

草莓褐斑病的病原鉴定及其生物学特性观察*

吕锐玲^{1,2} 谢甲涛¹ 付艳萍^{1*} 姜道宏¹

1. 华中农业大学植物科学技术学院/湖北省作物病害监测和安全控制重点实验室, 武汉 430070;

2. 湖北省黄冈市农业科学院, 黄冈 438000

摘要 采用柯赫氏法和 ITS DNA 序列分析对草莓褐斑病的病原进行确认和鉴定。结果表明:草莓褐斑病病原在病叶及 PDA 培养基上均可产生分生孢子器及分生孢子;分生孢子器球形、黑色,分生孢子梗瓶梗状,具分枝;分生孢子卵圆形至纺锤形、透明、单细胞,大小为(5.7~7.3) μm × (2.0~3.0) μm ;根据病菌形态,确定该病原菌为昏暗拟茎点霉 *Phomopsis obscurans* (Ellis & Everh.) B. Sutton。生物学特性观察结果表明:该病原菌菌丝生长和产孢的最适温度为 25~30 $^{\circ}\text{C}$, 生长和产孢最适 pH 值为 6, 光照对菌丝生长和产孢均有促进作用。

关键词 草莓褐斑病;病原;鉴定

中图分类号 S 432.4⁺4; S 663 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2010)04-0427-04

草莓褐斑病,又称轮纹病、轮斑病、褐色轮斑病,在我国各个草莓产区均有发生,一般植株发病率为 25.8%~52.3%。该病主要危害叶片,病斑红褐色到紫色、近圆形或不规则形,病斑上密生黑色点状物。国内外对该病害的发生和危害都进行过较为详细的报道^[1-4],但对其病原菌的形态学描述和生物学特性报道很少。笔者对草莓褐斑病的病原菌进行了形态学和分子学鉴定,并对其生物学特性进行了观察,旨在为草莓褐斑病的防治提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 供试材料

草莓褐斑病样品采自湖北省农业科学院草莓基地日光温室中发病草莓苗。马铃薯葡萄糖琼脂(PDA)培养基用于病菌的分离、培养和保存。将病菌的分生孢子涂布于灭菌滤纸圆片上,自然干燥后置于-20 $^{\circ}\text{C}$ 下保存备用。

1.2 病原菌的组织分离

采用组织分离法^[5]进行病原菌的组织分离。从发病草莓叶片上选取具有典型病斑的部位,用剪刀在病健交界处剪取 4 mm²的病组织,在 70%的乙醇中消毒 3~5 s,再经 0.1%的升汞消毒 1 min,用无菌水清洗 3 次。将清洗干净的病组织放入加有 25%乳酸的 PDA 培养基中,每个皿中放 4~5 块,

25 $^{\circ}\text{C}$ 培养 2~3 d,待菌落长出后挑取边缘部分转至另一新鲜 PDA 平板上。反复纯化几次,待长出孢子后再进行单孢分离。

1.3 病原菌的确认

对分离获得的 8 个菌株采用柯赫氏法进行病原物的确认。选用健康、完整的草莓叶片,用自来水冲洗表面灰尘,将活化 2~3 d 的菌株沿菌落边缘用无菌的打孔器打取菌丝块,以接种空白琼脂块为对照,5 d 后观察结果。从人工接种发病的病斑上按常规方法分离病原菌,并与接种菌株进行形态学比较。

1.4 病原菌的形态观察

在 PDA 平板上生长 10 d(25 $^{\circ}\text{C}$,有光照)后观察其菌落形态,30 d 后菌落中长出墨绿色的球状物(分生孢子器),35 d 后球状物成熟呈黑色。在玻片上滴 1 滴无菌水,用镊子取分生孢子器放在水中并盖上盖玻片,在显微镜下观察分生孢子和分生孢子梗的形态特征。

1.5 病原菌的分子鉴定

选取典型菌株 CM-6 进行分子鉴定。将培养 2~3 d 的菌株沿菌落边沿挑取 5 个菌丝块,加入到装有 80 mL PDB 的三角瓶中,100 r/min、25 $^{\circ}\text{C}$ 恒温培养 5 d,用 4 层纱布过滤并挤干水分后,置于-80 $^{\circ}\text{C}$ 保存。采用 CTAB 法提取菌株 CM-6 的基因组 DNA,并参考 Sambrook 等^[6]的方法进行。

收稿日期:2009-09-08; 修回日期:2010-04-06

* 教育部新世纪优秀人才支持计划项目(NCET-06-0665)资助

** 通讯作者. E-mail: yanpingfu@mail.hzau.edu.cn

吕锐玲,女,1982 生,硕士. 研究方向:园艺植物病理学. E-mail: ruilinglv@126.com

采用真菌 ITS 通用引物 ITS1 (5'-TCC GTA GGT GAA CCT GCG G-3') 和 ITS4 (5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3') 扩增病原菌包含 ITS1、5.8S rDNA、ITS2 和部分的 18S rDNA 和 28S rDNA 的 DNA 片段^[7]。按常规设置 PCR 反应体系于 DNA 扩增仪 (PTC-100, MJ Research) 上进行扩增。PCR 扩增反应程序如下: 94 °C 预变性 4 min; 94 °C 1 min, 54 °C 1 min, 72 °C 1 min, 35 个循环; 72 °C 10 min。利用 DNA 回收试剂盒 (博大泰克) 回收 PCR 扩增产物, 参照试剂盒说明书上的方法进行。将纯化回收的 DNA 和载体 pMD18-T (TAKARA, 大连) 连接。采用电击方法将连接产物导入大肠杆菌 JM109, 在含 Amp/IPTG/X2gal 的 LB 抗性平板 (Amp: 50 μg/mL) 上筛选培养。挑取转化子于 2 mL LB 液体培养基 (Amp: 50 μg/mL) 中 37 °C 200 r/min 培养过夜。碱裂解法抽提质粒后, 采用双脱氧法测序, 引物为通用引物 M13。测序由北京三博远志服务公司完成。利用 DNAMAN 软件对序列进行分析。在 NCBI 网站 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) 上进行序列同源性比较 (basic local alignment search tool, BLAST), 推断并确定菌株的分类地位。

1.6 温度和光照对菌丝生长和产孢的影响

用直径为 0.3 cm 的无菌打孔器, 沿菌落的边缘打取菌龄一致的菌丝块接种于 PDA 平板中央, 分别置于 15、20、25、30、35、40 °C 共 6 个不同温度下培养 5 d, 每处理 5 个重复。放置于光照 12 h/黑暗 12 h 的人工气候箱中培养, 将培养皿放到黑色纸盒中作为无光照处理。用十字交叉法测量菌落直径。

将正常光照和黑暗培养 15 d 的菌株用直径为 0.8 cm 的打孔器在培养皿中随机打取 3 个菌丝块, 放入装有 1 mL 无菌水的 Eppendorf 管中, 漩涡振荡器上振荡 1 min, 用血球计数板计算孢子数目。每个处理 5 个重复。

1.7 pH 值对菌丝生长和产孢的影响

用直径为 0.3 cm 的无菌打孔器, 沿菌落的边缘打取菌龄一致的菌丝块接种于 PDA 平板中央, 分别置于 pH 值为 3、4、5、6、7、8、9、10 的 PDA 平板中央, pH 值用灭菌的 1 mol/L Tris-HCl 调配, 25 °C 光照下培养 5 d, 用十字交叉法测量菌落直径。每个处理 5 个重复。各 pH 值处理的孢子产量统计方法同本文“1.6”。

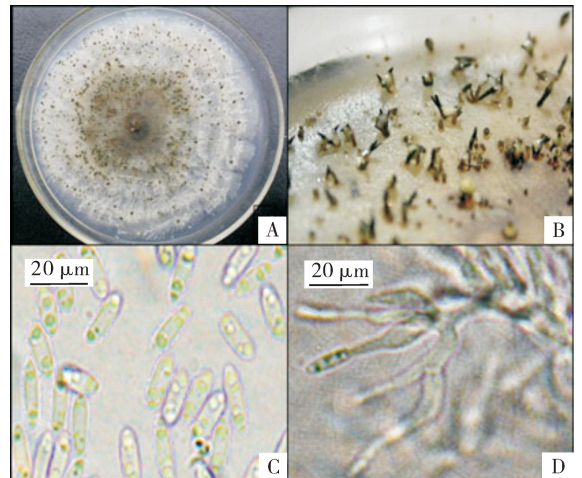
2 结果与分析

2.1 草莓褐斑病的发病症状

草莓褐斑病菌主要危害叶片, 并多从叶缘开始侵染。初期叶面出现紫褐色小斑点, 后期病斑中部灰白色、边缘紫红色, 并有明显的轮纹。病斑近圆形或不规则形, 其上密生黑色点状物。分离发病叶片获得菌株 CM-6, 将 CM-6 回接草莓叶片 5 d 后观察, 结果发现接种草莓离体叶片的发病症状类似草莓褐斑病田间发病叶片。对照草莓叶片未发病。

2.2 病原菌株的形态

CM-6 菌株菌丝在 PDA 平板上生长 10 d (25 °C, 有光照) 后开始伸入培养基内部生长, 在基质内形成树枝状乳白色分枝。10 d 后菌落中长出墨绿色的球状物 (即分生孢子器) (图 1-A), 继续培养后球状分生孢子器呈黑色, 并在上端开裂成鹿角状分枝 (图 1-B), 分枝 2~5 个或更多, 分枝上有黄白色黏液分泌, 取分泌物在显微镜下进行观测, 发现其中有大量的分生孢子。分生孢子卵圆形至纺锤形, 单细胞, (5.7~7.3) μm × (2.0~3.0) μm, 多数含 2 个油球, 但也有含 3 个、4 个或 5 个油球 (图 1-C)。分生孢子梗有分枝, (24.6~25.7) μm × (3.8~4.1) μm (图 1-D)。依据文献[8-10], 初步鉴定该病原为暗枝梗茎点霉属 *Phomopsis* 真菌。



A. 分生孢子器 (25 °C、10 d) Pycnidia at 25 °C for 10 d;
B. 分生孢子器 (25 °C、35 d) Pycnidia at 25 °C for 35 d;
C. 分生孢子 Conidia; D. 分生孢子梗 Branched conidiophore.

图 1 CM-6 菌株的分生孢子器、分生孢子梗和分生孢子形态 (PDA)

Fig. 1 Morphology of colony, conidiophore and conidia of pathogen of strain CM-6 produced on PDA plate

2.3 菌株的 ITS DNA 序列分析

采用真菌 ITS 区域通用引物 pITS1 和 pITS4 对 CM-6 菌株 ITS DNA 序列进行扩增,获得 1 个大小约 600 bp 的 DNA 片段。对该片段进行克隆和测序,并在 GenBank 上进行 BLAST 分析,其序列包含真菌核糖体 rDNA 的 ITS1、5.8S rDNA、ITS2、部分 18S rDNA 和 28S rDNA 的 DNA 片段,与子囊菌草莓穴喙壳 *Sphaeronaemella fragariae* CBS 118.16 菌株的 ITS 序列(登录号 AY271808)同源性为 99%。因为草莓穴喙壳 *S. fragariae*、昏暗枝梗茎点霉 *Dendrophma obscurans* 和暗拟茎点霉

Phomopsis obscurans 为同物异名^[11-12],所以结合形态学特性确定 CM-6 菌株为 *Phomopsis obscurans* (Ellis & Everh.) B. Sutton。

2.4 温度和光照对菌丝生长和产孢的影响

在光照和黑暗条件下,CM-6 菌株在 15~40 °C 温度范围内菌丝都能生长和产孢(表 1),其中菌丝生长最适宜温度是 25~30 °C,菌丝生长速率最高可达 1.98 cm/d,培养 15 d 后产孢量可达 5.8×10⁸ 个/cm²。试验结果表明:在适宜温度下,光照对菌丝生长和产孢都有促进作用;黑暗条件对产孢有显著抑制作用。

表 1 温度和光照对 CM-6 菌株菌丝生长和产孢的影响¹⁾

Table 1 Effect of temperature and light on mycelial growth and sporulation of strain CM-6

温度/°C Temperature	菌落平均直径/cm Average diameter of colony		生长速率/(cm/d) Growth rate		产孢量/(个/cm ²) Sporulation(spores per cm ²)	
	光照 Light	黑暗 Dark	光照 Light	黑暗 Dark	光照 Light	黑暗 Dark
15	1.4	1.1	0.46 cC	0.41 cC	6.1×10 ⁷ bB	5.8×10 ⁶ bB
20	3.7	3.3	1.31 bB	1.20 bB	8.9×10 ⁷ bB	2.2×10 ⁷ aA
25	5.8	4.8	1.98 aA	1.75 aA	5.8×10 ⁸ aA	2.3×10 ⁷ aA
30	5.6	4.7	1.85 aA	1.70 aA	3.2×10 ⁸ aA	2.7×10 ⁷ aA
35	3.6	3.1	1.23 bB	1.15 bB	0	0
40	1.4	0.9	0.43 cC	0.37 cC	0	0

1)同列数值后含相同的小写或大写字母表示在 0.05 或 0.01 水平上差异不显著(下表同)。

Figures followed by common letter within the same column are not significant at 0.05 or 0.01 level(the same as following table).

2.5 pH 值对菌丝生长和产孢的影响

将 CM-6 菌株分别接种在 pH 3~10 的 PDA 培养基上,25 °C 条件下光照培养,其菌丝都可以生长和产孢(表 2)。在 pH 6 条件下,菌丝生长速率可达 1.98 cm/d;培养 15 d 后,菌丝产孢量可达 5.8×10⁸ 个/cm²。试验结果表明,pH 值为 6 时最适合 CM-6 菌株菌丝的生长和产孢。

表 2 pH 值对 CM-6 菌株菌丝生长和产孢的影响

Table 2 Effect of pH value on mycelial growth and sporulation of strain CM-6

pH	菌落平均直径/cm Average diameter of colony	生长速率/(cm/d) Growth rate	产孢量/(个/cm ²) Sporulation (spores per cm ²)
3	2.4	0.09 eE	0
4	3.7	0.41 dD	0
5	4.8	1.09 cC	3.2×10 ⁸ bB
6	6.5	1.98 aA	5.8×10 ⁸ aA
7	5.6	1.53 bB	3.8×10 ⁸ bB
8	4.1	0.87 cC	2.8×10 ⁸ bB
9	3.3	0.31 dD	2.5×10 ⁸ bB
10	2.8	0.12 eE	0

ITS DNA 序列分析,确定该病原菌为昏暗拟茎点霉 *Phomopsis obscurans* (Ellis & Everh.) B. Sutton。

目前有关草莓穴喙壳真菌的命名比较混乱。笔者采用 ITS 通用引物 ITS1 和 ITS4 对 CM-6 菌株的 ITS 进行扩增,测序结果在 GenBank 上进行 BLASTn 分析,发现与子囊菌草莓穴喙壳 *Sphaeronaemella fragariae* 同源性为 99%。草莓穴喙壳 *S. fragariae* 与暗拟茎点霉 *Phomopsis obscurans* 和半知菌昏暗枝梗茎点霉 *Dendrophma obscurans* 属于同物异名^[11-12]。*Dendrophoma* Sacc. 是 Saccardo 于 1880 年创立的无性属,Sutton 在 1980 年废弃了该属名^[13],将其移至 1846 年建立的刺壳双毛孢属 *Dinemasporium* Leveille 中,该属的特征为分生孢子两端各有 1 根纤毛。显微镜观察时发现 CM-6 菌株分生孢子梗有分枝的特点,但分生孢子未见纤毛。据此可确定草莓褐斑病病原 CM-6 菌株应属 *Phomopsis obscurans* (Ellis & Everh.) B. Sutton。

陆家云^[14]对 *D. obscurans* 的分生孢子器、分生孢子及分生孢子梗形态和大小等性状进行了描述,本试验中笔者对其生物学特性进行了初步观察。试

3 讨论

本试验从湖北省农业科学院草莓基地日光温室分离获得了草莓褐斑病的病原菌,通过形态学和

验结果表明,在不影响草莓生长的情况下,通过适当调节环境的温度和湿度,对病情能起到一定的控制作用。关于草莓褐斑病的防治时期和防治方法还有待进一步研究。

参 考 文 献

- [1] ELMER W H. Recent outbreak of *Phomopsis* leaf blight, cause by *Phomopsis obscurans* on strawberry petiole and stolons in Connecticut[J]. Plant Disease, 1990, 74: 331.
- [2] ESHENAUER B C, MILHOLLAND R D. Factors influencing the growth of *Phomopsis obscurans* and disease development on strawbreey leaf and runner tissue[J]. Plant Disease, 1989, 73: 814-819.
- [3] ISHIKAWA S. Correlation between field disease and latent infection by *Glomere cingulata* of strawberry plants as revealed by a simple diagnostic method using ethanol immersion[J]. Journal of General Plant Pathology, 1989, 73: 814-819.
- [4] 黄丽华, 刘铎, 莫继荣. 草莓褐斑病的研究[J]. 湖南农业科学, 1988(6): 36-39.
- [5] 方中达. 植病研究方法[M]. 北京: 中国农业出版社, 1996.
- [6] SAMBROOK J, FRITSCH E F, MANIARIS T. Molecular cloning[M]. [s. l.]: Laboratory Manual Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- [7] WHITE T J, BRUNS T, LEE S, et al. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics [M]. San Diego, CA: Academic Press, 1990.
- [8] 魏景超. 真菌学鉴定手册[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1979.
- [9] 白金铠. 中国真菌志(第十五卷)[M]. 北京: 科学出版社, 2003.
- [10] 戚佩坤. 中国真菌志(第三十四卷)[M]. 北京: 科学出版社, 2007.
- [11] MASS J L. New system of strawbreey leaf blight disease[J]. Advstrawbreey Prod, 1985(4): 34-35.
- [12] HAUSNER G, REID J. The nuclear small subunit ribosomal genes of *Sphaeronaemella helvellae*, *Sphaeronaemella fimicola*, *Gabarnaudia betae* and *Cornuovesica falcata*: phylogenetic implications[J]. Canadian Journal of Botany, 2004, 82: 752-762.
- [13] SUTTON B C. The coelomycetes: fungi imperfecti with pycnidia acervuli and stromata[M]. Surry: Commonwealth Mycological Institute, 1990.
- [14] 陆家云. 植物病原真菌学[M]. 北京: 中国农业出版社, 2000.

Identification of Pathogen that Causes Strawberry Brown Blotch Disease and Observation of Biological Characteristics

LÜ Rui-ling^{1,2} XIE Jia-tao¹ FU Yan-ping¹ JIANG Dao-hong¹

1. College of Plant Science and Technology, Huazhong Agricultural University/
Key Laboratory of Crop Disease Monitoring and Safety Control of Hubei Province,
Wuhan 430070, China;

2. Huanggang Academy of Agricultural Sciences, Hubei Province, Huanggang 438000, China

Abstract The pathogen that causes strawberry brown blotch disease was identified and proved through a procedure of Koch's postulation. Pycnidium and conidia were produced in the diseased leaves and PDA medium. The pycnidium was spherical and black. The conidiophores were branching. The conidia was oval or spindle shaped, transparent and single-celled, with the size of $(5.7-7.3) \mu\text{m} \times (2.0-3.0) \mu\text{m}$. Based on the morphological characteristics of conidia and its DNA, the pathogen was identified as *Phomopsis obscurans* (Ellis & Everh.) B. Sutton. The effects of temperature, pH value and other environmental factors on the pathogen growth and sporulation were studied. The result showed that the optimum temperature was 25-30 °C and the optimum pH value was 6, and light will promote its mycelial growth and sporulation.

Keywords strawberry brown blotch disease; pathogen; identification