

参考文献:

[1] 赖小平, 刘心纯. 石南藤的本草考证[J]. 广州中医学院学报, 1994, 11(2): 105-110.

[2] 段书涛. 石南藤化学成分的研究[D]. 上海: 复旦大学, 2009.

[3] 韩桂秋, 黄葵, 魏丽华, 等. 石楠藤 PAF 受体拮抗剂活性成分的分离和鉴定 (I) [J]. 北京医科大学学报, 1987, 19(4): 243-245.

[4] 韩桂秋, 魏丽华, 李长龄, 等. 石南藤、山蒾活性成分的分离和结构鉴定[J]. 药学学报, 1989, 24(6): 438-443.

[5] 黄秀香, 赖红芳, 刘云英. 正交实验法优选石南藤黄酮苷的提取工艺[J]. 应用化工, 2009, 38(7): 1040-1042.

[6] 王波, 吴连花, 孙庆文, 等. 民族药石楠藤不同种质资源药材的品质分析[J]. 种子, 2014, 33(7): 60-63.

[7] Wang P P, Zhao G W, Xia W, et al. A new flavonol C-glycoside and a rare bioactive lignanamide from *Piper wallichii* Miq. Hand. -Mazz [J]. *Chin J Nat Med*, 2014, 12(5): 377-381.

[8] 雷海鹏, 陈显强, 乔春峰, 等. 山蒾藤茎化学成分研究[J]. 中药材, 2014, 37(1): 69-71.

[9] 高鹏. 离子交换树脂法纯化苦参总生物碱的工艺优选[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(13): 39-41.

[10] 李凤. 大黄等中药材有效成分的分离纯化研究[D]. 聊城: 聊城大学, 2019.

[11] 邓雪, 周云莉, 何丹, 等. *N, N*-二羟乙基甘氨酸-氢氧化钠缓冲液制备的过氧化氢酶复合纳米脂质体的特性分析及过氧化氢酶的药效学初步研究[J]. 中国医院药学杂志, 2015, 35(17): 1551-1554.

[12] Mata R, Morales I, Perez O, et al. Antimycobacterial compounds from *Piper sanctum* [J]. *J Nat Prod*, 2004, 67(12): 1961-1968.

[13] Kumar S, Arya P, Mukherjee C, et al. Novel aromatic ester from *Piper longum* and its analogues inhibit expression of cell adhesion molecules on endothelial cells [J]. *Biochemistry*, 2005, 44(48): 15944-159552.

[14] Oláh Z, Rédei D, Pecze L, et al. Pellitorine, an extract of *Tetradium daniellii*, is an antagonist of the ion channel TRPV1 [J]. *Phytomedicine*, 2017, 34(15): 44-49.

[15] Le Bars D, Gozariu M, Cadden S W. Animal models of nociception[J]. *Pharmacol Rev*, 2001, 53(4): 597-652.

[16] Thomazzi S M, Silva C B, Silveira D C R, et al. Antinociceptive and anti-inflammatory activities of *Bowdichia virgilioides* (sucupira) [J]. *J Ethnopharmacol*, 2010, 127(2): 451-456.

[17] 郭坤坤. 鼠妇镇痛抗炎作用、物质基础及质量控制的实验研究[D]. 广州: 南方医科大学, 2016.

[18] 李祖成, 王月, 赵峰, 等. 鸭跖草镇痛活性部位筛选及作用机制研究[J]. 中成药, 2020, 42(11): 3021-3024.

[19] 陆怡, 朱元章, 郭晨旭, 等. 飞龙掌血提取物的镇痛作用及相关机制研究[J]. 上海中医药杂志, 2015, 49(7): 82-86.

[20] 王海华, 王海珍, 曾瑾, 等. 水溶性蜂胶联合阿司匹林对大鼠炎性痛作用 [J]. 中成药, 2015, 37(6): 1157-1164.

守宫物种鉴定及其抗分枝杆菌活性研究

范云¹, 韩雪菲¹, 管泽豪¹, 潘沪生¹, 黄维纲¹, 王华梁^{1,2*}

(1. 上海市临床检验中心, 上海 200126; 2. 上海市实验医学研究院, 上海 200126)

摘要: **目的** 鉴定守宫物种, 并研究其抗分枝杆菌活性。**方法** 采用 12S rDNA 鉴定物种, 刃天青微孔板 (REMA) 测定提取物抑菌活性。**结果** 市售守宫对应壁虎科 3 个属。守宫石油醚提取物对“瘰癧”主要致病菌 (慢生型分枝杆菌) ——瘰癧分枝杆菌、胞内分枝杆菌、结核分枝杆菌的抑制作用最强, 最小抑菌浓度 (MIC) ≤600 μg/mL, 而对速生型分枝杆菌无明显活性。**结论** 12S rDNA 是鉴定守宫物种的有效方法。守宫提取物具有特异性抗分枝杆菌活性, 与《本草纲目》记载基本一致。

关键词: 守宫; 物种; 抗分枝杆菌活性; 12S rDNA; 刃天青微孔板 (REMA)

中图分类号: R282.5 **文献标志码:** B **文章编号:** 1001-1528(2023)03-1011-05

doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2023.03.056

收稿日期: 2021-08-24

基金项目: 国家重点研发计划项目 (2017YFC0910000); 国家传染病重大专项“十三五”项目 (2017ZX10302201); 上海市卫健委面上项目 (201940341)

作者简介: 范云 (1979—), 男, 博士, 从事分子微生物学研究。Tel: 15201956015, E-mail: fanyun@sccl.org.cn

* **通信作者:** 王华梁 (1961—), 男, 教授, 从事实验医学研究。Tel: (021) 68316300, E-mail: wanghualiang@sccl.org.cn

网络出版日期: 2022-01-20

网络出版地址: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/31.1368.R.20220119.1645.006.html>

分枝杆菌属（*Mycobacterium*）细菌是重要致病菌，其中的结核分枝杆菌每年导致约 150 万人死亡，是致死人数最多的病原菌^[1]，各种非结核分枝杆菌引发疾病的种类和数量也在逐年增加^[2]。目前，相关药物开发已严重滞后，近 50 年来仅有 3 种抗生素新药批准用于结核治疗^[3]，耐药菌则几乎同时出现^[4]，非结核分枝杆菌药物开发近乎空白，故探索新的研发策略，开拓新的药物来源已成为当务之急。虽然传统药材是重要研究方向，但研究人员大多只关注植物类^[5-6]，鲜有涉及动物类。

守宫又称壁虎、天龙等，是传统动物类中药，《本草纲目》记载它具有“疔风瘰癧”功效^[7]。疔风即麻风病，由麻风分枝杆菌复合群引起；瘰癧则为颈部结核，主要由

非结核分枝杆菌中的瘰癧分枝杆菌、鸟分枝杆菌复合体、结核分枝杆菌引起^[8]，“疔风瘰癧”的病原菌对应了分枝杆菌 3 个分类。课题组前期发现，守宫乙醇提取物的石油醚分离部位具有较好的抗结核分枝杆菌活性；本实验结合《本草纲目》，考察守宫提取物对更多致病性分枝杆菌的抑制作用。

基原准确是考察药材功效的基础，但目前守宫基原缺乏权威定义，既未收录于 2020 年版《中国药典》，也没有部颁标准，只存在于部分地方标准及中药饮片炮制规范^[9]，并且其物种来源的具体种属存在较大差异（表 1），从而影响研究结论的可靠性和重复性^[10]。为了使结论可靠，本研究采用分子生物学方法鉴定守宫物种。

表 1 守宫物种来源

年份	出处	来源	分类
1994 年	《上海市中药材标准》	壁虎科多疣壁虎或同属他种壁虎	属
1996 年	《全国中草药汇编》	壁虎科无疣壁虎、无蹼壁虎或多疣壁虎	种
1999 年	《中华本草》	壁虎科无蹼壁虎、多疣壁虎、蹼趾壁虎等	科
2015 年	《浙江省中药饮片炮制规范》	壁虎科无蹼壁虎或多疣壁虎或同属动物	属
2016 年	《江苏省中药材标准》	壁虎科无蹼壁虎或多疣壁虎	种
2018 年	《天津市中药饮片炮制规范》	壁虎科无蹼壁虎或其他几种壁虎	科

1 材料

1.1 药材 6 个来源、批次守宫购自上海当地药房及药材市场，经专家鉴定为正品。

1.2 供试菌株 由上海市肺科医院保藏并提供，具体见表 2。

表 2 供试菌株信息

分枝杆菌	拉丁名	编号或来源	培养温度/℃	培养基
结核分枝杆菌	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	H37Rv	37	7H9+10% OADC
瘰癧分枝杆菌	<i>Mycobacterium scrofulaceum</i>	ATCC 19981	37	CAMHB+5% OADC
胞内分枝杆菌	<i>Mycobacterium intracellulare</i>	ATCC 13950	37	CAMHB+5% OADC
堪萨斯分枝杆菌	<i>Mycobacterium kansasii</i>	ATCC 12478	37	CAMHB+5% OADC
海分枝分枝杆菌	<i>Mycobacterium marinum</i>	ATCC 927	30	CAMHB+5% OADC
龟分枝分枝杆菌	<i>Mycobacterium chelonae</i>	ATCC 14472	30	CAMHB
脓肿分枝分枝杆菌	<i>Mycobacterium abscessus</i>	临床分离	30	CAMHB
偶发分枝杆菌	<i>Mycobacterium fortuitum</i>	ATCC 6841	30	CAMHB
外来分枝杆菌	<i>Mycobacterium peregrinum</i>	ATCC 700686	30	CAMHB

1.3 试剂 CAMHB 培养基（上海瑞楚生物科技有限公司）；MGIT 改良 Middlebrook 7H9 培养基、OADC 增菌剂、BACTEC MGIT 960 系统配套试剂（美国 BD 公司）；DMSO（二甲亚砜）、异烟肼 [生工生物工程（上海）有限公司] ；多种来源基因组试剂盒、96 孔细胞培养板（美国 Corning 公司）。

1.4 仪器 Illumina MiSeq 测序仪（美国 Illumina 公司）；3730XL 基因测序仪（美国 ABI 公司）。

2 方法

2.1 物种鉴定

2.1.1 12S rDNA 100 g 药材干燥全体（个体数≥90 个）碾成粉末，取 100 mg 提取 DNA，使用 12S rDNA 特异性引物 L1091、H1478 进行 PCR 扩增^[11]，回收 400 bp 条带，Sanger 测序或构建文库后进行二代测序，其拼接序列按照 Mothur（version 1.39.0）^[12]去除低质量序列，以一致性 97% 1012

为阈值进行 OTU 聚类分析，取含量大于 1% 序列与 GenBank 数据库进行 BLASTN 比对，以数据库中一致性最高序列的种属作为该序列的种属特征，鉴定到种。

2.1.2 系统发育树 各样本中含量大于 1% 序列，MEGA X 软件构建系统发育树^[13]。算法采用 Neighbor-Joining，bootstrap test 设为 1 000。

2.2 抑菌活性测定

2.2.1 提取物制备 取同一批药材粉末 100 g，加入 1 000 mL 乙醇蒸馏提取 1 h，过滤回收上清，重复 2 次，合并上清，在旋转蒸发仪上浓缩，提取物重悬于 500 mL 蒸馏水中，等量石油醚萃取 3 次，浓缩并冷冻干燥，称定质量得 18.6 g 提取物，在 121 ℃下湿热灭菌 20 min，溶解于 40 mL DMSOE [DMSO-乙醇（10：1）] 中，即得（质量浓度为 460 mg/mL）。

2.2.2 待测菌液母液制备 制备浊度相当于标准麦氏 1 号

浊度管的各分枝杆菌母液，培养液稀释 50 倍后，取 200 μL 加入 7 mL 培养液中，即得，使用时取 100 μL ，加入等体积培养液。

2.2.3 抑菌活性研究 采用刃天青微孔板（REMA）测定提取物对各受试菌株的最小抑菌浓度（MIC）（即为防止刃天青由蓝转粉的最低浓度）^[14]，培养条件参考美国临床和实验室标准协会（CLSI）推荐^[15]，见表 2。96 孔板第一列孔石油醚提取物终质量浓度为 9.2 或 18.4 mg/mL，以后各列依次作 2 倍梯度稀释，设置只含培养基的阴性生长对照孔、不含提取物只含菌液的阳性生长对照孔（指示孔）。对于速生型分枝杆菌，直接在其中 1 个指示孔加入 32.5 μL 刃天青指示剂（0.015% 刃天青 20 μL 、20% 吐温-80 12.5 μL ），指示孔由蓝变粉时在所有孔中加入指示剂，3 d 内记录结果；对于慢生型分枝杆菌，培养 6 d 后加指示剂到其中 1 个指示孔中，如 3 d 内没有变成粉色则在另一孔中加入指示剂，直至指示孔变粉色，随后所有孔中加入指示剂，3 d 内记录结果，所有样本均设 3 个重复组。为了消除溶剂 DMSOE 对结果的干扰并同时测定其抑菌浓度，所有分枝杆菌实验操作均在二级生物安全实验室内进行。

表 3 守宫物种鉴定结果

序列	含量/%	种属	得分	E 值	同源性/%	同源序列
SEQ1	40	<i>Hemidactylus aquilonius</i>	457	4.00×10^{-124}	87.22	KY366209
SEQ2	27	<i>Hemidactylus frenatus</i>	743	0	100.00	KY366197
SEQ3	26	<i>Hemidactylus frenatus</i>	743	0	100.00	KY366195
SEQ4	7	<i>Gehyra mutilata</i>	745	0	99.75	AY218006

3.1.2 市售药材检测 各批药材中检测到 8 种动物序列，对应壁虎科 3 个属，而且每种至少包含 3 种动物序列，见图 2。另外，3 个注释为无蹼壁虎（*Gekko swinhonis*）的片段之间同源性小于 97%，不排除不同种的可能性。

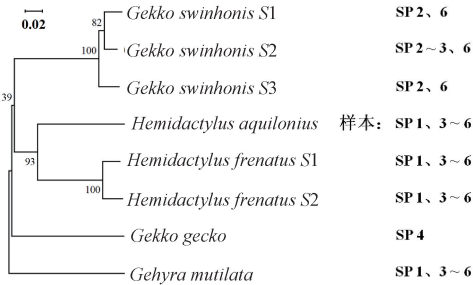


图 2 壁虎科动物及系统发育树

表 4 守宫石油醚提取物对慢生型分枝杆菌的抑制作用

分枝杆菌	MIC/($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	DMSOE 含量/%	DMSOE 对各菌株的抑制浓度/%	显色时间/d
瘰癧分枝杆菌	150	≤ 0.03	3.13	14
胞内分枝杆菌	300	≤ 0.06	3.13	18
堪萨斯分枝杆菌	300	≤ 0.06	1.56	22
结核分枝杆菌	600	≤ 0.13	6.25	21
海分枝分枝杆菌	1 200	≤ 0.25	12.50	7

3.2.2 速生型分枝杆菌 由表 5 可知，石油醚提取物仅对脓肿分枝杆菌临床分离菌株有微弱的抑制作用，而对龟分枝杆菌、偶发分枝杆菌、外来分枝杆菌均无明显活性。

3 结果

3.1 物种鉴定

3.1.1 12S rDNA Sanger 测序显示，部分区段峰形杂乱有重叠，碱基不能正确判读，提示扩增条带不是单一序列，见图 1。建库后二代测序，得到 4 种序列（占序列总数 99.6%，相互间同源性低于 97%），占比分别为 40%、27%、26%、7%，均对应壁虎科动物，分别属于蜥虎属（*Hemidactylus*）、截趾虎属（*Gehyra*），见表 3。另外，含量最高的 SEQ1（40%）虽注释为 *Hemidactylus aquilonius*，但同源性仅有 87.2%；SEQ2 与 SEQ3 之间同源性仅有 95.8%，却都注释为 *Hemidactylus frenatus*，不排除不同种的可能性。

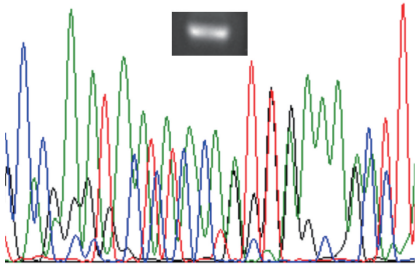


图 1 12S rDNA 片段及 Sanger 测序图

3.2 抗分枝杆菌活性研究

3.2.1 慢生型分枝杆菌 分枝杆菌按生长速度（显色时间）划分，可分为慢生型（ ≥ 7 d）、速生型（ < 7 d），而“痲风痲病”致病菌均属于慢生型^[2]。由表 4 可知，石油醚提取物对慢生型分枝杆菌均有一定抑制作用，其中对瘰癧分枝杆菌效果最好，其次为胞内分枝杆菌（属鸟分枝杆菌复合体）、堪萨斯分枝杆菌、结核分枝杆菌，而对海分枝杆菌无明显活性。目前，对天然产物抑菌浓度的阈值尚无定论，本研究参考文献 [6] 报道，认为守宫提取物对“痲病”的 3 种致病菌（结核分枝杆菌、瘰癧分枝杆菌、胞内分枝杆菌）及堪萨斯分枝杆菌均有较好抑菌活性，具有开发价值。另外，各菌株 MIC 所对应的 DMSOE 含量远低于 DMSOE 对各菌株的抑制浓度，可排除它对结果的影响。

4 讨论

本研究结合 12S rDNA 分子标签与二代测序，提供了一种鉴定守宫药材物种组成的可行方法。壁虎科动物各物种

表 5 守宫石油醚提取物对速生型分枝杆菌的抑制作用

分枝杆菌	MIC/($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	DMSOE 含量/%	DMSOE 对各菌株的抑制浓度/%	显色时间/d
脓肿分枝杆菌	2 400	≤ 0.5	12.5	4
龟分枝杆菌	>19 200	≤ 2	12.5	4
偶发分枝杆菌	>19 200	≤ 2	12.5	3
外来分枝杆菌	>19 200	≤ 2	12.5	3

间不易区分，各地使用习惯不同^[10]，可能是造成各地方标准、炮制规程、文献对守宫动物物种来源表述不一致的重要原因，这引起药材基原准确性困惑，影响对守宫药材评价及进一步开发。研究发现，市售守宫药材同时包含多种壁虎科动物，因此鉴定方法也应能识别鉴定多个物种并显示其组成。个别专利使用无蹼壁虎特定标签鉴定守宫^[16]，此类方法可鉴别药材是否包含特定物种（无蹼壁虎），但无法获取守宫中包含的其他物种及含量信息。本研究采用动物通用的 12S rDNA 分子标签，鉴定识别的物种更为全面，并已用于中药蛤蚧（同属壁虎科）真伪鉴定^[17]。同时，12S rDNA 分子标签结合二代测序解决了守宫样本物种不唯一、扩增产物不唯一造成的常规测序困难，可同时提供药材中动物物种及含量信息，是鉴定守宫的有效方法，有助于厘清守宫基因困扰。同时也需注意到，鉴定结果的种属信息，来源于数据比对，由于目前缺乏权威的壁虎科动物数据库，因此所获得的种属信息并不完全准确，有待于分类学的进一步研究，物种组成与守宫功效之间的对应关系也有待进一步解析。

从传统药材中寻找活性物质，是当前抗菌新药研发热点，但多限于药用植物。本项研究表明，抗菌活性物质的研究不应只局限于植物药材，从动物中分离抗分枝杆菌活性物质是可能的。这些活性物质可能源于动物拮抗分枝杆菌致病菌需要，如壁虎科所在蜥蜴目的多种动物可被溃疡分枝杆菌等多种分枝杆菌感染^[18]。而动物天然免疫系统中的抗菌肽^[19]、抗菌脂^[20]以及共生微生物合成的抗生素则可能是它产生的物质基础。本研究中，抑菌活性主要存在于守宫乙醇提取物石油醚分离组分，水提物则无抑菌活性，推测抑菌活性物质可能是壁虎科动物产生的生物碱、甾体或脂肪酸，亦或是这类物质组合，此外也可能来自共生微生物所分泌的脂溶性抗生素。本研究中，守宫提取物只对特定分枝杆菌有较强抑菌作用，并且与《本草纲目》中记载“疔风瘰癧”功效较为一致，对“瘰癧”的 3 种致病菌均表现出较强抑菌效果。引起“疔风”的麻风分枝杆菌复合体细菌，因无法体外培养不在本研究之中，但守宫提取物对慢生型分枝杆菌普遍具有抑菌活性，不排除对生长极端缓慢的麻风分枝杆菌^[21]也同样存在抑菌活性。这些结果提示，传统本草著作可为在动物药材中开发抗菌活性物质提供有价值线索。

参考文献：

[1] World Health Organization. Global tuberculosis report 2020 [R]. Geneva: World Health Organization, 2020.

[2] Johansen M D, Herrmann J L, Kremer L. Non-tuberculous

1014

mycobacteria and the rise of *Mycobacterium abscessus* [J]. *Nat Rev Microbiol*, 2020, 18(7): 392-407.

[3] Tweed C D, Dawson R, Burger D A, *et al.* Bedaquiline, moxifloxacin, pretomanid, and pyrazinamide during the first 8 weeks of treatment of patients with drug-susceptible or drug-resistant pulmonary tuberculosis: a multicentre, open-label, partially randomised, phase 2b trial [J]. *Lancet Respir Med*, 2019, 7(12): 1048-1058.

[4] Kadura S, King N, Nakhoul M, *et al.* Systematic review of mutations associated with resistance to the new and repurposed *Mycobacterium tuberculosis* drugs bedaquiline, clofazimine, linezolid, delamanid and pretomanid [J]. *J Antimicrob Chemother*, 2020, 75(8): 2031-2043.

[5] Lakshmanan D, Werngren J, Jose L, *et al.* Ethyl p-methoxycinnamate isolated from a traditional anti-tuberculosis medicinal herb inhibits drug resistant strains of *Mycobacterium tuberculosis in vitro* [J]. *Fitoterapia*, 2011, 82(5): 757-761.

[6] Abreu A C, McBain A J, Simoes M. Plants as sources of new antimicrobials and resistance-modifying agents [J]. *Nat Prod Rep*, 2012, 29(9): 1007-1021.

[7] 李时珍. 本草纲目[M]. 北京：人民卫生出版社，1982.

[8] Wilson J W, Jagtiani A C, Wengenack N L. *Mycobacterium scrofulaceum* disease: experience from a tertiary medical centre and review of the literature [J]. *Infect Dis (Lond)*, 2019, 51(8): 602-609.

[9] 张 荻. 壁虎烘制工艺及烘制品质量评价研究 [D]. 北京：北京中医药大学，2020.

[10] 蓝鸣生. 中药壁虎资源、临床及药理学研究进展 [J]. 内科, 2011, 6(4): 331-334.

[11] Kocher T D, Thomas W K, Meyer A, *et al.* Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals: amplification and sequencing with conserved primers [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1989, 86(16): 6196-6200.

[12] Schloss P D, Gevers D, Westcott S L. Reducing the effects of PCR amplification and sequencing artifacts on 16S rRNA-based studies [J]. *PLoS One*, 2011, 6(12): e27310.

[13] Kumar S, Stecher G, Li M, *et al.* MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms [J]. *Mol Biol Evol*, 2018, 35(6): 1547-1549.

[14] Jadaun G P S, Agarwal C, Sharma H, *et al.* Determination of ethambutol MICs for *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium avium* isolates by resazurin microtitre assay [J]. *J Antimicrob Chemother*, 2007, 60(1): 152-155.

[15] CLSI M24-A22011, Susceptibility testing of *Mycobacteria*, *Nocardiae*, and other *Aerobic Actinomycetes* [S].

[16] 李建生. 一种鉴定中药守宫的特异性引物、试剂盒及鉴别

方法：中国，CN201710254140.5[P]. 2017-06-20.

[17] 苏燕燕，丁丹丹，马婷玉，等. 蛤蚧及其混伪品基于 12S rRNA 序列的 Bar-HRM 鉴定研究[J]. 中国现代中药，2019，21(9)：1197-1205.

[18] Portaels F, Chemlal K, Elsen P, *et al.* *Mycobacterium ulcerans* in wild animals[J]. *Rev Sci Tech*, 2001，20(1)：252-264.

[19] Mookherjee N, Anderson M A, Haagsman H P, *et al.*

Antimicrobial host defence peptides: functions and clinical potential[J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2020，19(5)：311-332.

[20] Fischer C L. Antimicrobial activity of host-derived lipids[J]. *Antibiotics (Basel)*, 2020，9(2)：75.

[21] Adams L B. Susceptibility and resistance in leprosy: studies in the mouse model [J]. *Immunol Rev*, 2021，301 (1)：157-174.

滇重楼根茎腐病的致病菌分离鉴定及致病性研究

张莹莹^{1,2}，王开玲^{1,3}，赵志莲^{4*}，李海峰^{1,3*}

[1. 大理大学药学院，云南 大理 671000；2. 山西省临汾市中心医院，山西 临汾 041000；3. 云南省滇西抗病原植物资源筛选研究重点实验室（培育），云南 大理 671000；4. 大理农林职业技术学院，云南 大理 671000]

摘要：目的 探究滇重楼根茎腐病的致病菌类型及致病性。方法 采用微生物学方法及 18S rRNA 测序技术对滇重楼根茎腐病的致病菌进行分离鉴定，并通过离体回接法对分离鉴定的植物致病菌进行致病性验证。**结果** 从根茎腐病的滇重楼植物样品中分离鉴定出 7 株镰孢菌属致病真菌，包含 5 株尖孢镰刀菌 *Fusarium oxysporum* 和 2 株腐皮镰刀菌 *Fusarium solani*，分离鉴定的 7 株真菌均具有一定的致病性。**结论** 镰孢菌属尖孢镰刀菌和腐皮镰刀菌真菌是滇重楼根茎腐病的主要致病菌，对有效防治有重要参考价值。

关键词：滇重楼；根腐病；植物致病菌

中图分类号：R282 **文献标志码：**B **文章编号：**1001-1528(2023)03-1015-04

doi:10. 3969/j.issn.1001-1528. 2023. 03. 057

滇重楼 *Paris polyphylla* var. *yunnanensis* (Franch.) Hand. -Mazz. 为百合科重楼属多年生草本植物^[1-2]，是云南药用植物资源中占据产业化利用主导地位、最具代表性和全局影响力的道地药材之一^[3]。野生资源是滇重楼药材的主要来源，由于药材需求量巨大，每年的消耗量远远超出野生资源的年再生能力，加之资源再生周期长（平均需要 8~12 年）^[4]。野生资源利用已经发展成为严重的资源危机^[5]，药材种植是实现药用植物资源规模化再生的有效途径，滇重楼种植已经在云南打赢脱贫攻坚战中发挥重要作用。

滇重楼还是《全国道地药材生产基地建设规划（2018—2025 年）》西南道地药材产区主攻方向大力发展相对紧缺品种之一^[6]。但是，随着滇重楼种植产业的快速发展，在经济利益的驱使下，由于盲目引种、种植模式、气候及土壤等生态环境因素等改变，不仅影响滇重楼品质，

还致使滇重楼病害问题日益凸显，特别是滇重楼根茎腐病（产地俗称“根腐”），典型病害症状为受害根茎从尾部逐渐开始腐烂，腐烂部位呈湿状软腐或绵状软腐，染病根茎表皮颜色黑褐色，最后浸染新鲜茎部（产地俗称“茎腐”），直至根茎、茎、叶枯萎死亡^[-7-8]。滇重楼根茎腐病被称作滇重楼癌症，在滇重楼漫长的生长过程中只要患病可以导致绝收，是滇重楼种植最大的风险来源，严重制约相关产业的发展^[9-10]。

因此，本实验拟采用微生物学实验方法及 18S rRNA 测序技术对导致滇重楼根茎腐病的致病菌进行分离鉴定，再通过离体回接法对分离鉴定的植物致病菌进行致病性验证，明确滇重楼根茎腐的主要致病菌类型，以为滇重楼种植及根茎腐病的防治提供依据。

1 材料

1.1 仪器 SW-CJ-2F 型超净工作台（苏州安泰空气技术

收稿日期：2022-07-10

基金项目：云南省地方高校联合专项项目（2019FH001-031）；云南省滇西抗病原植物资源筛选研究重点实验室 2021 年度开放课题（APR202108）；大理农林职业技术学院资助项目（2016）

作者简介：张莹莹（1992—），女，硕士生，从事药用植物品质评价及生物技术研究。Tel：18334578665，E-mail：3255087594@qq.com

* 通信作者：赵志莲（1972—），女，副教授，从事药用植物品质评价及生物技术研究。E-mail：2630881673@qq.com
李海峰（1971—），男，教授，从事药用植物品质评价及生物技术研究。Tel：(0872) 2219313，E-mail：lihfhz888@sina.com