

化橘红柱头黑腐病病原菌鉴定

Molecular identification of the pathogen causing stigma black rot on *Exocarpium citrigrandis*

崔一平 彭埃天* 凌金峰 宋晓兵 陈霞 程保平

(广东省农业科学院植物保护研究所, 广东省植物保护新技术重点实验室, 广州 510640)

Cui Yiping Peng Aitian* Ling Jinfeng Song Xiaobing Chen Xia Cheng Baoping

(Guangdong Provincial Key Laboratory of High Technology for Plant Protection, Research Institute of Plant Protection, Guangdong Academy of Agricultural Sciences, Guangzhou 510640, Guangdong Province, China)

化橘红 *Exocarpium citrigrandis* 又名柚皮橘红、化州橘红、柚子皮等,是我国特有的国际性珍稀名贵药材,以产自广东省化州市的化橘红最著名。2018年在对化州市林尘镇外坡村化橘红种植园进行病害调查时发现化橘红的花器柱头上出现黑腐症状,造成植株授粉困难,果实难以膨大;有的幼果上带有未脱落的黑腐柱头,随着时间推移,病原菌蔓延转移到幼果上,对幼果造成危害。为明确引起该病害的主要病原菌,采集典型症状样品进行病原菌的分离及鉴定,明确其分类地位,以期为化橘红柱头黑腐病的防治提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料

供试植物及培养基:感病化橘红于2018年4月采集自广东省化州市林尘镇外坡村化橘红种植园,健康化橘红采自广东省农业科学院果树研究所柑橘种植大棚。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,去离子水定容至1 000 mL;PD培养液:PDA培养基中不添加琼脂。

试剂及仪器:Axygen动植物基因组DNA提取试剂盒,爱思进生物技术(杭州)有限公司;2×EasyTaq PCR SuperMix(-dye),北京全式金生物技术有限公司;T100TM PCR仪、1704487小型水平电泳槽,美国Bio-Rad公司。

1.2 方法

化橘红柱头黑腐病症状及形态学特征观察:2018年4月在上述化橘红种植园进行柑橘病害普查时发现化橘红柱头黑腐病,并于同年5月在同一地

点再次进行该病害的系统调查。在采集的感病化橘红柱头病健交界处取2 mm×2 mm小块,在70%酒精中浸泡30 s,再于2% NaClO中浸泡1~2 min,无菌水冲洗3~5次,于超净台中晾干后置于PDA平板上,于25℃培养3~5 d后,待分离物上长出白色菌丝,挑取单孢子接种在新的PDA平板上进行纯化。培养7~10 d后对纯培养物的菌丝和分生孢子进行镜检,共观察30个视野(40×)。

致病性测定:收集于PD培养液中过夜培养的病原菌,无菌水洗1次后配制浓度为 1×10^6 个/mL的分生孢子悬浮液。选取5~10枝有健康化橘红柱头的枝条,通过浸沾法在制备好的分生孢子悬浮液中停留20 s,同时以浸沾相同时间无菌水的处理为阴性对照。3~5 d后观察被接种化橘红柱头是否发病,并对发病柱头进行病原菌再分离,观察与原接种病原菌的培养性状及形态学特征是否一致。

分子生物学鉴定:将培养7~10 d的病原菌菌丝和分生孢子从PDA平板上刮下来,迅速用液氮研磨。依据Axygen动植物基因组DNA提取试剂盒说明书进行DNA提取。选取ITS(ITS1: 5'-TCCGT-AGGTGAACCTGCGG-3'和ITS4: 5'-TCCTCCGCT-TATTGATATGC-3')和多聚半乳糖醛酸内切酶基因 *endo-PG* (PG3: 5'-TACCATGGTTCCTTTCCGA-3'和PG2: 5'-RCARTCRCTCYTGRTT-3')检测引物,以提取的DNA为模板进行PCR扩增(White et al., 1990; Peever et al., 2002)。反应体系:2×EasyTaq PCR SuperMix(-dye) 10 μL、ITS1/ITS4(或 *endo-PG3/endo-PG2*)各0.5 μL、DNA 1 μL、ddH₂O 8 μL;反应程序:94℃预变性3 min;94℃变性40 s,53℃退火30 s,72℃

基金项目:国家重点研发计划(2017YFD0202005),广东省科技计划公益研究与建设项目(2014B020203003),广东省现代农业产业技术体系建设项目(2017LM1077)

* 通信作者(Author for correspondence), E-mail: pengait@163.com; 收稿日期:2018-10-16

延伸30 s,32个循环;最终72℃延伸5 min。所得PCR产物经1%琼脂糖凝胶电泳检测,筛选阳性PCR产物进行测序。引物合成及测序均由生工生物工程(上海)股份有限公司完成。将测序所得序列进行BLAST比对,利用MegAlign 7.1.0(44)软件建立病原菌及其相关菌株的系统进化树,明确其分类地位。

2 结果与分析

2.1 化橘红柱头黑腐病症状及病原菌形态学特征

化橘红柱头黑腐病症状表现为柱头上出现黑色斑点或斑块,在部分未脱落柱头的幼果上也发现柱头上有明显的黑色斑块;后期受侵染柱头脱落,果实膨大迟缓或腐烂脱落。从感病化橘红柱头分离获得单一的链格孢属真菌代表菌株,命名为A1-1,其菌落在PDA平板上初为白色,后逐渐变为灰白色直至黑色。菌株A1-1的菌丝为白色至褐色,有分枝、分隔;分生孢子呈倒棍棒形,为淡褐色至褐色,具有3个横隔和若干个纵隔膜,顶端有明显的柱状假喙。

2.2 菌株A1-1的致病性

接种菌株A1-1分生孢子悬浮液3 d后,化橘红柱头开始出现黑色斑点,后逐渐扩大至整个柱头,第5天时接种柱头上产生的症状与田间自然发病症状一致,从发病柱头上再分离获得的病原菌与原接种菌株培养性状和形态学特征一致,进一步确定菌株A1-1为化橘红柱头黑腐病病原菌(图1)。

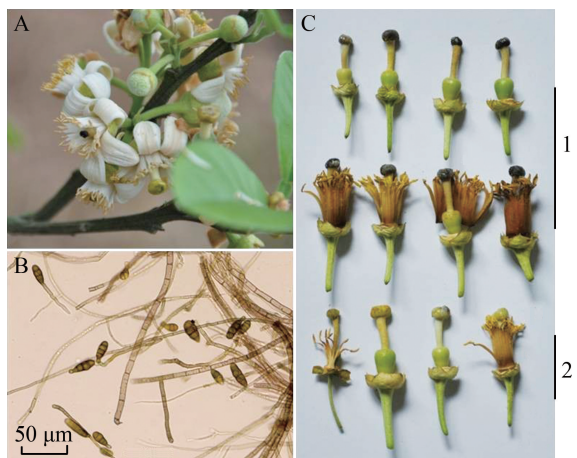


图1 广东省化州市化橘红柱头黑腐病症状及病原菌特征

Fig. 1 The disease symptoms of stigma black wilt on *Exocarpium citrigrandis* and the characteristics of the pathogen in Huazhou, Guangdong Province

A: 化橘红柱头黑腐病田间症状; B: 病原菌菌丝与分生孢子; C1: 接种病原菌5 d后的化橘红柱头; C2: 清水对照。
A: Symptoms of stigma black wilt on *E. citrigrandis* in the field; B: the mycelia and spores of the pathogen of stigma black wilt on *E. citrigrandis*; C1: stigmas after innovation 5 d; C2: water control.

2.3 菌株A1-1的分子生物学鉴定

经引物ITS1/ITS4扩增后得到460 bp的ITS片段,BLAST比对发现菌株A1-1的ITS序列与细极链格孢 *Alternaria tenuissima* (MH999495.1)和互隔交链格孢 *A. alternata* (MG434522.1)的ITS 同源性均达到100%。为进一步确认该菌株的分类地位,经链格孢属内特异性引物PG3/PG2扩增获得412 bp的 *endo-PG* 片段,BLAST比对发现菌株A1-1的 *endo-PG* 序列与互隔交链格孢 (JN122228.1)的 *endo-PG* 序列同源性达到100%。基于ITS和 *endo-PG* 序列构建系统发育树,发现菌株A1-1与互隔交链格孢的遗传距离最近,结合形态学特征及分子鉴定结果确定化橘红柱头黑腐病病原菌为互隔交链格孢。

3 讨论

本研究确定了引起化橘红柱头黑腐病的病原菌为互隔交链格孢,这是国内首次报道链格孢在化橘红上引起病害。过去的报道主要集中在互隔交链格孢引起宽皮柑橘及其杂交种的褐斑病上(孔向雯等,2018)。由于链格孢属级特征显著而种级特征变异较大,易于鉴定到属而难于鉴定到种,Peever et al. (2002;2004)的研究揭示ITS和 β -微管蛋白序列区不能准确区分链格孢小孢子种;而 *endo-PG* 能够有效区分在地理系统上有差异的2种致病型链格孢。因此,本研究采用ITS和 *endo-PG* 双鉴别引物对化橘红黑腐病的病原菌进行鉴定并明确其分类地位。有关化橘红柱头黑腐病病原菌互隔交链格孢的侵染机制和病害防治措施等仍需进一步研究。

参考文献 (References)

- Kong XW, Tang FY, Lü WW, Zhang Q, Tang KZ. 2018. Optimization of protoplast preparation and regeneration conditions of *Alternaria alternata*. *Journal of Plant Protection*, 45(6): 1431-1432 (in Chinese) [孔向雯, 唐飞艳, 吕韦玮, 张倩, 唐科志. 2018. 柑橘褐斑病菌原生质体制备与再生条件的优化. *植物保护学报*, 45(6): 1431-1432]
- Peever T, Ibañez A, Akimitsu K, Timmer L. 2002. Worldwide phylogeography of the citrus brown spot pathogen, *Alternaria alternata*. *Phytopathology*, 92(7): 794-802
- Peever T, Su G, Carpenter-Boggs L, Timmer L. 2004. Molecular systematics of citrus-associated *Alternaria* species. *Mycologia*, 96(1): 119-134
- White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics.//Innis MA. PCR protocols: a guide to methods and applications. San Diego: Academic Press, pp. 315-322

(责任编辑:李美娟)