

茭白胡麻叶斑病原菌分离与鉴定

黄婉琴, 李勤, 覃章辉, 王明红*

(湖北民族大学, 恩施 445000)

摘要 茭白胡麻叶斑病发生普遍且严重, 已成为茭白的常见病害。为了明确病原菌, 先后从茭白主产区采集胡麻叶斑病病叶, 各产区分离纯化 5~10 株病原菌。通过对菌株 DNA 的内转录间隔区 ITS 基因、3-磷酸甘油醛脱氢酶 GPDH 基因、延伸因子 EF-1 α 基因的序列进行分析。结合形态学观察、致病力测定等方法对茭白胡麻叶斑病病菌进行鉴定。结果表明, 茭白胡麻叶斑病病原菌为稻平脐蠕孢 *Bipolaris oryzae*, 与水稻胡麻叶斑病病原菌一致。本文的研究成果可为茭白胡麻叶斑病的防治提供一种新的思路。

关键词 茭白胡麻叶斑病; 病原菌鉴定; 稻平脐蠕孢

中图分类号: S 436.45 **文献标识码:** A **DOI:** 10.16688/j.zwbh.2019060

Isolation and identification of the pathogen causing leaf spot of *Zizania latifolia*

HUANG Wanqin, LI Qin, QIN Zhanghui, WANG Minghong*

(Hubei Minzu University, Enshi 445000, China)

Abstract *Zizania latifolia* leaf spot disease is a common and serious disease. In order to identify the pathogen, we collected infected leaves from different main production areas of *Z. latifolia* and selected 5 to 10 strains in each area. Identification experiments were performed based on DNA internal transcribed spacer ITS, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GDPH) and elongation factor EF-1 α gene sequences and morphology. The results showed that the pathogen of leaf spot of *Z. latifolia* was *Bipolaris oryzae*, which was the same as the pathogen of rice flax leaf spot. This study provides a new idea for the control of leaf spot of *Z. latifolia*.

Key words *Zizania latifolia* leaf spot disease; pathogen identification; *Bipolaris oryzae*

茭白 *Zizania latifolia*, 又名高笋、茭瓜, 是我国第二大水生蔬菜, 也是我国特有蔬菜, 经济效益非常显著^[1]。由 *Bipolaris oryzae* 引起的茭白胡麻叶斑病又称茭白叶枯病, 是近年来影响茭白产量的主要病害之一。随着茭白种植面积逐年扩大, 该病的发生范围也在不断扩大, 在全国茭白主要种植区都普遍发生^[2], 而且田间发生程度也越来越严重, 特别严重时, 株发病率达 90%, 病叶率达 100%^[1]。为了弄清不同茭白主产区胡麻叶斑病病原菌, 本研究对茭白五个主产区的胡麻叶斑病菌进行了分离纯化、形态学观察、致病力测定和分子鉴定, 以期对茭白胡麻叶斑病的诊断、抗病育种以及病害防治提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 主要生物试剂及仪器

DNA 提取的相关试剂、药品购自大连宝生物公司; 琼脂糖凝胶回收试剂盒为爱思进生物技术有限公司产品。本试验所涉及引物均委托武汉天一辉远生物技术有限公司合成, 使用引物序列详细信息见表 1。

PCR 扩增仪 (DNA Engine Peltier Thermal cycler, Bio-RAD); 水平电泳仪 (DYY-6C, 北京); 凝胶成像系统 (Gel Doc TMIImager, Bio-RAD); 微量分光光度计 (Nano Drop 2000c, Thermo Scientific 公司); 光学显微镜 (Nikon ECLIPSE 80i, Nikon Instruments Inc)。

收稿日期: 2019-02-02

修订日期: 2019-04-07

基金项目: 湖北省技术创新专项重大项目 (2017ABA152); 中央引导地方科技发展专项 ([2016]150)

* 通信作者 E-mail: red07991@163.com

表 1 引物
Table 1 Primers

基因 Gene	引物名称 Primer name	序列(5'-3') Sequence	长度/bp Length
GPDH	Gpd-1	CAACGGCTTCGGTCGCATTG	550~650
	Gpd-2	GCCAAGCAGTTGGTTGTGC	
EF-1 α	EF1-983 F	GCYCCYGGHCAYCGTGAYTTYAT	900~1 200
	EF1-2218R	ATGACACCRACRGCACRGTYTG	
ITS	ITS1	TCCGTAGGTGAACCTGCGG	500~600
	ITS4	TCCTCCGCTTATTGATATGC	

1.2 菌株采集与分离

在 2016 年 7 月—2017 年 11 月期间共采样 8 次,茭白胡麻叶斑病叶采自湖北武汉市与恩施州,浙江桐乡县与金华市,江西九江市,江苏南通市与扬州市以及广西贵港市等茭白主产区。病原菌的分离纯化方法参照组织分离法^[3],即:取茭白叶片病健交

界处,剪切成 5 mm×5 mm 的小块,用 75%乙醇消毒 30 s,灭菌水清洗 3 次后接种于 PDA 平板上,每皿 4~5 块,置于 28℃光照培养箱中暗培养 2~4 d,再纯化菌株。将成功分离纯化的病株用 PDA 培养基斜面接种保存后,在 4℃冰箱中保存(本试验筛选菌株情况见表 2)。

表 2 菌株信息
Table 2 Strains used in the experiments

编号 Number	来源 Source	编号 Number	来源 Source	编号 Number	来源 Source	编号 Number	来源 Source
ES16	湖北恩施	JH07	浙江金华	YZ10	江苏扬州	JX06	江西九江
ES40	湖北恩施	JH12	浙江金华	YZ33	江苏扬州	JX07	江西九江
BD21	湖北恩施	JH15	浙江金华	YZ35	江苏扬州	JX11	江西九江
BD73	湖北恩施	JH16	浙江金华	YZ45	江苏扬州	JX18	江西九江
LC197	湖北恩施	TX21	浙江桐乡	YZ47	江苏扬州	JX23	江西九江
M12	湖北武汉	TX33	浙江桐乡	NT02	江苏南通	GX02	广西贵港
M13	湖北武汉	TX34	浙江桐乡	NT03	江苏南通	GX04	广西贵港
M14	湖北武汉			NT04	江苏南通	GX17	广西贵港
M15	湖北武汉			NT31	江苏南通	GX42	广西贵港
M16	湖北武汉			NT32	江苏南通	GX46	广西贵港

1.3 致病力测定

采用离体叶片接种法^[4],该试验共进行 2 次,每次试验设 3 个重复。在茭白生长初期取宽约 2 cm 的叶片进行室内人工接种试验。从田间采回叶片后剪取其中部约 7 cm 的一段,置于铺有湿润吸水纸的培养皿中,叶背朝上,用直径为 5 mm 的菌丝块进行接种,每皿 3 组重复加 1 组 PDA 培养基琼脂块作为空白对照。接种后喷水雾,将培养皿盖住保湿,置于 28℃恒温黑暗条件下,观察 24~96 h,待叶片出现染病状态后将菌饼移除,96 h 后对病斑进行组织分离,观察菌落形态以及在显微镜下观察分离到的病菌是否与接种病菌相同。

1.4 菌株形态学特征观察

将已分离纯化的菌株接种在 PDA 培养基平板上,培养 3 代后用打孔器沿菌落边缘切取直径为 5 mm 的菌丝块接种于 PDA 培养基上,在 28℃培养箱中黑暗培养约 15 d,期间观察菌落的颜色以及在

PDA 培养基上的菌落形态等。在病原菌长满平板前在显微镜下观察菌丝尖端,待长满平板后,用无菌水将菌落表面的孢子洗下,在显微镜下进行观察。

1.5 菌株 DNA 的提取

菌株基因组 DNA 提取采用 CTAB 法^[5],核酸溶解后取 100 ng 产物进行 1%琼脂糖凝胶电泳检测,剩余产物置于一 20℃条件下保存备用。

1.6 基因扩增体系及条件

对溶解后的 DNA 核酸溶液进行质量检测,然后再进行基因扩增。EF-1 α 基因扩增体系为 25 μ L, DNA 模板 1 μ g, dNTPs (2.5 mmol/L) 2 μ L, 10×PCR buffer 2.5 μ L, 引物各 1 μ L, Taq 酶 1 U, 加灭菌水至 25 μ L。反应程序为: 95℃预变性 5 min; 95℃变性 30 s, 58℃退火 1 min, 72℃延伸 1 min 30 s, 循环 30 次; 最后 72℃延伸 7 min。基因 GPDH 和基因 ITS 扩增体系为 25 μ L, DNA 模板 1 μ g, dNTPs

(2.5 mmol/L)2 μ L,10 $\times$ PCR buffer 2.5 μ L,引物各 1 μ L, *Taq* 酶 1 U,加灭菌水至 25 μ L。基因 *EF-1 α* 反应程序为:95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min;95 $^{\circ}$ C 变性 30 s,54 $^{\circ}$ C 退火 50 s,72 $^{\circ}$ C 延伸1 min,循环 40 次;最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min。基因 ITS 反应程序为:95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min;95 $^{\circ}$ C 变性 30 s,50 $^{\circ}$ C 退火 1 min,72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min,循环 35 次;最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 7 min。

由于 *EF-1 α* 基因引物为简并引物,故将其扩增产物连 T 载体克隆后送武汉天一辉远公司测序检测,其他基因将扩增产物委托公司进行双向测序。检测结果分别得到菌株的 *EF-1 α* 基因序列、ITS 基因序列和 *GPDH* 基因序列。将测序结果用 DNA-MAN 7.0 软件进行分析,然后登录 NCBI(National Center for Biotechnology Information)的 BLASTn 后与 GenBank 数据库中公布相关属种病原菌基因

信息作同源性比较分析。

2 结果与分析

2.1 茭白胡麻叶斑病病菌危害症状

茭白胡麻叶斑病一般出现在 5 月下旬到 7 月上旬之间,在 6 月下旬到 7 月中上旬发病速度明显加快,7 月中旬后开始进入发病高峰期,到 9 月中旬发病速度开始变缓,进入 11 月后发病逐渐停止^[2]。在叶片发病初期,叶片上散生褐色小点,后逐渐扩大成状如芝麻粒的褐色椭圆形或纺锤形病斑(图 1a)。病斑周围呈黄褐色晕圈,时有轮纹,后期中心变灰白色。病情严重时叶片上分布着密密麻麻的病斑,甚至联合成不规则的大斑,造成较大的坏死区,致使叶片由叶尖或叶缘向下或向内逐渐枯死,最后叶片干枯。

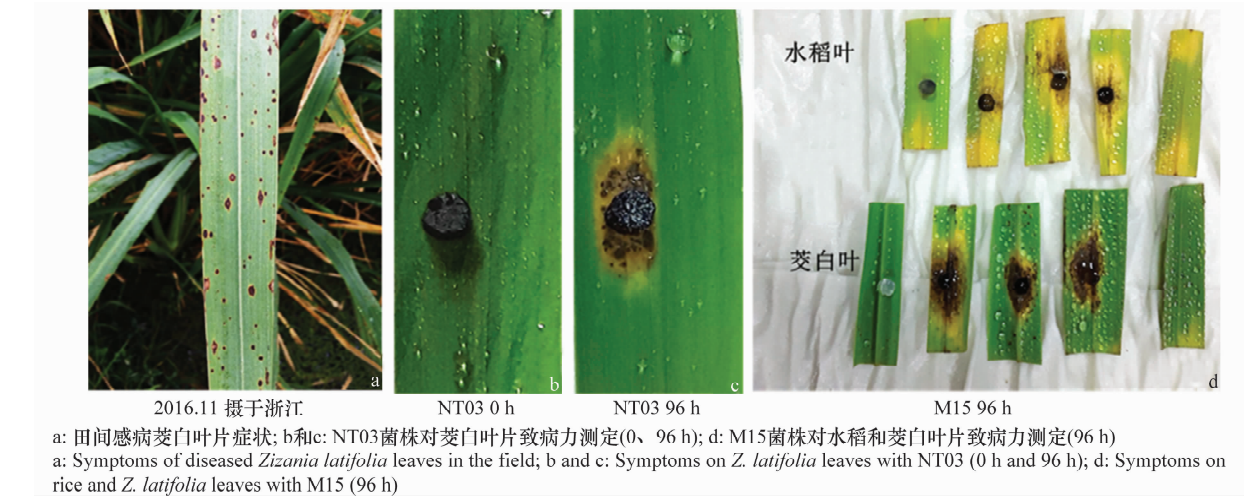


图 1 胡麻叶斑病菌危害水稻和茭白叶片症状

Fig. 1 Symptoms caused by *Bipolaris oryzae* on leaves of *Oryza sativa* and *Zizania latifolia*

2.2 形态学鉴定结果

病原菌在 PDA 培养基上生长良好,初期菌落为灰白色,2~3 d 后从中心开始变为淡灰色(图 2a),之后逐渐扩散,28 $^{\circ}$ C 黑暗培养 7 d 后,菌落能长满直径为 90 mm 的培养皿(图 2b)。长满整个培养皿后菌丝变为褐绿色,最终菌落呈黑褐色,圆环形,菌丝绒毛状,呈辐射状展开,边缘规则,中心部分或有气生菌丝,或产生白色菌丝团,培养 15 d 左右气生菌丝铺满整个培养皿。显微镜下分生孢子深黄褐色或浅褐色,长卵形、梭形或者倒棍棒形,光滑,正直或一侧弯曲,两端渐狭,钝圆,4~9 个假隔膜,脐部略突出,基部平截,长 33~188 μ m,宽 6~41 μ m(图 3)。菌丝尖端疏散铺开,有向一侧弯曲

的分支,或短或长(图 4)。

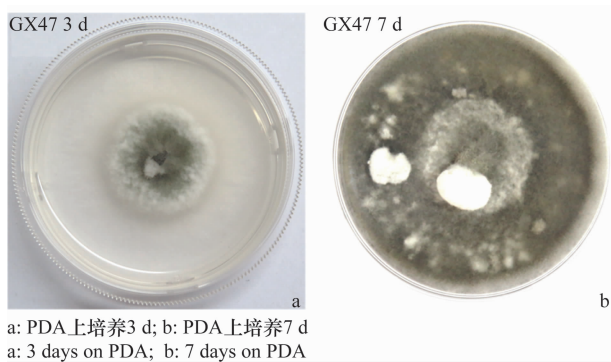


图 2 茭白胡麻叶斑病菌 GX47 菌落形态

Fig. 2 Colony morphology of *Bipolaris oryzae* strain GX47 isolated from a diseased *Zizania latifolia* leaf

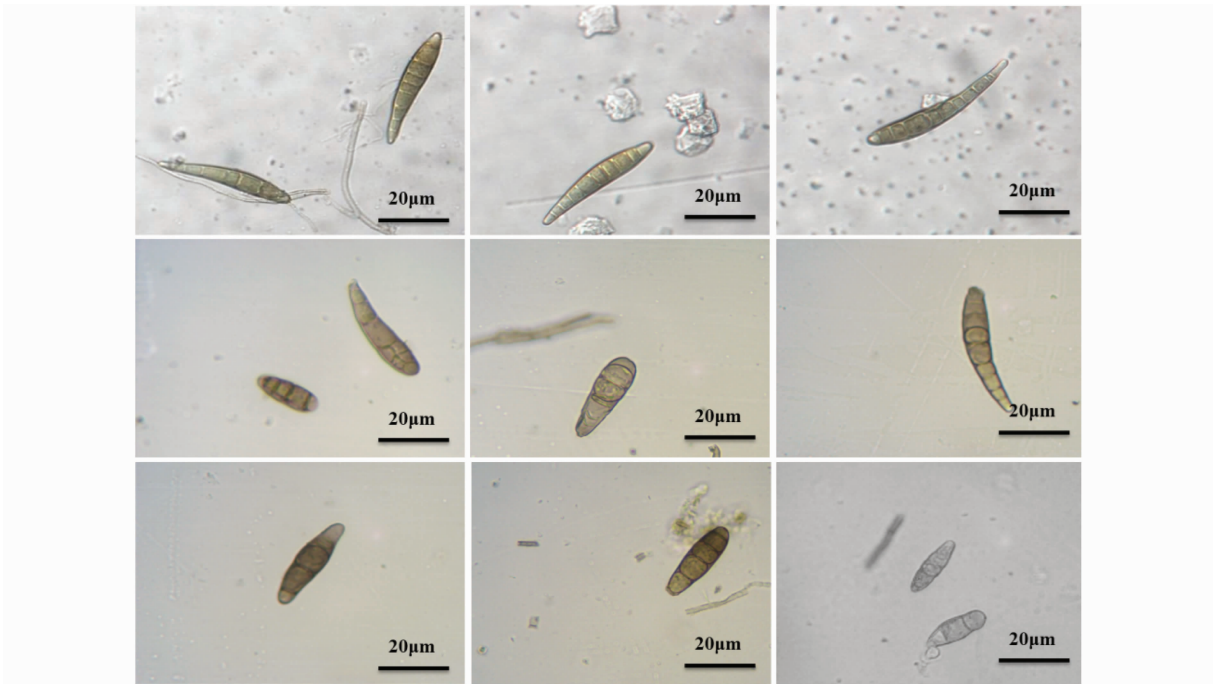


图 3 茭白胡麻叶斑病菌分生孢子形态

Fig. 3 Conidial morphology of the pathogen causing *Zizania latifolia* leaf spot disease

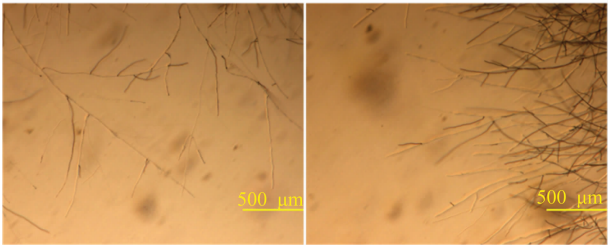


图 4 茭白胡麻叶斑病菌菌丝尖端形态

Fig. 4 Hyphal tip morphology of the pathogen causing *Zizania latifolia* leaf spot disease

2.3 致病力测定结果与分析

胡麻叶斑病病标样分离得到的 37 株菌株接种离体叶片致病力测定结果表明,所有菌株对茭白叶片均能致病,接种后发病率为 100%。96 h 时,病斑长度增加到 3~5 cm 左右。人工接种茭白和水稻叶片后,在叶片上表现的症状相同(图 1c)。

2.4 茭白胡麻斑病病原菌的分子鉴定

提取所有菌株基因组 DNA 且酶处理后,在 220 V, 45 min 电泳条件下检测基因组完整性。部分菌株检测结果见图 5。

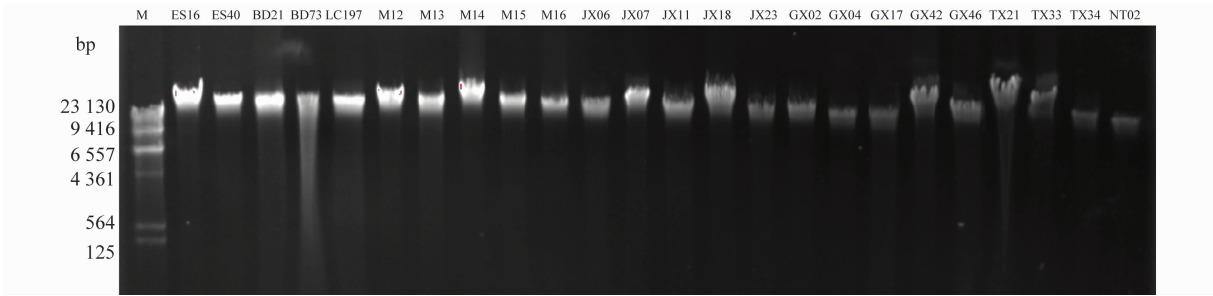


图 5 茭白胡麻叶斑病菌部分菌株 DNA 检测(M:λDNA/*Hind*Ⅲ Marker)

Fig. 5 DNA detection of representative strains of the pathogen causing *Zizania latifolia* leaf spot disease (M: λDNA/*Hind*Ⅲ Marker)

对提取成功的核酸进行含量检测,每个菌株取 1 μg 进行特定基因扩增。rDNA-ITS、*GPDH* 和 *EF-1α* 基因目的条带分别约 580 bp、550 bp 和

1 000 bp(图 6)。扩增后的电泳图目的条带片段大小跟预测值接近。

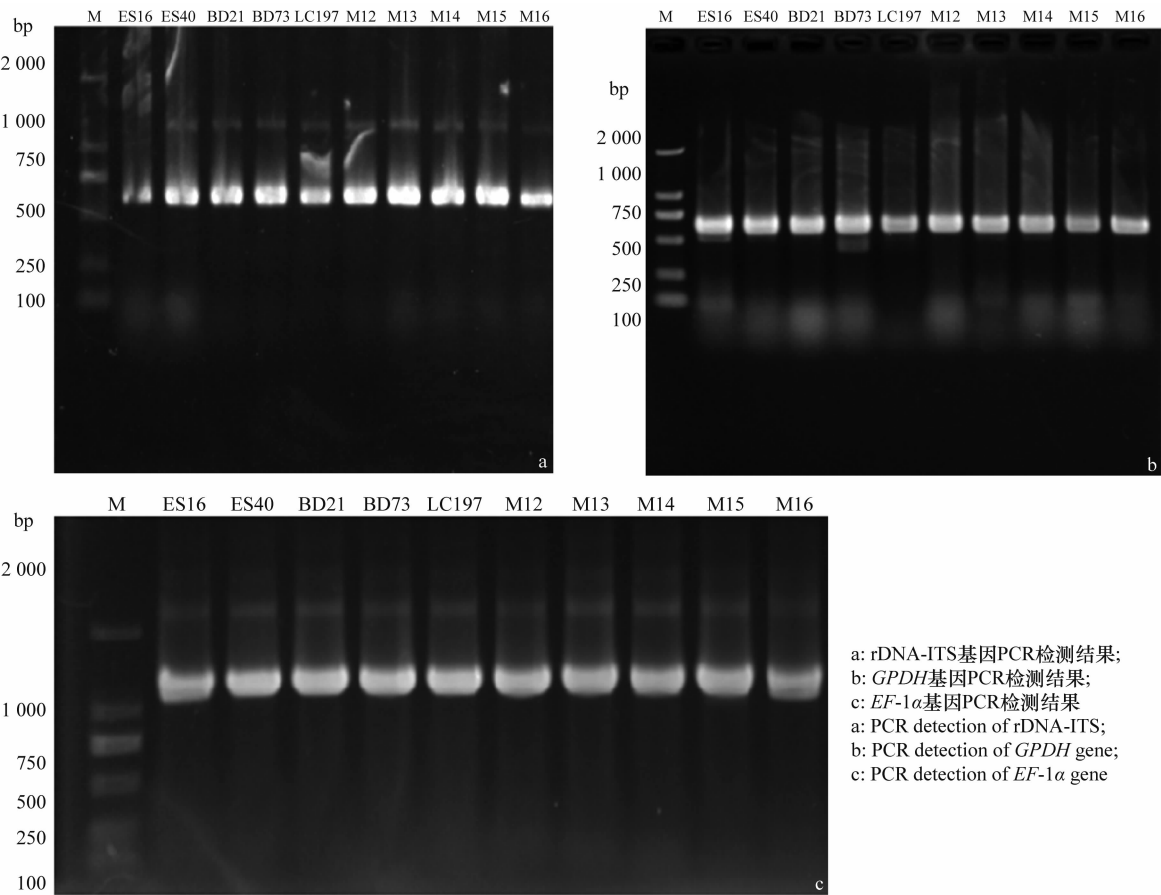


图 6 茭白胡麻叶斑病菌部分菌株基因 PCR 检测结果 (M:DL2000 Marker)

Fig. 6 PCR identification of representative strains of the pathogen causing *Zizania latifolia* leaf spot disease (M: DL2000 Marker)

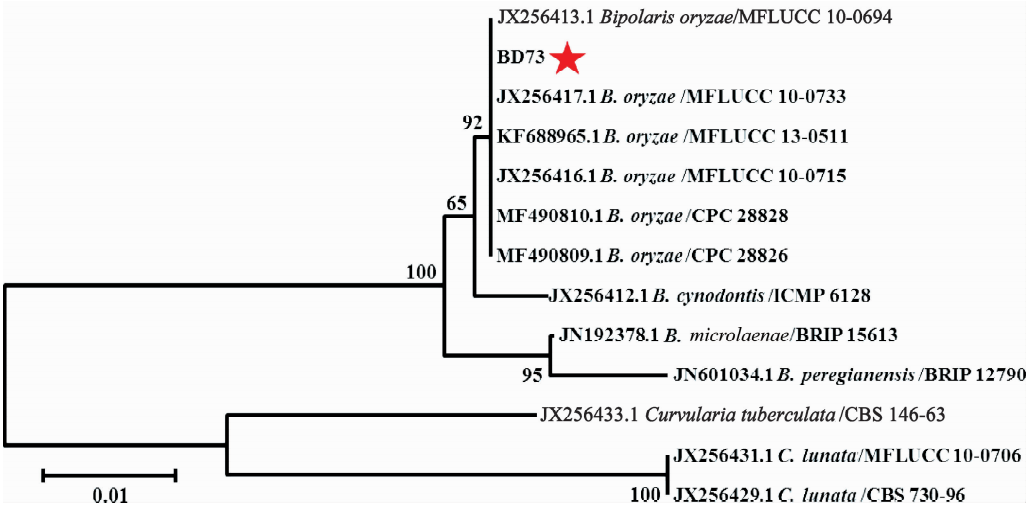


图 7 基于 rDNA-ITS 基因的茭白胡麻叶斑病菌系统发育分析

Fig. 7 Phylogenetic analysis of the strains isolated from diseased *Zizania latifolia* leaves based on rDNA-ITS sequences

测序结果分析发现 37 株菌株的 rDNA-ITS 基因序列完全一致,故选取 BD73 为代表菌株。根据构建的系统发育树,发现 BD73 与稻平脐蠕孢 MFLUCC10-0694 菌株 MFLUCC10-0733 菌株、MFLUCC13-0511 菌株、MFLUCC10-0715 菌株、CPC28828 菌株、CPC28826 菌株聚在一支。同时发现,菌株 BD73 与这些菌株的 rDNA-ITS 基因同源相似度在 99%。

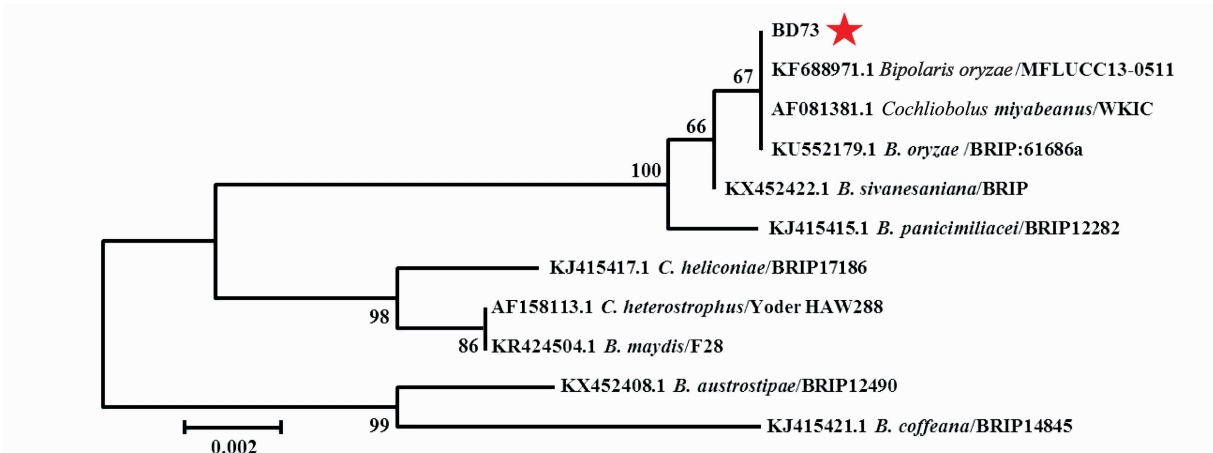


图 8 基于 *GPDH* 基因的茭白胡麻叶斑病菌系统发育分析

Fig. 8 Phylogenetic analysis of the strains isolated from diseased *Zizania latifolia* leaves based on *GPDH* gene sequences

测序结果分析发现 37 株菌株的 *GPDH* 基因序列完全一致,故选取 BD73 为代表菌株。根据构建的系统发育树,发现 BD73 与稻平脐蠕孢 MFLUCC13-

0511 菌株、BRIP:61686a 菌株和平脐蠕孢有性态菌株 WKIC 聚在一支。同时发现,菌株 BD73 与菌株 MFLUCC13-0511 的 *GPDH* 基因同源相似度在 100%。

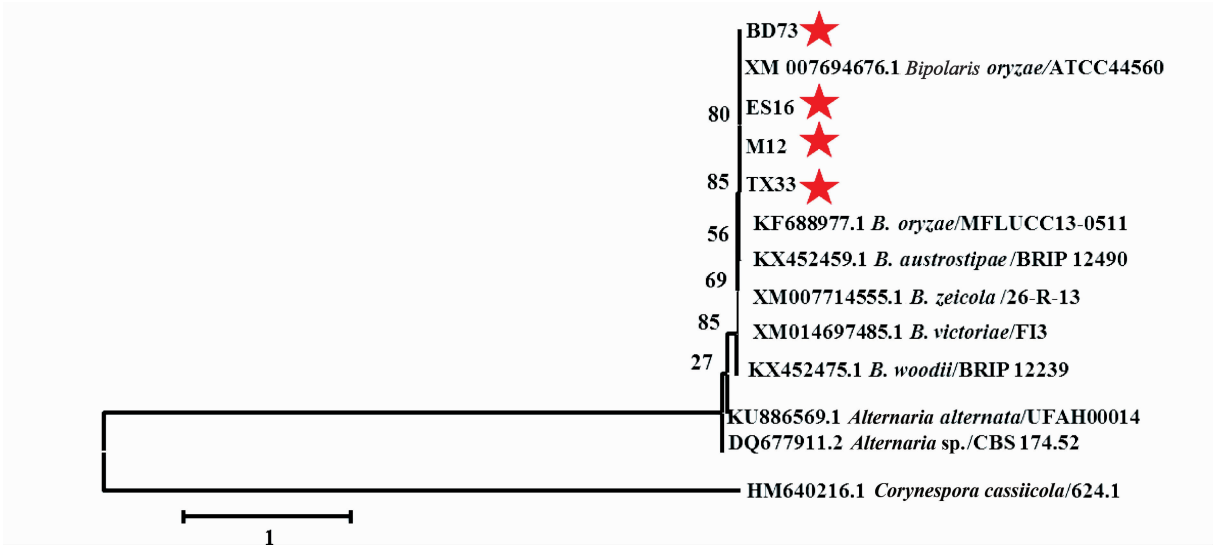


图 9 基于 *EF-1α* 基因的茭白胡麻叶斑病菌系统发育分析

Fig. 9 Phylogenetic analysis of the strains isolated from diseased *Zizania latifolia* leaves based on *EF-1α* gene sequences

37 株菌株的 *EF-1α* 基因序列有 30 种不同的序列,将这些序列进行 BLASTn 比对后,发现这些菌株均与 *B. oryzae*/ ATCC44560 (99%)、*B. oryzae*/MFLUCC13-0511 (99%)、*B. austrostipae* /BRIP 12490 (99%)、*B. zeicola*/26-R-13 (99%)、*B. victoriae*/FI3 (99%)、*B. woodii*/BRIP 12239(99%)、*A. alternata*/UFAH00014 (95%)、*Alternaria* sp. /CBS 174. 52(96%)、*C. cassiicola*/624. 1 相似,且相似度在95%以上。故选以上序列和不同序列的 BD73、ES16、M12 和 TX33 为代表菌株,构建 NJ 树。根据 NJ 树结果,发现 BD73、

ES16、M12、TX33 与稻平脐蠕孢菌株 ATCC44560 和菌株 MFLUCC13-0511 在同一支。

3 小结与讨论

虽然茭白胡麻叶斑病在茭白叶片上危害程度非常严重,但由于茭白的地理分布以及种植分布的局限性。长期以来人们对于茭白胡麻叶斑病的重视程度不够,导致对该病的研究较少。对于该菌的鉴定传统方法为观察病原菌分生孢子,通过测量分生孢

阳性菌多肽的分离纯化及抑菌活性机理[J]. 江苏农业科学, 2011(3): 408-411.

- [20] 伍明俊, 金丹, 李晖, 等. 抗真菌菌株 JW-725 的分离, 鉴定及发酵产物性质的初步分析[J]. 四川大学学报(自然科学版), 2003, 40(5): 945-948.
- [21] 周华强, 谭芙蓉, 周颖, 等. 多黏类芽孢杆菌极端嗜热多肽的纯化及性质研究[J]. 现代农药, 2007, 6(3): 40-43.
- [22] 罗路云, 金德才, 左晖, 等. 沼泽红假单胞菌 PSB06 对辣椒根际微生物群落结构的影响[J]. 环境科学, 2017, 38(2): 735-742.
- [23] 王进强, 许文耀, 朱巧玲, 等. 56% 氢氧化铜·烯酰吗啉可湿性粉剂对辣椒疫病的防治效果[J]. 亚热带农业研究, 2006, 2(1): 37-40.
- [24] MAGOČ T, SALZBERG S L. FLASH: fast length adjustment of short reads to improve genome assemblies [J]. Bioinformatics, 2011, 27(21): 2957-2963.
- [25] EDGAR R C, HAAS B J, CLEMENTE J C, et al. UCHIME improves sensitivity and speed of chimera detection [J]. Bioinformatics, 2011, 27(16): 2194-2200.
- [26] EDGAR R C. UPARSE: highly accurate OTU sequences from

microbial amplicon reads [J]. Nature Methods, 2013, 10(10): 996-998.

- [27] SETÄLÄ H, MC LEAN M A. Decomposition rate of organic substrates in relation to the species diversity of soil saprophytic fungi [J]. Oecologia, 2004, 139(1): 98-107.
- [28] FIERER N, JACKSON R B. The diversity and biogeography of soil bacterial communities [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2006, 103(3): 626-631.
- [29] 姚乌兰, 王云山, 韩继刚, 等. 水稻生防菌株多粘类芽孢杆菌 WY110 抗菌蛋白的纯化及其基因克隆[J]. 遗传学报, 2004, 31(9): 878-887.
- [30] 王光华, 周克琴, 金剑, 等. 生防微生物 BRF-1 对大豆根腐病的拮抗作用[J]. 大豆科学, 2004, 23(3): 188-191.
- [31] 岑浴. 多粘类芽孢杆菌在茶叶上的定殖及其对叶际细菌群落的影响[D]. 石家庄: 河北科技大学, 2016.
- [32] 汪涛, 迟元凯, 赵伟, 等. 多粘类芽孢杆菌 TC35 的鉴定及对辣椒疫病的田间防效[J]. 安徽农业科学, 2018, 46(4): 138-139.

(责任编辑: 田 喆)

(上接 134 页)

子的长度来判断种类^[6-7]; 长于 153 μm 即认定为菰平脐蠕孢, 小于 153 μm 则认定为稻平脐蠕孢^[8]。后来发现根据形态分类并不准确^[9], 稻平脐蠕孢和菰平脐蠕孢的分生孢子大小并没有明显的界线将两者分开。本次对茭白胡麻叶斑病原菌的形态鉴定也证明了这点。在对所分离的样本进行形态特征观察的过程中, 采取 PDA 培养基作为病原菌产孢培养基。发现在 PDA 培养基上不同菌株产孢量差异较大, 有些菌株甚至不产孢, 因此很难单从形态学上鉴定是菰平脐蠕孢还是稻平脐蠕孢。关于菌株产孢量与菌株致病力的强弱、菌株不同来源等方面的潜在关系还有待进一步探究。

随着生物技术的发展, 分子分类学的方法开始应用于真菌的鉴定与分类。近些年, 已陆续有学者通过 rDNA-ITS、*GPDH*、*EF-1 α* 三个基因对平脐蠕孢属及其相似属种进行分类鉴定^[10-12]。本研究对茭白胡麻叶斑病原菌的 rDNA-ITS、*GPDH*、*EF-1 α* 三个基因序列分别进行鉴定, 将采自湖北、浙江、江苏、江西和广西五个主产区的茭白胡麻叶斑病的病原菌鉴定为稻平脐蠕孢 *Bipolaris oryzae*, 与水稻胡麻叶斑病原菌^[13]一致。本研究在该病害病原菌的鉴定、侵染等方面的研究, 可以结合水稻胡麻叶斑病的研究成果, 为茭白胡麻叶斑病的防治提供新的思路。

参考文献

- [1] 杨绍丽, 吴仁锋. 我国水生蔬菜病害研究现状[J]. 长江蔬菜,

2016(2): 31-34.

- [2] 黄怀冬, 魏林, 梁志怀. 茭白胡麻斑病研究进展[J]. 长江蔬菜, 2015(22): 34-36.
- [3] 方中达. 植物研究方法[M]. 北京: 中国农业出版社, 1998.
- [4] 周而勋, 杨媚. 广东省水稻纹枯病菌的致病力和融合群研究[J]. 广东农业科学, 1999(5): 36-38.
- [5] 仇飞. 几种虫草类真菌多基因分子系统学研究[D]. 合肥: 安徽农业大学, 2012.
- [6] 杨绍丽, 吴仁锋, 刘义满, 等. 茭白胡麻叶斑病原鉴定及其生物学特性[J]. 长江蔬菜, 2012(16): 95-98.
- [7] 邓晖, 张天宇. 中国平脐蠕孢属的分类研究 I [J]. 菌物系统, 2002, 21(3): 327-333.
- [8] SIVANESAN A. Graminicolous species of *Bipolaris*, *Curvularia*, *Drechslera*, *Exserohilum* and their teleomorphs [J]. Mycologia, 1987, 81(1): 170.
- [9] MANAMGODA D S, ROSSMAN A Y, CASTLEBURY L A, et al. The genus *Bipolaris* [J]. Studies in Mycology, 2014, 79(79): 221-288.
- [10] XIAO Zilan, HYDE K D, ZHANG Jingze. Synonymy of two species of *Bipolaris* from aquatic crops of Poaceae [J]. Mycotaxon, 2015, 130(1): 131-143.
- [11] 郭玉杰. 中国平脐蠕孢属和弯孢属真菌分子系统学研究[D]. 北京: 中国农业科学院, 2016.
- [12] MANAMGODA D S, ROSSMAN A Y, CASTLEBURY L A, et al. The genus *Bipolaris* [J]. Studies in Mycology, 2014, 79: 221-288.
- [13] 陈洪亮. 水稻胡麻叶斑病原菌的分离鉴定及生物学特性研究[D]. 合肥: 安徽农业大学, 2012.

(责任编辑: 田 喆)