

三叶木通褐斑病病原菌鉴定

Identification of the pathogen causing brown spot disease on cultivated *Akebia trifoliata*潘 慧¹ 邹帅宇² 邓 蕾¹ 李文艺¹ 钟彩虹^{1*} 李 黎^{1*}

(1. 中国科学院植物种质创新与特色农业重点实验室, 中国科学院猕猴桃产业技术工程实验室, 中国科学院武汉植物园, 湖北 武汉 430074; 2. 中国科学院庐山植物园, 江西 九江 332900)

Pan Hui¹ Zou Shuaiyu² Deng Lei¹ Li Wenyi¹ Zhong Caihong^{1*} Li Li^{1*}

(1. Wuhan Botanical Garden, Chinese Academy of Sciences, CAS Engineering Laboratory for Kiwifruit Industrial Technology, CAS Key Laboratory of Plant Germplasm Enhancement and Specialty Agriculture, Wuhan 430074, Hubei Province, China; 2. Lushan Botanical Garden, Chinese Academy of Sciences, Jiujiang 332900, Jiangxi Province, China)

三叶木通 *Akebia trifoliata* 系木通科木通属植物, 又名八月瓜, 为多年生落叶木质藤本果实, 富含蛋白质、可溶性糖、维生素、矿物质元素等, 集食用、药用、观赏等功能于一体, 具有较高的经济开发及应用价值。近年来, 三叶木通的市场需求不断扩大, 野生资源已不能满足市场需求, 因此我国多地陆续建立了三叶木通人工种植基地。然而, 随着三叶木通人工种植面积逐年扩大及生长年份增加, 其生育期病害问题也日益突出, 叶片大量脱落, 果实表皮出现大面积褐色斑点, 部分伴有白色霜状物, 严重影响果实的产量和品质。为明确三叶木通褐斑病病原菌, 本研究对武汉市三叶木通褐斑病病叶和病害果实进行分离鉴定, 以期为该病的防治提供科学依据。

1 材料与方 法

1.1 材 料

供试植物: 于2019年10月自武汉植物园内采集具有典型褐斑病症状的三叶木通叶片、果实及健康三叶木通叶片、果实。

马铃薯葡萄糖琼脂(potato dextrose agar, PDA)培养基: 马铃薯浸出粉5 g/L、葡萄糖20 g/L、琼脂20 g/L。

试剂和仪器: Ezup 柱式真菌基因组提取试剂盒, 生工生物工程(上海)股份有限公司; 其他试剂均为国产分析纯。BX51 显微镜, 日本奥林巴斯株式会社; HP300GS 人工气候箱, 武汉瑞华仪器设备有限公司; DYY-6C 型电泳仪, 北京六一生物科技有限公司。

1.2 方 法

病原菌分离纯化及形态学鉴定: 分别于叶片和

果实感病初期、中期和后期跟踪观察感病症状。用直径1 cm 无菌打孔器于病害叶片病健交界处打取组织, 用无菌手术刀在病害果实果皮的病健交界处切取大小为5 mm×5 mm 组织, 经75% 乙醇消毒后置于PDA 平板上于25℃ 恒温培养5 d, 待菌落长出后, 挑取尖端菌丝置于新PDA 平板上进行纯化。取纯化菌株置于PDA 平板上于25℃ 恒温培养3~4 d 后观察菌落形态, 7 d 后于显微镜下观察分生孢子形态, 观察3 个视野, 每个视野观察30 个分生孢子。

病原菌分子生物学鉴定: 将纯化菌株置于铺有玻璃纸的PDA 培养基上于25℃ 培养5~8 d 后收集菌丝, 按照真菌基因组提取试剂盒说明书提取纯化菌株的基因组, 运用引物ITS4(5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3')/ITS5(5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3') 扩增菌株的核糖体基因组转录间隔区ITS 序列, 引物委托北京六合华大基因科技股份有限公司。40 μL 扩增反应体系: 10×PCR Buffer 4 μL、10 mmol/L dNTP 0.8 μL、100 μmol/L 上下游引物各0.2 μL、5 U/μL *Taq* 酶 0.25 μL、DNA 模板 2 μL、ddH₂O 32.55 μL。反应程序: 94℃ 预变性 5 min; 94℃ 变性 30 s, 55℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 1 min, 30 个循环; 72℃ 再延伸 10 min。扩增产物经1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测后, 委托北京六合华大基因科技有限公司进行测序。将测序提交至NCBI 并进行BLAST 比对以确定种类。

致病性验证: 根据柯赫氏法则对纯化菌株的致病性进行验证。对采集的健康三叶木通叶片和果实表面消毒后用2号解剖针进行刺伤, 用7 mm 无菌打

基金项目: 国家自然科学基金(31701974, 31901980), 武汉市科技局前资助科技计划(2018020401011307)

* 通信作者 (Authors for correspondence), E-mail: zhongch1969@163.com, lili@wbpcas.cn; 收稿日期: 2020-05-19

孔器在分离纯化的菌株菌落边缘打取菌饼,将其菌丝面朝下分别接种至健康叶片和果实伤口处,用无菌脱脂棉进行保湿处理,以无菌PDA培养基为阴性对照,重复3次。将接种后的组织置于25℃恒温、相对湿度80%~90%下培养7 d后观察发病情况,对出现相似症状的样本再进行病原菌的分离及鉴定。

2 结果与分析

2.1 三叶木通褐斑病害田间症状及病原菌分离

感病初期三叶木通叶片出现近圆形或不规则褐色斑点,随后逐渐扩大,病斑中心灰白或伴有褐色轮纹,边缘深褐色,叶片背面呈黑褐色;后期病斑逐渐融合成不规则大病斑,扩展至整个叶片,导致叶片脱落。感病初期果柄处出现白色霉状物,易落果;后期果面上陆续产生数个圆形或针头大的黑褐色斑点,随后病斑扩大,合并,呈现不规则的凹陷病斑,严重时全果呈褐色,伴随有白色霜状物。经分离得到6株菌株,编号分别为MT1~MT6。

2.2 三叶木通褐斑病病原菌形态学鉴定

菌株MT1~MT3:在PDA培养基上菌落呈圆形或近圆形,绒状,初期呈灰白色,3~4 d后逐渐变为灰褐绿色,菌落外围灰白色至暗绿褐色,随后菌丝颜色

逐渐加深至黑褐色(图1-A)。分生孢子串生或单生,短喙柱状或倒棍棒状,榄褐色至深榄褐色,有纵横隔膜,横隔多为3~4个,纵隔0~2个,大小为10.02~51.13 μm×4.35~13.78 μm(图1-B),根据形态学特征初步将其鉴定为互隔链格孢 *Alternaria alternata*。

菌株MT4~MT6:在PDA培养基上菌丝呈辐射状生长,气生菌丝发达,菌落初期为乳白色,3~4 d后菌落中央出现灰黑色(图1-C)。分生孢子长杆状,两端钝圆,部分孢子一端略尖,透明状,单胞,无隔,内含1~2个油球,多数分布于分生孢子的两端,大小为9.89~14.52 μm×3.28~6.02 μm(图1-D),根据形态学特征初步将其鉴定为胶孢炭疽菌 *Colletotrichum gloeosporioides*。

2.3 三叶木通褐斑病病原菌分子生物学鉴定

菌株MT1~MT3(NCBI序列号分别为MT451843~MT451845)与互隔链格孢(登录号为MN341242.1)的同源性达到100%。菌株MT4~MT6(NCBI序列号分别为MT451846~MT451848)与胶孢炭疽菌(登录号MN075768.1)同源性达到100%。结合形态学鉴定结果,将其分别鉴定为互隔链格孢 *A. alternata* 和胶孢炭疽菌 *C. gloeosporioides*。

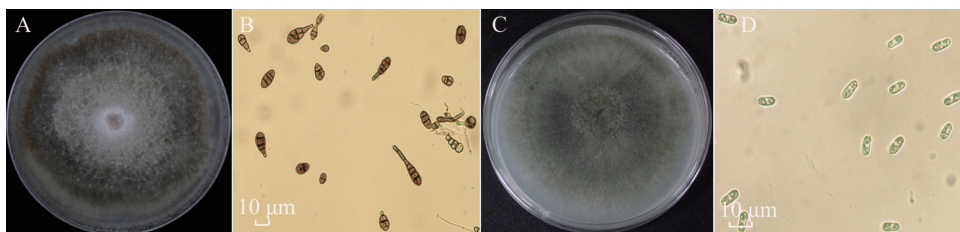


图1 三叶木通褐斑病病原菌 MT1 菌株(A~B)和 MT4 菌株(C~D)的菌落特征及分生孢子形态

Fig. 1 Colony and conidia of strain MT1 (A~B) and strain MT4 (C~D) causing brown spot disease on cultivated *Akebia trifoliata*

2.4 三叶木通褐斑病病原菌致病性鉴定

接种后健康叶片和果实的发病症状与田间自然发病症状一致,从发病部位重新分离的菌株与原接种菌株性状一致,表明所分离菌株均是引起三叶木通叶片与果实褐斑病的致病菌。

3 讨论

各地三叶木通叶斑病病原菌存在较大差异,如张铮等(2019)将陕西省三叶木通叶斑病病原菌鉴定为细极链格孢 *A. tenuissima*;张国辉等(2011)将凯里学院植物园内三叶木通炭疽病病原菌鉴定为胶孢炭疽菌;Ye et al.(2013)认为多主棒孢霉 *Corynespora cassiicola* 为南宁市三叶木通叶斑病病原菌;本研究将武汉植物园内三叶木通叶片和果实褐斑病病原菌鉴定为互隔链格孢和胶孢炭疽菌。建议加强园地管理,增加通风透光度,降低湿度,减少病害发生。

参考文献 (References)

- Ye YF, Jiang N, Fu G, Liu W, Hu FY, Liu LH, Miao JH. 2013. First report of *Corynespora cassiicola* causing leaf spot on *Akebia trifoliata*. *Plant Disease*, 97(12): 1659
- Zhang GH, Zhang WH, Liu DL. 2011. Identification of pathogen and disease analysis on anthracnose of *Holboellia latifolia* Wall. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 27(13): 277-280 (in Chinese) [张国辉, 张文华, 刘冬莲. 2011. 八月瓜炭疽病的病原菌鉴定及病害分析. *中国农学通报*, 27(13): 277-280]
- Zhang Z, Liu YF, Yang Q, Zhang JW. 2019. Laboratory screening of drug for *Akebia trifoliata* leaf spot prevention. *Journal of Shaanxi Normal University (Natural Science Edition)*, 47(3): 91-94 (in Chinese) [张铮, 刘昱锋, 杨晴, 张佳文. 2019. 三叶木通叶斑病防治药剂的室内筛选. *陕西师范大学学报(自然科学版)*, 47(3): 91-94]

(责任编辑:张俊芳)