

福建太子参黑斑病病原菌鉴定及生物学特性研究

张武君^{1,2}, 刘保财^{1,2}, 陈菁瑛^{1,2*}, 黄颖桢^{1,2}, 赵云青^{1,2}, 蔡净蓉²

(1.福建省农业科学院 农业生物资源研究所, 福建 福州 350003;

2.福建省农业科学院 药用植物研究中心, 福建 福州 350003)

[摘要] 福建省柘荣县太子参黑斑病常于每年4—6月份的多雨季节暴发,为太子参的主要叶部病害之一,对该药材的产量和质量造成严重影响。为明确太子参黑斑病的病原菌种类及其生物学特性,该研究依据柯赫法则对病原菌分离纯化,采用形态学特征观察及多基因序列分析进行鉴定,鉴定为链格孢属致病真菌并进行致病性测定及生物学特性测定。鉴定结果表明:引起该黑斑病的病原菌为梨黑斑链格孢 *Alternaria gaisen*。其菌落形态、孢子特征以及产孢表型特征与梨黑斑链格孢 *A. gaisen* 类似,且由 ITS、*tef1*、*gapdh*、*endoPG*、*Alta1*、OPA10-2 和 KOG1077 这 7 个组成的串联序列在 20 个链格孢属真菌的系统发育树上与梨黑斑链格孢 *A. gaisen* 聚为一支,最大似然支持率为 100%,贝叶斯后验概率 1.00。生物学特性表明:梨黑斑链格孢 *A. gaisen* 的菌丝生长的最适温度为 25℃,最适 pH 为 5~8,最适培养方式为 24 h 暗培养,菌丝和孢子致死温度均为 50℃ 处理 10 min。由 *A. gaisen* 引起的太子参黑斑病为国内外首次报道,该研究结果可为太子参叶斑类病害的诊断及防控提供理论依据。

[关键词] 太子参; 黑斑病; 梨黑斑链格孢; 多基因序列分析; 生物学特性

Identification and biological characterization of pathogen causing black spot of *Pseudostellaria heterophylla* in Fujian province

ZHANG Wu-jun^{1,2}, LIU Bao-cai^{1,2}, CHEN Jing-ying^{1,2*}, HUANG Ying-zhen^{1,2}, ZHAO Yun-qing^{1,2}, CAI Jing-rong²

(1. Agricultural Bio-resources Institute, Fujian Academy of Agricultural Sciences, Fuzhou 350003, China;

2. Research Center for Medicinal Plant, Fujian Academy of Agricultural Sciences, Fuzhou 350003, China)

[Abstract] In Zherong county, Fujian province, the black spot of *Pseudostellaria heterophylla* often breaks out in the rainy season from April to June every year. As one of the main leaf diseases of *P. heterophylla*, black spot seriously affects the yield and quality of the medicinal material. To identify and characterize the pathogens causing black spot, we isolated the pathogens, identified them as a species of *Alternaria* according to Koch's postulates, and then tested their pathogenicity and biological characteristics. The results showed that the pathogens causing *P. heterophylla* black spot were *A. gaisen*, as evidenced by the similar colony morphology, spore characteristics, sporulation phenotype, and the same clade with *A. gaisen* on the phylogenetic tree (the maximum likelihood support rate of 100% and the Bayesian posterior probability of 1.00) built based on the tandem sequences of ITS, *tef1*, *gapdh*, *endoPG*, *Alta1*, OPA10-2, and KOG1077. The optimum conditions for mycelial growth of the pathogen were 25℃, pH 5-8, and 24 h dark culture. The lethal conditions for mycelia and spores were both treatment at 50℃ for 10 min. We reported for the first time the *A. gaisen*-caused black spot of *P. heterophylla*. The results could provide a theoretical basis for the diagnosis and control of *P. heterophylla* leaf spot diseases.

[Key words] *Pseudostellaria heterophylla*; black spot; *Alternaria gaisen*; multiple gene sequence analysis; biological characteristics

DOI: 10.19540/j.cnki.cjcm.20230216.101

[收稿日期] 2022-11-14

[基金项目] 福建省自然科学基金项目(2022J01485);福建省属公益项目(2021R1034006);福建省农业科学院创新团队项目(CXTD2021014-2);福建省人民政府、中国农业科学院“5511”协同创新工程项目(XTCXGC2021003-5);国家重点研发计划项目(2019YFC1710502)

[通信作者] * 陈菁瑛, 研究员, 主要从事药用植物资源利用与规范栽培等研究, E-mail: cjq6601@163.com

[作者简介] 张武君, 硕士, 助理研究员, 主要从事药用植物生理生化及栽培研究, E-mail: 352047618@qq.com

太子参 *Pseudostellaria heterophylla* (Miq.) Pax et Hoffm. 为石竹科 Caryophyllaceae 异叶假繁缕属的宿根性草本植物, 又名孩儿参、童参等, 是我国著名的药食两用中药材, 以块根入药, 具有补肺气、健脾胃、生津液之功效^[1]。国内主产地为福建、贵州、山东、安徽、江苏等省, 其中在福建省的柘荣县栽培历史悠久, 常年种植面积超过 0.23 万 hm^2 , 年产量约占全国总产量的 60%, 是当地重要的经济支柱产业^[2]。每年 4—6 月, 该地区太子参感染黑斑病等叶部病害十分普遍, 严重影响其产量与品质, 给种植户造成较大的经济损失。因此研究柘荣太子参黑斑病的病原菌及其生物学特性, 对此类病害的有效防控具有重要意义。桑维钧等^[3]通过形态学鉴定, 将贵州太子参黑斑病的病原菌鉴定为细极链格孢 *Alternaria tenuissima*, YUAN Q S 等^[4]发现金色毛壳菌 *Arcopilus aureus* 能够导致贵州施秉县的太子参发生黑斑病。仅通过传统的形态学鉴定方法难以准确鉴定到种, 目前多采用形态学观察结合多基因序列分析对病原菌进行鉴定^[5]。本课题组前期研究发现, 引起福建省柘荣县太子参叶斑类病害的病原菌与现有报道存在一定差异, 需进一步进行鉴定分析。2020—2022 年作者前往柘荣县太子参主产区, 针对黑斑病危害进行多次调查取样, 通过病原菌分离培养、柯赫法则验证、形态学特征观察结合多基因序列分析对病原菌进行鉴定, 并探讨该病原菌的生物学特性, 以期防治太子参黑斑病及抗病育种等研究提供参考。

1 材料

1.1 植物病样

2021 年 5 月自福建省宁德市柘荣县英山乡田头洋村 (119°50'14"E, 27°16'43"N) 太子参种植基地, 采集典型的黑斑病病株带回实验室立即开展病原菌分离。

1.2 培养基

马铃薯葡萄糖琼脂 (PDA) 培养基: 马铃薯 300 g、葡萄糖 20 g、琼脂 15 g、氯霉素 0.1 g、蒸馏水 1 L (广东环凯微生物科技有限公司); 马铃薯胡萝卜 (PCA) 培养基: 马铃薯 20 g、胡萝卜 25 g、琼脂 15 g、蒸馏水 1 L。

1.3 仪器与试剂

MJ-II 霉菌培养箱 (上海一恒科技有限公司); 超净工作台 (苏州安泰空气技术有限公司); 高压蒸

汽灭菌器 (日本普和株式会社); Eclipse Ni-U 光学显微镜 (日本 Nikon 公司); 720 Thermal Cycler 型 PCR 仪 (美国 Applied Biosystems 公司); DYY-6C 型电泳仪 (北京六一仪器厂); FR980 凝胶成像系统 (上海复日科技仪器有限公司)。

真菌 DNA 提取试剂盒、SanPrep 柱式 DNA 胶回收试剂盒、DNA Ladder Mix maker [生工生物工程 (上海) 股份有限公司]; DreamTaq™ DNA Polymerase (MBI 公司); 琼脂粉 (西班牙 BIOWEST 公司); 浓 HCl 和 NaOH (分析纯, 国药集团药业股份有限公司)。

2 方法

2.1 病原菌分离与纯化

采用常规组织分离法^[6]分离太子参黑斑病病原菌。在新鲜病叶的病健交接处切取 4 mm×4 mm 的组织块, 在 75% 乙醇中浸泡 10 s, 取出用无菌水冲洗 3 次, 再经 0.1% HgCl_2 浸泡 2~3 min, 取出用无菌水冲洗 3 次后, 移入 PDA 平板上, 25 °C 恒温培养箱暗培养, 待病样组织块周围长出菌丝后, 用接种针挑取菌落边缘菌丝, 接种到新的 PDA 平板上纯化培养, 反复纯化 3 代并连续挑选至菌落形态一致, 将纯化后的菌株编号, 置于 4 °C 冰箱保存备用。

2.2 病原菌形态学鉴定

将纯化菌株接种于 PDA 培养基上, 25 °C 暗培养培养 7 d, 观察并拍照记录菌落颜色及形态, 在菌落边缘取直径 0.5 cm 的菌饼于 PCA 培养基上培养 7 d, 从菌落外围取小块带菌丝的培养基, 涂在置于灭菌载玻片上中心具方孔的灭菌滤纸片上^[7] (PCA+滤纸培养), 再将灭菌载玻片放入垫有湿润滤纸的无菌培养皿中, 25 °C 恒温暗培养 7~10 d 后观察产孢结构、孢子形态等, 测量孢子大小并拍照记录。

2.3 病原菌多基因序列分析

按照 DNA 提取试剂盒操作说明提取菌株基因组 DNA, 选择核糖体转录间隔区序列 (internal transcribed spacer, ITS)、延伸因子 (translation elongation factor 1- α , *tef1*)、甘油醛-3-磷酸脱氢酶基因 (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene, *gapdh*)、内聚半乳糖醛酸酶基因 (endopolygalacturonase gene, *endoPG*)、链格孢过敏原基因 (*Alternaria* major allergen gene, *Alta1*)、匿名基因区 (anonymous gene region, OPA10-2)、真核同源群 (eukaryotic orthologous group, KOG) 蛋白位点 KOG1077 进行扩增与测序, 其引物序列见表 1。PCR 反应程序: 预变性

94 ℃ 5 min ,变性 94 ℃ 30 s ,延伸 72 ℃ 30 s ,补充延伸 72 ℃ 5 min ,共 35 个循环。反应体系: 10×*Taq* Buffer(Mg +Plus) 5 μL ,dNTP Mixture (2.5 mmol · mL⁻¹) 1 μL ,上下游引物各 1 μL ,*TaKaRa Taq*(5 U · mL⁻¹) 0.25 μL ,DNA 2.0 μL ,ddH₂O 39.75 μL ,总体积 50 μL。根据近年来关于链格孢属真菌系统发育分析较全面的 WOUDEMBERG J H C 等^[8-9] 研究选取部分序列用于系统发育树的构建 ,见表 2。利用 Clustal X 1.83^[10] 进行 DNA 的多重序列比对后用 BioEditv 7.1.3^[11] 进行手动校正; 使用 PhyloSuitev 1.2.1^[12] 中的 concatenate sequence 选项将 7 个单基因序列组合拼接 1 个 7 基因序列 ,通过 Partitionfinder2 选项对每个基因的最佳核苷酸替换模型及相关参数进行计算 ,随后用 MrBayesv.3.2 构建 7 基因联合的贝叶斯系统发育树(Bayesian inference ,BI) 和用 IQ-TREE 1.5.5 构建 7 基因联合的最大似然树(maximum likelihood ,ML) 。生成的所有系统发育树用 Figtreev.1.4.0(<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>) 软件打开适当调节后在 Adobe Acrobat DC 与 PowerPoint 软件中进行编辑和美化。

表 1 扩增目的基因的引物及其序列

Table 1 Primer sequences of target genes			
引物名称	引物序列(5'-3')	退火温度/℃	参考文献
ITS-F	TCCTCCGCTTATTGATATGC	52	[13]
ITS-R	GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG		
tef1-F	CATCGAGAAGTTCGAGAAGG		
tef1-R	TACTTGAAGGAACCCCTTACC	52	[14]
gapdh-F	CAACGGCTTCGGTCGCATTG		
gapdh-R	GCCAAAGCAGTTGGTTGTGC		
endoPG-F	TATAAACCTTAGCGCCATCA	54	[16]
endoPG-R	TGTGCTACCATGGTTCCTTCC		
Alta1-F	ATGCAGTTCACCACCATCGC		
Alta1-R	ACGAGGGTGAGTAGGCGTC	59	[9]
OPA10-2-F	GATTTCGAGCAGGGAAGCTA		
OPA10-2-R	TCGCAGTAAGACACATTCTACG		
KOG1077-F	GGAGCAGTCGGGCAACG	59	[9]
KOG1077-R	ATTCRTGTTGTACRATCGC		

表 2 系统发育进化树构建所用菌株的种类及其基因序列登录号

Table 2 GanBank accession number and species of strains used for constructing the phylogenetic tree

种名	菌株号	登录号						
		ITS	tef1	gapdh	endoPG	Alta1	OPA10-2	KOG1077
<i>Alternaria acalyphicola</i>	CBS 541.94	KJ718097	KJ718446	KJ717952	-	KJ718617	-	-
<i>A. agerati</i>	CBS 117221	KJ718098	KJ718447	KJ717953	-	KJ718618	-	-
<i>A. agripestis</i>	CBS 577.94	KJ718099	KJ718448	JQ646356	-	KJ718619	-	-
<i>A. allii</i>	CBS 107.28	KJ718100	KJ718449	KJ717954	-	KJ718620	-	-
<i>A. alternata</i>	CBS 916.96	AF347031	KC584634	AY278808	JQ811978	AY563301	KP124632	KP125281
<i>A. alternantherae</i>	CBS 124392	KC584179	KC584633	KC584096	-	KP123846	-	KP125275
<i>A. alstroemeriae</i>	CBS 118809	KP124297	KP125072	KP124154	KP123994	-	KP124602	-
<i>A. arborescens</i>	CBS 102605	AF347033	KC584636	AY278810	AY295028	AY563303	KP124712	KP125303
<i>A. betae-kenyensis</i>	CBS 118810	KP124419	KP125197	KP124270	KP124123	KP123966	KP124733	KP125306
<i>A. burnsii</i>	CBS 107.38	KP124420	KP125198	JQ646305	KP124124	KP123967	KP124734	-
<i>A. cerealis</i>	CBS 119544	KP124408	KP125186	JQ646321	KP124112	KP123955	KP124722	KP125304
<i>A. eichhorniae</i>	CBS 489.92	KC146356	KP125204	KP124276	KP124130	KP123973	KP124740	KP125309
<i>A. gaisen</i>	CBS 118488	KP124427	KP125206	KP124278	KP124132	KP123975	KP124743	KP125312
	ZR-6	OP600533	OP615988	OP615989	OP615991	OP615987	OP615990	OP615992
<i>A. gossypina</i>	CBS 104.32	KP124430	KP125209	JQ646312	KP124135	JQ646395	KP124746	-
<i>A. iridialustralis</i>	CBS 118486	KP124435	KP125214	KP124284	KP124140	KP123981	KP124751	-
<i>A. jacinthicola</i>	CBS 133751	KP124438	KP125217	KP124287	KP124143	KP123984	KP124754	-
<i>A. longipes</i>	CBS 540.94	AY278835	KC584667	AY278811	KP124147	AY563304	KP124758	KP125315
<i>A. senecionicola</i>	CBS 119545; E.G.S. 48.130	KP124409	KP125187	KP124260	KP124113	KP123956	KP124723	KP125305
<i>A. tenuissima</i>	CBS 918.96R	AF347032	KC584435	AY278809	KP124026	KC584693	KP124633	KP125282
<i>A. tomato</i>	CBS 103.30	KP124445	KP125224	KP124294	KP124151	KP123991	KP124762	KP125316

2.4 致病性测定

将分离菌株于 PDA 培养基活化 7 d 后 ,在菌落

边缘取直径 0.5 cm 的菌饼 ,接种至已用 75%乙醇消毒、无菌针头刺伤的健康太子参叶片上 ,以接种无菌

琼脂块为对照,将叶片置于垫有湿润滤纸的塑料培养皿中,每处理3个重复,置于光/暗周期12 h/12 h的25℃恒温培养箱培养,观察并记录发病情况。待叶片明显发病后,按2.1项与2.2项的方法对接种后的病斑用PDA培养基进行再分离纯化,诱导产孢,观察菌落和分生孢子与原接种菌株是否一致。

2.5 生物学特性的研究

下列试验所用菌饼均为在PDA培养基上25℃暗培养7 d,用直径5 mm的灭菌打孔器沿菌落边缘打孔所得。

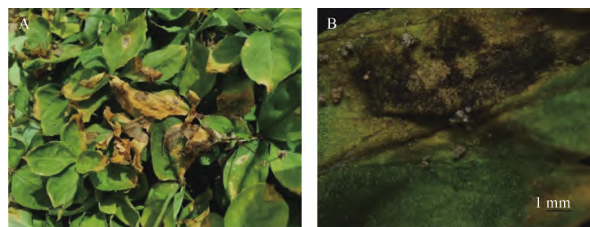
2.5.1 温度、pH、光照对病原菌丝生长的影响 将菌饼接种于PDA平板中央,并分别在5、10、15、20、25、30、35、40℃条件下恒温暗培养;利用 $1\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的HCl和 $1\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的NaOH配制pH为4、5、6、7、8、9、10、11、12的PDA培养基,将菌饼接种于不同pH的PDA平板中央,25℃恒温暗培养;将菌饼接种于PDA平板中央,分别在持续光照、持续黑暗、12 h/12 h光暗交替条件下25℃恒温培养。培养6 d后,采用十字交叉法测量菌落直径,每个处理重复5次。

2.5.2 菌丝体、孢子致死温度测定 将菌饼放入装有5 mL无菌水的试管中,每管5块,塞好棉塞,分别至于45、46、47、48、49、50℃的恒温水浴锅水浴10 min,快速冷却后接种于PDA培养基上^[17];采用PCA+滤纸培养基诱导产孢,将孢子洗入无菌水中,取1 mL孢子悬浮液于2 mL无菌离心管,盖好盖子后分别投入46、47、48、49、50、51、52、53、54℃的恒温水浴锅水浴10 min,快速冷却后取各温度处理的50 μL 孢子悬浮液涂布于PDA培养基上。25℃恒温暗培养3 d后观察菌丝、孢子生长情况,每个温度设置5次重复。

3 结果与分析

3.1 田间病害调查及症状特点

调查发现,柘荣县各太子参种植区均有黑斑病发生,苗期病害零星出现,进入生长中期,病株率可达20%~30%,至5月中下旬病害进入高发期。据观察,本病常发生于叶尖、叶缘上,初始染病部位呈现近圆形稍凹陷的浅褐色病斑,随病情发展,逐渐扩展成较大的近圆形或不规则形,边缘暗褐色,中间灰色,为害严重时引起叶枯,见图1A。病斑潮湿时上生暗色绒毛状物,系病原菌子实体,直立单生或簇生,见图1B。



A.田间发病症状; B.病叶上病原菌子实体。

图1 福建柘荣太子参黑斑病症状

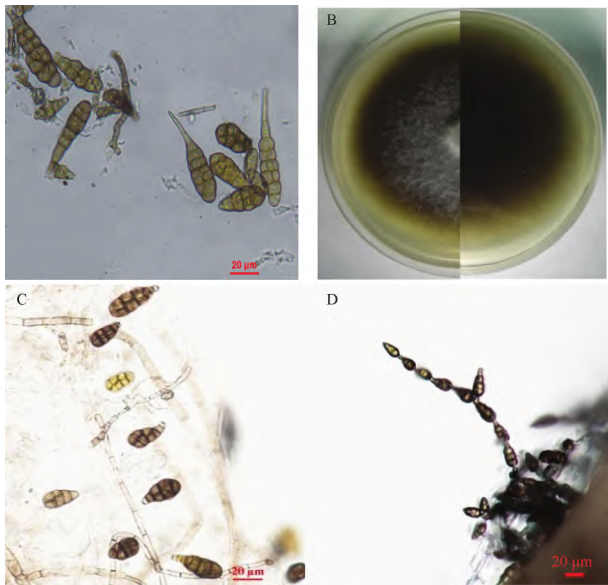
Fig.1 Symptoms of black spot of *Pseudostellaria heterophylla* in Zherong county, Fujian province

3.2 病原菌形态特征鉴定

从黑斑病病叶上刮取部分病原物进行镜检,可见分生孢子梗为褐色,单生或多根簇生,直立或膝状弯曲,有多个(多数4~6个)隔膜,大小为 $57.3\sim 103.3(78.8)\mu\text{m}\times 5.7\sim 7.5(6.6)\mu\text{m}$ 。分生孢子链生或单生,呈倒棍棒形、梨形、近椭圆形、卵圆形等,黄褐色至淡褐色,具横隔膜2~7个,纵、斜隔膜0~4个,表面光滑,分隔处有缢缩,孢身大小为 $24.6\sim 54.0(33.7)\mu\text{m}\times 11.4\sim 16.9(12.9)\mu\text{m}$;孢身顶端具短喙,部分无喙,短喙大小为 $8.7\sim 26.0(18.6)\mu\text{m}\times 2.4\sim 4.5(3.6)\mu\text{m}$,见图2A。从采集的10个病样中分离纯化后共得到6株菌株,通过菌落、孢子、产孢表型等形态特征鉴定,6株菌株为同一种菌,随机选取其中1株命名为ZR-6,作为代表菌株进行后续观察验证。在PDA培养基上,ZR-6初期菌落为黑褐色,25℃暗培养7 d后,菌落正面可见白灰色气生菌丝隆起,背面呈黑褐色,菌落直径达8 cm,边缘整齐,见图2B。采用PCA+滤纸培养基菌株产孢良好,孢子形态与病叶镜检结果相似,孢身具横隔膜3~6个,纵隔膜0~3个,孢身大小为 $17.49\sim 32.81(22.49)\mu\text{m}\times 9.52\sim 13.51(10.56)\mu\text{m}$;孢身顶端具短喙,部分无喙,大小为 $2.89\sim 14.43(10.14)\mu\text{m}\times 1.6\sim 4.36(3.28)\mu\text{m}$,见图2C;可形成3~9个孢子的分生孢子链,不分支或分支较少,见图2D。以上形态学特征符合张天宇^[7]对链格孢属 *Alternaria* 真菌的形态特征描述。

3.3 病原菌多基因序列分析

将菌株ZR-6及20个参考菌株的ITS、*tef1*、*gap-dh*、*endoPG*、*Altal*、OPA10-2、KOG1077的序列分别串联,基于该串联序列构建系统进化树,结果显示该菌株与梨黑斑链格孢 *Alternaria gaisen* 聚为一支,支持



A.分生孢子; B.PDA 培养基培养 7 d 菌落形态; C.PCA+滤纸培养分生孢子; D.分生孢子链。
图 2 福建柘荣太子参黑斑病原菌形态特征
Fig.2 Morphology of the pathogen causing black spot of *Pseudostellaria heterophylla* in Zherong county , Fujian province

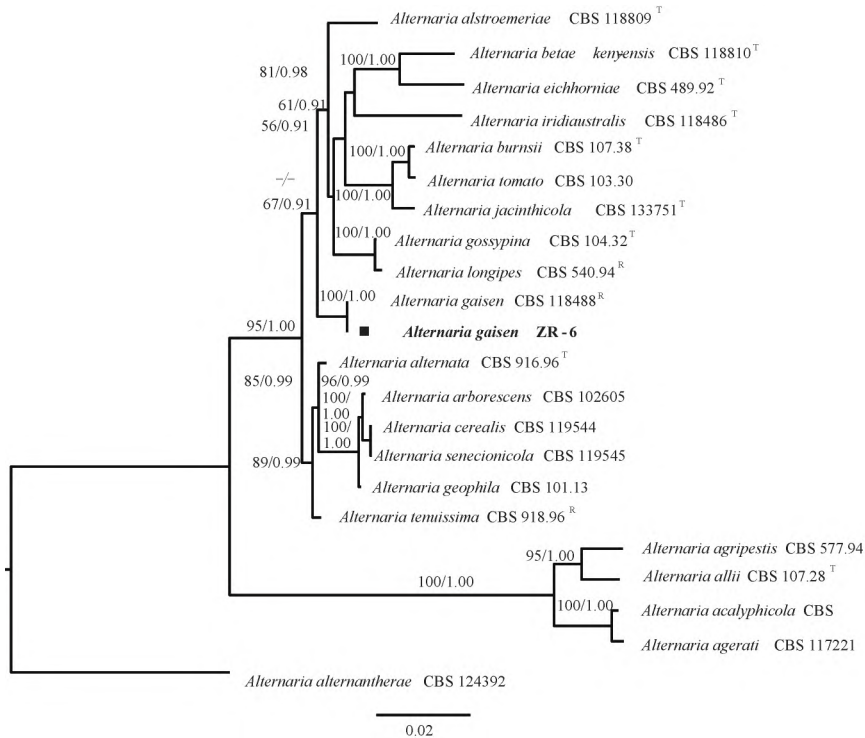
率为 100% ,后验概率 1.00 ,结合形态鉴定 ,最终将该病原菌鉴定为梨黑斑链格孢 *A. gaisen* ,见图 3。

3.4 分离菌株的致病性

以菌株 ZR-6 为代表进行离体叶片接种试验。叶片接种后 2~3 d 后均出现症状 ,呈黑褐色小点 ,后渐扩大呈现近圆形黑褐色病斑 ,经 7~10 d 后病斑逐渐扩大 ,小的 1~2 mm ,大的 3~4 mm ,对照叶片不发病 ,见图 4。对接种后的病斑进行分离 ,再次获得的病原菌与原接种菌基本一致。根据柯赫法则 ,证明接种菌就是引起太子参黑斑病的病原菌。

3.5 病原菌生物学特性

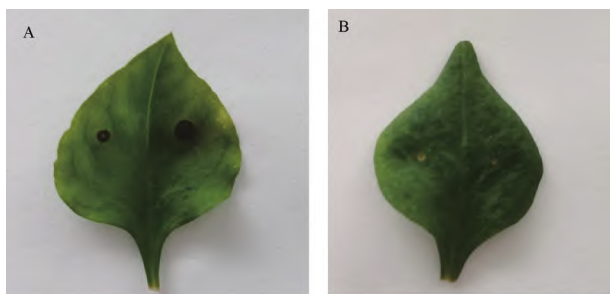
3.5.1 温度、pH、光照对菌丝生长的影响 将接种好的平板置于不同温度下培养 6 d ,结果表明菌丝在 5~35 ℃ 均能生长 ,其中在 5~25 ℃ 随着温度升高 ,菌丝生长速率不断提高 ,在 25 ℃ 达到最大值 ,其菌落直径为 75.0 mm; 当温度超过 25 ℃ 时 ,菌丝生长速率逐渐下降 ,说明该病原菌的最适培养温度为 25 ℃ ,见图 5。



^T. 衍生模式菌株(ex-type strain) ; ^R. 代表性菌株(representative stain) ; 此发育树以 *Alternaria alternantherae*(CBS 124392) 为外群种; 贝叶斯后验概率(PP) ≥0.80 ,最大似然支持率(MLBS) ≥50% 显示在系统发育树上 ,贝叶斯后验概率低于 0.80、最大似然支持率低于 50% 用 - 表示; 本研究获得的菌株已用符号标注并加粗; 标尺表示每个位点的核苷酸替换的预期数量。

图 3 基于 ITS、*tef1*、*gapdh*、*endoPG*、*Alta1*、OPA10-2、KOG1077 序列联合构建的最大似然(ML) 树

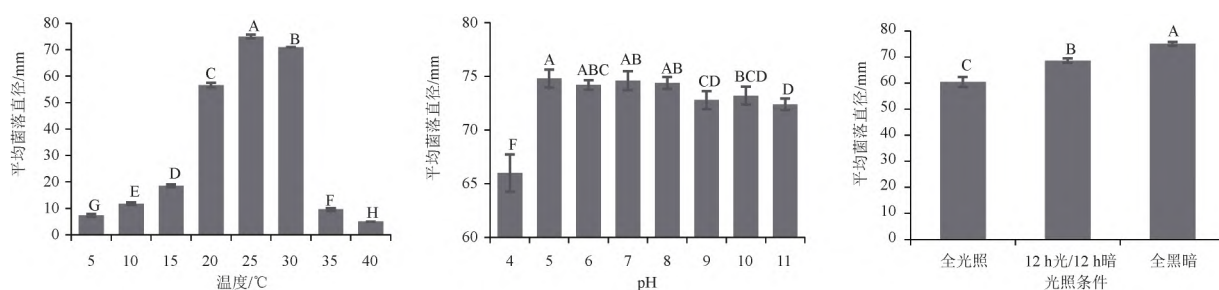
Fig.3 Maximum likelihood (ML) tree constructed based on ITS , *TEF1* , *gapdh* , *endoPG* , *Alta1* , OPA10-2 , and KOG1077



A. 太子参叶片人工接种 ZR-6 7 d 后发病症状; B. 对照叶片。

图 4 福建柘荣太子参黑斑病致病性测定

Fig.4 Pathogenicity of the pathogen causing black spot of *Pseudostellaria heterophylla* in Zherong county, Fujian province



不同大写字母表示差异极显著 ($P < 0.01$)。

图 5 温度、pH 和光照对柘荣太子参黑斑病菌菌株 ZR-6 菌丝生长的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 5$)

Fig.5 Effects of temperature, pH, and light on the mycelial growth of strain ZR-6 causing black spot of *P. heterophylla* ($\bar{x} \pm s$, $n = 5$)

平均菌落直径为 60.4 mm, 说明该病原菌的最适培养光照条件为暗培养, 见图 5。

3.5.2 菌丝体及孢子致死温度测定 将病原菌菌丝块在 45~50 °C 的恒温水浴锅中处理 10 min, 25 °C 培养 3 d 后, 45~49 °C 处理的菌丝能生长, 50 °C 处理的菌丝不能生长, 表明该菌丝的致死温度为 50 °C 处理 10 min。孢子悬浮液在 46~54 °C 的恒温水浴锅中处理 10 min, 25 °C 培养 3 d 后, 46~49 °C 处理的孢子均能萌发, 50 °C 及以上处理的孢子不能萌发, 表明孢子的致死温度为 50 °C 处理 10 min。

4 讨论与结论

链格孢属真菌是一类广泛存在于大自然中的兼性寄生菌, 种类繁多, 寄主多样, 危害程度大, 也是目前已知 100 多种植物叶斑病和其他植物病害的致病菌的原因^[7]。前人报道太子参黑斑病病原^[3], 以及何洁等^[18]报道引起太子参叶斑病的链格孢, 被确定为细极链格孢 *A. tenuissima*, 本研究从福建柘荣太子参黑斑病的病叶中分离到的 ZR-6 菌株, 形态学特征与细极链格孢相似度高, 仅凭传统的形态学鉴定方

法很难判别是否与细极链格孢为近似种, 况且, 链格孢属及其相似属细基格孢属 *Ulocadium* 和匍柄霉属 *Stemphylium* 易受环境条件影响而发生较大幅度的形态变化, 给分类鉴定工作造成很大困难^[7]。分子生物学技术在真菌分类上的应用, 为从分子水平阐明近似病原菌的种属间遗传差异提供了新的方法。WOUDENBERG J H C 等^[9]利用 SSU、LSU、ITS、*gapdh*、*rpb2*、*tef1*、*Alta1*、*endoPG* 和 OPA10-2 等 11 个目的片段确定链格孢属真菌在分子生物学上的分类地位; 王文青等^[19]在我国梨产区引起黑斑病的链格孢种类鉴定中, 证实 ITS 序列只能鉴定到属, 而采用 *tef1*、*gapdh*、*endoPG*、*Alta1* 能对不同种进行进一步的区分。以上研究表明, 分子鉴定中基因片段的选择十分重要。本研究选择 ITS、*tef1*、*gapdh*、*endoPG*、*Alta1*、OPA10-2 和 KOG1077 等 7 个目的基因片段串联构建分子系统发育树, 确认 ZR-6 菌株为梨黑斑链格孢 *A. gaisen*, 从而将其与形态高度相似的细极链格孢及遗传距离相近的多个小孢子种区分开来。本研究从福建柘荣县太子参黑斑病病样中分离鉴定出

梨黑斑链格孢 *A. gaisen* 与桑维钧等^[3] 从贵州施秉县太子参黑斑病病样中分离鉴定出的细极链格孢 *A. tenuissima* 存在差别,推测是由于生态条件不同导致黑斑病的优势致病菌株存在差异。

目前关于梨黑斑链格孢生物学特性的研究相对较少,本研究发现,梨黑斑链格孢最适生长温度为 25℃,与射干叶斑病^[20] 和三七黑斑病^[21] 的病原菌链格孢 *A. alternata* 研究结果相同;梨黑斑链格孢在全黑暗条件下生长速度最快,在全光照条件下生长速度最慢,与乌头黑斑病^[22] 的病原菌链格孢 *A. alternata* 研究结果相同,以上结果表明梨黑斑链格孢与链格孢的部分生物学特性较为相似。梨黑斑链格孢对 pH 的适应范围较广,最适 pH 为 5~8,但在 pH 为 4~12 的培养基上均能生长,王宏等^[23] 认为细极链格孢在较大 pH 范围内均能生长,可能是由于其菌丝生长过程中产生的物质能改变培养液的 pH,梨黑斑链格孢是否存在同样的生长特性还有待进一步探究。

本研究通过对福建省柘荣县太子参黑斑病病原的形态观察和多基因测序进行病原鉴定,并开展生物学特性研究,首次发现梨黑斑链格孢 *A. gaisen* 是太子参黑斑病的致病菌,明确该病原菌的生物学特性,为太子参生产中叶斑病类病害的诊断及防控提供理论依据。

[致谢] 福建省农业科学院果树研究所的陈景耀研究员提供病原菌形态鉴定指导;福建农林大学植物保护学院的苏济钰、范绍斌博士生提供病原菌分子鉴定指导。

[参考文献]

- [1] 南京中医药大学. 中药大辞典[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 2006: 533.
- [2] 陈菁瑛,黄颖桢,刘保财,等. 福建太子参常见病与绿色防控技术[J]. 安徽农业科学, 2021, 49(12): 152.
- [3] 桑维钧,熊继文,宋宝安,等. 贵州太子参主要真菌病害的调查与防治[J]. 安徽农业科学, 2006, 34(14): 3314.
- [4] YUAN Q S, WANG X A, WANG L, et al. First report of *Arcopilius aureus* causing leaf black spot disease of *Pseudostellaria heterophylla* in China[J]. Plant Dis, 2021, 105(12): 4164.
- [5] 马维思,郭兰萍,王馨,等. 滇黄精根状茎腐烂病致病新种的分离鉴定[J]. 中国中药杂志, 2021, 46(21): 5606.
- [6] 方中达. 植病研究方法[M]. 3版. 北京: 中国农业出版社, 1998.
- [7] 张天宇. 中国真菌志. 第16卷. 链格孢属[M]. 北京: 科学出版社, 2003.

- [8] WOUDEBERG J H C, TRUTER M, GROENEWALD J Z, et al. Large-spored *Alternaria* pathogens in section *Porri* disentangled[J]. Stud Mycol, 2014, 79: 1.
- [9] WOUDEBERG J H C, TRUTER M, GROENEWALD J Z, et al. *Alternaria* section *Alternaria*: species, formae speciales or pathotypes? [J]. Stud Mycol, 2015, 82: 1.
- [10] LARKIN M A, BLACKSHIELDS G, BROWN N P, et al. Clustal W and Clustal X version 2.0[J]. Bioinformatics, 2007, 23: 2947.
- [11] HALL T A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT [J]. Nucleic Acids Symp, 1999, 41: 95.
- [12] DONG Z, FANGLUAN G, IVAN J, et al. PhyloSuite: an integrated and scalable desktop platform for streamlined molecular sequence data management and evolutionary phylogenetics studies [J]. Mol Ecol Resour, 2020, 20(1): 348.
- [13] WHITE T J, BRUNS T, LEE S, et al. PCR Protocols, a guide to methods and application. amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics [M]. New York: Academic Press, 1990: 315.
- [14] DANIEL P L, PHILIPP B G, TOBIN L P, et al. The sections of *Alternaria*: formalizing species-group concepts [J]. Mycologia, 2013, 105(3): 530.
- [15] BERBEE M L, PIRSEYEDI M, HUBBARD S. *Cochliobolus* phylogenetics and the origin of known, highly virulent pathogens, inferred from ITS and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene sequences [J]. Mycologia, 1999, 91(6): 964.
- [16] PEEVER T L, SU G, CARPENTER B L, et al. Molecular systematics of citrus-associated *Alternaria* species [J]. Mycologia, 2004, 96(1): 119.
- [17] 刘保财,陈菁瑛,张武君,等. 福建太子参紫纹羽病原鉴定及其生物学特性[J]. 中国中药杂志, 2023, 48(1): 45.
- [18] 何洁,梁霜,张国俊,等. 太子参叶斑病原鉴定及室内药剂筛选[J]. 南方农业学报, 2021, 52(8): 2124.
- [19] 王文青,李扬,向均,等. 我国梨产区引起黑斑病的链格孢种类鉴定与致病性研究[J]. 果树学报, 2020, 37(12): 1922.
- [20] 杨雅雯,陈巧环,周佳,等. 射干叶斑病原菌的鉴定、生物学特性及其有效杀菌剂研究[J]. 中国中药杂志, 2022, 47(22): 6042.
- [21] 杨婷,杨宽,何迟,等. 三七黑斑病病原菌 *Alternaria alternata* Keissl. 生物学特性研究[J]. 中药材, 2018, 41(4): 763.
- [22] 周佳,王铁霖,苗玉焕,等. 乌头黑斑病原菌的鉴定、生物学特性及其有效杀菌剂研究[J]. 中国中药杂志, 2022, 47(5): 1215.
- [23] 王宏,常有宏,陈志谊. 梨黑斑病原菌生物学特性研究[J]. 果树学报, 2006, 23(2): 247.

[责任编辑 吕冬梅]