

引用格式:

任晓凤, 刘苗, 周倩, 杨华. 青风藤叶枯病原菌的分离鉴定及防治药剂的筛选[J]. 湖南农业大学学报(自然科学版), 2023, 49(1): 74–78.

REN X F, LIU M, ZHOU Q, YANG H. Isolation and identification of the pathogen causing leaf blight of *Caulis sinomenii* and screening of its fungicides[J]. Journal of Hunan Agricultural University(Natural Sciences), 2023, 49(1): 74–78.

投稿网址: <http://xb.hunau.edu.cn>



青风藤叶枯病原菌的分离鉴定及防治药剂的筛选

任晓凤^{1,2}, 刘苗^{1,2}, 周倩^{1,2*}, 杨华^{3,4}

(1.湖南农业大学植物保护学院, 湖南 长沙 410128; 2.植物疾病控制与利用湖南省高校重点实验室, 湖南 长沙 410128; 3.湖南农业大学生物科学技术学院, 湖南 长沙 410128; 4.湖南正清制药集团股份有限公司, 湖南 长沙 410116)

摘要: 2021年春季, 从湖南省怀化市中方县正清制药青风藤基地和湖南农业大学试验基地分别采集青风藤叶枯病病叶, 利用组织分离法获得病原菌, 并进行柯赫氏法则验证。借助形态学鉴定和分子系统学分析, 明确青风藤叶枯病病原为交链隔孢(*Alternaria alternata*)。利用菌丝生长速率法对5种药剂(95%苯醚甲环唑、98%咪鲜胺、96%己唑醇、96.5%丙硫菌唑、98%啞菌酯)进行筛选, 结果显示95%苯醚甲环唑抑菌效果最好, EC_{50} 为0.043 6 mg/L; 98%啞菌酯抑菌效果最差, EC_{50} 值为8.447 3 mg/L。

关键词: 青风藤; 叶枯病; 病原菌分离鉴定; 交链隔孢; 室内药剂筛选

中图分类号: Q949.746.9; S432.1

文献标志码: A

文章编号: 1007-1032(2023)01-0074-05

Isolation and identification of the pathogen causing leaf blight of *Caulis sinomenii* and screening of its fungicides

REN Xiaofeng^{1,2}, LIU Miao^{1,2}, ZHOU Qian^{1,2*}, YANG Hua^{3,4}

(1.College of Plant Protection, Hunan Agricultural University, Changsha, Hunan 410128, China; 2.Key Laboratory of Plant Disease Control and Utilization of Hunan Province, Changsha, Hunan 410128, China; 3.College of Biological Science and Technology, Hunan Agricultural University, Changsha, Hunan 410128, China; 4.Hunan Zhengqing Pharmaceutical Co. Ltd, Changsha, Hunan 410116, China)

Abstract: In the spring of 2021, the *Caulis sinomenii* leaves with leaf blight were collected from the Zhengqing Pharmaceutical Base in Zhongfang County, Huaihua City, Hunan Province, and from the experimental farm of Hunan Agricultural University. The pathogen was isolated by tissue separation method and verified by Koch's rule. The pathogen was identified as *Alternaria alternata*(*A. alternata*) by morphological and molecular phylogenetic identification. The mycelium growth rate method was used to determine the inhibition effect of 5 agents(95% Difenoconazole, 98% Prochloraz, 96% Hexaconazole, 96.5% Prothioconazole and 98% Azoxystrobin) to the pathogen, and the result showed that 95% Difenoconazole exhibited the best inhibitory effect with the EC_{50} of 0.043 6 mg/L, while 98% Azoxystrobin has the worst control effect with the EC_{50} of 8.447 3 mg/L.

Keywords: *Caulis sinomenii*; leaf blight; isolation and identification of the pathogen; *Alternaria alternata*; screening of fungicides

收稿日期: 2022-07-01

修回日期: 2022-11-09

基金项目: 湖南省自然科学基金项目(2020JJ4043)

作者简介: 任晓凤(1999—), 女, 重庆忠县人, 硕士研究生, 主要从事植物病理学研究, 1651509230@qq.com; *通信作者, 周倩, 博士, 教授, 主要从事植物病理学研究, zhouqian2617@hunau.edu.cn

青风藤(*Caulis sinomenii*)别名寻风藤、扶风藤、清风藤等。2015 年版《中华人民共和国药典》规定,青风藤原植物包括防己科植物青藤(*Sinomenium acutum*)和毛青藤(*S. acutum* var. *cinereum*)2 种,它们的根和茎是主要入药部位^[1],其主要活性成分为青藤碱,除在通经利尿、治疗风湿、止疼镇痛、治疗肾病综合征及心率失常方面有重要功效外^[2-4],对自身免疫性疾病、肿瘤等也有较好的效用^[5-8]。近年来对青风藤的过度开发已造成野生资源匮乏。湖南沅陵、中方县已建立青风藤种植基地,进行规模化生产,但原生境中一种偶发的病害发病面积不断扩大,因受害叶片逐渐枯死成黑褐色,故暂定名叶枯病。笔者利用组织分离法对病原菌进行了分离,用科赫氏法则进行了病原菌验证,并借助形态学与分子系统学分析对病原菌进行鉴定,对病原菌开展了室内药剂筛选试验,以期对青风藤叶枯病的科学防治提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

2021 年 5 月,分别从湖南省怀化市中方县正清制药青风藤基地和湖南农业大学试验基地采集青风藤叶枯病病叶。

原药 96%己唑醇、95%苯醚甲环唑、98%嘧菌酯、98%咪鲜胺和 96.5%丙硫菌唑分别由湖北瑞伯信化工有限公司、武汉远成共创科技有限公司、杭州宇龙化工有限公司、湖北双焱化工有限公司、安道麦辉丰有限公司提供。

1.2 方法

1.2.1 青风藤叶枯病病原菌的分离与鉴定

利用组织分离法^[9]获得清风藤叶枯病致病菌,经纯化后接种于 PDA 平板上培养;依据科赫氏法则,采用菌丝块非伤口接种法^[10]将致病菌回接至健康叶片上,每日观察叶片发病情况,待出现典型症状后再进行病原菌的重新分离鉴定。

用 Omega 真菌 DNA 提取试剂盒提取致病菌的 DNA,根据 WOUDEBERG 等的研究结果^[11],利用 ITS 通用引物 5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'和 5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3', *gpd* 基因引物 5'-CAACGG CTTCGGTCGCATTG-3'和

5'-GCCAAGCAGTTGGTGTGC-3'以及 *Alt a1* 基因引物 5'-ATGCAGTTCACCACCATCGC-3'和 5'-ACGAGGGTGAYGTAGGCGTC-3'对致病菌特定序列进行扩增测序。引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。50 μ L PCR 反应体系,加入模板 1 μ L,正向和反向引物各 1 μ L(10 μ mol /L), 2 \times *Taq* PCR Mix 25 μ L(北京擎科生物技术有限公司), ddH₂O 补足体系,扩增时使用 Bio-Rad S1000TM Thermal Cycler PCR 仪。扩增程序:95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 95 $^{\circ}$ C 变性 1 min, 50 $^{\circ}$ C 退火 1 min, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min,共 35 个循环;最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min, 4 $^{\circ}$ C 保存。PCR 产物经 1% 的琼脂糖凝胶电泳确认后送生工生物工程(上海)股份有限公司测序,在 NCBI 数据库 BLAST 中比对测序结果,用 MEGA 7 构建系统发育树。

1.2.2 杀菌剂抑菌活性的测定

采用菌丝生长速率法^[12]测定 5 种供试药剂对青风藤叶枯病病原菌的毒力。以丙酮作溶剂,依照预试结果设置 5 个浓度梯度:98%苯醚甲环唑分别稀释 2 560 000、5 120 000、10 240 000、20 480 000 和 81 920 000 倍;98%咪鲜胺分别稀释 1 280 000、2 560 000、5 120 000、10 240 000 和 40 960 000 倍;96%己唑醇分别稀释 320 000、640 000、2 560 000、5 120 000 和 10 240 000 倍;96.5%丙硫菌唑分别稀释 40 000、80 000、320 000、640 000、1 280 000 和 2 560 000 倍;98%嘧菌酯分别稀释 5000、20 000、40 000、80 000 和 160 000 倍。将药剂溶于丙酮后分别配制相应浓度的母液,每种药剂每种浓度取 1 mL 加入 49 mL PDA 培养基中混匀倒板,以等量丙酮溶液加入 49 mL PDA 培养基作为对照,每个处理重复 3 次。用十字交叉法^[13]测量菌丝直径,计算抑菌率。通过 SPASS 23.0 分析获得毒力回归方程、相关系数(*r*)及 EC₅₀ 值。

2 结果与分析

2.1 清风藤叶枯病病害症状及病原菌的分离鉴定

观察发现,青风藤叶枯病发病伊始,叶片显现褐色小斑,随后逐步延展,呈现近圆形或不规则形状的褐色坏死斑,严重时坏死斑逐渐扩展到整个叶片,导致叶片整片干枯、死亡(图 1)。叶片表面和背面病斑在潮湿时皆可见深褐色霉状物。在光学显微

镜下观察叶片病斑处的霉状物, 可发现典型的链格孢属形态的真菌孢子(图 2-1)。



图 1 青风藤叶枯病的田间症状

Fig. 1 Field symptoms of *Caulis sinomenia* leaf blight

通过组织分离法获得 7 个纯培养致病菌株, 命名为 SaCS-1、SaCS-2、SaCS-3、…、SaCS-7, 这 7 个菌株培养特征基本一致。在 PDA 培养基上培养 7 d, 菌落正面灰色(图 2-2), 背面橄榄色(图 2-3), 气生菌丝和基内菌丝生长茂盛, 菌丝有分隔多分支。25 °C 光照培养 5 d 后避光培养 5 d, 可镜检到分生孢子, 大小为(10.6~32.7) μm × (6.1~17.8) μm 。分生孢子梗从顶部到基部由浅褐色逐渐变成深褐色, 单生或簇生, 顶端为直立或略弯曲, 不分支但有分隔。分生孢子呈淡褐色至褐色, 有纵横隔膜, 单生或短链生且有纵横隔膜, 倒梨形、近椭圆形或倒棍棒形。7 个菌株的菌落培养, 分生孢子梗和分生孢子形状大小等基本一致, 且获得的分生孢子和分生孢子梗大小、形态特点等与自然发病病斑上获取的分生孢子和分生孢子梗大小无明显差异。



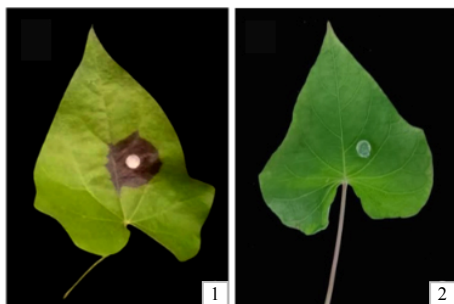
1 分生孢子; 2 培养 7 d 菌落正面; 3 培养 7 d 菌落背面。

图 2 青风藤叶枯病病原菌的形态

Fig. 2 Morphological characteristics of pathogen causing *Caulis sinomenia* leaf blight

2.2 柯赫氏法则验证与病原菌鉴定结果

在表面消毒的青风藤叶片上接种菌株 SaCS-1, 3 d 后接种叶片开始发病, 叶片正面与背面出现褐色坏死斑点, 随接种时间的延长, 褐色坏死斑点逐步扩大(图 3-1)。从发病叶片病、健交界处分离得到



1 接种 SaCS-1 菌株; 2 接种琼脂块(CK)。

图 3 青风藤叶枯病菌接种发病症状

Fig. 3 Inoculation of leaf blight pathogen on *Caulis sinomenia*

的菌株与 SaCS-1 形态一致, 而对照叶片(图 3-2)无任何症状, 因此判断从田间采集的病叶上分离得到的菌株是青风藤叶枯病的病原菌。

利用真菌通用引物 ITS4/ITS5、gpd1/gpd2、Alt-for/Alt-rev 对分离的菌株基因组 DNA 进行序列扩增, 3 个基因序列分别扩增获得大小为 548、560、460 bp 的片段, 测序后发现 7 个菌株中扩增所得到的序列完全一致。其中菌株 SaCS-1 的序列提交至 NCBI 数据库(登录号分别为 OK352271、OL512801 和 OL512802)进行序列比对, 发现该菌株 ITS 序列与 WOUDEMBERG 等报道的交链格孢菌株 *Alternaria alternata* CBS 106.24 的 ITS 序列一致(登录号 KP124298), 与 *gpd*(登录号 KP124155)和 *Alt a1*(登录号 KP123847)基因序列分别相差 3 个碱基和 4 个碱基。系统发育树选取链格孢属小孢子种 10 个

代表菌株的 ITS、*gpd* 和 *Alt a1* 基因序列进行联合建树,结果(图 4)显示菌株 SaCS-1 与菌株 *Alternaria alternata* CBS 106.24 单独聚于 1 个分支。根据形态

学和结合 ITS、*gpd* 和 *Alt a1* 序列构建的进化树,将青风藤叶枯病的病原鉴定为交链格孢菌 *A.alternata*。

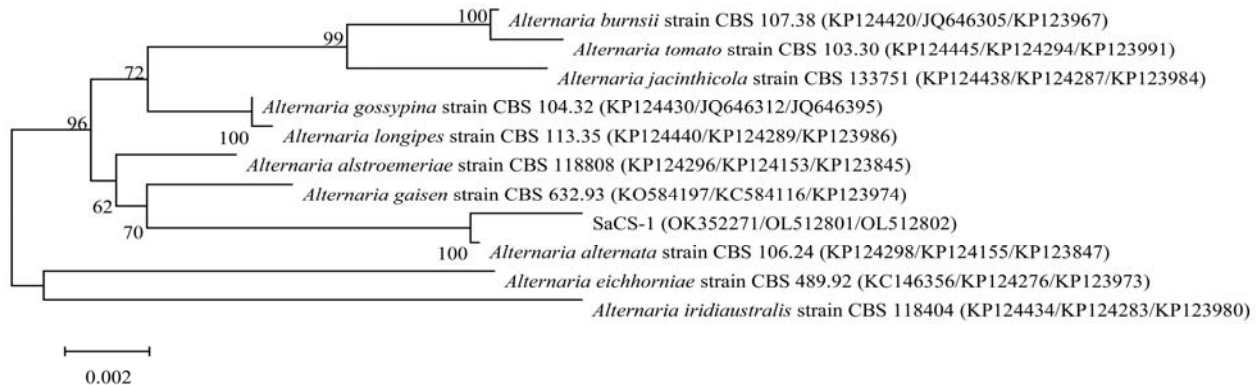


图 4 基于 ITS、*gpd* 和 *Alt a1* 基因序列的系统发育树

Fig.4 Phylogenetic tree based on sequences of ITS, *gpd* and *Alt a1* genes

2.3 青风藤叶枯病原菌药剂抑菌防效

利用菌丝生长速率法测定了 5 种药剂对病原菌的抑制效果,结果 95%苯醚甲环唑的抑菌效果最好;98%啞菌酯抑菌效果最差(表 1)。

表 1 5 种药剂对青风藤叶枯病原菌的毒力
Table 1 The inhibition effect of five fungicides against *Alternaria alternata*

药剂	毒力回归方程	相关系数	EC ₅₀ /(mg·L ⁻¹)
95%苯醚甲环唑	$y=0.645x+5.877$	0.964	0.043 6
98%咪鲜胺	$y=0.930x+5.966$	0.936	0.091 5
96%己唑醇	$y=0.821x+5.565$	0.991	0.205 0
96.5%丙硫菌唑	$y=0.516x+5.268$	0.979	0.302 4
98%啞菌酯	$y=0.655x+4.393$	0.981	8.447 3

3 讨论

对青风藤叶枯病原物进行的分离培养、室内接种、形态学观察以及分子系统发育分析结果表明,引起青风藤叶枯病的致病菌为交链格孢菌(*A.alternata*)。A.alternata 为害青风藤叶片形成近圆形或不规则形状的褐色坏死斑,相对湿度大时,病斑快速扩展到整个叶片,导致叶片干枯死亡,对青风藤产业造成严重影响。目前,对 A.alternata 的防治主要以化学药剂为主。SINGH 等^[14]研究发现三唑类杀菌剂己唑醇对 A.alternata 具有很好的抑制效果;在对 A.alternata 引起的苹果斑点落叶病进行防治药剂筛选时也发现三唑类杀菌剂戊唑醇、苯醚甲环唑、腈菌唑对其有较好的防治效果^[15-16]。此外,咪鲜胺^[17]、异菌脲^[18]和啞菌酯^[19]对 A.alternata 也具

有较好的防治效果。选用苯醚甲环唑、咪鲜胺、己唑醇、丙硫菌唑和啞菌酯 5 种药剂进行室内毒力测定,其中也是三唑类杀菌剂苯醚甲环唑对青风藤叶枯病致病菌的抑菌效果最佳,其次是咪鲜胺,同时筛选的己唑醇与丙硫菌唑 2 种药剂也有较好的抑菌效果,生产上可选择上述药剂轮换使用,以避免病原菌产生抗药性。

参考文献:

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 三部[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2015: 195-196.
- [2] 张卫东, 唐燕甫. 雷公藤及青风藤+中医定向透药治疗湿热内蕴型类风湿性关节炎的临床研究[J]. 中国医药科学, 2022, 12(7): 7-11.
- [3] 宋万平, 陈华国, 周欣. 苗药青风藤研究进展[J]. 国际药学研究杂志, 2020, 47(11): 946-953.
- [4] 陈曦, 王艳龙. 青风藤研究现状及展望[J]. 江西中医药, 2011, 42(2): 69-72.
- [5] 郑洁, 赵莉平, 胡亚莉, 等. 青藤碱对兔膝关节模型软骨 Toll 样受体 2、4 及髓样分化因子 88 表达的影响[J]. 中国中医药信息杂志, 2018, 25(9): 49-51.
- [6] 林琰杰, 于嘉智, 魏传银. 青藤碱对骨肉瘤细胞增殖的影响及其抑瘤作用观察[J]. 山东医药, 2018, 58(32): 38-41.
- [7] 朱昌毫, 孙诚谊, 喻超, 等. 青藤碱对胰腺癌细胞系 SW1990 增殖及凋亡的影响[J]. 贵州医科大学学报, 2018, 43(8): 879-883.
- [8] 周龙翔, 张曙, 饶雷平. 青藤碱通过 TNF- α 、IL-23 及 β -catenin 抑制人结肠癌细胞增殖[J]. 西南国防医药, 2017, 27(12): 1256-1259.
- [9] 方中达. 植病研究方法[M]. 3 版. 北京: 中国农业出版社, 1998: 122-127.

- [10] 伏荣桃, 王剑, 陈诚, 等. 华重楼 2 种叶斑病原菌分离与鉴定[J]. 中药材, 2019, 42(12): 2741-2745.
- [11] WOUDEBERG J H C, SEIDL M F, GROENEWALD J Z, et al. *Alternaria* section *Alternaria*: species, formae speciales or pathotypes?[J]. *Studies in Mycology*, 2015, 82: 1-21.
- [12] 桂瑶, 胡军华, 张蓉, 等. 云南玉溪冰糖橙果斑病致病菌的鉴定及室内药剂筛选[J]. 湖南农业大学学报(自然科学版), 2020, 46(3): 324-330.
- [13] 占爽, 杨静, 胡军华, 等. 大雅柑枯斑病斑的病原鉴定及防治药剂的筛选[J]. 湖南农业大学学报(自然科学版), 2021, 47(5): 535-539.
- [14] SINGH, P C, SINGH D. In vitro evaluation of fungicides against *Alternaria alternata*[J]. *Annals of Plant Protection Sciences*, 2006, 14(2): 500-502.
- [15] 时春喜, 黄磊, 惠浩浩, 等. 几种杀菌剂防治苹果斑点落叶病田间药效试验[J]. 西北农业学报, 2011, 20(11): 188-191.
- [16] 侯琿, 周增强, 王丽. 多种杀菌剂对苹果斑点落叶病的田间防治效果[J]. 中国农学通报, 2015, 31(28): 151-155.
- [17] 刘霞, 杨克强, 姜兴印, 等. 危害核桃的链格孢 (*Alternaria alternata*) 对 4 种杀菌剂的敏感性[J]. 农药, 2013, 52(1): 67-70.
- [18] 韩国兴, 符雨诗, 阮若昕, 等. 柑橘链格孢褐斑病病菌对异菌脲和啮菌环胺敏感性评价[J]. 中国植保导刊, 2017, 37(7): 11-15.
- [19] 杨华, 李广旭, 张广仁, 等. 几种杀菌剂防治苹果斑点落叶病田间试验[J]. 北方果树, 2019(6): 15-16.

责任编辑: 罗慧敏
英文编辑: 罗维

(上接第 51 页)

- [17] 赖亚宇, 周骐, 郑微, 等. 静脉表型分子 COUP-TF II 表达降低对血管内皮细胞衰老的影响[J]. 中国病理生理杂志, 2017, 33(8): 1345-1352.
- [18] 王彩霞, 张玉平, 陈小卫, 等. 骨髓间充质干细胞减轻体外扩增的脐血造血干细胞衰老的作用[J]. 中华器官移植杂志, 2013(7): 432-435.
- [19] 李亚, 秦海强, 陈启盛. β -淀粉样蛋白对 D-半乳糖致衰大鼠行为及海马 SOD 活性和 MDA 含量的影响[J]. 中国病理生理杂志, 2001, 17(1): 16-18.
- [20] 皮建辉, 谭娟, 胡朝曦, 等. 金银花黄酮对小鼠免疫调节作用的研究[J]. 中国应用生理学杂志, 2015, 31(1): 89-92.
- [21] 王雪, 修成奎, 杨静, 等. 人参-三七-川芎提取物对高糖高脂诱导血管内皮细胞衰老的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2019, 25(1): 124-129.
- [22] 王强, 修成奎, 雷燕, 等. 白藜芦醇延缓心肌微血管内皮细胞衰老的作用机制[J]. 中国实验方剂学杂志, 2018, 24(19): 145-152.
- [23] MARANZANA E, BARBERO G, FALASCA A I, et al. Mitochondrial respiratory super complex association limits production of reactive oxygen species from complex I[J]. *Antioxidants & Redox Signaling*, 2013, 19(13): 1469-1480.
- [24] LOPEZ-FABUEL I, LE DOUCE J, LOGAN A, et al. Complex I assembly into super complexes determines differential mitochondrial ROS production in neurons and astrocytes[J]. *PNAS*, 2016, 113(46): 13063-13068.
- [25] LETTS J A, FIEDORCZUK K, SAZANOV L A. The architecture of respiratory super complexes[J]. *Nature*, 2016, 537: 644-648.
- [26] 朱玉贤, 李毅, 郑晓峰, 等. 现代分子生物学[M]. 5 版. 北京: 高等教育出版社, 2019.
- [27] 周丹. 预知子提取物对抑郁症大鼠海马神经可塑性相关蛋白 BDNF/CREB/Bcl-2 的影响研究[J]. 药物生物技术, 2019, 26(2): 110-113.
- [28] PERINI G F, RIBEIRO G N, PINTO NETO J V, et al. BCL-2 as therapeutic target for hematological malignancies [J]. *Journal of Hematology & Oncology*, 2018, 11(1): 65.
- [29] WANG C, WANG G, LIU H, et al. Protective effect of bioactive compounds from *Lonicera japonica* Thunb. against H₂O₂-induced cytotoxicity using neonatal rat cardiomyocytes[J]. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences*, 2016, 19(1): 97-105.
- [30] 李靳, 杨莉, 万静枝, 等. 三七总皂苷对 D-半乳糖致 H9c2 细胞衰老的保护作用研究[J]. 中药材, 2014, 37(8): 1421-1424.
- [31] 但玉娇, 高晓蓉, 陈洁, 等. 三七总皂苷对缺氧诱导下视网膜神经节细胞凋亡的作用机制研究[J]. 中国临床药理学杂志, 2021, 37(17): 2295-2298.
- [32] 周雪. 基于 Bcl-2/Bax/Caspase-3 信号通路探讨三七总皂苷对自身免疫性心肌炎模型大鼠心肌凋亡影响的研究[J]. 陕西中医, 2021, 42(11): 1504-1510.

责任编辑: 毛友纯
英文编辑: 柳正