

云南非洲菊根腐病病原鉴定

李 越, 李 凡, 刘云龙, 李 玲, 陈精兰, 唐小艳, 陈海如

(教育部农业生物多样性与病虫害控制重点实验室, 云南农业大学 植物保护学院, 云南 昆明 650201)

摘要:从云南非洲菊主产区表现根腐症状的非洲菊病株上分离到13个镰刀菌菌株及18个疫霉菌菌株,经形态学鉴定、鉴别寄主测定及分子鉴定,分别确定为茄病镰刀菌 *Fusarium solani* (Mart.) Sacc. 和隐地疫霉 *Phytophthora cryptogea* Pethybridge & Lafferty. 将茄病镰刀菌和隐地疫霉回接到健康非洲菊根部,隐地疫霉可以单独引起根腐,而茄病镰刀菌不能单独使植株表现明显发病症状. 将茄病镰刀菌和隐地疫霉混合接种后,发现非洲菊根腐症状加重,且发病时间缩短. 表明隐地疫霉是引起云南非洲菊根腐病的主要病原,茄病镰刀菌对非洲菊根腐病的发生起到加速发病时间和加重发病症状的作用.

关键词:非洲菊; 根腐病; 隐地疫霉; 茄病镰刀菌

中图分类号:S436.8

文献标识码:A

文章编号:1001-411X(2008)03-0021-04

Identification of the Pathogens Causing Root Rot of *Gerbera jamesonii* in Yunnan

LI Yue, LI Fan, LIU Yun-long, LI Ling, CHEN Jing-lan, TANG Xiao-yan, CHEN Hai-ru

(Key Lab of Agricultural Biodiversity for Pest Management of Ministry of Education,
College of Plant Protection, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, China)

Abstract: Thirteen isolates of *Fusarium solani* and eighteen isolates of *Phytophthora cryptogea* were isolated from the diseased *Gerbera jamesonii* Bolus showing symptom of root rot in Yunnan Province. The isolates of *F. solani* was identified as *F. solani* (Mart.) Sacc. and the isolates of *P. cryptogea* was identified as *P. cryptogea* Pethybridge & Lafferty by morphology, by the methods of differential hosts test and molecular identification. *F. solani* and *P. cryptogea* were re-inoculated to healthy *G. jamesonii*. It was showed that only *P. cryptogea* had the infectivity and caused the root rot to *G. jamesonii*, however, no distinct symptom could be observed when *F. solani* was inoculated alone to *G. jamesonii*. The co-infection test revealed that the root rot was deteriorated. The results indicated that the symptom of root rot of *G. jamesonii* was mainly caused by *P. cryptogea*, and although *F. solani* caused no distinct symptom on *G. jamesonii*, and could somewhat play accelerated and enhanced role on the symptoms caused by *P. cryptogea*.

Key words: *Gerbera jamesonii*; root rot disease; *Phytophthora cryptogea*; *Fusarium solani*

非洲菊 *Gerbera jamesonii* Bolus 又名扶郎花,是世界五大切花之一,因其品种繁多,花色鲜艳而丰富,花朵清秀挺拔、飘逸俊逸而深得人们青睐,具有广阔的发展前景. 近几年随着我国非洲菊种植面积的逐年增加,病害问题越来越严重,特别是根腐病问题,其发生面积广,危害严重,是非洲菊生产上的主要病

害之一^[1-2]. 根据笔者对云南晋宁、呈贡、宜良、安宁以及玉溪等非洲菊主产区的调查,患病植株地上部分失水萎蔫,根部、茎部和叶柄基部变褐腐烂、呈水渍状,严重时皮层脱落,田间一般发病率为15%~20%,严重时可达80%以上,极大地影响了非洲菊的产量和品质,大大降低了生产效益. 关于引起非洲菊

收稿日期:2007-11-13

作者简介:李 越(1979—),女,硕士; 通讯作者:李 凡(1970—),男,教授,博士,E-mail: fanlikm@126.com

基金项目:云南省自然科学基金重点项目(2004C0007Z)

根腐病的病原,国内外主要有2种报道:芬兰、荷兰等国家以及我国甘肃、江苏等地报道为镰刀菌^[1-6];而丹麦、法国及我国广东珠海、海南、云南昆明等地报道为疫霉^[4-14]。为此笔者对非洲菊根腐病的病原进行了系统鉴定。

1 材料与方法

1.1 样品采集

从云南非洲菊主产区晋宁、呈贡、宜良、安宁以及玉溪等地的非洲菊苗圃中采集地上部萎蔫、根茎部和叶柄基部变褐腐烂、呈水渍状的病株,取腐烂病根,分类编号装于袋中带回室内分离培养。

1.2 病原分离

PDA 培养基组织分离:参照方中达^[15]的方法。

番茄胡萝卜选择性培养基组织分离:参照谢为龙等^[7]的方法。将番茄胡萝卜培养基(即番茄、胡萝卜各150 g捣碎后加水煮沸20 min,再加入葡萄糖6 g、琼脂20 g,融化后定容至1 000 mL)高压灭菌后,冷却至45℃左右,加入选择性成分安比西林500 mg/kg、制菌霉素50 mg/kg、五氯硝基苯10 mg/kg。

1.3 病原鉴定

1.3.1 镰刀菌的鉴定 将分离到的镰刀菌置于PDA平板上于25℃培养箱中培养,观察菌落培养性状、色泽、形态特征,并进行孢子大小等显微计测。参照王拱辰等^[16]的镰刀菌鉴定标准进行鉴定。

1.3.2 疫霉的鉴定 形态特征观测:将分离到的疫霉置于番茄胡萝卜平板上生长4 d后,描述菌落形态。从菌落边缘切取1 cm × 1 cm的菌丝块于灭过菌的土壤浸出液中诱导其孢子囊的产生,在显微镜下镜检菌丝和孢子囊的形态特征、孢囊梗分支方式,同时测量菌丝粗细及孢子囊的大小等。参照余永年的疫霉鉴定标准进行鉴定^[11]。

鉴别寄主测定:参照谢为龙等^[8]的方法,用黄瓜和西瓜作为鉴别寄主。将疫霉孢子悬浮液接种90 d苗龄的非洲菊和20 d苗龄的黄瓜和西瓜,用灭菌水作对照。每处理20株苗,置28℃左右温室中,观察接种植物发病症状。

分子鉴定:菌丝培养、基因组DNA提取参照He^[18]的方法,引物设计以及PCR反应条件参照郭成宝等^[9]的方法。引物序列为:PC1:5'-CCG CCT GGC CTA GTA GCG TA-3'; PC2:5'-TCC ACC CCA GCT TAC GCC AG-3'(由北京三博远志生物技术有限责任公司合成)。本试验扩增了所分离到的18个疫霉菌株,并以南京农业大学王源超教授惠赠的隐地疫霉 *Phytophthora cryptogea* 作为阳性对照,以茄病镰刀

菌 *Fusarium solani*、烟草疫霉 *P. nicotianae*(分离于烟草)、烟草疫霉(分离于枇杷)、致病疫霉 *P. infestans* 等其他真菌作为阴性对照。

1.4 致病性测定

1.4.1 孢子悬浮液的制备 镰刀菌孢子悬浮液的制备:将分离到的镰刀菌置于PDA平板上生长7 d后,用无菌水洗下孢子,于磁力振荡器上混匀,并将孢子浓度调至约 1.0×10^6 mL⁻¹。

疫霉孢子悬浮液的制备:将分离到的疫霉置于番茄胡萝卜平板上生长4 d后,从菌落边缘切取2 mm × 2 mm的菌丝块,移至番茄胡萝卜培养液中,在25℃黑暗条件下培养4 d后,倒去培养液,换上灭菌土壤浸出液,在25℃光照条件下培养2~3 d后在显微镜下镜检是否产生孢子囊。待产生大量孢子囊后,将孢子囊悬浮液置于4℃冰箱中15 min,再放入25℃恒温箱中约20 min使游动孢子充分释放,于磁力振荡器上混匀,并将孢子浓度用无菌水调至约 1.0×10^6 mL⁻¹。

1.4.2 接种方法 将健康非洲菊品种大臣的根部分别浸在配制的2种孢子悬浮液中,5~6 h后取出栽入装有灭菌土壤的钵钵,置于28℃左右温室中。以灭菌水中浸过的植株为对照,10株非洲菊为1个处理,每处理重复3次。接种后第4 d开始调查接种植物发病情况。

1.5 复合接种试验

将镰刀菌及疫霉的孢子悬浮液各取1/2体积,配制成镰刀菌和疫霉等量混合的孢子悬浮液。接种方法同1.4.2,以单独接种镰刀菌和疫霉孢子悬浮液的非洲菊植株为对照。接种后第3 d开始调查病情。按发病率及病情指数记录发病情况,分级标准参照李海燕等^[19]的方法:0级——无病;1级——1/2以下叶片萎蔫;2级——1/2以上叶片萎蔫,但未完全萎蔫;3级——全部叶片均萎蔫,有的叶片开始干枯;4级——全株枯死。

病情指数 = $\Sigma(\text{病级株数} \times \text{级数}) \times 100 / (\text{株数总和} \times \text{发病最重级数})$ 。

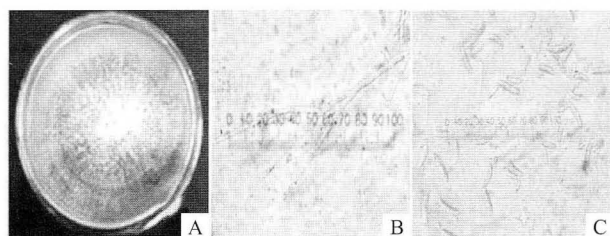
2 结果与分析

2.1 病原分离

将从云南非洲菊主产区采集到的非洲菊病根用PDA培养基分离得到13个镰刀菌菌株,用番茄胡萝卜选择性培养基分离得到18个疫霉菌株。由于其中一些病根仅采用了番茄胡萝卜选择性培养基分离法,忽略了对镰刀菌的分离,因此得到的镰刀菌菌株较疫霉菌株少。

2.2 病原鉴定

2.2.1 镰刀菌的鉴定 本试验所分离到的13个镰刀菌菌株其菌落均为薄绒状,浅灰色。小型分生孢子数量多,卵形或肾形,壁较厚,大小 $(8.3 \sim 15.3) \mu\text{m} \times (3.2 \sim 4.0) \mu\text{m}$ 。大型分生孢子马特型,两端较钝,顶胞稍尖,基胞有圆形足跟,壁较厚,2~8隔(多为3~5隔),大小为 $(20.0 \sim 50.0) \mu\text{m} \times (3.7 \sim 6.0) \mu\text{m}$ 。产孢细胞为长筒形、单瓶梗,长可达200 μm 以上,分枝较少。厚垣孢子球形,单生或对生,直径为 $7.2 \sim 9.3 \mu\text{m}$ (图1)。根据以上培养性状及形态特征,参照镰刀菌的鉴定标准^[5],本试验分离到的镰刀菌均被确定为茄病镰刀菌 *Fusarium solani* (Mart.) Sacc.。



A: 菌落; B: 产孢细胞(20×); C: 分生孢子(20×)

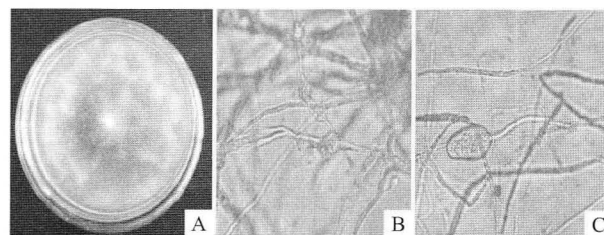
A: colony; B: conidiogenous cells; C: conidia

图1 茄病镰刀菌的形态特征

Fig. 1 Morphological characteristics of *Fusarium solani* isolated from diseased *Gerbera jamesonii*

2.2.2 疫霉的鉴定 形态特征观测:本试验分离到的18个疫霉菌株在番茄胡萝卜培养基平板上菌落均一,呈放射状,气生菌丝较少,边缘明显。菌丝无隔,粗 $3.0 \sim 8.0 \mu\text{m}$ 。菌丝膨大体呈网状结构,多球形,少不规则形。孢囊梗简单合轴分枝或不规则分枝,粗 $3.0 \sim 6.0 \mu\text{m}$ 。孢子囊不从孢囊梗上脱落,形态为典型的倒梨形或卵球形,基部钝圆,顶部无乳突,孢子囊大小 $(30 \sim 55) \mu\text{m} \times (15 \sim 32) \mu\text{m}$,平均 $41.2 \mu\text{m} \times 26.3 \mu\text{m}$,长宽比为1.57,排孢孔宽 $10.2 \sim 13.7 \mu\text{m}$,内层出3~6次。游动孢子肾形,大小 $(10 \sim 13) \mu\text{m} \times (8 \sim 10) \mu\text{m}$,休止孢子球形。单性培养不产生有性器官,与烟草疫霉配对培养也未见产生有性器官(图2)。根据以上培养性状和形态特征,参照疫霉的鉴定标准^[6],本试验分离到的疫霉均被初步确定为隐地疫霉 *Phytophthora cryptogea* Pethybridge & Lafferty。

鉴别寄主测定:疫霉孢子悬浮液接种黄瓜、西瓜始终未发病,而接种非洲菊4 d后地上部分萎蔫,6 d后病株根茎部变黑腐烂,最终植株死亡。据余永年^[17]报道,隐地疫霉和掘氏疫霉 *P. drechsleri* 均可侵染非洲菊,但隐地疫霉不能侵染黄瓜、西瓜,而掘



A: 菌落; B: 菌丝膨大体(20×); C: 游动孢子囊(20×)

A: colony; B: hyphal swellings; C: sporangia

图2 隐地疫霉的形态特征

Fig. 2 Morphological characteristics of *Phytophthora cryptogea* isolated from diseased *Gerbera jamesonii*

氏疫霉可侵染黄瓜、西瓜。因此可进一步将本试验分离到的疫霉菌确定为隐地疫霉。

分子鉴定:本试验分离到的18个疫霉菌株及南京农业大学提供的隐地疫霉菌株均扩增到620 bp的特异性条带,而烟草疫霉、致病疫霉和茄病镰刀菌等其他真菌未扩增到任何条带(图3),再次证明本试验分离到的疫霉为隐地疫霉。



M: marker; 1: 南京农业大学提供的隐地疫霉; 2~19: 本试验分离得到的疫霉; 20: 烟草疫霉(分离于烟草); 21: 烟草疫霉(分离于枇杷); 22: 致病疫霉; 23: 茄病镰刀菌

M: marker; 1: *P. cryptogea* of Nanjing; 2~19: *P. spp.* isolated from diseased *Gerbera jamesonii* in Yunnan, respectively; 20: *P. nicotianae* (isolated from tobacco); 21: *P. nicotianae* (isolated from loquat); 22: *P. infestans*; 23: *F. solani*

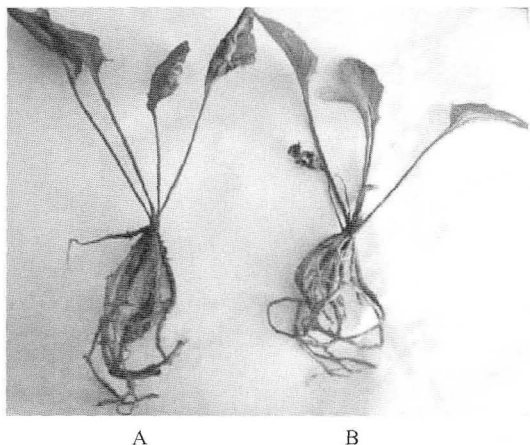
图3 疫霉及镰刀菌的PCR扩增结果

Fig. 3 Amplified products from *Phytophthora* spp. and *Fusarium* spp. by PCR

2.3 致病性测定

本试验分离到的13个茄病镰刀菌菌株活体接种健康非洲菊根部后始终未表现明显发病症状;18个隐地疫霉菌株活体接种健康非洲菊根部4 d后植株叶片开始出现失水症状,6 d后发生整株性萎蔫,病株根茎部开始变黑褐色、变软、水渍状、皮层腐烂,最终植株死亡,与田间植株自然发病症状相同(图4A),发病率达100%。对照植株始终生长正常,无任何发病症状。从发病植株上可分离到隐地疫霉,而从对照植株上未分离到该疫霉菌。

单独接种时隐地疫霉对非洲菊的致病性明显较茄病镰刀菌强,因此引起云南非洲菊主产区根腐病的主要致病病原菌为隐地疫霉。



A:接种植株; B:接种无菌水(对照)

A: inoculated with *Phytophthora*; B: inoculated with water (control)

图4 接种隐地疫霉后非洲菊的发病症状

Fig. 4 The symptom of *Gerbera jamesonii* caused by *Phytophthora cryptogea*

2.4 茄病镰刀菌与隐地疫霉复合接种

接种茄病镰刀菌与隐地疫霉等量混合的孢子悬浮液的植株从接种后第3 d开始萎蔫,而单独接种隐地疫霉孢子悬浮液的植株从接种后第4 d开始萎蔫,萎蔫程度较混合接种的植株轻,发病率及病情指数仅为茄病镰刀菌和隐地疫霉混合接种的1/3.第6 d开始两者的发病和死亡程度基本一致(图5A、5B,表1).单独接种茄病镰刀菌孢子悬浮液的植株

及对对照植株始终生长正常,无任何发病症状(图5C、5D).表明虽然茄病镰刀菌单独活体接种非洲菊不表现明显发病症状,但当茄病镰刀菌与隐地疫霉同时存在时,茄病镰刀菌对隐地疫霉的致病起到了缩短发病时间和加重发病症状的作用.



A B C D

A:复合接种隐地疫霉与茄病镰刀菌; B:单独接种隐地疫霉; C:单独接种茄病镰刀菌; D:接种无菌水(对照)

A: co-inoculated with *P. cryptogea* and *F. solani*; B: inoculated with *P. cryptogea*; C: inoculated with *F. solani*; D: inoculated with water (control)

图5 隐地疫霉与茄病镰刀菌复合接种发病症状

Fig. 5 Symptoms of *Gerbera jamesonii* co-inoculated with *Phytophthora cryptogea* and *Fusarium solani*

表1 隐地疫霉与茄病镰刀菌复合接种非洲菊发病情况

Tab. 1 The results of *Gerbera jamesonii* co-inoculated with *P. cryptogea* and *F. solani*

接种菌种 inoculated species	3 d		4 d		6 d		8 d	
	发病率	病情指数	发病率	病情指数	发病率	病情指数	发病率	病情指数
	disease incidence/%	disease index	disease incidence/%	disease index	disease incidence/%	disease index	disease incidence/%	disease index
隐地疫霉 <i>P. cryptogea</i>	0	0	25	29	100	92.0	100	100
茄病镰刀菌 <i>F. solani</i>	0	0	0	0	0	0	0	0
隐地疫霉与茄病镰刀菌 <i>P. cryptogea</i> and <i>F. solani</i>	13	21.7	80	83	100	92.5	100	100
对照 control	0	0	0	0	0	0	0	0

3 讨论与结论

本试验结果表明,隐地疫霉可以单独侵染引起非洲菊根腐,而茄病镰刀菌不能单独使植株表现明显发病症状.因此引起云南非洲菊根腐病的病原是隐地疫霉.据余永年^[17]记载,隐地疫霉与掘氏疫霉存在很多的相似性和交叉性状,很难从形态上将两者很好地区分开.两者均可侵染非洲菊,但隐地疫霉不能侵染黄瓜、西瓜,而掘氏疫霉可侵染黄瓜、西瓜.因此,鉴别寄主测定可作为隐地疫霉鉴定的一个重要方法.近年来,分子检测技术也逐步应用于疫霉的

鉴定^[9,15],这种技术具有较高的准确性和灵敏度,也是隐地疫霉鉴定的一个重要手段.本试验结合形态学鉴定、鉴别寄主测定及分子检测3种方法,对非洲菊根腐病菌进行了系统鉴定,明确了云南非洲菊根腐病的病原菌为隐地疫霉 *Phytophthora cryptogea* Pethybridge & Lafferty.

国内外学者大都认为非洲菊根腐病是由单一的病原镰刀菌或者疫霉引起,但关于两者复合接种后是否会引起发病时间提前和发病症状加重的现象至今鲜见系统报道.本研究明确提出茄病镰刀菌和隐

(下转第28页)