

广东省番木瓜茎基腐病病原菌鉴定

Identification of the pathogen causing basal stem rot on *Carica papaya* in Guangdong Province

崔一平 彭埃天* 宋晓兵 陈霞 凌金锋

(广东省农业科学院植物保护研究所, 广东省植物保护新技术重点实验室, 广州 510640)

CUI Yiping PENG Aitian* SONG Xiaobing CHEN Xia LING Jinfeng

(Guangdong Provincial Key Laboratory of High Technology for Plant Protection, Research Institute of Plant Protection, Guangdong Academy of Agricultural Sciences, Guangzhou 510640, Guangdong Province, China)

番木瓜 *Carica papaya* 又名木瓜、万寿果, 是重要的热带、亚热带水果, 属于番木瓜科番木瓜属, 为多年生常绿软质小乔木 (Serrano & Cattaneo, 2010)。番木瓜原产于南美洲, 于 17 世纪传入我国, 在我国已有 300 多年的栽培历史, 目前主要分布在广东、海南、广西和福建等省区。2017—2019 年笔者在广东省广州市南沙区木瓜种植园进行病害调查时发现部分木瓜出现茎基部腐烂的现象, 随后在很短时间内整株木瓜树倒伏死亡且该占地约 5 hm² 的果园, 每年有大约 15% 以上的植株因茎基部腐烂而死亡。为明确引起木瓜茎基部腐烂病的主要病原菌, 采集发病植株茎基部进行病原菌分离和致病性测定, 并对所得病原菌进行分子生物学鉴定, 明确其病原菌, 以期为该病害的有效防控提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料

供试植物: 感病番木瓜分别于 2017—2019 年夏季采自广州市南沙区木瓜种植园; 健康番木瓜苗购自广州市果树研究所, 于温室在自然光照下培养备用。

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 20 g, 去离子水定容至 1 000 mL。

试剂及仪器: 植物 DNA 提取试剂盒, 爱思进生物技术 (杭州) 有限公司; 2×EasyTaq PCR SuperMix (-dye), 北京全式金生物技术有限公司。Leica DM2500 光学显微镜, 德国 Leica 公司; T100TM PCR 仪、Mini-Sub Cell GT Cell 1704406 核酸水平电泳槽, 美国 Bio-Rad 公司。

1.2 方法

番木瓜茎基腐病的田间发病症状观察: 2017—

2019 年在广东省广州市南沙区木瓜种植园对番木瓜发病的茎基部病害发生条件及发展进行观察, 包括是否腐烂、有水渍症状及是否覆盖有病原体等; 每隔 10 d 观察 1 次, 直至番木瓜植株完全倒伏为止。

病原菌的分离与形态特征观察: 选取感病番木瓜的茎基部, 用解剖刀在病健交界处取大小为 0.2 mm×0.2 mm 的小块, 依次浸泡于 70% 酒精中 30 s、2% NaClO 2~3 min, 用无菌水冲洗 3~5 次, 置于无菌滤纸上晾干, 置于 PDA 平板上 25℃ 培养。3 d 后分离物上长出白色菌丝, 挑取单孢子接种在新的 PDA 平板上继续培养 10 d 后, 于显微镜下对分离所得代表菌株 1-1 的菌丝和孢子进行镜检, 至少观察 30 个视野。

致病性测定: 在培养 7 d 的菌株 1-1 菌落上, 用打孔器取直径为 5 mm 的菌饼, 同时用灭菌 1 mL 注射器针头在 5 株 2 个月大的健康木瓜幼苗茎基部和 5 个离体茎秆上分别轻轻刺伤 1 个小口, 把菌饼放置于伤口上进行致病性测定。以接种 PDA 培养基作阴性对照。接种 7 d 后, 对发病的番木瓜植株重新进行病原菌的再次分离和鉴定, 观察与原接种菌的性状是否一致。

病原菌分子生物学鉴定: 以分离获得的代表菌株 1-1 的全基因组 DNA 为模板进行 PCR 扩增。将培养 7~10 d 纯化菌株的菌丝和孢子从 PDA 平板上刮下来, 迅速用液氮研磨。根据植物 DNA 提取试剂盒的说明书提取 DNA。选取 ITS (ITS1: 5'-TCCG-TAGGTGAACCTGCGG-3'/ITS4: 5'-TCCTCCGCTT-ATTGATATGC-3')、*LSU* (LR5F: 5'-ATCCTGAGG-GAAACTTC-3'/LROR: 5'-ACCCGCTGAACCTAA-GC-3')、*RPB2* (RPB2-5F: 5'-GA(T/C)GA(T/C)(A/

基金项目: 科技创新战略专项资金 (R2018QD-059), 广东省农业科学院院长基金 (201708), 广东省现代农业产业技术体系建设项目 (2018LM1077)

* 通信作者 (Author for correspondence), E-mail: pengaitian@163.com; 收稿日期: 2020-05-21

C)G(A/T)GATCA(T/C)TT(T/C)GG-3'/RPB2-7cR: 5'-CCCAT(A/G)GCTTG(T/C)TT(A/G)CCCAT-3')和*EF-1a*(*EF1*:5'-ATGGGTAAGGAAGA-CAAGAC-3'/*EF2*:5'-GGAAGTACCAAGTGATC-ATGTT-3')基因序列进行PCR扩增。20 μ L PCR反应体系:2 $\times$ Easy Taq PCR SuperMix (-dye) 10 μ L、10 μ mol/L上下游引物各0.3 μ L、DNA模板2 μ L、ddH₂O补足至20 μ L。PCR反应程序:94 $^{\circ}$ C预变性3 min;94 $^{\circ}$ C变性40 s, 53 $^{\circ}$ C退火45 s, 72 $^{\circ}$ C延伸30 s, 34个循环;72 $^{\circ}$ C保持5 min。将PCR产物进行1%琼脂凝胶电泳检测,并将获得的阳性PCR产物进行测序,引物合成及测序均委托于生工生物工程(上海)股份有限公司完成;将获得的核酸序列在NCBI的BLAST中进行比对分析,利用MegAlign 7.1.0(44)软件建立菌株1-1及其相似菌株的系统发育树,从而确定其分类地位。

2 结果与分析

2.1 番木瓜茎基腐病症状

调查发现,番木瓜茎基腐病易发生在夏季高温高温的环境中。发病初期,受侵染的植株茎基部表现出边缘有水渍状的腐烂,其上有白色菌丝体;随着病害发展,番木瓜的茎基部开始变软,最后整个植株倒伏在地直至死亡。

2.2 病原菌的形态特征及致病性

共分离获得15株病原菌菌株,菌落在PDA平板上均呈圆形,最初为白色,而后菌落中心部位变为黑色,其它部位则变为淡黄色,为单一的镰刀菌属真菌,本研究选取其代表菌株1-1进行后续研究。菌株1-1的菌丝白色透明、有分枝和分隔,分生孢子镰刀形或豆荚状、透明且具2~5个横隔,大小为19.8~39.2 μ m $\times$ 2.9~4.3 μ m。接种菌株1-1的菌丝块7 d后,不管是离体木瓜茎秆上还是木瓜植株上,接种部位均出现带有水渍状的腐烂且其上附着有白色菌丝体;被接种活体木瓜苗则同时出现倒伏。而对照没有症状。从发病的木瓜茎秆上可再分离获得单一的与原接种菌株在培养性状和形态特征上一致的病原菌,进一步确定菌株1-1为番木瓜茎基腐病原菌。

2.3 菌株1-1的分子生物学鉴定

选取ITS、*LSU*、*RPB2*和*EF-1a*基因序列进行PCR扩增,分别得到大小为512、902、1151和660 bp的片段。通过胶回收和测序后,把得到的序列在GenBank中进行BLAST比对,发现菌株1-1(ITS、*LSU*、*RPB2*和*EF-1a*序列登录号分别为MH986723、MT077003、MT472639和MT894247)与变红镰刀菌*Fusarium incarnatum*(ITS、*LSU*、*RPB2*和*EF-1a*序列登录号分别为MN871565.1、MH877326.1、KM591-

682.1和KF255470.1)的同源性均达到了99%以上。将获得的ITS、*LSU*、*RPB2*和*EF-1a*序列分别构建系统发育树,发现菌株1-1序列与变红镰刀菌的遗传距离最近,结合形态学特征及分子生物学鉴定结果确定引起番木瓜茎基腐病的病原菌为变红镰刀菌*F. incarnatum*。文中仅列出基于*LSU*基因序列构建的系统发育树(图1),基于ITS、*RPB2*和*EF-1a*基因序列构建的系统发育树结果与其相类似。

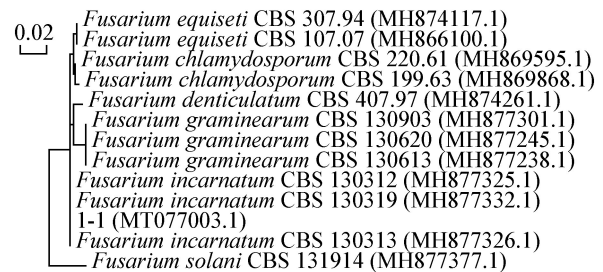


图1 基于*LSU*基因序列构建番木瓜病菌菌株1-1及相似病菌的系统发育树

Fig. 1 Phylogenetic tree of the pathogen strain 1-1 of basal stem rot on *Carica papaya* and related strains based on *LSU* sequence

3 讨论

本研究确定了引起番木瓜茎基腐病的病原菌为变红镰刀菌,这是在我国首次报道变红镰刀菌引起的番木瓜茎基腐病。此外,变红镰刀菌在我国的莲花和印度的核桃上也能够引起相似症状(Singh et al. 2011; Wang et al. 2020)。过去也有关于番木瓜茎基腐病的报道,一般认为其病原菌为棕榈疫霉 *Phytophthora palmivora*(李永忠等,2007),但在本次研究中没有分离到此病原菌。有关引起番木瓜茎基腐病病原菌变红镰刀菌的侵染机制和病害防治措施等方面仍需进一步研究。

参考文献 (References)

- LI YZ, YANG M, ZHOU EX, WANG ZH, FU CD, ZHOU DH, WU XB, WU GL. 2007. Preliminary investigation on papaya stem base rot. Guangdong Agricultural Sciences, (12): 60-61 (in Chinese) [李永忠, 杨媚, 周而勋, 王泽槐, 傅焯栋, 周东辉, 吴绪波, 吴国麟. 2007. 番木瓜茎基腐病初步研究. 广东农业科学, (12): 60-61]
- SERRANO LAL, CATTANEO LF. 2010. O cultivo do mamoeiro no Brasil. Revista Brasileira de Fruticultura, 32(3): 657-959
- SINGH B, KALHA CS, RAZDAN VK, VERMA VS. 2011. First report of walnut canker caused by *Fusarium incarnatum* from India. Plant Disease, 95(12): 1587
- WANG GF, TIAN T, MENG JF, XIAO XQ, XIAO YN. 2020. First report of *Fusarium incarnatum* causing rot disease on lotus in China. Journal of Plant Pathology, 102(5/6): 595

(责任编辑:王 璇)