

引起葡萄果穗溃烂的病原菌鉴定

Identification of pathogenic fungi causing grape cluster rot

尹向田¹ 杨立英¹ 徐亮² 高欢欢¹ 王咏梅^{1*} 吴新颖^{1*}

(1. 山东省葡萄研究院, 山东省葡萄栽培与精深加工工程技术研究中心, 济南 250100;

2. 北京市大兴区林业工作站, 北京 102600)

Yin Xiangtian¹ Yang Liying¹ Xu Liang² Gao Huanhuan¹ Wang Yongmei^{1*} Wu Xinying^{1*}

(1. Shandong Engineering Research Center for Grape Cultivation and Deep-Processing, Shandong Academy of Grape,

Jinan 250100, Shandong Province, China; 2. Forestry Station of Daxing District, Beijing 102600, China)

葡萄成熟期阴雨天气较多,葡萄果穗病害发生严重,其中以溃疡病、白腐病等危害较重(匡柳青等, 2014),目前已发现有20多种病原菌,且多为混合感染,防治难度大(徐玲等, 2006),严重影响葡萄的产量和品质。2017年,在烟台市开发区葡萄园发现一种导致葡萄溃烂的病害,主要危害成熟期果穗,枝干未见明显症状,初在穗轴上发生淡褐色、水浸状斑点,湿度大时迅速向四周扩展,使整个小穗轴变褐坏死。本试验在该发病园区取样并进行病原菌分离,通过致病性测定、形态学和分子生物学手段对病原菌进行鉴定,以期为该病害的防治提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

供试样品及培养基:2017年9月从烟台市开发区葡萄园中采集具有典型发病症状的赤霞珠葡萄果穗20串,置于冰盒中带回实验室备用。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、琼脂粉20 g、蒸馏水1 L。

试剂及仪器:OMEGA真菌基因组DNA提取试剂盒,美国Omega生物技术公司;OPTIKA B-383PL光学显微镜,意大利Optika公司;C100 PCR仪,美国Bio-Rad公司。

1.2 方法

病原菌的分离与形态特征:将感病葡萄果穗用无菌水冲洗干净,从病穗果梗部位的病健交界处切取2 mm×2 mm的小块,分别浸渍于75%酒精中30 s、升汞中2 min后取出,以无菌水冲洗3遍,将病组织块接种在PDA平板上,每个平板均匀放置3块,于25℃黑暗培养10 d。挑取单孢纯化,观察菌落形态特征,并记录菌丝和分生孢子形态特征。分生孢子大

小、分隔情况各统计50个视野、测量100个分生孢子。

分离物的致病性测定:从田间剪取健康赤霞珠葡萄果穗,用无菌水冲洗干净。将以上纯化菌株制成浓度为 1×10^6 个/mL的分生孢子悬浮液,用接种针在葡萄果梗上轻轻刺伤,将分生孢子悬浮液涂抹在伤口处,将接种植株用塑料袋套袋保湿,25℃黑暗培养。每处理10次重复。对照组只接无菌水。每天观察记录发病情况。

病原菌的分子生物学鉴定:采用OMEGA真菌基因组试剂盒提取DNA,以引物ITS1/ITS4(5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGC-3'/5'-TCCTCCGCT-TATTGATATGC-3')、TEF-F/TEF-R(5'-CATCGAG-AAGTTCGAGAAGG-3'/5'-TACTTGAAGGAACC-CTTACC-3')、T1/T2(5'-AACATGCGTGAGATTG-TAAGT-3'/5'-ACCCTCAGTGTAGTGACCCTTGG-C-3')分别对rDNA-ITS、*EF-1*和 β -*tubulin*基因片段进行PCR扩增,扩增产物委托生工生物工程(上海)股份有限公司测序,将拼接后的序列与NCBI核酸数据库中的数据进行BLAST比对。

2 结果与分析

2.1 病原菌的分离与形态特征

从病组织的果梗部位共分离到45株菌,依据在PDA平板上的生长速率与菌落形态特征,将其分为6组,分离率分别为35.6%、22.2%、22.4%、8.9%、8.9%、2.0%;从每组中选择具有代表性的1株菌进行后续试验,编号为G1~G6。菌株G1菌落初为白色,后渐变为灰褐色,最后变为灰黑色,气生菌丝浓密,40 d后产生少量分生孢子,呈梭形,大小为 $17.75 \sim 20.56 \mu\text{m} \times 4.89 \sim 7.07 \mu\text{m}$ (图1-A)。菌株G2菌丝为白色,有黑色素形成的同心轮或斑块,分生孢子为单胞,圆筒

形,两端钝圆,大小为 $14.14\sim 20.56\ \mu\text{m}\times 4.89\sim 7.07\ \mu\text{m}$ (图1-B)。菌株G3菌丝为白色,呈轮纹状向外扩展,易产生黑色分生孢子器,分生孢子单胞、卵形,一端钝圆,另一端平截,内含1至多个油球,大小为 $8.13\sim 12.18\ \mu\text{m}\times 4.25\sim 7.01\ \mu\text{m}$ (图1-C)。菌株G4菌落呈粉红色,分生孢子洋梨形,双胞,孢子基部具偏乳头状突起,大小为 $11.43\sim 17.67\ \mu\text{m}\times 5.57\sim 7.11\ \mu\text{m}$ (图1-D)。菌株G5气生菌丝为白色,边缘呈羽毛状;20 d

后产生黑色分生孢子器,产生 α 、 β 型的分生孢子, α 型分生孢子无色,单胞,椭圆形,内含2个油球,大小为 $5.5\sim 8.6\ \mu\text{m}\times 2.1\sim 2.6\ \mu\text{m}$, β 型分生孢子为线型或钩状,无色,单胞,大小为 $18.5\sim 35.2\ \mu\text{m}\times 0.5\sim 2.2\ \mu\text{m}$ (图1-E)。菌株G6菌丝呈白色绒毛状,边缘规则,产生大、小型的分生孢子,大型分生孢子镰刀型,中间有1~5隔,大小为 $20.2\sim 35.8\ \mu\text{m}\times 2.2\sim 4.8\ \mu\text{m}$,小型分生孢子卵圆形,大小为 $4.5\sim 12.2\ \mu\text{m}\times 1.9\sim 4.1\ \mu\text{m}$ (图1-F)。

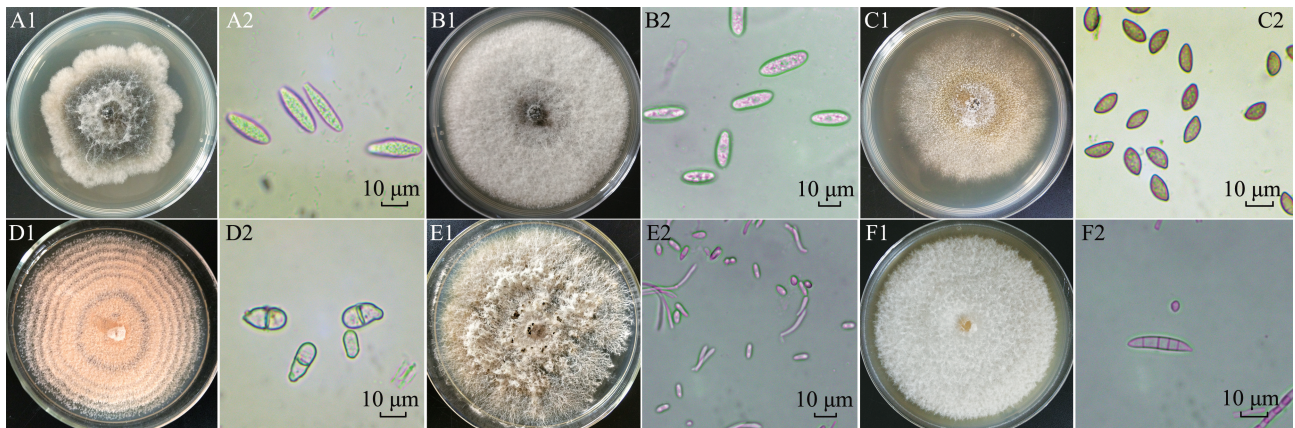


图1 病原菌株G1~G6菌落(A1~F1)和孢子(A2~F2)的形态学特征

Fig. 1 The morphological characteristics of the colonies (A1~F1) and conidia (A2~F2) of pathogens G1~G6

2.2 病原菌的致病性

将分离物接种至健康葡萄果穗,7 d后接种部位均不同程度变褐,呈现与田间相似的发病症状,而对照均无发病症状。其中,菌株G1、G3、G4致病性较强,接种后果梗严重变褐、腐烂;菌株G5、G6接种后果梗出现轻微变褐;菌株G2对果梗的致病性较弱。从发病组织重新分离病原菌,菌落和孢子形态与原接种病原菌一致。

2.3 病原菌的分子生物学鉴定

将6株菌的rDNA-ITS、*EF-1*和 β -*tubulin*的序列提交至GenBank进行比对,结果表明,菌株G1、G3、G6的3个相关序列分别与NCBI上的葡萄座腔菌*Botryosphaeria dothidea*、白腐垫壳孢*Coniella diploidiella*、尖孢镰刀菌*Fusarium oxysporum*的相关序列同源性为99%~100%。菌株G2与隐秘刺盘孢*Colletotrichum aenigma*的相关序列同源性为100%。菌株G4和G5分别与粉红单端孢*Trichothecium roseum*和间座壳菌*Diaporthe* sp.的相关序列同源性为99%。结合形态学特征,将菌株G1~G6分别鉴定为葡萄座腔菌、隐秘刺盘孢、白腐垫壳孢、粉红单端孢、间座壳菌、尖孢镰刀菌。

3 讨论

本试验从发病葡萄果穗上分离得到6种形态不同的真菌,且均能使健康葡萄果梗变褐腐烂,结合形

态学和分子生物学鉴定结果,初步证明引起烟台市葡萄果穗溃烂的是以葡萄座腔菌为主、多种病原菌引发的复合性病害,对于病原菌侵染规律与病害防治措施还需进一步研究。葡萄座腔菌危害果实,首先侵染葡萄穗轴,这与田间发病情况相符,且发病的葡萄溃疡组织中还包含有其它属的病原菌(Urbez-Torres et al., 2006; 匡柳青等, 2014),其中镰刀菌、粉红聚端孢与茎点霉属*Phoma*真菌常引起葡萄采后病害,加速果穗变褐(许玲等, 2006)。

参考文献 (References)

- Kuang LQ, Chen SW, Zhang W, Ma HQ. 2014. Identification of associated fungi in pre-overwintering grapevine canker tissues from Beijing and Yunnan. *Journal of China Agricultural University*, 19(1): 99-106 (in Chinese) [匡柳青, 陈商武, 张文, 马会勤. 2014. 越冬前北京和云南葡萄溃疡病组织内相关真菌的鉴定. *中国农业大学学报*, 19(1): 99-106]
- Urbez-Torres JR, Leavitt GM, Voegel T, Gubler WD. 2006. Identification and distribution of *Botryosphaeria* species associated with grapevine cankers in California. *Plant Disease*, 90(12): 1490-1503
- Xu L, Wang YZ, Toyoda H, Kusakari S. 2006. Role of fungal pathogens in the postharvest abscission of grape berries. *Acta Horticulturae Sinica*, 33(4): 839-841 (in Chinese) [许玲, 王彦章, 豊田秀吉, 草刈真一. 2006. 病原真菌对葡萄采后果粒脱落的影响. *园艺学报*, 33(4): 839-841]

(责任编辑:李美娟)