



李鹏飞,潘玉莹,郭子雯,等. 哈尔滨地区早开堇菜叶斑病的病原菌鉴定[J]. 黑龙江农业科学, 2022(9):73-76.

# 哈尔滨地区早开堇菜叶斑病的病原菌鉴定

李鹏飞<sup>1</sup>, 潘玉莹<sup>1</sup>, 郭子雯<sup>1</sup>, 谭可菲<sup>2</sup>, 刘大伟<sup>1</sup>

(1. 东北农业大学 农学院, 黑龙江 哈尔滨 150030; 2. 黑龙江省农业科学院 齐齐哈尔分院, 黑龙江 齐齐哈尔 161000)

**摘要:**早开堇菜(*Viola prionantha* Bunge)又名早花地丁,是一种具有药用价值的多年生草本植物,也是一种美丽的早春观赏植物。2020年在黑龙江省哈尔滨市发现一种早开堇菜叶斑病,为了明确引起这种病害的病原菌,采用组织分离法,对病原菌进行形态学和分子生物学鉴定,再通过柯赫氏法则进行验证。结果表明,引起哈尔滨地区早开堇菜叶斑病的病原菌为楸子茎点霉(*Didymella pomorum*),它的分生孢子单胞无色,长椭圆形,大小为 $4.60\sim 8.06\ \mu\text{m}\times 2.38\sim 3.81\ \mu\text{m}$ ,该病菌在PDA培养基上生长良好,菌丝浓密,呈绒毛状。本研究报道的关于楸子茎点霉引起的早开堇菜叶斑病为首次报道,今后要加强对早开堇菜叶斑病发生规律和防治药剂筛选的研究。

**关键词:**早开堇菜;叶斑病;形态特征;分子鉴定

早开堇菜(*Viola prionantha* Bunge)是堇菜科、堇菜属多年生草本植物,分布于我国东北、华北、西北、西南等地,朝鲜、俄罗斯远东地区也有分布<sup>[1]</sup>。早开堇菜生长在山坡、草地、沟边、宅旁等向阳处。早开堇菜可供药用,能清热解毒、除脓消炎,有较强的抗菌活性;早开堇菜的挥发性成分具有防霉、防腐、抗菌消炎、抗肿瘤、抗突变和增强免疫力等多方面药用功能<sup>[2]</sup>。早开堇菜花色艳丽,耐密植、适应性强,是一种极具开发价值的乡土型早春观花地被植物<sup>[3]</sup>。此外,早开堇菜还有较强的耐盐性<sup>[4]</sup>,对重金属镉(Cd)污染也有较强的耐性<sup>[5]</sup>。

近年来,关于早开堇菜的资源概况、生理特性、药用价值、再生体系建立以及对重金属富集吸收特性等方面的研究越来越多<sup>[6]</sup>,但是关于早开堇菜病害方面的研究鲜见报道。2020年9月,在黑龙江省哈尔滨市香坊区东北农业大学校园内发现早开堇菜的叶片上有许多病斑,发病率达到90%以上,严重影响其观赏价值。本研究采集了早开堇菜的感病叶片,通过组织分离、柯赫氏法则验证、病原菌形态学观察并结合分子生物学鉴定,明确了引起早开堇菜叶部发病的病原菌种类,以

期为该病害的正确诊断和病害防治提供参考依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 田间症状观察与样品采集

2020年9月在黑龙江省哈尔滨市香坊区东北农业大学校园内发现一种早开堇菜叶斑病,对其发病症状、发病部位进行拍照记录,并采集病样带回实验室。

### 1.2 病原菌的分离和纯化

采用组织分离法对早开堇菜叶斑病的致病菌进行分离。用灭过菌的剪刀在病健交界处剪取约 $1.0\text{ cm}\times 0.5\text{ cm}$ 的病组织,用镊子夹取放入75%酒精中消毒1 min,转移至1%次氯酸钠中3 min,最后用无菌水漂洗3次。夹取消毒后的发病组织置于PDA培养基上,每皿3块,5次重复,26℃恒温培养3~4 d,从新长出的菌落边缘挑取少量菌丝接种到新的PDA平板上进行真菌的纯化培养。

### 1.3 形态学鉴定

挑取纯化好的待鉴定菌株的菌丝置于PDA平板上再次进行培养,每天定时观察并记录菌落的生长情况和形态变化。5~7 d后制作水玻片在显微镜下观察菌丝是否有分枝、隔膜以及孢子的形态结构特征,并测量孢子的长度和宽度。

将菌株在PDA平板上活化5 d后,用灭菌的打孔器在菌落边缘打取菌饼( $d=5\text{ mm}$ ),将菌饼分别接种于马铃薯蔗糖琼脂培养基(PSA)、马铃薯葡萄糖琼脂培养基(PDA)、沙氏琼脂培养基(SDA)、胡萝卜琼脂培养基和水琼脂培养基

收稿日期:2022-05-20

基金项目:黑龙江省博士后科研启动金资助项目(LBH-Q19081);东北农业大学2021年大学生SIPT计划创新训练项目(202110224031)。

第一作者:李鹏飞(2001—),男,本科生,专业方向为植物保护。E-mail: 2361894461@qq.com。

通信作者:刘大伟(1983—),男,博士,副教授,硕导,从事植物病害生物防治研究。E-mail: liudawei353@163.com。

(WA) 上,于 26 ℃ 恒温培养,5 次重复,5 d 后采用十字交叉法测量菌落直径。

#### 1.4 分子鉴定

将菌株在 PDA 平板上培养 5 d 后,收集菌丝,采用改良的 CTAB 法提取菌株的 DNA。利用真菌通用引物 ITS1 和 ITS4 进行 PCR 扩增。PCR 反应体系为 50  $\mu$ L,包括模板 DNA 1  $\mu$ L,引物 ITS1 和 ITS4 各 2  $\mu$ L,2 $\times$  Taq Master Mix 25  $\mu$ L,ddH<sub>2</sub>O 20  $\mu$ L。PCR 扩增程序:94 ℃ 预变性 3 min;94 ℃ 变性 1 min,56 ℃ 退火 1 min,72 ℃ 延伸 50 s,32 个循环;72 ℃ 延伸 10 min。PCR 产物在 1% 琼脂糖凝胶上进行电泳检测,产物纯化后送往吉林省库美生物科技有限公司进行测序。

#### 1.5 致病性测定

依据柯赫氏法则,采用涂孢子悬液的方法对病原菌致病力进行测定。选取成熟度一致的早开莖菜健康植株,先用 75% 酒精对叶片表面进行消毒处理,然后用灭菌的接种针刺破叶片表层,取菌液浓度为  $1.0 \times 10^6$  孢子液 10  $\mu$ L 进行接种,以无

菌水为空白对照。置于生物测定箱中 26 ℃ 恒温保湿培养(湿度 80%,L/D = 12 h/12 h),定时观察接菌部位的变化。

## 2 结果与分析

### 2.1 早开莖菜叶斑病田间症状

对具有典型症状的早开莖菜叶斑病观察发现,该病害主要为害叶片,发病初期叶片上出现白色针状斑点,环境适宜时,病斑逐渐向外扩展,近圆形,病斑上常伴有黑色小点。单个叶片上可出现多个病斑,发病后期病斑易造成穿孔。

### 2.2 病原菌菌落特征及显微观察

从哈尔滨地区早开莖菜叶斑病的病样上分离纯化得到一株真菌,菌株编号为 HRBF-01。其形态为:菌落呈圆形,菌丝质密,具隔膜,最初为白色,之后中央菌丝变为橄榄绿或暗褐色,边缘白色,背面黑褐色(图 1A、B)。分生孢子单胞无色,薄壁光滑,长椭圆形,两端钝圆,孢子的大小为  $4.60 \sim 8.06 \mu\text{m} \times 2.38 \sim 3.81 \mu\text{m}$ (图 1C)。

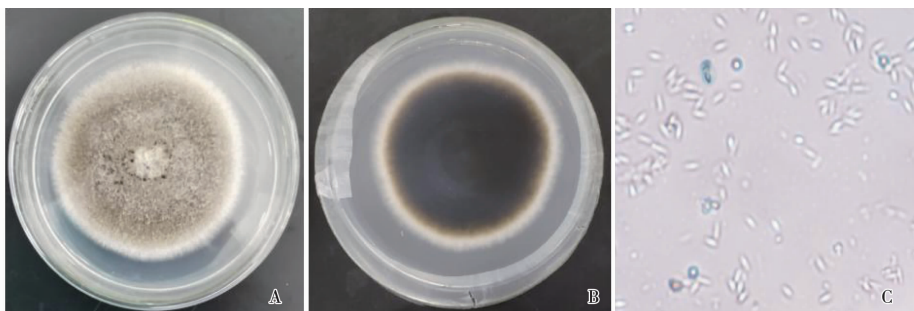


图 1 病原菌 HRBF-01 的形态学特征

### 2.3 病原菌在不同培养基上的生长情况

病原菌 HRBF-01 在不同培养基上的生长速度和菌落特征均有一定的差异(图 2)。

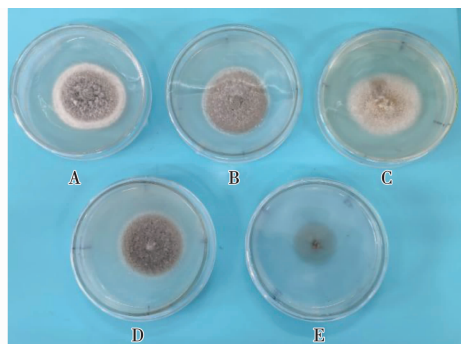


图 2 不同培养基对 HRBF-01 菌落生长的影响

菌落在 PSA、PDA 和 SDA 培养基上的生长速度相似。菌丝浓密,呈绒毛状,菌落在 PSA 和 PDA 上的颜色较深,但在 SDA 上的颜色较浅;菌落在胡萝卜培养基上的生长速度较慢,而在 WA 培养基上,菌落生长稀疏且缓慢。

### 2.4 病原菌分子生物学鉴定

利用真菌 rDNA-ITS 通用引物对病原菌 HRBF-01 的 DNA 进行扩增和序列测定,得到该菌株的有效序列长度为 487 bp。将得到的 ITS 序列在 NCBI 数据库进行同源性比对,结果显示该序列与 *Didymella pomorum* 序列(MH861278.1、KR909147.1)的同源性为 100%。由此可以得出引起早开莖菜叶斑病的病原菌为楸子茎点霉(*Didymella pomorum*)。

## 2.5 病原菌致病性测定

用菌株 HRBF-01 的孢子悬浮液接种早开堇菜健康叶片 7 d 后,接种点出现圆形病斑,初期白色,后逐渐变为褐色,组织坏死,而空白对照组叶片不发病(图 3)。从发病叶片病健交界处再分离得到的菌株与接种菌株相同。



图 3 早开堇菜叶片接种 HRBF-01 的发病情况

## 3 讨论

本研究通过形态学鉴定和 ITS 序列比对后,确定了引起哈尔滨地区早开堇菜叶斑病的病原菌为楸子茎点霉(*Didymella pomorum*),该菌属于囊菌门(Ascomycota)、盘菌亚门(Pezizomycotina)、座囊菌纲(Dothideomycetes)、隔孢菌亚纲(Pleosporomycetidae)、隔孢菌目(Pleosporales)、亚隔孢壳科(Didymellaceae)、亚隔孢壳属(*Didymella*)。该菌最早由德国真菌学家 Thümen 于 1879 年定名为 *Phoma pomorum*,2015 年 Chen 等根据 ITS、LSU、*rpb2* 及 *tub2* 序列和形态学特征,将其更名为 *D. pomorum*<sup>[7-8]</sup>。亚隔孢壳属真菌最早属于球腔菌科,后被归类到孢腔菌科、黑星菌科或格孢腔菌目中分类地位未定的属。2009 年,De Gruyter 等<sup>[9]</sup>为亚隔孢壳分支建立了一个新科,命名为亚隔孢壳科,包括了大多数茎点霉属物种和相关无性属。亚隔孢壳属真菌是一类重要的植物病原真菌,*D. bryoniae* 可引起甜瓜蔓枯病<sup>[10]</sup>,*D. glomerata* 能引起猕猴桃黑斑病<sup>[11]</sup>、中国山茱萸叶枯病<sup>[12]</sup>、华重楼斑枯病等<sup>[13]</sup>。

楸子茎点霉(*D. pomorum*)的寄主植物主要有辣椒、烟草、杏、欧洲甜樱桃、欧洲李、桃等。李海云等<sup>[14]</sup>于 2016 年在进口大豆的豆秆中分离得到 *D. pomorum*,首次报道该菌可侵染大豆,但在早开堇菜上未见相关报道。早开堇菜株型低矮紧凑、花期早且长、花色艳丽丰富、花型美观,是非常好的地被植物。因此,为了更好地展现早开堇菜

的观赏价值,减少由病害带来的不利影响,应该加强对早开堇菜叶斑病发生规律和防治药剂筛选的研究,促进早开堇菜在园林绿化中的应用以及制定栽培管理措施。

## 4 结论

本研究通过对叶斑病病原菌的形态学观察和分子生物学鉴定,确定引起早开堇菜叶斑病的病原菌为 *D. pomorum*,国内外尚未见到有关早开堇菜叶斑病的报道。本研究为早开堇菜病害的准确识别和防治提供了理论基础和指导意见。

## 参考文献:

- [1] 王丽娜. 早开堇菜(*Viola prionantha* Bunge)生活史及其生态适应性的研究[D]. 呼和浩特:内蒙古大学,2009.
- [2] 陈红英. 早开堇菜的挥发性成分分析[J]. 西南科技大学学报,2010,25(3):22-24.
- [3] 段春燕,候小改,张赞平,等. 堇菜属 *Viola* 植物资源的园林开发前景探讨[J]. 中国农学通报,2004,20(5):185-186.
- [4] 骆建霞,孙延辉,周丽霞,等. 盐胁迫对早开堇菜生长及生理指标的影响[J]. 北方园艺,2011(23):15-17.
- [5] 赵景龙,张帆,万雪琴,等. 早开堇菜对铜污染的耐性及其富集特征[J]. 草业科学,2016,33(1):54-60.
- [6] 李俊强,林利华,张帆,等. 早开堇菜组织培养及植株再生体系的建立[J]. 草业学报,2015,24(11):163-173.
- [7] CHEN Q,JIANG J R,ZHANG G Z,et al. Resolving the *Phoma* enigma[J]. Studies in Mycology,2015,82:137-217.
- [8] 陈倩. 亚隔孢壳科的系统演化及分类学研究[D]. 北京:中国农业大学,2015.
- [9] DE G J,AVESKAMP M M,WOUDENBERG J H C,et al. Molecular phylogeny of *Phoma* and allied anamorph genera: Towards a reclassification of the *Phoma* complex [J]. Mycological Research,2009,113(4):508-519.
- [10] 李伟,张爱香,江蛟,等. 甜瓜蔓枯病病原鉴定及其生物学特性[J]. 江苏农业学报,2008,24(2):148-152.
- [11] PAN H,CHEN M Y,DENG L,et al. First Report of *Didymella glomerata* causing black spot disease of kiwifruit in China[J]. Plant Disease,2018,102(12):2654.
- [12] HUANG S L,WANG L,WANG T,et al. First Report of didymella leaf blight on *Cornus officinalis* caused by *Didymella glomerata* in China[J]. Plant Disease,2018,102(5):1031.
- [13] 伏荣桃,陈诚,王剑,等. 华重楼斑枯病原鉴定[J]. 植物病理学报,2020,50(3):261-266.
- [14] 李海云,娄巧哲,范光辉,等. 美国进境大豆中楸子茎点霉的分离鉴定[J]. 植物检疫,2017,31(4):34-37.

## Identification of Pathogen Causing Leaf Spot on *Viola prionantha* in Harbin Area

LI Peng-fei<sup>1</sup>, PAN Yu-ying<sup>1</sup>, GUO Zi-wen<sup>1</sup>, TAN Ke-fei<sup>2</sup>, LIU Da-wei<sup>1</sup>

(1. College of Agriculture, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China; 2. Qiqihar Branch, Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Qiqihar 161000, China)

**Abstract:** *Viola prionantha* Bunge is a kind of perennial herb of medicinal value, and is also a kind of beautiful spring ornamental plants. In 2020, a unknown leaf spot disease of *V. prionantha* was found in Harbin City, Heilongjiang Province. In this study, the pathogen was identified with the method of morphological and molecular identification, and then verified according to the Koch's rule. The results showed that the pathogen causing this disease was *Didymella pomorum*, its conidia were colorless, single-celled, rounded to ellipsoidal, and the size of conidia was  $2.38\text{--}3.81\text{ }\mu\text{m} \times 4.60\text{--}8.06\text{ }\mu\text{m}$ . The pathogen grew well on PDA medium, and its hyphae were thick. This is the first report of *D. pomorum* causing leaf spot disease on *V. prionantha* in China, it is necessary to strengthen the research on the occurrence of this disease and the selection of control agents in the future.

**Keywords:** *Viola prionantha*; leaf spot; morphological characteristics; molecular identification

(上接第 63 页)

## Effects of Different Application Amount of Organic Fertilizer on Strawberry Quality and Yield

LIU Bing-fu<sup>1</sup>, WANG Dan<sup>1</sup>, SUN Jia-bo<sup>1</sup>, DONG Zhe-xiao<sup>1</sup>, LI Fa-xin<sup>2</sup>, GAO Xing-xiang<sup>3</sup>, WANG Zhi-fen<sup>4</sup>

(1. Institute of Leisure Agriculture, Shandong Academy of Agricultural Sciences, Jinan 250100, China; 2. Agricultural Committee of Guodian Sub-district Office, Licheng District, Jinan City, Shandong Province, Jinan 250100, China; 3. Agricultural Technology Station, Shagou Town, Yishui County, Shandong Province, Linyi 276400, China; 4. Institute of Special Economic Crops, Shandong Academy of Agricultural Sciences, Jinan 250100, China)

**Abstract:** In order to promote the scientific and rational fertilization of strawberries, improve the soil physical and chemical properties and the flavor and yield of strawberries, the "snow fragrance" strawberry was taken as the test material, and conducted the organic matrix organic fertilizer gradient test of Chinese medicinal materials. As a control (CK), four treatment gradients were  $4\ 678.5\text{ kg}\cdot\text{ha}^{-1}$  (T1),  $14\ 062.5\text{ kg}\cdot\text{ha}^{-1}$  (T2),  $23\ 437.5\text{ kg}\cdot\text{ha}^{-1}$  (T3),  $32\ 812.5\text{ kg}\cdot\text{ha}^{-1}$  (T4), and the effects of different application amounts on strawberry nutritional growth index, fruit quality index and fruit yield were determined. The results showed that the soil physical and chemical traits varied significantly with the increase of the fertilization gradient, indicating that the organic fertilizer significantly improved the soil physical and chemical properties and improved the soil fertility. From the influence of different organic fertilizer application amount on strawberry plant growth and fruit quality, the strawberry flavor under T3 treatment was better. Compared with T2 treatment, the average equivalent production increased by  $1.09\text{ kg}\cdot\text{ha}^{-1}$ . The yield difference between the two average single fruit weight increased by  $0.10\%$ , the average production increased by  $0.30\%$ , and there was not significant difference between them. From the measurement results, T2 and T3 treatments are the optimal amount of organic fertilizer application, but the overall T2 treatment can significantly improve the main nutrient content of strawberry field soil, but also promote the growth of strawberry, and significantly increase the yield of strawberry and improve the quality of strawberry.

**Keywords:** different application quantity; strawberry; quality; yield.