

花生焦斑病菌的鉴定及生物学特性分析

Identification and biological characteristics of the peanut scorch spot pathogen

Leptosphaerulina arachidicola

胡艳红 崔林开* 郭金利 李梦琪

(河南科技大学林学院, 洛阳 471023)

HU Yanhong CUI Linkai* GUO Jinli LI Mengqi

(College of Forestry, Henan University of Science and Technology, Luoyang 471023, Henan Province, China)

花生是一种重要的油料作物和经济作物,我国是世界上最大的花生生产和消费国(彭振英等, 2019)。花生焦斑病是花生上的一种常见叶部病害,在叶片上常产生焦斑和胡麻斑,焦斑症状更普遍,与其它叶部病害混合发生导致花生中后期叶片大量枯死,对花生生产造成一定的威胁(晏立英等, 2015)。目前国内外对花生焦斑病的研究很少,特别是对花生焦斑病菌生物学特性的研究尚未见报道。本研究采用组织分离法分离该病原菌,通过分子生物学方法进行鉴定,并对其生物学特性进行研究,以期为进一步明确花生焦斑病菌的致病机理及病害的有效防控提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料

供试病样:2018年8月在开封市产业集聚区采集具有典型焦斑病症状的花生叶片,带回实验室进行病原菌分离。

培养基: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、琼脂粉 15 g;添加花生叶 30 g 即为添加花生叶汁的 PDA (potato dextrose agar+peanut leaf, PDA+PL)培养基;马铃薯蔗糖琼脂(potato sugar agar, PSA)培养基:马铃薯 200 g、蔗糖 20 g、琼脂粉 15 g;燕麦(oatmeal agar, OA)培养基:燕麦片 30 g、琼脂粉 15 g;Landers 培养基:葡萄糖 50 g、 KH_2PO_4 5 g、天门冬酰胺 2 g、维生素 B₁ 0.2 g、琼脂粉 15 g;V8 汁琼脂(V8 juice agar, V8A)培养基:V8 汁 200 g、碳酸钙 3 g、琼脂粉 15 g;碳、氮源基础培养基: KH_2PO_4 0.5 g、 K_2HPO_4 0.6 g、NaCl 0.1 g、 CaCl_2 0.1 g、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5 g、琼脂粉 15 g。以上培养基均以蒸馏水定容至 1 L。

试剂及仪器:Taq 酶,宝生物工程(大连)有限

公司;其它试剂均为国产分析纯。P600 型 PCR 仪,日本 TaKaRa 公司;DYY-6C 电泳仪,北京六一仪器厂。

1.2 方法

病原菌的分离与纯化:从新鲜病叶病健交界处剪下 3 mm×3 mm 的小方块组织,放入 75% 酒精中消毒 30 s,再转入 3% 次氯酸钠消毒 3 min,无菌水漂洗 3 次,风干后置于 PDA 平板上 25℃ 黑暗培养;培养 5 d 后挑取菌落边缘菌丝转接到新的 PDA 平板上继续培养纯化获得病原菌。

病原菌的形态学鉴定及分子生物学分析:将病原菌于 PDA 平板上 25℃ 黑暗培养 10 d,观察记录菌落形态、颜色以及菌丝的基本形态,进行形态学鉴定(晏立英等, 2015)。采用 CTAB 法提取病原菌的基因组 DNA(Stewart & Via, 1993),应用引物 ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3')/ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3')、LR0R (5'-ACCCGCTGAACTTAAGC-3')/LR7 (5'-TACTACCACCAAGATCT-3') 和 TUBF (5'-GCTTACAATTGACAGGGTAACTTAAGC-3')/TUBR (5'-GGGACGGAAGAGCTGACCA-3') 分别扩增 rDNA ITS、28S rRNA 基因 LSU 和 β 微管蛋白基因 TUB 的序列。20 μL 反应体系:DNA 模板 1 μL 、上下游引物各 1 μL 、Premix Taq 10 μL 、ddH₂O 7 μL 。反应条件:94℃ 预变性 5 min;94℃ 变性 30 s,55℃ (ITS)/50℃ (LSU)/60℃ (TUB) 退火 30 s,72℃ 延伸 60 s (ITS 和 TUB)/90 s (LSU),32 个循环;72℃ 延伸 10 min。扩增产物送生工生物工程(上海)股份有限公司进行测序,应用 BLAST 和 MEGA 6.0 软件对测序结果进行同源性比对,采用邻接法构建系统发育树进行系统发育分析。

病原菌的生物学特性测定:用直径 5 mm 打孔

器在活化 7 d 后的菌落边缘打取菌饼, 分别置于 PDA、PDA+PL、PSA、OA、V8A 和 Landers 平板上 25℃ 黑暗培养 10 d, 测定不同培养基对病原菌菌丝生长的影响; 分别置于 15、20、25、30 和 35℃ 温度下黑暗培养 10 d, 测定温度对病原菌菌丝生长的影响; 分别置于 pH 4、5、6、7、8、9、10 和 11 的 PDA 平板上 25℃ 黑暗培养 10 d, 测定 pH 对病原菌菌丝生长的影响; 分别置于全黑暗、全光照、12 h/12 h 光暗交替条件下 25℃ 培养 10 d, 测定光照对病原菌菌丝生长的影响; 分别置于以葡萄糖、乳糖、木糖、蔗糖、麦芽糖和可溶性淀粉为碳源的基础培养基平板上 25℃ 黑暗培养 10 d, 测定不同碳源对病原菌菌丝生长的影响; 分别置于以硫酸铵、硝酸钠、牛肉膏、蛋白胨和天门冬酰胺为氮源的基础培养基平板上 25℃ 黑暗培养 10 d, 测定不同氮源对病原菌菌丝生长的影响。每处理 3 次重复, 采用十字交叉法测量菌落直径。

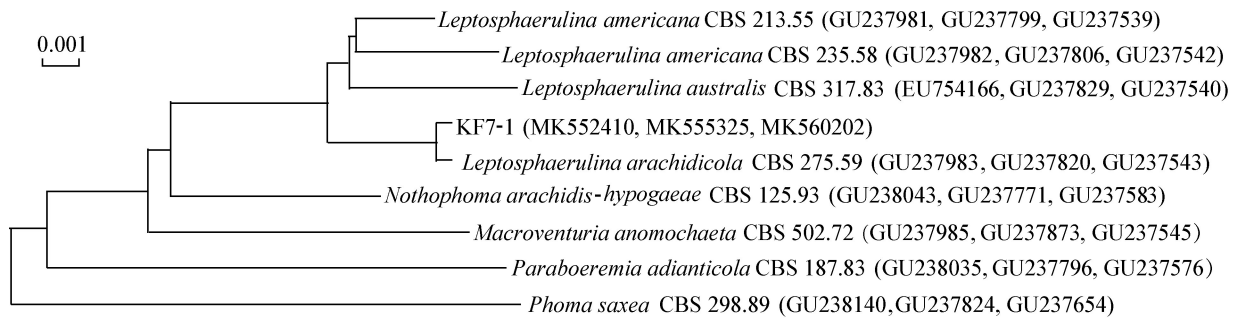


图 1 基于 LSU、ITS 和 TUB 序列构建花生焦斑病菌菌株 KF7-1 以及相似病菌的系统发育树

Fig. 1 Phylogenetic tree of peanut scorch spot pathogen strain KF7-1 and related strains based on LSU, ITS and TUB sequences

2.2 花生焦斑病菌的生物学特性

菌株 KF7-1 在 PDA+PL 培养基上菌丝生长最快, 菌落直径为 60.00 mm, 其次是在 PDA 和 V8A 培养基上, 但三者间差异不显著; 25℃ 下菌丝生长最快, 菌落直径为 54.67 mm, 其次是在 20℃ 下, 二者间差异不显著; pH 6 时菌丝生长最快, 菌落直径为 53.83 mm, 其次是 pH 7, 二者间差异不显著; 光暗交替下菌丝生长最快, 菌落直径为 66.33 mm, 显著快于全光照和全黑暗处理; 在含有可溶性淀粉的基础培养基上菌丝生长最快, 菌落直径为 50.67 mm, 其次是葡萄糖, 二者间差异显著; 在含有牛肉膏的基础培养基上菌丝生长最快, 菌落直径为 35.00 mm, 其次是蛋白胨, 二者间差异不显著。

3 讨论

本研究初步明确了花生焦斑病菌菌丝生长的最适条件, 但在不同培养基、pH、光照、碳、氮源等条件筛选试验中, 25℃ 下培养 10 d 均未发现该病原菌产生子囊和子囊孢子; 晏立英等(2015)将花生焦斑病菌在 PSA 上培养 14 d 也未见其产生子囊, 说明该病

1.3 数据分析

试验数据采用 SPSS 18.0 软件进行统计分析, 应用 Duncan 氏新复极差法进行差异显著性检验。

2 结果与分析

2.1 花生焦斑病菌的鉴定

共分离获得 5 株花生焦斑病菌菌株, 在 PDA 培养基上生长较慢, 菌落圆形, 正面灰黑色, 背面黑色; 菌丝无色, 有隔分枝, 不产生子囊和子囊孢子。选取代表菌株 KF7-1 进行分子生物学鉴定, 发现其 LSU (MK552410)、ITS (MK555325) 和 TUB 序列 (MK560202) 与落花生小光壳菌 *Leptosphaerulina arachidicola* 菌株 CBS 275.59 相关序列 (GU237983、GU237820 和 GU237543) 的相似度分别为 99%、100% 和 100%; 系统发育树显示菌株 KF7-1 与落花生小光壳菌 CBS 275.59 聚为同一分支(图 1)。将菌株 KF7-1 鉴定为落花生小光壳菌。

原菌的产孢条件可能较为特殊。目前培养基上只长菌丝不产孢是研究该病原菌的一个重要限制条件, 产孢条件还有待进一步深入研究。由于花生焦斑病菌在培养基上不产孢, 因此分离获得的病原菌主要通过分子生物学方法进行准确鉴定。

参 考 文 献 (References)

- PENG ZY, SHAN L, ZHANG ZM, LI XG, WAN SB. 2019. Variation analysis of amino acid content in peanut distant hybrid progeny. *Journal of Peanut Science*, 48(1): 21–26 (in Chinese) [彭振英, 单雷, 张智猛, 李新国, 万书波. 2019. 花生远缘杂交后代的氨基酸含量变异分析. *花生学报*, 48(1): 21–26]
- STEWART CN, VIA EL. 1993. A rapid CTAB DNA isolation technique useful for RAPD fingerprinting and other PCR applications. *Biotechniques*, 14(5): 748–750
- YAN LY, LEI Y, WAN LY, CHENG K, LIAO BS. 2015. Resistance of peanut scorch spot pathogen *Leptosphaerulina arachidicola* to carbendazim in Linshu, Shandong. *Chinese Journal of Oil Crop Sciences*, 37(4): 520–524 (in Chinese) [晏立英, 雷永, 万丽云, 程柯, 廖伯寿. 2015. 山东临沭花生焦斑菌株多菌灵抗药性的研究. *中国油料作物学报*, 37(4): 520–524]

(责任编辑: 王 璇)