

核桃炭疽病病原菌的分离鉴定

Isolation and identification of pathogen of walnut anthracnose

王雪菲¹ 李金荣¹ 卢东晓¹ 陈 孟¹ 朱会营³ 李会平^{1,2*}

(1. 河北农业大学林学院, 保定 071000; 2. 河北省城市森林健康技术创新中心, 保定 071000;

3. 天域生态环境股份有限公司, 上海 200082)

WANG Xuefei¹ LI Jinrong¹ LU Dongxiao¹ CHEN Meng¹ ZHU Huiying³ LI Huiping^{1,2*}

(1. College of Forestry, Hebei Agricultural University, Baoding 071000, Hebei Province, China; 2. Hebei Urban Forest

Health Technology Innovation Center, Baoding 071000, Hebei Province, China;

3. Tianyu Eco-Environment Co., Ltd., Shanghai 200082, China)

炭疽病是核桃生长过程中的一种重要病害,可危害其叶片、果实、芽和嫩梢。截止目前,已报道的核桃炭疽病病原菌主要有胶孢炭疽菌 *Colletotrichum gloeosporioides* (黄雄等, 2016)、果生刺盘孢菌 *Colletotrichum fructicola* (Wang et al., 2018) 和核桃盘二孢菌 *Marssonina juglandis* (Saremi & Amiri, 2010)。河北省是核桃生产大省,邢台市临城县薄皮核桃产业是我国薄皮核桃产业龙头县,也是最大的薄皮核桃基地,自2017年开始,核桃炭疽病已成为临城县乃至河北省核桃产业面临的一个严峻问题。本研究以临城县核桃园中的病枝、病果为材料,进行病原菌分离鉴定,以期明确该地区核桃炭疽病的病原,为该病的后续研究和防治提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

供试核桃:核桃炭疽病的感病枝条、果实以及健康的枝条、果实于2019年3月采自河北省邢台市临城县核桃园。

培养基: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15 g、蒸馏水1 L。

试剂及仪器:DNA提取试剂盒,上海桑尼生物科技有限公司;D4030A dNTP、DRR20AM *Taq* 酶,日本TaKaRa公司。GXZ-380B智能光照培养箱,宁波东南仪器有限公司制造;莱卡DM4000显微镜,德国Leica公司;ABI 3730XL测序仪,美国Applied Biosystems公司。

1.2 方法

致病性测定:采用组织分离法对病原菌进行分

离,将大小为1 cm×1 cm的感病组织块表面消毒后置于PDA培养基中,每皿放4块,置于25℃培养箱中暗培养。待病原菌长出后,挑取边缘菌丝纯化培养。将纯化后的菌株培养4~5 d后打取直径为8 mm的菌饼。选取健康的核桃果实、叶片经75%酒精消毒后,采用接种针进行刺伤,将菌饼接种于伤口处,覆上湿润脱脂棉,保鲜膜包裹48 h。以接种无菌PDA饼为对照。2 d后去掉脱脂棉,逐日观察发病情况。待其发病后进行病原菌的再分离,与初分离获得的菌株性状进行比较。

形态学鉴定:将纯化后的菌株在PDA培养基中于25℃培养箱中暗培养,逐日观察菌落颜色和形态,待其产孢后用显微镜观察分生孢子器、分生孢子及附着胞的形态并测量大小,观察5个视野,每个视野100个分生孢子。通过查阅《真菌鉴定手册》和《植物病原真菌》进行初步鉴定。

分子生物学鉴定:病原菌总DNA按照DNA提取试剂盒的操作说明进行提取。对*CAL*、*GS*基因进行PCR扩增,采用引物CL1C(5'-GAATTCAA-GGAGGCCTTCTC-3')/CL2C(5'-CTTCTGCATCAT-GAGCTGGAC-3')和GSF1(5'-ATGGCCGAGTACATCTGG-3')/GSR1(5'-GAACCGTCGAAGTTCCAG-3'),引物合成由上海桑尼生物科技有限公司完成。50 μL反应体系:20 ng/μL基因组DNA 1 μL、Buffer 5.0 μL、*Taq* 酶1.0 μL、dNTP 1.0 μL、正反向引物各1.5 μL、ddH₂O 39 μL。PCR扩增程序:95℃预变性5 min,95℃变性30 s,58℃退火30 s,72℃复性1 min,共35个循环,最后72℃延伸7 min。PCR产物经纯化后交上海桑尼生物科技有限公司进行测序。将测

序得到的序列在NCBI官网进行BLAST相似性比对,并通过MEGA 5.0软件以邻接法构建系统发育树,重复1 000次。

2 结果与分析

2.1 病原菌分离、培养及致病性测定

对核桃感病组织进行分离培养后得到1种菌株,编号为HTJ。将该菌株接种健康核桃果实和叶片,2 d后即发病,接种症状与田间发病症状相似。从菌株HTJ引起发病的叶片和果实上进行再分离,得到与接种菌株相同的菌株。根据柯赫氏法则,菌株HTJ为核桃炭疽病的致病菌。

2.2 形态学鉴定

菌株HTJ在PDA培养基上呈圆形蔓延生长,7~10 d时菌落长满整个培养皿,菌落棉絮状,菌丝初期呈白色,培养第4天时,菌落中间呈灰绿色,背面呈灰色,同时分泌出橘色分生孢子黏团,产生分生孢子

器。显微镜下观察,分生孢子器黑色,圆形,埋生或半埋生在PDA培养基中,大小为0.1~2.7 mm。分生孢子梗平行排列成一层,圆柱形。分生孢子单胞,无色,内含1个或2个或多个油球,圆柱形或一端尖锐或中间凹,大小为10.9~16.3 μm ×3.1~5.0 μm 。分生孢子萌发时从顶端、中间或两端萌发,附着胞褐色,近圆形或不规则状。初步鉴定菌株HTJ属于炭疽菌属 *Colletotrichum*。

2.3 分子生物学鉴定

CAL、GS基因序列比对结果显示,菌株HTJ与暹罗刺盘孢菌 *Colletotrichum siamense* 相应序列的同源性较高,相似性分别为99.49%、99.68%。基于CAL、GS基因序列构建系统发育树,发现菌株HTJ与暹罗刺盘孢菌聚于相同进化支(图1)。结合形态学特征鉴定结果和分子生物学鉴定结果确定菌株HTJ为暹罗刺盘孢菌。

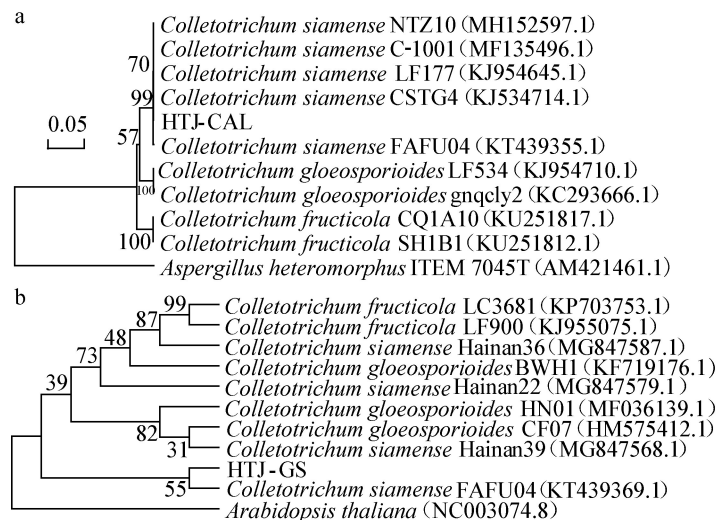


图1 基于CAL(a)和GS(b)基因序列构建菌株HTJ及其相关菌株的系统发育树

Fig. 1 The phylogenetic tree of strain HTJ and the related strains based CAL (a) and GS (b) gene sequences

3 讨论

目前关于核桃炭疽病的病原菌株多数报道为胶孢炭疽菌,仅有Wang et al.(2017)报道山东省济南市商河县张坊镇、历城区仲宫镇和乳山市崖子镇的核桃炭疽病病原菌为暹罗刺盘孢菌。本研究是关于暹罗刺盘孢菌能引起核桃发病的第2次报道,也体现了核桃炭疽病病原菌的多样性。此鉴定结果为后续其它地区核桃炭疽病的研究奠定了基础。关于该病原菌的生物学特性、所致病害的发病规律等还需继续研究,以便制定行之有效的防治方案。

参考文献 (References)

HUANG X, WANG LY, XIAO QW, PU GL, HE WC. 2016. Pathogen

- identification of walnut anthracnose and fungicide screening. Journal of China Agricultural University, 21(12): 41–48 (in Chinese) [黄雄, 王琳莹, 肖千文, 蒲光兰, 何汶椿. 2016. 核桃炭疽病病原鉴定及抑菌药剂筛选. 中国农业大学学报, 21(12): 41–48]
- SAREMI H, AMIRI ME. 2010. Evaluation of resistance to anthracnose (*Marssonina juglandis*) among diverse Iranian clones of walnut (*Juglans regia* L.). Journal of Food, Agriculture and Environment, 8(2): 375–378
- WANG QH, FAN K, LI DW, NIU SG, HOU LQ, WU XQ. 2017. Walnut anthracnose caused by *Colletotrichum siamense* in China. Australasian Plant Pathology, 46(6): 585–595
- WANG QH, LI DW, DUAN CH, LIU XH, NIU SG, HOU LQ, WU XQ. 2018. First report of walnut anthracnose caused by *Colletotrichum fruticola* in China. Plant Disease, 102(1): 247

(责任编辑:王璇)