

澳洲坚果褐腐病的病原菌鉴定及生物学特性

蒋桂芝, 何双凌, 岳海, 陶亮*, 贺熙勇*

(云南省热带作物科学研究所, 景洪 666100)

摘要 对云南景洪发生的澳洲坚果果实褐斑病进行了病原菌分离鉴定和生物学特性研究。经致病性测定、形态学和分子生物学鉴定,病原菌为 *Calonectria pentaseptata*。生物学特性研究表明,该菌菌丝生长的适温为 25~30℃,孢子萌发的适温为 20~25℃,光照对菌丝生长影响不明显,紫外光对分生孢子的萌发有显著影响,不同的糖溶液可促进分生孢子的萌发。

关键词 澳洲坚果; 果实腐烂; *Calonectria pentaseptata*

中图分类号: S 436.64 **文献标识码:** A **DOI:** 10.16688/j.zwbh.2019158

Identification and biological characteristics of the pathogen causing macadamia fruit brown rot

JIANG Guizhi, HE Shuangling, YUE Hai, TAO Liang*, HE Xiyong*

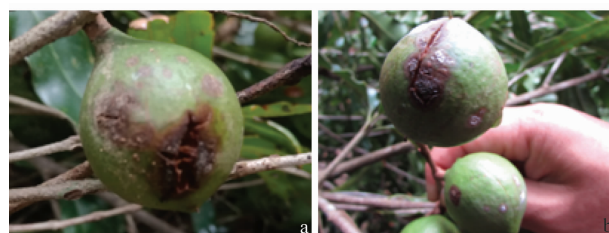
(Yunnan Institute of Tropical Crops, Jinghong 666100, China)

Abstract The pathogen causing macadamia nut brown spot disease in Jinghong, Yunnan province was isolated and identified and their biological characteristics were studied. The pathogen was identified as *Calonectria pentaseptata* by pathogenicity test, morphology and molecular biology. The study of biological characteristics showed that the suitable temperature for mycelium growth was 25—30℃, and the suitable temperature for spore germination was 20—25℃. The light condition had no obvious effect on mycelium growth. Ultraviolet light had significant effect on conidial germination. Different sugars could promote conidial germination.

Key words macadamia; disease; *Calonectria pentaseptata*

澳洲坚果 *Macadamia* sp., 又称夏威夷果、澳洲胡桃等,是世界公认的名贵食用干果和木本油料,被誉为“坚果之王”。据报道,截至 2015 年我国澳洲坚果种植面积达到 12.78 万 hm^2 ,占世界种植面积的 57.51%^[1]。我国澳洲坚果产业起步较晚,至 2008 年才迅速发展,目前种植较早的果园逐渐进入丰产期,随着果园种植时间的增加,病虫害发生日趋严重,种类也在不断变化、增加。2018 年 6 月,在景洪景哈澳洲坚果果园发现未成熟果大量脱落,严重的落果达到 50% 以上。新鲜落果和树上病果的症状表现为:果皮上有褐色病斑,呈水渍状,病斑边界清晰,有的病斑上有白色霉状物(图 1a),与炭疽菌引起的症状明显不同,将此病害暂定为澳洲坚果果实褐斑病。采集症状典型的病果带回实验室,在室内对病果表面霉状物进行镜检,同时进行病原菌的分

离鉴定和病原菌的生物学特性研究,现将结果进行报道。



a: 田间自然发病症状; b: 活体接种症状
a: Disease symptoms in the field; b: Disease symptoms after inoculation

图 1 田间与接种感病症状

Fig. 1 Disease symptoms in the field and after inoculation

1 材料和方法

1.1 材料

病原菌分离材料:来源于云南省热带作物科学

收稿日期: 2019-04-01 修订日期: 2019-06-12

基金项目: 云南省热带作物科技创新体系建设(RF2019-10)

* 通信作者 E-mail:陶亮 basanyeyu@vip.sina.com;贺熙勇 heda0691@163.com

研究所景哈澳洲坚果试验基地,采集症状典型的病果作为病原菌分离标本。

PDA 培养基:马铃薯 200 g,葡萄糖 20 g,琼脂粉 17 g,水 1 000 mL。

真菌菌丝 DNA 快速抽提试剂盒、ITS1/ITS4^[2]、HIS3^[3]、TEF1- α ^[4-5]、 β -tubulin T1/T22^[6-7]等 PCR 扩增引物,由生工生物工程(上海)技术服务有限公司合成。

试验接种材料:澳洲坚果未成熟果实,由云南省热带作物科学研究所澳洲坚果研究中心提供。

1.2 方法

1.2.1 病果上霉状物镜检

用牙签挑取病果表层霉状物少许,放在载玻片上,加灭菌水,盖上玻片,在显微镜下观察霉状物的形态特征。

1.2.2 病原菌的分离、致病性的测定

病原菌分离:将病果用自来水清洁后,用 75%乙醇表面消毒处理 30 s 后,取病健交界处组织 3~4 mm 分别放置在 PDA 培养基平板上 25℃下培养 5 d,将得到的菌落进行单孢分离,得到纯培养菌株用于致病性试验,并将菌株与病果上镜检结果进行比对。

致病性测试:将纯培养 10 d 的菌株孢子制成浓度为 1×10^6 个/mL 的孢子悬浮液备用。在果园选取 20 个正常未成熟果,10 个作为处理分别用微喷壶在每个果上喷 1 mL 孢子悬浮液;10 个为对照分别接种无菌水 1 mL。在 20~28℃温度下,用保鲜袋对果实进行保湿处理,3 d 后去除保鲜袋。处理 7~10 d,从被感染的果实组织中分离真菌,确认是否为病原菌。

1.2.3 病原菌鉴定

1.2.3.1 形态学鉴定

将纯培养病原菌在 PDA 培养基上培养 5~7 d,观察形态特征、产孢方式等,依据 Lombard、Li 等^[8-9]的方法进行鉴定。

1.2.3.2 分子生物学鉴定

菌株总基因组 DNA 采用快速抽提试剂盒提取后,分别用 4 对引物 ITS1/ITS4, HIS3, TEF1- α , β -tubulin T1/T22 进行 PCR 扩增,扩增产物由生工生物工程(上海)技术服务有限公司完成测序,最后将获得的 ITS、HIS3、TEF1- α 、TUB2 序列上传至 GenBank 数据库,并与 GenBank 数据库中有关序列进行同源性比较,通过 MEGA7 软件构建 rDNA-ITS-HIS-TEF-TUB 序列多基因联合系统发育树,

确定其分类地位。

1.2.4 生物学特性测定

1.2.4.1 温度对菌丝生长和孢子萌发的影响

1) 菌丝生长:将纯培养菌株用打孔器打成直径 5 mm 的菌块,接种在 PDA 平板上,分别置于 5、10、15、20、25、30、35、40℃,RH 80%,黑暗条件下进行恒温培养,5 d 后采用“十字交叉法”测定菌落生长直径,每处理 4 次重复,依据菌落生长情况确定病原菌的适宜温度。

2) 分生孢子萌发:采用悬滴法,将分生孢子制成 2.0×10^5 个/mL 的孢子悬浮液,分别在凹玻片凹面滴入 500 μ L 孢子悬浮液,然后凹玻片放入培养皿内保湿,再将培养皿分别置于 10、15、20、25、30、35℃,RH 80%的条件 10 h,观察孢子的萌发率,每处理重复 3 次。

1.2.4.2 光照条件对菌丝生长的影响

将直径为 5 mm 的菌饼接种在 PDA 培养基平板后,分别置于连续光照、12 h 光暗交替和全黑暗 3 种处理,在 25℃、RH 80%的培养箱中培养 5 d,测定菌落生长直径,每处理重复 3 次。

1.2.4.3 紫外光对分生孢子萌发的影响

采用悬滴法,用灭菌水将分生孢子制成 2.0×10^5 个/mL 的孢子悬浮液,放到无菌凹面载玻片上,然后分别置于 40 W 紫外灯下 50 cm 的距离照射 0、5、10、15、20、25、30 min,然后在 25℃条件下用无菌培养皿保湿,10 h 观察孢子的萌发率。每处理重复 3 次。

1.2.4.4 糖溶液对分生孢子萌发的影响

用浓度为 1%的葡萄糖、蔗糖、果糖、乳糖、麦芽糖溶液分别配成 2.0×10^5 个/mL 孢子悬浮液,然后在凹玻片每个凹面滴入 0.5 mL 孢子悬浮液,以蒸馏水为对照,在 25℃、RH 80%的培养箱中培养 10 h,检查孢子萌发率,每处理重复 3 次。

1.2.5 试验数据处理

试验数据用 SPSS 21 软件处理分析,使用 Duncan(D)法。

2 结果与分析

2.1 病果上霉状物镜检

在 20 倍显微镜下观察,霉状物为大型分生孢子,圆柱形,两端圆,(75~100) μ m $\times$ (6.0~10) μ m,有 5 个隔,未见小型分生孢子。

2.2 病原菌的分离、致病性的测定

分离样本 15 个,得到 15 个菌落。经观察菌落和分生孢子形态初步鉴定,15 个菌落均为同一种真菌,分生孢子形态与病果上霉状物镜检结果一致。单孢分离后,得到纯培养菌株编号为 OJ20180629。

2018 年 7 月 10 日进行致病性测定。接种处理 3 d 除去保鲜袋,接种孢子悬浮液的果实上开始出现点状水渍病斑,5 d 时病斑已扩大变成褐色,病斑边缘呈水渍状,7 d 时较大的病斑上有裂缝出现,有的病斑上开始出现白色霉状物,10 d 时的症状与田间一致(图 1b);对照无症状。从有症状的果实中重新分离到与接种一致的真菌,确认菌株 OJ20180629 对澳洲坚果果实有致病性。

2.3 病原菌鉴定

2.3.1 形态鉴定

菌株 OJ20180629 菌落近圆形,在 PDA 培养基上生长较慢,25℃ 时日平均生长量 5.95 mm,菌丝绒

毛状,初期为白色,逐渐变为红棕色,背面红褐色至深红棕色(图 2 a)。在 PDA 培养基上产生大量的分生孢子。大型分生孢子梗由总梗、扫帚状可育分枝、伸延梗和顶生囊泡组成(图 2 b)。总梗透明,平滑(50~100)μm×(6~9)μm;伸延梗有隔,直或弯曲,长 190~420 μm,宽 3~7 μm,顶端有隔,终止于棍棒状的囊泡(图 1 c),直径 2~6 μm。扫帚状可育分枝上孢子梗长 50~96 μm,宽 6~9 μm;1 级分支 0~1 隔,(15~30)μm×(3~7)μm;2 级分支 0~1 隔,(16~30)μm×(4~7)μm;3 级分支无隔,(14~22)μm×(4~6)μm,每个末端分支产生 1~3 瓶梗,圆柱形到肾状的瓶梗,单生时倒梨形,透明,无孔,(14~25)μm×(2~6)μm(图 2 d,e)。大分生孢子圆柱形,两端圆,(75~101)μm×(6~10)μm,有 3~7 隔,多数为 5 隔(图 2 f),由无色黏液平行聚集成束。基于这些形态特征,OJ20180629 鉴定为五隔大无性孢丽赤壳菌 *Calonectria pentaseptata*。

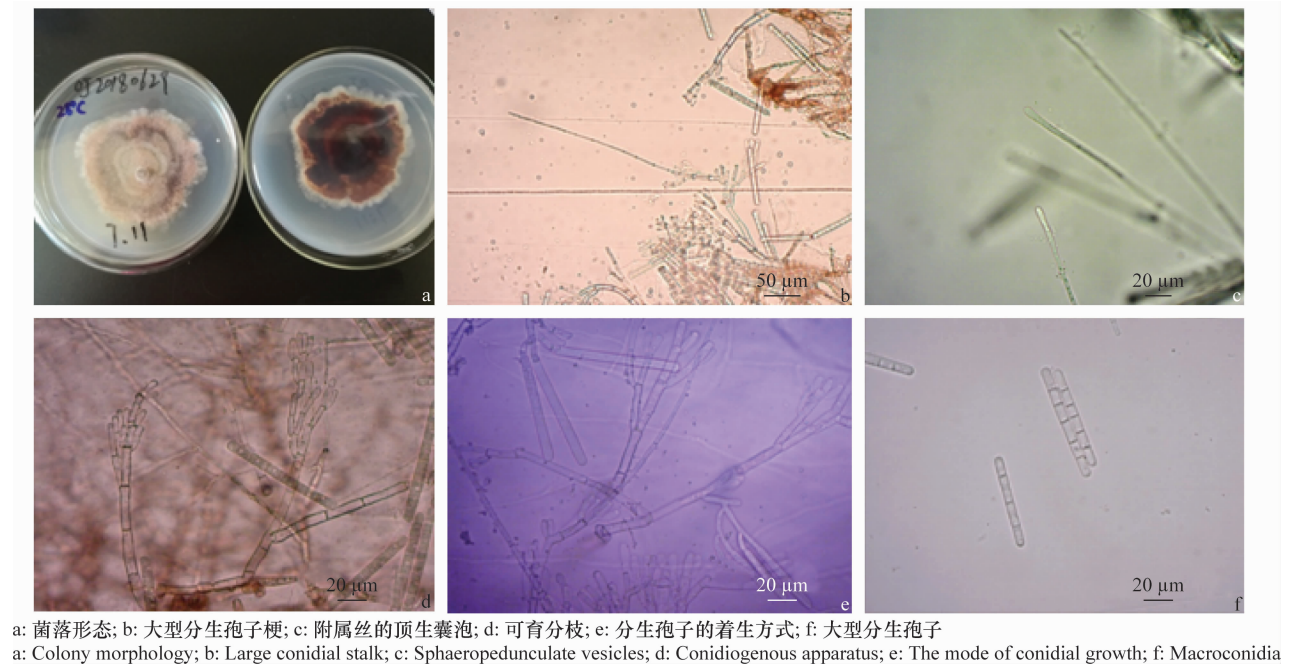


图 2 菌株 OJ20180629 的形态特征

Fig. 2 Morphological characteristics of OJ20180629

2.3.2 分子生物学鉴定

从 OJ20180629 菌丝体中提取 DNA 基因组,通过 4 对引物 ITS1/ITS4, HIS3, TEF-1α, β-tubulin T1/T22 等进行 PCR 扩增、测序,获得 531 bp ITS、428 bp HIS3、496 bp TEF-1α、561 bp TUB2 片段,登录号分别为 MH794284、MH794286、MH794285、

MH794287。在 NCBI 网站上进行同源性比较,通过 BLAST 搜索核酸数据库显示,与已报道 *Ca. pentaseptata* 中的 JX855950.1、MF442744.1、MF442859.1 和 MF443074.1 序列相似性分别为 99%、100%、100% 和 100%。通过 MEGA7 软件构建菌株 OJ20180629 的 ITS-TEF-TUB 多基因联合与近缘

种的系统发育树,结果显示 OJ20180629 与 *Ca. pentaseptata* 培养型模式菌株 CBS 133349 位于同一分枝,支持率为 100%(见图 3)。

形态学和分子鉴定分析表明病原菌 OJ20180629 是 *Calonectria pentaseptata*。

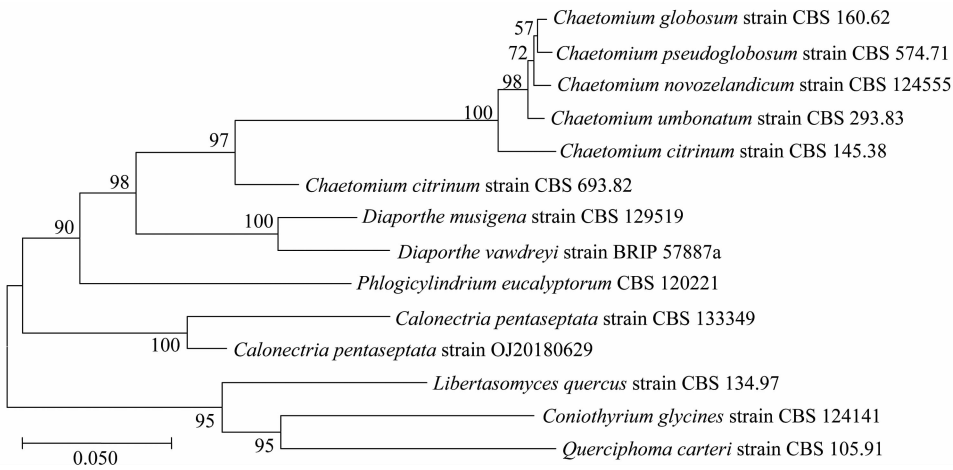


图 3 基于 ITS-TEF1-TUB2 序列构建的菌株 OJ20180629 与近源物种的系统发育树
Fig. 3 Phylogenetic relationships of the pathogenic fungus OJ20180629 and other relative species based on ITS-TEF1-TUB2 sequences

2.4 生物学特性测定

2.4.1 温度对菌丝生长和孢子萌发的影响

1) 菌丝生长:经过 5 d 培养,得到不同温度下菌落的平均生长量,见表 1。菌株 OJ20180629 的菌丝生长温度范围为 10~35℃,适宜温度为 25~30℃,10℃以下和 40℃以上不适宜生长,表明该菌适宜生长温度范围广。

表 1 温度对菌株 OJ20180629 菌丝生长的影响¹⁾
Table 1 Effects of temperature on mycelial growth of strain OJ20180629

温度/℃ Temperature	菌落直径/mm Mycelial growth
5	(0.0±0.0)E
10	(1.0±0.16)E
15	(10.2±0.50)D
20	(23.4±0.26)B
25	(29.0±0.60)A
30	(29.6±0.80)A
35	(12.6±0.84)C
40	(0.0±0.0)E

1) 表中数据为平均值±标准差。同列数据后不同大写字母表示在 0.01 水平差异显著。下同。
Data in the table are mean±SD. Different capital letters indicate significant difference at 0.01 level. The same below.

2) 分生孢子萌发:处理 10 h 观察孢子的萌发率结果见表 2。表 2 显示,菌株 OJ20180629 孢子萌发的温度为 15~30℃,适宜温度为 20~25℃,25℃时

孢子萌发率最高,15℃以下和 35℃以上孢子不能萌发。

表 2 温度对菌株 OJ20180629 孢子萌发的影响
Table 2 Effects of temperature on spore germination rate of strain OJ20180629

温度/℃ Temperature	孢子萌发率/% Spore germination rate
10	(0.0±0.0)E
15	(1.0±0.2)E
20	(31.4±0.6)B
25	(54.2±0.9)A
28	(16.1±2.1)C
30	(5.2±0.4)D
35	(0.0±0.0)E

2.4.2 光照条件对菌丝生长的影响

培养 7 d,菌落生长情况见表 3。全光照、12 h 光、暗交替、全暗等 3 种处理间无显著差异,即光照条件对菌丝生长影响不明显。

表 3 光照条件对菌株 OJ20180629 菌丝生长的影响
Table 3 Effects of illumination on mycelial growth of strain OJ20180629

处理 Treatment	菌落直径/mm Mycelial growth
全光照 Full light	(30.5±1.77)A
12 h 光、暗交替 12 h light and dark alternation	(28.6±2.71)A
全暗 Dark	(28.3±2.86)A

2.4.3 紫外光对分生孢子萌发的影响

处理后 10 h 观察孢子的萌发结果见表 4。紫外光对分生孢子的萌发有显著影响,随着紫外光照时间的延长,分生孢子的萌发率显著降低,紫外光照至 20 min 以上时分生孢子不能萌发,说明分生孢子对紫外光较敏感。

表 4 紫外光对菌株 OJ20180629 孢子萌发的影响
Table 4 Effects of ultraviolet light on spore germination of strain OJ20180629

时间/min Time	孢子萌发率/% Spore germination rate
0	(54.2±0.9)A
5	(4.5±0.36)B
10	(2.1±0.28)C
15	(0.25±0.50)D
20	(0.0±0.0)E
25	(0.0±0.0)E

2.4.4 糖溶液对分生孢子的萌发影响

在 25℃、RH 80%的培养箱中培养 10 h,分生孢子的萌发率见表 5。1%糖溶液可以提高分生孢子的萌发率,即可促进分生孢子的萌发,其中以葡萄糖的促进效果最好,以后依次为麦芽糖、蔗糖、乳糖、果糖。

表 5 1%糖溶液对菌株 OJ20180629 孢子萌发的影响
Table 5 Effects of 1% sugar solution on spore germination of strain OJ20180629

1%糖 1% sugar	孢子萌发率/% Spore germination rate
果糖 Fructose	(59.3±0.58)E
蔗糖 Sucrose	(66.3±0.58)C
葡萄糖 Glucose	(95.3±0.58)A
乳糖 Lactose	(64.3±0.58)D
麦芽糖 Maltose	(81.0±1.00)B
CK	(55.3±1.15)F

3 讨论

由五隔大无性孢丽赤壳菌 *Ca. pentaseptata* 引起澳洲坚果果实褐斑病属首次报道。由 *Ca. pentaseptata* 引起植物病害的报道不多见,目前报道在桉树、澳洲坚果^[10]和红千层、千层金^[11]等植物叶片上分离到,是桉树焦枯病的病原菌之一。对 *Ca. pentaseptata* 生物学特性的研究表明,该菌菌丝的生长温度范围广,为 10~35℃,孢子萌发的温度为 15~30℃,光照条件对菌丝生长影响不明显,但紫外光对分生孢子的萌发有显著影响,糖可促进分生孢子的萌发。在调查病害时发现,果园荫蔽度大,湿度大,

阳光很少能直射到地面,并且果实虫蛀率在 5%~10%左右,基于果园内的环境条件和病原菌的生物学特性,建议对澳洲坚果褐斑病的防治首先应采用农业措施——修枝整形,降低果园的荫蔽度,让紫外光穿过树冠照进果树内堂,同时降低果园内湿度,可抑制病原菌孢子的萌发;其次,对病害进行监测,在出现利于病害发生的天气条件时先进行预防喷施保护剂,必要时再使用杀菌剂进行防治。

参考文献

[1] 贺熙勇,陶亮,柳颢,等. 国内外澳洲坚果产业发展概况及趋势[J]. 中国热带农业,2017,74(1):4-11.

[2] WHITE T J, BRUNS T, LEE S, et al. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenies [M]// INNIS M A, GELFAND D H, SNINSKY J J. PCR protocols: a guide to methods and applications. San Diego: Academic Press,1990:315-322.

[3] GLASS N L, DONALDSON G C. Development of primer sets designed for use with the PCR to amplify conserved genes from filamentous ascomycetes [J]. Applied and Environment Microbiology,1995,61(4): 1323-1330.

[4] CARBONE I, KOHN L M. A method for designing primer sets for speciation studies in filamentous ascomycetes [J]. Mycologia,1999,94(3): 553-556.

[5] DONNELL K O, KISTLER H C, CIGELNIK E, et al. Multiple evolutionary origins of the fungus causing Panama disease of banana: concordant evidence from nuclear and mitochondrial gene genealogies [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1998, 95(5):2044-2049.

[6] ORBACH M J, PORRO E B, YANOFSKY C. Cloning and characterization of the gene for *beta*-tubulin from a benomyl-resistant mutant of *Neurospora crassa* and its use as a dominant selectable marker [J]. Molecular & Cellular Biology,1986, 6(7):2452-2461.

[7] CROUS P W, KANG J C, SCHOCH C L, et al. Phylogenetic relationships of *Cylindrocladium pseudogracile* and *Cylindrocladium rumohrae* with morphologically similar taxa, based om morphology and DNA sequences of internal transcribed spacers and *beta*-tubulin[J]. Canadian Journal of Botany, 1999, 77: 1813-1820.

[8] LOMBARD L, CROUS P W, WINGFIELD B D AND WINGFIELD M J. Phylogeny and systematics of the genus *Calonectria* [J]. Studies in Mycology, 2010 (66): 31-69.

[9] LI Jieqiong, WINGFIELD M J, LIU Qianli, et al. *Calonectria* species isolated from *Eucalyptus* plantations and nurseries in South China [J]. IMA Fungus, 2017,8(2): 259-286.

[10] CROUS P W, SHIVAS R G, WINGFIELD M J, et al. Fungal planet description sheets:128-153 [J]. Persoonia, 2012, 29(1): 146-201.

[11] 殷瑜. 广州地区丽赤壳属真菌的种类鉴定[D]. 广州:仲恺农业工程学院,2016.