

DOI:10.13718/j.cnki.zwyx.2024.05.006

广东百香果炭疽病病原菌的分离及鉴定

陈佩君, 杨春艳, 林泽岳, 韩群鑫

仲恺农业工程学院植物健康研究院/农业农村部华南果蔬绿色防控重点实验室/
广东省普通高校果蔬病虫害绿色防控重点实验室, 广州 510225

摘要: 随着我国百香果产业的发展, 病虫害成为生产中不可忽视的问题。采用组织分离法, 对广东省河源市和平县和广州市南沙区百香果产区采集到的炭疽病果实和枝蔓样本进行分离纯化, 获得4个高频率出现的菌株。通过致病性测定, 确认果实病原菌菌株 ZB2-1 和枝蔓病原菌菌株 DGZB, 二者的形态特征与巴西炭疽菌 (*Colletotrichum brasiliense*) 相似, 通过构建多基因联合系统发育树, 发现两个菌株与巴西炭疽菌处于同一分支, 自展值为 100%。结合形态学特征、致病性测定以及构建多基因序列系统发育树的方法进行病原鉴定, 结果表明, 在广东省河源市和平县和广州市南沙区感染百香果果实和枝蔓的炭疽病菌主要为巴西炭疽菌。

关键词: 百香果; 巴西炭疽菌; 形态特征;
多基因序列

中图分类号: S436

文献标志码: A

开放科学(资源服务)标识码(OSID):



文章编号: 2097-1354(2024)05-0048-08

Isolation and Identification of the Pathogen Causing Anthracnose in Passion Fruit in Guangdong

CHEN Peijun, YANG Chunyan, LIN Zeyue, HAN Qunxin

Innovative Institute for Plant Health, Zhongkai University of Agriculture and Engineering / Ministry of Agriculture and Rural Affairs /
Key Laboratory of Green Prevention and Control on Fruits and Vegetables in South China, Guangzhou 510225, China

Abstract: With the development of passion fruit industry in China, diseases and pests have become the problem that cannot be ignored in the production of passion fruit. In this paper, pathogens in the anthracnose disease infected samples from Heping County, Heyuan City and Nansha

收稿日期: 2024-06-27

基金项目: 广东省农业发展和农村工作专项资金项目(2017LM4172)。

作者简介: 陈佩君, 助理农艺师, 主要从事植物保护研究。

通信作者: 韩群鑫, 博士, 教授。

District, Guangzhou City, Guangdong Province were isolated and purified by tissue separation method, and 4 high-frequency strains were obtained. Through pathogenicity testing, it was confirmed that the strain ZB2-1 and strain DGZB could infect the fruit and branch of passion fruit, respectively. The morphological characteristics of the two strains were similar to those of *Colletotrichum brasiliense*. By constructing a multigene combined phylogenetic tree (ITS-TUB2-ACT-CHS1-HIS3-GAPDH), it was found that the two strains were in the same branch with *C. brasiliense*, with a 100% bootstrap support value. The pathogen identification was carried out by combining morphological characteristics, pathogenicity and phylogenetic tree construction. The results indicated that *C. brasiliense* was the pathogen of anthracnose infecting passion fruits and branches in Heping County, Heyuan City and Nansha District, Guangzhou City.

Key words: *Passiflora* spp.; *Colletotrichum brasiliense*; morphological characteristics; multiple gene sequences

百香果(*Passiflora* spp.)又称西番莲、巴西果、鸡蛋果,属于西番莲科西番莲属,原产于巴西、巴拉圭、阿根廷等国家,热带和亚热带地区均有种植.国内百香果产地主要分布在台湾、福建、广东和广西等地区^[1].近年来,百香果在我国多地作为扶贫产业推广,种植面积迅速增加.广东省百香果产业最大种植区为粤西南部^[2].广东适宜的气候,有利于百香果的种植和产业发展,除田间商业化种植外,不少农户庭院和闲置农场也种植了百香果.

随着百香果种植面积的不断扩大,病虫害问题日益凸显,成为影响生产的关键因素之一.其中,炭疽病作为百香果的重要病害,普遍存在于百香果果园中,对百香果的经济价值与产量构成了严重威胁.该病害不仅会导致果实与枝蔓腐烂,严重时甚至会使整株植物枯死,极大地制约了百香果产业的健康发展.国内外已有关于百香果炭疽病病原鉴定的研究,但不同地区鉴定出的病原种类不尽相同.已有研究表明,百香果炭疽病可以由不同种类的炭疽病菌单独或复合侵染^[3-7].目前,炭疽菌分类鉴定主要采用形态学与多基因分子鉴定相结合的方法^[8]. Júnior等^[3]认为巴西黄金百香果果实的炭疽病病原为博宁炭疽菌(*Colletotrichum boninense*); Damm等^[4]认为博宁炭疽菌复合种中的 *Colletotrichum brasiliense*、*Colletotrichum colombiense*、*Colletotrichum torulosum* 和 *Colletotrichum karstii* 等可引起百香果炭疽病; Du等^[5]认为福建百香果果实的炭疽病病原为短孢炭疽菌(*Colletotrichum brevisporum*); 冉飞等^[6]认为贵州百香果果实的炭疽病病原是喀斯特炭疽菌(*C. karstii*); 赵晓珍等^[7]认为贵州百香果果实炭疽病的病原主要有巴西炭疽菌(*C. brasiliense*)和喀斯特炭疽菌(*C. karstii*)两种.百香果炭疽病病原菌种类的多样性可能与种植地的气候和环境相关,而不同病原菌种类对同种杀菌剂的药效可能存在差异^[6].因此,鉴定广东地区百香果炭疽病病原具有重要意义.

采用组织分离法,并结合致病菌菌落形态、致病性和构建多基因联合系统发育树的方法对广东百香果主产区百香果炭疽病病原菌进行分离鉴定,为后期防治百香果炭疽病提供科学依据,有助于促进百香果产业的健康发展.

1 材料与方法

1.1 材料

百香果病果采集于广东省百香果产区.2019年7月于河源市和平县下车镇采集炭疽病果实,2020年8月于广州市南沙区大岗镇采集炭疽病枝蔓.

1.2 培养基

马铃薯葡萄糖琼脂培养基(PDA)和水琼脂培养基(WA).

1.3 病原菌的分离与纯化

采用组织分离法,取病健交界部 5 mm × 5 mm 组织块,先用 75% 酒精浸泡 35 s,然后转移至 2% 次氯酸钠溶液中浸泡 35 s,再用无菌水漂洗 3 次,放在灭菌滤纸上吸干水分.将组织块转移至 PDA 培养基,28 °C 恒温培养,待组织块周围长出菌落,肉眼可见无其他杂菌,挑取菌落边缘琼脂块至 WA 培养基,28 °C 恒温培养.待菌落在新的 WA 培养基上长出菌丝,挑取单菌丝,重复 3 次.单菌丝纯化后的菌株接种到斜面 PDA 培养基,放入 4 °C 冰箱保存.

1.4 致病性测定

将分离纯化后的菌株接种在 PDA 培养基中培养 5 d,用直径 5 mm 的灭菌打孔器取菌饼备用.利用活体接种以及针刺接种的方法把带菌菌饼接种到百香果的果皮和枝蔓上.设置对照组(CK),对照组的菌饼为在无菌 PDA 培养基获取的直径为 5 mm 的琼脂块.每个处理重复 3 次.2~15 d 后观察发病情况,并对发病组织再次进行分离纯化鉴定.

1.5 病原菌鉴定

1.5.1 形态学鉴定

将纯化后的分离病原菌接种到新的 PDA 培养基,28 °C 恒温培养箱中黑暗倒置培养 3 d 后,记录菌落的形态、颜色、边缘和表面特征,并在显微镜下观测分离菌的分生孢子和产孢结构.

1.5.2 分子生物学鉴定

根据 StarSpin Fungal DNA Kit DNA 提取试剂盒的操作步骤,提取致病菌总 DNA,对内转录间隔区基因(*Internal transcribed spacer, ITS*)^[9]、3-磷酸甘油醛脱氢酶基因(*Glyceraldehyde-3-phosphatedehydrogenase, GAPDH*)^[10]、 β -微管蛋白基因(*β -tubulin, TUB2*)^[11]、肌动蛋白基因(*Actin, ACT*)、几丁质合成酶基因(*Chitin synthase 1, CHS1*)^[12]、组蛋白基因 H3(*Histone H3, HIS3*)^[13]进行扩增,反应体系为 2×EasyTaq PCR SuperMix 12.5 μ L, DNA 模板 1 μ L,上下游引物各 1 μ L, Nuclease-Free Water 9.5 μ L. ACT 引物的反应条件:95 °C 预变性 8 min,95 °C 变性 12 s,55 °C 退火 20 s,72 °C 延伸 1 min,循环 35 次,72 °C 延伸 5 min. ITS、GAPDH 和 CHS1 3 对引物的反应条件:95 °C 预变性 3 min,95 °C 变性 30 s,退火温度分别为 50 °C、57 °C 和 56 °C,退火 30 s,72 °C 延伸 1 min,循环 35 次,72 °C 延伸 10 min. TUB2 和 HIS3 引物的反应条件:94 °C 分别预变性 1 min 和 3 min,94 °C 分别变性 60 s 和 30 s,退火温度为 58 °C,分别退火 60 s 和 30 s,72 °C 延伸 1 min,循环 35 次,72 °C 延伸 10 min. PCR 扩增所用的引物及序列见表 1.

委托天一辉远生物科技有限公司对待鉴定物种基因的 PCR 扩增产物进行测序和序列拼接,将得到的序列在 NCBI 数据库上进行 Blast 同源性比对,采用 MEGA 7 对所有序列进行 ClustalW 比对,按 ITS、TUB2、ACT、CHS1、HIS3、GAPDH 的顺序将各基因序列首尾拼接,采用邻接法(Neighbor-joining, NJ)构建系统发育树,自举值(Bootstrap)为 1 000.

表 1 PCR 扩增所用的引物及序列

基因	引物名称	序列(5'-3')
ITS	ITS1	TCCGTAGGTGAACCTGCGG
	ITS4	TCCTCCGCTTATTGATATGC
GAPDH	GDF1	GCCGTCAACGACCCCTTCATTGA
	GDR1	GGGTGGAGTCGTACTIONTGGAGCATGT
TUB2	T1	AACATGCGTGAGATTGTAAGT
	CYLTUB1R	AGTTGTCCGGACGGAAGAG
ACT	ACT-512F	ATGTGCAAGCCGGTTTCGC
	ACT-783R	TACGAGTCCTGGCCCAT
CHS1	CHS-79F	TGGGGCAAGGATGCTTGGGAAGAAG
	CHS-354R	TGGAAGAACCATCTGTGAGAGTTG
HIS3	CYLH3F	AGGTCCACTGGTGGCAAG
	CYLH3R	AGCGATGTCCTTGGACTG

2 结果与分析

2.1 百香果炭疽病田间症状

田间调查发现炭疽病可危害百香果的枝蔓和果实. 广州市南沙区大岗镇采集到的百香果炭疽病枝蔓在发病初期呈水渍状. 环境湿度大时, 发病组织逐渐腐烂, 环境湿度小时, 发病组织干枯, 出现病斑, 病斑上出现大量小黑点, 严重时全株干枯(图 1a 和图 1b). 河源市和平县下车镇采集到的百香果炭疽病果实的表皮在感病初期出现水渍状小斑点, 随后病斑扩大, 病斑中央呈黄褐色, 病斑边缘呈水渍状(图 1c).

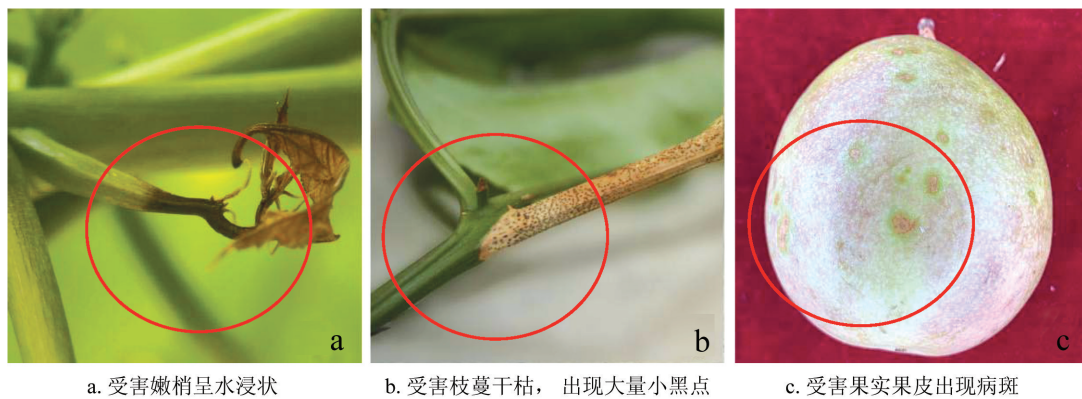
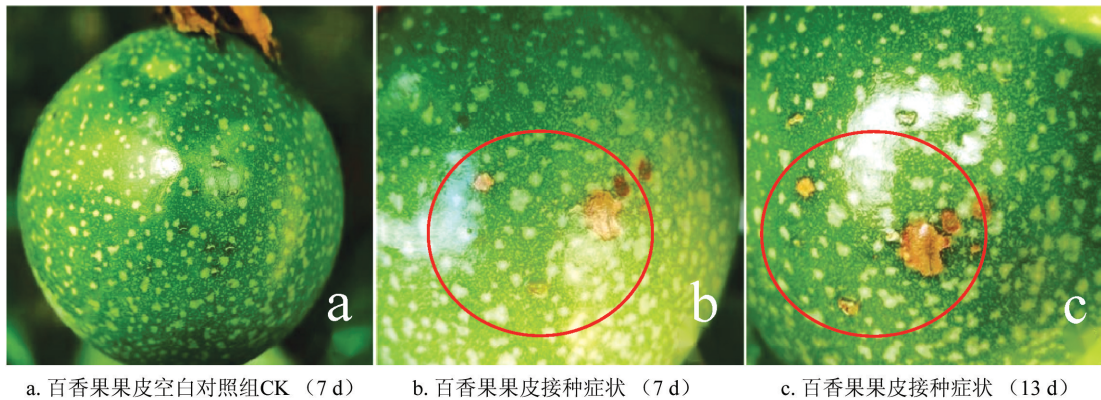


图 1 百香果炭疽病田间症状

2.2 致病菌的分离及致病性测定

采用组织分离法, 从感染的百香果中分离纯化得到 4 个菌株, 分别从百香果感病果实中获得菌株 ZB1 和菌株 ZB2-1, 从百香果感病枝蔓中获得菌株 DGZA 和菌株 DGZB. 将分离纯化后的菌株 ZB2-1 和 DGZB 分别接种到健康的果实和枝蔓上, 接种部位均出现褐色病斑(图 2b、图 2c 和图 3b), 分离纯化菌株 ZB2-1 和 DGZB 具有致病性, 分离纯化菌株 ZB1 和 DGZA 无致病性, 对照组未出现病斑(图 2a, 图 3a). 对发病组织再次分离纯化, 观察到菌株在 PDA 培养基上

的菌落形态与接种菌的菌落形态一致. 因此, 可以确认果实病原菌 ZB2-1 和枝蔓病原菌 DGZB 是百香果炭疽病的病原菌.



a. 百香果果皮空白对照组CK (7 d) b. 百香果果皮接种症状 (7 d) c. 百香果果皮接种症状 (13 d)

图2 百香果果实回接症状



a. 百香果枝蔓空白对照组CK (13 d) b. 百香果枝蔓接种症状 (13 d)

图3 百香果枝蔓回接症状

2.3 病原菌鉴定

2.3.1 病原菌形态特征

采用组织分离法, 对发病组织进行分离纯化, 纯化后的菌株接种到 PDA 培养基上, 置于 28 °C 恒温培养箱中, 黑暗培养 2~3 d, 病原菌形态特征见图 4.

由图 4 可以看出, 果实病原菌 ZB2-1 和枝蔓病原菌 DGZB 在 PDA 培养基上菌落形态一致, 菌落呈圆形, 菌丝绒毛状, 边缘完整. 菌落初期呈白色, 中后期菌落中央为橙红色. 培养 3 d 后, 分生孢子长 13.81~19.43 μm , 宽 5.84~7.71 μm , 边缘光滑, 呈圆柱形, 顶端和基部圆, 分生孢子内有颗粒状物质.

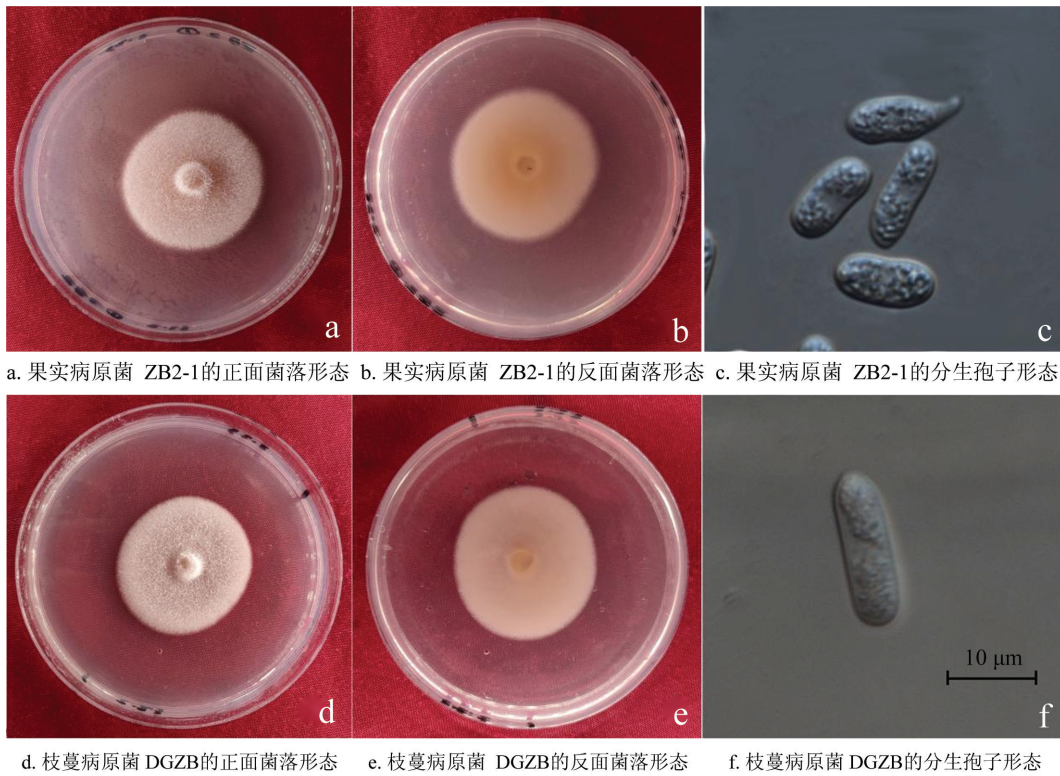


图 4 百香果炭疽病病原菌菌落形态及显微镜形态

2.3.2 病原菌分子生物学鉴定

用引物 *ITS-TUB2-ACT-CHS1-HIS3-GAPDH* 对果实病原菌菌株 ZB2-1 和枝蔓病原菌菌株 DGZB 进行 PCR 扩增, 得到 ZB2-1 和 DGZB 的多基因序列, 采用 MEGA7 Neighbor Joining 法构建系统发育树, 结果表明, 果实病原菌菌株 ZB2-1 和枝蔓病原菌菌株 DGZB 与巴西炭疽菌 *C. brasiliense* (菌株号 CBS: 128528 和 CBS: 128501) 聚于同一分支(表 2), 且自展值为 100%, 外群菌株处在系统发育树的外围(图 5). 综合病原菌形态学特征、致病性验证和多基因鉴定, 确定引起广东百香果炭疽病的病原菌为巴西炭疽菌.

表 2 用于构建百香果炭疽病病原菌进化树的 GeneBank 登录号

菌种	菌株号	GeneBank 登录号					
		<i>ITS</i>	<i>TUB2</i>	<i>ACT</i>	<i>CHS1</i>	<i>HIS3</i>	<i>GAPDH</i>
<i>Colletotrichum brasiliense</i>	CBS: 128528	MH865008.1	JQ005668.1	JQ005582.1	JQ005408.1	JQ005495.1	JQ005321.1
<i>Colletotrichum brasiliense</i>	CBS: 128501	MH864997.1	JQ005669.1	JQ005583.1	JQ005409.1	JQ005496.1	JQ005322.1
<i>Colletotrichum parsonsiae</i>	CBS: 128525	MH865006.1	JQ005667.1	JQ005581.1	JQ005407.1	JQ005494.1	JQ005320.1
<i>Colletotrichum hippeastri</i>	CBS: 241.78	JX010293.1	JQ005666.1	JX009485.1	JQ005406.1	JQ005493.1	JX009932.1
<i>Colletotrichum hippeastri</i>	CBS.125376	MH863510.1	JQ005665.1	JQ005579.1	JQ005405.1	JQ005492.1	JQ005318.1
<i>Colletotrichum hippeastri</i>	CBS.125377	JQ005230.1	JQ005664.1	JQ005578.1	JQ005404.1	JQ005491.1	JQ005317.1
<i>Colletotrichum boninense</i>	CBS.123756	MH863324.1	JQ005589.1	JQ005502.1	JQ005328.1	JQ005415.1	JQ005241.1
<i>Colletotrichum boninense</i>	CBS.128549	MH865016.1	JQ005590.1	JQ005504.1	JQ005330.1	JQ005417.1	JQ005243.1
<i>Colletotrichum boninense</i>	HJH-3	MH370508.1	MH370550.1	MH370529.1	MH370522.1	MH370543.1	MH370515.1
<i>Colletotrichum karsti</i>	CPO 27.948	MN744282.1	MN848362.1	MN746516.1	MN746549.1	MN848389.1	MN737341.1
<i>Colletotrichum karsti</i>	LW1	MT274065.1	MT274067.1	MT274066.1	MT274068.1	MT274070.1	MT274069.1
<i>Colletotrichum karsti</i>	CPO 27.953	MN744283.1	MN848363.1	MN746517.1	MN746550.1	MN848390.1	MN737342.1
<i>Colletotrichum plurivorum</i>	CBS 125473	MG600717.1	MG600984.1	MG600924.1	MG600840.1	MG600886.1	MG600780.1

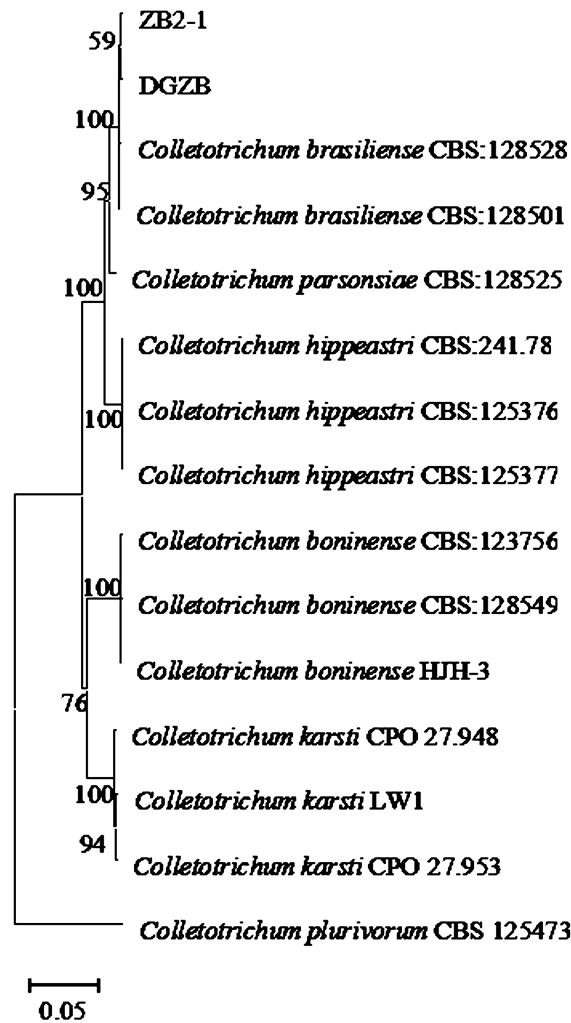


图5 基于 ITS-TUB2-ACT-CHS1-HIS3-GAPDH 基因序列构建的炭疽菌系统发育树

3 讨论与结论

炭疽菌属(*Colletotrichum*)真菌是一类全球分布的植物病原真菌, 寄主范围甚广. 已有研究表明, 炭疽病菌可侵染油茶^[14]、芒果^[15]、葡萄^[16]、辣椒^[17]和火龙果^[18]等作物, 可导致植株枯萎、果实腐烂、叶片病斑等症状, 造成严重的经济损失. 炭疽病原菌可通过风力作用在植物表皮伤口完成侵染. 每年6—10月是广东地区的台风季节, 植物容易受到机械损伤, 同时病残体的越冬菌丝体和分生孢子盘可借助风力传播侵染植物的表皮伤口, 继而发生炭疽病. 本研究在广东省河源市、平县和广州市南沙区百香果果园采样, 从感染的百香果果实和枝蔓中分离得到4个纯化菌株, 分别为 ZB1、ZB2-1、DGZA 和 DGZB. 菌株 ZB1 和 DGZA 分别回接在百香果果实和枝蔓后均无病征出现, 表明菌株 ZB1 和 DGZA 可能是百香果的内生真菌. 菌株 ZB2-1 和 DGZB 具有致病性, 这2个菌株的形态特征与巴西炭疽菌(*C. brasiliense*)的形态一致^[4], 结合 ITS-TUB2-ACT-CHS1-HIS3-GAPDH 多基因构建系统发育树分析, 鉴定出广东百香果炭疽病的致病菌为巴西炭疽菌(*C. brasiliense*), 与赵晓珍等^[7]报道炭疽病果上的病原菌(*C. brasiliense*)相同. 本研究证明了广东地区百香果炭疽病病原菌主要是巴西炭疽菌(*C. brasiliense*), 同时证明了巴西炭疽菌不仅可侵染果实, 降低百香果的经济价值和产量, 还可以危及百香果植

株的生长发育,影响百香果产业的发展。

明确炭疽病病原菌的种类及其侵染植株部位对炭疽病的防治至关重要,这不仅有利于有效选用药剂以及对部位精准施药,还能促进百香果炭疽病的绿色防控。在确定了广东省内引起百香果炭疽病的主要致病菌之后,还需进一步研究该菌的生物学特性,开发出适合大田生产的综合防控措施,为百香果产业的健康发展提供科学依据。

参考文献:

- [1] 杜伟,黎庆宏,陈渊,等.百香果-芒果复合饮料生产工艺[J].农村新技术,2020(5):58-59.
- [2] 邝瑞彬,杨护,孔凡利,等.广东省百香果产业现状与发展对策[J].广东农业科学,2019,46(9):165-172.
- [3] JÚNIOR H J T, FISCHER I H, CÂMARA M P S, et al. First Report of *Colletotrichum boninense* Infecting Yellow Passion Fruit (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*) in Brazil [J]. Australasian Plant Disease Notes, 2010, 5(1): 70-72.
- [4] DAMM U, CANNON P F, WOUDEBERG J H C, et al. The *Colletotrichum boninense* Species Complex [J]. Studies in Mycology, 2012, 73: 1-36.
- [5] DU Y X, SHI N N, CHEN W L, et al. Identification of *Colletotrichum brevisporum* Causing Anthracnose on Passion Fruit [J]. Canadian Journal of Plant Pathology, 2017, 39(4): 527-532.
- [6] 冉飞,陈佳,莫飞旭,等.百香果炭疽病菌生物学特性及室内药剂筛选[J].热带作物学报,2021,42(4): 1080-1085.
- [7] 赵晓珍,王红,王红林,等.贵州百香果果实炭疽病病原菌分离及鉴定[J].中国南方果树,2023,52(3): 50-54, 58.
- [8] 刘丽萍,高洁,李玉.植物炭疽菌属 *Colletotrichum* 真菌研究进展[J].菌物研究,2020,18(4): 266-281.
- [9] WHITE T J, BRUNS T, LEE S, et al. Amplification and Direct Sequencing of Fungal Ribosomal RNA Genes for Phylogenetics [M]//PCR Protocols. Amsterdam: Elsevier, 1990: 315-322.
- [10] GUERBER J C, LIU B, CORRELL J C, et al. Characterization of Diversity in *Colletotrichum acutatum* Sensu Lato by Sequence Analysis of Two Gene Introns, mtDNA and Intron RFLPS, and Mating Compatibility [J]. Mycologia, 2003, 95(5): 872-895.
- [11] O'DONNELL K, CIGELNIK E. Two Divergent Intragenomic rDNA ITS2 Types within a Monophyletic Lineage of the Fungus *Fusarium* are Nonorthologous [J]. Molecular Phylogenetics and Evolution, 1997, 7(1): 103-116.
- [12] CARBONE I, KOHN L M. A Method for Designing Primer Sets for Speciation Studies in Filamentous Ascomycetes [J]. Mycologia, 1999, 91(3): 553.
- [13] CROUS P W, GROENEWALD J Z, RISÈDE J M, et al. Calonectria Species and Their *Cylindrocladium* Anamorphs: Species with Clavate Vesicles [J]. Studies in Mycology, 2006, 55: 213-226.
- [14] 陈美霞,王泽榕,石玲,等.油茶炭疽病病原菌的分离与鉴定[J].亚热带农业研究,2021,17(4): 275-280.
- [15] 章乐乐,王冠,柳凤,等.芒果炭疽病拮抗菌分离、鉴定及生防机制研究[J].生物技术通报,2023,39(4): 277-287.
- [16] 罗跃,刘阿丽,刘旭东,等.葡萄炭疽病病原鉴定及防治药剂筛选[J].中国南方果树,2021,50(6): 121-125.
- [17] 朱晓琴,方树贤,刘冬梅,等.辣椒炭疽病生防菌株的筛选、鉴定及其抑菌机理[J].植物保护学报,2023, 50(4): 913-922.
- [18] 马文娟,刘月廉,梁拾睿.广西玉林火龙果炭疽病病原菌的分离与鉴定[J].广西植保,2022,35(1): 6-8, 16.