

蓝莓拟盘多毛孢枝枯病的病原菌

赵洪海 岳清华 梁晨*

青岛农业大学农学与植物保护学院 山东省植物病虫害综合防控重点实验室 山东 青岛 266109

摘要: 近期在山东省蓝莓种植区发现 1 种枝枯病害。为明确该致病菌, 通过病原菌组织分离和接种试验获得 2 个致病菌株。通过形态学观察和 rDNA-ITS 序列分析, 确定该病原菌为棒状拟盘多毛孢 *Pestalotiopsis clavispora*。这是棒状拟盘多毛孢所致蓝莓枝枯病在国内的首次报道。

关键词: 棒状拟盘多毛孢, 形态特征, 分子鉴定, 枝干病害

The pathogen causing *Pestalotiopsis* twig dieback of blueberry

ZHAO Hong-Hai YUE Qing-Hua LIANG Chen*

Key Lab of Integrated Crop Pest Management of Shandong Province, College of Agronomy and Plant Protection, Qingdao Agricultural University, Qingdao, Shandong 266109, China

Abstract: A disease of twig dieback was frequently found on *Vaccinium corymbosum* (blueberry) in Shandong Province in recent years. Through the test of pathogen tissue isolation two pathogenic isolates were finally obtained. Based on morphological characteristics and rDNA-ITS sequence analysis the isolates were identified as *Pestalotiopsis clavispora*. It is the first report of the pathogen responsible for blueberry twig dieback in China.

Key words: *Pestalotiopsis clavispora*, morphological characters, molecular identification, stem disease

蓝莓, 又称越橘, 是杜鹃花科 Ericaceae 越橘属 *Vaccinium* 植物, 为多年生小灌木浆果类果树, 其果实呈蓝色, 具极高的营养和药用价值 (韩明三等 2008)。蓝莓果实具有延缓脑神经衰老、增强心脏功能、明目及抗癌等独特功效。果实除直接食用外, 从中提取的天然色

素在食品和化妆品行业中具有广阔的应用前景 (王珊珊等 2010)。蓝莓种植业为国内的新兴果树产业, 山东半岛适宜的气候和土壤条件为蓝莓种植业的快速发展提供了基地保障。目前, 山东半岛已成为我国北高丛蓝莓 *Vaccinium corymbosum* L. 的主产区, 种植面积达 3 500hm²

基金项目: “泰山学者”建设工程专项经费

*Corresponding author. E-mail: liangchen@qau.edu.cn

收稿日期: 2012-12-21, 接受日期: 2013-11-04

(赵洪海和李保华 2012)。

近年来,作者在山东半岛蓝莓主产区的病害调查过程中,发现蓝莓枝枯病发生普遍,尤其幼枝发生严重。该病多从伤口和修剪口处发生;发病初期产生红褐色病斑,随着病斑扩展,枝梢开始干枯,渐渐导致整个幼枝枯死;在病害发生后期,在病斑上易产生密集埋生的小黑点(分生孢子盘);剖开受害组织,维管束组织变浅褐色,可见白色菌丝体。目前,生产上的主栽品种,如蓝丰、公爵和蓝美人等,均有枝枯病发生,显著影响其果实产量和品质。为明确该病的病原菌种类,本文采用形态学和分子生物学相结合的方法对该病原菌进行了鉴定研究。

1 材料与方法

1.1 病样采集和病原菌的分离与纯化

2012年4月在山东省胶南市蓝莓种植基地采集蓝莓枝枯病枝条若干带回实验室,采用组织分离法进行病原菌的分离和纯化(方中达等 1998),获得2个菌株(HMQAU110012和HMQAU110015),现保存在青岛农业大学真菌学研究室。

1.2 致病性测定

选用当年生的蓝莓枝条进行离体接种,品种为“蓝丰”,分有伤接种(针刺法)(林月莉等 2011)和无伤接种2个处理。首先将2个菌株分别在PDA上培养5d,然后用直径5mm经灭菌的打孔器在菌落边缘打取菌苔,将菌苔面朝向枝条贴接到枝条上,接种后在菌苔上用保鲜膜缠绕固定并保湿,各接种5个枝条,每个枝条接种3个点,以接种无菌的PDA饼为对照。培养条件为28℃,12h光暗交替。培养48h后去掉保鲜膜,开始观察和记录发病情况。待枝条上产生病斑后,重新分离病原菌。

1.3 病原菌的形态学观察

选取采自田间的具典型症状的罹病枝条,在解剖镜下进行症状观察和照像,切取典型病斑制作临时玻片(方中达 1998),在显微镜下观察病菌形态特征(分生孢子盘、产孢细胞及分生孢子等)。另外,对在PDA上生长的菌落(28℃,全黑暗)进行形态观察。

1.4 病原菌的分子鉴定

1.4.1 基因组 DNA 的提取: 将2个菌株分别接种于PD液体培养基中,于28℃黑暗培养4d后收集菌丝体用于DNA的提取。提取方法采用改良后的CTAB法(张颖慧等 2008)。

1.4.2 病原菌 rDNA-ITS PCR 扩增和序列分析:选取真菌rDNA-ITS通用引物ITS1(5'-TCCGTAGGTGAAACCTGCGG-3')和ITS4(5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'),对病菌基因组DNA进行PCR扩增。PCR反应体系(40μL):2×PCR Master Mix 20μL, ITS1/ITS4(10μmol/L)各2μL,模板DNA 0.5μL,补超纯水至40μL。PCR反应条件:94℃预变性3min;94℃变性45s,52℃复性45s,72℃延伸1min,30个循环;72℃延伸7min。扩增产物经1%琼脂糖凝胶电泳检测后,由生工生物工程(上海)有限公司进行纯化和双向测序,测序结果经Sequencher 5.0软件自动装配后导出重叠群(Contig),并在NCBI(<http://www.ncbi.nlm.gov>)数据库中进行BLAST分析后,提交给GenBank。再从GenBank中选取合适的序列,经CLUSTAL 2.0软件进行序列对比,并用MEGA 5.0软件采用邻接法(neighbor-joining analysis, NJ)构建系统发育树,以*Valsa ceratosperma*为外群,Bootstrap检验的重复次数为1000次。

2 结果与分析

2.1 病原菌的形态特征及分类地位

在自然发病枝条上的载孢体为分生孢子

盘，黑色，单腔，初散生，埋生于寄主表皮下，后突破表皮外露，直径 $100\text{--}150\mu\text{m}$ ；产孢细胞生于器壁内侧，棍棒形，无色，末端产生分生孢子（图 1A）；分生孢子直或稍弯曲，具 4 个隔膜，5 个细胞，分隔处稍缢缩，中间横隔明显， $21.7\text{--}25.1\times 5.7\text{--}6.3\mu\text{m}$ ；顶端细胞呈锥形，无色，长度 $3.1\text{--}3.5\mu\text{m}$ ，基部细胞呈倒锥形，无色，长度 $3.0\text{--}3.6\mu\text{m}$ ；自顶端第 2 和第 3 个细胞为暗褐色，壁厚，长度 $11.1\text{--}11.9\mu\text{m}$ ；第 4 个细胞呈极淡橄榄色，壁厚，长度 $5.5\text{--}5.9\mu\text{m}$ ；顶端附属丝 2-4 根，长 $23.8\text{--}27.2\mu\text{m}$ ，基部附属丝 1 根，长 $4.9\text{--}6.5\mu\text{m}$ ，分生孢子平均长宽比值为 $3.3\text{--}3.9$ （图 1B）。

在 PDA 上 28°C 黑暗培养 6d 后菌落直径达 85mm ，菌落白色至乳白色，背面同色，棉絮状，边缘全缘，具一圆形轮纹，轮纹内呈放射状扩展（图 1C）；培养 15d 后菌落上产生密集的分生孢子团（图 1D），直径 $0.3\text{--}1.0\text{mm}$ ；背面无色素沉积。

根据形态学特征和培养特性，将该菌鉴定为拟盘多毛孢 *Pestalotiopsis* 属真菌（有性阶段 *Pestalosphaeria*）。

2.2 致病性

健康蓝莓枝条经刺伤接种 48h 后，在刺伤接种处出现红褐色病斑（图 2A）；接种后第 4d ，红褐色病斑明显扩大并环绕枝条；接种后第 7 天，病斑中央渐变白色，并产生一圈红褐色坏死斑，外围为水渍状黄色晕圈（图 2B）；接种后第 10 天，整个枝条干枯；接种后第 12 天，在病斑处产生较多的黑色分生孢子盘（图 2C）；将产生分生孢子盘的枝条于 28°C 恒温保湿培养 2d 后，出现墨色的分生孢子角（图 2D）；镜检其分生孢子，与田间自然发病产生的分生孢子在形态上完全一致。无伤接种处理和有伤

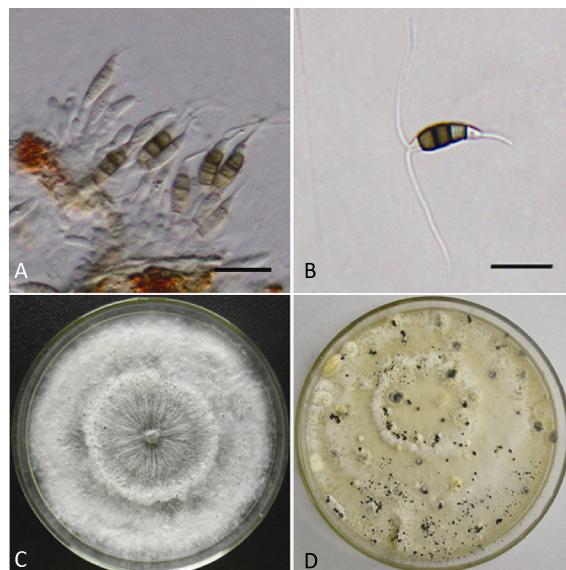


图 1 棒状拟盘多毛孢形态特征 A: 自然发病枝条上的产孢细胞和分生孢子；B: 成熟的分生孢子；C: PDA 上的菌落；D: PDA 上后期形成的分生孢子团。标尺 = $20\mu\text{m}$ 。

Fig. 1 Morphological characteristics of *Pestalotiopsis clavispora*. A: Conidiogenous cells and conidia on diseased twig; B: Mature conidium; C: Colony on PDA; D: Mass of conidia formed on PDA. Bars = $20\mu\text{m}$.

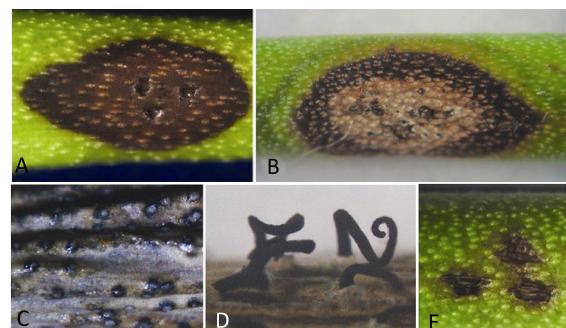


图 2 棒状拟盘多毛孢接种在蓝莓枝条上的症状 A: 初期症状；B: 中期症状；C: 枝条上形成黑色分生孢子盘；D: 分生孢子角；E: 有伤接种对照。

Fig. 2 Symptoms of *Pestalotiopsis clavispora* after inoculation on blueberry twig. A: Early symptoms produced on twig; B: Medium term symptom; C: Black acervuli formed on twig; D: Cirrhi of acervuli on twig; E: Control (wound inoculation).

接种对照均无病斑出现（图 2E）。经进一步病原菌分离证病，与自然条件下发生的蓝莓枝枯病的致病菌在形态上完全一致，表明所分离获得的菌株为致病菌。

2.3 病原菌 rDNA-ITS 序列分析

经 rDNA-ITS PCR 扩增和凝胶电泳检测，获得大小约 600bp 的片段，经测序分析，确定 2 个菌株（HMQAU110012 和 HMQAU110015）片段全长均为 551bp。将扩增得到的 rDNA ITS 序列提交 GenBank，登录号分别为 KC256919 和 KC256920。经与 GenBank 中相关核酸序列（表 1）的同源性比较分析，菌株 HMQAU110012 和 HMQAU110015 与棒状拟盘多毛孢

Pestalotiopsis clavispora (G.F. Atk.) Steyaert (EU342214) (有性阶段：*Pestalosphaeria clavispora*) 的同源性达到 100%。通过系统发育分析，供试菌株序列与 GenBank 中 Accession No. HQ414541 (寄主：加拿大的摩洛哥坚果)、Accession No. EU342214 (寄主：智利的北高丛越橘)、Accession No. EU342213 和 EU342215 (寄主：智利的南高丛蓝莓) 及 Accession No. GQ415344 (寄主：中国的牡丹) 的 5 株棒状拟盘多毛孢菌株的序列属于同一分支（图 3），因此，从分子水平证明棒状拟盘多毛孢 *P. clavispora* (G.F. Atk.) Steyaert 是导致山东蓝莓枝枯病的病原菌。

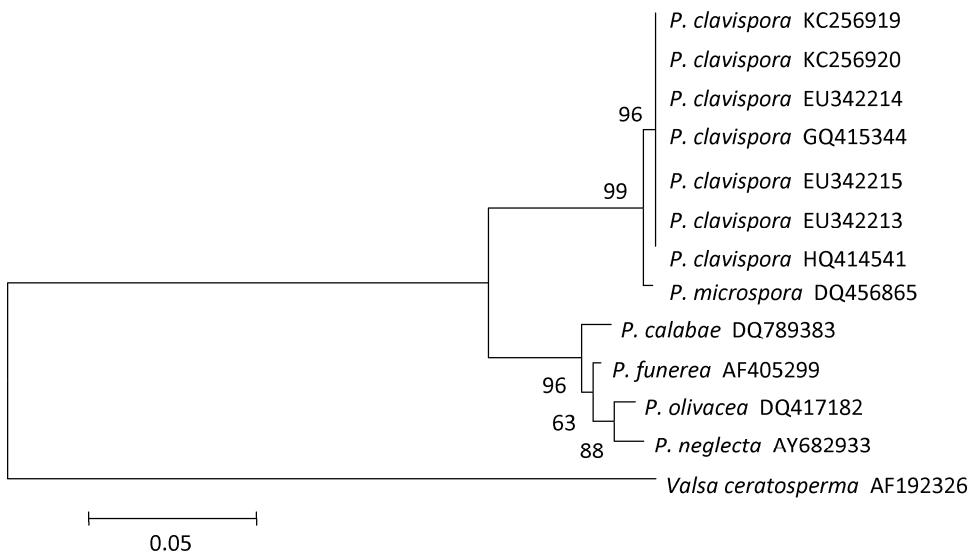


图 3 基于 rDNA-ITS 基因序列构建的蓝莓拟盘多毛孢枝枯病菌的 NJ 系统发育树 分支点上的数值为支持率；标尺 0.05 为进化距离；外群：*Valsa ceratosperma* AF192326。

Fig. 3 Neighbour-joining phylogenetic tree based on rDNA-ITS gene sequences of blueberry *Pestalotiopsis* twig dieback pathogen and related fungi. Numbers at nodes indicating bootstrap values for each node out of 1 000 bootstrap replications; scale 0.05 meaning evolutional distance. Outgroup: *Valsa ceratosperma* AF192326.

表 1 用于 NJ 系统发育树分析的相关 *Pestalotiopsis* 菌株及 ITS 序列登录号

Table 1 The related strains of *Pestalotiopsis* used in neighbour-joining phylogenetic analysis and their ITS sequence accession number

种类 Species	来源 Origin	寄主 Host	GenBank 登录号 GenBank accession No.
<i>Pestalotiopsis calabae</i>	中国 China	牛心番荔枝 <i>Annona reticulata</i>	DQ789383
<i>Pestalotiopsis clavispora</i>	加拿大, 魁北克 Québec, Canada	摩洛哥坚果 <i>Argania spinosa</i>	HQ414541
<i>Pestalotiopsis clavispora</i>	智利 Chile	南高丛蓝莓 <i>Vaccinium corymbosum</i> × <i>V. darrowi</i>	EU342215
<i>Pestalotiopsis clavispora</i>	智利 Chile	南高丛蓝莓 <i>Vaccinium corymbosum</i> × <i>V. darrowi</i>	EU342213
<i>Pestalotiopsis clavispora</i>	智利 Chile	北高丛越橘 <i>Vaccinium corymbosum</i>	EU342214
<i>Pestalotiopsis clavispora</i>	中国, 山东 Shandong, China	牡丹 <i>Paeonia suffruticosa</i>	GQ415344
<i>Pestalotiopsis clavispora</i>	中国, 山东 Shandong, China	北高丛越橘 <i>Vaccinium corymbosum</i>	KC256919
<i>Pestalotiopsis clavispora</i>	中国, 山东 Shandong, China	北高丛越橘 <i>Vaccinium corymbosum</i>	KC256920
<i>Pestalotiopsis funerea</i>	新西兰 New Zealand	杂交金柏 <i>Cupressocyparis leylandii</i> Soil fungi	AF405299
<i>Pestalotiopsis microspora</i>	韩国 Korea	日本山胡椒 <i>Lindera obtusiloba</i>	DQ456865
<i>Pestalotiopsis neglecta</i>	中国, 广西 Guangxi, China	金花茶 <i>Camellia nitidissima</i>	AY682933
<i>Pestalotiopsis olivacea</i>	中国, 云南 Yunnan, China	竹柏 <i>Podocarpus nagi</i> <i>Camellia sasanqua</i>	DQ417182
<i>Valsa ceratosperma</i>	日本 Japan	苹果 <i>Malus domestica</i>	AF192326

3 讨论

通过对山东省北高丛蓝莓主产区蓝莓枝枯病原菌的分离培养、形态学观察、致病性测定及 rDNA-ITS 序列分析, 证明该病害是由棒状拟盘多毛孢 *P. clavispora* 侵染引起的。*P. clavispora* 在智利和乌拉圭可引起北高丛蓝莓和南高丛蓝莓的枝条溃疡和干枯, 危害 2 年生以上的蓝莓植株(Espinoza et al. 2008; Gonzalez et al. 2012)。在我国, Luan et al. (2008) 曾报道 *P. clavispora* 侵染北高丛蓝莓叶部, 引起圆斑病, 与本文报道的蓝莓枝枯病菌一致, 但由棒状拟盘多毛孢引起的蓝莓枝枯病在我国属首次报道。

P. clavispora 可经昆虫或修剪伤口等物理损伤部位侵入(Espinoza et al. 2008), 遇适宜条件则可迅速扩展, 常引起枝条枯萎和顶梢枯死。该病菌侵染引起的蓝莓枝枯病症状与 *P. neglecta*、*Truncatella angustata* 以及 *Botryosphaeria*、*Pestalotia* 和 *Phomopsis* 等真菌引起的枝枯病症状相似。蓝莓枝枯病的病原菌组成复杂, 可由单一的病原菌引起, 也可由多种病原菌综合引起(Espinoza et al. 2008)。虽然这些病菌都可侵染蓝莓引起枝枯病, 但它们的抗药性以及寄主抗性存在差异, 因此, 正确鉴定病原菌对于科学有效防治蓝莓病害具有重要意义。

关于 *Pestalotiopsis* 属真菌的形态分类鉴定, 通常依据分生孢子的长度和宽度、有色细胞长度、分生孢子长宽比值、顶端附属丝的长度及基部附属丝的长度等特征, 但这些特征易受培养基和培养条件的影响而发生变化(韦继光 2004)。虽然 *P. clavispora* 与 *P. microspora* (Speg.) G.C. Zhao & N. Li 在形态特征(如分生孢

子盘和分生孢子的大小、附属丝的数目和长度及中间细胞颜色)上存在明显差异, 但二者在系统发育上却很相近(赵光材和李楠 1995)。所以, 关于 *Pestalotiopsis* 的形态分类存在很多困难(葛启新等 2009)。因此, 在鉴定 *Pestalotiopsis* 属真菌时, 要兼顾形态学特征和 rDNA 序列分析, 避免片面认识。

[REFERENCES]

- Espinoza JG, Briceño EX, Keith LM, Latorre BA, 2008. Canker and twig dieback of blueberry caused by *Pestalotiopsis* spp. and a *Truncatella* sp. in Chile. *Plant Disease*, 10: 1407-1414
- Fang ZD, 1998. Methodology on plant pathology research. 3rd edition. China Agricultural Press, Beijing. 122-145 (in Chinese)
- Ge QX, Chen YX, Xu T, 2009. Flora fungorum sinicorum. Vol. 38. *Pestalotiopsis*. Science Press, Beijing. 1-272 (in Chinese)
- González P, Alaniz S, Montelongo MJ, Rauduviniche L, Rebellato J, Silvera-Pérez E, Mondino P, 2012. First report of *Pestalotiopsis clavispora* causing dieback on blueberry in Uruguay. *Plant Disease*, 96: 914
- Han MS, Wang ZY, Liu XC, Zhang CL, 2008. Introduction behaviors and cultivation techniques of blueberry cultivars "Bluecrop". *Deciduous Fruits*, 5: 8-10 (in Chinese)
- Lin YL, Huang LL, Suolang LM, Gao XN, Chen YC, Kang ZS, 2011. A rapid laboratory evaluation system for apple ring rot. *Acta Phytophylacica Sinica*, 38(1): 37-41 (in Chinese)
- Luan YS, Shang ZT, Su Q, Feng L, An LJ, 2008. First report of a *Pestalotiopsis* sp. causing leaf spot of blueberry in China. *Plant Disease*, 92(1): 171

- Wang SS, Sun AD, Li SY, 2010. Health care function, development and application of blueberry. *Food and Nutrition in China*, 6: 17-20 (in Chinese)
- Wei JG, 2004. Diversity of endophytic *Pestalotiopsis* on Podocarpaceae, Theaceae and Taxaceae, and molecular phylogenetics of *Pestalotiopsis*. PhD Dissertation, Zhejiang University, Hangzhou. 1-205 (in Chinese)
- Zhang YH, Wei DS, Ying LJ, Li MC, 2008. A modified method for isolating DNA from fungus. *Microbiology*, 35(3): 466-469 (in Chinese)
- Zhao GC, Li N, 1995. Thirty-four species of *Pestalotiopsis* in Yunnan. *Journal of Northeast Forestry University*, 23(4): 21-27 (in Chinese)
- Zhao HH, Li BH, 2012. Current situation, influencing factors and strategies of blueberry plantation in Shandong. *Deciduous Fruits*, 44(1): 16-19 (in Chinese)
- [附中文参考文献]**
- 方中达, 1998. 植病研究方法. 第3版. 北京: 中国农业出版社. 122-145
- 葛起新, 陈育新, 徐同, 2009. 中国真菌志. 第38卷. 拟盘多毛孢属. 北京: 科学出版社. 1-272
- 韩明三, 王志云, 刘学才, 张翠岭, 2008. 蓝丰蓝莓的引种表现和栽培技术. 落叶果树, 5: 8-10
- 林月莉, 黄丽丽, 索朗拉姆, 高小宁, 陈银潮, 康振生, 2011. 苹果轮纹病室内快速评价体系的建立. 植物保护学报, 38(1): 37-41
- 王姗姗, 孙爱东, 李淑燕, 2010. 蓝莓的保健功能及其开发利用. 中国食物与营养, 6: 17-20
- 韦继光, 2004. 罗汉松科、山茶科和红豆杉科植物内生拟盘多毛孢的多样性及拟盘多毛孢属分子系统学研究. 浙江大学博士论文. 1-205
- 张颖慧, 魏东盛, 邢来君, 李明春, 2008. 一种改进的丝状真菌 DNA 提取方法. 微生物学通报, 35(3): 466-469
- 赵光材, 李楠, 1995. 拟盘多毛孢属在云南的 34 个种. 东北林业大学学报, 23(4): 21-27
- 赵洪海, 李保华, 2012. 山东省蓝莓种植业的现状、影响因素与对策. 落叶果树, 44(1): 16-19