

DOI:10.11937/bfyy.201505038

甜瓜炭疽病病原菌鉴定

黄 婷¹, 龚玲玲², 蒋军喜¹, 王园秀³

(1. 江西农业大学 农学院, 江西 南昌 330045; 2. 江西省贵溪市林业局, 江西 贵溪 335400;

3. 江西农业大学 生物科学与工程学院, 江西 南昌 330045)

摘 要:以南昌郊蛟桥镇甜瓜基地的甜瓜炭疽病病果为试材,采用致病性测定、形态学观察和分子生物学的方法,研究了甜瓜炭疽病病原归属。结果表明:黄瓜炭疽病病原菌形态具典型炭疽菌属类真菌 *Colletorichum orbiculare* 的特征,GPDH 基因序列与 NCBI-GenBank 中已有的 *C. orbiculare* 序列同源性为 100%,接种发病症状与自然发病症状类似,因此将该病原菌鉴定为瓜类刺盘孢(*Colletorichum orbiculare*)。

关键词:甜瓜;炭疽病;病原鉴定;瓜类刺盘孢

中图分类号:S 436.5 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2015)05-0132-03

甜瓜(*Cucumis melo* L.)属葫芦科黄瓜属一年生草本植物,具消暑热、利小便、除湿、退黄疸等功效,且富含多种营养元素,是一种重要的经济水果作物。甜瓜作为江西省的特色瓜果作物之一,在南昌市被广泛推广种植。2014 年该课题组对南昌市郊蛟桥镇甜瓜病害调查后发现了一种新的甜瓜炭疽病害,该病害主要危害果实,发病严重时超过 50%,给瓜农带来了严重的经济损失,阻碍了南昌甜瓜产业的发展。对此,现通过病原菌分离、致病性测定、形态学鉴定和病原菌 GPDH^[1] 基因序列比对分析,对该病害的病原菌进行鉴定研究,以期明确该病害的病原归属,为后续对该病害的研究和病害防治提供参考。

1 材料与方法

1.1 试验材料

甜瓜炭疽病新鲜病样采于南昌郊蛟桥镇甜瓜基地,采回后立即进行相关的病原菌分离。

1.2 试验方法

1.2.1 病症观察 2014 年 7—8 月在南昌郊蛟桥镇甜瓜基地观测记录甜瓜果实炭疽病症状。

1.2.2 病原菌分离纯化 采用常规组织分离法对病斑进行分离纯化培养^[2]。用 70%酒精对病果表面进行擦拭消毒;无菌条件下切去病健交界表皮组织,用灭菌的镊子挑取 3 mm 大小的病变组织移入 PDA 平板中,置于 25℃

恒温培养箱中黑暗培养;待长出纯的新菌落后,挑取边缘菌落进行纯化,获得纯培养,并适时观测和镜检记录病菌的形态学特征;斜面甘油保存菌种于 4℃冰箱备用。

1.2.3 致病性测定 采用菌丝块接种方法对离体的健康甜瓜果实进行刺伤接种。将直径为 5 mm 的适龄菌落菌饼菌丝面紧贴经刺伤消毒的甜瓜表面,设空白 PDA 基块为对照,每处理 5 次重复,接种后用无菌湿棉球进行保湿后置 25℃恒温培养箱,逐日观测发病情况,并对接种发病甜瓜进行病原菌再分离。

1.2.4 病原菌 GPDH 基因序列分析 参照 CTAB 法^[2]提取甜瓜炭疽病病原菌基因组 DNA。采用 GDF1 和 GDR1 引物对(GDF1 5'-GCCGTCAACGACCCCTTCATTGA-3'/GDR1 5'-GGGTGGAGTCGTACTTGAGCATGT-3'由上海生物工程有限公司合成)对基因组 DNA 的 GPDH 序列进行扩增,反应在 50 μL 体系中进行,10 pmol/μL GDF1/GDR1 引物各 1 μL,2×Taq PCR MasterMix 25 μL,模板 DNA 2 μL,dd H₂O 21 μL,混匀后按 94℃预变性 3 min,94℃变性 30 s,60℃退火 30 s,72℃延伸 1 min,共 35 个循环,最后 72℃延伸 10 min 程序进行 PCR 扩增。扩增产物测序委托上海生物工程有限公司进行。测序结果与 NCBI-GenBank 中已有序列进行同源性比较,并利用 MegA 5.2 软件中的邻位加入法(neighbor-joining,NJ)构建系统发育树。

2 结果与分析

2.1 发病症状

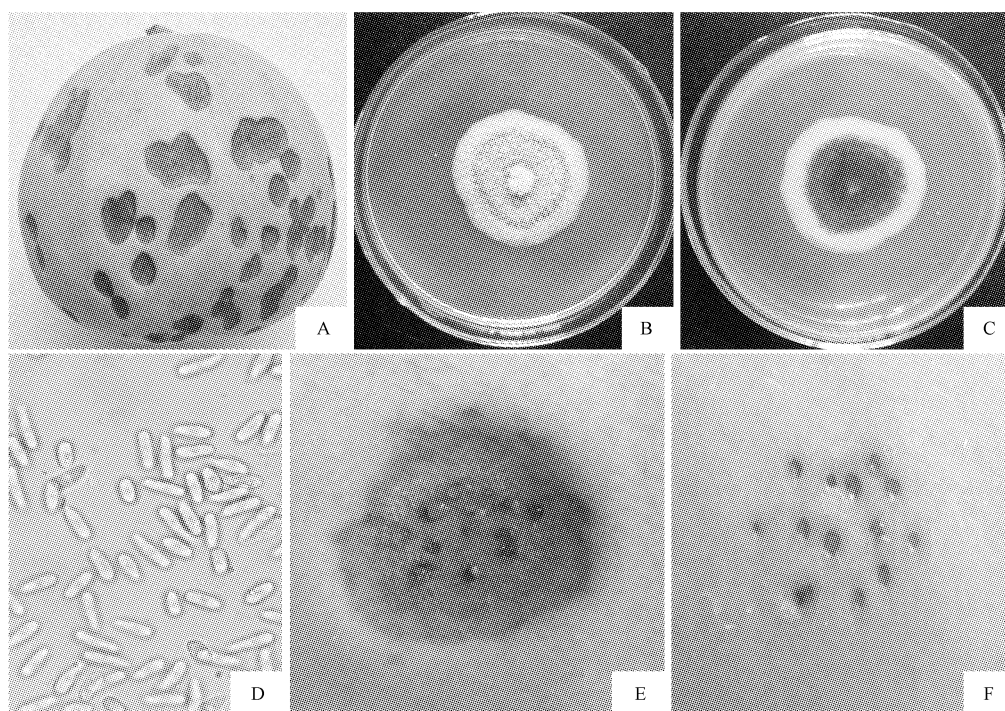
果实发病初期病斑呈淡绿色水渍状,后期病斑呈褐色圆形或椭圆形,凹陷龟裂,其上着生黑色小点,湿度较大时可看到明显的粉红色粘稠物,严重时病斑连片,果实腐烂(图 1-A)。

第一作者简介:黄婷(1989-),女,硕士,研究方向为分子植物病理学。E-mail:jxfzncht@126.com

责任作者:蒋军喜(1964-),男,博士,教授,现主要从事植物病害综合治理等研究工作。E-mail:jxau2011@126.com

基金项目:江西省教育厅科学技术研究资助项目(GJJ13269)。

收稿日期:2014-11-10



注:A:田间甜瓜果实症状;B~C:瓜类刺盘孢在PDA上25℃培养5d后的菌落特征(B:菌落正面图;C:菌落背面图);D:分生孢子(×400);E~F:接种6d后果实发病症状(E:接种处理;F:对照处理)。

Note: A: Symptoms in the field; B-C: Colony characteristics of *C. orbiculare* on PDA at 25°C after 5 days (B: Front; C: Reverse); D: Conidia (×400); E-F: Symptom of inoculated fruit after 6 days (E: Treatment; F: Control).

图1 甜瓜炭疽病症状及病菌形态

Fig. 1 Disease symptoms and morphology of pathogen causing anthracnose of muskmelon

2.2 菌落形态特征

分离纯化后比较发现所获得的各菌株形态特征一致,在PDA平板菌落边缘光滑灰白色,中间暗褐色,菌丝绒毛状(图1-B,C)。培养6d后可观测到平板中央有附着橘红色的黏孢团。分生孢子为长椭圆形、长卵形,无色,单胞,两端钝圆,大小 $(12.46 \sim 20.53) \mu\text{m} \times (3.89 \sim 5.03) \mu\text{m}$ (图1-D)。根据病原菌其形态特征,初步将该病原菌鉴定为瓜类刺盘孢(*Colletotrichum orbiculare* (Rerk & Mont) Arx),暂用TGTG表示。

2.3 致病性测定

致病性测定结果表明,刺伤接种4d后,接菌果实开始发病,初期果皮表面呈现橘色水渍状病斑,而后慢慢扩大,凹陷,其上着生许多小黑点(图1-E),空白对照不表现出发病症状(图1-F),对接种发病甜瓜再次进行病原菌分离,分离到与接种菌一致的病原菌。

2.4 病原菌GPDH基因序列分析

利用引物GDR1/GDF1对病原菌GPDH基因序列进行PCR扩增,扩增产物经测序去除两端引物后获得大小为240 bp片段(GenBank No. KM436081),经与NCBI-GenBank中已有序列Blast分析比对后发现该菌株的TGTG的序列与*Colletotrichum orbiculare* (GenBank No. KF178489)和*C. orbiculare* (GenBank No. KF178494)相似

性最高,均为100%。再以*Glomerella acutata*为GPDH系统发育树的外群,以邻近的相关同源序列比较分析构建系统发育树。由图2聚类分析结果可知,各炭疽菌都有其独立的分支,而该菌株与*Colletotrichum orbiculare*在同一分支上,且其同源性为100%,因此,根据同源性和系统发育结果将该病原菌鉴定为*Colletotrichum orbiculare*。

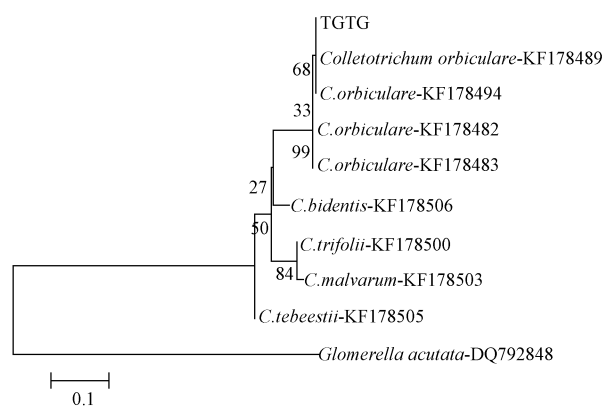


图2 基于GPDH基因序列构建的*Colletotrichum orbiculare*及该属其它真菌的系统发育树

Fig. 2 Phylogenetic tree based on glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene of *Colletotrichum orbiculare* and other related fungi

3 结论与讨论

甜瓜炭疽病是甜瓜上普遍发生的一种真菌性病害,而目前尚未明确该病害的病原物的归属,仅有关葫芦科炭疽病的病原为 *Colletotrichum lagenarium*^[3]、*Glomerella magna*^[4] 的相关报道。该研究通过常规组织分离法从南昌蛟桥镇甜瓜基地甜瓜上分离得到 10 个病原菌分离株,经菌落培养观察发现其与已报道的瓜类刺盘孢的形态特征一致。分离到的病原菌经致病性测定,其发病症状与田间发病症状一致。利用基因 *GPDH* 区段序列对分离菌进行了扩增并将其进行测序。经 Blast 比对表明,该病原菌的序列与 *Colletotrichum orbiculare* 的同源性为 100%,结合形态学和分子生物学鉴定结果,确定引起甜瓜炭疽病的病原为 *Colletotrichum orbiculare* (Berk and Mont)Arx。

该试验对甜瓜炭疽病的病原进行了鉴定,为了进一步明确甜瓜炭疽病的发生规律以及合理有效的防治该病害的发生,接下来课题组将就其生物学特性,药剂防治等方面开展相关工作。

参考文献

- [1] John C G, Liu B, James C C, et al. Characterization of diversity in *Colletotrichum acutatum sensu lato* by sequence analysis of two gene introns, mtDNA and intron RFLPs, and mating compatibility[J]. Mycologia, 2003, 95(5): 872-895.
- [2] 方中达. 植物研究方法[M]. 2 版. 北京: 农业出版社, 1979.
- [3] Kuan C P, Wu M T, Huang H C, et al. Rapid detection of *Colletotrichum lagenarium* causal agent of anthracnose of cucurbitaceous crops by PCR and Real-time PCR[J]. Journal of Phytopathology, 2011, 159 (4): 276-282.
- [4] Tsay J G, Chen R S, Wang W L, et al. First report of anthracnose on cucurbitaceous crops caused by *Glomerella magna* in Taiwan[J]. Plant Disease, 2010, 94(6): 787.

Identification of the Pathogen Causing Anthracnose of Melon (*Cucumis melo* L.)

HUANG Ting¹, GONG Ling-ling², JIANG Jun-xi¹, WANG Yuan-xiu³

(1. School of Agricultural Sciences, Jiangxi Agricultural University, Nanchang, Jiangxi 330045; 2. Agricultural Bureau of Guixi County, Guixi, Jiangxi 335400; 3. College of Biology Science and Engineering, Jiangxi Agricultural University, Nanchang, Jiangxi 330045)

Abstract: Taking the disease melon of anthracnose from Jiaoqiao town in Nanchang for test material, the pathogen was identified by the study of morphology, pathogenicity, cultural feature and the sequence of *GPDH*. The results showed that the sequence of *GPDH* of isolate NCBI showed a sequence identity of 100% with *C. orbiculare* published in GenBank. The vaccination symptoms was similar to the filed symptoms, so the fungus was identified as *C. orbiculare*.

Keywords: melon (*Cucumis melo* L.); anthracnose; identification; *Colletotrichum orbiculare*

桃树梨小食心虫为害的防治方法

知识窗

1. 为害特征: 梨小食心虫主要以幼虫为害桃树新梢。雌虫产卵于桃新梢中部叶片的背面, 幼虫孵化后, 多从桃梢顶端第 2、3 片叶的基部蛀入, 向下蛀食, 蛀空外有粪便排出。受害新梢常流出大量树胶, 梢顶端的叶片现萎缩, 然后新梢干枯下垂, 此时幼虫多已转移。1 头幼虫可以为害 2~3 个新梢。梨小食心虫为害桃树, 对定植后当年的幼树影响较大, 应加以防治。

2. 发生规律: 梨小食心虫在我国北方地区, 如河北、辽宁 1 年发生 3~4 代, 以老熟幼虫在树干翘皮缝中结茧越冬。来年 4 月上旬开始化蛹。第 1、2 代(5、6、7 月份) 幼虫主要为害桃树的新梢, 第 3 代成虫主要转移到梨果实上产卵为害。

3. 防治方法: 一是诱杀成虫: 利用糖醋液的果醋, 装入罐中挂在桃树上诱杀成虫。二是剪除虫梢: 当顶梢 1~2 片叶凋萎时, 及时剪除被害顶梢, 集中处理, 消灭幼虫。三是喷洒农药: 从 5 月上旬开始, 根据性诱剂预测, 当遇到成虫数量连续几天突然增加, 应及时喷洒 50% 杀螟松乳剂 1 000 倍液, 或马拉松乳剂 500 倍液。40% 水胺硫脲 1 500 倍液、20% 杀灭聚酯 2 000 倍液。

(来自中国农业技术网)