

JOURNAL OF HEBEI
NORMAL UNIVERSITY OF
SCIENCE & TECHNOLOGY

Vol. 36 No. 3 2022

河北科技师范学院学报

HEBEI KEJI SHIFAN XUEYUAN XUEBAO

第 36 卷 第 3 期

2022

ISSN 1672-7983



中国·秦皇岛

目 次

植物科学

- 冀东地区旱黄瓜多主棒孢菌(*Corynespora cassiicola*)培养性状多样性 薛制国,李婧婷,李翠霞,等(1)
- 黑钙土缺素施肥对甜菜干物质积累、氮素吸收与分配的影响 张吉立,冀金凤,王 宁,等(10)
- 基于 AHP 观赏海棠切枝观果品种评价与筛选 李扬森,张国君,冯树香,等(16)
- 基于主成分分析和聚类分析对 11 个辣椒品种产量和品质综合评价及引进筛选 李 燕,侯大山,张庆银,等(22)
- 20 个高粱品种在冀东地区的适应性比较 康 健,李 云,王 健,等(29)
- 复合微生物肥对设施连作黄瓜枯萎病和根结线虫病防治效果 崔继荣,宋 根,路 莎,等(34)
- 冀东地区鲜食型甘薯早栽早收对产量和经济效益的影响 武晋涛,杨德华,裴世娟,等(40)
- 薯类作物垄作栽培的生理生态效应研究进展 孙江婷,翟稳熙,韩金玲(48)

数学与计算机科学

- 基于教育机器人的语音控制自动化编程系统的设计与实现 刘美霞,李国林(55)

动物科学

- 不同产羔数湖羊生长性能和 *FecB* 基因遗传效应 张天浩,秦学波,刘铮铸,等(61)
- 鸡羽色研究现状及发展 周泽宇,张夕霏,孟 婕,等(68)

物理·化学

- 现场半定量快速判定水中总余氯 韩荣荣,周 冰,张 程,等(73)

其它

- 坐位体前屈测试仪及测试方法的改进 李亚坤,董 亮,刘念禹(76)

冀东地区旱黄瓜多主棒孢菌 (*Corynespora cassicola*) 培养性状多样性

薛制国, 李婧婷, 李翠霞, 金 鸽, 韩亚梅, 贺字典*

(河北科技师范学院农学与生物科技学院, 河北省作物逆境生物学重点实验室, 河北 秦皇岛, 066600)

摘要: 为明确旱黄瓜棒孢叶斑病的病菌种类及其菌株培养性状多样性, 采用 ITS 序列测定病原菌种类的基础上, 分析了河北省冀东地区旱黄瓜多主棒孢菌的生长速度、培养性状、显微特征、致病力及其营养需求的差异性。根据生长速度将 28 株旱黄瓜多主棒孢菌分为快、中、慢等 3 种类型, 分离频率分别占 25.00%, 67.86% 和 7.14%。菌落颜色分别为墨绿色、灰绿色、灰褐色和灰白色。BB19112508 致病力最强, 在中农 6, 新津春 4 号和娇子 8 号上黄瓜棒孢叶斑病病情指数分别为 57.78, 54.07, 53.70。BBCL19122506 的假隔膜数量变化最大, 1~14 个; 分生孢子的长度和基脐宽度最大, 分别为 139.17, 4.24 μm 。BB19112508 菌丝和分生孢子生长最适营养分别为: PDA, 乳糖; 硝酸钠。BBCL19122506 菌丝和分生孢子生长最适营养分别为: PDA, 可溶性淀粉; 硝酸钠, 硝酸钾。BBCL20052502 产孢最适培养基为察氏培养基。旱黄瓜多主棒孢菌培养性状间存在着丰富的多样性, 防治时应考虑优势菌株的比例。

关键词: 旱黄瓜; 棒孢叶斑病; 多主棒孢菌 (*Corynespora cassicola*); 性状; 多样性; 冀东地区

中图分类号: S436.421.1

文献标志码: A

文章编号: 1672-7983(2022)03-0001-09

由多主棒孢菌 (*Corynespora cassicola*) 引起的黄瓜棒孢叶斑病又称为褐斑病、靶斑病, 是近年来在河北省黄瓜生产上新流行的重要叶部病害之一, 发病率为 20%~50%, 个别重病田达 100%, 病叶率 50% 以上。印度于 1958 年首次报道了由多主棒孢菌引起的橡胶棒孢霉落叶病^[1], 之后在南美地区多主棒孢菌引起黄瓜、番茄、辣椒等园艺作物的棒孢叶斑病^[2], 尼日利亚、菲律宾、印度、韩国、日本等国也有报道^[3,4]。自 1993 年起, 中国的辽宁、黑龙江、河北、北京、河南等省市陆续报道该病害的发生与危害^[5-10]。

目前黄瓜棒孢叶斑病病菌的报道均来自于密刺黄瓜棒孢叶斑病的研究, 旱黄瓜棒孢叶斑病病菌相关研究尚未见报道。旱黄瓜又叫秋黄瓜、白黄瓜, 与常见的密刺黄瓜 (黑黄瓜) 外观上有明显区别。近年来, 随着国家蔬菜产业体系和河北省蔬菜产业体系的推广, 旱黄瓜种植面积逐渐扩大, 已在山东、河北、东北三省等地大面积种植, 形成了以昌黎、乐亭为中心的冀东旱黄瓜优势产业带。昌黎县旱黄瓜种植面积高达 2 000 多公顷, 2018 年被列为河北省首批特色农产品优势区。为了明确旱黄瓜棒孢叶斑病的病原菌种类及其生长性状差异, 笔者从唐山、秦皇岛旱黄瓜主产区采集了黄瓜棒孢叶斑病病叶, 通过病原菌的分离、鉴定明确旱黄瓜棒孢叶斑病的病原菌种类, 并与河北省密刺黄瓜棒孢叶斑病病原菌培养性状进行比较, 明确病原菌培养性状差异, 为旱黄瓜棒孢叶斑病的防治提供数据支撑。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 病样采集 从秦皇岛市昌黎县、卢龙县、山海关区, 唐山市乐亭县等河北省黄瓜主产区采集具有典型症状的黄瓜棒孢叶斑病病叶。

1.1.2 密刺黄瓜棒孢叶斑病病菌 实验室鉴定保存的河北省邯郸、沧州、承德等地分离鉴定的多主棒孢叶斑病菌。

基金项目: 河北省重点研发项目 (项目编号: 21326516D); 河北省高等学校科学技术研究重点项目 (项目编号: ZD2019018); 河北省蔬菜产业体系病虫害绿色防控岗位项目 (项目编号: HBCT2018030207); 河北省研究生创新资助项目 (项目编号: CXZZSS2021145)。

* 通讯作者, 女, 教授, 博士, 硕士研究生导师。主要研究方向: 蔬菜连作障碍生态修复及病害生物防治。E-mail: zidianhe@163.com。

收稿日期: 2022-04-07; 修改稿收到日期: 2022-06-15

1.1.3 供试组合培养基 KH_2PO_4 0.5 g, 无水 MgSO_4 0.5 g, NaCl 0.1 g, 天门冬酰胺 5.0 g, 蔗糖 20 g, 琼脂 20 g, 水 1 000 mL。分别以等量的乳糖、葡萄糖、木糖、可溶性淀粉和麦芽糖代替蔗糖测定碳源对病菌菌丝生长和分生孢子数量的影响;以 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, NH_4Cl , KNO_3 , NaNO_3 和甘氨酸代替天门冬酰胺测定氮源对病菌菌丝生长和分生孢子数量的影响。Czapek(察氏)培养基: KNO_3 2 g, KH_2PO_4 0.5 g, KCl 0.5 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05 g, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5 g, 蔗糖 15 g, 琼脂 18 g, 蒸馏水 1 000 mL。水琼脂(TWA)培养基: 琼脂 18 g, 蒸馏水 1 000 mL。

1.1.4 供试黄瓜品种 密刺黄瓜品种: 中农 6, 中蔬 17 和新津春 4 号。早黄瓜品种: 娇子 8 号和绿丰 1 号。均在当地市场购买。

1.1.5 供试引物 ITS1(TCCGTAGGTGAACCTGCGG)和 ITS4(TCCTCCGCTTATTGATATG), 由上海生物工程技术有限公司合成。

1.2 试验方法

1.2.1 早黄瓜棒孢叶斑病菌的分离纯化 采用组织分离法, 选取黄瓜发病叶片的病健交界处, 用无菌剪刀切成 0.5 cm × 0.5 cm 的叶片组织块, 放入 75% 的酒精溶液中表面消毒 5 ~ 10 s, 再置于无菌水中漂洗 3 次并于灭菌的干燥滤纸上晾干, 接种于 PDA 平板上, 28 °C 恒温箱培养。3 d 后, 用接种针挑取病斑组织边缘长出的菌丝, 转接到新的 PDA 上进行纯化。刮取少量病菌孢子加入到 1 mL 无菌水, 配制成孢子悬浮液, 用移液枪吸取 100 μL 于新的 PDA 平板上涂布均匀, 28 °C 恒温箱培养 7 d 挑取单菌落, 纯化获得菌株的单孢培养物。

1.2.2 病原菌致病性测定 按照柯赫氏法则对纯培养的病原菌进行致病性测定。将保存在斜面中的菌种, 挑取菌丝到 PDA 平板活化, 待培养 7 d 后用毛刷刷下菌体加入无菌水制成浓度为 1×10^6 个/mL 的孢子悬浮液。采用叶面喷雾法将病菌孢子悬浮液接种于健康的黄瓜叶片上, 以喷清水的为对照(CK)。每个处理 6 株黄瓜, 接种后套袋保湿, 48 h 后恢复正常管理。待叶片出现明显的发病症状后, 从发病叶片分离病组织, 鉴定其与分离纯化的病菌是否为同一种病原物。

1.2.3 早黄瓜棒孢叶斑病原菌形态学鉴定 将分离纯化后的病原菌株用直径 0.9 cm 的打孔器打取菌饼转接到新的 PDA 平板中央, 置于 28 °C 恒温培养箱中培养, 每日测量病原菌的菌落直径, 观察菌落颜色、色素的产生情况等培养性状。待培养 7 d 后, 用无菌水洗下菌丝体制成孢子悬浮液, 置于光学显微镜下观察记录 5 个视野下 100 个分生孢子和产孢结构的形态特征。

结合病菌在 PDA 上的培养性状、分生孢子及产孢结构的显微形态特征, 对照《中国真菌志第 55 卷棒孢属及其相关属》^[11] 描述的特征为参考依据进行鉴定。

1.2.4 多主棒孢菌分子生物学辅助鉴定 根据病原菌培养性状将早黄瓜多主棒孢菌分为 4 种类型, 从中选择了 4 个代表菌株测定其 ITS 区序列, 并以密刺黄瓜多主棒孢菌 BBCL19122506 为参照菌株。将供试多主棒孢菌菌株接种到 PDA 平板上, 待菌丝长满培养皿时, 用接种环刮取菌丝和分生孢子, 采用胍素法提取 DNA^[12]。以多主棒孢菌 DNA 为模板, 采用 ITS1 和 ITS4 双引物进行扩增, PCR 扩增体系为 Premix 12.5 μL , 10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 引物各 1 μL , 模板 DNA 1 μL , 以 ddH_2O 补足至 25 μL 。94 °C 预变性 10 min, 94 °C 变性 50 s, 55 °C 退火 60 s, 72 °C 延伸 90 s, 35 个循环, 72 °C 延伸 7 min 扩增后, 将 PCR 扩增样品送交上海生物工程技术有限公司, 分别以 ITS1 和 ITS4 为测序引物, 双向测通序列。将测序结果 Blast 比对后利用软件 MEGA4.0 对测得的多主棒孢菌(*Corynespora cassiicola*) 序列, 连同从 GenBank 中下载的多主棒孢菌 ITS 序列进行多重对位排列后, 去除所有序列 5' 和 3' 端的非对位排列区, 余下的对位序列进行系统发育分析, 采用邻接法与自展检验 1 000 次构建系统发育树, 对序列亲缘关系进行分析。

1.2.5 多主棒孢菌在不同碳源上菌丝生长速度和产孢量测定 采用组合培养基为基础培养基^[12], 通过等量转换, 以葡萄糖、乳糖、木糖、可溶性淀粉和麦芽糖作为碳源替换蔗糖, 用不加碳源培养基作为 CK。用直径 0.9 cm 的打孔器在菌落边缘打取多主棒孢菌菌饼, 置于各种碳源培养基平板中央, 每个平板放置 1 块菌饼, 3 次重复, 28 °C 恒温培养, 7 d 后测定菌落直径并用血球计数板测定分生孢子数量。

1.2.6 多主棒孢菌在不同氮源上菌丝生长速度和产孢量测定 采用组合培养基为基础培养基^[12], 按照等量转换原则以甘氨酸, NH_4Cl , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, KNO_3 , NaNO_3 作为氮源替换天门冬酰胺, 以不加氮源培

培养基作为 CK。多主棒孢菌菌落直径和分生孢子数量测定方法同 1.2.5。

1.2.7 培养基对多主棒孢菌菌丝生长速度和产孢量的影响 用直径 0.9 cm 的打孔器打取黄瓜棒孢叶斑病菌的菌饼,放置在制备好的 PDA,PSA,察氏和 TWA 培养基平板中央,每个平板放置一块菌饼,以 PDA 为 CK,多主棒孢菌菌落直径和分生孢子数量测定方法同 1.2.5。

1.2.8 数据处理 数据均使用 Microsoft Excel 2003 和 SPSS 24.0 软件进行统计分析,采用邓肯氏新复极差法进行方差分析,LSD 法进行差异显著性检验。

2 结果与分析

2.1 旱黄瓜棒孢叶斑病致病菌鉴定

通过对 5 株旱黄瓜棒孢叶斑病菌的 ITS 区测序后,进行 BLAST 比对确定旱黄瓜棒孢叶斑病菌均为多主棒孢菌(*Corynespora cassiicola*)(图 1)。

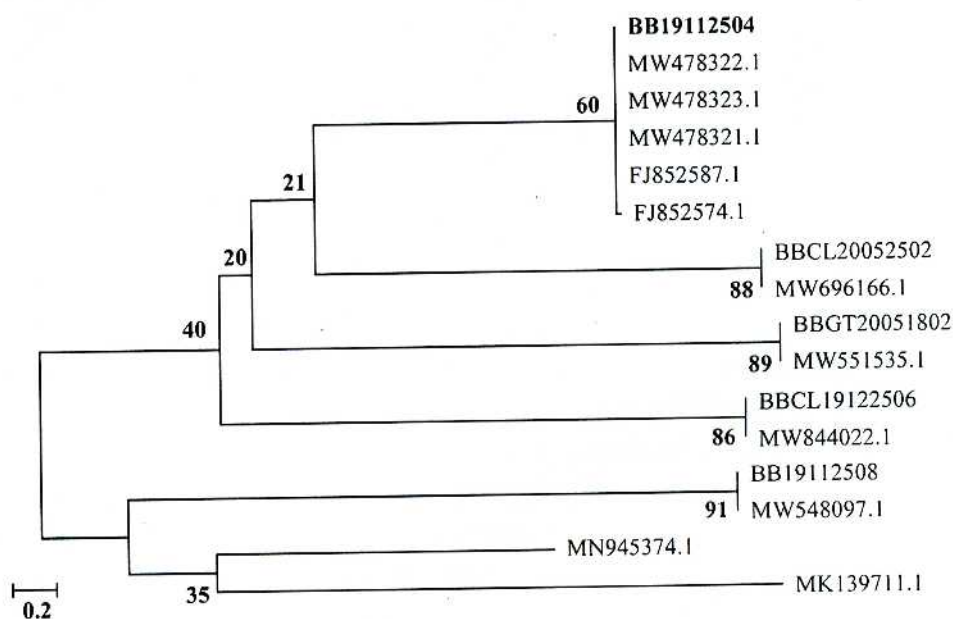


图 1 黄瓜棒孢叶斑病菌的 rDNA 的 ITS 聚类分析

2.2 旱黄瓜多主棒孢菌培养性状比较

根据培养特征和测序结果,从 28 株多主棒孢菌中选取 4 株培养性状不同的菌株 BBCL19122506, BBCL20052502, BB19112508, BB19112504 与密刺黄瓜多主棒孢菌 BBGT20051802 的培养性状、显微特征等进行比较。其中, BBCL19122506, BBCL20052502, BB19112508 和 BB19112504 的分离频率分别为 7.14%, 17.86%, 50.00% 和 25.00% (表 1)。

表 1 5 株多主棒孢菌的菌落形态特征

菌株编号	菌落颜色		气生菌丝	色素	7 d 菌落直径/cm	分离频率/%
	正面	背面				
BBCL19122506	墨绿色	黑灰色	稀疏毛发状	无	4.08 c	7.14
BBCL20052502	灰褐色	灰绿色	致密毛毡状	土黄色	4.53 b	17.86
BB19112508	灰白色	红褐色	致密毛毡状	黄褐色	4.98 b	50.00
BB19112504	灰绿色	灰白色	致密毛毡状	土黄色	5.26 a	25.00
BBGT20051802	灰白色	红褐色	致密毛毡状	砖红色	4.40 b	

BBCL19122506 初为稀疏的白色毛发状气生菌丝,后产生墨绿色色素,菌落呈同心轮纹状,不产生

色素,培养 7 d 的菌落直径为 4.08 cm(表 1,图 2)。BBCL20052502 的菌落为灰褐色毛毡状,产生土黄色色素,菌落直径为 4.53 cm。BB19112508 菌落为灰白色毛毡状,正面呈灰白色,背面红褐色,产生黄褐色色素,菌落直径为 4.98 cm。BB19112504 菌落表面绒层厚,正面灰绿色,背面灰白色,产生土黄色色素,菌落直径为 5.26 cm。BBGT20051802 菌落灰白色毛毡状,背面为红褐色的轮纹状产孢区,边缘颜色浅,中央颜色深,产生砖红色色素,培养 7 d 的菌落直径为 4.40 cm。

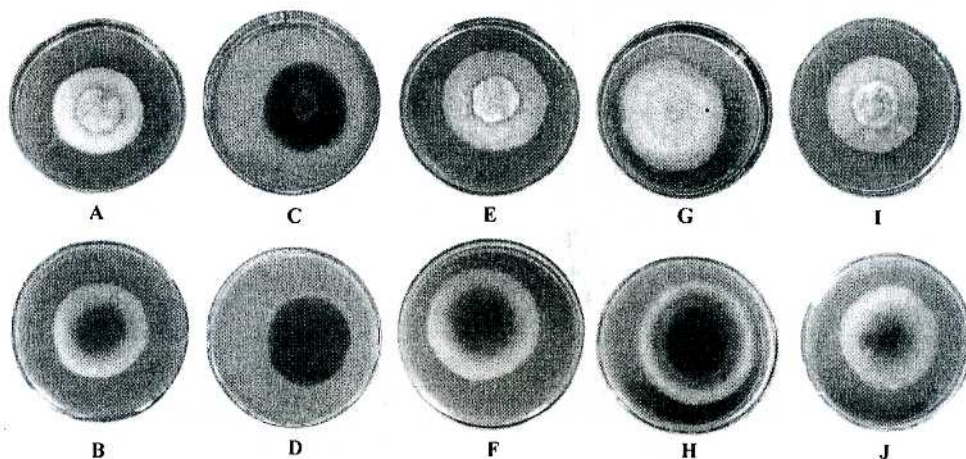


图 2 多主棒孢菌的菌落特征

注:A,B;BBGT20051802;C,D;BBCL19122506;E,F;BBCL20052502;G,H;BB19112508;I,J;BB19112504

5 株黄瓜棒孢叶斑病菌的分生孢子顶生于分生孢子梗上,平滑的分生孢子梗直立或略微弯曲,无色或褐色,具有多个层出梗。分生孢子形状为倒棍棒形或圆柱形,单生或串生,具有 0~14 个假隔膜(表 2,图 3)。BBGT20051802 分生孢子单生或 2~3 个串生,有 1~9 分隔,平均基脐宽度为 3.1 μm ,分生孢子的长度和宽度分别平均为 84.08,13.15 μm 。BCL19122506 分生孢子多单生、直立,多一端萌生芽管,直接着生在分生孢子梗上,基脐宽度为 4.24 μm ,分生孢子的长度和宽度分别为 139.17,10.87 μm ,长度显著高于 BBGT20051802,宽度却显著低于 BBGT20051802。BB19112508 分生孢子多为倒棍棒状,少数为两端钝圆的圆柱形,有分隔,多单生、少串生,分生孢子梗不分枝或偶有 2 个分支。BB19112504 的分生孢子以倒棍棒状为主,单生,分生孢子梗较粗壮。BB19112508 和 BB19112504 分生孢子的长度分别为 113.78,112.53 μm ;宽度分别为 24.18,23.16 μm ;基脐宽度分别为 2.90,2.84 μm 。BBCL20052502 的分生孢子多为圆柱形,少数倒棍棒状,多单生、少串生,有 1~12 分隔,分生孢子基脐的宽度、分生孢子的长度和宽度与 BBGT20051802 均没有显著差异。

表 2 5 株多主棒孢菌的孢子形状和大小比较

菌株 编号	分生孢子 形状	基脐宽度/ μm			孢子的宽度/ μm			孢子的长度/ μm			假隔膜 数量/个
		最小值	最大值	平均值	最小值	最大值	平均值	最小值	最大值	平均值	
BBCL1 9122506	倒棍棒形 或圆柱形	1.81	9.23	4.24 a	5.52	18.94	10.87 c	41.13	242.47	139.17 a	1~14
BBCL2 0052502	倒棍棒形 或圆柱形	1.71	9.62	3.37 b	4.57	23.04	11.55 bc	19.33	176.98	87.46 c	0~12
BB1911 2508	倒棍棒形 或圆柱形	0.95	4.66	2.90 c	10.09	37.79	24.18 a	20.28	199.73	113.78 b	0~8
BB1911 2504	倒棍棒形 或圆柱形	1.05	4.66	2.84 c	9.52	37.51	23.16 a	19.04	198.97	112.53 b	0~8
BBGT2 0051802	倒棍棒形 或圆柱形	1.71	5.14	3.10 bc	8.47	32.56	13.15 b	19.23	178.40	84.08 c	1~9

注:同行不同字母表示经 LSD 法检验在 $P < 0.05$ 水平差异显著,下同。

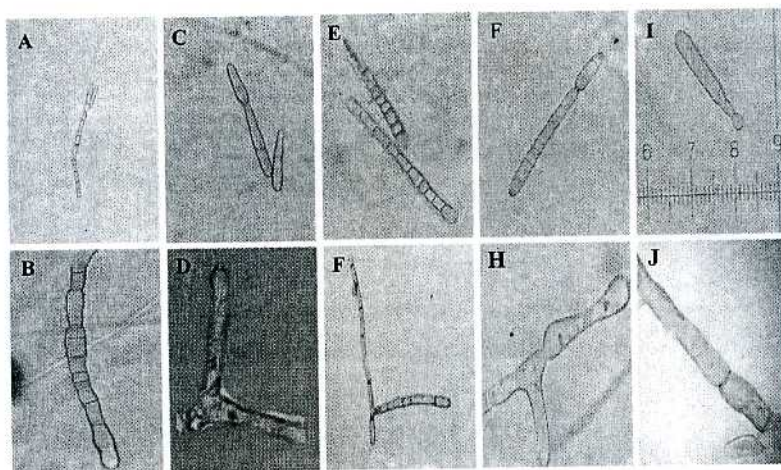


图3 多主棒孢菌的分生孢子和分生孢子梗

注:A,B:BBGT20051802;C,D:BBCL19122506;E,F:BBCL20052502;
G,H:BB19112508;I,J:BB19112504。测微尺每小格为9.52 μm

2.3 多主棒孢菌对黄瓜的致病力

4个旱黄瓜多主棒孢菌菌株中以BB19112508致病力最强,在中农6,新津春4号和娇子8号上黄瓜棒孢叶斑病病情指数分别为57.78,54.07和53.70,显著高于其他菌株的致病力(表3)。其次是BB19112504的致病力,中农6,中蔬17,新津春4号,娇子8号和绿丰1号棒孢叶斑病病情指数分别为33.33,40.56,39.95,37.22和67.65。菌株BBCL19122506的致病力最弱,5个黄瓜品种棒孢叶斑病病情指数分别为22.22,14.68,22.22,11.11和10.00,显著低于其他4个菌株的致病力。

表3 多主棒孢菌对黄瓜的致病力(病情指数)

菌株编号	中农6	中蔬17	新津春4号	娇子8号	绿丰1号
BBCL19122506	22.22 ± 5.24 c	14.68 ± 2.81 c	22.22 ± 0.00 d	11.11 ± 0.00 c	10.00 ± 2.86 c
BBCL20052502	34.03 ± 8.84 b	46.11 ± 13.35 ab	30.00 ± 4.71 c	34.92 ± 7.95 b	30.69 ± 1.50 b
BB19112508	57.78 ± 3.14 a	38.77 ± 4.54 b	54.07 ± 8.38 a	53.70 ± 2.62 a	24.07 ± 2.62 b
BB19112504	33.33 ± 1.57 b	40.56 ± 2.36 b	39.95 ± 11.60 b	37.22 ± 5.49 b	67.65 ± 4.89 a
BBGT20051802	27.96 ± 2.88 bc	50.55 ± 0.79 a	38.51 ± 13.62 b	40.74 ± 20.95 b	36.11 ± 11.79 b

2.4 多主棒孢菌在不同碳源上菌丝生长速度和产孢量

2.4.1 多主棒孢菌在不同碳源上的菌丝生长速度 BBCL19122506在葡萄糖为碳源的组合培养基中菌落直径为4.36 cm,显著高于其他4个菌株(图4)。在以乳糖为碳源的组合培养基中,BB19112508的菌落直径最大,为6.49 cm,显著高于BBCL19122506,BBCL20052502和BB19112504。在以木糖为碳源的组合培养基中,BB19112508的菌落直径最大,为3.92 cm,显著高于BBCL19122506,BBGT20051802和BB19112504。在可溶性淀粉培养基中,5个菌株的菌落直径并没有显著差异,但BB19112508的菌落直径最大,达6.16 cm。在麦芽糖培养基中,BBGT20051802的菌落直径最大,为6.18 cm,显著高于其他4个菌株。

2.4.2 多主棒孢菌在不同碳源上的分生孢子数量 BBGT20051802, BB19112508和BB19112504的分生孢子数量均以乳糖培养基最多,分别为 14.17×10^5 , 5.33×10^5 , 16.00×10^5 个/mL(表4)。

BBCL19122506和BBCL20052502在可溶性淀粉培养基上的分生孢子数量最多,分别为 46.17×10^5 , 29.17×10^5 个/mL。BBCL19122506, BBCL20052502和BB19112508均在以木糖为碳源的培养基上的分生孢子数量最少,分别为 14.50×10^5 , 2.67×10^5 , 2.33×10^5 个/mL。

在5种碳源培养基上,分生孢子数量最多的菌株均为BBCL19122506,分别为 28.83×10^5 , 28.67×10^5 , 14.50×10^5 , 46.17×10^5 , 24.00×10^5 个/mL,均显著高于其他4株多主棒孢菌(表4)。分生孢子数

量最少的菌株均为 BB19112508, 分别 2.67×10^5 , 5.33×10^5 , 2.33×10^5 , 4.00×10^5 , 4.00×10^5 个/mL, 均显著低于 BBCL19122506。

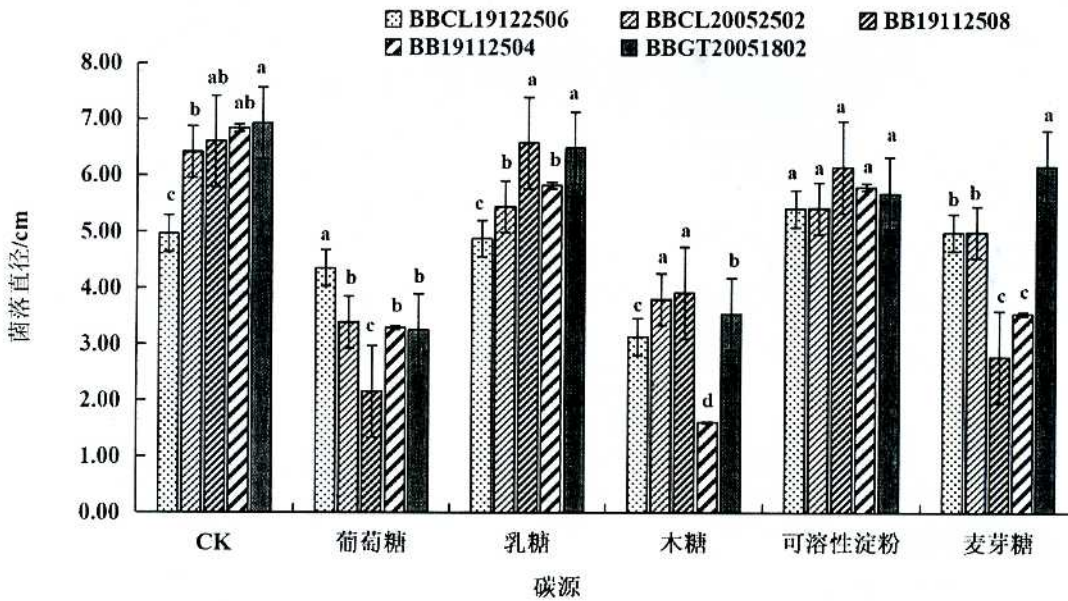


图4 多主棒孢菌在不同碳源培养基上的菌落直径

表4 多主棒孢菌在不同碳源上的分生孢子量

$\times 10^5$ 个/mL

菌株编号	CK	葡萄糖	乳糖	木糖	可溶性淀粉	麦芽糖
BBCL19122506	19.17 ± 2.02 a	28.83 ± 3.75 a	28.67 ± 6.66 a	14.50 ± 0.87 a	46.17 ± 7.29 a	24.00 ± 4.36 a
BBCL20052502	2.67 ± 0.77 b	9.50 ± 1.00 b	15.50 ± 0.50 b	2.67 ± 0.58 c	29.17 ± 2.75 b	18.00 ± 0.10 b
BB19112508	2.83 ± 0.58 b	2.67 ± 0.76 c	5.33 ± 0.58 c	2.33 ± 0.58 c	4.00 ± 1.32 d	4.00 ± 2.00 d
BB19112504	3.17 ± 0.29 b	3.83 ± 0.58 c	16.00 ± 2.18 b	6.33 ± 2.02 b	13.50 ± 2.65 c	15.83 ± 4.19 bc
BBGT20051802	2.83 ± 0.76 b	5.83 ± 1.26 c	14.17 ± 3.75 b	3.33 ± 1.26 c	9.50 ± 2.18 cd	10.83 ± 1.26 c

2.5 多主棒孢菌在不同氮源上菌丝生长速度和产孢量

2.5.1 多主棒孢菌在不同氮源上的菌丝生长速度 BBGT20051802, BBCL20052502 和 BB19112504 菌落直径以 CK 培养基上最大, 分别为 6.81, 6.66, 6.47 cm (图5); BBCL19122506 和 BB19112508 在 NaNO_3 培养基中菌落直径最大, 分别达 5.85, 5.35 cm。5 株多主棒孢菌均在 NH_4Cl 培养基上菌落直径最小, 分别为 2.79, 3.41, 2.24, 2.41, 2.90 cm, 均显著低于 CK。

2.5.2 多主棒孢菌在不同氮源上的分生孢子数量 BBCL19122506 的分生孢子数量在以甘氨酸, NaNO_3 , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 和 KNO_3 为氮源的培养基上数量均是最高 (表5), 分别为 49.83×10^5 , 77.33×10^5 , 92.83×10^5 , 95.00×10^5 个/mL, 均显著高于其他 4 个菌株; 在以甘氨酸、 NH_4Cl 和 KNO_3 为氮源的培养基上, BB19112508 的分生孢子数量最少, 分别为 1.00×10^5 , 1.67×10^5 , 5.50×10^5 个/mL, 显著低于其他多主棒孢菌菌株。

BBGT20051802, BBCL20052502 和 BB19112508 的分生孢子数量均以 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 培养基上最多, 分别为 23.50×10^5 , 58.50×10^5 , 18.00×10^5 个/mL; BBCL19122506 在 KNO_3 培养基上的分生孢子数量最多, 为 95.00×10^5 个/mL。BB19112504 在 NH_4Cl 培养基上的分生孢子数量最多, 为 20.67×10^5 个/mL。BBGT20051802, BBCL19122506, BB19112508 和 BB19112504 均在 CK 培养基上的分生孢子数量最少, 分别为 1.33×10^5 , 17.00×10^5 , 0.50×10^5 , 3.67×10^5 个/mL。BBCL20052502 在以 NaNO_3 为氮源的培养基上分生孢子数量最少, 为 3.67×10^5 个/mL (表5)。

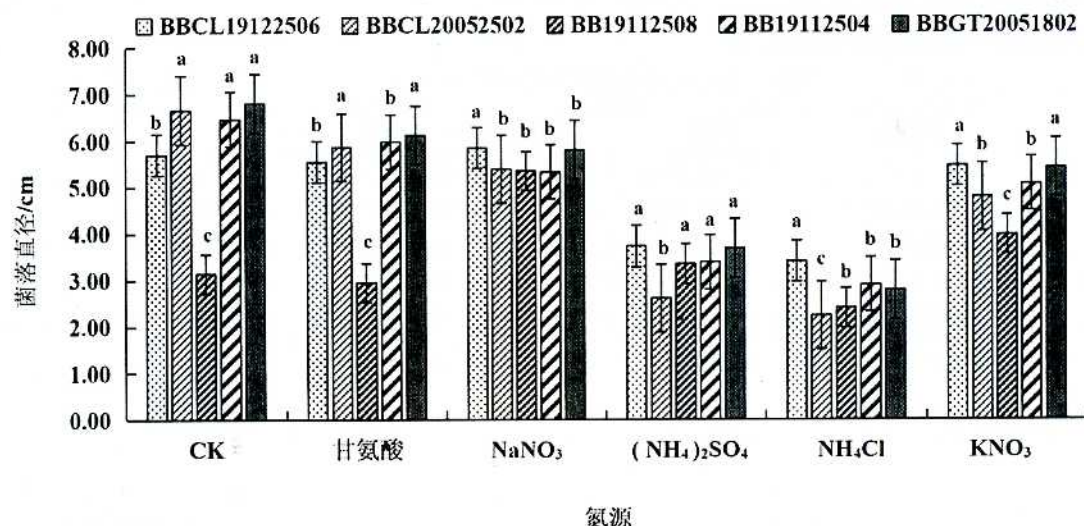


图5 多主棒孢菌在不同氮源上的菌落直径

表5 多主棒孢菌在不同氮源上的分生孢子量

 $\times 10^5$ 个/mL

菌株编号	CK	甘氨酸	NaNO ₃	(NH ₄) ₂ SO ₄	NH ₄ Cl	KNO ₃
BBCL19122506	17.00 $\pm$ 4.27 a	49.83 $\pm$ 4.01 a	77.33 $\pm$ 3.51 a	92.83 $\pm$ 6.17 a	8.33 $\pm$ 1.89 b	95.00 $\pm$ 4.77 a
BBCL20052502	15.00 $\pm$ 3.61 a	26.83 $\pm$ 2.02 b	3.67 $\pm$ 0.76 c	58.50 $\pm$ 4.92 b	6.67 $\pm$ 0.29 bc	19.75 $\pm$ 1.77 bc
BB19112508	0.50 $\pm$ 0.00 b	1.00 $\pm$ 0.50 d	3.67 $\pm$ 0.29 c	18.00 $\pm$ 3.28 c	1.67 $\pm$ 0.58 d	5.50 $\pm$ 1.30 d
BB19112504	3.67 $\pm$ 0.58 b	4.17 $\pm$ 1.04 cd	4.50 $\pm$ 1.00 c	7.50 $\pm$ 0.87 d	20.67 $\pm$ 1.04 a	10.83 $\pm$ 1.15 b
BBGT20051802	1.33 $\pm$ 0.04 b	6.75 $\pm$ 0.35 c	14.50 $\pm$ 1.32 b	23.50 $\pm$ 2.78 c	5.83 $\pm$ 1.26 c	12.50 $\pm$ 0.87 c

2.6 多主棒孢菌在不同培养基上的菌丝生长速度和分生孢子数量

2.6.1 多主棒孢菌在不同培养基上菌丝生长速度 在PDA, PSA和察氏培养基上, BB19112508菌落直径分别为5.30, 5.39, 5.06 cm, 高于其他4株多主棒孢菌(图6)。在TWA上BB19112504的菌落直径为5.04 cm, 显著高于其他4个菌株。BBCL19122506在PDA, PSA和察氏培养基上菌落直径均显著低于其他4株多主棒孢菌, 分别是3.18, 3.49, 2.54 cm。

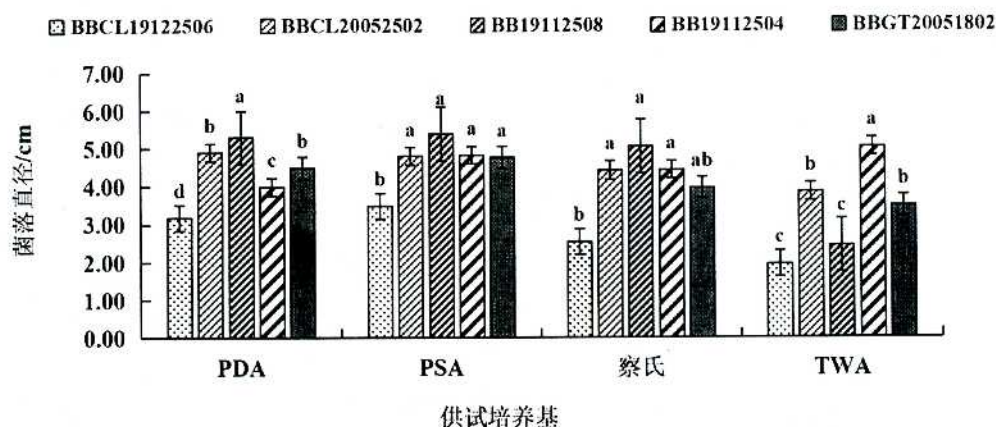


图6 多主棒孢菌在不同培养基上的菌落直径

2.6.2 多主棒孢菌在不同培养基上产孢量 在PDA和PSA上, BB19112504分生孢子数量分别为 23.33×10^5 , 8.83×10^5 个/mL, 显著高于BBGT20051802, BBCL20052502和BB19112508分生孢子数(表6)。在察氏和TWA培养基上BBCL20052502的分生孢子数量最多, 分别为 18.33×10^5 和 6.33×10^5 个/mL, 显著高于BBCL19122506, BBGT20051802和BB19112508的分生孢子数。BB19112508在PDA,

PSA 和察氏培养基上的分生孢子数量均最少,分别为 5.50×10^5 , 3.33×10^5 , 0.50×10^5 个/mL,而 BB19112508 在 TWA 上不产生分生孢子。

表 6 多主棒孢菌在不同培养基上的分生孢子量 $\times 10^5$ 个/mL

菌株编号	PDA	PSA	察氏	TWA
BBCL19122506	22.17 $\pm$ 1.04 a	6.33 $\pm$ 0.58 b	8.67 $\pm$ 0.29 b	2.83 $\pm$ 0.29 b
BBCL20052502	15.33 $\pm$ 0.29 b	4.83 $\pm$ 0.29 c	18.83 $\pm$ 0.29 a	6.33 $\pm$ 0.58 a
BB19112508	5.50 $\pm$ 0.50 d	3.33 $\pm$ 0.29 d	0.50 $\pm$ 0.00 e	0.00 $\pm$ 0.00 d
BB19112504	23.33 $\pm$ 1.04 a	8.83 $\pm$ 0.29 a	6.67 $\pm$ 0.76 c	5.83 $\pm$ 0.76 a
BBGT20051802	10.17 $\pm$ 0.29 c	5.83 $\pm$ 0.29 b	5.50 $\pm$ 0.50 d	0.67 $\pm$ 0.29 c

3 结论与讨论

3.1 结论

3.1.1 菌株间培养性状存在着明显多样性 早黄瓜多主棒孢菌间在菌落生长速度、菌落颜色和显微特征存在着明显分化。28 株早黄瓜多主棒孢菌生长速度快、中、慢的分离频率分别占 25.00%, 67.86% 和 7.14%。其中, BB19112508 和 BB19112504 的菌落直径、分生孢子的长度、宽度均显著大于密刺黄瓜棒孢叶斑病菌 BBGT20051802; BBCL19122506 分生孢子的长度和基脐宽度上都显著大于 BBGT20051802。

3.1.2 菌株在营养需求方面存在着明显多样性 可溶性淀粉和 NaNO_3 有利于菌落颜色为墨绿色的菌株 BBCL19122506 菌丝和孢子生长; 乳糖有利于菌落颜色浅的多主棒孢菌菌株的菌丝生长。

3.2 讨论

早黄瓜棒孢叶斑病的多主棒孢菌 (*C. Cassicola*) 的形态特征与已有报道的黄瓜棒孢叶斑病 (靶斑病、褐斑病) 的病原菌形态基本一致^[1,13]。早黄瓜棒孢叶斑病病原菌——多主棒孢菌与密刺黄瓜多主棒孢菌在培养性状、显微特征及其对养分的需求方面均有很大差别。黄瓜多主棒孢菌落颜色为深墨绿、深褐、灰、浅灰和白色等多样颜色, 灰色和浅灰色为多, 且生长速度分为快、中、慢 3 种类型^[14]。早黄瓜多主棒孢菌与此结果相同, 28 个菌株中只有 2 个菌株的菌落颜色为墨绿色, 且气生菌丝随着颜色加深而变得稀疏, 但分生孢子量却呈现增多趋势, 即墨绿色的菌株气生菌丝稀少且产孢量多, 而灰白色菌落菌株菌丝致密、分生孢子产量相对低。多主棒孢菌可分泌土黄色、微红色和酒红色的色素, 61.32% 的菌株不分泌色素^[14]。通过敲除 *cassicolin* 基因的突变株虽然在生长速度、色素产量和产孢量上与野生型菌株差异不显著, 但气生菌丝的发育和菌落表面颜色相比具有显著差异且病斑扩展速度变慢^[15]。蛋白组学和代谢组学也证明黄瓜多主棒孢菌具有更丰富的效应蛋白 (CAZymes, 蛋白酶, 脂肪酶和效应物) 和与次生代谢相关的基因^[16]。生长速率快、菌丝密集、菌落颜色为褐色或灰色的菌株致病力强, 而生长速率慢、不产生菌丝、颜色为墨绿色的菌株致病力弱^[17]。因此, 多主棒孢菌产生色素、菌丝和分生孢子数量与寄主致病性互作方面的研究还需要深入。

多主棒孢菌的培养性状不仅与温度、地理来源、寄主有关, 还与防治使用药剂有关。杨苗^[18]对我国蔬菜棒孢叶斑病菌 5 个遗传类群研究后表明多主棒孢菌对温度的敏感性与寄主来源密切相关。李淑菊等^[19]对来自黄瓜和番茄的 34 个菌株分为 4 个组, 每组分别包含 26, 5, 1, 2 菌株。多主棒孢菌可侵染黄瓜、茄子、辣椒、可可、番茄、番木瓜、有翅豆、甘薯和橡胶等多种植物。朱佳美^[20]对山东省黄瓜棒孢叶斑病菌对 SDHI 类杀菌剂的抗药菌株研究表明, 突变型菌株在菌丝生长、孢子萌发、产孢量和致病力方面没有明显的适合度代价, 但 H134R 突变体具有更强的耐高温性。在地理来源、培养性状、致病力和遗传类群均有代表性的黄瓜靶斑病菌供试菌株, 对氟唑菌酰胺的敏感性均与菌株地理来源有关^[16]。

因多主棒孢菌存在着丰富的遗传多样性, 菌株不仅在显微特征、生长性状等方面存在着显著差异, 对营养的需求方面也有其特异性。香蕉棒孢霉叶斑病的多主棒孢菌菌丝生长的最适培养基为马铃薯葡萄糖琼脂培养基 (PDA); 最适碳源为乳糖和甘露醇; 最适氮源为蛋白胨^[21]。节瓜褐斑病的多主棒孢菌菌丝以 OMA 上生长最快; 最适碳源为 D-甘露醇和蔗糖; 最适氮源为蛋白胨^[22]。广藿香的多主棒孢丝

最适在 PDA 培养基上生长^[23]。菌株间对营养的需要并不相同,这可能与不同来源多主棒孢菌的菌株的致病性有关^[24,25],也可能与菌株来自不同的寄主来源、地理环境、寄主植株养分有关^[26]。对冀东地区旱黄瓜病原菌的培养性状与营养需求还鲜有报道,因此对于旱黄瓜多主棒孢菌的遗传分化、抗药性、代谢组等有待于今后深入研究。

参考文献:

- [1] Ramakrishnan T S. Notes on some fungi from South India—VIII[J]. Proceedings of the Indian Academy of Sciences-Section B, 1960, 51(4): 164-168.
- [2] Blazquez, C H. *Corynespora* leaf spot of cucumber[J]. Proc Florid State Hort Soc, 1967, 80: 177-182.
- [3] Oluma H O A, Amuta E U. *Corynespora cassiicola* leaf spot of pawpaw (*Carica papaya* L.) in Nigeia[J]. Mycopathologia, 1999, 145(1): 23-27.
- [4] Onesirosan P, Army D, Durbin R D. Increasing sporulation of *Corynespora cassiicola*[J]. Mycopathologia, 1975, 55(2): 121-123.
- [5] 房德纯, 傅俊范. 黄瓜褐斑病原与发病情况调查研究初报[J]. 植物保护, 1994(3): 23-24.
- [6] 姚玉昆, 金刚, 陶景光, 等. 黄瓜褐斑病发生规律及寄主范围研究[J]. 辽宁农业科学, 2001(5): 42-43.
- [7] 李宝聚, 赵彦杰, 于淑晶, 等. 李宝聚博士诊病手记(六) 2008 年秋季河北青县黄瓜棒孢叶斑病大发生[J]. 中国蔬菜, 2008(11): 51-52.
- [8] 李长松, 张眉, 李林, 等. 山东省黄瓜棒孢叶斑病(褐斑病)病原菌鉴定和防治[J]. 中国蔬菜, 2009(18): 29-33.
- [9] 刘鸣韬, 田雪亮, 孙化田. 黄瓜褐斑病菌分生孢子萌发与侵染的研究[J]. 河南农业科学, 2005(11): 53-56.
- [10] 张艳菊, 刘东, 马柏壮, 等. 黑龙江省黄瓜棒孢叶斑病发生情况调查及病原鉴定[J]. 东北农业大学学报, 2014, 45(9): 34-39, 61.
- [11] 张修国. 中国真菌志第 55 卷棒孢属及其相关属[M]. 北京: 科学出版社, 2018.
- [12] 贺字典. 河北省蔬菜保护地木霉菌种群动态及抗逆生防木霉菌株筛选[D]. 沈阳: 沈阳农业大学, 2010.
- [13] 马迪, 王桂清. 聊城地区黄瓜靶斑病致病菌的鉴定与形态观察[J]. 农业科技与装备, 2016(6): 11-13.
- [14] 吴桥. 黄瓜褐斑病菌(*Corynespora cassiicola*)生物学特性、遗传多样性及防治基础研究[D]. 沈阳: 沈阳农业大学, 2017.
- [15] Xu Jing, Qi Xiaobo, Chang Xiaoli, et al. Functional identification of toxin encoding gene(Cas) of *Corynespora cassiicola*-the pathogen of brown leaf spot disease on Kiwi in Sichuan[C]//彭友良, 李向东. 中国植物病理学会 2017 年学术年会论文集. 北京: 中国农业科学技术出版社, 2017: 113.
- [16] DalSasso Thais Carolina da Silva, Rody Hugo Vianna Silva, Grijalba Pablo Enrique, et al. Genome sequences and in silico effector mining of *Corynespora cassiicola* CC_29 and *Corynespora olivacea* CBS 114450[J]. Archives of microbiology, 2021, 203: 5 257-5 265.
- [17] 张凌燕. 黄瓜靶斑病菌多样性与对药剂敏感性关系及氟唑菌酰胺的防病潜力[D]. 泰安: 山东农业大学, 2021.
- [18] 杨苗. 我国蔬菜棒孢叶斑病原菌多样性研究[D]. 北京: 中国农业科学院, 2013.
- [19] 李淑菊, 王惠哲, 杨瑞环, 等. 黄瓜棒孢叶斑病菌基因组 ISSR 分子指纹分析[J]. 分子植物育种, 2015, 13(11): 2 531-2 536.
- [20] 朱佳美. 山东省黄瓜棒孢叶斑病菌对 SDHI 类杀菌剂的抗性监测及高效防治药剂筛选[D]. 泰安: 山东农业大学, 2021.
- [21] 潘华彩, 郭志祥, 白亭亭, 等. 香蕉棒孢霉叶斑病原菌生物学特性测定[J]. 南方农业学报, 2018, 49(3): 481-487.
- [22] 肖敏, 曾向萍, 严婉荣, 等. 节瓜褐斑病原菌鉴定及生物学特性[J]. 分子植物育种, 2016, 14(11): 3 183-3 189.
- [23] 陈旭玉, 甘炳春, 隋春, 等. 广藿香棒孢霉叶斑病原菌生物学特性及药剂筛选[J]. 农药, 2012, 51(3): 215-217, 221.
- [24] 李俊香, 洪霓, 古勤生. 甜瓜靶斑病原菌鉴定[J]. 中国瓜菜, 2019(3): 8-12.
- [25] 刘鸣韬, 张定法, 孙化田. 黄瓜靶斑病菌的生物学特性[J]. 中国蔬菜, 2003(4): 17-18.
- [26] Ivan H F, Lucas M S, Rosemary M A B, et al. Target spot control and modulation of the physiology in cucumber using Phosphites and Chitosan[J]. Gesunde Pflanzen, 2021, 73(4): 1-11.

第一作者简介: 薛制国(1997-), 男, 硕士研究生。主要研究方向: 蔬菜病害生物防治。

(责任编辑: 朱宝昌)(下转至第 15 页)

and distribution in *Beta vulgaris* L. were studied to determine the law of dry matter accumulation and nitrogen absorption and utilization of *Beta vulgaris* L. due to lack of a certain nutrient element in fertilization, the test was under field conditions in 2016 and 2017, setting 4 treatments including control (no fertilizer), nitrogen-deficient fertilization, phosphorus-deficient fertilization, and potassium-deficient fertilization. The result showed that the root dry matter accumulation of nitrogen-deficient fertilization treatment was 21.20% and 45.20% lower than phosphorus-deficient fertilization treatment and potassium-deficient fertilization treatment, respectively, nitrogen absorption of nitrogen-deficient fertilization treatment was 20.49% and 33.63% lower than phosphorus-deficient fertilization treatment and potassium-deficient fertilization treatment respectively in the harvest period of 2016; the root dry matter accumulation of nitrogen-deficient fertilization treatment was significantly lower than that in phosphorus-deficient fertilization treatment and potassium-deficient fertilization treatment, and nitrogen absorption was no significant difference in 2017; the effects of different nutrient-deficient fertilization treatments on the dry matter accumulation and nitrogen absorption of *Beta vulgaris* L. leaves were at the same level; the nitrogen-deficient fertilization treatment decreased the distribution ratio of dry matter in roots and increased the distribution ratio in leaves compared with phosphorus-deficient fertilization treatment and potassium-deficient fertilization treatment. Comprehensive analysis showed that nitrogen-deficient fertilization on chernozem soil had a greater impact on *Beta vulgaris* L. than phosphorus deficiency and potassium deficiency.

Key words: *Beta vulgaris* L.; chernozem soil; nutrient-deficient fertilization; dry matter accumulation; nitrogen absorption and distribution

(上接第9页)

The Diversity of Culture Traits of *Corynespora cassiicola* in Cucumbers in Eastern Hebei Province

XUE Zhiguo, LI Jingting, LI Cuixia, JIN Ge, HAN Yamei, HE Zidian

(College of Agriculture and Biotechnology, Hebei Normal University of Science and Technology,
Hebei Key Laboratory of Crop Stress Biology, Qinhuangdao Hebei, 066600, China)

Abstract: The difference in growth rate, traits, microscopic features, pathogenicity and nutritional requirements of *C. cassiicola* was analyzed with ITS sequence determining the pathogen species to clarify the pathogenic species of cucumber *Corynespora cassiicola* leaf spot and the diversity of bacterial culture traits. According to the growth speed, 28 strains of *C. cassiicola* were divided into fast, medium and slow types, and the isolation frequencies accounted for 25.00%, 67.86% and 7.14%, respectively. Colony colors were dark green, gray-green, gray-brown, and gray-white. BB19112508 had the strongest pathogenicity, and the disease index of cucumber *C. cassiicola* leaf spot on Zhongnong 6, Xinjinchun 4 and Jiaozi 8 were 57.78, 54.07 and 53.70, respectively. BBCL19122506 had the largest variation in the number of false septa, ranging from 1 to 14. The length of conidia and the width of basal umbilicus were the largest, which were 139.17 and 4.24 μm , respectively. The optimum nutrients for mycelium and conidia growth of BB19112508 were PDA, lactose and sodium nitrate, respectively; the optimum nutrients for mycelium and conidia growth of BBCL19122506 were PDA, soluble starch and sodium nitrate, potassium nitrate, respectively; The medium was Chapman's medium. There was a rich diversity among the culture traits of *C. cassiicola* in cucumbers, and the proportion of dominant strains should be considered in the control.

Key words: Cucumber; *Corynespora* leaf spot; *Corynespora cassiicola*; traits; diversity; eastern Hebei province

《河北科技师范学院学报》

第九届编辑委员会

主任委员：郭鸿湧

副主任委员：闫立英

委 员：（以姓氏笔画为序）

于凤鸣 马玉泉 马增军 王利江 车永和 牛 奎
白俊东 巩元芳 吕金凤 朱天志 朱凤妹 朱英波
朱建佳 任 海 刘志亮 刘荣昌 刘素稳 齐秀东
闫立英 孙伟明 杜 彬 李志新 李国防 杨越冬
邹德文 宋士清 张传生 张国君 张京政 陈丽娜
武军凯 林小虎 侍朋宝 赵立强 郭鸿湧 常学东
蔡爱军

主 编：杨越冬

副 主 编：邹德文

HEBEI KEJI SHIFAN XUEYUAN XUEBAO

河北科技师范学院学报

季刊 1987 年创刊

第 36 卷 第 3 期（总第 143 期）

2022 年 9 月出版

JOURNAL OF HEBEI NORMAL UNIVERSITY
OF SCIENCE & TECHNOLOGY

Quarterly, Founded in 1987

Vol.36 No.3(General Serial No.143)

Published in Sep. 2022

主管单位：河北省教育厅

主办单位：河北科技师范学院

主 编：杨越冬

主 任：邹德文

编辑出版：河北科技师范学院学报编辑部

电 话：0335-8076375

E-mail: ksxbyj@163.com

印刷单位：秦皇岛市昌黎文苑印刷有限公司

国内发行：河北科技师范学院学报编辑部

（河北秦皇岛，邮政编码：066004）

海外发行：中国国际图书贸易集团有限公司

国外发行代号 Q 462

Supervised by: Hebei Education Department

Sponsored by: Hebei Normal University of
Science & Technology

Editor-in-Chief: YANG Yuedong

Director: ZOU Dewen

Published by: Journal Editorial Department of
Hebei Normal University of
Science & Technology

Distributed Abroad by: China International Book
Trading Corporation
(Code NO. Q462)

公开发行

国际标准连续出版物号 ISSN 1672-7983

国内统一连续出版物号 CN 13-1344/N

定价：10.00 元