

云南木薯一种叶斑病病原的分离鉴定

段春芳¹,黄贵修²,李超萍²,时涛²,郭容琦¹,李月仙¹,
刘倩¹,严炜¹,娄予强¹,张林辉¹,刘光华^{1*}

(1. 云南省农业科学院 热带亚热带经济作物研究所,云南 保山 678025;2. 中国热带农业科学院 环境与植物保护研究所,海南 儋州 571737)

摘要:2010年10月,在云南保山潞江坝木薯种植区发现了一种大面积发生的木薯叶斑病。笔者对这种叶斑病的病原菌进行了分离培养,经致病性鉴定、形态观察和 ITS 序列分析,将这种叶斑病的病原鉴定为狗尾草离蠕孢菌 *Bipolaris setariae* Sawada。

关键词:保山;木薯;叶斑病;病原菌;分离鉴定;狗尾草离蠕孢

中图分类号:S435.33 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-8581(2012)12-0118-03

Isolation and Identification of Pathogen of A Leaf Spot Disease of Cassava in Yunnan

DUAN Chun-fang¹, HUANG Gui-xiu², LI Chao-ping², SHI Tao², GUO Rong-qi¹, LI Yue-xian¹,
LIU Qian¹, YAN Wei¹, LOU Yu-qiang¹, ZHANG Lin-hui¹, LIU Guang-hua^{1*}

(1. Institute of Tropical and Subtropical Economical Crops, Yunnan Academy of Agricultural Sciences, Baoshan 678025, China;
2. Environment and Plant Protection Institute, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, Danzhou 571737, China)

Abstract: In October 2010, a new kind of leaf spot disease was found on cassava in Baoshan, Yunnan province. The pathogen of this disease was isolated and cultured. Moreover, its pathogenicity, morphology, and ITS sequence were identified. The results indicated that the pathogen causing this new leaf spot disease of cassava in Baoshan was *Bipolaris setariae* Sawada.

Key words: Baoshan; Cassava; Leaf spot disease; Pathogen; Isolation and identification; *Bipolaris setariae*

木薯 (*Manihot esculenta crantz*), 别名树薯、木番薯, 为多年生灌木, 地下结薯, 是世界三大薯类(木薯、马铃薯、甘薯)之一, 起源于热带美洲, 现主要分布在我国的热带、南亚热带地区(简称热区)的海南、广东、广西、云南和福建等省, 湖南南部及四川、贵州南端的河谷地带也有零散分布^[1]。木薯有“淀粉之王”、“地下粮仓”和“特用作物”等美称, 也是生产淀粉、变性淀粉以及乙醇等化工产品的重要原料。木薯已有 4000 多年的栽培历史, 于 19 世纪 20 年代引入我国, 近年来我国木薯的种植面积一直在 40 万 hm^2 以上^[2]。云南省热区总面积为 8111 万 km^2 ^[3], 占全国热区总面积的 16.18%, 是云南乃至全国不可多得的发展热作生产的宝地。云南适合种植木薯的荒山、荒坡约有 43.33 万 hm^2 , 主要集中在红河、文山、普洱、西双版纳、德宏、保山、临沧等海拔低于 1500 m 的低热河谷地区。这些地区全年平均气温在 20 $^{\circ}\text{C}$ 以上, 年降雨量 400 mm 以上, 光、热、水条件十分有利于木薯的生长。近年来, 云南木薯的种植面积稳定在 3.33 万 hm^2 左右, 总经济产值均达到 1.1 亿元以上, 其在云南众多热带经济作物中的优势越来越明显。

2010 年 10 月份, 在云南保山潞江坝木薯种植区发现了一种大面积发生的木薯叶斑病, 为害木薯的新老叶片、茎秆, 大部分木薯品种均发病。在发病初期, 在叶片

上形成水渍状、褪绿的圆形病斑, 后期发病组织变枯、坏死, 发病严重时为害木薯茎秆。在高温多雨季节, 该病害容易与其他病原菌一同侵染木薯, 严重影响木薯的品质和产量。笔者对这种叶斑病的病原进行了分离鉴定研究。现将结果报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料 分离病原菌所用的木薯病叶采自发病严重的云南保山潞江坝木薯种植基地, 木薯品种为 SC205。

1.2 方法

1.2.1 病原菌的分离培养 病原菌分离采用常规组织分离法^[4]。在木薯病叶组织的病健交界处剪取 5 mm \times 5 mm 的组织块, 用 70% 乙醇处理 30 s, 0.1% 升汞浸泡 2 ~ 3 min, 无菌水冲洗 3 ~ 4 次, 用灭菌的吸水纸将水吸干, 然后将组织块置于 PDA 培养基平板上, 在 28 $^{\circ}\text{C}$ 下培养 2 ~ 3 d 至长出菌落, 经单孢纯化后保存备用。

1.2.2 病原菌的形态鉴定 将分离获得的病原菌培养在 PDA 平板上, 对其菌落形态、分生孢子形状、大小等形态特征进行观察测量。

1.2.3 病原菌致病性测定 采用以下两种方法对分离得到的菌株进行致病性测定。(1) 活体叶片接种试验: 用打孔器打取菌饼接种于针刺过的健康 SC205 木薯叶

收稿日期: 2012-09-21

基金项目: 国家木薯产业技术体系资助项目(CARS-12); 云南省重点新产品开发计划项目(2011BB003)。

作者简介: 段春芳(1983—), 女, 云南鹤庆人, 从事热带作物真菌病害研究。* 通讯作者: 刘光华。

片,对照接种水琼脂块,保湿,观察。(2)离体叶片接种试验:用无菌水配制的孢子悬浮液对针刺过的健康 SC205 木薯叶片进行喷雾,对照喷施无菌水,保湿,观察。接种叶片发病后,参照 1.2.1 中所述的方法重新分离病原菌,观察再分离所得病原菌的菌落特征以及分生孢子形状,与最初分离且接种发病的分离物做比较,确认病原菌及其致病性。

1.2.4 5.8 s rDNA - ITS 序列分析 将该病原菌的菌丝接种于液体 PDA 中^[5-6],将培养出的菌丝烘干,然后用液氮充分研磨至粉末状,采用 CTAB 法提取病原菌的总 DNA。ITS 扩增引物为 ITS1 和 ITS4^[7-8]。扩增反应在 PCR 仪 Perkin Elmer 上进行,PCR 反应体系为 25 μ L。PCR 反应条件为:94 $^{\circ}$ C 预变性 3 min,循环 1 次;94 $^{\circ}$ C 变性 1 min,51 $^{\circ}$ C 退火 1 min,72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min,30 次循环;最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。PCR 产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳进行检测。PCR 扩增产物用大连宝生物公司提供的试剂盒进行纯化,对纯化产物直接测序。

2 结果与分析

2.1 田间症状描述 此叶斑病是 2010 年在云南潞江坝木薯种植基地发病较重的一种病害,所种植的其他木薯品种均发病。在发病初期,病原菌先感染叶片,在叶片上形成水渍状、褪绿的圆形病斑;在后期,发病组织变为枯黄色,坏死。当湿度较大时,病斑中央形成霉状物。当发病较重时,病原菌会为害叶柄和茎秆,病斑扩展并汇合成不规则的大病斑,并伴有病斑中央破裂、穿孔等症状。潞

江坝是保山市的一个干热河谷地区,著名的怒江横贯其南北,潞江坝年平均气温 21 $^{\circ}$ C,1 月最低温度 4 $^{\circ}$ C,7 月最高温度 38.5 $^{\circ}$ C,属于典型的热带亚热带气候。在该病害发生期间,潞江坝为阴雨绵绵的天气,这种特殊的天气加重了该叶斑病的蔓延,导致木薯落叶,成片枯黄,并伴有其他种类叶斑病的发生,严重影响了当年木薯的品质和产量。

2.2 分离菌株的培养性状 从田间采集 SC205 木薯发病叶片,将分离得到的菌株在 PDA 培养基上进行培养,菌落成圆形,浓密,青灰色,细发状,有隆起的绒状菌丝,边缘较整齐,菌丝有分隔、浅色至浅褐色(如图 1 所示)。分生孢子梗长、直立或膝状曲折、单生或丛生、基部细胞膨大,浅色至灰褐色、有分隔。分生孢子粗壮,长椭圆形、褐色,具有 3~9 个隔膜,脐点明显,位于基细胞内,分生孢子大小为 (40.41 ~ 136.35 μ m) \times (13.62 ~ 19.30 μ m),平均 87.05 μ m \times 16.08 μ m(见图 2)。



图 1 分离菌株在 PDA 上的菌落

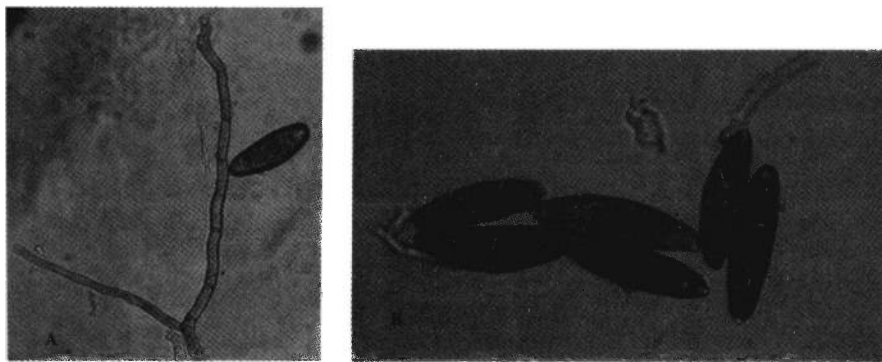


图 2 分离菌株的分生孢子梗(A)及分子孢子(B)

2.3 致病性测定结果 离体接种 3 d 后即可见明显症状,出现灰绿色至黑色水渍状病斑;活体针刺接种 5 d 后,病斑呈不规则形,灰褐色,病斑症状与大田症状相似。从接种发病部位的病健组织交界处,可再分离到与接种菌株菌落培养性状和分生孢子形态相似的菌株。

2.4 分离菌株 5.8 s rDNA - ITS 序列分析结果 分离菌株 YNMSYB - 10 - 3 - 2 扩增到大约 600 bp 的片段,经 NCBI 比对,该分离菌株片段大小为 557 bp。从图 3 中可以看出,分离菌株 YNMSYB - 10 - 3 - 2(GenBank 中序列号为 JX462256) 和 GenBank 中的序列(登录号为

EF452444.1、FJ606786.1、GU073108.1、GU290228.1) 的同源性为 99%,经比对,该分离菌株为狗尾草离蠕孢菌 *Bipolaris setariae* Sawada。

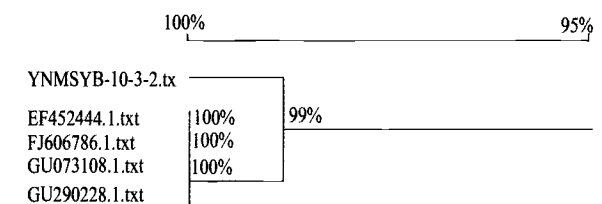


图 3 分离菌株 5.8s rDNA - ITS 序列同源性比较树状分析

3 结论与讨论

根据病原菌形态学观察以及 rDNA - ITS 序列分析结果,笔者将引起 2010 年云南保山潞江坝木薯叶斑病的病原菌鉴定为狗尾草离蠕孢菌 *Bipolaris setariae* Sawada。该病菌属于离蠕孢属,其分生孢子脐点位于基细胞内,不同于凹脐孢属和凸起孢属。此研究为今后木薯病害的防控提供了理论基础。

本文研究的由狗尾草离蠕孢菌引起的 SC205 叶斑病的病斑小、密集,这与时涛等^[9]报道的 SC205 叶斑病的发病症状有所不同;从云南保山潞江坝 SC205 上分离的狗尾草离蠕孢菌的分生孢子也比时涛等^[9]报道的粗些。这些说明,不同区域的病原菌形态存在着较大的差异;同一病害在不同区域发病症状不同,同一病害在同一木薯品种上的发病症状也不同,这可能会给木薯病害普查带来一定的困难。

迄今为止,在世界范围内已经发现的木薯病害有 38 种^[1]。据报道,国内木薯的主要病害有 7 种,包括真菌病害 6 种:褐斑病 (*Cercosporidium henningsii*)、炭疽病 (*Colletotrichum gloeosporioides*)、离蠕孢叶斑病 (*Bipolaris setariae*)、棒孢霉叶斑病 (*Corynespora cassiicola*)、白点病 (*Phaeoramularia manihotis*) 和萎蔫叶斑病 (*Cercospora vicosae*)、细菌病害 1 种即细菌性萎蔫病 (*Xanthomonas axonopodis* pv *manihotis*)^[10],其中离蠕孢叶斑病和棒孢霉叶斑病为新发病害^[11-12]。离蠕孢引起的木薯病害分布广泛,在海南、广西、云南的河口等地均有发生^[10]。此次,笔者从云南保山潞江坝发现了由狗尾草离蠕孢菌引起的木薯叶斑病,刷新了李超萍等^[10]该病在云南红河发生的报道,表明该病害在云南木薯种植区的发病范围已扩大,应该引起重视。离蠕孢属是一类常见病原菌,能引起多种作物的叶斑病,甚至能引起作物发生根腐病^[9,13]。据时涛等^[9]对 10 种杀菌剂的室内筛选结果,咪酰胺(取代苯类)对狗尾草离蠕孢菌的抑菌效果最好,其次是氟硅唑(三唑衍生物类)、异菌脲(二甲酰亚胺类)等。这为木薯生产上叶斑病的防治提供了依据。

参考文献:

- [1] 李开绵,黄贵修. 木薯主要病虫害[M]. 北京:中国农业科学技术出版社,2008:12.
- [2] 李开绵,林雄,黄洁. 国内外木薯科研发展概况[J]. 热带农业科学,2001,89(1):56-60.
- [3] 刘光华,刘倩,张林辉,等. 云南木薯高效栽培技术[M]. 昆明:云南科技出版社,2010.
- [4] 方中达. 植病研究方法(第三版)[M]. 北京:中国农业出版社,1998.
- [5] 易润华,朱西儒,周而勋. 简化 CTAB 法快速微量提取丝状真菌 DNA[J]. 湛江海洋大学学报,2003,23(6):72-73.
- [6] 彭秀玲,袁汉英,谢毅,等. 基因工程实验技术(第二版)[M]. 1997.
- [7] 卢圣栋. 现代分子生物学实验技术[M]. 北京:高等教育出版社,1993.
- [8] White T J, Bruns T, Lee S. Analysis of phylogenetic relationships by amplification and direct sequencing of ribosomal RNA genes[C]//Innis M A. PCR protocols: a guide to methods and applications. New York: New York Academic, 1990: 315-322.
- [9] 时涛,李超萍,蔡吉苗,等. 木薯新叶斑病原鉴定及其生物学特性[J]. 热带作物学报,2010,31(3):457-463.
- [10] 李超萍,时涛,刘先宝,等. 国内木薯病害普查及细菌性萎蔫病安全性评估[J]. 热带作物学报,2011,32(1):116-121.
- [11] Shi T, Li C P, Li J F, et al. First report of leaf spot caused by *Bipolaris setariae* on cassava in China[J]. Plant Disease, 2010, 94(7): 919-919.
- [12] Liu X B, Shi T, Li C P, et al. First report of *Corynespora cassiicola* causing leaf spot of cassava in China[J]. Plant Disease, 2010, 94(7): 916.
- [13] 石洁,李建成,刘玉瑛,等. 草坪草根腐病病原菌研究初报[J]. 华北农学报,2000,15(增刊):94-98.
- [14] 蔡吉苗,李超萍,时涛,等. 木薯炭疽病原鉴定及其生物学特性研究[J]. 安徽农业科学,2010(10):5435-5438.

(责任编辑:黄荣华)