

引用格式:

钟杰¹, 尹秀娟¹, 钟双玉¹, 陈锦², 朱俊子¹, 李晓刚^{1*}. 富贵草叶斑病原的鉴定[J]. 湖南农业大学学报(自然科学版), 2022, 48(1): 60–64.

ZHONG J, YIN X J, ZHONG S Y, CHEN J, ZHU J Z, LI X G. Identification of pathogen causing leaf spot on *Pachysandra terminalis*[J]. Journal of Hunan Agricultural University(Natural Sciences), 2022, 48(1): 60–64.

投稿网址: <http://xb.hunau.edu.cn>



富贵草叶斑病原的鉴定

钟杰¹, 尹秀娟¹, 钟双玉¹, 陈锦², 朱俊子¹, 李晓刚^{1*}

(1.湖南农业大学植物保护学院,湖南 长沙 410128;2.湖南省农业科学院农业环境生态研究所,湖南 长沙 410125)

摘 要: 2019 年 5 月,在湖南长沙地区富贵草上发生了一种不明原因的叶部病害,对其进行病原菌分离、形态学鉴定和科赫氏法则验证,并通过对核糖体转录间区 rDNA (ITS)、肌动蛋白基因 (ACT)、几丁质合成酶 1 基因 (CHS1)和甘油醛-3-磷酸脱氢酶基因(GAPDH)序列的系统进化树分析,对病原菌进行分子鉴定,确定病原菌为冬麦刺盘孢(*Colletotrichum liriopes*)。

关 键 词: 富贵草; 叶斑病; 冬麦刺盘孢

中图分类号: S436.8

文献标志码: A

文章编号: 1007-1032(2022)01-0060-05

Identification of pathogen causing *Colletotrichum liriopes* leaf spot on *Pachysandra terminalis*

ZHONG Jie¹, YIN Xiujuan¹, ZHONG Shuangyu¹, CHEN Jin², ZHU Junzi¹, LI Xiaogang^{1*}

(1.College of Plant Protection, Hunan Agricultural University, Changsha, Hunan 410128, China; 2.Institute of Agro-Environment and Ecology, Hunan Academy of Agricultural Sciences, Changsha, Hunan 410125, China)

Abstract: In this study, we isolated and identified the pathogen of a unknown leaf spot disease occurred on *Pachysandra terminalis* (*P. terminalis*) plants, in May 2019 in Changsha, Hunan Province of China. Based on morphological characteristics, pathogenicity test, and molecular identification which was conducted by constructing the phylogenetic tree using combined gene sequences of internal transcribed spacer (ITS) rDNA, actin (ACT), chitin synthase 1 (CHS1) and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH). Based on the above results, we can conclude that the leaf spot disease of *P. terminalis* was caused by *Colletotrichum liriopes*.

Keywords: *Pachysandra terminalis*; leaf spot disease; *Colletotrichum liriopes*

富贵草(*Pachysandra terminalis* Sieb. et Zucc)为黄杨科板蕨果属多年生常绿草本植物或亚灌木,又称为顶花板蕨果、顶蕊三角咪、转筋草、吉祥草等。富贵草具有重要的药用价值,从富贵草中提取的孕烷生物碱具有抗菌和抗癌功效^[1]。富贵草分布较广,因其观赏效果好,且耐寒、耐阴、易繁殖,常作为盆栽和绿化植物^[2]。

2019 年 5 月,在湖南长沙一中药材苗圃的富贵草上发生了一种不明原因的叶部病害,约 20%的植株叶片受到侵染。笔者对这种富贵草叶斑病进行了病原菌分离,结合形态学和分子生物学鉴定及科赫氏法则验证,确定了该病害病原,以期对病害的科学防控提供依据。

收稿日期: 2020-10-10

修回日期: 2021-08-11

基金项目: 湖南省自然科学基金项目(2018JJ3229)

作者简介: 钟杰(1987—),男,湖南宁乡人,博士,副教授,主要从事植物病理学研究, wzzhtx@sina.com; *通信作者, 李晓刚, 博士, 教授, 主要从事农药剂型开发及植物病害防治研究, lxgang@aliyun.com

1 材料与方法

1.1 材料

2020 年 5 月,在湖南长沙一中药材苗圃摘取不明原因的富贵草叶斑病典型症状叶片。

1.2 方法

1.2.1 富贵草叶斑病病原菌的分离和鉴定

剪取患病叶片病健交界部大小 5 mm×5 mm 的组织,用 75%乙醇消毒 30 s、0.1%升汞再消毒 1 min 后无菌水漂洗 3 次,用无菌滤纸吸干水分,置于含 50 μg/mL 链霉素的马铃薯葡萄糖琼脂培养基(PDA)上,26 ℃黑暗培养。将长出的菌落转接至新的 PDA 培养基,并通过单孢分离进行纯化后,于 4 ℃ PDA 斜面保存。

按照文献[3]的方法,刮取菌丝,提取病菌 DNA。采用通用引物 ITS4/ITS5^[4]、ACT-512F/ACT-783R^[5]、CHS-79F/CHS-354R^[5]和 GDF/GDR^[6]扩增核糖体转录间区 rDNA (ITS)、肌动蛋白基因 (ACT)、几丁质合成酶 1 基因(CHS1)和甘油醛-3-磷酸脱氢酶基因(GAPDH)序列(表 1)。PCR 扩增:2×Es Taq Master Mix 25 μL、总 DNA 模板 2 μL、10 μmol/L 上、下游引物各 2 μL、ddH₂O 19 μL。PCR 反应程序:95 ℃ 预变性 5 min;95 ℃变性 30 s,56 ℃退火 30 s,72 ℃延伸 45 s,共 30 个循环;最后 72 ℃延伸 10 min,4 ℃保存。

PCR 产物经 1%琼脂糖凝胶电泳检测后送上海生物工程有限公司测序。所获序列提交 GeneBank 数据库,获得登录号(ITS、ACT、CHS1、GAPDH 基因序列分别为 MT645674、MT648689、MT663546

和 MT663547),并进行同源性比对分析。利用 MEGA 6 软件中邻接法(NJ)构建串联系统发育树,采用自举法(bootstrap)进行 1000 次重复检验^[7]。

表 1 用于 PCR 扩增和测序的引物信息
Table 1 Information of primers used for PCR amplification and sequencing

引物名称	序列(5'-3')	基因
ITS4	GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG	ITS
ITS5	TCCTCCGCTTATTGATATGC	
ACT-512F	ATGTGCAAGCCGGTTTCGC	ACT
ACT-783R	TACGAGTCCTTCTGGCCCAT	
CHS-79F	TGGGGCAAGGATGCTTGGAAGAAG	CHS1
CHS-354R	TGGAAGAACCATCTGTGAGAGTTG	
GDF	GCCGTCAACGACCCCTTCATTGA	GAPDH
GDR	GGGTGGAGTCGTACTTGAGCATGT	

1.2.2 富贵草叶斑病病原菌致病性的测定

采用菌丝块接种方法进行柯赫氏法则验证。将菌株在 PDA 培养基上 26 ℃培养 7 d,用消毒后的 5 mm 打孔器打取菌落边缘的菌丝块,接种于健康的富贵草叶片。接种前叶片经 75%乙醇表面消毒,并将叶片针刺伤口。以无菌 PDA 琼脂块为对照处理。将所有接种体置于含有湿润滤纸的保鲜盒 26 ℃保湿培养,逐日观察发病情况,并对发病叶片再次进行病原菌分离鉴定。

2 结果与分析

2.1 富贵草叶斑病病原菌的分离和鉴定结果

富贵草叶斑病侵染症状如图 1 所示。受害植株叶片从叶尖和叶缘开始,呈现不规则的黄褐色病斑,叶片健康部分变黄;随着病斑扩展,颜色变成深褐色,叶片枯萎凋落。



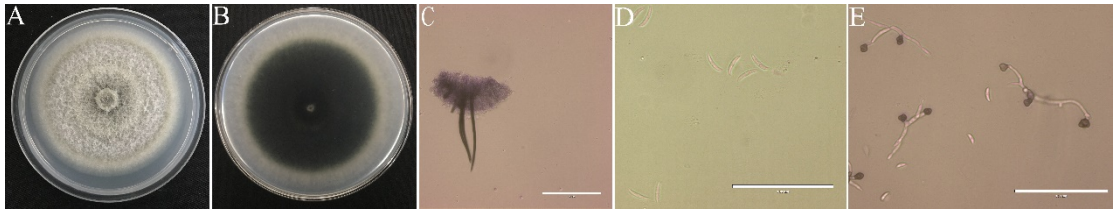
A 田间侵染植株症状; B 病害叶片。

图 1 富贵草叶斑病侵染症状

Fig.1 Symptoms of leaf spot disease observed on *Pachysandra terminalis* leaves

共获得 5 个培养性状一致的菌株, 代表性菌株命名为 FGC3-1。PDA 培养基 26 ℃ 恒温培养, 菌丝由白色逐渐转变成灰色, 菌落呈圆形, 边缘较平滑。培养 7 d 左右, 产生大量分生孢子, 分生孢子单生、透明、呈镰刀形, 大小为(20.5~27.5) μm×(3.8~4.2) μm (n=50)。从发病植株叶片病斑处镜检发

现黑褐色刚毛, 较僵直, 末端尖锐, 长约 85~115 μm。分生孢子萌发形成附着胞, 附着胞呈深褐色、形状近圆形或棍棒形, 大小为(8.8~12.5) μm × (6.5~8.5) μm (图 2-C、图 2-D、图 2-E)。病原菌形态特征与已报道的^[8]冬麦刺盘孢(*Colletotrichum liriopes*)相似。



A、B 分别为在 PDA 培养基上 26 ℃ 培养 7 d 后菌落的正面和反面; C 刚毛形态; D 分生孢子形态; E 附着胞形态。

图 2 富贵草叶斑病原菌的形态

Fig.2 Morphological characteristics of the isolated pathogens

对分离纯化后菌株的ITS、*ACT*、*CHS1*和*GAPDH*进行PCR扩增、克隆、测序, 分别获得了长度为581、245、260、257 bp的片段序列。利用BLASTn进行同源性比对分析, 结果表明, 除ITS序列外, *ACT*、*CHS1*和*GAPDH*序列与冬麦刺盘孢(*C. liriopes*)菌株对应序列相似性为97.21%~100%(对应菌株登录号

为 MK644098.1 、 KY995503.1 、 KY995452.1 、 MK644100.1等)。利用多基因构建系统进化树(序列登录号信息如表2所示), 结果, FGC3-1与冬麦刺盘孢聚为一支(图3)。结合形态学和分子鉴定结果, 可确定该病原菌为冬麦刺盘孢。

表 2 用于系统发育分析的真菌菌株信息

Table 2 Information of the fungal strains used for phylogenetic analysis					
病原菌	菌株	登录号			
		ITS	ACT	CHS1	GAPDH
冬麦刺盘孢(<i>C.liriopes</i>)	CBS119444	GU227804	GU227902	GU228294	GU228196
	CBS122747	GU227805	GU227903	GU228295	GU228197
	CDLG3	JQ400004	JQ399990	JQ399997	JQ400011
	CORK2	HM585396	HM581988	HM582029	HM585382
白蜡树刺盘孢(<i>C.spaethianum</i>)	CBS167.49	GU227807	GU227905	GU228297	GU228199
	CBS100063	GU227808	GU227906	GU228298	GU228200
	CBS101631	GU227809	GU227907	GU228299	GU228201
兰生炭疽菌(<i>C.chlorophyti</i>)	IMI103806	GU227894	GU227992	GU228384	GU228286
	CBS142.79	GU227895	GU227993	GU228385	GU228287
葱刺盘孢(<i>C.circinans</i>)	CBS221.18	GU227855	GU227953	GU228345	GU228247
	CBS125331	GU227861	GU227959	GU228351	GU228253
	CBS117546	GU227857	GU227955	GU228347	GU228249
郁金炭疽菌(<i>C.curcumae</i>)	IMI288937	GU227893	GU227991	GU228383	GU228285
黑线炭疽菌(<i>C.dematium</i>)	CBS125.25	GU227819	GU227917	GU228309	GU228211
	CBS125340	GU227820	GU227918	GU228310	GU228212
胶孢炭疽菌(<i>C.gloeosporioides</i>)	CBS953.97	GQ485605	GQ856782	GQ856733	GQ856762
	CDLG1	JQ400008	JQ399994	JQ400001	JQ400015
	CDLG4	JQ400009	JQ399995	JQ400002	JQ400016
海水仙炭疽菌(<i>C.hymenocallidis</i>)	CSSN2	GQ485600	GQ856775	GQ856730	GQ856757
	CSSN3	GQ485601	GQ856776	GQ856729	GQ856759
百合炭疽菌(<i>C.lilii</i>)	CBS109214	GU227810	GU227908	GU228300	GU228202

表 2(续)					
病原菌	菌株	登录号			
		ITS	ACT	CHS1	GAPDH
线列炭疽菌(<i>C.lineola</i>)	CBS186.30	GU227811	GU227909	GU228301	GU228203
	CBS125337	GU227829	GU227927	GU228319	GU228221
	CBS125339	GU227830	GU227928	GU228320	GU228222
赤豆炭疽菌(<i>C.phaseolorum</i>)	CBS157.36	GU227896	GU227994	GU228386	GU228288
	CBS158.36	GU227897	GU227995	GU228387	GU228289
菠菜刺盘孢(<i>C.spinaciae</i>)	CBS125349	GU227852	GU227950	GU228342	GU228244
	CBS128.57	GU227847	GU227945	GU228337	GU228239
常春藤炭疽菌(<i>C.trichellum</i>)	CBS102642	GU227816	GU227914	GU228306	GU228208
	CBS118198	GU227813	GU227911	GU228303	GU228205
平头刺盘孢(<i>C.truncatum</i>)	CBS151.35	GU227862	GU227960	GU228352	GU228254
	CBS119189	GU227863	GU227961	GU227961	GU228255

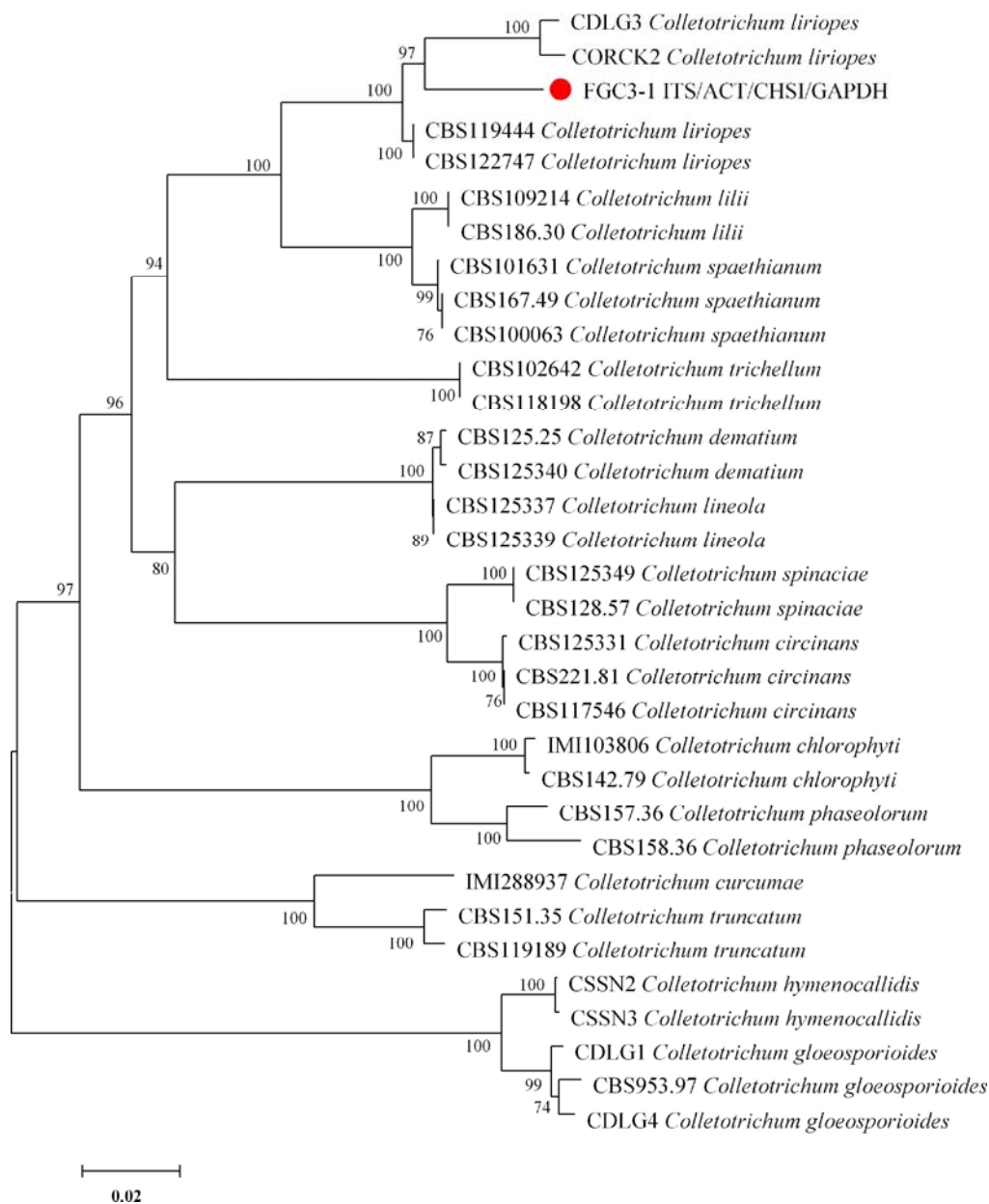


图 3 基于 ITS、ACT、CHS1 和 GAPDH 序列的联合进化树

Fig.3 Phylogenetic tree based on combined sequences of ITS, ACT, CHS1 and GAPDH

2.2 富贵草叶斑病原菌的致病性

利用菌丝块接种富贵草健康叶片, 7 d 后引起叶片发病。病斑呈褐色、近圆形或不规则形, 病斑周围变黄, 接种症状与田间自然发病症状相似。无菌 PDA 琼脂块接种的对照叶片未发病。从接种病斑处可镜检到病原菌分生孢子, 且可再次从病斑处分离并鉴定出相同的病原菌, 由此证明接种的分离菌株为富贵草叶斑病的致病菌。

3 结论

对富贵草上不明原因叶斑病进行了症状观察、病原菌分离及鉴定, 完成了科赫氏法则验证, 证明该富贵草叶斑病病原为冬麦刺盘孢(*C. liriopes*)。冬麦刺盘孢也可导致其他植物病害: TRIGIANO 等^[9]在美国报道了冬麦刺盘孢可引起万年青(*Rohdea japonica*)叶部炭疽病; CHEN 等^[10]对青岛发生的山麦冬(*Liriope spicata*)叶斑病进行鉴定, 确定其病原为冬麦刺盘孢; OO 等^[11]鉴定了由冬麦刺盘孢引起的阔叶山麦冬炭疽病。此外, 还有关于冬麦刺盘孢和胶孢炭疽菌(*C. gloeosporioides*)共同侵染引起兰花三七(*Liriope cymbidimorpha*)叶斑病的报道^[12]。YANG 等^[13]在贵州、广西和辽宁等省份的萱草属植物茎秆病害中分离到了冬麦刺盘孢和其他炭疽菌。关于冬麦刺盘孢的寄主范围及是否存在致病力分化等还有待进一步研究。

参考文献:

- [1] ZHAO H, WANG X Y, LI M K, et al. A novel pregnane-type alkaloid from *Pachysandra terminalis* inhibits methicillin-resistant staphylococcus aureus in vitro and in vivo[J]. *Phytotherapy Research*, 2015, 29(3): 373–380.
- [2] 刘刚. 优良喜阴地被植物——顶蕊三角咪[J]. *特种经济动植物*, 2003, 6(4): 37.
- [3] 夏花, 朱宏建, 周倩, 等. 湖南芷江辣椒上一种新炭疽病的病原鉴定[J]. *植物病理学报*, 2012, 42(2): 120–125.
- [4] INNIS M A, GELFAND D H, SNINSKY J J, et al. PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications[M]. New York: Academic Press, 1990: 315–322.
- [5] CARBONE I, KOHN L M. A method for designing primer sets for speciation studies in filamentous ascomycetes[J]. *Mycologia*, 1999, 91: 553–556.
- [6] GUERBER J C, LIU B, CORRELL J C. Characterization of diversity in *Colletotrichum acutatum* sensu lato by sequence analysis of two gene introns, mtDNA and intron RFLPs, and mating compatibility[J]. *Mycologia*, 2003, 95: 872–895.
- [7] TAMURA K, STECHER G, PETERSON D, et al. MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0[J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2013, 30(12): 2725–2729.
- [8] DAMM U, WOUDEBERG J H C, CANNON P F. *Colletotrichum* species with curved conidia from herbaceous hosts[J]. *Fungal Diversity*, 2009, 39: 45.
- [9] TRIGIANO R N, BOGGESS S L, BERNARD E C. First report of a leaf anthracnose on *Rohdea japonica* (Japanese Sacred Lily) caused by *Colletotrichum liriopes* (*Glomerella species*) in the United States[J]. *Plant Disease*, 2018, 102(11): 2380.
- [10] CHEN S Y, HOU X M, YANG S. First report of *Colletotrichum liriopes* causing leaf spots on *Liriope spicata* in China[J]. *Plant Disease*, 2019, 103(6): 1422.
- [11] OO M M, OH S K. New record of anthracnose caused by *Colletotrichum liriopes* on *Broadleaf liriop* in Korea [J]. *The Korean Journal of Mycology*, 2017, 45(1): 69.
- [12] YANG B, JIN X, FENG Q. *Colletotrichum* species causing leaf spot diseases of *Liriope cymbidimorpha* (ined.) in China[J]. *Australasian Plant Pathology*, 2020, 49(2): 137–139.
- [13] YANG Y, LIU Z, CAI L. New species and notes of *Colletotrichum* on daylilies(*Hemerocallis* spp.)[J]. *Tropical Plant Pathology*, 2012, 37(3): 165–174.

责任编辑: 罗慧敏
英文编辑: 罗 维