

芦笋枯萎病菌的鉴定及 rDNA ITS 序列分析

杨迎青¹ 兰 波¹ 孙 强² 陈洪凡¹
余 建^{1,3} 张顺梁¹ 李湘民¹

1.江西省农业科学院植物保护研究所,南昌 330200;
2.中华人民共和国黄岛出入境检验检疫局综合技术服务中心,青岛 266555;
3.江西农业大学生物工程学院,南昌 330045

摘要 为准确鉴定芦笋枯萎病致病菌并确定其分类地位,通过形态学观察和核糖体 DNA 内转录间区(rDNA ITS)序列比对方法,对该病菌进行形态学和分子生物学鉴定,比较其与近缘真菌 rDNA ITS 序列的差异,并进行系统发育分析。鉴定结果表明,芦笋枯萎病的致病菌为尖孢镰刀菌天门冬专化型 *Fusarium oxysporum* f. sp. *asparagi*。芦笋枯萎病菌 *F. oxysporum* f. sp. *asparagi* 及其同属近缘种木贼镰刀菌 *F. equiseti* 和变红镰刀菌 *F. incarnatum* 的 rDNA ITS 序列比对结果表明,其序列在 76~80、104~115、129~138、151~158、175~178、382~402、438~445 和 473~479 bp 等 rDNA ITS 区段上存在差异性碱基。芦笋枯萎病菌及其近缘真菌系统发育分析结果表明,6 属真菌大致聚为 2 个组群 2 个亚群,芦笋枯萎病菌 *F. oxysporum* f. sp. *asparagi* 与木贼镰刀菌 *F. equiseti* 和变红镰刀菌 *F. incarnatum* 亲缘关系最近。

关键词 芦笋枯萎病菌; rDNA ITS; 序列比对; 系统发育

中图分类号 S 432.4⁺4 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2017)02-0022-06

芦笋 *Asparagus officinalis* Linn 又称石刁柏,属百合科 Liliaceae,天门冬属 *Asparagus*,在国际市场上有“蔬菜之王”的美称。芦笋营养价值高,能润肺、镇咳、祛痰,且具有抑制肿瘤生长等功能,深受人们的喜爱^[1-2]。芦笋枯萎病,又称立枯病,主要侵染芦笋茎基部、地下茎和根部,发病部位棕红色,内部维管束变褐色,病株外观变黄萎蔫,最终落叶、全株枯死^[3-4]。芦笋枯萎病最早由 Cook 于 1921 年在美国新泽西州发现,当时命名为“Dwarf Asparagus”,经试验证明是由一种待鉴定的镰刀菌 *Fusarium* sp.引起的^[5]。1984 年,除新泽西州外,马萨诸塞州和纽约州等 10 余个州都相继报道此病,其中在纽约州和马萨诸塞州,该病的为害比当时美国最严重的芦笋锈病更具毁灭性。该病是通过种子传播的,一旦传入无病新区,将极难根除^[6]。我国最早发生此病是在台湾省,其后在全国范围内迅速蔓延^[4],其危害程度仅次于茎枯病^[7]。

目前,对于芦笋枯萎病菌的分类地位,大多学者认为该病菌是尖孢镰刀菌石刁柏专化型 *Fusarium oxysporum* (Schlecht.) f. sp. *asparagi* Cohen & Heald^[4-6]。核糖体 DNA 内转录间区(rDNA ITS)是植物病原真菌的保守区,根据目标菌 rDNA ITS 序列与 NCBI(<http://misuse.ncbi.nih.gov/>) GenBank 中的已有序列的相似度很容易对其进行分子鉴定^[8-10]。如王国芬等^[11]、王晓英等^[12]分别对香蕉枯萎病菌 *F. oxysporum* f. sp. *cubense*、串珠镰刀菌 *F. moniliforme* Sheldon 进行了分子鉴定。然而,该病菌与其近缘真菌的 rDNA ITS 序列差异、系统进化和分类地位等方面鲜见系统报道。为此,笔者对芦笋枯萎病菌 *F. oxysporum* f. sp. *asparagi* 进行了形态学和分子生物学鉴定,并从 rDNA ITS 序列差异和系统进化 2 个方面研究了其分类地位,旨在明确该病菌与其近缘镰刀菌 *Fusarium* sp.

的遗传差异,并深入探索镰刀菌 *Fusarium* sp. 的遗传分化规律。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试菌株:芦笋枯萎病菌 *F. oxysporum* f. sp. *asparagi* 菌株 NC1-2 分离于江西省南昌县向塘镇,用试管斜面保存于 4℃ 冰箱。选用大肠杆菌 *Escherichia coli* 菌株 DH5 α 制备大肠杆菌感受态细胞,该菌株由笔者所在实验室保存。

生化试剂:TaKaRa MiniBEST Universal 基因组 DNA 提取试剂盒、克隆 T 载体 pMD19-T、LATaq 酶购自宝生物(大连)有限公司,其他药品均为国产分析纯。

主要培养基:马铃薯葡萄糖琼脂培养基(PDA)、马铃薯葡萄糖培养液(PDB)的配制按照方中达^[13]的方法进行,LB 培养基的配制按照于飞进等^[14]的方法进行。

1.2 菌株的分离

参照方中达^[13]有关病原真菌的组织分离方法,对从江西省南昌县向塘镇采集到的芦笋枯萎病样本进行病原菌分离。在 PDA 培养基平板上培养菌株,用直径 5 mm 的打孔器在其菌落边缘打取菌丝块,用灭菌的接种针挑取用打孔器打好的直径 5 mm 的菌丝块进行病原菌的纯化,然后将纯化后的菌株进行单孢分离,在 PDA 试管斜面中培养好后,于 4℃ 冰箱中保存。

1.3 菌株的活化与培养

将保存于 4℃ 冰箱的菌株移植到直径 9 cm 的 PDA 平板上活化后,用直径 5 mm 的打孔器在其菌落边缘打取直径为 5 mm 的菌丝块,转接到新的 PDA 平板上,于 26℃ 培养。每个处理重复 3 次,每日早晚观察 2 次,记录菌落形态、生长情况和颜色变化。

1.4 病原菌的鉴定

1)形态学鉴定:芦笋枯萎病菌 *F. oxysporum* f. sp. *asparagi* 菌株 NC1-2 在 PDA 平板上培养 4 d 和 6 d 后,分别观察其菌落及菌丝体形态。用打孔器在其菌落边缘打取直径为 5 mm 的菌丝块,转接到 50 mL PDB 培养液中振荡培养,6 d 后将培养液经 3 层纱布过滤除去菌丝体,11 000 r/min 下离心 5 min,弃上清,加 1 mL 无菌水后,随机选取小型及大型分生孢子各 60 个,在 Olympus 生物显微镜 CX41(400 倍)下,用接目测微尺分别测量 2 种分生

孢子的大小^[15]。田间病区调查芦笋枯萎病的症状。采用离体接种方法,用直径 5 mm 的打孔器在芦笋枯萎病菌 *F. oxysporum* f. sp. *asparagi* PDA 平板的菌落边缘打取菌丝块,用大头针将菌丝块固定在 15~20 cm 长度的芦笋嫩茎上,26℃、95% 湿度下培养,6 d 后观察其症状,并与田间病区的发病症状进行比对。

2)分子生物学鉴定。①菌丝体的培养和收集:芦笋枯萎病菌 *F. oxysporum* f. sp. *asparagi* 菌株 NC1-2 菌丝体的培养与收集参考王震等^[16]的方法。②基因组 DNA 的提取:各菌株的基因组 DNA 参照 TaKaRa MiniBEST Universal 基因组 DNA 提取试剂盒提供的方法进行,提取的基因组 DNA 置于 20℃ 保存。③病菌 PCR 扩增:选用植物病原真菌 rDNA ITS 通用引物 ITS4/5^[10,17],对提取的基因组 DNA 进行 rDNA ITS 区段的 PCR 扩增。采用 25 μ L 反应体系:10 $\times$ LA PCR Buffer II (Mg²⁺ plus) 2.5 μ L、2.5 mmol/L dNTP Mixture 2 μ L、5 U/ μ L LA Taq 酶 0.25 μ L、10 μ mol/L 引物 ITS4/ITS5 各 1 μ L、基因组 DNA 1 μ L,用 ddH₂O 补足至 25 μ L。扩增程序为:94℃ 预变性 5 min;94℃ 变性 40 s,54℃ 退火 40 s,72℃ 延伸 1 min;30 个循环后,72℃ 延伸 10 min。④克隆与测序:将 15 μ L PCR 产物及 3 μ L 6 $\times$ Loading buffer 混合后,用移液器轻轻移入 1% 琼脂糖凝胶的点样孔,90 V 电压下电泳 30 min。在琼脂糖凝胶上进行切胶,切下 550 bp 左右的片段,连接到连接载体 pMD19-T,采用热击法转入大肠杆菌 *E. coli* DH5 α 感受态细胞,在 LB 培养基平板上 37℃ 培养 12~16 h,挑取阳性转化子转接到 LB 液体培养基中,37℃ 培养 10~12 h 后,菌落 PCR 验证确已插入,将 LB 菌液送交华大基因测序。⑤序列的比对与鉴定:在 NCBI(<http://misuse.ncbi.nih.gov/>)上对获得的序列进行 Nucleotide Blast 比对,并根据相似度进行分子鉴定。

1.5 rDNA ITS 序列分析

用 Gendoc 软件对芦笋枯萎病菌及其近缘真菌的 rDNA ITS 序列进行比对,并对其差异性片段进行分析。

1.6 系统发育分析

将芦笋枯萎病菌 *F. oxysporum* f. sp. *asparagi* 菌株 NC1-2 的 rDNA ITS 序列提交到 NCBI(<http://misuse.ncbi.nih.gov/>),获取登录号。用

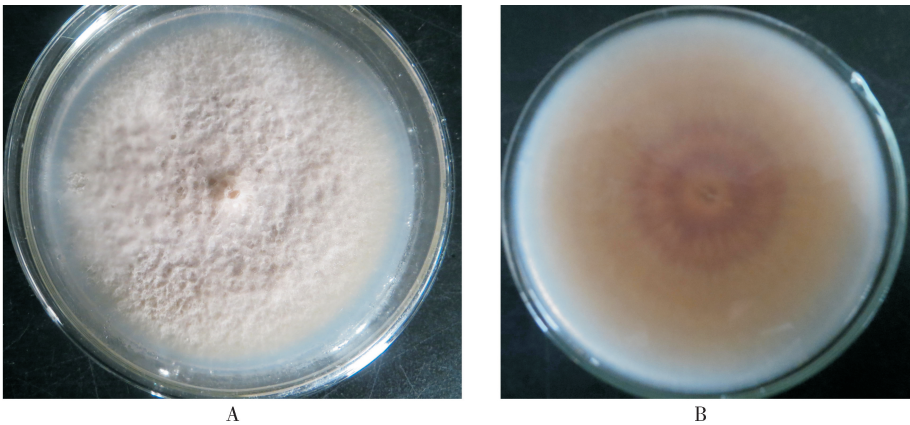
MEGA 4.0 的邻位加入法(neighbor-joining,NJ)构建其与近缘菌的系统发育树,并进行分析。

2 结果与分析

2.1 病原菌形态学鉴定

对分离到的芦笋枯萎病菌落形态进行了观察,

结果表明:芦笋枯萎病菌 *F. oxysporum* f. sp. *asparagi* 菌株在 PDA 平板上培养 4 d 后,呈白色绒毛状,菌丝纤细。培养 6 d 后,开始产生浅褐色的色素,根据色素程度的不同呈白色至浅褐色;菌落背面呈深浅不一的同心轮纹状,菌落边缘则颜色较浅(图 1)。



A:正面 Forward side; B:反面 Back side.

图 1 芦笋枯萎病菌菌落形态

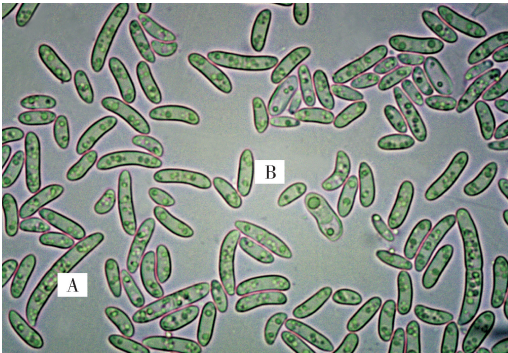
Fig.1 Colony characteristics of *Fusarium* wilt fungus of asparagus

对其分生孢子形态在 Olympus CX41 显微镜下进行了观察。结果表明:芦笋枯萎病菌小型分生孢子卵形至椭圆形,平直或弯曲,大小为(4.5~14.6) $\mu\text{m}\times(2.3\sim3.8)\mu\text{m}$ 。大型分生孢子通常具有 3~5 个分隔,镰刀形,顶部窄而弯,在基部具明显的足细胞,3 个分隔的大小为(25.5~48.7) $\mu\text{m}\times(2.8\sim4.8)\mu\text{m}$,5 个分隔的大小为(36.0~62.5) $\mu\text{m}\times(2.8\sim6.5)\mu\text{m}$ (图 2)。与 *Fusarium oxysporum* f. sp. *asparagi* 的形态一致,将其鉴定为 *F. oxysporum* f. sp. *asparagi*。

田间调查表明,芦笋枯萎病初始发病部位主要在茎基部,近地面茎基部具椭圆形红褐色病斑,软腐,地上部分茎叶逐渐黄化,直至枯死。芦笋嫩茎接种结果表明,接种 5 d 后可以产生典型的病斑,镜检证明分离到的病原菌为尖孢镰刀菌天门冬专化型 *F. oxysporum* f. sp. *asparagi*。

2.2 分子生物学鉴定

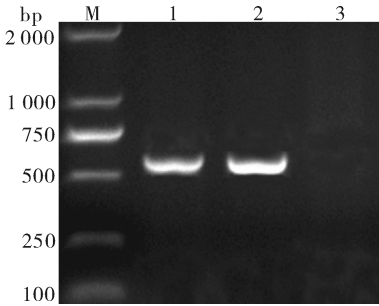
PCR 扩增到 550 bp 左右的条带(图 3)。NCBI (<http://misuse.ncbi.nih.gov/>)Blast 比对结果显示,芦笋枯萎病菌 *F. oxysporum* f. sp. *asparagi* 菌株 NC1-2 的序列与尖孢镰刀菌 *F. oxysporum*



A: 大型分生孢子 Large conidia; B: 小型分生孢子 Little conidia.

图 2 芦笋枯萎病菌分生孢子

Fig.2 Conidia of *Fusarium* wilt of asparagus fungus



M:DL2000 DNA marker; 1-2:芦笋枯萎病菌菌株 NC1-2 *Fusarium* wilt fungus of asparagus NC1-2; 3:超纯水 ddH₂O.

图 3 芦笋枯萎病菌株 ITS4/5 引物的 PCR 扩增

Fig.3 PCR amplification of *Fusarium* wilt fungus of asparagus with ITS4/5 primers

f. sp. *asparagi* 的序列相似度为 100%，将其鉴定为尖孢镰刀菌 *F. oxysporum* f. sp. *asparagi*，与形态学鉴定结果一致。

2.3 芦笋枯萎病菌及其同属近缘种 rDNA ITS 序列分析

芦笋枯萎病菌 *F. oxysporum* f. sp. *asparagi* 及其同属近缘种 rDNA ITS 序列在 76~80、104~115、129~138、151~158、175~178、382~402、438~445 和 473~479 bp 等 rDNA ITS 区段存在差异性碱基，表明镰刀菌属 *Fusarium* 不同种的 rDNA ITS 序列存在一定分化(图 4)。

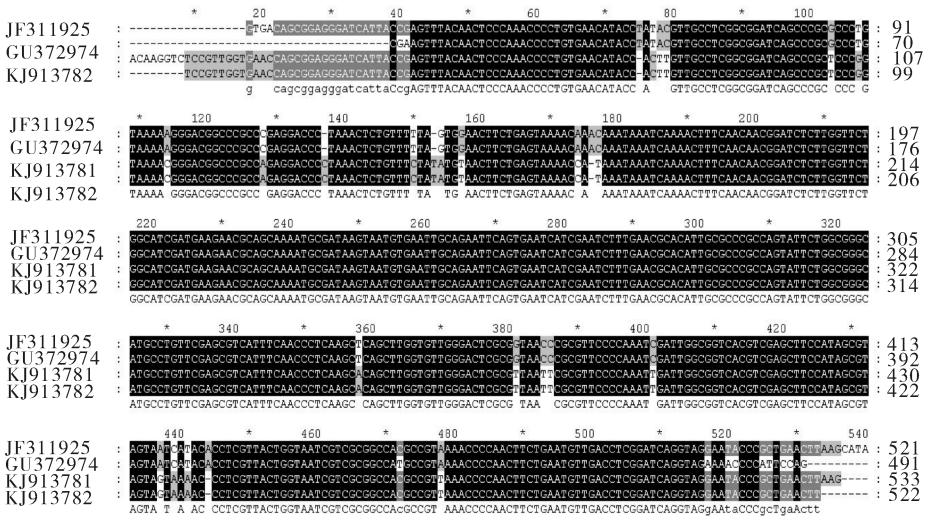
2.4 芦笋枯萎病菌及其近缘真菌系统发育分析

芦笋枯萎病菌及其近缘真菌分为 2 个组群。镰刀菌属 *Fusarium*、木霉属 *Trichoderma*、茎点霉属 *Phoma*、青霉属 *Penicillium* 和曲霉属 *Aspergillus*

聚为一个组群(Group I)，而炭疽菌属 *Colletotrichum* 单独聚为一个组群(Group II)；Group I 又进一步分为 2 个亚群，镰刀菌属 *Fusarium*、木霉属 *Trichoderma* 为一个亚群(Subgroup I)，茎点霉属 *Phoma*、青霉属 *Penicillium* 和曲霉属 *Aspergillus* 为一个亚群(Subgroup II)。芦笋枯萎病菌 *F. oxysporum* f. sp. *asparagi* 与木贼镰刀菌 *F. equiseti* 和变红镰刀菌 *F. incarnatum* 亲缘关系较近(图 5)。

3 讨论

本研究的形态学鉴定结果与前人在芦笋枯萎病的典型症状^[6]、分生孢子形态^[4,6]等方面的研究结果大体一致，将其鉴定为尖孢镰刀菌 *F. oxysporum* f. sp. *asparagi*。本研究测定的分生孢子尺寸与已有的报道结果略有差异，菌株的不同来源、分生孢子



KJ913781, KJ913782: 芦笋枯萎病菌菌株 NC1-2 *F. oxysporum* f. sp. *asparagi* isolate NC1-2; JF311925: 木贼镰刀菌菌株 *F. equiseti* isolate; GU372974: 变红镰刀菌菌株 *F. incarnatum* isolate.

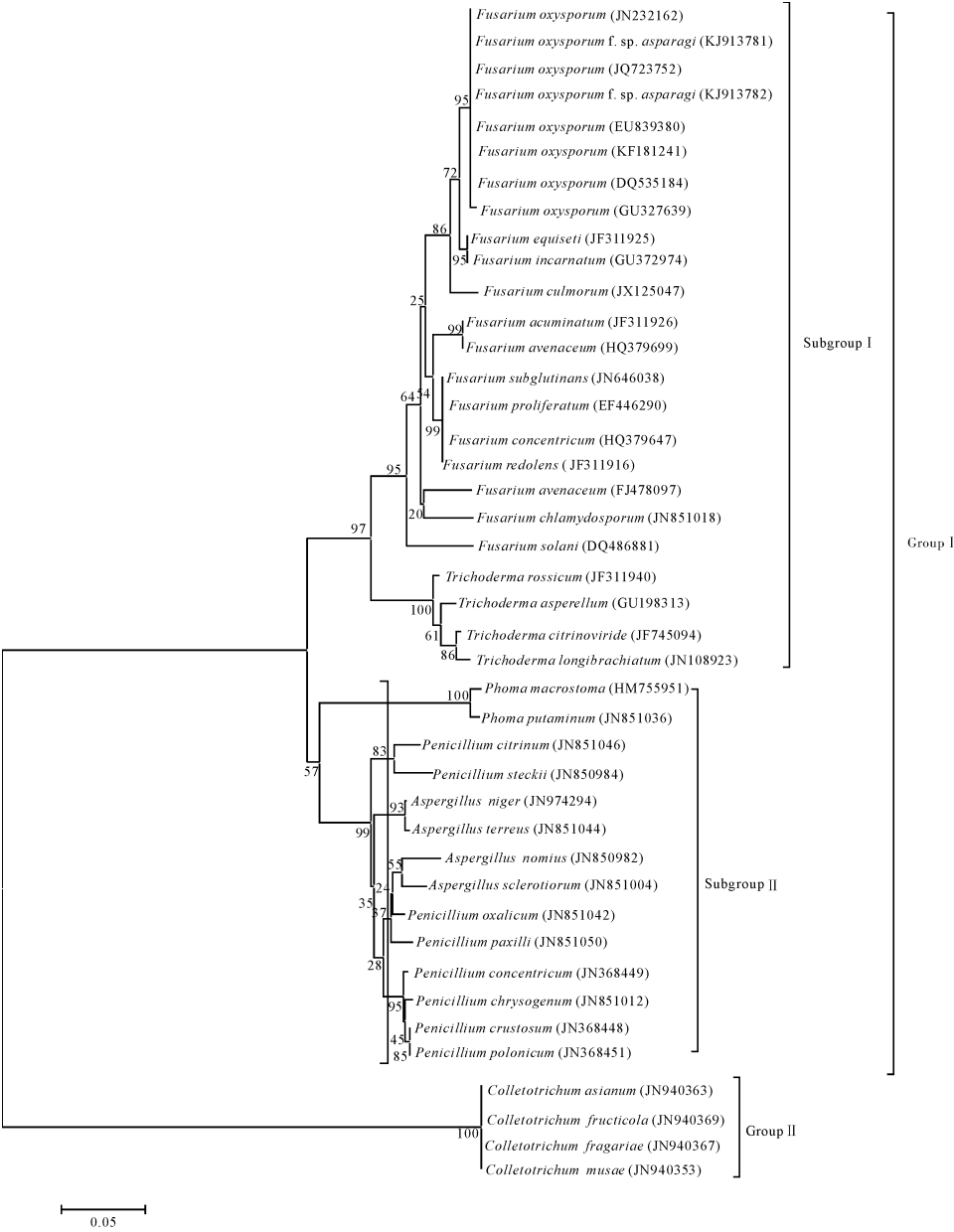
图 4 芦笋枯萎病菌及其同属近缘种 rDNA ITS 序列

Fig.4 Alignment based on rDNA ITS sequences from *Fusarium* wilt fungus of asparagus and its related fungi from the same genus

的成熟程度以及测量上的误差等因素都有可能造成尺寸上的差异。同时，本研究测定了芦笋枯萎病菌 *F. oxysporum* f. sp. *asparagi* 的 rDNA ITS 序列，并通过 Nucleotide Blast 比对，用分子生物学方法对该病菌进行了鉴定，在分子水平验证了形态学鉴定的结论。

White 等^[8]于 1990 年首次利用设计的 rDNA ITS 引物对真菌核内核糖体 RNA 基因进行了扩增，随后 rDNA ITS 序列分析技术越来越广泛地应用于真菌的鉴定中。真菌鉴定的传统方法主要是基

于培养性状和孢子形状、大小等形态特征，部分真菌还要结合其生理生化特性进行鉴定。真菌形态观察容易受到培养条件、实验人员显微测定存在的误差等因素的影响，而且许多真菌的孢子具有多种类型，培养困难，往往耗时较多。由于 rDNA ITS 序列具有能够实质性地反映出属间、种间以及差异性菌株间碱基的差异、序列片段小等优点，可以从相对较小的序列中获得足够的遗传信息，便于比较和分析，目前在真菌属内不同种间或近似属间的系统发育研究中得到了广泛应用^[9]。



KJ913781,KJ913782:芦笋枯萎病菌菌株 NC1-2 *Fusarium oxysporum* f. sp. *asparagi* isolate NC1-2. 其他序列来自 NCBI 数据库
Other sequences were from NCBI database.

图 5 芦笋枯萎病菌及其近缘真菌 rDNA ITS 序列系统发育树

Fig.5 Phylogenetic tree based on rDNA ITS sequences of *Fusarium* wilt fungus of asparagus and other related fungi

在镰刀菌 *Fusarium* sp. 方面,许多学者根据 rDNA ITS 序列对相关镰刀菌属 *Fusarium* 真菌进行了分子鉴定^[11-12],说明内转录间区 rDNA ITS 序列比对已广泛应用于该属真菌的分子鉴定。郑金龙等^[4]测定了芦笋枯萎病菌 *F. oxysporum* f. sp. *asparagi* 8 个菌株的 rDNA ITS 序列,并对这 8 个菌株进行了系统进化分析,明确了其差异。与郑金龙等^[4]的侧重点不同,本研究对芦笋枯萎病菌 *F. ox-*

ysporum f. sp. *asparagi* 和其同属近缘菌的 rDNA ITS 序列进行了序列比对和系统发育分析,找出了芦笋枯萎病菌 *F. oxysporum* f. sp. *asparagi* 与其近缘真菌 rDNA ITS 序列的差异性碱基,并通过系统发育分析明确了其分类地位。

参 考 文 献

[1] 刘克均,陆悦健,陈永莹,等. 芦笋茎枯萎病菌的生物学特性[J].

植物病理学报,1994,24(4):299-304.

[2] 刘克钧.芦笋高产栽培实用技术[M].北京:中国农业出版社,2001:38-42.

[3] 马利平,郝变青,王静,等.拮抗菌 B96-II 对芦笋枯萎菌的抑菌作用[J].应用与环境生物学报,2009,15(6):861-865.

[4] 郑金龙,张世清,高建明,等.芦笋枯萎病病原鉴定[J].热带农业科学,2010,30(11):33-36.

[5] COOK M T.A new disease of asparagus[J].Phytopathology,1922,12:49.

[6] 章桂明.芦笋枯萎病[J].植物检疫,1993,7(3):200-202.

[7] 杨迎青,孟凡,兰波,等.芦笋茎枯病菌细胞壁降解酶活性的测定及条件优化[J].华中农业大学学报,2014,33(2):57-60.

[8] WHITE T J,BRUNS T,LEE S.Analysis of phylogenetic relationships by amplification and direct sequencing of ribosomal RNA genes[M]//INNIS M A.PCR protocols:a guide to methods and applications.New York:Academic,1990:15-22.

[9] IWEN P C,HINRICHS S H,RUPP M E.Utilization of the internal transcribed spacer regions as molecular targets to detect and identify over hospital bed capacity[J].Medical mycology,2002,40:87-109.

[10] 杨迎青,李湘民,孟凡,等.芦笋茎枯病菌的鉴定及区域差异性分析[J].植物保护学报,2012,39(4):315-320.

[11] 王国芬,彭军,代鹏,等.香蕉枯萎病镰刀菌 ITS 序列的 PCR 扩增及其分子检测[J].华南热带农业大学学报,2007,13(3):1-5.

[12] 王晓英,刘秀梅.串珠镰刀菌分离菌株 PCR 筛选鉴定方法的研究[J].中国食品卫生杂志,2005,17(2):145-150.

[13] 方中达.植病研究方法[M].3 版.北京:中国农业出版社,1998:40,46-50.

[14] 于飞进,陈卫良.培养条件对 *Bacillus cereus* 357 生长及产生拮抗物质的影响[J].浙江大学学报(农业与生命科学版),2006,32(4):396-400.

[15] 裘维蕃.菌物学大全[M].北京:科学出版社,1998:329.

[16] 王震,杨媚,杨迎青,等.广东省柑橘炭疽病原菌的形态与分子鉴定[J].菌物学报,2010,29(4):488-493.

[17] WHITE R H,ENGELKE M C,MORTON S J,et al. *Acremonium endophyte* effects on tall fescue drought tolerance[J].Crop science,1992,32(6):1392-1396.

Identification and rDNA ITS sequence analysis of *Fusarium* wilt pathogen of asparagus

YANG Yingqing¹ LAN Bo¹ SUN Qiang² CHEN Hongfan¹
YU Jian^{1,3} ZHANG Shunliang¹ LI Xiangmin¹

1.Institute of Plant Protection,Jiangxi Academy of Agricultural Sciences,Nanchang 330200,China;
2.Service Center of Comprehensive Technology,Huangdao Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau,Qingdao 266555,China;
3.College of Bioscience and Engineering,Jiangxi Agricultural University,Nanchang 330045,China

Abstract To accurately identify *Fusarium* wilt, an important pathogen of asparagus, and to make its taxonomic status clear, the identification was carried out using morphology examination and BLASTn based on rDNA ITS sequences, the differences of rDNA ITS sequences between *Fusarium* wilt fungus of asparagus and its related fungi were compared, and the phylogenetic relationship was analyzed. The result revealed that the *Fusarium* wilt fungus of asparagus was *Fusarium oxysporum* f. sp. *asparagi*. The differences of rDNA ITS sequences were at 76-80 bp, 104-115 bp, 129-138 bp, 151-158 bp, 175-178 bp, 382-402 bp, 438-445 bp and 473-479 bp regions between the *Fusarium* wilt fungus of asparagus and its related fungi from the same genus. Fungi from the 6 genera were clustered as 2 groups and 2 subgroups, and *F. oxysporum* f. sp. *asparagi* was phylogenetically nearest related with *F. equiseti* and *F. incarnatum*.

Keywords *Fusarium* wilt fungus of asparagus; rDNA ITS; sequence alignment; phylogenetic relationship

(责任编辑:边书京)