

大白菜褐腐病（茎基腐病）的病原菌鉴定

周慧敏¹ 谢学文¹ 石延霞¹ 郭英兰² 李宝聚^{1*}

(¹中国农业科学院蔬菜花卉研究所, 北京 100081; ²中国科学院微生物研究所, 北京 100101)

摘要: 2011 年在北京、河北、江苏等地的部分大白菜种植区, 当地俗称的大白菜“茎基腐病”普遍严重发生, 实际调查后共采集到大白菜“茎基腐病”病样 12 份, 分离获得 12 个真菌分离物, 经形态学鉴定, 分离到的菌株均为立枯丝核菌 *Rhizoctonia solani*; 采用真菌通用引物 ITS1/ITS4 对病原菌 rDNA-ITS 进行 PCR 扩增, 并将测序结果在 GenBank 中进行同源性比对分析, 分子生物学鉴定结果与形态学鉴定结果一致。将分离到的菌株分别回接健康的大白菜植株, 植株表现出与田间相似的发病症状, 重新进行病原菌的分离, 得到相同的病原物。基于形态学、分子生物学鉴定和致病性试验最终确定北京、河北、江苏等地大白菜“茎基腐病”病原菌为立枯丝核菌 *Rhizoctonia solani*, 大白菜“茎基腐病”与大白菜褐腐病、大白菜立枯病属同病异名。

关键词: 大白菜褐腐病（茎基腐病）; 形态学特征; rDNA-ITS; 致病性; 立枯丝核菌

中图分类号: S436.341.1 文献标识码: A 文章编号: 1000-6346 (2012) 22-0070-05

Pathogen Identification of Chinese Cabbage Brown Rot (Base Stem Rot)

ZHOU Hui-min¹, XIE Xue-wen¹, SHI Yan-xia¹, GUO Ying-lan², LI Bao-ju^{1*}

(¹Institute of Vegetables and Flowers, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China;

²Microbiology Institute of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China)

Abstract: In 2011, the disease known as ‘base stem rot’ of Chinese cabbage [*Brassica campestris* L. ssp. *pekinensis* (Lour) Olsson] was prevalent in Beijing, Hebei and Jiangsu Provinces. 12 fungi isolates were collected from rotten stem of Chinese cabbage. The morphological identification show the isolated bacteria strain is *Rhizoctonia solani*. PCR of rDNA-ITS was propagated by general primer ITS1/ITS4 and the sequencing result was compared and analyzed in GenBank. The results of molecular identification and morphological identification were the same. Then the isolated bacteria strains were inoculated to the healthy Chinese cabbage stems. The symptoms resembled the ones originally observed in the fields. Finally, the pathogen’s identity was confirmed by re-isolation from lesions of infected plants. Based on the tests of morphological characteristics, pathogenicity and molecular biology, the pathogens of Chinese cabbage ‘base stem rot’ found in Beijing, Hebei and Jiangsu Provinces were the same as brown rot, *Rhizoctonia solani*. etc.

Key words: Chinese cabbage brown rot (base stem rot); Morphological characteristics; rDNA-ITS; Pathogenicity; *Rhizoctonia solani*

收稿日期: 2012-05-29; 接受日期: 2012-06-21

基金项目: 国家大宗蔬菜产业技术体系建设专项 (CARS-25)

作者简介: 周慧敏, 硕士研究生, 专业方向: 植物病理学, E-mail: hj88523@126.com

* 通讯作者 (Corresponding author): 李宝聚, 研究员, 专业方向: 蔬菜病害综合防治, E-mail: libj@mail.caas.net.cn

《中国蔬菜》学术论文下载 www.cnveq.or

大白菜 [*Brassica campestris* L. ssp. *pekinensis* (Lour) Olsson], 属十字花科 (Cruciferae) 芸薹属 (*Brassica*)。主要分布于中国北方各地, 供秋冬及春季食用, 其中以华北地区栽培面积最大, 其栽培面积和产量居各种蔬菜之首。但是随着连作年限增加, 大白菜生产中的病害在我国各大白菜种植区普遍发生, 并呈现逐年加重的趋势。

2011 年 1 月对北京、河北、江苏等地多个大白菜种植基地进行病害调查, 发现大白菜上普遍出现不同程度的茎基腐烂症状, 当地俗称“茎基腐病”。病菌常自靠近地面的叶柄处侵入, 严重发生时, 60%~70%的大白菜茎基部有此症状, 严重影响了大白菜的商品价值, 给生产者造成了一定的经济影响。调查分析发现, 造成该病害严重发生的主要原因是管理者对大白菜“茎基腐病”的发生规律和病原菌不了解, 针对这一现状, 本试验对这些地区大白菜“茎基腐病”在病原菌分离的基础上, 进行形态学、分子生物学鉴定和致病性测定试验, 旨在为大白菜“茎基腐病”的防治提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 病样采集及症状观察

2011 年 1 月在北京、河北、江苏等地进行大白菜病害发生情况调查, 发现当地俗称的大白菜“茎基腐病”普遍发生, 采集病样标本 12 份, 并进行病样症状描述和照片采集。

1.2 病原菌的分离及形态学鉴定

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: 在病样茎基部病健交界处剪取 10 mm²的组织块, 75%的酒精消毒 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 ℃条件下培养 2 d 后, 纯化培养, 菌种 4 ℃下甘油中冷冻保存。分离到的菌株转接到 PDA 培养基上, 25 ℃黑暗条件下培养 4 d, 观察菌落形态特征, 并在显微镜下进行观察, 拍照记录。

1.3 分子生物学鉴定

1.3.1 DNA 提取 形态学研究表明, 分离得到的 12 个菌株培养特征和显微特征均一致。随机选取 3 个菌株转接到 PD 液体培养基中, 28 ℃震荡培养 7 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 采用郭新梅等(2005)的改良 CTAB 法提取。

1.3.2 rDNA-ITS 序列扩增及测序 采用引物 ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') 和 ITS4 (5'-TCCTCCGCTTA TTGATATGC-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 Utaq DNA 聚合酶和 10.5 μL ddH₂O。反应条件: 94 ℃预变性 4 min; 每个循环 94 ℃变性 1 min, 56 ℃退火 1 min, 72 ℃延伸 1 min, 35 个循环; 72 ℃延伸 10 min, 最后在 4 ℃停止反应。产物经 1.0%琼脂糖凝胶电泳, goldview 染色, 经凝胶成像系统检测拍照。将扩增的 PCR 产物进行测序(测序单位: 中国农业科学院作物研究所), 将获得的序列在 GenBank 的核酸序列库中进行同源性比对。

1.4 致病性测定

根据柯赫氏法则, 采用贴菌片接种法对分离得到的菌株进行致病性测定, 致病性试验选择在中国农业科学院蔬菜花卉研究所温室中进行。病原菌在 PDA 培养基上培养 4 d 后, 用打孔器打取直径为 0.5 cm 的菌丝块, 贴到大白菜幼苗茎基部。每个菌株接种 9 株大白菜幼苗, 设贴不含病原菌的 PDA 培养基块的植株为空白对照。接种后植株保湿 48 h, 之后转入 26~32 ℃温室中进行培养, 接种 3 d 后进行病害发生情况调查, 并自发病部位重新采集病样进行病原菌的分离和鉴定。

2 结果与分析

2.1 病害症状及病原菌分离结果

2011 年 1 月, 北京、河北、江苏等地大白菜种植区出现不同程度大白菜茎基腐烂症状, 植株发病后, 靠近地面的叶柄首先表现病症, 发病初期在叶柄上形成浅黄褐色或浅紫灰色小斑, 病斑逐渐扩大, 呈黄褐色、紫灰色至暗褐色, 椭圆形至不规则形, 病斑表面凹陷, 内部组织腐败软化 (图 1)。从发病植株上共分离纯化得到 12 个菌株。



图 1 立枯丝核菌引起的大白菜“茎基腐病”田间自然发病症状

A: 发病初期形成椭圆形病斑; B: 后期病斑扩大。

2.2 病原菌的形态学鉴定

通过平板培养与显微观察表明, 分离得到的 12 个菌株特征一致。25 ℃ 条件下, 在 PDA 培养基上培养 4 d, 菌落浅黄色, 平均直径为 (80.0 ± 3.0) mm, 菌丝稀疏, 蛛丝状, 边缘规则, 初期菌落无色, 后期逐渐变为浅黄褐色至褐色, 菌落表面产生深褐色的小菌核, 菌核直径 1.5 ~ 5.0 mm。菌丝粗 $3.0 \sim 7.0 \mu\text{m}$, 分枝处缢缩, 离分枝不远处形成一隔膜 (图 2)。参考植物病原真菌学 (陆家云, 2000) 和真菌鉴定手册 (魏景超, 2004), 病原菌形态学鉴定分离到的病原菌为立枯丝核菌 (McCabe et al., 1999)。

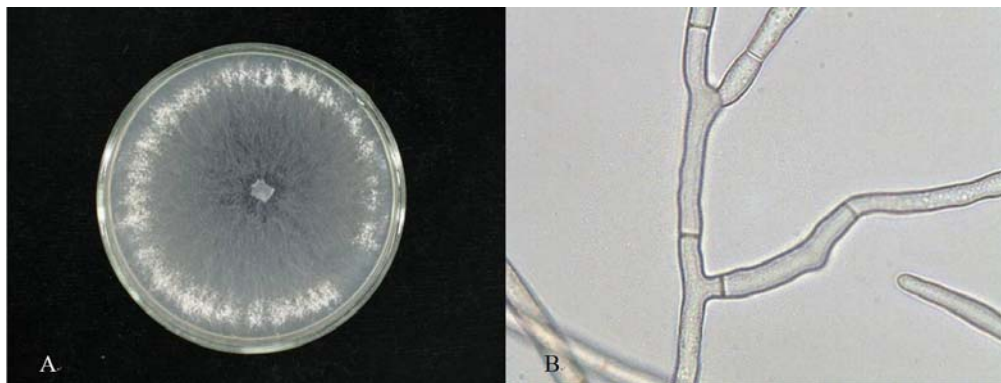


图 2 病原菌培养和显微特征

A: 病原菌培养特征; B: 病原菌显微特征。

2.3 ITS 序列分析

用 rDNA-ITS 通用引物 ITS1/ITS4 对菌株 R1、R7、R9 基因组 DNA 进行 PCR 扩增, 均得到大小为 500 ~ 600 bp 的单一片段 (图 3)。将扩增产物进行测序。然后将获得的 3 个菌株序列在

NCBI 上进行 BLAST 分析, 与立枯丝核菌 *Rhizoctonia solani* 菌株的相似性为 99% ~ 100%。结果表明, 供试 3 个菌株均为立枯丝核菌 *Rhizoctonia solani*, 以分离物 R7 序列为代表序列提交到 GenBank, 获得登录号为 JX137115。

2.4 致病性测定结果

3 个菌株分别接种大白菜幼苗, 7 d 后植株表现出明显的发病症状, 发病初期产生水浸状浅褐色略凹陷的小斑, 进一步扩展形成椭圆形至不规则形凹陷坏死病斑, 病斑浅褐色, 坏死腐烂状。接种症状与田间自然发病症状一致, 对照植株生长正常, 无病害症状(图 4)。剪取病健交界处的发病组织进行病原菌的重新分离鉴定, 所有发病植株均能分离到接种病原菌, 进一步证明在北京、河北、江苏地区发生的大白菜“茎基腐病”的病原菌为立枯丝核菌 *Rhizoctonia solani*。

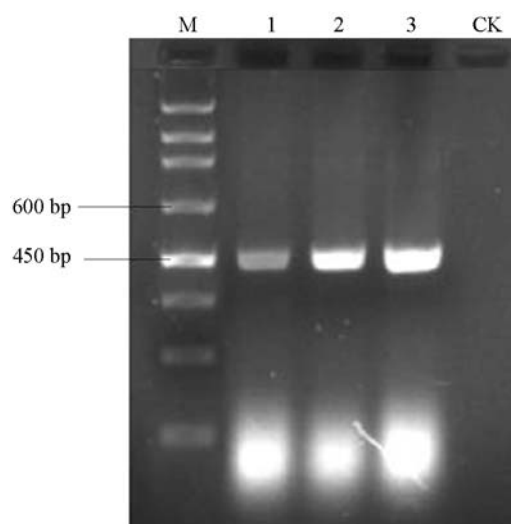


图 3 引物 ITS1/ITS4 扩增菌株总 DNA 凝胶电泳图

CK: 阴性对照; 1~3: 菌株 R1、R7、R9 扩增产物; M: 150 bp 分子量标准。



图 4 人工接种大白菜幼苗 7 d 后植株发病情况

A: 对照—健康大白菜; B: 接种后发病植株茎基部出现椭圆形病斑; C: 病斑扩大; D: 叶片感病症状。

3 结论与讨论

大白菜在我国的栽培历史悠久, 北方各地广泛种植, 是我国广大消费者喜食的重要蔬菜。2011 年, 在北京、河北、江苏等地的部分大白菜种植区, 当地俗称的大白菜“茎基腐病”普遍

《中国蔬菜》学术论文下载 www.cnveq.or

且严重发生,引起大白菜茎基部腐烂,严重影响了大白菜的产量和品质。在生产中由于对该病害的发生规律及病原情况不了解,导致无法进行及时有效的防治。本试验通过形态学、分子生物学和致病性鉴定等手段对大白菜“茎基腐病”病原菌进行鉴定,以期为该病害的防治和抗病育种奠定理论基础。

对采集到的不同地区的病样标本经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,确定了在我国北京、河北、江苏等地大白菜“茎基腐病”的病原菌为立枯丝核菌 *Rhizoctonia solani*,该病害与大白菜褐腐病病原菌相同,属同病异名。由立枯丝核菌引起的大白菜病害发生流行和造成的损失都较小,国内外研究也相对较少(da Silveira et al., 2000; Zhang et al., 2009)。因此,命名存在较大差异,给病害的鉴定和有效防治造成了较大困难。李明远等(1986)将由立枯丝核菌 *Rhizoctonia solani* 引起的大白菜病害命名为大白菜立枯病,吕佩珂等(1992)将由立枯丝核菌 *Rhizoctonia solani* 引起的大白菜病害命名为大白菜褐腐病,张丽(2008)将由立枯丝核菌 *Rhizoctonia solani* 引起的甘蓝病害命名为球腐病。立枯丝核菌 *Rhizoctonia solani* 是一类寄主范围广泛的土传病原菌(Liu et al., 2011)。目前,国内外已经报道的寄主包括:水稻、棉花、高粱、茄子、马铃薯、甜菜、瓜类、甘蓝等(Camporota & Perrin, 1998; Botha et al., 2003; Atkinson et al., 2011)。

2011年,在北京、河北、江苏的部分地区由立枯丝核菌引起的大白菜“茎基腐病”普遍严重发生,田间发病严重时,病株率高达90%以上,对生产造成了较大影响。本试验通过相关研究最终确定在北京、河北、江苏等地俗称大白菜“茎基腐病”的病原菌为立枯丝核菌 *Rhizoctonia solani*,大白菜“茎基腐病”与大白菜立枯病、褐腐病均属同病异名。

参考文献

- 方中达. 1998. 植病研究方法. 3版. 北京: 中国农业出版社.
- 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.
- 李明远, 李固本, 裴季燕. 1986. 北京蔬菜病情志. 北京: 北京科学技术出版社.
- 陆家云. 2000. 植物病原真菌学. 北京: 中国农业出版社.
- 吕佩珂, 李明远, 吴钜文, 易齐, 张宝棣, 姜克英, 文奇, 李明周, 王润初. 1992. 中国蔬菜病虫原色图谱. 北京: 中国农业出版社.
- 魏景超. 2004. 真菌鉴定手册. 上海: 上海科学技术出版社.
- 张丽. 2008. 包菜立枯丝核菌球腐病的病原学研究〔硕士论文〕. 武汉: 华中农业大学.
- Atkinson D, Thornton M K, Miller J S. 2011. Development of *Rhizoctonia solani* on stems, stolons and tubers of potato II. Efficacy of chemical applications. American Journal of Potato Research, 88: 96-103.
- Botha A, Denman S, Lamprecht S C, Mazzola M, Crous P W. 2003. Characterization and pathogenicity of *Rhizoctonia* isolates associated with black rot of strawberries in the Western Cape Province, South Africa. Australasian Plant Pathology, 32: 195-201.
- Camporota P, Perrin R. 1998. Characterization of *Rhizoctonia* species involved in tree seedling damping-off in French forest nurseries. Applied Soil Ecology, 10: 65-71.
- da Silveira S F, Alfenas A C, Ferreira F A, Sutton J C. 2000. Characterization of *Rhizoctonia* species associated with foliar necrosis and leaf scorch of clonally-propagated Eucalyptus in Brazil. European Journal of Plant Pathology, 106: 27-36.
- Liu T H, Lin M J, Ko W H. 2011. Development of artificial conidia for ecological studies of *Rhizoctonia solani* in soil. New Biotechnology, 28(1): 86-91.
- Mccabe P M, Gallagher M P, Deacon J W. 1999. Microscopic observation of perfect hyphal fusion in *Rhizoctonia solani*. Mycological Research, 103(4): 487-490.
- Zhang C Q, Liu Y H, Ma X Y, Feng Z, Ma Z H. 2009. Characterization of sensitivity of *Rhizoctonia solani*, causing rice sheath blight to mepronil and boscalid. Crop Protection, 28: 381-386.