

引用格式:

肖艳松, 钟权, 吴文信, 李思军, 朱俊子, 钟杰. 湖南烟草靶斑病的病原鉴定及分子检测[J]. 湖南农业大学学报(自然科学版), 2020, 46(6): 711–715.

XIAO Y S, ZHONG Q, WU W X, LI S J, ZHU J Z, ZHONG J. Pathogen identification and molecular detection of tobacco target spot in Hunan Province[J]. Journal of Hunan Agricultural University(Natural Sciences), 2020, 46(6): 711–715.

投稿网址: <http://xb.hunau.edu.cn>



湖南烟草靶斑病的病原鉴定及分子检测

肖艳松¹, 钟权¹, 吴文信¹, 李思军¹, 朱俊子², 钟杰^{2*}

(1.湖南省烟草公司郴州市公司, 湖南 郴州 423000; 2.植物病虫害生物学与防控湖南省重点实验室, 湖南 长沙 410128)

摘要: 2019至2020年,在湖南省郴州、永州、湘西和常德烟区发生了一种严重的叶部病害,表现为叶部出现圆形或不规则黄褐色病斑,有不规则同心纹,病斑周围可见黄绿色晕圈,后期易破裂穿孔。经组织分离、形态学观察、分子鉴定以及柯赫氏法则验证,确定该病害为烟草靶斑病,病原为立枯丝核菌(*Rhizoctonia solani* Kola)。在此基础上,以烟草靶斑病菌 rDNA-ITS 序列为靶标,设计特异性引物 Rs-1,建立了特异性针对靶斑病菌的 PCR 检测体系,从烟草病斑处检测烟草靶斑病菌。

关键词: 烟草; 烟草靶斑病; 立枯丝核菌; 湖南

中图分类号: S435.72

文献标志码: A

文章编号: 1007-1032(2020)06-0711-05

Pathogen identification and molecular detection of tobacco target spot in Hunan Province

XIAO Yansong¹, ZHONG Quan¹, WU Wenxin¹, LI Sijun¹, ZHU Junzi², ZHONG Jie^{2*}

(1.Chenzhou Tobacco Company of Hunan Province, Chenzhou, Hunan 423000, China; 2.Hunan Provincial Key Laboratory for Biology and Control of Plant Diseases and Insect Pests, Changsha, Hunan 410128, China)

Abstract: From 2019 to 2020, a serious leaf disease was found in Hunan Province including Chenzhou, Yongzhou, Xiangxi and Changde. Symptoms displayed as round or irregular brown spots, with irregular concentric pattern and yellow-green halo and later the infected leaves were easy to rupture and perforate. The pathogen was confirmed to be *Rhizoctonia solani* Kola via tissue isolation, morphological observation, molecular identification and Koch's Postulates. On this basis, a direct PCR method for detection of tobacco target spot was established using the specific primers Rs-1F and Rs-1R designed based on the rDNA-ITS sequence of the pathogen. Using this method, the pathogen fungus could be detected directly from the disease spots on tobacco leaves.

Keywords: tobacco; tobacco target spot; *Rhizoctonia solani*; Hunan Province

巴西最早发现烟草靶斑病^[1]。此后,该病害在哥斯达黎加、美国北卡罗来纳州严重发生,南非、意大利、保加利亚和津巴布韦等国家也有烟草靶斑病发生,严重时造成 80% 以上的损失^[2-3]。2005 年,吴元华等^[4]首次报道在中国辽宁省丹东烟区发现烟

草靶斑病;随后,陆续有吉林、黑龙江、广西烟区^[5]发生该病害的报道。2016 年,云南省普洱市和临沧市烟区靶斑病暴发流行,造成烟叶绝收^[6]。2019 至 2020 年,笔者在对湖南省烟草病害进行调研时,发现郴州、永州、湘西和常德烟区发生了疑似靶斑病

收稿日期: 2020-06-12

修回日期: 2020-09-01

基金项目: 湖南省郴州市烟草公司项目(CZYC2020JS04)

作者简介: 肖艳松(1981—),女,湖南邵阳人,高级农艺师,主要从事烤烟栽培及植保技术研究, xiaoyansong106@126.com; *通信作者, 钟杰, 博士, 副教授, 主要从事植物病理学研究, wzzhtx@sina.com

的病害,遂对病害叶片进行标本采集、组织分离、形态学和分子生物学以及柯赫氏法则鉴定,并建立了简易的检测方法。现将结果报告如下。

1 材料与方方法

1.1 材料来源

2019 至 2020 年,对湖南省郴州、永州、常德、湘西烟区发生的一种叶部病害进行调查,采集具有典型叶部发病症状的烟草叶片。

1.2 方法

1.2.1 病原菌分离纯化及鉴定

利用常规组织分离法^[7]对病叶进行病原菌分离。取病健交界处组织小块,经 75%乙醇和 0.1% HgCl₂ 消毒、无菌水漂洗后,接种于马铃薯葡萄糖琼脂培养基(PDA、含链霉素 50 μg/mL)上,26 °C 黑暗培养。待长出菌落后转接于 PDA 培养基进行纯化培养,纯化菌株保存备用。

将纯化的菌株接种于 PDA 培养基平板,26 °C 黑暗培养 7 d 后,观察菌落形态、颜色,测量其生长速率。根据病原菌的培养性状和显微形态对病原菌进行形态学鉴定。

根据柯赫氏法则对菌株进行致病性测定^[8]。选取 2 个月大小盆栽烟草(云烟 87)进行接种。每个菌株接种 3 盆。菌株在 PDA 培养基培养 7 d 后,打取菌落边缘菌饼,接种于烟草叶片,以无菌丝的琼脂块为对照。将植株放置于保湿装置中 25 °C 保湿 2 d 后,置于正常温室培养。观察记录发病情况。叶片发病后从病斑处再次分离病原菌并进行鉴定。

将分离纯化的菌株接种于 PDA 培养基上,26 °C 培养 7 d。刮取菌丝,采用 SDS-NaCl 方法提取病原菌 DNA^[9]。以此为模板,对菌株的 rDNA-ITS 进行 PCR 扩增^[10]。PCR 扩增反应体系为:2×Es Taq Master Mix 25 μL,总 DNA 模板 2 μL,10 μmol/L 上、下游引物各 2 μL,ddH₂O 19 μL。PCR 反应程序为:95 °C 预变性 5 min;95 °C 变性 30 s,56 °C 退火 30 s,72 °C 延伸 45 s,共 30 个循环;最后 72 °C 延伸 10 min,4 °C 保存。PCR 产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳进行检测后,委托上海生物工程有限公司测序。将测得的序列用 BLASTn 从 NCBI 数据库进行同源性查找,通过 MEGA 6 软件的 ClustalW 比对后,

用邻接法(NJ)构建系统进化树,采用自举法进行 1 000 次重复检验^[11]。

1.2.2 烟草靶斑病病原菌分子检测方法的建立

取 0.1 g 病原菌菌丝于 1.5 mL 离心管中,加入 100 μL 1×TE 溶液,用无菌枪头捣碎,12 000 g 离心 5 min,吸取上清,即获得真菌 DNA 粗提物。

基于 rDNA-ITS 序列,设计烟草靶斑病菌特异性引物 Rs-1,上游 5'-ATCGATGAAGAACGCAGC GA-3'和下游 5'-GGTGTGAAGCTGCAAAGACC-3',对从病原菌提取的 DNA 进行 PCR 扩增,进行引物特异性检测。以烟草赤星病菌的 rDNA-ITS 序列设计特异性引物 Aa-1,上游 5'-GAACCTCTCGGGT TACAGC-3',下游 GCGAGTCTCCAGCAAAGCTA-3',作为对照引物,以烟草赤星病菌、炭疽病菌和烟草黑胫病菌为对照菌株。

在田间采集烟草靶斑病和赤星病发病的烟草植株。选取带不同大小病斑的叶片,剪取叶片病斑部分。提取带病斑叶片 DNA,分别用引物 Rs-1 和 Aa-1 进行 PCR 检测,并以无症状健康烟草叶片为对照。

2 结果与分析

2.1 烟叶病害的症状

2019 年至 2020 年,在湖南省郴州、永州、常德、湘西烟区发现的类似烟草靶斑病的叶部病害,从烟草下部叶片开始发病,迅速向上部叶片扩展。发病初期病斑小,水浸状,后扩展成近圆形或不规则形状,边缘黄褐色,中央颜色略浅,有不规则同心纹,迎着光线,可观察到病斑中央有灰白色靶点,病斑周围可见褪黄绿色晕圈。后期病斑易破裂穿孔,且病斑融合引起叶片枯萎坏死(图 1)。



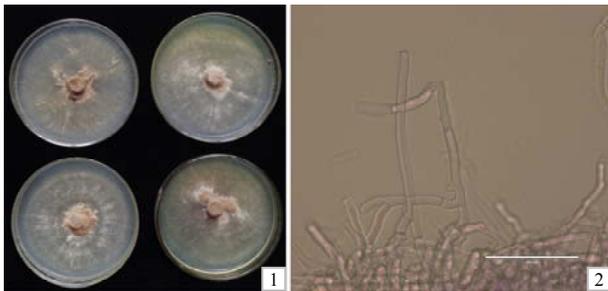
1 烟株苗期叶片病害症状;2、3 成株期烟叶病害症状。

图 1 烟叶病害的症状

Fig.1 Field symptoms of tobacco target spot

2.2 分离病原菌的鉴定结果

对采集的烟草叶片病样进行组织分离，共获得 28 个菌落形态一致的菌株。将分离的菌株于 PDA 培养基上 26 °C 恒温培养，生长速率为 24.80 mm/d。菌丝初为白色，后变为黄褐色。菌丝有分隔，分支夹角接近 90°，在分割处有缢缩，且分隔处附近有隔膜(图 2)。



1 分离菌株 PDA 培养 7 d 的形态；2 分离菌株的菌丝形态。

图 2 分离菌株菌落及菌丝的形态

Fig.2 Morphological characteristics of the isolated fungal strains

利用菌饼活体接种云烟 87 叶片，4 d 后烟草叶片出现明显的坏死症状：病斑初为水浸状，后逐渐扩大，周围有黄色晕圈，病斑易穿孔(图 3)。从接种发病病斑处再次分离得到的病原菌，经形态学和分子检测，鉴定为烟草靶斑病菌。根据柯赫氏法则，确定该病害为烟草靶斑病，病原为立枯丝核菌 (*Rhizoctonia solani*)。



图 3 分离菌株接种烟草后叶片发病症状

Fig.3 Pathogenicity test for the isolated pathogen fungal strains

对代表菌株 CZBB-Y1 的 rDNA-ITS 基因区域进行 PCR 扩增测序，获得了长度约为 697 bp 的片段。将测得的序列提交至 NCBI 的 GenBank(登录号 MW255345)，BLASTn 同源性搜索比对显示，其与 *R. solani* AG-3 的 ITS 序列具有 100% 的一致性，序

列覆盖率为 96%。利用 ITS 构建系统进化树，结果，菌株 CZBB-Y1 与 *R. solani* 聚在一簇(图 4)。结合形态特征和分子鉴定，确定菌株 CZBB-Y1 为立枯丝核菌(*Rhizoctonia solani*)。

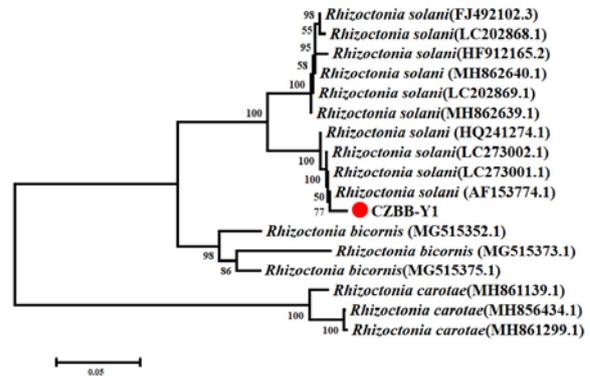
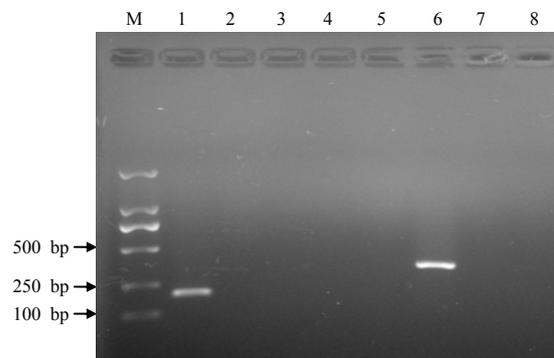


图 4 基于靶斑病菌株 CZBB-Y1, *R. solani* 和其他 *Rhizoctonia* 属菌株 ITS 序列的系统进化树

Fig.4 Phylogenetic tree based on the ITS sequences of the CZBB-Y1, *R. solani* and other *Rhizoctonia* species

2.3 烟草靶斑病菌的分子检测

烟草靶斑病常与赤星病混合发生，易混淆。为了对烟草靶斑病进行及时准确的诊断，基于 rDNA-ITS 序列设计了烟草靶斑病菌特异性引物 Rs-1 和 Aa-1，并用简易法提取了病原真菌的 DNA 进行 PCR 扩增，以验证引物的特异性。结果表明，引物 Rs-1 能特异地扩增烟草靶斑病菌中预期大小片段，而烟草赤星病菌、炭疽病菌和烟草黑胫病菌无扩增片段。同时，引物 Aa-1 可特异地扩增出烟草赤星病菌中预期片段，但烟草靶斑病菌、炭疽病菌和烟草黑胫病菌无扩增片段(图 5)。

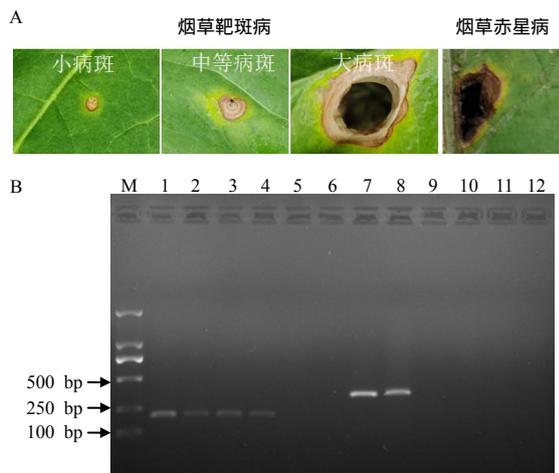


M Marker；泳道 1~4 分别代表引物 Rs-1 对烟草靶斑病菌、赤星病菌、炭疽病菌、黑胫病菌的 PCR 扩增；泳道 5~8 分别代表 Aa-1 对烟草靶斑病菌赤星病菌、炭疽病菌、黑胫病菌的 PCR 扩增。

图 5 引物 Rs-1 和 Aa-1 对病原菌特异性检测结果

Fig.5 Specific detection of the pathogen using primers Rs-1 and Aa-1

用设计的特异性引物分别对感染烟草靶斑病和赤星病的烟草叶片病斑进行检测。挑取病斑处坏死组织,利用简易法提取 DNA,以此为模板,PCR 扩增结果显示,利用引物 Rs-1 可特异性扩增出阳性烟草靶斑病菌和感染靶斑病病斑中的特异性片段,而对健康叶片和烟草赤星病病斑无扩增片段(图 6)。引物 Aa-1 可特异地扩增出阳性烟草赤星病菌和赤星病病斑的特异性片段,而对照健康叶片和烟草靶斑病叶片无扩增片段。说明引物能满足快速检测并区分烟草靶斑病和赤星病的诊断要求。



M Marker;泳道 1~6 分别为引物 Rs-1 对烟草靶斑病菌、靶斑病大病斑、靶斑病中号病斑、靶斑病小病斑、赤星病病斑、健康烟草叶片 PCR 扩增;泳道 7~12 分别为引物 Aa-1 对烟草赤星病菌、赤星病病斑、靶斑病大病斑、靶斑病中号病斑、靶斑病小病斑、健康烟草叶片 PCR 扩增。

图6 引物 Rs-1 和 Aa-1 对烟草叶片病斑提取的 DNA 检测结果

Fig.6 PCR detection results with primers Rs-1 and Aa-1 for DNAs extracted directly from leaf spots

3 结论与讨论

通过病害症状观察、组织分离、形态学观察、ITS 基因序列分析和致病力测定,鉴定了湖南烟区发生的烟草靶斑病,确定其病原菌为立枯丝核菌^[12-13]。

立枯丝核菌寄主范围非常广泛,可引起茎腐病、纹枯病和苗期立枯病等多种植物病害。在烟草上,立枯丝核菌主要引起苗期病害,一般条件下很难产生有性孢子,孢子的生活力也十分脆弱,但烟草靶斑病是丝核菌通过有性孢子传播引起的叶部病害。

烟草靶斑病菌株间的融合群具有多样性,同时不同地域的菌株也具有其独特性。部分研究^[6,14-17]

显示,中国云南和东北部分地区的烟草靶斑病菌属于相同的 AG-3 融合群,而陈媛媛等^[5]发现从广西分离到的部分烟草靶斑病菌属于 AG-2 和 AG-4 融合群,这与 20 世纪 80 年代在美国卡罗莱纳州北部发现部分 AG-4 菌株可引起烟草靶斑病的结果类似^[2]。MERCADO 等^[18]首次报道在阿根廷西北地区烟草上发现引起烟草靶斑病的立枯丝核菌 AG-2.1 融合群。随后又发现该区域烟草上的 AG4HG-I 和 AG4HG-III 融合群菌株主要引起烟草立枯病,AG2-1 既可引起立枯病,也可引起靶斑病^[19]。这些研究结果说明丝核菌不同融合群与其分离的地理环境、发病部位和侵染方式等有关。对不同烟区发生的烟草靶斑病原进行分离鉴定,将为探讨菌株的融合群和菌株间的遗传多样性分化,为研究病原菌种群遗传变异及对该病害发生流行预测提供依据。

由于烟草靶斑病易与烟草赤星病、野火病、炭疽病等同时发生,容易造成混淆,传统的鉴定方法需要经过病原菌分离、纯化、培养等过程,耗时长,在病害流行时易造成误诊,因而延误最佳防治时期。笔者依据烟草靶斑病菌和赤星病菌序列设计特异性引物,提取病原真菌 DNA 后,可直接快速地从烟草病害的病斑处检测并区分烟草靶斑病和赤星病,为烟草靶斑病的检测与诊断提供了工具,但由于烟草靶斑病菌的遗传背景复杂,对于该检测方法是否可应用于所有地区的烟草靶斑病检测,还需通过检测更多的样本来验证。

参考文献:

- [1] COSTA A S . Mancha aureolada erequeima do fumo causades por corticium solani[J] . Biologicol , 1948 , 14 : 113-114 .
- [2] SHEW H D . *Rhizoctonia* leaf spot of flue-cured tobacco in North Carolina[J] . Plant Disease , 1985 , 69(10) : 901-903 .
- [3] MEYER J C , VAN WYK R J , PHILLIPS A J L . *Rhizoctonia* leaf spot of tobacco in South Africa[J] . Plant Pathology , 1990 , 39(1) : 206-207 .
- [4] 吴元华,王左斌,刘志恒,等.我国烟草新病害——靶斑病[J].中国烟草学报,2006(6):22 .
WU Y H , WANG Z B , LIU Z H , et al . Tobacco target spot disease : a new tobacco disease in China[J] . Acta Tabacaria Sinica , 2006(6) : 22 .
- [5] 陈媛媛,谭海文,卢燕回,等.广西烟草立枯病菌和靶斑病菌菌株融合群初步分析[J].广东农业科学,

- 2016, 43(10): 106–111 .
CHEN Y Y , TAN H W , LU Y H , et al . Anastomosis groups of *Rhizoctonia solani* causing tobacco sore shin and target spot in Guangxi[J] . Guangdong Agricultural Sciences , 2016 , 43(10) : 106–111 .
- [6] 侯慧慧, 孙剑萍, 刘子仪, 等. 云南烟草靶斑病 (*Rhizoctonia solani* Kühn) 病原鉴定及其融合群研究[J] . 沈阳农业大学学报, 2018, 49(2): 203–208 .
HOU H H , SUN J P , LIU Z Y , et al . Identification and anastomosis groups of tobacco target spot disease (*Rhizoctonia solani* Kühn) in Yunnan tobacco planting areas[J] . Journal of Shenyang Agricultural University (Social and Edition) , 2018 , 49(2) : 203–208 .
- [7] 方中达. 植病研究方法[M] . 3 版. 北京: 中国农业出版社, 1998 : 122–145 .
FANG Z D . Methods of Plant Disease Research[M]. 3rd ed . Beijing : China Agriculture Press , 1998 : 122–145 .
- [8] XU M L , HAO K Q , YANG J G , WANG F L , et al . First report of *Rhizoctonia solani* AG-3 causing tobacco target spot in Yunnan , China[J] . Plant Disease , 2018 , 102(10) : 2038 .
- [9] 夏花, 朱宏建, 周倩, 等. 湖南芷江辣椒上一种新炭疽病的病原鉴定[J] . 植物病理学报, 2012 , 42(2) : 120–125 .
XIA H , ZHU H J , ZHOU Q , et al . Pathogen identification of a new anthracnose of pepper in Zhijiang , Hunan[J]. Acta Phytopathologica Sinica , 2012 , 42(2) : 120–125 .
- [10] 潘显婷, 陆训, 庞茜丹, 等. 莴苣叶斑病菌的分离鉴定及弱毒菌株致病力的衰退[J] . 湖南农业大学学报(自然科学版), 2016 , 42(5) : 538–542 .
PAN X T , LU X , PANG X D , et al . Isolation of the pathogens causing leaf spot of lettuce and analysis of the reason causing the attenuated virulence[J] . Journal of Hunan Agricultural University(Natural Sciences) , 2016 , 42(5) : 538–542 .
- [11] TAMUR A K , STECHER G , PETERSON D , et al . MEGA6 : molecular evolutionary genetics analysis version 6.0[J] . Molecular Biology and Evolution , 2013 , 30(12) : 2725–2729 .
- [12] SHEW H D . Target spot of tobacco[J]. Plant Disease , 1995 , 79(1) : 5 .
- [13] 吴元华, 赵艳琴, 赵秀香, 等. 烟草靶斑病原鉴定及生物学特性研究[J] . 沈阳农业大学学报, 2012 , 43(5) : 521–527 .
WU Y H , ZHAO Y Q , ZHAO X X , et al . Identification and biological characteristics of pathogen causing target spot on tobacco[J] . Journal of Shenyang Agricultural University(Social and Edition) , 2012 , 43(5) : 521–527 .
- [14] 吴元华, 伏颖, 赵秀香, 等. 烟草靶斑病菌菌丝融合群及 ITS 序列分析[J] . 植物病理学报, 2013 , 43(2) : 215–218 .
WU Y H , FU Y , ZHAO X X , et al . The anastomosis groups and ITS sequence analysis of *Rhizoctonia solani* isolates of tobacco target spot[J] . Acta Phytopathologica Sinica , 2013 , 43(2) : 215–218 .
- [15] WU Y H , ZHAO Y Q , FU Y , et al . First report of target spot of flue-cured tobacco caused by *Rhizoctonia solani* AG-3 in China[J] . Plant Disease , 2012 , 96(12) : 1824 .
- [16] ZHAO Y Q , WU Y H , FU Y , AN M N , et al . Characterization of *Rhizoctonia solani* AG-3 isolates causing target spot of flue-cured tobacco in China[J]. Advanced Materials Research , 2013 , 726 : 4321–4325 .
- [17] 苏燕妮, 董雪, 赵艳琴, 等. 东北地区烟草靶斑病菌 (*Rhizoctonia solani*) 融合群, 致病力分化及品种抗病性研究[J] . 植物保护, 2016 , 42 (1) : 170–174 .
SU Y N , DONG X , ZHAO Y Q , et al . Anastomosis groups , pathogenicity differentiation of *Rhizoctonia solani* from tobacco target spot in the Northeast China and the disease resistance of tobacco varieties[J] . Plant Protection , 2016 , 42(1) : 170–174 .
- [18] MERCADO CÁRDENAS G , GALVÁN M , BARRERA V , et al . First report of target spot of tobacco caused by *Rhizoctonia solani* AG-2.1[J] . Plant Disease , 2012 , 96(3) : 456 .
- [19] MERCADO CÁRDENAS G E , GALVÁN M Z , BARRERA V A , et al . Molecular Identification and pathogenicity of *Rhizoctonia* spp . from tobacco growing areas in northwestern Argentina[J] . Tropical Plant Pathology , 2015 , 40(3) : 160–168 .

责任编辑: 罗慧敏
英文编辑: 罗维