

尖孢镰孢菌番茄专化型的鉴定研究

王小哲, 高增贵, 张 硕, 周艳波, 王 敏, 孔婷婷

(沈阳农业大学 植物免疫研究所, 辽宁 沈阳 110866)

摘 要:以 27 株镰孢菌菌株为试材, 采用菌株形态学观察、rDNA-ITS 序列分析以及寄主专化型鉴定相结合的方法, 鉴定了尖孢镰孢菌番茄专化型。结果表明: 经形态学和 rDNA-ITS 测序筛选, 最后筛选出 10 株尖孢镰孢菌。将尖孢镰孢菌交叉接种到不同寄主植物, 确定菌株编号 YH070001 和 DL070009 的镰孢菌为尖孢镰孢菌番茄专化型。与单一的传统方法相比, ITS rDNA 方法有着较高的灵敏度, 所以采取形态学、现代分子生物学以及传统交叉接种相结合的鉴定方式, 能够使菌株专化型的鉴定更加准确、完善。

关键词:尖孢镰孢菌; 番茄枯萎病; rDNA-ITS; 交叉接种

中图分类号:S 436.412.1⁺9 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2013)11-0100-04

番茄枯萎病是由枯萎病菌(*Fusarium oxysporum* f. *lycopersici*(sacc)snyder et Hansen)引起的一种维管束素疾病^[1]。病原为半知菌亚门镰孢属的番茄萎蔫病菌。自 20 世纪初发现番茄枯萎病以来, 现已遍及世界各地, 使番茄生产受到严重影响, 成为番茄生产上的重要病害。据国外研究报道, 番茄枯萎病菌主要存在 2 个生理小种^[2-4]。1 号生理小种和 2 号生理小种广泛分布于美

国大部分地区以及以色列、日本、加拿大、澳大利亚等地, 我国以 1 号生理小种为主, 且在我国的黑龙江、辽宁、山东、四川、广西等省市地区普遍发生。近年来番茄枯萎病在辽宁省有蔓延的势头, 其中在辽阳、辽中、开原、义县等地发生严重。番茄枯萎病在苗期即可染病, 染病初期幼苗明显矮化, 叶片尚不萎蔫^[5]。在开花结果期始发, 病初期致一侧叶片发黄, 变褐后枯死, 剖开病茎, 维管束变褐。番茄枯萎病菌的专化性极强, 只危害番茄。目前, 番茄枯萎病主要采取综合防治措施, 其中生物防治方法与施用化学农药带来的环境污染和农药残留问题相比, 具有安全、经济、高效等优势^[6]。

目前 rDNA-ITS 序列分析已用于镰孢菌的分子鉴定^[7-8]。随着分子生物学的发展, 分子生物学方法越来越多地被应用于真菌系统学研究和分类鉴定, 其中核糖体基因(rDNA)序列分析已被应用于真菌各个等级水平

第一作者简介:王小哲(1986-), 男, 硕士, 研究方向为蔬菜病害。E-mail: wangxiaoxi1986@163.com.

责任作者:高增贵(1966-), 男, 内蒙古准格尔旗人, 博士, 研究员, 博士生导师, 研究方向为玉米病害和蔬菜病害生物防治。E-mail: gaozenggui@sina.com.

基金项目:辽宁省科技攻关资助项目(2011214002); 沈阳市科技攻关专项资助项目(F12-119-3-00)。

收稿日期:2013-01-17

Study on Culture Conditions of Callus Induction from Embryonic Axis Explants of *Panax quique folium* L.

HU Xuan-ping^{1,2}

(1. College of Biological Science and Engineering, Shaanxi University of Technology, Hanzhong, Shaanxi 723000; 2. Shaanxi Key Laboratory of Bio-resources, Hanzhong, Shaanxi 723000)

Abstract: Taking the seeds of *Panax quique folium* L. as materials, the effect that different culture conditions exerted on the callus induction from embryonic axis explants of *Panax quique folium* L. were studied. The results showed that culture conditions had significant influence on callus induction from embryonic axis explants ($P < 0.01$). The two ways that embryonic axis were fast 'community' and slow 'individuality' respectively. Moreover, it took the best effect of callus induction when the culture condition was MS+2,4-D 3.0 mg/L+NAA 2.0 mg/L+6-BA 1.0 mg/L.

Key words: *Panax quique folium* L.; embryonic axis; callus; culture conditions

的系统学研究^[9]。尤其是 5.8S rDNA 和其两侧的转录间区 ITS 序列分析适用于种级水平的分类研究^[10]。基于此点,可利用 ITS 区 rDNA 分析镰刀菌的种级分类。对枯萎病相关病原真菌,采用 rDNA-ITS 序列分析方法,确定到属下种,同时结合形态学观察和传统专化型鉴定进行分析,旨在为番茄枯萎病专化型鉴定以及防治提供一定的指导。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试的镰孢菌菌株分别为 7 株番茄枯萎病菌(采集自辽宁省沈阳市于洪区和东陵区)、6 株西瓜枯萎病菌(采集自辽宁省营口大石桥市和新民市)、5 株黄瓜枯萎病菌(采集自沈阳市于洪区和辽中市)、5 株玉米顶腐病菌(采集自辽宁省铁岭市和辽中市)、4 株甜菜根腐病菌株(哥本哈根大学生命科学院植物系赠送)共计 27 株。

1.2 试验方法

1.2.1 镰孢菌形态学鉴定及菌丝的培养 将 27 株供试镰孢菌菌株在 PDA 平板培养基上 28℃ 恒温培养 6 d,观察菌落的直径大小、颜色。用载片培养法观察大小分生孢子以及分生孢子梗的形态和着生方式,筛选出形态学上认为是尖孢镰孢菌的菌株,然后取菌落边缘生长旺盛的菌丝块接入盛有 100 mL PD 培养液的 250 mL 三角瓶中,28℃、120 r/min 震荡培养 7 d 后,纱布过滤并用滤纸收集菌丝体,去掉多余的水分,冷冻干燥后,用液氮研磨成粉状,分装入离心管,保存到 -20℃ 的冰箱,用于 DNA 的提取。

1.2.2 基因组 DNA 的提取,电泳检测及含量测定 研磨好的粉状菌丝采用试剂盒法提取镰刀菌基因组 DNA,将溶液(即稀释后的基因组)收集到离心管中。采用琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 条带并用紫外凝胶成像系统观察基因组提取效果,照相记录。采用核酸蛋白分析仪测定 DNA 含量和 OD 比值。

1.2.3 PCR 扩增反应和产物电泳检测及测序 取样品基因组 DNA 作为模板,引物使用 ITS1(5'-TCC GTA GGT GAA CCT GCG C-3')和 ITS4(3'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-5')。反应体系为:DNA 模板(50 ng/ μ L);10 倍扩增缓冲液 5 μ L;dNTP(2.5 mmol/L)4 μ L;引物(10 μ L/L)各 1 μ L;Taq DNA 聚合酶(5 U/ μ L)0.5 μ L;无菌超纯水补足总体积 50 μ L。反应条件为:94℃ 预变性 2 min;94℃ 变性 30 s,57.3℃ 退火 30 s,72℃ 延伸 40 s,共 30 个循环;最后 72℃ 延伸 10 min 30 s。反应结束后取 5 μ L PCR 产物加 1 μ L 6 \times 溴酚蓝上样缓冲液,在 1.5% 琼脂糖凝胶上电泳 40 min 进行检测后用紫外凝胶成像系统观察电泳条带并照相记录。PCR 产物经试剂盒纯化后由上海生物工程有限公司完成测序。

1.2.4 专化型鉴定 将 rDNA-ITS 测序后的尖孢镰孢菌菌株分别接种到番茄、西瓜、黄瓜、玉米、甜菜这 5 个不

同的寄主植物上进行交叉接种试验。种子进行消毒处理后用清水浸泡,然后催芽,2 片真叶期或幼苗期用孢子悬浮液(浓度 10^6 /mL)浸根 30 min,设不接菌为对照,20 d 后调查病情。

1.3 数据分析

所测序列提交 GenBank 数据库进行相似性分析,并与 GenBank 的相似序列用 Clustal X(1.81)进行多重序列比对(Multiple alignment),再用 MEGA(5.1)的 Neighbor-Joining 算法构建系统进化树。

2 结果与分析

2.1 镰孢菌的形态特征

按 Booth^[11] 和 Leslie 等^[12] 的分类系统,结合王拱辰等^[13] 及其它鉴定方法对镰孢菌菌株进行形态学鉴定。尖孢镰孢菌的气生菌丝白色,粉色,至紫色,丝绒状,羊毛状至毡状,培养基表面无色或淡紫色。小型分生孢子 0~1 分隔,卵圆形或肾形;大型分生孢子纺锤形或稍弯,较匀称,具 2~5 个隔膜;产孢细胞单瓶梗,较短,单生或具分枝。所以根据形态学观察(图 1~2),初步认定 27 株中的 12 株病原菌为尖孢镰孢菌。这 12 株菌株分别是 YH070001 和 DL070009(番茄枯萎病菌)、SQ070204 及 SQ070102 及 SQ070108(西瓜枯萎病菌)、YH070401 及 YH070403 及 LZ070103(黄瓜枯萎病菌)、LZ070105、TL070009(玉米顶腐病)、DL070102 和 DL070105(甜菜根腐病)。

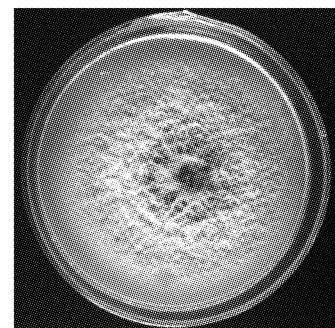


图 1 培养基中菌丝形态

Fig. 1 Mycelium formed in culture medium

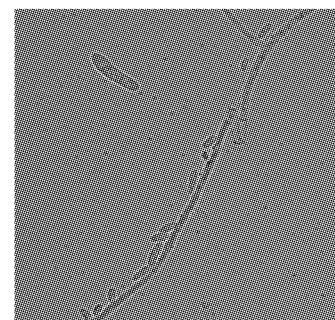


图 2 分生孢子及孢子梗形态

Fig. 2 The forms of conidia and sporophore

2.2 基因组 DNA 的提取

试剂盒法提取 12 株病原菌的基因组 DNA,经 1%

琼脂糖凝胶电泳,结果表明均可扩增出单一清晰 DNA 条带,无弥散现象(图 3)。用核酸蛋白分析仪测定 OD_{260}/OD_{280} 值和 DNA 浓度,结果见表 1。由表 1 可知,基因组 DNA 纯度较好,达到测定标准。

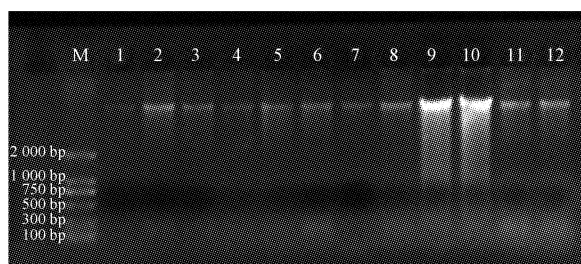


图 3 镰孢菌基因组 DNA 的电泳检测结果

注: M; 2 000 bp DNA Marker; 1: SQ070108; 2: YH070001; 3: DL07009; 4: SQ070204; 5: SQ070102; 6: YH070401; 7: YH070403; 8: LZ070103; 9: DL070102; 10: DL070105; 11: LZ070105; 12: TL070007。

Fig. 3 The genomic DNA electrophoresis results of *Fusarium* sp.

Note: M; 2 000 bp DNA Marker; 1: SQ070108; 2: YH070001; 3: DL07009; 4: SQ070204; 5: SQ070102; 6: YH070401; 7: YH070403; 8: LZ070103; 9: DL070102; 10: DL070105; 11: LZ070105; 12: TL070007。

表 1 基因组 DNA 的 OD_{260}/OD_{280} 值和浓度

Table 1 OD_{260}/OD_{280} ratio and concentration of genomic DNA

| 序号 | OD_{260}/OD_{280} | 浓度/ $ng \cdot \mu L^{-1}$ | 序号 | OD_{260}/OD_{280} | 浓度/ $ng \cdot \mu L^{-1}$ |
|----|---------------------|---------------------------|----|---------------------|---------------------------|
| 1 | 1.73 | 25.7 | 2 | 1.89 | 44.7 |
| 3 | 1.80 | 37.5 | 4 | 1.75 | 28.2 |
| 5 | 1.90 | 35.1 | 6 | 1.76 | 51.4 |
| 7 | 1.76 | 41.4 | 8 | 1.77 | 40.7 |
| 9 | 1.98 | 40.9 | 10 | 1.94 | 20.3 |
| 11 | 1.83 | 47.8 | 12 | 1.81 | 39.7 |

2.3 PCR 扩增结果

利用引物 ITS1/ITS4 对 12 株供试的镰孢菌的 rDNA ITS 区进行扩增,各菌株均扩增出特异性唯一一条带,条带大小约为 600 bp(图 4)。

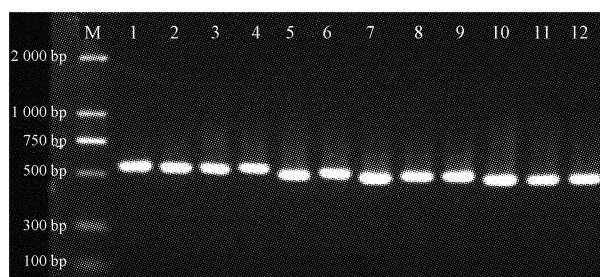


图 4 ITS 扩增产物的琼脂糖凝胶电泳图谱

注: M; 2 000 bp DNA Marker; 1: SQ070108; 2: YH070001; 3: DL07009; 4: SQ070204; 5: SQ070102; 6: YH070401; 7: YH070403; 8: LZ070103; 9: DL070102; 10: DL070105; 11: LZ070105; 12: TL070007。

Fig. 4 Gel electrophoresis of amplification products by ITS

Note: M; 2 000 bp DNA Marker; 1: SQ070108; 2: YH070001; 3: DL07009; 4: SQ070204; 5: SQ070102; 6: YH070401; 7: YH070403; 8: LZ070103; 9: DL070102; 10: DL070105; 11: LZ070105; 12: TL070007。

2.4 测序结果分析及系统发育树的构建

12 株测序菌株全部完成测序,菌株的 rDNA-ITS 区段 PCR 产物测序后获得 ITS 区段的全序列,所得序列

通过与 GenBank 中与之相近的已知种属的 rDNA-ITS 序列进行序列比对,确定供试菌株的分类地位。结果表明,菌株 SQ070108 的 rDNA-ITS 序列为大刀镰孢菌;菌株 TL070007 为层生镰孢菌;菌株 YH070001、DL07009、SQ070204、SQ070102、YH070401、YH070403、LZ070103、DL070102、DL070105、LZ070105 为尖孢镰孢菌。

由图 5 可知,供试的 12 个菌株在发育树相似系数小于 0.01 处可聚为 3 类:菌株 YH070001、DL07009、SQ070204、SQ070102、YH070401、YH070403、LZ070103、DL070102、DL070105、LZ070105 聚为第 1 组,为尖孢镰孢菌;菌株 SQ070108 为大刀镰孢菌,聚为第 2 组;菌株 TL070007 为层生镰孢菌,聚为第 3 组。

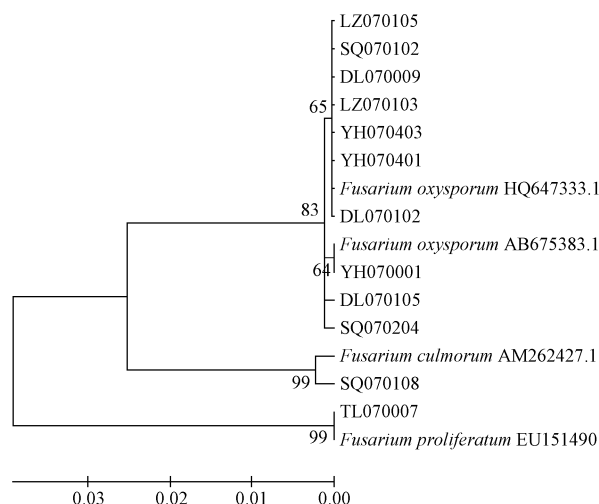


图 5 12 株镰孢菌菌株以及来自 GenBank 中的最相似菌株的 ITS 序列构建的 NJ 系统发育树

Fig. 5 NJ phylogenetic tree inferred from rDNA ITS sequences of isolates and strains from the Genbank with high sequence similarity

2.5 寄主专化型鉴定结果

由表 2 可知,10 个菌株的致病性有明显差异,证明它们是不同的专化型。所以可知菌株 YH070001 和 DL070009 是尖孢镰孢菌番茄专化型。

表 2 交叉接种试验结果

Table 2 Experimental results of cross inoculation

| 菌株 | 发病率/% | | | | | |
|----------|-------|-------|--------|-------|-------|----|
| | 番茄 | 西瓜 | 黄瓜 | 玉米 | 甜菜 | 对照 |
| YH070001 | 86.67 | 30.00 | 26.67 | 10.00 | 6.67 | 0 |
| DL070009 | 86.33 | 23.33 | 26.67 | 16.67 | 10.00 | 0 |
| SQ070204 | 36.67 | 76.67 | 50.00 | 23.33 | 13.33 | 0 |
| SQ070102 | 26.67 | 83.33 | 53.33 | 36.67 | 16.67 | 0 |
| YH070401 | 13.33 | 20.00 | 90.00 | 30.00 | 20.00 | 0 |
| YH070403 | 16.67 | 33.33 | 100.00 | 33.33 | 26.67 | 0 |
| LZ070103 | 10.00 | 26.67 | 83.33 | 6.67 | 0 | 0 |
| DL070102 | 6.67 | 16.67 | 20.00 | 0 | 66.67 | 0 |
| DL070105 | 10.00 | 20.00 | 30.00 | 13.33 | 73.33 | 0 |
| LZ070105 | 33.33 | 23.33 | 26.67 | 86.67 | 16.67 | 0 |

3 讨论

番茄枯萎病是番茄生产上重要的一种病害,对镰孢

菌的研究也越显重要,尖孢镰孢菌番茄专化型是引起番茄枯萎病的最直接病原菌,镰孢菌属也是真菌中最难鉴定和最具经济价值的属之一,因此该试验采用与世界同一水平的形态学和分子生物学研究方法对尖孢镰孢菌番茄专化型的鉴定进行了研究。

随着 PCR 技术的发展,内转录间隔区(ITS)被愈来愈多的研究领域采用,探讨种群的变异与分化、亲缘关系、品种鉴定等研究^[14]。由于核糖体 DNA 转录间隔子序列具有进化速度快,在种和种下水平变异丰富等特点,在遗传多样性研究、遗传分化、物种鉴定及种质资源管理等方面在国内外得到了广泛应用^[15-17]。目前所进行的真菌分子生物学研究多限于 rDNA 的 5.8S 片段和 ITS 区,就分子生物学研究而论,还必须选择更多的、较长的 DNA 片段进行分析,以求获得更多的有用信息。在此基础上,才能够更准确的分析鉴定某属种的专化型,为进一步研究病原菌的特性提供了理论基础。

该研究利用形态学观察和 ITS 区的 rDNA 序列结合来分析镰孢菌的种级分类,形态学鉴定出 12 株菌株为尖孢镰孢菌,但是采用用真菌核糖体 ITS 区段通用引物 ITS1 和 ITS4,对 12 个镰孢菌菌株的 ITS 区段进行扩增后明确了 12 个菌株的 ITS 区段的碱基编码序列,并与 GenBank 中尖孢镰孢菌的序列进行了同源性比较,更确切地鉴定出其中 10 株为尖孢镰孢菌,与单纯的形态学鉴定相比,鉴定结果更准确。但是尖孢镰孢菌不同专化型在 rDNA-ITS 区段序列上差异性较小,因而 rDNA-ITS 区段序列不适合于区分种内不同专化型及生理小种,所以继续利用寄主专化型鉴定的传统方式区分专化型。正是由于形态上的多变性、相似性及许多有性型的未知,通过培养特性及表型鉴定很难准确地将其在种级水平上分开,因此,将现代分子生物学技术引入镰孢菌的分类鉴定研究中,将形态描述和 DNA 序列信息相结合显得十分必要,特定的核苷酸序列分析是传统分类研究的重要补充,可以克服传统鉴定方法的片面性,从而提高了试验结果的真实性。

参考文献

[1] 徐艳辉,李烨,许向阳. 番茄枯萎病的研究进展[J]. 东北农业大学学

报,2008,39(11):128-134.

[2] Gabe H L. Standardization of nomenclature for pathogenic races of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*[J]. Trans Br Mycol Soc, 1975(64): 156-159.

[3] Conway W S, Mac Hardy W E. Distribution and growth of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* race 1 or race 2 within tomato plants resistant or susceptible to wilt[J]. Phytopathology, 1978, 68: 938-942.

[4] Gerdemann J W, Finley A M. The pathogenicity of race 1 and 2 of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*[J]. Phytopathology, 1951, 41: 238-244.

[5] 程爱昀. 大棚番茄枯萎病的诊断和防治新技术[J]. 中国瓜类, 2010(1): 45-46.

[6] Fravel D, Olivain C, Alabouvette C. *Fusarium oxysporum* and its biocontrol[J]. New phytologist, 2003, 157: 493-502.

[7] 张向民. 镰刀菌属分类学研究历史与现状[J]. 菌物研究, 2005(2): 59-62.

[8] Suga H, Hasegawa T, Mitsui H, et al. Phylogenetic analysis of the phytopathogenic fungus *Fusarium solani* based on the rDNA-ITS region[J]. Mycologica Research, 2000, 104(10): 1175-1183.

[9] Andersen B, Thrane U. Differentiation of *Alternaria infectoria* and *Alternaria alternata* based on morphology, metabolite profiles, and cultural characteristics[J]. Can J Microbiol, 1996, 42: 685-689.

[10] Adachi Y, Wantanabe K. Nuclear ribosomal DNA as a probe for genetic variability in Japanese pear pathotype *Alternaria alternata* [M]. Appl Environ Microbiol, 1993: 3197-3205.

[11] Booth. The Genus *Fusarium* [M]. UK (Kew) and USA (Surrey): Commonwealth Mycological Institute, 1971.

[12] Leslie J F, Summerell B A. The *Fusarium* Laboratory Manual [M]. USA: Blackwell Publishing, 2006.

[13] 王拱辰, 郑重, 叶琪明, 等. 常见镰刀菌鉴定指南 [M]. 北京: 中国农业科技出版社, 1996.

[14] Iwen P C, Hinrichs S H, Rupp M E. Utilization of the internal transcribed spacer regions as molecular targets to detect and identify human fungal pathogens [J]. Medical Mycology, 2002, 40: 87-109.

[15] Doohan F M, Parry D W, Jenkinson P, et al. The use of species-specific PCR based assays to analyse Fusarium ear blight of wheat [J]. Plant pathology, 1998, 47: 197-205.

[16] Theresa L, Woongoh D, Seonkim H, et al. Identification of Deoxynivalenol and Nivalenol-producing chemotypes of *Cibberella Zeaeby* using PCR Applied and Environmental [J]. Microbiology, 2001, 45: 2966-2972.

[17] Kulik T, Fordonski G, Pszczolkowska A, et al. Development of PCR assay based on ITS2 rDNA polymorphism for the detection and differentiation of *Fusarium sporotrichioides* [J]. Micro biology, 2004, 239(1): 181-186.

Study on Identification of Tomato Biotyoe *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*

WANG Xiao-xi, GAO Zeng-gui, ZHANG Shuo, ZHOU Yan-bo, WANG Min, KONG Ting-ting
(Institute of Plant Immunology, Shenyang Agricultural University, Shenyang, Liaoning 110866)

Abstract: Taking 27 *Fusarium* strains as materials, *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* was identified using morphology observation and rDNA-ITS sequencing. The results showed that after selected by morphology and rDNA-ITS sequencing, 10 *F. oxysporum* strains were identified by traditional method of specialized form as cross inoculation. Thus N0. YH070001 and DL070009 were confirmed *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*. Compared with single traditional method, rDNA-ITS sequencing has higher sensitivity. To test the accuracy and feasibility of this identification method, morphology observation, rDNA-ITS sequencing and traditional method of specialized form identification were used in this study.

Key words: *Fusarium oxysporum*; tomato fusarium wilt; rDNA-ITS; cross inoculation