

中国叶围煤污菌初探 Ⅲ. 黄瓜叶围煤污菌的研究

张玉华* 王立新 郑是琳 姜广正

(山东农业大学植保系 泰安 271018)

摘 要 对山东省黄瓜 (*Cucumis sativus* L.) 叶围煤污菌种群组成、分布、演替和对黄瓜的生理影响的研究结果表明: 8 个地市黄瓜叶面真菌有 15 属 21 种, 其中属煤污菌的有 6 属 10 种: 链格孢 (*Alternaria alternata* Karst.), 出芽短梗霉 [*Aureobasidium pullulans* (de Bary) Arn.], 芽枝状枝孢 [*Cladosporium cladosporioides* (Fres.) de Vries], 尖孢枝孢 (*C. oxysporum* Berk. & Curt.), 大孢枝孢 (*C. macrocarpum* Preuss), 多主枝孢 [*C. herbarum* (Pers.) Link.], 球孢枝孢 (*C. sphaerospermum* Perz.), 灰腐质霉 (*Humicola grisea* Traaen.), 紫附球菌 (*Epicoccum purpurascens* Ehrenb. ex Wallr.) 和弯孢霉 [*Curvularia lunata* (Walk.) Boed.]. 链格孢和枝孢霉 (*Cladosporium* spp.) 是各地区主要种群。黄瓜叶面真菌的种类和密度与苗龄、叶面可溶性糖和氨基酸组分含量成极显著正相关。随着苗龄的增长, 真菌的密度和种类增多。用两个主要种群的分生孢子悬浮液接种黄瓜叶面, 形成明显的煤污, 导致叶面光合作用降低, 呼吸作用升高, 气孔阻力增大, 蒸腾作用下降。穗状德氏霉 (*Drechslera spicifer* R. Nelson) 和核茎点霉 (*Phoma putaminum* Speg.) 是国内的新记录。

关键词 黄瓜, 叶围煤污菌, 演替, 叶面淋溶物, 生理影响

煤污菌是附生于植物绿色叶面常见的一类特殊真菌种群, 以半知菌为主要类群, 形成黑色霉层, 严重时对植物有一定的危害^[1,2]。植物叶面营养物, 蚜虫和介壳虫等昆虫的分泌物均是煤污菌良好的营养物质^[3]。国内对植物叶面煤污菌的研究多以木本植物为材料^[4-6]。作者以黄瓜为材料, 系统研究了煤污菌的种群、分布、演替, 与叶面营养物的关系以及对黄瓜的生理影响。

1 材料和方法

1.1 材料

供试材料采自山东省济南、临淄、烟台、青岛、泰安、枣庄、临沂、菏泽等 8 个地区市区露地黄瓜煤污叶片, 定期定点从泰安市郊黄瓜苗龄 15 天起, 每隔 10—15 天采样一次, 到拉蔓止。五点取样, 取植株上、中、下位叶。

1.2 叶面真菌的分离、纯化及鉴定

用直径 1cm 打孔器打取叶圆片, 每叶打取 1—2 片, 共取 40 个小圆片, 置于 20ml 无

* 现在河南省焦作市农业局工作。

本文于 1993 年 9 月 20 日收到。

菌水中振荡洗下菌体,得到菌悬液,做系列梯度稀释,取稀释液 1ml 于马铃薯葡萄糖培养基(PDA),麦芽糖培养基(MEA),查氏培养基(CYA)上分离,加入 25%乳酸 2 滴抑制细菌,25℃,培养 7—10 天,记录菌落数。随机移取 100 个分离物,用单孢子分离法和菌丝尖端分离法纯化菌种,并按有关专著鉴定到种。以单位叶面积的菌落数表示分离物密度,以某种菌占鉴定菌总株数(100)的百分比表示相对分离频率^[4,6]。

1.3 叶面淋溶物分析

称取来自泰安市郊的黄瓜叶片(去叶柄、断口处封蜡)100g 两份。分别加入重蒸馏水 1000ml 浸泡 2 小时,弃去叶片,过滤浸泡液,滤液减压蒸馏浓缩。一份浓缩液用蒽酮法 630nm 比色测定碳水化合物总量;茚三酮抗坏血酸法 580nm 下比色测定氨基酸总量;氨基酸自动分析仪(日立 835)分析氨基酸组分与含量;另一份浓缩液蒸干至固体,乙酰化处理,气相色谱层析仪(103 型)分析可溶性糖的组分与含量。

1.4 煤污菌对黄瓜生理的影响测定

用煤污菌优势种枝孢属(*Cladosporium* spp.),编号 A1,(包括尖孢枝孢、芽枝状枝孢和大孢枝孢)和链格孢(*Alternaria alternata*),编号 A2,作接种物。孢子悬浮液浓度:A1 为 4.8×10^7 个孢子/ml, A2 为 4.4×10^7 个孢子/ml, A1 与 A2 混合液(1:1)为 4.7×10^7 个孢子/ml。以蜂蜜的 50%、30%、10% 水溶液作补充营养。接种方法:先将不同浓度的蜂蜜水溶液分别喷洒于全株叶面,再喷孢子液,以喷清水作对照。用塑料袋保温保湿,25—30℃,相对湿度 95%以上,48 小时后去塑料袋^[7],待叶片出现典型煤污后,选择叶位相同的叶片用红外线 CO₂ 分析仪(QGD-07 型)测定光合作用;用黑布遮光,测定呼吸作用;恒态气孔仪(Li-1600)测定气孔阻力和蒸腾作用。

2 结果和分析

2.1 叶面真菌种类和分布

从山东 8 个地市黄瓜煤污叶面上共获 1136 个分离物,鉴定出 15 属 21 种真菌,均为半知菌。不同地区真菌种类和相对分离频率不尽相同。链格孢和枝孢属均为各地的优势种,枝孢属的不同种在不同地区出现的频率差别较大。叶面真菌分离物中属煤污菌的有 6 属 10 种:链格孢(*Alternaria alternata* Karst.)、出芽短梗霉[*Aureobasidium pullulans* (de Bary) Arn.]、芽枝状枝孢[*Cladosporium cladosporioides* (Fres.) de Vries]、尖孢枝孢(*C. oxysporum* Berk. & Curt.)、多主枝孢[*C. herbarum* (Pers.) Link.]、大孢枝孢(*C. macrocarpum* Preuss)、球孢枝孢(*C. sphaerospermum* Perz.)、紫附球菌(*Epicoccum purpurascens* Ehrenb. ex Wallr.)、灰腐质霉(*Humicola grisea* Traaen.)和弯孢霉[*Curcularia lunata* (Walk.) Boed.]。另外两种真菌,穗状德氏霉(*Drechslera spicifer* R. Nelson)和核茎点霉(*Phoma putaminum* Speg.)在国内首次分离到。

2.2 叶面真菌的演替

泰安秋黄瓜叶面真菌的种类和数量随着黄瓜植株生育期不同而变化。从苗龄 15 天起,随着苗龄增长,叶面真菌种类和数量呈上升的趋势;苗龄 75 天时,由于雨水的冲刷,导致了此期真菌密度和种类下降;苗龄继续增长,叶面真菌种类和密度也迅速增加,特别是腐生性较强的真菌。到黄瓜衰老期,其密度与种类均达到了最大值(表 1)。

在黄瓜全生育期中, 枝孢属和链格孢均为优势种。枝孢属的芽枝状枝孢和尖孢枝孢在各生育期均有出现; 球孢枝孢和多主枝孢仅零星出现。镰孢霉属 (*Fusarium* spp.)、毛壳菌属 (*Chaetomium* spp.)、灰腐质霉等, 多在接近叶片衰老期出现; 弯孢霉零星出现。此外, 在接近黄瓜衰老期还分离到了穗状德氏霉和核茎点霉。

2.3 叶面淋溶物与真菌密度的关系

2.3.1 可溶性糖和氨基酸总量的变化: 黄瓜叶面可溶性糖和氨基酸总量随苗龄增大而增加, 到衰老期达到最大值, 而在苗龄 75 天时, 由于降雨冲刷, 使可溶性糖和氨基酸含量较低 (表 1)。

表 1 泰安市黄瓜叶面淋溶物含量与叶面真菌密度的关系

Table 1 Contains of cucumber leaf leaching in relation to the density of phyllosphere fungi

黄瓜苗龄 (d) Age of seeding	15	25	40	60	75	90	115
采样日期 (日/月) Date of sampling	20/6	1/7	22/7	10/8	28/8	15/9	7/10
可溶性糖 (mg/100g 鲜叶) Soluble sugars (mg/100g fresh leaves)	—	0.41781	3.33171	0.30276	4.69632	10.36816	51.11016
可溶性氨基酸 (mg/100g 鲜叶) Soluble amino acid (mg/100g fresh leaves)	—	0.01680	0.02972	0.11887	0.04251	0.34694	1.46923
真菌分离物密度 (个/cm ²) Density of fungal isolation (isolates/cm ²)	268	424.6	3476.7	3892.5	1194.7	16305.8	7707.5
真菌种类 (种) Number of fungal species	4	5	7	3	5	9	11

2.3.2 可溶性糖和氨基酸组分和含量的变化: 自黄瓜苗龄 25 天以后的各生育期中共检测有 5 种糖 18 种氨基酸。随着苗龄增长, 氨基酸种类增多, 从苗龄 25 天至 115 天, 氨基酸的种类由 11 种增加到 17 种; 多数氨基酸含量呈上升趋势, 少数几种含量变化无规律。谷氨酸、甘氨酸、胱氨酸、缬氨酸、亮氨酸、天冬氨酸、赖氨酸、丙氨酸、丝氨酸、苏氨酸、蛋氨酸在各生育期均可检测到; 苯丙氨酸、酪氨酸、异亮氨酸从苗龄 40 天到衰老期也可以检测到; 组氨酸、精氨酸、脯氨酸、色氨酸仅在叶片接近衰老期 (苗龄 90 天以后) 出现。

在黄瓜各生育期中, 可溶性糖以木糖和葡萄糖为主, 均可检测到; 鼠李糖在苗龄 25 天, 岩藻糖在苗龄 40—75 天, 甘露糖在苗龄 75—115 天出现, 仅检测到微量 (表 2)。

2.3.3 叶面淋溶物含量与叶面真菌分离物密度的变化: 叶面淋溶物中可溶性糖和氨基酸总量的变化与叶面真菌密度变化的趋势相一致 (表 1)。幼苗期, 叶片生理过程以合成为主, 细胞外渗物质较少, 叶面淋溶物中糖和氨基酸含量较低, 此时期叶面真菌密度也较小, 随着苗龄增大, 叶细胞合成与分解代谢同步加强, 外渗物质增多, 可溶性糖和氨基酸含量升高, 真菌密度也逐渐增大, 到衰老期, 细胞以分解为主, 大量物质因细胞结构

崩溃而外渗，可溶性糖和氨基酸含量均达最大值，叶面真菌密度也达到最高值。相关分析表明，叶面真菌密度与可溶性糖和氨基酸总量之间均呈极显著正相关 ($t0.01$)，相关系数分别为 0.9173 和 0.8326。因此，黄瓜叶面淋溶物是叶面真菌赖以生存和繁殖的重要营养来源。淋溶物组分与含量是影响真菌种类与密度的重要因素之一。

表 2 泰安市秋黄瓜不同生育期叶面可溶性糖组分和含量

Table 2 Contains of soluble sugarg on autumn cucumber leaves of different growth stage in Taian

黄瓜苗龄 (d) Age of seedling	25	40	60	75	90	115
采样日期 (日/月) Date of sampling	1/7	22/7	10/8	28/8	15/9	7/10
鼠李糖 Rhamnose	+					
岩藻糖 Fucose		+	+	+		
木糖 Xylose	+	0.7100**	1.5434	0.7601	0.0172	+
甘露糖 Mannose				+	+	+
葡萄糖 Glucose	+	1.4498	2.7575	3.1713	3.1713	9.6850

* 表示微量；** 单位是 mg/100g 鲜叶。 * Trace; ** mg/100g fresh lecues.

2.3.4 煤污菌对黄瓜的生理影响：煤污菌接种黄瓜的叶片后，形成典型的黑色霉层，使叶片光合作用降低，呼吸作用增强，气孔阻力增大，蒸腾作用下降。A1，A2 菌单独或混合接菌对黄瓜叶片生理的影响不同（表 3）。方差分析结果表明：与对照比较，无论单独接种或是混合接种，对黄瓜生理指标均有显著影响，而单独接种之间差异不明显，混合接种与单独接种之间有显著性差异，补充营养浓度增大，加重真菌接种后对黄瓜叶片生理指标影响的程度。

3 讨论

山东黄瓜叶围煤污菌的种群组成十分复杂，半知菌是其主要成员，这与国内报道的结果基本一致^[4,5]。根据 Hughes (1976) 对煤污菌的概念，我们把从黄瓜叶面上分离到的以腐生为主的弯孢霉和紫附球菌列入煤污菌范畴之内。

链格孢和枝孢属是山东 8 个市区黄瓜叶围煤污菌的优势种群，也是泰安秋黄瓜不同生育期叶面煤污菌的主要种群，而枝孢属中的种在不同地区差别较大。作为绝大多数木本植物叶面上的优势种的出芽短梗霉^[4]，仅在 3 个市的黄瓜叶面上出现，而在不同生育期的秋黄瓜叶上始终未分离到。造成不同地区、不同植物、不同季节以及同一种植物不同生育期叶面真菌种类的变化和出现时间的差异，虽是受到综合因素的影响，但起主要作用的因素究竟是什么尚需进一步探讨。

叶面煤污菌与植物的关系，不仅是附生关系，由于叶面被黑色霉层覆盖，必然会影响植物正常生理活动^[8]，与植物被真菌寄生感病后的反应一样，光合作用下降，呼吸作用升高，气孔阻力增大，蒸腾作用下降。这在本研究中得到证实。

表 3 煤污菌对黄瓜叶片生理的影响

Table 3 The effect of sooty moulds on physiology of cucumber leaves

接种物 Inoculum		A1				A2			
营养液 Nutrient solution		50%	30%	10%	对照 CK	50%	30%	10%	对照 CK
光合作用 Photosynthesis (CO ₂ mg · dm ⁻² · h ⁻¹)		10.81	11.61	14.89	15.07	10.76	11.58	14.62	15.07
呼吸作用 Respiration (CO ₂ mg · dm ⁻² · h ⁻¹)		7.39	6.02	5.22	4.83	7.51	6.10	5.27	4.83
气孔阻力 Stoma resistance (S · cm ⁻¹)		2.734	1.049	1.002	0.938	2.814	1.071	1.004	0.938
蒸腾作用 Transpiration (μg · cm ⁻² · S ⁻¹)		6.24	7.82	8.49	9.11	6.15	7.494	8.47	9.11
接种物 Inoculum		A1+A2				无菌水 H ₂ O			
营养液 Nutrient solution		50%	30%	10%	对照 CK	50%	30%	10%	对照 CK
光合作用 Photosynthesis (CO ₂ mg · dm ⁻² · h ⁻¹)		8.91	10.29	13.22	15.36	15.59	15.82	16.03	16.05
呼吸作用 Respiration (CO ₂ mg · dm ⁻² · h ⁻¹)		8.92	6.41	5.54	4.82	4.82	4.85	4.87	4.88
气孔阻力 Stoma resistance (S · cm ⁻¹)		2.897	1.176	1.054	0.941	0.937	0.934	0.933	0.921
蒸腾作用 Transpiration (μg · cm ⁻² · S ⁻¹)		5.36	6.43	8.18	9.17	9.20	9.21	9.21	9.23

参 考 文 献

[1] Hughes S J. *Mycol*, 1976, **68**: 693—820.

[2] Dickinson C H. *Microbiology of Aerial Plant Surfaces*. Dickinson C H *et al* ed. London: Academic Press, 1976. 203.

[3] Tukey H B. *Ecology of Leaf Surface Microorganism*. Blakeman J P ed. London: Academic Press, 1971. 67—80.

[4] 李荣禧, 郑是琳, 姜广正, 等. 内蒙古农牧学院学报, 1987, **8** (1): 85—87.

[5] 姜广正, 郑是琳, 李荣禧, 等. 微生物学报, 1990, **30** (3): 201—209.

[6] 鲍晓明, 郑是琳, 姜广正, 等. 微生物学报, 1992, **32** (1): 36—41.

[7] Dickinson C H. *Tran Brit Mycol Soc*. 1980, **74** (2): 309—319.

[8] Tedders W L. *J Eco Ento*, 1976, **69** (4): 551—553.

AN INVESTIGATION ON PHYLLOSHERE SOOTY MOULDS OF CHINA

Ⅱ. INVESTIGATION OF PHYLLOSHERE SOOTY MOULDS OF *CUCUMIS SATIVUS* L.

Zhang Yuhua Wang Lixin Zheng Shilin Jiang Guangzhen

(Shandong Agricultural University, Taian 271018)

Abstract The sooty moulds of *Cucumis sativus* L. are studied from July 1987 to October 1988. The fungi isolated from cucumber leaves are identified as 21 species in 15 form-genera. Among them 10 species of 6 form-genera are so called sooty moulds e.g. *Alternaria alternata*, *Epicoccum purpurascens*, *Aureobasidium pullulans*, *Cladosporium cladosporioides*, *C. oxysporum*, *C. herbarum*, *C. macrocarpum*, *C. sphaerospermum*. The isolation density of sooty moulds is of positive correlation with soluble sugars and amino acids. The isolation density and concentration of leaching substances increase with seedling age and vary in different regions.

The influence of sooty moulds on photosynthesis and respiration was obvious. Inoculating with mixed spore suspension of *Cladosporium* spp. and *Alternaria alternata*, the pathological influence of sooty moulds was more intense than when inoculating with single species spore suspension.

Drechslera spicifer and *Phoma putaminum* are new records of China.

Key words *Cucumis sativus*, Sooty moulds, Succession, Leaf leaching, Physiological influence