

紫山药干腐病的病原鉴定

徐元柳^{1,2}, 黄磊³, 刘敏³, 杨家伟², 白庆荣¹, 杨超³

(1. 贵州大学绿色农药全国重点实验室 贵阳 550025; 2. 兴义市农业技术推广中心 贵州兴义 562400;
3. 贵州吉丰种业有限责任公司 贵州兴义 562400)

摘要: 为明确 2023 年在贵州省黔西南州兴义市引起当地特色作物紫山药干腐病的病原菌的分类地位, 采用组织分离法和单孢纯化法获得培养特征一致的 15 个菌株。代表菌株 SY2-2 经柯氏验证为病原物, 结合形态学特征观察及 ITS 与 RPB2 基因序列分析, 构建系统进化树, 确定引起紫山药干腐病的病原菌为产核青霉菌 *Penicillium sclerotigenum*。该研究结果为贵州省紫山药干腐病的科学防控奠定了理论基础。

关键词: 紫山药; 干腐病; 病原鉴定

中图分类号: S632.1

文献标志码: A

文章编号: 1673-2871(2025)02-129-05

Pathogen identification of dry rot of purple yam

XU Yuanliu^{1,2}, HUANG Lei³, LIU Min³, YANG Jiawei², BAI Qingrong¹, YANG Chao³

(1. State Key Laboratory of Green Pesticides, Guizhou University, Guiyang 550025, Guizhou, China; 2. Xingyi Agricultural Technology Extension Center, Xingyi 562400, Guizhou, China; 3. Guizhou Jifeng Seed Industry Co., Ltd, Xingyi 562400, Guizhou, China)

Abstract: To clarify the taxonomic status of the pathogen causing dry rot of purple yam in Xingyi city, Guizhou province in 2023, 15 strains with the same cultural characteristics were obtained by tissue isolation and single spore purification. The representative strain SY2-2 was confirmed as pathogen of the disease by Koch's test. Based on morphological characteristics and ITS and RPB2 sequence analysis, a phylogenetic tree was constructed. *Penicillium sclerotigenum* was identified as the pathogen causing the dry rot of purple yam. The results lay a theoretical foundation for the scientific control of dry rot of purple yam in Guizhou province.

Key words: Purple yam; Dry rot; *Penicillium sclerotigenum*; Pathogen identification

紫山药 (*Dioscorea alata*) 又名紫萁药、紫淮山和紫参薯等, 属薯蓣科薯蓣属参薯, 属于山药的近缘植物, 块茎肉质呈紫红色, 富含黏液质、多糖、蛋白质、淀粉和矿物质元素, 特别是花色苷含量较高, 是山药中的精品。花色苷也是迄今为止所发现的最强效的自由基清除剂, 具有抗氧化、抗衰老、抗癌与抗动脉硬化等功能, 有较高的食用价值和药用价值^[1-2]。紫山药原产于亚洲热带地区, 在我国主要分布于南方的温暖地带, 包括浙江、江苏、广东、广西、福建、江西、云南和台湾等地, 在北方地区种植较少^[3]。

紫山药是药食同源的植物, 深受广大消费者喜爱, 随着需求量的增多, 种植面积不断扩大, 该

特色产业对农民增收致富具有重要的现实意义。随着紫山药种植面积的增加, 其病害发生种类和发生程度也随之加重, 严重制约着山药产业的发展。山药块茎病害主要有根腐病 (*Fusarium chlamydosporum*、*Fusarium solani*、*Fusarium avenaceum*、*Fusarium oxysporum*、*Humicola fuscoatra*、*Pythium ultimum* var. *ultimum*)^[4-6]、干腐病 (*Penicillium sclerotigenum*)、黑皮病 *Monilochaetes infascans*、疮痂病 (*Streptomyces* spp.)、山药细菌性软腐病 (*Pseudomonas dioscoreae*、*Pantoea agglomerans*)、根腐线虫病 (*Pratylenchus* spp.) 和根结线虫病 (*Meloidogyne* spp.)^[6]。山药皮薄, 在收获、运输、贮藏和销售的过程中, 易破皮或折断造

收稿日期: 2024-03-09; 修回日期: 2024-07-17

基金项目: 国家重点研发计划 (2023YFE0104800); 贵州省科技计划 (黔科合支撑 (2023) 一般 023)

作者简介: 徐元柳, 女, 农艺师, 研究方向为植物保护。E-mail: 2681502555@qq.com

通信作者: 白庆荣, 女, 教授, 研究方向为植物病害综合治理。E-mail: bbbqqrrr@163.com

杨超, 男, 农艺师, 研究方向为新品种试验示范、科技成果转化与推广应用。E-mail: 907393658@qq.com

成伤口,大大增加了多种病原菌的侵染概率,干腐病的发生对山药品产生不利影响,造成巨大的经济损失^[7-8]。

2017年由贵州吉丰种业有限责任公司从广西引进种植的紫玉淮山,经4a(年)4代系统选育形成稳定品系,定名为紫山药1号,2021年将紫山药1号扩繁,2022年开始小面积种植,田间表现抗逆性强、适应范围广、产量高、效益显著。2023年开始推广种植,目前紫山药在黔西南州兴义市、晴隆县、普安县等地方均有种植。该品种植株蔓生,生长势强,叶片呈阔卵圆形,苗期叶色紫色,后期青绿色,平均叶长14.2 cm、叶宽8.5 cm;薯形长棒形,平均单薯长86 cm、横径6.2 cm,平均单薯质量1.4 kg;薯皮紫红色、肉质粉紫色。种子呈扁卵圆形、纺锤形等,表皮暗褐色,种子肉质深紫色;生育期260~300 d。在紫山药的种植过程中叶部零星发生炭疽病,尚未发现影响生产的地上部病害。2023年1月在贵州省黔西南州兴义市紫山药贮藏期间发现有5%~10%紫山药腐烂坏死,罹病部位呈深褐色,部分山药罹病部位长有青色霉层,罹病薯块不能食用,严重影响山药的品质和商品价值。为明确引起该病害的病原菌的分类地位,笔者对罹病紫山药进行病原菌的分离与纯化、致病性测定、形态特征观察及分子生物学鉴定,以期研究该病害的发生规律及防治方法奠定理论基础。

1 材料与方 法

1.1 材 料

试验于2023年1月至2024年3月在贵州大学绿色农药全国重点实验室完成。病害来源于贵州省黔西南州兴义市送检的紫山药干腐病样品。

马铃薯葡萄糖琼脂培养基(PDA):去皮马铃薯200 g,葡萄糖20 g,琼脂粉15 g,蒸馏水定容至1000 mL。

1.2 方 法

1.2.1 病原菌的分离与纯化 采用组织分离法对2次送检的15个罹病紫山药发病组织块进行病原菌分离,先用灭菌刀切去病部外表皮,再用无菌镊子从发病变色部位夹取少量组织块,置于75%乙醇溶液中浸泡消毒60 s,无菌水清洗3次。将消毒的组织块放到盛有吸水纸的培养皿中,在无菌操作台中风干2 h后,移至PDA培养基上,25℃恒温培养。待组织块边缘长出菌丝后,用无菌接种铲在菌落边缘铲起3 mm×3 mm菌块,放入

PDA培养基中进行纯化培养。待培养2~3 d后,将长出的真菌菌落挑取边缘菌丝至新的PDA培养基上,待病菌产孢后,挑取单个孢子进行纯化^[9],将纯化后的纯培养物保存备用。第一次送检样品分离得到6个分离物,记为SY1-1~SY1-6,第二次送检样品分离得到9个分离物,记为SY2-1~SY2-9。

1.2.2 分离物致病性测定 选取新鲜健康的紫山药块茎,使用75%的乙醇表面消毒,待乙醇自然风干后使用无菌刀将山药切段。代表菌株SY2-2培养7 d后用无菌水制成浓度为 1×10^6 个·mL⁻¹孢子悬浮液,均匀喷在整个山药块茎表面及两侧切口。以喷洒无菌水为对照,每个处理3次重复,观察并记录发病情况。

待山药块茎明显发病后采用1.2.1的方法进行病原菌的分离,观察其菌落和分生孢子的形态与接种菌株是否一致,若一致则证明该接种菌株为紫山药干腐病的病原菌。

1.2.3 病菌形态特征观察 观察病原菌在PDA培养基上的菌落形态、颜色及生长状况。使用BA210-T生物显微镜观察病原菌在PDA培养基上的分生孢子及产孢结构的形态特征并拍照,使用VHX-7000超景深显微镜(KEYENCE)测量病原菌的100个分生孢子大小。参照相关参考文献^[10],初步确认病菌的分类地位。

1.2.4 分子生物学鉴定 按照真菌基因组DNA提取试剂盒(北京索莱宝科技有限公司)提取新鲜菌丝的DNA并进行PCR扩增。选择引物ITS1/ITS4对核糖体内转录间隔区(internal transcribed spacer, rDNA-ITS)^[11]和RPB2-5F/RPB2-7cR对RNA聚合酶II第二大亚基(second largest subunit of RNA polymerase II, RPB2)^[12]进行PCR扩增,扩增反应体系25 μL: *Taq* mixture 12.5 μL,上游引物1.0 μL,下游引物1.0 μL, DNA模板1.0 μL, ddH₂O 9.5 μL。产物用1.0%琼脂糖凝胶电泳检测,委托生工生物工程(上海)有限公司测序。

将所得的序列与GenBank核酸数据库(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>)中的相关序列进行一致性比较。利用Phylosuite 1.2.2软件进行序列的比对与拼接,再手动对结果进行校正,通过MEGA 7.0软件对代表性菌株进行系统发育分析,通过最大似然法(maximum likelihood, ML)构建多基因联合系统发育树对其分类地位进行确认。

2 结果与分析

2.1 发病症状与分离结果

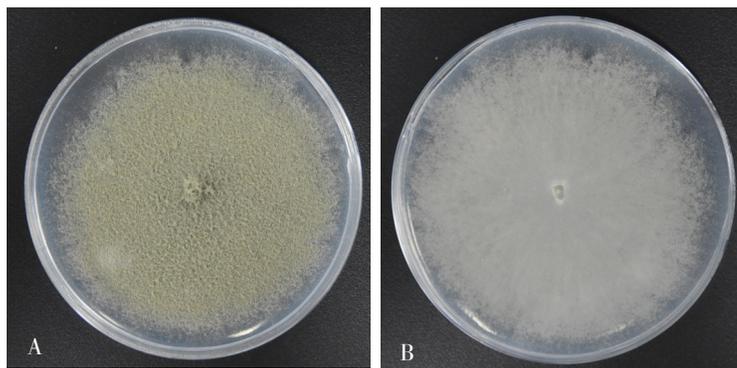
该病害多从伤口侵入,向内扩展,患病部位变褐,腐烂坏死,严重部位表面密生绿色霉层。干燥条件下病原菌侵入速度慢,坏死部位呈干腐状,病

斑形状不规则,病健交界明显(图1)。

通过对紫山药根茎发病组织的病原菌进行分离与纯化,共获得15株纯培养物,菌落形态基本一致(图2)。在PDA培养基上菌落近圆形,正面有绿色霉层,背面白色,散射状生长,致密,有轮纹。



图1 紫山药干腐病发病症状
Fig. 1 Symptoms of purple yam dry rot disease



注:A. 菌落正面;B. 菌落反面。
Note: A. Colony front; B. Colony opposite.

图2 菌落形态

Fig. 2 Colony morphology

2.2 分离物的致病性测定

随机选取代表菌株SY2-2进行接种。3d后在山药根茎横切面即可长出霉状物,7d后病部密生

灰绿色霉层,伤口部位变褐坏死,沿着伤口处纵切,山药表皮下组织腐烂成深褐色(图3-C~D),对照组山药无明显发病症状(图3-A~B)。采用组织分离



注:A~B为对照山药的横切面和纵切面;C~D为接种山药的横切面和纵切面。

Note: A-B represent transverse and longitudinal sections of control, respectively; C-D represent transverse and longitudinal sections of inoculated SY2-2, respectively.

图3 菌株SY2-2的致病性测定

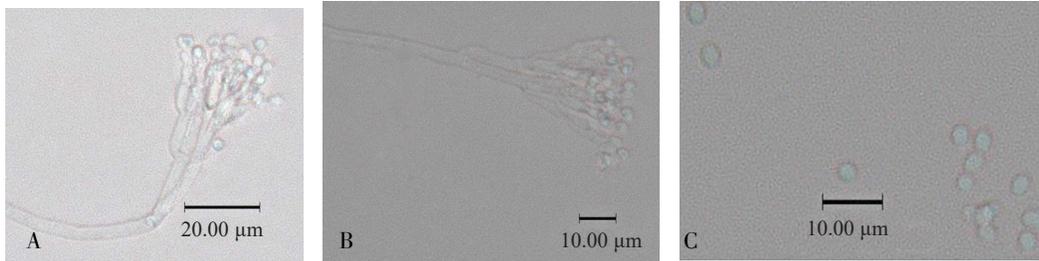
Fig. 3 Pathogenicity determination of strain SY2-2

法对接种山药发病部位进行再分离,发现分离物与接种菌株的菌落形态及孢子形态一致,确认接种菌为紫山药干腐病的病原菌。

2.3 病原菌的形态学鉴定

菌株 SY2-2 于 PDA 培养基上 25 °C 恒温培养,生长初期菌丝呈绒毛状、白色,后期正面菌丝为绿色,

边缘呈黄白色。分生孢子梗经过多次分枝,产生几轮对称或不对称的小梗,形如扫帚,其上有 2~3 个分生孢子,分生孢子椭圆形或球形,长 2.42~4.56 μm,宽 2.32~4.01 μm,分生孢子平均大小为 3.82 μm×3.11 μm (图 4)。参考《真菌鉴定手册》^[10],初步将菌株 SY2-2 鉴定为青霉菌属 *Penicillium* spp.。



注:A~B 为分生孢子梗和分生孢子;C 为分生孢子。

Note: A-B represent conidiophores and conidia; C represents conidia.

图 4 菌株 SY2-2 形态特征

Fig. 4 Morphological characteristics of strain SY2-2

2.4 病原菌的分子生物学鉴定

对菌株 SY2-2 的基因组 DNA 进行 ITS 和 *RPB2* 基因的 PCR 扩增,分别获得长度为 566 bp 和 982 bp 的序列。以 *Penicillium herquei* 为外群通

过多基因联合构建的系统发育树(图 5)结果可知,SY2-2 与 *Penicillium sclerotigenum* 聚在一枝上,且支持率为 100%。结合形态学鉴定,将紫山药干腐病病原菌鉴定为产核青霉菌 *Penicillium sclerotigenum*。

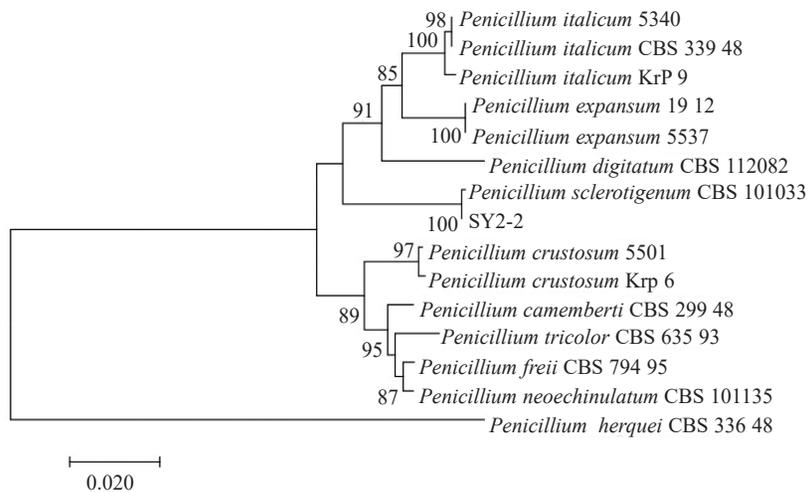


图 5 基于 SY2-2 的 ITS 和 *RPB2* 基因构建的系统发育树

Fig. 5 Phylogenetic tree constructed based on ITS and *RPB2* gene sequence of SY2-2

3 讨论与结论

由 *P. sclerotigenum* 引起的薯蓣干腐病在尼日利亚、印度、日本等多个国家已有报道,是薯蓣采后病害的病原菌之一^[13-15]。晏卫红等^[7]于 2007 年在国内首次报道 *P. sclerotigenum* 侵染薯蓣引起干腐病

在广西桂平县金田镇的发生和危害。笔者将贵州省兴义市送检的紫山药病害的病原菌鉴定为产核青霉菌 *P. sclerotigenum*,与姚甜甜^[8]报道的山药青霉腐烂病及日本报道的山药蓝霉病病原中的一种病菌一致^[16]。因病害发生后,症状主要表现为干腐,因此笔者确定该病害为紫山药干腐病。产核青霉菌

P. sclerotigenum 除了能引起山药腐烂病外,还能引起栗仁、苹果和梨等果树的腐烂病^[17-18]。

山药块茎表面的外皮具有保护作用,病原物很难穿透外皮进入山药内部,但是山药块茎在采收贮藏的过程中很容易损伤,出现伤口,而产核青霉菌多数通过伤口进行侵染。霍佳欢等^[17]通过对 *P. sclerotigenum* 的不同培养条件的研究,结果表明,产核青霉菌菌丝生长和产孢的温度为 25 °C,建议将山药置于低温环境下贮藏。Plumbley 等^[19]报道了用苯菌灵、抑霉唑两种药剂处理薯蓣可以抑制或减少贮藏期由 *P. sclerotigenum* 引起的块茎腐烂。姚甜甜^[8]研究表明,戊唑醇 1000~2000 倍液、啞菌酯 200~400 倍液、咪鲜胺 200~300 倍液、氟硅唑 2000~4000 倍液、抑霉唑硫酸盐 200~500 倍液、苯醚甲环唑 200~400 倍液、丙环唑 100~400 倍液对防治山药青霉腐烂病效果最好,其中在室内接种测定和冷库试验的防治效果均为 100%,并建议在山药种茎贮藏期采用上述药剂对该病害进行防控;该研究还对石灰与黏土的 9 种不同配比对青霉菌的抑制活性和冷库贮藏效果进行筛选评价,发现熟石灰和深层黏土按照体积比 2:5 处理山药切口的效果最好。

笔者通过对贵州省黔西南州兴义市发生的紫山药干腐病病菌的分离纯化、致病性测定、形态学和分子生物学鉴定,将该病害的病原菌鉴定为产核青霉菌 *P. sclerotigenum*。

参考文献

- [1] 周新勇,宋曙辉,王文琪,等.紫参薯及其同属植物铁杆山药中营养成分分析[J].安徽农业科学,2010,38(35):20005-20007.
- [2] 韩晓勇,王立,殷剑美,等.紫山药组织培养快繁技术优化[J].浙江农业科学,2019,60(5):759-761.
- [3] 刘庞源,宋曙辉,张宝海,等.紫山药种质资源及其利用研究[J].北方园艺,2011(23):55-56.
- [4] 沈丽淘,李平,王学贵,等.山药根腐病菌(*Fusarium solani*)的生物学特性[J].四川农业大学学报,2012,30(3):313-318.
- [5] 陈玉涵,马心瑶,田夏夏,等.陕西榆林山药根腐病病原菌的分离与鉴定[J].西北农业学报,2022,31(11):1521-1533.
- [6] 兰成云,高旭利,李永腾,等.山药病虫害研究进展[J].中国瓜菜,2022,35(12):7-19.
- [7] 晏卫红,黄思良,王永娇,等.中国薯蓣干腐病的病原鉴定[J].植物保护,2007,33(3):53-57.
- [8] 姚甜甜.山药贮藏期青霉腐烂病原鉴定及不同防治措施[D].山东泰安:山东农业大学,2020.
- [9] 方中达.植病研究方法[M].3版.北京:中国农业出版社,1998.
- [10] 魏景超.真菌鉴定手册[M].上海:上海科学技术出版社,1979.
- [11] INNIS M A, GELFAND D H, SNINSKY J J, et al. PCR protocols: A guide to methods and applications[M]. California: Academic Press, 1990.
- [12] HERNANDEZ-RESTREPO M, GROENEWALD J Z, CROUS P W. Taxonomic and phylogenetic re-evaluation of *Microdochium*, *Monographella* and *Idriella*[J]. Persoonia, 2016, 36(1):57-82.
- [13] NWANKITI A O, ARENE O B. Diseases of yam in Nigeria[J]. International Journal of Pest Management, 1978, 24(4):486-494.
- [14] AGRAWAL S B, GUPTA M N. A new record of *Penicillium sclerotigenum* causing dry rot of 'ratulu' *Dioscorea alata* [J]. Indian Phytopathology, 1973, 26(3):577-578.
- [15] SHISHIYAMA J, ITO K, ITO F, et al. Identification and pathogenicity of *Penicillium* species isolated from post harvest diseased fruits and vegetables[J]. Memoirs of the Faculty of Agriculture of Kinki, 1996(29):77-85.
- [16] UY R J, KAYAMORI M, NAKASHIMA C. Characterization of *Penicillium* species isolated from *Dioscorea polystachya* in Hokkaido, Japan[J]. Mycoscience, 2023, 64(1):11-18.
- [17] 霍佳欢,李双民,温晓蕾,等.不同培养条件对栗仁菌核青霉菌生长的影响[J].江苏农业科学,2021,49(23):129-132.
- [18] OLIVEIRA I S, MOURA R M, LUZ E D M N, et al. Post-harvest pathogenicity of *Penicillium sclerotigenum* to fruits and vegetables[J]. Fitopatologia Brasileira, 2006, 31(4):408-410.
- [19] PLUMBLEY R A, COX J, KILMINSTER K, et al. The effect of imazalil in the control of decay in yellow yam caused by *Penicillium sclerotigenum*[J]. Annals of Applied Biology, 1985, 106(2):277-284.