

菊花斑枯病菌生理性状的研究*

张宝棣 黎毓干

(植保系)

提 要

菊花斑枯病为华南地区菊花发生最普遍而严重的一个病害。病原菌鉴定为 *Septoria chrysanthemella* Sacc., 与国内大多数地区所鉴定的相一致, 但其生长适温比国外所报道的为高, 而与我国台湾省所报道的极为相似, 这可能是不同于国外所报道的另一菌系。

此菌在人工培养基上生长极缓慢, 形成黑褐色紧密状菌落。合适培养基为燕麦培养基、PDA培养基和菊花叶汁培养基, 尤以燕麦培养基为最佳, 这是前人所未曾报道的, 而文献^[3]认为适于 *Septoria* 生长的蔗糖硫酸铵等三种人工合成培养基却不适于此菌生长。

此菌产孢适温为20~24℃, 在此温度下和合适培养基上产孢所需时间均为16天; 光照或黑暗对产孢无影响; 产孢量亦以燕麦培养基为最佳。分生孢子萌发适温为26~28℃, 适宜pH为5~7, 并需要充足水湿、氧气和一定养料, 即使在饱和湿度下孢子也不萌发, 在嫌气条件下或在清水中孢子不萌发或萌发率极低; 在供试的9种糖液中, 以鼠李糖 (Rhamnose)、葡萄糖 (Glucose)、淀粉 (Starch)、乳糖 (Lactose) 对孢子萌发较好, 最差的为麦芽糖 (Maltose)。

菊花斑枯病又称黑斑病, 为华南地区菊花发生最普遍而严重的一个病害, 每致叶片病斑累累, 叶片变黄, 终致变黑干枯脱落, 不仅影响菊花的观赏价值, 而且降低菊花出口品级。本病1895年由Saccardo首次描述。在我国, 本病最早的报道见于台湾省(1919年泽田兼吉)^[4], 此后戴芳澜(1922)^[9]、邹钟琳(1922)^[2]、朱凤美(1927)^[1]、戴伦焰(1944)^[10]、凌立(1948)^[7]以及浙江(1952)^[6]、吉林(1966)^[8]、河北(1970)都有调查记载, 1982年台湾省杨秀珠、吕理燊^[8]对本病的发生及防治进行了研究。在国外, Schneider(1959)^[13]、Waddell(1960、1963)^{[14][15]}和Perisic(1978)^[12]先后对本菌的生理进行了研究, 但他们的研究结果并非完全一致。鉴于本病在华南地区未被研究而其发生为害又已成为当地菊花种植业发展的一大障碍, 我们于1982年开始对本病进行探讨。本文是关于此病菌生理性状的研究结果。

* 参加本研究工作的尚有张洛明、廖建华、林壁润、林乔生四位同学, 他们现均已毕业分配; 本文承蒙范怀忠教授、古希昕副教授审阅并提出宝贵意见, 谨致谢忱。

材 料 和 方 法

(一) 病菌的单孢分离

于田间采回病叶,洗净,按常规方法进行表面消毒(0.1%升汞液消毒5分钟,无菌水洗3次),移入灭菌培养皿内恒温保湿,待病部涌出孢子后即配制孢子悬浮液,用灭菌的玻璃小球或玻璃短棒蘸取孢子悬浮液,移置事先准备好的培养基平板上滚动进行单孢分离,挑取萌发的单孢至试管斜面以获取病菌单孢纯培养。

(二) 病菌培养性状的观察

将经单孢培养的病菌移入燕麦培养基平板上或斜面上,置恒温28°C培养,定期观察菌落的生长情况,并镜检分生孢子的形态。

(三) 不同培养基对病菌产孢的影响

将经单孢培养的病菌移入供试的燕麦等三种人工培养基和乳糖酪氨酸等三种合成培养基上,置恒温28°C或自然室温20~24°C下培养,每处理5次重复,每隔5天观察菌落生长及产孢情况。

(四) 温度对病菌产孢的影响

将经单孢培养的病菌分别移入上述几种培养基上,置12°C和28°C恒温培养,定期观察菌落生长及产孢情况,重复次数及检查间隔同前。

(五) 光照对病菌产孢的影响

将经单孢培养的病菌分别移入上述几种培养基上,设室内连续光照(40瓦日光灯,光源离培养物40公分)、自然光照(昼夜光暗交替)和连续黑暗三个处理,重复次数及检查间隔同前。

(六) 不同养分对病菌孢子萌发的影响

将在燕麦培养基上培养所得的病菌孢子,用无菌水洗出并配成一定浓度(150倍显微镜视野下含孢子120个)的孢子悬浮液,再分别与供试的葡萄糖等9种糖液混合,糖液浓度为4%,混合后稀释为2%,分别滴于载玻片上,每处理4滴,置恒温28°C下保湿培养24小时后用含棉兰的乳酚油固定并染色,每处理随机镜检500~1000个孢子,计算其发芽率。

(七) 酸硷度对病菌孢子萌发的影响

将已调好含缓冲液的不同pH值病菌孢子悬浮液分别滴于载玻片上,置恒温28°C保湿培养24小时(重复次数和镜检方法同前),计算各处理孢子发芽率。

(八) 温度对病菌孢子萌发的影响

将配好的孢子悬浮液(方法同前)滴于PDA培养基平板上,每处理4次重复,分别置于8、12、24、26、28、32和34°C下恒温保湿培养,经16、24小时取出随机镜检,计算孢子发芽率。

(九) 湿度对病菌孢子萌发的影响

将病部保湿产生的孢子移在载玻片上,自然干燥、饱和湿度和液滴(1%葡萄糖液)三个处理,每处理3次重复,置26°C恒温下培养72小时后取出镜检,计算孢子发芽率。

(十) 病菌孢子致死温度测定

将含1%葡萄糖的病菌孢子悬浮液吸入小玻管内(长80毫米、内径宽10毫米),分别置不同温度的恒温水浴中处理10分钟,取出并分别滴于载玻片上,再置恒温26°C保湿培养24小时,以不经水浴处理的孢子悬浮液为对照,随机镜检孢子萌发情况,确定孢子致死温度。

试验结果

(一) 病菌基本形态及种的确定

病菌分生孢子器叶面埋生、散生或聚生,近球形,直径60~113微米,顶部短喙状呈乳头状突起,具孔口,成熟时孔口突破表皮外露,器壁暗褐色,膜质。分生孢子针状,直或稍弯,一般2~5个分隔(也有无分隔的),无色,大小为 $23.31\sim 64\times 2\sim 2.66$ 微米。据Waddell^{[14][15]}报道,菊花斑枯病原菌有同属的两个种,即*Septoria chrysanthemella* Sacc. 和 *S. obesa* Syd.,其差别主要在于分生孢子器和分生孢子大小的不同(表1)。按上述病菌形态特征,与Saccardo所描述的基本一致,故确定华南地区菊花斑枯病的病原菌为*Septoria chrysanthemella* Sacc.,与国内大多数地区报道的相同。

(二) 病原菌生理性状

1. 培养性状:病菌单孢在供试的几种培养基上先发展为无色至淡色的菌丝,在28°C恒温培养一段时间后,菌丝开始变黑褐色,缠结逐渐紧密,菌落渐趋隆起,但在整个过程中生长极为缓慢。典型的菌落为半球状,黑色、致密,挑之有海绵质感。在不同培养基上菌落大小有明显差异。

表1 菊花斑枯病菌两个种的比较*

特 性		病	菌
		<i>Septoria obesa</i>	<i>S. chrysanthemella</i>
分 孢 器 直 径		60~160μ (平均92μ)	40~124μ (平均68μ)
分 生 孢 子	长 度	44~108μ (平均74.2μ)	22~70μ (平均38.4μ)
	宽 度	2.6~4.5μ (平均3.2μ)	1.8~3.0μ (平均2.1μ)
	分 隔	5~14	0~5
	形 状	线状,末端渐尖细,通常弯曲。	线状,通常不弯曲。

* 据Waddell^[5]资料整理

2. 产孢情况: 在不同培养基上, 除菌落大小有所不同外, 分孢器形成迟早和产孢量多少也有明显差异 (表 2)。此菌在燕麦培养基上生长最好, 菌落直径最宽, 产孢量最多; 其次为在 PDA 培养基和菊花叶汁琼脂培养基上; 最差的是在人工合成培养基上, 特别是蔗糖、硫酸铵人工合成培养基, 表现菌落小、产孢迟、产孢量少。温度对病菌产孢迟早也有明显影响, 此菌在 20~24°C 下产孢所需时间最短, 在燕麦培养基和 PDA 培养基上均为 16 天; 高于或低于此温度产孢所需时间有所延长, 在 28°C 下燕麦培养基和 PDA 培养基产孢所需时间分别为 21 天和 37 天; 在 12°C 下, 在燕麦培养基和 PDA 培养基产孢所需时间则分别为 37 天和 43 天。光照或黑暗 (连续或间歇交替) 条件对病菌产孢迟早及产孢量无影响。

表 2 菊花斑枯病菌在不同培养基上菌落大小及产孢情况比较

培 养 基	培养 6.3 天的菌落直径 (毫米) [4]	产孢所需时间 [5] (天)	产孢量 [6] [7]
燕麦培养基	13	16	+++
PDA 培养基	11	16	++
20% 菊花叶汁培养基	—	16	++ ⁻
麦芽糖天门冬酰胺人工合成培养基 [1]	9	36	+
乳糖酪氨酸人工合成培养基 [2]	7	41	+
蔗糖硫酸铵人工合成培养基 [3]	7	58	—

[1] 每 1000 毫升基础培养基 + 麦芽糖 10 克、天门冬酰胺 2 克; [2] 每 1000 毫升基础培养基 + 乳糖 10 克、酪氨酸 4.25 克; [3] 每 1000 毫升基础培养基 + 蔗糖 20 克、硫酸铵 4.07 克; [4] 培养温度为恒温 28°C; [5] [6] 培养温度为 20~24°C; [7] +++ 表示 150 倍显微镜视野下含孢子 500 个以上; ++ 表示 150 倍显微镜视野下含孢子 300~500 个; — 表示 150 倍显微镜视野下含孢子 < 100 个。

3. 分生孢子萌发: 温度、湿度、酸碱度、氧气、养料对分生孢子萌发皆有明显的影响。

孢子萌发的温度范围为 12~32°C, 萌发最适温度为 26~28°C (表 3)。分生孢子致死温度为 55°C、10 分钟。

此菌分生孢子萌发必须水滴或水膜的存在, 如孢子不接触水滴或水膜, 即使空气相对湿度已达饱和, 也不能萌发。孢子萌发还需要充足的氧气, 当孢子悬浮液加盖玻片时, 其萌发率即显著偏低 (不加盖玻片的孢子萌发率为 64.78%; 加盖玻片的孢子萌发率仅 3.3%)。分生孢子在酸碱度为 pH 1、3、5、7、9、11、12 时的萌发率分别为 0、4.2、39.41、35.05、19.05、0.21、0%, 说明此菌孢子萌发最适酸碱度为 pH 5~7。

此菌分生孢子萌发需要一定的养料, 在清水中孢子不萌发或萌发率极低, 而在糖液中则萌发较好, 在 1984 年供试的 9 种糖液中, 淀粉、鼠李糖、葡萄糖、乳糖孢子萌发较其它糖液好, 最差的为麦芽糖 (表 4)。

表3 温度对菊花斑枯病菌孢子萌发的影响

温 度 (°C)	分生孢子萌发率 (%)	
	16小时后	24小时后
8	0.00	0.00
12	0.86	2.00
24	29.30	61.70
26	44.60	75.80
28	45.60	82.20
32	0.97	10.00
34	0.00	0.00

表4 不同养分对菊花斑枯病菌孢子萌发的影响

年 份	供试孢子来源	养 分	检查孢子数 (个)	孢子萌发率 (%)
1983〔1〕	病部产生	葡 萄 糖	500	64.78
		蔗 糖	500	32.65
		酵 母 液	500	48.03
		菊花叶榨出液	500	11.22
		对照 (蒸馏水)	500	0
1984〔2〕	人工培养	淀 粉	1173	12.11
		鼠 李 糖	1052	11.98
		葡 萄 糖	1000	11.80
		乳 糖	981	11.30
		甘 露 醇	1044	9.67
		蔗 糖	1007	7.85
		果 糖	1008	6.65
		木 糖	446	4.71
		麦 芽 糖	1512	2.12
		对照 (无菌水)	1507	1.73

〔1〕表中数据为恒温26°C保湿24小时的孢子萌发率，对照处理72小时后仍不发芽，各养分浓度均为1%；〔2〕表中数据为恒温28°C保湿24小时的孢子萌发率，糖液浓度均为2%。

讨 论

菊花斑枯病菌 (*Septoria chrysanthemella* Sacc.) 在本试验供试的几种培养基中，就菌落大小、产孢所需时间和产孢量来看，以燕麦培养基为最优，PDA培养基和20%菊花叶汁琼脂培养基次之，而蔗糖硫酸铵等三种人工合成培养基都较差。而据文献报道〔3〕，蔗糖硫酸铵等三种人工合成培养基被认为对*Septoria*菌属有促进产孢的作用，但

我们的试验却表明,这三种人工合成培养基至少对菊花斑枯病菌并无促进产孢的作用,而燕麦培养基等三种培养基则具有这种作用。燕麦培养基能促进本病菌产孢并较供测的其它培养基为优,这是前人所未曾报道的。

本研究使用病菌单孢培养所得的菌株,测定温度对病菌产孢及孢子萌发的影响,结果是产孢适温为 $20\sim 24^{\circ}\text{C}$;孢子萌发温度范围为 $12\sim 32^{\circ}\text{C}$,萌发适温为 $26\sim 28^{\circ}\text{C}$,这些结果,与台湾省报道^[8]的基本一致,而孢子萌发温度范围和萌发适温却与国外Perisic报道^[12]的($8\sim 28^{\circ}\text{C}$)和Waddell报道^[15]的($1\sim 35^{\circ}\text{C}$)并不一致。鉴于台湾省与华南同处亚热带地区,两者地理条件相近,所以上述国内外研究结果的差异,可能由于地理条件的不同而存在菌系不同所致。

在本研究关于不同养分对孢子萌发影响的测定项目中,1984年所进行的试验,孢子萌发率在供测的9种糖液中似乎都明显偏低,这显然与供试菌株本身发芽率偏低有关,但试验对各种糖液评价的结果,与台湾的报道^[8]却基本相同,即淀粉、葡萄糖、鼠李糖较其它糖液的孢子萌发率高,麦芽糖的孢子萌发率最低。

关于病菌孢子在清水中能否发芽的问题,1983年和1984年的试验结果似乎不一致,前者结果表明孢子在清水中不能萌发,而与台湾的报道^[8]相一致;后者结果表明孢子在水中尚可萌发但萌发率却极低。究其原因,可能跟两次试验所用的供试孢子(前者用病部自然产生的孢子;后者用人工培养的孢子)和配制孢子悬所用的清水都不同(前者用蒸馏水;后者用无菌水)有关。但无论如何,这些事实一致表明,此病菌孢子在清水中是极难萌发的。病菌孢子萌发时水滴中需要含有某些营养物质,估计菊花叶片表面分泌物可能对孢子萌发侵入有很大作用。这个问题,有待进一步研究。

本研究的病菌单孢分离采用灭菌玻璃小球或玻璃短棒蘸取孢子悬浮液移至培养基平板上滚动以获取单孢的方法,与常规划线法或稀释法有所不同。我们认为,这个方法对于那些孢子细小而又易粘结难于振落的真菌(例如炭疽菌或壳针孢菌和叶点霉菌等)的单孢分离是特别适用的,如能同时注意排除细菌的干扰,其分离效果通常都很好。

本研究有关病菌产孢及孢子萌发营养生理和生态要求的试验结果,将有助于对菊花斑枯病在田间的发生与季节消长规律的进一步探讨。

参考文献

- [1] 朱凤美:中国植病所见,《中国农学会报》,54: 23—43 (引自戴芳澜《中国真菌总汇》, 1110) 科学出版社, 1979年, 未读原文。
- [2] 邹钟琳:南京植病名录,《科学》,7: 184—195 (引自戴芳澜《中国真菌总汇》, 1115页), 科学出版社, 1979年, 未读原文。
- [3] 俞大绂:《植物病理学和真菌学汇编》, 112, 人民教育出版社, 1975年。
- [4] 泽田兼吉 (Sawada, K): 台湾产菌类调查报告 (第一篇),《台湾总督府农事试验场特别报告第19号》, 1—695 (引自戴芳澜《中国真菌总汇》, 1154) 科学出版社, 1979年, 未读原文。
- [5] 浙江省卫生局科技局:浙江栽培药用植物病害防治, (引自戴芳澜《中国真菌总汇》, 1120), 科学出版社, 1979年, 未读原文。
- [6] 戚佩坤等:《吉林省栽培植物真菌志》, 332, 科学出版社, 1966年。
- [7] 凌立: Host index of the Parasitic fungi of Szechwan, China. pl. Disease Rep. (U. S. Dept. Agr.) Supple. 173: 1—38. (引自戴芳澜《中国真菌总汇》1121), 科学出版社, 1979年, 未读原文。
- [8] 杨秀珠等:菊花黑斑病病征、病原菌形态、生理及病原性之研究,《植病会刊》(台湾), (24) 1982, 19—20。
- [9] 戴芳澜:广东地方农林试验场第六次报告 (民国十年度)。病虫害课成绩报告, 病害部, 269—274. (引自戴芳澜《中国真菌总汇》, 1126) 科学出版社, 1979年。未读原文。
- [10] 戴伦培:嘉定作物病害之调查。武汉大学理科季刊, 8 (2): 1—15. (引自戴芳澜《中国真菌总汇》, 1126, 科学出版社, 1979年。未读原文。
- [11] 上住泰、西村十郎:《花の病虫害》, 56—57, 社团法人农山渔村文化协会出版, 昭和50年。
- [12] Persic, M. et al Condition of the study of *Septoria chrysanthemelle*, Pathogen of *chrysanthemum* black spot. Manke 1978 (31): 133—139 (未读原文)。
- [13] Schneider, R. *Septoria obesa* as the agent of a leaf spot disease of *C. indicum* in Germany, Phytopath. 1959 2 (34): 269—284 (引自Rev. Appl. Mycol. (34): 410. 未读原文)。
- [14] Waddell, H. T. Parasitism of *Septoria obesa* Syd. and *S. chrysanthemella* Sacc. on the cultural *chrysanthemum*, Diss. Abstri. 1960 (20): 242 (引自Rev. Appl. Mycol. (39): 712. 未读原文)。
- [15] Waddell, H. T. et al Physiology and pathology of *Septoria* species on *chrysanthemum*, Mycologia 1963 (55): 442—452.

A PHYSIOLOGICAL STUDY OF THE CAUSAL ORGANISM
OF CHRYSANTHEMUM BLIGHT LEAF SPOT
(*SEPTORIA CHRYSANTHEMELLA* SACC.)

Zhang Baodi

Li Yukgan

(Department of Plant Protection)

ABSTRACT

The blight leaf spot of chrysanthemum is one of the most serious diseases in South China. Its causal organism has been identified as *Septoria chrysanthemella* Saccardo. The fungus which is similar to that found in Taiwan may be another strain as its optimum temperature required for growth is higher than the other strain from abroad.

Within the leaves the fungus produces pycnidia which are dark, globose, sessile, membranous, ostiolate, erumpent and $60\sim 113\mu$ in diam, Conidiophores which are short and simple, Hyaline conidia which are narrowly elongated to filiform, usually $2\sim 5$ septate, straight with a little curve and $23.31\sim 64\mu$ in length and $2\sim 2.66\mu$ in width.

In our experiment using potato agar, oat agar or chrysanthemum leaf extract agar for artificial cultures the growth of mycelia was slow forming compact black colonies. They developed best on oat agar but worst on sucrose aminonium sulfate agar. The former medium had not been reported before and the later one was considered to be the suitable culture medium for the growth of *Septoria*. It was found optimum temperature for conidia production was $20\sim 24^{\circ}\text{C}$.

The range of temperatures for conidia germination was between $12\sim 32^{\circ}\text{C}$ with the optimum temperature at $26\sim 28^{\circ}\text{C}$. Conidia germinated in water drop but not in saturated moisture. The optimum pH for the germination of the conidia was $\text{pH } 5\sim 7$, requiring sufficient oxygen and nutrients of the 9 different carbon sources used for the conidia germination. It was found that Starch, Rhamnose, Glucose and Lactose were better than the others, Maltose was found not suitable.