

高园园,张龙平,任艳云,等. 山东省大蒜主产区根腐病病原菌分离与鉴定[J]. 江苏农业科学,2021,49(14):86-90.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2021.14.016

山东省大蒜主产区根腐病病原菌分离与鉴定

高园园¹,张龙平¹,任艳云¹,朱庚振²,刘国伟¹,王南南¹

(1. 济宁市农业科学研究院,山东济宁 272031; 2. 山东省微山县扶贫开发办公室,山东微山 277600)

摘要:为进一步探讨山东省大蒜主产区根腐病的病原菌及种类,于 2020 年从山东省济宁市任城区、金乡县,菏泽市巨野县,临沂市兰陵县等采集发病大蒜植株,通过组织分离法获得 4 株分离物,利用形态学鉴定方法,结合 Blast 同源性分析,利用 MAGE 7.0 构建系统发育树的方法对分离物进行鉴定。结果表明,尖孢镰孢菌(*Fusarium oxysporum*)、腐皮镰孢菌(*F. solani*)、芳香镰孢菌(*F. redolens*)、木贼镰孢菌(*F. equiseti*)是山东省大蒜主产区根腐病的致病菌。通过对比 4 种镰孢菌对大蒜根腐病的致病性发现,分离出尖孢镰孢菌的植株根腐病最为严重,可见尖孢镰孢菌是大蒜根腐病病害的主要致病菌。结果可为大蒜根腐病拮抗菌的筛选和防治及大蒜——根腐病互作机理研究提供理论依据和技术参考。

关键词:大蒜;根腐病;尖孢镰孢菌;病原菌鉴定;腐皮镰孢菌;芳香镰孢菌;木贼镰孢菌

中图分类号:S436.33 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2021)14-0086-04

大蒜(*Allium sativum* L.)为百合科葱属一年生或二年生草本植物,原产于西亚和中亚,汉代张骞出使西域带回我国^[1],至今已有 2 000 多年的种植历史^[2]。大蒜性温味辛,富含营养物质,是人们生活中重要的蔬菜和调味品。据统计,我国是世界上大蒜种植面积最大、产量最高的国家^[3],大蒜种植成为多数地区经济发展的重要支柱性产业和出口创汇农产品之一^[4]。近年来随着大蒜产业的发展 and 效益的增加,在大蒜主产区由于连作、管理不善等因素影响,大蒜病害呈现高发态势^[5],尤其是大蒜根腐病较为严重,影响大蒜的产量和品质。已有研究表明,根腐病发生是由多种病原菌混合侵染造成的^[6],比如牡丹根腐病病原菌是茄腐皮镰刀菌(*Fusarium solani*)、链格孢菌(*Alternaria* spp.)、立枯丝核菌(*Rhizoctonia solani*)等;甜瓜、黄瓜、苜蓿等作物的根腐病病原菌是茄腐皮镰刀菌;宁国山核桃根腐病的病原是尖孢镰刀菌(*F. oxysporum*)和瓜果腐霉菌(*Pythium aphanidermatum*)。有关大蒜根腐

病的病原,前人进行了一定研究,已知的有真菌性和细菌性病原菌。张博等通过对病株进行分离和致病力测定,确定致病菌是腐霉(*Pythium*)^[7];而有的研究则认为大蒜根腐病是由镰刀菌属的真菌引起的,其中尖孢镰刀菌是致病的优势种^[8];有的研究则认为大蒜根腐病属细菌性病害,是大蒜软腐病的一种^[9];由此可见,导致大蒜根腐病的致病菌在不同地区存在差异。本研究以大蒜根腐典型发病植株为供试材料,采用组织分离法对病原菌进行分离纯化,运用菌落形态学和分子生物学相结合的方法进行鉴定,以期明确导致大蒜发生根腐病的病原菌种类,旨在为大蒜生长过程中根腐病病害的有效防治提供理论基础和技术借鉴。

1 材料与方法

1.1 样品来源

于 2020 年从山东省济宁市任城区、金乡县,菏泽市巨野县,临沂市兰陵县等大蒜种植主产区采集发病的植株样品,将以上样品保存于无菌采样袋中,立刻到实验室进行病原菌分离。

真菌固体培养采用马铃薯葡萄糖琼脂培养基(PDA)、Ezup 柱式真菌基因组 DNA 抽提试剂盒购于生工生物工程(上海)股份有限公司。

1.2 方法

1.2.1 菌株分离纯化 采用常规组织分离法进行病原菌分离^[10-11],取患根腐病的大蒜植株,流水冲

收稿日期:2020-11-07

基金项目:国家特色蔬菜产业技术体系济宁综合试验站项目(编号:CARS-24-G-11);农业农村部农业微生物资源收集与保藏重点实验室开放基金(编号:MRCP-2018-2)

作者简介:高园园(1982—),女,山东东平人,硕士,高级农艺师,主要从事大蒜育种与栽培技术研究。E-mail:zgy_115@163.com。

通信作者:任艳云,博士,研究员,主要从事蔬菜育种与生态高效栽培技术研究工作。E-mail:renyanyun@126.com。

洗根部 30 min,75% 乙醇浸泡 1 min,3% 次氯酸钠浸泡 2 min,无菌水漂洗 5 次,无菌滤纸吸干。取病健交界处用无菌刀切 2 cm 小段接种于 PDA 培养基,28 ℃ 培养 5~7 d,挑取边缘菌丝转接纯化。

1.2.2 菌株的致病性测定 斜面保存的菌株接种到 PDA 液体培养基中,28 ℃、160 r/min 摇床培养 7 d,制成 10^7 个孢子/mL 的孢子悬浮液,用于接种备用,装有基质的组培瓶灭菌后备用。采集苗期大蒜植株,用流水冲洗 20 min,乙醇消毒鳞茎和根部 1 min,无菌水冲洗 5 次,移栽到灭过菌的基质中,加入 25 mL 菌悬液灌根,对照组接无菌水培养,观察接种后的发病情况。根据科赫法则,对发病的植株再次进行病原菌分离,并与原接种菌株进行比较。

1.2.3 菌株鉴定

1.2.3.1 形态观察 将分离到的致病菌接种到 PDA 培养基上,28 ℃ 培养 5 d 后观察菌落形态。挑取菌丝进行菌体显微观察,参照《真菌鉴定手册》进行形态学鉴定^[12]。

1.2.3.2 ITS 序列分析 将纯化培养好的菌株用真菌基因组 DNA 提取试剂盒进行提取。采用真菌通用引物 ITS1 (5' - TCCGTAGGTGAACCTGCGG - 3')、ITS4 (5' - TCCTCCGCTTATTGATATGC - 3') 进行扩增。PCR 反应体系为:DNA 模板 0.5 μL,10 × Buffer 2.5 μL,dNTP 1 μL,酶 0.2 μL,上下游引物各 0.5 μL,加双蒸 H₂O 至 25 μL。反应条件:94 ℃ 预

变性 4 min,94 ℃ 变性 45 s,55 ℃ 退火 45 s,72 ℃ 延伸 1 min,30 个循环;72 ℃ 延伸 10 min。PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测后,DNA 片段经胶回收试剂盒回收,将扩增产物送生工生物工程(上海)股份有限公司进行序列测定。

1.2.3.3 构建系统发育树 从 NCBI 网站下载与待测菌株相似的序列,通过 CLUSTAL_X (version 1.81)^[13] 进行序列比对,去除冗余序列。用邻接法 (neighbour-joining,NJ)^[14] 在 MEGA 7.0^[15] 软件中构建系统发育树,设定值 Bootstrap 均为 500 次。

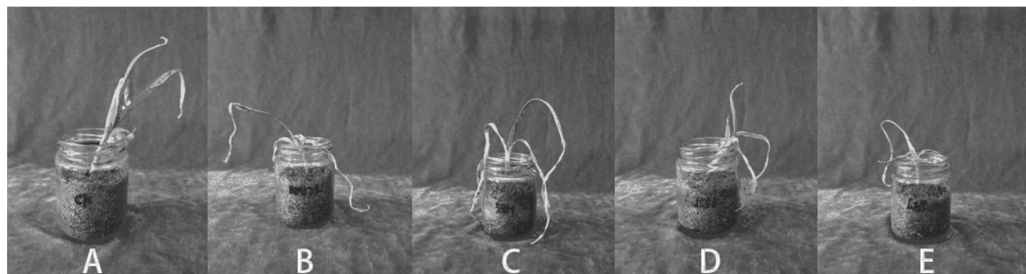
2 结果与分析

2.1 菌株分离纯化结果

通过组织分离法从发病大蒜植株中分离到 4 株菌落形态特征不同的真菌菌株,依次编号为 55R-1、BR917-3、JSS6、LZR,进一步分离纯化培养后,进行菌落形态鉴定和分子生物学鉴定。

2.2 菌株致病性测定

采用科赫法则进行致病性验证,将分离到的菌株重新接种到健康大蒜植株上。接种 7 d 后,分别接种不同病原菌分离物的植株均呈明显干枯症状,根部呈腐烂状(图 1)。对根部发病部位重新分离病原菌,分离结果与原接种真菌一致。根据科赫法则,证明接种的真菌 55R-1、BR917-3、JSS6、LZR 是引起大蒜根腐病的致病菌。



A—对照; B—菌株 BR917-3; C—菌株 55R-1; D—菌株 SCC6; E—菌株 LZR

图1 接种病原菌分离物后大蒜植株的发病症状

2.3 菌株鉴定

2.3.1 形态特征鉴定 菌株 55R-1 菌落颜色呈白色,菌落背面为浅黄色,生长速度中等,菌丝白色、絮状、致密。大分生孢子纺锤形,有横隔,1~3 隔常见,小分生孢子棒槌形(图 2)。

菌株 BR917-3 菌落颜色呈白色,菌落背面呈黄色,中心区域菌丝隆起,絮状茂盛,边缘菌丝颜色稍暗。大分生孢子细长,镰刀型或纺锤形,1~3 个隔膜,两端细胞尖或稍弯,小分生孢子纺锤形或者

椭圆形(图 3)。

菌株 JSS6 菌落颜色呈白色,菌落背面为土黄色。菌丝白色、密实、边缘齐。小孢子长椭圆形,大孢子顶端渐尖,呈镰刀状,多数 3 隔(图 4)。

菌株 LZR 菌落呈同心环状,初期颜色为浅白色,在生长后期中心圆环区呈土黄色,菌落背面黄色。大型分生孢子呈镰刀型,1~3 横隔,小型分生孢子呈卵圆形或柱形,偶有横隔(图 5)。

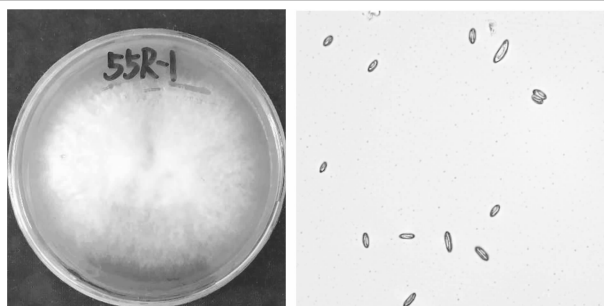


图2 菌株 55R-1 的菌落形态特征和菌体形态特征

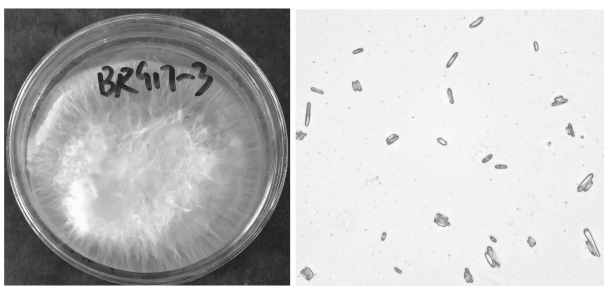


图3 菌株 BR917-3 的菌落形态特征和菌体形态特征

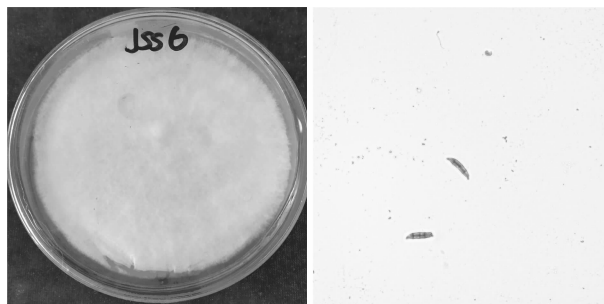


图4 菌株 JSS6 的菌落形态特征和菌体形态特征

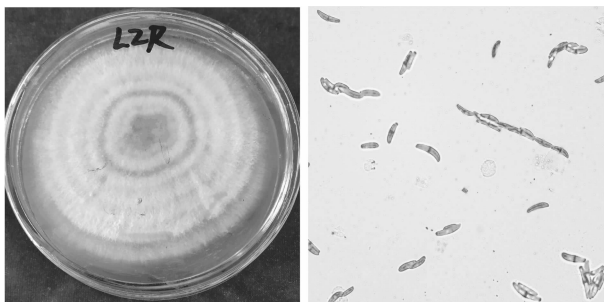


图5 菌株 LZR 的菌落形态特征和菌体形态特征

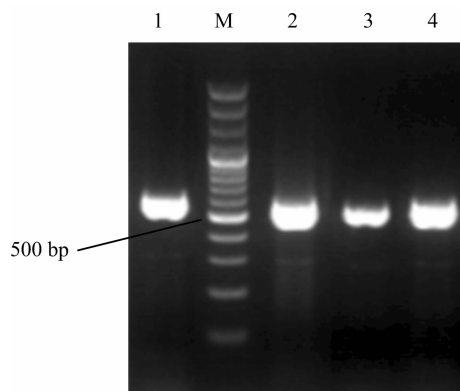
M—Marker; 1—菌株 55R-1; 2—菌株 JSS6;
3—菌株 BR917-3; 4—菌株 LZR

图6 菌株电泳结果

微观察结果,鉴定菌株 55R-1 为芳香镰孢菌;菌株 JSS6 与木贼镰孢菌 (*F. equiseti*) 的同源性最高,相似性 100% 且与该物种其他菌株均聚在一支,结合菌落形态及显微观察结果,鉴定菌株 JSS6 为木贼镰孢菌;菌株 BR917-3 与尖孢镰孢菌 (*F. oxysporum*) 的相似性最高 (100%) 且聚到一支,结合菌落形态及显微观察结果,鉴定菌株 BR917-3 为尖孢镰孢菌;菌株 LZR 与腐皮镰孢菌 (*F. solani*) 的其他菌株均聚到一支且表现出最高相似性 (100%),结合菌落形态及显微观察结果,鉴定菌株 LZR 为腐皮镰孢菌。

3 讨论

近年来由于市场需求增大,大蒜种植盲目扩大生产,连作、病害、种质资源退化等已成为山东省大蒜生产的主要限制因素^[16],尤其是土传病害已严重制约和影响大蒜的产量提高和品质改善。张丽等研究表明,土传病害的病原菌种类和数量与气候、土壤类型及生物因子等密切相关^[17]。前人对大蒜根腐病的致病菌进行了大量研究,但不同地域的研究者分离得到的病原菌却不尽相同^[16],可见不同区域大蒜根腐病的致病菌存在明显差异。本研究从山东省 3 个地市 4 个县 (市、区) 取样大蒜根腐病病株,通过形态学和分子生物学鉴定均为镰孢菌属,分别为尖孢镰孢菌、腐皮镰孢菌、芳香镰孢菌、木贼镰孢菌,可见镰孢菌属是山东省大蒜主产区根腐病的致病菌。但从分离地理区域来看,不同地域所分离到的分离物种类存在明显差别^[18],究其原因可能与各县 (市、区) 的地理位置、气候因素和耕作制度等密切相关^[11]。本研究的取样区域多采取大蒜连作种植模式,该种植模式致使土壤地力下降,自身

2.3.2 ITS 序列分析 对 PCR 扩增产物采用琼脂糖凝胶电泳进行检测,电泳结果见图 6,扩增条带大小在 510 ~ 540 bp 之间。

将 4 个菌株 ITS 序列进行 Blast 同源性分析,利用 MEGA 软件构建系统发育树,结果如图 7 所示。菌株 55R-1 与芳香镰孢菌 (*F. redolens*) 表现出最高相似度 (100%) 且聚在一支,结合菌落形态及显

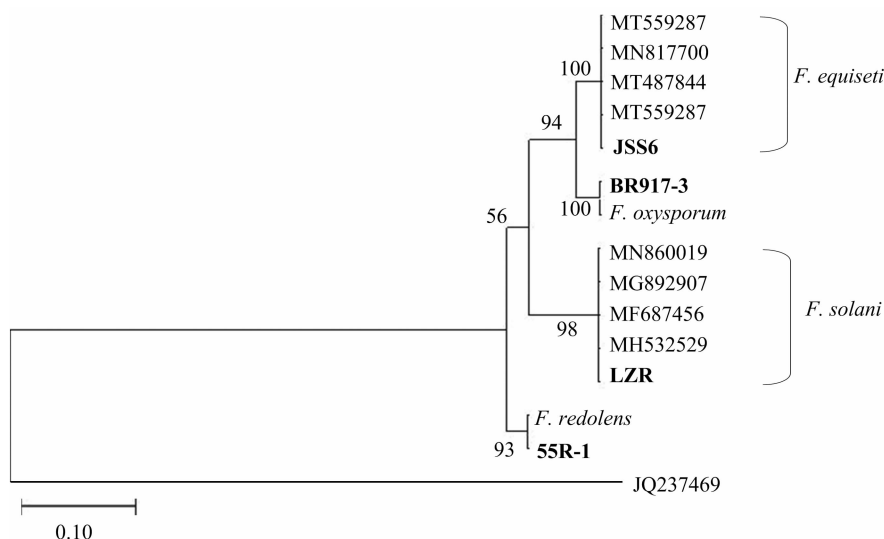


图7 基于菌株 55R-1、JSS6、BR917-3 和 LZR 的 ITS 序列构建的系统发育树

有毒物质不断积累,造成微生物群落结构和优势菌群发生明显变化,加剧根腐病等土传病害的发生^[16],这与张丽娟等的研究结果类似^[8]。

同一种属不同种类的致病菌对根腐病的致病效果差异明显,本研究通过对比尖孢镰孢菌、腐皮镰孢菌、芳香镰孢菌、木贼镰孢菌对大蒜根腐病的致病性发现,分离出尖孢镰孢菌的植株根腐病较为严重,分离出腐皮镰孢菌、芳香镰孢菌、木贼镰孢菌的植株根腐病较轻,可见尖孢镰孢菌是该病害的主要致病菌。下一步笔者所在课题组将通过盆栽和大田试验,进一步研究在不同生长时期尖孢镰孢菌对大蒜根腐病的致病机制,同时开展针对该病害的抗病品种选育和种苗繁育工作,筛选高效防治药剂^[19],以期防治山东省大蒜主产区根腐病提供理论依据和技术支撑。

4 结论

综上,尖孢镰孢菌、腐皮镰孢菌、芳香镰孢菌、木贼镰孢菌均可导致山东省大蒜主产区大蒜根腐病的发生,尤其是尖孢镰孢菌是该病害的主要致病菌。本研究能为开展山东省大蒜主产区根腐病病害的深入研究和防治工作奠定理论基础,为解决大蒜根腐病识别及科学防治提供了一定的参考,对提高大蒜产量和改善大蒜质量意义重大。

致谢:中央级公益性科研院所基本科研业务费专项(161013201704)资助。

参考文献:

[1]曹琳,曹东,陈存坤,等.鲜剥大蒜种腐微生物的分离纯化

及鉴定[J].中国酿造,2017,36(9):123-126.

[2]钟文文,刘婷婷,赵志龙,等.山东省苍山大蒜(*Allium sativum*)贮藏期新病原菌的分离与鉴定[J].安徽农业科学,2015,46(21):140-144.

[3]李旭双,陈典,梁誉,等.大蒜干腐病原菌的分离鉴定[J].中国蔬菜,2012(20):88-93.

[4]何伟,范龚健,吴彩娥,等.邳州地区霉腐蒜头致病性真菌的分离鉴定[J].生物技术,2019,29(3):267-271.

[5]程智慧,沈永杰.大蒜紫斑病菌的分离及培养条件研究[J].西北农业学报,2008,17(2):274-278.

[6]穆向荣,马逾英,杨枝中,等.药用植物根腐病防治的研究进展[J].中药与临床,2014,5(2):5-8.

[7]张博,李长松,李林,等.大蒜腐霉根腐病药剂防治试验[J].山东农业科学,2008(8):84-86,89.

[8]张丽娟,茆军,张志东,等.新疆大蒜根腐型病害根际土壤微生物群落多样性初探[J].新疆农业科学,2013,50(11):2109-2117.

[9]沙荣艳,徐红霞.地膜大蒜根腐病的发生及防治技术[J].长江蔬菜,2009,23:30-31.

[10]陈龙,王勇,李旭双,等.大蒜干腐病原菌分离鉴定及室内药剂筛选[J].北方园艺,2015(6):110-113.

[11]蒋承欢,瞿鸿飞,王忠宇,等.一种烟草细菌性病害病原菌分离培养及致病性测定[J].山东农业科学,2016,48(11):72-75.

[12]赵金梅,高贵田,谷留杰,等.中华猕猴桃褐斑病原菌鉴定及抑菌药剂筛选[J].中国农业科学,2013,46(23):4916-4925.

[13]Thompson J D, Gibson T J, Plewniak F, et al. The CLUSTAL_X Windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools [J]. Nucleic Acids Research, 1997, 25(24):4876-4882.

[14]Zhang W, Sun Z R. Random local neighbor joining: a new method for reconstructing phylogenetic trees [J]. Molecular Phylogenetics and Evolution, 2008, 47(1):117-128.

[15]Kumar S, Stecher G, Tamura K. MEGA7: molecular evolutionary

邹 芬,何烈干,赖金美,等. 江西省丝瓜果实腐烂病病原及寄主范围研究[J]. 江苏农业科学,2021,49(14):90-94.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2021.14.017

江西省丝瓜果实腐烂病病原及寄主范围研究

邹 芬¹,何烈干¹,赖金美²,李湘民¹,黄瑞荣¹,马辉刚¹

(1. 江西省农业科学院植物保护研究所,江西南昌 330200; 2. 江西省赣州市南康区农业局植保站,江西赣州 341401)

摘要:为明确江西省丝瓜果实腐烂病病原菌种类及病原菌寄主范围,从江西省南昌市和赣州市丝瓜种植区采集具有典型症状的腐烂病病果并进行病原菌分离,采用形态学观察、致病性测定和分子生物学技术对其种类进行鉴定,并接种 7 种作物幼苗以明确其寄主范围。结果表明,从丝瓜烂果病病样中共分离到 2 株菌株,分别命名为 SG-1 和 SG-2,2 株菌株形态特征一致,菌落呈圆形,气生菌丝发达,有膨大的孢子囊,孢子囊萌发有泡囊产生,有性生殖还可见雄器和藏卵器。在以 ITS、Cox2 β -tubulin 3 个基因构建的系统发育树中,菌株 SG-1、SG-2 和瓜果腐霉(*Pythium aphanidermatum*)聚在同一个分支,结合上述结果,将此次采集的丝瓜果实腐烂病病原鉴定为瓜果腐霉。将该病原菌接种葫芦科的黄瓜,茄科的辣椒、茄子,十字花科的白菜、西兰花,锦葵科的秋葵等代表性作物幼苗,结果表明其还可以引起幼苗猝倒病。

关键词:丝瓜果实腐烂病;病原鉴定;瓜果腐霉;寄主范围;Cox2 基因; β -tubulin 基因

中图分类号:S436.429 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2021)14-0090-05

丝瓜(*Luffa cylindrica*)隶属葫芦科丝瓜属,主要种植于热带和亚热带,如中国、泰国、印度、马来西亚等^[1]。丝瓜是我国常见的瓜类蔬菜之一,分为普通丝瓜和有棱丝瓜 2 个栽培种^[2],营养价值丰富,果肉中不仅富含蛋白质、维生素、钙磷铁等元素,还具有抗衰老和抗过敏等保健作用和药用价值^[3-4];成熟的丝瓜由于其发达的网状纤维且天然易降解还可替代海绵作为一种环保的洗刷灶具^[5]。丝瓜在江西省多个县(市、区)均有种植,据调查,丝瓜约占江西省瓜类蔬菜资源总量的 18.3%^[6]。作者 2019 年 7—8 月到田间调查发现,有部分丝瓜发生烂果现象,对产量和品质造成了较大影响,由于尚不清楚各地区丝瓜果实腐烂病由何种病原菌引起,

因此对病原菌进行系统分离鉴定,并明确其寄主范围,对生产上防治该病害具有重要意义。关于枯萎病、炭疽病、病毒病、蔓枯病等丝瓜生产上常见病害的病原鉴定已有较多报道。彭家柱等根据形态学鉴定和 ITS 序列分析相结合的方法将丝瓜枯萎病病原鉴定为尖孢镰刀菌^[7];孙蕾对吉林省丝瓜、黄瓜、西瓜等 11 种葫芦科作物炭疽病病原进行了鉴定,通过联合 ITS、CHS1 和 GAPDH 多基因测序分析,确定丝瓜、黄瓜等的病原为圆刺盘孢(*Colletotrichum orbiculare*),西瓜炭疽病的病原有 2 种,分别为 *C. orbiculare* 和 *C. incanum*,苦瓜炭疽病的病原为 *C. incanum*,表明不同寄主病原不尽相同^[8]。牛二波对山西省丝瓜病毒病病原检测结果表明,丝瓜受小西葫芦黄化叶病毒(zucchini yellow mosaic virus, ZYMV)和黄瓜花叶病毒(cucumber mosaic virus, CMV)复合侵染^[9]。目前对丝瓜果实病害病原鉴定的研究较少,对丝瓜果实腐烂病的研究主要见于常规发生和防治介绍,尚未发现对丝瓜果实腐烂病病原菌分子系统学方面的研究。本研究拟通过对病原菌进行形态学观察、致病性测定,结合核糖体内

收稿日期:2020-11-09

基金项目:江西省蔬菜产业技术体系资助项目(编号:JXARS-06);

江西省现代农业科研协同创新专项(编号:JXTCX201901-03)。

作者简介:邹 芬(1993—),女,江西宜春人,硕士,研究实习员,主要从事蔬菜病害防控研究。E-mail:zoufen163@163.com。

通信作者:马辉刚,硕士,研究员,主要从事蔬菜病害防控研究。

E-mail:mahg1997@sina.com。

genetics analysis version 7.0 for bigger datasets[J]. Molecular Biology and Evolution,2016,33(7):1870-1874.

[16]谢玉清,张丽娟,茆 军,等. 新疆地区根腐病大蒜根际土壤微生物群落特征研究[J]. 现代农业科技,2015(21):133-136.

[17]张 丽,耿肖兵,王春玲,等. 黑龙江省大豆镰孢根腐病菌鉴定

及致病力分析[J]. 植物保护,2014,40(3):165-168.

[18]张德珍,李鹏昌,陈晓霞,等. 山东省小麦根腐病病原菌的分离鉴定[J]. 植物保护学报,2016,43(2):233-240.

[19]王容燕,高 波,陈书龙,等. 河北省甘薯镰孢菌腐烂与溃疡病的病原鉴定[J]. 植物保护学报,2016,43(2):241-247.