

# 葡萄座腔菌侵染柑橘果实的报道

朱琪丽<sup>1,2</sup>, 赵会长<sup>1,2</sup>, 谢甲涛<sup>1,2</sup>, 程家森<sup>1,2</sup>, 付艳苹<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup>湖北省作物病害检测和安全控制重点实验室, 华中农业大学, 武汉 430070; <sup>2</sup>华中农业大学植物科学技术学院, 武汉 430070)

**摘要:** 柑橘生长中后期、运输和贮藏期间由真菌危害造成的烂果现象十分普遍。2016 年对采集自江西赣州果园的柑橘病果进行了组织分离、柯赫氏法则验证和病原菌鉴定, 明确病原菌为葡萄座腔菌(*Botryosphaeria dothidea*)。进一步发现该病菌可以侵染苹果枝干和果实, 引起腐烂。这是首次关于 *B. dothidea* 侵染柑橘果实的报道。

**关键词:** 采后病害; 柑橘; 葡萄座腔菌; 苹果

**Report of *Botryosphaeria dothidea* infecting citrus** ZHU Qi-li<sup>1,2</sup>, ZHAO Hui-zhang<sup>1,2</sup>, XIE Jia-tao<sup>1,2</sup>, CHENG Jia-sen<sup>1,2</sup>, FU Yan-ping<sup>1</sup> (<sup>1</sup> Provincial Key Laboratory of Plant Pathology of Hubei Province, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China; <sup>2</sup> Plant Science and Technology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China)

**Abstract:** Citrus fruit decay caused by fungi during late stages of fruit growth, postharvest transit and storage has been very common. The suspected fungal pathogen isolated from brown and hard fruit in a citrus orchard in Ganzhou, Jiangxi Province in 2016 was identified as *Botryosphaeria dothidea* based on the morphological and molecular characteristics and pathogenicity test. The pathogen could also infect twig or branch, trunk and fruit of apple. To our knowledge, this is the first report of *B. dothidea* infecting citrus.

**Key words:** postharvest fruit decay; citrus; *Botryosphaeria dothidea*; apple

中图分类号: S432.44

文献标识码: A

文章编号: 0412-0914(2018)02-0154-05

我国是全球柑橘第一大生产国, 2015 年柑橘种植面积 260 万公顷, 产量 3 660 万吨。柑橘生长中后期、运输和贮藏期间由真菌危害造成的烂果现象十分普遍, 轻者腐烂率为 10% ~ 30%, 重者高达 50%<sup>[1]</sup>。2016 年我们自江西赣州果园采集柑橘病果, 症状表现为果实褐色、坚硬。为明确其病原物, 我们对采集的病果进行了分离和鉴定, 并对分离所获菌株的致病性进行了测定, 以期对该病害的防治提供理论指导。

## 1 材料与方

### 1.1 供试材料

供试发病样品 2016 年采集自江西赣州柑

橘园。

### 1.2 病原菌的分离与培养

采用常规组织分离方法分离病原菌, 之后对分离所获菌株进行纯化, 4℃ 保存。

### 1.3 菌株致病性测定

以华中农业大学校园内栽培的柑橘(本地早)为供试柑橘对分离所获菌株进行致病力测定。取新鲜健康幼果和成熟果实用 75% 乙醇表面消毒 5 min, 无菌水冲洗 3 次。菌株连续活化 3 代, PDA 平板上培养 2 d。将果实和一年生枝干均分为刺伤、无刺伤两组。刺伤接种用无菌接种针在柑橘果实表面刺一个深约 0.5 cm 的小洞, 然后将直径

收稿日期: 2017-06-16; 修回日期: 2017-07-13; 网络出版时间: 2017-07-14

网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.2184.S.20170714.0902.002.html>

基金项目: 现代农业产业技术体系建设专项资金资助(CARS-27)

通讯作者: 付艳苹, 博士, 教授, 主要从事植物病理学研究; E-mail: yanpingfu@mail.hzau.edu.cn

第一作者: 朱琪丽, 女, 硕士研究生, 专业方向为分子植物病理学; E-mail: zhuqili1994@163.com。

0.5 cm活化的病原菌菌丝块接种于小洞处;无刺伤接种直接在柑橘果实表面接种病原菌菌丝块,每组5个重复。28℃光暗交替保湿培养,每隔24 h记录发病情况。实验独立重复2次。发病后再次纯化分离病原菌。

菌株对苹果(红富士)果实和一年生枝干的致病性测定方法同上。

#### 1.4 病原菌的鉴定

将分离获得的田间菌株和自致病性试验中分离的菌株在PDA平板上进行培养,记录其菌落形态和产孢情况。为进一步对菌株进行鉴定,采用CTAB法抽提菌株基因组DNA<sup>[2]</sup>,以真菌通用引物ITS1:5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3'和ITS4:5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'、引物EF1-728F:5'-CATCGAGAAGTTCGAGAAGG-3'和EF1-986R:5'-TACTTGAAGGAACCCTTACC-3'、引物T1:5'-AACATGCGTGAGATTGTAAGT-3'和BT2b:5'-ACCCTCAGTGTAGTGACCCTTGGC-3'<sup>[3-6]</sup>分别对rDNA-ITS、*EF-1*和 $\beta$ -*tubulin*基因片段进行PCR扩增,扩增产物委托武汉天一辉远公司进行序列分析。将获得的序列递交NCBI数据库,并进行blast比对。采用MEGA5.0根据DNA片段序列进行进化分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 病原菌种类鉴定

发病柑橘果实褐色、坚硬,其症状见图1-A。采用常规组织分离法自病果病健交界处分离病菌,

在PDA培养基上25℃培养7 d,获得的菌株菌落形态一致,均为不规则圆形,初期为白色,后为墨绿色,着生大量气生菌丝,不形成任何类型的孢子。代表菌株GZ-1的菌落形态见图1-B;扩增其ITS、*EF-1*和 $\beta$ -*tubulin*部分基因片段,分别获得543、272和386 bp的序列,将序列提交至GenBank(登录号分别为KY978573、KY978574和KY978575);在GenBank中进行同源性比对,发现与*Botryosphaeria dothidea*一致性达到98%以上;系统进化分析发现其与分离自石榴上的*B. dothidea*菌株hxliu9聚为一支(图2)。

### 2.2 致病性测定

将菌株GZ-1接种柑橘本地早果实,25℃光暗交替培养,刺伤柑橘接种3 d可见明显的病斑。幼果表面产生灰褐色至黑色病斑,潮湿时,部分区域有白色菌丝斑点且表面具有黑色霉层,果实坚硬结实,无腐烂柔软现象,内部瓢瓣也被病原菌入侵变为黑色,无明显腐烂和特殊气味(图3-A);成熟果实通过伤口被侵染之后,发病较幼果更加迅速。湿度适宜时,果实表面一天就长满白色菌丝,果实柔软易腐烂,之后生成黑色霉层,果实内部瓢瓣变为黑色(图3-B)。该病菌不能通过伤口侵染柑橘的叶片和枝条(结果未显示)。

### 2.3 病原菌对苹果的致病性

据报道*B. dothidea*可以引起苹果轮纹病及多种林木溃疡病,因此尝试将分离的病原菌GZ-1刺伤接种苹果(富士),在12 h光照12 h黑暗、25℃

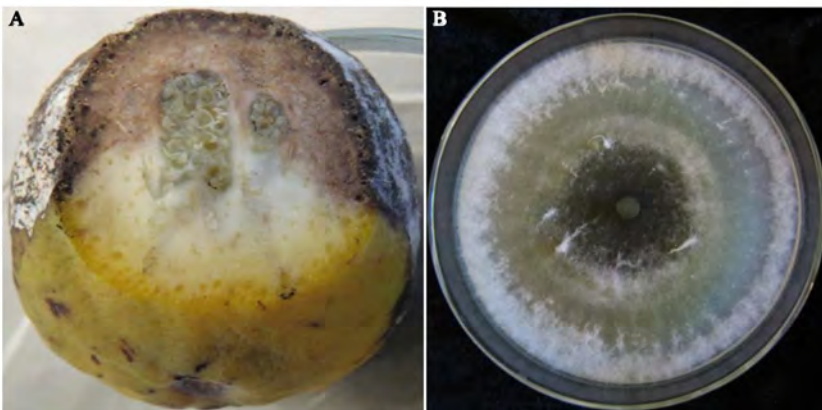


Fig. 1 Symptom of diseased citrus fruit (A) and colony morphology of the fungal strain GZ-1(B)

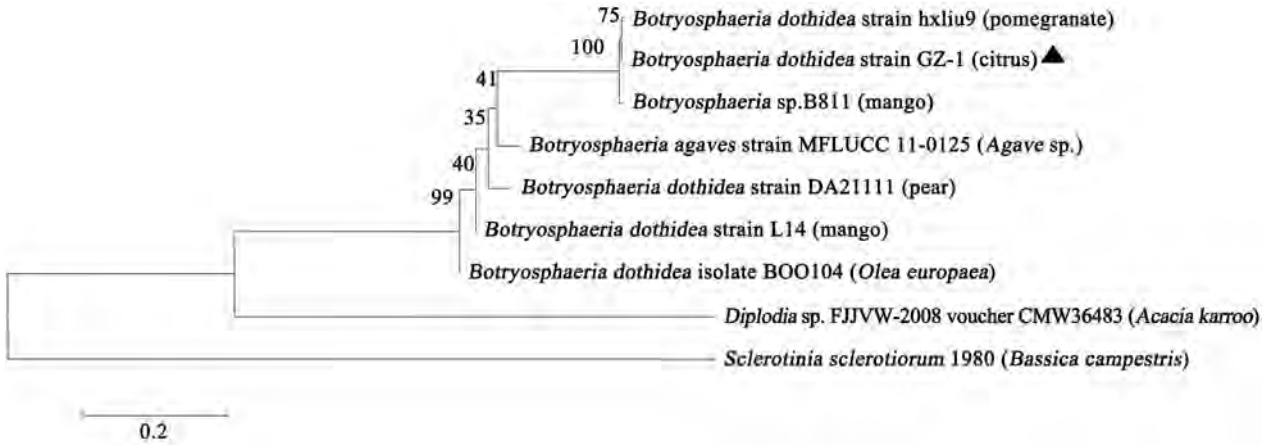


Fig. 2 Phylogenetic analysis of the strain GZ-1 based on ITS, *EF-1* and *β-tubulin* sequences. Bootstrap values (%) obtained with 1 000 replicates are indicated on branches and branch lengths correspond to genetic distance; A scale bar at the lower left corresponds to a genetic distance of 0.2.

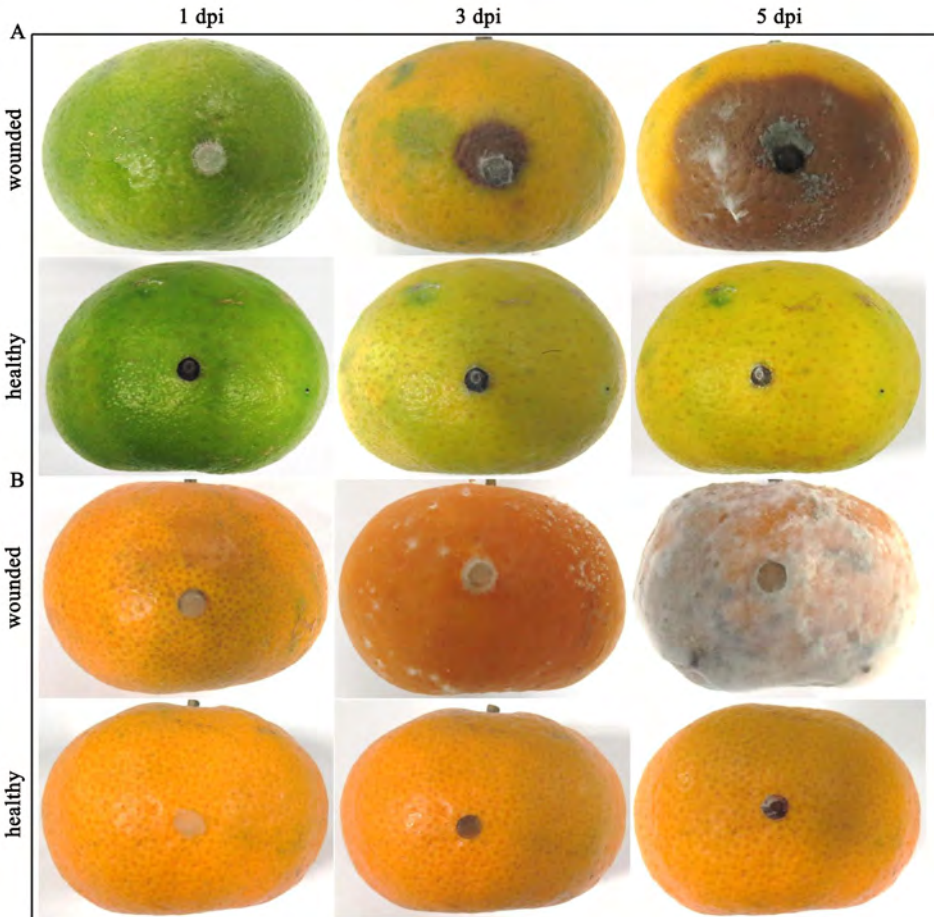


Fig. 3 Pathogenicity test of the strain GZ-1 on citrus fruits  
 A; Symptoms on the green fruits; B; Symptoms on the orange fruits.



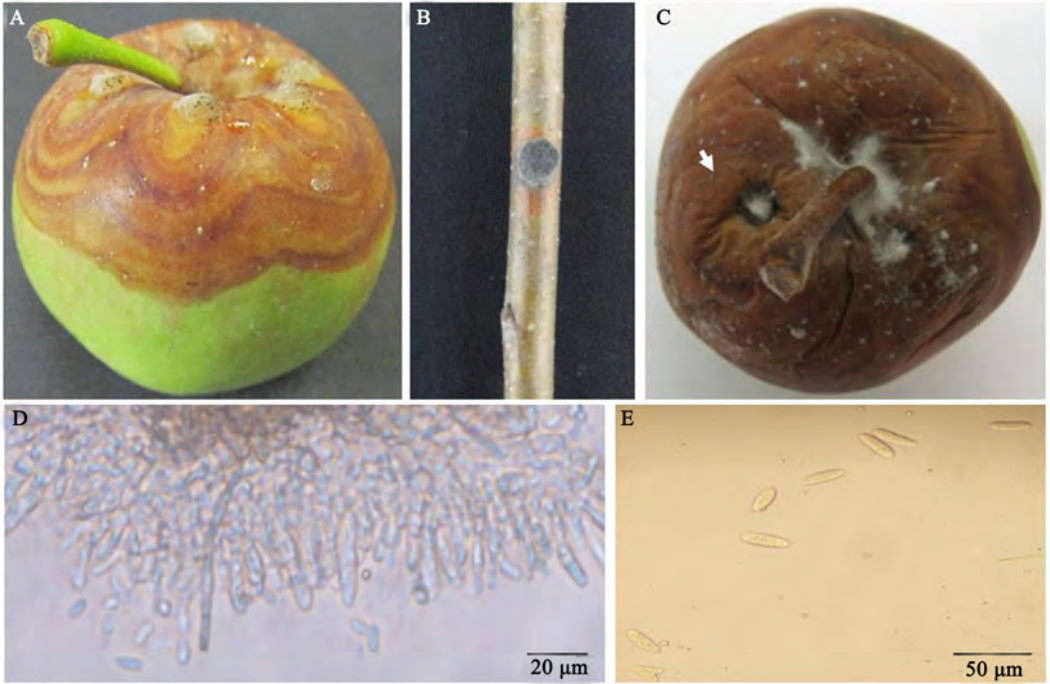


Fig. 4 Pathogenicity assay of the strain GZ-1 on apples

A: Symptom on apple fruit (8 d); B: Symptom on apple one-year-old shoot (15 d);

C: Pycnidia on the diseased apple fruit 20 d after treated with near ultraviolet light; D: Pycnidia; E: Conidia.

条件下保湿培养 8 d, 苹果形成轮纹状腐烂 (图 4-A)。相同条件下离体苹果一年生枝条接种 15 d 后形成明显病斑 (图 4-B); 在近紫外光灯下光暗交替培养 20 d 后, 苹果腐烂组织表面形成黑色点状物 (图 4-C), 显微观察, 可见分生孢子器和成熟的分生孢子。分生孢子长椭圆形, 平均长度  $19.59 (17.86 \sim 21.43) \mu\text{m}$ , 宽  $5.88 (4.29 \sim 7.86) \mu\text{m}$  (图 4-D、E)。

### 3 结论与讨论

葡萄座腔菌广泛分布于世界各地, 是一种弱寄生真菌, 在我国可侵染苹果属、李属、杨属、松属等果树及经济林木植物, 引起苹果轮纹病, 梨轮纹病, 桃、李、杏和樱桃流胶病, 柿子、猕猴桃、杨树、柳树、樟树、刺槐溃疡病、杨梅、玫瑰和核桃枝枯病等<sup>[7-10]</sup>, 同时它也是一种重要的植物内生菌<sup>[11,12]</sup>。本研究首次证实 *B. dothidea* 对柑橘果实的侵染, 但即使在刺伤的情况下该病原菌也不能侵染柑橘 (本地早) 的叶片和枝条, 推测与柑橘不同部位基因表达、物质积累和细胞结构的差异有关。本研究

仅检测了 *B. dothidea* 对柑橘本地早的致病性, 而该病原菌对柑橘其他品种、其他植物的致病性及相关病害发生的普遍程度尚不清楚。在我国南方, *B. dothidea* 的寄主植物分布广, 且与柑橘混杂种植, 因此, 进一步深入了解源自于不同寄主植物的 *B. dothidea* 菌株与柑橘之间的交互感染将对柑橘病害的控制有重要的指导意义。

### 参考文献

- [1] Salunkhe D K, Bolin H R, Reddy N R. Storage, processing and nutritional quality of fruits and vegetables (2<sup>nd</sup> Ed.) [M]. Florida: CRC Press, 1991.
- [2] Sambrook J, Frisch E F, Maniatis T. Molecular cloning: A laboratory manual (2<sup>nd</sup> Ed.) [M]. (Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press), 1989.
- [3] White T J, Bruns T, Lee S, et al. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics [A]. Innis M A, Gelfand D H, Sninsky J J, et al. PCR protocols: a guide to methods and

- applications [M]. San Diego: Academic Press, 1990, 315-322.
- [4] Jacobs K A, Rehner S A. Comparison of cultural and morphological characters and ITS sequences in anamorphs of *Botryosphaeria* species and related taxa [J]. *Mycologia*, 1998, 90(4): 601-610.
- [5] Crous P W, Slippers B, Wingfield M J, *et al.* Phylogenetic lineages in the Botryosphaeriaceae [J]. *Studies in Mycology*, 2006, 55: 235-253.
- [6] Slippers B, Crous P W, Denman S, *et al.* Combined multiple gene genealogies and phenotypic characters differentiate several species previously identified *Botryosphaeria dothidea* [J]. *Mycologia*, 2004, 96(1): 83-101.
- [7] Smith C O. Inoculations showing the wide host range of *Botryosphaeria ribis* [J]. *Journal of Agricultural Research*, 1934, 49(5): 467-476.
- [8] Slippers B, Johnson G I, Crous P W, *et al.* Phylogenetic and morphological re-evaluation of the *Botryosphaeria* species causing diseases of *Mangifera indica* [J]. *Mycologia*, 2005, 97(1): 99-110.
- [9] Smith H, Crous P W, Wingfield M J, *et al.* *Botryosphaeria eucalyptorum* sp. nov., a new species in the *B. dothidea*-complex on Eucalyptus in South Africa [J]. *Mycologia*, 2001, 93(2): 277-285.
- [10] Deng X Q, Guo L Z. Pathogen identification of canker of *Cinnamomum caphorn* (L.) Presl (in Chinese) [J]. *Hunan Forestry Science & Technology (湖南林业科技)*, 2005, 32(1): 41-43.
- [11] Slippers B, Wingfield J M. Botryosphaeriaceae as endophytes and latent pathogens of woody plants: diversity, ecology and impact [J]. *Fungal Biology Reviews*, 2007, 21(2-3): 90-106.
- [12] Li R H, Yan D H, Feng X, *et al.* Diversity of *Botryosphaeria* spp., as endophytes in poplars in Beijing, based on molecular operational taxonomic units (in Chinese) [J], *Scientia Silvae Sinicae (林业科学)*, 2014, 50(1): 109-115.

责任编辑:李晖