

DOI:10.11937/bfyy.201615027

新疆加工辣椒根腐病原鉴定

方晓翠, 屈荷丽, 赵思峰, 郭开发, 马 明

(石河子大学 农学院, 绿洲农作物病害治理与植保资源利用自治区高校重点实验室, 新疆 石河子 832003)

摘 要:以制干辣椒根腐病病样为分离对象,采用形态学和分子生物学方法对致病菌进行鉴定。结果表明:共采集根腐病样 211 个,从中分离获得 161 个分离物,其中镰刀菌 *Fusarium* spp. 121 个,占总分离物的 75.16%;其它菌 40 个,占 24.84%,说明镰刀菌是新疆加工辣椒的主要致病菌。经致病性测定后,采用形态学观察结合 18S rDNA-ITS、EF-1 α 和 β -tubulin 3 个序列分析,将 80 株有致病性的镰刀菌鉴定为尖孢镰刀菌(*F. oxysporum*)和茄病镰刀菌(*F. solani*),其中尖孢镰刀菌 57 株,占镰刀菌分离物的 47.11%;茄病镰刀菌 23 株,占 19.01%。

关键词:新疆;加工辣椒;根腐病;尖孢镰刀菌;茄病镰刀菌

中图分类号:S 436.418.1⁺9 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2016)15-0108-05

新疆自然气候条件非常适合以生产制干椒、酱制和提取辣椒碱、辣椒红素等加工专用品种的制干辣椒种植,年种植面积达 6.9 万 hm^2 ,总产量突破 138.0 万 t,在促进新疆农业产业结构调整和农民增收中发挥了重要作用^[1]。随着种植面积和种植年限的增加,辣椒根腐病的发生日趋严重,轻病田发病率一般为 10%~30%,重病田发病则可达 50%以上,甚至全田死亡,给辣椒生产造成严重损失^[2]。目前报道的能引起辣椒根部病害的病原菌有疫霉菌^[3]、丝核菌^[4]和镰刀菌^[5-6],然而新疆加工辣椒根腐病的病原菌种类尚鲜见系统的研究和报道。该研究从新疆加工辣椒主要种植区采集根腐病病样进行分离,对分离物进行致病性测定后,采用形态学和分子生物学方法和技术对病原菌鉴定,以期明确新疆加工辣椒病原菌的主要类群,为其有效防治提供理论和技术依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

从 2014 年 6 月至 2015 年 9 月,分别从新疆巴音郭楞蒙古自治州、奎屯和石河子等加工辣椒主产区采集典型辣椒根腐病病样 211 个,具体采样地点及样品个数见表 1。

马铃薯葡萄糖培养基(PDA):去皮马铃薯 200 g,葡

萄糖 20 g,琼脂 18 g,水 1 000 mL,pH 6.8;马铃薯蔗糖培养基(PSA):去皮马铃薯 200 g,蔗糖 20 g,琼脂 20 g,蒸馏水 1 000 mL,pH 6.8;Bilia's 培养基:磷酸二氢钾(KH_2PO_4) 1 g,硝酸钾(KNO_3) 1 g,硫酸镁($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) 0.5 g,氯化钾(KCl) 0.5 g,淀粉 0.2 g,蔗糖 1 g,葡萄糖 0.2 g,琼脂 20 g,蒸馏水 1 000 mL;水琼脂培养基(WA):琼脂 20 g,水 1 000 mL;米饭培养基:米平铺于皿底,加适量无菌水,120 °C 高压湿热灭菌;察氏液体培养基:硝酸钠 3 g,磷酸氢二钾 1 g,硫酸镁 0.5 g,氯化钾 0.5 g,硫酸亚铁 0.01 g,蔗糖 30 g,琼脂 15 g;大麦棉籽壳培养基:大麦浸泡过夜,大麦:棉籽壳=3:1 比例混匀,120 °C 高压湿热灭菌^[7]。

1.2 试验方法

1.2.1 病原分离和纯化 采用常规组织分离法^[7]在 PDA 平板上分离病原菌,待分离物长出后,在 WA 平板上进行单胞纯化,将纯化后获得的菌株保存在 PDA 斜面上,置 4 °C 冰箱中储存备用。

1.2.2 致病性测定 采用菌土法进行测定,将 $1 \times 10^4 \text{ cfu} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的孢子悬浮液接种于大麦棉籽壳培养基中,25 °C 培养 7 d,以 1:5 的比例与无菌土混匀后装入 12 cm×13 cm 营养钵内,每个营养钵内播种 10 粒辣椒种子,以无菌土为对照,每处理设置 3 次重复。辣椒出苗后,从初次发病起,每 3 d 调查 1 次发病情况,并对病株进行再分离。

1.2.3 形态学鉴定 将待鉴定菌株接种于 PDA 平板上,25 °C 下培养 3 d,用孔径 5 mm 打孔器于菌落边缘取菌丝块,分别接种于 PDA、PSA 和 Bilia's 培养基上,25 °C 下培养,4 d 后测量 PSA 上菌落的生长直径,7 d 后观察菌落 PSA、PDA、Bilia's 培养基上菌落形态,挑取 3 种培

第一作者简介:方晓翠(1990-),女,硕士研究生,研究方向为植物菌物病害及其防治。E-mail:1187343513@qq.com.

责任作者:赵思峰(1975-),男,博士,教授,研究方向为植物病害生物防治。E-mail:zhsf_agr@shzu.edu.cn.

基金项目:新疆生产建设兵团科技支疆专项资助项目(2014AB019)。

收稿日期:2016-04-20

培养基上的菌丝及孢子制备玻片,对大孢子、小孢子以及厚垣孢子的形态、大小进行测量和观察。另挑取少量菌丝进行小室培养,在 25 °C 下培养,2 d 后观察产孢细胞和小型分生孢子着生方式。参照 BOOTH^[8] 和 NELSON 等^[9] 的方法进行镰刀菌鉴定。

1.2.4 分子鉴定 依据形态学鉴定的结果,挑选 15 个代表菌株,在 PDA 平板上培养 3 d 后,用直径为 5 mm 打孔器取菌饼,接种于装有 200 mL 察氏液体培养基的 500 mL 三角瓶中,28 °C,1 800 r·min⁻¹ 摇床培养 3 d。用纱布过滤并用无菌水冲洗菌丝直至澄清,晾干。通过 CTAB 法^[10] 提取病原物基因组 DNA,采用通用引物 ITS1 和 ITS4^[11],引物 Beta-F 和 Beta-R,引物 EF-1F 和 EF-2R^[12] 分别扩增真菌 18S rDNA ITS、 β -tubulin 和延伸因子序列。25 μ L 的 PCR 反应体系中包含 Mix 10 μ L, ddH₂O 12.5 μ L,上游引物(10 μ mol·L⁻¹) 1 μ L,下游引物(10 μ mol·L⁻¹) 1 μ L,模板 DNA 1 μ L。ITS1/ITS4 PCR 扩增条件:94 °C 变性 4 min,接着 30 个循环:变性 94 °C 40 s,复性 55 °C 1 min,延伸 72 °C 1 min,最终延伸 72 °C 10 min。Beta-F/Beta-R PCR 扩增条件:94 °C 变性 3 min,接着 30 个循环:变性 94 °C 30 s,复性 60 °C 1 min,延伸 72 °C 1 min,最终延伸 72 °C 10 min。EF-1F/EF-2R PCR 扩增条件:94 °C 变性 3 min,接着 35 个循环:变性

94 °C 45 s,复性 52 °C 1 min,延伸 72 °C 1 min,最终延伸 72 °C 10 min。PCR 产物经 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测后,委托上海生工生物公司测序。测序后的序列经校正后,在 GenBank 中进行 Blast 搜索,比较测试菌株与现有数据库中相应序列的相似程度,用 MEGA 软件进行比对并构建系统树,采用 Bootstrap 法检验系统树,自展数据集为 1 000 次。

1.3 数据分析

采用 Excel 2007 软件对试验数据进行统计分析。

2 结果与分析

2.1 样品采集及病原菌分离结果

从表 1 可知,从新疆制干辣椒主产区巴音郭楞蒙古自治州兵团第二师 21 团、22 团,焉耆县,兵团第八师 143 团,北泉镇,第六师 105 团,第七师 131 团,昌吉回族自治州呼图壁县以及伊犁哈萨克自治州沙湾县共计采集典型辣椒根腐病样品 211 个,从中分离获得真菌分离物 161 个,其中镰刀菌 121 个,占总分离物的 75.16%;丝核菌 20 个,占 12.42%;其它真菌 20 个,占 12.42%。从分离物统计数目来看,镰刀菌是新疆制干辣椒根腐病样品上的主要分离物,且在所有主产区样品上均分离到了镰刀菌。

表 1 辣椒根腐病病样采集及菌株的分离

Table 1 Sample collection of pepper root rot disease and the isolation of strains

采样地点 Collection site	田块数 No. of plots	样品数 No. of samples	丝核菌 <i>Rhizoctonia</i>	镰刀菌 <i>Fusarium</i>	其它 Other
巴音郭楞蒙古自治州兵团第二师 21 团	4	41	5	30	4
巴音郭楞蒙古自治州兵团第二师 22 团	5	51	3	47	0
巴音郭楞蒙古自治州焉耆县查汗采开乡	1	7	1	6	0
兵团第八师石河子市 143 团	3	22	3	3	4
兵团第八师石河子市北泉镇	1	6	0	2	0
昌吉回族自治州兵团第六师 105 团	2	11	0	4	1
伊犁哈萨克自治州兵团第七师 131 团	1	8	1	3	1
昌吉回族自治州呼图壁县大丰镇	2	17	2	7	3
伊犁哈萨克自治州沙湾县金沟河镇	3	27	2	6	3
伊犁哈萨克自治州沙湾县安集海镇	3	21	3	13	4
合计	25	211	20	121	20

2.2 致病性测定

将分离获得的镰刀菌接种辣椒后,有 80 个分离物对接种的辣椒表现出致病性。辣椒苗在 2 片子叶完全展开时,辣椒茎基部呈现水渍状病斑。7 d 后病斑颜色变褐,14 d 后病斑颜色变深褐色,茎基部缢缩,部分叶片脱落,21 d 后病斑面积约占根茎总面积的 1/2,植株萎蔫(图 1)。28 d 后植物枯死。

2.3 形态学鉴定

将 80 个致病菌按照培养特征可以分为两大类,其中以 N2S-21-53 为代表的菌株培养特性基本一致。菌落在 PDA 平板上气生菌丝茂盛呈白色绒状,背面初无色,后逐渐产生浅紫色至深紫色的色素。小型分生孢子,数量多,0~1 个分隔,卵圆或肾形,大小为(5.1~11.8) μ m \times

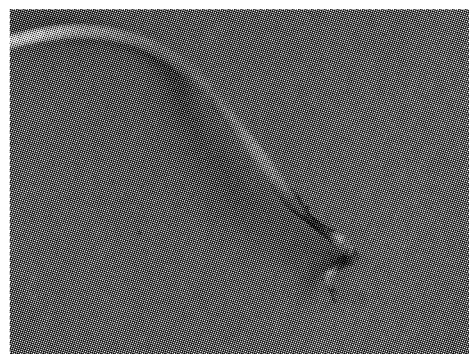
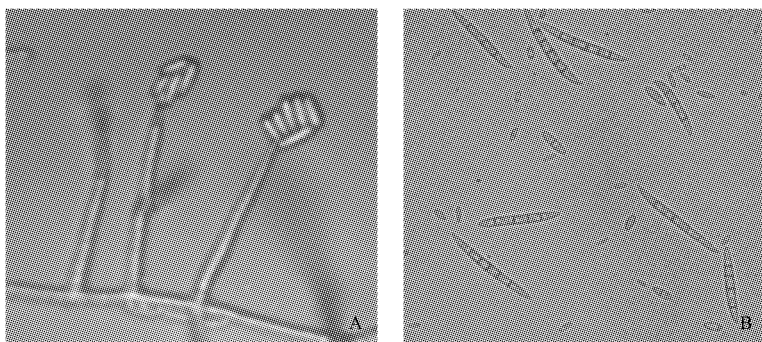


图 1 镰刀菌接种症状

Fig. 1 Symptoms of *Fusarium* inoculation

(2.5~2.6) μm ,假头状着生(图 2A);大型分生孢子美丽形稍弯两端渐尖,基胞足跟不明显,1~6 隔,多以 3 分隔为主,大小为(10.5~59.5) $\mu\text{m} \times (2.5 \sim 5.8)$ μm (图 2B)。菌落在 PSA 平板上气生菌丝绒状,初粉色或白色,有时产生蓝绿色菌丝团。在 Bilia's 培养基上气生菌丝

稀疏,培养基不变色。在米饭培养基上气生菌丝茂盛,絮状,粉红色至深红色。依据形态特征将病原菌鉴定为尖孢镰刀菌 *Fusarium oxysporum*,共 57 株,占镰刀菌分离物的 47.11%。



注:A. 小型分生孢子着生;B. 大型分生孢子。

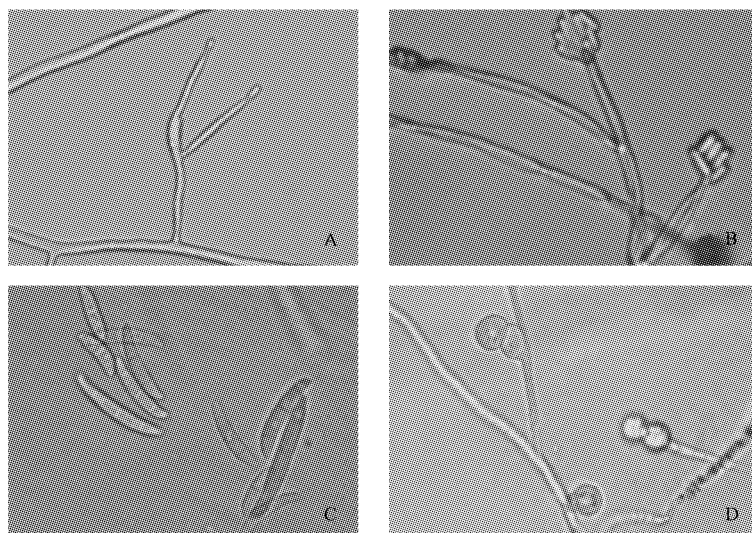
Note: A. Microconidia; B. Macroconidia.

图 2 *Fusarium oxysporum* 形态特征

Fig. 2 Morphology of *Fusarium oxysporum*

以 N2S-21-LFL 为代表的一类菌株表现基本一致。菌落在 PDA 上气生菌丝茂盛绒状,白色至灰色。小型分生孢子数量多,卵圆或肾形,假头状着生方式,大小为(8.2~14.6) $\mu\text{m} \times (2.5 \sim 4.0)$ μm ;大型分生孢子马特形稍弯,两端较钝圆,基胞足跟不明显,2~8 隔,多以 3~5 隔为主,大小为(10.0~73.7) $\mu\text{m} \times (2.5 \sim$

6.9) μm ,可产生大量厚垣孢子。在 PSA 平板上气生菌丝绒状,白色至浅灰色,平均生长速度为 $8.6 \text{ mm} \cdot \text{d}^{-1}$ 。Bilia's 培养基上菌丝,白色;米饭培养基上,有浅咖啡色色素产生。依据形态特征将病原菌鉴定为茄病镰孢菌 *Fusarium solani*,共 23 株,占镰刀菌分离物的 19.01%,见图 3。



注:A. 产孢细胞;B. 小型分生孢子;C. 大型分生孢子;D. 厚垣孢子。

Note: A. Sporogenous cell; B. Microconidia; C. Macroconidia; D. Chlamydospores.

图 3 *Fusarium solani* 的形态特征

Fig. 3 Morphology of *Fusarium solani*

2.4 分子鉴定结果

15 个代表菌株的 DNA 提取后经电泳检测,所得 DNA 片段约为 2 000 bp。经 PCR 扩增后分别获得了长度 550、500、700 bp 的清晰条带,经测序后比对,并挑选

NCBI 中的镰刀菌序列分别构建系统发育树,结果表明,基于 ITS 序列构建的系统发育树中,N2S-21-53 菌株和 N2S-22,25-1 菌株与 *F. oxysporum* 相似率达到 99%,N2S-22,25 28 和 N2S-21-LFL 与 *F. solani* 相似率达到

99%(图4)。基于 β -tubulin序列基因构建的系统发育树中,N2S-21-53菌株和N2S-22,25-1菌株与*F. oxysporum*相似率达到99%,N2S-22,25 28菌株和N2S-21-LFL菌株与*F. solani*相似率达到99%(图5)。基于TEF-1 α 序列基因构建的系统发育树中,N2S-21-53菌株和N2S-22,25-1菌株与*F. oxysporum*相似率达到99%,N2S-22,25 28菌株和N2S-21-LFL菌株与*F. solani*相似率达到99%(图6)。通过形态学和分子生物学鉴定,明确了新疆加工辣椒根腐病的主要病原菌为尖孢镰刀菌和茄病镰刀菌。

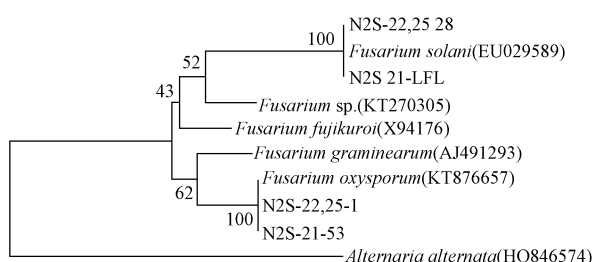


图4 基于ITS序列构建的系统发育树

Fig. 4 The NJ tree of strains inferred from partial ITS sequences data

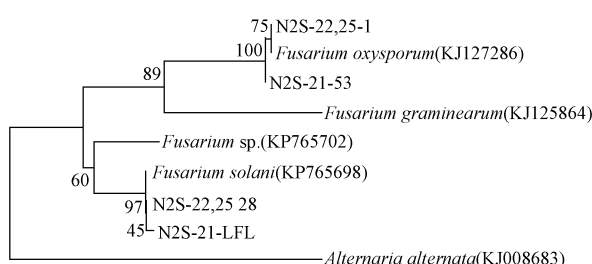


图5 基于 β -tubulin序列构建的系统发育树

Fig. 5 The NJ tree of strains inferred from partial β -tubulin sequences data

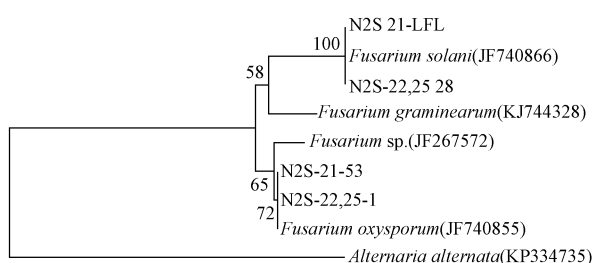


图6 基于TEF-1 α 序列构建的系统发育树

Fig. 6 The NJ tree of strains inferred from partial TEF-1 α sequences data

3 结论与讨论

该研究自2014—2015年分别从新疆制干辣椒主产区采集辣椒根腐病典型病样211个,从中分离到真菌分离物161个,其中镰刀菌121个,占总分离物的75.16%;

丝核菌20个,占12.42%;其它真菌占12.42%。镰刀菌是新疆制干辣椒根腐病样品上的主要分离物,且在所有产区根腐病样品上均分离到了镰刀菌。将镰刀菌接种辣椒后,有80个分离物对辣椒表现出致病性,说明镰刀菌是新疆制干辣椒根腐病的主要病原菌。对80株镰刀菌采用形态学方法和基于ITS、 β -tubulin和TEF-1 α 序列分析的分子生物学方法进行鉴定,结果表明,尖孢镰刀菌(*F. oxysporum*)有57株,是主要的致病菌,占镰刀菌分离物的47.11%;茄病镰孢菌(*F. solani*)有23株,占19.01%。

可引起辣椒根腐病的病原菌主要有辣椒疫霉^[3,13]、丝核菌^[4]、镰刀菌^[5-6,14]和大丽轮枝菌等^[15]。因各地辣椒栽培品种、栽培模式以及土壤地理条件的差异,从而导致辣椒根腐病病原种类存在差异性。该研究结果证明,新疆加工辣椒根腐病的病原菌主要为尖孢镰刀菌(*F. oxysporum*)和茄病镰刀菌(*F. solani*),但鉴定出的尖孢镰刀菌是否可以导致辣椒枯萎病,还需要进一步鉴定和证实,这与董红强等^[14]报道的引起新疆阿克苏地区辣椒枯萎病的病菌为尖孢镰刀菌的结果有一定差别。该研究结果明确了新疆加工辣椒根腐病的病原种类,对于有效防治加工辣椒根腐病具有一定的指导意义。

参考文献

- [1] 管晶晶,李克梅,罗明,等.新疆加工型辣椒细菌性斑点病的发生和病原鉴定[J].植物病理学报,2015,45(3):239-247.
- [2] 赵彦珍,田生辉.乌鲁木齐市安宁渠地区辣椒根腐病综合防治技术研究[J].现代农业科技,2014(18):141,146.
- [3] 李国英,张祥林,尹玉琦,等.新疆辣椒疫霉菌的越冬规律[J].植物病理学报,1995,25(2):161-165.
- [4] 李克梅,张春竹,楚金萍,等.加工辣椒立枯病的药剂室内筛选研究[J].新疆农业科学,2013,50(11):2103-2108.
- [5] 曲春鹤,何付丽,刘培福,等.辣椒根腐病拮抗细菌的筛选、鉴定及其抑菌促生作用[J].东北农业大学学报,2012,43(7):89-94.
- [6] 陈彦,刘长远,王晓红,等.辣椒根腐病化学防治田间试验[J].植物保护,2008,34(6):150-152.
- [7] 方中达.植病研究方法[M].3版.北京:中国农业出版社,1998:24-151.
- [8] BOOTH C. The genus *Fusarium* [M]. England: CMI Kew Surrey, 1971.
- [9] NELSON P E, TOUSSOUN T A, CLARK R J. *Fusarium*: diseases, biology and taxonomy [J]. Mycologia, 1983, 75(1): 190-191.
- [10] 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.
- [11] 郑雪芳,蓝江林,曹宜,等.瓜类作物枯萎病病原菌的分类鉴定及其ITS序列差异性分析[J].中国农业科学,2008,41(12):4077-4084.
- [12] 吕顺,曾莉莎,刘文清,等.大蕉枯萎病病原菌鉴定及TEF-1 α 序列分析[J].植物病理学报,2014,44(4):337-348.
- [13] 杨明英,曹继芬,李向东,等.辣椒苗期不同生长阶段对疫霉根腐病的抗性研究[J].西南农业学报,2015,28(1):155-158.
- [14] 董红强,顾晓惠,时慧敏.阿克苏地区辣椒枯萎病的症状观察和病原鉴定[J].塔里木农垦大学学报,2004,16(2):21-22.
- [15] 陆家云,余长福,鞠里红.大丽轮枝菌在辣椒上致病力的分化[J].植物病理学报,1984,14(4):213-217.

DOI:10.11937/bfyy.201615028

河北昌黎产区酿酒葡萄“赤霞珠” 霜霉病发生情况调查

庞建^{1,2}, 孔繁芳³, 严斌², 张振文¹, 王忠跃³, 井立军⁴(1. 西北农林科技大学 葡萄酒学院, 陕西 杨凌 712100; 2. 中粮华夏长城葡萄酒有限公司, 河北 昌黎 066600;
3. 中国农业科学院 植物保护研究所, 北京 100193; 4. 河北科技师范学院 园艺科技学院, 河北 昌黎 066600)

摘 要:以酿酒葡萄“赤霞珠”为试验材料,调查了 2012—2014 年昌黎产区酿酒葡萄“赤霞珠”霜霉病的发生情况。结果表明:葡萄霜霉病在昌黎产区一般从 6 月下旬开始出现,7—8 月是发病高峰期;对葡萄霜霉病的病情指数和气象因子进行相关分析表明,温度、降雨量及空气相对湿度对葡萄霜霉病发生影响较大,昼夜温差和日照时数对该病的发生没有显著影响。

关键词:昌黎;“赤霞珠”葡萄;霜霉病;调查

中图分类号:S 436.631.1⁺9(222) **文献标识码:**B **文章编号:**1001-0009(2016)15-0112-04

昌黎县葡萄产区大部分位于昌黎西北部山区,地处东经 118°45′~119°20′、北纬 39°22′~39°48′,属季风区、暖温带、半湿润大陆性气候。东临渤海、北依燕山、西南挟滦河,受山、海、河的影响形成了独特的区域性特点,被誉为“东方的波尔多”,昌黎县自 20 世纪 80 年代初开始种植酿酒葡萄发展至今,全县种植面积近 0.3 万 hm²,

种植的品种有“赤霞珠”“霞多丽”“梅鹿辄”等品种,但主要以“赤霞珠”为主,种植面积达 0.13 万 hm²^[1-3],近年来随着气候因素的变化,酿酒葡萄病虫害发生也较多,不仅影响酒的品质,而且会造成严重的损失。因此,该研究在昌黎县中粮华夏长城葡萄酒有限公司基地进行,以酿酒葡萄“赤霞珠”为试验材料,于 2012—2014 年连续 3 年对该品种的葡萄霜霉病害发生情况进行了调查,旨在找出该产区葡萄霜霉病的发生时期及发病规律,为该病的有效防治提供一定的理论基础。

1 材料与方法

1.1 试验地概况

试验于 2012—2014 年在昌黎县中粮华夏长城葡萄

第一作者简介:庞建(1982-),女,本科,工程师,研究方向为葡萄栽培及葡萄酒酿造。E-mail:hxpangjian@163.com.

责任作者:张振文(1960-),男,教授,博士生导师,研究方向为葡萄生态与生理及葡萄栽培技术。E-mail:zhangzhw60@nwsuaf.edu.cn.

收稿日期:2016-04-15

Pathogen Identification of Processing Chili Pepper Root Rot Disease in Xinjiang

FANG Xiaocui, QU Heli, ZHAO Sifeng, GUO Kaifa, MA Ming

(College of Agriculture, Shihezi University/Key Laboratory at the Universities of Xinjiang Uygur Autonomous Region for Oasis Agricultural Pest Management and Plant Protection Resource Utilization, Shihezi, Xinjiang 832003)

Abstract: To isolate and identify pathogen of processing chili pepper root rot disease in Xinjiang. A total of 211 samples were collected from different main production areas in Xinjiang. The pathogens which caused root rot of processing chili pepper were isolated and *Fusarium* isolates were identified according to the morphological features of culture and 18S rDNA-ITS, EF-1 α , β -tubulin gene sequences analysed of representative strains. The results showed that 211 samples of root rot diseased chili pepper plant were collected and 161 isolates were obtained. 121 of these, 75.16% of the total isolates, belonged to *Fusarium* which were the main pathogen for root rot of processing chili pepper in Xinjiang. 80 isolates with pathogenicity were identified to class into two different species, e. g. *Fusarium oxysporum* and *Fusarium solani*. *Fusarium oxysporum* were 57 strains, accounted for 47.11%, *Fusarium solani* were 23 strains, accounted for 19.01%.

Keywords: Xinjiang; processing chili pepper; root rot disease; *Fusarium oxysporum*; *Fusarium solani*