

猕猴桃枝枯病原菌鉴定

李 诚¹, 蒋军喜¹, 冷建华², 李帮明², 余 强², 涂贵庆²

(1. 江西农业大学 农学院, 江西 南昌 330045; 2. 江西省奉新县农业局, 江西 奉新 330700)

摘 要:通过病原菌的形态特征、致病性测定和 rDNA-ITS 序列分析, 对引起猕猴桃枝枯病的病原菌进行了分离鉴定。结果表明:猕猴桃枝枯病的主要病原菌为拟茎点霉菌(*Phomopsis* sp.)、隔孢丛壳菌(*Glomerella septospora*)和葡萄座腔菌(*Botryosphaeria dothidea*), 3 种病菌所占比率分别为 39%、38%和 23%, 且无论是孢子悬浮液接种还是菌丝体接种均只能通过伤口侵染而引起枝条发病。

关键词:猕猴桃枝枯病; 拟茎点霉菌; 隔孢丛壳菌; 葡萄座腔菌

中图分类号:S 663.4 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2013)24-0130-04

猕猴桃(*Actinidia chinensis*)原产于我国, 是深受人们喜爱的浆果类水果之一, 是一种重要的经济水果作物。目前全球已有 30 多个国家和地区种植猕猴桃, 猕猴桃自 20 世纪 70 年代开始在江西奉新县进行品种选育和人工栽培以来, 经过 40 余年的发展, 到目前为止已发展成为奉新县最具优势的特色产业。近年随着奉新猕猴桃产业的不断发展, 种植面积不断扩大, 其病害问题也日益突出, 如猕猴桃果腐病、炭疽病、灰霉病等已成为制约奉新猕猴桃产业发展的主要障碍。然而自 2011 年以来, 奉新猕猴桃园区又出现了一种未曾重视过的新病害, 病情不断加重和扩大, 严重制约着猕猴桃产业的发展, 因该病害主要发生在往年修剪后的枝条上, 造成修剪后的枝条从修剪口开始大面积枯死, 故将此病害称之为猕猴桃枝枯病。由于该病害或类似病害在我国猕猴桃上尚鲜见报道, 在国外报道也相对较少, 且在不同国家和地区对该病害所报道的鉴定结果也存在较大差异, 所以给该病害的防治工作带来了较大的困难。为明确奉新猕猴桃枝枯病的病原种类, 以便制定出具有针对性的防治方案, 为更有效地开展防治工作和对该病害后续的研究奠定科学的理论基础, 课题组通过对致病病原物进行分离, 结合形态学特征、分子生物学鉴定和致病性测定等方法对奉新猕猴桃枝枯病开展相关的鉴定研究, 现将相关的研究报道如下。

第一作者简介:李诚(1988-), 男, 硕士研究生, 研究方向为分子植物病理学。E-mail:licheng20070242@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研究工作。

基金项目:江西省教育厅科学技术研究资助项目(GJJ13269); 科技部国际科技合作资助项目(200DFA31050)。

收稿日期:2013-09-16

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试病样均采自江西省奉新县山口猕猴桃基地, 供试猕猴桃品种为“金魁”。

供试培养基为 PDA 培养基(马铃薯 200 g, 琼脂 20 g, 葡萄糖 20 g, 蒸馏水 1 000 mL)。

1.2 试验方法

1.2.1 病原菌的分离培养 从江西奉新山口猕猴桃基地采集具有典型枝枯病症状的 80 个猕猴桃枝条, 并采用常规分离法逐一单个进行病菌分离^[1], 分离后置 25℃ 培养箱中培养 72 h 后对所分离到的病菌进行纯化培养, 跟踪观测菌落形态和颜色变化, 适时镜检测量孢子大小, 拍照记录其结果, 并斜面甘油保存菌种, 置 4℃ 冰箱备用。

1.2.2 致病性测定 按照 Koch's 法则要求, 对离体的枝条进行接种^[1]。剪取长约 8 cm 相对幼嫩的健康枝条, 剪切口两端用石蜡封口, 并用 75% 的酒精棉球进行表面擦拭消毒, 供接种用。具体方法如下: 孢子悬浮液接种: 用无菌水配制浓度约为 $10^5 \sim 10^6$ 个/mL 的孢子悬浮液, 配好后用棉球蘸取至棉球湿度适宜后对枝条接种部位进行包裹保湿接种, 设无菌湿棉球包裹保湿接种作为对照处理, 接种分刺伤和非刺伤 2 种方式进行; 菌饼接种: 用灭菌打孔器沿适龄菌落边缘打取直径为 5 mm 的菌饼, 将菌饼的菌丝面紧贴枝条的接种部位, 并立即用无菌湿棉球对其包裹保湿, 设无菌 PDA 基块作为对照。接种枝条放搪瓷盘进行保湿后, 置 25℃ 培养箱中进行培养, 逐日观察、拍照和记录发病情况。待发病后对枝条病部进行病菌再分离。

1.2.3 病原菌的分子鉴定 采用 CTAB 法提取病菌的基因组 DNA^[2], 并用真核生物通用引物对 ITS1/ITS4 (ITS1 5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3' 和 ITS4 5'-

TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') 扩增 rDNA-ITS 序列^[3-4]。反应在 50 μ L 体系中进行,依次加入以下试剂:ITS1/ITS4(10 pmol/L)各 1 μ L;DNA 模板 2 μ L;2 \times Taq PCR Master Mix 25 μ L;ddH₂O 21 μ L,反应条件为:94 $^{\circ}$ C,预变性 3 min;94 $^{\circ}$ C 变性 30 s,60 $^{\circ}$ C 退火 30 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min,35 个循环;最后 1 次循环后,72 $^{\circ}$ C 补平 10 min。PCR 结束后经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测。PCR 产物委托天根生化(北京)有限公司进行测序,获得的序列用计算机分析软件 DNASTar (Madison Wisconsin, USA) 进行序列分析及同源性比较,递交 NCBI 数据库进行序列鉴定^[5]。

2 结果与分析

2.1 病原菌分离及形态特征

将从 80 个分离物中分离到的病菌根据其形态特征、生长速率和孢子形态分为 3 种类型,分别命名为 KZ-1、KZ-2 和 KZ-3,各类型真菌的分出占有率依次为 39%、38% 和 23%,其相关特征描述如表 1 所示。

表 1 病原菌的形态学特征

病菌	形态特征
KZ-1	菌落白色、絮状,有轮状生长现象,边缘较整齐,生长速率为 22 mm/d (图 1-A);分生孢子椭圆形和线形,椭圆形分生孢子大小为(4.25~8.75) μ m \times (2.25~5.00) μ m;线形分生孢子大小为(23.00~40.00) μ m \times (1.25~3.00) μ m(图 1-D)
KZ-2	菌落初为白色,后由中央开始向四周逐步转化为墨绿色,较蓬松、致密,边缘白色、整齐、光滑,生长速率为 13.75 mm/d,生长 7 d 后菌落铺满整个平板,菌丝全部变为墨绿色(图 1-B);子囊棍棒形,内含 8 个子囊孢子,子囊孢子近椭圆形,略弯,单胞,大小为(55.00~107.50) μ m \times (5.00~7.50) μ m(图 1-E)
KZ-3	菌落初为白色,后从中央开始转为淡墨绿色,边缘不整齐,菌落蓬松,在 PDA 平板上生长迅速,生长速率为 30 mm/d(图 1-C);分生孢子纺锤形,无色,单胞,大小为(6.25~25.00) μ m \times (2.50~7.50) μ m(图 1-F)

根据病原菌的形态特征结合有关文献报道将 KZ-1、KZ-2 和 KZ-3 3 种病菌依次初步鉴定为拟茎点霉菌 (*Phomopsis* sp.)、小丛壳属真菌 (*Glomerella* sp.) 和葡萄座腔菌 (*Botryosphaeria dothidea*)。

2.2 致病性测定

分别用 KZ-1、KZ-2 和 KZ-3 的孢子悬浮液和菌饼,在刺伤和不刺伤的条件下对备好的猕猴桃枝条进行接种,结果显示,接种 4 d 后,不论是孢子悬浮液还是菌饼,在刺伤条件下都能引起枝条发病,且 2 种侵染源的发病程度均为 KZ-1>KZ-3>KZ-2(图 2);在不刺伤的条件下都不引起发病。再对接种后发病的枝条病斑进行再分离,又分离到与原病菌性状一致的病菌。

2.3 病原菌的分子鉴定

采用 CTAB 法提取 KZ-1、KZ-2 和 KZ-3 3 种病菌的基因组 DNA,经凝胶电泳检测后都得到较高质量的 DNA,以该 DNA 为模板,经真核生物通用引物对 ITS1/ITS4 扩增,凝胶电泳检测后均获得约 500 bp 大小的单一清晰条带(图 3)。经测序去除两端引物后获得 3 种菌

的 rDNA ITS 序列长度分别为 539 bp(KZ-1)、521 bp(KZ-2)和 527 bp(KZ-3),将获得的序列递交至 GenBank 后所获得的登录号分别为 KZ-1(JX885686)、KZ-2(JX885688)和 KZ-3(JX885687)并与 GenBank 已有的序列进行同源性比较后发现 3 种菌的序列各与 *Phomopsis* sp. (拟茎点霉菌, JQ260831)、*Glomerella septospora* (隔孢丛壳菌, GU935910) 和 *Botryosphaeria dothidea* (葡萄座腔菌, JQ260829) 的同源性均为 100%。根据同源性比较结果,结合病菌形态学特征和致病性结果最终将 KZ-1、KZ-2 和 KZ-3 3 种病原菌分别鉴定为拟茎点霉菌 (*Phomopsis* sp.)、隔孢丛壳菌 (*Glomerella septospora*) 和葡萄座腔菌 (*B. dothidea*)。

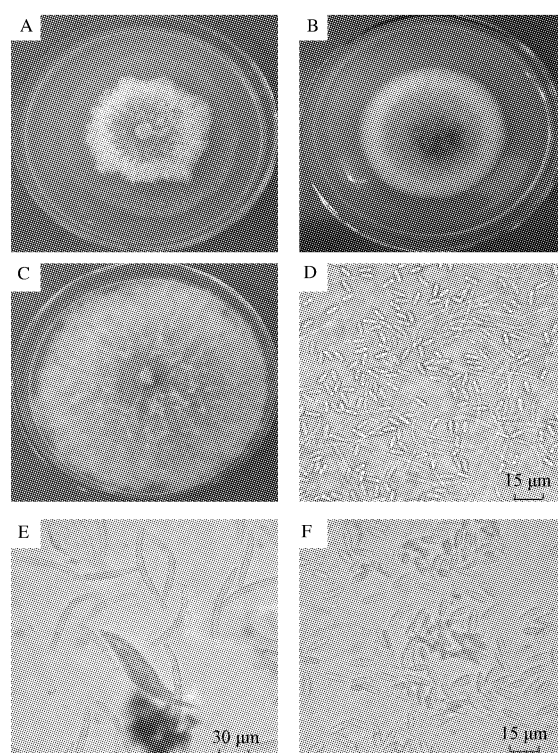


图 1 猕猴桃枝枯病菌的形态特征

注:A:KZ-1 菌落;B:KZ-2 菌落;C:KZ-3 菌落;D:KZ-1 分生孢子;E:KZ-2 子囊孢子;F:KZ-3 分生孢子。

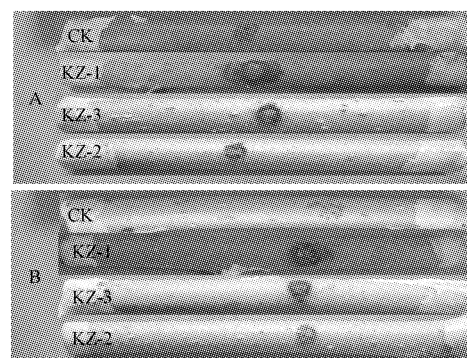


图 2 致病性测定

注:A:菌饼接种;B:孢子悬浮液接种。

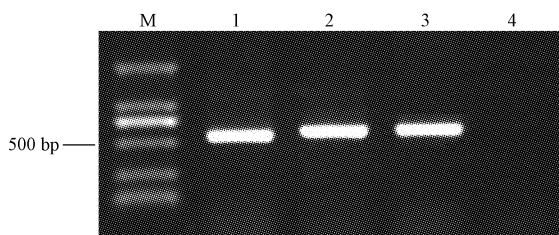


图3 病原菌 rDNA ITS 序列 PCR 扩增电泳图

注: M; DL 2 000 Marker; 1; KZ-1; 2; KZ-2; 3; KZ-3; 4; 阴性对照。

3 结论与讨论

经形态学和分子生物学鉴定后证实,奉新猕猴桃枝枯病主要由拟茎点霉菌(*Phomopsis* sp.)、隔孢丛壳菌(*Glomerella septospora*)和葡萄座腔菌(*B. dothidea*)3种真菌引起,占有率分别为39%、38%和23%,3种病原菌均可通过孢子悬浮液或菌丝体侵染引起刺伤接种枝条不同程度发病,致病力 *Phomopsis* sp. > *B. dothidea* > *Glomerella* sp.。该研究结果可为对该病害流行病学研究和防治方案的制定提供科学的理论依据。

猕猴桃枝枯病目前我国尚鲜见报道,在国外报道也相对甚少,且所报的鉴定结果也存在较大的差异,如在希腊主要以 *Alternaria alternata* 和 *B. dothidea* 为主^[6-7];在日本以 *B. dothidea* 为主^[8];在新西兰则主要以 *Botryosphaeria parva* 为主^[9];在土耳其主要以 *Phytophthora citriophthora* 为主^[10];在智利则主要以 *Verticillium albo-atrum* 为主^[11]。通过该研究与国外的研究比较后发现,*Phomopsis* sp. 和 *Glomerella septospora* 2种菌是首次证实能引起猕猴桃枝枯病,这也为我国猕猴桃枝枯病的研究奠定了良好的科学理论基础。该试验所报道的3种菌,有的虽在猕猴桃上属首次报道,但在其它植物枝枯病上都有或多或少的报道,如美国蓝莓枝枯病由 *Phomopsis* sp. 和 *B. dothidea* 引起^[12],美国乔木微白落尾木枝枯病由 *B. dothidea* 引起^[13],印度枣树枝枯病由 *Phomopsis* sp. 引起^[14],美国山茶枝枯病由 *Glomerella* sp. 引起^[15],进而证明该试验所鉴定得到的3种病菌的确是引起许多植物枝枯病的主要病菌。

奉新猕猴桃枝枯病主要发生在修剪后的枝条上,主要症状是从修剪口开始出现不同程度的枯死,发病严重的会使整个修剪后的侧枝枯死,未修剪过得枝条极少发生该病,通过对健康枝条表皮进行分离后同样能分离到这3种病菌,进而证明该病害病菌只能通过修剪后的伤口侵染而引起枝条发病。经研究 *B. dothidea* 和 *Phomopsis* sp. 也是引起奉新猕猴桃另一种主要病害(果腐病)的主要病菌^[16-17],且2种病菌在常规的PDA平板上不易产生分生孢子,需通过用燕麦琼脂培养基+打断菌丝+近紫外光照射的方法,进行诱导产孢。*Glomerella*

septospora 除了引起猕猴桃枝枯病外还能引起猕猴桃梗干枯病^[18],并已在猕猴桃果梗上发现其无性态 *Colletotrichum taixanense*,且该病菌在国内外报道相对甚少,目前仅在台湾省安息香和韩国的辣椒炭疽病上有所报道。3种病菌都能在修剪下来的枯枝上进行越冬,所以为达到更好的综合防治效果,对做好季末修剪清园工作至关重要,对修剪下来的枝条应及时进行无公害处理,保持果园的清洁卫生,修剪后及时用所筛选的高效药剂拿敌稳对果园进行一次全方位彻底的喷施。

参考文献

- [1] 方中达. 植物研究方法[M]. 3版. 北京:中国农业出版社,1998.
- [2] Murray M G, Thompson W F. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA[J]. Nucleic Acids Research, 1980, 8(19): 4321-4325.
- [3] 王树桐, 王亚南, 胡同乐, 等. 板蓝根根腐病原菌鉴定[J]. 植物保护学报, 2011, 38(5): 473-474.
- [4] 宋晓贺, 孙德茂, 王明刚, 等. 陕西石榴干腐病发生及病原菌鉴定[J]. 植物保护学报, 2011, 38(1): 93-94.
- [5] 李金花, 王蒂, 柴兆祥, 等. 甘肃省马铃薯镰刀菌干腐病优势病原的分离鉴定[J]. 植物病理学报, 2011, 41(5): 456-463.
- [6] Tsahouridou P C, Thanassouloupoulos C C. First report of *Alternaria alternata* as a dieback pathogen of kiwifruit[J]. Plant Disease, 2000, 84(3): 371.
- [7] Thomidis T, Exadaktylou E. First report of *Botryosphaeria dothidea* causing shoot blight of Kiwifruit (*Actinidia deliciosa*) in Greece[J]. Plant Disease, 2010, 94(12): 1053.
- [8] Kagawa M, Sato T. Kiwifruit dieback caused by *Diaporthe* sp. and *Botryosphaeria dothidea*, kiwifruit soft rot fungi[J]. Annals of the Phytopathological Society of Japan, 2003, 69: 373-383.
- [9] Rumbos I C, Phillips A J L. A new disease of kiwifruit caused by *Botryosphaeria parva*[J]. South African Journal of Science, 2005, 101(7/8): 314.
- [10] Akilli S, Serce C U, Katircioglu Y Z, et al. Involvement of *Phytophthora citriophthora* in kiwifruit decline in Turkey[J]. Journal of Phytopathology, 2011, 159: 579-581.
- [11] Auger J, Perea I, Fullerton R A, et al. First report of verticillium wilt of gold kiwifruit, *Actinidia chinensis* cv. Hort 16A, caused by *Verticillium albo-atrum* in Chile[J]. Plant Disease, 2009, 93(5): 553.
- [12] Polashock J J, Kramer M. Resistance of blueberry cultivars to *Botryosphaeria* stem blight and *Phomopsis* Twig blight[J]. Hort Science, 2006, 41(6): 1457-1461.
- [13] Ko W H, Koss. A new twig blight of mamaki (*Pipturus albidus*) caused by *Botryosphaeria ribis*[J]. Can J Plant Pathol, 2001(23): 312-314.
- [14] Sobita P H, Bhatt A I, Devi L R, et al. Mosaic disease of broad leaf mustard from North-East India[J]. Indian Phytopath, 2003, 56(2): 236-238.
- [15] Copes W E, Thomson J L. Survival analysis to determine the length of the incubation period of camellia twig blight caused by *Colletotrichum gloeosporioides*[J]. Plant disease, 2008, 92: 1177-1182.
- [16] 李诚, 蒋军喜, 冷建华, 等. 奉新县猕猴桃果实腐烂病原菌分离鉴定[J]. 江西农业大学学报, 2012, 34(2): 259-263.
- [17] 李诚, 蒋军喜, 冷建华, 等. 6种杀菌剂对猕猴桃主要腐烂病菌的室内独立测定[J]. 中国南方果树, 2012, 41(1): 27-29.
- [18] Li C, Jiang J X, Liu L P, et al. Fruit stem blight on kiwifruit (*Actinidia chinensis*) in China[J]. Canadian Journal of Plant Pathology, 2013, 35(3): 411-414.

梨树腐烂病病菌诱导产孢方法研究

吴湘琴, 吴婷婷, 叶振风, 刘 普, 朱立武

(安徽农业大学 果树学重点实验室, 安徽 合肥 230036)

摘 要:采用 5 种培养基质, 在不同的光照培养条件下, 对梨树腐烂病病菌的产孢情况进行研究。结果表明: 接种腐烂病菌丝的基质在 25℃ 的恒温培养下, 经持续黑光灯处理, 分生孢子器的产生时间缩短 3~5 d, 且成熟率提高 10%~20%; 其中, 在 30% PBA 培养基培养 15 d 后产生大量黑色分生孢子器, 25 d 后从分生孢子器体中溢出黄色的分生孢子角; 接种病原菌丝的蒲城雪梨树枝条产生的分生孢子器时间较抗病性强的杜梨和秋白梨提前 2~4 d, 且孢子器和分生孢子数量最多。

关键词:梨树腐烂病; 分生孢子; 诱导产孢

中图分类号:S 661.2 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2013)24-0133-03

梨树腐烂病(*Valsa canker of pear*)又称臭皮病、烂皮病, 主要危害梨树主枝和侧枝, 有时也危害主根基部, 病部树皮腐烂且多发生在枝干向阳面及枝杈部。该病常常造成树势衰弱, 影响梨树的产量和寿命, 当扩展到环绕枝干一周时, 全枝及整株逐渐死亡, 从而造成一定的经济损失^[1-2]。掌握梨树腐烂病发病流行规律是制定病害防治措施的基础, 而用梨树腐烂病菌的孢子人工接种梨树枝干, 然后观察枝干发病情况, 以及病害的发展过程是研究腐烂病发生和流行规律的基本方法。获取病菌孢子最简单的方法是在早春降雨或空气潮湿时, 到田

间梨树腐烂病病皮上找病菌金黄色的分生孢子角, 或找到带小黑点(子座)的病皮和成熟尚未裂口的分生孢子器带回实验室用温水淋湿, 分生孢子器内可涌出病菌的分生孢子角, 但此种方法易受到环境和季节的限制^[2-7]。因此, 研究出一种人工诱导梨树腐烂病产孢的方法十分重要, 而梨树腐烂病菌在一般培养基上极难产孢, 所以该试验研究了几种诱导梨树腐烂病菌产孢的方法, 以期筛选出快速产孢的方法, 满足梨树腐烂病流行病学研究的需求。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试菌株:供试菌株为安徽农业大学果树学重点实验室保存的梨树腐烂病病菌菌株, 分离自河北省保定市省力密植栽培标准化示范园发病的梨树枝条, 试验前将菌株在 PDA 培养基上活化 3~4 d。

供试产孢基质:PDA 培养基: 马铃薯 200 g, 葡萄糖

第一作者简介:吴湘琴(1990-), 女, 硕士研究生, 现主要从事植物病害流行和药剂防治筛选等研究工作。E-mail: 1040382345@qq.com.

责任作者:朱立武(1961-), 男, 硕士, 教授, 研究方向为果树资源与生物技术育种。E-mail: zhuliwu@ahau.edu.cn.

基金项目:国家公益性行业(农业)科研专项资助项目(201203034)。

收稿日期:2013-09-06

Identification of the Pathogen Causing Shoot Blight of Kiwifruit

LI Cheng¹, JIANG Jun-xi¹, LENG Jian-hua², LI Bang-ming², YU Qiang², TU Gui-qing²

(1. College of Agronomy, Jiangxi Agricultural University, Nanchang, Jiangxi 330045; 2. Agricultural Bureau of Fengxin County, Fengxin, Jiangxi 330700)

Abstract: The pathogen caused shoot blight of kiwifruit were isolated and characterized with the pathogenicity test, morphology and rDNA-ITS sequence assay. The results showed that three kinds of fungi were responsible for shoot blight of kiwifruit in Fengxin County. They were *Phomopsis* sp., *Glomerella septospora* and *Botryosphaeria dothidea*, which accounted 39%, 38% and 23% respectively. Three kinds of fungi penetrated shoot of kiwifruit through wounds including PDA plug inoculation and conidial suspension inoculation.

Key words: kiwifruit shoot blight; *Phomopsis* sp.; *Glomerella septospora*; *Botryosphaeria dothidea*