

郭治辰,李绍建,李雪梦,等.河南丹参叶斑病菌致病力分析及毒素蛋白亚型鉴定[J].山西农业科学,2026,54(1):185-193.
GUO Z C, LI S J, LI X M, et al. Pathogenicity analysis and toxin protein subtype identification of leaf spot pathogen in *Salvia miltiorrhiza* from henan province[J]. Journal of Shanxi Agricultural Sciences, 2026, 54(1):185-193.
doi:10.26942/j.cnki.issn.1002-2481.2026.01.21

河南丹参叶斑病菌致病力分析及毒素蛋白亚型鉴定

郭治辰^{1,2},李绍建²,李雪梦²,杨瑾²,鲁书豪²,秦艳红²,
高素霞²,文艺²,蔡丽¹,王飞²

(1.华中农业大学植物科学技术学院,湖北武汉430070;2.河南省农业科学院植物保护研究所,河南郑州450002)

摘要:为明确河南省丹参叶斑病原菌致病力及毒素蛋白亚型差异,采用组织分离法对6个丹参产区叶斑病样品的病原菌进行分离纯化,获得6株培养分离株,利用形态学和分子生物学方法对病原菌进行鉴定,并对病原菌分离株形态、生长速率、产孢特征、致病力差异及毒素蛋白亚型进行测定。结果表明,分离所得丹参叶斑病原菌均为多主棒孢(*Corynespora cassicola*),其在菌落特征、生长速率、产孢量、孢子尺寸、萌发率及致病力方面均存在差异。其中,分离株DS73-2生长速率最快,分离株DS40-7产孢量最高;在对丹参叶片致病力方面,分离株DS40-7、DS25-3致病力较强,分离株DS9-2次之,分离株DS27-1、DS53-1和DS73-2致病力较弱。毒素蛋白亚型检测结果显示,在供试分离株中共检测到3种毒素蛋白亚型,其中,分离株DS9-2、DS25-3和DS40-7属于Cas1亚型和Cas2亚型,分离株DS27-1属于Cas2亚型,分离株DS53-1和DS73-2属于未检测到毒素基因的Cas0亚型。供试分离株的毒素蛋白亚型与产区无直接相关性,但与其致病力表现出一定的相关性。此外,可检测到毒素蛋白基因的3个分离株(DS40-7、DS25-3、DS9-2)致病力均较强。

关键词:丹参;叶斑病;病原菌鉴定;多主棒孢;致病力差异;毒素蛋白亚型

中图分类号:S435.672 **文献标识码:**A **文章编号:**1002-2481(2026)01-0185-09

Pathogenicity Analysis and Toxin Protein Subtype Identification of Leaf Spot Pathogen in *Salvia miltiorrhiza* from Henan Province

GUO Zhichen^{1,2}, LI Shaojian², LI Xuemeng², YANG Jin², LU Shuhao²,
QIN Yanhong², GAO Suxia², WEN Yi², CAI Li¹, WANG Fei²

(1.College of Plant Science and Technology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China;

2.Institute of Plant Protection, Henan Academy of Agricultural Sciences, Zhengzhou 450002, China)

Abstract: To clarify the pathogenicity and toxin protein subtype differences of *Salvia miltiorrhiza* leaf spot pathogens in Henan province, in this study, the pathogens from diseased leaf samples collected from three *S. miltiorrhiza* production areas were isolated and purified using the tissue isolation method, and pure cultures were obtained. The pathogens were identified using morphological and molecular biological methods. Subsequently, the morphological characteristics, growth rate, sporulation traits, pathogenicity differences, and toxin protein subtypes of the pathogen isolate were analyzed. The results showed that all isolated pathogens were identified as *Corynespora cassicola*. Differences were observed among the isolates in terms of colony morphology, growth rate, sporulation quantity, spore size, germination rate, and pathogenicity. Among them, isolate DS73-2 exhibited the fastest growth rate, while isolate DS40-7 produced the highest sporulation. In terms of pathogenicity, isolates DS40-7 and DS25-3 demonstrated stronger pathogenicity, followed by isolate DS9-2, whereas isolates DS27-1, DS53-1, and DS73-2 showed less pathogenicity. Toxin protein subtype detection results revealed that three toxin

收稿日期:2025-03-05

基金项目:国家中药材产业技术体系(CARS-21);河南省中药材产业技术体系(HARS-22-11-Z1);河南省农业科学院新兴学科(2024XK06);河南省农业科学院自主创新项目(2025ZC51)

作者简介:郭治辰,在读硕士,研究方向:植物病害防治,E-mail:guozhichen1202@163.com。郭治辰、李绍建为同等贡献作者

通信作者:蔡丽,副教授,博士,主要从事植物病理学研究,E-mail:caili@mail.hzau.edu.cn

王飞,副研究员,硕士,主要从事药用植物保护研究,E-mail:yunfeiren@163.com

protein subtypes were identified among the tested isolates. Isolates DS9-2, DS25-3, and DS40-7 were identified as both *Cas1* and *Cas2* subtype, isolate DS27-1 was classified as *Cas2* subtype, and isolates DS53-1 and DS73-2 were identified as *Cas0* subtype for which no toxin genes were detected. No direct correlation was found between toxin protein subtypes and the production areas, but a certain association was observed with pathogenicity, all three isolates (DS40-7, DS25-3, DS9-2) testing positive for toxin protein genes exhibited strong pathogenicity.

Keywords: *Salvia miltiorrhiza*; leaf spot; pathogen identification; *Corynespora cassicola*; pathogenicity difference; toxin protein subtype

丹参(*Salvia miltiorrhiza* Bge.)属唇形科鼠尾草属,别名血参、活血根等,具有活血、祛瘀、清心、除烦、安神等功效^[1],常用来治疗冠心病等心血管疾病^[2]。丹参作为河南省大宗道地药材之一,在河南省每年种植面积近 20 000 hm²。随着近年来国家对中药材种植产业一系列利好政策的出台,丹参种植规模不断扩大,然而丹参的大面积种植也带来了病虫害日益增多的问题^[3-4]。丹参叶斑病作为丹参主要病害之一,在河南省普遍发生。叶斑病侵染初期,丹参叶片呈现不规则病斑,随病情发展病斑逐渐扩大,使病叶干枯、穿孔坏死,最终导致整株枯死^[5]。

已有研究报道,叶斑病病原菌寄主主要包括热带及亚热带地区的橡胶、木瓜、大豆、黄瓜等^[6],主要引起寄主叶部病害。邹欢等^[7]研究了四川省中江县丹参叶斑病病原菌种类,以及常用杀菌剂对该病原菌菌丝生长的抑制作用,发现四川丹参叶斑病病原菌为果生炭疽菌(*Colletotrichum fructicola*),80%的乙蒜素乳油对病原菌有较好的抑菌活性。王飞等^[5]研究了河南省丹参叶斑病病原菌种类,发现河南丹参叶斑病病原菌为多主棒孢(*Corynespora cassicola*),具有显著的寄生多样性特征。这些研究多集中于丹参叶斑病的发生、危害、室内药剂筛选等,对于其致病力差异的研究报道较少。彭建华等^[8]研究了橡胶树棒孢落叶病病原菌的致病性和产毒条件,发现多主棒孢可能存在不同生理小种,并筛选出了最佳产毒条件。多主棒孢中毒素蛋白共有 7 种,分别为 *Cas1*、*Cas2*、*Cas3*、*Cas4*、*Cas5*、*Cas6* 和 *Cas7*。根据多主棒孢中含有的毒素蛋白不同将其分成 7 种亚型(*Cas1*~*Cas7*),此外,还将检测不到毒素蛋白的多主棒孢划分为 *Cas0* 型^[9-10]。曲建楠等^[11]研究了海南省橡胶树棒孢落叶病菌及其毒素基因种类,发现海南橡胶树棒孢落叶病菌为含 *Cas5* 毒素蛋白的优势群体,并推测多主棒孢致病性可能与地理位置有关。雷雪梅等^[12]研究了广西烟草棒孢叶斑病及其毒素基因种类,发现广西烟草棒孢叶斑病菌为 *Cas7* 型和 *Cas0*

型,并且 *Cas0* 型为广西烟草棒孢叶斑病菌的优势群体。秦健等^[13]研究了广西苦瓜棒孢叶斑病菌及其毒素基因种类,发现广西苦瓜棒孢叶斑病菌为含 *Cas2* 型毒素蛋白的优势群体,且同一种毒素蛋白亚型病原菌致病力也存在差异。刘先宝等^[14]研究了不同地区、寄主的多主棒孢的致病性差异,发现 *Cas2* 型和 *Cas5* 型毒素对不同橡胶树存在致病性差异。目前,对丹参叶斑病病原菌多主棒孢毒素蛋白亚型的相关研究还较少。

本研究通过从河南不同丹参产区采集叶斑病样本进行病原菌分离鉴定,分析了不同产区病原菌产孢特征及致病力的差异,并进一步对不同产区病原菌毒素蛋白亚型进行了检测,旨在为多主棒孢致病机理研究及该病害的科学防控奠定基础。

1 材料和方法

1.1 试验材料

2021 年在河南省 6 个丹参产区(许昌市禹州市张得镇、许昌市建安区小召乡、许昌市禹州市范坡镇、南阳市方城县小史店镇、南阳市方城县古庄店镇、三门峡市渑池县张村镇)采集具有典型叶斑病发病特征的丹参植株叶片。PDA(马铃薯葡萄糖琼脂)培养基配方为:马铃薯 200 g,葡萄糖 20 g,琼脂 10 g,蒸馏水 1 000 mL。供试丹参为豫丹参 1 号,由河南省农业科学院植物保护研究所中药材研究室提供。

1.2 病原菌分离与鉴定

1.2.1 病原菌分离 采取组织分离法^[15]对叶斑病病原菌进行分离。使用无菌手术剪在病叶上截取 0.5 cm×0.5 cm 组织样本。依次使用 75% 乙醇和次氯酸钠对样本进行消毒处理。消毒后的组织块置于 PDA 培养基中央,28℃培养长出菌丝时,挑取尖端菌丝进行纯化。

1.2.2 形态学鉴定 观察在 PDA 培养基上生长 7 d 的供试分离株形态,并在光学显微镜下观察分生孢子特征,参考《中国真菌志》^[16]对病原菌进行形态鉴定。

1.2.3 病原菌基因型鉴定 分别取供试6株病原菌菌丝并提取DNA。以提取的DNA为模板,利用表1中的rDNA-ITS、 β -微管蛋白(β -tubulin)基因和转录延伸因子(EF-1 α)基因引物进行PCR

扩增,将产物进行测序^[17-18]。将测序结果先进行BLAST比对,然后利用MEGA 11.0软件构建基于ITS-EF1- α - β -tubulin串联序列的系统进化树,确定病原菌的种类。

表1 研究所用引物

Tab.1 Primers used in this study

鉴定类型	Type identification	基因	Gene	引物	Primer	序列(5'-3')	Sequence(5'-3')
病原菌种类	Pathogen species	rDNA-ITS		ITS1		TCCGTAGGTGAACCTGCGG	
				ITS4		TCCTCCGCTTATTGATATGC	
		EF-1 α		EF1-72F		CATCGAGAAGTTCGAGAAGG	
				EF1-986R		TACTTGAAGGAACCTTACC	
		β -tubulin		Bt2a		GGTAACCAAATCGGTGCTGCTTTC	
				Bt2b		ACCCTCAGTGTAGTGACCCTTGGC	
病原菌毒素蛋白亚型	Pathogen toxin protein subtype	Cas1		CasF18		CCCAAGATACATGTTTTGAATGT	
				CasR27		CCACACAAAGCAAGATACAGAATGAGC	
		Cas2		CasF17		GGATTTGCCTGAGATCCTA	
				CasR24		CAAACAATGCTAACCAAAACAAAC	
		Cas3, Cas4		CasF20		GTCGGCTAACTTGGGAAAACTCT	
				CasR28		GCAGGAAGCAAAACACAGAACAAG	
		Cas5		CasF19		CGGGGAGGTATCAGGTGTGAGATA	
				CasR26		CAGAACAAGCCAAAAGAGAACTAC	
		Cas6		CasF16		GCTTGATTGCTGTGAGATACT	
				CasR25		AAAACGATGCTAAACAAAAGGA	
		Cas7		CasF15		CCTTTGCTCCCTAGACAGT	
				CasR28		GCAGGAAGCAAAACACAGAACAAG	

1.3 病原菌形态与生长速率测定

在PDA培养基中心接种已培养5 d的病原菌斑(直径为6 mm), 28℃暗培养, 分别于第3、5、7天测定菌落直径, 比较病原菌的生长速率和病原菌形态。

1.4 病原菌产孢特征测定

1.4.1 产孢量测定 从培养7 d的菌落距中心1/2半径处挑取6 mm的菌斑3块, 加入5 mL无菌水(添加1%的吐温-80), 振荡混匀, 用纱布过滤菌块后得到孢子悬浮液。用血球计数板统计产孢量。每个处理重复3次。

1.4.2 分生孢子大小测定 在光学显微镜下观察生长7 d的病原菌分生孢子形态, 随机选取分生孢子, 测量孢子直径(n=100)。

1.4.3 分生孢子萌发率测定 制备孢子悬浮液后, 于28℃恒温黑暗培养2、4、6、8 h后镜检, 统计孢子萌发情况。

1.4.4 病原菌致病力测定 选用室内苗期、叶片大小一致的健康丹参植株叶片, 丹参品种选用豫

丹参1号, 叶面分别喷施浓度为 1×10^6 个/mL的6种分离株孢子悬浮液, 以清水代替孢子悬浮液处理作为空白对照, 每个处理3个重复。用保鲜膜套袋进行保湿, 28℃恒温培养, 5 d后记录发病率, 并参考朱广雪等^[19]的病情分级标准, 调查丹参叶片发病情况, 计算病情指数。

1.5 病原菌毒素蛋白亚型鉴定

利用表1中毒素蛋白亚型鉴定引物, 对7种编码毒素蛋白的基因进行PCR扩增, 并将产物进行测序^[20-21]。进一步将测序结果进行BLAST比对分析, 确定病原菌含有的毒素蛋白亚型。

1.6 数据分析

使用软件SPSS 26.0进行统计学分析, 使用软件Graphpad Prism 10进行制图。

2 结果与分析

2.1 病原菌分离与鉴定

2.1.1 病原菌分离纯化与形态学鉴定 由表2可知, 对6个丹参产区的叶斑病病原菌进行分离与纯

化,得到6株叶斑病病原菌,并分别命名为DS9-2、DS25-3、DS27-1、DS40-7、DS53-1和DS73-2。

表2 丹参叶斑病样本的采样情况

Tab.2 Sampling information of *S. miltiorrhiza* leaf spot

分离株编号 Isolate number	采样地 Sampling sites	经纬度 Longitude and latitude
DS9-2	许昌市禹州市张得镇	34°4'16"N, 113°27'5"E
DS25-3	许昌市建安区小召乡	34°3'6"N, 113°27'34"E
DS27-1	许昌市禹州市范坡镇	33°8'47"N, 113°18'31"E
DS40-7	南阳市方城县小史店镇	33°8'33"N, 113°18'21"E
DS53-1	南阳市方城县古庄镇	33°10'44"N, 113°9'31"E
DS73-2	三门峡市渑池县张村镇	34°47'19"N, 111°36'53"E

将分离纯化得到的6个分离株分别于PDA培养基上28℃恒温暗培养7d,结果显示,6个分离株的菌落均呈圆形或近圆形,颜色为灰白色或灰褐色。其中,分离株DS9-2菌落边缘规则,菌落中心呈现凹陷轮纹;DS25-3菌落边缘菌丝较稀疏,菌落中心轮纹不明显;DS27-1菌落边缘规则,菌落中心有凸起轮纹;DS40-7菌落边缘呈白色,菌落中心没有轮纹,背面有红褐色色素沉积;DS53-1菌落菌丝较稀疏,背面有灰绿色色素沉积;DS73-2菌落菌丝呈绒毛状,边缘和中心呈白色,背面有绿色色素沉积。6个分离株的分生孢子形态相近,均

呈倒棒状,顶端钝圆,部分具隔膜,大多数为单生,少数为2个或多个串生。这些分离株形态与棒孢属真菌相同,因此,这些分离株为棒孢属真菌。

2.1.2 病原菌种类鉴定 对6株供试分离株的rDNA-ITS、 β -tubulin基因和EF-1 α 基因序列在GenBank进行BLAST比对分析发现,它们的序列与GenBank中多主棒孢(*C. cassiicola*)序列一致性均达99%以上,6株分离株序列的rDNA-ITS、 β -tubulin基因和EF-1 α 基因GenBank登录号见表3。将各分离株序列串联后使用MEGA 11.0构建系统发育树,发现6个病原菌均与多主棒孢聚在同一个分支,遗传距离最近(图1)。结合分离株形态特征和分子生物学鉴定结果,确定6株分离株均为多主棒孢。

表3 分离株基因GenBank登录号

Tab.3 GenBank accession number of isolate genes

分离株编号 Isolate number	rDNA-ITS	β -tubulin	EF-1 α
DS9-2	PP346159	PP419027	PP696966
DS25-3	PP346160	PP419028	PP696967
DS27-1	PP346161	PP419029	PP696968
DS40-7	PP346162	PP419030	PP696969
DS53-1	PP346163	PP419031	PP696970
DS73-2	PP346164	PP546316	PP696971

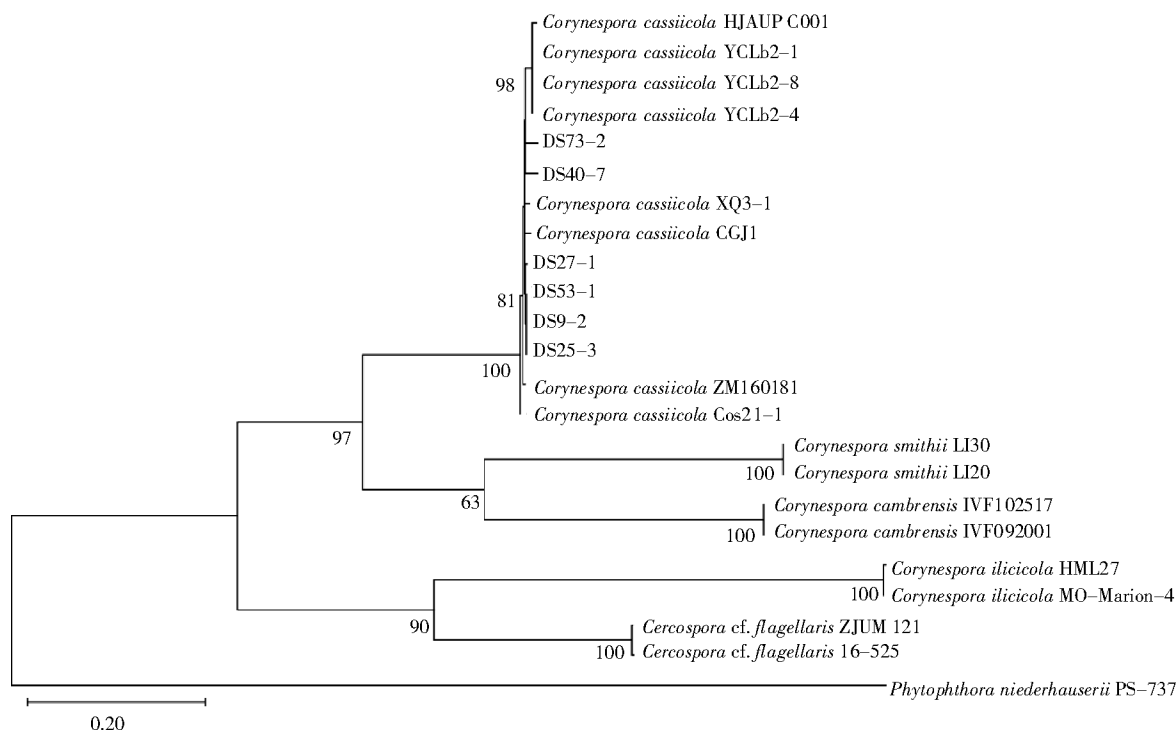
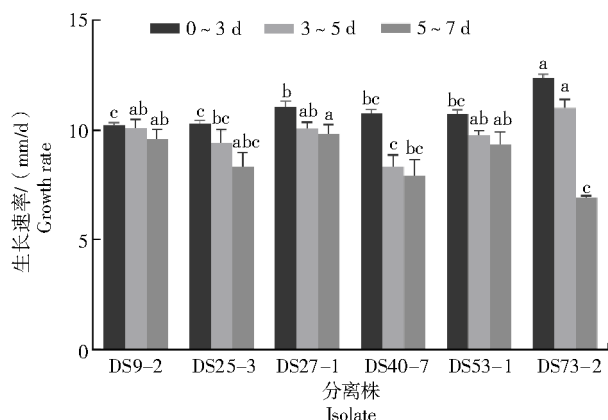


图1 基于多基因串接序列构建的系统发育树

Fig.1 Phylogenetic tree based on multi-gene concatenated sequences

2.2 不同产区病原菌生长速率分析

不同多主棒孢分离株生长速率的分析如图2所示。



不同小写字母表示不同分离株间差异显著($P<0.05$)

Different lowercase letters indicated significant differences among isolates($P<0.05$)

图2 不同多主棒孢分离株生长速率的分析

Fig.2 Analysis of growth rate among different *C. cassicola* isolates

由图2可知,在培养0~3 d时,DS73-2生长速率最快,为12.39 mm/d,与其他5株供试分离株差异显著($P<0.05$);其次是DS27-1,生长速率为11.06 mm/d;DS9-2生长速率最慢,为10.22 mm/d。

在培养3~5 d时,DS73-2生长速率仍最快,为11.00 mm/d,与其他5株供试分离株差异显著($P<0.05$);DS27-1的生长速率次之,为10.08 mm/d;DS40-7生长速率最慢,为8.33 mm/d。在培养5~7 d时,DS27-1的生长速率最快,为9.83 mm/d;DS73-2的生长速率最慢,仅为6.92 mm/d。综上,供试分离株的生长速率在7 d内表现各异,其中,DS73-2在前5 d生长速率最快,但在5~7 d降为最慢;DS27-1生长速率在前5 d小于DS73-2,但在5~7 d时生长速率为所有分离株中最快。

2.3 不同产区病原菌产孢特征分析

2.3.1 产孢量和分生孢子尺寸分析 从表4可以看出,6个供试分离株在28℃培养7 d后,分离株DS40-7产孢量达到 2.83×10^5 cfu/mL,显著高于其他5个分离株($P<0.05$);分离株DS53-1产孢量为 6.7×10^4 cfu/mL,产孢量最低,且与分离株DS9-2、DS27-1的产孢量差异显著($P<0.05$)。

从表4还可以看出,分离株DS73-2的平均分生孢子大小为 $(49.82 \pm 1.85) \mu\text{m} \times (7.22 \pm 0.12) \mu\text{m}$,显著大于其他分离株($P<0.05$);分离株40-7的平均分生孢子大小为 $(33.02 \pm 1.40) \mu\text{m} \times (6.25 \pm 0.10) \mu\text{m}$,平均长度与其余5株病原菌差异显著($P<0.05$),平均宽度与分离株DS9-2、DS27-1和DS73-2差异显著($P<0.05$)。

表4 不同多主棒孢分离株孢子尺寸及产孢量分析

Tab.4 The size and sporulation yield of the conidia by different isolates of *C. cassicola*

分离株 Isolate	产孢量/(cfu/mL) Sporulation yield	长度/ μm Length		宽度/ μm Width	
		范围 Range	平均值 Average	范围 Range	平均值 Average
DS9-2	$(1.67 \pm 0.17) \times 10^5$ b	13.04-109.99	39.03 ± 1.77 c	4.11-9.80	6.85 ± 0.12 b
DS25-3	$(1.33 \pm 0.17) \times 10^5$ bc	12.54-100.25	38.14 ± 1.54 c	4.33-9.51	6.37 ± 0.11 c
DS27-1	$(1.83 \pm 0.44) \times 10^5$ b	15.21-111.81	45.06 ± 2.16 b	3.99-9.93	6.97 ± 0.13 ab
DS40-7	$(2.83 \pm 0.17) \times 10^5$ a	14.46-107.42	33.02 ± 1.40 d	4.26-8.95	6.25 ± 0.10 c
DS53-1	$(6.70 \pm 0.17) \times 10^4$ c	16.30-99.36	37.94 ± 1.40 c	3.87-9.77	6.46 ± 0.12 c
DS73-2	$(1.00 \pm 0.29) \times 10^5$ bc	16.90-98.73	49.82 ± 1.85 a	4.53-9.72	7.22 ± 0.12 a

注:不同小写字母表示不同分离株间差异显著($P<0.05$)。下表同。

Note: Different lowercase letters indicated significant differences among isolates($P<0.05$). The same as below.

2.3.2 分生孢子萌发率分析 从表5可以看出,6株分离株分生孢子均于2 h后开始萌发,萌发4 h时,DS25-3、DS40-7孢子萌发率约为40%,显著高于其他4株分离株的孢子萌发率($P<0.05$);萌发6 h时,DS25-3、DS27-1、DS40-7孢子萌发

率达到60%以上,显著高于其他3株分离株孢子萌发率($P<0.05$),DS9-2、DS73-2孢子萌发率最低,仅为35%左右。萌发8 h时,DS25-3、DS27-1、DS40-7、DS53-1孢子萌发率均达到89%以上,显著高于分离株DS9-2、DS73-2(孢子

萌发率 $<60\%$)($P<0.05$)。

表 5 不同多主棒孢分离株孢子萌发率

Tab.5 The germination rate of conidia by different isolates of *C.cassicola*

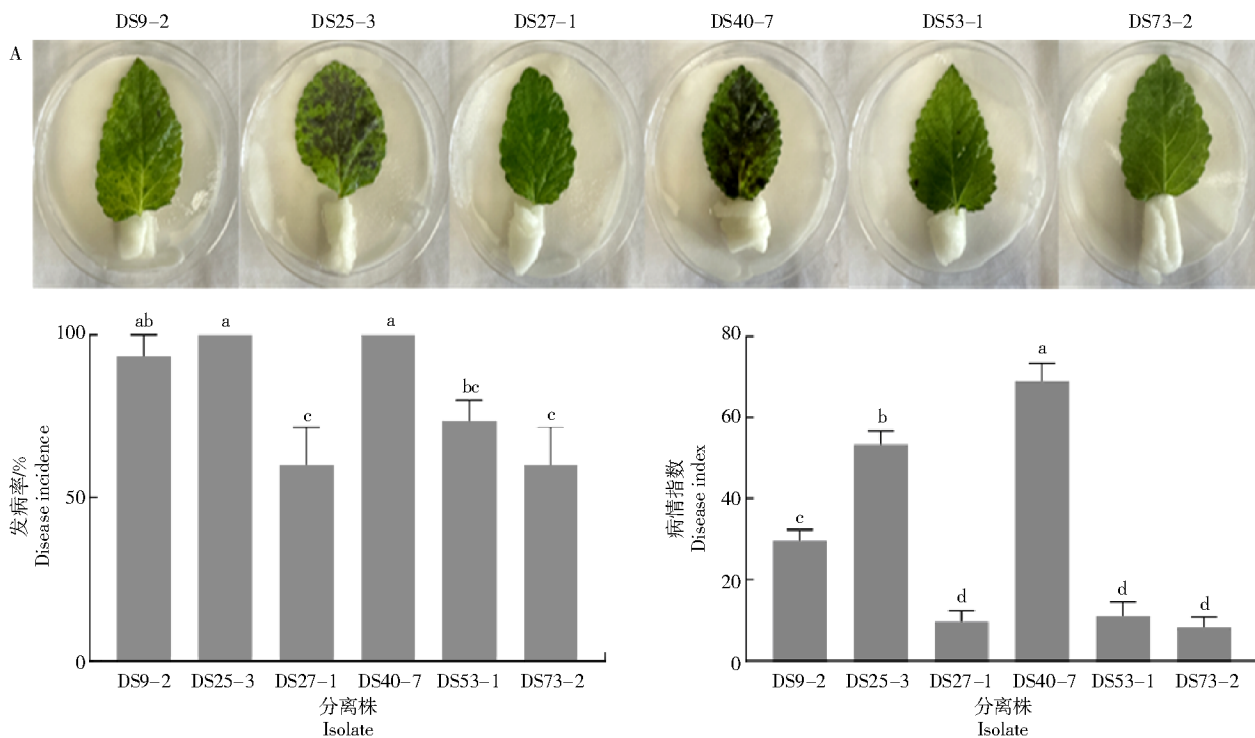
%

分离株 Isolate	萌发时间/h Germination time			分离株 Isolate	萌发时间/h Germination time		
	4	6	8		4	6	8
DS9-2	19.00 $\pm$ 3.79b	33.33 $\pm$ 3.18c	65.67 $\pm$ 2.33b	DS40-7	39.33 $\pm$ 4.33a	70.00 $\pm$ 3.22a	93.67 $\pm$ 2.03a
DS25-3	39.67 $\pm$ 2.33a	74.33 $\pm$ 1.86a	93.00 $\pm$ 1.53a	DS53-1	14.00 $\pm$ 2.08b	51.00 $\pm$ 1.53b	94.00 $\pm$ 2.08a
DS27-1	21.00 $\pm$ 3.22b	64.67 $\pm$ 2.91a	89.67 $\pm$ 0.88a	DS73-2	17.33 $\pm$ 1.76b	37.67 $\pm$ 5.24c	59.00 $\pm$ 4.04b

2.4 丹参棒孢叶斑病原菌致病力差异分析

从图 3 可以看出,将 6 株病原菌接种丹参叶片 5 d 后,DS40-7、DS25-3 的发病率均达到 100%;其次为 DS9-2、DS53-1,发病率分别为 93.33% 和 73.33%,DS73-2、DS27-1 发病率最低,为 60%。病情指数大小依次为 DS40-7>DS25-3>DS9-2>DS53-1>DS73-2>DS27-1。其中,分离株 DS40-7 处理的叶片优先发病,接种 5 d 后病情

指数为 68.89,其次为分离株 DS25-3,接种 5 d 后病情指数为 53.34,二者差异显著($P<0.05$)。分离株 DS9-2、DS53-1 接种 5 d 后的病情指数分别为 29.63 和 11.11;分离株 DS73-2、DS27-1 接种 5 d 后病情指数分别为 8.15 和 9.63。综上,结合发病率及病情指数结果,DS40-7 和 DS25-3 为强致病力分离株。



A. 不同分离株接种 5 d 后发病症状

A. Disease symptoms after inoculation with different isolates for 5 days

图 3 多主棒孢不同分离株的致病性测定

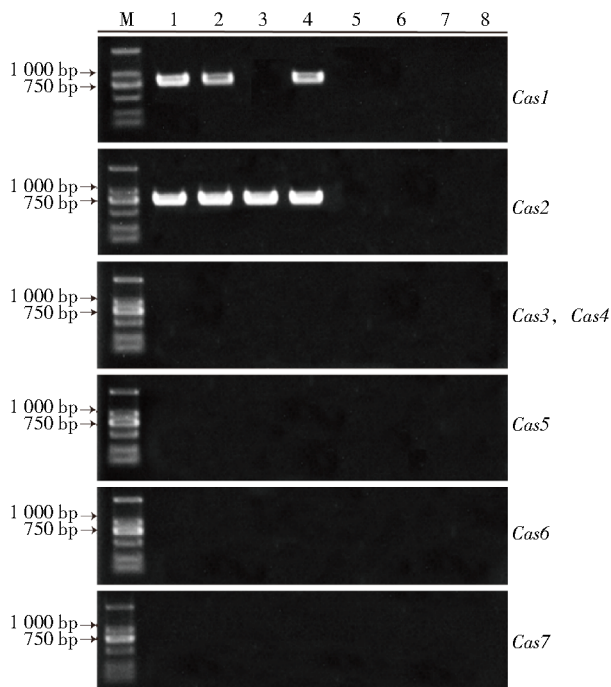
Fig.3 Pathogenicity determination of different *C. cassicola* isolates

2.5 丹参棒孢叶斑病原菌毒素蛋白亚型鉴定

利用 *Cas1*、*Cas2*、*Cas3*、*Cas4*、*Cas5*、*Cas6* 和 *Cas7* 的特异性引物对 6 株病原菌进行毒素蛋白

亚型鉴定(图 4),发现分离株 DS9-2、DS25-3 和 DS40-7 携带 *Cas1* 基因,分离株 DS9-2、DS25-3、DS27-1 和 DS40-7 携带 *Cas2* 基因,分离株 53-1 和

分离株 73-2 均无条带产生,初步认定为不产毒素的 Cas0 型。



M. DNA 分子量标记 DL2000; 1~8 分别代表分离株 DS9-2、DS25-3、DS27-1、DS40-7、DS53-1、DS73-2、空白对照和无菌水对照

M. DNA molecular weight marker DL2000; 1-8. isolates DS9-2, DS25-3, DS27-1, DS40-7, DS53-1, DS73-2, blank and negative control sterile water as template

图 4 不同分离株中毒素蛋白亚型分析

Fig.4 Analysis of toxin protein subtypes in different isolates

3 结论与讨论

多主棒孢寄主种类繁多,目前已被报道的寄主包括草莓^[22]、烟草^[23]、黄瓜^[24]、芝麻^[25]、金叶女贞^[26]等,其分布广泛,是多种经济作物叶部病害的重要病原菌之一^[27]。河南省农业科学院植物保护研究所中药材研究室在前期报道河南省丹参棒孢叶斑病的基础上^[5],进一步对河南不同产区的丹参叶斑病样本进行分离培养,结合形态学和分子生物学分析,确定其病原菌均为多主棒孢(*C. cassiicola*)。前人研究多以 ITS 单序列进行病原菌的分子鉴定工作,但部分病原菌尤其是同一病原菌不同分离株间序列相似度较高,仅用单序列无法有效区分病原菌^[28],而多基因序列的串联分析能有效提升病原菌鉴定的高效性和准确性^[29]。因此,本研究在对

分离株进行 ITS 鉴定的同时,又进一步使用了 β -tubulin 和 *EF-1 α* 基因鉴定,确保了病原菌鉴定的准确性。

已有研究发现,源自不同寄主的多主棒孢以及同一寄主的不同多主棒孢分离株间在生物学及致病力方面均存在差异^[30],但在丹参棒孢叶斑病菌中尚未见相关报道。本研究从河南省不同丹参产区的棒孢叶斑病样本中分离获得了 6 株多主棒孢分离株。在标准化培养条件下,这些分离株在菌落形态特征、生长速率、产孢能力、孢子大小及萌发率等方面均表现出差异,这一结果与芝麻、绣球、黄瓜棒孢叶斑病不同病原菌分离株生物学特性存在差异的结论相一致^[31-33],这种地域性差异可能是由不同环境条件下病原菌的适应性演化造成的。比较分离株的致病力差异时发现,分生孢子萌发率高和产孢量大的病原菌(分离株 DS40-7、DS25-3),叶片的病情指数较高,其致病力较强;另外,分离株 DS73-2 的菌丝生长速率较快、分生孢子的尺寸较大,但在离体叶片中致病力较弱,分离株 DS40-7 的菌丝生长速率较慢、分生孢子尺寸较小、致病力较强,菌丝生长速率和孢子尺寸大小与致病力强弱间是否存在直接相关关系还有待进一步研究。

关于多主棒孢毒素蛋白亚型的研究主要涉及橡胶、黄瓜、苦瓜、烟草等寄主植物,并已检测到 Cas2、Cas5 和 Cas7 这 3 种毒素蛋白亚型^[11]。本研究分离所得病原菌分离株共检测到 3 种亚型,分离株 DS9-2、DS25-3 和 DS40-7 内同时检测到 *Cas1*、*Cas2* 基因,分离株 DS27-1 仅检测到 *Cas2* 基因,分离株 DS53-1 和 DS73-2 未检测到毒素蛋白基因,这与曲建楠等^[11]、雷雪梅等^[12]研究发现的每个棒孢霉分离株仅检测到 1 种毒素蛋白基因的结果不完全一致。致病力测定结果显示,上述可检测到毒素蛋白基因的 3 个分离株致病力均较强,这与前人推测毒素蛋白与多主棒孢病菌致病性相关的结论一致^[34]。这是对河南丹参叶斑病多主棒孢分离株毒素蛋白亚型的首次鉴定,分离株的毒素蛋白亚型与产区间未表现出明显相关性,后续还需扩大样本采集进一步研究。

丹参棒孢叶斑病作为丹参主要的叶部病害之一,在河南省各大丹参产区普遍发生。已有研究发现,该病在河南产区发病率达 100%,田间病株率在 20%~70%,造成叶片枯死脱落^[5],进而影响

丹参产量。本研究从河南不同丹参产区分离得到 6 株叶斑病原多主棒孢分离株,分离株间在形态学特征、产孢特性及致病力方面均存在差异,研究结果可为进一步研究丹参叶斑病原菌多主棒孢的致病机理及防治技术提供理论依据。

参考文献:

- [1] 任越,霍梦琪,马婧,等. 基于系统中药学的丹参组方功效研究[J]. 中国中药杂志, 2020, 45(14): 3251-3258.
REN Y, HUO M Q, MA J, et al. Study on components efficacy of *Salviae miltiorrhizae* Radix et Rhizoma based on systematic traditional Chinese medicine[J]. China Journal of Chinese Materia Medica, 2020, 45(14): 3251-3258.
- [2] 单晓晓,洪帮振,刘洁,等. 丹参化学成分、药理作用、临床应用的研究进展及质量标志物的预测分析[J]. 中国中药杂志, 2021, 46(21): 5496-5511.
SHAN X X, HONG B Z, LIU J, et al. Review of chemical composition, pharmacological effects, and clinical application of *Salviae miltiorrhizae* Radix et Rhizoma and prediction of its Q-markers[J]. China Journal of Chinese Materia Medica, 2021, 46(21): 5496-5511.
- [3] 王振,李娜,宋晗,等. 丹参种植技术研究进展[J]. 北方园艺, 2023(13): 126-131.
WANG Z, LI N, SONG H, et al. Research progress on planting technology of *Salvia miltiorrhiza*[J]. Northern Horticulture, 2023(13): 126-131.
- [4] 杨瑾,文艺,高素霞,等. 河南产区丹参根腐病原鉴定[J]. 河南农业科学, 2021, 50(10): 92-98.
YANG J, WEN Y, GAO S X, et al. Identification of pathogens causing *Salvia miltiorrhiza* root rot disease in Henan province[J]. Journal of Henan Agricultural Sciences, 2021, 50(10): 92-98.
- [5] 王飞,李雪梦,高素霞,等. 河南丹参棒孢霉叶斑病原菌的鉴定[J]. 植物病理学报, 2023, 53(2): 317-320.
WANG F, LI X M, GAO S X, et al. Pathogen identification of the *Corynespora* leaf spot on *Salvia miltiorrhiza* Bge. in Henan[J]. Acta Phytopathologica Sinica, 2023, 53(2): 317-320.
- [6] 李宝聚,高苇,石延霞,等. 多主棒孢和棒孢叶斑病的研究进展[J]. 植物保护学报, 2012, 39(2): 171-176.
LI B J, GAO W, SHI Y X, et al. Progress in researches on *Corynespora* leaf spot[J]. Journal of Plant Protection, 2012, 39(2): 171-176.
- [7] 邹欢,韩帅,范中菡,等. 四川省中江县丹参叶斑病原鉴定与抑菌药剂筛选[J]. 西南农业学报, 2023, 36(12): 2735-2740.
ZOU H, HAN S, FAN Z H, et al. Pathogen identification and fungicides screening of leaf spot disease on *Salvia miltiorrhiza* in Zhongjiang county, Sichuan province[J]. Southwest China Journal of Agricultural Sciences, 2023, 36(12): 2735-2740.
- [8] 彭建华,郑春耀,潘溪心,等. 橡胶树多主棒孢病菌强致病菌株的筛选及产毒条件优化[J]. 热带作物学报, 2009, 30(4): 520-524.
PENG J H, ZHENG C Y, PAN X X, et al. Cultural conditions for *Corynespora cassiicola* of *hevea brasiliensis*[J]. Chinese Journal of Tropical Crops, 2009, 30(4): 520-524.
- [9] LOPEZ D, RIBEIRO S, LABEL P, et al. Genome-wide analysis of *Corynespora cassiicola* leaf fall disease putative effectors[J]. Frontiers in Microbiology, 2018, 9: 276.
- [10] WU J, XIE X W, SHI Y X, et al. Variation of cassiicolin genes among Chinese isolates of *Corynespora cassiicola*[J]. Journal of Microbiology, 2018, 56(9): 634-647.
- [11] 曲建楠,陈迪,侯巨梅,等. 海南橡胶树棒孢霉落叶病菌毒素蛋白基因检测与致病性分析[J]. 植物保护, 2020, 46(3): 110-117.
QU J N, CHEN D, HOU J M, et al. Isolation, identification of the cassiicolin and pathogenicity analysis of *Corynespora* leaf fall disease of *Hevea brasiliensis* in Hainan[J]. Plant Protection, 2020, 46(3): 110-117.
- [12] 雷雪梅,桑维钧,李昊熙,等. 广西烟草棒孢霉叶斑病菌鉴定及毒素蛋白亚型检测[J]. 山地农业生物学报, 2023, 42(1): 46-53.
LEI X M, SANG W J, LI H X, et al. Identification of tobacco *Corynespora* leaf spot pathogen and detection of toxin protein subtypes in Guangxi[J]. Journal of Mountain Agriculture and Biology, 2023, 42(1): 46-53.
- [13] 秦健,刘杏连,康德贤,等. 广西苦瓜棒孢叶斑病的病原鉴定[J]. 植物病理学报, 2022, 52(3): 489-492.
QIN J, LIU X L, KANG D X, et al. Identification of pathogen from *Corynespora* leaf spot on balsam pear in Guangxi[J]. Acta Phytopathologica Sinica, 2022, 52(3): 489-492.
- [14] 刘先宝,李博勋,陈珊,等. 国内橡胶树多主棒孢 *Cassiicolin* 毒素多样性及致病性分析[J]. 热带作物学报, 2016, 37(10): 1969-1973.
LIU X B, LI B X, CHEN S, et al. Diversity and pathogenicity of the cassiicolin gene in *Corynespora cassiicola* of rubber tree in China[J]. Chinese Journal of Tropical Crops, 2016, 37(10): 1969-1973.
- [15] 方中达. 植病研究方法[M]. 3 版. 北京: 中国农业出版社, 1998.
FANG Z D. Research methods of plant diseases[M]. 3rd ed. Beijing: China Agriculture Press, 1998.
- [16] 张修国. 中国真菌志. 第五十五卷. 棒孢属及其相关属[M]. 北京: 科学出版社, 2018.
ZHANG X G. Flora fungorum sinicorum Vol. 55: *Corynespora* and related genera[M]. Beijing: Science Press, 2018.
- [17] 李雪梦,李绍建,杨瑾,等. 河南金银花叶斑病原鉴定、生物学特性及室内药剂筛选[J]. 植物保护, 2025, 51(1): 132-140.
LI X M, LI S J, YANG J, et al. Identification and biological characteristics of pathogen causing leaf spot disease of *Lonicera japonica* in Henan province, and laboratory fungicide screening[J]. Plant Protection, 2025, 51(1): 132-140.
- [18] 李海骋,王繁珍,姜永成,等. 地黄叶斑病原鉴定及室内药效检测[J]. 河南农业科学, 2024, 53(4): 92-101.
LI H C, WANG F Z, JIANG Y C, et al. Identification and indoor fungicide screening of pathogen causing leaf spot on *Rehmannia glutinosa*[J]. Journal of Henan Agricultural Sciences, 2024, 53(4): 92-101.
- [19] 朱广雪,岳圆圆,朱青艳,等. 河北省多主棒孢对 3 种常用杀

- 菌剂的抗性及其替代药剂对黄瓜棒孢叶斑病的防治效果[J]. 农药学报, 2024, 26(6):1144-1153.
- ZHU G X, YUE Y Y, ZHU Q Y, et al. Resistance of *Corynespora cassiicola* of Hebei province to three common fungicides and the control efficacy of alternative fungicides on cucumber target leaf spot[J]. Chinese Journal of Pesticide Science, 2024, 26(6):1144-1153.
- [20] DÉON M, BOURRÉ Y, GIMENEZ S, et al. Characterization of a cassiicolin-encoding gene from *Corynespora cassiicola*, pathogen of rubber tree (*Hevea brasiliensis*) [J]. Plant Science, 2012, 185:227-237.
- [21] DÉON M, SCOMPARIN A, TIXIER A, et al. First characterization of endophytic *Corynespora cassiicola* isolates with variant cassiicolin genes recovered from rubber trees in Brazil [J]. Fungal Diversity, 2012, 54(1):87-99.
- [22] 薛彩英, 武海燕, 马庆周, 等. 河南省草莓棒孢叶斑病原菌鉴定及其生物学特性[J]. 植物保护学报, 2023, 50(2):402-412.
- XUE C Y, WU H Y, MA Q Z, et al. Identification and biological characteristics of the pathogen causing *Corynespora* leaf spot of strawberry in Henan Province[J]. Journal of Plant Protection, 2023, 50(2):402-412.
- [23] 冉茂阳, 刘忠伟, 周栗禾, 等. 烟草棒孢霉叶斑病的综合防控研究进展[J]. 植物医学, 2023, 2(1):82-88.
- RAN M Y, LIU Z W, ZHOU L H, et al. Research progress on the comprehensive prevention and control of tobacco *Corynespora* leaf spot[J]. Plant Health and Medicine, 2023, 2(1):82-88.
- [24] 张笛, 刘齐月, 刘东, 等. 黑龙江省黄瓜棒孢叶斑病分布及病菌生物学特性[J]. 北方园艺, 2020(21):7-14.
- ZHANG D, LIU Q Y, LIU D, et al. Investigation on the incidence of cucumber leaf spot disease and its biological characteristics in Heilongjiang Province[J]. Northern Horticulture, 2020(21):7-14.
- [25] 孙会杰, 高德学, 程洪森, 等. 芝麻棒孢根腐病原菌生物学特性研究[J]. 沈阳农业大学学报, 2020, 51(4):506-511.
- SUN H J, GAO D X, CHENG H S, et al. Biological characteristics of root rot caused by *Corynespora cassiicola* on sesame in China[J]. Journal of Shenyang Agricultural University, 2020, 51(4):506-511.
- [26] 王树和, 周彩勤, 张奎望, 等. 金叶女贞棒孢叶斑病菌的生物学特性、致病性及系统发育[J]. 浙江农林大学学报, 2019, 36(6):1174-1181.
- WANG S H, ZHOU C Q, ZHANG K W, et al. Characterization of *Corynespora cassiicola* from golden vicary privet based on phylogeny, biology, and pathogenicity[J]. Journal of Zhejiang A & F University, 2019, 36(6):1174-1181.
- [27] 李晗, 冉茂, 陈海涛, 等. 植物棒孢霉叶斑病的发生及防治研究进展[J]. 植物医生, 2020(1):15-20.
- LI H, RAN M, CHEN H T, et al. Progress in researches of *Corynespora* leaf spot[J]. Plant Doctor, 2020(1):15-20.
- [28] 段丽君, 吕燕, 张慧丽, 等. 基于DNA序列分析的葡萄茎枯病菌检疫鉴定[J]. 植物检疫, 2020, 34(4):22-30.
- DUAN L J, LÜ Y, ZHANG H L, et al. Detection and identification of *Didymella glomerata* based on DNA sequence analysis[J]. Plant Quarantine, 2020, 34(4):22-30.
- [29] 曾蓉, 徐丽慧, 陈灏岚, 等. 西瓜叶斑病病原菌的鉴定及室内药剂筛选[J]. 植物保护, 2024, 50(4):310-317.
- ZENG R, XU L H, CHEN H L, et al. Identification of the pathogen causing leaf spot on watermelon and fungicide screening *in vitro* [J]. Plant Protection, 2024, 50(4):310-317.
- [30] DÉON M, FUMANAL B, GIMENEZ S, et al. Diversity of the cassiicolin gene in *Corynespora cassiicola* and relation with the pathogenicity in *Hevea brasiliensis* [J]. Fungal Biology, 2014, 118(1):32-47.
- [31] 贾敏, 刘新涛, 赵辉, 等. 芝麻棒孢叶斑病原菌鉴定与致病力比较[J]. 植物病理学报, 2020, 50(6):641-648.
- JIA M, LIU X T, ZHAO H, et al. Identification and pathogenicity comparison of *Corynespora cassiicola* causing leaf spot on sesame [J]. Acta Phytopathologica Sinica, 2020, 50(6):641-648.
- [32] 陈慧杰, 邓衍明, 齐香玉, 等. 绣球叶斑病原菌鉴定及其生物学特性[J]. 江苏农业科学, 2022, 50(7):106-111.
- CHEN H J, DENG Y M, QI X Y, et al. Identification of pathogen from *Hydrangea* leaf spot disease and its biological characteristics [J]. Jiangsu Agricultural Sciences, 2022, 50(7):106-111.
- [33] 阎显韬, 孙炳学, 陈长军, 等. 啮酰菌胺不同抗性类型多主棒孢的生物学特性[J]. 农药学报, 2020, 22(6):973-983.
- YAN Y T, SUN B X, CHEN C J, et al. Biological characteristics of *Corynespora cassiicola* with different types of resistance to boscalid [J]. Chinese Journal of Pesticide Science, 2020, 22(6):973-983.
- [34] TRAN D M, CLÉMENT-DEMANGE A, DÉON M, et al. Genetic determinism of sensitivity to *Corynespora cassiicola* exudates in rubber tree (*Hevea brasiliensis*) [J]. PLoS One, 2016, 11(10):e0162807.