



甘肃省马铃薯黑痣病菌融合群鉴定及生物药剂筛选

黄振博¹,李继平^{1,2},郑果^{1,2},王立²,惠娜娜²,赵常权¹,李欣雨¹,拜治民¹

(1. 甘肃农业大学 植物保护学院,兰州 730070;2. 甘肃省农业科学院 植物保护研究所,兰州 730070)

摘要 为明确甘肃省马铃薯黑痣病的融合群类型及优势致病融合群,筛选对优势致病融合群防效较好的生物农药,对分离纯化得到的75株立枯丝核菌菌株进行融合群测定和室内毒力测定,结果表明:75株立枯丝核菌分为3个融合群包括AG-3、AG4-HG-II和AG-5,其中AG-3为优势致病融合群,占有菌株的66.67%,AG4-HG-II和AG-5的占比分别为10.67%和22.67%。10种生物药剂对AG-3的室内毒力测定结果表明,1000亿/g枯草芽孢杆菌WP和3亿/g哈茨木霉WP的抑制效果较好,EC₅₀分别为0.0354 mg/L和0.0662 mg/L。

关键词 马铃薯黑痣病;立枯丝核菌融合群;生物杀菌剂;室内毒力

马铃薯(*Solanum tuberosum* L.)具有耐干旱、耐瘠薄、耐低温、产量高等优点,其已成为甘肃省带动农民增收的朝阳产业。2022年甘肃省马铃薯种植面积达到57.61万hm²,占全国总种植面积的19%;总产量达到222.6万t,占全国总产量的12.4%。随着国家对马铃薯主粮化战略的推进和实施,马铃薯种植规模逐年加大,重茬种植问题日益突出,马铃薯土传病害呈现逐年加重趋势,尤其是马铃薯黑痣病发生更加普遍,严重影响马铃薯的产量和品质。马铃薯黑痣病为立枯丝核菌(*Rhizoctonia solani*)侵染引起,立枯丝核菌不仅可侵染马铃薯,还可以侵染其他作物^[1]。马铃薯已报道的立枯丝核菌目前被分为14个融合群(AG-1~AG-13和AG-BI)^[2]。据报道我国的优势融合群是AG-3且分布广泛,内蒙古、山东、山西、青海、云南的优势致病融合群均为AG-3^[1-8]。

马铃薯黑痣病的防控目前主要以化学农药为主,化学农药防控具有见效快的优势,弊端是对环境造成污染,且对人身健康存在一定危害。生物农药具环境友好和安全特性,是现代植保的发展趋势。甘肃省作为马铃薯生产大省,其黑痣病的防控对于保障马铃薯产业健康发展具有重要意义。

本研究对甘肃省采集的马铃薯黑痣病病样进行黑痣病融合群鉴定,旨在明确甘肃省马铃薯黑痣病融合群类型及优势致病融合群,并选取10种生物农药对优势致病融合群进行室内毒力测定,以期筛选出有效的生物农药。

1 材料与方法

1.1 供试菌株

马铃薯黑痣病病样采自甘肃省兰州、定西、白银等6个市,共80个样品,分离纯化鉴定后得到75株立枯丝核菌菌株。本试验已知融合群的标准菌株为:AG-A、AG-Fa、AG-K、AG-1-IB、AG-2-1、AG-3PT、AG-4HGII、AG-4HGIII和AG-5,共9个融合群,均由中国农业大学植物保护学院吴学宏教授惠赠。

1.2 供试药剂

3亿/g哈茨木霉可湿性粉剂(山东禾宜生物科技有限公司)、0.3%丁子香酚可湿液剂(保定市亚达益农农业科技有限公司)、10%多抗霉素可湿性粉剂(陕西麦可罗生物科技有限公司)、1.3%苦参碱悬浮剂(天津市恒源伟业科技发展有限公司)、1%申嗪霉素悬浮剂(上海农乐生物制品股

收稿日期:2024-09-05 修回日期:2024-11-05

基金项目:甘肃省科技计划(20CX9NA091);甘肃省农业科学院院级科研计划(2024GAAS16);甘肃省省级科技计划(18YF1NA095-1)。

第一作者:黄振博,男,硕士研究生,从事植物病理学研究。E-mail:1822427028@qq.com

通信作者:李继平,男,研究员,主要从事植物病虫害及防控技术研究。E-mail:gsljp@163.com

郑果,男,研究员,主要从事植物病虫害及防控技术研究。E-mail:zhengguo@gsagr.ac.cn

份有限公司)、1%蛇床子素水乳剂(山东惠民中联生物科技有限公司)、24%井冈霉素水剂(武汉科诺生物科技股份有限公司)、1 000 亿/g 枯草芽孢杆菌可湿性粉剂(山东秀邦生物科技有限公司)、100 亿/mL 解淀粉芽孢杆菌液体(武汉科诺生物科技股份有限公司)、80%乙蒜素乳油(开封大地农化生物科技有限公司)。

1.3 菌丝融合群鉴定

1.3.1 对峙培养法鉴定黑痣病融合群 马铃薯黑痣病融合群采用陈延熙等^[9]改进的载玻片对峙培养法进行鉴定。

1.3.2 5.8 S rDNA-ITS 序列分析鉴定融合群

供试菌株 DNA 的提取:将所有供试菌株先在 PDA 平板上 25% 黑暗培养 3 d,然后用北京索莱宝科技有限公司生产的真菌基因组 DNA 提取试剂盒(Fungi Genomic DNA Extraction Kit)提取 DNA。

PCR 扩增和 5.8 S rDNA-ITS 序列测定:将供试菌株的基因组 DNA 为模板,选用引物 ITS1 和 ITS4 进行 PCR 扩增。选用 25 μ L 反应体系, ddH₂O 8.5 μ L,引物 ITS1 和 ITS 各 1 μ L, DNA 模板 2 μ L, 2 \times Taq PCR Green. Mix 12.5 μ L。

扩增程序为:95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min;95 $^{\circ}$ C 变性 1 min,58 $^{\circ}$ C 退火 45 s,72 $^{\circ}$ C 延申 1 min,35 个循环;72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min;4 $^{\circ}$ C 保存。扩增产物用 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测(电泳缓冲液为 0.5 \times TBE),上样量 5 μ L。扩增产物送至生工生物工程(上海)股份有限公司进行双向测序并拼接。

序列分析:将所测得的菌株序列在 NCBI 上进行 BLAST 分析,同时在 NCBI 上下载其他代表融合群的序列。运用软件 MEGA11,采用 Nj 法构建系统发育树,进行融合群的分析及确定。

1.4 室内毒力测定

采用生长速率法测定。用直径为 5.0 mm 生物打孔器从活化 3 d 的菌落边缘打取菌饼,按预先设计好的各药剂浓度制备对应的 PDA 平板,每个处理 3 次重复。将打取的菌饼分别接到含药培养基平板上,置 25 $^{\circ}$ C 恒温培养箱黑暗培养 3 d,用游标卡尺十字方向测定菌落直径,求平均值,减去 5.0 mm 菌饼直径计算相对抑制率。

抑制率 = (对照菌落直径 - 处理菌落直径) / (对照菌落直径 - 5) \times 100%

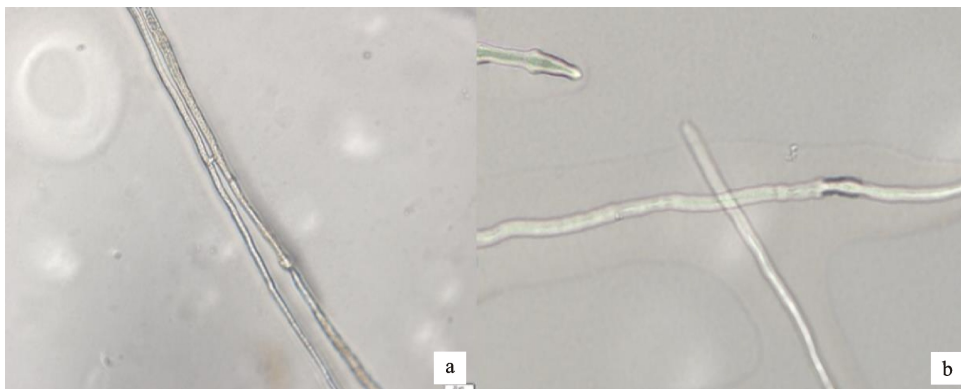
1.5 数据处理

采用 Excel 2016 和 DPS 9.01 数据处理系统软件对各药剂对菌株的毒力回归方程、相关系数(r)和 EC₅₀ 进行计算分析。

2 结果与分析

2.1 马铃薯黑痣病融合群鉴定

2.1.1 对峙培养结果 75 株菌株经对峙培养后分为 3 个融合群,分别为 AG-3、AG4-HG-II 和 AG-5(图 1),其中属于 AG-3 融合群的菌株有 50 株,占所测菌株的 66.67%;AG4-HG-II 融合亚群的菌株有 8 株,占所测菌株的 10.67%;AG-5 融合群的菌株有 17 株,占所测菌株的 22.67%。



a. 完全融合; b. 完全不融合

a. Complete fusion; b. Non-fusion

图 1 菌丝融合类型

Fig. 1 Hyphal fusion types

2.1.2 5.8 S rDNA-ITS 序列分析鉴定融合群 其中编号为 PT8、PT9、PT67、PT29、PT74、PT66、PT32 和 PT39 的待测菌株与代表 AG4-HG-II 融合亚群的菌株聚成一簇,确定以上编号

待测菌株属于 AG4-HG-II 融合亚群,占所测菌株的 16.67%;编号为 PT42、PT60、PT7、PT3、PT46、PT48、PT61、PT47、PT70、PT33、PT37、PT49、PT75、PT24、PT19、PT16 和 PT2 的待测

表 1 不同生物药剂对 AG-3 的毒力测定
Table 1 Toxicity of different biological agents against AG-3

供试药剂 Testagents	毒力回归方程 Toxicity regression equation	抑制中浓度/ (mg/L) EC ₅₀	95%置信限/ (mg/L) 95% confidence limits	相关系数(r) Correlation coefficient
3 亿/g 哈茨木霉可湿性粉剂 3×10 ⁸ cfu/g <i>Trichoderma harzianum</i> WP	$y=5.3735+0.3168x$	0.0662	0.0146~0.3000	0.9575
0.3% 丁香酚可溶液剂 Eugenol 0.3% SL	$y=4.8868+0.7108x$	1.4429	1.2895~1.6146	0.9968
10% 多抗霉素可湿性粉剂 Polyoxin 10% WP	$y=4.7403+0.6524x$	2.5005	1.3465~4.6434	0.9260
1.3% 苦参碱悬浮剂 Matrine 1.3% SC	$y=3.2286+0.7334x$	260.2818	222.6663~304.252	0.9950
1% 申啉霉素悬浮剂 Phenazine-1-carboxylic acid 1% SC	$y=4.7568+0.6722x$	2.3004	1.8182~2.9103	0.9892
1% 蛇床子素水乳剂 Osthole 1% EW	$y=3.9583+0.7881x$	20.9795	18.4537~23.8509	0.9948
24% 井冈霉素水剂 Validamycin 24% AS	$y=4.1169+0.2803x$	1413.667	381.7722~5234.68	0.8646
1 000 亿/g 枯草芽孢杆菌可湿性粉剂 1×10 ¹¹ cfu/g <i>Bacillus subtilis</i> WP	$y=5.6119+0.4216x$	0.0354	0.0157~0.0795	0.9818
100 亿/mL 解淀粉芽孢杆菌液体 1×10 ¹⁰ cfu/mL <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> LD	$y=5.3887+0.4032x$	0.1086	0.0904~0.1306	0.9988
80% 乙蒜素乳油 Ethylicin 80% EC	$y=4.6556+0.8807x$	2.4607	2.3157~2.6147	0.9990

注:毒力回归方程中 y 为几率值, x 为浓度对数。

Note: In the toxicity regression equation, y represents the probability value (or probit value), and x represents the logarithm of the concentration.

的最适寄主是马铃薯和魔芋,这可能是 AG-3 融合群是国内多数地区的优势致病融合群的原因之一。陈爱昌等^[11]通过对甘肃省定西市采集的马铃薯黑痣病病样进行鉴定,认为定西市的优势致病融合群为 AG-3,而王银钰等^[12]的研究表明定西市的优势致病融合群为 AG-5,原因可能是气候条件、栽培管理等因素导致病原菌的遗传变异和种群结构的变化。此外,不同时间采集的样本也可能因病原菌的季节性变化而存在差异,因此,样本来源和采集时间的差异可能导致鉴定结果不同,具体原因有待进一步研究。

本研究结果表明,1 000 亿/g 枯草芽孢杆菌 WP 对 AG-3 的毒力最强,其次是 3 亿/g 哈茨木霉 WP,毒力最弱的是 24% 井冈霉素 AS。目前国内未见有关枯草芽孢杆菌对立枯丝核菌的室内毒力测定的相关报道,但许丽婷等^[13]在对马铃薯黑痣病的防效研究时发现一株生防菌,在田间试验中该菌株对黑痣病防效显著,在收获期防效可达 54.51%,后经鉴定该菌株为枯草芽孢杆菌。陈建保^[14]发现在马铃薯播种时沟施枯草芽孢杆菌水剂可有效抑制黑痣病的发生,在马铃薯生长的各个阶段防效均在 60% 以上,收获期防效可达

到 67.3%。本研究结果可对上述报道作进一步补充。

本研究通过室内毒力测定筛选出 1 000 亿/g 枯草芽孢杆菌对 AG-3 融合群有较强的毒力,但并未进行田间防效试验,田间会受到环境等诸多因素的影响,在田间的防效有待进一步研究。

参考文献 Reference:

[1] 李晓妮,徐娜娜,于金凤. 中国北方马铃薯黑痣病立枯丝核菌的融合群鉴定[J]. 菌物学报,2014,33(3):584-593.
 [2] 刘霞,冯蕊,高达芳,等. 云南省马铃薯黑痣病原菌融合群鉴定及 8 种药剂对其的毒力[J]. 植物保护,2016,42(2):165-170.
 [3] 张明会,张雨竹,孙冬梅. 马铃薯立枯丝核菌融合群的确定及其对马铃薯侵染的观察[J]. 黑龙江农业科学,2016(3):51-54.
 [4] 曹春梅,王晓娇,许飞,等. 内蒙古地区马铃薯黑痣病立枯丝核菌融合群及致病性研究[J]. 中国马铃薯,2018,32(5):293-302.
 [5] 王宇. 河北和内蒙古马铃薯黑痣病菌遗传多样性研究[D]. 河北保定:河北农业大学,2012.
 [6] 田晓燕,蒙美莲,张笑宇,等. 马铃薯黑痣病菌融合群的鉴定[J]. 中国马铃薯,2011,25(5):298-301.
 [7] 张春艳,杨志辉,王宇,等. 内蒙古马铃薯黑痣病菌融合群的测定与分析[J]. 植物保护学报,2014,41(4):410-415.

- [8] 牟明,赵伟,杨明秀,等.黑龙江马铃薯黑痣病菌生物学特性及菌丝融合群的鉴定[J].中国瓜菜,2017,30(10):12-17.
- [9] 陈延熙,张敦华,段霞渝,等.关于 *RHIZOCTONIA SOLANI* 菌丝融合分类和有性世代的研究[J].植物病理学报,1985,15(3):139-143.
- [10] ANDERSON N A. The genetics and pathology of *Rhizoctonia solani* [J]. *Annual Review of Phytopathology*, 1982,20:329-347
- [11] 陈爱昌,魏周全,骆得功,等.甘肃省定西市马铃薯黑痣病菌菌丝融合群的鉴定及药剂筛选[J].植物保护,2016,42(1):197-202,248.
- [12] 王银钰,李青,杨成德,等.甘肃省安定区马铃薯黑痣病菌菌丝融合群鉴定及其越冬能力初探[J].中国植保导刊,2020,40(6):11-16.
- [13] 许丽婷,陈佳欣,李欢欢,等.生防菌 XC-1 的筛选、鉴定及其对马铃薯黑痣病的防效研究[J].植物病理学报,2021,51(3):413-422
- [14] 陈建保.枯草芽孢杆菌和啮菌酯对马铃薯黑痣病的田间防效[J].中国植保导刊,2015,35(12):55-57.

Identification of Anastomosis Groups of *Rhizoctonia solani* Causing Potato Black Scurf and Screening of Biological Control Agents in Gansu Province

HUANG Zhenbo¹, LI Jiping^{1,2}, ZHENG Guo^{1,2}, WANG Li², HUI Nana², ZHAO Changquan¹, LI Xinyu¹ and BAI Zhimin¹

(1. College of Plant Protection, Gansu Agricultural University, Lanzhou 730070, China;

2. Institute of Plant Protection, Gansu Academy of Agricultural Sciences, Lanzhou 730070, China)

Abstract To determine the anastomosis group (AG) types and identify the predominant pathogenic AG of potato black scurf disease in Gansu Province, and to screen biological control agents against the dominant pathogenic group. This study identified the anastomosis groups and evaluated the indoor virulence of 75 purified isolates of *Rhizoctonia solani*. The results showed that isolates belonged to three AGs: AG-3, AG4-HG-II, and AG-5, with AG-3 identified as the predominant pathogenic group, accounting for 66.67% of all isolates. The proportions of AG4-HG-II and AG-5 were 10.67% and 22.67% respectively. Indoor toxicity test of 10 biological agents against AG-3 indicated that *Bacillus subtilis* WP (1.0×10^{11} CFU/g) and *Trichoderma harzianum* WP (3.0×10^8 CFU/g) exhibited the most effective activities, with EC_{50} values of 0.035 4 mg/L and 0.066 2 mg/L respectively.

Key words Potato black scurf; Anastomosis group of *Rhizoctonia solani*; Biological fungicides; Indoor toxicity

Received 2024-09-05

Returned 2024-11-05

Foundation item Science and Technology Project of Gansu Province (No. 20CX9NA091); Institute-Level Scientific Research Planning Project of Gansu Academy of Agricultural Sciences (No. 2024GAAS16); Provincial Science and Technology Plan Project of Gansu Province (No. 18YF1NA095-1).

First author HUANG Zhenbo, male, master student. Research area: plant pathology. E-mail: 1822427028@qq.com

Corresponding author LI Jiping, male, research fellow. Research area: plant diseases and integrated prevention. E-mail: gslip@163.com

ZHENG Guo, male, research fellow. Research area: plant diseases and integrated prevention. E-mail: zhengguo@gsagr.ac.cn

(责任编辑:郭柏寿 Responsible editor: GUO Baishou)