

# 河南省部分地区小麦黑粉病菌的 鉴定和系统进化分析

张 怡,张福丽,曹 鹏,魏 森,韦丹丹,刘 柯,周 晗,李成伟

(周口师范学院 植物遗传与分子育种重点实验室,河南 周口 466001)

**摘要:**为了对小麦黑粉病及时预报与防治,以采自河南省南阳、周口和平顶山(2个)的4个病原菌菌系为材料,采用传统的形态学鉴定法和ITS序列分析相结合,确定来自南阳和平顶山市区的病原菌菌系为小麦散黑粉菌,来自周口和平顶山郟县的病原菌菌系属于小麦秆黑粉菌。根据ITS序列进行系统进化分析发现,南阳和平顶山市区的散黑粉菌与周口和平顶山郟县的秆黑粉菌分别聚在2个进化枝上。河南省流行的小麦黑粉病可能由散黑粉菌和秆黑粉菌共同导致。

**关键词:**河南省;小麦散黑粉菌;小麦秆黑粉菌;ITS序列;进化树

**中图分类号:**S432.4 **文献标识码:**A **文章编号:**1000-7091(2014)01-0213-04

## Identification and Phylogenic Analysis of Wheat Smut Fungi of Henan Province

ZHANG Yi,ZHANG Fu-li,CAO Peng,WEI Sen,WEI Dan-dan,LIU Ke,ZHOU Han,LI Cheng-wei

(Key Laboratory of Plant Genetics and Molecular Breeding,Zhoukou Normal University,Zhoukou 466001,China)

**Abstract:** In order to lay the foundation for wheat smut prevention and forecasting, four strains of wheat smut fungi of Nanyang, Zhoukou, Pingdingshan in Henan Province were identified. Internal transcribed spacer (ITS) analyses and microscopic morphological observations were conducted. It indicated that two strains from Nanyang and Pingdingshan city were *Ustilago tritici*, another two strains from Zhoukou and Jiaxian of Pingdingshan were *Urocystis agropyri*. Phylogenetic analysis demonstrated that the strains collected from Nanyang and Pingdingshan districts were clustered into one clade, while other two *U. agropyri* strains collected from Zhoukou and Pingdingshan Jiaxian were clustered into the other one. The results implied that there was coexistence phenomenon of *U. tritici* and *U. agropyri* in Henan Province.

**Key words:** Henan Province; *Ustilago tritici*; *Urocystis agropyri*; Internal transcribed spacer; Phylogenetic tree

小麦黑粉病俗称黑疸,包括小麦散黑穗病、小麦腥黑穗病和小麦秆黑粉病3种类型,属于系统性侵染病害,广泛发生于小麦产区,是小麦上的一类重要病害。目前,由于新的种子杀菌剂和抗病品种的不断出现,黑粉病对小麦的危害程度已有所减轻,但在一些地区,由于忽视植物检疫,农民不重视选用无病良种及药剂拌种处理,致使此类病害有所回升、加重,小麦感染黑粉病后一般减产10%~20%,重者可达70%甚至绝收,另外误食带菌小麦还可造成人畜中毒。

小麦散黑穗病(Loose smut)是由担子菌亚门的

小麦散黑粉菌(*Ustilago tritici*)引起的真菌病害,主要在穗部发病,病穗比健穗较早抽出,病穗上的小穗全部被毁或部分被毁,仅上部残留少数健穗。小麦秆黑粉病(Stem smut)又称“铁条麦”,由小麦秆黑粉菌(*Urocystis agropyri*)引起。过去该病在我国曾普遍发生于黄淮海冬麦区,以河南、山东等省发生较重。病株常矮化、畸形或卷曲,多数病株不能抽穗,卷曲于叶鞘内,或抽出畸形穗、花而不实,或仅有秕粒。

目前,有关小麦黑粉病的研究主要集中在发生原因、特点及防治对策等<sup>[1-2]</sup>方面,而结合显微形态学和分子生物学技术对小麦黑粉病鉴定的研究较

收稿日期:2013-07-05

基金项目:国家自然科学基金项目(31071807,31272168);河南省教育厅自然科学研究项目(12B210028);河南省教育厅科学技术研究重点项目(14A180038)

作者简介:张 怡(1985-),女,河南汝阳人,实验师,硕士,主要从事植物与微生物互作研究。

通讯作者:李成伟(1972-),男,河南民权人,教授,博士,主要从事植物与病原体互作和抗性分子育种研究。

少。植物遗传与分子育种重点实验室从河南省 3 个地级市采集小麦黑粉病植株,从外观上看麦穗和叶片上均布满黑粉,无法确定其为黑粉病的哪种类型。为此,采用传统的形态学方法和核糖体内转录间隔区(ITS)序列分析法对所采集的感病小麦进行病原鉴定和分析,并进一步在核酸序列数据库对 ITS 序列进行同源性搜索比对,构建系统发育进化树,以期为进一步深入研究小麦黑粉病以及培育小麦抗性品种奠定基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 试验材料

1.1.1 感病植物材料 感染黑粉病的小麦植株分别取自周口市川汇区、南阳市卧龙区、平顶山市区及郟县。

1.1.2 主要试剂 2% CTAB 抽提液:100 mmol/L Tris-HCl(pH 值 8.0),20 mmol/L EDTA(pH 值 8.0),1.5 mol/L NaCl,2% CTAB(*m/V*),4% PVP-40(*m/V*),121 °C 高压灭菌 20 min,使用前加入 2%  $\beta$ -巯基乙醇(*V/V*);10% CTAB 抽提液:100 mmol/L Tris-HCl(pH 值 8.0),20 mmol/L EDTA(pH 值 8.0),1.5 mol/L NaCl,10% CTAB(*m/V*),4% PVP-40(*m/V*),121 °C 高压灭菌 20 min,使用前加入 2%  $\beta$ -巯基乙醇(*V/V*)。pMD19-T Vector、2 × *Taq* Master Mix 购自宝生物工程(大连)有限公司(TaKaRa);SanPrep 柱式 DNA 胶回收试剂盒购自生工生物工程(上海)有限公司;高纯度质粒小量快速提取试剂盒购自北京艾德莱生物科技有限公司;其他试剂均为进口或国产分析纯。

### 1.2 试验方法

1.2.1 小麦黑粉病菌的形态观察 首先对小麦黑粉病感病叶片及麦穗进行观察并拍照,之后取 1.5 cm × 1.5 cm 大小的叶片或取部分感病麦穗进行真空镀金,在 FEI 公司的 Quanta 200 型扫描电子显微镜下观察拍照,具体参数设置如下:预设驻留时间为 10  $\mu$ s,灯丝电压为 20.00 kV,真空度分别采用  $1.56 \times 10^{-2}$  Pa 和  $1.94 \times 10^{-2}$  Pa。

1.2.2 小麦黑粉病菌总 DNA 的提取 采用改良后的真菌 DNA 提取方法<sup>[3]</sup>提取小麦黑粉病菌的 DNA。

1.2.3 小麦黑粉病菌 ITS 序列的 PCR 扩增及测序 小麦黑粉病菌 ITS 序列扩增的引物为真菌核糖体 ITS 区段通用引物 ITS1(5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3')和 ITS4(5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3')。PCR 体系(20  $\mu$ L):病原菌 DNA 2  $\mu$ L,上游引

物 1  $\mu$ L,下游引物 1  $\mu$ L,2 × *Taq* Master Mix 10  $\mu$ L,加双蒸水至 20  $\mu$ L。PCR 反应条件:94 °C 预变性 10 min;94 °C 变性 30 s,48.6 °C 退火 1 min,72 °C 延伸 45 s,共 35 个循环;最后 72 °C 延伸 10 min。取 6  $\mu$ L PCR 产物进行 0.8% 琼脂糖凝胶电泳,在紫外凝胶成像系统下观察并拍照。将所得到的目的条带经 SanPrep 柱式 DNA 胶回收试剂盒纯化后,连接至 pMD19-T Vector 上,选取阳性克隆送至南京金斯瑞生物科技有限公司进行测序。

1.2.4 ITS 序列比对和系统发育进化树的构建 对获得的小麦黑粉病菌 ITS 序列在 NCBI 中进行 BLAST 检索比对,将得到的同源性较高的序列通过 Clustal X 软件中的 Alignment 程序进行多重对位排列(Multiple alignments)。然后采用 MEGA 5.0 软件做邻近归群法分析,用 Kimura2-parameter 模式计算遗传距离,用自展法(Bootstrap)对系统进化树进行检测,自展重复次数设定为 1 000 次,对其进行系统发育分析和进化树的构建。

## 2 结果与分析

### 2.1 病原菌的形态特征

将南阳卧龙区和平顶山市区的小麦黑粉病菌简称为 NYUT1、PDSUT2,周口川汇区和平顶山郟县的小麦黑粉病菌简称为 ZKUA1、PDSUA1。NYUT1 和 PDSUT2 主要侵染穗部,最初病穗外面包裹一层灰色薄膜,成熟后破裂,散出黑粉,只剩下裸露的穗轴。ZKUA1 和 PDSUA1 在小麦分蘖时侵染,最初在叶片、叶鞘及茎秆上出现黄白色条斑,后逐渐变为银灰色,条斑内充满黑粉,后期表皮破裂,黑粉散出,引起叶片卷缩、扭曲、干枯(图 1)。

通过扫描电镜观察,NYUT1 和 PDSUT2 的孢子呈球形或近球形,表面布满细刺,大小(5~9)  $\mu$ m × (5~7)  $\mu$ m(图 2-A),因此初步认定 NYUT1 和 PDSUT2 为小麦散黑粉菌。ZKUA1 和 PDSUA1 的孢子为球形,具网状花纹,网眼宽 2~5  $\mu$ m(图 2-B),可能为小麦秆黑粉菌,由于其与小麦腥黑粉病菌的冬孢子形态相似,难以辨认,因此需要进一步从分子水平上进行确定。

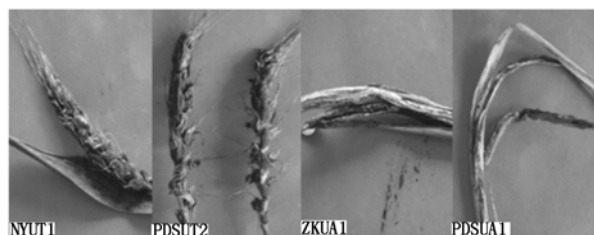


图 1 四株染病小麦症状特征  
Fig. 1 The symptom characteristic of four infected wheat plants

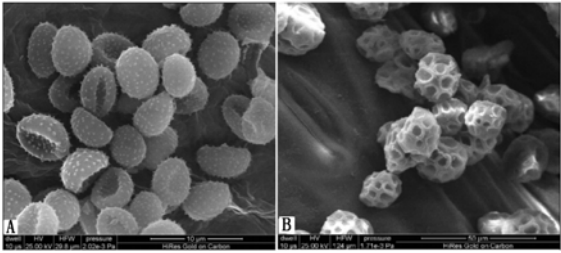
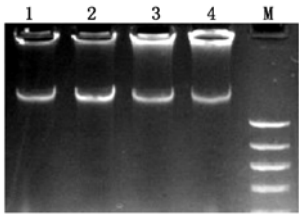


图 2 小麦黑粉病菌的扫描电镜照片  
Fig.2 Images of wheat smut fungi taken  
by scanning electron microscope



M. DNA Marker;1. PDSUT2 DNA;2. PDSUA1 DNA;  
3. ZKUA1 DNA;4. NYUT1 DNA.  
图 3 四株小麦黑粉病菌总基因组 DNA 的电泳检测  
Fig.3 Electrophoretic result of genomic  
DNA from four wheat smut fungi

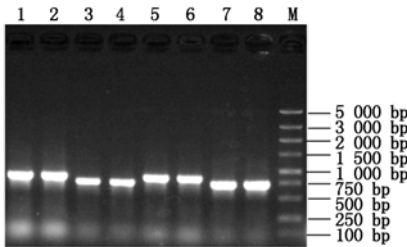
2.2 小麦黑粉病菌总 DNA 的提取

提取 4 株小麦病菌的总 DNA 后,采用 0.8 % 琼脂糖凝胶电泳检测条带的完整性,如图 3 所示;经分

光光度计检测 DNA 的质量,NYUT1、ZKUT2、ZKUA1 及 PDSUA1 的  $A_{260/280}$  值均在 1.8 左右,说明所提取的病菌 DNA 质量较好,可以作为模板进行 ITS 的扩增。

2.3 小麦黑粉病菌 ITS 序列的测定

以病原菌的 DNA 为模板,真菌核糖体 ITS 区通用引物 ITS1 和 ITS4 为引物,PCR 扩增小麦黑粉病菌 ITS 序列,经 35 个循环后分别得到 500 ~ 800 bp 的目的片段(图 4),测序后得到 4 株小麦黑粉病菌的 ITS 序列。将这 4 条 ITS 序列上传至 GenBank 数据库,NYUT1、PDSUT2、ZKUA1、PDSUA1 的登录号分别是 JN114418、JN114419、JN114421、JN114422。通过 BLAST 搜索和序列比对后,确定了各 ITS 序列的结构,见表 1。



M. DL5000;1 - 2. NYUT1;3 - 4. PDSUA1;5 - 6. PDSUT2;7 - 8. ZKUA1.  
图 4 四株小麦黑粉病菌 ITS 序列的 PCR 产物电泳图谱  
Fig.4 Electrophoresis of ITS PCR products from  
four wheat smut fungi in Henan

表 1 四条 ITS 序列的结构

| Tab.1 The sequence structure of four ITS from wheat smut fungi |        |          |           |           |           | bp |
|--|--------|----------|-----------|-----------|-----------|----|
| 登录号<br>Accession number  | 18S    | ITS1     | 5.8S      | ITS2      | 28S       |    |
| JN114418(776 bp)   | 1 ~ 20 | 21 ~ 265 | 266 ~ 420 | 421 ~ 717 | 718 ~ 776 |    |
| JN114419(777 bp)   | 1 ~ 23 | 24 ~ 264 | 265 ~ 430 | 431 ~ 727 | 728 ~ 777 |    |
| JN114421(673 bp)   | 1 ~ 31 | 32 ~ 198 | 199 ~ 356 | 357 ~ 621 | 622 ~ 673 |    |
| JN114422(662 bp)   | 1 ~ 20 | 21 ~ 187 | 188 ~ 345 | 346 ~ 610 | 611 ~ 662 |    |

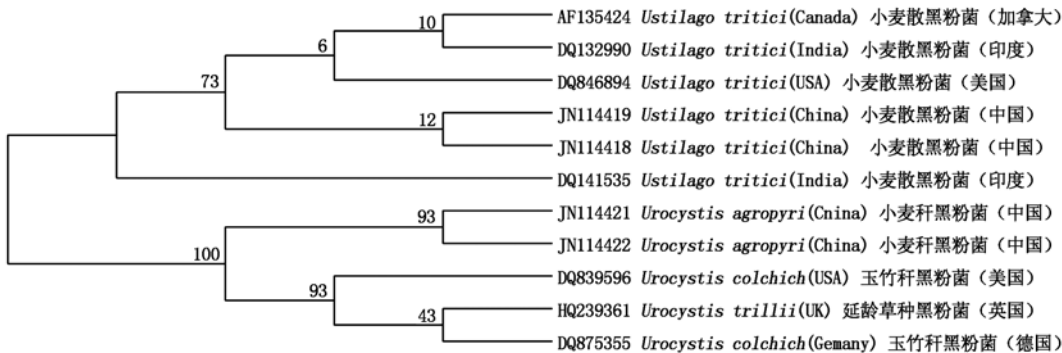


图 5 根据 4 株小麦黑粉病菌和 NCBI 中相关黑粉病菌 ITS 序列构建的 N-J 系统进化树  
Fig.5 Neighbor-joining consensus tree of 4 wheat smut fungi and related smut fungi in NCBI based on ITS sequence data

2.4 基于 ITS 序列的进化树分析

将这 4 条病菌 ITS 序列在 NCBI 网站上进行 BLAST 分析,搜索同源性较高的序列,构建系统进化树(图 5),聚类分析后发现,进化树明显分为 2 个亚支,南阳和平顶山市区的小麦黑粉病菌与加拿大、

美国、印度的小麦散黑粉菌的同源性达到 100%,聚在一个进化枝上,从而确定 NYUT1(JN114418)、PDSUT2(JN114419)为小麦散黑粉菌;周口和平顶山郟县的小麦黑粉病菌与来自美国、德国的玉竹秆黑粉菌(U. colchici)和英国的延龄草秆黑粉菌(U. trillii)

的亲缘关系在 91% 以上,聚在一个分支上,说明 ZKUA1(JN114421)和 PDSUA1(JN114422)为小麦散黑粉菌,且秆黑粉菌在不同植物上的进化比较保守。

### 3 结论与讨论

黑粉病菌是一类寄生于植物上引起多种症状并形成成堆黑色孢子的真菌,据统计,该类真菌有 50 多个属 950 余种,是寄生于高等植物的主要病原真菌<sup>[4]</sup>。黑粉菌主要侵染禾本科、莎草科、十字花科、毛茛科和百合科植物,以禾本科植物上寄生的种类最多,有 14 个属 600 余种。黑粉病主要在禾谷类作物上发生,目前国内发现感染黑粉病的作物有小麦、甘蔗<sup>[5]</sup>、青稞<sup>[6]</sup>、高粱<sup>[7]</sup>、玉米<sup>[8]</sup>、水稻<sup>[9]</sup>及竹类<sup>[10]</sup>等,对我国粮食作物及经济作物的产量影响较大,另外在一些草本植物上也发现了该病,如慈姑<sup>[11]</sup>、画眉草<sup>[12]</sup>、白羊草<sup>[12]</sup>、草玉梅<sup>[12]</sup>、蓼<sup>[12]</sup>及薏苡<sup>[13]</sup>等。在国外,黑粉病在干豆<sup>[14]</sup>、冰草<sup>[15]</sup>、牛毛草<sup>[16]</sup>上也有发生的报道。黑粉菌的分类主要根据冬孢子的性状,但是有许多黑粉菌很难通过冬孢子的性状区别,所以寄主范围也作为种的鉴别性状<sup>[17]</sup>。

传统的真菌分类方法仅以形态特征和生理生化指标为依据,但大多数真菌常由于种类多、分布广,理化指标和形态特征复杂易变,进而导致传统分类结果与系统进化分析不一致。近年来随着分子生物学的发展,ITS 序列分析技术逐渐成为真菌分类鉴定和系统发育研究的重要依据<sup>[18]</sup>。ITS 序列位于 18S 和 5.8S rDNA 之间(ITS1)以及 5.8S 和 2.8S rDNA 之间(ITS2),18S、5.8S、28S rDNA 的基因序列进化相对缓慢,但 ITS1 和 ITS2 序列的进化则相当迅速,因此,ITS 序列在真菌分类和鉴定中发挥越来越重要的作用,广泛用于种间或种内群体的系统学研究<sup>[5]</sup>。

本研究采用形态学鉴定法和 ITS 序列分析法相结合对河南省小麦黑粉病的病原进行鉴定,结果表明,南阳的病原菌(NYUT1)为小麦散黑粉菌,周口的病原菌(ZKUA1)为小麦秆黑粉菌,平顶山存在小麦散黑粉菌(PDSUT2)和小麦秆黑粉菌(PDSUA1)共存的现象,说明河南流行的黑粉病可能由不同的黑粉病菌共同导致。NYUT1 和 PDSUT2 均与相距较远的加拿大、美国、印度的小麦散黑粉菌的同源性达到 100%,据此推测小麦散黑粉菌在不同国家之间没有发生变异。ZKUA1 和 PDSUA1 与美国、德国的玉竹秆黑粉菌和英国的延龄草秆黑粉菌同源性很高,推断小麦秆黑粉菌的流行可能存在全球传播的途径。

本研究运用显微形态学和分子生物学的方法,对河南省 3 个地级市的小麦黑粉病菌进行了分析鉴定,为河南小麦黑粉病菌的分类和防治提供了理论依据。

### 参考文献:

- [1] 程小明,李铃鸽.复方适乐时拌种防治冬小麦病害和地下害虫效果试验[J].河南农业科学,2001(9):22-23.
- [2] 陶爱丽,黄思良,王坦,等.南阳市小麦秆黑粉病的发生及小麦品种的抗病性鉴定[J].河南农业科学,2013,42(3):79-82.
- [3] 张怡,张佩佩,马晓萌,等.河南两地市小麦白粉病菌的分子鉴定和进化分析[J].华北农学报,2012,27(1):189-192.
- [4] Kirk P M, Ainsworth G C. Ainsworth and Bisby's dictionary of the fungi[M]. UK: Cab International, 2008.
- [5] 杨志才,熊国如,陈雪婷,等.海南蔗区甘蔗黑穗病菌的分离鉴定[J].热带作物学报,2010,31(5):828-833.
- [6] 赖翼,刘成君,李晖,等.青稞散黑穗病拮抗菌 LN-176 的分离鉴定、发酵条件及发酵产物的研究[J].植物保护,2005,31(3):31-34.
- [7] 张福耀,平俊爱,杜志宏,等.山西高平高粱丝黑穗病菌致病力研究[J].植物病理学报,2005,35(5):475-477.
- [8] 吴景芝,魏永田,李自萍,等.玉米丝黑穗病菌冬孢子萌发湿度及云南玉米新品种抗性鉴定研究[J].中国农学通报,2009,25(19):186-189.
- [9] 刘慧.我国稻粒黑粉病的研究进展[J].江西植保,2008,31(1):3-6.
- [10] 余雯雯.安徽竹类病害种类调查及主要病害发生规律研究[D].合肥:安徽农业大学,2010.
- [11] 王汉荣,方丽,陆国军,等.慈姑黑粉病的识别与防治[J].中国蔬菜,2009(23):18-19.
- [12] 王生荣.甘肃省草本植物上几种黑粉病及病原鉴定[J].草业学报,2000,9(1):37-42.
- [13] 李戈,彭建明,高微微,等.我国南方薏苡种质资源对黑粉病的抗病性鉴定[J].中国中药杂志,2010,35(22):2950-2953.
- [14] Costa J L da S, de Oliveira V C. Occurrence of smut caused by a *Ustilago* sp. on dry-beans [J]. Plant Disease, 1999, 83(5):486-486.
- [15] Chang K F, Howard R J, Gossen B D, et al. Stem smut (*Ustilago n hypodytes*) on intermediate wheatgrass in Canada [J]. Plant Disease, 2001, 85(1):96-96.
- [16] McBeath J H, Cheng M, Gay P A, et al. First report of leaf smut on fescue (*Festuca rubra*) caused by *Urocystis agropyri* in interior Alaska [J]. Plant Disease, 2008, 92(4):652-652.
- [17] 方仲达.植病研究法[M].北京:中国农业出版社,1996.
- [18] 匡治州,许杨.核糖体 rDNA ITS 序列在真菌学研究中的应用[J].生命的化学,2004,24(2):120-122.