

河南商丘草莓青霉病病原菌的鉴定

Identification of the pathogen causing the blue mold disease of *Fragaria×ananassa* in Shangqiu, Henan Province裴冬丽¹ 朱晓琴¹ 叶芬¹ 徐园园¹ 宋 旸¹ 李成伟^{2*}

(1. 商丘师范学院生物与食品学院, 植物与微生物互作河南省高校重点实验室, 河南 商丘 476000;
2. 河南科技学院生命技术学院, 新乡 453003)

Pei Dongli¹ Zhu Xiaojin¹ Ye Fen¹ Xu Yuanyuan¹ Song Yang¹ Li Chengwei^{2*}

(1. Henan Provincial Key University Laboratory for Plant-Microbe Interactions/College of Biology and Food, Shangqiu Normal University, Shangqiu 476000, Henan Province, China; 2. College of Life Science and Technology, Henan Institute of Science and Technology, Xinxiang 453003, Henan Province, China)

草莓 *Fragaria×ananassa* Duch. 属于蔷薇科草莓属, 是一种多年生草本植物。草莓不但含有许多有益的营养物质, 还是一种功能性食品。河南省商丘市双八镇草莓基地被国家农业部授予“中国草莓之乡”称号, 被指定为农业标准化生产示范基地。2016—2017年对双八基地多个草莓大棚进行病害调查, 发现青霉病是草莓上最常见的果实病害, 严重时造成草莓减产 60% 以上甚至绝收。青霉菌属真菌是导致草莓腐败的重要病原菌, 各地从草莓中分离出的青霉菌属的种类也不相同, 如在四川省成都市为草酸青霉 *Penicillium oxalicum* (魏超等, 2017), 在浙江省金华市为扩展青霉 *P. expansum* (张宁等, 2016)。目前, 对河南省商丘市草莓青霉病的研究尚未见报道。本试验对采集自河南省商丘市双八基地的草莓进行青霉病病原菌的分离纯化, 获得菌株 SQQM-01, 对其进行形态学分析、致病性测定以及 rDNA-ITS 序列分析, 以期为研究草莓病害的发病规律、防治措施提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

供试植株及培养基: 2016—2017年从河南省商丘市双八镇草莓大棚中采集草莓病果以及健康果实, 品种为日本丰香。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 1 000 mL。

试剂及仪器: PCR 扩增试剂盒、DL2000 DNA

Marker, 宝生物工程(大连)有限公司; 其它试剂均为国产分析纯。Leica DM2500 生物显微镜, 德国徕卡公司; Mastercycler nexus PCR 仪, 德国 Eppendorf 公司。

1.2 方法

病原菌的分离纯化: 在草莓病果的病健交界处切取边长为 5 mm 的正方形组织切块 12 块, 75% 酒精消毒 1 min, 2% 次氯酸钠溶液消毒 6 min, 无菌水洗涤 3 次, 接种于 PDA 培养基中, 在 28℃ 下培养 3~5 d; 待长出菌落后, 用接种环轻轻挑取少量孢子进行划线培养, 每次划线 10 个 PDA 平板, 重复 3 次。多次反复培养, 获得纯化菌株 SQQM-01, 接种于试管 PDA 培养基斜面, 于 4℃ 保存。

病原菌形态学观察: 纯化菌株接种至 PDA 培养基上, 28℃ 培养 7 d 后观察菌落形态、颜色, 显微镜下观察分生孢子梗及分生孢子形态特征, 50 个视野, 每个视野观察数量 5 个, 计算孢子梗大小和孢子直径的平均值。

病原菌致病性测定: 选择健康、新鲜成熟且无损伤草莓果实, 70% 酒精消毒 1 min 后无菌水冲洗 3 次。针刺果实形成 5 mm×5 mm 的伤口, 单孢菌株培养 7 d 后用 5 mm 无菌打孔器制成菌饼紧贴于伤口上, 以贴无菌 PDA 培养基作为对照。分别接种 4 株草莓苗, 每株接种 3 个果实。接种后在 28℃、相对湿度 80% 条件下培养并逐日观察。果实发病后进行病原菌再分离, 与原接种菌株进行分析比较。

基金项目: 国家自然科学基金(31571997), 河南省自然科学基金(182300410058), 河南省科技攻关项目(182102110330)

* 通信作者 (Author for correspondence), E-mail: lichengweiwau@hotmail.com

收稿日期: 2018-11-03

病原菌分子生物学鉴定:采用 CTAB 法提取菌株 SQQM-01 的 DNA。选用真菌通用引物 ITS1F (5'-CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA-3') 与 ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') 扩增病原菌 rDNA-ITS 序列(朱晓琴等, 2017)。50 μ L PCR 反应体系: 2 \times Taq Master Mix 25 μ L、引物 ITS1F/ITS4 各 1 μ L、模板 2 μ L、ddH₂O 21 μ L。PCR 反应程序: 94 $^{\circ}$ C 预变性 3 min; 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 55 $^{\circ}$ C 退火 45 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min, 循环 30 次; 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。PCR 扩增产物经浓度 1% 琼脂糖凝胶电泳检测, 回收后进行测序, 所得序列上传 GenBank 进行 BLAST 比对, 选取与其亲缘性较高的已知菌株的 ITS 序列和 1 条其它属种序列, 采用 Mega 7.0 软件以邻接法构建系统发育树。

2 结果与分析

2.1 草莓青霉病原菌形态学鉴定

从草莓染青霉菌果实分离纯化获得菌株 SQQM-01, 在 PDA 培养基上 28 $^{\circ}$ C 下培养 7 d 后, 菌落直径 32~45 mm, 呈蓝绿色, 质地粉末状兼绒状, 平板较为干燥, 菌丝体白色; 反面为淡黄色, 平板中央颜色较深。显微形态观察发现, 该病原菌分生孢子梗发生于基质, 孢梗茎大小 200~600 μ m \times 3.5~4.5 μ m, 帚状枝通常三轮生, 副枝 1~2 个, 大小为 12.1~20.6 μ m \times 3.0~3.5 μ m; 梗基圆柱形, 每轮 2~5 个, 大小为 8.2~14.3 μ m \times 2.7~3.5 μ m; 瓶梗瓶状, 每轮 5~7 个, 大小为 8.0~11.2 μ m \times 2.2~2.6 μ m; 分生孢子链状, 球形或椭圆形, 直径为 3.3~4.5 μ m。根据菌株 SQQM-01 培养特性和形态特征, 初步确定为青霉菌属真菌。

2.2 草莓青霉病原菌致病性检测

接种青霉菌菌饼 4 d 后在接种部位周围开始失去光泽且发白, 产生许多白色菌丝体且中央带有蓝绿色的绒状物; 6 d 后接种部位出现黑褐色; 9 d 后草莓完全腐败霉变。接种后草莓表现症状与采集的自然发病症状一样, 12 个接种果实的发病率均为 100%, 对照组则无病症。根据柯赫氏法则, 对病原菌再次分离鉴定, 得到菌株与原接种菌株一致, 确定该病原菌株是草莓青霉病的致病菌。

2.3 病原菌分子生物学鉴定

菌株 SQQM-01 的 ITS 序列大小为 624 bp, GeneBank 登录号是 MH198055。在 NCBI 中进行 BLAST 比对, 该序列与来自宿主薹草 *Phalaris arundinacea* 的橘灰青霉 *Penicillium aurantiogriseum* (GU566234) 的相似性达 100%。系统进化树显示, 菌株 SQQM-01 与橘灰青霉处于同一分支, 自展值达

到 99% (图 1), 结合形态特征与分子生物学特征最终将草莓青霉病原菌确定其为橘灰青霉。

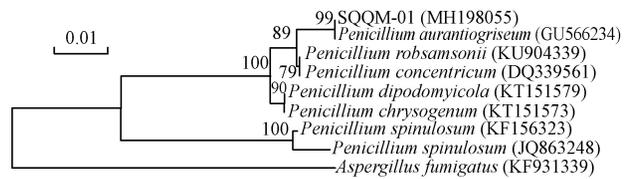


图 1 基于 ITS 序列采用邻接法构建菌株 SQQM-01 及其相似菌株的系统进化树

Fig. 1 Neighbor-joining consensus tree of strain SQQM-01 and the related strains based on ITS sequences

3 讨论

青霉菌属真菌对各种水果都具有一定程度的危害, 例如在枣、柑橘、苹果和哈密瓜等水果中都有发现青霉菌造成果实腐败霉变现象。本试验对河南省商丘市草莓青霉病原菌进行分离, 经形态学和分子生物学鉴定为橘灰青霉, 与已报道的草莓青霉病原菌不同(杨茜然等, 2017)。橘灰青霉在我国为分布种, 真菌志记载黄豆、生姜、燕麦、豌豆、玉米、松果、荞麦、板栗、苹果、蒜等植物均是橘灰青霉的基物。鉴于河南省双八镇草莓基地草莓的重要经济价值, 橘灰青霉导致草莓致病的流行规律、侵染条件、防治措施等仍需要进一步深入研究。

参考文献 (References)

- Wei C, Dai XH, Guo LA, Lei XY. 2017. Identification and toxin-producing capability of causing spoilage in strawberry. *Journal of Food Safety & Quality*, 8(5): 1721-1726 (in Chinese) [魏超, 代晓航, 郭灵安, 雷欣宇. 2017. 草莓致腐霉菌的鉴定及其产毒能力研究. *食品安全质量检测学报*, 8(5): 1721-1726]
- Yang QR, Gu XY, Zhang YJ, Wang W, Li LF. 2017. Isolation, identification and methods for inhibiting growth of the spoilage molds from postharvest strawberry fruits. *Journal of Dali University*, 2(6): 59-63 (in Chinese) [杨茜然, 顾晓颖, 张云娟, 汪雯, 李凌飞. 2017. 草莓果腐败霉菌的分离、鉴定及其防腐方法探索. *大理大学学报*, 2(6): 59-63]
- Zhang N, Gao HY, Fang YJ, Chen HJ. 2016. Research of fungi control on strawberry decay of post-harvest. *Zhejiang Agricultural Sciences*, 57(3): 396-400 (in Chinese) [张宁, 邵海燕, 房祥军, 陈杭君. 2016. 草莓采后腐烂真菌病害控制的研究进展. *浙江农业科学*, 57(3): 396-400]
- Zhu XQ, Song ZL, Pei DL. 2017. Isolation and identification of strawberry root rot pathogen in Shangqiu, Henan Province. *Journal of Plant Protection*, 44(2): 349-350 (in Chinese) [朱晓琴, 宋自力, 裴冬丽. 2017. 河南省商丘市草莓根腐病原菌的分离和鉴定. *植物保护学报*, 44(2): 349-350]

(责任编辑:王 璇)