

陈健鑫, 魏玉倩, 刘丽, 等. 云南油茶炭疽病菌的鉴定及生防菌筛选 [J]. 华南农业大学学报, 2022, 43(5): 43-53.
CHEN Jianxin, WEI Yuqian, LIU Li, et al. Identification of *Camellia oleifera* anthrax pathogens in Yunnan Province and screening of antagonistic bacteria[J]. Journal of South China Agricultural University, 2022, 43(5): 43-53.

云南油茶炭疽病菌的鉴定及生防菌筛选

陈健鑫¹, 魏玉倩¹, 刘 丽¹, 张东华¹, 马焕成², 伍建榕^{1,2}

(1 云南省高校森林灾害预警控制重点实验室/西南林业大学 生物多样性保护学院, 云南 昆明 650224; 2 西南地区生物多样性保育国家林业局重点实验室/西南林业大学 林学院, 云南 昆明 650224)

摘要:【目的】明确云南省德宏州、文山州和保山市油茶炭疽病菌的种类, 筛选具有良好拮抗效果的生防菌。【方法】本研究于 2019 和 2020 年 7—9 月进行了病害调查, 收集病叶标本, 采用组织分离法分离病原菌, 通过柯赫氏法则验证其致病性, 联合形态学与多位点序列分析鉴定病原菌种类。同时从健康油茶叶片内分离筛选内生拮抗菌, 并通过平板对峙法验证抑菌作用。【结果】云南省德宏州地区油茶炭疽病发生较严重, 平均发病率为 56.18%, 病情指数为 53.11, 云南省油茶炭疽病菌种类主要有 5 种, 分别是胶孢炭疽菌 *Colletotrichum gloeosporioides*、卡哈瓦炭疽菌 *C. kahawae*、喀斯特炭疽菌 *C. karstii*、松针刺盘孢 *C. fioriniae* 和暹罗刺盘孢 *C. siamense*。其中, 胶孢炭疽菌是优势病原菌, 菌株 CA17(暹罗刺盘孢) 在活体油茶叶片上的致病性最强。平板对峙培养结果表明, 采自德宏州健康油茶叶片的内生菌 *Streptomyces fulvissimus* 和 *Bacillus mojavensis* 对菌株 CA17 具有较好的拮抗作用, 抑菌率分别达到 37% 和 42%。【结论】本研究可为油茶炭疽病的诊断与绿色防控提供理论依据。

关键词: 油茶炭疽病; 内生拮抗菌; 多位点序列分析; 生物防治
中图分类号: S432.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1001-411X(2022)05-0043-11

Identification of *Camellia oleifera* anthrax pathogens in Yunnan Province and screening of antagonistic bacteria

CHEN Jianxin¹, WEI Yuqian¹, LIU Li¹, ZHANG Donghua¹, MA Huancheng², WU Jianrong^{1,2}

(1 Key Laboratory of Forest Disaster Warning and Control in Universities of Yunnan Province/College of Biodiversity Conservation, Southwest Forestry University, Kunming 650224, China; 2 Key Laboratory of Biodiversity Conservation in Southwest China, State Forestry Administration/College of Biodiversity Forestry, Southwest Forestry University, Kunming 650224, China)

Abstract: 【Objective】In order to identify the species of pathogens of *Camellia oleifera* anthrax in Dehong Prefecture, Wenshan Prefecture and Baoshan City of Yunnan Province, and screen their biocontrol bacterium. 【Method】Surveys of infected diseases were conducted from July to September in 2019 and 2020. Diseased leaf samples were collected. The pathogens were isolated by tissue isolation method, pathogenicity was verified by Koch's Postulation, and the pathogens were identified by morphology and multilocus sequence analysis. Meanwhile, endophytic bacteria were isolated and screened from the leaves of healthy *C. oleifera*, and the antibacterial effect was verified by plate confrontation method. 【Result】*C. oleifera* anthrax occurred seriously in Dehong Prefecture of Yunnan Province, with an average incidence rate of 56.18% and a disease index of

收稿日期:2022-01-05 网络首发时间:2022-06-16 15:45:19
网络首发地址:<https://kns.cnki.net/kcms/detail/44.1110.S.20220616.0959.002.html>
作者简介:陈健鑫, 硕士研究生, 主要从事森林病理学研究, E-mail: 535975299@qq.com; 通信作者: 伍建榕, 教授, 博士, 主要从事森林病理学及资源微生物利用研究, E-mail: 1176279044@qq.com
基金项目:国家自然科学基金(31860208); 国家重点研发计划(2019YFD100200X); 云南省教育厅科学研究基金(2021Y274, 2021Y240)

53.11. Five major strains were identified from Yunan Province including *Colletotrichum gloeosporioides*, *C. kahawae*, *C. karstii*, *C. fiorniae* and *C. siamense*. Among them, *C. gloeosporioides* was the dominant pathogen, and strain CA17 (*C. siamense*) had the strongest pathogenicity on living leaves of *C. oleifera*. The results of plate confrontation method indicated that *Streptomyces fulvissimus* and *Bacillus mojavensis* isolated from healthy *C. oleifera* in Dehong had good antagonistic effect on CA17, and the inhibition rates were 37% and 42% respectively. 【Result】 This study provides a theoretical basis for the diagnosis and green control of *Camellia anthrax*.

Key words: *Camellia oleifera* anthrax; Endophytic antagonistic bacteria; Multi locus sequence analysis; Biological control

油茶 *Camellia oleifera* 是一种重要的油料作物,在我国有长远的种植和栽培历史,被广泛地栽植于我国 14 个省(区),具有重要的经济价值。其种子含油率高,富含不饱和脂肪酸以及多酚、黄酮、原花青素等活性物质,是一种高质量、耐储存的健康食用油^[1-2];其活性化合物能调节血脂水平,降低脑血管疾病的发生。此外,油茶及其副产品是多种工业制品的原材料,其发酵物可制备绿色无公害农药^[3-4]。

单一品种油茶的集约化栽植、良种选育滞后及栽培管护技术落后均导致油茶病虫害发生严重,其中炭疽病的发生严重制约着云南省油茶产业的发展^[5]。炭疽病菌 *Colletotrichum* spp. 能侵染油茶幼嫩的器官,侵染初期组织表面出现较小的褐色斑点,随后出现轮纹状枯斑,后期病斑上着生轮状排列的黑色点状物(分生孢子盘),空气湿度大时病斑处可见分生孢子堆,严重时出现叶片早落、枝梢枯死及果皮开裂早落的症状^[6-7]。前期研究认为油茶炭疽病的病原菌为胶孢炭疽菌 *C. gloeosporioides*,随着病原学与分子生物学的深入研究,研究者们认为引起油茶炭疽病的病原存在多个种类^[8-9]。

几乎所有高等植物的多种组织中都普遍存在内生菌,内生菌在促进植物生长与提高植物抗逆性等方面具有重要的意义^[10]。芽孢杆菌 *Bacillus* 和链霉菌 *Streptomyces* 是报道最多的 2 类有益内生菌,均能显著抑制植物病原菌,同时能够减少因化学农药过度使用带来的负面生态影响^[11-12]。植物内生菌及其次生代谢产物在农林业有害生物控制和植物病害管理中具有较好的应用潜力。

本研究对云南省德宏州、文山州及保山市油茶种植区炭疽病的发生情况进行调查,联合形态学特征和多位点序列分析明确病原菌的种类,通过柯赫氏法则测定菌株对油茶的致病性,并通过分离健康油茶叶片内生菌筛选出具有拮抗效果的菌株,以期油茶炭疽病的绿色防控提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

2019 和 2020 年 7—9 月,在云南省德宏州、文山州及保山市油茶种植基地收集表现出典型炭疽病症状的病叶和健康油茶叶片,用自封袋保存带回实验室。

马铃薯琼脂固体培养基(PDA):马铃薯 200 g,葡萄糖 20 g,琼脂粉 20 g,蒸馏水 1 000 mL, pH=7.0;水酵母固体培养基(TWYE):酵母提取物 0.25 g, K₂HPO₄·7H₂O 0.5 g,琼脂粉 20 g,蒸馏水 1000 mL, pH=7.2;牛肉膏蛋白胨固体培养基(LB):胰蛋白胨 10 g,酵母提取物 5 g, NaCl 10 g,琼脂粉 20 g,蒸馏水 1 000 mL, pH=7.0。

1.2 油茶炭疽病病害调查

2019 和 2020 年的 7—9 月份对云南省德宏州、文山州和保山市的栽培油茶各进行 3 次炭疽病病害调查,每个地区调查 3 个主要种植区,各样区按五点采样法随机抽取 30 株油茶,每株油茶在 4 个方向各抽查 30 片叶片计算发病率,同时参考杨光道^[13]制定的分级标准(表 1)计算病情指数。

表 1 油茶炭疽病的分级标准
Table 1 Rated scale for disease severity of *Camellia oleifera* anthrax

病害级别	病叶率/%	代表数值
Disease rating	Percentage of diseased leaves	Representative value
I	0	0
II	(0, 10]	1
III	(10, 20]	2
IV	(20, 30]	3
V	(30, 100]	4

1.3 油茶炭疽病菌的分离及形态学鉴定

参照秦绍钊等^[6]的方法,采用常规组织分离法分离病原菌。剪取染病叶片病健交界处组织,经表面消毒后接种于 PDA 培养基平板,待菌丝生长后

重复纯化 3~5 次, 得到的纯菌株用 PDA 试管斜面于 4 ℃ 条件下保存备用。

采用玻片培养检视法观察油茶炭疽菌的形态特征。盖玻片灭菌后斜插入培养基平板, 供试菌接种于斜插片附近, 倒置培养 7~10 d 后拔出盖玻片, 使用光学显微镜 (尼康, 上海) 观察其形态特征。

采用徒手切片法观察染病部位炭疽菌的形态特征。将病症明显的病叶切成较薄的组织片并制成临时玻片标本, 通过光学显微镜观察病原菌的形态学特征。

1.4 油茶炭疽病菌的致病性测定

参照秦绍钊等^[6]的方法, 采用活体植物接种法验证病原真菌致病性。病原菌活化培养后用 5 mL 无菌水充分洗涤分生孢子, 调节其终浓度为 1×10⁶ mL⁻¹。健康油茶叶片用 φ 为 75% 乙醇轻轻擦拭表面并自然风干, 接种针灼烧后在叶片表面轻轻刺出伤口, 吸取 20 μL 孢子悬浮液接种至叶片伤口处, 空白对照接种无菌水, 5 次重复, 25 ℃ 条件下保湿培养 10 d, 每天观察并测量叶片的病斑面积, 进行数据统计分析。

1.5 油茶炭疽病菌的分子鉴定

采用基因组 DNA 提取试剂盒 (生工, 上海) 提取病原菌总 DNA, 提取后保存于-20 ℃ 冰箱备用。以真菌总 DNA 为模板扩增 ITS 片段、*ACT*、*TUB2*、*CHS-1*、*GAPDH* 和 *HIS3* 基因^[9], 所用引物见表 2。炭疽菌 ITS 片段的 PCR 反应条件: 94 ℃ 预变性 5 min 后; 94 ℃ 变性 30 s, 56 ℃ 退火 40 s, 72 ℃ 延伸 50 s, 循环 35 次; 最后 72 ℃ 延伸 10 min。其余基因片段的反应条件: 94 ℃ 预变性 5 min 后; 94 ℃ 变性 30 s, 52 ℃ 退火 30 s, 72 ℃ 延伸 30 s, 循环 35 次; 最后 72 ℃ 延伸 10 min。PCR 产物切胶纯化后送昆明硕擎生物科技有限公司测序, 利用 DNAMAN 8 将双向测通的序列拼接并提交到 NCBI 数据库比对, 利用 MEGA 6 中最大简约法 (Maximum-parsimony, MP) 同时通过 RAxML-HPC2 的最大似然法 (Maximum-likelihood, ML) 以 1 000 进行 Bootstrap 校验, 构建真菌系统发育树。

1.6 油茶叶片内生拮抗菌的分离及形态鉴定

将健康油茶的叶片用流水冲洗 20 min 后, 用超声波 (45 kHz) 清洗 10 min 去除表面灰尘及附着物, 然后进行常规表面消毒, 吸取 100 μL 最后一次清洗叶片的无菌水涂布于 LB 培养基平板, 以此检验表面消毒是否彻底。取 1.0 g 表面消毒后的叶片用 9 mL 无菌水充分研磨至匀浆状, 静止 10 min 后吸取上清液进行梯度稀释, 吸取 100 μL 各浓度梯度的悬浮液分别涂布于 TWYE 培养基平板 (添加制霉

表 2 本研究采用的引物
Table 2 Primers used in this study

基因	引物	序列 ¹⁾ (5'-3')
Gene	Primer	Sequence (5'-3')
ITS	ITS1	TCCGTAGGTGAACCTGCGG
	ITS4	TCCTCCGCTTATTGATATGC
<i>ACT</i>	ACT-512F	ATGTGCAAGGCCGGTTTCGC
	ACT-783R	TACGAGTCCTTCTGGCCCAT
<i>TUB2</i>	Btub2Fd	GTBCACCTYCARACCGGYCARTG
	Btub4Rd	CCRGAYTGRCCRAARACRAAGTTGTC
<i>CHS-1</i>	CHS-79F	TGGGGCAAGGATGCTTGGAAGAAG
	CHS-354R	TGGAAGAACCATCTGTGAGAGAGTTG
<i>GAPDH</i>	GDF1	GCCGTCAACGACCCCTTCATTGA
	GDR1	GGGTGGAGTCGTACTTGAGCATGT
<i>HIS3</i>	CYLH3F	AGGTCCACTGGTGGCAAG
	CYLH3R	AGCTGGATGTCCTTGGAAGT
16S rRNA	27F	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG
	1492R	GGTTACCTTGTTACGACTT

1) 简并位置的核苷酸由单一字母代替, 其中, B= C/G/T; Y=C/T; R=A/G

1) Nucleotide at degenerate positions is represented by a single letter code, B= C/G/T; Y=C/T; R=A/G

菌素 25 mg/L, K₂Cr₂O₇ 25 mg/L 和萘啶酮酸 25 mg/L) 放置吸收 1 h 后, 28 ℃ 条件下倒置培养 5~7 d, 同时涂布于 LB 培养基平板, 放置吸收后, 37 ℃ 条件下倒置过夜培养, 单菌落经 3~5 次纯化后接种于对应试管斜面 4 ℃ 冰箱保存备用。

采用玻片检视法观察内生放线菌的形态特征, 通过革兰染色法鉴定细菌类型并观察其形态特征。

1.7 油茶叶片内生拮抗菌的筛选

采用平板对峙法测定内生菌的抑菌效果。将供试病原菌及内生菌菌株活化培养, 调节供试内生菌悬浮液为 1×10⁴ cfu/mL, 用 6 mm 打孔器制取炭疽病菌菌丝块并接种于 PDA 平板的中央, 在距中央 2.5 cm 的两侧沾取内生菌悬浮液轻划 2 条细线, 静置 10 min 后于 28 ℃ 条件下倒置培养 5 d, 测量菌丝直径、计算抑菌率。

1.8 油茶叶片内生拮抗菌的分子鉴定

采用基因组 DNA 提取试剂盒 (生工, 上海) 提取内生菌总 DNA, 提取后保存于-20 ℃ 条件下备用。以细菌总 DNA 为模板扩增内生细菌的 16S rRNA 基因, PCR 反应条件: 94 ℃ 预变性 5 min 后; 95 ℃ 变性 30 s, 55 ℃ 退火 1 min, 72 ℃ 延伸 2 min, 循环 35 次; 最后 72 ℃ 延伸 10 min。双向测通的序列拼接并提交到 EzBioCloud 数据库进行比

对, 利用邻接法 (Neighbor jointing, NJ) 以 1 000 进行 Bootstrap 校验, 构建细菌系统发育树。

2 结果与分析

2.1 油茶炭疽病害调查

对 3 个地区油茶栽培地进行病害调查的结果表明, 人工栽植油茶炭疽病发生严重, 幼嫩的叶片、枝条和果实症状明显, 病斑灰白色至褐色, 表面轮生黑色点状物, 发病严重时叶片大面积枯死

并早落; 染病的小枝出现椭圆形病斑, 后期病斑开裂, 绕枝延伸 1 周后枝条枯死脱落; 染病幼果初期产生圆形病斑, 随后病斑延伸并产生轮状黑色点状物, 后期果皮开裂, 果实早落 (图 1)。定点调查结果表明, 德宏州的油茶炭疽病发生较为严重, 平均发病率为 56.18%, 病情指数为 53.11, 文山州油茶炭疽病病情较轻, 平均发病率为 43.99%, 病情指数为 42.01, 保山地区油茶炭疽病平均发病率为 53.65%, 病情指数为 47.19(表 3)。



A、B: 染病叶片; C、D: 染病幼果; E: 染病小枝
A and B: Infected leaves; C and D: Infected fruits; E: Infected twigs

图 1 油茶炭疽病症状表现

Fig. 1 Symptoms of *Camellia oleifera* anthrax

表 3 云南省 3 个地区油茶炭疽病害调查结果¹⁾
Table 3 Investigation results of *Camellia oleifera* anthrax in three areas of Yunnan Province

采样地 Sampling spot	发病率/% Incidence rate	病情指数 Disease index
德宏州 Dehong Prefecture	56.18±0.32a	53.11±0.18a
文山州 Wenshan Prefecture	43.99±0.31c	42.01±0.15c
保山市 Baoshan City	53.65±0.20b	47.19±0.23b

1) 同列数据后的不同小写字母表示差异显著 ($P < 0.05$, Duncan's 法)

1) Different lowercase letters of the same column indicate significant difference ($P < 0.05$, Duncan's test)

2.2 油茶炭疽病菌的分离及形态鉴定

从油茶染病叶片上共分离得到 82 株真菌, 通过菌落形态及玻片检视初步鉴定出 11 株炭疽菌。菌株 CA01、CA02、CA07、CA11、CA13 和 CA14 的形态学特征如图 2 所示, 在 PDA 培养基上, 菌丝初期为白色, 后逐渐加深为墨绿色, 绒毛状, 边缘整齐, 气生菌丝较发达, 绒毛状。分生孢子单孢, 无色, 长椭圆形, 具 1~2 个油球, $13.5\sim15.5\text{ }\mu\text{m}\times$

$4.5\sim5.9\text{ }\mu\text{m}$ 。光镜下可见少量附着胞, 浅棕色, 球形、棒形至不规则形, $8.2\sim9.5\text{ }\mu\text{m}\times5.5\sim6.3\text{ }\mu\text{m}$, 结合王玉春^[5]的描述, 初步确定上述 6 株菌属于胶孢炭疽菌复合种 (*C. gloeosporioides* complex)。

由图 3A 可见, 在 PDA 培养基上, 菌株 CA17 菌落初期为白色, 后期变为浅墨绿色, 背面乳白色至浅黄色, 有气生菌丝, 绒毛状, 边缘整齐。分生孢子单孢, 无色, 纺锤形质长椭圆状, 两端钝圆, 中心常可见明显的油滴, $14.2\sim16.5\text{ }\mu\text{m}\times4.9\sim5.1\text{ }\mu\text{m}$ 。光镜下可见附着胞, 卵圆形至不规则状, 褐色至黑褐色, 结合王玉春^[5]的描述, 菌株 CA17 可鉴定为暹罗炭疽菌 *C. siamense*, 属于 *C. gloeosporioides* complex。

由图 3B 可见, 在 PDA 培养基上, 菌株 CA21 菌落初期白色, 后期气生菌丝发达, 毯状, 出现鲜艳的橘红色至粉红色, 菌落背面橘红色至粉色, 菌落表面可见橘色分生孢子堆, 分生孢子单孢, 无色, 纺锤形至卵圆形, 光滑, $11.2\sim15.5\text{ }\mu\text{m}\times3.1\sim5.2\text{ }\mu\text{m}$ 。光镜下可见有隔菌丝, 未见附着胞形成, 结合王玉春^[5]的描述, 菌株 CA21 可鉴定为 *C. fioriniae*, 属于尖胞炭疽菌复合种 (*C. acutatum* complex)。

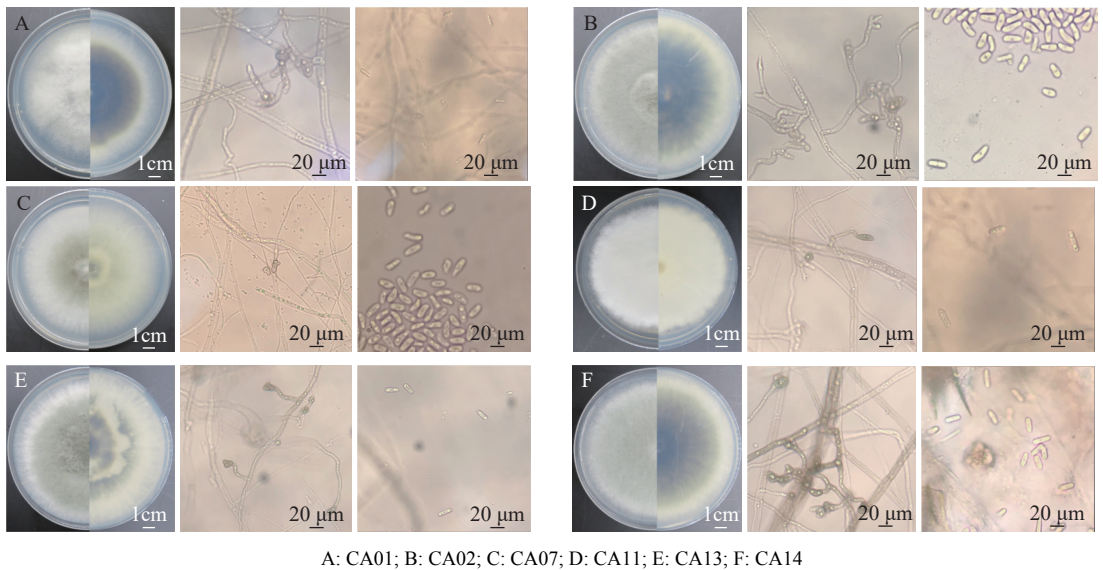


图 2 胶孢炭疽菌复合种各菌株在 PDA 培养基上的形态学特征

Fig. 2 Morphological characteristics of *Colletotrichum gloeosporioides* complex strains on the PDA medium

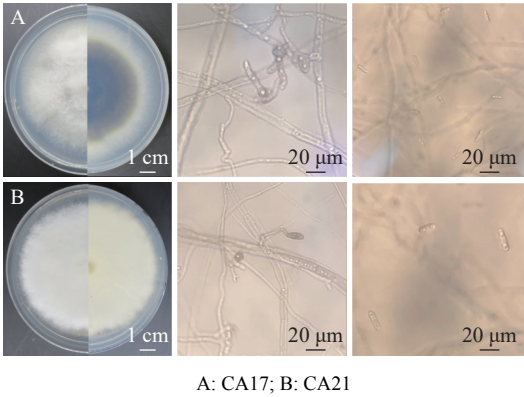


图 3 暹罗炭疽菌与松针炭疽菌菌株在 PDA 培养基上的形态学特征

Fig. 3 Morphological characteristics of *Colletotrichum siamense* and *C. fiorinae* on the PDA medium

在 PDA 培养基上, 菌株 CA05、CA09 和 CA23 菌落初期白色, 后加深至墨绿色, 略呈同心轮纹状, 气生菌丝较发达, 致密的毯状, 中央略凸起, 菌落背面浅橘色。分生孢子单孢, 透明, 纺锤形, $11.2\sim18.8\ \mu\text{m}\times3.3\sim5.5\ \mu\text{m}$ 。光镜下未见附着胞, 可见菌丝常纠结和缠绕形成较复杂的结构 (图 4), 结合王玉春^[5] 的描述, 上述 3 株菌可鉴定为博宁炭疽菌复合种 (*C. boninese* complex) 中的 *C. karstii*。

通过徒手切片观察染病叶片病斑处的显微结构, 可见病斑处的叶片组织褐色, 易碎, 病原菌分生孢子盘暗褐色, 半埋生于叶片组织内, 周围有刚毛或无刚毛, 刚毛暗色, 分生孢子着生在分生孢子梗上, 分生孢子无色, 单胞, 长椭圆形或短棒形 (图 5)。

2.3 油茶炭疽病菌的致病性测定

活体油茶接种病原菌保湿培养 10 d 后结果表

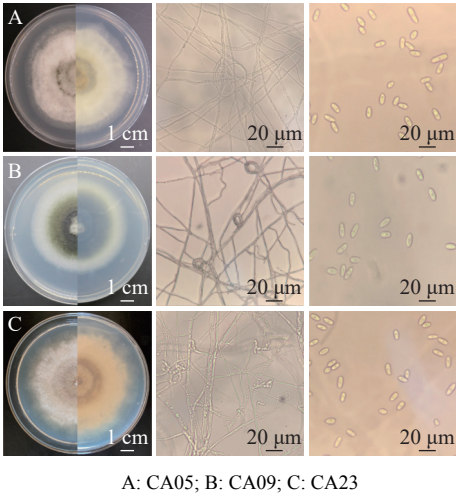
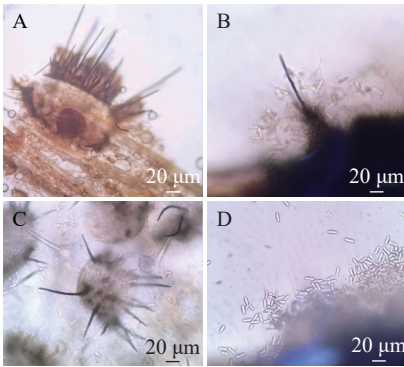


图 4 喀斯特炭疽菌菌株在 PDA 培养基上的形态学特征

Fig. 4 Morphological characteristics of *Colletotrichum karstii* on the PDA medium



A: 分生孢子盘; B: 分生孢子和刚毛; C: 分生孢子盘和分生孢子; D: 分生孢子

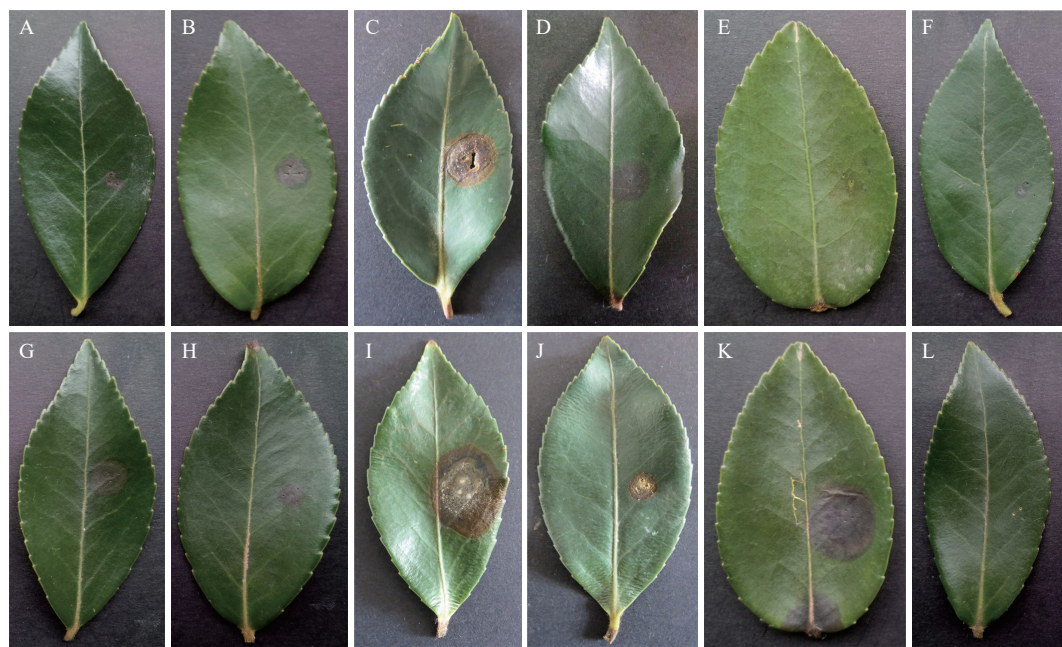
A: Acervulus; B: conidium and bristles; C: Acervulus and conidium; D: Conidium

图 5 染病部位炭疽菌的形态特征

Fig. 5 Morphological characteristics of *Colletotrichum* on the lesion

明, 各炭疽菌对油茶叶片均有致病性, 但致病力存在差异。接种后的 3 d 油茶叶片开始表现症状, 出现水渍状圆形病斑, 5 d 后病斑面积扩大且颜色变深。菌株 CA01 (图 6A), CA09 (图 6E), CA11 (图 6F)

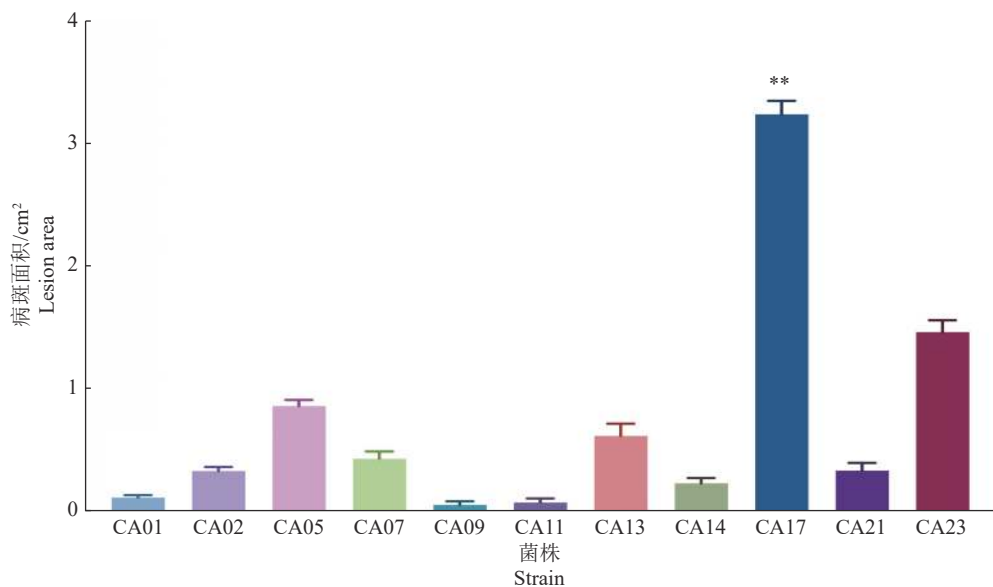
和 CA14 (图 6H) 病斑较小, 扩展较慢, 致病力较弱, 接种 10 d 后测量病斑, 结果表明菌株 CA17 (图 6I) 对油茶的致病力较强, 叶片病斑最大, 且与其他菌株差异显著 (图 7)。



A~K 分别表示菌株 CA01、CA02、CA05、CA07、CA09、CA11、CA13、CA14、CA17、CA21 和 CA23; L: 对照
A~K indicate strains of CA01, CA02, CA05, CA07, CA09, CA11, CA13, CA14, CA17, CA21 and CA23 respectively, L is the control

图 6 炭疽菌致病性验证

Fig. 6 Pathogenicity assay of *Colletotrichum*



“**” 表示与其他菌株差异显著 ($P < 0.05$, Duncan’s 法)
“***” indicates significant difference between CA17 and other strains ($P < 0.05$, Duncan’s test)

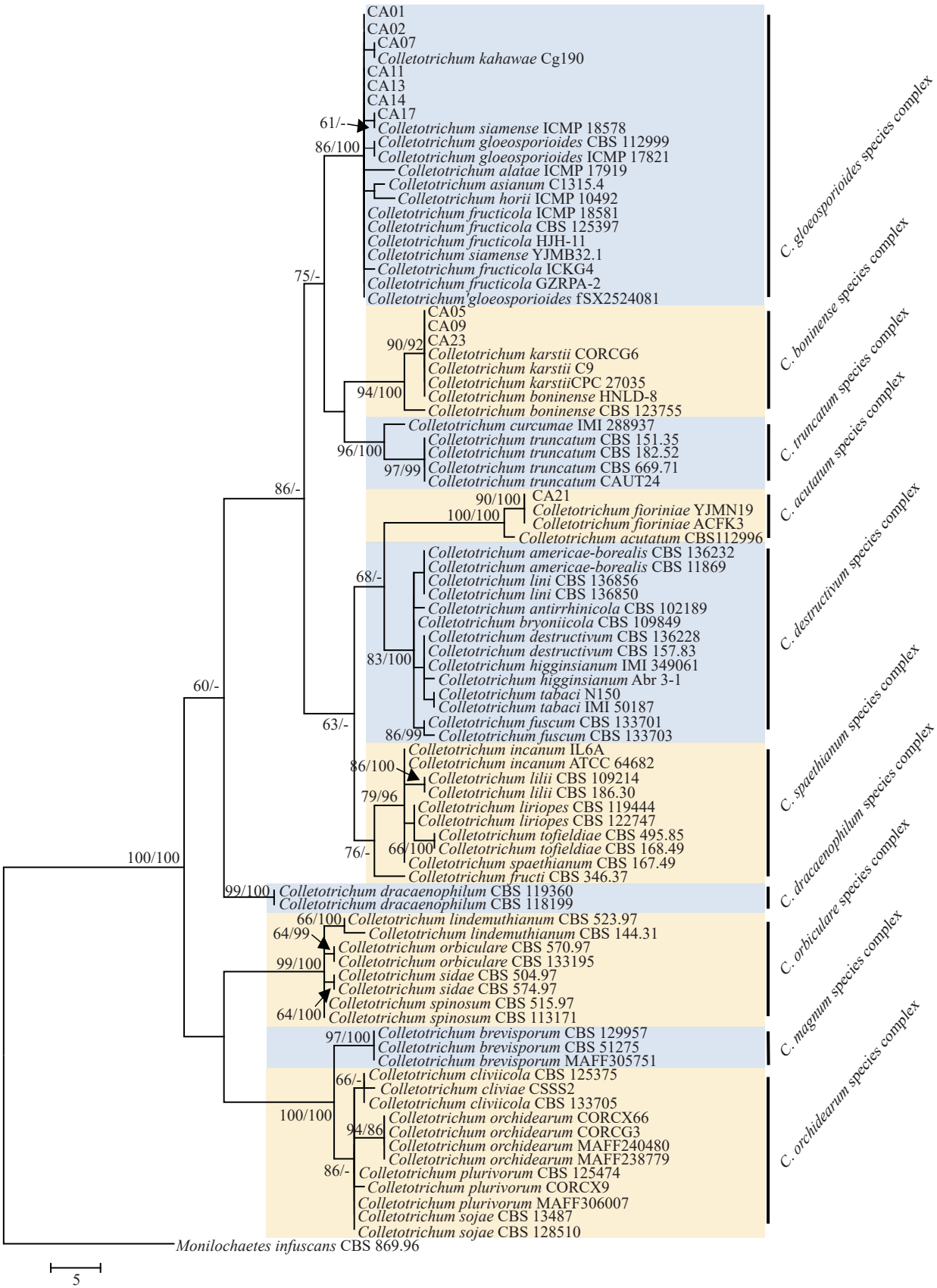
图 7 接种炭疽菌菌株 10 d 后的病斑面积

Fig. 7 Lesion area for 10 days after inoculation with *Colletotrichum*

2.4 油茶炭疽病菌的分子鉴定

以病原菌总 DNA 为模板分别扩增 ITS 序列 (700 bp)、*ACT*(300 bp)、*TUB2*(500 bp)、*CHS-1*(300 bp)、*GAPDH*(300 bp) 和 *HIS3*(450 bp) 基因片段, 基

于多基因片段串联序列构建的油茶炭疽病菌系统发育树 (图 8) 结果表明, CA01、CA02、CA07、CA11、CA13、CA14 和 CA17 并在胶孢炭疽菌复合种的进化支内且支持率较高, 结合形态学特征将



分支显示最大简约校验大于 50% 及最大似然大于 70% 的数值, 比例尺表示每个位点的预期更改数

Branches are labeled with maximum parsimony bootstrap proportions higher than 50% and maximum likelihood bootstrap higher than 70%, and the scale bar indicates the number of expected changes per site

图 8 基于多位点序列构建炭疽病菌的系统发育树

Fig. 8 Phylogenetic tree based on multilocus sequence of *Colletotrichum* spp.

菌株 CA01、CA02、CA11、CA13 和 CA14 鉴定为胶孢炭疽菌 *C. gloeosporioides*, 菌株 CA07 鉴定为卡哈瓦炭疽菌 *C. kahawae*, 菌株 CA17 鉴定为暹罗刺盘孢 *C. siamense*。菌株 CA05、CA09 和 CA23 处于博宁炭疽复合种的进化支内, 且与喀斯特炭疽菌 *C. karstii* 聚为一进化支, 结合形态特征将其鉴定为喀斯特炭疽菌 *C. karstii*。菌株 CA21 位于尖孢炭疽菌复合种进化支, 与松针刺盘孢 *C. fioriniae* 聚为一支, 结合形态学结果鉴定为松针刺盘孢 *C. fioriniae*。

2.5 油茶叶片内生拮抗菌的分离及形态鉴定

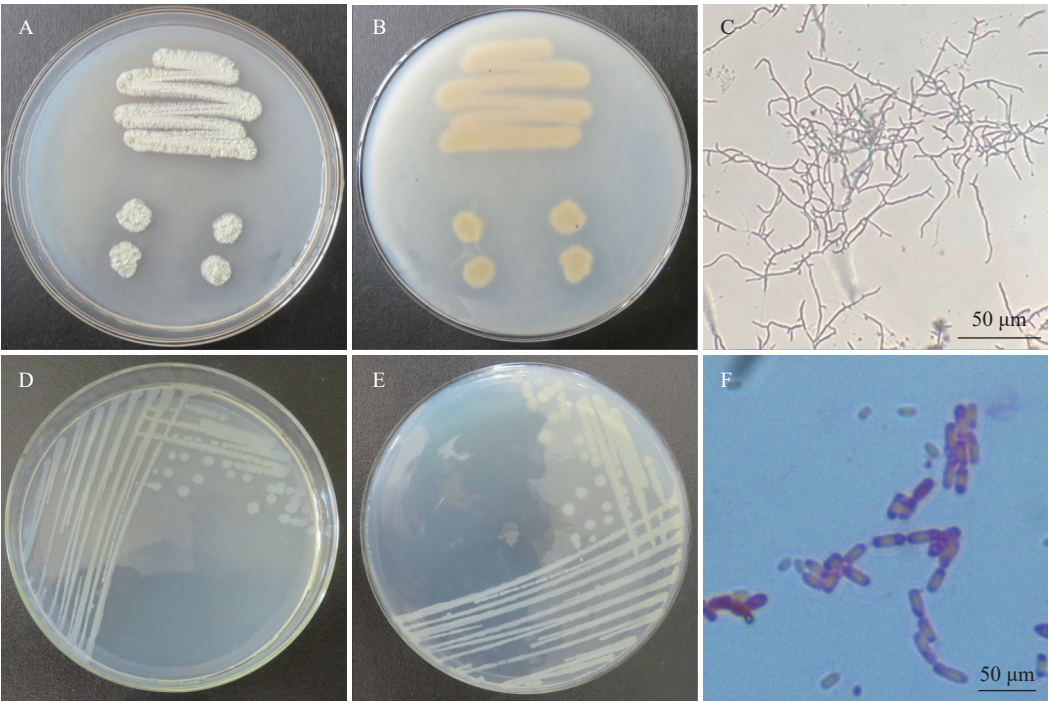
通过 TWYE 和 LB 培养基从健康油茶叶片内共分离出 19 株内生放线菌和 27 株内生细菌, 且

涂布最后一次清洗叶片的无菌水未长出菌落, 说明表面消毒彻底, 上述 46 株细菌均属于油茶叶片内生菌。

通过菌落与显微形态观察结果表明, 菌株 BC07 为链霉菌, 菌落致密, 干燥且不透明, 后期菌落上产生晶莹粉状物, 白色至浅绿色, 有特殊的气味, 光镜下可见发达的菌丝体, 淡色, 弯曲, 分枝较多 (图 9A~9C)。菌株 BC11 为芽孢杆菌, 菌落白色至浅黄色, 表面光滑, 镜检为革兰阳性菌, 可见芽孢 (图 9D~9F)。

2.6 油茶叶片内生拮抗菌的筛选

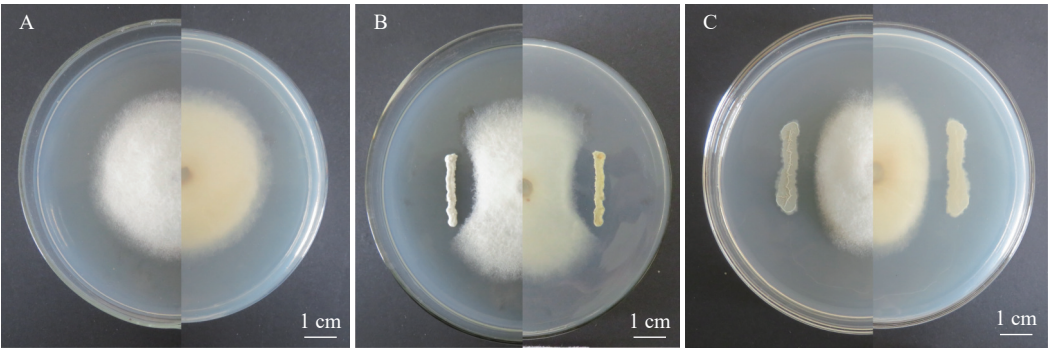
以油茶炭疽菌 CA17 为指示菌 (图 10A), 通过平板对峙培养 5 d, 筛选到 2 株内生细菌具有较宽



A-C 为生长在 TWYE 培养基上的菌株 BC07; D-F 为生长在 LB 培养基上的 BC11 菌株
A-C represent strain BC07 growing on medium TWYE, B-F represent strain BC11 growing on medium LB

图 9 内生拮抗菌的形态特征

Fig. 9 Morphological characteristics of antagonistic endophytic bacteria



A: CA17 (CK); B: BC07; C: BC11

图 10 内生拮抗细菌与菌株 CA17 平板对峙结果

Fig. 10 Confrontation effect of antagonistic endophytic bacteria against strain CA17

的抑菌带, 菌株 BC07 的平均抑菌率为 37%(图 10B), 菌株 BC11 的抑菌效果较好, 平均抑菌率为 42%(图 10C)。

2.7 油茶叶片内生拮抗菌的分子鉴定

内生细菌 16S rRNA PCR 扩增可获得约 1 500

bp 的特异性片段, 基于 16S rRNA 构建的系统发育树结果表明, BC07 与 *Streptomyces fulvissimus* (LC551891) 相似性最高 (图 11A), BC11 与 *Bacillus mojavensis*(JH600280) 序列相似性最高 (图 11B), 结合形态学特征确定了菌株的亲缘关系。

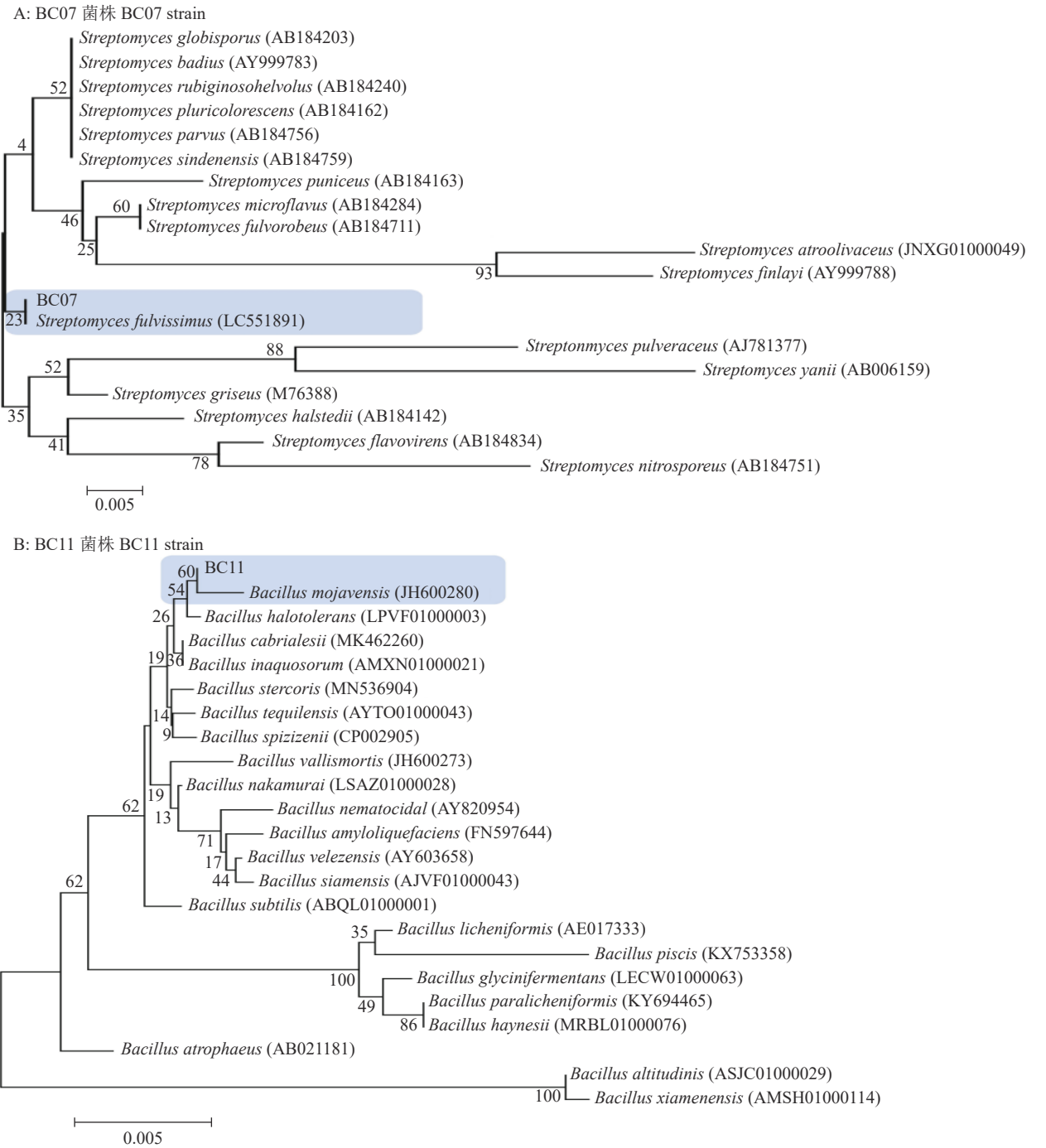


图 11 基于 16S rRNA 构建内生拮抗菌的系统发育树

Fig. 11 Phylogenetic tree based on 16S rRNA sequence of antagonistic endophytic bacteria

3 讨论与结论

随着分子生物学的快速发展, 从分子水平揭示菌株的差异和亲缘关系, 使得分类和鉴定变得更加

准确。核糖体 RNA(rRNA) 序列分析、DNA 碱基组成 [(G+C) mol%], 限制性片段长度多态性 (RFLP)、随机扩增多态性 DNA(RAPD) 在真菌种级分类研究中有重要的作用。对某些近缘种来说, ITS 片

段差异不大,利用 ITS 单基因序列对炭疽菌构建的系统发育树自展支持率不高,仍然不能准确地区分亲缘关系较近的种,对于炭疽菌的复合种就更加无法提供足够的支持率和区分度^[14-15]。Carbone 等^[16]设计了蛋白基因的通用引物并用于丝状真菌的系统发育研究中,后续的研究中一些具有足够分辨率的基因序列被广泛的关注,如 *ACT*、*TUB2*、*CAL*、*GHS-1*、*GS* 和 *GAPDH* 等基因^[17-19]。Liu 等^[9]学者在中国常见炭疽菌分子系统学最新研究报告中指出,基于 ITS 序列能将炭疽菌鉴定至复合种水平,但相近复合种与复合种内部物种的更准确地区分仍需要基于多位点的联合分析,该研究中多基因片段串联构建的系统发育树及全基因组特征分析的结果证实,*ACT*、*TUB2*、*CAL*、*GHS-1*、*GS* 和 *GAPDH* 联合分析能有效区分 *acutatum*、*destructivum*、*orchidearum*、*truncatum* 和 *boninense* 等复合种,但 *gloeosporioides* 复合种的准确区分还需要依据 *ApMat* 和 *GS* 2 个位点的串联分析。

本研究通过形态学特征及多位点序列联合构建系统发育树,经分析发现,胶孢炭疽菌 *C. gloeosporioides* 是云南省油茶炭疽病的主要病原菌,也是被广泛证实的油茶炭疽病的病原,但之前的研究普遍是基于 ITS 的单一片段分析,加之 NCBI 中无效序列的存在,导致很多胶孢炭疽菌的近缘种类未能得到准确区分^[5]。暹罗刺盘孢 *C. siamense* 作为 *gloeosporioides* 复合种已在包括油茶在内的多种植物上被报道,因其形态多变,分类单元一直有争议,刘威^[18] 和李河等^[20] 的研究证实了 *C. siamense* 在茶属植物中的存在,菌株 CA17 与 *C. siamense* 聚为一小进化支共同聚在 *gloeosporioides* 复合种进化支内,菌株 CA07 在形态上与帅小春等^[21] 描述的菌株形态特征相似,在系统发育树中与 *C. kahawae* 聚为一支,也共同聚在 *gloeosporioides* 复合种进化支内,因此,在后续的研究中还需依据 *ApMat* 和 *GS* 2 个位点对鉴定做进一步地完善^[5, 9]。松针刺盘孢 *C. fioriniae* 之前被认为是尖孢炭疽菌 *C. acutatum* 的变种,刘威^[18] 报道了该种在我国福建和云南等地的山茶属植物中存在,秦绍钊等^[22] 等报道了该种在贵州省的油茶中存在,并通过 *ACT-GAPDH* 串联进行分子鉴定。本研究构建的多基因系统发育树中, *C. fioriniae* 与 *C. acutatum* 位于不同的 2 个分支共聚为 *acutatum* 复合种进化支。喀斯特炭疽菌 *C. karstii* 可危害多种植物,刘威^[18] 和王玉春^[5] 在我国福建省、江苏省、湖南省及云南的临沧地区报道了茶树上的 *C. karstii*, 本研究在云南油茶上报了 *C.*

karstii, 与 Sharma 等^[23] 的报道相吻合,该种属于博宁炭疽菌复合种。

作为一个稳定的微生态环境,植物能被多种内生菌定殖,其中,厚壁菌门 (Firmicutes)、放线菌门 (Actinobacteria)、 α - β - γ -变形菌门 (α - β - γ -proteobacteria) 和拟杆菌门 (Bacteroidetes) 被认为是内生菌的优势类群^[24]。内生菌与致病菌的区别在于内生菌在宿主植物的生长过程中发挥着重要的作用,其中促生和抗逆作用是目前的研究热点。有报道指出由微生物产生的抗生素近一半由放线菌产生,其中链霉素、氯霉素和四环素等广泛应用于农林业及临床等领域。Golinska 等^[11] 对植物内生放线菌的功能进行综述,结果表明内生放线菌包含了超过 20 个天然产物合成基因簇,其中 *pks* 基因和 *nrps* 基因是被报道最多的 2 类基因家族,大多数内生链霉菌属菌株能产生抗菌化合物抑制植物病原物的生长。陈东波等^[25] 在分离西双版纳 3 种有毒植物内生放线菌的同时检测了 *pks*、*nrps*、*aph* 和 *cyp* 等 7 个化合物合成基因,从基因角度验证内生放线菌产生次生代谢物的能力。芽孢杆菌是被广泛证实和应用的防控植物病害的生物制剂,通过占据生态位、营养竞争、分泌细菌素及水解酶等次生代谢物抑制或杀死病原菌,或激活植物的防御系统抵抗病原菌的侵入^[26-27]。Malik 等^[28] 报道了 *S. fulvissimus* 分泌的抗菌蛋白对金黄色葡萄球菌等革兰阳性菌有抑制作用,王颖等^[29] 报道了马铃薯内生细菌 *Bacillus mojavensis* 发挥拮抗作用的同时能稳定地定殖于植物体内,且不影响土壤微生态中微生物群落的稳定。宏基因组学技术的快速发展为研究微生物群落结构及宿主与微生物相互关系提供了新的思路^[30]。在后续试验中,可通过培养组、基因组与代谢组联用的方式阐述健康油茶与染病油茶根系内的差异菌株,筛选出高效拮抗菌,分析拮抗菌的作用靶标及活性成分的代谢途径。

本研究首次对云南 3 个地区的栽培油茶进行炭疽病的调查,其中,德宏州的炭疽病发生较重,保山市次之,文山州发病较轻,结合形态学特征与多位点序列分析结果表明,云南省油茶炭疽病菌有 5 种,分别为胶孢炭疽菌 *C. gloeosporioides*、卡哈瓦炭疽菌 *C. kahawae*、喀斯特炭疽菌 *C. karstii*、松针刺盘孢 *C. fioriniae* 和暹罗刺盘孢 *C. siamense*。通过柯赫氏法则验证病原菌致病性结果表明,菌株 CA17 暹罗刺盘孢 *C. siamense* 的致病力较强。同时,以强致病菌 CA17 为指示菌筛选到 2 株拮抗效果较好的内生菌,分别为 BC07 (*S. fulvissimus*) 和

BC11 (*B. mojavensis*)。本研究可为油茶炭疽病的田间诊断、病原鉴定及其绿色防控提供依据。

参考文献:

[1] HE X S, XU L C, PAN C, et al. Drought resistance of *Camellia oleifera* under drought stress: Changes in physiology and growth characteristics[J]. *PLoS One*, 2020, 15(7): e0235795. doi: 10.1371/journal.pone.0235795.

[2] 贺义昌, 吴妹杰, 董乐, 等. 主产区浙江红花油茶籽仁含油率及脂肪酸组成变异分析[J]. *经济林研究*, 2020, 38(3): 37-45.

[3] 王羚, 方学智, 杜孟浩, 等. 超临界 CO₂ 萃取对油茶饼中油脂品质及茶皂素理化特性影响的研究[J]. *中国油脂*, 2020, 45(8): 109-114.

[4] ZHAO Y, SU R Q, ZHANG W T, et al. Antibacterial activity of tea saponin from *Camellia oleifera* shell by novel extraction method[J]. *Industrial Crops and Products*, 2020, 153: 112604. doi: 10.1016/j.indcrop.2020.112604.

[5] 王玉春. 中国茶树炭疽菌系统发育学研究及茶树咖啡碱抗炭疽病的作用[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2016.

[6] 秦绍钊, 张柱亭, 王洪, 等. 贵州油茶炭疽病 *Colletotrichum kahawae* 病原鉴定研究[J]. *现代园艺*, 2020(4): 6-7.

[7] 张莉, 赵兴丽, 张金峰, 等. 茶树炭疽病病原菌的分离与鉴定[J]. *贵州农业科学*, 2018, 46(11): 36-39.

[8] 李河, 李司政, 王悦辰, 等. 油茶苗圃炭疽病原菌鉴定及抗药性[J]. *林业科学*, 2019, 55(5): 85-94.

[9] LIU F, MA Z Y, HOU L W, et al. Updating species diversity of *Colletotrichum*, with a phylogenomic overview[J]. *Studies in Mycology*, 2022, 101: 1-56. doi: 10.31110/sin.2022.101.01.

[10] ULRICH K, ULRICH A, EWALD D. Diversity of endophytic bacterial communities in poplar grown under field conditions[J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 2008, 63(2): 169-180.

[11] GOLINSKA P, WYPIJ M, AGARKAR G, et al. Endophytic actinobacteria of medicinal plants: Diversity and bioactivity[J]. *Antonie Van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology*, 2015, 108(2): 267-289.

[12] 殷辉, 周建波, 吕红, 等. 枯草芽孢杆菌 LF17 与甲基硫菌灵协同防治苹果树腐烂病的效果研究[J]. *中国果树*, 2021(1): 28-32.

[13] 杨光道. 油茶品种对炭疽病的抗性机制研究[D]. 合肥: 安徽农业大学, 2009.

[14] 李河, 李杨, 蒋仕强, 等. 湖南省油茶炭疽病原鉴定[J]. *林业科学*, 2017, 53(8): 43-53.

[15] 向梅梅, 张云霞, 刘霄. 炭疽菌属真菌分类的研究进展[J]. *仲恺农业工程学院学报*, 2017, 30(1): 59-66.

[16] CARBONE I, KOHN L M. A method for designing

primer sets for speciation studies in filamentous ascomycetes[J]. *Mycologia*, 1999, 91(3): 553-556. doi: 10.1080/00275514.1999.12061051.

[17] 陈潇航. 菩提树炭疽病的病原种类鉴定以及防治研究[D]. 南宁: 广西大学, 2018.

[18] 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.

[19] 王薇. 苹果炭疽叶枯病病原学及苹果炭疽病侵染来源研究[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2017.

[20] 李河, 周国英, 徐建平. 一种新油茶炭疽病原多基因序列鉴定[J]. *植物保护*, 2015, 41(2): 92-96.

[21] 帅小春, 阮成江, 熊朝伟, 等. 油茶炭疽病新致病菌 *Colletotrichum kahawae* 的多基因序列鉴定[J]. *分子植物育种*, 2019, 17(18): 5939-5945.

[22] 秦绍钊, 洪之国, 王建伟. 贵州油茶炭疽病 *Colletotrichum fioriniae* 病原鉴定研究[J]. *福建茶叶*, 2019, 41(8): 3.

[23] SHARMA G, SHENOY B D. Multigene sequence-based identification of *Colletotrichum cymbidiicola*, *C. karstii* and *C. phyllanthi* from India[J]. *Czech Mycology*, 2013, 65(1): 79-88.

[24] REINHOLD-HUREK B, HUREK T. Living inside plants: Bacterial endophytes[J]. *Current Opinion in Plant Biology*, 2011, 14(4): 435-443.

[25] 陈东波, 柳成宾, 姜怡, 等. 来自西双版纳 3 种有毒植物的免培养与纯培养放线菌多样性及生物活性[J]. *微生物学通报*, 2018, 45(5): 1100-1111.

[26] FARACE G, FERNANDEZ O, JACQUENS L, et al. Cyclic lipopeptides from *Bacillus subtilis* activate distinct patterns of defense responses in grapevine[J]. *Molecular Plant Pathology*, 2015, 16(2): 177-187.

[27] YE W Q, SUN Y F, TANG Y J, et al. Biocontrol potential of a broad-spectrum antifungal strain *Bacillus amyloliquefaciens* B4 for postharvest loquat fruit storage[J]. *Postharvest Biology and Technology*, 2021, 174: 111439. doi: 10.1016/j.postharvbio.2020.111439.

[28] MALIK H, SUR B, SINGHAL N, et al. Antimicrobial protein from *Streptomyces fulvissimus* inhibitory to methicillin resistant *Staphylococcus aureus*[J]. *Indian Journal of Experimental Biology*, 2008, 46(4): 254-257.

[29] 王颖, 杨成德, 薛莉, 等. 拮抗内生细菌 *Bacillus mojavensis* ZA1 在马铃薯根内及根际的定殖动态及其对土壤微生物的影响[J]. *中国生物防治学报*, 2016, 32(3): 372-378.

[30] KATO S, YAMAGISHI A, DAIMON S, et al. Isolation of previously uncultured slow-growing bacteria by using a simple modification in the preparation of agar media[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2018, 84 (19). doi: 10.1128/aem.00807-18.