

徐丹丹, 石力允, 林泽勉, 等. 美丽崖豆藤炭疽病原鉴定及防治药剂的室内毒力测定 [J]. 华南农业大学学报, 2021, 42(4): 63-69.
XU Dandan, SHI Liyun, LIN Zemian, et al. Pathogen identification of anthracnose disease on *Millettia speciosa* and indoor determination of fungicide toxicity[J]. Journal of South China Agricultural University, 2021, 42(4): 63-69.

美丽崖豆藤炭疽病原鉴定及防治 药剂的室内毒力测定

徐丹丹^{1,2}, 石力允², 林泽勉², 李依庭¹, 姜子德², 乔方¹

(1 深圳职业技术学院 应用化学与生物技术学院/深圳职业技术学院博士后创新实践基地, 广东 深圳 518055;

2 华南农业大学 植物保护学院/广东省微生物信号与作物病害防控重点实验室, 广东 广州 510642)

摘要:【目的】明确引起美丽崖豆藤炭疽病的病原菌种类并筛选其防治药剂。【方法】采用组织分离法对病原菌进行分离、纯化后, 利用柯赫氏法则验证其致病性, 依据菌株的形态学特征和多基因序列分析确定病原菌种类; 采用菌丝生长速率法测定病原菌对生产上常用于炭疽病防治的 4 种杀菌剂的敏感性。【结果】分离得到的 6 株菌中有 2 株菌可侵染美丽崖豆藤叶片引起褐色病斑; 结合形态学鉴定和多基因序列分析, 确定引起美丽崖豆藤炭疽病的病原菌为暹罗刺盘孢 *Colletotrichum siamense*。该病菌对苯醚甲环唑、咪鲜胺、吡唑醚菌酯和甲基硫菌灵的敏感性均高, 抑制中浓度 (EC₅₀) 均小于 0.1 mg/L, 其中, 以咪鲜胺的防效最佳, EC₅₀ 为 0.015 mg/L。【结论】美丽崖豆藤炭疽病的病原菌为暹罗刺盘孢, 苯醚甲环唑、咪鲜胺、吡唑醚菌酯和甲基硫菌灵可作为防治美丽崖豆藤炭疽病的首选药剂。

关键词: 美丽崖豆藤; 炭疽病; 暹罗刺盘孢; 形态特征; 多基因序列分析; 防治药剂

中图分类号: R282.2; S432.4

文献标志码: A

文章编号: 1001-411X(2021)04-0063-07

Pathogen identification of anthracnose disease on *Millettia speciosa* and indoor determination of fungicide toxicity

XU Dandan^{1,2}, SHI Liyun², LIN Zemian², LI Yiting¹, JIANG Zide², QIAO Fang¹

(1 Department of Applied Chemistry and Biotechnology/Postdoctoral Innovation Practice Base, Shenzhen Polytechnic, Shenzhen 518055, China; 2 College of Plant Protection, South China Agricultural University/Guangdong Provincial Key Laboratory of Microbial Signals and Disease Control, Guangzhou 510642, China)

Abstract: 【Objective】To determine the pathogen causing anthracnose disease on *Millettia speciosa* and screen effective fungicides. 【Method】Tissue isolation method was used to isolate the pathogen. The pathogenicity was tested according to Koch's rule after purification. The pathogen was identified based on morphological characteristics and multi-locus sequence analysis. Furthermore, the sensitivity of this pathogen against four common fungicides was measured according to the mycelial growth rate. 【Result】Two out of six obtained isolates could infect *M. speciosa* leaf and caused brown spot. Combining morphological characteristics and multi-locus sequences analysis, the pathogen caused anthracnose disease on *M. speciosa* was identified as *Colletotrichum siamense*. This pathogen was highly sensitive to difenoconazole, prochloraz, pyraclostrobin and

收稿日期: 2020-12-03 网络首发时间: 2021-06-02 15:28:42

网络首发地址: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/44.1110.S.20210602.1026.002.html>

作者简介: 徐丹丹 (1988—), 女, 博士, E-mail: xudandan@szpt.edu.cn; 姜子德 (1962—), 男, 教授, 博士, E-mail: djjiang@scau.edu.cn; 通信作者: 乔方 (1970—), 女, 教授, 硕士, E-mail: qiaofang@szpt.edu.cn

基金项目: 国家现代农业产业体系 (CARS-32); 深圳职业技术学院博士后启动基金 (6019330008K)

thiophanate-methyl with EC_{50} values below 0.1 mg/L, and prochloraz showed the highest efficacy with EC_{50} of 0.015 mg/L. 【Conclusion】 The pathogen causing anthracnose disease on *M. speciosa* is *C. siamense*, and difenoconazole, prochloraz, pyraclostrobin and thiophanate-methyl can be applied to control anthracnose disease in the field.

Key words: *Millettia speciosa*; anthracnose disease; *colletotrichum siamense*; morphological characteristic; multi-locus sequence analysis; control fungicide

美丽崖豆藤 *Millettia speciosa* Champ., 又名牛大力、大力薯、山莲藕, 为豆科崖豆藤属植物, 主要分布在广东、福建、湖南、广西、海南、云南、贵州等省区的山谷、路旁、灌木林丛或疏林中^[1]。其根部可以入药, 用来治疗腰肌劳损、风湿性关节炎、肺结核等疾病, 是多种中成药的主要原料; 在美丽崖豆藤生产地, 其根部常用于制作药膳、药酒, 其茎、芽、叶片被开发成茶包或饲料添加剂, 产品附加值大大提升^[2]。目前美丽崖豆藤野生资源已濒临枯竭, 规模化的人工种植基地面积正逐渐扩大。但是, 鲜见关于美丽崖豆藤的病害研究^[3]。

炭疽病是世界范围内的一种重要病害, 炭疽病菌 *Colletotrichum* spp. 能够侵染为害 3200 余种单子叶和双子叶植物, 包括园艺观赏植物、水果、蔬菜、中药材等^[4]。在我国的豆科植物上已报道了多种炭疽病菌, 如 *C. spaethianum* 引起的菜豆炭疽病^[5]、*C. gloeosporioides* 引起的葛藤和大豆炭疽病^[6]、*C. capsici* 引起的豇豆炭疽病^[6]、*C. chlorophyti* 引起的大豆炭疽病^[7]、*C. siamense* 引起的紫荆炭疽病^[8], 但其鉴定所采用的标准不尽一致。即使是形态学特征和分子系统发育分析相结合, 也有单个内转录间隔区 (Internal transcribed spacer, ITS) 片段、肌动蛋白 (Actin, ACT)、3-磷酸甘油醛脱氢酶 (Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)、几丁质合成酶基因 (Chitin synthase, CHS-1)、 β -微管蛋白 (β -tubulin, TUB2) 和钙调蛋白 (Calmodulin, CAL) 等多个基因联合分析的区别, 后者已成为炭疽病菌精准鉴定的重要手段^[9-10]。美丽崖豆藤炭疽病菌主要侵染叶片, 在叶尖或叶缘形成大量病斑, 发病后期引起大量叶片脱落, 田间发病植株叶片黄化, 长势衰退。为明确广东省德庆县美丽崖豆藤叶片炭疽病的病原菌种类及筛选有效杀菌剂, 本研究采集了发病的美丽崖豆藤植株样品, 采用组织分离法获得分离物, 单孢纯化后通过柯赫氏法则验证其致病性; 结合病原菌形态学特征和多基因系统学分析确定病原菌分类地位; 同时, 采用菌丝生长速率法测定病原菌对 4 种常用杀菌剂的敏感性, 旨在为美丽崖豆

藤炭疽病的诊断和有效防控提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 症状观察及样本采集

2018 年 11 月在广东省肇庆市德庆县药材种植示范基地发现感染炭疽病的美丽崖豆藤, 观察并记录病害症状; 采集具有典型症状的叶片。

1.2 病原菌的分离和纯化

在采集的具有典型症状的美丽崖豆藤叶片的病健交界处切取 5 mm×5 mm 的叶片组织块, 于 ϕ 为 75% 的乙醇溶液中浸润 10 s 进行表面消毒, 随后用 ϕ 为 2% 的次氯酸钠消毒 2~3 min, 再用无菌蒸馏水冲洗 3 次, 最后于无菌滤纸上自然晾干水分。用无菌镊子将消毒后的叶片组织块移至倒好的 PDA 培养基上, 于 25 °C 黑暗条件下培养至组织块周围长出菌丝。挑取新鲜的菌丝至新 PDA 平板中央进行疑似病原菌的培养。待新转移的菌落产生橘红色黏孢团后, 挑取分生孢子配制孢子悬浮液, 涂布于琼脂培养基上, 于显微镜下切取单孢子的琼脂块转移至 PDA 平板上, 获得单孢纯化菌株。观察各纯化菌株的菌落形态, 并将各菌株接种至 PDA 斜面试管中在 4 °C 条件下保存备用。

1.3 病原菌致病性的测定

采用菌饼接种法进行菌株致病性测定。待培养菌株于 PDA 培养基上培养 7 d 后, 在菌落边缘打取直径为 5 mm 的菌饼。选取美丽崖豆藤嫩叶, 用无菌接种针刺伤后接种菌饼, 以接种纯 PDA 培养基饼作为对照, 每个菌株共计接种 15 张叶片。接种后的叶片置于保鲜盒中喷雾保湿, 定期观察叶片的发病情况, 方法参照文献 [7]; 随机选取发病的叶片进行病原菌的再分离, 并与原接种菌株进行形态及分子序列比较, 若与原接种菌株相同, 则原接种菌株即为致病菌。

1.4 病原菌的形态学鉴定

观察病原菌在 PDA 培养基上于 25 °C 条件下的培养性状; 待产生橘红色的黏孢团后, 用无菌牙签挑取黏孢团制备玻片, 用 Olympus BX41 显微镜观察各菌株形态、测定分生孢子大小。

1.5 病原菌的分子鉴定

将病原菌于 PDA 培养基上培养 5 d, 刮取菌丝置于液氮下充分研磨, 采用真菌基因组 DNA 提取试剂盒 (Omega 生物工程有限公司) 提取菌丝 DNA。采用引物 ITS1/ITS4^[11]、CHS-79F/CHS-345R^[12]、GDF/GDR^[13]、ACT-512F/ACT-783R^[12] 和 Bt2a/Bt2b^[14] 进行 PCR 扩增, 各序列扩增引物信息

见表 1。PCR 反应体系总体积为 25 μ L: DNA 模板 1 μ L, 正、反向引物各 1 μ L (10 μ mol/L), 2 \times MasterMix 12.5 μ L, 加 ddH₂O 补足至 25 μ L。反应条件为: 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s (CHS、ACT, 58 $^{\circ}$ C; GAPDH, 60 $^{\circ}$ C; ITS、TUB2, 55 $^{\circ}$ C) 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 45 s, 共 35 个循环; 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 7 min。表 2 为本研究所用的刺盘孢菌株的序列信息。

表 1 病原菌鉴定所用引物

Table 1 Primers used for pathogen identification

基因 Gene	产物名称 Product name	引物名称 Primer name	序列 (5'→3') Sequence
ITS	内转录间隔区 Internal transcribed spacer	ITS1	TCCGTAGGTGAACCTGCGG
		ITS4	TCCTCCGCTTATTGATATGC
CHS	几丁质合成酶 Chitin synthase	CHS-79F	TGGGGCAAGGATGCTTGAAGAAG
		CHS-345R	TGAAGAACCATCTGTGAGAGTTG
GAPDH	3-磷酸甘油醛脱氢酶 Glyceraldehyde-3- phosphate dehydrogenase	GDF	GCCGTCAACGACCCCTTCATTGA
		GDR	GGGTGGAGTCTACTTGAGCATGT
ACT	肌动蛋白 Actin	ACT-512F	ATGTGCAAGGCCGGTTTCGC
		ACT-783R	TACGAGTCCTTCTGGCCAT
TUB2	β -微管蛋白 β -tubulin	Bt2a	GGTAACCAAATCGGTGCTGCTTTC
		Bt2b	ACCCTCAGTGAGTGACCCCTGGC

表 2 刺盘孢菌株的序列信息

Table 2 Sequence information of the *Colletotrichum* isolates

类别 Taxon	菌株编号 ¹⁾ Isolate No.	宿主 Host	来源地 Original place	GenBank 登录号 GenBank accession No.				
				ITS	CHS	GAPDH	ACT	TUB2
<i>C. aenigma</i>	ICMP 18608	<i>Persea americana</i>	Israel	JX010244	JX009774	JX010044	JX009443	JX010389
<i>C. aenigma</i>	ICMP 18686	<i>Pyrus pyrifolia</i>	Japan	JX010243	JX009789	JX009913	JX009519	JX010390
<i>C. alienum</i>	ICMP 12071	<i>Malus domestica</i>	New Zealand	JX010251	JX009882	JX010028	JX009572	JX010411
<i>C. alienum</i>	ICMP 18704	<i>Persea americana</i>	New Zealand	JX010253	JX009886	JX010045	JX009456	
<i>C. asianum</i>	ICMP 18696	<i>Mangifera indica</i>	Australia	JX010192	JX009753	JX009915	JX009576	JX010384
<i>C. asianum</i>	ICMP 18580	<i>Coffea arabica</i>	Thailand	JX010196	JX009867	JX010053	JX009584	JX010406
<i>C. boninense</i>	ICMP 17904	<i>Crinum asiaticum</i> var. <i>sinicum</i>	Japan	JX010292	JX009827	JX009905	JX009583	JQ005588
<i>C. boninense</i>	LPS0023	<i>Alcantarea imperialis</i>	Brazil	MK286012	MK286457	MK286456	MK286458	
<i>C. fructicola</i>	ICMP 18645	<i>Theobroma cacao</i>	Panama	JX010172	JX009873	JX009992	JX009543	JX010408
<i>C. fructicola</i>	ICMP 18727	<i>Fragaria \times ananassa</i>	USA	JX010179	JX009812	JX010035	JX009565	JX010394
<i>C. fructicola</i>	ICMP 18120	<i>Dioscorea alata</i>	Nigeria	JX010182	JX009844	JX010041	JX009436	JX010401
<i>C. fructicola</i>	ICMP 17921	<i>Ficus habrophylla</i>	Germany	JX010181	JX009839	JX009923	JX009495	JX010400
<i>C. gloeosporioides</i>	ICMP 17821	<i>Citrus sinensis</i>	Italy	JX010152	JX009818	JX010056	JX009531	JX010445
<i>C. gloeosporioides</i>	ICMP 18697	<i>Vitis vinifera</i>	USA	JX010154	JX009780	JX009987	JX009557	
<i>C. horii</i>	ICMP 12492	<i>Diospyros kaki</i>	New Zealand	GQ329687	JX009748	JX010001	JX009533	JX010375
<i>C. horii</i>	ICMP 17968	<i>Diospyros kaki</i>	China	JX010212	JX009811	JX009939	JX009547	JX010378
<i>C. kahawae</i>	ICMP 17816	<i>Coffea arabica</i>	Kenya	JX010231	JX009813	JX010012	JX009452	JX010444
<i>C. kahawae</i>	ICMP 17915	<i>Coffea arabica</i>	Angola	JX010234	JX009829	JX010040	JX009474	JX010435
<i>C. queenslandicum</i>	ICMP 1778	<i>Carica papaya</i>	Australia	JX010276	JX009899	JX009934	JX009447	JX010414
<i>C. queenslandicum</i>	ICMP 18705	<i>Coffea</i> sp.	Fiji	JX010185	JX009890	JX010036	JX009490	JX010412
<i>C. siamense</i>	NDL13	<i>Millettia speciosa</i>	China	MT673674	MT683677	MT683679	MT683675	MT683681
<i>C. siamense</i>	NDL19	<i>Millettia speciosa</i>	China	MT673675	MT683678	MT683680	MT683676	MT683682
<i>C. siamense</i>	ICMP 17791	<i>Malus domestica</i>	USA	JX010273	JX009810	JX009933	JX009508	
<i>C. siamense</i>	ICMP 12567	<i>Persea americana</i>	Australia	JX010250	JX009761	JX009940	JX009541	JX010387
<i>C. siamense</i>	ICMP 18642	<i>Hymenocallis mericana</i>	China	JX010278	JX009875	JX010019	JX009441	JX010410

1) NDL13和NDL19为本研究所获得的菌株

1) NDL13 and NDL19 were isolates in the present study

取 5 μL PCR 扩增产物用 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳进行检测, 然后将 PCR 产物送至北京六合华大基因科技有限公司广州分公司测序。将测得的基因序列与 GenBank 中的序列进行比对。下载相似性高的序列及其对应复合种的常见模式菌株序列(各菌株均为狭义的生物物种, 具体信息见表 2), 使用 MEGA 软件剪切后按照 ITS-CHS-GAPDH-ACT-TUB2 的顺序首尾拼接, 然后分析系统发育关系, 采用最大似然法(Maximum likelihood, ML)构建系统发育树, 以自展法(Bootstrap)进行检测, 共循环 1000 次。

1.6 病原菌对杀菌剂的敏感性测定

以经致病性测定的菌株 NDL13 为材料, 供试药剂为苯醚甲环唑(ϕ 为 96.3%)、咪鲜胺(ϕ 为 97.0%)、吡唑醚菌酯(ϕ 为 98.0%)和甲基硫菌灵(ϕ 为 97.0%)原药, 采用菌丝生长速率法测定供试药剂对病原菌的抑制活性。首先将各药剂溶解于甲醇中得到原液, 然后加水稀释得到工作液, 取各工作液加入至 PDA 培养基中充分混匀, 配制得到不同终浓度的含药平板, 以不加药剂加入等量甲醇的 PDA 平板作为对照, 每个药剂浓度处理设置 4 个重复。用孔径为 5 mm 的打孔器在培养 7 d 的菌落边缘打取菌饼, 接种至 PDA 含药平板上, 置于 25 $^{\circ}\text{C}$ 条件下黑暗培养 7 d, 然后用十字交叉法测量各处理的菌落半径, 计算各杀菌剂菌丝生长抑制率和抑制中浓度(EC_{50}), 绘制毒力回归方程。

1.7 数据分析

用 SPSS 26 软件统计分析试验数据, 求得毒力回归方程、 EC_{50} 和相关系数, 并采用 Duncan's 新复极差法进行各处理间的差异显著性检验。

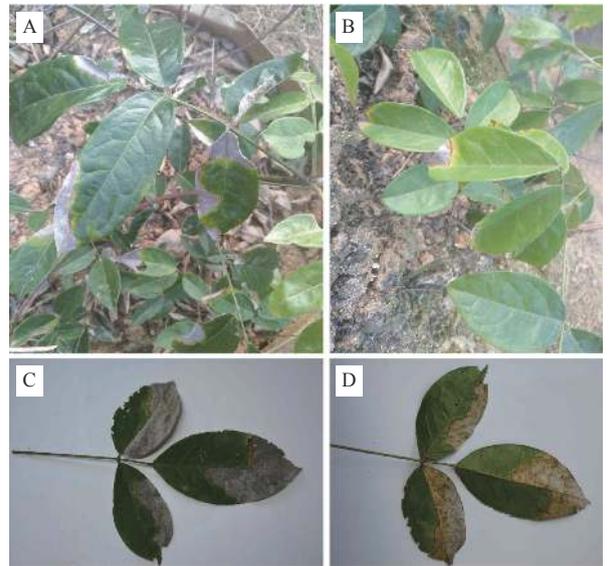
2 结果与分析

2.1 美丽崖豆藤炭疽病的田间症状

美丽崖豆藤炭疽病发生于叶片, 在叶尖或叶缘形成褐色的不规则形病斑, 发病后期病斑变为灰白色或灰褐色(图 1A、1B), 边缘具有一条明显的褐色坏死交界线(图 1C、1D), 病斑外具黄色晕圈, 病斑正面有明显的黑色小颗粒, 为病原菌的分生孢子盘(图 1C)。

2.2 病原菌的分离、纯化和致病性测定

经过病组织分离、单孢纯化及单孢菌株的菌落性状比较, 保存 6 个菌株, 分别编号为 NDL09、NDL13、NDL18、NDL19、NDL23 和 NDL35。6 个菌株的致病性测定结果表明, 只有菌株 NDL13 和 NDL19 可引起接种叶片发病, 接种 3 d 后叶片开始出现水渍状病斑, 接种 8 d 后病斑呈现为明显的褐色坏死, 中央灰白色, 边缘有黄色晕圈(图 2A~2C), 该症状与植株自然发病症状相似; 对发病组织进行病原菌的再分

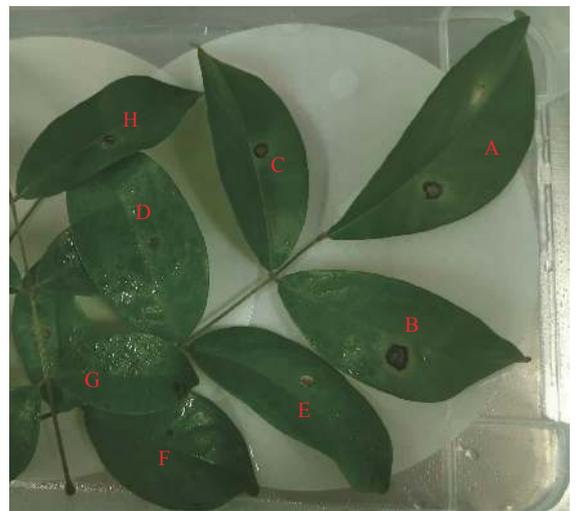


A 和 B: 田间发病症状; C 和 D: 发病叶片的正、反面
A and B: Typical symptoms in the field; C and D: The adaxial side and abaxial side of diseased leaves, respectively

图 1 美丽崖豆藤的田间发病症状

Fig. 1 Symptoms of the diseased *Millettia speciosa* in the field

离, 得到的菌株的菌丝生长特征、菌落颜色、产孢表现、分生孢子显微特征等均与接种菌株表现一致。PDA 对照、空白对照及另外 4 个菌株接种的叶片均不发病, 仅在伤口刺伤处有一褐色坏死点(图 2D~2H)。



A~C: NDL13 接种; D~E: 刺伤后接 PDA 饼; F: 空白对照; G~H: NDL18 接种

A~C indicate the anthracnose symptom of leaves inoculated with NDL13; D~E indicate leaves were wounded and inoculated with pure PDA plug; F indicate leaves were only wounded; G~H indicate leaves were inoculated with NDL18

图 2 美丽崖豆藤叶片接种 8 d 后的发病症状

Fig. 2 Disease symptoms on *Millettia speciosa* leaves eight days after inoculation

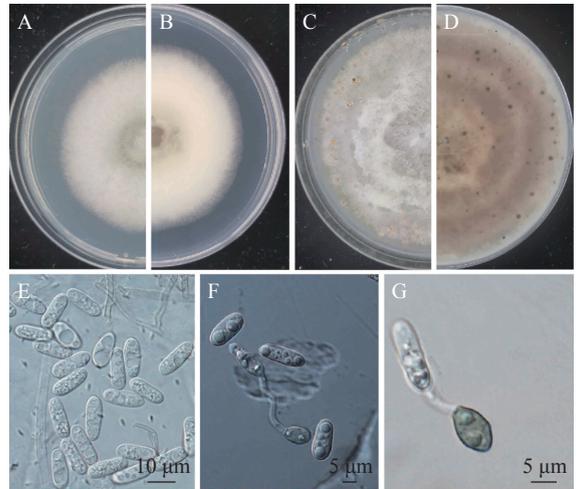
2.3 病原菌的形态学特征

致病菌株 NDL13 和 NDL19 的形态学特征基本一致。在 PDA 培养基上, 菌丝初期为白色, 气生菌丝茂盛, 呈绒毛状, 菌落边缘整齐(图 3A、3B); 培

养 15 d 后菌落上出现橘红色的黏孢团 (图 3C、3D), 为病原菌的分生孢子。分生孢子无色, 单孢, 长椭圆形, 两端钝圆, 具 1~2 个油球, $13.46\sim 15.45\ \mu\text{m}\times 4.77\sim 5.91\ \mu\text{m}$ (图 3E)。分生孢子萌发形成的附着孢浅棕色至黑褐色, 近球形、棒形或不规则形, $8.22\sim 9.95\ \mu\text{m}\times 5.46\sim 6.29\ \mu\text{m}$ (图 3F、3G)。根据病原菌的形态特征, 结合 Weir 等^[10] 的描述, 初步确定该菌株属于胶孢刺盘孢 *C. gloeosporioides* 复合种。

2.4 病原菌的生物信息学分析

将菌株 NDL13 和 NDL19 的 *ITS*、*CHS*、*GAPDH*、*ACT* 和 *TUB2* 这 5 个基因的序列与从 GenBank 中下载得到的 21 个模式菌株或公认菌株相应的序列进行比对, 以 *C. boninense* 为外类群构建的系统发育树如图 4 所示, 病原菌 NDL13 和 NDL19 均与暹罗刺盘孢 *C. siamense* 聚在一起, 形成一个明显的分支, 且各分支间均有较高的支持率, 因此确定美丽崖豆藤炭疽病的病原菌为暹罗刺盘孢 *C. siamense*。

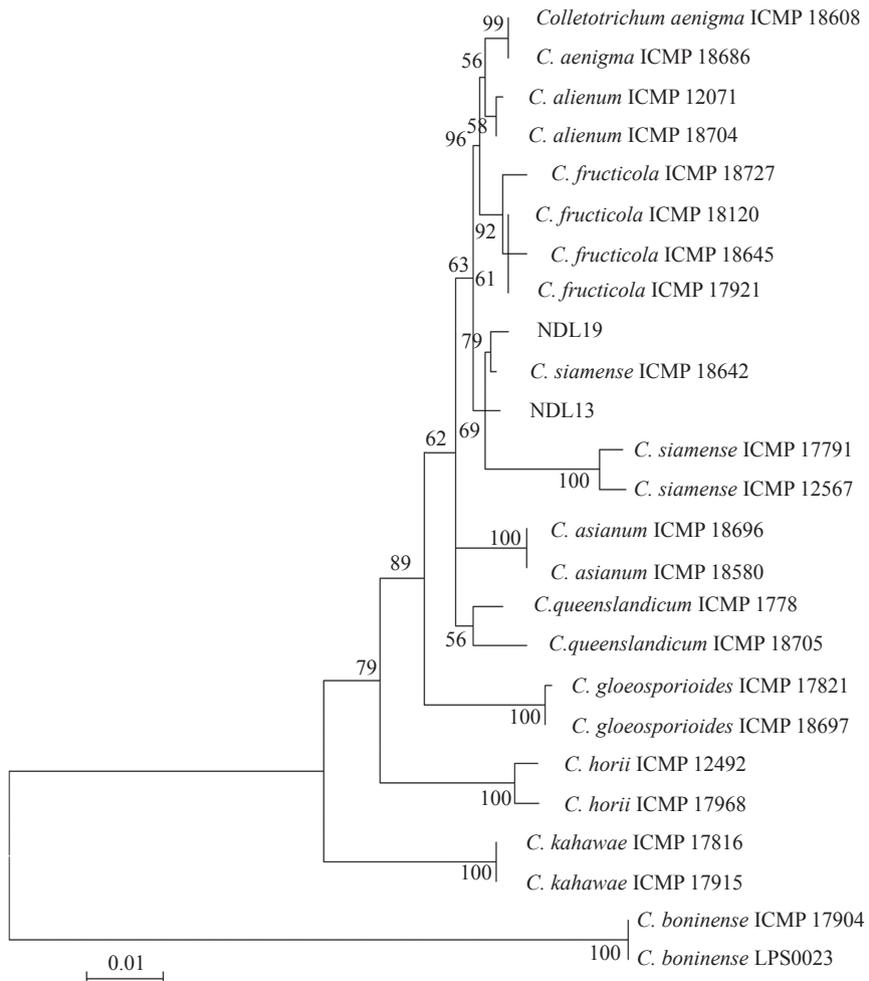


A 和 B: 培养 8 d 后正、反面菌落; C 和 D: 培养 15 d 后正、反面菌落; E: 孢子; F 和 G: 附着孢

A and B indicate upper and reverse of cultures 4 days after inoculation; C and D indicate upper and reverse of cultures 15 days after inoculation; E: conidia; F and G indicate appressoria

图 3 炭疽菌株的菌落形态和显微形态

Fig. 3 Colony morphology and microscopic characters of *Colletotrichum* isolates



NDL19 和 NDL13 为供试菌株

NDL19 and NDL13 indicate the present study isolates

图 4 基于最大似然法构建的多基因系统发育树

Fig. 4 Multigene phylogenetic tree based on maximum likelihood analysis

2.5 杀菌剂对病原菌的室内毒力

由表 3 可知, 4 种杀菌剂对美丽崖豆藤炭疽病菌均表现出显著的抑制效果, EC_{50} 为 0.015~0.066 mg/L。其中, 咪鲜胺的抑菌效果最佳, EC_{50} 最

低, 为 0.015 mg/L, 其次为吡唑醚菌酯、苯醚甲环唑和甲基硫菌灵, 其 EC_{50} 分别为 0.055、0.060 和 0.066 mg/L, 结果表明这 4 种测试药剂均可作为防治美丽崖豆藤炭疽病的首选药剂。

表 3 4 种杀菌剂对美丽崖豆藤炭疽病菌的室内毒力测定结果

Table 3 *In vitro* toxicity test of four fungicides against *Colletotrichum siamense*

杀菌剂 Fungicide	回归方程 ¹⁾ Regression equation	相关系数 Correlation coefficient	EC_{50} (mg·L ⁻¹)
苯醚甲环唑 Difenoconazole	$y=16.112x+51.699$	0.979	0.060
咪鲜胺 Prochloraz	$y=23.217x+71.232$	0.989	0.015
吡唑醚菌酯 Pyraclostrobin	$y=199.850x+32.768$	0.997	0.055
甲基硫菌灵 Thiophanate-methyl	$y=329.460x+20.391$	0.975	0.066

1) x: 杀菌剂的浓度对数; y: 杀菌剂对美丽崖豆藤炭疽病菌的抑制率

1) x: Logarithm of fungicide concentration; y: Inhibition rate of fungicide against *Colletotrichum siamense*

3 讨论与结论

美丽崖豆藤具有重要的药用和经济价值, 炭疽病的发生极大地影响了其产量和价值, 本研究报道了在广东省德庆县药材种植基地发现的美丽崖豆藤炭疽病, 并结合致病性接种、形态特征和多基因系统发育树, 将病原菌鉴定为暹罗刺盘孢 *C. siamense*。该发现为美丽崖豆藤炭疽病的诊断和防治提供了理论依据。

炭疽病是一种重要的植物病害, 可侵染为害植物叶片^[15]、花穗^[16]、果实^[17]等, 多年来很多学者致力于炭疽病的病原菌分类鉴定和病害防控的研究^[18-19]。暹罗刺盘孢 *C. siamense* 被归入胶孢刺盘孢 *C. gloeosporioides* 复合种, 前期研究只用 ITS 序列对病原菌进行鉴定, 而该序列不能很好地区分胶孢刺盘孢复合种里面的近缘种, 在后期的胶孢刺盘孢 *C. gloeosporioides* 复合种的修订中, 多基因 (*ITS*、*ACT*、*GAPDH*、*CHS-1*、*TUB* 和 *CAL* 等) 联合应用至胶孢刺盘孢复合种的鉴定中, 提升了生物种鉴定的准确性^[10, 20]。暹罗刺盘孢 *C. siamense* 能够侵染多种宿主植物, 如茜草科 Rubiaceae 的咖啡 *Coffea arabica*^[21]、天南星科 Araceae 的魔芋 *Amorphophallus konjac*^[22]、无患子科 Sapindaceae 的荔枝 *Litchi chinensis*^[23]、蔷薇科 Rosaceae 的苹果 *Malus domestica*^[24]、山龙眼科 Proteaceae 植物^[25]、五加科 Araliaceae 的鹅掌柴 *Schefflera octophylla*^[26]、兰科 Orchidaceae 植物^[27]等。美丽崖豆藤隶属于豆科 Leguminosae 崖豆藤属 *Millettia*, 目前鲜见刺盘孢属 *Colletotrichum* 病原菌在崖豆藤属植物上的相关报道。本研究结合形态特征并构建多基因 (*ITS*、*CHS*、*GAPDH*、*ACT* 和 *TUB2*) 系统发育树, 鉴定出美丽崖豆藤炭疽病的病原菌为

暹罗刺盘孢 *C. siamense*。

化学防治虽具有造成环境污染和诱使病原菌产生抗药性等缺陷, 但其具有高效、快速、不受地域限制、便于规模化农事操作等优点, 依然是目前防治炭疽病的主要措施。药效试验结果表明, 美丽崖豆藤炭疽病的病原菌 NDL13 对咪鲜胺和苯醚甲环唑敏感, 该结果与 Cao 等^[28] 的试验结果基本一致。Hu 等^[29] 对桃子 *Prunus persica* 和蓝莓 *Vaccinium spp.* 上分离得到的暹罗刺盘孢 *C. siamense* 进行研究, 结果发现 100 mg/L 的甲基硫菌灵对其抑制率才能超过 50%, 远高于本研究中甲基硫菌灵对美丽崖豆藤炭疽病的病原菌暹罗刺盘孢 *C. siamense* 的 EC_{50} (0.066 mg/L), 这或与该病害为新病害, 尚无进行长期的药剂防控, 病原菌对供试药剂敏感有关, 因此实际生产中应多种药剂轮换使用以降低病原菌的抗药性。本研究为美丽崖豆藤炭疽病的准确识别和科学防治奠定了理论基础、提供了科学的指导建议。

参考文献:

- [1] 方利娟, 宁珊. 药用植物牛大力研究概况[J]. 安徽农学通报, 2017, 23(23): 18-20.
- [2] 刘丹丹, 唐立海, 王艳, 等. 牛大力祛痰、镇咳和平喘作用的实验研究[J]. 广州中医药大学学报, 2009, 26(3): 266-269.
- [3] ZENG Q Q, XU D D, HUANG Y C, et al. First report of powdery mildew of beautiful milletia (*Millettia speciosa*) caused by *Erysiphe quercicola* in China[J]. Plant Disease, 2019, 103(7): 1791.
- [4] O'CONNELL R J, THON M R, HACQUARD S, et al. Lifestyle transitions in plant pathogenic *Colletotrichum* fungi deciphered by genome and transcriptome analyses[J]. Nature Genetics, 2012, 44(9): 1060-1065.
- [5] YANG L, LU X, LI S, et al. First report of common bean

- (*Phaseolus vulgaris*) stem rot caused by *Colletotrichum spaethianum* in China[J]. *Plant Disease*, 2019, 103(1): 151.
- [6] 孙劲, 徐彪, 周长彬. 西昌地区豆科植物炭疽病的鉴定[J]. *西昌学院学报(自然科学版)*, 2004, 18(4): 83-84.
- [7] 李海云, 靳帅, 张学勤, 等. 大豆炭疽病菌 *Colletotrichum chlorophyti* 的鉴定[J]. *植物保护*, 2017, 43(2): 163-166.
- [8] JI J, WANG T, XU X, et al. First report of *Colletotrichum siamense* causing leaf spot on redbud in China[J]. *Plant Disease*, 2018, 103(3): 585.
- [9] SILVA D N, TALHINHAS P, VÁRZEA V, et al. Application of the Apn2/MAT locus to improve the systematics of the *Colletotrichum gloeosporioides* complex: An example from coffee (*Coffea* spp.) hosts[J]. *Mycologia*, 2012, 104(2): 396-409.
- [10] WEIR B S, JOHNSTON P R, DAMM U. The *Colletotrichum gloeosporioides* species complex[J]. *Studies in Mycology*, 2012, 73: 115-180.
- [11] WHITE T J, BRUNS T, LEE S, et al. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics[M]//INNIS M A, GELFAND D H, SNINSKY J J, et al. PCR protocols: A guide to methods and applications. San Diego: Academic Press, 1990: 315-322.
- [12] CARBONE I, KOHN L M. A method for designing primer sets for speciation studies in filamentous ascomycetes[J]. *Mycologia*, 1999, 91(3): 553-556.
- [13] TEMPLETON M D, RIKKERINK E H A, SOLON S L, et al. Cloning and molecular characterization of the glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase-encoding gene and cDNA from the plant pathogenic fungus *Glomerella cingulata*[J]. *Gene*, 1992, 122(1): 225-230.
- [14] GLASS N L, DONALDSON G C. Development of primer sets designed for use with the PCR to amplify conserved genes from filamentous ascomycetes[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1995, 61(4): 1323-1330.
- [15] 李沛利, 刘丹, 陈诗瑶, 等. 四川省成都市狭叶十大功劳炭疽病病原菌的鉴定与生物学特性研究[J]. *植物保护*, 2018, 44(3): 61-66.
- [16] 张荣, 邓振权, 刘爱媛, 等. 荔枝叶面、花穗和果实上真菌消长动态[J]. *华南农业大学学报*, 2012, 33(2): 159-162.
- [17] 刘梅, JAYAWARDENA R S, 刘阳, 等. 北京市葡萄炭疽病病原菌的分子鉴定[J]. *植物保护学报*, 2018, 45(2): 393-394.
- [18] WIKEE S, WIKEE S, CAI L, et al. *Colletotrichum* species from jasmine (*Jasminum sambac*)[J]. *Fungal Diversity*, 2011, 46(1): 171-182.
- [19] YANG Y L, LIU Z Y, CAI L L, et al. *Colletotrichum* anthracnose of *Amaryllidaceae*[J]. *Fungal Diversity*, 2009, 39(2): 123-146.
- [20] SHARMA G, PINNAKA A K, SHENOY B D. Resolving the *Colletotrichum siamense* species complex using ApMat marker[J]. *Fungal Diversity*, 2015, 71(1): 247-264.
- [21] PRIHASTUTI H, CAI L, CHEN H, et al. Characterization of *Colletotrichum* species associated with coffee berries in northern Thailand[J]. *Fungal Diversity*, 2009, 39: 89-109.
- [22] WU J P, ZHOU J, JIAO Z B, et al. *Amorphophallus konjac* anthracnose caused by *Colletotrichum siamense* in China[J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2019, 128(1): 225-231.
- [23] LING J F, SONG X B, XI P G, et al. Identification of *Colletotrichum siamense* causing litchi pepper spot disease in mainland China[J]. *Plant Pathology*, 2019, 68(8): 1533-1542.
- [24] CHECHI A, STAHLLECKER J, DOWLING M E, et al. Diversity in species composition and fungicide resistance profiles in *Colletotrichum* isolates from apples[J]. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 2019, 158: 18-24.
- [25] LIU F, DAMM U, CAI L, et al. Species of the *Colletotrichum gloeosporioides* complex associated with anthracnose diseases of Proteaceae[J]. *Fungal Diversity*, 2013, 61(1): 89-105.
- [26] 李沛利, 李娟, 龚国淑, 等. 四川省鹅掌柴炭疽病病原菌的初步鉴定[J]. *植物病理学报*, 2017, 47(3): 296-304.
- [27] YANG Y, CAI L, YU Z, et al. *Colletotrichum* species on Orchidaceae in Southwest China[J]. *Cryptogamic Mycologie*, 2011, 32(3): 229-253.
- [28] CAO X R, XU X M, CHE H Y, et al. Characteristics and distribution of *Colletotrichum* species in coffee plantations in Hainan, China[J]. *Plant Pathology*, 2019, 68(6): 1146-1156.
- [29] HU M, GRABKE A, DOWLING M E, et al. Resistance in *Colletotrichum siamense* from peach and blueberry to thiophanate-methyl and azoxystrobin[J]. *Plant Disease*, 2015, 99(6): 806-814.