

云南省荞麦叶枯病病原菌鉴定及其生物学特性

卢文洁¹ 罗志明² 李春花¹ 尹桂芳¹ 王艳青¹ 王莉花^{1*}

(1. 云南省农业科学院生物技术与种质资源研究所, 云南省农业生物技术重点实验室, 农业部西南作物基因资源与种质创制重点实验室, 昆明 650205; 2. 云南省农业科学院甘蔗研究所, 开远 616699)

摘要: 为明确云南省荞麦叶枯病病原菌种类, 采用常规组织分离法获得病原菌菌株 LW2015.3, 通过形态学特征及分子生物学技术对菌株 LW2015.3 进行鉴定, 并研究其生物学特性。结果表明, 荞麦叶枯病病原菌的分生孢子呈倒棍棒状或倒梨状, 褐色, 具 3~8 个横隔膜, 0~4 个纵斜隔膜, 大小为 16.5~45.0 μm ×5.0~13.5 μm , 厚垣孢子呈球形, 直径为 6.0~12.0 μm ; 该菌株 ITS 序列系统发育进化分析结果表明, 菌株 LW2015.3 与链格孢 *Alternaria alternata* (登录号: MG195995.1) 的同源性为 100%, 结合形态学特征与分子鉴定结果确定云南省荞麦叶枯病病原菌为链格孢 *A. alternata* (登录号: KT362732.1)。该病原菌菌丝生长适宜温度为 20~30℃, 25℃ 为最适温度; 当 pH 为 6~9 时菌丝生长速率加快, pH 7 最适菌丝生长; PDA 培养基和 PSA 培养基最适菌丝生长; 该病原菌对以麦芽糖为碳源和以硝酸钠为氮源时的利用率最高; 菌丝的致死温度为 50℃, 10 min; 不同光照条件对菌丝生长的影响有显著差异, 连续光照最有利于菌丝生长。

关键词: 荞麦; 叶枯病; 病原菌鉴定; 链格孢; 生物学特性

Identification and biological characteristics of the pathogen causing leaf blight of *Fagopyrum esculentum* in Yunnan Province

Lu Wenjie¹ Luo Zhiming² Li Chunhua¹ Yin Guifang¹ Wang Yanqing¹ Wang Lihua^{1*}

(1. Key Laboratory of Southwestern Crop Gene Resources and Germplasm Innovation, Ministry of Agriculture, Biotechnology and Genetic Resources Institute; Yunnan Provincial Key Laboratory of Agricultural Biotechnology, Yunnan Academy of Agricultural Sciences, Kunming 650205, Yunnan Province, China; 2. Sugarcane Research Institute, Yunnan Academy of Agricultural Sciences, Kaiyuan 616699, Yunnan Province, China)

Abstract: To clarify the pathogen causing leaf blight of *Fagopyrum esculentum*, the strain LW2015.3 was obtained with the method of tissue isolation and identified based on morphological characteristics, molecular biological technology, and the biological characteristics of strain were also determined. The results showed that the fungal conidia were obclavate or obpyriform, brown, with three to eight transversely septate and zero to four longitudinally septate, 16.5–45.0 μm ×5.0–13.5 μm in diameter. The chlamydospores were spherical, 6.0–12.0 μm in diameter. The ITS sequence of the strain LW2015.3 showed 100% homology with that of *Alternaria alternata* (MG195995.1). The pathogen was finally identified as *A. alternata* (KT362732.1). The mycelia could growth at 20–30℃, and 25℃ was the optimum temperature. The growth rate of mycelial increased rapidly at pH 6–9, and the optimum pH was 7. The optimum media for mycelial growth were PDA and PSA. The utilization rates of maltose and sodium nitrate were the highest for mycelial growth among all carbon and nitrogen sources, respectively. The fatal temperature for mycelial growth was 50℃ for 10 min. Significant differences were found

基金项目: 国家现代农业(燕麦荞麦)产业技术体系(CARS-08-C-2), 云南省技术创新人才项目(2014HB062)

* 通信作者 (Author for correspondence), E-mail: wanglihua70@hotmail.com

收稿日期: 2018-09-20

in the mycelium growth under different light conditions and the continuous light was most favorable for mycelial growth.

Key words: *Fagopyrum esculentum*; leaf blight; pathogen identification; *Alternaria alternata*; biological characteristics

荞麦 *Fagopyrum esculentum* Moench. 为蓼科荞麦属一年生或多年生的双子叶草本植物,含有丰富的蛋白质、淀粉、脂肪酸等营养物质,以及芦丁、槲皮素等黄酮类药物成分(李双红等,2015),是药食同源保健食品。目前,我国广泛栽培的品种有甜荞(也称普通荞麦)和苦荞(也称鞑靼荞麦),其中甜荞主要分布于内蒙古、陕西、山西、甘肃、宁夏、吉林省区等北方产区,苦荞主要分布于云南、四川、贵州、西藏省区等南方产区(陈庆富,2018)。目前,国外已报道的荞麦病害主要有荞麦根腐病(Mondalet al., 2002; Lahoz et al., 2007)和荞麦霜霉病(Petrželová et al., 2015; Econopouly et al., 2017),引起这2种病害的病原菌分别为核盘菌 *Sclerotinia sclerotiorum* 和霜霉属真菌;在我国发生的荞麦病害主要有立枯病(卢文洁等,2014)、白粉病(Lu et al., 2015)、轮纹病(卢文洁等,2017)等。

Lu et al. (2015)和卢文洁等(2017)通过致病性测定、形态学及分子生物学等鉴定方法将云南省发生的荞麦白粉病和轮纹病的病原菌分别鉴定为蓼白粉菌 *Erysiphe polygoni* 和草茎点霉 *Phoma herbarum*。卢文洁等(2016)通过对荞麦轮纹病的病原菌生物学特性研究发现,该病原菌适宜的温度为20~28℃,最适温度为25℃,该病原菌主要危害叶片,严重时造成叶片枯萎脱落,导致荞麦减产,是目前危害荞麦生产较为严重的病害之一。2014年以来,云南省安宁市荞麦种植基地出现了一种新的荞麦病害——叶枯病。近年来,荞麦栽培面积逐年增加,加上管理粗放、气候因素,该病害呈逐年加重趋势,植株发病率达35%,给荞麦生产造成较大的经济损失。因此,明确引起荞麦叶枯病的病原菌对该病害的防治十分重要。

链格孢 *Alternaria alternata* 引起的桂花叶枯病症状与荞麦叶枯病的相似,发病初期叶尖或叶缘出现椭圆或不规则红褐色病斑,病健交界明显,后期病斑逐渐由边缘向叶基部扩展,呈倒V型(谢玲等,2009)。本研究从云南省安宁市荞麦种植基地采集病叶,通过组织分离法获得病原菌菌株,并进行致病性测定,通过形态学特征观察、rDNA-ITS序列和系

统发育树分析等方法对病原菌进行鉴定,并对其生物学特性进行测定,以期荞麦叶枯病病原菌致病机理及病害防治研究提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

供试植株:感染病害的荞麦采自云南省安宁市县街镇甸心村荞麦种植基地,品种为云荞1号。采集后带回实验室,置于4℃冰箱保存备用。

培养基:马铃薯葡萄糖琼脂(potato dextrose agar, PDA)培养基:马铃薯200 g、葡萄糖20 g、琼脂20 g;马铃薯蔗糖琼脂(potato sugar agar, PSA)培养基:马铃薯200 g、蔗糖20 g、琼脂20 g;查彼(Czappek)培养基: $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5 g、 K_2HPO_4 1 g、 KCl 0.5 g、 NaNO_3 2 g、 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.01 g、蔗糖25 g、琼脂20 g;胡萝卜琼脂(carrot agar, CA)培养基:胡萝卜200 g、琼脂20 g;燕麦片琼脂(oatmeal agar, OMA)培养基:燕麦片30 g、琼脂20 g;沙氏葡萄糖琼脂(sabouraud dextrose agar, SDA)培养基:蛋白胨10 g、琼脂20 g、葡萄糖40 g;玉米粉琼脂(cornmeal agar, CMA)培养基:玉米粉30 g、琼脂20 g;水琼脂(water agar, WA)培养基:琼脂20 g;碳(氮)源基础培养基:葡萄糖20 g、硝酸钾5 g、磷酸钠2 g、硫酸镁1 g、琼脂12 g。以上培养基均添加1 000 mL蒸馏水。

试剂及仪器:10×Buffer、 MgCl_2 、dNTPs、*Taq* 酶, 生工生物工程(上海)股份有限公司;真菌基因组DNA提取试剂盒,北京鼎国昌盛生物技术有限责任公司;其余试剂均为国产分析纯。Eppendorf 5424型台式离心机,德国艾本德公司;Tprofessional Standard 96型PCR仪,德国BIOMETRA公司;SPX-100B-Z型恒温培养箱,上海博迅实业有限公司;HVE-50型高压灭菌锅,日本株式会社平山制作所;DMI 4000B型倒置显微镜,德国徕卡仪器有限公司。

1.2 方法

1.2.1 荞麦叶枯病的田间症状观察

2014年6—8月在云南省安宁市县街镇甸心村的发病荞麦试验地仔细观察荞麦叶枯病的发病症状及病斑的蔓延扩展情况,并对发病叶片的症状进行

拍照,采集病叶后进行病原菌鉴定。

1.2.2 荞麦叶枯病原菌的致病性测定

采用真菌病害常规组织分离法,从病叶病健交界处取大小为5 mm×5 mm组织,依次用70%乙醇、2%次氯酸钠消毒处理后接种于PDA培养基,25℃恒温培养5 d,所获菌株纯化后低温保存备用。

采用离体叶片接种法进行致病性测定。取低温保存的菌株移至于PDA培养基上,25℃恒温培养,待菌落直径约为80 mm时,于菌落边缘打取直径6 mm的菌丝块,选取大小基本一致的健康荞麦叶片,用灭菌接种针轻轻刺伤叶片表面,伤口直径大小约为0.5~1.0 mm,将菌丝块接种到荞麦叶片针刺部位,以接种PDA培养基作对照,每个处理接种15叶片,置于35 cm×50 cm的瓷盘内用保鲜膜覆盖保湿,置于25℃温室培养,接种24 h后移去菌丝块,观察发病情况,比较从发病叶片上再次分离到的病原菌与原接种菌的培养性状和形态特征是否一致。

1.2.3 荞麦叶枯病原菌的形态学特征

选取代表性菌株LW2015.3进行病原菌鉴定。将菌株于PDA培养基上25℃恒温培养5 d后,挑取少许菌丝于载玻片上,在光学显微镜下观察分生孢子、厚垣孢子的形态特征,各测量100个孢子的大小,将菌株的分生孢子、厚垣孢子形态特征与《中国真菌志》第十六卷链格孢属真菌的孢子形态进行对比(张天宇,2003),初步确定菌株的种类。

1.2.4 荞麦叶枯病原菌的分子鉴定

菌株LW2015.3于PDA培养基上25℃恒温培养5 d后,用消毒刀片刮取菌丝,参考真菌基因组DNA提取试剂盒操作说明提取真菌DNA。选用真菌核糖体内转录间隔区(internal transcribed spacer, ITS)通用引物对ITS1(5'-TCCGTAGGTGAACCTGGG-3')和ITS4(5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3')进行PCR扩增,引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。25 μL PCR反应体系:菌株DNA模板1 μL、10×Buffer 2.5 μL、10 mmol/L dNTPs 1 μL、25 mmol/L MgCl₂ 0.5 μL、5 U/μL Taq 酶 0.2 μL、20 μmol/L引物ITS1、ITS4各1 μL,加ddH₂O至25 μL。PCR反应程序:94℃预变性5 min;94℃变性1 min,55℃退火1 min,72℃延伸1 min,共40个循环;最后72℃延伸10 min。利用1.0%琼脂糖凝胶对PCR产物进行电泳检测,目的片段回收纯化后由华大基因(深圳)生物科技有限公司进行测序。菌株序列经BLAST比对分析后在NCBI上进行提交,利用

MEGA 6.0软件以邻接法对菌株LW2015.3及相关菌株的序列进行聚类分析,构建同一个属不同种的系统发育树,重复1 000次。

1.2.5 荞麦叶枯病原菌的生物学特性

培养基对菌丝生长的影响:当菌落直径约为80 mm时,于菌落边缘取直径6 mm的菌丝块,分别接种至PDA、SDA、PSA、Czapek、OMA、CA、CMA七种不同培养基的平板中央,以WA培养基为对照,每种处理重复5皿,于25℃恒温条件下培养5 d,菌落直径采用十字交叉法进行测量,并观察菌落的形态特征。

温度对菌丝生长的影响:当菌落直径约为80 mm时,于菌落边缘取直径6 mm的菌丝块,接种至PDA培养基上,分别置于5、10、15、20、25、28、30、35℃恒温培养5 d,每种处理重复5皿,菌落直径采用十字交叉法进行测量,并观察菌落的形态特征。

病原菌致死温度的测定:菌落直径约为80 mm时,于菌落边缘取直径6 mm的菌丝块,接到无菌试管中,加入2 mL无菌水,分别置于40、45、50、55、60、65℃的水浴中加热,10 min后取出试管冷却至室温,再将菌丝块接种至PDA培养基上,每处理重复5皿,25℃恒温条件下培养5 d后,观察菌丝块生长情况。

pH对菌丝生长的影响:分别用1 mol/L盐酸溶液和1 mol/L氢氧化钠溶液调节PDA培养基pH为4、5、6、7、8、9、10、11、12。菌落直径约为80 mm时,于菌落边缘取直径6 mm的菌丝块,分别接种在不同pH的PDA培养基上,每种处理重复5皿,于25℃恒温条件下培养5 d,菌落直径采用十字交叉法进行测量,并观察菌落的形态特征。

光照对菌丝生长的影响:菌落直径约80 mm时,于菌落边缘取直径6 mm的菌丝块,接种于PDA培养基上,设连续光照、12 h光暗交替、全黑暗3种处理,每种处理重复5皿,于25℃恒温条件下培养5 d,菌落直径采用十字交叉法进行测量,并观察菌落的形态特征。

碳(氮)源对菌丝生长的影响:以蔗糖、可溶性淀粉、乳糖、麦芽糖、木糖、甘露糖等质量替换碳源基础培养基中的葡萄糖配制不同碳源培养基,以不加碳源的基础培养基作为对照(CK);以氯化铵、硝酸钠、苯丙氨酸、硫酸铵、胱氨酸、尿素、蛋白胨、牛肉浸膏等质量替换氮源基础培养基中的硝酸钾配制不同氮源培养基,以不加氮源的基础培养基作为对照(CK)。菌落直径约为80 mm时,于菌落边缘取直径

6 mm的菌丝块,分别接种至含有不同碳(氮)源的培养基上,每种处理重复5皿,于25℃恒温条件下培养5 d,菌落直径采用十字交叉法进行测量,并观察菌落的形态特征。

1.3 数据分析

试验数据利用SPSS 19.0软件进行统计分析,并应用Duncan新复极差法检验差异显著性。

2 结果与分析

2.1 荞麦叶枯病的症状

荞麦叶枯病在6月中下旬开始零星发病,7—8月发病严重。发病初期,荞麦叶尖或叶缘出现不规则褐色或深褐色病斑(图1-a~b),随着病情发展蔓延,病斑逐渐向叶基部扩展,病斑变为黑色,病部呈V型(图1-c)。该病害可危害成熟叶片和嫩叶,但嫩叶发病更为严重。

2.2 荞麦叶枯病病原菌的分离及致病性

对采集的病叶进行组织分离,结果表明分离到的链格孢属 *Alternaria* 真菌菌株比例高达95%,镰刀菌属 *Fusarium* 真菌菌株占3%,还分离出极少的灰葡萄孢 *Botrytis cinerea* 菌株。从分离的不同真菌中选择代表性菌株进行致病性测定,结果表明,只有链格孢属真菌菌株LW2015.3接种时,荞麦叶片产生黑色病斑。

致病性测定研究表明,菌株LW2015.3接种叶片2 d后针刺接种部位出现褐色小病斑,接种5 d后,病斑逐渐扩大,病斑呈黑色,与田间自然发病症状相

符,从接种发病叶片上再次分离到的病原菌与原接种菌株培养性状和形态特征一致,初步确认菌株LW2015.3为荞麦叶枯病病原菌。

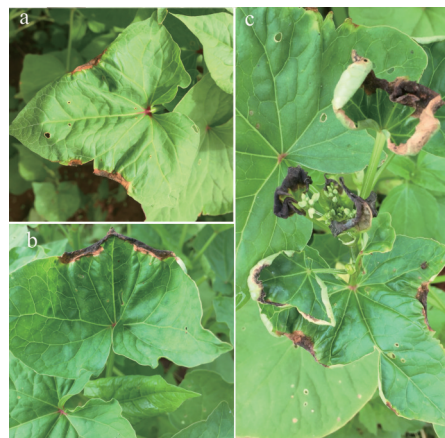


图1 云南省荞麦叶枯病的症状

Fig. 1 The symptoms of pathogen of leaf blight of *Fagopyrum esculentum* in Yunnan Province

a~b: 感病初期; c: 感病后期。a~b: Early symptom; c: late symptom.

2.3 荞麦叶枯病病原菌的形态学鉴定

荞麦叶枯病菌株在PDA培养基上的菌落近圆形,边缘规则,呈灰青色至暗褐色,菌丝致密(图2-a),菌落背面呈深褐色至黑色(图2-b);分生孢子呈倒棍棒状或倒梨状,褐色,具3~8个横隔膜,分隔处略隘缩或不隘缩,0~4个纵斜隔膜,分生孢子大小为16.5~45.0 μm×5.0~13.5 μm(图2-c);厚垣孢子呈球形,直径为6.0~12.0 μm(图2-d~e)。

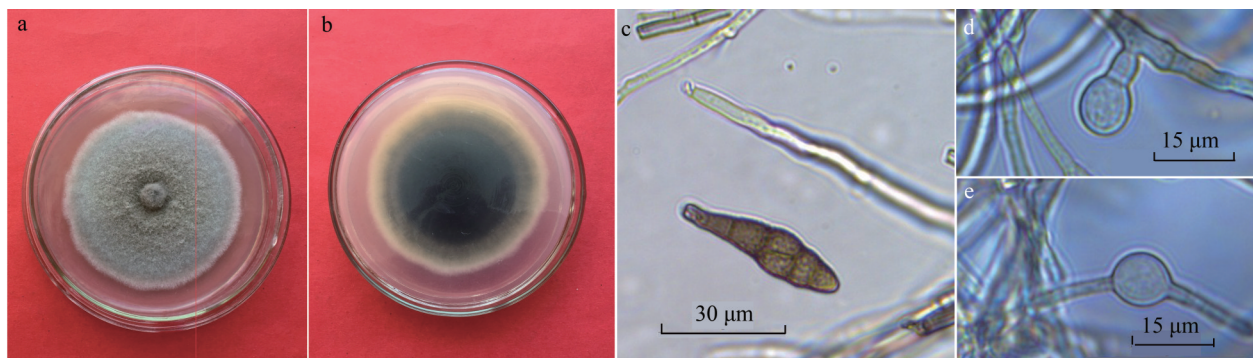


图2 荞麦叶枯病病原菌的形态特征

Fig. 2 Morphological characteristics of the pathogen of leaf blight of *Fagopyrum esculentum*

a: PDA平板上菌落正面形态; b: PDA平板上菌落背面形态; c: 分生孢子; d~e: 厚垣孢子。a: Colony morphology on the PDA plate at the front side; b: colony morphology on the PDA plate at the back side; c: conidium; d~e: chlamydo-spore.

2.4 荞麦叶枯病病原菌的分子鉴定

以病原菌株LW2015.3的基因组DNA为模板,采用引物对ITS1/ITS4进行PCR扩增,获得1条约

550 bp的清晰条带(图3-a),测序显示该菌株的ITS片段大小为569 bp(登录号:KT362732.1),将该序列在NCBI上BLAST比对,选取链格孢属侵染链格孢A.

infectoria EGS27-193 (登录号:NR_131263.1)、长柄链格孢 *A. longipes* EGS30-033 (登录号:AY295068.1)、链格孢 *A. alternata* IBR-SESA-AL1 (登录号:MG-195995.1)、葱链格孢 *A. porri* CBS116699 (登录号:NR_136100.1)、芸苔生链格孢 *A. brassicicola* 434/2 (登录号:KP993538.1)、梨黑斑链格孢 *A. gaisen* 15A

(登录号:AY295072.1)等菌株,进行多重序列比较及系统发育学分析,结果显示,该病原菌的ITS序列与链格孢 *A. alternata* IBR-SESA-AL1 的同源性为100%,表明菌株LW2015.3与链格孢遗传距离最小,聚为一类(图3-b)。结合菌株LW2015.3的形态特征,最终将荞麦叶枯病病原菌鉴定为链格孢属链格孢 *A. alternata*。

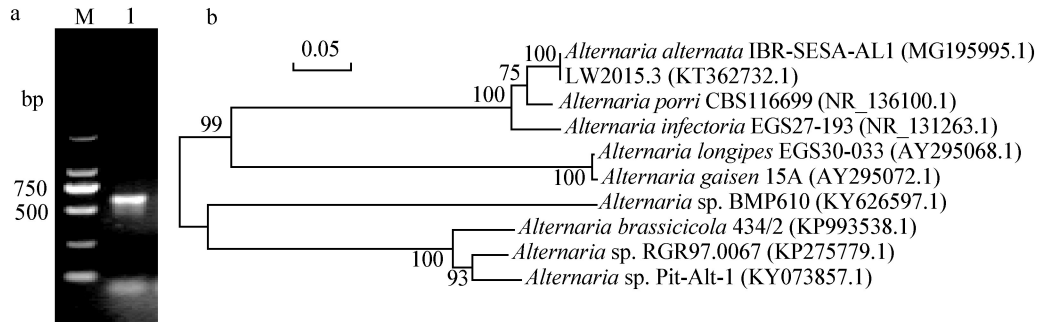


图3 荞麦叶枯病的PCR检测结果(a)与基于ITS序列构建菌株LW2015.3及相关菌株的系统发育树(b)

Fig. 3 Results of PCR detection of *Fagopyrum esculentum* leaf blight (a) and phylogenetic tree of strain LW2015.3 and related strains based on ITS sequences (b)

M: DL2000 DNA marker; 1: 菌株LW2015.3。M: DL2000 DNA marker; 1: the strain LW2015.3.

2.5 菌株LW2015.3的生物学特性

2.5.1 培养基对菌丝生长的影响

菌株LW2015.3在8种培养基上菌丝均能生长,其中在PDA培养基上菌丝生长最快,其次为PSA培养基,平均菌落直径分别为61.44、59.91 mm,二者处理之间无显著差异,且在2种培养基上的菌丝均生

长致密;在OMA、CMA、Czapek、SDA培养基上菌丝生长较快,平均菌落直径分别为55.38、54.16、53.72、53.51 mm,4种处理之间无显著差异,在CA培养基和WA培养基上的平均菌落直径分别为48.09 mm和21.67 mm,均显著低于以上6种培养基(图4)。说明PDA培养基和PSA培养基最适合该菌生长。

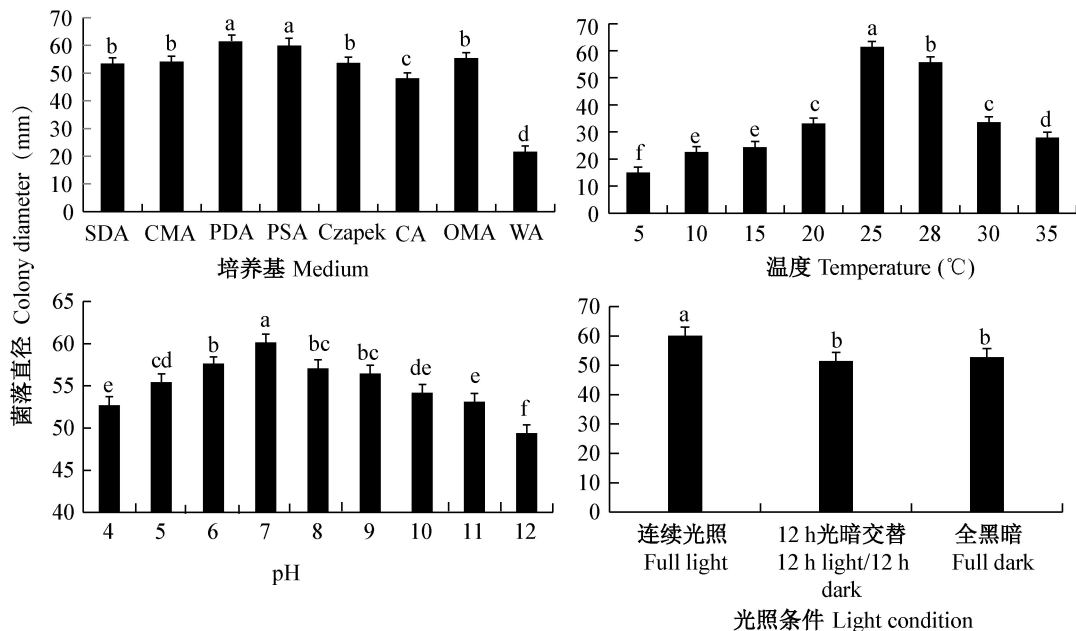


图4 不同培养条件对菌株LW2015.3菌丝生长的影响

Fig. 4 Effects of different culture conditions on the mycelial growth of the strain LW2015.3

图中数据为平均数±标准差。不同字母表示经Duncan氏新复极差法检验在 $P < 0.05$ 水平差异显著。Data are mean±SD. Different letters indicate significant difference at $P < 0.05$ level by Duncan's new multiple range test.

2.5.2 温度对菌丝生长的影响

菌株 LW2015.3 在 5~35℃ 范围内菌丝均能生长,适宜生长温度为 20~30℃,在 25℃ 温度下的平均菌落直径最大为 61.44 mm,显著大于其它温度处理,表明菌丝生长的最适温度为 25℃,其次在 28℃ 下菌丝生长较快,平均菌落直径为 55.74 mm,在 20、30℃ 下菌丝生长较慢,平均菌落直径分别为 33.13、33.57 mm,在 5、10、15、35℃ 下菌丝生长缓慢,明显抑制菌丝生长(图 4)。

菌丝块经不同温度水浴处理 10 min 后,置于 PDA 培养基上,发现经 40、45℃ 水浴处理的菌丝块 5 d 后均可长出菌丝,而在 50、55、60、65℃ 水浴处理的菌丝块培养 10 d 后仍未见菌丝生长;菌丝块分别在 46、47、48、49℃ 水浴处理 10 min 后,5 d 后均可长出菌丝,说明该病原菌菌丝的致死温度为 50℃,10 min。

2.5.3 pH 对菌丝生长的影响

菌株 LW2015.3 在 pH 4~12 时菌丝均能生长,平均菌落直径依次为 52.70、55.41、57.63、60.12、57.09、56.44、54.16、53.10、49.39 mm。在 pH 为 12 时,菌丝生长速度明显减慢,在 pH 为 6~9 时,菌丝生长速率加快,在 pH 为 7 时,平均菌落直径显著高于其它处理,菌丝生长速度最快,菌落致密,表明 pH 为 7 时最适菌丝生长(图 4)。

2.5.4 光照对菌丝生长的影响

菌株 LW2015.3 在连续光照、12 h 光暗交替、

全黑暗 3 种光照条件下均可生长,平均菌落直径依次分别为 60.04、51.42、52.70 mm,在 12 h 光暗交替和全黑暗条件下,二者之间平均菌落直径无显著差异,在连续光照条件下的平均菌落直径显著高于其它 2 种处理,表明连续光照最适菌丝生长(图 4)。

2.5.5 碳、氮源对菌丝生长的影响

菌株 LW2015.3 在供试 7 种碳源培养基上菌丝均能生长,其中在以麦芽糖为碳源的培养基上利用率最高,平均菌落直径为 60.94 mm,显著高于其它碳源处理;在以蔗糖、葡萄糖为碳源的培养基上利用率次之,平均菌落直径分别为 58.51、57.90 mm,二者间无显著差异;在以木糖为碳源的培养基上利用率较低,平均菌落直径为 48.73 mm;在以乳糖为碳源的培养基上菌丝生长最慢(表 1)。

菌株 LW2015.3 在供试 9 种氮源培养基上菌丝均能生长,其中在以硝酸钠为氮源的培养基上利用率最高,平均菌落直径为 62.51 mm,显著高于其它氮源处理;其次以胱氨酸、硝酸钾利用率较高,平均菌落直径分别为 59.19、58.53 mm,在以苯丙氨酸、氯化铵为氮源的培养基上利用率较低,平均菌落直径分别为 52.01、50.41 mm,在尿素为氮源的培养基上利用率最低,菌丝生长速度显著低于其它处理(表 1),表明尿素抑制菌丝生长最明显。

表 1 碳、氮源对菌株 LW2015.3 菌丝生长的影响

Table 1 Effects of carbon and nitrogen sources on the mycelia growth of strain LW2015.3

碳源 Carbon source	菌落直径 (mm) Colony diameter	氮源 Nitrogen source	菌落直径 (mm) Colony diameter
麦芽糖 Maltose	60.94±1.24 a	硝酸钠 Sodium nitrate	62.51±1.37 a
蔗糖 Sucrose	58.51±2.55 b	胱氨酸 Cystine	59.19±1.21 b
葡萄糖 Glucose	57.90±1.53 b	硝酸钾 Potassium nitrate	58.53±1.33 bc
可溶性淀粉 Soluble starch	53.70±0.84 c	硫酸铵 Ammonium sulphate	56.26±1.94 cd
甘露糖 Mannitol	53.66±0.41 c	蛋白胨 Peptone	55.93±0.58 d
木糖 Xylose	48.73±0.61 d	牛肉浸膏 Beef extract	54.18±2.36 de
乳糖 Lactose	45.68±0.92 e	苯丙氨酸 Phenylalanine	52.01±1.65 ef
对照 CK	48.43±0.46 d	氯化铵 Ammonium chloride	50.41±1.39 f
		尿素 Urea	44.23±1.42 g
		对照 CK	50.73±1.66 f

表中数据为平均数±标准差。同列不同字母表示经 Duncan 氏新复极差法检验在 $P<0.05$ 水平差异显著。Data are mean±SD. Different letters in the same column indicate significant difference at $P<0.05$ level by Duncan's new multiple range test.

3 讨论

本研究通过形态学特征与分子生物学鉴定,确定荞麦叶枯病的病原菌为链格孢属链格孢 *A. alternata*。链格孢属是世界性分布的真菌,包括腐生、内

生和致病性种类(王洪凯等,2001;张荣等,2009)。链格孢是一种常见的植物病原真菌,能引起核桃褐色顶端坏死病和黑斑病(曲文文等,2012)、山茱萸褐斑病(牛小瑞等,2014)、大白菜黑斑病(刘丽等,2015)等多种植物病害,严重影响植物的品质和产

量,造成较大的经济损失。

本研究发现,在相同培养条件下,病原菌菌落生长时间越长,菌落颜色越深,产孢量越大,这与沈会芳等(2016)及王宏等(2006)的试验结果基本一致。刘晓琳等(2015)认为,新疆枣果黑斑病菌链格孢 *A. alternata* 菌株 Q 最适生长培养基为 PSA 培养基,适宜生长温度范围为 20~30℃,最适温度为 25℃,在全光照条件下菌丝生长最快,与本研究的结论基本一致;但菌株 Q 最适生长碳源为可溶性淀粉,最适生长氮源为蛋白胨,与本研究分离菌株 LW2015.3 最适生长碳源为麦芽糖,最适生长氮源为硝酸钠的结论存在差异;袁月等(2016)对灰葡萄孢菌生物学特性研究发现,地域对病原菌相关生物学性状有较大的影响,推测产生以上这种差异有可能是不同地域环境影响菌株对碳、氮源的利用所致。杨婷等(2018)发现,三七黑斑病病原菌 *A. alternata* 菌株 A 最适生长 pH 为 11,与本研究菌株 LW2015.3 最适生长 pH 为 7 的结果差异明显,这可能与地区土壤环境、寄主等因素有关(汪爱娥,2005)。谢玲等(2009)对广西桂花叶枯病病原菌链格孢 *A. alternata* 研究表明,菌株 GHS 最适生长培养基为 PDA,最适生长 pH 值为 7,这与本试验结果相似,但菌株 GHS 对光照不敏感,在所有光环境下均能生长较好,与本研究连续光照最有利于菌株 LW2015.3 生长的结论不同,产生此现象的原因有可能受地区海拔、寄主等因素的影响(汪爱娥,2005;袁月等,2016),但具体原因还需进一步研究分析。

本研究通过室内分离培养、离体叶片接种测定菌株致病性,通过形态学特征、分子生物学等方法较为系统地对病原菌进行鉴定,并研究其生物学特性,为今后开展该病害的病原菌致病机理、药剂筛选及防控技术研究提供理论依据。

参 考 文 献 (References)

- Chen QF. 2018. The status of buckwheat production and recent progresses of breeding on new type of cultivated buckwheat. *Journal of Guizhou Normal University (Natural Sciences)*, 36(3): 1-7 (in Chinese) [陈庆富. 2018. 荞麦生产状况及新类型栽培荞麦育种研究的最新进展. 贵州师范大学学报(自然科学版), 36(3): 1-7]
- Econopoulou B, Derie ML, Jones SS, du Toit LJ. 2017. Downy mildew of buckwheat, *Fagopyrum esculentum*, in the United States caused by *Peronospora* cf. *ducometii*. *Plant Disease*, 101(2): 391
- Lahoz E, Caiazzo R, Carella A, Cozzolino E. 2007. First report of *Sclerotinia sclerotiorum* on buckwheat (*Fagopyrum esculentum*) in Italy. *Plant Disease*, 91(11): 1519
- Li SH, Zhang LX, Yang Y, Han YR. 2015. Research progress of buckwheat nutrition and its products development. *Shaanxi Journal of Agricultural Sciences*, 61(7): 57-60 (in Chinese) [李双红, 张礼秀, 杨莹, 韩裕睿. 2015. 荞麦营养及其产品开发的研究进展. 陕西农业科学, 61(7): 57-60]
- Liu L, Liu CY, Wang QY. 2015. Resistance evaluation and pathogen identification of black spot of Chinese cabbage. *Liaoning Agricultural Sciences*, (1): 80-81 (in Chinese) [刘丽, 刘长远, 汪岐禹. 2015. 大白菜黑斑病病原鉴定及品种抗性评价. 辽宁农业科学, (1): 80-81]
- Liu XL, Liu Y, Ma R, Liang YM, Chen BJ, Yan J. 2015. Identification and biological characteristics of the pathogen causing jujube black spot in Xinjiang. *Journal of Northwest Forestry University*, 30(3): 132-138 (in Chinese) [刘晓琳, 刘玉, 马荣, 梁英梅, 陈宝军, 闫军. 2015. 新疆枣果黑斑病病原菌鉴定及生物学特性. 西北林学院学报, 30(3): 132-138]
- Lu WJ, Lou SG, Li CH, Wang YQ, He CX, Sun DW, Yin GF, Wang LH. 2016. Biological characteristics of buckwheat ring rot pathogen. *Journal of Anhui Agricultural University*, 43(5): 799-803 (in Chinese) [卢文洁, 娄仕高, 李春花, 王艳青, 何成兴, 孙道旺, 尹桂芳, 王莉花. 2016. 荞麦轮纹病病原菌生物学特性研究. 安徽农业大学学报, 43(5): 799-803]
- Lu WJ, Sun DW, He CX, Li CH, Wang YQ, Yin GF, Wang LH. 2017. Occurrence and identification of the pathogen of buckwheat ring rot in Yunnan Province. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 33(9): 154-158 (in Chinese) [卢文洁, 孙道旺, 何成兴, 李春花, 王艳青, 尹桂芳, 王莉花. 2017. 云南荞麦轮纹病的发生及病原菌鉴定. 中国农学通报, 33(9): 154-158]
- Lu WJ, Wang LH, Wang YQ, Li CH. 2015. First report of powdery mildew caused by *Erysiphe polygoni* on buckwheat in Yunnan, China. *Plant Disease*, 99(9): 1281
- Lu WJ, Wang YQ, Li CH, Wang LH, He CX. 2014. Efficacy of different fungicides in controlling buckwheat damping off in field. *Shandong Agricultural Sciences*, 46(8): 121-122 (in Chinese) [卢文洁, 王艳青, 李春花, 王莉花, 何成兴. 2014. 不同杀菌剂防治荞麦立枯病田间药效试验. 山东农业科学, 46(8): 121-122]
- Mondal KK, Rana SS, Sood P. 2002. *Sclerotinia* root rot: a new threat to buckwheat seedlings in India. *Plant Disease*, 86(12): 1404
- Niu XR, Huang SL, Li QQ, Wang Y, Yu GM, Wang T. 2014. Identification of the causal agent of dogwood brown spots. *Acta Phytopathologica Sinica*, 44(2): 204-207 (in Chinese) [牛小瑞, 黄思良, 黎起秦, 王雅, 余功明, 王坦. 2014. 山茱萸褐斑病病原鉴定. 植物病理学报, 44(2): 204-207]
- Petrželová I, Kitner M, Jemelková M, Doležalová I. 2015. First report of buckwheat downy mildew caused by *Peronospora* cf. *ducometii* in the Czech Republic. *Plant Disease*, 99(8): 1178
- Qu WW, Liu X, Yang KQ, Liu HX, Hou LQ. 2012. Identification and phylogenetic analysis of walnut-associated *Alternaria* spp. in Shandong Province, China. *Journal of Plant Protection*, 39(2): 121-128 (in Chinese) [曲文文, 刘霞, 杨克强, 刘会香, 侯立群. 2012. 山东省危害核桃的链格孢属真菌鉴定及其系统发育. 植

- 物保护学报, 39(2): 121–128]
- Shen HF, Zhang JX, Pu XM, Lin BR. 2016. Identification and biological characteristics of pathogen of leaf brown spot on pineapple (*Ananas comosus*). Journal of Zhongkai University of Agriculture and Engineering, 29(3): 6–11 (in Chinese) [沈会芳, 张景欣, 蒲小明, 林璧润. 2016. 菠萝叶褐斑病菌的鉴定及其生物学特性. 仲恺农业工程学院学报, 29(3): 6–11]
- Wang AE. 2005. Studies on biological characteristics of *Colletotrichum* spp. from diverse hosts and the resistance mechanism of pepper to anthracnose. Master Thesis. Hefei: Anhui Agricultural University (in Chinese) [汪爱娥. 2005. 不同寄主炭疽菌的生物学特性及辣椒抗性机制的研究. 硕士学位论文. 合肥: 安徽农业大学]
- Wang H, Chang YH, Chen ZY. 2006. Study on biological characteristics of *Alternaria alternata* caused occurrence of pear black spot. Journal of Fruit Science, 23(2): 247–251 (in Chinese) [王宏, 常有宏, 陈志谊. 2006. 梨黑斑病原菌生物学特性研究. 果树学报, 23(2): 247–251]
- Wang HK, Zhang TY, Zhang M. 2001. Analysis of the classification of *Alternaria* species by applying of 5.8S rDNA and ITS sequence. Mycosystema, 20(2): 168–173 (in Chinese) [王洪凯, 张天宇, 张猛. 2001. 应用5.8S rDNA及ITS区序列分析链格孢种级分类. 菌物系统, 20(2): 168–173]
- Xie L, Tang CG, Cen ZL, Huang SL, Qin BX, Qin LP, Hu CJ. 2009. Identification and characterization of causal agent of sweet *Osmanthus* leaf blight in Guangxi. Southwest China Journal of Agricultural Sciences, 22(5): 1358–1362 (in Chinese) [谢玲, 唐晨光, 岑贞陆, 黄思良, 秦碧霞, 覃丽萍, 胡春锦. 2009. 广西桂花叶枯病原菌鉴定及其生物学特性研究. 西南农业学报, 22(5): 1358–1362]
- Yang T, Yang K, He C, Wang HL, Wang WP, Jin X, Zhu SS, Zhu YY, He XH. 2018. Biological characteristics of *Alternaria alternata* causing dark speckle disease of *Panax notoginseng*. Journal of Chinese Medicinal Materials, 41(4): 763–770 (in Chinese) [杨婷, 杨宽, 何迟, 王慧玲, 王文鹏, 金鑫, 朱书生, 朱有勇, 何霞红. 2018. 三七黑斑病原菌 *Alternaria alternata* Keissl. 生物学特性研究. 中药材, 41(4): 763–770]
- Yuan Y, Zhou RJ, Fu JF, Lu ZH, Shi XQ, Li ZB. 2016. Comparison of the biological characteristics and pathogenicity of *Botrytis cinerea* isolates. Journal of Shenyang Agricultural University, 47(3): 271–277 (in Chinese) [袁月, 周如军, 傅俊范, 卢占慧, 史晓琪, 李自博. 2016. 不同人参灰霉病的灰葡萄孢菌生物学特性及致病性比较. 沈阳农业大学学报, 47(3): 271–277]
- Zhang R, Yue HM, Sun GY. 2009. Sequence and phylogenetic analysis of OPA2-1 region from *Alternaria* small-spored species. Mycosystema, 28(4): 553–557 (in Chinese) [张荣, 岳海梅, 孙广宇. 2009. 小孢子链格孢 OPA2-1 核苷酸序列分析及系统发育研究. 菌物学报, 28(4): 553–557]
- Zhang TY. 2003. Flora fungorum sinicorum (Vol. 16): *Alternaria*. Beijing: Science Press, pp. 1–283 (in Chinese) [张天宇. 2003. 中国真菌志(第十六卷). 链格孢属. 北京: 科技出版社, pp. 1–283]

(责任编辑: 王 璇)