

猕猴桃采后腐烂病原的鉴定

陆训^{1a,2}, 潘显婷^{1a,2}, 庞立², 王仁才^{1b}, 周倩^{1a,2*}

(1.湖南农业大学 a.植物保护学院; b.园艺园林学院, 湖南 长沙 410128; 2.植物病虫害生物学与防控湖南省重点实验室, 湖南 长沙 410128)

摘 要: 2015 年 9 月, 于湖南省浏阳果园内发现大量采摘后易腐烂的猕猴桃, 腐烂部位有明显块状褐色病斑。对染病猕猴桃腐烂部位进行病原物的分离纯化、形态学观察和致病力验证、分子生物学方法进一步区分鉴定病原菌, 结果表明, 导致猕猴桃腐烂的病原菌为大豆拟茎点种腐病菌(*Phomopsis longicolla*)。

关 键 词: 猕猴桃; 病原菌; 拟茎点霉属

中图分类号: S436.634.1[†]9

文献标志码: A

文章编号: 1007-1032(2017)02-0171-05

Identification of the pathogen associated with postharvest fruit rot of kiwifruit

LU Xun^{1a,2}, PAN Xianting^{1a,2}, PANG Li², WANG Rencai^{1b}, ZHOU Qian^{1a,2*}

(1.a.College of Plant Protection; b.College of Horticultural & Landscape, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China; 2.Hunan Provincial Key Laboratory for Biology and Control of Plant Diseases and Insect Pests, Changsha 410128, China)

Abstract: In September 2015, post-harvest rot were found on a large number of kiwifruits in Hunan province of China which shows obvious brown disease spot. To figure the reason out, pathogen segregation and purification assay were conducted on the rotten parts of the kiwifruit. By morphological observation, pathogenicity verification, and molecular biological methods *Phomopsis longicolla* was finally identified as the cause of the kiwifruit rot.

Keywords: kiwifruits; pathogen; *Phomopsis longicolla*

笔者于 2015 年 9 月在湖南省浏阳官桥镇一果园内发现‘翠玉’猕猴桃采摘不久即发生腐烂, 发病率 50%以上。为了弄清导致猕猴桃果实腐烂的原因, 对病原进行了分离、纯化和鉴定, 现将结果报道如下。

1 材料与方法

1.1 腐烂猕猴桃取样

取腐烂程度不高的猕猴桃用自封袋密封, 每袋 1 个, 4 °C 冰箱保存。

1.2 方法

1.2.1 病原菌分离和纯化

采用常规真菌分离方法和单孢分离纯化技术^[1]分离、纯化病原菌。用灭菌剪刀随机剪取猕猴桃果实发病部位与健康部位交界处的表皮及组织, 用 75%乙醇消毒, 无菌水冲洗并用灭菌滤纸将水分吸干后, 接种于 PDA 平板上 25 °C 培养。随机挑取 6 个菌落, 分别接种于 PDA 平板上, 观察各菌落形态。培养至产孢后, 观察孢子形态, 用 1 mL 无菌水洗下孢子并稀释, 将稀释的孢子悬浮液取 70 μL 左右用

涂抹棒均匀涂抹在 PDA 平板上,待长成菌落后,随机挑取 6 个菌落在 PDA 斜面上,4℃冰箱保存。

1.2.2 病原菌的鉴定

1) 形态学观察。分离纯化得到的菌株接种于 PDA 平板上,25℃恒温培养箱中培养 4~30 d。从第 4 天开始,每天观察菌株菌落形态。培养 30 d 后,不定期观察菌株产孢情况、产孢结构和分生孢子形态,并测量分生孢子大小,参照文献[2],初步鉴定病原菌。

2) 病原菌致病性验证。分离纯化得到的 6 个菌落,通过培养观察,菌株菌落形态、产孢结构和分生孢子形态相同,初步确定 6 个菌落为相同病原真菌。取其中代表菌株(编号为 Liuyang)作致病性试验。将 Liuyang 接于 PDA 平板上,25℃恒温培养 10 d 后,用 7 mm 直径打孔器打取菌饼用于接种试验。25℃恒温培养 30 d 产孢后,用 1 mL 无菌水洗下分生孢子,在显微镜下利用血球计数板计算孢子的浓度,用无菌水将孢子悬浮液浓度调至 1×10^6 个/mL,以备后续接种试验。

挑选大小、形状基本一致的 8 个猕猴桃,其中 4 个用于菌饼接种:将菌饼菌丝面贴于 3 个猕猴桃果实表面,1 个用灭菌后的 PDA 培养基饼贴于表面作为对照;另 4 个用于孢子悬浮液接种:用移液枪吸取 10 μ L 孢子悬浮液滴在 3 个果实表面,对照为用移液枪取 10 μ L 灭菌双蒸水。2 种方式接种的猕猴桃均放置于温度 25℃和相对湿度 80%的恒温培养箱避光培养。接种 10 d 后,观察果实的发病情况。接种试验重复 3 次。发病后对接种发病的部位再次进行病原菌分离、纯化及鉴定,初步确定与接种前为同一病原真菌。

3) 病原菌的分子鉴定。分离菌株在 PDA 上 25℃恒温培养 7 d 后,CTAB 法^[3]提取病原菌基因组 DNA。用通用引物 ITS4、ITS5^[4],延伸因子 α (TEF1- α)基因^[5]和微管蛋白 β (BT)基因^[6]引物以及鉴定 *P. longicolla* 的特异性引物 Phom^[7]进行 PCR 扩增,PCR 反应体系(25 μ L):DNA 模板 2 μ L(20~30 ng),引物 ITS4(10 μ mol/L)和 ITS5(10 μ mol/L)、TEF1- α -F(10 μ mol/L)、TEF1- α -R(10 μ mol/L)、BT-F(10 μ mol/L)、BT-R(10 μ mol/L)、Phom.I(10 μ mol/L)和 Phom.II(10 μ mol/L)各 1 μ L, PremixExTaq@Version 2.0 12.5 μ L (TaKaRa 公司),双蒸水 8.5 μ L。PCR 扩增程序:94

℃预变性 5 min,94℃变性 30 s,55℃退火 30 s,72℃延伸 30 s,进行 32 个循环,最后 72℃延伸 7 min。用 1%琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 扩增的结果,回收 PCR 产物,送上海生工生物工程股份有限公司测序。将所得 ITS、延伸因子 α (TEF1- α)、微管蛋白 β (BT)序列提交到 GenBank,并用 Blast 进行同源性比对。所得数据利用 MEGA6 软件进行邻接法数据分析,并进行 1 000 次重复的自举法(bootstrap analysis)构建系统发育树。

2 结果与分析

2.1 染病猕猴桃的发病症状

湖南省浏阳染病猕猴桃果实表面有较大褐色椭圆形病斑,病斑处表皮较周围健康表皮软,颜色深,表面附着白色菌丝,剥去病斑处表皮可见果肉组织呈淡绿色,比相邻健康组织颜色浅且更疏松(图 1)。



图 1 猕猴桃采后腐烂症状

Fig.1 Post-harvest fruit rot in kiwifruit

2.2 病原菌的形态学特征

将染病猕猴桃果实表皮组织分离的病原菌置于 PDA 培养基上培养,初始菌丝白色,呈密集丛卷毛状,20 d 后产生黑色、较大、分散的子座,分生孢子座呈黑色,分散或聚集,有孔口,颈部有突起,分生孢子器多呈簇生,有突起的喙(图 2-A、图 2-B)。分生孢子有 2 种形态: α 形分生孢子透明椭圆((4~8) μ m $\times$ (1.2~2) μ m)分离; β 分生孢子透明,线状和一端有钩状结构((19~37) μ m $\times$ (0.7~1.1) μ m)。分生孢子以 α 形为主(图 2-C),初步鉴定为 *Phomopsis* sp.^[8]。



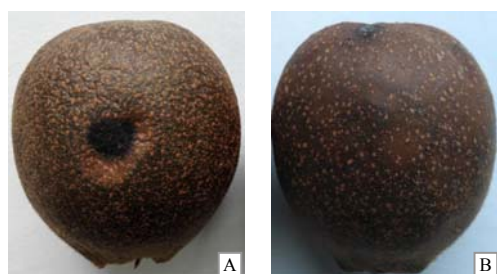
A 25 °C、7 d 菌落形态；B 25 °C、30 d 菌落形态；C 分生孢子形态。

图 2 Liuyang 菌株菌落及分生孢子形态

Fig.2 Liuyang colony and conidiophore morphology on PDA

2.3 病原菌的致病性

在 25 °C 和相对湿度 80% 条件下, 菌饼接种和孢子悬浮液接种均可导致猕猴桃发病。菌饼接种发病快, 发病部位的果皮表面凹陷, 颜色变深, 严重时呈褐色, 感病处组织变软(图 3-A); 孢子接种果实表面布有白色至灰色菌丝, 发病表皮褐色, 柔软, 有凹陷, 后期病斑逐渐扩大, 导致整个果实从里至外, 从病斑部位朝外围腐烂(图 3-B)。菌饼与孢子接种结果与染病猕猴桃症状一致。从发病部位再分离和纯化后, 经鉴定, 得到与接种菌株相同的病原菌。



A 25 °C、10 d 菌饼接种；B 25 °C、15 d 孢子悬浮液接种。

图 3 菌株 Liuyang 的室内接种症状

Fig.3 Kiwifruit fruit rot symptom induced by indoor inoculation of Liuyang

2.4 病原菌分子鉴定结果

利用真菌 18S-28S rDNA 间隔区序列(ITS)的通用引物 ITS4 和 ITS5、延伸因子 α (TEF1- α)和微管蛋白 β (Bt)基因, 从代表菌株 Liuyang 的 DNA 中分别 PCR 扩增得到 554、316、509 bp 的条带(图 4)。ITS、TEF1- α 和 BT 基因序列提交 GenBank(登录号 KU881771, KU881772 号和第 KU881773)。测序后得到的序列通过 BLAST 比对结果显示 rDNA-ITS

与 *P. longicolla*(登录号 EF026104)一致性为 98%, 与 *Diaporthe phaseolorum*(登录号 AF001024)一致性为 99%。利用 ITS4 和 ITS5、延伸因子 1- α (TEF1- α)和 β -微管蛋白基因(BT)测序结果构建系统发育树(图 5)。ITS 建树从亲缘关系远近只能确定 Liuyang 的属为 *Phomopsis* (拟茎点霉属)。通过 TEF1- α 和 BT 基因建树可鉴定到种, 但与 *Diaporthe phaseolorum* 易混淆。ZHANG^[7]在 1997 年报道了能区分 *P. longicolla* 方法, 即在 rDNA 的 ITS1 和 ITS2 区域内设计 1 对特异性引物 Phom, 通过 PCR 扩增后 *P. longicolla* 能够得到 337 bp 片段, 而 *Diaporthe phaseolorum* 没有条带。利用该引物对 Liuyang 进行扩增, 得到大小相同的片段, 据此, 进一步将 Liuyang 鉴定为 *P. longicolla*。

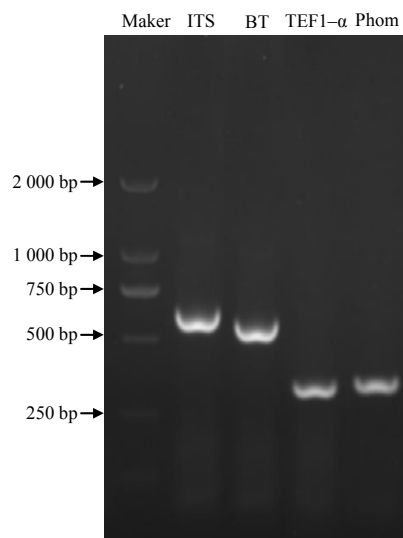
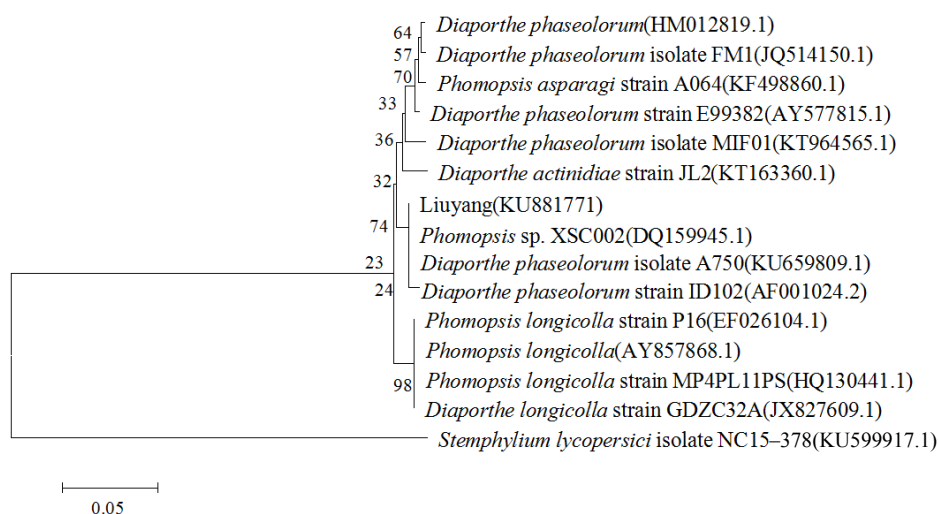


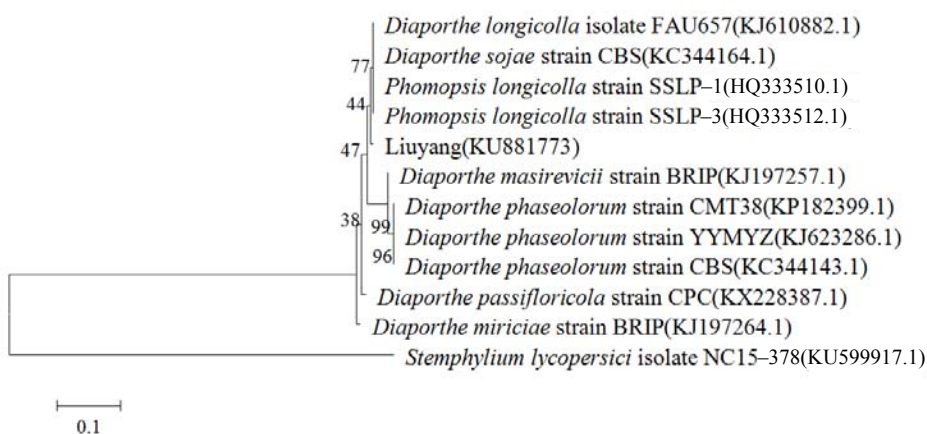
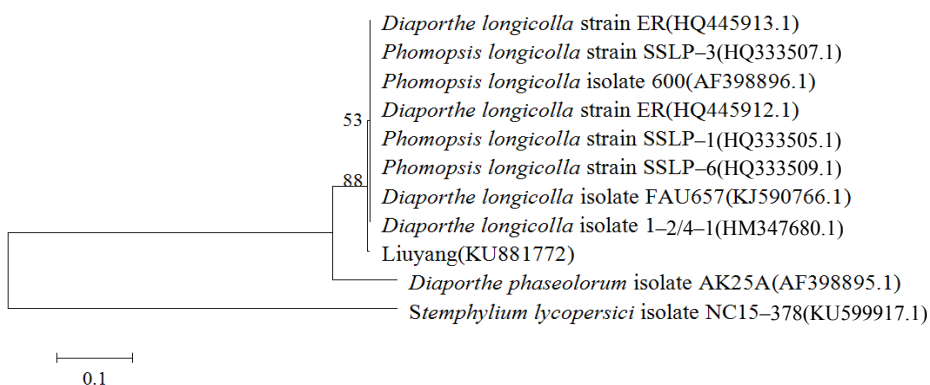
图 4 Liuyang 菌株 ITS、BT、TEF1- α 和 Phom 引物扩增产物电泳图谱

Fig.4 Liuyang agarose gel electrophoresis of ITS, BT, elongation TEF1- α and Phom primer

ITS:



BT:

TEF1- α 图5 ITS、BT 和 TEF1- α 基因系统发育树Fig.5 Phylogenetic tree for ITS, BT and TEF1- α

3 结论与讨论

从湖南省浏阳果园出现腐烂症状的猕猴桃果实上分离纯化得到病原真菌,在形态特征鉴定的基础

上,应用分子生物学方法,使用病原真菌鉴定的标记基因 ITS、TEF1- α 和 BT 扩增分析后,进一步使用能区别 *P. longicolla* 的特异性引物 Phom 扩增验证,结果表明,导致猕猴桃腐烂的病原菌为大豆拟茎点

种腐病菌 *P.longicolla*。

Phomopsis 的有性态为 *Diaporthe*(间座壳属), 隶属于子囊菌亚门的间座壳目, 其子囊壳一般都具有长颈, 通常在一个假子座中聚集, 子囊圆柱形, 顶端有顶环, 壁较厚; 子囊孢子椭圆形或纺锤形, 有双胞, 无色, 隔膜之间常有缢缩^[9]。*Diaporthe* 的分类主要是以子囊壳的形成方式(产生于载包体内或外)、子囊的形态与大小、子囊孢子的形态与大小为标准^[10]。虽然有性态对拟茎点霉的鉴定很有帮助, 但迄今报道形成有性态的拟茎点霉只有 180 余种, 仅占已报道种的 18%~20%^[11]。由于笔者尚未在分离到的菌株中培养出有性态, 因此将病原鉴定为 *Phomopsis longicolla* 提交序列入 NCBI 数据库时, NCBI 数据库默认为菌株有性态的名称, 因此 NCBI 数据库将序列名更改为 *Diaporthe longicolla*, 即 *Diaporthe longicolla* 和 *Phomopsis longicolla* 分别是同一种菌有性世代和无性世代的拉丁名。由系统发育树 *Diaporthe longicolla* 和 *Phomopsis longicolla* 也位于同一分支。

P. longicolla 是引起大豆种子腐烂的重要病菌, 也是种传病害的病原之一^[12]。*P. longicolla* 寄主范围广, 不仅可侵染大豆, 还可侵染豆科其他植物, 甚至其他科和属的植物, 如豆科的花生、菊科的苍耳和锦葵科的苘麻等。2013 年中国广东报道了 *P. longicolla* 能引起茄子染病^[13]。

智利、意大利、希腊和韩国等分别报道过 *Diaporthe ambigua*、*Phomopsis viticola*、*Phomopsis* sp.、*Phomopsis actinidiae* 和 *Diaporthe actinidiae* 引起的猕猴桃采后腐烂, 病斑大多最初发生在成熟的果实茎端, 从茎端逐渐扩散; 发病的部位开始变得柔软, 剥去表皮后, 发病组织颜色比周围健康组织更浅, 有水浸泡, 杂乱无章, 呈淡绿色^[14]。笔者发现的 *P.longicolla* 引起的腐烂由果实中间开始发病, 而后逐渐扩散, 表面有褐色病斑并附着白色菌丝。国外很多报道 *P. longicolla* 仅有 α 型分生孢子, 没有 β 型分生孢子, 认为仅产生 α 形分生孢子是 *P. longicolla* 的特点, 但是, MILO 等 2013 年报道 *P. longicolla* 能够产生大量的 β 分生孢子, β 型的分生孢子不仅在真菌培养物上, 在受侵染的田间也能大量产生^[15]。笔者分离到的 Liuyang 菌株在培养过程中也能产生少量 β 型分生孢子, 与 MILO 等的报道的一致。

参考文献:

- [1] 方中达. 植病研究方法[M]. 北京: 中国农业出版社, 1998: 122-145.
- [2] HOBBS T W. A new *Phomopsis* species from soybean[J]. Mycologia, 1985, 77(4): 535-544.
- [3] 刘丹, 刘太国, 张敏, 等. 小麦光腥黑粉菌冬孢子总 DNA 提取方法比较[J]. 植物保护, 2006, 32(2): 93-95.
- [4] Ortega-Larrocea M D P, Xoconostle-Cázares B, Maldonado-Mendoza I E, et al. Plant and fungal biodiversity from metal mine wastes under remediation at Zimapan, Hidalgo, Mexico[J]. Environmental Pollution, 2010, 158(5): 1922-1931.
- [5] BRAZEE N J, HULVEY J P, WICK R L. Evaluation of partial tef1, rpb2, and nLSU sequences for identification of isolates representing *Armillaria calvescens* and *Armillaria gallica* from Northeastern North America[J]. Fungal Biology, 2011, 115(8): 741-749.
- [6] GANTEN D. Alpha-Tubulin/Beta-Tubulin[M]. Berlin: Springer, 2006: 44-45.
- [7] ZHANG A W, HARTMAN G L, RICCONI L, et al. Using PCR to distinguish *Diaporthe phaseolorum* and *Phomopsis longicolla* from other soybean fungal pathogens and to detect them in soybean tissues[J]. Plant Disease, 1997, 81(10): 1143-1149.
- [8] 顾建锋, 杨颖, 张建成, 等. 大豆拟茎点种腐病菌的分离与鉴定[J]. 植物检疫, 2006, 20(3): 133-136.
- [9] HAWKSWORTH D L, SUTTON B C, AINSWORTH G C. Ainsworth and Bisby's dictionary of the fungi[J]. Ainsworth & Bisby's Dictionary of the Fungi Seventh Edition, 1983, 95(9/10): 713-714.
- [10] 戚佩坤, 姜子德, 向梅梅, 等. 中国真菌志. 第三十四卷[M]. 北京: 科学出版社, 2009: 7-16.
- [11] AJL P. The relationship between *Diaporthe perijuncta* and *Phomopsis viticola* on grapevines[J]. Mycologia, 1999, 91(6): 1001.
- [12] SUN S, VAN K, KIM M Y, et al. Evaluation of soybean cultivars for resistance to *Phomopsis* seed decay in Korea[J]. Journal of Crop Science and Biotechnology, 2012, 15(2): 85-91.
- [13] SHU C. First report of *Phomopsis longicolla* causing stem canker of eggplant in Guangdong, China[J]. Plant Disease, 2014, 98(3): 425-426.
- [14] THOMIDIS T. First report of *Phomopsis actinidiae* (Henn.) causing cankers on shoots of kiwifruit in Greece[J]. Italus Hortus, 2009, 91(2): 498-499.
- [15] MILO Vidi, KRISTINA Petrovi, VUK Dordevi. Occurrence of *Phomopsis longicolla*, β conidia in naturally infected soybean[J]. Journal of Phytopathology, 2013, 161(7/8): 470-477.

责任编辑: 罗慧敏

英文编辑: 罗维