甘肃定西地区甘蓝枯萎病病原菌的分离与鉴定

申永铭[1]， 李海源[1]， 陈爱昌[2]， 魏周全[2]， 胡小平[1*]

（1. 西北农林科技大学植物保护学院，杨凌 712100；2. 甘肃定西市植保植检站，定西 743000）

摘要 自2009年起，甘肃定西地区出现了甘蓝植株矮化、叶片黄化、枯萎甚至死亡的现象。2015年8月，我们采集了田间病株样本，使用常规组织分离法对病原菌进行了分离和纯化，依据柯赫氏法则进行了病原菌确认，并通过形态学和分子生物学方法对病原菌进行了鉴定。结果表明病原菌的形态学特征与尖孢镰刀菌 *Fusarium oxysporum* 一致，其rDNA-ITS、rDNA-IGS以及EF-1α序列与尖孢镰刀菌 *F. oxysporum* 相似性达99%，基于病原菌及尖孢镰刀菌各代表专化型EF-1α序列构建的系统发育树将该菌与尖孢镰刀菌黏团专化型 *F. oxysporum* f. sp. *conglutinans* 聚为一类，故引致甘肃定西地区甘蓝枯萎病的病原菌为尖孢镰刀菌黏团专化型 *F. oxysporum* f. sp. *conglutinans*。

关键词 EF-1α； *Fusarium oxysporum* f. sp. *conglutinans*； 镰刀菌

中图分类号： S 436.35 **文献标识码：** A **DOI：** 10.3969/j.issn.0529－1542.2017.04.032

Isolation and identification of the pathogen causing cabbage wilt in Dingxi District, Gansu Province

Shen Yongming[1]， Li Haiyuan[1]， Chen Aichang[2]， Wei Zhouquan[2]， Hu Xiaoping[1]

（1. *College of Plant Protection*, *Northwest A & F University*, *Yangling* 712100, *China*;
2. *Dingxi Station of Plant Protection and Quarantine*, *Gansu* 743000, *China*）

Abstract Symptoms of stunting, leaf yellowing, withered and dead of cabbage were observed in Dingxi District, Gansu Province since 2009. Samples were collected from diseased field in August, 2015. The pathogen was isolated and purified by the method of general tissue isolation, confirmed according to Koch's postulates, and identified by morphologic characteristics and molecular identification. The results showed that morphologic characteristics of the pathogen were consistent with those of *Fusarium oxysporum*. The similarity of rDNA-ITS, rDNA-IGS and EF-1α between *F. oxysporum* and the pathogen is 99%. The phylogenetic analysis of EF-1α gene sequences of *F. oxysporum formae speciales* and the pathogen showed that the pathogen was classified as *F. oxysporum* f. sp. *conglutinans*. Thus, the pathogen of cabbage wilt in Dingxi, Gansu was *F. oxysporum* f. sp. *conglutinans*.

Key words EF-1α； *Fusarium oxysporum* f. sp. *conglutinans*； *Fusarium*

甘蓝枯萎病是一种危害性极强的土传性病害，最早于1899年发现于美国纽约州，目前在全世界多数夏秋甘蓝栽培地区都有发生，如美国、加拿大、希腊、日本等[1-4]。在我国，该病害仅在北京延庆和山西寿阳地区有病原菌分离鉴定的记载[5-8]。

甘肃省定西市位于甘肃省中部，地处秦岭以西黄土高原沟壑丘陵区，属于南温带半湿润、中温带半干旱区，夏季气候凉爽，雨量相对充沛，昼夜温差大，有利于各类蔬菜干物质的积累，因此成为西北最大的高原夏菜产地。甘蓝作为当地的重要经济作物之一，有着悠久的种植历史和近0.67万 hm^2 的种植面积。但自2009年起，在田间出现了甘蓝叶片黄化，植株枯萎、死亡等症状。2016年，该病害的累计危害面积近0.2万 hm^2，占当地甘蓝种植总面积的30%，严重影响了甘蓝的质量和产量，造成了严重的经济损失。本文从甘肃定西地区采集了发病甘蓝样品，并进行了病原菌的分离与鉴定。现将结果报道如下。

收稿日期： 2016－09－07 **修订日期：** 2016－11－14
基金项目： 定西市蔬菜产业科技提升项目(DXSK2016006)；高原夏菜病害防治技术与应用项目
* 通信作者 E-mail：xphu@nwsuaf.edu.cn

1　材料与方法

1.1　病原菌分离纯化

2015 年 8 月于甘肃省定西市安定区采集具有典型症状的病害样品,用常规组织分离方法进行病原菌分离与纯化[9]。

1.2　致病性测定

采用蘸根法对分离物进行致病性测定。将分离物于马铃薯葡萄糖液体培养基(potato dextrose broth, PDB)中摇培 3 d 后,滤除菌丝,收集孢子悬浮液,将其孢子浓度调至 1×10^7 个/mL。将两叶一心期'秋悦'甘蓝(邢蔬种业有限公司)幼苗的根部浸于孢子悬浮液中 15 min,移植在装有无菌土的 10 cm×10 cm(口径×高度)营养钵中,以无菌水蘸根处理的甘蓝幼苗作为空白对照。14 d 后观察记载甘蓝发病情况。同时,采用常规组织分离方法对病原菌进行再分离,将分离物与初始接种体进行形态学比较。

1.3　病原菌形态特征观察

将病原菌接种于马铃薯葡萄糖培养基(potato dextrose agar, PDA)上,25℃黑暗培养,3 d 后观察菌落形态特征,并在光学显微镜下观察菌丝、分生孢子及产孢结构等形态特征。

1.4　病原菌分子鉴定

1.4.1　DNA 提取

将病原菌接种于铺有玻璃纸的 PDA 平板上,25℃黑暗培养 5 d 后收集菌丝,干燥后取 0.2 g 菌丝于研钵中,加入液氮研磨至粉状后置于无菌的 2.0 mL 离心管中,加入 800 μL 2% CTAB 溶液混匀,65℃水浴 15 min;然后加入 800 μL 酚/氯仿/异戊醇(25∶24∶1),混匀后离心 15 min (12 000 r/min),取上清液,在上清液中加入 800 μL 酚/氯仿/异戊醇(25∶24∶1),混匀后离心 15 min (12 000 r/min),取上清液,在上清液中加入 350 μL 冰异丙醇,混匀后于 4℃下静置 30 min,在 4℃条件下离心 15 min (12 000 r/min),弃上清液,用 75%乙醇洗涤沉淀 2 次,再用无水乙醇洗涤 1 次,晾干后加入 50 μL 超纯水充分溶解。利用 Nanodrop2000 检测合格后,于 −20℃下保存备用。

1.4.2　病原菌 ITS、IGS 及 EF-1α 序列扩增及测序

PCR 扩增病原菌核糖体 DNA 内转录间隔区(ribosome DNA internal transcribed spacer, rDNA-ITS)、核糖体 DNA 基因间隔区(intergenic spacer, IGS)及延长因子−1α(elongation factors−1α, EF-1α)序列。反应体系 25 μL:上下游引物(10 μmol/L) 各 0.5 μL, 10×TransTaq®-T Buffer 2.5 μL,2.5 mmol/L dNTPs 2 μL, TransTaq®-T DNA polymerase 0.25 μL,模板 DNA (50 ng/μL) 1 μL, ddH_2O 18.25 μL。所用引物及 PCR 程序见表 1。PCR 产物送英潍捷基(上海)贸易有限公司进行测序。

1.4.3　数据分析

将测序结果进行 BLAST 比对分析。从 GenBank 下载镰刀菌属代表种及尖孢镰刀菌不同专化型菌株的 EF-1α 序列,用 ClustalX(1.8)进行多重序列比对后,将序列信息导入 MEGA(4.0)通过邻接法(neighbor-joining)构建系统发育树,同时利用 Bootstrap(10 000 次重复)检验各分支的置信度。

表 1　引物信息及 PCR 扩增程序

Table 1　Information of primers and PCR programs

引物 Primer	引物序列(5′-3′) Primer sequence	扩增区域 Amplification region	PCR 扩增程序 PCR program
ITS1	TCCGTAGGTGAACCTGCGC	ITS[10]	94℃ 5 min;94℃ 30 s、55℃ 30 s、72℃ 1 min,35 个循环;72℃ 10 min
ITS4	TCCTCCGCTTATTGATATGC		
NL11	CTGAACGCCTCTAAGTCAG	IGS[11]	94℃ 5 min;94℃ 30 s、55℃ 30 s、72℃ 3 min,35 个循环;72℃ 10 min
CNS1	GAGACAAGCATATGACTAC		
EF-1	ATGGGTAAGGARGACAAGAC	EF-1α[12]	94℃ 5 min;94℃ 30 s、55℃ 30 s、72℃ 1 min,35 个循环;72℃ 10 min
EF-2	GGARGTACCAGTSATCATGTT		

2　结果与分析

2.1　病害症状

甘蓝枯萎病在田间会形成典型的发病中心,中心的面积表现出连年扩展的趋势,所辐射的区域也逐年扩大。处于发病中心边缘的病株一般发病较轻,仅植株下部部分叶片表现出沿叶脉黄化并伴有轻微萎蔫的现象,病株茎部横截面维管束处明显变褐,越靠近发病中心,病情越加严重,病株叶片几乎完全黄化,植株矮化枯死,以致田间出现明显的缺苗断垄现象(图 1)。

a: 甘蓝枯萎病田间表现症状; b: 田间无病甘蓝植株; c: 病株维管束表现症状; d: 健康甘蓝维管束
a: Diseased field; b: Healthy field; c: Cross section of diseased root; d: Cross section of healthy root

图 1　甘蓝枯萎病发病症状

Fig. 1　Symptoms of cabbage *Fusarium* wilt

2.2　致病性测定

经过病原菌的分离与纯化后共得到 17 个分离物，根据形态学特征归为 DXF001、DXF002、DXF003 和 DXF004 四类。其中，DXF001 包含 11 个分离物，占总分离物的 64.7%；DXF002 包含 3 个分离物，占总分离物的 17.6%；DXF003 包含 2 个分离物，占总分离物的 11.8%；DXF004 包含 1 个分离物，占总分离物的 5.9%。从每类分离物中选取一个代表性菌株，分别为 DXF001－01、DXF002－01、DXF003－01 和 DXF004－01，用于致病性测定。结果显示，接种 14 d 后只有接种 DXF001－01 的植株表现出典型的甘蓝枯萎病症状（图 2 b）。再分离物与 DXF001－01 表现出一致的形态学特征，说明 DXF001－01 为甘蓝枯萎病的病原菌。

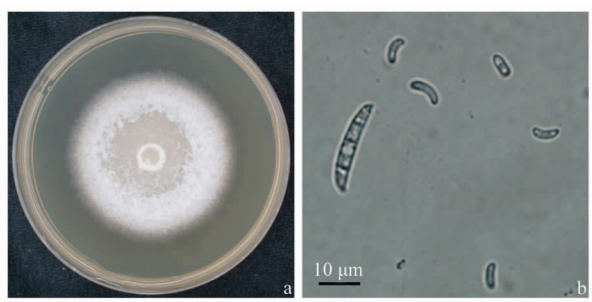
a: 清水对照, 健康甘蓝幼苗; b: 接种DXF001的甘蓝幼苗
a: Healthy cabbage seedling; b: Cabbage seedling inoculated with DXF001

图 2　病原菌对甘蓝致病性测定

Fig. 2　Pathogenicity identification of the pathogen to cabbage

2.3　病原菌形态特征

在 PDA 培养基平板上培养 4 d 后，病原菌菌落圆形白色，气生菌丝致密（图 3a）；显微观察可见其菌丝呈丝状、无色并伴有隔膜。病原菌产生大量的小型分生孢子和少量的大型分生孢子，其中小型分生孢子为卵圆形至长椭球形或肾型，无隔膜或具 1 个隔膜，大小为（3.8～15.0）μm×（1.5～5.0）μm，假头状着生于细长、瓶状的分生孢子梗上；大型分生孢子镰刀状，两端尖，一般具 3～5 个隔膜，大小为（18.6～33.8）μm×（3.2～6.2）μm（图 3b）。根据病原菌的形态学特征，依据 Booth 的镰刀菌属分类系统[13]，该病原菌被鉴定为尖孢镰刀菌 *F. oxysporum*。



a: 病原菌于PDA培养基上培养3 d后的菌落形态; b: 病原菌分生孢子形态
a: Colony cultured on PDA in darkness for 3 days; b: Microconidia and macroconidia of the pathogen

图 3　病原菌于 PDA 培养基上的培养特征

Fig. 3　Cultural characteristics of the pathogen on potato dextrose agar (PDA)

2.4　病原菌的分子鉴定

病原菌 ITS、IGS 及 EF-1α 序列的测序结果在

GenBank 的注册号分别为 LC165017、LC165016 和 LC165018,BLAST 分析结果显示这 3 个序列分别与尖孢镰刀菌 *F. oxysporum* 的相似性达到了 99%、99%和 100%。利用病原菌与尖孢镰刀菌各专化型菌株的 EF-1α 序列信息,构建系统发育树,结果显示 EF-1α 可以对 *Fusarium oxysporum* f. sp. *conglutinans*、*Fusarium oxysporum* f. sp. *lilii*、*Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis* 等 10 个尖孢镰刀菌专化型进行聚类(图 4)。最终 DXF001－01 被鉴定为尖孢镰刀菌黏团专化型(*F. oxysporum* f. sp. *conglutinans*)。

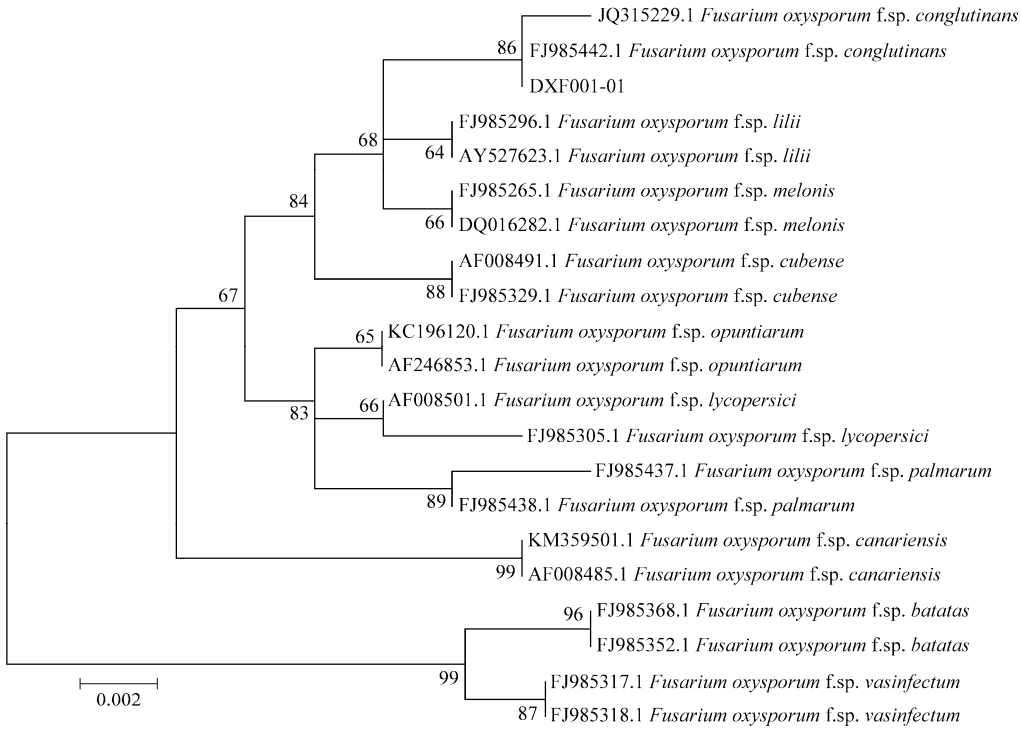


图 4　尖孢镰刀菌代表专化型及 DXF001－01 EF-1α 基因系统发育树

Fig. 4　Phylogenetic tree of translation elongation factor 1α (EF-1α) genes of DXF001－01 and *Fusarium oxysporum formae speciales*

3　讨论

甘蓝枯萎病首次发现于北京延庆地区,其病原菌被确定为尖孢镰刀菌黏团专化型 *F. oxysporum* f. sp. *conglutinans*[5,7]。张扬等报道,在北京延庆地区除尖孢镰刀菌黏团专化型 *F. oxysporum* f. sp. *conglutinans* 外,轮枝样镰刀菌 *F. verticillioides* 也可导致甘蓝枯萎病的发生[6]。田仁鹏从山西寿阳地区甘蓝枯萎病株上分离到的 GLHW1,经鉴定为尖孢镰刀菌 *F. oxysporum*[8]。本文则通过形态学观察结合分子生物学方法将甘肃定西地区甘蓝枯萎病鉴定为尖孢镰刀菌黏团专化型 *F. oxysporum* f. sp. *conglutinans*。

随着现代分子生物学技术的发展,病原菌的鉴定不再局限于形态学的观察。本文对病原菌的 ITS 序列进行了测序,通过序列比对将病原菌鉴定为尖孢镰刀菌 *F. oxysporum*。虽然 ITS 在进化的过程中具有高度的保守性,但是由于镰刀菌 ITS2 存在非同源的拷贝,可能会导致不准确的鉴定结果[14]。而 EF-1α 序列对镰刀菌系统发育学种的鉴定具有很大的可用性,它在镰刀菌种的水平上具有丰富的信息量,在镰刀菌属中也并未发现 EF-1α 序列的非直系同源拷贝[12]。目前已有很多学者利用 EF-1α 构建系统发育树成功地对镰刀菌进行了鉴定[15-17]。为了保证鉴定结果的准确性,本文对病原菌的 EF-1α 序列进行了扩增、测序,并将测序结果与其他尖孢镰刀菌专化型的 EF-1α 序列进行建树分析,结果显示,EF-1α 基因可以对 *Fusarium oxysporum* f. sp. *conglutinans*、*Fusarium oxysporum* f. sp. *lilii*、*Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis* 等 10 个尖孢镰刀菌专化型进行聚类,本文所分离的病原菌划归于尖孢镰刀菌黏团专化型 *F. oxysporum* f. sp. *conglutinans*,与

前人的研究结果相一致[5-7]。

有文献曾报道尖孢镰刀菌黏团专化型 *F. oxysporum* f. sp. *conglutinans* 的寄主范围十分广泛，不仅可以侵染大多数十字花科作物，还能侵染茄科、葫芦科、豆科、菊科、旋花科、伞形科及百合科等主要蔬菜作物，并使其成为无症带菌的隐性寄主[3,5,18-19]。而甘肃定西是西北最大的高原夏菜产地之一，蔬菜品种多，种植面积广，因此尖孢镰刀菌黏团专化型 *F. oxysporum* f. sp. *conglutinans* 不仅会对当地甘蓝的生产造成严重的影响，也会成为其他蔬菜生产的潜在隐患。本研究结果为当地甘蓝枯萎病的防治奠定了可靠的理论基础。

参考文献

[1] Smith E F. The fungus infection of agricultural soils in the United States[J]. Scientific American Supplement, 1899, 48: 19981-19982.

[2] Farnham M W, Keinath A P, Smith J P. Characterization of Fusarium yellows resistance in collard[J]. Plant Disease, 2001, 85(8):890-894.

[3] Thanassoulopoulos C C, Kitsos G T, Bonatsos D C. Cabbage yellows and new hosts of the pathogen in Greece [J]. Plant Disease Reporter, 1978,62(12):1051-1053.

[4] Nomura Y, Kato K, Takeuchi S. Studies on the method of early selection of the resistance of cabbage to the yellows disease [J]. Japanese Center Agriculture Experimentation Report, 1976, 24:141-182.

[5] 李明远，张涛涛，李兴红，等. 十字花科蔬菜枯萎病及其病原鉴定[J]. 植物保护，2003，29(3):44-45.

[6] 张扬，郑建秋，谢丙炎，等. 甘蓝枯萎病病原菌的鉴定[J]. 植物病理学报，2008，38(4):337-345.

[7] 耿丽华，迟胜起，焦晓辉，等. 北京延庆县甘蓝枯萎病病原菌的分离及其生物学特性的研究[J]. 中国蔬菜，2009(2):34-37.

[8] 田仁鹏. 甘蓝枯萎病病原菌研究及抗病种质群体结构分析[D]. 兰州:甘肃农业大学，2009.

[9] 方中达. 植病研究方法[M]. 北京:中国农业出版社，1998.

[10] White T J, Bruns T, Lee S, et al. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics [M]// Lee S B, Taylow J W. PCR protocols: A guide to methods and applications. San Diego, California, USA: Academic Press Co,1990:315-322.

[11] Aoki T, O'Donnell K, Homma Y, et al. Sudden-death syndrome of soybean is caused by two morphologically and phylogenetically distinct species within the *Fusarium solani* species complex—*F. virguliforme* in North America and *F. tucumaniae* in South America [J]. Mycologia, 2003, 95(4):660-684.

[12] O'Donnell K, Kistler H C, Cigelnik E, et al. Multiple evolutionary origins of the fungus causing Panama disease of banana: concordant evidence from nuclear and mitochondrial gene genealogies [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1998, 95(5):2044-2049.

[13] Booth C. The genus *Fusarium*[M]. Oxon: Commonwealth Agricultural Bureaux, 1971.

[14] Waalwijk C, Gams W. Discordant groupings of *Fusarium* spp. from sections elegans, liseola and dlaminia based on ribosomal ITS1 and ITS2 sequences [J]. Mycologia, 1996, 88(3): 361-368.

[15] Lazarotto M, Milanesi P M, Muniz M F, et al. Morphological and molecular characterization of *Fusarium* spp. pathogenic to pecan tree in Brazil[J]. Genetics and Molecular Research, 2014, 13(4):9390-9402.

[16] O'Donnell K, Gueidan C, Sink S, et al. A two-locus DNA sequence database for typing plant and human pathogens within the *Fusarium oxysporum*, species complex [J]. Fungal Genetics and Biology, 2009, 46(12):936-948.

[17] Silva F P D, Vechiato M H, Harakava R. EF-1*a* gene and IGS rDNA sequencing of *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* and *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli* reveals polyphyletic origin of strains [J]. Tropical Plant Pathology, 2014, 39(1):64-73.

[18] 杨宇红，杨翠荣，龚慧芝，等. 甘蓝枯萎病菌寄主范围研究[J]. 植物病理学报，2015，45(6):675-679.

[19] Armstrong G M, Armstrong J K. *Formae speciales* and races of *Fusarium oxysporum* causing wilts of the Cucurbitaceae[Reclassification] [J]. Phytopathology, 1978, 68(1):19-28.

（责任编辑：杨明丽）