒精表面消毒,将病叶分离所得3种真菌分别进行接种。对已产孢的真菌配制成一定浓度的孢子悬浮液(40×15视野中20~30个孢子,并有一些菌丝),对于未产孢的真菌取菌丝块(直径约为0.5 cm)进行接种。

接种采用以下两种方法:处理组雪松针叶为30束,CK组为30束。

(1) 针叶针刺接种:用消毒昆虫针扎伤表面已消毒的雪松针叶,然后将灭过菌的棉花用灭菌水蘸湿,并将用于接种的孢子或菌丝涂在湿棉花上,再将其包在扎伤的针叶上,同时用塑料布包好,保湿。CK直接用蘸灭菌水的无菌棉花包扎扎伤的针叶,同时进行保湿。

(2) 针叶直接接种:直接将已有接种菌孢子或菌丝的湿棉花直接包在表面消毒的针叶上进行保湿。CK用灭菌水湿棉花包在直接表面消毒的针叶上保湿。

1.1.5 病原菌的鉴定 用针挑取少许病针叶上的榄黑色霉层,采用水载法镜检、描述,鉴定主要参照参考文献[12]。

1.2 试验结果

1.2.1 致病性测定 病原分离共获得3种真菌,分别为枝孢菌(*Cladosporium* sp.)、盘多毛孢(*Pestalotia* sp.)和交链孢(*Alternaria* sp.)^[7,12,17,18]。经人工接种,大约10 d后只有接种枝孢菌的针叶产生病理反应,发病症状与采集的人工林雪松针叶枯斑病的症状基本一致,经切片镜检,发现针叶组织内有菌丝存在。同时将发病针叶进行病原分离,仅得到一种真菌,与枝孢菌的培养性状相同。为进一步证实病原菌,将人工接种发病的针叶在PDA培养基上培养,结果5个重复中有4个完全为枝孢菌,另一培养皿中所接的5块病叶组织中有4块为枝孢菌。

1.2.2 病原菌鉴定 病原菌形态:分生孢子梗较长,暗色,有分隔,顶生或侧生在菌丝上,直立,偶有分枝,丛生,5根以上,平滑,孢痕明显,110.0~424.2(243.68) μm×3~5(4.33) μm。产孢细胞合生,合轴式产孢,孢痕疤明显。枝孢顶生或侧生,一般为3个,0~3个隔膜,褐色,平滑,5.25~20.25 μm×2.75~5.25 μm。分生孢子链生,具有枝链,顶生,卵圆形、椭圆形或长椭圆形,典型为柠檬形,0~1个隔膜,淡褐色,平滑,孢脐明显,5.25~17.00 μm×2.50~4.75 μm。

培养性状:将产生病理反应的真菌培养1周后,再置于PDA培养基上培养6 d观察。结果为菌落圆形,绒状,平铺,橄榄绿色,菌丝体内生,无色至淡褐色,直径2.5~5.0 mm,菌丝极易产孢。

根据资料^[12,15,17,19],本菌在已知寄生于松科植物上的4种枝孢菌中(见本文3),与3种在

形态特征上差异明显,而与极细枝孢,无论从培养性状、分生孢子梗、枝孢、分生孢子的形状大小都十分相似,只是在分生孢子梗的簇生数上有差异,后者为2~5根,本菌为5根以上。根据以上研究,确定引起雪松针叶枯斑病的病原菌为极细枝孢(*Cladosporium tenuissimum* Cooke),属半知菌亚门(Deutemycotina) 丝孢纲(Hyphomycetes),暗色孢科(Dematiceae)^[20]。

2 病原菌的生物学特性

2.1 材料和方法

2.1.1 材料 将极细枝孢在PDA平板培养基上纯培养1周,准备其培养特性的观察。

2.1.2 测定不同营养、温度、pH值条件下菌丝生长 利用Lilly和Barnett半组合培养基:葡萄糖10g,天门冬素2g,磷酸二氢钾(KH_2PO_4)1g,硫酸镁($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)0.5g,铁(Fe^{+++})0.2mg,二价锌(Zn^{++})0.1mg,二价锰(Mg^{++})0.1mg,维生素B₁100μg,维生素H5μg,琼脂20g,蒸馏水1000mL^[21]。

(1)C源:固定N源为天门冬素,分别用葡萄糖、果糖、麦芽糖、乳糖、蔗糖、可溶性淀粉作为C源配制组合培养基,另设一组无C培养基作为对照,分别接种同质等径的菌块,每组5个重复,然后在25℃下培养10d,每24h测量1次菌落的平均直径。

(2)N源:固定C源为葡萄糖,分别用尿素、蛋白胨、酵母、天门冬酰胺、 KNO_3 、 NH_4Cl 、 $(\text{HN}_4)_2\text{HPO}_4$ 作为N源配制组合培养基,另设一组无N培养基作为对照,分别接种同质等径的菌块,每组5个重复,然后在25℃下培养10d,每24h测量1次菌落的平均直径。

(3)维生素:固定C源为葡萄糖,固定N源为天门冬酰胺,分别用维生素B₁、维生素B₂、维生素B₆、维生素H作为维生素源配制组合培养基,另设一组无维生素培养基作为对照,分别接种同质等径的菌块,每组5个重复,然后在25℃下培养10d,每24h测量1次菌落的平均直径。

(4)pH值: PDA培养基灭菌后加入Soroensen磷酸盐缓冲液(由 $15\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 和 $15\text{KH}_2\text{PO}_4$ 组成^[21]),调节PDA培养基的pH值分别为3、4、5、6、7、7.17、8.04、9.18。每一pH值做5个重复,将同质等径的菌块接种到各平板培养基上,在25℃温度下培养,每24h测量1次菌落平均直径。

(5)温度:病原菌在PDA平板培养基培养5d后,用无菌打孔器打取直径为0.5cm的菌块,接种在PDA平板中,每组5个重复,分别放置于5、10、15、20、25、30、35℃温箱内培养,每24h测量1次菌落平均直径。

2.1.3 测定不同温度、湿度条件下病原菌分生孢子萌发

(1)温度:用悬滴法将配制好的孢子悬浮液(40×15视野20~40个孢子)滴1滴在载玻片上,分别在10、15、20、25、30℃下作孢子萌发试验,每组5个重复,3h后镜检孢子萌发率。

(2)湿度:将孢子悬浮液涂在载玻片上,阴干后置于不同湿度的硫酸保湿液干燥器中,培养10h后,镜检孢子萌发率,每组重复5次。

2.2 结果

2.2.1 不同营养、温度、pH值对菌丝生长的影响

(1)C源:病原菌菌丝生长的较适宜C源依次为葡萄糖、蔗糖、果糖、淀粉(见表1)。菌落特征为菌落圆形,质地均匀、疏松、较稀薄,平铺,边缘色浅、苍白,中央为浅褐绿色,由中央向边缘颜色逐渐递减;菌落正面由孢子构成2个以上明显的同心圆。在麦芽糖和乳糖上生长较差,几

乎和对照一致,菌落质地较紧密,其它特征同上。

表1 不同C源条件下每天菌丝生长情况

mm

C源	时间/d									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
葡萄糖	6.0	9.3	14.1	17.1	22.1	25.1	28.5	32.3	37.8	42.3
蔗糖	6.0	8.6	12.4	16.0	20.1	23.4	27.5	31.4	35.9	39.9
果糖	6.0	7.9	12.5	15.7	19.9	23.0	26.6	30.4	35.2	39.7
淀粉	6.0	7.7	12.1	14.6	18.4	21.0	24.8	27.1	31.7	35.8
麦芽糖	6.0	7.9	12.1	13.7	16.2	19.5	23.1	25.5	29.7	31.9
乳糖	6.0	7.4	11.2	13.7	16.3	19.1	22.1	25.3	29.5	31.7
无C(对照)	6.0	7.2	10.2	12.0	16.1	18.7	22.0	24.9	28.9	32.3

(2)N源:根据表2、3可知,菌丝对N源的利用能力依次为酵母、蛋白胨,菌丝在天门冬素、硝酸钾、尿素、磷酸氢二铵上生长差,而氯化铵对菌丝生长还有较强的抑制作用。

表2 不同N源条件下每天菌丝生长情况

mm

N源	时间/d									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
酵母	6.0	10.3	15.6	18.7	24.1	27.3	30.6	34.1	37.6	41.8
蛋白胨	6.0	10.0	15.1	17.7	21.1	24.8	28.1	31.8	36.3	40.1
天门冬素	6.0	8.2	13.6	16.4	20.5	24.4	28.2	32.3	37.2	41.3
硝酸钾	6.0	8.5	12.8	15.8	18.8	21.5	24.2	26.3	29.8	32.4
尿素	6.0	8.3	11.7	14.7	18.6	21.5	24.7	27.8	30.9	34.0
磷酸氢二铵	6.0	8.7	12.3	14.4	17.4	20.7	23.8	26.7	30.4	33.2
无N(对照)	6.0	9.3	13.8	16.9	20.9	24.7	28.3	31.9	37.8	42.3

(3)维生素:试验表明维生素的加入对菌丝的生长无影响。菌落特征为:圆形,质地均匀、疏松、较稀薄,平铺,边缘色浅、苍白,中央为浅褐绿色,由中央向边缘颜色逐递减。

(4)温度:根据图1可知,菌丝生长的适宜温度为15~25℃,最佳温度为25℃,在35℃下几乎停止生长,30℃条件下菌丝生长明显缓慢,而在5℃下仍能生长,说明该真菌对高温特别敏感,对低温较适应。

(5)pH值:根据图2可知,菌丝生长的适宜pH值为3~6之间,最适pH值为4,在pH值大于7时菌丝生长明显缓慢。在pH值过高的培养基中,菌丝生长随时间延长,生长量明显下降,说明该真菌适宜于酸性环境下生长。

表3 不同N源条件下菌落培养特性

N源	菌落特征
蛋白胨	菌落质地均匀、紧密,绒状,平铺;菌落形状规则、圆形,边缘色浅、苍白,中心色深、褐绿色,由中心向边缘颜色逐渐递减:褐绿→绿→苍白
酵母	同上
氯化铵	同上
硝酸钾	同上
尿素	菌落质地均匀、紧密,绒状,平铺;菌落圆形,边缘不整、波浪状、色浅、苍白,中心色深、浅褐色
磷酸氢二铵	同上
天门冬素	菌落圆形,质地均匀、疏松、较稀薄,平铺,边缘色浅、苍白,中央为浅褐绿色,由中央向边缘颜色逐渐递减;菌落正面由孢子构成2个以上明显的同心圆
无N(对照)	同上

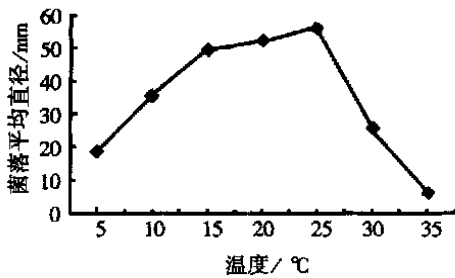


图 1 不同温度下培养 11 d 菌丝生长趋势

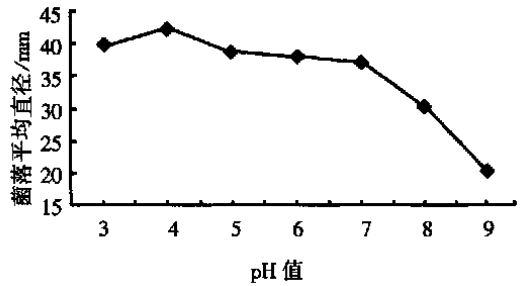


图 2 不同 pH 值下 9 d 内菌丝生长趋势

2.2.2 不同温度、湿度对孢子萌发的影响

(1) 温度: 表 4 表明: 孢子在 10~30 °C 下均能萌发, 但在 25~30 °C 下萌发最好。孢子萌发初期, 分生孢子从一端产生 1 个芽管, 形成细长的菌丝, 然后在另一端产生 1 个芽管, 随着时间的延长, 菌丝伸长并分枝。

表 4 不同温度下孢子的萌发结果

温度 / °C	10	15	20	25	30
镜检孢子平均数 / 个	55	69	66	78	67
萌发孢子平均数 / 个	20	51	56	71	61
萌发率 / %	36.4	73.9	84.8	91.0	91.0

(2) 湿度: 结果表明: 极细枝孢的孢子在 100% 相对湿度下有极少数孢子萌发 (5 个重复中总共有 3~5 个), 在相对湿度 98.5%~88.5% 下均未萌发。

3 结论与讨论

据目前我国报道^[2, 11~14, 18, 22, 23], 枝孢菌能引起许多农、林植物病害, 主要病害有叶霉病、黑霉病、疮痂病、叶斑病、煤污病、污斑病等。极细枝孢 (*C. tenuissimum* Cooke) 引致落叶松 (*Larix gmelinii* (Rupr.) Rupr.) 芽枯病^[12]; 草本枝孢 [*C. herbarum* (Pers.) Link.] 引起云南松 (*P. yunnanensis* Franch.)、华山松 (*P. armandi* Franch.)、云南油杉 (*Keteleeria evelyniana* Mast)、杉木 (*Cunninghamia lanceolata* (Lamb.) Hook.)、侧柏 (*Platydadus orientalis* (L.) Franco)、柏木 (*Cupressus funebris* Endl.) 等针叶树煤污病^[2]; 枝状枝孢 (*C. cladosporioides* (Freen.) de Vries) 引起赤松 (*Pinus densflora* Sieb. et Zucc.)^[2]、昆明地区松属 (*Pinus* sp.) 的叶枯病^[12]; 球孢枝孢 (*C. spaerospermum* Penzig) 引起油杉 (*Keteleeria fortunei* (Murr.) Carr.) 的叶枯病^[12]。未见有极细枝孢菌危害雪松的报道。因此由极细枝孢菌引起的雪松针叶枯斑病为雪松新病害, 雪松为极细枝孢的新寄主植物。

该病原菌极细枝孢菌丝生长的最佳 C 源为葡萄糖, 最佳 N 源为酵母, 菌丝在 PDA 培养基上生长的最适温度为 25 °C, 最佳 pH 值 4。维生素对菌丝生长无影响, 其原因在于该菌对维生素的需要量很少, PDA 培养基所含维生素已完全满足极细枝孢菌丝生长的需要, 所以是否加入维生素对该菌丝的生长无影响。

极细枝孢孢子萌发的最适温度为 25~30 °C, 对湿度要求相对严格。极细枝孢菌的孢子在有水滴的条件下萌发率很高 (可达 90% 以上), 在无水的情况下即使湿度为 100% 其萌发率也极低。由此解释在春末夏初雨季初期是该病发生高峰, 因为春末夏初雨季初期正是昆明高湿高温季节, 极有利于极细枝孢的孢子萌发和菌丝生长。

参考文献:

- [1] 郑万钧. 中国树木志(第一卷)[M]. 北京: 中国林业出版社, 1983
- [2] 任玮. 云南森林病害[M]. 昆明: 云南科技出版社, 1993
- [3] 花锁龙. 雪松枯梢病的研究[J]. 林业科学研究, 1989, 2(1): 47~ 53
- [4] 吴玲, 薛玲. 雪松枯梢病的研究[J]. 森林病虫通讯, 1995(1): 1~ 3
- [5] 戴雨生. 雪松梢枯病简报[J]. 江苏林业科技, 1999, 26(4): 43
- [6] 薛玲, 吴玲. 雪松溃疡病研究初报[J]. 森林病虫通讯, 1996(1): 6~ 7
- [7] 魏景超. 真菌鉴定手册[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1979
- [8] 黄世钰. 雪松疫病的初步研究[J]. 植物保护学报, 1988, 15(1): 13~ 14
- [9] 夏国平. 雪松灰霉病的调查与研究[J]. 浙江林业科技, 1986, 6(3): 58~ 63, 35
- [10] 广西林业局森林病虫害普查办公室. 广西森林病虫害普查资料汇编(上册)[M]. 南宁: 广西林业局森林病虫害普查办公室出版, 1982
- [11] 中国林业科学研究院. 中国森林病害[M]. 北京: 中国林业出版社, 1984
- [12] 张中义, 刘云龙. 中国真菌志: 枝孢、黑星孢、梨孢属志[M]. 北京: 科学出版社(待出版)
- [13] 中国农业科学院果树研究所. 中国果树病虫志[M]. 北京: 农业出版社, 1960
- [14] 张中义. 观赏植物真菌病害[M]. 成都: 四川科学技术出版社, 1992
- [15] 刘云龙, 何永宏, 张中义, 等. 中国枝孢属研究 X X V [J]. 菌物系统, 2000, 19(2): 169~ 171
- [16] 方中达. 植病研究方法[M]. 北京: 农业出版社, 1977
- [17] H L 巴尼特, B B 亨特. 半知菌属图解[M]. 沈崇尧译. 北京: 科学出版社, 1977
- [18] 陆家云. 植物病害诊断(第二版)[M]. 北京: 中国农业出版社, 1997
- [19] 张中义, 彭晖华, 刘云龙, 等. 中国枝孢属研究 VII [J]. 菌物系统, 1998, 17(1): 4~ 6
- [20] Hawksworth D L. Ainsworth & Bisby's Dictionary of the Fungi(7th Ed.) [M]. CMI Kew, UK, 1983
- [21] 项存悌. 林病研究法[M]. 哈尔滨: 东北林业大学出版社, 1991
- [22] P P 庇隆. 花木病虫害[M]. 沈瑞祥, 段道怀译. 北京: 中国建筑工业出版社, 1987
- [23] 裘维蕃. 菌物学大全[M]. 北京: 科学出版社, 1998

Determination of Necrotic Spot Pathogen on Needle of *Cedrus deodara* and the Biological Characteristics of the Pathogen

LEI Gui-lin¹, LIU Yun-long², LIU Xue-feng¹, FENG Zhi-wei¹

(1. Yunnan Academy of Forestry, Kunming 650204, Yunnan, China;

2. Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, Yunnan, China)

Abstract: Necrotic spot pathogen on needle of *Cedrus deodara* was identified as *Cladosporium tenuissimum*. It was a new pathogen on *C. deodara*. The optimum carbon source of the pathogen growth was glucose. The mycelium growth of the pathogen was obviously inhibited by nitrogen sources and vitamin. In PDA substrate, the preference temperature for mycelium growth was 15~ 25 °C, and the optimum temperature 25 °C and pH 4. Conidia could only germinate at the relative humidity of 100%.

Key words: *Cedrus deodara*; *Cladosporium tenuissimum*; necrotic spot