

2 种忍冬致病镰刀菌的生物学特性研究

毕淑娟^{1,2}, 刘玉霞², 王 飞², 刘红彦^{1,2*}, 董诚明¹

(1. 河南中医学院, 河南 郑州 450008; 2. 河南省农业科学院 植物保护研究所, 河南 郑州 450002)

摘要: 为了明确忍冬根腐病的发生规律, 以从忍冬根腐病株病根分离到的 2 种致病镰刀菌菌株 FQ3(*Fusarium solani* species complex)、FQ4(*Fusarium incarnatum-equiseti* species complex)为研究对象, 考察了其生物学特性。结果表明, 菌株 FQ3 最适生长温度为 30 ℃, 最适产孢温度为 35 ℃, 最适生长 pH 值为 9, 最适产孢 pH 值为 7~10, 全黑暗条件最有利于菌丝生长和产孢, 生长最适碳、氮源分别为乳糖和甘氨酸, 产孢最适碳、氮源分别为葡萄糖和硝酸钠; 菌株 FQ4 最适生长温度为 25~30 ℃, 最适产孢温度为 30 ℃, 最适生长 pH 值为 7~10, 最适产孢 pH 值为 9, 半光照条件有利于其生长和产孢, 生长最适碳、氮源分别为蔗糖和酵母, 产孢最适碳氮源分别为果糖和酵母。除温度处理外, 菌株 FQ3 在所有参试条件下, 菌丝生长速度及产孢量均明显高于菌株 FQ4。

关键词: 忍冬; 根腐病; 致病镰刀菌; 生物学特性

中图分类号: S435.671 文献标志码: A 文章编号: 1004-3268(2012)06-0115-04

Biological Characteristics of Two Pathogenic *Fusarium* Species from Honeysuckle

BI Shu-juan^{1,2}, LIU Yu-xia², WANG Fei², LIU Hong-yan^{1,2*}, DONG Cheng-ming¹

(1. Henan University of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450008, China;

2. Institute of Plant Protection, Henan Academy of Agricultural Sciences, Zhengzhou 450002, China)

Abstract: In order to master the occurrence law of honeysuckle root rot, the biological characteristics of two pathogenic *Fusarium* species, FQ3(*Fusarium solani* species complex) and FQ4(*Fusarium incarnatum-equiseti* species complex), isolated from honeysuckle rotten roots were studied. The results showed that for FQ3, the optimum temperatures were 30 ℃ for growth and 35 ℃ for sporulation, the optimum pH was 9 for growth and 7-10 for sporulation, consistent darkness promoted the mycelial growth and sporulation, the optimum carbon and nitrogen sources were respectively lactose and glycine for growth, and glucose and sodium nitrate for sporulation; For FQ4, the optimum temperatures were 25-30 ℃ for growth and 30 ℃ for sporulation, the optimum pH was 7-10 for growth and 9 for sporulation, semi-dark and semi-light condition promoted the mycelial growth and sporulation, the optimum carbon and nitrogen sources were respectively sucrose and yeast for growth, and fructose and yeast for sporulation. The isolate FQ3 grew and sporulated obviously better than FQ4 under all tested conditions except the temperature treatment.

Key words: honeysuckle; root rot; pathogenic *Fusarium* species; biological characteristics

金银花为忍冬科植物忍冬(*Lonicera japonica* Thumb.)的干燥花蕾或带初开的花^[1], 是我国常用

中药材, 具有很高的药用价值和经济价值。忍冬在全国广泛种植, 其中以河南新密、封丘及山东平邑等

收稿日期: 2012-01-25

基金项目: 河南省重点科技攻关计划项目(092102310020)

作者简介: 毕淑娟(1986-), 女, 河南新乡人, 在读硕士研究生, 研究方向: 中药材品质评价及病害鉴定。

E-mail: shujuanbi@163.com

* 通讯作者: 刘红彦(1964-), 男, 河南嵩县人, 研究员, 博士, 主要从事植物病理学研究。E-mail: liuhy1219@163.com

地区为道地产区。在这些地区,金银花相关产业收入在总体经济收入中占有较大比重。近年来,随着市场需求的增加,忍冬的种植面积逐年扩大,但与此同时,忍冬病虫害发生也日趋频繁和严重,成为生产上不可忽视的问题^[2-3]。特别是在河南省封丘、新密等忍冬老产区,忍冬叶枯和根腐现象比较普遍,并蔓延到新产区,严重威胁植株生长及药材产量。刘鸣韬等^[4]曾调查了河南省封丘县忍冬的根腐现象,认为尖孢镰刀菌(*Fusarium oxysporum*)可以导致忍冬根腐病,并对该病原菌进行了生物学特性描述。笔者在前期研究中发现,从发病忍冬根部组织分离出的 2 种镰刀菌可导致忍冬出现枯萎症状(另文发表),为此,对这 2 种镰刀菌的生物学特性进行了研究,以期探明影响病原菌生长的各种因素,为田间病害防治技术研究奠定基础。

1 材料和方法

1.1 菌种来源

从河南省封丘县采集表现枯萎症状的忍冬病株根部组织,采用组织分离法分离、纯化得到 2 个菌株,依据柯赫法则回接证明其致病,分别命名为 FQ3、FQ4。通过形态学鉴定、rDNA-ITS 序列分析及 EF-1 α 基因部分序列分析,将菌株 FQ3 鉴定为 *Fusarium solani* species complex,将菌株 FQ4 鉴定为 *Fusarium incarnatum-equiseti* species complex。将菌株 4℃ 保存于 PDA 斜面,试验前扩繁备用。

1.2 温度对镰刀菌生长及产孢的影响

于菌落边缘取直径 0.8 cm 的菌饼接于 PDA 平板中央,分别置于 4、10、15、20、25、30、35、40℃ 等 8 个不同温度条件下培养。每处理重复 5 次,6 d 后测定菌落直径及产孢量。

1.3 pH 值对镰刀菌生长及产孢的影响

将灭菌 PDA 培养基用 1 mol/L NaOH 和 1 mol/L HCl 分别调 pH 值至 4、5、6、7、8、9、10、11,倒平板。于菌落边缘取直径 0.8 cm 的菌饼接于平板中央,28℃ 下培养。每处理重复 5 次,5 d 后测定菌落直径及产孢量。

1.4 光照对镰刀菌生长及产孢的影响

于菌落边缘取直径 0.8 cm 的菌饼接于 PDA 平板中央,在 28℃ 条件下分别进行全光照、12 h 明暗交替、全黑暗 3 个不同光照条件下培养。每处理重复 5 次,5 d 后测定菌落直径及产孢量。

1.5 碳氮源对镰刀菌生长和产孢的影响

1.5.1 碳源对镰刀菌生长及产孢的影响

培养基(硝酸钠 2 g,磷酸氢二钾 1 g,氯化钾 0.5 g,硫酸镁 0.5 g,硫酸亚铁 0.01 g,蔗糖 30 g,琼脂 15 g,水 1 000 mL)为基础培养基^[5],分别以含有等量碳的葡萄糖、果糖、淀粉、麦芽糖、山梨醇、乳糖等 6 种碳源替换其中的蔗糖,以不含碳源培养基为对照,制成不同碳源培养基。于菌落边缘取直径 0.8 cm 的菌饼接于平板中央,28℃ 下培养。每处理重复 5 次,6 d 后测定菌落直径及产孢量。

1.5.2 氮源对镰刀菌生长及产孢的影响 以查氏培养基为基础培养基,另以含有等量氮的硫酸铵、甘氨酸、 β -丙氨酸、酵母、蛋白胨、尿素等 6 种氮源代替其中的硝酸钠,以不含氮源培养基为对照,制成不同氮源培养基。于菌落边缘取直径 0.8 cm 的菌饼接于平板中央,28℃ 下培养。每处理重复 5 次,6 d 后测量菌落直径及产孢量。

2 结果与分析

2.1 温度对镰刀菌生长及产孢的影响

2 种镰刀菌在不同温度条件下培养 6 d 后的菌落直径和产孢量分别见图 1、图 2。从图 1 可以看出,不同温度条件下,2 种镰刀菌的生长变化趋势相似。菌株 FQ3 在 15~35℃ 内能够生长,最适生长温度为 30℃,10℃ 以下及 40℃ 时不能生长;菌株 FQ4 在 15~30℃ 范围内能够生长,最适生长温度为 25~30℃,在 10℃ 以下及 35℃ 以上不能生长。在最适生长温度下,菌株 FQ3 平均日生长 1.80 cm,显著高于菌株 FQ4(0.48 cm)。

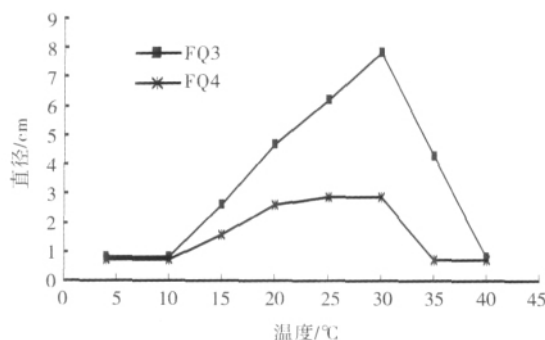


图 1 温度对 2 种镰刀菌生长的影响

由图 2 可以看出,2 种镰刀菌在 4~40℃ 范围内均可产孢,产孢量呈现先升高后降低的趋势。菌株 FQ3 在 15~35℃ 内产孢量较大,最适产孢温度为 35℃;菌株 FQ4 在 15~30℃ 内产孢量较大,最适产孢温度为 30℃。在最适产孢温度下,菌株 FQ3 的产孢量为 4.37×10^7 个/皿,与 FQ4(5.41×10^7 个/皿)相近。

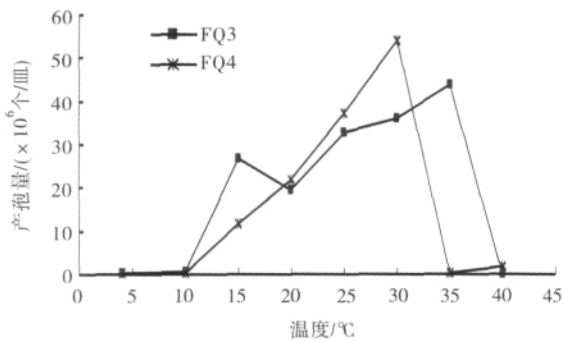


图 2 温度对 2 种镰刀菌产孢量的影响

2.2 pH 值对镰刀菌生长及产孢的影响

2 种镰刀菌在不同 pH 值条件下培养 5 d 后的菌落直径和产孢量分别见图 3、图 4。由图 3 可以看出,两菌株在 pH 值为 4~11 范围内均可生长。对于菌株 FQ3,其生长情况随 pH 值不同而呈现锯齿状波动,最适生长 pH 值为 9,其次为 5 和 10, pH 值为 4 时生长情况最差;菌株 FQ4 的生长随 pH 值变化波动幅度较小, pH 值 5~10 时均适宜菌丝生长, pH 值为 4 时生长情况最差。在最适生长 pH 值条件下,菌株 FQ3 平均日生长 1.35 cm,明显快于菌株 FQ4(0.55 cm)。

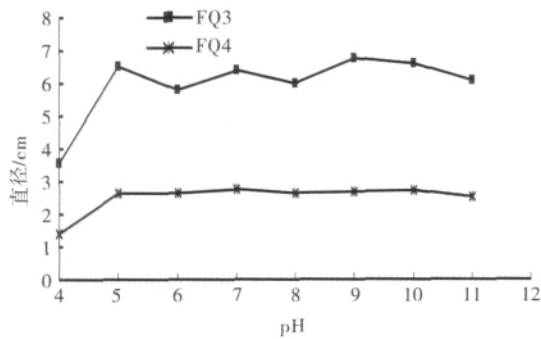


图 3 pH 值对 2 种镰刀菌生长的影响

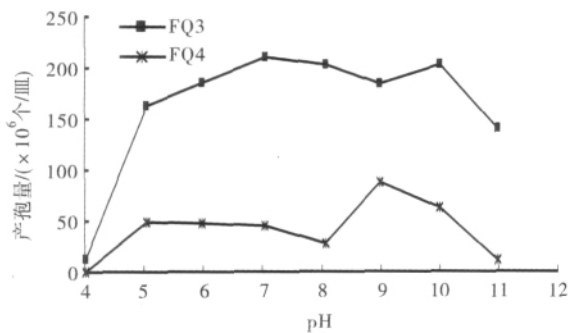


图 4 pH 值对 2 种镰刀菌产孢量的影响

由图 4 可以看出,2 种镰刀菌的产孢量随 pH 值增大呈现出相似的“升—降—升—降”变化趋势。菌株 FQ3 在 pH 值为 4~11 范围内均可产孢,当 pH 值为 7 和 10 时,产孢量呈现 2 个峰点, pH 值为 8 时产孢量也较大;菌株 FQ4 在 pH 值为 5~11 范围内可产

孢,当 pH 值为 9 时产孢量最大, pH 值为 10 时的产孢量次之。强酸及强碱条件对两菌株产孢不利。在最适产孢 pH 条件下,菌株 FQ3 产孢量达 2.10×10^8 个/皿,显著高于菌株 FQ4(6.23×10^7 个/皿)。

2.3 光照对镰刀菌生长及产孢的影响

试验结果表明,菌株 FQ3 在全黑暗条件下生长 5 d,直径可达 7.04 cm,与全光照和半光照条件下的生长速度有极显著差异,此条件下菌株的产孢量亦高于其他两处理。故对于 FQ3,全黑暗条件最有利于其菌丝生长和产孢。对于菌株 FQ4,半光照条件有利于菌丝生长,且在该条件下,产孢量达 3.98×10^7 个/皿,显著高于其他两处理,故半光照条件最有利于其生长和产孢。无论在何种光照条件下,菌株 FQ3 的生长速度和产孢量均高于菌株 FQ4。

表 1 不同光照处理对 2 种镰刀菌生长及产孢的影响

| 处理 | 菌落直径/cm | | 产孢量/($\times 10^6$ 个/皿) | |
|-----|---------|---------|--------------------------|---------|
| | FQ3 | FQ4 | FQ3 | FQ4 |
| 全光照 | 5.49cC | 3.01aAB | 64.00abA | 17.90cC |
| 半光照 | 6.13bB | 3.06aA | 62.00bA | 39.80aA |
| 全黑暗 | 7.04aA | 2.90bB | 74.00aA | 26.90bB |

注:同列数据后标注的大写字母表示 $P_{0.01}$ 水平上的显著性,小写字母表示 $P_{0.05}$ 水平上的显著性,下同。

2.4 碳、氮源对镰刀菌生长及产孢的影响

2 种镰刀菌在不同碳氮源条件下培养 6 d 后的菌落直径和产孢量见表 2、表 3。从表 2 可以看出,2 种镰刀菌在不同碳源培养基上生长及产孢情况差异明显。对于菌株 FQ3,其最适生长碳源为乳糖,6 d 菌落生长直径达 7.53 cm;最适产孢碳源为葡萄糖,菌株产孢量可达 1.43×10^8 个/皿,其在山梨醇为碳源的培养基上产孢量最低,仅为 1.71×10^7 个/皿。对于菌株 FQ4,其最适生长碳源为蔗糖,6 d 菌落生长直径为 2.53 cm,其次为山梨醇(2.34 cm),对乳糖利用最差,6 d 菌落生长直径仅为 2.00 cm。产孢量考察结果显示,FQ4 最适产孢碳源为果糖,菌株产孢量可达 1.12×10^7 个/皿,其次为乳糖(2.87×10^6 个/皿),在其他碳源培养基上产孢量均较低。

表 2 不同碳源对 2 种镰刀菌生长及产孢的影响

| 处理 | 菌落直径/cm | | 产孢量/($\times 10^6$ 个/皿) | |
|-----|-----------|----------|--------------------------|---------|
| | FQ3 | FQ4 | FQ3 | FQ4 |
| CK | 6.68dC | 2.14CDcd | 2.00De | 0.13Cd |
| 蔗糖 | 7.27abcAB | 2.53Aa | 70.80Bb | 1.05Ccd |
| 葡萄糖 | 6.91cBC | 2.08CDde | 143.00Aa | 1.40Cc |
| 果糖 | 7.17abcAB | 2.08CDde | 39.60Cc | 11.20Aa |
| 淀粉 | 7.01bcAB | 2.05CDde | 47.30Cc | 0.27Cd |
| 麦芽糖 | 7.39abAB | 2.23BCbc | 80.70Bb | 0.45Ccd |
| 山梨醇 | 6.83cBC | 2.34Bb | 17.10Dd | 0.37Ccd |
| 乳糖 | 7.53aA | 2.00De | 39.30Cc | 2.87Bb |

由表 3 可以看出,2 种镰刀菌在不同氮源培养基上生长及产孢情况差异也很明显。对于菌株 FQ3,其最适生长氮源为甘氨酸,6 d 菌落生长直径为 7.45 cm,最适产孢氮源为硝酸钠,菌株产孢量达 2.55×10^8 个/皿;对于菌株 FQ4,其最适生长及产孢氮源均为酵母,6 d 菌落生长直径及菌株产孢量分别为 2.96 cm 和 1.41×10^7 个/皿。两菌株在硫酸铵为氮源的培养基上菌落直径及产孢量均较低。

2 种镰刀菌在不含碳氮源的对照培养基上均能生长,但是培养基表面菌丝极稀薄,近透明,产孢量也极少。无论在何种碳、氮源处理条件下,菌株 FQ3 生长速度和产孢量均高于菌株 FQ4。

表 3 不同氮源对 2 种镰刀菌生长及产孢的影响

| 处理 | 菌落直径/cm | | 产孢量/($\times 10^6$ 个/皿) | |
|--------------|----------|---------|--------------------------|---------|
| | FQ3 | FQ4 | FQ3 | FQ4 |
| CK | 7.63Aa | 2.72Bb | 1.30De | 0.13Cc |
| 硝酸钠 | 7.09ABbc | 2.38Cc | 255.00Aa | 0.25Cc |
| 硫酸铵 | 3.04Cd | 1.58Ee | 1.80De | 0.33Cc |
| 甘氨酸 | 7.45Aab | 2.30CDc | 53.50Dd | 0.90Cc |
| β -丙氨酸 | 7.18ABab | 2.12Dd | 128.00Cc | 1.18Cc |
| 酵母 | 6.98ABbc | 2.96Aa | 173.00BCb | 14.10Aa |
| 蛋白胨 | 7.08ABbc | 2.44Cc | 194.00Bb | 4.52Bb |
| 尿素 | 6.62Bc | 2.37Cc | 165.00BCbc | 0.77Cc |

3 结论与讨论

本研究对从忍冬根腐病株根部组织上分离出的 2 种致病镰刀菌 FQ3、FQ4 进行了生物学特性考察。2 种菌株随温度变化,菌丝生长变化趋势及产孢量变化趋势相似,其最适菌丝生长温度相近,但相对于 FQ4,FQ3 的最适产孢温度较高,达 35℃;pH 值对两菌株的影响相似,pH 值为 7~10 时均适宜于菌丝生长,偏碱性环境最适宜于产孢;光照条件对 2 种病原菌生长及产孢影响不同,全黑暗条件最有利于菌株 FQ3 生长和产孢,而半光照条件最有利于菌株 FQ4 生长和产孢。

2 种病原菌对不同碳、氮源的利用情况差异较大。对于菌株 FQ3,其最适生长和产孢碳源分别为乳糖和葡萄糖,在山梨醇为碳源的培养基上生长和产孢状况最差;而对于菌株 FQ4,其最适生长及产孢碳源分别为蔗糖和果糖,以乳糖为碳源最不利于菌丝生长。在氮源利用上,菌株 FQ3 最适生长及产孢氮源分别为甘氨酸和硝酸钠;FQ4 最适生长和产孢氮源均为酵母。两菌株在硫酸铵为氮源的培养基上生长和产孢状况均较差。

镰刀菌是一类常见的土壤习居菌,兼寄生和腐生,其家族中的许多种能侵染多种植物根部,形成根腐和地上部枯萎症状,造成严重的经济损失。本研究比较了从忍冬根腐病株根部分离的 2 种镰刀菌的生物学特性,2 种镰刀菌均有很广的温度及 pH 值适应范围,说明其对环境适应性较强。通过对比分析还发现,在适宜的温度、pH 值、光照条件、碳氮源条件下,镰刀菌 FQ3 的菌丝生长速度和产孢量均明显高于 FQ4,其潜在的危害会更大。因此,需要进一步对这 2 种镰刀菌在田间的侵染情况和发生规律进行系统调查,为忍冬根腐病的准确预报和合理防治提供理论依据。

参考文献:

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典一部[M]. 北京:中国医药科技出版社,2010.
- [2] 任应党,刘玉霞,申效诚,等. 金银花主要害虫及防治[J]. 河南农业科学,2004(9):66-68.
- [3] 陈美兰,刘红彦,李琴,等. 白粉病发生程度对金银花药材中绿原酸含量的影响[J]. 中国中药杂志,2006,31(10):846-847.
- [4] 刘鸣韬,张定法,孙化田. 金银花根腐病初步研究[J]. 华北农学报,2004,19(1):109-111.
- [5] 方中达. 植病研究方法[M]. 3 版. 北京:中国农业出版社,1996:359-364.