

陕甘两省花椒疫霉病原鉴定及其拮抗菌筛选

王洁菲, 曹支敏, 白露超, 汤毅, 周雪

(西北农林科技大学 林学院, 陕西 杨陵 712100)

摘要:以采自陕西、甘肃的花椒疫霉菌为试材,依据病原菌的菌落与繁殖体特征、rDNA-ITS 及 β -tubulin 基因序列分析和致病性测定,研究该病菌的种类与分布,并对花椒疫霉菌拮抗菌进行了筛选。结果表明:陕西宝鸡地区的花椒疫霉菌系 *Pfs3*、*Pfs4*、*Pbjt* 和 *Pfs5* 为苎麻疫霉 (*Phytophthora boehmeriae* Sawada);甘肃陇南地区菌系 *Pcsx*、*Pwmc*、*Pwqh*、*Pwbs3* 和 *Pwbs2* 为多寄主疫霉 (*Phytophthora multivora* Scott & Jung),从花椒园土壤中分离筛选出 1 株对疫霉菌具有拮抗效果的放线菌 zy-1,初步鉴定为链霉菌之一种 (*Streptomyces* sp.)。

关键词:花椒;疫霉;形态学;rDNA-ITS; β -tubulin;致病性;拮抗作用

中图分类号:S 763.15 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2015)05-0113-07

由疫霉菌 (*Phytophthora* spp.) 引起的花椒疫霉病 (亦称黑胫病) 在我国陕西、甘肃两省的种植区时有发生,成为常见的一种花椒重要的枝干病害^[1-2]。该病害的发生部位常集中在花椒茎基部,受到侵染的树皮会发生腐烂和凹陷,颜色由褐色逐变成黑色,病斑不断扩展,到最后环绕树干,造成树萎蔫枯死,导致园内树体全部

死亡。目前有关花椒疫霉菌的鉴定仍有争议^[3-4],由于其发生规律仍不完全清楚,影响了该病害的有效防控^[1]。

疫霉菌传统形态学分类主要依据为:菌落形态及其菌丝膨大、厚垣孢子的产生与否;孢子囊的形状、大小、长宽比、有无乳突及其厚度、脱落性和柄的有无;雄器的类型和着生方式;卵孢子是否充满藏卵器及其壁的厚度等。据此,余永年^[5]将中国疫霉菌分为 27 种。世界疫霉菌约为 90 种^[6],但由于疫霉菌的形态、生物学特性易受环境条件影响,而呈现出较大的变异性,单纯采用形态学鉴定,使得形态和习性相似的种难以区分。因此,分子系统学分析现已成为国内外疫霉分类技术的重要手段。其中利用 rDNA-ITS 与 β -tubulin 基因进行菌种鉴定

第一作者简介:王洁菲(1987-),女,陕西西安人,硕士,研究方向为森林菌物学。E-mail:hiwjf0932@126.com.

责任作者:曹支敏(1954-),男,陕西富平人,教授,博士生导师,现主要从事森林病理学与菌物学等研究工作。E-mail:zmcao@nwsuaf.edu.cn.

基金项目:国家“十二五”科技支撑计划资助项目(2012BAD19B0804)。

收稿日期:2014-09-22

QTL Analysis for Total Organic Acid Content in Tomato Fruit

QI Fei, LIU Guan, LI Jing-fu

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

Abstract: An AFLP and SSR genetic linkage map was constructed in tomato with a 260 intraspecific F_2 population derived from a cross between high acid content line ‘12680’ as female parent and low acid content line ‘12574’ as male parent. Total acid content was determined by acid-base titration, total organic acid genetic development was studied to find QTL position related to organic acid content. The results showed that, in totally chose 256 pairs of AFLP molecule markers, 185 pairs of SSR molecule markers, 24 pairs of AFLP molecule markers and 17 pairs of SSR molecule markers had favorable polymorphism. F_2 generation were analyzed for patterns to construct the six linkage groups. It contained 41 molecule markers, the total length of 1 358.93 cM. There were two markers detected the LOD scores greater than 2.5, genetic contribution rate were 20.27% and 10.98%. The 2 QTLs distributed in 2 linkage groups, among which *Ta1* was negative additive effects, *Ta2* was positive additive effect.

Keywords: tomato; acid content; QTL; AFLP; SSR

是目前较为常用的方法,几乎所有的疫霉都可以使用相同的 rDNA-ITS 分子标记进行系统学研究^[7-10]。目前,多重基因发育学分析已广泛应用于疫霉菌种间系统学研究^[11]。该研究在扩大花椒疫霉菌系采集的基础上,根据病原菌的菌落特征、形态特征以及致病性测定,并结合 ITS 与 β -tubulin 基因序列分析,进一步鉴定陕甘地区花椒疫霉病的种类及其分布,以期为该病害的防治以及选育花椒抗病品种奠定研究基础。同时,为探索该病害的生物防治途径提供了疫霉菌拮抗菌材料^[12-13]。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 供试病原菌 2012 年、2013 年 9—10 月分别在陕西凤县、甘肃陇南等花椒主要栽植区采集新发疫霉病斑样本,每个样点采集病斑 3~5 个,记录花椒品种和采集地,装入冰盒并带回实验室。对病斑组织用 PDA 进行分离培养^[14],纯化菌系用 V8 斜面培养基保存于 12℃ 条件下备用。采集分离的花椒疫霉菌系如表 1 所示。

表 1 疫霉菌菌系来源

菌系编号	寄主品种	采集地
Isolate	Variety	Location
Pfs3	凤县大红袍	陕西凤县十里店村卫生所后
Pfs4	凤县大红袍	陕西凤县十里店村山上
Pfs5	凤县大红袍	陕西凤县十里店村坡底
Pbjt	大红袍	陕西宝鸡拓石镇
Pwqh	大红袍	甘肃文县桥头乡黄家村
Pumc	大红袍	甘肃武都米仓山
Pcsx	大红袍	甘肃成县索池乡
Pubs2	米椒	甘肃文县堡子坝乡寺陡坪村
Pubs3	米椒	甘肃文县堡子坝乡寺陡坪村

1.1.2 土壤样品 2013 年在陕西韩城嵬东、富平雷村等地花椒园采集土壤样品。采取 5 点取样混合法取土,样点靠近花椒树干基部 1 m,铲去表层土和腐殖质,挖取 5~10 cm 深度的土壤装入塑封袋中,做好标记带回实验室。

1.1.3 培养基 马铃薯葡萄糖琼脂培养基(PDA)用于疫霉的分离培养;V8 汁培养基:美国产 V8 蔬菜汁(用 8 种不同营养成分的蔬菜作为原料进行混合配比的灌装饮料)用于疫霉的分离培养,菌种保藏、孢子囊和卵孢子诱发;燕麦培养基(OA):用于疫霉的分离,培养,诱导卵孢子的产生;胡萝卜培养基(CA):胡萝卜 200 g,琼脂粉 16 g,水 1 000 mL;用于疫霉的分离,菌种保藏和生产卵孢子;高氏 1 号培养基:水 1 000 mL,可溶性淀粉 20 g, KNO_3 1 g, K_2HPO_4 0.5 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5 g, NaCl 0.5 g, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.01 g,琼脂 16 g;用于筛选土壤放线菌;改良黄豆粉浸汁培养液:蔗糖 10 g,蛋白胨 2 g,淀

粉 5 g,酵母膏 2 g, NaCl 2 g, K_2HPO_4 0.5 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5 g, Ca_2CO_3 1 g, 2% 黄豆粉浸汁原液 1 000 mL 用于放线菌发酵;以上培养基配方参照《植物病理学实验技术》^[15]。

1.2 试验方法

1.2.1 疫霉菌菌系菌落培养性状观察 将采集的带有花椒疫霉病斑的新鲜样品用无菌水冲洗干净并晾干,用灭菌手术刀去除样品表皮,并在病斑的病健交界处切下 3~4 mm 见方的小块,使用 0.1% 升汞作表面消毒后,用无菌水冲洗干净,在 PDA 上进行病原菌的分离,接种后第 3 天开始观察病菌的生成情况。将分离纯化的疫霉菌系先接种在 PDA 上,27℃ 黑暗培养 5 d 后,用打孔器在菌落边缘打取直径为 5 mm 的菌饼,再分别接种在 PDA、V8、CA、OA 培养基上,每种培养基上重复 3 次,置 27℃ 恒温黑暗培养。分别于接种后 2、4、6、8 d 时观察,记录各菌系的菌落形态特征与菌落生长速率。菌落生长速率=菌落生长半径(mm)/菌落生长天数(d)。

1.2.2 疫霉菌菌系形态学鉴定 有性器官生成:V8 培养基上 27℃ 条件下黑暗培养 10 d 后,在光学显微镜(OLYMPUS-CX31RTSF)下观察病菌藏卵器、雄器和卵孢子的形态并测量其大小。观察数不少于 20 个;孢子囊的诱发:采用菌丝丛水培法^[16]的方法诱导孢子囊产生,并在显微镜下观察孢子囊的产生情况。按照余永年^[5]的方法观测孢子囊的各项形态指标;形态学鉴定:根据菌落的培养性状、孢子囊和藏卵器、雄器、卵孢子的形态学特征,参照余永年^[5]、Kroon 等^[17]分类方法,对病原菌进行分类鉴定。

1.2.3 PCR 扩增 采用改良的 CTAB 法进行 DNA 提取,参考张颖慧等^[18]、易润华等^[19]的方法并略作调整。利用真菌核糖体 DNA-ITS 通用引物 ITS1 (5'-TCCG TAGGTGA ACCTGCG G-3') 和 ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3')^[20]进行 PCR 扩增。ITS-PCR 反应体系为 25 μL ,其中包括 2×Taq PCR MasterMix(北京康为世纪生物科技有限公司)12.5 μL ,基因组 DNA 1 μL ,引物 ITS1、ITS4 各 1 μL (6 $\mu\text{mol/L}$) 和 ddH₂O 9.5 μL 。PCR 扩增程序为:94℃ 预变性 5 min;进入循环,94℃ 变性 30 s,56℃ 退火 45 s,72℃ 延伸 1 min,30 个循环;最后 72℃ 延伸 10 min,4℃ 保存。利用特异引物 Bt1 (5'-GTTTCCAGATCACCCACTCGCTTG GT-3') 和 Bt2 (5'-GAGTTCTTGTTCTGCACGTTTCAGCAT-3') 对 β -tubulin 基因进行扩增。 β -tubulin PCR 反应体系为 25 μL ,其中包括 2×Taq PCR MasterMix 14 μL ,基因组 DNA 1 μL ,引物 Bt1、Bt2 各 1 μL 和 ddH₂O 8 μL 。PCR 扩增程序为:94℃ 预变性 5 min;进入循环,94℃ 变性 40 s,59℃ 退火 40 s,72℃ 延伸 1.5 min,30 个循环;最后 72℃ 延伸 5 min,4℃ 保存。

1.2.4 序列分析和系统发育树的构建 将 PCR 扩增产物进行双向测序,测得的序列拼接处理后,提交 GenBank 获取相似序列,通过 BLAST 工具和 DNAMAN 软件进行比对分析并以 Neighbor-Joining 方法构建系统发育树。

1.2.5 疫霉菌菌株致病性测定 参考曹支敏等^[21]的茎皮刺伤法:将纯化后的供试菌种打成 5 mm 的菌饼,接种健康的枝条伤口处,供试花椒寄主选取林学院试验苗圃栽植的“豆椒”、“米椒”和“凤县大红袍”3 个不同抗性品种^[4]的 1 年生枝条。以接种无菌菌饼作为对照,每个花椒品种接种 2 个枝条,每个枝条接种 2 个病斑作为重复。接种于 3 月下旬至 4 月上旬进行,接种 12 d 后,剪取接种及对照枝条,观察记录发病情况、测量病斑大小(长×宽)。

1.2.6 放线菌的分离 采用梯度稀释法^[22]进行放线菌分离,称取 10 g 土样放入盛有 90 mL 的无菌水的三角瓶中,放入灭菌的玻璃珠,震荡 20 min,制成 10^{-1} g 浓度的土壤悬液后静置。吸取 100 μ L 土壤悬液,加入到盛有 900 μ L 无菌水的离心管中充分混匀,制成 10^{-2} g 浓度悬液,以此类推制成 10^{-3} 、 10^{-4} 、 10^{-5} 、 10^{-6} g 不同梯度浓度的土壤稀释悬浮液;将不同浓度的土壤悬液依次滴加到高氏 1 号培养基上,用涂玻棒涂布均匀,进行 3 次重复于 27℃ 下培养 7 d。

1.2.7 拮抗放线菌筛选 采用划线法^[22]进行拮抗菌的初筛。挑取高氏 1 号培养基上分离纯化的单菌落至另一高氏 1 号培养基中培养 7 d,将菌株沿 V8 培养基中心划线,在距离线中心垂直 2 cm 处分别接种 5 mm 的疫霉菌饼,接种 2 d 后开始测量菌落直径,连续测量 3 d,初步筛选出对疫霉菌有抑制作用的菌株。

1.2.8 拮抗菌株发酵液抑菌活性测定 抑制菌丝生长测定:采用菌丝生长速率法^[23]对筛选出的菌株抑制活性进行测定,将疫霉菌菌饼接种于滴加发酵液的 V8 培养基中,滴加培养液作为空白对照(CK1 接种 *Pfs3*,CK2 接种 *Pwbs2*),每处理重复 3 次,接种 2 d 后开始测定菌落直径,连续测量 3 d,计算菌丝生长抑制率。菌丝生长抑制率(%)=(对照菌落直径-处理菌落直径)/对照菌落直径×100%;抑制游动孢子萌发试验:吸取放线菌发酵液与游动孢子悬浮液等体积混合,悬浮液滴加培养液作空白对照,每个处理重复 3 次。25℃ 培养 8 h 后,显微镜检查游动孢子的萌发情况。孢子萌发抑制率(%)=(对照游动孢子萌发率-处理游动孢子萌发率)/对照游动孢子萌发率×100%。

2 结果与分析

2.1 疫霉菌生物学性状

2.1.1 菌落的培养性状 花椒疫霉菌各供试菌系在 V8、PDA、CA、OA 4 种不同培养基上均可以良好生长,

表 2 疫霉菌在不同培养基上的菌落大小

Table 2 Colony diameters of *Phytophthora* Isolates on different media

菌系 Isolate	培养基 Medium	菌落直径(培养 4 d) Colony diameter(cultured 4 days)/mm				生长速率 Growth rate /(mm·d ⁻¹)
		I	II	III	均值	
<i>Pfs4</i>	V8	46	48	49	47.7b	6.0b
	PDA	43	44	44	43.7c	5.5c
	CA	37	37	37	37.0d	4.6d
	OA	59	60	60	59.7a	7.5a
<i>Pfs5</i>	V8	41	42	42	41.7b	5.2b
	PDA	32	33	33	32.7c	4.1c
	CA	23	24	25	24.0d	3.0d
	OA	54	55	55	54.7a	6.8a
<i>Pwbs3</i>	V8	47	48	49	48.0b	6.0b
	PDA	43	44	45	44.0c	5.5c
	CA	42	42	42	42.0d	5.3d
	OA	67	68	68	67.7a	8.5a
<i>Pwmc</i>	V8	48	60	60	56.0b	7.0b
	PDA	42	43	44	43.0c	5.4c
	CA	43	43	43	43.0c	5.4c
	OA	72	73	73	72.7a	9.1a
<i>Pwqh</i>	V8	57	58	60	58.3b	7.3b
	PDA	44	45	45	44.7c	5.6c
	CA	39	40	40	39.7d	5.0d
	OA	73	74	74	73.7a	9.2a
<i>Pcxs</i>	V8	56	56	57	56.3b	7.0b
	PDA	49	49	50	49.3c	6.2c
	CA	45	45	45	45.0d	5.6d
	OA	70	71	71	70.7a	8.8a
<i>Pwbs2</i>	V8	48	48	51	49.0b	6.1b
	PDA	46	42	42	43.3c	5.4c
	CA	41	42	42	41.7d	5.2d
	OA	65	66	65	65.3a	8.2a
<i>Phjt</i>	V8	44	45	45	44.7b	5.6b
	PDA	41	42	42	41.7c	5.2c
	CA	35	36	36	35.7d	4.5d
	OA	64	65	65	64.7a	8.1a
<i>Pfs3</i>	V8	52	52	53	52.3b	6.5b
	PDA	49	49	52	50.0c	6.3c
	CA	40	41	40	40.3d	5.0d
	OA	65	65	66	65.3a	8.2a

注:表中不同小写字母表示 $P=0.05$ 水平上差异显著。

Note: Different lowercases letters in the table show significant difference at 0.05 level.

菌落呈白色,绒毛状至短棉絮状,但在不同培养基上的菌落生长速率有明显差异。由表 2 可知,使各疫霉菌菌系生长最快的培养基是 OA,其次是 V8,生长最慢的则是 CA,气生菌丝在 V8 培养基上生长最茂密,OA 培养基上生长稀疏。

2.1.2 菌系的形态特征 对花椒疫霉菌的孢子囊及有性器官进行观察之后,对其形态特征(图 1)进行数据统计,具体情况见表 3。综合以上形态观察结果,可以初步将供试菌系归为 2 种:陕西宝鸡地区的 *Pfs3*、*Pfs4*、*Phjt*、*Pfs5* 菌系与苎麻疫霉(*Phytophthora boehmeriae* Sawada)相似,其孢子囊长宽比 0.9~1.5,乳突明显,雄器多为穿雄式;甘肃陇南地区的 *Pcxs*、*Pwmc*、*Pwqh*、*Pwbs3*、*Pwbs2* 菌系与多寄主疫霉(*Phytophthora multivora* P. M. Scott & T. Jung)相似,其孢子囊长宽比 1.0~2.1,乳突明显至不

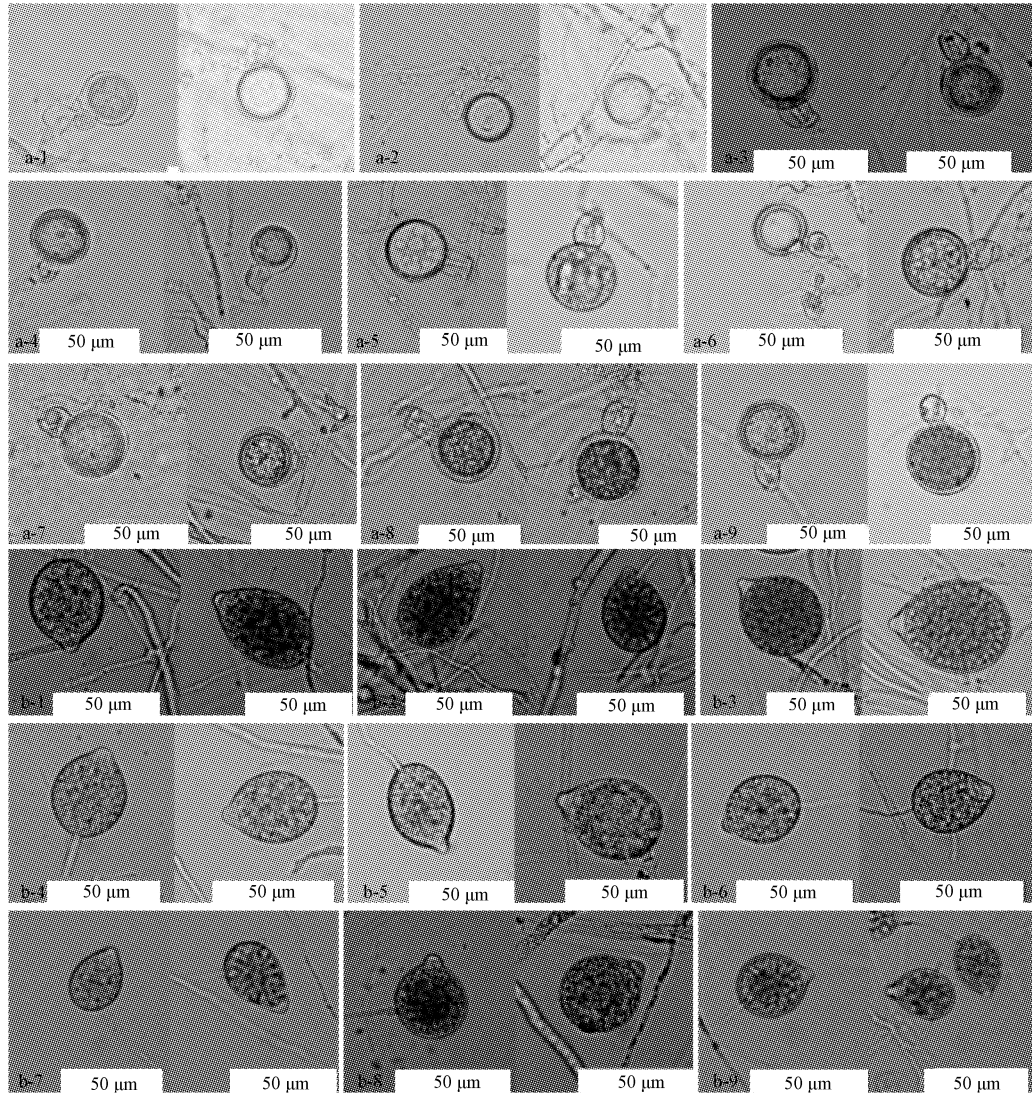
表 3 花椒疫霉菌的孢子囊及有性器官大小

Table 3 The size of *Phytophthora* isolate sporangia, oogonia, oospores, and antheridia

无性繁殖体 Asexual propagule					有性繁殖体 Sexual propagule					性配合方式 Sexual copulation
菌系 Isolate	菌丝宽度	孢子囊		藏卵器	卵孢子		雄器			
	Hypha width	Sporangium		Oogonium	Oospore		Antheridia			
	/ μm	长×宽	长宽比	乳突高	直径	直径	壁厚	长×宽		
		Length×width	Length	Papillate	Diameter	Diameter	Wall thickness	Length×width		
Attachment	/ μm		height/ μm	/ μm		/ μm		type		
<i>Pfs4</i>	1.5~7.3	(26.0~67.7)×(28.8~55.1)	1.0~1.5	4.2~7.3	17.7~35.4	16.6~28.1	0.5~1.0	(10.5~19.8)×(10.4~14.6)	A	Ho
<i>Pfs5</i>	2.6~9.4	(16.6~60.3)×(15.6~43.7)	1.0~1.5	3.1~5.7	23.9~31.2	18.7~28.1	0.6~1.0	(15.6~19.0)×(12.5~15.6)	A	Ho
<i>Pubs3</i>	2.0~6.3	(23.7~44.7)×(18.7~33.3)	1.0~1.7	2.1~4.2	29.1~32.2	23.9~26.7	0.6~1.0	(8.3~9.4)×(9.4~10.4)	P/A	Ho
<i>Pwmc</i>	1.8~7.2	(21.8~39.5)×(17.7~27.6)	1.0~1.5	1.0~5.2	21.8~31.7	15.6~24.9	0.7~1.0	(8.3~15.4)×(9.9~12.2)	P	Ho
<i>Pwqh</i>	1.1~8.3	(29.1~65.5)×(21.8~37.4)	1.1~2.1	2.1~5.2	28.1~34.3	19.8~30.2	0.8~1.0	(7.3~15.6)×(7.3~13.5)	P	Ho
<i>Pcxs</i>	1.6~7.3	(28.1~36.4)×(21.8~29.1)	1.1~1.5	1.0~4.2	25.0~28.1	15.6~23.9	0.6~1.0	(12.5~14.6)×(10.4~11.4)	P	Ho
<i>Pubs2</i>	2.0~6.3	(21.8~49.9)×(21.8~36.4)	1.0~1.5	2.6~4.2	23.9~31.7	19.8~27.0	0.6~1.0	(11.4~14.6)×(8.3~14.6)	P/A	Ho
<i>Pbjt</i>	2.1~6.8	(17.2~56.2)×(15.1~46.8)	0.9~1.4	1.0~4.2	14.6~34.3	11.4~31.2	0.6~1.6	(9.4~19.8)×(9.4~16.6)	A	Ho
<i>Pfs3</i>	2.9~9.4	(22.9~36.9)×(20.8~36.9)	1.0~1.4	3.1~4.7	27.0~40.6	23.9~34.3	1.0~2.1	(13.5~23.9)×(12.5~18.7)	A	Ho

注:Ho=同宗配合,A=穿雄式,P=雄器侧生。

Note:Ho=homothallic species,A=amphigynous,P=paragynous attachment of antheridia.



注:a-1~a-9 分别为 *Pubs2*、*Pubs3*、*Pfs4*、*Pwqh*、*Pfs5*、*Pwmc*、*Pcxs*、*Pfs3*、*Pbjt* 的藏卵器、雄器和卵孢子;b-1~b-9 分别为 *Pubs2*、*Pubs3*、*Pfs4*、*Pwqh*、*Pfs5*、*Pwmc*、*Pcxs*、*Pfs3*、*Pbjt* 的孢子囊(图中比例尺为 50 μm)。

Note:a-1—a-9;Oogonium,oospore and antheridia of *Pubs2*,*Pubs3*,*Pfs4*,*Pwqh*,*Pfs5*,*Pwmc*,*Pcxs*,*Pfs3*,*Pbjt*. b-1—b-9, sporangium of *Pubs2*,*Pubs3*,*Pfs4*,*Pwqh*,*Pfs5*,*Pwmc*,*Pcxs*,*Pfs3*,*Pbjt* (Bars=50 μm).

图 1 各疫霉菌繁殖体形态特征

Fig. 1 The oogonium,antheridium,oospore and sporangium morphology of *Phytophthora* isolates

明显,雄器多为侧生。

2.2 序列分析

2.2.1 PCR 扩增结果 根据扩增结果得知,各菌系均可得到 1 条 800 bp 左右的清晰条带。测序得到 ITS 序列长度为 787~855 bp(图 2), β -tubulin 序列长度为 784~805 bp(图 3)。

2.2.2 rDNA-ITS 序列的系统发育研究 由图 4 系统发育树划分可知,*Pfs3*、*Pfs4*、*Pbjt*、*Pfs5* 与 *P. boehmeriae* 聚为 1 组,*Pcxs*、*Pwmc*、*Pwqh*、*Pwbs3*、*Pwbs2* 与 *P. multivora* 聚为一组,其结果与形态学分类结果一致。从 GenBank 获得接受序列号 *Pfs3* (KJ854387)、*Pfs4* (KJ854388)、*Pbjt* (KJ854389)、*Pfs5* (KJ854390)、*Pcxs* (KJ854391)、*Pwbs3* (KJ854392)、*Pwqh* (KJ854393)、*Pwmc* (KJ854394)、*Pwbs2* (KJ854395)。

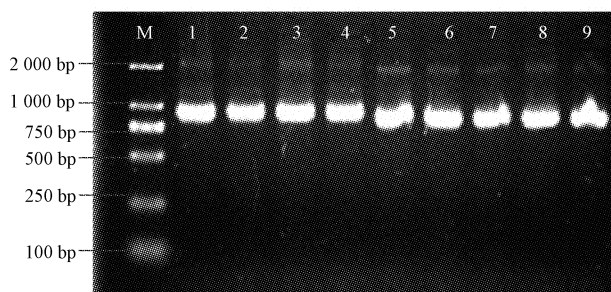


图 2 rDNA-PCR 产物凝胶电泳图

Fig. 2 The profiles of PCR amplification

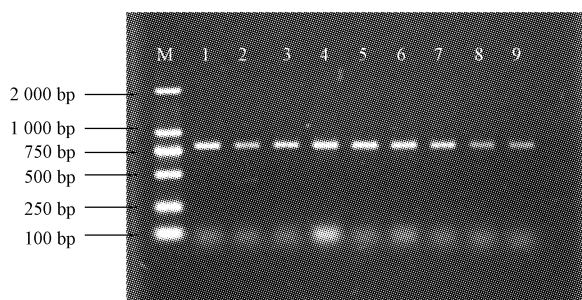


图 3 β -tubulin 产物凝胶电泳图

Fig. 3 The profiles of PCR amplification

2.2.3 β -tubulin 序列的系统发育研究 分析结果表明,供试 9 个菌系的 β -tubulin 序列与 GenBank 中已有的疫霉菌相关序列相似性高达 99%,*Pfs3*、*Pfs4*、*Pbjt*、*Pfs5* 与 *P. boehmeriae* 聚为一组,*Pcxs*、*Pwmc*、*Pwqh*、*Pwbs3*、*Pwbs2* 与 *P. multivora* 聚为一组(图 5)。其结果与 ITS 结果一致。从 GenBank 获得接受序列号 *Pfs3* (KJ890554)、*Pfs4* (KJ890551)、*Pbjt* (KJ890553)、*Pfs5* (KJ890552)、*Pcxs* (KJ890549)、*Pwbs3* (KJ890546)、*Pwqh* (KJ890548)、*Pwmc* (KJ890547)、*Psdp2* (KJ890550)。

2.3 致病性测定

田间人工接种结果表明,9 种菌系对供试花椒品种

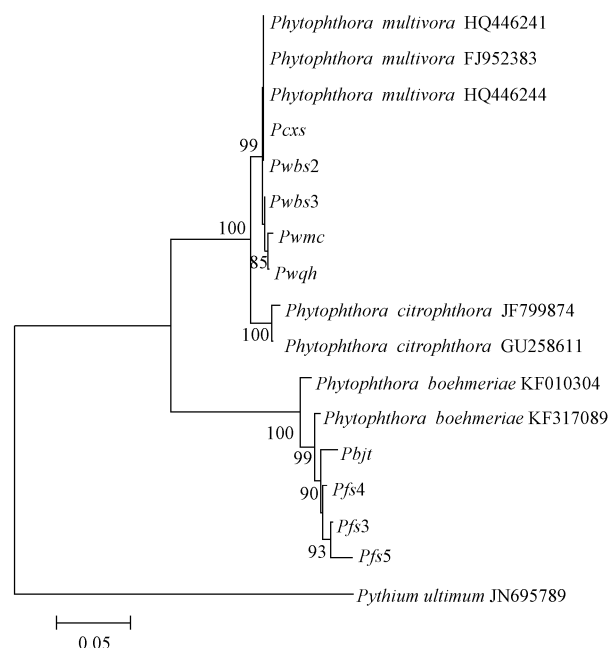


图 4 疫霉菌 ITS 系统发育树

Fig. 4 Phylogenetic tree (NJ) based on ITS sequences of *Phytophthora* isolates

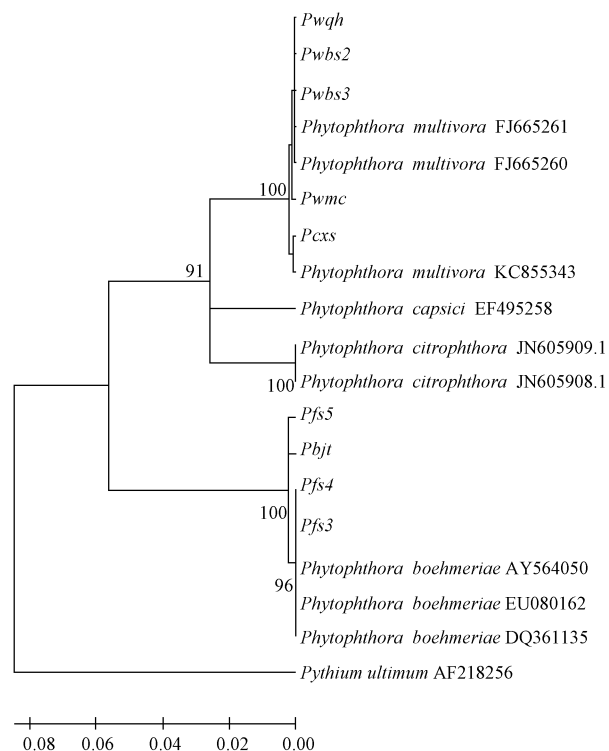


图 5 疫霉菌 β -tubulin 基因系统发育树

Fig. 5 Phylogenetic tree (NJ) based on β -tubulin gene sequences of *Phytophthora* isolates

均有不同程度致病性(表 4),其中成县索池乡菌系 *Pcxs* 侵染性最强,在“凤县大红袍”侵染病斑最大可达 105 mm×23 mm,病斑环绕接种枝干,导致萎蔫,枝条发

黑腐烂,流胶枯死;其次是凤县菌系 *Pfs3*,致病性最弱的是凤县菌系 *Pfs5*,其病斑最小。试验表明,供试的 9 个菌系间的致病力均表现出有差异性,存在明显地致病性分化,这种菌系间的致病力差异与菌系来源有明显的关联性,即甘肃陇南地区的菌系致病力总体上强于陕西宝鸡地区菌系。

表 4 供试疫霉菌对不同花椒品种致病性测定

Table 4 Pathogenicity of *Phytophthora* isolates to pricklyash varieties

菌系 Isolate	病斑大小(长×宽) Spot size (length×width)/mm		
	“凤县大红袍” “Fengxian Dahongpao”	“豆椒” “Doujiao”	“米椒” “Mijiao”
<i>Pfs4</i>	(17~20)×(8~11)	(10~13)×(7~9)	(12~13)×(8~10)
<i>Pfs5</i>	(15~41)×(12~17)	(8~13)×(7~10)	(7~9)×(3~6)
<i>Pubs3</i>	(72~95)×(19~29)	(15~22)×(8~13)	(15~33)×(9~14)
<i>Pwmc</i>	(69~98)×(19~30)	(15~22)×(7~13)	(9~23)×(7~17)
<i>Pqwh</i>	(42~98)×(12~22)	(12~21)×(9~14)	(8~22)×(6~15)
<i>Pcxs</i>	(93~105)×(17~23)	(15~24)×(6~11)	(21~30)×(15~21)
<i>Pubs2</i>	(60~67)×(12~21)	(18~26)×(11~15)	(15~24)×(9~13)
<i>Pbjt</i>	(7~85)×(5~20)	(11~18)×(8~9)	(10~15)×(7~10)
<i>Pfs3</i>	(69~119)×(27~41)	(9~16)×(5~13)	(11~17)×(9~15)
CK	0	0	0

2.4 拮抗放线菌的筛选与抑制作用测定

通过马丁培养基与高氏 1 号选择性培养基对花椒园土壤中的微生物进行筛选,根据其菌落形态特征进行筛选,共从土壤中分离得到纯培养菌落 8 株,其中真菌 4 株,放线菌 4 株。筛选出 1 株具有抑制作用的菌株 zy-1,通过放线菌发酵液对疫霉菌菌丝以及游动孢子萌发抑制作用进行测定。

2.4.1 放线菌发酵液对菌丝的抑制作用 放线菌 zy-1 发酵液对疫霉菌的菌丝生长抑制率结果详见表 5,表明作用 zy-1 对疫霉菌具有一定抑制作用。

表 5 放线菌发酵液对疫霉菌菌丝的抑制作用

Table 5 The antibacterial activity of the actinomycetes filtrate on *Phytophthora* hypha

供试菌系 Isolate	抑菌率 Inhibitory rate/ %		
	2 d	3 d	4 d
<i>Pfs3</i>	39.5	38.4	36.4
<i>Pubs2</i>	37.2	34.8	31.3

2.4.2 放线菌发酵液对游动孢子萌发的抑制作用 表 6 表明,放线菌 zy-1 发酵液对苎麻疫霉菌游动孢子萌发抑制率为 44.2%,对多寄主疫霉菌游动孢子萌发

表 6 放线菌发酵液对

疫霉菌游动孢子萌发的抑制作用

Table 6 The antibacterial activity of the actinomycetes filtrate on zoospore germination of *Phytophthora*

供试菌系 Isolate	抑制率	
	游动孢子萌发率 Zoospore germination rate/ %	Inhibitory rate/ %
<i>Pfs3</i>	53.5	44.2
<i>Pubs2</i>	57.0	41.1
CK1	95.8	—
CK2	96.8	—

抑制率为 41.1%。供试菌株经形态学初步鉴定为链霉菌之一种 *Streptomyces* sp.,是最为重要的抗生素生产菌,产生的抗生素对于疫霉菌的生长有较好的抑制作用。

3 结论与讨论

该研究依据菌系在 V8 培养基上培养性状与形态学特征、ITS 和 β -tubulin 基因序列分析及其致病性将采自陕西宝鸡地区和甘肃陇南花椒疫霉菌 9 个菌系分别鉴定为 2 种:陕西凤县、宝鸡菌系(*Pfs3*、*Pfs4*、*Pfs5*、*Pbjt*)的孢子囊多为卵圆形至椭圆形,长宽比较小,乳突明显,雄器多为穿雄式,为苎麻疫霉(*Phytophthora boehmeriae* Sawada);甘肃陇南的菌系(*Pubs3*、*Pwmc*、*Pqwh*、*Pcxs*、*Pubs2*)的孢子囊长宽比较大,乳突明显至不明显,少数无乳突,雄器多侧生,为多寄主疫霉(*Phytophthora multivora* P. M. Scott & T. Jung)。各疫霉菌系的 rDNA-ITS 和 β -tubulin 基因序列分析结果与形态学分类结果一致。证明了引起陕甘两省花椒疫霉病的主要病原菌种类^[2,4]。何苏琴等^[3]曾将甘肃舟曲的花椒流胶病病原鉴定为柑橘褐腐疫霉(*Phytophthora citrophthora* R. E. Sm & E. H. Sm),但该研究陇南花椒疫霉诸菌系为同宗配合,且雄器多侧生,与其明显不同。谢宁等^[4]也在陕甘花椒产区发现有在 PDA 培养基上不易产生有性繁殖结构的疫霉菌菌系。*P. citrophthora* 是否为花椒疫霉菌之一,有待进一步研究。

致病性测定表明,花椒疫霉菌系具有明显的地域分化,甘肃陇南菌系总体上致病性较强,而陕西菌系致病性一般较弱,该结果与谢宁等^[4]研究结果有差异,可能与试验菌系不同有关。多寄主疫霉(*P. multivora*)发现于澳大利亚西南,为疫霉菌一新种^[24],是从桉树、柑橘、栎和杜鹃等多种植物上发现并分离而来,与柑橘生疫霉(*P. citricola* Sawada)的亲缘关系很近^[17]。苎麻疫霉(*P. boehmeria*) 我国的寄主植物主要有苎麻、棉花、柑橘和构树等植物叶片。该研究证实花椒为这 2 种疫霉菌的寄主植物之一,疫霉菌主要侵染花椒根茎部位,引起树干流胶、腐烂或枯死。

利用放线菌的拮抗作用控制植物病害是无公害防治植物病害的重要途径之一^[25]。该试验初步筛选出了对疫霉菌具有抑制作用的链霉菌菌株 zy-1,其发酵液对疫霉菌菌丝生长和孢子萌发显示一定抑制作用,对其拮抗物质与抑菌机制值得更深入研究。该试验土壤采样点有限,大田筛选菌株数量不足。因此,有待进一步扩大采集,筛选出较多拮抗效果更好的生防菌菌株,并研究其生产应用。

参考文献

- [1] 孟铁男,冯泽,洪流,等. 花椒黑胫病的发生及防治技术研究[J]. 甘肃农业科技,1993(2):31-33.
- [2] 雷家瑶,车兴璧,李锋. 甘肃省花椒黑胫病的研究初报[J]. 植物保护,

1990(3):8-10.

[3] 何苏琴,袁忠林,洪流,等. 花椒流胶病原疫霉种的鉴定[J]. 西北农业学报,1997,6(4):4-7.

[4] 谢宁,曹支敏,梁超琼,等. 花椒疫霉病菌种的鉴定[J]. 西北林学院学报,2013,28(2):125-130.

[5] 余永年. 中国真菌志(第六卷 霜霉目)[M]. 北京:科学出版社,1998:123.

[6] Kirk P M, Cannon P F, Minter D W, et al. Dictionary of the Fungi. (10th ed.) [M]. UK CABI Europe-UK, 2008:753.

[7] Cooke D E L, Drenth A, Duncan J M, et al. A molecular phylogeny of *Phytophthora* and related Oomycetes[J]. Fungal Genet Biol, 2000, 30:17-32.

[8] Föster H, Cummings M P, Coffey M D. Phylogenetic relationships of *Phytophthora* species based on ribosomal ITS I DNA sequence analysis with emphasis on Waterhouse groups V and VI[J]. Mycol Res, 2000, 104(9):1055-1061.

[9] 张正光,郭宝成,王源超,等. 非洲菊根腐病原的鉴定与 ITS 序列分析[J]. 植物病理学报, 2005, 35(5):392-396.

[10] 燕勇,李卫平,高雯,等. rDNA-ITS 序列分析在真菌鉴定中的应用[J]. 中国卫生检验杂志, 2008, 18(10):1958-1961.

[11] Blair J E, Coffey M D, Park S Y, et al. A multi-locus phylogeny for *Phytophthora* utilizing markers derived from complete genome sequences[J]. Fungal Genet Biol, 2008, 45:266-277.

[12] Da Vinha F N M, Gravina-Oliveira M P, Franco M N, et al. Cellulase production by *Streptomyces viridobrunneus* SCPE-09 using lignocellulosic biomass as induce substrate[J]. Appl Biochem Biotechnol, 2011, 164:256-267.

[13] Kortema H, Pennanen T, Smolander A, et al. Distribution of antagonistic *Streptomyces griseoviridis* in rhizosphere and nonrhizosphere sand[J].

Journal of Phytopathology, 1997, 145(4):137-143.

[14] 方中达. 植病研究技术[M]. 北京:中国农业出版社,1998.

[15] 孙广宇,宗兆峰. 植物病理学实验技术[M]. 北京:中国农业出版社, 2002.

[16] 郑小波. 疫霉菌及其研究技术[M]. 北京:中国农业出版社,1997.

[17] Kroon L P, Brouwer H, de Cock A M, et al. The genus *Phytophthora* anno 2012[J]. Phytopathology, 2012, 102(4):348-364.

[18] 张颖慧,魏东盛,邢来君,等. 一种改进的丝状真菌 DNA 提取方法[J]. 微生物学通报, 2008, 35(3):466-469.

[19] 易润华,朱西儒,周而勋. 简化 CTAB 法快速微量提取丝状真菌 DNA [J]. 湛江海洋大学学报, 2003, 23(6):72-73.

[20] White T J, Bruns T, Lee S, et al. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics[M]// In: Innis M A, Gelfand D H, Sninsky J J, et al., eds. PCR Protocols. A Guide to Methods and Applications New York: Academic Press, 1990:315-322.

[21] 曹支敏,明玉玲,陈丹,等. 花椒干腐病的寄主抗病性与病原菌致病性分化[J]. 西北林学院学报, 2010, 25(6):115-118.

[22] 沈萍,范秀荣,李广武. 微生物学实验[M]. 北京:高等教育出版社, 2005.

[23] 王群利,师宝君,卞小莹,等. 土壤拮抗放线菌的分离及其抗菌活性筛选[J]. 植物保护, 2008, 34(3):41-46.

[24] Scott P M, Burgess T I, Barber P A, et al. *Phytophthora multivora* sp. nov., a new species recovered from declining *Eucalyptus*, *Banksia*, *Agonis* and other plant species in Western Australia [J]. Persoonia, 2009, 22:1-13.

[25] 姜玉,董怀玉,徐秀德,等. 放线菌在植病生防中的研究进展[J]. 杂粮作物, 2005, 25(5):329-331.

Identification of *Phytophthora* Species Causing Pricklyash Blight from Shaanxi and Gansu Provinces and Screening of Antagonistic Actinomycetes

WANG Jie-fei, CAO Zhi-min, BAI Lu-chao, TANG Yi, ZHOU Xue

(College of Forestry, Northwest Agriculture and Forestry University, Yangling, Shaanxi 712100)

Abstract: Taking species and distribution of *Phytophthora* which were isolated from pricklyash (*Zanthoxylum bungeanum*) in Shaanxi and Gansu provinces as material, based on colony, sporangium and oogonium morphology, ITS and β -tubulin gene sequences and their pathogenicity, species and distribution of the bacteria were studied, and the antagonistic bacteria of pricklyash *Phytophthora* were screened. The results showed that *Phytophthora* isolates *Pfs3*, *Pfs4*, *Pbjt* and *Pfs5* from Baoji of Shaanxi were identified as *Phytophthora boehmeriae* Sawada, and isolates *Pcsx*, *Pwmc*, *Pwqh*, *Pwbs3* and *Pwbs2* from Longnan of Gansu were identified as *Phytophthora multivora* Scott and Jung. One actinomycetes isolated from the soil of pricklyash field was screened out, and preliminary identified as *Streptomyces* sp. which showed antagonistic activity to these *Phytophthora* species.

Keywords: pricklyash; *Phytophthora*; morphology; rDNA-ITS; β -tubulin; pathogenicity; antagonism