

于红梅,赵密珍,王 静,等. 草莓枯萎病菌的分离、鉴定及生物学特性[J]. 江苏农业科学,2013,41(11):124-127.

草莓枯萎病菌的分离、鉴定及生物学特性

于红梅,赵密珍,王 静,孟宪风

(江苏省农业科学院园艺研究所,江苏南京 210014)

摘要:应用 PCR 技术,结合形态学手段,对草莓枯萎病病原菌种类进行鉴定,从江苏省农业科学院草莓生产基地采集草莓枯萎病株,对草莓枯萎病病原菌进行分离鉴定。在 PDA 培养基上用单孢分离法培养出 3 个单菌系,用交叉显微镜初步鉴定该病原物为草莓枯萎病病原菌尖孢镰刀菌。以这 3 个菌系 DNA 为模板,利用真菌通用引物 ITS1、ITS4 对单菌系进行 PCR 扩增,获得 544 bp 转录间隔区片段(ITS),序列测定、Blast 搜索比对结果表明,3 个单菌系序列完全一致,与番茄枯萎病病原菌的 18S rRNA 转录间隔区同源性达 100%,均属尖孢镰刀菌(*Fusarium oxysporum*)。以 PDA 为培养基,采用十字交叉法测定草莓枯萎病菌的生物学特性,结果表明:草莓枯萎病菌在 15~35℃、pH 值为 4~8 范围内均生长较好,最适温度为 30℃,pH 值为 5~8 时菌落变化不明显。

关键词:草莓枯萎病;生物学特性;分离;培养

中图分类号: S436.68 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2013)11-0124-03

草莓(*Fragaria ananassa* Duch.)属蔷薇科草莓属多年生草本植物,果肉鲜美多汁,堪称“水果皇后”。草莓上市时间适逢鲜果匮乏期,且采摘持续时间长。近年来,草莓种植面积逐年增大,品种不断更新,频繁地调种、引种以及连作,导致草莓枯萎病蔓延。草莓枯萎病是由尖孢镰刀菌草莓专化型(*Fusarium oxysporum* f. sp. *Fragariae*)从根部侵染引起的系统性病害,从苗期到收获期都会发生。草莓感染草莓枯萎病后,地上部分表现为心叶变黄绿、卷曲呈船形、两边不对称,叶片无光泽,叶柄及根部维管束变褐色或黑褐色,地下根系黑褐色,不长新根^[1]。该病可导致草莓结果减少、果实无法正常膨大、品质降低,甚至全株枯死^[2-3]。目前已有关于利用形态学鉴定草莓枯萎病的报道。PCR 技术由于具有灵敏度高、准确、快速等优点,已被广泛应用于植物病理学诊断领域^[4-5]。本研究应用 PCR 技术,结合形态学手段,对草莓枯萎病病原菌种类进行了鉴定,旨在为草莓枯萎病抗病育种工作提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

草莓枯萎病株于 2010 年 8 月采自江苏省农业科学院草莓繁育苗基地。

1.2 试剂

Tris-HCl AR、EDTA AR、磷酸钠 AR、NaCl AR、CTAB、Agarose、PMD18-T Vector、Amp、胰蛋白酶、酵母提取物、无水乙醇 AR。

1.3 仪器

Olympus 交叉显微镜、Biometra PCR 仪、Beckman X-22R

冷冻离心机、Tanon 3500 凝胶成像系统、华利达 ZD-9556 水平摇床等。

1.4 方法

1.4.1 草莓枯萎病菌株的分离、纯化 采用常规分离法,将病株根用自来水冲洗干净并晾干,在无菌操作台用 75% 乙醇消毒 30 s,0.1% HgCl₂ 浸泡 60 s,无菌水换洗 3 次;取 1 cm 长病株根在无菌水中纵切成 4 份,再次移入 PDA 平板培养,用连续稀释法经单孢分离纯化后获得供试菌株^[6]。PDA 培养基成分:马铃薯 200 g,葡萄糖 20 g,琼脂 20 g,蒸馏水 1 000 mL。

1.4.2 草莓枯萎菌菌丝、孢子形态 挑取纯化后菌株的边缘菌丝置于含 PDA 的凹皿载玻片中,25℃下置于灭菌培养皿中培养 3 d,观察草莓枯萎菌菌丝、孢子形态。

1.4.3 温度、pH 值对菌丝生长及产孢的影响 用 Na₂HPO₄ 和柠檬酸、NaOH 和 Na₂B₄O₇ 配制 pH 值分别为 4.0、5.0、6.0、7.0、8.0 的 PDA 培养基^[7],接种直径为 5 mm 的菌饼,28℃下培养,每处理重复 3 次,第 5 天测菌落直径,第 10 天测产孢子量。将直径为 5 mm 的菌饼接种到 PDA 平板上,分别置于 5、10、15、20、25、30、35℃等 7 个温度下培养,每处理重复 3 次,第 3 天测菌落直径。

1.5 PCR 检测

采用 CTAB 法提取 DNA^[8-10]。rDNA-ITS 扩增引物序列:ITS1 为 5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3',ITS4 为 5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'。PCR 反应体系:1.0 μL DNA 模板,0.5 μL Taq 酶,2.0 μL 2.5 mmol/L dNTP,2.5 μL 10×PCR buffer,2.5 μL 25 mmol/L MgCl₂,引物各 1.0 μL,加双蒸水至总体积为 25 μL。反应程序为:94℃预变性 2 min;94℃变性 1 min,51℃退火 30 s,72℃延伸 1 min,共 34 个循环;72℃10 min。

1.6 PCR 产物的回收、克隆与测序

将 PCR 产物在 1% 琼脂糖凝胶上电泳分离,用 DNA 回收试剂盒回收 DNA 目的片段,将目的片段纯化克隆至 pMD18-T 载体(Takara 公司),转化大肠埃希菌 JM109 感受态后,用

收稿日期:2013

基金项目:江苏省农业科技自主创新资金[编号:CX(12)3012]。

作者简介:于红梅(1976—),女,江苏兴化人,硕士,助理研究员,主要从事草莓抗病育种研究。Tel:(025)84390219;E-mail:yhmjsh@163.com。

LB 琼脂平板培养,挑取单个白色菌落于 LB 培养基摇菌过夜,取 1.0 mL 菌液测序(上海生工生物工程有限公司)。测序结果在 GenBank 中进行搜索、比对,采用 Clustalx(默认程序)及 GeneDoc 软件进行多序列比对及输出,确定菌株类型。

2 结果与分析

2.1 草莓枯萎病的分离及形态学鉴定

2.1.1 培养性状 样品常规分离后得到 3 株菌落,在 PDA 培养基上 25 ℃ 下培养 5~7 d 后,菌落呈圆形,边缘白色,向

内逐渐变成粉红色或紫红色或白色(图 1),表现出典型的草莓枯萎病菌菌落症状^[11]。

2.1.2 菌丝、孢子形态 菌丝蓬松有隔,大型分生孢子镰刀形,无色,弯曲,2~5 个隔膜,多数为 3 个隔膜,平均大小为 $(19 \sim 45) \mu\text{m} \times (2.5 \sim 5) \mu\text{m}$,基部具足细胞;小型分生孢子椭圆形或卵形,无色,单孢或双孢,大小为 $(5 \sim 26) \mu\text{m} \times (2 \sim 4.5) \mu\text{m}$,厚垣孢子球形,多数单孢子,平滑或皱缩,顶生或间生(图 2),与相关报道一致^[12]。

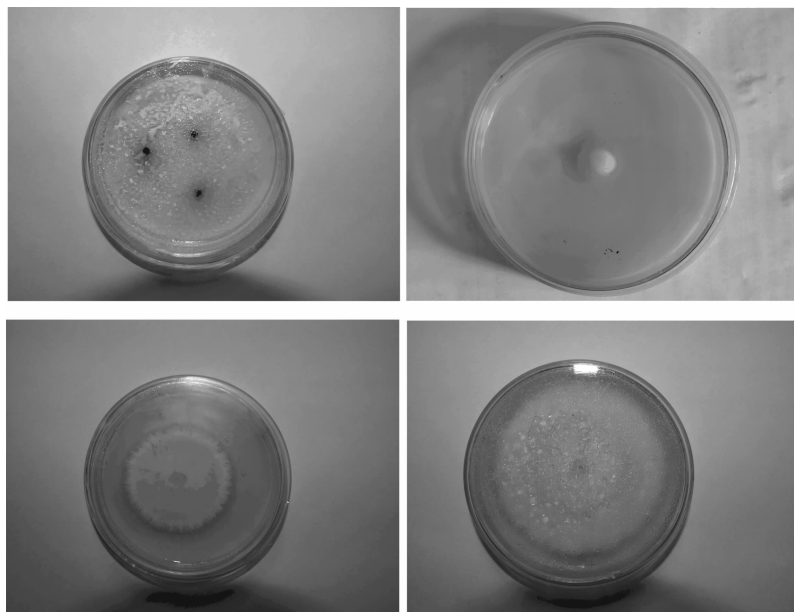


图1 草莓枯萎病病株分离纯化过程

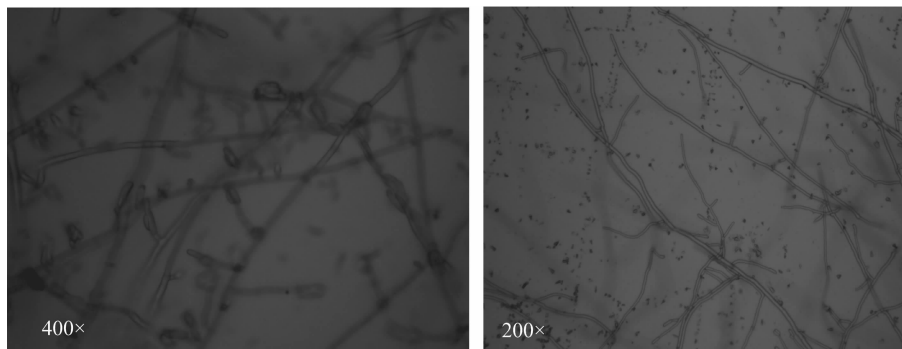


图2 草莓枯萎病菌丝、孢子形态

2.1.3 温度、pH 值对菌丝生长及产孢的影响 由图 3、图 4 可知,草莓枯萎病菌菌落在 15~35 ℃、pH 值为 4~8 范围内均可较好生长,最适温度为 30 ℃;pH 值为 5~8 时菌落变化不明显,当 pH 值低于 4 时菌丝生长不良且产孢量少,说明尖孢镰刀菌(*Fusarium oxysporum*)适合偏碱性条件,菌丝生长与产孢量不呈正相关。

2.2 草莓枯萎病 rDNA-ITS 序列的扩增及序列比较

2.2.1 病菌 rDNA-ITS 序列的扩增 以菌株 DNA 为模板,利用 ITS1、ITS4 通用引物分别扩增 3 个菌株的 rDNA-ITS 序列,其片段大小为 544 bp,产物电泳图有明亮条带,与预期大小一致(图 5)。

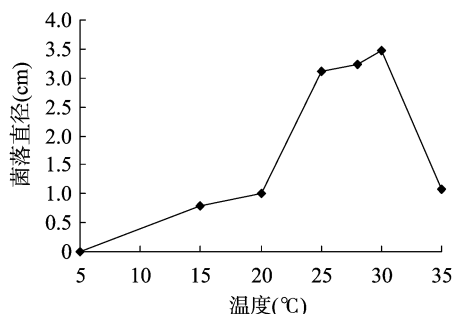


图3 不同温度对草莓枯萎病菌丝生长的影响

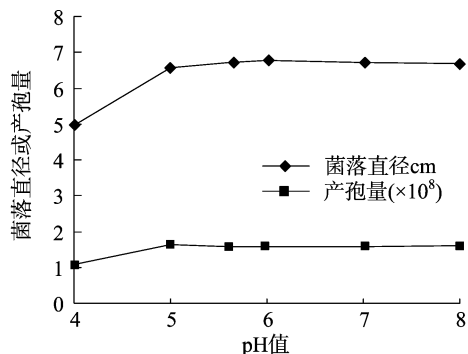
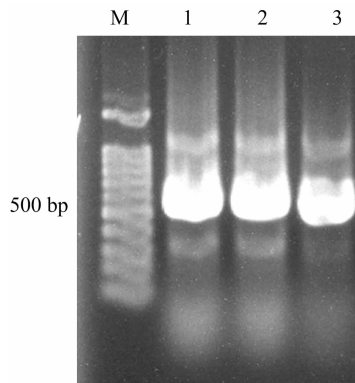


图4 不同 pH 值对草莓枯萎病菌丝生长及产孢量的影响

2.2.2 病菌 rDNA - ITS 序列的比较 用 Blast 2 软件对 3 个菌株的 rDNA - ITS 序列进行比对,结果表明,3 个菌株的 rDNA - ITS 序列一致,通过 Blast 比对分析,发现 3 个菌株的 rDNA - ITS 序列与尖孢镰刀菌 (*Fusarium oxysporum* f. sp. *Lycopersici*) 相似度达 100%^[13] (图 6)。根据草莓枯萎田间



M—100 bp DNA ladder; 1~3—分离的单菌株

图5 草莓枯萎病菌丝PCR产物扩增电泳图
症状、病菌的菌落形态特征以及 rDNA - ITS 序列比对分析结果,可判断本试验分离的草莓枯萎病 3 个病原菌株皆为尖孢镰刀菌。

```

Fa1 : TCCGTAGGTGAACCTGCGGAGGATCATTACCGAGTTTACAACCTCCCAACCCCTGTGAACATACCACCTTGTTCCTCGCGGATCAGCCGCT
Fa2 : TCCGTAGGTGAACCTGCGGAGGATCATTACCGAGTTTACAACCTCCCAACCCCTGTGAACATACCACCTTGTTCCTCGCGGATCAGCCGCT
Fa3 : TCCGTAGGTGAACCTGCGGAGGATCATTACCGAGTTTACAACCTCCCAACCCCTGTGAACATACCACCTTGTTCCTCGCGGATCAGCCGCT
Ly : TCCGTAGGTGAACCTGCGGAGGATCATTACCGAGTTTACAACCTCCCAACCCCTGTGAACATACCACCTTGTTCCTCGCGGATCAGCCGCT

Fa1 : CCCGGTAAACGGGACGGCCGCCAGAGGACCCCTAAACTCTGTTTCTATATGTAACTTCTGAGTAAACCATAAATAAATCAAACCTTTCAAC
Fa2 : CCCGGTAAACGGGACGGCCGCCAGAGGACCCCTAAACTCTGTTTCTATATGTAACTTCTGAGTAAACCATAAATAAATCAAACCTTTCAAC
Fa3 : CCCGGTAAACGGGACGGCCGCCAGAGGACCCCTAAACTCTGTTTCTATATGTAACTTCTGAGTAAACCATAAATAAATCAAACCTTTCAAC
Ly : CCCGGTAAACGGGACGGCCGCCAGAGGACCCCTAAACTCTGTTTCTATATGTAACTTCTGAGTAAACCATAAATAAATCAAACCTTTCAAC

Fa1 : AACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGACGACAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAA
Fa2 : AACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGACGACAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAA
Fa3 : AACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGACGACAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAA
Ly : AACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGACGACAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAA

Fa1 : CGCACATTGCGCCCGCCAGTATTCTGGCGGGCATGCTGTTTCGAGCGTCATTTCAACCCCTCAAGCACAGCTTGGTGTGGGACTCGCGTTAATT
Fa2 : CGCACATTGCGCCCGCCAGTATTCTGGCGGGCATGCTGTTTCGAGCGTCATTTCAACCCCTCAAGCACAGCTTGGTGTGGGACTCGCGTTAATT
Fa3 : CGCACATTGCGCCCGCCAGTATTCTGGCGGGCATGCTGTTTCGAGCGTCATTTCAACCCCTCAAGCACAGCTTGGTGTGGGACTCGCGTTAATT
Ly : CGCACATTGCGCCCGCCAGTATTCTGGCGGGCATGCTGTTTCGAGCGTCATTTCAACCCCTCAAGCACAGCTTGGTGTGGGACTCGCGTTAATT

Fa1 : CGCGTTCTCTCAAATTGATTGGCGGTACGTCGAGCTTCCATAGCGTAGTAGTAAAACCCCTCGTTACTGGTAATCGTCGCGGCCACGCGGTTAAA
Fa2 : CGCGTTCTCTCAAATTGATTGGCGGTACGTCGAGCTTCCATAGCGTAGTAGTAAAACCCCTCGTTACTGGTAATCGTCGCGGCCACGCGGTTAAA
Fa3 : CGCGTTCTCTCAAATTGATTGGCGGTACGTCGAGCTTCCATAGCGTAGTAGTAAAACCCCTCGTTACTGGTAATCGTCGCGGCCACGCGGTTAAA
Ly : CGCGTTCTCTCAAATTGATTGGCGGTACGTCGAGCTTCCATAGCGTAGTAGTAAAACCCCTCGTTACTGGTAATCGTCGCGGCCACGCGGTTAAA

Fa1 : CCCCAACTTCTGAATGTTGACCTCGGATCAGGTAGGAATACCCGCTGAACCTTAAGCATATCAATAAGCGGAGGA
Fa2 : CCCCAACTTCTGAATGTTGACCTCGGATCAGGTAGGAATACCCGCTGAACCTTAAGCATATCAATAAGCGGAGGA
Fa3 : CCCCAACTTCTGAATGTTGACCTCGGATCAGGTAGGAATACCCGCTGAACCTTAAGCATATCAATAAGCGGAGGA
Ly : CCCCAACTTCTGAATGTTGACCTCGGATCAGGTAGGAATACCCGCTGAACCTTAAGCATATCAATAAGCGGAGGA

```

Fa1、Fa2、Fa3 为本试验草莓枯萎病 3 个菌株的 ITS 序列, Ly 为番茄枯萎病病原菌的 ITS 序列 (HM043738.1)

图6 草莓枯萎病3个菌株与番茄枯萎病病原菌的ITS序列比较

3 结论与讨论

了解草莓枯萎病原菌的生物学特性是深入研究草莓枯萎病的基础,本研究结果表明,草莓枯萎病菌落在 15 ~ 35 ℃、pH 值为 4 ~ 8 范围内均可较好生长,最适温度为 30 ℃、pH 值为 5 ~ 8 时菌落变化不明显,pH 值低于 4 时菌丝生长不良且产孢量少,说明尖孢镰刀菌适合偏碱性条件且菌丝生长与产孢量不呈正相关。夏季草莓育苗困难与持续高温多雨有关,高温多雨的天气适合草莓枯萎病菌的生长。本试验建立的 PCR 鉴定技术可准确判断植株病害是否为枯萎病。黄萎病、枯萎病都是系统性病害,黄萎病菌属轮枝菌属,植株感染该病菌后外围老叶的叶缘、叶脉间变黄呈西瓜斑纹,心叶不畸形黄化,下部叶片最后变成青枯状直至植株枯死^[14]。传统方式分类鉴定镰孢菌是一项十分复杂的工作,主要通过形态特征、生理生化指标来分类鉴定该病原真菌。该方法受外界多种因素影响,不确定性很大,培养物不典型或不产孢子,使得鉴定工作更困难,因此有必要建立快速鉴定草莓枯萎病的方法。

应用 PCR 扩增技术检测草莓枯萎病具有快速、准确、方便等优点,但 PCR 反应条件需要仔细优化,本试验退火温度为 58 ℃ 时没有目的条带,当退火温度为 51 ℃ 时出现明亮单一的条带。PCR 扩增技术已被普遍用于真菌鉴定^[15-16]。植物真菌因不同地理分布、不同寄主宿主呈现多样性、复杂性,PCR 技术在真菌鉴定上存在很大困难。为了更好地了解草莓枯萎病原菌之间的分化与差异,不仅要增加不同地区的菌株,还要做寄主转化试验,同时有必要对其基因序列进行测序分析。

参考文献:

- [1] 王久兴,贺桂欣,李清云,等. 蔬菜病虫害诊治原色图谱:草莓分册[M]. 北京:科学技术文献出版社,2005:15.
- [2] 吴宝荣. 草莓枯萎病的识别与防治技术[J]. 现代园艺,2006(4): 28 - 29.
- [3] 杨焕青,王开运,范 昆,等. 草莓枯萎病菌的生物学特性及 7 种杀菌剂对其抑制作用[J]. 植物保护学报,2008, 35 (2):169 - 174.

江 曙,段金康,钱大玮,等. 腐烂茎线虫侵染机理及其防治技术体系的研究思路与方法[J]. 江苏农业科学,2013,41(11):127-130.

腐烂茎线虫侵染机理及其防治技术体系的研究思路与方法

江 曙,段金康,钱大玮,杨念云,严 辉

(南京中医药大学,江苏南京 210046)

摘要:腐烂茎线虫主要侵染甘薯、马铃薯等农作物以及当归、薄荷等多种中药材,造成农产品及中药材大量减产、品质低劣,该线虫病害是一种毁灭性病害,已被我国列入检疫性病害。综述了腐烂茎线虫的生物学特性、传播途径及侵染机理,从化学防治、无病壮苗、轮作覆膜等农艺措施,尤其是培育和使用抗病良种及生物防治等方面,提出了防治腐烂茎线虫危害的技术体系。

关键词:腐烂茎线虫;侵染;防治技术体系;思路;方法

中图分类号: S432.4⁺5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2013)11-0127-04

腐烂茎线虫(*Ditylenchus destructor* Thorne)属线虫纲垫习目茎线虫属,最初是在马铃薯上发现的,导致马铃薯腐烂,因此在国外也有“Potato rot nematode”之称。这种线虫在中国首先发现于甘薯,主要侵染块根使其腐烂,引起甘薯茎线虫病。腐烂茎线虫主要分布于美国、加拿大、秘鲁、伊朗、巴基斯坦、日本、新西兰、南非和许多欧洲国家,也是我国进境植物检疫性线虫,主要分布于我国河南、山东、河北、北京等地。一些农作物及中药材被侵染后,在生长后期和贮藏期可表现出如下 3 种症状类型:一种是形成“糠心病”,病部由上而下、由内向外扩展,被线虫危害后形成不规则的孔洞,加之其他微生物的侵染,受害部位呈现褐白相间的干腐症状,外表正常,但重量变轻。另一种症状是土壤中腐烂茎线虫经植物外皮侵入形成“糠皮病”,病部一般由下向上、由外向内扩展,在表皮产生青色至紫色稍凹陷小斑,然后因其他微生物侵染呈现黑褐色,后

期表皮龟裂,皮层内部呈褐白相间的干腐症状。此外,糠心和糠皮可同时发生,互为转换,混合发展^[1]。线虫侵染农作物及中药材后,不仅田间危害直接造成减产,而且还能造成贮藏期烂窖、育苗期烂床、移栽后死苗,有的死苗 15%~40%,发病重者甚至高达 60%~70%,造成严重减产^[2]。因此,本文通过探讨腐烂茎线虫的侵染机理,建立有效可行的防治技术体系,以促进农作物及中药材产量和品质的提高。

1 腐烂茎线虫的生物学特性

腐烂茎线虫是一种杂食性的植物寄生线虫,寄主范围较广,包括 70 余种作物和杂草,也可以寄生在土壤真菌的菌丝上,主要寄主是马铃薯,其他常见寄主有鳶尾、郁金香、大菖蒲、甜菜、三叶草、大丽菊、胡萝卜、花生、向日葵、甘薯、大豆、番茄、烟草、甘蔗、大麦、小麦等及多种野生植物^[3-4]。在无高等植物的情况下,该线虫能够在约 40 属 70 种真菌上繁殖,常见的有 *Alternaria*、*Botrytis*、*Fusarium*、*Penicillium*、*Phoma*、*Trichoderma*、*Verticillium*、*Cylindrocarpum*。不同寄主上的线虫群体在致病力上有差异,水仙、鳶尾、风信子上的线虫分离物在马铃薯上的致病性表现出明显的差异,其中从风信子上分离到的线虫不能侵染马铃薯。在我国,腐烂茎线虫主要危害甘薯,

收稿日期:2013-04-24

基金项目:国家自然科学基金(编号:81072996);国家科技支撑计划(编号:2006BAI09B05-1,2007BA137B02)。

作者简介:江 曙(1970—),男,安徽安庆人,博士,副教授,主要从事微生物与药用植物品质的相关研究。E-mail:jiangshu2000@163.com。

[4]李 伟,张爱香,江 蛟,等. 甜瓜蔓枯病原鉴定及其生物学特性[J]. 江苏农业学报,2008,24(2):148-152.

[5]陈志谊,王晓艳,罗楚平. 空心莲子草病原真菌的分离筛选及其菌株 SF-193 种的鉴定[J]. 中国生物防治,2007,23(4):353-357.

[6]张书建,何月秋. 介绍一种简单的真菌单孢子分离法[J]. 云南农业大学学报,2003,18(3):315-316.

[7]曾富春,黄 云,赵艳琴,等. 草莓枯萎病菌的生物学特性[J]. 四川农业大学学报,2006,24(2):156-160.

[8]徐成楠,周宗山,吴玉星,等. 苹果轮纹病菌 DNA 提取方法研究[J]. 江苏农业科学,2009(1):45-46.

[9]刘 丹,刘太国,张 敏,等. 小麦光腥黑粉菌冬孢子总 DNA 提取方法比较[J]. 植物保护,2006,32(2):93-95.

[10]胡小平,杨家荣,商文静,等. 苹果黑星病菌 DNA 提取方法研究[J]. 西北农林科技大学学报:自然科学版,2004,32(4):

41-43.

[11]方中达. 植病研究方法[M]. 2 版. 北京:中国农业出版社,1979:189-190.

[12]郑 莉,朱秋珍,冯自立,等. 草莓枯萎病原菌鉴定及其生物学特性[J]. 湖北农业科学,2006,45(2):194-195.

[13]郑雪芳,蓝江林,曹 宜,等. 瓜类作物枯萎病原菌的分类鉴定及其 ITS 序列差异性分析[J]. 中国农业科学,2008,41(12):4077-4084.

[14]邱 强,胡 淼,王志田,等. 原色西瓜、甜瓜、草莓病虫与营养诊断图谱[M]. 北京:中国科学技术出版社,2000:89-90.

[15]王文静,李成伟. 番茄白粉菌的 PCR 分子检测[J]. 河南农业科学,2010(5):72-75.

[16]张志华,洪 葵. 核酸序列直接分析在真菌鉴定方面的应用[J]. 华南热带农业大学学报,2006,12(2):39-43.