

一种适于分离荔枝霜疫霉的选择性培养基

凌金锋^{1,2} 习平根² 何平³ 宋晓兵¹ 彭埃天^{1*} 姜子德^{2*}

(1. 广东省农业科学院植物保护研究所, 广东省植物保护新技术重点实验室, 广州 510640;

2. 华南农业大学资源环境学院, 广东省微生物信号与作物病害防控重点实验室,

广州 510642; 3. 璧山县农业技术推广中心, 重庆 402760)

摘要: 为提高荔枝霜疫霉 *Peronophythora litchii* Chen ex Ko et al. 的分离成功率, 筛选一种适于分离该病原菌的选择性培养基, 采用菌丝生长速率法测定了3种杀菌剂和8种抗生素对荔枝霜疫霉及9种常见非目标真菌菌丝生长的抑菌活性。结果表明, 以PSA为基础培养基, 在其中添加多菌灵、咪鲜胺、异菌脲、利福平和制霉菌素使其浓度分别至10、2、200、10和50 $\mu\text{g/mL}$ 所配制成的选择性培养基, 可有效抑制非目标真菌炭疽菌 *Colletotrichum* sp.、拟茎点霉 *Phomopsis* sp.、链格孢菌 *Alternaria* sp.、镰刀菌 *Fusarium* sp.、拟盘多毛孢 *Pestalotiopsis* sp.、毛霉 *Mucor* sp.、地霉 *Geotrichum* sp.、酵母菌 *Saccharomyces* sp.、裂褶菌 *Schizophyllum* sp. 的生长, 但对荔枝霜疫霉的生长影响较小。分离实践表明, 采用该选择性培养基, 不管病组织是否经表面消毒, 均可成功分离获得荔枝霜疫霉纯菌落, 大大提高了分离的成功率和效率。

关键词: 荔枝霜疫霉病; 荔枝霜疫霉; 组织分离; 选择性培养基

A selective medium facilitating isolation of litchi downy blight pathogen *Peronophythora litchii*

Ling Jinfeng^{1,2} Xi Pinggen² He Ping³ Song Xiaobing¹ Peng Aitian^{1*} Jiang Zide^{2*}

(1. Plant Protection Research Institute, Guangdong Academy of Agricultural Sciences; Key Laboratory of High Technology for Plant Protection of Guangdong Province, Guangzhou 510640, Guangdong Province, China;

2. College of Natural Resources and Environment, South China Agricultural University; Key Laboratory of Microbial Signals and Disease Control of Guangdong Province, Guangzhou 510642, Guangdong Province,

China; 3. Bishan Agricultural Technology Promotion Center, Bishan 402760, Chongqing, China)

Abstract: In order to improve the isolation rate of the litchi downy blight pathogen *Peronophythora litchii* Chen ex Ko et al. and develop a selective medium, three fungicides and eight antibiotics were tested to determine their effects on mycelial growth of *P. litchii* and other nine contaminating fungi. The results showed that the selective medium, which consists of 10 $\mu\text{g a. i. / mL}$ carbendazim, 2 $\mu\text{g a. i. / mL}$ prochloraz, 200 $\mu\text{g a. i. / mL}$ iprodione, 10 $\mu\text{g a. i. / mL}$ rifampicin, and 50 $\mu\text{g a. i. / mL}$ nystatin in potato sucrose agar (PSA) medium, was able to allow *P. litchii* to grow well and to suppress most of the contaminating fungi, including *Colletotrichum* sp., *Phomopsis* sp., *Alternaria* sp., *Fusarium* sp., *Pestalotiopsis* sp., *Mucor* sp., *Geotrichum* sp., *Saccharomyces* sp. and *Schizophyllum* sp. The isolation revealed that the pure colony of *P. litchii* could be successfully obtained, whether the diseased tissues were surface-sterilized or not by using this selective medium. Therefore, the isolation efficiency of *P. litchii* has been greatly improved.

基金项目: 国家现代农业产业技术体系(CARS-33-07), 广东省现代农业产业技术体系(粤农[2009]380号)

作者简介: 凌金锋, 男, 1983年生, 助理研究员, 研究方向为果树病害防控研究, E-mail: ljf830109@163.com

* 通讯作者(Authors for correspondence), E-mail: pengait@163.com, zdjiang@scau.edu.cn

收稿日期: 2014-03-22

Key words: litchi downy blight; *Peronophythora litchii*; tissue isolation; selective medium

由荔枝霜疫霉 *Peronophythora litchii* Chen ex Ko et al. 引起的荔枝霜疫霉病是荔枝生产中的重要病害^[1],在开花、挂果期如遇阴雨天气极易发生和流行,造成大量落花、落果及果实的腐烂,严重时甚至失收。该病在受害部位形成褐色病斑,湿度大时可见霜状霉层,受害后天气转晴或湿度降低,则霜状霉层极少或不产生;而田间也常发生炭疽病,若没有病征出现,其病状与霜疫霉病难以区分。另外,为害荔枝果实的还有酸腐病、镰刀菌果腐病等^[1],这些病害的病状也易与霜疫霉病混淆。荔枝霜疫霉病是一种卵菌病害,其防治措施与无性型真菌引起的病害差异很大,故准确诊断尤为重要。尽管荔枝霜疫霉易在多种培养基上生长^[2-3],但分离出纯菌株比较困难。笔者执行国家产业技术体系建设项目的5年来,不仅多次分别到广东、广西、海南、福建、云南和四川荔枝主产区进行霜疫霉菌株的收集工作,也多次接到荔枝主产区快递的病害样品,发现在分离荔枝霜疫霉过程中除分离到已报道的炭疽菌 *Colletotrichum* sp.、镰刀菌 *Fusarium* sp. 和地霉 *Geotrichum* sp. 外^[4],还可分离到拟茎点霉 *Phomopsis* sp.、链格孢菌 *Alternaria* sp.、拟盘多毛孢 *Pestalotiopsis* sp.、毛霉 *Mucor* sp.、裂褶菌 *Schizophyllum* sp. 和酵母菌 *Saccharomyces* sp. 等真菌,特别是毛霉和裂褶菌的生长速率明显快于目标菌且气生菌丝生长旺盛,常将荔枝霜疫霉覆盖或抑制,极大地影响了荔枝霜疫霉的分离成功率。若是所分离的病害样本不新鲜,或是多种病原菌复合侵染,则更难检出和分离到荔枝霜疫霉。

鉴于病原菌分离对病害准确诊断的重要性,以及进行该病病原菌的形态学、生物学特性、侵染特性、致病机理、抗药性监测及其形成机理、防治药剂的筛选等方面的研究都离不开菌株的分离获得,因此急需筛选一种对荔枝霜疫霉具有高度选择性的培养基。关于荔枝霜疫霉的分离技术,已有学者研发出用于分离荔枝霜疫霉的选择性培养基^[4-5],但上述研究未将常为害荔枝果实的地霉纳入选择性培养基的抑制对象,或未提及分离过程中的常见污染真菌种类及对污染真菌的抑菌效果;岑贞陆和黄思良^[6]对常规组织分离方法作了一些改进,但未涉及选择性培养基。因此,在前人工作的基础上,本研究开展了一系列的培养基改良试验,以期筛选出一种更易于分离出荔枝霜疫霉纯菌落的选择性培养基。

1 材料与方法

1.1 材料

供试菌株:荔枝霜疫霉 *P. litchii* 和炭疽菌 *Colletotrichum* sp. 分离自增城市荔枝病果,拟茎点霉 *Phomopsis* sp.、链格孢菌 *Alternaria* sp.、镰刀菌 *Fusarium* sp. 和拟盘多毛孢 *Pestalotiopsis* sp. 分离自从化市荔枝病花穗,地霉 *Geotrichum* sp. 分离自廉江市荔枝病果,毛霉 *Mucor* sp. 和裂褶菌 *Schizophyllum* sp. 分离自钦州市荔枝病果,酵母菌 *Saccharomyces* sp. 分离自玉林市荔枝病果;除荔枝霜疫霉外,其它9种真菌均为自病果或病花穗分离该菌时常被分离到的非目标菌。应用于分离实践的荔枝病样为采自从化市的荔枝病花穗和东莞市的荔枝病果;为提高分离成功率,病样采回后立即进行分离。

供试药剂:根据供试菌株的种类及不同杀菌剂的抑菌谱,选取了3种杀菌剂和8种抗生素用于选择性培养基配方的筛选:25%咪鲜胺(prochloraz)乳油,德国拜耳作物科学公司;50%多菌灵(carbendazim)可湿性粉剂,江苏蓝丰生物化工股份有限公司;25%异菌脲(iprodione)悬浮剂,珠海真绿色技术有限公司;80万单位注射用青霉素钠(penicillin sodium)、100万单位注射用硫酸链霉素(streptomycin sulfate),华北制药股份有限公司;注射用头孢拉定(cefradine),广州白云山天心制药股份有限公司;25万单位四环素(tetracycline)片,广州白云山光华制药股份有限公司;12.5 mg/5 mL氯霉素(chloramphenicol)滴眼液,武汉天天明药业有限责任公司;25万单位红霉素(erythromycin)肠溶胶囊,浙江丽水众益药业有限公司;0.15 g利福平(rifampicin)胶囊,广东华南药业集团有限公司;50万单位制霉菌素(nystatin)片,上海信谊药厂有限公司。

培养基:马铃薯蔗糖琼脂(potato sucrose agar, PSA)培养基:马铃薯200 g、蔗糖10 g、琼脂条18 g、水1000 mL;选择性培养基(selective medium, SM):以PSA为基础培养基,在其中添加多菌灵、咪鲜胺、异菌脲、利福平和制霉菌素使其浓度分别至10、2、200、10和50 µg/mL。

1.2 方法

1.2.1 供试药剂对荔枝霜疫霉菌丝生长的影响

选取供试的3种杀菌剂和8种抗生素,以PSA为基础培养基,分别设置3~4个不同浓度(表1),

并以 PSA 作为空白对照,每处理 4 次重复,于平板(培养皿直径 9 cm)中央接入 2 mm × 2 mm 的荔枝霜疫霉新鲜菌块,在 26 ℃ 培养 6 d 后,用十字交叉法测量菌落直径,取其平均值,计算菌丝生长抑制率。平均抑菌率 = (对照平均菌落直径 - 处理平均菌落直径) / 对照平均菌落直径 × 100%。

1.2.2 供试药剂对非目标真菌菌丝生长的影响

抗细菌类抗生素主要是用于排除在分离荔枝霜疫霉过程中的细菌污染,因此不再进行该类抗生素对 9 种非目标真菌的毒力检测,仅进行多菌灵、咪鲜胺、异菌脲和制霉菌素对各真菌菌丝生长抑制效果的检测,方法同 1.2.1,供试菌株为 9 种非目标真菌,荔枝霜疫霉为阳性对照,培养时间为 3 d。

1.2.3 供试菌株在选择性培养基上的生长情况

综合 1.2.1 和 1.2.2 的试验结果,确定选择性培养基的组成配方;然后以 1.2.1 相同方法,检测其对各供试菌株的抑制效果。

1.2.4 选择性培养基用于分离荔枝霜疫霉的实践

病组织消毒分离方法^[7]:取病组织,用 70% 酒精和 2% 次氯酸钠溶液进行表面消毒,再用灭菌水漂洗 3 次,用灭菌滤纸吸干残余水分后将其接入选择性培养基平板,并以 PSA 作为空白对照,于 26 ℃ 培养 3 d 后观察荔枝霜疫霉的分离成功率和其它真菌的生长情况,并用显微镜镜检菌落中有无荔枝霜疫霉的生长。

病组织直接分离方法:取病组织不经表面消毒直接置于选择性培养基平板,并以 PSA 作为空白对

照,培养条件同病组织消毒分离方法。

1.3 数据分析

采用 Excel 2003 软件对数据进行统计,计算各处理平均菌落直径、标准差和平均抑菌率;采用 DPS 7.05 软件^[8]进行方差分析,用 Duncan 氏新复极差法进行差异显著性检验。

2 结果与分析

2.1 不同药剂对荔枝霜疫霉菌丝生长的影响

杀菌剂多菌灵 1 ~ 50 μg/mL、咪鲜胺 2 ~ 10 μg/mL 和异菌脲 50 ~ 200 μg/mL 对荔枝霜疫霉菌丝生长的影响较小,平均抑菌率在 3.17% ~ 29.51% 之间,且菌落性状与在 PSA 上无明显差异(表 1),表明该 3 种杀菌剂及其供试浓度范围可作为选择性培养基的备选成分和备选浓度。

在供试的 8 种抗生素中,青霉素钠、头孢拉定、利福平和制霉菌素 10 ~ 50 μg/mL、氯霉素 10 μg/mL 对荔枝霜疫霉的菌丝生长影响较小,平均抑菌率在 5.15% ~ 31.22% 之间,且菌落性状与在 PSA 上无明显差异,表明上述 5 种抗生素的浓度范围可用于配制选择性培养基,用于抑制细菌或部分真菌。

硫酸链霉素、四环素和红霉素 10 ~ 50 μg/mL、氯霉素 30 ~ 50 μg/mL、制霉菌素 100 μg/mL 对荔枝霜疫霉菌丝生长具有较强的抑制作用,平均抑菌率在 45.21% ~ 100% 之间,且菌落性状常发生变异,表明该 5 种抗生素的浓度范围不宜用于配制选择性培养基。

表 1 三种杀菌剂和 8 种抗生素对荔枝霜疫霉菌丝生长的抑制作用

Table 1 The inhibitory effects of three fungicides and eight antibiotics against mycelial growth of *Peronophythora litchii*

杀菌剂或抗生素 Fungicide or antibiotic	浓度 (μg/mL) Concentration	平均菌落直径 (cm) Average colony diameter	平均抑菌率 (%) Average inhibition rate
多菌灵 Carbendazim	1	7.10 ± 0.09 AB	3.17
	10	6.67 ± 0.26 DEF	9.01
	50	5.33 ± 0.20 JK	27.26
咪鲜胺 Prochloraz	2	6.27 ± 0.04 GH	14.50
	5	5.64 ± 0.10 I	23.06
	10	5.17 ± 0.06 KL	29.51
异菌脲 Iprodione	50	6.96 ± 0.17 BC	5.05
	100	6.85 ± 0.10 BCD	6.55
	200	6.56 ± 0.13 EF	10.44
青霉素钠 Penicillin sodium	10	6.95 ± 0.03 BC	5.15
	30	6.77 ± 0.10 CDE	7.68
	50	5.28 ± 0.05 JKL	27.91
头孢拉定 Cefradine	10	6.95 ± 0.12 BC	5.22
	30	6.69 ± 0.10 DE	8.77
	50	5.04 ± 0.05 L	31.22

续表 1

杀菌剂或抗生素 Fungicide or antibiotic	浓度 ($\mu\text{g/mL}$) Concentration	平均菌落直径 (cm) Average colony diameter	平均抑菌率 (%) Average inhibition rate
硫酸链霉素 Streptomycin sulfate	10	1.47 ± 0.10 O	79.90
	30	0.70 ± 0.01 P	90.45
	50	0.32 ± 0.18 R	95.63
四环素 Tetracycline	10	0.37 ± 0.19 QR	94.95
	30	0.00 ± 0.00 S	100.00
	50	0.00 ± 0.00 S	100.00
氯霉素 Chloramphenicol	10	6.42 ± 0.19 FG	12.42
	30	1.41 ± 0.13 O	80.83
	50	0.42 ± 0.20 QR	94.23
红霉素 Erythromycin	10	4.02 ± 0.21 M	45.21
	30	0.60 ± 0.14 PQ	91.81
	50	0.07 ± 0.09 S	99.08
利福平 Rifampicin	10	6.17 ± 0.13 H	15.83
	30	5.58 ± 0.10 I	23.85
	50	5.05 ± 0.09 L	31.12
制霉菌素 Nystatin	10	6.76 ± 0.09 CDE	7.78
	30	6.62 ± 0.11 DEF	9.69
	50	5.49 ± 0.09 IJ	25.15
	100	2.85 ± 0.16 N	61.17
空白对照 (CK)	0	7.33 ± 0.06 A	0.00

表中数据为平均数 $\pm$ 标准差。数据后不同大写字母表示经 Duncan 氏新复极差法检验在 $P < 0.01$ 水平差异显著。Data in the table are mean $\pm$ SD. Data in the table followed by different uppercase letters indicate significant difference at $P < 0.01$ level by Duncan's new multiple range test.

2.2 不同药剂对非目标真菌菌丝生长的影响

根据 2.1 的试验结果及各杀菌剂和抗生素的抗菌谱,选取多菌灵、咪鲜胺、异菌脲和制霉菌素进一步检测该 4 种药剂对 9 种非目标真菌菌丝生长的影响,结果表明(表 2),多菌灵 $10 \mu\text{g/mL}$ 、咪鲜胺 $2 \mu\text{g/mL}$ 对炭疽菌、拟茎点霉、镰刀菌和拟盘多毛孢具有明显的抑制作用,抑菌率可达 $87.02\% \sim 100\%$;异菌脲 $200 \mu\text{g/mL}$ 对链格孢菌、拟盘多毛孢、毛霉和酵母菌的抑菌效果显著,平均抑菌率在 $97.55\% \sim 100\%$ 之间;制霉菌素 $50 \mu\text{g/mL}$ 对炭疽菌、拟茎点霉、链格孢菌、拟盘多毛孢、地霉、酵母菌和裂褶菌均有较好的抑菌效果,平均抑菌率在 $80.84\% \sim 100\%$ 之间。针对供试的 9 种非目标真菌,均可从上述 4 种药剂浓度处理中找出一种用于抑制该真菌的生长,且在该药剂浓度下不影响荔枝霜疫霉菌丝生长或影响较小。

2.3 不同菌株在选择性培养基上的菌落生长情况

根据药剂筛选结果,拟定选择性培养基配方为:PSA 为基础培养基,在其中添加多菌灵、咪鲜胺、异菌脲、利福平和制霉菌素使其浓度分别至 10、2、200、10 和 $50 \mu\text{g/mL}$ 。

供试 10 个菌株在拟定的选择性培养基上, 26°C 培养 3 d 的结果表明(表 3),除地霉稍有生长外,其它 8 种非目标真菌的生长被完全抑制;荔枝霜疫霉的菌落生长速率虽然也受到一定的影响,但足以满足分离纯化的需要,其菌落性状也与在 PSA 上无明显区别,表明该拟定的选择性培养基是合适的。

2.4 选择性培养基应用于分离荔枝霜疫霉的实践

病组织经表面消毒分离培养 3 d 后,无论是荔枝病花穗还是病果,新鲜发病组织还是后期病组织,在 PSA 上虽然绝大多数组织块都可以检测到荔枝霜疫霉,但常和其它非目标真菌或细菌混合生长,甚至被覆盖;而在选择性培养基上,其它非目标真菌或细菌被抑制,仅获得纯的荔枝霜疫霉菌落(图 1),这一效果在分离后期病组织时尤为突出。

病组织直接分离结果与病组织经表面消毒分离结果相似,但在 PSA 上其它杂菌污染更明显,几乎观察不到荔枝霜疫霉菌落;而在选择性培养基上,虽然个别荔枝霜疫霉菌落混杂有一些非目标菌的生长,但荔枝霜疫霉菌落仍明显可见,可直接进行纯化和保存,极大地提高了分离的成功率和效率。

表 2 三种杀菌剂和 1 种抗生素对荔枝霜疫霉及 9 种非目标真菌菌丝生长的抑制作用
Table 2 The inhibitory effects of three fungicides and one antibiotic against mycelial growth of *Peronophythora litchii* and other nine contaminating fungi

杀菌剂或抗生素 Fungicide or antibiotic	浓度 Concentration ($\mu\text{g/mL}$)	荔枝霜疫霉 <i>P. litchii</i>		炭疽菌 <i>Colletotrichum</i> sp.		拟茎点霉 <i>Phomopsis</i> sp.		链格孢菌 <i>Alternaria</i> sp.		镰刀菌 <i>Fusarium</i> sp.	
		ACD (cm)	AIR (%)	ACD (cm)	AIR (%)	ACD (cm)	AIR (%)	ACD (cm)	AIR (%)	ACD (cm)	AIR (%)
多菌灵 Carbendazim	1	2.49 $\pm$ 0.06 D	2.26	0.23 $\pm$ 0.09 F	92.72	0.00 $\pm$ 0.00 G	100.00	2.87 $\pm$ 0.11 C	2.05	0.00 $\pm$ 0.00 G	100.00
	10	2.33 $\pm$ 0.03 D	8.45	0.00 $\pm$ 0.00 F	100.00	0.00 $\pm$ 0.00 F	100.00	2.80 $\pm$ 0.12 C	4.27	0.00 $\pm$ 0.00 F	100.00
	50	2.02 $\pm$ 0.07 C	20.83	0.00 $\pm$ 0.00 F	100.00	0.00 $\pm$ 0.00 F	100.00	1.99 $\pm$ 0.03 C	32.11	0.00 $\pm$ 0.00 F	100.00
	2	2.23 $\pm$ 0.05 D	12.48	0.10 $\pm$ 0.12 F	96.99	0.00 $\pm$ 0.00 F	100.00	0.62 $\pm$ 0.04 E	78.91	0.00 $\pm$ 0.00 F	100.00
	5	2.08 $\pm$ 0.04 D	18.17	0.00 $\pm$ 0.00 G	100.00	0.00 $\pm$ 0.00 G	100.00	0.55 $\pm$ 0.04 E	81.21	0.00 $\pm$ 0.00 G	100.00
咪鲜胺 Prochloraz	10	1.77 $\pm$ 0.07 D	30.45	0.00 $\pm$ 0.00 H	100.00	0.00 $\pm$ 0.00 H	100.00	0.53 $\pm$ 0.05 E	81.98	0.00 $\pm$ 0.00 H	100.00
	50	2.30 $\pm$ 0.05 B	9.82	1.41 $\pm$ 0.03 D	55.42	1.46 $\pm$ 0.13 D	65.38	0.16 $\pm$ 0.09 F	94.45	1.71 $\pm$ 0.08 C	46.18
	100	2.27 $\pm$ 0.06 B	11.00	1.32 $\pm$ 0.05 D	58.19	1.19 $\pm$ 0.17 DE	71.90	0.00 $\pm$ 0.00 G	100.00	1.69 $\pm$ 0.12 C	46.89
异菌脲 Iprodione	200	2.19 $\pm$ 0.04 B	14.15	1.28 $\pm$ 0.05 D	59.46	0.91 $\pm$ 0.16 F	78.48	0.00 $\pm$ 0.00 H	100.00	1.64 $\pm$ 0.04 C	48.31
	10	2.41 $\pm$ 0.07 B	5.50	0.85 $\pm$ 0.03 E	73.00	0.47 $\pm$ 0.32 F	88.80	0.85 $\pm$ 0.09 E	71.14	1.74 $\pm$ 0.07 D	45.16
	50	2.01 $\pm$ 0.04 B	21.02	0.61 $\pm$ 0.01 D	80.84	0.00 $\pm$ 0.00 G	100.00	0.40 $\pm$ 0.02 E	86.42	1.69 $\pm$ 0.03 C	46.73
制霉菌素 Nystatin	100	0.63 $\pm$ 0.35 C	75.15	0.55 $\pm$ 0.05 CD	82.58	0.00 $\pm$ 0.00 E	100.00	0.33 $\pm$ 0.03 D	88.81	1.10 $\pm$ 0.16 B	65.46
	0	2.55 $\pm$ 0.04 G	0.00	3.16 $\pm$ 0.01 DE	0.00	4.22 $\pm$ 0.06 B	0.00	2.93 $\pm$ 0.04 EF	0.00	3.18 $\pm$ 0.23 D	0.00
空白对照 (CK)											
杀菌剂或抗生素 Fungicide or antibiotic	浓度 Concentration ($\mu\text{g/mL}$)	拟盘多毛孢 <i>Pestalotiopsis</i> sp.		毛霉 <i>Mucor</i> sp.		地霉 <i>Geotrichum</i> sp.		酵母菌 <i>Saccharomyces</i> sp.		裂褶菌 <i>Schizophyllum</i> sp.	
		ACD (cm)	AIR (%)	ACD (cm)	AIR (%)	ACD (cm)	AIR (%)	ACD (cm)	AIR (%)	ACD (cm)	AIR (%)
多菌灵 Carbendazim	1	0.00 $\pm$ 0.00 G	100.00	8.80 $\pm$ 0.17 A	-1.44	3.15 $\pm$ 0.04 B	0.16	0.52 $\pm$ 0.07 E	-20.93	2.88 $\pm$ 0.15 C	35.12
	10	0.00 $\pm$ 0.00 F	100.00	8.72 $\pm$ 0.21 A	-0.43	3.17 $\pm$ 0.01 B	-0.40	0.55 $\pm$ 0.04 E	-28.49	2.78 $\pm$ 0.11 C	37.32
	50	0.00 $\pm$ 0.00 F	100.00	8.75 $\pm$ 0.20 A	-0.86	2.94 $\pm$ 0.10 B	6.81	0.45 $\pm$ 0.02 D	-4.65	0.19 $\pm$ 0.02 E	95.72
咪鲜胺 Prochloraz	2	0.47 $\pm$ 0.12 E	87.02	8.04 $\pm$ 0.28 A	7.40	2.97 $\pm$ 0.04 C	6.02	0.43 $\pm$ 0.03 E	0.00	3.88 $\pm$ 0.07 B	12.46
	5	0.35 $\pm$ 0.05 F	90.30	7.06 $\pm$ 0.14 A	18.61	2.79 $\pm$ 0.06 C	11.80	0.43 $\pm$ 0.02 EF	0.00	3.47 $\pm$ 0.16 B	21.87
异菌脲 Iprodione	10	0.13 $\pm$ 0.09 G	96.44	5.27 $\pm$ 0.11 A	39.27	2.63 $\pm$ 0.05 C	16.71	0.33 $\pm$ 0.02 F	23.26	3.09 $\pm$ 0.06 B	30.44
	50	0.00 $\pm$ 0.00 G	100.00	2.25 $\pm$ 0.11 B	74.10	2.77 $\pm$ 0.04 A	12.19	0.14 $\pm$ 0.03 F	68.02	1.18 $\pm$ 0.01 E	73.34
	100	0.00 $\pm$ 0.00 G	100.00	0.24 $\pm$ 0.01 F	97.21	2.78 $\pm$ 0.03 A	12.03	0.09 $\pm$ 0.06 G	79.65	1.13 $\pm$ 0.03 E	74.52
制霉菌素 Nystatin	200	0.00 $\pm$ 0.00 H	100.00	0.21 $\pm$ 0.01 G	97.55	2.74 $\pm$ 0.04 A	13.22	0.00 $\pm$ 0.00 H	100.00	1.02 $\pm$ 0.03 E	76.94
	10	0.93 $\pm$ 0.19 E	74.11	5.09 $\pm$ 0.04 E	41.31	2.09 $\pm$ 0.05 C	33.81	0.15 $\pm$ 0.09 G	66.28	0.76 $\pm$ 0.19 E	82.86
	50	0.00 $\pm$ 0.00 G	100.00	3.17 $\pm$ 0.05 A	63.50	0.00 $\pm$ 0.00 G	100.00	0.00 $\pm$ 0.00 G	100.00	0.24 $\pm$ 0.18 F	94.70
空白对照 (CK)	100	0.00 $\pm$ 0.00 E	100.00	2.13 $\pm$ 0.03 A	75.45	0.00 $\pm$ 0.00 E	100.00	0.00 $\pm$ 0.00 E	100.00	0.00 $\pm$ 0.00 E	100.00
	0	3.58 $\pm$ 0.16 C	0.00	8.68 $\pm$ 0.20 A	0.00	3.16 $\pm$ 0.03 DE	0.00	0.43 $\pm$ 0.02 H	0.00	4.44 $\pm$ 0.05 B	0.00

ACD：平均菌落直径；AIR：平均抑菌率。表中数据为平均数 $\pm$ 标准差。不同大写字母表示经 Duncan 氏新复极差法检验在 $P < 0.01$ 水平差异显著。ACD：Average colony diameter；AIR：average inhibition rate. Data in the table are mean $\pm$ SD. Data in the table followed by different uppercase letters indicate significant difference at $P < 0.01$ level by Duncan's new multiple range test.

表 3 荔枝霜疫霉和 9 种非目标真菌在选择性培养基上的菌落生长情况

Table 3 Mycelial growth of *Peronophythora litchii* and other nine contaminating fungi on selective medium cm

供试菌株 Isolate	不同培养基上的平均菌落直径 Average colony diameter on different media	
	PSA	SM
荔枝霜疫霉 <i>P. litchii</i>	3.12 ± 0.07 D	1.36 ± 0.31 A
炭疽菌 <i>Colletotrichum</i> sp.	3.02 ± 0.11 D	0.00 ± 0.00 B
拟茎点霉 <i>Phomopsis</i> sp.	4.03 ± 0.05 B	0.00 ± 0.00 B
链格孢菌 <i>Alternaria</i> sp.	2.56 ± 0.05 F	0.00 ± 0.00 B
镰刀菌 <i>Fusarium</i> sp.	3.15 ± 0.09 D	0.00 ± 0.00 B
拟盘多毛孢 <i>Pestalotiopsis</i> sp.	3.01 ± 0.06 D	0.00 ± 0.00 B
毛霉 <i>Mucor</i> sp.	8.08 ± 0.12 A	0.00 ± 0.00 B
地霉 <i>Geotrichum</i> sp.	2.80 ± 0.05 E	0.22 ± 0.06 B
酵母菌 <i>Saccharomyces</i> sp.	0.51 ± 0.02 G	0.00 ± 0.00 B
裂褶菌 <i>Schizophyllum</i> sp.	3.64 ± 0.06 C	0.00 ± 0.00 B

PSA: 基础培养基; SM: 选择性培养基。表中数据为平均数 ± 标准差。同列数据后不同大写字母表示经 Duncan 氏新复极差法检验在 $P < 0.01$ 水平差异显著。PSA: The basal medium; SM: selective medium. Data in the table are mean ± SD. Data in the table followed by different uppercase letters in the same column indicate significant difference at $P < 0.01$ level by Duncan's new multiple range test.

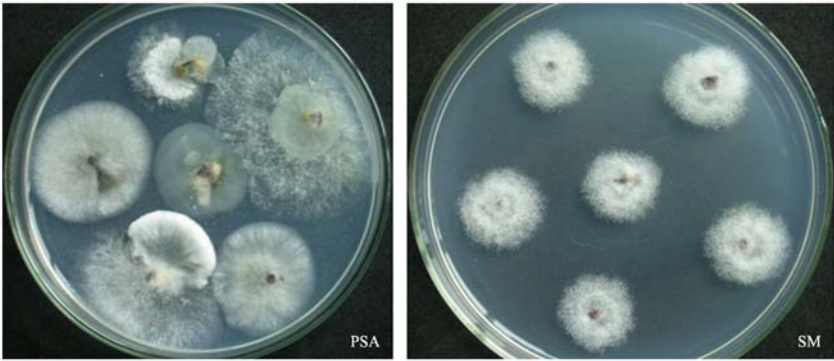


图 1 PSA 培养基及选择性培养基自病果分离荔枝霜疫霉的效果比较

Fig. 1 Comparison of selectivity of isolating *Peronophythora litchii* on PSA and selective medium from diseased fruits

PSA: 基础培养基; SM: 选择性培养基。PSA: The basal medium; SM: selective medium.

3 讨论

对有些植物病害的诊断及其病原菌的研究,组织分离是其中不可或缺的一步,必须通过分离获得该病原菌的纯培养。在分离荔枝霜疫霉过程中,由于常受到其它杂菌的干扰,特别是对于非新鲜样品,其干扰菌更为复杂,要分离出纯的荔枝霜疫霉菌株较为困难。有关荔枝霜疫霉的选择性培养基,仅见杨宏仁等^[4]报道的 PIKA 培养基和一发明专利—白云豆选择性培养基^[5]。前者在 10% V-8 juice agar 培养基中加入 25% 咪鲜胺 (prochloraz) 乳油、23.7% 异菌脲 (iprodione) 烟片及 43% 春雷霉素·多菌灵 (kasugamycin & carbendazim) 可湿性粉剂 3 种杀菌剂有效成分各 10 μg/mL 及氨苄青霉素 (ampicilin) 200 μg/mL 后能够有效抑制或延缓炭疽病菌、镰刀菌、根霉菌及细菌等的污染^[4];根据 PIKA 培养基中咪鲜胺和多菌

灵所用浓度判断,该培养基同样可有效抑制本研究中的另 3 种真菌—拟茎点霉、链格孢菌和拟盘多毛孢,但不包括地霉、裂褶菌和酵母菌。本研究发现,当有地霉污染时,荔枝霜疫霉很难被纯化出来,经药剂筛选,发现制霉菌素对该菌有良好的抑制作用,并将其作为选择性培养基的主要成分之一,有效解决了地霉的污染问题。本研究未发现根霉菌的污染,但发现另一同属接合菌亚门的真菌—毛霉的污染,该菌生长速率同样极快,严重影响荔枝霜疫霉的分离成功率。本研究结果表明当异菌脲的有效浓度为 200 μg/mL 时,远高于 PIKA 培养基中的 10 μg/mL^[4],可有效抑制毛霉的生长。此外,裂褶菌在 PSA 培养基上较荔枝霜疫霉生长快且气生菌丝发达,酵母菌的生长也易将分离的病组织块包裹,均不利于荔枝霜疫霉的成功分离,而本研究将异菌脲和制霉菌素混合使用,可有效抑制裂褶菌和酵母菌的生长,增强了该选择性培养

基排除其它污染真菌的能力,进一步扩大了其抑菌谱。然而,后者虽然也是通过添加苯醚甲环唑、多菌灵或咪鲜胺等杀菌剂来抑制其它非目标真菌的生长,但并未说明其它非目标真菌的种类以及所用杀菌剂浓度是否可对其进行有效抑制。岑贞陆和黄思良^[6]也曾报道过一种分离荔枝霜疫霉的方法,但该方法需时较长,而本研究仅采用选择性培养基通过常规组织分离的操作,甚至可省略表面消毒这一步,成功分离获得荔枝霜疫霉纯菌落,且3 d后即可观察结果,操作更为简便、省时。虽然也有个别荔枝霜疫霉菌落受到一些杂菌污染,但由于杂菌的生长受抑制较荔枝霜疫霉慢,不影响目标菌的直接纯化和保存。

对于分离荔枝霜疫霉所用的基础培养基,本研究选用较为常用的PSA培养基,更易制备和获得。为排除细菌污染,在培养基中加入适当的抗生素可有效抑制细菌生长,但本研究结果表明,并非所有抗生素都适合用于荔枝霜疫霉的分离,如硫酸链霉素和四环素对荔枝霜疫霉菌丝生长有很强的抑制作用,与刘爱媛^[9]、刘西莉等^[5]报道结果相一致,而氯霉素在本研究中同样对荔枝霜疫霉有较强的抑制作用,与刘西莉等^[5]报道不同,这可能与试验所用荔枝霜疫霉菌株对该抗生素的敏感性差异有关。此外,荔枝霜疫霉可通过孢子囊和游动孢子进行传播,并以卵孢子在病组织或土壤中越冬,因此本研究所选的选择性培养基是

否也适合该菌孢子囊、游动孢子及卵孢子的生长,对于可否扩大它的应用及检出范围具有决定性作用。本研究进一步的试验结果表明,荔枝霜疫霉的孢子囊及游动孢子在该选择性培养基上也能萌发、生长形成菌落,而对卵孢子的测试则仍在进行中。

参 考 文 献 (References)

- [1] 戚佩坤. 广东果树真菌病害志. 北京: 中国农业出版社, 2000: 38-43
- [2] 戚佩坤, 潘雪萍, 刘任. 荔枝霜疫病的研究 I. 病原菌的鉴定及其侵染过程. 植物病理学报, 1984, 14(2): 113-119
- [3] 蔡学清, 林娜, 陈炜, 等. 荔枝霜疫霉的生物学特性. 热带作物学报, 2009, 30(9): 1226-1231
- [4] 杨宏仁, 柯文琪, 安宝贞, 等. 检测荔枝露疫病菌之半选择性培养基. 植物病理学会刊, 2003, 12(1): 27-32
- [5] 刘西莉, 王茜, 毕扬, 等. 一种用于分离荔枝霜疫霉菌菌的培养基. 中国, 201210177845.9. 2012-11-07
- [6] 岑贞陆, 黄思良. 一种高效分离荔枝霜疫霉菌的新方法. 植物保护, 2008, 34(6): 137-138
- [7] 方中达. 植病研究方法(第3版). 北京: 中国农业出版社, 1998: 122-137
- [8] 唐启义. DPS®数据处理系统: 实验设计、统计分析及数据挖掘(第2版). 北京: 科学出版社, 2010: 82-84
- [9] 刘爱媛. 链霉素对几种卵菌的抑制作用. 植物保护学报, 2001, 28(3): 254-258

(责任编辑:高 峰)