·中药农业·

山牵牛炭疽病病原分离与鉴定△

宋利沙[1]，蒋妮[1*]
（1. 广西壮族自治区药用植物园，广西　南宁　530023）

［摘要］ **目的**：明确为害山牵牛的叶部病害的病原菌，为其防治奠定基础。**方法**：采用常规组织分离法对山牵牛炭疽病的病原菌进行分离，利用形态学特征和 ITS rDNA 序列分析法鉴定该病原菌的分类地位。**结果**：该病原鉴定为胶孢炭疽菌 *Colletotrichum gloeosporioides*。**结论**：该病原菌危害山牵牛造成其叶部病害，在国内为首次报道。

［关键词］ 山牵牛；炭疽病；胶孢炭疽菌；病原鉴定

Isolation andIdentification of Anthracnose Pathogen on *Thunbergia grandiflora*

SONG Li-sha[1]，JIANG Ni[1*]
（1. *Guangxi Botanica*l *Garden of Medicinal Plants*，*Guaugxi Nanning* 530023，*China*）

［**Abstract**］ **Objective**：To clear that the pathogenic of the leaf diseases of *Thunbergia grandiflora* for the foundation for its prevention and control. **Methods**：The pathogen was isolated by the plate confrontation assay and identified base on morphological characteristics and ITS DNA sequences analysis. **Results**：The pathogen was identified as *Colletotrichum gloeosporioides*. **Conclusion**：*C. gloeosporioides* cauaed the leaf diseases and this is the first report of *C. gloeosporioides* on *T. grandiflora* in China.

［**Keywords**］ *Thunbergia grandiflora*；anthracnose；*Colletotrichum gloeosporioides*；identification of pathogen
doi：10. 13313/j. issn. 1673-4890. 20180328001

山牵牛 *Thunbergia grandiflora*（Rottl. ex Willd.）Roxb.，别名大花山牵牛、大花老鸭嘴、大青和老鸭杓，是爵床科 Acnthaceae 山牵牛属藤本植物[1]。山牵牛在广西、广东、海南和福建鼓浪屿均有种植。山牵牛是瑶医药用植物之一，主要用于消肿拔毒，排脓生肌，止痛。根皮用于跌打损伤和骨折。茎叶蛇咬伤，疮疖，叶用于治疗胃痛[2-3]。目前，对山牵牛主要做为观赏藤本植物[4]，对其药理活性和病害研究尚未见报道。作者在广西药用 2017 年在广西南宁市广西药用植物园瑶药区调查发现一种严重影响山牵牛生长的病害，该病害主要为害山牵牛叶片，严重时造成叶片枯死。镜检发病组织上的病原孢子，初步将病原菌判断为炭疽菌属 *Colletotrichum* sp. 真菌，为进一步明确该病原菌的分类地位，本研究对病原菌进行了分离，并通过形态学和分子生物学相结合的方法进行鉴定，为该病害的有效防治提供理论依据。

1　材料与方法

1.1 试验材料

山牵牛病株于 2017 年 3 月采自广西壮族自治区南宁市兴宁区广西药用植物园瑶药区。

1.2 病原菌分离和纯化

选取山牵牛叶片的病健交界处病组织，切成 5 mm×5 mm 小块，用 75% 乙醇浸泡 30S，0.1% 升汞消毒 1 min，再用无菌水漂洗 3 次，置于 PDA 培养基上 28 ℃培养，待长出菌丝后，挑取菌落边缘进行纯化，纯化后的菌落通过单孢分离获得纯培养分离物[5]。

1.3 病原菌的致病性测定

用针刺法将分离和纯化的菌丝块（1 cm×1 cm）接种于无病健康且长势相近的山牵牛叶部[5]，以接种无菌 PDA 培养基（1 cm×1 cm）作为对照，每个处

△［基金项目］ 广西科技基地和人才专项（桂科 AD16380013）；广西药用植物园青年科学基金（桂药基 201801）
*［通信作者］ 蒋妮，副研究员，研究方向：药用植物栽培病虫害防治；E-mail：jiangni292@126. com

理 3 个重复，放置于具有湿润的滤纸片的培养皿中，保湿培养，定期观察发病情况。适时对发病组织进行病原菌分离和纯化，观察该病原菌是否与接种菌株相同。

1.4 病原菌形态鉴定

观察病原菌在 PDA 培养基上的菌落特征，用光学显微镜观察菌丝、分生孢子等形态特征，对病原菌进行形态鉴定。

1.5 分子生物学鉴定

将纯化好的拮抗菌株移植于 PDA 平板培养基上，培养 3 d，然后接种到 40 mL PDA 培养液的三角瓶(100 mL)中，于 28 ℃、180 r·min^{-1}，恒温振荡培养 48 h 后制成菌体悬浮液，离心收集菌体，采用改良的 SDS 裂解法用 DNA 提取试剂盒(生工生物工程(上海)股份有限公司)提取真菌基因组 DNA。ITS 扩增引物序列为通用引物 ITS1(5′-TCCGTAGGT-GAACCTGCGG -3′)和 ITS4(5′-TCCTCCGCT TATT-GATATGC-3′)。扩增反应在 25 μL 反应体系中进行，Template(基因组 DNA 20 ~ 50 ng·μL^{-1})为 0.5 μL，10 × Buffer(with Mg^{2+})为 2.5 μL，dNTP(各2.5 mM)为 1 μL，酶 0.2 μL，引物各 0.5 μL，加双蒸 H_2O 至 25 μL。热循环反应程序设置如下：94 ℃下初始变性 4 min，接下来为 94 ℃下变性 45 sec，55 ℃下引物退火 45 sec，72 ℃下延伸 60 sec，30 个循环结束后在 72 ℃下修复延伸 10 min。扩增中利用水代替 DNA 模板为空白对照。用凝胶电泳法检测 PCR 反应结果，吸取 4 μL PCR 产物加入 1%(W/V)琼脂糖凝胶，凝胶置于 1 × TBE 缓冲液(0.9 M Tris-Borate，0.01 M EDTA，pH = 8.3)中，在 110 V 下电泳 40 min。将扩增后的 DNA 产物送至生工生物工程(上海)股份有限公司进行纯化测序。并且把测序结果与 GenBank 中的序列进行 blast 比对。以 ITS 相似序列，利用 MEGA4.0 软件的 Neighbor-Joining 法构建系统发育树。

2　结果分析

2.1 病害症状

该病主要危害山牵牛叶片。叶片发病后，病斑在叶尖、叶缘、叶中部近圆形或不规则形状发展。病斑发病初期，出现黑色小斑点，随后扩大成多边形黑褐色病斑，病斑周围有黄色晕圈，后期病斑穿孔，病斑较多时融合成片，病叶后期叶片黄化枯死(图 1)。该病害在山牵牛生长期均可发生，且种种植密度大、排水不良的地块发病较重；高温气候，多雨季节，发生严重，蔓延迅速。



图 1　山牵牛叶部危害症状

2.2 病原菌分离和致病性测定

对山牵牛叶片病斑进行病原分离，分离纯化得到形态特征不同的真菌菌株 4 株。用针刺法将这些菌株接种在离体健康山牵牛叶片上，只有 sb10 菌落致病。接种后 5 d 叶片开始发病，7 d 后接种部位变黑褐色病斑，病斑周围暗黄褐色。对照叶片组织未发病。从发病的病斑上再次分离到与接种菌株形态一致的病原菌。

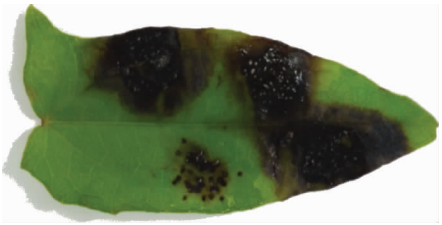
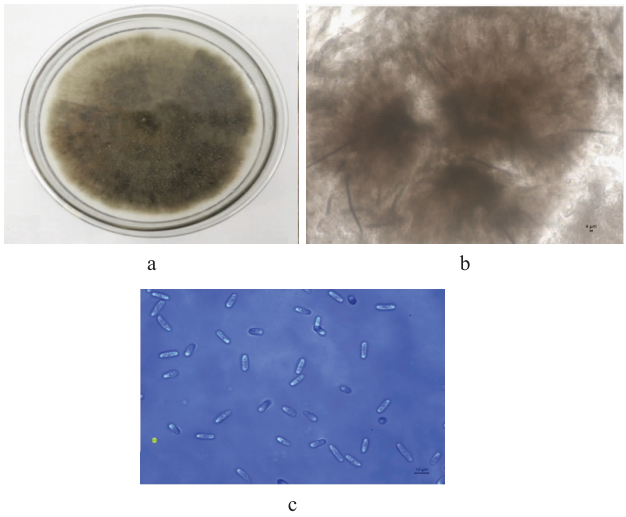


图 2　山牵牛炭疽病离体接种症状

2.3 病原菌的形态鉴定

病原菌 sb10 在 PDA 平板上，28 ℃培养 5 ~ 7 d，菌落圆形，边缘整齐，菌落从中央变为深灰黑色，菌落背面是深灰色同心轮纹，培养 6 d 后，菌落中央产生红色球形的分生孢子团。该病菌的菌丝有隔，粗度为 2 ~ 4 μm，分生孢子盘圆形或椭圆形，黑褐色，直径 112 ~ 248 μm；刚毛散生于分生孢子盘上，深褐色；分生孢子单胞，无色，长椭圆形，两头钝圆或一端稍尖，大小(11 ~ 21) μm × (4 ~ 6) μm。

参照《真菌鉴定手册》[7] 和《植物病原真菌学》[8]，将该病原菌鉴定为半知菌类腔孢纲黑盘孢目炭疽菌属胶孢炭疽菌 *C. gloeosporioides*。



注：a. 菌落；b. 分生孢子盘；c. 分生孢子。

图 3　山牵牛炭疽病病原形态

2.4 病原菌的分子(ITS)鉴定

利用真菌 ITS 通用引物 ITS1(5′-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3)和 ITS4(5′-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3′)对病原真菌的 rDNA 内转录区进行扩增，获得片段大小约为 563 bp 的扩增产物。将扩增后得到的产物在 GenBank 中进行 BLAST 比对，结果显示，与山牵牛病病原菌的 ITS 序列相似度在 99%以上的菌株为胶孢炭疽菌 *C. gloeosporioides*，并与其相似高的菌株构建系统发育树(图 4)，综合菌株 sb10 形态学和分子生物学鉴定该病原菌为胶孢炭疽菌 *C. gloeosporioides*。

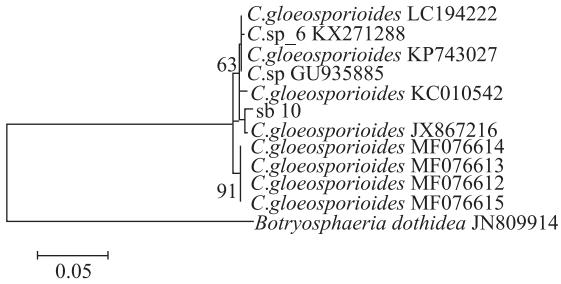


图 4　基于 ITS 序列构建 sb10 菌株系统发育树。

3　结论和讨论

山牵牛可作中药材使用，也可作为观赏的藤本植物，其栽培和开发利用有很大的广阔前景。作者在广西药用植物园种植区发现较严重的炭疽病，并利用形态学和分子手段将该病原鉴定为胶孢炭疽菌 *C. gloeosporioides*。该炭疽菌可危害地榆、田七、猫豆、阔叶十大功劳等多种植物[9-12]，是世界上分布最广的病原菌，但此病原危害山牵牛的叶片为国内第一次报道。此外，胶孢炭疽菌在致病性、寄主特异性和遗传同质性等方面可形成许多亚组和形态种[9]。本研究所获得菌株的寄主范围和专化型确定有待进一步研究确定。该病原菌的生物特性、侵染循环、发病条件、防治技术、药理活性等需要进一步研究加以明确。

目前，山牵牛炭疽病可参考由胶孢炭疽菌引起的其他作物炭疽病的防治技术进行控制，如选用无病种子或进行种子消毒、及时清除病残体、合理密植、创造良好的通风透光条件、合理施肥用水等，或在发病初期使用 25% 咪鲜胺乳 1500 倍液喷雾。具体药剂种类及综合防治技术尚待室内筛选试验和田间实践验证。

参考文献

[1] 中国植物志编委会. 中国植物志:第 70 卷[M]. 北京:科学出版社,2002:22-84.
[2] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:一部[M]. 北京:化学工业出版社,2005.
[3] 谢宗万,范崔生,朱兆仪. 全国中草药汇编[M]. 人民卫生出版社,1975.
[4] 高丽霞,陈阳春,郑元彦. 3 种观赏藤本植物耐旱性研究[J]. 防护林科技,2007(4):45-46,49.
[5] 方中达. 植病研究方法[M]. 北京:中国农业出版社,1998.
[6] DOYLE J J. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue[J]. Phytochem Bull,1987,19(1):11-15.
[7] 魏景超. 真菌鉴定手册[M]. 上海:上海科技出版社,1979:468-475.
[8] 陆家云. 植物病原真菌学[M]. 北京:中国农业出版社,2001:449-459.
[9] 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.
[10] 叶云峰,蒋妮,胡凤云,等. 广西田七重要病害的防治药剂初步筛选[J]. 西南农业学报,2015,28(1):177-181.
[11] 叶云峰,付岗,蒋妮,等. 广西猫豆主要病害种类调查及病原鉴定[J]. 热带生物学报,2013,34(3):538-542.
[12] 谭海文,黎起秦,叶靖平,等. 阔叶十大功劳炭疽病初报[J]. 植物病理学报,2010,40(4):446-448.

(收稿日期　2018-03-28)