



西北农业学报
Acta Agriculturae Boreali-occidentalis Sinica
ISSN 1004-1389, CN 61-1220/S

《西北农业学报》网络首发论文

题目: 草莓土赤壳菌根腐病病原鉴定及生物学特性
作者: 申光辉, 薛泉宏, 赵娟
收稿日期: 2018-01-08
网络首发日期: 2018-07-02
引用格式: 申光辉, 薛泉宏, 赵娟. 草莓土赤壳菌根腐病病原鉴定及生物学特性. 西北农业学报. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/61.1220.S.20180629.1716.030.html>



网络首发: 在编辑部工作流程中, 稿件从录用到出版要经历录用定稿、排版定稿、整期汇编定稿等阶段。录用定稿指内容已经确定, 且通过同行评议、主编终审同意刊用的稿件。排版定稿指录用定稿按照期刊特定版式(包括网络呈现版式)排版后的稿件, 可暂不确定出版年、卷、期和页码。整期汇编定稿指出版年、卷、期、页码均已确定的印刷或数字出版的整期汇编稿件。录用定稿网络首发稿件内容必须符合《出版管理条例》和《期刊出版管理规定》的有关规定; 学术研究成果具有创新性、科学性和先进性, 符合编辑部对刊文的录用要求, 不存在学术不端行为及其他侵权行为; 稿件内容应基本符合国家有关书刊编辑、出版的技术标准, 正确使用和统一规范语言文字、符号、数字、外文字母、法定计量单位及地图标注等。为确保录用定稿网络首发的严肃性, 录用定稿一经发布, 不得修改论文题目、作者、机构名称和学术内容, 只可基于编辑规范进行少量文字的修改。

出版确认: 纸质期刊编辑部通过与《中国学术期刊(光盘版)》电子杂志社有限公司签约, 在《中国学术期刊(网络版)》出版传播平台上创办与纸质期刊内容一致的网络版, 以单篇或整期出版形式, 在印刷出版之前刊发论文的录用定稿、排版定稿、整期汇编定稿。因为《中国学术期刊(网络版)》是国家新闻出版广电总局批准的网络连续型出版物(ISSN 2096-4188, CN 11-6037/Z), 所以签约期刊的网络版上网络首发论文视为正式出版。



草莓土赤壳菌根腐病病原鉴定及生物学特性

申光辉^{1,3}, 薛泉宏², 赵娟^{1,4}

(1. 西北农林科技大学 生命科学学院, 陕西杨凌 712100; 2. 西北农林科技大学 资源环境学院, 陕西杨凌 712100;
3. 四川农业大学 食品学院, 四川雅安 625014; 4. 北京市农林科学院 植物保护环境保护研究所, 北京 100097)

摘要 采用形态学特征结合 rDNA-ITS 序列比对方法, 对陕西长安区草莓根腐病病原菌进行鉴定, 以柯赫氏法则进行致病性验证, 结果表明大双孢土赤壳(*Ilyonectria macrodidyma*) 为该地区草莓根腐病的主要病原菌。生物学特性结果表明, 该病原菌适应范围广, 可在不同培养基上生长, 菌丝最适生长温度为 25 ℃, 最适生长 pH 为 4, 分生孢子最适萌发温度和 pH 分别为 30 ℃ 和 7, 分生孢子致死条件为 45 ℃ 10 min。

关键词 草莓根腐病; 大双孢土赤壳; 致病性; rDNA-ITS 序列

中图分类号 S436.5 **文献标志码** A

草莓酸甜可口, 营养丰富, 是中国广泛栽培的重要小浆果。草莓根腐病是由土传病原真菌及线虫等因素单独或共同引起的复合根部病害, 世界范围内已报道的草莓根腐病病原物多达 20 余种^[1]。不同地区或同一地区不同年份生态条件的差异性, 导致草莓根腐病优势致病菌种类往往存在较大的地域差异, 已报道从中国河北、湖北、北京、安徽、河南和山东等地分离确定的草莓根腐病病原差异很大, 包括拟盘多毛孢属(*Pestalotiopsis*)^[2-3]、镰刀菌属(*Fusarium*)^[4-8]、丝核菌属(*Rhizoctonia*)^[6-9]、疫霉属(*Phytophthora*)^[6,10]和链格孢属(*Alternaria*)^[2,3,12]等, 其中镰刀菌属致病菌的报道较多。

长安区是陕西省重要的草莓栽培主产区, 草莓种植已有 30 多年时间, 近年来随着设施栽培的快速推广发展, 当地草莓根腐病害逐年加重, 特别是连作田块, 严重危害草莓苗的健康生长, 导致减产, 甚至绝收, 已成为制约当地草莓产业持续发展的重要瓶颈。而目前鲜见对引起该地草莓根腐病发生的具体病原的详细报道。为查明该地区草莓根腐病发生的主要病原真菌种类, 本研究对采集到的草莓根腐病株进行病原菌分离纯化和柯赫氏法则验证, 采用形态学特征, 结合 rDNA-ITS 序列

分析进行病原菌鉴定, 并探究其生物学特征, 旨在为该地区草莓根腐病发生规律以及防治提供依据。

1 材料与方法

1.1 供试材料

草莓典型根腐病株于 2010 年 4 月采自西安市长安区。

1.2 病原菌的分离纯化

用自来水冲洗草莓根腐病病株根系表面泥沙, 选取发病根系, 采用组织分离法进行病原菌的分离^[13]; 剪取病健交界根系组织, 以 $\varphi=70\%$ 乙醇消毒 10 s, 再用 0.1% 升汞表面消毒 20 s, 无菌水反复冲洗 5 次, 切成 1 cm 长度根段, 置于 PDA 培养基平板 25 ℃ 培养 2~3 d, 待组织块表面长出菌落并产孢后, 采用单孢分离法获得纯培养物^[13], 纯化后的菌株转接于 PDA 斜面, 25 ℃ 培养 7 d, 4 ℃ 冰箱保存。

1.3 病原菌形态学鉴定

采用插片法将病原菌接种于 PDA 平板, 25 ℃ 培养 3~7 d, 镜检观察记录病原菌菌丝、产孢构造及孢子形态特征。

1.4 病原菌致病性测定

将病原菌接种于 PDA 平板, 25 ℃ 培养 10 d,

收稿日期: 2018-01-08 修回日期: 2018-02-27

基金项目: 教育部长江学者和创新团队发展计划(IRT0748); 四川农业大学 211 工程双支计划(03572107)。

第一作者: 申光辉, 男, 博士研究生, 讲师, 研究方向为微生物资源与利用。E-mail: shenghuishen@163.com

通信作者: 薛泉宏, 男, 教授, 博士生导师, 研究方向为微生物资源与利用。E-mail: shenghuishen@163.com

待大量产孢后用无菌水洗脱,采用血球板计数法计数,制备成浓度为 $1.8 \times 10^6 \text{ mL}^{-1}$ 的孢子悬浮液。采用根部离体接种法和活体伤根接种法测定病原菌致病性。根部离体接种法^[13]:取健康草莓植株,自来水冲洗根系,剪至长约 4~6 cm 小根段,浸于 $\varphi=70\%$ 乙醇溶液中消毒 30 s,再用无菌水冲洗 3 次。将取自于同一草莓植株的小根段随机分成两组,置于皿底铺有灭菌滤纸的无菌培养皿中,其中一组加入 3 mL 病原菌孢子悬浮液,另一组加等体积无菌水作为对照,于 25 ℃ 培养箱中培养观察根段发病状况,定期补水以保持皿内相对湿度 $\geq 85\%$ 。活体伤根接种法:选取根系发达程度较为一致的健康草莓苗,冲洗根系表面泥沙,无菌水反复冲洗 3 次,用无菌刀片切去根尖新生组织进行伤根处理后,移栽于装有无菌蛭石的营养钵中,沿根茎部位灌入 10 mL 病原菌孢子悬液,以灌入 10 mL 无菌水作对照,于 25 ℃ 下室内培养,常规方法进行管理,各处理均重复 6 株。观察记录病原菌侵染草莓离体根段情况和营养钵内草莓根系生长与发病情况。参照文献^[14]的病株分级方法:0 级,根系健康无侵染褐变;1 级,根系稍有侵染褐变,发病腐烂部分占全部根系比例 $< 25\%$;2 级,根系明显腐烂褐变,发病腐烂部分占全部根系比例为 $25\% \sim 50\%$;3 级,腐烂褐变根系占全部根系的 $51\% \sim 75\%$,并可见少量菌丝及孢子;4 级,发病腐烂根系占全部根系的 $76\% \sim 90\%$,并产生大量孢子;5 级,腐烂褐变根系占全部根系的比例 $> 90\%$ 。病情指数(RDSI) = $\sum(D_i \times N_i) / (N \times 5) \times 100$,式中 D_i 为病情级数, N_i 为各病级株数, N 为调查样本数;5 为最高病级。按照柯赫氏法则,从发病根系组织部位进行致病菌再分离,通过菌落特征和显微特征进行比较,确定再分离菌株与接种病原菌是否相同。

1.5 病原菌分子生物学鉴定

采用 CTAB 法提取病原菌株基因组 DNA,以 ITS1 (5'-TCCG TAGGTGAACCTGCGG-3') 和 ITS4^[15] (5'-TCCTCCGTTAT TGATATGC-3') 为引物,扩增 rDNA-ITS 片段。25 μL PCR 体系: *Taq* 酶 0.2 μL , 10 倍 Buffer 2.5 μL , dNTP 2.0 μL , ITS1/ITS4 引物各 1.0 μL , ddH₂O 16.3 μL , DNA 模板 2.0 μL 。反应程序:94 ℃ 预变性 3 min;94 ℃ 变性 30 s,50 ℃ 退火 40 s,72 ℃ 延伸 1 min,30 个循环;72 ℃ 10 min。PCR 扩增产物经 20 g/L 琼脂糖凝胶电泳检测确认,送交生

工生物工程(上海)股份有限公司进行纯化并测序。登陆 NCBI 网站 Nucleotide-nucleotide BLAST 工具与 GenBank 数据库中相似模式菌株序列进行比对,获得同源性较高的真菌 rDNA-ITS 序列,采用 MEGA 5.1 软件,邻接法(Neighbor-joining method)构建系统发育树^[16],自举检验次数(Bootstrap)1 000 次。结合病原菌形态特征,参考魏景超《真菌鉴定手册》^[17] 及相关参考文献^[18-20] 确定病原真菌分类地位。

1.6 病原菌生物学特性的测定

1.6.1 培养基对病原菌菌丝生长的影响 病原菌接种于 PDA 培养基 25 ℃ 培养 3~5 d,沿菌落边缘打取病原菌菌饼(直径 7.0 mm),接于 7 种不同培养基平板中央^[13],25 ℃ 培养 7 d 后十字架法测量菌落直径,每种培养基重复 3 次。

1.6.2 光照对病原菌菌丝生长的影响 设置 24 h 全光照、12 h 光照与 12 h 黑暗交替、24 h 全黑暗 3 种不同的光照条件,按“1.6.1”方法将菌饼置于 PDA 平板培养并测量菌落直径,各处理重复 3 次。

1.6.3 温度对病原菌菌丝生长及孢子萌发的影响 设置 20~35 ℃ 温度条件,按“1.6.1”方法将菌饼置于 PDA 平板培养,每 24 h 测量菌落直径,并计算菌丝平均生长速率。各温度培养均重复 3 次。用马铃薯蔗糖液体培养基洗脱病原菌平板表面的孢子,制成孢子悬浮液,并调整至每个视野(15×10 倍)25~30 个孢子,采用悬滴法^[13] 测定各温度条件下不同萌发时间的分生孢子萌发情况,并随机镜检 300 个分生孢子萌发情况,计算分生孢子萌发率。

1.6.4 pH 对病原菌菌丝生长及孢子萌发的影响 按“1.6.1”制备病原菌菌饼并接于不同 pH 的 PDA 平板中央,于 25 ℃ 培养并测定菌落直径,各处理均重复 3 次。用不同 pH 的 PBS 制备每视野(15×10 倍)25~30 个孢子的病原菌分生孢子悬浮液,25 ℃ 培养萌发,悬滴法^[7] 检测萌发 3 h 和 12 h 的分生孢子萌发情况,并随机镜检 300 个分生孢子,计算分生孢子萌发率。

1.6.5 分生孢子致死温度测定 将病原菌分生孢子悬浮液分别置于 35~50 ℃ 的恒温水浴锅中热致死处理 10 min,再置于 25 ℃ 培养 24 h,检测分生孢子萌发情况,每处理随机镜检 300 个分生孢子,计算分生孢子萌发率。

菌落平均生长速率(AGR) = $(D-7)/d$,式中 D

为菌落直径大小(mm), d 为培养时间(以天表示)。

采用 DPS 7.05 软件处理试验数据, 采用邓肯氏(Duncan's)新复极差法进行不同处理间差异显著性检验。

2 结果与分析

2.1 草莓根腐病病害症状

通过病害病情调查, 发现长安区连作草莓根

腐病始发于 3 月底至 4 月份, 4 月下旬达到病害盛发期, 植株死亡率在 60% 以上, 对草莓生产危害严重。病株相对健康植株矮小、分蘖数少、发病初期老叶变黄、发病后期全株叶片萎蔫枯死、病株根系枯萎坏死、新生须根不发达、根系表面呈褐色至黑色锈斑腐烂症状、表皮与木质部分严重分离(图 1-B); 而健康草莓植株新生毛细根发达, 无腐烂褐变症状(图 1-A)。



A. 健康草莓根系 Healthy strawberry roots; B. 发病草莓根系 Symptoms on rot roots of strawberry

图 1 草莓根腐病发病症状

Fig. 1 Symptoms of root rot of strawberry in field

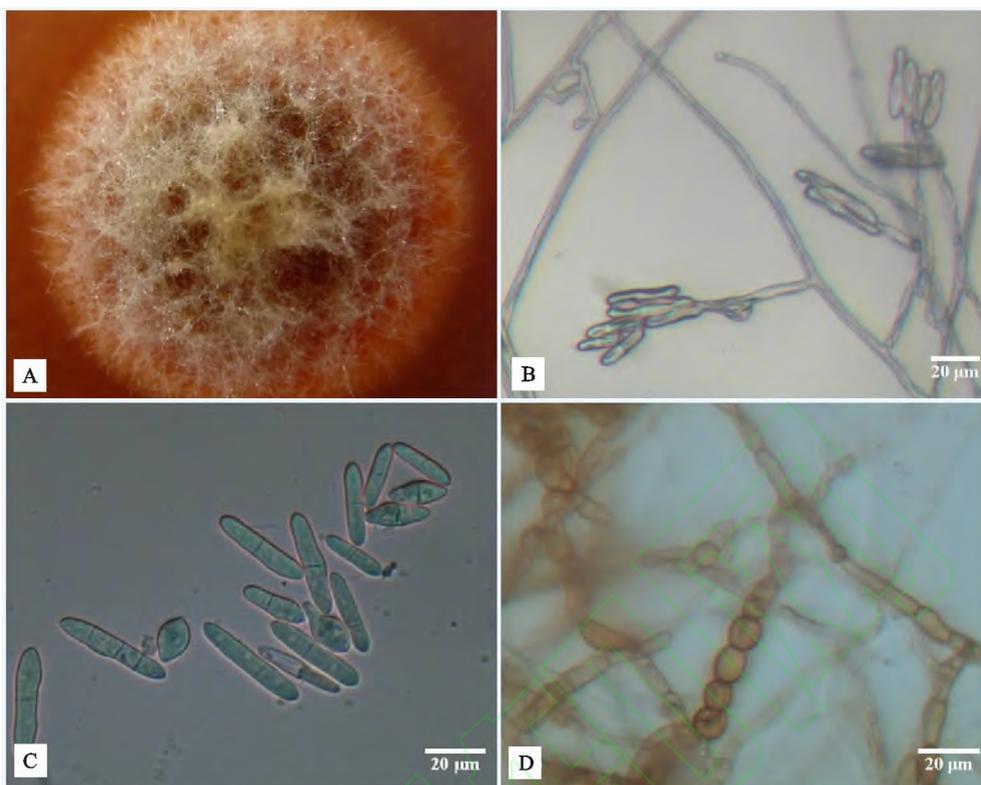
2.2 病原菌形态学鉴定

病原菌菌株 CF9 在 PDA 培养基上生长较为缓慢, 菌落圆形, 但边缘不规则, 培养初期边缘菌丝呈乳白色絮状绒毛状, 菌落由外向内从米黄色渐变至褐黄色, 整体呈毡状(图 2-A)。菌丝无色有隔, 直径 $2.0 \sim 4.9 \mu\text{m}$, 以单梗或分生孢子座方式产大型分生孢子或小型分生孢子(图 2-B), 分生孢子无色、壁光滑, 粘质状。大型分生孢子(图 2-C)圆柱状, 两端钝圆, 直或弯曲, 有 $1 \sim 3$ 个横隔膜, 其中一隔膜分生孢子大小 $(20 \sim 40) \mu\text{m} \times (5 \sim 10) \mu\text{m}$, 两隔分生孢子大小 $(30 \sim 42) \mu\text{m} \times (7 \sim 12) \mu\text{m}$, 三隔分生孢子大小 $(33 \sim 47) \mu\text{m} \times (6 \sim 10) \mu\text{m}$, 偶见呈梨形的单胞小型分生孢子 $(17 \sim 37) \mu\text{m} \times (5 \sim 9) \mu\text{m}$, 培养后期部分菌丝末端或中间细胞壁加厚形成厚垣孢子, 成熟的厚垣孢子金黄色至棕褐色, 单生或串生, 近圆形, 直径 $8 \sim 14 \mu\text{m}$ (图 2-D)。根据上述形态特性, 将病原菌初步鉴定为土赤壳属(*Ilyonectria* sp.)。

2.3 病原菌致病性测定

对草莓发病植株与健康植株根系及根域土壤真菌分离结果进行比较, 可以发现, 在发病植株样

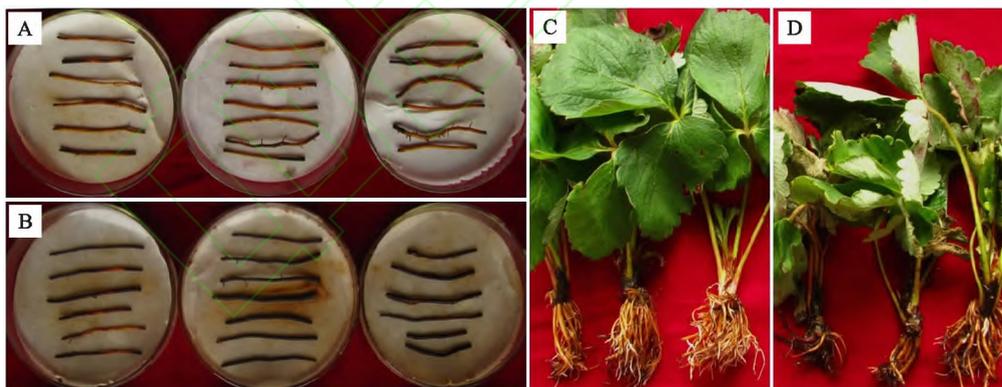
品中分离获得多株真菌, 其中 1 株真菌菌株 CF9 在发病后期样品中的数量占真菌总数的 68.0%^[21], 而在健康植株中并未分离到。初步认为该菌株为疑似病原菌。致病性测定结果表明, 离体根段接种和活体伤根接种草莓植株均表现出与田间病株相似的根系腐烂症状(图 3)。由图 3-B 可见, 草莓根系受病原菌感染后呈棕褐色至黑色, 后期表皮呈现典型腐烂症状, 部分根系表面有明显浅褐色病原菌菌丝, 而未接种离体根系腐烂褐变明显低于接种根系(图 3-A)。由图 3-D 可见, 活体伤根接种处理草莓植株生长矮小, 新生白色毛状根数量减少, 地上部叶片萎蔫症状明显, 而未接种对照植株根系相对较发达, 毛状根数量多(图 3-C)。由表 1 可知, 未接种草莓根系(对照组)在离体状态下仅有两端小部分由于切伤而发生轻微褐变, 其腐烂率和病情指数分别为 13.2% 和 29.1, 但根部离体接种处理草莓根系腐烂率和病情指数明显高于对照组, 分别达 73.7% 和 73.0, 表明病原菌分生孢子对草莓离体根系的感染致腐能力较强。活体伤根未接种草莓植株根系腐烂率、病情指数分别为 7.3%、17.9, 而活体伤



A. PDA 平板上菌落形态 Colony of mycelia on PDA plate (5 d); B. 分生孢子梗 Conidiophor; C. 分生孢子 Macroconidia and microconidia; D. 厚垣孢子 Chlamydospore

图 2 草莓根腐病原真菌 CF9 形态特征

Fig. 2 Morphological characteristics of *Ilyonectria macrodidyma* CF9



A. 未接种离体草莓根段 Control roots in vitro; B. 孢子悬浮液离体接种草莓根段 Rot roots inoculated with pathogen conidia suspension in vitro; C. 活体对照草莓植株 Control strawberry plants; D. 孢子悬浮液活体伤根接种草莓植株 Strawberry plants inoculated with pathogen conidia suspension

图 3 草莓根腐病原真菌致病性

Fig. 3 Symptom of strawberry root rot caused by *Ilyonectria macrodidyma* CF9

表 1 草莓根腐病原真菌 CF9 致病性测定 ($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Pathogenicity test with conidia suspension of pathogen strain CF9 causing root rot of strawberry

接种方式 Inoculation method				腐烂率/% Root rot percentage	病情指数 Disease index (RDSI)
根部离体接种 In vitro assay	对照 Control	对照 Control		13.2 ± 5.3	29.1 ± 18.1
	接种处理 Inoculation	接种处理 Inoculation		73.7 ± 27.8	73.0 ± 26.6
活体伤根接种 In vivo assay	对照 Control	对照 Control		7.3 ± 2.8	17.9 ± 2.1
	接种处理 Inoculation	接种处理 Inoculation		57.7 ± 12.1	60.4 ± 12.4

根接种草莓植株根系腐烂率、病情指数显著高于未接种对照,分别为57.7%、60.4,表明病原菌分生孢子对草莓活体根系也具有较强的侵染致病能力。从上述2种致病性测定方法的根系病健交界处重新分离得到与接种病原菌相同的病原菌。

2.4 病原菌分子生物学鉴定

将病原菌菌株 CF9 的 rDNA-ITS 基因测序结果(GenBank 登录号:JN641882)提交 GenBank 数据库进行 BLAST 比对分析,结果发现病原菌 CF9 与大双孢土赤壳 (*Ilyonectria macrodidyma*) isolate REF202 (GenBank 登录号:JN859422)的序列相似度高达 99.79%,与模式菌株 (*N. macrodidyma*) CBS 112615T(GenBank 登录号:AY677290)序列相似度达到 99.76%,且均与其位于系统发育进化树同一分支(图 4),并

以 100%的高支持率与其他(*I. macrodidyma*)聚为一支,而与其他近缘种距离较远。结合形态学特征,确定引起陕西长安草莓根腐病的病原为土赤壳属 (*Ilyonectria*) 大双孢土赤壳 (*Ilyonectria macrodidyma*),其无性型为大双孢柱孢 (*Cylindrocarpon macrodidymum*)。

2.5 病原菌生物学特性

2.5.1 培养基对菌丝生长的影响 由图 5 可见,病原菌在不同培养基上的菌丝生长速度存在明显差异。在 CMA 培养基上病原菌菌丝生长最快,培养至第 7 天时,菌落直径可达 58.17 mm,菌丝平均生长速率为 7.31 mm/d。在 PDA 和 PSA 上病原菌气生菌丝较发达,培养至第 7 天表面产生大量孢子,而在其他培养基上气生菌丝稀疏,孢子产量较低,尤以 CMA 培养产孢最少。

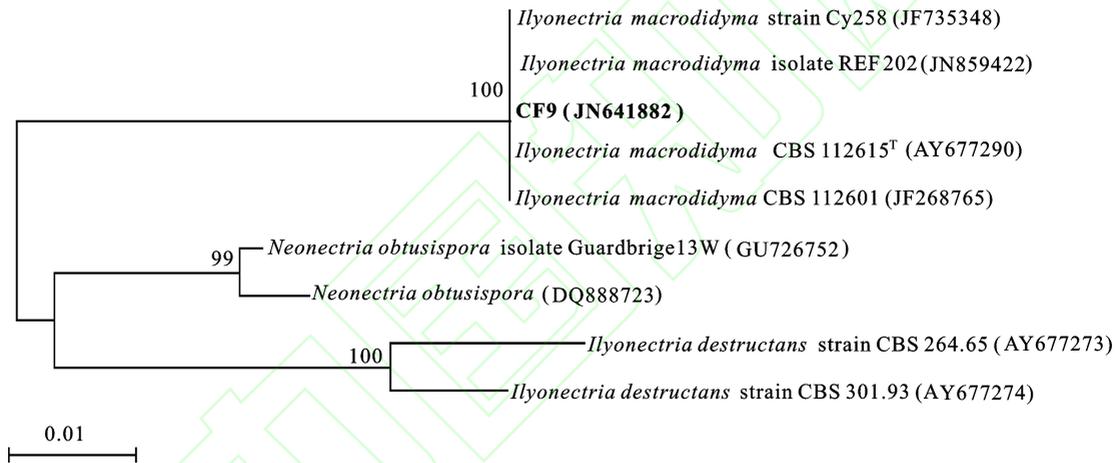


图 4 基于 rDNA-ITS 序列的草莓根腐病原真菌 CF9 系统发育树

Fig. 4 Phylogenetic tree of *Ilyonectria macrodidyma* CF9 and related strains based on rDNA-ITS sequence

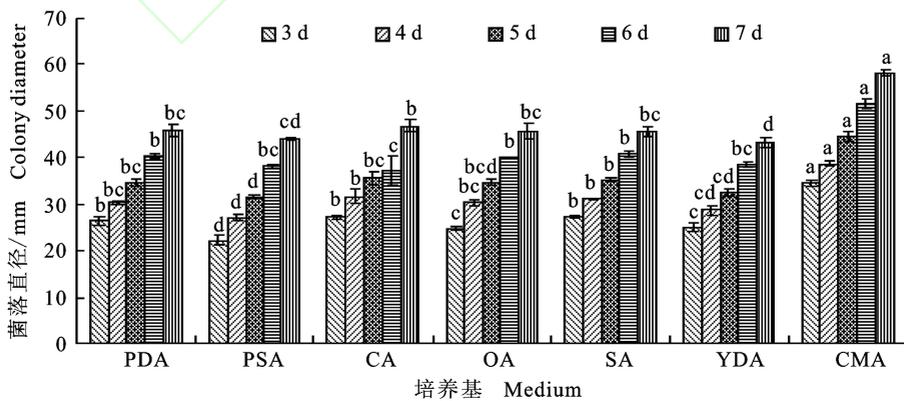


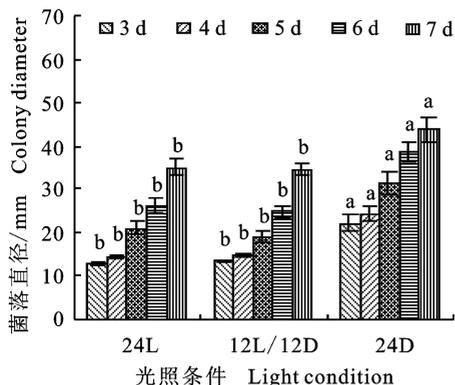
图 5 不同培养基上草莓根腐病原真菌 CF9 菌落直径

Fig. 5 Colony diameter of pathogen strain CF9 on different growth media

2.5.2 光照对菌丝生长的影响 由图 6 可知,病原菌 CF9 菌丝在不同光照条件生长速度存在明

显差异。在全黑暗(24D)条件下培养 7 d 菌落直径最大,可达 43.83 mm,菌丝平均生长速率为

5.26 mm/d,显著大于全光照(24L)和光暗交替(12L/12D)条件($P < 0.05$),全光照和光暗交替之间无显著差异($P > 0.05$),全黑暗条件利于菌丝生长。



24L 为 24 h 全光照 24L indicates 24 hours light;12L/12D 为 12 h 光照与 12 h 黑暗交替 12L/12D indicates 12 hours light each day;24D 为 24 h 全黑暗 24D indicates 24 hours darkness one day

图 6 不同光照条件下草莓根腐病原真菌 CF9 菌落直径

Fig. 6 Colony diameter of pathogen strain CF9 under different light hours

2.5.3 温度对菌丝生长及孢子萌发的影响 由图 7 可见,草莓根腐病原菌 CF9 在 20~30 °C 范围内均可生长。在 25 °C 下菌落直径最大,培养至第 7 天时,菌落直径为 52.7 mm。在 35 °C 下菌落大小未见变化,未见菌丝生长。

由图 8 可知,30 °C 条件下病原菌孢子萌发率最高,12 h 孢子萌发率为 68.0%,25 °C 12 h 的孢子萌发率为 66.2%。表明 25~30 °C 是 CF9 孢子萌发的最适温度。

2.5.4 培养基 pH 对菌丝生长及孢子萌发的影响 由图 9 可知,培养基 pH 对病原菌菌丝生长

速度影响显著。病原菌 CF9 在培养基 pH 3~8 内均可生长,生长范围较宽,其中菌丝在 pH 为 4 的培养基上生长蔓延最快,至第 7 天菌落直径可达 44.67 mm,菌丝平均生长速率为 5.38 mm/d,表明菌丝生长嗜酸性。在培养基 pH5~7 时菌

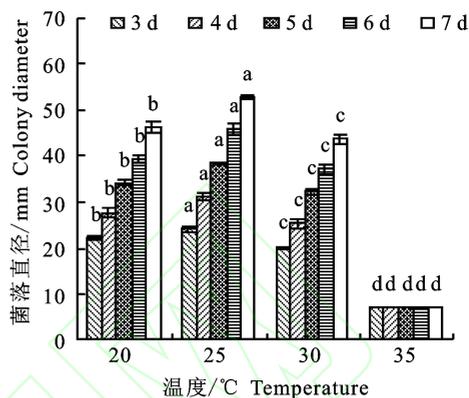


图 7 不同培养温度下草莓根腐病原真菌 CF9 菌落直径

Fig. 7 Colony diameter of pathogen under different temperatures

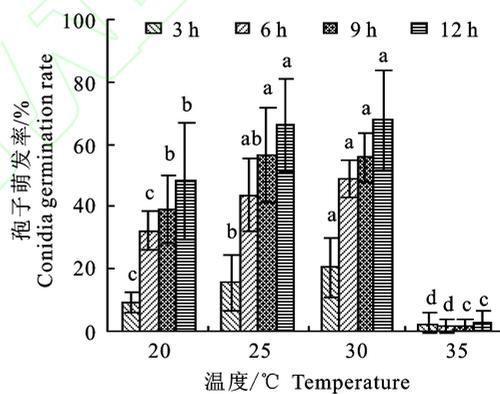


图 8 不同温度下病原真菌 CF9 孢子萌发率

Fig. 8 Conidia germination rate of pathogen under different temperatures

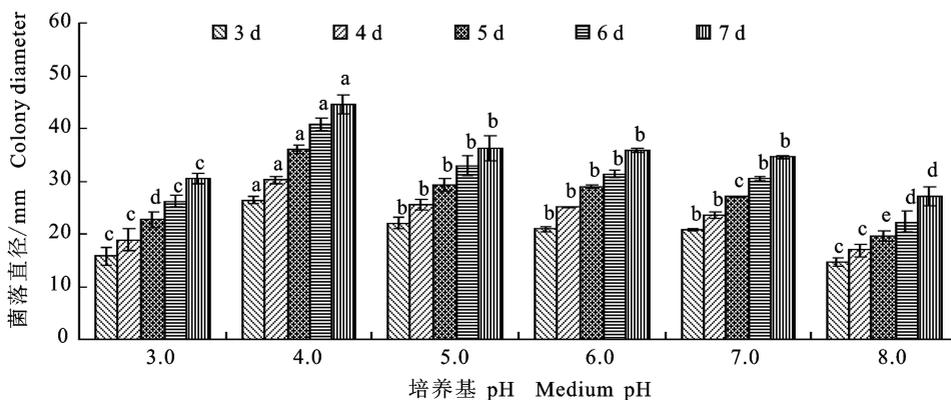


图 9 不同培养基 pH 条件下原真菌 CF9 菌落直径

Fig. 9 Colony diameter of pathogen under different pH conditions

落直径差异不显著($P>0.05$), 菌丝生长速率略低于 pH 4 条件, 第 7 天菌落直径可达 34.7~36.3 mm, 菌丝平均生长速率为 3.95~4.19 mm/d。

由图 10 可见, pH 为 5、6、7 条件下病原菌孢子萌发率和芽管平均长度均高于其他 pH 条件, 其中 pH 7 时最有利于孢子萌发及芽管伸长, 培养 3 h 和 12 h 后, 孢子萌发率分别为 34.6% 和

94.8%, 芽管平均长度分别可达 33.8 μm 和 207.9 μm , 芽管伸长速率为 19.34 $\mu\text{m}/\text{h}$, 表明中性偏酸环境利于病原菌 CF9 孢子萌发及芽管生长。

2.5.5 分生孢子致死温度 由表 2 可知, 病原菌 CF9 分生孢子在 45 $^{\circ}\text{C}$ 条件下处理 10 min 即失去萌发能力, 因此分生孢子的致死温度为 45 $^{\circ}\text{C}$, 作用 10 min。

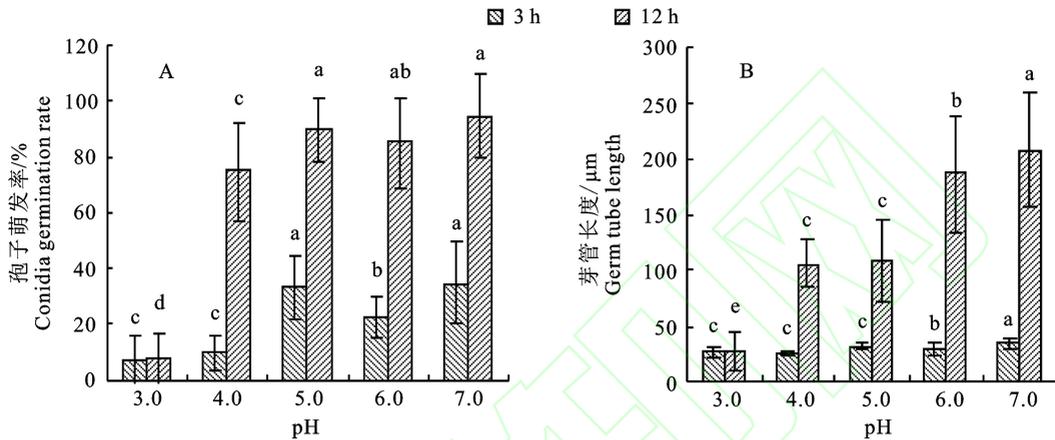


图 10 不同 pH 条件下病原菌 CF9 孢子萌发率和芽管长度

Fig. 10 Conidia germination rate and germ tube length of pathogen under different pH values

表 2 草莓根腐病原真菌 CF9 分生孢子致死温度 ($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Lethal temperature test of pathogen conidia

温度/ $^{\circ}\text{C}$	Temperature	35	40	41	42	43	44	45	50
孢子萌发率/%	Conidia germination rate	76.3 \pm 0.5	37.7 \pm 0.3	30.5 \pm 0.4	21.2 \pm 0.6	8.2 \pm 0.5	2.5 \pm 0.2	0	0

3 讨论

根腐病是长期危害中国各大草莓种植区的重要土传根部病害。草莓根腐病的致病菌种类多, 包括丝核菌属、镰刀菌属、轮枝菌属等 20 多种^[1]。不同地域气候及土壤栽培环境下主要致病菌种类往往不同, 因此明确不同地域生产环境中导致草莓根腐病发生的主要致病菌是实现草莓栽培可持续发展的关键问题之一。而目前对陕西长安区草莓根腐病发生的主要病原种类尚不清楚, 明确该地区草莓根腐病的病原对进行病害有效防控具有重要意义。本试验基于病原菌形态学特征、rDNA-ITS 序列分析及致病性测定, 证明土赤壳属大双孢土赤壳 (*Ilyonectria macrodidyma*) 是陕西省长安区草莓根腐病的主要病原菌, 与已报道的国内其他地区草莓根腐病病原菌不同。土赤壳属 (*Ilyonectria* P. Chaverri & C. Salgado) 及其无性型柱孢属 (*Cylindrocarpon* Wollenw.) 真菌分布广泛, 常见于木本和草本植物根内或土壤

中^[22], 属于腐生真菌或弱寄生真菌, 该属大多数种类为植物病原菌, 可引起根腐病和黑腐病等^[23]。已有研究发现, 土赤壳属真菌 (*Ilyonectria* spp.) 可导致葡萄藤黑脚病^[18-19]、苹果茎腐病^[20]、高丽参锈腐病^[24]、三七锈斑病^[25]和猕猴桃根腐病^[26]等多种作物病害的发生, 但尚未见关于此菌引起草莓根腐病的报道。本研究在国内首次报道大双孢土赤壳对草莓根系具有较强侵染能力, 可引起连作草莓栽培过程中根腐病发生, 而在国内其他地区尚未见报道, 该病原菌是否来源于种苗或周边其他栽培作物等问题尚需进一步研究。

病原菌的生物学特性与病害发生规律密切相关, 是进行病害爆发预测与控制的前提。本研究表明, 病原菌大双孢土赤壳营养要求低, 在所有供试培养基上均可生长, 在 CMA 培养基上生长最快, 但菌丝稀疏较薄, 产孢能力弱, 在其他培养基上生长速度无显著差异; 黑暗条件培养利于菌丝生长, 菌丝最适生长温度和 pH 分别为 25 $^{\circ}\text{C}$ 和 4,

分生孢子最适萌发温度和 pH 分别为 30 ℃ 和 7, 这与长安地区 4 月份前后设施栽培环境条件较为一致。草莓是一种极易受连作影响的经济作物, 长期单一种植易导致土壤酸化等问题, 给病原真菌提供更适宜的土壤环境, 同时连作土壤肥料不平衡导致植株生长障碍, 更易受病原菌侵染。因此, 生产上降低棚内温湿度, 施用有机肥调节土壤酸碱度可能有助于减轻草莓根腐病发生。申光辉等^[21]在开展本研究的同时, 还从健康草莓植株根际土壤中分离获得 2 株具有很好应用前景的防病促生真菌灰黄青霉素 HF3 和土曲霉 HF7, 并通过盆栽试验发现其防效分别为 53.0% 和 46.9%。

参考文献 Reference:

- [1] 赵秀娟, 王树桐, 张凤巧, 等. 草莓根腐病研究进展[J]. 中国农学通报, 2006, 8(8): 419-423.
ZHAO X J, WANG SH T, ZHANG F Q, *et al.* The research advance on strawberry root rot[J]. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2006, 8(8): 419-423.
- [2] 徐淑华, 蒋继志, 郝志敏. 河北满城地区草莓根腐病病原真菌的分离鉴定[C]//中国植物病理学会 2004 年学术年会论文集. 北京: 中国农业科学技术出版社, 2004: 68-71.
XU SH H, JIANG J ZH, HAO ZH M. Identification of pathogens from root rot in *Fragaria ananassa*[C]//Proceedings of the Annual Meeting of Chinese Society for Plant Pathology (2004). Beijing: China Agricultural Science and Technology Press, 2004: 68-71.
- [3] 赵宇, 钱恒伟, 徐鹏程, 等. 青岛市草莓根腐病病原菌分离及鉴定[J]. 中国植保导刊, 2016, 36(1): 43-46.
ZHAO Y, QIAN H W, XU P CH, *et al.* Isolation and identification of pathogen of strawberry root rot in Qingdao[J]. *China Plant Protection*, 2016, 36(1): 43-46.
- [4] 郑莉, 朱秋珍, 冯自立, 等. 草莓枯萎病病原菌鉴定及其生物学特性[J]. 湖北农业科学, 2006, 45(2): 194-195.
ZHENG L, ZHU Q ZH, FENG Z L, *et al.* Identification and biological characteristics of pathogen causing strawberry *Fusarium* wilt [J]. *Hubei Agricultural Sciences*, 2006, 45(2): 194-195.
- [5] 陈瑶, 王树雪, 魏艳敏, 等. 草莓根腐病菌 C16-4 的分离鉴定及生物学特性研究[J]. 果树学报, 2012, 29(4): 638-643.
CHEN Y, WANG SH X, WEI Y M, *et al.* Studies on isolation, identification and biological characteristics of pathogenic fungus strain C16-4 of strawberry root rot[J]. *Journal of Fruit Science*, 2012, 29(4): 638-643.
- [6] 胡彦江, 张茹琴. 烟台地区草莓根腐病病原鉴定及致病性测定[J]. 北方园艺, 2012(10): 141-144.
HU Y J, ZHANG R Q. Pathogenicity test and pathogen identification of strawberry root rot in Yantai area[J]. *Northern Horticulture*, 2012(10): 141-144.
- [7] 伊海静, 陈艳, 刘正坪, 等. 草莓枯萎病病原的分离鉴定及防治药剂筛选[J]. 西北农业学报, 2016, 25(4): 626-635.
YI H J, CHEN Y, LIU ZH P, *et al.* Isolation and identification of strawberry *Fusarium* wilt pathogen and fungicides screening[J]. *Acta Agriculturae Boreali-occidentalis Sinica*, 2016, 25(4): 626-635.
- [8] 张阳, 刘正坪, 魏艳敏, 等. 北京昌平地区草莓根腐病菌种类鉴定[J]. 中国农学通报, 2015, 31(18): 278-284.
ZHANG Y, LIU ZH P, WEI Y M, *et al.* Identification of the strawberry root rot pathogen in Changping District Beijing [J]. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2015, 31(18): 278-284.
- [9] 宁志怨, 董玲, 廖华俊, 等. 安徽省长丰县草莓根腐病病原的鉴定[J]. 安徽农业大学学报, 2017, 44(1): 130-134.
NING ZH Y, DONG L, LIAO H J, *et al.* Pathogen diagnosis of strawberry root rot caused by *Fusarium* in Changfeng county, Anhui province[J]. *Journal of Anhui Agricultural University*, 2017, 44(1): 130-134.
- [10] 钟珊, 张涛, 杨俊, 等. 草莓丝核菌根腐病的病原菌鉴定[J]. 植物病理学报, 2016, 46(3): 289-293.
ZHONG SH, ZHANG T, YANG J, *et al.* Identification of pathogen causing strawberry *Rhizoctonia* root rot[J]. *Acta Phytopathologica Sinica*, 2016, 46(3): 289-293.
- [11] 刘紫英, 康艳萍, 袁斌. 草莓红中柱根腐病病原菌的生物学特性[J]. 安徽农业大学学报, 2008, 34(4): 163-165.
LIU Z Y, KANG Y P, YUAN B. Identification of pathogens causing red strawberry root rot[J]. *Journal of Anhui Agricultural University*, 2008, 34(4): 163-165.
- [12] 朱晓琴, 宋自力, 裴冬丽, 等. 河南省商丘市草莓根腐病病原菌的分离和鉴定[J]. 植物保护学报, 2017, 44(2): 349-350.
ZHU X Q, SONG Z L, PEI D L, *et al.* Isolation and identification of strawberry root rot pathogen in Shangqiu, Henan province[J]. *Journal of Plant Protection*, 2017, 44(2): 349-350.
- [13] 方中达. 植病研究方法[M]. 北京: 中国农业出版社, 1998.
FANG ZH D. Methods of Phytopathology Research[M]. Beijing: China Agriculture Press, 1998.
- [14] 李林, 齐军山, 李长松, 等. 主要辣椒品种对疫病、根腐病的抗性鉴定[J]. 山东农业科学, 2001, 33(2): 29-30.
LI L, QI J SH, LI CH S, *et al.* Identification of root rot disease resistant of main pepper varieties[J]. *Shandong Agricultural Sciences*, 2001, 33(2): 29-30.
- [15] WHITE T J, BRUNS T D, LEE S, *et al.* Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics[C]//PCR Protocols: a Guide to Methods and Applications. San Diego: Academic Press, 1990: 315-322.
- [16] 王玲娜, 薛泉宏, 唐明, 等. 内蒙古芹菜根腐病病株和健株根域土壤的微生物生态研究[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2010, 38(8): 167-181.
WANG L N, XUE Q H, TANG M, *et al.* Microbial ecological study about the root-zone soil of the healthy and diseased celery plant in Inner Mongolia [J]. *Journal of Northwest A&F University (Natural Science Edition)*, 2010, 38(8): 167-181.
- [17] 魏景超. 真菌鉴定手册[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 2004.
WEI J CH. Fungal Identification Manual[M]. Shanghai: Shanghai Science and Technology Press, 2004.
- [18] ABREO E, MARTINEZ S, BETTUCCI L, *et al.* Morphological and molecular characterisation of *Campylocarpon* and *Cylindrocarpon* spp. associated with black foot dis-

- ease of grapevines in Uruguay [J]. *Australasian Plant Pathology*, 2010, 39(5): 446-452.
- [19] AGUSTÍ-BRISACH C, ARMENGOL J. Black-foot disease of grapevine: an update on taxonomy, epidemiology and management strategies [J]. *Phytopathologia Mediterranea*, 2013, 52(2): 245-261.
- [20] TEWOLDEMEDHIN Y, MAZZOLA M, MOSTERT L, et al. *Cylindrocarpon* species associated with apple tree roots in South Africa and their quantification using real-time PCR [J]. *European Journal of Plant Pathology*, 2011, 129(4): 637-651.
- [21] 申光辉, 薛泉宏, 张晶, 等. 草莓根腐病拮抗真菌筛选鉴定及其防病促生作用[J]. 中国农业科学, 2012, 45(22): 4612-4626.
- SHEN G H, XUE Q H, ZHANG J, et al. Screening, identification and biocontrol potential of antagonistic fungi against strawberry root rot and plant growth promotion [J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2012, 45(22): 4612-4626.
- [22] CHAVERRI P, SALGADO C, HIROOKA Y, et al. Delimitation of *Neonectria* and *Cylindrocarpon* (Nectriaceae, Hypocreales, Ascomycota) and related genera with *Cylindrocarpon*-like anamorphs [J]. *Studies in Mycology*, 2011, 68: 57-78.
- [23] 王玉君, 张丽春, 郭顺星. 土赤壳属三个中国新记录种[J]. 菌物学报, 2015, 34(6): 1209-1214.
- WANG Y J, ZHANG L CH, GUO SH X. Three records of *Ilyonectria* new to China [J]. *Mycosystema*, 2015, 34(6): 1209-1214.
- [24] LEE C Y, KIM K Y, LEE J E, et al. Enzymes hydrolyzing structural components and ferrous ion cause rusty-root symptom on ginseng (*Panax ginseng*) [J]. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2011, 21(2): 192-196.
- [25] 龙月娟, 毛忠顺, 朱书生, 等. 三七锈斑病的病原菌[J]. 菌物学报, 2015, 34(2): 177-185.
- LONG Y J, MAO ZH SH, ZHU SH SH, et al. The pathogen of *Panax notoginseng* root rust spot [J]. *Mycosystema*, 2015, 34(2): 177-185.
- [26] TRKKAN M. Evaluation of inhibitory effect of organic and inorganic salts against *Ilyonectria liriiodendri*, the causal agent of root rot disease of kiwifruit [J]. *Journal of Phytopathology*, 2015, 163(7/8): 567-577.

Identification and Biological Characteristics of Pathogen *Ilyonectria* Causing Strawberry Root Rot (*Fragaria* × *Ananassa* Duch.)

SHEN Guanghui^{1,3}, XUE Quanhong² and ZHAO Juan^{1,4}

(1. College of Life Sciences, Northwest A&F University, Yangling Shaanxi 712100, China; 2. College of Natural Resources & Environment, Northwest A&F University, Yangling Shaanxi 712100, China; 3. College of Food Science, Sichuan Agricultural University, Ya'an Sichuan 625014, China; 4. Institute of Plant and Environment Protection, Beijing Academy of Agriculture and Forestry Sciences, Beijing 100097, China)

Abstract Root rot is a serious damage to the strawberry production at fruit stage in recent years. Chang'an district of Xi'an city is the main production area of strawberry in Shaanxi province in China, the causal pathogen fungus was identified as *Ilyonectria macrodidyma* based on the morphology characteristics, ribosomal DNA-ITS phylogenetic analysis and Koch's postulates pathogenicity test. The biological characteristics showed that the pathogen could grow under different culture media. The optimum temperature for mycelia growth was 25 °C, and the suitable pH was pH 4. The optimum temperature and pH for spores germination were 30 °C and pH 7 respectively. The conidia lethal temperature was 45 °C for 10 min.

Key words Strawberry root rot; *Ilyonectria macrodidyma*; Pathogenicity; rDNA-ITS sequences

Received 2018-01-08

Returned 2018-02-27

Foundation item "Yangtze River Scholar and Innovation Team Development Plan" of Ministry of Education of P. R. China (No. IRT0748); Foundation for Disciplines Construction and Development of Sichuan Agricultural University (No. 03572107).

First author SHEN Guanghui, male, doctoral student, lecturer. Research area: microbial resource and utilization. E-mail: shenghuishen@163.com

Corresponding author XUE Quanhong, male, professor, doctoral supervisor. Research area: microbial resource and utilization. E-mail: xuequahong@163.com

(责任编辑: 郭柏寿 Responsible editor: GUO Baishou)