

蝴蝶兰灰霉病菌的分离鉴定

董 平, 赵培宝, 任爱芝

(聊城大学 农学院, 山东 聊城 252059)

摘 要:对蝴蝶兰灰霉病菌进行了分离、纯化,并采用分子生物学手段对病原菌核糖体 ITS 序列进行了扩增和分析。结果表明:该灰霉菌的有性态和无性态分别与 GenBank 中报道的富克尔核盘菌(*Botryotinia fuckeliana*)、灰葡萄孢菌(*Botrytis cinerea*)同源性均达到 99.8%,结合形态学特征确定蝴蝶兰灰霉病病原菌为富克尔核盘菌,无性态为灰葡萄孢菌。

关键词:蝴蝶兰;灰霉病;ITS;鉴定

中图分类号:S 682.31 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2014)04-0109-03

蝴蝶兰(*Phalaenopsis amabilis*)属兰科蝴蝶兰属植物,因其花形似蝶而得名。其株型优美、花姿优雅、花色丰富、色彩绚丽,在兰花中素有“兰花皇后”之美誉,具有极高的观赏价值和经济价值^[1-2]。近年来,蝴蝶兰越来越受到人们的喜爱,尤其是在国内的年宵花卉市场上。蝴蝶兰的栽培面积和栽培区域也随之扩大,导致蝴蝶兰病害也大量发生,严重时全株枯萎或者死亡,影响蝴蝶兰的工厂化生产^[3]。灰霉病是蝴蝶兰上常见的真菌病害,在我国南北方花圃时有发生,在早春或秋冬出现发病高峰,主要危害蝴蝶兰的花器、叶片,严重时花瓣变褐腐烂,严重影响其观赏价值^[4]。

目前国内外关于兰花灰霉病的研究主要集中在症状及防治上^[5],而有关病原鉴定的研究多集中在病原菌形态学方面。为了明确蝴蝶兰灰霉病菌的种类及分类地位,该试验从蝴蝶兰上分离纯化出其病原菌,并利用

形态学和分子生物学的手段对病原菌进行鉴定,以期为该病害的防治奠定理论基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

蝴蝶兰灰霉病菌采自聊城市农科院生物工程中心蝴蝶兰生产基地。供试蝴蝶兰苗龄 100~200 d。分离获得的菌种保存于聊城大学农学院实验室。

1.2 试验方法

1.2.1 病原菌的分离与纯化 将蝴蝶兰灰霉病的病组织用组织分离法^[6]进行分离和纯化至获得纯菌种。将所获得的菌株进行单孢分离^[7],进一步纯化后接种于 PDA 斜面培养基上,待菌落长到合适的程度后于 4℃ 冰箱保存备用。配置纯化的病原菌菌种的孢子悬浮液,并使其浓度为 1×10^6 cfu/mL。选取长势一致的蝴蝶兰健株,将孢子悬浮液喷洒到蝴蝶兰叶片上,然后用塑料袋包好叶片,并在袋内喷适量的水,22℃ 下保湿培养。观察发病症状,并与田间发病症状相比较,若症状一致则分离的菌种即为蝴蝶兰灰霉病的致病菌;若症状不同则重新分离。

1.2.2 病原菌培养性状及形态观察 将分离纯化的菌种接到 PDA 上,生长 4 d 后,用打孔器取菌落边缘长势一致的菌饼,接种到定量 15 mL 的 PDA 培养基上,观察

第一作者简介:董平(1986-),女,硕士研究生,研究方向为园林有害生物治理。E-mail:zixinzzuimeili@163.com.

责任作者:赵培宝(1969-),男,副教授,硕士生导师,研究方向为植物病害生物防治。E-mail:zhaopeibao@lcu.edu.cn.

基金项目:国家“863”计划资助项目(2011AA090704);山东省中青年科学家基金资助项目(2009B5B01454)。

收稿日期:2013-11-11

Abstract: Taking some cucumber and melon varieties as material, by disease resistant component analysis, the resistance to downy mildew was studied. The results showed that some cucumber varieties, such as ‘Tangshanqiugua 606’, ‘Shuiguoxing 101’ (Tangshanqiugua), ‘Jizaoguamanjia’, ‘Jinyan No. 4’, and ‘Lybao No. 2’, some melon varieties, such as ‘Chuntianshidai’ and ‘Gaotangjinyu’, were slightly susceptible and showed relatively small disease spots, less number of disease spots and fewer sporangia produced. Others cucumber varieties, such as ‘Jiza No. 4’ and ‘Mapihuang’, and melon varieties, such as ‘Ruyi’, and ‘Jintianjiamei’ were the highest susceptible and showed relatively bigger lesion, larger number of disease spots and more sporangia production.

Key words: cucumber; melon; *Pseudoperonospora cubensis*; disease resistance

菌落生长速度、形态、颜色等。挑取菌落制片观察菌丝、分生孢子、分生孢子梗等形态特征。

1.2.3 病原菌 rDNA-ITS 序列分析 采用 CTAB 法^[8]提取基因组 DNA,选择真菌核糖体 rDNA-ITS 序列通用引物 ITS1(5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3')和 ITS4(5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3')进行 PCR 扩增。PCR 反应体系为 25 μ L,其组分为:DNA 模板 2 μ L,10 \times PCR 缓冲液 2.5 μ L,10 mmol/L dNTPs 2.0 μ L,10 μ M 引物 ITS1 1.5 μ L,10 μ M 引物 ITS4 1.5 μ L,5 U/ μ L Taq 酶 0.5 μ L,ddH₂O 15 μ L。PCR 反应程序为:95 $^{\circ}$ C 预变性 3 min;95 $^{\circ}$ C 变性 30 s,52 $^{\circ}$ C 退火 1 min,72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min,32 个循环;最后 72 $^{\circ}$ C 继续延伸 10 min,电泳检测后送上海生物工程公司测序。测得序列在 GenBank 中进行 BLAST 分析。选取相关菌株的 ITS 序列,用 Clustal X1.8.1 程序进行多序列比对,用 MEGA 5.0 构建系统发育树。

2 结果与分析

2.1 蝴蝶兰灰霉病病害症状

蝴蝶兰灰霉病主要危害蝴蝶兰花器、花瓣、萼片,有时也危害叶片和茎。自然条件发病如图 1 所示。花瓣及萼片上发病,首先出现水浸状半透明的小点,逐渐扩大形成 2~3 mm 褐色至深褐色圆形病斑,有时病斑周围有白色或粉色霉层产生,严重时花瓣变黑腐烂。危害叶片时,主要从叶片边缘发病,初期在叶背形成水渍状小点,后叶背产生一层黏稠物质,2~3 d 后黏状物及周围产生黑色霉层。条件恶劣时在病部长出菌核。花梗染病初产生水渍状小点,后扩大呈圆形或长椭圆形,病斑略下陷,待病斑扩大至绕茎 1 周时,花朵凋亡。

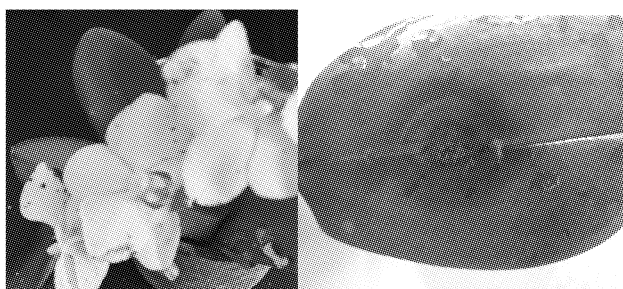


图 1 蝴蝶兰灰霉病症状

Fig. 1 Symptoms of *Botrytis cinerea* in *Phalaenopsis*

2.2 病原菌培养形状及形态

将该病原菌于 PDA 培养基上 22 $^{\circ}$ C 培养 24 h,发现有乳白色簇状菌丝长出,向四周辐射状延伸,菌落呈圆形,7 d 后长满培养皿($\phi=9$ cm)。随培养时间延长,菌落逐渐变为灰褐色。后期培养有时可见片状菌核,菌核大小不一,在(1.0~3.5)mm \times (1.8~4.5)mm 之间。菌丝有隔,不规则分支,分支处有隘缩。分生孢子梗散生

不集结为孢子束或分生孢子座,分支末端膨大。分生孢子单生,着生于分生孢子梗末端膨大的体表面,外观呈葡萄串状。分生孢子与分生孢子梗均无色。

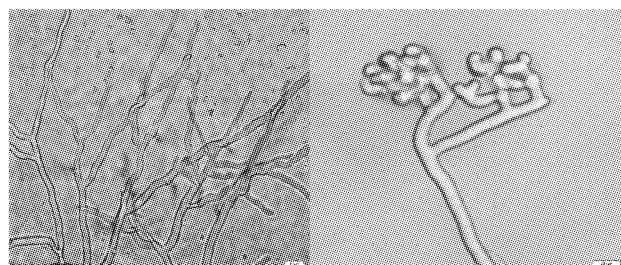


图 2 病原菌菌丝及分生孢子

Fig. 2 Hyphae and spores of the pathogens

2.3 病原菌 rDNA-ITS 序列分析

由图 3 可知,以病原菌有性态菌核和无性态菌丝的 DNA 为模板扩增出预期的真菌核糖体 ITS 片段,经测序证实其为真菌核糖体 ITS 特异片段。经 BLAST 分析显示,其与灰葡萄孢菌(*Botrytis cinerea*)和富克尔核盘菌(*Botryotinia fuckeliana*)几株真菌序列相似性均较高。基于 ITS 序列,选取与分离病原菌亲缘关系最近的菌株构建系统发育树,以 *Trichoderma pseudokoningii* 作为系统发育树的外群。由图 4 可知,有性态和无性态菌株与 GenBank 中已报道的 *Botryotinia fuckeliana*、*Botrytis elliptica* 和 *Botrytis cinerea* 亲缘关系较近,其中有性态菌株与富克尔核盘菌(*Botryotinia fuckeliana*)同源性达到 99.8%,无性态菌株与灰葡萄孢菌(*Botrytis cinerea*)同源性达到 99.8%。综合形态学特征确定蝴蝶兰灰霉病致病菌有性态是富克尔核盘菌(*Botryotinia fuckeliana*),属于子囊菌亚门柔膜菌目;无性态为灰葡萄孢菌(*Botrytis cinerea*),属于半知菌亚门丝孢目。

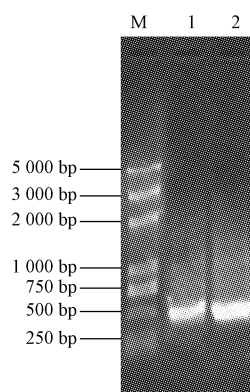


图 3 蝴蝶兰灰霉病菌 ITS 扩增结果

注:M;DL 2 000 plus marker;1:有性态;2:无性态。

Fig. 3 ITS amplification results of *Botrytis cinerea* in *Phalaenopsis*

Note: M;DL 2 000 plus marker; 1; Sexual state; 2; Anamorphic.

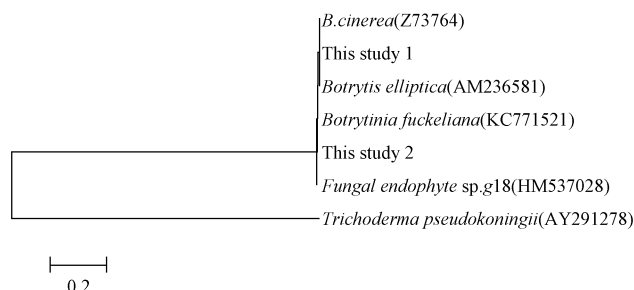


图4 分离菌株和亲缘关系相近菌株 ITS 序列的系统发育树

Fig. 4 Phylogenetic tree on ITS sequence of isolated strains and genetic relationship close strains

3 讨论

灰霉病是一种世界性的真菌病害,在露地、保护地作物上常有发生且比较难防治,属低温高湿型病害^[9]。病原菌腐生性强,寄主范围广泛,能危害多种植物,尤其在经济作物上发病严重^[10]。近年来,随着花卉市场的发展,花卉种植面积的扩大,灰霉病在花卉上的发生也渐趋严重,例如,在玫瑰、芍药、蝴蝶兰、凤仙花、非洲菊、海棠等^[11-13]均有发生,严重影响了园艺植物的观赏价值和经济价值^[14]。

对于病原菌的鉴定,现有报道结果多是从菌落形态、分生孢子等形态学角度进行鉴定,但真菌种类繁多,且形态特征易受培养条件等的影响,故鉴定时存在一定误差,真核生物的 DNA 组成具有遗传稳定性,ITS 常被用于真菌分类鉴定及系统分类学研究。该研究基于分子生物学手段结合形态特征对其病原菌进行了鉴定,结果更可靠。

参考文献

- [1] 谢启鑫,缪南生,宋小民,等. 蝴蝶兰种质资源遗传多样性的 ISSR 分析[J]. 西北植物学报, 2010, 30(7): 1331-1336.
- [2] 胡松华. 热带兰花[M]. 北京: 中国林业出版社, 2002: 45-46.
- [3] 谭巍. 蝴蝶兰常见真菌、细菌性病害及防治措施[J]. 北方园艺, 2006 (2): 128-129.

- [4] 易绮斐,刘东明,陈红峰,等. 兰花主要病害及其防治[J]. 植物保护, 2004(1): 71-72.
- [5] 孟祥东,傅俊范,周如军,等. 保护地主要园艺作物灰霉病菌生物学特性比较研究[J]. 沈阳农业大学学报, 2007, 38(3): 322-326.
- [6] Celik M. Preparation and characterization of starch poly methacrylamide copolymers[J]. J Polym Res, 2006, 13(5): 427-432.
- [7] 周德庆,祖若夫. 真菌单孢子分离的一种简易方法[J]. 微生物通报, 1979, 6(2): 35-36.
- [8] Hirata T, Cunningham J H, Paksiri U, et al. Evolutionary analysis of subsection Magnocellular of *Podospheera* section *Sphaerotheca* (Erysiphales) based on the rDNA internal transcribed spacer sequences with special reference to host plants[J]. Can J Bot, 2000, 78: 1521-1530.
- [9] 徐森富. 番茄灰霉病的发生与防治措施[J]. 中国园艺文摘, 2011(6): 128-129.
- [10] 黄亚丽,王淑霞,杜晓哲,等. 一株具有诱导抗性木霉菌株的筛选及其对黄瓜灰霉病诱导抗性的初步研究[J]. 植物保护, 2013, 39(1): 38-43.
- [11] 刘耕春,程霞英,王万立,等. 花卉灰霉病病原及发病特点[J]. 天津农业科学, 2004(2): 44-46.
- [12] 张宏伟,顾俊杰,石达祺. 东方百合灰霉病防治[J]. 中国花卉园艺, 2009(24): 34-35.
- [13] 瞿友均,徐源辉. 百合灰霉病的发生特点和综合防治方法[J]. 中国植保导刊, 2010(4): 26-27.
- [14] 易绮斐,刘东明,陈红峰,等. 兰花主要病害及其防治[J]. 植物保护, 2004(1): 71-73.

Isolation and Identification of *Botrytis cinerea* in *Phalaenopsis*

DONG Ping, ZHAO Pei-bao, REN Ai-zhi

(College of Agriculture, Liaocheng University, Liaocheng, Shandong 252059)

Abstract: The pathogen of *Botrytis cinerea* in *Phalaenopsis* were isolated and purified, and pathogen ribosomal DNA internal transcribed spacer region were amplified and sequenced with molecular biology methods. The results showed that the sequence of ITS for the pathogen shared 99. 8% homology with that of *Botrytinia fuckeliana* and *Botrytis cinerea* in GenBank. Combined with morphological characteristics, the pathogen was identified as *Botrytinia fuckeliana*, anamorphic was *Botrytis cinerea*.

Key words: *Phalaenopsis*; *Botrytis cinerea*; ITS; identification