

山西省蒙古黄芪根腐病优势致病菌群分析

高 芬^{1*} 赵晓霞¹ 秦雪梅^{2*} 雷振宏³

(1. 山西大学应用化学研究所, 太原 030006; 2. 山西大学中医药现代研究中心, 太原 030006;

3. 山西振东道地药材开发有限公司, 长治 047100)

摘要: 为明确山西省蒙古黄芪根腐病的优势致病菌群及其分布区域和症状差异性, 采用组织分离法分离获得致病菌, 按柯赫氏法则回接验证, 结合形态学特征与 *EF-1α* 基因分子鉴定结果明确其分类地位, 并分析不同地域和不同发病症状下致病菌的分离频率。结果表明, 引起山西省蒙古黄芪根腐病的致病菌包括锐顶镰刀菌 *Fusarium acuminatum*、腐皮镰刀菌 *F. solani*、尖孢镰刀菌 *F. oxysporum*、芬芳镰刀菌 *F. redolens*、链格孢菌 *Alternaria* sp. 以及 *Ilyonectria torresensis*, 其中锐顶镰刀菌和腐皮镰刀菌为优势致病菌, 平均分离频率为 53.83% 和 26.42%。不同地区根腐病的优势致病菌具有明显差异, 浑源县和应县为锐顶镰刀菌、腐皮镰刀菌, 分离频率分别是 42.86%、39.13% 和 62.50%、37.50%; 五寨县为锐顶镰刀菌和尖孢镰刀菌, 分离频率 56.14% 和 35.96%。根腐病的症状具有一定地域差异, 且引发不同症状的优势致病菌也不同, 总体上引起纤维状腐烂的优势致病菌为锐顶镰刀菌、腐皮镰刀菌和尖孢镰刀菌, 前二者平均分离频率分别为 63.37% 和 20.50%, 尖孢镰刀菌仅在五寨县检出, 分离频率为 21.98%; 引起侧根发黑的优势致病菌主要是锐顶镰刀菌和腐皮镰刀菌, 平均分离频率分别为 35.50% 和 21.65%, 但在浑源县未发现此类症状; 引起皱缩软根的优势致病菌在各地差异明显, 五寨县以尖孢镰刀菌最占优势, 分离频率为 43.48%, 浑源县为链格孢菌, 分离频率为 32.79%, 应县则是腐皮镰刀菌, 分离频率为 60.00%。

关键词: 蒙古黄芪; 根腐病; 优势致病菌群; 区域和症状差异

Analysis of dominant pathogen community causing *Astragalus membranaceus* var. *mongholicus* root rot in Shanxi Province

Gao Fen^{1*} Zhao Xiaoxia¹ Qin Xuemei^{2*} Lei Zhenhong³

(1. Institute of Applied Chemistry, Shanxi University, Taiyuan 030006, Shanxi Province, China; 2. Modern Research Center for Traditional Chinese Medicine, Shanxi University, Taiyuan 030006, Shanxi Province, China; 3. Shanxi Zhendong Geo-herbals Development Co. Ltd, Changzhi 047100, Shanxi Province, China)

Abstract: The study was designed to clarify the dominant pathogens that cause root rot disease of *Astragalus membranaceus* var. *mongholicus* and their distributive characteristics in different regions and symptoms in Shanxi Province. Pathogens were isolated from diseased root segments, their pathogenicity being tested applying Koch's postulates, and then identified with morphology and *EF-1α* sequences analysis. Follow-up analysis was made of the isolation frequency of the pathogens in terms of regions and symptoms. The result showed that a range of pathogens caused *A. membranaceus* var. *mongholicus* root rot in Shanxi Province, including *Fusarium acuminatum*, *F. solani*, *F. oxysporum*, *F. redolens*, *Alternaria* sp. and *Ilyonectria torresensis*, among which the dominant ones were *F. acuminatum* and *F. solani*, their average isolation frequency being 53.83% and 26.42% respectively. The composition and isolation frequen-

基金项目: 山西省科技攻关项目(2014ZD0501-2), 山西省重点研发计划(201603D3111001)

* 通信作者 (Authors for correspondence), E-mail: gaofen@sxu.edu.cn, qinxm@sxu.edu.cn, Tel: 0351-7018390

收稿日期: 2017-03-30

cy of dominant pathogen community showed regional differences: *F. acuminatum* and *F. solani* were dominant in both Hunyuan County and Ying County, their isolation frequency being 42.86%, 39.13% and 62.50%, 37.50% respectively; *F. acuminatum* and *F. oxysporum* were dominant in Wuzhai County, their isolation frequency being 56.14% and 35.96%. The symptoms of root rot had some regional differences and were caused by different dominant pathogens. On the whole, fibrous decay was caused mainly by *F. acuminatum*, *F. solani*, and *F. oxysporum*, the average isolation frequency of the first two being 63.37% and 20.50% respectively, while *F. oxysporum* was found only in Wuzhai County, its isolation frequency being 21.98%. The lateral root turning black was caused mainly by *F. acuminatum* and *F. solani*, their average isolation frequency being 35.50% and 21.65% respectively; but no such symptom was found in Hunyuan County. The root of shrinking and softening was caused principally by *F. oxysporum* in Wuzhai County, its isolation frequency being 43.48%; *Alternaria* sp. in Hunyuan County, its isolation frequency being 32.79%; and *F. solani* in Ying County, its isolation frequency being 60.0%.

Key words: *Astragalus membranaceus* var. *mongholicus*; root rot; dominant pathogen community; regional and symptomatic differences

黄芪是豆科黄芪属蒙古黄芪 *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bge. var. *mongholicus* (Bge.) Hsiao 或膜荚黄芪 *A. membranaceus* (Fisch.) Bge. 的干燥根,有补气固表、敛疮生肌等功效,是中医药学公认的一味大宗药材。根腐病是严重危害其生产的常发性土传病害,近几年随着黄芪种植面积的不断扩大,在全国各大主产区普遍发生。山西省作为蒙古黄芪主产区之一,根腐病的发生也呈逐年上升趋势。据调查,一般田块发病率为10%~30%,重者高达60%,3年或3年以上植株发病更严重(高芬等,2015),严重制约了当地黄芪产业的可持续发展。黄芪根腐病是多种病原菌复合侵染导致的病害,病原繁杂,症状多样,对其进行有针对性的防治非常困难。

镰刀菌属是引起黄芪根腐病的主要类群,其多个种均可侵染黄芪引起根腐病,然而由于地域环境、生态条件等的不同或变化,不同地区引发黄芪根腐病的致病菌群组成和优势致病菌存在差异。如甘肃省渭源县黄芪根腐病的优势致病菌为尖孢镰刀菌 *Fusarium oxysporum* 和腐皮镰刀菌 *F. solani* (陈垣等,2011),陇西县则为腐皮镰刀菌 *F. solani* 和尖孢镰刀菌(牛世全等,2016);内蒙古自治区以立枯丝核菌 *Rhizoctonia solani* 为主要致病菌,其次是尖孢镰刀菌和腐皮镰刀菌(邓成贵,2005)。中草药根腐病不仅病原繁多,而且不同病原引发的症状也多种多样,并且随发病时期和优势菌的变化,症状表现也不相同(高芬等,2015)。如引发三七根腐病的毁灭柱孢 *Cylindrocarpon destructans* 和人参柱孢 *C. dydimum* 可导致典型的黄腐;柱孢菌属真菌 *Cylindrocarpon* sp. 与一种病原细菌同时存在可导致急性青枯

型症状;草茎点霉 *Phoma herbarum* 和长棒孢菌属真菌 *Camposporium* sp. 则可分别引起茎基干枯型和块根湿腐型(缪作清等,2006)。西洋参根腐病的锈腐症状由柱孢菌属真菌引起,而黑腐由镰刀菌属真菌引起(毕武等,2011)。目前,山西省黄芪根腐病的优势致病菌尚不明确,且其区域分布及症状差异也未见报道。

明确引起植物病害的致病菌群,是进行有效防控、阻止其发生蔓延的最关键一环。本试验在分离获得黄芪根腐病致病菌的基础上,采用传统形态学和分子鉴定相结合的方法,明确其分类地位,并分析引发病害的优势致病菌群及其分布区域和症状差异性,以期对山西省黄芪根腐病的田间诊断、综合防控以及抗病育种提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

供试黄芪:一年生粗细均匀的健康黄芪根,于2015年7月采集自山西省浑源县黄芪种植基地。

培养基:马铃薯葡萄糖琼脂(potato dextrose agar, PDA)培养基:去皮马铃薯200 g、葡萄糖20 g、琼脂15~22 g、蒸馏水1 000 mL, pH 7.0。

试剂及仪器:DNA Marker、*Taq* PCR Master Mix 试剂盒,生工生物工程(上海)股份有限公司;其余试剂均为国产分析纯。Olympus-BX51 显微镜,日本 Olympus 公司;Centrifuge 5810R 台式离心机,德国 Eppendorf 公司;DYCP-31DN 型电泳仪,北京六一仪器厂;C1000 梯度 PCR 仪、Gel Doc™ XR+凝胶成像系统,美国 Bio-Rad 公司。

1.2 方法

1.2.1 发病情况调查及样品采集

分别于2013年和2014年的5—9月间,在山西省五寨、浑源和应县3个黄芪主产区进行黄芪根腐病调查和样品采集。每个县选取3个地块,每个地块面积约为1.50~2.67 hm²,每地块均以五点取样法调查发病率,并采集根腐病样本;每个取样点采集5株病样,并按照症状进行分类。样本置于无菌袋并放入便携式冰箱中带回,4℃保存备用。

1.2.2 病原菌的分离与回接验证

采用组织分离法进行病原菌分离(方中达,1998)。每株病样于病健交界处切取大小为5 mm×5 mm的组织块3个,每块分成对等的3份,在PDA平板上25℃培养3 d后,挑取菌落边缘菌丝继续培养;采用菌丝尖端纯化法(于晶等,2011)连续纯化3次后,转接于PDA斜面,4℃保存。同时,按菌落形态(圆形,边缘整齐;圆形至近圆形,边缘波纹状)、菌丝颜色(白色-乳白色、白色-粉色、白色-紫色、灰绿色-暗青褐色)、菌丝生长状态(棉絮状茂密突起、棉絮状疏松平铺、绒毛状致密平铺)、色素颜色(玫红色、蓝色或绿色、紫色、无色素)以及孢子形态,将菌株分成不同类群,同时记录不同年份、不同地区和不同症状下各类群菌株的数量,然后将各类群按照不同地区、不同采样地块分别选取1株代表性菌株进行致病性测定及鉴定。

选取的30株代表性菌株在PDA平板上25℃培养7 d后,制备直径5 mm的菌块。将健康黄芪根用清水洗干净后,70%酒精表面消毒,再用无菌水反复冲洗后,置于无菌培养皿中。根据柯赫氏法则,离体接种法回接验证,每段根用无菌针刺伤3处,贴上病原菌块,25℃条件下12 h/12 h光暗交替保湿培养,3 d和7 d后记录病斑大小和颜色。试验设3次重复,以PDA培养基为对照。发病后,对具有典型发病症状的黄芪根进行致病菌再分离,方法同上。

1.2.3 病原菌的鉴定

形态鉴定:将上述制备的病原菌于PDA平板上培养,逐日记录菌落形态和色素产生情况,待培养7~15 d孢子产生后,制备孢子悬浮液(30~40个/视野,10×15倍),采用盖玻片法(方中达,1998)观察大型分生孢子、小型分生孢子形态,共观察5~8个视野,并分别随机测量80~100个孢子。按Leslie分类系统(Leslie & Summerell, 2006),结合《常见镰刀菌鉴定指南》(王拱辰等,1996)及魏巍等(2013)、杨晓贺等(2011)的记载,进行形态学鉴定。

分子鉴定及系统发育分析:采用CTAB法提取病菌的基因组DNA(张德珍等,2016),以EF1H(5'-ATGGGTAAGGAAGACAAGAC-3')和EF2T(5'-GG-AAGTACCAGTGATCATGTT-3')为引物(O'Donnell, 2000),使用Taq PCR Master Mix试剂盒扩增EF-1 α 基因。25 μ L反应体系:DNA模板0.5 μ L、10 μ mol/L上下游引物各0.8 μ L、Mix 12.5 μ L,加ddH₂O补足至25 μ L。扩增条件:94℃预变性3 min;94℃变性30 s,55℃退火30 s,72℃延伸1 min,35个循环;72℃再延伸7 min,4℃保存。PCR产物经琼脂糖凝胶电泳确认后送生工生物工程(上海)股份有限公司测序。将EF-1 α 基因测序结果与GenBank中的序列进行同源性比对,利用Mega 5.0软件对测得的序列连同从GenBank下载的EF-1 α 基因序列进行多重对位排列并人工校正,采用邻接法构建系统发育树,自展检验1 000次。

1.2.4 根腐病致病菌群及其区域和症状差异性分析

在明确代表性菌株分类地位的基础上,按照不同年份、不同地区和不同症状下黄芪根腐病致病菌的种类和数量,采用分离频率比较判断不同区域和不同症状的优势致病菌群。分离频率是指分离到的某种指定类型的真菌菌株数占分离的总真菌菌株数的百分率(于晶等,2011;郭聪聪等,2015)。分离频率=分离得到的各镰孢菌属菌株数/分离得到的总真菌菌株数×100%。

2 结果与分析

2.1 黄芪根腐病发病情况及症状分类

山西省黄芪根腐病多发生于6—8月,属高温多雨季节,在浑源、五寨、应县3个县,病害发生程度和发病症状有所不同。浑源县是3个县中发病程度最重的县,被调查地块的平均发病率为34.7%,且3年或3年以上生的植株发病更重;五寨县的发病情况次之,平地移栽苗发病重于斜坡地,平均发病率为29.8%;应县发病程度最轻,以平地上重茬种植发病重,发病率为23.8%。黄芪根腐病发病症状主要有3类:一是患病植株主根或芦头部呈腐朽状,表皮为褐色或深褐色,粗糙易剥落,严重时龟裂状松软腐烂,内部纤维状明显(图1-A);二是侧根上呈现棕黑至黑色斑点,严重时整体发黑,但坚硬不腐烂(图1-B);三是病根不变色,呈皱缩状,变软(图1-C)。纤维状腐烂和皱缩变软在3个县均有分布,前者以浑源县和五寨县为多,后者以应县居多;而侧根发黑在浑源县鲜有发现。

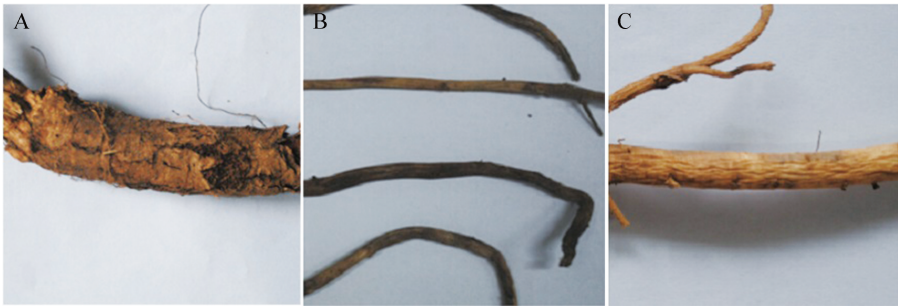


图1 山西省黄芪根腐病的发病症状

Fig. 1 Symptoms of *Astragalus membranaceus* root rot in Shanxi Province

A: 纤维状腐烂; B: 侧根发黑; C: 皱缩变软。A: Fibrous rot; B: lateral root turning black; C: shrinking and softening.

2.2 病原菌的分离与回接验证结果

选取具典型症状的黄芪根腐病根进行病原菌分离、纯化,共获得313株真菌分离物。根据菌落形态、菌丝生长状态、色素颜色和孢子形态,这些分离物可初步归为11个代表类型,其中除类型6为链格孢菌外,其它类型均为镰刀菌。回接验证结果表明,

黄芪根在接种后3 d显症,初为浅褐色斑点,7 d后变为深褐色,凹陷或纵向裂开;切开病斑可见中心接种处为褐色至深褐色。所测30株菌株全部能引起发病,但致病力不同(表1),对照则未发病。取发病黄芪进行病原菌再分离,分离物与接种菌株的形态特征基本一致,证明所接种的菌株均为致病菌。

表1 山西省黄芪根腐病不同致病菌代表性菌株的致病性差异

Table 1 The pathogenicity difference of typical strains causing *Astragalus membranaceus* root rot in Shanxi Province

来源	编号	致病程度	来源	编号	致病程度
Source	No.	Pathogenicity level	Source	No.	Pathogenicity level
五寨县 Wuzhai County	Y1	++	浑源县 Hunyuan County	KP2	++
	Y3	+		KP7	+
	Y4	+++		KP11	+
	Y5	++		SH6	++
	YZ8	+++		SH9	+++
	YZ9	+		LX3	+
	SHI1	++		LX6	+++
	SHI2	++		LX7	+
	SHI4	++		LX11	+++
	SHI7	++		FP	+++
	SHI8	++		XS2	+++
	LS7	+++		X3	++
	LS8	++	应县 Ying County	YX1	++
	JB1	++		YX3	+
	JB2	++		JB3	++++

+: 病斑浅褐色,直径(φ) ≤ 2 mm; ++: 病斑褐色,2 mm $< \varphi \leq 3$ mm; +++: 病斑深褐色,3 mm $< \varphi \leq 4$ mm; ++++: 病斑黑色, $\varphi > 4$ mm。+: Scab is light brown, diameter (φ) ≤ 2 mm; ++: scab is brown, 2 mm $< \varphi \leq 3$ mm; +++: scab is dark brown, 3 mm $< \varphi \leq 4$ mm; ++++: scab is black, $\varphi > 4$ mm.

2.3 病原菌的鉴定

2.3.1 形态学鉴定

菌落形态各异的11类分离物中,类型1~5均为粉色系列,包括菌株Y1、Y3、Y5、JB1、JB2、JB3、KP2、X3、XS2、LX3、YX3、SHI1、SHI2、SHI4。菌落

圆形至近圆形,边缘整齐或波纹状;初期白色,后期呈粉色、深粉色,并有部分菌丝变成黄棕色;菌落背面色素玫瑰红色;气生菌丝旺盛、棉絮状、厚。大型分生孢子多为镰刀形(图2-A),弯曲度较大,顶部细胞锥状,3~5分隔,多为3隔,大小为23.4~51.2 $\mu\text{m} \times$

3.3~5.1 μm ; 小型分生孢子数量少, 1~3 分隔, 大小为 9.1~18 μm ×2.1~4.1 μm , 按照形态特征初步鉴定为锐顶镰刀菌 *F. acuminatum*。

类型 7、9、10 和 11 为白色系列, 包括菌株 FP、SHI7、SH9、YX1、YZ9、KP7、KP11、LX7、LX11。菌落圆形, 边缘整齐; 白色、乳白色至灰白色, 菌落生长后期有同心轮纹出现, 菌落背面白色至土黄色, 有时产生蓝色或绿色的色素; 气生菌丝绒毛状或棉絮状, 平铺。大型分生孢子稍弯曲(图 2-B), 镰刀形或纺锤形, 壁厚, 顶端钝圆, 最宽处在中部, 具 3~5 个隔膜, 大小为 16.8~42.5 μm ×4.8~6.2 μm ; 小孢子形态多样, 肾形、长椭圆形, 少数为近椭圆至卵圆形, 多无隔, 大小为 6.7~11.0 μm ×2.5~4.7 μm (图 2-B), 按照形态特征初步鉴定为腐皮镰刀菌 *F. solani*。

类型 8 为紫色系列, 包括菌株 SHI8、LS7、LS8、YZ8、Y4。菌落圆形, 边缘整齐; 初期为白色至灰白

色, 后期产生浅紫色至深紫色色素; 气生菌丝呈絮状或绒毛状, 较致密。大型孢子直至稍弯曲(图 2-C), 两端渐尖, 具 1~5 个隔膜, 多为 3~4 个隔膜, 隔膜处缢缩, 大小为 20.0~48.8 μm ×2.9~4.7 μm ; 小型孢子为长椭圆形或卵圆形, 两端略尖(图 2-D), 大小为 7.1~12.9 μm ×2.4~3.3 μm , 按照形态特征初步鉴定为尖孢镰刀菌 *F. oxysporum*。

类型 6 为灰绿色系列, 包括菌株 SH6 和 LX6。菌落圆形, 边缘整齐, 菌丝厚且疏松, 有同心轮纹。气生菌丝絮状, 起初为白色, 后变为灰绿色、墨绿色至暗青褐色, 菌落背面为灰黑色。孢子为淡褐色或褐色, 壁砖状分隔, 具 2~4 个横隔膜, 1~5 个纵隔膜, 分隔处略缢缩, 中部隔膜明显较粗; 分生孢子多数为倒棒槌型、倒梨形, 少数为近椭圆形或卵型; 有短喙, 呈柱状或锥状, 按照形态特征初步鉴定为链格孢菌 *Alternaria* sp.。

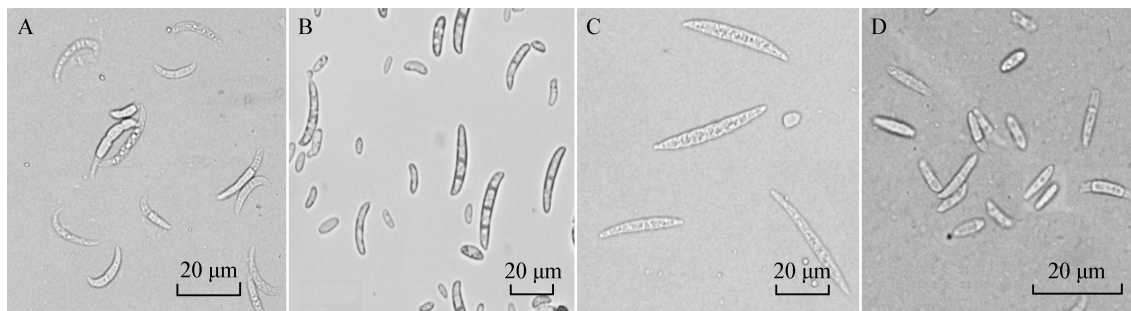


图 2 黄芪根腐病 3 种主要致病镰刀菌分生孢子的形态特征

Fig. 2 Morphological characteristics of conidia of three main pathogenic *Fusarium* fungi causing *Astragalus membranaceus* root rot

A: 锐顶镰刀菌的大孢子; B: 腐皮镰刀菌的大、小孢子; C-D: 尖孢镰刀菌的大、小孢子。A: Macroconidia of *F. acuminatum*; B: macroconidia and microconidia of *F. solani*; C-D: macroconidia and microconidia of *F. oxysporum*.

2.3.2 分子鉴定

对镰刀菌属各致病菌株的基因组 DNA 进行 *EF-1 α* 基因的 PCR 扩增, 获得大小约 700 bp 的序列, 对测序结果进行 BLAST 比对并建立系统发育进化树, 菌株可聚类为 5 组。第 1 组包含菌株 LS7、Y4、LS8、SHI8、YZ8, 与 GenBank 登录号为 KM025417、JQ965453、KR072627 的菌株聚在一起, 同源性达 98%~100%, 为尖孢镰刀菌。菌株 KP7 与 GenBank 登录号为 JF272611 的菌株位于聚类图的一小分支, 同源性高达 99%, 为芬芳镰刀菌 *F. redolens*。菌株 SHI7、YX1、KP11、LX7、FP、LX11、SH9 与 GenBank 登录号为 FJ939714、KF939494、JF740841 的菌株聚为一类, 同源性达 99%~100%, 为腐皮镰刀菌。最大的 1 组包括菌株 YX3、XS2、Y5、LX3、JB1、SHI1、SHI2、JB3、SHI4、KP2、JB2、Y1、Y3、X3, 与 GenBank

登录号为 JX397850、KC175292、JX397873 等的菌株聚为第 4 组, 同源性达 96% 以上, 为锐顶镰刀菌。菌株 YZ9 单独成一支, 与 GenBank 登录号为 KF511994 的菌株同源性高, 为 *Ilyonectria torresensis*(图 3)。结合形态特征和分子鉴定结果, 发现除菌株 KP7 和 YZ9 外, 其它菌株的鉴定结果基本一致。

2.4 根腐病致病菌群及其区域和症状差异性分析

2.4.1 优势致病菌群及其区域差异性分析

山西省黄芪根腐病的致病菌在种类、地域分布上呈现出明显差异性。五寨县(栽培芪)黄芪根腐病致病菌发现 5 种, 分别为锐顶镰刀菌、尖孢镰刀菌、*I. torresensis*、链格孢菌和腐皮镰刀菌, 分离频率分别为 56.14%、35.96%、7.89%、5.28% 和 2.63%; 浑源县(传统芪)黄芪根腐病致病菌发现 4 种, 依次为锐顶镰刀菌、腐皮镰刀菌、链格孢菌和芬芳镰刀菌, 分

离频率分别为42.86%、39.13%、17.62%和1.86%;应县(重茬芪)黄芪根腐病致病菌仅发现2种,分别为锐顶镰刀菌和腐皮镰刀菌,分离频率分别为62.50%和37.50%。表明3个县镰刀菌属真菌均为优势致病菌

群,其中锐顶镰刀菌和腐皮镰刀菌是共有的优势致病菌,平均分离频率分别为53.83%和26.42%,为山西省黄芪根腐病的优势致病菌;尖孢镰刀菌虽然分离频率也较高(35.96%),但仅在五寨县被检出。

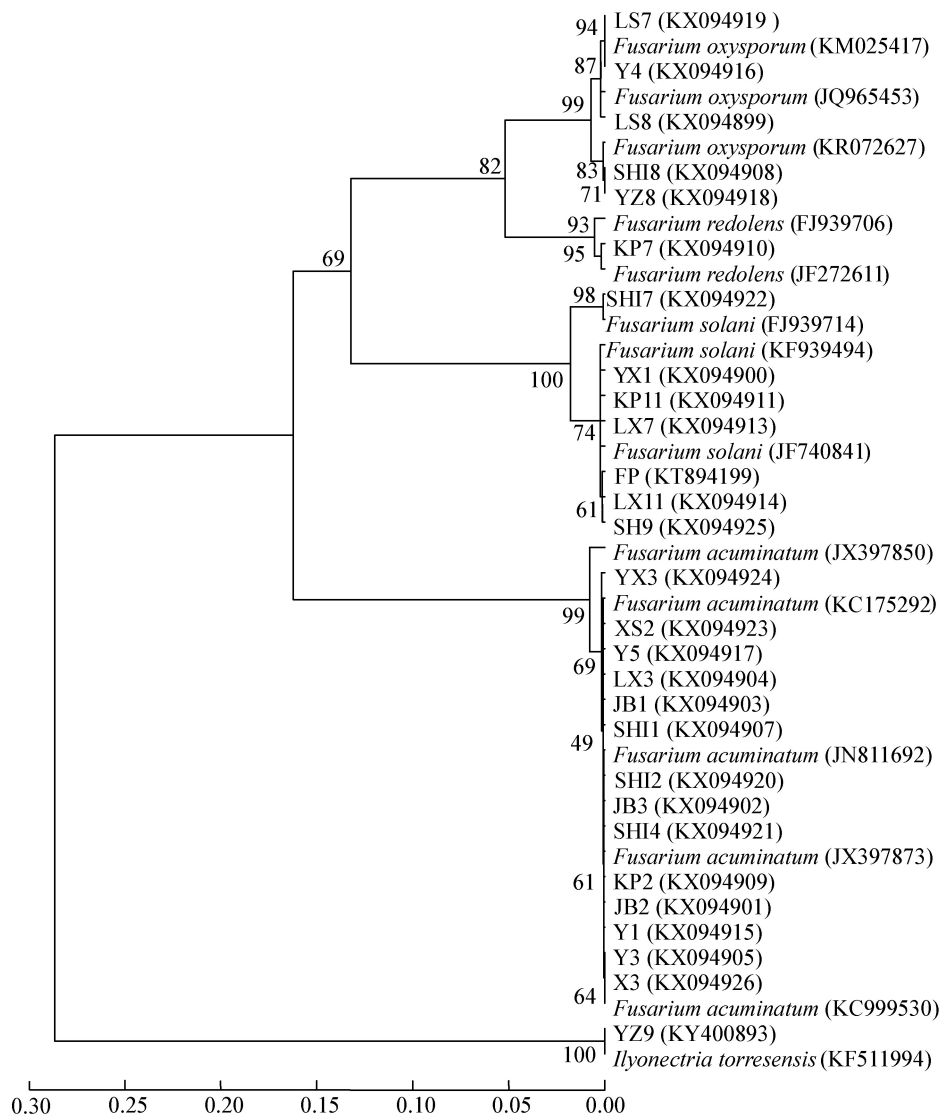


图3 基于 *EF-1α* 序列构建山西省黄芪根腐病代表性致病菌株及其相关菌株的系统发育树

Fig. 3 Phylogenetic tree of typical strains causing *Astragalus membranaceus* root rot in Shanxi Province and other related strains based on analysis of *EF-1α* sequences

2.4.2 根腐病不同症状的优势致病菌群分析

根腐病的症状具有一定地域差异,且引起不同症状的致病菌群和优势致病菌也不同,甚至同一症状在不同地区也有所区别。引发纤维状腐烂症状的致病菌在五寨县为锐顶镰刀菌、尖孢镰刀菌、*I. torresensis*、腐皮镰刀菌和链格孢菌,分离频率分别为67.03%、21.98%、11.54%、9.89%和1.10%;在浑源县为锐顶镰刀菌、腐皮镰刀菌和链格孢菌,分离频率分别为48.07%、43.27%和8.65%;在应县为锐顶镰刀菌

和腐皮镰刀菌,分离频率分别为75.0%和8.33%。引起侧根发黑症状的致病菌在五寨县为锐顶镰刀菌、腐皮镰刀菌和链格孢菌,分离频率分别为42.86%、28.60%和1.65%;在应县为锐顶镰刀菌和腐皮镰刀菌,分离频率分别为63.64%和36.36%;在浑源县未发现此症状。引起皱缩软根的致病菌在五寨县为尖孢镰刀菌、锐顶镰刀菌、腐皮镰刀菌和链格孢菌,分离频率分别为43.48%、26.08%、17.39%和2.48%;在浑源县为链格孢菌、锐顶镰刀菌、腐皮镰刀菌和芬芳

镰刀菌,分离频率分别为32.79%、31.15%、29.51%和4.92%;在应县仅有腐皮镰刀菌和锐顶镰刀菌,分离频率分别为60.00%和40.00%。总体来看,引起纤维状腐烂的优势致病菌为锐顶镰刀菌和腐皮镰刀菌,平均分离频率分别为63.37%和20.50%,尖孢镰刀菌仅在五寨县检出;引起侧根发黑的优势致病菌为锐顶镰刀菌和腐皮镰刀菌,平均分离频率分别为35.50%和21.65%;引起皱缩软根的优势致病菌随地域变化明显不同,五寨县以尖孢镰刀菌最占优势,浑源县以链格孢菌比例最大,而应县为腐皮镰刀菌。

3 讨论

在已报道的黄芪根腐病致病菌中,尖孢镰刀菌、腐皮镰刀菌和立枯丝核菌为最常见的优势病原菌,而本研究发现,引发山西省黄芪根腐病的优势致病菌为锐顶镰刀菌、腐皮镰刀菌和尖孢镰刀菌,另外还有少量芬芳镰刀菌、链格孢菌和*I. torresensis*。尽管未发现立枯丝核菌,但与其它地区相比,病菌种类更加多样,优势种群也明显不同。其中,作为优势致病菌的锐顶镰刀菌,以及芬芳镰刀菌、链格孢菌、*I. torresensis*等致病菌均为首次报道。

镰刀菌属真菌是目前为止人类发现的最重要的植物病原真菌之一,将镰刀菌准确鉴定到种是相关病害研究的基础,但以形态结构为基础的传统镰刀菌分类系统在一定程度上易受人为因素的干扰,不能充分揭示物种的进化关系,且培养过程中许多性状不稳定,容易发生变异,使得形态鉴定难度增加。近年来,分子技术的快速发展使镰刀菌的准确鉴定成为可能。O'Donnell(2000)认为*EF-1α*是适用于镰刀菌群体遗传多样性分析的基因片段,该基因表达调控高度保守,在种的水平上信息丰富,可以较好地表现镰刀菌在种一级的关系(Geiser et al., 2004),是鉴定镰刀菌的理想基因。据此,本研究采用基于*EF-1α*基因的分子技术,并结合形态学特征进行鉴定,较好地保证了分类地位的准确性。

锐顶镰刀菌对生态环境适应性强,寄主范围广泛,能引起马铃薯(魏巍等, 2013)、蔬菜(杨晓贺等, 2011)等作物的根部病害。山西省黄芪根腐病株中,锐顶镰刀菌分离频率高,致病力强,是最重要的优势致病菌。芬芳镰刀菌也是引起马铃薯和各类蔬菜根部病害的致病菌,由于其在形态学上介于尖孢镰刀菌和腐皮镰刀菌之间,因此通过形态学鉴定时,不同的研究者往往将它归为不同的分类地位。最早,Booth(1988)将芬芳镰刀菌作为尖孢镰刀菌的1个变种*F. oxysporum* var. *redolens*。近年来,由于在分子

特征上,芬芳镰刀菌与尖孢镰刀菌有显著不同,因此,Leslie & Summerell(2006)又将其提升到种的级别。本研究在初期依据形态特征进行的鉴定中,也将其归为尖孢镰刀菌,但在分子鉴定时,显示所属的菌株为芬芳镰刀菌,所以最终以分子鉴定结果为准。

链格孢属真菌在药用植物上常见于引起各类叶部病害(王艳等, 2012; 2013),早年罗文富等(1997)曾报道该属的细链格孢*A. tenuis*也是引起三七根腐病的病原菌之一,但致病力较弱。本研究分离到的链格孢菌致病力较强,离体接种时能引起明显发病,但其具体的分类地位和致病性还有待进一步明确。*I. torresensis*据报道是南非葡萄黑根病和山龙眼科植物根腐病的主要病原菌。*Ilyonectria*属被认为是柱孢属毁灭柱孢菌*Cylindrocarpum destructans*的无性世代(Chaverri et al., 2011)。在全球范围内,该属真菌被认为是引起多种经济植物病害(如根腐)的重要致病菌(Cabral et al., 2012a, b)。柱孢属真菌也是引起三七(缪作清等, 2006)和西洋参(毕武等, 2011)根腐病的主要致病菌,但在黄芪上还未见报道。本研究中该类菌株的菌落和孢子形态基本与报道吻合,但仅依靠*EF-1α*单基因测序结果对其分类地位进行确定,还有一定的欠缺,需后续加以确证。

目前,甘肃、内蒙古等省区黄芪根腐病的发病情况已多有报道,但发病症状的描述仅限于纤维状腐烂一种(王立新等, 1994; 陈垣等, 2011; 牛世全等, 2016)。在山西省黄芪根腐病的调查中,本课题组发现了另外2种新的症状,即侧根发黑和皱缩变软,上述3类症状在不同地区的分布不尽相同,可能和当地的气候、土壤条件,特别是致病菌群的差异有关。本研究发现,在山西省不同的黄芪种植区,引发根腐病的致病菌群差异明显,但锐顶镰刀菌、腐皮镰刀菌为共有优势致病菌,这一结果为后期的根腐病防治提供了明确的靶标。同时,明确了引发3种症状的优势致病菌,为依据症状特征判断主要致病菌,并进行有针对性的科学防治提供了可能。另外,从呈纤维状腐烂的病根中分离到的病原菌无论种类还是分离频率,均高于其它2种症状,这一结果也与发病症状的严重度一致。上述结果,为有针对性地合理防控该病害提供了依据,但在优势致病镰刀菌的遗传多样性、专化型等方面还有待进一步深入研究。

参 考 文 献 (References)

- Bi W, Chen J, Jiao XL, Gao WW. 2011. Identification of the pathogens causing the root rot and their pathogenicity on American ginseng in Beijing. *Plant Protection*, 37(5): 135-138 (in Chinese) [毕武,

- 陈娟, 焦晓林, 高微微. 2011. 北京地区西洋参根腐病原鉴定及其致病性. 植物保护, 37(5): 135-138]
- Booth C. 1988. The genus *Fusarium*. Chen QY, translation. Beijing: Agriculture Press, pp. 1-323 (in Chinese) [Booth C. 1988. 镰刀菌属. 陈其焜, 译. 北京: 农业出版社, pp. 1-323]
- Cabral A, Groenewald JZ, Rego C, Oliveira H, Crous PW. 2012a. *Cylindrocarpon* root rot: multi-gene analysis reveals novel species within the *Ilyonectria radicola* species complex. Mycological Progress, 11: 655-688
- Cabral A, Rego C, Crous PW, Oliveira H. 2012b. Virulence and cross infection potential of *Ilyonectria* spp. to grapevine. Phytopathologia Mediterranea, 51(2): 340-354
- Chaverri P, Salgado C, Hirooka Y, Rossman AY, Samuels GJ. 2011. Delimitation of *Neonectria* and *Cylindrocarpon* (Nectriaceae, Hypocreales, Ascomycota) and related genera with *Cylindrocarpon*-like anamorphs. Studies in Mycology, 68(1): 57-78
- Chen Y, Zhu L, Guo FX, Wu ZJ. 2011. Isolation and identification of the pathogens causing *Astragalus membranaceus* var. *mongolicus* root rot in Wei yuan of Gansu Province. Acta Phytopathologica Sinica, 41(4): 428-431 (in Chinese) [陈垣, 朱蕾, 郭凤霞, 武志江. 2011. 甘肃渭源蒙古黄芪根腐病原菌的分离与鉴定. 植物病理学报, 41(4): 428-431]
- Deng CG. 2005. A preliminary study on identification of pathogens causing *Astragalus membranaceus* root rot. Journal of Chinese Medicinal Materials, 28(2): 85 (in Chinese) [邓成贵. 2005. 黄芪根腐病原菌鉴定研究初报. 中药材, 28(2): 85]
- Fang ZD. 1998. Methods for plant pathology (3rd edition). Beijing: China Agriculture Press, pp. 122-125 (in Chinese) [方中达. 1998. 植物研究方法(第3版). 北京: 中国农业出版社, pp. 122-125]
- Gao F, Ren XX, Wang ML, Qin XM. 2015. Research progress in root rot diseases Chinese herbal medicine and control strategy by antagonistic microorganisms. China Journal of Chinese Materia Medica, 40(21): 4122-4126 (in Chinese) [高芬, 任小霞, 王梦亮, 秦雪梅. 2015. 中草药根腐病及其微生物防治研究进展. 中国中药杂志, 40(21): 4122-4126]
- Geiser DM, Jiménez-Gasco MM, Kang S, Makalowska I, Veeraraghavan N, Ward TJ, Zhang N, Kuldau GA, O'Donnell K. 2004. FUSARIUM-ID v. 1.0: A DNA sequence database for identifying *Fusarium*. European Journal of Plant Pathology, 110: 473-479
- Guo CC, Zhu WF, Fu M, Pang MH, Liu YC, Dong JG. 2015. Occurrence of *Fusarium* species and fumonisins associated with maize kernels from Gansu Province. Journal of Plant Protection, 42(6): 942-948 (in Chinese) [郭聪聪, 朱维芳, 付萌, 庞民好, 刘颖超, 董金皋. 2015. 甘肃省玉米籽粒中镰孢菌分离频率及伏马毒素含量监测. 植物保护学报, 42(6): 942-948]
- Leslie JF, Summerell BA. 2006. The *Fusarium* laboratory manual. Iowa, USA: Blackwell Publishing, pp. 1-388
- Luo WF, Yu SF, He CF, Li ZY, Wang CL, Cui XM. 1997. On the combined infection of root rot pathogens on *Panax notoginseng*. Acta Phytopathologica Sinica, 27(1): 85-91 (in Chinese) [罗文富, 喻盛甫, 贺承福, 李忠义, 王朝梁, 崔秀明. 1997. 三七根腐病原及复合侵染的研究. 植物病理学报, 27(1): 85-91]
- Miao ZQ, Li SD, Liu XZ, Chen YJ, Li YH, Wang Y, Guo RJ, Xia ZY, Zhang KQ. 2006. The causal microorganisms of *Panax notoginseng* root rot disease. Scientia Agricultura Sinica, 39(7): 1371-1378 (in Chinese) [缪作清, 李世东, 刘杏忠, 陈昱君, 李云华, 王勇, 郭荣君, 夏振远, 张克勤. 2006. 三七根腐病原研究. 中国农业科学, 39(7): 1371-1378]
- Niu SQ, Geng H, Han CH, Yan WR, Da WY. 2016. Isolation and identification of pathogens causing *Astragalus membranaceus* root rot in Gansu Longxi. Journal of Northwest Normal University (Natural Science), 52(2): 75-78 (in Chinese) [牛世全, 耿晖, 韩彩虹, 阎薇如, 达文燕. 2016. 甘肃陇西黄芪根腐病原菌的分离与鉴定. 西北师范大学学报(自然科学版), 52(2): 75-78]
- O'Donnell K. 2000. Molecular phylogeny of the *Nectria haematococca-Fusarium solani* species complex. Mycologia, 92(5): 919-938
- Wang GC, Zheng Z, Ye QM, Zhang CL. 1996. Identification guide of common *Fusarium*. Beijing: China Agricultural Science and Technology Press (in Chinese) [王拱辰, 郑重, 叶琪明, 章初龙. 1996. 常见镰刀菌鉴定指南. 北京: 中国农业科技出版社]
- Wang LX, Sun XR, Bai QJ, Qi FM, Liu ZP. 1994. Pathogen identification of root rot in *Astragalus mongolicus*. Acta Agriculturae Boreali-Sinica, 9(2): 107-109 (in Chinese) [王立新, 孙先荣, 白全江, 齐凤鸣, 刘正坪. 1994. 黄芪根腐病原菌鉴定. 华北农学报, 9(2): 107-109]
- Wang Y, Chen XR, Wang YQ, Jin L. 2012. *Alternaria* species on medicinal plants in Gansu Province (I). Plant Protection, 38(2): 156-159 (in Chinese) [王艳, 陈秀蓉, 王引权, 晋玲. 2012. 甘肃省药用植物上链格孢属(*Alternaria*)病原的种类及分布 I. 植物保护, 38(2): 156-159]
- Wang Y, Chen XR, Yang CD. 2013. Species and distribution of *Alternaria* on medicinal plants in Gansu Province (II). Plant Protection, 39(4): 116-118 (in Chinese) [王艳, 陈秀蓉, 杨成德. 2013. 甘肃省药用植物上链格孢属(*Alternaria*)的种类及分布(II). 植物保护, 39(4): 116-118]
- Wei W, Zhu JH, Zhang HL, Yang ZH. 2013. Identification of the pathogens causing potato dry rot in Hebei and Inner Mongolia. Journal of Plant Protection, 40(4): 296-300 (in Chinese) [魏巍, 朱杰华, 张宏磊, 杨志辉. 2013. 河北和内蒙古马铃薯干腐病菌种类鉴定. 植物保护学报, 40(4): 296-300]
- Yang XH, Ding JJ, Gu X, Shen HB, Zhang Y, Lü GZ. 2011. Isolation and identification of *Fusarium* of vegetables from some parts of China. Journal of Fungal Research, 9(2): 88-96 (in Chinese) [杨晓贺, 丁俊杰, 顾鑫, 申宏波, 张瑜, 吕国忠. 2011. 我国部分地区蔬菜镰刀菌的分离及鉴定. 菌物研究, 9(2): 88-96]
- Yu J, Zhou F, Chen J, Wang X, Xu J, Liu TN. 2011. Diversity of endophytic fungi from *Cistanche deserticola*. China Journal of Chinese Materia Medica, 36(5): 542-546 (in Chinese) [于晶, 周峰, 陈君, 王霞, 徐江, 刘同宁. 2011. 肉苁蓉内生真菌多样性研究. 中国中药杂志, 36(5): 542-546]
- Zhang DZ, Li PC, Chen XX, Wang CX, Yu JF. 2016. Isolation and identification of the pathogens causing wheat common root rot in Shandong Province. Journal of Plant Protection, 43(2): 233-240 (in Chinese) [张德珍, 李鹏昌, 陈晓霞, 王彩霞, 于金凤. 2016. 山东省小麦根腐病原菌的分离鉴定. 植物保护学报, 43(2): 233-240]

(责任编辑:李美娟)