

天津市新型月季叶枯病病原菌鉴定及生物学特性研究

冯友仁, 刘宝生, 白鹏华

(天津市植物保护研究所, 天津 300381)

摘要:以天津市某花圃栽培中发现的一种新型病害为研究对象,采用形态特征观察、致病性测定及 rDNA-ITS 测序、比对研究方法,对其进行了病原鉴定,并对病原菌的生物学特性进行了简单研究。结果表明:该菌株在 PDA 培养基上 4 d 菌落直径达到 34.6~37.2 mm,具明显的灰白色轮纹。分生孢子呈梭形,宽度为 4.83~9.11 μm ,由 5 个细胞组成,细胞间有隔膜,孢子顶端有 2~3 根附属丝,长度约为 5.93~36.23 μm ,尾胞具附属丝 1 根,长度为 2.85~16.05 μm 。其 rDNA-ITS 测序比对结果表明,该菌株与棒状拟盘多毛孢菌 *Pestalotiopsis clavispora* 的同源性达到 99%。基于形态学特征和 rDNA-ITS 测序比对结果,该病原菌被最终鉴定为 *Pestalotiopsis clavispora* (Arth.) Stey., 经检索月季病害,属国内首次发现由棒状拟盘多毛孢菌引起月季叶枯病。生物学特性研究表明,该菌生长最适温度是 25℃,但 20~30℃ 范围内差异不显著;适宜 pH 5.0;最佳碳源为乳糖。

关键词:月季;叶枯病;病原菌鉴定;生物学特性;棒状拟盘多毛孢菌

中图分类号:S 436.8⁺1 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2015)14-0125-05

月季(*Rosa chinensis* Jacq)属蔷薇科蔷薇属植物,原产于中国,17—18 世纪传入欧洲,引起西方园艺学家的重视与兴趣。月季因其花朵硕大、花瓣鲜艳阔厚、花香清新醉人而深受人们的喜爱,是当今世界花卉市场上十分畅销的花卉品种之一^[1]。月季被我国多个城市定义为市花,在城市园林绿化中被广泛应用,但在种植生长过程中,易受到病虫害危害,出现生长不良、掉叶、萎蔫、甚至死亡的现象,既影响观赏效果,又降低了月季本身的经济价值^[2]。目前文献及报道的月季病害种类有 10 种,其中真菌性病害有 7 种:分别为白粉病、黑斑病、霜霉病、灰霉病、叶霉病、锈病、月季枝枯病;细菌性病害 1 种,为根癌病;病毒病害 1 种;及生理性病因所致的月季缺素症^[3]。

2013 年下半年,天津市植物保护研究所在天津花圃栽培的月季叶片上发现一种新型病害,发病率接近 40%,其主要症状为病叶多发自下层老叶,从叶尖处向内呈深“V”字型枯黄,病健组织交界处有明显的黄色晕圈。2014 年 5 月底 6 月初,该病害在花圃内大规模爆发,发病率达到 60%以上。为明确该病害是否为病原性

病害,采集了病害标样并开展病原菌鉴定及病原菌相关生物学特性研究。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试一种新型月季叶部病害发现自天津市西青区天津花圃。

1.2 试验方法

1.2.1 病原菌的分离培养 在超净台内,切取病害标样叶片的病健交界处组织,用 70%乙醇消毒 30 s 后以 1%次氯酸钠溶液表面消毒 1 min 后用灭菌水冲洗 3 次,将消毒后病叶切成约 5 mm×5 mm 小块,移入含 PDA 平板培养基的平皿,在恒温 25℃培养箱内培养;待菌落长出后,进行纯化,纯化后在试管斜面上培养,待长出分生孢子盘后置于 4℃冷藏箱中保存。

1.2.2 分离菌的致病性测定 按照柯赫氏法则对分离所得菌株进行致病性测定。采用 2 种接菌方法:1)菌落圆片菌丝接菌法:用 70%酒精棉球将新鲜月季叶片表面消毒,然后用灭菌水冲洗 3 次,把消毒后叶片风干表水分,然后放在灭菌平皿内的湿纱布上,以备接菌。用直径 5 mm 的打孔器取培养 14 d 的菌落圆片,以菌丝面贴于叶片,每叶接种 3 个位点,空白对照为相同大小的 PDA 培养基圆片。2)孢子悬浮液接菌法:用无菌水制备

第一作者简介:冯友仁(1983-),男,硕士,研究实习员,研究方向为植物保护和病虫害生物防治。E-mail:znlfyr@126.com.

收稿日期:2015-03-15

分生孢子悬浮液,把经过 70%酒精棉球消毒、灭菌水冲洗、风干表水的叶片浸泡于孢子悬浮液中 4~5 s,以浸泡无菌水处理的叶片作为空白对照。接菌后的叶片置于灭菌平皿内的湿纱布上,在恒温 25℃ 培养箱内培养、观察发病情况。对上述 2 组接菌处理的发病叶片长出的黑色颗粒物进行镜检、对病叶进行重新分离培养,观察分生孢子及菌落形态。

1.2.3 病原鉴定 菌落观察:将病原菌接于 PDA 平板上,25℃ 恒温培养后,记录菌落形态及颜色等特征;14 d 后观察分生孢子盘和分生孢子形状,并在显微镜下观察分生孢子形状,测量分生孢子及相关特征数值。

1.2.4 病原菌分子技术鉴定 病原菌总 DNA 提取:将病原菌接种于 PDA 平板上培养扩繁,在 25℃ 培养箱中恒温培养 7~10 d,取菌丝体置于洁净灭菌的研钵内中以保鲜膜封存,连同研磨棒一起在 -20℃ 冰箱中冷冻后,放在冰粉上研磨 5~8 min 后,按照真菌中量 DNA 提取试剂盒 (Omega Bio-tek 产品) 方法和试剂提取总 DNA。病原菌 rDNA-ITS 序列 PCR 扩增:采用真菌核糖体 18S rDNA 的通用引物 ITS1 与 ITS4 进行 PCR 扩增,引物序列如下:ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGC-3'), ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3')。25 μL PCR 反应体系包括 10×PCR buffer 2.5 μL,2.5 mmol/L dNTP 1 μL,2.5 U/μL Taq 酶 0.5 μL,模版 DNA 溶液 1 μL,10 pmol/L ITS1 和 ITS4 引物各 1 μL,ddH₂O 18 μL。反应程序为:94℃ 预变性 5 min,94℃ 变性 45 s,55℃ 退火 45 s,72℃ 延伸 45 s,32 个循环,最后 72℃ 延伸 10 min,4℃ 保存。扩增产物电泳检测及测序:用 1% 的琼脂糖凝胶电泳,用凝胶成像仪 (BIO-RAD) 进行观察并照相。PCR 产物委托北京三博远志生物技术有限责任公司进行序列测定。病原菌核糖体 DNA-ITS 序列同源性比较和分析:将病害标样菌株测得序列,运用 GenBank 数据库 (<http://www.Ncbi.nlm.nih.gov/gene/>) 中的 BLAST 工具进行比对分析,判断标样菌株与其近缘菌种同源百分率。用 MEGA 5.2 软件进行比较分析,构建种间系统发育树。

1.2.5 病原菌生物学特性 不同碳源对病原菌生长速率的影响:在 PDA 基础培养基中分别加入含有相当碳的不同碳源:麦芽糖、蔗糖、可溶性淀粉和乳糖,做成不同碳源的固体培养基。在平板培养基上接种直径为 0.5 cm 的月季叶枯病菌菌饼,每处理 3 次重复,置于 25℃ 培养箱中培养,每 24 h 测定菌落直径,连续测量 3 次。比较不同碳源的利用情况。pH 值对病原菌生长速率的影响:PDA 培养基高压灭菌后,在无菌条件下用质量分数 5% 的盐酸和 5% 的氢氧化钠调节 pH 值,试验共设 8 个 pH 值水平:5.0、6.0、6.5、7.0、7.5、8.0、8.5、9.0,每个 pH 值 3 次重复。将直径为 0.5 cm 菌饼分别接种到不同 pH 值的 PDA 培养基上,置于 25℃ 的恒温培养箱

中培养。每隔 24 h 用十字交叉法测量菌落直径 1 次,连续测定 3 次。温度对病原菌生长速率的影响:在无菌条件下,将 0.5 cm 月季叶枯病菌菌饼接种到 PDA 培养基上,于 10~30℃ 内设 5 个温度梯度:10、15、20、25、30℃。每隔 24 h 后,用十字交叉法测量菌落直径,连续测定 3 次。每处理设 3 次重复,取其平均值,分析菌丝生长与温度的关系。

2 结果与分析

2.1 田间症状

由图 1 可以看出,病叶多发自下层老叶,从叶尖处向内呈深“V”字型枯黄,病健组织交界处有明显的黄色晕圈,叶背黄色病斑处散生许多黑色小点,即为病原菌的分生孢子盘。



图 1 天津市花圃内的月季叶枯病病叶

Fig. 1 Infected leaf of rose plant in Tianjin flower nursery

2.2 分离菌致病性测定

由图 2 可以看出,标样分离菌菌落圆片菌丝接菌和孢子悬浮液接菌处理皆能致叶片发病,菌饼接种发病较快且严重,且症状与田间发病症状一致。发病叶片上可明显见到黑色的分生孢子盘,并能从发病叶片再次分离到与所接菌菌株形态一致的病原菌,而空白对照未发病。表明病害标样分离菌株 YTYK1 为该病害的病原菌。

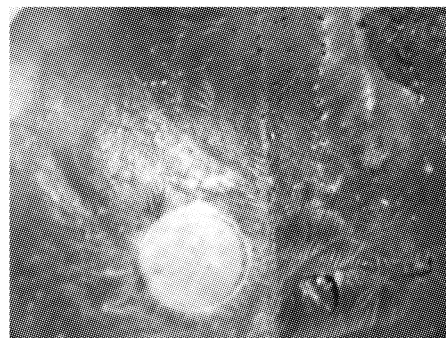


图 2 回接后叶片上明显可见的黑色分生孢子盘

Fig. 2 Black acervulus of pathogen on re-inoculated leaf surface

2.3 病原鉴定

2.3.1 病原菌形态观察 图 3 表明,PDA 培养基上恒

温 25℃ 培养 4 d, 菌落直径达到 34.6~37.2 mm, 菌落圆形, 灰白色、絮状, 反面淡黄色, 有轮纹, 10 d 后开始产孢, 菌落中心出现黑色分生孢子盘。在显微镜下观察, 分生孢子梭形或纺锤形, 部分向一侧略弯曲, 有隔膜 4 个, 中部 3 胞深茶褐色, 两端部单胞色浅; 孢子直径 4.83~9.11 μm , 顶部着生 2~3 根附属丝, 长度为 5.93~36.23 μm , 中间 3 个着色细胞长度为 15.06~22.05 μm 。从图 4 可以看出, 顶胞与尾胞均为半圆形或近三角形, 无色透明。分生孢子基部生有 1 根附属丝, 中生, 长 2.85~16.05 μm 。从病原菌的上述培养性状和分生孢子特征结合相关文献^[4], 课题组认为月季病害标样分离菌株 YJYK1 属盘多毛孢属 (*Pestalotia* de Not. = *Pestalozzia* Cda.)。

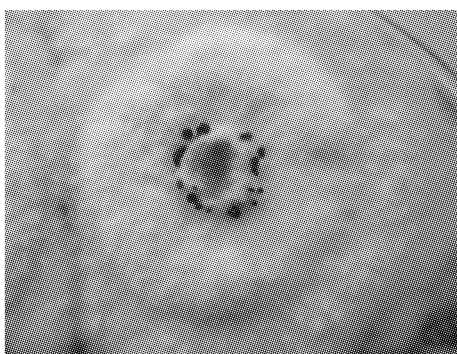


图 3 病原菌在 PDA 培养基的菌落形态

Fig. 3 Colonial morphology of pathogen on PDA medium

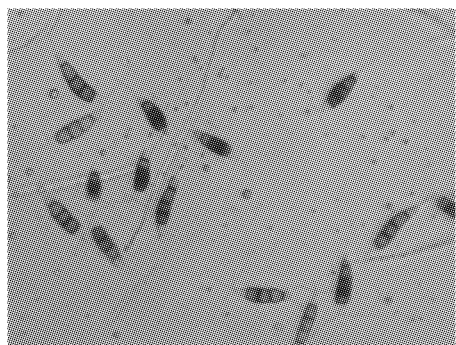


图 4 40×显微镜下分生孢子形态

Fig. 4 Morphology of conidia under 40× microscope

2.3.2 病原菌分子技术鉴定 经 18S rDNA ITS1 和 ITS4 引物对菌株 YJYK1 进行 PCR 扩增和琼脂糖凝胶电泳检测, 获得了 1 条介于 500~600 bp 的清晰条带, 经测序, 其长度为 525 bp。经 GenBank 序列同源性比对, 菌株 YJYK1 与 *Pestalotiopsis clavispora* (Arth.) Stey. 菌株的 18S rDNA-ITS 序列同源性达 99.00%。将病原菌 YJYK1 与 GenBank 中模式菌株 18S rDNA 在序列软件 Mega 5.2 程序中进行比对, 采用 neighbour-joining 法构建系统进化树如图 5。可知从月季病害标样分离出的 YJYK1 菌株的 18S rDNA 及两侧的 ITS 区与模式菌株

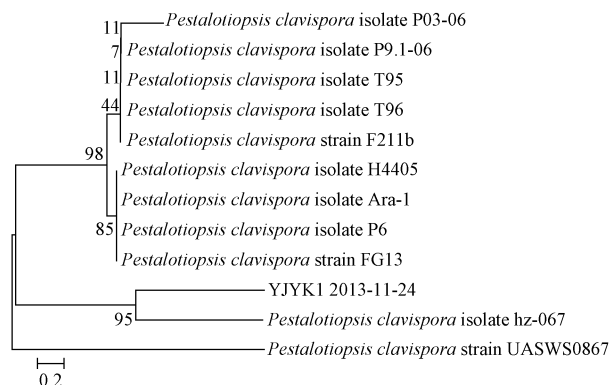


图 5 月季叶枯病菌 YJYK1 与相近种的

18S 基因分子系统树

Fig. 5 18S genetic molecular phylogenetic tree of rose leaf blotch pathogen YJYK1 and related isolates

Pestalotiopsis clavispora isolate hz-067 的同源性为 95%, 引起月季“V”字型叶枯症状的病原菌为棒拟盘多毛孢 *Pestalotiopsis clavispora* (Arth.) Stey.。

2.4 病原菌生物学特性

2.4.1 不同碳源对病原菌生长速率的影响 从表 1 可以看出, 月季叶枯病病原菌对所供试的碳源均可利用, 其中以乳糖效果最好, 麦芽糖、可溶性淀粉次之, 蔗糖生长最差。方差测试结果显示, 供试菌株在乳糖培养基生长速度显著优于其它 3 类培养基, 在研究中可根据实际情况选择相应的碳源。

表 1 不同碳源对病原菌生长速率的影响

Table 1 The influence of different carbon sources on growth rate of pathogen

不同碳源 Different carbon sources	平均净生长量 Average net growth rate/cm			差异显著水平 Significant difference	
	24 h 后	48 h 后	72 h 后	0.05	0.01
麦芽糖	0.42	1.70	2.82	b	B
蔗糖	0.33	1.35	2.68	c	B
可溶性淀粉	0.42	1.60	2.70	bc	B
乳糖	0.72	1.97	3.05	a	A

2.4.2 pH 值对病原菌生长速率的影响 由图 6 可知, 月季叶枯病菌在 pH 5.0~9.0 均能良好生长, 在 pH 5.0

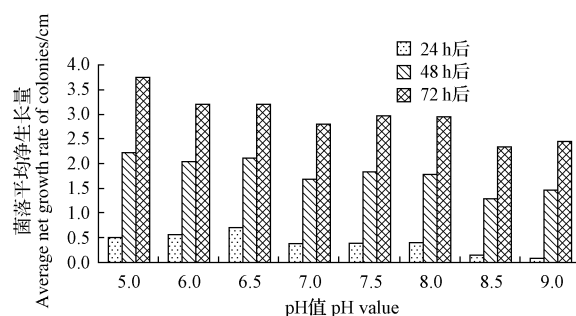


图 6 pH 值对月季叶枯病菌生长速率的影响

Fig. 6 The influence of pH value on growth rate of pathogen

时生长最快,pH 值高于 8.5 后生长速度明显下降。自然配制的 PDA 经 pH 值试纸测定约为 7.0,不需要再额外调节即可满足病原菌生长所需的条件;若在弱酸性条件下,则可加快病原菌生长速率。方差分析表明,pH 值在 5.0~6.5 菌丝生长速率显著高于其它酸碱度条件。

2.4.3 温度对病菌生长速率的影响 从表 2 可以看出,月季叶枯病菌在 15~30℃ 均能良好生长,10℃ 时,生长明显放缓,48 h 内几乎停止生长,25℃ 时,生长速度最快,25℃ 上下随温度变化,生长速率均出现下降。方差分析表明,20~30℃ 时菌丝生长较快;10℃ 时菌丝生长显著低于其它温度处理。

表 2 不同温度对病原菌生长速率的影响

Table 2 The influence of different temperature on growth rate of pathogen

不同温度 Different temperature/℃	平均净生长量 Average net growth rate/cm			差异显著水平 Significant difference	
	24 h 后	48 h 后	72 h 后	0.05	0.01
10	0.20	0.20	0.93	c	B
15	0.53	1.23	1.92	b	AB
20	0.83	1.63	2.85	ab	A
25	0.85	1.90	3.12	a	A
30	0.78	1.67	2.40	ab	A

3 结论与讨论

天津一花圃栽培的月季植株下层叶片上呈“V”字形枯黄的叶片症状是一种侵染性病害,经病原菌形态学及分子技术鉴定结果表明,是棒状拟盘多毛孢 *Pestalotiopsis clavispora* (Arth.) Stey.。该菌属于半知菌类、黑盘孢目、黑盘孢科暗色多孢族、盘多毛孢属 (*Pestalotia* de Not. = *Pestalozzia* Cda.)^[5]。

棒孢拟盘多毛孢 *Pestalotiopsis clavispora* (Arth.) Stey. 与棒孢盘多毛孢 *Pestalotia clavispora* Arth. 为同种异名,此病原菌所致病害称为叶枯病,我国截至 2005 年上半年已报道的寄主为石栗、油桐 2 种寄主植物,分布在广东、广西省^[6]。

周洪英等^[7]在 2006—2008 年对贵阳市设施栽培的切花月季进行了大量的田间病害调查,发现月季常见的真菌性病害有 7 种,*Oidium leucoconium* Des 引起的月季白粉病;*Peronospora sparsa* Berk 引起的月季霜霉病;*Botrytis cinerea* Pers 引起的月季灰霉病;*Actinonema rosae* (Lib.) 引起的月季黑斑病;*Nladosporium cladosporioides* (Fes) 引起的月季叶霉病以及 *Coniothyrium fuckelii* Sacc 引起的月季枝枯病,细菌性病害 1 种,病毒性病害 1 种,生理性病害 1 种。2009 年 6 月山西大同林业规划设计院又对近年来大同地区常见的月季病害调查中^[8]及我国东北地区常见的月季病害报道^[9]中均未见有棒状拟盘多毛孢 *Pestalotiopsis clavispora* (Arth.) Stey. 所致叶枯病害种类报道。由此,分离鉴定的由棒状拟盘多毛孢菌 *Pestalotiopsis clavispora* 侵染所致月季叶枯病可能是我国月季上首次发现并鉴定的一种新病害。

在我国,拟盘多毛孢属真菌作为叶枯病或叶斑病的病原菌到目前为止有许多研究报告:如芒果苗圃叶枯病病原菌^[10] *Pestalotiopsis mangiferae* Steyaert; 龙眼叶枯病病原菌^[11] *Pestalotiopsis pauciseta* Y. X. Chen; 枇杷叶斑病(灰斑病)病原菌^[12] *Pestalotiopsis eriobotriifolia* Chen et Cao; 桂花灰斑病病原菌^[13] *Pestalotiopsis scirrofaciens* Y. X. Chen。这些病菌主要危害叶片,部分能危害嫩梢,花穗,甚至果实。侵染叶片时多从叶缘或叶尖处发生,初为小斑点,后期扩大并连合导致叶片干枯,病斑处散生出黑色的分生孢子盘。在所见报道的拟盘多毛孢种类中,只有斑污拟盘多毛孢 *P. maculans* (A. C. J. Corda) T. R. Nag Raj 的寄主中包含有月季,且只分布在新疆(该菌的同种异名有: *Hendersonia maculans* (Cda) Lev 斑污壳孢菌; *Pestalotia guepini* Desm. 茶褐斑盘多毛孢; *P. maculans* (Corda) Hughes 斑污盘多毛孢; *P. guepini* (Desm.) Stey. 茶褐斑拟盘多毛孢; *Sporocadus maculans* Cda. 斑污盘刺孢)^[6]。

在我国,棒状拟盘多毛孢菌侵染月季致叶枯病害为月季一种新病害。病原菌的生物学特性研究表明,月季叶枯病菌在温度约 25℃,pH 值在 5.0~6.5,碳源为乳糖的培养基中生长可获得最大菌丝量。在研究此病原菌时可采用以上条件对病原菌进行培养。月季是深受人民喜爱的大众花卉,其花大色艳,具有极高的观赏价值和经济价值。生理特性的研究将为全面掌握和深入研究月季叶枯病的发生规律和科学防治提供一定的理论基础。月季作为天津市市花,被广泛运用于城市美化和景观配置,因此有必要对该病害病原学、发病规律以及防治技术开展深入系统研究,为有效控制该病害提供理论依据和技术支持。

参考文献

- [1] 于红革,崔红. 两类月季病害的防治[J]. 中国花卉盆景,2002(8): 32.
- [2] 严桂华,曹萍. 月季主要病虫害及其防治[J]. 现代农业科技,2007(22):94-97.
- [3] 谭鹏,夏兴雷,王彦庆. 月季主要病害的发生与防治[J]. 西北林学院学报,2006,21(1):114-117.
- [4] WEI J G, XU T, GUO L D, et al. Endophytic pestalotiopsis species from southern China[J]. Mycosystema, 2005, 24(4): 481-493.
- [5] 魏景超. 真菌鉴定手册[M]. 上海:上海科学技术出版社,1979.
- [6] 徐梅卿,何平勋. 中国木本植物病原总汇[M]. 哈尔滨:东北林业大学出版社,2008.
- [7] 周洪英,黄承玲,李涛,等. 贵阳市设施栽培切花月季病害种类调查与防治技术研究[C]//中国植物园学术年会暨广西药用植物园 50 岁华诞,2009.
- [8] 苏莲英. 大同市月季病害的发生及防治技术[J]. 内蒙古林业,2009(6):18-19.
- [9] 冯翠萍,李艳琼,纳玲洁,等. 玉溪市月季病害种类调查鉴定与防治技术[J]. 西南园艺,2006,34(2):49-50.
- [10] 丁榕,王延丽,李博勋,等. 芒果拟盘多毛孢叶枯病菌鉴定及其生物学特性研究[J]. 中国南方果树,2010,39(4):20-24.

苹果叶总黄酮的提取及其含量测定

库尔班江·巴拉提¹, 王 萌², 张小莺^{1,2}

(1. 新疆伊犁师范学院 化学与生物科学学院, 新疆 伊宁 835000; 2. 西北农林科技大学 动物医学院, 陕西 杨凌 712100)

摘 要:以“红元帅”苹果的干燥叶子为试材,通过单因素试验确定苹果叶总黄酮的最佳提取工艺条件,采用可见分光光度法对苹果叶中总黄酮含量进行测定,以期为苹果叶中总黄酮提取工艺及含量测定提供方法和依据。结果表明:苹果叶总黄酮的最佳提取工艺条件为乙醇作溶剂,乙醇浓度60%,料液比1:20 g/mL,提取温度为70℃,提取时间为30 min;在选定试验条件下对苹果叶进行含量测定,对芦丁对照品浓度与吸光度进行线性回归,其回归方程为 $Y=24.821\ 43X-0.031$, $R^2=0.999\ 45$ ($n=6$),芦丁对照品质量在4~24 μg 范围内呈良好的线性关系,在此条件下测定苹果叶中总黄酮平均含量为30.28 mg/g。试验优选出了苹果叶中总黄酮的最佳提取工艺条件及含量测定方法,该方法简单、快速、准确,精密度、稳定性、重现性良好。

关键词:苹果叶;总黄酮;提取工艺;含量测定

中图分类号:R 284.2 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2015)14-0129-04

苹果系蔷薇科(Rosaceae)苹果属(*Malus pumila* Mill.)植物苹果的果实,属大宗水果,是我国及全世界上

种植最广、产量最多的果品。新疆苹果资源丰富,已发展成为我国苹果主产区之一^[1-2]。大量的苹果叶大多被废弃或焚烧,不但造成严重的资源浪费而且污染了环境。黄酮类化合物是植物的次生代谢产物,广泛存在于高等植物及啮齿植物的根、茎、叶、花、果实等中,是许多中草药的有效成分。由于其生理活性多样性,近年来,

第一作者简介:库尔班江·巴拉提(1962-),男,维吾尔族,教授,研究方向为中药与天然药物。E-mail:korbanjhon@126.com.

基金项目:国家自然科学基金资助项目(21166024)。

收稿日期:2015-03-15

[11] 赖传雅,李朝生,韦迎春,等. 龙眼叶枯病菌疏毛拟盘多毛孢生物学特性研究[J]. 中国南方果树,2013,42(4):84-88.

[12] 孔琼,袁盛勇,刘双芹,等. 枇杷拟盘多毛孢生物学特性研究[J]. 河北

农业大学学报,2010,33(2):84-87.

[13] 徐永辉,邹燕敏,蔡平,等. 桂花拟盘多毛孢灰斑病生物学特性研究[J]. 上海农业科技,2008(4):83-84.

Pathogen Identification and Biological Characteristics of Rose Leaf Blotch in Tianjin

FENG Youren, LIU Baosheng, BAI Penghua

(Tianjin Institute of Plant Protection, Tianjin 300381)

Abstract: Taking one disease on leaf of *Rosa chinensis* that found in Tianjin flower nursery as test material, the pathogen was identified through morphological characteristics, pathogenicity and rDNA-ITS sequence analysis, simple biological characteristics research of this pathogen was conducted also. The results showed that fungal colony that developed on PDA was 34.6—37.2 mm in diameter, with concentric rings in white in four days. The conidia was fusiform and 4.83—9.11 μm in diameter, formed by five cells with four transverses; the apical appendage of conidia was 2—3, 5.93—36.23 μm in length; the basal appendage of conidia was 1, 2.85—16.05 μm in length. The homology of rDNA-ITS sequence between this pathogen and *Pestalotiopsis clavispora* was 99%. Based on the morphological characteristics and rDNA-ITS sequence analysis, the pathogen was finally identified as *P. clavispora*. This was the first report that *Pestalotiopsis clavispora* could cause leaf blotch disease of *Rosa chinensis* Jacq in China. Biological characteristics studies demonstrated that the optimum temperature for growth was 25℃, no significant difference existed in the range of 20—30℃; the suitable pH value was around 5.0; the suitable carbon source was lactose.

Keywords: *Rosa chinensis* Jacq; leaf blotch; pathogen identification; biological characteristics; *Pestalotiopsis clavispora* (Arth.) Stey.