

物学报, 1988, 30 (5): 524-527.

物学报, 1990, 32 (6): 490-491.

[7] 林隆泽, 王晓明. 新二萜醌——红根草对醌. 药学报, 1990, 25 (2): 154-156.

(2007 - 12 - 03 收稿)

[8] 黄秀兰, 王晓明, 黄勇, 等. 红根草内酯的化学结构. 植

2008 - 04 - 09 修回)

滇重楼根茎腐烂与小杆线虫的关系研究

杨永红^{1,2}, 刘君英¹, 王明辉², 杨昌红², 韦建荣², 马青², 管开云³

(1. 云南农业大学教育部农业生物多样性和病虫害防治重点实验室/云南省植物病理重点实验室, 云南昆明 650201; 2. 云南白药集团股份有限公司, 云南昆明 650118; 3. 中国科学院昆明植物研究所, 云南昆明 650204)

摘要 栽培滇重楼根茎腐烂严重, 从中分离得到小杆线虫 *Rhabditis* sp. 及其它土壤昆虫幼虫。通过接种实验证明滇重楼根茎腐烂严重程度与小杆线虫 *Rhabditis* sp. 原始密度密切相关。采用切块、挖孔、划伤和完整的接种方法, 均可引起发病, 最高发病率高达 94.4%。

关键词 滇重楼; 根茎腐烂; 小杆线虫

中图分类号: R282.2 **文献标识码**: A **文章编号**: 1001-4454 (2008) 10-1467-03

滇重楼 *Paris polyphylla* Smith var. *yunnansensis* (Franch.) Hand. Mazz. 分布于云南、贵州和四川, 生长在海拔 1400 ~ 3100 m 的常绿阔叶林、云南松林、竹林、灌丛或草坡, 根茎入药, 有清热解毒、消肿止痛、凉肝定惊之功效, 用于疗肿痛、咽喉肿痛、毒蛇咬伤、跌打伤痛、惊风抽搐等症^[1]。滇重楼在我国有着悠久的药用历史, 为云南白药、宫血宁、夺命丹等中成药的主要原料^[2]。

滇重楼是云南省地道稀缺贵重药材, 随着中医药产业的快速发展, 近 10 年来云南省重楼栽培面积不断扩展。由于重楼种子有二次休眠的特性, 用种子繁殖, 技术复杂、生长周期长。近年来切块繁殖取得一定进展^[3], 但根腐病非常严重, 成为栽培的关键问题。从田间调查发现, 滇重楼的根腐病发病率一般为 50%, 严重可达到 87.7%, 也影响原料的质量。本研究主要探明滇重楼根茎腐烂与小杆线虫的关系, 为防治提供依据。

1 材料与方法

滇重楼 *Paris polyphylla* var. *yunnansensis* 经云南农业大学杨永红教授鉴定。健康滇重楼植株于 2005 年 10 月引种自云南白药集团武定滇重楼种植基地, 在云南农业大学植物保护学院温室栽培。腐烂滇重楼根茎也采自该种植基地。参考文献^[4-11]方法分离,

鉴定得到小杆线虫 *Rhabditis* sp. 并按植病研究方法设计实验步骤^[12]。

1.1 小杆线虫培养

1.1.1 培养基: 马铃薯培养基 (PDA), 胡萝卜马铃薯培养基 (PCA), 重楼培养基 (PDA 培养基中马铃薯换成重楼)。

1.1.2 培养物的准备: 灰葡萄孢及从重楼根茎分离到的真菌 G 和真菌 D 接种到 PDA 或 PCA, 于 28 °C 倒置培养, 培养基表面长满菌丝, 以备培养线虫。

1.1.3 线虫消毒: 用改良贝曼漏斗分离到的线虫收集在无菌的指形管中, 3000 rpm 离心 6 min 后, 加入消毒液消毒, 用无菌水冲洗 3 遍, 定容成一定线虫浓度的悬浮液 (可在 4 °C 保存) 备用。

1.2 接种实验

1.2.1 土壤准备: 重楼病害的土壤, 121 °C 高压灭菌 2 h。分离接种线虫时使用灭菌过的细河沙过滤真菌孢子。

1.2.2 根茎准备: 提前两天细水冲洗干净滇重楼根茎, 用毛笔刷去表面泥沙, 以防伤及表面, 再用蒸馏水浸泡, 冲洗。

1.2.3 接种条件: 灭菌的土壤装入透明矿泉水瓶, 植入消毒过并表面划伤的根茎, 用线虫悬浮液喷洒

作者简介 杨永红 (1965-), 女, 教授, 博士生导师, 主要从事中药资源、中药栽培及其病虫害防治研究; Tel: 13700656671, E-mail: yyh831994@yahoo.com.cn

在根茎表面,盖上土壤。设不同温湿度及线虫浓度 6 个处理,3 次重复,培养 60 d。

1.2.4 接种方法:根茎经 0.1% 升汞及 70% 酒精消毒。实验设:

切块:重楼切成直径为 3~5 cm,厚为 1 cm 的切片,放在铺有灭菌滤纸的培养皿,切片表面分别喷上线虫悬浮液。

挖孔:在重楼根茎上挖 2~3 个孔,用移液枪注入线虫悬浮液孔,再将原先挖下来的小块封上,放入灭菌敞口玻璃瓶,盖上盖子而不拧紧。

划伤:将消毒过的根茎用解剖刀划伤,喷上线虫悬浮液,置于培养皿。

完整:喷洒线虫悬浮液在根茎表面,放在培养皿中培养。

2 结果与分析

2.1 温湿度与线虫繁殖率 用繁殖指数 Rf 说明线虫对滇重楼根茎的致病力, $Rf = Pf/Pi$ (Pf 为线虫最后的虫口密度, Pi 为接种量)。

2.1.1 常温:在 20~24 条件下, Pf 100 出现在 Pi 1000 条以上, Pf 最高为 397.2, 平均发病级数最高为 2.7, 表明滇重楼在此条件下病害较轻;但 Rf 随着 Pi 水平增加而级数降低, 最高的 Rf 为 1.6 出现在 Pi 10, 表明线虫的原始密度影响着繁殖率, 详见表 1。

表 1 常温与线虫繁殖率					
Pi(条)	根茎重量(g)	根茎内线虫数(条)	Pf(条)	Rf	发病级数
100000	4.7	1867	397.2	0.0040	2.6
10000	6.2	1067	171.1	0.0171	2.3
1000	4.3	1533	359.4	0.3594	2.7
100	6.7	633	94.1	0.9406	2
10	8.1	133	16.5	1.6461	2
CK	7.7	0	0	-	1

2.1.2 中温高湿:26~28 及每天浇水条件下的 Pf 为 100 出现在 Pi 10 以上, Pf 最高为 406.3, 平均发病级数最高为 3.7, 表明病害严重, 而且高湿影响滇重楼生长, 降低了抗病性。但线虫在滇重楼上的 Rf 同样随着 Pi 水平增加而级数降低 (表 2), 表明线虫的原始密度同样影响繁殖率。

2.1.3 高温高湿:29 每天浇水条件下的 Pf 为 100 出现在 Pi 10 以上, 平均发病级数最高为 4.3, 表明此种条件下病害发生最为严重, 即不接种线虫, 也有病害发生;高温高湿条件下, 最高的 Rf 出现在 Pi 10 上, 详见表 3。表明线虫的原始密度也影响繁殖率。

表 2 中温高湿与线虫繁殖率					
Pi(条)	块茎重量(g)	块茎内线虫数(条)	Pf(条)	Rf	发病级数
100000	8.5	1867	220.5	0.0022	2.7
10000	4.4	1500	338.3	0.0338	3.7
1000	3.9	867	222.2	0.2222	2.7
100	3.2	1300	406.3	4.0625	3.3
10	8.1	867	107.4	10.7438	2.7
CK	7.3	0	0	-	1

表 3 高温高湿与线虫繁殖率					
Pi(条)	块茎重量(g)	块茎内线虫数(条)	Pf(条)	Rf	发病级数
100000	5.9	2600	440.7	0.0044	4.3
10000	7.2	1933	269.8	0.0270	3.7
1000	4.1	2433	593.5	0.5935	4.3
100	5.5	2200	402.4	4.0244	4
10	5.6	733	131.7	13.1737	3
CK	7.3	0	0	-	1.7

2.2 温湿度与滇重楼生长 从表 4 看出苗率随着温湿度增加而降低, 且块茎严重腐烂, 发病率、发病级数和病情指数也随之增加, 显示高温和高湿的生长环境易发生滇重楼腐烂。

表 4 三种接种条件与重楼生长			
接种条件	出苗率(%)	发病率(%)	病情指数(%)
正常生长条件	50.0	66.7	29
中温高湿条件	44.4	72.2	33
高温高湿条件	0	94.4	50

2.3 接种方法与发病程度 切块接种的根茎在第 3 天出现一些淡黄色或紫红色斑点, 而 CK 没有颜色变化;第 10 天时, 切块成泛土色或土色, 油状的浑浊物增多, 开始腐烂, 而 CK 长了霉菌, 颜色没有变化;第 20 天时, 大多数切块整个表面变成土色, 中央出现蜂窝状的腐烂样。

各种不同接种方法, 以挖孔接种的虫口密度最大 (11084), 其次是切块接种 (8960) 和划伤接种 (8340), 完整根茎 (CK) 的虫口密度最小为 7291。发病级数以切块接种最高为 3.7, 其次是挖孔及划伤分别为 2.61 和 2.33, 完整根茎发病级数最小为 1.998。这说明线虫主要通过伤口对根茎造成影响, 加重根茎腐烂。详见图 1、2。

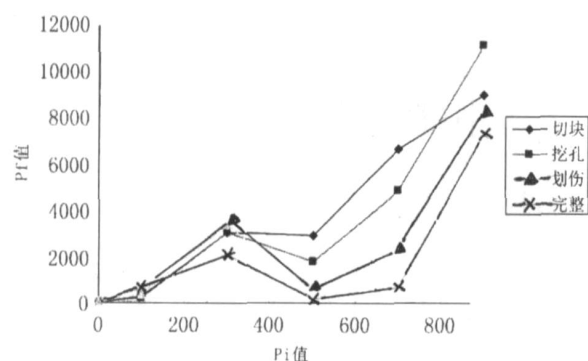


图 1 接种方法和接种量对 Pf 影响

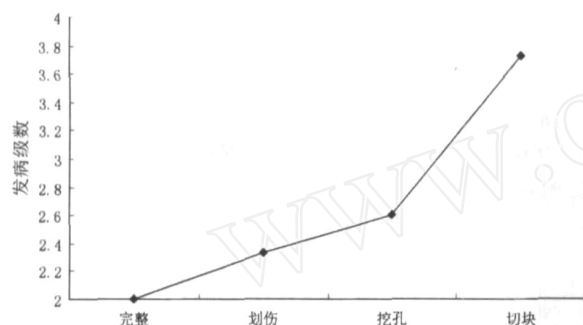


图 2 接种方法与发病级数

3 讨论

滇重楼人工栽培病虫害严重,尤其根茎腐烂,并从腐烂根茎中分离得到小杆线虫。本实验以表面消毒的线虫接种健康的根茎,无论哪种接种方法,均可引起发病,且发病程度与接种虫口数呈正相关,最高发病率可高达 94.4%。至于线虫以外的其他病原体还有待测定。

参 考 文 献

[1] 李恒. 重楼属植物. 北京:科学出版社,1998: 35.

[2] 卫生部药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部. 北京:化学工业出版社,2005: 183.

[3] 王丽萍,赵学伟. 云南重楼野生驯化及栽培技术研究初探. 中国野生植物资源,2002,21(1): 62.

[4] 杨永红,陆峻波,王明辉,等. 从文献分析看我国重楼研究进展. 中药材,2008,31(1): 165-177.

[5] 尹文英. 中国亚热带土壤动物. 北京:科学出版社,1992: 76.

[6] 胡先奇,王杨,喻盛甫. 云南药用植物根结线虫病害调查. 中药材,2001,24(12): 851-853.

[7] Park S D, Khan Z, Ryu J G, et al. Effect of initial density of *Meloidogyne hapla* on its Pathogenic Potential and reproduction in three species of medicinal plants. J. Phytopathology, 2005, 153: 250-253.

[8] Daunte S G, Anderson G L, Beuchat L R, et al. Potential role of *Diploscapter* sp. strain LKC25, a bacterivorous nematode from soil, as a vector of food-borne pathogenic bacteria to preharvest fruits and vegetables. Applied And Environmental Microbiology, 2005, (5): 2433-2437.

[9] 谢辉. 植物线虫分类学. 第二版. 北京:高等教育出版社,2005: 73.

[10] 张绍升. 植物线虫病害诊断与治理. 福州:福建科学出版社,1999: 90-95.

[11] 毕志树,陈品三译. 线虫学基础与进展——植物寄生性与土壤线虫. 北京:农业出版社,1985: 309.

[12] 方中达. 植病研究方法. 第三版. 北京:中国农业出版社,1998: 306-325.

(2007 - 12 - 03 收稿)

2008 - 05 - 20 修回)

《中药材》杂志征稿内容

- 1 药用植物栽培,包括野生药材变家种,引种药材和异地药材的引种驯化,道地药材的研究,培育优良品种,防治病虫害,改革耕作制度,提高产量、质量,组织培养,药用真菌的栽培及 GAP 基地的建设等。
- 2 动物药研究,包括药用动物的饲养和管理,资源、生态、习性的调查与观察。野生变家养与异地引种品种的驯化;用新技术、新方法提高动物药的产量与质量,动物药的药理、药化和临床实验等。
- 3 中药材鉴别,加工炮制和商品养护。
- 4 中药资源的合理开发和利用。
- 5 中药化学成分及有效成分的提取、分离及鉴定研究。
- 6 中药药理、临床试验研究。
- 7 新技术、新方法在中药材上的应用。
- 8 基础理论讲座,文献综述,专论,考证,译文,中药剂型改革,制剂,用药,药膳,经验以及报道中药店(房)的文章等。