

牛耳枫枯梢病病原分离与鉴定

胡风云, 刘威, 叶云峰, 蒋妮, 刘丽辉, 黄雪彦

(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:以染病及健康的牛耳枫为试材, 采用常规组织分离法对牛耳枫枯梢病病原进行分离, 通过对病原菌的形态学特征、致病性测定和 rDNA-ITS 序列分析, 对引起牛耳枫枯梢病的病原菌进行了鉴定。结果表明: 牛耳枫枯梢病的病原为尖孢镰刀菌 (*Fusarium oxysporum*), 该病原菌直接侵染牛耳枫嫩梢引起枯梢病。

关键词:牛耳枫; 枯梢病; 尖孢镰刀菌; 病原鉴定

中图分类号:S 435.67 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2014)16-0115-04

牛耳枫 (*Daphniphyllum calycinum* Benth.) 属虎皮楠科 (Daphniphyllaceae) 虎皮楠属 (*Daphniphyllum*) 植物, 别名老虎耳、南岭虎皮楠、假楠木、牛耳铃、猪颌木、岭南虎皮楠等, 主要分布于我国广东、广西、海南和云南等省区, 是我国传统的民间药用植物^[1-2]。牛耳枫根部、枝叶、果实均可入药, 具有清热解毒、活血舒筋等功效。主治感冒发热, 扁桃体炎, 风湿关节痛; 还可外用治跌打肿痛, 骨折, 毒蛇咬伤, 疮疡肿毒, 乳腺炎, 皮炎和无名肿毒等^[3], 能开发多种药品。枫蓼肠胃康制剂即为其中之一, 目前该成药年销售额过亿^[4]。牛耳枫作为枫蓼肠胃康制剂的主药, 其需求量逐年增加。近年来, 牛耳枫野生资源已远不能满足市场的要求, 需要进行人工栽培方能解决资源匮乏的问题。因此, 海南、广西等地药农相继尝试人工种植牛耳枫。2012 年 9 月, 在广西南宁市石埠乡的牛耳枫种植基地, 出现了一种为害极重的病害—牛耳枫枯梢病。该病病原菌主要为害牛耳枫幼苗嫩梢茎部, 引起梢部萎蔫枯死, 随后向上下扩展, 可致整株枯死, 严重影响了牛耳枫药材的品质和产量。经作者调查, 该病在广西南宁、防城港、融安等种植区均有发生。目前, 关于牛耳枫的化学成分的研究报道较多^[5-7], 但对其病害方面的研究还很少, 特别是枯梢病方面尚鲜见相关报道。现以广西南宁市采集的牛耳枫枯梢病病样为试材, 开展了病原分离和鉴定工作, 以期为进一步的防控技术研究提供基础。

第一作者简介:胡风云(1986-), 女, 硕士, 研究方向为药用植物病害及其防治研究。E-mail: hfy316@126.com.

责任作者:黄雪彦(1978-), 女, 硕士, 副研究员, 研究方向为药用植物保育。E-mail: xueyan-h@163.com.

基金项目:广西科学研究与技术开发计划资助项目(桂科攻 1099063-15)。

收稿日期:2014-03-25

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试染病及健康的牛耳枫植株均采自广西南宁市石埠乡牛耳枫种植基地。供试培养基为马铃薯葡萄糖培养基(PDA)。

1.2 试验方法

1.2.1 病原菌的分离与纯化 病原菌参照方中达^[8]的常规的组织分离法进行分离。分离得到的菌株经单孢纯化后保存于 PDA 斜面培养基上, 置 4℃ 冰箱中贮存备用。

1.2.2 病原菌的致病性测定 纯化后的病原菌菌株移到 PDA 培养基平板上, 于 26℃ 下培养 7 d 备用。选取健康的牛耳枫植株梢部(5~6 片叶), 用灭过菌的蒸馏水冲洗干净后晾干表面水分, 采用针刺接种法接种, 即用针刺伤嫩梢部茎杆后取直径为 5 mm 菌丝块覆盖在伤处, 用封口膜缠紧。对照植株梢部伤口处覆盖 PDA 培养基块。每处理 3 次重复。接种后插于有水的广口瓶中套袋保湿, 并将其置于 25~30℃ 自然光下培养, 每隔 2 d 观察发病情况。对接种发病的茎段进行病原菌再分离, 观察分离得到的病原菌是否与接种菌株相同。

1.2.3 病原菌形态学鉴定 将分离纯化得到的病原菌接种于 PDA 培养基平板上, 28℃ 培养 7~8 d, 记录菌落形态和颜色。在普通光学显微镜下观察并描述其产孢结构和分生孢子的形态学特征, 随机测量 100 个病原菌分生孢子的大小, 并拍照, 对病原菌进行形态学鉴定。

1.2.4 分子生物学鉴定 将病原菌接种于 PDA 平板上培养 4 d 后, 接入 PD 液体培养基中, 振荡培养(26℃, 150 r/min) 7 d 后收集菌丝用无菌水冲洗, 抽滤, 冷冻干燥, -20℃ 低温保存备用。病原菌 DNA 的提取参照易润华等^[9]的 CTAB 法。引物分别为 ITS4 5'-TCCTCGCTTATTGATATGC - 3' 和 IT5 5'-GGAAGTA-

AAAGTCGTAACAAGG-3', 对菌株 rDNA-ITS 区域进行 PCR 扩增。反应体系含 10× 缓冲液 (20 mmol/L Tris-HCl, 20 mmol/L KCl) 5 μ L, dNTP (各 2.5 mmol/L) 1 μ L, 引物 ITS4 (10 μ mol/L)、ITS5 (10 μ mol/L) 各 2 μ L, DNA 模板 2 μ L (约 20 ng), Taq 酶 (5 U/ μ L) 0.5 μ L; ddH₂O 至 50 μ L。扩增程序为 95℃ 预变性 5 min, 然后进入循环, 94℃ 变性 30 s, 58℃ 退火 1 min, 72℃ 复性 90 s, 35 个循环, 最后 72℃ 延伸 10 min。PCR 产物委托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。

2 结果与分析

2.1 病害症状

2012 年 9 月, 该课题组在南宁市石埠乡的牛耳枫种植基地发现了牛耳枫枯梢病, 该病主要为害牛耳枫嫩梢茎部, 也可受害叶、叶柄。受害茎秆初期产生水浸状病斑, 迅速向上、下扩大环绕茎秆, 病部凹陷, 病茎以上的茎叶呈萎蔫状, 而后由凹陷处下折, 最后发病部位以上部分变褐色干枯而死。受害叶柄呈水渍状, 病健交界处不明显, 病斑可向上蔓延至叶片, 叶片受害后似开水烫过。该病害主要在牛耳枫苗期发生, 感病苗最易从病部折断, 湿度大时病部表面产生白色至粉红色霉层 (图 1)。

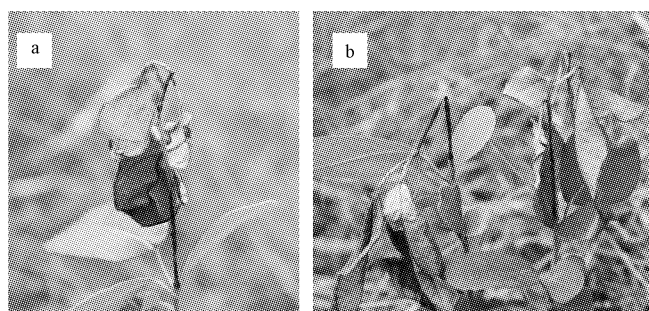


图 1 牛耳枫枯梢病田间症状

注: a: 早期症状; b: 后期症状。

Fig. 1 Natural symptoms of shoot blight of *D. calycinum*

Note: a: early symptoms; b: late symptoms.

2.2 病原菌的分离和致病性测定

在广西南宁市石埠乡牛耳枫种植基地内采集到的牛耳枫枯梢病 6 个病害标样, 分离纯化后得到形态特征一致的分离物 12 个。采用针刺接种法将这些菌株接种到健康的牛耳枫茎梢上, 接种 2 d 后, 接种茎段周围出现水渍状, 5 d 后开始变黑, 7 d 可扩展至梢部叶柄和叶片, 导致叶片脱落, 症状与田间自然发病症状相似 (图 2); 对照植株不发病。且人工接种后发病植株经再分离所得菌株形态和培养性状均与接种菌相同。

2.3 病原菌形态学鉴定

病原菌在 PDA 平板上培养, 菌落为圆形或近圆形, 边缘整齐, 絮状突起, 气生菌丝白色质密。菌落粉白色,



图 2 牛耳枫枯梢病离体接种症状

注: a: 接种后症状; b: 对照。

Fig. 2 Inoculation symptoms of shoot blight of *D. calycinum*

Note: a: symptoms after inoculation; b: CK.

浅粉色至肉色, 略带有紫色。显微镜观察表明, 分生孢子镰刀形, 稍弯曲, 无色, 多胞, 两端细胞稍尖, 自单瓶梗产生, 假头生, 大小 (44.6~86.4) μ m \times (5.5~7.3) μ m。分生孢子座直径 100~180 μ m, 有许多聚集成垫状的、很短的分生孢子梗基形成, 梗基上产生单瓶梗, 顶端着生分生孢子。厚垣孢子紫黑色, 近球形, 表面光滑, 壁厚, 后期形成圆形的菌核。参照《真菌鉴定手册》^[10] 以及《植物病原真菌学》^[11], 将该病原菌鉴定为半知菌类 (Imperfecti fungi) 从梗孢目 (Moniliales) 瘤座孢科 (Tuberculariaceae) 镰刀菌属 (*Fusarium*) 尖孢镰刀菌 (*Fusarium oxysporum*)。

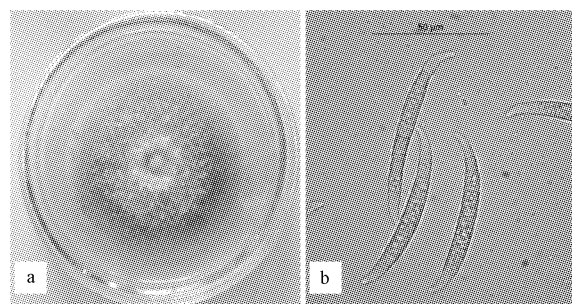


图 3 牛耳枫枯梢病原形态

注: a: 菌落; b: 分生孢子; c: 分生孢子座。

Fig. 3 Pathogen morphology of shoot blight of *D. calycinum*

Note: a: colony; b: conidia; c: sporodochium.

2.4 分子生物学鉴定

通过 CTAB 法提取病原菌的 DNA, 并进行 PCR 扩增, 对其产物进行测序, 获得 493 bp 的 DNA 序列(图 4, GenBank 登录号为 KC977497), 通过 Blast 比对搜索发现, 该序列与 GenBank 核酸数据库中已报道的多个尖孢

镰刀菌(*F. oxysporum*)的 ITS 序列同源性高达 99%~100%。牛耳枫枯梢病病原菌形态特征与 Booth 等^[12]描述的尖孢镰刀菌的形态学特征相似, rDNA-ITS 序列分析结果进一步从分子水平证明其为尖孢镰刀菌(*F. oxysporum*)。

1	ACCTGATCGA	GGTCACATTC	AGAAAGTTGGG	GTTTAACGGC	GTGGCCGCGA
51	CGATTACCAG	TAACGAGGGT	TTTACTACTA	CGCTATGGAA	GCTCGACGTG
101	ACGCCAATC	AATTTGAGGA	ACGCGAATTA	ACGCGAGTCC	CAACACCAAG
151	CTGTGCTTGA	GGGTGAAAT	GACGCTCGAA	CAGGCATGCC	CGCCAGAATA
201	CTGGCGGGCG	CAATGTGCGT	TCAAAGATTC	GATGATTCAC	TGAATTCTGC
251	AATTCACATT	ACTTATCGCA	TTTTGCTGCG	TTCTTCATCG	ATGCCAGAAC
301	CAAGAGATCC	GTTGTTGAAA	GTTTGTGATT	ATTATGTT	TTACTCAGAA
351	GTTACATATA	GAAACAGAGT	TTAGGGGTCC	TCTGGCGGGC	CGTCCCGTTT
401	TACCGGGAGC	GGGCTGATCC	GCCGAGGCAA	CAAGTGGTAT	GTTACAGGG
451	GTTTGGGAGT	TGTAACTCG	GTAATGATCC	CTCCGCATAA	CCC

图 4 牛耳枫枯梢病病原菌的 rDNA-ITS 序列

Fig. 4 rDNA-ITS sequence of shoot blight pathogen of *D. calycinum*

3 结论与讨论

近年来,随着牛耳枫需求量的增加,牛耳枫人工种植栽培技术的推广刻不容缓,牛耳枫枯梢病给牛耳枫生产造成的影响亦不容忽视,但至今尚鲜见相关病原的报道。该课题组调查发现,该病已在广西多个牛耳枫种植区发生,且病害发生与气温和雨量关系密切。春、秋阴凉天气及雨季发病较严重,苗期种植密度过大也会成为该病发生的主要原因。此外,氮肥施用过多及连作种植,也使该病情发生加重。该研究结合形态学特征及分子生物学方法,对牛耳枫枯梢病的病原进行了研究,首次将广西发现的牛耳枫枯梢病的病原菌鉴定为尖孢镰刀菌(*F. oxysporum*)。 *F. oxysporum* 是世界上分布最广的植物病原菌之一^[13], 寄主范围广泛,可引起瓜类、香蕉、茄科、棉、豆科及花卉等 100 多种植物枯萎病的发生,主要是导致植株维管束枯萎,根部腐烂。该菌在自然条件下直接侵染植物嫩梢引起枯梢病,在其它植物上尚鲜见报道。尖孢镰刀菌致病菌株对不同作物种类或同一种作物的不同品种都表现出致病性差异,具有高度的寄主专化性,目前已报道的尖孢镰刀菌专化型和小种至少有 120 多个^[12], 而该试验所获得的菌株是否能感染其它寄主植物,属于何种专化型和小种,尚待进一步研究。由于尖孢镰刀菌可引起多种植物病害,其侵染循环和发病条件多有相似,因此,可参考该病原引起的其它植物病害的防治方法进行防控,如选用无病种苗、及时清除病残体、合理密植、创造良好的通风透光条件、合理施肥

用水等,或在发病初期使用 80% 多菌灵 2 000 倍液和 40% 氟硅唑 4 000 倍液喷雾^[14], 但具体防治药剂及综合防治技术的建立尚待进一步试验。

参考文献

- [1] 陈焕镛. 海南植物志[M]. 2 卷. 北京: 科学出版社, 1965: 188.
- [2] 广西植物研究所. 广西植物名录(第 2 册) [M]. 北京: 中华书局, 1971: 238.
- [3] 全国中草药汇编编写组. 全国中草药汇编(下册) [M]. 北京: 人民卫生出版社, 1978: 154-155.
- [4] 刘明生. 黎药学概论[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2008: 41-42.
- [5] 张小坡, 张俊清, 裴月湖, 等. 黎药牛耳枫化学成分研究[J]. 中国现代中药, 2011, 13(10): 26-29.
- [6] 朱文粮, 罗都强, 刘召阳. 牛耳枫中生物碱的研究[J]. 天然产物研究与开发, 2010, 22(6): 1024-1027.
- [7] 李海龙, 刘明生, 张俊清, 等. 牛耳枫药材中总黄酮含量测定[J]. 海南医学, 2012, 23(15): 106-108.
- [8] 方中达. 植物研究方法[M]. 3 版. 北京: 中国农业出版社, 1998: 124.
- [9] 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.
- [10] 魏景超. 真菌鉴定手册[M]. 上海: 上海科技出版社, 1979: 468-475.
- [11] 陆家云. 植物病原真菌学[M]. 北京: 中国农业出版社, 2001: 449-459.
- [12] Booth C. 镰刀菌属[M]. 陈其英, 译. 北京: 农业出版社, 1988: 83-93.
- [13] Correll J C. The relationship between formae speciales, races, and vegetative compatibility groups in *Fusarium oxysporum* [J]. Phytopathology, 1991, 81: 1061-1064.
- [14] 王翠霞, 纪莉景, 栗秋生, 等. 西瓜枯萎病药剂筛选及其防效研究[J]. 北方园艺, 2013(13): 154-157.

Isolation and Identification of the Shoot Blight Pathogen on *Daphniphyllum calycinum*

HU Feng-yun, LIU Wei, YE Yun-feng, JIANG Ni, LIU Li-hui, HUANG Xue-yun

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

基于 TOPSIS 法的生防菌 BG3 对 黄瓜苗生长的影响

徐明珠¹, 王远宏¹, 常若葵², 张盼¹

(1. 天津农学院 园艺园林学院, 天津 300384; 2. 天津农学院 工程技术学院, 天津 300384)

摘要:以“津春 4 号”黄瓜为试材,探讨了不同剂量的生防菌剂 BG3 对黄瓜幼苗农艺性状表现以及生理生化指标的影响,研究了生防菌 BG3 对黄瓜生长的促生效应。结果表明:适宜剂量的生防菌剂 BG3 能够促进黄瓜幼苗的生长,但相同剂量的 BG3 制剂对不同指标的影响效果却不同;通过利用 TOPSIS 方法对各处理的生长指标进行综合评价得出,防菌剂 BG3 对黄瓜苗总体具有促生效应,在黄瓜生产中,可采用 1 kg 土:100 mL 生防菌剂 BG3 混合来处理播种土壤,以保证黄瓜苗期的良好生长。

关键词:黄瓜苗;生防菌剂 BG3;TOPSIS 方法;促生效应

中图分类号:S 642.2 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2014)16-0118-05

近年来,植物根际促生菌(Plant-growth promoting rhizobacteria, PGPR)作为最具防病潜力和应用价值的一类生防菌备受国内外学者关注,广泛应用于植物病害的防治,特别是针对多种顽固性土传病害^[1]。Iris 等^[2]在土壤和无菌的水培试验中,研究了生防菌剂 T-203(哈茨木霉菌, *Trichoderma harzianum*)诱导黄瓜植株的生长反应的潜力。梁建根等^[3]通过采用种子催芽、温室盆栽与生理生化的方法,发现菌株 CHI 与 CH2 对黄瓜种子萌发、根与植株的生长有显著促进作用。段春梅等^[4]以黄瓜幼苗为试材,研究发现施用放线菌剂能显著促进黄瓜生长,对根系生长及活力的促进作用尤为明显,并使黄瓜产生诱导抗性。嵇苏等^[5]通过将生防放线菌与草木

灰混合包衣黄瓜种子发现,生防放线菌对黄瓜出苗有抑制作用,但适宜浓度的生防放线菌制剂能促进黄瓜幼苗株高和根的生长,提高叶片叶绿素含量和过氧化氢酶及硝酸还原酶活性。综上所述,根际促生细菌(PGPR)能抑制黄瓜枯萎病病原菌生长,对黄瓜幼苗有显著的促生作用,该试验通过跟踪不同剂量的生防菌剂 BG3 处理土壤对黄瓜苗农艺性状及生理生化性状的影响,利用综合评价模型评判各不同处理对黄瓜苗的生长效应,探讨生防菌剂 BG3 在黄瓜栽培种最适宜的使用方法,以期为黄瓜栽培与病害防治提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试黄瓜品种为天津科润黄瓜研究所研制的“津春 4 号”。

供试菌株:生防菌 BG3 是从黄瓜根际土壤分离筛选的,微孔滤膜过滤菌液后用介质法测定菌落直径发现, BG3 发酵液对黄瓜枯萎病菌有明显的抑制能力。经 16S rDNA(序列号:GQ505250)序列同源性比较^[6]和 Biolog 分析,该菌株初步命名为解淀粉芽孢杆菌 BG (*Bacillus amyloliquefaciens* BG)。

第一作者简介:徐明珠(1989-),女,天津人,硕士研究生,研究方向为植物保护。E-mail:changrk@163.com.

责任作者:王远宏(1974-),男,河南人,博士,副教授,硕士生导师,现主要从事植物病害生物防治等教学与科研工作。E-mail:wangyh@tjau.edu.cn.

基金项目:国家自然科学基金资助项目(31171892);天津市农委推广资助项目(201304160)。

收稿日期:2014-04-24

Abstract: Taking healthy and infected *Daphniphyllum calycinum* as material, the pathogen caused shoot blight of *Daphniphyllum calycinum* was isolated by general tissue isolation, and identified based on morphological characteristics, pathogenicity test and rDNA-ITS sequences analysis. The results showed that the pathogen caused shoot blight of *Daphniphyllum calycinum* was *Fusarium oxysporum*, and *F. oxysporum* causing shoot blight by directly infecting on *Daphniphyllum calycinum*.

Key words: *Daphniphyllum calycinum*; shoot blight; *Fusarium oxysporum*; identification of pathogen