

海带配子体克隆中一株镰刀菌的分离鉴定

王娜 钱冠兰* 李晓捷 罗世菊 李言 张壮志

(山东东方海洋科技股份有限公司 山东 烟台 264003)

摘要: 从海带配子体克隆中分离出一株真菌(菌株编号: 059601016C), 对其培养性状、形态特征和 ITS 基因进行研究分析。结果显示: 059601016C 真菌在 PDA 培养基上呈棉絮状生长, 菌落背面颜色由白色变为深紫色。气生菌丝发达, 高度可达 5 mm-7 mm。小型分生孢子以链状或假头状着生于瓶状产孢细胞上, (5.0-10.5) μm \times (1.2-2.5) μm 。大型分生孢子镰刀状, 略有弯曲, 顶胞渐尖, 2-5 个隔膜, 多 3-4 个隔膜。通过 ITS 基因序列同源性分析, 该菌株与层出镰刀菌的相似性为 100%。系统发育树的分析结果也表明该菌株与层出镰刀菌的亲缘关系最接近, 因此将菌株 059601016C 鉴定为层出镰刀菌(*Fusarium proliferatum* Nirenberg)。在 GenBank 中申请的基因序列号为 GU951805。

关键词: 镰刀菌, ITS, 系统发育树, 分离鉴定

Isolation and Identification of a *Fusarium* sp. from Laminaria Gametophyte Clones

WANG Na QIAN Guan-Lan* LI Xiao-Jie LUO Shi-Ju LI Yan
ZHANG Zhuang-Zhi

(Shandong Oriental Ocean Sci-Tech Co., Ltd, Yantai, Shandong 264003, China)

Abstract: A fungal strain (No. 059601016C) was obtained from Laminaria Gametophyte Clones. Growth states, morphological characteristics and internal transcribed sequence (ITS) were studied. The results showed that colonics on PDA are white and cottony, the reverse color changed from white to dark purple. The aerial mycelium grew abundantly and the height reached 5 mm to 7 mm. Microconidia are in false head or chains, (5.0-10.5) μm \times (1.2-2.5) μm . Macroconidia sickle-shaped were slightly bent, apex acuminate, 2-5 septate, mostly 3-4 septate. Based on the analysis of ITS and the phylogenetic tree, the strain showed a 100% homogeneous and the most close relationship to *Fusarium proliferatum* Nirenberg. Hence, the strain 059601016C isolated from Laminaria Gametophyte Clones belonged to the genus *Fusarium* sp. and the GenBank accession number of strain 059601016C ITS is GU951805.

Keywords: *Fusarium*, ITS, Phylogenetic analysis, Identification

镰刀菌(*Fusarium*)在土壤、淡水和海水中广泛存在, 可侵袭各种农作物、瓜果和蔬菜等, 引发萎蔫

病、腐烂病等^[1-2]。传统的真菌鉴定主要是依据菌株形态特征, 这些形态特征易受环境影响, 有时会发

生变化,因此,仅根据形态学鉴定已难以适应真菌研究的需要。目前,国内外对真菌的鉴定多采用形态学与分子生物学相结合的方法,形态学主要包括:菌落的形状、质地、色泽、大小;菌丝的色泽、平滑或粗糙、宽度;分生孢子梗的形态、色泽、量度;产孢细胞的类型、色泽、量度;分生孢子的类型、形态、色泽隔膜,着生方式(头状、链生或二者兼具)、量度等。分子生物学方法主要为限制性片段长度多态性(RFLP),DNA扩增片段长度多态性(AFLP),核糖 rRNA 内部转录间隔区(ITS)序列分析技术和扩增多态性 DNA (RAPD)等^[3],其中,利用 PCR 扩增真菌核糖体 ITS 基因区段进行真菌鉴定的方法快速、准确、简便,应用最为广泛^[4]。

本实验以从海带配子体克隆中分离出的一株真菌为研究对象,根据该株真菌在 PDA 培养基上的培养性状和形态特征,利用 18S rRNA 通用引物对 ITS 区序列扩增,通过序列比对和系统发育树的构建,将该真菌鉴定到种的水平。

1 材料与方 法

1.1 材 料

来源:污染的海带配子体克隆来自于本实验室种质保存室。

PDA 培养基:马铃薯汁 1000 mL (陈海水配制),蔗糖 20 g,琼脂 20 g, pH 5.5-6.0。

液体培养基:蛋白胨 10 g,葡萄糖 40 g,陈海水 1000 mL, pH 5.5。

试剂:PCR 试剂购于上海生工生物工程有限公司,引物由上海捷瑞生物技术公司合成,PCR 产物由上海桑尼生物科技有限公司测序。

1.2 方 法

病原菌的分离纯化:取污染的配子体克隆三区划线,分离出单个菌落,直到获得纯培养。

真菌培养:将获得的纯培养用点植法接种在 PDA 培养基上,置于 28°C 培养箱中培养。定期观察并记录生长状况。

小培养:取纯培养的真菌孢子制成悬液,接种于灭菌载玻片的培养基边缘,盖上灭菌的盖玻片,放在无菌培养皿的 U 形玻棒上,置于 28°C 培养箱中培养。

总 DNA 提取、18S rRNA 基因扩增和测序:总

DNA 提取采用 CTAB 法,18S rRNA 基因扩增选用真菌通用引物 ITS1 与 ITS4,正向引物 ITS1: 5'-TC CGTAGGTGAACCTGCGG-3',反向引物 ITS4: 5'-T CCTCCGCTTATTGATATGC-3'。PCR 扩增条件:94°C 5 min; 94°C 1 min, 54.5°C 1 min, 72°C 1 min, 30 个循环;72°C 10 min。取 PCR 产物由上海桑尼生物科技有限公司测序。

系统发育树的构建:将测得的序列用 BLASTn 程序在 GenBank 中进行相似性比较,采用软件 MEGA 4.0 中的邻近相邻法对相似性较大的序列进行系统发育树分析,利用 Bootstrap (1000 次重复)检验各分支的置信度。

2 结 果

2.1 镰刀菌培养特征

在 PDA 培养基上菌落(图 1)生长速度为 11 mm/d,棉絮状,白色,背面颜色变化为:白色-奶黄色-紫色-深紫色。气生菌丝发达,高度可达 5 mm-7 mm,后期可布满整个培养皿。

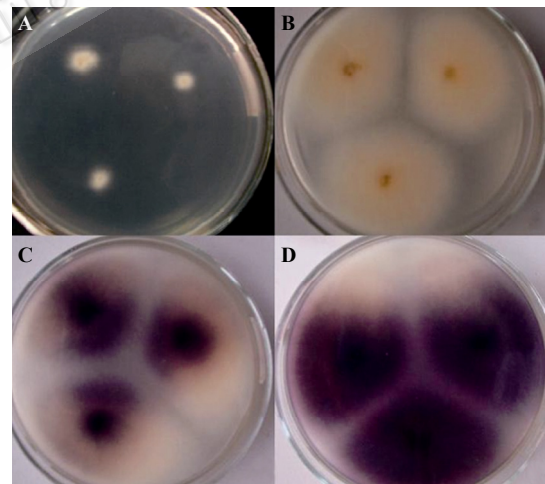


图 1 059601016C 菌株的菌落背面颜色变化

Fig. 1 The reverse color change of 059601016C

注:A:白色;B:中心黄色;C:紫色;D:深紫色。

Note: A: White; B: Center yellow; C: Purple; D: Dark purple.

2.2 小培养的特征

气生菌丝具隔膜,无色。小型分生孢子(图 2A)数量多,无色,单胞,卵形、椭圆形、圆柱形或肾形,链生或假头状着生于瓶状产孢细胞上,(5-10.5) μm \times (1.2-2.5) μm 。大型分生孢子(图 2B)镰刀状,略弯曲,顶胞渐尖,足胞较明显,2-5 个隔膜,多 3-4 个隔膜,(6.9-14.4) μm \times (2.4-3.3) μm 。

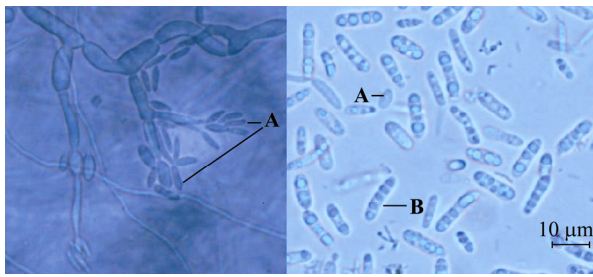


图 2 059601016C 菌株形态特征($\times 400$)

Fig. 2 Morphology of the 059601016C ($\times 400$)

注: A: 产孢细胞及小分生孢子; B: 大分生孢子。

Note: A: Conidiogenous cells and microconidia; B: Macroconidia.

2.3 ITS 扩增

ITS 序列 PCR 扩增结果见图 3。从提取的基因组 DNA 中, 利用 18S rRNA 通用引物 ITS1/ITS4 成功地扩增出了单一清晰的条带, 序列长度在 500–750 bp 之间, 没有拖带现象。与预期条带大小一致。

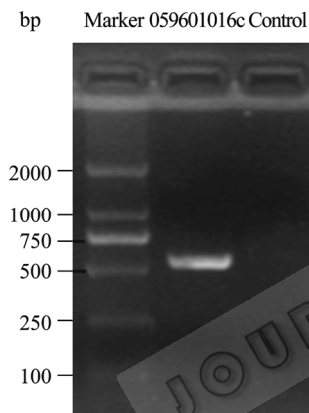


图 3 059601016C 菌株 ITS 序列的 PCR 结果

Fig. 3 Electrophoresis of PCR products of 059601016C

2.4 ITS 序列测定及 BLASTn 搜索

将序列在 GenBank 数据库中进行 BLASTn 搜索, 发现与 059601016C 菌株 ITS 序列同源性最高的是层出镰刀菌(*Fusarium proliferatum*), 同源性为 100%。表 1 列出了与 059601016C 菌株 ITS 序列同源性最高的前 10 个菌株的 GenBank 号。RENSKE 等^[5]认为真菌通过 ITS 区域比对, 序列相似性大于等于 99%, 鉴别为相同种; 序列相似性大于等于 95%且小于 99%, 鉴别为相同属; 序列相似性小于 95%, 鉴别为同科。

2.5 菌株分子系统发育树的构建及基因序列号的申请

下载 GenBank 数据库中同源性前 10 位的 ITS 序列与本实验所测的 059601016C 菌株 ITS 序列对位

排列后, 利用 MEGA 4.0 软件的邻近相邻法构建系统发育树, 见图 4。从系统发育树中可以看出 059601016C 菌株(在 GenBank 中申请的基因序列号为 GU951805)与基因序列号为 GQ167231 的镰刀菌属真菌亲缘关系最近。

表 1 与 059601016C 菌株 ITS 序列同源性前 10 位的菌株
Table 1 The top 10 strains similar to 059601016C ITS sequence and their accession numbers from GenBank

菌株名称 Strain name	基因序列号 Gene ID	同源性 Homology (%)
<i>Fusarium proliferatum</i> strain CMU05	GQ924895	100
<i>Botryosphaeria dothidea</i> strain sdau08-88	GQ855797	100
<i>Gibberella moniliformis</i> culture-collection NRRL:20984	GQ168841	100
<i>Fusarium proliferatum</i> culture-collection NRRL:22058	GQ167232	100
<i>Fusarium proliferatum</i> culture-collection NRRL:13569	GQ167231	100
<i>Fusarium proliferatum</i> genes TS08-165-2	AB470869	100
<i>Fusarium proliferatum</i>	FJ040179	100
<i>Sordariomycete</i> sp. 7670B	EU680539	100
<i>Fusarium proliferatum</i> genes TB10-3	AB369476	100
<i>Fusarium proliferatum</i> genes TB5-3	AB369470	100

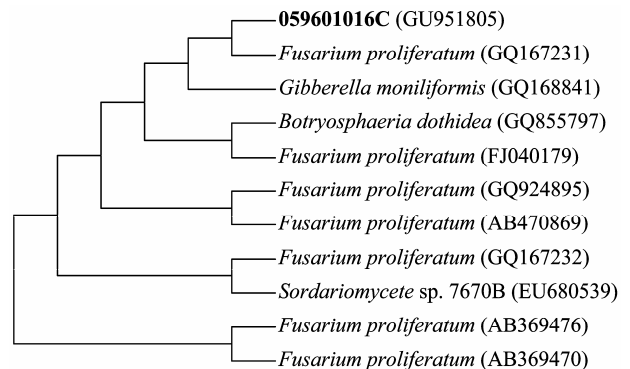


图 4 基于 ITS 序列构建的分子系统发育树

Fig. 4 Phylogenetic tree based on ITS sequences and constructed using the Neighbor-joining method

注: 括号中的序号为基因序列号。

Note: Numbers in the bracket are GenBank accession numbers.

3 讨论

镰刀菌属于条件致病菌, 它对人类的生产、生活的影响极大, 许多科学家不断地对镰刀菌的形态、生理、致病性等多方面进行研究。近年来多采用 rRNA 序列分析进行镰刀菌的分子生物学分类。

rRNA 序列分析的最大特点是病原菌的 rRNA 在 ITS 区段既具保守性又在科、属、种水平上均有差异, 所以最能反映菌株间的遗传关系^[6]。有关 rRNA ITS 序列在真菌学研究中的应用国内外已有许多报道^[7-9]。

本实验中分离的这株镰刀菌根据培养性状和形态特征可认定为层出镰刀菌, 它与晁龙军等人^[10-11]报道的层出镰刀菌 *Fusarium proliferatum* 相似, 但是与顾爱国等人^[12]和徐秀德等人^[13]报道的有所差别, 因此需要从分子生物学层面进行验证。18S rRNA ITS 序列分析结果表明: 059601016C 菌株与层出镰刀菌相似性为 100%, 同时系统发育树分析结果也显示了它与层出镰刀菌的亲缘关系最近, 再结合形态学特征, 最终将其鉴定为层出镰刀菌。

目前, 国内外关于层出镰刀菌的报道较少, 国内主要集中在农作物方面, 它可引起玉米鞘腐病^[13-14], 可引起杨树湿心材^[10]。国外研究则集中在层出镰刀菌分泌的各种毒素和酶等方面^[15-17], 但还未见有海带配子体受层出镰刀菌污染的相关报道, 层出镰刀菌是通过何种途径使配子体致病, 致病后整体的表现过程如何还有待进一步的研究和探讨。

参 考 文 献

- [1] 布斯著, 陈其烘, 译. 镰刀菌属. 北京: 中国农业出版社, 1988: 1-4.
- [2] 俞大绂. 镰刀菌分类学的意义. 微生物学报, 1977, **17**(2): 163-171.
- [3] 赵瑞琳. RAPD 在真菌分类鉴定上的应用. 热带农业科技, 2004, **27**(3): 23-26.
- [4] 陈剑山, 郑服丛. ITS 序列分析在真菌分类鉴定中的应用. 安徽农业科学, 2007, **35**(13): 3785-3786, 3792.
- [5] Landeweert R, Leeftang P, Kuyper TW, et al. Molecular identification of ectomycorrhizal mycelium in soil horizons. *Appl Environ Microbiol*, 2003, **69**(1): 327-333.
- [6] 张宝俊, 张家榕, 李志岗, 等. 镰刀菌 rDNA ITS 序列的克隆及序列分析. 农业生物技术科学, 2008, **24**(10): 94-98.
- [7] Liou GY, Tzcan SS. Phylogeny of the genus *Arthrotrichy* and allied nematode-trapping fungi based on rDNA sequences. *Mycologia*, 1997(61): 876-884.
- [8] 祝明亮, 缪作清, 张克勤, 等. 捕食线虫真菌 rDNA ITS 区间 RFLPs 分析. 菌物系统, 2000, **19**(2): 175-180.
- [9] 杨佩文, 王峰, 王扬, 等. 尾松萎蔫病树一种线虫分离物的鉴定. 植物病理学报, 2004, **34**(6): 495-500.
- [10] 晁龙军, 曾大鹏, 孙福在, 等. 引起杨树湿心材的一种真菌——*Fusarium proliferatum* (Matsushima) Nirenberg. 林业科学, 1998, **34**(5): 69-73.
- [11] CHENG Zhong-Shan, TANG Wen-Cheng, SU Zhi-Jian, et al. Identification of mangrove endophytic fungus 1403 (*Fusarium proliferatum*) based on morphological and molecular evidence. *Journal of Forestry Research*, 2008, **19**(3): 219-224.
- [12] 顾爱国, 兰琪, 宗兆锋, 等. 苦皮藤内生真菌 2B 菌株的鉴定. 西北农林科技大学学报, 2004, **32**(8): 92-94.
- [13] 徐秀德, 姜钰, 王丽娟, 等. 玉米新病害—鞘腐病研究初报. 中国农业科学, 2008, **41**(10): 3083-3087.
- [14] 胡兰, 徐秀德, 姜钰, 等. 玉米鞘腐病原菌生物学特性研究. 玉米科学, 2008, **16**(5): 131-134.
- [15] Miguel Jurado, Patricia Marin, Carmen Callejas, et al. Genetic variability and Fumonisin production by *Fusarium proliferatum*. *Food Microbiology*, 2010(27): 50-57.
- [16] Gábor Kohut, Attila L. Ádám, Béla Fazekas, et al. N-starvation stress induced FUM gene expression and fumonisin production is mediated via the HOG-type MAPK pathway in *Fusarium proliferatum*. *International Journal of Food Microbiology*, 2009(130): 65-69.
- [17] SI KWON, AJ ANDERSON. Laccase isozymes: production by an opportunistic pathogen, a *Fusarium proliferatum* isolate from wheat. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 2001(59): 235-242.