

黄祖旬, 黄小龙, 吴文蔷, 等. 海南紫山药枯萎病病原菌的分离鉴定及抑菌药剂筛选[J]. 江苏农业科学, 2013, 41(12): 121–123.

海南紫山药枯萎病病原菌的分离鉴定及抑菌药剂筛选

黄祖旬, 黄小龙, 吴文蔷, 陈吉良, 高洪昌, 黄东益

(海南大学农学院, 海南海口 570228)

摘要:紫山药营养价值高, 具有多种药用功能, 但紫山药病害严重。本研究以患有枯萎病的紫山药为材料, 对其进行病原菌的分离、纯化与鉴定, 包括 rDNA – ITS 序列分析, 最终确定其病原菌为尖孢镰刀菌 (*Fusarium oxysporum*); 采用 11 种农药对紫山药枯萎病菌进行抑菌效果筛选, 结果显示, 敌磺钠对紫山药枯萎病菌具有较好的抑菌效果。

关键词:紫山药; 枯萎病; 分离; 鉴定

中图分类号: S436.32 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002–1302(2013)12–0121–03

紫山药 (*Dioscorea alata* L.) 别称紫参薯, 在海南称之为大薯, 为薯蓣科藤本植物^[1]。其块茎中富含蛋白质、淀粉、多种维生素和胆碱等, 营养价值极高。紫山药还富含花青素和薯蓣皂, 有促进内分泌荷尔蒙的合成、抗癌、抗衰老等药用功能。紫山药产量潜力高, 块茎产量一般可达 10 kg/株, 高产的甚至可超过 50 kg/株^[1]。紫山药种植分布范围广, 生育期通常为 5~8 个月, 生长过程中主要病害有炭疽病、枯萎病等。据报道, 紫山药枯萎病的病原菌为尖孢镰刀菌 (*Fusarium oxysporum*), 称山药尖镰孢, 属半知菌类真菌^[2], 但在海南还未见报道。山药枯萎病 (俗称死藤)^[3] 主要危害紫山药茎基部和地下块茎, 发病初期是在茎蔓的基部出现棱条形湿腐状的褐色病斑, 以后病斑不断扩展, 使基部的整个表皮腐烂, 当表皮腐烂面积迅速扩大到能绕茎一周时, 就会致使地上部的叶片逐渐黄化、脱落, 茎蔓也就迅速枯死。若剖开茎的基部, 可见感病部位变为褐色。若是块茎感病, 则在皮孔的四周产生圆形至不规则的暗褐色病斑, 须根和内部组织也变为褐色、干腐, 严重感病的整个块茎变细、褐色。贮藏期间枯萎病仍可继续扩展, 造成危害^[4]。本研究通过对紫山药感病植株取样, 进行病原菌的分离、鉴定, 从而找到海南紫山药枯萎病的病害根源; 同时, 对常用的化学防治农药进行筛选, 为枯萎病的农药防治提供理论依据, 以更好地指导该病的田间防治工作。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 感病材料 病害标本采自海南大学薯蓣资源圃紫山药 56 号。

1.1.2 培养基 马铃薯培养基: 马铃薯 200 g, 葡萄糖 20 g, 琼脂 20 g, pH 值自然。

收稿日期: 2013–04–18

基金项目: 高等学校博士学科点专项科研基金 (编号: 20114601110001); 农业部热带作物种质资源保护项目 (编号: 13RZZY–43)。

作者简介: 黄祖旬 (1986—), 男, 云南宣威人, 硕士, 研究方向为植物病害。E-mail: 764132241@qq.com。

通信作者: 黄东益, 博士, 教授, 研究方向为薯蓣植物开发研究。E-mail: scpyzls@163.com。

1.1.3 主要试剂 引物: ITS1: 5′ – TCCGTAGCTGAACCT-GCGG – 3′; ITS4: 5′ – TCCTCCGCTTATTGATATGC – 3′。农药: 90% 丙环唑原药、80% 多菌灵可湿性粉剂、65% 代森锌可湿性粉剂、72% 甲霜·锰锌可湿性粉剂、80% 代森锰锌可湿性粉剂、75% 百菌清可湿性粉剂、70% 甲基硫菌灵可湿性粉剂、95% 敌磺钠可溶性粉剂、50% 异菌脲可湿性粉剂、80% 福福锌可溶性粉剂、77% 氢氧化铜可湿性粉剂等 11 种农药。

1.2 方法

1.2.1 病害调查及症状观察 2012 年 5—11 月对海口云龙、临高、儋州、东方、文昌等 5 个紫山药种植基地枯萎病的发生和危害情况进行了调查, 对感病植株的叶、茎上的症状进行观察、记载和拍照。

1.2.2 病原菌的分离、纯化与保存 将采集的紫山药茎、块茎用无菌水冲洗, 晾干, 在超净工作台中进行消毒处理。处理步骤为: 75% 乙醇浸泡 1 min, 然后 0.1% 氯化汞处理 1 min, 无菌水冲洗 3~4 次, 用无菌吸水纸吸去多余水分。块茎剪为 0.3 cm × 0.3 cm 大小的小块, 茎剪为长 0.5 cm 的茎段, 将小块样品铺于 PDA 培养基上, 培养皿用封口膜封口。于 28℃ 培养箱中培养 3~5 d^[5]。等产生分生孢子后, 将分生孢子挑入灭菌蒸馏水中, 配成浓度约为 1.0×10^6 CFU/mL 的孢子悬浮液, 用无菌毛细管吸取少量孢子液, 轻轻点在 PDA 培养基平板上 (培养基平板预先用直径 6 mm 的打孔器打孔作好标记, 以便以后找到孢子), 置于 25℃ 下培养 36 h 左右, 使分生孢子萌发, 并在培养基上形成微小菌落, 用显微镜观察, 将由单个分生孢子萌发形成的微小菌落连同周围的培养基切下, 移入另一 PDA 培养基上, 即可获得病原菌的单孢纯菌株^[6], 将纯化好的菌株 PDA 斜面保存。

1.2.3 致病性测定 分别以病原菌的菌丝块和孢子悬浮液作为接种体对在山药上的致病性进行测定。选择健康的山药植株中部叶片进行接种, 叶片先用 75% 乙醇表面消毒, 再进行有伤口 (用新牙刷在叶片表面刷 3 下) 接种和无伤口接种^[7], 以清水为对照。接种后保湿 24 h, 每隔 1~2 d 观察症状。发病后, 从病斑再次分离病原菌, 并与原接种菌进行比较。

1.2.4 菌株 DNA 提取及 rDNA – ITS 扩增 Chelex – 100 法提取基因组 DNA^[8]: 用刀片轻轻在培养皿中刮取菌块, 放入研钵中加液氮研磨, 然后装入 Eppendorf 管中并加入 0.5 mL 100 g/L 的无菌 Chelex – 100 溶液, 在旋涡混合器上振荡 5 s,

沸水浴 10 min,冷却至室温后,12 000 r/min 离心 15 min,保存上清作为 PCR 扩增模板。rDNA - ITS 扩增^[8]:以提取的基因组 DNA 作为模板进行 PCR 扩增。50 μ L 反应体系中含:2 μ L DNA 原液、25 μ L 2 \times Easy Taq PCR Super Mix 溶液、引物各 2 μ L (20 μ mol/L)、ddH₂O 19 μ L。反应程序:95 $^{\circ}$ C 预变性 3 min;94 $^{\circ}$ C 变性 1 min,55 $^{\circ}$ C 复性 1 min,72 $^{\circ}$ C 延伸 1.5 min,50 个循环;72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。取 10 μ L PCR 产物在 2% 琼脂糖凝胶上电泳 (120 V),260 nm 紫外灯下观察并照相。

1.2.5 抑菌农药筛选 采用药皿抑菌法^[9]。将上述 11 种药剂分别配成 500、1 000、1 500 倍浓度梯度溶液,分别取 3 mL 加入装有 15 mL PDA 直径为 9 cm 的培养基中,随后将已培养 7 d 的病原菌沿菌落边缘用 6 mm 打孔器打孔,取 6 mm 菌饼接种于培养基中央,25 $^{\circ}$ C 避光培养。以加无菌水为对照。接种 7 d 后测量抑制圈直径,并进行评价。

2 结果与分析

2.1 紫山药枯萎病的危害与症状特点

紫山药枯萎病在上述 5 个种植地均有发生,发病率在 30% 以上,特别是在 8—10 月这样的高温高湿季节最容易暴发流行,造成大量的叶片脱落和植株死亡,该病主要危害山药的茎段、根部、叶片等。通常是与土壤接触的茎段先发病,病斑初为暗绿色条状斑点,后扩展成长方形、椭圆形或不规则形,病斑边缘褐色至黑褐色,中部颜色较深,多为黑褐色。病害由茎基部逐渐往上传播,再传到叶柄,叶柄上的病斑初为暗绿色小点,后逐渐扩大成不规则的长条形斑,褐色至黑褐色,严重时叶柄直接枯萎腐烂,造成大量落叶;如果根部特别严重,会直接造成整株死亡 (图 1)。



图1 海南紫山药枯萎病症状

2.2 菌种分离培养菌落的形态特征

分离的 5 个菌株形态特征基本一致,在 PDA 培养基平板上形成圆形菌落,菌落为白色,绒毛状。培养基上菌落生长速度较慢,72 h 后可见菌落直径大约 2~3 cm (图 2)。培养 3 d 左右,镜检后可看见明显的橘红色、黏质的分生孢子。分生孢子单胞,无色,镰刀形,略弯曲,两端细胞稍尖,大小为 (19.6~39.4) μ m \times (3.5~5.0) μ m (图 3)。

对分离得到的 5 个菌株的形态初步鉴定得到一致的结果,根据病原菌的形态特征,参照《真菌鉴定手册》的描述,初步鉴定海南紫山药枯萎病的病原菌可能为尖孢镰刀菌。

2.3 病原菌的致病性

将纯化后的菌株重新接种到健康的无菌叶片或组培苗上,回接 5~9 d 后,接种菌丝块、孢子悬浮液的山药叶片全部



图2 紫山药枯萎病菌菌物分离培养



图3 紫山药枯萎病菌分生孢子

发病,有伤口的叶片发病比无伤口的叶片早 1~2 d,症状与田间观察到的相同。对照不发病。用发病的病斑进行常规分离,再次获得与原分离菌基本一致的病原菌,根据柯赫氏法则,证明接种菌即为海南紫山药枯萎病的病原菌^[6]。

2.4 病原菌 rDNA - ITS 的序列分析及同源性比较

为进一步确定海南紫山药枯萎病菌是否为尖孢镰刀菌,首先,对培养纯化的其中 1 个菌株 HB 的菌块进行 DNA 提取,并对提取的 DNA 进行电泳检测,结果如图 4 所示,无明显的拖尾现象,达到后期试验的要求^[5]。其次,将达到要求的 DNA 产物进行 PCR 扩增,并对其进行电泳检测,得到 1 个大小约 500 bp 的片段 (图 5),将 rDNA - ITS 扩增产物送测序公司测序。菌株序列经测定,全长为 521 bp,具体结果如下: GC ATAACCGGGGCACTCTAACCCCTGCTGCACATACACACTTGTGCTCGGCGGATCAGCCCGCTCCCGGTAAAACGGGACGGCCCGCCAGAGGACCCCTAAACTCTGTTTCTATATGTAACCTCTCTTGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCAAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGCCAGTATTCTGGCGGGCATGCTGTTCGAGCGTCATTTC AACCCCTCAAGCACAGCTTGTTGGGACTCGCGTTAATTTCGCGTTCTCTCAAATTGATTGGCGGT CACGTCGAGCTTCCATAGCGTAGTACTAAAACCCCTCGTTAC TGGAATCGTCGCGGCCACGCCGTTAAACCCCAACTTCTGATGTTGACCTCGGATCAGGTAGGAATACCCGCTGAACCTTAAGCATATCAATAGTCCGGAGGAAAG。

将测得的 ITS rDNA 全序列输入 NCBI 主页,应用 Blast 软件进行同源性搜索,将该序列与已报道的 130 多个尖孢镰刀菌序列进行同源性比较,结果都在 98%~99%,并选择同源性比较高的 13 个菌株来构建系统发育树 (图 6)。

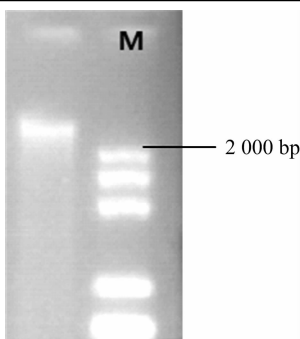


图4 菌株HB基因组DNA

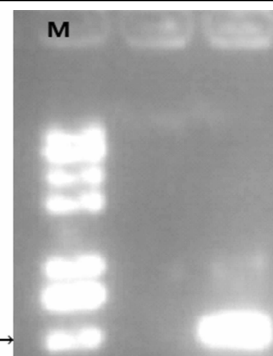


图5 菌株HB基因组DNA PCR扩增结果

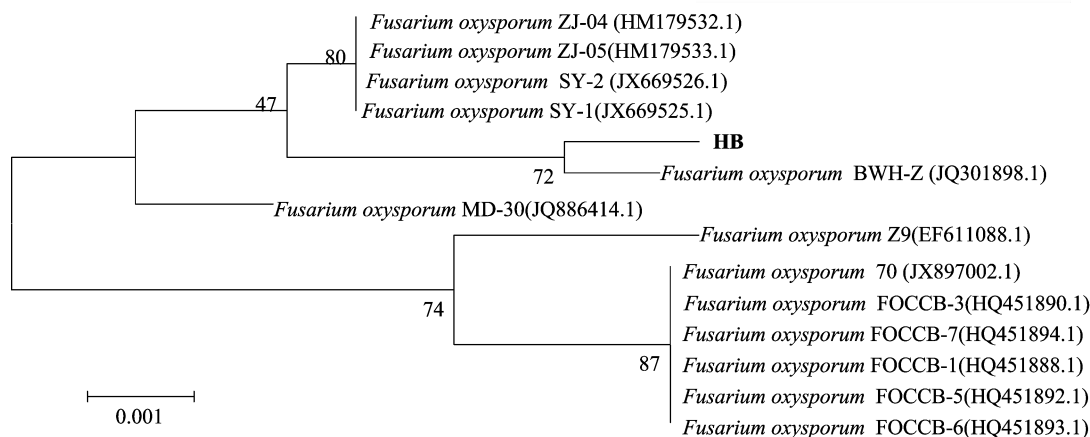


图6 系统发育树

由图 6 可知,在亲缘关系相近的前 13 个序列中(其同源相似系数均为 99%),都为尖孢镰刀菌(*Fusarium oxysporum*)的菌株,其中检测菌 HB 与登录号为 JQ301898 的遗传距离最近,都在同一个分支,与其同源性也是 99%,仅有 3 个碱基的差异。一般当 16S rDNA 系列相似性为 99% 时,可能是新种的比率为 20% ~ 30%^[10],由此可判断菌株 HB 属于镰刀菌。再根据前面病原菌的形态、生理特性以及同源性比较的结果可鉴定该病害的病原菌为尖孢镰刀菌(*Fusarium oxysporum*)。

2.5 农药筛选结果

本试验针对所分离的枯萎病菌进行了 11 种常用化学药物的筛选,结果(表 1)表明敌磺钠对其抑制效果最佳。

表 1 11 种常用农药对紫山药枯萎病菌的抑菌效果筛选评价

农药名称	不同浓度农药抑菌圈直径(mm)			抑菌效果评价
	500 倍液	1 000 倍液	1 500 倍液	
90% 丙环唑原药	30	30	29	-
80% 多菌灵可湿性粉剂	3	2	2	++++
65% 代森锌可湿性粉剂	7	6	7	++
72% 甲霜·锰锌可湿性粉剂	4	4	3	+++
80% 代森锰锌可湿性粉剂	5	3	3	+++
75% 百菌清可湿性粉剂	7	6	6	++
70% 甲基硫菌灵可湿性粉剂	8	6	6	++
95% 敌磺钠可溶性粉剂	2	0	0	+++++
50% 异菌脲可湿性粉剂	33	34	32	-
80% 福福锌可溶性粉剂	9	7	6	+
77% 氢氧化铜可湿性粉剂	30	33	30	-

3 结论与讨论

通过对紫山药感病部位样品的采集,进行病原菌的分离、

培养、纯化及 rDNA - ITS 序列分析,结合形态学鉴定,将紫山药枯萎病的病原菌初步鉴定为尖孢镰刀菌(*Fusarium oxysporum*)。对该种病菌进行了 11 种农药筛选试验,结果敌磺钠的抑菌效果最佳。

参考文献:

- [1]程文杰. 大薯种质资源遗传多样性分析[D]. 海口:海南大学,2010.
- [2]姜敦和,李华风,毛传生. 徐州地区火山药栽培现状[J]. 特种经济动植物,2006(7):19.
- [3]蒋日盛. 淮山死藤原因及其防治技术[J]. 福建农业科技,2001(5):53-54.
- [4]李术臣,贾海民,陈丹. 山药主要病害研究进展和生产中存在的问题[J]. 西北农林科技大学学报:自然科学版,2005,33(增刊1):243-245.
- [5]陈吉良. 薯蓣炭疽病病原菌的分离鉴定及抑菌制剂的筛选[D]. 海口:海南大学,2011.
- [6]朱桂宁,蔡健和,胡春锦,等. 广西山药炭疽病病原菌的鉴定与 ITS 序列分析[J]. 植物病理学报,2007,37(6):572-577.
- [7]朱振东,霍云龙,王晓鸣,等. 一个抗大豆疫霉根腐病新基因的分子鉴定[J]. 作物学报,2007,33(1):154-157.
- [8]陈吉良,黄小龙,吴安迪,等. 一种快速高效提取病原真菌 DNA 作为 PCR 模板的方法[J]. 菌物学报,2011,30(1):147-149.
- [9]王振君,刘红彦. 山药细菌性叶斑病病原菌的鉴定[D]. 郑州:河南农业大学,2006.
- [10]战勇,智海剑,喻德跃,等. 黄淮地区大豆花叶病毒株系的鉴定与分布[J]. 中国农业科学,2006,39(10):2009-2015.