

唐冬兰,蒋立奔,唐 泉,等. 应用二次 PCR 检测草莓炭疽病菌[J]. 江苏农业科学,2023,51(9):125-131.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2023.09.017

应用二次 PCR 检测草莓炭疽病菌

唐冬兰,蒋立奔,唐 泉,宋芹芹,曹荣祥

(江苏丘陵地区南京农业科学研究所,江苏南京 210046)

摘要:开发了一种基于 PCR 的草莓炭疽病致病菌暹罗炭疽菌(*Colletotrichum sisamense*)检测方法。通过分析暹罗炭疽菌及 24 种真菌的 ITS 区序列,设计了 1 条反向特异引物 CsiaR,结合引物 CgInt 可仅从暹罗炭疽菌中扩出约 400 bp 片段。对不同浓度暹罗炭疽菌 DNA 溶液进行检测,第 1 轮和第 2 轮 PCR 的最低检出限分别为 50 pg/μL 和 5 fg/μL;对接种不同浓度暹罗炭疽菌分生孢子悬浮液的草莓样本(接种 48 h,症状未出现)进行检测,低于 1.0×10^4 个孢子/mL 的处理无法检出;对田间随机采集的草莓样本检测时,PCR 检测阳性的样本(含有症状和无症状)中均可分离到暹罗炭疽菌。总体来说,本方法可用于草莓中暹罗炭疽菌的早期、快速及准确检测,从而为草莓炭疽病的及时有效防控提供依据。

关键词:草莓;炭疽病;暹罗炭疽菌;ITS 序列;PCR 检测

中图分类号:S436.68⁺4 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2023)09-0125-06

草莓作为一种果形美观、风味独特、营养价值丰富的水果,不仅深受消费者青睐,还为莓农带来巨大的经济效益,种植面积逐年提升,但由于品种单一、国内大部分采用设施栽培导致草莓病害防不胜防,给草莓产业带来的损失也是不容忽视的。其中,炭疽病首当其冲,凡有草莓种植的地方,如湖北、浙江、陕西、江苏等,几乎均有该病报道^[2-6]。草莓生长的各阶段,地上部各部位包括叶片、匍匐茎、果实、叶柄及茎基部等均可被该病病原菌侵染,其中,以侵染茎基部危害最大,严重时可导致整个植株死亡,防治难度与土传病害无异。

国内目前已知可引起草莓炭疽病的致病菌主要有 3 种:尖孢炭疽菌(*Colletotrichum acutatum*)、胶孢炭疽菌[*C. gloeosporioides*]、草莓炭疽菌(*C. fragariae*)。其中,胶孢炭疽菌复合种中的暹罗炭疽菌(*C. siamense*)被鉴定为多地优势种^[7-9]。

草莓炭疽病菌的防治目前主要采用化学防治的方法,生产中莓农通常在出现肉眼可见的症状后

针对性地用药,或是在症状出现前,随意大量用药,不仅成本高,而且长期大量用药会造成病原菌产生抗药性导致防治难度逐渐加大,同时也对环境造成巨大污染^[10]。事实上,在出现症状后再进行防治,病害往往已侵入植株内部,即使用药也很难控制。因此,通过检测技术尽早、准确地掌握植株带菌情况对炭疽病的控制及草莓的安全生产至关重要。

传统的病害检测,通常采用分离培养和形态观察的方式,这种方法步骤多,鉴定环节需要操作者有很丰富的真菌形态分类鉴定经验,一系列的操作至少需要 5~7 d,往往已错过最佳防治时期^[11]。

近年,分子检测技术逐渐普及,基本原理通常是利用种内保守、种间多态的区域设计特异引物对病原菌的基因组进行特异扩增,其中,ITS 区(核糖体内转录间隔区)又因其在基因组中通常表现为多拷贝状态,可以提高扩增效率而更常被使用。国内外已有研究人员开发出了多种病原菌的特异引物,如向日葵黑茎病菌(*Phoma macdonaldii*)^[12]、柑橘黄龙病菌(*Candidatus Liberibacter asiaticus*)^[13]、橄榄黄萎病菌(*Verticillium dahliae*)^[14]等,在草莓上也有尖孢炭疽菌(*C. acutatum*)、草莓炭疽病菌(*C. fragariae*)^[15]、尖孢镰刀菌(*Fusarium oxysporum* f. sp. *fragariae*)^[16]、腐皮镰刀菌(*F. solani*)^[17]等病原菌的快速检测技术研究,但对草莓炭疽病常见致病菌暹罗炭疽菌尚无相关报道。本研究将通过多重序列比对,分析暹罗炭疽菌与其他多种草莓植株中

收稿日期:2022-07-18

基金项目:江苏省农业科技自主创新资金[编号:CX(20)3017];亚夫科技服务项目[编号:KF(20)1021];江苏现代农业产业技术体系建设(编号:JATS[2021]008)。

作者简介:唐冬兰(1983—),女,江苏淮安人,博士,副研究员,主要从事果树病理学及种质资源研究。TE-mail:dofthmlhm@163.com。

通信作者:曹荣祥,男,江苏扬州人,副研究员,主要从事草莓栽培与生理研究。E-mail:3060601887@qq.com。

及植株周围常见真菌的 ITS 序列,找出暹罗炭疽菌与其他真菌保守型较低的区域,设计可用于暹罗炭疽菌特异检测的引物,实现草莓组织中暹罗炭疽菌的早期、快速及准确检测,从而为草莓炭疽病的及时有效防控提供依据。

1 材料与方法

1.1 试验时间与地点

本试验于 2020 年 6 月至 2021 年 6 月在江苏省南京市完成。

1.2 供试菌株

本研究共采用 3 个暹罗炭疽菌菌株,和 24 个其他真菌菌株(表 1),所有菌株均分离自南京不同草莓园的炭疽病病株及健株的植物组织或生长介质(土壤或基质)。植株组织中的真菌采用组织分离法获得,土壤或基质中的真菌采用稀释平板法获得^[18]。所有菌株经单孢纯化后,保存于 25% 甘油中,存于江苏丘陵地区南京农业科学研究所 - 80 ℃ 冰箱备用。所有暹罗炭疽菌菌株均采用活体(注射法和喷雾法)与离体的接种方法进行过致病性鉴定^[19],确定可引起草莓炭疽病典型症状。

1.3 菌丝收集和 DNA 提取

将供试菌株接种到 PDA 培养基上,放入培养箱 28 ℃ 培养数日,待菌丝长满,收集 300 mg 新鲜菌丝,装于 2 mL 离心管中,管中加入 3 ~ 5 颗钢珠,然后放入 Tissuelyser - L 系列多样品组织研磨仪中(上海静信实业发展有限公司),50 Hz 研磨 30 s 用于 DNA 提取。总 DNA 的提取采用商业试剂盒,方法参考说明书。DNA 的浓度及质量,采用 NanoDrop ND - 1000 超微量分光光度计(美国,Thermo Fisher 科技公司)查验。DNA 保存于 - 20 ℃ 冰箱中备用。

1.4 ITS 片段扩增、测序和引物设计

所有菌株的 ITS 片段用正向引物 ITS5/ITS4 进行扩增。由表 2 可知,扩增体系 50 μL,各成分终浓度分别为:1 × Es Taq Master Mix(含染料;北京,康为世纪生物科技股份有限公司),50 ~ 100 ng DNA,引物各 0.25 μmol/L,不足部分用 ddH₂O 补足。用

表 1 供试菌株

序号	物种	分离部位	年份
1	暹罗炭疽菌	叶片	2018
2	暹罗炭疽菌	叶片	2018
3	暹罗炭疽菌	根颈	2018
4	土曲霉	根颈	2018
5	尖孢镰刀菌	根颈	2018
6	尖孢镰刀菌	基质	2018
7	菊池尾孢菌	叶片	2018
8	红苍白草螺菌	根颈	2018
9	<i>Pilidium lythri</i>	土壤	2018
10	链格孢菌	叶片	2018
11	小球腔霉属	叶片	2018
12	菜豆壳球孢菌	根颈	2018
13	莓型炭团菌	根颈	2018
14	黄瓜织球壳菌	土壤	2018
15	高粱附球菌	根颈	2018
16	稻黑孢菌	根颈	2019
17	<i>Ectophoma multirostrata</i>	叶片	2018
18	首都叶点霉	叶片	2018
19	节菱孢菌	叶片	2019
20	青霉属	叶柄	2019
21	三线三隔镰孢菌	叶片	2019
22	嗜松篮状菌	根颈	2019
23	长孢被孢霉	叶片	2019
24	烟曲霉	土壤	2019
25	微紫青霉	基质	2019
26	锐顶镰孢菌	基质	2019
27	菌悬柄腐霉	根颈	2018

无菌水代替 DNA 模板作为阴性对照。反应条件如下:96 ℃ 5 min;96 ℃ 30 s,60 ℃ 45 s,72 ℃ 1 min,循环 35 次;72 ℃ 8 min。反应结束后,取 5 μL PCR 产物进行电泳检测,使用 0.8% 质量浓度的琼脂糖凝胶,电泳缓冲液为 1 × TAE,染料使用 Sparkred 思科捷生物技术有限公司),并用 Tannon - 1600 全自动数码凝胶图像分析系统(上海天能科技有限公司)拍照。对有扩增片段的 PCR 产物使用扩增引物进行双向直接测序,测序工作委托擎科生物科技有限公司进行。

表 2 本研究中所用引物序列及其来源

引物名	方向	序列(5'→3')	碱基数(个)	参考文献或来源
ITS5	正向	GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG	22	[20]
ITS4	反向	TCCTCCGCTTATTGATATGC	20	[20]
CgInt	正向	GGCCTCCCGCCTCCGGGCGG	20	[21]
CsiaR	反向	TTTACGGCAAGAGTCCCTCC	20	自行设计

将试验中测得的暹罗炭疽菌与其他真菌的 ITS 序列,采用 DNASTAR 软件包 (DNASTAR, Inc.) 中的 EditSeq 和 SeqMan 进行多序列比对,分析暹罗炭疽菌与其他菌株 ITS 序列间同源性较低的区域,采用 Primer Premier 5.0 软件 (Premier Biosoft International) 设计了一系列反向引物。

1.5 引物特异性的验证

从草莓植株与生长介质中分离到其他真菌被用于验证针对暹罗炭疽菌的引物的特异性。正向引物为 CgInt,反向引物为自行设计。为减少药品用量,PCR 反应总体积改为 10 μ L,各成分终浓度及反应条件同前述,DNA 用量由 2.5 μ L 改为 0.5 μ L。以无菌水代替 DNA 作为阴性对照。PCR 扩增结果通过电泳的方式呈现。

1.6 检测限判定

用无菌水以 10 倍梯度将暹罗炭疽菌基因组 DNA 稀释成一系列浓度梯度的溶液,共 7 个浓度,从 10 ng/ μ L 到 10 fg/ μ L,然后进行 2 轮 PCR 反应,阴性对照中采用无菌水代替 DNA。PCR 反应体系及扩增程序与前述引物特异性验证相同。进行第二轮 PCR 反应时,取 0.5 μ L 前一轮扩增产物代替 DNA,用相同体系和程序进行第二轮 PCR 扩增。

1.7 人工接种样本中暹罗炭疽菌检测

采用从南京仙林分离到的 1 株暹罗炭疽菌菌株 (T3-2) 对健康草莓苗进行人工接种。接种前将菌株接种在 PDL 液体培养基中,振荡培养 5~7 d,待产生足够多的分生孢子后,用 3~4 层纱布将菌丝过滤掉,留下孢子液,12 000 r/m 离心 2 min,弃上清,采用无菌水重悬浮,再离心,如此反复 2~3 次,统计最终得到的菌悬液的分生孢子浓度,然后配成 5 个浓度: 5×10^5 、 1×10^5 、 1×10^4 、 1×10^3 、 1×10^2 个孢子/mL。每个处理接种 6 株,重复 3 次。采用喷雾法接种,每株接种 20 mL 菌悬液,对照采用等量的无菌水,采用喷雾器接种,保证草莓地上各个部位均喷洒菌液或无菌水,随后将植株放入加水 20 mL 的自封袋中置于 28 $^{\circ}$ C、光照—黑暗为 12 h—12 h 的人工气候箱中 (RXZ-280B, 宁波江南仪器厂, 中国),密封 24 h 后打开自封袋^[22],并于接种 48 h 后取叶片提取总 DNA (多糖多酚植物 DNA 提取试剂盒,上海浦迪生物科技有限公司),使用 CgInt/CsiaR 特异引物进行 2 轮 PCR 反应检测暹罗炭疽菌。PCR 反应同上,总体积 10 μ L,2 轮 PCR 模板用量稍有不同。第一轮取 4.5 μ L DNA 溶液,反应前只需

要检测 DNA 的 $D_{260\text{ nm}}/D_{280\text{ nm}}$ 比值即可,确保 DNA 质量满足试验需求即可,无需稀释;二次 PCR 时,仅取 0.5 μ L 前一轮产物为模板。扩增程序同前述。能扩增至约 400 bp 单一片段的样品视为阳性样本。

1.8 田间样本中暹罗炭疽菌检测

随机选择田间自然发病 (具可见炭疽病病斑) 与无症状的草莓植株各 15 株,采集叶片,尽快带回实验室,将每份样品分成 2 部分,一部分用于提取 DNA 进行 PCR 检测,一部分用于分离培养鉴定。用于 PCR 检测的样品提取总 DNA 后用引物 CgInt/CsiaR 对各样品进行 2 轮 PCR 扩增。反应体系和扩增程序同前述人工接种样本检测。能扩增至约 400 bp 单一目的片段的视为阳性样本。用于分离培养的样品,经 70% 乙醇处理数秒,3% NaClO 浸泡 3 min,无菌水漂洗 3~4 次后切成 3~5 mm 的小块,置于含有 0.25 g/L 氨苄青霉素和 0.10 g/L 链霉素的 PDA 平板上,5~7 d 后根据菌落特征和分生孢子及菌丝形态进行鉴定。

1.9 阳性样品 PCR 扩增产物的测序及分析

为确定在田间和人工接种的样本中检测到约 400 bp 的片段确实来自暹罗炭疽菌,对阳性样品的扩增产物进行测序,采用对 PCR 产物双向直接测序的方式,测序引物为 CgInt/CsiaR,得到的序列拼接后,在 NCBI 中进行 BLAST 分析,以验证 PCR 的特异性。

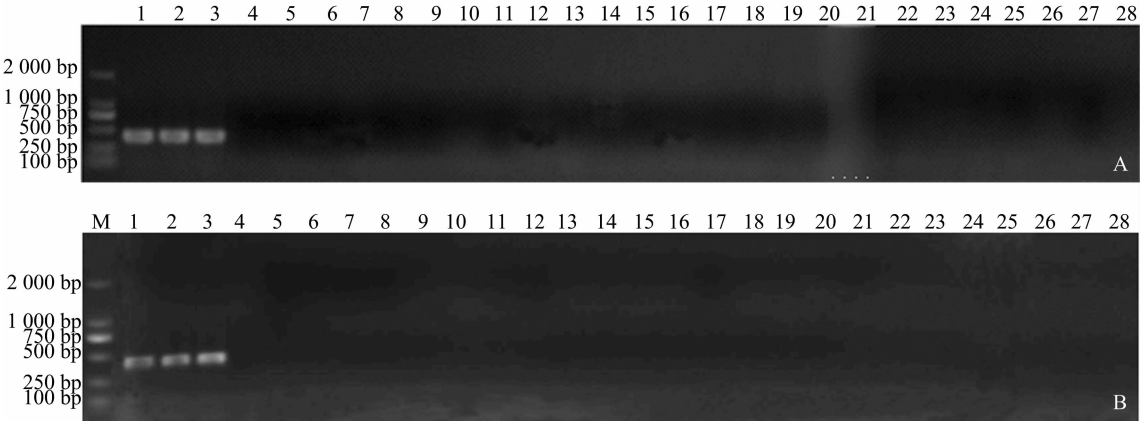
2 结果与分析

2.1 ITS 序列扩增与引物设计

利用引物 ITS5/ITS4,获得了草莓中的暹罗炭疽菌及 24 种草莓植株及根际介质中常见真菌的 ITS 序列,对这些序列进行多重比对后,发现暹罗炭疽菌 ITS 序列的 355~494 bp 碱基范围内的同源性与其他常见真菌较低,利用该区域设计了针对草莓中暹罗炭疽菌的反向特异引物。

2.2 引物的特异性

本研究利用 3 个暹罗炭疽菌菌株及草莓植株与生长介质中分离到的其他 24 种真菌 DNA 进行了引物特异性验证。在设计的一些反向引物中,通过条带亮度、引物二聚体形成情况及在非目的菌株中是否有条带等最终选出引物 CsiaR,该引物与前人发表的正向引物 CgInt 相结合的扩增结果最理想。利用该引物组合,仅有当 DNA 模板为暹罗炭疽菌时,才能扩增至约 400 bp 的片段。由图 1 可知,提示该引物组合针对暹罗炭疽菌具有较高的特异性,与其



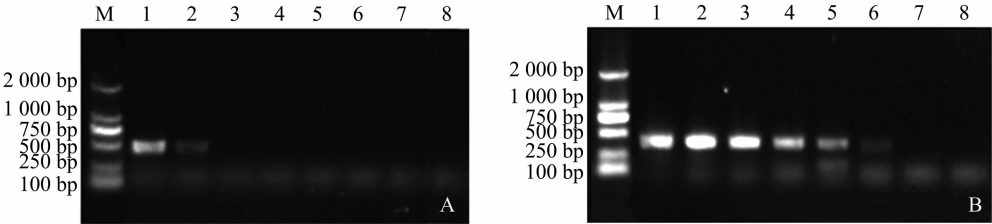
A. 第一轮 PCR; B. 第二轮 PCR; 1~27—对应表 1 中 1~27 号菌株; 28—阴性对照; M—DL-2000 marker
图1 引物 CgInt/CsiaR 在不同菌株纯培养物提取的 DNA 中的扩增结果

他真菌基因组无稳定的结合位点,无法实现扩增。

2.3 检测限验证

2 轮 PCR 对暹罗炭疽菌纯培养物提取的 DNA 最低检测限结果见图 2。由图 2 可知,第一轮 PCR

扩增,最低检测限为反应体系中 DNA 浓度为 50 pg/ μ L(图 2 - A)。进行二次 PCR 后,检测下限降低至反应体系中 DNA 浓度仅有 5 fg/ μ L 也可观察到条带(图 2 - B)。

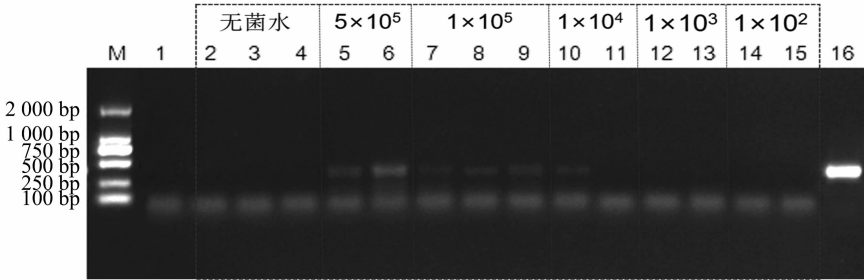


1~7—反应体系中 DNA 浓度依此为 5 ng/ μ L 5 \times 10⁻⁶ ng/ μ L; 8—阴性对照; M—DL-2000 marker
图2 使用系列浓度暹罗炭疽菌纯培养菌株 DNA 进行第一轮(A)和第二轮(B)PCR 检测检测限的确认结果

2.4 人工接种样品检测

利用引物组合 CgInt/CsiaR 对人工接种不同浓度暹罗炭疽菌分生孢子悬浮液 48 h 后的草莓叶片进行检测,通过二次 PCR,得到最低检出限是 1 \times

10⁴ 个孢子/mL,这一浓度下部分样品可检出暹罗炭疽菌,高于该浓度可 100% 检出;低于该浓度,则无法检出(图 3)。



1—阴性对照; 2~4—接种无菌水的草莓叶片 DNA; 5~15—接种不同浓度孢子悬浮液的样品 DNA; 16—暹罗炭疽菌纯化菌株 DNA; M—DL-2000 marker
图3 应用二次 PCR 对接种不同浓度暹罗炭疽菌分生孢子悬浮液 48 h 后草莓叶片试验结果

2.5 田间样品检测

为验证本方法对随机采集的样本的检验效果,从田间随机选择了 30 份草莓叶片,采用引物 CgInt/CsiaR 对其检验表明,当用具炭疽病症状的草莓叶

片中提取的 DNA 作为模板时,观察到预期约 400 bp 的电泳条带,部分无症状的样品中也可观察到同样大小的条带(图 4)。样品分离培养的结果表明,所有具症状及部分无症状的草莓叶片组织边缘有暹

罗炭疽菌样菌落形成,这些菌落初为灰白色,气生菌丝蓬松、较致密,后颜色逐渐变成灰色,菌落背面灰黑色,5~7 d 后形成橘色的分生孢子堆,在显微镜下观察,丝状菌丝具分隔、分枝,分生孢子椭圆形、透明单胞、两端钝圆、有些具明显的油胞。可培养出暹罗炭疽菌样菌落的样品与 PCR 检测为阳性的样品结果基本一致。

2.6 PCR 产物测序

对人工接种和田间自然发病和无症状样品中检测出的阳性 PCR 产物进行测序,结果(图 5)表明,这 3 种样品中检测到的 PCR 产物与从暹罗炭疽菌纯培养菌株中检测到的 PCR 产物拥有相同序列,

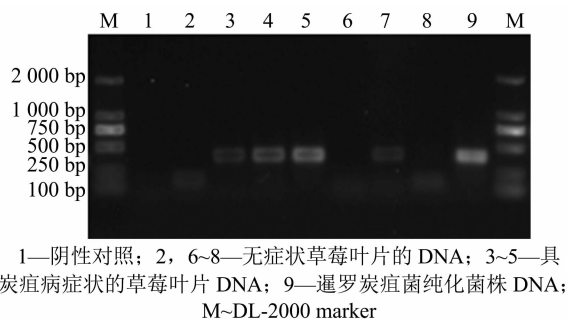


图4 对田间随机采集的叶片 DNA 进行二次 PCR 检测结果

且与 GenBank 中的暹罗炭疽菌(登录号 LC684901.1)序列同源性达 100%。因此,它们同为暹罗炭疽菌。

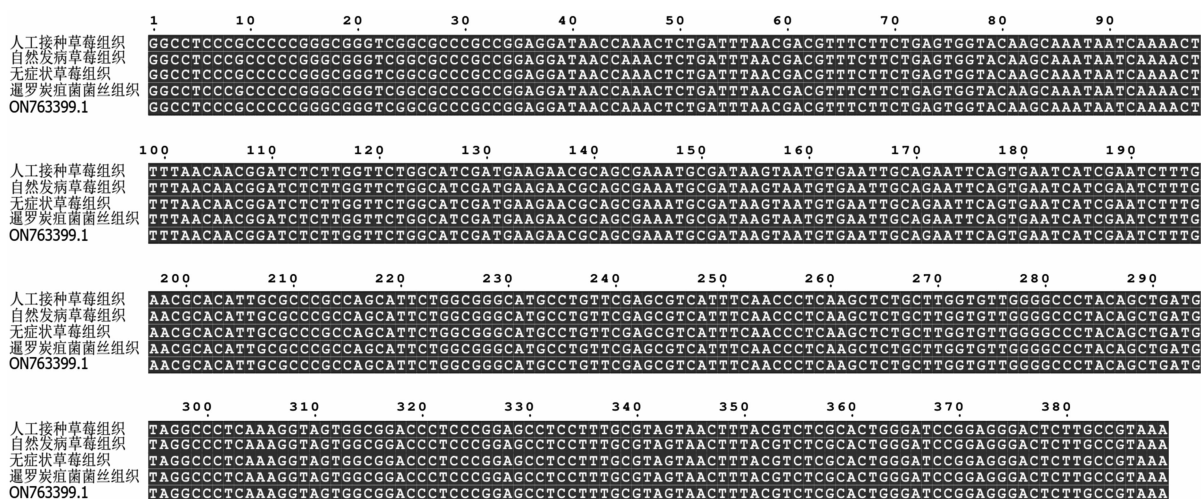


图5 应用引物 CgInt/CsiaR 从不同草莓组织及暹罗炭疽菌纯化菌株中扩增到的产物序列与 NCBI 中的暹罗炭疽菌(登录号 ON763399.1)ITS 序列多重比对结果

3 讨论与结论

众所周知,病害防治的基本原则是“预防为主,综合防治”。症状一旦出现,病原菌已侵入植物组织内部且大量繁殖,防治的难度和成本均大幅提高,并且往往收效甚微。在病害发生之前采取保护措施,可以起到最好的防治效果,既可有效防止病害蔓延,又可减少农药的用量。

草莓炭疽病的发生与传播有几个特点:第一,草莓炭疽病菌虽在全年各阶段均可对草莓造成危害,但该病通常在育苗期(6—8 月)和定植初期(8 月底至 9 月)发病最重,而在其他季节一般均是零星发生,不会造成重大危害,生产上也不会重点防治。第二,草莓炭疽菌有潜伏侵染的特性。在不适宜该病发生的气候与环境条件下,病原菌可形成无症状侵染,也就是病原菌可在植株上存活,但不会

让植株发病,当条件适宜时,携带病菌的无症状组织可成为初感染源导致病害传播。第三,草莓通常采用匍匐茎进行无性繁殖,母苗的质量会直接影响到子苗的质量。综上,根据炭疽病的传播与发病特点,为炭疽病的提前防治提供了可争取的时机。可以在草莓育苗和定植的几个关键时期和环节进行严格监控,如母苗及育苗地带菌情况检测、定植前抽样调查,可起到减少用药和有效防控的效果。

在本研究中,开发了一种基于 PCR 的检测草莓炭疽病致病菌暹罗炭疽菌的方法。该方法与传统的组织分离法相比,具有快速、准确、易于掌握的优点,甚至可以在症状出现前的侵染早期监测草莓组织中暹罗炭疽菌的携带情况。传统的方法通常要经过表面消毒、培养、镜检甚至是回接等流程,不仅费时、费力,且有很强的专业依赖性,要求操作者熟悉致病菌及常见真菌的培养形态与显微特征,而炭

疽菌的分生孢子通常要在培养 5 ~ 7 d 后才有可能形成产孢结构及分生孢子^[23],在试验过程中还发现有些菌株在固体培养基上基本不产孢,需要在液体培养基中经过振荡培养才能形成孢子,这无疑增加了鉴定的复杂程度及检测周期。本方法只要掌握 DNA 提取、PCR 扩增、电泳等常规分子操作手段,无需操作者有分类学基础,现在大部分科研机构,只要可进行常规分子检测,均可在较短时间内诊断出批量样品中携带暹罗炭疽菌的情况。

这一技术的核心是引物特异性和检出下限。为了得到针对草莓中暹罗炭疽菌的特异引物,用草莓植株及生长介质中分离到的 20 余种真菌作为对照,之所以选择这些菌株作为对照,是因为只有出现在草莓植株或生长介质中的真菌才有可能出现在实际检测样品的总 DNA 中,成为得到正确检测结果的干扰。通过分析它们与暹罗炭疽菌的 ITS 序列的差异位点,本研究设计了 1 条反向特异引物 Csiar,结果证明,将该引物与前人发表的针对胶孢炭疽病菌的正向引物 CgInt 相组合,可从草莓中特异地检测到暹罗炭疽菌,且在草莓基因组 DNA、其他对照菌株或无菌水中均不会扩增出预期的约 400 bp 片段。为降低检测下限,采取了 2 个设计:第一,将从草莓组织中得到的 DNA 原液不经稀释,直接用于 PCR 扩增,在第一轮反应体系中除了引物和 DNA 聚合酶,剩余部分全部用 DNA 溶液补足,这样可以尽可能提高反应体系中目的菌株的 DNA 含量;第二,用第一轮 PCR 产物作为模板,进行二次 PCR,实际证明检出下限降低了 99.99%,反应体系中 DNA 浓度仅有 5 fg/μL 也可观察到条带,利用二次 PCR 提高目的片段的扩增效率已在其他研究中被多次证实是有效的^[24-26]。

虽然本研究在无症状的样品中检测到了目的片段,通过测序也确定属于暹罗炭疽菌,但仍无法确定通过 PCR 没有扩增到预期的约 400 bp DNA 片段的样品中是否无暹罗炭疽菌的存在。本研究对人工接种不同浓度暹罗炭疽菌分生孢子悬浮液的草莓苗进行了后续观察,发现浓度为 1×10^4 个/mL 孢子是发病临界值,在这一浓度,只有部分接种的植株表现较重的症状;当高于这一浓度时,植株可以整体出现炭疽病典型症状,当低于这浓度时,仅产生个别病斑甚至完全不表现症状,而且在生长一段时间后,病斑通常不会扩大,这说明植株本身的免疫系统可抵抗较低浓度的病原菌入侵。本研究

实际检测结果是只有接种浓度高于 1×10^4 个/mL 孢子的样品,及部分接种了 1×10^4 个/mL 孢子样品中可得到阳性条带。提示这套方法虽然不能在植株携带极少量病菌的情况下得到阳性结果,但检测限与真菌致病浓度是有对应关系的,可用于病害的早期预报。

总的来说,本研究中开发的基于 PCR 的方法较传统分离培养方法更高效、准确。该方法适用于检测有、无症状草莓组织中的暹罗炭疽菌,以期对病害预测,深入了解病害流行,有助于制定有效的病害控制策略。

参考文献:

- [1] 张艳婷. 草莓茎基腐病的病原菌鉴定、生物学特性及生物-化学协同控制技术[D]. 杭州:浙江农林大学,2021.
- [2] 姜莉莉,孙瑞红,宫庆涛,等. 草莓炭疽病原菌的分离及高效防治药剂筛选[J]. 山东农业科学,2021,53(6):89-93.
- [3] 赵玳琳,何海水,杨学辉. 温湿度对草莓炭疽菌侵染草莓叶片的影响[J]. 农学学报,2020,10(1):22-26.
- [4] 王步云,乔岩,张涛,等. 北京地区草莓炭疽病原菌鉴定及生物防治药剂筛选[J]. 河南农业科学,2019,48(4):88-92.
- [5] 宋丽丽,张丽勃,高清华,等. 草莓果生刺盘孢菌的生物学特性及致病性测定[J]. 上海农业学报,2019,35(6):88-96.
- [6] 郭劼,王晓琳,黄洁雪,等. 7 种杀菌剂对草莓胶孢炭疽菌和灰霉病菌的室内毒力测定[J]. 江苏农业科学,2019,47(20):129-133.
- [7] Hu S D, Zhang Y T, Yu H, et al. *Colletotrichum* spp. diversity between leaf anthracnose and crown rot from the same strawberry plant[J]. Frontiers in Microbiology,2022,13:860694.
- [8] Zhang L Q, Song L L, Xu X M, et al. Characterization and fungicide sensitivity of *Colletotrichum* species causing strawberry anthracnose in Eastern China[J]. Plant Disease,2020,104(7):1960-1968.
- [9] Mills P R, Sreenivasaprasad S, Brown A E. Detection and differentiation of *Colletotrichum* gloeosporioides isolates using PCR[J]. FEMS Microbiology Letters,1992,98(1/2/3):137-143.
- [10] 林婷. 胶孢炭疽菌杀菌剂抗药性的机制、检测技术及治理研究[D]. 杭州:浙江农林大学,2015:1-4.
- [11] 史芳芳,王雷. 草莓枯萎病和炭疽病的双重 LAMP 快速病原鉴定[J]. 农业生物技术学报,2021,29(6):1215-1221.
- [12] Qian Y K, Wei S, Zhang N, et al. Rapid detection of 5 fungal diseases in sunflower (*Helianthus annuus*) using dual priming oligonucleotide system - based multiplex PCR and capillary electrophoresis[J]. SLAS Technology,2022,27(4):253-260.
- [13] 贾瑾,徐云龙,周佳乐,等. ‘Cocktail’ 葡萄柚黄龙病菌检测及鉴定[J]. 园艺学报,2022,49(3):590-596.
- [14] Mousavi S A, Keykhasab M, Fahmideh L, et al. A robust method for identification and *in-planta* detection of *Verticillium dahliae* in the infected olive trees, using real-time PCR and nested PCR[J]. Physiological and Molecular Plant Pathology,2020,112:101559.

武亚芬, 向 丹, 梁 斌, 等. 番茄枯萎病拮抗菌 KCKB1 的分离、鉴定及生防效果[J]. 江苏农业科学, 2023, 51(9): 131–139.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2023.09.018

番茄枯萎病拮抗菌 KCKB1 的分离、鉴定及生防效果

武亚芬, 向 丹, 梁 斌, 李 琳, 黄玉丹, 朱晓雪, 徐 良

(青岛农业大学资源与环境学院, 山东青岛 266109)

摘要:为筛选获得针对番茄枯萎病的生防菌, 从山东寿光设施大棚内番茄根际筛选获得 1 株细菌菌株 KCKB1, 通过菌落形态特征观察以及 16S rRNA 基因序列分析, 菌株 KCKB1 确认为枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*), 并对其开展对峙培养、种属鉴定、生长特性研究、抑菌谱检测以及盆栽防效验证。结果表明, 菌株 KCKB1 能有效抑制番茄枯萎病, 盆栽防治效果达到 61.46%; 菌株 KCKB1 可以提高番茄植株叶片内抗氧化酶 (SOD、CAT) 以及抑菌物质合成酶 (PAL、PPO) 的活性, 进而提高植株抗病性。同时, 菌株 KCKB1 还具有溶磷、固氮、产铁载体、产 ACC 脱氨酶、产 IAA 等促生功能, 能明显促进番茄植株的生长。此外, 菌株 KCKB1 对链格孢菌、甘薯长喙壳菌、灰葡萄孢、烟草疫霉菌、尖孢镰刀菌甘薯专化型 5 种病原菌均具有良好的的抑菌效果。综上, 枯草芽孢杆菌菌株 KCKB1 具有良好的生防潜力与广阔的应用前景, 为对番茄枯萎病进行生物防治提供了菌种资源。

关键词: 枯草芽孢杆菌; 番茄枯萎病; 生物防治; 促生长特性

中图分类号: S436.412.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2023)09-0131-09

山东省寿光市是全国著名的菜都, 番茄的种植面积占蔬菜总种植面积的 1/4 左右^[1]。但由于近年来番茄的栽培面积不断扩大且连续栽培年限不断

加长, 使寿光设施栽培条件下种植的番茄受到很多土传植物病害的危害, 其中对番茄影响很大的病害之一为番茄枯萎病。番茄枯萎病是一种维管束疾病, 导致这种病害产生的病原菌是尖孢镰刀菌番茄专化型 (*Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*, Fol), 番茄的整个生育期都有可能被该病原菌侵染^[2], 严重时可造成番茄减产 65% 以上甚至绝收^[3]。目前, 对番茄枯萎病的防治措施有喷施化学药剂^[4], 还有以选育抗病品种和改善栽培模式为主的农业防治^[5], 以改良土壤理化性质、改善土壤 pH 值等为主

收稿日期: 2022-07-27

基金项目: 山东省重大科技创新工程项目 (编号: 2021CXGC010801);

青岛市科技惠民示范引导专项 (编号: 21-1-4-ny-13-nsh)。

作者简介: 武亚芬 (1998—), 女, 山东泰安人, 硕士研究生, 从事根际功能微生物对番茄枯萎病抗病研究。E-mail: 3494511371@qq.com。

通信作者: 徐 良, 博士, 副教授, 从事植物修复与资源化研究。

E-mail: xuliang@qau.edu.cn。

[15] Forcelini B B, Lee S, Oliveira M S, et al. Development of high-throughput SNP genotyping assays for rapid detection of strawberry *Colletotrichum* species and the G143A mutation [J]. *Phytopathology*, 2018, 108(12): 1501–1508.

[16] 侯圣凡, 刘峻杰, 李小峰, 等. 基于环介导等温扩增技术的草莓枯萎病检测[J]. *中国农业大学学报*, 2022, 27(3): 172–180.

[17] de la Lastra E, Maria J B, Berta D S, et al. A TaqMan real-time polymerase chain reaction assay for accurate detection and quantification of *Fusarium solani* in strawberry plants and soil[J]. *Scientia Horticulturae*, 2018, 237: 128–134.

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

[19] 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.

[20] 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.

[21] Widodo, Hidayat S H. Identification of *Colletotrichum* species associated with chili anthracnose in Indonesia by morphological characteristics and species-specific primers[J]. *Asian Journal of Plant Pathology*, 2018, 12(1): 7–15.

[22] 梁钰平. 草莓炭疽病检测及防治之研究[D]. 台北: 台湾大学, 2015: 4–10.

[23] 黄军凯, 张国珍. 促进草莓炭疽病菌大量产孢的方法[J]. *植物保护*, 2014, 40(4): 107–111.

[24] 朱高倩, 李双良, 马 莉, 等. 应用 DNA 提取改良和二次聚合酶链反应技术检测乌头及其炮制品[J]. *广州中医药大学学报*, 2021, 38(2): 385–391.

[25] 文亦带, 韩蓉蓉, 单贵莲, 等. 低磷胁迫柱花草差异表达基因分析研究[J]. *热带作物学报*, 2020, 41(5): 971–977.

[26] 叶碧欢, 陈友吾, 胡 杨, 等. 两种分子技术检测松木中松材线虫的效果评价[J]. *植物保护学报*, 2018, 45(6): 1335–1341.