

江 艳,桑维钧,曾尔玲,等. 烟草茎点病在贵州省的发生及病原鉴定[J]. 江苏农业科学,2018,46(10):92-95.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2018.10.024

烟草茎点病在贵州省的发生及病原鉴定

江 艳^{1,3}, 桑维钧^{2,3}, 曾尔玲^{1,3}, 王 勇^{1,3}, 王德凤^{1,3}, 章 可^{1,3}

(1. 贵州大学农学院, 贵州贵阳 50025; 2. 贵州大学烟草学院, 贵州贵阳 550025;

3. 贵州山地农业病虫害重点实验室, 贵州贵阳 550025)

摘要:2016 年 7 月笔者于贵州大学烟草实习基地及贵州省遵义市播州区乐山镇发现烟草茎点病。为明确其病原,从病区采集发病的烟株茎秆,镜检和分离培养发现病组织中均存在茎点霉(*Phoma*);根据柯赫氏法则测定其致病性,结果表明该病菌可引起伸根期和旺长期叶片及茎秆发病;研究该菌株的形态学、培养性状及 rDNA-ITS、LSU 这 2 个基因的部分序列,并构建系统发育树,初步断定引起烟草茎点病的病原菌为广生茎点霉(*P. omnivirens*)。

关键词:烟草茎点病;病原鉴定;广生茎点霉;柯赫氏法则;致病性;系统发育树

中图分类号: S435.72 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2018)10-0092-04

烟草约于 17 世纪初传入我国^[1-2],是我国重要的经济作物。烟草行业在世界各产烟国经济中占有非常重要的地位,我国更是世界上的烟草产销大国。在生产上,烟草病害是制约烟叶产量提高的重要因素。至 2002 年,已报道的烟草病害有 116 种,其中侵染性病害有 79 种,非侵染性病害 37 种^[3-4]。2016 年 7 月笔者于贵州大学烟草实习基地及贵州省遵义市播州区乐山镇发现疑似烟草茎点病,但目前对该病害的报道不多^[5-8]。鉴于此,本研究对该病原菌进行形态学鉴定,并经柯赫氏法则对其致病性进行验证,分析其 rDNA-ITS 及 LSU 基因序列,以明确烟草茎点病的致病菌,为烟草茎点病后期的相关研究提供依据。

收稿日期:2017-09-05

基金项目:贵州省烟草公司项目(编号:2013-10)。

作者简介:江 艳(1992—),女,贵州安顺人,硕士研究生,主要从事植物病原真菌学研究。E-mail: yjiang1304426331@163.com。

通信作者:桑维钧,硕士,教授,主要从事植物病理学研究。E-mail: wjsang@163.com。

2008,24(3):253-256.

[22] 庄敬华,高增贵,刘 限,等. 不同发酵条件对木霉产孢类型的影响[J]. 中国生物防治,2005,21(1):37-40.

[23] 沈其益. 棉花病害基础研究与防治[M]. 北京:科学出版社,1992.

[24] 安 刚. 棉花机械采收产量完成鉴定产量的制约因素初探[J]. 新疆农垦科技,2017,40(8):16-18.

[25] 马江锋,张丽萍,易海燕,等. 地膜棉田黄萎病发生与气象因子关系的初步研究[J]. 石河子大学学报(自然科学版),2007,25(5):541-544.

[26] Longa C M, Savazzini F, Tosi S, et al. Evaluating the survival and environmental fate of the biocontrol agent *Trichoderma atroviride* SC1 in vineyards in northern Italy[J]. Journal of Applied Microbiology, 2009,106(5):1549.

[27] Longa C M, Pertot I. An intact soil-core microcosm method to evaluate the survival and vertical dispersal of *Trichoderma atroviride*

1 材料与方法

1.1 病害症状观察

2016 年 7 月通过对贵州省多个主要产烟区烟草病害的调查及采样,于贵州大学烟草实习基地及贵州省遵义市播州区乐山镇 K326 上发现烟草茎点病,采集具有典型症状的烟株茎秆,观察并记录病害症状。

1.2 病原菌的分离、纯化及形态特征观察

将所采病茎放在体视显微镜下观察并挑取单个分生孢子器,置于无菌水中制成孢子悬浮液,涂布到水琼脂(WA)平板上。挑取单孢接种到马铃薯葡萄糖琼脂培养基(PDA)上,28℃恒温培养2~3d,然后进行纯化保存,之后转入试管中置于4℃条件下保存备用。如果单孢子不长菌落,则直接挑取单个分生孢子器接种到平板上进行分离。

将保存好的菌株接种于 PDA 培养基上,于 28℃恒温避光培养 7 d,观察记录菌落形态及培养特性,观察分生孢子器和分生孢子的形态,并测量其大小,参照文献[9-14]确定烟草茎点病菌的分类地位。

SC1[J]. Letters in Applied Microbiology,2009,49(5):609-614.

[28] Harman G E, Howell C R, Viterbo A, et al. *Trichoderma* species—opportunistic, avirulent plant symbionts [J]. Nature Reviews Microbiology,2004,2(1):43-56.

[29] Bouregghda H, Bouznad Z. Biological control of *Fusarium* wilt of chickpea using isolates of *Trichoderma atroviride*, *T. harzianum* and *T. longibrachiatum* [J]. Acta Phytopathologica et Entomologica Hungarica,2009,44(1):25-38.

[30] Dubey S C, Bhavani R, Singh B. Development of Pusa 5SD for seed dressing and Pusa Biopellet 10G for soil application formulations of *Trichoderma harzianum* and their evaluation for integrated management of dry root rot of mungbean (*Vigna radiata*) [J]. Biological Control,2009,50(3):231-242.

[31] Galletti S, Burzi P L, Cerato C, et al. *Trichoderma* as a potential biocontrol agent for *Cercospora* leaf spot of sugar beet [J]. BioControl,2008,53(6):917-930.

1.3 病原菌的致病性测定

根据柯赫氏法则,对分离得到的菌株进行致病性测定。选取 K326 健康的伸根期和旺长期烟株,用经灭菌后的接种针刺伤茎秆以造成伤口。刮取在 PDA 平板上生长 7 d 的菌丝,接种于 2 个生长期的茎秆伤口处,同时以不接菌丝为对照。将生长 7 d 的菌落用打孔器打取直径为 5 mm 的菌丝圆片,接种于叶片上,同时以无菌的 PDA 培养基圆片为对照。茎秆和叶片均用塑料袋保湿 48 h,置于 28 ℃ 人工气候箱中。接种 48 h 后移去菌丝和菌丝圆片。定期观察并记载发病情况和症状特点,对病组织进行镜检并再次分离,观察描述病原菌的形态特征,确定致病菌。

1.4 病原菌的分子生物学鉴定

参照 Cubero 等的方法^[15]提取菌丝的总 DNA。采用引物 ITS1/ITS4 (5' - TCCGTAGGTGAACCTGCGG - 3'/5' - TCCTC CGCTTATTGATATGC - 3')、LROR/LROR5 (5' - ACCCGCTGA ACT TAAGC - 3'/5' - TCCTGAGGGAACCTTCG - 3') 对菌株的 DNA 进行 PCR 扩增,分别获得 *ITS*、*LSU* 2 段基因。

扩增 *ITS* 基因的 PCR 反应程序:94 ℃ 5 min;94 ℃ 30 s, 53 ℃ 30 s,72 ℃ 90 s,共 40 个循环;72 ℃ 延伸 10 min。扩增 *LSU* 基因的 PCR 反应程序:94 ℃ 5 min;94 ℃ 1 min,48 ℃ 45 s,72 ℃ 1 min,共 40 个循环;72 ℃ 延伸 10 min。

所获得的 PCR 产物经 1% 琼胶糖凝胶电泳检测后送往北京诺赛基因组研究中心有限公司进行测序。采用 MAFFT^[16] 对病原菌的 *ITS* 和 *LSU* 序列与在 GenBank 下载的相关序列进行比对。为实现排序匹配的最优化,采用手工校对。比对后的序列采用 MrBayes 3.1.2^[17] 软件以贝叶斯法^[18] 构建系统发育树。

2 结果与分析

2.1 烟草茎点病症状观察

田间观察发现,该病害多发生在烟株的生育后期,主要危害茎秆部位。发病初期在烟株茎秆上形成边缘明显的近椭圆形或不规则形灰白色或褐色病斑(图 1-A),病斑稍凹陷、粗糙。发病后期多个病斑融合成长条溃疡,有时甚至扩展至顶部,病部凹陷,上面密生小黑点,即为病菌的分生孢子器(图 1-B)。病重时茎部组织大面积干枯,造成水分和养分的运输受阻,影响叶片的产量和品质。病菌易从打顶抹杈和采叶伤口处侵入。



A. 初期症状 B. 后期症状

图1 烟草茎点病症状

2.2 病原菌培养性状与形态特征

病菌在 PDA、麦芽汁琼脂培养基(MEA)和燕麦琼脂培养基(OA)上生长良好,25 ℃ 黑暗条件下培养 5 d,菌落直径分别为 4.5、3.7、4.6 cm。由图 2 可知,菌落在 PDA 培养基上呈圆形或近圆形,边缘整齐,菌落菌丝细长且密,初期菌丝白色,后变成灰褐色,菌落边缘为白色。26 ℃ 黑暗条件下培养 6 d 可产生大量分生孢子器。分生孢子器散生或聚生,褐色,椭圆形或近球形,器壁薄且内壁无色,有孔口,具乳突,大小为 82.72 μm × 243.93 μm ~ 91.12 μm × 255.12 μm。产孢细胞由分生孢子器内壁细胞生出,呈瓶梗状,透明。分生孢子无色透明,单胞,有 1~2 个油球,无隔膜,近圆柱形或椭圆形,壁薄,无附属物,大小为 1.55 μm × 3.39 μm ~ 2.82 μm × 5.50 μm。

2.3 病原菌致病性测定

由图 3 可知,采用菌丝接种盆栽伸根期和旺长期的烟株茎秆 7 d 后,均出现明显的病斑。伸根期病斑为浅灰色至浅褐色,粗糙且凹陷,病斑随后逐渐扩大,回接所产生的症状与田间症状一致,但短期内未在病斑处产生分生孢子器。将 5 mm 菌丝圆片接种于伸根期和旺长期叶片,6 d 后均在叶片上形成明显病斑,病斑黄褐色,近圆形或不规则形,病斑边缘有黄色晕圈。病斑处较薄、质脆、易破,部分病斑扩大连成片。从接种发病的茎秆及叶片上再次分离的病原菌与原接种菌株形态相同,表明接种菌株为致病菌。

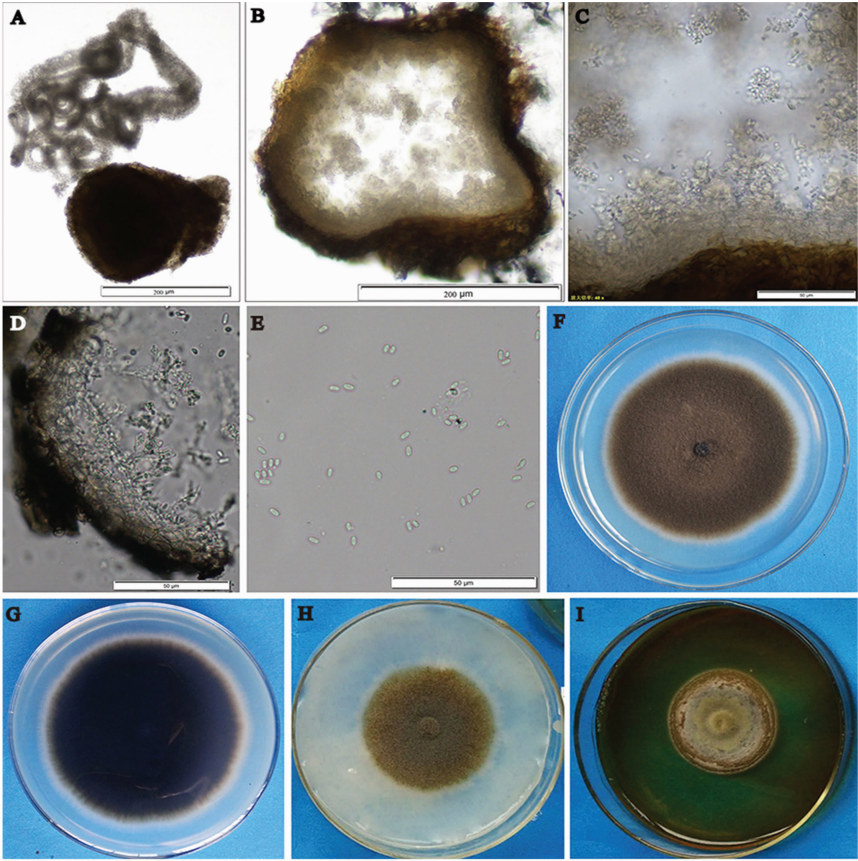
2.4 病原菌的分子生物学鉴定

对烟草茎点病菌株 HGUP8001 的 *ITS* 和 *LSU* 序列进行 PCR 扩增,分别获得 528、856 bp 的片段。将测序得到的序列提交至 GenBank(登录号为: *ITS*, MF192850; *LSU*, MF192851)。利用 Blast 进行同源性比较,结果显示与 HGUP8001 的 *ITS* 基因序列同源性达 99% 的菌株均为茎点霉,进一步比对 *LSU* 基因序列,也与多个茎点霉属菌株同源性为 99%,表明 HGUP8001 菌株属于茎点霉属真菌。图 4 系统发育树显示,烟草茎点病菌株与广生茎点霉(*P. omnivirens* CBS 654.77、*P. omnivirens* CBS991.95)聚在一起,结合其形态学特征将其鉴定为广生茎点霉。

3 结论与讨论

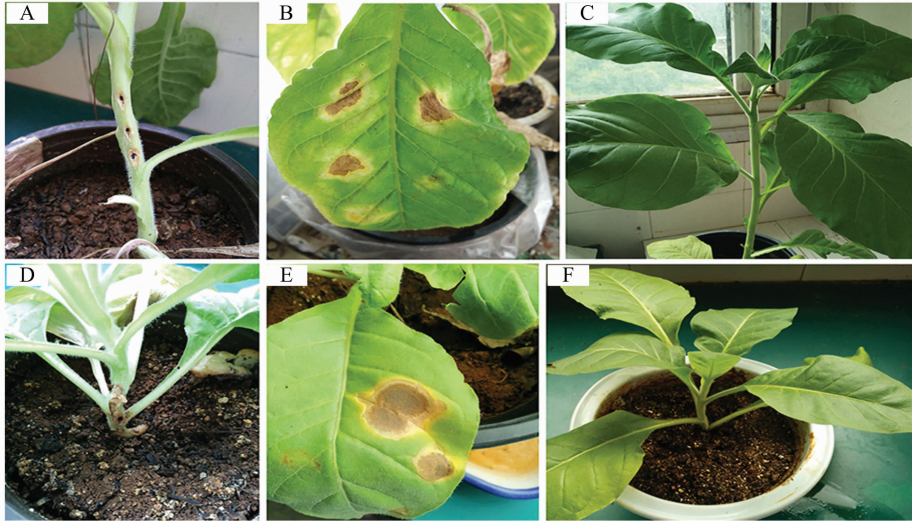
本研究于 2016 年 7 月在贵州省 2 地发现烟草茎点病,分离得到病原菌,采用形态学和分子生物学相结合的方法将病原菌确定为广生茎点霉。该病害仅在吉林^[5-6,8]、陕西^[7] 2 省有过报道,目前尚未有在贵州省发生的相关报道。于莉等曾描述了烟草茎点病的病原为 *P. tabaci*,但该病原菌回接时仅能使烟秆发病,而叶片不产生任何症状^[5]。该菌还能引起其他植物产生病害,如龟背竹茎点霉叶斑病^[19],说明广生茎点霉没有寄主特异性。除本研究中的广生茎点霉外,茎点霉属还有多个种可引起其他作物产生病害,如 *P. adianticola* 引起茶树褐芽病^[20]、苜蓿茎点霉(*P. medicaginis*)引起苜蓿茎点霉叶斑病^[21]、茎点霉属真菌能引起紫茎泽兰褐斑病^[22]、*P. herbicola* 引起核桃茎点霉黑斑病^[23]、向日葵茎点霉(*P. macdonaldii*)引起向日葵黑茎病菌^[24]、南方茎点霉菌(*P. jolyana*)引起香蕉茎点霉鞘腐病^[25]等。

前人报道烟草茎点病菌一般不直接侵染叶片,且易从打



A—分生孢子器；B、C、D—分生孢子器纵切；E—分生孢子；F、G—PDA培养基上的菌落形态正、反面；H—OA 培养基上的菌落形态；I—MEA 培养基上的菌落形态。标尺：A~B 为 200 μm；C~E 为 50 μm

图2 烟草茎点病原菌的形态结构



A—旺长期茎秆；B—旺长期叶片；D—伸根期茎秆；E—伸根期叶片；C、F—旺长期和伸根期对照(CK)

图3 分离菌株回接后的发病情况

顶抹杈和采叶伤口处侵入^[26]。在测定病原菌致病性的试验中,笔者分别对与采集样本同品种的 K326 伸根期及旺长期叶片和茎秆进行回接。烟杆刺伤后较易发病,而烟叶无伤口也易发病,表明广生茎点霉不仅能侵染烟草茎秆,也能侵染叶片,可侵染的烟株生长期也更广范。在进行烟田耕作时建议减少烟株机械损伤,以减少该病菌侵染烟株引发烟草茎点病。

本研究对烟草茎点病在贵州省 2 个地区的发病情况进行

调查,初步确定该病在贵州省 2 地确有发生。对病原菌进行分离,并根据柯赫氏法则确定分离菌株为致病菌。进一步对病原菌的 rDNA - ITS 序列及 LSU 基因进行分析,并建立基于 rDNA - ITS 序列和 LSU 基因的系统发育树,最终将引起贵州省烟草茎点病的病原鉴定为半知菌亚门球壳孢目茎点霉属广生茎点霉,但关于该病菌是否能引起其他烤烟品种发病还须继续探究。

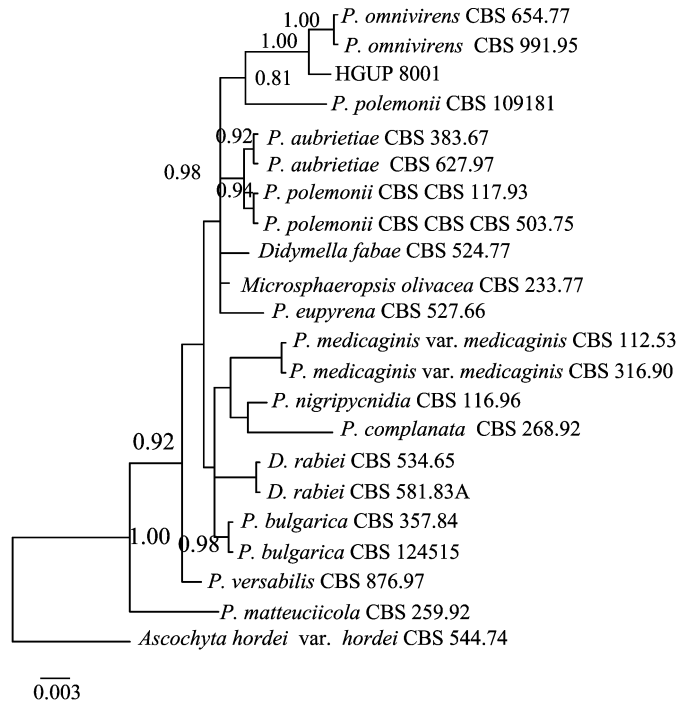


图4 烟草茎点霉病菌基于 ITS 和 LSU 的分子系统发育树

参考文献:

- [1] 陈重明, 陈迎晖. 烟草的历史[J]. 中国野生植物资源, 2002, 20(5): 30-33.
- [2] 任民, 王志德, 牟建民, 等. 我国烟草种质资源的种类与分布概况[J]. 中国烟草科学, 2009, 30(增刊1): 8-14.
- [3] 朱贤朝, 王彦亭, 王智发. 中国烟草病害[M]. 北京: 中国农业出版社, 2002: 3-4.
- [4] Nyvall R F. Field crop disease handbook[M]. New York: Van Nostrand Reinhold, 1989: 661-707.
- [5] 于莉, 华致甫, 李玉. 烟草上的一种新病害——烟草茎点病[J]. 吉林农业大学学报, 1993, 15(1): 97-107.
- [6] 陈瑞泰, 朱贤朝, 王智发, 等. 全国 16 个主产烟省(区)烟草侵染性病害调研报告[J]. 中国烟草科学, 1997, 18(4): 1-7.
- [7] 田佳, 安德荣, 雷超, 等. 陕西烟田病害种类调查[J]. 中国烟草科学, 2016, 37(5): 57-62.
- [8] 高崇, 高玉亮, 吴国贺, 等. 吉林省烟草有害生物种类及分布情况调查[J]. 黑龙江农业科学, 2016(11): 77-81.
- [9] 陆家云. 植物病原真菌学[M]. 北京: 中国农业出版社, 2001: 512-5185.
- [10] 戴芳澜. 中国真菌总汇[M]. 北京: 科学出版社, 1979: 1025-1031.
- [11] Aveskamp M M, Verkley G J, de Gruyter J, et al. DNA phylogeny reveals polyphyly of *Phoma* section *Peyronellaea* and multiple taxonomic novelties[J]. Mycologia, 2009, 101(3): 363-382.
- [12] Hutchison L J, Chakravarty P, Kawchuk L M, et al. *Phoma etheridgei* sp. nov. from black galls and cankers of trembling aspen (*Populus tremuloides*) and its potential role as a bioprotectant against the aspen decay pathogen *Phellinus tremulae*[J]. Canadian Journal of Botany, 2011, 72(10): 1424-1431.
- [13] Aveskamp M M, Gruyter J D, Woudenberg J H C, et al. Highlights of the *Didymellaceae*: a polyphasic approach to characterise *Phoma* and related pleosporalean genera[J]. Studies in Mycology, 2010, 65: 1-60.
- [14] Boerema G H, Gruyter J D, Noordeloos M E, et al. *Phoma* identification manual[M]. San Francisco: CABI Publishing, 2004: 21-193.
- [15] Cubero O F, Crespo A, Fatehi J, et al. DNA extraction and PCR amplification method suitable for fresh, herbarium-stored, lichenized, and other fungi[J]. Plant Systematics and Evolution, 1999, 216(3): 243-249.
- [16] Katoh K, Kuma K, Toh H, et al. MAFFT version 5: improvement in accuracy of multiple sequence alignment[J]. Nucleic Acids Research, 2005, 33(2): 511-518.
- [17] Ronquist F, Huelsenbeck J P. MrBayes 3: bayesian phylogenetic inference under mixed models[J]. Bioinformatics, 2003, 19(12): 1572-1574.
- [18] 冯思玲. 系统发育树构建方法研究[J]. 信息技术, 2009, 33(6): 38-40, 44.
- [19] 王丽霞. 主要花卉真菌病害调查与病原真菌鉴定[D]. 沈阳: 沈阳农业大学, 2012: 21-23.
- [20] 杨文, 陈瑶, 陈小均, 等. 茎点霉真菌 *Phoma adianticola* 引起的一种茶树新病害[J]. 茶叶科学, 2016(1): 59-67.
- [21] 张丽, 潘龙其, 王生荣, 等. 苜蓿茎点霉叶斑病病原鉴定及生物学特性研究[J]. 中国农业大学学报, 2015, 20(4): 158-166.
- [22] 严加林. 紫茎泽兰褐斑病的诊断鉴定及病原菌的主要生物学特性研究[D]. 重庆: 西南大学, 2014: 20-23.
- [23] 熊婉. 核桃茎点霉黑斑病病原学及防治技术研究[D]. 武汉: 华中农业大学, 2013: 18-27.
- [24] 轩娅萍, 郭庆元, 吴喜莲, 等. 向日葵茎病菌主要生物学特性及致病性研究[J]. 新疆农业大学学报, 2011, 34(6): 494-500.
- [25] 谢昌平, 张能, 纪烨斌, 等. 香蕉茎点霉鞘腐病的病原鉴定与药剂毒力测定[J]. 热带作物学报, 2007, 28(3): 88-92.
- [26] 将士君, 吴元华. 烟草病理学[M]. 北京: 中国农业出版社, 2013: 175-176.