

柴胡斑枯病病原及其生物学特性

王艳, 晋玲, 曾翠云, 雒军, 朱田田

(甘肃中医药大学, 兰州 730000)

摘要 据 2011—2014 年调查, 甘肃省柴胡斑枯病发生严重, 常年发病率为 13%~21%, 严重度 1~2 级。本研究以形态学和分子生物学方法相结合, 明确了甘肃省柴胡斑枯病病原及其生物学特性。甘肃省柴胡斑枯病菌分生孢子器近球形或球形, 黑褐色, 高 66.4~90.2 μm , 平均 77.5 μm ; 直径 57.3~90.0 μm , 平均 70.5 μm 。分生孢子针形、无色, 有些稍弯曲, 具 1~3 隔膜, 大小 (13.0~26.0) μm \times (1.5~3.0) μm , 平均 19.0 μm \times 2.0 μm 。通过 ITS、LSU、RBP2 和 β -tubline 多基因位点构建系统发育树, 将柴胡斑枯病病原鉴定为柴胡壳针孢 *Septoria bupleuricola* Sacc.。该菌菌丝生长、分生孢子萌发和产孢的温度范围分别为 0~35 $^{\circ}\text{C}$ 、0~35 $^{\circ}\text{C}$ 、5~35 $^{\circ}\text{C}$, 最适温度分别为 20~25 $^{\circ}\text{C}$ 、15 $^{\circ}\text{C}$ 、10~15 $^{\circ}\text{C}$; 连续光照有利于菌丝生长、孢子萌发和病菌产孢; 菌丝生长、孢子萌发和产孢的适宜 pH 范围分别为 4.0~10.0、4.51~9.19 和 5.0~9.0, 最适 pH 分别为 5.0、6.49 和 5.5; 此菌在相对湿度 75% 以上可萌发, 以水中萌发最好; 柴胡叶或根浸液对孢子萌发有较强的促进作用。表明柴胡壳针孢菌丝生长和孢子萌发的适宜温度偏低, 因此该病害在气温偏低及持续阴雨结露条件下发生较重。

关键词 柴胡斑枯病; 形态学; 分子生物学; 病原鉴定; 生物学特性

中图分类号: S 435.67 文献标识码: A DOI: 10.3969/j.issn.0529-1542.2017.06.012

Pathogen identification and biological characteristics of leaf spot on *Bupleurum chinense*

Wang Yan, Jin Ling, Zeng Cuiyun, Luo Jun, Zhu Tian Tian

(Gansu University of Chinese Medicine, Lanzhou 730000, China)

Abstract During disease surveys on medicinal plants in Gansu Province in 2011—2014, we found that leaf spot on *Bupleurum chinense* DC. was a serious disease with 13%—21% disease incidence and 1—2 level of disease severity. Morphological and molecular methods were combined to identify and test the biological characteristics of the pathogen. The pycnidia of the pathogen was spherical or sub-spherical, 66.4—90.2 μm (mean: 77.5 μm) in height, 57.3—90.0 μm (mean: 70.5 μm) in diameter, conidia hyaline, needle, with 1—3 septates of (13.0—26.0) μm \times (1.5—3.0) μm (mean: 19.0 μm \times 2.0 μm) in size. Multi-locus phylogenetic analysis of the five loci: ITS, LSU, RBP2 and β -tubulin showed that the pathogen was *Septoria bupleuricola* Sacc. The temperature ranges of hypha growth, spore germination and production were 0—35, 0—35 and 5—35 $^{\circ}\text{C}$, respectively. The optimum temperatures were 20—25, 15 and 10—15 $^{\circ}\text{C}$, correspondingly. Continuous illumination facilitates hyphal growth, spore production and germination. The pH ranges of the hypha growth, spore germination and production were 4.0—10.0, 4.51—9.19 and 5.0—9.0, with the optimum values of 5.0, 6.49 and 5.5, respectively. The relative humidity for spore germination was above 75%. Spores germinated well in water. Root and leaf extracts stimulated spore germination. The optimum temperature for mycelium growth and spore germination of the pathogen was low, indicating that the disease might worsen under low-temperature, dewing and continuous rainy weather.

Key words *Bupleurum chinense* leaf-spot; morphology; multi-locus phylogeny; pathogen identification; biological characteristic

柴胡 *Bupleurum chinense* DC. 属伞形科多年生草本植物^[1], 为我国常用大宗药材, 始载于《神农本

草经》, 列为上品, 以根入药, 性味苦、微寒, 具疏散退热, 升阳, 舒肝等功效, 主治疟疾, 肝郁气滞, 胸肋胀

收稿日期: 2017-01-08

修订日期: 2017-03-03

基金项目: 国家自然科学基金(31460013); 甘肃省科技计划项目(1508RJ2A011); 甘肃省科技计划基础研究创新群体(1606RJIA323); 中央财政引导地方科技创新平台项目(2016-A-02)

联系方式 E-mail: gswangyan101@163.com

痛等症^[2]。主产于我国东北、华北、内蒙古、河南、陕西及甘肃等省区,多为野生^[3]。由于长期过度采挖,野生资源不能满足市场需要,中国从 20 世纪 80 年代初开始研究野生变家种试验^[4]。甘肃省是柴胡的道地产区之一,经调查,甘肃省定西市、陇南市以及河西地区均有大面积种植,仅定西市的陇西县柴胡种植面积就达到约 2 000 hm²,陇南一带的礼县、清水县,河西地区的金昌、天祝、武威等地种植规模也在 400 hm²,使甘肃的柴胡产量跃居全国之首^[5],2012 年甘肃柴胡种植面积达 19 090 hm²,年产量达 4.34 万 t,占全国的 50%^[6]。

但是随着栽培面积逐年增大,柴胡病害发生日趋严重,国内记载柴胡病害主要有斑枯病 *Septoria bupleuri* Sacc.^[7-9]、壳二孢叶斑病 *Ascochyta bupleuri* Thüm.^[9]、锈病 *Puccinia bupleuri* Rudolphi^[10]、根腐病 *Fusarium oxysporum* Schl.^[11]、*Rhizoctonia* sp.^[12]和链格孢叶斑病 *Alternaria alternata* (Fr.:Fr.) Keissl.^[13]。在 2011—2014 年甘肃省药用植物病害调查中,发现斑枯病是甘肃省柴胡生产中的主要病害,甘肃省定西地区陇西县、灵台县、渭源县、漳县及安定区都有发生,发病率平均 13%~21%,严重度 1~2 级^[12]。作为柴胡栽培过程中影响柴胡质量和产量的重要病害,国内仅对其病原进行了记载,但是对该病害的发生危害情况,病原的生物学特性及病害的防治措施等均无系统的研究报告。本研究旨在对该病的病原进行研究,测定其生物学特性,同时提出一定的防治建议,为柴胡规范化种植以及斑枯病的有效防治提供一定的科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料

供试菌种:2007 年 10 月采自甘肃中医药大学药材示范园的柴胡斑枯病新鲜标样,经分离培养后镜检确定为壳针孢属真菌 *Septoria* sp.,纯化后接种健康柴胡叶片发病的病菌,再次分离后,于 4℃下保存备用。

1.2 方法

1.2.1 病原形态观察

从采集的柴胡斑枯病病叶组织上挑取病原分生孢子器,置于载玻片上,以水为浮载剂,在光学显微镜下观察并测定分生孢子器 20 个,分生孢子 30 个,分别取最大值和最小值作为该指标的上限和下限,

同时观察菌株在 PDA、OA 和 MEA 培养基^[14]上,于 25℃下黑暗培养 20 d 的培养性状,并利用冷冻切片机对分生孢子器进行切片,观察分生孢子器内部结构,再参照相关资料^[7-9]鉴定病原。

1.2.2 病原菌 DNA 提取及系统发育树的构建

取在 PD 培养液中于 20℃、45 r/min 振荡培养 7 d 的柴胡斑枯病病原菌菌丝在液氮中研磨,用 UNIQ-10 柱式真菌基因组 DNA 抽提试剂盒(SK1375,上海生工)提取 DNA。ITS、LSU、RBP2 和 β -tubulin 4 个片段的 PCR 扩增分别采用引物 ITS1/ITS4、LROR/LRS5^[15]、fRPB2-5f/fRPB2-7cR^[16]、T1/ β -Sandy-R^[17-18]。50 μ L PCR 反应体系:10 \times PCR Buffer(含 MgCl₂ 20 mmol/L)5 μ L、dNTPs 10 mmol/L 0.5 μ L、10 μ mol/L 引物各 2.5 μ L、2 U/ μ L Taq 4 μ L、模板 DNA 2 μ L。PCR 扩增条件:95℃预变性 3 min;94℃变性 30 s,分别以 53℃(ITS、LSU),55℃(RBP2),52℃(β -tubulin)退火 45 s,72℃延伸 1 min,共 30 个循环;最后 72℃延伸 8 min,4℃保存。扩增产物用 1%的琼脂糖凝胶进行电泳,用凝胶成像仪进行观察并照相。PCR 产物委托生工生物工程(上海)股份有限公司进行纯化和测序。并用 BioEdit^[19]软件反复校对,去除两端不确定的序列后,在 GenBank 中进行 BLASTn 比较搜索,下载相似序列并进行多基因片段的拼接,选用 *Readeriella mirabilis* 作为外群(菌株号:CBS125000;ITS、LSU、RBP2 和 β -tublin 在 GenBank 登录号分别为:KF251332、KF251836、KF252335 和 KF252804)。MEGA 6.0 软件采用邻接法构建系统发育树。

1.2.3 柴胡斑枯病菌生物学特性测定

1.2.3.1 不同温度对菌丝生长、产孢量及孢子萌发的影响

在已培养 30 d 的菌落边缘打取直径为 7 mm 的菌饼接种于 PDA 平板上,分别置于 5、10、15、20、25、30、35℃温度下培养,每温度处理重复 3 皿。每隔 4 d 用十字交叉法测定菌落大小,20 d 后测定产孢量。孢子量测定采用血球计数板计数;孢子萌发采用悬滴培养,每温度处理重复 3 次,定时观察孢子萌发率,每重复观察计数 5 个视野约 300 个孢子,统计其萌发率。

1.2.3.2 不同光照对菌丝生长、产孢量及孢子萌发的影响

将菌饼接种于 PDA 平板上,置 25℃连续光照,光暗 12 h 交替及连续黑暗条件下培养;将孢子悬浮液于 20℃在上述光照条件下悬滴培养,其他同上。

1.2.3.3 不同 pH 对菌丝生长、产孢量及孢子萌发的影响

将菌饼接种于由 NaOH 和 HCl 调制的 pH 为 4.0、4.5、5.0、5.5、6.0、6.5、7.0、7.5、8.0、8.5、9.0、9.5、10.0 的 PDA 培养基平板上,25℃下培养;用柠檬酸-磷酸二氢钾缓冲液配制 pH 为 4.51、5.58、6.49、7.00、7.41、8.39、9.19 的孢子悬浮液,20℃下悬滴培养,其他同上。

1.2.3.4 不同湿度对孢子萌发的影响

将孢子悬浮液均匀涂抹于载玻片上,在室温下自然干燥,用小容器调节法,以硫酸控制相对湿度,湿度设置为 70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%、99.5%,以 100% 饱和湿度为对照,共 9 个处理,20℃下培养。其他同上。

1.2.3.5 不同营养条件对孢子萌发的影响

分别以尿素、马粪浸渍液、土壤浸渍液、葡萄糖、柴胡根浸液、柴胡叶浸液 1:5、1:10、1:20 稀释成孢子悬浮液,20℃下悬滴培养^[16],其他同上。

2 结果与分析

2.1 症状

病原菌主要危害叶片、茎秆。叶部产生直径为 1~2.5 mm 的近圆形、椭圆形、半圆形小病斑,边缘紫褐色,稍隆起,中部黄褐色、灰褐色,后变灰白色。叶片两面的病斑上均可产生黑色小颗粒,即病菌的分生孢子器。有些病斑自叶尖向下扩展呈“V”字形,有些沿叶缘发生,造成中脉一侧枯死。发病严重时,病斑相互汇合,引起叶片枯死。

2.2 病原

病原菌在 PDA 培养基上菌落灰白色至肉粉色,分生孢子器埋生在菌丝中,孢子量少,菌丝呈紫红色,菌丝壁较厚,产紫色色素,生长速度 0.73 mm/d(图 1a);在 OA 培养基上的培养性状同 PDA 培养基,生长速度:0.99 mm/d,有少量分生孢子器,似乎孢子还未成熟(图 1b);在 MEA 培养基上,菌落黑灰色,有大量的分生孢子器,孢子角肉粉色,生长速度 0.44 mm/d(图 1c)。

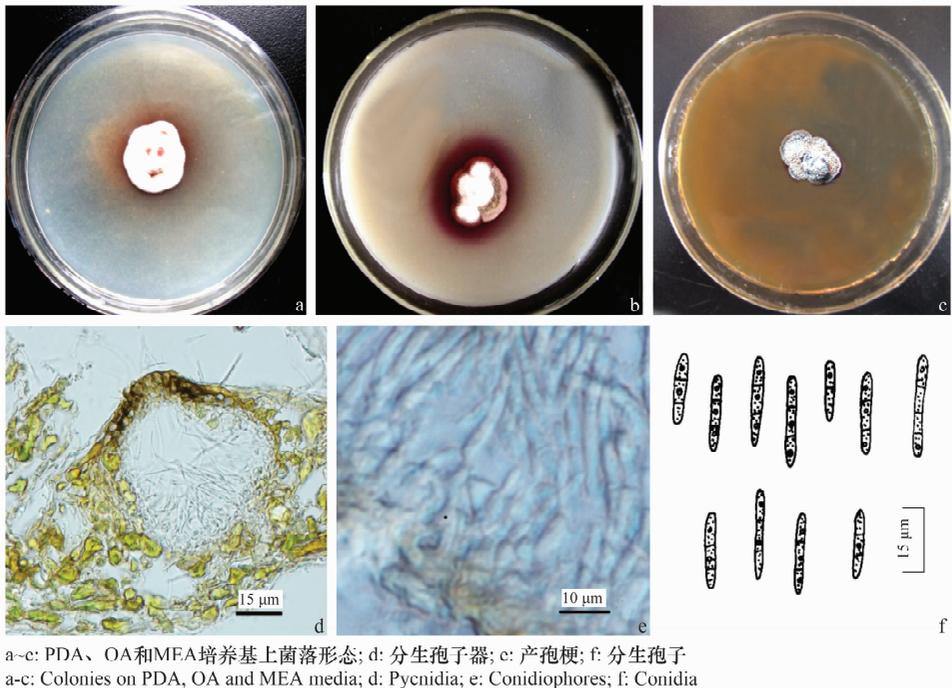


图 1 柴胡斑枯病菌菌落及微观形态

Fig. 1 Colonies and morphology of *Septoria bupleuricola*

挑取组织上病原并对分生孢子器切片观察,此菌分生孢子器近球形或球形,黑褐色,器壁由 1~2 层细胞构成,高 66.4~90.2 μm(平均 77.5 μm),直径 57.3~90.0 μm(平均 70.5 μm)(图 1d),外壁细胞黑褐色,内层淡褐色至无色,具圆形孔口,大小(10~

30.2) μm × (10~31.4) μm,平均 18 μm × 20.25 μm,孔口细胞壁明显增厚;分生孢子梗产生于内壁细胞,无色,大小为(1.5~5.0) μm × (1.0~3.0) μm,平均 2.7 μm × 2.8 μm(图 1e)。分生孢子针形、基部较圆,顶部较细,无色,有些稍弯曲,具 1~3 隔膜,大小

(13.0~26.0) $\mu\text{m}\times(1.5\sim3.0)\mu\text{m}$,平均19.0 $\mu\text{m}\times$ 2.0 μm (图1f)。此菌分生孢子两端和中间细胞均可萌发出无色芽管。经分离培养和从组织上挑取病原镜检,内有顺序排列的小油珠。该菌引起的病害在甘肃省干旱地区种植的柴胡上发生普遍,且较严重。

依据形态和培养特性,根据参考资料,将柴胡斑枯病菌鉴定为真菌界无性态真菌柴胡壳针孢 *Septoria bupleuricola* Sacc.。

2.3 柴胡斑枯病原系统发育分析

通过对 ITS、LSU、RBP2 和 β -tubulin 片段的扩增和测序,得到长度分别为 516、894、1 166 和 423 bp 的序列(登录号分别为:KC874675, KY798144, KY798146 和 KY798145)。用 BLASTn 在 GenBank 中搜索并下载同源序列,通过多基因片段拼接并构建系统发育树发现,菌株 TCM-5 与寄生于柴胡 *B. chinense* 的柴胡壳针孢 *S. bupleuricola* (菌株: CBS128601, CBS128603) 聚类在同一分支上(图 2),同时该菌株分生孢子 1~3 个隔膜,孢子大小为(15.3~38.8) $\mu\text{m}\times(0.9\sim1.2)\mu\text{m}$,与柴胡壳针孢 *S. bupleuricola* 相似,依据多基因序列片段和形态鉴定结果,将柴胡斑枯病菌 TCM-5 鉴定为柴胡壳针孢 *S. bupleuricola*。

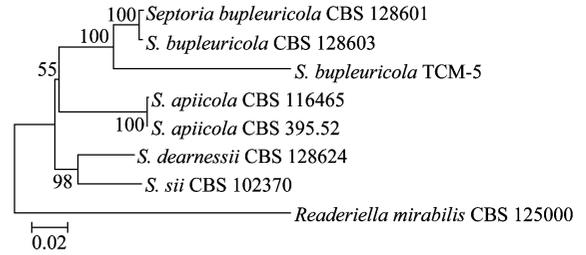


图 2 柴胡斑枯病菌多基因序列分析

Fig. 2 Phylogenetic tree of 8 strains based on a combined dataset of ITS, LSU, RPB2 and β -tubulin sequences

2.4 病原菌生物学特性

2.4.1 温度对菌丝生长,产孢和孢子萌发的影响

该菌在 0~35 $^{\circ}\text{C}$ 范围内均能生长,适宜温度为 20~25 $^{\circ}\text{C}$,但生长缓慢,5~25 $^{\circ}\text{C}$ 病菌的生长量随温度的升高而缓慢升高,低于 5 $^{\circ}\text{C}$ 或高于 30 $^{\circ}\text{C}$ 生长速率急剧下降,在 20 $^{\circ}\text{C}$ 下,生长速度最快,为 0.6 mm/d,20 d 时菌落直径 11.8 mm;而 35 $^{\circ}\text{C}$ 时急剧下降,20 d 菌落直径仅为 1.8 mm。这表明该菌生长极其缓慢,并且高温抑制该菌正常生长发育(表 1)。

该菌产孢温度范围较宽,在 5~35 $^{\circ}\text{C}$ 均能产孢,适宜温度为 10~15 $^{\circ}\text{C}$,产孢量分别为 18.1×10^4 个/ cm^2 和 18.5×10^4 个/ cm^2 ,与其他温度的产孢量存在极显著的差异。低于 5 $^{\circ}\text{C}$ 不产孢,高于 30 $^{\circ}\text{C}$ 产孢量急剧下降(表 1)。

表 1 不同温度对柴胡壳针孢菌丝生长、产孢量和孢子萌发的影响(20 d)¹⁾

Table 1 Colony diameters, spore production and germination rates of *Septoria bupleuricola* at different temperatures (20 d)

温度/ $^{\circ}\text{C}$ Temperature	菌落直径/mm Diameter of colony					产孢量/ $\times 10^4 \cdot (\text{cm}^2)^{-1}$ Yield of spores	孢子萌发率/% Germination rate						
	4 d	8 d	12 d	16 d	20 d		8 h	12 h	24 h	36 h	48 h	60 h	72 h
0	0.0	0.0	0.0	0.5	(1.3 \pm 1.2)e	(0.0 \pm 0.0)c	0.0	0.0	0.0	0.0	0.2	0.7	(1.2 \pm 0.8)e
5	0.0	0.0	0.5	0.8	(2.2 \pm 1.0)cde	(8.7 \pm 2.0)b	0.0	0.3	0.8	1.8	2.5	4.2	(5.7 \pm 1.0)e
10	0.0	0.2	1.2	1.5	(3.5 \pm 2.2)cd	(18.1 \pm 1.2)a	0.0	0.7	2.0	3.7	4.5	6.7	(8.8 \pm 1.2)cd
15	0.0	1.0	1.5	2.8	(4.0 \pm 2.1)bc	(18.5 \pm 3.0)a	0.8	7.8	12.3	19.7	31.5	34.0	(36.5 \pm 2.0)a
20	0.0	1.5	6.0	8.8	(11.8 \pm 3.2)a	(12.0 \pm 2.4)b	0.7	6.7	11.8	17.8	25.8	30.8	(36.2 \pm 2.0)a
25	0.0	1.7	4.8	8.2	(11.3 \pm 2.0)a	(4.0 \pm 1.2)c	0.0	3.2	9.3	13.7	16.3	24.8	(31.2 \pm 3.2)a
30	0.0	0.3	1.8	4.5	(5.7 \pm 1.0)b	(1.4 \pm 1.0)c	0.0	1.8	6.7	7.8	8.3	13.8	(19.3 \pm 1.0)b
35	0.0	0	0.5	1.0	(1.8 \pm 1.0)de	(1.4 \pm 1.0)c	0.0	0	0.7	4.7	5.5	6.5	(12.8 \pm 2.0)c

1) 表中数据为平均值 \pm SD,同列数据后不同小写字母表示在 0.05 水平差异显著。下同。

Data are mean \pm SD. Different lowercase letters in the same column indicate significant difference at 0.05 level by LSD. The same below.

分生孢子在 0~35 $^{\circ}\text{C}$ 均可萌发,15 $^{\circ}\text{C}$ 为适宜萌发温度,30 $^{\circ}\text{C}$ 时萌发率急剧下降,35 $^{\circ}\text{C}$ 不萌发。该菌孢子萌发速度很缓慢,最适温度下 8 h 萌发率 0.8%,72 h 最高萌发率达 36.5%(表 1)。由此可见,病菌菌丝生长和孢子萌发速度均缓慢;孢子萌发和孢子形成的适温均为 15 $^{\circ}\text{C}$,而菌丝生长的适温为(20~25 $^{\circ}\text{C}$),由此可见,柴胡壳针孢孢子形成、萌发和菌丝生长缓慢,

但是适应温度范围较广,所以在甘肃省发生面积和地域范围较广。

2.4.2 菌丝生长、产孢及孢子萌发的光照条件

从表 2 可以看出,菌丝在连续光照条件下生长较好,20 d 菌落直径可达到 11.0 mm,产孢量最大,达到 5.8×10^4 个/ cm^2 ,显著高于其他处理;同样分生孢子在连续光照条件下,72 h 萌发率最高达

34.3%。而在光暗交替和连续黑暗条件下菌落生长、产孢量和孢子萌发率无显著差异,但均低于连续

光照。表明连续光照有利于菌丝生长、孢子萌发和病菌产孢。

表 2 不同光照对柴胡壳针孢菌丝生长、产孢量(20 d)和孢子萌发的影响

Table 2 Colony diameters, spore production (20 d) and germination rates of *Septoria bupleuricola* at different illumination conditions

处理 Illuminating condition	菌落直径/mm Diameter of colony				产孢量/ $\times 10^4$ 个 $\cdot (\text{cm}^2)^{-1}$ Yield of spores	孢子萌发率/% Germination rate						
	8 d	12 d	16 d	20 d		8 h	12 h	24 h	36 h	48 h	60 h	72 h
连续光照 Continuous illumination	1.2	4.5	7.2	(11.0±3.2)a	(5.8±1.5)a	0.3	3.3	9.3	15.5	22.0	28.3	(34.3±2.0)a
光暗交替 12 h illumination/12 h darkness	1.5	4.7	7.3	(9.3±1.8)b	(3.1±1.8)b	0.2	4.8	11.8	14.2	17.0	23.7	(31.5±3.2)b
连续黑暗 Continuous darkness	0.7	3.8	7.3	(9.8±1.2)b	(3.7±2.0)a	0.0	4.2	10.3	12.0	13.8	21.0	(28.7±2.3)b

2.4.3 菌丝生长、产孢及孢子萌发的 pH

表 3 结果表明:病菌生长适宜的 pH 范围较宽,在 pH 4.0~10.0 范围内均能生长,pH5.0 时菌落生长最快,20 d 可达到 13.8 mm;产孢要求的 pH 为 5.0~9.0。其中以 pH 5.5 产孢量最大,达到 $6.7 \times$

10^4 个/ cm^2 ,pH 低于 5.0 和高于 9.0 均不产孢。

表 4 结果表明:分生孢子在 pH 4.51~9.19 间均可萌发,以 pH 6.49 最好,72 h 孢子萌发率达 10.33%,pH 高于 7.00 孢子萌发率逐渐下降。孢子的形成、萌发及菌丝的生长均以偏酸性条件为好。

表 3 不同 pH 条件对柴胡壳针孢菌丝生长和产孢量(20 d)的影响

Table 3 Colony diameters, spore production (20 d) of *Septoria bupleuricola* at different pH degrees

pH	菌落直径/mm Diameter of colony				产孢量/ $\times 10^4$ 个 $\cdot (\text{cm}^2)^{-1}$ Yield of spores
	8 d	12 d	16 d	20 d	
4.0	1.3	4.5	7.5	(8.5±0.8)c	(0.0±0.0)c
4.5	2.3	6.8	11.8	(13.2±1.3)a	(0.0±0.0)c
5.0	4.3	7.8	12.0	(13.8±1.2)a	(4.0±0.7)bc
5.5	0.5	3.0	6.2	(11.5±1.3)b	(6.7±0.5)a
6.0	1.8	5.2	8.7	(11.3±1.8)b	(5.2±1.2)b
6.5	1.2	4.5	9.0	(11.7±2.2)b	(5.2±3.7)b
7.0	1.0	4.7	7.5	(11.0±2.2)b	(4.0±3.1)bc
7.5	1.7	4.8	7.8	(10.8±2.6)bc	(3.9±0.2)bc
8.0	2.2	4.5	7.7	(9.8±2.1)bc	(4.5±2.2)bc
8.5	2.3	5.3	8.5	(10.8±1.6)bc	(1.7±1.2)c
9.0	1.0	3.8	6.0	(8.3±3.1)c	(1.6±0.2)c
9.5	1.0	3.0	6.2	(8.7±1.3)c	(0.0±0.0)c
10.0	1.2	4.3	7.2	(8.3±1.5)c	(0.0±0.0)c

表 4 不同 pH 条件下孢子萌发率

Table 4 Germination rates of *Septoria bupleuricola* at different pH degrees

pH	孢子萌发率/% Germination rate						
	8 h	12 h	24 h	36 h	48 h	60 h	72 h
4.51	0.0	1.2	2.7	4.2	6.2	7.3	(8.3±1.2)bc
5.58	0.5	2.2	4.7	6.3	8.0	8.7	(9.7±3.2)ab
6.49	0.3	1.7	4.3	5.5	6.8	8.8	(10.3±3.2)a
7.00	0.3	1.5	3.8	5.2	6.3	6.7	(7.3±2.6)cd
7.41	0.0	1.0	3.5	4.2	4.5	5.2	(5.7±0.8)d
8.39	0.0	0.8	2.0	2.3	2.5	3.2	(3.8±1.7)e
9.19	0.0	0.7	1.7	1.8	2.2	2.8	(3.5±0.3)e

2.4.4 孢子萌发的湿度条件

表 5 结果表明:分生孢子在相对湿度 75%~99.5%和水滴中均可萌发,以对照水滴中萌发最好,

达到 23.0%,与其他处理均有极显著差异,其次为 100%的相对湿度,萌发率 13.7%,而 RH 在 99.5%以下,孢子萌发率逐渐下降,70%时不萌发。

表 5 不同湿度对柴胡壳针孢子萌发率的影响

Table 5 Spore germination rates of *Septoria bupleuricola* at different relative humidities

相对湿度/% Relative humidity	孢子萌发率/% Germination rate						
	8 h	12 h	24 h	36 h	48 h	60 h	72 h
水滴 Water	0.0	0.2	1.7	11.8	19.3	21.0	(23.0±3.3)a
100	0.0	0.0	0.7	5.3	8.7	10.3	(13.7±2.6)b
99.5	0.0	0.0	0.7	2.5	5.3	6.3	(7.7±1.6)b
98	0.0	0.0	0.3	1.5	2.8	4.3	(5.8±1.4)b
95	0.0	0.0	0.2	0.5	1.2	1.8	(3.2±2.1)c
90	0.0	0.0	0.0	0.3	0.8	1.5	(2.3±1.2)cd
85	0.0	0.0	0.0	0.2	0.3	0.8	(1.7±1.6)cd
80	0.0	0.0	0.0	0.0	0.2	0.7	(0.8±0.5)d
75	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.3	(0.7±0.5)d
70	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	(0.0±0.0)d

2.4.5 孢子萌发的营养条件

图 3 表明,分生孢子在柴胡叶片浸渍液中萌发最好,萌发率达 57.0%~60.33%,高出对照 40.66 百分

点,其次是柴胡根浸液和土壤浸渍液,分别为 49.3%~60.5%及 15.3%~26.5%,均高于清水对照的萌发率。

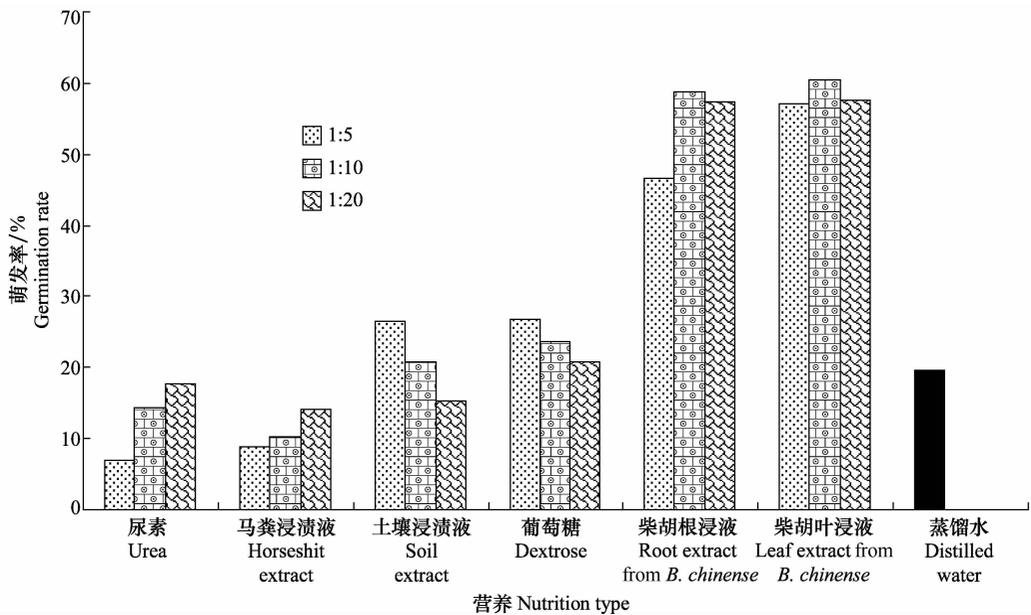


图 3 不同营养液中柴胡斑枯病菌孢子萌发率(72 h)

Fig. 3 Spore germination rates (72 h) of *Septoria bupleuricola* in different nutrition media

图 4 表明,柴胡斑枯病菌分生孢子萌发时速度很慢,即使在适宜的营养液中,前期 12 h 萌发率在 10%左右,24~48 h 间增长至 54%,说明 24~48 h 是孢子萌发的最快时期,这与温度、湿度等试验中的结果一致。

3 讨论

3.1 病原

生于柴胡叶上的壳针孢属真菌记载有 4 种: (1) *S. amphigena* Miyake, 其分生孢子器 120~150 μm , 分生孢子 3 个隔膜, 大小(18~22) μm ×(1.5~2) μm ;

(2) *S. buplenricola* Sacc., 其分生孢子大小(24~30) μm ×2 μm ; (3) *S. buplenrina*, 其分生孢子 3 个隔膜, 大小(32~43) μm ×2.2 μm ; (4) *S. buplenri-taleati* Diet., 其分生孢子 3 个隔膜, 大小(30~40) μm ×2 μm ^[9]。白金铠认为这 4 种菌在形态上均与 *S. buplenri* 相似, 其分生孢子器大小(55~135) μm ×(50~110) μm , 分生孢子 1~4 个隔膜, 多为 2~3 个隔膜, 分生孢子器球形, 分生孢子隔膜和大小也均相近, 均应视为其异名。甘肃省柴胡斑枯病的病原通过形态学和分子生物学鉴定, 确定为 *S. bupleuricola* Sacc.。

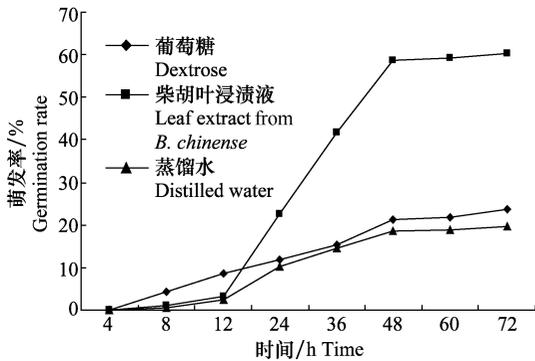


图4 不同营养液中柴胡斑枯病菌孢子萌发率

Fig. 4 Spore germination rate of *Septoria bupleuricola* in different nutrition media

3.2 病原菌的生物学特性

病原菌的培养特性和生物学特性与病害的发生发展密切相关。壳针孢属 *Septoria* 真菌是在全球分布最广泛、最常见的一类病原菌，寄主范围广泛，可寄生于很多植物的叶片和果实上，引起叶斑或果斑症状^[20]。该属真菌普遍生长缓慢，菌丝生长、产孢和孢子萌发均需要较低的温度和持续的露水。如当归褐斑病菌 *Septoria* sp. 分生孢子萌发的适温为 20℃，相对湿度要求在 75% 以上^[21]。本研究对柴胡斑枯菌生物学特性的测定结果表明，该菌菌丝生长、产孢和孢子萌发的最适温度分别为 20~25℃、15、10~15℃，孢子萌发相对湿度要求在 75% 以上，菌丝生长、孢子萌发和产孢的适宜 pH 分别为 5.0、6.49 和 5.5，因此在低温、高湿和中性偏酸环境下该病易于侵染和发生。甘肃省定西地区柴胡主产区陇西县、灵台县、渭源县、漳县及安定区等地属高寒阴湿地区，气温较低，阴湿多露，适于孢子的萌发和侵染，因此病害发生重。

3.3 防治建议

在栽培过程中，建议多采用玉米-柴胡和小麦-柴胡套种模式，不仅利用前作物的遮阴保湿作用代替地面盖草，节约了盖草成本，有利于柴胡出苗、出壮苗，而且还可以减少病虫害的发生^[22]。依据课题组对当归褐斑病防治的研究^[23]以及国内对龙胆草斑枯病的药剂防治研究结果^[24]，建议在柴胡斑枯病发病初期喷施 50% 多菌灵可湿性粉剂 600 倍液、70% 甲基硫菌灵可湿性粉剂 700 倍液、10% 苯醚甲环唑水分散颗粒剂 1 800 倍液、78% 波·锰锌可湿性粉剂 600 倍液及 70% 丙森锌可湿性粉剂 600 倍

液。7~10 d 喷施 1 次，连续喷施 3 次。并且在柴胡收获后，彻底清除病残组织，集中烧毁或沤肥，减少越冬菌源，可减轻来年病害的发生。

参考文献

- [1] 周荣汉. 中药资源学[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 1993: 384-391.
- [2] 国家药典编委会. 中华人民共和国药典[M]. 北京: 化学工业出版社, 2005: 198.
- [3] 王玉庆, 牛颜冰, 秦雪梅, 等. 野生柴胡资源调查[J]. 山西农业大学学报, 2007, 27(1): 103-107.
- [4] 冯亦平, 牛颜冰, 王玉庆, 等. 柴胡播种技术研究[J]. 山西农业大学学报(自然科学版), 2006, 26(5): 23-25.
- [5] 李晓伟, 王玉庆, 杜国军, 等. 药用柴胡资源调查及市场现状分析[C]//海峡两岸暨 CSNR 全国第 10 届中药及天然药物资源学术研讨会论文集. 兰州, 2012: 159-165.
- [6] 张世祖, 马庆江. 政策性金融支持甘肃中药材产业发展情况的调查与思考[J]. 甘肃金融, 2015(2): 58-60.
- [7] 戴芳澜. 中国真菌总汇[M]. 北京: 科学出版社, 1979.
- [8] 韩金声. 中国药用植物病害[M]. 长春: 吉林科学技术出版社, 1990: 605.
- [9] 白金铠. 中国真菌志(第十七卷)球壳孢属、壳针孢属[M]. 北京: 科学出版社, 2003: 313.
- [10] 庄剑云. 中国真菌志: 锈菌目(二)[M]. 北京: 科学出版社, 2001.
- [11] 李勇, 刘时轮, 杨成民, 等. 北京地区柴胡根腐病的病原菌鉴定[J]. 植物病理学报, 2009, 39(3): 314-317.
- [12] 陈秀蓉. 甘肃省药用植物病害种类及其防治[M]. 北京: 科学出版社, 2015: 23-25.
- [13] Zhang Z, Wei J H, Yang C M, et al. First report of *Alternaria* leaf blight on *Bupleurum chinense* caused by *Alternaria alternata* in China [J]. Plant Disease, 2010, 94(7): 918.
- [14] 方中达. 植病研究方法[M]. 北京: 农业出版社, 1979.
- [15] White T J, Bruns T, Lee S B, et al. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics [M]//Innis M A, Gelfand D H, Sninsky J J, et al. PCR protocols: a guide to methods and applications. New York: Academic Press, 1990: 315-322.
- [16] Liu Yajuan, Whelen S, Hall B D. Phylogenetic relationships among ascomycetes: evidence from an RNA polymerase II subunit [J]. Molecular Biology and Evolution, 1999, 16(12): 1799-1808.
- [17] Verkley G J, Quaedvlieg W, Shin H D, et al. A new approach to species delimitation in *Emporia* [J]. Studies in Mycology, 2013, 75(1): 213-305.
- [18] Stukenbrock E H, Quaedvlieg W, Javan-Nikhah M, et al. *Zymoseptoria ardabiliae* and *Z. pseudotritici*, two progenitor species of the *Septoria tritici* leaf blotch fungus *Z. tritici* (synonym: *Mycosphaerella graminicola*) [J]. Mycologia, 2012, 104(6): 1397-1407.

牡丹黑斑病多在牡丹生长后期发生,且危害严重,主要由链格孢属真菌引起。本研究中分离获得的牡丹黑斑病病原菌为链格孢菌 *A. alternata*,与石良红等^[20]的研究结果一致,但笔者在分离病原菌时,还获得了另外一种链格孢菌,经致病性测定,发现也能引起牡丹黑斑病的发生。由于链格孢属真菌多为弱寄生性真菌,对寄主的适应性较为广泛,因此推测牡丹黑斑病可能由多种链格孢属真菌引起,其不同种类链格孢菌的致病性是否存在差异,有待进一步研究。

随着洛阳地区牡丹种植面积的增加,尤其是近几年油用牡丹种植面积的增加,牡丹病害的防控逐渐成为牡丹栽培管理过程中的重要事项,目前有关牡丹病害的基础性研究很少,病害防治以化学防治为主,容易造成环境污染,且易导致病原菌抗病性的增加,因此今后应从病原学和病害流行病学入手,明确病害流行发生规律,找出关键防治时期,开展绿色生态防控研究,保障牡丹种植产业健康持续发展;同时,应进一步开展牡丹病害病原菌致病性分析,调查和分析病原菌在不同牡丹品种上的致病性差异,获得抗病性强的品种,为牡丹的抗病育种提供基础和依据。

参考文献

[1] 贾文庆,徐小博,刘会超,等. 牡丹‘乌龙捧盛’组培苗生根及生根解剖学研究[J]. 林业科学研究, 2013, 26(4): 516 - 520.

[2] 杨瑞先,刘萍,方站民,等. 牡丹病害研究现状及展望[J]. 河南农业科学, 2010, 39(11): 138 - 143.

[3] 段亚冰. 牡丹叶斑病病原真菌鉴定及生物学特性研究[D]. 洛阳: 河南科技大学, 2009.

[4] Asgari B, Zare R, Zamanizadeh H R, et al. Systematics of *Aspergillus* species of subgenus *Nidulantes* in Iran [J]. Rostaniha, 2012, 13(2): 126 - 151.

[5] Scoble J M, Cavalier-Smith T. Scale evolution, sequence phylogeny, and taxonomy of thaumatomonad Cercozoa: 11 new species and new genera *Scutellomonas*, *Cowlomonas*, *Thaumatospina* and *Ovaloplaca* [J]. European Journal of Protistology, 2014, 50(3): 270 - 313.

[6] 白树猛,田黎. ITS序列分析在真菌分类鉴定和分子检测中的应用[J]. 畜牧与饲料科学, 2009, 30(1): 52 - 53.

[7] Porras-Alfaro A, Liu K L, Kuske C R, et al. From genus to phylum: large-subunit and internal transcribed spacer rRNA operon regions show similar classification accuracies influenced by database composition[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2014, 80(3): 829 - 840.

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

[9] Innisetal M. PCR Protocols: A guide to methods and applications [M]. New York: Academic Press, 1990.

[10] 吴玉柱,季延平,刘愚,等. 牡丹红斑病的研究[J]. 林业科学研究, 2005, 15(6): 711 - 716.

[11] 石良红,李玲,申宏伟,等. 牡丹红斑病病原鉴定与 ITS 序列分析[J]. 农学学报, 2014, 4(10): 32 - 35.

[12] 蓝莹,赵桂华,郑彭彭. 芍药红斑病的研究[J]. 南京林业大学学报(自然科学版), 1984(1): 16 - 29.

[13] 李丽,宋淑香,刘会香,等. 山东省芍药红斑病病原菌鉴定[J]. 园艺学报, 2016, 43(2): 365 - 372.

[14] 杨友联,刘永翔,刘作易. 炭疽菌属真菌分类学研究进展[J]. 贵州农业科学, 2011, 39(1): 152 - 157.

[15] 路梅,杨佳妮,周端瑛,等. 佛手炭疽病病原菌的生物学特性研究[J]. 浙江师范大学学报(自然科学版), 2011, 34(3): 323 - 327.

[16] 杨友联,刘永翔,刘作易. 棉花炭疽病的病原鉴定[J]. 贵州农业科学, 2014, 42(8): 86 - 91.

[17] 叶云峰,胡风云,付岗,等. 地榆炭疽病病原菌分离与鉴定[J]. 西南农业学报, 2014, 27(5): 2249 - 2251.

[18] 聂彩花. 山西省古县牡丹病虫害种类调查及防治[D]. 晋中: 山西农业大学, 2014.

[19] 曾大兴,戚佩坤,姜子德. 胶孢炭疽菌的种内遗传多样性研究[J]. 菌物学报, 2003, 22(1): 50 - 55.

[20] 石良红,赵兰勇,吴迪,等. 山东牡丹黑斑病的病原菌鉴定与 ITS 序列分析[J]. 园艺学报, 2015, 42(3): 585 - 590.

(责任编辑: 田 喆)

(上接 84 页)

[19] Hall T A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT [J]. Nucleic Acids Symposium Series, 1999(41): 95 - 98.

[20] Verkley G J M, Starink-Willemse M, van Iperen A, et al. Phylogenetic analyses of *Septoria* species based on the ITS and LSU-D2 regions of nuclear ribosomal DNA[J]. Mycologia, 2004, 96(3): 558 - 571.

[21] 王艳,陈秀蓉,王引权,等. 甘肃省当归褐斑病菌 *Septoria* sp. 生物

学特性及其营养利用研究[J]. 中药材, 2009, 32(4): 479 - 482.

[22] 王玉庆,杨忠义,杨静,等. 黄土高原半干旱区柴胡种植模式[J]. 应用生态学报, 2011, 22(3): 825 - 828.

[23] 王艳,陈秀蓉,王惠珍,等. 六种杀菌剂对当归褐斑病菌室内毒力的测定[J]. 甘肃中医学院学报, 2008, 25(5): 27 - 29.

[24] 孙立晨,高郁芳,刘志刚,等. 防治龙胆草斑枯病药剂筛选试验[J]. 植物保护, 2006, 32(6): 154 - 156.

(责任编辑: 田 喆)