

研究报告

贵州半夏块茎腐烂病病原菌的分离与鉴定

石建龙 李玉权 胡琨敏 任建国 刘红美*

(贵阳医学院 生物技术教研室 贵州 贵阳 550004)

摘要:【目的】对贵州省半夏块茎腐烂病病原菌进行分离和鉴定,为开发有效的防治技术体系提供依据。【方法】采用组织分离法进行病原菌分离,根据柯氏法则进行致病性测定,结合形态学、生理生化特性和分子生物学方法进行鉴定。【结果】从贵州3个半夏产地患病样品中分离出12株病原细菌和5株病原真菌。经形态学、生理生化特性和分子生物学方法鉴定,12株病原细菌为胡萝卜软腐果胶杆菌胡萝卜软腐亚种;ZJ、Z3病原真菌为尖孢镰刀菌,D3、D5、H1为茄病镰刀菌。【结论】贵州省半夏块茎腐烂病的病原菌有病原细菌和病原真菌。

关键词: 半夏,块茎腐烂病,胡萝卜软腐果胶杆菌胡萝卜软腐亚种,尖孢镰刀菌,茄病镰刀菌

Isolation and identification of pathogens from rotted root of *Pinellia ternata* in Guizhou province

SHI Jian-Long LI Yu-Quan HU Kun-Min REN Jian-Guo LIU Hong-Mei*

(Department of Biotechnology, Guiyang Medical University, Guiyang, Guizhou 550004, China)

Abstract: [Objective] To identify microbes from rotted root of *Pinellia ternata*, so as to provide clues for efficient prevention of this plant disease. [Methods] Pathogens were isolated and their pathogenicity was confirmed by Koch's rule. These pathogens were further studied through etiological, morphological and bacteriological techniques. In addition, 16S rRNA sequence analysis was done for bacterial pathogens, ITS and TEF sequence were used analysis for fungal pathogens. [Results] Twelve strains of bacterial pathogens and five strains of fungal pathogens were found in rotted tuber of *P. ternata* from three different cultivating places in Guizhou. The twelve strains of bacterial pathogens belonged to *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*. Among the fungal pathogens, ZJ and Z3 belonged to *Fusarium oxysporum*, and D3, D5 and H1 belonged to *F. solani*. [Conclusion] The pathogens that cause root-rot of *Pinellia ternata* in Guizhou include bacterial pathogens and fungal pathogens.

Keywords: *Pinellia ternata*, Root-rot, *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium solani*

基金项目: 贵州省中药现代化项目(No. 黔科合成字[2013]5014)

*通讯作者: Tel: 86-851-6909916; 信箱: hmlu@gmc.edu.cn

收稿日期: 2014-05-09; 接受日期: 2014-09-04; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2014-09-28

半夏[*Pinellia ternata* (Thunb.) Breit.]为天南星科半夏属植物,药用地块茎^[1]。半夏是我国传统中药材,其主要化学成分含有淀粉、生物碱类、半夏蛋白、辣性物、酚类、甾醇类、氨基酸类、脂肪酸类、无机元素等多种成分^[2],具有镇咳祛痰、降逆止呕、消痞散结、抗心律失常、降血脂、抗肿瘤、抗早孕、镇静催眠和解毒抗炎、降血压等功效^[3]。在我国,半夏主要产于贵州、甘肃、山西、山东、云南和湖北等省区^[4]。长期以来,半夏依赖野生资源。由于过度采集及环境的破坏,野生资源已近枯竭,半夏原料供不应求。我国从20世纪70年代开始半夏野生变家种及其栽培技术研究^[5]。半夏人工栽培后,由于生态环境的改变,常发生病虫害,使产量降低,质量变劣,尤其在高温多湿环境中,半夏易受细菌、真菌等病原的侵染而导致腐烂病、烫叶病等^[6]。曾令祥等^[7]对贵州半夏主产区进行了半夏病虫害调查,记录了半夏数十种病虫害,其中以块茎腐烂病的发生最为普遍和严重。半夏是我国传统中药材,年需求量巨大。由于受到病虫害的影响,特别是块茎腐烂病的发生,严重影响半夏的品质和产量,是半夏产业健康发展的瓶颈。贵州是半夏的主产区,每年人工种植半夏上万亩。近年来,半夏病虫害严重,特别是块茎腐烂病发生普遍。2012–2013年,笔者调查贵州省半夏种植基地病害发生情况时发现,每年7–9月份,半夏基地就会发生严重的块茎腐烂现象。半夏块茎腐烂病多发生于高温高湿季节,发病的半夏叶片、叶柄发生水渍样软腐或是叶片、叶柄发黄,然后叶柄基部腐烂,块茎严重腐烂并伴有恶臭味,传染性极强。发病初期如不及时采取防治措施,发病面积会迅速扩大,大大地降低了半夏产量,严重影响了半夏的品质,致使产量减少甚至绝收。块茎腐烂病被药农称为半夏“癌症”,目前没有有效的防治方法。本研究对贵州省赫章县、大方县和遵义县3个半夏主产区的半夏块茎腐烂病病原菌进行了分离与鉴定,以期找到有效的防治方法奠定基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

半夏块茎腐烂样品采自贵州省赫章县、大方县

和遵义县半夏种植基地。样品采集的时间是2013年7–9月份。

1.2 病原菌的分离与纯化

参照文献^[8]。选取发病明显但不完全腐烂的半夏块茎,去表皮,去除腐烂部分,用70%乙醇浸泡30 s,无菌水洗3次,再用2%次氯酸钠浸泡2 min,无菌水洗5次,用无菌干燥滤纸吸干样品表面水分。将每个消毒好的半夏块茎样品平均切成两半,一半取病健交界处组织块(5 mm×5 mm)接种于PDA平板上;另一半将病健交界处组织放入无菌研钵中,加入3 mL无菌水捣碎后划线接种于PDA平板上,28 °C培养48–72 h。挑取在组织小块周围生长的菌丝,接种于新的PDA平板上纯化3–5次;根据细菌菌落形态和颜色,挑取单菌落在新的PDA平板上转接纯化3–5次。将纯化好的真菌分离物接种于PDA斜面试管内,28 °C培养3 d后,放置–20 °C中保存备用;将纯化好的细菌分离物接种于1 mL LB液体培养基中,28 °C培养24 h后加入适量甘油,使甘油终浓度达15%,放置–20 °C中保存备用。

1.3 分离微生物回接致病性试验

1.3.1 分离微生物注射液的制备: (1) 真菌孢子悬液的制备:吸取1 mL无菌水滴加在已纯化好的培养7 d的真菌培养平板上,将孢子洗脱下来后加入到30 mL PDB液体培养基中,28 °C、150 r/min振荡培养48 h,用无菌水配制成孢子悬液(1.0×10^8 个/mL)备用。(2) 细菌注射液的制备:将保存细菌在LB平板上活化,挑起单菌落接种于30 mL PDB液体培养基中,28 °C、150 r/min振荡培养48 h,用无菌水配制成细菌悬液(1.0×10^8 CFU/mL)备用。

1.3.2 离体半夏块茎的回接^[8]:取健康半夏块茎,用自来水将其表面冲洗干净,用2%次氯酸钠浸泡5 min,用无菌水洗3次,用无菌吸水纸吸干后备用。在块茎芽点基部附近用无菌注射器注射新鲜制备的孢子悬液10 μ L和细菌悬液10 μ L,细菌和真菌各自分别接种10个半夏块茎,注射10 μ L灭菌PDB液体培养基做阴性对照,健康无伤口块茎做空白对照,然后分别放置于垫有湿润滤纸的灭菌平皿中,封口膜封闭,放

置于 28 °C 培养箱, 每天观察发病情况并做好记录。

1.3.3 半夏植株的回接: 取健康半夏块茎, 用自来水将其表面冲洗干净, 用 2% 次氯酸钠浸泡 5 min, 用无菌水洗 3 次, 灭菌吸水纸吸干后种植在灭菌珍珠岩中, 28 °C 人工气候箱培养, 待其长出 3 片子叶。(1) 注射接种^[8]: 在半夏植株叶柄基部附近用无菌注射器注射新鲜制备的孢子悬液、细菌悬液和细菌真菌等体积混合液各 10 μ L, 细菌、真菌和细菌真菌混合液各自分别接种 10 株, 接种好后移栽在灭菌土中, 保持一定的湿度, 28 °C 人工气候箱中培养, 每天观察发病情况。用注射 10 μ L PDB 液体培养基植株作为阴性对照, 用健康无伤口植株作空白对照。(2) 浸根接种^[8-9]: 将完整无伤口半夏植株各 10 株分别将其块茎在细菌悬液、真菌悬液和细菌真菌混合液浸泡 15 min 后移栽在灭菌土中, 保持一定的湿度, 28 °C 人工气候箱中培养, 每天观察发病情况。用浸泡在无菌 PDB 中的半夏植株作为阴性对照, 浸泡在无菌水中的作空白对照。

取发病的离体半夏块茎和植株, 按照 1.2 的方法重新分离病原菌, 并与原接种物进行表型鉴定(菌落形态、颜色), 以确定引发病害的病原菌是否为原接种物, 病原菌与原接种物一致者即确定为半夏块茎腐烂病病原菌。

1.4 病原细菌的鉴定

对回接试验中已确定具有致病性的细菌进行菌落形态观察、革兰氏染色并用 3% KOH 溶解试验验证。病原细菌的生理生化试验参照文献^[10-11]进行。

对病原细菌 16S rRNA 基因片段的扩增和序列进行分析, 将病原细菌接种于 PDA 平板, 28 °C 培养 24 h, 挑起单菌落置于 30 μ L 无菌 ddH₂O 制成细菌悬液。用细菌 16S rRNA 基因通用引物对细菌总 DNA 进行扩增, 其上游引物 27F: 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3', 下游引物 1514R: 5'-AAGGAGGTGATCCAGCCGCA-3', 扩增片段大小预计在 1 500 bp 左右, PCR 扩增体系(50 μ L): 10 \times PCR buffer 5 μ L, dNTPs mixture (2.5 mmol/L) 4 μ L, 上下游引物(10 μ mol/L)各 1 μ L, TaKaRa Taq

酶 (5 U/ μ L) 0.5 μ L, 菌悬液 1 μ L (对照用同样体积的无菌 ddH₂O), 加无菌 ddH₂O 至 50 μ L。PCR 条件: 96 °C 8 min; 94 °C 1 min, 50 °C 1 min, 72 °C 1 min, 30 个循环; 72 °C 10 min。反应终止, 取 3 μ L PCR 产物, 1% 琼脂糖电泳检测扩增效果。将特异性 PCR 产物送往北京华大基因测序。将测序结果与 NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) GenBank 数据库中进行同源性检索。采用 MEGA 5.1 软件中的 Neighbor-Joining 法构建系统进化树。

1.5 病原真菌的鉴定

1.5.1 病原真菌孢子形态观察: 载玻片培养法^[8]: 在无菌操作台上将 PDA 培养基倒入培养皿, 厚度约为 1-5 mm。接种铲灼烧灭菌后, 在凝固好的培养基上划 5 mm \times 5 mm 的琼脂培养基小块, 并将其转移至灭菌的载玻片上, 将分离得到的病原真菌菌种活化后接种在小块四角, 盖上无菌盖玻片, 置于保湿培养皿中 28 °C 培养 2-3 d。在显微镜下观察并记录分生孢子形状, 小型和大型分生孢子的数量及其形态特征, 产孢细胞、厚垣孢子的有无。根据 Booth 分类系统^[12-14]对镰刀菌进行分类鉴定。

1.5.2 病原真菌 ITS 和 TEF 片段的扩增和序列分析: (1) 真菌总 DNA 的提取^[15]: 1) 菌丝体的制备: 将少许菌丝接种于 50 mL PDB 液体培养基, 于 28 °C 振荡培养 48 h, 12 000 r/min 离心 10 min 收集菌体, 并用无菌水洗涤 3 次, 保存于 -20 °C 备用。2) 采用 CTAB 法提取基因组 DNA: 取 200 mg 菌体于 500 μ L 溶菌液充分研磨, 65 °C 温育 1 h, 加 300 μ L 氯仿:酚:异戊醇(25:24:1, 体积比)混匀, 12 000 r/min 离心 15 min, 取 300 μ L 上层水相再用氯仿:酚:异戊醇(25:24:1, 体积比)重复抽提 2 次, 加入 7 μ L NaAc (3 mol/L)和 150 μ L 异丙醇, 轻轻混匀, 12 000 r/min 离心 15 min, 弃上清, 用 70%酒精洗涤沉淀 3 次, 室温风干, 用 50 μ L ddH₂O 溶解沉淀, -20 °C 保存。

(2) ITS 区域和转录延长因子 TEF-1 α PCR 扩增: 用通用引物 ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') 和 ITS5 (5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3') 扩增真菌 ITS 区域^[16]。ITS 区域目的片段大小预计

在 600 bp 左右。50 μ L PCR 体系: 10 \times PCR buffer 5 μ L, dNTPs mixture (2.5 mmol/L) 4 μ L, 上下游引物(10 μ mol/L)各 1 μ L, TaKaRa *Taq* 酶(5 U/ μ L) 0.5 μ L, DNA 模板 1 μ L (对照用同样体积的无菌 ddH₂O), 加无菌 ddH₂O 至 50 μ L。PCR 条件: 94 $^{\circ}$ C 5 min; 94 $^{\circ}$ C 1 min, 54 $^{\circ}$ C 1 min, 72 $^{\circ}$ C 1 min, 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 10 min。转录延长因子 TEF-1 α 采用通用引物 EF1T (5'-ATGGGTAAAGGAGGACAAGAC-3') 和 EF2T (5'-GGAAGTACCAGTGATCATGTT-3') 进行 PCR 扩增^[17], 目的片段大小预计在 710 bp 左右。PCR 体系和 ITS 的体系相同, PCR 反应条件: 94 $^{\circ}$ C 5 min; 94 $^{\circ}$ C 1 min, 57 $^{\circ}$ C 1 min, 72 $^{\circ}$ C 1 min, 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 10 min。反应终止后取 3 μ L PCR 产物, 1%琼脂糖电泳检测扩增效果。将特异性 PCR 产物送往北京华大基因测序。将测序结果在 GenBank 数据库中进行同源性检索。采用 MEGA 5.1 软件中的 Neighbor-Joining 法构建系统进化树。

2 结果与分析

2.1 病原菌的分离和致病性试验

从贵州赫章县、大方县、遵义县采集半夏腐烂病样品进行病原菌的分离和致病性测定。从采集到的半夏块茎腐烂样品中同时分离纯化到了细菌和真菌共 56 株, 其中 46 株细菌, 10 株真菌。分离物按样品来源地进行命名: 赫章县来源的细菌分离物命名为 HZ1-20, 真菌为 H1; 大方县来源的细菌分离物命名为 DF1-8, 真菌为 D1-5; 遵义县来源的细菌分离物命名为 ZY1-18, 真菌为 ZJ、Z1-3。通过离

体半夏块茎和完整半夏植株回接致病性试验, 结果表明, 离体半夏块茎接种细菌病原 24-48 h 后整个半夏块茎出现豆腐渣样腐烂, 并伴有恶臭; 而接种真菌病原的离体半夏块茎出现干腐(图 1)。半夏植株回接致病性试验, 细菌注射接种 24-48 h 后半夏植株都表现出了病征, 而真菌则要 3-5 d 才能开始表现出病征。细菌无伤口浸根接种 48-72 h 后开始表现出病症, 而真菌无伤口浸根接种则需要更长的时间才能表现出病症。单独接种细菌病原的发病植株的叶片、叶柄发生水渍样软腐, 而单独接种真菌病原的发病植株的叶片、叶柄发黄, 随后叶柄基部腐烂; 剖开块茎观察, 注射接种的植株块茎从注射处开始发生腐烂, 浸泡接种的从叶柄基部及附近开始腐烂, 几天后整个块茎全部腐烂, 并伴有恶臭, 这与田间的病征相似, 对照组没有引发腐烂症状(图 2)。在观察还未表现出病症的植株时发现其有一部分根部已腐烂, 其他组织部位都完好, 对照组根部完好。

回接试验结果表明病原菌(细菌病原和真菌病原)从伤口、根部和叶柄基部及附近侵染, 其中最容易从伤口处侵染, 细菌病原比真菌病原更具有侵染性, 致病能力更强。由于细菌病原的侵染力要比真菌病原的侵染力强得多, 接种后发病时间快, 在混合接种细菌和真菌两种病原的实验组中表现出来的病症与单独接种细菌病原实验组的病症一样, 块茎腐烂程度与单一接种细菌病原试验组相似。能够引起半夏块茎腐烂病的分离物共有 17 株, 其中细菌 12 株(HZ2, HZ7, HZ12, HZ15, DF1, DF5, DF6, ZY3, ZY8, ZY9, ZY10, ZY15), 真菌 5 株

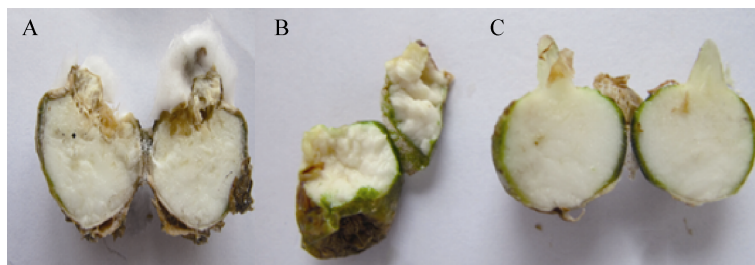


图1 半夏块茎回接试验

Figure 1 Pathogenicity test on *Pinellia* tuber

注: A: 真菌回接试验; B: 细菌回接试验; C: 对照。

Note: A: Pathogenicity test of fungal pathogen; B: Pathogenicity test of bacterial pathogen; C: Control.

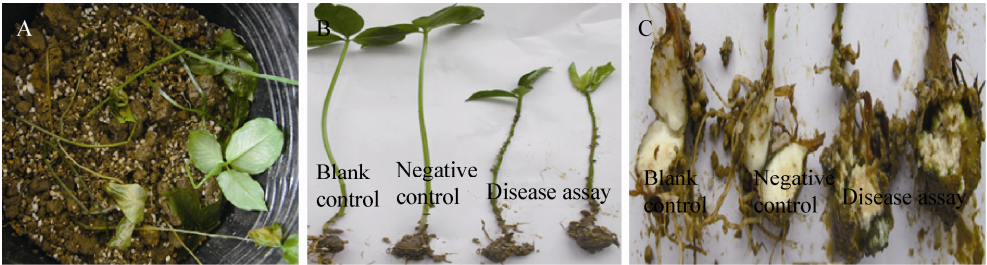


图2 半夏植株回接试验

Figure 2 Pathogenicity test on *Pinellia ternata* plant

注: A, B: 发病植株叶片、叶柄发生水渍样软腐; C: 实验组地下整个块茎发生豆腐渣样腐烂。
Note: A, B: Symptom produced on leaf and petiole of *Pinellia ternata* plant; C: Symptom produced on tuber of *Pinellia ternata*.

(H1, D3, D5, ZJ, Z3)。对接种发病后的块茎按照方法 1.2 重新分离病原菌, 结果分离到的细菌、真菌在菌落形态上和接种的细菌、真菌完全一致。根据柯赫法则可以判定, 它们是引起半夏块茎腐烂的病原菌。

2.2 病原细菌鉴定结果

2.2.1 病原细菌形态与生理生化特征: 在 PDA 平板上 28 °C 培养 48 h 均形成圆形菌落, 稍突起, 灰白色, 生长后期变为半透明。革兰染色均为阴性, 12 株细菌培养物与 3% KOH 溶液混合 15 s 左右均可拉出丝状物体, 均为革兰阴性菌, 革兰染色与 3% KOH 溶解试验结果一致。12 株病原细菌的生理生化特性相似, 结果见表 1。

2.2.2 病原细菌的分子生物学鉴定: 扩增能引起半夏块茎腐烂的 12 株病原细菌的 16S rRNA 基因, 并将 PCR 特异性产物送北京华大基因测序。将测序结果与 NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) GenBank 数据库进行同源性比对, 根据已报道的相关 16S rRNA 基因序列^[18-22](表 2), 以 *Pseudomonas fluorescens* 作为外群, 采用 MEGA 5.1 软件中的 Neighbor-Joining 法构建系统进化树。结果显示: 从大方地区分离到的 DF1、DF5、DF6 与胡萝卜软腐果胶杆菌胡萝卜软腐亚种 (*Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*) C144 (JF926739.1)等菌株报告的序列相似度达 99%; 从赫章和遵义地区分离到的 9 株病原细菌与胡萝卜软腐果胶杆菌胡萝卜软腐亚种 (*Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*)

表 1 12 株病原细菌主要生理生化特性 Table 1 Main bacteriological characteristics for 12 bacterial pathogens	
项目 Items	结果 Results
41 °C 生长 Growth at 41 °C	+
5% NaCl 生长 Growth at 5% NaCl	+
葡萄糖发酵 Acid production from glucose	+
蔗糖发酵 Acid production from sucrose	+
吡啶试验 Indole production	-
氧化酶试验 Oxidas	-
硝酸盐还原 Nitrate reduction	+
H ₂ O ₂ 试验 Catalase	-
明胶液化 Gelatin liquefaction	-
淀粉水解 Starch hydrolysis	-
MR 试验 MR reaction	-
V-P 试验 VP reaction	+
柠檬酸盐 Citrate production	+
H ₂ S 试验 H ₂ S production	-
革兰氏染色 Gram stain	-

注: +: 阳性; -: 阴性。
Note: +: Positive reaction; -: Negative reaction.

表 2 16S rRNA 系统发育分析参考序列			
Table 2 The reference sequences used in phylogenetic analyses based on 16S rRNA			
菌株 Strains	索引号 Accession numbers	参考文献 References	备注 Remark
<i>P. carotovorum</i> subsp. <i>carotovorum</i> strain RF1	DQ886670.1	18	
<i>P. carotovorum</i> subsp. <i>brasiliense</i> strain 1001	JF926759.1	19	
<i>P. carotovorum</i> subsp. <i>carotovorum</i> strain C150	JF926744.1	19	
<i>P. carotovorum</i> subsp. <i>carotovorum</i> strain CFBP2046	JF926732.1	19	
<i>P. carotovorum</i> subsp. <i>carotovorum</i> strain A10.1	JF926735.1	19	
<i>P. carotovorum</i> subsp. <i>carotovorum</i> strain C144	JF926739.1	19	
<i>P. carotovorum</i> subsp. <i>carotovorum</i> strain ATCC 15713	U80197.1	20	模式菌株
<i>Pectobacterium betavasculorum</i> strain ATCC 43762	U80198.1	20	
<i>Pectobacterium wasabiae</i> CFBP 3304	U80199.1	20	
<i>Erwinia ananas</i>	U80196.1	20	
<i>Erwinia herbicola</i>	U80202.1	20	
<i>Erwinia amylovora</i>	U80195.1	20	
<i>Erwinia cypripedii</i>	U80201.1	20	
<i>Erwinia chrysanthemi</i>	U80200.1	20	
<i>P. carotovorum</i> subsp. <i>odoriferum</i> strain LMG 17566	NR-025316.1	21	
<i>Pseudomonas fluorescens</i> strain Pfl	AY622220.1	22	

RF1 (DQ886670.1)等菌株报告的序列相似度达99%。Mohamed 等^[23]分别利用 *pmrA* 和 16S rRNA 序列对胡萝卜软腐果胶杆菌胡萝卜软腐亚种 (*Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*) 进行了系统发育分析, 结果显示该亚种在同一分支上分为两个小的分支, 为两个不同的种群。16S rRNA 系统进化树(图 3)显示: 12 株病原细菌分别与不同菌株的胡萝卜软腐果胶杆菌胡萝卜软腐亚种(*Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*) 聚为两个大的分支, 赫章县和遵义县分离的病原细菌聚在同一分支, 但各自聚为一支。大方县分离到的病原细菌则聚为另一个分支, 分两个小支, 这与 Kettani-Halabi 等的报道结果相似。综上所述, 结合形态学、生理生化特性^[24]、16S rRNA 系统发育学分析结果以及相关文献^[18-22,25], 笔者将这 12 株病原细菌确定为胡萝卜软腐果胶杆菌胡萝卜软腐亚种 (*Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*)。

2.3 病原真菌形态学鉴定结果

致病真菌 H1、D3、D5 在 PDA 平板上, 28℃ 培养 5 d 形成圆形菌斑, 大小在 5.3–6.0 cm, 菌丝呈灰白色、质地棉絮状(图 4A), 平皿背面能看到有墨绿色不规则或扇形斑, 或轮纹上有墨绿色斑点(图 4B)。Z3、ZJ 菌株在 PDA 平板上, 28℃ 培养 5 d 形成圆形菌斑, 大小 6.0–6.5 cm, 菌丝白色、质地棉絮状(图 4C), 背面有紫红色色素(图 4D)。

光学显微镜 40 倍下观察, H1、D3、D5 菌株的孢子形态也高度相似。大型分生孢子较宽, 稍弯曲, 通常 3–4 个隔膜。大多数大型分生孢子的顶细胞短、钝圆, 偶尔有少数的顶细胞较弯曲, 足胞锯齿状。分生孢子座上产生有分枝的产孢梗, 产孢梗单瓶梗, 稍长(图 5A)。小型分生孢子长椭圆形、肾形, 单胞或双胞, 数量多, 呈假头状聚生, 0–1 个隔膜。有厚垣孢子, 厚垣孢子顶生、单生、间生, 或 2–3 个聚生。H1、D3、D5 的培养性状及孢子形态特征与茄病镰刀菌(*Fusarium solani*)的标准形态一致^[12-14]。

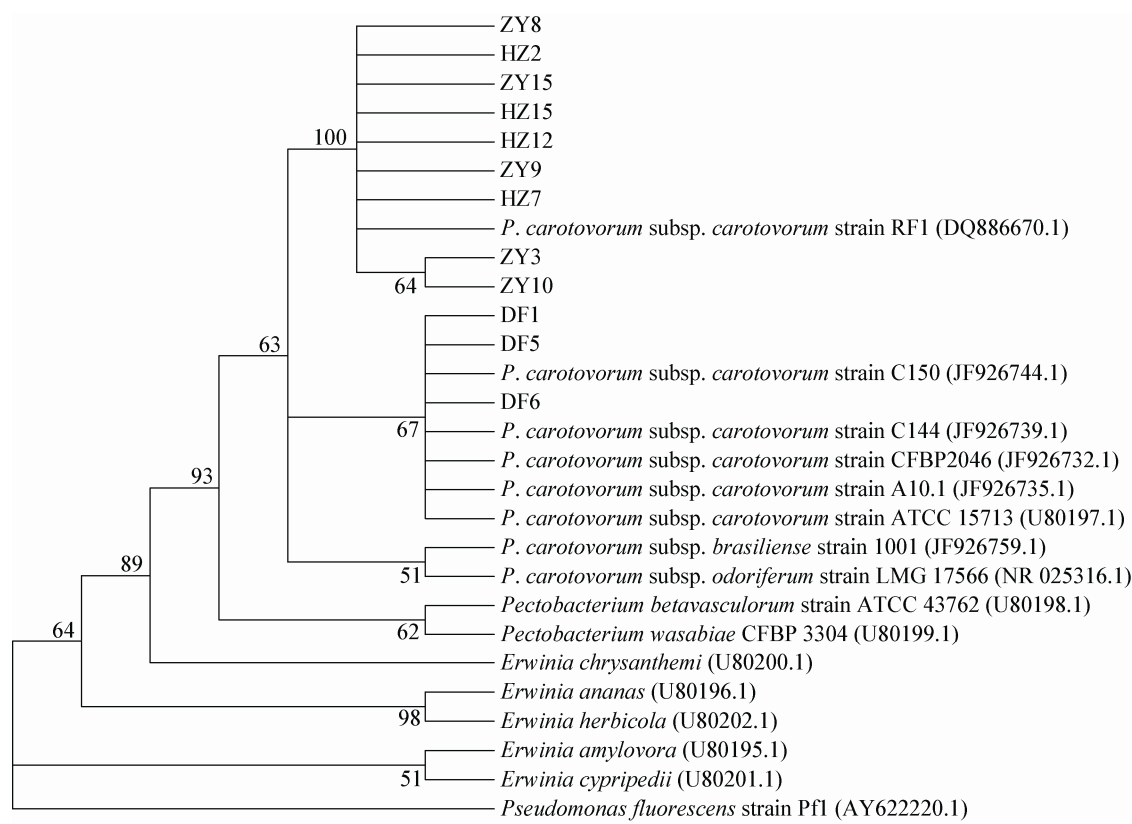


图 3 12 株病原细菌 16S rRNA 进化树

Figure 3 Phylogenesis of 16S rRNA of twelve bacterial pathogens

注：括号内为菌株的 16S rRNA 基因序列在 GenBank 中的索引号；分支点上的数字表示构建系统树时 500 次计算时形成该节点的百分比。

Note: The numbers in parentheses represent the accession numbers in the GenBank for the 16S rRNA gene sequences of those strains. The numbers in the branching points are bootstrap values (expressed as percentages of 500 replications).

Z3 和 ZJ 的孢子形态高度相似。小型分生孢子较多，为肾形或卵圆形，0-1 隔；大型分生孢子极少，两端比较均匀地逐渐变尖，类似镰刀形状，2-6 隔，多为 3 隔。厚垣孢子为球形，单生、对生，产孢细胞为短的单瓶梗(图 5B)。ZJ、Z3 的培养性状及形态特征与尖孢镰刀菌(*Fusarium oxysporum*)的标准形态一致^[12-14]。

2.4 病原真菌 ITS 和 TEF 序列分析

对能引起半夏块茎腐烂的 5 株真菌分别扩增其 ITS 和 TEF 片段，将 PCR 特异性产物送北京华大基因测序，将测序结果分别与 NCBI 的 GenBank 数据库进行同源性比对，结果显示：D3、D5、H1 的 ITS 序列与茄病镰刀菌(*F. solani*) P109-4 (HM461910.1) 等菌株报告的序列相似度达 99%，ZJ、Z3 的 ITS

序列与尖孢镰刀菌(*F. oxysporum*) r160 (HQ649816.1) 等菌株报告的序列相似度达 99%；D3、D5、H1 的 TEF 序列与茄病镰刀菌(*F. solani*) FRC S-2516 (JN235735.1)等菌株报告的序列相似度达 99%，ZJ、Z3 的 TEF 序列与尖孢镰刀菌(*F. Oxysporum*) MAFF 744009 (DQ452425.1)等菌株报告的序列相似度达 99%。D3、D5、H1、ZJ、Z3 的 ITS 序列已提交 NCBI 的 GenBank 数据库，索引号分别是：KJ019827.1、KJ019829.1、KJ019828.1、KF278962.1 和 KJ019830.1。采用 MEGA 5.1 软件中的 Neighbor-Joining 法构建系统进化树。从 ITS (图 6) 和 TEF (图 7)构建的进化树可以看出：ZJ、Z3 与不同菌株的尖孢镰刀菌(*F. oxysporum*)聚在同一分支上，而 D3、D5、H1 与不同菌株的茄病镰刀菌

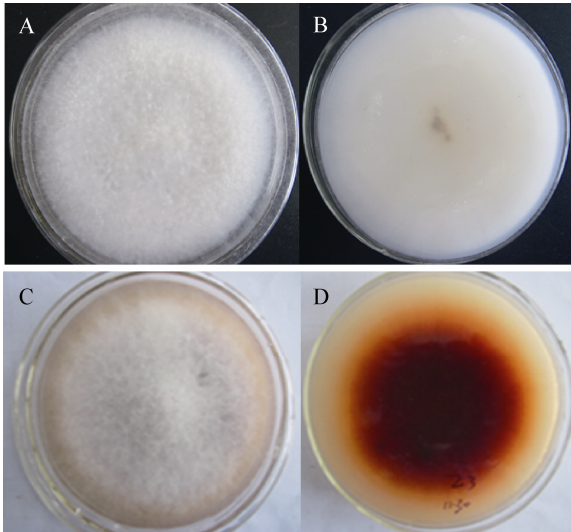


图 4 病原真菌在 PDA 平板上的菌落形态

Figure 4 Colony characteristic of fungal pathogens on PDA

注：A: D3 菌株正面；B: D3 菌株背面；C: Z3 菌株正面；D: Z3 菌株背面。

Note: A: The face of colony of strain D3; B: The reverse side of colony of strain D3; C: The face of colony of strain Z3; D: The reverse side of colony of strain Z3.

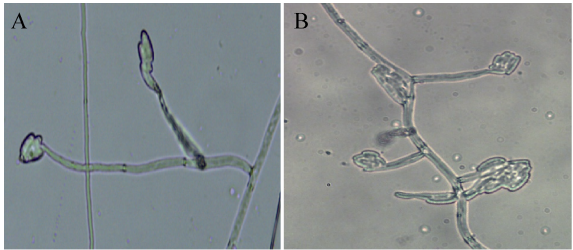


图 5 病原真菌孢子梗(40×)

Figure 5 The characteristic of sporophore of fungal pathogens (40×)

注：A: H1 菌株孢子梗；B: Z3 菌株孢子梗。

Note: A: Strain H1; B: Strain Z3.

(*F. solani*)聚在同一分支上。ITS 和 TEF 的聚类图结果显示基本一致。

综上所述，真菌病原菌的形态鉴定和分子鉴定结果一致。因此，笔者结合形态鉴定和分子鉴定的结果以及相关报道^[26-30]，将 ZJ、Z3 确定为尖孢镰刀菌(*F. oxysporum*)，将 D3、D5、H1 确定为茄病镰刀菌(*F. solani*)。

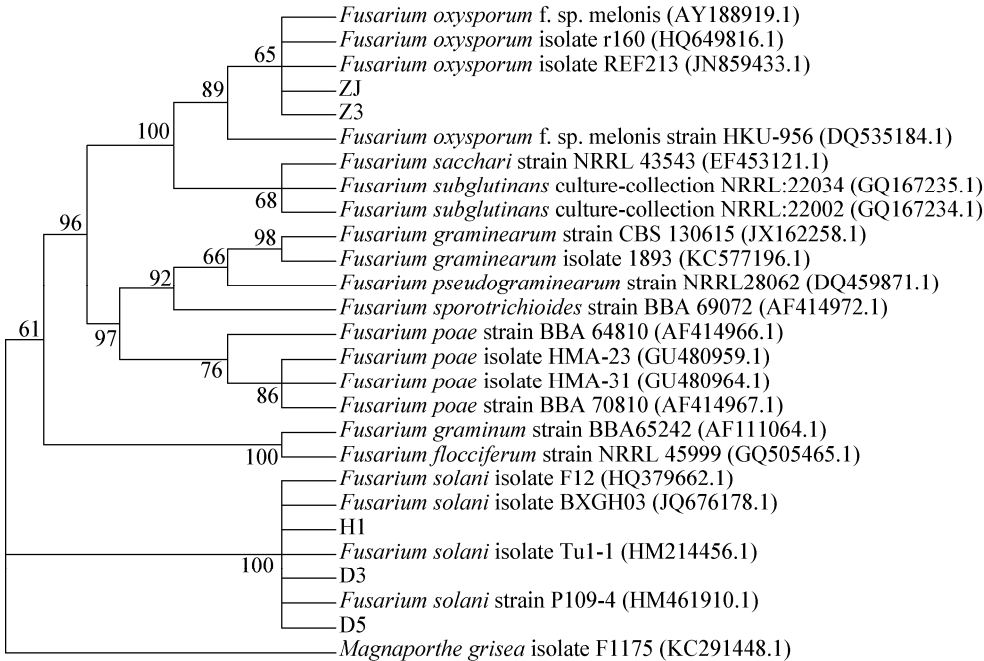


图 6 5 种病原真菌 ITS 进化树

Figure 6 Phylogenesis of ITS of five fungal pathogens

注：括号内为菌株的 ITS 基因序列在 GenBank 中的索引号；分支点上的数字表示构建系统树时 500 次计算时形成该节点的百分比。

Note: The numbers in parentheses represent the accession numbers in the GenBank for the ITS gene sequences of those strains. The numbers in the branching points are bootstrap values (expressed as percentages of 500 replications).

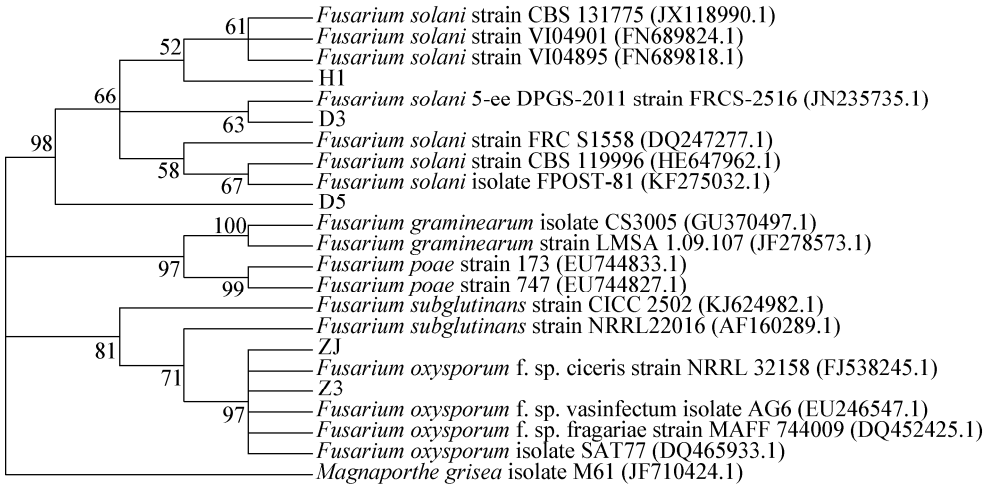


图 7 5 种病原真菌 TEF 进化树

Figure 7 Phylogenesis of TEF of five fungal pathogens

注：括号内为菌株的 TEF 基因序列在 GenBank 中的索引号；分支点上的数字表示构建系统树时 500 次计算时形成该节点的百分比。
Note: The numbers in parentheses represent the accession numbers in the GenBank for the TEF gene sequences of those strains. The numbers in the branching points are bootstrap values (expressed as percentages of 500 replications).

3 讨论

植物器官和组织(根、块茎、果实、茎基等)腐烂病可由多种病原菌引起，发病不限于田间，贮藏期间也有发生，其中由欧氏杆菌属(*Erwinia*)的软腐欧文氏菌^[31-35]和镰刀菌属(*Fusarium*)^[36-40]的尖孢镰刀菌引起的腐烂病最为普遍，严重影响了经济作物的品质和产量，造成巨大的经济损失。半夏是我国传统中药材，年需求量大，经实地考察和当地农民反映，贵州省半夏人工栽培基地块茎腐烂病连年发生且很严重，甚至导致绝收。为此，对贵州省半夏块茎腐烂病的相关研究意义重大。

何煜波等^[18]报道了浙江萧山地区的半夏细菌性软腐病原菌为胡萝卜果胶杆菌软腐果胶杆菌胡萝卜亚种(*Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*)。曾令祥等^[7]报道了贵州省半夏种球腐烂病的真菌病原为镰刀菌属(*Fusarium* sp.)的一种，但没有做更进一步的鉴定。孙新荣等^[28]报道了甘肃清水地区的半夏块茎腐烂病的病原菌为尖孢镰刀菌(*F. oxysporum*)。由此可知半夏块茎腐烂病的病原菌有细菌病原和真菌病原两类。已报道过的关于半

夏块茎腐烂病病原菌都是只报道了单一的一类病原菌(细菌或真菌病原)。

本研究从腐烂的半夏块茎样品中同时分离到了细菌和真菌两类病原物，采用伤口和无伤口两种接种方法各自单独回接于离体半夏块茎和半夏植株后都能使半夏块茎腐烂，病原菌更容易从伤口感染，都表现出较强的致病性，接种细菌病原出现湿腐症状，接种真菌病原出现干腐症状，细菌病原的侵染性和致病力都强于真菌病原。提示在病害防治上要注意防治地下害虫，以免咬伤半夏块茎形成伤口给病原菌的侵入提供可乘之机。细菌病原比真菌病原的侵染力和致病性更强，发病时间更快，提示在病害防治上以重点防治病原细菌的同时也要防止病原真菌的侵染。笔者认为，贵州省半夏块茎腐烂病的发生可以由细菌或真菌单一病原菌引起，也可由细菌和真菌两类病原菌复合侵染而引起。通过致病性试验、形态学、生理生化特性和分子生物学的方法对病原菌进行鉴定，半夏块茎腐烂病病原细菌均为胡萝卜果胶杆菌软腐果胶杆菌胡萝卜亚种(*Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*)，病原真菌为尖孢镰刀菌(*F. oxysporum*)和茄病镰刀

菌(*F. solani*)。病原真菌中,笔者首次分离到茄病镰刀菌(*F. solani*),并且致病力与尖孢镰刀菌相当。本文首次详细报道了贵州省半夏块茎腐烂病的病原菌(细菌病原和真菌病原),为贵州省半夏块茎腐烂病的防治工作提供了强有力的理论依据。

参 考 文 献

- [1] Chinese Pharmacopoeia Commission. Chinese Pharmacopoeia[M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2005: 78 (in Chinese)
中华人民共和国卫生部药典委员会. 中国药典[M]. 北京: 化学工业出版社, 2005: 78
- [2] Guan HL. Research and Application of the Modernization of Traditional Chinese Medicine[M]. Beijing: Academy Press, 1997: 1659 (in Chinese)
关虎吕. 中药现代化研究与应用[M]. 北京: 学苑出版社, 1997: 1659
- [3] Cai SZ, Zhou ZM, Xu LZ, et al. Advances in studies on medicinal plants of *Pinellia*[J]. Foreign Medical Sciences, 2004, 26(1): 17-25 (in Chinese)
蔡世珍, 邹丽梅, 徐丽珍, 等. 半夏属药用植物的研究进展[J]. 国外医药, 2004, 26(1): 17-25
- [4] Wang HD, Wu FM. Investigation of *Pinellia ternate* resources in China[J]. Journal of Anhui Agricultural Sciences, 2012, 40(1): 150-151 (in Chinese)
王化东, 吴发明. 我国半夏资源调查研究[J]. 安徽农业科学, 2012, 40(1): 150-151
- [5] Mao ZC, Peng ZS. Progress on research of *Pinellia ternate*[J]. Jiangxi Science, 2002, 1(20): 42-45 (in Chinese)
毛子成, 彭正松. 半夏研究进展[J]. 江西科学, 2002, 1(20): 42-45
- [6] Zhang XB, Tang YX. A preliminary study on reasons of Shangluo *Pinellia*'s block stem rotten disease and precenting measures[J]. Journal of Shangluo University, 2006, 2(20): 37-38 (in Chinese)
张小斌, 唐养璇. 商洛半夏块茎腐烂病的原因初探及防治对策[J]. 商洛师范专科学校学报, 2006, 2(20): 37-38
- [7] Zeng LX, Li DY. Investigation and integrated management for diseases and pests on *Pinellia ternate* in Guizhou[J]. Guizhou Agricultural Sciences, 2009, 37(1): 92-95 (in Chinese)
曾令祥, 李德友. 贵州地道中药材半夏病虫害种类调查及综合防治[J]. 贵州农业科学, 2009, 37(1): 92-95
- [8] Fang ZD. Research Methods on Plant Pathology[M]. Beijing: China Agricultural Press, 1998 (in Chinese)
方中达. 植病研究方法[M]. 北京: 中国农业出版社, 1998
- [9] Wellman FL. A technique for studying host resistance and pathogenicity intomato *Fusarium wilt*[J]. Phytopathol, 1939, 29: 945-956
- [10] Qian CR, Huang YX. Laboratory Experiments in Microbiology[M]. Beijing: Peking University Press, 2008: 113-129 (in Chinese)
钱存柔, 黄仪秀. 微生物学实验教程[M]. 北京: 北京大学出版社, 2008: 113-129
- [11] Ren XZ. Classification and Identification of Plant Pathogens[M]. Beijing: China Agricultural Press, 1992: 47-56 (in Chinese)
任欣正. 植物病原菌的分类和鉴定[M]. 北京: 中国农业出版社, 1992: 47-56
- [12] Booth C. The Genus *Fusarium*[M]. London: CIM, 1988
- 布斯-C. 镰刀菌属[M]. 陈其煊, 译. 北京: 中国农业出版社, 1988
- [13] Leslie JF, Summerell BA, Bullock S. The *Fusarium* Laboratory Manual[M]. Iowa: Blackwell Publishing Professional, 2005
- [14] Kirk PM, Cannon PF, David JC, et al. Dictionary of the fungi[M]. 8th edition. Oxford: CAB I International, 1995: 173-174
- [15] Rosewich UL, Pettway RE, Katan T, et al. Population genetic analysis corroborates dispersal of *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* from Florida to Europe[J]. Phytopathology, 1999, 89: 623-630
- [16] White TJ, Bruns T, Lee SB, et al. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics[M]. San Diego: Academic Press, 1990: 315-322
- [17] Mirets S, Vázquez C, Mulè G, et al. Differentiation of *Fusarium verticillioides* from banana fruits by IGS and EF-1α sequence analyses[J]. European Journal of Plant Pathology, 2004, 110: 515-523
- [18] He LB, Hu XF, Chen HM, et al. Isolation and identification of a bacterial pathogen causing soft-rot on *Pinallia ternata*[J]. Acta Phytopathologica Sinica, 2007, 37(4): 337-342 (in Chinese)
何煜波, 胡秀芳, 陈海敏, 等. 半夏细菌性软腐病原菌的分离及鉴定[J]. 植物病理学报, 2007, 37(4): 337-342
- [19] Nabhan S, De Boer SH, Maiss E, et al. Taxonomic relatedness between *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*, *Pectobacterium carotovorum* subsp. *odoriferum* and *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliense* subsp. nov.[J]. Journal of Applied Microbiology, 2012, 113(4): 904-913
- [20] Kwon WS, Go SJ, Kang HW, et al. Phylogenetic analysis of *Erwinia* species based on 16S rRNA gene sequences[J]. Journal of Systematic Bacteriology, 1997, 47(4): 1061-1067
- [21] Hauben L, Moore ER, Vauterin L, et al. Phylogenetic position of phytopathogens within the *Enterobacteriaceae*[J]. Systematic and Applied Microbiology, 1998, 21(3): 384-397
- [22] Rezzonico F1, Défago G, Moënné-Loccoz Y. Comparison of ATPase-encoding type III secretion system *hrcN* genes in biocontrol fluorescent *Pseudomonads* and in phytopathogenic proteobacteria[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2004, 70(9): 5119-5131
- [23] Mohamed KH, Meriam T, Mohamed A, et al. An easy, simple inexpensive test for the specific detection of *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* based on sequence analysis of the *pmrA* gene[J]. BMC Microbiology, 2013, 13: 176
- [24] Buchanan RE, Gibbons NE. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology[M]. Baltimore: Williams and Wilkins, 1984
布坎南 RE, 吉本斯 NE, 等. 伯杰细菌鉴定手册[M]. 北京: 科学出版社, 1984
- [25] Gardan L, Gouy C, Christen R, et al. Elevation of three subspecies of *Pectobacterium carotovorum* to species level: *Pectobacterium atrosepticum* sp. nov., *Pectobacterium betavascularum* sp. nov. and *Pectobacterium wasabiae* sp. nov.[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2003, 53(Pt2): 381-391
- [26] Shun Y, Liao Q, Shun Y, et al. Isolation and identification of 6 species of plant endophytic *Fusarium*[J]. Jiangsu Agricultural Sciences, 2010(5): 437-439 (in Chinese)
孙勇, 缪倩, 孙颖, 等. 6种植物内生镰刀菌的分离和鉴定[J]. 江苏农业科学, 2010(5): 437-439
- [27] Li XS, Chen D, Liang Y, et al. Isolation and identification of Garlic dry rot disease pathogen[J]. Chian Vegetables, 2012(20): 88-93 (in Chinese)

- 李旭双, 陈典, 梁誉, 等. 大蒜干腐病原菌的分离鉴定[J]. 中国蔬菜, 2012(20): 88-93
- [28] Shun XR, Hu LP, Liu YM, et al. Pathogen identification of *Pinellia ternata* tuber disease and selection of fungicide[J]. China Journal of Chinese Materia Medica, 2010, 35(7): 837-840 (in Chinese)
- 孙新荣, 呼丽萍, 刘艳梅, 等. 半夏块茎腐烂病原菌鉴定和药效比较[J]. 中国中药杂志, 2010, 35(7): 837-840
- [29] Bi W, Chen J, Jiao XL, et al. Identification of the pathogens causing the root rot and their pathogenicity on American ginseng in Beijing[J]. Plant Protection, 2011, 37(5): 135-138 (in Chinese)
- 毕武, 陈娟, 焦晓林, 等. 北京地区西洋参根腐病原菌鉴定及其致病性[J]. 植物保护, 2011, 37(5): 135-138
- [30] Li JH, Wang T, Cai ZX, et al. Isolation and identification of the dominant pathogens causing potato Fusarium dry rot in Gansu Province[J]. Acta Phytopathologica Sinica, 2011, 41(5): 456-46 (in Chinese)
- 李金花, 王蒂, 柴兆祥, 等. 甘肃省马铃薯镰刀菌干腐病优势病原的分离鉴定[J]. 植物病理学报, 2011, 41(5): 456-463
- [31] Shen YT, Chu S. Studies on the pathogenicity and the isolation of pathogen from konnyaku's soft rot[J]. Journal of Anhui University, 2002, 26(1): 96-100 (in Chinese)
- 沈业寿, 储苏. 魔芋软腐病原菌的分离及致病性研究[J]. 安徽大学学报, 2002, 26(1): 96-100
- [32] Zang W, Zhang YW, Shun JQ, et al. Study on population structure and dominant pathogenic types of soft rot bacteria in *Brassica pekinensis*[J]. Journal of Plant Resources and Environment, 2006, 15(1): 26-29 (in Chinese)
- 臧威, 张耀伟, 孙剑秋, 等. 大白菜软腐菌种群组成及优势菌致病型的研究[J]. 植物资源与环境学报, 2006, 15(1): 26-29
- [33] Gu CY, Fan JQ, Yang X, et al. Identification of the pathogen and quorum quenching study on bacterial soft rot of colored calla lily[J]. Journal of Nanjing Agricultural University, 2009, 32(3): 71-77 (in Chinese)
- 谷春艳, 范加勤, 杨雪, 等. 彩色马蹄莲细菌性软腐病菌的鉴定及其群体感应淬灭的研究[J]. 南京农业大学学报, 2009, 32(3): 71-77
- [34] Lü HP, Wei H, Qi YH, et al. Pathogen identification from soft rot disease of onion bulbs in Jiayuguan, Gansu Province[J]. Acta Prataculturae Sinica, 2013, 22(4): 153-159 (in Chinese)
- 吕和平, 魏晖, 漆永红, 等. 甘肃省嘉峪关市洋葱鳞茎软腐病原菌鉴定[J]. 草业学报, 2013, 22(4): 153-159
- [35] Li B, Ma XH, Shen Q, et al. Rapid identification of soft rot pathogen and bactericidal test in *Hyacinthus orientalis*[J]. Journal of Shanghai Jiaotong University, 2011, 29(5): 20-24 (in Chinese)
- 李冰, 马晓红, 沈强, 等. 风信子软腐病原菌的鉴定和杀菌剂试验[J]. 上海交通大学学报, 2011, 29(5): 20-24
- [36] Sun LL, Yang YH, Liu JK, et al. *Bletilla striata* pseudobulb rot pathogen identification and its biological characteristic[J]. Journal of Chinese Medicinal Materials, 2013, 36(3): 341-345 (in Chinese)
- 孙乐乐, 杨永红, 刘军凯, 等. 白及根腐病原菌鉴定和生物学特性研究[J]. 中药材, 2013, 36(3): 341-345
- [37] Hu CZ, Shun XT, Xie KQ, et al. Isolation and identification of pathogens causing rhizome rot of Lotus[J]. Journal of Changjiang Vegetables, 2013(18): 92-94 (in Chinese)
- 胡长志, 孙晓棠, 谢克强, 等. 白莲腐败病原菌的分离鉴定[J]. 长江蔬菜, 2013(18): 92-94
- [38] Tan GY, Yang ZL, Yuan ZL, et al. Isolation and identification of fungal pathogens of *Atractylodes macrocephala*[J]. Acta Agriculturae Zhejiangensis, 2013, 25(5): 1050-1055 (in Chinese)
- 檀国印, 杨志玲, 袁志林, 等. 白术真菌病害的分离鉴定[J]. 浙江农业学报, 2013, 25(5): 1050-1055
- [39] Zhao ZX, Chen Y, Chen JC, et al. Identification of dioscorea stem rot disease in Hainan[J]. Genomics and Applied Biology, 2013, 32(6): 761-766 (in Chinese)
- 赵志祥, 陈圆, 陈绵才, 等. 海南薯蓣茎腐病原菌的鉴定[J]. 基因组学与应用生物学, 2013, 32(6): 761-766
- [40] Wang ST, Wang YN, Hu TL, et al. Identification of the root rot pathogens of *Isatis indigotica*[J]. Acta Phytophylacica Sinica, 2011, 38(5): 473-474 (in Chinese)
- 王树桐, 王亚南, 胡同乐, 等. 板蓝根根腐病原菌鉴定[J]. 植物保护报, 2011, 38(5): 473-474