

当归根腐病主要病原菌生物学特性及室内毒力测定

张 婷^{1,2}, 王 艳^{1,2*}, 晋 玲^{1,2}, 吕娇娇¹, 高国香¹

(1. 甘肃中医药大学 药学院, 甘肃 兰州 730000; 2. 甘肃中医药大学药学院 西北中藏药省部共建协同创新中心, 甘肃 兰州 730000)

摘 要 为探究当归 (*Angelica sinensis*) 根腐病的病原菌种类、生物学特性并筛选其防治药剂。采用常规组织法分离培养病原菌, 利用柯赫氏法则验证其致病性, 通过形态学和分子生物学相结合的方法进行病原菌的鉴定、生物学特性分析; 采用菌丝生长速率法对病原菌进行室内毒力测定。结果表明, 当归根腐病菌菌落毛毡状, 在三种培养基上大型分生孢子呈镰刀形, 大小为 $(27.5 \sim 47.5) \mu\text{m} \times (3.8 \sim 7.5) \mu\text{m}$ ($n=50$), 隔膜数 1~5; 小型分生孢子在 PDA 和 SNA 培养基上呈椭圆形、肾型、纺锤形, 在 CLA 培养基上肾型, $(3.8 \sim 15.0) \mu\text{m} \times (2.5 \sim 7.5) \mu\text{m}$ ($n=50$), 隔膜数 0~3; 厚垣孢子在 CLA 培养基上呈串生, PDA 培养基上呈不规则形, SNA 培养基上厚垣孢子着生方式多样, 串生、圆形、不规则形, 大小为 $(2.5 \sim 3.8) \mu\text{m} \times (2.5 \sim 5.0) \mu\text{m}$ ($n=50$)。EF-1 α 、RPB1 和 RPB2 联合序列系统发育树表明, 该菌为锐顶镰刀菌 (*Fusarium acuminatum*), 其最适生长温度为 25 °C, 最适生长初始 pH 为 9, 光照对其生长无显著影响。室内毒力测定显示 10% 苯醚甲环唑 (WG) 对其抑制效果最好, EC₅₀ 值为 83.71 mg/L。本研究可为当归根腐病病原鉴定及田间药剂防治提供参考。

关键词 当归; 根腐病; 病原鉴定; 生物学特性; 室内毒力

中图分类号 Q935

文献标识码 A

文章编号 1005-7021(2024)02-0071-08

doi: 10.3969/j.issn.1005-7021.2024.02.007

Biological Characteristics and Indoor Toxicity Test of Main Pathogens of Chinese Angelica (*Angelica sinensis*) Root Rot

ZHANG Ting^{1,2}, WANG Yan^{1,2*}, JIN Ling^{1,2}, LYU Jiao-jiao¹, GAO Guo-xiang¹

(1. Schl. of Pharm., Gansu Uni. of Chinese Med., Lanzhou 730000; 2. NW Collabor. Innovation Ctr. for Trad. Chinese & Tibetan Med. Co-Construct. by Gansu Prov. & MOE of PRC, Lanzhou 730000)

Abstract The aim of this study was to explore the taxonomic and biological characteristics of the pathogen inducing Chinese angelica (*Angelica sinensis*) root rot and screen its effective fungicides. Conventional tissue isolation method was used to isolate and culture the pathogen and its pathogenicity was tested according to Koch's postulate. The identification and biological characteristics of the pathogen were detected by combination of morphology and molecular biology methods. The indoor toxicity of pathogens was determined according to the mycelial growth rate. The results showed that the colony of pathogen of *A. sinensis* root rot was felt-shaped. On three media, the macroconidia were falcate with the size of $(27.5 \sim 47.5) \mu\text{m} \times (3.8 \sim 7.5) \mu\text{m}$ ($n=50$) with 1-5 septiments; the microconidia were elliptic, reniform, fusiform on PDA and on SNA media; it has diversified form of insertion style, concatenation, spherical, irregular, with the size of $2.5 \sim 3.8 \mu\text{m}$ and reniform on CLA media, showing $(3.8 \sim 15.0) \mu\text{m} \times (2.5 \sim 7.5) \mu\text{m}$ ($n=50$) with 0 to 3 septiments; the chlamydospores were formed in concatenation on CLA media; irregular on PDA media; spherical, irregular and formed on SNA media, showing $(2.5 \sim 3.8) \mu\text{m} \times (2.5 \sim 5.0) \mu\text{m}$ in size ($n=50$). The phylogenetic tree of

基金项目: 中央本级重大增减支项目 (2060302); 道地药材生态种植及质量保障项目 (国中医药科技[2020]153 号); 西北中藏药省部共建协同创新中心开放基金项目 (Xbzzy-2022-02)

作者简介: 张婷 女, 硕士研究生。从事中药资源评价、保护与可持续利用研究。E-mail: ztt199605@163.com

* 通讯作者。女, 副教授, 博士, 硕士生导师。从事药用植物保护与微生物开发利用研究。

E-mail: gswangyan101@163.com

收稿日期: 2023-02-17

the combined sequences was EF-1 α , RPB1 and RPB2, demonstrated that the pathogen was *Fusarium acuminatum*. The optimum growth temperature of this pathogenic *F. acuminatum* was 25 °C, the optimum initial pH was 9, and light has no significant effect on its growth. Indoor toxicity indicated that 10% difenoconazole WG achieved the greatest inhibitory effect on the *F. acuminatum* at a EC₅₀ value of 83.71 mg/L. This study provided a theoretical basis for pathogen identification and chemical control of *A. sinensis* root rot in field.

Keywords Chinese angelica (*Angelica sinensis*); root rot; pathogen identification; biological characteristic; indoor toxicity

当归 (*Angelica sinensis* (Oliv.) Diels) 为伞形科多年生草本植物,以根入药,有补血活血、调经止痛、润肠通便的功效^[1]。临床应用广泛,素有“十方九归”之称^[2]。我国当归种植区主要分布在甘肃、四川及云南省,青海、湖北、陕西、贵州等地也有栽培,甘肃岷县为其道地产区。据 2020 年统计,岷县当归种植面积达 2 万 hm²,占全国当归种植面积的 40%^[3-4]。随着种植年限的积累和种植面积的逐年增大,当归病害发生严重。文献记载的当归病害共有 14 种,包括褐斑病 (*Septoria piricola* Desm.)、炭疽病 (*Colletotrichum gloeosporioides* Penz.)、茎线虫(麻口)病 (*Ditylenchus destructor* Thorne) 和根腐病 (*Fusarium avenaceum* (Fr.) Sacc.) 等^[5-11]。根腐病病原种类繁多、寄主范围广,地域不同,病原种类也不同,其主要病原菌为镰孢属 (*Fusarium*) 真菌^[12]。镰孢菌生态适应性强,可营寄生或腐生生活,广泛分布于土壤、空气、动植物体中,是重要的植物病原真菌,可引起不同植物根腐病、茎基腐病、枯萎病和果腐病等^[13]。据调查,该病在当归主产区发病率约为 35%,严重者达到 80% 及以上,是导致当归减产甚至绝收的重要原因之一^[14]。目前已知的由镰孢菌引起的当归根腐病病原菌有茄病镰孢菌 (*Fusarium solani* (Mart.) Sacc)、尖孢镰孢菌 (*Fusarium oxysporum* Schlecht.)、芬芳镰孢菌 (*Fusarium redolens* Wollenw.)、锐顶镰孢菌 (*Fusarium acuminatum* Ellis & Everhart.) 和燕麦镰孢菌 (*Fusarium avenaceum* (Fr.) Sacc.) 等^[6,9,15]。赵庆芳等^[16] 提出岷县当归根腐病是由镰孢菌 (*Fusarium sloani* (Mart.) Sacc.)、腐霉菌 (*Pythium aphanidermatum* (Edson) Fitzpatrick) 和软腐细菌 (*Erwinia aroideae* (Townsend) Holland) 共同侵染所致;彭铁楠等^[17] 进一步总结当归根腐病致病菌种源存在地域差异,有与其他致病菌和(或)病原线虫协同致病的作用,病害的发生与耕作模式、土壤害虫和土壤湿度有关。基

于此,本研究拟通过病害调查、病原分离、生物学特性分析及室内毒力测定,确定甘肃省当归根腐病的主要病原菌,为该病的田间防治和生产提供一定的参考和技术支撑。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种来源 于 2019 年 7~9 月当归根腐病发病高峰期,分别在甘肃省岷县立林村、渭源县会川镇和陇西县首阳镇三地大田调查病害发生情况,描述症状,拍照并采集标样带回实验室进行病原菌分离。

1.1.2 培养基 ①马铃薯葡萄糖琼脂培养基(PDA):马铃薯 200 g,葡萄糖 10 g,琼脂 15 g,水 1 000 mL;②康乃馨叶片培养基(CLA):康乃馨叶片(3~5 mm²)90%乙醇处理 20 s,10% H₂O₂ 处理 10 min,无菌水冲洗 5 次,50 °C 烘干 2 h,置于 WA 培养基(水 1 000 mL,琼脂 20 g)中央;③合成低营养培养基(SNA):KH₂PO₄ 1 g,KNO₃ 1 g,MgSO₄ · 7H₂O 0.5 g,KCl 0.5 g,葡萄糖 0.2 g,蔗糖 0.2 g,琼脂 23 g,水 1 000 mL。

1.1.3 主要试剂与仪器设备 10%苯醚甲环唑水分散粒剂(WG),山东荣邦化工有限公司;3%甲霜·噁霜灵水剂(AS),天津市绿亨化工有限公司;11%精甲·咯·嘧菌悬浮种衣剂(FSC),江西威力特生物科技有限公司;50%多菌灵可湿性粉剂(WP),江苏蓝丰生物化工股份有限公司;70%甲基硫菌灵可湿性粉剂(WP),安徽华星化工有限公司;真菌基因组 DNA 提取试剂盒(离心柱型),无锡百泰克(BiTeke)生物技术有限公司;引物对 EF1/EF2 (EF1: 5'-ATGGGTAAGGARGACAAGAC-3';EF2:5'-GGARGTACCAGTSATCATG-3')、Fa/G2R (Fa:5'-CAYAAARGARTCYATGATGGGWCd-3';G2R: 5'-GTCATYTGdGTdGdGdGGYTCDCC-3') 和 5f2/7cr (5f2: 5'-GGGGWGAYCAGAAGAAGGC-3';7cr: 5'-

CCCATRGCTTGYTTTCCCCAT-3')由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。单人单面净化工作台(SW-CJ-1FD,上海苏净实业有限公司);电子分析天平(XB224,上海精科天美科学仪器有限公司);立式压力蒸汽灭菌器(LDZX-50KBS,上海申安医疗器械厂);光照培养箱(SPX-250-GB,上海佳胜实验设备有限公司);紫外分光光度计(T6新世纪,北京普析通用仪器有限责任公司);数码显微成像分析系统(Nikon ECLIPSE 80i,北京荣兴光恒科技有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 病原菌的分离与纯化 采用常规组织分离法^[18],取当归根部病健交界处 5 mm² 组织块,用 0.1%升汞消毒 1 min,无菌水冲洗 3~4 次。将组织块放至 PDA 培养基上,每皿 5 块,25 ℃ 培养 5 d 后,计算分离频率。将优势菌种纯化并保存于 4 ℃ 冰箱备用。

1.2.2 致病性测定 采用离体和活体接种法进行致病性测定。①离体接种法:将病原菌于 PDA 培养基上活化 7 d,选取苗龄为 6 月龄的健康当归幼苗,切取 5 cm 根段,0.1%升汞消毒 3 min,无菌水冲洗 3~4 次,置于无菌培养皿中,刺伤接种组用解剖针在距根头部 1 cm 处刺伤。将直径为 6 mm 的病原菌菌饼覆在刺伤处,25 ℃ 培养,隔天观察并记录发病情况。每皿 3 根,3 次重复,以刺伤接种组空白 PDA 培养基为对照。无伤接种组不进行根段刺伤,其他同刺伤接种组。②活体接种法:将病原菌制成浓度为 1×10^6 cfu/mL 孢子悬浮液,对 6 月龄当归幼苗,进行根部刺伤,取 5 mL 孢子悬浮液接种于刺伤植株周围土壤,以无菌水为对照,置于室内(25±2) ℃ 观察并记录,无伤接种组不进行刺伤,其余同刺伤接种组。发病后进行病原菌分离。

1.2.3 病原菌鉴定 ①形态鉴定:将直径 6 mm 的菌饼,接种于 PDA、CLA 和 SNA 培养基上,25 ℃,12 h 光暗交替培养,十字交叉法每天测量菌落直径。第 7 天于光学显微镜下观察病原菌大型分生孢子、小型分生孢子、厚垣孢子形态、大小及隔膜数量;产孢梗形态;大孢子基细胞与顶细胞的形状;分生孢子座颜色等,每项测定 100 个数据。查阅相关资料^[19-20],初步鉴定病原菌种类。②病原菌 DNA 提取及系统发育树的构建:将当归根腐病

菌新鲜菌丝在液氮中充分研磨,用真菌基因组 DNA 提取试剂盒(BioTeKe)提取病原菌基因组 DNA。分别采用引物对 EF1/EF2、Fa/G2R 和 5f2/7cr^[20] 扩增 EF-1 α 、RPB1 和 RPB2 三个片段。PCR 反应体系(20 μ L):ddH₂O 7 μ L,2×Mix 10 μ L,10 μ mol/L 上下游引物各 1 μ L,模板 DNA 1 μ L。PCR 扩增条件 95 ℃ 预变性 5 min,94 ℃ 变性 30 s,分别以 48 ℃ 扩增 EF-1 α 片段,54.3 ℃ 扩增 RPB1 片段,52.1 ℃ 扩增 RPB2 片段,退火 30 s,72 ℃ 延伸 1 min,35 个循环,72 ℃ 延伸 10 min,4 ℃ 保存。扩增产物用 1%的琼脂糖凝胶电泳,凝胶成像仪观察并拍照。PCR 产物由生工生物工程(上海)有限公司进行纯化和测序。将测序结果在 GenBank 进行比对,下载相似度较高的基因片段,MEGA7^[21] 构建 N-J 树^[22],确定病原菌系统发育地位。

1.2.4 生物学特性测定 ①不同温度对菌丝生长的影响:取菌龄 7 d 的菌饼(d=6 mm)接种于 PDA 培养基上,分别于 4、10、15、20、25、30 ℃ 共 6 个温度梯度下黑暗培养,每处理重复 3 皿。十字交叉法每天测定菌落大小,测量 7 d。②不同光照对菌丝生长的影响:将培养基置于 25 ℃ 恒温培养箱中 24 h 连续光照、12 h 光暗交替及 24 h 连续黑暗三种光照条件下培养,其他同 1.2.4①。③不同初始 pH 对菌丝生长的影响:将菌饼分别接种于由浓度为 0.1 mol/L 的 NaOH 和浓度为 0.1 mol/L 的 HCl 调制的初始 pH 为 5.0、6.0、7.0、8.0、9.0、10.0 的培养基上,25 ℃ 恒温黑暗培养,其他同 1.2.4①。采用 SPSS 软件对数据进行统计分析,并进行单因素方差分析,检验数据的差异显著性。

1.2.5 室内毒力测定 使用菌丝生长速率法测定 10%苯醚甲环唑水分散粒剂、3%甲霜·噁霜灵水剂、11%精甲·咯·嘧菌悬浮种衣剂、50%多菌灵可湿性粉剂和 70%甲基硫菌灵可湿性粉剂 5 种供试药剂对当归根腐病菌的室内毒力。将药剂加入 50 ℃ 左右 PDA 培养基,混匀后倒平板,含药平板浓度如表 4 所示,以不加药剂 PDA 培养基为对照。取菌饼(d=6 mm)接种于含药 PDA 平板中央,25 ℃ 培养 7 d 后用十字交叉法测量菌落直径(mm),计算各药剂处理对病原菌的抑菌率。采用 DPS 软件分析数据,以药剂质量浓度的对数值为自变量(X),以抑菌率对应的机率值为因变量

(Y),采用回归分析法,计算不同药剂质量浓度回归方程,相关系数R、 EC_{50} 和 EC_{90} 值^[23-24]。抑菌率(%)=((空白对照菌落直径-处理菌落直径)/(空白对照菌落直径-菌饼直径))×100%。

2 结果与分析

2.1 当归根腐病症状

根腐病在当归幼苗期至成株期均可发生。发病早期,仅少数侧根和须根感染病害,发黄腐烂,随着病情发展逐渐向主根扩展、腐烂,腐烂处呈锈黄色,表皮易剥落,主根呈纤维状物,极易从土中拔起。早期发病植株地上部分无明显症状,随着根部腐烂程度加重,植株上部叶片出现萎蔫,严重时,根部腐烂严重,极易从土中拔起,地上部分植株矮小,叶片枯黄下垂,最终整株死亡(图1)。



图1 当归根腐病症状

Fig.1 Symptom of *Angelica sinensis* root rot

2.2 病原菌的分离

对岷县立林村、渭源县会川镇和陇西县首阳镇三地大田采集的30份当归根腐病病样进行病原菌的分离,共分离出3种病原菌。分别命名为DGGF1、DGGF2和DGGF3,其中DGGF2在三地标样中均可分离到,分离频率分别为85%、100%和100%,而DGGF1和DGGF3仅在岷县立林村标样中分离到,分离频率分别为15%。因此,确定当归根腐病的主要病原菌为DGGF2,并将其纯化保存并进行后续研究。

2.3 致病性测定

将分离到的病原菌接种在当归根部进行离体检测,接种在活体植株上进行盆栽试验(图2),刺伤组的当归根段菌饼周围产生白色菌丝,67%腐烂裂开(图2A),接种部位100%产生棕色病变(图2E),侵染率为100%;无伤组当归根段菌饼周围产生少量白色菌丝(图2C),菌饼覆盖处分别可见受试当归根段接菌饼处凹陷,产

生棕色湿润性病变,病变由菌饼接种部位向四周蔓延、轻微病变和无明显变化,侵染率33%(图2G)。接种空白PDA培养基的刺伤根段和无伤根段均未发病(图2B、2F、2D、2H)。盆栽植株在接种致病菌后植株整体长势缓慢,10 d后38%地上部分萎蔫衰败,70%根部刺伤部位呈棕褐色腐烂,32.5%产生黑棕色干枯皱缩样腐烂病变,严重者整株死亡,侵染率为100%(图3A、3C);刺伤空白组表皮刺伤部位4%产生浅棕色腐烂病变,7%表皮产生黑棕色干枯皱缩样腐烂病变,侵染率为11%(图3B、3C)。通过组织分离法将受试当归发病部位病健交界处进行分离与纯化,得到与最初接种于当归根部病原菌形态特征一致的菌株,分离概率为100%,确定菌株DGGF2为当归根腐病主要病原菌。

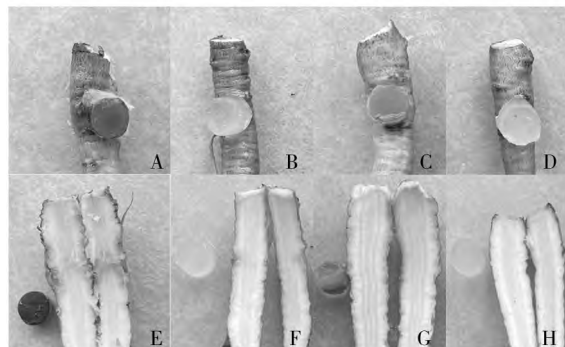


图2 当归根腐病离体致病性测定

Fig.2 Determination of pathogenicity of *Angelica sinensis* root rot *in vitro*

A, E; 刺伤接种; B, F; 刺伤空白对照; C, G; 无伤接种; D, H; 无伤空白对照
A, E; Stab inoculation; B, F; Stab blank control; C, G; Noninvasive inoculation; D, H; Noninvasive blank control

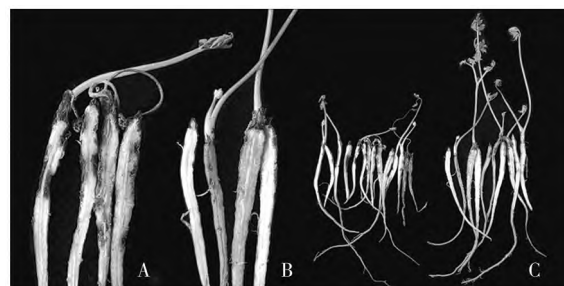


图3 当归根腐病活体致病性测定

Fig.3 Determination of pathogenicity of *Angelica sinensis* root rot *in vivo*

A; 刺伤接种; B; 刺伤空白对照; C; 活体盆栽
A; Stab inoculation; B; Stab blank control; C; Living potted plant

2.4 病原鉴定

病原菌在 PDA 上生长速度为 1.12 cm/d, 菌落正面由内向外为粉白色、桃粉色、白色、气生菌丝毛毡状密集。培养基背面中央为玫瑰红色, 边缘红色(图 4A); SNA 上菌落生长速度 1.10 cm/d, 正面白色, 中央粉色, 菌丝致密, 培养基背面内圈浅粉色, 外圈白色(图 4B); CLA 上生长速度 1.16 cm/d, 菌落正面白色与粉色夹杂, 边缘可见羽毛样菌丝团块, 背面培养基米白色半透明(图 4C)。大型分生孢子在 CLA、PDA 和 SNA 三种培养基上呈镰刀形, 无足细胞, 顶细胞渐尖, ($27.5 \sim 47.5$) $\mu\text{m} \times (3.8 \sim 7.5)$ μm , 隔膜数 1~5 ($n=50$) (图 4D、4E); 小型分生孢子在 PDA 和 SNA 培养基上椭圆形、肾型、纺锤形, 在 CLA 培养基上形态单一, 仅为肾形, ($3.8 \sim 15.0$) $\mu\text{m} \times (2.5 \sim 7.5)$ μm , 隔膜数 0~3 ($n=50$) (图 4D); 产孢梗为单瓶梗; 厚垣孢子在 CLA 培养基上串生, PDA 培养基上呈不规则形, SNA 培养基上厚垣孢子着生方式多样, 串生、圆形、不规则形, ($2.5 \sim 3.8$) $\mu\text{m} \times (2.5 \sim 5.0)$ μm ($n=50$) (图 4F)。

2.5 DNA 提取及系统发育树的构建

对致病菌的 EF-1 α 、RPB1 和 RPB2 片段进行扩增并测序, 得到长度分别为 727、1 603 和 1 017 bp 的序列(登录号分别为 OQ357556、OQ357557 和 OQ357558)。在 GenBank 经 BLAST 比对, 下载同源性较高的 19 条序列的 EF-1 α 、RPB1 和 RPB2 片段

发育树, 结果显示菌株 DGGF2 (RPB2+EF+RPB1) 与锐顶镰刀菌 *Fusarium acuminatum* NRRL 54218 (EF: NRRL 54218 + R2; NRRL 54218 + R1; NRRL 45994) (登录号: EF: HM068316.1+R2; HM068336.1+R1; KC808324.1)、*Fusarium acuminatum* N-51-1 (R2: NRRL 54218+R1; NRRL 45994+EF; N-51-1) (登录号: R2; HM068336.1+R1; KC808324.1+EF; MT749771.1) 聚类在同一分支上(图 5), 依据形态及系统发育树结果, 将当归根腐病菌 DGGF2 鉴定为锐顶镰刀菌 *Fusarium acuminatum*。

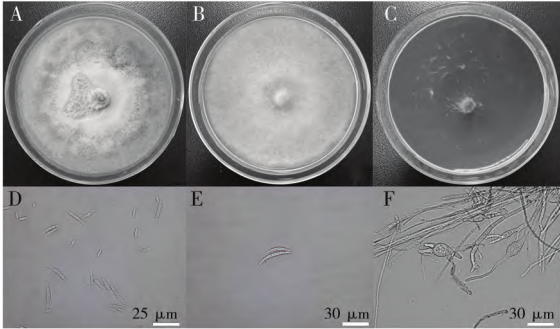


图 4 当归根腐病菌宏观及微观形态

Fig.4 Morphology of the pathogen of *Angelica sinensis* root rot

A~C: PDA、SNA 和 CLA 上菌落形态 (25 °C 恒温黑暗培养 7 d); D: PDA 上大型分生孢子和小型分生孢子; E: CLA 上大型分生孢子; F: SNA 上厚垣孢子
A~C: Colonie on PDA, SNA and CLA media (Incubated at 25 °C in dark for 7 d); D: Macroconidia and microconidia on PDA; E: Macroconidia on CLA; F: Chlamydospores on SNA

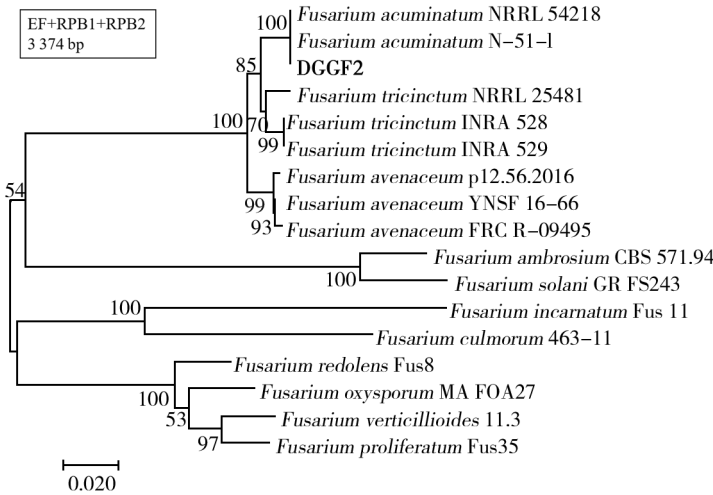


图 5 当归根腐病菌多基因联合系统发育树

Fig.5 Phylogenetic tree of the *Angelica sinensis* root rot pathogenic based on multi-gene combination

2.6 病原菌的生物学特性

2.6.1 温度对菌丝生长的影响 如表 1 所示,菌株 DGGF2 生长温度范围较宽,在 4~30 ℃ 范围内均能生长,适宜温度为 20~25 ℃,最适温度为 25 ℃。10~25 ℃ 病菌的生长速度随温度的升高而升高,低于 5 ℃ 或高于 30 ℃ 生长速率急剧下降。25 ℃ 时,生长速度为 1.1 cm/d,7 d 时菌落直径为 7.8 cm;4 ℃ 时菌丝受低温抑制,生长缓慢,7 d 仅为 1.0 cm;30 ℃ 时受高温影响,7 d 菌落直径仅为 1.9 cm,这表明该菌生长适宜温度范围为 10~25 ℃,低、高温均抑制该菌正常生长发育。

表 1 不同温度对当归根腐病菌菌丝生长的影响

Table 1 Growth diameter of the pathogen of *Angelica sinensis* root rot at different temperature

温度 /℃	菌落直径/cm						
	1 d	2 d	3 d	4 d	5 d	6 d	7 d
4	0.7	0.7	0.7	0.8	0.8	0.9	(1.0 ± 0.1) a
10	0.7	1.0	1.6	2.5	3.2	4.2	(4.9 ± 0.0) c
15	1.0	2.1	2.9	3.3	4.4	4.9	(5.6 ± 0.0) d
20	0.8	2.0	3.3	3.9	5.0	6.8	(7.6 ± 0.2) e
25	1.2	2.6	3.6	4.1	6.3	7.3	(7.8 ± 0.0) e
30	0.8	0.8	0.8	0.9	1.2	1.6	(1.9 ± 0.1) b

注:同列数据后不同小写字母表示在 $\alpha=0.05$ 水平差异具有统计学意义,表 2、表 3 同

2.6.2 光照条件对菌丝生长的影响 如表 2 所示,菌丝在连续光照、光暗交替、连续黑暗条件下,菌落生长速度无显著差异,7 d 菌落直径均可达到 8.5 cm。表明不同光照条件对菌丝生长速率没有太大影响。

表 2 不同光照对当归镰刀菌菌丝生长的影响

Table 2 Growth diameter of the pathogen of *Angelica sinensis* root rot at different illumination

光照 处理	菌落直径/cm						
	1 d	2 d	3 d	4 d	5 d	6 d	7 d
连续光照	1.1	2.5	3.8	4.3	6.1	7.7	(8.5 ± 0.1) a
光暗交替	0.9	2.5	3.9	4.6	6.1	7.7	(8.6 ± 0.1) a
连续黑暗	1.1	2.5	3.8	4.5	6.1	7.7	(8.6 ± 0.0) a

2.6.3 初始 pH 对菌丝生长影响 如表 3 所示,病菌生长适宜的初始 pH 范围较宽,在初始 pH 5.0~10.0 范围内均能生长,初始 pH 值 9.0 时菌落生长最快,7 d 可达到 8.6 cm。初始 pH 7.0~10.0

范围内菌落均生长良好,表明该菌适宜在中性及弱碱性环境生长。

表 3 不同初始 pH 对当归镰刀菌菌丝生长的影响

Table 3 Growth diameter of the pathogen of *Angelica sinensis* root rot at different initial pH

初始 pH	菌落直径/cm						
	1 d	2 d	3 d	4 d	5 d	6 d	7 d
5	1	2.1	3.1	3.6	4.6	6.4	(6.8 ± 0.1) a
6	1	2.1	3.3	3.9	5.1	6.7	(7.4 ± 0.0) b
7	1	2.5	3.7	3.9	6.4	7.6	(8.4 ± 0.0) c
8	1	2.4	3.6	4.9	6.0	7.6	(8.3 ± 0.0) cd
9	1	2.4	3.8	5.0	6.0	7.3	(8.6 ± 0.1) e
10	1.1	2.2	4	4.3	6.2	7.6	(8.5 ± 0.1) de

综上所述,当归根腐病病原菌在温度为 4~30 ℃,初始 pH 为 5~10 内菌丝均能生长,其生长最适温度为 25 ℃,最适初始 pH 为 9,不同光照条件对病原菌生长没有太大影响。菌株 DGGF2 对环境条件的适应范围较广,与甘肃当归栽培区的环境条件较为一致,这是根腐病病害情况发生严重的原因之一。

2.7 室内毒力测定

5 种杀菌剂对当归根腐病菌的室内毒力测定结果(表 4)表明:各药剂对锐顶镰刀菌的抑菌率随着药剂浓度的增加而增加。10% 苯醚甲环唑(WG)的抑制效果最强,1 000 倍液(浓度为 100.00 mg/L),抑菌率为 61.00%, EC_{50} 值为 83.71 mg/L, EC_{90} 值为 276.55 mg/L;其次为 50% 多菌灵(WP),稀释 200 倍液(浓度为 500.00 mg/L)抑菌率高达 94.47%, EC_{50} 值为 103.84 mg/L, EC_{90} 值 404.35 mg/L;其余三种杀菌剂对锐顶镰刀菌的抑制效果较差,由强到弱依次为 70% 甲基硫菌灵(WP),11% 精甲·咯·嘧菌(FSC)和 3% 甲霜·噁霉灵(AS), EC_{50} 值分别为 106.91、119.69 和 139.02 mg/L。

3 讨 论

本研究对当归多个产区采集的根腐病病样进行了分离,参考 Summerell 等^[25] 的镰刀菌鉴定方法制备了三种不同的培养基对镰刀菌进行形态学鉴定,利用通用引物 EF-1 α 、RPB1 和 RPB2 扩增病原菌并测序,多基因联合构建系统发育树,确定

当归根腐病的主要致病菌为锐顶镰刀菌,这与牛世全等^[6]的研究结果一致。

表 4 5 种药剂对锐顶镰刀菌的抑菌活性测定
Table 4 Determination of the inhibition effects of 5 fungicides on *F. acuminatum*

供试药剂	浓度/ (mg · L ⁻¹)	抑菌率/ %	抑制机率值	毒力回归方程 (y=)	相关系数 (r)	EC ₅₀ 值/ (mg · L ⁻¹)	EC ₉₀ 值/ (mg · L ⁻¹)
10% 苯醚甲环唑 (WG)	100.0	61.00	5.28	0.25+2.47X	0.957 6	83.71	276.55
	83.3	45.98	4.90				
	66.7	37.29	4.68				
	55.6	36.76	4.66				
	50.0	28.59	4.43				
	166.7	59.95	5.25				
3% 甲霜 · 噁霉灵 (AS)	125.0	43.35	4.83	0.17+2.25X	0.976 1	139.02	515.37
	100.0	36.23	4.65				
	83.3	28.33	4.43				
	66.6	26.48	4.37				
	166.7	53.62	5.09				
	125.0	51.52	5.04	2.33+1.29X	0.821 9	119.69	1 185.60
11% 精甲 · 咯 · 嘧菌 (FSC)	100.0	49.93	5.00				
	83.3	48.35	4.96				
	66.0	30.43	4.49				
	500.0	94.47	6.60				
	250.0	78.13	5.78	0.62 + 2.17X	0.970 5	103.84	404.35
50% 多菌灵 (WP)	200.0	64.95	5.38				
	125.0	61.53	5.29				
	100.0	50.72	5.02				
	200.0	65.22	6.60				
	166.7	63.37	5.78	1.80+1.58X	0.984 4	106.91	693.78
70% 甲基硫菌灵 (WP)	142.9	58.10	5.38				
	125.0	55.20	5.29				
	100.0	47.04	5.02				

通过测定植物病原菌的生物学特性,研究其形态结构特点和生活习性,掌握病害发病条件及发生规律,可为病害防治提供理论依据。本研究表明,致病菌对环境有较强适应性,生长适宜温度范围广,最适温度为 25 ℃,这与牛世全等^[6]的研究结果相同;可在中性及弱碱性环境中生长,最适初始 pH 为 9,这与陈伶俐等^[26]鉴定锐顶镰刀菌最适生长初始 pH 为 11,牛世全等^[6]鉴定锐顶镰刀菌最适初始 pH 为 8 的研究有所差异;光照对该病原菌无明显影响,24 h 全光照培养有利于菌落色素的形成,该结果与贵晓荷^[27]对锐顶镰刀菌的研究基本一致。因此,当归应当选择高寒长日照,排水性好的中性砂质土壤栽种。致病性测定结果显示,较无伤接种,病原菌更易通过刺伤部位快速侵染植株。故当归栽种地应避免选用重茬地,对土壤勤翻晒,清除烂根;防止地下害虫咬伤及栽种刺伤植株,选用健康种苗,以降低当归根腐

病病害的发生。

化学农药因其有高效、速效、操作简便、适应性广及经济效益显著等特点广泛用于根腐病病害防治。本研究筛选 5 种杀菌剂对当归根腐病致病菌进行室内毒力测定,包括生产上常用农药甲基硫菌灵和多菌灵、复配农药悬浮种衣剂精甲 · 咯 · 嘧菌、三唑类杀菌剂苯醚甲环唑、内吸性高效杀菌剂甲霜 · 噁霉灵。结果表明,10% 苯醚甲环唑水分散粒剂和 50% 多菌灵可湿性粉剂对当归根腐病的防治效果较好,该结果与马桂花等^[28]提出的苯醚甲环唑和多菌灵对黄芪根腐病致病菌锐顶镰刀菌抑制作用较好的结论一致。具体情况有待于后期田间药剂防治试验进一步验证。

参考文献:

[1] 国家药典编委会. 中华人民共和国药典[M]. 北京: 化学工业出版社, 2020: 198.

[2] 徐国钧, 何宏贤, 徐璐珊, 等. 中国药材学[M]. 北京: 中国医

- 药科技出版社,1996;332.
- [3] 晋玲,吴迪,崔洁家,等.当归药材资源种类及分布研究[J].中兽医医药杂志,2013,32(1):74-77.
- [4] 魏秀芝,刘向晖.岷县当归产业带贫增收路径探析[J].农村经济与科技,2022,33(4):90-92.
- [5] 王艳,王引权,晋玲,等.甘肃省当归病害种类调查及其病原鉴定[J].湖北农业科学,2012,51(7):1352-1354.
- [6] 牛世全,张雪莹,李静,等.岷县当归根腐病原菌的分离鉴定及生物学特性研究[J].西北师范大学学报(自然科学版),2021,57(1):77-83.
- [7] 陈书珍,季绪霞,杨成德,等.甘肃省岷县当归病害调查及叶斑病田间药剂筛选[J].草业科学,2017,34(12):2470-2475.
- [8] 吕祝邦,李敏权,惠娜娜,等.甘肃省定西市当归“水烂病”病原鉴定及致病性测定[J].植物保护,2013,39(2):45-49.
- [9] 李静丽.当归主要病害及其防治的研究[J].中药材科技,1983(6):13-14.
- [10] 卞静,陈泰祥,陈秀蓉,等.当归新病害--炭疽病原鉴定及发病规律研究[J].草业学报,2014,23(6):266-273.
- [11] 刘娟娟,赵慧巧,卢年华,等.当归主要病虫害防治研究进展[J].药学研究,2015,34(5):293-295.
- [12] 何韦静,王洪苏,张巧,等.四川重点药用植物病害研究现状与展望[J/OL].中药材,2022(8):1998-2008.
- [13] 张向民.镰刀菌属分类学研究历史与现状[J].菌物研究,2005(2):63-66.
- [14] 汪淑霞,宋振华,王富胜.当归根腐病防治技术[J].甘肃农业科技,2016(10):87-89.
- [15] 黄亚萍.当归根腐病原物研究[D].兰州:甘肃农业大学,2011.
- [16] 赵庆芳,刘靓,李巧峡,等.15种植物水提液对当归根腐病抑制活性的初步筛选[J].西北师范大学学报:自然科学版,2012,48(2):66-69.
- [17] 彭铁楠,祝英,姜一鸣,等.当归根腐病发病机制及防治措施[J].中国现代中药,2014,16(12):975-978.
- [18] 方中达.植病研究方法[M].北京:农业出版社,1979:123.
- [19] Booth C.镰刀菌属[M].北京:农业出版社,1998:83-93.
- [20] O'Donnell K, Sutton DA, Rinaldi MG, et al. Internet-accessible DNA sequence database for identifying fusaria from human and animal infections[J]. Journal of Clinical Microbiology, 2010, 48(10): 3708-3718.
- [21] Sudhir K, Glen S, Koichiro T. MEGA7: Molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets[J]. Molecular Biology and Evolution, 2016, 33(7): 1870-1874.
- [22] Saitou N, Nei M. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees.[J]. Molecular Biology & Evolution, 1987(4): 406.
- [23] 孙海峰,沈莹,宁荣彬,等.防治平贝母菌核病的药剂筛选及田间应用[J].农药,2019,58(2):141-144.
- [24] 孙新荣,仲彩萍,张西梅,等.甘肃定西地区党参根腐病原鉴定与防治研究[J].植物保护,2020,46(5):290-297.
- [25] Summerell BA, Salleh B, Leslie JF. A utilitarian approach to *Fusarium* identification [J]. Plant Disease, 2003, 87(2): 117-128.
- [26] 陈伶俐,马洪福,李亚娟,等.10种杀菌剂对枸杞根腐病菌的室内毒力测定[J].青海大学学报(自然科学版),2015,33(5):10-13.
- [27] 贵晓荷.紫花苜蓿根腐病原镰刀菌的生物学特性研究[D].兰州:兰州大学,2019.
- [28] 马桂花,段晓明,徐文华,等.蒙古黄芪根腐病原鉴定及防治药剂室内筛选[J].草地学报,2022,30(5):1122-1130.