

广西一点红真菌性病害病原鉴定初报*

A Report of Pathogenic Identification on Fungal Diseases of *Emilia sonchifolia* in Guangxi

农彦贤¹, 李济贞¹, 廖咏梅¹, 周志权^{2**}

NONG Yan-xian¹, LI Ji-zhen¹, LIAO Yong-mei¹, ZHOU Zhi-quan^{2**}

(1. 广西大学农学院, 广西南宁 530004; 2. 广西壮族自治区产品质量监督检验院, 广西南宁 530022)

(1. Agriculture College, Guangxi University, Nanning, Guangxi, 530004, China; 2. Guangxi Institute of Supervision & Testing on Product Quality, Nanning, Guangxi, 530022, China)

摘要: 2003年9月至2005年11月, 在广西药用植物园、柳江种植基地和南宁郊区等一点红 [*Emilia sonchifolia* (L.) DC.] 的种植区调查研究一点红真菌性病害。结果鉴定了6种真菌性病害, 即: 斑点病 (*Corynespora cassiicola*)、灰霉病 (*Botrytis cinerea*)、黑斑病 (*Alternaria longipes*)、斑枯病 (*Septoria glycines*)、炭疽病 (*Colletotrichum* sp.) 和锈病 (*Coleosporium* sp.), 其中斑点病、灰霉病、黑斑病和斑枯病的病原鉴定是采用传统分类与分子生物学分类相结合的方法进行。

关键词: 一点红 真菌 病害 症状 病原鉴定

中图分类号: S435.672 文献标识码: A 文章编号: 1002-7378(2006)03-0183-05

Abstract: The fungal diseases of *Emilia sonchifolia* was investigated in Guangxi Medicinal Garden of Botany, Liujiang Planting Base and the Nanning suburb from Sept. 2003 to Nov. 2005. Six fungal diseases were identified. They were leaf spot (*Corynespora cassiicola*), grey mold (*Botrytis cinerea*), black spot (*Alternaria longipes*), leaf spot and blight (*Septoria glycines*), anthracnose (*Colletotrichum* sp.) and rust (*Coleosporium* sp.). The identification of *Corynespora cassiicola*, *Botrytis cinerea*, *Alternaria longipes* and *Septoria glycines* was conducted using both the traditional classification method and the molecular biology classification method.

Key words: *Emilia sonchifolia*, fungal, disease, symptom, pathogenic identification

一点红 [*Emilia sonchifolia* (L.) DC.] 又名: 叶下红、红背叶、红花草、石青红等, 为菊科一年生或多年生草本植物, 是《中华人民共和国药典》收载的药用植物之一, 其性凉味微苦, 具有清热解毒、消炎利尿、活血清肿等功效^[1]。在国内, 主要分布于华南、华中和西南等地; 在国外, 非洲西部和印度也有分布^[2]。在广西和广东可全年生长^[3]。一点红有较高的药用价值, 是目前市场上畅销药品“花红片”的主要原料; 一点红也是一种新兴的蔬菜, 可采食其嫩梢。

因此, 近年来很多地方开始人工栽培一点红。目前一点红在广西的种植面积已有约 300 hm²。

随着一点红人工栽培面积的不断扩大, 其病害问题也日渐突出, 已经成为一点红生产发展的主要限制因素之一, 但目前尚未见有一点红病害的研究报道。为此我们于2003年9月至2005年11月, 在广西药用植物园、柳江种植基地和南宁郊区等一点红的种植区, 进行一点红真菌性病害调查及其病原鉴定。现将结果报道如下。

1 材料与方法

1.1 症状观察

2003年9月至2005年11月, 在广西药用植物园一点红的生长季节, 依据样地的大小和形状, 采用

收稿日期: 2005-12-26

修回日期: 2006-04-18

作者简介: 农彦贤(1979-), 女, 广西崇左人, 在读硕士研究生, 主要从事真菌学及植物病理学的研究。

* 广西自然科学基金项目(桂科自 9912015)。

** 通讯作者。

5点取样或平行取样的方式,每点调查1平方米,计算病株率,并对每一种病害初期、中期、后期的症状进行描述、拍照。每半个月调查病害和采集标本一次,系统调查、记录病害发生的种类及其在田间的发生特点。同时,在柳江种植基地和南宁郊区等一点红的种植区,于不同季节,随机采集不同种类的病害,调查病株率,记载病害的症状和发生特点。

1.2 病原真菌鉴定

采用常规的组织分离法^[4]分离培养病原菌,经纯化取得纯培养物后,首先回接确定其致病性,然后依据形态特征和分子生物学方法进行病原鉴定。

1.2.1 用传统分类方法进行鉴定

将分离纯化的各病原菌接种于马铃薯蔗糖琼脂培养基(PSA)平板上,26℃下培养10d后,在普通光学显微镜下观察病菌的形态特征,随机选取10个视野,测量病菌的分生孢子梗、分生孢子的大小,并分别在10×10倍和10×40倍进行数码显微拍摄。最后,根据参考文献^[5~10]所描述的形态特征,进行病原菌的种类鉴定。

1.2.2 用分子生物学相结合的方法进行病原鉴定

在对病原菌进行传统分类的基础上,采用了分子生物学鉴定的方法^[11~14]来鉴定病原菌:分别将经传统分类方法鉴定的斑点病、灰霉病、黑斑病、斑枯病的4种病原菌的纯培养物用马铃薯蔗糖(PS)培养液在25℃下120 r/min培养4~5d,采用十六烷基三甲基溴化胺法(CTAB)^[15]提取病原菌的总DNA。聚合酶链式反应(Polymerase chain reaction, PCR)的引物为真核生物rDNA-ITS的通用引物:ITS1(5' TCCGTAGGTGAACCTGCGG 3')和ITS4(5' TCCTCCGCTTATTGATATGC 3')。PCR反应体系(25 μl):10×PCR缓冲液2.5 μl,10 mmol/L dNTP 1 μl,5 μmol/L ITS1和ITS4引物各1 μl,5 U/μl Taq DNA聚合酶(TaKaRa)1 μl,DNA模板1 μl,加ddH₂O至25 μl。PCR扩增程序为:95℃预变性5 min,然后,96℃变性30 s,55℃退火1 min,72℃延伸1 min,35个循环后72℃延伸10 min。取5 μl的扩增产物在1%的琼脂糖凝胶上电泳,溴化乙锭染色后,在紫外光下检测。PCR产物由宝生生物工程(大连)有限公司(TaKaRa)协助进行双向测序。我们根据测序结果进行DNA序列分析,采用BLAST程序进行同源性比较、鉴定病原。

2 结果

经田间调查及病原鉴定,我们初步明确了广西

一点红发生的主要真菌性病害有6种,即斑点病 [*Corynespora cassiicola* (Berk. et Curt. Wei)],灰霉病 (*Botrytis cinerea* Pers.),黑斑病 (*Alternaria longipes* Ellis et Everhart),斑枯病 (*Septoria glycines*),炭疽病 (*Colletotrichum* sp.)和锈病 (*Coleosporium* sp.)。

2.1 斑点病

症状:初期叶片表面呈深紫色小斑点,后扩大为圆形至近圆形病斑,直径为3~8 mm,中间呈灰白色,周缘有1~2 mm的深紫色带,病斑的病健交界不明显;湿度大时,病斑增多,叶片逐渐变黄枯死。在茎杆上的病斑一般为条形或梭形,严重时病部绕着茎杆上下扩展,使整个枝条枯死。后期病斑上可见到黑褐色的茸毛状霉层。

病原:病原菌在PSA培养基上极易生长,菌落为灰青色,气生菌丝发达,密集,茸毛状;有时可在培养基里产生红色的色素;菌丝体初无色,后期颜色加深,有分隔。分生孢子梗从寄主表皮细胞伸出,顶部略为膨大,单生或2~6根丛生,直立,不分枝,淡褐色,多细胞,有1~4个分隔,大小为(131.2~712.5) μm×(4.0~7.5) μm;湿度较大时,新的分生孢子梗从旧的孢子梗顶孔伸出,形成结节状。分生孢子顶端单生,新分生孢子在前一分生孢子脱落时所留的孢痕伸出的新枝顶端形成,偶尔见有2~3个链生,两个分生孢子或分生孢子与分生孢子梗相连处有时有无色的连接体,倒棍棒形至长圆筒形,淡褐色,有3~16个分隔,大小为(31.0~287.5) μm×(6.2~13.8) μm,平均大小为135.02 μm×10.76 μm。

PCR测序表明,该菌的rDNA-ITS区PCR产物序列长度为561 bp,与山扁豆生棒孢 ATCC64204菌株 (*Corynespora cassiicola* strain ATCC64204, GenBank 登录号为AY238606)有99%的同源性。因此,我们将该病原菌鉴定为山扁豆生棒孢菌 [*Corynespora cassiicola* (Berk. et Curt. Wei)]。山扁豆生棒孢菌的分生孢子梗和分生孢子如图1所示。

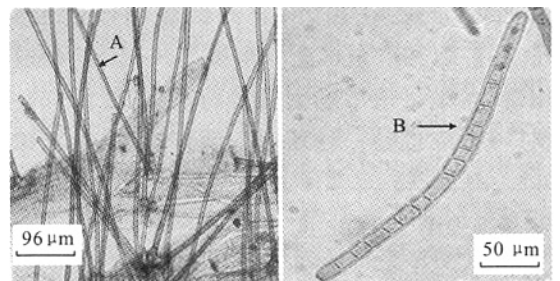


图1 山扁豆生棒孢菌的形态

A. 分生孢子梗(10×10); B. 分生孢子(10×40)。

2.2 灰霉病

症状:一般在叶片基部或两个枝条的分叉处呈淡褐色、水渍状腐烂,随着病害的发展,水渍状的腐烂绕着茎秆一周,然后向上向下扩展,病斑中间呈黄褐色,两端呈暗褐色。湿度较大时,1~2 d 后在发病部位可见到灰色的绒状霉层,即病原的分生孢子梗及分生孢子。有时病枝的表皮脱落,仅剩白色的纤维,并在上面见到不规则的黑色小菌核。如果遇上干燥天气,下部病斑呈黑色干缩,上部枝条很快枯萎。当病害向茎基部扩展、向周边枝条蔓延时,会导致植株枯死。

病原:病原菌在 PSA 培养基上生长迅速,在 25℃ 下培养 3 d 即可长满整个培养皿(直径 9 cm),菌落白色,气生菌丝稀疏,后期可形成很多菌核。菌核黑色,形状不规则但比较扁平,表面粗糙,似鼠粪状,大小为 0.1~1.2 cm;分生孢子梗成丛地从菌丝体或菌核上长出,直立,灰褐色,有分隔,顶部不规则树状分枝,顶端尖削,大小为 $(143.7 \sim 6000) \mu\text{m} \times (10.0 \sim 18.8) \mu\text{m}$;分生孢子较疏松地着生在各分枝的顶端,球形至卵圆形,淡褐色,单胞,大小为 $(6.2 \sim 17.5) \mu\text{m} \times (6.2 \sim 12.5) \mu\text{m}$,平均大小为 $10.13 \mu\text{m} \times 9.04 \mu\text{m}$ 。

PCR 测序显示,该菌的 rDNA-ITS 区 PCR 产物序列长度为 529 bp,与灰葡萄孢菌 (*Botrytis cinerea*, GenBank 登录号为 AJ716294)有 99% 同源性。因此,我们将该病原菌鉴定为灰葡萄孢菌 (*Botrytis cinerea* Pers.)。灰葡萄孢菌的分生孢子梗和分生孢子如图 2 所示。

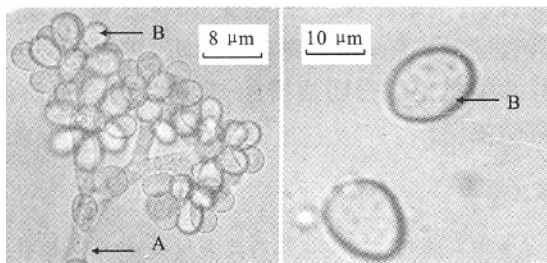


图 2 灰葡萄孢菌的形态

A. 分生孢子梗(10×10); B. 分生孢子(10×40)。

2.3 黑斑病

症状:主要是从叶尖或叶缘开始发病,初期呈开水烫伤状,然后向叶片中央扩展,形状为“V”形或不规则形,一般为暗褐色,病健交界明显,几个病斑汇合成片引起叶片枯死;或是病害向枝条发展,引起枝条或植株死亡。潮湿天气,病叶容易腐烂穿孔,有时在病叶或病枝上长出墨绿色的霉状物。

病原:病原菌在 PSA 培养基上极易生长,菌落圆形、等径长,初无色,后变成墨绿色;菌丝细长,淡色至褐色。分生孢子梗簇生或单生,比菌丝粗壮,淡褐色到褐色,直立或呈屈膝状弯曲,不分枝,大小为 $(31.2 \sim 125.0) \mu\text{m} \times (3.7 \sim 6.3) \mu\text{m}$ 。分生孢子卵形或倒棍棒形,基部钝圆,有纵横分隔,一般纵或斜隔 0~6 个,横隔 3~6 个,孢身大小为 $(17.5 \sim 42.5) \mu\text{m} \times (8.7 \sim 17.5) \mu\text{m}$,平均大小为 $33.21 \mu\text{m} \times 10.7 \mu\text{m}$ 。喙的大小为 $(5.0 \sim 41.3) \mu\text{m} \times (3.7 \sim 6.3) \mu\text{m}$ 。

PCR 测序显示,该菌的 rDNA-ITS 区 PCR 产物序列长度为 565 bp,与长柄链格孢菌株 (*Alternaria longipes* EGS30-033, GenBank 登录号为 AY751457)有 99% 的同源性。因此,我们将该病原菌鉴定为长柄链格孢菌 (*Alternaria longipes* Ellis et Everhart)。长柄链格孢的分生孢子梗和分生孢子如图 3 所示。

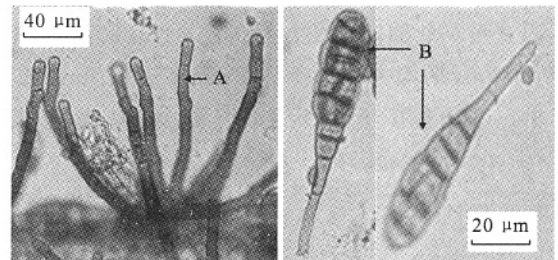


图 3 长柄链格孢的形态

A. 分生孢子梗(10×10); B. 分生孢子(10×40)。

2.4 斑枯病

症状:发病初期叶片局部呈不规则的皱缩,然后渐渐干枯成圆形或近圆形病斑,直径约 2~9 mm,天气湿度较大时,病斑呈深褐色;遇上干燥的天气,病斑多呈灰白色。后期,病斑上生有很多排列不规则的小黑点,即病原的分生孢子器,分生孢子器在叶面生长,初埋生,后突破寄主表皮。严重发生时,多个病斑汇合,导致叶片大面积焦枯。

病原:病原菌在 PSA 培养基上生长极为缓慢,组织分离 5~6 d 才长出菌落,菌落为灰色,主要以颗粒状的分生孢子器存在。分生孢子器球形或近球形,直径约为 50~118 μm ,有孔口,孔口圆形,暗褐色,居中。分生孢子针形至线形,无色透明,微弯曲,有 1~4 个隔膜,大小为 $(16.2 \sim 43.8) \mu\text{m} \times (1.2 \sim 2.0) \mu\text{m}$ 。

PCR 测序显示,该菌的 rDNA-ITS 区 PCR 产物序列长度为 527 bp,与大豆褐纹壳针孢 SGMI-1 菌株 (*Septoria glycines* isolate SGMI-1, GenBank 登录号为 AY826767)有 99.2% 的同源性。因此,我们将该病原菌鉴定为大豆褐纹壳针孢 (*Septoria*

glycines)。大豆褐纹壳针孢的分生孢子器和分生孢子如图4所示。

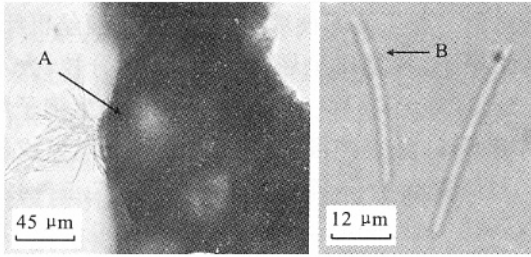


图4 大豆褐纹壳针孢的形态

A. 分生孢子器(10×10); B. 分生孢子(10×40)。

2.5 炭疽病

症状: 主要引起枝梢黄褐色枯死, 后期在病部上形成小黑点。很少看见在叶片上发生。

病原: 病原菌的菌落为白色, 后期可形成粉红色的孢子团。分生孢子盘色深, 大小为 $87.5 \mu\text{m} \sim 175.0 \mu\text{m}$ 。分生孢子长椭圆形, 两头钝圆, 无色、单胞, 具1~3个油滴, 大小为 $(9.6 \sim 16.8) \mu\text{m} \times (3.1 \sim 6.0) \mu\text{m}$, 平均大小为 $14.98 \mu\text{m} \times 5.26 \mu\text{m}$ 。如图5所示。我们初步鉴定该病原菌为炭疽菌属 (*Colletotrichum* sp.) 的一种。

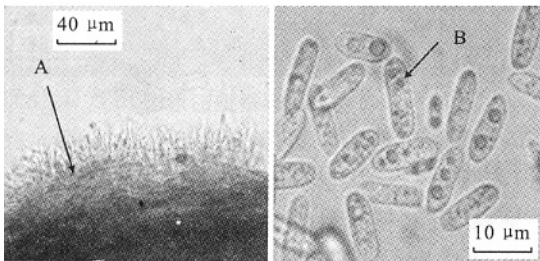


图5 炭疽菌的形态

A. 分生孢子盘(10×10); B. 分生孢子(10×40)。

2.6 锈病

症状: 为害一点红的叶片和茎秆。叶面病斑初呈青黄色, 后颜色逐渐变黄, 病斑逐渐增多, 使整张叶面呈青黄的斑驳状; 叶背面可见铁锈色疱状物, 即病原菌的夏孢子堆, 夏孢子堆破裂后露出粉状物即夏孢子, 初期为锈黄色, 后期呈灰色。茎秆上的病斑初期呈疱状突起, 后期破裂呈溃疡状。

病原: 夏孢子堆有包被, 外形近球形至杯形, 大小为 $(100 \sim 225) \mu\text{m} \times (130 \sim 230) \mu\text{m}$ 。夏孢子成串形成, 排列整齐, 近圆形或呈方块状, 成熟时为灰白色, 大小为 $(14.4 \sim 32.5) \mu\text{m} \times (12.2 \sim 20.2) \mu\text{m}$; 夏孢子壁双层, 有明显的细疣, 厚度为 $1.3 \sim 4.5 \mu\text{m}$; 有两个芽孔。未见冬孢子。夏孢子堆和夏孢子如图6所示。我们初步鉴定该病原菌为鞘锈菌属 (*Coleosporium* sp.) 的一种。

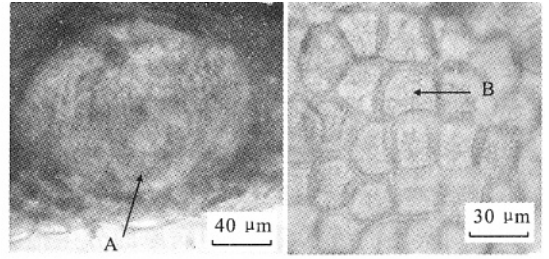


图6 鞘锈菌的形态

A: 夏孢子堆(10×10); B: 夏孢子(10×40)。

3 结束语

目前, 生物物种鉴定的趋势是传统分类与分子生物学方法分类相结合。在一点红病害病原真菌鉴定上, 我们遵循了这一原则, 在传统的形态特征分类鉴定的基础上, 尽可能地结合了分子生物学的方法进行鉴定。但由于时间关系, 我们只对斑点病菌, 灰霉病菌、黑斑病菌和斑枯病菌进行了 rDNA-ITS 区的测定及鉴定; 有的病原菌还没有进行分子生物学鉴定, 下一步将对炭疽病等病害的病原菌进行分子生物学方法的鉴定。

经田间调查及病原鉴定, 我们初步明确了广西一点红发生的主要真菌性病害有斑点病等6种, 这些病害均为国内首次报道。但是, 田间调查结果还表明, 除了以上6种真菌性病害以外, 一点红还有细菌性、病毒性病害, 甚至新的真菌性病害, 因此, 病害调查和病原鉴定工作还要继续进行。

一点红病害的病原菌鉴定仅仅是病害研究工作的一部分, 病害的发生规律和防治技术需要更进一步的研究, 特别是斑点病是一点红的主要病害, 它危害期长(有两个高峰期, 分别在5~7月和10~11月份), 枝叶被害枯死, 损失非常严重, 必须深入研究。这样才能提出综合防治措施, 为病害的有效防治提供科学依据。

参考文献:

- [1] 中华人民共和国卫生部药典委员会. 中华人民共和国药典[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1978: 1-2.
- [2] 刘厚诚. 一点红及其栽培技术[J]. 长江蔬菜, 2002(11): 12.
- [3] 李春瑶, 温霓梅. 一点红的茎叶培养和植株再生[J]. 植物学通报, 1993, 10(4): 53.
- [4] 方中达. 植病研究法[M]. 第2版. 北京: 农业出版社, 1979: 189-190.
- [5] 王云章, 庄剑云. 中国真菌志: 锈菌目[M]. 北京: 科学出版社, 1998: 4-22.
- [6] 白金铠. 中国真菌志: 球壳孢目[M]. 北京: 科学出版

社,2003:179-181.

- [7] 吴文平,张志铭. 炭疽菌属 (*Colletotrichum* Cda.) 分类学研究 I: 属级分类和名称[J]. 河北农业大学学报, 1994, 17(2): 24-29.
- [8] 吴文平,张志铭. 炭疽菌属 (*Colletotrichum* Cda.) 分类学研究 II: 种的划分[J]. 河北农业大学学报, 1994, 17(2): 31-37.
- [9] 陆家云. 植物病原真菌学[M]. 北京: 中国农业出版社, 2001: 248-454.
- [10] 魏景超. 真菌鉴定手册[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1982: 204-427.
- [11] 赵杰. ITS 序列分析及其在植物真菌病害分子检测中的应用[J]. 陕西农业科学, 2004(4): 35-37.
- [12] 赵国柱, 张天宇, 张猛. 核糖体基因簇在真菌系统学研

究中的意义[J]. 生命化学, 2002, 22(1): 13-15.

- [13] BERNARD PAUL. ITS region of *Pythium canariense* sp nov, its morphology and its interaction with *Botrytis cinerea* [J]. FEMS Microbiology Letters, 2002, 208(1): 135-141.
- [14] BERNARD PAUL. *Pythium terrestris*, a new species isolated from France, its ITS region, taxonomy and its comparison with related species [J]. FEMS Microbiology Letters, 2002, 212(2): 255-260.
- [15] 易润华, 朱西儒, 周而勋. 简化 CTAB 法快速微量提取丝状真菌 DNA[J]. 湛江海洋大学学报, 2003, 23(6): 72-73.

(责任编辑: 韦廷宗)

(上接第 182 页)

健壮, 所以, 林下表土+草皮灰+农家肥按 100: 30: 20 比例混合的配方 a₂ 较适合苗木生长要求, 效果也显著, 是本次育苗试验中营养土配方的最佳选择。

因素 C 对本试验影响不大。14 cm×20 cm 的营养杯规格稍大, 使用会造成不必要的浪费; 10 cm×16 cm 的营养杯规格偏小, 苗木生长至两个月后, 根部容易在杯内卷曲或易穿杯; 12 cm×18 cm 的营养杯规格, 基本满足于短期内培育大叶栎杯苗生长要求, 是本次育苗试验营养杯规格的合理选择。

致谢

参加本试验部分工作的尚有邓艳、秦元丽同志,

在此一并致谢。

参考文献:

- [1] 中国树木志编委会. 中国主要树种造林技术[M]. 北京: 农业出版社, 1978.
- [2] 广西林业局, 广西林学会. 阔叶树种造林技术[M]. 南宁: 广西人民出版社, 1980.
- [3] 北京林学院. 数理统计[M]. 北京: 中国林业出版社, 1979.

(责任编辑: 韦廷宗)