

吴廷娟,杜 权,王玉星,等.地黄根腐病原菌的分离鉴定及其防治[J].江苏农业科学,2021,49(22):132-136.

doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2021.22.023

地黄根腐病原菌的分离鉴定及其防治

吴廷娟,杜 权,王玉星,谢小龙

(河南中医药大学药学院,河南郑州 450046)

摘要:选取北京三号和金状元2个地黄品种的发病块根,经表面灭菌后切成小块,置于PDA培养基上分离和纯化致病菌;将纯化后的真菌进行形态及显微鉴定,再进行致病性检测及分子生物学方法确定致病菌的种类;最后对3种常用杀菌剂甲霜·咪霉灵、代森锰锌、肟菌·戊唑醇的抑菌效果进行评价。结果表明,从北京三号和金状元中分别分离出5个致病菌株;经过致病性试验发现,北京三号3个菌株为致病菌株,金状元中2个菌株为致病菌株;选择2个优势致病菌作为试验菌,发现3种杀菌剂的抑菌效果表现为250~500 mg/L 肟菌·戊唑醇>2 000 mg/L 代森锰锌>3 333 mg/L 甲霜·咪霉灵。利用组织分离法获得的菌株,通过致病性测定确定致病菌后,经形态学鉴定和基因序列分析确定致病菌为尖孢镰刀菌(*Fusarium oxysporum*)和腐皮镰刀菌(*F. solani*)以及黑曲霉菌(*Aspergillus niger*);在3种杀菌剂中,以浓度为250~500 mg/L的肟菌·戊唑醇的抑菌效果最好,但应结合田间施用效果才能确定是否能大面积推广使用。本试验结果可为地黄根腐病的田间防治提供一定的理论依据。

关键词:地黄;根腐病;致病性测定;防治;病原菌分离鉴定

中图分类号: S435.672 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2021)22-0132-05

地黄(*Rehmannia glutinosa* L.)为玄参科多年生草本植物,产于河南省焦作地区的温县、武陟、孟县、博爱、沁阳等地,以干燥块根入药,主要功效为清热凉血,养阴生津,能够降血糖、保肝、止血、消炎等,具有很高的临床使用价值和经济价值。但地黄病虫害发生较为严重,尤其是根腐病,发病率较高,严重影响其产量及质量,降低临床使用价值,影响农民的经济收入^[1]。因此,研究地黄根腐病的病原菌,及探究适宜的杀菌剂对提高地黄的产量和品质具有重要意义。

地黄根腐病在发病初期,靠近地面的根茎和叶柄处会出现水浸状黄褐色腐烂斑,逐渐向上向内扩展,导致叶片变黄,甚至萎蔫,湿度大时,病部会产生白色棉絮状的菌丝体。后期离地面较远的根茎也发生干腐的症状,导致吸收水分和养分的功能急剧下降,严重时地黄整株腐烂,只剩下褐色的表皮和木质部,导致产量大幅度下降^[2]。目前,对地黄

根腐病的研究发现其致病菌为镰刀菌^[3]、帕鲁迪根红酵母^[2]、立枯丝核菌和恶疫霉菌等^[1],病原菌较多。由于造成地黄根腐病的病原菌不确定,难以对症下药,造成防治效果差。同时,同一植物不同品种由于对土壤微生物群落结构的塑造性不同,导致不同地黄品种具有不同的土壤微生物群落结构和组成,进而影响其抗病性。因此,本试验拟通过传统的形态学鉴定和分子生物学鉴定,观测2个当家地黄品种根腐病的病原菌种类及致病性,并采用3种常用杀菌剂评价其抑菌效果,旨在为地黄根腐病的防治提供技术支持,为地黄的规范化种植提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

本研究所用地黄块根于2019年11月采自河南省焦作市温县地黄种植基地。分别采取北京三号和京状元2个当家品种的根腐病病株的块根以及健康地黄的块根。试验于2019年12月至2020年6月在河南中医药大学中药材种植技术中心实验室内进行。

1.2 地黄根腐病原菌的分离、纯化与鉴定

选择症状典型的、明显的2个地黄品种发病株,分别切取地黄块根病健交界处组织,选择适合的表

收稿日期:2021-03-05

基金项目:国家重点研发计划(编号:2017YFC1702800);河南省重大科技专项(编号:171100310500)。

作者简介:吴廷娟(1981—),女,河南新乡人,博士,讲师,从事药用植物栽培和病虫害防治研究。E-mail:wutj2011@163.com。

通信作者:谢小龙,博士,副教授,从事中药材规范化种植技术研究。E-mail:xiaolongxie@126.com。

面灭菌方法,采用常规的组织分离法对病原菌进行分离。即将发病块根用清水洗净,置于肥皂水中浸泡 30 min,于清水中浸泡 2 h。洗净块根的表面泥土后,先用 75% 乙醇浸泡 3 min,再用 0.1% 氯化汞溶液浸泡 3 min^[4],最后用无菌水冲洗 3 遍,取最后一轮的无菌水用涂布器均匀涂抹于 PDA 培养基上。在无菌操作台上用镊子夹取病健组织,用无菌刀切成 1.0 cm × 1.0 cm × 1.0 cm 的小块。每个 PDA 培养基上均匀放置 4 块,每个品种重复 5 次。在 PDA 培养基上于 28 ℃ 黑暗培养,每天记录其生长情况。待其产生明显菌落后,用无菌牙签挑取病健组织块附近的菌丝于 PDA 培养基上 28 ℃ 黑暗培养。待分离物产孢后,采用单孢分离法进行纯化,经多次反复提纯,获得该菌的纯培养物。然后将无菌液体石蜡油覆盖于菌丝生长良好的琼脂斜面真菌培养物表面,厚度为 1 cm 左右,置于 4 ℃ 冰箱保存备用。

采用肉眼观察法,观察菌落凸起性状、菌落大小、菌落高度、形态、颜色和质地方面的特征。依据真菌鉴定手册,用光学显微镜观察菌丝形态,如菌丝颜色、有无分枝和有无隔膜,并测量菌丝粗细,观察从初生到后期菌丝颜色的变化及是否使培养基变色,孢子大小以及孢子梗的大小、形态等方面,并进行描述和鉴定^[5-8]。

1.3 地黄根腐病原菌致病性的测定及鉴定

选择北京三号和金状元健康、发病的植株的块根,采用病原菌分离时的灭菌方法灭菌。然后于无菌条件下将地黄块根(发病植株取病健交界处)纵切成 2 块,分别做刻伤或不刻伤处理。然后把块根分别放入铺有 2 层灭菌滤纸的培养皿中,每皿放 1 块,重复 3 次。将在 28 ℃ 培养 3 d 的待测分离物菌饼(5 mm)倒置于已做好伤口处理和不做伤口处理的地黄块根上。每个块根接种 1 个菌饼,以接种 PDA 为对照,重复 3 次。将接种的块根于 38 ℃ 的种子老化箱中培养,观察地黄块根的发病情况,然后进行分离及形态学鉴定,并与第 1 次分离得到的菌株进行形态学上的比较,得到致病菌菌株。

形态学鉴定:将分离得到并保存在石蜡油中的菌株,挑取适量菌丝于 PDA 培养基上于 28 ℃ 恒温培养箱黑暗培养。3 d 之后,通过肉眼观察其形态特征,通过光学显微镜观察其菌丝、孢子的形态特征,与第 1 次分离得到的菌株进行对照。

分子生物学鉴定:首先,将通过致病性测定确定的致病菌菌株在 PDA 培养基上经活化培养后取

新鲜菌丝,加入液氮充分研磨成粉末,提取 DNA 并进行电泳检测;其次,用真菌的通用引物 ITS1(5′ - TCCGTAGGTGAACCTGCGG - 3′)和 ITS4(5′ - TCCTCCGCTTATTGATATGC - 3′)对 rDNA - ITS 区段进行 PCR 扩增,电泳,测序。将获得的测序结果与 GenBank 数据库的基因序列进行比对分析。最后利用 Neighbor - Joining 方法进行聚类并构建系统发育树^[9]。

1.4 地黄根腐病致病菌的杀菌防治

本试验共选择 3 种常用的杀菌剂,即 80% 代森锰锌可湿性粉剂(利民化工股份有限公司)、75% 肟菌·戊唑醇水分散粒剂(拜耳股份公司国内办事机构)、3% 甲霜·噁霉灵水剂(天津市绿亨化工有限公司)。先将 3 种杀菌剂配制成 3 个有效成分浓度梯度的药液,再与溶化的培养基按药液:培养基 = 1:9(体积比)混合均匀,倒入灭菌的培养皿中,制成带毒的培养基平面。然后用接种针将菌饼(1 cm)接种于培养基平面上,置于 28 ℃ 的生化培养箱中恒温培养。于培养的第 4 天取出培养皿用十字交叉法测菌落直径,求其平均值,再减去菌饼的直径,即可测量出在不同浓度下的菌落直径。最后根据测得的结果计算该杀菌剂对菌丝的生长相对抑制率,评价供试药剂对目标菌生长的抑制活性。以其生长速度快慢即生长速率法^[10]评价该药剂的毒力大小。以无菌水为空白对照,每个处理重复 3 次。

菌丝生长抑制率 = (对照菌落直径 - 处理菌落直径) / (对照菌落纯生长量 - 菌饼直径) × 100%。

1.5 数据统计分析

原始数据用 Excel 2007 进行整理分析。用 SPSS 16.0 对不同杀菌剂不同浓度下的抑菌率进行两因素方差统计分析,对不同稀释浓度条件下的抑菌率进行单因素方差分析。用 MEGA 6.0 软件将获得的菌株与获取的同源性序列最高的菌株构建系统发育树。

2 结果与分析

2.1 地黄根腐病原菌的分离及形态学鉴定

从北京三号地黄根腐病发病病株分离出 5 个菌株,分别编号为 BP1、BP2、BP3、BP4、BP5。金状元地黄病株分离出 5 个菌株,分别编号为 JP1、JP2、JP3、JP4、JP5。

BP1:菌落呈圆形,菌丝呈白色绒毛状,绒毛稍

密,菌落背面呈棕色,边缘光滑全缘,无渗出物;菌丝为有隔菌丝,大型分生孢子近镰刀形或纺锤形,有 1 个隔膜或者没有隔膜, $(5.0 \sim 15.0) \mu\text{m} \times (4.0 \sim 5.0) \mu\text{m}$,两端稍钝(图 1-a)。

BP2:菌落呈圆形,菌丝呈白色绒毛状,绒毛较稀,菌落背面呈棕色,中心有色素分泌,呈现红棕色,边缘光滑全缘;菌丝为无隔菌丝,小型分生孢子肾形, $(6.0 \sim 7.0) \mu\text{m} \times (1.5 \sim 3.0) \mu\text{m}$,大型分生孢子近镰刀形,没有隔膜, $(5.0 \sim 15.0) \mu\text{m} \times (4.0 \sim 5.0) \mu\text{m}$,顶端稍弯(图 1-b)。

BP3:菌落呈圆形,菌落呈白色绒毛状,菌丝稍致密,菌落背面棕色,边缘光滑,无渗出物;菌丝为无隔菌丝,小型分生孢子肾形,大型分生孢子镰刀形, $(5.0 \sim 15.0) \mu\text{m} \times (4.0 \sim 5.0) \mu\text{m}$,有 1~4 个隔膜(图 1-c)。

BP4:菌落呈圆形,菌丝起初为白色绒毛状,后变为中间淡绿色,周围白色,呈放射状,菌落背面呈灰棕色;菌丝无隔,多分枝,孢子呈圆形, $4.0 \mu\text{m} \times 5.0 \mu\text{m}$,顶生或者侧生(图 1-d)。

BP5:菌落呈圆形,菌丝呈灰白色絮状,特别疏松,生长速度快,无渗出物;菌丝无隔,孢子呈卵圆形, $5.0 \mu\text{m} \times 6.0 \mu\text{m}$,孢子囊顶生,类球形,孢子梗粗(图 1-e)。

JP1:菌落呈不规则形,菌落最初呈白色绒毛状,较稀疏,随后,中间颜色发生变化,呈浅蓝色绒毛状,四周仍为白色绒毛状;菌丝为有隔菌丝,孢子呈圆形, $3.0 \mu\text{m} \times 4.0 \mu\text{m}$,孢子顶生(图 2-a)。

JP2:菌落呈圆形,菌落中心蓝色,四周白色,呈较疏松的绒毛状,菌落背面呈灰色;菌丝为有隔菌丝,孢子为圆形, $4.0 \mu\text{m} \times 5.0 \mu\text{m}$,附在菌丝上,菌丝顶端膨大(图 2-b)。

JP3:菌落呈椭圆形,菌落呈白色绒毛状,较稀疏,菌落背面灰色,无渗出物;菌丝为无隔菌丝,孢子呈纺锤形或者镰刀状, $(5.0 \sim 15.0) \mu\text{m} \times (4.0 \sim 5.0) \mu\text{m}$,有 1~3 个隔膜,中间略弯(图 2-c)。

JP4:菌落呈圆形,菌落呈白色绒毛状,较疏松,菌落背面呈棕色,边缘光滑,无分泌物;菌丝为有隔菌丝,大型分生孢子镰刀状,稍弯, $(6.0 \sim 15.0) \mu\text{m} \times (3.0 \sim 4.0) \mu\text{m}$,多有 1 个隔膜(图 2-d)。

JP5:菌落呈圆形,菌落中心呈黑色绒毛状,周围白色绒毛状,较疏松,菌落背面黑色;菌丝为有隔菌丝,孢子呈圆球形, $4.0 \mu\text{m} \times 5.0 \mu\text{m}$,孢子附在菌丝上,侧生(图 2-e)。

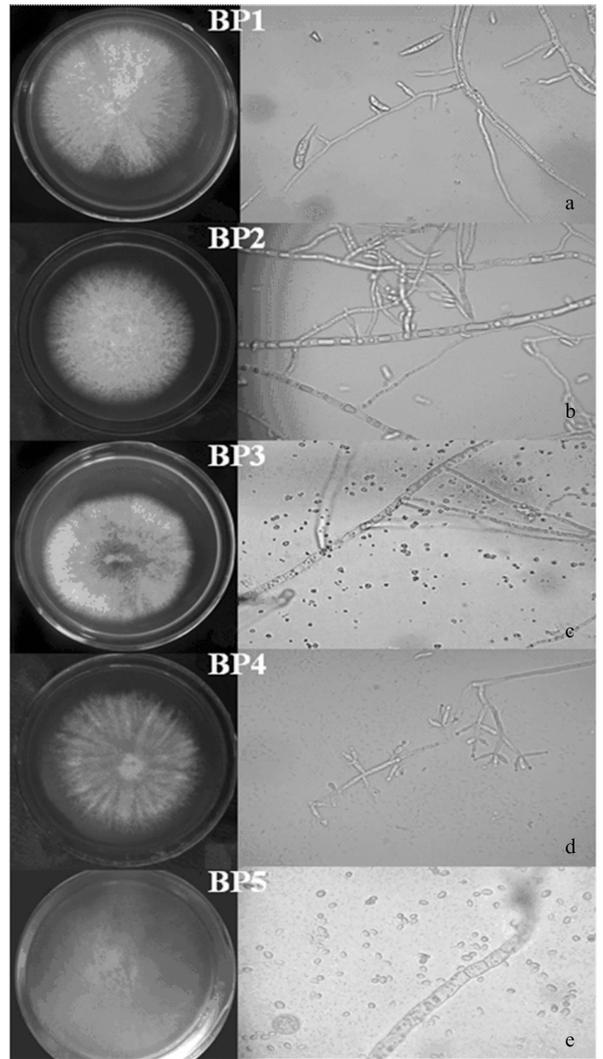


图1 北京三号地黄根腐病致病菌株菌落(左)和菌丝显微特征(右)

2.2 致病性测定

前期用地黄块根切片后进行接种试验,确定北京三号的致病菌为 BP1、BP2、BP3。然后将这 3 种致病菌分别接种至有伤和无伤的健康地黄块根中。结果表明,3 种致病菌均在伤口处生长,导致地黄表面颜色变褐,干枯腐烂,无伤处发病程度低。接种 BP1、BP2 至有伤和无伤的健康地黄中,仅 4 d 就表现出上述现象,接种 BP3 于 5 d 后才表现出上述现象。接种 PDA 培养基的无伤和有伤的地黄块根没有任何变化。再次鉴定 BP1、BP2、BP3 为致病菌。

将地黄片接种试验中确定的金状元的致病菌 JP3、JP5 接种至有伤和无伤的健康地黄块根中,2 种致病菌 5 d 后均在伤口处生长,导致地黄表面颜色变褐,干枯腐烂,无伤处发病程度低。接种 PDA 培养基的无伤和有伤的地黄块根没有任何变化,再次鉴定 JP3、JP5 为致病菌。

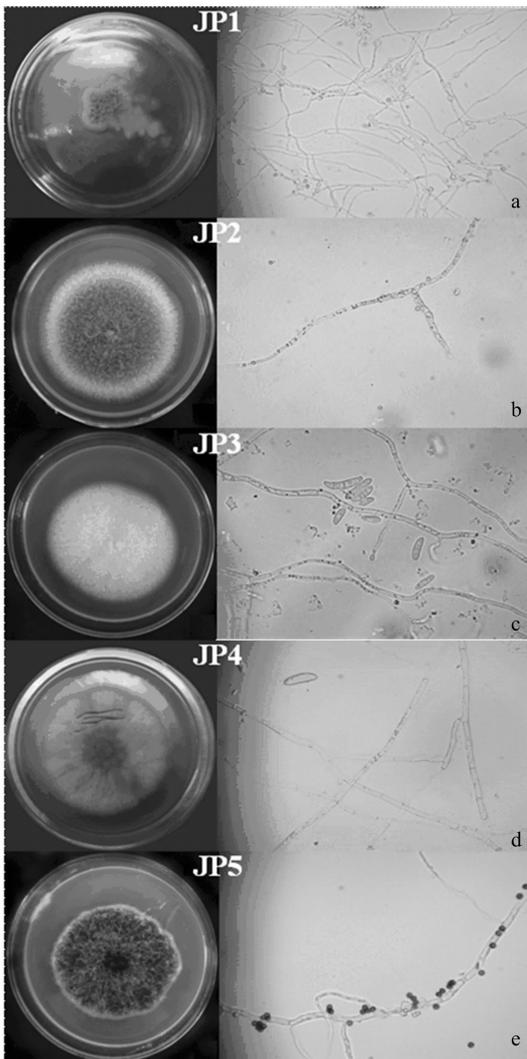


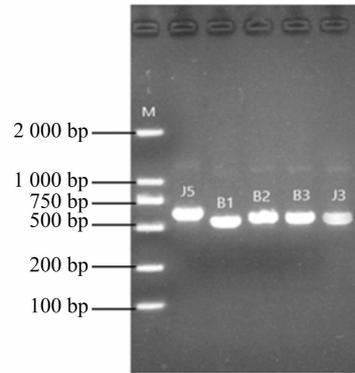
图2 金状元地黄根腐病致病菌株菌落(左)和菌丝显微特征(右)

2.3 分离物鉴定

2.3.1 形态学鉴定 从发病的病健组织分离出致病菌,经肉眼观察其形态以及光学显微镜观察其菌丝。孢子形态分别与北京三号的致病菌 BP1、BP2、BP3,金状元的致病菌 JP3、JP5 一致,再次证明 BP1、BP2、BP3、JP3、JP5 是导致地黄根腐病的致病菌。

2.3.2 分子生物学鉴定 对致病菌 BP1、BP2、BP3、JP3、JP5 的测序结果表明,致病菌 BP1、BP2、BP3、JP3、JP5 5 个菌株的序列长度分别为 516、515、540、541、575 bp(图 3)。将 5 个目的基因序列分别输入 NCBI 的 BLAST 系统中,会得到与目的基因相似的序列,搜索下载同源性最高的序列,并与相似序列进行多重序列比较,再利用 MEGA6.0 软件构建系统发育树。由系统发育树的结果可知,BP1 与尖孢镰刀菌(*Fusarium oxysporum*) (JN624906.1 等)聚在一起,且同源性达到 98%;BP2 与尖孢镰刀菌

(*F. oxysporum*) (MT154248.1) 聚在一起,同源性达到 99%;BP3、JP3 与腐皮镰刀菌(*F. solani*) (MT560378.1、MG543740.1) 聚在一起,同源性为 97%;JP5 与黑曲霉(*Aspergillus niger*) (MT729920.1) 聚在一起,同源性为 99%(图 4)。



M 为 DNA marker; B1、B2、B3、J3、J5 分别为 BP1、BP2、BP3、JP3、JP5 菌株

图3 目的基因 ITS rDNA 序列片段

2.4 杀菌剂防治

2.4.1 抑菌效果的测定 由表 1 可知,3 种杀菌剂均对致病菌株 BP1、BP2 的生长有抑制作用,且整体的趋势为随着杀菌剂稀释倍数变大(即有效浓度变小),对优势菌 BP1、BP2 的抑制作用越弱,抑菌率越低。其中,脞菌·戊唑醇在浓度为 250、330、500 mg/L 时,杀菌率均达到 100.0%,说明脞菌·戊唑醇的稀释倍数十分适宜,且脞菌·戊唑醇的浓度最低,微量高效,防治效果最好。3 种杀菌剂的抑菌率表现为 250 ~ 500 mg/L 脞菌·戊唑醇 > 2 000 mg/L 代森锰锌 > 3 333 mg/L 甲霜·噁霉灵。

3 结论与讨论

本次试验利用组织分离法分离出的 5 个致病菌经初步鉴定后,致病菌 JP3 与之前从重庆市石柱县患根腐病的黄连分离与鉴定出来的腐皮镰刀菌(*F. solani*) 一致。致病菌 BP1、BP2 与之前从患根腐病的胡萝卜分离鉴定出来的尖孢镰刀菌(*F. oxysporum*)^[6] 一致,因此可以说明镰刀属(*Fusarium*) 真菌是地黄根腐病的主要致病菌。在他人的研究中,层出镰刀菌(*F. proliferatum*)^[3] 和帕鲁迪根红酵母(*Rhodotorula paludigena*)^[2] 被确定为引起地黄根腐病的病原菌,但本试验并未分离出该菌,可能与分离条件或样本来源有关。本次试验中得到的致病菌株黑曲霉菌(*A. niger*),属于半知菌门曲霉属丝状真菌,据报道该菌会引起软而多汁的

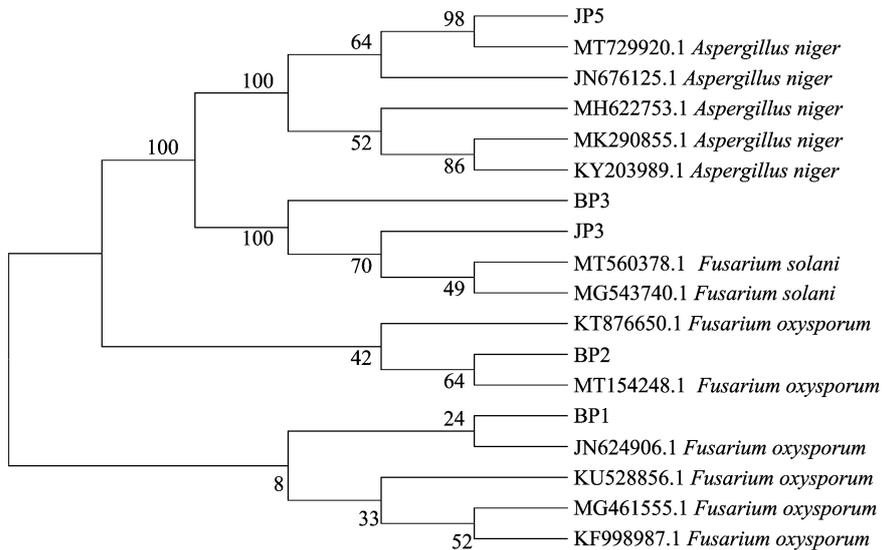


图4 北京三号致病菌 BP1、BP2、BP3 和金状元致病菌 JP3、JP5 的系统发育树

表1 3种杀菌剂在不同浓度下4 d后对BP1和BP2的抑菌效果

杀菌剂	浓度 (mg/L)	4 d后菌落 平均直径(cm)		4 d后菌丝生长 抑制率(%)	
		BP1	BP2	BP1	BP2
代森锰锌	2 000	4.5	4.2	46.2	50.5
	1 333	5.5	5.2	30.3	34.4
	1 000	5.5	5.2	31.3	33.9
脲菌·戊唑醇	500	1.0	1.0	100.0	100.0
	330	1.0	1.0	100.0	100.0
	250	1.0	1.0	100.0	100.0
甲霜·啶霉灵	3 333	6.5	6.0	15.4	14.2
	1 667	6.7	6.1	11.8	15.1
	1 111	6.9	6.2	9.7	5.3
无菌水	0	7.5	7.4		

果实发生软腐或造成丝兰发生茎腐^[10]。根据致病性试验和分子鉴定,本试验结果在一定程度上说明该黑曲霉菌有可能是引起地黄根腐病的病原菌之一。因此,本试验结果表明,引起地黄根腐病的病原菌主要为尖孢镰刀菌、腐皮镰刀菌和黑曲霉菌,具有多来源性。

在致病性试验中,分离出来的4株镰刀菌和1株黑曲霉菌的室内致病性测定结果表明,这5株致病菌的发病病状均表现为组织表面腐烂,皱缩,木质部变黑,并且随着温度的升高,水分的增多,腐烂程度加剧。该结果表明高温高湿是地黄根腐病发病的重要环境因素。因此在地黄栽培过程中要及时灌溉排水,避免高温高湿。

本试验选择的杀菌剂是治疗根腐病常用的杀菌剂,浓度均在推荐的浓度范围内。研究结果表

明,75%脲菌·戊唑醇为防治地黄根腐病的最有效杀菌剂,低毒且高效,可在大田进一步试验确定过后推广使用。不同浓度下的代森锰锌以及甲霜·啶霉灵也具有抑菌效果,但是抑菌率偏低。可能是稀释的浓度偏小,或者优势菌BP1尖孢镰刀菌、BP2尖孢镰刀菌对代森锰锌以及甲霜·啶霉灵不敏感。因此,关于地黄根腐病的防治还需要选择更多种类、具有不同作用机制的杀菌剂来进行防治试验,才能筛选出针对不同致病菌株的有效杀菌剂。

参考文献:

- [1]黄艳琴. 地黄常见病害的发生与防治[J]. 河南农业,2006(8):22.
- [2]王亚利,康春晓,杨传臻,等. 一株地黄根腐病病原菌的分离鉴定及生物学特性研究[J]. 生物技术通报,2020,36(1):37-44.
- [3]王明道,时延光,郜峰,等. 1株引起地黄根腐的镰刀菌的鉴定及生物学特性研究[J]. 河南农业大学学报,2013,47(2):177-181.
- [4]马英玲,罗丽蝉. 油茶根腐病致病菌分离检测与防治药剂的筛选[J]. 安徽农业科学,2019,47(5):154-156.
- [5]张笑宇,焦建平,周洪友,等. 胡萝卜镰刀菌根腐病病原菌的鉴定[J]. 中国蔬菜,2016(8):64-69.
- [6]解红娥,王娇娟,解晓红,等. 地黄土壤中主要病原真菌的鉴定及致病性研究[J]. 山西农业科学,2007,35(2):59-63.
- [7]陈姗姗,罗秀媚,杨星勇. 重庆市石柱县黄连根腐病病原菌的分离与鉴定[J]. 植物保护学报,2018,45(6):1437-1438.
- [8]魏蜜,朱洁倩,陈嘉敏,等. 玛咖根腐病原菌的形态和分子鉴定[J]. 江苏农业科学,2018,46(22):93-96.
- [9]魏敏,于淑晶,丁国华,等. 姜黄炭疽病的病原菌鉴定及杀菌剂对其室内生物活性测定[J]. 农药,2020,59(6):455-458.
- [10]李凤玲,范明夏,边传周. 黑曲霉菌的产酶特性及在动物生产中的应用[J]. 现代牧业,2018,2(4):47-49.