

大樱桃根茎腐烂致病菌的分离鉴定

李淑平, 刘美英, 孙庆田, 姜学玲, 李延菊, 张福兴

(烟台市农业科学研究院, 山东 烟台 265500)

摘要:以感根茎腐烂病的樱桃树为试材, 对其病原菌进行分离纯化、致病性检测和 r-DNA-ITS 序列分析, 研究了 pH 和温度对病原菌菌丝生长的影响。结果表明: 分离到的 4 株病原菌中仅 1 株引起了根茎腐烂病, 经 r-DNA-ITS 序列分析鉴定, 该菌为撕裂蜡孔菌; 该菌在 pH 4.0~7.0 生长较快, 最适宜 pH 为 6.0; 最适生长温度为 32~34℃, 最高生长温度 38℃, 致死温度 42℃。

关键词: 樱桃; 根茎腐烂; 撕裂蜡孔菌

中图分类号: S 662.5 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0009(2013)15-0130-03

甜樱桃为北方经济效益最高的树种之一, 国内从上世纪 80 年代开始引种栽培。迄今, 全国栽培面积已超过 10 万 hm^2 , 且各地的发展积极性仍然较高。但在樱桃生产中, 却出现了一种致死性的病害—樱桃根茎腐烂病, 尤其在老产区烟台等地, 发生尤为严重, 经常出现 7、8 a 生樱桃树, 刚开始结果就死亡的现象。树体发病初期不易察觉, 一般根茎遭受侵染 2~3 a 后, 发病树叶发黄、卷曲, 扒开根茎部位树皮, 韧皮部和木质部褐色、腐烂。发病严重的树, 根茎部皮层腐烂一周, 造成整株死亡。国内尚鲜见关于樱桃根茎腐烂病菌分离鉴定的报道。现以感根茎腐烂病的樱桃树试材, 对其病原菌进行分离纯化、致病性检测和 r-DNA-ITS 序列分析, 并研究了 pH 和温度对病原菌菌丝生长的影响。

1 材料与方法

1.1 试验材料

病菌分离材料为樱桃根茎腐烂病树。试验接种材料为健康盆栽苗, 品种为“黑珍珠”, 砧木为“大青叶”。

1.2 试验方法

1.2.1 病菌的分离与纯化 病菌分离: 切取具有典型根茎腐烂病的树干病健交界处的皮层和木质部组织, 放入干净的采集袋内, 带回实验室分离培养。超净台灭菌后先切取较大病组织, 1 cm 左右小块, 先置于 70% 乙醇中浸 3~5 min, 接着把病组织移入 0.1% 氯化汞中浸 3~5 s, 消毒后切取中央部分, 经灭菌水漂洗 3 次后, 转移到 PDA 培

养基上培养。菌种纯化: 采用稀释分离法, 准备 100 mL 的灭菌水 3 瓶, 用接种针挑取从病健交界组织分离物加到培养瓶中与灭菌水混合, 然后从第 1 瓶中吸取 1 mL 到第 2 个培养瓶中, 混和后再吸 1 mL 到第 3 个瓶中。

1.2.2 致病性测定 取分离纯化的病菌, 用针刺法接种到樱桃盆栽苗根茎部位, 设清水对照, 重复 3 次。接种部位用土覆盖, 盆土保持湿润。接种后 1 个月观察, 并对接种发病的植株再次进行分离和鉴定。

1.2.3 樱桃根茎腐烂致病菌分子鉴定 按常规方法提取真菌 DNA, 采用 r-DNA 通用引物 ITS4 (5'-TCCTC-CGCTTATTGATATGC -3') 和 TTS5 (5'-GGAAGTAAAGTCGTAAGAAG -3') 按常规方法扩增 ITS (Internal Transcribed Spacer, 内转录间隔区) 区。回收 PCR 产物, 将目的片段连接到载体 Pmd19-T Vector 上, 进行转化, 挑选 PCR 检测为阳性的菌落, 接种到 Amp+LB 液体培养基中, 180 r/min 37℃ 摇菌过夜, 按质粒提取试剂盒小量提取质粒。用 pMD19-T 载体引物 M13(-47) 和 M13(-48) 双向测序, 测序结果拼接, 于 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> 上 BLAST 比对。

1.2.4 不同 pH 值对菌丝生长的影响 设 pH 为 2.0、3.0、4.0、5.0、6.0、7.0、8.0、9.0、10.0、11.0、12.0 共 11 个处理。PDA 培养基灭菌前用 ZD-2 型精密酸度计标定 pH 值。挑取直径 0.5 cm 大小的菌饼, 接种到培养基上, 放入 28℃ 暗培养, 处理 3 d 后, 用十字交叉法测量菌落的平均直径, 净生长量 = 菌落平均直径 - 菌饼平均直径。

1.2.5 不同温度对菌丝生长的影响 参考李静等^[1]试验的方法, 测定该病菌的最低生长温度、最适生长温度、最高生长温度及致死温度。最低生长温度: 低于该温度 1℃ 时, 生长被抑制; 最适生长温度: 在该温度下, 菌落日生长速率最大; 最高生长温度: 高于该温度 1℃ 时, 生长即被抑制; 致死温度: 在该温度下, 生长被抑制, 菌体死亡, 而在低于该温度 1℃ 时, 生长被抑制, 但置于适宜温度后仍可以恢复生长。

第一作者简介: 李淑平(1975-), 女, 山东德州人, 硕士, 高级农艺师, 现主要从事樱桃病害防治等研究工作。E-mail: lsp2008@163.com

责任作者: 张福兴(1962-), 男, 山东烟台人, 本科, 研究员, 现主要从事樱桃品种选育及栽培技术等研究工作。E-mail: gsszfx@163.com

基金项目: 国家公益性行业(农业)科研专项资助项目(200903019); 烟台市科学技术攻关计划资助项目(2008107)。

收稿日期: 2013-03-11

2 结果与分析

2.1 病原菌分离和致病性测定

分离到的病菌纯化后,得到2株真菌和2株细菌,将其分别接种于健康樱桃苗后,只有1株真菌引起了根茎腐烂症状,其它菌株接种没有发病。对接种后的病斑再次进行病菌分离,得到与接种病菌形态一致的菌株。该病菌在PDA培养基上洁白,呈绒状(图1)。

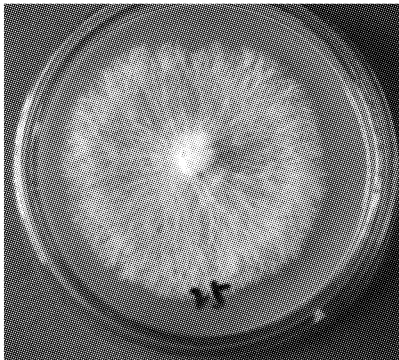


图1 病菌在25℃生长4d后状况

Fig. 1 Cultured after 4 days in PDA medium under 25℃

2.2 致病菌 r-DNA-ITS 序列分析

致病菌序列测定为:

ATTTCG TAGGTGAACCTGCGGAAGGATCAT
TATCGAGTTTGAACGGGTGTAGCTGGCCTTTA
ACGAGGCATGTGCACACCTGGCTCATCCACTCTC
AACCTCTGTGCACTTTATGTAAGAAACGGTGTA
GCCAGCTATTTAATAGTTGGTAATAAGCCTTTCT
TATGTTTACTACAAACGCTTCAGTTATAGAATGT
TACTGTGTATAACACAATATATACAACCTTTCA
GCAACGGATCTCTTGGCTCTCGCATCGATGAAG
AACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTG
CAGAGTTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCG
CCTTGCACTCCTTGGTATTCGAGGAGTATGCCT
GTTTGAGTCTCATGGAATTCTCAACCCCTAAAT
TTGTAATGAAGTTTAGTGGGCTTGGACTTGGAG
GTTGTGTCGGCTTCTAGTTCGACTCCTCTGAAATG
CATTAGCGTGAATCTTACGGATCGCCTTCAGTGT
GATAATTATCTGCGCTGTGGTGTTGAAGTATTTA
TTAGTTTCATGCTTATAGTCGTCTCTTATCGAGAC
AATTTATGACAATCTGAGCTCAAATCAGGTAGG
ACTACCCGCTGAACCTTAAGCATATCAATAAGCGG
AGGAAAT。

该研究分离纯化的菌株序列与 GenBank 中的已有

序列进行比较,与撕裂蜡孔菌(*Ceriporia lacerata*)同源率为99%。

2.3 撕裂蜡孔菌生理特性试验

2.3.1 不同 pH 值对病菌菌丝生长的影响 由表1可以看出,此菌在 pH 3.0~11.0 均能生长,在 pH 4.0~7.0 生长较快,生长最适宜 pH 为 6.0,表明病原菌有较强的耐盐碱能力,但最适宜在偏酸的环境中生长。

表1 pH 值对撕裂蜡孔菌菌丝生长的影响

Table 1 Effect of pH on growth of *Ceriporia lacerata* mycelium

pH 值	2.0	3.0	4.0	5.0	6.0	7.0	8.0	9.0	10.0	11.0	12.0
菌落直径/cm	0	5.21	7.33	7.61	7.87	7.00	5.27	4.76	4.07	1.56	0

2.3.2 不同温度对病菌菌丝生长的影响 该病菌在4℃冰箱中,仍可以生长,因条件所限,没有测出最低生长温度。可以确定最低生长温度<4℃。最适生长温度为32~34℃。在此温度下,菌丝日生长速率达到了2.17 cm/d。最高生长温度38℃,致死温度42℃。

3 结论与讨论

从樱桃根茎腐烂部位分离到的致病菌经 ITS 序列分析鉴定,确定为撕裂蜡孔菌,接种结果表明,该病菌可引起樱桃的根茎腐烂,该菌在 pH 4.0~7.0 生长较快,最适宜 pH 为 6.0;最适生长温度为32~34℃,最高生长温度38℃,致死温度42℃。

关于撕裂蜡孔菌的研究,Jae-Won Lee 等^[2]试验撕裂蜡孔菌作为生物工程前处理中分解木质素。四川农业大学的岳爱玲等^[3]在四川冕宁的树木上分离得到过1株撕裂蜡孔菌。2006 年网络上有篇报道是中国科学院沈阳应用生态研究所的崔宝凯^[4]在紫金山考察时发现撕裂蜡孔菌,为中国新记录种,是白腐菌中的一员,能全部或部分降解木材中的木质素、纤维素和半纤维素,促进生态系中物质的循环。

撕裂蜡孔菌作为致病菌,该研究属首次报道。结合前人研究可认为,撕裂蜡孔菌具有降解木质素和纤维素等物质的能力,可在生物工程中利用;但在农业生产中,却可以引起樱桃根茎腐烂病,对生产造成重大损失。

参考文献

- [1] 李静,赵筱萌,王雪薇. 毛壳属 *Chaetomium* 真菌的生长温度特征及其分类学价值[J]. 菌物学报,2012,31(2):213-222.
- [2] Jae-Won Lee, ki-Seob Gwak, Jun-Yeong Park. Biological pretreatment of softwood pinus densiflora by three white rot fungi[J]. The Journal of Microbiology,2007(10):485-491.
- [3] 岳爱玲,张悦,姚琼,等. 一株撕裂蜡孔菌的分离培养及其系统发育分析[J]. 生物技术,2010,20(5):47-50.
- [4] 崔宝凯. 紫金山新发现一种多孔菌[DB/OL]. <http://news.sina.com.cn/c/edu/2006-05-19/07298965711s.shtml/>.

Study on Isolation and Identification Fungi Pathogen Causing Root Crown Rot in Cherry

LI Shu-ping, LIU Mei-ying, SUN Qing-tian, JIANG Xue-ling, LI Yan-ju, ZHANG Fu-xing
(Yantai Academy of Agricultural Sciences, Yantai, Shandong 265500)

六种常用杀虫剂对豆蚜的毒力测定及田间防效

官亚军, 石宝才, 康总江, 王泽华, 朱 亮, 魏书军

(北京市农林科学院 植物保护环境保护研究所, 北京 100097)

摘 要:以豆蚜为供试虫源,采用室内毒力测定和田间药效试验方法,测定了6种药剂对豆蚜的敏感性。结果表明:供试豆蚜对74.6%甲氨基阿维菌素苯甲酸盐产生极高的抗性,当测试浓度达1 000 mg/L时,24 h校正死亡率仅为30.36%,对95%高效氯氰菊酯的敏感性最高,半数致死浓度(LC₅₀)为8.1609 mg/L。6种药剂对豆蚜的毒杀效果依次为:95%高效氯氰菊酯>95%毒死蜱>98%啶虫脒>94%阿维菌素>96%吡虫啉>74.6%甲氨基阿维菌素苯甲酸盐。田间试验结果表明:除甲氨基阿维菌素苯甲酸盐外,其余5种药剂均对豆蚜具有非常好的防效,施药后3、7 d的防效均达99%以上。除74.6%甲氨基阿维菌素苯甲酸盐外,目前使用的多数药剂对豆蚜具有较好的防治效果。

关键词:药剂;豆蚜;生物测定;田间防治效果

中图分类号:S 436.43 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2013)15-0132-03

豆蚜(*Aphis craccivora* Koch)属半翅目蚜科,在全世界广泛分布。据报道该蚜寄主植物非常广,可达200余种,并能传播40余种植物病毒病,是豆科植物的主要害虫^[1]。由于豆蚜生活周期短,繁殖速度快,4~6 d可完成1代,每头成蚜可产若蚜达100余头,使种群密度升高,适应性强,极易发生猖獗,曾给花生、蚕豆、苜蓿及豆类蔬菜等作物造成了严重危害^[2]。为控制豆蚜危害,国内外长期采用化学药剂防治,致使豆蚜的抗药性迅速发

展,一些地区已对有机磷、氨基甲酸酯、烟碱类、拟除虫菊酯类等杀虫剂产生了不同程度的耐药性^[3-5]。同时,由于频繁用药,污染问题已严重影响蔬菜品质,海南毒豇豆曾给农民造成了严重损失。因此,明确不同种类农药对豆蚜的控制效果,选择高效低毒农药品种,减少农药的污染已成为蔬菜生产研究中的主要任务之一^[6]。为明确常用杀虫剂对豆蚜的毒力及在田间的控制效果,现选用6种常用杀虫剂对豆蚜开展了毒力测定和田间药效试验,为田间更好地控制豆蚜的危害提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试虫源:豆蚜(*Aphis craccivora* Koch)采自北京市农林科学院植物保护环境保护研究所塑料大棚中的豇豆上。

供试杀虫剂:用于室内毒力测定的药剂均为原药,分别为96%吡虫啉(Imidacloprid)、95%毒死蜱(Chlorpyrifos)、95%高效氯氰菊酯(Beta-cypermethrin)(成都科利隆生化有限公司)、98%啶虫脒(Acetamiprid)(江苏龙灯化学有限公司)、74.6%甲氨基阿维菌素苯甲

第一作者简介:官亚军(1961-),女,山东淄博人,本科,副研究员,现主要从事蔬菜害虫综合治理等研究工作。E-mail: gongyajun2003@yahoo.com.cn.

责任作者:魏书军(1981-),男,山东日照人,博士,现主要从事害虫综合治理等研究工作。Email:shujun268@163.com.

基金项目:国家重点基础研究发展计划资助项目(2009CB119004);北京市科技计划资助项目(Z0906050060009017);北京市科技新星计划资助项目(2010B027);北京市优秀人才培养资助项目(2010D002020000010);北京市农林科学院科技创新能力建设专项资助项目(KJCX201104009)。

收稿日期:2013-04-03

Abstract: Taking cherry collar rot tree as material, the pathogen was isolated and purified, and its pathogenicity was tested and r-DNA-ITS sequence was analyzed. The effect of pH and temperature on growth of mycelium were also studied. The results showed that four strains were isolated but only one strain could cause cherry collar rot. The pathogen was *Ceriporia lacerate* based on r-DNA-ITS sequence analysis. The ideal pH for mycelium was 4.0~7.0, the optimum pH was 6.0. The optimum growth temperature for the mycelium was 32~34°C, the maximum growth temperature was 38°C and the lethal temperature was 42°C.

Key words: cherry; root crown rot; *Ceriporia lacerate*