

· 资源与鉴定 ·

栀子褐斑病病原菌鉴定及寄主范围测定

董艳凯, 朱玉野, 胡燕珍, 龚雨虹, 罗光明*
(江西中医药大学药学院, 南昌 330004)

[摘要] **目的:**明确引起栀子褐斑病病原菌种类,为病害防治提供依据。**方法:**采集江西省不同地区栀子褐斑病病叶标本,采用组织块法对病原菌进行分离纯化,按照柯赫氏法则,用致病性试验、病原菌形态学观察、分子生物学真菌 rDNA-ITS 序列分析,对病原菌进行鉴定,采用离体叶片接种方法对不同种属的植物叶片进行致病性测定,确定病原菌寄主范围。**结果:**从收集的栀子褐斑病病原菌感染的叶片中分离纯化得到的菌株,在培养基中初期气生菌丝绒毛状,白色,菌落的颜色初为白色,后变为深褐色,显微镜下观察菌丝有隔及分枝,子实体球型,灰色至褐色,分离的菌株回接后可使栀子叶片产生褐斑病病害,对扩增得到的 rDNA-ITS 序列进行 Blast 对比分析,确定该病害为葡萄座腔菌 *Botryosphaeria dothidea* 引起。病原菌寄主范围较广泛,供试的 10 种植物中对白花前胡的致病性最强,对千日红则没有致病性。**结论:**明确了栀子褐斑病病原菌及其寄主范围。

[关键词] 栀子; 褐斑病; 病原菌

[中图分类号] Q945;R282 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2016)23-0035-05

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2016230035

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20160906.0913.030.html>

[网络出版时间] 2016-09-06 9:13

Pathogen Identification and Determination of Host Range for *Gardenia jasminoides* Brown Spot

DONG Yan-kai, ZHU Yu-ye, HU Yan-zhen, GONG Yu-hong, LUO Guang-ming*

(School of Pharmacy, Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330004, China)

[Abstract] **Objective:** To clarify the pathogenic species of *Gardenia jasminoides* brown spot, and provide the basis for disease prevention and control. **Method:** The diseased leaf with *G. jasminoides* brown spot were collected from different regions of Jiangxi province. Pathogens were separated and purified by tissue culture method, and identified by using pathogenic test, pathological observation and rDNA-ITS sequence analysis according the Koch's postulates. Pathogenicity of the leaf from different species plants was identified by using isolated leaf inoculation method to determine the host range. **Result:** The pathogens separated from sample leaves showed white villiform aerial hyphae at the initial stage in medium, so that the color of colony was white at first, and then turned to dark brown. Observation under microscope showed that the hyphae had septum and branch, with gray to brown spheroidal fruiting body. The separated pathogen would make the healthy *G. jasminoides* leaves produce brown spot after tie-back. Blast analysis of the amplified rDNA-ITS sequence confirmed that the disease was caused by *Botryosphaeria dothidea*. The pathogen had a wide host range, and the test results of 10 kinds of plants showed strongest pathogenicity in *Peucedanum praeruptorum*, but showed no pathogenicity in *Gomphrena globosa*. **Conclusion:** The pathogens and host range for *G. jasminoides* brown spot were clarified in this paper.

[Key words] *Gardenia jasminoides*; brown spot; pathogen

[收稿日期] 20151124(012)

[基金项目] 国家公益性行业科研专项(201507002);国家“重大新药创制”科技重大专项(2011BAI04B01);中央本级重大增减支项目(20603020213,20603020110)

[第一作者] 董艳凯,硕士,从事中药资源的开发与利用研究,Tel:13672211442,E-mail:450866106@qq.com

[通讯作者] *罗光明,博士,教授,从事中药资源研究,Tel:0791-87118982,E-mail:jzlgm88@163.com

梔子来源于茜草科的干燥成熟果实,主要分布于我国长江以南各省。现代研究证明,梔子主要活性成分为黄酮类梔子素,三萜类化合物藏红花素、藏红花酸及 *d*-藏红花苷元,环烯醚萜苷类梔子苷、异梔子苷、去羟梔子苷、山梔子苷等^[1-2]。国内外对于梔子的需求量很大,且不断上升,具有很好的市场前景^[3]。

目前国内外对梔子的需求量日益增加,具有广阔的市场前景,栽培面积不断扩大^[4]。褐斑病为梔子栽培中的主要病害之一,病害全年都可能发生,严重时植株落叶、落果或枯死,直接影响药材的产量和质量,造成巨大的经济损失。防治手段也仅限于病害发生初期或发生期施用多菌灵、退菌特等。病害控制应在明确病原的前提下针对性的进行,才能取得最优的防治效果。施宝瑞^[5]对加拿利海枣褐斑病病原菌进行鉴定,明确病原菌为柯氏帚梗柱孢霉 *Cylindrocladium colhounii*。谭舒心^[6]对蜘蛛兰褐斑病进行过系统性研究,明确病原菌为盘长孢状刺盘孢 *Colletotrichum gloeosporioides* 和韦斯梅拟盘多毛孢 *Pestalotiopsis vamaiae*。目前国内未见对引起梔子褐斑病病原菌系统性鉴定的报道,本研究基于柯赫氏症病例,通过形态学观察及真菌 rDNA-ITS 序列分析对梔子褐斑病进行系统的症状与病原菌鉴定,为梔子褐斑病的防治提供依据。

1 材料

2015 年 4 月从九江市湖口县流芳乡、樟树市义城镇采集具有典型症状的病株作为试验材料由江西中医药大学药学院罗光明教授鉴定为茜草科 Rubiaceae 植物梔子 *Gardenia jasminoides* 的叶,进行病原菌的分离纯化和鉴定。发病植株叶片上病斑为梭形、椭圆形或长条形,深褐色,略呈水浸状,边缘黄褐色。采集的病株放于塑料袋中,置冰箱中低温(4℃)保存。

Tris-HCl(上海瑞永生物科技有限公司,批号 20150120), EDTA, disodium salt, dihydrate(生工生物,批号 201501), GelRed, DL2000 DNA Marker, 2 × PCR Master Mix(天根生化科技有限公司,批号分别为 20150418, 201504, 20150123), 氯化钠(天津市科密欧化学试剂开发中心,批号 20140928), 马铃薯葡萄糖琼脂培养基(上海楷洋生物技术有限公司,批号 20150124), 三羟甲基氨基甲烷(上海瑞永生物科技有限公司,批号 20150122), 琼脂糖(鼎国生物科技有限公司,批号 20150115), 无水乙醇, 乙酸, 异丙醇, 异戊醇, 三氯甲烷均为化学纯, 引物由天根生化

科技有限公司合成。

JV-3021HR 型高速冷冻离心机(安徽嘉文仪器装备有限公司), BXM-30R 立式压力灭菌锅(上海博迅实业有限公司医疗设备厂), ZHJH-1115C 型垂直直流超净工作台(上海智城分析仪器制造有限公司), LRH-250-5 型恒温恒湿培养箱(广东省医疗器械厂), HH-4 型数显恒温水浴锅(同华电器有限公司), Meter PP-15 型酸度计, BP211D 型 1/1 万电子天平(Sartorius), RS 型水平凝胶电泳仪 C1000 Touch Thermal Cycler 型扩增仪, MelecμLar Imager ChemIDoc™ X RSF with Image Lab™ Software 型凝胶成像系统(美国 BIO-RAD 公司), BA410 型光学显微镜(游标卡尺, 浙江工具量具有限公司)。

2 方法

2.1 病原菌分离^[7] 选取病斑叶片, 表面用清水冲洗干净。病斑处剪取 5 mm × 5 mm 大小的组织块, 在无菌超净工作台上用 70% 乙醇浸洗 30 s, 5% 次氯酸钠消毒 5 min, 用灭菌水连续漂洗去除残余的次氯酸钠, 取出后用灭菌吸水纸吸去多余的水分, 置于事先备好的 PDA 平板上, 于 30℃ 恒温培养箱中培养。72 ~ 96 h 后形成菌落, 切取典型菌落边缘的菌丝块, 置于新 PDA 平板基上培养获得分离物的纯培养, 转入试管, 于 4℃ 冷藏箱中保存备用。

2.2 致病菌测定 采成熟健康梔子叶片 20 片进行接种。接种前, 用 75% 乙醇进行叶片表面消毒, 后用无菌水冲洗干净, 放进铺有双层无菌吸水纸的瓷盘中, 叶柄部位用吸水纸覆盖。取在 PDA 培养基上培养 15 d 后的成熟菌落, 用打孔器取直径为 6 mm 菌丝块, 接于叶片表面, 菌丝块周围保持较高湿度。并置于 30℃ 恒温培养箱中黑暗培养 2 d。2 d 后移去菌丝块, 观察叶片发病情况。以接种空白菌丝块的叶片作对照, 遵循一般植物病害症状的记述要点和观察方法, 记录病害发生过程中的特征和病状, 并对特征病斑拍摄记录。

2.3 病原菌的再分离 从接种发病叶片的病健交界处, 剪取 5 mm × 5 mm 大小的病变组织, 用常规的组织分离法进行病原菌的再分离, 鉴定 PDA 平板上长出的病菌与接种用菌株是否一致, 进行柯赫氏法则验证。

2.4 病原菌鉴定

2.4.1 菌落形态、菌丝及子实体的形态观察 将供试菌株接种到 PDA 培养基上, 在 30℃ 条件下恒温黑暗培养, 观察菌落形态, 制作载玻片在光学显微镜(40 倍)下观察菌丝的形态特征, 根据菌落形态、无

性和有性繁殖器官等,对照《真菌鉴定手册》,《中国真菌志》等进行鉴定。

2.4.2 分子鉴定 在 PDA 培养基中对菌株进行活化培养,4~7 d 后在菌落边缘打取直径 6 mm 的菌饼置于查彼克液体培养基中 28 ℃ 振荡培养。菌丝长到一定数量后挑出。取适量菌丝,DNA 的提取按常规的 CTAB 法。采用真菌 ITS 通用引物 ITS1 5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3', 和 ITS4 5'-TCC TCCGCTTATTGATATGC-3'。进行扩增。PCR 反应体系为 50 μL 组分:模板 DNA 2 μL,2 × Taq PCR Master Mix 25 μL,ITS1 (10 μmol·L⁻¹) 和 ITS4 (10 μmol·L⁻¹) 各 2 μL,ddH₂O 19 μL。

扩增程序:95 ℃ 预变性 4 min,94 ℃ 变性 1 min,54 ℃ 退火 1 min,72 ℃ 延伸 1 min,共 35 个循环;最后 72 ℃ 延伸 10 min。4 ℃ 保存。反应结束后,取 10 μL 扩增产物,采用 1% 琼脂糖凝胶电泳进行检测,于凝胶成像系统成像、照相、保存。PCR 产物委托天根生化科技有限公司进行纯化和测序。获得目的基因序列后,将菌株的 rDNA-ITS 序列与 NCBI 数据库中已知序列进行对比,并进行同源性分析,结合病原菌的形态学观察及致病性测定,最终确定病原菌的种类^[8]。

2.5 病原菌寄生范围测定 采用离体叶片接种法对供试植物的成熟叶片进行接种。接种前,用 75% 乙醇将上述植物叶片表面消毒,后用无菌水冲洗干净,置于瓷盘中,双层吸水纸覆盖叶柄部位。打取直径为 6 mm 的菌饼接种到叶片上。每种供试植物处理 10 片叶。接种空白培养基圆饼作对照。培养条件:30 ℃ 恒温条件下高湿度培养。72 h 后移走菌饼,观察叶片的发病情况并统计发病率(%)。均采自江西中医药大学神农园,由罗光明教授鉴定。见表 1。

发病率 = (病叶数/供试总叶数) × 100%

3 结果与分析

3.1 病害症状调查结果 褐斑病为真菌性病害,全年都可发生,但以高温高湿的多雨炎热夏季危害最重。主要发生在植株的中、下部叶片,发病从下部叶片开始,多从叶尖和叶缘处发生,病斑呈现不规则形^[9],内部淡褐色而周边略呈角型浓淡有差别的同心轮纹病斑,病重时病斑直径可达 2~3 cm,之后病斑变成黑褐色,严重时植株落叶、落果或枯死。一般种植密度大、土壤黏重、环境潮湿条件下病害发生更为严重。

3.2 病原菌形态特征与致病性检测

3.2.1 病原菌形态特征 在 PDA 培养基上,菌落

表 1 供试植物

Table 1 Test plants

供试植物	科	属
凤仙花 <i>Impatiens balsamina</i>	凤仙花	凤仙花
白花前胡 <i>Peucedanum praeruptorum</i>	伞形	前胡
藿香 <i>Agastache rugosa</i>	唇形	藿香
伏生紫堇 <i>Corydalis decumbens</i>	紫堇	紫堇
望江南 <i>Cassia occidentalis</i>	豆	决明
珠牙紫堇 <i>Corydalis edulis</i>	罂粟	紫堇
桔梗 <i>Platycodon grandiflorus</i>	桔梗	桔梗
野菊花 <i>Dendranthema morifolium</i>	菊	菊
千日红 <i>Gomphrena globosa</i>	苋	千日红
长朔麻黄 <i>Ephedra sinica</i>	麻黄	麻黄

呈现圆形或不规则形,菌丝幼嫩时白色至淡黄色,培养 2 d 时由菌落的中心开始颜色逐步变为浅褐色,后菌落颜色逐渐加深,老熟后褐色至黑色,5~6 d 即可长满直径 9 cm 的平板,旺盛时可至平板顶盖出,气生菌丝绒毛状,发达,不产孢,菌落形态见图 1。显微镜下菌丝透明光滑、壁薄,扭曲状的曲线式生长,菌丝宽度不规则,直径为 3~6 μm,分枝与主枝成直角,部分成锐角,有明显的隔膜,但是在显微镜下未见有分生孢子产生,见图 2。部分菌落会产生子实体,个体较大,大部分直径 1 mm 左右,个别直径较大,可达到 3 mm,形状为球形,表面生长,还会有褐色的半透明油状液体物质溢出。

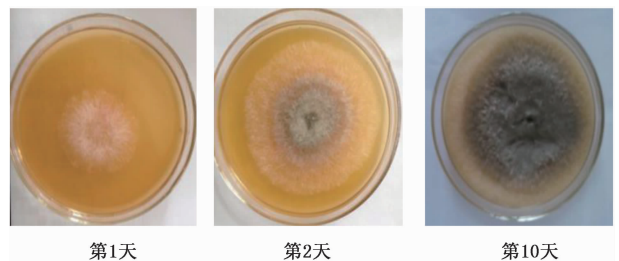


图 1 栀子褐斑病病原菌不同培养阶段菌落形态(肉眼观察)

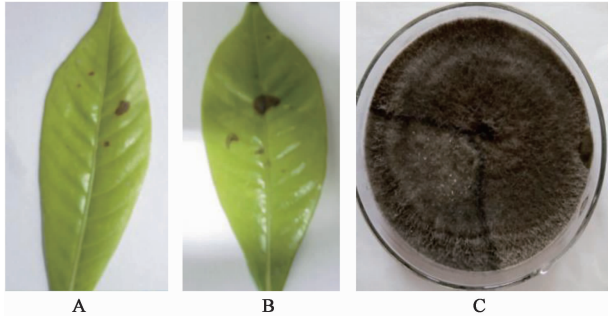
Fig. 1 *Gardenia* leaf spot pathogen colony morphology different culture stages(visually)

3.2.2 致病性检测 叶片接种菌丝 48 h 内出现大小不等的褐色病斑,小的为针孔状大小,大的呈椭圆形或近圆形,初时为黄褐色至淡褐色,游标卡尺测得直径 1.7~4.2 mm。随后病斑扩大,颜色逐步变为深褐色,取感染病原菌的栀子叶片进行病原菌分离后可得到相同的病原菌。见图 3。

3.3 rDNA-ITS 区段扩增及测序 用通用引物对褐斑病病原菌的 rDNA-ITS 序列进行扩增,以该病原菌



图 2 栀子褐斑病原菌菌丝形态显微特征 (×40)
Fig. 2 Gardenia leaf spot mycelial form microscopic characteristics (×40)



A, B. 病变叶片; C. 再分离得到的病原菌 (肉眼观察)
图 3 接种之后的病变叶片及再分离之后的病原菌 (肉眼观察)
Fig. 3 Pathogen inoculated leaves after lesion and then after separation (visually)

基因组 DNA 为模板, 扩增出 500 ~ 750 bp 的单一一条带, 见图 5。

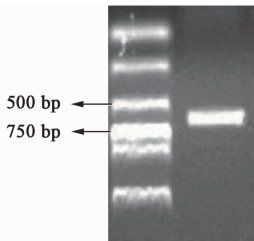


图 5 褐斑病原菌 rDNA-ITS 区 PCR 扩增结果
Fig. 5 Leaf spot pathogen rDNA-ITS region PCR amplification results

3.4 同源性 用通用引物对褐斑病病原菌的 rDNA-ITS 序列进行扩增, 扩增出 558 bp 的特异性片断。产物测序获得的序列 5'-CGTACAAAGCTGATTCGGGCTCCGGCCCGATCCTCCCACCCTTTGTGTA CCTACCTCTGTTGCTTTGGCGGGCCGCGTCTCCG CGGCCGCCCTCCCGGGGGGTGGCCAGCGCC CGCCA GAGGA CCATCA AACTC CAGTC AGTAA ACCA TGCA GTCTG AAAAA CATT AATAAA CTAA AACTTT CAACA ACGGA TCTCTTGGTTC TGGCA TCGATGAAG AACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCA GAATT CAGTG AATCA TCGAA TCTTT GAACG CACAT

TGCGC CCTTT GGTAT TCCGA AGGG CATGC CTGTTC GAGCG TCATT ACAACC CTCAA GCTC TGCT TGGTAT TGGGC ACCG TCCTTT GCGG GCGCG CCTCA AAGACC TCGGC GGTGG CGTCTTG CCTC AAGC GTAGT AGAAC ATACA TCTC GCTTC GGAGC GCAG GCGCT CGCC CGC CGGA CGAA CCTTC TGAAC TTTT CTCA AGGTTGACC TCGGATCAGGTAGGGATACCCGCTGAACTTAAGCA TATCAATAAGCGGAGGAA-3'。将菌株的 rDNA-ITS 序列与 NCBI 网站已有的 DNA 序列进行同源性比较, 数据显示, 同源性较高的菌株是 *Botryosphaeria dothidea* (葡萄座腔菌), 其相似性 100%。

3.5 寄主范围的测定 寄主范围测定研究结果表明, 接种 3 d 后, 除了千日红之外所有植株的叶片均出现了不同程度的褐斑病症状, 发病率最高为 100%, 分别是白花前胡、伏生紫堇、珠牙紫堇、桔梗和长朔麻黄, 白花前胡发病最严重, 病斑面积占叶片面积 50% 以上, 其次是桔梗, 凤仙花、野菊花、望江南等病斑面积较小, 发病轻微, 见表 2。

表 2 栀子褐斑病原菌寄主范围测定结果
Table 2 Gardenia leaf spot pathogen host range of measurement results

供试植物	发病率/%	严重度
凤仙花	90	+
白花前胡	100	卅
藿香	90	卅
伏生紫堇	100	+
望江南	90	+
珠牙紫堇	100	+
桔梗	100	卅
野菊花	80	+
千日红	0	/
长朔麻黄	100	+

注: +. 病斑面积占叶面积的 10% 以下; ++. 病斑面积占叶面积的 10% ~ 30%; 卅. 病斑面积占叶面积的 30% ~ 50%; 卅. 病斑面积占叶面积的 50% ~ 70%。

4 讨论

褐斑病发病后期病斑穿孔或完整, 降低栀子的观赏性^[10]。针对栀子褐斑病病原菌的鉴定, 此前报道多为形态鉴别及防治技术^[10], 此病害严重影响栀子的产量, 系统的菌物分类以形态特征和生理生化指标为分类基础, 但真菌的形态特征在生长过程中受环境影响, 或者存在中间种等情况, 使形态学鉴定有时不准确。利用现代分子生物学技术能直接反映基因本身, 具有传统形态学方法无可比拟的优越

性^[11]。本研究对栀子主要产区九江褐斑病原进行了鉴定,运用传统的形态学与现代分子生物学技术相结合,利用 rDNA-ITS 序列分析,鉴定出引起褐斑病的病原菌为葡萄座腔菌 *B. dothidea*。

这类真菌分布广泛,种类繁多,其寄主主要为具有经济价值的树种,如苹果树、梨树、栗子树、桉树等^[12],该菌株的寄主范围很广。对多种不同种属的植物均有较强的致病性。本研究后期也进行了葡萄座腔菌引起的栀子褐斑病药剂筛选研究,结合本文研究,可为栀子褐斑病的田间防治提供依据和指导。

褐斑病病害症状随着植物种属和病原菌株系等不同而表现不同。作者在基地调查时发现光照充足、栽培密度低、通风性好、环境湿度低的基地中褐斑病发病率普遍较低,建议在生产中加大植株个体间的距离,从而改善栀子在发病季节的整体表现,提高植株的综合抗病或耐病能力,减轻病害的蔓延趋势,尽可能地避免或减少病害发生所造成的危害。

[参考文献]

[1] 倪慧艳,张朝晖,傅海珍. 中药栀子的研究与开发概述[J]. 中国中药杂志, 2006, 31(7): 538-541.
[2] 董丽华,邹红,朱玉野,等. 不同产地栀子种子萌发特性研究[J]. 种子, 2014, 33(10): 1-4.

[3] 罗光明,董艳凯,朱玉野,等. 不同产地栀子种子同工酶比较[J]. 江苏农业科学, 2015, 43(8): 244-247.
[4] 罗光明,董艳凯,王晓云,等. 栀子种子质量标准研究[J]. 湖北农业科学, 2014, 53(19): 4628-4631.
[5] 施宝瑞. 加拿利海枣褐斑病病原菌生物学特性及药剂筛选研究[D]. 福州:福建农林大学, 2011.
[6] 谭舒心. 蜘蛛兰褐斑病及其病原菌鉴定与病害的药剂控制试验[D]. 重庆:西南大学, 2009.
[7] 孙广宇,宗兆锋. 植物病理学实验技术[M]. 北京:中国农业出版社, 2002: 94.
[8] 赵云青,陈菁瑛,林晓军,等. 金线莲茎腐病病原菌分离及分子鉴定[J]. 福建农业学报, 2014, 29(10): 995-999.
[9] 李国元,邓青云. 栀子主要病害发生特点及综合防治[J]. 湖北林业科技, 2003(125): 24-26.
[10] 李冬,刘兴平. 栀子病害调查及病原鉴定初报[J]. 江西林业科技, 2009(5): 31-32.
[11] 胡红杏,吴金平,郭兰,等. 魔芋白绢病病原菌的分子鉴定及其生物学特性研究[J]. 湖北农业科学, 2010, 49(6): 1370-1372.
[12] 姜晓龙,金磊磊,陈辉辉,等. 1株侵染蓖麻的葡萄座腔菌菌株鉴定[J]. 江苏农业科学, 2015, 43(2): 319-322.

[责任编辑 邹晓翠]