

## 瑞典常春藤漆斑病病原鉴定

贲海燕<sup>1, 2</sup>, 李宝聚<sup>1\*</sup>, 刘学敏<sup>2</sup>, 石延霞<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>中国农业科学院蔬菜花卉研究所, 北京 100081; <sup>2</sup>东北农业大学农学院, 哈尔滨 150030)

**摘要:** 通过病原菌的形态特征、培养性状和致病性测定的方法对引起瑞典常春藤漆斑病的病原菌进行了分离鉴定, 采用 PCR 技术扩增病菌 *rDNA*-ITS 基因, 获得一长度为 523 bp 的 DNA 片段, 序列测定结果表明该片段序列与 GenBank 已有的露湿漆斑菌序列的同源性达到了 99%。综合两种方法鉴定结果, 露湿漆斑菌是引起瑞典常春藤漆斑病的致病菌, 露湿漆斑菌为该寄主上的真菌新病害。

**关键词:** 瑞典常春藤; 瑞典常春藤漆斑病; 露湿漆斑菌; ITS-*rDNA* 测序

**中图分类号:** S 682.36 **文献标识码:** A **文章编号:** 0513-353X (2009) 04-0553-06

## Identification of the Pathogen Causing Black Spot Disease of Little Spurflower

BEN Hai-yan<sup>1, 2</sup>, LIBao-ju<sup>1\*</sup>, LU Xue-min<sup>2</sup>, and SHI Yan-xia<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>Institute of Vegetables and Flowers, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China; <sup>2</sup>Agronomy College, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China)

**Abstract:** A pathogenic fungus causing leaf spot of *Plectranthus parviflorus* was isolated and characterized based on the morphological features, cultural characteristics and pathogenicity. By using polymerase chain reaction (PCR) technique to amplify *rDNA*-ITS of the isolate, we obtained a 523 bp DNA fragment, the result showed that *rDNA*-ITS sequences of the isolate and *Myrothecium roridum* shared 99% homology, which was compared in National Center for Biotechnology Information (NCBI) GenBank. Synthesized two identification results indicated that *Myrothecium roridum* was the pathogen causing black spot disease of *Plectranthus parviflorus*. This is the first report of *Myrothecium* leaf spot caused by *Myrothecium roridum* on *Plectranthus parviflorus*.

**Key words:** *Plectranthus parviflorus*; little spurflower black spot disease; *Myrothecium roridum* Tode ex Fr.; ITS-*rDNA* sequencing

瑞典常春藤 (*Plectranthus parviflorus*, little spurflower), 又名吸毒草、澳洲香茶菜, 是唇形科香茶菜属多年生草本植物。瑞典常春藤原产于澳大利亚, 2006年由北京市农业技术推广站引进并开始在京郊推广种植。2007年9月, 作者在北京市大兴区调查病害时发现, 盆栽瑞典常春藤植株叶片出现严重的病斑, 发病叶率高达40%, 甚至出现整叶枯萎、脱落的现象, 给种植者带来很大经济损失。目前国内外还未见此瑞典常春藤病害的研究报道。为了建立该病害的有效防治方法并为病害流行预测提供基础资料, 笔者采集了大量的瑞典常春藤病样, 分离培养病原物, 通过观察病原菌形态特征和培养性状, 测定致病性, 结合病原菌基因组 ITS 区序列测定结果, 对其致病菌进行鉴定, 以明确此种致病菌的种类。

收稿日期: 2008-11-28; 修回日期: 2009-04-07

基金项目: 国家科技基础条件平台建设项目 (2005DKA21201); ‘十一五’国家科技支撑计划项目 (2006BAD07B02); 科技部科研院所社会公益研究专项项目 (2004DB4J153)

\*通讯作者 Author for correspondence (E-mail: libj@mail.caas.net.cn)

## 1 材料与方法

### 1.1 试材

病害标本采集：2007年9月14日，调查北京市大兴区蜂鸟花卉市场的温室花卉病害，发现3号温室内盆栽瑞典常春藤叶部出现褐色近圆形病斑，且发生严重。采集此种发病叶片，并对典型发病症状进行描述和数码照相。

试验用的瑞典常春藤植株购自北京中蔬大森林花卉市场。

### 1.2 病原菌的分离及鉴定

常规切片镜检：挑取寄主典型病斑上的子实体（即分生孢子盘）进行切片镜检，若未产生分生孢子，则将病部常规保湿培养数天，待子实体成熟后再进行切片镜检，观察描述病原菌的形态特征。

初分离：采用组织分离培养法。选取典型发病植株的叶片，切取4 mm × 4 mm病健交界处的组织，先后分别置入75%酒精3~5 s和0.1%升汞3 min进行表面消毒，灭菌水漂洗3次，接种于PDA培养基平板上，26℃黑暗条件下培养。3 d后用无菌钩挑取菌落边缘菌丝至PDA平板上进行纯化，观察菌落形态及颜色，5 d后将纯化的病原菌转置PDA斜面上低温保存。

### 1.3 致病性测定

将分离纯化后的病原菌转至PDA平板上，于26℃黑暗条件下培养7 d后，用无菌水洗出孢子配制成孢子浓度为 $1 \times 10^6$ 个·mL<sup>-1</sup>的孢子悬浮液，采用喷雾法接种于10株盆栽瑞典常春藤的叶片和茎部（每盆1株，每株瑞典常春藤15片叶左右），接种量以雾滴均匀覆盖叶片表面且不流淌为度。设清水喷雾为空白对照。接种后放置于26~28℃的塑料棚内保湿（光照强时棚上覆盖黑纱），每天观察并记录发病情况。

### 1.4 病原菌 rDNA-ITS序列测定

#### 1.4.1 菌株培养

菌丝的培养收集：将试管斜面菌种转入PDA培养基平板上26℃活化2~3 d；将经高温湿热灭菌的玻璃纸平铺到PDA培养基平板上，再将活化后的病原菌用无菌接种钩转移到玻璃纸上面，每皿转入5 mm见方的小菌块3~4块，共两板；在26℃，黑暗条件下培养1周左右（菌丝生长充足），在无菌操作工作台用灭菌小铁勺刮下菌丝，并用锡箔纸包好。

菌丝抽提干燥：将锡箔纸包好的菌丝用真空抽提干燥仪进行干燥。每次干燥4 h，共干燥2次，然后于-20℃保存备用。

#### 1.4.2 菌株基因组DNA提取

将干燥后的菌丝放入1.5 mL灭菌离心管中，加入液氮，用研磨棒研磨菌丝至粉末，加入600 μL CTAB提取液（CTAB 20 g·L<sup>-1</sup>，NaCl 1.4 mol·L<sup>-1</sup>，EDTA 20 mmol·L<sup>-1</sup>，Tris 100 mmol·L<sup>-1</sup>），置于65℃水浴30 min，每隔10 min震荡1次，使其充分抽提；抽提后于12 000 r·min<sup>-1</sup>、4℃离心10 min，取上清液，加入等体积的水饱和酚，用摇床轻摇10 min后，12 000 r·min<sup>-1</sup>、4℃离心10 min，小心抽取上清液，加入等体积的酚 氯仿 异戊醇（25:24:1），轻摇10 min，12 000 r·min<sup>-1</sup>、4℃离心10 min后，小心抽取上清液，加入等体积的氯仿 异戊醇（24:1），轻摇10 min，12 000 r·min<sup>-1</sup>、4℃离心10 min后，取上清液，加入等体积或2/3体积的预冷异戊醇，产生白色的絮状沉淀，轻摇，12 000 r·min<sup>-1</sup>、4℃离心10 min后，弃上清液，用75%的酒精冲洗沉淀2~3次，风干后溶解于50 μL 1×TE中，保存于-20℃备用。

#### 1.4.3 ITS区段PCR扩增

用真菌生物核糖体DNA通用引物ITS1和ITS4进行PCR扩增，引物为ITS1（5'-TCCGTAGGT-GAACCTGCGC-3'），ITS4（5'-TCTTCCGCTTATTGATATGC-3'），由上海生工生物工程服务有限公司合

成。

反应体系为 50  $\mu\text{L}$ ，其中含模板 DNA 1  $\mu\text{L}$ ，10  $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  dNTP 6  $\mu\text{L}$ ，10  $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  引物 和引物 各 1  $\mu\text{L}$ ，10  $\times$ Buffer 5  $\mu\text{L}$ ，2.5  $\text{U} \cdot \mu\text{L}^{-1}$  *Taq* DNA 聚合酶 1.5  $\mu\text{L}$ ，用 ddH<sub>2</sub>O 补足 50  $\mu\text{L}$ ，轻摇使其充分混匀。体系中不加菌株 DNA 提取物，用 ddH<sub>2</sub>O 补足 50  $\mu\text{L}$  的为阴性对照。

PCR 扩增程序为：94 预变性 4 min；94 变性 1 min，56 退火 1 min，72 延伸 1 min，35 个循环；72 终延伸 10 min，扩增产物于 4 保藏。

取 PCR 扩增产物 2  $\mu\text{L}$  在 1  $\times$ TAE 缓冲液中用 1% 琼脂糖凝胶电泳 20 min，经 EB 染色后置于紫外照射仪上观察结果并照相。

将回收的 DNA 样品送到中国农业科学院作物研究所测序中心进行测序。所得序列提交到 National Center for Biotechnology Information (NCBI) 核酸数据库，通过 Blast 程序，将  $\text{rDNA-ITS}$  序列与 GenBank 中的核酸序列进行对照，确定病原菌种的分类地位。

## 2 结果与分析

### 2.1 瑞典常春藤漆斑病症状

观察发现病原菌主要侵染危害叶片，初期叶面及叶背均出现近圆形或不规则的水浸状小斑点，病斑两面均稍有凹陷（图 1，A）。

随着小斑点的逐渐扩展，病斑颜色加深；湿度较大时，病斑呈水浸状。发病的典型症状是近圆形病斑，直径 1~6 mm，边缘颜色较深，中央灰白色至褐色，病健交界明显，病斑有明显凹陷（图 1，B）。

发病后期，圆形病斑相互连接，整片叶子变黑、皱缩，叶柄萎蔫，湿度大时病斑上长有白色的小颗粒（图 1，C），为病原菌的分生孢子盘，整片叶子极易从叶柄处脱落（图 1，D）。

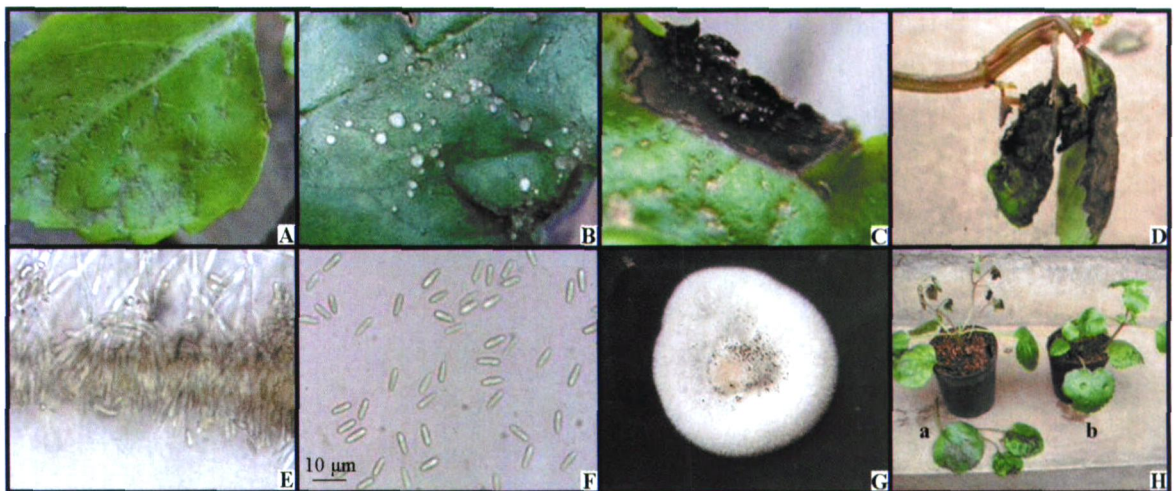


图 1 露湿漆斑菌的危害症状、特征性状及致病性测定结果

- A. 初期发病症状；B. 典型症状——小圆斑；C. 后期病斑上长有白色小颗粒即分生孢子盘；D. 发病后期病叶萎蔫，易脱落；E. 分生孢子梗；F. 分生孢子；G. 培养性状；H. 致病性测定结果，a: 接种发病植株（叶片萎蔫、脱落）；b: 对照，未发病。

Fig. 1 The damage symptoms, trait character and determined results of *Myrothecium roridum* Tode ex Fr.

- A. Initial symptom; B. Typical symptom with small round spot; C. Leaf lesions with white acervuli in late stage; D. Diseased leaves wilting and leaves falling off in late stage; E. Conidiophores; F. Conidium; G. Culture character; H. Determined results of the pathogen, a: Symptom of diseased leaves after inoculating; b: Control, no disease.

## 2.2 病原菌的形态特征及培养性状

分生孢子座浅杯状，座状，直径 0.1~1.5 mm，无刚毛。分生孢子梗单生或丛生，顶端帚状分枝，轮生 3~7个产孢瓶梗（图 1，E）。产孢细胞无色，细长，棍棒状，顶端稍膨大，孔口小，无明显围领， $11\sim 16\ \mu\text{m}\times 1.5\sim 2.0\ \mu\text{m}$ 。分生孢子杆状，长椭圆形，两端顿圆，但基部略呈平截，光滑，无色，成堆时呈墨绿色或黑色，埋藏于粘液中，大小为  $4.9\sim 7.5\ \mu\text{m}\times 1.3\sim 2.0\ \mu\text{m}$ ，含 2~3个油球（图 1，F）。

在 PDA 上，25℃ 黑暗条件下培养。菌丝初为白色，绒毛状，菌落背面淡黄色，菌落以圆形向四周扩展，培养 5 d 左右，菌落上长有分生孢子座，常被大量的墨绿色的胶黏分生孢子团覆盖（图 1，G），菌落背面颜色加深变为蔷薇褐色。

根据病原菌的形态特征及培养性状，参阅专著（张忠义等，1986；陆家云，2001）及吴文平（1991）对漆斑菌属 4 个种的研究，鉴定该致病菌为露湿漆斑菌（*Myrothecium roridum* Tode ex Fr.）。

## 2.3 致病性测定结果

将露湿漆斑菌孢子悬浮液喷雾接种于盆栽瑞典常春藤叶片和茎上，接种后 3 d 开始发病，初发病率为 60%。5 d 时出现典型症状，与温室内自然发病症状一致。在高温高湿时形成不规则的黑色大斑，病斑上有近圆形的白色小颗粒，即分生孢子盘，条件适宜时分生孢子盘中会释放出大量的墨绿色的胶黏孢子团，即露湿漆斑菌的分生孢子。接种后 7 d 发病已经很严重，发病率达 90% 以上，叶片极易脱落，脱叶率 40% 左右（图 1，H，a）；茎部没有发病。对照植株生长良好，未见发病（图 1，H，b）。试验结果表明，病菌在植株叶片内潜育期较短，发病迅速。

分离培养接种发病植株的病原菌，与接种病原菌形态一致，证明露湿漆斑菌是引致瑞典常春藤发病的致病菌。

## 2.4 病原菌分子鉴定结果

扩增病菌 ITS-rDNA 基因，获得一长度为 523 bp 的 DNA 片段（图 2）。序列测定结果表明，供试菌株基因组 ITS-rDNA 序列与 NCB I 库内的露湿漆斑菌（GenBank 登录号为 EF151002.1）同源性达到了 99%，据此确认致病菌为露湿漆斑菌。该菌为半知菌亚门（Deuteromycotina），丝孢纲（Hyphomycetes），瘤座孢目（Tuberculariales），瘤座孢科（Tuberculariaceae），漆斑菌属（*Myrothecium* Tode ex Link）。

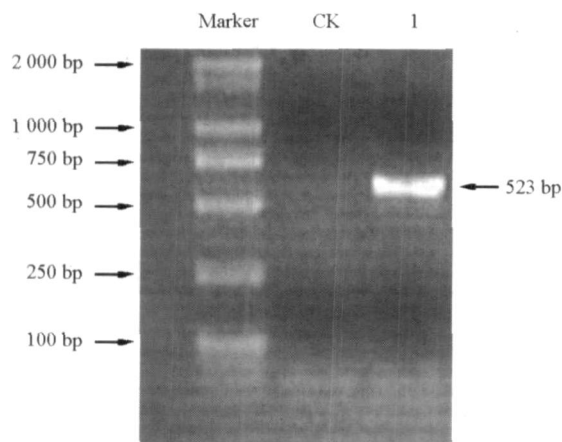


图 2 PCR 扩增产物检测结果

1: 分离得到的病原菌; CK: 阴性对照。

Fig 2 Detection profile of DNA fragment after PCR

1: Isolated fungus; CK: Negative control

### 3 讨论

传统真菌系统分类是以形态学特征为主要依据, 尤其是子实体的形态和结构被用作分类鉴定的典型性状。按照这一方法并遵循柯赫氏法则, 本试验中将分离培养、回接, 得到的病原菌通过显微镜观察, 参阅张忠义等 (1986)、Daughtrey (1995)、陆家云 (2001) 和吴文平 (1991) 的相关文献, 比对菌体特征, 初步鉴定瑞典常春藤叶斑病的致病菌为露湿漆斑菌。

以形态结构为基础的分类系统在一定程度上受人为因素和外界环境的影响, 不能充分反映物种的进化和种群间的亲缘关系; 有时欲获得其有性或无性器官需较长时间, 有些种类则不易甚至不能形成繁殖结构, 这给分类鉴定带来诸多不便 (刘伟成, 1995)。要克服这些不足, 就必须从更深刻的层次上去分析和研究, 以找到更真实可靠的证据。因此, 一些分子生物学方法已发展成为用于鉴定许多真菌性病害的重要手段 (Cano et al, 2004; 杨腊英等, 2006; 付娟妮等, 2007)。*rDNA-ITS*是介于 18S *rDNA*、5.8S *rDNA* 和 28S *rDNA* 之间的区域, 已有研究表明 *ITS*在真菌的种间存在着丰富的变异, 而在种内不同菌株间却高度保守, 可以为真菌的系统发育和分类鉴定提供丰富的遗传信息 (Culebras et al, 2000; 陈剑山和郑服丛, 2007)。

本研究中采用传统真菌形态学鉴定和 *rDNA-ITS*序列分析相结合的方法, 对引致瑞典常春藤漆斑病的病原菌进行了鉴定, 两种方法鉴定结果相互印证, 更具说服力。

露湿漆斑菌 (*M. rotundum* Tode ex Fr.) 寄主范围广泛, 能侵染危害多种经济作物 (Raut & Moghe, 1980; 堵鹤鸣和浦冠勤, 1988; 田立道和李雪明, 1993)。露湿漆斑菌对花卉作物危害的相关报道和记载也屡见不鲜, Strider (1983) 记录了 8 种寄主植物感染此病原菌, Chase (1987) 记载了 23 个属的观叶寄主植物能够被其侵染危害, 其中有 8 个属的寄主植物发病严重。Mangandi 等 (2007) 发现了由露湿漆斑菌引起的鼠尾草叶斑病, 此种病害在美国是首次报道。Daughtrey (1995) 描述了露湿漆斑菌在不同的寄主上所表现的症状极为相似, 并且记录了此种病原真菌分生孢子大小 ( $4.5 \sim 10.8 \mu\text{m} \times 1.3 \sim 2.7 \mu\text{m}$ , 平均大小为  $7.2 \mu\text{m} \times 1.8 \mu\text{m}$ ), 本试验中从瑞典常春藤上分离到的致病菌与其描述相一致。目前国内外还没有关于瑞典常春藤病害的研究报道, 该属植物 (香茶菜属) 的病害记录也仅有 3 种 (Hansford, 1961; Cybertruffle's, 2008), 因此露湿漆斑菌为该寄主新的致病真菌。

瑞典常春藤漆斑病在北京大兴区、山东省青州市等地发生严重, 给种植者造成严重的损失。我们在病菌接种试验中发现, 在温湿度适宜的条件下, 露湿漆斑菌侵入迅速, 危害严重, 发病率在 90% 以上, 脱叶率 40% 左右。

瑞典常春藤为北京市新引进花卉品种, 不适宜的栽培管理方法是造成漆斑病发生危害严重的重要原因, 本病原鉴定结果为制定合理的栽培管理方法以及瑞典常春藤漆斑病的防治措施提供了重要基础资料, 也为其它病害病原真菌的鉴定提供了有益的参考。

### References

- Cano J, Guarro J, Gen é l. 2004. Molecular and morphological identification of colletotrichum species of clinical interest. *Journal of Clinical Microbiology*, 42 (6): 2450 - 2452.
- Chase A R. 1987. Compendium of ornamental foliage plant diseases. American Phytopathological Society, 1 - 92.
- Chen Jian-shan, Zheng Fu-cong. 2007. Application of ITS sequences in fungi classification and identification. *Journal of Anhui Agriculture Science*, 35 (13): 3785 - 3786, 3792. (in Chinese)
- 陈剑山, 郑服丛. 2007. ITS序列分析在真菌分类鉴定中的应用. *安徽农业科学*, 35 (13): 3785 - 3786, 3792.
- Culebras P M, Eladio B M, Querol D A. 2000. Identification of colletotrichum species responsible for anthracnose of strawberry based on the internal transcribed spacers of the ribosomal region. *FEMS Microbiology Letters*, 189 (1): 97 - 101.

- Cybertruffle's Robigalia 2008. Observations of fungi and their associated organisms Cybertruffle foundation [2008 - 02 - 28]. <http://www.cybertruffle.org.uk/robigalia/chi/index.htm>.
- Daughtrey M G 1995. Compendium of flowering potted plant diseases The American Phytopathological Society, 19.
- Du He-ming, Pu Guan-qin 1988. Isolation, Identification and biological characters of the pathogen, *Myrothecium vridium* Tode ex Fr. caused a tar leaf spot disease of mulberry. *Acta Phytophylacica Sinica*, 15 (4): 230 - 234. (in Chinese)
- 堵鹤鸣, 浦冠勤. 1988. 桑树漆斑病菌的鉴定和某些性状研究. *植物保护学报*, 15 (4): 230 - 234.
- Fu Juan-ni, Liu Xing-hua, Cai Fu-dai, Kou Li-ping 2007. Identification of pathogenic fungus causing a decay of stored pomegranate fruits using molecular biology technique. *Acta Horticulturae Sinica*, 34 (4): 877 - 882. (in Chinese)
- 付娟妮, 刘兴华, 蔡福带, 寇莉萍. 2007. 石榴采后腐烂病原菌的分子鉴定. *园艺学报*, 34 (4): 877 - 882.
- Hansford C G 1961. The meliolineae. A Monograph Sydowia Beiheft, 2: 806
- Liu Wei-cheng 1995. Systematic studies on taxonomy of main species and genera of sphaeropsidales [Ph. D. Dissertation]. Shenyang: Shenyang Agricultural University (in Chinese)
- 刘伟成. 1995. 球壳孢目真菌系统分类研究 [博士论文]. 沈阳: 沈阳农业大学.
- Lu Jia-yun 2001. Plant pathogenic mycology. Beijing: China Agricultural Press (in Chinese)
- 陆家云. 2001. 植物病原真菌学. 北京: 中国农业出版社.
- Mangandi J A, Seijo T E, Peres N A. 2007. First report of *Myrothecium vridium* causing myrothecium leaf spot on *Salvia* spp. in the United States. *Plant Disease Report*, 91 (6): 772.
- Raut N R, Moghe P G 1980. Occurrence of *Myrothecium* leaf spot on cotton in Vidarbha. *Indian Phytopathology*, 33: 510 - 511.
- Strider D L 1983. Diseases of floral crops. Shanghai: Flower Society of Shanghai, Phytopathology Society of Shanghai: 29. (in Chinese)
- Strider D L 1983. 花卉作物病害 (下). 上海: 上海市花卉学会, 上海市植物病理学会: 29.
- Tian Li-dao, Li Xue-ming 1993. Studies on the pathogen of mulberry black spot and ITS disease cycle and control. *Canye Kexue*, 19 (4): 193 - 197. (in Chinese)
- 田立道, 李雪明. 1993. 桑漆斑病病原发生规律及防治研究. *蚕业科学*, 19 (4): 193 - 197.
- Wu Wen-ping 1991. Studies on hyphomycetes in Hebei. species of the genus *Myrothecium* Tode: Fr. on plants. *Journal of the Hebei Academy of Sciences*, (1): 69 - 74. (in Chinese)
- 吴文平. 1991. 河北省丝孢菌研究、漆斑菌属 (*Myrothecium* Tode: Fr.) 的四个种. *河北省科学院学报*, (1): 69 - 74.
- Yang La-ying, Huang Hua-ping, Tang Fu-run, Hu Mei-jiao, Zhang Shi-qing, Huang Jun-sheng 2006. Rapid molecular identification and detection of *Colletotrichum musae* with species-specific primers based on the internal transcribed spacer (ITS) region. *Acta Phytopathologica Sinica*, 36 (3): 219 - 225. (in Chinese)
- 杨腊英, 黄华平, 唐复润, 胡美娇, 张世清, 黄俊生. 2006. 香蕉炭疽病的分子鉴定及其检测. *植物病理学报*, 36 (3): 219 - 225.
- Zhang Zhong-yi, Leng Huai-qiong, Zhang Zhim-ing, Cao Ruo-bin, Zhang Tian-yu 1986. Plant pathogenic mycology. Chengdu: Sichuan Science and Technology Press (in Chinese)
- 张忠义, 冷怀琼, 张志明, 曹若彬, 张天宇. 1986. 植物病原真菌学. 成都: 四川科学技术出版社.

## 图书推荐

### 《中国蔬菜品种志》

本书由中国农业科学院蔬菜花卉研究所主编, 已于 2002 年 9 月出版发行。全书分上、下卷, 1~6 章为上卷, 包括根菜类、白菜类、芥菜类、甘蓝类、绿叶菜类及葱蒜类, 计 2 263 个品种, 1 347 页; 7~12 章为下卷, 包括瓜类、茄果类、豆类、薯芋类、水生蔬菜类和多年生蔬菜类, 计 2 550 个品种, 1 177 页。入志的品种中, 地方品种占 90% 以上, 少量在全国栽培时间较长、种植面积较大的一代杂种也选入其中。本书较全面系统而又有重点地反映了中国丰富的蔬菜品种资源概貌、研究成果及育种水平, 可供蔬菜科研、教学、生产及种子子公司、农业行政单位的人员参考。本书出版后受到读者普遍好评, 现尚有少量存书, 特以优惠价格 490 元 (上、下卷) 提供给读者 (原价 980 元)。

购书者请通过邮局汇款至北京中关村南大街 12 号中国农科院蔬菜花卉所《园艺学报》编辑部, 邮编 100081。