

# 药水苏白绢病病原鉴定及其生防木霉菌株筛选

刘 威, 蓝祖裁, 叶云峰, 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:**以药水苏白绢病株为试材,通过致病性测定法确定病原菌,采用病原菌的形态鉴定方法并结合该菌的 ITS rDNA 序列分析鉴定病原菌种类;采用平板对峙法筛选拮抗菌株。结果表明:药水苏白绢病的病原菌为罗氏白绢小菌核菌(*Sclerotium rolfsii* Sacc.);5 个供试木霉菌株中以哈茨木霉(H2)对病原菌的抑制作用最强,拮抗指数为Ⅱ级,抑菌率为 86.27%。

**关键词:**药水苏;白绢病;病原鉴定;拮抗木霉;筛选

**中图分类号:**S 567.23<sup>+</sup>9 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2013)05-0125-04

药水苏(*Betonica officinalis* L.)属唇形科药水苏属多年生草本植物,以根茎入药,其性辛、平,入脾、胃二经,芳香醒胃、行气消胀,用于脾胃不和或脾胃气滞所致纳少、脘腹胀满、暖气呃逆、大便溏薄等症。主要化学成分有水苏素(Betonicine)和异水苏素(Ltutricine)<sup>[1]</sup>。

药水苏原产欧洲及西亚,在全国各地植物园及生产种植基地作为药用植物引种栽培,主要以根茎繁殖。白绢病是药水苏的主要病害,该病害在高温多雨季节容易发生和流行,主要危害根茎和茎基部。发生期病菌可大量繁殖扩散,且为害期长,一旦感染病害就会造成严重

损失,直接影响品种的产量、品质,严重时甚至导致全部死亡。鉴于药水苏白绢病的发生及防治方面尚鲜见相关的报道,为此,该研究对该病害的病原菌进行了分离、鉴定,研究其发病规律,筛选对药水苏白绢病病原菌抑制效果较好的木霉菌株,以期对药水苏白绢病的有效防治提供依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

标本来源:试验用的药水菌白绢病标本采于广西药用植物园。

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

**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等研究工作。

**基金项目:**广西省卫生厅自筹基金资助项目(Z2011161)。

**收稿日期:**2012-11-09

## Initial Quantitative Study on Incubation and Development of Lesion of Cabbage Black Spot Disease

MA Hai-xia<sup>1,2</sup>, QU Zhi<sup>1</sup>, LIU Ying<sup>2,3</sup>, LI Dan<sup>2</sup>, GAO Dong-mei<sup>2</sup>, YANG Xin-dong<sup>2,4</sup>

(1. Institute of Tropical Bioscience and Biotechnology, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, Haikou, Hainan 571101; 2. College of Agriculture, Jilin Agricultural University, Changchun, Jilin 130118; 3. Institute of Plant Protection, Jilin Province Institute of Agricultural Sciences, Gongzhuling, Jilin 136100; 4. College of Development, Jilin Agricultural University, Changchun, Jilin 130600)

**Abstract:** Taking 'Baibangcai' cabbage as material, lesion incubation and development of cabbage black spot disease were studied in laboratory and field. The results showed that the incubation period of the disease was 2~3 days under natural condition. Temperature had obvious effect on incubation period. The higher the temperature, the shorter the incubation period, and the incubation period was 12 hours over 30°C. Symptomatic appearance of the disease was about 4 days. The extension period of lesion the disease was 8~13 days and different lesion had different extension period. The different lesion extend different length, was 3.4~5.0 mm. The lesion extended quickly at the beginning and reached the half of the greatest length at 4~5 d, lesion reached the biggest length at 14 d. The linear regression equation of lesion length (y) to date (x) was concluded, which was  $y=1.3827+0.2073x$  ( $r=0.9951$ ).

**Key words:** black spot disease of cabbage; *Alternaria brassicae*; incubation period; lesion extension

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。

引物:核糖体 rDNA-ITS 序列的通用引物 ITS1(5'-TCC GTA GGT GAA CCT GCG G-3')和 ITS4(5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3'),由上海捷瑞生物工程技术服务有限公司合成。

## 1.2 试验方法

1.2.1 病害症状描述 对田间植株的自然发病症状进行观察和描述。

1.2.2 病原菌分离培养 采用常规的组织分离法进行病原菌的分离。选取初发病的茎组织进行病菌分离,在病健交界处剪取约 0.5 cm 的茎段,用 75%酒精消毒 30 s,再用 0.1%浓度的升汞溶液消毒 3 min 后,用无菌水洗 3 次,接种于 PDA 培养基平板上,28℃恒温条件下培养,待长出菌丝后(4 d),挑取菌落边缘菌丝至 PDA 培养基上进行纯化,直至获得纯培养物。

1.2.3 致病性测定 将分离、纯化后培养出来的病原菌,用针刺接种法<sup>[2]</sup>接种到药水苏的健康叶片及茎秆上,以不接种病原菌的组织为对照,放置于具有湿润滤纸的培养皿中,置于 28℃的恒温箱内培养。每处理重复 4 次,培养期间保持一定的湿度,观察、记录发病情况。待接种组织表现出症状后对病斑进行组织分离并培养,根据柯氏赫氏法则验证分离物是否为该病原菌,确认致病菌株。

1.2.4 病原菌的培养性状及形态特征观察 将纯化后的菌株移至 PDA 平板,于 28℃下培养,观察记录病原菌的菌落、菌丝及菌核的形态特征,参考魏景超<sup>[3]</sup>的方法进行形态鉴定。

1.2.5 rDNA ITS 区的 PCR 扩增及序列分析 病原菌 DNA 提取采用 CTAB 法<sup>[4]</sup>。病原菌 rDNA 的 ITS 区域 PCR 扩增选用通用引物 ITS1(5'-TCC GTA GGT GAA CCT GCG G-3')和 ITS4(5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3')。反应在 50 μL 体系中进行,体系含有 10×PCR Buffer 5 μL,dNTP (10 mM) 2 μL,Primer ITS1 (10 μM) 2 μL,Primer ITS4 (10 μM) 2 μL,Genomic DNA 100 ng,rTaq (5 U/μL) 1 μL;ddH<sub>2</sub>O 补足至 50 μL。反应程序为:95℃预变性 5 min;95℃变性 30 s,58℃退火 30 s,72℃复性 80 s,33 个循环;72℃延伸 7 min。PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳回收目标 DNA 片段,由北京诺赛基因组研究中心有限公司进行测序,测序结果用 Blast 软件在 GenBank 数据库中进行同源性比对。根据同源性比对结果,结合病原菌的形态特征进行鉴定。

1.2.6 木霉菌株对药水苏白绢病菌的室内拮抗作用测定 采用对峙培养法<sup>[5]</sup>,以 PDA 为供试培养基,在培养皿上将病原菌分别与康氏木霉 *K(Trichoderma koningii)*、

哈茨木霉 H1、H2、H5(*Trichoderma harzianum*)、绿色木霉 *L(Trichoderma viride)* 5 种不同来源的木霉菌株进行对峙培养试验,每处理 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。以单独培养的病原菌为对照。每天记录病原菌落指向木霉菌半径及对照病原菌菌落半径,5 d 后,采用拮抗系数及抑制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。拮抗系数分级标准<sup>[6]</sup>为: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%。

## 2 结果与分析

### 2.1 症状特点

调查发现,白绢病主要为害根、茎部,叶片也可受害。病株发病部位多呈水渍状病斑,表面生白色绢丝状菌丝,土壤湿度大时在病部产生白色菌丝覆盖病部和四周地面,呈辐射状,边缘尤为明显,发病后期,在白色绢丝状菌丝体上产生许多油菜籽状菌核。随着病情的加重,根茎部皮层腐烂,呈纤维状,地上茎叶萎蔫枯死。

### 2.2 病原菌的分离与致病性测定

将采集回来的病组织中分离出来的白绢病原菌,经纯化培养后回接到药水苏的健康叶片及茎秆上,在 28℃温度下培养,培养过程中加水保湿。接种后的第 3 天开始发病,菌斑扩展快,白色菌丝紧贴于组织表面,呈放射状(图 1),接种 10 d 后产生白色菌核,后渐变成棕褐色菜籽状小菌核(图 2),其症状特点与田间病株症状相似,对照植物上无发病症状。从接种的病组织分离的病原菌与田间发病组织分离的病原菌形态一致。

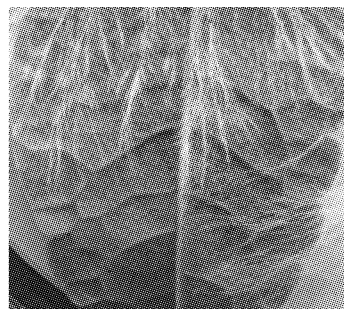


图 1 病原菌接种后的第 4 天

Fig. 1 Pathogens at 4 days after inoculation

### 2.3 病原菌的培养性状及形态特点

药水苏白绢病在 PDA 培养基上,菌丝体白色绢丝状,呈放射状扩展(图 3),生长速度快。培养 7 d 后形成油菜籽状菌核,菌核椭圆形或球形,外观初呈白色,后略带黄色至茶褐色或棕褐色,直径 0.5~1.0 mm,大的 3 mm,



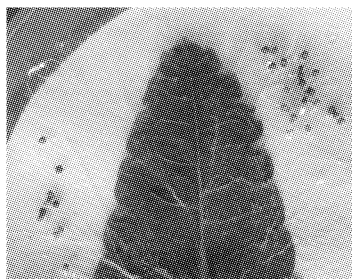


图2 病原菌接种后的第11天

Fig. 2 Pathogens at 11 days after inoculation

平滑而有光泽。镜检观察,菌丝无色透明,呈空心管状结构,具隔膜(图4),有锁状联合现象(图5);菌核切片后观察,表面细胞小而色深,内部细胞大而色浅或无色,菌核外层包以近圆形或多角形,排列紧密的拟薄壁组织(图6)。病原菌的上述特征与罗氏白绢小菌核菌(*Sclerotium rolfsii* Sacc.)相同。



图3 病原菌在PDA上的菌落特征

Fig. 3 Colony morphology of pathogen on PDA media

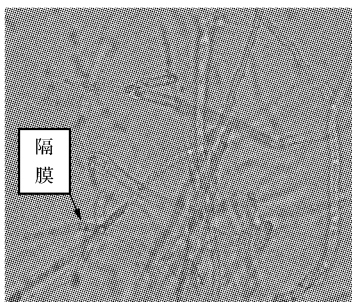


图4 有隔膜的病原菌菌丝

Fig. 4 Diaphragmatic mycelia

#### 2.4 rDNA ITS区的PCR扩增及序列分析

以提取的药水苏白绢病菌的DNA为模板,用rDNA的ITS区段通用引物ITS1与ITS4进行扩增,并对此片段进行序列测定,获得长度为640 bp的特异性片段。将产物测得的序列在GenBank中进行BLAST比对,结果显示,该序列与GenBank中多个*Athelia rolfsii*菌株ITS序列的同源性最高,为100%(表1)。结合病原菌rDNA的ITS序列分析结果和形态特征,将其鉴定为罗氏白绢小菌核菌(*Sclerotium rolfsii* Sacc.),属半知菌亚门,丝孢纲,无孢目,小菌核菌属真菌。有性态为

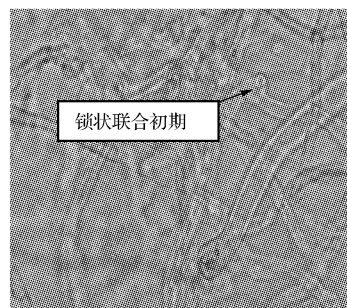


图5 菌丝形成的锁状联合

Fig. 5 Clamp connection of the mycelia

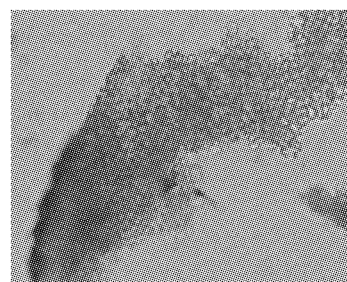


图6 病原菌菌核切面显微形态

Fig. 6 The pathogens sclerotia section micromorphology

[*Pellicularia rolfsii* (Sacc.) West.],现以罗氏阿太菌[*Athelia rolfsii* (Curiz) Tu & Kimbrough]为大家所公认<sup>[7]</sup>,戴芳澜<sup>[8]</sup>称之为齐整小核菌。

表1 药水苏白绢病病原菌ITS序列与GenBank中相似序列的比较

Table 1 Comparison of ITS sequence of the pathogen and similar sequences in GenBank

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident
JN241563.1	<i>Athelia rolfsii</i>	296	296	100	3E-77	100
JN241561.1	<i>Athelia rolfsii</i>	296	296	100	3E-77	100
JN241559.1	<i>Athelia rolfsii</i>	296	296	100	3E-77	100
JN241558.1	<i>Athelia rolfsii</i>	296	296	100	3E-77	100
JN241557.1	<i>Athelia rolfsii</i>	296	296	100	3E-77	100
JN241556.1	<i>Athelia rolfsii</i>	296	296	100	3E-77	100
JN241555.1	<i>Athelia rolfsii</i>	296	296	100	3E-77	100
JN241554.1	<i>Athelia rolfsii</i>	296	296	100	3E-77	100
JN017199.1	<i>Athelia rolfsii</i>	296	296	100	3E-77	100
HQ895966.1	<i>Athelia rolfsii</i>	296	296	100	3E-77	100

#### 2.5 木霉对病原菌的抑制效果

通过白绢病病原菌与木霉的对峙培养试验,观察木霉对病菌的侵入及占领营养空间情况。对峙培养第3天哈茨木霉菌即对药水苏白绢病菌表现出抑制作用,培养后的第5天在哈茨木霉与病原菌的交界处形成较明显黄色抑菌带(图7),挑取抑菌带处的菌丝镜检发现,木霉孢子与病菌菌丝共存于这一区域,此处的病原菌被木霉菌以缠绕方式寄生于病原菌丝上,同时出现菌丝断裂(图8)、菌丝消解,细胞质变稀薄等现象。由表2可以看出,不同木霉菌株对药水苏白绢病菌的抑制作用存在显

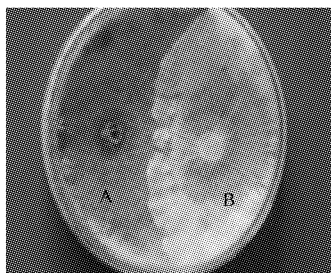


图 7 哈茨木霉与病原菌的对峙

注:A,哈茨木霉 H2;B,病原菌。

Fig. 7 *Trichoderma harzianum* and pathogen of confrontation culture



图 8 病原菌丝断裂

Fig. 8 Mycelium fracture

表 2 不同木霉菌对药苏白绢病菌的拮抗效果

Table 2 Antagonistic effect of different trichoderma strains on the pathogen

木霉菌株 Trichoderma strain	哈茨木霉 H5 <i>Trichoderma harzianum</i> H5	哈茨木霉 H1 <i>Trichoderma harzianum</i> H1	哈茨木霉 H2 <i>Trichoderma harzianum</i> H2	康氏木霉 K <i>Trichoderma koningii</i> K	绿色木霉 L <i>Trichoderma viride</i> L
拮抗系数 Antagonistic index	II	II	II	III	III
抑菌率 Pathogen inhibitory ratio/%	74.56b	75.31b	86.27a	51.22d	63.59c

注:数据后不同字母为差异显著性分析(SAS,  $P < 0.05$ )。

Note: Data after different letters was significant difference analysis (Followed by SAS,  $P < 0.05$ ).

### 3 结论与讨论

综合药苏白绢病症状观察、致病性测定、病原形态特征观察及 rDNA 的 ITS 序列分析结果,确定引起药苏白绢病的病原菌为罗氏白绢小菌核菌(*Sclerotium rolfsii* Sacc.)。木霉对药苏白绢病的对峙试验中,哈茨木霉 H2 对病原菌的拮抗作用及抑菌率最为理想,在显微镜检结果中发现病原菌被该木霉以缠绕方式寄生,出现菌丝消解,菌丝断裂,细胞质变稀薄等现象,且在重复试验中对病原菌的抑制作用相对持续平稳。由于拮抗微生物在田间的防治效果会受许多因素的影响,木霉菌株对药苏白绢病的防治效果能否与室内试验表现一致,还有待探讨。

### 参考文献

- [1] 冉先德. 中华药海(下册)[M]. 哈尔滨:哈尔滨出版社,1993:1297.
- [2] 方中达. 植物研究方法[M]. 北京:中国农业出版社,1998:194.
- [3] 魏景超. 真菌鉴定手册[M]. 上海:上海科技出版社,1979:645-648.
- [4] 易润华,朱西儒,周而勋. 简化 CTAB 法快速微量提取丝状真菌 DNA[J]. 湛江海洋大学学报,2003,23(6):72-73.
- [5] 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.
- [6] 张丽荣,康萍芝,沈瑞清. 土壤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.
- [7] 金苹,高晓余. 白绢病的研究[J]. 农业灾害研究,2011(1):14-22.
- [8] 戴芳澜. 中国真菌总汇[M]. 北京:科学出版社,1979:1060.

## Identification of the Pathogen of *Sclerotium rolfsii* on *Betonica officinalis* and Screening of Antagonistic Trichoderma Strain

LIU Wei, LAN Zu-zai, YE Yun-feng, JIANG Ni, LIU Li-hui

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

**Abstract:** Taking diseased plants of *Betonica officinalis* as experimental materials, the pathogen was identified by pathogenicity test; the types of pathogen were tested by the way of morphological identification and ITS rDNA sequence analysis; the antagonistic strains had been screened by confronting cultivation on PDA plates. The results showed that the pathogen of sclerotiniase on *Betonica officinalis* was identified as *Sclerotium rolfsii* Sacc; among the five tested trichoderma strains, *Trichoderma harzianum* H2 had the best control potential for controlling the sclerotiniase on *Betonica officinalis*, its antagonistic index and control efficiency were II level and 86.27%, respectively.

**Key words:** *Betonica officinalis*; *Sclerotium rolfsii*; identification of the pathogen; antagonistic trichoderma strain; screen