

加拿大进境油菜籽茎基溃疡病菌的检测与鉴定

王振华¹ 杨武¹ 赵晖¹ 曾宪东¹ 李凤新¹
蔡翔² 王瀚昌¹ 余浩¹

1. 湖北出入境检验检疫局, 武汉 430050; 2. 华中农业大学植物科技学院, 武汉 430070

摘要 从加拿大进境油菜籽中随机选取船载油菜籽样品, 通过特异引物的 PCR 扩增检测和病原菌分离鉴定, 观察了油菜茎基溃疡病菌 *Leptosphaeria maculans* 的发生情况。结果表明: 所有来自 3 艘轮船的 15 份油菜籽样品的油菜茎基溃疡病菌 PCR 检测都呈阳性; 随机选择的 3 份阳性样品的病原菌分离、鉴定与致病性测试结果证实了 PCR 的检测结果。

关键词 油菜茎基溃疡病菌; 检测; 鉴定

中图分类号 S 432.4⁺4; S 435.654 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2011)01-0066-04

油菜茎基溃疡病(phoma stem canker)是油菜上最严重的真菌病害之一, 其致病菌为小球腔菌属的油菜茎基溃疡病菌 *Leptosphaeria maculans*^[1]。油菜茎基溃疡病菌 *L. maculans* 致病力强, 能引起油菜茎基部发生溃烂, 严重影响油菜等作物的产量。该病原菌在欧洲、澳大利亚和北美地区广泛分布^[2], 但在我国还未见报道, 属于我国进境植物检疫性有害生物。近期以来, 我国出入境检验检疫机构从进口澳大利亚油菜籽中多次截获茎基溃疡病菌。

为有效防止油菜茎基溃疡病传入我国, 国家质量监督检验检疫总局在 2009 年 11 月 9 日发布了《关于进口油菜籽实施紧急检疫措施的公告》(2009 年第 101 号)。2010 年 1 月, 笔者从加拿大进境的油菜籽样品中截获了一种真菌性有害生物, 其 PCR 检测、扩增产物测序以及菌落形态学鉴定结果表明, 该病菌为油菜茎基溃疡病菌 *L. maculans*。

1 材料与方法

1.1 供试油菜籽样品和菌株

供试油菜籽样品采自 3 艘轮船上集装箱散装的加拿大进境油菜籽, 进境时间为 2010 年 1 月。油菜茎基溃疡病菌的阳性对照分离物为笔者所在单位收藏的标准菌株 ATCC 60737。1 份油菜黑胫病菌 *L. biglobosa* 湖北分离物作为阴性对照, 由华中农业大

学李国庆教授惠赠。

1.2 样品的前处理和 PCR 检测

样品经过去除杂质和混匀后, 从每份样品中随机选取 1 g 用于 PCR 检测。

取样品 1 g, 液氮研磨后取样 0.1 g, 采用 DNA 纯化试剂盒(Promega 公司生产)提取样品总 DNA, 用油菜茎基溃疡病菌 *L. maculans* 特异性引物^[3]: *LMR1-D F* 5'-GCGTAAGAAGCGTGCCTTAGA GTC-3' 和 *LMR1-D R* 5'-TCCTGCTCCTACTC CTTCTCTAGC-3' 进行 PCR 扩增, 预期扩增片段为 581 bp。

PCR 反应总体积为 25 μ L, 其中 10 \times buffer 2.5 μ L、10 mmol/L dNTP 0.5 μ L, *Taq* 酶 2.5 U, DNA 模板 1 μ L, 正反引物各 1 μ L, 双蒸水 18.5 μ L。PCR 反应条件为: 预变性 94 $^{\circ}$ C 5 min; 94 $^{\circ}$ C 30 s、58 $^{\circ}$ C 30 s、72 $^{\circ}$ C 40 s, 35 个循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 7 min。

试验中以相同体积的水作为阴性对照。取 5 μ L PCR 扩增产物在 2% 琼脂糖凝胶电泳。凝胶经 EB 染色后, 用凝胶成像系统拍照。

随机选取 3 份扩增产物, 由上海生工生物工程技术服务有限公司进行直接双向测序, 测序获得的序列经拼接后与 GenBank 中相关序列进行 Blast 搜索与比对分析。

1.3 病原菌的分离与形态鉴定

在解剖镜下从阳性样品挑选表面皱缩、干瘪、变色、残缺或有霉变的500粒种子和带有黑色点状的下脚料分离病原菌。将带菌种子和下脚料切成4~5 mm的小块分别置于灭菌蒸馏水中室温浸泡处理1 d,转入-20℃下冷冻处理24 h,1%次氯酸钠消毒5 min,无菌水洗涤3次后,置于PDA平板(加入链霉素,浓度为50~100 U/mL)上,每皿放入种子25粒和病组织4个,在20~25℃ 12 h黑暗和12 h光照交替培养10 d。第5天开始观察种子和病组织周围菌丝形态特征。当与病原菌特征一致时,挑取菌丝小块转入新的PDA培养基纯化培养。

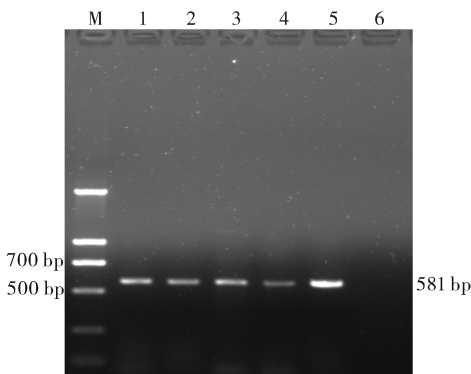
1.4 致病性测试

选取健康的Westar感病油菜籽种植,在长出2片子叶后进行致病性测试。随机选取3份PCR检测为阳性且符合预期形态特征的分离物,用无菌水配制每毫升含 10^7 个分生孢子液,针刺接种,黑暗保湿1 d,置于15~20℃下生长观察(可剪掉生出的心叶)。接种5~8 d后,观察接种点附近的发病情况。

2 结果与分析

2.1 PCR检测及其扩增产物的序列分析

检测结果表明,用油菜茎基溃疡病菌*L. maculans*特异性引物对LMR1-D F/R对油菜籽种子样品总DNA PCR扩增,15份样品都扩增到了约580 bp的预期产物,但不能从油菜黑胫病菌*L. biglobosa*湖北分离物扩增到任何DNA条带(图1)。



M. Markers DL 2 000(Takara, Japan); 1~4. 油菜籽样品 Rapeseed samples; 5. 阳性对照 Positive control; 6. 阴性对照 Negative control.

图1 引物对LMR1-D F/R的PCR扩增产物的琼脂糖凝胶电泳结果

Fig. 1 Agarose gel electrophoresis of PCR amplification products by primer set LMR1-D F/R

随机选取的3份扩增产物双向测序后,有2条序列长为581 bp,还有1条序列长为582 bp。所得序列在GenBank中进行Blast搜索,获得了源自该病菌的大量相关序列。序列1与油菜茎基溃疡病菌*L. maculans* subsp. *brassicae*的法国株系v23.1.3的1段序列(CT485789.1)的同源性最高,同源性为96%;序列2与该株系的1条序列(CT485666.1)也有96%的相似性;序列3与该株系的1条序列(CT485670.1)的同源性最高,但只有94%。

特异性引物对LMR1-D F/R对扩增的片段为油菜茎基溃疡病菌*L. maculans*的无毒基因*Avr-Lm1*(AM084345)附近的基因组序列。将所得的3条序列进行比对,发现序列之间存在一定的变异性,同源性为92%~95%。除了位于两端的引物序列外,变异碱基分布较均匀(图2)。这3条序列分别在GenBank中Blast搜索后的比对结果也表现出这一特征(结果未给出)。

检测结果初步显示,进境油菜籽样品中油菜籽种子可能携带有油菜茎基溃疡病菌*L. maculans*。

2.2 病原菌的形态特征

在随机选取1份PCR检测为阳性的船载油菜籽、筒仓油菜籽或下脚料样品中,均观察到了典型的油菜茎基溃疡病菌*L. maculans*的形态特征。

检测样本的种子和病组织周围菌丝形态特征均表现为菌丝白色,有隔,边缘不整齐、有较多分枝,白色菌丝、菌落上有较大的结节状颗粒点。培养10 d的菌落上可见到黑色点状的分生孢子器,显微镜下分生孢子呈椭圆形至纺锤形,无色透明,两端各1个油球。据此也可初步判定供试样品中携带了油菜茎基溃疡病菌*L. maculans*。

2.3 病原菌致病性的测试

致病性的测试结果表明,纯化的分离物针刺接种油菜叶片5~8 d后,在接种点周围出现圆形浅褐色枯死斑,病斑稍凹陷。该症状表现符合油菜茎基溃疡病菌*L. maculans*强毒株系引发的典型病理学特征。

另外,在进行致病性的测试同时还发现,对油菜发病子叶再进行病原菌分离,镜检该分离物仍可以观察到与油菜茎基溃疡病菌*L. maculans*一致的形态特征。

```

1 GCGTAAGAAG CGTGCCTTAG AGTCTATAGG GAGCTACCTA GGTTCGCCCTA ACCTAGGATC TATAGGGGGA ACCTTAGAGG [ 80]
2 ~~~~~A.....G.....A..... [ 80]
3 .....G.....A.....TT..... [ 80]

1 AGCTAGAGTC CTTATCTTCT AATAAGGAGC TCTAGCGCC CTTAGCTATA GTAGCAGCCT TGCGCGCAAG CTTAGTAGTA [160]
2 .....T.....T.....TT.....A..... [160]
3 .....A.T.....GC.A.....A.....C.C. [160]

1 GCAGCAGCAG CTTTACTAG CTCCTACTAT TTAGCCTCGC TCTCCTTAAG GAGCACTAAG ACCCTCTGCT TCTTATCCTT [240]
2 .T.T.T.....G..C.....T.....A..... [240]
3 .T.....G..C.....TA.....CT..... [240]

1 AAGAAGTCT TAGCTCTTAC CTACCTGCTT CTTGCTAGG AAGGATAGCG TAGAATATTA GGCAAGCTTA GGCCTATTAG [320]
2 .....A.....A.....C..... [320]
3 .....C.TA...GCG..... [320]

1 TTTATTAGTA TA-GATCTTA CTAAGCGTTA TAAAGGAAAA ATTCTTATAT AGATTATATA TATTAGGATA TAGCTATACC [400]
2 .....-.....TA..... [400]
3 ..G.....A.....TA.....G..... [400]

1 TAGAGGAGCA CTACTAGCAC TAAGTCCCC TACTAGAAGA GTTATAGCAC TTAGCTATTAG ACTTATATAA GAGCGCTAAG [480]
2 .....T.....T.....G.....T..AG.. [480]
3 ..A..... [480]

1 TGCAGATAAT TTAGACAAGT TTTAGCATAA TAAATGCTAG GCTCTTTATA GTAGGAGGAT CTTAGGGTCT CCTTAGGAGC [560]
2 .AT.....T.....T.....A.....C...A..... [560]
3 ~~~~~C....CG....A.....C..... [560]

1 TAGAGAAGGA GTAGGAGCAG GA [582]
2 ..... [582]
3 ..... [582]

```

图2 3条油菜茎基溃疡病菌无毒基因 *AvrLm1* (AM084345)附近的基因组序列的比对结果

Fig.2 Alignment of three genomic sequences surrounding the avirulence gene *AvrLm1* (AM084345) of *L. maculans*

3 讨论

油菜茎基溃疡病菌 *L. maculans* (无性世代为 *Phoma lingam*) 是小球腔菌属 *Leptosphaeria* 的一个种, 油菜黑胫病菌 *L. biglobosa* (无性世代尚未确认) 是该属的另一个种^[1,4]。这2种病原菌的形态特征相近, 但引起油菜茎部感染和基部溃疡的能力并不相同。油菜茎基溃疡病菌 *L. maculans* 致病力强, 引起油菜茎基部发病, 造成的损失很大, 引起的产量损失平均为 10%~20%, 在澳大利亚、加拿大、

美国、欧洲等油菜主产区广泛分布, 而在中国则未见报道; 油菜黑胫病菌 *L. biglobosa* 致病力弱, 一般引起油菜茎上部发病, 造成的损失小, 在我国主要分布于浙江、安徽、湖北、湖南、四川和内蒙古等地区^[5-6]。

来源于强毒株系的特异引物的 PCR 扩增及其产物测序结果, 结合分离物的形态特征与致病性结果, 证实了本试验样品中携带了油菜茎基溃疡病菌 *L. maculans*。强毒分离物的无毒基因 *AvrLm1* (AM084345) 附近的基因组序列有一定的保守性 (同源性大于 92%)。

当用同样的引物对来源于湖北的油菜黑胫病菌 *L. biglobosa* 弱毒分离物的基因组 DNA 进行 PCR 扩增时,不能扩增到任何 DNA 片段。这也进一步说明了本试验样品中携带了油菜茎基溃疡病菌 *L. maculans*,同时也表明有可以利用特异性引物对 LMR1-D F/R 的 PCR 扩增结果对油菜茎基溃疡病菌 *L. maculans* 和油菜黑胫病菌 *L. biglobosa* 进行快速鉴别。

致谢 华中农业大学植物科技学院李国庆教授和上海出入境检验检疫局易建平研究员在试验中提供了指导和帮助,谨致谢意!

参 考 文 献

[1] WILLIAMS R H, FITT B D L. Differentiating A and B groups of *Leptosphaeria maculans*, causal agent of stem canker (blackleg) of oilseed rape[J]. *Plant Pathology*, 1999, 48: 161-175.

- [2] WEST J S, KHARBANDA P D, BARBETTI M J, et al. Epidemiology and management of *Leptosphaeria maculans* (phoma stem canker) on oilseed rape in Australia, Canada and Europe [J]. *Plant Pathology*, 2001, 50: 10-27.
- [3] TAYLOR L J. A simple, sensitive, and rapid method for detecting seed contaminated with highly virulent *Leptosphaeria maculans* [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1993, 59(11): 3681-3685.
- [4] AVESKAMP M M, DE GRUYTER J, CROUS P W, et al. Biology and recent development in the systematics of phoma, a complex genus of major quarantine significance [J]. *Fungal Diversity*, 2008, 31: 1-18.
- [5] FITT B, BRUN H, BARBETTI M, et al. World-wide importance of phoma stem canker (*Leptosphaeria maculans* and *L. biglobosa*) on oilseed rape (*Brassica napus*) [J]. *European Journal of Plant Pathology*, 2006, 114: 3-15.
- [6] WEST J S, EVENTS N, LIU S, et al. *Leptosphaeria maculans* causing stem canker of oilseed rape in China [J]. *Plant Pathology*, 2000, 49: 800.

Detection and identification of *Leptosphaeria maculans* in imported Canadian rapeseeds

WANG Zhen-hua¹ YANG Wu¹ ZHAO Hui¹ ZENG Xian-dong¹ LI Feng-xin¹
CAI Xiang² WANG Han-chang¹ YU Hao¹

1. Hubei Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau of P. R. China, Wuhan 430050, China;
2. College of Plant Science and Technology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China

Abstract In this research, shipborne samples were randomly selected from imported Canadian rapeseeds to investigate the occurrence of phoma stem canker (*Leptosphaeria maculans*) by PCR amplification, pathogen isolation and pathogenicity test. The results showed that all fifteen rapeseed samples from three ships were positive in PCR detection of *Leptosphaeria maculans*. The results from pathogen isolation, identification and pathogenicity testing of three randomly selected samples confirmed the PCR detection.

Key words *Leptosphaeria maculans*; detection; identification

(责任编辑:陈红叶)