

岗梅枝枯病病原鉴定

傅昱[#], 李燕霞[#], 刘婉蓉, 章攀, 游春平^{*}

(仲恺农业工程学院农业与生物学院, 广州 510225)

摘要 为明确引起岗梅 *Ilex asprella* 枝枯病的病原, 对从广东梅州采集的岗梅枝枯病部分离的致病菌株 Gangmei 2 进行了形态学观察, 并运用 MEGA-X 构建了病原菌株 rDNA 内转录间隔区 (internal transcribed spacer, ITS) 的系统发育树。结果显示: 病原菌的形态学特征与拟盘多毛孢属 *Pestalotiopsis* 真菌相似, 在系统发育树中该菌株与小孢拟盘多毛孢菌 *Pestalotiopsis microspora* 在同一分支上。因此, 初步将岗梅枝枯病病原菌鉴定为小孢拟盘多毛孢菌 *P. microspora*。

关键词 岗梅; 枝枯病; 病原鉴定; 小孢拟盘多毛孢菌

中图分类号: S 432.1 **文献标识码:** A **DOI:** 10.16688/j.zwbh.2018268

Identification of the pathogen causing branch blight of *Ilex asprella*

FU Yu, LI Yanxia, LIU Wanrong, ZHANG Pan, YOU Chunping

(College of Agriculture and Biology, Zhongkai University of Agriculture and Engineering, Guangzhou 510225, China)

Abstract The pathogen causing branch blight of *Ilex asprella* was identified by Koch's postulates, morphological characteristics and phylogeny analysis of rDNA internal transcribed spacer (ITS). The results showed that the pathogenic isolate Gangmei 2 from diseased *I. asprella* samples from Meizhou, Guangdong province was similar to *Pestalotiopsis* fungus in morphological characteristics. The isolate Gangmei 2 was in the same clade with *Pestalotiopsis microspora* by construction of phylogenetic tree between the isolate and the related isolates from GenBank. Therefore, the pathogen that causing branch blight of *I. asprella* was preliminarily identified as *P. microspora*.

Key words *Ilex asprella*; branch blight; identification of the pathogen; *Pestalotiopsis microspora*

岗梅 *Ilex asprella* (Hook. et Arn.) Champ. ex Benth. 属冬青科冬青属 *Ilex* L., 分布于广东、广西等地^[1], 是我国南方民用中药, 具有清热解毒、生津止渴、利咽消肿、散瘀止痛之功效, 临床用于治疗感冒发热、肺热咳嗽、热病津伤口渴、咽喉肿痛、跌打瘀痛等病症^[2]。

岗梅的药用价值之广使其市场需求量越来越大, 岗梅的栽培面积也随之扩大。枝枯病是岗梅大面积种植过程中的一种主要病害, 株发病率为 10% 以上。岗梅枝枯病主要危害岗梅的主干、侧枝和嫩梢, 引起发病枝条萎蔫、干枯, 树势衰弱, 生长速度缓慢, 岗梅的产量和品质下降。关于岗梅枝枯病病原的报道, 袁勤峰等^[3]认为引起广东岗梅枝枯病的病原菌是胶孢炭疽菌 *Colletotrichum gloeosporioides* complex, 何凌冰等^[4]则认为该病由葡萄座腔菌 *Botryosphaeria dothidea* 引起, 但是否存在

其他病原菌引起广东省梅州市平远县岗梅生产基地上的岗梅枝枯病, 并不清楚。因此, 本研究对岗梅枝枯病病原菌进行鉴定, 旨在对该病害的防治提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

植物材料: 供试健康岗梅植株株高约 40 cm, 由华润三九医药股份有限公司提供; 罹病岗梅样本于 2016 年 10 月采自广东省梅州市平远县的华润三九医药股份有限公司中药材种植基地。

培养基: PDA, 参照《植病研究方法》^[5] 配方配制。

1.2 方法

1.2.1 病原菌的分离纯化与致病性测定

采用常规组织分离法对田间采回的罹病岗梅样

本进行分离,将获得的培养物在显微镜下用无菌接种针挑取单菌丝片段进行两次菌株纯化,获得纯培养分离物。致病性测定采用针刺法在无病健康且长势相近的岗梅幼苗茎部进行。将纯化后的菌株在PDA平板上28℃培养3~4 d后取直径1 cm的菌丝块贴住针刺部位,并用湿润的棉花覆盖固定,对照组接种直径1 cm的无菌PDA培养基,每个处理设置5个重复。于28℃光照条件下保湿培养5~10 d后,观察分离物的致病情况。对接种后发病的组织再次进行病原菌分离纯化,比较该分离物与接种病原菌的形态异同。

1.2.2 病原菌的形态观察

将4℃斜面保存的菌株转至PDA平板上,于28℃培养箱中培养3~7 d,观察并记录菌落特征,每日测定菌落大小。待菌落产孢后利用镜台及目镜测微尺测定分生孢子的大小,记录并统计。

1.2.3 病原菌的分子鉴定

采用Chi等^[6]的方法提取病原真菌总基因组DNA,对rDNA内转录间隔区(ITS)进行扩增。扩增所用的引物为ITS1(5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3')和ITS4(5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3')^[7]。PCR反应体系(25 μL):2×Taq PCR Green Mix 12.5 μL、DNA模板5 μL、5 μmol/L ITS1和ITS4各1 μL、Nuclease-free Water 5.5 μL;PCR扩增反应程序:94℃预热3 min;94℃变性30 s,53℃退火30 s,72℃延伸1 min,35个循环;72℃再延伸7 min;4℃保存。

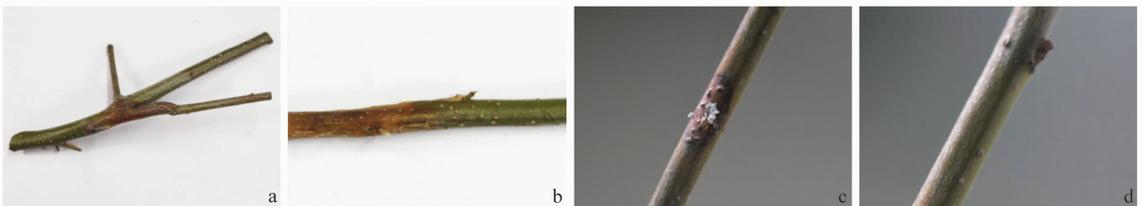
扩增结束后取5 μL PCR产物在1%琼脂糖凝胶中进行电泳,最后将目标片段送往华大基因科技股份有限公司进行测序。测序结果与GenBank中的数据进行BLAST同源性比对,并运用MEGA 7.0进行系统发育分析。

2 结果与分析

2.1 岗梅枝枯病的症状特点及病原菌致病性测定

岗梅枝枯病主要危害岗梅的主干、侧枝和嫩梢,引起发病枝条萎蔫、干枯,树势衰弱,生长缓慢。嫩梢发病时枝条由绿色变为深褐色,嫩叶和幼茎失水,干枯(图1a~b)。主干和侧枝初侵染时,病斑处失绿变褐,呈条状,病斑中心呈现出黑褐色的斑块,病斑周围浅褐色,病斑逐渐扩散侵染,后整个病斑成为黑褐色,严重时病斑环绕大部分主茎,导致病斑以上部位因养分输送受阻而失水失绿干枯。

从病组织上获得3个分离物:Gangmei 1、Gangmei 2和Gangmei 3。利用针刺法对其进行致病性测定,结果显示,只有分离物Gangmei 2在接种9 d后,岗梅枝干部出现深褐色病变,病变部位中间有白色羽状物(图1c),与原采回的标本岗梅枝枯病在田间自然病害特征一样,病斑有逐渐扩大的趋势,分离物Gangmei 1、Gangmei 3未引起岗梅产生病变。从接种后岗梅发病茎部的病健交界处组织上(图1c)再次进行病原菌的分离纯化,此次分离的菌物在PDA平板上的菌落形态(图2a~b)和分子特征(ITS)与原接种体一致。



a-b: 田间症状; c: Gangmei 2接种症状(接种9 d); d: CK
a-b: Symptoms in field; c: Symptoms 9 days after inoculation with Gangmei 2; d: CK

图1 岗梅枝枯病田间症状及分离物接种所致症状

Fig. 1 Symptoms of the branch blight of *Ilex asprella* in field and after inoculation

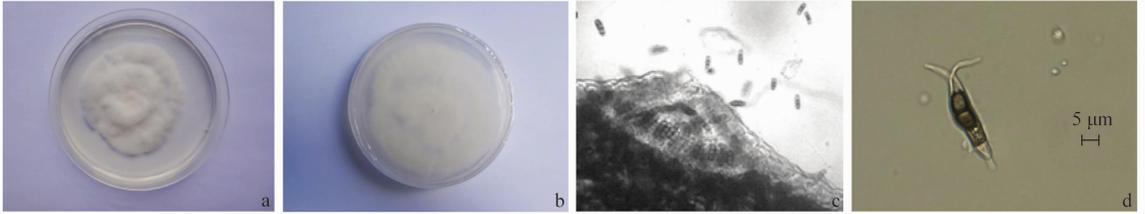
2.2 岗梅枝枯病病原菌的形态学特征

Gangmei 2在PDA培养基上于28℃培养箱中培养5 d后的菌落近圆形,边缘规则,正面为白色丝绒状,反面淡黄色,有轮纹,菌体由内而外呈波浪形扩张,整体蓬松,10 d后产孢(图2a~b);对病部进行切片观察到分生孢子盘埋生于寄主表皮下,黑色,单腔,

分生孢子整齐地排列在分生孢子盘内(图2c);光学显微镜下观察到分生孢子大小为(19.8~29.5) μm × (5.2~9.9) μm(图2d),呈纺锤形或长梭形,直或微弯,具4个隔膜,5个细胞,分隔处稍有缢缩,基部和顶部细胞无色,中间3个细胞均为淡橄榄色,其中上部两个细胞颜色较下部细胞颜色深;成熟孢子顶端有

2~4 根无色透明附属丝,分支或不分支,长为 24.5~36 μm ,基部细胞平截,具一内生附属丝,长为 9.05~

12.96 μm ,不分支。根据病原菌的形态特征,此病原菌属于拟盘多毛孢属 *Pestalotiopsis* 真菌。



a~b: 菌落正反面; c: 分生孢子盘; d: 分生孢子
a-b: Colony (5 d on PDA); c: Acervulus; d: Conidium

图 2 岗梅枝枯病病原菌形态特征

Fig. 2 Morphological characteristics of the isolate Gangmei 2 isolated from *Ilex asprella* branch

2.3 岗梅枝枯病病原菌的分子鉴定

利用真菌 ITS 通用引物 ITS1 和 ITS4 对病原菌 Gangmei 2 的 rDNA 内转录间隔区(ITS)进行扩增,获得片段大小约为 524 bp 的产物。将扩增产物序列(MG820124)在 GenBank 中进行 BLAST 比对,用 MEGA 7.0 按照 NJ(neighbor-joining)法构建 Gangmei 2 及

相关真菌的系统发育树(图 3),结果表明,病原菌株 Gangmei 2 与 *Pestalotiopsis microspora* strain CGJ-4 (KT459350.1)、*P. microspora* strain Pm-1(MH094237.1)、*P. microspora* strain DPX3-2(KY849799.1)和 *P. microspora* strain LK11(DQ001009.1)在同一分支上。

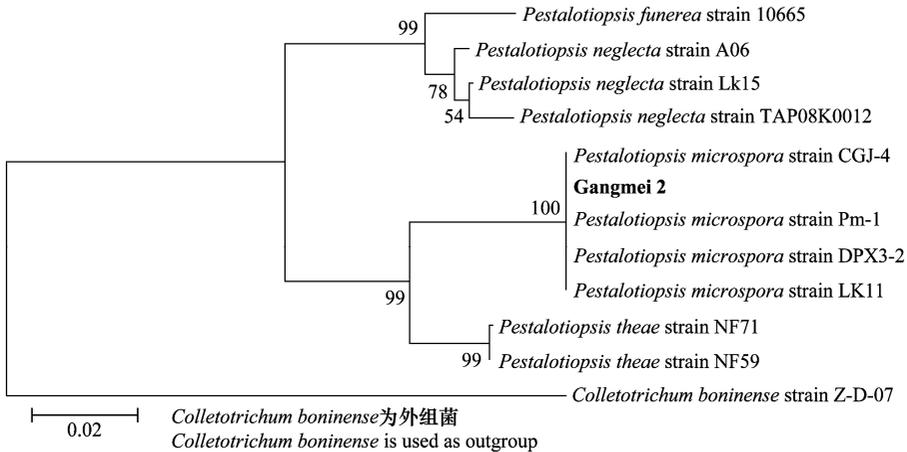


图 3 岗梅枝枯病病原菌株 Gangmei 2 及相关真菌基于 ITS 序列的系统发育树

Fig. 3 Phylogenetic tree of the isolate Gangmei 2 from *Ilex asprella* and related species based on sequences of ITS

3 讨论

本研究对采自广东省梅州市平远县的岗梅枝枯病样品进行组织分离纯化,经柯赫氏法则验证获得岗梅枝枯病病原菌株,观察病原菌株形态学特征并对病原菌株的 ITS 序列进行分析后,初步将岗梅枝枯病的病原菌鉴定为小孢拟盘多毛孢 *P. microspora*。

本研究结果与袁勤峰等^[3]报道的岗梅枝枯病病原为胶炭炭疽菌 *C. gloeosporioides* complex,何凌冰等^[4]报道的岗梅枝枯病病原为葡萄座腔菌 *B. dothidea* 不同,其原因可能是采样的地点、季节、岗梅植株的生长环境不同,也可能是岗梅枝枯病可由多

种病原菌引起或存在多种病原菌复合侵染的情况。

韦继光^[8]的研究表明,拟盘多毛孢属分类的首要特征是分生孢子有色胞的颜色类型,其次是顶端附属丝(顶端附属丝末端是否膨大、是否呈单根后分支、附属丝着生位置以及根数)及基部附属丝的有无、是否分叉。宋利沙^[9]的研究表明,基部附属丝的有无及是否分叉与顶端附属丝是否呈单根后分支以及着生的位置,不是很重要的分类特征。

本研究使用了 ITS 序列对岗梅枝枯病病原菌进行分子鉴定。宋利沙^[9]的研究表明,该序列能区分拟盘多毛孢属中包括 *P. microspora* 在内的 6 个物种,建议把 ITS 作为拟盘多毛孢属的主要条形码,

β -tub作为拟盘多毛孢属的辅助条形码,对于个别比较难以鉴别的种类,可采取 ITS+ β -tub+EF1- α 序列组合建立分子系统发育树对拟盘多毛孢属物种进行识别。本研究利用 ITS 序列构建病原菌株及相关真菌的系统发育树能很好地将 *P. microspora* 与其他菌株区分开。

传统的拟盘多毛孢属 *Pestalotiopsis* 分类多数以 Guba^[10] 的检索表为依据,但该检索表存在形态特征重叠严重,种间区别不够明确等不足之处^[11]。拟盘多毛孢属真菌在培养时也会出现同种菌株在不同培养基上的分生孢子长度、顶端附属丝长度、基部附属丝长度等形态指标有明显差异的现象^[12],不同的研究者对同一个种的描述也有差别。在拟盘多毛孢属真菌的分类和鉴定中,应统一培养基和培养条件从而对拟盘多毛孢属真菌进行形态特征的比较并结合形态特征和分子特征进行正确鉴定。迄今为止,国内外未见有小孢拟盘多毛孢 *P. microspora* 引起岗梅枝枯病的报道,该发现为岗梅枝枯病的防治提供了一定的理论依据。

参考文献

- [1] 曾坤,陈良华,丘琴,等. 岗梅根的研究进展[J]. 中国民族民间医药,2012,21(18):28-29.
- [2] 黄锦茶,陈丰连,陈海明,等. 岗梅根的化学成分研究[J]. 中草药
- (上接 151 页)
- [12] NAGATA T, INOUE-NAGATA A K, SMID H M, et al. Tissue tropism related to vector competence of *Frankliniella occidentalis* for *Tomato spotted wilt tospovirus* [J]. Journal of General Virology, 1999, 80 (1): 507-515.
- [13] 程俊峰,万方浩,郭建英. 西花蓟马在中国适生区的基于 CLIMEX 的 GIS 预测[J]. 中国农业科学,2006,39(3):525-529.
- [14] 张友军,吴青君,徐宝云,等. 危险性外来入侵生物——西花蓟马在北京发生危害[J]. 植物保护,2003,29(4):58-59.
- [15] 郑长英,刘云虹,张乃芹,等. 山东省发现外来入侵有害生物——西花蓟马[J]. 青岛农业大学学报(自然科学版),2007,24(3):172-174.
- [16] 刘若思,刘燕,王军,等. 重要外来入侵害虫西花蓟马在吉林省部分地区的首次发现[J]. 北京农学院学报,2015,30(2):24-27.
- [17] 刘佳,张林,卢焰梅,等. 湖南外来入侵害虫西花蓟马初步调查[J]. 安徽农业科学,2010(25):13800-13801.

药,2012,43(8):1475-1478.

- [3] 袁勤峰,郑露,刘浩,等. 广东岗梅枝枯病原鉴定及生物学特性研究[C]//中国植物病理学会 2015 年学术年会论文集. 北京:中国农业出版社,2015:188.
- [4] 何凌冰,吴惠萍,游春平,等. 岗梅枝枯病原鉴定[J]. 广东农业科学,2017,44(1):111-114.
- [5] 方中达. 植病研究方法[M]. 第 3 版. 北京:中国农业出版社,1998:46.
- [6] CHI M H, PARK S Y, KIM S, et al. A novel pathogenicity gene is required in the rice blast fungus to suppress the basal defenses of the host [J/OL]. PLoS Pathogens, 2009, 5(4): e1000401.
- [7] WHITE T J, BRUNS T, LEE S B. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics [M]// INNIS M A, GELFAND D H, SNINSKY J J, et al. PCR protocols: A guide to methods and application. San Diego, California, New York: Academic Press Co, 1990: 315-322.
- [8] 韦继光. 罗汉松科、山茶科和红豆杉科植物内生拟盘多毛孢的多样性及拟盘多毛孢属分子系统学研究[D]. 杭州:浙江大学,2004.
- [9] 宋利沙. 拟盘多毛孢属的分类及分子系统学和分子条形码研究[D]. 南宁:广西大学,2016.
- [10] GUBA E F. Monograph of *Monochaetia* and *Pestalotia* [M]. U. S. A.: Harvard University Press, 1961: 54-250.
- [11] 韦继光,徐同,潘秀湖,等. 拟盘多毛孢属的分类学研究进展[J]. 广西农业生物科学,2006,25(1):78-85.
- [12] 韦继光,徐同,郭良栋. 拟盘多毛孢属形态稳定性及分类学意义[J]. 莱阳农学院学报(自然科学版),2006,23(4):280-284.

(责任编辑:杨明丽)

- [18] 袁成明,邹军锐,郑珊珊,等. 西花蓟马在贵阳地区发生危害调查研究[J]. 西南师范大学学报(自然科学版),2010,35(1):142-145.
- [19] 许泽永,REDDY D V R, RAJESHWARI R,等. 我国南方花生发生一种由蕃茄斑萎病毒引起的新病害[J]. 病毒学报,1986,2(3):80-83.
- [20] 苏大昆,袁宣泽,谢永红,等. 成都、渡口两市番茄中检出番茄斑萎病毒[J]. 植物病理学报,1987,17(4):255-256.
- [21] 饶雪琴,刘勇,李媛媛,等. 广东番茄上检测到 *Tospovirus* 病毒[J]. 植物病理学报,2010,40(4):430-432.
- [22] 李飞,吴青君,徐宝云,等. 北京地区发现番茄斑萎病毒[J]. 植物保护,2012,38(6):186-188.
- [23] 李洁,迟胜起,杨勤民,等. 山东烟台地区发生番茄斑萎病毒病危害[J]. 植物保护,2017,43(1):228-232.

(责任编辑:杨明丽)