

尖孢镰刀菌及欧文氏杆菌复合侵染引起的半夏腐烂病研究

姚天明¹, 伏建增¹, 南建军¹, 曲丹妮², 田雨², 耿甜甜²

(1. 天水农业学校, 甘肃 清水 741400; 2. 西北师范大学, 甘肃 兰州 730070)

摘要: 以家种健康半夏、发毛半夏和腐烂半夏为材料, 对引起半夏腐烂病的尖孢镰刀菌和欧文氏杆菌进行分离、提纯、镜检、回接和药敏试验。结果在家种健康半夏和发毛半夏中分离出尖孢镰刀菌, 在发毛半夏和腐烂半夏中分离到欧文氏杆菌。通过对 2 种菌回接, 半夏接种尖孢镰刀菌腐烂病发病率为 0, 发芽率 75%; 接种欧文氏杆菌腐烂病发病率为 20%, 发芽率 60%; 而先接种尖孢镰刀菌, 过 3 d 后再接种欧文氏杆菌的腐烂病发病率为 90%, 发芽率 20%。药敏试验和盆栽试验发现, 尖孢镰刀菌对三唑类农药戊唑醇敏感, 欧文氏杆菌对乙蒜素敏感, 并具有很好的防治效果。综上, 半夏腐烂病是由尖孢镰刀菌和欧文氏杆菌复合侵染引起。

关键词: 尖孢镰刀菌; 欧文氏杆菌; 复合侵染; 半夏腐烂病

中图分类号: S435.672 **文献标志码:** A **文章编号:** 1001-1463(2020)07-0054-05

doi: 10.3969/j.issn.1001-1463.2020.07.014

Study on *Pinellia ternata* Rot Caused by Combined Infection of *Fusarium oxysporum* and *Erwiniella*

YAO Tianming¹, FU Jianzeng¹, NAN Jianjun¹, QU Danni², TIAN Yu², GENG Tiantian²

(1. Tianshui Agricultural School, Qingshui Gansu 741400, China; 2. Northwest Normal University, Lanzhou Gansu 730070, China)

Abstract: With family health *Pinellia ternata*, hairiness and rot as materials, The separation, purification, microscopic examination, reconnection and drug sensitivity tests of *Fusarium oxysporum* and *Erwiniella* which caused *Pinellia rottensis* were carried out. The results showed that the isolates of *Fusarium oxysporum* were isolated from the *Pinellia ternata* and *Pinellia ternata*, and the *Erwinia* spp. were isolated from the *Pinellia ternata* and rotten *Pinellia*. The test of two bacteria showed that the incidence of *Fusarium oxysporum* was 0, the incidence rate of *Pinellia ternata* was 75%, the incidence rate of *Erwinia* rot was 20%, and the germination rate of *Pinellia ternata* was 60%, and inoculated with *Fusarium oxysporum* first, and with *Erwiniella* after 3 days. The incidence rate of rot disease was 90% after inoculation with *Erwinia* spp., and the germination rate of *Pinellia ternate* was 20%. Through drug sensitivity test and pot experiment, it was found that *Fusarium oxysporum* was sensitive to three azole pesticide, and that *Erwinia* was sensitive to allicin and had good control effect. Conclusion: the canker of *Pinellia ternata* is caused by the compound infection of *Fusarium oxysporum* and *Erwinia*.

Key words: *Erwinia*; *Fusarium oxysporum*; Co-infection; *Pinellia ternate rot*

半夏 [*Pinellia ternata*(Thunb) Breit] 以块茎入药, 具有润燥化痰、降逆止呕、消痞散结之功, 为常用大宗中药材^[1]。我国年产干半夏约 6 500 t, 甘肃西和县和清水县是全国

收稿日期: 2020-04-09

基金项目: 甘肃省重点研发项目(18YF1NE147)。

作者简介: 姚天明(1970—), 男, 甘肃天水人, 高级讲师, 主要从事中药材遗传育种研究和教育教学工作。Email: 1525719811。

半夏的主要产区,约占总产的 70%左右^[2]。半夏块茎腐烂病是半夏生产中的主要威胁,轻则减产 10%~20%,重则绝收,主要危害维管束。在发病初期,半夏叶柄出现一条铁锈色红线,块茎芽头腐烂,叶脉失绿,叶片发黄,呈花叶状,7~10 d 后叶片如水烫状,块茎严重腐烂并伴有恶臭味,皮层破裂失水后呈豆腐渣样。田间湿度大时传播速度快,甚至整田绝收。我们对半夏腐烂病进行了分离、提纯、镜检、回接、药敏及田间试验,以期找出行之有效的防治方法。

1 材料与方法

1.1 供试材料

半夏样本采自清水县半夏种植基地。2019 年 5—8 月采集健康半夏、发毛半夏(半夏块茎表面附着灰白色镰刀菌丝)和腐烂半夏。

1.2 试验方法

1.2.1 病原菌分离提纯 取供试材料用自来水冲洗 24 h,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。在超净工作台上用灭菌拔针挑取健康半夏芽头内组织块、发毛半夏芽头内组织块和腐烂半夏病健交接组织块各 5 mm×5 mm 分别研磨。吸取 1 mL 无菌水制成菌悬液,然后分别稀释为 10⁻¹、10⁻²、10⁻³、10⁻⁴、10⁻⁵、10⁻⁶ 菌悬液备用。PDA 和 NA 培养基在 121 ℃下灭菌 30 min,不同浓度菌悬液接种后置于 28 ℃的恒温箱中培养 48 h,选取有 10~20 个独立菌落的培养皿,对各菌落进行分类计数、镜检,最后对符合镰刀菌和欧文氏杆菌的特征菌落进行提纯。

1.2.2 回接试验 回接试验设 4 个处理,分别为处理 1,尖孢镰刀菌;处理 2,欧文氏杆菌;处理 3,先接尖孢镰刀菌,培养 3 d 后再接欧文氏杆菌;处理 4(CK),加无菌水。

接种时,选取健康的直径约 1 cm 的半

夏块茎,用自来水冲洗 10 min,70%乙醇浸泡 30 s,无菌水充分冲洗后,每 20 粒置于无菌加盖瓶底置滤纸的直径 8 cm 的玻璃瓶中,然后用无菌接种针挑取提纯的各处理菌落,放入加了 5 mL 灭菌水的试管中充分震荡,倒入各加盖玻璃瓶中,贴上标签。在 25 ℃的恒温箱中培养 10 d,统计半夏发芽率和腐烂率。

半夏块茎腐烂病鉴定分级调查标准:0 级,无病;1 级,块茎腐烂病斑<块茎总面 1/4;2 级,块茎腐烂病斑占块茎总面 1/4~1/2;3 级,块茎腐烂病斑占块茎总面 1/2~3/4;4 级,块茎腐烂病斑占块茎总面 3/4 以上^[3]。

腐烂病发病率=(腐烂病粒数/调查总粒数)×100%

病情指数=[∑(各级腐烂病粒数×该级级数)]/(调查粒数×最高级级数)

1.2.3 药敏试验 尖孢镰刀菌药敏试验采用丝状真菌纸片扩散法^[4]。制作纸片所用药剂分别为 50%多菌灵可湿性粉剂、30%恶霉灵、50%代森锰锌可湿性粉剂、50%福美双可湿性粉剂、75%百菌清可湿性粉剂、15%三唑酮可湿性粉剂、430 g/L 戊唑醇悬浮剂。细菌药敏试验采用 1997 年美国 NCCLS 对药敏试验纸片扩散法法规^[5]。采用标准纸片和自制纸片 2 种,标准纸片分别为庆大霉素(GM10)、西(头孢呋辛)、羧苄西林(CB100)、头孢他啶(达)、哌拉西林(氧)、红霉素(E15)、卡那霉素(K30);自制纸片所使用的药剂分别为 80%乙蒜素 1 000 倍液、20%噻菌铜悬浮剂(浙江龙湾化工有限公司)500 倍液、15%三唑酮可湿性粉剂(江西剑牌农化股份有限公司)500 倍液、6%春雷霉素细菌一遍净可湿性粉剂(山东韩农化学有限公司)500 倍液、10%中生·氨基寡糖素(2.5%中生菌素,氨基寡糖素 7.5%)500 倍液、46%氢氧化铜水分散粒剂(美国杜邦公司)1 000

倍液、86.2%氧化亚铜可湿性粉剂(挪威·劳道克斯公司)1 000 倍液。自制纸片用不同药剂浸湿后,置于 80 ℃烘箱中烘干。在超净工作台中分别取提纯的尖孢镰刀菌、欧文氏杆菌用涂布棒涂布接种于灭菌的 NA 培养基上,然后每皿贴 7 种自制纸片,置于 28 ℃恒温箱中培养,48 h 后观察抑菌环的大小,测定 2 种菌对不同药剂的敏感性。

纸片扩散法是 WHO 推进使用的微生物敏感性测定方法,能在抑菌浓度范围内待测菌的生长被抑制,形成透明的抑菌圈。根据抑菌圈的大小可判断待测菌对测定药物的敏感程度,一般分为敏感(S)、中介(I)和耐受(R)3 个标准。对于唑类药物抑制镰刀菌, $R \leq 13 \text{ mm}$, $14 \text{ mm} \leq I \leq 16 \text{ mm}$, $S \geq 17 \text{ mm}$;对于肠杆菌科的细菌,不同药物敏感程度的判定略有差异,我们以最大直径为标准,设定测量值为 $R \leq 20 \text{ mm}$, $21 \text{ mm} \leq I \leq 30 \text{ mm}$, $S \geq 31 \text{ mm}$ 。

1.2.4 温室盆栽试验 采用直径 1.0~1.5 cm

健康半夏块茎做种,用 430 g/L 戊唑醇 1 000 倍液 + 80%乙蒜素 1 000 倍液混合液处理种茎,以未处理为对照,采用对比法排列,进行催芽。盆长 0.80 m,宽 0.25 m,每盆种植 0.3 kg,每处理种植 10 盆,播种后在整个生长期观察发病情况。

2 结果与分析

2.1 各供试材料的微生物分离结果

通过对健康半夏、发毛半夏和腐烂半夏样本进行微生物分离、镜检的结果(表1)可以看出,土壤中存在大量细菌,可腐生于半夏块茎内,半夏不同块茎细菌种类有所不同,但绝大多数植物病原细菌为革兰氏阴性菌。革兰氏阴性菌只检出 1 种,通过查阅文献^[6],结合田间症状观察,认为是欧文氏杆菌。在腐烂半夏中未能检出镰刀菌丝,主要原因可能为腐烂半夏中存在大量欧文氏杆菌,欧文氏杆菌通过占位性竞争和营养竞争,抑制了尖孢镰刀菌的生长。在发毛半夏中既检出了尖孢镰刀菌,又检出了大量欧文

表 1 不同半夏样本微生物分离主要结果

样本类型	菌落特征	菌落数目 $\times 10^5$ 个	镜检结果	菌落类型
健康半夏	白色圆形干燥粗糙菌落,表面具中心十字形小孔,质地坚硬,不易挑起,一周后菌落扩大呈白色絮状圆形菌落,中间镶嵌黑色圆环菌丝,十字小孔破裂。	6	无色透明有隔菌丝,菌丝发达,相互缠绕,后期产生大量分生孢子,分生孢子镰刀形,3~4 个分隔。	尖孢镰刀菌
	蜡黄色干燥不规则扁平中间不规则圈,圈外放射状短线,菌落大小约 2~3 cm。	1	革兰氏阳性连杆菌,产分生孢子,大小大小为 $1 \mu\text{m} \times (3\sim 4) \mu\text{m}$ 分生孢子近球形。	放线菌
	白色圆形凸起光滑菌落,菌落大小 2~8 mm。	3	革兰氏阳性芽孢杆菌,一头粗,芽孢近中,大小 $(2\sim 4) \mu\text{m} \times 1 \mu\text{m}$ 。	芽孢杆菌
发毛半夏	白色圆形干燥粗糙菌落,表面具中心十字形小孔,质地坚硬,不易挑起,一周后菌落扩大呈白色絮状圆形菌落,中间镶嵌黑色圆环菌丝,十字小孔破裂。	12	无色透明有隔菌丝,菌丝发达,相互缠绕,后期产生大量分生孢子,分生孢子镰刀形,3~4 个分隔。	尖孢镰刀菌
	蜡青色光滑圆形边缘凸起中间凹陷湿润黏稠菌落,用挑针挑有弹性。	88	革兰氏阴性杆菌,大小 $0.5 \mu\text{m} \times (1\sim 2) \mu\text{m}$	欧文氏杆菌
腐烂半夏	蜡青色光滑圆形边缘凸起中间凹陷湿润黏稠菌落,用挑针挑有弹性。	275	革兰氏阴性杆菌,大小 $0.5 \mu\text{m} \times (1\sim 2) \mu\text{m}$	欧文氏杆菌

氏杆菌，认为由于发毛半夏尖孢镰刀菌大量生长，对半夏造成伤口，从而有利于土壤中的欧文氏杆菌的侵入，欧文氏杆菌侵入半夏后生长迅速，进而抑制了其他内生细菌的生长，所以在腐烂半夏中只检出了欧文氏杆菌，健康半夏中检测出尖孢镰刀菌、放线菌、芽孢杆菌和其他革兰氏阳性杆菌，而很少检出欧文氏杆菌。

2.2 尖孢镰刀菌和欧文氏杆菌复合侵染回接试验结果

从表2可以看出，单接尖孢镰刀菌并没有发生腐烂病，但影响半夏的发芽率。单接欧文氏杆菌的发病率有所提高，但发芽率降低。复合接种尖孢镰刀菌和欧文氏杆菌的发芽率严重降低，腐烂率大大增加。由此表明，半夏腐烂病的发生是由尖孢镰刀菌和欧文氏杆菌复合侵染形成的，其中尖孢镰刀菌菌丝在半夏块茎表面附着繁殖，刺伤了半夏，造成欧文氏杆菌侵染的微伤口，为欧文氏杆菌的侵染提供了条件；欧文氏杆菌在半夏块茎内大量繁殖，产生解果胶酶和解淀粉酶，使半夏块茎分解，造成腐烂。

2.3 欧文氏杆菌和尖孢镰刀菌药敏试验结果

药敏试验结果(图1、图2、图3)显示，欧文氏杆菌对诺氟沙星、庆大霉素、哌拉西林和乙蒜素敏感，其中诺氟沙星、庆大霉素和哌拉西林是临床上常用的治疗肠杆菌科疾病的常用药，而我们所得欧文氏杆菌正是肠杆菌科细菌，进一步证明了结果的正确性。乙蒜素是农业生产中的常用药，属于低毒生

物农药，可供防治半夏腐烂病选择。其他几种农药耐受性高，应谨慎选择。尖孢镰刀菌对戊唑醇敏感，对三唑酮中介，对其他如多菌灵、代森锰锌、代森锌、恶霉灵等耐受。半夏生产上建议使用三唑类药物。

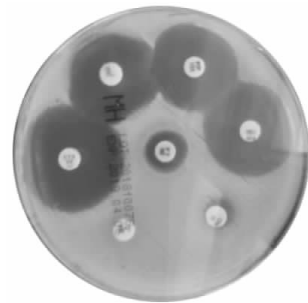


图1 标准纸片欧文氏杆菌药敏抑菌结果

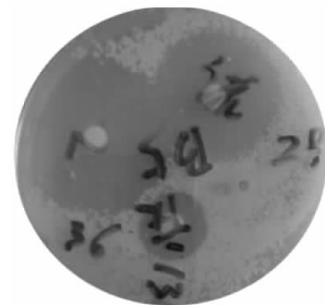


图2 自制纸片欧文氏杆菌药敏抑菌结果

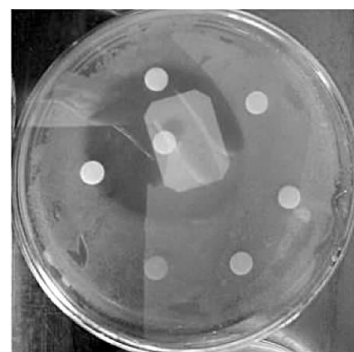


图3 自制纸片尖孢镰刀菌抑菌药敏抑菌结果

表2 尖孢镰刀菌和欧文氏杆菌的复合侵染回接试验结果

处理	发芽率 /%	腐烂病病级					发病率 /%	严重度
		0级	1级	2级	3级	4级		
尖孢镰刀菌	75	20	0	0	0	0	0	
欧文氏杆菌	60	15	3	2	0	0	20	0.05
尖孢镰刀菌培养+欧文氏杆菌	20	2	8	6	4	0	90	0.40
灭菌水	100	20	0	0	0	0	0	0

2.4 温室盆栽

通过温室盆栽试验观察,种茎用戊唑醇和乙蒜素浸种催芽的,整个生长季没有发病,而对照在5月中旬大量发病,发病率达40%以上,其中3盆绝收。

3 结论与讨论

我们以家种健康半夏、发毛半夏和腐烂半夏为材料,对引起半夏腐烂病的尖孢镰刀菌和欧文氏杆菌进行分离、提纯、镜检、回接和药敏试验。结果在家种健康半夏和发毛半夏中分离出尖孢镰刀菌,在发毛半夏和腐烂半夏中分离到欧文氏杆菌。回接试验表明,接种尖孢镰刀菌腐烂病发病率为0,半夏发芽率75%;接种欧文氏杆菌腐烂病发病率为20%,半夏发芽率60%;而先接种尖孢镰刀菌,3d后再接种欧文氏杆菌的半夏,腐烂病发病率为90%,半夏发芽率20%。药敏试验和盆栽实验发现,尖孢镰刀菌对三唑类农药戊唑醇敏感,欧文氏杆菌对乙蒜素敏感,并具有很好的防治效果。可以得出,半夏腐烂病是由尖孢镰刀菌和欧文氏杆菌复合侵染引起的。

何煜波等^[7]采用针刺浸泡法对半夏软腐病病原菌进行分离、回接以及16s DNA片段的扩增和序列分析,认为半夏腐烂病病原为胡萝卜软腐果胶杆菌胡萝卜软腐亚种;孙新荣等^[8]通过形态学观察和致病性测定,表明引起半夏块茎腐烂病的病原物为尖孢镰刀菌。我们不仅在发毛半夏中检测出尖孢镰刀菌,也在许多健康半夏块茎种检测出尖孢镰刀菌,因此认为尖孢镰刀菌是半夏块茎的内生菌,营弱寄生和腐生生活;在半夏生长期,尖孢镰刀菌在健康半夏维管束内病菌扩展是比较缓慢的,通常不发病。但由于栽培半夏播种量大,部分病籽、劣籽带菌量大,当温湿度环境适宜,如土温在10℃以上,相对湿度大于80%时菌丝大量繁殖,这些菌丝再次侵染健康半夏,对健康半夏造成微伤

口,而微伤口又是欧文氏杆菌侵入的入口。欧文氏杆菌存在于土壤中,既可通过自然孔口入侵,但更主要的入侵途径是微伤口。因此认为半夏腐烂病由尖孢镰刀菌和欧文氏杆菌复合侵染所致,要对半夏腐烂病进行有效防治,必须要同时抑制尖孢镰刀菌和欧文氏杆菌。一般病害防治试验是直接对作物施药,然后比较发病率和严重度进行药物有效性试验,我们采用医院检验科所用药敏试验,对药物的筛选具有直观、简便和用时短的特点,通过药敏试验,筛选出对病原菌敏感的药剂,然后在进行大田防治试验,针对性强,效果好,是一种值得推广的好方法。

参考文献:

- [1] 文建水. 采收期对天水小拱棚半夏产量的影响[J]. 甘肃农业科技, 2020(4): 14-16.
- [2] 鲁斌, 王永峰. 16份半夏地方品种在清水县引种初报[J]. 甘肃农业科技, 2019(1): 52-55.
- [3] 曾令祥, 杨琳, 毛堂芬, 等. 贵州中药材半夏块茎腐烂病田间发生消长动态[J]. 西南农业学报, 2013, 26(1): 386-388.
- [4] 刘根焰, 赵旺胜. 病原真菌的体外药物敏感试验[J]. 临床检验杂志, 2011, 29(6): 406-409.
- [5] 贺靖冬, 胡云建, 戴书萍, 等. 简介美国NCCLS药敏试验纸片扩散法法规(1997年版)变动部分[J]. 中华检验医学杂志, 1998(2): 126-127.
- [6] 石建龙. 贵州半夏块茎腐烂病病原菌的分离与鉴定[J]. 微生物学通报, 2015, 42(2): 289-299.
- [7] 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.
- [8] 孙新荣, 呼丽萍, 刘艳梅, 等. 半夏块茎腐烂病病原鉴定和药效比较[J]. 中国中药杂志, 2010, 35(7): 837-841.

(本文责编: 陈伟)