

张鹏鹏,李园园,刘 露,等.大樱桃溃疡病病原菌的分离纯化和鉴定[J].江苏农业科学,2016,44(11):145-148.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2016.11.043

大樱桃溃疡病病原菌的分离纯化和鉴定

张鹏鹏¹,李园园²,刘 露²,李 丽²,闫洪雪²,赵洪涛²

(1. 青岛明月海藻集团有限公司海藻活性物质国家重点实验室,山东青岛 266400; 2. 青岛明月蓝海生物科技有限公司,山东青岛 266400)

摘要:为研究大樱桃溃疡病的发病机制,明确其病原菌种类及其生物学特性,从山东省青岛市黄岛区张家楼镇采集了几株发病的大樱桃树枝条,从其腐烂处取样筛选出 1 株导致大樱桃树溃疡病的病原菌 YT-2。根据柯赫氏法则验证了 YT-2 的致病性,通过观察形态学特征,并提取 ITS 序列进行分析,将 YT-2 的 ITS 序列在 NCBI(National Center for Biotechnology Information)数据库中进行 BLAST 比对,并利用 MEGA 5.0 软件构建系统发育树,对 YT-2 菌株进行鉴定。结果发现,病原菌 YT-2 的形态特征与葡萄座腔菌相符,ITS 序列与已发布的葡萄座腔菌的 ITS 序列相似度达到 100%,系统发育树分析结果也与之相同。说明引起山东省青岛市大樱桃溃疡病的病原为葡萄座腔菌,尤其是对长势旺盛的布鲁克斯大樱桃品种危害最为严重。

关键词:葡萄座腔菌;布鲁克斯大樱桃;rDNA-ITS;有性型;溃疡病

中图分类号:S436.629 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2016)11-0145-03

樱桃是原产于欧洲的古老树种^[1],大樱桃因具有较高的营养价值,口味鲜美而成为人们最喜爱的水果之一。随着大樱桃产量的增加,现在的供求关系已由原来供不应求变为供大于求,因此消费者对樱桃的内在品质要求也越来越高。布鲁克斯大樱桃因具有早熟、大果脆甜的特点,日益引起消费者的关注和青睐,成为目前销量最好的樱桃新品种之一^[2],因此研究布鲁克斯大樱桃的病虫害对今后樱桃种植业的发展具有重大意义。然而在山东省青岛市黄岛区张家楼镇的大樱桃园里,布鲁克斯大樱桃植株出现根腐、枝干干腐、流胶、叶片发黄等一系列溃疡病病症,并且发病集中于 1~2 年的幼苗。发病迅速,树干干枯,营养物质得不到运输,造成整株死亡,大樱桃植株成片死亡,给樱桃园造成严重的经济损失。因为溃疡病的病原菌种类较多、症状表现多样、危害巨大、发生期蔓延面广且迅速,并且采用市面上的杀虫剂、杀菌剂均无明显的改善作用,较难控制等,使其成为林业种植和病害防治的重难点^[3]。因此,找出病害的根源并鉴定出该病原菌,为大樱桃的综合防治提供理论基础尤为重要。

目前已有的报道表明,树木溃疡类病害危害的生态、经济林木主要有杨树、苹果、梨树、石榴、松树等^[4]。我国的树木溃疡病主要是由真菌引发的,目前研究表明,引起树木溃疡病的病原真菌类群主要有葡萄座腔菌属(*Botryosphaeria* Cas.)、壳壳孢属(*Dothichiza* Lib.)、囊壳孢属(*Cytospora* Ehrenb.)、盾壳霉属(*Coniothyrium* Sacc.)等 4 属真菌,这些真菌也成为阻碍我国现阶段林业发展的有害生物。其中,分布范围最广泛的葡萄座腔菌属(*Botryosphaeria* sp.)因对树木的影响最大、危害最严重,而成为导致树木溃疡病最主要的病原真菌,也成为目前在我国受到最广泛关注的重大生物灾害之一。但迄今

为止,葡萄座腔菌属在大樱桃树上发病的情况并不多见,目前还未见相关报道。

1 材料与方法

1.1 标样采集与分离

2014 年 6—7 月于山东省青岛市黄岛区张家楼镇大樱桃园溃疡病发病区域采集标样,采集时沿病斑周围将整个发病枝条取下,完整保存整个病斑,记录发病症状、采集时间、地点、树龄、胸径、危害程度,于 4℃ 冰箱保存。

在无菌超净工作台内将采集的病斑枝条切成 5 mm × 5 mm 的小块,用 75% 乙醇消毒 2 min,0.1% 的氯化汞消毒 5 min,然后在无菌水中清洗几次,以防止氯化汞残留。将消毒处理好的病斑块放入含有抗生素的马铃薯葡萄糖琼脂培养基的培养皿中,每皿 2 块,28℃ 下培养,待菌落直径长至 2 cm 时,挑取菌落边缘未被污染的少许菌丝转接于新的马铃薯葡萄糖琼脂培养基的培养皿中进行纯化,将纯化后菌株转入试管,置于 4℃ 冰箱中保存,以便下一步研究。

1.2 菌株的致病性测定

根据柯赫氏法则,以健康品种为易感病的品种布鲁克斯大樱桃枝条作为接种对象,检测分离病原菌的致病性。取直径约 2 cm 的 2 年生枝条,截成 25 cm 段,用 75% 乙醇进行表面消毒、晾干,用灼烧灭菌处理后的直径 6 mm 的打孔器刺入枝条,形成 1 个烫伤伤口,将同样大小的病原菌饼放入伤口处,然后用保鲜膜密封,对照组则用无菌 PDA 饼处理。将枝条上端用保鲜膜密封后插入盛有水的烧杯,放入培养箱中 28℃ 下培养,每天进行观察,记录是否发病以及发病特征。

1.3 病原菌菌落与菌丝特征

1.3.1 菌落特征观察 将分离纯化后的菌株接种于马铃薯葡萄糖琼脂培养基和改良马丁培养基上,28℃ 黑暗条件下培养,观察并记录菌落生长快慢、菌落形状、质地、气生菌丝特征、正背面颜色、有无色素沉积、有无特殊气味等。

1.3.2 菌丝形态观察 采用斜面插片法,使菌丝生长至斜插

收稿日期:2015-09-08

基金项目:国家星火计划(编号:S2012C620021)。

作者简介:张鹏鹏(1987—),女,山东泰安人,硕士,中级工程师,主要从事微生物肥料的研究工作。E-mail:myhzhfzp@126.com。

在马铃薯葡萄糖琼脂培养基的盖玻片上,取出盖玻片在显微镜下观察菌丝形态。

1.3.3 孢子观察 将培养基上产生的子实体置于载玻片上,先用解剖刀切开子实体,加上 1 滴蒸馏水,再用解剖针将其拨开,使孢子散落在载玻片上,简单染色后,在显微镜下观察孢子形态。

2 结果与分析

2.1 病原物的分离培养

病斑组织在马铃薯葡萄糖琼脂平板上培养 3 d,在边缘切口处长出菌丝,经马铃薯葡萄糖琼脂培养基多次纯化后得到 3 个纯培养物 YT-1、YT-2、YT-3。

2.2 致病性测定

利用上述 3 株菌株进行致病性测定(回接试验),结果发现只有菌株 YT-2 能引起枝条溃疡病的症状。枝条感染后出现暗褐色至黑褐色不规则形病斑,在 28 ℃ 条件下培养 5 d

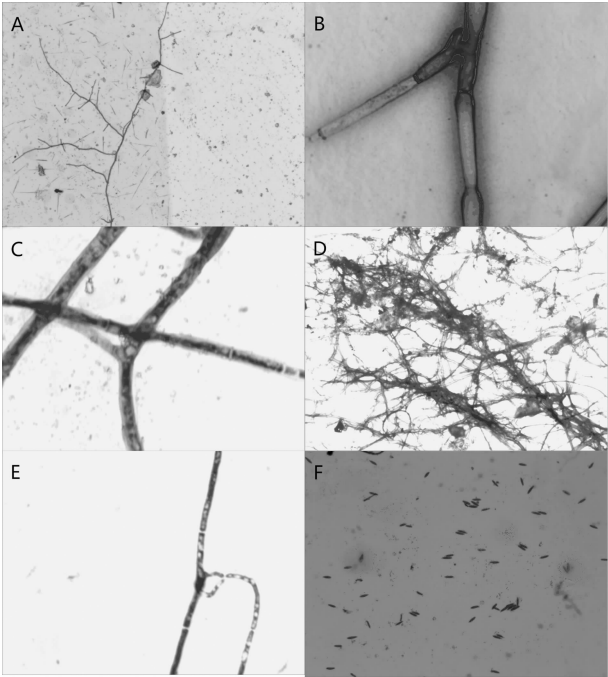
后,病斑部位再分离,所获分离菌株与菌株 YT-2 完全一致,符合柯赫氏法则。

2.3 病原物的培养性状及产孢结构观察

病原菌在马铃薯葡萄糖琼脂培养基上长势最好,而在改良马丁培养基上生长相对迟缓。气生菌丝十分发达,会呈现“峰”状耸起,菌丝最高可以触到培养皿盖;生长初期菌落呈白色,后期呈灰色。在野外病株中可以观察到该病原菌的有性或无性繁殖结构(图 1)。经近紫外线照射培养后,病原菌可在改良马丁培养基上产生繁殖体。培养 30 d 后,菌落表面局部有直径约 1~2 mm 的颗粒状角质化凸起物(分生孢子器)生成,分生孢子纺锤形,单细胞,无色,大小 15~20 μm × 3~5 μm(图 2-F)。根据上述病原菌的培养性状和形态学特征,初步鉴定该病原菌为葡萄座腔菌(*Botryosphaeria dothidea*)。为了进一步确认,利用 ITS 基因分析方法对病原菌进行分子鉴定。



箭头所示为病原菌子实体
图1 大樱桃干腐病症状



A—直角分枝; B—锐角分枝与竹节形态; C—桥状连接;
D—菌丝交织聚集; E—菌丝断裂; F—分生孢子形态

图2 病原菌菌丝及分生孢子形态

2.4 病原菌的分子鉴定及系统发育树分析

PCR 产物琼脂糖电泳结果显示,ITS 基因片段的大小在 540 bp 左右(图 3)。序列经 BLAST 比对后发现,基因序列与 GenBank 数据库中多个葡萄座腔菌菌株的相似性均达到 100%。系统发育分析(图 4)也表明病原菌株 YT-2 与已报道葡萄座腔菌种在一个分支内(自展支持率达 98%),与葡萄座腔菌属其他种类遗传关系相对较远,结合形态学鉴定结果,确定 YT-2 菌株为葡萄座腔菌(*B. dothidea*)。

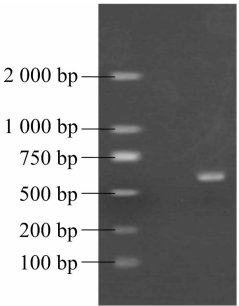


图3 YT-2 PCR 扩增产物电泳

3 结论与讨论

葡萄座腔菌(*B. dothidea*)是一种分布十分广泛的真菌,在世界范围内均有报道,它不仅可以侵染植物,成为植物的病

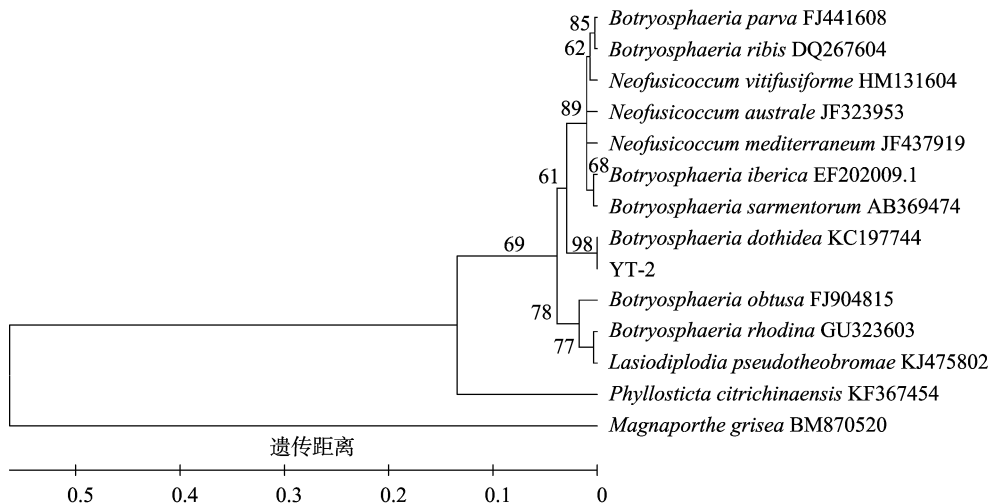


图4 YT-2 菌株 rDNA 的 ITS 基因序列的 NJ 系统发育树

原菌,也可以寄生在植物组织内成为内生真菌,甚至存活在某些坏死的植物组织上作为腐生菌^[1]。作为病原菌,该菌的寄生性比较弱,目前已经有研究报道它能侵染的主要林业树木有苹果、葡萄、松树、杨树、黑莓、桃树、橄榄、芒果等^[5-10],由于不同林木的生理生化性质不同,因此该菌的致病性、林木的抗病性和在二者共生过程中,不同种类的林木产生的防御反应差异也比较大,这很容易造成相同症状的不同寄主拥有不同的反应机制;而同种林木因为个体间的生长差异以及不同环境地域的差异,对同一真菌的反应也不尽相同^[11]。因此,葡萄座腔菌引起的病症也因树种和树体自身差异而表现不同,主要的病症表现为叶斑、枝干溃疡、枝条枯萎、果实腐烂等。目前研究表明病害多发生在长势衰弱的植株上,尤其当植物受到干旱、霜冻或其他病虫害侵染时发病率更会极大地提高^[12-14],但是,在本研究中,长势健壮的大樱桃植株会迅速感染该病原菌,并且造成植株死亡的严重后果,尤其以布鲁克斯大樱桃表现最为明显,这也是首次发现葡萄座腔菌可以感染大樱桃,因此,在大樱桃上首次发现葡萄座腔菌,为研究大樱桃的栽培管理技术奠定了基础。虽然布鲁克斯大樱桃适应环境的能力强,但却是对葡萄座腔菌抗性最弱的品种,在嫁接时应注意消毒杀菌,施用腐熟好的农家肥,并注意做好防寒措施。

葡萄座腔菌科 (Botryosphaeriaceae) 真菌的无性型在自然界和实验室人工条件下培养比较常见,但是有性型在这 2 种条件下都较少见,尤其是在实验室条件下,很少能观察到它的有性型形态。因此,目前对于该属真菌主要基于无性型的形态特征进行分类学鉴定的^[15]。但是,葡萄座腔菌种间的形态十分相似,不易产生有性繁殖结构,葡萄座腔菌的寄主广泛、容易交叉污染等特点使无性态区别十分模糊,并且这些特征也使该类群有性型和无性型种的建立比较混乱,所以单纯依靠传统的鉴定方法有一定的局限性。目前该属真菌种类的分类学和亲缘关系仍不是很清楚,需要进一步深入研究。随着分子技术的发展,基因组 DNA 中的保守序列 (LSU/ITS 等) 已越来越多地应用到该类病原菌的鉴定中。本试验通过形态学观察并对 rDNA - ITS 序列进行分析,对引起大樱桃溃疡病的病原菌进行鉴定,最终确认其为葡萄座腔菌 (*B. dothidea*),为山东省青岛地区大樱桃溃疡病的防治奠定了理论基础。

在进行病原菌鉴定的过程中,本研究主要通过紫外线照射的方法进行人工诱导产孢,最终观察到该菌株的孢子结构特征,但耗时 1 个月,时间过长,由于种间的形态比较相似,鉴定需要有丰富的经验,难度相对较大。而利用 rDNA - ITS 序列分析方法对病原菌进行鉴定,操作不仅简单,而且快速。但是,因为 ITS 序列在遗传变异性上属于中等保守区,难以充分显示葡萄座腔菌种间复杂的相关性和多样性。所以,在进行病原鉴定时结合形态学方法作为验证仍是十分必要的。而且,由于葡萄座腔菌属真菌感染寄主的广泛性,以及不同菌株对于不同寄主致病性的显著差异,找到能够快速区别不同致病力菌株的分子标记或相关方法也是亟待开展的工作。

参考文献:

- [1] 董薇,宋雅坤,吴明勤,等. 大樱桃病毒病研究进展[J]. 中国农学通报,2005,21(5):332-336.
- [2] 王家喜,王少敏,王江勇. 甜樱桃品种布鲁克斯引种试验[J]. 中国果树,2008(2):30-32.
- [3] 刘秋霞. 林木溃疡病的综合防治[J]. 国土绿化,2008(6):55.
- [4] 吴小芹,何月秋,刘中华. 葡萄座腔菌所致树木溃疡病发生与研究进展[J]. 南京林业大学学报:自然科学版,2001,25(1):61-66.
- [5] Smith H, Wingfield M J, Crous P W, et al. *Sphaeropsis sapinea* and *Botryosphaeria dothidea* endophytic in *Pinus* spp. and *Eucalyptus* spp. in South Africa[J]. South Africa Journal of Botany, 1996, 62(2):86-88.
- [6] Maas J L, Uecker F A. *Botryosphaeria dothidea* cane canker of thornless blackberry[J]. Plant Disease, 1984, 68(8):720-726.
- [7] Xie L, Huang S L, Cen Z L, et al. First report of *Botryosphaeria dothidea* causing sweet osmanthus leaf dieback in China[J]. Agriculture Science in China, 2010, 9(6):847-853.
- [8] Wunderlich N, Costa S S, Tpoi R P, et al. First report of *Botryosphaeria dothidea* causing shoot blight and cankers of pistachio in Australia[J]. Australasian Plant Disease Notes, 2012, 7(1):47-49.
- [9] Zhang Z X, Deng D F, Qi W J, et al. *Botryosphaeria dothidea*, the causal agent of a new stem canker disease of Tatarian dogwood (*Cornus alba*) in China[J]. Australasian Plant Pathology, 2013, 42(2):113-119.

王铁军,钟万芳,朱丽梅,等. 烟粉虱病原真菌的分离鉴定及生物活性初步研究[J]. 江苏农业科学,2016,44(11):148-150.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2016.11.044

烟粉虱病原真菌的分离鉴定及生物活性初步研究

王铁军², 钟万芳³, 朱丽梅¹, 王 耘¹, 陈 冬⁴, 康秋玉⁴, 赵明珠⁴

(1. 金陵科技学院园艺学院, 江苏南京 210036; 2. 南京新农科创投资有限责任公司, 江苏南京 211134;
3. 江苏省农业科学院植物保护研究所, 江苏南京 210014; 4. 南京清雅花卉专业合作社, 江苏南京 211134)

摘要:对田间分离的死亡烟粉虱虫体进行保湿培养,分离得到1株具有杀虫活性的菌株,通过对该菌株的形态、培养特征的观察及对其 ITS 核酸序列进行扩增与分析,鉴定该菌株为玫烟色棒束孢(*Isaria fumosorosea*)。采用浸渍法测定该菌株对烟粉虱2龄若虫的生物活性,结果表明,在孢子浓度为 1.0×10^7 CFU/mL时,孢子加菌丝悬浮液处理的虫体死亡率最高,其72 h和120 h的平均死亡率分别为39%和62%,其次为单用孢子悬液处理,死亡率分别为35%和52%,但两者无显著差异,单用菌丝处理的死亡率最低,分别为20%和38%,与前2种处理方式结果有显著性差异,说明菌株QH1可能主要是通过孢子侵染烟粉虱虫体而表现出杀虫活性。

关键词:烟粉虱;病原真菌;分离鉴定;生物活性

中图分类号: S433.39 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2016)11-0148-03

烟粉虱(*Bemisia tabaci* Gennadius)广泛分布于除南极洲以外的90多个国家,是一种杂食性害虫,其寄主植物超过600种,包括棉花、多种蔬菜以及多种观赏植物和花卉^[1-2]。烟粉虱危害方式多样,不仅可以直接吸取植物汁液、分泌蜜露,还可以传播多种植物病毒,给农业生产带来了严重的危害^[3]。因此,如何对烟粉虱进行有效的治理和控制引起了国内外学者的广泛重视,并积极研究有效防控烟粉虱的策略和方法。实践证明一些农业和物理防治措施对预防和控制田间烟粉虱是很有效的,按照可持续控制的理念,生物防治在烟粉虱的综合防治中扮演着非常重要的角色。目前,国内外学者在烟粉虱天敌的基础研究和应用方面已经做了大量工作,并在农业生产实践中发挥着重要作用,其中病原真菌的寻找和应用是生物防治的主要研究内容之一。已报道的烟粉虱病原

真菌种类繁多,且多为丝孢菌纲,主要包括轮枝菌(*Verticillium*)、拟青霉菌(*Paecilomyces*)和座壳孢属(*Aschersonia*)的一些种类^[4]。这些天敌中的很多都能取食或寄生大量烟粉虱,在控制烟粉虱时起着重要作用。

玫烟色棒束孢(*Isaria fumosorosea*)是一类较为常见的昆虫病原真菌,曾称为玫烟色拟青霉(*Paecilomyces fumosoroseus*),属于囊菌亚门核菌纲,肉座菌目,虫草菌科棒束孢属,能寄生蜚蠊目、等翅目、缨翅目、半翅目、鳞翅目、双翅目和鞘翅目等目的多种害虫^[5]。玫烟色棒束孢也是常见的土壤微生物,具有较广泛的地理分布和较强的生态适应能力,因此,开发和利用该类昆虫病原真菌已成为生物防治中控制害虫危害的一个重要手段和发展趋势。目前,国外已筛选出对粉虱、蚜虫等刺吸式口器害虫高致病力的菌株,并将其应用于大田和温室的害虫防治^[6]。本研究从金陵科技学院园艺站采集感染真菌死亡的烟粉虱虫体,经分离纯化得到了菌株QH1,在观察了该菌株的形态特征、菌落生长特征以及菌株显微特征的前提下,采用分子生物学手段对该菌株进行了鉴定,并初步测定了该菌株对烟粉虱的杀虫活性。

1 材料与方法

1.1 烟粉虱病原真菌的分离纯化

将田间收集的死亡烟粉虱虫体放入70%乙醇中浸3~

收稿日期:2015-08-24

基金项目:江苏省高校自然科学研究面上项目(编号:14KJB210004);

江苏省南京市江宁区科技发展计划项目(编号:2015Ed01)。

作者简介:王铁军(1985—),男,湖南衡阳人,助理园艺师,主要从事汤山翠谷现代农业科技园园区农业生产与科研工作。E-mail: 122065151@qq.com。

通信作者:朱丽梅,博士,教授,主要从事园艺病虫害防治的教学与科研工作。E-mail:910703164@qq.com。

[10] Tang W, Ding Z, Zhou Z Q, et al. Phylogenetic and pathogenic analyses show that the causal agent of apple ring rot in China is *Botryosphaeria dothidea* [J]. Plant Disease, 2012, 96 (4): 486-489.

[11] Latinović J, Mazzaglia A, Latinović N, et al. Resistance of olive cultivars to *Botryosphaeria dothidea*, causal agent of olive fruit rot in Montenegro [J]. Crop Protection, 2013, 48: 35-40.

[12] 薛云飞,穆希凤,袁秀英,等. 葡萄座腔菌属真菌毒素研究进展 [J]. 中国森林病虫, 2010, 29(2): 31-34.

[13] Slippers B, Wingfield M J. Botryosphaeriaceae as endophytes and la-

tent pathogens of woody plants: diversity, ecology and impact [J]. Fungal Biology Reviews, 2007, 21(2): 90-106.

[14] Alves A, Phillips A J L, Henriques I, et al. Evaluation of amplified ribosomal DNA restriction analysis as a method for the identification of *Botryosphaeria* species [J]. FEMS Microbiology Letters, 2005, 245 (2): 221-229.

[15] Denman S, Crous P W, Taylor J E, et al. An overview of the taxonomic history of *Botryosphaeria* and a re-evaluation of its anamorphs based on morphology and ITS rDNA phylogeny [J]. Studies in Mycology, 2000, 45: 129-140.