

DOI:10.11937/bfyy.201506030

# 大蒜干腐病原菌分离鉴定及室内药剂筛选

陈 龙, 王 勇, 李 旭 双, 陈 典

(东北农业大学 园艺学院, 农业部东北地区园艺作物生物学与种质创制重点实验室, 黑龙江 哈尔滨 150030)

**摘 要:**以采自于黑龙江省双城、大同、甘南、五常等地的大蒜干腐病病样为供试材料,采用组织分离法分离病原菌,进行形态学鉴定和 ITS 序列测定,同时进行 4 种药剂的室内筛选;并选取这 2 种药剂配制不同浓度梯度的含药培养基,进行抑菌试验,制作毒力回归方程。结果表明:大蒜干腐病致病菌为尖孢镰刀菌(*Fusarium oxysporum* Schlecht),60% 纯白多菌灵和根萎停对大蒜干腐病尖孢镰刀菌的抑菌效果最好。经毒力回归方程计算,防治尖孢镰刀菌时根萎停的  $EC_{50}$  值为 29.65 mg/L,60% 纯白多菌灵的  $EC_{50}$  值为 69.82 mg/L,表明根萎停对尖孢镰刀菌的抑制效果更好。

**关键词:**大蒜;干腐病;尖孢镰刀菌;毒力回归方程;根萎停

**中图分类号:**S 633.4 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2015)06-0110-04

大蒜(*Allium sativum* L.)属百合科葱属植物,既是烹饪常用的调味品,也是一种保健型蔬菜,且在临床上有很高的药用价值,如具抗菌、抗肿瘤、激活免疫等功能。大蒜在中国已有 2 000 多年的栽培历史,种植遍及全国城乡。我国是世界上大蒜种植面积最大和产量最高的国家,目前大蒜已成为我国蔬菜出口的一大亮点。

大蒜栽培及留种过程中,经常受到病毒病、紫斑病等的危害,特别是大蒜干腐病在大蒜的整个生育期及贮藏运输期均会发生。植株染病后叶尖发黄或叶面出现浅黄色条斑,有时扩展到鳞茎上,鳞茎上呈水浸状暗色,间或长有白色或粉红色霉<sup>[1]</sup>。病菌以菌丝体在土壤中越冬<sup>[2]</sup>,翌年借雨水、灌溉水、线虫的传播。该病的发生导致大蒜产量及品质下降,尤其是受干腐病菌侵染的新鳞茎,留种后下一季种植将为田间初侵染来源,周而复始使得危害逐年加重。因此,明确大蒜干腐病致病菌,筛选抑制该菌的有效药剂,对有效防治大蒜干腐病,降低贮藏期损失具有十分重要的意义。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

大蒜干腐病原菌采集于黑龙江省的双城、大同、甘

南、五常等地区。室内筛选药剂包括 50% 异菌脲可湿性粉剂(奥瑞斯农化(山东)有限公司)、75% 百菌清可湿性粉剂(奥瑞斯农化(山东)有限公司)、60% 纯白多菌灵可湿性粉剂(德国天道生物工程有限公司)、根萎停可湿性粉剂(山东曹达化工有限公司)。

### 1.2 试验方法

1.2.1 病菌的分离与纯化 采用组织分离法对大蒜干腐病鳞茎进行病原菌的分离<sup>[3]</sup>。

1.2.2 病原菌形态学鉴定 形态学鉴定方法,将纯化后的菌株在 SNA 培养基上培养 4 d 后观察大、小型分生孢子和厚垣孢子的有无及形态特征和着生方式、产孢细胞的形状、菌核及分生孢子座的有无,对镰孢菌大、小型分生孢子,厚垣孢子,产孢细胞进行测量,每个菌株测量 30~50 个孢子<sup>[4-5]</sup>。

1.2.3 分子生物学鉴定方法 真菌菌丝体的制备采用 PDA 培养基进行培养,培养 5 d 后备用。DNA 提取采用 CTAB 法<sup>[6]</sup>,PCR 扩增:对菌株进行 ITS 区域扩增,引物序列为:ITS1 5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3',ITS4 5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'。反应体系为 25  $\mu$ L,包括 2.5  $\mu$ L 10  $\times$  PCR Buffer,1.5  $\mu$ L  $Mg^{2+}$  (25 mmol/L),0.8  $\mu$ L dNTP(2.5 mmol/L),100 ng DNA 模板,各 1  $\mu$ L 的引物 ITS1 和 ITS4 (1  $\mu$ mol/L),0.5  $\mu$ L Taq DNA 聚合酶(2.5 U/ $\mu$ L),dd H<sub>2</sub>O 补足;PCR 反应条件为:94℃ 预变性 5 min;94℃ 变性 40 s,56℃ 退火 30 s,72℃ 延伸 30 s,共 30 个循环;72℃ 延伸 10 min,4℃ 保存;PCR 产物在 1% 的琼胶电泳上进行电泳检测,在紫外光条件下检测 PCR 产物条带大小,PCR 产物经北京华大基因有限公司完成测序,根据 GenBank 序列进行比对。

**第一作者简介:**陈龙(1988-),男,硕士研究生,研究方向为蔬菜栽培与育种。E-mail:2216241710@qq.com.

**责任作者:**陈典(1953-),男,教授,硕士生导师,研究方向为蔬菜栽培。E-mail:lwang2002@163.com.

**基金项目:**黑龙江省特设特派员资助项目(GC13B809);公益性行业(农业)科研专项资助项目(200903018)。

**收稿日期:**2014-11-13

### 1.3 项目测定

1.3.1 病原菌的致病性测定 将分离到的菌株在 PDA 板上培养 7 d 后,取纯化后的菌株在 SNA 培养基上培养 7~10 d 后配制成  $10^6 \sim 10^7$  个孢子/mL 的孢子悬浮液,采用针刺方法<sup>[3]</sup>进行病原菌接种,以清水接种做对照,接种到用 70% 的酒精表面消毒 3 min 后的大蒜鳞茎上。

1.3.2 室内药剂筛选 配制浓度为 400、200、100 mg/L 的 PDA 含药培养基,之后倒平板。每处理 3 次重复。接种直接为 8 mm 的病原菌菌碟到含药培养基平板中央,25℃ 恒温黑暗培养,不含药剂培养及平板作对照,5 d 后采用十字交叉法测量菌落直径,根据药剂的抑制率筛

$$\text{抑制率}(\%) = \frac{(\text{对照菌落直径} - \text{初始菌碟直径}) - (\text{处理菌落直径} - \text{初始菌碟直径})}{\text{对照菌落直径} - \text{初始菌碟直径}} \times 100\%。$$

### 1.4 数据分析

采用 Excel 和 SPSS 软件对试验数据进行统计分析,试验数据为 3 次重复的平均值 ± 标准差,并采用 Duncan 检验进行多重比较。

## 2 结果与分析

### 2.1 病原菌分离与鉴定

2.1.1 病原菌的分离与纯化 采用组织分离法共获得了 30 个培养性状基本一致的纯化菌株,在 PDA 斜面培养基上保存。

2.1.2 致病性测定结果 接种菌株 10 d 后,大蒜鳞茎全部发病,症状首先表现为叶尖发黄或叶面出现浅黄色条斑,鳞茎基部呈水浸状暗褐色,病症发展缓慢,但病斑

选出在高浓度 400、200 mg/L 下具有明显抑制效果的药剂,并在 100 mg/L 下做进一步筛选,最后筛选出最佳抑制病原菌生长的药剂。根据不同药剂在 3 种浓度下对菌丝生长的抑制率的差异性效果,将筛选出的有效药剂按照浓度梯度 20、10、5、2.5、1.25 mg/L 制作含药 PDA 平板,接种供试病原菌,以药剂浓度对数值作为 X 值,以计算出各浓度含药培养基对菌丝生长的抑制率转换成几率值作为 Y 值,采用几率值分析法<sup>[4-5]</sup>进行回归分析求出毒力回归方程,并求出供试药剂抑制率中浓度 ( $EC_{50}$ ) 及相关系数 ( $R^2$ )。

蔓延及至整个鳞茎导致蒜瓣黄褐色且逐渐干缩,有的长出白色或粉红色霉,拔出病株,根部呈褐色腐烂,病情指数较重。

2.1.3 病原菌形态学鉴定结果 病原菌在 PDA 培养基上 25℃ 恒温培养 5 d 的菌落直径 60~65 mm,菌落呈规则圆形,菌丝较稀疏,呈边羊毛状,缘白色,中央部分粉红色或整个菌落粉红色。如图 1 小型分生孢子为肾形或卵形,0~1 隔。大型分生孢子,向两端比较均匀地逐渐变尖,类似镰刀形状,2~6 隔,多为 3 隔,  $(20 \sim 50) \mu\text{m} \times (3 \sim 5) \mu\text{m}$ ,厚垣孢子为球形,单生、对生,直径  $7 \sim 12 \mu\text{m}$ ,产孢细胞是单瓶梗。形态学特征表明菌株形态指标与尖孢镰刀菌 (*Fusarium oxysporum* Schlecht)。

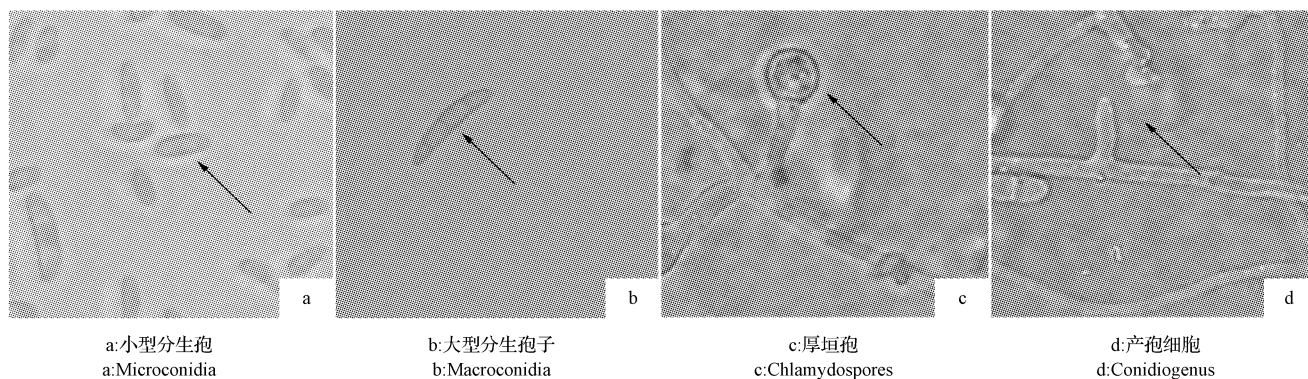


图 1 菌株形态

Fig. 1 Strain morphological

2.1.4 病原菌分子鉴定结果 ITS 区域的 PCR 扩增产物为 1 条大小约 500 bp 的片段扩增条带清晰,且无非特异性条带,测序结果显示 ITS 区长 500 bp。将所测得的 ITS 序列分别与 GenBank 中已有的序列进行比较,与尖孢镰刀菌 (*Fusarium oxysporum*) 的相似性为 99%,进一步证实形态学鉴定结果的正确性。

### 2.2 供试药剂的药效测定

主要测定供试药剂在 400、200、100 mg/L 3 种浓度

下对大蒜干腐病病原菌菌丝生长的影响,计算抑制率。由表 1 可知,不同药剂对菌丝生长的抑制率效果差异显著,根萎停、60% 纯白多菌灵、75% 百菌清和 50% 异菌脲 4 种被试药剂在浓度分别为 400、200 mg/L 下对尖孢镰刀菌在抑制率依次降低,其中根萎停和 60% 纯白多菌灵在 2 种浓度下抑制效果与其它药剂相比均差异显著,75% 百菌清具有一定的抑制效果,50% 异菌脲抑制效果不明显。筛选根萎停、60% 纯白多菌灵、75% 百菌清 3

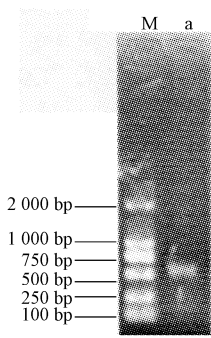


图2 ITS序列的PCR产物凝胶电泳结果  
Fig.2 Electrophoresis results of PCR product of ITS sequence of the pathogen

表1 不同药剂对菌丝生长的影响  
Table 1 The effect of different fungicides on mycelia growth

药剂 Fungicide	平均菌落直径 Average diameter of colony/mm			抑制率 Restraining rate/%		
	400 mg/L	200 mg/L	100 mg/L	400 mg/L	200 mg/L	100 mg/L
根菱停	11.0±0.00c	11.0±0.00d	14.4±0.90b	95.52±0.00a	95.83±0.00a	90.64±0.01a
60%纯白多菌灵	13.5±0.50c	14.0±0.00c	14.0±0.55b	91.79±0.01a	91.67±0.00b	91.11±0.00a
75%百菌清	35.8±0.76b	33.5±1.00b	41.0±2.02a	58.46±0.01b	64.58±0.01c	51.48±0.03b
50%异菌脲	39.0±1.00b	51.2±0.29a		53.73±0.02b	40.05±0.00d	
CK	67.0	72.2	68.5			

注:表中相同浓度下不同字母表示差异显著性(α=0.05)。  
Note: Different lowercase letters in the table show significant difference at 0.05 levels.

表2 2种单剂对尖孢镰刀菌的毒力测试结果  
Table 2 The results of two fungicides to *Fusarium oxysporum* Schlecht

药剂 Fungicide	浓度 Concentration /(mg·L <sup>-1</sup> )	浓度对数 Logarithm cumulative concentration(x)	平均菌落直径 The average colony diameter/mm	抑制率 Inhibition ratio /%	几率值 Probabilit(y)	y=a+bx	EC <sub>50</sub> /(mg·L <sup>-1</sup> )	R <sup>2</sup>
根菱停	20	1.301	31.8	62.22	5.31	y=4.3101+0.4584x	29.65	0.9199
	10	1.000	32.0	61.90	5.30			
	5	0.699	35.3	56.67	5.18			
	2.5	0.399	40.2	48.89	4.97			
	1.25	0.097	45.3	40.79	4.77			
CK			71.0					
60%纯白多菌灵	20	1.301	25.7	71.90	5.58	y=3.0629+1.1296x	51.76	0.9662
	10	1.000	31.7	62.38	5.32			
	5	0.699	36.3	55.08	5.13			
	2.5	0.399	47.4	37.46	4.68			
	1.25	0.097	57.7	21.11	4.2			
CK			71.0					

3 结论与讨论

该试验以传统的形态学特征鉴定为基础,结合病原菌的 rDNA ITS 序列分析,确定大蒜干腐病的病原菌为主要为尖孢镰刀菌(*Fusarium oxysporum* Schlecht)。通过对大蒜干腐病尖孢镰刀菌室内药剂筛选结果表明,在供试药剂中,60%纯白多菌灵和根菱停 2 种药剂的抑菌效果优于其它供试药剂,后经毒力回归方程计算,求得防治尖孢镰刀菌的 60%纯白多菌灵 EC<sub>50</sub> 值为 51.76 mg/L,根菱停的 EC<sub>50</sub> 值为 29.65 mg/L,根菱停尖孢镰刀菌抑制效果明显,为大蒜生产防治干腐病提供防治依据。

干腐病是一种在果树、蔬菜及花卉作物上广泛发生

种药剂在浓度为 100 mg/L 时的抑制率试验效果表明,根菱停和 60%纯白多菌灵抑制效果均显著,75%百菌清抑制效果不明显。

2.3 筛选药剂的毒力回归方程

根据供试药剂在浓度 400、200、100 mg/L 药剂筛选结果,选取抑菌效果最好的根菱停、60%纯白多菌灵在浓度分别为 20、10、5、2.5、1.25 mg/L 时的药效试验制作毒力回归方程。由表 2 可以看出,相关系数 R<sup>2</sup> 接近 1 时,可认为 LD-P 方程回归显著。当供试药剂抑菌效果达到 50%时,由回归方程计算得出供试药剂的 EC<sub>50</sub>,可以看出根菱停的 EC<sub>50</sub> 值最小,为 29.65 mg/L,说明根菱停对尖孢镰刀菌的抑菌效果更好些。

的病害,在世界范围内多种作物上都进行了有关干腐病的研究工作。研究证明,防治作物干腐病要靠农业、生态、药剂等综合防治措施,才能达到较好的防治效果。避免连作,精选种蒜,精心管理,在进行中耕时,要注意防止造成伤口,以防其危害根茎,施用腐熟有机肥,采用配方施肥技术,防止烧根,还要结合化学药剂防治。

参考文献

[1] 王迪轩. 如何识别与防治大蒜干腐病[J]. 蔬菜, 2011(7):30.  
[2] 肖汝松. 大蒜干腐病的防治[J]. 云南农业, 1995(4):18.  
[3] 李旭双. 大蒜干腐病病原菌的分离鉴定[J]. 中国蔬菜, 2012(20):88-93.  
[4] Gerlach W, Nirenberg H L. The genus *Fusarium* pictorial atlas[M]. Berlin-Dahlem: Paul Parey, 1982:1-406.



# 黄花松松籽壳色素的提取工艺研究

张 欣<sup>1,2</sup>, 张建峰<sup>2</sup>

(1. 吉林农业科技学院 生物工程学院, 吉林 吉林 132101; 2. 吉林农业大学 生命科学学院, 吉林 长春 130118)

**摘 要:**以黄花松松籽壳为试材,采用溶剂浸提法对其色素提取工艺进行初探,研究溶剂浓度、提取温度和提取时间等因素对黄花松松籽壳中色素提取效果的影响。结果表明:溶剂浸提法的最佳提取工艺条件为乙醇浓度 50%,提取时间 120 min,提取温度 70℃。

**关键词:**松籽壳;色素;提取;工艺研究

**中图分类号:**Q 946 **文献标识码:**B **文章编号:**1001-0009(2015)06-0113-03

黄花松(*Larix olgensis* Henry)属松科落叶松属落叶乔木,主要分布在吉林、辽宁省等地<sup>[1]</sup>。松籽是松树的种子,其含有脂肪、蛋白质、碳水化合物等物质。松籽既是重要的中药,久食健身心,滋润皮肤,延年益寿,也有很高的食疗价值<sup>[2]</sup>。松籽壳中含有大量的天然色素,其

主要成分为多酚类化合物,黄酮类化合物<sup>[3]</sup>。天然食用色素具有比合成色素更优越的功能,如营养、保健、抗氧化及抗衰老等<sup>[4]</sup>,其应用前景非常广泛,并有完全取代合成色素的趋势<sup>[5]</sup>。但目前对于松籽壳色素方面的研究报道还很少,现以黄花松松籽壳为原料,采用溶剂浸提法对其色素的提取工艺进行初探,以期为进一步研究提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

供试松塔采于吉林农业科技学院校园内,经专家鉴

**第一作者简介:**张欣(1981-),男,硕士,讲师,现主要从事天然产物及微生物等教学与科研工作。E-mail:463309000@qq.com.

**责任作者:**张建峰(1973-),男,博士,副教授,现主要从事生物工程等教学与科研工作。E-mail:88657158@qq.com.

**收稿日期:**2014-11-13

[5] Leslie J F, Summerell B A, Bullock S. The Fusarium Laboratory Manual [M]. Iowa: Blackwell Publishing Professional, 2005.

[6] 吴发红, 黄东益, 黄小龙, 等. 几种真菌 DNA 提取方法的比较[J]. 中国农学通报, 2009, 25(8): 62-64.

## Isolation and Fungicide Screening of Garlic Dry Rot Disease

CHEN Long, WANG Yong, LI Xu-shuang, CHEN Dian

(School of Horticulture, Key Laboratory of Biology and Genetic Improvement of Horticultural Crops Northeast Region, Ministry of Agriculture, Northeast Agricultural University, Harbin, Heilongjiang 150030)

**Abstract:** Pathogenic bacteria was used as test materials, that were separated from the garlic dry rot samples collected from Shuangcheng, Datong, Gannan and Wuchang, etc. of Heilongjiang province with tissue separation. Then morphological identification and ITS sequence determination were conducted, and simultaneous lab screening of four types of fungicides was performed. The results showed that the pathogenic bacteria of garlic dry rot was *Fusarium oxysporum* Schlecht; 60% purely white carbendazim and root wilt stop presented the most obvious antibacterial effects on the *Fusarium oxysporum* Schlecht that inducing garlic dry rot. These two fungicides were selected to prepare drug-containing medium with different concentration gradients, and bacteriostatic experiments were performed and virulence regression equation was formulated. In accordance with the calculation of virulence regression equation, the EC<sub>50</sub> values of root wilt stop and 60% purely white carbendazim were 29.65 mg/L and 69.82 mg/L when they were exerting the preventive and therapeutic effects on *Fusarium oxysporum* Schlecht. The EC<sub>50</sub> values of the tested fungicides demonstrated that root wilt stop had a better inhibitory effect on *Fusarium oxysporum* Schlecht.

**Keywords:** garlic dry rot; *Fusarium oxysporum* Schlecht; virulence regression equation; root wilt stop