进境美国大豆夹杂向日葵黑茎病菌的检疫鉴定

Identification of the quarantine fungus *Plenodomus lindquistii* within the soybean seeds imported from the United States

李雪莲[1,2] 张慧丽[1,2] 段丽君[1] 陈先锋[1,2] 段维军[1,2*]

（1. 宁波检验检疫科学技术研究院，浙江 宁波 315012；2. 宁波海关，浙江 宁波 315012）

LI Xuelian[1,2] ZHANG Huili[1,2] DUAN Lijun[1] CHEN Xianfeng[1,2] DUAN Weijun[1,2*]

（1. Ningbo Academy of Inspection and Quarantine, Ningbo 315012, Zhejiang Province, China;
2. Ningbo Customs District, Ningbo 315012, Zhejiang Province, China）

大豆是一种重要的粮食作物和食用油原料，国内的市场需求量日益增长，目前我国已成为大豆净进口国。进口大豆虽能满足国内市场需求，但加大了外来有害生物传入的风险。向日葵黑茎病是一种毁灭性的向日葵病害，其病原菌向日葵黑茎病菌*Plenodomus lindquistii*属于我国进境检疫性植物病原真菌（段维军等，2015；2017）。2017年12月，宁波口岸自进境美国大豆夹杂的向日葵种子上分离获得1株菌株72298-10，为明确其分类地位，本研究通过形态学观察、ITS序列分析和致病性测定对其进行鉴定，以期为口岸疫情检测、防控和后续处理等工作提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

供试菌株及向日葵：自进境美国大豆夹杂的向日葵种子中挑选变色或形态异常的种子，采用常规平板分离法获得1株疑似向日葵黑茎病菌分离物，对其进行单孢纯化后获得菌株72298-10，于4℃下马铃薯葡萄糖琼脂（potato dextrose agar，PDA）斜面培养基保存，备用。食用型向日葵品种SH363由新疆阿拉山口海关提供，25℃、自然光照条件下在温室中培育12周后供试。

培养基、试剂和仪器：PDA培养基：马铃薯200 g、葡萄糖20 g、琼脂20 g，蒸馏水定容至1 L。TANBead® Plant DNA Auto Kit核酸提取试剂盒，台湾奈米技术开发有限公司；PCR预混液，北京康为世纪生物科技有限公司；其它试剂均为国产分析纯。Axio Scope. A1显微镜，德国Zeiss公司；C1000 Touch PCR仪、PowerPac Basic电泳设备、Gel Doc EQ型凝胶成像系统，美国Bio-Rid公司。

1.2 方法

形态学特征观察：将供试菌株72298-10接于PDA平板上，25℃下暗培养7 d后观察菌落形态特征；再在12 h光照/12 h黑暗交替条件下培养7 d后，用解剖针挑取分生孢子器置于加有水滴的玻片上，盖上盖玻片，小心压破后，显微镜下观察其形态特征，分别测量100个分生孢子器和分生孢子的大小。

ITS序列分析：采用段维军等（2015）方法，利用核酸提取试剂盒提取菌株72298-10基因组DNA，浓度达5 ng/μL以上后于−20℃保存备用。利用真菌通用引物ITS1（5′-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3′）/ITS4（5′-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3′）进行ITS扩增，引物由英潍捷基（上海）贸易有限公司合成。25 μL PCR反应体系：PCR预混液12.5 μL、正反向引物各1 μL、模板DNA 1 μL、ddH_2O 9.5 μL。反应程序：95℃预变性3 min；95℃变性40 s，53℃退火40 s，72℃延伸60 s，35个循环；72℃再延伸10 min。PCR扩增产物经2%琼脂糖凝胶电泳检测后，送北京六合华大生物技术有限公司进行双向测序。测序所得序列拼接后，与NCBI中下载的向日葵黑茎病菌及其近似种的ITS序列用MEGA 6.0软件进行比对分析，以草茎点霉*Phoma herbarum*的ITS序列（序列号AY293791和JQ754707）为外群，应用邻接法构建系统发育树，用自展分析法进行检验，共循环1 000次。

致病性测定：挑选3株苗龄12周的向日葵幼苗，每株取茎秆顶部、中部和根部3个部位，经70%酒精消毒后，用接种针刺入约0.5 cm深，在培养7 d的菌株72298-10菌落边缘打取直径5 mm菌饼，将菌丝

基金项目：国家重点研发计划（2016YFF0203201），浙江省公益技术研究项目（LGF20C140001），宁波市科技创新团队项目（2015C110018）

* 通信作者（Author for correspondence），E-mail：weijunduan@163.com；收稿日期：2019-07-12

面贴放在伤口表面，用湿润灭菌脱脂棉覆盖伤口。以PDA培养基处理为对照，每处理3次重复。于22℃、日常光照条件下进行培养，接种后逐日观察记录发病情况，15 d后对发病部位进行再分离，观察分离菌株的性状与原接种菌株是否一致。

2 结果与分析

2.1 菌株72298-10的形态学特征

菌株72298-10培养7 d后菌落直径可达3.5 cm，正面为浅灰色，后期转为黑褐色，背面呈橄榄色或灰黑色；气生菌丝稀少，呈白色，多丛生于培养基中央。产生的分生孢子器为黑褐色，半埋生，呈球形或近球形，有突起，可分散或聚生在一起，直径为210~540 μm。轻轻挤压分生孢子器会释放大量无色分生孢子，呈肾形至椭圆形，单胞，两端有油球，大小为3.6~9.1 μm×2.8~4.8 μm。

2.2 菌株72298-10的ITS序列分析

经真菌ITS通用引物扩增后获得的片段长度为581 bp，BLAST比对分析发现其与NCBI中登录号为KU361373、KU361380、JF740232等多株向日葵黑茎病菌的ITS序列一致性达100%。系统发育树显示，菌株72298-10与多株向日葵黑茎病菌聚在同一分支，而其它近似种聚在其它分支（图1）。结合形态特征和ITS序列分析结果可将菌株72298-10鉴定为向日葵黑茎病菌。

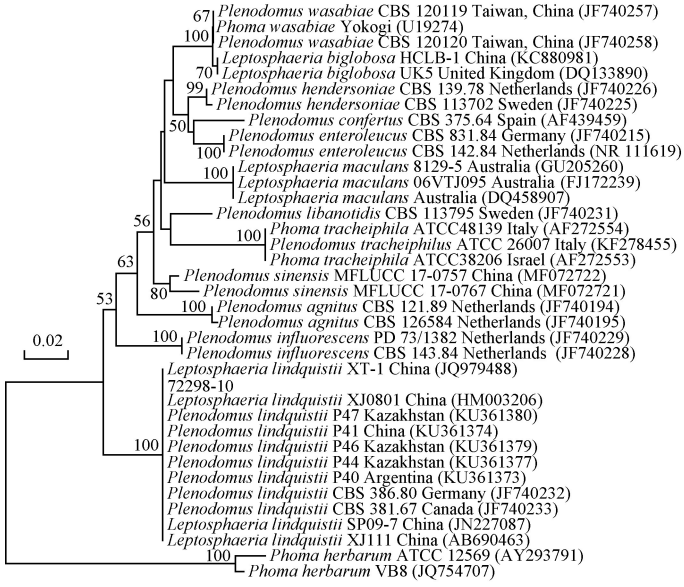

图1 基于ITS序列采用邻接法构建向日葵黑茎病菌及其近似种的系统进化树

Fig. 1 Phylogenetic tree of *Plenodomus lindquistii* and related species based on ITS sequence with neighbor-joining method

2.3 菌株72298-10的致病性

接种2 d后，3株向日葵茎秆顶部、中部、根部均出现典型的黑色病斑，并快速向茎秆扩展，边缘清晰，严重时病斑可绕茎一周，造成植株倒伏，与田间向日葵黑茎病典型症状相同；而对照未发病。取发病部位进行再分离培养，分离菌株的性状与原接种菌株一致。

3 讨论

本研究基于形态学特征、ITS序列分析和致病性测定结果，在进境美国大豆夹杂的向日葵种子上分离鉴定出向日葵黑茎病菌。近年来，随着口岸植物检疫工作的不断深入，检疫性真菌检测鉴定能力逐步增强，如多次从进境大豆中截获大豆北方茎溃疡病菌 *Diaporthe caulivora*、大豆茎褐腐病菌 *Phialophora gregata* 等检疫性真菌（段维军等，2017）。美国、巴西、澳大利亚等我国进口粮油作物生产大国，机械化程度较高，在进境大宗粮油货物中夹杂其它植物种子、植物病残体的可能性也较高，口岸检疫部门应对进境货物中夹杂物的检疫予以高度关注，以防检疫性真菌跨境传播。

参 考 文 献（References）

DUAN WJ, LI L, MO SM, DUAN LJ, CAI L. 2015. Identification of the quarantine fungus *Plenodomus lindquistii* from the sunflower seeds imported from Kazakhstan. Journal of Plant Protection, 42(5): 795−800 (in Chinese) [段维军, 李兰, 莫善明, 段丽君, 蔡磊. 2015. 进境哈萨克斯坦向日葵种子中向日葵黑茎病菌的鉴定. 植物保护学报, 42(5): 795−800]

DUAN WJ, YAN J, CAI L, ZHU SF. 2017. The current status and future prospect of fungal quarantine in China. Mycosystema, 36 (10): 1311−1331 (in Chinese) [段维军, 严进, 蔡磊, 朱水芳. 2017. 我国进境植物检疫性菌物截获现状与展望. 菌物学报, 36(10): 1311−1331]

（责任编辑：李美娟）