

甘草叶斑病的发生与病原菌鉴定

阎 合¹, 徐秉良^{1*}, 梁巧兰¹, 薛应钰¹, 唐丽婧¹, 徐福祥²

(1. 甘肃农业大学植物保护系, 草业生态系统教育部重点实验室, 中—美草地畜牧业可持续发展研究中心, 兰州 730070; 2. 甘肃渭源县农业技术推广中心, 渭源 748200)

摘要 近年来,在甘肃省兰州市及渭源地区甘草产区发现一种甘草新病害—甘草叶斑病。2006—2008 年对其发病情况进行了调查,甘草叶斑病在 6 月下旬开始发病,9 月中旬为发病高峰期,发病率达 80%。高燥地发病率低于低洼地,采用轮作可减轻甘草叶斑病的发生。经过对甘草叶斑病原菌形态、培养性状和致病性等方面的测定表明,病原菌为豆链格孢(*Alternaria azukiae*)。通过寄主范围测定表明,该病原菌亦可侵染独活、羌活等药用植物。对大黄、苍耳等不具侵染性。

关键词 甘草; 叶斑病; 病害发生; 病原菌鉴定; 寄主范围测定

中图分类号: S 435.677 文献标识码: A DOI: 10.3969/j.issn.0529-1542.2009.03.028

Occurrence and identification of the leaf spot disease on *Glycyrrhiza*

Yan He¹, Xu Bingliang¹, Liang Qiaolan¹, Xue Yingyu¹, Tang Lijing¹, Xu Fuxiang²

(1. Department of Plant Pathology, Gansu Agricultural University; Key Laboratory of Grassland Ecosystem, Ministry of Education; Sino-U. S. Centers for Grazingland Ecosystem Sustainability, Lanzhou 730070, China; 2. Extension Center for Agro-Technology, Weiyuan 748200, China)

Abstract In recent years, the disease causing leaf spot on *Glycyrrhiza* has been observed in Lanzhou and Weiyuan districts of Gansu Province. The incidence of *Glycyrrhiza* leaf spot disease was surveyed from 2006 to 2008. The results showed that the disease appeared in late June and became serious in mid-September, with the rate of disease at 80%. The disease incidence of plants in uplands was lower than that in lowlands. Rotation could reduce the incidence of the disease. The pathogen was identified as *Alternaria azukiae*, according to the morphology, cultural characteristics and pathogenicity. The host range test showed that the pathogen could also infect *Notopterygium incisum*, *Angelica biserrata* and *Datura stramonium*.

Key words *Glycyrrhiza*; leaf spot disease; occurrence; identification of pathogen; host range test

甘草作为甘肃省渭源地区的主要经济作物,种植面积逐年增加,为当地农民的脱贫致富起到了积极作用^[1-4]。然而近年来,甘草叶斑病发生日趋严重,成为影响甘草产量的主要因素。该病害主要危害叶片,亦可危害茎秆,从下部老叶开始发病,在叶片上形成具同心轮纹的枯死斑,末期病斑连片生长,严重时病叶率高达 80.0% 以上,使植株的光合作用受阻,产量明显降低,给农户造成较大的经济损失。但是,对于甘草叶斑病的研究国内外尚未见报道。因此,作者对甘肃省兰州及渭源地区甘草叶斑病的发生情况进行了定期调查,对引起甘草叶斑病的病

原物进行了分离鉴定,并测定了该病原菌的寄主范围,为该病害的深入研究和有效控制奠定了基础,对提高甘草的产量和品质具有重要意义。

1 材料与方法

1.1 甘草叶斑病田间发病情况调查

2006—2008 年每年 6~9 月份在甘肃省渭源县甘草生产地,采用五点取样法按照 5 级分级标准对甘草叶斑病进行了调查,每样点调查 20 株,每株分下、中、上共调查 30 片叶,按下式计算病叶率和病情指数,并采集具典型症状的病叶,带回实验室保存于

收稿日期: 2008-09-27 修订日期: 2008-11-27

基金项目: 甘肃省扶贫项目(定市农发[2004]87 号)

* 通讯作者 E-mail: xubl@gsau.edu.cn

4℃冰箱中,用于分离、鉴定和致病性测定。

甘草叶斑病症状分级标准为1级:无病或者几乎无病,代表数值0;2级:病斑占叶片面积5%以内,代表数值1;3级:病斑占叶片面积6%~10%,代表数值2;4级:病斑占叶片面积11%~20%,代表数值3;5级:病斑占叶片面积20%以上,代表值4。

病情指数 =

$$\frac{\sum (\text{病级株数} \times \text{代表数值})}{\text{株数总和} \times \text{发病最重级的代表数值}} \times 100。$$

1.2 病原物的分离、鉴定

1.2.1 甘草叶斑病病原分离,形态及培养性状观察

在无菌操作条件下,选择新近发病的病叶,取其病健交界处作为分离材料,切取2 mm的小块病组织,先用70%乙醇消毒,然后用0.1%升汞消毒1 min,最后用灭菌水漂洗3次,将其移至PDA培养基平板上,在25℃培养箱中培养。经2次纯化后备用,进行单孢分离进一步纯化病原菌。

得到的单孢纯系菌落,5 d后测定菌落直径并计算生长速度,10 d后观察培养性状及色泽,并挑取一定量的菌丝及孢子,在显微镜下观测孢子形态、大小和数量,产孢细胞的形态、大小,厚垣孢子的有无、数量、形态和大小,喙的形态和大小,孢子有无隔膜,纵隔膜和横隔膜的数目等,并进行显微计测和照相。鉴定主要参照魏景超的方法^[6]。

1.2.2 甘草叶斑病病原物的致病性测定

采用离体接种法测定病原菌的致病性。健康甘草叶片采回后用自来水洗净,然后用70%乙醇表面消毒,晾干后置于灭菌的、铺有1层滤纸的培养皿中。将从病株上分离、纯化的分离物打成菌饼后接在甘草健康叶片上,分别采用刺伤接菌和无刺伤接菌2种方法进行,重复2次,以只接种空白PDA培养基的刺伤和无刺伤叶片为对照(每种处理30片叶)。放入25℃光照培养箱中,保湿培养48 h后开始观察发病情况,待叶片发病后,统计记录发病叶片数,计算发病率和病情指数。若接种甘草发生与原发病甘草叶片同样的枯斑症状,将发病部位再次进行分离培养,通过培养性状观察以及显微镜观察确定分离得到的病菌是否为同一病菌^[5]。

1.2.3 甘草叶斑病病原物鉴定

将单孢菌株接于PDA平板中央,置于25℃培养7 d后观察菌落形态,并挑取少量菌丝及孢子制成玻片在显微镜下观察分生孢子和分生孢子梗形态,根据《真菌鉴定手册》^[6]描述的形态特征及寄主

范围,对分离纯化得到的真菌进行鉴定。

1.3 寄主范围测定

以唇形科、茄科、落葵科、伞形科、蓼科、菊科、鸢尾科等9种中草药植物为供试材料,对该病原菌进行寄主范围测定,采用刺伤喷雾法接种。供试寄主幼苗长到2~4片真叶时进行接种,72 h后开始观察并记录发病情况,10 d后调查发病率和病情指数;发病后进行病原的再分离并与原菌种对照。

2 结果与分析

2.1 甘草叶斑病田间发病情况

2.1.1 甘草叶斑病田间症状

通过调查发现,甘草叶斑病主要在成株期发病及6月中下旬发生,苗期偶有发生。该病主要危害叶片,亦可危害茎部。

苗期发病,叶面产生针尖大小褐色或黑褐色圆形、近圆形病斑。病斑中央黑褐色,边缘颜色较浅,外围有不明显的黄色褪绿圆晕。温湿度适宜时,病叶上密布黑褐色小点,严重时串连成片,造成叶片枯死,引起死苗。

成株期从下部老叶开始发病,逐渐向上蔓延。发病初期病斑如针尖大小,褐色,圆形或椭圆形,少有不规则形。中部颜色较深边缘较浅,并有不明显的黄色褪绿圆晕,叶背面病斑呈黄褐色。以后病斑逐渐扩大形成圆形、椭圆形或不规则形的深褐色病斑,病斑表面具明显的同心轮纹,直径为2~4 mm,最大可达6.0 mm。发病严重时病斑连片,造成叶片枯死;潮湿条件下,叶背病部产生黑色霉层(图1)。

茎部染病,可产生与叶片上相似的症状,但多从叶腋处先发生,并向新生枝及主茎扩展,造成病部变褐,凹陷,病斑多为圆筒形或长椭圆形。严重时,病斑可以布满茎表,并可串连成片,使茎的表皮呈黑褐色,严重影响养分的运输,造成植株生长衰弱,部分病株枯死。

2.1.2 甘草叶斑病田间发生情况

通过2006—2008年3年的调查发现,该病在6月下旬开始发病,发病率平均为8.0%,9月中旬为病害高峰期,发病率可达80%以上,病情指数平均达60.0(图2)。

2.1.3 立地条件对甘草叶斑病发生的影响

调查发现,立地条件不同对甘草叶斑病发生有一定影响。高燥地甘草叶斑病发生较轻,平均发病率为64.7%,病情指数38.2。方差分析结果表明,高燥地与低洼地及平坦地甘草叶斑病病情指数存在极显著差异,而低洼地和平坦地之间无显著差异(表1)。



图 1 甘草叶斑病症状

表 1 立地条件与甘草叶斑病发生的关系¹⁾

立地条件	2006 年		2007 年		2008 年		平均	
	发病率/%	病情指数	发病率/%	病情指数	发病率/%	病情指数	发病率/%	病情指数
高燥地	62.8	35.4	65.1	38.8	66.3	40.4	64.7	38.2 bB
低洼地	82.1	54.3	87.3	56.4	89.7	57.6	86.7	56.1 aA
平坦地	80.8	52.1	85.2	55.9	88.4	57.3	84.8	55.1 aA

1) a,b 和 A,B 分别代表 0.05 和 0.01 水平上的显著差异性。

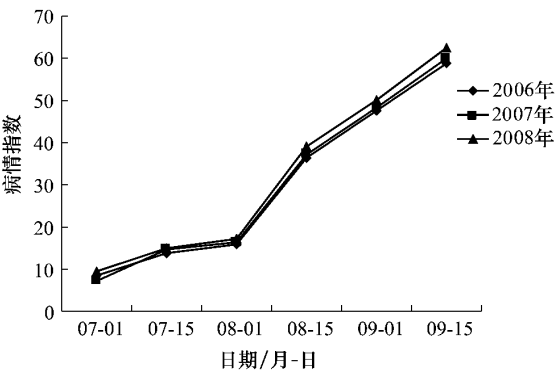


图 2 2006—2008 年甘草叶斑病发生情况

2.1.4 连作与轮作对叶斑病发生的影响

通过在甘肃省渭源县调查轮作与甘草叶斑病发生关系,结果表明,连作 2 年的地块平均病情指数达到 96.1。轮作 1 年的地块平均病情指数降低到 75.4。间隔 2 年轮作的地块平均病情指数又有降低,为 57.3。方差分析表明,轮作 2 年的甘草叶斑病病情指数与轮作 1 年,连作 2 年病情指数均存在极显著差异(表 2)。

表 2 轮作与甘草叶斑病发生的关系¹⁾

耕作方式	发病率/%	病情指数
连作 2 年	99.8	96.1 aA
轮作 1 年	92.4	75.4 bB
轮作 2 年	87.2	57.3 cC

1) 调查地点为甘肃省渭源县县城周边、杨庄、锹峪;a,b 和 A,B 分别代表 0.05 和 0.01 水平上的显著差异性。

2.2 甘草叶斑病病原菌的分离及鉴定

2.2.1 病原菌形态

从病组织中分离培养的病原物在 PDA 培养基

上产生的菌落铺展,圆形或近圆形,黑色,气生菌丝初为白色,后为淡褐色或褐色,待菌丝扩展到占培养皿 1/2 时菌丝逐渐变黑。12 h 白光灯照射与 12 h 黑暗交替,菌落可形成明显的轮纹,背面为黑色。

甘草叶斑病菌丝无色透明有隔膜,分生孢子梗直立或膝状,分支或不分支,分生孢子有的无喙,有的具柱状假喙,形状变化极大,卵形、椭圆形、倒棍棒形,表面有缢缩,淡褐色或深褐色,有横隔膜 1~6 个,纵隔膜 0~4 个。孢子大小为(18~42) μm×(6~15) μm。病叶上分生孢子梗由叶两面生,单生或簇生,分生孢子大小较 PDA 培养基平板上略大。

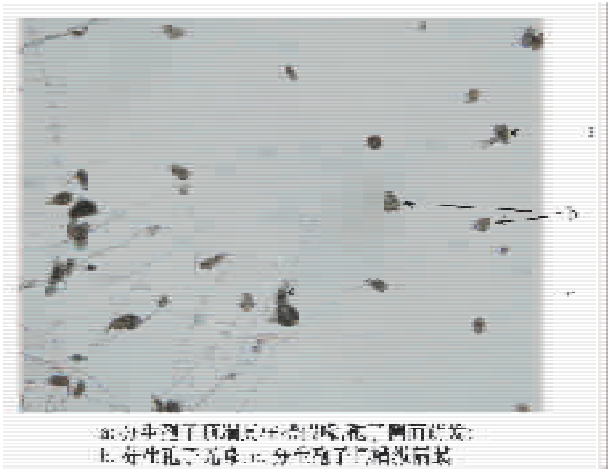


图 3 甘草叶斑病病原菌分生孢子形态
(10×40 倍镜下拍摄)

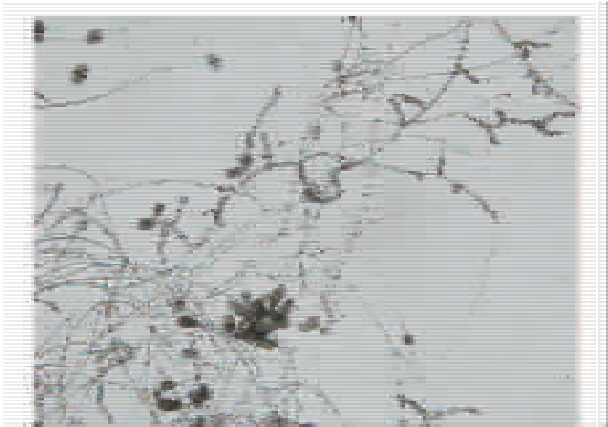


图 4 甘草叶斑病原菌菌丝及分生孢子梗形态
(10×40 倍镜下拍摄)

2.2.2 病原菌致病性测定及鉴定

通过无伤接种和刺伤接种两种方法进行了病原菌致病性测定,结果表明两种接种方法均能使甘草叶片发病,其中刺伤接种发病情况更为严重,潜育期更短,表明伤口有助于病原菌的侵入(表 3)。结合病原菌形态观察将该病原菌鉴定为豆链格孢(*Alternaria azukiae*),属有丝分裂孢子真菌,丝孢纲,链格孢属。

表 3 甘草叶斑病原菌致病性测定结果

接种方式	接种叶数	发病叶片数	发病率/%	病情指数	潜育期/h
无伤接种	30	26	86.7	67.5	72
刺伤接种	30	30	100.0	92.5	48
无伤(CK)	30	0	0.0	0.0	—
刺伤(CK)	30	0	0.0	0.0	—

2.3 寄主范围测定

经对 9 种不同科的药用植物接种测定表明,豆链格孢对几种植物的致病性之间存在差异。对独活、羌活和曼陀罗的致病性最强,接种病叶率分别为 60.0%、46.7%和 70.0%,病情指数分别为 32.4、26.4 和 37.5。对藤三七的致病性较弱,病叶率为 27%,病情指数为 14.7;而对甘西鼠尾、射干、苍耳、大黄、紫苏等作物无侵染性(表 4),经再分离表明病原菌和接种菌株形态特征一致。

3 结论与讨论

甘草叶斑病在甘肃省兰州及渭源甘草产区均有发生,尤其以渭源地区发病较重,已成为影响甘草产量的主要病害。病害高峰期,严重田块发病率可达 80%以上,使植株的光合作用受阻,产量明显降低,给农户造成较大的经济损失。目前,国内外对于甘

草病害方面研究较为匮乏,仅有王宽仓、韩学俭等人报道了甘草根腐病、白粉病以及锈病等病害的发生和防治方法。对于甘草叶斑病尚未见报道。本研究通过 3 年的调查发现,甘草叶斑病于 6 月末甘草进入成株期时发病,至 9 月中旬进入雨季,降雨量增加,湿度增大时病害达到高峰期。该病的发生程度与轮作、立地条件均有很大关系。因此,将甘草种植区尽量选在高燥地,并与其他作物轮作倒茬能在很大程度上减轻甘草叶斑病的发生。

表 4 甘草叶斑病原菌寄主范围测定结果

供试植物	接种叶片数	发病叶片数	发病率/%	病情指数
独活	30	18	60.0	32.4
藤三七	30	8	26.7	14.7
甘西鼠尾	20	0	0.0	0.0
射干	30	0	0.0	0.0
苍耳	30	0	0.0	0.0
羌活	30	14	46.7	26.4
大黄	30	0	0.0	0.0
曼陀罗	30	21	70.0	37.5
紫苏	30	0	0.0	0.0

本研究明确了引起甘草叶斑病的病原菌为豆链格孢(*Alternaria azukiae*)。该菌除了导致甘草叶斑病外,还能够使曼陀罗、藤三七、独活等药用植物发病。

参考文献

[1] 黄一. 种植甘草收益高[J]. 四川农业科技, 2005(9):6.

[2] 罗芒生. 人工种植甘草发展潜力大[J]. 农家参谋, 2005(3):28.

[3] 王宽方, 查仙芳, 南宁丽. 宁夏甘草主要病害种类调查研究[J]. 宁夏科技, 2001(5):48-49.

[4] 霍云谦, 葛淑俊, 孟义江, 等. 中国甘草的组织培养研究进展[J]. 中国农学通报, 2005(9):64-66.

[5] 方中达. 植病研究方法[M]. 北京: 中国农业出版社, 1998:32-153.

[6] 魏景超. 真菌鉴定手册[M]. 上海: 上海科技出版社, 1979:33-649.

[7] 张敬泽, 张天宇, 王瑾. 链格孢属种间培养形状的分类研究[J]. 浙江农业大学学报, 1997, 23(5):511-514.

[8] 贾凤娇, 王义勋, 伊少华, 等. 日本结缕草叶斑病原鉴定及其生物学特性研究[J]. 草业科学, 2007, 24(2):81-84.

[9] 王春江, 商鸿生, 王旭. 小麦链格孢中国菌株的生物学特性研究[J]. 西北农业大学学报, 2000, 28(3):7-10.

[10] 向梅梅, 何敏生. 莲子草假链格孢在不同条件下的生长和产孢能力[J]. 仲恺农业技术学院学报, 1999, 12(4):1-5.

[11] 孙广宇, 宗兆锋. 植物病理学实验技术[M]. 北京: 中国农业出版社, 2002:142-144.

[12] 张天宇. 中国真菌志: 链格孢属[M]. 北京: 科技出版社, 1997:16.