

浙江省铁皮石斛根腐病病原真菌的鉴定

曹瑱艳 杨怡华 申屠旭萍* 俞晓平

(中国计量大学, 浙江省生物计量及检验检疫技术重点实验室, 杭州 310018)

摘要: 为明确铁皮石斛根腐病病原真菌, 于其主产地浙江省金华市武义县收集铁皮石斛根腐病植株, 采用平板分离方法对病原真菌进行分离, 使用镰刀菌种特异性引物并结合 ITS 和 TEF 序列分析及形态学鉴定确定该镰刀菌的分类地位。结果表明, 共分离纯获得真菌 117 株, 其中有 105 株镰刀菌; 经分子生物学分析及形态学鉴定结果显示, 分离出的镰刀菌为层出镰刀菌 *Fusarium proliferum*、茄病镰刀菌 *F. solani*、尖孢镰刀菌 *F. oxysporum* 和厚垣镰刀菌 *F. chlamydosporum* 四个种, 其中层出镰刀菌在数量上具有优势地位, 占总镰刀菌数的 44.8%; 茄病镰刀菌、尖孢镰刀菌、厚垣镰刀菌分别占总镰刀菌数的 21.0%、15.2% 和 19.0%。在致病性测定中发现层出镰刀菌和茄病镰刀菌并不具备致病性, 尖孢镰刀菌的致病性明显弱于厚垣镰刀菌, 表明厚垣镰刀菌为浙江省金华市武义县铁皮石斛根腐病的主要致病菌。

关键词: 铁皮石斛; 根腐病; 镰刀菌; 病原真菌鉴定

Identification of the pathogenic fungi of root rot of traditional medicinal *Dendrobium officinale* in Zhejiang Province

CAO Zhenyan YANG Yihua SHENTU Xuping* YU Xiaoping

(Zhejiang Provincial Key Laboratory of Biometrology and Inspection & Quarantine, China Jiliang University, Hangzhou 310018, Zhejiang Province, China)

Abstract: In order to clarify the pathogenic fungi of root rot of traditional medicinal herb *Dendrobium officinale*, some diseased plants of *D. officinale* were collected from Wuyi County, Jinhua City, Zhejiang Province, the main production area of *D. officinale*. One hundred and seventeen fungal strains were obtained by plate isolation and purification and identified by PCR using the *Fusarium* specific primer pairs in combination with ITS, TEF sequence analysis and morphological method. The results showed that 105 strains belonged to four different species, i.e., *F. proliferum*, *F. solani*, *F. oxysporum* and *F. chlamydosporum*. *F. proliferum* was the predominant species with a percentage of 44.8%. The percentages of *F. solani*, *F. oxysporum* and *F. chlamydosporum* were 21.0%, 15.2% and 19.0%, respectively. It was found that *F. proliferum* and *F. solani* had no pathogenicity against *D. officinale* in the pathogenicity test. Moreover, the pathogenicity of *F. oxysporum* on *D. officinale* was obviously weaker than that of *F. chlamydosporum*. It suggested that *F. chlamydosporum* was the main pathogen of *D. officinale* root rot in Wuyi County, Jinhua City, Zhejiang Province.

Key words: *Dendrobium officinale*; root rot; *Fusarium* spp.; identification of pathogenic fungi

铁皮石斛 *Dendrobium officinale* 是兰科石斛属多年生草本植物,具有益胃生津、滋阴清热、增加免疫力等作用(Da Silva & Ng, 2017; 刘敬等, 2017),是一种非常珍贵的中药材。野生铁皮石斛资源非常稀少,由于医药市场的大量需求推动其人工栽培面积不断增大,铁皮石斛的栽培面积不断扩大(Tang et al., 2017)。铁皮石斛是多年生药用植物,随着种植年限延长大量病害也伴随于其种植过程中发生。金华市武义县是浙江省铁皮石斛的主产区,也是原产地,目前全县铁皮石斛基地 452 万 hm^2 , 占浙江省铁皮石斛总种植面积的 40%, 占全国种植面积的 10%, 根腐病是该地区铁皮石斛最常见的病害之一。引起铁皮石斛根部腐烂的病原真菌主要有镰刀菌 *Fusarium* spp.、烟草疫霉菌 *Phytophthora nicotianae* 以及立枯丝核菌 *Rhizoctonia solani* (李静等, 2008; 李海明等, 2015), 其中由镰刀菌引起的根腐病田间发病率较高,且全年均可发生(谢昀烨等, 2017)。

镰刀菌是危害最大的植物病原真菌之一,其寄生性强,致病性高,有植物的“癌症”之称(卢振辉等, 2016)。镰刀属内的多个种均可引起铁皮石斛根茎部病害,但由于地域环境、耕作制度、气候环境不同,铁皮石斛根腐病主要致病镰刀菌种类也存在差异。例如砖红镰刀菌 *F. incarnatum*、层出镰刀菌 *F. proliferatum* (曹星星, 2015) 和尖孢镰刀菌 *F. oxysporum* (王国荣等, 2017) 均可以引起浙江省铁皮石斛根茎部腐烂; 尖孢镰刀菌(李梦娇, 2017) 是造成云南省铁皮石斛根茎部腐烂的主要病原真菌。目前引起武义县铁皮石斛根腐病的病原真菌种类未见报道。

铁皮石斛内存在多种内生镰刀菌(胡克兴等, 2010; 赵昕梅等, 2012; 周琢艳等, 2017), 为了进一步明确浙江省金华市武义县铁皮石斛内不同种镰刀菌的致病性以及铁皮石斛根腐病的主要病原真菌,以该地区铁皮石斛种植基地内铁皮石斛根腐病的病株为研究对象,对病菌进行分离、纯化,利用核糖体内转录间隔区(internal transcribed spacer, ITS) 以及翻译延长因子(translation elongation factor, TEF) 进行序列分析,结合特异性引物及形态学鉴定对该病原真菌种类进行鉴定,并进一步测定该病原真菌的致病性,以期浙江省铁皮石斛根腐病的防治提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

供试植株及培养基: 于 2018 年 9 月从浙江省金

华市武义县寿仙谷铁皮石斛种植区进行采样,采集具有典型根腐病症状的铁皮石斛病株放入无菌牛皮纸袋并编号,带回实验室立即分离; 健康铁皮石斛盆栽由浙江寿仙谷铁皮石斛种植基地提供,于温度 26℃、光照时间 L12 h:D 12 h、相对湿度 60% 条件下培养,保证植物处于健康状态,供致病性测定用。马铃薯葡萄糖琼脂(potato dextrose agar, PDA) 培养基: 马铃薯 200 g、葡萄糖 20 g、琼脂 15 g,蒸馏水定容至 1 L。

试剂及仪器: CTAB 提取液,北京索莱宝科技有限公司; 无水乙醇,上海阿拉丁生化科技股份有限公司; dNTP、*Taq* 聚合酶、10×Buffer, 翊圣生物(上海)有限公司; DNA 胶回收试剂盒、DNA Marker, 生工生物工程(上海)股份有限公司; 其它试剂均为国产分析纯。SPX-150B-Z 电热恒温培养箱, 上海博迅医疗生物仪器股份有限公司; T100 PCR 仪、Sub-Cell GT 核酸电泳仪、Gel Doc XR 凝胶成像仪, 美国 Bio-Rad 公司; YS100 显微镜, 日本尼康公司; MP Fast-prep-24 均质仪, 北京优尼康生物科技有限公司; Nanodrop2000 蛋白核酸定量分析仪, 美国 Thermo 公司。

1.2 方法

1.2.1 病原真菌分离纯化

采用平板分离方法对病原真菌进行分离纯化(方中达, 1998)。将带病组织用含 75% 酒精的棉花擦洗,用无菌刀片在病健交界处切取大小 1.0 cm×1.0 cm 的小块组织,置于 75% 酒精中浸泡 30 s,用 1% NaClO 表面消毒 4 min,用 75% 的酒精清洗 30 s 去除表面残留的 NaClO,用无菌水漂洗 3 次,将小块组织放在消毒滤纸上吸干水分,转移到 PDA 平板上,待 4~5 d 长出菌落后,挑取菌落边缘菌丝转接至新鲜 PDA 平板上培养,多次转接直至菌落形态一致,最后将纯化好的菌落转移到 PDA 斜面保存待用。

1.2.2 病原真菌的分子鉴定

病原真菌 DNA 的提取: 采用改良过的 CTAB 法(Hayden et al., 2004) 进行,将分离到的病原真菌于 PDA 平板上培养 5 d,用接种针刮下培养基表面的菌丝并收集至 2 mL 平底离心管中,加入 10 颗直径为 1 mm 钢珠及 500 μL CTAB,置于均质仪上,4.0 m/s 振荡 10 min。用移液枪吸取离心管中的溶液至新的离心管中,于液氮内冷冻 2 min,再于 75℃ 水浴锅内融化 2 min,重复 3 次,最后 1 次于 75℃ 水浴锅内融化 30 min,加入 500 μL 酚:氯仿:异戊醇混合溶液,比例为

25:24:1,上下颠倒混匀,12 000 r/min 离心 10 min,取上清液,加入 2 倍体积的冰无水乙醇沉淀 1 h,12 000 r/min 离心 10 min,弃上清液,沉淀用 70%乙醇洗涤,自然风干后用 50 μ L ddH₂O 溶解 DNA,−20℃保存备用。将提取的 DNA 用蛋白核酸定量分析仪测量 OD 值,当 OD_{260 nm}/OD_{280 nm} 为 1.8~2.0 时,用于 PCR 反应模板。

病原真菌分类鉴定:在 NCBI BLAST 的过程中发现,仅通过 ITS 序列比对无法准确鉴定各种镰刀菌。因此,本研究先使用镰刀菌属通用引物 F1/F2 筛选出病原真菌里的镰刀属真菌,并用从铁皮石斛植株中分离出的链格孢菌作为阴性对照证明镰刀菌通用引物的特异性;再结合茄病镰刀菌 *F. solani*、尖孢镰刀菌、层出镰刀菌、禾谷镰刀菌 *F. graminearum*

和木贼镰刀菌 *F. equiseti* 等常见病原镰刀菌种的特异性引物对镰刀菌的种类进行进一步鉴定(表 1);对于镰刀菌种特异性引物未鉴定到种的镰刀菌再利用真菌通用引物 ITS1/ITS4 和 TEF-F/TEF-R 分别扩增其 ITS 和 TEF 序列,比对分析,明确镰刀菌的分类地位。其它非镰刀菌则采用 ITS 通用引物进行 PCR 扩增,然后序列分析比对明确其分类地位。所有引物均由上海桑尼生物科技公司合成。扩增出的 ITS 和 TEF 序列送上海桑尼生物科技公司进行测序,测序结果于 NCBI 网站上进行 BLAST 序列比对,并随机选择初步鉴定为镰刀菌的 20 株菌株分别对其 ITS 及 TEF 序列采用邻近法构建系统发育树以确定其种类。

表 1 本试验中所用的引物序列

Table 1 Primers used in this study

引物 Primer	引物序列(5'-3') Sequence (5'-3')	目的片段大小 Expected size/bp	退火温度 $T_m/^\circ\text{C}$	引物所扩增镰刀菌种类 Species
ITS1	TCCGTAGGTGAACCTGCGG	750	55	通用引物 Universal primer (White et al., 1999)
ITS4	TCCTCCGCTTATTGATATGC			
TEF-F	ATGGGTAAGGAGGACAAGAC	700	58	通用引物 Universal primer (O'Donnell., 1998)
TEF-R	GGAAGTACCAGTGATCATGTT			
F1	ATTACTCCAGCATCCTTGC	1 000	50	镰刀菌通用引物(张亚朵等, 2018) Universal primer for <i>Fusarium</i> spp. (Zhang et al., 2018)
F2	TTTACAACCTCCCAACCC			
FS1	CCGCCAGAGGACCCCTAACT	200	57	茄病镰刀菌(孙静等, 2014) <i>F. solani</i> (Sun et al., 2014)
FS2	TGTGCCCCACAGGGGGCTT			
FO1	AAGAAGTCGAAGAATACATCGCT	700	59	尖孢镰刀菌(张亚朵等, 2018) <i>F. oxysporum</i> (Zhang et al., 2018)
FO2	CGAGGAGTGATGAGACGGC			
PRO1	CTTTCCGCCAAGTTTCTTC	600	56	层出镰刀菌(孙静等, 2014) <i>F. proliferatum</i> (Sun et al., 2014)
PRO2	TGTCAGTAACTCGACGTTGTTG			
Fgr-F	GTTGATGGGTAAAAGTGTG	500	50	禾谷镰刀菌 <i>F. graminearum</i> (Mulè et al., 2004)
Fgc-R	CTCTCATATACCCTCCG			
Feq-F	GGCCTGCCGATGCGTC	990	53	木贼镰刀菌 <i>F. equiseti</i> (Mulè et al., 2004)
Feq-R	CGATACTGAAACCGACCTC			

PCR 扩增: 25 μ L 反应体系: 10×Buffer (含 Mg²⁺) 2 μ L、10 mol/L dNTP 0.5 μ L、10 μ mol/L 正、反向引物各 0.3 μ L、2 U/ μ L *Taq* polymerase 0.4 μ L、80~100 ng/ μ L DNA 模板 2 μ L、ddH₂O 19.5 μ L。扩增条件为: 94℃预变性 2 min; 94℃变性 45 s, 55~62℃退火 30 s(表 1), 72℃延伸 45 s, 共 35 个循环; 最终 72℃延伸 10 min (O'Donnell et al., 1998)。采用 1.0% 琼脂凝胶电泳检测 PCR 产物, 扩增出的条带使用胶回收试剂盒回收纯化 DNA 片段。

1.2.3 病原真菌形态学鉴定

通过 PCR 扩增结果初步确定各菌株的分类地

位,通过形态学鉴定最终确定其分类地位。

菌落形态观察: 分离纯化后得到的菌株于 PDA 平板上培养 5 d 后观察菌落形态、培养基颜色等,并测定菌落直径,根据布斯(1998)方法鉴定镰刀属真菌。

孢子形态观察: 将纯化后的镰刀属真菌于 PDA 平板上培养 5 d 后用无菌水将孢子洗下,经 4 层无菌纱布过滤后取 20 μ L,于 400 倍显微镜下观察。重复观察 3 个视野,每个视野大约 200 个孢子,并记录分生孢子形态、大小和有无隔膜,再根据布斯(1998)方法进行种类鉴定。

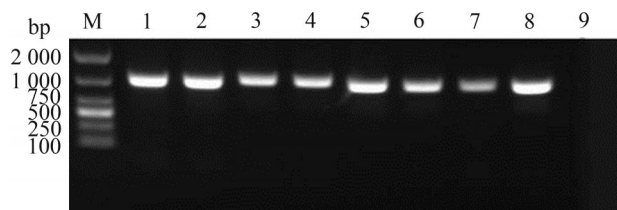
1.2.4 镰刀菌致病性测定

利用柯赫法则对从铁皮石斛根腐病病株上分离到的病原真菌进行致病性测定。由于前期试验分离到的镰刀菌数量较多,故不同种的镰刀菌各选取3株代表菌株,分别是厚垣镰刀菌 *F. chlamydosporum* J-22、G-16、G-10,尖孢镰刀菌 B-3、G-12、G-15,层出镰刀菌 G-7、B-6、G-3,茄病镰刀菌 G-14、G-10、B-9 进行测定。将病原真菌于 PDA 培养基上培养 5 d,用无菌水冲洗菌落表面制得浓度为 1×10^6 个/mL 的孢子悬浮液。采用蘸根法进行接种试验(方中达,1998),用针刺法损伤健康铁皮石斛植株根部,随后将损伤的植株于 1×10^6 个/mL 孢子悬浮液中浸泡 30 min 后移到 500 mL 密封塑料杯中,塑料杯中提前放置湿润的滤纸,以保证杯内湿度。塑料杯置于温度 26℃、光照时间 L12 h:D 12 h、相对湿度 60% 的人工气候室中培养,用无菌水浸泡 30 min 作为空白对照,每组设 3 组重复。15 d 后观察记录植株感病形态并对病变部位进行组织分离,鉴定分离到的病菌性状是否与原始病菌相同。

2 结果与分析

2.1 病原真菌分离结果

对采集到的 60 株铁皮石斛根腐病病株进行分离,共分离获得 117 株真菌。镰刀菌通用引物 F1/F2 扩增结果显示,105 株真菌为镰刀菌,占分离总菌株数的 89.7%(图 1),另外 12 株真菌用镰刀菌通用引物 F1/F2 未能扩增出条带,然后通过 ITS 序列分析将这 12 株真菌鉴定为链格孢菌 *Alternaria alternata*、光炭轮菌 *Daldinia eschscholtzii*、拟盘多毛孢属真菌 *Pestalotiopsis dissminata*、哈茨木霉菌 *Trichoderma harzianum*,分别占分离总菌株数的 5.9%、0.9%、0.9% 以及 2.6%。

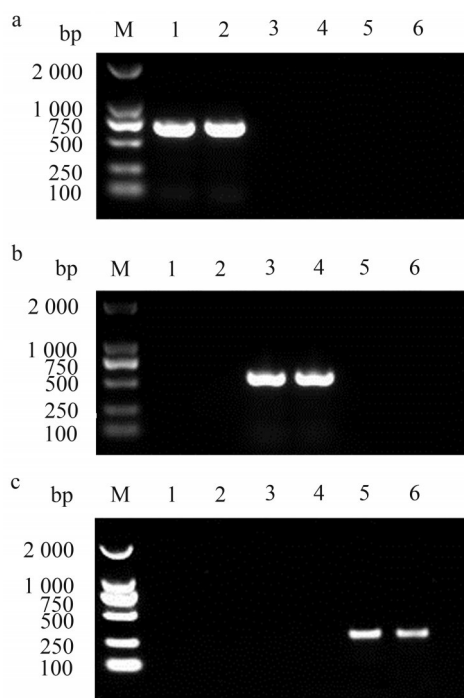


1~8: 镰刀菌通用引物 F1/F2 鉴定出的具有代表性的镰刀菌菌株; 9: 阴性对照(链格孢菌); M: DL 2000 DNA marker。1~8: Representative *Fusarium* spp. strains are verified by using *Fusarium* universal primer F1/F2; 9: negative control (*Alternaria alternata*).

图 1 利用镰刀菌通用引物 F1/F2 的 PCR 扩增结果
Fig.1 PCR amplifications with *Fusarium* universal primers F1/F2

2.2 各镰刀菌种特异性引物的 PCR 扩增结果分析

分别用特异性引物对 105 株镰刀菌进一步鉴定,采用尖孢镰刀菌的特异性引物 FO1/FO2 进行分子鉴定,有 16 株镰刀菌出现 700 bp 左右的目的条带(图 2-a);采用层出镰刀菌的特异性引物 PRO1/PRO2 进行鉴定,有 44 株镰刀菌出现 600 bp 左右的目的条带(图 2-b);采用茄病镰刀菌的特异性引物 FS1/FS2 进行分子鉴定,有 21 株镰刀菌出现 200 bp 左右的目的条带(图 2-c)。剩余 24 株镰刀菌使用特异性引物均未能鉴定出,通过 ITS、TEF 序列比对进一步鉴定。



1~2: 尖孢镰刀菌代表菌株; 3~4: 层出镰刀菌代表菌株; 5~6: 茄病镰刀菌代表菌株; M: DL2000 DNA marker。1~2: Representative strains of *F. oxysporum*; 3~4: representative strains of *F. proliferum*; 5~6: representative strains of *F. solani*; M: DL2000 DNA marker.

图 2 对镰刀菌种特异性引物 FO1/FO2(a)、PRO1/PRO2 (b)和 FS1/FS2(c)的 PCR 扩增结果

Fig. 2 PCR amplifications with three species-specific primer pairs FO1/FO2 (a), PRO1/PRO2 (b) and FS1/FS2 (c)

2.3 序列比对分析

根据系统发育树构建结果初步将镰刀菌分为 I、II、III、IV 四种类型。类型 I 镰刀菌的 ITS 序列和 TEF 序列分别与厚垣镰刀菌 *F. chlamydosporum* (登录号 MG543702.1) ITS 序列和厚垣镰刀菌 (登录号 KF993969.1) TEF 序列的同源性均达 99%; 类型 II 镰刀菌的 ITS 序列和 TEF 序列分别与尖孢镰刀菌 (登

录号 MG975622.1)ITS 序列和尖孢镰刀菌(登录号 MF174059.1)TEF 序列的同源性均达 99%;类型 III 镰刀菌的 ITS 序列和 TEF 序列分别与层出镰刀菌(登录号 MH712154.1)ITS 序列和层出镰刀菌(登录号 KU872102.1)TEF 序列的同源性均达 99%;类型 IV 镰刀菌的 ITS 序列和 TEF 序列分别与茄病镰刀菌

(登录号 MG561938.1)ITS 序列和茄病镰刀菌(登录号 KP143718.1)TEF 序列的同源性均达 99%(图 3~4)。序列分析结果与 PCR 扩增结果基本一致,并鉴定出使用镰刀菌特异性引物未鉴定出的 24 株镰刀菌中 20 株为厚垣镰刀菌,1 株为茄病镰刀菌,3 株为层出镰刀菌。

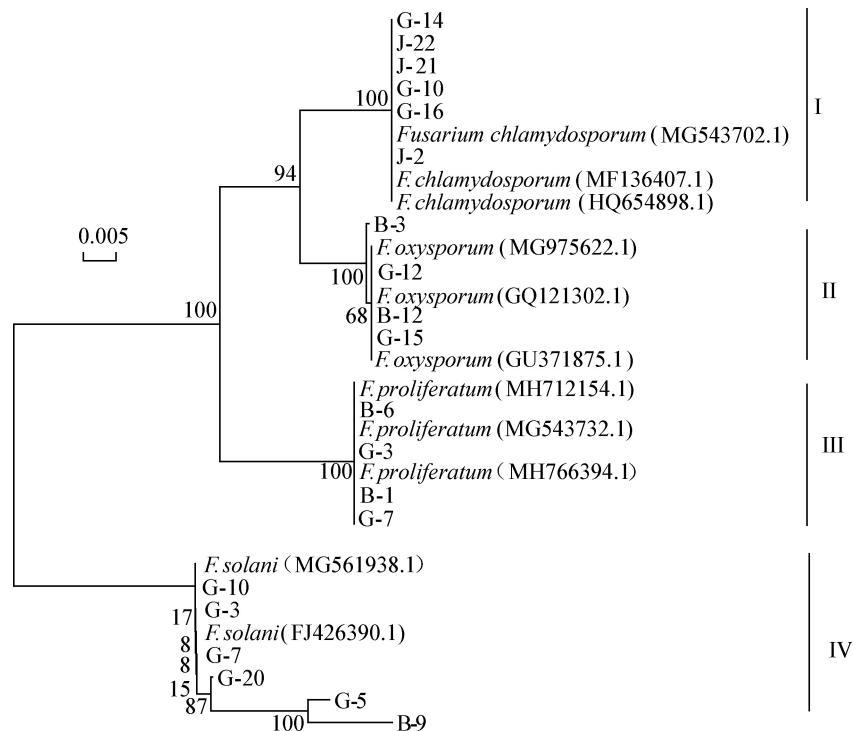


图3 基于 rDNA-ITS 序列采用邻近法构建代表菌株及其相似菌株的系统发育树

Fig. 3 Phylogenetic tree of representative strains and the related strains based on rDNA-ITS sequences by using neighbor-joining method

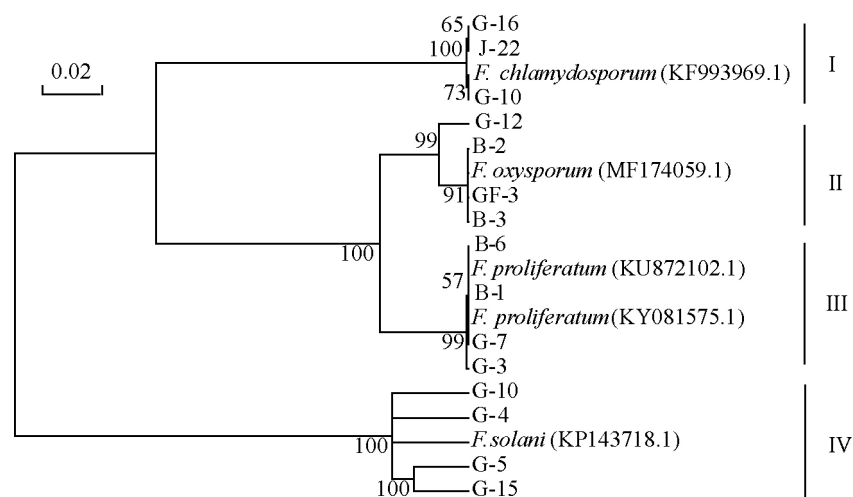


图4 基于 TEF 序列采用邻近法构建代表菌株及其相似菌株的系统发育树

Fig. 4 Phylogenetic tree of representative strains and the related strains based on TEF gene sequences by using neighbor-joining method

2.4 镰刀菌形态学鉴定

分子鉴定为厚垣镰刀菌的菌株 J-22:菌落生长速率明显快于其它种类的菌株,5 d 后直径达 90.0 mm,

菌丝生长致密,气生菌丝旺盛呈棉絮状,初期培养基无色,后期变为深黄色(图 5-a)。PDA 平板上未见小型分生孢子;大型分生孢子镰刀形,细长较直,顶

细胞渐尖, 3~5 分隔, 大小为 $30.0\sim45.0\ \mu\text{m}\times3.5\sim7.0\ \mu\text{m}$ (图 6-a)。

分子鉴定为尖孢镰刀菌的菌株 B-3: 菌落生长较快, PDA 平板上培养 5 d 直径为 75.0 mm, 气生菌丝羊毛状, 白色或紫色(图 5-b)。PDA 平板上生长 5 d 后多为小型分生孢子偶见大型分生孢子; 大型分生孢子呈柱状, 两端较钝, 孢子呈短椭圆状, 3~4 隔, 大小为 $8.5\sim14.5\ \mu\text{m}\times2.5\sim5.5\ \mu\text{m}$; 小型分生孢子呈棒状、卵状或椭圆形, 0~3 隔, 多无隔, 大小为 $5.5\sim12.0\ \mu\text{m}\times2.0\sim2.5\ \mu\text{m}$ (图 6-b)。

分子鉴定为厚垣镰刀菌的菌株 G-7: PDA 平板上培养 5 d 直径为 65.0 mm, 气生菌丝羊毛状, 菌落初期白色或淡紫色, 后期菌落背面产生紫色色素(图

5-c)。PDA 平板上生长 5 d 多为小型分生孢子偶见大型分生孢子; 大型分生孢子为镰刀型, 较直且细长, 3~5 分隔, 大小为 $30.0\sim60.0\ \mu\text{m}\times3.5\sim7.0\ \mu\text{m}$; 小型分生孢子为串生或假头生, 卵形、椭圆形, 通常 0~3 隔, 大小为 $5.5\sim16.5\ \mu\text{m}\times2.5\sim4.0\ \mu\text{m}$ (图 6-c)。

分子鉴定为茄病镰刀菌的菌株 G-14: PDA 平板上培养 5 d 后菌落直径为 50.0 mm, 气生菌丝体羊绒状, 白色(图 5-d); PDA 平板上生长 5 d 多见大型分生孢子。大型分生孢子为弯筒型或纺锤型, 顶端钝圆, 孢子细且长, 大小为 $45.0\sim60.0\ \mu\text{m}\times4.5\sim6.0\ \mu\text{m}$ (图 6-d); 小型分生孢子呈假头状, 卵形, 多无隔, 大小为 $4.5\sim15.0\ \mu\text{m}\times2.3\sim4.5\ \mu\text{m}$ (图 6-d)。

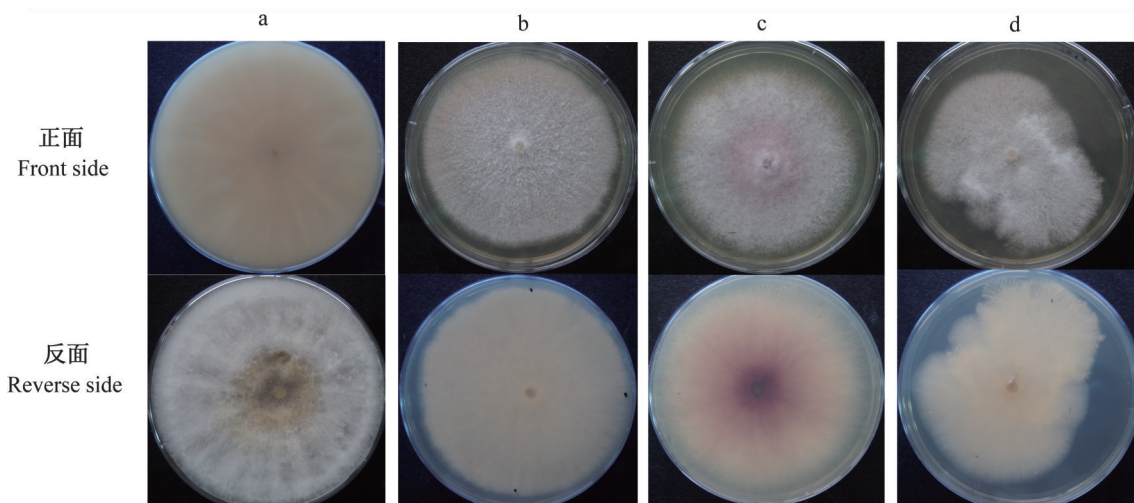
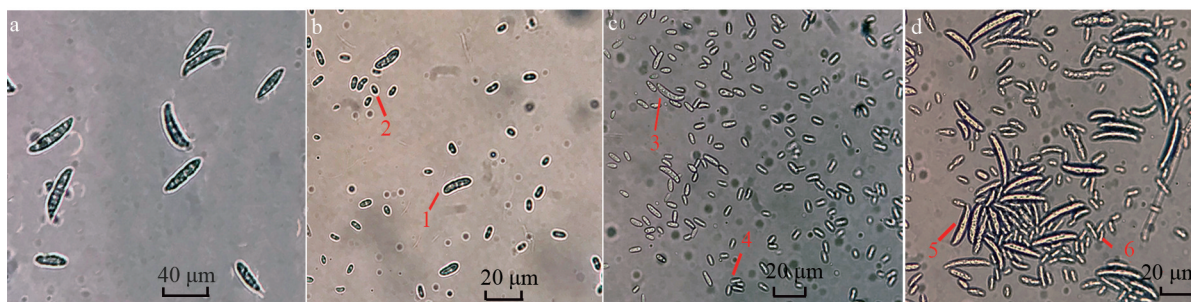


图 5 厚垣镰刀菌(a)、尖孢镰刀菌(b)、层出镰刀菌(c)和茄病镰刀菌(d)正面和反面的菌落形态

Fig. 5 The colony morphology of *Fusarium chlamydosporum* (a), *F. oxysporum* (b), *F. proliferum* (c) and *F. solani* (d)



1~2: 分别为尖孢镰刀菌 B-3 大型分生孢子和小型分生孢子; 3~4: 分别为层出镰刀菌 G-7 的小型分生孢子和大型分生孢子; 5~6: 分别为茄病镰刀菌 G-14 大型分生孢子和小型分生孢子。1~2: the macroconidia and microconidia of *F. oxysporum* B-3, respectively; 3~4: the microconidia and macroconidia of *F. proliferum* G-7, respectively; 5~6: the macroconidia and microconidia of *F. solani* G-14, respectively.

图 6 厚垣镰刀菌(a)、尖孢镰刀菌(b)、层出镰刀菌(c)和茄病镰刀菌(d)的分生孢子形态(400×)

Fig. 6 The conidia morphology of *Fusarium chlamydosporum* (a), *F. oxysporum* (b), *F. proliferum* (c) and *F. solani* (d) (400×)

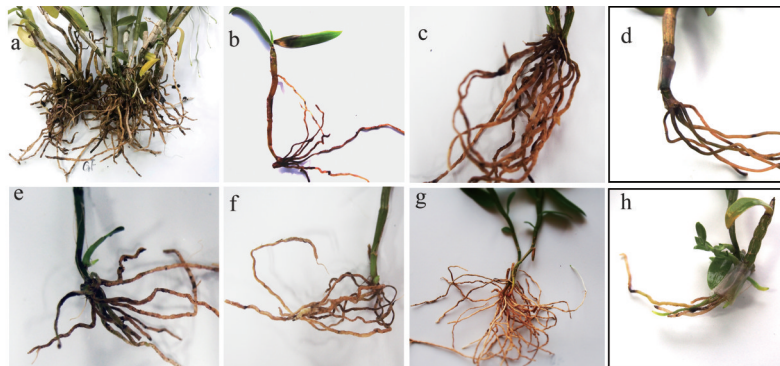
对镰刀菌各个种的形态学鉴定结果与分子鉴定结果基本一致。经序列分析并结合形态学鉴定结果表明, 分离出的 105 株镰刀菌中, 层出镰刀菌 47 株,

占总菌株数的 44.8%; 茄病镰刀菌 22 株, 占总菌株数的 21.0%; 厚垣镰刀菌 20 株, 占总菌株数 19.0%; 尖孢镰刀菌 16 株, 占总菌数的 15.2%。

2.5 镰刀菌病原真菌的致病性

镰刀菌导致的铁皮石斛根腐病主要侵染铁皮石斛的根茎,田间病症表现为植株从根部开始腐烂,病斑不断扩大延伸至茎秆部,进而造成维管束褐变,输水系统阻断,上部叶片枯黄掉落,致使整株植株死亡(图 7-a)。镰刀菌致病性试验测定结果表明,3株厚垣镰刀菌代表菌株J-22、G-16、G-10都表现出强致病性,呈现出典型的铁皮石斛根腐病发病症状,主要症状表现为植株叶片由下而上逐

渐变黄,茎秆基部腐烂变软,根部自下向上逐步腐烂,呈黑褐色,捏之软烂,有水渍渗出,根部有明显腐烂的气味(图 7-b~d)。尖孢镰刀菌代表菌株仅有1株B-3菌株表现出致病性(图 7-e),其它菌株未表现出致病性(图 7-f)。茄病镰刀菌和层出镰刀菌均未表现出致病性(图 7-g~h)。对病变部位进行组织分离,鉴定分离到的病菌与原病菌相同,说明厚垣镰刀菌为金华市武义县铁皮石斛根腐病的主要致病病原真菌。



a: 镰刀菌根腐病田间症状; b~d: 接种厚垣镰刀菌 J-22、G-16、G-10; e~f: 接种尖孢镰刀菌 B-3、G-12; g: 接种层出镰刀菌 G-7; h: 接种茄病镰刀菌 G-14。a: Symptoms of *Fusarium* root rot in the field; b~d: inoculation with *F. chlamydosporum* J-22, G-16 and G-10; e~f: inoculation with *F. oxysporum* B-3 and G-12; g: inoculation with *F. proliferum* G-7; h: inoculation with *F. solani* G-14.

图 7 代表镰刀菌菌株致病性的测定结果

Fig. 7 Pathogenicity assay of the representative predominant *Fusarium* spp. strains

3 讨论

镰刀菌是非常庞大的一个属,且由于镰刀菌属真菌在生长过程中形态变异较大,所以单纯依据形态学鉴定存在一定的困难(Summerell et al., 2003; 吕国忠等, 2010; 邢安, 2017)。近年来利用特异性引物、特征DNA序列等分子技术辅助鉴定镰刀菌的方法已经被广泛应用(Rahjoo et al., 2008; Hsuan et al., 2011)。ITS序列分析是目前真菌种属鉴定中应用最早、最多的方法。但Yli-Mattila et al. (2004)研究表明ITS序列无法有效地区分拟枝孢镰刀菌 *F. sporotrichioides* 和镰刀属真菌 *F. langsethiae*。赵志慧(2011)等认为对于九州镰孢菌 *F. kyushuense*、厚垣镰孢菌和拟枝孢镰孢菌而言,TEF序列较ITS序列更能准确地区分与辨别。TEF序列是编码蛋白翻译装置的主要部分,其在镰刀菌种水平上包含大量的信息,具有高分辨力,较ITS序列有较多的种间变异,且在遗传水平上具有稳定性与多样性,是目前在镰刀菌分类上应用较多的基因序列,可以作为镰刀菌种属分类一个补充(Dubey et al., 2014; 雷娅红等, 2016; Zarrin et al., 2016)。本试验使用类似的研究

方法并加以改良,在ITS序列分析的基础上结合TEF基因序列分析以及镰刀菌种特异性引物,多方面鉴定各镰刀菌的种类:首先使用镰刀菌种特异性引物对镰刀菌进行分类鉴定,其中81株镰刀菌可直接鉴定到种;剩余未鉴定出的24株真菌通过ITS、TEF序列分析也相继得到种的鉴定结果,本研究将分离出的105株镰刀菌鉴定为4个种,其中层出镰刀菌在数量上占优势地位,占总菌株数的44.8%。本研究的试验方法不仅减少了序列扩增和分析的工作量,并且得到更可靠的分类鉴定结果,为今后镰刀菌鉴定工作提供更有效的技术手段。

本研究中也发现,镰刀菌所占比例最高,占分离总菌株数的89.7%,同时,通过ITS测序还从铁皮石斛内鉴定出链格孢菌、光炭轮菌、拟盘多毛孢属真菌和哈茨木霉菌,分别占分离总菌株数的5.9%、0.9%、0.9%和2.6%,说明感病的铁皮石斛内存在大量镰刀菌,此结果与已有结论相似,如赵昕梅等(2012)从健康野生铁皮石斛根部分离到4株内生真菌,其中3株为镰刀菌属,所占比例为75%;周琢艳等(2017)从铁皮石斛中分离到28株内生真菌,这些真菌分别属于

10个属,其中镰刀菌为优势属。以上报道均表明铁皮石斛体内有着非常丰富的内生菌资源,其中镰刀菌又是优势种群。铁皮石斛内存在的大量内生镰刀菌给根腐病原真菌的分离鉴定及优势种的确定增加了一定的难度和工作量,为了区分内生菌和病原真菌,本研究利用柯赫法则进行了致病性测定,确定厚垣镰刀菌为浙江省金华市武义县铁皮石斛根腐病的主要致病菌,也是首次从铁皮石斛中分离到该病原真菌。不同种类镰刀菌生物特性不同,明确不同地区铁皮石斛根腐病中病原镰刀菌的种类及致病力,可为其病害防治奠定理论基础。

大量研究表明镰刀菌通过分泌细胞壁降解酶破坏细胞壁入侵到植物表皮细胞,再从导管及维管组织扩增定殖到整个植株中,随后还会分泌一些毒素物质来抑制植物根的生长(Kang et al., 2005; Cendoya et al., 2018)。此外镰刀菌还能够识别寄主植物产生的防御酶等抗性物质,并分泌出一些物质来抵御植物的防御系统(Lairini et al., 1996; Lanubile et al., 2012)。本研究表明铁皮石斛内的层出镰刀菌和茄病镰刀菌不具备致病性,并且厚垣镰刀菌的致病力高于尖孢镰刀菌,推测可能是不同种的镰刀菌在侵染能力或者破坏植物防御系统的能力存在差异,从而导致致病能力不同,如邹庆甲(2012)发现苹果树内存在的6株不同种的镰刀菌中,强致病力菌株所产生的细胞壁降解酶远高于弱致病菌株。后续可针对这4种镰刀菌的致病能力开展研究,阐明镰刀菌在铁皮石斛中的致病机制,为铁皮石斛根腐病的生物防治奠定理论基础。

参 考 文 献 (References)

- BOOTH. 1998. *Fusarium* spp. Beijing: China Agriculture Press (in Chinese) [布斯. 1998. 镰刀属. 北京: 中国农业出版社]
- CAO XX. 2015. Isolation and identification of pathogenic fungi causing diseases on *Dendrobium officinale* and the research on growth-promoting effect of *Piriformospora indica*. Master Thesis. Hangzhou: Zhejiang University (in Chinese) [曹星星. 2015. 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. 硕士学位论文. 杭州: 浙江大学]
- CENDOYA E, CHIOTTA ML, ZACHETTI V, CHULZE SN, RAMIREZ ML. 2018. Fumonisin and fumonisin-producing *Fusarium* occurrence in wheat and wheat by products: a review. *Journal of Cereal Science*, 80: 158–166
- DA SILVA JAT, NG TB. 2017. The medicinal and pharmaceutical importance of *Dendrobium* species. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 101(6): 2227–2239
- DUBEY SC, PRIYANKA K, SINGH V. 2014. Phylogenetic relationship between different race representative populations of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* in respect of translation elongation factor-1 α , β -tubulin, and internal transcribed spacer region genes. *Archives of Microbiology*, 196(6): 445–452
- FANG ZD. 1998. Research methods of plant pathology. 3rd edition. Beijing: China Agriculture Press, pp. 62 (in Chinese) [方中达. 1998. 植物研究法. 第3版. 北京: 中国农业出版社, pp. 62]
- HAYDEN KJ, RIZZO D, TSE J, GARBELOTTO M. 2004. Detection and quantification of *Phytophthora ramorum* from California forests using a real-time polymerase chain reaction assay. *Phytopathology*, 94(10): 1075–1083
- HSUAN HM, SALLEH B, ZAKARIA L. 2011. Molecular identification of *Fusarium* species in *Gibberella fujikuroi* species complex from rice, sugarcane and maize from Peninsular Malaysia. *International Journal of Molecular Sciences*, 12(10): 6722–6732
- HU KX, HOU XQ, GUO SX. 2010. Distribution of endophytic fungi in *Dendrobium officinale*. *Microbiology China*, 37(1): 37–42 (in Chinese) [胡克兴, 侯晓强, 郭顺星. 2010. 铁皮石斛内生真菌分布. 微生物学通报, 37(1): 37–42]
- KANG ZS, ZINGEN-SELL I, BUCHENAUER H. 2005. Infection of wheat spikes by *Fusarium avenaceum* and alterations of cell wall components in the infected tissue. *European Journal of Plant Pathology*, 111(1): 19–28
- LAIRINI K, PEREZ-ESPINOSA A, PINEDA M, RUIZ-RUBIO M. 1996. Purification and characterization of tomatinase from *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. *Applied and Environmental Microbiology*, 62(5): 1604–1609
- LANUBILE A, BERNARDI J, MAROCCO A, LOGRIECO A, PACIO-LLA C. 2012. Differential activation of defense genes and enzymes in maize genotypes with contrasting levels of resistance to *Fusarium verticillioides*. *Environmental and Experimental Botany*, 78: 3946
- LEI YH, KUANG WG, ZHENG CS, LI XZ, GAO WN, LI CJ. 2016. Detection and identification of the genus *Fusarium* by DNA barcoding. *Journal of Plant Protection*, 43(4): 544–551 (in Chinese) [雷娅红, 况卫刚, 郑春生, 李秀璋, 高文娜, 李春杰. 2016. 基于DNA条形码技术对镰刀菌属的检测鉴定. 植物保护学报, 43(4): 544–551]
- LI HM, LIN JB, WANG WY, ZOU H, DAI YM. 2015. Isolation of pathogen and fungicide selection for sclerotial blight in *Dendrobium officinale*. *Fujian Journal of Agricultural Sciences*, 30(9): 901–904 (in Chinese) [李海明, 林江波, 王伟英, 邹晖, 戴艺民. 2015. 铁皮石斛白绢病菌的分离鉴定与抑菌药剂筛选. 福建农业学报, 30(9): 901–904]
- LI J, ZHANG JZ, WU XP, SHAN WX, XU T. 2008. The causal agent of *Dendrobium candidum* blight disease. *Mycosystema*, 27(2): 171–176 (in Chinese) [李静, 张敬泽, 吴晓鹏, 单卫星, 徐同. 2008. 铁皮石斛疫病及其病原菌. 菌物学报, 27(2): 171–176]
- LI MJ. 2017. Identification of common fungal diseases of *Dendrobium officinale* and application of compound fungicide. Master Thesis. Kunming: Yunnan Agricultural University (in Chinese) [李梦娇. 2017. 铁皮石斛常见真菌病害的鉴定及复合菌剂的应用研究. 硕士学位论文. 昆明: 云南农业大学]
- LIU J, DENG XM, ZHAO B, WANG Q. 2017. Progress in pharmacolog-

- ical studies on *Dendrobium officinale*. Asia-Pacific Traditional Medicine, 13(15): 27–30 (in Chinese) [刘敬, 邓仙梅, 赵斌, 王琼. 2017. 铁皮石斛药理作用研究进展. 亚太传统医药, 13(15): 27–30]
- LU ZH, LI MD, WANG WJ, HAN Y, ZHENG LW, WANG Y, KONG DD, XU J. 2016. Main pests and diseases of *Dendrobium officinale* and its non-chemical pesticide control. Journal of Zhejiang Agricultural Sciences, 57(1): 123–126 (in Chinese) [卢振辉, 李明焱, 王伟杰, 韩易, 郑良伟, 王瑛, 孔德栋, 徐靖. 2016. 铁皮石斛主要病虫害及其非化学农药防治. 浙江农业科学, 57(1): 123–126]
- LÜ GZ, ZHAO ZH, SUN XD, JIANG ZD, YANG H. 2010. The abandonment of the name *Fusarium moniliforme* and the concept of *Gibberella fujikuroi* species complex. Mycosystema, 29(1): 143–151 (in Chinese) [吕国忠, 赵志慧, 孙晓东, 姜子德, 杨红. 2010. 串珠镰孢菌种名的废弃及其与腾仓赤霉复合种的关系. 菌物学报, 29(1): 143–151]
- MULÈ G, SUSCA A, STEA G, MORETTI A. 2004. Species-specific PCR assay based on the calmodulin partial gene for identification of *Fusarium verticillioides*, *F. proliferatum* and *F. subglutinans*. European Journal of Plant Pathology, 110(5/6): 495–502
- O'DONNELL, KISTLER HC, CIGELNIK E, PLOETZ R. 1998. Multiple evolutionary origins of the fungus causing Panama disease of banana: concordant evidence from nuclear and mitochondrial gene genealogies. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 95(5): 2044–2049
- RAHJOO V, ZAD J, JAVAN-NIKKHAH M, GOHARI AM, OKHOV-VAT SM, BIHAMTA MR, RAZZAGHIAN J, KLEMSDAL SS. 2008. Morphological and molecular identification of *Fusarium* isolated from maize ears in Iran. Journal of Plant Pathology, 90(3): 463–468
- SUMMERELL BA, SALLEH B, LESLIE JF. 2003. Utilitarian approach to *Fusarium* identification. Plant Disease, 87(2): 117–128
- SUN J, XIE SN, LIU JZ, LIU JB, HAO JJ, DENG SJ. 2014. Morphological and molecular identification of *Fusarium* isolated from basal stalks of maize in Henan Province. Acta Phytopathologica Sinica, 44(1): 8–16 (in Chinese) [孙静, 谢淑娜, 刘佳中, 刘京宝, 郝俊杰, 邓士杰. 2014. 河南省玉米茎基部镰刀菌的形态和分子鉴定. 植物病理学报, 44(1): 8–16]
- TANG HX, ZHAO TW, SHENG YJ, ZHENG T, FU LZ, ZHANG YS. 2017. *Dendrobium officinale* Kimura et Migo: a review on its ethnopharmacology, phytochemistry, pharmacology, and industrialization. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, 2017: 7436259
- WANG GR, SHEN WD, SUN C, SHEN XL, QIU CY, SU ZZ, LOU BG. 2017. Isolation and identification of two main pathogenic bacteria of stem base of *Dendrobium officinale*. Plant Protection, 43(1): 168–172 (in Chinese) [王国荣, 沈伟东, 孙超, 沈肖玲, 邱春英, 苏珍珠, 楼兵干. 2017. 铁皮石斛茎基部2种主要病害病原菌的分离与鉴定. 植物保护, 43(1): 168–172]
- White TJ, Bruin T, Lee S, Taylor J. 1999. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal rDNA genes for phylogenetics. San Diego: California Academic, pp. 315–322
- XIE YY, Fang L, Wang LP, Wang HR. 2017. Occurrence and investigation of *Dendrobium officinale* disease in Zhejiang Province. Journal of Zhejiang Agricultural Sciences, 58(10): 1757–1759, 1762 (in Chinese) [谢昀烨, 方丽, 王连平, 王汉荣. 2017. 浙江省铁皮石斛病害的发生与调查. 浙江农业科学, 58(10): 1757–1759, 1762]
- XING A. 2017. Classification of *Fusarium* spp. from main crops and rhizosphere soil in Heilongjiang Province. Master Thesis. Haerbin: Northeast Agricultural University (in Chinese) [邢安. 2017. 黑龙江省主要作物及其根际土壤中的镰孢菌分类研究. 硕士学位论文. 哈尔滨: 东北农业大学]
- YLI-MATTILA T, MACH RL, ALEKHINA IA, BULAT SA, KOSKINEN S, KULLNIG-GRADINGER CM, KUBICEK CP, KLEMSDAL SS. 2004. Phylogenetic relationship of *Fusarium langsethiae* to *Fusarium poae* and *Fusarium sporotrichioides* as inferred by IGS, ITS, beta-tubulin sequences and UP-PCR hybridization analysis. International Journal of Food Microbiology, 95(3): 267–285
- ZARRIN M, GANJ F, FARAMARZI S. 2016. Development of a polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism method for identification of the *Fusarium* genus using the transcription elongation factor-1alpha gene. Biomedical Reports, 5(6): 705–708
- ZHANG YD, LIU J, HUANG WK, PENG H, FANG Q, PENG DL, ZHU YB, KONG LA. 2018. Molecular identification of *Fusarium* species from the wilt soybean lines in Langfang, Hebei Province. Acta Phytopathologica Sinica, 48(6): 738–747 (in Chinese) [张亚朵, 刘佳, 黄文坤, 彭焕, 房庆, 彭德良, 朱英波, 孔令安. 2018. 河北廊坊大豆枯萎病病原镰刀菌的分子鉴定. 植物病理学报, 48(6): 738–747]
- ZHAO XM, YUAN LW, ZHANG SF, ZHAO XB, CHEN SF. 2012. Isolation and identification of endophytic fungi from *Dendrobium officinale* and its promoting host growth. Journal of Henan Agricultural Sciences 41(6): 101–105 (in Chinese) [赵昕梅, 远凌威, 张苏锋, 赵兴兵, 陈世锋. 2012. 铁皮石斛内生真菌的分离鉴定及其促宿主生长作用. 河南农业科学, 41(6): 101–105]
- ZHAO ZH, LÜ GZ, JIANG ZS, ZENG LS. 2011. Identification of *Fusarium kyushuense*, *F. sporotrichioides* and *F. chlamydosporum* using EF-1α sequence data and morphological characteristics of conidia in aerial mycelium. Mycosystema, 30(5): 713–720 (in Chinese) [赵志慧, 吕国忠, 姜子德, 曾莉莎. 2011. 采用EF-1α序列及气生菌丝上的孢子形态特征对九州镰孢菌、拟枝孢镰孢菌和厚垣镰孢菌的鉴定. 菌物学报, 30(5): 713–720]
- ZHOU ZY, LIU YH, LIU WH, LI JF, YANG M, GUO Y, XIA J. 2017. Isolation of endophytic fungi from *Dendrobium officinale* and preliminary study on its antibacterial and antitumor activities *in vitro*. Chinese Traditional and Herbal Drugs, 48(3): 533–538 (in Chinese) [周琢艳, 刘玉寒, 刘文洪, 李俊峰, 杨明, 郭莹, 夏瑾. 2017. 铁皮石斛内生真菌的分离及其体外抑菌和抗肿瘤活性初步研究. 中草药, 48(3): 533–538]
- ZOU QJ. 2012. The identification of the pathogenic *Fusarium* spp. and the preliminary study on their pathogenic mechanisms in apple replant disease. Master Thesis. Baoding: Hebei Agricultural University (in Chinese) [邹庆甲. 2012. 河北省苹果再植病害致病镰刀菌种类的鉴定及其致病机制初探. 硕士学位论文. 保定: 河北农业大学]

(责任编辑:王璇)