

杜鹃褐斑病病原菌的分离与鉴定

潘 欣^{1,2}, 邹立扣³, 彭培好¹, 陈文德¹, 彭俊生¹

(1. 成都理工大学 地球科学学院园林系, 四川 成都 610059; 2. 四川农业大学 林学与园艺学院 四川 雅安 625014;

3. 四川农业大学都江堰分校 微生物实验室, 四川 都江堰 611830)

摘 要: 对杜鹃褐斑病的病原菌进行分离、培养, 进行了形态学鉴定, 并对其 rRNA 基因内转录间区 (ITS 区) 进行了克隆测序, 与 Genbank 中已有的有关序列进行了比较, 确定其病原菌为 *Phomopsis* sp.。

关键词: 杜鹃; 褐斑病; 分离; 鉴定

中图分类号: S 436.8 **文献标识码:** B **文章编号:** 1001-0009(2008)06-0198-03

杜鹃褐斑病是杜鹃上常见的重要病害之一^[1], 全国各地发生较普遍, 严重影响杜鹃花的长势及园林景观, 除危害杜鹃花外, 还危害杜鹃属其他植物^[2-4]。该病主要为害杜鹃花叶片, 初期在叶面产生红褐色小点。随后逐渐扩展为近圆形或因受叶脉限制而呈多角形病斑。后期病斑中央变为黄白色至灰白色, 边缘红褐色(因品种而不同), 病斑中央产生黑色小点, 为病原菌的子实体。虽然该病在各省市均有发生, 但国内对其病原菌分离、纯化及生物学特性方面的研究报道甚少。国内外的一些学者开始采用分子生物学方法对该属进行进一步的研究, 以弥补传统形态学鉴定的不足。而目前国内的研究还集中在形态学鉴定及生物学特性上, 分子方法并未涉及, 因此在这方面可作大胆尝试。

该研究对杜鹃花褐斑病病原菌进行了分离、纯化, 并通过形态学及分子生物学的方法进行了鉴定, 对其 ITS 区进行了 PCR 扩增和克隆测序分析。

1 材料与方法

1.1 杜鹃褐斑病病原菌的分离与形态学特征鉴定

对发病的杜鹃叶片进行徒手切片, 观察分生孢子器及分生孢子形态。从发病的杜鹃上采下褐斑病病叶片, 冲洗干净后, 在叶片的病健交界处切下 5 mm×5 mm 的小块, 用 0.1% 浓度的升汞溶液消毒 3 min, 75% 乙醇溶液中浸泡 1 min, 用无菌水冲洗干净后移于 PDA 平板培养基上, 置于 25℃ 恒温条件下培养。待长出菌丝后, 在菌落边缘用无菌接种针挑取带有菌丝的培养基一块, 移

于 PDA 斜面试管中, 继续放入 25℃ 恒温条件下培养^[5-7]。

1.2 杜鹃褐斑病病原菌分子生物学鉴定

1.2.1 试剂 UltraPure™ 质粒 DNA 小量提取试剂盒(购自赛百胜); 质粒 T 载体, TaqplusDNA 聚合酶, 限制性内切酶, X-gal, IPTG (购自上海生工); 转化宿主细胞大肠杆菌 JM109 (实验室保存); 小量胶回收试剂盒(购自上海华舜生工); 连接试剂盒(购自天泰生命科技)。

1.2.2 菌丝体的培养收集 将分离纯化后的病原菌菌丝接种于 PDA 液体培养基, 25℃ 下, PDA 培养液摇床振荡培养 5~7 d, 转速 120 r/m, 离心收集菌丝体, 用吸水纸尽量吸干水分, 4℃ 保存备用。

1.2.3 DNA 的提取 采用改良氯化苄法^[8], 离心收集菌丝体, 尽量吸干水分, 每克菌丝体加 5 mL 提取液 (100 mM Tris-HCl, 40 mM EDTA, pH 8.0), 振荡使之与菌丝体充分混匀, 再加入 1 mL 10% SDS, 3 mL 氯化苄, 剧烈震荡, 使管内混合物呈乳状。在 50℃ 水浴保温 1 h, 每隔 10 min 振荡混合 1 次。然后加入 3 mL 3M NaOAc, pH 5.2 混匀, 冰水浴 15 min, 6 000 rpm 离心 15 min, 取上清液, 加入等体积的异丙醇室温沉淀 20 min。10 000 rpm 室温离心 15 min, 沉淀用 70% 乙醇洗 1 次, 自然干燥或吹干后溶于 TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0), 加 1 μL RNAase 消化后, 保存于一 20℃ 冰箱备用。提取的 DNA 可在 0.8% 的琼脂糖凝胶上电泳检测。

1.2.4 ITS 区 PCR 扩增引物 采用真菌通用引物 ITS₁ 和 ITS₄, 由上海生工生物工程有限公司提供, 其序列如下: ITS₁ (5'-3'): TCCGTAGGTGAACCTGCGG; ITS₄ (5'-3'): TCCTCCGCTTATTGATATGC。

1.2.5 PCR 扩增体系 PCR 扩增体系 50 μL, 包括超纯水 40.5 μL, 10× Buffer 5.0 μL, 4× dNTP 1.0 μL, ITS₁ 和 ITS₄ 各 1.0 μL, 模板 DNA 1.0 μL, TaqPlus 酶 0.5 μL。反应混合物加 30.0 μL 矿物油覆盖。每个反应为 30 个

第一作者简介: 潘欣(1979-), 女, 在读博士, 讲师, 主要从事森林病理及生态学的研究。

通讯作者: 邹立扣。

基金项目: 成都理工大学“校青年科学基金”资助项目。

收稿日期: 2008-02-09

循环, 每个循环包括 95℃变性 1 min, 55℃退火 1 min, 72℃延伸 1 min, 首次循环先在 95℃预变性 3 min, 最后 1 次循环后在 72℃延伸 3 min。扩增产物经 0.8%琼脂糖凝胶电泳 (Goldenview 染色, 购自赛百胜) 后用凝胶成像系统 (BIO-RAD) 观察并保存。分子量标准为赛百胜公司提供的 DL 2000。

1.2.6 PCR 产物的回收、连接与转化 用上海华舜生物工程有限公司的小量胶回收试剂盒, 按说明书提供的方法即可完成回收。用成都天泰生命科技有限公司提供的连接试剂盒连接 PCR 片段与 pUCm-T 载体。用氯化钙法制备新鲜的大肠杆菌感受态细胞 (按《分子克隆实验指南》第三版)。将重组质粒 DNA 转入感受态细胞

JM109, 取适量菌液涂布于 Amp 抗性平板 (含 X-gal, IPTG) 上, 37℃培养 16~24 h, 放于 4℃使显色完全。

1.2.7 阳性重组质粒的筛选和鉴定 经蓝白筛选, 进行菌落 PCR 鉴定, 反应体系与反应条件同前。将 PCR 初步筛选阳性的重组质粒 DNA 用限制性内切酶 SalI 和 EcoRI 进行酶切证实。酶切体系总体积 10 μL, 混匀后 37℃水浴 3 h, 电泳检测。

1.2.8 DNA 测序 利用 UltraPure™ 质粒 DNA 小量提取试剂盒 (购自赛百胜) 提取高纯度的质粒 DNA, 用于测定插入片段的碱基序列。样品送上海生工生物工程技术有限公司测序。

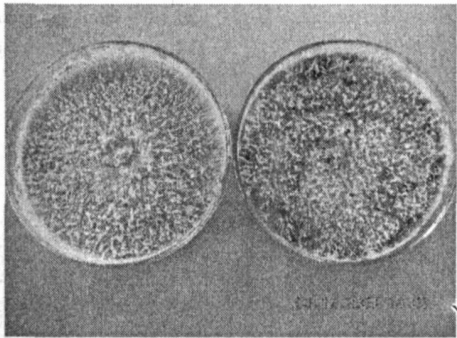


图 1 杜鹃褐斑病组织培养菌落形态

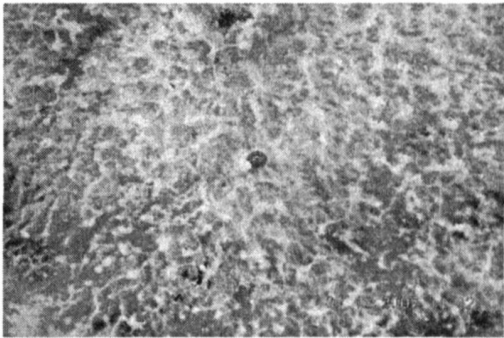


图 2 菌落局部 (示黑色颗粒状子实体)

(左: 培养 1 周后; 右: 培养 2 周后)

2 结果

2.1 病原菌的形态学特征及培养形状

病叶切片镜检, 分生孢子器具有长短不等的颈, 颈的开口常有液滴状的分生孢子群, α 型分生孢子椭圆至纺锤形, 内具油滴, 5~9 μm×2~3.5 μm。未见典型的 β 型孢子。

PDA 培养基上菌落呈白色绒毛状, 菌丝生长较为缓慢 1 周后满皿, 14 d 后菌落上出现散生的黑色小颗粒子实体 (如图 1, 图 2), 培养基背面变成黑褐色。

2.2 病原菌 ITS 区的序列系统发育分析

Length: 578bp (见图 3)。
将所得的 *Phomopsis sp.* 的 ITS 区序列分别与 GenBank 中已有的序列进行比较, 并构建了系统发育树 (见图 4)。

从图 4 及图 5 中可以看出, 病原菌 ITS 区与 *Phomopsis* 若干种有着较高的同源性, 其同源率最高达到 97.3%。根据形态学及分子生物学特征, 鉴定该菌为 *Phomopsis sp.*。

TCCGTAGCTGAACCTGCGGAGGGATCATTGCT
GGAACGCGCCCTAGGCGCACCCAGAAACCCTTT
GTGAACCTTATACCTTTTGTGCTCGGCGCATGC
TGGTCTCCAGTAGGCCCCCTACCCCCGTGAGGA
GACGGCACGCCGGCGGCCAAGTTAACTCTTGTCT
TTAACTGAAACTCTGAGAAAAACACAATGA
ATAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTG
GCATCCGATGAAGAACGCAGCGAATGCGATAA
GTAATGTGAATTGCAGATTTCAGTGAATCATCG
AATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTCTGGTATTCT
CGGAGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTCAAC
CCTCAAGCATTGCTTGGTGTGTTGGGGCACTGCTT
TTTACCAAGCAGGCCCTGAAATCTAGTGGCGAG
CTCGCCAGGACCCCGAGCGCAGTAGTTAAACCCCT
CGCTCTGGAAGGCCCTGGCGGCGCCCTGCCGTT
AAACCCCCAACTTTTGAAAATTTGACCTCGGA
TCAGGTAGGAATACCCGCTGAACTTAAGCATAT
CAATGACGCGGAGGA

图 3 *Phomopsis sp.* ITS 区序列

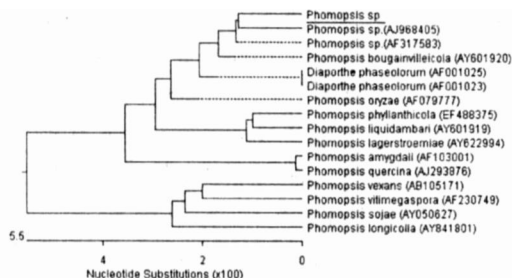


图 4 根据 *Phomopsis* 属不同种类的 ITS 序列构建的系统发育树

3 讨论

严巍, 徐颖等^[3] 曾对引起杜鹃红斑病和褐斑病的病原物进行了分离鉴定, 得出 *Diplodia. sp* 是引起杜鹃红斑病的主要病原菌, *Pestalotiopsis. sp* 是引起杜鹃褐斑病的主要病原菌。现通过病叶切片观察以及组织培养, 虽然病原菌培养性状与前人研究较为接近, 但分生孢子

形态有较大的差异。

曾在国内首次对杜鹃褐斑病病原菌的 ITS 区基因片段进行了成功的 PCR 扩增、克隆及测序, 并根据其 ITS 区序列以及 *Genbank* 中查到的有关序列构建了亲缘关系树状图, 与该图所反映的种间与种内关系与形态学分类结果一致。由图 4, 5 可以看出, 病原菌与这另外 8 个种 (菌株) 即 AF001025、AF001023、AJ968405、AY601920、AF079777 和 AF317583 的同源率均在 90.1% 以上, 而与其它种的同源率也在 78.4% 至 89.2% 之间, 但仍然高于其它种间的差异, 如 EF488375 与 AY841801 之间同源率为 77.3%, 反映了种间较大的遗传差异。根据形态学及分子生物学特征, 最终鉴定该菌为 *Phomopsis sp.*。因此认为 ITS 序列分析与形态学特征相结合是鉴定杜鹃褐斑病病原菌的一个较好的方法, 这与相关报道也是一致的^[9-10]。

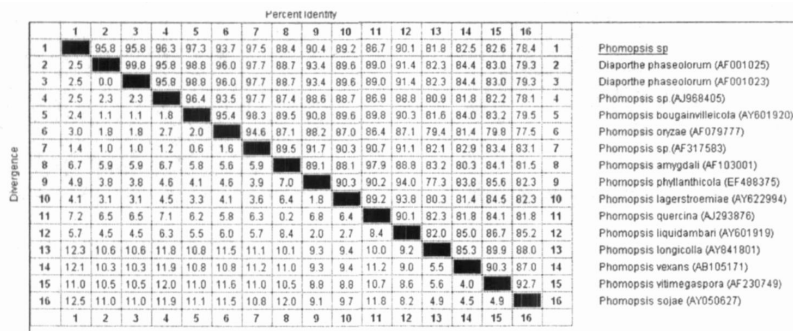


图 5 *Phomopsis* 属不同种的 ITS 序列同源性

参考文献

[1] 黄茂如. 杜鹃花[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1998.
 [2] 张乐华. 杜鹃叶斑病的初步调查[J]. 森林病虫通讯, 1993(1): 28-30.
 [3] 严巍, 徐颖, 池杏珍. 杜鹃两种病害的初步调查[J]. 中国森林病虫, 2002, 21(6): 16-19.
 [4] 徐明慧. 园林植物病虫害防治[M]. 北京: 中国林业出版社, 1993.
 [5] 陈利锋, 王静之, 徐雅皋. 杜鹃茎基腐病病原菌的鉴定[J]. 植物保护学报, 1997, 24(3): 254-256.
 [6] 李秀艳, 张革, 陈军. 杜鹃花枯梢病病原菌的研究[J]. 森林病虫通讯,

1999(1): 29-31.

[7] 王琪, 赖传雅, 廖咏梅. 龙眼褐斑病病原及其生物特性[J]. 植物病理学报, 2003, 33(5): 406-410.
 [8] 朱衡, 瞿峰, 朱立煌. 利用氯化苄提取适用于分子生物学分析的真菌 DNA[J]. 真菌学报, 1994, 13(1): 34-40.
 [9] 骆志成, 王端礼, 李若瑜, 等. 烟曲霉 rRNA 基因 ITS 区的克隆测序分析[J]. 菌物系统, 2000, 19(3): 336-341.
 [10] 陈永青, 姜子德, 戚佩坤. RAPD 分析与 ITS 序列分析在拟茎点霉分类鉴定上的应用[J]. 菌物系统, 2002, 21(1): 39-46.

Isolation and Identification of Pathogens that Caused Rhododendron Brown Patch

PAN Xin^{1,2}, ZOU Li-kou³, PENG Pei-hao¹, CHEN Wen-de¹, PENG Jun-sheng¹

(1. College of Earth Science of Chengdu University of Technology, Chengdu, Sichuan 610059, China; 2. College of Forestry and Landscape of Sichuan Agricultural University of Technology, Ya'an, Sichuan 625014, China; 3. Lab of Microbiology of Dujiangyan Campus, Sichuan Agricultural University, Dujiangyan, Sichuan 6211830, China)

Abstract: The pathogen of rhododendron caused brown patch was isolated and cultivated. Both morphological and molecular methods were used to identify the pathogen. The internal transcribed spacer(ITS) region in rRNA gene was cloned and sequenced, and the sequence was compared with others species in Genbank. The results showed that the *Phomopsis sp.* was the pathogen of rhododendron brown patch.

Key words: Rhododendron; Brown patch; Isolation; Identification