

芍药鲜切花煤污病病原菌鉴定

Identification of the pathogen causing sooty mould on peony cut flower

李 萌^{1*} 张吕醉² 唐慧骥³ 韩 英³(1. 郑州轻工业学院, 食品与生物工程学院, 郑州 450002; 2. 中华人民共和国洛阳海关, 河南 洛阳 471003;
3. 中华人民共和国郑州海关, 郑州 450003)Li Meng^{1*} Zhang Lüzui² Tang Huiji³ Han Ying³

(1. School of Food and Bioengineering, Zhengzhou University of Light Industry, Zhengzhou 450002, Henan Province, China; 2. Luoyang Customs District P. R. China, Luoyang 471003, Henan Province, China; 3. Zhengzhou Customs District P. R. China, Zhengzhou 450003, Henan Province, China)

芍药是近年来深受消费者喜欢的鲜切花,市场前景十分广阔。洛阳市是我国重要的芍药鲜切花出口加工基地,其产品已出口荷兰、美国及澳大利亚等多个国家。芍药煤污病是近年来洛阳市芍药上普遍发生的病害,该病害使花蕾上形成大量橄榄绿色霉斑,导致鲜切花外观质量和等级下降。由于进口国对鲜切花有严格的检疫要求,携带煤污病斑的鲜切花被销毁或退运的风险极高。因此,芍药煤污病已成为我国芍药鲜切花产业化和国际化的重要限制因素。目前尚未见该病害的研究报道。本研究通过形态学和分子生物学方法对其病原菌进行鉴定,旨在为该病害的防治和检疫监管提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

供试病源及植物:2017年4月29日在洛阳市神州牡丹园出口芍药种植基地采集有明显霉斑的芍药花蕾,芍药品种为种生粉。

培养基、试剂及仪器: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,补充蒸馏水至 1 L。植物基因组提取试剂盒,河南惠尔纳米科技有限公司;Taq DNA 聚合酶、dNTPs 和琼脂糖,生工生物工程(上海)股份有限公司。Thermo Micro CL17 小型高速冷冻离心机、Applied Biosystems Veriti 96 孔 PCR 仪,美国赛默飞世尔科技公司。

1.2 方法

病原菌分离纯化和形态学鉴定:用无菌挑针从芍药花蕾上挑取霉斑置入装有 1 mL 无菌水的离心

管中,轻微振荡制备孢子悬浮液,无菌水稀释至 10^{-1} 、 10^{-2} 、 10^{-3} 、 10^{-4} 及 10^{-5} 倍菌液,分别吸取 100 μ L 各浓度菌液涂布于 PDA 平板上,28℃、黑暗培养 2 d 获得单菌落。从单菌落边缘挑取菌丝转移至新 PDA 平板,28℃、黑暗培养 4 d,将纯培养获得的 6 株菌株命名为 Luoyang SY1~Luoyang SY6。观察菌落颜色、形状和质地,显微镜下观察菌丝、分生孢子梗及孢子的形态特征,拍照记录并对病原菌作初步鉴定,每个视野观察 20 个孢子,共观察 5 个视野。

病原菌分子鉴定:挑取 Luoyang SY1~Luoyang SY6 菌株菌落,去除培养基后应用植物基因组提取试剂盒提取基因组 DNA。应用引物 ITS1/ITS4 扩增 Luoyang SY1~Luoyang SY6 菌株的 rDNA-ITS 序列;应用引物 ACT-512F/ACT-783R、CAL-228F/CAL-737R 和 CylH3F/CylH3R 分别扩增 Luoyang SY3 菌株 ACT、CAL 和 HIS 基因序列(Crous et al., 2004)。PCR 反应条件:94℃ 预变性 5 min;94℃ 变性 30 s, 55℃ (ITS)、49.5℃ (ACT 和 HIS)、48℃ (CAL) 退火 30 s, 72℃ 延伸 1 min, 31 个循环;72℃ 延伸 10 min。扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳确认大小后送生工生物工程(上海)股份有限公司进行测序,采用邻接法分别应用 BLAST 和 MEGA6.0 软件对测序结果进行同源相似性和系统发育分析。

2 结果与分析

2.1 病原菌分离纯化和形态学鉴定

PDA 培养基上菌落中央呈灰绿色,边缘灰白色,背面黑色,有开裂(图 1)。菌丝有隔,无色或褐色,有分支;分生孢子梗顶生或侧生,分生孢子淡褐

色,卵形或梭形,单胞(大小为 $3.8\sim 4.3\ \mu\text{m}\times 5.2\sim 7.3\ \mu\text{m}$)或双胞(大小为 $3.8\sim 4.5\ \mu\text{m}\times 9.7\sim 16.7\ \mu\text{m}$)。病原菌

初步鉴定为枝孢属 *Cladosporium* sp. 真菌。

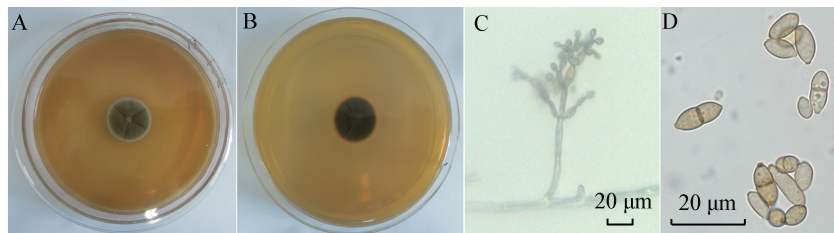


图1 芍药煤污病病原菌的形态特征

Fig. 1 Morphological characterization of the pathogen causing peony sooty mould

A、B为正面和反面菌落; C: 分生孢子梗; D: 分生孢子。A, B: Front and reverse of colony; C: conidiophore; D: conidia.

2.2 病原菌分子鉴定

Luoyang SY1~Luoyang SY6 菌株的 ITS 序列相似度为 100%, 表明分离到的 6 株菌为同一种真菌, 序列比对发现其与枝细枝孢 *Cladosporium ramotenellum* (EF679384) 和枝状枝孢 *C. cladosporioides*

(EF679353) 的同源性均超过 99%。基于 *ACT*、*CAL*、*ITS* 和 *HIS* 4 个基因序列的系统发育分析显示, Luoyang SY3 菌株与枝细枝孢 *C. ramotenellum* 为同一支(图 2)。结合形态学鉴定结果, 将其鉴定为枝细枝孢。

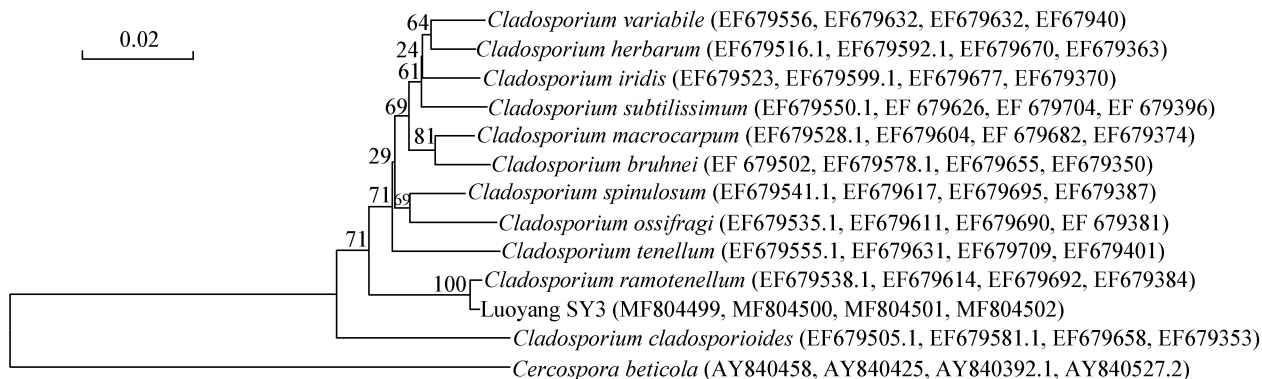


图2 基于 *ACT*、*CAL*、*HIS* 和 *ITS* 基因序列的芍药煤污病病原菌与其相似种的系统发育树

Fig. 2 Phylogenetic tree based on *ACT*, *CAL*, *HIS*, and *ITS* sequences of the pathogen causing peony sooty mould and related species in *Cladosporium*

括号内依次为 *ACT*、*CAL*、*HIS* 和 *ITS* 基因序列的 GenBank 登录号。GenBank accession numbers for *ACT*, *CAL*, *HIS*, and *ITS* gene sequences are shown in parentheses following each species.

3 讨论

形态学结合 ITS 序列比对是病原真菌鉴定的常用方法, 但本研究显示, 枝孢属近缘种间 ITS 序列差异很小, 单一应用 ITS 不能准确鉴定芍药煤污病病原菌。本研究应用多基因序列构建系统发育树的方法将该病害病原菌鉴定为枝细枝孢。本课题组 2013—2017 年田间调查发现, 大棚栽培芍药上煤污病的发病率明显高于露地栽培芍药, 推测可能与大棚内湿度较高有关; 病原菌在芍药花蕾分泌蜜液上的大量繁殖是诱发煤污病的直接原因, 可通过降低大棚湿度或于花蕾形成初期喷施多菌灵、戊唑醇等杀菌剂(徐建强等, 2016)来防治该病害。

致谢: 河南农业大学张猛教授、河南科技大学李文亮博士、徐

建强博士对本文提出宝贵意见, 特此致谢!

参考文献 (References)

- Crous PW, Groenewald JZ, Risede JM, Simoneau P, Hywel-Jones NL. 2004. *Calonectria* species and their *Cylindrocladium* anamorphs: species with sphaeropedunculate vesicles. *Studies in Mycology*, 50: 415–430
- Xu JQ, Yang GF, Tian J, Che ZP, Kang YB. 2016. Effects of carbendazim, tebuconazole and azoxystrobin on sporulation and conidial germination of *Cladosporium paeoniae* causing tree peony red spot. *Journal of Plant Protection*, 43(5): 850–857 (in Chinese) [徐建强, 杨改凤, 田娟, 车志平, 康业斌. 2016. 三种杀菌剂对牡丹红斑病菌分生孢子形成和萌发的影响. *植物保护学报*, 43(5): 850–857]

(责任编辑: 张俊芳)