

火龙果锈斑病病原菌鉴定

Pathogen identification of pitaya rusty spot disease

吴婧波 詹儒林* 柳 凤 常金梅 何衍彪 赵艳龙

(中国热带农业科学院南亚热带作物研究所, 农业农村部热带果树生物学重点实验室, 广东 湛江 524091)

Wu Jingbo Zhan Rulin* Liu Feng Chang Jinmei He Yanbiao Zhao Yanlong

(Key Laboratory of Tropical Fruit Biology, Ministry of Agriculture and Rural Affairs; South Subtropical Crops Research Institute, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, Zhanjiang 524091, Guangdong Province, China)

近年来,随着火龙果的种植面积不断扩大,高密度的种植和不科学的栽培管理使得火龙果植株病害突显。广东省湛江市台风频繁,大面积的伤口和高温高湿的气候为病害侵染和传播提供了适宜条件,使得该地区火龙果病害日益严重。在湛江市发现一种危害火龙果植株茎和果实的新病害——火龙果锈斑病,严重时果园发病率可达50%。本研究拟采用形态学观察和分子序列分析对该地区的火龙果锈斑病病原菌进行鉴定,以期为该病害发生流行规律的研究提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料

供试病株和健康植株:火龙果锈斑病病株采自广东省湛江市麻章区中国农业科学院南亚热带作物研究所百果园火龙果示范中心,种植5年。栽培2年的健康火龙果茎、盆栽1年的火龙果苗均由中国农业科学院南亚热带作物研究所休闲农业体验中心提供,所用供试火龙果品种均为金都一号。

培养基:马铃薯葡萄糖琼脂(potato dextrose agar, PDA)培养基:马铃薯200 g、葡萄糖20 g、琼脂20 g、蒸馏水1 000 mL。

试剂和仪器:2× MightAmp Buffer 和 MightAmp DNA Polymerase, 日本 TaKaRa 公司;其它试剂均为国产分析纯。TP600 PCR 仪, 日本 TaKaRa 公司; Chemidoc MP 全能型凝胶成像分析系统, 美国伯乐公司。

1.2 方法

病原菌的致病性测定:采用组织块分离法从火龙果病茎、病果上病斑的病健交界处分离病原菌,纯

化培养后制备直径为5 mm的菌饼,采用针刺法将其分别接种到刺伤的健康离体火龙果茎部和果实表皮,每个火龙果茎部和果实分别接种2个病原菌菌饼,1个空白PDA对照,3次重复。配制浓度为 1×10^3 个/mL的孢子悬浮液,取200 μ L喷洒到刮伤的盆栽苗茎部,用无菌水作为对照,3次重复。接种后的火龙果茎、果和盆栽苗于28℃下光照培养箱培养。

病原菌的鉴定:形态学观察:将致病菌接种到PDA平板上,28℃培养箱黑暗培养10 d,观察菌落特性,菌丝、产孢结构及孢子形态和大小。病原菌的分子序列分析:利用ITS和 β -tubulin基因通用引物对致病菌进行PCR扩增。20 μ L PCR反应体系:2× MightAmp Buffer 10 μ L、0.3 μ mol/L ITS1/T1 和 ITS4/ β t2b 引物各0.5 μ L、 2.5×10^4 U/L MightAmp DNA Polymerase 0.5 μ L、ddH₂O 8.5 μ L。挑取适量病原菌菌丝适量于上述反应体系中,扩增程序:98℃预变性2 min;98℃变性10 s,56℃退火15 s,68℃延伸40 s,39个循环。PCR产物经1%琼脂糖凝胶电泳检测后送英潍捷基(上海)贸易有限公司测序。测序结果用BLAST软件在GenBank进行同源性比较,以Clustal X进行多序列比对。采用MEGA5.2软件的邻接法构建系统发育树,共1 000次循环。

2 结果与分析

2.1 火龙果锈斑病病原菌的致病性

接种火龙果锈斑病病原菌10 d后,健康火龙果离体茎部的锈斑覆盖刺伤部位,病斑扩展较慢;接种12 d后,健康盆栽苗出现锈斑,18 d后锈斑扩展连成片,35 d后最初连接成片的锈斑开始脱落;接种7 d后,健康火龙果果实褪色,变软,开裂;与田间发病症

基金项目:中央级非盈利性研究机构基本科研业务费研究专项(1630062015007),海南省自然科学基金(20163109),广东省现代农业产业技术体系创新团队(2016LM1144)

* 通信作者(Author for correspondence), E-mail: zhanrulin555@163.com; 收稿日期:2018-05-04

状相似,对照无任何发病症状。对发病火龙果茎部和果实进行再分离,均能获得与原接种菌一致的菌株。根据柯赫氏法则证明分离得到的菌株为火龙果锈斑病病原菌。

2.2 火龙果锈斑病病原菌形态学观察

共分离得到8株火龙果锈斑病病原菌,以BJ12为代表的菌株菌落黏稠,在PDA培养基上呈黑白相

间的螺旋状酵母样,后期呈现黑色油漆状(图1-A)。分生孢子梗分化不明显,在菌丝上突出的产孢细胞的顶端产生分生孢子;分生孢子椭圆形,两端钝圆,无色,单胞,4~11 μm ×3~5 μm (图1-B)。厚垣孢子椭圆形、圆筒形,深褐色,壁厚,光滑,1~2个细胞,9~15 μm ×5~7 μm (图1-C)。根据形态特征初步将其鉴定为出芽短梗霉 *Aureobasidium pullulans*。

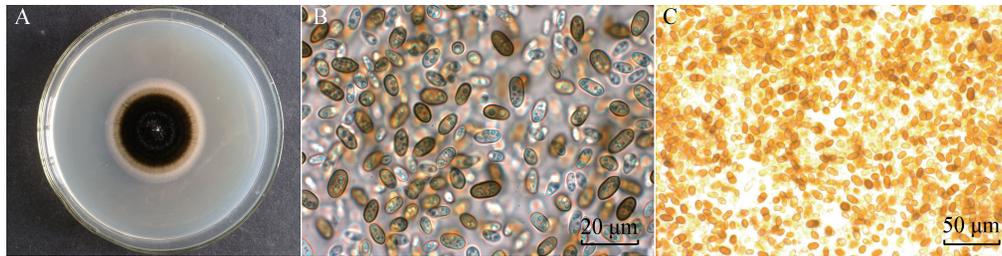


图1 火龙果锈斑病病原菌出芽短梗霉的形态特征

Fig. 1 Morphological characteristics of *Aureobasidium pullulans* from rust disease of pitaya

A: 菌落形态; B: 分生孢子; C: 厚垣孢子。A: Colony morphology; B: conidia; C: chlamydospores.

2.3 火龙果锈斑病病原菌分子序列分析

利用2个通用引物扩增,分别得到大小为558 bp(登录号 KX184283)和500 bp(登录号 KX184275)2个片段;在NCBI数据库进行比对,其分别与

AY225167和KU341770同源性达到100%;在系统发育树上与出芽短梗霉(登录号KU341770和JF419607)位于同一分支(图2),与形态学鉴定结果一致。

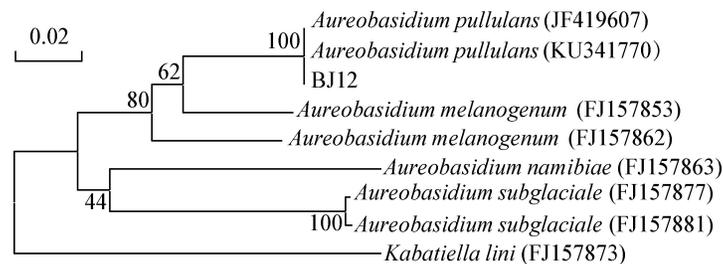


图2 基于 β -tubulin基因序列采用邻接法构建BJ12菌株及近缘种的系统发育树

Fig. 2 Phylogenetic tree derived from neighbor-joining analysis and β -tubulin of BJ12 strains and related species

3 讨论

出芽短梗霉寄主广泛(Kim, 2014),但关于其引起火龙果锈斑病的相关报道较少。本试验共分离得到的8株菌株形态和致病性都略有不同,主要可分为2个群体,以BJ12和BJ01(Wu et al., 2017)为代表的菌株分别为5株和3株,是否存在2个生理小种,有待后续试验进一步确定。BJ12菌株回接到健康火龙果果皮上,引起果皮开裂,变色变软;但田间发病果不仅仅有开裂症状,同时还有溃疡症状出现。易润华等(2013)研究结果显示引起火龙果溃疡病的病原菌为新暗色柱节孢 *Neoscytalidium dimidiatum*。广东省火龙果也可能被多种致病菌复合侵染,这有待后续试验验证。

参考文献 (References)

- Kim YK. 2014. First report of a new postharvest rot in sweet cherries caused by *Aureobasidium pullulans*. *Plant Disease*, 98(3): 424
- Wu JB, Zhan RL, Liu F, Chang JM. 2017. First report of a stem and fruit spot of pitaya caused by *Aureobasidium pullulans* in China. *Plant Disease*, 101(1): 249
- Yi RH, Gan LJ, Yan DH, Wu ZJ, Tong YT, Wu FF. 2013. Identification and biological characteristic of *Neoscytalidium dimidiatum* causing pitaya canker. *Journal of Plant Protection*, 40(2): 102-108 (in Chinese) [易润华, 甘罗军, 晏冬华, 吴泽菁, 童依婷, 吴凤发. 2013. 火龙果溃疡病病原菌鉴定及生物学特性. *植物保护学报*, 40(2): 102-108]

(责任编辑:张俊芳)