

镰刀菌引起的北京市草莓根腐病病原鉴定

盛茹媛¹ 肖长坤² 郑书恒² 石延霞³ 谢学文³ 王相晶^{1*} 李宝聚^{3*}

(¹东北农业大学生命科学学院, 黑龙江哈尔滨 150030; ²北京市植物保护站, 北京 100029; ³中国农业科学院蔬菜花卉研究所, 北京 100081)

摘 要: 对北京市昌平区采集的 35 个草莓根腐病病样进行病原鉴定, 结果分离获得 13 个菌株, 根据培养特征和形态学鉴定, 确定分离到的菌株均为尖孢镰刀菌 (*Fusarium oxysporum*); 选取真菌通用引物 ITS1/ITS4 扩增菌株的 rDNA-ITS 序列并进行测序, 通过与 GenBank 数据库序列比对, 分子鉴定结果与形态学一致。将分离到的菌株回接到健康草莓幼苗上, 植株表现出与田间发病相似的症状, 重新分离能够得到相同的病原物。基于形态学、分子生物学鉴定及致病性检测, 最终确定北京市昌平区草莓根腐病的病原菌为 *Fusarium oxysporum*。

关键词: 草莓根腐病; 尖孢镰刀菌; 致病性; rDNA-ITS 序列

中图分类号: S436.44 文献标识码: A 文章编号: 1000-6346 (2012) 12-0052-05

Identification of Strawberry Root Rot Pathogeny Caused by *Fusarium* in Beijing

SHENG Ru-yuan¹, XIAO Chang-kun², ZHENG Shu-heng², SHI Yan-xia³, XIE Xue-wen³, WANG Xiang-jing^{1*}, LI Bao-ju^{3*}

(¹College of Life Science, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, Heilongjiang, China; ²Plant Protection Station of Beijing City, Beijing 100029, China; ³Institute of Vegetables and Flowers, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China)

Abstract: A high incidence of strawberry root rot was observed in Changping District of Beijing in April 2011 and 35 samples of affected plants were collected at random. Thirteen strains were taken at the colony edge for subculture and purification. The purified isolates were primarily identified based on morphological and colony characteristics. It was found that all strains isolates were similar in morphology and colony. Analysis of rDNA-ITS sequence of isolates indicated that the strains were *Fusarium oxysporum*. The healthy strawberries were used for fungal pathogenicity test. All isolates had pathogenicity. Symptoms became to appear 2 weeks after inoculation. The pathogens were recovered from strawberry roots, confirming Koch's postulates. Based on the morphological characteristics, pathogenicity test and molecular methods, strawberry root rot pathogens were identified as *Fusarium oxysporum*.

Key words: Strawberry root rot; *Fusarium oxysporum*; Pathogenicity; rDNA-ITS sequences

收稿日期: 2012-03-16; 接受日期: 2012-03-28

基金项目: 北京市农业局科技项目

作者简介: 盛茹媛, 女, 硕士研究生, 专业方向: 分子植物病理学, E-mail: ruyuan@126.com

* 通讯作者 (Corresponding authors): 王相晶, 女, 教授, 专业方向: 生物化学与分子生物学, E-mail: wangxiangjing2008@yahoo.com.cn; 李宝聚, 男, 研究员, 博士生导师, 专业方向: 蔬菜病害诊断与综合防治, E-mail: Libj@mail.caas.net.cn

草莓 (*Fragaria ananassa* Duch.) 属宿根性多年生草本植物, 具有易于栽培、当年结果、产量高、经济效益好等特点。近年来, 作为特种经济作物已成为我国一项重要经济发展项目。但是随着生产规模发展、种植面积扩大、连作年限增加, 草莓根腐病在我国各主产区普遍发生, 并呈现逐年加重的趋势, 已成为制约草莓产业发展的障碍因素之一。世界范围内草莓主产区已报道的草莓根腐病病原菌达 20 多种, 是一类难以防治的土传病害 (赵秀娟 等, 2006)。

2011 年 4 月对北京市昌平区多个草莓种植基地进行病害调查, 结果发现草莓根腐病在该地区普遍发生, 病株率 10% ~ 40%。发病植株症状表现为叶片枯黄萎蔫, 茎基部和须根不同程度的变黑腐烂, 发病严重时出现死秧现象, 潮湿环境时长有霉层。导致病害难以控制的主要原因是草莓根腐病的病原及发生规律不清楚, 针对这一现状, 本试验在该地区草莓根腐病病原分离的基础上, 进行了形态学、分子生物学鉴定和致病性检测, 旨在确定该地区草莓根腐病的病原, 为草莓根腐病的防治提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 病样采集和病原菌的分离

2011 年 4 月在北京市昌平区进行草莓根腐病发病情况调查, 共采集草莓根腐病病株 35 份, 用常规根腐病菌的分离方法 (方中达, 1998) 进行病原菌分离培养: 在病样茎基部腐烂或须根病健交界处切取 10 mm² 的组织块, 75% 酒精消毒 30 s, 无菌水漂洗 3 次, 无菌吸水纸吸干, 接种在 PDA 培养基上, 25 °C 条件下培养 2 d 后转接纯化, 4 °C 甘油冷冻保存。

1.2 形态学鉴定

根据 Booth (1971) 的镰刀菌分类系统, 将分离到的菌株接种在 PDA 培养基上, 3 次重复, 每重复 3 个平板, 25 °C 黑暗条件下培养 4 d, 观察菌落形态特征, 并在显微镜下进行产孢细胞, 大、小型分生孢子和厚垣孢子的形态观察, 拍照记录。

1.3 分子生物学鉴定

1.3.1 DNA 提取 取分离得到的菌株在 PD 液体培养基中, 28 °C 震荡培养 5 d, 无菌纱布过滤培养液, 收集菌丝体, 高压抽滤后冻干, 基因组 DNA 采用改良 CTAB 法提取 (郭新梅 等, 2005)。

1.3.2 rDNA-ITS 序列扩增及测序 采用引物 ITS1 (5' -TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') 和 ITS4 (5' -TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') 对分离物进行 PCR 扩增。扩增反应在 S1000 Thermal Cycler PCR 仪 (BIO-RAD) 上进行。反应体系为 20 μL: 4 μL 10×PCR Buffer 反应缓冲液, 2 μL 0.2 mmol·L⁻¹ dNTPs, 2 μL 10 μmol·L⁻¹ 的 1 对引物, 1 μL 250 ng 模板 DNA, 0.5 μL 5 U Taq DNA 聚合酶和 10.5 μL dd H₂O。反应条件: 94 °C 预变性 4 min; 94 °C 变性 1 min, 56 °C 退火 1 min, 72 °C 延伸 1 min, 35 个循环; 72 °C 延伸 10 min, 最后在 4 °C 停止反应 (甘辉林 等, 2010)。产物经 1.0% 琼脂糖凝胶电泳, goldview 染色, 凝胶成像系统检测拍照。

PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳回收试剂盒 (北京天根科技有限公司) 回收后, 克隆到 pMD20-T 载体 (编号 D107A, TaKaRa) 并转化感受态大肠杆菌 DH5 α (编号 D9057S) 16 h 后, 从蓝白斑筛选平板挑取白色单菌落到 LB 培养液中培养。利用引物 M13+ 进行菌落 PCR 验证, 筛选的阳性克隆送中国农业科学院作物研究所测序部测序。

将所测菌株的 rDNA-ITS 序列通过 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> 的 BLAST 软件进行同源性比较。

1.4 致病性测定

根据柯赫氏法则, 采用伤根接种法对分离得到的菌株进行致病性测定。菌株在 PD 液体培养基中 28 °C 震荡培养 7 d, 培养液 4 层无菌纱布过滤, 除去菌丝体, 滤液经 5 000 r·min⁻¹ 离心 10 min, 得到白色孢子沉淀, 加无菌水稀释成浓度为 1 × 10⁶ 个·mL⁻¹ 孢子悬浮液。供试草莓

品种为红颜, 用灭菌刀片在草莓须根部造成伤口若干, 每株伤根草莓灌入 25 mL 孢子悬浮液, 3 次重复, 每重复 5 株, 即每个菌株共接种 15 株草莓幼苗。设伤根不接种为空白对照。接种后, 植株保湿 48 h 后转入 28~35 °C 温室培养。接种 14 d 后进行病害调查, 并进行病原菌的重新分离和鉴定。

2 结果与分析

2.1 病害症状及病原菌分离结果

2011 年 4 月对北京市昌平区草莓采摘园和生产基地进行调查, 正值草莓结果期, 均有不同程度的草莓根腐病发生。发病植株表现不同程度的草莓根腐病症状: 地上部分, 发病初期植株叶片变黄, 叶脉间变褐坏死, 茎基部轻微变黑腐烂, 植株长势衰弱, 结果少, 果实不能正常膨大, 品质变劣或减产; 发病严重时, 老叶变紫红色萎蔫, 茎部出现霉层, 整株萎蔫甚至变黑腐烂。地下部分, 初期须根少而细, 表皮形成褐色病斑, 病、健交界明显, 维管束变褐, 后期须根变黑腐烂, 表皮和木质部分离, 主根偶有红褐色病变, 最严重的症状是在开花结果期死秧 (图 1)。从发病植株上共分离纯化得到 13 个菌株, 分别编号 CPCM-1~CPCM-13。

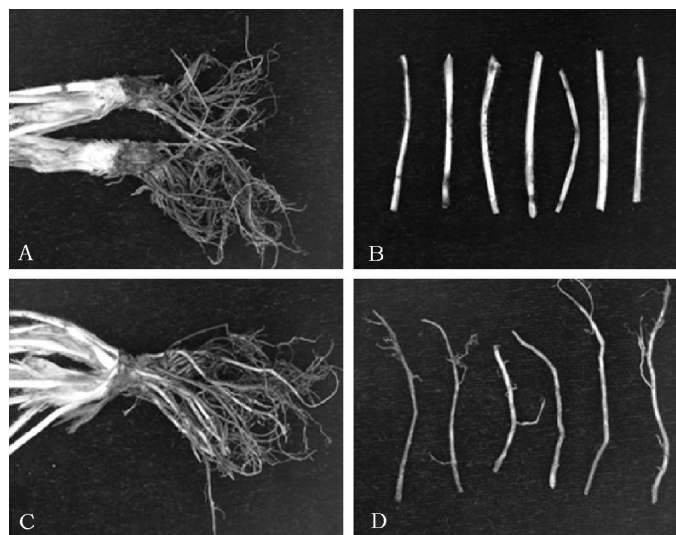


图 1 尖孢镰刀菌引起的草莓根腐病田间自然发病症状

A, 病株根部症状; B, 须根表面褐色病斑; C, 发病茎部褐色至黑色病斑; D, 发病主根内部变红褐色。

2.2 病原菌的形态学鉴定

通过平板培养与显微观察结果表明, 分离得到的 13 个菌株特征一致。25 °C 条件下, 在 PDA 培养基上培养 4 d, 菌落白色, 平均直径为 (40.0 ± 3.0) mm, 气生菌丝绒状。小型分生孢子较多, 卵形或肾形, 0~1 个隔膜, 假头状着生在产孢细胞上, $12.5 (7.5 \sim 17.5) \mu\text{m} \times 2.8 (2.0 \sim 4.0) \mu\text{m}$ 。大型分生孢子镰刀形, 美丽型, 较匀称, 足细胞明显, 具 1~4 个隔膜, 多数为 3~4 个隔膜, $28.4 (13.0 \sim 38.0) \mu\text{m} \times 3.0 (2.3 \sim 4.5) \mu\text{m}$ 。厚垣孢子单生或串生, 球形。产孢细胞单瓶梗, 较短 (图 2)。依据 Booth (1971) 的镰刀菌分类系统将分离到的 13 个菌株鉴定为尖孢镰刀菌 (*Fusarium oxysporum*)。

2.3 ITS 序列分析

用 rDNA-ITS 通用引物 ITS1/ITS4 对分离得到的 13 个菌株基因组 DNA 进行 PCR 扩增, 均得到大小为 500~600 bp 的单一片段。将扩增产物进行回收、克隆和测序。13 个菌株扩增产物片段大小均为 544 bp (图 3), 包含有完整的 ITS1-5.8S-ITS2 DNA 序列。将获得的 13 个菌株序列

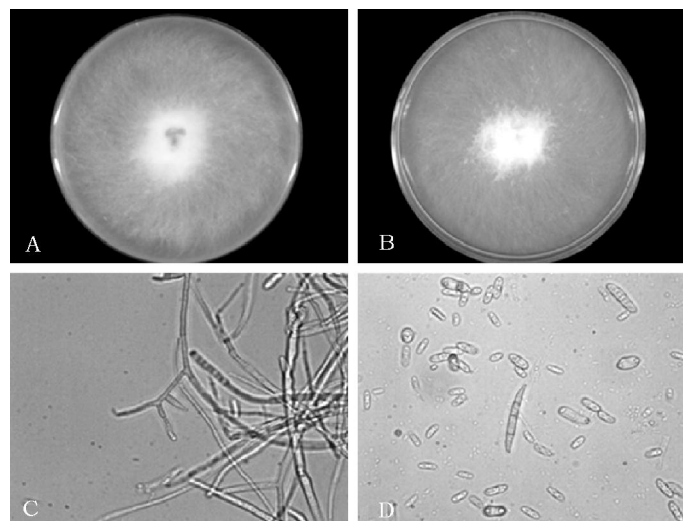


图2 草莓根腐病原菌在 PDA 培养基上的菌落特征及显微形态特征

A, 菌株 CPCM-1 在 PDA 上菌落正面; B, 菌株 CPCM-1 在 PDA 上菌落背面; C, 分生孢子梗; D, 分生孢子。

在 NCBI 上进行 BLAST 分析, 与 20 个 *Fusarium oxysporum* 菌株的相似性为 99% ~ 100%。表明供试菌株均为尖孢镰刀菌 (*Fusarium oxysporum*), 以分离物 CPCM-1 序列为代表, 提交到 GenBank, 获得登录号为 JQ045558。

2.4 致病性测定

13 个菌株分别接种草莓幼苗, 14 d 后幼苗表现出明显的发病症状, 发病初期茎基部出现小于 1 cm 的变黑腐烂, 叶面边缘变黄卷曲。发病后期茎叶萎焉, 腐烂或整株死亡。从土壤中取出发病植株, 可以看到须根变黑腐烂 (图 4)。接种植株症状与田间采集病样基本一致。对照无发病症状, 生长正常。取发病植株组织进行病原菌重新分离, 目标分离物获得率为 100%, 进一步表明分离得到的 13 个菌株为北京市昌平区草莓根腐病原。

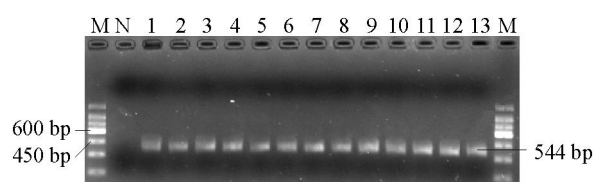


图3 引物 ITS1/ITS4 扩增菌株总 DNA 凝胶电泳图

N, 阴性对照; 1 ~ 13, 菌株 CPCM-1 ~ CPCM-13 扩增产物; M, 150 bp 分子量标准。

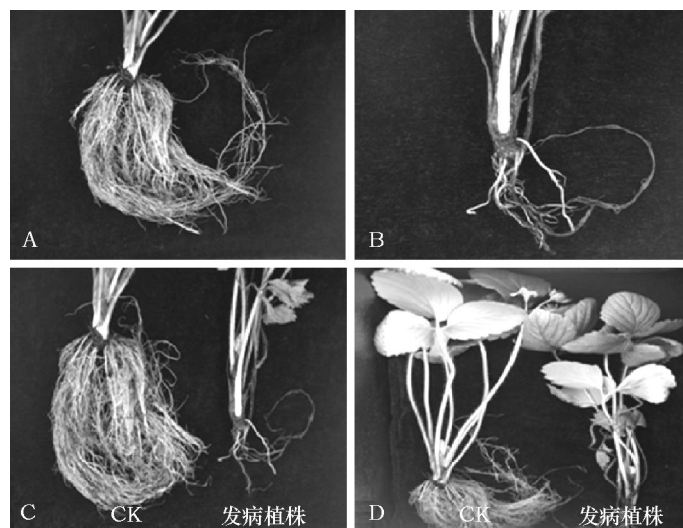


图4 人工接种草莓幼苗 14 d 后植株发病情况

A, 健康草莓植株根部 (CK); B, 接种后发病植株根部变黑腐烂; C, 对照与发病植株根部; D, 接种 14 d 后对照和发病植株。

3 结论与讨论

草莓根腐病病原菌类型复杂多样,对生产危害极大(任小杰,2007)。目前,国内外对草莓根腐病病原菌研究主要是依据传统的鉴定技术,即把形态特征和生理生化指标作为病原菌分类鉴定的主要依据。但是这些鉴定方法容易受到多种因素的影响,具有较大不确定性,本试验在形态学鉴定的基础上,采用分子生物学的方法进行鉴定,为分子生物学技术应用于病原菌类型鉴定奠定了一定的理论基础。

草莓根腐病在全世界各草莓种植区均有发生,但是不同地区病原菌种类存在较大差异。日本、美国、澳大利亚等地的草莓主产区,草莓根腐病病原菌根据培养特征和形态学特征鉴定为立枯丝核菌(*Rhizoctonia solani*)、腐霉属(*Pythium* spp.)、尖孢镰刀菌草莓专化型(*Fusarium oxysporum* f. sp. *fragariae*)和恶疫霉(*Phytophthora cactorum*)(Minegish, 1989; Paulus, 1990; Botha et al., 2003; Nagarajan et al., 2006; Golzar et al., 2007; Manici & Bonora, 2007)。我国河北满城和甘肃兰州等地的草莓根腐病严重发生,采集发病植株进行病原菌分离培养,形态学鉴定主要为分拟盘多毛孢属(*Pestalotiopsis* sp.)、草莓疫霉(*Phytophthora fragariae*)、尖孢镰刀菌(*Fusarium oxysporum*)和立枯丝核菌(*Rhizoctonia solani*)(徐淑华等,2004;曹奎荣,2006;刘紫英等,2008;Liu et al., 2010)。本文针对北京昌平地区草莓根腐病日趋严重的现况,进行了病样采集。对采集到的病样标本进行病原菌分离鉴定和致病性检测,并将传统真菌形态学鉴定方法与现代分子生物学方法相结合,证明北京昌平地区草莓根腐病的病原菌为尖孢镰刀菌(*Fusarium oxysporum*)。关于该病害的侵染途径及致病原理需要进一步的研究,在国内其他产区草莓根腐病发病情况及病原类型还需采集更大范围的病株样本进行调查。

参考文献

- 曹奎荣. 2006. 草莓根腐病病原菌鉴定及生物学特性的研究[硕士论文]. 兰州: 甘肃农业大学.
- 方中达. 1998. 植物研究方法. 3版. 北京: 中国农业出版社.
- 甘辉林, 柴兆祥, 楼兵干, 李金花. 2010. 中国腐霉新记录种 *Pythium heterothallicum* 的分离鉴定及致病性测定. 菌物学报, 29(4): 494-501.
- 郭新梅, 康冀川, 张杰. 2005. CTAB 法在金黄色葡萄球菌 DNA 提取中的应用. 山地农业生物学报, 24(6): 558-560.
- 刘紫英, 康艳萍, 袁斌. 2008. 草莓红中柱根腐病病原菌的生物学特性. 安徽农业大学学报, 35(4): 577-580.
- 任小杰. 2007. 草莓炭疽病病原鉴定、生物学特性及药剂毒力测定[硕士论文]. 扬州: 扬州大学.
- 徐淑华, 蒋继志, 郝志敏. 2004. 河北满城地区草莓根腐病病原真菌的分离鉴定//中国植物病理学会 2004 年学术会论文集. 北京: 中国农业科学技术出版社: 68-71.
- 赵秀娟, 王树桐, 张凤巧, 杜洪忠, 蒋继志. 2006. 草莓根腐病研究进展. 中国农学通报, 8(8): 419-423.
- Botha A, Denman S, Lamprecht S C, Mazzola M, Crous P W. 2003. Characterisation and pathogenicity of *Rhizoctonia* isolates associated with black root rot of strawberries in the Western Cape Province, South Africa. Australasian Plant Pathology, 32(2): 195-201.
- Booth C. 1971. The genus *Fusarium*. UK (Kew) and USA (Surrey): Commonwealth Mycological Institute: 1-237.
- Golzar H, Phillips D, Mack S. 2007. Occurrence of strawberry root and crown rot in Western Australia. Australasian Plant Disease Notes, 2: 145-147.
- Liu X, Zhang J Z, Yao W, Hu D W. 2010. Identification of *Colletotrichum* spp. isolated from strawberry in Zhejiang Province and Shanghai City, China. Journal of Zhejiang University-Science B (Biomedicine & Biotechnology), 11(1): 61-70.
- Manici L M, Bonora P. 2007. Molecular genetic variability of Italian binucleate *Rhizoctonia* spp. isolates from strawberry. European Journal of Plant Pathology, 118(1): 31-42.
- Minegish M. 1989. Strawberry production in Japan cultivar, cultivating method, main disease and breeding. Acta Horticulturae, 265: 665-670.
- Nagarajan G, Kang S W, Nam M H. 2006. Characterization of *Fusarium oxysporum* f. sp. *fragariae* based on vegetative compatibility group, random amplified polymorphic DNA and pathogenicity. Plant Pathology Journal, 22(3): 222-229.
- Paulus A O. 1990. Fungal disease of strawberry. Hortscience, 25(8): 885-889.