

蓝国兵, 何自福, 罗方芳, 等. 霸王花褐腐病的病原鉴定[J]. 华南农业大学学报, 2014, 35(1): 60-63.

霸王花褐腐病的病原鉴定

蓝国兵^{1,2}, 何自福^{1,2}, 罗方芳¹, 汤亚飞¹, 余小漫¹, 杜振国¹

(1 广东省农业科学院 植物保护研究所, 广东 广州 510640; 2 广东省植物保护新技术重点实验室, 广东 广州 510640)

摘要:【目的】明确导致广东省霸王花 *Hylocereus undatus* 褐腐病的病原种类。【方法】通过病组织分离、致病性测定、形态学观察及rDNA序列分析等方法对广东省霸王花褐腐病病原进行了种类鉴定。【结果和结论】在 PDA 培养基上, 病原菌的菌落为深灰色, 绒毛状。产生 2 种类型的节孢子: 一种为浅色、薄壁的柱状孢子, 大小为 (5.00 ~ 10.69) μm × (2.61 ~ 4.52) μm; 另一种为褐色、厚壁、圆形或椭圆形、基部平截、成链的孢子, 大小为 (5.15 ~ 12.39) μm × (3.87 ~ 6.07) μm。应用真菌通用引物 ITS1 和 ITS4 进行 PCR, 获得该病原菌 579 bp 的 18S-28S rDNA ITS 序列。BLAST 结果显示, 该序列与 *Neoscytalidium dimidiatum* 火龙果菌株的 18S-28S rDNA ITS 序列相似性最高, 为 99% ~ 100%。这些研究结果表明, 引起广东省霸王花褐腐病的病原菌为 *N. dimidiatum*。

关键词:霸王花; 褐腐病; 病原鉴定
中图分类号:S436.418.11 **文献标志码:**A **文章编号:**1001-411X(2014)01-0060-04

Identification of the pathogen causing brown rot of
Hylocereus undatus

LAN Guobing^{1,2}, HE Zifu^{1,2}, LUO Fangfang¹, TANG Yafei¹, SHE Xiaoman¹, DU Zhenguo¹
(1 Institute of Plant Protection, Guangdong Academy of Agricultural Sciences, Guangzhou 510640, China;
2 Guangdong Provincial Key Laboratory of High Technology for Plant Protection, Guangzhou 510640, China)

Abstract:【Objective】To confirm the pathogen species that caused brown rot disease on *Hylocereus undatus*. 【Method】Diseased tissue isolation, indoor pathogenicity test, morphological observation and rDNA sequence analysis were used to confirm the pathogen species. 【Result and conclusion】The colonies of the fungus were dark grey and fluffy on potato dextrose agar (PDA) medium. Two kinds of arthrospore were observed on PDA medium. One was columnar conidium with light-colored, thin-walled and (5.00 – 10.69) μm × (2.61 – 4.52) μm in size, and the other was chained conidium with dark brown, thick-walled, circular or oval, base truncate and (5.15 – 12.39) μm × (3.87 – 6.07) μm in size. Using PCR with primers ITS1 and ITS4 for internal transcribed spacer (ITS) sequences of fungal 18S-28S rDNA, the sequence was cloned to be 579 bp in length. The BLAST results showed that the sequence had the highest sequence identity with that of *Neoscytalidium dimidiatum* strains isolated from pitahaya (99% – 100%). These results indicated that night-blooming cereus brown rot in Guangdong was caused by *N. dimidiatum*.

Key words:*Hylocereus undatus*; brown rot; pathogen identification

收稿日期:2013-02-21 优先出版时间:2013-11-07
优先出版网址:<http://www.cnki.net/kcms/detail/44.1110.S.20131107.1611.019.html>
作者简介:蓝国兵(1984—),男,硕士,助理研究员,E-mail:languo020@163.com;通信作者:何自福(1966—),男,研究员,博士,E-mail:hezf@gdppri.com
基金项目:星火计划重点项目(2011GA780007);国际科技合作项目(2011DFB30040);广东省现代农业产业技术体系创新团队专项

霸王花 *Hylocereus undatus* (Haw.) Britt. et Rose 又名剑花、量天尺等,属仙人掌科量天尺属,分布于澳大利亚、美国以及我国广东、广西、福建、海南、台湾等地^[1-2]. 霸王花的花朵具有食用和药用价值,其花的加工产品在国内外市场十分畅销,主要用作汤料或蔬菜食用,具有强身健体、清补养生功效^[3]. 近年来,随着人工栽培面积的不断扩大,霸王花病害问题日益突出,严重地影响了霸王花的生产. 2011 年秋,在广东省台山市冲蒌镇的霸王花种植区暴发了一种新病害. 病株茎秆上先出现褐色近圆形病斑,病情发展较快,病斑扩大且数量不断增多,最终导致茎秆腐烂枯死. 为了弄清霸王花褐腐病的病原,为病害防治提供科学依据,本研究对引起霸王花褐腐病的病原进行了鉴定.

1 材料与方法

1.1 材料

霸王花褐腐病的病样采集于广东省台山市冲蒌镇. 观察所用显微镜型号为 ECLIPSE 90i 显微镜,尼康公司产品. 试验所用试剂主要购自 TaKaRa 公司,引物 ITS1 和 ITS4 合成于上海英俊生物技术有限公司.

1.2 病原菌分离、纯化和致病性测定

采用植物病原真菌病组织常规分离法^[4]进行病原菌分离. 菌株经单孢分离纯化后,保存于 PDA 斜面上,置于 4℃ 冰箱中保存备用. 采用菌丝块接种和孢子悬浮液注射接种 2 种方法,分别对分离菌株的致病性进行测定. 菌丝块接种方法为:将分离菌株 BWH-TS1 在 PDA 平板上活化,27℃ 培养 3 d 后用直径为 0.5 cm 的打孔器在菌落边缘打孔,然后将菌饼置于经清水洗净的健康霸王花茎秆上(用挑针造成微伤口),以 PDA 块做空白对照. 孢子悬浮液注射接种方法为:将菌株 BWH-TS1 在 PDA 平板上 27℃ 活化培养 7 d,然后用无菌水将孢子洗下,并配成浓度为 $1 \times 10^6 \text{ mL}^{-1}$ 的孢子悬浮液,用无菌注射器将 100 μL 的孢子悬浮液注射到健康的霸王花茎秆内,注射等量无菌水的健康植株为空白对照. 每处理 3 个重复,27℃ 黑暗保湿培养,接种后 3~15 d 观察发病情况,并对接种后发病的组织进行病原菌再分离.

1.3 病原菌鉴定

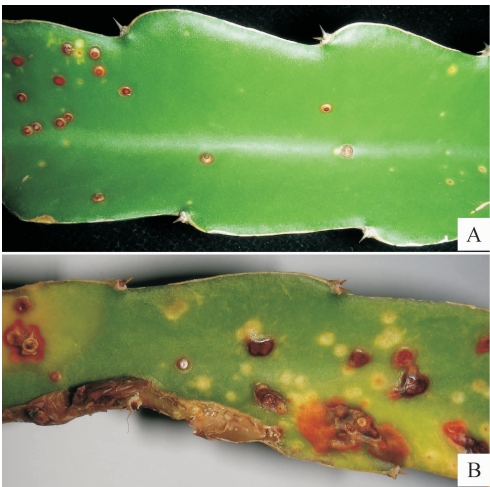
1.3.1 形态学观察 将待鉴定的病原菌株在 PDA 平板上活化,27℃ 培养 30 d,不定期观察菌落特征,包括菌落大小、颜色、分泌物和质地等,显微镜下观察产孢结构和孢子形态特征,并测量分生孢子大小. 根据真菌分类有关文献^[5-8]进行鉴定.

1.3.2 病原菌 rDNA-ITS 序列分析 CTAB 法^[9]提取病原菌菌株 BWH-TS1 基因组 DNA. 以真菌通用引物 ITS1 和 ITS4 进行 PCR 扩增^[10]. PCR 反应体系(50 μL):DNA 模板 1.5 μL (20~30 ng),引物 ITS1 (10 $\mu\text{mol/L}$) 和 ITS4 (10 $\mu\text{mol/L}$) 各 2 μL ,Premix Ex Taq[®] Version 2.0 25 μL (TaKaRa 公司), ddH₂O 19.5 μL . PCR 扩增程序:95℃ 预变性 6 min;94℃ 变性 30 s,55℃ 退火 30 s,72℃ 延伸 50 s,进行 35 个循环;最后 72℃ 延伸 10 min. 在质量浓度为 10 g/L 的琼脂糖凝胶上检测 PCR 结果,对 PCR 扩增获得的约 600 bp 特异片段进行克隆,送上海生工生物技术有限公司测序,并进行 BLAST 同源性比对.

2 结果与分析

2.1 霸王花病株田间症状

霸王花植株感病后,症状最初表现为茎秆表皮产生许多褪绿小病斑,15 d 左右病斑上形成近圆形黄褐色凸起小斑点,病斑直径大小 2~5 mm. 随着病情的发展,病斑不断增多,病斑不断扩大,甚至多个病斑连在一起形成更大的病斑,呈褐色或深褐色. 后期病斑连成一片,病斑组织腐烂,造成整条茎秆腐烂枯死(图 1).



A: 田间霸王花病株初期症状;B: 田间霸王花病株后期症状.

图 1 霸王花褐腐病的症状

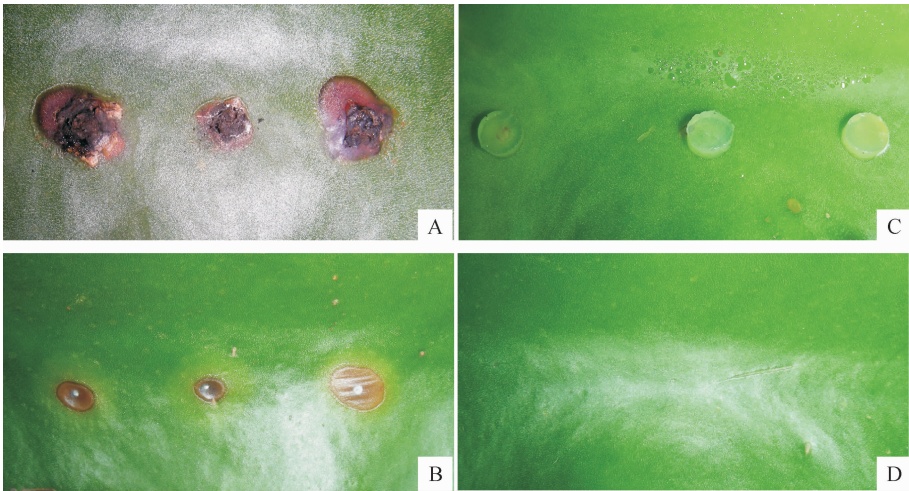
Fig. 1 Symptoms of plants caused by *Hylocereus undatus*

2.2 病原菌致病性测定结果

通过植物病原真菌常规病组织分离方法,分离获得 3 株形态一致的菌株,选取其中 1 株(菌株编号为 BWH-TS1)用于致病性测定. 将菌株 BWH-TS1 的菌丝块接种在用挑针造成微伤口的健康霸王花茎秆上,27℃ 条件下,3 d 后即能观察到水浸状的小病斑出现;病斑随后慢慢扩大,接种 15 d 后形成直径为

1.3 cm 左右褐色病斑,与田间症状相同,而对照没有表现症状(图 2). 菌株 BWH-TS1 孢子悬浮液注射接种在霸王花茎秆上,27 ℃ 条件下,3 d 后也出现水浸状的病斑,接种 7 d 后病斑扩展到 1.0 cm 左右,与病

害的田间后期症状基本一致,对照没有病症(图 2). 对接种后发病的组织进行再分离,均能获得与接种菌株形态一致的病原菌. 因此,菌株 BWH-TS1 为霸王花褐腐病的致病菌.



A: 菌丝接种 15 d 后的症状;B: 孢子悬浮液接种 7 d 后的症状;C、D: 空白对照.

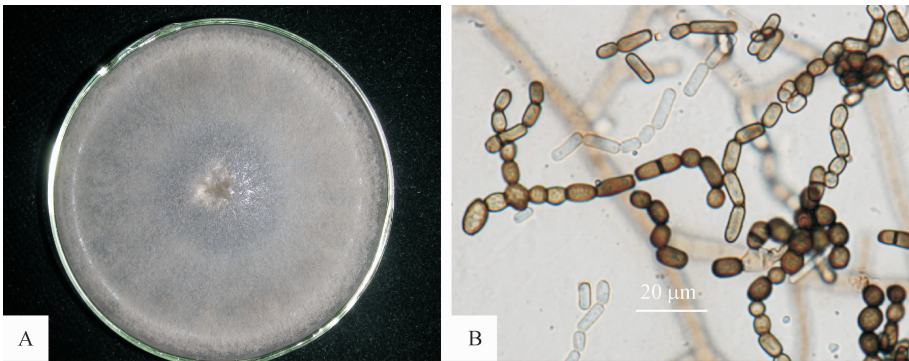
图 2 霸王花茎秆接种菌株 BWH-TS1 的症状

Fig. 2 Symptoms of the night-blooming cereus stem inoculated with strain BWH-TS1

2.3 病原菌形态学鉴定结果

在 PDA 培养基上,霸王花病原菌株菌落初期浅白色,平铺;后期菌落呈深灰色,绒毛状. 菌落生长较快,27℃ 黑暗培养 3 d 菌落直径即可达 9 cm(图 3). 在 PDA 培养基上,该病原菌可产生 2 种类型的节孢子(图 3):一种是由菌丝或侧生菌丝断裂产生的浅色、薄壁的柱状孢子,孢子大小为 7.83 (5.00 ~

10.69) μm × 3.60 (2.61 ~ 4.52) μm;另一种是由菌丝厚垣化断裂形成的褐色、厚壁、圆形或椭圆形、基部平截、成链的孢子,孢子大小为 7.09 (5.15 ~ 12.39) μm × 4.69 (3.87 ~ 6.07) μm. 没有观察到该菌的有性阶段. 根据这些特征,结合相关文献^[5-8],将引起广东省霸王花褐腐病的病原菌初步鉴定为 *Neoscytalidium dimidiatum* Crous & Slippers.



A: PDA 培养基上 27 ℃ 培养 3 d 的菌落形态;B: PDA 培养基上 27 ℃ 培养 7 d 的分生孢子显微形态.

图 3 病原菌 *Neoscytalidium dimidiatum* 的形态观察

Fig. 3 Morphological characteristics of *Neoscytalidium dimidiatum*

2.4 病原菌 rDNA-ITS 序列分析结果

应用真菌 18S-28S rDNA 间隔区序列(ITS)的通用引物 ITS1 和 ITS4,从菌株 BWH-TS1 的 DNA 中 PCR 扩增到一条约 600 bp 的片段. 序列测定结果显示,该特异片段长度为 579 bp (GenBank No. JX473739). BLAST 比对结果表明,BWH-TS1 18S-28S

rDNA ITS 序列与已报道的侵染火龙果的 *N. dimidiatum* 中国台湾菌株(HQ439174)的序列相似性为 99%,与 *N. dimidiatum* 广东菌株(JX128103, JX128104, JX524168)的序列相似性为 100%. 该结果进一步支持引起霸王花褐腐病的病原菌为 *N. dimidiatum*.

3 讨论与结论

应用常规的植物病原真菌研究方法,从霸王花病样组织中成功分离获得病原菌. 根据该病原菌的形态学特征及其 18S-28S rDNA ITS 序列,将该病原菌鉴定为半知菌亚门、丝孢纲、丝孢目、暗色孢科、新节格孢属的 *Neoscytalidium dimidiatum*.

霸王花和火龙果 *H. undatus* & *H. polyrhizus* 在形态上十分接近,均为仙人掌科量天尺属 *Hylocereus* 植物,但在生产中霸王花只开花不结果^[11]. 2012 年,我国台湾和广东相继报道了 *N. dimidiatum* 侵染引起的火龙果茎腐病^[7-8],其病害症状与发生在霸王花上的褐腐病症状相似,这说明 *N. dimidiatum* 不仅可以侵染霸王花,而且也侵染火龙果.

新节格孢属 *Neoscytalidium* 是 Crous 等^[6]对 *Botryosphaeriaceae* 发育系统研究中建立的一个新属,模式种为 *N. dimidiatum*. 该属的主要特征是:在呈粉末状气生菌丝上产生链状分生节孢子;节孢子易断裂脱落,基部平截,圆柱形或钝椭圆形,暗褐色,细胞壁厚,0~2 隔膜. 自该属建立以来,国内外已有一些文献报道了 *N. dimidiatum* 侵染引起的病害,如发生在意大利的甜橙 *Citrus sinensis* 枝条溃疡病^[12]、美国加州的无花果 *Ficus carica* 枝枯病^[13]、澳大利亚的猢猻树 *Adansonia perrieri* 枝枯病^[14]、我国台湾和广东的火龙果茎腐病^[7-8]等. 可见,该病原菌的寄主比较广泛,可以侵染多种重要经济作物,造成枝枯、溃疡及茎腐等症状,但在仙人掌科上的危害目前已报道的仅有量天尺属 *Hylocereus*^[7-8]. 另外,也有研究者^[15]将导致火龙果果实腐烂的病原菌鉴定为 *Scytalidium dimidiatum*(Penz.) Sutton and Dyko, 而 *Scytalidium dimidiatum* 为 *N. dimidiatum* 的同物异名.

2012 年 3—6 月,广东雨水比往年偏多,高温潮湿的天气导致霸王花褐腐病发生特别严重,在部分霸王花种植区暴发流行,导致毁园失收. 对于该新病害的发生规律及病害防治有效药剂筛选等研究还在进行.

致谢:华南农业大学姜子德教授和习平根副教授在病原菌鉴定方面给予了指导,特此致谢!

参考文献:

[1] 曾宋君,吴真养. 剑花的繁殖栽培和加工技术[J]. 福建林业科技,2006,33(1):225-227.

[2] 曹裕汉,沈汉华,郑卓辉,等. 霸王花生产技术规程[J]. 广东农业科学,2006(7):77-78.

[3] 陈胜龄. 剑花中氨基酸与微量元素分析[J]. 广东医学,2000,10(6):24.

[4] 方中达. 植病研究方法[M]. 3 版. 北京:中国农业出版社,1998:122-145.

[5] SEIFERT K, MORGAN-JONES G, GAMS W, et al. The genera of Hyphomycetes: CBS biodiversity series 9[M]. Utrecht: CBS-KNAW Fungal Biodiversity Centre, 2011: 635.

[6] CROUS P W, SLIPPERS B, WINGFIELD M J, et al. Phylogenetic lineages in the *Botryosphaeriaceae*[J]. Stud Mycol, 2006, 55: 235-253.

[7] CHUANG M F, NI H F, YANG H R, et al. First report of stem canker disease of pitaya (*Hylocereus undatus* and *H. polyrhizus*) caused by *Neoscytalidium dimidiatum* in Taiwan[J]. Plant Dis, 2012, 96(6):906.

[8] LAN G B, HE Z F, XI P G, et al. First report of brown spot disease caused by *Neoscytalidium dimidiatum* on *Hylocereus undatus* in Guangdong, Chinese Mainland[J]. Plant Dis, 2012, 96(11):1702.

[9] 刘少华,陆金萍,朱瑞良,等. 一种快速简便的植物病原真菌基因组 DNA 提取方法[J]. 植物病理学报,2005,35(4):362-365.

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

[11] 吕庆芳,李润唐,邹恒欢,等. 火龙果和霸王花授粉效应[J]. 中国南方果树,2011,40(3):60-62.

[12] POLIZZI G, AIELLO D, VITALE A, et al. First report of shoot blight, canker, and gummosis caused by *Neoscytalidium dimidiatum* on citrus in Italy[J]. Plant Dis, 2009, 93(11):1215.

[13] INDERBITZIN P, BOSTOCK R M, TROUILLAS F P, et al. A six locus phylogeny reveals high species diversity in *Botryosphaeriaceae* from California almond[J]. Mycologia, 2010, 102(6):1350-1368.

[14] SAKALIDIS M L, HARDY G E S, BURGESS T I. Endophytes as potential pathogens of the baobab species *Adansonia gregorii*: A focus on the *Botryosphaeriaceae*[J]. Fungal Ecology, 2011,4(1):1-14.

[15] 李敏,胡美姣,高兆银,等. 一种火龙果腐烂病原菌鉴定及生物学特性研究[J]. 热带作物学报,2012,33(11):2044-2048.

【责任编辑 霍 欢】