

韦荣昌,唐 其,白隆华. 田七炭疽病病原的分离与鉴定[J]. 江苏农业科学,2017,45(10):86-88.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2017.10.023

田七炭疽病病原的分离与鉴定

韦荣昌¹, 唐 其^{1,2}, 白隆华¹

(1. 广西药用植物园,广西南宁 530023; 2. 湖南农业大学园艺园林学院,湖南长沙 410128)

摘要:炭疽病是田七生长发育过程中一种严重的病害,为明确引起炭疽病的病因,从引起田七叶片穿孔和褐化的样本上分离病原,对病原进行致病性测定,对显微形态和 rDNA ITS 分子进行鉴定。结果表明,2 种田七炭疽病病原分别为人参炭疽菌(*Colletotrichum panacicola*)和胶孢炭疽菌(*C. gloeosporioides*)。

关键词:田七;炭疽病;人参炭疽菌;胶孢炭疽菌;病原鉴定;发生规律;病害防治

中图分类号:S435.675 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2017)10-0086-03

田七 [*Panax notoginseng* (Burk.) F. H. Chen] 别称三七、山漆、金不换、南方神草等,为五加科 (Araliaceae) 人参属 (*Panax*) 多年生草本植物,主要以根和根茎入药^[1]。田七为我国著名的传统中药,是人参属植物中皂苷类分子多样性最丰富、含量最高、最有医疗保健价值以及最具有开发利用前景的药材^[2],在中枢神经系统、血液系统、心脑血管系统以及免疫系统等方面具有较好的生理活性^[3-7],广泛应用于药品、食品、保健品和化妆品中。然而,由于独特的生态环境及严重的连作障碍,导致田七病害发生种类多、发病重^[8]。2014—2015 年,笔者在广西壮族自治区南宁市各地田七病害的田间调查中发现了造成田七叶片穿孔和褐化的 2 种病害,导致叶片大量脱落,严重影响药材的质量和产量。本研究通过病原分离和鉴定,确认人参炭疽菌 (*Colletotrichum panacicola*) 和胶孢炭疽菌 (*C. gloeosporioides*) 侵染田七是造成其叶片穿孔和褐化的主要原因,为进一步系统研究该病的发生规律及其病害防控提供参考。

收稿日期:2015-12-10

基金项目:广西壮族自治区科技攻关项目(编号:桂科重 1355001-1);广西壮族自治区自然科学基金(编号:2013GXNSFAA019207、2014GXNSFAA118254);广西壮族自治区药用植物园青年基金(编号:桂药基 201106);广西壮族自治区卫生计生委委员会自筹课题(编号:ZZ014236)。

作者简介:韦荣昌(1983—),男,广西梧州人,博士,助理研究员,主要从事生药学研究。Tel: (0771) 2443056; E-mail: wrc830612@163.com。

参考文献:

- [1] 贾世隆. 陇东苹果生产中存在的问题及可持续发展对策[J]. 甘肃农业科技, 2002(2): 23-24.
- [2] 高克祥. 内生真菌 *Chaetomium spirale*, *Stagonospora* sp. 与病原菌、寄主植物相互作用的机制[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2005.
- [3] 原彝彝. 几种林木病原菌拮抗放线菌的筛选及其活性物质研究[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2007.
- [4] 展丽然. 苹果腐烂病菌拮抗放线菌的筛选、鉴定及发酵条件的优

1 材料与方法

1.1 标本来源及症状描述

标本来源于广西药用植物园田七种植基地,通过田间自然感病和人工接种发病叶片进行症状描述。

1.2 病原菌的分离纯化及致病性测定

选取染病田七叶片,在病健结合组织处切取 0.5 cm 小块,依次用 75% 乙醇浸泡 30 s, 0.1% 氯化汞消毒 2 min, 灭菌水漂洗 3~5 次,置于 PSA 培养基上 26℃ 恒温培养,待菌丝长出后挑取菌落的边缘进行纯化,通过单孢分离纯化后的菌落,得到纯培养分离物。待分离获得的菌株经单孢纯化后,保存于 PSA 培养基斜面上,置于 4℃ 冰箱中贮存,备用。

依据针刺接种法进行病原菌致病性测定,在健康的田七叶片上接种纯培养的分离物(菌丝块),置于 26℃ 的恒温培养箱内保湿培养,3 次重复,以未接种的健康田七叶片作对照,定期观察叶片的发病情况。对接种发病的叶片进行病原菌再分离,观察分离得到的病原菌是否与接种菌株相同。

1.3 形态学鉴定

对 PSA 平板上的病原菌菌落特征及产孢情况进行观察分析,同时对分生孢子进行革兰氏染色,显微测定分生孢子盘、分生孢子梗长以及分生孢子的大小。

1.4 分子生物学鉴定

1.4.1 DNA 提取 采用易润华等的方法^[9],用 DNA 提取试剂盒(北京天根生化科技有限公司)提取病原菌基因组 DNA。

1.4.2 rDNAITS 区的扩增及测序 以 ITS1 (5'-TCCGTAG

化[D]. 保定:河北农业大学,2008.

- [5] 黄海东,杨红澎,王 玉,等. 云雾龙胆内生菌的分离鉴定及抗菌活性分析[J]. 微生物学通报, 2010, 37(7): 1017-1021.
- [6] Xin Y F, Shang J J. Bio-control trials of *Chaetomium spirale* ND35 against apple canker[J]. Journal of Forestry Research, 2005, 16(2): 121-124.
- [7] 王 磊, 邵佐鹏, 黄丽丽, 等. 防治苹果腐烂病杀菌剂的室内筛选[J]. 植物病理学报, 2009, 39(5): 549-554.
- [8] 张淑颖, 曲田丽, 孙 阳, 等. 剑麻内生细菌 JM-3 对苹果腐烂病抑制作用的研究[J]. 华北农学报, 2013, 28(4): 208-213.

GTGAACCTGCGG - 3') 和 ITS4 (5' - TCCTCCGCTTATTGATATGC - 3') 为引物,PCR 扩增菌株的 rDNA ITS 序列。反应体系:10 × Ex Buffer 5 μL, 2.5 mmol/L dNTP 1 μL, 10 μmol/L Primer ITS1 2 μL, 10 μmol/L ITS54 2 μL, Genomic DNA 20 ng, 5 U/μL Ex Taq 0.5 μL; ddH₂O 补足至 50 μL。反应程序:95 °C 预变性 5 min; 95 °C 变性 30 s, 58 °C 退火 30 s, 72 °C 复性 80 s, 35 个循环; 72 °C 延伸 10 min, 4 °C 保存。

用琼脂糖凝胶电泳扩增 PCR 产物,回收目标 DNA 片段,送往生工生物工程(上海)股份有限公司进行纯化测序。通过 BioEdit 校对测序结果,进行序列拼接,把拼接好的系列与 GenBank 数据库中的序列进行 Blast 相似性比对,选取同源性较高的序列,利用 MEGA 5.05 软件的 Neighbor - Joining 法构建系统发育树。

2 结果与分析

2.1 病害症状

标本 1, 叶片染病初生圆形或近圆形黄褐色病斑, 中间呈灰褐色至灰色, 边缘黄色晕圈明显, 后期病部易破裂穿孔, 病斑较小, 直径 2 ~ 5 mm (图 1)。标本 2, 病菌主要从叶缘侵入,

在叶片上形成半圆形或“V”形病斑, 有轮纹, 中间呈红褐色至灰褐色, 后期具有黑色小点, 周围有黄晕, 病斑较大, 直径 8 ~ 15 mm (图 1)。

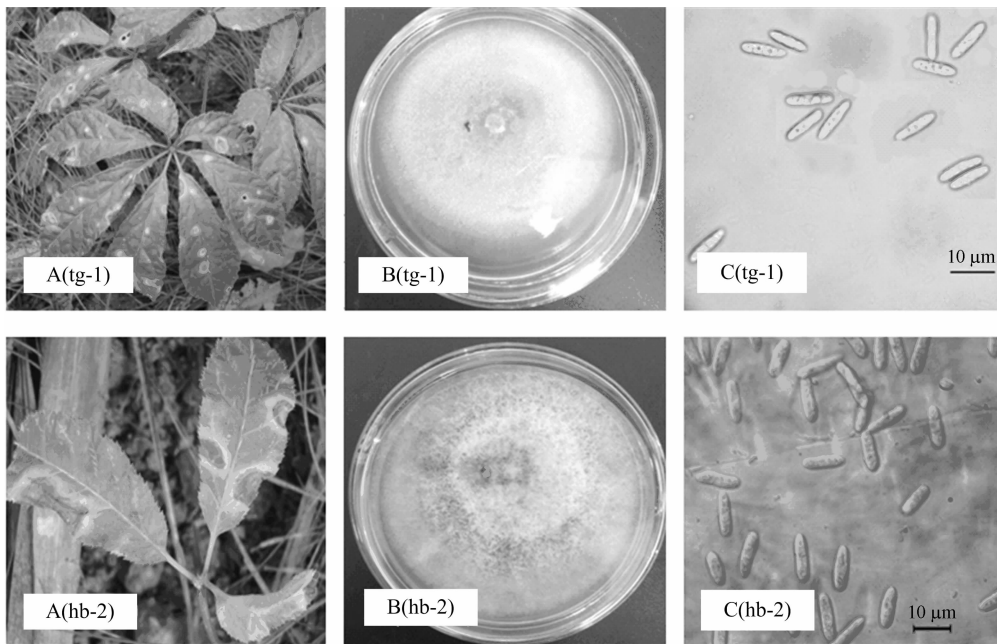
2.2 致病性测定

接种叶片表现出与自然病叶相同的症状, 未接种叶片表现正常, 从回接发病田七叶片上可以 100% 得到原接种病菌。

2.3 形态学鉴定

在 PSA 平板上, 病原菌 tg - 1 菌落圆形, 边缘整齐, 气生菌丝初为白色, 后渐变为浅黄褐色, 菌丝毛绒状, 不会形成分生孢子盘; 分生孢子为单胞, 无色, 呈长椭圆形或棍棒状, 大小为 (6.0 ~ 16.0) μm × (2.5 ~ 5.5) μm, 平均为 12.0 μm × 4.0 μm (图 1)。

在 PSA 平板上, 病原菌 hb - 2 菌落圆形, 边缘整齐, 气生菌丝初为白色, 后渐变为灰白色或深灰色, 菌丝棉絮状; 分生孢子盘呈黄褐色垫状突起, 圆形, 直径 (85.0 ~ 210.0) μm, 无刚毛; 分生孢子梗短, 略呈倒棒状, (8.0 ~ 11.0) μm × (3.0 ~ 4.0) μm; 分生孢子单胞, 无色, 长椭圆形, 两头钝圆或一端稍尖, 大小为 (9.0 ~ 13.0) μm × (3.0 ~ 5.0) μm, 平均为 11.0 μm × 4.0 μm (图 1)。



A—田间病症; B—菌落; C—分生孢子

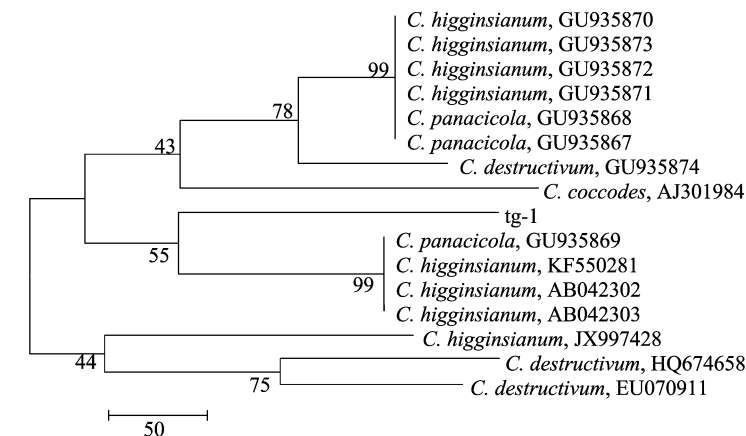
图1 田七炭疽病的田间病症和病原形态特征

2.4 分子生物学鉴定

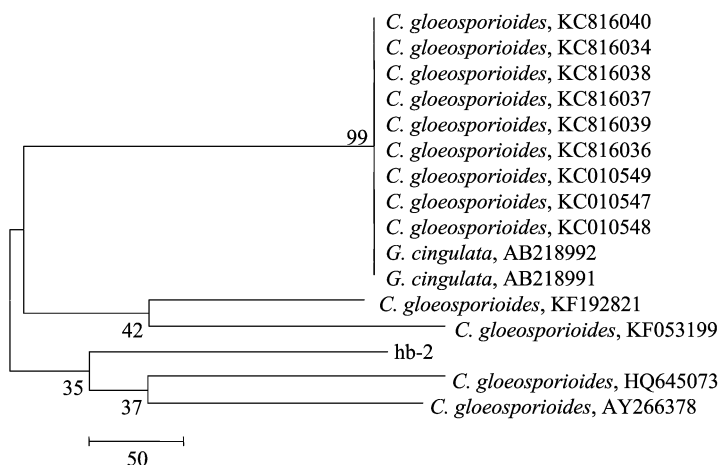
使用真菌 ITS 区域的引物 ITS1 和 ITS4, 对病原菌 tg - 1、hb - 2 进行扩增, 分别获得大小为 568、556 bp 的片段。将扩增产物测序所得的序列拼接后与 GenBank 中核酸数据进行 Blast 比对分析, 结果发现, tg - 1 与已报道的多个人参炭疽菌的序列同源性最高, 相似性达 99%; 从系统发育树也可以看出, tg - 1 与人参炭疽菌的遗传距离最近 (图 2); hb - 2 与多个胶孢炭疽菌的序列同源性最高, 相似性达 100%。系统发育树也表明, hb - 2 与多个胶孢炭疽菌的遗传距离最近 (图 2)。参照文献 [10 - 11], 结合病原菌形态学及分子生物学鉴定结果, 分别将病原菌 tg - 1、hb - 2 鉴定为人参炭疽菌和胶孢炭疽菌。

3 讨论与结论

近年来, 随着广西壮族自治区政府“田七回家”扶贫项目的启动, 众多农民选择种植田七脱贫致富, 然而田七炭疽病的发生, 严重影响田七产业的健康发展和农民的增收。作为世界上分布最广的植物病原菌之一, 炭疽菌在致病性、寄主特异性和遗传同质性等方面可分为多种亚组, 属多形态种^[12], 且其分生孢子形态多相似。因此, 单从形态学鉴定菌种显得尤为困难, 须要借助分子生物学加以鉴定^[13]。就进化速度来说, rDNA ITS 区域比编码区快, 可以提供更多变异来进行种间或种内的分子系统研究。本研究根据形态学特征和分子生物学分析结果, 将引起田七叶片穿孔和褐化的田七炭疽病病



a.病原菌 tg-1



b.病原菌 hb-2

图2 病原菌 rDNA ITS 区系统进化分析结果

原菌鉴定为人参炭疽菌或胶孢炭疽菌,但有关该病害的发生流行规律、侵染循环、防治措施以及抗性品种的选育有待进一步研究。

rDNA ITS 序列测定是当前常用的植物病原分子鉴定方法,然而本研究中病原菌 tg-1 的 rDNA ITS 序列既与人参炭疽菌的对应序列具有 99% 的同源性,也与希金斯炭疽菌(*C. higginsianum*)99% 同源,单靠分子生物学的方法难以鉴定,说明 rDNA ITS 序列在炭疽病菌(或其他病菌)的鉴定中还存在一定的局限性,须要与形态学特征等传统鉴定方法相结合才能更好地进行病原鉴定。

参考文献:

- [1] 中华人民共和国国家药典委员会. 中华人民共和国药典(一部)[M]. 北京:中国医药科技出版社,2015.
- [2] 乔春玲,丁艳芬,杨崇仁. 三七总皂苷药理研究进展[J]. 中国现代中药,2012,14(11):25-30.
- [3] He N W, Zhao Y, Guo L, et al. Antioxidant, antiproliferative, and pro-apoptotic activities of a saponin extract derived from the roots of *Panax notoginseng* (Burk.) F. H. Chen[J]. Journal of Medicinal Food,2012,15(4):350-359.
- [4] Chen J C, Chen L D, Tsauer W, et al. Effects of ginsenoside Rb2 and Rc on inferior human sperm motility *in vitro* [J]. The American Journal of Chinese Medicine,2001,29(1):155-160.
- [5] Li W, Fitzloff J F. A validated method for quantitative determination of saponins in notoginseng(*Panax notoginseng*) using high-performance liquid chromatography with evaporative light-scattering detection[J]. The Journal of Pharmacy and Pharmacology,2001,53(12):1637-1643.
- [6] Ng T B. Pharmacological activity of sanchi ginseng(*Panax notoginseng*) [J]. Journal of Pharmacy and Pharmacology,2006,58(8):1007-1019.
- [7] 王薇. 三七总皂苷对脑出血患者血肿吸收及血浆基质金属蛋白酶-9 的影响[J]. 中草药,2011,42(5):963-965.
- [8] 蒋妮,覃柳燕,叶云峰. 三七病害研究进展[J]. 南方农业学报,2011,42(9):1070-1074.
- [9] 易润华,朱西儒,周而勋. 简化 CTAB 法快速微量提取丝状真菌 DNA[J]. 湛江海洋大学学报,2003,23(6):72-73.
- [10] 魏景超. 真菌鉴定手册[M]. 上海:上海科学技术出版社,1979:468-475.
- [11] 陆家云. 植物病原真菌学[M]. 北京:中国农业出版社,2001:449-459.
- [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.
- [13] Hyde K D, Cai L, Cannon P F, et al. *Colletotrichum* - names in current use[J]. Fungal Diversity,2009,39:147-182.