

重庆市石柱县黄连根腐病原菌的分离与鉴定

Isolation and identification of *Coptis chinensis* root rot pathogen
in Shizhu County, Chongqing City陈姗姗¹ 罗秀媚² 杨星勇^{1*}

(1. 重庆师范大学重庆市特色作物资源工程技术研究中心, 重庆 401331; 2. 重庆大学生命科学学院, 重庆 401331)

Chen Shanshan¹ Luo Xiumei² Yang Xingyong^{1*}

(1. Chongqing Engineering Research Center of Specialty Crop Resources, Chongqing Normal University, Chongqing 401331, China; 2. School of Life Sciences, Chongqing University, Chongqing 401331, China)

黄连 *Coptis chinensis* 是一种常用中药, 具有泻火、解毒、清热、燥湿和良好的抗菌作用, 主产于重庆市石柱县, 其产量占我国黄连总产量的60%(宋旭红等, 2017)。近年来, 黄连的长期复耕、复种导致黄连根腐病发生逐年加重, 平均发病率达40%, 严重地块达80%~90%, 平均产量由2 250 kg/hm²降到750 kg/hm²以下(宋旭红等, 2017)。目前关于黄连根腐病原菌的报道较少, 在黄连产区对根腐病的防治缺乏针对性。鉴于此, 本试验结合形态特征与病原菌 rDNA 转录间隔区(ITS)序列分析来鉴定黄连根腐病的病原菌, 以期为该地区黄连根腐病的防治提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料

供试植株: 发病黄连植株于2013年5月在重庆市石柱县黄连种植区采集, 带回室内进行病原菌分离培养; 健康黄连植株由重庆市药物种植研究所提供。

培养基: 马铃薯葡萄糖琼脂(potato dextrose agar, PDA)培养基: 马铃薯200 g、葡萄糖20 g、琼脂20 g、蒸馏水1 000 mL。

试剂及仪器: *Taq* 酶和 dNTPs, 宝生物工程(大连)有限公司; 回收试剂盒, 美国 Sigma 公司; 其它试剂均为国产分析纯。Ni-E 光学显微镜, 尼康仪器(上海)有限公司; C1000 PCR 仪, 美国 Bio-Rad 公司。

1.2 方法

病原菌分离与致病性测定: 将黄连病株主根用清水洗净后, 放入70%酒精中消毒10 s, 再用1.5%(体积比)次氯酸钠溶液消毒5 min, 无菌水漂洗3次后转移至灭菌培养皿风干。将主根切成长3 mm的小

段放于PDA平板上25℃培养, 待产孢后进行单孢纯化。参照朱晓琴等(2017)方法制备浓度为10⁶个/mL的孢子悬浮液, 采用浸泡法侵染健康黄连植株根部30 min, 4次重复, 每次重复12株, 对照组用无菌水代替。将接种后的黄连植株栽培在灭菌培养基质(石英砂: 蛭石: 珍珠岩=4: 2: 1)中, 在28±1℃、湿度(85±2)%、16 h光照条件下培养15 d后调查黄连的发病情况, 并对患病根部再次进行病原菌分离。将得到的再分离菌株再次接种, 检测植株发病情况是否相同, 确认致病病原菌。

病原菌的形态学鉴定: 在PDA上单孢培养病原菌, 观察记录菌落形态、颜色以及菌丝和分生孢子的形态、大小和分隔等, 初步鉴定病原菌。

病原菌的分子生物学鉴定: 采用CTAB法提取病原菌的基因组DNA(Stewart & Via, 1993), 以真菌通用引物ITS4(5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3')和ITS5(5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3')对菌株的ITS序列进行扩增。20 μL PCR反应体系: 缓冲液2.5 μL、模板DNA 1 μL、*Taq* 聚合酶0.2 μL、10 μmol/L 通用引物ITS4和ITS5各1 μL、ddH₂O 14.3 μL。PCR反应条件: 94℃变性5 min; 94℃变性30 s, 58℃退火1 min, 72℃延伸1 min, 共30个循环; 72℃延伸10 min。将PCR扩增产物进行测序, 获得的rDNA-ITS序列在GenBank中进行相似性比对, 并通过BLAST同源性分析对病原菌进行分子鉴定, 通过Mega 5.1软件以邻接法构建系统发育树。

2 结果与分析

2.1 病原菌的分离与致病性

通过分离和纯化, 从患病黄连主根分离到4株

菌株(HL1~HL4),其孢子悬浮液接种健康黄连15 d后,接种菌株HL1的黄连发病症状与石柱县田间发病症状相同,顶端新叶黄化,须根开始腐烂,并能从其根部分离到接种菌;但接种菌株HL2、HL3、HL4和无菌水的黄连没有出现任何发病症状,且从黄连中不能分离到接种菌。致病性测定结果证明菌株HL1为黄连根腐病的致病菌,病株根部组织被破坏,木质部变黑。

2.2 病原菌的形态学鉴定

病原菌HL1在PDA平板上的菌落呈浅灰色薄绒状,气生菌丝稀少,培养基不变色(图1-A);其菌丝均为有隔膜菌丝(图1-B);小型分生孢子肾形,0~1隔,

6.0~8.0 μm ×2.5~4.0 μm ;大型分生孢子近镰刀形,两端较钝,顶端稍弯,多为2~3个隔膜,10.0~20.0 μm ×2.5~4.5 μm ;根据菌株HL1的形态特征,初步鉴定为腐皮镰孢菌 *Fusarium solani*。

2.3 病原菌的分子生物学鉴定

HL1菌株进行PCR扩增后获得600 bp特异性rDNA-ITS片段。相似性比对结果表明,该序列与 *F. solani* DBOF83和 *F. solani* XSD-28两株菌株的同源性高达99.9%和100.0%;系统发育树结果表明,菌株HL1与上述2株菌株属于同一个类群(图2);结合形态学和分子生物学特征将HL1鉴定为腐皮镰孢菌。

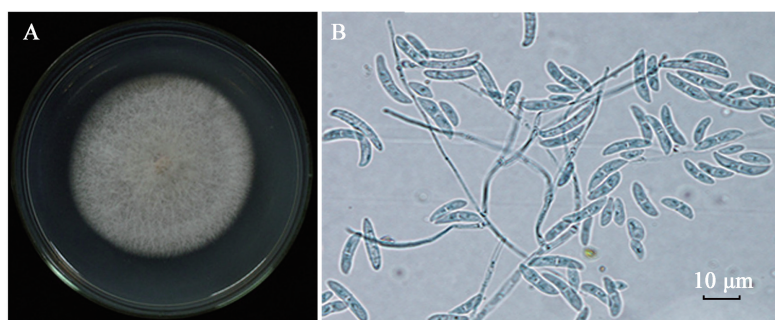


图1 黄连根腐病病原菌的形态特征

Fig. 1 Morphological characteristics of the pathogen of *Coptis chinensis* root rot

A: PDA培养基上HL1菌落; B: 菌丝和分生孢子。A: Mycelia on PDA medium; B: hypha and conidia.

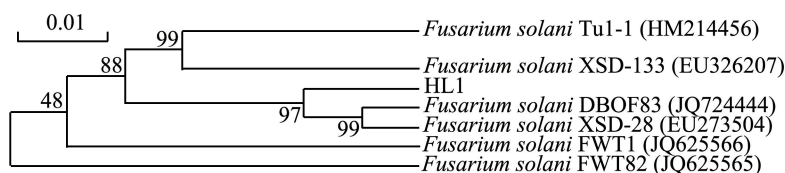


图2 基于ITS序列的黄连根腐病病原菌株HL1及相关菌株的系统进化树

Fig. 2 Phylogenetic tree of strain HL1 from *Coptis chinensis* root rot and the related strains based on ITS sequences

3 讨论

本试验从感染根腐病的黄连根部分离到4株菌株,经致病性测定只有HL1菌株引起黄连根腐病,另外3株菌株单独接种健康黄连不能致病,这3株菌株与根腐病的关系还有待进一步研究。通过形态学鉴定和分子生物学的rDNA-ITS分析鉴定,黄连根腐病病原菌属于腐皮镰孢菌 *F. solani*。腐皮镰孢菌寄主范围广、致病性强,可引起枸杞根腐病、山药褐腐病等药用植物和多种蔬菜与农作物病害。本研究结果表明,在石柱县等黄连产区黄连根腐病的病原菌为腐皮镰孢菌,关于该病原菌对黄连根系的侵染途径及致病机理,以及与另外3株非致病菌株的关系还需进一步研究。

参考文献 (References)

- Song XH, Wang Y, Li LY, Tan J. 2017. Research on bacteria microecology in root rot rhizosphere soil of *Coptis chinensis* produced in Shizhu City. China Journal of Chinese Meteria Medica, 42(7): 1304-1311 (in Chinese) [宋旭红, 王钰, 李隆云, 谭均. 2017. 石柱黄连根腐病根际土壤细菌微生态研究. 中国中药杂志, 42(7): 1304-1311]
- Stewart CN Jr., Via LE. 1993. A rapid CTAB DNA isolation technique useful for rapid fingerprinting and other PCR applications. Bio-techniques, 14(5): 748-750
- Zhu XQ, Song ZL, Pei DL. 2017. Isolation and identification of strawberry root rot pathogen in Shangqiu, Henan Province. Journal of Plant Protection, 44(2): 349-350 (in Chinese) [朱晓琴, 宋自力, 裴冬丽. 2017. 河南省商丘市草莓根腐病病原菌的分离和鉴定. 植物保护学报, 44(2): 349-350]

(责任编辑:张俊芳)