

女贞锈病发生初报

贾丽霞¹, 李志勇²

(1. 河北工程大学, 河北 邯郸 056038; 2. 河北省农林科学院 谷子研究所, 河北 石家庄 050031)

摘要:以从河北邯郸女贞上分离的锈菌为研究材料, 经显微观测, 锈菌为黄褐色, 形状为卵圆形、梨形或近球形, 大小为 $(15 \sim 21.5) \mu\text{m} \times (16.5 \sim 22) \mu\text{m}$ 。利用微波法快速提取了女贞锈病DNA, 并利用保守引物扩增核糖体 28S rDNA 变异区, 经聚类分析表明: 女贞锈菌为柄锈菌科, 与该科的白蜡柄锈菌及酸浆柄锈菌亲缘关系最近。该试验首次对女贞锈菌从分子水平进行分类及检测, 对女贞锈病的防治具有重要意义。

关键词: 女贞; 锈病; PCR 扩增; 聚类分析

中图分类号: S 688 **文献标识码:** B **文章编号:** 1001-0009(2011)09-0174-03

女贞(*Ligustrum lucidum*)为木犀科女贞属常绿灌木或小乔木, 为我国常见的园林植物。由于其适应性强, 耐污染, 可以吸附多种有害气体及灰尘, 并且四季常青, 越来越受到人们的青睐。尤其是金叶女贞的引进与种植, 是园林造景不可缺少的彩叶植物。随着女贞的广泛种植, 叶部病害发生逐年加重, 严重影响了女贞的观赏价值。徐颖等报道棒孢霉属真菌引起女贞叶斑病, 并导致叶片提早脱落^[1]。徐东生等发现女贞褐斑病严重影响了金叶女贞观赏价值及女贞的生长^[2-3]。近期在河北邯郸女贞上发现了一种新的叶部病害, 严重影响了女贞的观赏价值, 并且有继续扩散的趋势, 经显微观测与

分子鉴定为女贞锈病(*Aecidium kluifaistianum*)。该病害的诊断将为今后女贞的引种及其寄主范围及其起源的研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 病样的采集、病菌形态学观测及致病性测定

病样采自 2010 年 6 月份邯郸自然发病的女贞, 选取女贞典型新鲜发病叶片, 用灭菌刀片刮取叶片表面新鲜的孢子粉, 放于载玻片上, 在光学显微镜下观测孢子形态及测量孢子大小。把收集的新鲜孢子用灭菌蒸馏水稀释到 10^6 个/mL, 加入终浓度为 0.5% 吐温。用毛笔把孢悬液刷到健康女贞叶片, 用塑料袋包住接种叶片, 保湿 2 d 后, 揭开塑料袋 15 d 后观察叶部症状。

1.2 病菌 DNA 的提取及 28S rDNA 测序

利用潘力报道的方法提取锈菌 DNA, 并加以改进^[4]。收集 10 mg 锈菌配成孢悬液滴加于载玻片上, 25℃ 培养过夜使其萌发, 离心收集萌发的孢子, 加入 100 μL 10×TE 缓冲液使其悬浮, 用封口膜密封离心管, 微波加热 2 min, 马上冰浴 5 min, 冰浴后 12 000 r/min 离心

第一作者简介: 贾丽霞(1976), 女, 河北行唐人, 硕士, 讲师, 现主要从事园林植物教学与研究工作。E-mail: jialixiale@163.com。

责任作者: 李志勇(1976), 男, 河北邯郸人, 博士, 助理研究员, 现主要从事分子植物病理学研究工作。E-mail: lizhiyongds@126.com。

基金项目: 河北邯郸市社科联基金资助项目(201053)。

收稿日期: 2011-01-19

Study on Correlation Between Beginning of Wolfberry Thrips and Temperature

LI Feng¹, MA Jian-guo², LIU Xiao-li¹, SUN Hai-xia¹, YU Jian-ping²

(1. Institute of Germplasm Resources, Ningxia Academy of Agricultural and Forestry Sciences, Yinchuan, Ningxia 750002; 2. West Yinchuan Ecology Protective Forest Administrative Office, Yinchuan, Ningxia 750021)

Abstract: Preliminary study was carried out on correlation between population of wolfberry thrips and temperature. The results showed that there was correlation between the infection of wolfberry thrips and temperature. The population of wolfberry thrips increased as the temperature rose higher; the population of Wolfberry thrips inclined as the temperature dropped.

Key words: wolfberry thrips; temperature; correlation

5 min, 吸取 3 μ L 上清液作为扩增模板。根据真菌核糖体 28S rDNA, 设计 2 条引物 LROR 5'-ACCCGCT GA AC TTAAGC-3' 和 LR6 5'-CGCCAGTTCTGCTTACC-3' 扩增 28S rDNA D1 和 D2 区。反应程序为: 95 $^{\circ}$ C 5 min; 94 $^{\circ}$ C 30 s, 57 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 2 min, 35 个循环; 72 $^{\circ}$ C 10 min。PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳后, 回收目的条带, 与 Pmd19-T 载体连接过夜后, 经热激转化到大肠杆菌 JM109 中, 经菌落 PCR 检测出阳性克隆后, 送出测序。

1.3 基于 28S rDNA 系统进化分析

把克隆测序得到的女贞锈病 28S rDNA 序列提交到 Genbank 上, 以此与锈菌目的柄锈菌科(Pucciniaceae)、多胞锈菌科(Phragmidaceae)、鞘锈菌科(Coleosporiaceae)、栅锈菌科(Melampsoraceae)的锈菌 28S rDNA 序



图1 女贞感染锈病后症状

2.2 28S rDNA 片段的扩增

以引物 LROR 和 LR6 扩增女贞锈菌 DNA, 经 1.2% 琼脂糖凝胶电泳检测, 可以看出扩增出大约 1 kb 的片段(图 3)。回收目的条带, 连接 T 载体后, 转化到大肠杆菌 JM109 挑取阳性克隆送出测序, 在 Genbank 进行核苷酸比对, 发现女贞锈菌 28S rDNA 序列与锈菌目真菌的 28S rDNA 同源性在 82.9%~97.8%, 与柄锈菌科(Pucciniaceae)同源性在 92.19%~97.8%, 与鞘锈菌科(Coleosporiaceae)同源性在 90.4%~90.6%, 与多胞锈菌科(Phragmidaceae)同源性在 92.19%~97.8%, 与栅锈菌科(Melampsoraceae)同源性在 81.9%~82.9%, 该基因在 Genebank 登录号为 HQ69907。

2.3 28S rDNA 序列聚类分析

对 28S rDNA 序列进行聚类分析(图 4), 女贞锈菌与锈菌目内柄锈菌科内锈菌聚在一起, 表明其属于柄锈菌科。女贞锈菌与柄锈菌科的白蜡锈菌(*Puccinia sparganioidis*)及酸浆锈菌(*Puccinia physalidis*)亲缘关系最近。从图 4 可知, 栅锈菌科与锈菌目其它各科亲缘关系较远, 与其它各科分聚在不同分支上。

列进行对比。利用 DNA MAN 软件进行多重序列比对, 以邻接法构建系统发育树, 利用 bootstrap 进行检验, 共重复 1 000 次。

2 结果与分析

2.1 女贞锈病症状及病原显微观测

叶片上可看到大量的褐色病斑, 病斑圆形凹陷, 四周有黄色晕圈, 发病后期叶片变厚卷曲, 在叶片背面可以看到杯状锈孢子器(图 1)。夏孢子黄褐色, 卵圆形、梨形或近球形, (15~21.5) μ m \times (16.5~22) μ m, 孢子表面有刺状突起(图 2)。将收集到的锈菌夏孢子保湿接种健康女贞叶片, 发病后与自然发病症状一致, 说明该夏孢子即为女贞锈病病原。

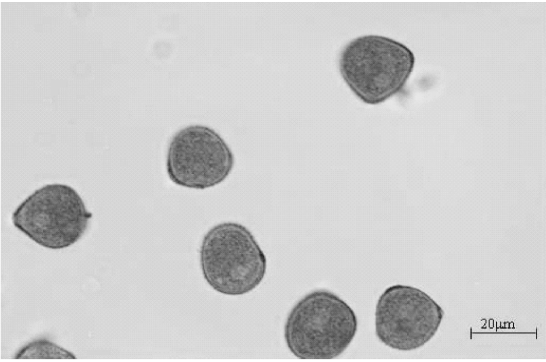


图2 女贞锈菌夏孢子显微结构

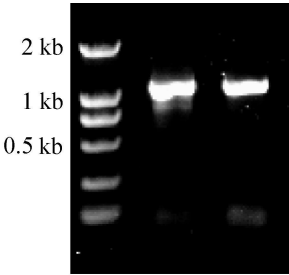


图3 PCR法扩增女贞锈菌28SrDNA 基因

3 结论与讨论

锈菌 DNA 的提取通常采用液氮研磨破壁, 再经 CTAB 裂解细胞壁, 及苯酚和氯仿抽提, 步骤较繁琐。而该试验采用的微波加热破壁法步骤简单, 不需要接触苯酚和氯仿等有毒化学物质, 并且适合大量样品的检测, 对确定锈菌寄主范围及检测极其方便。提取的 DNA 质量虽然不能满足分子标记的要求, 但可用于 PCR 扩增模板。直接把锈菌微波加热, 锈菌孢子不易破壁, 而经诱导其孢子萌发后较易破壁。锈菌的传统分类是根据冬孢子形态为依据, 但是许多锈菌未发现冬孢子, 并且孢子形态不易区分, 且锈菌起源关系不太清晰, 因而根据孢子形态学并借助于其它方法进行分类极其重要。

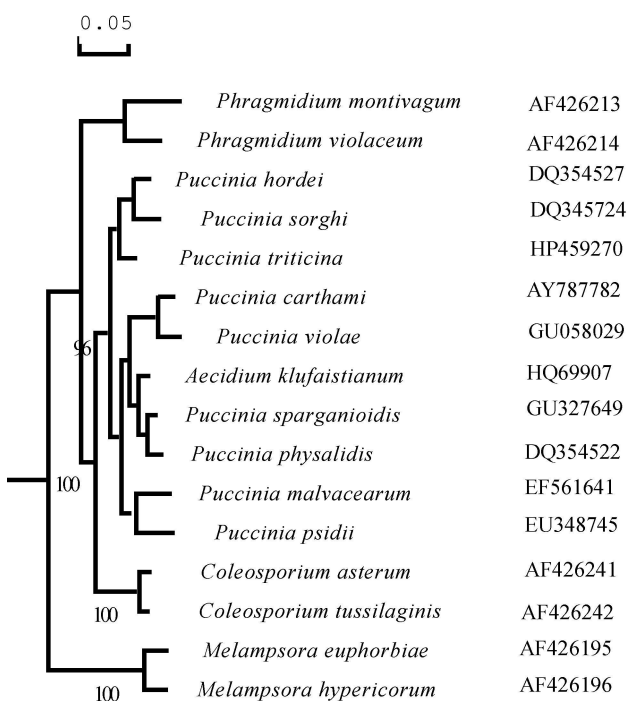


图4 基于28S rDNA序列建立的女贞锈菌与锈菌目其它锈菌聚类树

目前 Catherine 等人根据锈菌 28S rDNA 序列成功的对锈菌进行分类,并揭示了锈菌目进化关系^[5-7]。真菌核糖体 28S 亚基前端 900 bp 包含 3 个基因序列异变区(D1、D2、D3)^[8-10],可以用来进行分类研究,而其它区域基因序列变异不大,对分类意义不大,该研究设计的引物就是用来扩增核糖体异变区。从系统发育树可以看出锈菌目不同科都分别聚类在不同分支上,可以非常方便进行锈菌目下分类研究。另外可知栅锈菌科与锈菌目其它各科亲缘关系较远,聚在不同分支上。可能栅锈

菌科很早就从锈菌目分化出来,或者该目锈菌进化速度较快所致。锈菌往往有转主寄主,而对转主寄主的防控对锈病防治非常有效。因而通过 28S rDNA 检测可以方便对锈菌转主寄主进行检测,并且提早进行病害诊断,对揭示其进化地位及防控有重要意义。

参考文献

- [1] 徐颖,严巍,池杏珍,等.金叶女贞叶斑病的研究[J].中国森林病虫,2002,21(5):12-14.
- [2] 徐东生.农药防治金叶女贞褐斑病的研究[J].北方园艺,2009(4):99-101.
- [3] 何苏琴,金秀琳,王卫成.金叶女贞褐斑病病原鉴定[J].植物保护,2006,32(2):70-72.
- [4] 潘力,崔翠,王斌.一种用于 PCR 扩增的丝状真菌 DNA 快速提取方法[J].微生物学通报,2010,37(3):450-453.
- [5] Aime M C. Toward resolving family-level relationships in rust fungi[J]. Mycoscience, 2006, 47: 112-122.
- [6] Jintana E, Yoshitaka O, Makoto K. Phylogenetic relationships of four *Puccinia* species parasitic on *Artemisia* in Japan[J]. Mycoscience, 2005, 46: 61-65.
- [7] Kaur R, Rouge B, Knott G, et al. First report of rust disease caused by *Puccinia sparganioides* on *Spartina alterniflora* in Louisiana[J]. Plant disease, 2010, 94(5):636.
- [8] Castlebury L. First Report of Rust on Switchgrass (*Panicum virgatum*) Caused by *Puccinia emaculata* in Tennessee[J]. Plant disease, 2008, 92(12):1710.
- [9] Hye Y Y, Young H K, Soon G H, et al. First description of *Coleosporium plectranthi* causing perilla rust in Korea[J]. Plant pathol, 2007, 23(1):7-12.
- [10] Mathew D G, Connie F G, Akihiko T, et al. Ascoma development and phylogeny of an Apothecioid dothideomycete[J]. American journal of botany, 2007, 94(11):1890-1899.

A Report of Rust Disease on Glossy Privet

JIA Li-xia¹, LI Zhi-yong²

(1. Hebei Engineering University, Handan, Hebei 056021; 2. Millet Institute of Agricultural Academy of Hebei Province, Shijiazhuang, Hebei 050031)

Abstract: Privet leaf samples with symptoms of a rust disease were collected from handan city in Hebei province and morphological characteristics of spore were identified based on microscopic examination. Urediniospores were tawny, globose to pear shaped and measured (15~21.5) $\mu\text{m} \times (16.5 \sim 22) \mu\text{m}$. Rust DNA were extracted with microwave and the D1/D2/D3 domain of 28S rDNA were amplified by PCR using the conservative primer. The Phylogenic analysis revealed privet rust belong to Pucciniaceae and was most closely related to *Puccinia sparganioides*. This is the first report of detection of privet rust based on PCR amplification which would provide basic information for further drawing up control measure.

Key words: Glossy privet; rust disease; PCR amplification; phylogenic analysis