

一种波斯菊叶枯病新病原菌的分离与鉴定

罗欢, 贾国庚, 范小燕, 刘海峰, 裴东方, 邓建新*, 周燚*

(长江大学农学院, 荆州 434025)

摘要 波斯菊是一种重要的观赏植物,叶枯病的发生影响其生长及市场价值。本文从陕西杨凌地区采集波斯菊病叶,通过保湿培养、单孢分离方法获得2株分离物。将分离菌的纯培养物接种健康寄主植物,发病后再分离的分离物与原接种病原菌菌株特征相同。采用形态学及rDNA-ITS、EF-1 α 和GAPDH基因序列分析相结合的方法对分离菌进行鉴定,结果表明,两株菌株均为侵染向日葵链格孢 *Alternaria helianthiinficiens*。这是国内外波斯菊上 *A. helianthiinficiens* 的首次报道。

关键词 侵染向日葵链格孢; 波斯菊; 叶枯病; 形态学; 多基因序列

中图分类号: S 436.8 文献标识码: A DOI: 10.3969/j.issn.0529-1542.2017.06.032

Isolation and identification of a new pathogen causing leaf blight on *Cosmos bipinnatus*

Luo Huan, Jia Guogeng, Fan Xiaoyan, Liu Haifeng, Pei Dongfang, Deng Jianxin, Zhou Yi

(College of Agriculture, Yangtze University, Jingzhou 434025, China)

Abstract *Cosmos bipinnatus* is an important ornamental plant. The leaf blight disease can affect plant growth and market value. In this study, the causal agent was obtained from diseased leaves by single spore isolation and its pathogenicity was tested to fulfill the Koch's rule. Based on the morphological characteristics and phylogenetic analysis of a combined gene sequence dataset (rDNA-ITS, EF-1 α and GAPDH), the pathogen was identified as *Alternaria helianthiinficiens*. It's the first report of leaf blight disease on *C. bipinnatus* caused by *A. helianthiinficiens* in the world.

Key words *Alternaria helianthiinficiens*; *Cosmos bipinnatus*; leaf blight; morphology; sequence analysis

波斯菊 *Cosmos bipinnatus*, 一年生菊科秋英属观赏植物,原产于墨西哥和南美洲。因其花美叶茂、易栽培,被广泛应用于公园及道路等基础栽植区,环境效益优良^[1]。波斯菊医药潜能巨大,既可作为传统中药材,治疗黄疸、间歇热、脾肿大等疾病,还可作为抗氧化剂,用于DNA氧化损伤治疗^[2]。国内外研究发现,细菌^[3]、植原体^[4]、真菌^[5-8]均可侵染波斯菊。

本文通过对波斯菊叶枯病病叶进行保湿培养,采用单孢分离法分离获得病原菌,依据柯赫法则验证其致病性,最后通过形态学与分子生物学相结合的方法进行种类鉴定,为波斯菊叶枯病的预测预报及防控提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 病原菌的分离

2016年于陕西省西安市杨凌植物园采集波斯菊病叶,切取病健交界处,保湿培养后用无菌玻璃针进行单孢分离,将获得的纯培养物保存于PDA斜面及15%甘油中。

1.2 致病性测定

将分离物的菌丝转接于V8培养基上,在22℃恒温条件下,每天光照8h,培养7d后,用无菌水洗脱分生孢子,过滤后离心,再用灭菌水将滤液配制成孢子悬浮液(10⁵个/mL)。用无菌毛笔蘸取配制好的孢子悬浮液刷在健康的波斯菊叶片上,以无菌水作对

照,室温培养于无菌保湿装置中,观察并记录发病情况。利用相同的方法对发病叶片中的病原菌进行再分离,并与原分离物进行对比,验证柯赫氏法则。重复 3 次。

1.3 病原菌鉴定

选取分离的病原菌菌株 YZU 161169 及 YZU 161170 进行形态学与基因序列分析鉴定。

1.3.1 形态学鉴定

菌落形态: 供试菌株在 PDA 培养基上培养 2~3 d 后用直径 6 mm 的无菌打孔器切取菌落边缘的菌丝块,转接于含 PDA 培养基的 90 mm 培养皿中央,25℃ 恒温黑暗培养 7 d,观察菌落形态、分泌物颜色等,并测量菌落直径。

孢子形态: 挑取少量待试菌株菌丝转接于 PCA (马铃薯 20 g、胡萝卜 20 g、琼脂 20 g、蒸馏水 1 000 mL) 培养基上,在 22℃ 恒温条件下,每天 8 h 光照,培养 7 d 后,观察并记录其分生孢子产孢方式、分生孢子与分生孢子梗的形态、颜色等,并随机测量 50 个成熟分生孢子的大小。

1.3.2 多基因位点序列分析

将供试菌株在 PDA 培养基上培养 5~7 d,刮取适量菌丝用液氮研磨后采取改良 CTAB 法提取 DNA。PCR 扩增和测序所用引物为 ITS5 和 ITS4^[9]、gpd1 和 gpd2^[9]、EF446F 和 EF1473r^[10],均由南京金斯瑞生物科技有限公司提供。用体积为 40 μ L 的 2 \times Taq 预混反应体系进行 PCR 扩增 (Genstar,北京康润诚业生物科技有限公司)。获得

的 PCR 产物在含核酸染料 (GoldenView,北京博迈德基因技术有限公司) 的 1% 琼脂凝胶上电泳后,在凝胶成像系统下成像,扩增产物由北京六合华大基因生物技术有限公司进行纯化,并利用正反引物测序。对获得的正反两个序列进行校正后,将完整的序列利用 BLAST 进行同源性比对分析,再利用 Mega 7.0.26 软件,将本研究序列与其他比对序列的 3 个基因序列拼接合并,最后利用 RaxML 软件构建 ML(maximum likelihood) 系统发育树,以自展法 (bootstrap) 进行检测,1 000 次循环。

2 结果与分析

2.1 波斯菊叶枯病危害症状及致病性测定

波斯菊叶枯病 6 月初开始发病,受高温和多湿气候影响,7 月中旬为发病高峰期。发病初期,病叶多见于植物中下部,受侵染叶片的叶尖部出现褐色坏死,靠近坏死部的叶组织常伴有褪绿现象 (图 1a),条件适宜时病害发展迅速,后期整个叶片黄萎枯死 (图 1b)。根据体视显微镜下观察到的分生孢子形态特征将所获得菌株初步判断为链格孢属真菌。将分离菌株的分生孢子接种于健康波斯菊叶片,接种 24 h 后叶片出现水渍状褐色斑点,2 d 后接种叶片有明显坏死症状,3 d 后整个叶尖大面积枯死 (图 1c),对照组未见发病症状。从接种后发病叶片上再分离的分离物与原接种病原菌菌株特征相同,表明所分离的链格孢是引起波斯菊叶枯病的病原菌。



a: 早期自然发病症状; b: 后期自然发病症状; c: 回接 3 d 后发病症状
a: Early stage of symptom; b: Late stage of symptom; c: Symptom on leaves 3 days after inoculation with spore suspension

图 1 波斯菊叶枯病症状

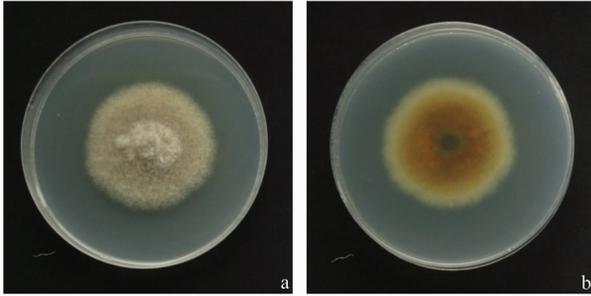
Fig. 1 Leaf blight symptom and pathogenicity tests on *Cosmos bipinnatus*

2.2 病原菌形态特征

选取的两株病原菌 YZU 161169 及 YZU 161170

的菌落形态及孢子形态一致。在 PDA 培养基上,25℃ 黑暗培养 7 d 后的菌落圆形,黄灰色,中央气生

菌丝颜色稍浅、絮状,边缘呈绒毛状(图 2a)。菌落背面中央浅棕色,有黄色色素产生、边缘呈淡黄色(图 2b)。菌落大小为 45~49 mm。



a: 正面; b: 反面
a: Obverse; b: Reverse

图 2 波斯菊病原菌在 PDA 培养基上 25°C 培养 7 d 的菌落形态

Fig. 2 Colony morphology of the pathogen from *Cosmos bipinnatus* on PDA plate at 25°C for 7 days

分离物在 PCA 培养基上的产孢表型如图 3a 所示,分生孢子单生或产生 2 个分生孢子的短链。分生孢子梗单生,直立或弯曲,黄褐色,具隔膜 2~8 个,大小为 $(54\sim 130)\mu\text{m} \times (4.8\sim 6.5)\mu\text{m}$ 。分生孢子倒棒状、长椭圆形或卵形,浅棕色至黄褐色,孢身具 3~8 个横隔膜,横隔膜间常有 1~2 个纵隔膜或斜隔膜,大小为 $(45\sim 90)\mu\text{m} \times (16\sim 23.5)\mu\text{m}$,无喙或有喙。喙圆柱状或丝状,常有 1~3 个隔膜,大小为 $(67\sim 197)\mu\text{m} \times (2.5\sim 5.5)\mu\text{m}$ (图 3b)。

通过形态学比较分析,发现菌株 YZU 161169 及 YZU 161170 的形态学特征与 *Alternaria helianthiinficiens* 一致^[11],形态学研究表明该病原菌为 *A. helianthiinficiens*。



a: 产孢方式; b: 分生孢子形态。比例尺=20 μm
a: Sporulation pattern; b: Conidia. Scale bar=20 μm

图 3 波斯菊病原菌在 PCA 培养基上 22°C 下培养 7 d 的孢子形态

Fig. 3 Conidial morphology of the pathogen from *Cosmos bipinnatus* on PCA plate at 22°C for 7 days

2.3 病原菌分子生物学鉴定

将分离菌株 YZU 161169 和 YZU 161170 的 rDNA-ITS、GAPDH、EF-1 α 基因序列利用 BLAST 进行同源性比对分析,发现各序列与 *Alternaria helianthiinficiens* 的相似度均为 100%,测序结果提交至 GenBank 获得的登录号见表 1。将两株病原菌与其相近种的 3 个基因序列合并分析(共 1197 bp),构建 ML(maximum likelihood)系统发育树,结果显示该病原菌与 *Alternaria helianthiinficiens* 聚为一

簇,bootstrap 支持率为 100%(图 4)。表明波斯菊叶枯病的病原菌为 *A. helianthiinficiens*。

3 结论与讨论

本试验对波斯菊叶枯病病原菌进行了单孢分离、致病性测定、形态学鉴定,以及 rDNA-ITS、GAPDH、EF-1 α 基因序列分析,研究表明:陕西杨凌波斯菊叶枯病的病原菌为链格孢属的 *Alternaria helianthiinficiens*。Simmons^[11]以 Roberts 从向日

葵种子上分离的病原菌为模式菌株建立此种。Vrandecic 等^[12]首次报道其引起克罗地亚地区向日葵叶枯病及茎枯病,发病率 10%~50%。孙霞^[13]在我国新疆及云南两地的向日葵上首次报道此菌,并通过形态学鉴定确定其为侵染向日葵链格孢 *A. he-*

lianthiinficiens, 并指出该种寄生性较强。本研究通过致病性试验发现,如果条件适宜,供试菌株可快速侵染波斯菊致其严重发病。此外,将供试菌株的菌丝块和孢子液接种离体向日葵、苦苣菜及飞蓬叶片,均可侵染导致发病。

表 1 参考菌株的编号、寄主、地理分布及 GenBank 登录号

Table 1 Species and their GenBank accession numbers used in the phylogenetic tree

种 Species	菌株编号 Strain	寄主 Host	来源 Country	GenBank 登录号 GenBank accession number		
				ITS	GAPDH	EF-1 α
链格孢 <i>A. alternata</i>	CBS 916.96	落花生 <i>Arachis hypogaea</i>	印度 India	AF347031	AY278808	KC584634
假格链格孢 <i>A. alternantherae</i>	CBS 124392	茄 <i>Solanum melongena</i>	中国 China	KC584179	KC584096	KC584633
芸薹生链格孢 <i>A. brassicicola</i>	ATCC 96836	甘蓝 <i>Brassica oleracea</i>	美国 USA	JX499031	KC584103	KC584642
芸薹链格孢 <i>A. brassicae</i>	CBS 116528	甘蓝 <i>Brassica oleracea</i>	美国 USA	KC584185	KC584102	KC584641
<i>A. carotiincultae</i>	CBS 109381	胡萝卜 <i>Daucus carota</i>	美国 USA	KC584188	KC584106	KC584645
雪叶莲链格孢 <i>A. cinerariae</i>	CBS 116495	橐吾 <i>Ligularia</i> sp.	美国 USA	KC584190	KC584109	KC584648
侵染向日葵链格孢 <i>A. helianthiinficiens</i>	CBS 117370	向日葵 <i>Helianthus annuus</i>	英国 UK	KC584200	KC584119	KC584661
	CBS 208.86	向日葵 <i>Helianthus annuus</i>	美国 USA	NR077213	KC584120	EU130548
	YZU 161169	波斯菊 <i>Cosmos bipinnatus</i>	中国 China	MF414165	MF414167	MF414169
	YZU 161170	波斯菊 <i>Cosmos bipinnatus</i>	中国 China	MF414166	MF414168	MF414170
日本链格孢 <i>A. japonica</i>	CBS 118390	青菜 <i>Brassica chinensis</i>	美国 USA	KC584201	KC584121	KC584663
葱链格孢 <i>A. porri</i>	EGS 48.147	洋葱 <i>Allium cepa</i>	美国 USA	DQ323700	KC584132	KC584679
苦苣菜链格孢 <i>A. sonchi</i>	CBS 119675	花叶滇苦菜 <i>Sonchus asper</i>	加拿大 Canada	KC584220	KC584142	KC584691

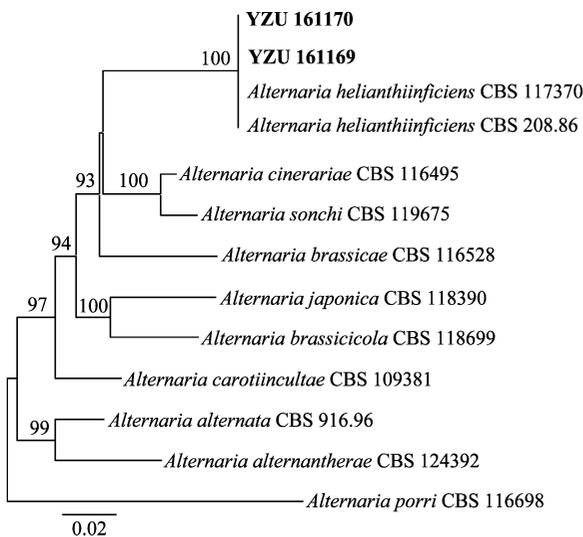


图 4 基于 rDNA-ITS、GAPDH、EF-1 α 基因序列用 ML 方法构建的菌株 YZU 161169 及 YZU 161170 系统发育树

Fig. 4 Phylogenetic tree of the pathogenic strains YZU 161169 and YZU 161170 based on rDNA-ITS, GAPDH, EF-1 α gene sequences

波斯菊是优良的园林绿化材料,其种植面积不断扩大,而病害的发生极大地影响了其观赏价值。目前,国外已报道 *Alternaria cosmosa*^[5], *Cercospo-*

ra fagopyri^[6], *Colletotrichum acutatum*^[7] 和 *Diaporthe stewartii*^[8] 等病原真菌可侵染波斯菊引起病害,其中同为链格孢属的真菌 *A. cosmosa* 引起波斯菊叶枯病在症状上与 *A. helianthiinficiens* 并无明显差异。本研究首次发现并报道了波斯菊为 *Alternaria helianthiinficiens* 新寄主,为该菌引起的波斯菊叶枯病的防治提供了可靠依据。

参考文献

- [1] Kiger R W. *Cosmos* Cavanilles [M]// Flora of North America Editorial Committee. Flora of North America North of Mexico. Volume 21; Magnoliophyta: Asteridae, part 8; Asteraceae, part 3. New York-Oxford: Oxford University Press, 2006: 203-205.
- [2] Jang I C, Park J H, Park E, et al. Antioxidative and antigenotoxic activity of extracts from cosmos (*Cosmos bipinnatus*) flowers [J]. Plant Foods for Human Nutrition, 2008, 63: 205-210.
- [3] Yugo K, Osamu N, Takamichi N, et al. First report of bacterial leaf blight on cosmos (*Cosmos bipinnatus* Cav.) caused by *Pseudomonas cichorii* in Japan [J]. Journal of General Plant Pathology, 2014, 80: 499-503.
- [4] Sawayanagi T, Jung H Y, Komatsu K, et al. Phytoplasma detected from yellow cosmos (*Cosmos sulphureus*) showing

yellows symptoms (abstract in Japanese)[J]. Japanese Journal Phytopathology, 2002, 68: 258.

[5] Deng Jianxin, Lee J H, Paul N C, et al. Occurrence of leaf blight on cosmos caused by *Alternaria cosmosa* in Korea[J]. Plant Pathology Journal, 2015, 31(1): 78 - 82.

[6] Groenewald J Z, Nakashima C, Nishikawa J, et al. Species concepts in *Cercospora*: spotting the weeds among the roses [J]. Studies in Mycology, 2013, 75: 115 - 170.

[7] Kwon J H, Kang S W, Son K E, et al. Anthracnose of cosmos caused by *Colletotrichum acutatum* in Korea [J]. Plant Pathology Journal, 1999, 15: 172 - 174.

[8] Udayanga D, Liu Xingzhong, Crous P W, et al. A multi-locus phylogenetic evaluation of *Diaaporthe (Phomopsis)*[J]. Fungal

Diversity, 2012, 56(1): 157 - 171.

[9] 李河, 周国英, 徐建平. 一种新油茶炭疽病原多基因序列鉴定 [J]. 植物保护, 2015, 41(2): 92 - 96.

[10] 宋博, 徐兵强, 朱晓锋, 等. 南疆红枣黑斑病原鉴定及其保守基因序列分析[J]. 植物病理学报, 2017, 47(3): 411 - 415.

[11] Simmons E G. *Alternaria: an identification manual* [M]. CBS Fungal Biodiversity Centre Utrecht Press (Netherlands), 2007.

[12] Vrandečić K, Jurković D, Čosić J, et al. First report of foliar and stem blight on sunflower caused by *Alternaria helianthii-ficiens* in Croatia [J]. Plant Disease, 2012, 96(11): 1698.

[13] 孙霞. 链格孢属真菌现代分类方法研究[D]. 泰安: 山东农业大学, 2006.

(责任编辑: 杨明丽)

(上接 176 页)

[17] 王明祖, 彭德良, 武学勤. 小麦孢囊线虫病的研究 I. 病原鉴定 [J]. 华中农业大学学报, 1991, 10(4): 352 - 356.

[18] 元晓莉, 彭德良, 彭焕, 等. 基于 SCAR 标记的小麦禾谷孢囊线虫快速分子检测技术[J]. 中国农业科学, 2012, 45(21): 4388 - 4395.

[19] Subbotin S A, Peng Deliang, Moens M. A rapid method for the identification of the soybean cyst nematode *Heterodera glycines* using duplex PCR [J]. Nematology, 2001, 3(4): 365 - 371.

[20] Davis E L, Tylka G L. Soybean cyst nematode disease [J]. The Plant Health Instructor, 2000, DOI:10.1094/PHI-I-2000-0725-0.

[21] 孙玉秋, 许艳丽, 李春杰, 等. 黑龙江省大豆孢囊线虫种群分布和卵密度研究[J]. 大豆科学, 2011, 30(2): 250 - 253.

[22] 刘海勤, 刘泉成, 赵洪海. 大豆孢囊线虫大豆和烟草群体寄生性比较分析[J]. 植物保护, 2016, 42(2): 68 - 73.

[23] 许艳丽, 王丽芳, 战丽莉. 大豆孢囊线虫病研究进展(续一)[J]. 大豆科技, 2010(1): 21 - 24.

[24] 周书其, 王振荣, 高同春, 等. 大豆孢囊线虫危害大豆损失率研究[J]. 植物病理学报, 1990, 20(2): 116.

[25] 车延平. 大豆孢囊线虫的研究进展及其防治现状[J]. 黑龙江科技信息, 2002(10): 25.

[26] Riggs R D, Schmitt D P. Complete characterization of the scheme for *Heterodera glycines* [J]. Journal of Nematology, 1988, 20(3): 392 - 395.

(责任编辑: 杨明丽)

(上接 181 页)

[2] 檀国印, 杨志玲, 袁志林, 等. 白术真菌病害的分离鉴定[J]. 浙江农业学报, 2013(5): 1050 - 1055.

[3] 李小霞, 肖仲久, 李黛, 等. 白术白绢病病原菌的分子鉴定 [J]. 贵州农业科学, 2011(12): 126 - 128.

[4] 鲁鹏, 肖仲久, 李小霞, 等. 白术白绢病菌的生物学特性及杀菌剂对其室内毒力测定[J]. 贵州农业科学, 2010(8): 90 - 93.

[5] 潘兰兰, 郑永利, 吕先真. 白术主要病害的发生及综合治理 [J]. 浙江农业科学, 2006(3): 315 - 318.

[6] 俞永信. 白术铁叶病初步研究[J]. 浙江农业科学, 1974(1): 39 - 42.

[7] 臧少先, 安信伯, 石丽军, 等. 白术根腐病症状类型及病原鉴定[J]. 河北农业大学学报, 2005(3): 73 - 76.

[8] 张礼维. 贵州白术根腐病病原鉴定及防治研究[D]. 贵阳: 贵州大学, 2015.

[9] 刘凡. 白术根腐病原鉴定、生物学特性和防治研究[D]. 雅安: 四川农业大学, 2012.

[10] 桑维钧, 练启仙, 宋宝安, 等. 贵州省白术真菌病害种类调查及防治[J]. 贵州农业科学, 2006(3): 40 - 41.

[11] 黄力刚. 白术主要病害的发生与防治[J]. 现代农业科技, 2005(2): 19 - 20.

[12] 宋涛. 药用植物白术主要病害的综合防治[J]. 吉林农业, 2015(9): 96.

[13] 沈立荣, 庞阿土, 陈集双. 白术纹枯病研究初报[J]. 植物保护, 1993, 19(3): 28 - 29.

[14] 胡琼波. 白术白绢病发生规律与防治研究[D]. 长沙: 湖南农业大学, 2002.

[15] 张璨. 几种杀菌剂对西藏设施蔬菜立枯病菌的室内毒力测定 [C]//中国植物病理学会. 中国植物病理学会 2012 年学术年会论文集, 2012: 492.

[16] Grichar W J. Management of stem rot of peanuts (*Arachis hypogaea*) caused by *Sclerotium rolfsii* with fungicides [J]. Crop Protection, 1995, 14(2): 111 - 115.

[17] 张献强, 黎起秦, 甘启范, 等. 防治茉莉白绢病的药剂筛选研究[J]. 安徽农业科学, 2010(10): 5152 - 5154.

(责任编辑: 杨明丽)