

胡晓莉,蒋彩虹,耿锐梅,等. 山东部分地区烟草赤星病病原菌的形态学与分子生物学鉴定[J]. 江苏农业科学,2018,46(11):82-86.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2018.11.020

山东部分地区烟草赤星病病原菌的形态学与分子生物学鉴定

胡晓莉^{1,2}, 蒋彩虹², 耿锐梅², 赵强², 侯烁³, 张雨生², 程立锐², 杨爱国², 王元英²

(1. 青岛农业大学, 山东青岛 266109; 2. 中国农业科学院烟草研究所, 山东青岛 266101;

3. 中国农业科学院植物保护研究所, 北京 100193)

摘要:烟草赤星病是由链格孢菌引起的叶部真菌病害,对烟叶产量和质量影响较大。收集山东诸城、即墨、高密3个地区的烟草赤星病病原菌,通过病原菌菌落和分生孢子形态特征研究,明确所收集的12株病原菌均属于链格孢属真菌。利用DNAMAN软件和NCBI数据库进行真菌rDNA-ITS区域序列分析,初步确定:A3、A4、A7为*Alternaria* sp.; A1、A2、A5、A6、A9、A10、A11、A12为链格孢*Alternaria alternata*; A8为细极链格孢*Alternaria tenuissima*。表明山东部分地区烟草赤星病的病原菌主要为链格孢菌*Alternaria alternata*。此研究为链格孢菌致病机制研究和烟草赤星病防治提供理论依据。

关键词:烟草赤星病;病原菌;形态学;分子鉴定

中图分类号: S435.72 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2018)11-0082-05

烟草赤星病是一类真菌性病害,多发生于成熟期叶片,严重危害烟叶的产量和品质。该病害于1892年首次在美国发现^[1],1916年,我国首次在北京的近郊发现,到20世纪60年代初,开始在河南以及山东的烟区流行。20世纪80年代以来,全国烟区发病有日益严重的趋势^[2-4]。发病初期为黄色小点,随着发病时间的增加,病斑逐渐变为褐色至深褐色,呈轮纹状,质脆易破,严重时病斑相互连接合并,叶片失去其利用价值^[5-6]。近年来的统计数据表明,烟草赤星病每年发病面积在10万hm²左右,经济损失上亿元,是烟草生产上威胁最大的病害之一^[7-8]。因此,明确烟草赤星病病原菌类型,进而提出病害防治措施是降低烟区经济损失的重要前提。

前人的研究表明引起烟草赤星病的病原菌为链格孢属真菌,且该属中多种病菌均能引起烟草赤星病的发生。彭希文等报道了云南烟区赤星病致病菌为长柄链格孢菌和链格孢菌^[9]。张国辉等在贵州烟草赤星病病区鉴定出了芸薹链格孢^[10]。本研究利用真菌形态学、基于rDNA-ITS序列的分子生物学方法鉴定山东部分地区烟草赤星病病原菌,以期烟草赤星病防治和抗性机制研究提供依据。

1 材料与方法

1.1 供试材料

本试验于2017年3—7月在中国农业科学院烟草研究所

烟草行业基因资源利用重点实验室进行,试验菌株主要由本课题组分离,部分菌株由中国农业科学院烟草研究所植物保护中心和青岛农业大学提供。菌株地理来源信息见表1。

表1 病原菌菌株来源信息

菌株编号	地理来源	菌株编号	地理来源
A1	山东诸城	A7	山东诸城
A2	山东即墨	A8	山东诸城
A3	山东即墨	A9	山东即墨
A4	山东即墨	A10	山东即墨
A5	山东即墨	A11	山东诸城
A6	山东即墨	A12	山东高密

1.2 形态学鉴定

1.2.1 菌种活化 采用8 mm打孔器沿供试菌株的菌落边缘打取含有菌丝的菌饼,并用灭菌牙签挑取菌饼倒置于PDA固体培养基(去皮马铃薯200 g,葡萄糖20 g,琼脂18 g,蒸馏水1 000 mL),置于28℃培养箱中,黑暗条件下培养,所有菌株均培养4~5代,使其具有较大致病活力时再进行后续试验。

1.2.2 形态学观察 (1)菌落形态观察:活化后的菌株于28℃黑暗培养箱培养3 d,观察描述菌落形状、颜色等形态学特征。(2)孢子悬浮液制备:菌株培养7 d左右,待菌落铺满培养基,用移液枪移取2 mL灭菌水于培养基,轻轻刮取菌落,并用2层灭菌医用脱脂纱布过滤掉菌丝体,留取孢子悬浮液,采用血球计数板调整其浓度约为 1×10^6 个/mL。(3)分生孢子观察与测量。采用上述配制好的孢子悬浮液制片,在光学显微镜下观察菌株的产孢类型,分生孢子的形状、纵横隔膜数等形态学特征。每个菌株选择21个分生孢子,用标尺测量40×放大倍数分生孢子的长宽,统计测量数据,并按显微镜标尺计算分生孢子实际值。计算方法如下:实际值(μm) = $10 \mu\text{m} \times \text{测量值}(\text{cm}) / 2.4 \text{ cm}$ 。

收稿日期:2017-12-06

基金项目:中国博士后科学基金(编号:2016M602214);中国烟草总公司烟草基因组计划重大专项(编号:110201601028)。

作者简介:胡晓莉(1992—),女,山东济宁人,硕士研究生,主要从事作物遗传育种研究。E-mail:huxiaoli11@163.com。

通信作者:王元英,研究员,主要从事烟草遗传育种研究。E-mail:wanguanying@caas.cn。

1.3 分子生物学鉴定

1.3.1 DNA提取 挑取菌丝,移到含有50 mL PDA液体培养基的锥形瓶中,于220 r/min的28℃恒温摇床振荡培养7 d,用2层灭菌医用脱脂纱布对菌丝体溶液进行过滤,收集菌丝体,利用真菌DNA提取试剂盒(Omega Bio-Tek,美国)提取各菌株的DNA,放于-20℃冰箱待用。

1.3.2 PCR扩增及回收测序 rDNA-ITS扩增所需引物为ITS1(5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3')和ITS4(5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3')。PCR扩增体积为30 μL:其中Hifi superMix II 13 μL、ITS1(10 μmol/L)1 μL、ITS4(10 μmol/L)1 μL、DNA模板2 μL、ddH₂O 13 μL。反应程序:94℃预变性3 min;94℃变性30 s,58℃退火30 s,72℃延伸1 min,共35个循环;72℃延伸5 min。用1%的琼脂糖凝胶电泳检测扩增产物。利用TaKaRa凝胶回收试剂盒对PCR产物进行回收,连接到Peasy-blunt载体,转入5α感受态细胞,挑取阳性单克隆进行测序。

1.3.3 序列分析 利用DNAMAN软件对测定的12株菌株的ITS序列进行多重比对,分析不同菌株间的核苷酸差异性。然后将不同类别菌株的ITS序列提交到NCBI数据库,经Blast与数据库中的已知序列进行同源性比对,初步确定病原菌类型。

1.3.4 构建进化树 以本试验初步鉴定结果为基础,在NCBI(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)中下载已报道的常见链格孢属真菌ITS区序列数据,利用MUSCLE程序对各链格孢属ITS区的核酸序列进行多序列比对,基于比对结果利用MEGA 6.0软件采用邻接法(Neighbor-Joining, NJ)构建ITS序列的系统进化树,检验参数Bootstrap设置为1 000。

2 结果与分析

2.1 病原菌形态学

2.1.1 菌落形态 12株病原菌于PDA培养基培养3 d后,形成圆形或近圆形菌落。菌落铺展于培养基,呈绒毡状。其中A1菌株菌落呈米白色,气生菌丝发达,边缘较整齐,生长均匀,分生孢子为卵形,灰黑色。A2、A10菌株菌落呈轮状生长,边缘不整齐,中间凹,边缘气生菌丝发达呈灰色,中间菌丝不发达呈墨绿色。A3、A5、A6、A7、A9菌株气生菌丝不发达,菌落呈轮状生长,中间凹呈墨绿色,边缘有白色环带,边缘较整齐。A4、A11菌株培养初期,菌落颜色泛绿色,随着培养时间的增加,菌落颜色逐渐变为灰黑色,边缘生长不整齐,气生菌丝发达,边缘生长整齐。A8、A12菌株菌落呈轮状生长,内部呈白色,外部呈灰黑色,边缘生长整齐(图1)。

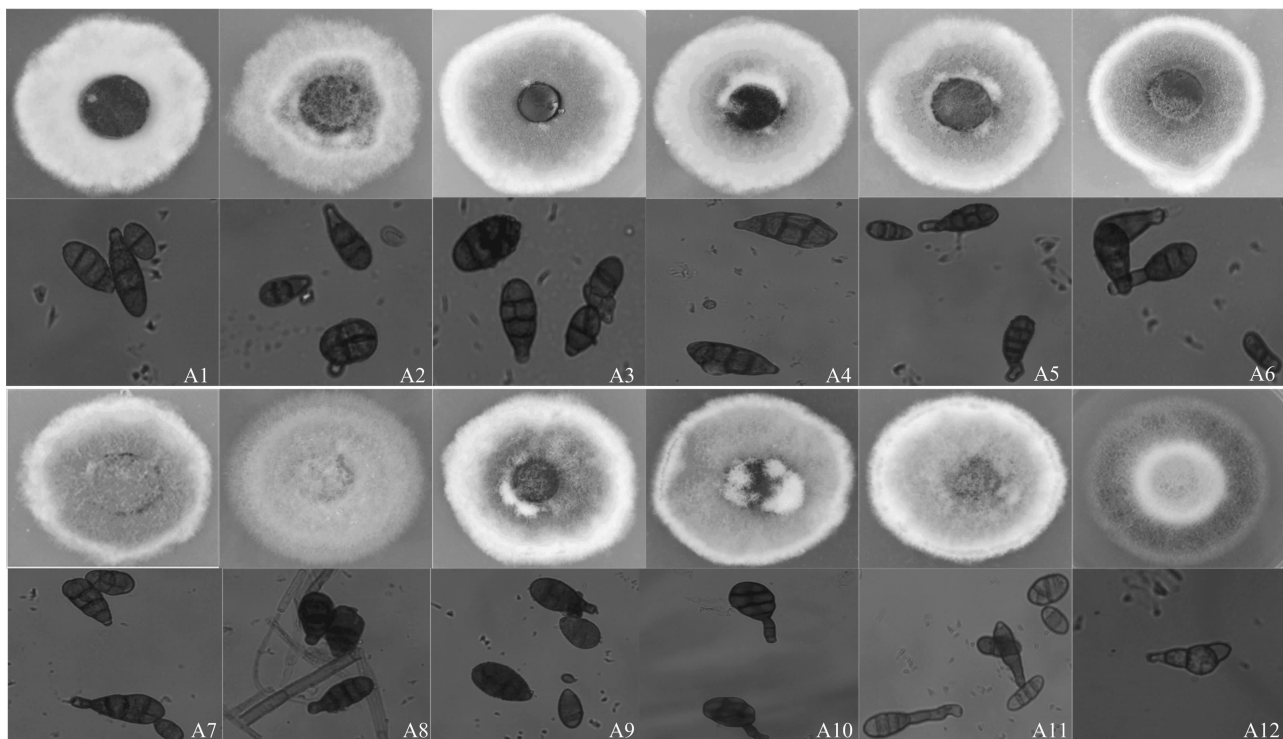


图1 12个供试菌株形态特征

2.1.2 分生孢子 分生孢子从培养基表面的菌丝或气生菌丝上产生,直立单生,表面光滑,颜色为棕色或深褐色,形状呈卵圆状、梨状、棒状。分生孢子的横隔膜数为2~5个,纵隔膜为0~3个,分生孢子的大小为(5.00~20.83) μm × (0.83~8.33) μm,孢子梗突出,长度为0.83~5.00 μm(表2)。通过形态学研究表明本研究12株赤星病菌株的链格孢属形态特征明显,其菌落形态、分生孢子形态、产孢类型等特征,与张天宇在《中国真菌志(第16卷 链格孢属)》^[11]中对链格孢属

真菌形态特征的描述相符,说明本试验所研究的12株供试菌株均为链格孢属真菌。

2.2 分子生物学鉴定

利用ITS1/ITS4真菌通用引物,对提取的12株菌株的DNA进行扩增,用1%琼脂糖凝胶电泳检测,结果如图2所示,均扩增出了目的片段,片段大小570 bp左右。采用DNAMAN软件对测序结果进行多重比对,其中A5、A6、A9、A10、A11、A12这6个菌株的ITS序列一致,同源性达到100%。

表2 菌株分生孢子特征值

菌株	横隔(个)		纵隔(个)		孢身长(μm)		孢身宽(μm)		孢子梗长(μm)	
	范围	均值	范围	均值	范围	均值	范围	均值	范围	均值
A1	2~5	3.75	0~3	1.05	12.08~20.83	16.75	3.33~5.83	4.67	1.67~3.33	2.29
A2	2~5	3.15	0~3	1.10	8.75~16.67	12.33	3.33~6.25	4.67	0.83~3.33	2.13
A3	2~4	2.65	0~2	0.85	7.92~15.00	11.96	4.58~7.08	5.42	1.67~5.00	2.88
A4	3~4	3.50	0~1	0.65	10.00~17.50	14.21	4.17~9.17	6.00	0.83~3.33	1.92
A5	3~4	3.50	0~2	0.80	11.25~17.08	13.71	3.33~5.42	4.38	0.83~2.50	1.58
A6	3~5	3.60	0~2	0.40	9.17~17.08	12.83	3.33~5.83	4.13	1.25~4.58	2.13
A7	3~5	3.65	0~3	0.75	9.17~16.67	14.08	4.58~7.50	5.08	0.83~2.50	1.58
A8	2~5	3.13	0~2	0.31	10.00~17.50	14.04	3.75~7.08	5.17	1.25~3.75	2.17
A9	3~4	3.50	0~1	0.45	8.75~14.58	12.29	3.33~6.67	4.96	1.25~2.92	1.79
A10	3~5	3.60	3~5	3.60	10.42~22.08	16.38	4.17~8.33	6.13	1.25~3.75	2.29
A11	1~4	2.64	0~1	0.55	5.00~20.00	5.60	0.83~5.83	3.33	0.83~2.92	1.75
A12	3~4	3.10	0~1	0.30	9.17~13.30	10.30	3.75~5.42	4.50	1.25~2.50	1.88

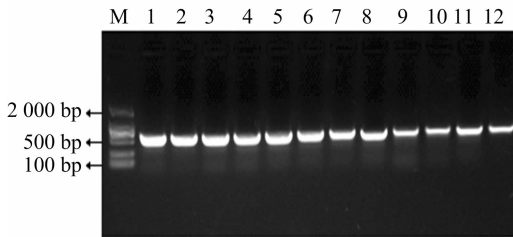


图2 PCR扩增12个菌株的ITS区

与这6株菌株的ITS序列对比,A1、A4、A8菌株均与其有单个核苷酸的差异,其中A1在起始位多出1个碱基T,A4菌株在46 bp处存在A与G的碱基差异,A8菌株在493 bp处存在C与T的碱基差异;A3和A7菌株均与其有2个核苷酸的差异,分别在271 bp、520 bp处存在G与A、T与C的碱基差异,150、201 bp处存在G与A、G与T的碱基差异;A2菌株与其有3个核苷酸的差异,分别在571、572、573 bp处多出A、A、G

3个碱基(图3)。表明A5、A6、A9、A10、A11、A12菌株可能属于相同的种,A1、A2、A3、A4、A7、A8菌株可能属于不同的种或同一种的不同生理小种。

DNAMAN软件比对后,将具有差异菌株的ITS序列在NCBI数据库中进行Blast比对,结果显示,A3、A4、A7菌株与*Alternaria* sp.的同源性为99%,只能鉴定到链格孢属,而未能鉴定到种。A1、A2菌株分别与登录号为KM458821、KU182490的链格孢菌*Alternaria alternata*的同源性为100%。A5、A6、A9、A10、A11、A12菌株与登录号为KY788021的链格孢菌*Alternaria alternata*同源性为100%,初步确定此8株菌株为链格孢菌*Alternaria alternata*。A8菌株与*Alternaria tenuissima*(登录号:HQ402558)的同源性为100%,初步确定该菌株为细极链格孢菌(表3)。以本研究的初步鉴定结果为基础,构建出了基于rDNA-ITS序列的常见链格孢属真菌系统发育树(图4)。

表3 菌株序列于NCBI数据库Blast比对结果

菌株	种名	最大值(bp)	总值(bp)	碱基参与率(%)	E值	同源性(%)	序列号
A1	<i>Alternaria alternata</i>	1 055	1 055	100	0.0	100	KM458821
A2	<i>Alternaria alternata</i>	1 057	1 057	99	0.0	100	KU182490
A3	<i>Alternaria</i> sp.	1 042	1 042	100	0.0	99	KY788045
A4	<i>Alternaria</i> sp.	1 048	1 048	100	0.0	99	KY788045
A5	<i>Alternaria alternata</i>	1 053	1 053	100	0.0	100	KY788021
A6	<i>Alternaria alternata</i>	1 053	1 053	100	0.0	100	KY788021
A7	<i>Alternaria</i> sp.	1 046	1 046	99	0.0	99	JN403047
A8	<i>Alternaria tenuissima</i>	1 053	1 053	100	0.0	100	HQ402558
A9	<i>Alternaria alternata</i>	1 053	1 053	100	0.0	100	KY788021
A10	<i>Alternaria alternata</i>	1 053	1 053	100	0.0	100	KY788021
A11	<i>Alternaria alternata</i>	1 053	1 053	100	0.0	100	KY788021
A12	<i>Alternaria alternata</i>	1 053	1 053	100	0.0	100	KY788021

3 讨论与结论

世界上已报道的链格孢菌共有500多个种,95%以上的种类可寄生于多种作物上,引起作物病害^[12]。其中引起烟草赤星病病害的病原菌主要为*Alternaria alternata*、*Alternaria longipes*、*Alternaria nicotianae*^[9,13-14]。本研究收集到来自山东诸城、即墨、高密3个地区的赤星病病原菌12株,通过形态学和ITS区段序列分析,结果表明来自3个地区的病原菌A1、

A11、A2、A5、A6、A9、A10、A12均初步鉴定为*Alternaria alternata*,没有表现出区域差异性,这一结果与康业斌、陈瑞泰等认为的河南省烟草赤星病菌为*Alternaria alternata*^[15-16]、关博元鉴定的重庆烟区的赤星病菌为*Alternaria alternata*^[14]具有相似性。此外,本研究在诸城烟区初步鉴定到了*Alternaria tenuissima*可引起烟草赤星病的现象,与耿莉娜等初次在重庆烟草赤星病发病区鉴定到*Alternaria tenuissima*^[17]具有一致性,说明链格孢属中的*Alternaria tenuissima*也可能是烟草赤

A5.seq	...TCCGTAGGTGAACCTGCGGAGGGATCATTACACAAAATATGAAGGCGGCTGGAACCTCTCGGGGTACAGCCTTGCTGAATATTACACC	90
A6.seqRC	...TCCGTAGGTGAACCTGCGGAGGGATCATTACACAAAATATGAAGGCGGCTGGAACCTCTCGGGGTACAGCCTTGCTGAATATTACACC	90
A9.seq	...TCCGTAGGTGAACCTGCGGAGGGATCATTACACAAAATATGAAGGCGGCTGGAACCTCTCGGGGTACAGCCTTGCTGAATATTACACC	90
A10.seq	...TCCGTAGGTGAACCTGCGGAGGGATCATTACACAAAATATGAAGGCGGCTGGAACCTCTCGGGGTACAGCCTTGCTGAATATTACACC	90
A11.seqRC	...TCCGTAGGTGAACCTGCGGAGGGATCATTACACAAAATATGAAGGCGGCTGGAACCTCTCGGGGTACAGCCTTGCTGAATATTACACC	90
A12.seqRC	...TCCGTAGGTGAACCTGCGGAGGGATCATTACACAAAATATGAAGGCGGCTGGAACCTCTCGGGGTACAGCCTTGCTGAATATTACACC	90
A1.seq	...TCCGTAGGTGAACCTGCGGAGGGATCATTACACAAAATATGAAGGCGGCTGGAACCTCTCGGGGTACAGCCTTGCTGAATATTACACC	91
A4.seq	...TCCGTAGGTGAACCTGCGGAGGGATCATTACACAAAATATGAAGGCGGCTGGAACCTCTCGGGGTACAGCCTTGCTGAATATTACACC	90
A8.seq	...TCCGTAGGTGAACCTGCGGAGGGATCATTACACAAAATATGAAGGCGGCTGGAACCTCTCGGGGTACAGCCTTGCTGAATATTACACC	90
A3.seqRC	...TCCGTAGGTGAACCTGCGGAGGGATCATTACACAAAATATGAAGGCGGCTGGAACCTCTCGGGGTACAGCCTTGCTGAATATTACACC	90
A7.seqRC	...TCCGTAGGTGAACCTGCGGAGGGATCATTACACAAAATATGAAGGCGGCTGGAACCTCTCGGGGTACAGCCTTGCTGAATATTACACC	90
A2.seqRC	...TCCGTAGGTGAACCTGCGGAGGGATCATTACACAAAATATGAAGGCGGCTGGAACCTCTCGGGGTACAGCCTTGCTGAATATTACACC	90
Consensus	tccgtaggtgaacctgcgagggatcattacacaaaatagaaggcggtggaacctctcggggttacagccttgcgtaattattacacc	
A5.seq	...TTGCTTTTGGCTACTCTTGTTTCCCTTGGTGGGTTCGCCACCCTAGGACAAAACATAAACCTTTTGTAAATGCAATCAGCGTCAGTAAAC	181
A6.seqRC	...TTGCTTTTGGCTACTCTTGTTTCCCTTGGTGGGTTCGCCACCCTAGGACAAAACATAAACCTTTTGTAAATGCAATCAGCGTCAGTAAAC	181
A9.seq	...TTGCTTTTGGCTACTCTTGTTTCCCTTGGTGGGTTCGCCACCCTAGGACAAAACATAAACCTTTTGTAAATGCAATCAGCGTCAGTAAAC	181
A10.seq	...TTGCTTTTGGCTACTCTTGTTTCCCTTGGTGGGTTCGCCACCCTAGGACAAAACATAAACCTTTTGTAAATGCAATCAGCGTCAGTAAAC	181
A11.seqRC	...TTGCTTTTGGCTACTCTTGTTTCCCTTGGTGGGTTCGCCACCCTAGGACAAAACATAAACCTTTTGTAAATGCAATCAGCGTCAGTAAAC	181
A12.seqRC	...TTGCTTTTGGCTACTCTTGTTTCCCTTGGTGGGTTCGCCACCCTAGGACAAAACATAAACCTTTTGTAAATGCAATCAGCGTCAGTAAAC	181
A1.seq	...TTGCTTTTGGCTACTCTTGTTTCCCTTGGTGGGTTCGCCACCCTAGGACAAAACATAAACCTTTTGTAAATGCAATCAGCGTCAGTAAAC	182
A4.seq	...TTGCTTTTGGCTACTCTTGTTTCCCTTGGTGGGTTCGCCACCCTAGGACAAAACATAAACCTTTTGTAAATGCAATCAGCGTCAGTAAAC	181
A8.seq	...TTGCTTTTGGCTACTCTTGTTTCCCTTGGTGGGTTCGCCACCCTAGGACAAAACATAAACCTTTTGTAAATGCAATCAGCGTCAGTAAAC	181
A3.seqRC	...TTGCTTTTGGCTACTCTTGTTTCCCTTGGTGGGTTCGCCACCCTAGGACAAAACATAAACCTTTTGTAAATGCAATCAGCGTCAGTAAAC	181
A7.seqRC	...TTGCTTTTGGCTACTCTTGTTTCCCTTGGTGGGTTCGCCACCCTAGGACAAAACATAAACCTTTTGTAAATGCAATCAGCGTCAGTAAAC	181
A2.seqRC	...TTGCTTTTGGCTACTCTTGTTTCCCTTGGTGGGTTCGCCACCCTAGGACAAAACATAAACCTTTTGTAAATGCAATCAGCGTCAGTAAAC	181
Consensus	ttgcttttggctactcttgtttcccttgggtgggttcgccaccctaggacaaaacataaaccttttgtaaatgcaatcagcgtcagtaaac	
A5.seq	...AAATTAATAAATACAACCTTCAACAACGGATCTCTGGTTCGGCATCGATGAAGAAGCCAGCGAAATGCGATAAGTAGTGTGAATGGAG	272
A6.seqRC	...AAATTAATAAATACAACCTTCAACAACGGATCTCTGGTTCGGCATCGATGAAGAAGCCAGCGAAATGCGATAAGTAGTGTGAATGGAG	272
A9.seq	...AAATTAATAAATACAACCTTCAACAACGGATCTCTGGTTCGGCATCGATGAAGAAGCCAGCGAAATGCGATAAGTAGTGTGAATGGAG	272
A10.seq	...AAATTAATAAATACAACCTTCAACAACGGATCTCTGGTTCGGCATCGATGAAGAAGCCAGCGAAATGCGATAAGTAGTGTGAATGGAG	272
A11.seqRC	...AAATTAATAAATACAACCTTCAACAACGGATCTCTGGTTCGGCATCGATGAAGAAGCCAGCGAAATGCGATAAGTAGTGTGAATGGAG	272
A12.seqRC	...AAATTAATAAATACAACCTTCAACAACGGATCTCTGGTTCGGCATCGATGAAGAAGCCAGCGAAATGCGATAAGTAGTGTGAATGGAG	272
A1.seq	...AAATTAATAAATACAACCTTCAACAACGGATCTCTGGTTCGGCATCGATGAAGAAGCCAGCGAAATGCGATAAGTAGTGTGAATGGAG	273
A4.seq	...AAATTAATAAATACAACCTTCAACAACGGATCTCTGGTTCGGCATCGATGAAGAAGCCAGCGAAATGCGATAAGTAGTGTGAATGGAG	272
A8.seq	...AAATTAATAAATACAACCTTCAACAACGGATCTCTGGTTCGGCATCGATGAAGAAGCCAGCGAAATGCGATAAGTAGTGTGAATGGAG	272
A3.seqRC	...AAATTAATAAATACAACCTTCAACAACGGATCTCTGGTTCGGCATCGATGAAGAAGCCAGCGAAATGCGATAAGTAGTGTGAATGGAG	272
A7.seqRC	...AAATTAATAAATACAACCTTCAACAACGGATCTCTGGTTCGGCATCGATGAAGAAGCCAGCGAAATGCGATAAGTAGTGTGAATGGAG	272
A2.seqRC	...AAATTAATAAATACAACCTTCAACAACGGATCTCTGGTTCGGCATCGATGAAGAAGCCAGCGAAATGCGATAAGTAGTGTGAATGGAG	272
Consensus	aaatataataatacaacttcaacaacggatctctggttctggcatcgatgaagaagccagcgaaatgcgataaagtagtgtgaatggag	
A5.seq	...AATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTCGCCCCCTTTGGTATTCCAAAGGGCATGCCTGTTGAGGCTCATTTGTACCCTCAAG	363
A6.seqRC	...AATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTCGCCCCCTTTGGTATTCCAAAGGGCATGCCTGTTGAGGCTCATTTGTACCCTCAAG	363
A9.seq	...AATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTCGCCCCCTTTGGTATTCCAAAGGGCATGCCTGTTGAGGCTCATTTGTACCCTCAAG	363
A10.seq	...AATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTCGCCCCCTTTGGTATTCCAAAGGGCATGCCTGTTGAGGCTCATTTGTACCCTCAAG	363
A11.seqRC	...AATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTCGCCCCCTTTGGTATTCCAAAGGGCATGCCTGTTGAGGCTCATTTGTACCCTCAAG	363
A12.seqRC	...AATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTCGCCCCCTTTGGTATTCCAAAGGGCATGCCTGTTGAGGCTCATTTGTACCCTCAAG	363
A1.seq	...AATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTCGCCCCCTTTGGTATTCCAAAGGGCATGCCTGTTGAGGCTCATTTGTACCCTCAAG	364
A4.seq	...AATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTCGCCCCCTTTGGTATTCCAAAGGGCATGCCTGTTGAGGCTCATTTGTACCCTCAAG	363
A8.seq	...AATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTCGCCCCCTTTGGTATTCCAAAGGGCATGCCTGTTGAGGCTCATTTGTACCCTCAAG	363
A3.seqRC	...AATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTCGCCCCCTTTGGTATTCCAAAGGGCATGCCTGTTGAGGCTCATTTGTACCCTCAAG	363
A7.seqRC	...AATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTCGCCCCCTTTGGTATTCCAAAGGGCATGCCTGTTGAGGCTCATTTGTACCCTCAAG	363
A2.seqRC	...AATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTCGCCCCCTTTGGTATTCCAAAGGGCATGCCTGTTGAGGCTCATTTGTACCCTCAAG	363
Consensus	aattcagtgaaatcatcgaaatctttgaacgcacattcgccccctttggtattccaaagggcatgcctgttgagcctcatttgtaccctcaag	
A5.seq	...CTTTGCTTGGTGTGGGGCTCTTGTCCTAGCTTTGCTGGAGACFCGCCCTAAAGTAATTTGGCAGCCGGCTACTGGTTTCGGAGCGCAGC	454
A6.seqRC	...CTTTGCTTGGTGTGGGGCTCTTGTCCTAGCTTTGCTGGAGACFCGCCCTAAAGTAATTTGGCAGCCGGCTACTGGTTTCGGAGCGCAGC	454
A9.seq	...CTTTGCTTGGTGTGGGGCTCTTGTCCTAGCTTTGCTGGAGACFCGCCCTAAAGTAATTTGGCAGCCGGCTACTGGTTTCGGAGCGCAGC	454
A10.seq	...CTTTGCTTGGTGTGGGGCTCTTGTCCTAGCTTTGCTGGAGACFCGCCCTAAAGTAATTTGGCAGCCGGCTACTGGTTTCGGAGCGCAGC	454
A11.seqRC	...CTTTGCTTGGTGTGGGGCTCTTGTCCTAGCTTTGCTGGAGACFCGCCCTAAAGTAATTTGGCAGCCGGCTACTGGTTTCGGAGCGCAGC	454
A12.seqRC	...CTTTGCTTGGTGTGGGGCTCTTGTCCTAGCTTTGCTGGAGACFCGCCCTAAAGTAATTTGGCAGCCGGCTACTGGTTTCGGAGCGCAGC	454
A1.seq	...CTTTGCTTGGTGTGGGGCTCTTGTCCTAGCTTTGCTGGAGACFCGCCCTAAAGTAATTTGGCAGCCGGCTACTGGTTTCGGAGCGCAGC	455
A4.seq	...CTTTGCTTGGTGTGGGGCTCTTGTCCTAGCTTTGCTGGAGACFCGCCCTAAAGTAATTTGGCAGCCGGCTACTGGTTTCGGAGCGCAGC	454
A8.seq	...CTTTGCTTGGTGTGGGGCTCTTGTCCTAGCTTTGCTGGAGACFCGCCCTAAAGTAATTTGGCAGCCGGCTACTGGTTTCGGAGCGCAGC	454
A3.seqRC	...CTTTGCTTGGTGTGGGGCTCTTGTCCTAGCTTTGCTGGAGACFCGCCCTAAAGTAATTTGGCAGCCGGCTACTGGTTTCGGAGCGCAGC	454
A7.seqRC	...CTTTGCTTGGTGTGGGGCTCTTGTCCTAGCTTTGCTGGAGACFCGCCCTAAAGTAATTTGGCAGCCGGCTACTGGTTTCGGAGCGCAGC	454
A2.seqRC	...CTTTGCTTGGTGTGGGGCTCTTGTCCTAGCTTTGCTGGAGACFCGCCCTAAAGTAATTTGGCAGCCGGCTACTGGTTTCGGAGCGCAGC	454
Consensus	ctttgcttgggtgtggggctcttgctctagctttgctggagacfcgccctaaagtaatttggcagccggcctactggtttcggagcgcagc	
A5.seq	...ACAAGTCGCACCTCTATCAGCAAAGGTCTAGCATCCATAAAGCCTTTTTTCAACTTTTGACCTCGGATCAGGTAGGATACCCGCTGAA	545
A6.seqRC	...ACAAGTCGCACCTCTATCAGCAAAGGTCTAGCATCCATAAAGCCTTTTTTCAACTTTTGACCTCGGATCAGGTAGGATACCCGCTGAA	545
A9.seq	...ACAAGTCGCACCTCTATCAGCAAAGGTCTAGCATCCATAAAGCCTTTTTTCAACTTTTGACCTCGGATCAGGTAGGATACCCGCTGAA	545
A10.seq	...ACAAGTCGCACCTCTATCAGCAAAGGTCTAGCATCCATAAAGCCTTTTTTCAACTTTTGACCTCGGATCAGGTAGGATACCCGCTGAA	545
A11.seqRC	...ACAAGTCGCACCTCTATCAGCAAAGGTCTAGCATCCATAAAGCCTTTTTTCAACTTTTGACCTCGGATCAGGTAGGATACCCGCTGAA	545
A12.seqRC	...ACAAGTCGCACCTCTATCAGCAAAGGTCTAGCATCCATAAAGCCTTTTTTCAACTTTTGACCTCGGATCAGGTAGGATACCCGCTGAA	545
A1.seq	...ACAAGTCGCACCTCTATCAGCAAAGGTCTAGCATCCATAAAGCCTTTTTTCAACTTTTGACCTCGGATCAGGTAGGATACCCGCTGAA	546
A4.seq	...ACAAGTCGCACCTCTATCAGCAAAGGTCTAGCATCCATAAAGCCTTTTTTCAACTTTTGACCTCGGATCAGGTAGGATACCCGCTGAA	545
A8.seq	...ACAAGTCGCACCTCTATCAGCAAAGGTCTAGCATCCATAAAGCCTTTTTTCAACTTTTGACCTCGGATCAGGTAGGATACCCGCTGAA	545
A3.seqRC	...ACAAGTCGCACCTCTATCAGCAAAGGTCTAGCATCCATAAAGCCTTTTTTCAACTTTTGACCTCGGATCAGGTAGGATACCCGCTGAA	545
A7.seqRC	...ACAAGTCGCACCTCTATCAGCAAAGGTCTAGCATCCATAAAGCCTTTTTTCAACTTTTGACCTCGGATCAGGTAGGATACCCGCTGAA	545
A2.seqRC	...ACAAGTCGCACCTCTATCAGCAAAGGTCTAGCATCCATAAAGCCTTTTTTCAACTTTTGACCTCGGATCAGGTAGGATACCCGCTGAA	545
Consensus	acaagtcgcacctctatcagcaaaggtctagcatccataaagcctttttcaacttttgacctcggatcaggtaggatgccgctgaa	
A5.seq	...CTTAAGCATATCAATAAGCGGAGGA.....	570
A6.seqRC	...CTTAAGCATATCAATAAGCGGAGGA.....	570
A9.seq	...CTTAAGCATATCAATAAGCGGAGGA.....	570
A10.seq	...CTTAAGCATATCAATAAGCGGAGGA.....	570
A11.seqRC	...CTTAAGCATATCAATAAGCGGAGGA.....	570
A12.seqRC	...CTTAAGCATATCAATAAGCGGAGGA.....	570
A1.seq	...CTTAAGCATATCAATAAGCGGAGGA.....	571
A4.seq	...CTTAAGCATATCAATAAGCGGAGGA.....	570
A8.seq	...CTTAAGCATATCAATAAGCGGAGGA.....	570
A3.seqRC	...CTTAAGCATATCAATAAGCGGAGGA.....	570
A7.seqRC	...CTTAAGCATATCAATAAGCGGAGGA.....	570
A2.seqRC	...CTTAAGCATATCAATAAGCGGAGGA.....	570
Consensus	cttaagcatatcaataagcggagga	573

图3 菌株 rDNA-ITS 序列同源性比对结果

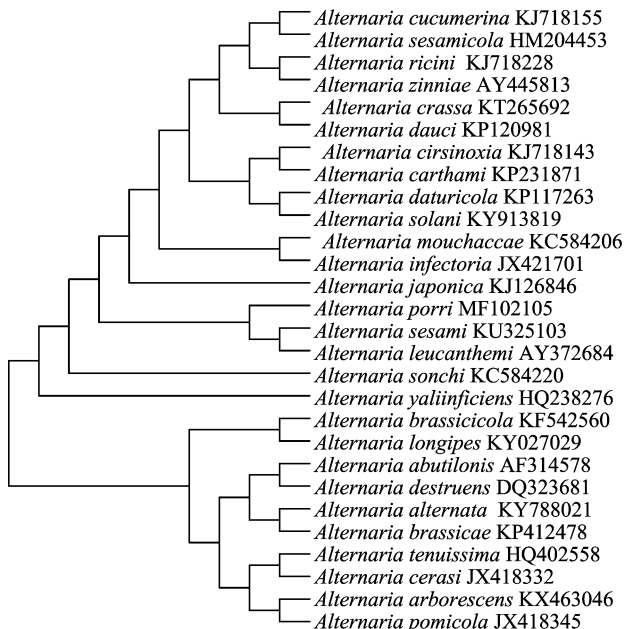


图4 基于 rDNA-ITS 基因序列的常见链格孢属真菌系统发育

星病的主要致病菌。

目前,对真菌病原菌的鉴定主要有形态学鉴定法和分子生物学鉴定法^[18-19]。祖艳青等利用形态学鉴定法将河南省烟草赤星病病原菌鉴定为 3 个种,分别是鸭梨链格孢 *Alternaria yaliinficiens*、链格孢 *Alternaria alternata*、长柄链格孢 *Alternaria longipes*^[20]。该方法主要以病原菌菌落形态及分生孢子形态为依据,但病原菌形态易受到培养基种类、光暗时间、温度条件等环境因素的影响,变化幅度较大,准确鉴定到种较困难。分子生物学鉴定方法的出现为真菌病原菌的鉴定提供了更为科学、准确、高效的技术手段。其中 ITS 序列是公认的真菌分子鉴定的首选序列^[21],该序列以其进化速率快,有丰富的变异、信息位点,而被广泛应用于属内种间及居群间分子系统演化关系的鉴别^[22-23],2012 年胡中会等利用 ITS 序列分析的方法确定云南烟区赤星病病原菌为小孢子种^[24],本研究利用该方法初步确定 12 株病原菌的类型为 *Alternaria* sp.、*Alternaria alternata*、*Alternaria tenuissima*。随着分子鉴定方法的不断探究和日臻完善,rDNA-ITS 序列分析将会得到越来越广泛的应用,具有较大的发展空间和应用价值。

本研究通过对山东部分地区烟草赤星病病原菌鉴定的试验研究,结果表明引起山东部分地区烟草赤星病的病原菌组成至少有 2 个种,分别为链格孢菌 (*Alternaria alternate*) 和细极链格孢菌 (*Alternaria tenuissima*),其中链格孢菌 *Alternaria alternata* 为烟草赤星病主要致病菌。

参考文献:

[1] Pearson R C, Hall D H. Factors affecting the occurrence and severity of blackmold of ripe tomato fruit caused by *Alternaria alternata* [J]. *Phytopathology*, 1975, 65 (12) : 1352 - 1359.

[2] 孔凡玉, 朱贤朝. 我国烟草侵染性病害发生趋势原因及防治对策

[J]. *中国烟草科学*, 1995 (1) : 31 - 34.

[3] 宋利民. 我国赤星病发生流行规律调查研究 [J]. *烟草科技*, 1994 (3) : 40 - 42.

[4] 张济能, 庞乡林, 李庆义, 等. 烟草赤星病流行因素及其防治 [J]. *中国烟草*, 1992 (3) : 28 - 30.

[5] 杜雷, 张乐, 高智谋, 等. 安徽烟草赤星病菌生物学特性及致病力分化研究 [J]. *中国烟草学报*, 2009, 15 (1) : 39 - 43.

[6] 张世才. 重庆烟草赤星病菌的致病力分化及遗传差异性研究 [D]. 重庆: 西南大学, 2009.

[7] 易龙, 肖崇刚. 重庆烟草赤星病菌致病力分化及培养性状研究 [J]. *西南农业学报*, 2003, 16 (3) : 34 - 37.

[8] 张万良, 翟争光, 谢扬军, 等. 烟草赤星病研究进展 [J]. *江西农业学报*, 2011, 23 (1) : 122 - 124.

[9] 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]. *西南农业大学学报 (自然科学版)*, 2004, 22 (2) : 153 - 156.

[10] 张国辉, 陶敏, 张文华. 毕节市白菜黑斑病的病害研究及病原鉴定 [J]. *安徽农业科学*, 2011, 39 (19) : 11477 - 11479.

[11] 张天宇. 中国真菌志 (第 16 卷 链格孢属) [M]. 北京: 科学出版社, 2003 : 187 - 203.

[12] Farr D F, Bills G F, Chamuris G P, et al. *Fungi on plants and plant products in the United States* [M]. St. Paul, Minn, USA: APS Press, 1989.

[13] 成巨龙, 安德荣. 陕西烟草赤星病的病原鉴定 [J]. *陕西农业科学*, 1997 (3) : 18 - 19.

[14] 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 : 1 - 57.

[16] 康业斌, 成玉梅, 郭合营. 豫西地区烟草侵染性病害调查分析 [J]. *河南农业科学*, 1995 (2) : 17 - 20.

[16] 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.

[17] 耿莉娜, 帅红, 赵敏, 等. 重庆巫溪烟区烟草赤星病病原鉴定 [J]. *江苏农业科学*, 2016, 44 (8) : 181 - 183.

[18] 张弛成, 吴伟怀, 梁艳琼, 等. 王草茎点霉叶斑病病原鉴定及生物学特性 [J]. *江苏农业科学*, 2016, 44 (6) : 210 - 214.

[19] 张国辉, 王龙, 任永权, 等. 药用植物太子参 3 种病害的病原鉴定与病害分析 [J]. *江苏农业科学*, 2016, 44 (7) : 177 - 179.

[20] 祖艳青, 蒋士君, 王海涛, 等. 河南省烟草赤星病病原鉴定 [J]. *中国烟草学报*, 2013, 19 (4) : 73 - 77.

[21] Bellemain E, Carlsen T, Brochmann C, et al. ITS as an environmental DNA barcode for fungi: an in silico approach reveals potential PCR biases [J]. *BMC Microbial*, 2010, 10 : 189.

[22] de Hoog G S, Horre R. Molecular taxonomy of the *Alternaria* and *Ulocladium* species from humans and their identification in the routine laboratory [J]. *Mycoses*, 2002, 45 : 259 - 276.

[23] 张荣, 岳海梅, 孙广宇. 小孢子链格孢 OPA2-1 核苷酸序列分析及系统发育研究 [J]. *菌物学报*, 2009, 28 (4) : 553 - 557.

[24] 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*, 2012, 27 (5) : 670 - 676.