

云南、广西三七黑斑病病原链格孢菌的鉴定

何迟¹, 王慧玲¹, 金鑫¹, 靳百慧¹, 粟珊¹, 段亚男¹, 何霞红^{1,2*}

(¹云南农业大学植物保护学院, 昆明 650201; ²西南林业大学, 昆明 650224)

Identification of *Alternaria* species associated with black spot disease on *Panax notoginseng* in Yunnan and Guangxi HE Chi¹, WANG Hui-ling¹, JIN Xin¹, JIN Bai-hui¹, SU Shan¹, DUAN Ya-nan¹, HE Xia-hong^{1,2*} (¹College of Plant Protection, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, China; ²Southwest Forestry University, Kunming 650224, China)

Abstract: Black spot disease caused by *Alternaria* species is an important and common disease on *Panax notoginseng*. In this study, 82 isolates were obtained from diseased *P. notoginseng* plants sampled from Yunnan and Guangxi provinces. ITS region and partial coding sequence of *histone 3* gene of all isolates were amplified and sequenced to do the phylogenetic analysis. Based on molecular identification and morphological traits, the isolates were identified as *Alternaria tenuissima*, *A. alternata* and *A. panax* separately. This study firstly confirmed that *A. tenuissima* was the dominant pathogen population (62 isolates, 75.6%) associated with black spot disease in main producing areas of *P. notoginseng*, followed by *A. alternata* (12 isolates, 14.6%) and *A. panax* (8 isolates, 9.8%). Among these species, *A. panax* had the highest pathogenicity to *P. notoginseng*.

Key words: *Alternaria* pathogen; *Panax notoginseng*; *histone 3* gene; pathogenicity

中图分类号: S567.236

文献标识码: A

文章编号: 0412-0914(2020)02-0246-05

黑斑病是三七栽培生产中常见的一大病害, 叶片受害产生近圆形或不规则水浸状病斑, 常导致成株落叶、幼苗生长点及茎秆顶端腐烂枯死。其病原一般认为是链格孢属真菌人参链格 *Alternaria panax* Whetzel^[1, 2], 也有相关研究证明黑斑病病原为细链格孢 *Alternaria tenuis* Nees^[3], 后定名为链格孢 *Alternaria alternata* Keissl^[4]。本研究利用 ITS 序列和 *histone 3* 部分编码序列的 PCR 鉴定, 结合形态学鉴定, 分析三七主产区黑斑病菌的组成和分布情况及几种病原菌的致病力差异, 以期对三七黑斑病防治提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 病样采集和菌株分离、纯化、保存与柯赫氏法则验证

2017年6~8月, 在云南省寻甸、石屏、建水与广西百色等9个市(县)的13个镇(村)采集了三七黑斑病病样, 采集部位主要为具有明显病斑的叶片以及幼苗受害生长点。

病原菌分离采用组织分离法, 单孢纯化后室温保存于PDA/PCA斜面上。

选取健康的一年七植株, 酒精消毒后针刺叶片, 将供试菌株的菌饼(直径5 mm)接种于针刺处。接种

收稿日期: 2019-03-08; 修回日期: 2019-06-04; 网络出版时间: 2019-06-05

网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.2184.Q.20190605.1457.002.html>

基金项目: 国家重点研发计划资助(2018YFD0201100); 现代农业产业技术体系建设专项资金资助(CARS-21)

通讯作者: 何霞红, 博士, 教授, 研究方向为生物多样性与病害控制; E-mail: hexiahong@hotmail.com

第一作者: 何迟, 硕士研究生, 研究方向为植物病理学; E-mail: hechi_kishi@163.com。

后的三七植株置于相对湿度 90% 的 25℃ 保温箱中,黑暗处理 48 h 后设置光周期为 12 h/d, 3~7 d 三七发病后重新分离、培养菌株并观察菌落形态。

1.2 形态学鉴定

将供试菌株在 PDA 上 25℃ 培养 7 d 后观察其菌落形状、颜色等性状,显微镜下测量分生孢子大小(每个菌株测量 30 个孢子)。在两支日光灯中间加一支黑光灯(NUV, 近紫外光),将供试菌株培养于 PCA 培养基上,置于上述光照条件下(12 h/d)培养 7 d 后,显微镜下观察其产孢表型,或用菌丝块将菌丝组织涂在中心凿有方孔的滤纸上,并置于灭菌载玻片上,继续置于上述光、温条件下保湿培养 5 d^[4],光学显微镜下拍摄方孔内缘的分生孢子链,比较菌株间差异。

1.3 DNA 的提取与分子鉴定

菌株 DNA 的提取使用 HP Fungal DNA Kit (OMEGA) 试剂盒。ITS 片段与 *histone 3* 序列的扩增使用通用引物 ITS1/ITS4 与引物 H3-1a/H3-1b^[5]。PCR 扩增产物使用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测后,送往擎科生物(昆明)公司进行测序。测序结果使用 BioEdit 手工校正后,使用 Blast (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) 进行序列比对,序列上传至 GenBank 数据库。

将每个菌株的 ITS 序列与 *histone 3* 序列首尾相连,使用 *A. infectoria* 作为外群,使用 Mega 6.0 构建系统发育树,建树方法采用邻接法(neighbor-joining, NJ), Bootstrap 1 000 次重复。参比菌株的 GenBank 登录号见表 1。

1.4 致病力检测

各菌株致病力检测采用离体叶片接种法。按

照 1.1 所述方法接种三七离体叶片,接种后 7 d 和 14 d,采用十字交叉法测量病斑大小并按照 5 级法分级,不发病为 0 级,病斑直径 0~5 mm 为 1 级,5.1~10 mm 为 2 级,10.1~15 mm 为 3 级,15.1~20 mm 为 4 级,20.1 mm 以上至叶片完全腐烂为 5 级。每个菌株接种 10 片叶子,重复试验 3 次。根据调查数据统计发病率,计算病情指数(DI)。统计数据使用 SPSS 16.0 进行方差分析(LSD, $P < 0.05$)。

2 结果与分析

2.1 形态学鉴定

根据《中国真菌志》第十六卷链格孢属的相关描述,将 82 个单孢菌株鉴定为 3 个种。

YN-LPA2 等 62 个菌株被鉴定为细极链格孢 *Alternaria tenuissima*, YN-Shilin4-2 等 12 个菌株被鉴定为链格孢 *Alternaria alternata*。它们在 PDA 上的菌丝都较为松散,初生菌丝白色,菌落呈灰绿色、灰白色或橄榄色;分生孢子梗单枝或丛生;分生孢子倒棍棒形,黄褐色至褐色,孢身(17.5~40) $\mu\text{m} \times (7.5 \sim 15) \mu\text{m}$,喙呈柱状或锥状,(0~)(6~20) $\mu\text{m} \times (2.5 \sim 5) \mu\text{m}$,具横隔 2~6 个,纵(斜)隔 0~5 个;*A. tenuissima* 分生孢子易成链,且多为 10 个以上的长链,可见侧链与二级分枝,而 *A. alternata* 成链孢子通常在 12 个以下,孢子链更易分枝,且可见三级分枝。YN-YS 等 8 个菌株被鉴定为人参链格孢 *Alternaria panax*。其在 PDA 上的菌丝致密,初生菌丝为白色,后呈灰绿色或黄褐色;分生孢子梗多为单生;分生孢子呈长倒棍棒形,孢身(37.5~60) $\mu\text{m} \times (15 \sim 22.5) \mu\text{m}$,喙(17.5~55) $\mu\text{m} \times (4 \sim 7) \mu\text{m}$,具横隔 5~9 个,纵(斜)隔 1~5 个(图 1)。

Table 1 Accession numbers of two genes (ITS and *histone 3*) of reference *Alternaria* spp.

<i>Alternaria</i> species	ITS accession numbers	<i>histone 3</i> gene accession numbers
<i>A. panax</i>	JQ693662	JX213257
<i>A. tenuissima</i>	EF031053	EF371552
<i>A. alternata</i>	FJ196306	AF404638
<i>A. arborescens</i>	KX463406	AF404591
<i>A. solani</i>	KJ718237	JX213319
<i>A. brassicicola</i>	GQ496082	JX213318
<i>A. infectoria</i>	AF081456	AF404629

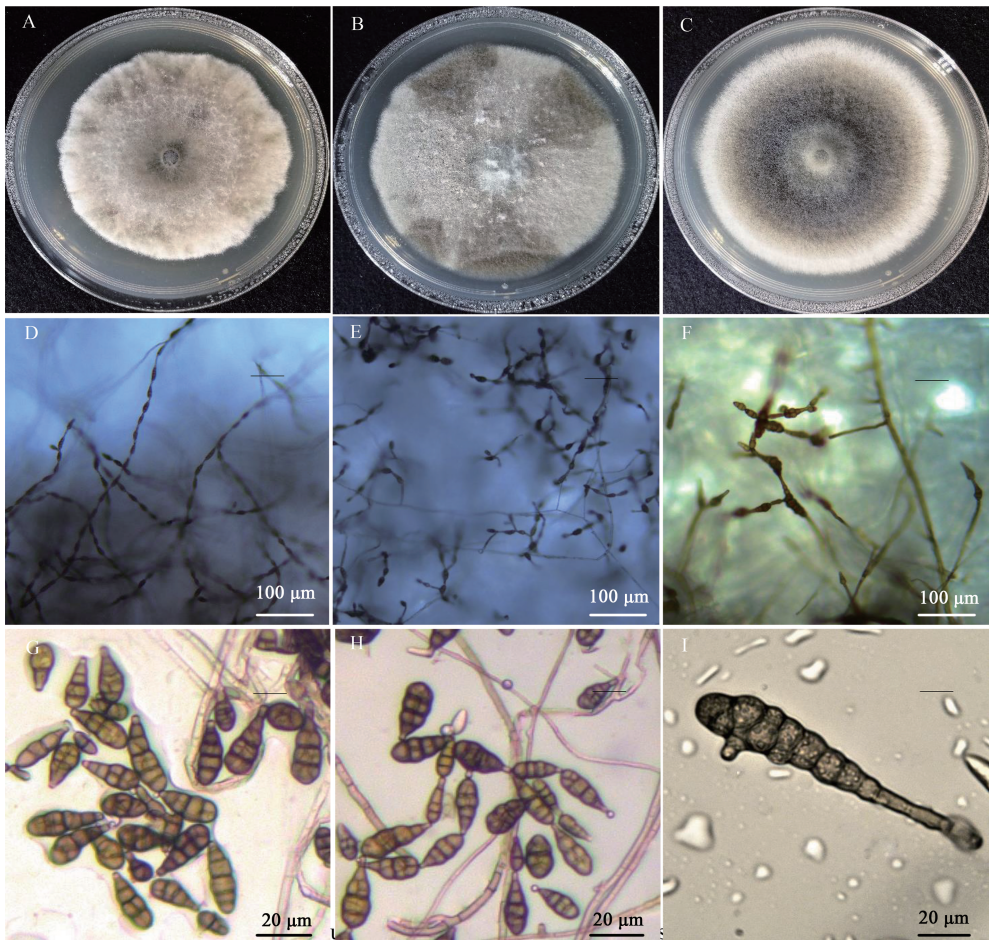


Fig. 1 Colonies, conidia and sporulation patterns of representative isolates of three *Alternaria* species

A, B, C: Colonies of the representative isolates of *A. tenuissima*, *A. alternata*, *A. panax* observed on PDA plates, respectively;
 D, E, F: Sporulation patterns of the representative isolates of three species observed on filter paper respectively;
 G, H, I: Conidia of the representative isolates of three species observed on PCA plates respectively.

2.2 分子鉴定与系统发育分析

82 个菌株的 DNA 均扩增出了 540 bp 的 ITS 片段,序列已上传至 GenBank, 登录号 MK534873-534955。 *histone 3* 序列方面, YN-YJ26 等 62 个菌株扩增出 546 bp, GX-SL7 等 8 个菌株扩增出 544 bp, YN-SZL7 等 12 个菌株扩增出 440 bp 的片段, 序列已上传至 GenBank, 登录号 MH647718-647726, MH687452-687491, MH713587-713598, MH716444-716457, MH716459-716464, MH719218。

基于 ITS 序列与 *histone 3* 序列构建的多基因系统发育树显示, YN-JS16 等 74 个菌株和 *A. alternata*, *A. tenuissima* 及 *A. arborescens* 等小孢子参比

菌株聚在一个大组, 这个大组又分为两支, YN-JS16 等 62 个菌株与 *A. tenuissima* 聚在一起, YN-SZL7 等 12 个菌株与 *A. alternata* 聚在一起。 GX-SL8 等 8 个菌株与 *A. panax* 聚在一起, 并与 *A. brassicicola*, *A. solani* 等大孢子链格孢种聚为一个 大组(图 2)。

2.3 致病力分析

所有分离得到的菌株通过回接三七植株后均可发病, 且病状与田间病状一致, 满足柯赫氏法则。 病原菌接种三七离体叶片, 叶片均产生圆形或不规则形水渍状病斑(图 3)。 三七叶片在接种了 *A. panax* 后 7 d 和 14 d 的病情指数分别为 37.67 和

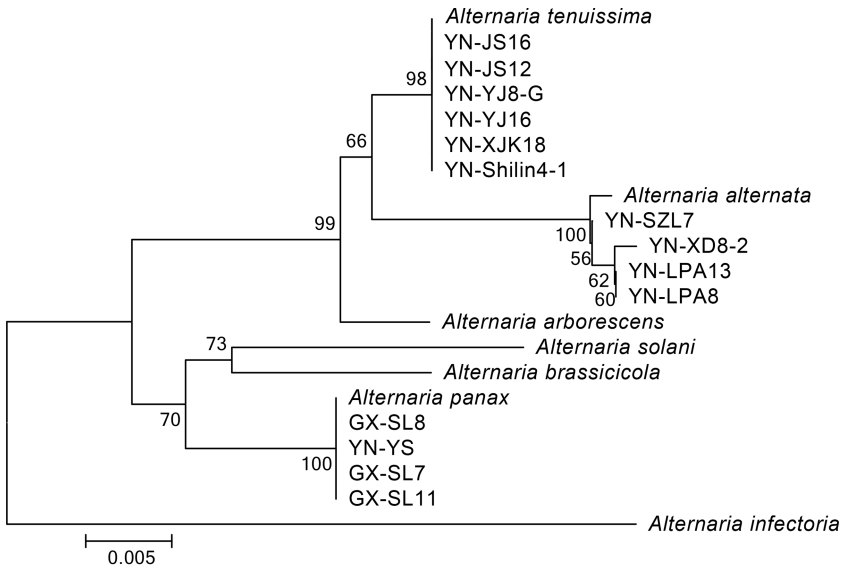


Fig. 2 Phylogenetic tree constructed based on ITS region and partial coding sequences of *histone 3* gene of representative *Alternaria* isolates

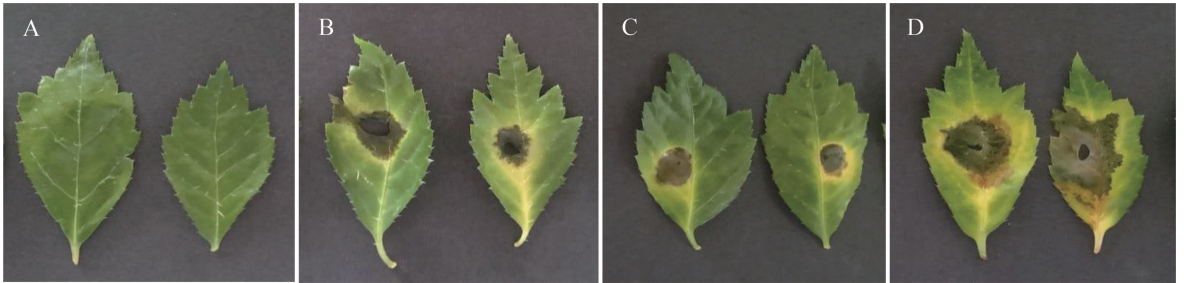


Fig. 3 Pathogenicity of three *Alternaria* species on detached *Panax notoginseng* leaves (7DAL)

A: Control; B: *A. tenuissima*; C: *A. alternata*; D: *A. panax*.

72.67,均显著高于 *A. tenuissima* (13.14, 22.37) 与 *A. alternata* (13.89, 20.94), 2 个小孢子种致病力无显著差异。

3 结论与讨论

链格孢属小孢子种的鉴定一直是一个难点, Simmons^[6]认为产孢表型差异可以作为种级鉴定标准, 研究者们也尝试使用不同的单基因^[7]或多基因序列联合鉴定^[8]加以区分。本研究通过观察产孢表型, 结合 ITS 序列与 *histone 3* 序列多基因分子鉴定, 发现云南与广西三七主产区黑斑病原菌有 *A. tenuissima*、*A. alternata* 与 *A. panax* 3 种, 且 *A. tenuissima* 是优势种 (75.6%)。这与 Zheng 等对马铃薯叶斑病原 3 种链格孢菌的鉴定结果很相似^[9]。

对 3 种病原菌致病力的调查分析显示, *A. panax* 致病力较强, *A. tenuissima*、*A. alternata* 致病力较弱但仍可导致三七叶片轻至中度发病。

本研究测定菌株致病力所用的三七叶片取自云南农业大学寻甸大河桥农场, 其使用的三七种子与实际生产中一致, 杂合度较高。在之后的相关研究中可以针对不同三七品种开展黑斑病抗性评价, 筛选抗病品种, 或许是三七品种选育的方向之一。

参考文献

- [1] Wang S Q, Yu H J, Chen X H. Prevention and treatment of *Panax notoginseng* black spot disease (in Chinese) [J]. Special Wild Economic Animal and Plant Research (特产科学实验), 1980: 8-14.

- [2] Huang H Q, Fan X Y, Tao Y Q, *et al.* Review and identification of black spot disease pathogens of *Panax notoginseng* (in Chinese) [J]. Journal of Yangtze University (Natural Science Edition) [长江大学学报(自科科学版)], 2016, 13: 6-9.
- [3] Wang C L, Cui X M, Li Z Y. Study on the infection and incidence condition of black spot disease on *Panax notoginseng* (in Chinese) [J]. Journal of Chinese Medicinal Materials (中药材), 1998, 21: 328-330.
- [4] Zhang T Y. Chinese fungi vol.16 *Alternaria* genus (in Chinese) [M]. Beijing: Science Press (北京:科学出版社), 2003.
- [5] 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, (4): 1323-1330.
- [6] Simmons E. *Alternaria* themes and variations (112-144) [J]. Mycotaxon, 1995, 55(1): 55-163.
- [7] Zu Y Q. Identification and genetic diversity study on brown spot pathogen and endogenous *Alternaria* of tobacco in Henan Province (in Chinese) [D]. Zhengzhou: Henan Agricultural University (郑州:河南农业大学), 2013.
- [8] Zhu X Q, Xiao C L. Phylogenetic, morphological and pathogenic characterization of *Alternaria* species associated with fruit Rot of blueberry in California [J]. Phytopathology, 2015, 105(12): 1555.
- [9] Zheng H H, Zhao J, Wang T Y, *et al.* Characterization of *Alternaria* species associated with potato foliar diseases in China [J]. Plant Pathology, 2015, 64(2): 425-433.

责任编辑:于金枝