

DOI: 10.13718/j.cnki.xdzk.2021.06.005

# 黄连根腐病腐霉属病原菌鉴定

伍晓丽<sup>1,2,3,4</sup>, 陈大霞<sup>1,2,3,4</sup>, 刘飞<sup>2,5</sup>,  
王钰<sup>1,2,3,4</sup>, 李隆云<sup>1,2,3,4</sup>

1. 重庆市中药研究院 种植研究所, 重庆 400065; 2. 中国中医科学院 中药资源中心重庆分中心, 重庆 400065;
3. 重庆市中药良种选育与评价工程技术研究中心, 重庆 400065;
4. 中药资源学重庆市重点实验室, 重庆 400065; 5. 重庆市中药研究院 大健康中心, 重庆 400065

**摘要:** 黄连是我国的重要中药材, 根腐病是黄连的主要病害之一, 近几年大面积爆发, 给生产造成了严重损失。为了明确其病原菌, 采用组织分离法分离出病根中的腐霉属真菌, 通过离体回接初步筛选出疑似病原菌, 再通过活体回接明确病原菌, 利用分子鉴定和形态鉴定将病原菌鉴定到种, 并筛选出病原菌菌株的最适合培养基。结果共计分离到腐霉属真菌 8 株, 其中 *Pythium. macrosporum* 在室温(日均温 4.7~11.2 °C)和 25 °C 离体回接和活体回接时均显示致病性。根据以上结果推断, *P. macrosporum* 是病原菌之一, 且具有在高温和低温都能致病的能力。纯脱皮小麦粒是 *P. macrosporum* 的最佳培养基。

**关键词:** 黄连根腐病; 腐霉属; 病原菌

**中图分类号:** S888.716

**文献标志码:** A

**文章编号:** 1673-9868(2021)06-0037-07

黄连为毛茛科黄连属植物黄连(*Coptis chinensis* Franch.)、三角叶黄连(*Coptis deltoidea* C. Y. Cheng et Hsiao)或云连(*Coptis teeta* Wall.)的干燥根茎。史载于《神农本草经》, 列为上品。性寒, 味苦, 归心、脾、胃、肝、胆、大肠经。具有泻火解毒, 清热燥湿, 用于湿热痞满、呕吐吞酸、高热神昏、心火亢盛、心烦不寐、心悸不宁等<sup>[1]</sup>。是我国内销和出口的大宗药用植物, 也是全国 100 多种中成药的原料, 主产于四川、湖北、重庆等地。近 10 年来, 根腐病在各大产区爆发, 使连农遭受重大损失, 种连积极性大大降低, 严重制约着黄连产业的规模化发展。此外, 黄连连作会加剧根腐病的发生<sup>[2-3]</sup>。该病目前还没有有效的防治方法。

项目组和其他研究人员前期研究的结果表明, 真菌是黄连根腐病的致病病原之一, 其中镰刀菌是强致病菌<sup>[4-5]</sup>。同时, 病根中腐霉属真菌分离频率也很高, 高于镰刀菌<sup>[6]</sup>, 推测其中可能也包含致病菌, 因此本研究对其中的腐霉属真菌进行了致病性研究。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

材料和取材方法见已发表文献<sup>[6]</sup>。

收稿日期: 2020-05-22

基金项目: 重庆市基本科研业务费项目(cstc2019jxjl-jbky10004); 重庆市卫计委重点项目(ZY201801006); 重庆市自然科学基金项目(cstc2019jcyj-msxmX0677); 农业农村部国家中药材产业技术体系项目(CARS-21); 科技部国家重点研发计划项目(2017YFC1702601)。

作者简介: 伍晓丽, 副研究员, 主要从事药用植物生物农药的研究。

通信作者: 李隆云, 研究员。

## 1.2 试剂与仪器

B518259Ezup 柱式真菌基因组 DNA 抽提试剂盒, 生工 SangonBiontech; RR178 Fungi Identification PCR Kit, Takara; 马铃薯葡萄糖琼脂培养基, 北京陆桥; 脱皮麦粒-木屑培养基: 木屑和脱皮麦粒清水浸泡 24 h, 沥干水分, 按照木屑与脱皮麦粒比例为 3 : 1 混合均匀, 装平皿, 121 °C 灭菌 40 min.

超微量分光光度计(NanoDrop 2000), Thermo Scientific 公司; 水平电泳仪(DYY-6C), 北京六一生物科技有限公司; PCR 仪(PTC-100), Bio-Rad 公司; 凝胶成像仪(Gel Doc XR), Bio-Rad 公司; 电子显微镜(OlympusCX31-32C02), 奥林巴斯株式会社.

## 1.3 方法

### 1.3.1 腐霉属菌株分离与纯化

组织分离的方法见已发表的文献<sup>[6]</sup>, 25 °C 培养 5~7 d 后, 挑取组织周围长出的似腐霉属的菌丝(菌丝白色, 短, 稀疏, 贴培养基表面生长, 菌落呈菊花瓣型、月季花瓣型、放射型或平滑型<sup>[7-8]</sup>), 转接入 PDA 中进行纯化, 直到获得纯菌落.

### 1.3.2 可培养真菌分子鉴定

分子鉴定的方法见已发表的文献<sup>[6]</sup>.

### 1.3.3 离体回接

选取腐霉菌株, 在 PDA 培养基上, 黑暗条件下, 25 °C 培养 5~7 d, 至菌丝长满平皿. 剪取健康黄连根条(约 3~4 cm), 无菌水清洗 5 次, 无菌滤纸吸干多余水分, 置于平皿中菌丝上, 12 条根/平皿, 分别置于 25 °C 和室温(4.3~14.2 °C), 在黑暗条件下共培养 7~10 d 后统计发病情况. 以 25 °C 下水琼脂培养基上培养的健康黄连根条为对照.

### 1.3.4 活体回接

取离体回接筛选出的发病严重的菌株, 接种于脱皮麦粒-木屑培养基上, 25 °C 黑暗条件下培养 10~15 d, 至菌丝长满培养基, 备用; 健康 2 年生黄连苗, 将根部泥土杂物洗净, 无菌水清洗 5 次, 剪断部分须根制造伤口, 备用; 河沙混合腐殖土(2 : 1)作为基质, 120 °C 高温烘烤灭菌 3 h, 冷却, 加无菌水润湿, 备用; 小花钵用 5 % 高锰酸钾溶液浸泡 24 h 消毒后用无菌水洗净, 先加入厚约 2 cm 的灭菌基质垫底, 再填入 2 g 长满腐霉菌丝的脱皮麦粒-木屑培养基, 栽入黄连苗, 把基质和脱皮麦粒-木屑菌种混合均匀后填入花钵盖住根, 浇透无菌水, 置于 25 °C 培养箱, 光照 8 h /d. 部分苗置于室温生长(日均温 4.7~11.2 °C). 12 株苗/处理. 对照苗不接种菌, 其余培养方法同上. 7 d 后开始观察, 15 d 后统计发病情况, 计算病情指数(DI). 并取发病根条, 按照步骤 1.3.1 的操作进行病原菌再分离.

$$DI = \sum (PA \times LE) \times 100 / (TO \times HI)$$

式中, PA 为各级病株数, LE 为级数, TO 为调查总数, HI 为最高级数.

### 1.3.5 致病菌系统发育分析

以致病菌株 ITS 序列为基础, 用 BioEdit 和 MEGA6.0 软件按照邻接法, 自展数为 1 000, 构建系统发育树.

### 1.3.6 病原菌形态观察

取致病菌株, 在 PDA 培养基上采用“插片法”, 25 °C 黑暗培养 10~15 d 后, 进行显微形态观察.

### 1.3.7 腐霉培养基筛选

由于腐霉在 PDA 上长期保存会很快枯萎死亡, 不容易继代. 因此对其保存培养基进行了筛选. 基质原料: 带皮小麦(浸泡 48 h 过心, 沥干水分)、脱皮小麦(浸泡 48 h 过心, 沥干水分)、木屑(浸泡 24 h, 挤干水分)、玉米油, 以上原料按照不同比例进行混合后, 装平皿, 121 °C 灭菌 40 min, 接种腐霉菌种, 25 °C 培养 15~20 d 后, 观察菌丝生长状况, 筛选最优良的培养基.

## 2 结果与分析

### 2.1 离体回接发病情况

共计分离到8个不同的腐霉属菌株. 由于其他菌株污染, 取未污染的菌株Q进行离体回接. 结果表明, 无论是高温还是低温下, 它的致病性都较强, 大约5 d后开始发病, 10 d时根条全部腐烂变黑. 因此挑取Q进行进一步的活体回接试验(表1, 图1).

表1 黄连根条离体回接发病情况

菌株编号/温度	发病情况	致病性
Q-25 °C	100%根条变黑	+++++
Q-室温	100%根条变黑	+++++
CK-25 °C	12条根全部保持正常鲜黄色	/

注: +表明致病强度.

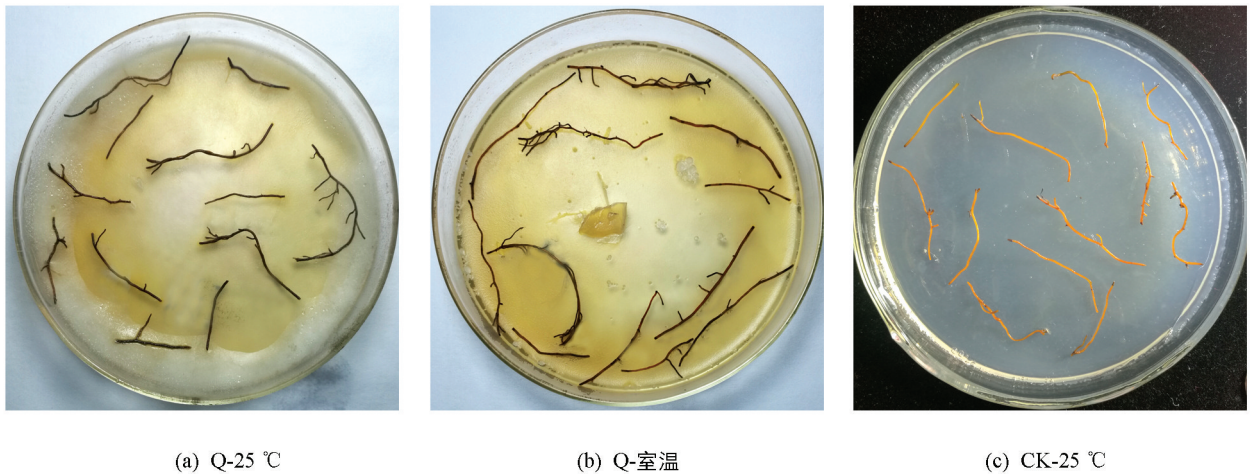


图1 离体回接发病情况

### 2.2 活体回接发病情况

Q菌株在室温和25 °C下均会发病, 发病程度高温比低温略高, 差别不明显. 病株全部根或大量根变黑, 叶片枯萎, 新叶较对照数量少, 长势弱. 活体回接发病的根条进行再分离, 仍然能分离到形态相同的菌株(表2, 图2).

表2 活体回接发病情况

处 理	各级病株数						病情指数
	0级: 根条无 任何腐烂	1级: 腐烂 根条数量<1/4	2级: 腐烂 根条数量占 1/4-1/3	3级: 腐烂 根条数量占 1/3-2/3	4级: 腐烂 根条数量占 2/3-3/4	5级: 腐烂 根条数量占 3/4-1	
Q-25 °C	0	0	0	2	5	5	85.00
CK-25 °C	8	2	0	2	0	0	13.33
Q-室温	0	3	0	0	4	5	73.33
CK-室温	9	3	0	0	0	0	5.00

注: 腐烂根条数量标准包括后值.

### 2.3 致病菌株显微形态

Q菌株的菌落在PDA上呈玫瑰花瓣形, 菌丝短, 米白色, 贴培养基表面生长, 较稀疏. 菌丝直径

3.1~6.7  $\mu\text{m}$  左右. 孢子囊有丝状、球形或椭圆形两种, 后者直径 17.7~20.4  $\mu\text{m}$ . 游动孢子直径 3.8~6.6  $\mu\text{m}$ , 部分发现芽管萌发<sup>[7]</sup>(图 3).

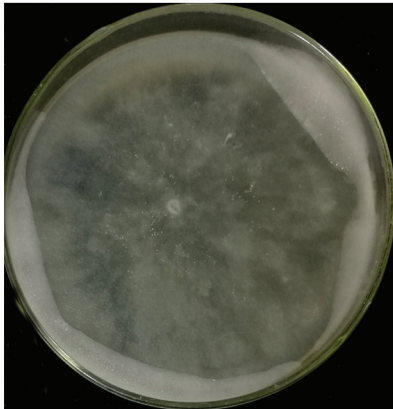


(a) 发病根条

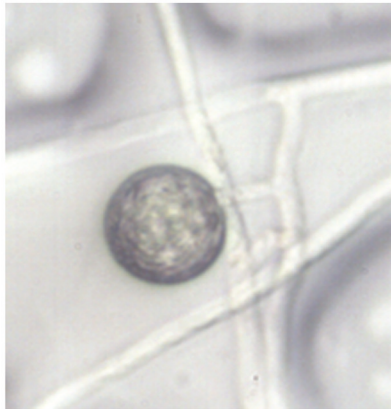


(b) CK

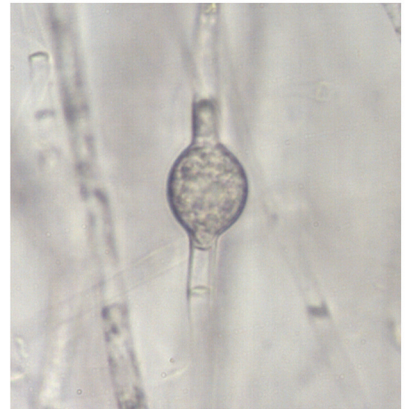
图 2 活体回接发病情况



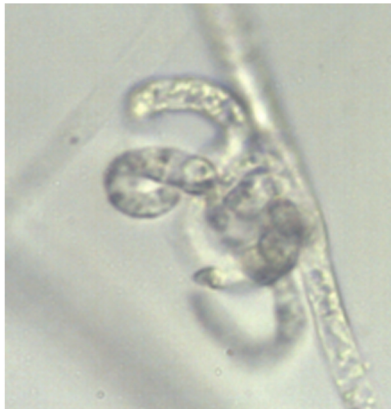
(a) 菌落



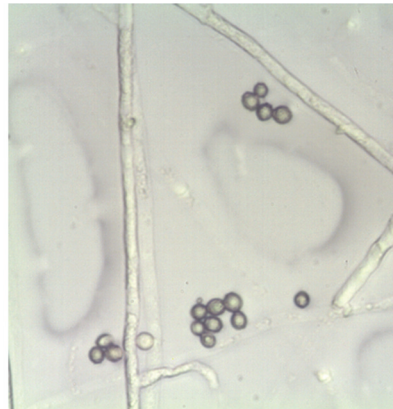
(b) 顶生球形孢子囊



(c) 间生椭圆形孢子囊



(d) 丝状孢子囊



(e) 游动孢子

图 3 菌株 Q 显微形态

## 2.4 最适合培养基筛选

培养基筛选接种的菌种是 Q, 它在纯带皮麦粒和纯木屑上几乎无菌丝生长, 而纯脱皮麦粒上生长最旺盛, 可作为腐霉生长和保存的培养基. 添加玉米油对菌丝生长有一定的促进作用(表 3).

表3 不同培养基上腐霉菌丝生长状况

培养基配方	腐霉菌丝生长状况
纯脱皮麦粒	++++菌丝生长非常茂盛
脱皮麦粒与木屑比例为1:1	+++菌丝生长较茂盛
脱皮麦粒、木屑和玉米油比例为25:25:1	++++菌丝生长很茂盛
脱皮麦粒与木屑比例为1:10	++菌丝生长较差
脱皮麦粒、木屑与玉米油比例为5:50:1	++菌丝生长较差
纯木屑	几乎无菌丝生长
纯带皮麦粒	几乎无菌丝生长
纯带皮麦粒与木屑比例为1:1	+++菌丝生长较茂盛
纯带皮麦粒与木屑比例为1:5	++菌丝生长较差
纯带皮麦粒与木屑比例为1:10	++菌丝生长较差

注: +代表菌丝生长状况。

## 2.5 腐霉属菌株分子鉴定结果及致病菌系统发育分析

8个腐霉属菌株的分子鉴定结果见表4。

表4 黄连病根中腐霉属菌株分子鉴定结果

菌株编号	基因登录号	最相似菌株	ITS序列一致性/%
1F	AB512927.1	<i>Pythium intermedium</i> strain 5Kam211	99
Q	AY598646.2	<i>Pythium macrosporum</i> strain CBS 574.80	98
13.20	EU038831.1	<i>Pythium</i> sp. 29 us	98
1B	AB468806.1	<i>Pythium</i> sp. UZ318	99
3B	AB468810.1	<i>Pythium</i> sp. UZ400	97
2.2	KU208250.1	<i>Pythium spinosum</i> isolate AR_246. S. 2. 3. A	99
3J	AY598701.2	<i>Pythium spinosum</i> strain CBS 275.67	99
I2	KY084736.1	<i>Pythium sylvaticum</i> isolate HF3	98

系统发育分析结果表明, 1B, 1F, 3B, 13.20 和 *P. intermedium* 聚为一枝, I2, 2.2, 3J 和 *P. spinosum* 聚为一枝。Q 和 *P. macrosporum* strain CBS 574.80 聚为一枝(图4)。

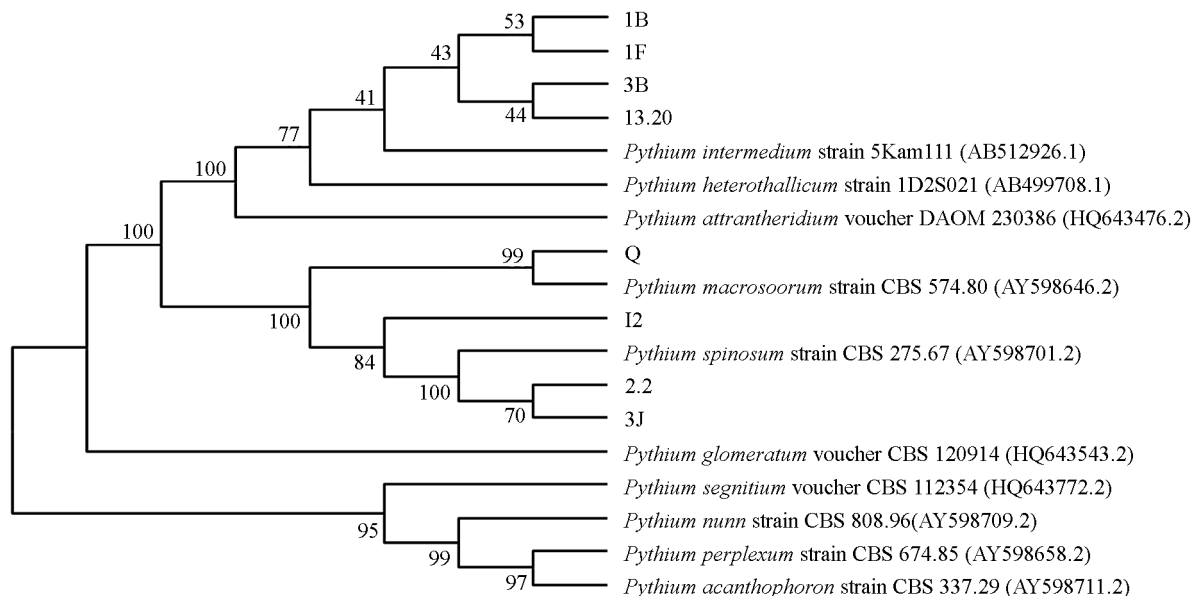


图4 黄连根条中腐霉属菌株基于ITS序列的系统发育树

### 3 结 论

腐霉(*Pythium*)是藻物界,卵菌门,卵菌纲,霜霉目,腐霉科的一个属<sup>[8]</sup>。该属真菌分布十分广泛,且可腐生、寄生或兼性寄生,又可水生、陆生或水陆两栖生。许多种类是重要的土传植物病原菌,常造成果实腐烂、根腐、茎基腐和幼苗猝倒病等。迄今为止,重要的植物病原腐霉已经超过 80 种,对农作物危害很大<sup>[9]</sup>。

腐霉属菌在黄连根腐病根条中分离频率很高,且包含多个种<sup>[6]</sup>。这些种很多都是其他植物的根腐病菌。*P. spinosum* 可导致小麦根腐病<sup>[10]</sup>,*P. sylvaticum* 可导致大豆、大蒜根腐病<sup>[11-12]</sup>。*P. intermedium* 可导致欧防风(*Pastinaca sativa* L.)<sup>[13]</sup>、狗蔷薇(*Rosa canina* L.)<sup>[14]</sup> 幼苗根腐病。*P. macrosporum* 可导致花卉鳞茎腐烂和草类<sup>[15]</sup>、胡萝卜<sup>[16]</sup> 的根腐病。Q 和 *P. macrosporum* strain CBS 574.80 聚类可信度是 100,*P. macrosporum* strain CBS 574.80 是模式菌株,A. J. van der 用这株菌对 *P. macrosporum* 这个种进行描述和定义<sup>[7]</sup>,结合显微特征,说明 Q 就是 *P. macrosporum*。因此 *P. macrosporum* 是黄连根腐病致病菌之一。本研究还发现该菌在低温下也对黄连根条具有致病性,且致病能力和 25 °C 时没有明显差别。其他腐霉也有类似报道,如 *Pythium sulcatum* 在 10 °C,18 °C 和 24 °C 均能导致欧芹幼苗<sup>[13]</sup> 和狗蔷薇幼苗根腐病<sup>[14]</sup>。国内外有关 *P. macrosporum* 的报道很少,该菌在荷兰<sup>[7,15]</sup>、德国<sup>[7]</sup>、加拿大<sup>[7,16]</sup> 和美国<sup>[17]</sup> 均有分离到,在国内是首次分离报道。根据以上分析推测,其他 7 株未作回接的腐霉菌株中可能也包含在不同温度侵染黄连根部的致病菌,有待进一步研究。

腐霉离体回接发病表现和镰刀菌不同,前者只是腐烂变黑,而后者会产生大量黄色水珠,且腐烂程度比腐霉高<sup>[5]</sup>。说明腐霉致病能力不如镰刀菌强。而即便如此,腐霉具有镰刀菌不具备的低温致病能力<sup>[5]</sup>,与高温致病的镰刀菌配合,延长了侵染时期,大大增加了黄连根腐病的防治难度。

腐霉菌丝在纯带皮小麦上几乎不生长,加了湿润的木屑才生长,在脱皮小麦上生长最好,推测原因是纯带皮小麦表面水分容易干,木屑和脱皮小麦能保持湿润。但腐霉在纯木屑上不生长,说明它对木质纤维分解能力弱,需要淀粉作为外源养分。很多腐霉的培养基都含有油脂类成分,常用的 KPYG2 培养基就含有玉米油<sup>[18-19]</sup>。因此,本研究在基质中添加玉米油,结果对菌丝生长有一定促进作用。推测玉米油和纯脱皮小麦的组合培养效果更佳,拟进行进一步的比较研究。

### 参考文献:

- [1] 王 影,刘文娟,崔 瑛. 黄连现代研究进展 [J]. 中医学报,2014,29(11): 1642-1645.
- [2] 刘云露,郑守豪,叶磊鑫,等. 黄连土壤阿魏酸降解菌的筛选及降解特性 [J]. 西南大学学报(自然科学版),2019,41(1): 46-50.
- [3] 刘昌云,张永至,申 杰,等. 黄连根腐病发病因素分析及防治药剂筛选 [J]. 植物医生,2019,32(4): 24-27.
- [4] LUO X M, LI J L, DONG J Y, et al. First Report of Fusarium Solani Causing Root Rot on Coptis Chinensis in South-western China [J]. Plant Disease, 2014, 98(9): 1273.
- [5] 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.
- [6] 伍晓丽,刘 飞,陈大霞,等. 重庆石柱黄连根腐病病原可培养真菌多样性研究 [J]. 中国中药杂志,2019,44(20): 4439.
- [7] A. J. VAN DER PLAATS-NITERINK A J. Monograph of the Genus Pythium [J]. Stud Mycol, 1981, 21: 1-242.
- [8] 龙艳艳. 腐霉属的 DNA 条形码和分子系统学研究 [D]. 南宁: 广西大学,2014.
- [9] 银 玲,田 迅,霍万学. 腐霉属菌形态学及分子生物学鉴定技术的概述 [J]. 中国蔬菜,2013(12): 15-22.
- [10] 张 博,刘 莘,张悦丽,等. 几种生物制剂对小麦根腐病菌的毒力 [J]. 麦类作物学报,2018,38(3): 366-371.
- [11] 张瑞萍,王家军,魏 嵘,等. 一株大豆腐霉菌(PSHH1)rDNA 的 ITS 序列鉴定 [J]. 大豆科学,2015,34(5): 867-873.
- [12] 张 博. 山东省大蒜腐霉根腐病初步研究 [D]. 乌鲁木齐: 新疆农业大学,2008.

- [13] PETKOWSKI J E, BOER R F, NORNG S, et al. Pythium Species Associated with Root Rot Complex in Winter-Grown Parsnip and Parsley Crops in South Eastern Australia [J]. Australasian Plant Pathology, 2013, 42(4): 403-411.
- [14] METZGER R, BELBAHRI L, CALMIN G, et al. First Report of *Pythium intermedium* Causing Root Rot on *Rosa canina* Rootstock in France [J]. Plant Disease, 2007, 91(8): 1055.
- [15] VAN OS G J, WIJNKER J P M, VAN GULIK W J M. Effects of Soil Fumigation and Flooding on Suppression of Pythium Root Rot in Ornamental Bulb Culture [J]. European Journal of Plant Pathology, 1999, 105(8): 791-800.
- [16] ALLAIN-BOULÉ N, LÉVESQUE CA, MARTINEZ C, et al. Identification of Pythium Species Associated with Cavity Lesions on Carrots in Eastern Quebec [J]. Canadian Journal of Plant Pathology, 2004, 26: 365-370.
- [17] WESTOVER K M, BEVER J D. Mechanisms of Plant Species Coexistence: Roles of Rhizosphere Bacteria and Root Fungal Pathogens [J]. Ecology, 2001, 82: 3285-3294.
- [18] 张 振, 苏晓庆. 灭蚊真菌贵阳腐霉长期保存方法的研究 [J]. 贵阳医学院学报, 2013, 38(2): 115-119.
- [19] 赵竟男, 江 梅, 苏晓庆. 灭蚊真菌贵阳腐霉原生质体的制备和再生研究 [J]. 贵阳医学院学报, 2008, 33(2): 111-114.

## Identification of the *Pythium* Pathogen Responsible for Root Rot of *Coptis chinensis*

WU Xiao-li<sup>1,2,3,4</sup>, CHEN Da-xia<sup>1,2,3,4</sup>, LIU Fei<sup>2,5</sup>,  
WANG Yu<sup>1,2,3,4</sup>, LI Long-yun<sup>1,2,3,4</sup>

1. Institute of Material Medical Planting, Chongqing Academy of Chinese Materia Medica, Chongqing 400065, China;
2. Chongqing Sub-center of National Resource Center for Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Science, Chongqing 400065, China;
3. Chongqing Engineering Research Center for Fine Variety Breeding Techniques of Chinese Materia Medica, Chongqing 400065, China;
4. Chongqing Key Laboratory of Traditional Chinese Medicine Resource, Chongqing 400065, China;
5. Health Center of Chongqing Academy of Chinese Materia Medica, Chongqing 400065, China

**Abstract:** *Coptis chinensis* is an important traditional Chinese medicine herb, and root rot is one of its main diseases, which has repeatedly broken out in some producing areas in recent years, causing severe damage to the crop. To identify the pathogen(s) of this disease, according to Kochs postulate, *Pythium* spp. strains were isolated from the rot root. Then, probable pathogens were preliminarily screened with the method of in vitro back inoculation, and identified with molecular and morphological method. In the result, 8 *Pythium* strains were obtained, of which *P. macrosporum* displayed pathogenicity when in vitro inoculated on the root and the plant at both room temperature (daily mean temperature 4.7~11.2 °C) and 25 °C. So *P. macrosporum* was speculated to be one of the pathogens and could infect *C. chinensis* at both low and high temperature. Pure decorticated wheat was the best medium for *P. macrosporum*.

**Key words:** root rot of *Coptis chinensis*; *Pythium*; pathogen