

上海市鸡爪槭枝干溃疡病病原菌鉴定

Identification of the pathogen caused trunk canker of red emperor maple
Acer plamatum in Shanghai孙荣华^{1,2*} 路广亮^{1,2} 王章训^{1,2}

(1. 上海市园林科学规划研究院植保研究所, 上海 200232; 2. 上海城市困难立地绿化工程技术研究中心, 上海 200232)

Sun Ronghua^{1,2*} Lu Guangliang^{1,2} Wang Zhangxun^{1,2}

(1. Institute of Plant Protection, Shanghai Academy of Landscape Architecture Science and Planning, Shanghai 200232, China; 2. Shanghai Engineering Research Center of Landscaping on Challenging Urban Site, Shanghai 200232, China)

鸡爪槭 *Acer palmatum* 又称鸡爪枫, 是槭树科槭属落叶小乔木, 为园林造景中的优良彩叶树种, 种植广泛(徐廷志, 1996)。近几年, 本课题组在上海市鸡爪槭上发现一种新的枝干病害, 在其小枝和主干上均有发生, 导致枝干溃疡, 严重时甚至导致植株枯萎死亡。目前关于鸡爪槭的病害研究较匮乏, 国内还未见关于鸡爪槭枝干溃疡病的报道。为明确其病原, 本研究对上海市鸡爪槭枝干溃疡病进行症状观察和病原菌分离, 结合形态学特征和ITS序列分析对病原菌进行鉴定, 以期对鸡爪槭枝干溃疡病的防治提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

供试植株及培养基: 于上海市青浦区赵巷镇苗圃的鸡爪槭上采集发病枝干和健康枝条。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。

试剂和仪器: DNA专用抽提试剂盒, 生工生物工程(上海)股份有限公司; 常规PCR试剂, 日本TaKaRa公司; 其余试剂均为国产分析纯。Simpli-Amp™ PCR仪, 赛默飞世尔科技(中国)有限公司; DMLST/PH5光学显微镜, 德国徕卡公司。

1.2 方法

病害观察和致病性检测: 在2017年4—10月, 每2周对上述苗圃内鸡爪槭枝干溃疡病进行1次调查, 观察发病主干与枝条上溃疡病斑的形成过程并记录发病情况。采用组织分离法从发病枝干的病健交界处取2 mm×4 mm组织进行病原菌分离, 于PDA平板上25℃培养, 挑取菌落边缘的菌丝块转移纯化,

将纯化菌株于PDA平板上活化培养2~3 d后打取直径7 mm的菌饼。选取健康鸡爪槭枝条, 用手术刀轻轻划伤枝条表皮, 使菌饼正面朝向伤口, 用已浸湿脱脂棉保湿伤口, 并对接枝条套袋保湿24 h。每株菌株3次重复, 并设清水对照。25℃培养7、14 d时观察并记录发病情况, 对发病枝条进行病原菌再分离, 观察是否与原接种菌株性状一致。

形态学鉴定: 将病原菌转接到PDA平板上, 于25℃恒温培养, 逐日观察菌丝的颜色、生长速度及菌落形状等, 在光学显微镜下观察病原菌10个视野下的分生孢子形态特征并拍照, 使用DCview 7软件测量分生孢子大小, 共测量30个孢子。

分子生物学鉴定: 采用改良CTAB法提取基因组DNA, 于-20℃保存备用。用真菌核糖体rDNA区通用引物ITS1(5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3')/ITS4(5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3')扩增ITS序列, 引物合成与测序由生工生物工程(上海)股份有限公司完成。50 μL PCR反应体系: 10×PCR Buffer 5 μL、2.5 mmol/L dNTP Mix 4 μL、25 mmol/L MgCl₂ 3 μL、引物ITS1/ITS4各1 μL、DNA模板50 ng、*rTaq*酶0.25 μL、ddH₂O补足至50 μL。反应程序: 94℃预变性5 min; 94℃变性15 s, 50℃退火45 s, 72℃延伸45 s, 35个循环; 72℃后延伸5 min。PCR产物测序结果在GenBank中进行BLAST同源比对, 经Mega 5.0软件进行聚类分析, 通过邻接法(neighbor joining, NJ)构建系统进化树, 自展值为1 000。

2 结果与分析

2.1 鸡爪槭枝干溃疡病的症状观察

鸡爪槭枝干溃疡病在上海市始发于4月, 发病

初期受害枝条表面出现黑褐色椭圆形病斑,随着病情的发展,病斑逐步扩大,长达数厘米或扩展成片,呈不规则状,使枝条表皮环状坏死(图1-A-1)。病原菌既可侵染植株分枝也可侵染主干,导致分枝枯死,主干发病部位出现不规则水渍状病斑,病情扩展后,甚至整株枯萎死亡。

2.2 鸡爪槭枝干溃疡病病原菌的致病性

病组织在PDA平板上25℃恒温培养后,均在2~4 d内形成菌落,菌落形态、颜色均一致,将分离病菌命名为2017SHA.P。将该菌株接种到离体鸡爪槭植株上,7 d后发现接种植株发病,而对照未发病(图1-A-2)。发病植株接种位置出现黑色病斑,发病症状与鸡爪槭在自然状态下的感染症状基本相同(图1-A-3)。对接种发病后病斑进行再分离,获得与原

分离菌株一致的病原菌。根据柯赫氏法则,菌株2017SHA.P为鸡爪槭枝干溃疡病的病原菌。

2.3 鸡爪槭枝干溃疡病病原菌的形态鉴定

菌株2017SHA.P菌丝生长速度较快,4~7 d可布满整个平板。初期菌丝呈白色,5~6 d后呈灰白色,之后颜色逐渐加深,14 d后呈黑色,气生菌丝绒毛状;在PDA培养基上不产孢,在野外和回接病原菌的发病枝条上肉眼可见黑色粒状小点,在显微镜下可见分生孢子。分生孢子近球形或不规则型,分生孢子与分生孢子梗无色;分生孢子椭圆形或卵圆形,基部平截,端部钝圆,单孢、双层壁,大小为 $16.67\sim 25.01\ \mu\text{m}\times 9.26\sim 13.89\ \mu\text{m}$ (图1-B~C)。基于上述形态特征将菌株2017SHA.P初步鉴定为可可毛色二孢菌*Lasiodiplodia theobromae* (Pat.) Griff. & Maubl.

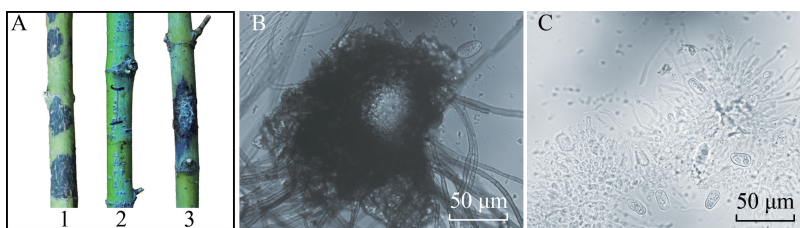


图1 上海市鸡爪槭枝干溃疡病病枝症状及病原菌形态特征

Fig. 1 Symptom and morphological characteristics of the pathogen causing branch canker on *Acer palmatum* in Shanghai

A: 1为病枝症状,2为对照,3为接种2017SHA.P; B: 分生孢子器; C: 分生孢子和分生孢子梗。A: 1 is symptom of naturally infected branch; 2 is control branch; 3 is branch inoculated with 2017SHA.P; B: pycnidium; C: conidia and conidiophores.

2.4 鸡爪槭枝干溃疡病病原菌的ITS序列分析

对2017SHA.P菌株rDNA-ITS区域进行PCR扩增获得约644 bp的片段。BLAST同源性比对结果显示,所测序列与可可毛色二孢菌相关序列的相似性为99%。聚类分析结果表明,2017SHA.P菌株ITS序列与可可毛色二孢菌相关序列的遗传距离最近,位于同一分支(图2)。进一步证明鸡爪槭枝干溃疡病的病原菌为可可毛色二孢菌。

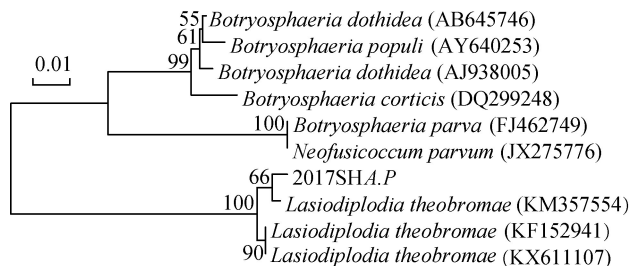


图2 基于ITS序列以邻接法构建菌株2017SHA.P及其相关菌株的系统发育树

Fig. 2 Phylogenetic tree of the 2017SHA.P and other isolates based on the ITS sequences by neighbor-joining method

3 讨论

可可毛色二孢菌引起的病害在全球范围内分布广泛、危害严重。廖旺娇等(2016)研究结果表明,可可毛色二孢菌喜高温、高湿环境,较适宜温度为25~35℃,随湿度增加其分生孢子萌发率升高,在饱和湿度和水滴中的萌发率为93.2%,这与该病害在上海市4月开始发病,梅雨季节为发病高峰期的发病规律相吻合。本研究发现可可毛色二孢菌在PDA培养基上不产孢,在病斑组织保湿培养10~14 d后可见分生孢子。有关该病害的发生流行规律、侵染循环途径及防治措施等还需进一步研究。

参考文献 (References)

- Liao WJ, Zhu YZ, Zou DX, Huang NX, Wu YJ. 2016. Biological characteristics of pathogens for eucalyptus dieback. *Guangxi Forestry Science*, 45(4): 369-372 (in Chinese) [廖旺娇, 朱英之, 邹东霞, 黄乃秀, 吴耀军. 2016. 桉树枝枯病菌生物学特性. *广西林业科学*, 45(4): 369-372]
- Xu TZ. 1996. Phytogeography of the family Aceraceae. *Acta Botanica Yunnanica*, 18(1): 43-50 (in Chinese) [徐廷志. 1996. 槭树科的地理分布. *云南植物研究*, 18(1): 43-50]

(责任编辑:李美娟)