

齿瓣石斛病原链格孢菌生物学特性研究

王仕玉^{1,3}, 萧凤回^{1,2,4}

(1 云南农业大学 中药材研究所, 云南省中药材规范化种植技术指导中心, 云南 昆明 650201;
2 云南农业大学 农学与生物技术学院, 云南 昆明 650201; 3 云南农业大学 园林园艺学院, 云南 昆明 650201;
4 云南省生物技术创新人才培养基地, 云南 昆明 650201)

摘要: 对齿瓣石斛 (*Dendrobium devonianum* Paxt) 黑斑病病原物链格孢菌 (*Alternaria tenuis* Nees) 进行分离并对其生物学特性进行研究。用常规组织分离法从齿瓣石斛叶片中分离黑斑病病原物链格孢菌, 以 PSA 为基本培养基, 研究培养基 pH 值、附加不同碳源和氮源、温度、光照等培养条件对链格孢菌菌丝生长及产孢的影响。齿瓣石斛链格孢菌菌丝最适宜生长的温度 25℃, 20℃ 最宜产孢; 最适宜的 pH 值为 5~6 光照对菌丝生长影响不显著, 产孢量以光暗交替下培养最多; 在 PSA 培养基上加入淀粉或硝酸铵对菌丝生长最好, 产孢则以葡萄糖较好, 在其他碳源或氮源的培养基上极少产孢。齿瓣石斛链格孢菌适宜在 PSA 培养基 pH 值为 5~6 附加一定葡萄糖和硝酸铵, 25℃ 和光暗交替下生长。

关键词: 齿瓣石斛; 黑斑病; 链格孢菌; 生物学特性

中图分类号: S567.01 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-7091(2009)增刊-0243-04

Biological Characteristics of *Dendrobium devonianum* Pathogen *Alternaria tenuis* Nees

WANG Shi-yu^{1,3}, XIAO Feng-hui^{1,2,4}

(1 Institute of Chinese Medicinal Materials of Yunnan Agricultural University, Yunnan Provincial Center for Chinese Medicinal Material GAP Technology, Kunming 650201, China

2 College of Agronomy and Biotechnology, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, China

3 College of Landscape and Horticulture, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, China

4. Center for Agriculture and Biodiversity Research and Training of Yunnan Province, Kunming 650201, China)

Abstract To isolate the *Alternaria tenuis* Nees from infected leaves of *Dendrobium devonianum* Paxt and study the biological characteristics of this pathogenic fungus. Isolated the *A. tenuis* Nees from infected leaves of *D. devonianum* Paxt according to the method of Fang ZD first and then used PSA as basic media to study the effects of pH value, different carbon and nitrogen sources, temperature and illumination on mycelial growth and sporulation of *A. tenuis* Nees. Results The optimal temperatures for mycelial growth and sporulation of *A. tenuis* Nees isolated from *D. devonianum* Paxt were 25℃ and 20℃ respectively. Media with pH values between 5.0 and 6.0 were beneficial for mycelial growth and sporulation of *A. tenuis* Nees. Illumination did not have significant effect on its mycelial growth while daily alternation of 12 hours' lighting and 12 hours' dark at 25℃ gave the highest spore yield. PSA media supplemented with starch or ammonium nitrate provided best results for mycelial growth. PSA medium with glucose was suitable for sporulation of this fungus. The fungus inoculated on PSA media with other carbon and nitrogen sources produced very few spores. *A. tenuis* Nees isolated from *D. devonianum* Paxt could be cultured on PSA media with pH values between 5.0 and 6.0, glucose and ammonium nitrate at 25℃ and under the daily alternation of half lighting and half dark.

Key words *Dendrobium devonianum* Paxt; Black spot; *Alternaria tenuis* Nees; Biological characteristics

收稿日期: 2009-10-21

基金项目: 云南省财政厅项目 (云财教[2005]220号)

作者简介: 王仕玉 (1965-), 女, 重庆人, 副教授, 在读博士, 主要从事果树和药用植物研究。

通讯作者: 萧凤回 (1960-), 男, 浙江温州人, 教授, 博士, 主要从事药用植物研究。

齿瓣石斛 (*Dendrobium devonianum* Paxt.) 是兰科石斛属 (*Dendrobium*) 植物, 俗称紫皮石斛、紫皮兰, 主要分布于我国的云南、广西、贵州、西藏东南部和缅甸、越南、老挝、泰国等东南亚国家。20世纪80年代末至90年代初出现在上海市, 作鲜石斛用, 另外还作黄草石斛或用其加工成细黄草^[1-3]。李满飞等^[4]用比色法测定齿瓣石斛多糖含量为21.09%, 比铁皮石斛的18.24%稍高。药农认为其质量不亚于铁皮石斛, 因其生长速度快, 产量较高, 则被大量用于替代枯竭的铁皮石斛加工成紫皮枫斗^[1]、紫皮芽等。杨永红等^[5]报道拉祜族药“鹅母架那此”中用到齿瓣石斛。齿瓣石斛药用与密花石斛相同, 具有“滋阴益胃, 生浸止渴”之功效, 被《云南中药资源名录》^[6]收载。

齿瓣石斛药用较晚, 主要用于替代铁皮石斛被大量采挖, 导致国内齿瓣石斛资源短缺, 目前用于加工产品的齿瓣石斛多来自于国内边远山区和周边国家。云南省内有识之士看好其发展前景, 在进行广泛资源调查的同时已开始人工驯化种植齿瓣石斛^[7]。由于其对生长环境要求低于铁皮石斛, 产量较高, 各种种植地规模在不断扩大。对云南几个石斛主产区的齿瓣石斛人工种植地进行实地考察, 在调查的生产基地中, 几乎都发现有不同程度的病虫害。

本试验对从云南省主产区采集到的齿瓣石斛感病植株进行观测, 记录叶片上黑斑病病斑大小、形状、颜色和感病部位; 从病叶上分离鉴定链格孢菌菌种, 通过离体培养的方法对菌种的生物学特性进行研究, 结果可为进一步防治该病原菌提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 病菌观测分离

首先对采回的新鲜齿瓣石斛感病植株叶片上病斑大小、形状、颜色进行观测, 然后采用常规组织分离法分离病菌^[8], 接种于PSA培养基上, 在25℃全光照条件下培养25 d, 在显微镜下鉴定菌源后, 菌源用PSA培养基保存备用。

1.2 病原菌生物学特性的研究

1.2.1 温度设计 在12 cm培养皿内PSA平板培养基上, 接入直径0.7 cm小菌饼, 每皿2块, 分别置于20、25、30、40℃下恒温箱中培养, 每处理重复3次。

1.2.2 pH值设计 用0.1 mol/L HCl和0.1 mol/L NaOH调节PSA培养基pH值, pH值梯度设为4、5、6、7、8, 然后接入直径0.7 cm小菌饼, 每皿2块, 于25℃下培养, 每梯度重复3次。

1.2.3 光照设计 将接种了0.7 cm小菌饼的PSA培养基, 培养在25℃的3个光照条件下: ①持续光照;

②持续黑暗; ③12 h光暗交替。每处理重复3次。

1.2.4 不同碳源设计 在PSA基础培养基中分别加入3%的葡萄糖、蔗糖、乳糖和淀粉, 每处理重复3次, 在25℃的12 h光暗交替下培养。

1.2.5 不同氮源设计 在PSA基础培养基中分别加入0.3%的甘氨酸、硝酸钾、硝酸铵、硫酸铵、蛋白胨、酸水解酪蛋白、水解乳蛋白、脲、牛肉浸膏, 每处理重复3次, 在25℃的12 h光暗交替下培养。

逐日用十字交叉法观测各处理菌落直径, 直至不能观测时, 取直径为0.7 cm的菌饼, 用2 mL无菌水稀释, 用显微镜检查分生孢子数, 观察10个视野取平均值。

2 结果与分析

2.1 病原菌分离鉴定

齿瓣石斛黑斑病斑多分布在叶片的上半部, 中间略有凹陷为黑色, 外缘为褐色晕圈, 大小为0.01~0.28 cm², 病斑近圆形、椭圆形或呈小圆点。在PSA培养基上培养的病原菌菌落初期为灰白色, 后期逐渐转为黑灰色, 具有黑白相间的轮纹。在显微镜下观测到菌丝细长分枝, 淡色至褐色, 具隔膜; 分生孢子梗褐色, 单枝, 具隔膜, 大小为72.8 μm × 10.9 μm; 分生孢子单生, 黑褐色, 卵圆形或倒棒形, 有纵横隔膜, 大小为54.5 μm × 25.1 μm。根据病原菌分生孢子梗, 分生孢子及菌丝形态特征, 鉴定该菌为半知菌亚门链格孢菌 (*Alternaria tenuis* Nees)^[9]。

2.2 温度对菌丝生长和产孢的影响

链格孢菌在所设20~40℃温度范围内均可生长, 且在12 cm培养皿中的2个菌块在4 d内生长即达交叉状。图1结果显示除40℃外, 其余温度下菌块均有明显生长, 以25℃最宜菌丝生长, 属中温型病原菌。经方差分析和多重比较得知, 在20、25和30℃下菌丝生长无差异显著性, 但均与40℃差异显著。

图2结果显示, 除40℃不产孢子外, 20~30℃范围内都能产生分生孢子, 但20℃下产孢量极显著高于其他2个温度处理。

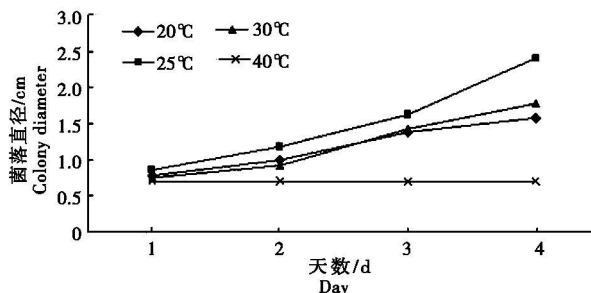


图1 温度对链格孢菌落生长的影响

Fig 1 Effect of temperature on colony growth of *Alternaria tenuis*

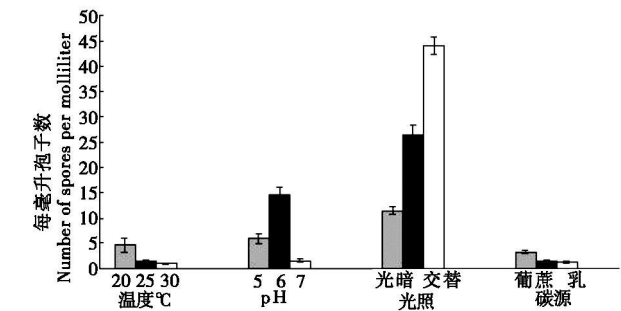


图 2 不同处理对链格孢产孢的影响

Fig 2 Effects of different treats on sporulation of *A.lernaria teu is*

2 3 pH 值对菌丝生长和产孢的影响

图 3 为培养基质不同 pH 值对链格孢病菌生长发育的影响。第 1 天, pH 4、pH 5 和 pH 6 培养基中的菌落直径生长快; 第 2 天, pH 4 和 pH 5 中的菌落直径生长最快, 但 2 d 后, pH 4 培养基中的菌落直径生长极缓慢, 最终菌落直径为最小; 第 3~6 天, pH 5 培养基中的菌落直径生长快, 菌丝生长旺盛, 最终菌落直径最大; 第 5~6 天, pH 6、pH 7 和 pH 8 培养基中的菌落直径迅速生长, 但 pH 6 中的菌落直径增长比 pH 7 和 pH 8 中的大, 最终其大小仅次于 pH 5。由此可见, pH 5 和 pH 6 的培养基质中菌落都有显著生长, 且以 pH 5 培养基中的菌丝生长平稳快速。pH 4、pH 7 和 pH 8 培养基较不适宜于菌丝生长, 最后其菌落直径都显著小于 pH 5 和 pH 6 的培养基中的菌落直径。

图 2 结果表明, 在 pH 5、pH 6、pH 7 的培养基中有分生孢子产生, 以 pH 6 中分生孢子数量极显著多

于另二者, pH 5 与 pH 7 条件下产孢量也有显著差异, pH 4 和 pH 8 条件下不产孢。

2 4 光照对菌丝生长和产孢的影响

图 4 显示, 在不同光照条件下链格孢病菌菌丝均呈快速生长态势, 当第 5 天达到观测最大值时, 各处理间菌落直径大小差异不显著。图 2 表明, 不同光照对产孢有极显著影响, 光照 (12 h) 与黑暗 (12 h) 交替光照比持续光照、持续黑暗培养下的产孢量极显著的多, 持续光照时的产孢量最少。

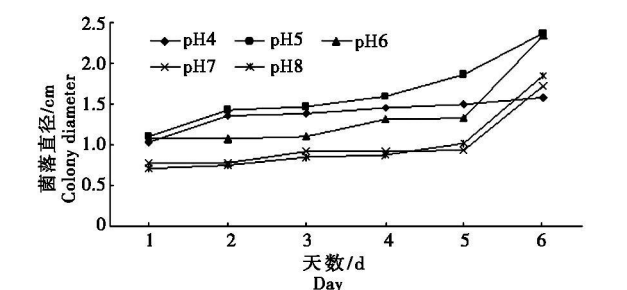


图 3 pH 对链格孢菌落生长的影响

Fig 3 Effect of pH on cobny growth of *A.lernaria teu is*

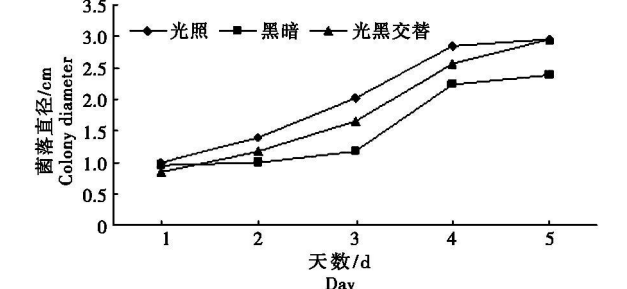


图 4 光照对链格孢菌落生长的影响

Fig 4 Effect of light on colony growth of *A.lernaria teu is*

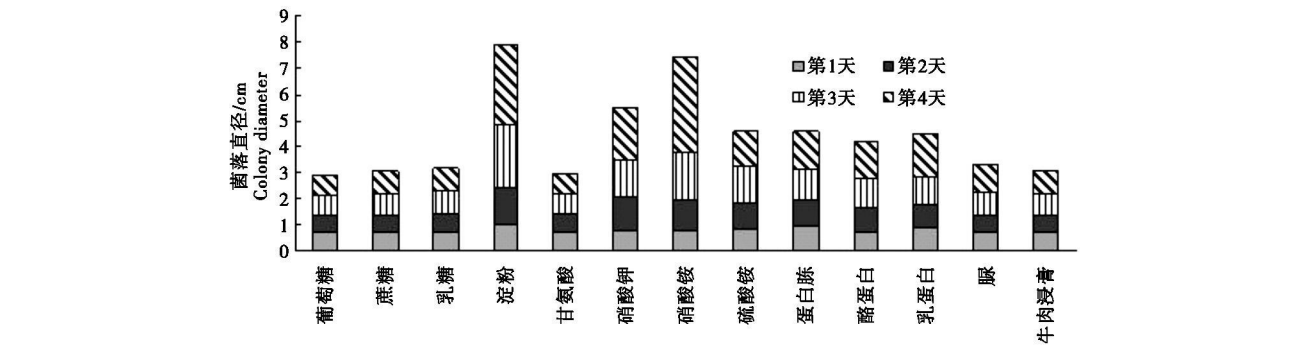


图 5 不同碳源和氮源对链格孢菌落生长的影响

Fig 5 Effects of carbon and nitrogen sources on cobny growth of *A.lernaria teu is*

2 5 碳源对菌丝生长和产孢的影响

图 5 显示链格孢病菌对不同的碳源利用有一定的差异。以淀粉为碳源的培养基中菌落直径生长最快, 菌丝生长旺盛, 菌落直径最大, 显著大于其他 3 个碳源培养基中的菌落直径。碳源为葡萄糖、蔗糖和乳糖的培养基中菌落生长缓慢, 菌落大小三者间

无显著差异, 但三者均有分生孢子产生 (图 2), 而淀粉培养基中未产孢。葡萄糖培养基中的菌落直径最小, 产孢量最多, 极显著多于蔗糖和乳糖培养基中的分生孢子数。

2 6 氮源对菌落生长及产孢量的影响

图 5 显示, 培养 1~2 d 时, 不同氮源培养基中

的菌落直径相差不大;第 3~ 4 天时,氮源为硝酸钾和水解乳蛋白的菌落直径加快生长;以其他为氮源的培养基中菌落直径生长缓慢,以甘氨酸为氮源的菌落直径最小。硝酸铵最利于菌丝生长,第 2~ 4 天内,以硝酸铵为氮源的培养基中的菌丝生长最快,菌落直径最大。在分生孢子产孢量中,以甘氨酸、硝酸钾、硝酸铵、硫酸铵、蛋白胨、酸水解酪蛋白、脲为氮源的培养基中均无分生孢子产生,仅在以水解乳蛋白和牛肉浸膏为氮源的培养基中有极少量分生孢子产生。

3 结 论

从齿瓣石斛的叶片黑斑病斑上分离获得链格孢菌。生物学特性研究表明,适宜病原菌生长及产孢的温度为 20~ 30℃,产孢量以 20℃为最多。病原菌适宜在 pH 为 5~ 6 的偏酸性环境中生长和产孢,光照与否对菌丝生长影响不大且都可产孢,但以光暗交替 (12 h /12 h)更宜于分生孢子产生。对碳氮营养要求不高,以硝酸铵为氮源和以淀粉为碳源均促进了菌丝生长,但未有分生孢子产生,仅以水解乳蛋白为氮源和以葡萄糖为碳源的培养基中有少量分生孢子产生。

参考文献:

- [1] 包雪声, 顺庆生, 陈立钻. 中国药用石斛彩色图谱 [M]. 上海: 上海医科大学出版社, 复旦大学出版社, 2001
- [2] 李满飞, 徐国钧, 徐珞珊, 等. 商品石斛的调查及鉴定 (II) [J]. 中草药, 1991, 22 (4): 173– 176, 180
- [3] 马国祥, 徐国钧, 徐珞珊, 等. 商品石斛的调查及鉴定 (III) [J]. 中草药, 1996, 20 (7): 370– 372
- [4] 李满飞, 平田义正. 重要石斛类多糖的含量测定 [J]. 中草药, 1990, 21 (10): 10– 12
- [5] 杨永红, 白 巍, 李茂兰, 等. 拉祜族药“ 鹅母架那此 ” [J]. 中国民族民间医药杂志, 1998, 34: 38– 39.
- [6] 云南药材公司编. 云南中药资源名录 [M]. 北京: 科学出版社, 1993
- [7] 郑志新, 李 昆, 张昌顺, 等. 云南龙陵齿瓣石斛化学成分分析测定及栽培方式选择 [J]. 安徽农业科学, 2008 1426– 1427.
- [8] 方中达, 植病研究法 [M]. 第 3 版. 北京: 农业出版社, 2004.
- [9] 魏景超. 真菌鉴定手册 [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1979.