



段晓东. 几种蚕豆根腐病病原菌的分离鉴定[J]. 黑龙江农业科学, 2021(6):59-66.

几种蚕豆根腐病病原菌的分离鉴定

段晓东

(乌鲁木齐市农业技术推广中心, 新疆 乌鲁木齐 830011)

摘要:为确定乌鲁木齐市达坂城区蚕豆根腐病的病原菌种类,从而有针对性地进行病害防治,本研究从乌鲁木齐市达坂城区多个蚕豆产区采集病原样本,进行分离纯化再回接,对比发病症状,并结合形态学和分子生物学鉴定技术明确病原菌的分类地位。结果表明:经病原菌分离纯化后得到 8 个菌株,通过对病原菌菌落结构、菌丝的形态学观察及分子生物学方法确认,腐皮镰刀菌、半裸镰刀菌、立枯丝核菌、细极交链孢 4 种真菌是蚕豆根腐病的致病菌。达坂城区蚕豆根腐病是由多种病原菌复合侵染引起的。因此,达坂城区蚕豆根腐病应采用包括轮作倒茬、种子消毒、改良土壤菌落结构、覆膜、沟灌、机器点播等综合防控措施。

关键词:蚕豆根腐病;病原菌;形态学鉴定;分子生物学鉴定

开放科学(资源服务)标识码(OSID):



自 2009 年蚕豆根腐病传入,造成达坂城地区蚕豆大面积死苗、绝产,严重制约了蚕豆产业的正常发展。当地农技部门采用化学防治、轮作、外地引用抗病品种等方式,未能起到很好的控制作用。反而造成达坂城蚕豆种质资源的丧失和化学农药残留超标等问题,很多农户因为蚕豆根腐病的问题,已放弃种植蚕豆。根腐病是世界性难题,其病因往往不是单一菌种,表现出复合侵染特性。蚕豆根腐病很可能是多种病原菌复合侵染。因此,本研究依据柯霍氏法则,在乌鲁木齐市达坂城区采取多点取样,对不同发病部位病原菌进行分离、纯化,再进行不同部位回接,分离比对,获取蚕豆根腐病的病原菌。同时结合形态学及分子生物学鉴定技术,确定该病原菌的分类地位,为后续防治奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

2016—2018 年,分别在达坂城东沟乡、西沟乡、阿克苏乡及高压子乡等蚕豆主产区的不同发病类型田采集典型根腐病样本 582 个,用于病原菌的分离鉴定。接种蚕豆品种为青海 12 号和农户自留种,由乌鲁木齐农业技术推广中心提供。

1.2 方法

1.2.1 病原菌的分离纯化方法 采用常规的组织分离技术,选取典型特征蚕豆根腐病组织,冲洗除去泥土等大的颗粒,用刀切去损伤及污染严重

部位,切取病健交界处 1~3 cm 组织,进行病原菌分离。先用 75% 乙醇溶液浸泡 15 s,然后用 0.1% 升汞浸泡 1 min,消毒时要不断搅动,使分离材料与消毒剂充分接触,用无菌水冲洗 3 次,分离材料在无菌水中停留的时间分别为 3、5 和 3 min,以除去残留的消毒剂。将废液倒入烧杯中,待分离结束后集中处理。表面消毒完毕后,将分离材料放在无菌纸上,吸去病组织表面多余的水分^[1]。在无菌条件下置于 PDA 培养基(马铃薯 200 g,葡萄糖 20.0 g,琼脂 18.0 g,蒸馏水 1 000 mL)^[2]平板上,每个培养皿上放一个组织块,做好标记(姓名、材料、消毒时间等)。封上封口膜,将培养皿倒置放入 26 ℃ 左右的恒温箱内培养^[3]。前 2 d 主要观察是否被细菌污染,后待有肉眼可见菌落出现,取菌落前沿菌丝转于新培养皿,经过培养的菌株,显微镜下初步镜检,已产孢子的配制成孢子悬浮液进行单孢子分离,未产孢子或不产孢子的采取划线法分离,直至分离的菌落为纯菌落为止^[4]。并按菌株类型和培养特性进行初步分类,转管后供鉴定和致病性测定用。

1.2.2 病原菌的形态学观察 将纯化的病原菌接种在 PDA 培养基上,25 ℃ 黑暗条件下培养 7 d,观察菌落颜色和形态,并在光学显微镜下记录产孢子结构和孢子形态特征^[5]。

1.2.3 疑似病原菌的回接试验 依据科赫法则,采用活体接种法测试上述分离菌株的致病能力。采用室内盆栽土壤接菌的方法,在上口径×下口径×高度为 16 cm×13 cm×11 cm 的带孔花盆内装入 2/3 高度的灭菌土,将浸泡于无菌水中 2 d

收稿日期:2021-02-25

作者简介:段晓东(1982—),男,硕士,高级农艺师,从事病虫害综合防控。E-mail:27582245@qq.com。

的健康蚕豆种植于盆中央,每盆一粒,覆土 2~3 cm,对外壳已经逐渐裂开的蚕豆种,芽点朝上覆土 2~3 cm。浇水培育,待子叶出土。此时将纯化后的菌株分别大量繁殖,待分生孢子或菌丝大量出现时,取 5~10 皿,用灭菌水稀释并用细毛笔轻轻冲刷,将孢子或菌丝体配制成浓度是 $(10\sim 20)\times 10^3$ 个孢子 $\cdot\text{mL}^{-1}$ 的悬浮液(未产孢子的疑似病原菌浓度不予统计),刮接于花盆,然后灌水保湿,各品种设 3 次重复,贴上标签,并设置一组空白对照,每 5 d 重复浇灌带菌悬液,以无菌水补足水分营造高湿环境。于花期后,结荚前拔取蚕豆植株调查发病情况,将发病部位清理后进行无菌分离,描述发病症状,孢子形态、菌落颜色等生物学性状,并与样本发病症状及初接种疑似病原菌进行形态学比对^[6]。

1.2.4 病原菌的分子鉴定 分别刮取在 PDA 上培养 7 d 的疑似病原菌菌丝,采用 Ezup(Ezup Column Fungi Genomic DNA Purification Kit)柱式真菌基因组 DNA 抽提试剂盒(上海生工生物工程股份有限公司)提取 DNA。

基因扩增引物采用 rDNA-ITS 区段通用引物 ITS1(5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3'), ITS4(5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3')^[7]。PCR 扩增条件为:94 ℃预变性 5 min;94 ℃变性 40 s;57 ℃退火 40 s;72 ℃延伸 2 min,35 次循环;最后 72 ℃延伸 10 min。反应体系参见文献^[5]。取 5 μL 产物在 1.5% 的琼脂糖凝胶中电泳(电压 5 V $\cdot\text{cm}^{-1}$),在紫外透射仪下检测并照相。PCR 产物送上海生工生物工程技术有限公司测序,将得到的序列在 GenBank 中进行对比,通过同源性分析对病原菌进行分子水平鉴定^[8]。结合病原菌的形态观察及致病性测定,最终确定达坂城地区蚕豆根腐病的病原菌。

表 1 达坂城蚕豆根腐病疑似病原菌的分离频次结果

地点	镰刀菌 R1/R3/R8	立枯丝核菌 R6/R7	细极交链孢霉 R2	粘帚霉 R5	弯孢菌 R4	R9	曲霉	青霉	分离总数
东沟乡	128	61	21	4	-	-	18	4	224
西沟乡	8	10	5	-	2	-	9	-	42
阿克苏乡	42	31	11	23	-	-	2	5	119
高厓子乡	77	16	2	12	-	13	7	4	197
合计	255	118	39	39	2	13	29	13	582

注:R9 为子囊菌门未知菌种;“-”表示未分离。

2.4 疑似病原菌 R1 和 R3 的回接发病症状及形态学描述

回接试验表明,R1 和 R3 均为致病菌,且引起的症状相似。发病特点:根部感病后,首先从根

1.2.5 病原菌的同源性比对方法 将测得的序列通过 NCBI(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)进行 Blast 检索,并下载相关序列,利用 DNASTar 分析软件,对测序的结果及相关引用序列进行对比分析^[9],利用软件中的 Meg Align- Clustal V 模型进行同源性分析,比对后进行手工校正。构建系统发育树。

2 结果与分析

2.1 病害症状描述及疑似病原菌分离鉴定

由图 1 可知,病害发生在蚕豆根部和茎基部,根部发病,维管束变黑腐烂,侧根死亡,主根炭化,叶片、豆荚上出现黑色斑块,植株上部枯萎。茎部发病,黑色病斑常绕茎一周。取发病部位经 PDA 培养基培养纯化后共获得 9 个疑似病原菌,编号 R1~R9。

2.2 疑似病原菌分离频次

从达坂城 4 个乡采集的 582 份病残体样本,经病原菌初步分离发现镰刀菌、丝核菌、交链孢 3 种病原菌占分离频次总数的 70.79%,其中镰刀菌分离率为 43.81%,丝核菌分离率为 20.27%,交链孢的分离率为 6.70%;粘帚霉、弯孢菌、青霉、曲霉等真菌的占总分离率的 29.21%,其中粘帚霉分离率为 6.70%,其他真菌的分离率均在 5% 以下(表 1)。

2.3 疑似病原菌的回接试验结果分析

根据依据科赫法则,对上述分离得到的 8 个疑似病原菌进行致病力测定。结果表明,R4、R5、R9、曲霉、青霉接种后未致病。R1、R2、R3、R6、R7、R8 对蚕豆具有致病性,通过对接种植株的再分离、培养性状观察和病原形态镜检表明,再分离获得的病原菌与接种病原菌完全一致,对照植株未发病。据此,证实 R1、R2、R3、R6、R7、R8 为致病菌。

尖开始变色,进而主根下半部出现褐色条斑,病斑多不凹陷,以后逐渐扩大,表皮及皮层变黑坏死,叶片由下而上逐渐变黄,植株矮化,但病程进展比较缓慢,严重时可造成整株死亡(图 2)。

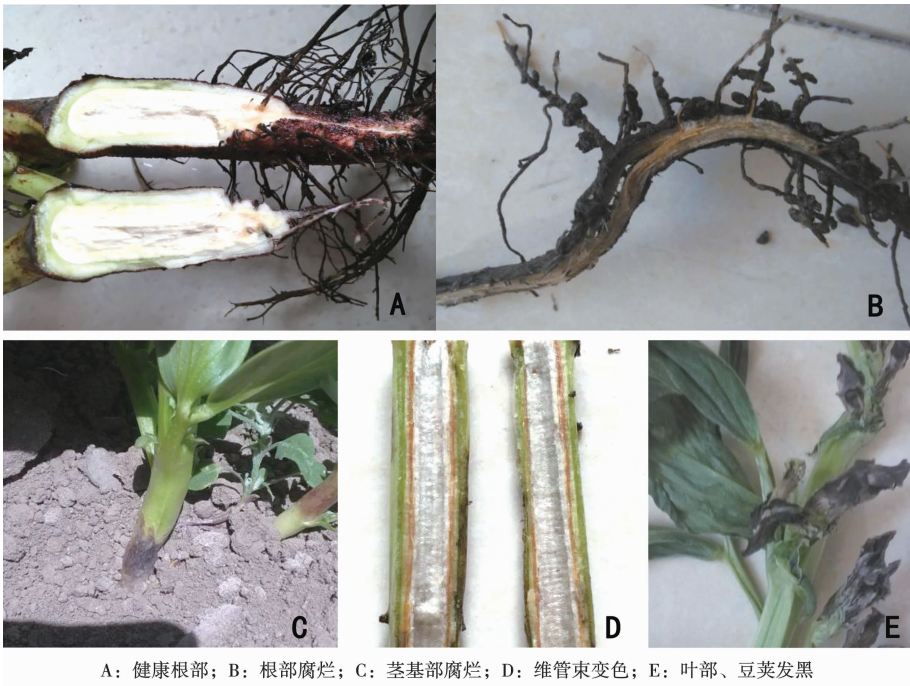


图 1 蚕豆根腐病病害症状



图 2 病原菌 R1 和 R3 菌株的致病性鉴定

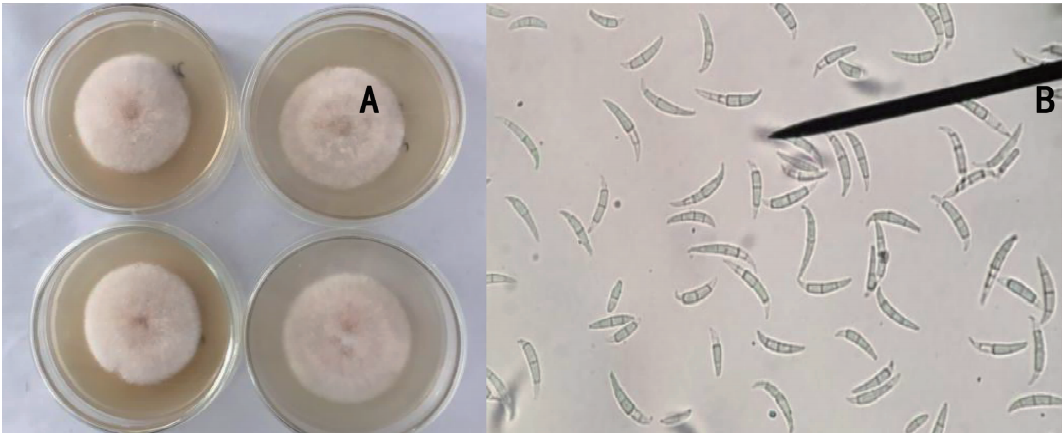
形态学描述:由图 3 可知,R1 和 R3 病原菌的菌落生长快,在 PDA 平板上 25 ℃培养 3 d 的直径为52~57 mm,菌落圆形,绒毛状,初生菌丝奶白色,后略带黄色,有的逐渐转为紫色或淡蓝色,培养基背面由内向外呈黄棕色至淡黄色,小型分生孢子少,纺锤形或哑铃形,0~1 隔,菌丝平铺成厚密,白至灰白,有隔,并有分枝,气生菌丝绒毛状,培养基不变色。大型分生孢子镰刀形,弯曲,细胞壁薄,向两端比较均匀地逐渐收缩变尖,基部足胞明显,一般 2~4 隔,多数 3 隔。厚垣孢子圆形,间生或串生产孢细胞^[4],根据形态特征初步鉴定该菌株为 *Fusarium incarnatum* (半裸镰刀菌)^[10-11]。

2.5 疑似病原菌 R8 的回接发病症状及形态学描述

回接试验表明 R8 为致病菌。发病特点:主

要侵染根部,并向上发展。发病初期根部产生水渍状褐色坏死斑,严重时整个根内部腐烂,仅残留纤维状维管束,病部黑褐色或红褐色。发病速度快(图 4)。

形态学描述:由图 5 可知,R8 病原菌的菌落平铺,气生菌丝羊绒状,白色至浅灰,大多数菌株呈奶油色,中央有土黄色粘孢团。PDA 上培养 3 d,菌落直径为 37~48 mm。大型分生孢子马特型,即大型分生孢子最宽处在孢子中线上部,两端较钝,顶细胞稍弯,基细胞钝圆形或足跟不明显,多数分隔 3~5,整个孢子形态较短较胖^[12]。小型分生孢子椭圆形、卵形或肾形,比较宽,分隔,多为 1 隔。根据形态特征初步鉴定该菌株为 *Fusarium solani* (腐皮镰刀菌)^[10-11]。

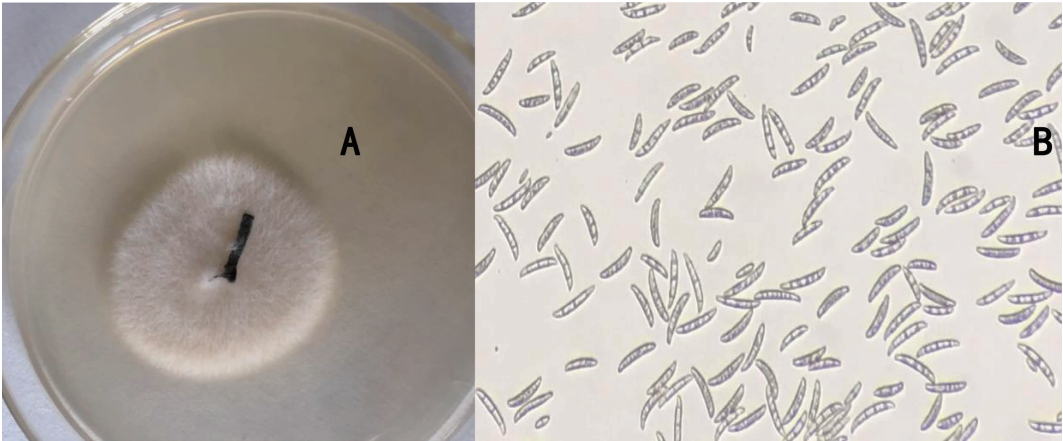


A: R1、R3菌落形态; B: R1、R3孢子形态

图 3 病原菌 R1 和 R3 的形态特征



图 4 病原菌 R8 菌株的致病性鉴定



A: R8菌落形态; B: R8孢子形态

图 5 病原菌 R8 的形态特征

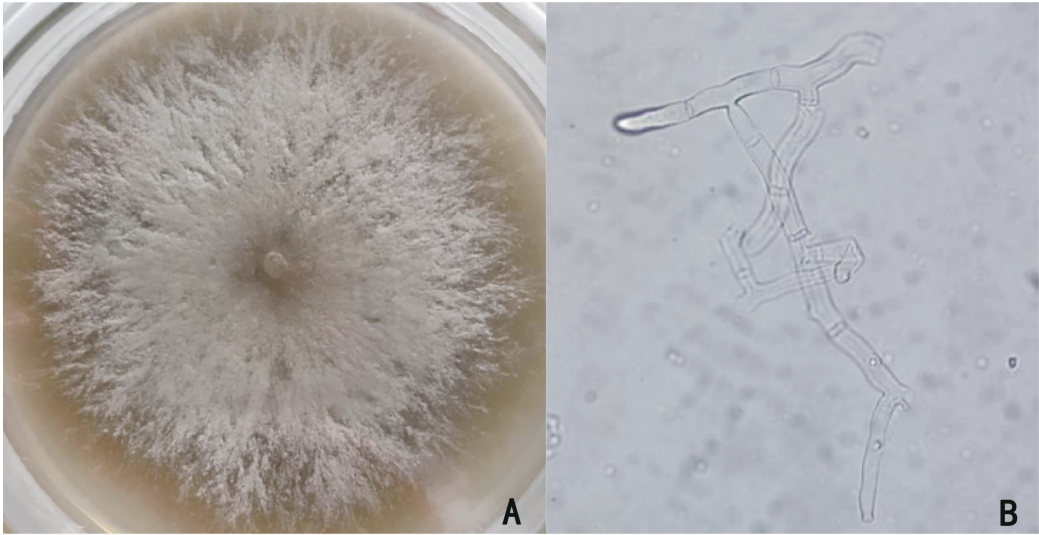
2.6 疑似病原菌 R6 和 R7 的回接发病症状及形态学描述

回接试验表明,R6、R7 是致病菌,且引起的症状相似。发病特点:接种 R6、R7 后,植株从茎基部开始发病,出现黑褐色、不规则形的凹陷病斑,并向地下根部延伸,导致近地表处缢缩或断

裂(图 6)。形态学描述:由图 7 可知,R6、R7 病原菌的菌丝分枝处缢缩;分枝菌丝在离起源处不远有隔膜;菌丝分支呈直角或者锐角;无性阶段不形成产生孢子;形成内外结构一致的菌核,菌丝从菌核四周长出^[13]。根据形态特征初步鉴定该菌株为 *Rhizoctonia solani*(立枯丝核菌)^[10-11]。



图 6 病原菌 R6 和 R7 菌株的致病性鉴定



A: R6、R7菌落形态; B: R6、R7菌丝形态

图 7 病原菌 R6 和 R7 的形态特征

2.7 疑似病原菌 R2 的回接发病症状及形态学描述

回接试验表明,R2 是致病菌。发病特点:接种 R2 的植株根部有黑褐色条斑,根系颜色逐渐变深。叶片发黄,叶缘变黑。严重的植株根部腐烂,整株颜色变黑萎蔫,是叶片和豆荚变黑的主要原因(图 8)。

形态学描述:由图 9 可知,在 PDA 平板上,25 ℃培养 3 d,R2 病原菌的菌落直径 4.6 cm,菌落圆形,中央厚,外围薄,青褐色,较厚,气生菌丝绒毛状,致密,背面中央灰黑色,外围灰白色。分生孢子单生,阔倒棒状或近椭圆形,黄褐色,具横隔 4~8 个,纵、斜隔 1~3 个;产生不分枝的长链,及其分生孢子中间 1~2 个横隔膜增厚^[14-15]。根据

形态特征初步鉴定该菌株为 *Alternaria tenuissima* (细极交链孢霉)^[10-11]。

2.8 病原菌菌株的分子生物学鉴定

用真菌通用引物 ITS1/ITS4 对病原菌菌株 R1、R2、R6、R8 rDNA 的 ITS 区进行扩增,得到大约 550~750 bp 的 DNA 片段,将扩增的 PCR 产物进行测序,通过 BLAST 进行比对和同源性分析(图 10~12)(附图 1~4 详见文章 OSID 码)。

R1 和 R3 同源性为 100%,可确定为同一种病原菌。其与 *Fusarium incarnatum* (半裸镰刀菌)、*Fusarium equiseti* (木贼镰刀菌)、*Fusarium chlamydosporum* (厚垣镰孢菌)同源性分别为 98.6%、99.0%、99.6%。结合形态学特征和致病性,鉴定 R1、R3 为 *Fusarium incarnatum* (半裸镰刀菌)。



图 8 病原菌 R2 菌株的致病性鉴定



A: R2菌落形态; B: R2孢子形态

图 9 病原菌 R2 的形态特征

R2 与 *Alternaria tenuissima* (细极交链孢霉)、*Alternaria alternata* (细交链孢霉) 同源性分别为 99.1%、98.9%。结合形态学特征, 鉴定 R2 为 *Alternaria tenuissima* (细极交链孢霉)。

R6 与 R7 同源性为 100%, 可确定为同一种病原菌, 其与 *Rhizoctonia solani* (立枯丝核菌) 同源性均为 99.9%。结合形态学特征, 鉴定 R6、R7 为 *Rhizoctonia solani* (立枯丝核菌)。

R8 与 *Fusarium solani* (腐皮镰刀菌) 同源性为 100%。结合形态学特征, 鉴定 R8 为 *Fusarium solani* (腐皮镰刀菌)。

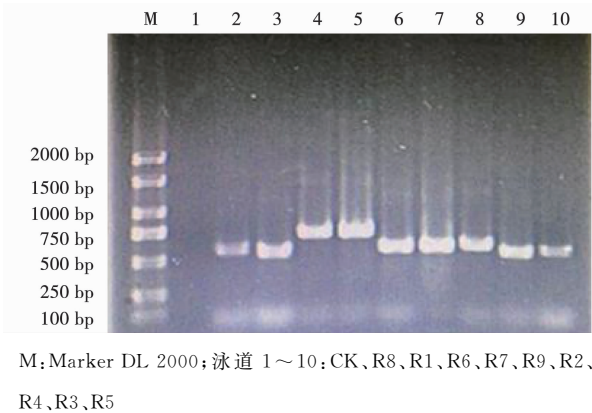


图 10 蚕豆根腐病病原菌菌株 rDNA-ITS 区段 PCR 扩增凝胶电泳图

表 2 引用 mtDNA COI 基因片段在 GenBank 中的登录号及其作用

真菌名称	基因片段登录号	中文名称	主要作用
<i>Alternaria alternata</i>	KT366738.1	细交链孢霉	柑橘褐斑病等
<i>Alternaria tenuissima</i>	JX867218.1	细极交链孢霉	小麦黑胚病等
<i>Cladosporium oxysporum</i>	JN887339.1	尖孢支孢霉	辣椒叶斑病等
<i>Clonostachys rosea</i>	FJ025201.1	粉红粘帚霉	生物防治菌等
<i>Curvularia lunata</i>	KY404178.1	新月弯孢霉	玉米黄斑病等
<i>Fusarium chlamydosporum</i>	KT634074.1	厚垣镰孢菌	山药根腐病等
<i>Fusarium equiseti</i>	KY426410.1	木贼镰刀菌	水稻立枯病等
<i>Fusarium incarnatum</i>	KT587650.1	半裸镰刀菌	白术根茎腐烂病等
<i>Fusarium solani</i>	KJ847740.1	腐皮镰刀菌	大豆根茎腐病等
<i>Rhizoctonia solani</i>	FR846465.1	立枯丝核菌	根腐、枯萎病等

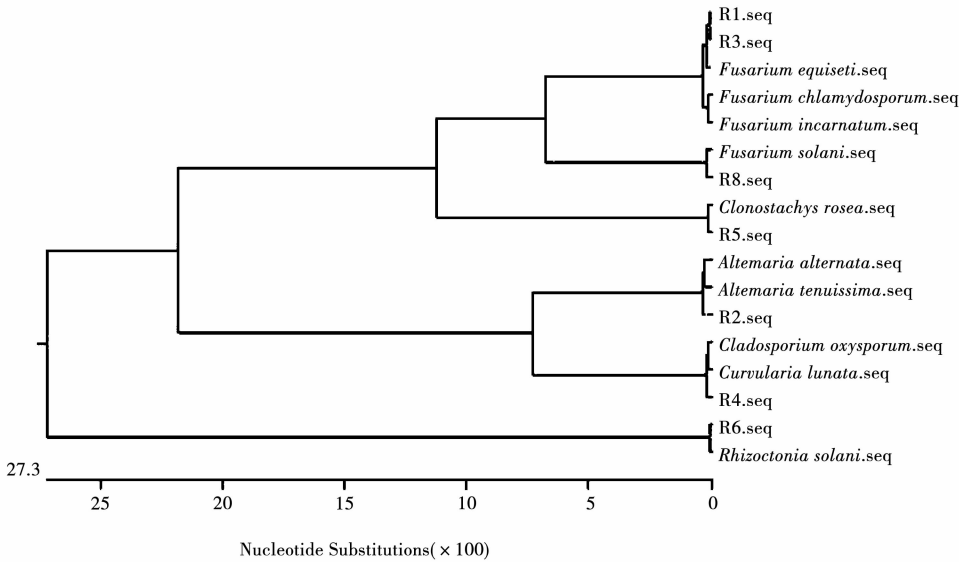


图 11 蚕豆根腐病不同病原菌系统聚类树

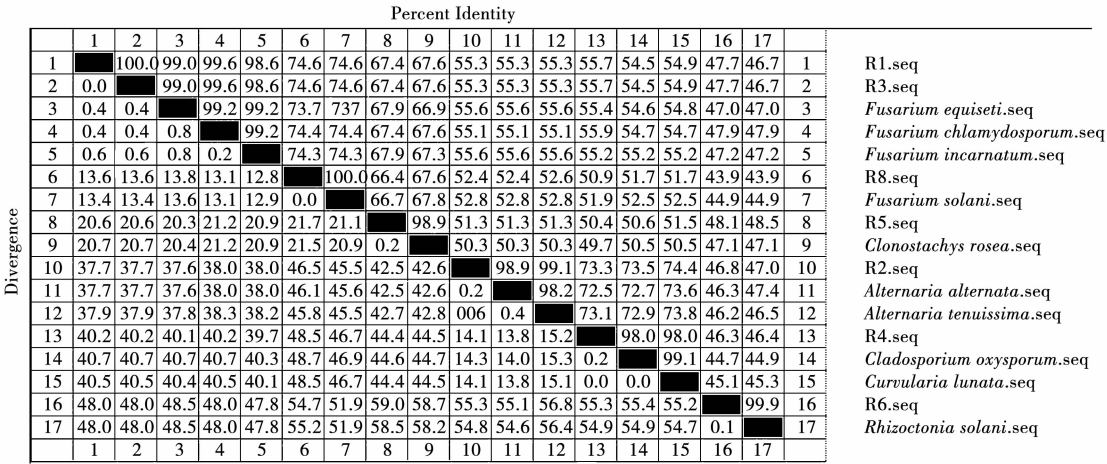


图 12 蚕豆根腐病不同病原菌 mtDNA COI 基因 550 bp 片段序列的同源性比较

3 结论与讨论

通过对达坂城地区蚕豆根腐病主要致病性病原菌的多次分离、纯化、鉴定和统计,初步查明了该地区的蚕豆根腐病病原菌主要有腐皮镰刀菌、立枯丝核菌、半裸镰刀菌、细极交链孢,其中腐皮镰孢霉、立枯丝核菌、细极交链孢均具有强致病性。镰孢霉所占的比例最大,造成蚕豆根部腐烂、炭化。立枯丝核菌是造成茎基腐的主要原因。而细极交链孢则造成叶部、根部发黑的重要原因。粉红粘帚霉接种后并未致病。确定蚕豆根腐病是多种病原菌的复合侵染。因此,在防治过程中单纯的使用一种药剂或使用一种方法是不行的。在此基础上,提出蚕豆根腐病的综合防控策略:(1)轮作倒茬,前茬为非豆科作物;(2)种子消毒,可采用温汤浸种配合药剂拌种。种皮带菌除了造成苗期病害以外,也可潜伏在花期发病,形成病害流行中心;(3)改良土壤菌落结构,增加土壤中有益菌数量,通过营养竞争抑制有害菌的生长;(4)通过覆膜,促进蚕豆早熟,避开高温天气,避免病害流行;(5)沟灌代替大水漫灌,较少积水;(6)机器点播,留出行距,减少播种量,促进生长,提高抗病性。

参考文献:

[1] 燕翀.小扁豆根腐病菌的分离与鉴定及对紫花苜蓿、红豆草

和沙打旺的致病性研究[D].兰州:兰州大学,2013.

- [2] 丁浩,张帆,曹研,等.马铃薯葡萄糖培养基制作方法的改进[J].中国酿造,2012(4):141-144.
- [3] 张立微,张景涛,李小梅.芜荑软腐病病原菌分离与鉴定[J].黑龙江农业科学,2015(6):48-51.
- [4] 李本金,陈庆河,兰成忠,等.福建省大豆根腐病病原菌的鉴定[J].福建农业学报,2011(5):798-803.
- [5] 齐永志,张小凤,王文桥,等.河北省辣椒主要土传病原菌种类及病害防治[J].河北农业科学,2010(4):57-59.
- [6] 张振粉.紫花苜蓿种带细菌及其致病性[D].兰州:兰州大学,2013.
- [7] 郭洪参,张悦丽,齐军山,等.山东花生茎腐病病原菌研究[J].中国油料作物学报,2014(4):524-528.
- [8] 曹星星.铁皮石斛病原真菌分离与鉴定及印度梨形孢促生作用研究[D].杭州:浙江大学,2015.
- [9] 车建美,刘波,阮传清,等.莲雾黑腐病病原菌的鉴定及其生物学特性研究[J].福建农业学报,2014(6):580-585.
- [10] 魏景超.真菌鉴定手册[M].上海:上海科学技术出版社,1979.
- [11] BOOTH C.镰刀菌属[M].北京:农业出版社,1998.
- [12] 李新风.山西镰刀菌种类鉴定及遗传多样性分析研究[D].晋中:山西农业大学,2013.
- [13] 陶萌.土壤中粉红粘帚霉 67-1 荧光定量 PCR 监测体系的建立及应用[D].北京:中国农业科学院,2008.
- [14] 孙霞.链格孢属真菌现代分类方法研究[D].泰安:山东农业大学,2006.
- [15] 任守才.中国华南及云南热带、亚热带地区枯枝暗色丝孢真菌分类研究[D].泰安:山东农业大学,2012.

Isolation and Identification of Several Broad Bean Root Rot Pathogens

DUAN Xiao-dong

(Urumqi Agricultural Technology Extension Center, Urumqi 830011, China)

Abstract: In order to identify the pathogen species of broad bean root rot in Dabancheng District of Urumqi City, and to carry out targeted control, this study collected pathogen samples from several broad bean producing areas in Dabancheng District of Urumqi City, and then separated and purified them, compared the disease symptoms, and combined with morphological and molecular biological identification technology to clarify the classification status of pathogens. The results showed that 8 strains were obtained after isolation and purification of pathogenic bacteria. Through the observation of colony structure and mycelium morphology of pathogenic bacteria and molecular biological methods, it was confirmed that *Fusarium solani*, *Fusarium incarnatum*, *Rhizoctonia solani* and *Alternaria tenuissima* were the pathogenic bacteria of broad bean root rot. Faba bean root rot in Dabancheng district is a complex infection of many pathogens. Therefore, comprehensive control measures should be taken in Dabancheng District, including crop rotation, seed disinfection, soil colony structure improvement, film mulching, furrow irrigation, machine on demand and so on.

Keywords: root rot of broad bean; pathogenic bacteria; morphological identification; molecular biology assay