

内蒙古莫旗黄芪根腐病病原的分离与鉴定

周 默, 白庆荣*

(吉林农业大学农学院, 长春 130118)

摘要:黄芪在内蒙古莫旗地区大量种植, 其根腐病是影响黄芪产量的病害之一, 本研究以该地区的黄芪根腐病材料为研究对象, 对患病植株进行病害症状的描述、组织分离和致病性测定, 并通过培养特征、显微形态特征及分子生物学技术, 获得黄芪根腐病的4个致病菌, 确定菌株LD1为尖孢镰刀菌(*Fusarium oxysporum*), LD2为腐皮镰刀菌(*F. solani*), LD3为锐顶镰刀菌(*F. acuminatum*), LD4为木贼镰刀菌(*F. equisetim*)。其中LD4引起黄芪根腐病为首次报道。

关键词:黄芪根腐病; 显微形态学; 致病菌

中图分类号: S435.672

文献标识码: A

文章编号: 2096-5877(2021)02-0052-04

Isolation and Identification of Root Rot Pathogen of *Astragalus Membranaceus* in Moqi, Inner Mongolia

ZHOU Mo, BAI Qingrong*

(College of Agriculture, Jilin Agricultural University, Changchun 130118, China)

Abstract: *Astragalus membranaceus* is planted in large quantities in Moqi area of Inner Mongolia. Root rot is one of the diseases affecting the yield of *A. membranaceus*. In this study, the root rot of *A. membranaceus* in this area was used as the research object. The symptoms of the disease, tissue isolation and pathogenicity of the diseased plants were described. Four pathogens of root rot of *A. membranaceus* were obtained by culture characteristics, micromorphological characteristics and molecular biological techniques. The isolates LD1 were identified as *Fusarium oxysporum*, LD2 as *F. solani*, LD3 as *F. acuminatum*, LD4 as *F. equisetim*. It was first reported that LD4 caused root rot of *A. membranaceus*

Key words: Root rot of *Astragalus membranaceus*; Micromorphology; Pathogen

黄芪(*Astragalus mongholicus*)属豆科黄芪属多年生草本植物, 以根入药, 性温、味甘, 具补气固表、托疮生肌等功效^[1]。随着种植结构的调整, 黄芪种植面积不断扩大, 轮作周期缩短, 重茬和迎茬面积也随之增加, 从而使黄芪的根部病害越来越重, 现已成为限制黄芪种植、生产以及持续发展的主要原因。该病的主要发病特征为根颈部产生大量褐色纵向裂纹或龟裂纹, 地上部分长势衰弱或矮小, 严重时叶片变黄脱落, 严重影响黄芪的品质与产量。引起黄芪根腐病菌的种类较多, 包括立枯丝核菌(*Rhizoctonia solani*)^[2-3]、尖孢镰刀菌(*Fusarium oxysporum*)^[2-6]和腐皮镰孢菌(*F. solani*)^[2-6]。高芬等^[6]报道山西省蒙古黄芪的主要

致病菌除腐皮镰刀菌(*F. solani*)、尖孢镰刀菌(*F. oxysporum*)外, 还包括锐顶镰刀菌(*F. acuminatum*)、芬芳镰刀菌(*F. redolens*)、链格孢菌(*Alternaria* sp.), 优势菌株为锐顶镰刀菌和腐皮镰刀菌。罗光宏等^[4]报道灌水不当或在黄芪结实期遇连续阴雨是引起黄芪根腐病大面积发生的直接因子。陈垣等^[3]对甘肃渭源地区的蒙古黄芪根腐病进行田间调查及病原菌的分离与鉴定, 结果表明, 8月份为该病发生盛期, 二年生较一年生发生严重。本研究对内蒙古莫旗地区黄芪根腐病进行病害症状的描述、组织分离和致病性测定, 并通过培养特征、显微形态特征以及分子生物学技术, 获得黄芪根腐病的4种致病菌, 为黄芪根腐病的防治提供依据并奠定基础。

1 材料与方 法

1.1 病害标本的采集及症状观察

2016年4月采集内蒙古莫旗地区二年生黄芪

收稿日期: 2019-01-21

基金项目: 国家自然科学基金项目(31500022)

作者简介: 周 默(1994-), 女, 在读硕士, 研究方向: 植物病害综合防治。

通讯作者: 白庆荣, 女, 博士, 教授, E-mail: bbbqqqr@163.com

根腐病病样,对收集到的黄芪根腐病标本进行症状特点的描述并记录。

1.2 病原菌的分离与纯化

用已灭菌的剪刀剪取病健交界的病组织 2 mm×2 mm 若干块,放入 75%乙醇中浸泡消毒 1 min,无菌水漂洗 3 次,待组织块吹干后放置于 PDA 平板培养基上,每皿放 4~5 块,25 °C 恒温培养箱内培养。用灭过菌的接种铲挑取菌落边缘的单根菌丝,放置在预先准备好的 PDA 平板培养基中央纯化培养,置于 25 °C 恒温培养箱中培养,待长出菌丝后转移至带有斜面培养基的试管,其生长至斜面培养基的 2/3 时,将 PDA 斜面试管培养基放置在 4 °C 冰箱内保存菌种,留以备。

PDA:新鲜马铃薯 200 g;葡萄糖 18 g;琼脂粉 12 g;蒸馏水 1 000 mL^[7]。

1.3 致病性测定及接种物的再分离

1.3.1 离体根部接种法

选取代表性菌株进行致病性测定,将纯化后的菌株在 PDA 平板上扩大培养后,将孢子洗脱,配成浓度为 10⁶ 孢子/mL 的孢子悬浮液。取两年生黄芪的离体根部,对其进行消毒后无伤接种,每株分离菌株做 3 次重复实验。置于 25 °C 培养箱培养,培养 7 d 后,对接种发病的植物进行再分离,如再分离获得的菌株与接种物相同,则证明其为该病害的病原菌。

1.3.2 根部伤口接种法

健康黄芪苗根部用消毒过的针制作伤口,接种直径为 8 mm 菌丝块,用蘸有无菌水的脱脂棉包裹住接种部位进行保湿,并以同样大小无菌的培养基块和蘸有无菌水的脱脂棉包裹住接种于健康植株为对照,每个处理重复 3 次,置于相同的环境条件下培养,观察并记录植株发病情况。对接种发病的部位进行再分离,如再分离获得的菌株与接种物相同,则证明其为该病害的病原菌。

1.4 病原菌的形态特征

切取新鲜带有典型病症特点的患病植物根部标本进行镜检,切取病健交界处组织,在镜下观察病原菌形态,在超景深下测量孢子大小并拍照记录。观察病原菌在 PDA 培养基上的菌落形态、颜色等,并做详细记录。查阅相关文献资料进行比对,对引起该病害的致病菌进行初步鉴定^[8]。

1.5 病原菌的分子生物学鉴定

1.5.1 真菌 DNA 的提取

真菌基因组 DNA 使用 CTAB 法进行提取^[9-12]。具体操作步骤为:将干净的研钵、研杵、药匙灭菌

烘干备用,CTAB 提取液置于 65 °C 水浴中预热,先加少量灭菌的石英砂,然后加入适量新鲜的菌丝,迅速充分研磨后分装于 1.5 mL 离心管中,再加入事先预热的 CTAB 750 μL,反复颠倒,使其迅速混溶,65 °C 水浴 1 h,每隔 15 min 拿出并上下颠倒进行混匀(防止气体因受热膨胀而使盖子崩开)。取出冷却至室温后,加入酚·氯仿·异戊醇(25:24:1) 700 μL,12 000 r/min 离心 10 min。吸取上清液加入等体积的氯仿·异戊醇(24:1),12 000 r/min 离心 10 min。吸取上清液加入等体积的异戊醇和 0.1 体积的 NaAC,放入 -20 °C 冰箱中 30 min。12 000 r/min 离心 10 min。用 70%乙醇洗涤三次,吹干,无酒精气味后,加入适量 TE 缓冲液,放入 -20 °C 冰箱,溶解 DNA。用 1.0%的琼脂糖凝胶电泳检测 DNA^[13]。

1.5.2 PCR 扩增

分别以 LD1-LD4 基因组 DNA 为模板,利用通用引物 ITS5/ITS4(5'-GGAAGTAAAAGTCTGTAACAAG-3'/5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3')对所提取的 DNA 进行扩增,扩增反应体系(25 μL 体系):10×PCR Buffer 2.5 μL,dNTP 2 μL,上下引物各 0.5 μL,Taq 酶 0.2 μL,DNA 模板 1 μL,ddH₂O 16 μL。PCR 反应条件为:94 °C 预变 5 min,94 °C 变性 1 min,48.5 °C 退火 50 s,72 °C 延伸 1 min,共 35 个循环,72 °C 温浴 10 min,4 °C 保存^[14-16]。PCR 产物用 1.0%琼脂糖凝胶电泳检测,电泳产物测序委托上海生工公司完成。

分别以 LD1-LD4 基因组 DNA 为模板,利用延长因子 EF1T/ET2T(5'-ATGGGTAAGGAGGACAAGC-3'/5'-GGAAGTACCAGTGATCATGTT-3')对所提取的 DNA 进行特异性扩增,扩增反应体系同 ITS。PCR 反应条件为:94 °C 预变 5 min,94 °C 变性 30 s,59 °C 退火 45 s,72 °C 延伸 1 min 30 s,共 35 个循环,72 °C 温浴 10 min,4 °C 保存。PCR 产物用 1.0%琼脂糖凝胶电泳检测,电泳产物测序委托上海生工公司完成。

1.5.3 序列的分析比对

将所得的序列递交至 GenBank,并与 GenBank 核酸数据库(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>)中的相关序列进行同源性比较。

将序列分析比对结果与病原菌的培养性状及形态学鉴定相结合,并查阅相关文献比对,完成对病原菌的鉴定。

2 结 果

2.1 病害症状描述

黄芪根腐病发病大多数从主根的顶部开始,主根症状表现为腐烂,严重时根部表面腐烂呈纤维状,主根局部受到侵染则形成不规则红褐色斑块,并逐渐向髓部扩展,造成髓部腐烂。发病严重时,其茎基部以及主根都呈红褐色,有纵裂或龟状条纹,根部的表面极其粗糙,侧根呈腐烂状,根系溃烂且颜色发黑,极易从土中拔起,病情严重时叶片大部分枯萎并脱落^[7]。

2.2 病原菌的分离与纯化

利用组织分离法对内蒙古莫旗地区2份黄芪标本进行分离,共分离菌株200株,获得4种培养性状不同的分离物,分别为LD1型、LD2型、LD3型、LD4型,分离菌株数分别为63株、45株、37株、55株,分离频率为31.5%、22.5%、18.5%、27.5%。从4种不同型的分离物中选取代表性菌株分别命名为LD1、LD2、LD3、LD4。

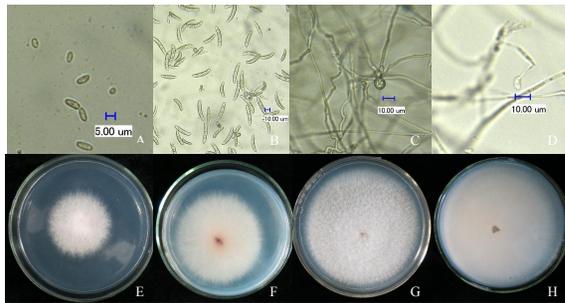
2.3 致病性测定及接种物的再分离

将内蒙古莫旗黄芪根腐病标本上分离纯化的4个代表菌株接种于健康的黄芪根部,接种3 d之后发现接种的黄芪根部开始受到侵染,黄芪表面开始出现红褐色斑块,对照植株未见异常,接种发病的植株上再次分离得到与分离物相同的病原菌,证明分离物为致病菌。同时使用根部伤口接种法接种在健康的黄芪根部,接种发病症状与田间病害症状一致,对照植株未见异常,分别取回接种成功的根部进行分离培养得到的病原菌与田间发病植株上分离的一致,证明分离物为致病菌。

2.4 黄芪根腐病菌的形态特征

2.4.1 LD1 菌株的形态特征

由图1可知,LD1在PDA上菌落呈圆形,边缘整齐;气生菌丝较致密呈绒毛状,初期白色至淡粉色,后期产生浅紫色至深紫色色素,菌落背面呈淡紫色。大型分生孢子为细镰刀状,稍弯,向



A: 小型分生孢子; B: 大型分生孢子; C: 厚垣孢子; D: 产孢器官; E: 正面菌落形态(4 d); F: 反面菌落形态(4 d); G: 正面菌落形态(7 d); H: 反面菌落形态(7 d), 下同
图1 PDA上LD1(尖孢镰刀菌)的形态特征

两头均匀地变尖,具有1~5个隔膜,隔膜处缢缩,(23~56.6) μm×(3~5) μm;小型分生孢子数量多,单细胞,卵圆形,(5~12.6) μm×(2.6~2.7) μm;厚垣孢子球形,直径6.1~8.2 μm,单生、对生或串生。依据病原菌的形态特征和培养性状,参照中国真菌志与浙江镰刀菌志^[18-19],将其初步鉴定为尖孢镰刀菌(*F. oxysporum*)。

2.4.2 LD2 菌株的形态特征

由图2可知,LD2在PDA上菌落呈圆形,边缘整齐,气生菌丝繁茂呈白色,绒状至絮状,松散,基质为玫瑰色。菌落生长的后期有同心轮纹产生,菌落背面呈白色至土黄色。大型分生孢子呈镰刀或纺锤形,以3隔为主,(24.8~33.3) μm×(4.1~5.4) μm;小型分生孢子椭圆至卵圆形,无隔,(5.4~10.5) μm×(2.9~3.5) μm;厚垣孢子球形,表面不光滑,直径8.1~14.5 μm,单生居多,有的顶生或间生^[20]。依据病原菌的形态特征,参照中国真菌志与浙江镰刀菌志,将其初步鉴定为腐皮镰刀菌(*F. solani*)。

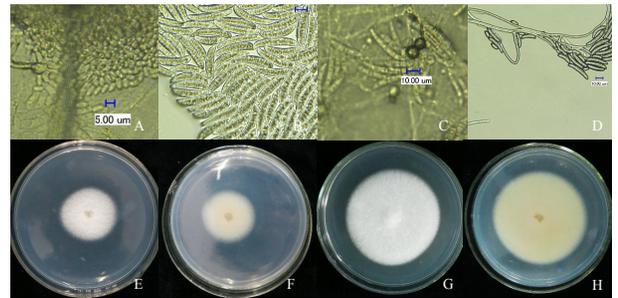


图2 PDA上LD2(腐皮镰刀菌)的形态特征

2.4.3 LD3 菌株的形态特征

由图3可知,LD3在PDA上菌落呈圆形至近圆形,边缘波纹状或整齐;菌丝茂盛棉絮状至绒状、厚气生菌丝,初期呈白色至淡粉色,后期呈粉色、深粉色甚至朱红色,菌落背面呈玫瑰红色;大型分生孢子镰刀形,腹背明显弯曲,顶胞延长,多为3隔,有的5隔,(14~58) μm×(3.0~4.6) μm;小型分生孢子椭圆至卵圆形,量极少。厚垣孢子

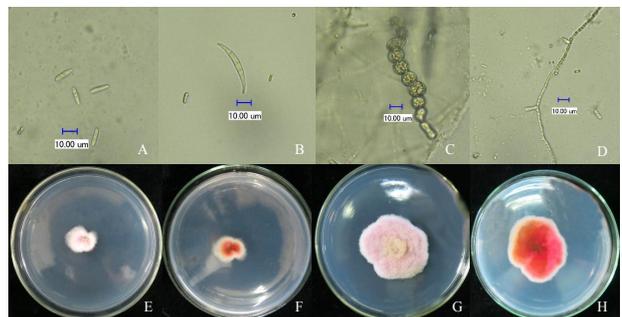


图3 PDA上LD3(锐顶镰刀菌)的形态特征

圆至椭圆形, (11.5 ~ 12.7) $\mu\text{m} \times$ (8.1 ~ 9.20) μm 。依据病原菌的形态特征, 参照中国真菌志与浙江镰刀菌志, 将其初步鉴定为锐顶镰刀菌 (*F. acuminatum*)。

2.4.4 LD4 菌株的形态特征

由图4可知, LD4在PDA上菌落呈圆形至近圆形, 边缘波纹状或整齐, 气生菌丝绒状至棉絮状, 初期白色至粉红色, 生长后期表面黄色至淡褐色, 菌落背面呈现白色至淡粉色; 大型分生孢子镰刀形, 弯曲且中部细胞明显膨大, 一般3~7个隔膜, (16.5 ~ 57.5) $\mu\text{m} \times$ (3.1 ~ 6.2) μm ; 小型分生孢子, 椭圆, 量极少。厚垣孢子球形, 直径6~9.2 μm 。依据病原菌的形态特征, 参照中国真菌志与浙江镰刀菌志, 将其初步鉴定为木贼镰刀菌 (*F. equiseti*)。

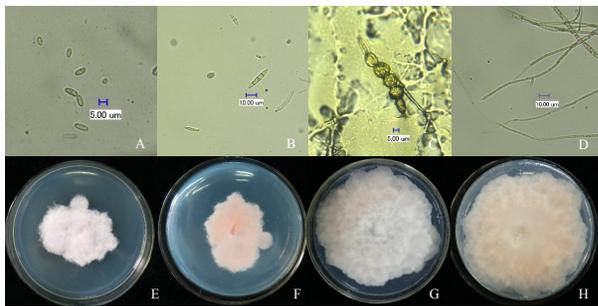


图4 PDA上LD4(木贼镰刀菌)的形态特征

2.5 病菌分子生物学鉴定

利用真菌通用引物ITS4/ITS5和特异性引物EF1/EF2对代表菌株的相关区域进行PCR扩增。病原菌rDNA-ITS区序列与TEF1 α 序列PCR产物经生物公司测序, 与GenBank中已有的序列进行Blast分析^[21-23], 结果如下:

将LD1菌株的ITS序列提交到NCBI GenBank, 得到的序列号为MG252282, 与*F. oxysporum* (Accession No. KU529151.1)序列同源性为100%; 该菌株的TEF1 α 序列提交后得到的登录号为MG252285, 与*F. oxysporum* (Accession No. KX965700.1)序列同源性为100%。因此依据其形态特征和分子生物学鉴定结果将LD1菌株鉴定为尖孢镰刀菌 (*F. oxysporum*)。

将LD2菌株的ITS序列提交到NCBI GenBank, 得到的序列号为MG252283, 与*F. solani* (Accession No. KX138452.1)序列同源性为100%; 该菌株的TEF1 α 序列提交后得到的登录号为MG252286, 与*F. solani* (Accession No. KX523136.1)序列同源性为100%。因此依据其形态特征和分子生物学鉴定结果将LD2菌株鉴定为腐皮镰刀菌

(*F. solani*)。

将LD3菌株的ITS序列提交到NCBI GenBank, 得到的序列号为MG252284, 与*F. acuminatum* (Accession No. KU382644.1)序列同源性为100%; 该菌株的TEF1 α 序列提交后得到的登录号为MG252287, 与*F. acuminatum* (Accession No. JX397844.1)序列同源性为100%。因此依据其形态特征和分子生物学鉴定结果将LD3菌株鉴定为锐顶镰刀菌 (*F. acuminatum*)。

将LD4菌株的ITS序列提交到NCBI GenBank, 得到的序列号为MG252288, 与*F. equiseti* (Accession No. KU361540.1)序列同源性为100%; 该菌株的TEF1 α 序列提交后得到的登录号为MG252289, 与*F. equiseti* (Accession No. KT213318.1)序列同源性为100%。因此依据其形态特征和分子生物学鉴定结果将LD4菌株鉴定为木贼镰刀菌 (*F. equiseti*)。

3 结论与讨论

本研究对内蒙古莫旗地区黄芪根腐病标本的病害症状进行了详细的病害症状描述。对黄芪根腐病标本进行分离, 获得4种分离物, 经致病性测定及再分离, 确定获得的分离物为黄芪根腐病的致病菌。经形态学鉴定与分子生物学辅助鉴定, 确定引起黄芪根腐病的病原菌为尖孢镰刀菌 (*F. oxysporum*)、腐皮镰刀菌 (*F. solani*)、锐顶镰刀菌 (*F. acuminatum*)、木贼镰刀菌 (*F. equiseti*), 其分离频率分别为31.5%、22.5%、18.5%、27.5%。

在已有的报道中, 引起黄芪根腐病的主要致病菌包括立枯丝核菌、尖孢镰刀菌和腐皮镰刀菌、芬芳镰刀菌、链格孢菌, 但本文的试验结果表明, 除所报道的镰刀菌外, 木贼镰刀菌也能引起黄芪的根腐病, 其分离频率较高, 该菌能引起大白菜、烟草、火龙果、芦笋、山核桃等多类植物的病害^[24-28], 但能够引起黄芪根腐病为首次报道。通过本研究确定了引起内蒙古莫旗地区黄芪根腐病的病原菌, 可结合本试验的研究结果, 综合多方面因素, 开展一系列的药剂筛选实验, 为药用植物在田间的种植和生产提供一定的理论基础。

对内蒙、山西、甘肃等地的黄芪根腐病已有较多的报道, 不同地区引起根腐病的致病菌不尽相同, 可能与各地区不同的地理生态环境相关, 此内容仍需根据各地区的致病菌群进一步研究。

参考文献:

(下转第61页)

