

奉新县猕猴桃果实腐烂病 病原菌分离鉴定

李 诚¹ 蒋军喜^{1*} 冷建华² 李帮明² 余 强² 涂贵庆²

(1. 江西农业大学 农学院 江西 南昌 330045; 2. 江西省奉新县农业局 江西 奉新 330700)

摘要: 为明确江西奉新猕猴桃果实腐烂的病原菌种类, 对该县猕猴桃烂果进行大量病菌分离, 对分离的病菌进行了分子鉴定和致病性测定, 结果表明引起奉新猕猴桃烂果的病原菌有 6 种, 分别是葡萄座腔菌(*Botryosphaeria dothidea*)、富氏葡萄孢盘菌(*Botryotinia fuckeliana*)、盘多毛孢菌(*Pestalotiopsis* sp.)、层出镰刀菌(*Fusarium proliferatum*)、拟茎点霉菌(*Phomopsis* sp.) 和链格孢菌(*Alternaria* sp.)。其中主要是葡萄座腔菌(分出率占 83.0%), 其次是拟茎点霉菌(分出率占 8.9%)。致病性测定结果同时表明葡萄座腔菌既可从果面伤口侵入, 也可以从果皮直接侵入, 其他 5 种真菌则只能从伤口侵入。研究结果对奉新猕猴桃烂果病害的防治和进一步研究将具有重要的指导意义。

关键词: 猕猴桃; 果实腐烂病害; 病菌分子鉴定; 葡萄座腔菌

中图分类号: S436.634.1⁺2 文献标志码: A 文章编号: 1000-2286(2012)02-0259-05

Isolation and Identification of Pathogenic Fungi Causing Fruit Rot of Kiwifruit in Fengxin County

LI Cheng¹, JIANG Jun-xi^{1*}, LENG Jian-hua²,
LI Bang-ming², YU Qiang², TU Gui-qing²

(1. College of Agronomy Jiangxi Agriculture University, Nanchang 330045, China; 2. Agricultural Bureau of Fengxin County, Fengxin 330700, China)

Abstract: In order to ascertain the fungi which cause rot of kiwifruit fruit, fungi were isolated from a large number of rotten fruit, and the isolated fungi were molecularly identified and tested for their pathogenesis. The results showed that six kinds of fungi were responsible for fruit rot of kiwifruit in Fengxin County. They are *Botryosphaeria dothidea*, *Botryotinia fuckeliana*, *Pestalotiopsis* sp., *Fusarium proliferatum*, *Phomopsis* sp., and *Alternaria* sp. Among them, *Botryosphaeria dothidea* is the dominant pathogen having 83.0% of isolation rate, and next is *Phomopsis* sp. having 8.9% of isolation rate. The results also showed that *Botryosphaeria dothidea* is able to penetrate fruit of kiwifruit by direct penetration of cell walls or through wounds, while the other five kinds of fungi penetrate fruit of kiwifruit only through wounds. The results way have important significance for control and further research of fruit rot of kiwifruit in Fengxin County.

Key words: kiwifruit; fruit rot diseases; molecular identification of pathogenic fungi; *Botryosphaeria dothidea*

收稿日期: 2011-11-20 修回日期: 2011-12-25

基金项目: 国家自然科学基金(30960213) 和国际合作项目(200DFA31050)

作者简介: 李诚(1988—) 男, 硕士生, 主要从事分子植物病理学研究, E-mail: licheng20070242@126.com; * 通讯作者: 蒋军喜 教授, 博士, E-mail: jxjiang64115@yahoo.com.cn.

猕猴桃又名毛桃、阳桃、羊桃、奇异果(Kiwifruit),是猕猴桃科(Actinidiaceae)、猕猴桃属(*Actinidia*)植物的浆果果实^[1]。猕猴桃原产我国,是一种新兴果品,目前在中国、新西兰、意大利、法国、智利等国家广泛种植^[2]。近年来猕猴桃以其独特的风味和药用价值在国内外受到消费者青睐,据测定,猕猴桃维生素C的含量比柑桔高5~10倍,比梨、苹果高30倍,并含人体必需的18种氨基酸、多种矿物质和微量元素,有“水果之王”、“维C之冠”、“果类金矿”之美誉^[3-4]。江西省奉新县作为我国南方猕猴桃的主产区,是全国的猕猴桃基地县,近年来,全县每年栽培面积达2 000 hm²,年产量超2万t,通过贮藏鲜销和加工转化实现产值1.2亿元,成为名副其实的猕猴桃资源和生产大县,被国家林业局授予“中国猕猴桃之乡”称号;同时,广大果农收益颇丰,正常年份每667 hm²可获纯收入5 000余元。然而,近几年奉新猕猴桃易发生烂果现象,先是果园挂果后期发生烂果脱落,后是贮藏期间果实加剧腐烂,烂果问题已成为制约奉新猕猴桃生产的重要因素。从烂果症状判断,主要由病菌侵染所致,但具体病菌种类并不清楚。为明确奉新猕猴桃烂果的病菌种类,本文对奉新猕猴桃大量烂果逐个进行组织分离,对分离到的病菌进行分子鉴定和回接实验,现将结果报道如下。

1 材料及方法

1.1 病果来源

2010年11月—2011年10月分批从江西奉新山口猕猴桃基地及江西新叶有机农产品有限公司储存库采集病果,品种为金魁(秦美系列),共采集病果386个,采回后立即进行病菌分离。

1.2 病菌分离方法

将果实病斑及四周表面用酒精擦拭并在酒精灯上来回火焰消毒,用消毒好的刀片削去病斑果皮及外层组织,再用消毒过的镊子挑取病斑组织移入PDA平板培养基上,平板置于25℃恒温箱中培养,定期观察菌落生长情况并作菌落纯化。

1.3 病菌液体培养

将在PDA平板上培养的适龄菌落,打制成直径5 mm的菌饼,将菌饼接入盛有150 mL的液体培养基(PD)三角瓶中,每瓶1个菌饼,200 r/min,28℃振荡培养2~3 d^[5]。

1.4 病菌DNA提取

采用CTAB法提取病菌DNA^[6-7]。液体培养的菌丝体经滤纸吸干后,置于研钵中用液氮研磨成粉末状;取0.05 g粉末,加入0.6 mL CTAB/NaCl,振荡混合,65℃水浴45 min,水浴时每隔5 min颠倒混匀1次;加入等体积V(氯仿):V(异戊醇)=24:1并混匀,12 000 r/min,离心10 min;取上清,加等体积的异丙醇,-20℃放置30 min;12 000 r/min,离心10 min,去上清,DNA沉淀用体积分数为70%乙醇洗涤并干燥后溶于20 μL ddH₂O中;最后,用10 g/L琼脂糖凝胶检测提取DNA的质量。

1.5 rDNA ITS序列扩增

采用真核生物通用引物ITS1/ITS4扩增rDNA ITS序列^[8-9],引物序列为ITS1 5′-TCCGTAGGT-GAACCTGCGG-3′和ITS4 5′-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3′,由上海捷瑞生物工程有限公司合成。反应总体积50 μL。依次加入以下试剂:①dNTP Mix Solution(2.5 mmol/L)4 μL;②10×Taq Plus Buffer 5 μL;③Taq Plus DNA Polymerase 0.5 μL(天根生化有限公司);④ITS1(10 pmol/L)1 μL;⑤ITS4(10 pmol/L)1 μL;⑥DNA模板2 μL;⑦ddH₂O 36.5 μL,混匀后进行PCR扩增。反应程序为:94℃预变性3 min;94℃变性30 s;60℃退火30 s;72℃延伸1 min,35个循环,最后一次循环后,72℃补平10 min。PCR结束后进行10 g/L琼脂糖凝胶电泳。

1.6 扩增产物纯化及测序

采用琼脂糖凝胶DNA回收试剂盒(天根生化有限公司)纯化扩增产物,纯化产物由上海捷瑞生物工程有限公司进行测序,获得的序列用计算机分析软件DNASTar(Madison Wisconsin,USA)进行序列分析及同源性比较,并递交NCBI数据库进行序列鉴定^[10-11]。

1.7 病菌回接及再分离

将得到的病菌按照柯赫氏法则进行回接验证^[12]。操作步骤如下:将适龄PDA平板菌落用打孔器打成直径5 mm的菌饼,将菌饼的菌丝面紧贴在表面消毒过的果面上,分刺伤和不刺伤2种方式进行接

种。接种表面覆盖湿棉球,并放入搪瓷盘中进行保湿,放入 25 °C 培养箱中进行培养,定期观察发病情况并测量病斑直径,根据病斑直径大小判断病菌致病性强弱^[13]。无致病性记为“-”,有致病性记为“+”,“+”越多表示致病性越强,其中病斑直径 $\Phi \leq 5$ mm、 $5 \text{ mm} < \Phi \leq 10$ mm、 $10 \text{ mm} < \Phi \leq 15$ mm、 $15 \text{ mm} < \Phi \leq 20$ mm 和 > 20 mm 时,病菌致病性分别用 1、2、3、4 和 5 个“+”号表示。对接种发病的病斑,又采用组织分离法分离病菌,以完成柯赫氏证病律。

2 结果与分析

2.1 病菌分离

共对 386 个病果中 412 个病斑进行了病菌分离,有 281 个病斑分离到真菌菌落,菌落分为 6 种类型,分别命名为 Kf-1、Kf-2、Kf-3、Kf-4、Kf-5 和 Kf-6,各类型菌落的分出率依次为 83.0%、2.5%、1.4%、2.1%、8.9% 和 2.1%,其菌落特征描述如下。

Kf-1: 菌落初为白色,后从中央开始转为墨绿色,菌落背面中央墨绿色,边缘不整齐,菌落蓬松,在 PDA 平板上生长迅速,经 72 h 生长,菌落直径达 90 mm(图 1A)。

Kf-2: 菌落初为白色,后变为灰白色,边缘不整齐,菌落蓬松,生长迅速,经 72 h 生长,菌落直径达 67 mm(图 1B)。

Kf-3: 菌落中央白色,四周灰白色,菌落较致密,平贴培养基,边缘整齐,菌落背面浅黄色,生长速度适中,经 72 h 生长,菌落直径达 39 mm(图 1C)。

Kf-4: 菌落白色,背面淡紫红色,菌落絮状,边缘呈放射状,生长速度适中,经 72 h 生长,菌落直径达 43 mm(图 1D)。

Kf-5: 菌落白色,背面中央浅黄色,菌落絮状,有轮状生长现象,边缘较整齐,生长迅速,经 72 h 生长,菌落直径达 66 mm(图 1E)。

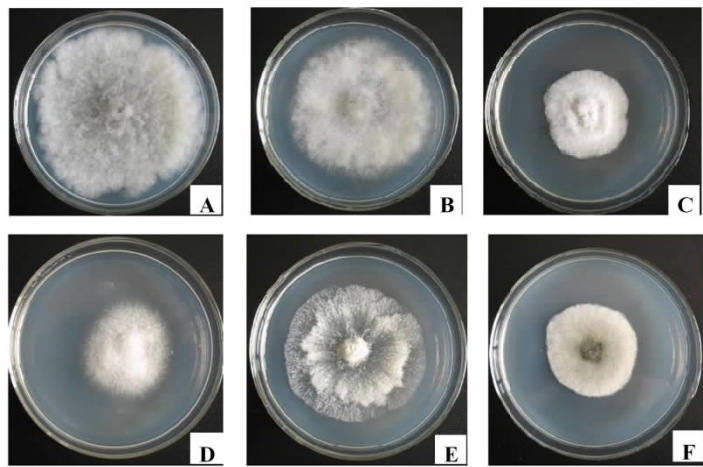
Kf-6: 菌落初为白色,后变为灰绿色,菌落背面墨绿色,较蓬松,边缘整齐,生长速度适中,经 72 h 生长,菌落直径达 46 mm(图 1F)。

2.2 病菌 DNA 提取及 PCR 扩增

从各类型菌落中选择 1 个分离物进行病菌基因组 DNA 提取,电泳结果表明提取的 DNA 质量较好(图 2)。以基因组 DNA 为模板,对上述 6 个分离物的 rDNA ITS 序列进行 PCR 扩增,均获得了大小约 550 bp 的单一清晰条带(图 3)。

2.3 病菌 ITS 序列测定

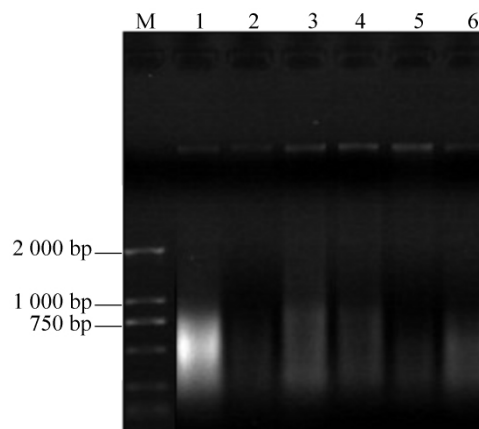
对 PCR 产物进行测序,除去两端引物序列,获得的 6 个分离物的 rDNA ITS 序列长度分别为 527 bp(Kf-1)、500 bp(Kf-2)、511 bp(Kf-3)、519 bp(Kf-4)、539 bp(Kf-5) 和 533 bp(Kf-6),递交至 NCBI 中的基因登录号分别为: JQ260829、JQ260834、



A: Kf-1; B: Kf-2; C: Kf-3; D: Kf-4; E: Kf-5; F: Kf-6。

图 1 病原菌在 PDA 上的菌落特征

Fig. 1 Colony morphology of pathogen on PDA media



M: D2000 Marker; 1: Kf-1; 2: Kf-2; 3: Kf-3; 4: Kf-4; 5: Kf-5; 6: Kf-6。

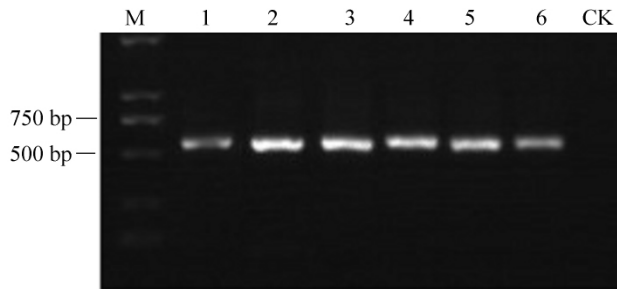
图 2 病原菌 DNA 电泳图谱

Fig. 2 Electrophoresis of pathogen DNA

JQ260830、JQ260832、JQ260831 和 JQ260833。将获得的序列分别与 GenBank 中已有序列进行同源性比较,结果发现各与葡萄座腔菌(*Botryosphaeria dothidea*, HQ730969.1)、富氏葡萄孢盘菌(*Botryotinia fuckeliana*, HM849615.1)、盘多毛孢菌(*Pestalotiopsis* sp., JN418787.1)、层出镰刀菌(*Fusarium proliferatum*, HQ380763.1)、拟茎点霉菌(*Phomopsis* sp., DQ235667.1)和链格孢菌(*Alternaria* sp., JN545807.1)的同源性最高,同源性分别为 99%、100%、100%、100%、98% 和 100%。根据同源性比对结果,将上述 6 个真菌分离物 Kf-1、Kf-2、Kf-3、Kf-4、Kf-5 和 Kf-6 分别鉴定为 *Botryosphaeria dothidea*、*Botryotinia fuckeliana*、*Pestalotiopsis* sp.、*Fusarium proliferatum*、*Phomopsis* sp. 和 *Alternaria* sp.。

2.4 病菌回接及再分离

用分离到的 6 个分离物对猕猴桃果实进行刺伤和不刺伤接种,结果见表 1。由表 1 可知,在刺伤条件下,6 个分离物都能使猕猴桃果实致病,其中致病性最强的是拟茎点霉菌,其次是葡萄座腔菌,致病性分别达到“++++”和“++++”级,致病性最弱的是链格孢菌,致病性仅为“++”级。另外,在不刺伤接种的条件下,只有葡萄座腔菌才能致病。接种病斑症状与自然发病症状相同。对接种后发病的病斑进行再分离,又分离到与原病菌性状一致的病菌。



M: D2000 Marker; 1: Kf-1; 2: Kf-2; 3: Kf-3; 4: Kf-4; 5: Kf-5; 6: Kf-6; CK: Negative control.

图 3 病原菌 rDNA ITS 序列 PCR 扩增电泳图

Fig. 3 Electrophoresis of PCR products of pathogen rDNA ITS region

表 1 6 个真菌分离物接种猕猴桃果实致病情况

Tab. 1 Pathogenicity of six Fungi isolates on fruits of kiwifruit (25 °C, 5 d)

| 病菌 Pathogenic fungi | 刺伤接种 Wound inoculation | | 未刺伤接种 No wound inoculation | |
|--|--|----------------------|--|----------------------|
| | 腐烂斑直径* /mm Diameter of rotton spots | 致病性 Pathogenicity | 腐烂斑直径* /mm Diameter of rotton spots | 致病性 Pathogenicity |
| <i>Botryosphaeria dothidea</i> (Kf-1) | 16 | ++++ | 14 | +++ |
| <i>Phomopsis</i> sp. (Kf-5) | 24 | +++++ | 0 | - |
| <i>Pestalotiopsis</i> sp. (Kf-3) | 13 | +++ | 0 | - |
| <i>Botryotinia fuckeliana</i> (Kf-2) | 12 | +++ | 0 | - |
| <i>Fusarium proliferatum</i> (Kf-4) | 10 | +++ | 0 | - |
| <i>Alternaria</i> sp. (Kf-6) | 8 | ++ | 0 | - |
| CK | 0 | - | 0 | - |

* 腐烂斑直径为 3 次重复的平均值。* Diameter of rotton spots is mean value of three replicates.

3 小结与讨论

近年来,烂果问题一直困扰着奉新猕猴桃产业的发展,并给果农造成严重的经济损失,但由于对当地烂果的病原了解不够,使得对其难以开展有效的研究和防治。本研究通过病菌分离、DNA 测序鉴定和病菌致病性测定,明确了引起奉新猕猴桃烂果的病原菌有 6 种,分别是 *Botryosphaeria dothidea*、*Botryotinia fuckeliana*、*Pestalotiopsis* sp.、*Fusarium proliferatum*、*Phomopsis* sp. 和 *Alternaria* sp. 其中主要是葡萄座腔菌(占 83.0%) 其次是拟茎点霉菌(占 8.9%) 其他 4 种病菌发生较少。这 6 种病菌都能从猕猴桃果实伤口侵入而导致发病,而 *Botryosphaeria dothidea* 更具有从果实表皮直接侵入而导致发病的能力。奉新猕猴桃烂果病菌种类及其侵入方式的明确为该病害的研究和防治奠定了较好的前期工作基础。

烂果问题也是国内外其他猕猴桃种植区的主要病害之一,在 20 世纪 80 年代初,永田贤嗣^[14]就对日本猕猴桃后熟阶段中果肉一部分发生圆形软腐症状进行了病原研究,得出引起猕猴桃软腐的病菌主

要是大茎点菌属(*Macrophoma*) 真菌,其有性态属于葡萄座腔菌;我国早在20世纪80年代末90年代初,丁爱冬^[15]就对陕西省周至县和北京房山区的猕猴桃烂果问题进行了研究,研究表明引起猕猴桃烂果的主要病原菌为*Botrytis cinerea*、*Penicillium* sp. 和 *Phomopsis* sp.;2007年姜景魁^[16]对福建省建宁县猕猴桃软腐病进行了研究,结果表明引起该地区猕猴桃软腐的主要病原菌为 *Phomopsis* sp.。将本研究结果与前人研究结果进行比较,发现引起江西奉新县猕猴桃烂果的病菌种类与日本猕猴桃烂果的病菌种类更为接近,而与国内其他地区的猕猴桃烂果的病菌种类存在一定的差异,差异原因有待进一步研究。

参考文献:

- [1] 贾爱平,王飞,张潮红,等. 中华猕猴桃品种间亲和性研究[J]. 园艺学报, 2010, 37(11): 1829-1835.
- [2] 韩礼星,黄贞光,李明,等. 加入WTO后我国猕猴桃产业的发展策略[J]. 果树学报, 2003, 20(3): 218-223.
- [3] 谭皓,廖康,涂正顺. 金魁猕猴桃发育过程中香气成分的动态变化[J]. 果树学报, 2006, 20(3): 205-208.
- [4] 何忠俊,张广林,张国武,等. 钾对黄土区猕猴桃产量和品质的影响[J]. 果树学报, 2002, 19(3): 163-166.
- [5] 陈健华,荆锦城,张茸茸,等. 不同地区小麦纹枯病菌的生物学特性及种类鉴定研究[J]. 江西农业大学学报, 2010, 32(1): 73-77.
- [6] Murray M G, Thompson W F. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA [J]. Nucleic Acids Research, 1980, 8(19): 4321-4325.
- [7] 杨民和,徐焰平,苏经迁. 茶树内生球坐菌的鉴定及遗传多样性分析[J]. 江西农业大学学报, 2010, 32(5): 946-955.
- [8] XIAO Zhong-jiu, LI Hong-mei, JIANG Xuan-li. Identification of tuber pathogen on *Stachys sieboldii* Miq [J]. Acta Phytopathologica Sinica, 2011, 41(2): 210-214.
- [9] 谢丽源,张勇,彭金华,等. 桑黄真菌分子鉴定及遗传多样性分析[J]. 菌物学报, 2010, 29(3): 347-356.
- [10] 李金花,王蒂,柴兆祥,等. 甘肃省马铃薯镰刀菌干腐病优势病原的分离鉴定[J]. 植物病理学报, 2011, 41(5): 456-463.
- [11] 车海彦,郑文虎,温衍生,等. 海南长春花病叶病原物的分子鉴定[J]. 热带作物学报, 2011, 32(3): 485-489.
- [12] 王卫芳,胡佳,赵立荣,等. 进境美国苹果星裂壳孢果腐病菌的首次截获: 病原真菌的鉴定及风险分析[J]. 植物病理学报, 2011, 41(3): 232-239.
- [13] 严玉宁,何红,叶艺俊,等. 香蕉叶鞘腐败病原菌鉴定[J]. 植物病理学报, 2007, 41(2): 124-130.
- [14] 永田贤嗣. 猕猴桃果实的软腐病[J]. 农业与园艺, 1982, 57(12): 33-34.
- [15] 丁爱冬,于梁,石蕴莲. 猕猴桃采后病害鉴定和侵染规律研究[J]. 植物病理学报, 1995, 25(2): 149-153.
- [16] 姜景魁,张绍升,廖廷武. 猕猴桃黄腐病的研究[J]. 中国果树, 2007(6): 14-16.