洛阳地区牡丹3种主要叶部病害病原菌的分离与鉴定

宣俊好， 张元博， 蒙城功， 彭彪彪， 杨瑞先*

（洛阳理工学院环境工程与化学学院，洛阳 471023）

摘要 为明确引起洛阳牡丹 *Paeonia suffruticosa* 叶部主要病害的病原菌种类及其症状特点，于2016年从洛阳市的4个牡丹种植区采集叶部病害样本，采用组织分离法进行病原菌的分离和纯化，柯赫氏法则回接验证病原菌的致病性，利用形态学与基因序列分析相结合的方法鉴定病原菌的种类。结果表明，洛阳地区牡丹叶部主要病害种类为牡丹红斑病、炭疽病和黑斑病，引起这三种病害的病原菌分别鉴定为枝孢霉菌 *Cladosporium* sp.、胶孢炭疽菌 *Colletotrichum gloeosporioides* 和链格孢菌 *Alternaria alternata*。本研究为牡丹叶部病害的快速诊断与防治提供了理论依据。

关键词 牡丹； 叶部病害； 病原菌； 鉴定

中图分类号： S 436.81 **文献标识码：** A **DOI：** 10.3969/j.issn.0529 - 1542.2017.06.014

Isolation and identification of three main leaf pathogens on tree peony in Luoyang

Xuan Junhao， Zhang Yuanbo， Meng Chenggong， Peng Biaobiao， Yang Ruixian

（*Department of Environmental Engineering and Chemistry*, *Luoyang Institute of Science and Technology*, *Luoyang* 471023, *China*）

Abstract In order to identify the symptoms and pathogens of the main leaf diseases of tree peony, infected leaves were collected from four tree peony-growing regions in Luoyang in 2016. The pathogenic isolates were obtained and purified by tissue isolation method. The pathogenicity was proved by the Koch's rule. The pathogenic isolates were identified based on morphological characteristics and gene sequencing analysis. The results showed that the main leaf diseases on tree peony were red spot, anthracnose and leaf spot. The pathogens of three leaf diseases were identified as *Cladosporium* sp., *Colletotrichum gloeosporioides* and *Alternaria alternata*. This research provides theoretical basis for rapid diagnosis and control of tree peony diseases.

Key words tree peony； leaf disease； pathogen； identification

牡丹 *Paeonia suffruticosa* Andr. 为芍药科芍药属多年生落叶灌木，兼具观赏和药用价值，是我国的传统名花之一，在我国已有一千多年的栽培历史[1]。河南洛阳作为中国牡丹的主要栽培地之一，其栽培历史悠久，栽培面积大，且品种繁多。近年来随着洛阳观赏牡丹和油用牡丹生产面积的扩大，牡丹病害的发生日益突出，严重影响了牡丹的正常生长发育，降低了牡丹的观赏效果和后期开发应用效果[2]，牡丹病害的发生发展已逐渐成为牡丹生产中的重要限制因素。近年来研究表明，牡丹病害大约有20多种，主要以叶部病害为主，多造成牡丹叶片产生病斑和穿孔等症状，严重时危及花和茎秆，甚至导致植株死亡[3]。目前关于牡丹病害的研究多集中于症状的描述，多数病原菌种类的鉴定也仅限于形态学特征的观察。而研究发现利用传统的形态学方法进行植物病原菌的分类鉴定，存在准确性较差的缺点，因此引起牡丹病害发生的病原菌种类的准确鉴定已成为急需解决的问题。

收稿日期： 2017 - 02 - 23 **修订日期：** 2017 - 03 - 11
基金项目： 国家自然科学基金(31500008)；河南省科技厅科技攻关项目(152102210328)
* 通信作者 E-mail：fairy19790805@163.com

基于传统的病原真菌分类和鉴定的局限性，克隆和测序真菌 5.8S rDNA 核糖体基因及其两侧的内转录间隔区(internal transcribed space，ITS 区)基因，根据其基因序列的差异进行真菌菌株的鉴定和系统发育的研究已成为植物病原学的研究热点[4-5]。尤其是真菌的 ITS 区进化速度较快，在不同菌种内高度保守，通过与数据库中同源序列的比较可以确定真菌属种关系，其使用尤为广泛[6-7]。为明确引起洛阳地区牡丹主要叶部病害的病原菌种类和分类地位，本研究从洛阳不同牡丹种植地进行牡丹叶部病害症状的观察和病原菌的分离，同时基于形态学特征和 ITS 序列测定分析准确鉴定病原菌种类，为进一步研究牡丹叶部病害的发病规律、防治措施和牡丹抗病品种的培育提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料

供试植物材料：牡丹叶片病害标本于 2016 年 4—9 月采自洛阳隋唐城遗址公园、中国国花园、国家牡丹园和洛阳理工学院牡丹种植区，通过叶片发病特征加以区别分类，并拍照记录，将症状不同的病叶置于不同自封袋内保存，做好标记，带回实验室用于病原菌的分离。

1.2 方法

1.2.1 病原菌分离

采用组织分离法对牡丹叶部病害进行病原菌分离和纯化[8]。用自来水冲洗病叶，将病健交界处组织剪成 2～3 mm 的小块，75%乙醇消毒后用 10%次氯酸钠溶液浸泡 10 min，再用灭菌水漂洗 3 次后接种在 PDA 培养基上，每皿接种 4 块，25℃恒温培养，待长出菌落后进行纯化，再转接到 PDA 斜面培养基中，并于 4℃冰箱保存备用。

1.2.2 病原菌致病性检验

采集健康的牡丹叶片，自来水冲洗干净后用 75%乙醇擦拭叶片表面后，晾干备用。采用针刺接种法进行病原菌的致病性测定，即将纯化后获得的病原菌转至 PDA 平板，于 25℃培养 7 d 后，用 4 mm 灭菌打孔器在 PDA 平板的菌落边缘均匀切取菌饼，用针轻度刺伤叶片后，取菌饼反贴于伤口处，对照为不接菌的 PDA 培养基。接种后的牡丹叶片置于直径 20 cm 的培养皿内，25℃保湿培养，3 d 后开始观察并记录发病情况。选取菌饼接种处产生明显病斑的叶片，重新分离纯化病原菌，观察与初始分离菌株是否一致。

1.2.3 病原菌鉴定

形态学鉴定：将纯化后的病原菌分离物 MDHB、MDTJ 和 MDYB 接种于 PDA 培养基中，25℃条件下培养 7 d 后，肉眼观察菌落的培养性状，主要包括菌落颜色、表面形状、边缘形状和气生菌丝是否丰盛等特征；同时在光学显微镜下观察病原菌菌丝、分生孢子梗和分生孢子的形态特征。

分子生物学鉴定：采用真菌提取试剂盒(北京索莱宝生物技术有限公司)提取真菌 DNA 基因组，方法详见说明书，提取后的 DNA 置－20℃冰箱保存备用。用真菌通用引物 ITS1(5′-TCCGTAGGTGAACCTGCGCGG-3′)和 ITS4(5′-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3′)扩增病原菌 rDNA-ITS 序列[9]。扩增体系为 50 μL，PCR 反应程序为：预变性 94℃ 5 min；变性 94℃ 30 s，退火 55℃ 30 s，延伸 72℃ 1 min，35 个循环；72℃ 10 min，4℃保存。PCR 扩增产物经 1%琼脂糖凝胶电泳检测，DNA 片段经凝胶回收试剂盒(天根生物工程有限公司)回收，回收产物委托上海生工生物工程公司进行测序。

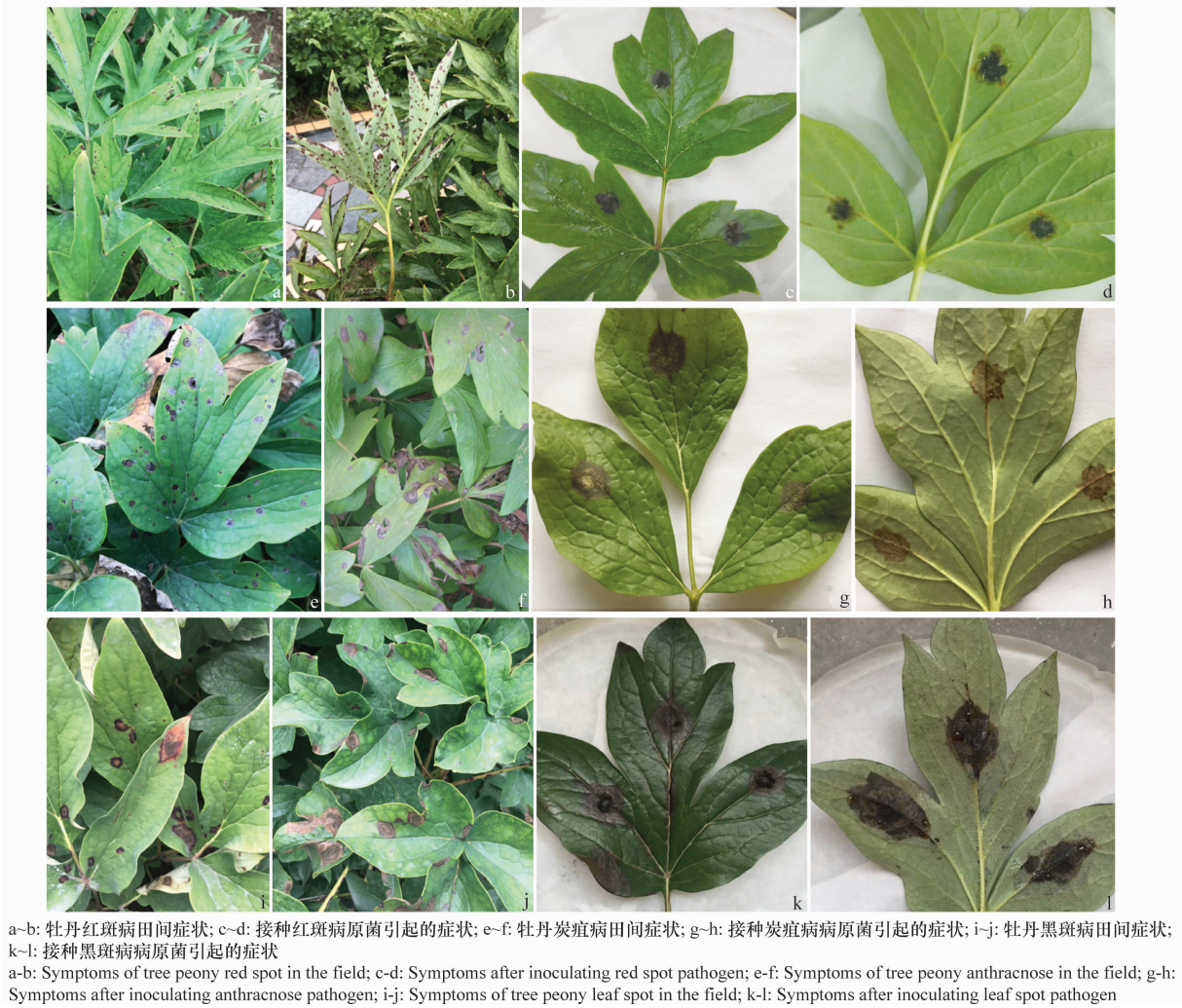
序列分析：利用 Blastn 软件将获得的 ITS 基因序列与 GenBank 数据库中的已知序列进行比较，确定与该菌株亲缘关系最近的种属，并从数据库获得相关种属的序列，用 ClustalX 2.0 软件进行序列的比对排列，利用 Mega 7 中的邻接法(neighbour-joining methods，NJ)构建系统发育树，以确定牡丹病原菌的分类地位。

2 结果与分析

2.1 牡丹叶部病害症状观察

2016 年 4—9 月对洛阳地区牡丹叶部病害症状进行调查发现，其叶部病害主要有三种，分别为牡丹红斑病、牡丹炭疽病和牡丹黑斑病。牡丹红斑病发病初期表现为叶片正、反面皆出现绿色针状小点，病斑逐渐扩展为近圆形或不规则形病斑，病斑中央淡褐色、边缘紫褐色，最后呈现出明显的同心轮纹，病斑直径约 3～30 mm，发病后期病部出现墨绿色霉层(图 1a～b)。牡丹炭疽病发病初期病斑为褐色小点状，以后逐渐扩大成红褐色近圆形或形状不规则的斑块，病斑直径约 4～25 mm，病斑扩展受主脉及大侧脉限制，病斑多为褐色，有些边缘呈黄褐色，中央

灰白色,后期发病严重时叶缘部位成片出现半圆形病斑,中央会出现穿孔症状(图 1e～f)。牡丹黑斑病发病时叶片上出现褐色至灰黑色近圆形病斑,病斑直径约为 5～10 mm,可观察到淡淡的轮纹,中央略泛灰白或出现较深的黑褐色,后期发病严重时造成叶片穿孔和脱落,甚至是植株的死亡,空气湿度大时在叶片发病部位出现黑色霉层,即病原菌的分生孢子(图 1i～j)。



a～b: 牡丹红斑病田间症状; c～d: 接种红斑病原菌引起的症状; e～f: 牡丹炭疽病田间症状; g～h: 接种炭疽病病原菌引起的症状; i～j: 牡丹黑斑病田间症状; k～l: 接种黑斑病病原菌引起的症状

a-b: Symptoms of tree peony red spot in the field; c-d: Symptoms after inoculating red spot pathogen; e-f: Symptoms of tree peony anthracnose in the field; g-h: Symptoms after inoculating anthracnose pathogen; i-j: Symptoms of tree peony leaf spot in the field; k-l: Symptoms after inoculating leaf spot pathogen

图 1　牡丹叶部病害的症状特征和致病性测定

Fig. 1　Symptoms of tree peony leaf disease and results of pathogenicity

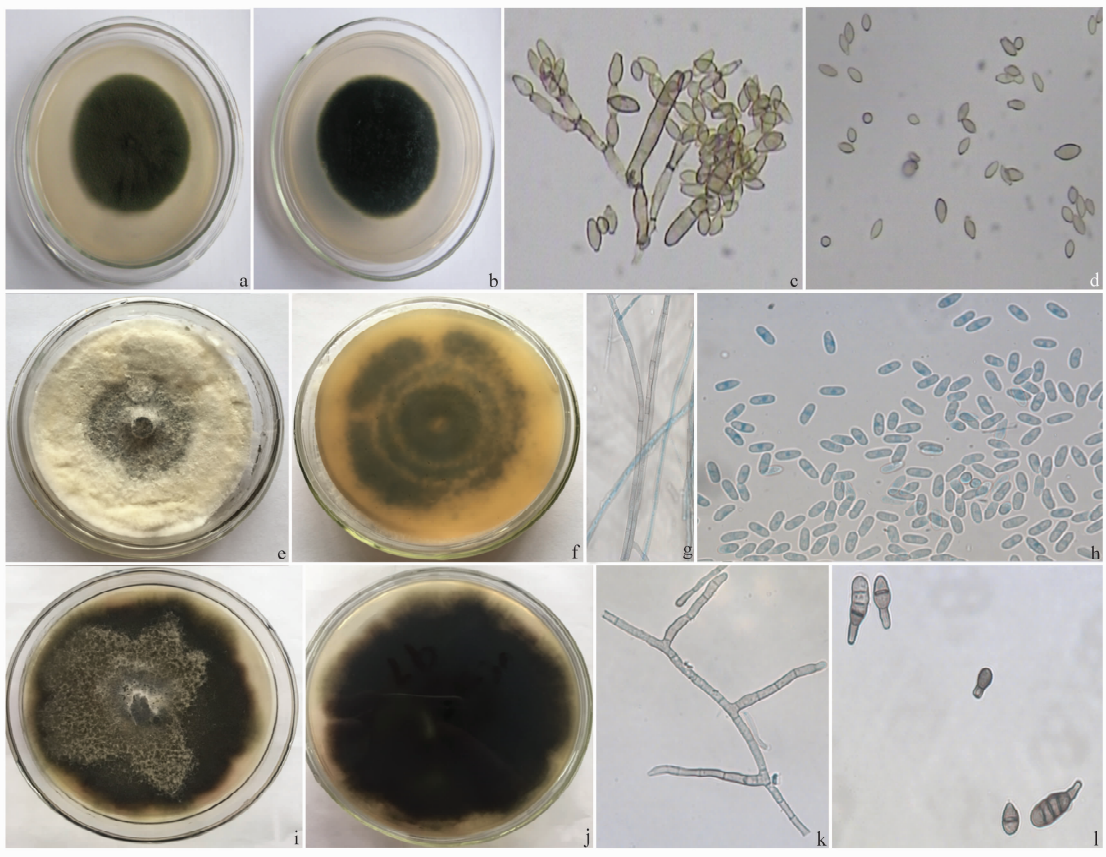
2.2　牡丹叶部病害病原菌致病性检测

牡丹病原菌 MDHB 接种健康牡丹叶片 3 d 后,菌饼周围开始出现病斑,病斑慢慢扩大,5 d 后移除菌饼,可观察到病斑为紫褐色,病部有墨绿色霉层出现(图 1c～d)。MDTJ 接种健康叶片 5 d 后,开始出现症状,7 d 后移除菌饼,可观察到病斑正面为灰褐色,背面为浅褐色,且仅在接种处出现病斑,病斑扩散不明显,在接种叶片的背面可观察到明显的粉红色分生孢子团(图 1g～h)。接种分离物 MDTJ 后 2 d即可观察到菌丝扩散,5 d 后移去菌饼,病斑扩散较为明显,病斑正面呈现黑褐色,病斑背面可观察到明显的黑色霉层(图 1k～l)。对照处理的叶片均没有出现发病症状。将接种分离物后的发病叶片进行病原菌的再分离,均获得与接种供试菌株培养性状相同的病原菌,表明从离体牡丹叶片上分离的病原菌为原接种病原菌。

2.3　病原菌菌落与形态学特征

将三种牡丹病害的病原菌分离物 MDHB、MDTJ 和 MDYB 接种于 PDA 平板上,培养 7d 后,牡丹红斑病菌分离物 MDHB 的菌落正面为橄榄绿色,背面呈墨绿色,后期形成星裂状,菌丝短绒状,菌落生长缓慢,菌落边缘有一圈白色菌丝(图 2a～

b)；显微镜下观察发现其菌丝有隔，分生孢子多为长椭圆形，大小不等，呈灰色，分生孢子梗多簇生，有 2～6 个分隔，分生孢子成串着生于分生孢子梗顶端(图 2c～d)。牡丹炭疽病菌分离物 MDTJ 菌落初期为白色，后变为灰白色，气生菌丝绒毛状，前期可产生黑色的分生孢子堆，后期产生橘红色分生孢子团，菌落背面可观察到明显的同心轮纹(图 2e～f)；显微镜下观察发现其菌丝无色有隔，分生孢子无色，单胞，椭圆形或圆筒形，两端钝圆，浅灰色，分生孢子内部有 1～2 个油球(图 2g～h)。牡丹黑斑病菌分离物 MDYB 菌落生长速度快，气生菌丝发达呈长绒状，菌落正面初为白色，后渐变为暗褐色，中央为灰绿色，菌落背面呈暗褐色至黑色(图 2i～g)；显微镜下观察发现其菌丝暗色有隔，分生孢子梗暗褐色，单生或数根丛生，有分支，直立或弯曲，顶生分生孢子，分生孢子单生或链状着生，卵形，长椭圆形或倒棍棒形，淡褐色，1～4 个纵、斜隔膜和 3～8 个横隔膜，分隔处略缢缩或不缢缩(图 2k～l)。根据病原菌菌落、菌丝和分生孢子的形态特征初步将牡丹红斑病菌分离物 MDHB、牡丹炭疽病菌分离物 MDTJ 和牡丹黑斑病菌分离物 MDYB 归于枝孢霉属 *Cladosporium*、刺盘孢属 *Colletotrichum* 和链格孢属 *Alternaria* 真菌。



a~b: 牡丹红斑病菌菌落特征; c~d: 牡丹红斑病菌分生孢子梗和分生孢子特征; e~f: 牡丹炭疽病菌菌落特征; g~h: 牡丹炭疽病菌菌丝和分生孢子特征; i~j: 牡丹黑斑病菌菌落特征; k~l: 牡丹黑斑病菌菌丝和分生孢子特征
a-b: Colonies of red spot pathogen; c-d: Conidiophores and conidia of red spot pathogen; e-f: Colonies of anthracnose pathogen; g-h: Mycelia and conidia of anthracnose pathogen; i-j: Colonies of leaf spot pathogen; k-l: Mycelia and conidia of leaf spot pathogen

图 2　牡丹病害病原菌的菌落、菌丝和分生孢子形态特征

Fig. 2　Morphological characteristics of colonies, mycelia and conidia of the pathogenic fungi causing tree peony diseases

2.4　病原菌 ITS 序列系统发育分析

利用真菌鉴定通用引物 ITS1/ITS4 对 3 个病原菌分离物基因组 DNA 进行 PCR 扩增，测序后均获得约 500 bp 的 ITS 序列，将获得的序列提交至 GenBank，得到分离物 MDHB、MDTJ 和 MDYB 的 ITS 序列登录号分别为 KY398831、KY398833 和 KY398832。利用 Blastn 软件进行序列同源性比对，结果表明，牡丹红斑病菌分离物 MDHB 与枝孢霉属 *Cladosporium* sp.(KR492688)序列同源性为 99%；牡丹炭疽病菌分离物 MDTJ 与胶孢炭疽菌 *Colletotrichum gloeosporioides*

(AY266374)序列同源性为 100%;牡丹黑斑病菌与链格孢菌 *Alternaria alternata*(KX016032)序列同源性为 100%。从 GenBank 数据库中选取与 3 种牡丹病害病原菌分离物序列同源性较高的菌株,构建系统发育树(图 3)。结果发现,系统发育树形成 3 个明显的分支,将三种牡丹病原菌分离物的 ITS 序列显著区分,且分离物 MDHB、MDTJ 和 MDYB 分别与其亲缘关系较近的真菌归为一类。结合形态学特征观察和 ITS 序列系统发育树分析,最终将牡丹 3 种病害的病原菌分离物分别鉴定为枝孢霉菌 *Cladosporium* sp.、胶孢炭疽菌 *Colletotrichum gloeosporioides* 和链格孢菌 *Alternaria alternata*。

3　结论与讨论

目前关于牡丹病害的研究仍存在一定的问题,如一些牡丹病害病原菌种类的不确定性;同时关于牡丹病害病原菌的鉴定也多停留于病原菌形态特征的观察,其鉴定的准确性有待考证。因此本研究调查了洛阳牡丹叶部 3 种主要病害,记录其症状特征、进行致病性测定,经形态学和 ITS 序列鉴定,确定引起洛阳地区牡丹 3 种主要叶部病害红斑病、炭疽病和黑斑病的病原菌分别为枝孢霉菌 *Cladosporium* sp.、链格孢菌 *A. alternata* 和胶孢炭疽菌 *C. gloeosporioides*。

调查发现牡丹红斑病是牡丹生长发育期间危害严重的叶部病害,目前关于牡丹红斑病的报道相对较多,研究认为引起牡丹红斑病的病原菌主要为牡丹枝孢霉 *C. paeoniae*[10-11]。牡丹和芍药是同属种,二者常毗邻栽植,芍药红斑病是危害芍药生长的重要病害,蓝莹和李丽等研究发现引起芍药红斑病的病原菌有 3 种,分别为牡丹枝孢霉 *C. paeoniae*[12]、链格孢 *A. alternata* 和细极链格孢 *A. tenuissima*[13],表明芍药红斑病可能由几种病原菌交叉引起,在不同种植区其病原菌种类有所不同。本研究分离获得的牡丹红斑病原菌其菌落形态与牡丹枝孢霉相同,但 ITS 序列却与牡丹枝孢霉同源性较低,与枝孢霉属未知种序列相似性较高,表明引起牡丹红斑病的病原菌除了牡丹枝孢霉外,枝孢霉属的其他种类也可能参与致病。

植物炭疽菌是广泛分布于热带、亚热带的一种全球性植物病原菌,可以引起禾本科植物、果树、花卉、蔬菜等植物的炭疽病[14],目前关于多种植物的炭疽病已被详细研究[15-17]。牡丹炭疽病在牡丹生长发育期间也广泛发生,为洛阳地区牡丹的主要叶部病害。但关于牡丹炭疽病方面的研究还相对较少,研究者仅描述了牡丹炭疽病的发病症状,将其病原菌归于刺盘孢属真菌[18]。本研究首次将引起牡丹炭疽病的病原菌鉴定为胶孢炭疽菌 *C. gloeosporioides*。胶孢炭疽菌分布和寄主范围广泛,是炭疽菌属最常见的种类,其对植物危害性较大[19]。因此,牡丹炭疽病病原菌的准确鉴定可为该病害的防治提供可靠的依据。

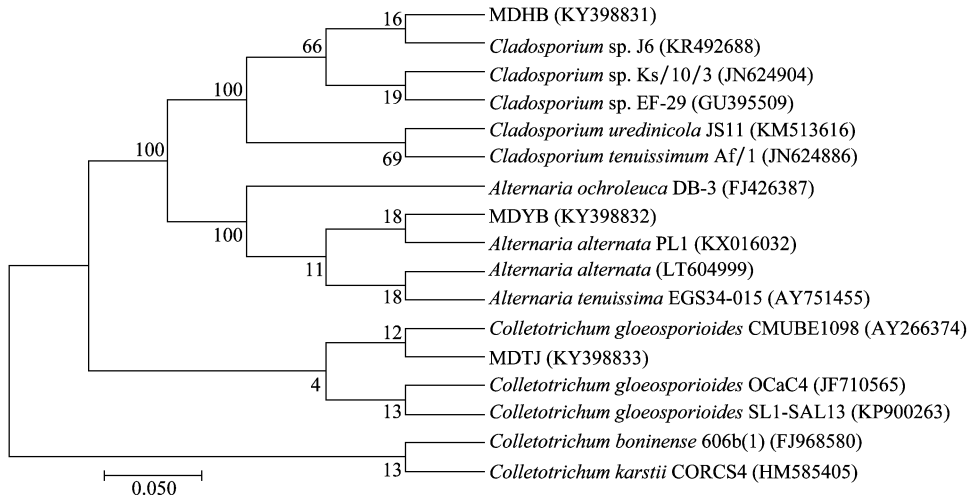


图 3　基于牡丹病原菌 ITS 序列构建的系统发育树

Fig. 3　Phylogenetic relationship of tree peony pathogenic fungi based on ITS gene homology

牡丹黑斑病多在牡丹生长后期发生，且危害严重，主要由链格孢属真菌引起。本研究中分离获得的牡丹黑斑病病原菌为链格孢菌 *A. alternata*，与石良红等[20]的研究结果一致，但笔者在分离病原菌时，还获得了另外一种链格孢菌，经致病性测定，发现也能引起牡丹黑斑病的发生。由于链格孢属真菌多为弱寄生性真菌，对寄主的适应性较为广泛，因此推测牡丹黑斑病可能由多种链格孢属真菌引起，其不同种类链格孢菌的致病性是否存在差异，有待进一步研究。

随着洛阳地区牡丹种植面积的增加，尤其是近几年油用牡丹种植面积的增加，牡丹病害的防控逐渐成为牡丹栽培管理过程中的重要事项，目前有关牡丹病害的基础性研究很少，病害防治以化学防治为主，容易造成环境污染，且易导致病原菌抗病性的增加，因此今后应从病原学和病害流行学入手，明确病害流行发生规律，找出关键防治时期，开展绿色生态防控研究，保障牡丹种植产业健康持续发展；同时，应进一步开展牡丹病害病原菌致病性分析，调查和分析病原菌在不同牡丹品种上的致病性差异，获得抗病性强的品种，为牡丹的抗病育种提供基础和依据。

参考文献

[1] 贾文庆，徐小博，刘会超，等. 牡丹‘乌龙捧盛’组培苗生根及生根解剖学研究[J]. 林业科学研究，2013，26(4)：516－520.

[2] 杨瑞先，刘萍，方站民，等. 牡丹病害研究现状及展望[J]. 河南农业科学，2010，39(11)：138－143.

[3] 段亚冰. 牡丹叶斑病病原真菌鉴定及生物学特性研究[D]. 洛阳：河南科技大学，2009.

[4] Asgari B，Zare R，Zamanizadeh H R，et al. Systematics of *Aspergillus* species of subgenus *Nidulantes* in Iran [J]. Rostaniha，2012，13(2)：126－151.

[5] Scoble J M，Cavalier-Smith T. Scale evolution，sequence phylogeny，and taxonomy of thaumatomonad Cercozoa：11 new species and new genera *Scutellomonas*，*Cowlomonas*，*Thaumatospina* and *Ovaloplaca* [J]. European Journal of Protistology，2014，50(3)：270－313.

[6] 白树猛，田黎. ITS序列分析在真菌分类鉴定和分子检测中的应用[J]. 畜牧与饲料科学，2009，30(1)：52－53.

[7] Porras-Alfaro A，Liu K L，Kuske C R，et al. From genus to phylum：large-subunit and internal transcribed spacer rRNA operon regions show similar classification accuracies influenced by database composition[J]. Applied and Environmental Microbiology，2014，80(3)：829－840.

[8] 方中达. 植病研究方法[M]. 北京：中国农业出版社，1998.

[9] Innisetal M. PCR Protocols：A guide to methods and applications [M]. New York：Academic Press，1990.

[10] 吴玉柱，季延平，刘愚，等. 牡丹红斑病的研究[J]. 林业科学研究，2005，15(6)：711－716.

[11] 石良红，李玲，申宏伟，等. 牡丹红斑病病原鉴定与ITS序列分析[J]. 农学学报，2014，4(10)：32－35.

[12] 蓝莹，赵桂华，郑彭彭. 芍药红斑病的研究[J]. 南京林业大学学报(自然科学版)，1984(1)：16－29.

[13] 李丽，宋淑香，刘会香，等. 山东省芍药红斑病病原菌鉴定[J]. 园艺学报，2016，43(2)：365－372.

[14] 杨友联，刘永翔，刘作易. 炭疽菌属真菌分类学研究进展[J]. 贵州农业科学，2011，39(1)：152－157.

[15] 路梅，杨佳妮，周端琐，等. 佛手炭疽病病原菌的生物学特性研究[J]. 浙江师范大学学报(自然科学版)，2011，34(3)：323－327.

[16] 杨友联，刘永翔，刘作易. 棉花炭疽病的病原鉴定[J]. 贵州农业科学，2014，42(8)：86－91.

[17] 叶云峰，胡凤云，付岗，等. 地榆炭疽病病原菌分离与鉴定[J]. 西南农业学报，2014，27(5)：2249－2251.

[18] 聂彩花. 山西省古县牡丹病虫害种类调查及防治[D]. 晋中：山西农业大学，2014.

[19] 曾大兴，戚佩坤，姜子德. 胶孢炭疽菌的种内遗传多样性研究[J]. 菌物学报，2003，22(1)：50－55.

[20] 石良红，赵兰勇，吴迪，等. 山东牡丹黑斑病的病原菌鉴定与ITS序列分析[J]. 园艺学报，2015，42(3)：585－590.

(责任编辑：田 喆)

(上接84页)

[19] Hall T A. BioEdit：a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT [J]. Nucleic Acids Symposium Series，1999(41)：95－98.

[20] Verkley G J M，Starink-Willemse M，van Iperen A，et al. Phylogenetic analyses of *Septoria* species based on the ITS and LSU-D2 regions of nuclear ribosomal DNA[J]. Mycologia，2004，96(3)：558－571.

[21] 王艳，陈秀蓉，王引权，等. 甘肃省当归褐斑病菌 *Septoria* sp. 生物学特性及其营养利用研究[J]. 中药材，2009，32(4)：479－482.

[22] 王玉庆，杨忠义，杨静，等. 黄土高原半干旱区柴胡种植模式[J]. 应用生态学报，2011，22(3)：825－828.

[23] 王艳，陈秀蓉，王惠珍，等. 六种杀菌剂对当归褐斑病菌室内毒力的测定[J]. 甘肃中医学院学报，2008，25(5)：27－29.

[24] 孙立晨，高郁芳，刘志刚，等. 防治龙胆草斑枯病药剂筛选试验[J]. 植物保护，2006，32(6)：154－156.

(责任编辑：田 喆)