

进境百合种球中镰刀菌的分离鉴定

李敏¹, 宋蕴哲², 虞赞¹, 陈智明³, 刘国坤², 沈建国^{1*} (1. 福建出入境检验检疫局检验检疫技术中心, 福建福州 350000; 2. 福建农林大学植物保护学院, 福建福州 350002; 3. 福州出入境检验检疫局, 福建福州 350015)

摘要 [目的]从日本进境百合种球中发现带有褐色、不规则病斑的种球, 对其进行病原菌分离培养, 以明确其病原种类及分类地位。[方法]通过菌落形态特征观察、ITS 序列分析、致病性测定对该分离物进行鉴定。[结果]该分离物接种百合种球引起枯萎反应, ITS 序列和层出镰刀菌(*Fusarium proliferatum*)的序列相似性为 100%, 结合分离物的菌落特征和孢子特征将病原菌鉴定为层出镰刀菌。[结论]引起百合种球病斑的病原菌为层出镰刀菌。
关键词 百合; 种球; 层出镰刀菌; 鉴定
中图分类号 S41; S436.8 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2017)04-0008-03

Identification of *Fusarium proliferatum* in Introduced Lily Bulbs
LI Min¹, SONG Yun-zhe², YU Yun¹, SHEN Jian-guo^{1*} et al (1. Inspection and Quarantine Technology Center, Fujian Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Fuzhou, Fujian 350000; 2. College of Plant Protection, Fujian Agriculture and Forest University, Fuzhou, Fujian 350002)
Abstract [Objective] The pathogene was isolated and cultured from the lily bulbs introduced from Japan which had brown and irregular disease spot, so as to determine its taxonomic status. [Method] The pathogene were identified by pathogenicity determination, morphology observation and ITS sequence analysis. [Result] The ITS sequence of the pathogen causing wilt in lily identity of 100% with *Fusarium proliferatum* published in GenBank. [Conclusion] The results indicated that the pathogene isolated from the lily bulbs with black brown and irregular disease spot were *F. proliferatum*.
Key words Lily; Bulbs; *F. proliferatum*; Identify

镰刀菌可引起百合枯萎病, 是影响百合生产的重要病害之一^[1]。该病原菌主要侵染百合肉质根或鳞茎盘基部, 引起肉质根和盘基变褐腐烂, 并可向上发展导致鳞片出现褐色凹陷病斑, 后期鳞片从盘基散开并剥落。罹病鳞茎的植株明显矮化, 叶片由上而下黄化, 最后枯萎而死^[2]。2016 年福建出入境检验检疫局从日本进境的百合种球中发现带有褐色、不规则病斑的种球, 对其进行病原菌分离培养, 利用菌落形态特征观察、ITS 序列分析、致病性测定对该分离物进行了鉴定, 旨在为百合枯萎病的研究与防治提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料 供试材料为日本进境百合种球, 进境时间为 2016 年 3 月。

1.2 方法

1.2.1 病原菌分离。选取有病斑的感病种球进行病原菌分离。种球病斑部位用 70% 乙醇表面消毒, 切取病健交界处的组织, 置入 5% NaClO 消毒 3 min, 无菌水漂洗 3 次后, 将组织切成小块接种于 PDA 培养基平板上, 25 ℃ 培养。取菌落边缘的菌丝进行纯化 3 次后用于后续试验。

1.2.2 致病性测试。将培养基上的分离物用灭菌水稀释后制成悬浮液, 以孢子悬浮液作为接种体, 采用灌根接种法接种百合幼苗植株。接种后用塑料袋罩好, 置于 25 ℃ 生化培养中保湿 48 h。去掉塑料袋, 将植株移至温室正常生长, 以灭菌水为对照, 观察植株的发病情况。

1.2.3 形态学鉴定。观察菌落在 PDA 培养基上的颜色和形态, 在光学显微镜下观察病原菌的分生孢子梗、分生孢子、分生孢子器的形状和颜色, 测量其大小, 并显微拍摄。根据病原菌的形态特征, 进行病原菌种类的鉴定, 以明确病原菌的分类地位。

1.2.4 分子生物学方法鉴定。

1.2.4.1 总 DNA 提取。将 PDA 培养基上的菌丝挑至 1.5 mL 分离管中, 采用植物基因组提取试剂盒(TIANGEN 公司, DP305-02)提取病原菌总 DNA, -20 ℃ 保存备用。

1.2.4.2 ITS 区 PCR 扩增。采用真菌通用引物 ITS4(5'-TCCTCCGCTTATGATATGC-3')/ITS5(5'-GGAAGTAAAGTCGTAACAAGG-3')进行 PCR 扩增, 引物由上海生工生物工程技术有限公司合成。扩增体系: 2×Taq PCR Master Mix 12.5 μL, 上、下游引物(10 pmol/L)各 1.0 μL, DNA 模板 2.0 μL, ddH₂O 补至 25.0 μL。反应循环程序: 94 ℃ 预变性 3 min; 94 ℃ 30 s, 60 ℃ 30 s, 72 ℃ 1 min, 35 个循环; 最后 72 ℃ 延伸 10 min。

取 10.0 μL 扩增产物在 1.5% 琼脂糖凝胶 1×TAE 缓冲液中电泳, 核酸染料染色后用凝胶成像系统分析。扩增产物由上海生工生物工程技术有限公司测序, 所得序列经 Contig 软件进行正反向拼接、人工校对后提交到 NCBI 数据库进行 Blast, 与 GenBank 中的核酸序列进行比对与同源性分析, 确定菌株类别。

2 结果与分析

2.1 菌落形态特征 从百合种球的褐色、不规则病斑中分离出 1 株分离物(图 1), 编号为 bh-1, PDA 培养基上菌落白色, 圆形, 菌丝疏松如絮状, 基底粉色, 略带紫色(图 2)。分生孢子梗瓶颈状(图 3)。小型分生孢子较多, 卵圆形至长圆

基金项目 质检公益性行业科研专项(201710076); 福建出入境检验检疫局科技计划项目(FK2014-JS003); 福建省林业科学研究项目(H2014009)。
作者简介 李敏(1984—), 女, 山东菏泽人, 农艺师, 硕士, 从事植物病理学研究。* 通讯作者, 研究员, 博士, 从事植物病毒研究。
收稿日期 2016-12-07

形,有 0~1 个分隔,大小为(4.7~12.1) $\mu\text{m} \times (1.4 \sim 3.9)$ μm ,着生于分生孢子梗上,常在瓶梗顶端聚成球团;大型分生孢子较少,纺锤形或镰刀形,较粗壮,稍弯曲,有 3~5 个分隔,大小为(17.3~40.7) $\mu\text{m} \times (2.1 \sim 4.8)$ μm (图 4)。

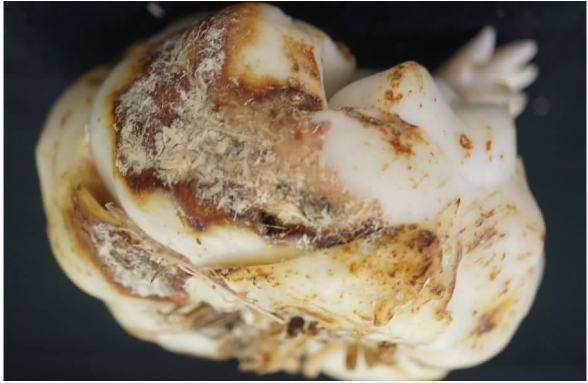


图 1 百合种球病斑症状
Fig.1 The symptom of spot in lily bulbs

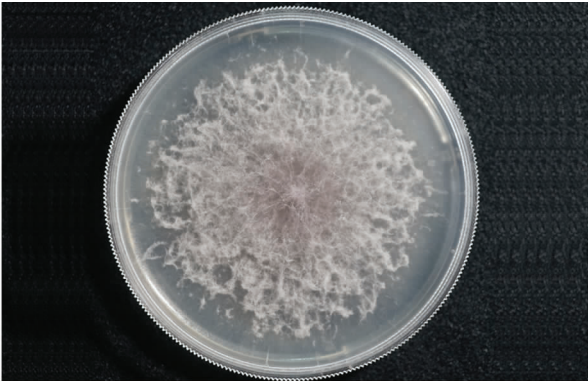


图 2 分离物 bh-1 在 PDA 上的形态
Fig.2 The colonial morphology of strain bh-1 on PDA medium



注:a. 分离物 bh-1;b. 无菌水
Note:a. Isolate bh-1;b. Sterile water

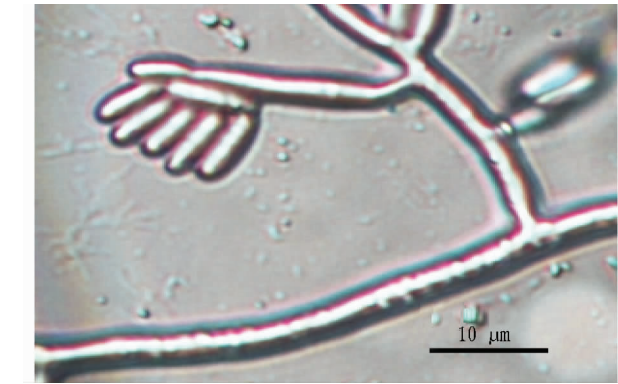


图 3 分生孢子梗
Fig.3 Conidiophore

2.2 致病性测试 将孢子悬浮液接种到健康百合幼苗植株上,7 d 后叶片顶部黄化,随后叶片由上而下黄化、萎蔫,15 d 后枯萎而死。从接种发病的病株上分离获得一致的病原菌,无菌水对照植株未出现症状(图 5)。

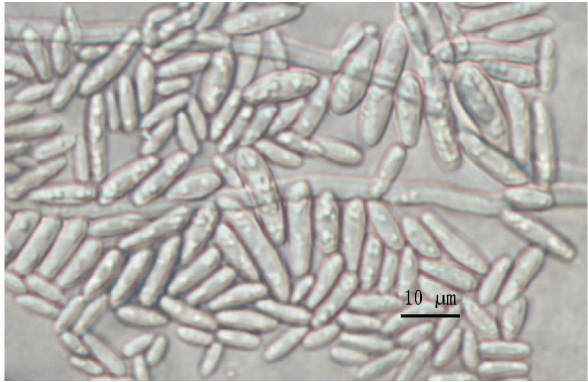


图 4 分生孢子
Fig.4 Conidia



图 5 分离物 bh-1 接种百合后症状

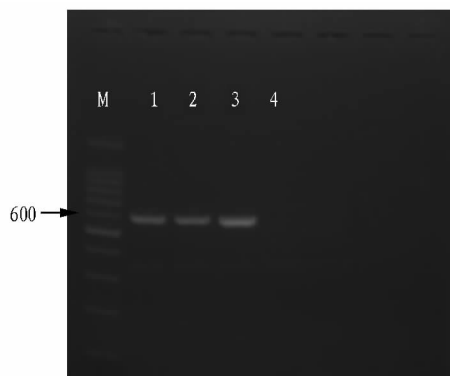
Fig.5 The symptom of spot on lily inoculated with strain bh-1

2.3 序列分析 利用真菌通用引物 ITS/I4TS5 对分离物 bh-1 提取的 DNA 进行扩增,PCP 扩增产物双向测序后拼接得到 557 bp 的序列(图 6)。将该序列提交到 NCBI 上进行 Blast 比对,分离物 bh-1 与 GenBank 中 *Fusarium proliferatum* (登录号: KJ767073、EU151484、FJ040179) 的 ITS 区序列同源性均达 100%。结合菌落、分生孢子、培养性状等形态学特征

和 ITS 区的 DNA 序列分析,确定分离物 bh-1 为层出镰刀菌(*Fusarium proliferatum*)。

3 结论与讨论

近年来,随着物质文化生活水平的不断提高,人们对各种苗木、花卉和盆栽等景观植物的需求不断增长,越来越多的游客在进境或邮寄包裹时携带花卉种子、种球及植株等。



注: M. Mark; 1~3. 分离物 bh-1; 4. ddH₂O

Note: M. Mark; 1~3. Isolate bh-1; 4. ddH₂O

图6 分离物 bh-1 PCR 扩增产物

Fig. 6 The PCR products of strain bh-1

镰刀菌属是进境水果、种苗等植物产品中经常截获的有害生物,而长期以来该属病原菌的命名较混乱,加之其病原菌种类较多,传统的形态学鉴定方法为真菌分类研究提供了必要前提,但存在外界因素和人为因素的局限性,尤其分离培养物的培养性状不典型或者不产孢时,为该菌的口岸检疫鉴定工作增加了一定困难。

镰刀菌属真菌可侵染农作物、观赏植物等 100 余种,引起植物根腐、茎腐、穗腐等多种病害,导致植物萎蔫死亡^[3]。层出镰刀菌又称层生镰刀菌或再育镰刀菌,该菌寄主广泛,可侵染玉米、向日葵、大蒜、瓜类等多种作物及观赏植物^[4-7]。国内对百合病害的研究中少有报道该菌,前人报道了云南百合、龙牙百合、甘肃百合、江西百合枯萎病的主要致病菌均为尖孢镰刀菌^[1,8-10];李诚等^[11]报道兰州百合枯萎病病原为尖孢镰刀菌、串珠镰刀菌(*F. moniliforme*)和茄腐皮镰刀菌(*F. solani*)。在国外研究中,Prados-ligero 等^[12]报道了

Fusarium proliferatum 引起西班牙百合枯萎病。该研究采用真菌利用 ITS 通用引物,扩增百合种球中分离物 bh-1 的 DNA,扩增产物进行测序,所得序列与 GenBank 中的核酸序列进行比对,初步确定病原菌种类,结合菌落、分生孢子、培养性状等形态学特征,查阅相关文献资料,确定分离物 bh-1 为层出镰刀菌(*F. proliferatum*),这与 Prados-ligero 等^[12]的研究结论一致。该研究将传统的形态学鉴定和分子生物学技术相结合,可以快速地对层出镰刀菌进行鉴定,兼顾鉴定检疫的效率和质量,为层出镰刀菌的鉴定和进境口岸检疫提供理论依据。

参考文献

- [1] 杨秀梅,王继华,王丽花,等. 百合枯萎病病原鉴定与 ITS 序列分析[J]. 西南农业学报,2010,23(6):1914-1916.
- [2] 丁丁,吕长平,刘飞,等. 百合枯萎病研究进展[J]. 江苏农业科学,2009(3):128-130.
- [3] 陈剑山. 来自海南岛的镰刀菌的种类鉴定[D]. 海口:华南热带农业大学,2007.
- [4] 卢维宏,黄思良,陶爱丽,等. 玉米穗腐病样品中层出镰刀菌的分离与鉴定[J]. 植物保护学报,2011,38(3):233-239.
- [5] 高婧,张园园,王凯,等. 向日葵枯萎病菌的分离鉴定及其生物学特性[J]. 中国油料作物学报,2016,38(2):214-222.
- [6] 李旭双,陈典,梁誉,等. 大蒜干腐病病原菌的分离鉴定[J]. 中国蔬菜,2012,1(20):88-93.
- [7] 袁微微,李新凤,高俊明,等. 山西省瓜类作物根茎部镰刀菌的分离与鉴定[J]. 山西农业科学,2013,41(3):246-250,258.
- [8] 潘其云,朱明德,邓建玲,等. 百合镰刀菌枯萎病的发生与防治[J]. 上海农业科技,2004(3):103-239.
- [9] 邹一平,周蓉,杨士杰,等. 镰刀菌与根螨在食用百合鳞茎上的协同侵染及防治[J]. 江苏农业科学,2006(6):135-138.
- [10] 梁巧兰,徐秉良,刘艳梅,等. 观赏百合根腐病病原鉴定及药剂筛选[J]. 甘肃农业大学学报,2004,39(1):25-28.
- [11] 李诚,李俊杰. 百合枯萎病病原菌鉴定[J]. 植物病理学报,1996,26(2):192-193.
- [12] PRADOS-LIGERO A M, BASALLOTE-UREBA M J, MELERO-VARA J M. First report of *Fusarium oxysporum* f. sp. lili and *F. proliferatum* affecting *Lilium* crops in Spain [J]. Tropical plant pathology, 2008, 33(3):9.

(上接第7页)

3 结论

混合菌降解竹笋壳的微观过程基本如下:混合菌分泌的水解酶先将竹笋壳表面的蜡质、半纤维素和纤维素进行降解,对木质素进行侧链甲基化和氧化,使竹笋壳表面出现裂痕,内部结构裸露,随后破坏木质素苯环,菌丝进入竹笋壳内部,释放木质纤维素降解酶系^[9]。

参考文献

- [1] 黄丹莲,曾光明,黄国和,等. 白腐菌固态发酵条件最优化及其降解植物生物质的研究[J]. 环境科学学报,2005,25(2):232-237.
- [2] 王洪媛,范丙全. 三株高效秸秆纤维素降解真菌的筛选及其降解效果[J]. 微生物学报,2010,50(7):870-875.
- [3] XIONG X P, WEN X H, BAI Y N, et al. Effects of culture conditions on ligninolytic enzymes and protease production by *Phanerochaete chrysosporium* in air[J]. Journal of environmental sciences, 2008, 20(1):94-100.

- [4] SÁNCHEZ C. Lignocellulosic residues: Biodegradation and bioconversion by fungi[J]. Biotechnology advances, 2009, 27(2):185-194.
- [5] 白洪志,杨谦,张鲁进. 纤维素降解菌筒青霉 H-11 的筛选及酶学特性的研究[J]. 华北农学报,2007,22(3):160-162.
- [6] 王仁佑,刘剑潇,黄红丽,等. 鼠李糖脂对两株木质素降解菌产酶能力的影响[J]. 湖南大学学报(自然科学版),2008,35(10):70-74.
- [7] ZENG G M, YU M, CHEN Y N, et al. Effects of inoculation with *Phanerochaete chrysosporium* at various time points on enzyme activities during agricultural waste composting [J]. Bioresource technology, 2010, 101(1):222-227.
- [8] RODRÍGUEZ GOUTO S, MDES D, SANROMÁN M A. Optimum stability conditions of pH and temperature for ligninase and manganese-dependent peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium*. Application to *in vitro* decolorization of Poly R-478 by MnP[J]. World journal of microbiology and biotechnology, 2006, 22(6):607-612.
- [9] 高大文,文湘华,钱易. 白腐真菌培养条件对其分泌木质素降解酶的影响[J]. 中国环境科学,2005,25(5):572-575.