

# 柑桔黑斑病研究<sup>\*</sup>

曾宪铭

(植保系)

## 提 要

在广东各地,不同柑桔类对本病的反应不同,在果上表现不同类型的斑点。枝、叶上的病斑与果上的相似。

在广东果园的落叶上,发现了本病原菌(*Phoma citricarpa* McAlp.)的子囊世代(*Gulgnardia citricarpa* Kiely)。1965年在从化良新果园观察到,落叶上被囊器的成熟和子囊孢子的大量放射适值春雨时期,与柑桔开花幼果期相吻合。落叶上被囊器所产生的子囊孢子是本病主要初次接种体。

## 引 言

黑斑病是柑桔的一种重要病害,但在国内除魏景超<sup>[1]</sup>于1941年在四川作有关本病在贮藏中的研究外,尚未见对此病作较系统研究的报道。

对本病的侵染循环和病原菌的生活史,国外学者根据各自的观察和试验,见解有所分歧。在侵染循环方面,未田平七<sup>[3]</sup>于1941年认为潜伏于柑桔类枝叶上的菌丝体是本病的初次接种体,但Kiely<sup>[5]</sup>于1948年及McOnie<sup>[7][8]</sup>于1964年则认为在澳大利亚及南非,落叶上产生的有性世代(*G. citricarpa*)所产生的子囊孢子是本病主要初侵染接种体。McOnie<sup>[7]</sup>还认为喷药有防效这一点也说明了枝叶中的潜伏菌丝体在本病的发生中作用不大。

本病原菌是否有变种也是一个有争论的问题。魏景超<sup>[1]</sup>通过交互接种试验证明了原摄祐所区分的两个不同的种和变种,即*P. citricarpa* McAlp.和*P. citricarpa* McAlp. var. *mikan* Hara并无区别。

在我国,究竟本病原菌的子囊世代是否存在,其作用如何?柑桔落叶是不是初次接种体来源?有否其它接种体来源?本病菌有无变种?都是值得探讨的问题。

本研究的目的是调查本病在广东的危害及发生规律,并探索本病原菌的生活史。从1964年冬至1965年,曾先后到省内主要柑桔产区进行调查,并在从化良新果园对本病的初次接种体来源进行了观察和试验。

本文是研究生毕业论文,初稿写成于1966年,由于客观原因当时未能发表。十多年过去了,我国台湾省于1966年<sup>[10]</sup>(Liu, K.C.)已报道在不同柑桔品种的死叶上发

\* 本研究系在林孔湘教授指导下进行,敬表谢忱。

现本病原菌的有性世代, 1972年<sup>[11]</sup> (Huang, C. S. ; Chang, S. L. ) 和1973年<sup>[12]</sup> (Lee, Y. S. ; Huang, C. S. ) 对本病原菌子囊世代的成熟和子囊孢子的放射有过研究。在大陆各省区, 朱伟生等<sup>[2]</sup>于1979年对本病的发生规律和防治提出过报告, 但尚未见有关子囊世代的报道。

## 危 害

### 一、不同柑桔类果上以及枝叶上的症状

1964年9~12月, 在广东省的新会、四会、从化、惠来、普宁、潮安、饶平、兴宁和博罗等县的柑桔产区对本病进行了调查。

在上述某些柑桔产区, 果斑普遍发生。不同柑桔类的病斑类型不完全相同。年桔果上有3种斑点: (1) 斑点细小, 直径约1毫米, 圆形, 边缘砖红色, 稍隆起, 中央淡褐色, 微陷, 无分生孢子器小黑粒(以下简称分孢器黑粒), 斑点密布于果面某一部分, 多的可占整个果面的1/3~1/2, 但并不扩大联合; (2) 常见的一种斑点, 较大, 直径约1~5毫米, 通常为2~3毫米, 边缘紫黑色, 隆起, 中央灰褐色, 有数个分孢器黑粒, 几个斑点可联合成较大的不规则的病斑; (3) 整个病斑黑褐色或黑色, 深陷, 无隆起的边缘, 直径约1~2毫米, 有或无分孢器黑粒(图版—1)。红柠檬果上有与年桔上的第一和第三种斑点相象的病斑。茶枝柑上则只有与年桔上的第二种斑点相象的病斑。蕉柑果上有与年桔上的第二和第三种斑点相象的病斑, 后一种斑点在田间植株上可扩大, 并联合成不规则的大斑块, 无分孢器黑粒(图版—3)。甜橙类的果上也有两种斑点(图版—5), 与年桔上的第一和第二种斑点相象。

在果斑上, 分生孢子器黑色, 扁球形, 内生, 孔口外露,  $134.6 \times 126.4$ 微米; 产生卵圆形或圆形孢子,  $8.3 \times 6.1$ 微米。

Kiely<sup>[5]</sup>和Calavan<sup>[6]</sup>报道, 在柠檬及橙的枝叶上都有少数病斑, 这在我国过去尚未有报道。1964年, 在从化良新果园的茶枝柑、年桔和红柠檬的小枝条和从化良新、四会万垌和独岗等地的柑桔类叶片上, 都发现有本病引致的小斑点。枝条上的斑点与年桔果上的第一种斑点相似(图版—4)。一个枝条上一般有几个病斑, 大都无分孢器黑粒, 少数有2~3个小黑粒。叶片上的斑点与年桔果上的第二种斑点相似, 只是小一些, 直径约1~1.5毫米, 多数在1毫米以内。每叶有数个至几十个不等的病斑, 但不联合成大斑块, 大部分也没有分孢器黑粒, 小部分只有3~4个小黑粒(图版—2)。斑点穿透叶的两面, 有的斑点发生于中肋的背面, 不穿透两面, 呈梭形或椭圆形, 只限于中肋上。

### 二、果园中本病的发生和发展

在从化良新果园, 本病在不同时期的发生情况如表1。从表1可见, 在当地条件下, 果上病斑最早出现于7月中旬左右, 在9~10月间发展最速, 以后病情的发展趋于缓慢。为了观察生长后期本病的发展, 1965年10月18日在茶枝柑上选取无病果和病果(只有1个斑点)各42个, 标记观察, 到11月29日在许多果上都出现新的病斑, 新病果率分别达到59.5%和66.7%。每个果上新出现的病斑多在1~4个之间, 直径都在1毫米

表 1 不同时期果的发病情况<sup>(1)</sup>

调查日期	品 种	调查总果数 (个)	病果率%
1965年 7月15日	茶枝柑 <sup>(2)</sup>	—	个别发现
9月 1日	茶枝柑	936	19.6
10月18日	茶枝柑	724	66.8
11月29日	茶枝柑	1048	79.1
1965年 7月15日	年 桔 <sup>(2)</sup>	—	0.0
9月 1日	年 桔	762	12.1
10月18日	年 桔	782	54.6
11月29日	年 桔	1085	74.1

(1) 调查方法: 按果园的对角线选树取样, 在每株树的 4 个不同方向随机取果, 计算病果率, 每一品种调查 10~20 株。

(2) 树龄 20~30 年

以内。说明在这段时间里, 本病仍有所发展, 虽然不严重。

### 三、在贮藏期间病果症状的发展

柑桔类的果在贮藏期间还会发生黑斑<sup>[1][4]</sup>。1964年12月15日, 将采自从化良新果园的茶枝柑和年桔的成熟果(每一品种100个果), 用绘图墨标记病斑的数目和大小后, 置于经过0.1%升汞水喷洒消毒的木箱中, 在室温下贮藏(室温为13~20.5℃, 日平均为16℃, 相对湿度为64~87%, 日平均为71.3%)。一周后在病果上原来无病斑的部分, 都出现很多红褐色至黑褐色下陷的小斑点, 其直径皆在1毫米以内, 没有隆起的边缘, 亦无分孢器黑粒, 密集在果面的某一部分, 一般可达30~40个, 甚至100个以上。后来斑点扩大联合成大斑块, 初呈赭褐色, 坚韧, 革质, 干燥, 稍陷, 无分孢器黑粒。病斑缓慢地逐渐扩大, 约经1个半月至2个月后, 一个大病斑即可占整个果面的1/3~2/3。此时病部密生大量分孢器黑粒, 终成炭状。有少数病果, 在这些小黑粒间还长有短密的灰黑色绒毛状气生菌丝。此时, 扩大的病斑已穿过果皮, 果肉、果心及种子均变黑腐烂。这种症状与魏景超<sup>[1]</sup>所描述的很相象。但原有病斑则仍保持其原来的大小和形状。

### 病原菌的越冬及接种体来源的探索

1965年3月~11月间在从化良新果园进行了如下几方面的探索。

#### 一、果园地面上柑桔类落叶作为接种体来源的作用

在从化良新、四会万垌、饶平和潮安山区等病区, 都发现在接近腐烂的落叶的向阳一面, 着生很多小黑粒, 经显微镜检查, 发现子囊世代(*Guignardia*)和分孢世代(*Phoma*)两种子实体。

子囊世代的被囊器内生至半表生, 黑色, 球形, 139.4×128.1微米, 有孔口。子囊棒状, 无侧丝, 117.4×14.9微米, 8孢子, 孢子单列或双列。子囊孢子无色, 单胞, 近菱形或纺锤形, 15.3×6.7微米, 在孢子两端有透明的粘胶状的附属物(见图1)

分孢世代的形态特征与果斑上的相似, 但产生两种分生孢子, 即卵圆形或圆形孢子

(8.6×6.1微米)和短杆状孢子(5.7×1.7微米),两端略膨大(见图2)。

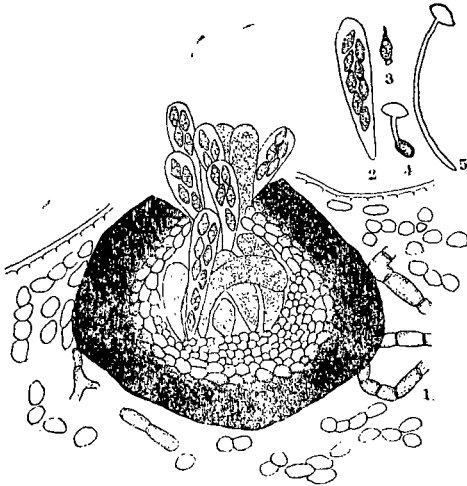


图1 柑桔落叶上的*Guignardia citricarpa* Kiely 的形态

1.被囊器中子囊的着生情况;2.子囊及子囊孢子;3.子囊孢子及其两端的附属物;4.子囊孢子萌发生成附着胞;5.子囊孢子萌发成的芽管。

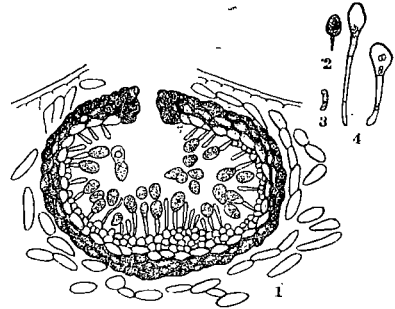


图2 柑桔落叶上的*Phoma citricarpa* MeAlp. 的形态

1. 分生孢子器; 2. 分生孢子及基部的附属物; 3. 杆状的分生孢子; 4. 分生孢子萌发形成芽管。

(一) 落叶上子实体的形成和成熟: 1965年3~7月间(每隔5~7天或更长一些时间)和9月1日, 10月18日和11月30日, 对落叶上被囊器和分孢器的数量及成熟时期进行了观察。取果园落叶上小黑粒作镜检, 每次检查10~40片叶, 每片叶检查20个小黑粒, 分别计算出成熟被囊器(有子囊及子囊孢子)、未成熟被囊器(只有子囊无子囊孢子)及分生孢子器所占的百分率(见图3)。

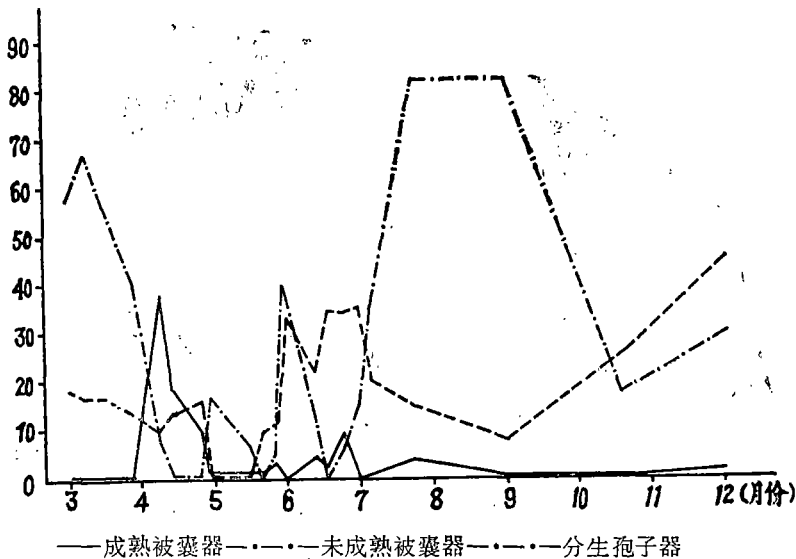


图3 柑桔落叶上*G.citricarpa* Kiely和*P.citricarpa* McAlp.一年间的数量变化。

从图 3 可以看出, 1965 年在从化良新果园, 4 月 8 日前后落叶上被囊器的成熟和子囊孢子的放射达到高峰, 成熟的被囊器数占所检查的小黑粒总数的 38.0%。之后, 子囊世代尤其是成熟被囊器的数量一直保持在较低水平, 特别是 7~10 月数量更少。10 月之后, 子囊世代的数量显著增加, 到 11 月底, 未成熟的被囊器的数量高达 44.5%。

从图 3 还可看出, 落叶上被囊器大量成熟在四月初是较为突然的, 因为在整个三月份都未发现有成熟的被囊器。这说明在当时当地条件下, 被囊器很快就通过了成熟的最后阶段。

在调查中还看到, 在 4 月 29 日新的落叶中, 到 5 月 26 日已有少量成熟的被囊器, 即在一个月之内就可形成成熟的被囊器。而上年冬天和当年初春的落叶, 在四月份以前没有发现成熟的被囊器。这就说明, 在不同时期(显然由于温湿度的差异)落叶上被囊器形成和成熟的时间不相同。这与 McOnie<sup>[8]</sup> 于 1964 年在南非的发现相吻合。

分孢世代的数量变化与子囊世代相交替。在开花幼果期, 落叶上的分孢器很少, 但子囊孢子的成熟放射则处于高峰, 而在 7 至 9 月间, 当子囊世代数量最少时, 分孢器的数量则达到最高峰, 占全部小黑粒的 81.8%。

## (二) 落叶上子实体的致病作用

### 1. 落叶上子实体分离物的培养性状与果斑分离物的比较

(1) 落叶上子实体分离物的培养性状: 将落叶上子实体产生的分生孢子和子囊孢子采用单孢子分离培养法进行分离培养, 所得的纯培养物只产生分生孢子器和分生孢子, 不产生被囊器。菌落较小, 初期都长出灰白色的, 短而密集的菌丝体, 生长缓慢, 在 25~28℃ 下培养 5 天后即变为黑色, 直径约为 1.5~2 厘米, 一周左右即长满了分孢器黑粒, 炭质, 坚硬, 表面凹凸不平, 并有白色粘液(内含分生孢子)涌出来。分生孢子的类型, 形状和大小与在落叶上的相似, 只是卵圆形孢子比在落叶上和果斑上的稍大一些, 约为 9.7×7.9 微米。

(2) 果斑分离物的培养性状: 从广东各地柑桔类的病果上, 采用常规方法, 分离得到的纯培养物大部分是分孢世代 (*Phoma*), 小部分是分孢世代与子囊世代 (*Guignardia*) 混合的培养物。

单纯分孢世代的培养物的培养性状与落叶上子实体分离物相同, 也有两种形状的分生孢子。分孢世代和子囊世代混合的培养物, 生长较快, 菌落较单纯分孢世代的为大, 在 25~28℃ 下培养 5 天后, 直径约为 3~4 厘米, 黑色, 表面平整, 约经 15~30 天后, 即可产生成熟的被囊器。子囊孢子的形态特征与落叶上的相似, 大小也差不多, 14.3×6.4 微米。在此之前, 即在培养一周左右时, 已产生大量上述的两种分生孢子。

2. 接种试验: 为了明确从各种不同材料分离得到的培养物的致病性, 是否属于同一种真菌, 进行了如下的接种试验。

(1) 树上果喷雾接种: 用华南农学院试验果园(无病区)6 年生蕉柑树的果, 分别于 1965 年 3 月 24 日, 4 月 20 日及 10 月 13 日进行接种。将落叶上分生孢子的单孢分离物和树上果斑的分离物(只产生分孢世代)及贮藏期果斑的分离物, 用无菌水配成孢子悬浮液, 用喉头喷雾器直接喷洒于果上, 共计三次。前两次每一培养物各接种 10 个结果枝,

后一次每一培养物各接种果10个。接种后用薄膜袋将整个结果枝或每一个单纯果套住，保湿48小时后除去。用无菌水代替病原物悬浮液同样喷洒处理作为对照。

(2) 室内成熟果伤口接种：1965年5月6日，12月6日及1966年1月17日分别将蕉柑，茶枝柑和朱砂桔的成熟果，用70%酒精表面消毒，在果皮上用消毒解剖刀各切伤口2处，后取各种纯分离物（除上述3种外，还有落叶上子囊孢子的单孢分离物，树上果斑的分孢世代和子囊世代混合培养物）的少量培养物塞入切口，放入定温箱中（15~20℃）。在1965年5月6日的接种中，还用生有*Guignardia*的成熟被囊器的落叶作为接种材料。接种时剪取一小块落叶组织，置于0.1%升汞水中消毒5分钟，在无菌水中洗涤后，直接塞入切口中。对照除接种体不含病原物外，其它处理同上。

1965年3月24日和4月20日树上接种的果，七月中旬检查时，已开始有少量发病，到后期其病状与自然发病的相同（图版—6），即具有上述蕉柑上的两种病斑，从病部分离都得到本病原菌的分孢世代（*P. citricarpa*）。10月13日接种的果，12月24日检查时，皆不发病。将这些果采收并置于25℃恒温箱中，企图诱发其贮藏期病斑，1966年1月17日检查，仍未见病斑出现。

伤口接种的果，在15~20℃下，一般在第三天就在切口周围开始出现赭褐色至黑褐色下陷病斑（与贮藏果斑相似），以后病斑缓慢扩展，形成直径1~2厘米的大斑块（图版—7）。从接种形成的病斑分离得到的绝大部分分离物是本病原菌的单纯分孢世代（*P. citricarpa*），只是用分孢世代和子囊世代混合的培养物及落叶上子囊孢子的单孢分离物接种引致的病斑，则分离到少量的本病原菌的分孢世代和子囊世代（*G. citricarpa*）混合的培养物。

上述试验结果表明：①落叶上的子囊世代（*Guignardia*）和分孢世代（*Phoma*）以及从果斑上分离得到的子囊世代和分孢世代都能致病，可以认为确是柑桔黑斑病菌的子囊世代（*G. citricarpa* Kiely）和分孢世代（*P. citricarpa* McAlp.）；②贮藏期果斑的分离物接种于柑树幼果上，引致树上果斑，树上果斑分离物接种于成熟柑果上，则引致贮藏期果斑；③在果园，柑桔黑斑病菌只能在开花幼果期侵入。10月13日接种的果不发病，说明此时病原菌已不能侵入果皮组织。

## 二、枝叶上的病斑作为接种体来源的观察和试验

枝和叶的发病情况，根据1965年11月间在从化良新果园的调查，一般都很轻。叶斑上分孢世代的着生、形态、大小与果斑和落叶上的相似，只产生卵圆形或圆形的分生孢子， $10.1 \times 7.4$ 微米。枝条上的病斑很少产生分孢器。纵有分孢器，其内部也未见有分生孢子。

将枝、叶上病斑进行分离、培养，接种和再分离，其试验方法和所得结果与上述果斑的相同。分离物大部分为单纯分孢世代，小部分为分孢世代和子囊世代混合的培养物，都能引致树上果斑和贮藏果斑。

## 结论及讨论

广东各柑桔区，不同柑桔类果上的黑斑病病斑类型不同。枝和叶上也有与果斑相似的

病斑。

柑桔落叶上的子囊世代是本病的主要初次接种体。1965年在广东从化良新果园的落叶上，发现本病原菌的子囊世代，被囊器在四月柑桔谢花期间成熟，放射大量的子囊孢子，侵染幼果。这与Kiely<sup>[5]</sup>在澳大利亚和McOnie<sup>[7]</sup><sup>[8]</sup>在南非的观察结果和见解是一致的。

落叶上的分生孢子作为初次接种体的作用不大。在从化良新果园，分生孢子的大量出现有两个高峰，一个是在三月初，另一个在七至九月份。第一个高峰期显然没有赶上柑桔的开花幼果期，而在第二个高峰期则果实早已进入了不可侵入的阶段<sup>[5]</sup><sup>[7]</sup>。

枝斑、叶斑作为本病的接种体来源的可能性较小。根据1965年在从化良新果园的调查，枝、叶发病的数量很少。

在贮藏期间，本病继续发展。尽管树上果斑和贮藏果斑有所不同，但交互接种试验证明，引致柑桔贮藏果斑和引致树上果斑的病原菌，可以互相侵染，产生相应的症状，说明这两种不同时期的病斑是由同一种病原菌引起的。这与魏景超<sup>[1]</sup>的见解也是相同的。

从柑桔果，枝和叶上病斑分离得到的纯培养物有两种。一种为单纯分孢世代，另一为子囊世代和分孢世代混合的培养物。在PDA培养基上，前者生长较慢，后者生长较快。这与Freen<sup>[9]</sup>报道的慢生长型（分孢型）和快生长型（子囊型）的结果是相似的。

建议结合喷药，进行冬季清园，收集果园落叶焚烧，以减少初次接种体来源。

#### 引用文献

- [1] 魏景超, 1941, 四川甜橙之贮藏病害, 《金陵学报》9(1—2): 239~268.
- [2] 朱伟生等, 1979, 柑桔黑星病研究, 《中国柑桔》1979(3): 36~42.
- [3] 未田平七, 1941, 柑桔黑星病菌寄生に 関する实验的研究(预报), 《台湾博物学会会报》31(217-218): 416-432(华南农学院陈爱莲先生代看)。
- [4] Lee, H.A. 1921 *Phoma citricarpa* A deutromycete parasitic on *citrus sinensis* and *C. nobilis* in China. *Int. Rev. Sci. & Prac. Agric.* 12(7): 926-927.
- [5] Kiely, T.B. 1948 Preliminary studies on *Guignardia citricarpa* n.sp., the ascigerous stage of *Phoma citricarpa* McAlp. and its relation to black spot of citrus. *Proc. Linnean Soc. N.S.W.* 73(5-6): 249-292.
- [6] Calavan, E.C. 1960 Black spot of citrus. *Calif. Citrogr.* 46(1): 4, 18, 20-24.
- [7] McOnie, K.C. 1964 Source of inoculum of *Guignardia citricarpa*, the citrus black spot pathogen. *Phytopath.* 54(1): 64-67.
- [8] — 1964a Orchard development and discharge of ascospores of *Guignardia citricarpa* and the onset of infection in relation to the control of citrus black spot. *Phytopath.* 54(12): 1448-1453.
- [9] Freen, R.T. 1966 Physiological studies with *Guignardia citricarpa* Kiely, the cause of the black spot disease of citrus. *S. Afr. J. Agric. Sci* 9(4): 777-793(R.A.M. 46: 3436 原文未见)
- [10] Liu, K. C. 1966 Studies on citrus black spot. I. Infection of fruit by the causal

fungus.(R.A.M.47:1126 原文未见).

- [11] Huang,C.S., Chang, S.L, 1972 [Leaf infection with citrus black spot and perithecial development in relation to ascospore discharge of *Guignardia citricarpa* Kiely.] Journal of Taiwan Agricultural Research 21(4):256-263(R.P.P.53:951 原文未见) .
- [12] Lee,Y.S.; Huang, C.S. 1973 [Effect of climatic factors on the development and discharge of ascospores of the citrus black spot fungus.] Journal of Taiwan Agricultural Research 22(2):135-144(R.P.P.53:1384 原文未见).

## STUDIES ON THE BLACK SPOT OF CITRUS (*Guignardia citricarpa* Kiely )

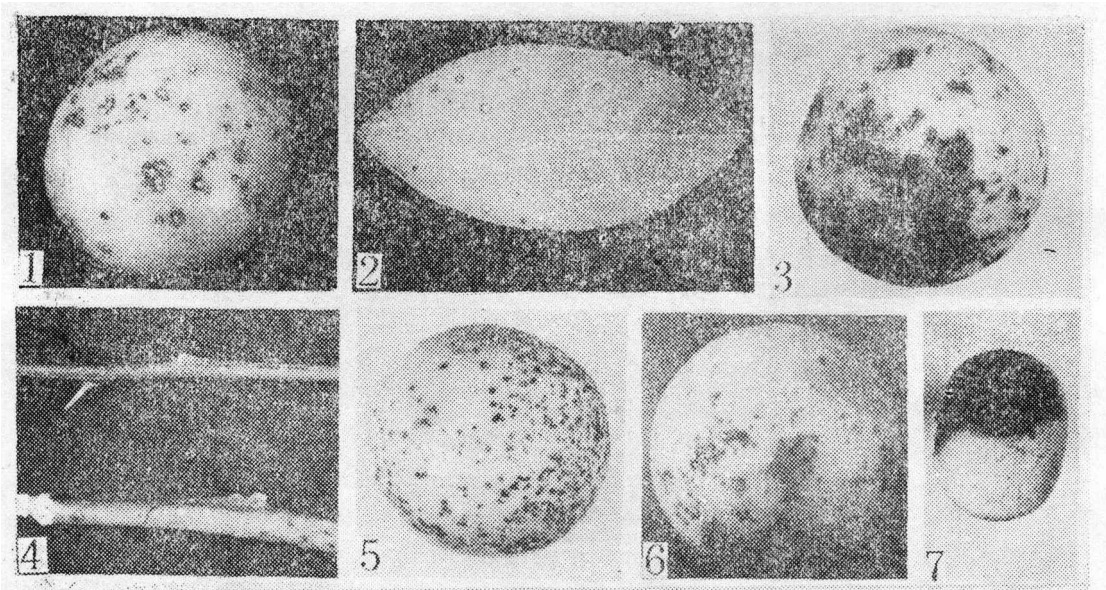
Zeng Xiangming

(Department of Plant Protection)

### ABSTRACT

Studies on the symptomatology, varietal susceptibility, and the life history of the pathogen of black spot of citrus were made in 1964-65. Characteristic spots on infected branches and leaves and the ascigerous stage of the pathogen (*Guignardia citricarpa* Kiely) were found for the first time in China. Until then the pathogen had been known in its imperfect stage as *Phoma citricarpa* McAlp.

In 1965 perithecia of the pathogen in fallen leaves on the ground in an orchard in Conghua county of Guangdong Province were found to ripen and discharge ascospores in large number in rainy days just at the time of blooming of citrus trees. It is obvious that the ascospores constitute the main primary inocula of infection, which until then had remained obscure in China.



图版 1.年桔果上的病斑, 2.红柠檬叶上的病斑, 3.蕉柑果上的病斑, 4.红柠檬枝条上的病斑, 5.雪柑果上的病斑, 6.蕉柑幼果用分生孢子悬浮液喷雾接种引致的病斑; 7.朱砂桔成熟果伤口分别用子囊世代和分孢世代接种引致的腐烂病状。