

DOI: 10.3969/j.issn.2095-3704.2012.03.006

## 车前草穗枯病菌分子鉴定

梁艳<sup>1</sup>, 涂怀妹<sup>2</sup>, 崔朝宇<sup>1</sup>, 蒋军喜<sup>1\*</sup>

(1. 江西农业大学 农学院, 江西 南昌 330045; 2. 江西省安义县农业局, 江西 安义 330500)

**摘要:** 采用真核生物通用引物 ITS1/ITS4, 对来自江西省吉安县 2 个车前草穗枯病菌菌株进行 rDNA-ITS 区段的 PCR 扩增, 对扩增产物进行测序, 结果获得 2 个长度均为 579 nt 且序列完全一致的 rDNA-ITS 序列, 该序列与 GenBank 中当归间座壳菌(*Diaporthe angelicae*)及其无性态拟茎点霉菌(*Phomopsis subordinaria*)对应序列的同源性高达 99.0%, 根据以 rDNA-ITS 序列同源性大小划分种类的标准, 将车前草穗枯病菌鉴定为当归间座壳菌。

**关键词:** 车前草穗枯病; 当归间座壳菌; 分子鉴定

中图分类号: S432.1

文献标志码: A

文章编号: 2095-3704 (2012) 03-0258-03

### Molecular Identification of Pathogen of Plantain Head Blight

LIANG Yan<sup>1</sup>, TU Huai-mei<sup>2</sup>, CUI Chao-yu<sup>1</sup>, JIANG Jun-xi<sup>1\*</sup>

(1. College of Agronomy, Jiangxi Agricultural University, Nanchang 330045, China;

2. Agricultural Bureau of An'yi County, An'yi 330500, China)

**Abstract:** In the paper, two isolates of pathogen of plantain head blight from Ji'an county in Jiangxi province were molecularly identified. RDNA-ITS region of each of the two isolates was amplified by PCR, and the PCR products were sequenced. Both of them are 579 nt in length, and they have a consensus sequence. The sequence shares 99.0% homology with sequence of either *Diaporthe angelicae* or its anamorph *Phomopsis subordinaria*. Based on the criterion of rDNA-ITS sequence homology in fungus species classification, pathogen of plantain head blight was identified as *Diaporthe angelicae*.

**Key words:** plantain head blight; *Diaporthe angelicae*; molecular identification

车前草穗枯病(plantain head blight)是危害车前草(*Plantago asiatica* L.)生长最严重的病害之一<sup>[1-2]</sup>, 该病主要为害穗部和叶片, 造成病部迅速坏死直至全株枯死现象, 发病严重时常常导致全田枯死, 颗粒无收。2004-2005年, 我们对该病病原进行了病菌分离和形态鉴定, 初步鉴定为一种壳梭孢属真菌(*Fusicoccum* sp.)<sup>[3]</sup>。近来, 我们通过测定核糖体基因转录间隔区(rDNA-ITS)序列对该病菌进行了分子鉴定, 结果发现该病菌不是壳梭孢属真菌, 而是间座壳属(无性态为拟茎点属)真菌。根据分子鉴

定结果以及重新对形态观察结果进行分析, 我们认为车前草穗枯病的病原应确定为间座壳菌, 之前将其病原鉴定为壳梭孢属真菌的结论是错误的, 需要纠正。现将对其分子鉴定结果报道如下。

### 1 材料与方法

#### 1.1 菌株

供试菌株2个, 即Yonghe-1和Yonghe-2, 分别从江西省吉安县永和镇林洲村不同自然村田块的车前草穗枯病病株中分离得到, 前者分自病穗, 后者

收稿日期: 2012-08-15

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30960213)

作者简介: 梁艳, 女, 硕士, 主要从事植物病害综合治理研究; \* 通信作者: 蒋军喜, 男, 江西湖口人, 教授, 博士, 主要从事植物病害综合治理研究, E-mail: jxjiang64115@yahoo.com.cn。

分自病叶。

## 1.2 寡聚核苷酸引物

采用真核生物的通用引物ITS1和ITS4<sup>[4]</sup>,扩增车前草穗枯病菌的rDNA-ITS区段。

ITS1: 5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3'

ITS4: 5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'

引物由上海生工生物工程有限公司合成。

## 1.3 病菌培养

将4℃冰箱中保存的供试菌株移至PSA平板上进行活化,25℃黑暗条件下培养2~3 d,从菌落边缘切取直径2~3 mm的菌饼,移至盛有150 mL PS液体培养基的三角瓶中,每瓶5个菌饼,25℃振荡培养4~5 d。

## 1.4 菌丝预处理

将液体培养菌丝用双层尼龙网过滤,用无菌水洗涤2次,以去除菌丝内的培养液,收集菌丝,吸干水分,用液氮研磨成粉末,备用。

## 1.5 车前草穗枯病菌 DNA 提取

取0.05 g研磨好的菌丝样品,加入1 mL提取液(50 mmol/L Tris-HCl、150 mmol/L NaCl、100 mmol/L EDTA),振荡混匀,再加入100 μL 20% SDS混匀,然后将离心管置于摇床内37℃缓慢摇动1 h,每管加入5 mol/L NaCl溶液150 μL,缓慢混匀,加入130 μL CTAB/NaCl溶液(10%CTAB、0.7 mol/L NaCl),混匀,65℃水浴20 min,每隔5 min摇动1次,后冷却置室温,加入等体积氯仿:异戊醇,在摇床内剧烈摇动5 min,10 000 r/min离心12 min,上清12 000 r/min离心5 min;上清液移入新管中,加入等体积预冷的异丙醇,-20℃放置半小时,10 000 r/min离心12 min;弃上清液,倒置使管壁液体流尽,70%乙醇洗沉淀,室温放置干燥5~10 min,溶于20 μL dd H<sub>2</sub>O中,加入RNase A(10 μg/μL)1 μL,37℃水浴30 min,-20℃保存备用。

## 1.6 rDNA-ITS 区段的 PCR 扩增

PCR反应在20 μL体系中进行,含DNA模板1 μL,10 pmol/μL上、下游引物各2 μL,10×PCR Buffer 2 μL,25 mmol/L MgCl<sub>2</sub> 2 μL,10 mmol/L dNTP 2 μL,1U/μL Taq DNA聚合酶0.4 μL,dd H<sub>2</sub>O 8.6 μL。扩增程序为:94℃预变性3 min;94℃变性1 min,55℃退火30 s,72℃延伸1 min,30个循环;72℃补平10 min。PCR产物用1%琼脂糖凝胶电泳检测。

## 1.7 PCR 产物测序及序列同源性比较

回收PCR产物,将产物送至上海生工生物工程有限公司进行序列测定。所得序列递交NCBI网站进行核苷酸序列同源性搜索,根据同源性大小对车前草穗枯病菌进行种类鉴定。

## 2 结果与分析

### 2.1 车前草穗枯病菌 rDNA-ITS 区段的 PCR 扩增

采用真核生物通用引物ITS1/ITS4扩增车前草穗枯病菌rDNA-ITS序列,结果从供试的车前草穗枯病菌2个菌株中均扩增出一条长约550 bp的DNA片段(图-1)。

### 2.2 车前草穗枯病 ITS 序列测定

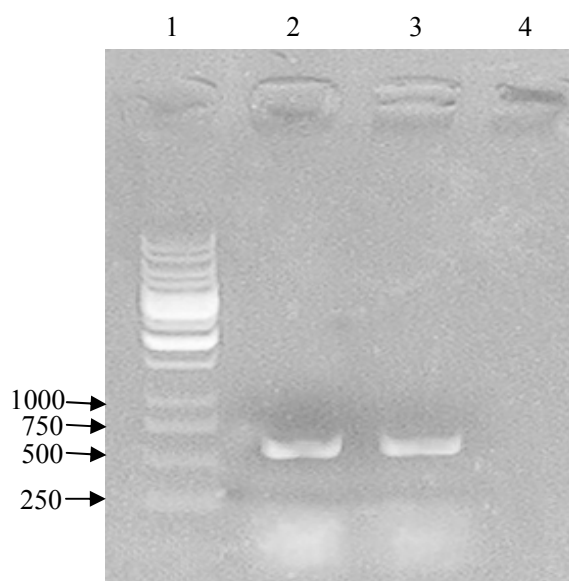
将PCR产物进行测序,获得长度为579 nt的rDNA-ITS序列,2个菌株序列完全一致,序列依次覆盖部分18 S、ITS1、5.8 S、ITS2和部分28 S等5个区段,该序列在Genebank中的登录号为EU512922。

### 2.3 车前草穗枯病 ITS 序列同源性比较

利用blast程序,将测定的579 nt rDNA-ITS序列与GenBank中已有序列进行同源性比较,发现车前草穗枯病菌与间座壳属(*Diaporthe*)中的当归间座壳菌(*D. angelicae*)以及与间座壳属的无性态拟茎点属(*Phomopsis*)中的拟茎点霉菌(*P. subordinaria*)的核苷酸序列同源性最高,均达到99%。

## 3 讨论

ITS序列是介于18S rDNA、5.8S rDNA和28S rDNA之间的区域,该区域进化速度较编码区快<sup>[4]</sup>。已有的研究表明ITS在真菌的种间存在着丰富的变异,而在种内不同菌株间却高度保守,其序列同源性可作为真菌鉴定的重要依据<sup>[5-8]</sup>。本研究获得了车前草穗枯病菌579 nt rDNA-ITS序列,该序列与当归间座壳菌和拟茎点霉菌的序列同源性最高,达99%,如此高的同源性足可以将车前草穗枯病菌鉴定为当归间座壳菌或拟茎点霉菌。当归间座壳菌与茎点霉菌实际上为同一种真菌,它们分别为该菌的有性世代和无性世代。当归间座壳菌与拟茎点霉菌目前国内尚未见报道,但前者已在奥地利、葡萄牙有发生报道,主要危害中草药茴香,后者在荷兰、芬兰、德国、波兰、新西兰等国家有发生报道,引起长叶车前(*Plantago lanceolata*)穗枯病<sup>[9-11]</sup>,看来车前草穗枯病菌很可能是一种世界性分布和多寄主的病原菌。



1. DNA Marker; 2. 菌株 Yonghe-1; 3. 菌株 Yonghe-2; 4. 空白对照

图1 车前草穗枯病菌 rDNA-ITS 序列 PCR 扩增电泳图

本文将车前草穗枯病菌的 rDNA-ITS 序列与壳梭孢属真菌的对应序列也进行了同源性比较, 结果其同源性只有 72%, 因此, 可以肯定车前草穗枯病菌不属于壳梭孢属真菌。之前, 我们主要是根据车前草穗枯病菌在分生孢子器中产生梭形的分生孢子, 分生孢子形状及大小符合壳梭孢属真菌的描述, 而将车前草穗枯病菌鉴定为壳梭孢属真菌, 未将其鉴定为拟茎点霉菌的原因是通常认为拟茎点霉菌能产生梭形(或椭圆形)和钩丝状两种类型的孢子。通过大量查阅文献后发现, 虽然大多数拟茎点霉菌产生椭圆形和钩丝状两种类型分生孢子, 但也有部分种只产生椭圆形分生孢子。据此可知, 车前草穗枯病菌很可能就属于只产生椭圆形分生孢子拟茎点霉菌的那一类。

#### 参考文献:

- [1] 陈须文, 盛传华, 曾水根. 车前草穗枯病发生规律与综合防治研究[J]. 江西植保, 2008, 31(4): 168-170.
- [2] 蒋军喜, 张超群, 阙海勇, 等. 车前草穗枯病研究 II. 病菌生物学特性[J]. 江西农业大学学报, 2007, 29(5): 872-874.
- [3] 李庚花, 张敬军, 蒋军喜, 等. 车前草穗枯病研究 I. 症状及病原菌鉴定[J]. 江西农业大学学报. 2005, 27(5): 872-874.
- [4] 陈立红, 闫伟, 徐燕. 土生空团菌(*Cenococcum geophilum* Fr.)的菌种鉴定及其遗传多样性的初步分析[J]. 中国农业科学, 2007, 40(10): 2214-2220.
- [5] 秦旭升, 李立军. 植物病原真菌中 DNA 分子鉴定技术[J]. 植物生理学通讯, 2000, 36(4): 872-874.
- [6] 付立忠, 李海波, 魏海龙, 等. 四个红菇科菌株的 rDNA ITS 序列分析和系统发育研究[J]. 食用菌学报, 2007, 14(2): 23-28.
- [7] Taylor J W, Jacobsen D J, Kroken S, et al. Phylogenetic species recognition and species concepts in fungi[J]. Fungal Genetic Biology, 2000, 31: 21-32.
- [8] Cooke D E L, Duncan J M. Phylogenetic analysis of *Phytophthora* species based on ITS1 and ITS2 sequences of the ribosomal RNA gene repeat[J]. Mycological Research, 1997, 101: 667-677.
- [9] Nooij M P, Damme J M M. Variation in the pathogenicity among and within populations of the fungus *Phomopsis subordinaria* infecting *Plantago lanceolata*[J]. Evolution, 1988, 42(6): 1166-1171.
- [10] Laine A L. First report of *Phomopsis subordinaria* in a natural population of *Plantago lanceolata* in south-west Finland[J]. Plant Pathology, 2003, 52: 422.
- [11] de Nooij M, van der Aa HA. *Phomopsis subordinaria* and associated stalk disease in natural populations of *Plantago lanceolata*[J]. Canadian Journal of Botany, 1987, 65: 2318-2325.