

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

有限公司); Centrifuge 5415R 型冷冻离心机(德国 Eppendorf 公司); PCR 仪(美国 Thermo Fisher Scientific 公司); BG-Power 600 型电泳仪(北京百晶生物技术有限公司); WD-9413 凝胶成像分析仪(北京六一仪器厂)。

1.2 试剂与药物 患根茎腐病的植物样品于 2021 年 6 月在云南省大理白族自治州云龙县关坪镇种植基地采集, 经大理大学李海峰教授鉴定为百合科重楼属滇重楼 *Paris polyphylla* Smith var. *yunnanensis* (Franch.) Hand. -Mazz, 见图 1, 取其病根茎部位用于滇重楼根茎腐病致病菌的研究。



图 1 滇重楼根茎腐病主要病害

异丙醇、氯仿、无水乙醇均为分析纯; ddH₂O、DNA marker、甘油、蛋白酶 K 为化学纯; LB 液体培养基(氯化钠 10 g/L+胰蛋白胨 10 g/L+酵母提取物 5 g/L)、PDA 培养基(新鲜土豆 200 g/L+葡萄糖 20 g/L+琼脂粉 15 g/L)为实验室自制。

真菌扩增引物为 ITS1 5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3', ITS4 5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3', 购自生工生物工程(上海)股份有限公司。

2 方法

2.1 植物致病菌的分离纯化

2.1.1 清洗与消毒 将患根茎腐病的滇重楼表面的泥土等杂质洗净, 将病根茎部分依次使用 75% 乙醇浸泡 60 s, 无菌水冲洗 2 次, 再用 0.2% HgCl₂ 溶液浸泡 60 s, 无菌水冲洗 3 次, 无菌滤纸吸干, 备用。

2.1.2 涂布与培养 取“2.1.1”项下消毒后的患病滇重楼样品的病根茎约 1.0 g 置于无菌研钵中, 加入无菌水适量研磨至成黏稠状后, 作为样品原液, 将样品原液依次稀释至 0.1、0.01、0.001 g/mL, 分别吸取不同浓度梯度的样品溶液各 100 μL 均匀涂布于 PDA 培养基上, 无菌胶带密封, 于 25 ℃ 恒温箱中培养, 重复 3 次。

2.1.3 分离与纯化 待平板上长满菌落后, 在体视显微镜下依次对肉眼观察不一致的菌落进行编号, 按编号顺序依次挑取单菌落使用平板划线法分离到不同的平板上, 并做好标记, 将平板倒置于 25 ℃ 恒温箱中培养, 观察纯化第一次后的菌落形态, 若在培养过程中同一平板上菌落形态不一, 再次对菌落进行纯化, 直至菌落形态完全一致为止。

2.1.4 菌种保存 将经多次纯化后的单菌落菌种接种于加入甘油比例为 26% 的 LB 液体培养基中, -80 ℃ 冰箱保存备用。

2.2 基于 18S rRNA 序列的菌株物种鉴定

2.2.1 植物致病菌 DNA 提取 用无菌枪头挑取适量真菌菌丝于 2 mL 无菌 EP 管中, 加入液氮冷冻, 12 000 r/min

研磨 3 min, 严格按照生工生物工程(上海)股份有限公司 Ezup 柱式真菌基因组 DNA 抽提试剂盒步骤操作, 进行真菌 DNA 溶液的提取。

2.2.2 PCR 扩增 取“2.2.1”项下提取的真菌 DNA 溶液作为 DNA 模板, 以 ITS1 和 ITS4 为引物, 反应体系为显色剂 12.5 μL, 前后引物各 2 μL, DNA 模板 2 μL, ddH₂O 8.5 μL 进行 PCR 扩增, 反应条件为 94 ℃ 预变性 4 min; 94 ℃ 变性 30 s, 55 ℃ 退火 30 s, 72 ℃ 延伸 1 min, 共 30 个循环; 72 ℃ 延伸 5 min。PCR 扩增产物经琼脂糖凝胶电泳检测鉴定合格后送至昆明生工生物科技有限公司进行测序, 待测序结果返回使用 Bioedit 对序列进行拼接, 使用 NCBI 网站进行 BLAST 比对分析, 从而确定菌株信息。

2.3 致病菌的致病性测定 采用离体回接法在 PDA 培养基上接种已分离纯化的致病菌, 25 ℃ 黑暗培养 5 d 至菌丝长满平板, 备用。剪取健康的滇重楼根茎 0.5~1 cm, 加入 75% 乙醇和 0.2% HgCl₂ 依次消毒后, 用无菌水清洗, 无菌滤纸吸干水分, 置于菌丝上共培养(5 条滇重楼根茎/菌), 每种菌株均重复 3 次, 在 25 ℃ 条件下以不接种致病菌的 PDA 培养基上培养的无菌滇重楼根茎为空白组, 黑暗培养, 于 10~15 d 后观察统计致病情况。

3 结果

3.1 滇重楼致病菌的分离纯化 通过微生物学方法对患根茎腐病的滇重楼样品的病根茎部分进行分离纯化培养, 结果共分离出 7 株菌株, 分别为菌株 G1~G7, 其中, 菌株 G1、G5 在 PDA 培养基上初期呈白色的圆形菌落, 菌丝生长迅速且发达, 随着培养时间的延长, 菌体中心呈现为淡黄色; 菌株 G2、G3、G4、G6、G7 在 PDA 培养基上初期呈白色的规则圆形菌落, 菌丝发达, 生长迅速, 后变为淡粉色、颜色渐渐加深至呈紫红色, 依据其外观形态, 见图 2, 可初步断定为真菌。

3.2 基于 18S rRNA 序列的菌株物种鉴定 采用 18S rRNA 测序技术对从患根茎腐病的滇重楼样品中分离的 7 株菌种进行物种鉴定, 在 NCBI 网站上经 BLAST 比对分析, 菌株均属于镰孢属 *Fusarium*, 其中, 菌株 G1、G5 序列与 *F. solani* 参考菌株 MH857319.1、MT463389.1 的相似度分别为 100%、99.56%, 菌株 G2 序列与 *F. oxysporum* 参考菌株 MT530243.1 的相似度为 100%, 菌株 G3~G4、G6~G7 序列与 *F. oxysporum* 参考菌株 MT420651.1 的相似度均为 100%, 因此, 确定导致云龙关坪产地患根茎腐病的滇重楼根茎病害的菌株为腐皮镰刀菌 *F. solani* 和尖孢镰刀菌 *F. oxysporum*。具体种属信息见表 1。

表 1 从患根茎腐病的滇重楼样品中分离鉴定的植物致病菌种属信息

类型	属	种	株数/株	样品编号	分离部位
Fungi	<i>Fusarium</i>	<i>solani</i>	2	G1、G5	病根茎
		<i>oxysporum</i>	5	G2~G4、G6~G7	

3.3 致病菌致病性测定结果 选择上述已分离鉴定的患根茎腐病的滇重楼的代表性植物致病真菌 2 株(腐皮镰刀菌

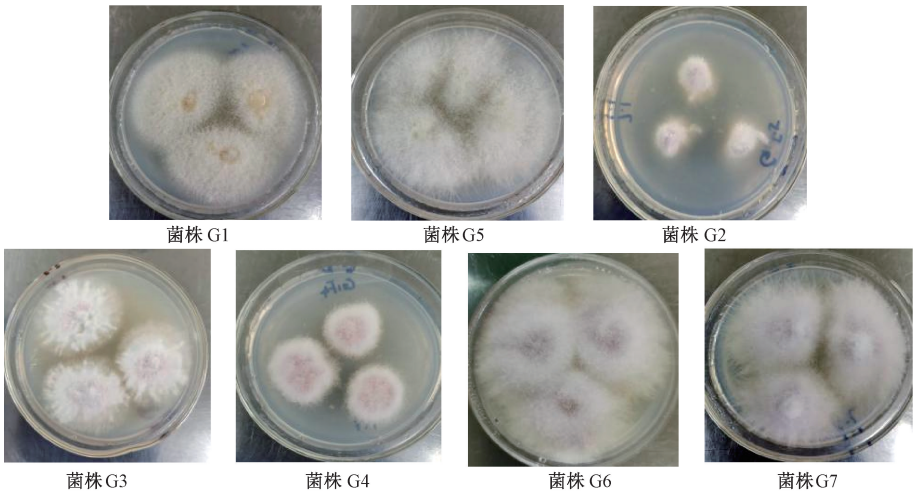


图 2 从患根茎腐病的滇重楼样品中分离鉴定的植物致病菌形态

F. solani、尖孢镰刀菌 *F. oxysporum*) 进行滇重楼健康植物组织根茎的回接, 致病情况见图 3, 根茎部致病真菌 *F. solani* 共培养 4 d 后菌丝开始环绕根茎感染, 6 d 后整个根茎均被菌丝包围, 15 d 后根茎部表面软化、发黑直至腐烂;

致病真菌 *F. oxysporum* 共培养 7 d 后菌丝开始感染根茎, 10 d 后根茎部出现变色、发黑现象, 继而腐烂; 而空白组共培养一段时间后根茎部仍为正常颜色, 无发黑、腐烂现象, 表明分离的致病真菌具有一定的致病性。

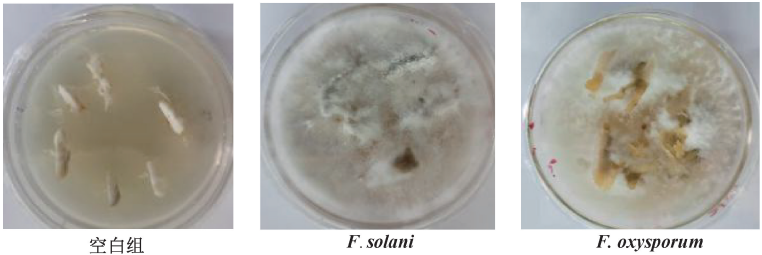


图 3 致病性实验

4 讨论

由于重楼生长周期较长(一般为 5 年以上), 容易遭受各种病原菌的侵染。重楼根腐病是危害最为严重的真菌性病害, 主要侵染重楼根部, 继而造成根部腐烂及不可逆的植株萎蔫, 直至最后枯萎死亡^[9-11]。重楼病害的普遍发生和流行, 严重影响药材产量和品质。本实验对云龙县关坪镇种植基地的滇重楼根茎腐病的典型病变部位根茎中致病菌进行分离纯化与物种鉴定, 结果从典型患病部位根茎中共分离鉴定出镰孢菌属(*Fusarium*) 腐皮镰刀菌 *F. solani* 和尖孢镰刀菌 *F. oxysporum* 共计 1 属 2 种植物致病真菌, 并对这 2 种致病真菌对滇重楼健康植物组织根茎进行了致病性测定, 结果这 2 种致病真菌可使滇重楼根茎出现与植物根茎腐病发病症状一致的病症, 如变色、发黑、软化、腐烂等。对致病真菌的致病性进行文献调研发现, 尖孢镰刀菌可导致丽江滇重楼根腐病^[12], 同时, 致病菌尖孢镰刀菌、腐皮镰刀菌还可侵染白芨、丹参、黄连、三七、人参、滇黄精等药用植物的根部, 造成根腐病的发生^[13-18]。

综上所述, 导致云南省大理白族自治州云龙县关坪镇种植基地中滇重楼根茎腐病的主要致病菌类型为镰孢菌属的腐皮镰刀菌和尖孢镰刀菌, 该致病菌的发现为今后滇重楼规范化种植及根茎腐病的防治提供了参考。此外, 由于

滇重楼生长周期的限制, 本实验还需通过活体回接实验进一步验证致病菌对滇重楼致病性的影响。

参考文献:

[1] 李 恒. 重楼属植物[M]. 北京: 科学出版社, 1998: 118.
[2] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 2020 年版一部[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2020.
[3] 李海涛, 罗先文, 管燕红, 等. 云南省不同地区滇重楼皂苷含量的对比及影响因子分析[J]. 中国中药杂志, 2014, 39(5): 803-806.
[4] 杨 斌, 李绍平, 王 馨, 等. 滇重楼的栽培与合理利用[J]. 中国野生植物资源, 2008, 27(6): 70-73.
[5] 李 恒, 苏 豹, 张兆云, 等. 中国重楼资源现状评价及其种植业的发展对策[J]. 西部林业科学, 2015, 44(3): 1-7; 15.
[6] 中华人民共和国农业农村部, 国家药品监督管理局, 国家中医药管理局. 全国道地药材生产基地建设规划(2018—2025 年)[EB/OL]. (2018-12-18) [2022-12-28]. http://www.gov.cn/gongbao/content/2019/content_5380376.htm.
[7] 黄生延, 杨永华, 张彦昌. 重楼病害防治[J]. 云南农业, 2021(5): 64-66.

[8] 周先治, 高 晖, 孙新涛. 华重楼根茎腐烂病发病情况调查与病因分析[J]. 福建农业科技, 2021, 51(2): 37-40.

[9] 杨永红, 严 君, 刘君英, 等. 滇重楼根茎腐烂的调查及其主要害虫研究[J]. 中药材, 2009, 32(9): 1342-1346.

[10] 杨显秋, 孙孝全. 重楼人工种植病虫害防治的重要性分析[J]. 南方农机, 2018, 49(14): 80.

[11] 柳 敏, 周茂嫦, 李恒谦, 等. 重楼属植物真菌病害和防治方法研究进展[J]. 安徽农业科学, 2022, 50(9): 15-18; 22.

[12] 赵彩呈, 洪英娣, 刘 丽, 等. 丽江滇重楼和白芨根腐病病原菌鉴定[J]. 贵州农业科学, 2019, 47(5): 28-30; 35.

[13] 杨 瑾, 文 艺, 高素霞, 等. 河南产区丹参根腐病病原

鉴定[J]. 河南农业科学, 2021, 50(10): 92-98.

[14] 伍晓丽, 王 钰, 刘 飞, 等. 黄连根腐病镰刀菌属病原真菌鉴定[J]. 中国中药杂志, 2020, 45(6): 1323-1328.

[15] 董 鲜, 马晓惠, 陈传娇, 等. 三七根腐病尖孢镰刀菌分离鉴定及致病作用研究[J]. 中药材, 2018, 41(1): 8-12.

[16] 文增叶, 李定华, 代梦瑶, 等. 三七根腐病原菌尖孢镰刀菌的生物学特性分析[J]. 中药材, 2019, 42(9): 1978-1984.

[17] 王 瑞, 董林林, 徐 江, 等. 农田栽参模式中人参根腐病原菌鉴定与防治[J]. 中国中药杂志, 2016, 41(10): 1787-1791.

[18] 杨林毅, 陈泽历, 赖清玉, 等. 滇黄精腐皮镰刀菌的分离鉴定[J]. 湖北农业科学, 2019, 58(3): 65-67; 101.

茅苍术 *AIPMK1*、*AIPMK2* 基因的克隆和表达分析

刘巍玮¹, 吴君贤¹, 徐 睿¹, 管凤雅¹, 胡健鹏¹, 刘军玲², 张亚中^{2*}, 刘 超³, 彭华胜^{4,5}, 查良平^{1*}

[1. 安徽中医药大学药学院, 安徽 合肥 230012; 2. 安徽省食品药品检验研究院, 安徽 合肥 230051; 3. 安徽医科大学基础医学院, 安徽 合肥 230032; 4. 中国中医科学院中药资源中心, 北京 100700; 5. 中国医学科学院道地药材研究创新单元 (2019RU57), 北京 100700]

摘要: **目的** 从茅苍术中克隆萜类化合物生物合成途径中的甲羟戊酸-5-磷酸激酶 (*PMK*) 基因, 并对其进行序列分析、原核表达及基因表达分析。**方法** 基于茅苍术转录组数据, 采用 RT-qPCR 法克隆获得茅苍术的 2 条甲羟戊酸-5-磷酸激酶基因的全长序列, 命名为 *AIPMK1*、*AIPMK2*, 使用生物信息学软件预测 *AIPMK1*、*AIPMK2* 编码蛋白的特征; 利用 MEGA 6.06 软件构建系统进化树; 构建原核表达载体, 在大肠杆菌中诱导表达; 运用 RT-qPCR 检测该基因在不同产地茅苍术中的相对表达及经不同时间茉莉酸甲酯诱导后的表达情况。**结果** *AIPMK1*、*AIPMK2* 基因的 ORF 长度分别为 1 512、1 590 bp, 分别编码 503 aa、529 aa。2 个基因的二级结构中 α 螺旋和无规则卷曲占比最高, 均属不稳定的酸性蛋白; 结构功能域分析证明 *AIPMK1*、*AIPMK2* 分别在 4~490 aa、40~527 aa 处包含甲羟戊酸激酶的保守结构域; 跨膜结构域分析预测, 两者均为膜外蛋白; SDS-PAGE 结果显示, 分别在 55、58 kDa 处有清晰的目的蛋白表达。基因表达结果显示, 在不同时间的茉莉酸甲酯诱导下 *AIPMK1*、*AIPMK2* 的基因表达分别在 48、24 h 达到最高值, 且均在 3 h 表达最低。不同产地的茅苍术 *AIPMK1*、*AIPMK2* 基因具有组织特异性, 两者均在岳西茅苍术的叶中表达量最高。**结论** 本研究首次克隆 2 条茅苍术 *AIPMK1*、*AIPMK2* 基因, 并对其进行表达分析, 为进一步探究茅苍术萜类生物合成途径奠定基础。

关键词: 茅苍术; 甲羟戊酸-5-磷酸激酶; 基因克隆; 原核表达; 表达分析

中图分类号: R282 **文献标志码:** B **文章编号:** 1001-1528(2023)03-1018-07

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2023.03.058

收稿日期: 2022-05-10

基金项目: 国家重点研发计划项目 (2019YFC1711505); 国家自然科学基金项目 (82073957)

作者简介: 刘巍玮 (1997—), 女, 硕士生, 研究方向为中药资源及其质量评价。Tel: 17856913116, E-mail: fro0403@126.com

* 通信作者: 张亚中 (1976—), 男, 博士, 主任中药师, 研究方向为中药质量分析。Tel: 13956985695, E-mail: yazhongzhang@hotmail.com

查良平 (1987—), 女, 副研究员, 研究方向为中药资源及其质量评价。Tel: 18130028287, E-mail: zlp_ahtcm@126.com