

夏艳秋,郑宇慧,严浩,等.江苏省连云港市草莓根腐病病原菌的分离及鉴定[J].江苏农业科学,2022,50(2):85-90.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2022.02.014

江苏省连云港市草莓根腐病病原菌的分离及鉴定

夏艳秋,郑宇慧,严浩,张悦,陈静,杨杰,朱强

(江苏海洋大学食品科学与工程学院,江苏连云港 222005)

摘要:草莓根腐病是影响草莓产业发展的主要障碍之一,其发病广,危害重。本研究采用组织分离法,从连云港市东海县黄川镇草莓基地根腐病病害植株上分离草莓根腐病病原菌,采用 rDNA-ITS 序列分析方法结合病原菌形态学特征进行菌种鉴定。结果表明,共分离获得 5 株典型病原真菌,包括 4 个种,分别是串珠镰刀菌、棒孢拟盘多毛孢、胶孢炭疽菌、尖孢镰刀菌。果皮粗提物可以有效抑制草莓根腐病病菌。分离鉴定草莓根腐病病原菌,对分析草莓根腐病病原菌生物多样性、创建病原菌快速检测方法、深入研究草莓根腐病病害原因及综合防治均具有理论价值及实践意义。

关键词:草莓;根腐病;病原菌;分离;鉴定

中图分类号:S436.68⁺4

文献标志码:A

文章编号:1002-1302(2022)02-0085-06

联合国粮食及农业组织发布,2008—2018 年,全球草莓产量增长了 39.4%^[1]。江苏省是我国排名第 4 的优质草莓主产区,连云港市东海县黄川镇草莓基地被誉为“中国草莓第一镇”,草莓种植多以小规模为主,采用简单易行的连作栽培^[2]。然而连作栽培易引起土传病害也是不争的事实,尤以草莓根腐病发病广、危害重,且具有逐年上升趋势,已成为草莓产业发展的主要障碍之一^[3]。草莓根腐病由多种病原引起,各地区差异极大,连云港地区鲜有报道。欲保质增产,稳做“第一”,当务之急是弄清当地草莓根腐病病原菌种类及发病规律,并探寻综合防治措施。笔者所在课题组长期从事草莓病害治理、高质繁育及加工等科研与实践工作,取得一定成效,本研究主要对江苏省连云港市草莓根腐病病原菌进行筛选、分离及鉴定,以期明确草莓根腐病病害原因及生物防治提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 样品采集

草莓病株样本于 2020 年 3 月采集于江苏省连

云港市东海县黄川镇草莓基地,经凤舞剑副教授鉴定为典型根腐病病株。

1.2 草莓根腐病病原菌的分离

取草莓根腐病病株,自来水冲洗 2~3 次,将初步清洗后的植株病害部位剪切成 1 cm×2 cm 小块,用无菌镊子夹取置于体积分数为 70% 的乙醇溶液中浸泡 30 s 后,用无菌水冲洗,然后置于 0.1% 的氯化汞中浸泡 1 min,用无菌水冲洗,最后用无菌纱布拭去表面水分。用无菌组培刀将病害组织切成 0.5 cm×0.5 cm 组织块,置于 PDA 培养基上 28℃ 条件下培养 2~5 d。挑取不同形态的菌株分离培养,多次纯化培养后保藏备用^[4]。

1.3 草莓根腐病病原菌的鉴定

1.3.1 形态学鉴定 (1)平板划线法:将上述病原菌置于 PDA 培养基上 28℃ 条件下培养,在菌丝生长初期,插入已灭菌的盖玻片,待菌丝延伸至盖玻片上,用乳酸、石炭酸、棉兰染色,观察菌丝生长及形态特征。(2)显微镜法:挑取菌丝,制作水浸片直接观察。

1.3.2 分子生物学鉴定 采用 rDNA-ITS 序列分析法:即核糖体 DNA 内转录间隔区序列分析法,将上述病原菌纯培养后提取 DNA,进行 PCR 扩增,产物经琼脂糖凝胶电泳分离送至生工生物工程(上海)股份有限公司测定碱基序列。在 NCBI 网站 GenBank 数据库中,采用 BLAST 软件比对病原菌碱基序列与其他草莓根腐病病菌碱基序列的同源性,采用 MEGA 7.0 软件构建系统进化树^[5]。

收稿日期:2021-04-10

基金项目:江苏省政策引导类计划苏北科技专项(编号:LYG-SZ201806);连云港市“521 工程”专项(编号:LYG52105-2018046)。

作者简介:夏艳秋(1978—),女,江苏徐州人,硕士,讲师,从事生物发酵、生物防治等生物工程技术研究。E-mail:1121409728@qq.com。

通信作者:朱强,硕士,高级实验师,主要从事生物防治及果蔬生理等农业技术研究。E-mail:zq7685@163.com。

1.4 果皮粗提物对草莓根腐病病原菌的抑制作用

采用牛津杯法测定果皮粗提物对草莓根腐病病原菌的抑制作用。无菌条件下,将 0.1 mL 待测病原菌孢子悬液均匀涂布于 PDA 固体平板上,用镊子在其上均匀放置 3~4 个牛津杯,杯中加入 100 μ L 待测果皮提取物样液,果皮提取物为火龙果果皮提取物、山竹果皮提取物、柚子果皮提取物、桔子果皮提取物、香蕉果皮提取物和石榴果皮提取物。28 $^{\circ}$ C 条件下培养 2~5 d,观察抑菌效果并测量抑菌圈大小。



A—草莓根腐病全株; B—草莓根腐病根基; C—培养 2 d; D—培养 4 d

图1 草莓根腐病病原菌的分离

2 结果与分析

2.1 草莓根腐病病原菌的分离

采用组织分离法,从连云港市东海县黄川镇草莓基地根腐病害植株(图 1-A,图 1-B)上共分离得到 4 株细菌(图 1-C),11 株真菌(图 1-D)。其中,有 5 株真菌表现出典型的草莓根腐病病害特征,分别命名为 CMGF-1~CMGF-5。

2.2 草莓根腐病病原菌的鉴定

2.2.1 菌落形态学鉴定 从图 2 可以看出,病原菌 CMGF-1~CMGF-5 中,有 3 株产色素,3 株产菌核;5 株初生菌丝均为白色,生长速度快(3~4 d 即可铺满平板);5 株气生菌丝发达,向空间延伸的能力强;其中,CMGF-4 菌株生长速度最快,气生菌丝为绒毛状;3 株菌落呈辐射环状,2 株菌落边缘不规则。具体描述如下。

CMGF-1: 菌落边缘整齐,气生菌丝发达呈白色,有黑色菌核形成,不产色素,菌落呈辐射环状。

CMGF-2: 菌落边缘错落,气生菌丝发达呈白色,能产生菌核且分布广,产黄色色素,边缘菌丝黄色,内部菌丝白色,菌落无辐射环状。

CMGF-3: 菌落边缘错落,气生菌丝发达呈白

色,菌落边缘形成黑色菌核,产黄色色素,内外菌丝均为黄色,菌落无辐射环状。

CMGF-4: 菌落边缘整齐,发达的白色气生菌丝形成绒毛状,不产生菌核,产黑紫色色素,菌落呈辐射环状。

CMGF-5: 菌落边缘整齐,气生菌丝较为发达呈白色,不产菌核,不产色素,菌落呈辐射环状。

2.2.2 微观形态学鉴定

2.2.2.1 CMGF-1 从图 3 可以看出,气生菌丝无色无横隔,孢子梗直而长,多以分生孢子座产孢,分生孢子呈短杆状,两端圆顺,孢子无横隔,脱落孢子盘为簇状。

2.2.2.2 CMGF-2、CMGF-3 从图 4 可以看出,CMGF-2、CMGF-3 气生菌丝细长弯曲有横隔,分

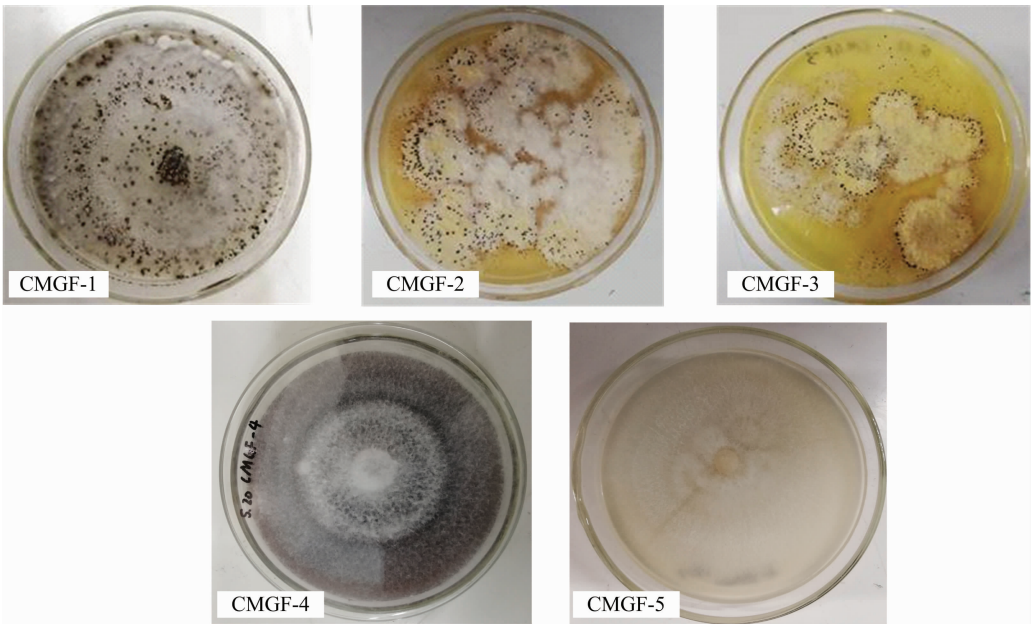


图2 CMGF-1~CMGF-5 菌落形态学特征(5 d)

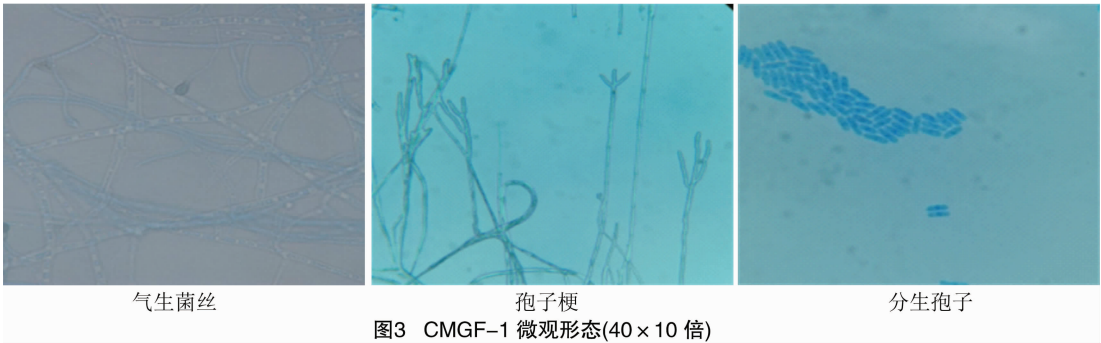


图3 CMGF-1 微观形态(40×10 倍)

隔处收缩明显,分生孢子呈纺锤形或船形,脱落孢子盘为葡萄状,分生孢子顶端未观察到附属丝。2 株菌微观形态相似,结合“2.2.1”节菌落形态学特征,判断为同属,是否为同种还需进一步鉴定。

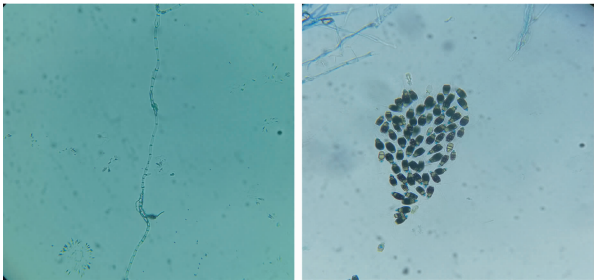


图4 CMGF-2、CMGF-3 微观形态(40×10 倍)

2.2.2.3 CMGF-4 从图 5 可见,CMGF-4 气生菌丝笔直细长无横隔,分生孢子初期为圆润珠状,以单梗方式产生孢子,分布于孢子丝两侧;后期展开为镰刀状,孢子展开后比释放前直径变短,孢子两端钝圆,多隔,可初步判断为串珠镰刀菌^[6]。

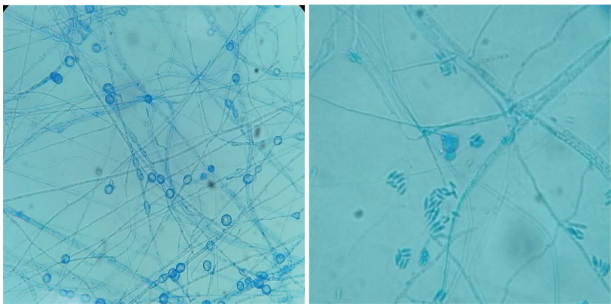


图5 CMGF-4 微观形态(40×10 倍)

2.2.2.4 CMGF-5 从图 6 可以看出,CMGF-5 微观形态非常典型。气生菌丝长而直且无横隔,以单梗形式产生孢子,未释放前,孢子为圆状,释放后为镰刀状;孢子细长且两端尖锐,长度明显大于释放前圆形孢子直径,可判断为尖孢镰刀菌^[6]。

2.2.3 分子生物学鉴定

2.2.3.1 CMGF-1 从图 7 可以看出,CMGF-1 与 KC010547. 1 胶孢炭疽菌 (*Colletotrichum gloeosporioides*) 在进化树中距离最近,相似性为 58%,

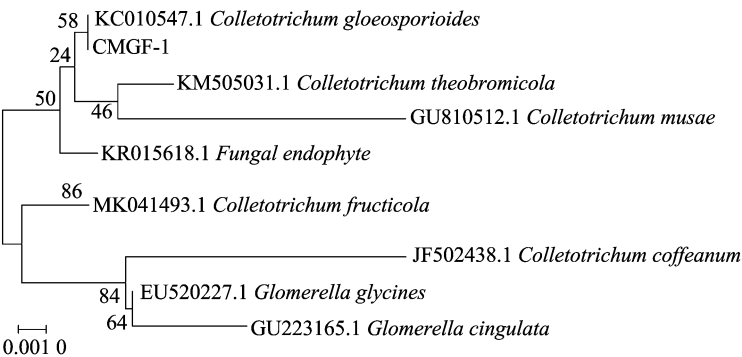
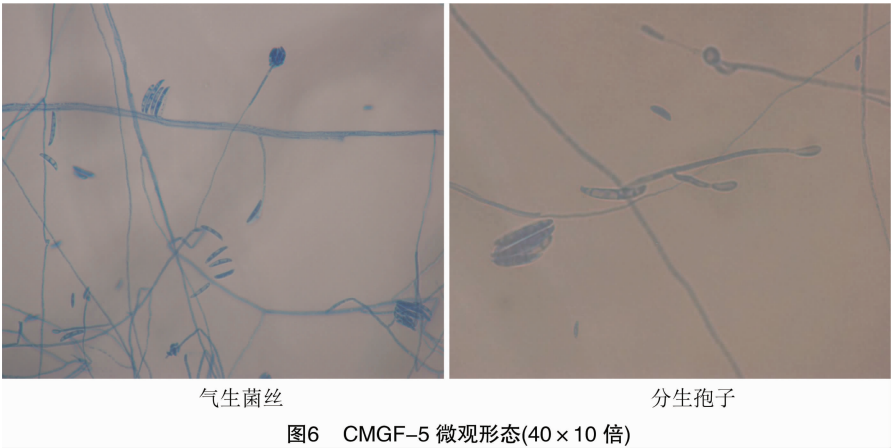


图7 CMGF-1 系统进化树

可以判断为同种,即 CMGF-1 为胶孢炭疽菌。

2.2.3.2 CMGF-2 从图 8 可以看出,CMGF-2 与 KY_606543.1 棒孢新拟盘多毛孢菌

(*Neopestalotiopsis clavispora*) 在进化树中距离最近,相似性为 87%,可以判断为同种,即 CMGF-2 为棒孢拟盘多毛孢。

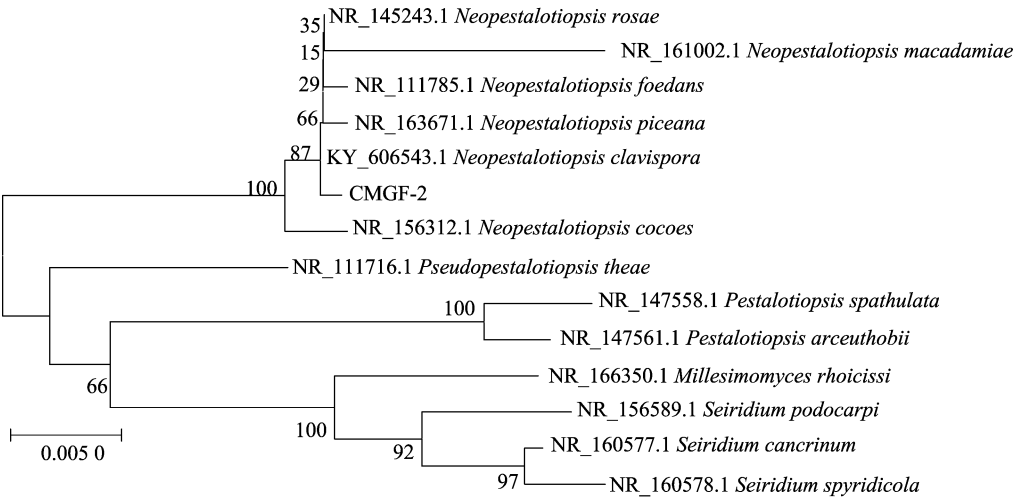


图8 CMGF-2 系统进化树

2.2.3.3 CMGF-3 从图 9 可以看出,CMGF-3 与 KR_052094.1 棒孢新拟盘多毛孢菌(*N. clavispora*)在进化树中距离最近,相似性为 63%,可以判断为同种,即 CMGF-3 为棒孢新拟盘多毛孢

菌。图 8、图 9 进一步印证了 CMGF-2、CMGF-3 的近缘性,可能为同种的 2 个亚种。
2.2.3.4 CMGF-4 从图 10 可以看出,CMGF-4 与 NR_159818.1 串珠镰刀菌(*Fusarium continuum*)

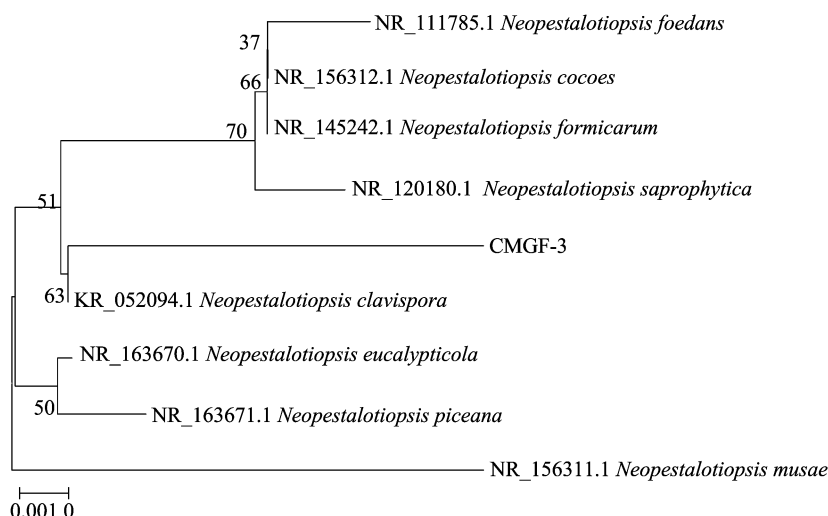


图9 CMGF-3 系统进化树

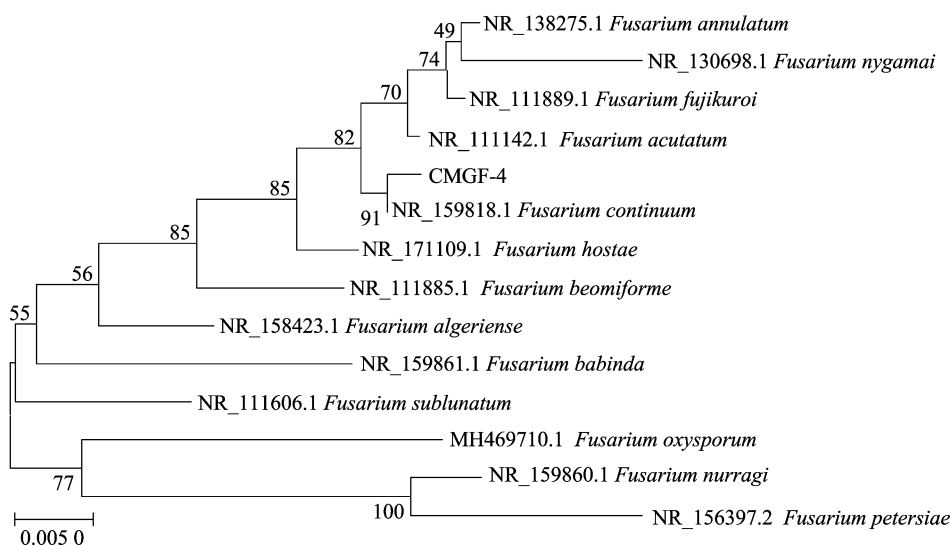


图10 CMGF-4 系统进化树

在进化树中距离最近,相似性 91%,可以判断为同种,即 CMGF-4 为串珠镰刀菌,印证了“2.2.2”节中形态鉴定的结论。

3 结论与讨论

本研究采用组织分离法,从江苏省连云港市东海县黄川镇草莓基地根腐病病害植株中分离获得 5 株草莓根腐病病原菌,根据形态学特征以及 18S rDNA 碱基序列,鉴定 CMGF-1 为胶孢炭疽菌或其亚种,CMGF-2、CMGF-3 为棒孢拟盘多毛孢或其亚种,CMGF-4 为串珠镰刀菌或其亚种,CMGF-5 为尖孢镰刀菌或其亚种。草莓根腐病是由多种病原和环境互作引起的,连云港市特殊的海洋气候及盐碱生境,是否会改变病原菌的基因构型及致病力,基于 rDNA-ITS 序列分析的低相似同源关系是

否与此有关,还有待于进一步深入研究。

草莓根腐病在我国各地均有发生。目前研究结果(表 1)表明,草莓根腐病病原多达 20 种。从病害看,由丝核菌、镰刀菌及拟盘多毛孢菌引起的草莓黑根腐病危害最重,影响最大,其病原涉及多个属,甚至还包括线虫类。其次为由胶孢炭疽菌引起的草莓红中柱根腐病。从地域看,北方发病频率更高,以北京市、河北省、山东省、吉林省及江苏省等最为严重。病原差异主要表现为,北京市周边病原种类较复杂,主要为丝核菌属、镰刀属、多毛孢属、炭疽属及腐霉属等;安徽省以尖孢镰刀菌为主,浙江省以胶孢炭疽菌为主,河南省以链格孢菌为主。本次样本分离自江苏省,主要以镰刀属、多毛孢属、炭疽属为主。各地区草莓根腐病表征不同,相应的病原也不同,预防及治理方式亦要因病而异。

表 1 国内报道草莓根腐病原菌及其引起的病害症状

病原菌	发生地	病害
(立枯、双核)丝核菌 ^[7-12]	北京市、山东省、吉林省、河北省	草莓黑根腐病
(串珠、尖孢、木贼、茄病)镰刀菌 ^[5,7,9,10,13-16]	北京市、山东省、吉林省、天津市、安徽省、江苏省	
(棒孢)拟盘多毛孢菌 ^[11]	北京市、山东省、江苏省	
链格孢菌 ^[17]	河南省	
伤残短体线虫、(终极)腐霉菌 ^[7]	北京市	
胶孢炭疽菌 ^[7,11,14,18]	北京市、山东省、天津市、江苏省、杭州市	草莓红中柱(红心)根腐病
(草莓、烟草、恶)疫霉菌 ^[11,19]	山东省、河北省	
新月花顶孢霉菌	不详	
褐座坚壳菌、菜豆壳孢菌、蜜环菌	不详	草莓冠(白心)根腐病
淡色生赤壳菌、伏革菌科菌、纸葡萄穗霉、核盘菌、放射线虫、茄根枯菌 ^[7,16]	北京市、吉林省	不详

笔者所在课题组初步试验结果表明,60% 以上果皮粗提物均可以抑制草莓根腐病菌。其中,火龙果果皮提取物的抑菌圈最大的达 2 cm 以上,表现

出极强的抑菌效应(图 11),后期将重点研究果皮提取物在草莓病害方面的防治及应用。

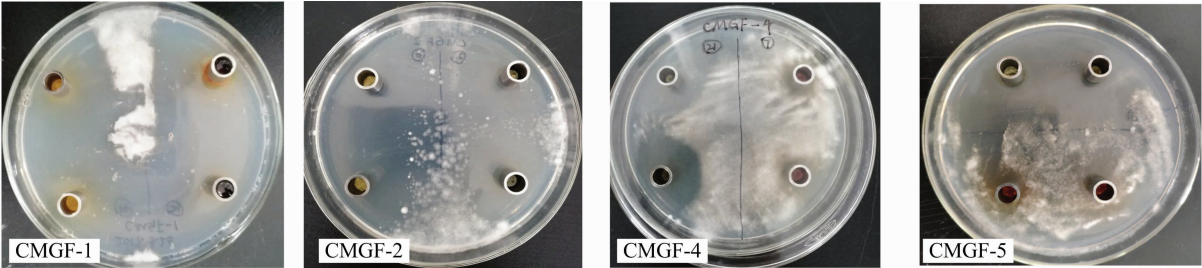


图 11 火龙果果皮提取物抑制草莓根腐病菌结果(5 d)

参考文献:

[1]梁 容. 全球:十年间草莓产量增长近 40% [J]. 中国果业信息, 2020,37(10):48.

[2]常向阳,车晶晶. 江苏省草莓生产状况调查及成本收益分析 [J]. 中国果树,2020(3):126-131.

[3]申光辉. 草莓连作根腐病发生机制与微生物及化学修复研究 [D]. 杨凌:西北农林科技大学,2012.

[4]方中达. 植病研究方法 [M]. 3 版. 北京:中国农业出版社,1998.

[5]盛茹媛. 草莓根腐病原菌鉴定及分子检测技术研究 [D]. 哈尔滨:东北农业大学,2012.

[6]魏景超. 真菌鉴定手册 [M]. 上海:上海科学技术出版社,1979.

[7]咸俊男,宋艰难,吴晓云,等. 北京房山区草莓根腐病原菌分离鉴定及室内毒力测定 [J]. 北京农学院学报,2017,32(4):65-69.

[8]张 阳,刘正坪,魏艳敏,等. 北京昌平地区草莓根腐病菌种类鉴定 [J]. 中国农学通报,2015,31(18):278-284.

[9]尹沙亮,钟 珊,刘奇志,等. 草莓丝核菌根腐病原菌鉴定及 7 种杀菌剂的抑菌作用测定 [J]. 植物保护,2019,45(4):132-136,148.

[10]孙 倩,张 玮,王 琦,等. 北京市草莓丝核菌根腐病原菌的鉴定 [J]. 植物保护学报,2020,47(5):1163-1164.

[11]胡彦江,张茹琴. 烟台地区草莓根腐病原菌鉴定及致病性测定 [J]. 北方园艺,2012(10):141-144.

[12]赵 宇,钱恒伟,徐鹏程,等. 青岛市草莓根腐病原菌分离及鉴定 [J]. 中国植保导刊,2016,36(1):43-46,82.

[13]王中武,臧慧明. 吉林地区草莓根腐病原菌及生物学特性研究 [J]. 吉林农业科技学院学报,2011,20(1):1-3,14.

[14]姚玉荣,霍建飞,郝永娟,等. 天津地区草莓根腐病原菌分离鉴定及室内毒力测定 [J]. 山东农业科学,2019,51(2):107-110.

[15]宁志怨,董 玲,廖华俊,等. 安徽省长丰县草莓根腐病原菌的鉴定 [J]. 安徽农业大学学报,2017,44(1):130-134.

[16]韩国兴. 杭州地区草莓炭疽病病原菌鉴定及防治研究 [D]. 杭州:浙江大学,2009.

[17]朱晓琴,宋自力,裴冬丽. 河南省商丘市草莓根腐病原菌的分离和鉴定 [J]. 植物保护学报,2017,44(2):349-350.

[18]Fan W Z. Identification and biological characteristics of strawberry root rot pathogen [J]. Applied Mechanics and Materials,2013,312:857-861.

[19]张梦影. 昌黎县草莓根腐病原菌鉴定、生物学特性及室内毒力测定 [D]. 秦皇岛:河北科技师范学院,2018.