北方园艺 2015(16):116～119

DOI:10.11937/bfyy.201516027

牡丹根腐病病原的形态与分子鉴定

成玉梅[1],赵　丹[2],康业斌[3]

(1.河南科技大学 化工与制药学院,河南 洛阳 471003;2.信阳师范学院 华锐学院,河南 信阳 464000;
3.河南科技大学 林学院,河南 洛阳 471003)

摘　要:以河南洛阳各大主要牡丹园栽培的牡丹典型根腐病病株为试材,采用组织分离法获得纯菌株,并对所得菌株进行致病性测定、形态学鉴定及rDNA-ITS序列分析,研究牡丹根腐病的病原菌种类。结果表明:分离获得的4个菌株在PDA培养基上均产生茂密、呈疏松棉絮状的菌丝及黄、红、紫等色素,大型分生孢子镰刀形或椭圆形,无色,多胞;小型分生孢子卵圆形至椭圆形,无色,单胞或双胞。致病性测定表明,4个菌株能侵染离体牡丹根尖使其变黑。在GenBank序列数据库中,F1～F4菌株的DNA序列与编号为HM214456.1和AB498917.1等的*F. solani* ITS区段DNA序列的同源性为99%～100%。据此,将河南洛阳牡丹根腐病的病原菌鉴定为*F. solani*。

关键词:牡丹;镰刀菌;形态鉴定;分子鉴定

中图分类号:S 436.8^{+}1　**文献标识码**:A　**文章编号**:1001－0009(2015)16－0116－04

牡丹的根皮即“丹皮”,具有清热、凉血、活血化瘀等功效。现代药理研究证实,丹皮还具有抗炎、抗肿瘤、抗血栓、降血糖和抗动脉粥样硬化等作用,是临床上常用的一种中药,具有很高的药用价值[1]。近年来,洛阳各大牡丹种植园牡丹根腐病发病严重,造成大面积植株长势衰弱,甚至整株死亡,严重影响牡丹的观赏价值,同时,根部受害后变黑腐烂,亦严重影响其药用价值。孙文姬等[2]从山东菏泽61株牡丹根腐病病根样品中分离获得121个分离物,根据其培养特性、生长速度、产孢细胞、孢子形态、孢子量度和致病性等,按*C. Booth*镰刀菌分类系统[3],定名为镰刀菌属茄病镰刀菌(*Fusarium solani* (Mart.) Sacc.)。吴玉柱等[4]从山东菏泽牡丹园64个牡丹根腐病样品中分离获得137个分离物,依其培养性状、形态特征及致病性,将病原菌鉴定为茄腐皮镰孢霉(*F. solani*)。以往的报道均基于形态学的鉴定结果,缺乏分子生物学鉴定依据。现以河南省洛阳各大主要牡丹园牡丹根、茎部具典型症状的病株为样本,通过组织分离、形态学鉴定并结合rDNA-ITS序列分析对病原菌进行鉴定,结果报道如下。

第一作者简介:成玉梅(1964-),女,本科,高级实验师,研究方向为农产品分析测试。E-mail:chengym999@163.com.

责任作者:康业斌(1964-),男,博士,教授,研究方向为植物免疫学。E-mail:kangyb999@163.com。

基金项目:河南省科技厅重点科技攻关资助项目(102102110090)。

收稿日期:2015－05－20

1　材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1　供试材料　2009—2011年的5—10月,选择河南省洛阳市的王城公园、国家牡丹园、中国国花园等主要牡丹种植园,对多个牡丹品种进行随机调查,每个牡丹园选取具有典型症状的根腐病株20株,共6批,120株带回实验室备用。

1.1.2　试剂和仪器　*Taq* DNA聚合酶、10× PCR Buffer、dNTP Mixture购于TaKaRa公司,通用引物ITS1和ITS4由上海生工生物工程技术服务有限公司提供,BIOMETRA PCR仪(德国Biometra公司制造),BST-20M型凝胶成像系统(英国Uvitec公司制造)。

1.2　试验方法

1.2.1　病原菌的分离　每批样品分为根部和根茎部病症2类,利用常规组织分离法于PDA培养基平板上进行分离,于25℃恒温培养箱中培养,2～4 d待菌落形成后,挑取边缘菌落纯化[5]。依据纯化后的菌落特征分类编号,观察菌落的培养性状,统计分离物的种类、数量,保存备用。

1.2.2　致病性离体检测　将分离物打成菌饼,接入直径12 cm培养皿中央,待菌落生长2 d后,剪取牡丹品种“洛阳红”须根根尖约1 cm,清水冲洗干净,再用3%的次氯酸钠消毒2～3 min后,用无菌水冲洗3遍,插入菌落边缘,每皿对称插入6个根尖,每个菌株3次重复;对照直接将根尖插入未接种的培养基中,观察根尖颜色变化。

1.2.3　形态学观察　挑取培养菌丝制作临时水玻片,在

PDF 文件使用 "pdfFactory Pro" 试用版本创建 www.fineprint.cn

光学显微镜下观察并记录分生孢子的大小、形状,厚垣孢子的有无等,依据 Booth 分类系统对镰刀菌进行分类鉴定[6-8]。

1.2.4 分子生物学鉴定 刮取培养 5～7 d 的菌丝体 50 mg,采用 CTAB 法[9-10]提取基因组 DNA。利用通用引物 ITS1 和 ITS4 对所提取的 DNA 进行 PCR 扩增,反应在 25 μL 反应体系中进行。PCR 反应程序为:94℃预变性 5 min;94℃变性 45 s,55℃退火 45 s,72℃延伸 105 s,30 个循环;最后 72℃延伸 10 min,扩增产物在 4℃条件下保存。取 5 μL 扩增产物,与 1 μL loading buffer 混匀,加入 1%琼脂糖凝胶孔中,DNA Marker 为对照,在 1×TAE 电泳缓冲液中电泳,以凝胶成像系统检测 PCR 扩增产物大小,观察到合适的条带后,将所对应的原始扩增产物(未纯化)40 μL 送至生工生物工程(上海)股份有限公司测序。将测序结果在 GenBank 上进行 BLAST 比对,并使用 ClustalX(1.83)软件对此序列进行校准后,利用 MAGA 5 软件[10-11]以距离法[12]构建系统发育树。

2 结果与分析

2.1 分离物

从牡丹发病根部、根茎部样品中共分离获得 125 个分离物,根据其培养性状和形态特征,初步鉴定为 12 个菌株,其中镰刀菌(*Fusarium* spp.)10 个,丝核菌属(*Rhizoctonia* sp.)1 个,拟盘多毛孢属(*Pestalotiopsis* sp.)1 个,镰刀菌分离频率达 80%以上,为优势致病菌株,将这 10 个菌株编号为 F1～F10。

2.2 致病性

用根尖法对分离获得的 F1～F10 菌株进行离体致病性检测,插入 F1～F4 菌株菌落边缘的根尖 2 d 后明显变黑,变黑率 100%,从变黑部位重新分离获得与原菌落一致的病原物,说明 F1～F4 菌株对牡丹根具有致病性。F5～F10 菌株边缘的根尖及对照的根尖无明显变化。

2.3 培养性状与形态特征

F1 菌株:菌落圆形,边缘整齐,气生菌丝白色,毡状,较稀疏,培养后期,菌落背面产生青灰色代谢产物,呈不均匀的放射状,培养基变葡萄酒红色。产生大、小 2 种类型的分生孢子,大型分生孢子镰刀形、纺锤形,有脚胞,1～5 个隔膜,多数为 3 个隔膜,大小(21.2～38.7) μm×(3.3～7.2) μm,平均(31.6×5.2) μm;小型分生孢子长椭圆形、近圆形、肾形,0～1 个隔膜,大小(5.9～15.5) μm×(2.8～5.2) μm,平均(9.8×3.9) μm;厚垣孢子球形,顶生或间生,单生或对生,大小(5.4～11.6) μm×(5.4～11.1) μm,平均(8.2×8.1) μm,可由菌丝产生,亦可由大型分生孢子产生,即将产生厚垣孢子时,大型孢子分隔先变不明显,后变透明,分隔明显。

F2 菌株:菌落圆形,边缘整齐,气生菌丝白色,短绒毛状或毡状,菌落正面淡黄褐色,有时正面背面均略呈青色,培养后期菌落表面生有土黄色黏质状分生孢子堆。产生大、小 2 种类型的分生孢子,大型分生孢子镰刀形、纺锤形,有脚胞,顶端细胞较钝,1～5 个隔膜,多数为 3 个隔膜,大小(22.7～42.6) μm×(4.1～6.7) μm,平均(32.3×5.3) μm;小型分生孢子椭圆形、近圆形、肾形,0～1 个隔膜,大小(5.2～17.5) μm×(2.8～5.7) μm,平均(10.2×4.0) μm;厚垣孢子球形,顶生或间生,单生或对生,大小(5.4～11.6) μm×(5.4～11.1) μm,平均(8.2×8.1) μm,可由菌丝产生,亦可由大型分生孢子产生,即将产生厚垣孢子时,大型孢子分隔先变不明显,后变透明,分隔明显。

F3 菌株:菌落圆形,边缘整齐,气生菌丝白色,长绒毛状,较稀疏,培养后期,培养基变浅暗红色,中心颜色较重,边缘颜色浅。产生大、小 2 种类型的分生孢子,小型孢子多。大型分生孢子较少见,镰刀形、纺锤形,有脚胞,顶端细胞稍尖,1～5 个隔膜,大小(15～48) μm×(3.6～5.4) μm,平均(28.1×4.5) μm;小型分生孢子长椭圆形、近圆形、肾形,0～1 个隔膜,大小(3.4～16.5) μm×(2.0～5.4) μm,平均(7.8×3.2) μm;厚垣孢子球形,顶生或间生,单生或对生,大小(5.4～11.9) μm×(5.2～11.6) μm,平均(8.3×8.0) μm,多由菌丝产生,亦可由大型分生孢子产生。

F4 菌株:菌落圆形,边缘较整齐,气生菌丝白色,稀疏绒毛状,接种处气生菌丝生长较旺盛,培养后期菌落略变浅黄褐色。产生大、小 2 种类型的分生孢子,小型孢子多。大型分生孢子较少见,镰刀形、纺锤形,有脚胞,顶端细胞稍尖,1～3 个隔膜,大小(15.5～31.5) μm×(2.6～4.6) μm,平均(22.9×3.6) μm;小型分生孢子长椭圆形、近圆形、肾形,0～1 个隔膜,大小(3.9～12.9) μm×(1.5～5.2) μm,平均(8.1×3.6) μm;厚垣孢子球形,顶生或间生,单生或对生,大小(4.6～8.0) μm×(4.6～7.7) μm,平均(6.5×6.3) μm,多由菌丝产生,亦可由大型分生孢子产生。

2.4 ITS 序列分析

对 F1 菌株进行 rDNA-ITS 序列测定,获得有效序列长度为 548 bp,在 GenBank 上进行 BLAST 比对,结果表明,该序列与登陆号为 HM214456.1 和 AM412635.1 等 20 多个 *F. solani* 序列的 ITS 序列同源性为 100%。

对 F2 菌株进行 rDNA-ITS 序列测定,获得有效序列长度为 548 bp,在 GenBank 上进行 BLAST 比对,结果表明,该序列与登陆号为 AB498917.1 和 GU586832.1 等 20 多个 *F. solani* 序列的 ITS 序列同源性为 99%。

对 F3 菌株进行 rDNA-ITS 序列测定,获得有效序列长度为 547 bp,在 GenBank 上进行 BLAST 比对,结果

PDF 文件使用 "pdfFactory Pro" 试用版本创建 www.fineprint.cn

表明,该序列与登陆号为 JF311928.1 和 AB551705.1 等多个 *F. solani* 序列的 ITS 序列同源性为 99%。

对 F4 菌株进行 rDNA-ITS 序列测定,获得有效序列长度为 548 bp,在 GenBank 上进行 BLAST 比对,结果表明,该序列与登陆号为 FM179605.1 和 EU719658.1 等多个 *F. solani* 序列的 ITS 序列同源性为 99%。

系统发育树分析结果(图 1)表明,F1～F4 菌株序列与 GenBank 下载的多个 *F. solani* 序列聚在一起,均获得 50%以上的自展支持率,具有较高的同源性,而与菌株 *F. oxysporum* 和 *F. equiseti* 不在同一分支上,同源性较远。

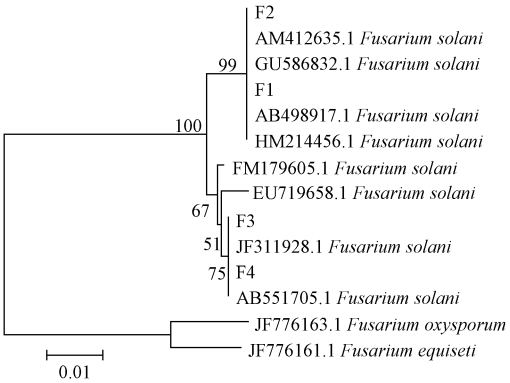

图 1　用 MEGA5 软件构建的 F1～F4 系统发育树

Fig. 1　Phylogenetic tree of F1－F4 strucutured by MEGA5

3　结论与讨论

依据形态特征,结合 rDNA-ITS 序列分析,将河南洛阳牡丹根腐病病原鉴定为 *Fusarium solani* (Mart.) Sacc.。

F1～F4 菌株在 PDA 培养基上的菌落形态与颜色各不相同,产生的分生孢子形态和大小亦略有不同。分子鉴定结果表明,这 4 个菌株均为茄病镰刀菌(*F. solani*)。通常镰刀菌的培养特征属于不稳定性状[13],同种的镰刀菌亦可在种下划分为不同的变种。SNYDER 等[14]研究表明,孢子大小、隔膜数、分生孢子座、后垣孢子有无以及色素等特征均是不稳定的,而大孢子的形态是稳定的,可作为分种的主要依据,其次是小型分生孢子及厚垣孢子的产生与否等。因此,根据分离物的培养特征、形态特征以及 ITS 序列比对结果,将 F1～F4 菌株鉴定为茄病镰刀菌(*F. solani*)[15],与孙文姬等[2]报道的山东菏泽地区牡丹根腐病病原主要为茄病镰刀菌相一致。F1～F4 菌株在 PDA 培养基上的培养性状及分生孢子形态和大小的差异,很可能是菌株分离于不同的牡丹品种造成的,是否为茄病镰刀菌不同变种,尚有待研究。

牡丹根腐病的病原主要为镰刀菌,丝核菌属(*Rhizoctonia* sp.)、拟盘多毛孢属(*Pestalotiopsis* sp.)等虽然分离频率较低,但均为土壤习居菌,在根腐病的发生和发展过程中,几种病菌往往与茄病镰刀菌混合侵染,加重根腐病的危害程度[16]。在病害调查过程中发现,地下害虫尤其是蛴螬危害严重的地块,根腐病菌通过蛴螬啃食后造成的伤口侵入牡丹根部,致使牡丹根腐病亦发病严重;地势低洼处,夏季积水地发病重,连年种植地发病较重[16]。因此,生产中应加强田间管理,在防治根腐病的同时应加强地下害虫的防治。

参考文献

[1]　姜潇.牡丹皮药理作用的研究进展[J].中国新医药,2004,3(8):110.

[2]　孙文姬,简桂良,刘秀兰,等.山东菏泽地区牡丹根腐病病原真菌的分离鉴定[J].植物病理学报,1999,5(2):177-180.

[3]　BOOTH C. The Genus of *Fusarium*[M]. Kew,England:CMI,1971.

[4]　吴玉柱,季延平,赵桂华,等.牡丹根腐病及其防治的研究[J].南京林业大学学报(自然科学版),2005,11(6):69-72.

[5]　赵杰.山东省烟草镰刀菌根腐病病原及生物学特性的研究[D].北京:中国农业科学院,2013.

[6]　布斯,著.镰刀菌属[M].陈其烘,译.北京:农业出版社,1988.

[7]　陈鸿逵,王拱辰.浙江镰刀菌志[M].杭州:浙江科学技术出版社,1992:4-70.

[8]　王拱辰,郑重,叶琪明,等.常见镰刀菌鉴定指南[M].北京:中国农业科学技术出版社,1996:1-45.

[9]　LOH J I N P,KIEW R,KEE A,et al. Amplified fragment length polymorphism (AFLP) provides molecular markers for the identification of *Caladium bicolor* cultivars[J]. Annals of Botany,1999,84(2):155-161.

[10]　CHANG Y K,VEILLEUX R E,IQBAL M J. Analysis of genetic variability among Phalaenopsis pecies and hybrids using amplified fragment length polymorphism[J]. Journal of the American Society for Horticultural Science,2009,134(1):58-66.

[11]　刘琳,刘洋,刘红娟.基于 16S rDNA 的系统发育分析的微生物进化关系中的应用[J].生物学通报,2008,43(11):4-6.

[12]　冯思玲.系统发育树构建方法研究[J].信息技术,2009(6):38-40.

[13]　林清洪,黄志忠.镰刀菌研究概述[J].亚热带植物通讯,1996,25(1):51-56.

[14]　SNYDER W C,HANSEN H N. The species concept in *Fusarium* [J]. American Journal of Botany,1940,27(2):64-67.

[15]　王勇,杨秀荣,杨依军.茄根腐病致病病原—茄病镰刀菌及其蓝色变种的分离与鉴定[J].天津农业科学,2000,6(3):4-6.

[16]　赵丹.牡丹根部茎部真菌病害及病原鉴定[D].洛阳:河南科技大学,2012.

Molecular and Morphological Identification of Peony Root Rot Pathogen

CHENG Yumei[1],ZHAO Dan[2],KANG Yebin[3]

(1. School of Chemical and Pharmaceutical,Henan University of Science and Technology,Luoyang,Henan 471003;2. Huarui College,Xinyang Normal University,Xinyang,Henan 464000;3. School of Forestry,Henan University of Science and Technology,Luoyang,Henan 471003)

PDF 文件使用 "pdfFactory Pro" 试用版本创建 www.fineprint.cn

DOI:10.11937/bfyy.201516028

不同植物提取物对款冬蚜虫杀虫活性研究

贺润丽,樊 杰,平莉莉,刘计权,周春竹

(山西中医学院 中药学院,山西 太原 030024)

摘 要:以款冬蚜虫为试验对象,采用浸虫法,研究了12种植物提取物对款冬蚜虫的触杀活性。结果表明:12种植物提取液在10 mg/mL浓度下对款冬蚜虫均有一定的触杀作用,其中狼毒大戟、鸢尾、粗茎鳞毛蕨3种植物提取物对款冬蚜虫48 h的触杀活性达80%左右,狼毒大戟提取物的毒力最强,24 h的致死中浓度(LC_{50})为9.025 mg/mL,鸢尾、粗茎鳞毛蕨24 h的致死中浓度(LC_{50})分别为16.111、33.612 mg/mL。狼毒大戟、鸢尾、粗茎鳞毛蕨具有研究开发的价值。

关键词:款冬;蚜虫;植物提取物;触杀活性;毒力

中图分类号:S 482.3 **文献标识码**:B **文章编号**:1001－0009(2015)16－0119－03

款冬花为菊科植物款冬(*Tussilago farfara* L.)的干燥花蕾,其味辛、性温,具有润肺下气、止咳化痰的功效,用于新久咳嗽、喘咳痰多、劳嗽咳血等症的治疗[1]。随着国内外对款冬花需求量的逐渐增大,其种植面积不断扩大,目前市场上款冬花以栽培品为主,主产于甘肃、山西、河北、内蒙古、陕西等省。蚜虫是为害栽培款冬的主要害虫之一,多发生在6—7月份,以幼虫、成虫刺吸叶片汁液,导致叶片变黄、皱缩或卷曲,为害过程中还分泌蜜露,诱发煤烟病,严重影响叶片的光合作用,使款冬花药材的产量和品质下降[2]。

生产上防治款冬蚜虫仍然以化学药剂为主,但过度使用化学农药会引起严重的"3R"问题,影响药材品质、人类健康和生态环境,因此开发高效、低毒、低残留、低抗性风险的新型农药成为研究的重点和热点,从植物中提取高效低毒活性成分是途径之一。近年来,国内学者在植物源杀虫剂利用方面开展了大量的研究工作,并取得了一定的研究成果[3-8]。该试验以款冬蚜虫为试验对象,采用一些常见的具有杀虫功效的植物及中药材,测定其提取物对款冬蚜虫的毒杀活性,筛选杀虫活性高的植物,以期为进一步研究其杀虫有效成分及开发利用这些植物资源提供依据。

第一作者简介:贺润丽(1971-),女,博士,讲师,研究方向为药用植物资源开发与利用。E-mail:herunli666@163.com.

基金项目:山西省国际科技合作资助项目(2012081045-1)。

收稿日期:2015－05－13

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试蚜虫采自于山西和顺栽培款冬植株,接种到实验室盆栽款冬上,然后放入人工气候箱中饲养多代,挑选大小一致的无翅成蚜进行试验。人工气候箱温度为(25±1)℃,相对湿度为(50±7)%,光周期(L∶D)为14 h∶10 h。

试验所用植物及中药材种类见表1,均由山西中医学院裴香萍副教授鉴定;市售0.3%印楝素乳油由云南中科生物产业有限公司、云南新联化工厂联合出品。

1.2 试验方法

1.2.1 提取液的制备 新鲜植物用清水冲净污尘,阴干。将阴干植物及中药材在40℃恒温干燥箱中烘干,粉

Abstract:Taking the typical infected plants of peony root rot as test materials,which from in mainly peony garden in Luoyang,Henan Province. The pathogens were isolated by tissue separation,tested according to the standard Koch's postulation methods,and identified by the methods of microscopy and molecules,the pathogen species of peony root were studied. The results showed that four strains all produced thick,loose cotton wool hypha and yellow,red,violet colors in PDA. Macroconidium were falciform or ellipse,colourless,multi-cell;microconidia were oval to ellipse,colourless,one-celled or bicellular. those strains of *Fusarium* could infect *in vitro* peony root and make it black. The DNA sequence homology of F1 to F4 strains and Nos in GenBank sequence database of HM214456.1 and AB498917.1 *F. solani* was 99%－100%. Accordingly,the pathogen of peony root rot disease was identified as *F. solani*.

Keywords:peony;*F. solani*;morphological identification;molecular identification

PDF 文件使用 "pdfFactory Pro" 试用版本创建 www.fineprint.cn