

文章编号: 1674 - 7054(2010)02 - 0134 - 04

一种由角斑梨孢菌引起的香蕉叶斑病

张贺^{1,2}, 张欣², 漆艳香², 蒲金基², 吕延超¹, 谢艺贤²

(1. 海南大学(儋州校区)环境与植物保护学院, 海南 儋州 571737;

2. 中国热带农业科学院环境与植物保护研究所, 海南 儋州 571737)

摘要: 在开展香蕉叶部病害调查时, 发现了1例国内新记录病害。通过组织分离、柯赫氏法则验证以及病原菌形态学、rDNA-ITS 序列克隆和绘制 *Pyricularia* 属系统发育树等鉴定方法, 系统性地鉴定了这一病害, 将该病害命名为香蕉角斑梨孢叶斑病, 病原菌为 *Pyricularia angulata* Hashioka。

关键词: 香蕉叶斑病; *Pyricularia angulata*; 鉴定

中图分类号: S 435.621.24

文献标志码: A

香蕉 (*Musa* spp.) 是仅次于柑橘的世界第二大水果, 鲜果消费量和贸易量均居世界水果之冠, 也是我国热区第一大水果。据农业部发展南亚热带作物办公室统计, 2006 年我国香蕉栽培面积(不含台湾) 297 200 km², 产量 689.9 万 t, 种植面积和产量分别位居世界第 5 位和第 3 位。香蕉在整个生育期间, 遭受多种病害的为害, 严重影响其产量和质量^[1]。近年来, 我国发现新病害危害蕉园, Huang 等人^[2]于 2007 年报道了 *Pestalotiopsis menezesiana* 危害广西香蕉叶片, 引起香蕉环纹叶斑病(Plantain zonate leaf spot); 王振中等人^[3]于 2006 年报道了一种疫霉菌危害广东香蕉, 引起香蕉疫霉病。笔者在开展香蕉叶部病害调查时, 发现 1 例新的香蕉叶部病害, 经组织分离、柯赫氏法则验证以及病原菌形态学、rDNA-ITS 序列克隆和绘制 *Pyricularia* 属系统发育树等鉴定方法, 确诊了这一病害, 并命名为香蕉角斑梨孢叶斑病。

1 材料与方法

1.1 病原菌的分离及柯赫氏法则验证 按照植病研究方法^[4]上描述的方法对病斑进行组织分离、病原菌的纯化, 菌株编号为 CATAS - Pa04, 然后进行柯赫氏法则验证。致病性测定的方法是喷雾接种法, 配置浓度为 1.0×10^6 个 \cdot mL⁻¹ 分生孢子悬浮液, 喷雾于刚刚完全展开的香蕉幼苗嫩叶 6 片。温室内放置、保鲜袋保湿 72 h, 观察病斑形态及扩展情况, 设置清水对照。接种叶片发病后对病斑再次进行组织分离。

1.2 病原菌基因组总 DNA 的提取和 rDNA-ITS 区段 PCR 扩增 病原菌基因组总 DNA 的提取采用 O-MEGA 真菌 DNA 小量提取试剂盒(纯化方式: 硅胶柱), 参照说明书进行提取基因组总 DNA。参照 White 等人^[5]设计的真菌 rDNA-ITS 通用引物对: ITS1: 5' - TCCGTAGGTGAACCTGCGG - 3', ITS4: 5' - TCCTC-CGCTTATTGATATGC - 3', 以病原菌基因组总 DNA 为模板进行 PCR 扩增, 预期产物约 540 bp。25 μ L 扩增体系: 10 \times PCR buffer 2.5 μ L, 1.5 mmol \cdot L⁻¹ MgCl₂ 2.5 μ L, 10 μ mol \cdot L⁻¹ dNTPs 2.0 μ L, 每条引物(20 μ mol \cdot L⁻¹) 0.5 μ L, Taq DNA 聚合酶 5 U \cdot μ L⁻¹ (TaKaRa Biotech) 0.2 μ L, 模板 1.0 μ L, 灭菌双蒸水 15.8 μ L。PCR 扩增条件: 95 $^{\circ}$ C 预变性 3 min; 95 $^{\circ}$ C 变性 30 s; 60 $^{\circ}$ C 退火 30 s; 72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min, 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 8 min。w = 1.0% 的琼脂糖凝胶电泳检测, Gold View(北京赛百盛生物工程公司)染色分析, 紫外灯下观察。

收稿日期: 2009 - 12 - 09

基金项目: 国家香蕉技术产业体系建设项目(nycytx - 33 - 05); 香蕉枯萎病等疫情监测与防控项目(09RZBC - 2); 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项项目(NO. 2008hzs1J002)

作者简介: 张贺(1983 -), 男, 安徽太和人, 海南大学环境与植物保护学院 2008 级硕士研究生。

通信作者: 谢艺贤(1963 -), 男, 中国热带农业科学院环境与植物保护研究所研究员。

1.3 病原菌 rDNA-ITS 区段的克隆与测序 PCR 产物回收采用琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒(普通离心柱型、TIANGEN Biotech)按试剂盒说明书进行操作。使用 TaKaRa pMD18-T Vector 试剂盒,并按说明书进行操作,将回收产物与 pMD18-T Vector 经 T₄DNA 连接酶连接后转化 *Escherichia coli* JM109 感受态细胞。用含氨苄青霉素的 X-gal/IPTG/LB 平板进行蓝白斑筛选,采用普通质粒小提试剂盒(离心柱型、TIANGEN Biotech)提取阳性克隆质粒,PCR 扩增和酶切鉴定,并将成功克隆的质粒送上海英骏生物科技有限公司测序,成功测序后将测序得到的序列提交至 GenBank,获得病原菌 rDNA-ITS 序列的登录号。

1.4 病原菌 rDNA-ITS 区段的序列分析及系统发育树的构建 将测序得到的 rDNA-ITS 序列与 GenBank 中的序列经 BLASTn 比对、同源序列分析并下载 *Pyricularia* 属的 19 个 rDNA-ITS 序列,采用 Clustal X(Version 2.0.10)软件对所得到的 rDNA-ITS 序列进行多重对位排列,采用邻位相连法(N-J 法)绘制系统发育树,系统发育树的每个分支的统计学显著性分析以自展法进行检验,重复次数为 1 000 次,以 *Mycosphaerella fijiensis*(登录号:GQ169763)为系统进化外支。所选 *Pyricularia* 属 rDNA-ITS 序列如下:*P. angulata*(登录号:AY265322),*Magnaporthe oryzae*(无性态:*Pyricularia oryzae*,登录号:AB274418 - AB274425,AB476612 - AB476613),*M. grisea*(无性态:*P. grisea*,登录号:AB274428 - AB274430),*P. zingiberis*(登录号:AB274434),*P. zizaniicola*(登录号:AB274432),*P. costina*(登录号:AY265329),*P. logispora*(登录号:AY265319),*M. poae*(无性态:*P. poae*,登录号:AJ010042)。

2 结果

2.1 病害症状、病原菌形态及柯赫氏法则验证结果 病害症状初期为带有黄色晕圈的小黑点,在适宜的环境条件下,病斑扩展成灰褐色圆形或椭圆形,病斑中心灰色,有黄色晕圈,病健交界明显,适宜的温湿度促进病斑扩展,导致病斑相互汇集(图 1 A)。病原菌在 PDA 培养基上,菌落为灰棕色、气生菌丝稀薄,不易产生分生孢子。致病性测定结果显示,喷雾接种后 6 d,叶片上即形成边缘淡黄色、中心灰色的小斑点。随着病斑的扩展,病斑呈灰褐色圆形、椭圆形,病斑汇集呈不规则形,浅黄色晕圈外有随叶脉延伸的褐色坏死线(图 1 B~C)。湿度大时,病斑周围水渍状,黄色晕圈明显,叶背有灰绿色霉层,此霉层系聚集在一起的分生孢子梗及分生孢子。分生孢子梗单生或数根从寄主细胞间隙抽出,不分枝,略弯曲,顶端呈膝状屈折,基部膨大,孢痕显著,淡褐色,具隔膜,大小为 64.22 ~ 105.22 μm × 2.93 ~ 6.01 μm (91.06 μm × 4.35 μm)。分生孢子梨形、梭形,无色,群集时灰绿色,顶端较尖,基部钝圆,有小突起,多数有 2 个隔膜,少数有 1 个隔膜,大小为 12.67 ~ 23.08 μm × 6.36 ~ 11.03 μm (19.05 μm × 8.67 μm)(图 1 D~G)。

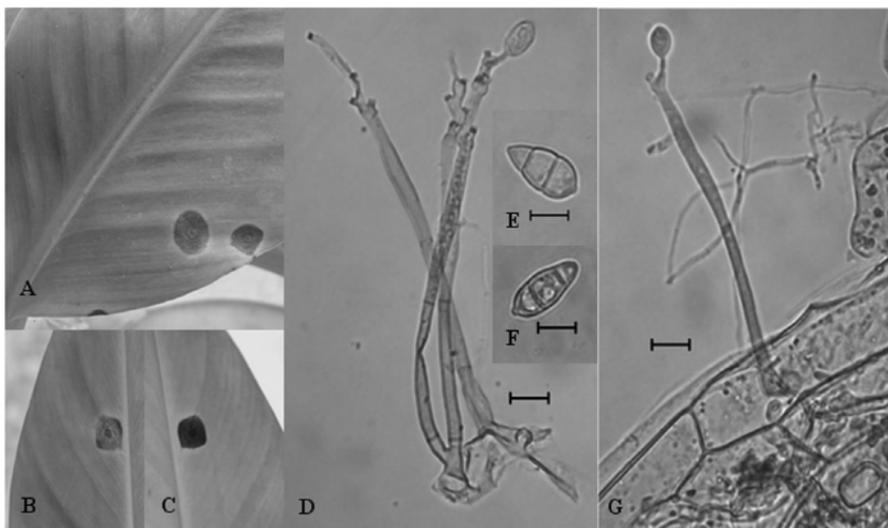


图 1 病害症状、病原菌形态及致病性测定结果

A. 田间幼苗上病斑; B~C. 致病性测定结果(B. 叶片正面; C. 叶片背面); D. *Pyricularia angulata* 的分生孢子梗和正在形成的分生孢子; E~F. 分生孢子; G. 从叶片表皮上形成的分生孢子梗; 标尺长度为 10 μm 。

2.2 rDNA-ITS 区段的 PCR 扩增、克隆与测序结果 PCR 产物、切胶回收产物和重组质粒 PCR 扩增产物经 $w = 1.0\%$ 的琼脂糖凝胶电泳检测, 均获得 1 条 541 bp 的扩增条带, 与期望值基本相符。阳性克隆质粒送上海英骏生物科技有限公司测序表明, 克隆片段由 502 个核苷酸组成(不含引物 ITS1/ITS4 的序列), 其中 A 碱基含量为 24.5%、T 碱基含量为 21.9%、G 碱基含量为 28.9%、C 碱基含量为 24.7%。该序列与 GenBank 中的序列经 BLASTn 网络比对、同源性分析显示与 Bussaban 等人提交的 *Pyricularia angulata* 的 rDNA-ITS 序列(登录号: AY265322) 同源性达 100%。

2.3 rDNA-ITS 序列的系统发育分析 通过对 GenBank 上的 *Pyricularia* 属的 19 个 rDNA-ITS 序列, 使用 Clustal X (Version 2.0.10) 软件, 采用 N-J 法构建该属的系统发育树。结果(见图 2) 表明: 所绘制的系统发育树包含了 *Pyricularia* 属内的 8 个种, 同一个种内的不同 rDNA-ITS 序列虽有差异, 但仍会聚集在同一个分支, 如 *Magnaporthe oryzae* 的 8 个 rDNA-ITS 序列聚集在同一个分支。试验所测得的病原菌 CATAS-Pa04 号菌株的 rDNA-ITS 序列与登录号为 AY265322 的序列聚集在同一支且检验值为 998, 十分接近于重复抽样次数, 这表明实验所得的序列与 AY265322 具有很好的同源性, 二者可确定为同一菌种。将实验所得的序列提交至 GenBank, 获得序列的登录号为 GU066873。该菌在 *Pyricularia* 属内与引起稻瘟病的病原菌 *Magnaporthe oryzae* 亲缘关系最近, 二者聚类在同一分支上。

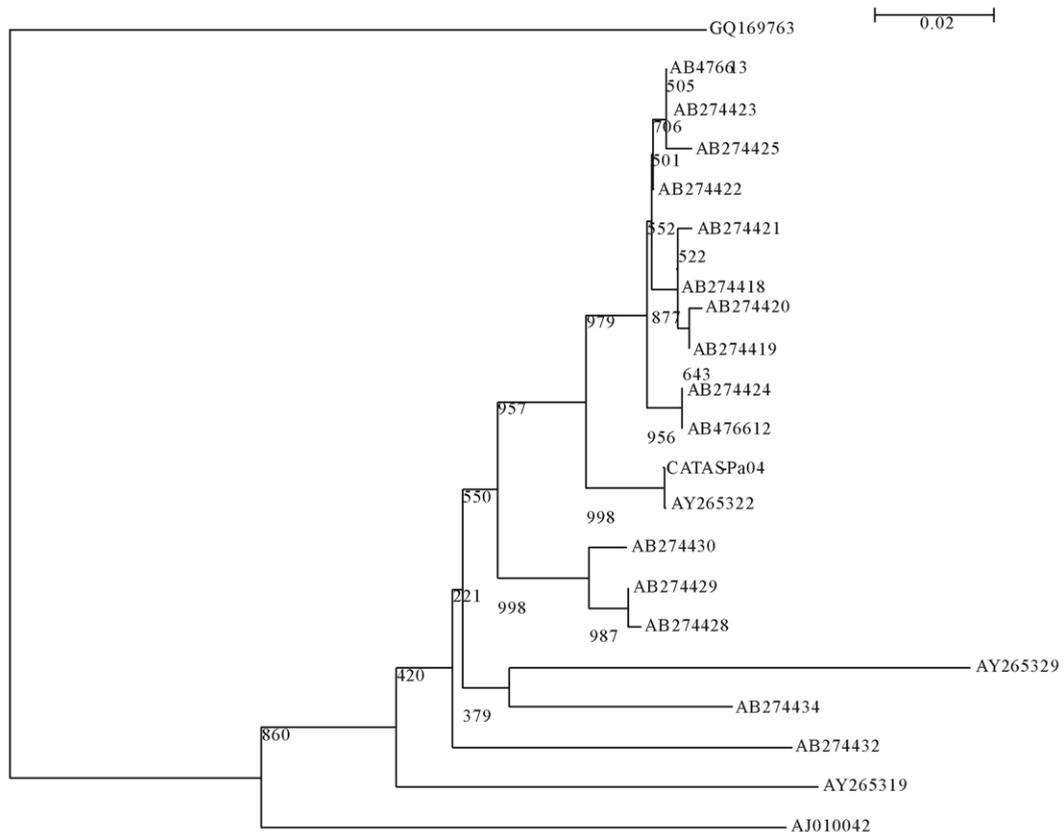


图 2 以 rDNA-ITS 序列构建的 *Pyricularia* 属 N-J 法系统发育树

3 讨论

笔者在海南省儋州市、文昌市和乐东县等市县进行香蕉叶部病害调查时, 均有发现一种田间症状与 *Pyricularia angulata*^[6] 较为相似的叶部病害。从病原菌的组织分离、柯赫氏法则验证结果以及其分生孢子、分生孢子梗的形态、大小和色泽看均符合梨孢属的特征^[7], 该病原菌与 Kim 等人^[6] 描述的 *Pyricularia angulata* 形态特征也基本相符。进一步对该病原菌 rDNA-ITS 序列与 GenBank 中 rDNA-ITS 序列进行 BLASTn 比对, 以及通过以 rDNA-ITS 序列对梨孢属真菌绘制系统发育树等鉴定方法, 将该病原菌鉴定为 *Pyricularia angulata* Hashioka, 并将由该病原菌引起的病害命名为香蕉角梨孢叶斑病。经查阅国内外有关香蕉病害名录^[8-9], 国内尚未对这一病害进行过报道, 因此, 香蕉角梨孢叶斑病的报道为国内首次, 是国内

香蕉病害的新记录病害。Kim 等人^[6]认为,该病害分布在叶片和果实上,叶柄、叶鞘、假茎以及果轴上也有该病害的分布,温室内的危害率达 100%,叶片上的病斑直径大小为 1~10 mm,果实上的病斑直径可达 20 mm,从而致使果实失去商品价值。笔者田间调查发现,该病害主要危害香蕉叶片,尤以危害幼苗叶片为重,病原菌也会危害其他部位,但目前尚未发现典型症状。在长期潮湿的苗圃、新植蕉园里,由于病斑迅速扩展,致使叶片枯黄衰落丧失营养功能,病斑上产生的分生孢子会再次侵染叶片,加重对蕉苗的危害,从而影响了香蕉幼苗的正常生长。因此,对该病害的防治应及时,以免造成更大的危害。

参考文献:

- [1] 魏守兴,陈业渊.香蕉周年生产技术[M].北京:中国农业出版社,2008:1-10.
- [2] HUANG S L, YAN B, WEI J G *et al.* First report of plantain zonate leaf spot caused by *Pestalotiopsis menezesiana* in china [J]. Australasian plant disease notes 2007(2):61-62.
- [3] 王振中,李学文,孙正祥,等.一种疫霉菌引起的香蕉新病害的病原初步鉴定[J].广东农业科学,2006(4):50-52.
- [4] 方中达.植病研究方法[M].3版.北京:中国农业出版社,1998:122-125.
- [5] 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. New York: Academic Press, 1990: 315-322.
- [6] KIM W G, KIM C K, LEE E J. Banana blast caused by *Pyricularia angulata* Hashioka [J]. Korean Journal of Plant Pathology, 1987, 3(2): 114-119.
- [7] 陆家云.植物病原真菌学[M].北京:中国农业出版社,2001:424.
- [8] 张开明.香蕉病虫害防治[M].北京:中国农业出版社,1999:90-97.
- [9] 农业部农垦司热带作物处,中国热带作物学会植保专业委员会.华南五省(区)热带作物病虫害名录[G].儋州:中国热带农业科学院华南热带作物学院文印中心,1994:56-58.

A New Leaf Spot Disease of Banana Caused by *Pyricularia angulata*

ZHANG He^{1,2}, ZHANG Xin², QI Yan-xiang², PU Jin-ji², LV Yan-chao¹, XIE Yi-xian²

(1. College of Environment and Plant Protection, Hainan University, Danzhou 571737, China;

2. Environment and Plant Protection Institute, CATAS, Danzhou 571737, China)

Abstract: A new recorded disease of banana in China was found when the species and damages of banana leaf spot disease in Hainan were investigated. Based on the results of tissue isolating, Koch's postulates, morphology identification, rDNA-ITS sequence cloning and *Pyricularia* rDNA-ITS sequences phylogenetic tree analysis, the disease was nominated banana leaf spot disease, whose pathogen was identified as *Pyricularia angulata* Hashio-ka.

Key words: banana leaf spot disease; *Pyricularia angulata*; identification