

蒜头果种腐病研究初报*

A Research on Seed Rot of *Malania oleifera*

熊 英

吴彦琼

周传明

黎向东

Xiong Ying

Wu Yanqiong

Zhou Chuanming

Li Xiangdong

(广西大学林学院 南宁市邕武路16号 530001)

(Forestry College, Guangxi Univ., 16 Yongwulu, Nanning, Guangxi, 530001, China)

摘要 于2000年10月至2001年5月做蒜头果 (*Malania oleifera* Chun et S. Lee) 种子沙藏试验, 沙藏2个月后随机抽样100粒种子解剖检查, 发现种子感病率64%, 其中全部腐烂变质率高达50%, 局部感病率14%; 沙藏5个月发病率达72%。从蒜头果种病腐组织分离、纯化得到4个属的6个菌株病原真菌, 镜检到一种线虫。分别用这6个菌株的菌丝与分生孢子的混合液体进行人工接种试验, 结果表明, 茄类镰刀菌 (*Fusarium solani*) 和黄萎轮枝菌 (*Verticillium albo-atrum* Reinke et Berthold.) 表现出较强的致病力, 认为它们是蒜头果种腐病的致病菌, 并对它们的形态特征及引致的症状特点作了描述。线虫的危害状尚未明确。

关键词 蒜头果 种腐病 茄类镰刀菌 黄萎轮枝菌

中图法分类号 Q949.741.2

Abstract The seeds of *Malania oleifera* were stored in sands from Oct. 2000 to May 2001. Two months later, 100 seeds were randomly chosen for examination. The diseased seeds were found to be 64%, and the whole rotted seeds up to 50%, and partly rotted seeds 14%. Five months later, the diseased seeds reached to 72%. Six strains of pathogen belonging to four genres were separated and purified from the rotted seeds. A kind of nematode was found in light microscope. The mixed solution of mycelia and conidias of these six strains was inoculated into the health seeds. It was found that *Fusarium solani* and *Verticillium albo-atrum* had strong pathogenicity, and they were keys pathogens rotting the seeds of *Malania oleifera*. The morphological characteristics of these two pathogens and symptoms were described. The responsibility of nematode is not clear.

Key words *Malania oleifera*, seed rot, *Fusarium solani*, *Verticillium albo-atrum* Reinke et Berthold

蒜头果 (*Malania oleifera* Chun et S. Lee), 属铁青树科 (Olacaceae) 蒜头果属的常绿乔木, 仅分布于我国云南东南部至广西西部的狭窄地带^[1]; 为石灰岩石山区特有植物之一^[2]。其材质优良, 有多种用途。种仁富含油脂, 既可食用^[3], 又是合成麝香酮的理想原料^[4], 因而已渐被人们所重视。但因其分布区较窄, 长期过度地利用, 加上自然更新能力极弱, 现已处于濒危状态, 被定为我国重点保护物种^[5]。

蒜头果种子富含油脂及水分, 每年10月果实成熟采收后正好遇上干旱季节, 易失水而丧失生命力, 常

规情况沙藏下又容易霉烂, 给育苗工作带来很大的困难。作者于2000年10月~2001年5月做种子常规沙藏试验, 沙藏2个月后随机抽样100粒种子解剖检查, 发现种子感病率为64%, 其中全部腐烂变质率高达50%, 局部感病为14%; 沙藏5个月后, 种子感病率为72%。种腐病已成为天然更新障碍之一。此病国内未见报道。为了预防此病发生及探讨贮藏蒜头果种子的适宜条件提供科学依据, 我们对此病进行初步研究, 现将研究结果报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料来源及贮藏

蒜头果种子来自老山林场及巴马县。我们于2000

年10月初到林地采种,就地去掉外果皮,将种子带回室内,用0.5% KMO₄水溶液浸泡8 min~ 10 min,自来水冲洗2次~ 3次,置于相对含水量50%~ 60%的新河沙中分层贮藏,砂与种子比例为3: 1,贮藏期间不定期浇水保持湿润,定期检查种子完好情况,共贮藏种子1000粒

1.2 培养基

分离病原菌用的培养基为 PDA培养基

1.3 病原的分离

选择种腐病症状典型的病种子20粒,无菌操作下,用0.1% HgCl₂液浸泡6 min~ 8 min后,用无菌水冲洗4次~ 5次,用常规组织分离进行病原分离,恒温28℃培养2 d~ 3 d后长出菌落,经纯化,观察组成类群、形态特征及其出现率;共获得4个属的6菌株,这6菌株分别编号为 F₁、F₂、V、M、G₁、G₂

1.4 人工接种试验

选健康种子,作常规表面消毒后,用无菌水冲洗3次~ 5次,在无菌操作条件下,将6菌株各自的菌丝与分生孢子混合液分别伤口接种和非伤口接种各5粒种子。伤口接种方法是将种皮敲裂开,在裂口处涂上菌液,置于无菌广口瓶中加盖保湿(内装约3 cm厚无菌细沙,相对含水量约60%);非伤口接种采用浸种法加土壤(用细沙代替土壤)拌种法^[6],也用无菌广口瓶加盖保湿;接种完毕,置于28℃恒温下培养。设有伤口和非伤口无菌水接种空白对照各5粒种子。接种后定期观察,检查发病情况。

1.5 病原菌形态特征观察

徒手切片病组织做水渍片,用插片法培养分离到的纯菌株制成临时玻片及永久玻片标本,镜检病原菌的形态特征,肉眼观察病原菌在病组织和培养基上的性状

2 结果与分析

2.1 病害的症状特征

蒜头果种腐病典型症状大致可分为3种:

第1种是黑褐色心腐型(见图1)主要表现为病原菌侵入后迅速深入种仁中心,胚乳组织由白色变褐色至黑褐色坏死,病斑呈近圆形扩大,部分组织腐烂解体,水渍状凹陷,保湿培养后,表面长出茂盛菌丝体,白色绒毛状。此类症状主要是茄镰刀菌引起,伴有丛梗孢霉菌及其它霉菌危害。

第2种是褐腐型(见图2)主要表现为病原菌侵入点及附近组织变黄色,浅褐色至深褐色,病斑组织呈不规则状扩展,但不易解体,易在发病部和种皮外形成分生孢子堆,初为淡黄色,后为桔黄色,表面干燥,

粉状;最后果实腐烂。此类症状主要是黄萎轮枝霉菌引起,伴有镰刀菌等危害。



图1 F₁、F₂菌株危害的自然发病症状

Fig. 1 Symptoms caused by the strains F1 and F2 in nature



图2 V菌株危害的自然发病症状

Fig. 2 Symptoms caused by Strain V in nature

第3种为全腐型。整粒种子的胚乳全部腐烂,变质,发臭,呈现粘液状或水渍状,浅黄色、褐色至黑色,可能是前2种症状的后期症状。

发病种子的外种皮表面呈深褐色至黑褐色,是以上3种症状表现出来的共同特征,往往较难从外种皮表面的颜色判断种子的受害程度。此病在湿润条件下,温度25℃~ 32℃时易发生。

2.2 人工接种试验结果

人工接种结果表明,供试6个菌株中,F₁、F₂与V在伤口接种的致病力很强,其中以F₁与F₂致病力最强,接种后2 d~ 3 d开始发病,15 d引致种实全腐;V接种5d开始发病,4周后种实开始腐烂;其症状与自然发病症状相似(见图3),经再次分离得到原来的菌种;其它菌株致病力较弱,症状不明显,但在接种的种实上也能镜检到相同的病原菌;对照不发病。



图3 接种菌株后的发病症状

Fig. 3 Symptoms caused by the diseases in inoculation

a. F₁菌株接种的症状; b. F₂菌株接种的症状; c. V菌株接种的症状 a. By Strain F₁; b. By Strain F₂; c. By Strain V

在非伤口接种情况下, F₁与 F₂较其它菌株致病力强, 接种 3周, 菌丝已深入到胚乳组织并引起种皮局部变黑褐色; 其它菌株致病力较弱, V与 M能引起种皮局部变深褐色至黑色; 其它菌株接种无发病迹象。

大部分菌株接种的种子在种皮能分离到相同的病原菌, 除 F₁与 F₂能在胚组织分离到病原菌之外, 其它均不能。故 F₁、F₂与 V是蒜头果种腐病的主要病原菌。

由于人工接种持续时间长, 部分种子已出根萌芽, 但根与芽长出后, 很快被 F₁、F₂与 V 3种病原菌侵入危害, 引起根茎交界处及芽尖变黑坏死, 是典型的幼苗茎叶腐烂型症状。这一现象进一步说明 F₁、F₂与 V 不仅是引致蒜头果种腐主要病原菌, 也是导致育苗失败原因之一。

2.3 病原菌的形态特征

F₁: 菌丝体发达粗壮, 白色至灰白色, 呈毛毡状, 在腐烂的蒜头果及 PDA培养基上呈放射状生长, 分泌色素使培养基变淡褐色, 在 PDA培养基上, 25℃恒温培养 4 d, 菌落直径大于 2.5 cm; 分生孢子梗散生, 无色, 单枝或分枝; 产生大小两型分生孢子, 无色, 小型分生孢子较多, 卵圆形至椭圆形, 单胞 (少数双胞), 其大小为 5μm~12μm×3μm~4μm, 大型分生孢子弯月形, 1~6隔, 多为 4~5隔, 大小为 43μm~80μm×5.5μm~7μm, 常常形成不同形态的株系; 厚垣孢子表面光滑至粗糙, 间生或顶生; (见图 4)。

F₂: 菌丝体较 F₁纤细、稀疏, 绒毛状, 白色, 分泌色素使培养基变紫红色, 在 PDA培养基上, 25℃恒温培养 4 d, 菌落直径大于 2.5 cm; 分生孢子梗散生, 无色, 单枝或分枝; 产生大小两型分生孢子, 无色; 小型分生孢子甚多, 单胞至双胞, 多为卵圆形至椭圆形, 大小为 4μm~8μm×3μm~4μm, 大型分生孢子也常见, 多为梭形, 1~4隔, 多为 3隔, 大小为 33μm~48μm×5μm~6μm, 也常形成不同形态的株系; 厚垣孢子表面光滑至粗糙, 间生或顶生 (见图 5)。

经过对 F₁和 F₂多代单孢分离发现, 它们各自常形成不同形态的株系, 并且多代培养后两菌株的分生孢子形态大小又变得十分相近, 仅是分泌色素使培养基变色的特征不变。因此, 认为它们是相同的种不同的菌系。

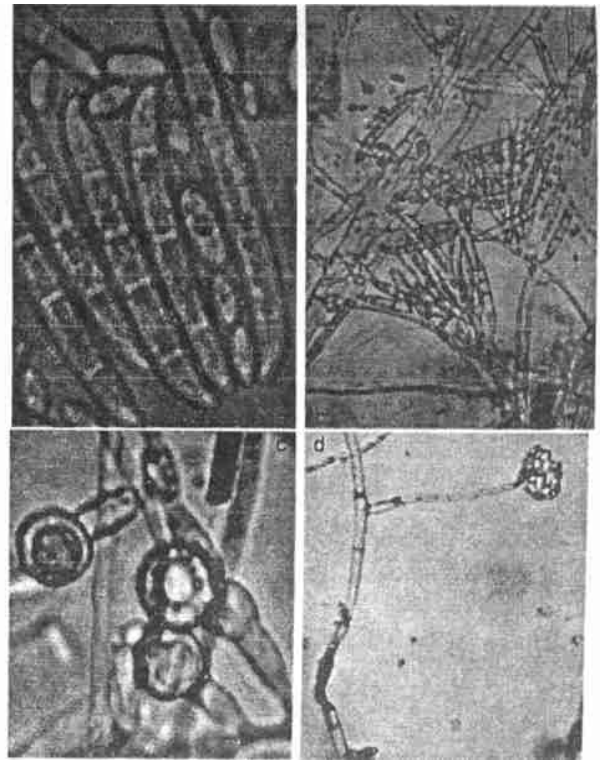


图 4 F₁菌株形态

Fig. 4 Morphological characters of Strain F₁

a. 大小两型分生孢子 (16×40); b. 大型分生孢子着生情况 (16×10); c. 厚垣孢子 (16×40); d. 小型分生孢子着生情况 (16×10). a. Big and small conidias (16×40); b. Big conidas on the conidial cells (16×10); c. Chlamydospores (16×40); d. Small conidas on the conidial cells (16×10)

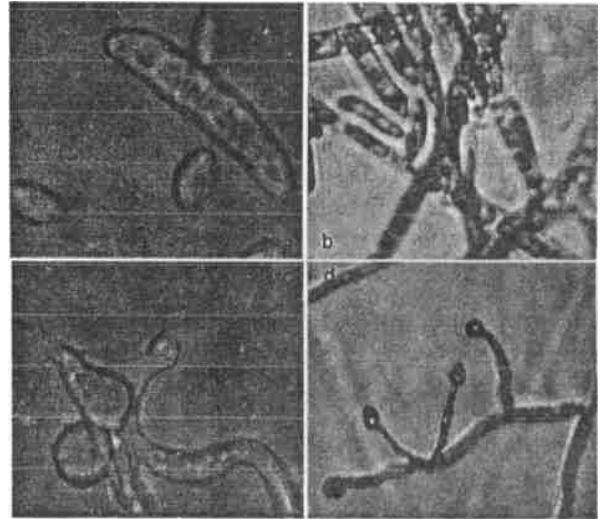


图 5 F₂菌株形态特征

Fig. 5 Morphological characters of Strain F₂

a. 大小两型分生孢子 (16×40); b. 大型分生孢子着生情况 (16×40); c. 厚垣孢子 (16×40); d. 小型分生孢子着生情况 (干制片, 16×10). a. Big and small conidias (16×40); b. Big conidas on the conidial cells (16×40); c. Chlamydospores (16×40); d. Small conidas on the conidial cells (dried slide sample, 16×10)

V: 菌丝无色, 有隔, 有些老熟菌丝形成厚垣孢子, 在 PDA 培养基上的菌落初为白色, 绒毛状, 紧贴培养基表面, 产生分生孢子后呈桔黄色, 粉状; 分生孢子梗无色, 有隔, 直立, 分枝细长, 初次分枝 2~3 出, 二次分枝轮状, 顶层小梗下部膨大而细削; 分生孢子单生或顶生成小的潮湿的簇, 卵圆形或长圆形, 单胞, 无色, 大小为 $3\mu\text{m} \sim 8\mu\text{m} \times 1.8\mu\text{m} \sim 3.2\mu\text{m}$ (见图 6)。

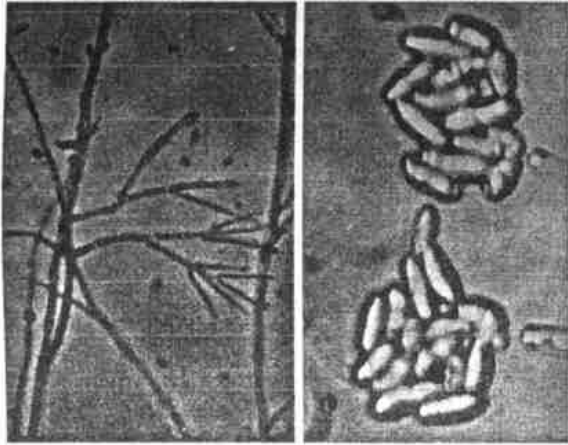


图 6 V 菌株形态

Fig. 6 Morphological characters of Strain V

a. 分生孢子梗分枝情况 (16 \times 10); b. 分生孢子形态 (16 \times 40) a. Conidial branches (16 \times 40); b. Conidias (16 \times 40)

根据病原菌的形态特征, 参照文献 [7~ 10] 对它们进行鉴定, F₁ 与 F₂ 为茄类镰刀菌 (*Fusarium solani*) 的 2 株不同的菌系; V 为黄萎轮枝菌 (*Verticillium albo-atrum* Reinke et Berthold)。

其余 3 个菌株分别是 M: 从梗孢菌 (*Monilia* sp.); G₁ 与 G₂: 粘帚霉菌 (*Gliocladium* sp.)。人工接种试验结果表明, 它们不是蒜头果种腐病的主要病原菌, 而是该病后期的腐生菌。

3 讨论

常规沙藏蒜头果种子半年, 其种腐率达 64%~72%, 全腐烂率达 50% 以上。引致种腐病的病原菌有多种, 其中以茄类镰刀菌和黄萎轮枝菌为主要病原菌。经室内人工接种试验, 它们很快能从伤口侵入危害, 但非伤口侵入能力除 F₁ 与 F₂ 菌株外, 其它菌株显出较弱的致病力。这可能与菌株致病力、种皮结构坚硬及选作接种用的种子具有较强抗病力有关。

人工接种试验的症状与自然发病的症状相似, 并能经常镜检到 F₁、F₂ 与 V 3 种病原菌, 再次组织分离

也能得到同样的病原菌, 因此, 认为这种病原菌是蒜头果种腐病的优势菌种。

引致蒜头果种腐病的 3 种主要病原菌可单独侵入也可混合侵入危害, 其中以茄类镰刀菌较易导致种实全腐, 其次是黄萎轮枝菌, 后者较迟引起种子腐烂。

蒜头果种腐病发病率之高, 危害程度之严重, 可能与下列因素有关: 种子的成熟度, 去外果皮的时机与方式, 种子贮藏的方法及贮藏前的处理, 贮藏材料的选择与处理, 贮藏环境的温度、湿度等等。这些方面均有待进一步深入研究。

另外在病原分离过程中检查到一种病原为线虫, 显微镜下观察, 雌虫与雄虫均为线形, 成虫大小为: 长 $250\mu\text{m} \sim 575\mu\text{m}$, 平均长 $341\mu\text{m}$, 宽 $12.5\mu\text{m} \sim 27.5\mu\text{m}$, 平均宽 $19.25\mu\text{m}$; 卵长 $38\mu\text{m} \sim 68\mu\text{m}$, 平均长 $46.08\mu\text{m}$, 宽 $19\mu\text{m} \sim 41\mu\text{m}$, 平均宽 $25.32\mu\text{m}$ 。虫体雌雄同形, 可排除是根结线虫。这里不作进一步的鉴定。镜检发病组织时, 常见到此种线虫与病原菌混杂在一起, 其危害状尚不清楚, 有待进一步探讨。

致谢

本研究承蒙广西大学林学院黄飞龙副教授的大力帮助, 并审阅修改文稿, 特此致谢。

参考文献

- 1 李树刚. 油料植物一新属——蒜头果属. 东北林学院植物研究汇刊, 1980, 1 (6): 67~72.
- 2 许兆然. 中国南部和西南部石灰岩植物区系的研究. 安徽农学院学报, 1980, (2): 88~94.
- 3 伍春魁. 蒜头果营林特性的调查研究. 河池林业科技, 1981, (1): 3~6.
- 4 欧乞铎. 一种重要脂肪酸 Cis-Tetracos-15-enoic 的新存在——蒜头果油. 云南植物研究, 1981, 3 (2): 181~183.
- 5 傅立国主编. 中国植物红皮书——稀有濒危植物. 第 1 册. 北京: 科学出版社, 1992. 480.
- 6 方中达. 植病研究方法. 第 3 版. 中国农业出版社, 1998, 12 63.
- 7 [美] 巴尼特 H L, 亨特 B B 著. 半知菌属图解. 沈崇尧译. 北京: 科学出版社, 1977.
- 8 魏景超. 真菌鉴定手册. 北京: 科学出版社, 1979.
- 9 邵力平, 沈瑞祥, 张素轩等编. 真菌分类学. 北京: 中国林业出版社, 1988. 10.
- 10 布斯 C 著. 镰刀菌属. 陈其煊译. 北京: 农业出版社, 1988. 6~51.

(责任编辑: 邓大玉)