

越橘葡萄座腔菌枝枯病的病原菌鉴定

徐成楠, 周宗山*, 迟福梅, 吴玉星, 冀志蕊, 张红军

(中国农业科学院果树研究所, 辽宁兴城 125199)

摘要: 通过形态学观察、诱导产孢、致病力测定和分子生物学研究, 对引起辽宁地区越橘枝枯病的病原菌进行鉴定, 确定其为葡萄座腔菌 (*Botryosphaeria dothidea*)。病原菌在越橘植株上接种后表现枝条枯萎、木质部变色等症状, 与田间自然发病植株一致; 在 PDA 培养基上菌落初期为白色, 后转为灰黑色, 分生孢子纺锤形或梭形, 无色, 单胞, 内含多个油滴; 水琼脂 + 麦芽提取物、苹果枝条和苹果幼果 3 种病原菌培养方法均可诱导产孢, 苹果幼果是诱导病原菌产孢的最佳基质。供试菌株 LB1 的 rDNA-ITS 和 β -tubulin 基因序列与 GenBank 中已有的 *Botryosphaeria dothidea* 序列相似性分别达到 99% 与 100%。

关键词: 越橘; 枝枯病; 葡萄座腔菌; *Botryosphaeria dothidea*; 诱导产孢

中图分类号: S 663.2

文献标志码: A

文章编号: 0513-353X (2013) 02-0231-06

Research on the Pathogen Causing *Botryosphaeria* Stem Blight on Blueberry

XU Cheng-nan, ZHOU Zong-shan*, CHI Fu-mei, WU Yu-xing, JI Zhi-rui, and ZHANG Hong-jun
(Research Institute of Pomology, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Xingcheng, Liaoning 125199, China)

Abstract: The pathogen causing stem blight on blueberry in Liaoning, China was identified as *Botryosphaeria dothidea* by morphological characteristics, sporulation features, pathogenicity test, and the molecular identification. The stems showed symptoms of dieback, discoloration in trunks and death after inoculating with the pathogen, which were consistent with the symptoms of the natural infected plants. All isolates showed the colonies white at the early stage, then became gray to black, conidia were hyaline, aseptate, fusiform with several oil globules, young apple fruit is the suitable medium for sporulation. Identity of isolate LB1 was confirmed by analysis of the rDNA-ITS and β -tubulin sequences with primers ITS1 – ITS4 and Bt2a – Bt2b. BLAST searches showed 99% and 100% identity with *Botryosphaeria dothidea* isolates from GenBank.

Key words: blueberry; stem blight; *Botryosphaeria dothidea*; induce sporulation

越橘为杜鹃花科 (Ericaceae) 越橘属 (*Vaccinium*) 小浆果类果树, 其中蓝果类型俗称“蓝莓”。越橘是近几年世界发展最为迅速、集营养与保健于一身的第 3 代果树品种 (傅俊范 等, 2010)。自 21 世纪以来, 越橘这一新兴果树在中国开始了大面积的产业化生产栽培, 果农通过栽植越橘获得了巨大的经济效益。随着生产面积的不断扩大, 各种病虫害的危害及其防治问题显得越来越突出。

收稿日期: 2012-09-07; **修回日期:** 2013-01-15

基金项目: 中国农业科学院基本科研业务费预算增量项目 (2013ZL019); 公益性行业 (农业) 科研专项 (201103037)

* 通信作者 Author for correspondence (E-mail: zszhou2000@hotmail.com)

由葡萄座腔菌科 (Botryosphaeriaceae) 真菌引起的越橘病害是世界越橘生产上的重要病害, 该病菌可侵染越橘主干及侧枝, 引起幼嫩枝条枯萎、主枝木质部组织死亡、枝干溃疡和树势衰弱等症, 严重时会导致植株整株死亡。近期的研究表明, *Botryosphaeria corticis*、*Neofusicoccum arbuti*、*Neofusicoccum australe*、*Neofusicoccum parvum*、*Neofusicoccum ribis*、*Lasiodiplodia theobromae* 和 *Botryosphaeria dothidea* 等葡萄座腔菌科的多种病原真菌均能引起越橘枝干发生病害, 在葡萄牙、智利、美国、韩国等越橘产区广泛发生, 并造成了不同程度的损失 (Phillips et al., 2006; Espinoza et al., 2009; Wright & Harmon, 2009, 2010; Choi, 2011)。目前在中国未见相关研究报道。根据笔者近年来的调查, 在中国辽宁省越橘主栽地区, 葡萄座腔菌枝枯病已成为越橘生产上流行性和破坏性最强的病害, 严重影响越橘植株长势, 以及果实的品质和产量。由于越橘果实属于鲜食类型, 在生产上对于越橘病虫害防治提出了较高要求。本研究旨在通过病原菌形态学、致病性和分子生物学研究, 明确中国辽宁省部分地区越橘枝枯病病原菌的种类及其危害特点, 以期对越橘葡萄座腔菌枝枯病的防控提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料的选取与症状观察

自 2011 年 5 月到 2012 年 6 月, 于越橘生长季节调查中国辽宁省营口、大连和兴城保护地越橘以及露地栽培越橘园的枝枯病发生和危害情况, 对田间越橘枝枯病发生严重植株进行详细症状描述记录并拍照, 采集典型发病枝条 40 份。

1.2 病原菌的分离培养以及形态学观察

1.2.1 病原菌分离

参考方中达 (1998) 的方法, 选取典型发病枝条 (枯死的顶梢、发病初期的新梢), 切取 5 mm 主枝木质部变褐色的病健交界处的组织, 先用 75% 酒精处理 10 ~ 15 s, 然后用 0.1 % 升汞处理 30 ~ 40 s, 最后用无菌水漂洗 3 次, 置于 PDA 平板培养基上, 26 °C 黑暗培养。3 d 后用灭菌的移植针挑取菌落边缘菌丝至 PDA 平板进行纯化, 待菌落长满培养皿后, 在 26 °C 和不间断光照下培养 8 ~ 10 d, 观察菌落形态、颜色及产孢特征, 最后将纯化的病原菌转置 PDA 试管中低温保存。

1.2.2 病原菌诱导产孢研究

将分离纯化的菌株活化后转接于 PDA 平板上, 28 °C 黑暗培养 3 ~ 4 d, 待菌落生长至培养皿边缘时, 用于诱导产孢研究, 方法参考 Slippers 等 (2004a) 和冷伟锋等 (2009) 的报道稍有改动, 病原菌接种后每天定时观察并记录产孢结果。(1) 从 PDA 平板上的菌落边缘切取菌丝块, 置于 2% 水琼脂 (WA) + 2% 麦芽提取物 (MEA) 培养基 (2% WA: 琼脂 20 g, 蒸馏水 1 000 mL; 2% MEA: 麦芽提取物 20 g, 琼脂 15 g, 蒸馏水 1 000 mL, 每平板四周插入 3 ~ 4 个长度为 1 cm 左右的灭菌 2 年生苹果枝条小段) 平板中央, 于 24 h 光照条件下 28 °C 培养。(2) 用打孔器从 PDA 平板上生长的菌落边缘切取直径 5 mm 的菌饼, 接种于灭菌苹果枝条培养基 (采集田间 2 年生苹果枝条, 截成长度为 8 cm 的短枝, 取 3 ~ 4 个装入 250 mL 三角瓶中并加入 3 ~ 4 mL 蒸馏水, 湿热灭菌) 上, 每瓶接 2 ~ 3 个菌饼, 于 24 h 光照条件下 28 °C 培养。(3) 在 6 月份苹果生长季节, 摘取直径约 3 ~ 4 cm 的苹果健康幼果, 清水冲洗后, 用 70% 酒精进行表面消毒。采用经表面消毒的直径为 4 mm 的打孔器在果实表面打深度为 2 ~ 3 mm 的圆孔, 然后, 取 4 mm 菌丝饼接种到果实表面的圆孔中, 菌丝面贴近果实伤口处, 将接种后的果实置于密封的塑料盒内, 24 h 光照条件下 28 °C 保湿培养。

1.3 病原菌的致病性测定

在实验室进行盆栽越橘枝条接种试验, 供试品种为 2 ~ 3 年生‘伯克利’(Berkeley)、“北陆”(Northland)和‘布列吉他’(Brigitta)。

致病性测定采用菌丝接种法: 将分离纯化后的病原菌转至 PDA 平板上, 于 28 °C 黑暗培养 6 d 后, 用 4 mm 灭菌打孔器在 PDA 平板上菌落边缘均匀切取菌饼。用无菌医用注射器在新梢处进行针刺, 并用无菌手术刀片将越橘主枝刮伤, 木质部伤口为 4 mm, 然后将菌饼菌丝面朝伤口处贴紧, 将蘸有无菌水的脱脂棉用塑料薄膜包裹接种处, 然后喷雾保湿。3 个越橘品种刺伤及无伤接种植株各 5 株, 同时接种空白的 PDA 培养基块和无菌水各 5 株作为对照。每天观察并记录发病情况。选取明显发病的枝条重新分离病原菌并进行鉴定。

1.4 病原菌的分子鉴定

通过改良的 CTAB 法提取病原菌基因组 DNA, 采用真菌核糖体基因组转录间隔区通用引物 ITS1 ~ ITS4 和真菌微管蛋白基因序列通用引物 Bt2a ~ Bt2b 对病原菌的基因组 DNA 进行 PCR 扩增 (Slipers et al., 2004a)。PCR 反应体系为 50 μL , 包括: 10 \times PCR buffer 5 μL , MgCl_2 (25 mmol \cdot L $^{-1}$) 5 μL , dNTP (10 mmol \cdot L $^{-1}$) 2 μL , 模板 DNA 溶液 2 μL , 5 U \cdot μL^{-1} Taq 酶 0.4 μL , 10 pmol \cdot μL^{-1} ITS1 和 ITS4 引物 (由上海生工合成) 各 0.5 μL , 超纯水 34.6 μL 。ITS 区扩增条件: 94 °C 预变性 5 min; 94 °C 变性 1 min, 55 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 1 min, 30 个循环; 最后 72 °C 延伸 10 min, 4 °C 保存; β -tubulin 区扩增条件: 94 °C 预变性 2 min; 94 °C 变性 30 s, 55 °C 退火 45 s, 72 °C 延伸 1.5 min, 40 个循环; 最后 72 °C 延伸 5 min, 4 °C 保存。产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳, 通过凝胶成像仪进行观察并拍照。PCR 产物送上海生工生物工程技术服务有限公司测序。

分析供试菌株核糖体 DNA-ITS 区段序列以及 β -tubulin 区段序列, 运用 GenBank 核酸数据库中的 BLAST 工具软件, 在 DNA 序列数据库中搜索同源 DNA 序列并进行比较分析, 根据病菌的形态特征、培养性状和致病性, 结合序列分析, 对病原菌进行鉴定。

2 结果与分析

2.1 越橘葡萄座腔菌枝枯病症状特点及危害性

2011 年和 2012 年的调查发现, 越橘葡萄座腔菌枝枯病在整个植株生长期均可发生并造成危害。设施栽培 (暖棚) 条件下由于植株长势良好、抗病性增强加上合理精细的管理模式, 未见此病害发生, 而露地栽培管理方式的粗放加上适宜的气候环境, 枝枯病的危害显著增加, 田间发病率为 30% 左右, 并且呈逐渐扩大趋势。

在病害发生初期, 植株上部幼嫩枝条变黑褐色, 叶片变黄、变红并且枝条干枯、萎垂, 部分死亡枝条附近依旧有健康枝条 (图 1, A)。相同植株在病害不同阶段症状表现差异较大。植株主枝基部受病原菌侵染时, 枝条表面有时不表现症状, 将主枝从中间切开, 可见被侵染的枝干一侧木质部变为棕色或黑褐色 (图 1, B), 坏死的木质部组织可长达 10 ~ 15 cm 甚至遍布整个主枝, 最终造成整株死亡。在适宜的气候条件下, 受害植株的枝条表面可见病原菌白色分生孢子丝 (图 1, C)。

2.2 病原菌的形态特性和培养性状

通过对植株顶端病枝及罹病木质部组织分离获得菌株 20 个 (LB1 ~ LB20), 在 PDA 培养基上, 所有菌株形态特征基本一致, 菌落圆形或不规则形, 菌落生长初期白色, 5 ~ 6 d 后变为灰色, 15 d

后变为黑色, 气生菌丝较发达, 绒毛状并偶尔长至培养皿顶盖处, 光照培养 20 d 后, 菌落上可见散生或聚生的黑色颗粒状分生孢子器 (图 1, D、E); 分生孢子纺锤形或梭形, 无色, 单胞, 内含多个不规则油滴, 基部平截, 顶部稍钝 (图 1, F), 人工培养条件下产生的分生孢子形态与自然发病枝条上产生的基本一致, 并且在自然条件和人工培养基上均未见有性型。根据病原菌形态特征, 参照葡萄座腔菌属 (*Botryosphaeria*) 真菌相关文献, 初步鉴定其为葡萄座腔菌 *Botryosphaeria dothidea*。

病原菌诱导产孢结果: 所用 3 种诱导产孢方法均可较快速获得大量病原菌分生孢子。(1) WA + MEA 培养基产孢情况: 接种至培养皿内的菌丝块经 10 d 左右, 在短枝段上形成大量载孢体 (图 1, G); (2) 苹果枝条培养基产孢情况: 经过 5 ~ 6 d 光照培养, 三角瓶内灭菌的苹果枝条上产生大量分生孢子器, 但仅少数分生孢子器可产生分生孢子角 (图 1, H); (3) 接种菌丝饼的苹果幼果光照培养 3 d 后, 表面形成褐色病斑, 10 d 后病斑扩展至整个幼嫩果实, 果实表面着生大量分生孢子器及白色分生孢子角 (图 1, I)。研究表明, 幼果诱导产孢是快速、大量获得病菌分生孢子的最适宜方法。



图 1 越橘葡萄座腔菌枝枯病的典型症状、病原菌形态特征及致病性测定

A: 整株症状; B: 发病枝条斜切面; C: 发病枝条上分生孢子丝; D: 菌落在 PDA 上生长初期; E: 菌落在 PDA 上生长后期; F: 分生孢子; G: WA + MEA 培养基上的分子孢子器; H: 苹果枝条上的分生孢子角; I: 苹果幼果上分生孢子; J: 病原菌在“布列吉他”上的致病性测定。

Fig. 1 Symptoms of stem blight on blueberry caused by *Botryosphaeria dothidea* and morphology of the pathogen

A: Symptoms on blueberry stems in field; B: Longitudinal section shows infected trunk in stem; C: Conidia on infected stem; D: Early stages of the colony on PDA; E: Later stages of the colony on PDA; F: Conidia; G: The conidiomata formed on 2% WA + 2% MEA medium; H: The conidiomata formed on apple shoots; I: Young apple fruit with conidial mass; J: Symptoms of infected ‘Brigitta’ stem after inoculation with *Botryosphaeria dothidea* after 15 d.

2.3 致病性测定

选用代表性菌株 LB1 以菌丝饼接种的方法对 3 个越橘品种的健康枝条进行致病性测定。结果表明, 接种的‘布列吉他’(Brigitta) 幼嫩枝条上 7 d 左右可出现水渍状黑褐色斑点, 病斑呈梭形扩展, 经 15 d 左右整个枝条变为黑褐色, 枯萎(图 1, J), 发病枝条上叶片变黄并枯死、切开接种发病的主枝部位, 木质部出现黑褐色病斑。刺伤接种的越橘品种‘布列吉他’均发病, 而无伤接种与对照接种枝条均未发病, 其他 2 个品种‘伯克利’(Berkeley) 与‘北陆’(Northland) 接种后均未发病。从接种发病的枝条及主枝的病健交界处取发病组织重新分离、纯化, 发现重新分离获得的病原菌与接种所用菌株在菌落形态及孢子形态上完全一致, 因此, 可以判断葡萄座腔菌(*Botryosphaeria dothidea*) 为越橘枝枯病的病原菌。

2.4 病原菌的分子鉴定

根据 Slippers 等(2004a) 的研究, 真菌 rDNA-ITS 基因部分序列以及 β -tubulin 基因部分序列可作为葡萄座腔菌种的分类鉴定的分子依据。为进一步从分子方面鉴定越橘枝枯病的病原为葡萄座腔菌 *Botryosphaeria*, 采用这 2 对真菌通用引物对代表菌株 LB1 进行扩增, 分别获得了 550 bp 与 416 bp 大小的片段, 所测菌株序列与 GenBank 中已有的序列比对结果表明, 待测菌株 ITS、 β -tubulin 扩增序列均与 *Botryosphaeria dothidea* 相似性最高, 分别为 99% 和 100%。因此, 结合病原菌形态学特征, 确认引起越橘枝枯病的病原菌为葡萄座腔菌 *Botryosphaeria dothidea*。菌株 LB1 的 rDNA-ITS 和 β -tubulin 基因在 GenBank 上登录号分别为 JX524805 和 JX556419。

3 讨论

葡萄座腔菌属(*Botryosphaeria* Ces. et de Not.) 真菌通过寄主花芽、皮孔、气孔和伤口侵染寄主维管束组织, 初期引起寄主枝干溃疡或者新梢枯萎, 后期病斑连片导致整株死亡, 葡萄座腔菌枝枯病目前已成为导致越橘植株死亡率最高和经济损失最严重的病害(Witcher & Clayton, 1963; Milholland, 1972)。Witcher 和 Clayton(1963) 首次报道了由葡萄座腔菌(*B. dothidea*) 引起的高丛越橘枝枯病的发生, 伤口是病原菌侵染扩展的有利条件, 本研究中刺伤接种造成病原菌侵染致病的结论与此一致。该病曾经给美国北卡罗莱纳州越橘生产造成极大危害, 从 1959 年至 1985 年该病发病率从 9% 上升至 23% (Witcher & Clayton, 1963; Creswell, 1987), 栽培中选用感病品种‘蓝丰’及机械化采收是该病加重的原因。Creswell 和 Milholland 于 1987 年对不同越橘品种抗葡萄座腔菌(*B. dothidea*) 侵染的表现做了大量的研究工作, 筛选了一批优良抗病品种(Creswell & Milholland, 1987)。

本研究中对越橘葡萄座腔菌 *Botryosphaeria* 枝枯病的症状进行了详细描述, 采用菌物形态学和分子生物学方法对病原菌(*B. dothidea*) 进行了初步研究。通过病原菌的致病力测定可得知, 不同越橘栽培品种之间抗病性有较大差异。通过笔者近 2 年田间病害调查发现, 采用日光温室等栽培条件, 栽植抗病品种, 每年植株生长初期修剪发病枝条, 建立合理的栽培管理方式, 可以最大限度地控制该病害发生。

葡萄座腔菌及其相关无性型是常见的植物病原菌, 广泛分布于世界各地, 可引起多种植物病害, 并造成重要经济损失(Slippers et al., 2004a)。该属真菌可腐生或寄生于植物体内, 或以内生真菌形态存在(Smith et al., 1996), 并可导致七叶树属、栲属、苹果属、杨属、李属、栎属、松属等多种木本植物产生叶斑、枝干溃疡、枝条枯萎、果实腐烂等不同症状, 造成生态林木及经济果树生产毁灭性后果(Denman et al., 2000; Smith & Stanosz, 2001; Zhou & Stanosz, 2001; Slippers et al., 2004b;

Farr et al., 2005)。对该属真菌分类主要依据该属真菌无性型纯培养物的形态学特征,但是对于 *Botryosphaeria* 属中很多种类来说,仅仅依据这些特征并不足以对菌株的分类地位进行准确界定。因此,本研究中根据 Slippers 等 (2004a) 的方法,采用 ITS 和 β -tubulin 基因的序列分析,结合菌株的形态学特征对引起越橘枝枯病的 *Botryosphaeria* 属真菌进行了准确鉴定,引起越橘枝枯病的病原为葡萄座腔菌 (*B. dothidea*)。

References

- Choi I Y. 2011. First report of bark dieback on blueberry caused by *Botryosphaeria dothidea* in Korea. *Plant Dis*, 95 (2): 227.
- Creswell T C. 1987. Occurrence and development of stem blight of blueberry in North Carolina caused by *Botryosphaeria dothidea* [Ph. D. Dissertation]. Raleigh: North Carolina State University.
- Creswell T C, Milholland R D. 1987. Responses of blueberry genotypes to infection by *Botryosphaeria dothidea*. *Plant Disease*, 71: 710 - 713.
- Denman S, Crous P W, Taylor J E, Kang J C, Pascoe I, Wingfield M J. 2000. An overview of the taxonomic history of *Botryosphaeria*, and a re-evaluation of its anamorphs based on morphology and ITS rDNA phylogeny. *Studies in Mycology*, 45: 129 - 140.
- Espinoza J G, Briceño E X, Chávez E R, Úrbez-Torres J R, Latorre B A. 2009. *Neofusicoccum* spp. associated with stem canker and dieback of blueberry in Chile. *Plant Dis*, 93: 1187 - 1194.
- Fang Zhong-da. 1998. *Plant pathology research methods*. Beijing: China Agriculture Press. (in Chinese)
- 方中达. 1998. *植物研究方法*. 北京: 中国农业出版社.
- Farr D F, Elliott M, Rossman A Y, Edmonds R L. 2005. *Fusicoccum arbuti* sp. nov. causing cankers on pacific madrone in Western North America with notes on *Fusicoccum dimidiatum*, the correct name for *Scytalidium dimidiatum* and *Natrassia mangiferae*. *Mycologia*, 97: 730 - 741.
- Fu Jun-fan, Yan Xue-rui, Li Ya-dong. 2010. *A color atlas of small fruits diseases and pests control*. Beijing: China Agriculture Press. (in Chinese)
- 傅俊范, 严雪瑞, 李亚东. 2010. *小浆果病虫害防治原色图谱*. 北京: 中国农业出版社.
- Leng Wei-feng, Li Bao-hua, Guo Li-yun, Dong Juan-hua, Wang Cai-xia, Li Gui-fang, Dong Xiang-li. 2009. Method to promote sporulation of *Botryosphaeria berengeriana* f. sp. *piricola*. *Acta Phytopathologica Sinica*, 39 (5): 536 - 539. (in Chinese)
- 冷伟锋, 李保华, 国立耘, 董娟华, 王彩霞, 李桂舫, 董向丽. 2009. 苹果轮纹病菌诱导产孢方法. *植物病理学报*, 39 (5): 536 - 539.
- Milholland R D. 1972. Histopathology and pathogenicity of *Botryosphaeria dothidea* on blueberry stems. *Phytopathology*, 62: 654 - 660.
- Phillips A J L, Oudemans P V, Correia A, Alves A. 2006. Characterisation and epitypification of *Botryosphaeria corticis*, the cause of blueberry cane canker. *Fungal Diversity*, 21: 141 - 155.
- Slippers B, Crous P W, Denman S, Coutinho T A, Wingfield B D, Wingfield M J. 2004a. Combined multiple gene genealogies and phenotypic characters differentiate several species previously identified as *Botryosphaeria dothidea*. *Mycologia*, 96: 83 - 101.
- Slippers B, Fourie G, Crous P W, Coutinho T A, Wingfield B D, Carnegie A J, Wingfield M J. 2004b. Speciation and distribution of *Botryosphaeria* spp. on native and introduced *Eucalyptus* trees in Australia and South Africa. *Studies in Mycology*, 50: 343 - 358.
- Smith D R, Stanosz G R. 2001. Molecular and morphological differentiation of *Botryosphaeria dothidea* (anamorph *Fusicoccum aesculi*) from some other fungi with *Fusicoccum* anamorphs. *Mycologia*, 93 (3): 505 - 515.
- Smith H, Wingfield M J, Crous P W, Coutinho T A. 1996. *Sphaeropsis sapinea* and *Botryosphaeria dothidea* endophytic in *Pinus* spp. in South Africa. *S Afr J Bot*, 62: 86 - 88.
- Witcher W, Clayton C N. 1963. Blueberry stem blight caused by *Botryosphaeria dothidea* (*B. ribis*). *Phytopathology*, 53: 705 - 712.
- Wright A F, Harmon P F. 2009. Morphological identification and pathogenicity of *Botryosphaeria* spp. causing stem blight on southern highbush blueberries in Florida. *Phytopathology*, 99: S143.
- Wright A F, Harmon P F. 2010. Identification of species in the Botryosphaeriaceae family causing stem blight on southern highbush blueberry in Florida. *Plant Dis*, 94: 966 - 971.
- Zhou S, Stanosz G R. 2001. Relationships among *Botryosphaeria* species and associated anamorphic fungi inferred from the analysis of ITS and 5.8S rDNA sequences. *Mycologia*, 93 (3): 519 - 529.