

番石榴枯萎病病原菌的分离及分子生物学鉴定

Isolation and molecular identification of the pathogen causing wilt in *Psidium guajava*

崔一平 彭埃天* 宋晓兵 凌金锋 陈霞 程保平

(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 Ling Jinfeng Chen Xia Cheng Baoping

(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)

番石榴俗称芭乐或拔子,属于桃金娘科番石榴属的常绿灌木或小乔木,在我国主要种植于广东省、广西壮族自治区、福建省和云南省等地。2018年和2019年每年的7月至9月,笔者在对广东省广州市南沙区番石榴种植园病害进行普查时发现,该果园部分番石榴植株出现成片的整株枯萎症状,该病害的整个发病历程和发病症状与已报道的番石榴病害不完全相同或相似,故将其命名为番石榴枯萎病(高新明等, 2011)。为明确引起番石榴枯萎病的病原菌,对采集的田间病样进行病原菌分离及分子生物学鉴定,以期科学防治番石榴枯萎病及对番石榴产业的健康发展作技术准备。

1 材料与方法

1.1 材料

供试植物:感病与健康番石榴均于2018年和2019年的7—9月采集自广东省广州市南沙区番石榴种植园,品种为珍珠。

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:Axygen动植物基因组DNA试剂盒,爱思进生物技术(杭州)有限公司;2×Easy Taq PCR SuperMix(-dye),北京全式金生物技术有限公司;其他试剂均为国产分析纯。Microfuge 20微量离心机,美国Beckman Coulter公司;T100TM PCR、美伯乐1704487小型水平电泳槽,美国Bio-Rad公司;Leica DM2500光学显微镜,德国Leica公司。

1.2 方法

番石榴枯萎病的田间发病症状观察:2018年和2019年的7—9月在广东省广州市南沙区番石榴种植园对番石榴枯萎病的发生情况进行调查;每隔7 d

观察1次,直至番石榴植株整株变黑、干枯为止。

病原物分离与形态特征观察:选取感病的番石榴病组织(包括茎秆和果实),在病健交界处剪出大小2 mm×2 mm的菌丝块,在70%酒精中浸泡30 s,2% NaClO中浸泡1.5 min,无菌水冲洗4次,置于无菌滤纸上晾干,置于PDA培养基上于25℃进行培养。3~5 d后,通过纯化挑取单孢子接种在新的PDA平板上进行培养。7~10 d后在光学显微镜下对代表菌株1-1的菌丝和孢子进行镜检,观察视野10个以上,约25个孢子,观察孢子形态特征并统计大小。

致病性测定:选取在PDA上培养7 d的大小为5 mm×5 mm的菌丝块;用注射器针头在健康的番石榴茎秆和果实上扎3个孔,把菌丝块倒置接种于有伤口的番石榴茎秆和果实上,以及无伤口的番石榴茎秆和果实上;以PDA培养基接种作为阴性对照。逐日观察发病情况,并从发病组织上分离病原,观察是否与接种病原的性状一致。

真菌的分子生物学鉴定:将培养7 d的菌株1-1的菌丝从PDA平板上刮下来,迅速用液氮研磨。依据Axygen动植物基因组DNA试剂盒操作说明书进行DNA提取。选取ITS(ITS1:5'-TCCGTAGGTGA-ACCTGCGG-3'和ITS4:5'-TCCTCCGCTTATTGAT-ATGC-3'), LSU(LR5F:5'-ATCCTGAGGGAACT-TC-3'和LROR:5'-ACCCGCTGAACTTAAGC-3'), β -Tubulin(TUBUF2:5'-CGGTAACAACCTGGGCCA-AGG-3'和TUBUR1:5'-CCTGGTACTGCTGGTAC-TCAG-3')和EF-1 α (ELONGF1:5'-TCACGATCGA-CATTGCCCTG-3'和ELONGR1:5'-ACGGCTCGAG-GATGACCATG-3')为引物,以提取的全基因组DNA为模板进行PCR扩增。20 μ L PCR反应体系:模板1.0 μ L、2×EasyTaq® PCR SuperMix 10.0 μ L、上下游

引物各 0.5 μL , ddH₂O 8.0 μL 。反应条件: 95℃预变性 5 min; 95℃变性 30 s, 55℃退火 30 s, 72℃延伸 60 s, 34 个循环; 72℃延伸 10 min; 取 5 μL PCR 产物在 1% 琼脂凝胶上进行电泳检测; 同时将获得的阳性 PCR 产物测序, 引物合成及 PCR 产物测序均委托生工生物工程(上海)股份有限公司完成。通过 NCBI 的 BLAST 对获得的片段信息进行比对, 同时把片段的核酸信息提交到 NCBI 数据库, 利用 MegAlign 7.1.0(44) 软件以最大似然法构建系统进化树, 重复构建 3 次。

2 结果与分析

2.1 番石榴枯萎病症状

番石榴枯萎病发病初期, 植株上的所有部位都可能会出现不规则病斑, 而后沿番石榴植株上的维管束进行扩展; 被感染部位迅速变为黑色, 并沿着维管束进行蔓延; 在很短的时间内整株番石榴树迅速死亡, 挂于树上的干枯果实和干枯叶片暂未脱落。

2.2 分离所得真菌的形态特征及致病性分析

共分离获得了 10 株菌株, 其中 9 株的菌落生长形态一致, 均具有白色、疏松和蓬松的气生菌丝; 孢子和菌丝呈现出相似的形态特征, 菌丝体透明, 有分隔和分支。孢子囊为卵球形至球形, 顶生, 有突出的乳头, 长 18.2~78.8 μm , 宽 15.6~29.2 μm 。厚垣孢子的直径为 9.19~28.3 μm , 多数间生, 球形; 卵原细胞

直径为 17.3~32.8 μm , 球形。

接种菌株 1-1 后 10 d, 番石榴的茎秆已完全由绿色变为黑色, 并沿着维管束向叶片侵染, 被侵染的叶片也变为了黑色; 15~20 d 后, 被接种果实已经完全变为黑色的干腐症状, 并沿着果柄向果实的茎秆进行侵染, 症状均与田间发现的番石榴枯萎病症状相同。从发病的番石榴组织上可再分离获得单一病原菌, 与原接种菌株在培养性状和形态特征一致, 进一步确定菌株 1-1 为番石榴枯萎病原菌。

2.3 菌株 1-1 的分子生物学鉴定

选取 ITS、LSU、 β -Tubulin 和 EF-1 α 序列进行 PCR 扩增, 分别得到大小为 849、1 106、987 和 969 bp 的片段。在 NCBI 的 BLAST 中对比发现菌株 1-1 (ITS、LSU、 β -Tubulin 和 EF-1 α 序列登录号分别为 MH973199、MK583673、MT458708 和 MT45-8707) 与烟草黑胫病菌 *Phytophthora nicotianae* (ITS、LSU、 β -Tubulin 和 EF-1 α 序列登录号分别为 KJ494902、KX250514、LC595874 和 KC984202) 的同源性均达到了 98% 以上。基于 LSU 片段序列构建的系统发育树显示, 菌株 1-1 与烟草黑胫病菌的遗传距离最近(图 1), 基于 ITS、 β -Tubulin 和 EF-1 α 基因序列构建的系统发育树结果类似。结合形态学特征及分子鉴定结果确定番石榴枯萎病病原菌为烟草黑胫病菌 *P. nicotianae*。

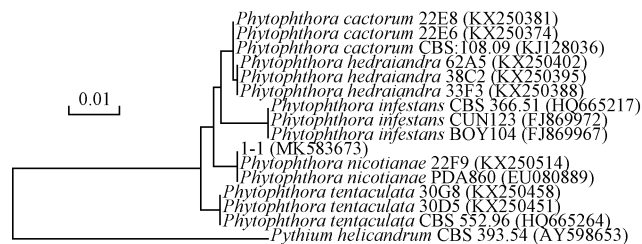


图 1 基于 LSU 序列以最大似然法构建的菌株 1-1 与疫霉属及其近缘属的系统发育树

Fig. 1 Phylogenetic tree for strain 1-1, and isolates in *Phytophthora* and *Pythium* constructed on LSU sequences using the maximum likelihood method

3 讨论

近年来越来越多的由烟草黑胫病菌引起的植物病害被发现和报道, 如花卉、樱桃、三叶草和魔芋等 (Cheng et al., 2020)。本研究确定了引起番石榴枯萎病病原为烟草黑胫病菌, 这是我国甚至是全世界首次报道该病菌在番石榴上引起病害。在对番石榴枯萎病病原菌进行分离时, 共获得了 2 种致病真菌, 分别为烟草黑胫病菌 (分离率为 90%) 和链格孢菌 (分离率为 10%); 前者在进行致病性测定时可以引起与田间症状相似的症状, 后者仅可在番石榴叶片上引起叶斑病 (Song et al. 2020)。有关烟草黑胫病菌的侵染机制和病害防治措施等方面仍需进一步的研究。

参考文献 (References)

- Cheng S, Ke J, Tan LT, Galileya MR, Liang PY, Gong TZ, Sun ZX. 2020. First report of leaf spot on *Akebia trifoliata* caused by *Phytophthora nicotianae* in China. *Plant Disease*, 105: 2
- Gao XM, Li BJ, Lan CZ, Weng QY, Chen QH. 2011. Analysis of ITS sequences and PCR detection of *Botryosphaeria rhodina*. *Journal of Plant Protection*, 38(3): 227-232 (in Chinese) [高新明, 李本金, 兰成忠, 翁启勇, 陈庆河. 2011. 番石榴焦腐病菌的 ITS 分析及 PCR 检测. *植物保护学报*, 38(3): 227-232]
- Song XB, Cui YP, Peng AT, Ling JF, Chen X. 2020. First report of brown spot disease in *Psidium guajava* caused by *Alternaria tenuissima* in China. *Journal of Plant Pathology*, 102: 1309

(责任编辑: 王 璇)