

# 草莓黑斑病病原菌的分离鉴定

朱洪坤 赵丽娜\*

吉林农业科技学院

**摘要:** 本试验为了鉴定在吉林农业科技学院(吉林省吉林市)种植的露地草莓上发现的草莓黑斑病病原菌,明确引起草莓黑斑病的病原菌种类。采用了形态学特征、柯赫氏法则、rDNA-ITS序列比对鉴定,确定了致病菌的分类地位。结果表明:草莓黑斑病的病原菌为细极链格孢菌*Alternaria tenuissima*。

**关键词:** 草莓; 黑斑病; 细极链格孢菌; 形态学特征; 分子鉴定

【DOI】10.12252/j.issn.2096-6288.2023.08.229

草莓*Fragaria x ananassa* Duch.属于蔷薇科多年生草本植物,由于其果实口感香甜,色泽鲜艳,因此有“水果皇后”之称。2013年世界草莓总量达到73.96 × 10<sup>5</sup> t<sup>[1]</sup>,近年来,吉林、辽宁两省草莓种植面积为11.67万hm<sup>2</sup>,栽培规模空前扩大。草莓在种植的过程中易发生各种病虫害,本文简述了草莓黑斑病的症状并就病原菌的种类进行了鉴定,以期为进一步防治提供理论依据。

## 一、材料与方法

### (一) 病害症状观察

2020年9月,在吉林农业科技学院露地草莓上发现病害,对病害症状进行数码拍照记录,并采集患病叶片带回实验室,用显微镜观察病原菌。

### (二) 病原菌分离、纯化与致病性测定

对病原菌采用组织分离法<sup>[2-7]</sup>进行分离,剪取叶片的病健交界处5mm×5mm的组织,在75%乙醇中消毒30s,重复三次,最后用无菌水冲洗3次,放入PDA固体培养基中,每皿3块,25℃恒温培养。待长出菌落后,挑取边缘的单根菌丝,放入PDA固体培养基中进行纯化,重复上述步骤反复纯化,纯化后的菌种保存备用<sup>[8]</sup>。

将纯化后的分离物移至PDA固体培养基中,25℃恒温培养直至菌落直径约为80mm,从外缘打取直径6mm的菌丝块,选取大小基本一致健康的草莓叶片,用无菌针造成微伤口,然后将菌丝块接种到针刺部位,并用脱脂棉保湿,以接种PDA培养基作为对照,每个处理设3个重复,置于25℃温室培养,接种24h后观察植株发病情况。发病后对植株的病组织再进行分离,比较与其最初分离到的病原菌是否一致<sup>[9-13]</sup>。

### (三) 病原菌鉴定

观察培养基上病原菌的菌落形态、颜色及生长状况。在显微镜下观察病原菌的孢子形态和产孢结构。

使用真菌基因组DNA提取试剂盒提取DNA。以总DNA为模板,利用ITS4: 5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3'; ITS5: 5'-TCCTCGCTTATTGATATGC-3'为引物进行PCR扩增<sup>[14]</sup>。PCR产物送至上海生工生物工程有限公司进行测序,然后将测序结果与GenBank数据库中模式菌株的序列进行BLAST比对,确定其分类地位。

## 二、结果与分析

### (一) 症状描述

草莓黑斑病主要症状为:产生不规则的黑色病斑,略呈轮纹状,病斑中心为灰褐色,病斑外缘有黄色晕圈,发生严重时影响草莓的质量与产量。

### (二) 病原菌分离、纯化及致病性

通过组织分离获得8个菌株,命名为:CM01、CM02、CM03、CM04、CM05、CM06、CM07、CM08。因菌株CM01~CM08的形态特征一致,为同一株菌,故后续试验均以CM01为样本。采用离体接种法进行致病性测定,结果表明:接种菌株CM01的植株叶片5d后出现褐色小病斑(图1-A);7d后病斑逐渐扩大,由褐色变为黑色,与田间发病症状基本一致(图1-B);而接种PDA培养基的叶片无任何变化(图1-C、图1-D)。对接种病原菌的叶片进行再分离,获得了与原接种菌株形态一致的菌株,初步确定菌株CM01为草莓黑斑病病原菌。

### (三) 病原菌的形态学特征及分子生物学鉴定

草莓黑斑病菌株在PDA培养基上的菌落近圆形,边缘规则,呈灰青色至暗褐色,菌丝致密,菌落背面呈深褐色至黑色;分生孢子呈倒棍棒状或倒梨状,褐色、具有3~8个横隔膜。

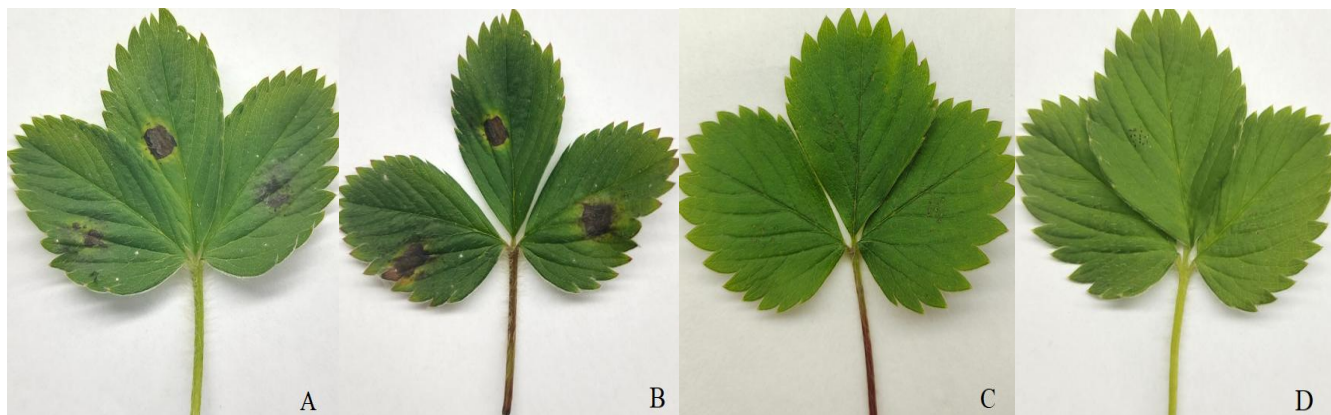


图1 分离菌株CM01对草莓离体叶片的致病性测定

ITS基因扩增结果表明：PCR扩增条带大小约为550 bp（图2）。测序结果输入到GenBank数据库中BLAST比对，结果表明：菌株CM01与*A. tenuissima*同源率为100%。结合菌株CM01的形态特征，最终将草莓黑斑病病原菌鉴定为链格孢属细极链格孢*A. tenuissima*。

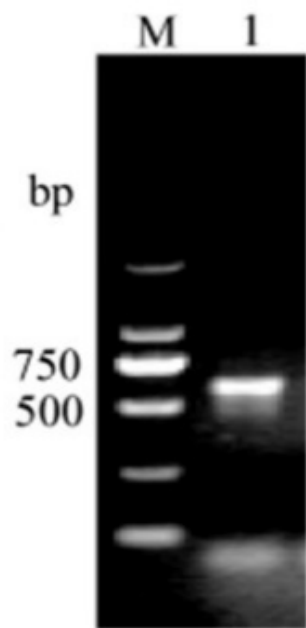


图2 菌株CM01的ITS基因扩增产物

### 三、讨论

本研究对吉林农业科技学院（吉林省吉林市）种植的露地草莓黑斑病病原菌进行分离纯化，结合形态学和分子生物学鉴定结果最终将草莓黑斑病病原菌鉴定为细极链格孢菌*A. tenuissima*。吉林省种植草莓有很多年的历史，但草莓单产水平一直不高，近几年随着农业产业化政策的逐步完善及中国农业供给改革的出台，吉林省

草莓的单产水平逐步增长，草莓种植面积不断扩大<sup>[15]</sup>，但是草莓比较容易受到各种因素的侵扰而影响生产，例如常见的病虫害，所以在草莓日常的种植管理环节中，对于其病虫害的预防和治理尤为重要。

草莓黑斑病是1977年在日本首次被发现并报道的<sup>[16]</sup>，在伊朗报道出草莓黑斑病是由细极链格孢菌*A. tenuissima*引起的<sup>[17]</sup>，与本文论证相同；但是在北京有报道称链格孢菌*Alternaria alternata*和细极链格孢菌*A. tenuissima*共同作用引起草莓黑斑病<sup>[18]</sup>，本试验分离鉴定出细极链格孢菌*A. tenuissima*，并未分离出链格孢菌*A. alternata*。此外，意大利<sup>[19]</sup>报道草莓黑斑病也是由链格孢菌*A. alternata*引起的，与本文论证不同。

此外，很多经济作物也会感染黑斑病，例如月季<sup>[20]</sup>、甜瓜<sup>[21]</sup>、芍药<sup>[22]</sup>和大樱桃<sup>[23]</sup>等。其中大多数黑斑病是由链格孢菌*A. alternata*引起的，但是不同的是月季黑斑病的致病菌为半知菌亚门盘二孢属的蔷薇盘二孢<sup>[20]</sup>，核桃黑斑病的主要病原菌为黄单胞杆菌<sup>[24]</sup>。所以黑斑病不光由链格孢菌引起，还受其他致病菌和因素影响。本研究目前对草莓黑斑病病原菌进行了初步的分离鉴定，下一步将对草莓黑斑病的生物学特性和防治进行研究。

### 参考文献

- [1] FAO STAT. Food and agriculture organization of the United Nations [EB/OL]. 2015. <http://www.fao.org/home/zh/>.
- [2] 方中达. 植物病害研究方法（第三版）[M]. 北京：中国农业出版社，1998：122-140.

- [3] 杨成前, 吴中宝, 余中莲. 重庆市白术根腐病发生危害及其病原菌生物学特性[J]. 南方农业学报, 2018 (8): 1561-1567.
- [4] 张凡, 冯婷, 韩正敏. 落羽杉赤枯病病原菌的分离鉴定及生物学特性分析[J]. 植物保护学报, 2018, 45 (4): 900-907.
- [5] 杨婷, 杨宽, 何迟. 三七黑斑病病原菌 *Alternaria alternata* Keissl. 生物学特性研究[J]. 中药材, 2018 (4): 763-770.
- [6] 臧超群, 林秋君, 傅俊范. 辽宁树莓黏菌病病原菌原质团生物学特性研究[J]. 湖北农业科学, 2018, 57 (12): 65-68.
- [7] 孔琼, 袁盛勇, 郭建伟. 铁皮石斛根腐病病原菌鉴定及生物学特性研究[J]. 中药材, 2018 (7): 1566-1570.
- [8] 刘燕妮. 吉林省8种药用植物真菌病害病原学研究及室内药剂筛选[D]. 长春: 吉林农业大学, 2014.
- [9] 曾尔玲, 任春光, 桑维钧. 蓝莓枝枯病病原菌生物学特性及室内药剂筛选[J]. 江苏农业科学, 2018, 46 (12): 79-82.
- [10] 姚锦爱, 黄鹏, 陈峰. 建兰茎腐病原菌尖孢镰刀菌的生物学特性研究[J]. 福建农业学报, 2018, 33 (2): 190-194.
- [11] 李沛利, 刘丹, 陈诗瑶. 四川省成都市狭叶十大功劳炭疽病原菌的鉴定与生物学特性研究[J]. 植物保护, 2018, 44 (3): 61-66.
- [12] 孙杨, 付全娟, 孙玉刚. 樱桃褐斑病病原菌生物学特性及品种抗性评价[J]. 植物保护, 2017, 43 (4): 110-114.
- [13] 丁文姣, 于安芬, 李瑞琴. 定西市黄芪根腐病优势病原菌生物学特性研究[J]. 甘肃农业科技, 2018 (3): 33-36.
- [14] 邹娟, 姚卓, 尚永华. 柑橘炭疽病菌的生物学特性及枯草芽胞杆菌对其的抑制作用[J]. 植物保护, 2016, 42 (1): 61-67.
- [15] 武海波. 临江市草莓种植现状分析及发展对策研究[D]. 吉林农业大学, 2019.
- [16] Watanabe Y, Umekawa M, Nishimura S. On the causal pathogen of black leaf spot of strawberry (in Japanese) [J]. Annals of the Japanese Society of Phytopathology. 1978, 44: 363.
- [17] Bagherabadi S, Zafari D, Soleimani M J. First report of leaf spot of strawberry caused by *Alternaria tenuissima* in Iran [J]. Journal of Plant Pathology Microbiology. 2015, 6 (3): 258.
- [18] Fu Yu, Zhang Xiaofang, Liu Shijiahui, et al. Characterization of *Alternaria* species associated with black spot of strawberry in Beijing municipality of China [J]. Canadian Journal of Plant Pathology. 2020, 42 (2).
- [19] Wada H, Cavanni P, Bugiani R, et al. Occurrence of the strawberry pathotype of *Alternaria alternata* in Italy [J]. Plant Disease. 1996, 04 (6): 715-716.
- [20] 冯宝珍, 李培谦. 月季黑斑病病原菌鉴定及室内药剂初步筛选[J]. 植物保护学报, 2019, 46 (05): 1147-1154.
- [21] 何香, 孙磊, 艾尔肯·热合曼, 等. 冬季储藏甜瓜黑斑病病原菌的分离与鉴定[J]. 新疆农业科学, 2010, 47 (07): 1365-1369.
- [22] 陶航, 扎依娜·玛合巴提, 张烨, 等. 芍药黑斑病病原菌鉴定及其对杀菌剂敏感性分析[J]. 园艺学报, 2021, 48 (01): 173-182.
- [23] 赵远征, 刘志恒, 李俞涛, 等. 大樱桃黑斑病病原鉴定及其致病性研究[J]. 园艺学报, 2013, 40 (08): 1560-1566.
- [24] 怀婷婷, 刘春晓, 苗庆选, 等. 核桃黑斑病发生规律及防控技术研究进展[J]. 北方园艺, 2021 (20): 143-149.
- 基金项目: 吉林省大学生科技创新科研项目(编号: SJ2022041)
- 作者简介: 朱洪坤(2001—), 女, 吉林通化人, 学士。研究方向: 植物病害研究。
- 通讯作者: 赵丽娜(1985—), 女, 吉林榆树人, 博士, 讲师。研究方向: 植物病害研究。