

文章编号:1674-7054(2010)04-0337-05

香蕉枯萎病菌的分离鉴定与形态学研究

谢俊^{1,2}, 张旭¹, 陈银华^{1,2}, 陈彩燕³, 韦双双^{1,2}, 夏幽泉^{1,2}, 汤华^{1,2}

(1. 海南大学农学院, 海南 海口 570228; 2. 海南大学热带生物资源可持续利用国家重点实验室培育基地, 海南 海口 570228; 3. 海南省海口市农业技术推广中心, 海南 海口 570206)

摘要:香蕉枯萎病是一种毁灭性真菌病害,对香蕉的种植和产业发展危害严重,其病原为尖孢镰刀菌古巴专化型(*Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*)。为了研究该病原菌的致病机理和香蕉的枯萎病抗性机理,笔者采用组织分离法,对分离纯化得到的候选真菌菌株进行了形态学和显微镜观察,采用CTAB法提取了真菌DNA,并对ITS序列进行了PCR扩增,通过ITS测序及生物信息学分析等手段,对该病原菌进行了分子鉴定。结果表明:分离得到的候选真菌为尖孢镰刀菌古巴专化型,是香蕉枯萎病的致病真菌。

关键词:香蕉; 枯萎病; 尖孢镰刀菌古巴专化型; 形态观察; 分子鉴定

中图分类号: S 432.4 **文献标志码:** A

香蕉(*Musa* spp.)为单子叶草本植物,属芭蕉科(Musaceae)、芭蕉属(*Musa*)、真蕉亚属,是最重要的热带水果之一。香蕉枯萎病,又称巴拿马病、黄叶病,是一种毁灭性维管束系统性病害,近年来该病害在世界各香蕉产地频繁爆发,给香蕉生产和产业发展带来了极大威胁^[1]。该病害现广泛分布于南太平洋、亚洲、澳大利亚、非洲及热带美洲的香蕉产区,在我国广东、广西、福建和海南等省区也有分布^[2]。香蕉枯萎病的病原菌为尖孢镰刀菌古巴专化型(*Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*, FOC),属于半知菌、肉座目、镰刀菌属,为古巴专化型,是一种土壤习居菌,通过土壤、灌溉水流动和染病吸芽进行传播^[3]。目前生产上采用无病组织培养苗和抗病品种来进行防治,有一定的效果,其他防治措施(如化学防治)都达不到理想的效果。采用生物技术手段选育抗病品种,是防治香蕉枯萎病最经济、最根本的出路^[4]。真菌是真核生物,其核糖体的18S、5.8S、28S rDNA基因序列进化缓慢且相对保守,这3个基因之间的ITS(Internal Transcribed Spacers)区段的进化则相对迅速,在科、属、种水平上均有特异性序列,可用于真菌分类鉴定。其18S rDNA和28S rDNA分别约为1.8 kb和3.4 kb,序列中既有保守区又有可变区,在进化速率上比较保守,是系统发育研究的种级以上阶元的良好标记。5.8S基因分子质量小且高度保守,较少用于系统学研究,但为真菌rDNA的PCR扩增的通用引物设计提供了方便。利用18S、5.8S、28S rDNA的保守序列设计引物,对ITS序列进行PCR扩增,然后对扩增片段进行直接测序或克隆测序,通过生物信息学分析,就可以确定真菌的种属^[5-6]。为了研究香蕉枯萎病的致病机理及克隆香蕉抗病基因,笔者采用组织分离法,从发生枯萎病的香蕉植株中分离病原真菌,并通过形态学观察、ITS序列分析及病原菌接种验证实验,确定了分离得到的候选菌株为香蕉枯萎病的致病菌株,为后续的深入研究奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 遗传材料 在海口市郊发生枯萎病的香蕉园,采集发病香蕉植株的假茎和病叶,作为分离病原真菌

收稿日期: 2010-09-07
基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30860149); 教育部科学技术研究重点项目(210172)
作者简介: 谢俊(1976-),男,江西吉安人,海南大学农学院讲师,硕士, E-mail: junxie96@126.com
通信作者: 汤华(1974-),男,湖北恩施人,海南大学农学院副教授,博士, E-mail: thtiger@163.com

的基础材料。

1.2 病原真菌的分离 病原真菌的分离,采用组织分离法^[7],培养基为 PDA,培养基配方(每升培养基采用 200 g 去皮马铃薯,20 g 葡萄糖,18 g 琼脂粉)参照文献[8]。将培养皿、培养基等用品在 0.103 MPa, 121 ℃ 条件下高压蒸气灭菌 20 min;在无菌操作台倒平板,约 12 mL·皿⁻¹,待其冷却凝固。分别从香蕉假茎维管束变褐和叶片变褐的病健交界处切取 5 mm×5 mm 的小块组织,先经过 $\varphi=75\%$ 酒精浸泡 25 s,再用 $\varphi=0.1\%$ 升汞溶液浸泡 30 s,后用无菌水洗 3 次,吸水纸吸干水分后,切去表层和两端组织,保留 3 mm×3 mm 的薄片组织,接种放入培养皿中央,使部分组织嵌在培养基中,充分与培养基接触。用蜡制密封胶将培养皿密封,标注接种日期,最后放入 28 ℃ 恒温培养箱中培养观察。

1.3 病原真菌的形态观察 测量菌落的直径,记录病原真菌的生长情况。主要观察菌落的形状、颜色、边缘、表面、隆起度、透明程度、干湿情况、色素分泌和特殊气味等方面,并用普通光学显微镜在 400 倍下观察菌丝的形态及产孢情况等,然后用数码相机拍照记录。

1.4 病原真菌的 DNA 提取 真菌 DNA 提取采用 CTAB 法,笔者进行了改良。首先将各菌株在 PDA 培养基上培养,待其生长到即将铺满整个培养皿时,刮取 0.2 g 菌丝,加入 1 mL 的 CTAB 抽提液,充分研磨匀浆;转入 2 mL 的 EP 管,65 ℃ 温育 30 min,中间混匀 2 次;加入等体积的 V(氯仿):V(异戊醇)=24:1 混匀,12 000 r·min⁻¹ 离心 10 min,取上清,重复 1 次;上清中加入等体积的异丙醇,12 000 r·min⁻¹ 离心 10 min 沉淀 DNA;弃上清,沉淀用 $\varphi=75\%$ 乙醇洗 2 遍,稍晾干后用 TE 溶解 $\rho=1.0\%$ 琼脂糖凝胶电泳检测,紫外分光光度计测定浓度和纯度。

1.5 ITS 引物设计与序列扩增 根据真菌 rDNA 基因的保守区域设计特异性引物,设计合成如下引物序列:ITS1(5'TCCGTAGGTGAACCTGCGG3'),ITS4(5'TCCTCCGCTTATTGATA TGC3')^[5]。PCR 反应体系为 50 μ L;模板 DNA 2.0 μ L,ITS1 引物(10 μ mol·L⁻¹) 2.0 μ L,ITS4 引物(10 μ mol·L⁻¹) 2.0 μ L,10×PCR buffer 5.0 μ L,MgCl₂(25 mmol·L⁻¹) 3.0 μ L,dNTP(10 mmol·L⁻¹) 1.0 μ L,Taq 酶(10U· μ L⁻¹)1.0 μ L,ddH₂O 34.0 μ L。PCR 反应程序:94 ℃ 3 min;94 ℃ 30 s,58 ℃ 40 s,72 ℃ 1 min,35 个循环;72 ℃ 5 min。PCR 扩增产物用 $\rho=1\%$ 的琼脂糖凝胶电泳检测。

1.6 ITS 序列的测序及生物信息分析 将合格的 PCR 产物割胶回收纯化,送交上海生物工程公司测序。将测序结果通过 BLASTn 软件与 Genbank 中的 NR 核酸数据库进行序列相似性检索(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>),通过比较与已知序列信息的同源程度,推测 ITS 序列代表的真菌种属。

2 结果与分析

2.1 病原真菌的分离 用于病原真菌分离的材料来源于海口市郊香蕉园的发病植株。叶片上有发病的黑色病斑,假茎的维管束颜色变褐,香蕉枯萎病的症状非常典型(见图 1)。采用组织分离法,对菌株进行分离和纯化,获得了香蕉枯萎病候选菌株,该菌株的菌丝为白色,有浅黄色的色素,其在 PDA 培养基上的生长情况见图 2。

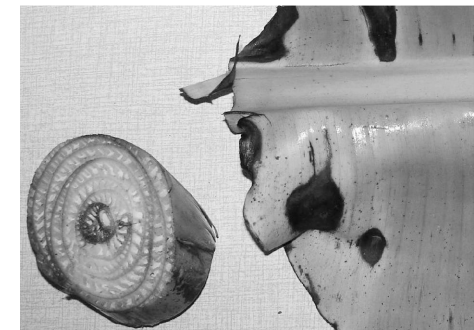


图 1 用于分离病原真菌的香蕉组织

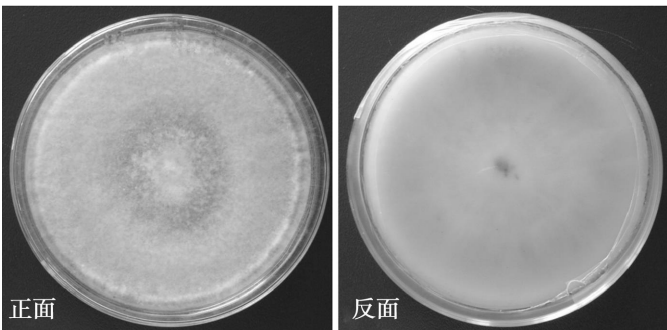


图 2 病原真菌在 PDA 培养基上的生长情况

2.2 病原菌的生长特性及形态学观察 该病原真菌在 PDA 培养基上生长时,对菌落直径进行测量,观察菌株的生长情况(见图 3)。结果表明:菌落直径的增长速度约为 $11\text{ mm} \cdot \text{d}^{-1}$,生长活力旺盛。对候选病原真菌进行形态学观察,主要观察菌落的形状、颜色、边缘情况、表面、隆起度、透明程度、干湿情况、色素分泌和特殊气味等。其特点分别是圆状、白色、整齐丝状、棉絮状、脐突状、不透明、干燥、黄色和无味。

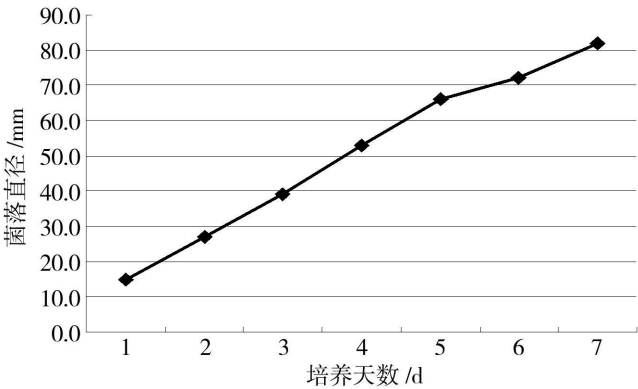


图 3 病原真菌的生长情况

2.3 病原真菌的显微镜观察 刮取少许菌丝置于载玻片上,在 400 倍的普通光学复式显微镜下观察。病原真菌呈网状的透明管状菌丝,菌丝产生分支,有隔膜,并有大量呈椭圆形或卵形的小型分生孢子,无色,多为单胞,少数双胞,还有少量呈镰刀形或纺锤形的大型分生孢子,无色,有 3~5 隔。这些形态观察表明,该病原菌具有尖孢镰刀菌属真菌的典型特征。

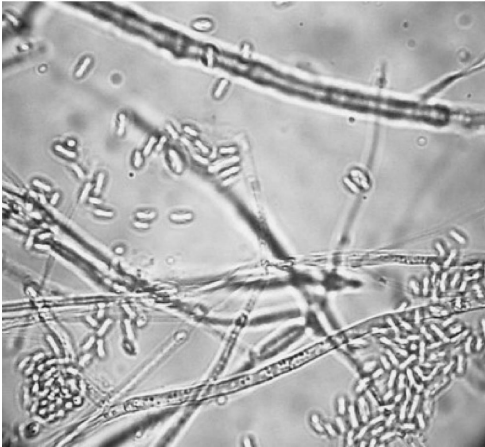


图 4 病原菌的显微观察

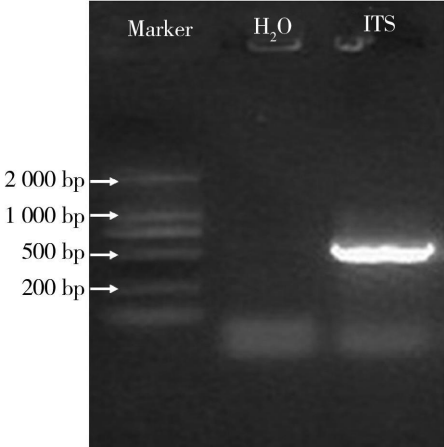


图 5 真菌 ITS 序列扩增电泳检测

2.4 真菌 ITS 序列扩增及序列分析 通过形态学观察和显微镜观察,该候选真菌与尖孢镰刀菌古巴专化型的形态特征一致。为了进一步确认,笔者提取了 DNA,并对 ITS 序列进行了 PCR 扩增,电泳检测结果见图 5。扩增产物的片段大小约 500 bp。将 ITS 的 PCR 产物割胶回收纯化,送上海生物工程公司测序,结果如下:

```
GGCTCGAGTGCACCTCCAAACCCCTGTGAACATACCACTTGGTTGCCTCGGCGGATCAGCCCGTCCCG
GTAAACGGGACGGCCCCGCCAGAGGACCCCTAACTCTGTTTCTATATGTAACTTCTGAGTAAACCA
TAAATAAATCAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCAAAATGC
GATAAGTAATGTGAATTGCAAAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCGCCAGTA
TTCTGGCGGGCATGCCTGTTGAGCGTCATTTCAACCCTCAAGCACAGCTTGGTGTTGGGACCCGCGT
TAATTCGCGTTCCTCCAAATTGATTGGCGGTCACGTCGAGCTTCCATAGCGTAGTAGTAAACCCCTCGTT
ACTGGTAATCGTCGCGGCCACGCCGTTAAACCCCAACTTCTGAATGTTGACCTCGGATCAGGTAGGAA
TACCCGCTGAACCTAAGCATATCAATAAGCCGGGAGGAA
```

将上述序列登录 NCBI 网站,通过 BLASTn 软件与 Genbank 中的 NR 核酸数据库进行序列相似性检索,结果(图6)表明:该病原真菌 ITS 序列与尖孢镰刀菌古巴专化型(*Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*)的 18S rDNA, ITS1, 5.8S rDNA, ITS2 及 28S rDNA 区域的序列的相似程度为 99%。可以认定,该候选病原真菌就是尖孢镰刀菌古巴专化型,是引起香蕉枯萎病的致病真菌。

>[gb|AY864891.1| *Fusarium oxysporum* f. *cubense* 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence
Length=543

Score = 905 bits (490), Expect = 0.0
Identities = 502/507 (99%), Gaps = 4/507 (0%)
Strand=Plus/Plus

Query	11	CACT-CCAAACCCCTGTGAACATACCACCTTGGTTGCCTCGGCGGATCAGCCCGCTCCCGG	69
Sbjct	40	CACTCCCAAACCCCTGTGAACATACCACCTT-GTTGCCTCGGCGGATCAGCCCGCTCCCGG	98
Query	70	TAAAACGGGACGGCCCGCCAGAGGACCCCTAAACTCTGTTTCTATATGTAACCTCTGAGT	129
Sbjct	99	TAAAACGGGACGGCCCGCCAGAGGACCCCTAAACTCTGTTTCTATATGTAACCTCTGAGT	158
Query	130	AAAACCATAAATAAATCAAACCTTTCAACAACGGATCTCTTGTTCTGGCATCGATGAAG	189
Sbjct	159	AAAACCATAAATAAATCAAACCTTTCAACAACGGATCTCTTGTTCTGGCATCGATGAAG	218
Query	190	AACGCAGCAAATATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAAATTCAGTGAATCATCGAATCTTT	249
Sbjct	219	AACGCAGCAAATATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAAATTCAGTGAATCATCGAATCTTT	278

图 6 ITS 序列同源性检索的结果

2.5 病原真菌的接种验证实验

依据柯赫氏法则,为了验证病菌与病害的关系,需要将分离纯化的菌株接种到健康而敏感的寄主,如果能导致同样疾病的发生,并能再度分离培养出这种微生物来,才能确定病菌与病害直接的关系。因此,本研究利用分离得到的候选菌株,接种到健康的巴西蕉品种的叶片上,结果(图7)表明,候选菌株能够引起与香蕉枯萎病完全相同的症状,进一步验证了该菌株就是香蕉枯萎病的致病菌。

3 讨 论

在分离病原真菌时必须对植物材料进行表面消毒^[7]。第 1 次培养时,将组织小块在升汞中处理 3 min,结果病原菌未生长;第 2 次培养时,将组织小块在升汞中处理 1 min,结果病原菌仍未生长;第 3 次培养时,将组织小块在升汞中处理 30 s,结果病原菌生长了,但发生了细菌污染;第 4 次培养,用升汞处理 30 s,并在 PDA 培养基中加入头孢氨苄抗生素抑制细菌生长,结果取得成功。可见,对植物病原菌的分离需要对相关实验条件进行探索和优化。

本研究在分离病原真菌的过程中,通过生长情况、形态及显微镜观察,参照前人研究经验^[9],确定香蕉枯萎病的候选致病菌株,通过 ITS 序列分析技术,对 ITS 测序和生物信息学分析,确定候选菌株与尖孢镰刀菌古巴专化型(*Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*)具有 99% 的同源性。进一步通过接种验证实验,验证了该菌株就是香蕉枯萎病的致病真菌。可见,ITS 序列分析技术在病原真菌的种属鉴别中,准确性高,特别是在通过形态特征无法鉴别的情况下,ITS 序列可发挥至关重要的作用。香蕉枯萎病的致病真菌的成功分离,为本课题后续的香蕉枯萎病致病机理研究及香蕉抗病基因的分离克隆奠定了基础。



图7 候选菌株的接种验证实验

参考文献:

- [1] DE ASCENSAO A R, DUBERY I A. Panama Disease; Cell wall reinforcement in banana roots in response to elicitors from *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* Race Four [J]. *Phytopathology*, 2000, 90(10): 1173 – 1180.
- [2] 魏岳荣, 黄秉智, 杨护, 等. 香蕉镰刀菌枯萎病研究进展[J]. *果树学报*, 2005(2): 154 – 159.
- [3] VAN DEN BERG N, BERGER D K, HEIN I, et al. Tolerance in banana to *Fusarium* wilt is associated with early up-regulation of cell wall-strengthening genes in the roots [J]. *Mol Plant Pathol*, 2007, 8(3): 333 – 341.
- [4] 严定平, 柳晓磊, 汤华. 香蕉枯萎病及其抗病育种研究进展[J]. *海南大学学报: 自然科学版*, 2008(3): 290 – 295.
- [5] 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]. *Med Mycol*, 2002, 40: 87 – 109.
- [6] 刘春来, 文景芝, 杨明秀, 等. rDNA-ITS 在植物病原真菌分子检测中的应用[J]. *东北农业大学学报*, 2007(1): 101 – 106.
- [7] 方中达. 植病研究方法[M]. 北京: 中国农业出版社, 1998: 156 – 168.
- [8] 莎姆布鲁克 J, 黄培堂. 分子克隆实验指南[M]. 第3版. 北京: 科学出版社, 2005.
- [9] KAMEL A A. PCR identification of *Fusarium* genus based on nuclear ribosomal-DNA sequence data [J]. *African Journal of Biotechnology*, 2003(4): 125 – 129.

Isolation of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* and Its Morphological Investigation

XIE Jun^{1,2}, ZHANG Xu-yi¹, CHEN Yin-hua^{1,2}, CHEN Cai-yan³, WEI Shuang-shuang^{1,2},
XIA You-quan^{1,2}, TANG Hua^{1,2}

(1. College of Agriculture, Hainan University, Haikou 570228, China;

2. National Key Laboratory Base of Tropic Biological Resources Sustainable Utilization, Hainan University, Haikou 570228, China;

3. Agricultural Technology Popularizing Center of Haikou County, Haikou 570206, China)

Abstract: *Fusarium* wilt of banana is a destructive fungus disease caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *Cubense*, and which is serious harm to banana planting and its industry development. In order to study the pathogenic mechanism of the disease and the resistance mechanism of banana, tissue isolation method was used to isolate and purify the candidate fungus strain, which were observed by morphological method; CTAB method was used to extract DNA of fungus, and ITS (Internal Transcribed Spacers) sequence was amplified and analyzed; the pathogenic fungus were identified by molecular method. The results indicated that the candidate strain was *Fusarium oxysporum* f. sp. *Cubense*, and which was confirmed as pathogenic fungi of banana wilt disease.

Key words: banana; wilt disease; *Fusarium oxysporum* f. sp. *Cubense*; morphological observation; molecular identification