

山东地区梨腐烂病菌的分离鉴定

董冉, 魏树伟, 冉昆, 王宏伟, 董肖昌, 王少敏*

(山东省果树研究所, 山东泰安 271000)

摘要:【目的】获得梨腐烂病的致病菌株用于后期筛选抗病梨种质资源。【方法】采集具有典型腐烂病症状的‘黄金梨’枝干样品进行组织分离、培养, 获得梨腐烂病菌株, 采用形态学、分子生物学以及病原菌致病性相结合的方法对其进行鉴定。【结果】根据分离菌株的菌落、分生孢子形态特征、rDNA-ITS 序列分析将分离到 Va1 菌株鉴定为腐烂菌(*Valsa mali*), 并选取 8 个山东地区的梨种质资源进行致病性验证。【结论】分离得到的菌株对 8 个品种都具有致病性, 证实为梨腐烂病的病原。

关键词: 梨; 山东; 腐烂病菌; 分离; 致病性

中图分类号: S661.2

文献标志码: A

文章编号: 1009-9980(2018)Suppl.-135-04

The identification and the Pathogenicity of analysis for the pathogen of pear *Valsa* canker

DONG Ran, WEI Shuwei, RAN Kun, WANG Hongwei, DONG Xiaochang, WANG Shaomin*

(Shandong Institute of Pomology, Taian 271000, Shandong, China)

Abstract: 【Objective】In order to detect the resistance of pear germplasms to canker, we obtained fungal pathogens from pear trees. 【Methods】Isolates from disease-affected branches of pear were purified culture and obtaining pear rot disease strain named (No. Va1). Identification of the pathogenic fungus was carried out according to the characteristics of fungal morphology, pathogenicity and by rDNA-ITS sequence analysis. 【Results】The strain was identified as *Valsa mali* based on the colony and conidiphores morphological observation and the rDNA-ITS sequence homology. Eight pear germplasm resources were selected for pathogenicity detection. 【Conclusion】The results showed that the isolate was the pathogen of pear rot. It has certain pathogenicity of the Va1 isolate on eight varieties of pear.

Key words: Pear; Shandong; *Valsa mali*; Isolation; Pathogenicity

梨(*Pyrus*)是一种世界性水果,我国种植面积和产量均居世界首位^[1]。梨树腐烂病(pear *valsa* canker)是梨树生产上最为重要的病害之一。该病长期以来普遍发生,已成为制约我国梨果生产的一个主要因素^[2-3]。有报道表明梨黑腐皮壳菌(*Valsa ambiens*)、苹果黑腐皮壳梨变种(*Valsa mali* var. *pyri*)、*Valsa ceratosperma*)均可引起梨树腐烂病^[4-7]。周玉霞等^[8],对中国 15 个省(市)梨产区分离获得的 168 份梨树腐烂病菌分离株进行了序列系统进化分

析,认为中国梨树腐烂病病原菌为(*Valsa mali* var. *pyri*)。目前关于梨树腐烂病的研究主要集中在生物特性方面,对其致病机理和梨树的抗病机制尚不清楚。笔者从疑似腐烂病的‘黄金梨’枝条上采用组织分离法获得腐烂病原菌株,并采用 rDNA-ITS 序列分析和形态学相结合的方法对其进行鉴定,并选取 8 个山东地区的梨种质资源进行致病性检测,确定该病原菌为梨腐烂病的病原,为后期进行梨种质资源抗病性筛选,选育抗病品种提供依据并奠定基础。

收稿日期:2018-11-05

接受日期:2018-12-18

基金项目:山东省自然科学基金(ZP2018PC025);国家梨产业技术体系(CARS-28-36);山东省农业良种工程(2016LZGC034);“十二五”农村领域国家科技计划(2014BAD16B03-4);泰安市发展计划(2017NS0099)

作者简介:董冉,女,助理研究员,博士,研究方向为果树植物保护。Tel: 13853847913, E-mail: dryan2011@163.com

*通信作者 Author for correspondence. Tel: 0538-8298262, E-mail: sdipwsm@163.com

1 材料和方法

1.1 样品采集

采集具有腐烂病症状的‘黄金梨’枝条样品采自山东省果树研究所天平湖基地梨园。

1.2 病原菌的分离及形态特征观察采用组织分离法

先用 70% (φ, 后同) 乙醇表面消毒具有腐烂病症状的‘黄金梨’枝条, 再用灭菌的解剖刀在病健交界处切下 3 mm × 5 mm 的组织块, 用 75% 乙醇处理 30 s, 再用 0.1% 氯化汞消毒处理 40 s, 最后用无菌水冲洗干净后置于 PDA 培养基上, 25 °C 下暗培养 3 d, 挑取单个菌落菌丝, 转移到新的 PDA 平板培养基上, 25 °C 下暗培养 6 d, 保存得到的纯菌株, 观察并记录菌落形态学特征, 挑取分生孢子进行显微形态观测并记录孢子的形状大小。

1.3 DNA 提取和 PCR 扩增

真菌总 DNA 提取采用 OMEGA 公司试剂盒, 提取的 DNA 溶解后于 -20 °C 贮存备用。以菌丝总 DNA 为模板, 对 ITS 区进行扩增, 以 ITS1(5' - CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA - 3')、ITS4(5' - TCCTCCGCTTATTGATATGC - 3')为引物(由上海生物工程技术有限公司合成)。25 μL PCR 反应体系: 2.5 μL 10 × PCR buffer(2.50 mmol · L⁻¹, 含 Mg²⁺)、2.00 μL d NTPs(2.50 mmol · L⁻¹)、0.50 μL ITS1(10.00 μmol · L⁻¹)、0.50 μL ITS4(10.0 μmol · L⁻¹)、0.75 μL DNA 模板、0.25 μL(5.00 U · μL⁻¹) Taq 酶、18.50 μL 灭菌水。PCR 扩增反应在 BIO - RAD S1000 TM PCR 扩增仪上进行。PCR 反应条件为: 94 °C 5 min; 94 °C 45 s, 52 °C 1 min, 72 °C 1 min, 30 个循环; 72 °C 延伸 10 min。PCR 产物由 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测, PCR 产物回收纯化后与 pMD18-T 载体连接, 转化感受态细胞(大肠杆菌 DH5α), 挑取阳性克隆送上海生物工程技术有限公司进行测序。

1.4 序列分析及构建系统发育树

序列分析及构建系统进化树所得序列在国际核酸数据库(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>)中进行同源序列搜索。将分离菌株序列用 ClustalX 软件进行多个序列比对, 并与 Gen Bank 中的相关序列进行同源性比较, 然后用 MEGA 6.0 软件中邻位加入(neighbor-joining, 简称 NJ)构建系统发育树。

1.5 致病力测定

选用 8 个梨品种的 1 a(年)生枝条, 用清水洗净晾干, 再用酒精消毒并晾干, 剪成 30 cm 长小段, 两端用石蜡封口。用直径为 5 mm 打孔器在枝条上去皮后, 接种 5 mm 的菌块, 同时用接种空白 PDA 培养基的枝条作为对照, 保鲜膜覆盖保湿, 每个枝条上接种 3 个点, 设置重复 3 次, 7 d 观察病斑, 测量病斑直径, 并记录发病情况。

病斑平均直径法(以下简称 AD 法): 划分各梨种质的抗性等级。AD = Σ 接种点病斑直径 / 接种点数。抗性分级标准: 免疫(I)为 AD = 0.5 cm; 高抗(HR)为 0.5 cm < AD ≤ 1 cm; 抗病(R)为 1 cm < AD ≤ 2 cm; 感病(S)为 2 cm < AD ≤ 5 cm; 高感(HS)AD > 5 cm。

2 结果与分析

2.1 病原菌形态特征

从采集的样品中分离纯化的菌株, 编号为 Va1, PDA 培养基上培养, 初期为白色羽毛状, 有少量气生菌丝, 5 d 后开始分泌色素使 PDA 培养基呈现黄褐色(图 1-A)。菌株在 PDA 培养基上培养 20 d 后, 可见菌丝中间出现黑色分生孢子团(图 1-B), 40 × 10 倍的显微镜下观察, 菌丝无色、具有隔膜和分枝, 分生孢子梗(图 1-D), 分生孢子为香蕉形, 单胞、无色、大小均匀(图 1-C)。

2.2 序列分析和构建系统进化树

以纯培养物总 DNA 为模板, ITS1、ITS4 为引物, 经 PCR 扩增, 获得大小为 549 bp 的 rDNA-ITS 基因片段。NCBI Blast 搜索结果表明, 该片段与腐烂病原菌的同源性在 99% 以上。在 NCBI 搜索结果中, 选取常见的腐烂病原菌 *Valsa mali* strain 78-1-1 (Gen Bank 编号为 GQ934362.1)、*Valsa mali* strain SXP1 (Gen Bank 编号为 GQ337612.1)、*Valsa mali* var. *mali* isolate JQYMP08 (Gen Bank 编号为 GQ337612.1)、*Valsa ceratosperma* strain 293 (Gen Bank 编号为 GQ877484.1)、*Valsa ceratosperma* strain 8-1 (Gen Bank 编号为 GQ 454350.1) 以及 *Valsa mali* var. *pyri* strain LF035 (Gen Bank 编号为 GQ 196253.1), 采用 Clustal X 软件多序列比对后用 MEGA 6.0 软件构建系统进化树, 结果显示, 从染病梨果实分离的腐烂病菌株与 *Valsa mali* strain 78-1-1 (Gen Bank 编号为 GQ934362.1) 聚在同一分支上

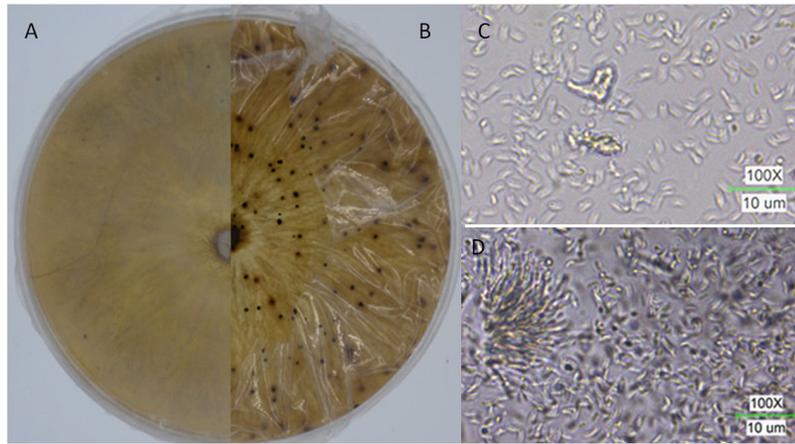


图1 Va1 菌落形态及分生孢子、分生孢子梗

Fig. 1 The conidium、conidiophores and colony morphology of Va1 isolate

(图2)。据此,将该腐烂病原菌鉴定为梨腐烂病菌。

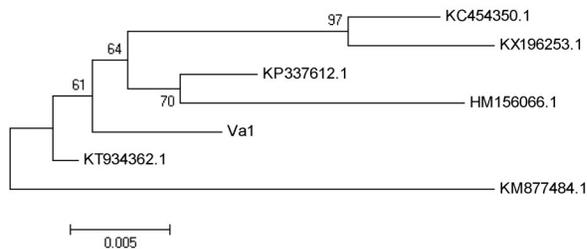


图2 梨腐烂病原菌基于 rDNA-ITS 序列的系统发育树
Fig. 2 phylogentic tree of pear valsa canker pathogen and high homology pathogen based on rDNA-ITS datasets

2.3 致病性验证

为了进一步研究分离得到的病原菌的致病力,选取了山东地区的8个梨种质,进行枝条接种,对照为空白PDA培养基,根据接种7 d后测量病斑直径,结果显示‘乐陵棠梨’‘龙口甜香水’的表现抗病,平均病斑直径小于2 cm。‘阳信小把梨’‘蓬莱短把梨’平均病斑直径大于5 cm表现为高度感病,而‘冬果梨’‘昌邑金秋’‘乐陵大面梨’‘疙瘩梨’等病斑直径在2~5 cm,表现为感病(表1)。

3 讨论

由于自然界中存在的病原菌种类繁多,有些病原菌的分生孢子的大小、形态相似。Abang等^[9]和Du等^[10]认为,通常仅根据形态学特征、单以分生孢子的形态学特征,对病原菌进行鉴定分类是不恰当的。病原真菌 rDNA-ITS 序列可提供大量信息来进行真菌种间的分子研究,相对传统的形态学鉴定方法,以 PCR 为基础的 rDNA-ITS 分子检测技术,具

表1 Va1 菌株对8个梨品种的致病力检测

Table 1 Pathogenicity of the Va1 isolate on eight varieties of pear

编号 Number	梨品种 Pear cultivar	平均病斑直径 Average diameter of the lesion/cm	抗性鉴定 Identification of resistance
1	乐陵棠梨 Laoling tangli	1.06	抗病 Resistant
2	龙口甜香水 Longkou tianxiangshui	1.33	抗病 Resistant
3	冬果梨 Dongguoli	2.10	感病 Suiceptible
4	阳信小把梨 Yangxin xiaobali	5.02	高感 High suiceptible
5	蓬莱短把洋梨 Penglai duanbayangli	6.02	高感 High suiceptible
6	昌邑金秋 Changyi jinqiu	2.21	感病 Suiceptible
7	乐陵大面梨 Laoling damianli	3.90	感病 Suiceptible
8	疙瘩梨 Gedali	2.44	感病 Suiceptible

有特异性强、灵敏度高、重复好、受外界因素影响较小等特点,可保证鉴定结果的可靠性^[11]。

本研究采用室内打孔接种的方法,研究分离得到梨腐烂病对不同梨种质资源的致病性。接种病原菌后病斑长度是腐烂病致病力的一个重要方面。但由于病原菌致病机制尚不清楚,影响因素复杂多样,如不同品种之间落皮层形成差异、愈伤组织形成能力差异及一些生理生化反应的机制,都可能造成腐烂病对树体的致病力差异。因此本研究只是确定分离得到的梨腐烂病菌对梨树种质具有致病性。

综上所述,本研究对来源于山东泰安梨树品种上的腐烂病菌分离株,通过PDA培养基上病原菌的形态学观察、rDNA-ITS 基因序列分析以及离体梨树枝条致病力测定,通过室内鉴定方法检测致病性

及品种抗性, 鉴定条件比较统一, 这也为后续检测更多梨种质资源, 从而筛选抗病种质和感病种质奠定了基础。

参考文献 References:

- [1] 张绍铃, 周应恒. 2012 年度梨产业发展趋势与建议[J]. 中国果业信息, 2012, 29(2): 25-27.
ZHANG Shaoling, ZHOU Yingheng. Pear industry trends and recommendations for 2012 [J]. Chinese Fruit Industry Information, 2012, 29(2): 25-27.
- [2] RUMBOS I C. *Cytospora* canker on pear trees in Greece[J]. Plant Pathology, 2010, 36(3): 407-410.
- [3] WANG X, WEI J, HUANG L, WANG X, WEI J, HUANG L, KANG Z. Re-evaluation of pathogens causing *Valsa* canker on apple in China [J]. Mycologia, 2011, 103(2): 8.
- [4] TANAKA T. New Japanese fungi Notes and translations[J]. Mycologia, 1919, 11: 148-154.
- [5] TOGASHI K. Some studies on a Japanese apple canker and its causal fungus, *Valsa mali*[J]. Journal of the College of Agriculture, 1924, 12: 265-324.
- [6] WATERMAN A M. Canker and dieback of poplars caused by *Dothichiza populea* [J]. Forest Science, 1957, 3(2):175-183.
- [7] WU Y X, LIU Q, XU C N, CHI F M, DING Y J, CAO K Q, ZHOU Z S. Investigation on apple *Valsa* canker in Western Liaoning province[J]. China Fruits, 2010, 6: 63-65.
- [8] 周玉霞, 张美鑫, 翟立峰, 杨晓平, 曹素芳, 洪霓. 梨和苹果腐烂病菌不同培养表型菌株的致病性分析[J]. 植物病理学报, 2014, 44(2):217-220.
ZHOU Yuxia, ZHANG Menxin, ZHAI Lifeng, YANG Xiaoping, CAO Sufang, HONG Ni. Pathogenicity analysis of different phenotypic strains of pear and apple rot pathogens[J]. Acta Phytopathologica Sinica, 2014, 44(2):217-220
- [9] ABANG M M, WINTER S, GREEN K R, HOFFMANN P, MIGNOUNA H D, WOLF G A. Molecular identification of colletotrichum gloeosporioides causing yam anthracnose in nigeria[J]. Plant Pathology, 2002, 51: 63-71.
- [10] DU M, SCHARDL C L, NUCKLES E M, VAILLANCOURT L J. Using mating-type gene sequences for improved phylogenetic resolution of *Collectotrichum* species complexes [J]. Mycologia, 2005, 97(3): 641-658.
- [11] 吴良庆, 朱立武, 衡伟, 叶振风, 刘刚, 史苏湘. 砀山梨炭疽病原鉴定及其抑菌药剂的筛选[J]. 中国农业科学, 2010, 43(18): 3750-3758.
WU Liangqing, ZHU Liwu, HENG Wei, YE Zhenfeng, LIU Gang, SHI Suxiang. Identification of the pathogen of alfalfa anthracnose and screening of antibacterial agents[J]. Sciences Agricultural Sinica, 2010, 43(18): 3750-3758.