

文章编号: 1674-7054(2023)02-0229-05



肾茶叶枯病病原的分离与鉴定

商瑞¹, 毛佳², 王延谦³, 白亭亭², 杨春勇³,
王红卫¹, 王艳芳³, 郭睿¹, 李戈³

(1. 云南医药健康职业学院, 昆明 650033; 2. 云南省农业科学院 农业环境资源研究所, 昆明 650205;
3. 中国医学科学院 药用植物研究所云南分所, 景洪 666100)

摘要: 为了确定肾茶叶枯病致病病原菌, 笔者从肾茶云南产区采集的肾茶叶枯病样本中分离到 1 株病原菌, 并对其进行了病害症状观察, 病原菌分离、鉴定和病原菌生物学特性研究。结果表明, 其在 PDA 培养基上菌落为白色, 气生菌丝发达, 菌落初期下部淡粉色, 后期为深黄棕色, 分生孢子顶胞钩状, 成熟的大型分生孢子有 3~5 个隔膜。将病原菌离体接种到健康肾茶叶片, 保湿培养数天后接种部位出现黑褐色病斑, 与田间症状一致。病原菌基因组 DNA 经真菌 rDNA-ITS 通用引物 ITS1/ITS4 扩增及同源性分析, 病原菌与 *Fusarium nematophilum*, *Fusarium equiseti*, *Fusarium chlamyosporum*, *Fusarium longipes* 聚为一支, 核酸序列同源性为 99.40%~99.60%。结合形态特征观察、ITS 序列分析及柯赫氏法则验证结果, 初步确定该病原菌为镰刀菌。

关键词: 肾茶; 叶枯病; 病原分离; 病原鉴定

中图分类号: S 432 **文献标志码:** A

引用格式: 商瑞, 毛佳, 王延谦, 等. 肾茶叶枯病病原的分离与鉴定 [J]. 热带生物学报, 2023, 14(2): 229-233.

DOI: 10.15886/j.cnki.rds wxb.2023.02.013

肾茶 [*Clerodendranthus spicatus* (Thunb.) C.Y. Wu], 又名猫须草, 为唇形科 (Lamiaceae) 肾茶属 (*Clerodendranthus*) 多年生草本植物, 喜高温多湿环境, 怕寒, 怕旱, 忌积水, 耐肥。该属植物全世界有 5 种, 主要分布于福建、台湾、海南、广西、广东和云南等省^[1]。肾茶全草均可入药, 性凉, 味淡、微苦, 具有清热祛湿、排石利尿的疗效^[2]。对肾结石、胆结石、胆囊炎、尿路结石具有神奇疗效, 被誉为“国际利尿化石药”^[3]。肾茶除应用于泌尿系统外, 还具有抗炎、抗肿瘤、降血糖血脂、保肝、提高机体免疫力及治疗风湿性关节炎等药理活性^[4-6]。目前, 由于肾茶的药用价值较高, 市场需求量越来越大, 并且随着环境气候的变化及野生肾茶资源的破坏, 野生肾茶已处于濒危状态, 无法满足市场需求^[7]。据报道, 肾茶在我国广东、广

西、海南、云南、福建等地已有引种栽培^[8], 在云南, 以思茅和西双版纳地区种植最多。随着肾茶种植面积不断扩大, 规模化种植后发现其病害也随之发生, 其中肾茶叶枯病发生最严重, 导致肾茶严重减产, 成为阻碍肾茶规模化生产的重要病害。而国内外对于肾茶的研究多集中在种质资源亲缘关系研究、生药学鉴别研究、传统应用调查研究、化学成分及其生物活性研究和部分高产栽培技术研究^[7, 9-11]。对于肾茶栽培过程中出现的病虫害少见报道^[12]。于旭东等^[13]报道了肾茶根结线虫的危害, 严珍等^[14]报道了肾茶新害虫泡壳背网蝽的危害, 关于肾茶叶枯病的研究至今未见报道。笔者针对肾茶叶枯病, 进行了病害症状观察, 病原菌分离、鉴定和病原菌生物学特性研究, 旨在为有效防治肾茶叶枯病提供理论基础。

收稿日期: 2022-01-20

修回日期: 2022-06-19

基金项目: 云南省教育厅科学研究基金项目(2021J1361)

第一作者: 商瑞(1982-), 女, 硕士, 副教授。研究方向: 药用植物栽培及病虫害防治。E-mail: 415516463@qq.com

通信作者: 李戈(1980-), 男, 硕士, 副研究员。研究方向: 中药材栽培及病虫害防治。E-mail: 295600582@qq.com

1 材料与方法

1.1 试验材料 在中国医学科学院药用植物研究所云南分所肾茶种植地里采取肾茶发病叶片。放入无菌采集袋中并编号, 运回实验室进行病原菌分离纯化。

1.2 肾茶病害调查 对中国医学科学院药用植物研究所云南分所肾茶地的肾茶进行病害调查。采集感染叶枯病害肾茶叶片进行症状描述、拍照、镜检。

1.3 病原菌的分离纯化 采用组织分离法^[15]从采回的肾茶样本上分离病原菌, 将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 30 s, 再用无菌水漂洗 3 次, 用无菌滤纸置于 PDA 培养基上 25 °C 培养^[16], 待菌落长出后, 挑取菌落组织制片镜检, 并进行分离纯化, 观察记录菌落颜色和形态等培养特征。

1.4 病原菌的致病性测定 用针刺法将分离纯化培养 7 d 的病原菌饼(直径 8 mm)接种于无病健康且长势相近的肾茶叶片上^[15], 以接种无菌 PDA 培养基饼(直径 8 mm)作为对照, 每个处理 3 个重复, 连续观察 7 d 记录其病害发生情况。依据 Koch's 法则, 再次对发病组织进行病原菌分离和纯化, 并与原接种的分离菌株进行比较。

1.5 病原菌的鉴定

1.5.1 病原菌的形态观察 将分离纯化得到的菌株接种至 PDA 培养基上, 25 °C 恒温培养 7 d。观察菌落的形态和颜色, 并挑取菌丝置于显微镜下观察记录分生孢子的形态、大小及有无隔膜等, 进行分离菌株的形态学鉴定^[17-18]。

1.5.2 病原菌的分子鉴定 将分离纯化得到的菌株接种至 PDA 培养基上进行扩大培养, 采用 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] 提取基因组 DNA。选用真菌 ITS 序列的通用引物 (ITS1/ITS4) 进行 PCR 扩增, 扩增反应在 15 μL 反应体系中进行, Template 为 1 μL, Primers (5 mmol·L⁻¹) 2 μL, 10×PCR Buffer 为 2 μL, dNTP 为 1.6 μL, Taq 酶 0.1 μL, 加双蒸水至 15 μL。热循环反应程序设置: 94 °C 初始变性 2 min, 接下来为 94 °C 变性 30 s, 55 °C 引物退火 30 s, 72 °C 延伸 2 min, 30 个循环结束后 72 °C 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% 琼脂糖凝胶, 凝胶置于 1×TBE 缓冲液 (0.9 mol·L⁻¹ Tris-Borate, 0.01 mol·L⁻¹ EDTA, pH8.3) 中, 在 110 V 下电泳 40 min。将 PCR 扩增产物测序委托北京优博兰基因技术有限公司完成, 将测序结果提交至 NCBI 的 GenBank 进行 BLAST 比对分析, 检索出相似性较高的 ITS 序列, 以确定分离菌株的分类地位; 再利用 MEGA 5.1 中的邻接法 (Neighbor-Joining, NJ) 构建系统发育进化树并分析其亲缘关系^[19]。

2 结果与分析

2.1 肾茶叶枯病症状的观察 肾茶叶枯病是肾茶种植过程中一种常见的叶片病害, 该病一般发生于肾茶叶片的叶缘、叶尖, 开始为淡褐色小点, 后渐扩大为不规则的大型斑块, 若几个病斑连接, 1/3 ~ 1/2 叶片将变干枯, 最后使整个叶片坏死脱落。除了为害叶片外, 肾茶叶枯病还发生在肾茶嫩梢, 嫩梢发病时变黑, 枯死 (图 1)。



图 1 肾茶叶枯病田间危害症状

2.2 病原菌的分离培养及其致病性的测定 对肾茶叶枯病病斑进行病原菌分离纯化得到 7 个菌株, 于 4 °C 保存备用。用针刺法将菌株接种在离体健康的肾茶叶片上, 用脱脂棉保湿, 持续观察叶片发病情况, 其中 6 个菌株不发病, 1 号菌株接种的叶片在接种 4 d 后出现褐色小点, 在接种 7 d 后褐色小点扩大连成片, 形成黑褐色病斑, 发病症状与田间发病一致 (图 2)。将菌株接种到刺伤和未刺伤的肾茶叶片上, 结果刺伤的叶片会发病, 未刺伤的不发病, 证明肾茶叶枯病病原菌主要通过伤口侵入。将 1 号菌株接种, 取病健交界处组织进行再分离, 重新分离出相同的菌株。



图 2 分离菌株的致病性测定

2.3 病原菌鉴定

2.3.1 病原菌形态学鉴定 在 PDA 培养基上生长迅速, 菌落呈圆形, 菌丝初为白色, 气生菌丝发达, 菌落初期下部淡粉色, 后期为深黄棕色。分生孢子顶胞钩状, 成熟的大型分生孢子有 3~5 个隔

膜, 多为 5 个, 顶生或顶侧生, 分生孢子大小为 $(16.5 \sim 45) \mu\text{m} \times (1.6 \sim 5.5) \mu\text{m}$ (图 3), 根据形态特征初步鉴定肾茶叶枯病为镰刀菌(*Fusarium*)。

2.3.2 病原菌分子鉴定 以病原菌基因组 DNA 为模板, 用 ITS1/ITS4 引物进行 PCR 扩增目的片段, 得到 1 条 500 bp 条带, 经琼脂糖凝胶回收、克隆测序及 BLAST 比对, 该扩增片段与 *Fusarium nematophilum* (MT447543), *Fusarium equiseti* (MT937067), *Fusarium chlamydosporum* (MT182952), *Fusarium longipes* (MN498044) 核酸序列同源性为 99.40%~99.60%, 结合同源菌株 rDNA-ITS 序列构建系统发育树(图 4), 病原菌与 *Fusarium nematophilum*, *Fusarium equiseti*, *Fusarium chlamydosporum*, *Fusarium longipes* 聚为一支。

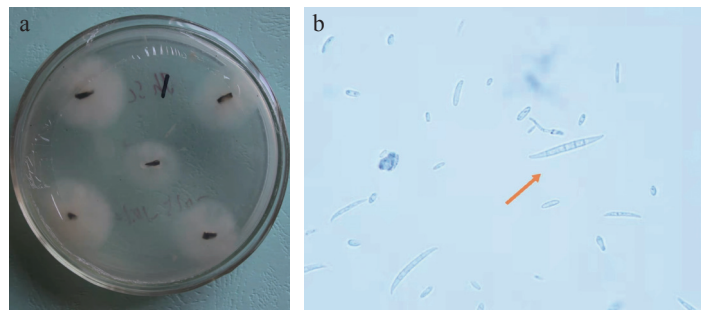


图 3 肾茶叶枯病病原菌的形态特征

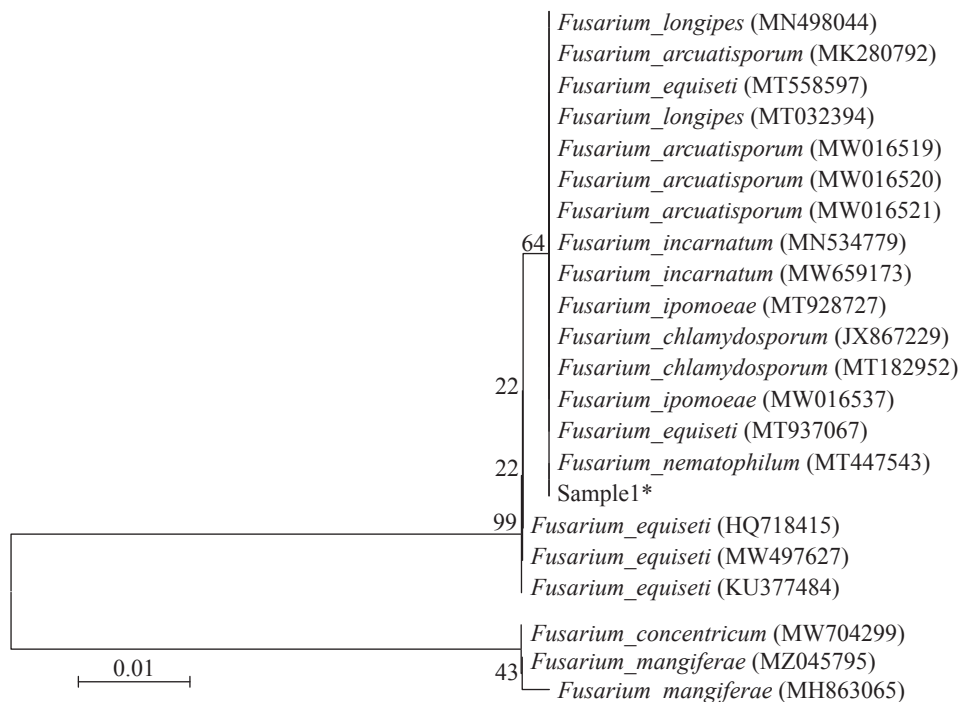


图 4 分离菌株及其同源性菌株基于 rDNA-ITS 序列的系统发育关系

3 讨论

肾茶多生长于高温湿热地区,同时也适合病原菌生长繁殖,通过对肾茶在栽培过程中的病害调查,发现叶枯病最严重,造成肾茶大面积减产,是制约肾茶规模化发展的重要瓶颈。本研究对西双版纳肾茶叶枯病病害的症状进行了描述,并分离出病原菌1株,通过致病性测定、形态特征观察及rDNA-ITS序列分析结果,鉴定为镰刀菌。镰刀菌是一种广谱性致病菌,寄主植物种类繁多,已报道铁皮石斛根腐病病原菌(*Fusarium chlamyosporum*)^[20]、北苍术枝枯病致病菌(*Fusarium equiseti*)^[21]、辣木枝枯病病原菌(*Fusarium equiseti*)^[22]、杭白菊叶枯病(*Fusarium oxysporum*)^[23]、黄连根腐病(*Fusarium oxysporum*)^[24]、蓝莓镰孢菌叶枯病(*Fusarium asiaticum*)^[25]、地黄叶枯病(*F. acuminatum*)^[26]等均为镰刀菌引起,但镰刀菌引起肾茶叶枯病尚属首次报道。目前国内外对肾茶叶枯病病害的研究较少,本研究后续将对肾茶叶枯病病原菌的生物学特性、病害循环、发生规律以及综合防治等进行深入研究,为生产上能更好地防控该病害提供理论依据。此外,肾茶叶枯病可参考由镰刀菌引起的其他作物叶枯病的防治技术进行控制,经研究因该病为伤口侵入,在田间管理时要减少机械损伤,加强虫害防治、合理密植、通风透光、合理施肥浇水等,或在发病初期使用25%啞菌酯和25%吡唑醚菌酯进行防治^[27]。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] 中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志(第六十六卷)[M]. 北京: 科学出版社, 1999: 574-577.
- [2] 陈建白, 白旭华, 蒋桂芝. 肾茶开发利用的初步研究[J]. 云南热作科技, 1988, 21(3): 6-8.
- [3] 许娜, 许旭东, 杨俊山, 等. 猫须草的研究进展[J]. 中草药, 2010, 41(5): 848-852.
- [4] 高南南, 田泽, 李玲玲等. 肾茶药理作用的研究[J]. 中草药, 1996, 27(10): 615.
- [5] 张荣荣, 梅文莉, 黄圣卓, 等. 海南栽培肾茶的化学成分研究[J]. 热带亚热带植物学报, 2017, 25(2): 182-188.
- [6] CAI H F, SHOU Y, WANG J J, et al. Preliminary study on the pharmacological action of *Spicatus* [J]. Journal of Chinese Medicinal Materials, 1997(20): 38-40.
- [7] 罗灿, 于旭东, 吴繁花, 等. 肾茶种植资源遗传多样性的ISSR分析[J]. 热带生物学报, 2015, 6(2): 204-222.
- [8] 罗关兴, 娄尚椿. 珍贵药用保健植物——肾茶[J]. 广西热带农业, 2004(6): 31-32.
- [9] 姜帅, 皱德志, 徐建平. 肾茶的传统应用调查与研究进展[J]. 中国现代中药, 2015, 17(9): 980-987.
- [10] 李倩. 民族药肾茶的活性物质基础研究[D]. 中南民族大学. 2020.
- [11] 罗灿. 87分肾茶属植物种质资源亲缘关系研究[D]. 海南大学. 2015.
- [12] 赵应红, 林艳芳, 张丽丽, 等. 傣药芽儒妙(肾茶)的研究与应用[J]. 中国民族医药杂志, 2008, 14(10): 72-77.
- [13] 于旭东, 裴佐蒂, 吴繁花, 等. 海南肾茶病原根结线虫的鉴定及其对寄主生长的影响[J]. 中国农学通报, 2009, 25(10): 197-201.
- [14] 严珍, 岳建军, 唐德英, 等. 肾茶新害虫泡壳背网蝽的形态特征与危害[J]. 农业科技通讯, 2018(1): 180-182.
- [15] 方中达. 植物病害研究方法[M]. 3版. 北京: 中国农业出版社, 2007: 129.
- [16] 宋利沙, 蒋妮. 山牵牛炭疽病原分离与鉴定[J]. 中国现代中药, 2018, 20(8): 984-986.
- [17] 王拱辰, 郑重, 叶琪明, 等. 常见镰刀菌鉴定指南[M]. 北京: 中国农业科技出版社, 1996.
- [18] LESLIE J F, SUMMERELL B A. The *Fusarium* Laboratory Manual [M]. Iowa: Blackwell Publishing, 2006.
- [19] STEFANIŁCZYK E, SOBKOWIAK S, BRYLIŃSKA M, et al. Diversity of *Fusarium* spp. associated with dry rot of potato tubers in Poland [J]. Eur J Plant Pathol, 2016, 145(4): 871-874.
- [20] 曹琪艳, 杨怡华, 申屠旭萍, 等. 浙江省铁皮石斛根腐病病原真菌的鉴定[J]. 植物保护学报, 2020, 47(1): 178-186.
- [21] 温晓蕾, 齐慧霞, 孙伟明, 等. 北苍术枝枯病病原菌(*Fusarium equiseti*)的鉴定及其生物学特性研究[J]. 中国农业科技导报, 2020, 22(5): 115-121.
- [22] KANG X, JIN P F, FENG X, et al. Identification and biological characteristics of the pathogen causing shoot blight of *Moringa oleifera* [J]. Journal of Plant Protection, 2017, 44(3): 481-487.
- [23] 王呈辉, 马婉琴, 楼钰函, 等. 尖孢镰刀菌引起的杭白菊叶枯病[J]. 浙江农业科学, 2015, 56(7): 1051-1053.
- [24] 伍晓丽, 王钰, 刘飞, 等. 黄连根腐病镰刀菌属病原真菌鉴定[J]. 中国中药杂志, 2020, 45(6): 1323-1328.
- [25] 严雪瑞, 胡梦琼, 王旭, 等. 蓝莓镰孢菌叶枯病的病原菌鉴定[J]. 沈阳农业大学学报, 2015, 46(6): 667-671.
- [26] 蔡玉彪, 窦涛, 高富涛, 等. 一株地黄叶枯病致病菌的鉴定及生物学特性研究[J/OL]. 中国中药志. <https://doi.org/10.19540/j.cnki.cjcm.20220111.101>
- [27] 沈宝宇, 刘坤, 张天静, 等. 辽五味根腐病的病原菌鉴定与室内药剂筛选[J]. 中药材, 2021, 44(7): 1554-1558.

Isolation and identification of leaf blight on *Clerodendranthus spicatus*

SHANG Rui¹, MAO Jia², WANG Yanqian³, BAI Tingting², YANG Chunyong³,

WANG Hongwei¹, WANG Yanfang³, GUO Rui¹, LI Ge³

(1. Yunnan Medical Health College, Kunming, Yunnan 650033; 2. Agricultural Environment and Resources Institute, Yunnan Academy of Agricultural Sciences, Kunming, Yunnan 650205; 3. Yunnan Branch of Research Institute of Medicinal Plants, Chinese Academy of Medical Sciences, Jinghong, Yunnan 666100, China)

Abstract: In order to determine the pathogen of leaf blight of kidney plant (*Clerodendranthus spicatus* (Thunb.) C.Y.Wu), the kidney plant leaves infected with leaf blight were sampled from a kidney plant producing area in Yunnan, and one strain of the pathogen was isolated from the samples and then identified morphologically and molecularly. The results showed that the pathogen cultured on the PDA medium was white in colony, and well developed in aerial mycelia. The colony in the lower part was pale pink initially and then turned yellow-brown. The apical cells of the conidia were uncinata, and the mature macroconidia have 3 ~ 5 septa. The pathogen isolated was inoculated onto the healthy plant leaves of *C. spicatus*. After several days of moist culture, dark-brown lesions appeared at the inoculated sites of the leaves, which were consistent with the field symptoms. Genomic DNA of the pathogen was amplified by using fungal rDNA-ITS universal primers ITS1/ITS4 and analyzed by homology analysis. The results showed that the pathogen isolated was clustered into the same branch with *Fusarium nematophilum*, *F. equiseti*, *F. chlamyosporum* and *F. longip*, and had a nucleic acid sequence homology of 99.40%–99.60%. The morphological observation, ITS sequence analysis and establishment of Koch's postulates showed that the pathogen was preliminarily identified as *F. oxysporum*.

Keywords: *Clerodendranthus spicatu*; leaf blight; pathogen isolation; pathogen identification

(责任编辑:叶 静)