

银杏疫病的研究

On *Ginkgo biloba* Wilt Caused by *Phytophthora*

廖咏梅 周志权* 王 琪 张发远 张桂英
Liao Yongmei Zhou Zhiquang Wang Qi Zhang Fayuan Zhang Guiying

(广西大学农学院 南宁市秀灵路 13号 530005)

(Agricultural College, Guangxi University, 13 Xiulinglu, Nanning, Guangxi, 530005)

摘要 对银杏苗圃中发生苗枯的植株进行病原分离及回接试验,发现引起银杏苗枯的病原为 *Phytophthora* sp. 称这种苗枯为银杏疫病。该病危害银杏幼嫩苗木的地上部分,未见危害根部和多年生成林树。叶片受害似开水烫伤状,茎干受害则变黑,黑色病斑环绕茎干一周后,病茎以上部分叶片青枯萎垂。病原菌在 PSA 培养基上,菌落白色绒毛状,28℃下 7 d 可长出大量孢子囊,易产生厚壁孢子,病菌生长适宜温度为 24℃~ 32℃。人工接种可致受伤银杏叶片及幼嫩茎干严重发病,但无伤茎叶发病较轻或不受害。在田间,该病 5月初开始发生,3 d ~ 5 d 病情达到高峰,苗圃的发病率为 10%~ 20%,有明显的发病中心,5月底病情稳定,以后病害不再发生。用含药培养基及含药纸碟法测定,甲霜灵及甲霜灵锰锌对病原菌有很强的抑制作用。病原种鉴定正在进行。

关键词 银杏 疫病 病原菌

Abstract Pathogeny isolation and back-inoculation were conducted for the *Ginkgo biloba* wilt occurring in the nursery. *Ginkgo biloba* wilt is found to be caused by *Phytophthora* sp., and harms the tender stems and leaves of nursery stock, but the roots and the individuals of perennial plants aren't harmed. The diseased leaves look like being scalded by boiling water. The diseased stems become black and the leaves on it wilt when a black spot has circled the stems. The pathogen colony on the PSA is white, villus shape and the sporangia and chlamydo spores are abundant at 28℃ for 7 days. Sex organs are not found in culture medium. The favour temperature of the pathogen growth is 24℃~ 32℃. Inoculated with the pathogen, the wounded leaves and tender stems are infected seriously, but the healthy ones are lightly infected or can't be infected. *Ginkgo biloba* wilt in the field appears in early May, and goes to peak in 3 to 5 days, then stops in late May, and never appears again in the same year. The rate of infection is 10% to 20%. The infection center in the field is noticeable. Metalaxyl and Metalaxy1-MZ show strong restrain to the pathogen growth in the culture media containing and paper-disc containing. The species distinguish of the pathogen is going on.

Key words *Ginkgo biloba*, *Ginkgo biloba* wilt, *Phytophthora* sp.

中图法分类号 S 763.1

由于银杏种植面积的不断扩大,银杏病害问题也日趋严重,尤其是苗圃中发生的苗枯,苗木枯死率达 10%~ 20%,严重影响了银杏的育苗工作,经对该病进行分离及回接试验,发现其病原为疫霉菌 (*Phytophthora* sp.),我们将由疫霉引起的银杏苗木枯死称为银杏疫病。为有效防治该病提供依据,我们

开展了试验研究,现将结果报道如下:

1 材料与方法

1.1 病害症状的观察及病原菌的鉴定

在病害发生时期,到发病地区采集不同部位的病组织,描述其症状,并分离病原菌,用分离到的病原菌回接到银杏幼苗上,观察病害发生情况,对能引起和田间相同症状的病原菌,观察其形态特征,并根据有关参考书,鉴定病原菌

1997-09-22收稿

* 广西科学院生物研究所,南宁大岭路 2号,530003 (Institute of Biology, Guangxi Academy of Sciences, 2 Dalinglu, Nanning, Guangxi, 530003)

1.2 病原菌生长温度范围的测定

取培养 3 d 的同龄菌丝块 (0.4 cm×0.4 cm), 置于 PSA 培养基平板的中央, 于 20℃、24℃、28℃、32℃、36℃ 及冰箱中进行培养, 其中在 28℃ 下分两个处理, 一处理完全黑暗, 另一处理置于光照条件下, 用“十”字测量法测定菌落的直径

1.3 病原菌的侵染途径

1.3.1 病原菌对叶片的侵染

自田间采回健叶, 清水洗掉表面污泥后, 再用无菌水清洗 1 次, 整个过程要求动作轻巧, 避免擦伤叶片。用刺伤接种和无伤接种法接种, 刺伤接种时, 先用带 6 支大头针的胶塞在叶片中央扎 1 次, 后接带培养基的菌丝块 (0.1 cm×0.2 cm), 无伤接种时则直接将菌丝块置于叶片中央, 同时设刺伤及无伤空白对照。每个处理 6 张叶片。将处理后的叶片置于灭菌培养皿中的三角玻璃支架上, 加入无菌水, 于 24℃、28℃ 下保湿培养, 逐日观察其发病情况, 测量发病叶面积, 计算发病率。

1.3.2 病原菌对茎干的侵染

用刺伤接种和无伤接种法, 分别接种盆栽小苗近顶芽的幼嫩茎部 (茎干呈绿色) 及近地面的已木质化茎部 (茎干呈褐色)。刺伤接种时, 先刺伤接种部位, 后用长满菌丝的琼脂条 (0.5 cm×2 cm) 包扎刺伤部位, 无伤接种时直接用带菌丝琼脂条包扎, 设刺伤及无伤空白对照, 置于 28℃ 恒温箱中用钟罩保湿培养, 逐日观察其发病情况

1.4 化学药剂对病原菌的室内毒力测定

1.4.1 供试药剂: 25% 甲霜灵、58% 甲霜灵锰锌 (江苏省南通染化厂), 47% 加瑞农可湿性粉剂 (北兴化学工业株式会社), 50% 扑海因 (法国罗纳普朗克公司), 50% 多菌灵 (上海亚太化工厂)

采用含药纸碟法及含药培养基法测定。

1.4.2 含药纸碟法: 将病原菌培养 3 d, 用口径为 0.6 cm 的灭菌金属打孔器于菌落边缘打成带菌丝圆片, 放入 PSA 培养基平板上, 每皿放 4 块菌丝圆片, 呈四方形排列; 将直径为 0.6 cm 的无菌滤纸圆碟投入已配制好的药液中, 浸 5 min, 取出滴去多余的药液, 置于培养皿的中央, 用灭菌纸碟浸无菌水作为对照, 于 28℃ 下恒温培养, 采用“十”字形测量法测量抑菌圈直径, 每日测量 1 次。

1.4.3 含药培养基法: 将 PSA 培养基加热融化, 待冷却至 45℃ 左右, 分别加入各种药剂, 制成含有一定浓度的含药培养基, 充分摇匀后倒成平板, 每皿中央放置 1 块培养 3 d 的直径为 0.6 cm 的带培养基菌丝圆片, 于 28℃ 下恒温培养, 用“十”字形测量法测量

菌落直径, 每日测量 1 次

2 结果与分析

2.1 病害的症状及发生时期

该病主要危害苗圃中的幼嫩苗木, 尤其是当年生嫁接苗, 一般不危害多年生成林树。病害可在幼嫩苗木的任何部位发生, 但以嫁接苗的嫁接口发病机率最高。茎干及嫁接口受害, 首先产生水渍状灰黑色病斑, 病斑环绕茎干扩展 1 周后, 病斑以上叶片青枯萎垂, 最后叶片发黄, 茎干变黑干腐。叶柄发病也变成灰黑色, 叶柄所在叶片青枯萎垂。叶片发病, 病斑自叶缘向叶内扩展, 发病叶片似开水烫伤状, 病斑扩展至全叶, 叶片萎垂, 最后叶片变黄。病菌侵染顶芽, 整个顶芽变黑枯死。自然条件下, 发病部位难以见到病征。

该病一般在育苗 3 年以上的苗圃中出现, 在新建立的苗圃一般少见。在桂林地区, 5 月初开始发病, 有明显的发病中心, 始病后 5 d~10 d 病情迅速发展, 5 月下旬病情稳定, 田间发病率为 10%~20%, 6 月份以后病情不再发展。

2.2 病原菌的分离和鉴定

自病区采集病枝、病叶, 进行分离, 病原菌在 PSA 培养基上, 菌落呈白色绒毛状, 菌丝无色, 无隔, 老龄菌丝膨大成珊瑚状, 边缘波浪状, 28℃ 下培养 7 d 产生大量的孢子囊, 如果在生长丰满的菌落上加无菌蒸馏水, 则孢子囊的数量更多。孢子囊梗菌丝状, 无分枝, 孢子囊顶生或横生, 卵圆形或长椭圆形, 大小为 (15 μm~25 μm)×(17.5 μm~25 μm), 不易脱落, 初无乳突, 成熟时形成乳突; 在冰箱内 (0℃~10℃), 形成大量的厚壁孢子, 厚壁孢子顶生或菌丝中间形成, 圆形, 直径 12.5 μm~25 μm, 有双层壁, 无色, 萌发时产生孢子囊或菌丝, 在人工培养条件下未见到有性孢子。根据这些特征可将病原菌鉴定为 *Phytophthora* sp., 其种的鉴定正在进行。回接后症状与大田自然感病的完全一致, 并重新分离到病原菌。

表 1 病原菌在不同温度条件下培养 4 d 的菌落大小

Table 1 The colony diameter of *Phytophthora* sp. after 4 days of incubation at different temperature

培养温度 Incubation temperature	菌落直径 Colony diameter (cm)
冰箱 In refrigerator 10℃	0
20℃	1.7
24℃	3.5
28℃ (黑暗 dark)	3.9
28℃ (光照 light)	3.9
32℃	4.4
36℃	0

2.3 病原菌的生长温度范围

表 1 中可见,在 20°C~32°C 范围内,病菌均能正常地生长,但以 24°C~32°C 菌丝的生长速度较快。同时还可看出,光暗条件并不影响菌丝的生长速度

2.4 病原菌的侵染途径

2.4.1 病原菌对叶片的侵染

从表 2、表 3 中可以看出,接种于叶片伤口,无论在 24°C 或 28°C,接种后 1 d 发病率均达 100%,接种后 5 d,病情指数达 100 无伤接种发病率为 33%,接种后第 2 天或第 5~6 天开始发病,一旦发病,5 d~6 d 内病斑扩展至整张叶片,但不发病的叶片保持健康。说明病原菌易从叶片的伤口侵入,在无伤条件下接种,发病率较低。自然条件下,刮风下大雨造成幼嫩组织受伤可能是病害发生的诱发条件。接种发病的叶片,叶面布满菌丝,发病后 7 d~9 d 即可见叶面产生大量的孢子囊。

同时还发现,如果远离无伤叶片 2 cm~3 cm 处放一块带培养基的菌丝或一块接种发病的病组织,于培养皿中保湿培养,则病菌能爬上叶片,叶片自叶缘开始发病,后迅速发展,在 5 d 内整张叶片发病,这和田间的典型叶片症状一致,其可能原因是叶片的叶缘水孔多,利于病菌的侵入所致。

2.4.2 病原菌对茎干的侵染

表 4 中可见,病原菌只能侵染受伤的幼嫩茎干,对于已老化(木质化)的茎干即使受伤也不被侵染,或仅在接种点产生病斑,但病斑不能扩展。病原菌接种表 2 病原菌接种叶片的发病情况 (28°C)

Table 2 The incidence of leaf blight inoculated with *Phytophthora* sp. at 28°C

接种方法 Inoculation method	接种天数 Days after inoculation (d)	发病率 Disease incidence (%)	病情指数 Disease index
刺伤接种 Wounded inoculation	1	100	27
	2	100	89
	5	100	100
无伤接种 Unwounded inoculation	1	0	0
	2	16	13
	5	16	17
	6	33	23
	8	33	33
刺伤对照 Wounded control	8	0	0
无伤对照 Unwounded control	8	0	0

表 3 病原菌接种叶片的发病情况 (24°C)

Table 3 The incidence fo leaf blight inoculated with *Phytophthora* sp. at 24°C

接种方法 Inoculation method	接种天数 Days after inoculation (d)	发病率 Disease incidence (%)	病情指数 Disease index
刺伤接种 Wounded inoculation	1	100	23
	2	100	67
	5	100	100
无伤接种 Unwounded inoculation	1	0	0
	2	0	0
	5	33	20
	8	33	27
	15	33	33
刺伤对照 Wounded control	15	0	0
无伤对照 Unwounded control	15	0	0

病情分级标准如下: 0级——叶片无病斑; 1级——病斑占叶面积的 20% 以下; 2级——病斑占叶面积的 21% - 40%; 3级——病斑占叶面积的 41% - 60%; 4级——病斑占叶面积的 61% - 80%; 5级——病斑占叶面积的 81% - 100%。The state of disease is classified as follows: 0— No disease spot; 1— Less than 20% area of leaf with disease; 2— 21% to 40% area of leaf with disease; 3— 41% to 60% area of leaf with disease; 4— 61% to 80% area of leaf with disease; 5— 81% to 100% area of leaf with disease.

种受伤嫩茎,接种后 3 d~4 d 表现症状,病斑迅速扩展到附近叶柄,导致叶片萎垂,最后叶片变黄,茎干干枯。

用病原菌的悬浮液接种刺伤及无伤根部,均未见发病,说明该菌不侵染根部。

2.5 病害在自然条件下发生因素的分析

从田间调查及人工接种试验均可看出,病原菌只侵染幼嫩的受伤组织,病害一旦发生,发展迅速,但病情很快稳定下来,在田间,病害的发生时间仅在 5 月份。为探讨影响病害发生的主要因素,我们录用了当地的气象资料,如表 5

表 5 中可以看出,5 月上旬至 6 月上旬的旬均温为 23°C~26°C,在病原菌的生长适宜温度范围内,雨量、雨日及相对湿度也差异不大,多年的气象资料表明,桂林地区长年阴雨连绵,七、八月份常有大至暴雨,气温也稳定在 25°C 以上,这些气候条件均适于银杏疫病的发生,但病害 6 月后则稳定不发展,显然气候不是决定病害是否发生的主要因素。

表 4 病原菌接种茎干的发病情况

Table 4 The incidence of stem blight inoculated with *Phytophthora* sp.

接种方法 Inoculation method	接种天数 Days after inoculation	接种部位 Part inoculated	接种后症状变化 Symptom variation after inoculated with <i>Phytophthora</i> sp.
刺伤接种 Wounded inoculation	3 d	幼茎 Green stem	接种点产生黑斑 Spots inoculated become black
		老茎 Brown stem	没有变化 Same as before inoculation
	4 d	幼茎 Green stem	病斑扩展到附近叶柄, 叶柄变黑叶片萎垂 Black spots spread to leafstalk nearby, leafstalks become black, leaves blight
		老茎 Brown stem	接种点有黑斑 Spots inoculation become black
	5 d	幼茎 Green stem	病斑向四周扩展, 茎干腐, 扩展范围受到老茎限制 Black spots spread in all directions, stem dry rot, dry rot spreading is limited in the brown stem part
		老茎 Brown stem	病斑不见扩展 Black spots not spread
5 d以后 After 5days	幼茎 Green stem	病情稳定顶部茎干干腐, 下部老茎完好抽出新芽 . Disease steadiness, green stem blight and brown stem health with budding	
老茎 Brown stem			病斑不见扩展 Black spots not spread
无伤接种 Unwounded inoculation	5 d以后 After 5days	幼茎 Green stem	健康如初, 没有任何变化 Stems still health, no change.
		老茎 Brown stem	健康如初, 没有任何变化 Stems still health, no change.
刺伤对照 Wounded control	5 d以后 After 5days	幼茎 Green stem	健康如初, 没有任何变化 Stems still health, no change.
		老茎 Brown stem	健康如初, 没有任何变化 Stems still health, no change.
无伤对照 Unwounded control	5 d以后 After 5days	幼茎 Green stem	健康如初, 没有任何变化 Stems still health, no change.
		老茎 Brown stem	健康如初, 没有任何变化 Stems still health, no change.

表 5 桂林地区 1997年 4月下旬至 6月上旬的气象资料

Table 5 Meteorological information from April to June, 1997, in Guilin

时期 Period	旬平均温 Average temperature (°C)	旬最高温 The highest temperature (°C)	旬最低温 The lowest temperature (°C)	旬总降雨 量 Total rainfall (mm)	旬雨日 Total raindays (d)	旬平均 相对湿度 Average relative humidity (%)
4月下旬 The last ten days of April	19.7	29.5	13.1	117.8	6	80
5月上旬 The first ten days of May	24.3	33.5	19.4	98.3	5	82
5月中旬 The second ten days of May	25.9	32.1	19.1	43.5	8	79
5月下旬 The last ten days of May	23.0	33.5	16.1	82.7	5	79
6月上旬 The first ten days of June	25.7	32.3	19.7	76.4	8	86

据报道, 银杏一般一年生长一次新梢, 新梢生长期为 60 d 左右, 4月中、下旬新梢开始生长, 6月中旬至 7月初停止生长, 5月初至 6月初为生长高峰期, 约 30 d^[1]。5月初至 6月初的新梢生长高峰期即是银杏新梢最幼嫩的时期, 此时期气温已升到 20°C 以上, 达到病原菌的适宜生长温度条件, 如遇风雨, 嫩枝嫩叶易于相互擦伤, 为病原菌的繁殖和侵入寄主创造了有利条件。田间实地调查表明, 5月份是病害的发生高峰期, 由此可见, 苗木幼嫩是病原侵入银杏引起病害的关键因素, 这在上述的接种试验中也得到证实。因此, 生产上应抓住时机, 在新梢旺长期病害

发生前喷药保护。

表 6 化学药剂对病原菌的抑制作用

Table 6 Restraint of fungicides to *Phytophthora* sp.

药剂种类 Fungicide	含药培养基上的菌落 直径 Colony diameter on medium containing fungicide(cm)	抑菌圈大小 Diameter of zones inhibiting(cm)
甲霜灵 800x Metalaxyl	0.6(未长 No growth)	3.0
甲霜灵锰锌 500x Metalaxyl-MZ	0.6(未长 No growth)	2.7
加瑞农 1000x Kasumin-Bordeaux	6.8	0
扑海因 1000x Rovral	6.6	0.2
多菌灵 800x Carbendazim	9.0(长满 Full of culture dish)	0
对照 control	9.0(长满 Full of culture dish)	0

2.6 化学药剂对病原菌的抑制作用

表 6 中可以看出, 试验药剂中甲霜灵及甲霜灵锰锌对病原菌有很强的抑制作用, 在含药培养基上, 病原菌不能生长, 在含药纸碟的周围, 病菌生长也极有限, 因此, 这两种化学药剂可作为田间防治试验的首选药剂

3 结语

调查结果表明, 银杏疫病的发生仅限于很短的时期, 这主要和银杏的生物学特性有关, 而与气候条件

关系不大, 银杏由于老化而抑制了病原菌对它的侵染, 其抑病机制及利用其抑病因子防治病害, 是值得进一步研究的重要课题。室内药剂毒力测定表明, 甲霜灵和甲霜灵锰锌对银杏疫霉有很强的抑制作用, 建议生产上利用这两种化学药剂于病害可能出现时期或病害开始出现时喷施保护, 可望有效控制该病害的发展。

有关银杏疫霉种的鉴定正在进行, 对病原菌种的生物学特性及病害的发生发展规律如病害的初侵染来源、病原菌的传播途径、病原菌的寄主范围等, 有待进一步研究。疫霉能危害裸子植物, 说明疫霉有很强的寄生能力和更宽的寄主范围, 进一步研究疫霉的致病特性对于有效防治由该菌引起的作物病害有重

要的指导意义。

致谢

广西植物研究所梁惠凌同志提供气象资料及协助田间调查, 特此致谢!

参考文献

- 1 梁立兴等编著, 中国银杏. 济南: 山东科学技术出版社, 1988.
- 2 周志权等. 银杏病害种类的调查研究初报. 广西科学院学报, 1996, 12 (3, 4): 66-71.
- 3 张中义等编著. 植物病原真菌学. 成都: 四川科学技术出版社, 1988.
- 4 魏景超. 真菌鉴定手册. 上海: 上海科技出版社, 1982.

(责任编辑: 蒋汉明)

(上接第 65页 Continue from page 65)

制显著。盐胁迫抑制生长的原因, Robinson^[9]指出, 这是由于组织内部积累较多的 NaCl 所致。盐胁迫抑制生长与组织内 Na⁺ 含量和 Na⁺ /K⁺ 比值升高有关^[9]。本次试验结果表明: 在高 NaCl 溶液中, 植物体内积累大量的 Na⁺, Na⁺ /K⁺ 比值提高。因此, 可以认为: 盐境抑制树木的幼苗生长的可能原因是由于盐境中幼苗积累过多的 Na⁺, 降低水势, 在高浓度 NaCl 浓度溶液中, 根吸收大量的 Na⁺, 影响对其他元素的吸收, 造成细胞内离子不平衡, 同时在高浓度 NaCl 液中, Na⁺ 取代质膜上的 Ca²⁺, 破坏了质膜的选择透性, 影响细胞正常生理功能, 从而抑制幼苗生长。而用 H₂BO₃、CaCl₂ 处理种子有良好的抗盐效果。

致谢

论文在完成过程中得到方升佐副教授的悉心指导与大力帮助, 实验工作得到种子中心李淑娴老师和造林组张往祥老师及其他老师的关心与支持。在此一并深表谢忱。

参考文献

- 1 蔡清泉. 我国海涂资源开发利用的现状和展望. 国土与自然资源研究, 1990, (2): 33-37.
- 2 张殿忠, 汪沛洪, 赵会贤. 测定小麦叶片游离脯氨酸含量的方法. 植物生理通讯, 1990, (4): 62-65.
- 3 劳家桢主编. 土壤农化分析手册. 北京: 农业出版社, 1988, 641-648.
- 4 沈惠娟等. 多效唑浸种提高刺槐幼苗耐盐性研究. 植物学报, 1993, 35 (8): 606-610.
- 5 吕芝香, 仲崇信. NaCl 对大米草幼苗游离氨基酸成分和脯氨酸含量的影响. 植物生理学报, 1982, (8): 390-398.
- 6 吕芝香, 乙引. NaCl 对小麦叶片脯氨酸氧化酶活性和游离脯氨酸累积的影响. 植物生理学报, 1992, 18 (4): 376-382.
- 7 汤章城. 逆境条件下脯氨酸的累积及其可能的意义. 植物生理学通讯, 1984, (1): 15-21.
- 8 刘友良, 毛才良, 汪良驹. 植物耐盐性研究进展. 植物生理学通讯, 1987, (4): 1-7.
- 9 张臻等. NaCl 对碱谷幼苗无机离子含量和生长的影响. 植物资源与环境, 1996, 5 (2): 19-22.

(责任编辑: 邓大玉 蒋汉明)