

北京西瓜嫁接苗褐斑病病原鉴定

Identification of the pathogen causing brown spot on grafted watermelon seedlings in Beijing

宋顺华¹ 马乐乐² 宁利园¹ 张 猛² 耿丽华^{1*}

(1. 北京市农林科学院蔬菜研究中心, 农业部华北地区园艺作物生物学与种质创制重点实验室, 农业部都市农业(北方)重点实验室, 北京 100097; 2. 河南农业大学植物保护学院, 郑州 450002)

Song Shunhua¹ Ma Lele² Ning Liyuan¹ Zhang Meng² Geng Lihua^{1*}

(1. Key Laboratory of Biology and Genetic Improvement of Horticultural Crops in North China Area; Key Laboratory of Urban Agriculture (North), Ministry of Agriculture; Vegetable Research Center, Beijing Academy of Agricultural and Forestry Sciences, Beijing 100097, China; 2. College of Plant Protection, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, Henan Province, China)

我国是世界西瓜生产与消费第一大国,西瓜收获面积占全球总面积的58.06%,产量占全球总产量的76.5%(赵姜和吴敬学,2012)。采用嫁接栽培可以提高西瓜对土传病虫害的抗性,但西瓜嫁接苗生产中育苗温室内相对的高温和高湿环境容易导致病虫害的发生蔓延(别之龙,2011)。2014年以来,在北京市西瓜种植区的育苗温室内,用南瓜嫁接砧木的幼苗上发生一种褐斑病,导致嫁接苗长得弱小。目前国内外还未见关于该病害的研究报道。为明确其病原,本试验从病区采集典型发病叶片,进行病原分离纯化、致病性测定,病原菌形态特征观察,并结合病原菌基因组ITS区序列测定结果,对病原菌进行鉴定,以期生产中准确防治该病害提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

2014年1—3月在北京市西瓜种植区采集典型发病叶片(南瓜砧木叶片),带回室内进行分离培养,并用PDA斜面4℃保存备用。南瓜砧木品种为京域甜砧一号,北京京研益农科技发展中心提供。

培养基:马铃薯葡萄糖琼脂(potato dextrose agar, PDA)培养基:土豆200 g、葡萄糖20 g、琼脂17 g、蒸馏水1 000 mL;马铃薯胡萝卜琼脂(potato carrot agar, PCA)培养基:土豆20 g、胡萝卜20 g、琼脂17 g、蒸馏水1 000 mL;马铃薯乳糖(potato lactose, PL)液体培养基:土豆200 g、乳糖20 g、蒸馏水1 000 mL。

试剂及仪器:试验所用试剂均为国产分析纯。Centrifuge 5810 R高速冷冻离心机,德国Eppendorf

公司;C1000 PCR仪,美国BIORAD公司;NIKON 80i显微镜,日本尼康公司。

1.2 方法

致病性测定:采用常规组织分离法,将采集到的典型发病叶片用PDA平板在25℃条件下培养,挑取单孢纯化。将南瓜种子播种在温室的育苗盘内,于子叶平展期采集健康的叶片进行试验。在培养皿内放2层充分湿润的灭菌滤纸,上置灭菌的U型玻璃棒,将叶片放于U型玻璃棒上;挑取分离物菌丝接入灭菌的PL液体培养基中振荡培养7 d,过滤去掉菌丝,离心去上清液,加适量无菌水稀释制成 1×10^6 个/mL的孢子悬浮液,对叶片表面进行喷雾接种,以无菌水喷雾作为对照。接种后于18~25℃培养。

形态学鉴定:于PDA平板上接种病原菌,25℃暗培养观察菌落形态特征;将病原菌接种于PCA平板上,25℃光暗交替培养,7 d后在显微镜下观察产孢表型、分生孢子和分生孢子梗的形态特征,拍照记录并进行鉴定(张天宇,2003;Simmons,2007)。

分子鉴定:用真菌通用引物ITS1/ITS4对病原菌rDNA的ITS区进行扩增。将病原菌接种于PL液体培养基中,在25℃、125 r/min条件下振荡培养3~4 d,过滤收集菌丝体,采用改良的CTAB法提取菌株DNA。PCR扩增条件:94℃预变性5 min;94℃变性30 s,52℃退火30 s,72℃延伸1 min,30个循环;72℃延伸7 min。扩增产物由北京三博远志生物技术有限公司进行测序,并在GenBank中进行比对,通过BLAST搜索和同源性分析对病原菌进行鉴定。

基金项目:现代农业产业技术体系北京市西甜瓜创新团队专项(BAIC10),北京市农林科学院蔬菜种质资源创新专项(KJCX20140111),河南省高校科技创新人才支持计划(13HASTIT007)

* 通讯作者(Author for correspondence), E-mail: genglihua@nrcv.org; 收稿日期:2016-02-26

2 结果与分析

2.1 病原菌致病性

对采集于北京市的西瓜嫁接苗褐斑病的典型发病叶片进行病原菌分离纯化,共得到2个分离物。接种分离物1的南瓜叶片有褐色病斑产生,其症状与生产中西瓜嫁接苗褐斑病相同,从接种发病的叶片分离纯化的病菌,与分离物1在形态上相同,而接种分离物2的南瓜叶片与对照没有病斑产生,因此确定分离物1是病原菌。

2.2 病原菌鉴定

形态学特征:PDA培养基上菌落呈灰色至灰黑

色,茸毛状扩展(图1-A)。分生孢子梗产生于菌丝末端或侧面,单生,直立或膝状弯曲,平滑,有分隔,中褐色,顶部颜色渐淡,45~82 μm ×3~4 μm 。产孢表型为单个分生孢子梗顶端形成的分生孢子链具多重分枝,矮树状(图1-B)。分生孢子长椭圆形或卵形,灰褐色,平滑或具微刺,具2~7个横隔膜和0~3个纵、斜隔膜,15~45 μm ×5~12 μm 。短喙柱状或锥状,浅褐色,有隔膜,2.5~25 μm ×3~4 μm (图1-C)。依据形态特征初步将病原菌鉴定为链格孢属的链格孢 *Alternaria alternata* (Fries) Keissler。

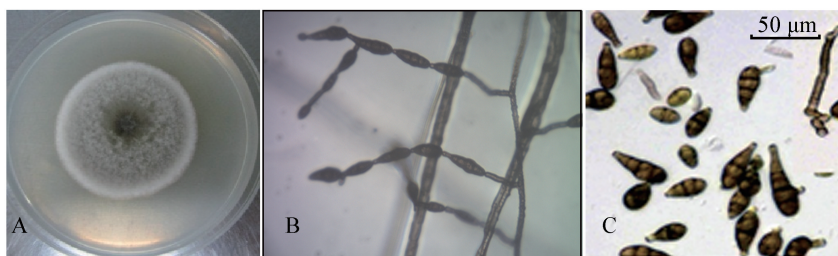


图1 西瓜嫁接苗褐斑病病原菌的形态特征

Fig. 1 Morphological characteristics of the pathogen causing brown spot on grafted watermelon seedlings

A: 菌落形态; B: 产孢表型; C: PCA上的分生孢子和分生孢子梗。A: Colony morphology; B: sporulation pattern; C: conidia and conidiophores on PCA.

分子鉴定:用真菌通用引物 ITS1/ITS4 对该病原菌 rDNA 的 ITS 区进行扩增,电泳检测得到大于 500 bp 的片段(图2),经测序分析其长度为 526 bp,将该序列提交 GenBank,通过 BLAST 进行序列比对,与链格孢(AY433814)的同源性达到 100%。结合形态学鉴定结果,将该病原菌鉴定为链格孢。

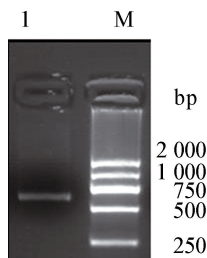


图2 西瓜嫁接苗褐斑病病原菌的PCR产物

Fig. 2 PCR product of the pathogen causing brown spot on grafted watermelon seedlings

1: 病原菌的PCR产物; M: D2000 DNA marker。1: PCR product of the pathogen; M: D2000 DNA marker.

3 讨论

本试验对北京市西瓜种植区普遍发生的嫁接苗褐斑病进行病原菌分离纯化、致病性测定,结合形态学及分子鉴定结果,确定该病病原菌为链格孢。嫁

接前,作为嫁接砧木的南瓜幼苗和作为接穗的西瓜幼苗均无褐斑病发生,嫁接后待揭膜时南瓜砧木的叶片表现出发病症状,因此该病的发生可能与覆盖薄膜后的温度较高、湿度较大有关,与别之龙(2011)调查结果一致。据本课题组初步调查,西瓜生长中后期也有褐斑病发生,其初侵染源是否来自于嫁接苗及该病菌传播途径、发生规律尚需进一步研究。

参考文献 (References)

- Bie ZL. 2011. China current situation of the development and counter-measures of watermelon and melon grafting seedling industry. *China Cucurbits and Vegetables*, 24(2): 68-71 (in Chinese) [别之龙. 2011. 我国西瓜和甜瓜嫁接育苗产业发展现状和对策. *中国瓜菜*, 24(2): 68-71]
- Simmons EG. 2007. *Alternaria: an identification manual*. Utrecht: ASM Press
- Zhang TY. 2003. *Chinese fungi (Alternaria)*. Beijing: Science Press (in Chinese) [张天宇. 2003. 中国真菌志·第十六卷链格孢属. 北京: 科学出版社]
- Zhao J, Wu JX. 2012. Evolution analysis of the regionalization of the production of watermelon and melon in China. *China Vegetables*, (11): 5-10 (in Chinese) [赵姜, 吴敬学. 2012. 中国西甜瓜生产区域化演变分析. *中国蔬菜*, (11): 5-10]

(责任编辑:高峰)