

潘慧,邓蕾,陈美艳,等.浙江省泰顺县猕猴桃周年病害调查及病原菌鉴定[J].江苏农业科学,2019,47(14):104-111.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2019.14.024

浙江省泰顺县猕猴桃周年病害调查及病原菌鉴定

潘慧¹,邓蕾¹,陈美艳¹,张胜菊¹,刘康猛²,张庆朝²,庄期海²,李黎¹,钟彩虹¹

(1.中国科学院植物所质创新与特色农业重点实验室/中国科学院武汉植物园,湖北武汉 430074;

2.浙江省泰顺县林业局,浙江温州 325599)

摘要:浙江省泰顺县周年雨水较多,部分猕猴桃园区由于栽培管理方式不当造成病害严重流行。中国科学院武汉植物园联合泰顺县林业局分别于2016年8月、10月,2017年4月对泰顺县7个乡镇共19个代表性栽培果园进行了猕猴桃周年病害调查。通过采集大量典型病害样本,结合生物学特征、分子鉴定及致病性验证试验进行分析。结果表明,泰顺县猕猴桃夏季和秋冬季主要病害为细菌性溃疡病和真菌性软腐病、黑斑病、灰斑病和炭疽病;春季溃疡病发生率显著升高,但真菌病害轻微很多。调查结果可为泰顺县后期猕猴桃病害的预测及综合防治提供理论依据。

关键词:猕猴桃;病害;生物学特征;ITS鉴定;Psa鉴定

中图分类号: S436.634 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2019)14-0104-07

猕猴桃(*Actinidia* spp.)隶属猕猴桃科(Actinidiaceae)猕猴桃属(*Actinidia* Lindl.),具有很高的营养及经济价值,目前在中国、新西兰、意大利、法国、智利等国家广泛种植^[1]。浙江省泰顺县地处温州西南,是我国浙江省第二大猕猴桃主产区,至2017年12月全县发展猕猴桃近930 hm²,年产量约9 000 t。目前主要在罗阳镇、泗溪镇、三魁镇、司前镇、筱村镇、百丈镇等乡镇种植,品种多数为红阳,其次是布鲁诺和华特,近几年开始逐步发展金艳和Hort16A等品种。

浙江省泰顺县属于亚热带海洋型季风气候,雨量充沛,气候温和湿润,土壤为山区沙质壤土,优越的地理环境为猕猴桃产业的发展提供了保障。但同时猕猴桃生长季节雨水也较多,部分果农栽培管理方式不当,导致园区阴蔽潮湿,造成猕猴桃细菌性及真菌性病害的流行,阻碍了当地猕猴桃产业的发展。因此,中国科学院武汉植物园联合泰顺县林业局于2016年8月、10月,2017年4月对该县7个乡镇19个代表性栽培园区进行了猕猴桃周年病害调查,通过采样分析和病原鉴定,全面了解该县不同季节猕猴桃病害的种类、危害程度及分布,为后期猕猴桃病害的预测及综合防治提供理论依据。

1 材料与与方法

1.1 感病样本采集

收稿日期:2018-04-25

基金项目:国家自然科学基金青年科学基金(编号:31701974);湖北省自然科学基金面上项目(编号:2017CFB443);湖北省技术创新专项(重大项目)(编号:2016ABA109);湖北省农业科技创新行动项目“特色水果生态高效栽培与采后处理”;湖北省武汉市科技局前资助科技计划(编号:2018020401011307)。

作者简介:潘慧(1984—),女,湖北武汉人,硕士,助理工程师,主要从事猕猴桃病虫害预测、鉴定、防治及抗性资源选育工作。
E-mail:panhui@wbgeas.cn。

通信作者:钟彩虹,博士,研究员,主要从事猕猴桃资源利用及开发工作,E-mail:zhongch1969@163.com;李黎,博士,副研究员,主要从事猕猴桃病害研究,E-mail:lili@wbgeas.cn。

2016年8月、10月,2017年4月对19个采样点进行感病样本的采集。共采集243份具有明显病斑的叶片,53份果实,25份枝干作为试验材料。各采样点具体地理位置及所采样本品种见表1。

1.2 病原菌的分离和培养

1.2.1 细菌性病原菌的分离和培养 叶片样本用1 cm规格打孔器取病健交界处3片直径1 cm的组织,经75%乙醇表面消毒,置于装有600 μL 10 mmol/L MgSO₄和2粒钢珠的1.5 mL离心管中,用研磨仪进行匀浆。对于枝干样本,用无菌手术刀切取病健交界处内部组织,同样方法消毒并研磨。将菌悬液进行梯度稀释,取150 μL 10⁻³菌悬液涂布于假单胞菌专用固体培养基KB CFC,28℃培养2 d后划线分离单菌落。挑取生物学特征近似丁香假单胞杆菌猕猴桃致病变种(*Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*, Psa)的单菌落进行氧化酶测试,保存阴性菌落。每个样本设置3个重复。

1.2.2 真菌性病原菌的分离和培养 叶片样本用1 cm规格打孔器取病健交界处3片直径1 cm的组织,经75%乙醇表面消毒后置于PDA培养基25℃恒温培养5 d。针对果实样本,运用无菌手术刀切取病健交界处果肉组织直接置于PDA培养基25℃培养5 d。待平板长出菌落后,选取菌丝尖端置于新PDA平板以获得纯菌株。每个样本设置3个重复。

1.3 病原菌的分子鉴定

1.3.1 细菌性溃疡病病原菌分子鉴定 运用Rees等的方法^[2],用特异引物PsaF1(5'-TTTTGCTTTTGACACCCGATTIT-3')和PsaR2(5'-CACGCACCCTTCAATCAGGATG-3');扩增反应体系10 μL,10 mmol/L dNTP 0.2 μL,含Mg²⁺的10×PCR buffer 1 μL,100 μmol/L引物各0.1 μL,5 U/μL Taq酶0.1 μL,1.1 g/mL二甲基亚砜(DMSO) 0.2 μL,DNA模板2 μL,ddH₂O 6.3 μL;PCR反应程序为94℃ 5 min;94℃ 30 s,55℃ 30 s,72℃ 1 min,30个循环;72℃ 10 min。扩增产物经1.5%琼脂糖凝胶电泳检测,观察是否有溃疡病菌菌株可扩增得到的大小为280 bp的目的条带。

1.3.2 真菌ITS鉴定 将纯菌株置于平铺玻璃纸的PDA培

表1 不同采样点地理位置及样本品种

编号	季节	经度 (E)	纬度 (N)	高度 (m)	乡镇名称	样本品种
1	夏季	119°43'08"	27°37'04"	511	罗阳镇	红阳
2	夏季	119°44'24"	27°58'21"	805	罗阳镇	布鲁诺
3	夏季	119°44'04"	27°38'37"	883	罗阳镇	红阳、翠玉、布鲁诺
4	夏季、春季	119°44'56"	27°37'36"	626	罗阳镇	红阳
5	夏季、秋冬季、春季	119°44'05"	27°36'42"	646	罗阳镇	金艳
6	夏季	119°44'44"	27°35'47"	290	罗阳镇	红阳
7	夏季	119°44'34"	27°34'44"	324	罗阳镇	布鲁诺
8	夏季、秋冬季	119°47'02"	27°30'42"	816	罗阳镇	翠玉、金艳
9	夏季、春季	119°58'58"	27°28'59"	465	泗溪镇	红阳
10	夏季、春季	119°54'13"	27°26'37"	470	三魁镇	红阳、金艳
11	夏季	119°45'15"	27°42'02"	280	司前镇	红阳、布鲁诺、华特
12	夏季	119°44'46"	27°41'15"	196	司前镇	红阳
13	夏季、秋冬季	119°45'33"	27°41'35"	183	司前镇	红阳
14	秋冬季、春季	119°43'14"	27°36'36"	421	罗阳镇	红阳
15	秋冬季、春季	119°51'53"	27°30'52"	646	罗阳镇	红阳、布鲁诺、华特
16	秋冬季	119°53'56"	27°35'22"	418	筱村镇	红阳
17	秋冬季	119°49'37"	27°39'17"	363	百丈镇	红阳
18	春季	119°51'27"	27°26'53"	731	大安乡	红阳
19	春季	119°51'42"	27°29'56"	589	罗阳镇	红阳

培养基上,25℃静置培养5~8 d后收集菌丝。采用生工生物工程(上海)股份有限公司 Ezup 柱式真菌基因组 DNA 抽提试剂盒提取基因组 DNA,置于-20℃备用。运用真菌核糖体基因组转录间隔区通用引物 ITS4/ITS5 进行 PCR 扩增(ITS5 序列, GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG; ITS4 序列, TCCTCCGCTTA TTGATATGC)。扩增反应体系 40 μL, 10 mmol/L dNTP 0.80 μL, 含 Mg²⁺ 的 10 × PCR buffer 4.00 μL, 100 μmol/L 引物各 0.20 μL, 5 U/μL Taq 酶 0.25 μL, 1.10 g/mL DMSO 0.80 μL, DNA 模板 2.00 μL, ddH₂O 31.75 μL。PCR 反应程序为 94℃ 5 min; 94℃ 30 s, 55℃ 30 s, 72℃ 1 min, 30 个循环; 72℃ 10 min。扩增产物经 1.5% 琼脂糖凝胶检测后送至华大基因公司测序,将测序结果进行 Blast 比对,作同源性相似度差异性分析,确定菌株的分类地位。

1.4 致病性验证

1.4.1 细菌性病原菌致病性验证 将单菌落置于液体 KB 培养基中,于 28℃ 恒温振荡培养 3~4 d,转速为 180 r/min。将菌悬液稀释为 $D_{600\text{nm}} = 0.2$,喷雾接种 20 μL 于组培苗叶片上,塑料盖密封保湿 48 h,同时接种无菌水为阴性对照,5~6 d 后观察发病情况。接种试验重复 3 次。待叶片发病后从病健交界处再次分离培养菌落,进行氧化酶测试和分子鉴定。

1.4.2 真菌性病原菌致病性验证 将果实和叶片的表面用 2 号解剖针刺伤,果实刺伤深度为 2~3 mm,将 5 mm 无菌打孔器制成的菌株菌饼接种于伤口处,菌丝面朝下并覆盖无菌湿棉球,置于透明盒中密封保湿,同时以接种 PDA 琼脂块为对照,5~8 d 后观察发病情况。每个菌株的接种试验重复 3 次。果实和叶片发病后从病健交界处再次分离培养病原菌,与原接种菌株进行比较。

2 结果与分析

2.1 感病症状

在浙江省泰顺县大部分栽培园区观察到疑似灰斑病、黑

斑病、炭疽病、溃疡病和果实软腐病的症状(图 1),感病症状与罗禄怡等描述的^[3-7]一致。疑似灰斑病感病症状:叶面病斑呈灰褐至暗褐色,叶背黑褐色。疑似黑斑病感病症状:叶背黑色霉状病斑,病部对应的叶面出现黄色褪绿斑。疑似炭疽病感病症状:叶面病斑中间为灰白色,边缘深褐色,叶缘略向叶背卷缩。疑似溃疡病感病症状:叶面有不规则形褐色斑点,病斑周围伴有 3~5 mm 明显的黄色晕圈;枝干上乳白色黏质菌脓与植物伤流混合后呈锈红色,顺着枝干流下。疑似软腐病感病症状:剥开发病部位表皮,病部中心果肉呈乳白色,周围呈黄绿色水渍状。

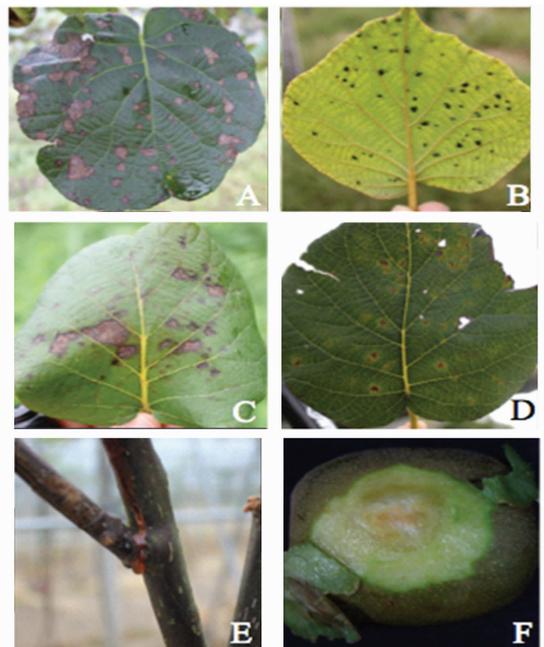


图1 浙江省泰顺县猕猴桃栽培园区主要病害感病症状
A—疑似灰斑病症状; B—疑似黑斑病症状; C—疑似炭疽病症状;
D—E—疑似溃疡病症状; F—疑似果实软腐病症状

2.2 细菌性溃疡病原菌的鉴定结果

经鉴定发现,夏季采样点1的叶片样本携带溃疡病原菌,秋冬季采样点8和14的叶片样本携带溃疡病原菌,春

季发现携带溃疡病原菌采样点明显增多,包括采样点4、9、10、14、15、18、19(图2)。

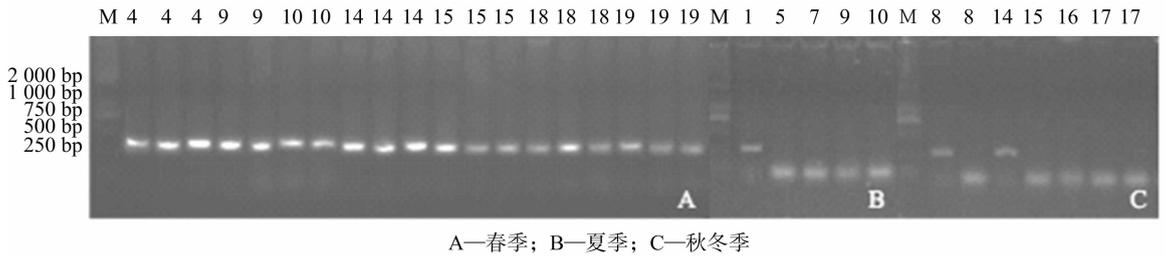


图2 不同季节感病园区样本 PsalF1/PsalR2 菌落 PCR 扩增

2.3 真菌性病原菌的鉴定结果及预测病害

不同季节采样鉴定到的全部真菌菌株列表及预测病害见表2。部分菌株菌落及其孢子形态见图3。小孢拟盘多毛孢菌分生孢子纺锤形或棍棒状,隔膜分成5个细胞,大小为(18.5~22.5) μm \times (5.6~7.3) μm ;顶孢上着生2~3根长

9.2~20.5 μm 的无色附属丝。胶孢炭疽菌分生孢子透明圆柱状,单胞,大小为(9.8~14.3) μm \times (4.2~5.4) μm 。稻黑孢菌和球黑孢菌分生孢子均为黑色圆球形,单胞,大小直径分别为10.8~14.3 μm 和12.5~18.0 μm 。

表2 不同季节采样鉴定到的具体真菌菌株列表及预测病害

采样园区	采样季节	菌株号	NCBI 编号	Blast 对应最近似种属编号	Blast 对应最近似种属	相似性 (%)	预测病害
1	夏季	TS-1	MG832421	HQ859952	新壳梭孢菌(<i>Neofusicoccum parvum</i>)	100	
1	夏季	TS-2	MG832422	JX846914	拟茎点霉菌(<i>Phomopsis vaccinii</i>)	100	软腐病
1	夏季	TS-3	MG832423	KY319134	<i>Neopestalotiopsis clavispora</i>	100	
1	夏季	TS-4	MG832424	KX244815	<i>Lasiodiplodia pseudotheobromae</i>	100	
1	夏季	TS-5	MG832425	KX866882	拟盘多毛孢菌(<i>Pestalotiopsis versicolor</i>)	100	软腐病、灰斑病
1	夏季	TS-6	MG832426	KT953237	胶孢炭疽菌(<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>)	100	炭疽病
1	夏季	TS-7	MG832427	HM537048	<i>Fungal endophyte</i> sp.	100	
1	夏季	TS-8	MG832428	KC153101	拟茎点霉菌(<i>Phomopsis lithocarpus</i>)	100	软腐病
1	夏季	TS-9	MG832429	KR011192	间座壳属(<i>Diaporthe</i> sp.)	99	软腐病
1	夏季	TS-10	MG832430	MF509747	<i>Fusarium avenaceum</i>	100	
2	夏季	TS-11	MG832431	KX355196	拟盘多毛孢菌(<i>Pestalotiopsis neglecta</i>)	100	软腐病、灰斑病
2	夏季	TS-12	MG832432	EF638785	<i>Neofusicoccum vitifusiforme</i>	98	
2	夏季	TS-13	MG832433	JX258717	博宁炭疽菌(<i>Colletotrichum boninense</i>)	100	
2	夏季	TS-14	MG832434	AB741610	<i>Xylariaceae</i> sp.	100	
2	夏季	TS-15	MG832435	JX258802	胶孢炭疽菌(<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>)	100	炭疽病
2	夏季	TS-16	MG832436	KY555011	<i>Didymella rosea</i>	100	
2	夏季	TS-17	MG832437	KY508362	<i>Fusarium fujikuroi</i>	100	
3	夏季	TS-18	MG832438	HM537048	<i>Fungal endophyte</i> sp.	100	
3	夏季	TS-19	MG832439	KX866885	小孢拟盘多毛孢(<i>Pestalotiopsis microspora</i>)	100	软腐病、灰斑病
3	夏季	TS-20	MG832440	KX533933	<i>Arthrinium arundinis</i>	100	
4	夏季	TS-21	MG832441	JQ260831	拟茎点霉菌(<i>Phomopsis vaccinii</i>)	99	软腐病
4	夏季	TS-22	MG832442	KR995714	胶孢炭疽菌(<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>)	100	炭疽病
4	夏季	TS-23	MG832443	KM921666	球黑孢菌(<i>Nigrospora sphaerica</i>)	100	叶斑病
4	夏季	TS-24	MG832444	JX624262	<i>Nemanita</i> sp.	100	
4	夏季	TS-25	MG832445	FJ481024	<i>Didymella glomerata</i>	100	
4	夏季	TS-26	MG832446	KT337391	拟盘多毛孢菌(<i>Pestalotiopsis neglecta</i>)	99	软腐病、灰斑病
4	夏季	TS-27	MG832447	MF135666	球黑孢菌(<i>Nigrospora sphaerica</i>)	100	叶斑病
4	夏季	TS-28	MG832448	KM921666	球黑孢菌(<i>Nigrospora sphaerica</i>)	100	叶斑病
4	夏季	TS-29	MG832449	MF125057	间座壳菌(<i>Diaporthe longicolla</i>)	99	软腐病
4	夏季	TS-30	MG832450	AB701365	<i>Xylaria</i> sp.	100	
4	夏季	TS-31	MG832451	KR995714	胶孢炭疽菌(<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>)	100	炭疽病
4	夏季	TS-32	MG832452	KX866879	间座壳菌(<i>Diaporthe phaseolorum</i>)	100	软腐病
5	夏季	TS-33	MG832453	KR995714	胶孢炭疽菌(<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>)	100	炭疽病
6	夏季	TS-34	MG832454	MF135666	球黑孢菌(<i>Nigrospora sphaerica</i>)	100	叶斑病

续表 2

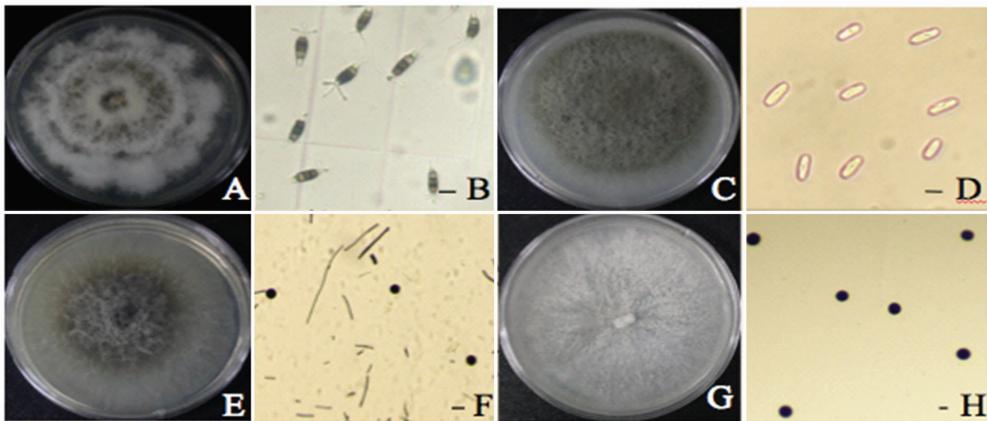
采样园区	采样季节	菌株号	NCBI 编号	Blast 对应最近 似种属编号	Blast 对应最近似种属	相似性 (%)	预测病害
6	夏季	TS-35	MG832455	JF925333	隔孢伏革菌属 (<i>Peniophora</i> sp.)	99	
6	夏季	TS-36	MG832456	KU904475	哈茨木霉菌 (<i>Trichoderma harzianum</i>)	99	
6	夏季	TS-37	MG832457	KX757719	拟盘多毛孢属 (<i>Pestalotiopsis</i> sp.)	100	软腐病、灰斑病
6	夏季	TS-38	MG832458	DQ145731	拟茎点霉菌 (<i>Phomopsis vaccinii</i>)	100	软腐病
6	夏季	TS-39	MG832459	JX231012	胶孢炭疽菌 (<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>)	99	炭疽病
6	夏季	TS-40	MG832460	AB741610	<i>Xylariaceae</i> sp.	100	
7	夏季	TS-41	MG832461	KM921666	球黑孢 (<i>Nigrospora sphaerica</i>)	100	叶斑病
7	夏季	TS-42	MG832462	HQ859952	新壳梭孢菌 (<i>Neofusicoccum parvum</i>)	99	
7	夏季	TS-43	MG832463	KX757719	拟盘多毛孢属 (<i>Pestalotiopsis</i> sp.)	100	软腐病、灰斑病
7	夏季	TS-44	MG832464	KM921666	球黑孢菌 (<i>Nigrospora sphaerica</i>)	100	叶斑病
8	夏季	TS-45	MG832465	EF432257	间座壳属 (<i>Diaporthe</i> sp.)	99	软腐病
8	夏季	TS-46	MG832466	KX355191	稻黑孢 (<i>Nigrospora oryzae</i>)	100	黑斑病、褐斑病
8	夏季	TS-47	MG832467	KR995714	胶孢炭疽菌 (<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>)	100	炭疽病
8	夏季	TS-48	MG832468	HQ859952	新壳梭孢菌 (<i>Neofusicoccum parvum</i>)	100	
8	夏季	TS-49	MG832469	KC145876	间座壳属 (<i>Diaporthe</i> sp.)	100	软腐病
8	夏季	TS-50	MG832470	MF135666	球黑孢菌 (<i>Nigrospora sphaerica</i>)	100	叶斑病
8	夏季	TS-51	MG832471	KT390189	胶孢炭疽菌 (<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>)	100	炭疽病
9	夏季	TS-52	MG832472	GQ906963	多节孢属 (<i>Nodulisporium</i> sp.)	99	
9	夏季	TS-53	MG832473	MF135666	球黑孢菌 (<i>Nigrospora sphaerica</i>)	100	叶斑病
9	夏季	TS-54	MG832474	FJ481024	<i>Didymella glomerata</i>	100	
9	夏季	TS-55	MG832475	KU821459	间座壳菌 (<i>Diaporthe lithocarpus</i>)	99	软腐病
9	夏季	TS-56	MG832476	KX866914	间座壳菌 (<i>Diaporthe eres</i>)	99	软腐病
9	夏季	TS-57	MG832477	MF135666	球黑孢菌 (<i>Nigrospora sphaerica</i>)	100	叶斑病
10	夏季	TS-58	MG832478	KT953379	拟盘多毛孢属 (<i>Pestalotiopsis</i> sp.)	100	软腐病、灰斑病
10	夏季	TS-59	MG832479	KR011192	间座壳属 (<i>Diaporthe</i> sp.)	100	软腐病
10	夏季	TS-60	MG832480	KX655596	胶孢炭疽菌 (<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>)	100	炭疽病
10	夏季	TS-61	MG832481	MF135666	球黑孢菌 (<i>Nigrospora sphaerica</i>)	100	叶斑病
10	夏季	TS-62	MG832482	JX010218	炭疽菌 (<i>Colletotrichum aotearoa</i>)	100	
11	夏季	TS-63	MG832483	HM595544	<i>Xylariaceae</i> sp.	98	
11	夏季	TS-64	MG832484	KR995714	胶孢炭疽菌 (<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>)	100	炭疽病
11	夏季	TS-65	MG832485	KX977489	间座壳菌 (<i>Diaporthe longicolla</i>)	99	软腐病
11	夏季	TS-66	MG832486	MF135666	球黑孢菌 (<i>Nigrospora sphaerica</i>)	100	叶斑病
11	夏季	TS-67	MG832487	KX249709	间座壳菌 (<i>Diaporthe lithocarpus</i>)	99	软腐病
12	夏季	TS-68	MG832488	AB513846	丛赤壳菌 (<i>Nectria ipomoeae</i>)	100	
12	夏季	TS-69	MG832489	EU326186	淡色生赤壳菌 (<i>Bionectria ochroleuca</i>)	100	
12	夏季	TS-70	MG832490	KP267877	间座壳菌 (<i>Diaporthe amygdali</i>)	100	软腐病
12	夏季	TS-71	MG832491	KU534983	胶孢炭疽菌 (<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>)	100	炭疽病
12	夏季	TS-72	MG832492	AB701365	<i>Xylaria</i> sp.	100	
12	夏季	TS-73	MG832493	MF135666	球黑孢菌 (<i>Nigrospora sphaerica</i>)	100	叶斑病
13	夏季	TS-74	MG832494	KX866885	小孢拟盘多毛孢 (<i>Pestalotiopsis microspora</i>)	100	软腐病、灰斑病
13	夏季	TS-75	MG832495	MF125057	间座壳菌 (<i>Diaporthe longicolla</i>)	99	软腐病
13	夏季	TS-76	MG832496	KR995714	胶孢炭疽菌 (<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>)	100	炭疽病
5	秋冬季	TS-77	MG832497	KR995714	胶孢炭疽菌 (<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>)	100	炭疽病
5	秋冬季	TS-78	MG832498	MF135666	球黑孢菌 (<i>Nigrospora sphaerica</i>)	100	叶斑病
5	秋冬季	TS-79	MG832499	KP942899	草茎点霉 (<i>Phoma herbarum</i>)	100	
5	秋冬季	TS-80	MG832500	KX355186	<i>Neopestalotiopsis egyptiaca</i>	100	
5	秋冬季	TS-81	MG832501	FJ481024	<i>Didymella glomerata</i>	100	
5	秋冬季	TS-82	MG832502	KX866917	间座壳菌 (<i>Diaporthe nobilis</i>)	100	软腐病
5	秋冬季	TS-83	MG832503	KU252298	拟盘多毛孢属 (<i>Pestalotiopsis</i> sp.)	100	软腐病、灰斑病
5	秋冬季	TS-84	MG832504	KX866879	间座壳菌 (<i>Diaporthe phaseolorum</i>)	100	软腐病
5	秋冬季	TS-85	MG832505	KX985943	<i>Nigrospora pyriformis</i>	100	
5	秋冬季	TS-86	MG832506	KF496905	拟茎点霉菌 (<i>Phomopsis vaccinii</i>)	100	软腐病
5	秋冬季	TS-87	MG832507	MF135666	球黑孢菌 (<i>Nigrospora sphaerica</i>)	100	叶斑病

续表 2

采样园区	采样季节	菌株号	NCBI 编号	Blast 对应最近 似种属编号	Blast 对应最近似种属	相似性 (%)	预测病害
8	秋冬季	TS-88	MG832508	MG603656	稻黑孢菌(<i>Nigrospora oryzae</i>)	100	黑斑病、褐斑病
8	秋冬季	TS-89	MG832509	HQ832826	拟茎点霉菌(<i>Phomopsis vaccinii</i>)	100	软腐病
8	秋冬季	TS-90	MG832510	KR995714	胶胞炭疽菌(<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>)	100	炭疽病
8	秋冬季	TS-91	MG832511	KM921666	球黑孢菌(<i>Nigrospora sphaerica</i>)	100	叶斑病
8	秋冬季	TS-92	MG832512	MF135666	球黑孢菌(<i>Nigrospora sphaerica</i>)	100	叶斑病
8	秋冬季	TS-93	MG832513	EF687936	拟茎点霉菌(<i>Phomopsis vaccinii</i>)	100	软腐病
8	秋冬季	TS-94	MG832514	KR703276	间座壳菌(<i>Diaporthe lithocarpus</i>)	100	软腐病
8	秋冬季	TS-95	MG832515	DQ631940	座坚壳属(<i>Rosellinia</i> sp.)	99	
13	秋冬季	TS-96	MG832516	KR995714	胶胞炭疽菌(<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>)	100	炭疽病
13	秋冬季	TS-97	MG832517	JN857951	拟茎点霉菌(<i>Phomopsis vaccinii</i>)	99	软腐病
13	秋冬季	TS-98	MG832518	KT192371	稻黑孢菌(<i>Nigrospora oryzae</i>)	99	黑斑病、褐斑病
13	秋冬季	TS-99	MG832519	LC194223	胶胞炭疽菌(<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>)	100	炭疽病
13	秋冬季	TS-100	MG832520	KM921666	球黑孢菌(<i>Nigrospora sphaerica</i>)	100	叶斑病
13	秋冬季	TS-101	MG832521	KX866874	间座壳菌(<i>Diaporthe phaseolorum</i>)	100	软腐病
14	秋冬季	TS-102	MG832522	KM015217	拟盘多毛孢菌(<i>Pestalotiopsis vismiae</i>)	100	软腐病、灰斑病
14	秋冬季	TS-103	MG832523	FJ481024	<i>Didymella glomerata</i>	100	
14	秋冬季	TS-104	MG832524	KR703276	间座壳菌(<i>Diaporthe lithocarpus</i>)	100	软腐病
14	秋冬季	TS-105	MG832525	MG603654	稻黑孢菌(<i>Nigrospora oryzae</i>)	100	黑斑病、褐斑病
14	秋冬季	TS-106	MG832526	KX631723	<i>Botryosphaeria fuispora</i>	99	
14	秋冬季	TS-107	MG832527	AB741610	<i>Xylariaceae</i> sp.	99	
14	秋冬季	TS-108	MG832528	KR995714	胶胞炭疽菌(<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>)	100	炭疽病
14	秋冬季	TS-109	MG832529	MG603655	稻黑孢菌(<i>Nigrospora oryzae</i>)	100	黑斑病、褐斑病
14	秋冬季	TS-110	MG832530	KX866887	球黑孢菌(<i>Nigrospora sphaerica</i>)	100	叶斑病
14	秋冬季	TS-111	MG832531	KY788310	葡萄座腔菌(<i>Botryosphaeria dothidea</i>)	100	软腐病
15	秋冬季	TS-112	MG832532	EU436680	稻黑孢菌(<i>Nigrospora oryzae</i>)	100	黑斑病、褐斑病
15	秋冬季	TS-113	MG832533	HQ859952	新壳梭孢菌(<i>Neofusicoccum parvum</i>)	100	
15	秋冬季	TS-114	MG832534	KR011192	间座壳属(<i>Diaporthe</i> sp.)	100	软腐病
15	秋冬季	TS-115	MG832535	MF135666	球黑孢菌(<i>Nigrospora sphaerica</i>)	100	叶斑病
15	秋冬季	TS-116	MG832536	KR995714	胶胞炭疽菌(<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>)	100	炭疽病
15	秋冬季	TS-117	MG832537	FJ478134	球黑孢菌(<i>Nigrospora sphaerica</i>)	100	叶斑病
15	秋冬季	TS-118	MG832538	KX977489	间座壳菌(<i>Diaporthe longicolla</i>)	99	软腐病
16	秋冬季	TS-119	MG832539	JQ809670	拟茎点霉菌(<i>Phomopsis</i> sp.)	99	软腐病
16	秋冬季	TS-120	MG832540	KX249709	间座壳菌(<i>Diaporthe lithocarpus</i>)	100	软腐病
16	秋冬季	TS-121	MG832541	KX866914	间座壳菌(<i>Diaporthe eres</i>)	100	软腐病
16	秋冬季	TS-122	MG832542	FJ810147	烟管菌(<i>Bjerkandera adusta</i>)	100	
16	秋冬季	TS-123	MG832543	MF135666	球黑孢菌(<i>Nigrospora sphaerica</i>)	100	叶斑病
16	秋冬季	TS-124	MG832544	KY419542	葡萄座腔菌(<i>Botryosphaeria dothidea</i>)	100	软腐病
16	秋冬季	TS-125	MG832545	KX610327	拟盘多毛孢菌(<i>Pestalotiopsis maculans</i>)	100	软腐病、灰斑病
16	秋冬季	TS-126	MG832546	KR995714	胶胞炭疽菌(<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>)	99	炭疽病
16	秋冬季	TS-127	MG832547	AY601918	拟茎点霉菌(<i>Phomopsis vaccinii</i>)	100	软腐病
16	秋冬季	TS-128	MG832548	KP050660	粉红粘帚霉(<i>Clonostachys rosea</i>)	99	
16	秋冬季	TS-129	MG832549	KX866889	间座壳菌(<i>Diaporthe tulliensis</i>)	100	软腐病
17	秋冬季	TS-130	MG832550	MF135666	球黑孢菌(<i>Nigrospora sphaerica</i>)	100	叶斑病
17	秋冬季	TS-131	MG832551	MF125057	间座壳菌(<i>Diaporthe longicolla</i>)	99	软腐病
17	秋冬季	TS-132	MG832552	KX866878	间座壳菌(<i>Diaporthe nobilis</i>)	100	软腐病
17	秋冬季	TS-133	MG832553	AB701365	<i>Xylaria</i> sp.	99	
17	秋冬季	TS-134	MG832554	KX866887	球黑孢菌(<i>Nigrospora sphaerica</i>)	100	叶斑病
17	秋冬季	TS-135	MG832555	DQ145731	拟茎点霉菌(<i>Phomopsis vaccinii</i>)	100	软腐病
17	秋冬季	TS-136	MG832556	FJ481024	<i>Didymella glomerata</i>	100	
17	秋冬季	TS-137	MG832557	AY601918	拟茎点霉菌(<i>Phomopsis vaccinii</i>)	99	软腐病
17	秋冬季	TS-138	MG832558	FJ481024	<i>Didymella glomerata</i>	100	
17	秋冬季	TS-139	MG832559	KR995714	胶胞炭疽菌(<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>)	100	炭疽病
17	秋冬季	TS-140	MG832560	KR011192	间座壳属(<i>Diaporthe</i> sp.)	100	软腐病

续表 2

采样园区	采样季节	菌株号	NCBI 编号	Blast 对应最近似种属编号	Blast 对应最近似种属	相似性 (%)	预测病害
17	秋冬季	TS-141	MG832561	MF135666	球黑孢菌 (<i>Nigrospora sphaerica</i>)	100	叶斑病
17	秋冬季	TS-142	MG832562	HQ859952	新壳梭孢菌 (<i>Neofusicoccum parvum</i>)	100	
9	春季	TS-143	MG832563	MG250391	细极链格孢 (<i>Alternaria tenuissima</i>)	100	
9	春季	TS-144	MG832564	FJ481024	<i>Didymella glomerata</i>	100	
10	春季	TS-145	MG832565	FJ481024	<i>Didymella glomerata</i>	100	
10	春季	TS-146	MG832566	LC342975	间座壳菌 (<i>Diaporthe eres</i>)	100	软腐病
14	春季	TS-147	MG832567	FJ481024	<i>Didymella glomerata</i>	100	
14	春季	TS-148	MG832568	MG250391	细极链格孢 (<i>Alternaria tenuissima</i>)	100	
14	春季	TS-149	MG832569	KY398730	<i>Neopestalotiopsis australis</i>	100	
14	春季	TS-150	MG832570	KX346889	链格孢菌 (<i>Alternaria alternata</i>)	100	软腐病、褐斑病
5	春季	TS-151	MG832571	KU252219	新拟盘多毛孢属 (<i>Neopestalotiopsis</i> sp.)	100	
5	春季	TS-152	MG832572	MG274308	<i>Fusarium graminearum</i>	99	



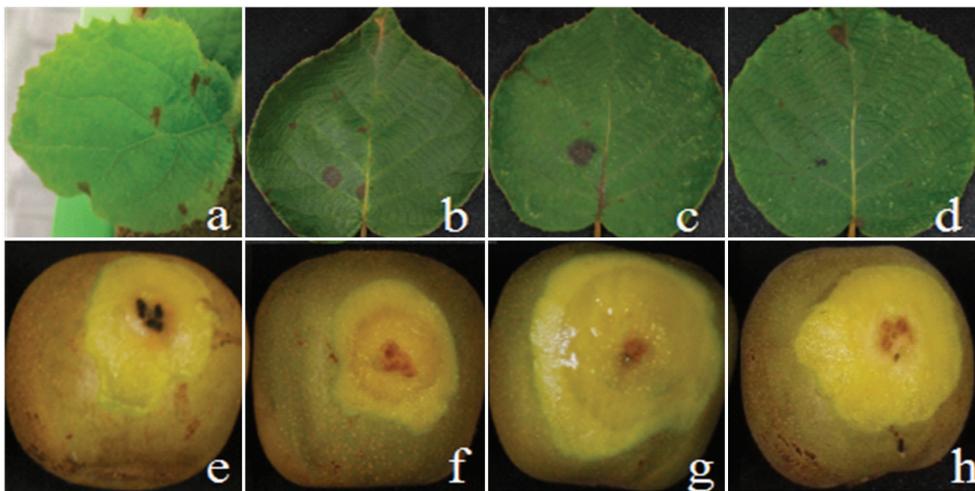
A~B—小孢拟盘多毛孢菌菌落及其孢子形态图；C~D—胶孢炭疽菌菌落及其孢子形态图；E~F—稻黑孢菌菌落及其孢子形态图；G~H—球黑孢菌菌落及其孢子形态图。图中标尺均为 10 μm。

图3 不同菌株的菌落及孢子形态

2.4 致病性验证

致病力试验测试(图4)表明,接种细菌性病原菌的叶片6 d后出现溃疡病症状;接种真菌菌株的刺伤叶片在6 d左右

出现症状,果实刺伤处出现典型软腐症状,叶片和果实的发病部位也重新分离到原接种菌株,符合柯赫氏法则致病性验证。结果显示Psa菌株会导致猕猴桃溃疡病;拟盘多毛孢菌可引



a—Psa 菌株接种在 Hort16A 叶片上引起的感病症状；b~d—小孢拟盘多毛孢菌、胶孢炭疽菌、球黑孢菌分别接种在红阳叶片上引起的感病症状；e~h—链格孢菌、葡萄座腔菌、间座壳菌、小孢拟盘多毛孢菌分别接种在红阳果实上引起的感病症状

图4 不同菌株接种猕猴桃叶片和果实的症状

起灰斑病;胶孢炭疽菌会引起炭疽病;球黑孢菌会导致叶斑病。链格孢菌、葡萄座腔菌、间座壳菌、拟盘多毛孢菌均可导致果实软腐病;鉴定为其他病原菌的菌株致病力效果并不十分明显,还有待进一步确认。

3 讨论与结论

浙江省泰顺县猕猴桃产业主要是专业合作社性质,大部分为家庭式种植,栽培范围从海拔 100 m 以上至 800 m 以上,各园区普遍存在同时种植早熟、中熟和晚熟多品种的现象,加大了栽培管理难度,从而诱发猕猴桃病害的流行。本次周年病害调查发现,泰顺县猕猴桃夏季和秋冬季主要病害为细菌性溃疡病和真菌性软腐病、黑斑病、灰斑病和炭疽病;春季溃疡病发生率显著升高,但真菌病害轻微很多。

猕猴桃细菌性溃疡病由丁香假单胞杆菌猕猴桃致病变种引起,致病性强,病原菌可随风雨进行传播,根除难度较大,目前已成为全球猕猴桃产业发展的主要限制因素。从泰顺县猕猴桃病害的周年检测结果来看,采样点 1、4、8、9、10、14、15、18、19 已感染细菌性溃疡病,特别是春季溃疡病的整体发病率较上一年夏季和秋冬季明显升高,除采样点 5 以外,其他果园都有发生,品种从红阳扩展到米良 1 号、华特和翠玉等。其原因主要有 3 点:(1)主栽品种红阳溃疡病抗性较差,且泰顺地区 2016 年冬季低温、2017 年早春倒春寒及花期多阴雨,导致溃疡病流行蔓延;(2)部分种植户从网上购买猕猴桃接穗苗木、外地随意引进接穗,极有可能携带溃疡病病原菌;(3)当地各园区种植户对溃疡病认识不足,修剪嫁接前工具未经消毒,且经常在无防护措施的情况下相互参观溃疡病疫区果园,进一步加快了溃疡病的传播。

真菌性病害方面,目前国内外专家已确定导致猕猴桃果实软腐病致病菌有葡萄座腔菌,拟盘多毛孢菌,间座壳菌(拟茎点霉菌的有性态),链格孢菌等^[8-14]。同时,拟盘多毛孢菌和胶孢炭疽菌分别会引起灰斑病^[15]和炭疽病^[16],球黑孢菌引起猕猴桃叶斑病^[17],稻黑孢菌证实引起黑斑病和褐斑病^[18]。此次调查结果,夏季和秋冬季果园均鉴定出大量导致猕猴桃果实软腐病、黑斑病、炭疽病、灰斑病的病原菌,春季在大部分园区并未鉴定到真菌性病害病原菌,比夏季和秋冬季轻微很多。另外,部分分离到的真菌病原菌菌株在致病性验证中,尚未发现引起叶片或果实明显的感病症状,仍需后期进一步验证。泰顺县真菌病害严重,主要原因(1)该县气候温和,雨量充沛,猕猴桃的生长季雨水较多,且大部分排水沟排水不畅,园区雨后严重积水导致猕猴桃植株根系腐烂,树势较弱;(2)架式不规范,泰顺县仅有少数新果园采用了钢丝、钢缆搭架,大部分园区仍采用传统的毛竹为支柱,毛竹中易潜藏病原菌,导致病害发生;(3)大部分果园杂草丛生,通风透光极差,易造成病害的流行。

目前,对于猕猴桃病害的防治措施主要为农业防治与化学防治相结合,其中防治关键是加强栽培管理,增强树势,落实冬季清园和用药,减少病情基数。根据果农生产经验反馈,化学防治主要为花前施用加瑞农、可杀得 3 000 和异菌脲等药剂,花后施用啉菌酯和苯醚甲环唑等药剂。针对细菌性溃疡病,防治关键是秋冬季 9—12 月施用 3~4 次氢氧化铜、硫酸链霉素等进行预防保护^[19-20]。笔者建议当地负责部门除

重视农业防治和化学防治外,应加强种植户消毒防范意识以减少人为传播的发生,同时在高海拔地区种植抗性较好的品种,种苗从当地正规产业部门引进。

笔者所在课题组首次对泰顺县猕猴桃栽培果园常见病害进行了周年调查,确定了当地不同季节的主要病原菌,并预测了潜在可能发生的病害,调查结果将为泰顺县后期结合预测预报形成适合本地的综合防治技术,提高猕猴桃整体生产管理水 平奠定理论基础。

参考文献:

- [1] Huang H W. The genus actinidia a world monograph[M]. Beijing: Science Press, 2014.
- [2] Rees G J, Vanneste J L, Cornish D A, et al. Detection of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* using polymerase chain reaction (PCR) primers based on the 16S - 23S rDNA intertranscribed spacer region and comparison with PCR primers based on other gene regions[J]. Plant Pathology, 2010, 59(3): 453 - 464.
- [3] 罗禄怡, 张晓燕. 为害猕猴桃的 2 种叶斑病及防治[J]. 中国南方果树, 2000, 29(2): 40.
- [4] 姜景魁, 高日霞, 林允剑. 中华猕猴桃黑斑病的研究[J]. 果树科学, 1995, 12(3): 182 - 184.
- [5] 赵 丰. 奉新猕猴桃果梗炭疽病病原菌鉴定及防治研究[D]. 南昌: 江西农业大学, 2013.
- [6] 李 黎, 钟彩虹, 李大卫, 等. 猕猴桃细菌性溃疡病的研究进展[J]. 华中农业大学学报, 2013, 32(5): 124 - 133.
- [7] 李 黎, 陈美艳, 张 鹏, 等. 猕猴桃软腐病的病原菌鉴定[J]. 植物保护学报, 2016, 43(3): 527 - 528.
- [8] 王小洁, 李士谣, 李亚巍, 等. 猕猴桃软腐病病原菌的分离鉴定及其防治药剂筛选[J]. 植物保护学报, 2017, 44(5): 826 - 832.
- [9] Zhou Y, Gong G S, Cui Y L, et al. Identification of *Botryosphaeriaceae* species causing kiwifruit rot in Sichuan Province, China[J]. Plant Disease, 2015, 99(5): 699 - 708.
- [10] Li L, Pan H, Chen M Y, et al. First report of *Pestalotiopsis microspora* causing postharvest rot of kiwifruit in Hubei Province, China[J]. Plant Disease, 2016, 100(10): 2161 - 2162.
- [11] Li L, Pan H, Chen M Y, et al. First report of *Diaporthe lithocarpus* causing postharvest rot of kiwifruit in Sichuan Province, China[J]. Plant Disease, 2016, 100(11): 2327.
- [12] Diaz G A, Latorre B A, Lolas M A, et al. Identification and characterization of *Diaporthe ambigua*, *D. australifricana*, *D. novem*, and *D. rudis* causing a postharvest fruit rot in kiwifruit[J]. Plant Disease, 2017, 101(8): 1402 - 1410.
- [13] Luongo L, Santori A, Riccioni L, et al. *Phomopsis* sp. associated with post-harvest fruit rot of kiwifruit in Italy[J]. Journal of Plant Pathology, 2011, 93(1): 205 - 209.
- [14] Li L, Pan H, Liu W, et al. First report of *Alternaria alternata* causing postharvest rot of kiwifruit in China[J]. Plant Disease, 2017, 101(6): 1046 - 1047.
- [15] Jeong I H, Lim M T, Kim G H, et al. Incidences of leaf spots and blights on kiwifruit in Korea[J]. Plant Pathology Journal, 2008, 24(2): 125 - 130.
- [16] Li L, Pan H, Chen M Y, et al. First report of anthracnose caused by *Colletotrichum gloeosporioides* on kiwifruit (*Actinidia chinensis*) in China[J]. Plant Disease, 2017, 101(12): 2151.

徐悦,束成杰,聂韡,等. 芫荽籽精油成分解析及其对秀丽隐杆线虫寿命和运动的影响[J]. 江苏农业科学,2019,47(14):111-115.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2019.14.025

芫荽籽精油成分解析及其对秀丽隐杆线虫寿命和运动的影响

徐悦¹,束成杰²,聂韡²,马世宏²,张卫明²,单承莺²

(1.南京师范大学生命科学学院,江苏南京 210097; 2.南京野生植物综合利用研究院,江苏南京 210042)

摘要:以水蒸气提取法获得芫荽籽精油,通过气质联用(GC-MS)方法检测鉴定分析了精油的组分与含量,同时以秀丽隐杆线虫为模式生物研究芫荽籽精油对线虫的影响。结果表明,GC-MS检测确定精油中有效组分有18种,其中芳樟醇含量最高,为83.43%;其次为乙酸橙花酯,为3.21%;萜品烯,为2.85%; α -蒎烯,为2.53%;樟脑,为1.33%;橙花醇,为1.11%等。动物试验结果表明,芫荽籽精油对线虫具有抑制作用,与对照试验组相比,芫荽籽精油处理后的线虫出现寿命缩短、运动行为能力下降、后代数目减少以及体内ROS水平升高的变化,且2组间差异显著,推测芫荽籽精油处理后可能导致线虫神经系统受损及胰岛素信号通路变化是导致线虫出现上述变化的原因。

关键词:芫荽籽精油;芳樟醇;秀丽隐杆线虫;GC-MS;ROS水平

中图分类号:S432.4⁺5 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2019)14-0111-05

芫荽(*Coriandrum sativum* L.)为一年生或两年生的伞形科芫荽属草本植物,最早在汉代从西方国家引入我国,目前在我国种植广泛,不仅是美味的蔬菜,同时也是一味常见中药材。芫荽籽可药食两用,其精油成分不仅可用于调配食品,还有防腐抑菌及多种疾病治疗的作用^[1-3]。秀丽隐杆线虫(*Caenorhabditis elegans*)是一种广泛应用于药理学、遗传学、发育学和神经生物学等领域研究的模式生物,具有体积小、体透明、结构简单、生命周期短、易饲养等特点,其神经系统、生殖系统、消化系统与哺乳动物具有高度同源性,是一种适用于化合物物质性质评价与机制研究的模式生物^[4-5]。本研究以水蒸气蒸馏法提取芫荽籽精油,并采用气质联用(GC-MS)法对其成分进行鉴定与解析;同时还研究了芫荽籽精油对秀丽隐杆线虫寿命、运动行为能力、后代数目以及体内活性氧水平方面的影响,以期探究芫荽籽精油对线虫作用影响提供依据。

1 材料与方 法

1.1 材料与仪器

芫荽籽采自江苏省南京市高淳地区,由南京野生植物综

收稿日期:2018-03-23

基金项目:国家重点研发计划(编号:2016YFD0400804)。

作者简介:徐悦(1993—),女,江苏镇江人,硕士研究生,主要从事植物资源开发工作。E-mail:manghuzj@163.com。

通信作者:单承莺,博士,副研究员,主要从事植物天然产物化学工作。E-mail:shancy81@163.com。

合利用研究院肖正春教授鉴定为伞形科芫荽属的籽实,芫荽籽于2016年8月采集保存,经干燥后粉碎过40目筛备用。秀丽隐杆线虫(N2野生型)和OP50(尿嘧啶渗漏突变型)大肠埃希菌由东南大学惠赠,线虫试验工作于2017年4月在南京野生植物研究院线虫实验室内开展。

琼脂,日本制药株式会社生产;活性氧(ROS)试剂盒,南京建成科技有限公司生产;胆固醇、多聚蛋白胍、NaCl、CaCl₂、MgSO₄·7H₂O、K₃PO₄、KH₂PO₄、Na₂HPO₄、NaCl、NaOH、NaClO、DMSO均为国药集团化学试剂有限公司生产。

顶空气质联用仪,美国安捷伦科技有限公司生产;LDZX-50KBS立式压力蒸汽灭菌锅,上海申安医疗器械厂生产;HCB-1300V洁净工作台,青岛海尔特种电器有限公司生产;SPX-150B-Z型生化培养箱,上海博讯实业有限公司医疗设备厂生产;JW-2017HR高速冷冻离心机,安徽嘉文仪器装备有限公司生产;奥林巴斯显微镜,OlympusBX41,南京艾朗仪器有限公司生产。

1.2 试验方法

1.2.1 芫荽籽精油提取 精确称取芫荽籽粉末120g置于蒸馏瓶中,加入蒸馏水进行水蒸气蒸馏法提取精油,料液比为1:10,浸泡1h后蒸馏3h,馏出液冷凝收集,经萃取、过滤、干燥、除杂后得样品精油0.61g,得油率为0.508%,使用该精油做GC-MS成分分析和秀丽线虫体内试验。

1.2.2 GC-MS测定条件与成分解析^[6] 气相色谱条件:色谱柱为HP-5MS毛细管色谱柱(30.00m×0.25mm×

[17] Chen Y, Yang X, Zhang A F, et al. First report of leaf spot caused by *Nigrospora sphaerica* on kiwifruit in China[J]. Plant Disease, 2016, 100(11):2326-2327.

[18] Li L, Pan H, Chen M Y, et al. First report of *Nigrospora oryzae* causing brown/black spot disease of kiwifruit in China[J]. Plant Disease, 2018, 102(1):243.

[19] 秦虎强,赵志博,高小宁,等. 4种杀菌剂防治猕猴桃溃疡病的效果及田间应用技术[J]. 植物保护学报, 2016, 43(2):321-328.

[20] 秦虎强,赵志博,高小宁,等. 猕猴桃细菌性溃疡病菌对17种杀菌剂的敏感性及其不同药剂田间防效[J]. 西北农业学报, 2015, 24(9):145-151.