



黄国林,刘月廉,朱艳秋.荔枝酸腐病病原菌的形态学及分子生物学鉴定[J].黑龙江农业科学,2021(2):66-69.

荔枝酸腐病病原菌的形态学及分子生物学鉴定

黄国林¹,刘月廉²,朱艳秋²

(1.广东省湛江市绿海生物工程有限公司,广东 湛江 524088;2.广东海洋大学 滨海农业学院,广东 湛江 524088)

摘要:为了鉴定荔枝酸腐病的病原,利用组织分离法从新鲜发病的荔枝果实组织中分离并纯化出培养物,再经单孢分离获得3个菌株 LCG-1、LCG-2 和 LCG-3;经形态学特征和 rDNA-ITS 序列分析,从而对分离菌株进行鉴定。结果表明:3个菌株形态学和分子生物学特性一致,综合鉴定为白地霉(*Geotrichum candidum* Link & Magazin)。根据柯赫氏法则对3个菌株进行致病性测定,接种果实的致病率均为100%,而对照无症状表现,因而证实分离菌株为荔枝酸腐病的病原菌。

关键词:荔枝;酸腐病;白地霉;鉴定

荔枝(*Litchi chinensis* Sonn)是中国南方著名的水果^[1]。近年来我国荔枝年产量逐年增加,获得了较高的经济效益,从事荔枝产业人员越来越多^[2]。荔枝产业已成为一些区域的特色产业^[3]。荔枝成熟于盛夏高温季节,采后果实极易褐变腐烂,保鲜期较短,不利于贮藏和销售。已有研究表明,由荔枝酸腐菌侵染导致果实褐变腐烂是主要的原因之一^[4-5]。该病在中国、印度及澳洲均有记载^[6],但是,该病原鉴定目前均只限于形态学鉴定,缺乏分子生物学特性的支持。因此本文对引起该病害的病原菌进行形态学和分子生物学鉴定,并通过柯赫氏法则进行验证,以期能够为该病在遗传学方面和防治方面的研究提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 病样来源 2018年5月26日,于广东省湛江市江南果蔬批发市场采集获得发病样本(21.17°N,110.18°E)。品种为妃子笑(广东高州、广东廉江、广西灵山)。记录病害典型症状,并为病原菌分离鉴定备用。

1.1.2 致病性测定果实 刚从无病荔枝树上采摘的健康七八成熟果实,品种为妃子笑(广东省湛

江市麻章区赤岭树)。

1.1.3 病原菌培养基 培养基为 PDA,其成分包括:马铃薯 200.0 g,葡萄糖 20.0 g,琼脂 20.0 g,自来水 1 000 mL。121 °C,0.11 MPa,20 min 高压灭菌后冷却备用。

1.2 方法

1.2.1 病原菌菌株的分离 采用组织分离法对病原菌进行分离。取新鲜发病的荔枝果实,自来水流水冲洗 3 min,70%酒精中浸泡 3 s,然后转入 0.1%升汞溶液中表面消毒 2 min,取出用无菌水漂洗 4 次,使用灭菌吸水纸吸干组织块上多余水分。在无菌培养皿将组织块切成 1~2 mm²大小,用无菌镊子镊入 PDA 平板上,每个平板上分别放置 4 块组织,然后置于 25 °C 下培养 2 d。共培养 120 块组织,30 个培养皿。待菌丝从组织块上长出,即用接种针挑取菌丝尖端移入新鲜的 PDA 平板上进行培养,再将经纯化的分离物进行单孢分离并获得单菌落。挑选 3 个具有典型特征的菌落的分离物为代表菌株进行形态学、分子生物学和致病性研究。

1.2.2 病原菌的形态学鉴定 将代表菌株接种到 PDA 平板上,25 °C 恒温条件下培养 3 d。记录菌落的生长速度及特征,在光学显微镜下观察菌株的菌丝、产孢结构和节孢子形态特征,拍照保存。

1.2.3 病原菌的分子鉴定 参照真菌基因组 DNA 提取试剂盒方法,取培养 2 d 的菌丝体提取总 DNA。采用 ITS 序列扩增的通用引物 ITS1

收稿日期:2020-11-02

基金项目:广东海洋大学大学生创新创业训练计划项目(CXXL2019177);湛江市科技项目(2016B01038)。

第一作者:黄国林(1966-),男,初级农艺师,从事农作物育种与栽培研究。E-mail:bananafield@126.com。

通信作者:刘月廉(1965-),女,博士,教授,从事植物病理学。E-mail:mushwoman@126.com。

5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') 和 ITS4(5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'), 设置 PCR 反应体系为 94 °C 预变性 4 min; 94 °C 变性 1 min, 56 °C 退火 1 min, 72 °C 延伸 1 min, 32 个循环后, 72 °C 延伸 10 min, 然后置于 4 °C 冰箱中保存待用^[7]。PCR 产物经纯化、回收后, 送至广州生工测序中心进行序列测序。将获得的序列在 NCBI 上进行 Blast 比对, 并选取同源性较高和相近菌株序列用 MEGA7.0 中的邻接法(neighbor-joining)构建系统发育树, 同时用 bootstrap 对系统发育树进行检验, 1 000 次重复^[8]。

1.2.4 代表菌株的致病性测定 根据柯赫氏法则进行分离物的回接测定。取新鲜的荔枝果实, 自来水流水冲洗 3 min, 参考上述表面消毒的方法进行处理后, 浸入浓度为 10^5 CFU·mL⁻¹ 的孢子

悬浮液中, 立即取出, 以无菌水处理组为对照, 每处理接种 3 个果实, 重复 3 次。接种后的果实置于铺有无菌湿润滤纸的保鲜盒中, 温度 28 °C, 培养箱中培养, 逐日观察发病情况, 对发病果实病原菌再分离并进行鉴定。

2 结果与分析

2.1 病害采样与症状观察

荔枝酸腐病在批发市场的发病率为 5%~20%(来自广东高州的发病率为 12.5%、广东廉江的为 5%、广西灵山 20%)。发病的果实变褐, 有明显的发酵酸味, 严重的果皮表面布有白色霉层, 水渍状, 有黄褐色汁水流出(图 1a 和 b)。挑取白色霉层于显微镜下观察, 可见大量节孢子(图 1c 和 d)。



a 和 b: 病果; c: 菌落; d: 节孢子

图 1 果实发病症状及分离菌株形态

2.2 病原菌的分离

从来自广东高州、广东廉江和广西灵山的病果上分别分离并纯化共获得 10 个菌株。经平板稀释法分离得到 3 株单孢菌株 LCG-1(广东高州)、LCG-2(广东廉江)和 LCG-3(广西灵山), 它们在形态和分子分析上完全一致。

2.3 病原菌的形态学特性

LCG-1 菌株在 PDA 培养基上, 于 25 °C 下培养 3 d, 其菌落平均直径大于 30 mm; 菌落表面扁平呈圆形, 乳白色, 培养基背面无色。菌丝质地为绒毛状兼粉状, 呈放射线状生长, 气生菌丝不发达, 边缘清晰(图 1c)。分生孢子梗无色, 有隔, 有分枝, 梗顶端渐趋变细; 单孢无色, 矩形至圆筒形, 两端钝圆或平切状, 老熟菌丝断裂为节孢子。节孢子发育成熟后成为厚垣孢子。厚垣孢子以圆形、圆柱形为主, 少见长筒形。孢子两端钝圆, 单胞, 无色透明, 大小为 $(4.4 \sim 14.6) \mu\text{m} \times (3.5 \sim 8.8) \mu\text{m}$ (图 1d)。该菌形态特征与白地霉 *Geotri-*

chum candidum^[9]描述的一致。

2.4 病原菌的分子鉴定

菌株 LCG-1、LCG-2 和 LCG-3 经 rDNA-ITS 基因测序后, 在 GenBank 上分别获得登录号为 MW092556、MW092557 和 MW092558。在 GenBank 数据库中利用 BlastN 进行同源性比对表明, 这 3 个菌株与白地霉 *G. candidum* 不同菌株(JQ668719、AJ279445 和 KY103454)相似性达 99%~100%。进一步从 GenBank 数据库选择白地霉及其近缘种的 rDNA-ITS 序列, 与供试菌株构建系统发育树。结果表明, 供试的 3 个菌株与白地霉 *G. candidum* 代表菌株 LMA-244、DSM1240 和 CBS11616(登录号为 JQ668719、AJ279445 和 KY103454)处于同一分枝上; 但与其他近缘种有一定的遗传距离(图 2)。

2.5 病原菌的鉴定

分离的菌株 LCG-1、LCG-2 和 LCG-3 形态特征与白地霉 *G. candidum* 一致, ITS 序列与模式

菌株同源性高于 99%，综合分析，鉴定 3 个菌株为白地霉 *G. candidum*。

2.6 病原菌的致病性测定

新鲜荔枝(妃子笑)分别接种 3 个菌株,症状表现基本一致。处理的果实第 3 天开始形成橘黄色或浅褐色水渍斑,第 4 天长出白色霉层,第 6 天

全果腐烂,流出酸臭的汁液。3 个菌株接种的果实发病率均为 100%，且发病症状与采样症状相似,对照组不发病(图 3)。重新分离回接病果,获得的纯培养物经形态和 ITS 序列鉴定与所接种供试菌株一致。由此证明分离的菌株为荔枝酸腐病的病原菌。

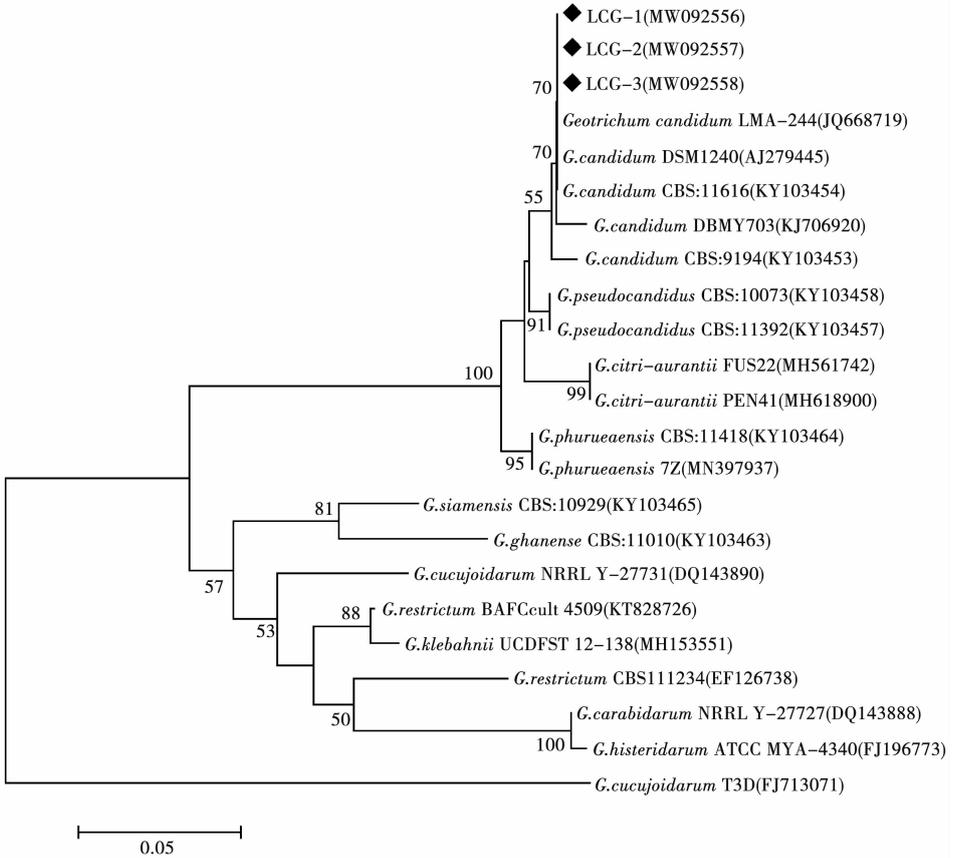
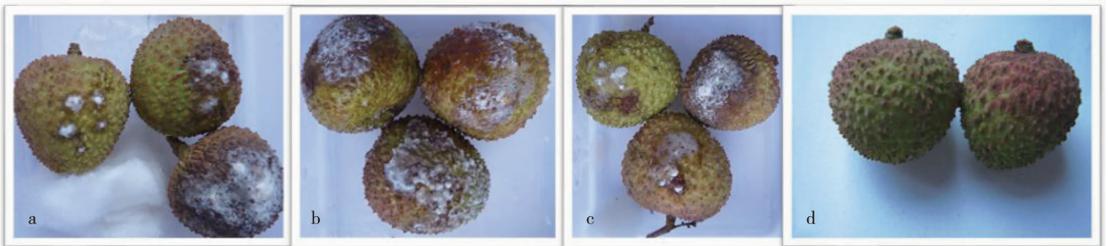


图 2 菌株 LCG-1、LCG-2 和 LCG-3 基于 rDNA-ITS 序列构建的系统发育树



a: 接种菌株 LCG-1; b: 接种菌株 LCG-2; c: 接种菌株 LCG-3; d: 对照

图 3 三个菌株的致病性测定

3 结论与讨论

利用组织分离法从新鲜发病的荔枝果实组织中分离并纯化出培养物,再经单孢分离获得 3 个菌株 LCG-1、LCG-2 和 LCG-3;经形态学特征和

rDNA-ITS 序列分析对分离菌株进行鉴定。结果表明,3 个菌株形态学和分子生物学特性一致,鉴定为白地霉 *G. candidum*。根据柯赫氏法则对 3 个菌株进行致病性测定,结果证实为荔枝酸腐

病的病原菌。

酸腐病分布广泛,特别容易在温暖潮湿季节发生,并且以危害成熟果实为主,侵染途径主要是伤口,是典型的采后病害。酸腐病的病原菌为白地霉 *G. candidum* (有性型: *Galactomyces candidum*), 是常见的植物病原菌,可寄生荔枝、番茄、西瓜、胡萝卜、龙眼、葡萄、草莓、番薯和巴西红果^[9-10],由于地理隔离可能存在遗传多样性。本文的研究结果将为该菌的遗传多样性方面的研究及防治提供参考。

参考文献:

- [1] 李冬波,徐宁,秦献泉,等. 广西原产和引种荔枝种质资源的遗传多样性分析及核心种质构建[J]. 南方农业学报,2020,51(7):1537-1544.
- [2] 陈厚彬. 我国荔枝产业发展情况——在 2018 年中国国际荔枝产业大会开摘节暨新闻发布会上的讲话[J]. 中国热带农业,2018(3):6-7,5.
- [3] 叶贞琴. 推动荔枝产业高质量发展 打造广东金字招牌[J]. 现代农业装备,2018(4):10-12.

- [4] 刘月廉,习平根,姜子德. 荔枝酸腐病拮抗菌株的筛选[C]// 中国菌物学会. 中国菌物学会第五届会员代表大会暨 2011 年学术年会论文摘要集. 中国菌物学会:中国菌物学会,2011:2.
- [5] 黄梁新. 荔枝周年病虫害发生及防治技术[J]. 中国热带农业,2013(2):48-49.
- [6] 谢玲平. 荔枝酸腐病的防治研究进展[J]. 现代农业科技,2013(24):169.
- [7] Vu D, Groenewald M, Szöke S, et al. DNA barcoding analysis of more than 9 000 yeast isolates contributes to quantitative thresholds for yeast species and genera delimitation[J]. Studies in Mycology,2016,85:91-105.
- [8] Alper I, Frenette M, Labrie S. Ribosomal DNA polymorphisms in the yeast *Geotrichum candidum* [J]. Fungal Biology,2011,115(12):1259-1269.
- [9] 周禹含,刘月廉,李映志. 巴西红果实腐烂病原鉴定[J]. 广东海洋大学学报,2018,38(5):71-75.
- [10] Horita H, Hatta Y. Sour rot of carrot caused by *Geotrichum candidum* in Japan[J]. Journal of General Plant Pathology,2016,82(1):65-68.

Morphological and Molecular Identification of the Pathogen of Litchi Sour Rot

HUANG Guo-lin¹, LIU Yue-lian², ZHU Yan-qiu²

(1. Zhanjiang Lyuhai Bioengineering Limited Company, Zhanjiang 524200, China; 2. Binhai Agricultural College, Guangdong Ocean University, Zhanjiang 524088, China)

Abstract: In order to confirm the pathogen of litchi acid rot, three isolates, LCG-1, LCG-2, and LCG-3, were isolated and purified from fresh litchi fruit tissues by tissue isolation method, and identified by morphological characteristics and the rDNA-ITS sequences analysis. The results showed that the morphological and molecular biological characteristics of the three strains were consistent, and they were identified as *Geotrichum candidum* Link & Magazin. According to Koch's rule, the pathogenicity of the three strains were tested. The results showed that the incidence rates of all inoculated fruits were 100%, while the control showed no symptoms. Therefore, the isolates were identified as the pathogen causing litchi sour rot.

Keywords: *Litchi chinensis*; sour rot; *Geotrichum candidum*; identification

致 读 者

为适应我国信息化建设,扩大本刊及作者知识信息交流渠道,本刊现被《中国学术期刊网出版总库》及 CNKI 等系列数据库收录,其作者文章著作权使用费与本刊稿酬一次性给付。如作者不同意文章被收录,请在来稿时声明,本刊将做适当处理。

《黑龙江农业科学》编辑部