

袁孟娟, 张 薇, 董慧钧, 等. 中药材天南星根腐病病原菌的分离与鉴定[J]. 江苏农业科学, 2015, 43(1): 153–154.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2015.01.053

中药材天南星根腐病病原菌的分离与鉴定

袁孟娟, 张 薇, 董慧钧, 冯 玮, 韩 军, 陈 芳

(聊城大学药学院, 山东聊城 252059)

摘要:采用组织分离法、梯度稀释法分离并纯化出天南星根腐病的致病菌, 并进行病原菌致病性测定, 通过形态学、分子生物学鉴定, 确定天南星根腐病的主要致病菌是毛霉属的卷枝毛霉。

关键词:天南星; 根腐病; 毛霉

中图分类号: S435.67 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2015)01-0153-02

天南星是一种重要的中药材, 具有燥湿化痰、祛风止痉、散结消肿等功效, 可用于治疗顽痰咳嗽、风痰眩晕、中风痰壅、口眼歪斜、半身不遂、癫痫、惊风、破伤风等症^[1]。天南星根腐病是一种土传病害, 传染性极强, 一株植株出现病症, 临近的植株大多会被传染, 天南星根腐病病菌主要靠水传播, 波及范围广, 如果不注意防治, 将造成较大损失。植株感染天南星根腐病病菌后, 首先出现褐色斑点, 周围有黄色晕圈, 最后叶片枯萎, 植株死亡。根腐病对天南星产量、品质影响极大。本研究从山东省茌平县杜郎口镇中药材种植基地采集天南星根腐病病株, 用组织分离法对天南星根腐病原菌进行了分离纯化与鉴定, 观察病原菌在 PDA 培养基上的培养性状、孢子形状, 结合致病性测定及菌株分子生物学鉴定方法确定病原菌的种属分类^[2], 并且在天南星根际土壤中分离得到大量具有拮抗活性的有益微生物, 利用这些拮抗微生物对天南星土传病害进行生物防治, 旨在为天南星根腐病的有效防治提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料

天南星根腐病病株采自山东省茌平县杜郎口镇中药材种植基地。

1.2 病原菌分离方法

为降低腐生菌的干扰, 以新鲜发病的植物组织作为分离材料, 选取发病部位、健康部位之间(病健交界处)的组织进行分离^[3]。取天南星根腐病株的块茎, 掰开后用镊子刮取断面上的发病组织, 均匀涂布在制好的培养基上。采用组织分离法分离病原菌, 从病株刮取适量组织, 用 5% NaOCl 溶液消毒 3 min, 无菌水洗 2~3 次, 用灭菌滤纸吸干, 分别接种到 LB 培养基、PDA 培养基上, 于恒温培养箱中 25~28℃ 倒置培养

5 d, 观察菌落生长状况^[4]。

1.3 病原菌纯化方法

在无菌条件下, 从菌落边缘部分挑取菌丝转接到 PDA 培养基上 25℃ 培养 2 d, 待菌丝长出后进行多次重复培养, 确定培养皿中无其他杂菌后进行转管, 4℃ 冰箱保存。

1.4 天南星根腐病病原菌 Tnx 的形态学鉴定

肉眼直接观察病原菌在 PDA 培养基上的菌落形态、色泽等。选择生长状况良好的菌落挑取菌丝、孢子制成临时装片, 在显微镜下观察菌丝形态、有无孢子等。若有孢子则进一步观察孢子形状及多少、有无隔膜及隔膜数、产孢细胞类型、厚垣孢子的有无、子实体类型等, 并测量孢子大小, 对 Tnx 菌株进行形态学鉴定。

1.5 天南星根腐病病原菌 Tnx 的分子生物学鉴定

用真菌基因组 DNA 快速抽提试剂盒提取基因组 DNA。采用引物 NS1 (5′-GTAGTCATATGCTTGTCTC-3′)、NS6 (5′-GCATCACAGACCTGTTATTGCCTC-3′) 对供试菌株基因组 DNA 进行 PCR 扩增。反应体系为: Template (基因组 DNA 20~50 ng/μL) 0.5 μL, 5×buffer (含 Mg²⁺) 2.5 μL, dNTP (各 2.5 mmol/L) 1 μL, F (10 μmol/L) 0.5 μL, R (10 μmol/L) 0.5 μL, 并加 ddH₂O 至 25 μL。PCR 循环条件: 预变性 (98℃, 3 min) → 变性 (98℃, 25 s) → 退火 (55℃, 25 s) → 延伸 (72℃, 1 min) → 修复延伸 (72℃, 10 min) → 终止反应 (4℃, ∞), 30 个循环。PCR 扩增产物进行 1.0% 琼脂糖凝胶电泳, 用凝胶成像系统检测拍照记录, 得到目的条带后, 将 PCR 扩增产物送至生工生物工程(上海)股份有限公司测序。用所获菌株的 rDNA-NS 序列信息同 GenBank 中的序列信息进行同源性比对, 确定病原菌的种类。

1.6 天南星根腐病病原菌 Tnx 的致病性鉴定

采用根部切伤接种法接种, 将分离的病原菌在 PDA 培养基上培养 7 d, 从培养基上刮取菌丝, 制成孢子悬浮液, 在显微镜下用孢子计数器将孢子悬浮液浓度调至 10⁶ 个/mL 接种健康植株根部, 接种量为 10 mL/株, 每处理重复 3 次, 设清水作为对照, 定期观察并记录发病情况。接种植株出现症状后, 比较其症状是否与田间症状一致, 再次进行病原菌分离, 比较分离前后得到的病原菌菌落形态、色泽、孢子等特征是否一致^[5]。

收稿日期: 2014-02-25

基金项目: 山东省自然科学基金(编号: ZR2013CQ019); 聊城大学博士科研启动基金(编号: 3010)。

作者简介: 袁孟娟(1990—), 女, 山东日照人, 硕士研究生, 主要从事生物制药研究。E-mail: yuanmengjuan1990@163.com。

通信作者: 陈 芳, 博士, 副教授, 主要从事微生物制药研究。E-mail: chenfang20045@163.com。

2 结果与分析

2.1 天南星根腐病病原菌 Tnx 的分离纯化结果

分离纯化得到的病原菌见图 1。



A. 正面



B. 背面

图1 分离纯化得到的病原菌

2.2 天南星根腐病病原菌 Tnx 的形态学鉴定结果

天南星的根腐病原菌生长速度比其他病原真菌快,一般接种后 1~2 d 即可观察到白色菌落,呈圆形,孢子长出后略呈黑色,孢子在显微镜下呈椭圆状(图 2、图 3)。

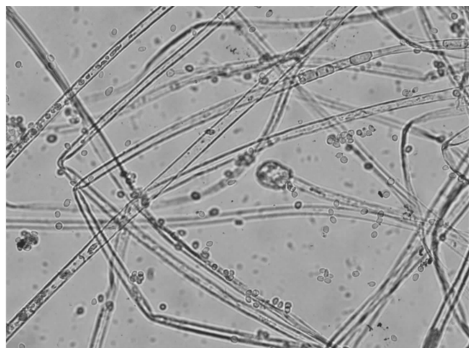


图2 天南星根腐病病原菌的菌丝(电镜40×)

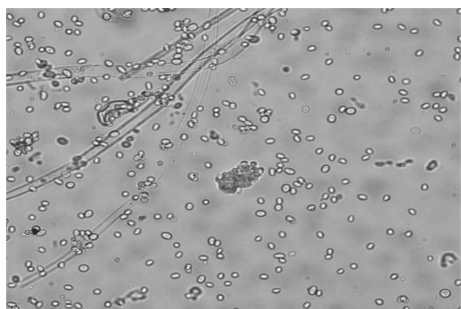


图3 天南星根腐病病原菌的孢子(电镜40×)

2.3 天南星根腐病病原菌 Tnx 的分子生物学鉴定

测序结果表明,天南星根腐病病原菌 Tnx 18S rDNA 为 1 354 bp, Blast 比对结果表明,该序列与毛霉属相似度达 99%。

2.4 天南星根腐病病原菌 Tnx 致病性鉴定

经根部切伤接种法接种的天南星植株表现出根腐病的一系列症状,与田间症状一致。从病组织上再次进行病原菌分离得到的病原菌与先前分离的病原菌菌落形态一致。对照组天南星植株不出现根腐病的症状,从其植株中分离不出根腐病病原菌(图 4、图 5)。

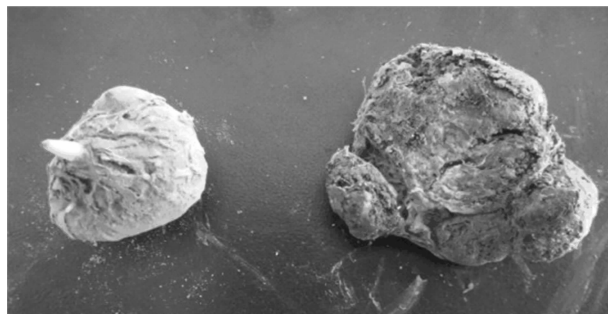


图4 天南星正常球根(左)、患根腐病的球根(右)



图5 天南星根腐病球根断面(左)、正常球根断面(右)

3 结论

通过对天南星根腐病原菌病情调查,得知天南星根腐病是由真菌引起的一种土传病害,近年来传播蔓延较快,严重影响天南星的产量、质量。本研究对天南星根腐病原菌的分离到了一种病原菌 Tnx,经过分子生物学 18S rDNA 鉴定,得知该病原菌为卷枝毛霉。

参考文献:

- [1] 卫生部药典委员会. 中国药典[M]. 北京:化学工业出版社, 1995:63.
- [2] 魏景超. 真菌鉴定手册[M]. 上海:上海科学技术出版社,1979: 560-646.
- [3] 方中达. 植病研究方法[M]. 北京:农业出版社,1979:110-155.
- [4] Uddin W, Knous T R. Fusarium species associated with crown rot of alfalfa in Nevada[J]. Plant Disease, 1991, 75(1): 51-55.
- [5] Hietala A M, Sen R B, Lilja A. Anamorphic and teleomorphic characteristics of a uninucleate *Rhizoctonia solani* isolated from the roots nursery grown conifer seedlings[J]. Mycological Research, 1994, 98(9): 1044-1050.