

# 河南省豫西地区农田土壤镰孢菌种群多样性分析

唐琳<sup>1</sup> 赵辉<sup>2</sup> 高增贵<sup>3</sup>

(1. 洛阳师范学院 生命科学系 河南 洛阳 471000; 2. 河南省农业科学院 河南 郑州 450002;

3. 沈阳农业大学 植物免疫研究所 辽宁 沈阳 110866)

**摘要:**采用形态学和现代分子生物学方法,对河南省豫西地区农田土壤镰孢菌种群多样性进行了分析。通过鉴定,共得到了9个种的镰孢菌,分别为尖孢镰孢菌、半裸镰孢菌、轮枝镰孢菌、禾谷镰孢菌、层生镰孢菌、锐顶镰孢菌、黄色镰孢菌、木贼镰孢菌和茄腐镰孢菌。系统发育学分析结果表明:镰孢菌属真菌18S rDNA-ITS和EF-1 $\alpha$ 基因序列均具有一定的同源性和丰富的遗传多态性,其中李瑟组镰孢菌轮枝镰孢菌、层生镰孢菌、黄色镰孢菌种间18S rDNA-ITS基因序列存在着较高的同源性,不能正确地表现镰孢菌属种一级分类单元的特征;而延伸因子EF-1 $\alpha$ 基因序列却较好地表现出了供试菌株种一级的关系,说明镰孢菌延伸因子EF-1 $\alpha$ 基因序列较18S rDNA-ITS基因序列存在更丰富的种间多态性,可以较好地表现镰孢菌种一级的关系。

**关键词:**镰孢菌;种群多样性;系统发育学

中图分类号:S432.4<sup>+</sup>4 文献标识码:A 文章编号:1000-7091(2012)02-0202-05

## Analysis of *Fusarium* Species Diversity from Field Soil in Western Henan Province

TANG Lin<sup>1</sup> ZHAO Hui<sup>2</sup> GAO Zeng-gui<sup>3</sup>

(1. Life Science Department, Luoyang Normal University, Luoyang 471000, China; 2. Henan Academy of Agricultural Sciences, Zhengzhou 450002, China; 3. Institute of Plant Immunology, Shenyang Agricultural University, Shenyang 110866, China)

**Abstract:** It was analyzed the phylogenetic relationships among *Fusarium* strains for the soil diversity of *Fusarium* species in western Henan province. The species diversity on *Fusarium* of field soil in western Henan province was analyzed by methods of morphological modern molecular biology. It was obtained nine species of *Fusarium* through the identification. There are *F. oxysporum*, *F. semitectum*, *F. verticillioides*, *F. graminearum*, *F. proliferatum*, *F. acuminatum*, *F. equiseti*, *F. thapsinum* and *F. solani*. Phylogenetic analysis showed that 18S rDNA-ITS and EF-1 $\alpha$  gene sequences showed homology and the genetic polymorphism. 18S rDNA-ITS gene sequence analysis showed that *F. verticillioides*, *F. proliferatum* and *F. thapsinum* which belonged to Liseola *Fusarium* fungi species presenced high homology. The performance can not be correct to manifest the classification of the *Fusarium* species. Elongation factor EF-1 $\alpha$  gene sequences better demonstrated the relationship of the tested strains between the species level. It indicated that elongation factor EF-1 $\alpha$  gene sequences exist more abundant species polymorphisms than 18S rDNA-ITS gene sequence. It can be more better to show the relationship between the level of *Fusarium* species.

**Key words:** *Fusarium*; Species diversity; Phylogenetic analysis

镰孢菌属(*Fusarium*)真菌是重要的植物病原真菌类群之一,广泛分布于土壤中,寄主植物达100余种。该属真菌中很多种类属植物病原菌<sup>[1-2]</sup>,能够

引起许多植物病害,如小麦赤霉病、玉米茎基腐病、瓜类枯萎病等,病害的发生与流行不仅降低了作物的产量和质量,而且因产生毒素而限制了粮食作物

收稿日期:2010-10-09

基金项目:国家“十一五”科技支撑计划项目(No. 2006BAD08A06);洛阳师范学院青年科研基金项目(2011-QNJJ-004)

作者简介:唐琳(1981-),女,天津人,讲师,硕士,主要从事植物微生态和生物防治研究。

通讯作者:赵辉(1978-),男,辽宁昌图人,助理,博士,主要从事植物微生态和病害生物防治研究。

的利用<sup>[3]</sup>给粮食的生产和食品安全带来了威胁。本研究采用形态学分类和现代分子生物学方法,对河南省豫西地区农田土壤镰孢菌种群的多样性和系统进化进行了分析,旨在明确豫西地区农田镰孢菌属真菌种的多样性,为镰孢菌引起的农作物病害病理学及流行防治等方面的研究提供参考。

## 1 材料和方法

### 1.1 豫西地区自然条件及种植作物种类

豫西地区指的是河南省京广线以西包括太行山、熊耳山、外方山和伏牛山及其山前平原与山间盆地在内的广大地区(包括三门峡、洛阳、平顶山在内的地区)<sup>[4]</sup>,位于亚欧大陆桥东段,中国河南省西部(东经约 111°08′至 133°45′,北纬约 33°08′至 35°05′之间),横跨黄河中游两岸,地处暖温带南缘向北亚热带过渡地带。豫西地区在大地构造上属于华北地区,地貌上属于豫西山地和黄土丘陵区,气候上属于暖温带半湿润、半干旱的大陆性季风气候和亚热带雨林气候,水系上属于黄河、淮河两大流域<sup>[5]</sup>。年平均气温 14.2~15.8℃,平均年降雨量 546~1 287 mm。豫西地区地势西高东低,境内多以山川丘陵为主,地形错综复杂。种植作物种类以小麦、玉米、大豆、果树和蔬菜等为主。

### 1.2 样品采集及菌株分离

2008-2009 年分别在河南省豫西地区的洛阳市(孟津县、洛宁县、宜阳县、嵩县、栾川县)、三门峡市(义马市、灵宝市、卢氏县)、平顶山市(郏县、汝城县、鲁山县、叶县)等地采集小麦和玉米轮作农田土壤样品 65 份。

采用稀释分离法<sup>[6]</sup>对土壤中的镰孢菌进行分离,每份土样重复 3 次,25℃下恒温培养,经单孢纯化后转试管保存备用<sup>[1,7-9]</sup>,并计算镰孢菌的分离频率。

菌株的分离频率 = (分离得到的各镰孢菌属菌株数/分离得到总镰孢菌菌株数) × 100%。

### 1.3 菌株培养及形态观察

将分离纯化的镰孢菌转到 PDA、PSA 和 SNA(合成低营养培养基)3 种培养基上<sup>[7]</sup>,置于 25℃下恒温培养 4 d 后观察记录菌落直径大小、菌落正反面颜色、分生孢子和厚垣孢子形状及着生方式、产孢细胞形态特点、分生孢子座及菌核的产生情况等,分别测量大、小型分生孢子、产孢细胞及厚垣孢子的大小。

按照 Booth<sup>[1]</sup>、Leslie 等<sup>[10]</sup>、Nelson 等<sup>[11]</sup>的分类

系统,结合《浙江镰刀菌志》<sup>[12]</sup>及其他鉴定方法对镰孢菌菌株进行形态学鉴定。

### 1.4 菌株 DNA 提取

采用 CTAB 法提取镰孢菌菌株的基因组 DNA<sup>[13]</sup>。

### 1.5 ITS 及 EF-1 $\alpha$ 分析

选取形态上具有代表性的菌株进行 ITS(internal transcribed spacer)及 EF-1 $\alpha$ (translation elongation factor 1 $\alpha$ )分析。ITS 分析采用真菌核糖体基因转录间隔区通用引物 ITS1(5′-TCCGTAGCTGAAC-CTGCGG-3′)和 ITS4(5′-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3′)<sup>[14]</sup>;延伸因子基因 EF-1 $\alpha$  序列分析采用引物 EF1H(5′-ATGGGTAAGGAAGACAAGAC-3′)和 EF2T(5′-GGAAGTACCACTGATCATGTT-3′)<sup>[15]</sup>进行扩增。引物由上海生工生物工程技术服务有限公司合成。

PCR 扩增体系(50  $\mu$ L): Taq 酶(5 U/ $\mu$ L) 0.2  $\mu$ L, 10 × PCR Buffer 5  $\mu$ L, 25 mmol/L MgCl<sub>2</sub> 3  $\mu$ L, 10 mmol/L dNTP 1  $\mu$ L, 10 mmol/L 引物 ITS1 和 ITS4 各 1  $\mu$ L, DNA 模板 1  $\mu$ L, 加 ddH<sub>2</sub>O 补足至 50  $\mu$ L。扩增程序: 94℃ 2 min; 94℃ 1 min, 55℃ 1 min, 72℃ 1 min, 35 个循环; 72℃ 5 min; 4℃ 保存<sup>[16-17]</sup>。PCR 扩增产物由上海生工生物工程技术服务有限公司测序。

### 1.6 序列分析

登陆 NCBI 网站(<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/blast.cgi>)及 Fusarium 数据库(<http://fusarium.cbio.psu.edu/>)将 ITS 和 EF-1 $\alpha$  测序结果与数据库中所有已测定的真菌 ITS 和 EF-1 $\alpha$  序列进行 BLAST 分析,找出最近似序列,分析序列相似程度。下载相似性高、可信度高的序列,用于分析。用 MEGA4.0 软件进行 Neighbor-Joining 分析,构建系统进化树。

## 2 结果与分析

### 2.1 镰孢菌的分离频率

从采集自河南省豫西地区农田的 65 份土壤样品中共分离得到 101 株镰孢菌,根据形态学鉴定和 ITS 及 EF-1 $\alpha$  序列比对分析结果,确定本次分离得到的镰孢菌分属于 9 个种。其各自的分离频率分别为:尖孢镰孢菌 15.84%,半裸镰孢菌 5.95%,轮枝镰孢菌 17.82%,禾谷镰孢菌 36.63%,层生镰孢菌 4.95%,锐顶镰孢菌 1.98%,黄色镰孢菌 2.97%,木贼镰孢菌 6.93%,茄腐镰孢菌 6.93%(表 1)。其中禾谷镰孢菌分离频率最高,而锐顶镰孢菌和黄色镰孢菌分离频率最低。

表 1 河南豫西农田土壤镰孢菌的分离频率

Tab. 1 *Fusarium* isolation rate from crop soil in western Henan province

| 镰孢菌<br><i>Fusarium</i> species  | 土样采集地点<br>Soil sampling site                 | 分离频率/%<br>Isolation rate |
|---------------------------------|--|--------------------------|
| 尖孢镰孢菌 <i>F. oxysporum</i>       | 洛宁县、嵩县、栾川县、宜阳县、义马市、灵宝市、卢氏县、郑县、汝州县、鲁山县        | 15.84                    |
| 半裸镰孢菌 <i>F. semitectum</i>      | 洛宁县、孟津县、义马市、郑县、叶县                            | 5.95                     |
| 轮枝镰孢菌 <i>F. verticillioides</i> | 洛宁县、孟津县、嵩县、宜阳县、义马市、灵宝市、卢氏县、郑县、汝州县、鲁山县、叶县     | 17.82                    |
| 禾谷镰孢菌 <i>F. graminearum</i>     | 洛宁县、孟津县、栾川县、嵩县、宜阳县、义马市、灵宝市、卢氏县、郑县、汝州县、鲁山县、叶县 | 36.63                    |
| 层生镰孢菌 <i>F. proliferatum</i>    | 洛宁县、孟津县、灵宝市                                  | 4.95                     |
| 锐顶镰孢菌 <i>F. acuminatum</i>      | 孟津县、灵宝市                                      | 1.98                     |
| 木贼镰孢菌 <i>F. equiseti</i>        | 孟津县、栾川县、灵宝市、卢氏县、郑县、汝州县                       | 6.93                     |
| 黄色镰孢菌 <i>F. thapsinum</i>       | 栾川县、卢氏县                                      | 2.97                     |
| 茄腐镰孢菌 <i>F. solani</i>          | 宜阳县、栾川县、义马市、郑县、汝州县、叶县                        | 6.93                     |

2.2 菌株的 ITS 分析

对其中部分菌株的 *18S rDNA-ITS* 序列进行了扩增,扩增片段长度在 600 bp 左右。将序列提交 GenBank,供试菌株及其序列的 GenBank 登录号见表 2。通过 BLAST 分析,确定其分属于镰孢菌的 7 个种,并且搜索相似性高的序列构建系统发育树。从图 1 可以看出,供试菌株可分为 5 个进化簇:菌株 LYF007、LYF027、LYF044、LYF051 聚为第一进化枝,为禾谷镰孢菌;LYF004、LYF005 聚为第二进化

枝,为木贼镰孢菌;LYF002、LYF009、LYF011、LYF065、LYF071 聚为第三进化枝,为黄色镰孢菌、层生镰孢菌和轮枝镰孢菌;LYF019、LYF043 聚为第四进化枝,为茄腐镰孢菌;LYF013、LYF022、LYF025 聚为第五进化枝,为尖孢镰孢菌。序列比对显示,其中李瑟组镰孢菌黄色镰孢菌、层生镰孢菌和轮枝镰孢菌菌株的 *18S rDNA* 基因序列聚为一类,说明这 3 个种的镰孢菌 *18S rDNA* 基因序列具有较高的遗传相似性。

表 2 供试菌株及其序列的 GenBank 登录号

Tab. 2 ITS and EF-1 $\alpha$  accession numbers in GenBank of the tested isolates

| 供试菌株编号<br>No. of isolates | 镰孢菌种类<br><i>Fusarium</i> sp. | ITS 序列 GenBank 登录号<br>ITS accession number in GenBank | EF-1 $\alpha$ 序列 GenBank 登录号<br>EF-1 $\alpha$ accession number in GenBank |
|---------------------------|------------------------------|---|---|
| LYF007                    | <i>F. graminearum</i>        | HQ176432  |   |
| LYF027                    | <i>F. graminearum</i>        | HQ176433  | HQ176419  |
| LYF044                    | <i>F. graminearum</i>        | HQ176434  | HQ176421  |
| LYF051                    | <i>F. graminearum</i>        | HQ176435  |   |
| LYF004                    | <i>F. equiseti</i>           | HQ176430  | HQ176417  |
| LYF005                    | <i>F. equiseti</i>           | HQ176431  | HQ176418  |
| LYF002                    | <i>F. thapsinum</i>          | HQ176442  | HQ176429  |
| LYF009                    | <i>F. proliferatum</i>       | HQ176439  | HQ176427  |
| LYF011                    | <i>F. verticillioides</i>    | HQ176443  | HQ176446  |
| LYF065                    | <i>F. verticillioides</i>    | HQ176444  | HQ176447  |
| LYF071                    | <i>F. verticillioides</i>    | HQ176445  | HQ176448  |
| LYF019                    | <i>F. solani</i>             | HQ176440  | HQ176428  |
| LYF043                    | <i>F. solani</i>             | HQ176441  |   |
| LYF013                    | <i>F. oxysporum</i>          | HQ176436  | HQ176424  |
| LYF022                    | <i>F. oxysporum</i>          | HQ176437  | HQ176425  |
| LYF025                    | <i>F. oxysporum</i>          | HQ176438  | HQ176426  |

2.3 菌株的 EF-1 $\alpha$  分析

将进行 *18S rDNA-ITS* 分析的部分菌株的 *EF-1 $\alpha$*  基因序列同时进行了扩增,扩增片段长度约 580 bp,供试菌株及其序列的 GenBank 登录号见表 2。在 *Fusarium* 数据库和 GenBank 数据库中进行 BLAST

分析,进一步确定其分类地位,同时结合相似性高的序列构建系统发育树。系统发育树将供试菌株分为 7 个进化簇(图 2):菌株 LYF011、LYF065、LYF071 聚为第一进化枝,为轮枝镰孢菌;LYF002 为第二进化枝,为黄色镰孢菌;LYF009 为第三进化枝,为层生

镰孢菌; LYF013、LYF022、LYF025 聚为第四进化枝, 为尖孢镰孢菌; LYF027、LYF044 聚为第五进化枝, 为禾谷镰孢菌; LYF004、LYF005 聚为第六进化枝, 为木贼镰孢菌; LYF019 为第七进化枝, 为茄腐镰孢

菌。序列比对结果和系统进化树显示, 镰孢菌菌株的 EF-1 $\alpha$  基因序列差异较大, 存在丰富的遗传多样性。在分类学上, 可以应用延伸因子 EF-1 $\alpha$  基因序列准确地鉴别区分这 7 个种的镰孢菌。

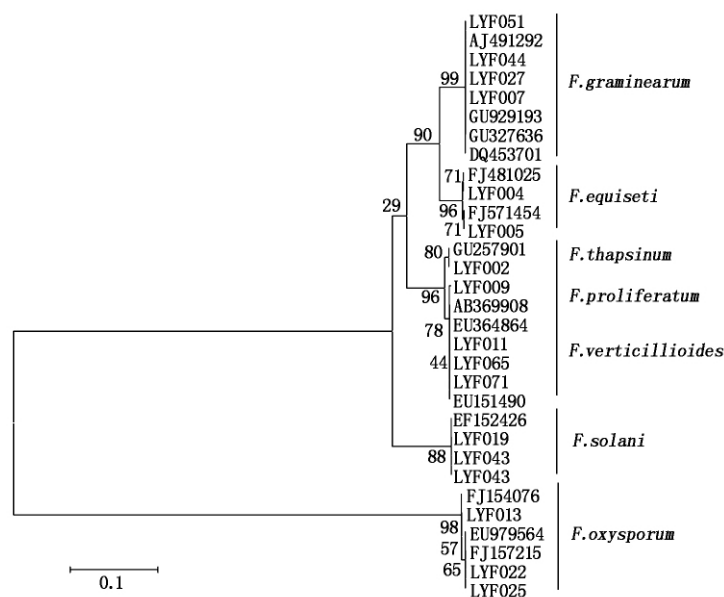


图 1 部分镰孢菌 18S rDNA 基因片段的邻接进化树

Fig. 1 The Neighbor-Joining polygenetic tree constructed by *Fusarium* 18S rDNA ITS sequences

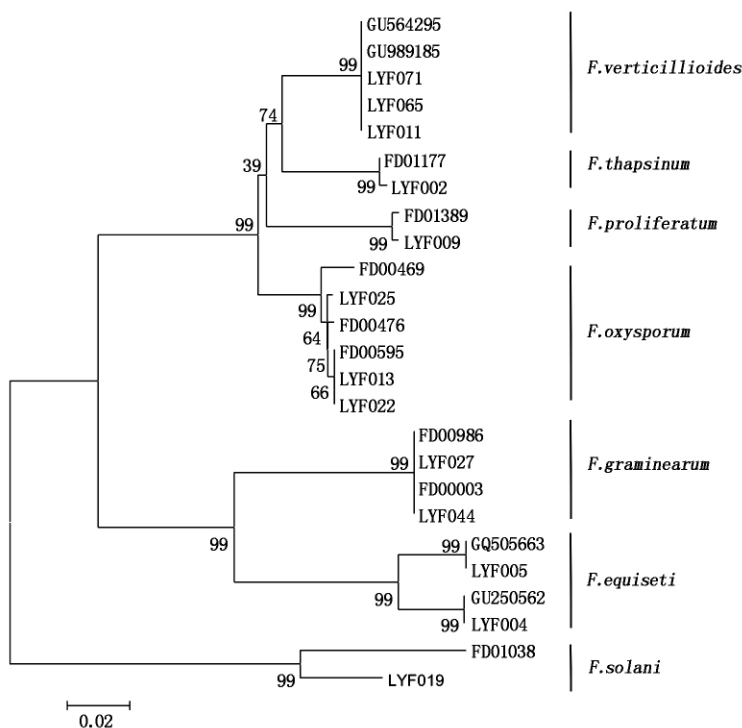


图 2 部分镰孢菌 EF-1 $\alpha$  基因片段的邻接进化树

Fig. 2 The Neighbor-Joining polygenetic tree constructed by *Fusarium* EF-1 $\alpha$  sequences

### 3 结论与讨论

镰孢菌属种的分类和鉴定一直依靠形态学和生物学特征进行, 目前形态学分类系统中影响最大的是 Booth<sup>[1]</sup>, Gerlach 等<sup>[18]</sup> 和 Nelson 等<sup>[11]</sup> 的分类系

统。然而镰孢菌属真菌在生长过程中许多性状不稳定, 形态变异较大, 因此种的划分争议很大。直到 1989 年, Guadet 等<sup>[19]</sup> 将基于分子生物学的系统发育学方法引入镰孢菌属种的鉴定, 从而使镰孢菌属真菌的种的鉴定体系更加完善。目前对镰孢菌属真

菌的鉴定和分类,除依据传统形态学和生物学特征外,人们还将某些基因位点(如  $\beta$ -tubulin、ITS、EF-1 $\alpha$ 、IGS( intergenic spacer) 等)的分子系统发育学分析作为镰孢菌属真菌分类的重要依据<sup>[20-22]</sup>。

本研究采用形态学和 ITS、EF-1 $\alpha$  分析等分子生物学方法,对河南省豫西地区农田镰孢菌的多态性和系统发育进行了分析,从豫西地区农田土壤土样中共分离鉴定出 9 个种的镰孢菌,分别为尖孢镰孢菌、半裸镰孢菌、轮枝镰孢菌、禾谷镰孢菌、层生镰孢菌、锐顶镰孢菌、黄色镰孢菌、木贼镰孢菌和茄腐镰孢菌,其中禾谷镰孢菌分离频率最高,为 36.63%,其次为轮枝镰孢菌和尖孢镰孢菌,其他镰孢菌分离频率较低,说明豫西地区农田土壤镰孢菌以禾谷镰孢菌为主要类群,这与采样农田以玉米和小麦为主要栽培作物的耕作栽培制度<sup>[23]</sup>有关。

系统发育分析结果表明:镰孢菌 ITS 和 EF-1 $\alpha$  基因序列具有一定的同源性和丰富的多态性。而李瑟组镰孢菌轮枝镰孢菌、层生镰孢菌和黄色镰孢菌的 18S rDNA-ITS 序列同源性较高,说明 ITS 序列不能正确地表现镰孢菌属种一级分类单元的特征,这与 O'Donnell<sup>[15]</sup>等的研究结果相似。而供试镰孢菌的 EF-1 $\alpha$  序列表现出了较好的同源性和丰富的多态性,较好地表现出了供试菌株的种一级的关系,说明镰孢菌延伸因子 EF-1 $\alpha$  基因序列较 ITS 基因序列存在更丰富的种间多态性,其更能表现出镰孢菌属的种的差别<sup>[18, 24-25]</sup>。

#### 参考文献:

- [1] Booth C. The genus *Fusarium* [M]. Kew: Commonwealth Mycological Institute, 1971.
- [2] Kistler H C, Alabouvette C, Baayen R P *et al.* Systematic numbering of vegetative compatibility groups in the plant pathogenic fungus *Fusarium oxysporum* [J]. *Phytopathology*, 1999, 88: 30-32.
- [3] 徐雍皋, 陈利锋. 小麦赤霉病防治理论与实践 [J]. 南京: 江苏科学技术出版社, 1993.
- [4] 黄以柱. 略论豫西地区环境的变迁与对策 [J]. 河南大学学报: 自然科学版, 1985, 1: 51-58.
- [5] 周国强, 张青. 豫西地区土地分异规律及合理利用研究 [J]. 地域研究与开发, 2004, 23(4): 126-128.
- [6] 方中达. 植病研究方法 [M]. 3 版. 北京: 中国农业出版社, 1998.
- [7] 梁建根, 张炳欣, 喻景权, 等. 黄瓜根际重要病原与其拮抗菌消长规律的研究 [J]. 应用生态学报, 2005, 16(5): 911-914.
- [8] 马云华, 魏珉, 王秀峰. 日光温室连作黄瓜根区微生物区系及酶活性的变化 [J]. 应用生态学报, 2004, 15(6): 1005-1008.
- [9] 高同春, 叶钟音, 王梅, 等. 水稻旱育秧苗立枯病致病镰孢菌分离、鉴定及致病性测定 [J]. 中国水稻科学, 2001, 15(4): 320-322.
- [10] Leslie J F, Summerell B A. The *Fusarium* laboratory manual [M]. Ames: Blackwell Publishing, 2006.
- [11] Nelson P E, Toussoun T A, Marasas W F O. *Fusarium* species: an illustrated manual for identification [M]. Harrisburg: Pennsylvania State University Press, 1983.
- [12] 陈鸿逵, 王拱辰. 浙江镰刀菌志 [M]. 杭州: 浙江科学技术出版社, 1992.
- [13] Liu D, Coloe S, Baird R *et al.* Rapid mini-preparation of fungal DNA for PCR [J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 2000, 38(1): 471.
- [14] Chen Y C, Eisner J D, Kattar M M *et al.* Polymorphic internal transcribed spacer region 1 DNA sequences identify medically important yeasts [J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 2001, 39(11): 4042-4051.
- [15] O'Donnell K. Molecular phylogeny of the *Nectria haematococca-Fusarium solani* species complex [J]. *Mycologia*, 2000, 92: 919-938.
- [16] 陈玉玺, 张利平, 吕志堂. 10 株镰刀菌 rDNA 内转录间隔区(ITS)序列分析 [J]. 安徽农业科学, 2008, 36(12): 4886-4887.
- [17] Geiser D M, Jimenez-Gasco M, Kang S *et al.* *Fusarium-ID v. 1.0*: A DNA sequence database for identifying *Fusarium* [J]. *European Journal of Plant Pathology*, 2004, 110: 473-479.
- [18] Gerlaeh W, Nirenberg H I. The genus *Fusarium*-a pictorial atlas [M]. Berlin: Paul Parey, 1982.
- [19] Guadet J, Julien J, Lafay J F *et al.* Phylogeny of some *Fusarium* species as determined by large-subunit rRNA sequence comparison [J]. *Molecular Biology & Evolution*, 1989, 6: 227-242.
- [20] O'Donnell K, Cigelnik E. Two divergent intragenomic rDNA ITS2 types within a monophyletic lineage of the fungus *Fusarium* are nonorthologous [J]. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 1997, 7: 103-116.
- [21] 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]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, 95: 2044-2049.
- [22] O'Donnell K, Ward T J, Geiser D M *et al.* Genealogical concordance between the mating type locus and seven other nuclear genes supports formal recognition of nine phylogenetically distinct species within the *Fusarium graminearum* clade [J]. *Fungal Genetics and Biology*, 2004, 41: 600-623.
- [23] 何玉梅, 张仁陟, 张丽华, 等. 不同耕作措施对土壤真菌群落结构与生态特征的影响 [J]. 生态学报, 2007, 27(1): 113-119.
- [24] O'Donnell K, Cigelnik E, Nirenberg H I. Molecular systematics and phylogeography of the *Gibberella fujikumi* species complex [J]. *Mycologia*, 1998, 90: 465-493.
- [25] Kristensen R, Torp M, Kosiak B *et al.* Phylogeny and toxigenic potential is correlated in *Fusarium* species as revealed by partial translation elongation factor 1 alpha gene sequences [J]. *Mycological Research*, 2005, 109(2): 173-186.