

引用格式:

卢文洁, 尹桂芳, 隆文杰, 李程鹏, 孙道旺, 王莉花. 云南金荞麦叶斑病病原菌的鉴定及其生物学特性[J]. 湖南农业大学学报(自然科学版), 2024, 50(3): 69–75.

LU W J, YIN G F, LONG W J, LI C P, SUN D W, WANG L H. Identification and biological characterization of the pathogen causing leaf spot of *Fagopyrum dibotrys* in Yunnan[J]. Journal of Hunan Agricultural University(Natural Sciences), 2024, 50(3): 69–75.

投稿网址: <http://xb.hunau.edu.cn>



## 云南金荞麦叶斑病病原菌的鉴定及其生物学特性

卢文洁<sup>1,2,3</sup>, 尹桂芳<sup>1,2,3</sup>, 隆文杰<sup>1,2,3</sup>, 李程鹏<sup>1,2,3</sup>, 孙道旺<sup>1,2,3</sup>, 王莉花<sup>1,2,3\*</sup>

(1.云南省农业科学院生物技术与种质资源研究所, 云南 昆明 650205; 2.云南省农业生物技术重点实验室, 云南 昆明 650205; 3.农业农村部西南作物基因资源与种质创制重点实验室, 云南 昆明 650205)

**摘要:** 从云南省嵩明县试验基地采集金荞麦叶斑病病叶, 采用组织分离法分离培养病原菌, 根据柯赫氏法则测定病原菌的致病性, 观察病原菌形态学特征, 并与 ITS、TUB2 系统发育分析相结合鉴定病原菌, 测定病原菌的生物学特性。结果表明: 云南金荞麦叶斑病病原菌代表菌株 GY3 的孢子形态与拟盘多毛孢属(*Pestalotiopsis*)真菌相似, 菌株 GY3 的 rDNA-ITS 及 TUB2 联合序列与小孢拟盘多毛孢(*P. microspora*)2 个菌株(ZK1-1、ZK5-5)的序列聚在同一分支, 鉴定认为金荞麦叶斑病的病原菌为小孢拟盘多毛孢(*P. microspora*); 病原菌生物学特性测定结果表明, GY3 菌丝生长最适培养基为 PDA, 以 PDA 培养基培养 GY3, 菌丝生长最适 pH 为 7, 最适温度为 25 °C, 菌丝的致死温度为 50 °C(水浴 10 min), 连续光照最有利于菌丝生长, 菌丝生长的最适的碳源和氮源分别为葡萄糖和蛋白胨。

**关键词:** 金荞麦; 叶斑病; 病原菌鉴定; 小孢拟盘多毛孢; 生物学特性; 云南

中图分类号: S435.17

文献标志码: A

文章编号: 1007-1032(2024)03-0069-07

## Identification and biological characterization of the pathogen causing leaf spot of *Fagopyrum dibotrys* in Yunnan

LU Wenjie<sup>1,2,3</sup>, YIN Guifang<sup>1,2,3</sup>, LONG Wenjie<sup>1,2,3</sup>, LI Chengpeng<sup>1,2,3</sup>, SUN Daowang<sup>1,2,3</sup>, WANG Lihua<sup>1,2,3\*</sup>

(1.Biotechnology and Genetic Resources Institute, Yunnan Academy of Agricultural Sciences, Kunming, Yunnan 650205, China; 2.Yunnan Provincial Key Lab of Agricultural Biotechnology, Kunming, Yunnan 650205, China; 3.Key Lab of Southwestern Crop Gene Resources and Germplasm Innovation, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Kunming, Yunnan 650205, China)

**Abstract:** Samples of leaf spot of *Fagopyrum dibotrys* (*F. dibotrys*) were collected from experimental base of Songming, Yunnan province, and the pathogen was isolated and cultured by tissue separation method. The pathogenicity of the pathogen was tested according to Koch's rule. The pathogen was identified through morphological characteristics and phylogenetic analysis of ITS and TUB2 genes, and the biological characteristics of the pathogen was investigated. The results showed that the spore morphology of strain GY3, a representative of the pathogen causing *F. dibotrys* leaf spot, was similar to the fungi of *Pestalotiopsis*. The rDNA-ITS and TUB2 sequences of strain GY3 was belonged to the branch which the rDNA-ITS and TUB2 sequences of two isolates (ZK1-1, ZK5-5) of *Pestalotiopsis Microspora* (*P. microspora*) belonged to, thus the pathogen causing leaf spot of *F. dibotrys* was identified as *P. microspora*. The optimum media for mycelia growth of strain GY3 was PDA. On PDA media, the optimum pH value for mycelia growth of strain

收稿日期: 2023-12-18

修回日期: 2024-03-09

基金项目: 云南省农业基础研究联合专项(202101BD070001-122); 财政部和农业农村部-国家现代农业产业技术体系(CARS-07-C-2); 云南省重大科技专项与重点研发计划(202202AE090020)

作者简介: 卢文洁(1976—), 女, 云南建水人, 硕士, 副研究员, 主要从事作物病害防控研究, [luwenjie1976@163.com](mailto:luwenjie1976@163.com); \*通信作者, 王莉花, 硕士, 研究员, 主要从事荞麦育种及病虫害防控研究, [908242246@qq.com](mailto:908242246@qq.com)

GY3 was pH7, the optimum temperature for mycelia growth was 25 °C and the fatal temperature for mycelia was 50 °C for 10 min. Continuous illumination was favorable for mycelia growth and the optimum carbon source and nitrogen source for mycelia growth were glucose and peptone, respectively.

**Keywords:** *Fagopyrum dibotrys*; leaf spot; pathogen identification; *Pestalotiopsis microspora*; biological characteristics; Yunnan

金荞麦(*Fagopyrum dibotrys*)又称野荞麦、赤地利、荞麦当归、苦荞头等,系蓼科(Polygonaceae)荞麦属(*Fagopyrum* Mill.)多年生草本植物<sup>[1-3]</sup>。金荞麦耐旱、耐寒、耐贫瘠,对环境适应性较广。金荞麦原产于中国西南地区,现已广泛分布于黄河以南多个省份,亚洲、美洲的多个国家也有种植<sup>[4]</sup>。

金荞麦病害主要有金荞麦病毒病,该病害引起叶片呈花叶状或卷曲皱缩<sup>[5]</sup>,导致植株不能正常生长。近年在云南省嵩明县金荞麦保育圃发现了一种新的叶部病害——金荞麦叶斑病,植株中部及以上叶片感染发病,高温多湿、通风不良时发病较为严重。金荞麦叶斑病一旦发生,植株生长缓慢,长势也较弱,开花不育,种子产量降低。笔者调查金荞麦叶斑病发病情况,采集病叶样品,采用组织分离法分离培养病原菌,采用病原菌的孢子形态学特征与病原菌基因分析结合的方法对病原菌进行鉴定,并研究病原菌的生物学特性,以期能及时有效防控金荞麦叶斑病病害提供依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

于云南省嵩明县金荞麦保育圃采集金荞麦叶斑病典型症状的病叶样品,带回实验室于 4 °C 保存。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 分离纯化金荞麦叶斑病病原菌

采用常规组织分离法<sup>[6]</sup>分离培养病原菌。取金荞麦叶斑病叶组织,先后用 70% 乙醇、2% 次氯酸钠消毒、ddH<sub>2</sub>O 漂洗,晾干后接种于 PDA 培养基平板上,25 °C 恒温培养。采用单孢分离法纯化培养病原菌,将纯化的分离菌株保存于 PDA 试管斜面,于 4 °C 冰箱储存,备用。

#### 1.2.2 病原菌的致病性测定

利用分离纯化菌株接种金荞麦植株健康叶片测定致病性。分离菌株于 PDA 培养基活化培养 5 d

后,用 5 mm 打孔器取圆形菌丝块,用消毒针于叶片主脉两侧刺伤叶片,将菌丝块接种于叶片针刺点,对照接种 PDA 琼脂块,各接种 15 个叶片,48 h 后去除菌丝块及 PDA 琼脂块,定期观察接种叶片的发病情况。

#### 1.2.3 病原菌的鉴定

1) 形态学鉴定。于 PDA 培养基平板上,25 °C 恒温培养致病菌株,每 24 h 观察菌落的形态特征,待菌落产孢后,观察孢子形态,测量孢子大小。

2) 分子生物学鉴定。于 PDA 培养基平板上,25 °C 恒温培养致病菌株,5 d 后用灭菌刀片收集菌丝,采用 CTAB 法提取菌丝总 DNA,分别用引物 ITS1(5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') 和 ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3')<sup>[6]</sup>及引物 Bt2a (5'-GGTAACCAAATCGGTGCTGCTTTC-3')和 Bt2b (5'-ACCCTCAGTGTAGTGACCCTTGGC-3')<sup>[7]</sup>进行 PCR 扩增。引物合成由生工生物工程(上海)股份有限公司完成。25 μL PCR 反应体系<sup>[7]</sup>: 1.0 μL DNA 模板、2.5 μL 10×Buffer、0.5 μL dNTPs(10 mmol/L)、0.25 μL *Taq* 酶(5 U/μL)、引物(10 μmol/L)各 0.5 μL、加 ddH<sub>2</sub>O 至 25 μL。ITS 引物的 PCR 反应程序<sup>[6]</sup>: 94 °C 预变性 5 min; 94 °C 变性 1 min, 55 °C 退火 1 min, 72 °C 延伸 1 min, 共 40 个循环; 最后 72 °C 延伸 10 min。*TUB2* 引物的 PCR 反应程序<sup>[7]</sup>: 95 °C 预变性 3 min; 94 °C 变性 1 min, 55 °C 退火 50 s, 72 °C 延伸 1 min, 共 35 个循环; 最后 72 °C 延伸 10 min。PCR 产物利用 1.0% 琼脂糖凝胶进行电泳检测,交由华大基因生物科技有限公司测序。

#### 1.2.4 病原菌的生物学特性测定

①设置 PDA、OMA、Czapek、PSA、CA、CMA 6 种培养基培养致病菌株; ②分别用 1 mol/L 盐酸溶液和 1 mol/L 氢氧化钠溶液调制 PDA 培养基的 pH 为 4、5、6、7、8、9、10、11、12; ③分别在 5、10、15、20、25、28、30、35 °C 恒

温条件下, PDA 培养基培养致病菌; ④以 PDA 培养基进行培养, 设 24 h 连续光照、12 h 光照和 12 h 黑暗光暗交替、24 h 连续黑暗 3 种处理; ⑤以 PDA 培养基(葡萄糖的碳元素含量为 2%) 为基础培养基, 分别用可溶性淀粉、木糖、蔗糖、麦芽糖、乳糖、甘露糖 6 种碳源等质量置换 PDA 培养基中的碳元素; ⑥以加入硝酸钾的 PDA 培养基(硝酸钾氮元素含量为 0.2%) 为基础培养基, 分别用氯化铵、硝酸钠、苯丙氨酸、蛋白胨、硫酸铵、胱氨酸、尿素、牛肉浸膏 8 种氮源等质量置换培养基中的氮元素, 测定致病菌的生物学特性。用直径 5 mm 的打孔器于菌落边缘打取圆形菌丝块, 接种于培养基平板上, 每种处理 5 个重复, 置于 25 °C(除不同温度处理外)恒温培养, 十字交叉法测量培养 2、5 d 的菌落直径。

### 1.3 数据处理

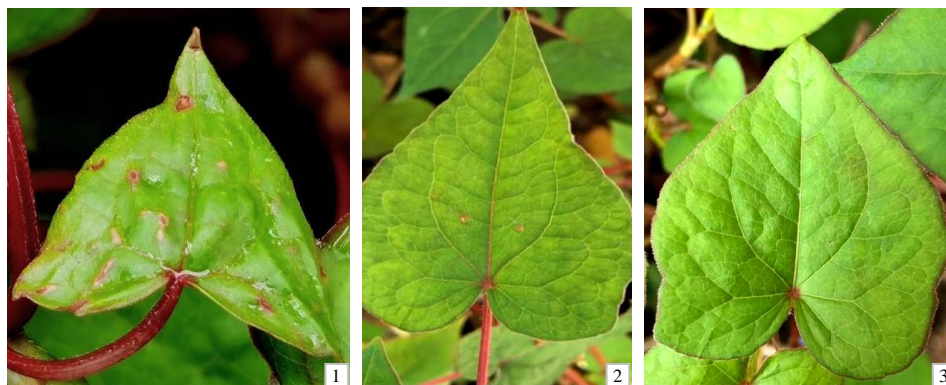
菌株序列在 NCBI 上进行 BLAST 比对分析, 下载拟盘多毛孢属(*Pestalotiopsis*)及盘单毛孢属参考菌株的相应序列, 应用 BioEdit7.0.9.0 软件将菌株的 2 个基因序列进行联合, 采用 MEGA-6.06 软件以邻接法对致病菌株及下载的参考菌株构建系

统发育树。致病菌株生物学特性数据用 Duncan 新复极差法检验差异显著性。

## 2 结果与分析

### 2.1 金荞麦叶斑病病害症状及菌株致病性

调查金荞麦叶斑病的发病情况, 发现金荞麦整个生长期均可发生叶斑病, 8 月为高发期。发病初期, 叶片上出现零星黄色小斑点, 病斑边缘不规则, 病健交界处为较窄的黄色晕圈; 随病情发展, 病斑逐步布满叶片, 病斑扩大, 中心逐渐变为黑色, 为病原菌的分生孢子堆(图 1-1)。利用分离的病原菌的代表性菌株接种金荞麦植株健康叶片, 接种 7 d 后, 接种部位可见明显的淡黄色小病斑(图 1-2), 与保育圃金荞麦叶片发病症状相似, PDA 琼脂块对照接种叶片未出现症状(图 1-3)。接种发病的金荞麦叶片经再次分离、纯化获得的菌株与接种的分离的代表性菌株菌落形态及分生孢子的形态特征完全一致; 因此, 证明接种的分离菌株为金荞麦叶斑病的致病菌株, 并将致病菌株命名为 GY3。



1 田间发病症状; 2 分离菌株接种症状; 3 接种对照。

图 1 金荞麦叶斑病田间自然发病症状及分离菌株接种后症状

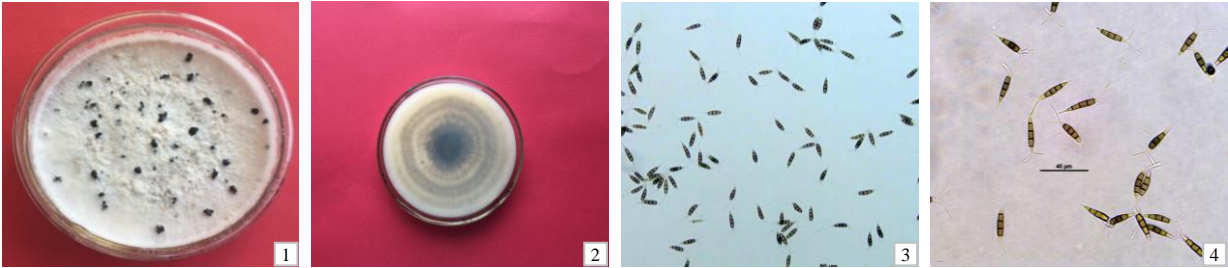
Fig. 1 Symptoms of leaf spot of *F. dibotrys* in field and symptoms inoculated with isolated strain

### 2.2 病原菌的鉴定结果

#### 2.2.1 病原菌菌株的孢子形态

菌株 GY3 在 PDA 培养基平板上生长较快, 25 °C 恒温培养 5 d 几乎长满培养皿(直径为 90 mm)。菌落呈近圆形, 气生菌丝浓密, 白色絮状, 15 d 后菌丝表面产生黑色墨汁状黏液, 排列松散, 不规则, 即为分生孢子堆(图 2-1)。菌落反面自中心至边缘呈颜色逐渐变浅的轮纹(图 2-2)。分

生孢子纺锤形, 直或略弯, 具 4 隔膜 5 细胞, 大小为(18.5~22.5)  $\mu\text{m}$   $\times$  (5.5~7.0)  $\mu\text{m}$ , 中间 3 个细胞呈淡褐色, 顶端细胞和基部细胞呈圆锥形, 无色透明, 成熟孢子顶端细胞着生 2~4 根无色附属丝, 多数着生 2 根附属丝, 长 12.5~27.0  $\mu\text{m}$ , 基部细胞具尾毛 1 根, 为短小的中生式短柄, 长 2.5~6.5  $\mu\text{m}$ (图 2-3、图 2-4)。根据 GY3 的菌落及孢子形态特征, 初步鉴定为拟盘多毛孢属(*Pestalotiopsis*)真菌。



1 菌落正面; 2 菌落反面; 3 分生孢子; 4 分生孢子。

图 2 金荞麦叶斑病菌株 GY3 的形态

Fig. 2 Morphological characteristics of strain GY3 causing leaf spot of *F. dibotrys*

2. 2. 2 病原菌菌株的分子生物学鉴定结果

菌株 GY3 的 ITS、*TUB2* 序列长度分别为 602、755 bp, 将测序结果在 NCBI 上进行 BLAST 比对, 利用 MEGA-6.06 对菌株 GY3 及参考菌株的联合序列进行系统发育分析。结果显示, GY3

与小孢拟盘多毛孢的 2 个菌株(ZK1-1、ZK5-5)聚在同一分支, 置信度为 100%(图 3)。综合 GY3 的致病性测定结果、孢子形态特征及 ITS、*TUB2* 序列联合分析, 将菌株 GY3 鉴定为拟盘多毛孢属小孢拟盘多毛孢(*P. microspora*)。

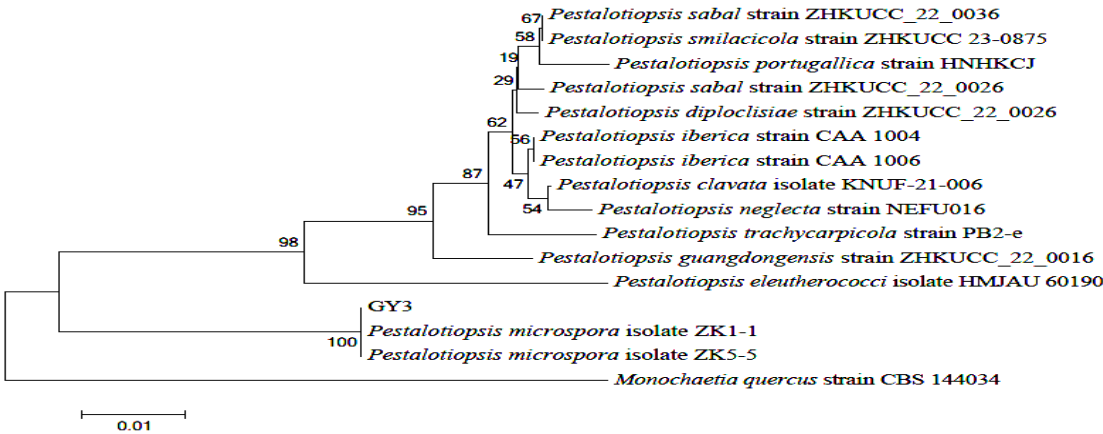


图 3 基于 ITS 和 *TUB2* 序列的金荞麦叶斑病原菌的系统发育树

Fig. 3 Phylogenetic tree of the pathogen based on ITS and *TUB2* sequences

2.3 病原菌的生物学特性

2. 3. 1 培养基对病原菌菌丝生长的影响

GY3 菌丝在 PDA 培养基上生长最快, 培养 2、5 d 的平均菌落直径分别达 35.40、89.03 mm, 菌落呈白色, 近圆形, 菌丝致密; 菌丝在 CMA、

Czapek 培养基上生长较慢, 菌落均为白色, 不规则, 菌丝较稀薄; 菌丝在 OMA 培养基上生长最慢, 培养 2、5 d 的菌落平均直径分别为 18.94、52.13 mm(表 1), 菌落呈白色, 不规则, 菌丝稀薄。结果表明, PDA 是 GY3 菌丝生长的最适培养基。

表 1 病原菌 GY3 在不同培养基上的菌落直径及形态

Table 1 Colony diameter and colony morphology of pathogenic strain GY3 on different media			
培养基	菌落直径/mm		菌落形态
	第 2 天	第 5 天	
PDA	(35.40±1.15)aA	(89.03±2.16)aA	菌落呈白色, 近圆形, 菌丝致密
PSA	(32.38±0.98)bB	(74.81±5.62)bB	菌落呈白色, 近圆形, 菌丝致密
CA	(24.09±1.19)cC	(55.56±2.32)cC	菌落呈白色, 近圆形, 菌丝较密
CMA	(22.85±0.51)cC	(55.08±0.50)cC	菌落呈白色, 不规则, 菌丝较稀薄
Czapek	(19.30±3.60)dD	(53.03±8.54)cCD	菌落呈白色, 不规则, 菌丝较稀薄
OMA	(18.94±0.59)dD	(52.13±3.29)cCD	菌落呈白色, 不规则, 菌丝稀薄

同列不同字母表示培养基间的差异有统计学意义( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ )。

2.3.2 pH 对病原菌菌丝生长的影响

将 GY3 菌丝接种于不同 pH 值的 PDA 培养基上培养,发现 pH 7 时菌丝生长最快,培养 2、5 d 的平均菌落直径分别为 29.21、76.28 mm,生长明显快于其他处理,菌落呈白色,近圆形,菌丝致

密;菌丝在 pH 5、8、6、9 时生长较快,菌落均为白色,近圆形,菌丝致密。在 pH 12 时,菌丝生长最慢,培养 2、5 d 的平均菌落直径分别为 22.20、53.53 mm,菌落呈白色,近圆形,菌丝较密(表 2)。由此看来,pH7 是 GY3 菌丝生长最适 pH。

表 2 病原菌 GY3 在不同 pH 下的菌落直径及形态

Table 2 Colony diameter and colony morphology of pathogenic strain GY3 under different pH conditions			
pH	菌落直径/mm		菌落形态
	第 2 天	第 5 天	
7	(29.21±1.20)aA	(76.28±0.81)aA	菌落呈白色,近圆形,菌丝致密
5	(29.09±1.34)aA	(71.21±6.70)abAB	菌落呈白色,近圆形,菌丝致密
8	(28.90±0.53)abA	(70.69±16.36)abAB	菌落呈白色,近圆形,菌丝致密
6	(28.89±1.16)abA	(69.65±0.93)abAB	菌落呈白色,近圆形,菌丝致密
9	(28.04±0.60)abcAB	(69.53±7.51)abAB	菌落呈白色,近圆形,菌丝致密
10	(27.54±1.43)bcAB	(63.29±7.11)bcABC	菌落呈白色,近圆形,菌丝致密
11	(26.76±0.87)cBC	(61.60±3.01)bcBC	菌落呈白色,近圆形,菌丝致密
4	(25.31±1.27)dC	(57.51±8.85)cBC	菌落呈白色,近圆形,菌丝致密
12	(22.20±0.59)eD	(53.53±1.79)cC	菌落呈白色,近圆形,菌丝较密

同列不同字母表示不同 pH 间的差异有统计学意义( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ )。

2.3.3 温度对病原菌菌丝生长的影响

GY3 菌丝在 25 °C 时生长最快,培养 2、5 d 的平均菌落直径分别为 31.86、74.79 mm,与其他温度处理存在显著差异,菌落呈白色,近圆形,菌丝致密,因此菌丝生长的最适温度为 25 °C。菌丝在 20 °C 时生长较快,菌落为白色,近圆形,菌丝致密。菌丝在 10 °C 时生长慢,菌落小,白色,

不规则,菌丝稀薄。在 35、5 °C 时菌丝未生长(表 3)。致死温度试验表明,菌丝块在 49 °C 及其以下温度水浴处理 10 min,置于 25 °C 恒温培养 5 d,可见菌丝生长,菌丝块在 50 °C 及其以上温度水浴处理 10 min,置于 25 °C 恒温培养 10 d,未见菌丝生长,因此菌丝的致死温度为 50 °C(水浴 10 min)。

表 3 病原菌 GY3 在不同温度下的菌落直径及形态

Table 3 Colony diameter and colony morphology of pathogenic strain GY3 under different temperature conditions			
温度/°C	菌落直径/mm		菌落形态
	第 2 天	第 5 天	
25	(31.86±0.82)aA	(74.79±4.38)aA	菌落呈白色,近圆形,菌丝致密
20	(30.55±1.53)ba	(67.16±0.77)bB	菌落呈白色,近圆形,菌丝致密
28	(27.94±0.52)cB	(55.33±4.47)cC	菌落呈白色,近圆形,菌丝致密
15	(23.71±0.41)dC	(50.31±1.05)dD	菌落呈白色,不规则,菌丝稀薄
30	(13.21±3.61)eD	(30.66±1.70)eE	菌落小,呈白色,近圆形,菌丝致密
10	(7.52±2.46)fE	(18.00±1.57)fF	菌落小,呈白色,不规则,菌丝较稀薄
35	(5.00±0.00)fE	(5.00±0.00)gG	菌丝未生长
5	(5.00±0.00)fE	(5.00±0.00)gG	菌丝未生长

同列不同字母表示不同温度间的差异有统计学意义( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ )。

2.3.4 光照方式对病原菌菌丝生长的影响

将 GY3 菌丝接种于 PDA 培养基上,在不同光照方式下培养,发现菌丝在连续光照下生长最快,培养 2、5 d 的平均菌落直径分别为 35.56、

77.52 mm;菌丝在光暗交替条件下菌丝生长最慢,培养 2、5 d 的平均菌落直径分别为 34.00、65.04 mm(表 4),3 种光照方式的菌落均为白色,近圆形,菌丝致密。由此说明连续光照最利于菌丝生长。



表 4 病原菌 GY3 在不同光照方式下的菌落直径及形态

光照方式	菌落直径/mm		菌落形态
	第 2 天	第 5 天	
连续光照	35.56±0.73	(77.52±8.91)aA	菌落呈白色, 近圆形, 菌丝致密
连续黑暗	34.72±1.82	(68.62±5.54)abA	菌落呈白色, 近圆形, 菌丝致密
光暗交替	34.00±1.02	(65.04±9.05)bA	菌落呈白色, 近圆形, 菌丝致密

同列不同字母表示不同光照间的差异有统计学意义( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ )。

2.3.5 碳源对病原菌菌丝生长的影响

观察 GY3 菌丝在不同碳源培养基上的生长情况, 发现菌丝在以葡萄糖为碳源的培养基上生长最快, 培养 2、5 d 的平均菌落直径分别为 20.75、57.96 mm, 菌落呈白色, 近圆形, 菌丝致密; 菌丝在以甘露糖为碳源的培养基上生长较快, 菌落

呈白色, 不规则, 菌丝较密; 以木糖为碳源的培养基最不宜菌丝生长, 培养 2、5 d 的平均菌落直径分别为 13.78、25.42 mm, 菌落小, 白色, 不规则, 菌丝较密(表 5)。由此说明葡萄糖为菌丝生长的最适碳源。

表 5 病原菌 GY3 在不同碳源下的菌落直径及形态

碳源	菌落直径/mm		菌落形态
	第 2 天	第 5 天	
葡萄糖	(20.75±1.19)aA	(57.96±2.58)aA	菌落呈白色, 近圆形, 菌丝致密
甘露糖	(19.54±0.55)aAB	(52.72±1.82)bB	菌落呈白色, 不规则, 菌丝较密
麦芽糖	(19.24±0.46)bB	(48.31±0.72)cC	菌落呈白色, 不规则, 菌丝较密
蔗糖	(18.60±0.61)bBC	(44.67±3.70)dCD	菌落呈白色, 近圆形, 菌丝致密
乳糖	(18.05±0.78)bcBC	(44.09±0.60)deD	菌落呈白色, 近圆形, 菌丝稀薄
可溶性淀粉	(17.63±0.67)cD	(41.45±2.09)eD	菌落呈白色, 不规则, 菌丝较稀薄
木糖	(13.78±0.87)dE	(25.42±0.94)fE	菌落小, 呈白色, 不规则, 菌丝较密

同列不同字母表示不同碳源间的差异有统计学意义( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ )。

2.3.6 氮源对病原菌 GY3 菌丝生长的影响

观察 GY3 菌丝在不同氮源培养基上生长情况, 发现菌丝在以蛋白胨为氮源的培养基上生长最快, 培养 2、5 d 的平均菌落直径分别为 19.16、59.16 mm, 菌落呈白色, 近圆形, 菌丝致密; 其次, 菌丝在以牛肉浸膏、胱氨酸、硝酸钾为氮源

的培养基上生长较快, 牛肉浸膏处理的菌落形态与胱氨酸、硝酸钾处理的菌落形态存在差异; 菌丝在氯化铵为氮源的培养基上生长最慢, 培养 2、5 d 的平均菌落直径分别为 5.79、7.31 mm, 菌落呈白色, 近圆形, 菌丝较密; 以尿素为氮源的培养基未见菌丝生长(表 6), 因而蛋白胨为菌丝生长的最适氮源。

表 6 病原菌 GY3 在不同氮源条件下的菌落直径及形态

氮源	菌落直径/mm		菌落形态
	第 2 天	第 5 天	
蛋白胨	(19.16±1.92)aA	(59.16±7.01)aA	菌落呈白色, 近圆形, 菌丝致密
牛肉浸膏	(18.72±2.73)aA	(53.40±7.48)abAB	菌落呈白色, 不规则, 菌丝较密
胱氨酸	(17.83±5.94)aA	(45.95±3.74)bcBCD	菌落呈白色, 近圆形, 菌丝较密
硝酸钾	(13.47±2.12)abAB	(45.72±5.54)bcBCD	菌落呈白色, 近圆形, 菌丝稀薄
苯丙氨酸	(11.33±2.81)bB	(38.20±2.17)cdCD	菌落呈白色, 近圆形, 菌丝稀薄
硝酸钠	(10.57±6.59)bB	(34.40±15.40)dDE	菌落呈白色, 不规则, 菌丝较密
硫酸铵	(7.82±4.31)cC	(24.74±5.51)eE	菌落呈白色, 近圆形, 菌丝较稀薄
氯化铵	(5.79±1.23)dD	(7.31±6.69)fF	菌落呈白色, 近圆形, 菌丝较密
尿素	(5.00±0.00)eE	(5.00±0.00)fF	菌丝未生长

同列不同字母表示不同氮源间的差异有统计学意义( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ )。

### 3 结论与讨论

应用组织分离法对金荞麦叶斑病样品进行分离培养, 通过致病性测定获得代表性致病菌株 GY3。结合 GY3 的孢子形态学特征及其 ITS、*TUB2* 序列系统发育分析结果, 将金荞麦叶斑病的病原菌鉴定为小孢拟盘多毛孢(*P. microspora*)。

小孢拟盘多毛孢通过侵染植物的叶片、枝干、果实等诱发病害, 已报道的有红叶石楠叶斑病<sup>[8]</sup>、云南核桃叶枯病<sup>[9]</sup>、柑桔黄斑落叶病<sup>[10]</sup>、油茶叶枯病<sup>[11]</sup>、美国红枫褐斑病<sup>[12]</sup>、青脆李枯萎病<sup>[13]</sup>、‘恩科尔’果斑病<sup>[14]</sup>、山核桃果实黑斑病<sup>[15]</sup>等多种植物病害。

对金荞麦叶斑病病原菌菌株 GY3 进行生物学特性测定, 结果表明, 菌株 GY3 菌丝在不同培养基上生长存在差异, 菌丝生长的最适培养基为 PDA, 这与肖仲久等<sup>[16]</sup>对白术叶枯病病原菌小孢拟盘多毛孢的研究结果一致。GY3 菌丝生长的适宜 pH 为 5~9, 与朱轶慧等<sup>[8]</sup>发现的红叶石楠叶斑病病原适宜 pH 为 6~9 的结果较为相似。GY3 适宜生长的最适碳源为葡萄糖, 与陈全助等<sup>[17]</sup>对闽楠叶斑病病原菌菌株 ZZ-03 的研究结果相同。最适氮源为蛋白胨, 与红叶石楠叶斑病<sup>[8]</sup>、油茶叶枯病<sup>[11]</sup>及橄榄果腐病<sup>[18]</sup>病原菌的最适氮源一致, 但与闽楠叶斑病菌株 ZZ-03<sup>[17]</sup>、澳洲坚果叶斑病病原菌<sup>[19]</sup>的最适氮源有所不同, 这可能与病害发生的寄主、气候、海拔高度及病原菌的生理小种等的差异有关。温度对 GY3 菌丝生长有显著影响, 菌丝在 5、35 °C 时都不能生长, 提示可据此预测病害的发生、流行及消长变化情况。

#### 参考文献:

- [1] 邓蓉, 向清华, 王安娜, 等. 11 份野生金荞麦资源的性状表现与聚类分析[J]. 贵州农业科学, 2014, 42(4): 36–41.
- [2] 董元火, 高威, 荣一兵, 等. 湖北省利川市金荞麦群落的物种多样性及保护[J]. 江苏农业科学, 2014, 42(4): 190–191.
- [3] 彭勇, 孙载明, 肖培根. 金荞麦的研究与开发[J]. 中草药, 1996, 27(10): 629–631.
- [4] 顾亮亮, 黄晓燕, 李月, 等. 金荞麦发酵茶生产工艺条件的优化[J]. 贵州农业科学, 2014, 42(4): 169–171.
- [5] 秦银. 金荞麦高产栽培技术[J]. 现代农业科技, 2015, 1(14): 72–73.
- [6] 卢文洁, 罗志明, 李春花, 等. 云南省荞麦叶枯病病原菌鉴定及其生物学特性[J]. 植物保护学报, 2019, 46(5): 1065–1072.
- [7] MAHARACHCHIKUMBURA S S N, GUO L D, CAI L, et al. A multi-locus backbone tree for *Pestalotiopsis*, with a polyphasic characterization of 14 new species[J]. Fungal Diversity, 2012, 56(1): 95–129.
- [8] 朱轶慧, 刘玉军, 毕飞虎, 等. 红叶石楠叶斑病病原鉴定及其生物学特性研究[J]. 植物保护, 2021, 47(5): 210–215.
- [9] 樊炳君, 赵玉美, 陈俊珠, 等. 云南核桃叶枯病病原鉴定及其生物学特性[J]. 植物保护, 2020, 46(3): 123–130.
- [10] 覃旭, 邓明学, 谭有龙, 等. 柑桔黄斑落叶病病原菌鉴定[J]. 植物病理学报, 2017, 47(6): 855–858.
- [11] 牛晓庆, 陈良秋, 付登强, 等. 油茶叶枯病菌的鉴定及生物学特性研究[J]. 热带作物学报, 2013, 34(2): 352–357.
- [12] 崔朝宇, 王园秀, 蒋军喜, 等. 美国红枫褐斑病病原菌鉴定[J]. 林业科学, 2015, 51(10): 142–147.
- [13] 吴玉珠, 陈娜, 胡军华, 等. 青脆李枯萎病致病菌的分离鉴定及药剂筛选[J]. 湖南农业大学学报(自然科学版), 2022, 48(3): 298–304.
- [14] 吴望, 吴玉珠, 胡军华, 等. ‘恩科尔’果斑病主要致病菌的分离与鉴定及药剂筛选[J]. 果树学报, 2020, 37(11): 1723–1732.
- [15] 张传清, 徐志宏, 孙品雷, 等. 新病害——山核桃果实黑斑病病原菌的鉴定[J]. 植物保护, 2010, 36(4): 160–162.
- [16] 肖仲久, 李小霞. 白术叶枯病病原菌鉴定及其生物学特性研究[J]. 热带作物学报, 2013, 34(5): 973–977.
- [17] 陈全助, 金亚杰, 郭朦朦, 等. 闽楠叶斑病病原鉴定及其生物学特性测定[J]. 植物病理学报, 2018, 48(3): 313–323.
- [18] 陈南泉, 林河通, 陈艺晖, 等. 橄榄小孢拟盘多毛孢(*Pestalotiopsis microspora*)的生物学特性研究[J]. 保鲜与加工, 2016, 16(3): 5–10.
- [19] 卢雪敏, 詹儒林, 吴婧波, 等. 澳洲坚果叶斑病新病原及生物学特性[J]. 中国南方果树, 2018, 47(4): 7–12.

责任编辑: 罗慧敏

英文编辑: 罗维