

薄壳山核桃黑斑病新病原快速检测与生物防治研究

郑香容, 彭金凤, 潘静霞, 黄晓潇, 于健, 陈佳佳*

(江苏农林职业技术学院风景园林学院, 江苏镇江 212400)

摘要:【目的】薄壳山核桃作为一种重要的坚果和木本油料树种, 其产量和品质常年受到黑斑病的威胁。传统的化学防治方法存在环境污染和食品安全等问题。因此, 快速鉴定病原并寻求生物防治方法成为当前研究的热点。前期研究表明瓜笄霉 (*Choanephora cucurbitarum*) 为薄壳山核桃黑斑病新病原, 为建立瓜笄霉 (*C. cucurbitarum*) 可视化快速检测体系, 并解析螺旋木霉 JSAFC2090 菌株对该病害的生防潜力。

【方法】本研究以瓜笄霉的 RNA polymerase II largest subunit (*RPB1*) 基因序列为靶标设计特异性引物建立环介导等温扩增 (Loop-mediated isothermal amplification, LAMP) 检测方法, 首先对 LAMP 的反应条件和检测体系进行优化, 再进行特异性验证和灵敏度检测。此外, 从健康薄壳山核桃根系分离菌株, 以形态学和分子生物学方向鉴定菌株种类。并采用平板对峙法和盆栽试验验证其对薄壳山核桃黑斑病的生防效果。更深入的, 对 JSAFC 2090 菌株处理后的薄壳山核桃根际土壤进行高通量测序, 检测土壤微生物群落组成变化; 检测 JSAFC 2090 菌株处理后薄壳山核桃叶片苯丙氨酸解氨酶 (PAL) 酶活、过氧化物酶 (POD) 酶活、过氧化氢酶 (CAT) 酶活、超氧阴离子 ($O_2^{\cdot-}$) 含量、过氧化氢 (H_2O_2) 含量, 解析 JSAFC 2090 菌株能否提高薄壳山核桃植株抗性。【结果】以瓜笄霉 (*RPB1*) 基因靶标建立的 LAMP 可视化快速检测反应体系为: 2.5 μ L 10 $\times$ ThermoPol Buffer, 8 mmol $\cdot$ L $^{-1}$ MgSO $_4$, 1.2 mmol $\cdot$ L $^{-1}$ dNTPs, 内引物 FIP 和 BIP 各 1.6 μ mol $\cdot$ L $^{-1}$, 外引物 F3 和 B3 各 0.4 μ mol $\cdot$ L $^{-1}$, 0.8 μ mol $\cdot$ L $^{-1}$ 环引物 LB, 0.8 μ mol $\cdot$ L $^{-1}$ 甜菜碱, 8 U $\cdot$ μ L $^{-1}$ Bst DNA polymerase, 180 mmol $\cdot$ L $^{-1}$ 羟基萘酚蓝, 2 μ L 模板 DNA, 灭菌水补至 26 μ L。使用该体系可特异有效地检测出瓜笄霉 (*C. cucurbitarum*), 体系最佳反应温度为 63 $^{\circ}$ C, 最佳反应时间为 60 min, 最低检测灵敏度为 100 pg/ μ L。经形态学和分子生物学鉴定, 从健康薄壳山核桃根系分离的 JSAFC 2090 菌株为螺旋木霉 (*Trichoderma spirale*)。平板对峙实验表明, 螺旋木霉 JSAFC 2090 菌株可显著抑制薄壳山核桃黑斑病新病原瓜笄霉的菌丝生长, 抑菌率为 91.45%。盆栽实验表明, 螺旋木霉 JSAFC 2090 菌株处理后, 薄壳山核桃黑斑病的发病率和病斑大小显著降低, 此外, 螺旋木霉 JSAFC 2090 菌株还有助于改善薄壳山核桃根际土壤微生物的种群结构, 改良后的土壤病原菌菌群丰度降低; 并通过提高植株防御酶酶活和活性氧积累, 以增强植株广谱抗病性。【结论】此项研究为今后薄壳山核桃黑斑病的田间快速检测, 以及木霉菌作为生防因子防治薄壳山核桃病害的研究和市场化推广奠定理论基础。