

油菜黑胫病菌(*Leptosphaeria biglobosa*) 侵染条件研究李欣洲<sup>1,2</sup> 宋培玲<sup>1,2</sup> 郝丽芬<sup>1,2</sup> 苑琳<sup>1</sup> 李子钦<sup>2</sup>

(1. 内蒙古大学 生命科学院 内蒙古 呼和浩特 010020; 2. 内蒙古农牧业科学院 植物保护研究所 内蒙古 呼和浩特 010031)

**摘要:** 对采自安徽油菜黑胫病菌分离株的 ITS 序列进行了测定和分析,结合 GenBank 中的有性型 *Leptosphaeria maculans* 和 *Leptosphaeria biglobosa* 的 ITS 序列构建了系统发育树,将该病菌鉴定为 *Leptosphaeria biglobosa*。在人工气候条件下,对 *Leptosphaeria biglobosa* 侵染条件的研究表明,油菜黑胫病菌是属偏高高温高湿类型的病害,在温湿度条件不能得到满足时,病害就难以完成侵染发病;温度与保湿时间对 *Leptosphaeria biglobosa* 的侵染有很大的影响,病原菌侵染的最佳温度和保湿时间组合为:温度 21~24℃,保湿 48 h 以上。保湿 48 h 以下,随着保湿时间的减少及培养温度的降低或升高,病情指数均降低;但在 12~72 h 各保湿梯度内,随培养温度由 15~21℃ 上升,病情指数逐渐升高,而随培养温度由 21~27℃ 上升,病情指数逐渐降低。

**关键词:** *Leptosphaeria biglobosa*; 侵染条件; 病情指数

中图分类号: S435.654 文献标识码: A 文章编号: 1000-7091(2013)02-0235-04

Studies on Infection Conditions of *Leptosphaeria biglobosa*LI Xin-zhou<sup>1,2</sup> SONG Pei-ling<sup>1,2</sup> HAO Li-fen<sup>1,2</sup> YUAN Lin<sup>1</sup> LI Zi-qin<sup>2</sup>

(1. School of Life Science, Inner Mongolia University, Huhhot 010020, China; 2. Plant Protection Institute, Inner Mongolia Academy of Agriculture and Animal Sciences, Huhhot 010031, China)

**Abstract:** The species identity of the pathogen of Phoma stem canker was determined through a combined study of rDNA-ITS sequences. Phylogenetic analysis showed that the isolate clustered together with the isolates of *Leptosphaeria biglobosa* and was distinct from those of *Leptosphaeria maculans*. ITS sequence analysis indicated the isolate was *Leptosphaeria biglobosa*. Infection conditions and pathogenicity of *Leptosphaeria biglobosa* were conducted in controlled environment. The studies indicated that blackleg of oilseed rape frequently occurred under high temperature and high humidity conditions and the pathogen couldn't infect the host when temperature and humidity were unsuitable; Temperature and wetness period can greatly affect the infection of *Leptosphaeria biglobosa*, at 21~24℃ with over 48 h of wetness period was the favorite combination of temperature and wetness period for infection, below 48 h of wetness period, disease index decreased with decreasing wetness period and increasing or decreasing temperature. As wetness period from 12~72 h, disease index increased with temperature increasing from 15~21℃, but it reduced with temperature increasing from 21~27℃.

**Key words:** *Leptosphaeria biglobosa*; Infection conditions; Disease index

油菜黑胫病(Phoma stem canker)是目前世界上最重要的油菜真菌病害之一<sup>[1]</sup>,其病原菌属小球腔菌属,主要有 2 个种:油菜茎基溃疡病菌 *Leptosphaeria maculans* 和油菜黑胫病菌 *L. biglobosa*<sup>[2-5]</sup>。前者为强侵染型,主要引起茎基部病斑,造成茎基腐而倒伏,危害重,造成的损失大;后者为弱侵染型,主要引起茎上部病斑,造成的损失相对较轻<sup>[6]</sup>。

*Leptosphaeria maculans* 是世界范围内广泛分布

的一种严重危害油菜产业的病原菌,目前,该病原菌在我国尚未发现<sup>[7-8]</sup>。但国内外学者已先后在我国安徽、湖北、内蒙古海拉尔等 7 个省区的油菜种植区采集并分离获得了其弱毒性的近缘种 *L. biglobosa*。从该病害的扩散趋势来看,我国正面临着 *L. maculans* 入侵的风险<sup>[1,9]</sup>。黑胫病是我国油菜生产中的新病害,由于对病原菌种类、致病性分化情况尚不清楚,影响了人们对病害发生和流行规律的认识,

收稿日期: 2012-10-11

基金项目: 内蒙古国际科技合作平台建设; 内蒙古创新基金项目(NM22032); 国家质检总局(2010IK279)

作者简介: 李欣洲(1988-),男,山东莱州人,在读硕士,主要从事植物病理研究。

通讯作者: 李子钦(1962-),男,内蒙古鄂尔多斯人,研究员,博士,主要从事植物病理研究。

制约了对病害防治、预测预报及寄主抗病性的研究,致使我们对病害防治缺乏相应对策。本研究以分离自安徽油菜种植区的 *L. biglobosa* 为研究对象,对其侵染条件进行了系统研究,以期对进一步认识该病原菌,为农业生产中及时有效地开展病害的防治工作提供理论基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 供试菌株和油菜品种

供试菌株:采集自安徽油菜患病茎秆,对其进行常规组织分离后,再进行单孢分离获得病原菌的纯培养。经病原菌形态鉴定后用于后续试验。

供试油菜品种:从内蒙古、新疆收集了 5 份黄油菜品种(锡盟、武川、察右中旗、石宝、新疆)。

### 1.2 病原菌的分子鉴定

1.2.1 DNA 提取 利用 QIAGEN 试剂盒提取供试菌株的基因组总 DNA。

1.2.2 PCR 扩增 采用引物 ITS5 和 ITS4<sup>[10]</sup> 对病菌 rDNA 的 ITS 片段进行扩增,引物序列为:ITS5 (5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3') 和 ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3')。25  $\mu$ L PCR 反应体系为 2.5  $\mu$ L 10  $\times$  PCR buffer 2  $\mu$ L 2 mmol/L dNTP 10 pmol/L 的 ITS5 和 ITS4 引物各 0.5  $\mu$ L, 0.5  $\mu$ L 5 U/L *Taq* 酶(含  $MgCl_2$ ), 4  $\mu$ L 模板 DNA, 15  $\mu$ L ddH<sub>2</sub>O。PCR 反应程序为:95  $^{\circ}C$  3 min; 94  $^{\circ}C$  30 s; 50  $^{\circ}C$  30 s; 72  $^{\circ}C$  30 s; 35 个循环; 72  $^{\circ}C$ , 10 min; PCR 扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测后,送上海生工生物工程有限公司进行序列测定。

1.2.3 序列分析及系统发育树的构建 在 GenBank 中,利用 BLAST 软件对病原菌 rDNA-ITS 序列进行同源序列查找,选择 12 个所需的相关种的序列并下载同源序列,用 MEGA 5.1 软件进行序列分析。以 *Phoma tracheiphila* 作为外群,对包括 A1 在内的 13 个菌株,用 NJ( Neighbor-Joining) 法构建系统发育树。并对所构建的系统发育树进行自举分析(Bootstrap)(重复 1 000 次),以估算分支的支持率。

### 1.3 病原菌侵染条件的研究

1.3.1 温度对病原菌侵染的影响 将灭菌土装在口径为 7.5 cm 的营养钵中,选取健康、饱满的黄油菜种子播于营养钵中,置于人工气候室培养。将 3~5 mL 无菌水直接加在已产孢的 *L. biglobosa* 平板内,静置 10 min,用无菌载玻片轻刮平板表面,使孢子释放并悬浮于无菌水中,经 2 层无菌纱布过滤,获孢子悬浮液。吸 1  $\mu$ L 孢子悬浮液用血球计数板计数并稀释到所需浓度  $1 \times 10^7$  个/mL。在油菜子叶期

采用穿刺接种法接种,每一处理 10 株 3 次重复,对照接无菌水,套上内部湿润的塑料袋以保湿。接种后 48 h 内在黑暗条件下培养,48 h 后光照条件为光照/黑暗=16 h/8 h,分别置于温度为 15、18、21、24、27  $^{\circ}C$ ,相对湿度为 90% 的人工气候培养箱内培养,保湿 60 h 后移去塑料袋,继续置于各温度梯度中培养,逐日观察并统计发病情况。

1.3.2 保湿时间对病原菌侵染的影响 采用相同的接种方法,接种后采用相同的光照条件,置于温度为 21  $^{\circ}C$ ,相对湿度为 90% 的人工气候培养箱内培养,设置保湿时间分别为 12、24、36、48、60、72 h,在不同的保湿时间结束后移去塑料袋,每一处理 10 株 3 次重复,对照接无菌水。接种后逐日观察并统计发病情况。

1.3.3 不同保湿时间与温度组合对病原菌侵染的影响 采用相同的接种方法及光照条件,在 15~27  $^{\circ}C$  各温度处理中,设置不同的保湿时间 12~72 h,每个油菜品种共设 30 个组合,每组合设置 3 次重复。接种后观察并统计发病情况。

1.4 病情分级与抗病性水平评价 在参考 De Marc、Somda 等学者所采用的鉴定标准<sup>[11-12]</sup> 的基础上,制定了油菜黑胫病病情分级标准(表 1)。

表 1 油菜黑胫病病情分级标准

Tab. 1 Standard of grade of phoma stem canker

病级 Disease grade	症状 Symptoms
0 级	无可见症状
1 级	接种点周围呈轻微黑色
2 级	叶片上有微小病斑,坏死型病斑在 < 25%
3 级	叶片上有小至中等大小病斑,坏死型病斑在 25%~50%
4 级	叶片上有较大病斑,坏死型病斑在 50%~75%
5 级	病斑组织腐烂,叶片枯死

根据 Williams、Balesdent 等关于病情指数(Disease index, DI)<sup>[2,13]</sup> 的概念,本研究定义:  $DI = \sum (N_i \times i) / (N_t \times 5)$ , 即(0~5 级别  $\times$  该级别病叶数)之和/(总的接种点数目  $\times$  最高发病等级)。

## 2 结果与分析

### 2.1 病原菌分子鉴定

测序结果表明,供试菌株序列长度为 558 bp 在 GenBank 中经 BLAST 分析,分别与 GenBank 中的 AJ550857、JF740199.1 (*Leptosphaeria biglobosa* subsp.) 菌株的序列同源性为 100%、99%,且供试菌株与 AJ550857、JF740199.1 聚在了一起,得到了 100% 的支持率(图 1),证明分离自采于安徽油菜种植区

的患病茎秆上的致病菌为 *Leptosphaeria biglobosa*。

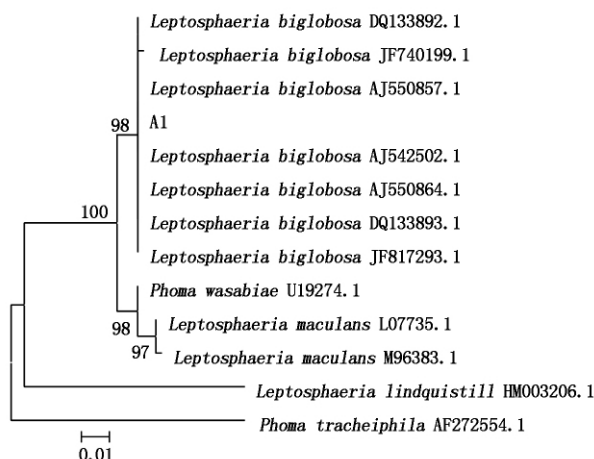


图1 基于 ITS 基因片段的 A1 与近似菌株的系统发育树

Fig.1 Phylogenetic tree of A1 strains and related fungal species based on sequences of rDNA ITS region

## 2.2 温度对病原菌侵染的影响

子叶期分生孢子悬浮液穿刺接种结果表明, 温度对病原菌的侵染影响很大 21 ~ 24 °C 时最适合病原菌侵染发病, 病情指数为 68.5 ~ 85.0; 15 ~ 18 °C, 叶片上接种点周围呈轻微黑色或有微小病斑, 虽病情指数和病斑面积随温度的升高而增大, 但在温度低于 18 °C 时病菌侵染发病明显降低; 18 ~ 21 °C 病情指数和病斑面积随温度的升高而骤升; 21 ~ 27 °C

供试接种的 5 个油菜品种中有 4 个品种的病情指数和病斑面积随温度的升高而减小。这表明, 油菜黑胫病菌为偏高温侵染型真菌 21 °C 以下有利于病菌侵入而不利其扩展 27 °C 的高温虽不适于病菌侵入, 但有利于已侵入菌丝在寄主叶内扩展。

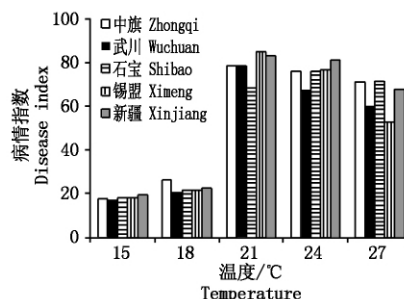


图2 温度对病原菌侵染的影响

Fig.2 Effects of temperature on the infection of the pathogen

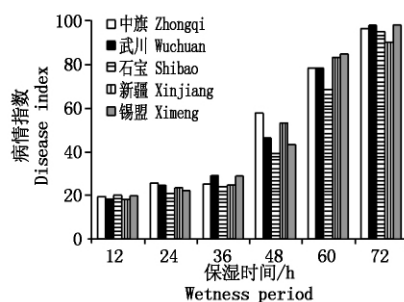


图3 保湿时间对病原菌侵染的影响

Fig.3 Effects of wetness on the infection of the pathogen

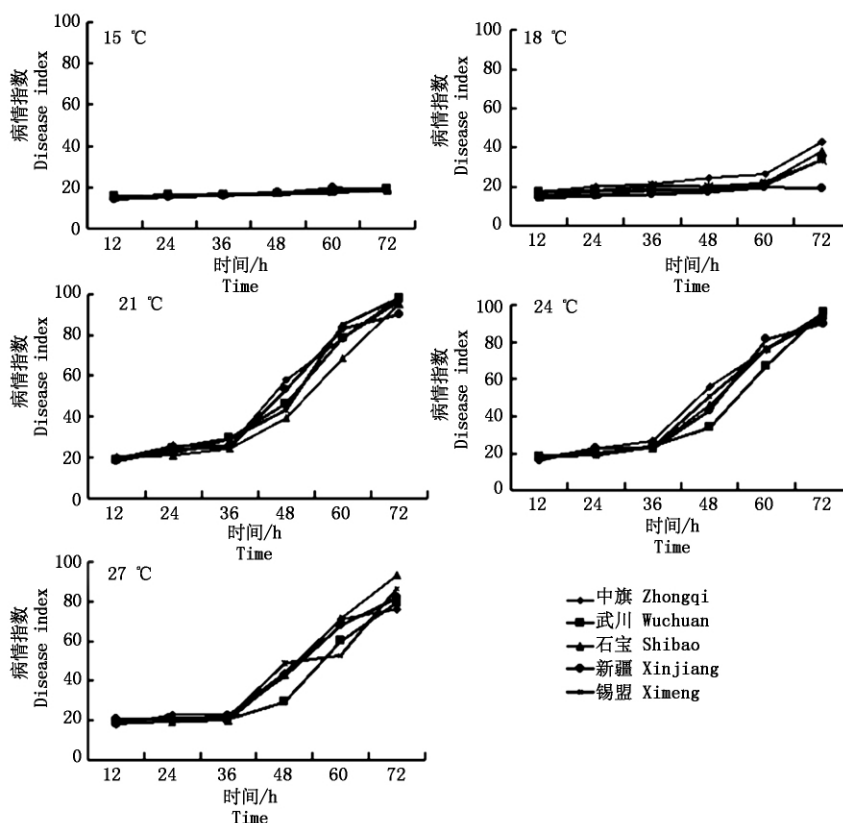


图4 不同保湿时间与温度组合对病原菌侵染的影响

Fig.4 Effects of temperature and wetness on the infection of the pathogen

### 2.3 保湿时间对病原菌侵染的影响

试验结果显示,在培养温度为 21 ℃,相对湿度为 90% 的条件下,保湿时间对病原菌的侵入有较大影响,保湿时间越长,越有利于病原菌侵入、病斑扩展,病情指数越高,保湿时间越短,病情指数越低。保湿时间 12 h 时供试品种中病情指数最高的只有 20,而保湿 72 h 时供试品种中病情指数最低的是 90。

### 2.4 不同保湿时间与温度组合对病原菌侵染的影响

通过对每一个油菜品种共设的 30 个温湿度处理组合的分析可知,15 ℃ 时,各品种的病情指数均随保湿时间增长而略显升高,且保湿时间长达 72 h 时,病情指数亦低于 20; 21 ℃ 时,保湿 48 h 以上,各品种的病情指数均大幅上升; 而 27 ℃ 时,保湿 48 h 以上,各品种的病情指数虽随保湿时间的增长而上升,但较 21 ℃ 条件下缓慢得多。

## 3 讨论

经在人工气候室对油菜黑胫病的侵染条件研究可知, *Leptosphaeria biglobosa* 的分生孢子可在广泛的温湿度范围内对油菜叶片进行侵染,研究表明,该病原菌侵染的最佳温度和保湿时间组合为: 温度 21 ~ 24 ℃, 保湿 48 h 以上。说明该病菌入侵至发病需较高的温度和较长的叶面湿润时数。

Rotem 曾研究油菜黑胫病强毒型菌株 *Leptosphaeria maculans* 的发病条件,试验结果显示,18 ~ 20 ℃, 保湿时间不低于 48 h 时,有效侵染最高,病斑最多,当侵染条件欠佳时,保湿时间缩短,温度高于或低于最适温度时,有效侵染降低。本试验亦证实 *Leptosphaeria biglobosa* 喜温好湿,其侵染发病对温湿度要求较高,特别是湿度。

油菜黑胫病病菌为偏高温侵染型真菌,21 ℃ 以下的温度有利于病菌侵入而不利于其扩展,27 ℃ 的高温虽不适于病菌侵入,但有利于已侵入菌丝在寄主叶内扩展。因此,进行病菌生理分化鉴定时,接种温度不能过高或过低。

病菌入侵是病程中极为重要的一环,研究证明,接种温度及叶面湿润时数显著地影响油菜黑胫病菌的侵入,因此,在田间病害预测中,考虑品种、栽培因素的同时,须抓住田间结露温度和叶面湿润时数这两个重要的气象条件,从而可以对病菌的侵入作出准确估计,对整个病害的发生趋势作出科学准确的预测,以便于实时开展防治工作,有效地控制病害发生危害。

### 参考文献:

- [1] Fitt B D L, Brun H, Barbetti M J *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.
- [2] 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.
- [3] 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.
- [4] Shoe maker R A, Brun H. The teleomorph of the weakly aggressive segregate of *Leptosphaeria maculans* [J]. Canadian Journal of Botany 2001, 79: 412 - 419.
- [5] Mendes Pereira E, Balesdent M H, Brun H *et al.* Molecular phylogeny of the *Leptosphaeria maculans* L. *biglobosa* species complex [J]. Mycological Research 2003, 107: 1287 - 1304.
- [6] Gugel R K, Petrie G A. History, occurrence, impact, and control of blackleg of rapeseed [J]. Canadian Journal of Plant Pathology, 1992, 14: 36 - 45.
- [7] 刘泽, 李强生, Avic M H 等. 油菜黑胫病病原真菌的分离与鉴定 [C] // 中国植物病理学会 2008 年学术年会论文集. 北京: 中国农业科学技术出版社, 2008: 172 - 176.
- [8] West J S, Evans N, Liu S *et al.* *Leptosphaeria maculans* causing stem canker of oilseed rape in China [J]. Plant Pathology 2000, 48: 800.
- [9] Rouxel T, Balesdent M H. The stem canker (blackleg) fungus *Leptosphaeria maculans*, enters the genomic era [J]. Molecular Plant Science 2005, 6: 225 - 241.
- [10] Jeewon R, Liew E C Y, Hyde K D. Phylogenetic evaluation of species nomenclature of Pestalotiopsis in relation to host association [J]. Fungal Diversity 2004, 17: 39 - 55.
- [11] De March G, Seguin-Swartz G, Petrie G A. Virulence and culture filtrate phytotoxicity in *Leptosphaeria Maculans*: perspectives for in vitro selection [J]. Canadian Journal of Plant Pathology, 1986, 8: 422 - 428.
- [12] Somda I, Renard M, Brun H. Seedling and adult plant reactions of *Brassica napus*-B. juncea recombinant lines towards A-and B-group isolates of *Leptosphaeria maculans* [J]. Annals of Applied Biology, 1998, 132: 187 - 196.
- [13] Balesdent M H, Attard A, Ansan-Melayah D *et al.* Genetic control and host range of avirulence towards *Brassica napus* cultivars Quinta and Jet Neuf in *Leptosphaeria maculans* [J]. Phytopathology 2001, 91: 70 - 76.