

雷娇娇,田 力,袁 伟,等. 贵阳花溪久安茶树炭疽病病原菌(*Colletotrichum gloeosporioides*)的分离鉴定及生物学特性[J]. 江苏农业科学, 2020,48(11):100-105.

doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2020.11.020

贵阳花溪久安茶树炭疽病病原菌(*Colletotrichum gloeosporioides*)的分离鉴定及生物学特性

雷娇娇,田 力,袁 伟,杨 瑞,于 存

(贵州大学林学院,贵州贵阳 550025)

摘要:为明确贵阳花溪久安茶树炭疽病的病原菌,利用组织分离法和柯赫氏法则对病原菌进行分离与验证,利用形态学与 rDNA-ITS 对致病菌进行鉴定,同时对致病菌的生物学特性进行系统研究。结果表明,引起久安茶树炭疽病的病原菌为胶孢炭疽菌(*Colletotrichum gloeosporioides*);生物学特性测定结果表明,*C. gloeosporioides* 适宜生长条件:在温度为 28 ℃ 的条件下,以 OA 培养基和 SNA 培养基作为培养基,半光照,pH 值为 5~7,以乳糖作碳源,以牛肉膏作氮源。通过本研究明确了花溪久安茶炭疽病病原,可以为该地区茶树炭疽病病害流行及防控提供理论依据。

关键词:茶树;炭疽病;病原菌分离;生物学特性;胶孢炭疽菌

中图分类号:S435.711 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2020)11-0100-06

近年来,贵州省大力发展茶产业,至 2019 年茶树种植面积约已达 50 万 hm^2 ^[1]。而且随着 2019 年两会代表孙志刚在审议政府工作报告中提到“要喝没有污染的茶到贵州来”,可见茶叶产业在贵州经济发展及扶贫攻坚中起到了重要的作用。在贵州省的茶树集中连片栽植过程中,有大量病虫害发生,对茶产业造成严重的威胁。贵州省茶树主要病虫害包括茶饼病、茶白星病、茶圆赤星病、茶轮纹叶枯病、茶轮斑病、茶煤病、茶炭疽病等^[2-3]。其中,茶

叶炭疽病是茶树重要的叶部病害之一,该病害的发生可引起茶叶部坏死、影响茶的光合作用、严重者导致其死亡。以往的报道中有关茶树炭疽病病原菌的种类主要包括山茶刺孢菌(*Colletotrichum camelliae*)、雕刻刺盘孢菌(*C. carveri*)、马尤斯刺盘孢菌(*C. majus*)、壳皮炭疽菌(*C. crassipes*)、胶孢炭疽菌(*C. gloeosporioides*)、果生刺盘孢菌(*C. fructicola*)、暹罗刺盘孢菌(*C. siamense*)、尖炭疽菌(*C. acutatum*)、河南刺盘孢菌(*C. henanense*)、江西刺盘孢菌(*C. jiangxiense*)等^[4]。不同病原菌在引起植物发病的过程中受温度、湿度、pH 值、碳源、氮源等环境因素的影响,明确病原菌的生物学特性,可为防治该病害采取有效措施奠定基础^[5]。

贵州省贵阳市花溪区久安乡位于黔中腹地,久安乡土壤呈酸性,有机成分含量高,非常适合茶树生长,是适宜生产优质有机生态茶叶的地方^[6]。2013 年,久安乡生态精品茶示范园区被列入“5 个

收稿日期:2019-05-29

基金项目:现代农业创新性示范基地建设(编号:091821104022292027-4);贵州大学“SRT 计划”项目[编号:贵大 SRT 字(2018)293 号];贵州省大学生创新创业训练计划[编号:贵大(省)创字 2019(155)]。

作者简介:雷娇娇(1995—),女,贵州织金人,主要从事林木病理学相关研究。E-mail:980435499@qq.com。

通信作者:于 存,博士,讲师,主要从事森林病理学相关研究。E-mail:chifengyucun@163.com。

[19]杨 巍. 脱氧雪腐镰刀菌烯醇对人外周血淋巴细胞的遗传毒性研究[D]. 武汉:华中科技大学,2012:1-144.

[20]Rizzo A F, Atroshi F, Ahotupa M, et al. Protective effect of antioxidants against free radical-mediated lipid peroxidation induced by DON or T-2 toxin[J]. ZentralblVeterinarmed A, 1994,41(1-10):81-90.

[21]FarreG, Sudhakar D, Naqvi S, et al. Transgenic rice grains expressing a heterologous β -hydroxyphenylpyruvate dioxygenase

shift tocopherol synthesis from the γ to the α -isoform without increasing absolute tocopherol levels[J]. Transgenic Research, 2012,21(5):1093-1097.

[22]施 璇. 小麦类过敏反应突变体抗病性研究及氮依赖性类过敏反应基因的定位[D]. 扬州:扬州大学,2018:1-72.

[23]靳梦瞳,王建华,林善海,等. 室温下麦粒中脱氧雪腐镰刀菌烯醇(DON)及其隐蔽型(D3G)毒素累积分析[J]. 食品工业科技,2015,36(17):132-136.

100 工程”,截至 2015 年,建成面积为 666.67 hm² 的规模化、标准化、设施完善的特色精品茶园。近年来,随着茶园面积的不断扩大,加之茶园被列入欧盟有机认证和雨林认证,不允许使用化学农药防治病虫害的发生,进而导致久安乡茶园内病虫害频发。近年来,久安乡茶场茶树炭疽病发生较严重,而茶树炭疽病致病菌种类仍未明确,因此,开展该地区茶树炭疽病致病菌鉴定及病原致病性研究对于当地茶园茶树炭疽病病害防治具有重要意义。本研究将从形态学以及分子生物学对茶树炭疽病病原菌进行分离与鉴定,对其生物学特性作出探索,为进一步了解久安乡茶场的炭疽病病害防控提供重要的参考。

1 材料与方法

1.1 试验材料

燕麦琼脂(OA)培养基:30 g 燕麦,20 g 琼脂,1 L 蒸馏水;合成低营养琼脂(SNA)培养基:1 g KH₂PO₄,2 g KNO₃,0.5 g MgSO₄·7H₂O,0.5 g KCl,20 g 琼脂,0.2 g 葡萄糖,0.2 g 蔗糖,1 L 蒸馏水;马铃薯葡萄糖琼脂(PDA)培养基:200 g 马铃薯,20 g 葡萄糖,20 g 琼脂,1 L 蒸馏水;马铃薯蔗糖琼脂(PSA)培养基:200 g 马铃薯,20 g 蔗糖,20 g 琼脂,1 L 蒸馏水;茶汁培养基:20 g 葡萄糖,3 g CaCO₃,50 g 茶叶,20 g 琼脂,1 L 蒸馏水。

1.2 试验方法

1.2.1 茶树炭疽病病原菌的分离与验证 于贵阳市花溪区久安乡茶园采集患有炭疽病的 5 张典型叶片。利用组织分离法对 5 张病叶进行病原菌的分离。将分离菌株离体回接至刺伤和未刺伤的茶树叶片上,用脱脂棉进行保湿在 28 ℃ 条件下培养,以相同处理接种 PDA 菌饼的叶片作为对照。以上试验均重复 5 次。

1.2.2 茶树炭疽病病原菌的鉴定 利用形态学与核糖体 DNA 基因内转录间隔区(rDNA-ITS)测序结合的方法对“1.2.1 节”中可以引起茶树炭疽病的病原菌进行鉴定。利用形态学方法^[7],主要对病原菌菌落特征、颜色、菌丝及孢子大小等进行观察;rDNA-ITS 鉴定参考李婕等的方法^[8-9],首先利用十六烷基三甲基溴化铵(cetyltrimethylammonium bromide,简称 CTAB)法提取致病菌总 DNA,利用真菌通用引物 ITS1(5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3')和 ITS4(5'-TCCTCCGCTTATTGA

TATGC-3')进行序列扩增,得到序列后,通过 NCBI 的 Blast 进行序列的比对分析,同时利用 MEGA 7.0 进行包含致病菌 ITS 序列在内的系统进化树,综合形态学与分子生物学的方法进行病原菌的鉴定。

1.2.3 茶树炭疽病病原菌生物学特性测定 分别将茶树炭疽病病原菌菌株接种至不同培养基(OA 培养基、SNA 培养基、PDA 培养基、PSA 培养基、茶汁培养基),并设置不同碳源(麦芽糖、蔗糖、淀粉、果糖、乳糖)、不同氮源(尿素、硫酸铵、硝酸铵、硝酸钠、牛肉膏、蛋白胨)、不同温度(15、20、25、28、30、35 ℃)、不同光照(全光照、半光照、全黑暗)、不同 pH 值(4、5、6、7、8、9)。以上处理分别在培养 3、4、5、6、7、8、9、10 d 后测定菌落生长半径,分析不同因素对炭疽病病原菌生长的影响。以上处理均重复 3 次。

2 结果与分析

2.1 茶树炭疽病的分离及回接验证

茶树炭疽病野外发病症状如图 1-a。茶树炭疽病发生初期,在叶片上形成灰色病斑,病斑处凹陷,后期易破碎,病健交界处明显。病斑上的小黑点即为分生孢子盘,寄生于叶片表皮下,后期分生孢子穿破表皮,随风雨飞散,作为病原物再次侵染茶树^[8]。利用组织分离法从 5 个不同发病茶叶中分离纯化得到 5 株菌株,分别命名为 TJ2-1、TJ2-2、TJ2-3、TJ2-4、TJ2-5。将 5 株菌株分别接种至刺伤和未刺伤茶树叶片上,结果表明,在刺伤叶片上菌株 TJ2-1 可以引起茶树炭疽病相同症状(图 1-b)。而在未刺伤叶片上 5 株菌株都未引起茶叶发病。对发病离体叶片采取组织分离法分离病原菌,同样得到了与 TJ2-1 相同的菌株。由此可以确定菌株 TJ2-1 为茶树炭疽病的病原菌。菌株 TJ2-1 主要通过伤口侵入到茶树叶片内引起发病。

2.2 茶树炭疽病病原菌鉴定

病原菌在温度为 28 ℃,PDA 培养基暗培养条件下,菌落生长速度为 0.9 cm/d,菌落白色至浅灰色,气生菌丝较长,毯状,边缘较整齐,背面一般会形成黑色物质(图 2-a),培养后期于菌落中心产生橙黄色分生孢子堆。菌丝有隔(图 2-b),分生孢子椭圆形(图 2-c),两端钝圆,浅灰色,表面粗糙,中间凹陷,大小为(7.3~20.0 μm)×(2.0~5.0 μm)。分生孢子上易产生分生孢子附着孢,附着孢呈不规则形、球形,表面黑色或灰黑色,表面灰

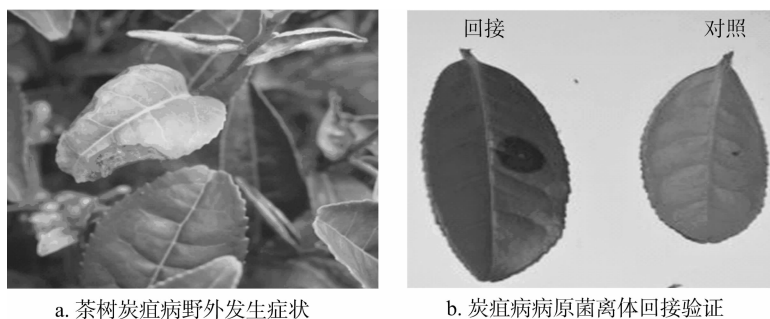


图1 茶树炭疽病野外发生症状及病原菌离体回接症状

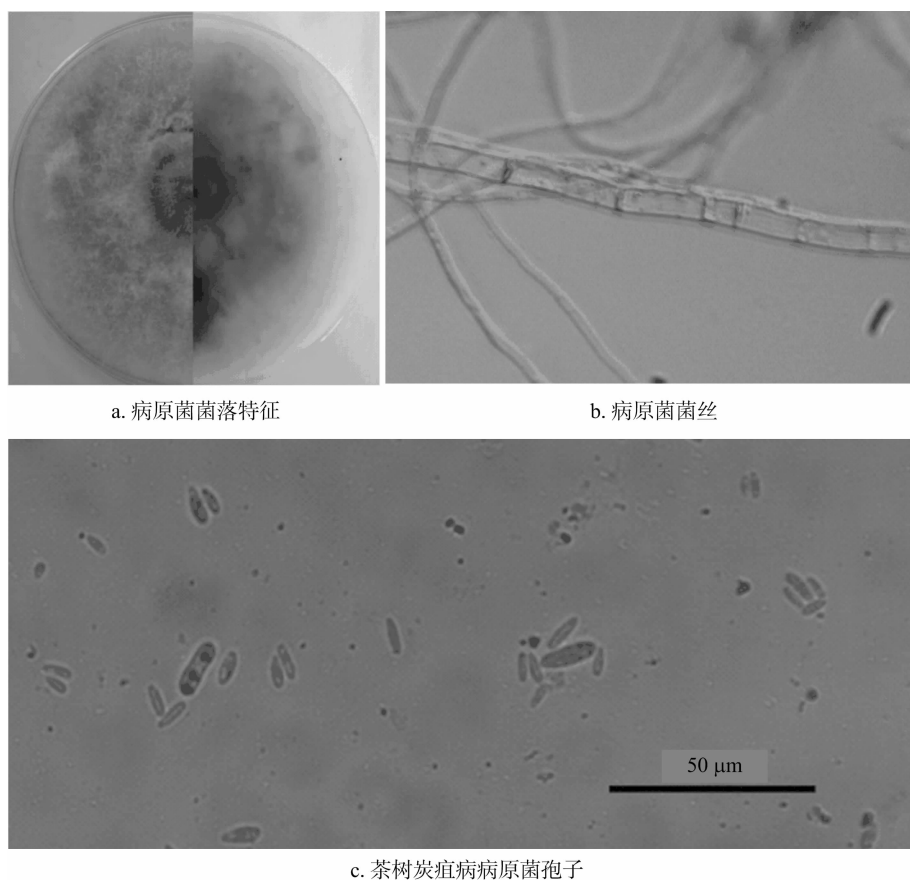


图2 茶树炭疽病病原菌形态学特征

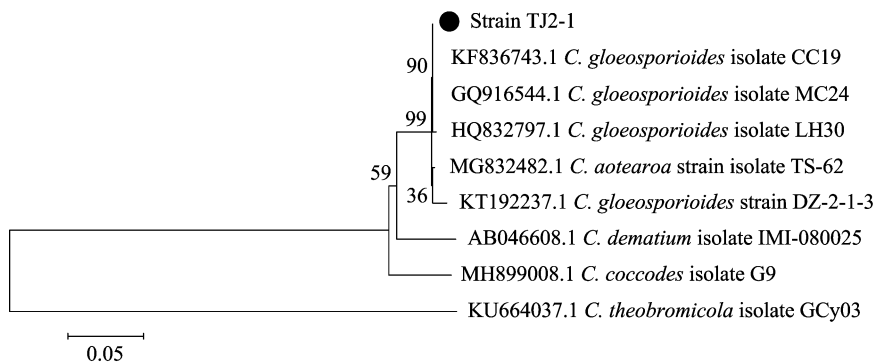
色颗粒状物明显,大小为 $(6.1 \sim 10.2 \mu\text{m}) \times (4.5 \sim 6.8 \mu\text{m})$ 。参照魏景超的《真菌鉴定手册》以及邵力平等的《真菌分类学》等书籍,鉴定茶树炭疽病病原菌属于胶孢炭疽菌 (*Colletotrichum gloeosporioides*)^[10-11]。

扩增菌株 TJ2-1 的 rDNA-ITS 获得长度为 541 bp 的分子序列,GenBank 登录号为 MK757870。NCBI 的 Blast 比对结果显示,该序列与 GenBank 登录号为 KF836743.1 的 *C. gloeosporioides* 的序列覆盖度为 100%,序列相似性为 100%。由图 3 可知,菌株 TJ2-1 的 ITS 序列与胶孢炭疽菌聚为一类,亲

缘关系较近,而与 *C. theobromicola* 菌株间遗传距离较远,具有相对远的亲缘关系。由此结合形态学与分子生物学鉴定茶树炭疽病致病菌为胶孢炭疽菌。

2.3 茶树炭疽病病原菌生物学特性观察

2.3.1 光照对胶孢炭疽菌生长的影响 由图 4 可知,在不同光照条件下,菌株均可生长,在相同培养时间内,不同光照处理对菌丝生长影响差异不明显。不同时间光照对胶孢炭疽菌生长的影响结果显示,在培养初期 3~8 d 时全黑暗条件下更有利于菌落生长。而培养至 9 d 开始,半光照更利于胶孢炭疽菌的生长。不同光照及时间内,全光照对菌落



C. aotearoa 为新西兰炭疽菌; *C. dematium* 为黑浅炭疽菌; *C. coccodes* 为马铃薯炭疽菌;
C. theobromicola 为可可炭疽菌

图3 茶树炭疽病原菌 ITS 序列的系统进化树

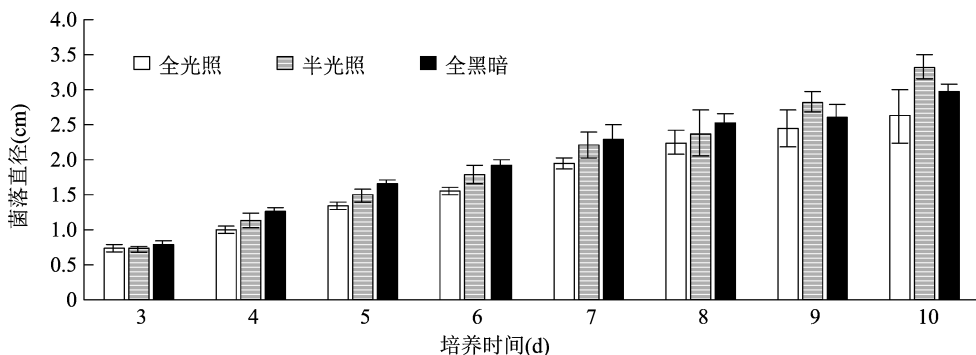


图4 光照对胶孢炭疽菌生长的影响

生长均较全黑暗和半光照生长缓慢。由此可见,茶树常年处在高山多雾,日照少的自然条件下,是炭疽病严重发生的原因之一。

2.3.2 不同 pH 值对胶孢炭疽菌菌丝生长的影响

由图 5 可知,在 pH 值为 4~9 时,菌丝均可生长,

在培养 3~5 d 时,pH 值 = 7 时更利于菌丝生长,而在培养 6~10 d 时适宜菌丝生长的 pH 值范围为 5~6。结合茶树的生长条件可知,在中性偏酸性的条件下更有利于胶孢炭疽菌的生长。

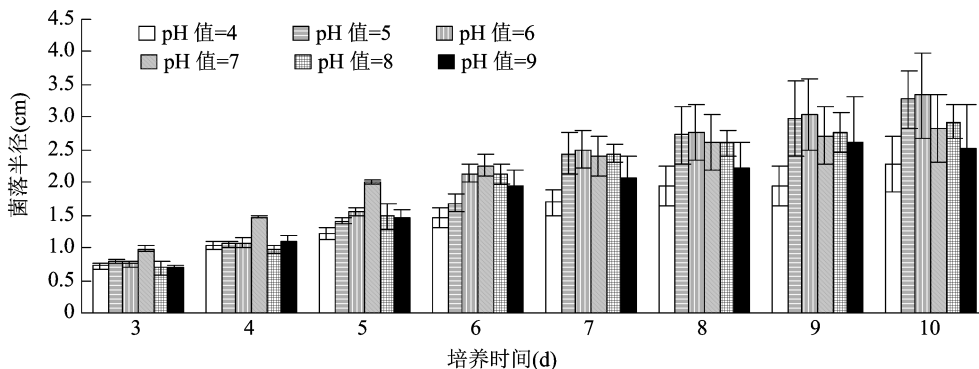


图5 pH 值对胶孢炭疽菌生长的影响

2.3.3 不同氮源对胶孢炭疽菌生长的影响 由图 6 可知,以尿素作为氮源时,菌落在不同时间均没有生长。以牛肉膏作为氮源时,更利于菌丝的生长,以硝酸钠、硫酸铵、硝酸铵、蛋白胨作为氮源对菌落生长的促进效果依次减弱。

2.3.4 不同碳源对胶孢炭疽菌生长的影响 由图

7 可知,在培养 3~4 d 时,不同碳源条件下菌丝长势基本一致。5 d 以后,以乳糖和果糖作为碳源更利于菌丝的生长。综合评价不同碳源对胶孢炭疽菌生长影响的排序为乳糖 > 果糖 > 麦芽糖 > 蔗糖 > 淀粉。

2.3.5 不同培养基对菌丝生长的影响 由图 8 可知,在培养初期 OA 培养基、SNA 培养基更利于菌落

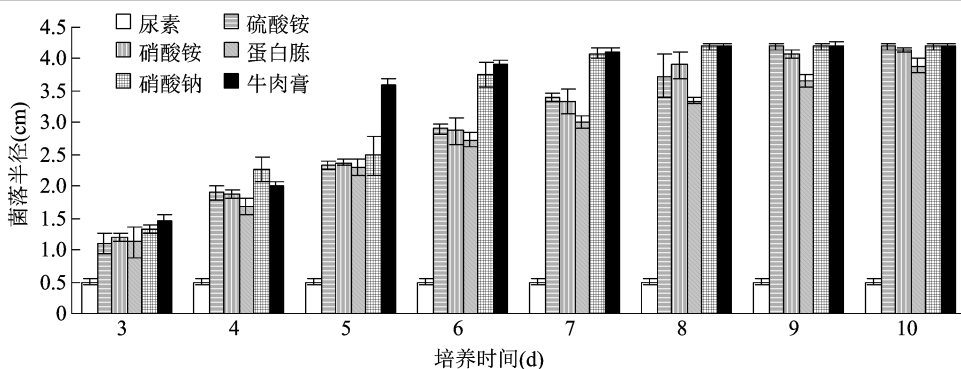


图6 氮源种类对胶孢炭疽菌生长的影响

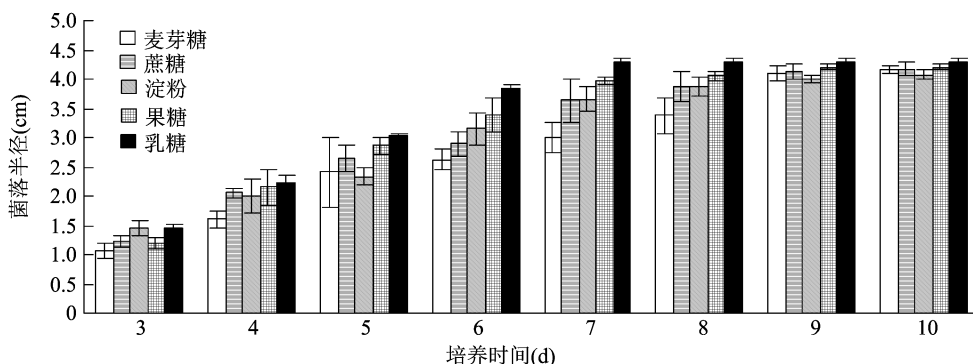


图7 碳源种类对胶孢炭疽菌生长的影响

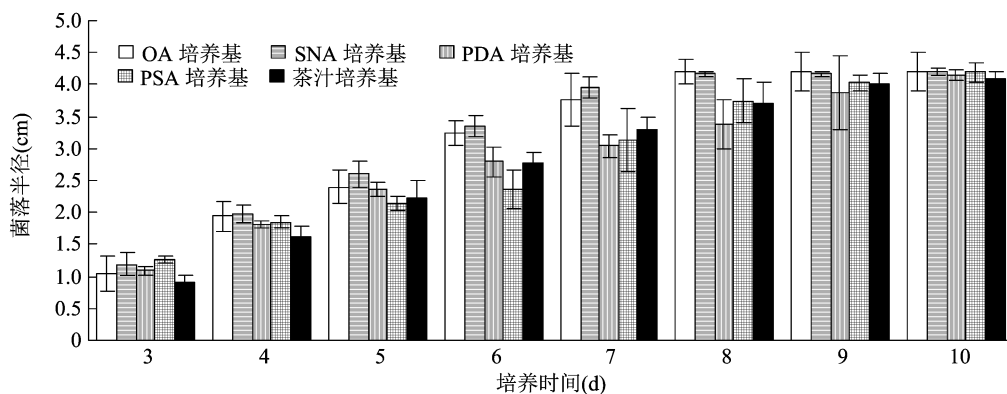


图8 培养基种类对胶孢炭疽菌生长的影响

的生长,在培养后期不同培养基对菌落生长的影响差异不明显。综合分析,不同培养基对胶孢炭疽菌生长影响的排序为 OA 培养基 > SNA 培养基 > PSA 培养基 > PDA 培养基 > 茶汁培养基。

2.3.6 不同温度对菌丝生长的影响 由图 9 可知,在温度为 15~30℃ 范围内,胶孢炭疽菌均可生长,而当温度高于 35℃ 时菌落的停止生长。在不同温度范围内,28℃ 更利于胶孢炭疽菌的生长,温度由 28℃ 逐渐降低或升高,胶孢炭疽菌的生长均呈下降趋势。因此,夏季是炭疽病流行的高发时期,应注意病害的预防监测。

3 讨论与结论

贵州茶区普遍存在高海拔、多云雾、寡日照、气候冷凉等特点,茶轮斑病、炭疽病等病害的发生与虫害相比更为严重^[12]。而对病害的有效防治须要准确掌握引起病害的病原菌^[13]。以往研究中报道的茶树炭疽病病原菌主要为炭疽菌属,本研究明确贵阳花溪久安茶炭疽病病原为胶孢炭疽菌。对病原菌生物学特性的了解可以有助于从病原角度了解病害发生发展及指导防治措施的制定^[14-15]。胶孢炭疽菌生物学特性结果表明,不同温度对胶孢炭

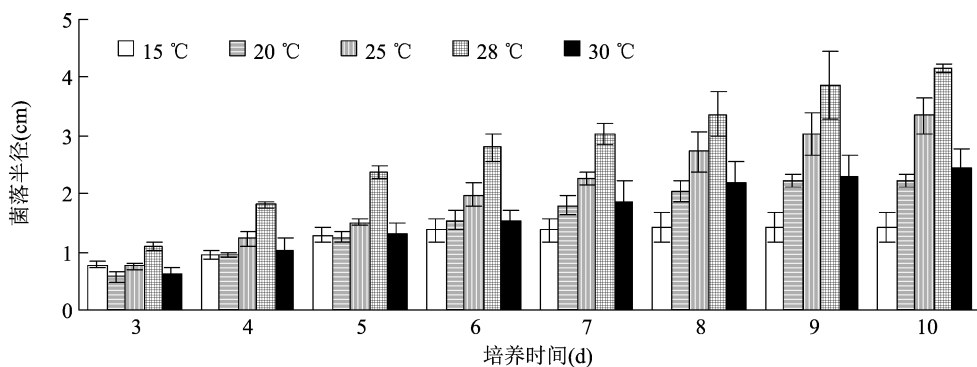


图9 温度对胶孢炭疽菌生长的影响

疽生长的影响差异明显,其中当温度为 28 °C 时更利于菌株的生长,当温度下降或上升均不利于菌株的生长,由此推断该病害更容易发生在 28 °C 左右的夏季,这与实际调查发现的该地区茶树炭疽病多发生在夏季(夏季平均温度为 23 ~ 30 °C)的结果相符。病原菌在引起病害过程中要经历接触、侵入、潜育、发病等 4 个发病历程,其中潜育期时间长短决定了该病害发生周期的长短,也决定了一种病害再侵染周期的长短。而在病原菌潜育期过程中主要以吸收营养,增加自身的生长为主。因此,了解病原菌所需要的营养条件,可以判断其不同条件下病原菌生长的速度及潜育期的长短,进而合理地制定防治措施。在本研究中,胶孢炭疽菌以 SNA 培养基、OA 培养基作为培养基,以乳糖作为碳源,以牛肉膏作为氮源,pH 值为 5 ~ 7 时更利于其生长,而不同光照处理对胶孢炭疽菌的影响差异不明显,以初期黑暗条件,后期半光照条件更利于菌株的生长,因此,可以将茶树尽量种植在光照充足的地域以减缓茶树炭疽病的发生。通过本研究明确了贵阳花溪久安茶树炭疽病的病原及其生物学特性,为该地区今后茶树炭疽病的有效防治奠定了基础,可以为今后该病原菌的进一步研究提供理论依据。

参考文献:

- [1] 贵州省农业科学院. 贵茶十讲 [N]. 贵州日报, 2019 - 03 - 20 (12).
- [2] 施利, 江健, 王勇, 等. 贵州茶树病虫害防控现状及对策建议 [J]. 茶叶, 2015, 41 (3): 146 - 149, 153.
- [3] 刘霞, 江健, 詹金碧, 等. 湄潭县危害茶树的主要病虫害调查 [J]. 贵州农业科学, 2011, 39 (9): 77 - 80.
- [4] 韩立志. 炭疽菌属真菌分类研究现状及发展趋势 [J]. 中国植保导刊, 2015, 35 (6): 24 - 30.
- [5] 朱迎迎, 李敏, 高兆银, 等. 火龙果炭疽病病原菌的鉴定及生物学特性研究 [J]. 南方农业学报, 2016, 47 (1): 59 - 66.
- [6] 汪圣洪, 胡嘉欢, 周博杨. 贵阳花溪久安茶叶园区气候适宜性分析及减灾对策 [J]. 安徽农业科学, 2018, 46 (30): 176 - 179.
- [7] Weir B S, Johnston P R, Damm U. The *Colletotrichum gloeosporioides* species complex [J]. Studies in Mycology, 2012, 73 (1): 115 - 180.
- [8] 李婕, 李永川, 杨虹, 等. 甘蔗黑腐病病原菌的鉴定 [J]. 云南大学学报 (自然科学版), 2014, 36 (1): 139 - 143.
- [9] 刘小玉, 余凤玉, 付登强, 等. 油茶炭疽病病原菌的分离与鉴定 [J]. 中国果菜, 2018, 38 (11): 40 - 42.
- [10] 魏景超. 真菌鉴定手册 [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1979.
- [11] 邵力平, 沈瑞祥, 张素轩, 等. 真菌分类学 [M]. 北京: 中国林业出版社, 1984.
- [12] 刘威. 茶树炭疽病的病原鉴定及其遗传多样性分析 [D]. 福州: 福建农林大学, 2013.
- [13] 王珊珊, 乜兰春, 李潘, 等. 植物病原真菌毒素的分类、致病机制及应用前景 [J]. 江苏农业科学, 2019, 47 (3): 94 - 97.
- [14] 文小东, 宋星陈, 王勇, 等. 茶轮斑病病原菌 (*Pseudopezalotiopsis camelliae* - *sinensis*) 生物学特性研究 [J]. 中国植保导刊, 2018, 38 (10): 19 - 25.
- [15] 陈全助, 陈慧洁, 郭文硕, 等. 桉树焦枯病菌 (*Calonectria pseudoreteauii*) 生物学特性测定 [J]. 福建林学院学报, 2014, 34 (4): 328 - 332.