

耿莉娜, 帅红, 赵敏, 等. 重庆巫溪烟区烟草赤星病原鉴定[J]. 江苏农业科学, 2016, 44(8): 181-183.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2016.08.049

重庆巫溪烟区烟草赤星病原鉴定

耿莉娜¹, 帅红², 赵敏¹, 江厚龙¹, 李钠钾¹, 夏茜¹, 唐梅¹, 陈益银¹

(1. 重庆烟草科学研究所, 重庆 400715; 2. 重庆市烟草公司巫溪分公司, 重庆 405800)

摘要:为明确重庆市巫溪烟区烟草赤星病原菌的种类, 从重庆市巫溪县通城烟站不同田块采集烟草赤星病典型病斑, 分离病原菌并进行鉴定。结果显示, 分离到 1 株优势致病菌株 Tb-wx-1, 被证明是烟草赤星病原菌, 经对致病菌株的 rDNA-ITS 区序列进行测序, 确定为细极链格孢 (*Alternaria tenuissima*), 这是首次在重庆烟区发现细极链格孢引起烟草赤星病。

关键词:重庆市; 巫溪烟区; 烟草赤星病; rDNA-ITS; 细极链格孢

中图分类号: S435.72 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2016)08-0181-03

烟草属于收获叶片的作物, 在我国经济中占有比较重要的地位。烟草病害发生后对烟叶产量与质量影响很大, 严重时会造成毁灭性的损失。目前, 烟草赤星病是严重制约我国烟叶生产的一类真菌病害, 该病具有潜育期短、暴发快的特点, 在温湿度适宜的条件下, 短时间内即可大面积流行, 给烟叶生产造成巨大损失^[1]。

烟草赤星病的病原属半知菌亚门链格孢属, 其寄主范围较广, 烟草、棉花、花生、大豆等均可被其侵染并产生病斑^[2]。早在 1892 年就有研究人员将该病害病原命名为 *Macrosporium longipes* Ell. & Ev.。1928 年 Mason 将其修改为 *Alternaria longipes* (Ell. & Ev.) Mason^[3]。1971 年 Lucas 提出 *Alternaria longipes* 与 *Alternaria alternata* (Fr.) Keissler 在形态上相同^[4]。直到 1998 年张天宇等主张将烟草赤星病菌学名确定为 *Alternaria alternata* (Fr.) Keissler, 并认为鉴于其对烟草有明确的致病性, 建议将其定名为链格孢烟草专化型 [*Alternaria alternata* (Fr.) Keissler f. sp. *nicotianae*]^[5]。2004 年彭希文等对云南地区的 12 株烟草赤星病菌菌株进行鉴定, 通过培养性状及形态特征确定属于长柄链格孢菌 (*A. longipes*) 和链格孢菌 (*A. alternata*)^[6]。2007 年关博元对重庆多个烟区采集到的 55 株烟草赤星病菌菌株进行鉴定, 确定均为链格孢菌 (*A. alternata*)^[7]。2012 年胡中会等对云南地区 28 份烟草赤星病菌菌株的 rDNA-ITS 序列进行分析, 经鉴定确定属于小孢子种^[8]。2013 年祖艳青等对河南烟区的赤星病菌进行鉴定, 从形态学上鉴定为链格孢 (*A. alternata*)、长柄链格孢 (*A. longipes*) 和鸭梨链格孢 (*A. yaliinficiens*), 其中首次报道了鸭梨链格孢 (*A. yaliinficiens*) 可以引起烟草赤星病^[9]。

近几年来, 重庆巫溪烟区赤星病病害较为严重, 烘烤期大

量叶片发病, 造成烟叶烘烤后不可用, 减产严重。为确定巫溪烟区赤星病原菌的种类, 笔者采集田间发病病叶, 对赤星病致病菌进行室内分离并进行初步鉴定, 为研究赤星病的发生规律、提出有效防治方法奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

2014 年 9 月自重庆市巫溪县通城烟站不同的田块采集带有烟草赤星病菌典型病斑的病叶, 带回实验室, 并在实验室内分离致病菌株。供试培养基为马铃薯葡萄糖琼脂 (PDA) 培养基: 去皮马铃薯 200 g, 琼脂 20 g, 葡萄糖 20 g, 蒸馏水定容至 1 000 mL)。

1.2 方法

1.2.1 致病菌株分离 样品首先采用组织分离法^[10]。选取带有典型赤星病病斑的叶片, 清水冲洗干净后, 在病健交界处切下 0.2 cm × 0.2 cm 大小的组织块, 在 75% 乙醇中消毒 10 s, 无菌水连续漂洗 3 次, 再用灭菌滤纸除去多余水分, 置于固体 PDA 培养基上, 25 °C 恒温培养, 待长出菌丝后作菌种纯化用。

1.2.2 致病菌株纯化 采用稀释纯化法^[10], 取初分离的培养菌丝置于加入无菌水的离心管中振荡, 分离菌丝上的孢子, 取 1 μL 进行镜检, 并调整其浓度, 在 PDA 平板上加入 20 μL 已配制好的孢子悬浮液, 涂板后于 25 °C 恒温培养。当平板上形成单个菌落, 挑取菌落转接到新的 PDA 平板上培养以获得分离物的纯培养, 纯化的菌种于 4 °C 保存备用。

1.2.3 致病性测定 采用离体组织接种法。将病原菌在 PDA 平板上于 25 °C 恒温培养后, 用灭菌枪头在菌落的边缘打取菌饼。取 K326 烟草新鲜健康烟叶, 用 75% 乙醇棉球对叶片表面消毒, 无菌水冲洗 3 次。将菌丝块贴于烟叶叶片背面, 接种后的烟叶置于消过毒的保鲜盘内, 叶片处于保湿状态, 置于 25 °C 室温培养箱内保湿培养 12 d, 观察烟叶叶片发病情况。

1.2.4 致病菌的形态学鉴定 观察致病菌在 PDA 平板上的菌落特征, 显微镜下观察菌丝体、分生孢子等的形态特征, 对其进行形态学鉴定。

收稿日期: 2016-02-17

基金项目: 中国烟草总公司科技重大专项 (编号: 110201301009); 中国烟草总公司重庆市公司项目 (编号: NY20140403030022、NY20150401070001)。

作者简介: 耿莉娜 (1983—), 女, 山东德州人, 博士, 农艺师, 主要从事烟草植保研究。Tel: (023) 68251456; E-mail: lijian_0129@163.com。

1.2.5 致病菌的分子生物学鉴定 采用 CTAB 法提取致病菌基因组 DNA^[11]。以基因组 DNA 为模板,用真菌核糖体基因转录间隔区 *ITS* 通用引物 ITS1 和 ITS4 进行 PCR 扩增。

根据文献合成 *ITS* 的引物^[9],见表 1。

表 1 PCR 扩增引物

引物名称	引物序列
ITS1	5' - TCC GTA GGT GAA CCT GCG G - 3'
ITS4	5' - TCC TCC CGC TTA TTG ATA TGC - 3'

以基因组 DNA 为模板进行扩增。25 μL PCR 反应体系如下:DNA template (< 1 μg) 3.0 μL, 10 × PCR buffer 2.5 μL, 2.5 mmol/L MgCl₂ 2.0 μL, 2.5 mmol/L dNTPs 2.0 μL, 2.5 U/μL *Taq* DNA 聚合酶 0.3 μL, 5 pmol/μL ITS1 1.0 μL, 5 pmol/μL ITS4 1.0 μL, 灭菌 ddH₂O 13.2 μL。

PCR 扩增程序:95 °C 5 min;95 °C 40 s,56 °C 40 s,72 °C 30 s,共 30 个循环;72 °C 10 min,最后于 10 °C 保存。

PCR 产物由华大基因生物科技有限公司进行序列测定。将供试菌株测序结果序列在 NCBI 上采用 BLAST 比对分析,并在 GenBank 中下载已发表的部分链格孢 rDNA - ITS 区序列,使用 ClustalX 软件进行多重序列比对,然后将得到的比对结果使用在线软件 Boxshade (http://www.ch.embnet.org/software/BOX_form.html) 进行格式化,得到多重序列比对结果。将上述获得的多重序列比对结果导入 MEGA 5.10 软件中,使用邻接法 (neighbor - joining methods, NJ) 构建系统进化树,选择 1 000 次重复,计算其进化数值 (bootstrap values)。

2 结果与分析

2.1 致病菌株的分离纯化

于重庆市巫溪县通城烟站不同的田块采集带有烟草赤星病菌典型病斑的病叶 20 份,带回实验室,采用常规方法进行病原菌分离,在 25 °C 下培养至长出菌丝,经纯化后观察培养性状并镜检,筛选得到 1 株优势致病菌株,命名为 Tb - wx - 1,结果见图 1。经平板培养,菌株菌落呈圆形,前期生长为白色菌落,后期颜色逐渐加深呈现黑褐色甚至黑色 (图 1 - A);其分生孢子在显微镜下观察结果见图 1 - B,参照《中国真菌志》第十六卷描述^[12],确定分离得到的菌株属于链格孢属 (*Alternaria*)。

2.2 致病性测定

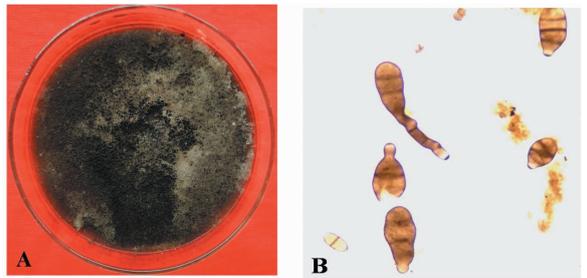
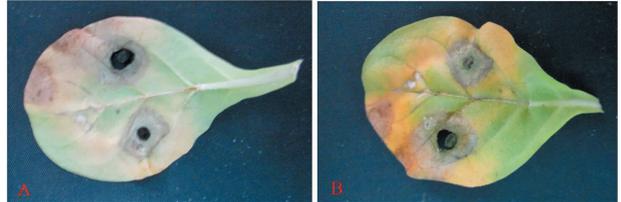


图 1 烟草赤星病致病菌株 Tb-wx-1 菌落(A)及分生孢子(B)

经室内接种 K326 的离体叶片,从接种点处逐渐扩展,边缘有黄色晕圈,叶片发病部分变黄 (图 2),且从发病病斑再次分离到同一种菌株。



A—K326叶片接种12 d后的背面; B—K326叶片接种12 d后的正面
图 2 烟草赤星病致病菌株 Tb-wx-1 室内回接 12 d 的症状

2.3 致病菌株的分子生物学鉴定

2.3.1 致病菌株 rDNA - ITS 序列多重比对 采用 CTAB 法提取致病菌 Tb - wx - 1 的基因组 DNA,以基因组 DNA 为模板进行 PCR 扩增,将扩增产物直接进行测序。将得到的测序结果在 NCBI 上采用 Blast 比对分析,结果如图 3 所示,可见 Tb - wx - 1 的序列与已报道的细极链格孢 (*Alternaria tenuissima*) 序列同源性最高,相似性达 100%。在 GenBank 中下载已发表的部分链格孢 rDNA - ITS 区序列 *Alternaria tenuissima* (HQ647307.1)、*Alternaria alternata* (FJ717729.1)、*Alternaria longipes* (AY751457.1)、*Alternaria yaliinficiens* (HQ238276.1),使用 ClustalX 软件将 Tb - wx - 1 的序列与其进行多重序列比对,然后将得到的比对结果采用 Boxshade 格式化。图 4 结果显示,这几种 rDNA - ITS 区序列相似度非常高,仅有几个核苷酸不同,Tb - wx - 1 与细极链格孢 (*A. tenuissima*) 序列一致。结合形态学与分子生物学鉴定结果,将该病原菌鉴定为细极链格孢 (*A. tenuissima*)。这是首次在重庆烟区鉴定到细极链格孢 (*A. tenuissima*) 可以引起烟草赤星病。

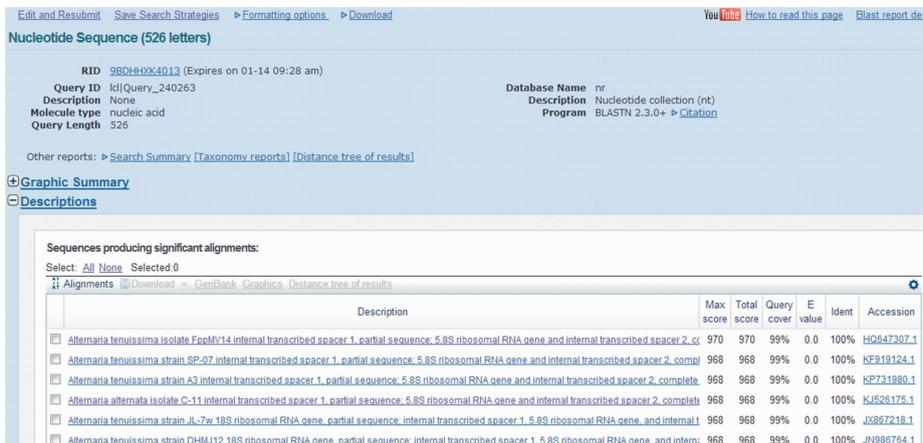


图 3 Blast 比对结果

<i>Tb-wx-1</i>	1	-----AAAATATGA_GGCGGGCTGGA_CCTCTCGGGTTACAGCCTTGCTGAA
<i>A. tenuissima</i>	1	-----AAAATATGA_GGCGGGCTGGA_CCTCTCGGGTTACAGCCTTGCTGAA
<i>A. longipes</i>	1	-----TCTCCGTAGTGGAACTCTGGGAGGATGATTAAGAAATGAAAGCGGGTGAACCTCTCGGGTTACAGCCTTGCTGAA
<i>A. alternata</i>	1	TAACAAGGTCTCCGTAGTGGAACTCTGGGAGGATGATTAAGAAATGAAAGCGGGTGAACCTCTCGGGTTACAGCCTTGCTGAA
<i>A. yaliinficiens</i>	1	-----FCATTACACAAATATGAAGCGGGCTGGAACCTCTCGGGTTACAGCCTTGCTGAA
<i>consensus</i>	1	*****
<i>Tb-wx-1</i>	47	TTATTACAGCCTTGCTCTTTTGGGACTTCTTCTTCTTGGTGGGTTGCGCCACCCTAGGACAAACATAAACCTTTTGTAAATTGCAATCA
<i>A. tenuissima</i>	48	TTATTACAGCCTTGCTCTTTTGGGACTTCTTCTTCTTGGTGGGTTGCGCCACCCTAGGACAAACATAAACCTTTTGTAAATTGCAATCA
<i>A. longipes</i>	43	TTATTACAGCCTTGCTCTTTTGGGACTTCTTCTTCTTGGTGGGTTGCGCCACCCTAGGACAAACATAAACCTTTTGTAAATTGCAATCA
<i>A. alternata</i>	91	TTATTACAGCCTTGCTCTTTTGGGACTTCTTCTTCTTGGTGGGTTGCGCCACCCTAGGACAAACATAAACCTTTTGTAAATTGCAATCA
<i>A. yaliinficiens</i>	57	TTATTACAGCCTTGCTCTTTTGGGACTTCTTCTTCTTGGTGGGTTGCGCCACCCTAGGACAAACATAAACCTTTTGTAAATTGCAATCA
<i>consensus</i>	91	*****
<i>Tb-wx-1</i>	137	CGGTCAGTAAACAAATTAATAATTACAACCTTCAACAACGGATCTCTTGGTCTGGCATCGATGAAGAACCGAGCGAAATGCGATAAGTAG
<i>A. tenuissima</i>	138	CGGTCAGTAAACAAATTAATAATTACAACCTTCAACAACGGATCTCTTGGTCTGGCATCGATGAAGAACCGAGCGAAATGCGATAAGTAG
<i>A. longipes</i>	173	CGGTCAGTAAACAAATTAATAATTACAACCTTCAACAACGGATCTCTTGGTCTGGCATCGATGAAGAACCGAGCGAAATGCGATAAGTAG
<i>A. alternata</i>	181	CGGTCAGTAAACAAATTAATAATTACAACCTTCAACAACGGATCTCTTGGTCTGGCATCGATGAAGAACCGAGCGAAATGCGATAAGTAG
<i>A. yaliinficiens</i>	147	CGGTCAGTAAACAAATTAATAATTACAACCTTCAACAACGGATCTCTTGGTCTGGCATCGATGAAGAACCGAGCGAAATGCGATAAGTAG
<i>consensus</i>	181	*****
<i>Tb-wx-1</i>	227	TGTGAATTGCAGAAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTTTGGTATTCCAAAGGGCATGCCTGTCGAGCCTCAT
<i>A. tenuissima</i>	228	TGTGAATTGCAGAAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTTTGGTATTCCAAAGGGCATGCCTGTCGAGCCTCAT
<i>A. longipes</i>	263	TGTGAATTGCAGAAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTTTGGTATTCCAAAGGGCATGCCTGTCGAGCCTCAT
<i>A. alternata</i>	271	TGTGAATTGCAGAAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTTTGGTATTCCAAAGGGCATGCCTGTCGAGCCTCAT
<i>A. yaliinficiens</i>	237	TGTGAATTGCAGAAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTTTGGTATTCCAAAGGGCATGCCTGTCGAGCCTCAT
<i>consensus</i>	271	*****
<i>Tb-wx-1</i>	317	TTGTAGCCCAAGCTTTGCTTGGTGTGGGCGCTTGTCTCTAGCTTTGGCTGGAGACTCGCCTTAAAGTAATTTGGACGGCGGCTACTGG
<i>A. tenuissima</i>	318	TTGTAGCCCAAGCTTTGCTTGGTGTGGGCGCTTGTCTCTAGCTTTGGCTGGAGACTCGCCTTAAAGTAATTTGGACGGCGGCTACTGG
<i>A. longipes</i>	353	TTGTAGCCCAAGCTTTGCTTGGTGTGGGCGCTTGTCTCTAGCTTTGGCTGGAGACTCGCCTTAAAGTAATTTGGACGGCGGCTACTGG
<i>A. alternata</i>	361	TTGTAGCCCAAGCTTTGCTTGGTGTGGGCGCTTGTCTCTAGCTTTGGCTGGAGACTCGCCTTAAAGTAATTTGGACGGCGGCTACTGG
<i>A. yaliinficiens</i>	327	TTGTAGCCCAAGCTTTGCTTGGTGTGGGCGCTTGTCTCTAGCTTTGGCTGGAGACTCGCCTTAAAGTAATTTGGACGGCGGCTACTGG
<i>consensus</i>	361	*****
<i>Tb-wx-1</i>	407	TTTCGGAGCGCAGCAAGTCCGCACTCTCTATCAGCAAAGGCTTAGCATCCATTAAGCCTTTTTTTCAACTTTTGACCTCGGATCAGGTA
<i>A. tenuissima</i>	408	TTTCGGAGCGCAGCAAGTCCGCACTCTCTATCAGCAAAGGCTTAGCATCCATTAAGCCTTTTTTTCAACTTTTGACCTCGGATCAGGTA
<i>A. longipes</i>	443	TTTCGGAGCGCAGCAAGTCCGCACTCTCTATCAGCAAAGGCTTAGCATCCATTAAGCCTTTTTTTCAACTTTTGACCTCGGATCAGGTA
<i>A. alternata</i>	451	TTTCGGAGCGCAGCAAGTCCGCACTCTCTATCAGCAAAGGCTTAGCATCCATTAAGCCTTTTTTTCAACTTTTGACCTCGGATCAGGTA
<i>A. yaliinficiens</i>	417	TTTCGGAGCGCAGCAAGTCCGCACTCTCTATCAGCAAAGGCTTAGCATCCATTAAGCCTTTTTTTCAACTTTTGACCTCGGATCAGGTA
<i>consensus</i>	451	*****
<i>Tb-wx-1</i>	497	GGGATACCCGCTGAACCTTAAGCATATCAA
<i>A. tenuissima</i>	498	GGGATACCCGCTGAACCTTAAGCATATCAA
<i>A. longipes</i>	533	GGGATACCCGCTGAACCTTAAGCATATCAA
<i>A. alternata</i>	540	GGGATACCCGCTGAACCTTAAGCATATCAA
<i>A. yaliinficiens</i>	541	GGGATACCCGCTGAACCTTAAGCATATCAA
<i>consensus</i>	541	*****

黑色阴影和星号表示相同的核苷酸

图4 rDNA-ITS 序列多重比对

2.3.2 系统进化分析 在对以上序列进行多重比对的基础上,使用 MEGA5.10 软件采用邻接法构建系统进化树,如图 5 所示,菌株 *Tb-wx-1* 与细极链格孢 (*A. tenuissima*) 同处系统发育树的 1 个分支,遗传距离最近;虽然与其他链格孢菌菌株的遗传关系也较近,但并不与 *A. alternata*、*A. longipes* 聚为 1 支。

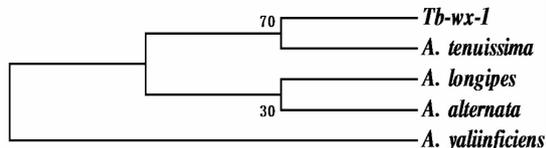


图5 系统进化分析

3 讨论与结论

赤星病作为烟叶生长后期重要的叶部真菌性病害,一旦暴发,对烟叶产业造成的损失巨大。因此,对其病原的种类进行分析有助于烟区制定有针对性的防治措施。根据以前的报道,重庆市多个烟区采集到的烟草赤星病菌菌株均为链格孢菌 (*A. alternata*)^[7],本研究通过对重庆市巫溪烟区赤星病致病菌的 rDNA-ITS 序列进行测定和分析,最终鉴定为细极链格孢 (*A. tenuissima*),在重庆地区属于首次报道,为巫溪烟区开展该病害的防治提供了科学依据。

参考文献:

[1] 高亭亭,蒋彩虹,罗成刚,等. Beinhart1000-1 抗赤星病基因的

QTL 定位[J]. 中国烟草学报,2014,20(2):104-107.
 [2] 李岩,童治军,焦芳婵,等. 基于 SSR 标记对 33 份烟草材料的聚类分析[J]. 西北植物学报,2013,33(10):1972-1980.
 [3] Mason E W. Annotated account of fungi received at the Imperial Bureau of Mycology, List II (Fascicle I) [M]. London: CAB International, 1928.
 [4] Lucas G B. *Alternaria alternata* (Fries) Keissler, the correct name for *A. tenuis* and *A. longipes* [J]. Tobacco Science, 1971, 15 (1): 37 - 42.
 [5] 张天宇,陈伟群. 关于烟草赤星病原名称的再思考 [M]. 中国植物病理学会第六届代表大会暨学术年会, 1998: 83 - 85.
 [6] 彭希文,刘光珍,杨永柱,等. 云南省烟草赤星病 (Tobacco brown spot) 病原研究及其防治药剂的筛选 [J]. 重庆:西南农业大学学报:自然科学版,2004,22(2):153-156.
 [7] 关博元. 重庆烟草赤星病菌种级地位及致病力分化研究 [D]. 重庆:西南大学,2007:23-27.
 [8] 胡中会,赵立华,严恩平,等. 云南烟草赤星病菌及近似种 rDNA-ITS 序列分析 [J]. 云南农业大学学报:自然科学版, 2012, 5 (5): 670 - 676.
 [9] 祖艳青,蒋士君,王海涛,等. 河南省烟草赤星病原鉴定 [J]. 中国烟草学报,2013,4(4):73-77.
 [10] 方中达. 植病研究方法 [M]. 3 版. 北京:中国农业出版社, 1998:122-140.
 [11] 陈锋菊,李百元,杨冰,等. 一种经济快速提取丝状真菌基因组 DNA 的方法 [J]. 生命科学研究,2010,14(2):122-124.
 [12] 张天宇. 中国真菌志:第十六卷——链格孢属 [M]. 北京:科学出版社,2003:1-18.