

冬枣黑疗病病原菌鉴定

靳增军¹, 刘春琴², 甄文超¹, 曹克强¹, 王庆雷², 杜凤华¹

(1. 河北农业大学 植物保护学院, 河北 保定 071001; 2. 沧州市农林科学院, 河北 沧州 061001)

摘要: 近年在河北省、山东省等地的冬枣果实上发现一种新病害—冬枣黑疗病, 又称黑斑病或果实黑点病。经2004—2005年在河北省和山东省7市县调查, 从18批次219个冬枣病果样品中分离得到653个分离物, 经筛选、纯化和回接试验, 依照柯赫氏法则对冬枣黑疗病病原菌进行了研究, 根据病原菌的形态特征, 病原菌鉴定为毁灭茎点霉 *Phoma destructiva* Plowr. 和细交链孢 *Alternaria alternata* (Fr.) Keissler。

关键词: 冬枣; 黑疗病; 病原菌鉴定

中图分类号: S665.1 文献标识码: A 文章编号: 1000-7091(2006)增刊-0162-04

Identification of Pathogens Causing Black Spot on Dongzao Jujube

JIN Zengjun¹, LIU Chunqin², ZHEN Wenchao¹, CAO Keqiang¹,
WANG Qinglei², DU Fenghua¹

(1. College of Plant Protection, Hebei Agricultural University, Hebei Baoding 071001, China;

2. Cangzhou Academy of Agricultural and Forestry Science, Hebei Cangzhou 061001, China)

Abstract: A new disease—Dongzao jujube black spot in Hebei and Shandong provinces was reported. The black spot of Dongzao jujube has been studied in the laboratory and in fields during 2004—2005. 653 isolates from 219 infected Dongzao jujube samples from eighteen times of sample collection were selected, purified and reinoculated. The pathogens were inoculated on fruits through wounds and on surface directly. According to Koch's Rule and cultural and morphological characters, two fungal pathogens were identified as *Alternaria alternata* (Fr.) Keissler and *Phoma destructiva* Plowr. .

Key words: Dongzao jujube; Black spot; Identification of pathogens

冬枣为鼠李科枣属落叶果树, 河北沧州、山东沾化为主产区, 多年来冬枣在国内外市场久赋盛名, 但近年来冬枣果实黑疗病发生日趋严重, 蔓延迅速, 由2000年初病果率不足5%上升到现在的30%, 严重的病果率达70%。该病如不及时控制, 冬枣这一地方名产的经济价值将在很大程度上受到影响。吴玉柱^[1]、季延平^[2]、辛玉成^[3]等对冬枣黑斑病(黑疗病)进行了初步研究, 吴玉柱、季延平认为该病害主要由细极链孢 *Alternaria tenuissima* 单独侵染引起; 而辛玉成认为黄单孢杆菌属细菌(*Xanthomonas*)和假单孢杆菌属细菌(*Pseudomonas*)病原复合侵染导致该病害。鉴于目前人们对引起冬枣黑疗病的病原菌存

在分歧, 而在生产上, 冬枣黑疗病发展日益严重的局面未能得到有效控制, 因此, 全面系统研究冬枣黑斑病原尤为重要, 准确的病原鉴定可为病害的有效防治奠定理论基础。本试验报道了2004—2005年对病原菌的分离鉴定结果。

1 材料和方法

1.1 病样采集

2004—2005年于叶片和果实发病期(6月下旬~8月下旬), 在沧州市所属沧县、献县、南皮、黄骅、海兴、沧州市农林科学院农场选择有代表性的冬枣园, 多批次采集新鲜冬枣叶片和病枣果。

收稿日期: 2006-08-29

基金项目: 河北省农作物病虫害生物防治工程技术中心项目资助

作者简介: 靳增军(1981-), 男, 河北成安人, 硕士, 主要从事植物病理学研究工作; 曹克强为通讯作者。

1.2 病原菌分离与鉴定

1.2.1 病菌分离 采用马铃薯、葡萄糖、琼脂培养基(PDA),按照常规方法^[5]进行组织分离培养。取新鲜病枣果,先用70%酒精棉球对枣果表面消毒,再用新配制的3%次氯酸钠溶液进行表面灭菌半分钟,然后无菌水清洗3次;每一病斑于病健交界处分离3~5块病组织,同一病斑的病组织块放于同一个培养皿中,25℃恒温箱内培养。5d后检查病组织分离菌落,记录分离物的种类和数量,并及时纯化,转入试管保存于4℃冰箱。分离物分别以菌1,2,3……表示。

1.2.2 病菌的纯化和鉴定 将纯化的病原菌在PDA培养基上于25℃恒温黑暗条件下培养,观察菌落形态、颜色等,观察分生孢子器、分生孢子形状、颜色、着生情况。测量孢子大小,依照病原菌培养性状及形态特征,按文献[4~8]所述特征对病菌进行鉴定。

1.2.3 分离物的致病性测定 2004-2005年连续两年,将分离到的3种真菌(菌1,2,3),分别单独或混合在室内和田间进行回接试验。

1.2.3.1 配制孢子悬浮液 将在PDA培养基上培养7d的分离物,加无菌水制成孢子悬浮液。悬浮液中孢子浓度为 10×40 倍显微镜下每视野40~60个孢子。

1.2.3.2 室内接种方法 采集7月20日前的幼

果、缓慢生长期和白熟期新鲜健康枣果,用70%酒精棉球对枣果表面消毒,无菌水冲洗3次。用打孔器将滤纸切成直径为0.6cm的圆纸片,蘸取孢子悬浮液后轻贴于枣果表面,每果接种三个位点,每处理10~15个果。枣果分刺伤和无伤两种方式接种,刺伤处理即用灭菌的医用针头刺伤果皮造成伤口。分离物采取单接和混合接种。以无菌水作对照(ck)。接种后的枣果在25~30℃室温下保湿培养,每天观察,记录果实发病情况,7~10d后统计发病率。

1.2.3.3 田间接种方法 选轻病冬枣园(沧州市农林科学院示范园),在无病果的枝上进行分离物田间接种,分别对7月20日前的幼果、缓慢生长期和枣果白熟期按照室内接种的方法接种,接种处覆盖灭菌湿脱脂棉,并套硫酸纸袋(规格为7.0×12cm)保湿。每处理30个果。以无菌水作对照。8月下旬和9月上、中旬调查接种果发病情况,记录发病果数,统计发病率。

2 结果与分析

2.1 采集分离结果

2004-2005年连续2年采集典型病果进行室内分离培养,主要分出真菌(见表1):茎点霉属真菌和交链孢属真菌,前者2年平均分离频率为45.6%,后者2年平均分离频率为48.8%;其他菌主要为真菌 *Fusicoccum* sp,2年平均分离频率仅为5.6%。

表1 2004-2005年冬枣黑疗病病果分离结果

Tab. 1 The isolated results of Dongzao in different places during 2004-2005

年份 Year	样本数 Diseased Samples	病组织块数 Number of tissues	茎点霉属(%) Phoma sp. isolating rate	交链孢属(%) Alternaria sp. isolating rate	其他菌(%) Isolating rate of the others
2004	82	263	46.8	48.1	5.1
2005	137	390	44.5	49.5	6.0
平均分离频率(%)			45.6	48.8	5.6

2.2 鉴定的结果

2.2.1 分离物的回接试验 2004~2005年连续2年,将分离物分别在室内和田间进行回接及再分离(表2;图1),结果表明,不论室内或田间,分离物接种枣果均可导致枣果发病,其表现与田间典型症状一致。田间枣果刺伤接种发病率刺伤高于无伤接种发病率,*Phoma* sp. 刺伤接种处理中,最高发病率为62.5%,平均为46.8%,无伤处理的最高发病率为19.6%,平均为16.9%;*Alternaria* sp. 刺伤接种处理的最高发病率为66.0%,平均为46.4%,无伤处理的发病率比较低,平均为19.2%。室内条件下,刺

伤处理中,*Phoma* sp. 接种最高发病率为84.2%,平均为70.6%,*Alternaria* sp. 接种最高发病率为100%,平均为75.4%;无伤处理中,*Phoma* sp. 和 *Alternaria* sp. 接种平均发病率分别为14.6%,14.2%。而且,无论田间或室内接种发病的枣果,均能重新分离出接种菌,经鉴定证实与所接菌相同。田间接种再分离频率 *Phoma* sp. 和 *Alternaria* sp. 分别为87.0%,87.5%,*Phoma* sp. 和 *Alternaria* sp. 室内接种平均再分离频率分别为79.5%,83.6%。

依据柯赫氏法则,充分证明分离物为冬枣黑疗病的病原菌。

表 2 3种真菌的致病性测试及再分离结果

Tab. 2 Tests on pathogenicities and re-separation of the species of fungi

接种地点 Locations	接种时间 Inoculation time	接种果数 Number of the inoculated	接种方式 Inoculation method	Phoma sp.		Alternaria sp.		Fusicocum sp.*
				发病率(%) Disease incidence	再分离率(%) Re_isolation frequencies	发病率(%) Disease incidence	再分离率(%) Re_isolation frequencies	发病率(%) Disease incidence
室内 Room	2004- 8- 17	24	刺伤	83.3	85.7	91.7	79.3	
	2004- 9- 19	24	刺伤	41.7	76.0	58.3	81.0	100
	2005- 8- 1	24	刺伤	75.0	73.1	83.3	82.1	66.7
	2005- 8- 15	24	刺伤	68.7	76.9	43.7	86.7	
	2005- 9- 6	21	刺伤	84.2	85.7	100	88.9	78.9
	平均/ %			70.6	79.5	75.4	83.6	81.9
	2004- 8- 17	24	无伤	25.0	69.5	16.7	84.6	
	2004- 9- 19	24	无伤	33.3	73.9	25.0	76.1	41.7
	2005- 8- 1	24	无伤	8.3	70.6	16.7	74.4	54.5
	2005- 9- 6	21	无伤	6.2	69.2	12.5	72.7	
平均(%)			14.6	70.8	14.2	77.0	33.8	
田间 Field	2005- 7- 8	30	刺伤	31.2	85.4	26.8	87.8	15.0
	2005- 8- 5	50	刺伤	62.5	88.6	66.0	87.2	20.0
	平均(%)			46.8	87.0	46.4	87.5	17.5
	2005- 7- 8	30	无伤	14.3	73.7	20.0	78.3	6.4
	2005- 8- 5	50	无伤	19.6	66.7	18.4	71.4	2.3
	平均(%)			16.9	70.2	19.2	74.9	4.3

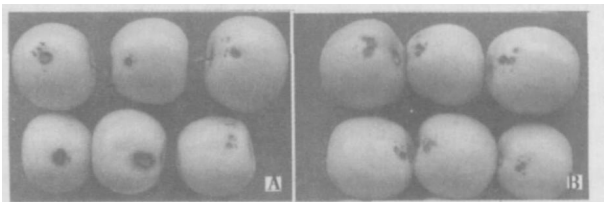
注: * 无论室内和田间回接, *Fusicocum* sp. 接种时接种处变褐、软腐, 与典型症状不一致。

2.2.2 病原菌的培养性状和鉴定 *Phoma* sp. (图2): 在 PDA 培养基上, 菌落近圆形, 浅灰至黄褐色, 易变异, 有的菌落呈扇形或瓣状。菌落中心部分菌丝隆起。气生菌丝毛毡状, 灰白色。后期菌落表面产生大量黑点(分生孢子器), 有时黑点呈轮纹状排列。

分生孢子器褐色至黑褐色, 球形或近球形, 或瓶形, 假薄壁状, 散生在培养基表层, 大小为: (197.2) 216.9~ 345.1(493.0) μm \times (128.2) 147.9~ 305.7(353.3) μm 。产孢细胞无色, 光滑, 瓶体式产孢。分生孢子卵圆形、卵形, 无色或浅色, 有或无油球, 大小: (2.6) 5.2~ 7.8 μm \times (2.4) 4.5~ 6.4 μm 。

根据以上形态特征, *Phoma* sp. 菌株被鉴定为: 毁灭茎点霉 *Phoma destructiva* Plov.。

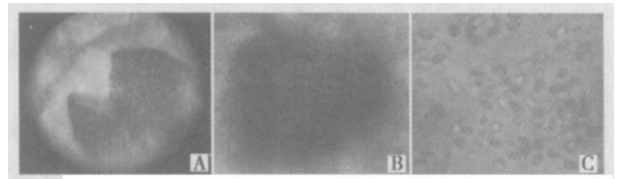
分类地位: Deuteromycotina, Coelomycetes, Sphaeropsidales, *Phoma*。



A. *Phoma* sp. 接种枣果后发病症状; B. *Alternaria* sp. 接种枣果后发病症状 A. Symptoms after inoculation by *Phoma* sp.
B. Symptoms after inoculation by *Alternaria* sp.

图 1 接种健枣发病照片

Fig. 1 The photos of the symptoms after inoculation by two pathogens for 20 days

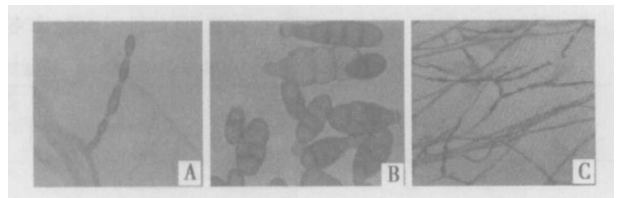


A. 分生孢子器; B. 分生孢子器; C. 分生孢子

A. The broken pycnidium; B. Pycnidium; C. Conidia

图 2 *Phoma* sp. 菌株的分生孢子器和分生孢子

Fig. 2 Conidia and Pycnidium of the *Phoma* sp.



A. 分生孢子梗和串生的分生孢子; B. 分生孢子; C. 分生孢子串生

A. Conidiophore and the conidia in a chain; B. Conidia;

C. Conidia in chains

图 3 *Alternaria* sp. 菌株的分生孢子梗和分生孢子

Fig. 3 Conidia and conidiophore of the *Alternaria* sp.

Alternaria sp. (图3): 菌落圆形、正面墨绿色、背面黑色。12 h 黑暗交替培养可形成明显的同心轮纹。菌丝初为无色, 后为浅褐色, 有隔, 分枝。分生孢子梗分枝或不分枝, 浅榄褐色, 屈膝状, 单生, 合轴式延伸, 2~ 3 个隔膜, 孔生式产孢。分生孢子常聚为带有分枝的长链状, 一般 6~ 12 个串生。分生孢子倒棒形、卵圆形, 淡褐色至褐色, 平滑, 少数有小细点, 具有纵隔膜 1~ 2 个, 横隔 3~ 4 个, 大小为: (11.

7) 16.8~47.3(49.3)(m × (6.5)9.1~12.9(15.5)(m)。分生孢子常有喙, 喙较直, 不分枝, 无隔膜, 大小为 4.9~6.5(m × 1.3~2.7(m)。

根据以上形态特征, *Alternaria* sp. 菌株被鉴定为: 细交链孢 *Alternaria alternata* (Fr.) Keissler

分类地位: Deuteromycotina, Hyphomycetes, Hyphomycetales, Dematiaceae, *Alternaria*。

3 结论与讨论

冬枣黑疗病又名黑斑病、果实黑点病。曾报道该病原菌为 *Alternaria tenuissima* (Fr.) Wiltshire 及 *Xanthomonas* 和 *Pseudomonas*。本研究经两年、多地广泛采集病果标样, 依照柯赫氏法则进行分离、回接、再分离, 得到致病菌, 分别为 *Phoma destructiva* Ploewr. 和 *Alternaria alternata* (Fr.) Keissler, 两者均不同于以往的报道。据文献记载, 茎点霉属真菌 *Phoma destructiva* 和细链格孢菌 *Alternaria alternata* 致病力强, 在生产上造成多种植物病害, 也可以侵染、危害经济林树种及花卉^[5-11], 但它们作为冬枣树上重要病原菌尚未见报道。

分离频率、刺伤和无伤接种以及发病症状与田间典型症状相比较, 证明了 *Alternaria alternata* 和 *Phoma destructiva* 是黑疗病的 2 种病原菌, 关于分离频率, *Alternaria alternata* 高于 *Phoma destructiva*, 说明 *Alternaria alternata* 是优势种。但不同生态枣树和不同气候条件下其优势种可能会有一定幅度的变化, 这势必给防治带来一定难度。因此, 应对不同生态枣园的优势种, 通过采样分离, 给予确认。

Fusicoccum sp. 菌株在刺伤和无伤接种条件下能够引起发病, 但其症状为腐烂型病斑, 与该病典型症状差异较大, 有必要对其致病作用作进一步研究。

关于枣果实病害病原菌的研究, 郑晓莲^[12] 等提出枣缩果病病原有盾壳霉菌 (*Coniothyrium olivaceum*)、交链孢菌 (*Alternaria alternata* f. sp. Tenuis)、小穴壳菌 (*Dothiorella gregaria*) 3 种; 康绍兰^[13] 等认为枣铁皮病是由细交链孢菌 (*Alternaria alternata* (Fr.) Keissler)、毁灭茎点霉菌 (*Phoma destructiva* Ploewr)、壳梭孢菌 (*Fusicoccum* sp.) 3 种菌单独或共同侵染引起。上述作者所报道的枣果实病害

的病原菌为 1~3 种, 可单独或复合侵染, 而本研究经接种证实, 接种 *Alternaria alternata* 和 *Phoma destructiva* 均表现出与自然发病的黑疗病典型症状一致。康绍兰等研究的大枣属于制干品种, 而本研究的冬枣属于鲜食品种, 树种不同是否能相互侵染需进一步研究。

本研究所确定的 2 种病原, 虽然与康绍兰^[13] 等报道的枣铁皮病病原菌中的 2 种是相同的, 但经比较后认为, 这是 2 种区别显著的枣树病害, 后者症状是全果性症状, 且枣果易于脱落, 而黑疗病病果属病斑型症状, 且病枣不脱落。

致谢: 本文病原菌鉴定工作得到河北农业大学植物保护学院张志铭教授的指导和朱杰华教授的帮助, 谨表谢意。

参考文献:

- [1] 吴玉柱, 季延平, 刘会香, 等. 冬枣黑斑病病原菌的鉴定[J]. 中国森林病虫, 2005, 24(2): 1-3.
- [2] 辛玉成, 王贵禧, 崔卫东, 等. 沾化冬枣果实病害的发生与生态相关性研究初报[J]. 莱阳农学院学报, 2003, 20(4): 255-257.
- [3] 季延平, 吴玉柱, 刘会香, 等. 冬枣黑斑病病原菌生物学特性的研究[J]. 山东林业科技, 2003, 149(6): 7-8.
- [4] 方中达. 植病研究方法[M]. 北京: 中国农业出版社, 1998.
- [5] 陆家云. 植物病原真菌学[M]. 北京: 中国农业出版社, 2001.
- [6] 魏景超. 真菌鉴定手册[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1979.
- [7] 张天宇. 中国真菌志. 第 16 卷, 链格孢属[M]. 北京: 科学出版社, 2003.
- [8] 王洪凯, 张天宇, 张猛. 链格孢属真菌分类研究进展[J]. 山东农业大学学报, 2001, 32(3): 406-410.
- [9] 袁高庆, 赖传雅, 黄丽华. 毛叶枣黑斑病及其生物学特性的研究[J]. 中国农学通报, 2003, 19(1): 44-47.
- [10] Eills M B. More Dematiaceous Hyphomycetes, C. M. I., Kew, Surrey, England, 1976, 225-227.
- [11] Sutton B C. The Coelomycetes. Comm. Mycol. Inst. Kew, England, 1980.
- [12] 郑晓莲, 齐秋锁, 赵光耀, 等. 枣缩果病病原诊断初报[J]. 植物保护, 1995, 21(2): 19-21.
- [13] 康绍兰, 邸垫平, 李兴红, 等. 枣铁皮病病原鉴定[J]. 植物病理学报, 1998, 28(2): 165-171.