

红花黑斑病菌的分离与鉴定

张 钰, 傅俊范*, 周如军, 严雪瑞

(沈阳农业大学 植物保护学院, 辽宁 沈阳 110161)

摘要: 对辽宁省多个地区的红花黑斑病进行了病害调查, 对病田中采集到的大量病组织进行分离、纯化得到了一种半知菌亚门的链格孢属真菌。在进行了形态学和生长特性等初步研究后, 根据柯赫氏法则, 用该菌接种健康的红花叶片, 最终致使叶片发病, 由此确定红花黑斑病的病原菌为半知菌亚门、从梗孢目、链格孢属真菌红花链格孢菌(*Alternaria carthami* Chowdhury), 在试验中还发现伤口有利于病害的发生。

关键词: 红花黑斑病; 链格孢; 分离; 鉴定

中图分类号: S435.672 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-3268(2008)02-0064-03

红花(*Carthamus tinctorius* L.)属菊科一年生草本药用植物。原产埃及, 我国东北三省以及新疆、河南、四川、浙江等大部分地区均有栽培。红花以花入药, 苦、辛、性温。有活血通经、祛瘀止痛的功效。红花黑斑病是危害红花叶片的主要病害, 分布较广, 红花各产区均有发生。随着辽宁省红花栽培面积的迅速发展, 黑斑病日趋严重, 造成严重减产, 给红花生产带来了巨大的损失。为此, 对辽宁省红花黑斑病发生危害情况进行了调查, 并对该病的病原菌进行了分离、纯化、鉴定, 初步提出该病害的防治方法, 以为该病的进一步研究提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 病害调查及病状观察

于 2006 年对沈阳农业大学药材种植园内及辽宁省内的红花种植地进行了定点、定株、定时地观察记录, 用对角线五点取样法, 统计调查病株数、病叶数。

1.2 病害标本的采集

红花黑斑病的病害标本于 2006 年 6 月采于沈阳农业大学药材种植园。

1.3 病原菌的分离、培养及鉴定

将田间采回的病叶, 用清水冲洗干净, 采用常规组织块分离法分离^[1]。用单孢法分离纯化^[2], 根据寄主组织上病菌形态和显微特征进行鉴定。

1.4 接种试验

分别采用离体接种和活体接种 2 种方式接种, 接种浓度为 25×10^4 个/mL, 在离体叶片接种时, 采用叶正喷雾、叶背喷雾、针刺喷雾, 每处理 4 次重复, 以喷施无菌水为对照, 将接种后的叶片置于 25℃ 培养箱内恒温恒湿观察; 室内盆栽试验, 接种浓度及方法同离体接种, 重复 3 次, 以喷施无菌水为对照, 套上塑料袋室内保湿培养。

2 结果与分析

2.1 病害发生情况

调查发现, 人工栽培红花地区均不同程度发生黑斑病, 病田率 100%, 病株率 70% 以上, 病情指数 58.3。地势低洼、排水不畅、防治不及时地块容易流行成灾。病害始发期为 7 月上中旬, 8 月为发病高峰。发病后期病斑连片, 叶片出现干枯、死亡, 严重影响红花的产量。

2.2 病害症状特点

该病主要危害叶片, 也可危害叶柄及茎。发病初期, 叶片上出现暗黑色斑点, 扩大后为圆形或近圆形褐色病斑, 直径 3~12 mm, 同心轮纹不明显, 后期病斑中央坏死。湿度大时病斑两面均可产生灰褐色至黑色霉层, 为病菌分生孢子梗及分生孢子(图 1)。幼苗期发病子叶上有明显病斑, 向下扩展后在胚轴上形成坏死条斑, 子叶凋萎, 植株死亡。

收稿日期: 2007-10-12

作者简介: 张 钰(1981-), 女, 山西繁峙人, 在读硕士研究生, 研究方向: 药用植物真菌病害。

通讯作者: 傅俊范(1958-), 男, 辽宁朝阳人, 教授, 博士生导师, 主要从事药用植物真菌病害和植物病害流行病学研究。

E-mail: fujf@syau.edu.cn

2.3 病原菌鉴定结果

镜检发现大量分生孢子梗和分生孢子。分生孢子梗单生或2~6根簇生,褐色,顶端近无色,基部细胞稍大,不分枝,正直或具1~2个膝状节,有2~10个隔膜,大小为43.0~56.5 μm ×7.5~11.0 μm 。分生孢子单生或2~4个串生,多为倒棍棒状,少数不规则形,大小为62.0~80.0 μm ×20.0~30.0 μm ,孢身至喙部逐渐变细,具横隔膜4~9个,纵隔膜0~6个,喙无色至浅褐色,13.0~47.5 μm ×3.5~6.0 μm , (图2,图3)。参照真菌分类相关文献^[3],确认红花黑斑病病原菌为红花链格孢(*Alternaria carthami* Chowdhury)属半知菌亚门、从梗孢目、链格孢属真菌。

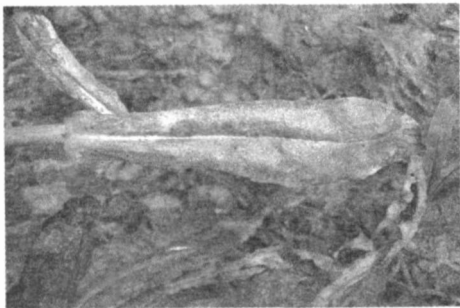


图1 红花黑斑病田间症状

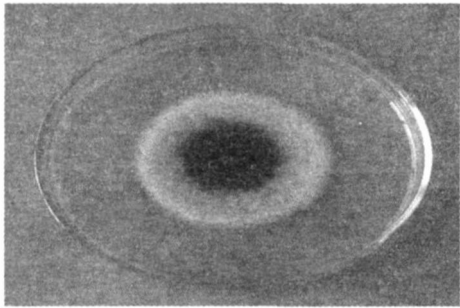


图2 红花链格孢菌落生长状况(3d)

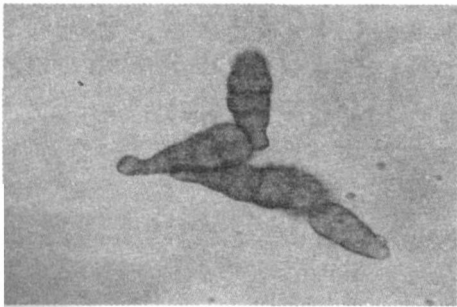


图3 红花链格孢分生孢子

2.4 病原菌培养特征

在PDA培养基上,25℃恒温培养,菌落绒毛状,7d时直径达85mm,并产生大量分生孢子。菌

丝生长初期为白色,随着培养时间的增加菌丝颜色明显加重,培养5~6d后菌丝中部产生大量分生孢子,而外围菌丝较多,分生孢子减少,最终,整个菌落变为墨绿色。

2.5 致病性测定

试验表明:红花链格孢菌经红花叶片伤口与气孔接种均会引起叶片发病(表1)。从伤口接种每叶平均病斑数多,侵染面广,严重度高;气孔接种每叶平均病斑数少,病状较轻;对照则无病斑,这表明在温度为25℃,接种浓度为 25×10^4 个/mL的条件下,伤口有利于病原菌侵入并加重病害发生。从接种后发病叶片的病斑上分离得到同样的病原菌。上述结果充分证明 *Alternaria carthami* Chowdhury 是引起红花黑斑病的病原菌。

表1 红花链格孢菌的致病性测定

| 接种方式 | 是否发病 | 最初发病时间 (d) | 发病率 (%) | 严重度(病斑占 叶片面积)(%) |
|------|------|---------------|------------|---------------------|
| 叶正喷雾 | + | 6 | 32.1 | 18.7 |
| 叶背喷雾 | + | 6 | 35.3 | 19.3 |
| 针刺喷雾 | + | 5 | 48.2 | 29.4 |
| 活体接种 | + | 7 | 45.3 | 13.1 |
| CK | — | — | — | — |

3 结论与讨论

经过对病叶标样的分离、培养、鉴定和接种试验初步确定了红花黑斑病的病原种类,红花链格孢(*Alternaria carthami* Chowdhury)是引起红花黑斑病害的病原菌。本本试验对红花黑斑病病状进行了描述,介绍红花链格孢分生孢子、分生孢子梗及培养性状。本研究采用4种接种方法,均可发病,表明该菌可从叶正、叶背和伤口侵入,伤口最易侵入,发病快而且明显。红花黑斑病在7、8月份危害明显严重。

目前,国内外尚未见有关红花黑斑病害的系统报道。病害侵染过程、侵染循环及病原菌的生物学特性等均不祥,无法满足生产上的防病需求。本研究的目的在于明确红花黑斑病病原菌的种类,危害程度,为认识红花病害提供第一手资料,为开展红花病害的深入研究和提出有效的防治方法奠定基础。为了保障红花种植业的健康发展,应尽快开展有关红花黑斑病病原学、发病规律及防治技术的系统研究,为病害防治提供科学依据。(下转第102页)

策略, 将信号肽(SP)序列插入到 pEGFP-C1 载体 EGFP 编码序列的起始密码子的后面, 利用 EGFP 的起始密码子作为信号肽的第一个氨基酸, 将编码信号肽其余氨基酸的碱基平均分为两段, 反向引物携带前半段碱基, 正向引物携带后半段碱基, 用高保真的 PrimeSTAR HS DNA 聚合酶(TaKaRa)扩增 pEGFP-C1 质粒并保证 PCR 产物末端不出现突出的 A; 然后进行末端磷酸化和高效平滑末端连接, 平滑连接后引物携带的信号肽就导入到 EGFP 的起始密码后面。鸡 Ig λ cDNA 定向克隆于中间载体后构建真核表达载体, 用脂质体瞬时转染 COS 细胞, 荧光显微镜可直接观察到融合蛋白的分泌表达。本研究分别利用鸡 Ig λ 轻链信号肽、小鼠纤溶酶原信号肽构建了鸡 Ig λ 轻链绿色荧光蛋白真核表达载体, COS7 细胞转染结果证明鸡 Ig λ 轻链自身所具有的信号肽序列可以使表达的蛋白有效分泌到细胞外。但是, 小鼠纤溶酶原信号肽不能引导 Ig λ 轻链/GFP 融合蛋白的分泌表达。试验结果说明在真核表达体系中, 信号肽序列对蛋白质向膜外转运有一定影响, 选择合适的信号肽才能促进重组蛋白的分泌表达。

参考文献:

- [1] Sayegh C E, Drury G, Ratcliffe M J H. Efficient anti-

body diversification by gene conversion in vivo in the absence of selection for V(D)J- encoded determinants [J]. EMBO J, 1999, 18 (22): 6319— 6328.

- [2] Conlon T M, Meyer K B. Cloning and functional characterisation of avian transcription factor E2A [J]. BMC Immunol, 2004, 14: 5— 11.
- [3] Rosnet O, Blanco-Betancourt C, Grivel K, *et al.* Binding of free immunoglobulin light chains to VpreB3 inhibits their maturation and secretion in chicken B cells [J]. J Biol Chem, 2004, 279(11): 10228— 10236.
- [4] Fang T, Smith B, Pand Roman C A J. Coventional and surrogate light chains differentially regulate Ig μ and D μ heavy chain maturation and surface expression [J]. J Immunol, 2001, 167(7): 3846— 3857 .
- [5] Magari M, Sawatari T, Kawano Y, *et al.* Contribution of light chain rearrangement in peripheral B cells to the generation of high-affinity antibodies [J]. Eur J Immunol, 2002, 32(4): 957— 966 .
- [6] Vecero-Akbani A M, Heyden N V, Lissy N A, *et al.* Killing HIV-infected cells by transduction with an HIV protease- activated caspase- 3 protein [J]. Nat Med, 1999, 5(1): 29— 33.
- [7] Zhong Ming Qian, Xun Shen. Brain iron transport and neurodegeneration [J]. Trends in Molecular Medicine, 2001(7) : 103— 108.

(上接第 65 页)

参考文献:

- [1] 方仲达. 植病研究方法 [M]. 北京: 中国农业出版社, 1996.
- [2] 孙广宇, 张天宇. 一种简易单孢子分离技术 [J]. 植物检疫, 1996, 10(1): 40.
- [3] 张天宇. 中国真菌志: 链格孢属 [M]. 北京: 科学出版社, 1997: 16.
- [4] 蒋冬花. 佛手黑斑病原菌鉴定及生物学特性研究 [J]. 植物保护, 1997: 23(4).

- [5] 王守正, 王海燕, 李洪连. 植物微生物区系和植物抗病性研究 [J]. 河南农业科学, 2001(5): 20— 23.
- [6] 王洪凯, 张天宇, 张猛. 链格孢属真菌分类研究进展 [J]. 山东农业大学学报, 2001: 32(3).
- [7] 吕印谱, 杨阳, 王建敏. 科学使用农药减少农药残留 [J]. 河南农业科学, 2002(3): 34— 35.
- [8] 张天宇. 中国菊科植物上链格孢属真菌的种 [J]. 云南农业大学学报, 2002: 12(4).
- [9] 侯慧, 徐汉虹, 林壁润. 防治植物病害的农用抗生素的研究及应用 [J]. 河南农业科学, 2003(11): 28— 31.