北方园艺 2011 (6):148～151

黑龙江省依兰县酸浆根腐病病原菌分离鉴定

张晶晶,陈　典,叶阳阳,黄　珏,王　勇

(东北农业大学 园艺学院,黑龙江 哈尔滨 150030)

摘　要:为明确黑龙江省依兰县酸浆根腐病的致病菌,以发病地区的酸浆病根及地下茎为材料,对病原菌进行分离鉴定。结果表明:对致病菌的形态特征观察结合 rDNA ITS 序列分析,最终确定腐皮镰孢菌(*F. solani*)与尖镰孢菌(*F. oxysporum*)为该病的主要致病菌。

关键词:酸浆;根腐病;腐皮镰孢菌;尖镰孢菌

中图分类号:S 644.9(235)　文献标识码:A　文章编号:1001－0009(2011)16－0148－04

酸浆(*Physalis alkekengi* L. var Franchetii(Mast.) Makino)是茄科酸浆属多年生宿根草本植物,基部匍匐生根,浆果橙红色,可供鲜食和观赏。酸浆属约有 120 个种,大多数分布在美洲热带及温带地区,少数分布欧亚大陆及东南亚。我国产 5 种 2 变种[1]。酸浆大多野生,野生的酸浆生于山坡、林下、路旁等地。在热带和亚热带地区,酸浆作为一种常用药物被广泛用于治疗疟疾、哮喘、肝炎、皮炎、风湿等疾病,另外酸浆中的酸浆苦素还具有免疫调节抗肿瘤、抗菌、强心等生物活性[2-5]。被称为"红灯笼"的带宿萼的果实具有极高的观赏价值,既可以生食,也可加工成果汁、罐头、果酒等产品。它是目前发现的少有的集观赏、食用、药用于一身的宝贵的野生植物资源。由于其开发前景非常广阔,酸浆的种植已经人工化。

在酸浆大面积生产种植中,由于酸浆种子具有休眠性,所以多利用酸浆根茎具有耐寒性而直接繁殖,可持续 4～5 a[6],但也导致了酸浆种植地土传病害根腐病的大发生。为了明确该病的发病原因及提出有效的防治方法,该研究以发病地区感病酸浆的病根和地下茎为材料进行了病原菌的分离,并采用科赫式法则初步明确主要致病菌;以形态学观察结合 rDNA ITS 序列分析等技术手段,对主要致病菌进行了进一步鉴定,为制定综合防治措施提供参考依据。

1　材料与方法

1.1　试验材料

从黑龙江省依兰县酸浆种植地采集病根及地下茎。采用组织分离法[7],将新鲜的患病部位用流动的清水冲洗 12 h,观察酸浆根腐病发病部位的症状。感病部位用 75%乙醇表面消毒,再用无菌水洗 3 遍后,在病健交界处用灭菌刀切取 0.5～1 cm 的病样组织,PDA 培养基在 25℃恒温培养(PDA 中含浓度为 1%的链霉素溶液以抑制细菌生长)。经纯化后,转入冻存管中,4℃冰箱保存备用。

1.2　试验方法

1.2.1　致病性测定　将分离得到的优势菌落在 PDA 平板上于 25℃,24 h 光照条件下培养 5 d,采用伤口接种法,将 8 mm 的菌碟直接接种于苗龄为 20～25 d 的酸浆幼苗地上茎部位,在温室中培养,设不接菌的为对照。定期观察并根据 Burpee 等提出的根腐病病情分级标准将根腐病病级划分为 5 个级别,来记录植株的发病情况。0 级:无病;1 级:须根变黑;2 级:主根及地下茎变黑;3 级:主根及地下茎变黑腐烂地上部生长不良;4 级:根部腐烂、植株死亡。发病率＝染病株数/调查总株数×100%,病情指数＝∑(病级数×该级病株数)/(调查总数×最高病级数)×100。根据分级调查结果统计各接种分离病菌的发病率及病情指数。

1.2.2　病原菌的形态观察　将分离出的优势菌株接种到 PDA 平板上,于 25℃培养箱中光照培养 5 d 后,肉眼观察菌落形态特征,在光学显微镜下观察培养病原菌的分生孢子和分生孢子梗形态。根据病原菌产孢特征及其在 PDA 培养基上的形态特征,对病原菌进行初步鉴定。

1.2.3　病原菌产孢特征观察　在 SNA 平板上接种直径为 8 mm 的病原菌菌碟,于 25℃光照培养箱中培养,4 d 后,在滴有无菌水的载玻片上挑取少量菌丝,在光学显微镜下观察产孢情况。

1.2.4　病原菌的 rDNA ITS 的扩增及序列分析　将酸浆根腐病致病菌接在 PDA 培养基上的玻璃纸上,25℃恒温培养 5 d 后,取 0.1 g 菌丝体,加入液氮研磨,用改良的 CTAB 法提取病原菌基因组总 DNA[8]。ITS

第一作者简介:张晶晶(1985-),女,在读硕士,研究方向为蔬菜抗病育种。E-mail:jingjing080516@sina.com。

责任作者:王勇(1971-),女,博士,副教授,研究方向为蔬菜分子育种学。

基金项目:哈尔滨市高新技术产业专项资助项目(2007ZG6AN079)。

收稿日期:2011－04－26

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

rDNA 的扩增采用真菌核糖体基因转录间隔区(ITS)通用引物 ITS1(5′-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3′)和 ITS4(5′-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3′),引物由上海生物工程技术服务有限公司合成[9]。PCR 反应体系为 25 μL,包括:10×PCR Buffer(含 Mg^{2+})2.5 μL,dNTP(2.5 mmol/L)1 μL,DNA 模板 100 ng,引物 ITS1 和 ITS4(10 μmol/L)各 1 μL,*Taq* DNA 聚合酶(2.5 U/μL)2 U,ddH_2O 补足。PCR 扩增程序是:94℃预变性 5 min,94℃变性 40 s,56℃退火 30 s,72℃延伸 30 s,30 个循环;最后 72℃延伸 10 min。扩增产物在 1%的琼脂糖凝胶上进行电泳检测,PCR 产物测序由上海生工生物工程技术服务有限公司完成。测序的结果经 BLAST(http://www.ncb.inlm.nih.gov/blast)与 NCBI 数据库中的已知序列进行同源性比较,根据同源性比较的结果,结合病原菌的形态学特征及致病性测定,最终确定酸浆根腐病主要致病菌。

2 结果与分析

2.1 病害症状

受病原菌侵害的酸浆植株矮小、长势弱。发病初期,地下须根感病,变少,新生的根也很稀疏,植株基部叶片由叶尖开始变黄,并逐渐向上部叶片发展。后期在主根及根茎上可见黑褐色病斑,出现腐烂至病部组织变硬,裂口深及木质部,直接导致水分与营养物质中断,最后导致整个植株萎蔫死亡。

2.2 致病性测定

为了明确致病菌,首先将分离菌在 PDA 培养基上培养 5 d,打成直径为 8 mm 的菌碟进行伤口接种。定期观察,接种 9 d 后接种部位出现黑色斑点,后期植株的根部出现水渍状病斑,逐渐腐烂,地上部分叶片变黄并逐渐萎蔫,与健康植株比较长势弱(图 1)。从病变组织共分离出 7 种菌株,其中 3 号与 6 号菌株为广谱性青霉菌。其它 5 种菌株中,7 号菌株发病率为 86.67%,病情指数为 60.61%;4 号菌株发病率为 66.67%,病情指数为 60.00%,说明此 2 种菌为酸浆根腐病的主要致病菌(表 1)。

表 1 分离病原菌的发病率和病情指数

Table 1 Pathogenicity of the isolates on *Physalis alkekengi* L. and the index

病原菌序号 Pathogen numbers	发病率 Incidence /%	差异显著性 α=0.05	病情指数 Disease index/%	差异显著性 α=0.05
7	86.67	a	60.00	a
4	66.67	a	56.67	b
1	26.67	b	20.00	c
2	20	b	13.33	d
5	0	c	0	e

从病重组织重新分离病原物经分离纯化获得的病原菌与原接种病原菌在菌落、分生孢子等形态特征上完全一致。根据致病性测定结果及病原菌形态特征观察,参考布斯的《镰刀菌属》,初步鉴定酸浆根腐病主要致病菌为腐皮镰孢菌(*F. solani*)和尖镰孢菌(*F. oxysporum*)[9]。

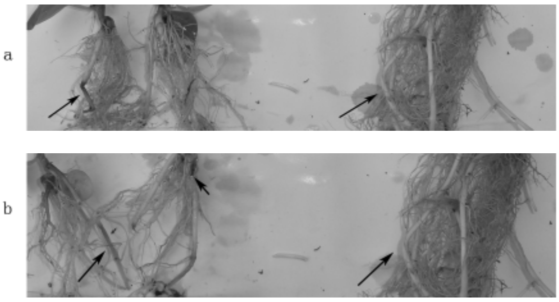

图 1 病原菌接种植株后与健康植株

Fig. 1 Infected with nematodes pathogen and healthy plants

注:a:水渍状病斑和健康植株(腐皮镰孢菌);b:水渍状病斑、坏死病斑与健康植株(尖镰孢菌)。

Note:a:W. P. A shape disease apot and healthy plants(*F. solani*);b:W. P. A shape disease apot,rot disease spot and healthy plants(*F. oxysporum*).

2.3 病原菌鉴定

2.3.1 病原菌的形态特征　腐皮镰孢菌在 PDA 培养基上 25℃恒温培养 5 d 的菌落直径为 55～62 mm,菌落边缘平滑,近圆形,气生菌丝绵绒状,白色至肉色,间有土黄色,培养基不变色。小型分生孢子卵形或洋梨形或肾形,散生,无隔或有隔。大型分生孢子马特形,3～5 隔,两端较钝圆,在菌丝顶端或单生或散生。气生菌丝上的产孢细胞为长筒形的单瓶梗(图 2)。尖镰孢菌在 PDA 培养基上 25℃恒温培养 5 d 的菌落直径为 58～70 mm,菌落呈圆形,淡粉色或洋红色,菌落边缘菌丝呈乳白色,培养基不变色。大型分生孢子米粒形,两端渐尖,足细胞较明显,多为 2～4 分隔,小型分生孢子卵形、椭圆形或肾形,假头生,0～1 分隔,产孢细胞为单瓶梗,较短,单生或具分枝(图 3)。

2.3.2 致病菌的分子鉴定　以 4 号和 7 号菌株的基因组 DNA 为模板,用真菌通用引物 ITS1 和 ITS4 进行 PCR 扩增,均得到了 500～600 bp 大小的扩增条带,将 PCR 产物委托上海生工生物工程技术服务有限公司进行纯化和测序。测序结果显示,4 号真菌的片段大小为 504 bp,7 号真菌的片段大小为 542 bp(图 4)。将所得序列于 NCBI 的数据库中进行 BLAST 分析,结果显示,7 号扩增片段核酸序列与 GenBank 中的 FJ426390.1、EU029589.1、AB518683.1、AB369488.1 等菌株序列的同源性达到 99%,但未找到同源性 100%的菌株,可认为是一个新的菌种,将些 ITS 登录到 GenBank,收录号为 HQ829354。4 号真菌扩增片段核酸序列与 GenBank 中的 GU126688.1 菌株序列的同源性可达到 100%,为尖镰孢菌(*F. oxysporum*)。结合形态学观察、致病性测定与 ITS 分析结果,最终确定该试验分离的酸浆根腐病主要致病菌为腐皮镰孢菌(*F.*

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

北方园艺2011(6):148～151

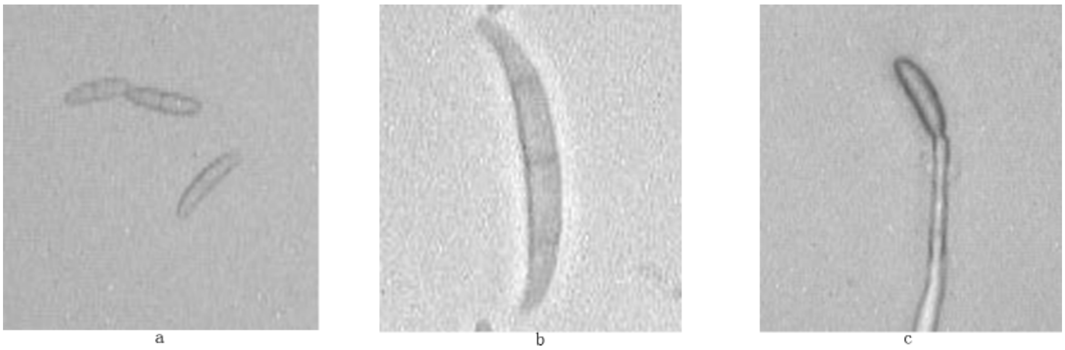

图2　腐皮镰孢菌

注:a:小型分生孢子 b:大型分生孢子 c:分生孢子梗。图3同。

Fig. 2　*Soya sheet fusarium*

Note:a:Microconidia;b:Macroconidia;c:Conidiogenus cells. The same as Fig. 3.

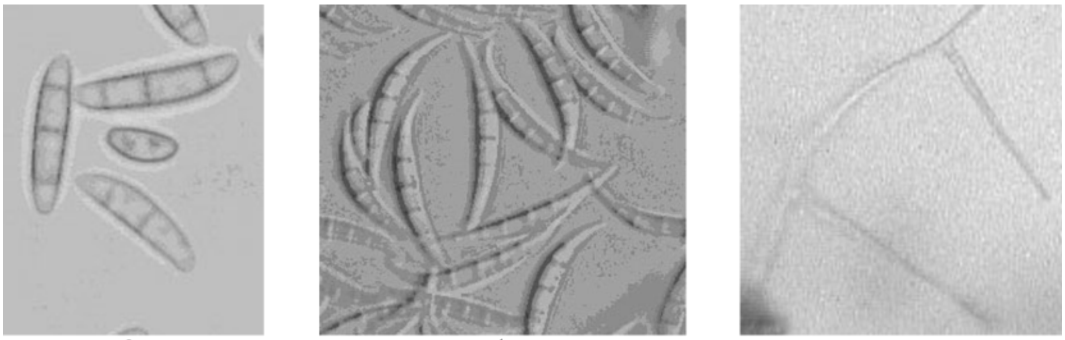

图3　尖镰孢菌

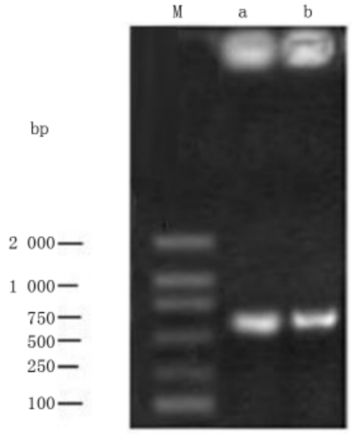

图4　腐皮镰孢菌与尖镰孢菌的PCR扩增产物

注:a.尖镰孢菌;b.腐皮镰孢菌。

Fig. 4　Agarose gelelectrophoresis of *Fusarium oxysporum* and *Fusarium solani* genomic ITS regionamplified by prmiers ITS1 and ITS4.

Note:a: *F. oxysporum*;b: *F. solani*.

solani)与尖镰孢菌(*F. oxysporum*)。

3　结论与讨论

在以往对酸浆病害研究方面,有报道过的酸浆枝孢褐斑病、酸浆黄萎病、酸浆尾孢褐斑病、酸浆轮斑病、酸浆菌核病、酸浆假尾孢褐斑病和酸浆叶点霉叶斑病[11]等,还未见有关酸浆根腐病的研究。

根腐病是一种危害范围大,侵害作物种类范围广的土传病害,容易发生在连作的地块。十字花科、禾本科、豆科、菊科等作物的根部以及葱蒜类的地下茎部都有过被根腐病侵害的记载与研究[10]。能引发根腐病的病原菌也有很多种,尖镰孢菌(*F. oxysporum*)、立枯丝核菌(*Rhizoctonia solani*)、大豆疫霉菌(*Phytophthora sojae*)、腐皮镰孢菌(*F. solani*)和瓜果腐霉菌(*Pythium aphanidermatum*)等都引起过根腐病的发生,只是致病能力有差异。

该试验通过病菌培养的形态特征观察和鉴定、ITS rDNA序列分析,最终确定酸浆根腐病主要的致病菌为尖镰孢菌(*F. oxysporum*)和腐皮镰孢菌(*F. solani*)。腐皮镰刀菌和尖镰孢菌是分布广泛的土壤习居菌,侵染能力很强,可侵染十字花科、禾本科、豆科、菊科等多种植物发生根腐病[12]。

随着酸浆种植人工化,根茎繁殖的种植方式很容易给土传病害创造条件,会导致真菌病害的大发生和流行,给产量与质量均带来冲击。该研究的意义在于明确酸浆根腐病病原菌的种类,为酸浆病害的深入研究和防治奠定基础。

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

参考文献

[1] Xu L,Wang R X,Yang Y Y,etal. The Research of Chinese Physalis Medicinal Resources[J]. Chinese Wild Plant Resources,2009,28(1):21-23.

[2] Chiang H C,Jaw S M,Chen P M. Inhibitory effects of physalin B and physalin F on various human leuke[J]. Anticancer Res,1992(12):1155-1164.

[3] Chiang H C,Jaw S M,Chen C F,et al. Antitumor agent,physalin F from Physalis angulataL. [J]. Anti,1993,(12):837-844.

[4] Soares M B,Bellintani M C,Riberiro I M,et al. Inhibition of macrophage activation and lipopolysaccarideseco-steroids purified fromPhysalis angulataL. [J]. European Journal of Pharmacology,2003,459(1):107-112.

[5] Garcia E S,Castro D P,Ribeiro I M,et al. Trypanosoma rangeli:Effects of physalin B on the immune reactions of the infected larvae of Rhodnius prolixus[J]. Experimental parasitoloqy,2006,112:37-43.

[6] Sun W,Liu Y Z,Qu S H,et al. The Physalis alkekengiL. Cultivation in Spring[J]. Medicinal plants,2008,10:33-34.

[7] Fang Z D. Research Methods for Plant Pathology[M]. Beijing:Agricultural Publishing House,1998:8-12,122-125.

[8] Sun X. Themethodological study on taxonomy of the genusAlternariaNees (in Chinese)[D]. Taian:Shandong Agricultural University,2006.

[9] Booth C. The genus *Fusarium* [M]. London:CMI,Press,1988:102-103.

[10] Zhang D C. Physalis alkekengi L[J]. China Vegetables,2008(4):56.

[11] Su H L,Gao Z J,Lv P K,etal. The Physalis alkekengiL. Disease Prevention and Cure[J]. China Vegetables,2009(3):24-26.

[12] Bai J Y,Bai L Y,Wang D Y,etal. Establishment of PCR-RFLP Identification System of Soybean Root Rot Pathogen[J]. Journal of Xinjiang Agricultural University,2010,33(2):151-154.

The Pathogen Isolation,Identification of *Physalis alkekengi* L. Root Rot in Yilan County of Heilongjiang Province

ZHANG Jing-jing,CHEN Dian,YE Yang-yang,HUANG Yu,WANG Yong

(College of Horticulture,Northeast Agricultural University,Harbin,Heilongjiang 150030)

Abstract:The root rot disease of *Physalis alkekengi* L. is a serious disease in Yilan county of Heilongjiang province,which could cause huge economic losses when it happens. The separation and identification of pathogens from the disease tissue were studied in this report. The results showed that *F. solani* and the *F. oxysporum* were identified as the main pathogenic bacterias by using morphology observation and the rDNA ITS sequence analysis.

Key words:*Physalis alkekengi* L.;root rot disease; *F. solani*;*F. oxysporum*

蔬菜去毒十法

蔬菜中的农药残留是食品安全中的一个重要问题。尤其夏季,既是蔬菜消费的高峰期,也是害虫的活跃时期,易造成大量蔬菜农药残留严重超标。

现介绍蔬菜去毒的10种简易方法:

1. 不合时令,提早上市的菜,因与气候不合,往往施用大量农药,要多洗几遍。
2. 清洗蔬菜最好用清水。施用脂溶性农药的蔬菜用盐水反而不易洗净。
3. 蔬菜不可先切后洗,以防营养流失。
4. 蔬菜最好不要生吃。如果一定要生吃,应多洗几遍。
5. 烫菜比煮菜好。烫菜部分农药会随水汽蒸发。
6. 洗菜时,最好先放在水盆中泡洗,再在水龙头下冲。
7. 包心菜、大白菜应去外围的叶片,再单片冲洗。
8. 鸡毛菜、小白菜应先将根切除,直立冲洗。
9. 苦瓜、小黄瓜如不去皮应用软毛刷刷洗。
10. 豌豆、刀豆、韭菜花和小黄瓜等,由于采收期长,为了预防未成熟部分遭受虫害,农药洒得多,必须多洗几遍。

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net