

研究报告

Research Report

海南豇豆枯萎病病原鉴定及生物学特性初步研究

肖敏 曾向萍 严婉荣 吉训聪 王会芳 赵志祥*

海南省农业科学院农业环境与植物保护研究所, 海南省植物病虫害防控重点实验室, 海口, 571100

* 通讯作者, zhaozhixiang0207@126.com

摘要 从海南乐东豇豆地采集到的枯萎病病样, 经形态学观察、致病性测定和真菌 ITS 序列分析, 将其病原鉴定为尖孢镰刀菌菜豆专化型(*Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseolus*)。生物学特性分析表明: 该病原菌菌丝生长适宜温度为 20~30℃, 最适温度为 25℃, 50℃时不能生长; 适宜 pH 为 6~10, 最适 pH 值为 8.0; 全黑暗和全光照有利于菌丝的生长; 可利用多种碳、氮源, 最适碳源为果糖和 D-甘露醇, 氮源为蛋白胨和硝酸钠。

关键词 豇豆枯萎病, 病原鉴定, 系统进化分析, 生物学特性

Pathogenic Identification of Cowpea Fusarium Wilt and Preliminary Research of Its Biological Characteristics in Hainan

Xiao Min Zeng Xiangping Yan Wanrong Ji Xuncong Wang Huifang Zhao Zhixiang*

Institute of Agro-environment & Plant Protection of Hainan Academy of Agricultural Sciences, Hainan Key Laboratory for Control of Plant Diseases and Insect Pests, Haikou, 571100

* Corresponding author, zhaozhixiang0207@126.com

DOI: 10.13417/j.gab.034.000345

Abstract Samples of cowpea fusarium wilt were collected from a cowpea field in Ledong, Hainan province. The pathogens were identified as *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseolus* by the methods of morphological characters, pathogenicity testing *in vivo* and sequence analysis of fungic ITS. At the same time, biological characteristic analysis showed that the temperature of the mycelium growth was range from 20℃ to 30℃. The optimum temperature was 25℃. This strain could not grow when the temperature was up to 50℃. The pH value of mycelium growth was range from 6 to 10. The optimal pH value was 8.0. It was grown best under full lighting and complete darkness. It can utilize many kinds of carbon and nitrogen sources. And the optimum carbon sources were fructose and D-mannitol, the optimum nitrogen sources were peptone and sodium nitrate.

Keywords Cowpea fusarium wilt, Pathogenic identification, Phylogenetic analysis, Biological characteristic

豇豆(*Vigna unguiculata* (L.) Walp.)是日常食用最广的蔬菜品种之一, 具有理中益气、补肾健胃、和五脏、调营卫、生精髓。广泛分布在热带、亚热带地区, 在我国栽培历史悠久。豇豆也是海南农民喜欢种植的反季节蔬菜, 种植面积约 22 000 ha, 特别是海南的南部地区。

枯萎病是豇豆生产上发生的一种重要的土传病害, 在海南豇豆种植区常有发生。由于复种指数大, 抗病品种较少等原因, 豇豆枯萎病的发生与危害越发严重, 常造成死株, 影响产量和品质, 是制约豇豆规模生产的主要病害之一。对于豇豆枯萎病的研究, 国内文献

报道不多。吴仁锋(2012, 湖北大学学报, 34(1): 100-103)对武汉市豇豆枯萎病分离后鉴定为尖孢镰刀菌, 潘虹等(2011)对尖孢镰刀菌亚麻专化型进行了生物学特性研究。笔者 2014 年在海南乐东一豇豆地分离采集到病原菌分离物, 经致病性测定, 可致豇豆引起枯萎病, 对其生物学特性进行了研究, 现将结果报道如下。

1 结果与分析

1.1 病原菌的分离与形态特征

对田间采集到的病样经常规组织分离, 通过培

基金项目: 本研究由公益性行业(农业)科研专项资金(201303023)、十二五国家科技支撑计划(2012BAD19B06)、海南省农科院农业科技创新专项(CXZX201416)和国家星火科技计划项目(NO.2012GA800026)共同资助

养、纯化,获得尖孢镰刀菌菌株。在 PDA 培养基上 28℃ 培养,菌落近圆形,气生菌丝白色絮状或粉绒状,培养基表面紫红色,背面深紫色,菌株菌丝浓密,呈同心轮纹,质地厚实,气生菌丝茂盛。大型分生孢子镰刀形或略弯曲,顶细胞渐尖并弯曲成喙状,基细胞足状,多数为 3 隔,少数 4~7 隔,大小为 16.8~42.5 μm×3~5 μm。小型分生孢子无色,椭圆形,单胞或具 1 分隔,大小 5~14.8 μm×2.2~5 μm。分生孢子梗瓶状突起,厚垣分生孢子顶生或间生,圆形或椭圆形(图 1)。这与吕佩珂(1992, 农业出版社, pp.118)对豇豆尖孢镰刀菌枯萎病菌的描述较一致,而与本文作者赵志祥(2013)报道的海南薯蓣茎腐病病原菌尖孢镰刀菌薯蓣专业化型未见厚垣孢子有差异,这可能与不同作物或病原菌的培养时间有关系。

1.2 病原菌致病性测定

用病菌孢子悬浮液处理过的豇豆,初期病株下部叶片先变黄,逐渐向上发展,叶片干枯、脱落,剖开病株根茎基部,内部维管束组织变褐,植株枯萎,而对照植株不发病(图 2)。对发病植株进行镜检和再次组织分离,获得的菌株与接种的菌株形态一致,证明分离物即为豇豆枯萎病的病原。

1.3 rDNA-ITS 的扩增

如图 3A 所示,提取和纯化的病原菌基因组总 DNA 大于 23 kb,条带清晰,说明 DNA 浓度较高,适合后续 PCR 反应。将其稀释 10 倍后,用真菌 rDNA-ITS

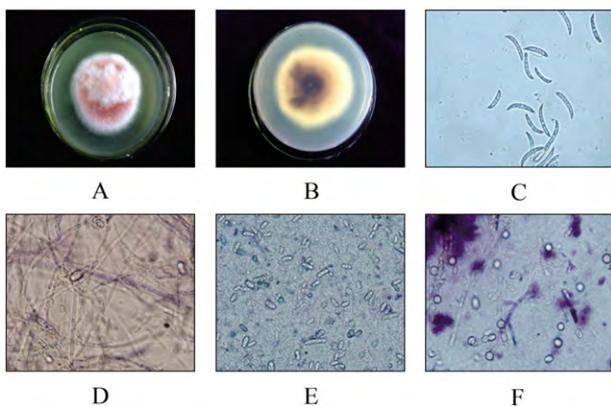


图 1 豇豆枯萎病菌株的形态。
注: A,B: 菌株正反面形态; C: 大型分生孢子; D: 分生孢子梗; E: 小型分生孢子; F: 厚垣孢子
Figure 1 Morphological characters of cowpea fusarium wilt in Hainan
Note: A: Colony face; B: Colony back; C: Macroconidium; D: Conidiophore; E: Microconidia; F: Chlamydospore



图 2 枯萎病菌接种豇豆的致病性测定
Figure 2 Pathogenicity testing of cowpea fusarium wilt

区的通用引物 ITS1 和 ITS4 PCR 扩增,扩增产物经 1%琼脂凝胶电泳检测,可扩增出条带约为 650 bp 目的片段(图 3B)。

1.4 ITS 同源性分析

测得的序列在 NCBI 中在线去除载体序列后,得到全长为 569 bp 的 ITS 序列,和 Blast 比对发现:其与已报道的菜豆尖孢镰刀菌(*Fusarium oxysporum* (AB705144))序列相似性高达 99%;与其它尖孢镰刀菌序列相似性均在 97%以上。下载相似性最高的多条序列,与该豇豆病原菌一起,用 MEGA 4.0 软件采用 Neighbor Joining rNJ 法 Complete Deletion 模式构建系统进化发育树,并分析系统进化发育关系(图 4)。

从图 4 中我们也能清晰的看到,该病原菌与菜豆尖孢镰刀菌(*Fusarium oxysporum* (AB705144))聚在同一分支上面,遗传距离最近。这也说明了豇豆枯萎病的病原为尖孢镰刀菌菜豆专业化型(*Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseolus*),这与吴仁锋等(2012, 湖北大学学报, 34(1): 100-103)报道一致。

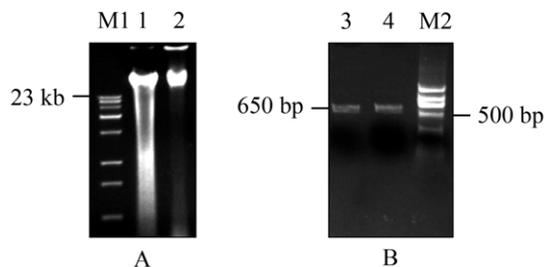


图 3 豇豆枯萎病菌基因组 DNA 及 ITS 扩增。
注: M1: λ DNA/*Hind* III; M2: DM2000 DNA Marker; 1,2: 豇豆枯萎病菌基因组 DNA; 3,4: 豇豆枯萎病菌 ITS 扩增
Figure 3 Genomic DNA of cowpea fusarium wilt and ITS amplification
Note: M1: λ DNA/*Hind* III; M2: DM2000 DNA Marker; 1,2: Genomic DNA of cowpea fusarium wilt; 3,4: ITS amplification of cowpea fusarium wilt

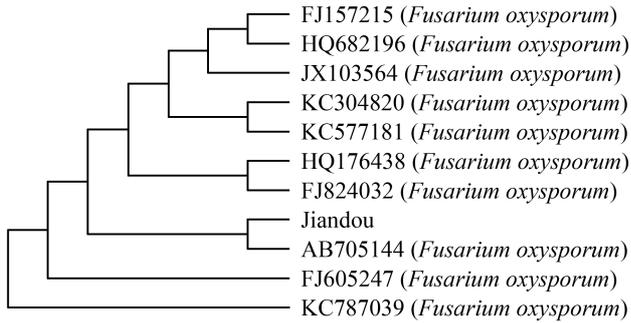


图4 豇豆枯萎病菌 ITS 系统进化发育分析

注: 采用邻近距离法建树, 自举数据集 1 000 次

Figure 4 Phylogenetic tree based on jiangdou and the correlativite isolate ITS sequences of the clones

Note: The tree was constructed via the neighbor-joining method, bootstrap values above 1 000 are shown as percentage

1.5 病原菌生物学测定

1.5.1 温度对菌丝生长速率的影响

从图 5 可见, 在所试温度下, 4℃时生长较缓慢, 37℃生长不好, 50℃不生长, 其它温度下豇豆尖孢镰刀菌菌丝生长较好, 适宜生长温度为 20~30℃, 最适温度为 25℃。

1.5.2 pH 对菌丝生长的影响

由图 6 可见, 豇豆尖孢镰刀菌菌丝在 pH 为 4~12 范围内均能生长, 适宜 pH 为 6~10, 最适 pH 值 8.0, 嗜好碱性条件, 即适应碱性的环境较酸性环境强。

1.5.3 光照对菌丝生长速率的影响

从图 7 和表 1 可见, 持续光照下菌丝生长最好, 其次是全黑暗, 但两者间无显著差异, 而光暗 12 h 条件下生长最慢, 且菌丝稀疏, 与上述两处理差异达显著水平。

1.5.4 不同碳源、氮源对菌丝生长的影响

由表 2 可知, 供试的 6 种碳源中, 以果糖、D- 甘

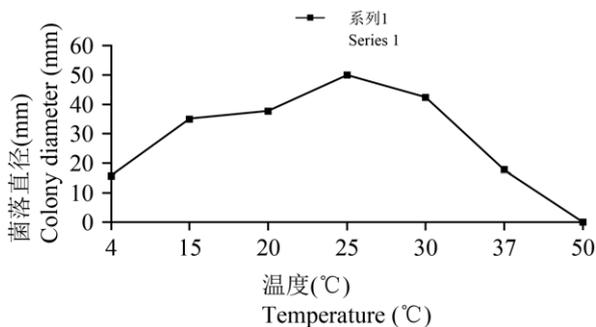


图5 温度对菌丝生长的影响

Figure 5 The effect of temperature on mycelial growth of *Fusarium oxysporum*

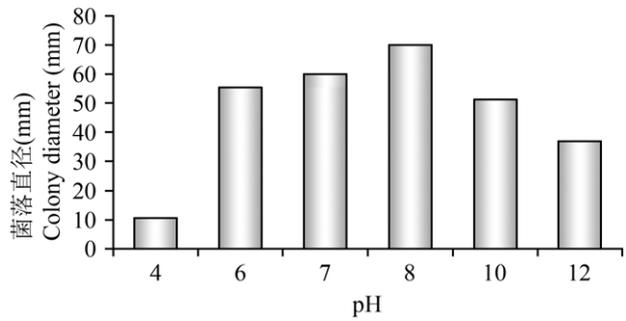


图6 pH 对菌丝生长的影响

Figure 6 The effect of pH value on mycelial growth of *Fusarium oxysporum*

露醇为碳源的培养基上生长速度较快, 在 $LSD_{0.01}$ 水平上无显著性差异; 而以葡萄糖、麦芽糖、蔗糖和可溶性淀粉为碳源的培养基上生长相对缓慢。而供试的 6 种氮源中, 以蛋白胨为氮源的培养基上生长最快, 然后依次为硝酸钠、硝酸钾、氨基乙酸、牛肉浸膏和酵母浸膏。其中酵母浸膏在 $p=0.01$ 的水平上与其它 5 种氮源相比, 差异达显著水平。

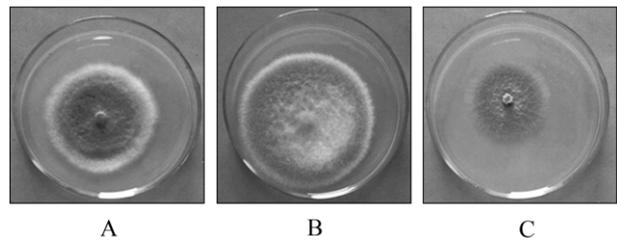


图7 光照对菌丝生长的影响

注: A: 全黑暗菌丝; B: 全光照菌丝; C: 光暗 12 h 菌丝

Figure 7 The effect of light duration on mycelial growth of *Fusarium oxysporum*

Note: A: Dark 24 h; B: Lighting 24 h; C: Dark 12 h and lighting 12 h

表 1 不同光照处理对豇豆尖孢镰刀菌菌丝生长的影响

Table 1 The effect of light duration on mycelial growth of *Fusarium oxysporum*

光照处理 Lighting treatment	菌落直径(mm) Colony diameter (mm)	差异显著性 Significance of difference	
		$LSD_{0.05}$	$LSD_{0.01}$
全黑暗 Dark 24 h	61.33	b	A
全光照 Lighting 24 h	69.33	a	A
光暗 12 h Dark 12 h and lighting 12 h	37.33	c	B

表 2 不同碳源处理对豇豆尖孢镰刀菌菌丝生长的影响
Table 2 The effect of different carbon and nitrogen sources on mycelial growth of *Fusarium oxysporum*

碳源 Carbon sources	菌落直径(mm) Colony diameter (mm)	氮源 Nitrogen sources	菌落直径(mm) Colony diameter (mm)
蔗糖 Sucrose	61.67 bcB	硝酸钠 Sodium nitrate	62.00 bAB
可溶性淀粉 Soluble starch	59.33 cB	硝酸钾 Potassium nitrate	58.33 bcBC
果糖 Fructose	71.33 aA	蛋白胨 Peptone	67.33 aA
麦芽糖 Maltose	63.00 bcB	酵母浸膏 Yeast extract	46.00 dD
葡萄糖 Glucose	64.67 bB	牛肉浸膏 Beef extract	55.00 cC
D-甘露醇 D-mannitol	65.33 bAB	氨基乙酸 Aminoacetic acid	55.67 cBC

2 讨论

海南近年来豇豆种植面积不断扩大,2013 年约占瓜菜类种植面积的 11%,占豆类种植面积大于 70%,而豇豆枯萎病田间发病率一般 5%~20%,严重时 30%以上,甚至绝收。本研究对采自海南豇豆病原菌分离物经形态学观察、致病性测定和 ITS 序列分析,鉴定该病原菌为尖孢镰刀菌菜豆专化型(*Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseolus*),这为该病害的致病分子机理及综合防治研究提供了充分的背景资料和技术手段,同时也加速了豇豆抗尖孢镰刀菌枯萎病品种的筛选和培育的进程。

经对豇豆尖孢镰刀菌菜豆专化型生物学特性初步研究,菌丝适宜生长温度为 20~30℃,与海南田间发病规律相吻合。适宜 pH 值为 6~10,嗜偏碱性,这与潘虹等(2011)报道的尖孢镰刀菌亚麻专化型适应碱性的能力较酸性强相一致,而据吕佩珂等(1992,农业出版社, pp.118)报道酸性条件利于分生孢子芽管的生长。全光照和全黑暗有利于菌丝生长,与潘虹等(2011)报道全黑暗有利于尖孢镰刀菌亚麻专化型菌丝生长稍有差异,这可能与不同作物病原菌、不同区域或品种等有关。生产上豇豆枯萎病与豇豆茎基腐烂病表面上症状相似,两者都造成豇豆萎蔫,但前者造成维管束褐变,后者不造成维管束褐变,同时豇豆枯萎病病原菌为尖孢镰刀菌菜豆专化型,豇豆茎基腐烂病原菌为瓜果腐霉,生产中要注意两者的区别(毛勇等, 2011)。通过对其生物学特性初步研究,表

明温度、pH 值及光照均能影响该病原菌菌丝的生长,影响菌丝生长和孢子生长的其它因素及发生规律等的研究有待开展,希望相关工作能为致病机理和病害防治等研究提供理论基础。

3 材料与方法

3.1 病原菌分离及鉴定

3.1.1 供试菌株来源

2014 年 3 月 13 日从海南省乐东县九所镇豇豆地枯萎病发病样本上采集到,经常规组织分离和纯化培养后(方中达, 1998, 中国农业出版社, pp.122-124),纯化菌株保存于 4℃冰箱中备用。

3.1.2 病原菌形态观察

采集到的病样经保湿培养后用针轻轻挑取表面霉层,在显微镜下直接观察菌丝和孢子形态。病原菌在 PDA 上培养,待其长孢挑取菌丝制作临时玻片,观察其形态特征。

3.1.3 病原菌致病性测定

盆栽豇豆待其长出 7、8 片叶时,用消毒过的针刺伤根茎基部,然后配制供试菌株的孢子悬浮液(孢子浓度约为 10^5 ~ 10^6 个/mL),用喷雾法将孢子悬浮液喷到根茎基部,多余悬浮液浇灌豇豆根部,同时喷无菌水为对照。正常栽种管理,每隔 1~2 d 观察症状,发病后,从病株再次分离病原菌,确认致病菌。

3.1.4 病原菌 DNA 提取

将分离纯化的病原菌接种于 PDA 平板上 28℃培养 7 d 后,用灭菌刮铲刮取菌丝,液氮中研磨成粉末。同时,分装到 2.0 mL 无菌离心管中,每管约 0.1~0.2 g, -20℃冰箱保存,备用。或者直接加上 1 mL 的 DNA 提取缓冲液,参考王会芳等(2012)的方法略作修改,按北京三博远志生物技术有限公司生产的真菌基因组 DNA 快速提取试剂盒使用说明提取并纯化病原菌基因组总 DNA。

3.1.5 特异引物扩增 ITS 序列

以提取并纯化的病原菌基因组 DNA 为模板,经真菌 ITS 通用引物 ITS1 和 ITS4 PCR 扩增(刘春来等, 2007, 东北农业大学学报, 38(1): 101-106)。扩增反应体系 50.0 μ L,其中,10 \times Easy Taq Buffer 5.0 μ L, 2.5 mmol/L dNTPs 2.5 μ L, 1 492r 5 pmol (2.5 μ L), 27f 5 pmol (2.5 μ L), 模板 1 mL (50 ng), ddH₂O 36.0 μ L, Easy Taq DNA 聚合酶 0.5 μ L。反应条件为:94℃预变

性 5 min, 94℃变性 30 s, 55℃退火 45 s, 72℃, 延伸 90 s, 32 个循环, 72℃, 延伸 10 min, 4℃保存。取少量(约 5 μL)扩增产物, 经 1%的琼脂糖凝胶电泳检测目的条带的大小。引物 ITS1: 5'-TCCGTAGGTGAACCTGC GG-3', ITS4: 5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3', 均由北京三博远志生物技术有限公司合成。

3.1.6 纯化 PCR 产物、测序及比对

余下 PCR 扩增产物经胶回收, pEASY-T 载体连接, Trans 5α 转化涂板, 蓝白斑筛选和菌液 PCR 验证的阳性克隆送北京三博远志生物技术有限公司测序。获得的序列在 NCBI 中比对搜索, 确定种属, 并下载一致性较高的序列与上述菌株的 ITS 序列一起, 采用 Mega4.0 软件生物信息软件(Tamura et al., 2007), 以邻近距离法构建系统进化发育树, 并分析系统进化发育关系。

3.2 病原菌的生物学测定

3.2.1 温度对菌丝生长的影响

培养 5 d 后, 从距培养皿边缘 3 cm 处用无菌打孔器打取直径为 5 mm 的菌块接种于 PDA 平板中央, 并放置于 5℃、15℃、20℃、25℃、30℃、37℃和 50℃的恒温培养箱中进行培养, 每个处理 3 次重复, 培养 6 d 后, 测量菌落直径(方中达, 1998, 中国农业出版社, pp. 140-142)。菌落直径(mm)=菌落测量直径(mm)- 菌块直径(mm)。

3.2.2 pH 对菌丝生长的影响

调配 pH 值为 4、6、7、8、10 和 12 的 6 种 PDA 培养基, 倒培养基并制成平板, 同一圈打取培养 5 d 直径为 5 mm 的菌块, 28℃恒温培养 6 d 后再测量菌落的直径。

3.2.3 光照对菌丝生长速率的影响

制作 PDA 平板并接种培养 5 d 直径为 5 mm 的菌块, 同时放置于 24 h 全黑暗、24 h 全光照和光暗交替 12 h 三种条件下 28℃培养箱中培养, 6 d 后测量菌落的直径。

3.2.4 不同碳源、氮源对菌丝生长速度的影响

采用 Crapek 为基础培养基: NaNO₃ 2 g、KCl 0.5 g、K₂HPO₄ 1 g、FeSO₄ 0.01 g、MgSO₄ 0.5 g、蔗糖 30 g、琼脂 20 g、水 1 000 mL、pH 自然, 然后再以相同碳量的可溶性淀粉、果糖、麦芽糖、葡萄糖及 D- 甘露醇代替基础培养基中的蔗糖作为试验碳源, 配制含不同碳源的培养基。用以上 Crapek 为基础培养基, 再分别

以等氮量的硝酸钾、蛋白胨、酵母浸膏、牛肉浸膏、氨基乙酸代替硝酸钠作为试验的氮源, 配制含不同氮源的培养基。以上制作成平板后, 接种培养 5 d 菌龄的菌块, 置 28℃下培养 6 d, 测量菌落直径。

作者贡献

肖敏是本研究的具体执行者, 负责试验的操作和论文的撰写; 赵志祥老师负责试验设计和论文撰写修改; 吉训聪研究员田间采集病样; 曾向萍和严婉荣进行生物学的研究; 王会芳负责病原菌鉴定工作。

致谢

本研究获得国家级及单位创新基金的支持, 得到海南省植物病虫害防控重点实验室大力资助, 同时也感谢本研究所其他同仁试验过程中给予的帮助。

参考文献

- Pan H., Guan F.Z., Wu G.W., Song X.X., Jiang W.D., and Wang L.Q., 2011, Study on biological characteristics of *Fusarium oxysporum* Schl. f. sp. *linil*, Dongbei Nongye Daxue Xuebao (Journal of Northeast Agricultural University), 42(7): 50-56 (潘虹, 关凤芝, 吴广文, 宋喜霞, 姜卫东, 王立群, 2011, 尖孢镰刀菌亚麻专化型生物学特性研究, 东北农业大学学报, 42(7): 50-56)
- Wang H.F., Zeng X.P., Rui K., and Cheng M.C., 2012, The preliminary study of biology characteristics and identification of momordica in *Charantia anthracnose* L., Zhongguo Nongxue Tongbao (Chinese Agricultural Science Bulletin), 28(7): 141-145 (王会芳, 曾向萍, 芮凯, 陈绵才, 2012, 苦瓜炭疽病病原菌鉴定及生物学特性初步研究, 中国农学通报, 28(7): 141-145)
- Tamura K., Dudley J., and Nei M., 2007, MEGA4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0, Molecular Biology and Evolution, 24(8): 1596
- Mao Y., Tang Z.Q., Ruan Y.Z., and Zhang R.Y., 2011, Pathogen Identification of cowpea foot rot and its biological characteristics, Zhongguo Nongxue Tongbao (Chinese Agricultural Science Bulletin), 27(16): 172-175 (毛勇, 谭志琼, 阮云泽, 张荣意, 2011, 豇豆茎基腐烂病原菌鉴定及其生物学特性, 中国农学通报, 27(16): 172-175)
- Zhao Z.X., Chen Y., Chen M.C., Hu M.Y., Wang S.Y., and Xiao T.B., 2013, Identification of dioscorea stem rot disease in Hainan, Jiyinzuxue Yu Yingyong Shengwuxue (Genomics and Applied Biology), 32(6): 761-766 (赵志祥, 陈圆, 陈绵才, 符美英, 王三勇, 肖彤斌, 2013, 海南薯蓣茎腐病原菌的鉴定, 基因组学与应用生物学, 32(6): 761-766)