植物保护学报 Journal of Plant Protection，2019，46(6)：1373-1374 DOI: 10.13802/j.cnki.zwbhxb.2019.2018188

新疆枣树腐烂病病原菌的鉴定

Identification of the pathogen causing jujube canker in Xinjiang

严海璘 张王斌* 唐俊煜 刘振亚

（塔里木大学植物科学学院，南疆农业有害生物综合治理重点实验室，新疆 阿拉尔 843300）

Yan Hailin Zhang Wangbin* Tang Junyu Liu Zhenya

（Southern Xinjiang Key Laboratory of Integrated Pest Management, College of Plant Science, Tarim University, Alar 843300, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China）

枣树为鼠李科枣属植物，在我国拥有悠久的栽培历史。新疆维族自治区（简称新疆）红枣种植最多的地区为阿克苏市，种植面积约13万hm^2。近年来枣树腐烂病扩大蔓延迅速，已成为枣树主要病害之一，枣园病株率可达70%，死亡率在20%以上（王永崇，2018）。贺志强等（2006）认为阿拉尔垦区有枣树腐烂病的发生，且发生规律与枣树树势有关。国内目前关于新疆枣树腐烂病病原菌的报道较少，对新疆红枣产区的枣树腐烂病病害防控缺少理论基础。本研究通过形态学特征、致病性测定和分子生物学分析对新疆3个红枣主产区的枣树腐烂病病原菌进行鉴定，以期为开展枣树腐烂病病害及其防控措施研究提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

供试样品：从阿克苏市的第一师九团枣树、杨树、胡杨混栽的枣园，第一师十一团枣树、杨树、柳树混栽的枣园和温宿县无其它树种混栽的枣园共采集21份均感染枣树腐烂病的枝条和树皮，品种为骏枣，树龄5年，放于标本袋中标记以备用。健康的1~2年生枣树枝条采自塔里木大学校园。

试剂、培养基及仪器：*Taq*酶和dNTPs，宝生物工程（大连）有限公司；其它试剂均为国产分析纯。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、蒸馏水1 000 mL。Axio Lab.A1正置生物显微镜、ZEISS ZEN显微镜数字成像系统，德国卡尔蔡司公司；T100 PCR仪，美国Bio-Rad公司。

1.2 方法

病原菌的分离与致病性测定：采用常规组织分离法分离获得病原菌单菌落，保存备用。采用严海璘等（2018）改良的枝条组织烫伤法进行致病性测定，取15 cm长的健康枣树枝条，经无菌水冲洗后，将树枝表皮用直径为5 mm的打孔器烫伤，打取直径5 mm的病原菌菌饼接种于烫伤部位，以无菌PDA饼为空白对照，放于消毒盘中于25℃全光照培养箱中培养观察，记录枝条发病情况并依据柯赫氏法则验证病原菌的致病性。

形态学鉴定：对选取来自九团的代表菌株JHZ122、十一团的代表菌株SHZ43和温宿县的代表菌株WHZ51进行病原菌鉴定。将病原菌的单胞菌株接种于PDA平板上，25℃光暗交替培养3 d，记录各菌株的菌落特征。将离体枣树枝条上产生的产孢体进行切片观察，用体式显微镜观察分生孢子器外部形态、纵横切面形态特征及腔室数量并测量分生孢子器和分生孢子大小，观察7个重复，每个重复观察3个视野，每个视野100~150个分生孢子，记录、拍照。

分子生物学鉴定：采用改进的CTAB法提取菌丝基因组DNA（Yu et al.，2011）。采用通用引物ITS1（5′-GGCGTCCAAGTGGATGCCT-3′）和ITS4（5′-CGTATAGTTATTCGCCTCCCT-3′）对ITS片段进行扩增，25 μL PCR反应体系：*Taq* Master Mix 5 μL、ITS1/ ITS4各1 μL、ddH_2O 17 μL、DNA模板1 μL；PCR扩增程序：94℃预变性4 min；94℃变性30 s，51℃退火30 s，72℃延伸40 s，共38个循环。采用通用引物Bt2a（5′-GGTAACCAAATCGGTGCTGCTTTC-3′）/Bt2b（5′-ACCCTCAGTGTAGTGACCCTTGGC-3′）对*β-tubulin*基因进行扩增，25 μL PCR反应体系：*Taq* Master Mix 5 μL、Bt2a/Bt2b各1 μL、ddH_2O 17 μL、DNA模板1 μL；PCR反应程序：94℃预变性3 min；94℃变性30 s，61℃退火30 s，72℃延伸1 min，共38个循环。将PCR反应产物委托生工生物工程

基金项目：国家自然科学基金（31660034）

* 通信作者（Author for correspondence），E-mail：zwbzky@163.com；收稿日期：2018-11-13

(上海)股份有限公司进行测序,将获得的ITS和*β-tubulin*序列进行BLAST相似性比对,并通过MEGA 7.0软件以邻接法构建系统发育树。

2 结果与分析

2.1 病原菌的形态学特征及致病性鉴定

共分离获得21株菌株,且均能在PDA培养基上生长,但不同地理来源的分离株在培养性状上有较大差异。温宿县的代表菌株WHZ51菌落呈同心圆轮纹状;九团的代表菌株JHZ122菌落呈放射状;十一团的代表菌株SHZ43菌落呈雪花状。菌株分生孢子器具有9~16个数量不等的内陷腔室,腔室形状大小不一,器壁共用,分生孢子器横切面大小为277.84~791.83 μm×286.19~818.92 μm,纵切面大小为102.06~222.09 μm×209.24~620.36 μm。分生孢子较小呈腊肠形,单胞,大小为4.16~5.72 μm×1.65~2.81 μm。枣树腐烂病病原菌形态特征符合金黄壳囊孢*Cytospora chrysosperma*的特征。

致病性测定结果表明,21株菌株均可导致枣树枝条发病,对发病组织进行再分离,均可获得相应的接种菌株,将菌株进行纯培养后,性状与原接种菌株性状相同,而对照枝条上未出现症状。

2.3 分子生物学鉴定

基于ITS序列构建的系统发育树结果显示,菌株WHZ51(MK061532)、JHZ122(MN015031)和SHZ43(MK061533)均与金黄壳囊孢(KP114128、KX168605)聚在一支(图1-A)。基于*β-tubulin*序列构建的系统发育树结果显示,菌株JHZ122(MN121755)、SHZ43(MN121756)、WHZ51(MN128703)与金黄壳囊孢菌(KP117038、KF039741)的*β-tubulin*序列同源性达到98%~100%(图1-B)。表明3株菌株均与金黄壳囊孢序列同源性最高,菌株JHB122与SHB43聚在同一分支,与菌株WHB51聚在不同分支,表明来源九团、十一团的菌株与来源温宿县的菌株存在一定的碱基差异。

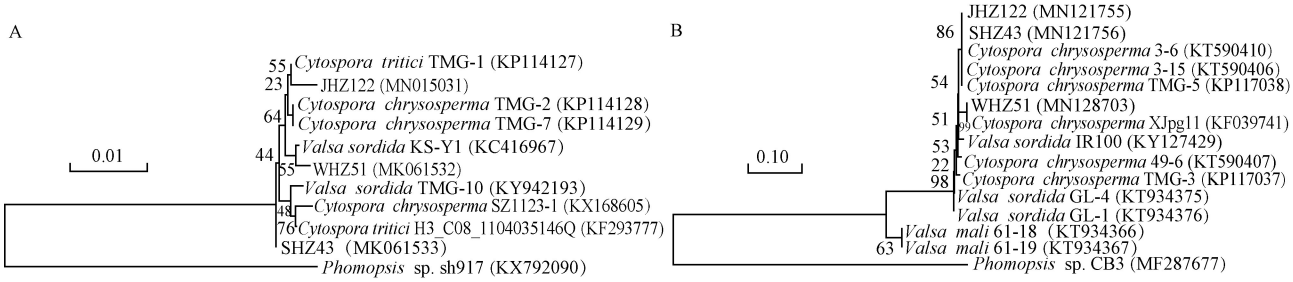

图1 基于ITS序列(A)和*β-tubulin*序列(B)构建菌株WHZ51、JHZ122和SHZ43及其相似菌株的系统发育树

Fig. 1 Phylogenetic tree of WHZ51, JHZ122, SHZ43 and the related strains based on ITS (A) and *β-tubulin* (B) sequences

3 讨论

本研究将3个不同地理来源的供试菌株接种在PDA培养基上,其培养性状有明显差异,结合ITS和*β-tubulin*序列片段对病原菌进行了分子生物鉴定,结果表明引起新疆枣树腐烂病的病原菌是金黄壳囊孢。本试验中不同菌株培养性状间存在差异可能与其不同地理来源有关,与张星耀等(2007)认为金黄壳囊孢亲缘关系远近与地理来源有明显的相关性的结论一致。由于壳囊孢属*Cytospora*种类较多,分布范围广,因此枣树腐烂病菌是否能够侵染其它树种或已经侵染到哪些树种还有待进一步研究。

参 考 文 献(References)

He ZQ, Wang ZX, Ding ZG. 2006. Species and occurrence regularity of diseases and pests of jujube, peach and grape in spring in Alar reclamation area. Plant Protection, 32(3): 108−109 (in Chinese) [贺志强, 王志贤, 丁兆光. 2006. 阿拉尔垦区春季枣、桃、葡萄病虫害种类及其发生规律. 植物保护, 32(3): 108−109]

Wang YC. 2018. Classification of crop diseases and insect pests and its control map-jujube canker and its control map. Pesticide Market Information, (5): 66 (in Chinese) [王永崇. 2018. 作物病虫害分类介绍及其防治图谱: 枣树腐烂病及其防治图谱. 农药市场信息, (5): 66]

Yan HL, Zhang WB, Zhu ZC, Yi ZB, Wang FY, Yue J. 2018. Study on pathogenicity differentiation of *Cytospora chiysosperma* and different hosts after interaction. Forestry Science & Technology, 43(2): 20−24 (in Chinese) [严海璘, 张王斌, 朱宗财, 仪子博, 王飞亚, 岳娟. 2018. 杨树腐烂病菌与不同寄主互作后致病力分化研究. 林业科技, 43(2): 20−24]

Yu ZD, Ma EJ, Yang J. 2011. ITS-nrDNA sequence study of important species in genus *Cytospora*. Journal of Food, Agriculture & Environment, 9(1): 557−562

Zhang XY, Chen HY, Liang J, Tian CM, Lü Q. 2007. Cultural morphology and vegetative compatibility of *Cytospora chrysosperma* isolates. Journal of Northwest A&F University (Natural Science Edition), 35(3): 99−105 (in Chinese) [张星耀, 陈海燕, 梁军, 田呈明, 吕全. 2007. 金黄壳囊孢菌(*Cytospora chrysosperma*)的培养性状和营养体亲和性. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 35(3): 99−105]

(责任编辑:王 璇)