

河南省烟草低头黑病的病原鉴定

王海涛¹, 苗圃², 李淑君¹, 赵丹², 白静科², 康业斌^{2*}

(1. 河南省农业科学院烟草研究所, 河南 许昌 461000; 2. 河南科技大学林学院, 河南 洛阳 471000)

摘要: 为了明确引起河南省烟草低头黑病的病原菌, 在襄城、舞阳两县采集表现烟草低头黑病症状的病株, 采用组织分离与单孢分离相结合的方法分别获得Ⅰ号和Ⅱ号2个菌株。形态学鉴定结果表明: 在PDA培养基上, 菌落正面初期呈白色、黄色或灰色等变化, 但后期均能产生分生孢子盘、刚毛、分生孢子梗与分生孢子。rDNA-ITS序列分析结果表明, 菌株Ⅰ号和菌株Ⅱ号属于同一个种, 其序列与序列号为DQ286158.1和HM231266.1的辣椒炭疽菌(*Colletotrichum capsici*) ITS序列同源性分别均为100%和99%。因此, 河南省烟草低头黑病的病原菌可确定为辣椒炭疽菌 [*Colletotrichum capsici* (Syd.) Butler & Bisby]。

关键词: 烟草; 低头黑病; 辣椒炭疽菌; 鉴定

中图分类号: S435.72 **文献标志码:** A **文章编号:** 1004-3268(2013)11-0086-04

Identification of Pathogen Causing Tobacco Black Death Disease in Henan Province

WANG Hai-tao¹, MIAO Pu², LI Shu-jun¹, ZHAO Dan², BAI Jing-ke², KANG Ye-bin^{2*}

(1. Tobacco Research Institute, Henan Academy of Agricultural Sciences, Xuchang 461000, China;

2. College of Forestry, Henan University of Science and Technology, Luoyang 471000, China)

Abstract: In order to identify the pathogen causing tobacco black death disease in Henan province, two strains were isolated from the disease infected plants in Xiangcheng and Wuyang by the methods of tissue separation and single spore isolation. The pathogens were identified based on their morphological characteristics and ITS sequences. Studies on the pathogens showed that colonies were initially white, yellow or gray on PDA medium, and they all produced acervuli, bristles, conidiophores, and conidia. Two strains were identified as the same species based on their rDNA-ITS, which displayed 100% and 99% identities with DQ286158.1 and HM231266.1, respectively. It is confirmed that *Colletotrichum capsici* (Syd.) Butler & Bisby is the causal organism of tobacco black death disease in Henan province.

Key words: tobacco; black death disease; *Colletotrichum capsici*; identification

烟草低头黑病多发生于烟株茎、叶部, 茎部发病时一侧先形成直径0.2~0.3 mm的圆形或椭圆形小黑斑, 逐渐向上、向下扩展成下陷条斑, 顶芽随之向有病的一侧弯曲, 呈“低头”状, 最后全株变黑枯死, 故称“低头黑病”。在我国该病最早发现于潍坊市, 20世纪50年代其危害程度不亚于烟草黑胫病,

至90年代仍是山东烟区第二大根茎病害。1963年, 陈瑞泰等首次报道该病病原菌属于半知菌亚门、炭疽菌属(*Colletotrichum*), 但种名未定^[1]。张广民等^[2]对山东青州低头黑病病原分离物进行单孢分离培养、形态特征观察、致病性和寄主范围测定, 将其鉴定为辣椒炭疽菌(*Colletotrichum capsici*)的新变

收稿日期: 2013-05-08

基金项目: 中国烟草总公司项目(110200902065); 河南省烟草公司项目(2010)

作者简介: 王海涛(1972-), 男, 湖北枝江人, 副研究员, 主要从事烟草植保研究。E-mail: wanght3231@163.com

* 通讯作者: 康业斌(1964-), 男, 河南唐河人, 教授, 主要从事植物免疫学研究。E-mail: kangyb999@163.com

型——辣椒炭疽菌烟草变型 [*Colletotrichum capsici* (Syd.) Butler & Bisby f. *nicotlanae* G. M. Zhang & G. Z. Jiang f. nov.]。河南烟区也曾遭受低头黑病的危害,1964 年、1980 年分别报道长葛县、襄城县有该病的零星发生^[3],总体上危害较轻。2011 年 8 月,笔者在进行烟田有害生物调查时发现,襄城县和舞阳县有少量低头黑病疑似病株,发病品种均为中烟 100,严重地块病株率在 2% 左右,且呈现危害加重的趋势。本研究采取形态学观察结合分子生物学方法对上述病株的病原菌进行鉴定,以期为该病的准确诊断及对症防治提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 植物材料

2011 年 8 月从襄城县和舞阳县田间采集具烟草低头黑病典型症状的疑似病株。

1.2 试验方法

1.2.1 病原菌的分离纯化 将取自襄城、舞阳两地的病株按常规组织分离法^[4],在无菌条件下分别切取病部组织,剪成 3 mm×3 mm 大小的组织块,置于 PDA 培养基平板上 25℃ 光/暗(12 h/12 h)培养;分离纯化后,经单孢分离获得病原菌的纯培养物。从襄城、舞阳获得的菌株分别编号为 I 号和 II 号。

1.2.2 病原菌的培养性状观察 单孢菌株在 PDA 培养基上培养 5 d 后,用直径 5 mm 的打孔器打取菌饼,转接于 PDA 平板中央,25℃ 光/暗(12 h/12 h)培养,7 d 后观察菌落特征。

1.2.3 载孢体与分生孢子观察 挑取自然病株和 PDA 培养基上的病原菌子实体,置于载玻片上,在光学显微镜下观测载孢体与分生孢子的大小与形态。

1.2.4 rDNA-ITS 序列测定及分析 菌株 I 号和菌株 II 号在 PDA 培养基上培养 5~7 d 后,刮取菌丝体及上面的小黑点,用 CTAB 法^[5-6]提取 DNA,琼脂糖凝胶电泳检测所提取 DNA 的纯度。利用通用引物 ITS1 和 ITS4 对 DNA 进行 PCR 扩增,设计 25 μL PCR 反应体系,反应条件为:94℃ 预变性 5 min;94℃ 变性 45 s,54℃ 退火 45 s,72℃ 延伸 105 s,共 30 个循环;最后 72℃ 延伸 10 min。反应结束后,将扩增产物用 1% 琼脂糖凝胶进行电泳,BST-20M 型凝胶成像系统检测并记录扩增产物的电泳图谱。将扩增产物送交生工生物工程(上海)股份有限公司进行序列测定,对测序结果在 GenBank 中进行 BLAST 比对。使用 ClustalX 1.83 软件^[7]

对自测序列以及从 GenBank 下载的相关序列进行比对后,利用 MEGA 5 软件^[8]以距离法(neighbor-joining 法)^[9-11]构建系统发育树。

2 结果与分析

2.1 烟草病株症状

发病初期,茎部出现黑斑,并沿茎的一侧逐渐向上蔓延至顶芽(图 1a),由于受害一侧枯萎,顶芽逐渐向受害一侧弯曲(图 1b),最终致全株枯萎死亡。病部皮层下密生小黑点,即病原菌的分生孢子盘,发育成熟后突破表皮,病害后期,可见小黑点密集排列呈椭圆形(图 1c)。

2.2 病原菌的培养性状

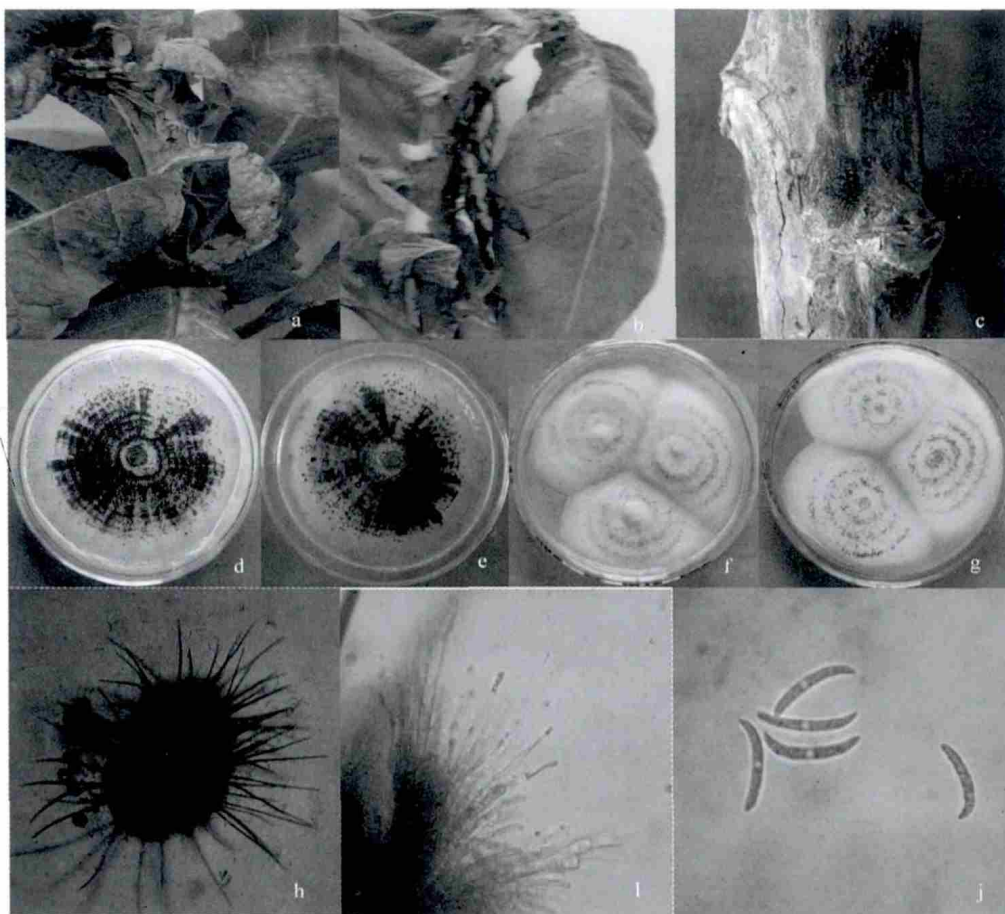
菌株 I 号和菌株 II 号在 PDA 培养基上的生长性状不同。菌株 I 号菌落圆形,边缘整齐,菌丝生长密实,正面初呈白色,渐变为灰白色,绒毛状,分生孢子盘初期埋生,7 d 左右突出培养基表面,呈轮纹状排列,并有灰褐色胶黏物溢出,即分生孢子团(图 1d);菌落背面浅黄褐色,有零星褐色点状物,5 d 后能清晰看见黑色小点粒,即分生孢子盘(图 1e)。菌株 II 号菌落正面初期呈白色、黄色或灰色,菌丝稀疏,边缘整齐,5 d 后渐变为灰白色(图 1f),背面褐色,出现散生小黑点,并逐渐增多,以接种点为中心呈轮状与辐射状排列(图 1g)。

2.3 病原菌的子实体特征

菌株 I 号和菌株 II 号子实体特征相同。寄主病部表皮层下密生小黑点状分生孢子盘,发育成熟后突破表皮,直径为 56.8~149.6 μm;刚毛深褐色,直立,散生于分生孢子盘中,3~5 个分隔,末端渐细,大小为(41.3~221.9)μm×(2.6~7.7)μm(图 1h);分生孢子梗无色,圆柱形或棒状,密集栅栏状排列(图 1i);分生孢子无色,单胞,新月形,内含油球,大小为(16.1~28.4)μm×(3.6~5.8)μm(图 1j)。分生孢子萌发时中部产生一隔膜,于一端或两端产生芽管,芽管顶端或分枝顶端产生附着胞。

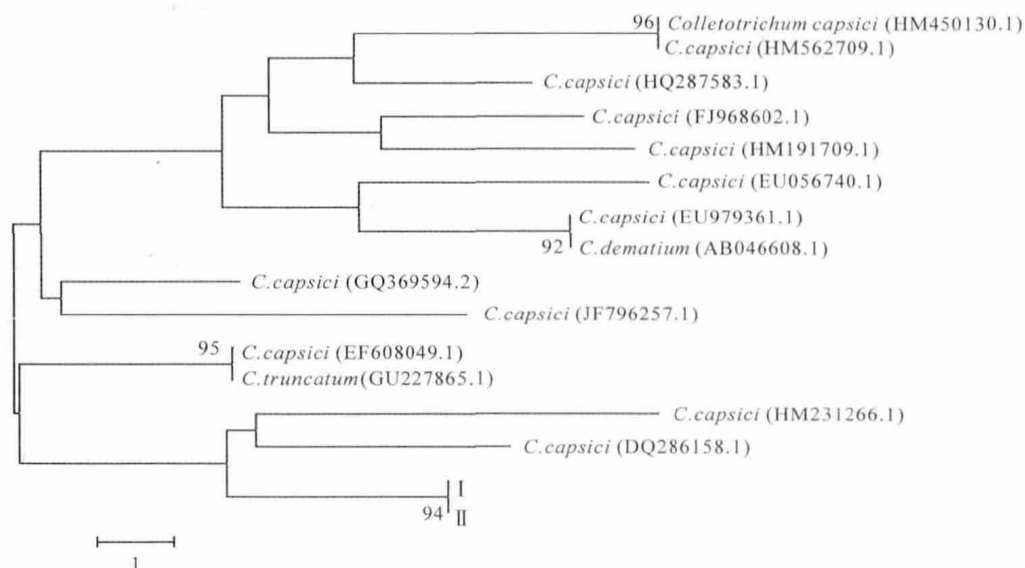
2.4 病原菌 rDNA-ITS 序列分析

对菌株 I 号和菌株 II 号 rDNA-ITS 进行 PCR 扩增和序列测定后,利用 MEGA 5 软件构建系统发育树(图 2)。结果显示,从襄城县和舞阳县分离到的 2 个菌株聚在一起,获得 94% 的自展支持率,且这 2 条序列与序列号 DQ286158.1 和 HM231266.1 的 ITS 序列同源性分别为 100% 和 99%,表明从襄城县和舞阳县分离到的 2 株烟草低头黑病菌属于同一个种,均为辣椒炭疽菌(*C. capsici*)。



a. 症状初期; b. 症状中期; c. 症状后期; d. 菌株 I 号菌落正面观; e. 菌株 I 号菌落背面观;
f. 菌株 II 号菌落正面观; g. 菌株 II 号菌落背面观; h. 分生孢子盘、刚毛; i. 分生孢子梗; j. 分生孢子

图 1 烟草低头黑病症状及病原特征



Colletotrichum capsici 为辣椒炭疽菌; *Colletotrichum dematium* 为黑线炭疽菌;
Colletotrichum truncatum 为平头炭疽菌

图 2 菌株 I 号和菌株 II 号系统发育树

3 结论与讨论

炭疽菌属的特征主要为分生孢子盘一般生于寄

主表皮下,常产生褐色、有分隔、表面光滑、顶部渐尖的刚毛;分生孢子梗无色至褐色,具分隔;产孢细胞无色,圆柱形,以内生芽殖的方式产生分生孢子;孢

子无色、单胞、柱状或新月形,萌发后芽管顶端产生附着胞^[12]。本试验观察到的菌株 I 号和菌株 II 号的培养性状、子实体特征与炭疽菌属的属级特征相一致,测量结果与张广民等^[2]、贲海燕^[13]、肖杰文等^[14]报道的辣椒炭疽菌(*C. capsici*)特征相一致。在 20 世纪 90 年代之前,炭疽菌属真菌的分类主要依赖于形态学方法。由于该属真菌的纯培养特征及孢子和附着胞形态不稳定,且具有广泛的寄主范围,导致形态分类出现较大的混乱^[15-16]。随着分子生物学手段的发展,基于分子标记的系统学方法被引入该属真菌的分类^[17],随后得到广泛的应用^[18-20]。本试验对供试菌株 rDNA-ITS 进行 PCR 扩增和序列测定后,在 GenBank 中进行 BLAST 比对,以距离法构建系统发育树,结果表明,供试菌株 DNA 序列与序列号 DQ286158.1 和 HM231266.1 的 ITS 序列同源性分别为 100% 和 99%,其均为 *C. capsici*。

通过形态学鉴定和分子生物学鉴定证明,引起河南省烟草低头黑病的病原菌为辣椒炭疽菌 [*Colletotrichum capsici* (Syd.) Butler & Bisby]。

致谢:试验得到襄城县、舞阳县烟草分公司的大力支持,在此表示谢忱。

参考文献:

- [1] 陈瑞泰,韩晓东. 烟草低头黑研究 I 诊断与接种方法[J]. 山东农业科学,1963(1):2-6.
- [2] 张广民,王智发,陈泰瑞,等. 烟草低头黑病原菌的研究[J]. 植物病理学报,1994(4):367-371.
- [3] 王守正. 河南省经济植物病害志[M]. 郑州:河南科学技术出版社,1994.
- [4] 方中达. 植病研究方法[M]. 3 版. 北京:中国农业出版社,1998.
- [5] 楼兵干,陈吴健,林钊,等. 一种新大豆豆荚炭疽病症状类型及其病原鉴定[J]. 植物保护学报,2009,36(3):229-233.
- [6] 赵思峰,方许阳,姜海荣,等. 新疆加工番茄腐霉根腐病原鉴定及其 rDNA 的 ITS 区段分析[J]. 植物保护学报,2009,36(3):219-224.
- [7] 尹智刚. 多序列对比 Clustal W 并行算法研究[D]. 大连:大连理工大学,2005.
- [8] 刘琳,刘洋,刘红娟. 基于 16S rDNA 的系统发育分析在微生物进化关系中的应用[J]. 生物学通报,2008,43(11):4-6.
- [9] 冯思玲. 系统发育树构建方法研究[J]. 信息技术,2009(6):38-44.
- [10] 吕宝忠,钟扬,高丽萍,等. 分子进化与系统发育[M]. 北京:高等教育出版社,2002.
- [11] 曹清毅,侯晓丽,吴昊,等. 应用系统发育分析方法鉴别近缘病原菌[J]. 浙江大学学报:医学版,2007,36(6):531-536.
- [12] Hyde K D, Cai L, Cannon P F, et al. *Colletotrichum* names in current use [J]. Fungal Diversity, 2009, 39: 147-182.
- [13] 贲海燕. 我国北方主要花卉新病害及病原鉴定[D]. 哈尔滨:东北农业大学,2008.
- [14] 肖杰文,刘月廉,肖俊祥,等. 巴西大豆中炭疽菌的分离鉴定研究[J]. 中国农学通报,2011,27(5):333-337.
- [15] Du M, Schardl C L, Nuckles E M, et al. Using mating-type gene sequences for improved phylogenetic resolution of *Colletotrichum* species complexes [J]. Mycologia, 2005, 97: 641-658.
- [16] Thaug M M. Coelomy cetesystematics with special reference to *Colletotrichum* [J]. Mycologia Science, 2008, 49: 345-350.
- [17] Sherriff C, Whelan M J, Arnold G M, et al. Ribosomal DNA sequence analysis reveals new species groupings in the genus *Colletotrichum* [J]. Experimental Mycology, 1994, 18: 121-138.
- [18] Crouch J A, White J F J, Clarke B B, et al. Systematic analysis of the falcate spored graminicolous *Colletotrichum* and a description of seven new species from warm season grasses [J]. Mycologia, 2009, 101: 717-732.
- [19] Moriwaki J, Sato T, Tsukiboshi T. Morphological and molecular characterization of *Colletotrichum boninense* sp. nov. from Japan [J]. Mycoscience, 2003, 44: 47-53.
- [20] Farr D F, Aime M C, Rossman A Y, et al. Species of *Colletotrichum* on Agavaceae [J]. Mycological Research, 2006, 110: 1395-1408.