

红花酢浆草叶斑病原菌生物学特性研究

纪 瑛, 肖崇刚*

(西南大学植物保护学院, 重庆 400716)

摘要 引起红花酢浆草叶斑病的假尾孢属真菌红花酢浆草假尾孢(*Pseudocercospora oxalidis* Goh & Hsieh)适合生长的培养基有红花酢浆草叶片煎汁+葡萄糖 20 g、V₈ 汁和 Richard 培养基。pH3~12 适合菌落生长,最适宜 pH4~6,适宜温度为 20~25 ℃。病原菌对麦芽糖、葡萄糖、蔗糖、乳糖和对牛肉膏的利用好于其他碳源或氮源。分生孢子萌发的温度为 20~25 ℃,pH4~6,分生孢子萌发的相对湿度为 98%~100%,营养对孢子萌发有促进作用。

关键词 红花酢浆草; 叶斑病; 生物学特性

中图分类号 432.1

Biological characteristics of *Pseudocercospora oxalidis*

Ji Ying, Xiao Chonggang

(College of Plant Protection, Southwest University, Chongqing 400716, China)

Abstract In recent years, *Oxalis corymbosa* DC. has become more prevalent in the dry farms in Guizhou. Moreover, it has become a kind of virulent weed in lawn and in garden plots of southern China. This study aimed to use its pathogenic fungus *Pseudocercospora oxalidis* Goh & Hsieh to control the weed. The biological characteristics of the pathogen were investigated. The most optimum medium for the growth of *P. oxalidis* was leaf decocts of *O. corymbosa* plus sugar. V₈ juice agar and Richard's medium were also propitious to the pathogenic fungus. For the growth of the pathogen, the favorable pH fell within 3—12 with pH 4—6 as the optimum, and the favorable temperature was between 20—25 ℃, with the same for conidial germination. Among the carbon and nitrogen resources tested, maltose, glucose, sucrose, lactose and beef extract were better. A comparatively high humidity was required for conidial germination. Nutritional doses had selective effects on conidial germination.

Key words *Oxalis corymbosa*; leaf spot; biological characteristics

红花酢浆草(*Oxalis corymbosa* DC.)又名大酸叶草、铜锤草、紫花酢浆草、多花酢浆草。系酢浆草科多年生宿根性阔叶草本。分布于我国河北、陕西、华东、华中、华南、四川和云南等地。原产南美热带地区。我国长江以北各地作为观赏植物引入,南方各地已逸为野生^[1]。此草本身具有很强的繁殖力和生长能力、侵占性强。在贵州贵阳和独山地区危害辣椒、玉米、花生、大豆及西瓜等作物田,造成严重减产,成为当地旱地作物的恶性杂草之一^[2-4];南方地区常为城市草坪杂草、园林地恶性杂草,在重庆已成为危害性大的外来入侵植物^[5]。近年对红花酢浆草的防治,主要依靠化学防治^[3-4],利用生防菌控制红花酢浆草尚刚刚起步^[6-7]。化学除草剂一直都发挥

了巨大的作用,但也已对生态环境造成了严重的残毒污染,恶化了环境质量,并逐步威胁到人类自身的身心健康;耐药性杂草种群上升和抗化学除草剂杂草的出现,也成为不可忽视的问题。生物防治具有安全性高、持效期长、投入少等优点。作者观察发现,重庆市各城区红花酢浆草均有不同程度叶斑病发生,部分地区极为严重,可造成大面积目标杂草枯死。而目前对引起红花酢浆草叶斑病病原真菌的研究主要集中在形态描述方面,关于该菌的生物学特性鲜有报道。本试验对红花酢浆草叶斑病原菌生物学特性进行了初步研究,为进一步利用生防制剂防除红花酢浆草奠定基础。

1 材料与方法

1.1 供试材料

1.1.1 标样采集

从重庆西南大学校园采集红花酢浆草典型叶斑病标本。

1.1.2 病原菌

采用常规组织分离法分离病害标本的病原菌。

1.2 研究方法

1.2.1 病原菌形态和培养特征

依据刘锡璠、郭英兰中国真菌志第九卷假尾孢属进行病原鉴定。采用清水琼脂 WA 培养基和 PDA 培养基分离^[8],并用 PDA 培养基 25 ℃ 进行培养。

1.2.2 培养基对菌丝生长的影响

选用 PDA、PSA、红花酢浆草叶片榨汁、红花酢浆草叶片煎汁、红花酢浆草叶片煎汁+葡萄糖 20 g、V₈ 汁、玉米粉培养基、燕麦片培养基、胡萝卜培养基、Czapek 和 Richard 共 11 种培养基^[8-9],将供试菌株分别接种在直径为 9 cm 平板中央,25 ℃ 恒温箱连续培养 40 d,定期观察、隔天测量菌落直径,3 次重复。

1.2.3 温度对菌丝生长的影响及致死温度

将病原菌接种在 PDA 培养基上,于 5、10、15、20、25、30、35、40 ℃ 培养箱连续培养 30 d,隔天测量菌落直径,3 次重复。将菌落在培养皿中捣碎,加灭菌水振荡几分钟,双层纱布过滤,配成菌丝悬浮液,取 10 支灭菌试管,各加入 10 mL 菌丝悬浮液,分别放在 35、40、45、50、55、60、65、70、75 ℃ 的水浴锅里处理 10 min,一支在室温中放置作为对照,然后各取 0.5 mL 涂在 PDA 培养基上,25 ℃ 培养,5 d 后观察有无菌落出现并记录菌落数目,重复 3 次。

1.2.4 pH 对菌丝生长的影响

将 PDA 培养基分别调 pH 为 3、4、5、6、7、8、9、10、11 和 12,接种病原菌,25 ℃ 恒温培养 40 d,隔天测量菌落直径,3 次重复。

1.2.5 碳、氮源及糖浓度对菌丝生长的影响

以组合培养基为基础,按相同比例分别以蔗糖、麦芽糖、乳糖、果糖、甘油、木糖和淀粉 7 种糖代替葡萄糖,以不加糖为对照;以硝酸钾、酵母膏、牛肉膏、蛋白胨、甘氨酸、氯化铵和硫酸铵 7 种氮源代替天门冬酰胺,以不加氮源为对照;以组合培养基为基础,以葡萄糖为碳源,设 0、5、10、15、20、30、40、50 g/L 8

个浓度梯度^[10]。接种后 25 ℃ 恒温培养 30 d,隔天测量菌落直径,3 次重复。

1.2.6 温度对分生孢子萌发的影响

采用载玻片孢子萌发法,温度设 5、10、15、20、25、30、35、40 ℃,分别在 8 h 和 24 h 镜检萌发情况,计算萌发率,每处理 3 次重复。

1.2.7 pH 对分生孢子萌发的影响

将孢子悬浮液 pH 分别调至 2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12,采用载玻片孢子萌发法,20 ℃ 培养,分别在 8 h 和 24 h 镜检萌发情况,计算萌发率,每处理 3 次重复。

1.2.8 湿度对分生孢子萌发的影响^[9-11]

在干净的标本瓶中加入不同饱和度的盐溶液控制相对湿度,设置相对湿度为 100%、99%、98%、95%、93%、88%、81%和 79%,用透明胶带(0.5 cm × 1 cm)粘取分生孢子,再用凡士林固定在载玻片上,悬挂于标本瓶中,20 ℃ 培养,18 h 和 36 h 镜检观察萌发情况,计算萌发率,每处理重复 3 次。

1.2.9 营养对分生孢子萌发的影响

红花酢浆草叶浸汁(红花酢浆草叶片捣碎 60 g,1 000 mL 水浸 12 h)和 1% 的葡萄糖溶液制成孢子悬液,清水处理为对照,20 ℃ 培养,8 h 和 12 h 观察萌发情况,每处理重复 3 次。

2 结果与分析

2.1 病害症状特点和病原菌形态

2.1.1 病害症状特点

病原菌仅危害红花酢浆草叶片,斑点生于叶的正背两面,近圆形,直径 2.0~9.0 mm,有时多斑愈合,叶面斑点中央浅褐色至中度褐色,边缘暗褐色,具浅黄褐色晕,叶背斑点灰白色至青黄褐色。子实体叶两面生,但多生于叶正面。严重时病斑脱落,整片叶枯死。重庆发病严重地区,大面积红花酢浆草感病,叶片大部受害脱落,生长受限。

2.1.2 病原菌形态和培养特征^[12]

2004—2005 年于重庆北碚西南大学采集标本,进行病原鉴定。病原菌子座无或仅由少数无色球形细胞组成。分生孢子梗非常短,单生或簇生在球形细胞或内生菌丝上,近无色,多基部较宽,不分枝,直立,上部具 1 个曲膝状折点,顶部圆至圆锥形或近平截,无隔膜,(3.0~20.0) μm × (2.0~4.0) μm。分生孢子窄倒棍棒形至圆柱形,近无色,直立至弯曲,顶部尖细至钝,基部倒

圆锥形平截至近平截,2~9 个隔膜,(20.0~86.5) $\mu\text{m}\times(2.0\sim3.0)$ μm 。鉴定病原菌为红花酢浆草假尾孢(*Pseudocercospora oxalidis* Goh & Hsieh)。选典型病斑,取病健交界处进行分离培养。病菌菌丝生长缓慢,菌落垫状隆起,开始暗黄绿色,生长圈浅黄绿色且稀疏,后菌落中央长出白色菌丝,形成灰白色棉絮状菌落,培养基背面黑绿色。继代培养后,菌落白色增多。

2.2 病原菌生物学特性

2.2.1 培养基的影响

试验结果表明:在 11 种培养基中,最适合菌落生长的为红花酢浆草叶片煎汁+葡萄糖 20 g 培养基,其次是 V₈ 汁琼脂、Richard 和红花酢浆草叶片煎汁琼脂培养基,玉米粉、红花酢浆草叶片榨汁、CAA、PDA、PSA 和 Czapek 培养基也适合生长,菌落生长较差的是燕麦片培养基。

2.2.2 pH 的影响

不同 pH 下菌丝生长差异明显,pH3~12 均能生长,其中 pH4~7 较适合,最适 pH4~6。pH3、11、12 虽然能生长,形成正常菌落,但生长缓慢。

2.2.3 温度的影响

温度对菌丝生长影响很大,适合温度为 10~30 $^{\circ}\text{C}$,以 20~25 $^{\circ}\text{C}$ 生长最快,低于 5 $^{\circ}\text{C}$ 或高于 30 $^{\circ}\text{C}$ 不能生长,说明该菌适宜相对中温环境。55 $^{\circ}\text{C}$ 处理 10 min 的菌悬液未在 PDA 平板上形成菌落,表明该菌的致死温度为 55 $^{\circ}\text{C}$ 10 min。

2.2.4 碳、氮源及糖浓度的影响

不同碳源对菌丝生长有一定影响。病原菌对麦芽糖、葡萄糖、蔗糖和乳糖的利用效果最好,其次是淀粉、果糖和甘油,木糖的利用较差,但都比不加碳源的空白对照要好。

试验结果表明,在氮素营养利用方面,病原菌对牛肉膏、蛋白胨和 KNO_3 利用最好,其次是酵母膏和

天门冬酰胺,甘氨酸、氯化铵和硫酸铵利用最差。病原菌空白对照的培养基上,虽然菌落稀薄,菌丝生长纤细,但生长速度快,菌落大。

随糖浓度的增加菌落生长速度也相应增加。但当葡萄糖浓度增加到 50 g/L 时,培养基凝固度降低。

2.2.5 温度对分生孢子萌发的影响

试验结果表明:分生孢子在 5~40 $^{\circ}\text{C}$ 均能萌发,20 $^{\circ}\text{C}$ 和 25 $^{\circ}\text{C}$ 萌发最好,15 $^{\circ}\text{C}$ 和 30 $^{\circ}\text{C}$ 次之。8 h 时各温度萌发率均较低,且萌发程度也不明显,少数有极短分枝。24 h 时 15~40 $^{\circ}\text{C}$ 均呈现菌丝状分枝,芽管很长。

2.2.6 pH 对分生孢子萌发的影响

试验结果表明:分生孢子在 pH2~12 均能萌发,pH4~6 最适。pH10~12 虽能萌发,但数量极少、芽管短、需要时间长。酸性环境对菌丝的生长和分生孢子的萌发有利,这可能与红花酢浆草叶片成酸性有关。

2.2.7 湿度对分生孢子萌发的影响

试验结果表明:分生孢子在相对湿度(RH)高于 81% 才能萌发,并随相对湿度的增加,萌发率也增加。说明高湿条件利于孢子的萌发。

2.2.8 营养对分生孢子萌发的影响

试验结果表明:营养对分生孢子的萌发起促进作用。8 h 观察浸汁、1% 葡萄糖液及清水对照三者的萌发率分别为 36%、27% 和 23%。24 h 后,分别达到 86%、97% 和 85%。糖液更有利于分生孢子的萌发。

表 1 温度对红花酢浆草叶斑病病原菌分生孢子萌发率的影响

处理 时间/h	萌发率/%							
	5 $^{\circ}\text{C}$	10 $^{\circ}\text{C}$	15 $^{\circ}\text{C}$	20 $^{\circ}\text{C}$	25 $^{\circ}\text{C}$	30 $^{\circ}\text{C}$	35 $^{\circ}\text{C}$	40 $^{\circ}\text{C}$
8	2	3	5	17	17	12	3	0
24	8	13	83	96	96	87	15	13

表 2 pH 对红花酢浆草叶斑病病原菌分生孢子萌发率的影响

处理时间/h	萌发率/%										
	pH 2	pH 3	pH 4	pH 5	pH 6	pH 7	pH 8	pH 9	pH 10	pH 11	pH 12
8	2	5	15	8	10	10	9	3	0	2	0
24	13	82	87	88	83	57	41	32	18	7	3

3 结论与讨论

杂草病原真菌生物学特性的研究为利用病原真菌对杂草进行生物防除奠定了基础。近年来,随着国外真菌除草剂的开发应用,我国学者也在杂草病原真菌调查及应用基础研究方面做了大量工作。山

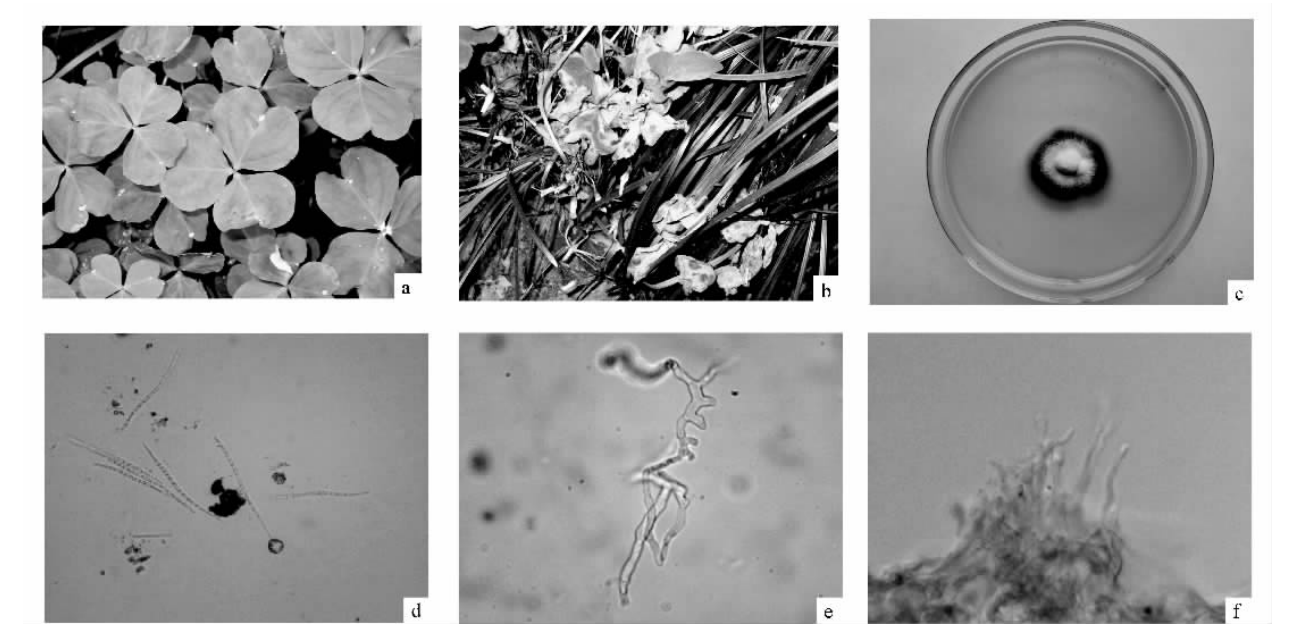
东省农业科学院植物保护研究所从感病的大豆菟丝子(*Cuscuta australis*)上分离得到胶炭疽菌菟丝子专化型(*Colletotrichum gloeosporioides* Penz. Sacc. f. sp. *cuscutae*),并研制成功鲁保一号菌剂。新疆哈密植检站从自然感病埃及列当植株中分离得

到镰刀菌(*Fusarium orobanches*),并制成了 F798。

红花酢浆草叶斑病在重庆发生普遍而严重,对目标杂草起到了很好的控制效果,大面积目标杂草感病枯死,可作为比较理想的生防真菌,有进一步研究推广的价值,与向梅梅报道一致^[6-7]。

通过本试验作者认为:(1)红花酢浆草叶斑病的典型病斑近圆形,病斑中央浅褐色至中度褐色,边缘暗褐色,具浅黄褐色晕,只危害寄主叶片。但经作者观察,红花酢浆草的叶斑直径可达 9.0 mm,较刘锡璉、郭英兰及向梅梅所描述的 2.0~7.0 mm 大。(2)病原菌在不同培养基上菌丝生长差异显著,以红花酢浆草叶片煎汁+葡萄糖 20 g 培养基最好。(3)病菌适合相对中温环境生长,菌丝在 20~25 ℃下生长快,此温度亦有利于分生孢子的萌发,与病害发生

发展温度相同。分生孢子萌发要求较高的相对湿度,RH≥98%时萌发最好,阴雨天气比较有利于病害的流行。(4)菌丝在酸性环境下生长良好,其中 pH4~7 较适合,最适 4~6,pH3~12 也能生长。分生孢子在 pH2~12 均能萌发,pH4~6 最适,与菌丝生长最适 pH 相同。(5)不同碳源、氮源及糖浓度对菌丝的生长也有一定的影响。研究中发现各碳源对菌丝生长速度的影响差异不明显,但都要明显优于空白对照。氮源对菌丝生长速度有促进作用,但菌丝生长速度有明显的差异,菌落形态也存在明显差异,以牛肉膏、蛋白胨和 KNO₃ 利用最好。在一定范围内,菌丝的生长随糖浓度的增加而加快。分生孢子萌发方面,营养也起到了促进作用。



a:叶片上典型病斑;b:发病严重造成叶片枯死;c:在 PDA 上形成的菌落正面;
d:分生孢子;e:分生孢子梗侧生在表生菌丝上;f:分生孢子梗

图 1 红花酢浆草叶斑病原真菌生物学特性

参考文献

[1] 徐朗然,黄成就. 中国植物志第 43 卷第 1 分册[M]. 北京:科学出版社,1998:5-13.

[2] 罗天琼,莫本田. 红花酢浆草生物学特性研究[J]. 贵州农业科学,1997,25(4):49-53.

[3] 罗天琼,莫本田. 农达防除红花酢浆草效果初报[J]. 耕作与栽培,1999(3):38-40.

[4] 罗天琼,莫本田. 农达与西玛津复配防除红花酢浆草的效果[J]. 耕作与栽培,1998(5):61-63.

[5] 石胜璋,田茂洁,刘玉成. 重庆外来入侵植物调查研究[J]. 西南师范大学学报(自然科学版),2004,29(5):863-866.

[6] 向梅梅. 广东农田杂草上的病原真菌[J]. 华南农业大学学报,2002,23(1):41-44.

[7] 向梅梅,向红琼,陈祥盛. 贵州农田杂草上的几种病原真菌[J]. 仲恺农业技术学院学报,1999,12(1):21-25.

[8] 方中达. 植病研究方法第 3 版[M]. 北京:中国农业出版社,1998:46-50.

[9] 俞达绥. 植物病理学和真菌研究技术汇编卷一[M]. 北京:高等教育出版社,1957:111-204,310-312.

[10] 张益先,吕国忠,梁景颐,等. 玉米灰斑病菌生物学特性研究[J]. 植物病理学报,2003,33(4):292-295.

[11] 张定法,刘鸣韬,高付军. 番茄尾孢叶霉病菌原鉴定及生物学特性研究[J]. 河南农业科学,2004(10):59-61.

[12] 刘锡璉,郭英兰. 中国真菌志第九卷假尾孢属[M]. 北京:科学出版社,1998:250-251.