

马拉巴栗疫病病原的分离与鉴定

李琳, 陈鸿宇, 柳凤, 何红*, 余莎

(广东海洋大学农学院, 广东湛江 524088)

摘要: 2008—2009 年, 从广东省湛江等地采集疑似疫病的马拉巴栗病株, 经病原菌分离及柯赫氏法则验证, 证明其病原菌是疫霉菌。通过致病性、寄主范围测定, 菌体形态, 培养特性及 rDNA-ITS 序列分析等, 将该病原菌初步鉴定为棕榈疫霉 (*Phytophthora palmivora*)。

关键词: 马拉巴栗; 棕榈疫霉; 疫病; 分离; 鉴定

中图分类号: S 68

文献标识码: A

文章编号: 0513-353X (2011) 12-2395-06

Isolation and Identification of the Pathogen Causing Phytophthora Blight of *Pachira macrocarpa*

LI Lin, CHEN Hong-yu, LIU Feng, HE Hong*, and YU Sha

(College of Agriculture, Guangdong Ocean University, Zhanjiang, Guangdong 524088, China)

Abstract: The diseased plants of *Pachira macrocarpa* showing symptoms of phytophthora blight were collected from Zhanjiang, Guangdong Province from 2008 to 2009. This study proved that the pathogen was a kind of fungus by test of Koch's postulates. The pathogenic fungus was identified as *Phytophthora palmivora* based on pathogenicity and morphology, host range and sequence analysis of rDNA-ITS.

Key words: *Pachira macrocarpa*; *Phytophthora palmivora*; phytophthora blight; isolation; identification

马拉巴栗 (*Pachira macrocarpa*) 俗称发财树、美国花生、中美木棉, 原产热带美洲, 是一种室内绿化观赏树木。近年来随着需求量增加, 马拉巴栗在中国广东、海南、广西等地的种植面积不断扩大, 病害发生也越来越严重。

马拉巴栗的病害有茎部腐烂病 (章桂明和麦瑞生, 1992; 冯家望 等, 1997; 李一农和陈雪娇, 1997; 习平根 等, 2000; 尚巧霞 等, 2004; 谭志琼 等, 2009) 和根褐腐病 (Ann et al., 2002) 等, 马拉巴栗疫病为各种植区严重发生的病害之一。根据本实验室 2008—2009 年在广东种植区调查发现, 马拉巴栗疫病发病率高达 30%~40%, 若遇到台风或暴风雨天气, 病害发生更为严重。但有关马拉巴栗疫病的病原菌目前尚未见报道。

本研究中对马拉巴栗疫病病原菌进行了鉴定, 旨在为进一步研究病害的发生规律, 防治措施等提供依据。

收稿日期: 2011-09-02; 修回日期: 2011-11-24

基金项目: 广东省科技计划项目 (2009B020310015, 2009B030803055)

* 通信作者 Author for correspondence (E-mail: hehong893@163.com)

1 材料与方法

1.1 病原菌的分离与培养

2008—2009 年从广东湛江等地马拉巴栗苗圃中采集疑似疫病的病株,立即带回实验室用组织分离法(方中达,1998)对其病原菌进行分离。分离用培养基为 PDA 培养基(马铃薯 200 g,葡萄糖 20 g,琼脂 20 g,蒸馏水 1 000 mL)和 NA 培养基(蛋白胨 10 g,牛肉浸膏 5 g,氯化钠 5 g,琼脂 20 g,蒸馏水 1 000 mL, pH 7.2~7.5)。长出的菌落纯化后,保存备用。

1.2 病原菌致病性与寄主范围测定

1.2.1 致病性测定

取健康无病 6~8 叶期的马拉巴栗苗移植于装有灭菌土的圆盆钵(160 mm×220 mm)中常规管理备用。接种测定时用大头针分别刺伤叶片和苗茎基部,用内径为 8 mm 的打孔器提取 PDA 培养基上的菌丝块,接种于伤口处(方中达,1998),立即用无菌水湿棉球保湿,以接种无菌水为对照,室温下保湿培育,逐日观察发病情况,待发病后从病部再次分离病原菌。

1.2.2 寄主范围测定

供试植物为狗尾草(*Setaria viridis*)、巴西橡胶树(*Hevea brasiliensis*)、柑橘(*Citrus reticulata*)、灰藜(*Chenopodium album*)、杧果(*Mangifera indica*)、马蹄莲(*Zantedeschia aethiopica*)、美丽针葵(*Phoenix roebelenii*)、肿柄菊(*Tithonia diversifolia*)、木瓜(*Chaenomeles sinensis*)、万年青(*Rohdea japonica*)、富贵竹(*Dracaena sanderiana*)等 11 科 11 种植物。接种方法同上。

1.3 病原菌形态观察

供试菌株在 PDA 平板上 28℃ 下黑暗培养 3 d 后用孔径 5 mm 打孔器在菌落边缘取菌丝块接种在 PDA 平板中央,每处理 5 次重复,28℃ 恒温培养 5 d,观察菌落形态,在显微镜下观察菌丝特征。

孢子囊的诱导采用平板培养光照法:将在 PDA 平板上生长 5~7 d 的供试菌株培养物置于日光灯下连续培养 4~7 d,显微镜下观测培养基表面产生的孢子囊和厚垣孢子的形态和大小。

以 OMA(燕麦片 30 g, 60℃ 水浴 2 h, 琼脂 20 g, 蒸馏水 1 000 mL)为基础培养基,分别取供试菌株和南京农业大学王源超教授提供的疫霉菌 A1 和 A2 交配型标准菌株菌丝块(4 mm×4 mm),配对培养(两菌丝块距离约 4 cm),28℃ 下培养 10~15 d。在显微镜下观察菌落交界处是否产生卵孢子,并观测卵孢子的形态和大小(郑小波,1997)。

1.4 rDNA-ITS 序列分析及系统发育树的构建

将供试菌株接种于 PDB(马铃薯 200 g,葡萄糖 20 g,蒸馏水 1 000 mL)液体培养基中,于 25℃ 下培养 2~3 d 后收集菌丝,采用简化 CTAB 法(白占兵等,2009)提取菌株的基因组总 DNA。

采用引物 ITS5/ITS4(程颖慧等,2009)扩增病菌 rDNA 的 ITS 片段,引物序列为:ITS5(5'-GGAA GTAAAAGTCGTAACAAGG-3')和 ITS4(5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3')。PCR 反应体系为 25 μL,包括 10×PCR buffer 2.5 μL,2 mmol·L⁻¹ dNTPs 2 μL,10 pmol·μL⁻¹ 的 ITS5 和 ITS4 引物各 1 μL,5 U·μL⁻¹ Taq 酶(含 MgCl₂) 0.5 μL,模板 DNA 1.5 μL,ddH₂O 16.5 μL。

PCR 扩增反应程序为:95℃ 预变性 4 min;94℃ 变性 30 s,50℃ 退火 30 s,72℃ 延伸 1 min,35 个循环;最后 72℃ 延伸 10 min。PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测后,送大连宝生物工程有限公司进行序列测定。

将供试菌株的 rDNA-ITS 序列在 NCBI 网站上用 BLAST 软件进行同源性比对, 下载同源序列, 用 DNAMAN 软件保存所有待分析的序列, 用 MEGA 4.0 (molecular evolutionary genetics analysis) 软件将病原菌 rDNA-ITS 序列与下载的同源序列进行比对, 并用邻接法 (neighbor-joining, NJ) (Tamura et al., 2007) 构建系统发育树, 自举法 (bootstrap) (Singh & Xie, 2010) 对系统发育树进行检验, 1 000 次重复。

2 结果与分析

2.1 病害症状及病原菌的致病性

马拉巴栗疫病主要危害叶片和茎基部 (图 1, A、B), 叶片发病时, 初期在叶片边缘或中央出现水渍状暗褐色小点, 之后病斑扩展呈灰褐色大病斑, 病斑的病健交界不明显, 湿度大时病斑可扩展至全叶, 并在病部可见大量的灰白色霉层 (病菌菌丝体及孢子囊), 致使叶片大量脱落。茎基部发病时, 初期在茎基部出现水渍状暗褐色小点, 之后病斑上下扩展至整个茎基部呈灰褐色大病斑, 剖开病茎, 其木质部呈黑褐色棉絮状腐烂, 导致全株萎蔫死亡。

用常规组织分离法从病部分离纯化病原菌, 多次分离结果均只出现菌物菌株, 未出现细菌, 表明马拉巴栗疫病的病原可能是菌物。根据菌落形态或色素产生情况等基本特征的判断, 获得镰刀菌 (*Fusarium* sp.)、疫霉菌 (*Phytophthora* sp.) 和丝核菌 (*Rhizoctonia* sp.) 3 种类型菌物菌株, 分别选取代表菌株, 编号为 P1、P2、P3。将分离得到的菌株分别回接到马拉巴栗幼苗上, 结果显示, 接种疫霉菌的处理均可引起健康马拉巴栗植株发病, 接种后 5~7 d 出现明显症状, 且病斑症状与田间病斑症状基本相似, 并从发病后的植株上再次分离到相同的疫霉菌菌落, 而接种其余两种菌落处理未发病, 根据柯赫氏法则, 表明引起马拉巴栗疫病的病原菌为疫霉菌。为此本研究中以疫霉菌 P2 菌株为代表, 对其种类进行了鉴定。

2.2 寄主范围测定

盆栽接种测定结果 (表 1) 表明, 供试病原菌物可侵染马蹄莲、木瓜、万年青、狗尾草、巴西橡胶树、柑橘、杧果等植物, 并引起灰褐色病斑, 病部表面出现霜状霉层、茎溃疡等症状, 而不侵染富贵竹。测定中还发现, 病原菌物可侵染肿柄菊、灰藜、美丽针葵, 但不表现病害症状。表明该病原菌可侵染多种植物, 其寄主范围较广 (表 1)。

表 1 供试菌株的寄主范围测定结果
Table 1 The host range of pathogenic fungi P2

接种植物 Inoculated plant	分类地位 Taxonomic statue	发病情况 Pathogenicity
马蹄莲 <i>Zantedeschia aethiopica</i>	天南星科 Araceae	+
肿柄菊 <i>Tithonia diversifolia</i>	菊科 Asteraceae	- +
木瓜 <i>Chaenomeles sinensis</i>	蔷薇科 Rosaceae	+
万年青 <i>Rohdea japonica</i>	假叶树科 Ruscaceae	+
富贵竹 <i>Dracaena sanderiana</i>	龙舌兰科 Agavaceae	-
狗尾草 <i>Setaria viridis</i>	禾本科 Poaceae	+
巴西橡胶树 <i>Hevea brasiliensis</i>	大戟科 Euphorbiaceae	+
柑橘 <i>Citrus reticulata</i>	芸香科 Rutaceae	+
灰藜 <i>Chenopodium album</i>	藜科 Chenopodiaceae	- +
杧果 <i>Mangifera indica</i>	漆树科 Anacardiaceae	+
美丽针葵 <i>Phoenix roebelenii</i>	棕榈科 Palmae	- +

注: “+” 表示发病, “-” 表示不发病, “- +” 表示侵染但不表现症状。

Note: “+” indicates having pathogenicity; “-” indicates no pathogenicity; “- +” infection but no disease signs.

2.3 病原菌鉴定

2.3.1 病原菌的形态特征

将供试菌株接种在 PDA 培养基平板上, 28 °C 培养 5 d 后进行观测。结果表明, 分离获得的菌株在 PDA 平板上菌落呈现白色, 气生菌丝中等旺盛; 显微镜下观察, 菌丝无隔, 粗细均匀, 宽度 2.0~5.6 μm, 未见菌丝膨大体 (图 1, C、D)。

供试菌株孢囊梗简单合轴分枝, 孢子囊大多数倒梨形, 少数呈椭圆形或卵圆形, 乳突明显; 孢子囊大小差异较大, 长 29~58 μm, 宽 15~40 μm, 长宽比大于 1.6。厚垣孢子大量, 顶生或间生, 球形, 淡褐色, 直径 25~40 μm (图 1, E~G)。

供试菌株为异宗配合, 在 OMA 固体培养基上可产生大量卵孢子, 藏卵器球形, 直径 24~30 μm。卵孢子蜜黄色, 球形, 近满器, 直径 20~28 μm。雄器球形或椭圆形, 围生 (图 1, H)。

综上, 分离的病原菌株形态特征与郑小波 (1997) 描述的 *Phytophthora palmivora* 基本相同, 可初步认为马拉巴栗疫病的病原菌为棕榈疫霉。

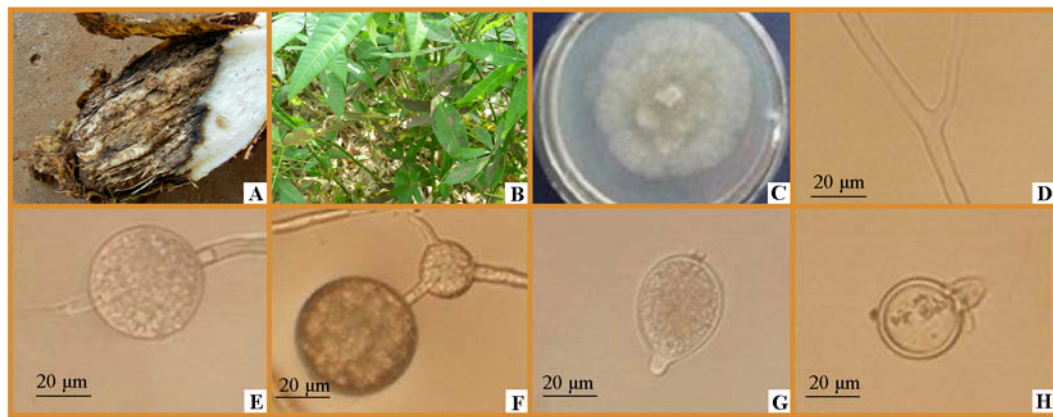


图 1 马拉巴栗感染疫病的症状及供试菌株的形态特征

A: 根; B: 叶; C: 菌落形态; D: 菌丝; E、F: 厚垣孢子; G: 孢子囊 (乳突和排孢孔); H: 卵孢子, 藏卵器和雄器。

Fig. 1 The symptom of phytophthora blight from *Pachira macrocarpa* and the morphological characteristics of the strain

A: Root; B: Leaf; C: The colony morphology; D: Mycelium;

E, F: Chlamydospore; G: Sporangia; H: Oospore.

2.3.2 病原菌 rDNA-ITS 序列测定及系统发育树构建

以供试菌株 P2 基因组 DNA 为模板, 用引物 ITS4/ITS5 扩增到约 800~900 bp 的 DNA 序列 (图 2), 经纯化、测序得供试菌株 rDNA-ITS 序列长度为 866 bp (GeneBank 登录号为 GQ924478)。

经 BLAST 分析, 供试菌株 P2 的 ITS 序列与疫霉菌 (*Phytophthora* sp.) 序列的同源性较高。

选取其中相近种的 rDNA-ITS 序列, 经 MEGA4.0 进行多序列对比并用 Neighbor-joining 法构造系统发育树 (图 3)。结果表明, 供试

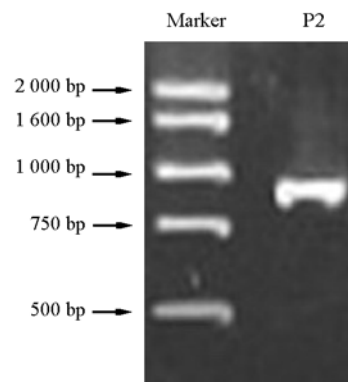


图 2 供试菌株 P2 的 rDNA-ITS 区段 PCR 扩增凝胶电泳图

Fig. 2 The electrophoresis of ITS PCR for the strain P2

菌株 P2 与棕榈疫霉 (*P. palmivora*) (GQ398157、GQ131800、FJ801259) ITS 序列的同源性达 99.87%, 结合供试菌株的形态特征和培养性状, 将马拉巴栗疫病的病原菌鉴定为棕榈疫霉 (*P. palmivora*)。

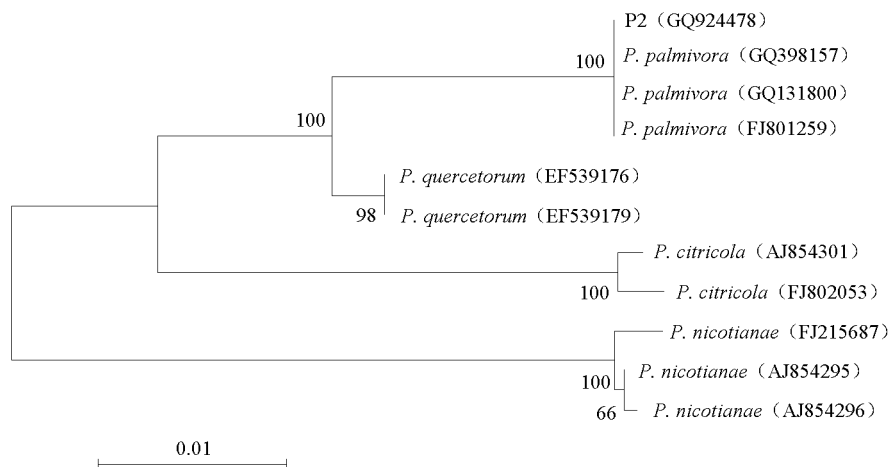


图 3 供试菌株 P2 与来自 GenBank 的 *Phytophthora* 属不同种的菌株 rDNA-ITS 序列构建的系统发育树

Fig. 3 The phylogenetic tree based on ITS sequences of *Phytophthora* strains

3 讨论

马拉巴栗茎部腐烂病在我国各种植区均有发生, 关于其病原菌, 现已报道的有可可毛色二孢菌 (*Lasiodiplodia theobromae*) (章桂明和麦瑞生, 1992; 冯家望 等, 1997; 李一农和陈雪娇, 1997; 习平根 等, 2000)、潮湿镰孢菌 (*Fusarium udum*) 和茄病镰孢菌 (*F. solani*) (尚巧霞 等, 2004)、华丽腐霉菌 (*Pythium splendens*) (谭志琼 等, 2009)。本试验中采用常规组织分离法和柯赫氏法则测定发现, 引起马拉巴栗疫病的病原为病原菌物, 进一步经形态特征观测及 rDNA-ITS 序列分析, 证明马拉巴栗疫病的病原为棕榈疫霉 (*Phytophthora palmivora*)。由此可见, 有多种病原菌可引起马拉巴栗的茎部腐烂, 这可能是在不同环境条件下其病原菌有所不同, 对此在病害发病规律及防控等相关研究中也应引起注意。

据报道, 棕榈疫霉可侵染可可树、榴莲、面包树、凤梨、韭、木瓜、番木瓜、甜橙、咖啡、枇杷、冬青卫矛、无花果、短筒倒挂金钟、橡胶树、杧果、泡桐属植物、柑橘属植物、鳄梨、蝴蝶兰、胡椒、洋蒲桃、酸枣、芋、丝兰属植物 (郑小波, 1997; APPS, 2008)。但目前国内外尚未见棕榈疫霉侵染马拉巴栗的报道, 有关该病害的发生规律、病害循环及其防控措施等有待进一步研究。

References

- Ann P J, Chang T T, Ko W H. 2002. *Phellinus noxius* brown root rot of fruit and ornamental trees in Taiwan. *Plant Disease*, 86 (8): 820 - 825.
- Australian Physiological & Pharmacological Society (APPS). 2008. *Phytophthora palmivora* (Butler). *Pathogen of the Month*, 10: 1.
- Bai Zhan-bing, Ding Zhuo-yi, Li Xue-feng, Dai Xiong-ze, Ma Yan-qing, Su Jian-wen, Wang Xiao-wu. 2009. Rapid extraction total DNA from purple Tsai-tai and characterization with SSR molecular marker. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 25 (14): 63 - 66. (in Chinese)
- 白占兵, 丁茁夷, 李雪峰, 戴雄泽, 马艳青, 栗建文, 王晓武. 2009. 紫菜薹总 DNA 的快速提取与 SSR 分子标记鉴定. *中国农学通报*, 25 (14): 63 - 66.
- Cheng Ying-hui, Wang Ying, Zhang Gui-ming. 2009. Identification of *Phytophthora palmivora* from imported Thailand durian. *Plant Quarantine*, 23 (3): 26 - 28. (in Chinese)

- 程颖慧, 王 颖, 章桂明. 2009. 进口泰国榴莲上棕榈疫霉的分离和鉴定. 植物检疫, 23 (3): 26 - 28.
- Fang Zhong-da. 1998. The research methods of plant pathology. Beijing: China Agriculture Press. (in Chinese)
- 方中达. 1998. 植病研究方法. 北京: 中国农业出版社.
- Feng Jia-wang, Mo Xiao-feng, Li Ji-dan. 1997. Quarantine and treatment of root rot of import seedling of *Pachira aquatica*. Plant Quarantine, 11 (4): 215 - 217. (in Chinese)
- 冯家望, 莫晓凤, 李纪丹. 1997. 进境圭亚那栗巴歧拉苗木腐烂病的检疫处理. 植物检疫, 11 (4): 215 - 217.
- Li Yi-nong, Chen Xue-jiao. 1997. Identification and control of root rot of import *Pachira aquatica*. Shenzhen Sez Technology, 1: 40. (in Chinese)
- 李一农, 陈雪娇. 1997. 进境马拉巴栗腐烂病的识别及防治. 深圳特区科技, 1: 40.
- Shang Qiao-xia, Jia Hui, Liu Su-hua, Wang Jin-zhong, Wei Yan-min. 2004. Identification of foot-rot from *Pachira aquatica*//Peng You-liang. Proceedings of the Annual Meeting of Chinese Society for Plant Pathology (2004). Beijing: China Agricultural Technology Press: 10 - 12. (in Chinese)
- 尚巧霞, 贾 辉, 刘素花, 王进忠, 魏艳敏. 2004. 马拉巴栗茎基腐烂病原鉴定//彭友良. 中国植物病理学 2004 年学术年会论文集. 北京: 中国农业科学技术出版社: 10 - 12.
- Singh K, Xie M. 2010. Bootstrap method. International Encyclopedia of Education, 5: 46 - 51.
- Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S. 2007. MEGA4: Molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. Molecular Biology and Evolution, 24: 1596 - 1599.
- Tan Zhi-qiong, Fan Hong-yan, Zhang Rong-yi. 2009. Identification of the pathogen causing the foot rot on *Pachira macrocarpa*. Plant Protection, 35 (5): 125 - 127. (in Chinese)
- 谭志琼, 范红岩, 张荣意. 2009. 马拉巴栗茎基腐烂病原菌鉴定. 植物保护, 35 (5): 125 - 127.
- Xi Ping-gen, Qi Pei-kun, Jiang Zi-de. 2000. Identification of the fungal diseases in *Pachira macrocarpa*. Journal of South China Agricultural University, 21 (4): 30 - 32. (in Chinese)
- 习平根, 戚佩坤, 姜子德. 2000. 瓜栗病原真菌的鉴定. 华南农业大学学报, 21 (4): 30 - 32.
- Zhang Gui-ming, Mai Rui-sheng. 1992. Investigation and identification of root rot from *Pachira aquatica*. Plant Quarantine, 6 (5): 329 - 330. (in Chinese)
- 章桂明, 麦瑞生. 1992. 圭亚那栗巴歧拉腐烂病的调查与鉴定. 植物检疫, 6 (5): 329 - 330.
- Zheng Xiao-bo. 1997. *Phytophthora* and its research technology. Beijing: China Agriculture Press. (in Chinese)
- 郑小波. 1997. 疫霉菌及其研究技术. 北京: 中国农业出版社.

征 订

《中国蔬菜品种志》

本书由中国农业科学院蔬菜花卉研究所主编, 已于 2002 年 9 月出版发行。全书分上、下卷, 1 ~ 6 章为上卷, 包括根菜类、白菜类、芥菜类、甘蓝类、绿叶菜类及葱蒜类, 计 2 263 个品种, 1 347 页; 7 ~ 12 章为下卷, 包括瓜类、茄果类、豆类、薯芋类、水生蔬菜类和多年生蔬菜类, 计 2 550 个品种, 1 177 页。入志的品种中, 地方品种占 90% 以上, 少量在全国栽培时间较长、种植面积较大的一代杂种也选入其中。本书较全面系统而又有重点地反映了中国丰富的蔬菜品种资源概貌、研究成果及育种水平, 可供蔬菜科研、教学、生产及种子公司、农业行政单位的人员参考。本书出版后受到读者普遍好评, 现尚有少量存书, 特以优惠价格 490 元 (上、下卷) 提供给读者 (原价 980 元)。

购书者请通过邮局汇款至北京中关村南大街 12 号中国农科院蔬菜花卉所《园艺学报》编辑部, 邮编 100081。