

石楠叶锈病菌 *Aecidium wenshanense* 锈孢子萌发的生物学特性

祝菱, 陶刊, 左亚波, 赵正员, 陈玉惠*

(西南林业大学生命科学学院, 昆明 650224)

摘要 为了解由文山春孢锈菌 *Aecidium wenshanense* 引起的石楠叶锈病的发生发展及流行规律, 为病害的防治提供依据, 本文以椭圆叶石楠 *Photinia beckii* 发病植株叶上的新鲜锈孢子为试验材料, 采用水琼脂平板孢子萌发法对温度、湿度、光照、酸碱度及寄主汁液等条件对该锈孢子萌发的影响进行了研究。结果表明, 该锈菌锈孢子温度 5~30℃ 和 pH 3~10 的范围内都能萌发, 最适温度为 20~25℃; 最适 pH 为 6~8; 相对湿度大于或等于 90% 时孢子才能萌发, 最适湿度为 100%+水; 连续光照抑制孢子萌发, 而连续黑暗条件下孢子萌发率最高。寄主(椭圆叶石楠)老叶的新鲜汁液对锈孢子的萌发有一定抑制作用。

关键词 石楠锈病; 锈孢子; 孢子萌发; 生物学特性

中图分类号: S 436.8 **文献标识码:** A **DOI:** 10.16688/j.zwbh.2018537

The biological characteristics of aeciospore germination of *Aecidium wenshanense*

ZHU Ling, TAO Kan, ZUO Yabo, ZHAO Zhengyuan, CHEN Yuhui*

(Faculty of Life Sciences, Southwest Forestry University, Kunming 650224, China)

Abstract *Aecidium wenshanense* is a pathogen causing rust disease of *Photinia* spp., and it can seriously damage the leaves and twigs of host plant. In order to provide the basis for rust disease prevention and understand the regularity of disease development and epidemics, the effects of temperature, relative humidity (RH), light, pH and host plant juice on the aeciospore germination of the pathogen were studied by using the method of water agar plate surface germination. The results showed that the aeciospores could germinate in the range of 5–30°C and pH 3–10; the optimum temperature was 20–25°C, and the optimum pH was 6–8. However, the aeciospores could only germinate under the conditions of greater than or equal to 90% RH, and the optimum RH was 100% in water. Further studies found that the continuous illumination inhibited aeciospore germination, the germination rate was the highest under continuous darkness. To some extent, the fresh old leaf juice of *P. beckii* could inhibit aeciospore germination.

Key words *Aecidium wenshanense*; aeciospore; spore germination; biological characteristics

石楠 *Photinia* Lindl. 为常绿乔灌木或小乔木, 隶属于蔷薇目蔷薇科石楠属 *Photinia* 木本植物^[1]。世界石楠属植物约有 140 余种, 主要分布在亚洲东部及南部; 而在中国, 石楠属植物约有 60 余种, 主要分布于四川、云南、贵州、福建、广东等省区, 是我国南方绿化、用材兼用的亚热带优良树种^[2-3]。此外, 石楠属植物还在镇痛解热、抗肿瘤、除草、杀虫和杀真菌等多方面具有显著的生物活性^[4]。

锈病是石楠属植物上普遍发生的一类严重病害, 常导致受害植株叶、腋芽、枝梢褪绿、变形、肿胀, 严重影响植株的生长发育及观赏应用价值^[5]。文山春孢锈菌 *Aecidium wenshanense* 是椭圆叶石楠 *Photinia beckii* 和贵州石楠 *P. bodinieri* 叶锈病的病原菌, 主要危害中幼龄植株的幼叶及腋芽^[6]。发病初期, 叶片上出现大量近圆形或不规则黄色病斑, 后病部颜色逐渐加深呈橙黄色至橙红色, 叶片正面长

收稿日期: 2018-12-28 修订日期: 2019-01-16

基金项目: 云南省优势特色学科生物学一级学科建设项目(50097505); 国家自然科学基金(31260177)

* 通信作者 E-mail: cyh196107@126.com

出橙黄色、针尖大小圆形突起的性子器,叶背面逐渐出现橙黄色、圆柱状的锈子器。病害严重时,感病植株整株叶片受害,且病害连年连片发生,持续数年,给两类石楠的推广应用及幼苗培育带来极大影响。

锈菌孢子作为引发植物锈病的主要侵染源,其萌发的生物学特性在很大程度上决定着植物锈病的发生发展状况及病害流行趋势。对锈菌孢子萌发条件的研究,前人已有一些相关报道^[7-12],但对石楠锈病菌锈孢子萌发的生物学特性研究至今尚未见报道。本文通过研究不同温度、湿度、酸碱度、光照等环境因素对文山春孢锈菌锈孢子萌发的影响,以明确该锈孢子的萌发条件,为进一步深入了解石楠锈病的发生发展与流行规律以及病害测报与防治等研究提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

供试锈孢子采自西南林业大学椭圆叶石楠发病植株。具体方法为:采集带有已突破叶表皮且包被内已明显可见黄色锈孢子的锈子器的新鲜病叶,带回实验室后先用流水冲洗病叶表面,再用75%乙醇擦拭锈子器周围叶面,然后将病叶置于底部放置湿滤纸的培养皿中保湿,1 d后收集散落于锈子器周围的新鲜孢子,置于4℃冰箱保存备用;另采集锈子器包被顶部已局部开裂的完整锈子器保存备用。

1.2 方法

1.2.1 锈孢子萌发特性的观察

将收集保存的完整锈子器和一小堆锈孢子分别放置在滤纸上,然后将其置于培养皿中并加入适量无菌水以湿润滤纸,盖上皿盖置于(25±2)℃恒温培养箱中,1 d后取出,挑出锈子器和约1/4堆锈孢子置于显微镜下观察并拍照。

1.2.2 孢子悬浮液的制备

取收集到的新鲜锈孢子放入2 mL EP管中,加入适量含0.3%吐温80的无菌水,振荡摇匀,制成孢子悬液,然后于显微镜下用血球计数板计数,并调整孢子浓度约为 1.0×10^5 个/mL^[12]。

1.2.3 孢子萌发水琼脂平板的制备

将配制好的1.5%灭菌水琼脂倒于直径为6 cm的小培养皿中制成厚度约1~2 mm的水琼脂板,然后用灭菌移液器吸取100 μL孢子悬浮液滴加在平板中央,并用涂布棒将孢子悬浮液涂抹均匀,盖上皿

盖备用。

1.2.4 温度、酸碱度和光照条件对孢子萌发的影响
参照胡文婕等^[10]的方法,分别设置5、10、15、20、25、30、35、40℃8个温度梯度,3、4、5、6、7、8、9、10等8个pH梯度和全光照、全黑暗、半光照和半黑暗3个光照条件,按1.2.2的方法制备水琼脂板及涂抹孢子悬浮液,然后将制好的平板分别置于以上所设各条件下进行培养,其中pH条件在(25±2)℃恒温培养箱中进行,光照条件在(25±2)℃、光照强度30 000 lx的光照培养箱中进行,温度梯度中的5℃和10℃在冰箱中完成,其余温度在恒温培养箱中进行。每隔3 h镜检一次直至24 h,同步统计被检总孢子数和萌发孢子数。

1.2.5 相对湿度对孢子萌发的影响

采用小容器空气湿度法^[13],用不同浓度的硫酸溶液设置50%、60%、70%、80%、90%、100%6个相对湿度条件;采用载玻片萌发法进行试验。具体过程为:取1 mL配制好的水琼脂均匀地滴加在载玻片上并轻轻晃动使之形成一均匀的薄层,室温下凝固后,滴一滴孢子悬浮液在制备好的玻片上,均匀涂布后,分别放入以上设置好的各相对湿度条件下;另采用凹片设置100%+水的湿度条件,即在凹片上滴一滴孢子悬浮液,盖上盖玻片,然后放入底部铺有湿滤纸的培养皿中保湿。以上各处理最后均置于(25±2)℃培养箱中进行培养,3 h后定时观察孢子萌发情况并统计萌发孢子数及总观察孢子数。

1.2.6 寄主叶汁液对孢子萌发的影响

采集长势、大小相似且健康的寄主(椭圆叶石楠)老叶20 g,用剪刀剪碎后平均分为两份。一份放入烧杯中加100 mL蒸馏水煮沸2 min;一份放入研钵中加入少量水研磨2 min后用蒸馏水补足至100 mL。两份处理好的材料分别于5 000 r/min下离心5 min后,取上清液分别替代水配制琼脂培养基,以不含寄主汁液的水琼脂培养基作为对照。

以上各培养基按1.2.3的方法制备平板和涂抹孢子悬浮液,并置于(25±2)℃培养箱中培养,3 h后定时观察孢子萌发情况并统计萌发孢子数及总观察孢子数。

1.2.7 结果观察与数据分析

采用光学显微镜观察统计孢子萌发情况,以芽管长度超过锈孢子直径的1/2为萌发标准。试验中的每处理均设3个重复,观察时间均为培养后3、6、

12 h 和 24 h, 每次观察孢子数都不低于 200 个。孢子萌发率计算公式为: 萌发率 = 孢子萌发数 / 观察孢子总数 $\times 100\%$ 。

所有数据采用 SPSS 21.0 软件进行统计分析。

2 结果与分析

2.1 文山春孢锈菌锈孢子的萌发状态

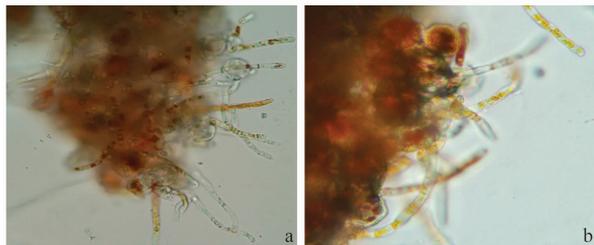
文山春孢锈菌锈孢子在保湿状态下较易萌发, 萌发速度快、萌发率也较高。成熟锈子器和锈孢子堆在保湿滤纸上保湿 1 d 后, 可见从锈子器上伸出长短不一的大量芽管, 表明大多数孢子已萌发(图 1a); 而锈孢子堆保湿后表面可见纵横交错排列的芽管(图 1b)。锈孢子萌发时芽管顶端不变或略膨大, 黄色内含物移入芽管并随芽管的延长不断向前移动(图 2a、b); 锈孢子一般萌生 1 个芽管, 偶见 2 个芽管, 未见有多个芽管萌生的现象(图 2c)。

2.2 环境因素对锈孢子萌发的影响

2.2.1 不同温度对锈孢子萌发的影响

由表 1 可知, 温度对锈孢子萌发的影响较大, 在供试温度范围内, 锈孢子在 $5\sim 30^{\circ}\text{C}$ 下都能萌发。其中 $15\sim 25^{\circ}\text{C}$ 范围内孢子萌发率较高, 24 h 时的萌发率均超过 90%, 与其他温度下的萌发率存在显著差异 ($P < 0.05$); $20\sim 25^{\circ}\text{C}$ 下孢子最易萌发, 6 h 时孢子萌发率均已超过 50%, 显著高于其他温度下的萌发率 ($P < 0.05$)。当温度达到 35°C 及以上时,

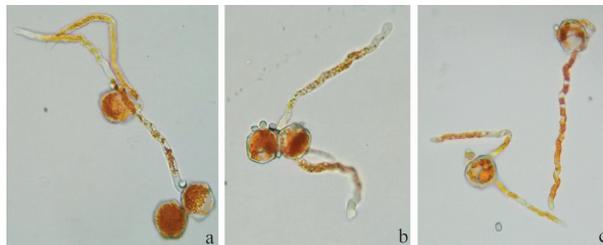
锈孢子不萌发, 而当温度低于 10°C 时, 锈孢子萌发率显著下降, 12 h 时的萌发率还未超过 10%。



a: 锈子器及伸出锈子器外的芽管; b: 锈孢子堆及表面锈孢子萌生的芽管
a: Aecidium and germ tubes extended from inside the aeciospore pile and germ tubes germinated from aeciospores

图 1 保湿 1 d 后文山春孢锈菌的锈子器、锈孢子堆及锈孢子萌生的芽管

Fig. 1 Aecidium, aeciospore pile and germ tubes germinated from *Aecidium wenshanense* aeciospores after moisture preservation for 1 d



a: 芽管顶部不膨大; b: 芽管顶部稍膨大; c: 孢子萌生 1~2 个芽管
a: The top part of germ tube is not swollen; b: The top part of germ tubes is lightly swollen; c: 1~2 germ tubes sprout from aeciospores

图 2 文山春孢锈菌锈孢子在水琼脂培养基上的萌发状态

Fig. 2 The germination state of *Aecidium wenshanense* aeciospores on water agar medium

表 1 温度对文山春孢锈菌锈孢子萌发的影响¹⁾

Table 1 Effects of temperature on the germination of *Aecidium wenshanense* aeciospores

温度/ $^{\circ}\text{C}$ Temperature	萌发率/% Germination rate			
	3 h	6 h	12 h	24 h
5	—	—	(3.56 \pm 3.56)d	(11.02 \pm 5.65)d
10	—	—	(9.38 \pm 1.58)d	(27.07 \pm 3.09)c
15	(16.54 \pm 1.10)b	(32.64 \pm 2.58)b	(59.90 \pm 11.39)c	(96.57 \pm 0.57)a
20	(22.38 \pm 2.20)a	(59.14 \pm 2.20)a	(73.87 \pm 0.61)b	(93.08 \pm 1.72)a
25	(24.01 \pm 0.65)a	(61.19 \pm 2.29)a	(84.59 \pm 1.36)a	(96.58 \pm 1.11)a
30	(7.14 \pm 1.99)c	(21.81 \pm 2.44)c	(58.54 \pm 3.91)c	(59.76 \pm 0.65)b
35	—	—	—	—
40	—	—	—	—

1) “—”表示没有孢子萌发。下同。

“—” indicates no spore germination. The same below.

2.2.2 pH 对锈孢子萌发的影响

表 2 数据显示, 锈孢子在 pH 3~10 范围内都能萌发。虽然它们在不同时间点上的萌发率存在差异, 但处于 pH 4 和 pH 10 环境下的锈孢子, 培养 24 h 时的萌发率均超过了 50%, 显示该锈孢子

具有较广泛的酸碱适应性。锈孢子在 pH 6~8 范围内最易萌发且不同培养时间的萌发率都明显高于其他 pH 条件下的萌发率, 其中又以 pH 6 条件下的萌发率最高, 培养 12 h 时的萌发率已达到 93.36%。

表 2 pH 对文山春孢锈菌锈孢子萌发的影响

Table 2 Effects of pH on the germination of *Aecidium wenshanense* aeciospores

pH	萌发率/% Germination rate			
	3 h	6 h	12 h	24 h
3	(3.16±0.30)f	(6.67±1.40)cd	(22.85±3.81)d	(45.43±11.58)c
4	(8.34±0.98)de	(12.41±0.24)cd	(40.19±2.99)c	(55.31±1.37)c
5	(12.29±0.95)cd	(30.39±9.78)b	(60.06±1.42)b	(69.90±0.20)b
6	(27.56±1.07)a	(40.71±0.87)a	(93.36±1.04)a	(99.70±0.20)a
7	(22.66±3.29)b	(40.55±1.02)a	(69.40±12.17)b	(99.17±0.43)a
8	(16.90±6.56)c	(36.53±5.75)ab	(59.66±16.03)b	(97.66±2.07)a
9	(10.46±1.32)d	(15.88±3.58)c	(33.58±1.14)cd	(52.51±0.60)c
10	(5.14±1.38)ef	(10.66±0.90)cd	(33.74±2.66)cd	(55.24±1.16)c

2.2.3 相对湿度(RH)对锈孢子萌发的影响

由表 3 数据可以看出,锈孢子萌发对相对湿度的要求较高,在 RH 80%及以下时,锈孢子不萌发,只有当 RH 达到 90%及以上时,锈孢子才开始萌发并且随

湿度的增加和处理时间的延长,萌发率逐渐升高。在 RH 100%和 100%+水条件下,锈孢子培养 3 h 后,便有超过 10%的锈孢子萌发,12 h 时萌发率超过 50%,24 h 时萌发率分别达到了 62.49%和 81.22%。

表 3 不同相对湿度对文山春孢锈菌锈孢子萌发的影响

Table 3 Effects of relative humidity on the germination of *Aecidium wenshanense* aeciospores

相对湿度/% Relative humidity	萌发率/% Germination rate			
	3 h	6 h	12 h	24 h
50	—	—	—	—
60	—	—	—	—
70	—	—	—	—
80	—	—	—	—
90	—	(6.38±6.38)b	(15.81±6.75)b	(32.72±8.41)c
100	(11.41±2.94)a	(27.17±11.35)a	(52.39±0.85)a	(62.49±3.86)b
100+水	(10.83±1.59)a	(28.38±6.46)a	(55.39±5.20)a	(81.22±1.98)a

2.2.4 不同光照时间处理对孢子萌发的影响

不同光照时间处理对锈孢子萌发的影响差异较大(表 4),锈孢子在全黑暗下最易萌发,3 h 时的萌发率已超过 20%,12 h 时萌发率达到 72.33%,24 h 时萌发率接近 90%。全光明显抑制孢子萌发,处

理 24 h 时的萌发率还不足 3%,而半光照和半黑暗交替时孢子萌发速度和萌发率明显高于全光照下的孢子萌发率,但仍显著低于全黑暗下的孢子萌发率,表明光照时间的长短是影响锈孢子萌发的重要因素。

表 4 不同光照处理对文山春孢锈菌锈孢子萌发的影响

Table 4 Effects of illumination on the germination of *Aecidium wenshanense* aeciospores

光照条件 Illumination conditions	萌发率/% Germination rate			
	3 h	6 h	12 h	24 h
全光照 Full lighting	—	—	—	(2.06±0.69)c
全黑暗 Complete darkness	(21.97±3.41)a	(44.84±6.58)a	(72.33±7.45)a	(89.05±0.52)a
半光照半黑暗 Half light and half dark	(9.35±1.29)b	(19.57±1.89)b	(25.09±3.58)b	(36.67±1.79)b

2.2.5 寄主叶汁液对孢子萌发的影响

石楠叶汁液对锈孢子萌发的影响见表 8。与对照相比,煮沸汁液对锈孢子萌发的影响不大,24 h 后的孢子萌发率达到 94.91%,与对照萌发率没有明

显差异;而研磨新鲜汁液则能显著抑制孢子的萌发,在该条件下,锈孢子 6 h 才开始萌发,24 h 的萌发率仅为 44.90%。

表 5 寄主叶汁液对文山春孢锈菌孢子萌发的影响

Table 5 Effects of host leaf juice on the germination of *Aecidium wenshanense* aeciospores

汁液种类 Juice type	萌发率/% Germination rate			
	3 h	6 h	12 h	24 h
研磨 Ground	—	(11.84±5.92)b	(35.37±1.33)b	(44.90±5.70)b
煮沸 Boiled	(16.12±0.33)a	(27.94±1.82)a	(71.77±0.78)a	(94.91±1.76)a
对照 Control	(14.31±0.82)b	(26.16±1.86)a	(75.65±1.21)a	(91.96±0.16)a

3 讨论

椭圆叶石楠和贵州石楠锈病的文山春孢锈菌锈孢子的萌发与外界环境条件密切相关,适宜条件下,萌发速度快、萌发率高。本研究结果显示,锈孢子萌发对温度和 pH 的要求相对较低,其萌发的温度范围和 pH 范围较广,在 5~30℃ 和 pH 3~10 的范围内均可萌发,但对相对湿度和光照要求相对较高,持续光照不利于锈孢子萌发,而相对湿度小于 90% 时锈孢子不萌发。

温度是影响真菌孢子萌发的主要因素之一,文山春孢锈菌锈孢子萌发的最适温度范围(20~25℃)与廖安平^[14]、More 等^[15]报道的锈菌锈孢子萌发最适温度以及 Kochmank 等^[16]报道的向日葵锈菌夏孢子侵染温度基本一致。而湿度往往是许多真菌孢子萌发的限制因子,大多数真菌孢子在高湿条件下才能萌发^[11,17]。文山春孢锈菌锈孢子在 RH 90% 以下时,孢子均不萌发,当 RH 超过 90% 后,随湿度的增加,孢子萌发率增加,在 100%+ 水的湿度条件下,孢子萌发率最高,说明湿度也是文山春孢锈菌锈孢子萌发的限制因子。在野外环境下一旦达到孢子萌发的湿度条件,便会有大量成熟锈孢子萌发,侵染寄主植物,导致病害的发生和流行。文山春孢锈菌锈孢子在黑暗环境下萌发最好,而持续光照会抑制孢子萌发,表明黑暗条件对孢子萌发具有促进作用,这与持续光照抑制小麦条锈菌夏孢子萌发的结果相近^[18]。文山春孢锈菌锈孢子萌发的最适 pH 范围为 6~8,但在偏酸(pH 3)或偏碱(pH 10)条件下仍有超过 1/3 的孢子萌发,表明其对环境 pH 的敏感性较低,这与张玉霞等^[11]、刘静等^[19]关于 pH 对病原菌孢子萌发影响的报道基本一致。

本研究采用 2 种不同处理方法获得的寄主叶汁液处理锈孢子,未经加热的研磨汁液能显著抑制孢子萌发,这与前人报道的新鲜榨汁比煎汁更能促进孢子萌发的结果明显不符^[14],此种差异应与寄主含有的挥发性抑菌物质或对热不稳定的抑菌成分有关,有待进一步研究。

在采用悬滴法完成 100%+ 水相对湿度对孢子萌发的影响试验中,发现未加盖玻片的孢子萌发率大于加盖时的孢子萌发率。究其原因可能是该锈孢子萌发需要一定的氧气;或者是当加盖片后,由于孢子过于聚集在盖片与凹片交界处导致孢子浓度过高

所致^[12,20],因此,在进行此类试验时,还需考虑氧气及孢子浓度对孢子萌发的影响。

参考文献

- [1] 中国科学院中国植物志委员会. 中国植物志. 第七十六卷[M]. 北京: 科学出版社, 1983.
- [2] 陈有民. 园林树木学[M]. 第 2 版. 北京: 中国林业出版社, 2011.
- [3] 芦建国, 陈春芳. 石楠属植物研究进展[J]. 农业科技与信息(现代园林), 2009(5): 44-47.
- [4] 申万祥, 姚眺, 赵兵, 等. 石楠属药理学研究概况[J]. 畜牧与饲料科学, 2011(11): 58-60.
- [5] 蔡灿, 伍建榕. 球花石楠锈病原菌的初步研究[J]. 北方园艺, 2008(1): 208-210.
- [6] 庄剑云, 魏淑霞. 中国无性型锈菌新资料 I. 春孢子阶段的几个式样种[J]. 菌物学报, 2016, 35(12): 1468-1474.
- [7] 张永红, 黄丽丽, 康振生. 小麦条锈菌 CY32 夏孢子萌发研究[J]. 菌物学报, 2006, 25(4): 656-659.
- [8] 郭志青, 曹支敏, 余仲东, 落叶松-杨棚锈菌夏孢子萌发条件研究[J]. 西北林学院学报, 2010, 25(3): 118-121.
- [9] 魏勇. 黄槲鞘锈菌(*Coleosporium phellodendri*)孢子萌发、侵染及病害田间发生动态[D]. 雅安: 四川农业大学, 2010.
- [10] 胡文婕, 郭丹丹, 梁宇, 等. 向日葵锈菌夏孢子萌发条件的研究[J]. 植物保护, 2016, 42(3): 75-80.
- [11] 张玉霞, 赵桂琴, 姚拓, 等. 燕麦散黑穗病菌冬孢子萌发条件研究[J]. 草原与草坪, 2014, 34(2): 33-38.
- [12] AYLIFFE M A, LAWRENCE G J, ELLIS J G, et al. Production of a self-inhibitor of urediospore germination in *Melampsoralini* (flax rust) segregates as a recessive, single gene trait[J]. Canadian Journal of Botany, 1997, 75(1): 74-76.
- [13] 方中达. 植病研究方法[M]. 第 3 版. 北京: 中国农业出版社, 1998.
- [14] 廖安平. 红花锈病(*Puccinia carthami*)的研究[D]. 雅安: 四川农业大学, 2008.
- [15] MORE P E, DEOKAR C D, GAME B C. Effect of temperature on germination and survival of *Uromyces viciae fabae* (Pers.) de Bary [J]. Journal of Agrometeorology, 2018, 20(2): 144-148.
- [16] KOCHMAN J K, GOULTER K C. The occurrence of a second race of rust (*Puccinia helianthi*) in sunflower crops in eastern Australia [J]. Australasian Plant Pathology, 1984, 13(1): 3-4.
- [17] 李莎, 张文蔚, 齐放军, 等. 环境条件对棉花条纹斑病菌分生孢子萌发的影响[J]. 棉花学报, 2011, 23(5): 472-475.
- [18] BURRAGE S W. Environmental factors influencing the infection of wheat by *Puccinia graminis* [J]. Annals of Applied Biology, 1970, 66(3): 429-440.
- [19] 刘静, 李国华, 周明, 等. 橡胶树白粉菌分生孢子萌发条件及存活时间的研究[J]. 西南农业学报, 2014, 27(1): 151-155.
- [20] 康振生, 李振蛟, 商鸿生, 等. 小麦条锈菌夏孢子和芽管细胞核荧光染色技术[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 1993, 21(1): 11-14.