

灵芝绿霉病病原菌的分离鉴定及快速检测

Isolation, identification and rapid detection of the pathogen causing green mold on lingzhi *Ganoderma lucidum*黄鑫伟¹ 严寅珩¹ 张 通¹ 耿兰君¹ 程 哲^{1*} 徐济贵^{1,2*}

(1. 吉林农业科技学院, 吉林 132000; 2. 吉林农业大学食药菌教育部工程研究中心, 长春 130000)

Huang Xinwei¹ Yan Yinhui¹ Zhang tong¹ Geng Lanjun¹ Cheng Zhe^{1*} Xu Jize^{1,2*}

(1. Jilin College of Agricultural Science and Technology, Jilin 132000, Jilin Province, China; 2. Engineering Research Center of Chinese Ministry of Education for Edible and Medicinal Fungi, Jilin Agricultural University, Changchun 130000, Jilin Province, China)

灵芝 *Ganoderma lucidum* 是一种灵芝科著名药用真菌,我国一直是世界上灵芝的主要生产国和出口国(金鑫等,2016),其栽培规模在逐年递增。但是由于检测手段缺乏和管理方式不完善,木霉已经成为灵芝栽培中重要的病原菌之一,加之其分布广,种类多,发病快,隐蔽性强,严重时可导致绝产。所以,目前对新木霉病原菌的发现和侵染灵芝的病原菌进行实时、快速的检测已成为防治灵芝绿霉病的关键。目前,传统纯培养等检测方法耗时长,准确度低,限制因素多,效率低下,很难对病原菌进行及时、准确的鉴定(Gunnell & Gubler, 1992)。因此,本研究拟建立一种快速检测灵芝病原菌木霉的方法,以期今后灵芝生产中绿霉病发生与防治提供技术支持。

1 材料与方法

1.1 材料

供试灵芝及菌株:灵芝采集自吉林省蛟河灵芝栽培基地。侧耳木霉 *Trichoderma pleuroticola*、哈茨木霉 *T. harzianum*、长枝木霉 *T. longibrachiatum*、深绿木霉 *T. atroviride*、拟康宁木霉 *T. koningiopsis* 均为吉林农业科技学院应用真菌研究室分离、鉴定后保藏备用。

试剂及仪器:植物DNA提取试剂盒、PCR扩增试剂盒,北京全式金生物技术有限公司;马铃薯葡萄糖琼脂(potato dextrose agar, PDA)培养基:马铃薯200 g、葡萄糖20 g、琼脂20 g,去离子水定容至1 000 mL。TC型PCR扩增仪,杭州博日科技有限公司;JY600电泳仪,北京君意东方电泳设备有

限公司。

1.2 方法

菌株致病性测定:采集感染绿霉病的灵芝子实体,分离病原菌并纯化得到菌株,编号XU8130,将其配制成浓度为 1×10^6 个/mL的孢子悬浮液回接至健康的灵芝子实体,在温度25℃、湿度85%、自然光照下培养7 d,观察并记录发病情况。取发病灵芝再次进行分离鉴定,单孢分离后与原接种菌株进行比较,试验3次重复。

菌株形态及分子生物学鉴定:将菌株XU8130接种于PDA培养基中,25℃下培养,5 d后根据木霉种群分类系统(<http://mmit.china-cctc.org>)进行形态鉴定。根据植物DNA提取试剂盒操作说明提取总DNA。扩增引物为ITS1(5'-TCCGTAGGTGAAC-CTGCGG-3')和ITS4(5'-TCCTCCGCTTATTGAT-ATGC-3'),引物均由华大基因科技有限公司合成。50 μL PCR反应体系:10×PCR Buffer 5 μL、2.5 mmol/L dNTP 4 μL、10 μmol/L上下游引物各1 μL、样品总DNA模板1 μL、5 U/μL *Taq* DNA聚合酶1 μL、无菌ddH₂O 37 μL。PCR反应条件:94℃预变性5 min;94℃变性30 s,58℃退火30 s,72℃延伸45 s,循环30次;最后72℃延伸10 min,4℃保存。PCR产物进行1%琼脂糖凝胶电泳,凝胶成像仪照相保存。产物由华大基因科技有限公司测序,利用MEGA 6.0软件以最大似然法构建系统发育树,系统树分支的可信度用Bootstrap检测,1 000次重复。

引物设计:将菌株XU8130的rDNA-ITS序列与侧耳木霉、哈茨木霉、长枝木霉、深绿木霉、拟康宁木

霉的序列进行比对,依据引物设计原则,用 Vector NT11 设计引物: CZ03F: 5'-GGGTGTTTTACGGCTGTGGC-3' 和 CZ04R: 5'-CTGAGCCTTCTCGGC-GACC-3', 均由华大基因科技有限公司合成。

引物特异性及灵敏度试验: 选取引物 CZ03F/CZ04R 对菌株 XU8130、拟康宁木霉、哈茨木霉、长枝木霉、深绿木霉进行引物特异性验证, 50 μ L PCR 反应体系: 10 \times PCR Buffer 5 μ L、2.5 mmol/L dNTP 4 μ L、10 μ mol/L 上下游引物各 1 μ L、样品总 DNA 模板 1 μ L、5 U/ μ L *Taq* DNA 聚合酶 1 μ L、无菌 ddH₂O 37 μ L。PCR 反应条件: 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 58 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 45 s, 循环 30 次; 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min, 4 $^{\circ}$ C 保存。PCR 产物进行 1% 琼脂糖凝胶电泳, 凝胶成像仪照相保存。试验 3 次重复。菌株 XU8130 的 DNA 测定含量后稀释至 1 ng/ μ L, 然后 10 倍梯度稀释至 10⁻¹、10⁻²、10⁻³、10⁻⁴、10⁻⁵ ng/ μ L, 各取 10 μ L 作为模板, 用 PCR 反应体系同上进行灵敏度检测。试验 3 次重复。

2 结果与分析

2.1 病原菌的致病性

接种 7 d 后灵芝菌孔处形成灰绿色腐朽斑, 回接后病症与田间发病特征一致, 对接种发病灵芝进行再次分离, 得到与最初纯化的菌株 XU8130 相同的病原菌, 证明菌株 XU8130 为灵芝绿霉病的病原菌。

2.2 病原菌的形态特征与分子鉴定

菌株 XU8130 的菌落在 PDA 培养基上呈同心轮纹状, 初期为绿灰色、灰绿色, 后期为暗绿色至黑绿色。菌落背面初期无色, 后期呈黄绿色。分生孢梗分枝相对狭窄, 呈波曲状。小梗对生, 安甬形, 顶部突然变细为瓶颈, 大小为 4.2~9.5 μ m \times 3.0~4.2 μ m。分生孢子亚球形至宽椭圆形, 大小为 2.7~5.0 μ m \times 2.5~3.7 μ m, 初步鉴定为侧耳木霉 *Trichoderma pleuroticola*。基于菌株 XU8130 的 16S rDNA 序列构建系统发育树, 发现与侧耳木霉序列同源率为 100%, 聚为一支, 最终确定菌株 XU8130 为侧耳木霉。

2.3 引物的特异性及灵敏度

仅有菌株 XU8130 扩增出目的条带, 大小为 358 bp, 而其它木霉均未扩增出特异性条带(图 1-A)。由此可见, 引物具有良好的特异性。病原菌基因组 DNA 以 10 倍梯度稀释至 10⁻² ng/ μ L 时仍有可见的目标扩增条带, 说明此检测体系对病原菌检测的灵敏度为 10⁻² ng/ μ L(图 1-B)。

3 讨论

本研究结合形态特征与分子鉴定结果最终确定

引起灵芝绿霉病的病原菌为侧耳木霉。试验结果显示引物 CZ03F 和 CZ04R 对目标菌株有特异性, 对非目标菌株无特异性, 引物浓度为 10 μ mol/L 时, 可以对侧耳木霉进行特异性检测。根据优化后的反应条件和体系, 扩增出了侧耳木霉的特异性条带, 大小为 358 bp, 并且该引物仅对目标菌特异, 因而可用来很好地区分其它物种。本研究结果显示, 建立的检测体系的灵敏度最低检测限度可达 10⁻² ng/ μ L, 马庆周等(2017)对玉米圆斑病病原菌的检测限度为 10⁻³ ng/ μ L, 造成这种灵敏度差异性的原因还有待进一步探究。本研究目标菌种的特异性产物比较小, 能有效缩短反应时间, 同时可以提高 PCR 扩增的灵敏性。本研究所建立的方法能够准确、快速地检测侧耳木霉, 可应用于灵芝病害的早期检测, 对于灵芝病害快速检测、及时防治具有积极的指导意义。

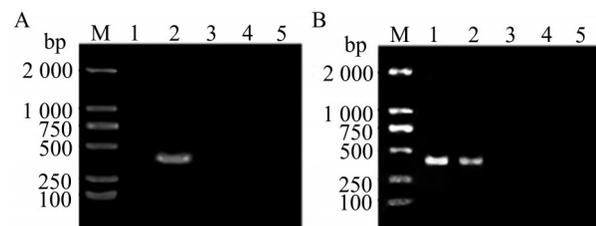


图 1 木霉引物 CZ03F/CZ04R 特异性检测(A)和引物 PCR 灵敏度检测电泳图(B)

Fig. 1 Specific detection of *Trichoderma* with the primers CZ03F/CZ04R (A) and sensitivity detection of primers using PCR (B)

M: DNA 分子量标准。A: 1: 长枝木霉; 2: 菌株 XU8130; 3: 哈茨木霉; 4: 拟康宁木霉; 5: 深绿木霉。B: 1~5: 10⁻¹、10⁻²、10⁻³、10⁻⁴、10⁻⁵ ng/ μ L 的 DNA 浓度。M: DNA marker。A: 1: *T. longibrachiatum*; 2: strain XU8130; 3: *T. harzianum*; 4: *T. koningiopsis*; 5: *T. atroviride*。B: 1~5: 10⁻¹, 10⁻², 10⁻³, 10⁻⁴, 10⁻⁵ ng/ μ L of DNA, respectively.

参考文献 (References)

- Gunnell PS, Gubler WD. 1992. Taxonomy and morphology of *Colletotrichum* species pathogenic to strawberry. *Mycologia*, 84: 157-165
- Jin X, Liu ZM, Huang YJ, Huang WL, Zheng LY. 2016. The current situation and development trend of *Ganoderma lucidum* cultivation in China. *Edible and Medicinal Mushrooms*, 24(1): 33-37 (in Chinese) [金鑫, 刘宗敏, 黄羽佳, 黄文丽, 郑林用. 2016. 我国灵芝栽培现状及发展趋势. *食药菌*, 24(1): 33-37]
- Ma QZ, Li Y, Ma LL, Wu HY, Geng YH, Zhang M. 2017. Rapid detection of northern corn leaf spot pathogen. *Acta Phytopathologica Sinica*, 47(2): 154-161 (in Chinese) [马庆周, 李跃, 马乐乐, 武海燕, 耿月华, 张猛. 2017. 玉米圆斑病病原的快速检测. *植物病理学报*, 47(2): 154-161]

(责任编辑:王璇)