

# 乌头叶面微生物菌群变化特征及其与乌头霜霉病相关性

李娜, 胡亮, 王婷, 欧洪, 王光志\*

(成都中医药大学, 中药材标准化教育部重点实验室, 中药资源系统研究与  
开发利用省部共建国家重点实验室培育基地, 成都 611137)

**[摘要]** **目的:**以四川江油栽培乌头为研究对象,探索乌头叶面微生物菌群动态变化特征及其与乌头霜霉病的相关性。**方法:**收集不同病害等级的乌头霜霉病叶片,摇床震荡与超声结合的方法提取乌头叶面微生物,稀释平板计数法测定乌头叶面细菌,真菌数量。**结果:**乌头霜霉病发病情况与环境温度相关,患病乌头叶面细菌,真菌数量相较于健康乌头都有所增加,且叶面其他真菌数量随着病害程度的逐渐加重而呈现出较有规律的逐渐增加趋势。**结论:**乌头霜霉病在其生长期的3月末至5月末发病迅速,且日平均气温15~20℃比较适宜乌头霜霉病病原菌的生长繁殖。乌头叶面真菌数量的变化与乌头霜霉病病害程度呈正相关。

**[关键词]** 乌头; 霜霉病; 叶面; 细菌; 真菌

**[中图分类号]** R282 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2017)05-0042-05

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfx.2017050042

**[网络出版地址]** <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20161207.1138.034.html>

**[网络出版时间]** 2016-12-07 11:38

## Variation Characteristics of Phylloplane Microbes from *Aconitum carmichaeli* and Correlation with Downy Mildew

LI Na, HU Liang, WANG Ting, OU Hong, WANG Guang-zhi\*

(Key Laboratory of Standardization of Chinese Herbal Medicine, Ministry of Education, Key Laboratory Breeding Base of Systematic Research, Development and Utilization of Chinese Medicine Resources, Co-founded by Sichuan Province and Ministry of Science and Technology, Ministry of Education, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 611137, China)

**[Abstract]** **Objective:** To explore the dynamic change characteristics of phylloplane microbe from *Aconitum carmichaeli* and its correlation with *Aconitum* downy mildew, with those cultivated in Jiangyou Sichuan as the research subjects. **Method:** The leaves with downy mildew disease at different levels were collected. Foliar microbes were extracted by combined shock shaker and ultrasound method. The count of bacteria and fungi were measured by dilution plate count method. **Result:** *Aconitum* downy mildew was associated with environmental temperature. The count of phylloplane bacteria and fungi in the leaves suffering from downy mildew of *A. carmichaeli* was increased as compared to healthy one, and the count of other fungi showed a more regular upward trend with the increasing degree of downy mildew disease of *A. carmichaeli*. **Conclusion:** *Aconitum* downy mildew from *A. carmichaeli* had rapid onset in its growth period at the end of March to the end of May, and the daily average temperature between 15℃ to 20℃ was more appropriate for the growth and reproduction of *Aconitum* downy mildew pathogens. Changes in count of phylloplane fungi from *A. carmichaeli* were positively correlated with

**[收稿日期]** 20160725(006)

**[基金项目]** 国家自然科学基金项目(30901962);四川省教育厅重点项目(15ZA0098)

**[第一作者]** 李娜,在读硕士,从事中药资源研究,Tel:18384265090,E-mail:18384265090@163.com

**[通讯作者]** \*王光志,硕士生导师,教授,从事中药资源研究与开发,Tel:13348885717,E-mail:kzwon@163.com

the degree of *Aconitum downy mildew* disease.

[Key words] *Aconitum carmichaeli*; downy mildew; phylloplane; bacteria; fungi

毛茛科植物乌头为常用药用植物,其母根川乌、子根附子为知名川产道地药材,在四川江油地区已有上千年的栽培历史<sup>[1]</sup>。近年来,随着川乌、附子药材的需求量日益增大,乌头种植面积也逐渐扩增,但连作障碍、化学农药过度使用等导致栽培地环境条件下降等问题,使得乌头在栽培过程中病害问题日益突出。相关调查表明,乌头的病害种类较多,包括白绢病、霜霉病、根腐病、叶斑病、病毒病等,其中根腐病、霜霉病、白绢病对药材产量的影响较大,这几种病害也常常相互交叉影响,严重时可引起 50% 以上的减产<sup>[2]</sup>。其中,霜霉病是乌头植株较为普遍的叶类病害,具有发病时间早、传播速度快、防治困难等特点,成为待解决的影响药材附子、川乌产量与品质的难题。

乌头霜霉病病原菌是余永年等<sup>[3-4]</sup>在 1979 年对其进行鉴定时发现的一种新的霜霉菌。经定种为鞭毛菌亚纲卵菌目霜霉科真菌乌头霜霉 *Peronospora aconiti*。唐莉等<sup>[2]</sup>对乌头霜霉病发病情况做了调查,研究了乌头霜霉病的发病症状和发病规律。自此,对乌头霜霉病的研究几近空白。针对以上问题,本课题组前期从形态学和分子生物学两方面对乌头霜霉菌进行了进一步研究,从形态学以及分子生物学的角度对其进行准确了鉴定,初步明确了乌头霜霉病病原菌为乌头霜霉 *P. aconiti*<sup>[5-6]</sup>,但乌头霜霉病的发生与其邻接生境的其他微生物的相关性还不清楚。

叶面微生物,指附生或寄生于植物叶片表面的微生物群体。叶面微生物受叶面理化条件、外界光照、温度、湿度、人为等因素的影响,呈现出数量和种类的多样性<sup>[7]</sup>。植物的叶面环境中不仅存在能引起植物病害的微生物,同时,也存在许多对植物有益的微生物,有的能促进植物生长,增强植物的抗病性,有的能降解环境污染物,固定大气中的氮等<sup>[8-10]</sup>。有研究表明,叶面微生物与植物病害可能存在定性和定量的关系,病害的发生与叶面微生物群体水平有关,叶面微生物菌群的失衡则是植物发生病害的直接诱因之一<sup>[11]</sup>。近年来,叶面微生物与植物病害的相关性研究主要集中在烟草<sup>[10]</sup>、山茶<sup>[12]</sup>、毛白杨<sup>[13]</sup>等经济、农林作物的研究当中,而在药用植物方面的研究很少。

近年来,以微生态调控的病害生物防控技术因

其高效、安全、环保等特点逐渐成为药用植物病害防控技术研究的热点,而探明植物微生物区系的组成情况和演替规律是进行微生态调控必不可少的环节。本实验以 3~5 月份健康与患霜霉病的乌头叶面微生物为研究对象,探索乌头叶面微生物数量的动态变化特征,以期揭示乌头不同生长期叶面微生物的动态变化规律及其与乌头霜霉病的相关性,为乌头霜霉病的预测及生物防治技术的研究提供理论依据。

## 1 材料

MLS-3020 型自动高压灭菌器(日本 Sanyo 公司),JA5003 型电子天平(上海良平仪器仪表有限公司),SW-CJ-1F 型超净工作台(苏州安泰空气技术有限公司),PYX-DHS-40X50 型隔水式电热恒温培养箱(上海跃进医疗器械公司)。

牛肉膏,蛋白胨,琼脂粉,蔗糖,  $K_2HPO_4$ ,  $MgSO_4$ ,  $KH_2PO_4$ , NaCl, KCl 均购自成都科龙化工试剂厂(批号别为 20160303, 20151219, 2015051201, 20121228, 2015082401, 2015082901, 2015120701, 2015042301, 2015042302);青霉素-链霉素双抗(BBI Life Sciences,批号 20150512)。供试材料为 2016 年 3~5 月采自四川省江油市太平镇普照村栽培乌头的新鲜叶片,经成都中医药大学中药资源教研室王光志教授鉴定为毛茛科植物 *Aconitum carmichaeli* 的新鲜叶。材料于每月中旬,月末各采样 1 次,采样时,选择前一天未下雨并在早上采取,尽量避免和减小降雨和阳光对叶面微生物区系的影响。参考黄瓜霜霉菌病情分级标准<sup>[14]</sup>(表 1),收集不同病害等级的乌头叶片,从乌头第 1 片完全展开叶起,每株分为上、中、下 3 层,幼叶、中叶、老叶平均采取<sup>[15-16]</sup>,每

表 1 黄瓜霜霉菌病情分级标准

Table 1 Classification standard of cucumber downy mildew disease

病情等级	分级依据
0 级	全株叶片无病
1 级	病斑面积占所在叶片面积 $\leq 1/4$
2 级	$1/4 \leq$ 病斑面积占所在叶片面积 $\leq 1/2$
3 级	$1/2 \leq$ 病斑面积占所在叶面积 $\leq 3/4$ , 病叶尚未干枯或死亡
4 级	全株大多数叶片干枯或死亡,病斑面积占所在叶片面积 $\geq 3/4$

个病害等级的样品共收集 15~30 片叶片。采集的叶片立即装入灭菌袋,最后放入低温采样箱中并带回实验室于 4℃ 冰箱中保存,备用。

## 2 方法

### 2.1 叶面微生物计数

采用稀释平板法对乌头叶面微生物进行测定。分别用牛肉膏蛋白胨培养基和马铃薯(PDA)培养基培养乌头叶面细菌和真菌。

在无菌操作台上将采回的样品剪成 1 cm 大小左右的小块,混匀后称取 5 g,转入盛有无菌 PBS 缓冲液 100 mL 的锥形瓶中,室温 150 r·min<sup>-1</sup> 震荡 30 min,超声(40 kHz)3 min<sup>[17-18]</sup> 后即得菌悬液原液。按照 10 倍稀释法<sup>[19]</sup> 将原液(菌悬液)配制成 1×10<sup>-1</sup>, 1×10<sup>-2</sup>, 1×10<sup>-3</sup> 稀释液;取各质量浓度的稀释液 0.1 mL 接种于 2 种培养基,每个浓度重复 3 次。真菌培养基在 28℃ 培养 3~5 d,细菌培养基在 37℃ 培养 1~3 d。细菌选取菌落数在 20~200 cfu 的培养皿,真菌选取菌落数在 10~100 cfu 的培养皿进行计数。微生物数量以每克叶片的菌落数表示。

叶面微生物密度 (cfu·g<sup>-1</sup>) = (菌落平均数 × 稀释倍数) / 样品质量

### 2.2 乌头霜霉病病情调查

乌头霜霉病病害调查从 2016 年 3 月中旬开始到 2016 年 5 月末结束,每月中旬,月末调查 1 次,调查地点同样在四川省江油市太平镇普照村乌头栽培基地。调查时,随机选择 5 块田地,每块田地按五点法选取 5 点,每点随机调查 40 片乌头叶片<sup>[20]</sup>,按照表 1 分级标准做记载,进行乌头霜霉病的病情调查。发病率计算公式如下<sup>[21]</sup>。

$$\text{发病率} = \text{病叶数} / \text{调查总叶数} \times 100\%$$

### 2.3 数据处理

相对湿度、平均气温气象资料由当地气象站提供。测试数据用 SPSS 20.0 统计软件进行线性回归及单因素方差分析,采用软件 Origin 8.0 作图。

## 3 结果与分析

### 3.1 气象因素与乌头霜霉病发病率的相关性分析

对定位点的气候因素随时间的变化与发病率进行了统计及其相关性分析(图 1,表 2)。发现试验点乌头霜霉病发病率总体上随着平均气温的逐渐升高而呈现逐渐上升趋势,尤其在乌头生长期的 4,5 月份,线性趋势更加明显,表明日平均气温 15~20℃ 可能比较适宜乌头霜霉病病原菌的生长繁殖。线性回归分析也表明平均气温与发病率之间存在较明显的直线相关性 ( $P < 0.05$ ),而相对湿度与发病率未见统计学意义上的相关性。

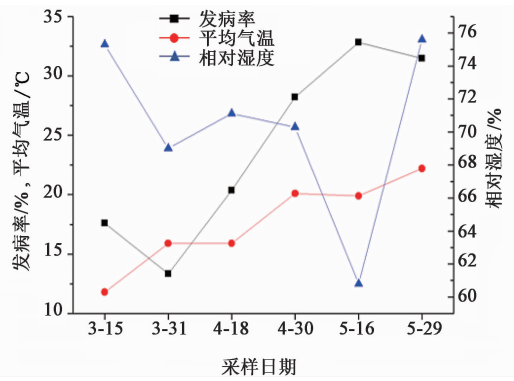


图 1 乌头霜霉病发病率及天气指数随时间的变化趋势

Fig. 1 Changes of weather index and incidence of downy mildew of *Aconitum carmichaeli*

表 2 气候因素对乌头霜霉病发病率的相关性分析

Table 2 Analysis of correlation between climatic factors and incidence of downy mildew of *Aconitum carmichaeli*

模型	R	R <sup>2</sup>	调整 R <sup>2</sup>	标准估计的误差
1	0.303 <sup>a</sup>	0.092	-0.135	8.504
2	0.834 <sup>b</sup>	0.696	0.620	4.919

注:引入因子 a. 相对湿度;b. 平均气温。

### 3.2 乌头叶面微生物数量随病害程度的动态变化特征

不同生长期乌头叶面微生物数量随病害程度的动态变化见图 2,3。5 月细菌数量随病害程度增加总体上呈现上升的趋势,4 级病害程度的细菌数量超过 10<sup>6</sup> cfu·g<sup>-1</sup>,而其余生长期细菌数量随病害程度增加总体上呈现较平稳的趋势,在 0 级和 1 级病害间有较为明显的细菌数量的上升。

随着病害程度的增加,乌头叶面其他真菌数量总体上呈逐渐上升趋势。3 月份真菌数量在 3 级病害中达到最高值,而 4 月份以及 5 月中旬真菌数量峰值出现在 4 级病害。

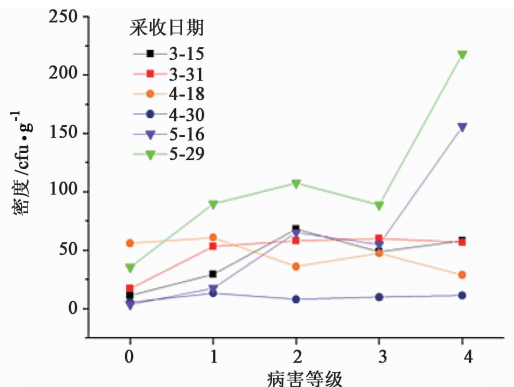


图 2 乌头叶面细菌数量随病级的变化

Fig. 2 Changes of phyloplane bacteria count with variation of disease degree of *Aconitum carmichaeli*

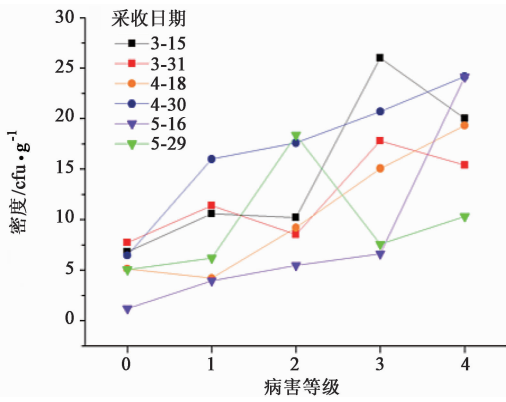


图 3 乌头叶面真菌数量随病级的变化  
Fig. 3 Changes of phylloplane fungi count with variation of disease degree of *Aconitum carmichaeli*

表 3 病害程度差异对乌头叶面微生物数量影响的方差分析  
Table 3 Variance analysis on effect of disease degree on phylloplane microbes of *Aconitum carmichaeli*

因变量	MS	SS	F	P
细菌数量	17 857.624	4 464.406	4.789 <sup>1)</sup>	0.007
真菌数量	747.177	186.794	9.486 <sup>1)</sup>	0.000

注:变异来源均为病害程度,f 均为 4;<sup>1)</sup>a = 0.01。

不同病害程度对乌头叶面微生物数量影响的方差分析结果见表 3。方差分析结果表明:不同病害程度乌头叶面细菌、真菌数量差异极显著。两两比较结果显示,4 级病害细菌数量明显多于 0,1,3 级病害,而与 2 级病害细菌数量差异不显著,细菌数量在 2,4 级病害最多,表明细菌的变化情况比较复杂;叶面真菌的数量从 2 级病害开始,患病乌头叶面真菌数量就较健康乌头有显著差异,而随着病害程度的增加,真菌也在逐渐增加。总体来说,患病乌头叶面细菌,真菌数量相较于健康乌头都有所增加,其中,真菌数量随着病害程度的增加而表现出较有规律的逐渐增加趋势。说明霜霉病的发生及发展与叶面环境中微生物尤其是真菌的数量的增加有一定关联性。

#### 4 讨论

本研究中,发现患病乌头叶面细菌,真菌数量相较于健康乌头都有所增加,且真菌数量随着病害程度的增加而表现出较有规律的在逐渐增加趋势,而乌头霜霉为专性寄生菌,表明叶面其他真菌与乌头霜霉病发生发展具有一定联系。可能存在以下原因:叶面其他微生物直接或间接受到霜霉菌不同程度的影响,叶面微生物菌群结构发生改变,拮抗或协同乌头霜霉菌的菌群活跃起来,导致叶面微生物数量上升。随着霜霉病发病程度的加重,乌头植株为了响应乌头霜霉菌的不断侵害,改变了叶面生理

生化环境,导致叶面微生物菌群生态发生改变。随着乌头霜霉病症状加重,乌头叶片逐渐干枯,卷曲程度逐渐加重,叶片背面霜霉菌产生的霉层面积逐渐增大,使得乌头叶片空间形状发生改变,为其他微生物在叶面的附着提供了更有利的空间条件<sup>[6]</sup>。

本实验就乌头叶面细菌,真菌数量的动态变化探讨叶面微生物数量的变化与乌头霜霉病的相关性。发现乌头霜霉病的发生发展与叶面真菌数量呈正相关,为更加深入了解乌头叶面微生物与乌头霜霉病的关联,还需要研究叶面微生物种类多样性与植物病害的联系。有研究表明植物叶面微生物与植物病害可能存在定性和定量的关系<sup>[15]</sup>,因此,除了比较微生物数量的差异,种类多样性的差异也是一个需要了解的重点内容。根据本实验的结果,微生物尤其是一部分真菌在叶面的繁殖很有可能与霜霉病的发生具有紧密联系,需要找到这部分关键菌类,以更加深入地揭示乌头霜霉病的发病机制;本实验采用传统培养法培养乌头叶面微生物,从中分离纯化出种类丰富的微生物类群,深入研究这些微生物与病原菌之间的相互作用不仅能更好的阐明霜霉病的致病机制,同样也为霜霉病的生物防治奠定理论基础。

本实验也进行了乌头霜霉病田间发病情况的调查。发现乌头霜霉病较适宜的发病时间是 3 月末至 5 月末,温度的变化可以影响乌头霜霉病的发病情况,日平均气温在 15 ~ 20 °C 可能比较适宜乌头霜霉病病原菌的生长繁殖。

#### [参考文献]

[ 1 ] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部 [ M ]. 北京: 中国医药科技出版社, 2015: 39.  
[ 2 ] 唐莉, 梁丽娟, 叶华智, 等. 附子常见病害的调查研究 [ J ]. 现代中药研究与实践, 2004, 6( 18 ): 29-32.  
[ 3 ] 余永年. 霜霉—新种 [ J ]. 植物病理学报, 1979, 9( 2 ): 127-130.  
[ 4 ] 余永年, 王燕林. 乌头霜霉卵孢子的发现 [ J ]. 真菌学报, 1984, 3( 4 ): 189-191.  
[ 5 ] 欧洪, 李娜, 王光志. 乌头霜霉病病原菌形态学研究 [ J ]. 甘肃中医药大学学报, 2016, 33( 2 ): 59-63.  
[ 6 ] 欧洪, 李娜, 胡亮, 等. 乌头霜霉病病原菌 rDNA-ITS 和 28S rDNA D1/D2 区序列分析 [ J ]. 中草药, 2016, 47( 15 ): 2741-2746.  
[ 7 ] Hirano S S, Upper C D. Bacteria in the leaf ecosystem with emphasis on *Pseudomonas syringae* -a pathogen, ice nucleus, and epiphyte [ J ]. Microbiol Mol Biol Rev, 2000, 64( 3 ): 624-653.  
[ 8 ] 潘建刚, 呼庆, 齐鸿雁, 等. 叶际微生物研究进展 [ J ].

- 生态学报,2011,31(2):583-592.
- [9] Kishore G K, Pande S, Podile A R. Phylloplane bacteria increase seedling emergence, growth and yield of field-grown groundnut[J]. Lett Appl Microbiol,2005,40(4):260-268.
- [10] Adriana B A, Patricia A T, Enrique H B. The importance of phyllosphere microbial populations in nitrogen cycling in the *Chaco semiarid* woodland[J]. J Trop Ecol,2004,21(1):103-107.
- [11] 刘欢欢. 烟草角斑病菌侵染的叶面微生物生态学特征分析及其生物被膜调节物的筛选[D]. 郑州:河南农业大学,2012.
- [12] 张丽娜. 山茶叶部微生物区系与灰斑病发生关系的研究[D]. 成都:四川农业大学,2009.
- [13] 郭徐鹏. 毛白杨叶际微生物多样性及对杨树溃疡病生物防治研究[D]. 咸阳:西北农林科技大学,2009.
- [14] 张立军,马伟东,魏修山,等. 黄瓜改良施肥试验[J]. 现代农业科技,2009(18):95-98.
- [15] 赵辉. 转 Bt 基因玉米叶面微生物多样性变化[D]. 济南:山东师范大学,2012.
- [16] 白燕. 四川几种竹叶部微生物区系研究[D]. 成都:四川农业大学,2011.
- [17] 张洪勋,张保国,杜方舟,等. 植物叶际微生物基因组 DNA 提取方法:中国,CN 200710120511.7[P]. 2009-02-25.
- [18] 周育,乔雄梧,王静,等. 植物叶际微生物提取方法研究[J]. 植物研究,2006,26(2):2233-2237.
- [19] 王祥红. 微生物与海洋微生物学实验[M]. 青岛:中国海洋大学出版社,2011:71-73.
- [20] 张元恩. 蔬菜植保员培训教材. 北方本[M]. 北京:金盾出版社,2008:146.
- [21] 王生荣,张俊华,冉隆贤,等. 普通植物病理学实验[M]. 北京:北京大学出版社,2013:113-115.
- [责任编辑 邹晓翠]

## 《中国实验方剂学杂志》简介

《中国实验方剂学杂志》主编为吴以岭院士,由国家中医药管理局主管,中国中医科学院中药研究所和中华中医药学会共同主办。以报道、介绍中医药研究为主旨的专业性学术期刊,创刊于1995年10月,目前为半月刊。

随着中医药政策扶持力度的加大和中医药科技创新的振兴,在中医药事业蓬勃发展的进程中,《中国实验方剂学杂志》也进入快速发展阶段! 以下是本刊在各权威数据库中的最新评价数据及收录情况:

①中国知网《中国学术期刊影响年报》(2016年版):影响力指数(CI)学科排序3/122(中医药类122本期刊中排第3名);复合影响因子1.319,学科排序9/122;

②万方数据《中国科技期刊引证报告(扩刊版)》: H 指标为16,总被引频次15 664,复合影响因子1.620,在中医药类122本期刊中排序分别为第2,2,11名;

③入选“中国科学引文数据库来源期刊”(CSCD 2015—2016);

④入选最新版《北大中文核心期刊要目总览》(2014年版);

⑤入选“中国科技论文统计源期刊”(中国科技核心期刊2016年版);

⑥入选“RCCSE 中国核心学术期刊”(2015—2016)。