

尖孢镰刀菌与极细链格孢复合侵染引起甘薯茎枯病

Mixed infection by *Fusarium oxysporum* and *Alternaria tenuissima* on sweet potato *Fusarium* wilt

钱恒伟 徐鹏程 迟梦宇 黄金光*

(青岛农业大学农学与植物保护学院, 山东省植物病虫害综合防控重点实验室, 青岛 266109)

Qian Hengwei Xu Pengcheng Chi Mengyu Huang Jinguang*

(Key Laboratory of Integrated Crop Disease and Pest Management of Shandong Province, College of Agronomy and Plant Protection, Qingdao Agricultural University, Qingdao 266109, Shandong Province, China)

甘薯茎枯病, 又名甘薯蔓割病, 主要由尖孢镰刀菌 *Fusarium oxysporum* 引起 (Logeshwarn et al., 2011), 近年来有向长江中下游蔓延的趋势。2015年, 甘薯茎枯病在青岛市发病严重, 发病率高达60%~70%, 本课题组从青岛市即墨市采集的发病样本中得到了尖孢镰刀菌和极细链格孢 *Alternaria tenuissima* 两种病原菌。为探明这2种病原菌在致病性方面的关系, 通过甘薯茎部接种致病性试验, 明确青岛市甘薯茎枯病的致病菌种类以及不同致病菌间的复合侵染, 以期全面合理有效地防治甘薯茎枯病及指导田间生产提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 材料

供试菌株及培养基: 甘薯茎枯病病株于2015年5月采集自青岛市即墨市, 带回室内进行分离纯化, 于4℃斜面保藏。马铃薯葡萄糖琼脂 (potato dextrose agar, PDA) 培养基: 马铃薯200 g、葡萄糖20 g、琼脂20 g、蒸馏水1 L; 马铃薯胡萝卜琼脂 (potato carrot agar, PCA) 培养基: 马铃薯10 g、胡萝卜10 g、琼脂糖20 g、蒸馏水1 L; SNA合成低营养琼脂 (synthetic low nutrient agar, SNA) 培养基: KH_2PO_4 1 g、 KNO_3 1 g、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5 g、 KCl 0.5 g、葡萄糖0.2 g、蔗糖0.2 g、琼脂糖20 g、蒸馏水1 L。

试剂及仪器: $2 \times \text{Taq}$ Master Mix 及引物合成, 北京擎科新业生物技术有限公司; DL2000 DNA Marker, 德国Sigma公司。SimpliAmp™ PCR仪, 赛默飞世尔科技有限公司; K8360凝胶成像系统, 北京科创锐新生物科技有限公司。

1.2 方法

病原菌的分离纯化与鉴定: 对甘薯茎部上的病

原菌进行组织分离并纯化, PDA培养基上观察病原菌菌落形态及颜色; SNA培养基上观察尖孢镰刀菌分生孢子形态并测量大小; PCA培养基上观察极细链格孢产孢形态、分生孢子形态并测量大小; CTAB法提取病原菌基因组DNA, 尖孢镰刀菌利用真菌通用引物PCR扩增进行种间鉴定, 极细链格孢利用H3-1a (5'-ACTAAGCAGACCGCCCGCAGG-3') 和H3-1b (5'-GCGGGCGAGCTGGATGTCCTT-3') 引物PCR扩增进行种间鉴定 (Zheng et al., 2015)。PCR产物由北京擎科新业生物技术有限公司测序, 并将序列上传至GenBank进行BLAST同源性分析。

病原菌致病性测定及复合侵染试验: 将待接种健康甘薯茎部组织清洗干净并消毒, 用挑针刺伤茎部组织, 每个组织的刺伤数目及刺伤深度保持一致, 挑取在PDA平板上活化7 d的病原菌于茎部刺伤部位进行接种, 共设3个处理, 即单独接种尖孢镰刀菌、单独接种极细链格孢菌、混合接种。每种病原菌挑取直径5 mm菌丝, 混合接种时各菌接种量与单独接种的菌量相同。每个处理3次重复, 以无菌水作为对照。接种后25℃保湿培养, 4 d后观察发病症状。

2 结果与分析

2.1 病原菌鉴定

从甘薯茎枯病发病样本中分离得到32株病原菌, 经形态及分子鉴定, 确定了2种病原菌, 即尖孢镰刀菌 *F. oxysporum* 和极细链格孢 *A. tenuissima*。

尖孢镰刀菌: 菌落呈规则圆形, 背面紫红色 (图1-A1), 在SNA培养基上产生2种分生孢子, 小型分生孢子无色, 卵形或肾形, 大小为 $5.1 \sim 12.2 \mu\text{m} \times 2.1 \sim 3.6 \mu\text{m}$; 大分生孢子无色, 镰刀形, 3~5个分隔, 大小为 $24.6 \sim 39.7 \mu\text{m} \times 3.5 \sim 4.6 \mu\text{m}$ (图1-B1); 厚垣孢子多

单生,球形,直径为7.2~9.4 μm ,初步鉴定该菌为尖孢镰刀菌。从菌株1的DNA中PCR扩增到1条大小为518 bp (KU533843)的ITS片段(图1-C1),在GenBank中进行BLAST比对,菌株1与已报道的尖孢镰刀菌菌株(KT634077.1)的序列相似性为100%,结合形态学鉴定结果,将该菌鉴定为尖孢镰刀菌。

极细链格孢:菌落呈圆形或近圆形,灰白色,后变为青灰色,背面褐色(图1-A2)。在PCA培养基上5 d左右便形成较长的孢子链,多数不分枝,侧链较短。分生孢子梗分化明显,单生或簇生,23.2~67.5×

3.6~5.2 μm ,分生孢子串生,倒棒状形或长椭圆形,淡褐色至黄褐色,成熟孢子有4~7个横隔膜,0~4个纵或斜隔膜,大小为18.6~37.1×8.0~13.4 μm (图1-B2)。喙以及柱状假喙,淡褐色,大小为3.0~13.7×2.4~4.2 μm ,初步鉴定为极细链格孢。从菌株2的DNA中扩增到1条大小为530 bp (KU321685)的片段(图1-C2),BLAST比对表明,菌株2与已报道的极细链格孢菌株(KF996995.1, KF308923.1)的序列相似性为99%,结合形态学鉴定结果,将该菌鉴定为极细链格孢。

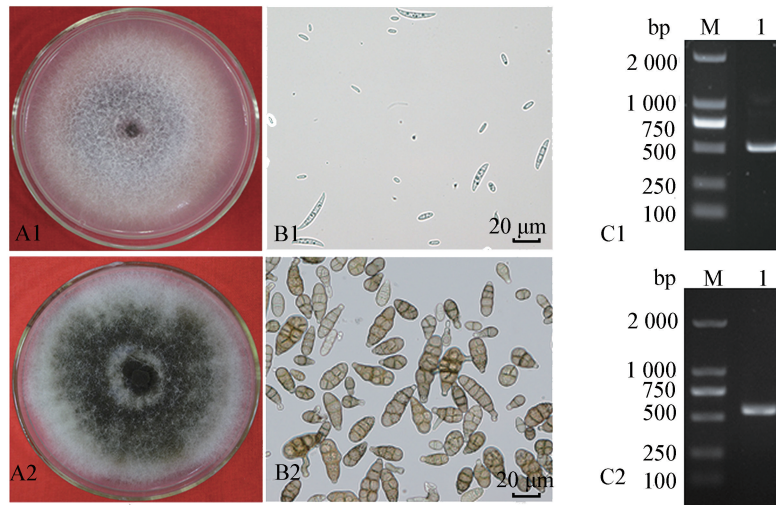


图1 青岛市甘薯茎枯病原菌鉴定

Fig. 1 The identification of pathogen causing sweet potato *Fusarium* wilt in Qingdao City

A1~C1: 尖孢镰刀菌菌落形态、分生孢子、ITS序列; A2~C2: 极细链格孢菌落形态、分生孢子、histone 3序列。A1~C1: Colonies, conidia and ITS sequence of *F. oxysporum*; A2~C2: colonies, conidia, histone 3 sequence of *A. tenuissima*.

2.2 对甘薯的致病性及复合侵染

相较于对照组,不同接种部位4 d后出现明显变色现象,部分呈黑褐色,与前期采集样品的症状一致。致病性试验结果表明:2种病原菌均可引起甘薯茎部病害,其形态分别与原分离病原菌一致,说明尖孢镰刀菌和极细链格孢均为甘薯的致病菌。复合侵染试验表明,混合接种较单独接种的发病率高,发病早,致病性较强。且同一病株均能分离出2种病原菌,表明这2种病原菌可复合侵染引起甘薯茎枯病。

3 讨论

通过形态学及分子鉴定,明确了青岛市甘薯茎枯病的病原菌为尖孢镰刀菌和极细链格孢。致病性分析两者均可引起甘薯茎部病害,并存在复合侵染现象。Logeshwarn et al. (2011)发现尖孢镰刀菌是引起甘薯茎枯病的主要致病菌,与本次鉴定结果一致,但极细链格孢引起甘薯茎枯病是首次报道。链格孢菌能穿透破坏寄主细胞的细胞壁,并且分泌纤

维素酶与果胶酶等降解酶损坏细胞壁(康子腾等, 2013),对甘薯植株造成一定的损伤,从而为尖孢镰刀菌快速侵入提供了有利条件,但两者发生复合侵染的具体作用机制仍需进一步研究。

参考文献 (References)

- Kang ZT, Jiang LM, Luo YY, Liu CJ, Li XR. 2013. The research advances of mechanism of pathogenicity of *Alternaria* phytopathogenic fungi. Chinese Bulletin of Life Sciences, 25(9): 908–914 (in Chinese) [康子腾, 姜黎明, 罗义勇, 柳陈坚, 李晓然. 2013. 植物病原链格孢属真菌的致病机制研究进展. 生命科学, 25(9): 908–914]
- Logeshwarn P, Thangaraju M, Rajasundari K. 2011. Antagonistic potential of *Gluconacetobacter diazotrophicus* against *Fusarium oxysporum* in sweet potato (*Ipomea batatas*). Archives of Phytopathology and Plant Protection, 44(3): 216–223
- Zheng HH, Zhao J, Wang TY, Wu XH. 2015. Characterization of *Alternaria* species associated with potato foliar diseases in China. Plant Pathology, 64(2): 425–433

(责任编辑:高峰)