

茶树链格孢叶斑病的病原鉴定

周园园¹, 吴治然¹, 贡长怡¹, 韦朝领^{2*}, 张立新^{1*}

(1. 安徽农业大学植物保护学院, 合肥 230036; 2. 安徽农业大学茶树生物学与资源利用国家重点实验室, 合肥 230036)

摘要 茶树是我国重要的经济作物, 茶园叶病的流行会造成严重的经济损失。2017年10月到2018年1月从安徽、福建和湖北省茶区的9个茶树品种上采集代表性茶叶斑病叶, 该病害的发病症状与由 *Colletotrichum* spp. 引起的茶炭疽病相似。采用组织分离法从发病叶片组织分离获得26株菌落形态一致的真菌分离物, 显微镜观察结果显示, 各菌株分生孢子的产生方式和形态特征相似。为进一步明确菌株的分类地位, 选取2株来自安徽庐江和宣城地区的代表性菌株(EC-6和XBC1-3)进行多基因片段的PCR扩增和序列分析。结果表明, 代表性菌株EC-6和XBC1-3的ITS、*gpd*、*tef-1a*基因序列分别与交链格孢 *Alternaria alternata* 参考菌株CBS 107.27的序列(KP124300, KP124157, KP125075)相似性为100%、99%和100%, 结合菌株形态学观察以及柯赫氏法则验证, 证实交链格孢是引起该茶树叶斑病的致病菌。这是在安徽茶区首次发现由致病性链格孢引起茶树叶斑病。

关键词 茶树叶斑病; 链格孢; 致病性; 鉴定

中图分类号: S 435.711 **文献标识码:** A **DOI:** 10.16688/j.zwbh.2018458

Identification of *Alternaria alternata* causing leaf spot disease of *Camellia sinensis*

ZHOU Yuanyuan¹, WU Zhiran¹, GONG Changyi¹, WEI Chaoling², ZHANG Lixin¹

(1. College of Plant Protection, Anhui Agricultural University, Hefei 230036, China; 2. State Key Laboratory of Tea Plant Biology and Utilization, Anhui Agricultural University, Hefei 230036, China)

Abstract The tea plant, *Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze, is a crucial commercial crop in China. The foliar diseases often resulted in serious production loss during epidemic outbreak in tea plantations in China. From October 2017 to January 2018, representative diseased leaves showing similar symptoms with anthracnose disease were collected from tea plants of nine varieties in tea plantations in Anhui, Fujian and Hubei provinces. A total of 26 isolates were recovered consistently from symptomatic leaves by tissue isolation, and identified as *Alternaria* sp. by morphological features. The two strains (EC-6, XBC1-3) from Lujiang county and Xuancheng regions in Anhui province, respectively, were representatively selected for further identification by PCR amplification and sequence analysis. Using BLAST analysis of NCBI, the internal transcribed spacer (ITS) region, the *gpd* and *tef-1a* gene sequences of the two strains shared 100%, 99% and 100% sequence identity with those of the *A. alternata* strain CBS107.27 in GenBank (KP124300, KP124157, KP125075), respectively. Based on the morphological characters, sequences analysis as well as pathogenicity tests, the causal pathogen was identified as *A. alternata*. This is the first report of *A. alternata* causing leaf spot disease of tea plants in Anhui province.

Key words leaf spot disease of tea plant; *Alternaria alternata*; pathogenicity; identification

茶树 *Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze 起源于云南^[1], 是我国重要的经济作物。我国对茶树病害的研究多集中在叶部病害, 原因一方面在于叶部病害是我国茶树的主要病害, 另一方面是茶树的营养价值多集中在叶片, 茶树芽和叶的品质直接影响

到茶叶的生产和经济价值^[2]。茶树叶部病害已记载的有126种, 主要有炭疽病、轮斑病和茶饼病等^[2-4]。根据联合国粮食及农业组织(FAO)的记录, 2016年中国生产茶叶241万t左右。若茶树种植区发生严重叶病, 则会造成茶叶大量减产。2017年10月到2018年1月

收稿日期: 2018-10-28

修订日期: 2019-02-14

基金项目: 安徽农业大学茶树生物学与资源利用国家重点实验室开放基金(SKLT0F20170108); 安徽省科技重大专项(18030701211)

* 通信作者: E-mail: 韦朝领 weichl@ahau.edu.cn; 张立新 lxzhang@ahau.edu.cn

分别在安徽、福建和湖北采集到茶叶斑病叶,其症状与 *Colletotrichum* spp. 引起的茶炭疽病^[4] 症状相似。为弄清该茶叶斑病的病原,本研究对病原菌进行了分离与致病性测定,并通过形态学观察和分子生物学手段对该病原菌进行种类鉴定,以期为该病害的监测和防控提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 病样采集及病菌分离

在安徽、福建和湖北省主要产茶区的 9 个茶树品种(‘春兰’‘鄂茶 1 号’‘柿大茶黄种’‘桃源大叶’‘皖茶 91’‘白茶 1 号’‘紫娟’‘梅占’‘五峰 212’)上采集症状相似的叶斑病叶,采用组织分离法^[5] 分离病原菌。取新鲜病叶,在病健交界处剪取 1 cm² 的小块,在 0.1% 的升汞中消毒 2 min,70% 乙醇浸泡 30 s,然后用无菌水冲洗 3 次,每次 20 s,晾干,接种至 PDA 平板上,在 28℃ 黑暗条件下培养。待长出菌落后转接到另一平板上纯化培养,将纯培养获得的菌株保存至 PDA 斜面备用。

1.2 形态学观察

将纯化后的菌株在 PDA 培养基上培养 3 d 后分别用 6 mm 的打孔器取菌饼转接至 PDA 培养基中央,在 28℃ 黑暗条件下培养,于第 3 天和第 7 天观察和记录菌落形态和颜色,并用十字交叉法测量菌落直径。菌株在 PDA 培养基上产孢后,在光学显微镜下观察菌落形态,记录各菌株分生孢子的形态特征和大小。

1.3 分子鉴定

选取 2 株代表性菌株(EC-6 和 XBC1-3)对其进行 ITS、*gpd* 和 *tef-1a* 基因的扩增和序列分析,其中菌株 EC-6 分离于安徽庐江茶园的发病品种‘鄂茶 1 号’,XBC1-3 分离于宣城茶区的发病品种‘白茶 1 号’。通过 CTAB 法提取菌株的基因组 DNA,然后以基因组 DNA 为模板,分别采用通用引物 ITS1/ITS4^[6]、*gpd1/gpd2*^[7] 和 EF1-728F/EF1-986R^[7] 进行基因片段的 PCR 扩增,引物由英潍捷基(上海)贸易有限公司合成。PCR 扩增选用 25 μL 体系: 2×Es Taq Master Mix 12.5 μL,菌株 DNA 2 μL,引物各 1 μL,ddH₂O 8.5 μL。

ITS 的 PCR 扩增反应条件: 94℃ 预变性 90 s; 94℃ 变性 20 s, 59℃ 退火 20 s, 72℃ 延伸 50 s, 共 30 个循环; 72℃ 终延伸 5 min。

gpd 基因的 PCR 扩增反应条件: 94℃ 预变性 4 min; 94℃ 变性 45 s, 56℃ 退火 45 s, 72℃ 延伸 45 s, 共 30 个循环; 72℃ 终延伸 5 min。

tef-1a 基因的 PCR 扩增反应条件: 94℃ 预变性 5 min; 94℃ 变性 30 s, 52℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 90 s, 共 40 个循环; 72℃ 终延伸 7 min。

扩增产物经 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测后,将目的片段送至合肥擎科生物科技有限公司进行测序。将获得的序列结果在 NCBI(National Center for Biotechnology Information)数据库中进行 BLAST 同源性搜索,明确与测试菌株序列同源性高的参考菌株及其物种地位。

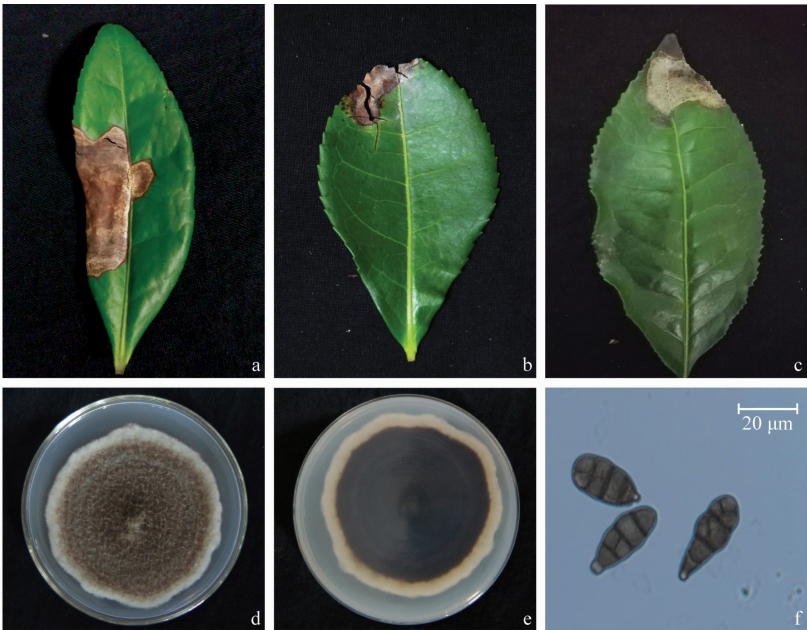
1.4 致病性测定

采用分生孢子悬浮液接种^[8] 进行致病性测定。将菌株在 PDA 培养基上活化,用无菌水洗下分生孢子,调配成浓度为 1×10⁵ 个/mL 的分生孢子悬浮液。以健康‘舒茶早’的离体叶片和离体枝条上的叶片为材料,用灭菌的大头针从叶片背面刺伤边缘,然后将配制好的分生孢子悬浮液 100 μL 滴至叶片刺伤部位,以无菌水接种作为空白对照,每个菌株 3 次重复。离体叶片接种后放置于铺有保湿滤纸的灭菌培养皿中; 在离体枝条上接种叶片后,将离体枝条插入盛有蒸馏水的三角瓶中。将接种的茶叶片和枝条放于人工气候箱中培养,设置温度 28℃, L/D=12 h//12 h, 湿度为 90%, 并逐日对接种的叶片发病情况做观察记录。

2 结果与分析

2.1 病原菌分离

从安徽、福建和湖北省不同茶区的 9 个茶树品种上采集的病叶症状相似,表现为病斑红褐色或棕褐色,部分叶片病斑中央灰白,病斑上散生有黑色霉点(图 1a~c)。采用组织分离法获得了菌落形态一致的 26 株菌株。25℃ 下在 PDA 平板培养 3 d 后,菌落形态表现为正面致密,呈较规则圆形,菌落正面中央橄榄褐色,边缘白色; 背面中央深褐色,边缘白色,菌落直径约 42 mm×47 mm; 培养 7 d 后,菌落直径约 72 mm×72 mm,分生孢子为卵形或倒棍棒形,褐色至黄褐色,大小为(18.0~30.0) μm×(4.0~15.0) μm,横隔膜 1~3 个,纵斜隔膜 1~3 个。短喙柱状或锥状(图 1d~f)。根据菌落和分生孢子形态学特征^[8],可初步认为获得的分离菌株为链格孢属 *Alternaria* 成员。



a~c: 安徽‘白茶1号’、福建‘梅占’和湖北‘五峰212’茶树品种上发生的叶斑病; d~e: 菌株EC-6在PDA平板上培养7 d的菌落特征;
f: 菌株EC-6的分生孢子形态
a-c: Symptoms of leaf spot disease of the tea varieties *Camellia sinensis* ‘Baicha 1’ in Anhui, *C. sinensis* ‘Meizhan’ in Fujian and *C. sinensis* ‘Wufeng 212’ in Hubei, respectively; d-e: Colony features of strain EC-6; f: Conidial features of strain EC-6

图 1 茶叶斑病症状及链格孢分离物的形态学特征

Fig. 1 Symptoms of leaf spot disease on tea plants and morphological characters of *Alternaria* isolates

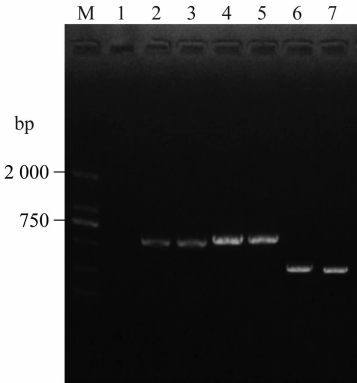
2.2 分子鉴定

以选取的代表性菌株 EC-6 和 XBC1-3 的基因组 DNA 为模板,分别 PCR 扩增 ITS、*gpd* 和 *tef-1a* 基因片段,其扩增片段大小分别约为 560、580 和 280 bp(图 2)。将测序后得到的基因片段序列分别在 NCBI 网站进行 BLAST 分析。结果表明,菌株 EC-6 的 ITS、*gpd* 和 *tef-1a* 基因序列(MH588262、MH593373 和 MH593371)与交链格孢 *A. alternata* 参考菌株 CBS107. 27 的序列(KP124300, KP124157, KP125075)同源性分别为 100%、99. 0% 和 100%; 菌株 XBC1-3 的 ITS、*gpd* 和 *tef-1a* 基因序列(MH588263、MH593374 和 MH593372)同样与交链格孢 CBS107. 27 表现出很高的序列同源性,其序列相似性分别达到 100%、99. 6% 和 100%。

2.3 致病性测定

将分离获得的交链格孢菌株的分生孢子悬浮液,创伤接种到健康‘舒茶早’离体叶片和离体枝条上的叶片,接种 7 d 后,接种叶片上环绕接种点出现明显的红褐色病斑,病斑直径 1~3 cm; 接种 14 d 后,病斑中央变为灰白色,病斑直径扩展至 2~4 cm。接种无菌水的对照组则未观察到病斑(图 3)。采用组织分离法从接种发病的叶片上再次分离病原

菌,可分离获得与原始接种病原菌菌落形态一致的菌落,经形态学观察和 ITS 序列分析证实是最初接种的交链格孢,完成柯赫氏法则验证。这表明交链格孢是引起茶树叶斑病的致病因子。



M: DL2000 DNA marker; 1: 阴性对照; 2~3: 菌株EC-6和XBC1-3的ITS片段; 4~5: 菌株EC-6和XBC1-3的*gpd*片段; 6~7: 菌株EC-6和XBC1-3的*tef-1a*片段
M: DL2000 DNA marker; Lane 1: Negative control; Lanes 2-3: Amplified fragments of ITS from strains EC-6 and XBC1-3; Lanes 4-5: Fragments of *gpd* gene from strains EC-6 and XBC1-3; Lanes 6-7: Fragments of *tef-1a* gene from strains EC-6 and XBC1-3

图 2 茶叶斑病菌代表性菌株 ITS、*gpd* 和 *tef-1a* 基因片段的 PCR 扩增电泳图

Fig. 2 Agarose gel electrophoresis of amplified fragments of ITS, *gpd* and *tef-1a* genes from representative strains of tea leaf spot disease



a-c: 菌株EC-6, a: 左边为对照, 右边为离体叶片接种后7 d; b: 左边为对照, 右边为离体枝条上叶片接种后14 d; c: 离体枝条上叶片接种后14 d; d-f: 菌株XBC1-3, d: 左边为对照, 右边为接种后7 d; e: 左边为对照, 右边为接种后14 d; f: 离体枝条上叶片接种后14 d
a-c: Strain EC-6, a: The left and right of the panel represent the detached leaves of tea inoculated artificially with sterile water and conidial suspensions after seven days, respectively; b: The left and right of the panel represent the tea leaves of detached twigs inoculated with sterile water and conidial suspensions after 14 days, respectively; c: The tea leaves of detached twigs inoculated with conidial suspensions after 14 days; d-f: Strain XBC1-3, d: The left and right of the panel represent the detached leaves of tea inoculated with sterile water and conidial suspensions after seven days, respectively; e: The left and right of the panel represent the tea leaves of detached twigs inoculated with sterile water and conidial suspensions after 14 days, respectively; f: The tea leaves of detached twigs inoculated with conidial suspensions after 14 days

图3 茶树叶片接种交链格孢病菌后的发病症状

Fig. 3 Symptoms of the tea leaves inoculated artificially with conidial suspensions of *Alternaria alternata* isolates

3 讨论

迄今全世界已发表的链格孢种级分类单位 500 个左右,广泛分布于自然界中,该类群菌既是动植物内生菌,也可以是动植物病原菌。李秀凯曾报道交链格孢可引起甲癣^[9]。链格孢形态特征醒目,易于辨认至属,但种间变异幅度大,难以确定到种^[9-10]。在真菌学研究中,传统的真菌鉴定主要依靠菌落、分生孢子和子实体的形态特征等来鉴定。Simmons 主张以三维产孢表型作为区分小孢子链格孢的指标之一,但需要操作者有足够的经验^[9]。除了传统的形态学方法,近年来有越来越多的学者采用了多基因鉴定的方法对链格孢属真菌进行区分和鉴定^[11]。严进等^[12]研究发现 ITS 和 *gpd* 基因序列可以将链格孢属中大孢子种群和小孢子种群区分开。本文采用 ITS、*gpd* 和 *tef-1a* 3 个基因序列对分离菌株进行分析和鉴定,结合形态学特征将引起茶树叶斑病的致病菌鉴定为交链格孢 *A. alternata*。

国内外关于链格孢引起茶树叶部病害的报道很少,目前仅有两篇文献报道了由交链格孢引起的茶树叶斑病^[13-14],而对该病原在茶园的流行规律尚不清楚。2005 年在印度孟加拉北部地区的茶园苗圃

中品种‘T-17’出现叶斑病,超过 70% 的茶苗叶片受到了感染,经鉴定确定为由交链格孢引起^[13];2012 年在中国湖北省罗田县茶树未知品种的嫩叶上发生叶斑病,超过 20% 的嫩叶受到了感染,后经鉴定为交链格孢引起^[14]。在本研究中,笔者在湖北、福建和安徽茶园的多个茶树品种上发现由交链格孢引起的茶树叶斑病,表明致病性链格孢在茶树品种上的专化性不强,能够侵染大多数茶品种,不同茶品种对交链格孢的抗病性急需进一步深入研究。

在前人的研究中,链格孢一直被视为茶树内生菌^[15]。内生菌通常被认为是存在于健康的植物体内并不引起植物致病的一类微生物。游见明研究发现,在四川省茶树叶片中,链格孢是优势内生菌群^[16-17]。然而,随着对茶树病害种类的广泛调查和研究深入,越来越多的研究发现交链格孢可以引起茶树叶斑病。此外,在对茶园病害调查中,由交链格孢引起的茶树叶斑病和由炭疽菌复合群引起的茶树炭疽病症状极其相似,很容易混淆。因此,在茶园生产和管理过程中,有必要深入调查两种病害的发病特点和流行规律,因地制宜地制定病害防治措施,防止由交链格孢引起的叶斑病在不同茶园大面积发生和流行。

(下转 155 页)

- 东林业科技, 2012, 28(1): 77–81.
- [9] SHAN Tijiang, TIAN Jin, WANG Xiaohan, et al. Bioactive spirobisanaphthalenes from the endophytic fungus *Berkleasmium* sp. [J]. Journal of Natural Products, 2014, 77(10): 2151–2160.
- [10] LI Shoujie, ZHANG Xuan, WANG Xianghua, et al. Novel natural compounds from endophytic fungi with anticancer activity [J]. European Journal of Medicinal Chemistry, 2018, 156: 316–343.
- [11] WANG Dongmei, WANG Huan, LI Jing, et al. Investigating the role of endophytic fungi in *Gentiana scabra* Bge. by cross-growth period inoculation [J]. Indian Journal of Microbiology, 2018, 58(3): 319–325.
- [12] KHARWAR R N, GOND S K, KUMAR A, et al. A comparative study of endophytic and epiphytic fungal association with leaf of *Eucalyptus citriodora* Hook., and their antimicrobial activity [J]. World Journal of Microbiology & Biotechnology, 2010, 26(11): 1941–1948.
- [13] 格希格图, 胡鸾雷, 慈忠玲, 等. 桉树根部内生菌与青枯病相关关系研究[J]. 林业实用技术, 2009(8): 42–43.
- [14] SHAN Tijiang, LOU Jingfeng, GAO Shan, et al. Antibacterial activity of the endophytic fungi from a traditional Chinese herb *Paris polyphylla* var. *chinensis* [J]. African Journal of Microbiology Research, 2012, 6(14): 3440–3446.
- [15] 宋慧云, 段志豪, 张伟豪, 等. 宫粉羊蹄甲炭疽病原鉴定及其药剂筛选[J]. 南方农业学报, 2018, 49(10): 1975–1981.
- [16] XIA Ye, SAHIB M R, AMNA A. Culturable endophytic fungal communities associated with plants in organic and conventional farming systems and their effects on plant growth [J/OL]. Scientific Reports, 2019, 9(1): 1669–1679.
- [17] 张伟豪, 翁道明, 宋慧云, 等. 9 种夹竹桃科和大戟科植物抗菌和抗氧化活性测定[J]. 南方农业学报, 2018, 49(1): 85–90.
- [18] LUPO S, TISCORNIA S, BETTUCCI L. Endophytic fungi from flowers, capsules and seeds of *Eucalyptus globulus* [J]. Revista Iberoamericana de Micología, 2001, 18(1): 38–41.
- [19] MIGUEL P S B, DELVAUX J C, OLIVEIRA M N V, et al. Diversity and distribution of the endophytic fungal community in eucalyptus leaves [J]. African Journal of Microbiology Research, 2017, 11(3): 92–105.
- [20] 宋薇薇, 朱辉, 余凤玉, 等. 植物内生菌及其对植物病害的防治作用综述[J]. 江苏农业科学, 2018, 46(6): 12–16.
- [21] 单体江, 秦楷, 谢银燕, 等. 木麻黄内生真菌次生代谢产物及生物活性[J]. 华南农业大学学报, 2019, 40(3): 67–74.
- [22] 郭顺星. 药用植物内生真菌研究现状和发展趋势[J]. 菌物学报, 2018, 37(1): 1–13.
- [23] CHOKPAIBOON S, CHOODEJ S, BOONYUEN N, et al. Highly oxygenated chromones from mangrove-derived endophytic fungus *Rhytidhysterion rufulum* [J]. Phytochemistry, 2016, 122: 172–177.
- [24] PUDHOM K, TEERAWATANANOND T, CHOOKPAIBOON S. Spirobisanaphthalenes from the mangrove-derived fungus *Rhytidhysterion* sp. AS21B [J]. Marine Drugs, 2014, 12(3): 1271–1280.
- [25] EL AMRANI M, LAI D, DEBBAB A, et al. Protein kinase and HDAC inhibitors from the endophytic fungus *Epicoccum nigrum* [J]. Journal of Natural Products, 2014, 77(1): 49–56.
- [26] DZOYEM J P, MELONG R, TSAMO A T, et al. Cytotoxicity, antioxidant and antibacterial activity of four compounds produced by an endophytic fungus *Epicoccum nigrum* associated with *Entada abyssinica* [J]. Revista Brasileira de Farmacognosia, 2017, 27(2): 251–253.

(责任编辑: 田 喆)

(上接 148 页)

参考文献

- [1] 季鹏章, 张俊, 王平盛, 等. 云南古茶树(园)遗传多样性的 ISSR 分析[J]. 茶叶科学, 2007(4): 271–279.
- [2] 孙晓玲. 中国重要茶树叶部病害的研究现状及展望[J]. 中国茶叶, 2016, 38(12): 12–13.
- [3] 陈宗懋, 陈雪芬. 世界茶树病原名录[J]. 茶叶科学, 1988(2): 65–76.
- [4] 刘威, 叶乃兴, 陈玉森, 等. 茶树炭疽菌 *Colletotrichum fructicola* 的鉴定及系统发育分析[J]. 茶叶科学, 2014, 34(1): 95–104.
- [5] 方中达. 植病研究方法[M]. 北京: 中国农业出版社, 1998: 122–142.
- [6] 陈凤毛. 真菌 ITS 区序列结构及其应用[J]. 林业科技开发, 2007(2): 5–7.
- [7] DENG Jianxin, PAUL N C, PARK M S, et al. Molecular characterization, morphology, and pathogenicity of *Alternaria panax*, from araliaceous plants in Korea [J]. Mycological Progress, 2013, 12(2): 383–396.
- [8] WOUTENBERG J H C, GROENEWALD J Z, BINDER M, et al. *Alternaria* redefined [J]. Studies in Mycology, 2013, 75(1): 171.
- [9] 张天宇. 链格孢属[M]. 中国真菌志. 第十六卷. 北京: 科学出版社, 2003: 1–25.
- [10] 王洪凯, 张天宇, 张猛. 应用 5.8S rDNA 及 ITS 区序列分析链格孢种级分类[J]. 菌物系统, 2001(2): 168–173.
- [11] ZHANG L X, SHI Y R, YU J H, et al. First report of leaf blight caused by *Alternaria alternata* on *Trichosanthes kirilowii* Maxim in China [J]. Plant Disease, 2016, 100(5): 1021.
- [12] 严进, 施宗伟, 宋福, 等. 河北和山东鸭梨果实上链格孢菌鉴定[J]. 植物保护学报, 2009, 36(1): 37–43.
- [13] CHAKRABORTY B N, DASBISWAS R, SHARMA M. *Alternaria alternata*—a new foliar fungal pathogen of tea in North Bengal, India [J]. Plant Pathology, 2006, 55(2): 303.
- [14] ZHOU L X, XU W X. First report of *Alternaria alternata* causing leaf spots of tea (*Camellia sinensis*) in China [J]. Plant Disease, 2014, 98(5): 697.
- [15] 王雪萍, 谭荣荣, 曹丹, 等. 茶树内生真菌研究进展[J]. 湖北农业学报, 2015, 54(23): 5808–5812.
- [16] 游见明. 茶树中内生菌的动态分布[J]. 广西植物, 2008, 28(1): 82–85.
- [17] 游见明. 茶树内生菌的分离[J]. 湖北农业科学, 2009, 48(5): 1168–1170.

(责任编辑: 田 喆)