

天人菊菌核病病原鉴定及其拮抗木霉菌株的筛选

刘 威, 叶 云 峰, 李 林 轩, 蒋 妮, 刘 丽 辉

(广西壮族自治区药用植物园, 广西药用资源保护与遗传改良重点实验室, 广西 南宁 530023)

摘 要:通过致病性测定、病害症状、病原菌培养性状及形态特征等对天人菊菌核病病原菌进行鉴定;通过室内拮抗作用测定和盆栽防治效果测定筛选生防木霉菌株。结果表明:将天人菊菌核病的病原菌鉴定为核盘菌(*Sclerotinia sclerotiorum* (Lib) de Bary);筛选到对天人菊菌核病菌拮抗作用最强,盆栽防治效果最好的菌株是哈茨木霉 H5,其拮抗指数为I级,防治效果为 93.2%。在测试的 5 个木霉菌株中,哈茨木霉 H5 对天人菊菌核病的防治效果最好。

关键词:天人菊;菌核病;病原鉴定;拮抗木霉;筛选

中图分类号:S 482.2⁺92 **文献标识码:**B **文章编号:**1001-0009(2012)05-0142-04

天人菊(*Gaillardia pulchella* Foug.)为菊科 1 a 生草本植物,别名虎皮菊、六月菊。原产北美,喜阳光,耐半阴,是干旱地区良好的防风固沙植物。由于其花期较长,色彩绚丽,深得人们喜爱,是花坛、庭园美化的理想花卉,也是城市园林绿化中的重要观赏植物之一。此外,该植物全株含天人菊内脂(gaillardin),有抗肿瘤(人体鼻咽癌)和治疗阿米巴痢疾、阴道滴虫等药用功效^[1]。

第一作者简介:刘威(1982-),女,广西北流人,本科,助理工程师,现主要从事药用植物病虫害研究工作。E-mail: liuweiy98@126.com。

基金项目:广西药用植物园青年基金资助项目(桂药基 200807)。

收稿日期:2012-01-04

2011 年以来,随着政府刺激内需政策效应的逐渐显现以及国际经济形势的好转,天人菊内酯市场需求膨胀,面临巨大的市场投资机遇。目前,该植物在我国的台湾、四川、广西、贵州、云南等中、南部省区有大量栽培。随着天人菊种植年限的增加和种植面积的扩大,其生育期间的病害问题也日渐突显,尤其是近 2 a 在广西的多个栽培区出现了菌核病,病害严重时发病率达 40%~50%,常造成大片植株枯死,严重影响了天人菊的品质和产量。目前,对天人菊的研究主要集中在快速繁殖方面^[2-3],关于其病虫害方面的研究尚未见报道。

为了有效控制天人菊菌核病的发生和蔓延,现对该病的病原种类进行了鉴定,并通过室内拮抗作用测定和

Optimizing Study on Tissue Technology of the Purple Skin *Dendrobe*

QI Yong-qiong¹, CHEN Zhi-yuan¹, LI Kai-yun², LI Chang-ke¹

(1. Yunnan Vocational and Technical College of Agriculture, Kunming, Yunnan 650031; 2. West Mountain Forest Station of Kunming, Kunming, Yunnan 650100)

Abstract: With the purple skin *Dendrobe* seed and stem section as explants, the bud seedling proliferation, rooting, and optimized conditions of plantlets were studied. The results showed that the seed was most appropriate as rapid propagation explant, seeds through the small bud seedling, the proliferation and seedling rooting of the way into complete plant regeneration; And a suitable culture medium formula was explored; beginning the generation of inductive medium for 1/2MS+1 mg/L BA+0.5 mg/L NAA, seed germination directly grow, growth of large green and sterile small bud seedling; Proliferation medium for MS+2 mg/L BA+0.5 mg/L NAA+5% potatoes juice+5% mashed bananas, bud seedling multiple of 4.6 times as high proliferation and growth better, the bud seedling stout; Rooting medium 1/2MS+0.5 mg/L NAA+10% mashed bananas+0.1% activated carbon, take root seedlings root number and root for average to best, root system developed, seedling height, robust, and the leaves deep green. Medium suitable for the AGAR concentration of 6 g/L, therefore, higher multiples, erect plant, leaf also didn't bend.

Key words: purple skin *Dendrobe*; rapid propagation; seed; agar

盆栽防治试验,从几种对植物菌核病具有生防潜力的木霉菌株(包括哈茨木霉(*Trichoderma harzianum*)、康氏木霉(*T. koningii*)和绿色木霉(*T. viride*))^[4-6]中筛选出防治作用最好的生防菌株,以期为该病害的生物防治提供理论依据,也为天人菊的无公害产业化发展打下理论基础。

1 材料与方法

1.1 病原菌的鉴定

1.1.1 标本采集及症状观察 2010年10月在广西药用植物园种植基地观察天人菊菌核病的症状,采集新鲜病株,并对典型发病症状进行描述和数码照相。

1.1.2 病原菌的分离 采用常规的组织分离法^[7]进行病菌的分离。选取初发病的叶片和茎组织进行病菌的分离。剪取病健交界处的叶片组织,每小块约0.5 cm×0.5 cm,先用75%的乙醇浸泡10 s,再用0.1%升汞浸泡20~30 s,用灭菌水漂洗3次,置于PDA培养基上;此外,剪取病健交界处的茎段组织,每小段长约0.5 cm,先用75%的乙醇浸泡20 s,再用0.1%升汞浸泡1 min,用灭菌水漂洗3次,置于PDA培养基上。分离物均置于28℃条件下培养,待长出菌丝后取菌落边缘菌丝转接至PDA上培养,直至获得纯培养分离物。

1.1.3 致病性测定 将纯培养的分离物菌丝块通过针刺接种法接种到天人菊的健康叶片及茎秆上,置于28℃的恒温培养箱内保湿培养,以针刺伤口处放PDA培养基块的叶片及茎秆为对照,4次重复。定期观察叶片、茎秆的发病情况。发病后再对病斑进行组织分离,根据柯赫氏法则验证分离物是否为致病菌株。

1.1.4 病原菌的培养性状及形态特征观察 将纯化后的致病菌株置于PDA平板上,在28℃的恒温箱中培养,观察记录病原菌的培养性状,并制片在显微镜下观察病原菌的产孢结构及孢子形态,测其大小,进行种类鉴定。

1.2 拮抗木霉菌株的筛选

1.2.1 供试木霉菌株 供试的生防木霉菌株:①哈茨木霉 H1(*T. harzianum*) (广西农科院微生物研究所生物防治研究室提供)、②哈茨木霉 H2(*T. harzianum*) (中国工业微生物菌种保藏中心提供)、③哈茨木霉 H5(*T. harzianum*) (中国工业微生物菌种保藏中心提供)、④康氏木霉 K(*T. koningii*) (中国工业微生物菌种保藏中心提供)、⑤绿色木霉 L(*T. viride*) (广西农科院微生物研究所生物防治研究室提供)。

1.2.2 木霉菌株对天人菊菌核病菌的室内拮抗作用测定 试验采用对峙培养法^[8],以PDA为供试培养基,在培养皿上将天人菊菌核病菌分别与哈茨木霉 H1、H2、H5、康氏木霉 K、绿色木霉 L 5个不同来源的木霉菌株进行对峙培养试验,4次重复,于28℃恒温培养箱中培养,观察木霉菌株和病原菌的生长情况。6 d后,采用拮

抗指数及抑菌率评价不同木霉菌间的拮抗作用强度,筛选出拮抗作用较强的木霉菌株。拮抗指数采用张丽荣等^[9]的分级标准:I级,木霉菌丝占据平皿100%;II级,木霉菌丝占据平皿>2/3;III级,木霉菌丝占据平皿1/3~2/3;IV级,木霉菌丝占据平皿<1/3;V级,病原菌丝占据平皿100%;抑制率(%)=(病原菌对照菌落半径-病原菌落指向木霉菌的半径)/病原菌对照菌落半径×100。

1.2.3 木霉菌株对天人菊菌核病的盆栽防效测定 对筛选出拮抗活性较强的木霉菌株进行盆栽防治试验。选择长势一致的天人菊幼苗进行盆栽试验。试验设2种处理,处理1:以含有生防木霉菌(H1、H2、H5)的麦麸基质与盆土混匀后栽种天人菊幼苗,待生长分蘖期(移栽后20 d),用病原菌孢子悬浮液(1×10^6 个孢子/mL)以每株30 mL的量灌根;处理2:以不含生防木霉菌的麦麸基质与盆土混匀后栽种天人菊幼苗,在同一生长分蘖期伤根后,用病原菌孢子悬浮液(1×10^6 个孢子/mL)以每株30 mL的量灌根。2种处理均在接种病原菌24 h后,用木霉孢子悬浮液(1×10^6 个孢子/mL)以每株30 mL的量灌根。对照(CK)的盆土同样与麦麸基质混合,在接种病原菌24 h后,用稀释相同倍数的空白培养液以每株30 mL的量灌根。3次重复,每重复30株,15 d后调查发病情况,计算各处理的病情指数和防治效果。病害分级标准:0级:无病;1级:轻微发病,发病面积占茎秆表面积的5%以下;3级:轻度发病,发病面积占茎秆表面积的6%~15%;5级:中等发病,发病面积占茎秆表面积的16%~30%;7级:高度发病,发病面积占茎秆表面积的31%~50%;9级:严重发病,发病面积占茎秆表面积的50%以上。病情指数= $\sum(\text{各级病叶数} \times \text{相对级指数}) / (\text{调查总叶数} \times 9) \times 100$;防治效果(%)=(对照区病情指数-处理区病情指数)/对照区病情指数×100。

2 结果与分析

2.1 病害症状及病原菌的鉴定

2.1.1 症状特点 调查发现,植株感病一般在分蘖盛期至开花结果期。主要为害茎基部及茎秆,也可受害叶片。发病初期茎基部形成水渍状淡褐色不规则病斑,随后病斑向上部茎秆和叶柄扩展蔓延,病健交界明显。湿度大时病斑发展迅速,病斑表面可见白色棉絮状菌丝,并逐渐形成近圆形或不规则形黑色鼠粪状菌核。叶片感病,多从下部叶片的叶尖或叶缘开始出现水渍状、褐色、不规则形病斑,边缘不明显,潮湿时病斑迅速扩展,全叶腐烂,上面长出白色絮状菌丝。后期植株茎髓变成空腔,维管束成麻状易折断,最后全株萎蔫枯死。

2.1.2 病原菌的分离与致病性测定 从病叶、茎组织中共分离、纯化得到3种真菌,将其分别回接到天人菊的健康叶片及茎秆上,只有其中1种真菌于接种后的第3天在叶片和茎秆上表现感病变化,发病初期病变部位出

现褐色斑点,成软腐状,病斑扩展快,接种 3 d 后病斑表面出现白色棉絮状菌丝,9 d 后形成黑色菌核(图 1),其症状特点与田间病株症状(图 2)相似,对照无发病症状。从接种的病组织分离到的病原菌与田间发病组织分离到的培养物形态一致,表明该种真菌是天人菊菌核病的病原菌。

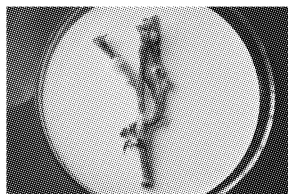


图 1 人工接种发病症状

Fig. 1 The symptom inoculated by needle injury with the pathogen in lab

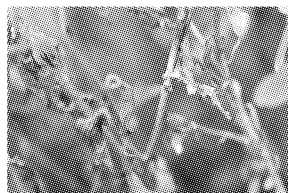


图 2 田间发病症状

Fig. 2 The initial symptom in the field

2.1.3 病原菌的培养性状及形态特征 病原菌在 PDA 培养基上培养 3 d 后,形成白色圆形菌落,菌丝平展,在菌落边缘和表面形成突起,逐渐在突出的部位上出现晶莹的水珠。培养至第 6 天可形成菌核,菌核形成初期为白色绵状突起,后转为黑色,呈椭圆形、球形或鼠粪状。菌核质地坚硬,表面黑色,内部灰白色,外层为黑色紧密的拟薄壁组织。菌核经 5℃左右的低温处理 1 个月后,菌核萌发成子囊盘。每粒菌核通常可产生 5~10 个子囊盘。子囊盘初期为杯状,展开后成盘状,盘柄褐色,子囊圆筒形,大小(114~160) $\mu\text{m} \times (8 \sim 11) \mu\text{m}$ 。表面着生子囊和侧丝,排成一层。子囊棍棒状,内有 8 个单胞、无色、椭圆形、单行排列的子囊孢子,大小(9~14) $\mu\text{m} \times (5 \sim 8) \mu\text{m}$ 。侧丝长在子囊之间,无色,丝状。根据上述病原菌的培养性状及形态特征,参照魏景超的《真菌鉴定手册》^[10],确定该病原菌为核盘菌(*Sclerotinia sclerotiorum* (Lib) de Bary),属子囊菌亚门,盘菌纲,柔膜菌目,核盘菌属真菌。

2.2 拮抗木霉菌株的筛选

2.2.1 木霉菌株对天人菊菌核病菌的室内拮抗作用 供试的 5 个木霉菌株与病原菌对峙培养 6 d 后,所有木霉菌株对核盘菌均表现不同程度的抑制作用(表 1),其中哈茨木霉 H5 对病原菌的拮抗抑菌作用最强,拮抗指数表现为 I 级,抑菌率可达 100%(图 3);与其它木霉菌株之间存在显著性差异;哈茨木霉 H1、H2 对病原菌的拮抗作用也较强,拮抗指数均为 II 级,抑菌率均在 80%以

上,二者之间差异不显著;而康氏木霉 K 与绿色木霉 L 对病原菌的拮抗作用较弱,拮抗指数仅为 III 级,抑菌率也相对较低。

表 1 不同木霉菌株对天人菊菌核病菌的拮抗作用

Table 1	The antagonistic ability of different trichoderma strains on the pathogen				
木霉菌株 Trichoderma strain	哈茨木霉 H1 <i>Trichoderma harzianum</i> H1	哈茨木霉 H2 <i>Trichoderma harzianum</i> H2	哈茨木霉 H5 <i>Trichoderma harzianum</i> H5	康氏木霉 K <i>Trichoderma koningii</i> K	绿色木霉 L <i>Trichoderma viride</i> L
拮抗指数 Antagonistic index	II	II	I	III	III
抑菌率 Pathogen inhibitory ratio/%	82.35b	85.43b	100a	51.14c	61.06c

注:同一列中不同字母表示差异显著(SAS, $P < 0.05$)。下同。

Note: Numbers in columns with different letters are significantly different (followed by SAS, $P < 0.05$). The same below.

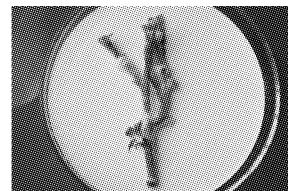


图 3 哈茨木霉 H5 对病原菌的拮抗效果

注:A: 哈茨木霉 H5;B:病原菌。

Fig. 3 The antagonist effect of *Trichoderma harzianum* H5 against the pathogen

Note: A: *Trichoderma harzianum* H5; B: pathogen.

2.2.2 木霉菌株对天人菊菌核病的盆栽防治效果 用筛选出的拮抗活性较强的 3 个哈茨木霉菌株对天人菊菌核病进行盆栽防治试验。由表 2 可知,在施用的菌株相同的情况下,按处理 1 的方法(即栽苗前用含有哈茨木霉菌株的基质与盆土混合,并在病原菌接种 24 h 后再

表 2 哈茨木霉菌株对天人菊菌核病的盆栽防治效果

Table 2	The control efficiency of different <i>Trichoderma harzianum</i> strains on the sclerotinose of <i>Gaillardia pulchella</i>			
木霉菌株 Trichoderma strain	处理 1 Treatment 1		处理 2 Treatment 2	
	病情指数 Disease index	防治效果 Control efficiency/%	病情指数 Disease index	防治效果 Control efficiency/%
哈茨木霉 H1 <i>Trichoderma harzianum</i> H1	0.165	81.5 b	0.221	72.5 b
哈茨木霉 H2 <i>Trichoderma harzianum</i> H2	0.182	79.6 b	0.238	70.4 b
哈茨木霉 H5 <i>Trichoderma harzianum</i> H5	0.061	93.2 a	0.084	89.5 a
CK	0.894	—	0.803	—

次施用哈茨木霉孢悬浮子液)进行防治比处理 2 的方法(即在病原菌接种 24 h 后施用 1 次哈茨木霉孢子悬浮液)能取得更好的防治效果。在处理方法相同的情况下,H5 菌株的防治效果显著高于 H1、H2 菌株的防治效果,其防效高达 93.2%。而 H1、H2 菌株的防治效果分别为 81.5%和 79.6%,差异不显著。

3 结论与讨论

培养性状和形态学特征观察是植物病原真菌鉴定的传统方法。根据菌落的形态和颜色、菌核的形态和颜色、子囊和子囊孢子的形态、大小,将天人菊菌核病的病原鉴定为核盘菌(*Sclerotinia sclerotiorum* (Lib) de Bary),属于囊菌亚门,盘菌纲,柔膜菌目,核盘菌属真菌。

核盘菌为土壤习居菌,能在土壤中长期存活和积累。核盘菌的生活史中有 90%的时间是以菌核形式长期存活于土壤中,诸如轮作、田园清洁等农业技术措施都很难取得较好的防治效果^[11],施用化学药剂虽能取得一定防治效果,但容易造成环境污染和病原菌产生抗性。因此,利用土壤中的有益微生物来抑制核盘菌是一种环保、有效的措施。据报道,从土壤中分离到的木霉属真菌包括哈茨木霉(*T. harzianum*)^[4]、康氏木霉(*T. koningii*)^[5]和绿色木霉(*T. viride*)^[6]等对核盘菌均有较好的拮抗作用。试验结果发现,哈茨木霉对核盘菌的拮抗作用较好,康氏木霉和绿色木霉的拮抗作用较差。在测试的 3 个哈茨木霉菌株中,H5 菌株对核盘菌的拮抗作用最好,其对天人菊菌核病的盆栽防治效果也是最好的,说明同一种类真菌的不同菌株对病原菌的抑制效果不同。

在盆栽防治试验中,栽苗前用含有哈茨木霉菌株的

麦麸基质与盆土混合,并在病原菌接种 24 h 后再次施用哈茨木霉孢悬浮子液的处理能取得很好的防治效果,原因可能是土壤中加入的麦麸基质为木霉菌提供了营养载体,因而提高了木霉菌在土壤中的生长能力,使其成为优势种群定植于植物根际,从而抑制了病原菌在土壤中的繁殖。

此外,哈茨木霉菌株对天人菊菌核病菌的拮抗机理及其田间防治效果有待进一步研究。

参考文献

- [1] 江纪武. 药用植物辞典[M]. 天津:天津科学技术出版社,2005:342.
- [2] 邱玲玉. 天人菊无性系建立的研究[J]. 黑龙江农业科学,2010(12):1-4.
- [3] 倪苏. 天人菊的组织培养和植株再生[J]. 植物生理学通讯,2003,39(4):342.
- [4] 曹舜,高智谋,杨光红,等. 哈茨木霉 TH-1 对大豆疫霉和油菜菌核病的抑制作用及其机制[C]. 中国植物病理学会 2010 年学术年会论文集,2010:732-733.
- [5] 曹翠玲,刘素琪,康瑞姣,等. 康氏木霉对向日葵菌核病菌拮抗作用研究[J]. 山西农业大学学报,2005,25(2):150-152.
- [6] 陈碧云,周乐聪,陆致平. 绿色木霉发酵配方与防治油菜菌核病的研究[J]. 中国生物防治,2001,17(2):67-70.
- [7] 方中达. 植物病研究方法 [M]. 3 版. 北京:中国农业出版社,1998:123-124.
- [8] 曹玉桃,姚革,文成敬,等. 木霉拮抗黄瓜枯萎病菌菌株的筛选[J]. 西南农业学报,2007,20(3):408-411.
- [9] 张丽荣,康萍芝,沈瑞清. 木霉菌对土传病害病原真菌的拮抗作用[J]. 内蒙古农业科技,2007(5):48-50.
- [10] 魏景超. 真菌鉴定手册[M]. 上海:上海科学技术出版社,1979:254-256.
- [11] 马炳田,文成敬. 几种核盘菌菌核重寄生真菌生物防治潜能的研究[J]. 中国农学通报,2002(6):58-63.

Identification of the Pathogen of Sclerotiniosis on *Gaillardia pulchella* and Screening of Antagonistic *Trichoderma* Strain

LIU Wei, YE Yun-feng, LI Lin-xuan, JIANG Ni, LIU Li-hui

(Guangxi Botanical Garden of Medicinal Plant, Guangxi Medicinal Resources Conservation and Genetic Improvement Laboratory, Nanning, Guangxi 530023)

Abstract: The pathogen was identified based on pathogenicity, disease symptom, cultivation characters and morphology. The antagonistic *Trichoderma* strain was screened by antagonistic ability tests *in vitro* and pot experiments. The results showed that pathogen of sclerotiniosis on *Gaillardia pulchella* was identified as *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib) de Bary. *Trichoderma harzianum* H5 gave the strongest antagonistic ability *in vitro* and highest control efficiency in pot experiments. Its antagonistic index and control efficiency were 1 and 93.2%, respectively. Among the five tested *Trichoderma* strains, *Trichoderma harzianum* H5 had the best control potential for controlling the sclerotiniosis on *Gaillardia pulchella*.

Key words: *Gaillardia pulchella*; sclerotiniosis; identification of the pathogen; antagonistic *Trichoderma* strain; screen