

姜荷花炭疽病病原菌分离与鉴定

赵健¹, 赵志国¹, 李秀娟¹, 张翠萍¹, 区蝉¹, 林萌², 仇硕^{1*}

(1. 广西壮族自治区广西植物研究所, 广西桂林 541006; 2. 桂林市石山绿化试验站, 广西桂林 541001)

摘要: 利用常规组织分离法对姜荷花炭疽病病原菌进行了分离, 并对分离菌株进行培养、纯化、回接和重新分离, 最后利用形态学和分子生物学技术对致病菌株进行了鉴定。结果表明: 从感病叶片中分离得到 6 株病原菌, 病原菌室外回接发现只有菌株 Cum-3 致病, Cum-3 室外回接致病率 96.7%, 室内回接致病率 100%。形态学鉴定, Cum-3 为镰孢属病原菌, 菌落圆型, 菌丝白色, 有隔膜, 有分枝; 分生孢子有小型、大型和厚垣 3 种。对菌株 Cum-3 进行 ITS 序列分析, 获得全长 528 bp 的序列, 该序列与 Genbank 中已登陆的序列进行相似性分析, 并结合田间致病症状, 认为该致病菌为层出镰孢菌。

关键词: 姜荷花; 炭疽病; 分离; 鉴定

中图分类号: S432 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3142(2011)04-0531-05

Isolation and identification of pathogens that caused *Curcuma alismatifolia* anthracnose

ZHAO Jian¹, ZHAO Zhi-Guo¹, LI Xiu-Juan¹, ZHANG Cui-Ping¹,
OU Chan¹, LIN Meng², QIU Shuo^{1*}

(1. Guangxi Institute of Botany, Guangxi Zhuang Autonomous Region and the Chinese Academy of Sciences, Guilin 541006, China; 2. Limestone Greening Station of Guilin, Guilin 541001, China)

Abstract: The pathogens that caused *Curcuma alismatifolia* anthracnose were isolated using usual tissue isolation. Strains were cultivated, purified, reinoculated in the field and laboratory. The strain that caused the anthracnose was re-isolated. Morphological and molecular biological techniques were used to identify the strain. Results showed that 6 strains were isolated from infected leaves of *C. alismatifolia*, but only Cum-3 caused the anthracnose. The incidences of Cum-3 disease reinoculated in the field and laboratory were 96.7% and 100% respectively. Cum-3 is a kind of fungi belonging to the genus *Fusarium*, and its colonial morphology is a circular form, with white mycelium, diaphragms and branches. There are three kinds of conidia: microconidia, macroconidia and chlamydoconidia. At last, the sequence of internal transcribed spacer (ITS) region of Cum-3 was analyzed, the length was 528bp and the sequence was compared with other species in the Genbank. The symptom in the field indicates that the pathogen of *Curcuma alismatifolia* anthracnose is *Fusarium proliferatum*.

Key words: *Curcuma alismatifolia*; anthracnose; isolation; identification

姜荷花 (*Curcuma alismatifolia*) 是姜科 (Zingiberaceae) 姜黄属 (*Curcuma*) 多年生热带球根花

卉, 原产于泰国清迈一带, 现在美国、荷兰、日本、中国等有种植, 是优良的鲜切花和盆栽花卉 (张锦兴,

收稿日期: 2010-08-17 修回日期: 2010-07-05

基金项目: 广西自然科学基金(桂科自 0991225); 广西植物研究所基本科研业务费项目(桂植业 09018, 桂植业 09008)[Supported by the Natural Science Foundation of Guangxi(0991225); Science Research Foundation of Guangxi Institute of Botany(09018, 09008)]

作者简介: 赵健(1963-), 男, 广西玉林人, 副研究员, 主要从事园林植物的引种栽培及开发工作, (E-mail) zhaoj@gxib.cn.

* 通讯作者 (Author for correspondence, E-mail: qiushuo001@163.com)

1997;刘启云,2005;林金水等,2003)。目前,国内外对姜荷花的栽培管理、切花保鲜、组培快繁、新品种培育等研究已有很多报道(Supuk等,2006;Kanok等,2004;叶秀仙等,2007;陆奎眉,2006;牟小翎等,2006)。据研究报道,姜荷花易感染枯萎病(Morita等,1996;Kunopagan等,2005)、炭疽病(Supuk等,2007)和叶斑病(Takeuchi等,1994)等病害,这些病害严重影响切花的产量和品质,他们还还对致病病原菌分别进行了鉴定,而国内未见有关姜荷花病原菌分离与鉴定的报道。我们观察发现姜荷花发生的炭疽病发病症状与Supuk等(2007)报道的姜荷花炭疽病发病症状不同,而病原菌是否相同还需要对其分离和鉴定。为此,我们对姜荷花炭疽病病原菌进行了分离和纯化,并利用形态学及分子生物学的方法进行了初步鉴定,旨在为该病害的有效防治提供一定理论依据。

1 材料与方 法

1.1 植物材料

姜荷花品种‘清迈粉’(*Curcuma alismatifolia* Chiang Mai Pink),2009年1月从广东东莞引进,种植于广西植物研究所花卉中心苗圃。

1.2 实验方法

1.2.1 病原菌的分离、纯化 2009年8月,从发病的姜荷花植株上采下病叶后,参照常规组织分离法(方中达,1995)分离。冲洗干净,在叶片的病健交界处切下5 mm×5 mm的小块,用75%的酒精消毒30 s,再用0.1%浓度的升汞溶液消毒90 s后,用无菌水冲洗干净后移置于PDA培养基上,每个培养皿(直径9 cm)放5~6个材料,25℃恒温条件下培养,待长出菌丝后(7 d),在各菌落边缘用无菌接种针分别挑取约2 mm×2 mm带有菌丝的培养基一块,移于PDA培养基上,编号,继续放入25℃恒温条件下培养。

1.2.2 病原菌的回接及重新分离 (1)田间回接:选择健康植株的叶片,利用解剖刀轻轻割伤叶片上表面,面积约5 mm×5 mm,取培养基中生长良好的病原菌菌落(约5 mm×5 mm),利用透明胶布粘附到已割伤的叶片部位,长菌落的一面贴向叶片,以无菌的PDA培养基作对照,每个处理5株,各1片叶子,每个叶片粘贴2个菌落,共计10个菌落,重复3次。7 d后统计感病菌落和发病率,发病率=感病菌落

数/接种菌落数×100%。数码相机拍照(型号: Cannon IXUS 870)。(2)室内回接:对田间回接致病的病原菌进行室内回接。选择健康植株的叶片,洗净、无菌水冲洗,剪取大约7 cm×8 cm大小的叶片置于铺有4层吸水纸的培养皿(直径9 cm)中,利用解剖刀轻轻割伤叶片上表面,面积约5 mm×5 mm,取培养基中生长良好的病原菌菌落(约5 mm×5 mm),以无菌的PDA培养基作对照,每个处理3个叶片,每个叶片粘贴4个菌落,重复3次。4 d后统计感病菌落和发病率,发病率=感病菌落数/接种菌落数×100%。数码相机拍照(型号: Cannon IXUS 870)。(3)重新分离:对田间回接致病病原菌进行再次分离,分离方法同1.2.1。

1.2.3 病原菌的形态学鉴定 挑取生长良好的病原菌菌落,大小约2 mm×2 mm,置于含有PDA的培养皿(直径9 cm)中,25℃恒温条件下培养,2 d后观察菌丝体、分生孢子的形态,光学显微镜(型号: DIGICLASS)拍照,同时测量分生孢子大小(长×宽)及菌丝直径。根据真菌鉴定手册(魏景超,1979)对病原菌进行初步鉴定。

1.2.4 姜荷花炭疽病病原菌分子生物学鉴定 DNA的提取:微波炉法提取DNA(Cobb等,1994)。PCR扩增:采用真菌通用引物对ITS1/ITS4进行PCR扩增(White等,1990)。测序与比对:PCR产物的纯化和测序由上海生工生物工程有限公司完成,将所得序列与GenBank(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)中核酸数据进行BLAST分析,利用Clustal X2.0进行比对,通过MEGA4x1进行UP-GMA分析生成系统发育树。通过同源性分析对病原菌种进行分子水平鉴定(李若瑜等,2002)。

2 结果与分析

2.1 病原菌的分离和纯化

从感病叶片中分离得到6株病原菌,编号分别为Cum-1、Cum-2、Cum-3、Cum-4、Cum-5、Cum-6,分别在PDA培养基上纯化3次。

2.2 病原菌的回接及重新分离

分别对Cum-1、Cum-2、Cum-3、Cum-4、Cum-5和Cum-6等6个菌株进行田间回接,7 d后统计发病率(表1),与对照比,只有Cum-3号菌株引起姜荷花发病,发病率96.7%,接种部位中心黑褐色、干枯,周围黄色(图1:d,e),症状表现同田间发病基本

一致(图 1:a, b), 而对照和其它菌株接种后的接种部位生长正常, 无感病症状(图 1:c)。从接种的发病组织中重新分离获得的病原菌, 经纯化培养后, 与接种的病原菌完全一致, 充分表明分离获得的病原菌为该病的病原物。

对田间回接致病的菌株 Cum-3 室内回接, 4 d 后观察, 发现接种 Cum-3 后, 叶片接种部位中心黑褐色, 周围轻微黄色(图 1:g), 而对照(接种 PDA 培养基)接种部位无黑褐色和黄色, 只有水浸状(图 1:f)。统计发现, 菌株 Cum-3 室内回接发病率 100%,

表 1 分离菌株田间回接和室内回接的发病率(%)

Table 1 Disease incidence of isolated strains reinoculated in the field and laboratory

菌株编号 Catalogue accession number	对照(CK)	Cum-1	Cum-2	Cum-3	Cum-4	Cum-5	Cum-6
田间回接 Reinoculation in the field	0	0	0	96.7	0	0	0
室内回接 Reinoculation in the lab	0	×	×	100	×	×	×

“×”代表未进行室内回接试验。

“×” indicated these strains were not reinoculated in the laboratory.

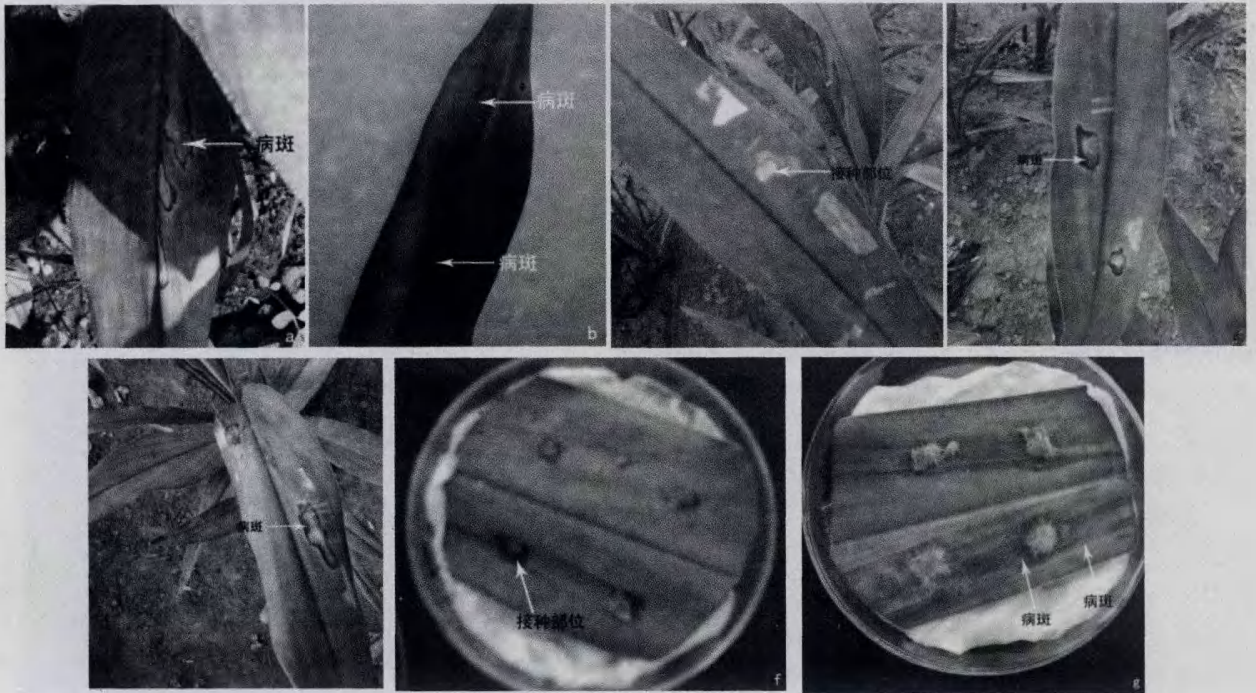


图 1 姜荷花炭疽病田间症状和菌株 Cum-3 田间、室内回接致病症状 a, b: 姜荷花炭疽病田间症状; c: 对照(PDA 培养基)田间回接; d, e: Cum-3 田间回接症状; f: 对照室内回接; g: Cum-3 室内回接症状。

Fig. 1 Symptoms of *Curcuma alismatifolia* anthracnose in the field and that of reinoculated in the field and in the lab of Cum-3 a, b: symptoms of *Curcuma alismatifolia* anthracnose in the field; c: control (PDA medium) in the field; d, e: symptoms of reinoculation of Cum-3 in the field; f: control (PDA medium) in the lab; g: symptoms of reinoculation of Cum-3 in the lab.

而对照部位发病率为 0。

2.3 病原菌的形态学鉴定

病原菌在 PDA 培养基上, 25 °C 恒温条件下培养 2 d 即可长出白色绒毛状菌落, 菌丝向上生长、气生, 菌落白色, 圆型(图 2:a), 菌落背部中心无色或粉红色(图 2:b)。菌丝生长较快, 转接 2 mm × 2 mm 的菌落 2d 后, 产生分生孢子, 4d 后菌落直径

4.0~4.5 cm; 菌丝无色, 有隔膜(图 2:c), 直径为 2.5~10.5 μm, 有分枝; 产生分生孢子, 其中小型分生孢子, 卵圆形, 卵形或椭圆形等, 散生, 单胞、无隔(图 2:d), 大小为(9.7~18.2) μm × (4.6~7.4) μm; 大型分生孢子散生于气生菌丝上(图 2:e), 具有尖而弯曲的顶细胞和具有小柄的基部细胞, 有隔膜 1~3 个; 菌丝上还产生厚垣孢子, 顶生(图 2:f)。对照植

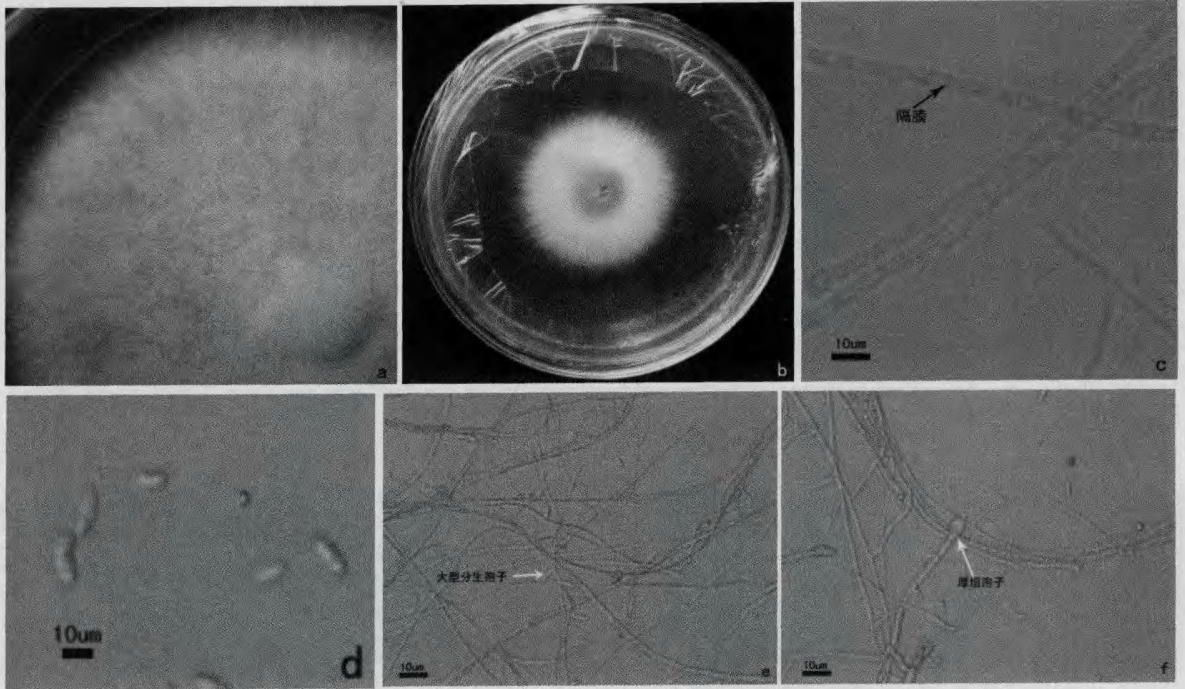


图 2 病原菌形态 a,b:菌落; c:菌丝; d:孢子; e:大型分生孢子; f:厚垣孢子。

Fig. 2 Morphology of pathogen a,b:colonial morphology; c:the mycelium; d:the microconidia; e:the macroconidia; f:the chlamydospores.

物真菌鉴定手册(魏景超,1979),初步判断该致病病原菌为半知菌类镰孢酶属病原菌,但还不能断定具体种类。

2.4 病原菌的 ITS 区的序列系统发育分析

将菌株 Cum-3ITS rDNA 的 PCR 扩增产物测序、校对、剪切和拼接,获得全长 528 bp 序列(图 3)。将序列与 GenBank 中相关数据进行同源性分析,并构建了系统发育树(图 4),结果表明,该菌的 ITS 与已登陆的 *Gibberella moniliiformis* (GQ168841) 和 *Fusarium proliferatum* (GQ167232) 两种菌株的 ITS 序列同源性均在 99% 以上。

3 结论与讨论

徐秀德等(2008)报道,玉米鞘腐病原菌为层出镰孢菌(*Fusarium proliferatum*),病害主要发生于叶鞘部位,形成不规则褐色腐烂状病斑,后期形成黑褐色。串珠赤霉菌(*Gibberella moniliiformis*),主要使玉米内核和穗腐烂(马秉元等,1998; Mathan 等,2008),对叶片没有危害。串珠赤霉菌菌丝与分生孢子不产生厚垣孢子,这一特征与本文研究菌丝产生少量厚垣孢子的结果不一致。而姜荷花炭疽病



图 3 姜荷花炭疽病菌的 ITS PCR 产物琼脂糖凝胶电泳图
Fig. 3 Electrophoresis of PCR products of rDNA ITS of the sweet *Curcuma alismatifolia* anthracnose

症状主要表现为初期病斑表现为褐色、周围黄色,形状不规则;后期发展为整片叶子甚至全株黑褐色、烧焦状、干枯、死亡,这证明引起姜荷花炭疽病的病原菌是层出镰孢菌。Abbas 等(1998)在美国阿肯色州发现层出镰孢菌可引起水稻鞘腐病,Abdalla 等(2000)认为该菌还可引起许多其它植物病害。

姜荷花枯萎病病原菌为青枯病菌(*Ralstonia solanacearum*) (Morita 等,1996; Kunopagan 等,2005),叶片炭疽病病原菌是香蕉炭疽菌(*Colletot-*

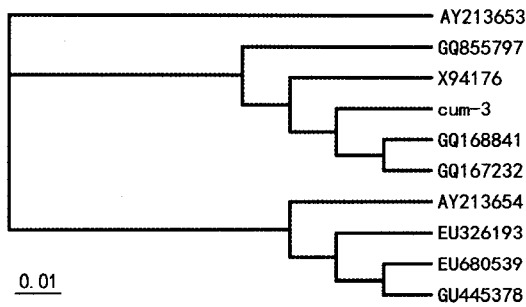


图 4 菌株 cum-3 及其近源属种的聚类分析树状图
Fig. 4 Phylogenetic tree of isolate cum-3 and its homologous based on ITS sequences AY213654 (*Fusarium annulatum*); GQ855797 (*Botryosphaeria dothidea*); X94176 (*F. fujikuroi*); GQ168841 (*Gibberella moniliformis*); GQ167232 (*F. proliferatum*); AY213653 (*F. acutatum*); EU326193 (*G. fujikuroi*); EU680539 (*Sordariomycete* sp.); GU445378 (*F. oxysporum*)

trichum musae (Supuk 等, 2007), 花苞片和叶片叶斑病是由顶孢霉属的一种菌 (*Acremonium* spp.) 引起的 (Takeuchi 等, 1994)。本文运用形态学和分子生物学手段, 对姜荷花炭疽病病原菌进行鉴定发现, 结合该病原菌对植物致病症状, 认为该病原菌是由层出镰孢菌引起的, 这与泰国学者 Supuk 等 (2007) 年报道的炭疽病病原菌不同, 他们发现由香蕉炭疽菌引起的姜荷花叶片炭疽病最初症状是花瓣出现极小的水浸状, 然后扩大呈中间棕褐色、周围暗黑色斑状, 随后在花茎上形成棕褐色溃疡等症状, 而本研究中姜荷花发生的炭疽病发病初期表现为叶片出现褐色斑块, 周围黄色, 随后整个叶片出现褐色斑块, 并呈烧焦状, 直至全株干枯、死亡, 但没有溃疡症状出现, 这说明应该是不同病原菌引起的姜荷花炭疽病。

参考文献:

方中达. 1998. 植病研究方法[M]. 北京: 中国农业出版社
牟小翎, 李文金, 王均华, 等. 2006. 姜荷花的组织培养和快速繁殖[J]. 北方园艺, 28(5): 23
林金水, 陆奎眉. 2003. 姜荷花生长习性与其栽培技术的研究初报[J]. 福建热作科技, (3): 13-15
刘启云. 2005. 姜荷花的特征特性与栽培技术[J]. 甘肃农业科技, (1): 34-35
魏泉超遗著. 1979. 真菌鉴定手册[M]. 上海: 上海科学技术出版社
张锦兴. 1997. 栽植密度、遮光、种球大小对姜荷花生产之影响[J]. 中国园艺(台北), 43(1): 61-71
Abbas HK, Cartwright RD, Shier WT, et al. 1998. Natural occurrence of Fumonins in rice with *Fusarium* sheath rot disease[J]. *Plant Disease*, 82(1): 22-25
Abdalla MY, Al-Rokibah A, Moretti A, et al. 2000. Pathogenicity

of toxigenic *Fusarium proliferatum* from date palm in Saudi Arabia[J]. *Plant Disease*, 84(3): 321-324
Cobb BD, Clarkson JM. 1994. A simple procedure for optimizing the polymerase chain reaction (PCR) using modified Taguchi methods[J]. *Nucleic Acids Res*, 22: 3 801-3 805
Kanok B, Saichol K, Wouter G. 2004. Postharvest physiology of *Curcuma alismatifolia* flowers[J]. *Postharvest Biol Tech*, 34(2): 219-226
Kunopagan J, Thongwai N. 2005. Growth inhibition of microbes causing wilt in *Curcuma alismatifolia* by antagonistic bacteria [C]. 31st Congress on Science and Technology of Thailand at Suranaree University of Technology
Lu LM (陆奎眉). 2006. Effects of harvest treatment and other methods on the vase life of cut *Curcuma alismatifolia* (姜荷花切花采后处理方法对其瓶插寿命的影响)[J]. *Chin Agric Sci (中国农学通报)*, 22(11): 258-262
Li RY (李若瑜), Li DM (李东明), Yu J (余进), et al. 2002. Recent advances in medical mycology (真菌与真菌病研究近况)[J]. *J Peking Univ: Health Sci (北京大学学报·医学版)*, 34(5): 559-563
Ma BY (马秉元), Long SS (龙书生), Li YL (李亚玲), et al. 1998. Identification and pathogenicity of the pathogens of corn ear of kernel rot (玉米穗粒腐病的病原菌鉴定及致病性测试)[J]. *Acta Phytophylacica (植物保护学报)*, 25(4): 14-18
Mathan A, Balabaskar P, Kuruchev V. 2008. *In vitro* evaluation of fungitoxicity of selected natural products on heavy inoculum and conidial germination of *Fusarium moniliforme* [J]. *Indian Phytopath*, 61(2): 238-242
Morita Y, Yano K, Tsuchiya K, et al. 1996. Bacterial wilt of *Curcuma alismatifolia* caused by *Pseudomonas solanacearum* [J]. *Protec Shikoku*, 31: 1-6
Supuk M, Nopmanee T, Takashi H, 2006, et al. Genetic transformation of *Curcuma alismatifolia* using retarded shoots [J]. *Plant Biotech*, 23: 233-237
Supuk M, Mondhon S, Robert W C, et al. 2007. Control of antracnose caused by *Colletotrichum musae* on *Curcuma alismatifolia* using antagonistic *Bacillus* spp. [J]. *Am J Agric Biol Sci*, 2(2): 54-61
Takeuchi J, Horie H, Ando K, et al. 1994. Occurrence of bract and leaf spot of *Curcuma alismatifolia* caused by *Acremonium* spp. [J]. *Phytopathological Society Japan*, 60(6): 747
White TJ, Bruns T, Lee S, et al. 1990. Amplification and direct sequencing of fungi ribosome RNA genes for phylogenies[M]// Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ (eds). A Guide to Method and Application. San Diego, New York: Academic Press: 315-322
Xu XD (徐秀德), Jiang Y (姜钰), Wang LJ (王丽娟), et al. 2008. Corn sheath rot—A new disease found in China (玉米新病害——鞘腐病研究初报)[J]. *Sci Agric Sin (中国农业科学)*, 41(10): 3 083-3 087
Ye XX (叶秀仙), Huang ML (黄敏玲), Chen YQ (陈源泉), et al. 2007. Introduction and effects of different harvest way on the yield and quality of new bulb of *Curcuma alismatifolia* (姜荷花引种 适应性及不同采切方式对种球生产的影响)[J]. *Subtrop Plants Sci (亚热带植物科学)*, 36(2): 36-38