

安徽省长丰县草莓根腐病病原的鉴定

宁志怨, 董玲*, 廖华俊, 李卫文, 江芹, 王爱昕, 闫冲冲

(安徽省农业科学院园艺研究所, 合肥 230031)

摘要: 对安徽省长丰县随机采集的 20 个草莓根腐病病样进行病原鉴定, 结果分离获得 12 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 对菌株基因组 DNA 进行 PCR 扩增并进行克隆和测序, 通过与 NCBI 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, 2~3 周后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, 最终确定安徽省长丰县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: S436.684

文献标识码: A

文章编号: 1672-352X (2017)01-0130-05

Pathogen diagnosis of strawberry root rot caused by *Fusarium* in Changfeng county, Anhui Province

NING Zhiyuan, DONG Ling, LIAO Huajun, LI Weiwen, JIANG Qin, WANG Aiting, YAN Chongchong

(Horticultural Institute, Anhui Academy of Agricultural Sciences, Hefei 230031)

Abstract: Strawberry root rot was observed in Changfeng county, Anhui Province. Twelve strains were isolated from the root of 20 randomly-collected infected plants. The isolates were primarily identified as *Fusarium* based on their morphological and colony characteristics, and further confirmed as *Fusarium oxysporum* by analyzing the rDNA-ITS sequence of isolates and morphological characteristics. The healthy strawberries inoculated with the isolate showed the similar symptoms in two to three weeks after inoculation. *Fusarium oxysporum* was re-isolated from the inoculated pathogenetic strawberry roots. Based on the morphological characteristics, pathogenicity test and molecular analysis, strawberry root rot pathogens from Changfeng county were identified as *Fusarium oxysporum*.

Key words: strawberry root rot; *Fusarium oxysporum*; pathogenicity; rDNA-ITS sequences

草莓 (*Fragaria ananassa* Duch.) 为蔷薇科草莓属植物, 具有营养价值高、经济效益好等特点, 是冬季时令水果之一。近年来, 随着农业产业结构的调整, 草莓种植已经逐渐发展到安徽省各地, 在合肥、淮南和阜阳等城市周边逐渐出现以草莓采摘为主的休闲观光农业。长丰县为中国设施草莓栽培第一大县, 2015 年种植面积已达 21.5 万亩。草莓根腐病是草莓根部重要病害, 特别是在多年种植草莓的重茬地块, 严重时可造成整个草莓园区的毁灭。据河北满城调查显示: 即使在倒茬后第 5 年草莓发病率为 34.2%, 第 8 年仍为 13.2%^[1], 这给草莓根腐病

的防治工作带来了困难。草莓根腐病在安徽省的发生有逐年上升趋势, 已成为制约全省草莓产业发展的因素之一。

草莓根腐病病原菌根据形态特征和分子鉴定鉴定主要可以分为立枯丝核菌 (*Rhizoctonia solani*)、拟盘多毛孢属 (*Pestalotiopsis* sp.)、尖孢镰刀菌属 (*Fusarium oxysporum* f. sp.) 和恶疫霉 (*Phytophthora cactorum*) 等。

草莓根腐病在全世界不同的草莓种植区均有发生, 美国^[2-4]、澳大利亚^[5]、南非^[6]、意大利^[7]等国家均有相关的报道, 但是不同地区的草莓根腐病的

收稿日期: 2016-02-07

基金项目: 安徽省科技厅国际科技合作项目(1604b0602013)和安徽省农业科学院学科建设项目(15A0331)共同资助。

作者简介: 宁志怨, 博士, 助理研究员。E-mail: ningzhiyuan2000@163.com

* 通信作者: 董玲, 研究员。E-mail: 674549072@qq.com

病原菌种类存在一定程度的差异。在我国的北京、山东、甘肃及江苏等省市也有草莓根腐病发生的报道, 根据分离出的病菌形态特征和分子鉴定结果, 主要可以分为拟盘多毛孢属^[1,8]、草莓疫霉^[9]、尖孢镰刀菌^[9-12]和立枯丝核菌^[9-10,13]。

草莓根腐病一般在冬季和早春发病严重。一般发病率为 10% 以下, 严重时达到 50% 以上, 严重影响草莓的生产。2014 年 11 月对安徽省长丰县的多个草莓种植基地进行病害调查, 结果发现草莓根腐病在这些地区时有发生。发病植株症状主要表现为叶片萎蔫下垂, 茎基部和须根均表现出不同程度的变黑腐烂, 尤其是在开花结果期出现死秧现象 (图 1)。导致病害难以控制的主要原因是草莓根腐病的病原不清楚。针对这一现状, 本试验在对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

2014 年 11 月在合肥市长丰县水湖、吴山、岗集和左店等乡镇进行草莓根腐病发病情况调查, 共采集草莓病株 20 份, 在病株的病健交界处切取 8~10 mm² 的组织块, 用流水冲洗 30 min 后, 75% 酒精消毒 30 s, 然后用 0.1% 的升汞消毒 8 min 后, 无菌水漂洗 3 次, 无菌吸水纸吸干后, 接种在固体 PDA 培养基上, 25 °C 条件下培养 3~4 d 后转接纯化保存备用^[14]。

1.2 形态学鉴定

将分离到的菌株接种在 PDA 培养基上, 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、大和小型分生孢子及厚垣孢子的形态观察。

1.3 分子生物学鉴定

1.3.1 DNA 提取 将取分离得到的菌株转移到 Czapek 液体培养基中, 28 °C 恒温震荡培养 7 d 后, 离心收集沉淀。基因组 DNA 采用 Ezup 柱式真菌基因组 DNA 抽提试剂盒 (上海生工, 产品编号 SK8259/SK8260), 具体过程详见说明书。

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') 对病菌的基因组 DNA 进行 PCR 扩增。扩增反应在 2720 Thermal cycler PCR 仪 (Applied Biosystems) 上进行。反应体系为 25 μL: 2.5 μL 10× PCR 反应缓冲液, 1 μL

dNTPs (各 2.5 mmol·L⁻¹), 上下游引物 (10 μmol·L⁻¹) 各 0.5 μL, 0.5 μL (基因组 DNA 20~50 ng·μL⁻¹) 模板 DNA, 0.2 μL *Taq* DNA 聚合酶, 最后加双蒸水补足至 25 μL。反应条件: 94 °C 预变性 4 min; 94 °C 变性 45 s, 55 °C 退火 45 s, 72 °C 延伸 1 min, 30 个循环; 72 °C 延伸 10 min, 最后在 4 °C 终止反应。产物经 1.0% 琼脂糖凝胶电泳, 染色和凝胶成像系统检测拍照。PCR 产物经 SanPrep 柱式 DNA 回收试剂盒 (上海生工, 编号 SK8131) 回收后, 克隆到 pMD@18-T Vector 载体 (上海生工, 编号 D101A) 并转化感受态大肠杆菌 16 h 后, 从蓝白斑筛选平板挑取白色单菌落到 LB 液体培养液中培养。利用引物 M13 引物扩增进行菌落 PCR 验证, 筛选的阳性克隆送交上海生工生物工程有限公司测序。将所测菌株的 rDNA-ITS 序列通过 <http://rdp.cme.msu.edu/index.jsp> 进行同源性比较。利用生物软件 MEGA5.1 将获得病菌的 ITS 序列与 NCBI 已发表的 *Fusarium oxysporum* 菌株 ITS 序列进行分子遗传进化树分析。

1.4 致病性测定

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 VL (专利申请号: 201610321648.8) 液体培养基中 28 °C 震荡培养 7 d 后, 培养液经 3 层无菌纱布过滤, 除去菌丝体, 滤液经 5 000 r·min⁻¹ 离心 30 min 后, 得到白色孢子沉淀, 加无菌水稀释成浓度为 1.5×10⁷ 个·mL⁻¹ 孢子悬浮液。供试草莓品种为红颜, 在草莓根部造成轻微伤口, 每株伤根草莓灌入 25 mL 孢子悬浮液, 3 次重复, 每重复 3 株。设以伤根以无菌水接种为空白对照。接种后, 植株保湿 48 h 后转入 22 °C 温室培养。接种 14 d 后开始进行病害调查, 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

2014 年 11 月对安徽省长丰县主要草莓采摘园和生产基地进行调查, 正值草莓开花结果期, 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: 地上部分植株叶片下垂, 轻微变黑腐烂, 植株长势衰弱, 果实不能正常膨大, 整株萎蔫甚至变黑腐烂; 地下部分的须根少而细, 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。从发病植株上共分离纯化得到 12 个菌株, 分别编号 F1~F12。

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 12 个菌株特征基本上一致。28 °C 条件下, PDA 培养基上培养 3~4 d 后, 菌落呈白色, 气生菌丝绒状 (图 2)。多数为带有分支状的菌丝, 以及小型分生孢子和大型分生孢子。小型分生孢子呈卵形或肾形, 0~1 个隔膜, 假头状着生在产孢细胞上。大型分生孢子镰刀形, 较匀称, 具 1~4 个隔膜, 多数为 3~4 个隔膜。根据菌种形态特征, 初步将分离到的 12 个菌株鉴定为尖孢镰刀菌 (*Fusarium oxysporum*)。



图 1 草莓根腐病的发病症状

Figure 1 The disease symptom of strawberry root rot

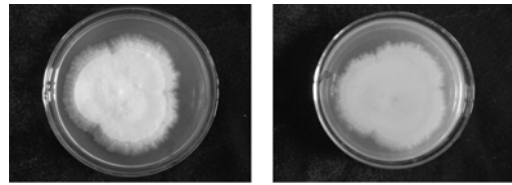


图 2 PDA 培养基分离的致病菌

Figure 2 The isolated pathogen cultured on the solid PDA medium

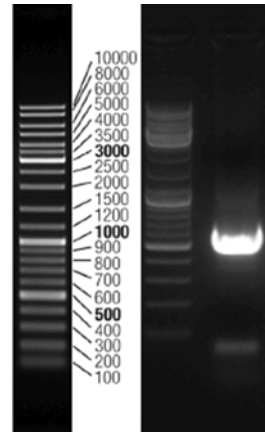


图 3 PCR 克隆的病菌 ITS 序列

Figure 3 The cloned ITS sequence by PCR amplification

>IS1054_r-1_519bp

TGCGGAGGGATCATTACCGAGTTTACAACCTCCAAACCCCTGTGAACATACCCTTGTTCGCTCGGCG
GATCAGCCCGCTCCCGGTAACGGGACGGCCCGCCAGAGGACCCCTAACTCTGTTTCTATATGTAA
CTTTTGAGTAAAACCATAAATAAATAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCGGCATCGATGAAG
AACGCAGAAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCAC
AATGCGCCCGCCAGTATTCTGGCGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCAITTC AACCCCTCAAGCACAGCTTG
GTGTTGGGACTCGCGTAAATTCGCGTTCCTCAAATGATTGGCGGTCACGTCGAGCTTCCATAGCGTAG
TAGTAAACCCCTCGTTACTGGTAATCGTCGCGGCCACGCCGTTAAACCCCAACTTCTGAATGTTGACCT
CGGATCAGGTAGGAATACCCGCTGAACCTTAAGCATATCAA

The aligned sequence by NCBI blast

Description	Max. score	Total score	Query cover	E. value	Ident	Accession
<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. ciceris isolate Foc164 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	959	959	100%	0.0	100%	JN400683.1
<i>Fusarium oxysporum</i> strain EEC-715 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	953	953	100%	0.0	99%	KP942933.1
<i>Fusarium oxysporum</i> strain EEC-523 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	953	953	100%	0.0	99%	KP942920.1
<i>Fusarium oxysporum</i> culture-collection MUT-ITA>: 3293 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	953	953	100%	0.0	99%	KM203360.1
<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. niveum strain XG-1 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	953	953	100%	0.0	99%	KP280312.1
<i>Fusarium oxysporum</i> genomic DNA sequence contains ITS1, 5.8S rRNA gene, ITS2, isolate LEMM_121470	953	953	100%	0.0	99%	LN828176.1
<i>Fusarium oxysporum</i> genomic DNA sequence contains ITS1, 5.8S rRNA gene, ITS2, isolate LEMM_121377	953	953	100%	0.0	99%	LN828174.1
<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. ciceris strain JHB F 2902 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	953	953	100%	0.0	99%	KM817208.1

图 4 分离病菌 ITS 片段的序列测定及其 Blast 搜索结果

Figure 4 The sequencing and blasting result of the cloned ITS sequence

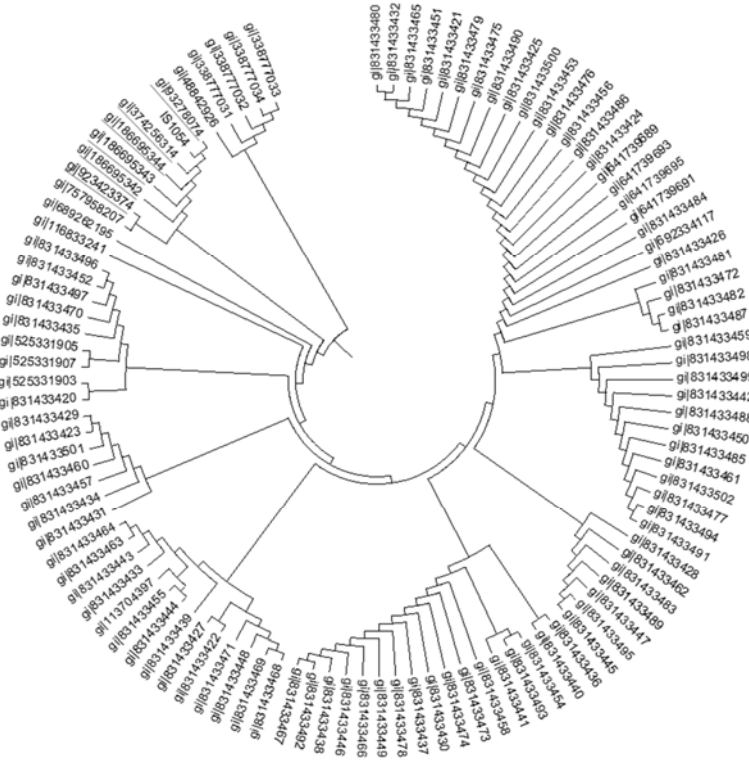


图 5 病菌 ITS 序列的分子遗传进化树 (下划线表示该 ITS 序列的枯萎菌来源于草莓)

Figure 5 Phylogenetic tree analysis based on cloned ITS sequences from NCBI (The underline indicated that *Fusarium* of this ITS sequence isolated from strawberry)

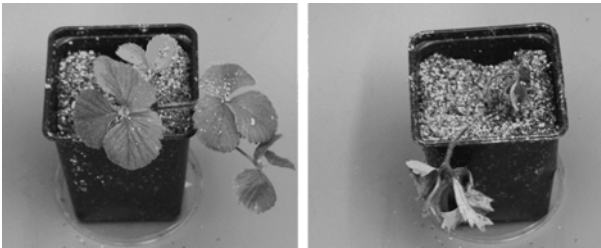


图 6 回接种致病菌后的发病症状 (左: 对照植株, 右: 接种分离病菌的植株)

Figure 6 The disease symptom caused by isolated *Fusarium* (left: plant inoculated with pure water, right: plant inoculated with isolated pathogen)

2.3 ITS 序列分析与系统进化树研究

用 rDNA-ITS 通用引物 ITS1/ITS4 对分离得到的 12 个菌株基因组 DNA 进行 PCR 扩增, 均得到大小为 500 多 bp 的单一片段 (图 3)。对扩增产物进行回收、克隆和测序。12 个菌株扩增产物片段大小均为 519 bp (图 4)。将获得的 12 个菌株序列进行 BLAST 序列比对分析表明: 该序列与 8 个 *Fusarium oxysporum* 菌株的序列同源性均为 100% (图 4)。表明供试菌株均为尖孢镰刀菌 (*Fusarium oxysporum*)。从 NCBI 网站上下载已发表的 *Fusarium oxysporum* 的 ITS 序列, 利用生物软件

MEGA5.1 将获得的 ITS 序列与已发表的 *Fusarium oxysporum* 菌株 ITS 序列进行分子遗传进化树分析, 结果显示该病菌的 ITS 序列和来源于草莓的 *Fusarium oxysporum* 菌株的 ITS 序列同源性很高, 这也证明分离的菌株的准确性 (图 5)。

2.4 致病性测定

12 个菌株分别接种草莓幼苗, 将其置于温度为 22℃、相对湿度为 70% 的温室进行培养, 2 周后开始检查草莓发病情况。3 周后草莓植株表现出明显的发病症状, 叶片尖部逐渐脱水变灰绿色, 最终整株草莓死亡 (图 6)。从蛭石基质中取出发病植株, 可以看到根系变黑腐烂。接种植株症状与田间表现的病症基本一致。而对照无发病症状, 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 12 个菌株为安徽省草莓根腐病病原。

3 讨论

草莓根腐病在安徽省的发生有逐年上升趋势, 已成为制约安徽省草莓产业稳定发展的因素之一。草莓根腐病在我国的不同的草莓种植区均有发生, 但是不同地区的草莓根腐病的病原菌种类存在一定程度的差异。导致安徽省草莓根腐病难以控制的主

要原因之一就是草莓根腐病的病原不清楚。针对这一现状,本研究对安徽省长丰县主要草莓种植区的草莓根腐病病株进行了采集和分析,通过传统的形态学鉴定、现代分子生物学鉴定、分离病菌的致病性鉴定和分子遗传进化树鉴定,证明安徽省长丰县草莓根腐病的病原菌主要为尖孢镰刀菌 (*Fusarium oxysporum*);其次,在草莓枯萎菌的孢子悬浮液的配制过程中,本研究使用多种液体培养基(包括 PDB、VL、Cezpek、Nutrient Dox Broth、YPA 和 YLPA 等液体培养基),通过显微镜观察显示一些培养基如 Cezpek 等能培养出病菌的孢子和数量庞大的菌丝,但是孢子的浓度均达不到接种的浓度,只有液体 VL 培养基能够培养出数量相对较多的孢子,因此通过过滤、离心和重新悬浮等方法配制出符合接种浓度的孢子悬浮液;最后,研究发现正常温度下枯萎菌孢子回接种草莓过程中原本需要 1~2 周的时间,但是通过降低温度至 22℃ 可以延迟草莓表现症状的时间,这说明温度对草莓枯萎菌的生长具有一定的影响。虽然本研究阐述了长丰地区草莓根腐病的病原,但是省内其它产区草莓根腐病发病情况及病原类型还需要进一步的研究。

参考文献:

- [1] 徐淑华, 蒋继志, 郝志敏. 河北满城地区草莓根腐病病原真菌的分离鉴定[C]//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, 2004: 68-71.
- [2] PAULUS A O. Fungal diseases of strawberry [J]. HortScience, 1990, 25(8): 885-889.
- [3] MARTIN F N. Strawberry root rot and the recovery of *Pythium* and *Rhizoctonia* spp[C]//Ann Inter Res Conf on Methyl Bromide: Alternatives and emissions reduction. 1999, 6: 1-3.
- [4] MINEGISHI M. Strawberry production in Japan-Cultivar, cultivating method, main disease and breeding[C]// International Strawberry Symposium 265. 1988: 665-670.
- [5] GOLZAR H, PHILLIPS D, MACK S. Occurrence of strawberry root and crown rot in Western Australia[J]. Australas Plant Dis Notes, 2007, 2(1): 145-147.
- [6] BOTHA A, DENMAN S, LAMPRECHT S C, et al. Characterisation and pathogenicity of *Rhizoctonia* isolates associated with black root rot of strawberries in the Western Cape Province, South Africa[J]. Australas Plant Path, 2003, 32(2): 195-201.
- [7] MANICI L M, CAPUTO F, BARUZZI G. Additional experiences to elucidate the microbial component of soil suppressiveness towards strawberry black root rot complex[J]. Ann Appl Biol, 2005, 146(4): 421-431.
- [8] 赵宇, 钱恒伟, 徐鹏程, 等. 青岛市草莓根腐病病原菌分离及鉴定[J]. 中国植保导刊, 2016, 36(1): 43-46.
- [9] 胡彦江, 张茹琴. 烟台地区草莓根腐病病原鉴定及致病性测定[J]. 北方园艺, 2012(10): 141-144.
- [10] 曹奎荣. 草莓根腐病病原菌鉴定及生物学特性的研究[D]. 兰州:甘肃农业大学, 2006.
- [11] 盛茹媛, 肖长坤, 郑书恒, 等. 镰刀菌引起的北京市草莓根腐病病原鉴定[J]. 中国蔬菜, 2012(12): 52-56.
- [12] 于红梅, 赵密珍, 王静, 等. 草莓枯萎病菌的分离、鉴定及生物学特性[J]. 江苏农业科学, 2013, 41(11): 124-127.
- [13] ZHONG S, XU J M, YIN S L, et al. First report of root rot on strawberry caused by binucleate *Rhizoctonia* AG-A in China [J]. Plant Dis, 2015, 100(1): 225-225.
- [14] 方中达. 植病研究方法[M]. 3 版. 北京: 中国农业出版社, 1998.