

文章编号: 1674-7054(2013)03-0220-05

柱花草炭疽病菌的准确快速鉴定

杨 勤^{1,2}, 罗丽娟^{1,2}

(1. 海南热带生物资源可持续利用国家重点实验室, 海南 海口 570228; 2. 海南大学 农学院, 海南 海口 570228)

摘 要: 采用常规组织分离法分离得到 2 个柱花草炭疽病菌致病性菌株, 利用 ITS 通用引物 ITS1/ITS4 对炭疽菌 rDNA-ITS 进行扩增, 电泳检测得到约 500 bp 大小的目的条带, 经过生物信息学分析 2 个菌株均为刺盘孢属胶胞炭疽病菌, 且两者之间同源性达到 99%, 对其侵染能力进行检测, 5 个柱花草品系的抗病性有所不同。

关键词: 柱花草; 炭疽病菌; 核糖体 rDNA-ITS; 抗性分级

中图分类号: S 541⁺.9; S 423.4⁺4

文献标志码: A

炭疽病的传统分类是以形态特征和生理生化指标作为分类基础, 但是大部分真菌分布广、形态特征复杂, 尤其是真菌种间很难区别, 因此, 传统的菌物分类常引起分类系统的意见分歧。与传统分类方法相比, 分子生物学技术具有明显的优越性。在真核生物中, 核糖体 DNA 是由核糖体基因及与之相邻的间隔区组成, 包括外部转录间隔区、18S 基因、内部转录间隔区 1、5.8S 基因、内部转录间隔区 2、28S 基因及基因间隔序列。其中 18S、5.8S 和 28S 的基因序列趋于保守, 而在真菌的种间存在丰富的变化。通过对该区段进行聚合酶链式反应及序列测定后, 再进行特异性引物的设计, 从而可以诊断及检测植物的病原菌, 该方法在植物病原真菌分子检测方面的应用尤为广泛^[1]。在柱花草(*Stylosanthes* spp.) 炭疽病菌属内小种的分类方面, 张伟丽等通过形态学及接种症状来初步鉴定柱花草炭疽病菌属^[2], 易克贤利用 RAPD 分子标记技术对柱花草菌株进行聚类分析^[3]。目前, ITS 序列分析在橡胶炭疽病菌中应用比较广泛, 但在柱花草炭疽病菌中的鉴定鲜见报道。笔者应用 ITS 序列分析结合形态观察法检测柱花草炭疽病菌, 选择 5 个不同抗病能力的柱花草品系来检测病原菌的致病性, 旨在为准确快速鉴定海南地区柱花草炭疽病菌种类提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料 2011 年 9 月, 从海口市世纪大桥下的海南大学种植基地采集柱花草炭疽病样带回实验室进行分离纯化。供试柱花草品种为热研 5 号、热研 2 号、品 907 和从热研 5 号中分离到的品 39、stilo1979。新型植物基因组 DNA 快速提取试剂盒和 DNA 片段回收试剂盒, 均购自北京艾德来生物科技有限公司; Taq DNA 聚合酶试剂盒购自 TAKARA 公司; pGEM-T Easy Vector 购自 Promega 公司; 乙醇等常用试剂均为国产分析纯。

1.2 方法

1.2.1 炭疽菌的分离与纯化 柱花草炭疽病菌分离采用常规组织分离法^[4]。

1.2.2 炭疽菌致病性测定 选用健康完好同一位置的柱花草叶片, 每片小叶上取 1 个接种点, 用无菌束

收稿日期: 2013-06-04

基金项目: “国家牧草产业技术体系”之“热带牧草育种”(CARS-35)

作者简介: 杨勤(1987-), 女, 浙江德清人, 海南大学农学院 2010 级硕士研究生。

通信作者: 罗丽娟(1964-), 女, 教授, E-mail: Luoljd@126.com

针轻轻刺破接种点表皮。然后将刺破的小叶放入有无菌湿滤纸的培养皿中。用打孔器在纯化后培养1周的菌落边缘打取菌饼,有菌面朝下放置于针刺处,用打孔器取同样大小的无菌水琼脂块作为对照。28℃保湿培养3d后去掉菌饼和水琼脂块,继续培养2d后观察发病情况。接种叶片发病后,重新分离病原菌,观察菌落和孢子形态,与最初分离的菌株做对比,确认其致病性^[5]。

1.2.3 基因组DNA提取 取适量菌丝(约100 mg)加入液氮碾磨,使用“新型植物基因组DNA快速提取试剂盒”进行DNA提取。

1.2.4 rDNA-ITS区的PCR扩增 根据柱花草炭疽病原菌ITS保守区域设计特异性引物,引物序列如下:ITS1(5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3'),ITS4(5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3')。反应体系(50 μL):模板DNA 2 μL,dNTP(10 mmol·L⁻¹) 4 μL,引物ITS1(10 mmol·L⁻¹) 1.5 μL,引物ITS4(10 mmol·L⁻¹) 1.5 μL,Taq DNA聚合酶(10 U·μL⁻¹) 0.2 μL,Pyrobest DNA Polymerase(5 U·μL⁻¹) 0.8 μL,10×PCR Buffer(Mg²⁺ Plus) 5 μL,dH₂O 35 μL。PCR反应程序为:预变性94℃ 4 min;94℃ 30 s,55℃ 30 s,72℃ 40 s,30个循环;72℃延伸7 min,4℃保存。取上述PCR扩增产物30 μL,用1×TAE制备w=1%的琼脂糖凝胶,电泳30 min后,在紫外灯下拍照、回收。

1.2.5 PCR产物的纯化、克隆和测序 用琼脂糖凝胶回收试剂盒对PCR产物进行回收纯化。回收后的DNA连接到pGEM-T Easy载体上,载体连接后42℃热击法转化感受态细胞DH5α,通过蓝白斑的筛选,挑选白斑菌落,通过菌落PCR验证阳性克隆,将阳性克隆摇菌后用碱裂解法提取质粒DNA,并对质粒DNA进行酶切进一步验证阳性克隆,每个菌株挑选3个阳性克隆送深圳华大基因研究院进行测序。

1.2.6 序列分析 将菌株序列与GenBank中核酸数据库(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>)上的序列进行同源性比较。

1.2.7 炭疽菌的形态学观察 用显微镜观察分离到的菌株孢子及菌丝的形态,培养观察其在培养基上的生长状况。

1.2.8 不同柱花草品系的抗病情况 配制1×10⁶·mL⁻¹孢子悬浮液,加入w=0.1% Tween-20,便于孢子附着。选出5个柱花草品系,每个品系扦插10株,每枝条保留4个节间,重复3次。待扦插的植株长出嫩叶,表明已经生根成活时,即可进行接种。接种时,把制得的孢子悬浮液喷于柱花草植株,使叶片有明显水珠,用黑色薄膜覆盖,黑暗生长24 h后撤去薄膜,每日上、中、下午各喷1次水,保持其湿度,观察记录其性状,然后根据Horsfall-Barrat的分类标准^[6]对柱花草进行抗性分级,计算发病率及病情指数。

2 结果与分析

2.1 柱花草炭疽病菌的分离和致病性 利用常规组织分离法分离到2个菌株,然后接种到热研5号柱花草的嫩叶(第3片叶)上,针刺接种3d后,病斑呈圆形或不规则形,四周深褐色,中间浅褐色;空白对照的叶片均不发病。这说明分离到的2个菌株均具有致病性。

2.2 ITS通用引物对炭疽菌rDNA-ITS的扩增 利用ITS通用引物ITS1/ITS4对分离到的炭疽菌株进行扩增,琼脂糖电泳检测后获得1条约500 bp的条带(见图1)。

2.3 重组子的菌液PCR鉴定 将PCR产物回收纯化后,进行载体连接及转化,得到白色单菌落后,对其进行PCR扩增及电泳检测,结果如图2a,1~6为1号菌株挑取的菌落,7~12为2号菌株挑取的菌落,均在约500 bp处有明显亮带,说明均已连接转化成功;再次酶切验证,结果均能得到目的条带(见图2b),送去深圳华大基因研究院进行测序。

2.4 核糖体DNA-ITS序列的生物信息学分析 将测序结果在NCBI网站上进行BLAST对比分析,不包含引物结合区,2个菌株的核糖体DNA-ITS基因序列长度分别为576 bp和574 bp,与NCBI上刺盘孢属胶

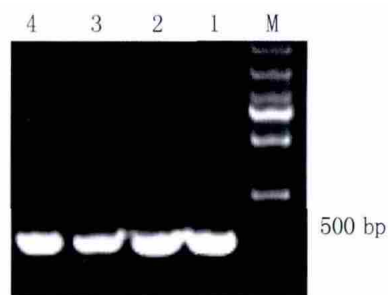


图1 病原菌ITS序列扩增电泳图

M为BM2000 DNA Marker,1~2为1号菌株,3~4为2号菌株

Fig.1 Electrophoresis of pathogenic bacteria
M: BM2000 DNA Marker; 1 and 2: No. 1 bacterial strain; 3 and 4: No. 2 bacterial strain

炭疽菌(*Colletotrichum gloeosporioides*)的 ITS 序列同源性最高为 100% ,供试的 2 个菌株间同源性达到 99% (见图 3)。

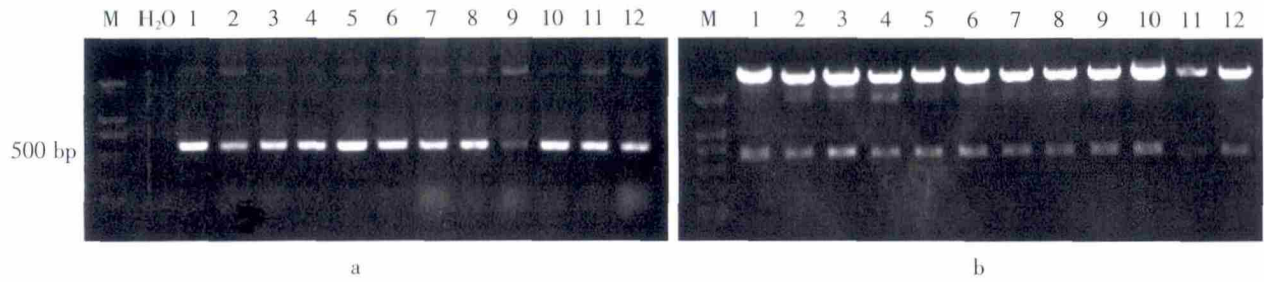


图 2 菌落 PCR 电泳图 (a) 和 Not I 酶切电泳图 (b)

M 为 BM2000 DNA Marker, 1~6 为 1 号菌株, 7~12 为 2 号菌株, H₂O 为空白对照

Fig. 1 Electrophoresis of colony PCR (a) and Not I digestion (b)

M: BM2000 DNA Marker; 1 to 6: No. 1 bacterial strain; 7 to 12: No. 2 bacterial strain; H₂O: Blank



图 3 2 个菌株与胶胞炭疽菌之间 rDNA-ITS 序列分析

Fig. 3 rDNA-ITS sequence analysis between two strains and *Colletotrichum gloeosporioides*

2.5 炭疽菌的形态 对 ITS 序列分析鉴定的胶胞炭疽菌进行形态学观察 (见图 4)。培养 5 d 后的病原菌菌落呈圆形, 边缘整齐, 菌落初期为白色或浅灰色, 后为浅褐色, 有明显的同心环带。菌落气生菌丝为白色或灰色, 显微镜下观察其具有隔膜。5 d 后中间开始产生橘黄色孢子团, 15 d 后产生黑色菌核状构成物。分生孢子为单胞, 椭圆形或圆柱形, 大多数分生孢子一端呈尖锐状, 少数两端均为圆形。2 个菌株形态无明显差异。

2.6 分离到的柱花草炭疽病菌的致病性

为了确定分离到的菌株对柱花草品系的侵染

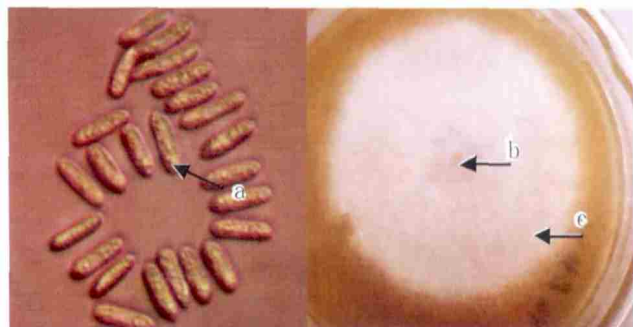


图 4 分离菌株的形态

a: 分生孢子 (×400); b: 菌落分生孢子粘孢团; c: 菌落气生菌丝

Fig. 4 Modality of isolated strain of *Colletotrichum* sp.

a: Conidia (×400); b: Conidia group; c: Aerial mycelium

能力,选 5 个圭亚那柱花草品系进行接种,结果表明,病情指数为 0~10 (抗病)和 11~30 (中抗)的各有 1 份,病情指数为 31~40 (中感)的无,病情指数在 41 以上(感病和高感)的有 3 份(见表 1)。病斑不规则,边缘也不整齐,呈褐色,为胶胞炭疽病菌的 B 型。

表 1 不同柱花草品系发病情况
Tab. 1 The incidence of the disease attacking different varieties of Stylos

柱花草品系 <i>Stylosanthes</i> spp.	发病率/% Incidence	病情指数 Disease index	抗病性 Disease resistance
品 39 Stylo 39	100	100 d	高感 Highly infectious
热研 2 号 <i>Stylosanthes guianensis</i> cv. Reyan No. 2	61.54	54.6 c	感病 Infectious
热研 5 号 <i>Stylosanthes guianensis</i> cv. Reyan No. 5	58.14	47.5 c	感病 Infectious
品 907 Stylo 907	28.57	17.3 b	中抗 Moderate disease resistance
Stylo1979	6.06	6.7 a	抗病 Disease resistance

注:表中病情指数数据后小写英文字母不同者表示差异显著($P<0.05$)
Note: Data with different lower case letters in the table mean significant difference ($P<0.05$)

5 个品系间出现病斑时间不同:接种后第 3 天,品 39 的老叶和茎秆出现病斑,随后逐步增加并扩散到新叶上,约 20 d 后,整个植株死亡。热研 2 号在接种后第 5 天小范围出现病斑,热研 5 号则是第 7 天出现病斑。

接种后 30 d 的病症表现:1) 品 39 柱花草,100% 植株死亡,病症严重,叶片绝大多数脱落。2) 热研 2 号柱花草,植株无死亡,长势一般,叶片症状较重,病斑多,叶片脱落较多,茎秆上有黑色病斑。3) 热研 5 号,植株无死亡,长势一般,叶片病症较重,病斑较多,部分叶片脱落。4) 品 907,植株无死亡,长势较好,部分叶片有病斑,脱落叶片较少。5) Stylo1979,植株无死亡,长势好,零星叶片有病斑。

3 讨 论

由于真菌的 rDNA 存在高度保守区和可变区,在种内不同菌株间高度保守,而在真菌的种间存在着极大的变化,能真实反映同一属内不同种间以及某些种内菌株间的序列差异,因此,ITS 序列分析广泛地被应用在真菌属种分类的研究领域中^[7]。病原物的准确鉴定对病害的防治有重要意义,传统的形态鉴定和柯赫氏法则证明结合分子生物学检测手段,可快速准确地诊断病原物的种类。尽管有的真菌种内出现显著的 ITS 多态性,但对于大多数的真菌而言,ITS 多态性出现在属内种间差异明显,而种内较一致^[8]。本试验中 2 个柱花草炭疽病菌的 ITS 扩增片段均约 500 bp,且基本无差异,与形态学观察到的菌落相符,均为胶胞炭疽菌。

柱花草炭疽病菌主要由胶胞炭疽菌(*Colletotrichum gloeosporioides*)引起,少部分由平头炭疽菌(*Colletotrichum truncatum*)和豆炭疽菌(*Colletotrichum lindemuthianum*)引起^[9]。根据胶胞炭疽病不同生物类型,分为 A 型和 B 型^[10]。A 型菌侵染后产生的病斑为圆形,不连续分布,中间灰白,边缘暗褐色,能感染大多数柱花草^[11],是危害澳大利亚柱花草的主要菌种。而 B 型病斑不规则,边缘也不整齐,呈褐色,主要侵染圭亚那柱花草。在我国,主要危害柱花草的菌株为胶胞炭疽病菌,且 2 种专化类型都存在^[12]。笔者通过 ITS 序列分析和观察接种症状可知,分离的 2 个菌株为胶胞炭疽病菌的 B 型。分离鉴定的柱花草炭疽病原菌,对不同柱花草品系的致病性不同,stylo1979 为雄性不育突变株,具有较强的抗病性,可为柱花草炭疽病种质选育提供材料。

参考文献:

- [1]刘春来,文景芝,杨明秀,等. rDNA-ITS 在植物病原真菌分子检测中的应用[J]. 东北农业大学学报 2007(1): 101-106.
- [2]张伟丽,郭振飞. 柱花草炭疽菌初步鉴定及柱花草抗性分级研究[J]. 广东农业科学 2007(2): 51-54.
- [3]易克贤. 柱花草炭疽病原菌的 RAPD 分析[D]. 儋州: 华南热带农业大学 2001.
- [4]梁英彩. 柱花草炭疽病抗性的测定方法[J]. 广西畜牧医 1998, 14(3): 16-24.
- [5]方中达. 植病研究方法[M]. 第3版. 北京: 中国农业出版社, 1998.
- [6]HORSFALL J G, BARRATT R W. An improved grading system for measuring plant diseases[J]. Phytopathology, 1945, 35: 655.
- [7]邢红梅,丁平,王克荣,等. 红掌炭疽病病原的分离鉴定及其核糖体 DNA-ITS 序列分析[J]. 园艺学报 2009, 36(5): 743-748.
- [8]崔昌平,郑肖兰,刘洪平,等. 橡胶树炭疽病菌 rDNA-ITS 区序列分析[J]. 热带作物学报 2006, 27(4): 41-45.
- [9]冯淑芬,李凤娥,何朝族,等. 笔花豆炭疽病菌生物学特性和流行条件研究[J]. 热带作物研究 1994, 1(1): 87-94.
- [10]IRWIN J A G, CAMERON D F. Two diseases in *Stylosanthes* spp. caused by *C. gloeosporioides* in Australia, and pathogenic specialization within one of the causal organism[J]. Aust. J. Agric. Res., 1978, 29: 305-317.
- [11]蒋昌顺,邹冬梅,张义正. 柱花草炭疽病及其抗病育种研究进展[J]. 四川草原, 2002, 1: 22-24.
- [12]易克贤. 柱花草炭疽病及其抗病育种进展[J]. 中国草地 2001, 23(4): 59-65.

Accurate and Rapid Identification of *Colletotrichum* from *Stylosanthes* spp.

YANG Qin^{1,2}, LUO Lijuan^{1,2}

(1. National Key Laboratory for Sustainable Utilization of Tropical Biological Resources in Hainan, Haikou 571101, China;

2. College of Agronomy, Hainan University, Haikou 571101, China)

Abstract: Anthracnose is the main plant disease of *Stylosanthes*. Identification of pathogen of the disease is particularly important. Two pathogenic strains of anthracnose were separated by using conventional tissue isolation method, and the rDNA-ITS of the pathogens were amplified by using universal primers ITS1/ITS4. The electrophoresis results showed that the target band was 500 bp approximately. Bioinformatics analysis showed that the two strains were clustered into *Colletotrichum gloeosporioides* and had 99% homology. Five Stylo species were inoculated with the two pathogenic strains, and the result showed that these 5 stylo species were different in tolerance to anthracnose.

Key words: *Stylosanthes* spp.; anthracnose; rDNA-ITS; resistance assessment