

# 烟草赤星病原菌生物学特性及致病性研究

彭坤<sup>1</sup> 王士良<sup>2</sup> 刘富<sup>1</sup> 马波<sup>1</sup> 沈先奎<sup>1</sup> 吴建昌<sup>1</sup> 黄保宏<sup>3</sup> 刘露<sup>4\*</sup>

<sup>1</sup> 湖南袁创超级稻技术有限公司,湖南浏阳 410323;

<sup>2</sup> 中种华南(广州)种业有限公司,广东广州 510000;

<sup>3</sup> 安徽科技学院,安徽凤阳 233100;

<sup>4</sup> 肥西种子管理站,安徽肥西 231200)

**摘要** 采集具有典型烟草赤星病症状的烟株分离纯化得到烟草赤星病菌,并对烟草赤星病菌进行生物学特性及致病性研究。结果表明,该菌生长温度为10~35℃,最适生长温度为25℃;分生孢子和菌丝致死温度分别为50、49℃;光照12 h/d有利于菌丝生长和孢子产生;孢子悬浮液棉球接种和菌丝块接种均有利于云烟87成株期发病,所致病斑平均直径分别为5.73、5.23 mm,平均病叶率分别为67.23%和78.33%。

**关键词** 烟草赤星病;生物学特性;致病性

**中图分类号** S435.72 **文献标识码** A

**文章编号** 1007-5739(2021)02-0078-03

**DOI:** 10.3969/j.issn.1007-5739.2021.02.032

开放科学(资源服务)标识码(OSID):



在烟草生长过程中,烟草赤星病是对其影响最大的真菌病害。1892年烟草赤星病最早在美国被发现,之后在1956年突然暴发于美国的北卡罗来纳州,并且造成了高达2 100万美元的损失<sup>[1]</sup>。20世纪50年代之前,烟草赤星病是非洲地区烟草生产过程中最严重的病害,1931年烟草赤星病在津巴布韦肆虐并造成了巨大损失。之后,烟草赤星病陆续在南美洲的委内瑞拉、阿根廷、加拿大、哥伦比亚以及大洋洲的澳大利亚等地发生。烟草赤星病在我国各烟区均有发生,并且造成了严重后果,诸如安徽、贵州、广西、河南、黑龙江、湖南以及山东等地都发生过烟草赤星病。当前烟草赤星病的发病率通常在5%~10%,严重地区发病率超过20%,甚至高达50%以上,严重影响了烟草的正常收获,并造成了巨大损失<sup>[2]</sup>。烟草赤星病主要发生在烟叶成熟期,具有流行速度快、间歇暴发、潜育期短等特点<sup>[3]</sup>,常影响烟叶的产量、质量、化学成分,降低烟叶的可用性<sup>[4-5]</sup>。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

**1.1.1 仪器。**普通光学显微镜、全自动电热压力蒸汽灭菌箱(YXQ-LS-S II)、立式循环通风干燥箱(101A-2C)、智能人工气候箱(RXZ 106L-A 光照度3000)、洁净工作台(SW-OJ-2F)、分析天平等。

**1.1.2 器具。**直径9 cm培养皿、三角瓶、烧杯、玻璃棒、量筒、记号笔、滴管、棉花、纱布、酒精灯、镊子、剪刀、

接种针、试管、花盆、保鲜膜、振荡器、血球计数板等。

**1.1.3 药品。**无菌水、葡萄糖、尿素、蔗糖、盐酸、磷酸二氢钾、乙醇、氢氧化钠、琼脂等,均为国产分析试剂。

**1.1.4 供试寄主。**感病烟草品种云烟87,在室温中育苗移栽,常规管理至15片叶展开后接种备用。

### 1.2 试验方法

**1.2.1 菌种的采集和分离。**在烟草赤星病发病时期,从安徽省凤阳县田间采集有典型烟草赤星病症状的烟株。分离病原菌,用75%乙醇对剪刀消毒,用剪刀将感病叶片边缘组织(病健交界处)剪切成若干小块,按无菌操作法将病组织放入75%乙醇中,3~5 s后再将病组织转入0.1%汞液中分别表面消毒,在无菌条件下用灭过菌的镊子夹取叶块于PDA平板培养基上,每皿3块,重复3次。在25℃条件下培养3~4 d,待叶块与培养基接触处长出白色绒毛状菌丝时,挑取菌丝转接到PDA平板培养基上培养纯化<sup>[6]</sup>。纯化后接种于斜面培养基上,做好记录,储存在冰箱中备用。

**1.2.2 PDA培养基配制。**新鲜马铃薯200 g切丁,加入1 000 mL蒸馏水,加热煮沸30 min后,用4层纱布过滤去渣,滤液加入琼脂18 g、葡萄糖20 g,继续加热至琼脂融化后,用蒸馏水定容到1 000 mL,趁热分装,121℃高压蒸汽灭菌30 min。

**1.2.3 形态学特征观察。**通过显微镜观察菌丝有无颜色、分隔;分生孢子梗的颜色;分生孢子的形态结构、颜色。

**1.2.4 生理特性试验。**该试验主要包括以下内容。

(1)温度对菌丝生长的影响。将直径4 mm、生长

\* 通信作者

收稿日期 2020-08-18

良好的菌碟在无菌条件下移入含有 PDA 培养基的培养皿中,置于 5、10、15、20、25、30、35、40 °C 恒温箱下培养,6 d 后测菌落直径。3 次重复。

(2)温度对产孢的影响。采用打孔器打一小块直径 13 mm 的菌饼,放在直径 9 cm 培养皿中的无菌湿润滤纸的中央<sup>[6]</sup>,置于 5、10、15、20、25、30、35、40 °C 恒温箱下培养,3 次重复。5 d 后分别用 10 mL 无菌水洗涤,制成孢子悬浮液,在显微镜下用血球计数板计量孢子浓度。

(3)致死温度测定。菌丝致死温度:将直径 4 mm、生长良好的菌碟在无菌条件下移入含有 PDA 培养基的培养皿中,置于 45、46、47、48、49、50、51、52 °C 恒温箱内培养 10 min,然后移入 25 °C 恒温箱下培养 3 d,观察是否长出菌落,3 次重复。孢子致死温度:配制孢子悬浮液  $1.92 \times 10^8$  个/L,取 3 mL 移入无菌试管内,分别置于 45、46、47、48、49、50、51、52 °C 恒温箱内培养 10 min。处理后将孢子悬浮液接种在平面培养基上,3 d 后观察孢子萌发情况,3 次重复。

(4)光照对病菌生长的影响。在适宜、无菌的条件下,采用 24 h 光照/0 h 黑暗、12 h 光照/12 h 黑暗处理和 0 h 光照/24 h 黑暗处理等 3 种光照处理,将直径 4 mm 的菌碟移入含有 PDA 培养基的培养皿中,3 次重复。培养 7 d 后,测量菌落直径。

(5)光照对病菌产孢量的影响。采用 24 h 光照/0 h 黑暗、12 h 光照/12 h 黑暗处理和 0 h 光照/24 h 黑暗处理等 3 种光照处理,在无菌条件下把 4 mm 的菌碟移入含有 PDA 培养基的培养皿中,在 25 °C 条件下培养 7 d,用血球计数板测其产孢量,3 次重复。

**1.2.5 病原菌致病性的测定。**采用菌丝块接种、孢子液喷雾接种、孢子液棉球接种、孢子悬滴接种等 4 种接种法测定病原菌致病性。每个处理接种 10 株烟苗,3 次重复。处理后,将室温保持在 25~28 °C。

(1)菌丝块接种。将供试烟草赤星病菌置于 PDA 培养基上于适宜条件下培养 5 d,沿菌落边缘用直径 4 mm 的打孔器打取菌碟,均匀放置在云烟 87 最下部 2 片叶的脉间叶肉上,每片叶上放 5 块菌碟,并在菌碟上覆盖脱脂棉(灭菌水浸湿)保湿。

(2)孢子液喷雾接种。在培养皿中的无菌湿润滤纸中央放一块直径 13 mm PDA 培养基(用打孔器打),其上接种供试菌,于 25 °C 恒温箱培养 5 d 后用 10 mL 无菌水清洗,用 4 层纱布过滤,制成  $1.92 \times 10^8$  个/L 孢子悬浮液。用小型喷雾器将孢子悬浮液均匀喷洒在烟草最下部的 2 片叶片上。

(3)孢子液棉球接种。使用脱脂棉制成小棉球,之

后将棉球浸泡于赤星病菌孢子含量为  $1.92 \times 10^8$  个/L 的悬浊液中,浸泡 2 min 后,将棉球从浸泡液中取出,并将其均匀贴敷于 2 片叶的脉间叶肉之上,保证每片叶都能放置 5 个棉球。

(4)孢子悬滴接种。用吸管取  $1.92 \times 10^8$  个/L 赤星病菌孢子悬浮液,均匀悬滴在烟草最下部 2 片叶的脉间叶肉上,每片叶滴 5 滴。

4 种方法接种赤星病菌 10 d 后,调查烟草发病情况,记载病叶数、叶片病斑直径,计算各处理平均病斑直径和病叶率。采用 Excel 软件对病斑直径数据进行方差分析,多重比较采用 Duncan's 新复极差检验。当被接烟草植株发病后,从被接烟草植株发病的叶片上再分离病原菌,进行纯培养,观测性状与接种菌是否相同。

## 2 结果与分析

### 2.1 形态学特征

菌丝前期白色透明,后期呈暗褐色,有分隔;分生孢子单生或串生于分生孢子梗上,分生孢子梗暗褐色聚集成堆,顶端弯曲,不规则。孢子呈倒棒槌形,基部大,顶端较细,有纵、横分隔,纵格 1~3 个,横格 3~7 个,喙长短不等。

### 2.2 温度对烟草赤星病菌生长的影响

**2.2.1 温度对病菌菌丝生长的影响。**如表 1 所示,温度会对烟草赤星病病原菌生长的整体速度造成较大的影响。其中:最适合菌丝生长的温度为 20~30 °C,在此温度之间时菌丝直径差异不显著;温度超过 30 °C 或低于 10 °C 时均会对菌丝生长造成较大的影响;温度一旦超过 40 °C 或低于 5 °C,菌丝都不能正常生长。

表 1 温度对烟草赤星病菌菌丝生长的影响

温度/°C	直径均值/cm	温度/°C	直径均值/cm
25	7.57 aA	10	2.01 cdBC
30	7.10 aA	35	1.75 cdBC
20	5.61 abAB	5	0 dC
15	3.72 bcABC	40	0 dC

注:不同小、大写字母分别表示 5%、1% 水平上的差异显著性。下同。

**2.2.2 温度对病菌产孢量形成的影响。**烟草赤星病病原菌在不同温度下的产孢量差异较大,5~30 °C 时产孢量随温度升高而增加,30~40 °C 时产孢量随温度升高而减少。其中,20~30 °C 适合病菌产孢,30 °C 为最适宜温度,5 °C 和 40 °C 时病菌均不产生孢子。

**2.2.3 致死温度的测定。**烟草赤星病菌菌丝在 49 °C 时处理 10 min,不能在培养基上生长,可见其致死温度是 49 °C,处理 10 min;烟草赤星病菌孢子 50 °C 处理 10 min,不能在培养基上生长,可知其致死温度是 50 °C,处理 10 min。

2.3 光照对烟草赤星病菌生长的影响

3种光照条件下的菌落直径都随着时间的增长而增加。在培养时间相同的条件下,光暗交替条件下的菌落平均直径大于全光 and 全暗条件下的菌落平均直径,且在光暗交替条件下培养的菌株产孢量最大。说明光暗交替是菌落生长的最适光照条件。综合来看,光照 12 h/d 有利于菌丝生长和孢子产生。

2.4 致病性测定

由表 2 可知,在烟草品种云烟 87 上接种赤星病

菌 10 d 后,只有孢子液棉球接种和菌丝块接种引致发病,所致病斑直径分别为 5.73 mm 和 5.23 mm;而孢子喷雾接种和孢子悬滴接种未能引起烟苗叶片发病。从接种后引起的病叶率来看,菌丝块接种法最高,平均病叶率为 78.33%;其次为孢子液棉球接种法,平均病叶率为 67.23%。

3 结论与讨论

研究结果表明,烟草赤星病菌产孢数量以及孢子生长速度受到光照、温度等因素的影响。烟草赤星病

表 2 烟草赤星病不同接种方法接种效果比较

接种方法	接种后 10 d 病斑直径/mm				病叶率/%			
	I	II	III	平均	I	II	III	平均
菌丝块接种	5.7	5	5	5.23 aA	100.0	75	60	78.33 aA
孢子喷雾接种	0	0	0	0 bA	0	0	0	0 bA
孢子液棉球接种	6.2	5	6	5.73 aA	66.7	85	50	67.23 abA
孢子悬滴接种	0	0	0	0 bA	0	0	0	0 bA

菌在 10~35℃条件下均可生长,最适生长温度为 25℃;分生孢子致死温度是 50℃,处理 10 min;菌丝致死温度是 49℃,处理 10 min;光暗交替条件有利于菌丝生长和孢子产生。菌丝块接种的方式容易导致烟草赤星病发病,且整体接种成功率明显较高。

4 参考文献

[1] SHEW H D, LUCAS G B. Compendium of tobacco diseases[M]. St Paul, MN: APS Press, 1991.

[2] 朱贤朝,王彦亭,王智发,等.中国烟草病害[M].北京:中国农业出版社,2002.  
 [3] 吴海荣,胡学难,钟国强,等.外来杂草假臭草的特征特性[J].杂草科学,2008(3):69-71.  
 [4] 李光义,陈贞蓉,邓晓,等.假臭草对南方几种常见大田杂草的化感作用[J].中国农学通报,2007,23(5):425-427.  
 [5] 邓世明,王宁,汤丽昌,等.外来入侵植物假臭草的化感作用研究[J].中国农学通报,2010,26(16):277-280.  
 [6] 沈亚恒,叶东海.中国真菌志[M].北京:科学出版社,2006.

(上接第 77 页)

发生成灾的主要原因。猕猴桃人工驯化时间相对较短,相关科学研究滞后于产业发展需求,目前诸如猕猴桃苗木调运处理技术规程、抗线虫砧木及品种选育及综合防控技术研究已受到重视,这些都将成为控制猕猴桃根结线虫的蔓延危害提供重要理论指导作用。

4 参考文献

[1] 张绍升,林尤剑.福建猕猴桃根结线虫病病原鉴定[J].福建农学院学报,1993,22(4):433-435.  
 [2] 方炎祖,王宇道.湖南猕猴桃根结线虫病研究[J].湖南农业科学,1991(4):40-42.  
 [3] 李添群,亚欣,朱菊仙,等.修文县猕猴桃根结线虫的发生危害调查[J].耕作与栽培,2014(5):68-69.  
 [4] 姜凤丽,邵桂英.猕猴桃根结线虫病的初步研究[J].浙江林学院学报,1990,7(1):43-48.  
 [5] 宋晓斌,王培新,张星耀,等.陕西猕猴桃病虫害发生与危害的调查分析[J].西北林学院学报,1998,13(3):79-84.  
 [6] 冯华,李海洲,李长莉,等.猕猴桃根部病害的发生规律及综合防治技术[J].现代农业科技,2012(10):174-179.

[7] 常青,李英梅,杨艺炜,等.陕西省猕猴桃根结线虫病发生现状[C]//中国植物保护学会 2019 年学术年会论文集.贵阳:中国植物保护学会,2019.  
 [8] 刘晨,王晨光,张锋,等.周至县猕猴桃根结线虫种类鉴定[J].现代农业科技,2018(2):117-118.  
 [9] 陈志杰,张淑莲,张锋,等.设施蔬菜根结线虫防治基础与技术[M].北京:科学出版社,2013.  
 [10] 刘维志.植物病原线虫学[M].北京:中国农业出版社,2000.  
 [11] 赵磊,段玉玺,白春明,等.辽宁省保护地蔬菜根结线虫发生规律及防治对策[J].植物保护,2011,37(1):105-109.  
 [12] 刘鸣韬.北方蔬菜根结线虫病加重的原因及控制对策[J].河南农业科学,2001(1):23-24.  
 [13] 刘晨,李英梅,陈志杰.南方根结线虫耐寒性研究进展[J].陕西农业科学,2016,62(7):98-100.  
 [14] 洪波,张锋,李英梅,等.基于 GIS 的南方根结线虫在陕西省越冬区划分析[J].生态学报,2014,34(16):4603-4611.  
 [15] 洪波,李英梅,张锋,等.低温处理对南方根结线虫二龄幼虫的影响[J].西北农业学报,2013,22(1):184-187.