# 牛大力叶斑病菌的分离鉴定及生防菌筛选

# 1研究目的

牛大力具有抗疲劳等多种功效，根据统计，2020年广西牛大力种植面积达到5973公顷[1]。但是，在种植过程中会出现牛大力病害，影响牛大力的生长从而影响经济收入。因此，探索研究掌握牛大力病害的机理以及治疗措施具有十分重要的意义。通过本课题的研究，可获得使牛大力患叶斑病的病原菌N2-2，并对其进行分类鉴定，为牛大力病害的防治奠定基础。

# 2研究内容和研究路线

## 2.1研究内容

1. 牛大力病原菌的分离和纯化
2. 致病性测定

（3）病原菌的鉴定

（4）生物学特性测定

## 2.2研究路线

1、牛大力病原菌的分离和纯化

2、致病性实验测定致病性

3、显微镜观察形态学特征

4、提取基因组DNA、进行PCR、琼脂糖凝胶电泳检测产物

5、16SrDNA序列测定

6、构建系统发育树并分析

7、生物学特性测定

8、生防菌对植物的病害测定

# 3材料与方法

## 3.1材料

### 3.1.1样品采集

在广西牛大力种植田中采集带有叶斑病的牛大力叶，把所采集的样本装进保

鲜袋子将其带回实验室放进4℃冰箱保存备用。

### 3.1.2主要试剂

真菌基因组DNA快速抽提试剂盒（B518229-0100）、75%乙醇、引物ITS1、ITS4、2×SanTaqPCRMix、琼脂糖、DNAMarker、绿如蓝核酸染料等。

### 3.1.3主要培养基

马铃薯葡萄糖琼脂培养基（PDA），详细配方参考文献[2]。

### 3.1.4实验主要仪器

本实验所使用的主要仪器见表1.1所示。

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **表1.1实验所用仪器**  **Table 1.1 Instruments used in the experiment** | | |
| 仪器名称 | 型号 | 生产厂家 |
| 立式自动压力蒸汽灭菌锅 | G154TW | 致微（厦门）仪器有限公司 |
| 电子分析天平 | AJ5003 | 上海舜宇恒平科学仪器有限公司 |
| 微波炉 | M3-L253C | 广东美的厨房电器制造有限公司 |
| 光学显微镜 | DM2500 | CMSGmbH,Wetzlar,Germany |
| 电热恒温水浴锅 | 11380 | 天津市泰斯特仪器有限公司 |
| 超净工作台 | A18127727 | 苏州安泰空气技术有限公司 |
| 光照培养箱 | HGZ-400 | 上海慧泰仪器制造有限公司 |
| PCR扩增仪 | T100 | 上海艾研生物科技发展有限公司 |
| 水平电泳仪 | MP-300V | Intertek4004030 |
| 凝胶成像分析系统 | 12200157 | 北京五洲东方科技发展有限公司 |
| 医用离心机 | H1650 | 湖南湘仪实验室仪器有限公司 |

## 3.2方法

### 3.2.1病原菌分离与纯化

参考邱泽澜[3]等较为常规的组织分离法分离纯化得到病原菌，具体操作如下：把采集到的患叶斑病的牛大力叶用无菌水洗干净晾干，超净工作台中在病叶的发病与健康交接处用灭过菌的剪刀剪取5mm×5mm左右大小的组织块，将组织块首先浸泡在75%的酒精中10s左右，接着用无菌水充分冲洗3次，沥干水分晾干后，把组织块转移到PDA培养基中培养，培养温度设为28℃。等平板长出菌落时，挑取菌落进行纯化培养。运用新鲜的培养基进行单孢分离，待长出菌株后，在这些菌株中挑选一株生长状况良好的菌株，编号记为N2-2放置4℃冰箱中储存备用。

### 3.2.2致病性测定

参照王晓宇[4]等方法测定N2-2菌株的致病性。选用无病害的牛大力幼苗植株作为实验植株，把健康的牛大力叶用无菌水擦拭干净，再用75%的酒精消毒，待叶子晾干后用灭过菌的牙签轻轻刺破接种处的表皮制作伤口，用无菌的枪头打1cm左右大小的已用PDA培养基培养好的菌块，再用灭过菌的接种环挑取菌丝块使有菌丝一面与伤口接触覆盖在叶子上，用空白PDA培养基作为对照，叶子表面均用无菌水浸湿的棉花覆盖其上并套上透明塑料袋以起到保湿的作用，每天观察叶片病害的发生情况，并拍照记录。对病叶进行再分离纯化，检测致病性，证实柯赫氏法则。

### 3.2.3病原菌鉴定

（1）形态学鉴定

把分离纯化得到的菌株接种到含有新鲜PDA培养基的平板上28℃培养5d，观察菌落形态和颜色，7-8d后挑取菌丝制作玻片运用光学显微镜观察测量该病原菌的孢子并拍照做好记录[5]。

（2）分子鉴定

从分离纯化得到的菌株平板上挑取菌饼接种在PDA培养基上28℃培养7-8d，随后利用真菌基因组DNA快速抽提试剂盒（B518229-0100）来提取该株病原菌的总DNA。用所提取的N2-2总DNA为PCR模板，采用通用引物和特异性引物[6]来扩增该病原菌的DNA片段，PCR反应体系和反应条件如表1.2和表1.3所示。PCR反应结束后吸取2μL产物进行琼脂糖凝胶电泳检测，在凝胶成像分析系统下观察看到清晰、单一条带后，将PCR产物送到广州艾基生物有限公司测序，测序结果使用NCBI数据库比对，运用MEGA7.0软件采用邻接法、最大似然法构建系统进化发育树[7]。

|  |  |
| --- | --- |
| 表1.2PCR反应体系  Table 1.2 PCR reaction system | |
| PCR反应体系50μL | 体积 |
| ITS1 | 2μL |
| ITS4 | 2μL |
| DNA模板 | 2μL |
| ddH2O | 19μL |
| 2×SanTaq PCR Mix | 25μL |

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| 表1.3PCR反应条件  Table 2.3 PCR reaction conditions | | | |
| 步骤 | 温度 | 时间 | 循环数 |
| 预变性 | 95℃ | 3min | 35cycles |
| 变性 | 95℃ | 30sec |
| 退火 | 52℃ | 30sec |
| 延伸 | 72℃ | 2min |
| 保存 | 4℃ | ∞ |

### 3.2.4生物学特性测定

1. 不同PH对牛大力叶斑病病原菌菌落生长的影响

在配制好的PDA灭菌培养基等待温度降至50℃左右未固化之前，使用1mol/LHCl溶液或1mol/LNaOH溶液[8]把培养基的pH分别调节至3、4、5、6、7、8、9、10和11并倒平板形成平板培养基。用无菌打孔器将已培养好的N2-2打成5mm大小的菌饼，分别接种在不同pH的平板培养基中央，每组设置3个重复，在28℃的培养箱中培养，每2d使用十字交叉法测量菌落直径[9]。

（2）不同温度对牛大力叶斑病病原菌菌落生长的影响

在超净工作台中，用打孔器和接种环将5mm大小的菌饼接种到PDA培养基平板上，分别放在20℃、24℃、28℃、32℃、36℃培养箱中培养，每组设置3个重复，每隔2d运用十字交叉法测量其直径，连续测量6d。

1. 不同光照对牛大力叶斑病病原菌菌落生长的影响

把N2-2菌株5mm大小的菌饼接在PDA培养基中央，分别置于完全光照、完全黑暗和光暗交替（每12h交换1次）[10]，其他条件相同，每组设置3个重复，分别放置在28℃培养箱中培养8d,第4d和第8d用十字交叉发测量其菌落直径。

1. 不同碳源对牛大力叶斑病病原菌菌落生长的影响

分别称量等碳量的L-李鼠糖、D-棉籽糖、肌醇、木糖、果糖、葡萄糖、甘露醇、阿拉伯糖加入到基础碳源培养基中，以无碳的Czapek培养基作为空白对照[11]。将5mm大小的试验菌株菌块接种到各培养基中，除碳源条件不同外，其他条件相同，每组设置3个重复，28℃培养6d,每隔2d用十字交叉法测量一次直径。

# 4生防菌对植物病害的测定

# 5研究预期成果

通过对广西牛大力叶斑病这一新病害病原菌N2-2进行形态学观察和分子鉴定并结合系统进化发育树结果，将该株菌株确定为塔利间座壳菌（Diaporthe tulliensis）。塔利间座壳菌归属于间座壳属，此属的病原菌还可以引起槟榔叶斑病、杧果叶斑病、蓝莓溃疡病、金刺梨叶部病害等[12]-[15]，这表明间座壳属菌对于寄主没有特异性，可以感染不同的植物。对该株塔利间座壳菌进行生物学特性测定表明：该株塔利间座壳菌生长的适宜温度范围是24~28℃，适宜pH范围为7~10。在分别以L-鼠李糖、D-棉籽糖、肌醇、木糖、葡萄糖、甘露糖或阿拉伯糖为碳源的培养基上其生长状态均良好一致，如若以果糖为碳源则其菌丝的生长受到抑制，这与2022年唐伟等人[16]报道的甘薯基腐病病原菌最适合碳源为糊精不一致。完全黑暗条件对该株塔利间座壳菌菌丝生长有抑制作用，与2023年刘凯[17]报道的苹果新栽幼树干腐病病原菌D.sojae在完全黑暗的条件下菌丝生长得最慢相同。这些间座壳属的病原菌与本实验研究的牛大力叶斑病塔利间座壳菌（Diaporthe tulliensis）的生物学特性有一定的差异，推测这些差异有可能是来自不同地理位置、不同寄主的同一属真菌同一种间或不同种间有差异导致的[18]。通过了解该株塔利间座壳菌的生物学特性，可以通过控制各种外界环境例如温度、光照条件等来抑制病原菌的生长，从而达到防治病害的效果。

# 6研究进度

2024年5月8日——2024年7月31日：完成牛大力病原菌的分离和纯化

2024年8月1日——2024年9月10日：完成致病性实验测定致病性

2024年9月11日——2024年10月31日：完成显微镜观察形态学特征

2024年11月1日——2024年12月1日：完成病原菌分子鉴定

2024年12月2日——2025年1月5日：完成生物学特性测定

2025年1月6日——2025年2月1日：完成生防菌的筛选

# 参考文献

1. 陈少容,黄荣韶,李良波,等.牛大力主要病虫害调查及白粉病的防治技术研究[J].湖北农业科学,2022,61(15):121-123+132.DOI:10.14088/j.cnki.issn0439-8114.2022.15.020.
2. 张强,张艳茹,霍云凤,等.禾谷镰刀菌拮抗菌21-1的发酵条件及稳定性分析[J].江苏农业科学,2023,51(20):122-127.DOI:10.15889/j.issn.1002-1302.2023.20.017.
3. 邱泽澜,陈锦,张卓,等.湖南省多花黄精炭疽病病原鉴定及其药剂筛选[J].西南农业学报,2023,36(01):91-97.DOI:10.16213/j.cnki.scjas.2023.1.011.
4. 王晓宇,李增平,郑志淋,等.莲藕棒孢霉叶斑病病原鉴定及其生物学特性测定[J].热带作物学报,2019,40(04):734-740.
5. 梁松,高媛,于新,等.临沂地区草莓叶枯病病原菌的分离鉴定及其生物学特性研究[J].安徽农业科学,2024,52(05):140-143.
6. White T J, Bruns T, Lee S, et al.Amplification and direct sequencing offungal ribosomal RNA genes for phylogenetics[M]//Innis M A, Gelfand D H, Sninsky J J, et al (eds) .PCR protocols:A guide to methods and applications.New York:Academic Press, 1990:315-322.
7. 王飞,杨瑾,李绍建,等.牛膝茎基腐病的病原菌分离与鉴定[J].植物病理学报,2024,54(06):1268-1272.DOI:10.13926/j.cnki.apps.000920.
8. 刘思睿,赵兴丽,罗林丽,等.魔芋茎腐病病原的生物学特性及不同杀菌剂对病原菌的室内毒力[J].贵州农业科学,2024,52(02):56-63.
9. 王小秋,葛礼姣,仇亮,等.蘘荷叶枯病病原菌的分离鉴定与生物学特性[J].湖南农业大学学报(自然科学版),2023,49(06):689-693+736.DOI:10.13331/j.cnki.jhau.2023.06.009.
10. 马皓月.丹参炭疽病病原菌鉴定、生物学特性研究及室内药剂筛选[D].西南大学,2023.DOI:10.27684/d.cnki.gxndx.2023.000354.
11. 吴如慧,李增平,张宇,等.橡胶树毛色二孢叶斑病病原菌的鉴定及其生物学特性研究[J].热带作物学报,2019,40(01):107-114.
12. 张超,王玉梓,王照琪,等.槟榔间座壳菌叶斑病病原鉴定及生物学特性[J/OL].热带生物学报,1-11[2024-05-06].
13. 张玉杰,莫贱友,李其利,等.杧果间座壳叶斑病病原种类鉴定[C]//中国植物病理学会.植物病理科技创新与绿色防控——中国植物病理学会 2021 年学术年会论文集.广西农业科学院植物保护研究所;长江大学生命科学学院;,2021:1.
14. 李媛,石凌波,费诺亚,等.蓝莓间座壳茎溃疡病病原鉴定及生物学特性研究[J].植物保护,2017,43(01):89-94.
15. 张兴跃,刘天雷,从春蕾,等.金刺梨叶部病害发生规律调查及病原鉴定[J].安徽农业科学,2024,52(05):147-151.
16. 唐伟,张成玲,王芳,等.甘薯基腐病病原鉴定及生长特性测定[J].南方农业学报,2022,53(07):1917-1924.
17. 刘凯.苹果新栽幼树干腐病病原鉴定与防治技术研究[D].西北农林科技大学,2023.
18. 谢玲,黄思良,岑贞陆,等.芒果褐色蒂腐病菌(Phomopsis mangiferae)生物学特性研究[J].微生物学杂志,2002,(01):15-17.