

陕西石榴干腐病发生及病原菌鉴定

Occurrence of the pomegranate fruit rot and identification of its pathogen

宋晓贺 孙德茂 王明刚 马 青*

(西北农林科技大学植物保护学院, 陕西省农业分子生物学重点实验室, 杨凌 712100)

Song Xiaohu Sun Demao Wang Minggang Ma Qing*

(Shaanxi Key Laboratory of Molecular Biology for Agriculture, College of Plant Protection

Northwest A & F University, Yangling 712100 Shaanxi Province, China)

石榴干腐病是我国石榴树上重要病害。陕西省临潼石榴产区病害调查发现, 干腐病已成为该地区石榴上危害最严重的病害, 管理粗放的果园, 发病率高达 40% 以上, 造成果实腐烂, 并且在储藏期继续危害。目前国内外关于该病病原菌的鉴定结果存在较大分歧, 周又生等^[1]认为是石榴鲜壳孢 *Zythia versoniana* Sacc 引起, 而刘会香等^[2]认为, 山东石榴果实病害是由 *Dothiorella* 属真菌引起; 据国外报道, 希腊、韩国石榴果实腐烂均由 *Coniella granati* 引起^[3-4]。为此, 作者在陕西省临潼石榴产区对该病害进行发病规律的研究, 并对其病原菌进行分离鉴定。

1 材料与方法

1.1 病原菌的分离

病原菌采自陕西省临潼区不同石榴产区感病的果实。将症状典型的病果表面消毒后, 采用组织分离法分离培养病原菌, 获得纯种菌, 保存于 PDA 斜面, 置 4℃ 冰箱中贮存备用。

1.2 致病性测定

采用离体果实接种法, 将保存的待试菌株接种到 PDA 平板上, 在 26℃ 下恒温培养 6 天。用无菌水将健康石榴果实冲洗干净, 晾干后将菌饼分别接种在健康和用消毒针刺伤的果实上, 每果实接种 5 个点, 以接种无菌的 PDA 培养基块为对照, 每个处理重复 10 次。将处理果实置于保湿容器中, 在 25~28℃ 下 12h 光照、12h 黑暗交替培养, 定期观察并记录发病情况。

1.3 病原菌形态学观察

自然寄主上病菌形态: 田间采集病果, 挑取典型

病斑上的病菌制片, 观察分生孢子器和分生孢子形态特征, 并测量大小。PDA 培养基上病菌形态: 26℃ 下 PDA 平板培养 10 天后, 观察病菌的分生孢子器和分生孢子形态。根据病原菌的产孢表型及在自然寄主和 PDA 培养基上的形态特征, 参考 Tziros & Tzavelle-Klonari^[3]和 Kwon & Paik^[4]方法进行鉴定。

1.4 病原菌核糖体 DNA-ITS 序列分析

PCR 扩增引物: ITS1-F 5'-CTTGTCATTTAGAG-GAAGTAA-3', ITS4 5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'。PCR 反应体系: 10×Taq buffer 2.5 μL, 25mmol/L MgCl₂ 2.0 μL, 2.5mmol/L dNTP 2.0 μL, 10μmol/L 正反向引物各 1.0 μL, 5U/μL Tagase 0.2 μL, 20ng/μL DNA 模板 2 μL, 补水至总体积 25 μL。PCR 反应程序: 94℃ 4min, 94℃ 30s, 52℃ 30s, 72℃ 30s, 35 个循环; 72℃ 10min, 4℃ 保存。PCR 产物纯化及测序由南京金斯瑞生物科技有限公司完成。通过 BLAST 分析, 将分离所得菌株的 rDNA-ITS 序列与 GenBank 核酸数据库中已知种的 rDNA 进行序列比对, 确定菌株类别。

2 结果与分析

2.1 症状

田间观察发现, 石榴干腐病在花期、幼果期即可侵染发病, 造成落花落果。主要发病时期是在成果期, 果实受害多发生在萼筒和果面受伤处, 初为浅褐色小病斑, 后逐渐扩大。潮湿情况下, 病斑扩展迅速, 造成果实腐烂(脓包果), 病部产生许多黑褐色小点, 即为病菌的分生孢子器。水肥施用不当和虫害等不良因素的影响, 造成果面破裂, 干腐病菌易从

基金项目: 西安市科技攻关项目 (CG06108), 高等学校学科创新引智计划项目 (B07049)

作者简介: 宋晓贺, 女, 1982 年生, 博士研究生, 研究方向为植物病害综合治理, email: sxh@nwsuaf.edu.cn

* 通讯作者 (Author for correspondence), email: maqing@nwsuaf.edu.cn

收稿日期: 2010-09-08

伤口侵染发病, 造成果实腐烂。干燥时病果逐渐失水皱缩, 呈僵果状悬挂枝条上。

2.2 致病性

在有伤、无伤情况下, 接种病菌的成熟果实和幼果都可以发病, 发病率为 100%。无伤情况下, 只能形成褐色小斑; 有伤情况下, 病斑迅速扩展腐烂, 长出白色菌丝, 并密生黑褐色分生孢子器。果实表面呈黄褐色, 即病菌释放的分生孢子。从接种的有伤和无伤果实上再分离该病菌, 结果与原接种菌株相同, 证实其为干腐病的致病菌。

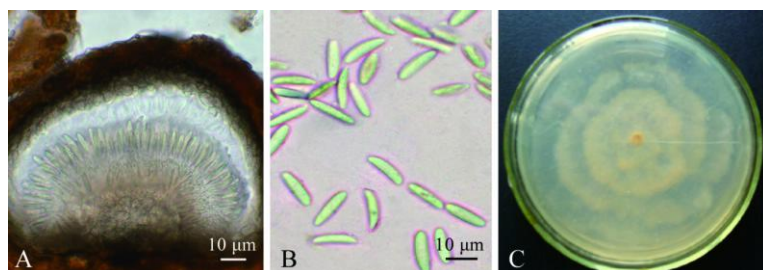


图 1 石榴干腐病菌的形态特征

Fig 1 Morphology of pomegranate dry rot pathogen

注: A: 分生孢子器; B: 分生孢子; C: 菌落形态。Note: A: Pycnidium; B: conidia; C: mycelia

根据菌株的形态特征和致病性测定结果, 并参照 Tziros & Tzavella-Klonari^[3]、Kwon & Pak^[4]、Hebert & Clayton^[5]对该种的特征描述, 将引起石榴干腐病的病原菌初步鉴定为石榴垫壳孢菌 *Coniella granati*。

2.4 病菌的 rDNA-ITS 的序列分析

以分离获得纯种菌 DNA 为模板, 用引物 ITS-1F/ITS4 对其核糖体 rDNA 的 ITS 区进行 PCR 扩增, 得到一个长度为 650 bp 左右的扩增片段。用 BLAST 在 GenBank 中搜索同源序列。该分离物与 *Piliella granati* (GenBank AY339342.1) 的同源性为 98%。因 *P. granati* 是 *C. granati* 的异名, 因此结合形态鉴定和分子鉴定分析, 将该病原菌鉴定为石榴垫壳孢菌 *Coniella granati* (GenBank HQ166057)。

3 讨论

本试验结合形态鉴定和分子鉴定确认引起石榴干腐病的病原菌为 *C. granati*。该结果与 Tziros & Tzavella-Klonari^[3]报道的希腊石榴果实腐烂和 Kwon & Pak^[4]报道的韩国石榴果实腐烂为同一病原菌。作者多年来在临潼不同地区大量采样、镜检和分离培养, 未发现 *Dothiorella* 属真菌引起的山东石榴果实的干腐病菌。

2.3 病原菌的形态特征及培养性状

从发病果实上挑取的分生孢子器球形 (图 1-A), 直径为 101.4~141.9 μm, 散生或密聚, 淡褐色, 埋生至半埋生。器壁较薄, 产孢区呈垫状隆起; 器中央具一孔口, 顶部不凸出; 产孢细胞圆柱形, 无色, 光滑, 从基部垫状隆起伸出。分生孢子纺锤形 (图 1-B), 淡褐色, 直或微弯, 大小为 10.9~16.4 μm × 2.7~5.5 μm。在 PDA 培养基上, 病原菌菌丝呈放射状扩展, 同心轮纹状 (图 1-C), 后产生黑褐色的分生孢子器。

在致病性测定中发现, 该病原菌接种有伤和无伤果实都可引起发病, 还可以侵染幼小的果实, 并且可以产生子实体和分生孢子, 这与作者分期套袋的试验结果一致。石榴干腐病菌侵染时期早, 具有潜伏侵染的特性, 且可以发生再侵染。因此果实套袋可以减轻干腐病的危害。另外冬季清园、摘除僵果, 套袋前用药等, 均可以起到预防作用。

参考文献 (References)

- [1] 周又生, 陆进, 朱天贵, 等. 石榴干腐病生物生态学及发生流行规律和治理研究. 西南农业大学学报, 1999, 21(6): 551-555
- [2] 刘会香, 梁军, 赵嘉平, 等. 石榴溃疡病害病原学研究. 林业科学, 2007, 43(4): 57-58
- [3] Tziros G T, Tzavella-Klonari K. Pomegranate fruit rot caused by *Coniella granati* confirmed in Greece. Plant Pathology, 2008, 57: 783
- [4] Kwon JH, Park C S. Fruit rot of pomegranate (*Punica granatum*) caused by *Coniella granati* in Korea. The Plant Pathology Journal, 2002, 12: 45-50
- [5] Hebert T T, Clayton C N. Pomegranate fruit rot caused by *Coniella granati*. Plant Disease Reporter, 1963, 47: 222-223