

# 石榴枯萎病菌生物学特性研究\*

侯宗琼<sup>1</sup>, 肖翔<sup>2</sup>, 郑晓慧<sup>3\*\*</sup>

(1.昭觉县林业局,四川昭觉 616150;2.华南农业大学,广东广州 510642;3.西昌学院,四川西昌 615013)

**【摘要】**石榴枯萎病(Pomegranate wilt)为甘薯长喙壳(*Ceratocystis fimbriata* Ellis & Halsted)引起的一种真菌病害,是四川省攀西地区石榴上的一种新病害。对甘薯长喙壳菌的生物学特性研究结果表明:病原菌在供试甘薯葡萄糖琼脂(SPDA)、马铃薯葡萄糖琼脂、马铃薯葡萄糖琼脂(PDA)、玉米琼脂、石榴叶煎汁琼脂5种培养基中均能良好生长,而在查氏(Czapek)固体培养基和2%水琼脂培养基上不生长。能利用多种碳源,其中葡萄糖为最佳碳源。不同温度和pH对菌丝生长影响较大。菌丝在10~35℃范围内均能生长,最适温度为26℃,致死温度为50℃处理10min;菌丝生长的pH范围为3~6,最适pH为5。黑暗条件有利于病原菌菌丝的生长。

**【关键词】**石榴枯萎病;甘薯长喙壳;生物学特性

**【中图分类号】**S436.65 **【文献标识码】**A **【文章编号】**1673-1891(2013)02-0007-04

石榴(*Punica granatum* L.)属石榴科石榴属植物,原产于西域,汉代传入我国,现在世界很多国家和地区广泛栽种,我国除极寒地区外,均有栽培分布<sup>[1]</sup>。而四川攀西地区(主要包括凉山州的会理县、西昌市和攀枝花市仁和区)是全国最大的石榴产区,也是品质最好的产区之一。2009年,项目组在攀西地区发现了一种新的毁灭性病害,该病在石榴上表现为发病初期树干基部可见细微纵向开裂,少数枝条上的叶片黄化和萎蔫;发病中期树干不同高度可见梭状开裂斑,不连续,主要从根部逐渐沿茎干向上部呈逆时针螺旋式上升蔓延,这时发病树地上部叶片开始变黄、萎蔫,树梢部位开始落叶;木质部被病原菌侵染而变色,树干横截面可见放射状暗红色、紫褐色到深褐色或黑色“V”字形或发散状病斑,发病后期树干基部病斑宽度可达树干周长的1/2以上,叶片全部凋落,枝条枯萎或整树枯死。重病果园病株高达30%~40%,并扩展蔓延迅速,经项目组鉴定为由甘薯长喙壳(*Ceratocystis fimbriata* Ellis & Halsted)引起的石榴枯萎病<sup>[5,14]</sup>。该病害最早于1990年在印度Karnataka地区被发现<sup>[2]</sup>,之后于1999年在中国云南蒙自县发生该病<sup>[3]</sup>,并造成石榴产区大面积绝收,成为当地石榴生产中的一种毁灭性病害<sup>[3,4]</sup>。

国内李倩等对分离自云南蒙自的*Ceratocystis fimbriata*菌株研究进行过生物学特性研究<sup>[12]</sup>,本文就攀西地区采集并分离出的*Ceratocystis fimbriata*菌株的生物学特性进行了研究,旨在为攀西地区石榴枯萎病的防治提供理论基础,以保证攀西地区石榴产业的可持续发展。

## 1 材料与方法

### 1.1 供试材料与设备

供试菌株:甘薯长喙壳菌,采自四川省攀枝花市仁和区的石榴种植区,并由本实验室分离并保存。

仪器设备:光学显微镜(OLYMPUS B70404);数码显微摄像系统(Motic BA300);单人净化工作台(SW-CJ-1D);小天鹅电冰箱(BCD-220WA);恒温恒湿培养箱(LRH-250-S);载玻片;锥形瓶;培养皿;试管;接种环;打孔器等。

### 1.2 甘薯长喙壳菌落性状及形态学观察

将供试菌株置于PDA培养基、25℃、黑暗条件下活化3次后,用直径7mm灭菌打孔器于菌落边缘打取菌饼,转接至PDA培养基平板中央,并于25℃黑暗条件下培养,7d后对病原菌进行形态学观察,并记录拍照。

### 1.3 不同培养基对甘薯长喙壳菌丝生长的影响

供试培养基为马铃薯葡萄糖琼脂培养基(马铃薯200g,葡萄糖20g,琼脂20g,蒸馏水1000mL);甘薯葡萄糖琼脂培养基(甘薯200g,葡萄糖20g,琼脂20g,蒸馏水1000mL);甘薯马铃薯葡萄糖琼脂培养基(甘薯100g,马铃薯100g,葡萄糖20g,琼脂20g,蒸馏水1000mL);玉米琼脂培养基(玉米粉300g,琼脂17g,蒸馏水1000mL);石榴叶煎汁琼脂培养基(石榴叶200g,琼脂20g,蒸馏水1000mL);查氏(Czapek)固体培养基(硝酸钾2g,磷酸氢二钾1g,氯化钾0.5g,硫酸镁0.5g,硫酸亚铁0.01g,蔗糖30g,琼脂17g),并以2%水琼脂培养基(琼脂20g,清水1000ml)作对照。各培养基做3个平板重复,用直径7mm的灭菌打孔

收稿日期:2013-05-07

\*基金项目:国家现代农业产业体系四川省创新团队攀西特色水果病虫害防治岗位基金。

作者简介:侯宗琼(1969-),女,林业工程师,主要从事林业植物保护工作。\*\*为通讯作者。

器在培养7d后的菌落边缘打取菌饼,分别接种于7种培养基上,置于24℃恒温箱中培养,观察并记录菌落的生长情况,并于6d后用十字交叉法测量菌落直径。试验结果用方差分析法比较各处理之间的差异显著性。

#### 1.4 不同碳源对甘薯长喙壳菌丝生长的影响

以马铃薯葡萄糖琼脂培养基为基础培养基,并以该培养基中葡萄糖为碳源的含碳量为标准,分别以甘露醇、蔗糖、可溶性淀粉、麦芽糖替换葡萄糖,配置成含有不同碳源的培养基,并制成平板,每种处理设置3种重复,另以不含碳源的马铃薯琼脂培养基为对照。用直径7mm的灭菌打孔器在培养7d后的菌落边缘打取菌饼,接种于平板中央,置于25℃恒温箱中培养7d,观察并记录菌落的生长情况,7d后用十字交叉法测量菌落的直径。试验结果采用方差分析法比较各处理之间的差异显著性。

#### 1.5 不同温度对甘薯长喙壳菌丝生长的影响

用直径7mm的灭菌打孔器在培养7d后的菌落边缘打取菌饼,分别接种于马铃薯葡萄糖琼脂平板中央,置于5、10、15、20、24、25、26、28、30、35℃恒温培养箱中培养6天,每个处理设3个重复,6d后用十字交叉法测量菌落的直径。试验结果采用方差分析法比较各处理之间的差异显著性。

#### 1.6 不同光照时间对甘薯长喙壳菌丝生长的影响

用直径7mm的灭菌打孔器在培养7d后的菌落边缘打取菌饼,分别接种于马铃薯葡萄糖琼脂平板中央,置于3种光照条件下(a.连续黑暗 b.12h光暗交替 c.连续光照)的25℃恒温培养箱中培养6d,每个处理设3个重复,6d后用十字交叉法测量菌落的直径。试验结果采用方差分析法比较各处理之间的差异显著性。

#### 1.7 不同PH对甘薯长喙壳菌丝生长的影响

在无菌操作条件下,用柠檬酸和磷酸氢二钠分别配制成供试pH为3、4、5、6、7和8的6种缓冲溶液(浓度加倍)<sup>[9]</sup>。马铃薯葡萄糖琼脂培养基(浓度加倍)常规灭菌,将二者等体积混合并倒置成平板,每种处理设3个重复。用直径7mm的灭菌打孔器在培养7d后的菌落边缘打取菌饼,并接种于平板中央,置于25℃恒温箱中培养6d,6d后用十字交叉法测量菌落的直径。试验结果采用方差分析法比较各处理之间的差异显著性。

#### 1.8 甘薯长喙壳菌丝的致死温度

用7mm的打孔器在培养7d后的菌落边缘打取菌饼,分装于6支灭菌后的试管中,每个试管放3个

菌饼,并分别将6支试管置于35、40、45、50、55、60℃的恒温水浴锅中处理10min(处理过程中缓慢摇动试管,使其受热均匀)后迅速冷却。将菌饼取出放在PDA平板中央,置于25℃恒温箱中培养,3d后观察菌落生长情况。得到致死温度大致范围后,再以1℃为温度梯度,按照上述方法处理,3d后观察菌落生长。

## 2 结果与分析

### 2.1 甘薯长喙壳菌落性状及形态学观察

甘薯长喙壳菌于马铃薯葡萄糖琼脂培养基上培养24h后长出少量无色菌丝,48h后菌落中间部分菌丝深入培养基内生长,颜色变为墨绿色。培养72h后基内菌丝颜色变为褐色且生长茂密,菌落颜色从边缘至中心逐渐变深,由无色到墨绿色,再到深褐色,并产生少量子囊壳。培养7d后,菌落直径约为培养皿1/2,呈圆形生长,同时产生较多子囊壳,部分长喙上有少量黄色粘状物(图1-A)。培养14d后,菌落长满培养皿,菌丝为深褐色,产生大量子囊壳并有大量黄色粘状物流出(图1-B)。

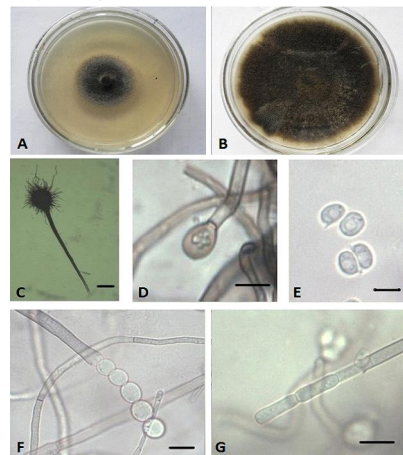


图1 甘薯长喙壳菌落性状及形态学特征

A: 培养1周后的菌落性状; B: 培养2周后的菌落性状; C: 子囊壳(ascogonium base. Scale bar = 100  $\mu$  m); D: 子囊孢子(ascospore. Scale bar = 5  $\mu$  m); E: 厚垣孢子(chlamydospores. Scale bar = 10  $\mu$  m); F: 桶形分生孢子(barrel-shaped conidia. Scale bar = 10  $\mu$  m); G: 圆柱形内生分生孢子(cylindrical conidia. Scale bar = 10  $\mu$  m)

### 2.2 不同温度对甘薯长喙壳菌丝生长的影响

测定结果表明,不同温度对菌丝生长影响差异较大。菌丝生长的适宜温度范围为20~30℃,最适生长温度为26℃,培养6d后菌落的平均直径达4.68cm。当温度低于15℃或高于30℃时菌丝的生长速度缓慢。5℃时菌丝生长速度几乎为零,35℃时菌落平均直径仅为1.47cm(图2)。

表1 不同培养基及不同碳源对甘薯长喙壳菌丝生长的影响

培养基	菌落直径(cm)	菌落形状	菌落质地	碳源	菌落直径(cm)	菌落形状	菌落质地
甘薯葡萄糖琼脂培养基	4.15 ± 0.10a	不均匀发散状	稀疏	葡萄糖	5.32 ± 0.09a	圆形	致密
甘薯马铃薯葡萄糖琼脂培养基	3.98 ± 0.11a	圆形	致密	蔗糖	4.98 ± 0.02b	不均匀发散状	致密
马铃薯葡萄糖琼脂培养基	3.63 ± 0.02b	圆形	致密	甘露醇	4.58 ± 0.07c	圆形	致密
玉米琼脂培养基	3.42 ± 0.12bc	圆形	稀疏	可溶性淀粉	4.48 ± 0.12c	圆形	致密
石榴叶煎汁琼脂培养基	3.37 ± 0.07c	圆形	稀疏	麦芽糖	4.40 ± 0.08c	圆形	稀疏
查氏固体培养基	0.70 ± 0.00d	无	无	CK	4.10 ± 0.08c	圆形	稀疏
清水琼脂培养基	0.70 ± 0.00d	无	无				

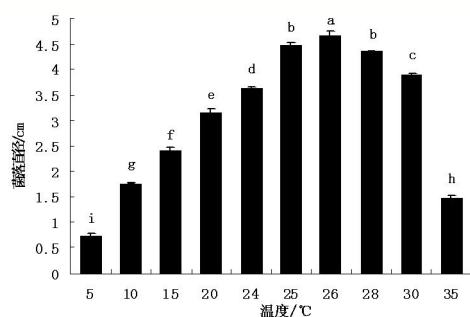


图2 不同温度对甘薯长喙壳菌丝生长的影响

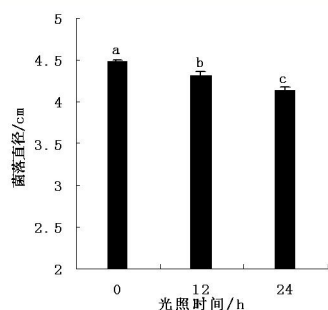


图3 不同光照对甘薯长喙壳菌丝生长的影响

### 2.3 不同光照时间对甘薯长喙壳菌丝生长的影响

菌丝在不同光照条件下生长差异较大(图3),连续黑暗条件下最适宜甘薯长喙壳菌丝生长,菌落平均直径达4.48cm;而在连续光照条件下生长相对较差,菌落平均直径为4.13cm。

表2 甘薯长喙壳菌丝的致死温度

生长时间/h	测试温度/°C							
	40°C	45°C	48°C	49°C	50°C	51°C	52°C	55°C
24h	+	+	+	+	-	-	-	-
48h	+	+	+	+	-	-	-	-
72h	+	+	+	+	-	-	-	-

注:“+”表示菌落生长,“-”表示菌落无生长。

## 3 结论与讨论

已有研究表明,甘薯长喙壳菌表现出显著的地理差异与遗传多样性<sup>[10,11]</sup>。因此,对不同地区来源的菌株进行生物学特性研究具有重要意义。2008年,李倩等<sup>[12]</sup>报道了来自云南蒙自地区石榴

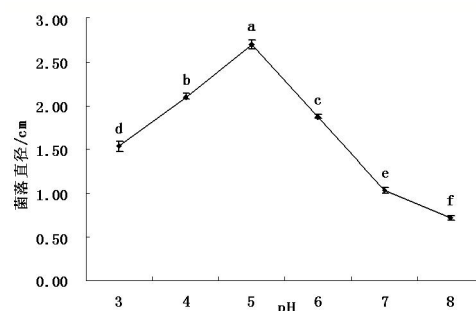


图4 不同pH对甘薯长喙壳菌丝生长的影响

### 2.4 不同pH对甘薯长喙壳菌丝生长的影响

不同pH对菌丝生长影响较大。可以在pH3~6范围内生长,pH3~5时菌丝的生长速度逐渐增大。pH为5时菌丝生长最好,菌落的平均直径为2.70cm。pH超过5时,随着pH的升高,菌丝的生长速度逐渐变小。pH达到7时,菌丝生长缓慢,至pH为8时,菌丝仅微量生长(图4)。

### 2.5 甘薯长喙壳菌丝的致死温度

菌丝在35°C、40°C、45°C水浴锅中处理10min后仍可继续生长,而在50°C、55°C、60°C水浴锅中处理10min后均不再生长,由此可知病菌菌丝致死温度范围在45°C~50°C。再以1°C为梯度进行水浴加热处理,用上述方法得到试验结果,由此表明该菌丝致死温度为50°C处理10min(表2)。

上的甘薯长喙壳菌的生物学特性:在马铃薯葡萄糖琼脂培养基上呈放射状生长,菌落边缘不规则,菌落为深绿色;菌丝在甘薯葡萄糖琼脂培养基上生长最快,但菌丝较稀疏;黑暗条件更适于菌丝生长;菌丝的最适生长温度为25°C,低于5°C或高于

36℃ 菌丝不生长;菌丝于 pH4~12 范围内均能生长,最适 pH 为 6;致死温度为 50℃ 处理 5min 或 48℃ 处理 10min。

而本试验结果表明来自攀枝花仁和地区石榴上的甘薯长喙壳菌在多种培养基上均能良好生长,以 SPDA 培养基、甘薯马铃薯培养基和 PDA 培养基最为适合。菌丝在不同光照下均能较好生长,尤其在黑暗条件下最佳。菌丝生长的适宜温度范围在 20~30℃,高于 35℃ 或低于 5℃ 都不利于菌丝的生长。这些与李倩等研究结果一致。但本试验结果还表明:攀西地区菌株在多数培养基上呈圆形生长,最适温度为 26℃,最适 pH 值为 5,致死温度为 50℃ 处理 10min;而云南地区菌株多呈放射状生长,最适温度为 25℃,最适 pH 值为 6,致死温度为 50℃ 处理 5min 或 48℃ 处理 10min。

另外,病菌的适宜温度在 20~30℃,低于 15℃ 或

高于 30℃ 时菌丝生长缓慢,中国仅云南蒙自县和四川攀西地区发现此病害,而这些地方气候都适宜该病原菌的生长及越冬。本试验表明,来自攀枝花仁和地区石榴上的甘薯长喙壳菌最适 pH 为 5,较李倩等人所测定结果存在一定差异。本试验通过加入 pH 缓冲液来调节培养基 pH,而李倩等人是通过加入 NaOH 和 HCl 来调节培养基 pH,该方法缺点在于培养基 pH 可能由于微生物生长过程中产生的酸性或碱性物质改变培养基 pH,而导致实验数据有较大误差<sup>[9]</sup>,因而本实验因采用缓冲液来调节培养基 pH,数据的准确性更高。但本试验中,菌落的生长量远低于不加缓冲溶液中菌落的生长量,且甘薯长喙壳菌在查氏培养基上不生长,这可能是由于无机养分不能被该菌有效利用,甚至抑制其生长,但该结论仍需通过试验进一步验证,而测定最适 pH 还有待寻找一种更为合适的方法。

#### 注释及参考文献:

- [1]李保印.石榴[M].北京:中国林业出版社,2004:3-4.
- [2]Somasekhara Y M. New record of *Ceratocystis fimbriata* causing wilt of pomegranate in India[J].Plant Disease,1999,83:400.
- [3]黄琼,卢文洁,范金祥,等.云南发现石榴枯萎病[J].植物病理学报,2004(1):95-96.
- [4]刘云龙,何永宏,王新志.国内一种果树新病害—石榴枯萎病[J].植物检疫,2003,17(4):206-208.
- [5]B.Xu, X.H.Zheng, W.X.Guo, X.P.Zhou, and P.He. First Report of Pomegranate Wilt Caused by *Ceratocystis fimbriata* in Sichuan Province[J].Plant Disease,2011:776.
- [6]CAB International.*Ceratocystis fimbriata* [original text prepared by Baker CJ and Harrington TC].In:Crop Protection Compendium,2001,CAB International, Wallingford, UK.
- [7]刘云龙,何永宏,王新志.甘薯长喙壳—危害多种作物广泛分布的病原体[J].云南农业大学学报,2003,18(4):408-412.
- [8]Van Wyk M, Al-Adawi A O, Khan I A, et al. *Ceratocystis manginecans* sp. nov, causal agent of a destructive mango wilt disease in Oman and Pakistan[J].Fungal Diversity,2007:213-230.
- [9]方中达.植病研究方法[M].北京:中国农业出版社,1998:46-47,326-336.
- [10]Johnson J A, Harrington T C. Phylogeny and taxonomy of the North American clade of the *Ceratocystis fimbriata* complex [J].Mycologia,2005,97(5):1067-1092.
- [11]Van Wyk M, Al-Adawi A O, Wingfield, B D, et al. DNA based characterization of *Ceratocystis fimbriata* isolates associated with mango decline in Oman[J].Australasian Plant Pathology,2005,34:587-590.
- [12]李倩,邓吉,杨敏,等.引起石榴枯萎病和甘薯黑斑病的甘薯长喙壳菌菌株生物学特性的比较研究[J].菌物学报,2009,28(2):189-196.
- [13]Somasekhara YM, Wali SY.Survey of incidence of pomegranate (*Punica granatum* Linn) wilt (*Ceratocystis fimbriata* Ell & Halst.)[J].Orissa Journal of Horticulture,2000,28:84-89.
- [14]郑晓慧,徐彪,何平,等.四川石榴枯萎病的病原菌[J].菌物学报,2012,31(4):523-530.

## Research on the Biological Characteristics of Pomegranate Wilt

HOU Zong-qiong<sup>1</sup>, XIAO Xiang<sup>2</sup>, ZHENG Xiao-hui<sup>3</sup>

(1.Forestry Bureau of Zhaojue County, Zhaojue, Sichuan 616150;

2.South China Agricultural University, Guangzhou, Guangdong 510642;

3.Xichang College, Xichang, Sichuan 615013)

**Abstract:** Pomegranate wilt is a fungal disease caused by *Ceratocystis fimbriata*, which was a new disease  
(下转 15 页)

**注释及参考文献:**

- [1]王利亚,孙茂林,杨艳丽,等.云南马铃薯晚疫病区域性流行学的研究[J].西南农业学报,2005,18(2):157-162.
- [2]张厚桐.春季马铃薯晚疫病的气象因素分析[J].山东气象,2002,22(2):12-13.
- [3]谭宗九,王文泽,丁明亚,等.气象因素对马铃薯晚疫病发生流行的影响[J].中国马铃薯,2001,15(2):96-98.
- [4]丁俊杰,郑天琪,马淑梅,等.马铃薯晚疫病发生因素研究[J].中国农学通报,2005,21(2):253-255.
- [5]陈淑华,侯琼.乌盟地区马铃薯晚疫病滋生和蔓延的气象条件分析及预报模式的建立[J].中国马铃薯,2002,16(5):281-284.
- [6]陈琳,费永成,亢继林,等.成都市2009年小麦条锈病特重发生的气候特征[J].高原山地气象研究,2010,30(1):50-3.

## The Climate Characteristics of the Popular Occurrence of Potato Late Blight Epidemic, Liangshan Prefecture in 2012

ZHU Hong-xiu<sup>1</sup>, CAO Yan-qiu<sup>2</sup>, FANG Peng<sup>2</sup>

(1.Mianning Meteorological Bureau, Manning, Sichuan 615600;

2.Liangshan Bureau of Meteorology, Xichang, Sichuan 615000)

**Abstract:** In this paper, we analyze the ecological environment of spring potato late blight from the aspects of the climate characteristics of potato late blight popular occurrence under the background of the existence of the spring potato late blight in Liangshan Prefecture in 2012. The climate characteristics include the warm, cool climate and the rainy, humid season in early summer. We find out the regulation of popular late blight and analyze it in this paper. The epidemic of potato late blight occurrence happens from the middle of May to early July. If the rainy weather reaches 4 days or continuous rainfall continues for more than 3 days, the daily average air relative humidity over 75% lasting 4 to 5 days, late blight epidemic will occur. The conclusion can be used as a warning indicator to prevent and control potato late blight in Liangshan Prefecture in spring, and it also can provide the scientific evidence for the prevention of late spring potato blight epidemic.

**Key words:** Late spring potato blight epidemic; Popular occurrence; The climate characteristics

(上接10页)

devastated in Sichuan Panzihua-Xichang area. The biological characteristics of *C. fimbriata* were studied. The results showed that the mycelia could grow well in sweet potato dextrose agar (SPDA), sweet potato and potato dextrose agar, potato dextrose agar (PDA), corn meal agar and pomegranate leaf juice culture media, but never in the Czapek culture media or 2% water agar culture media. *C. fimbriata* could utilize carbon sources, and dextrose was the optimum. The mycelial growth was impacted by different temperature and pH. The temperature for mycelial growth ranged from 10°C to 35°C, the optimum temperature was 26°C and the lethal temperature of the mycelium was 50°C for 10 minutes. The mycelia could grow from pH3 to pH6, and pH5 was the optimum. The dark was suitable for mycelium growth.

**Key words:** Pomegranate wilt; *Ceratocystis fimbriata*; Biological characteristic