



吉林省公主岭与敦化大豆根腐病镰孢菌的系统鉴定

桑永生^{1,2}, 刘月^{1,2}, 袁翠平², 邱红梅², 刘晓冬², 王跃强², 李玉秋², 董英山^{1,2}

(1. 吉林农业大学 农学院, 吉林 长春 130118; 2. 吉林省农业科学院, 吉林 长春 130033)

摘要:为明确吉林省公主岭和敦化的大豆根腐病镰孢菌种类,分离 93 份根腐病标样的病原真菌,利用 *ITS*、*TEFI-α*、*RPB2* 基因序列比对和多基因位点系统发育分析,结合形态学鉴定方法,鉴定出 104 株镰孢菌,共分 4 种,腐皮镰孢菌占 64.42%,尖镰孢菌占 33.65%,轮枝镰孢菌占 0.96%,层出镰孢菌占 0.96%。在公主岭罹病植株上分离鉴定出 57 株镰孢菌,腐皮镰孢菌占 91.23%,尖镰孢菌占 5.27%,轮枝镰孢菌占 1.75%,层出镰孢菌占 1.75%;在敦化罹病植株上分离鉴定出 47 株镰孢菌,腐皮镰孢菌占 31.91%,尖镰孢菌占 68.09%。结果表明:公主岭优势病原菌为腐皮镰孢菌,而敦化优势病原菌为尖镰孢菌。致病性试验结果表明,仅有 3 株腐皮镰孢菌对合丰 55 无致病性,其余 101 株镰孢菌对合丰 55 均有不同程度的致病性。

关键词:大豆;根腐病;镰孢菌;多基因联合序列;系统发育树

Systematic Identification of *Fusarium* Species Associated with Soybean Root Rot in Dunhua and Gongzhuling, Jilin Province

SANG Yong-sheng^{1,2}, LIU Yue^{1,2}, YUAN Cui-ping², QIU Hong-mei², LIU Xiao-dong², WANG Yue-qiang², LI Yu-qiu², DONG Ying-shan^{1,2}

(1. College of Agriculture, Jilin Agricultural University, Changchun 130118, China; 2. Jilin Academy of Agricultural Sciences, Changchun 130033, China)

Abstract: In order to identify the fusarium species associated with soybean root rot in Dunhua and Gongzhuling, 93 samples of diseased plants with typical root rot symptom were collected to isolate and identify the species of *Fusarium* causing the disease in Gongzhuling and Dunhua, Jilin province. Sequence alignment carried out by *ITS*, *TEFI-α* and *RPB2* genes, multiple-gene phylogenetic analysis and morphology were used to identify the pathogens. 104 strains of *Fusarium* classified in 4 species were identified, including *F. solani* (64.42%), *F. oxysporum* (33.65%), *F. verticillioides* (0.96%) and *F. proliferatum* (0.96%). 57 out of the 104 strains of *Fusarium* were isolated from the diseased plants in Gongzhuling, including *F. solani* (91.23%), *F. oxysporum* (5.27%), *F. verticillioides* (1.75%) and *F. proliferatum* (1.75%). The other 47 strains were isolated from Dunhua, including *F. solani* (31.91%) and *F. oxysporum* (68.09%). The results showed *F. solani* and *F. oxysporum* were respectively the dominant pathogen in Gongzhuling and Dunhua. Pathogenicity test showed that only 3 strains of *F. solani* had no pathogenicity to Hefeng 55, but the other 101 strains had different degrees of pathogenicity to Hefeng 55.

Keywords: Soybean (*Glycine max*); Root rot; *Fusarium*; Concatenated sequence; Phylogeny

大豆[*Glycine max* (L.) Merr.]是一年生草本植物,也是中国重要的粮食和油料作物。大豆根腐病是危害严重的土传性真菌病害,主要危害大豆根系,病原菌会分泌一些具有水解酶功能的植物毒素去破坏植株根部细胞壁,并抑制大豆的植物抗毒素分泌或影响植物抗毒素活性,从而影响寄主的根系发育,具有分布广泛、危害时间长、难以防治等特点,给大豆生产造成巨大损失^[1-3]。据报道造成大豆根腐病病原菌有大豆疫霉菌、立枯丝核菌、腐霉属和镰孢菌属等^[3-6]。已报道侵染大豆的镰孢菌至少有 10 种,如木贼镰孢菌(*F. equiseti*)^[6]、尖镰孢菌(*F. oxysporum*)^[6-7]、三隔镰孢菌(*F. tricinctum*)^[6-7]、禾谷镰孢菌(*F. graminearum*)^[6-8,10]、燕麦镰孢菌

(*F. avenaceum*)^[7,11]、层出镰孢菌(*F. proliferatum*)^[9-10,12]、腐皮镰孢菌(*F. solani*)^[6,13]等,其中木贼镰孢菌、层出镰孢菌、禾谷镰孢菌还可以侵染小麦和玉米等作物^[14-16]。不同地区引起大豆根腐病镰孢菌的优势病原菌种群各有差异,如黑龙江省主要为尖镰孢菌^[17],山东省与河南省主要为腐皮镰孢菌^[18],江苏省清浦区主要为层出镰孢菌^[19],四川主要为尖镰孢菌、禾谷镰孢菌和木贼镰孢菌^[20],其它国家如北美和加拿大等地主要为尖镰孢菌和腐皮镰孢菌^[21]。

传统的镰孢菌鉴定技术以形态学特征为主,但由于该属的种类较多,形态复杂且变异较大,有些种还需结合其宿主关系才能准确鉴定,使得镰孢菌的鉴定具有一定的难度,并且有许多研究发现种间

收稿日期:2019-11-12

基金项目:吉林省农业科学院结余经费(统筹部分)(y81990401);吉林省农业科技创新工程(C92070404)。

第一作者简介:桑永生(1993-),男,硕士,主要从事大豆根腐病抗病性研究。E-mail:1013206059@qq.com。

通讯作者:董英山(1963-),男,博士,研究员,主要从事野生大豆种质资源研究。E-mail:ysdong@cjaas.com。

形态随着世代交替往往不能稳定遗传^[21-22]。分子生物学应用于真菌的分类鉴定,可以极大提高鉴定结果的准确性,为研究种属间的亲缘关系打下良好的基础。其中具有高度保守性基因核糖体内转录间隔区(*ITS*)、翻译延伸因子(*TEF1-α*)、RNA 聚合酶Ⅱ型第二大亚基(*RPB2*)等核苷酸序列在真菌的分类鉴定中被广泛应用。研究表明,通过形态学鉴定结合核酸序列分析的方法可以快速、准确地鉴定病原菌的种属^[23]。目前,吉林省大豆根腐病镰孢菌研究主要是形态学鉴定,而通过形态学与多基因联合系统发育分析去鉴定吉林省大豆根腐病镰孢菌的种属关系以及不同生理小种之间的亲缘关系的研究鲜见报道。本研究选取吉林省公主岭和敦化的大豆根腐罹病植株进行病原菌的分离,并根据形态特征结合核酸序列分析鉴定病原菌的种类,进行多基因系统发育关系分析和致病性试验,明确吉林省大豆根腐病镰孢菌的种类,以期为吉林省大豆根腐病的防治打下基础和提供科学理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验设计

分别于吉林省农业科学院的敦化大豆试验田、公主岭大豆试验田采集罹病植株 43 和 50 份,共计 93 份。对吉林省两个地区采集的罹病植株进行病原真菌的分离纯化,分离出 122 株真菌,并对其中类似镰孢菌分离物进行分子鉴定,再结合形态学观察进一步确定分类。将鉴定的镰孢菌分离物使用下胚轴直接接种法接种至合丰 55,检测分离物的致病性,以明确镰孢菌分离物是否对大豆产生危害。

1.2 方法

1.2.1 DNA 提取、引物设计及 PCR 扩增 采用改良 CTAB 法^[24]提取病原菌基因组 DNA,1% 的琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 质量,并用 Nano Drop 2000 (Bio-RAD)超微量分光光度计测定 DNA 的浓度后稀释成工作液 $50 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 。

以 *ITS*、*TEF1-α*、*RPB2* 基因序列为目标序列,分别利用通用引物 ITS1 和 ITS4^[25]、RPB2-6F 和 RPB2-7.1R^[26]扩增 *ITS* 和 *RPB2*,并利用 DNAMANV6 和 Oligo7 设计镰刀菌通属引物 EF1α-6F17 (CATCATTCGCGCCGGTA) 和 EF1α-939R2 (CAACGGTCTGTGCGCATGTCA),用于 *TEF1-α* 的扩增与测序。利用 Bio-RAD 的 PCR 仪 (S1000™ Thermal cycler) 进行 PCR 反应,采用 $50 \mu\text{L}$ 反应体系:上下游引物各 $0.5 \mu\text{L}$ ($10 \mu\text{M}$), *Taq* DNA 聚合酶 (全式金 Easy *Taq*® DNA polymerase) $0.5 \mu\text{L}$ ($5 \text{ U} \cdot \mu\text{L}^{-1}$), dNTP $4.0 \mu\text{L}$ ($2.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$), 模板 DNA 200 ng , $10 \times$ Easy *Taq*®

buffer $5 \mu\text{L}$, ddH₂O 补足 $50 \mu\text{L}$ 。*ITS* 的 PCR 反应条件: 94°C 预变性 5 min ; 94°C 变性 30 s , 55°C 复性 30 s , 72°C 延伸 30 s , 30 个循环; 72°C 延伸 8 min 。扩增 *TEF1-α* 和 *RPB2* 的 PCR 反应条件为: 94°C 预变性 5 min ; 94°C 变性 30 s , $58^\circ\text{C} \rightarrow 52^\circ\text{C}$ 复性 30 s (每循环降低 0.5°C), 72°C 延伸 40 s , 12 个循环; 94°C 变性 30 s , 52°C 复性 30 s , 72°C 延伸 40 s , 30 个循环; 72°C 延伸 8 min 。取 PCR 产物 $3 \mu\text{L}$ 用 1% 琼脂糖凝胶进行电泳检测 (DYW-6C 型三恒电泳仪,北京市六一仪器厂),染料使用 Super GelRed 染色 ($10\,000 \times$ super GelRed®, US Everbright Inc),并利用 UVP 紫外凝胶成像仪查看电泳条带。引物合成及测序均由北京六合华大股份有限公司完成。

1.2.2 数据处理及多基因联合系统发育分析 利用 BioEdit7 查看测序峰图的质量,结合 DNAMANV6 对序列进行拼接,在 Genbank 中进行序列比对,利用 BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>) 在线工具完成。使用 MEGAX 中的 Clustal W 算法分别对 *ITS*、*TEF1-α* 和 *RPB2* 基因序列进行多重序列比对并删减冗余序列,利用 DAMBE 中的 xia' test 对各个建树序列进行核酸饱和度检测,应用 Phylosuite (Concatenate sequence) 进行多基因串联,再利用 PAUP 中 Partition-homogeneity test 对 3 个保守区序列能否合并分析进行异质性检验。使用 Phylosuite (ModelFinder) 为每个串连序列矩阵选择最佳核苷酸替换模型。利用 PhyloSuite (IQ-TREE) 软件完成最大似然法 (Maximum Likelihood, ML) 运算,并用 Bootstrap 重复抽样 5 000 次来评估各分支节点的可信度 (自举值)^[27]。

1.2.3 镰孢菌的分离纯化及形态学鉴定 将病根切成小块,用 75% 乙醇消毒 30 s , 1% NaOCl 消毒 60 s , 并放置在 PCNB 培养基^[28],在 27°C 恒温光照培养箱内 12 h 光照与黑暗交替培养 $7 \sim 8 \text{ d}$ 。挑取菌丝经不断纯化后,将菌丝接种到 PDA 和 CMC 培养基上^[20],于 27°C 恒温光照培养箱内培养 $7 \sim 10 \text{ d}$, 12 h 光照与黑暗交替,利用显微镜 (奥林巴斯-CX31) 对菌落的分生孢子进行形态学观察^[21,29],并使用明美显微数码成像系统记录孢子大小。

1.2.4 镰孢菌分离物的致病性鉴定 使用下胚轴接种法鉴定镰孢菌分离物的致病性。即将 1% NaOCl 消毒后大豆的种子放入发芽机中黑暗 25°C 恒温生长 3 d , 培养的大豆苗的下胚轴接种 1.5 cm^3 的 PDA 菌丝块 (纯化后镰孢菌的分离物在 PDA 上 25°C 恒温生长 6 d), 并用湿润的无菌滤纸和锡纸包裹,放置恒温光照培养箱 (光照 12 h /黑暗 12 h) 中 25°C 培养 5 d 。接种 5 株, 2 次重复, 分级标准参考姚艳等^[30]。

2 结果与分析

2.1 镰孢菌分离物的分子鉴定

从 122 株真菌中鉴定出 4 种镰孢菌共 104 个分离物,其中腐皮镰孢菌 67 株,尖镰孢菌 35 株,轮枝

镰孢菌 1 株,层出镰孢菌 1 株。公主岭罹病植株分离出 4 种镰孢菌共 57 株,其中腐皮镰孢菌 52 株,尖孢镰孢菌 3 株,轮枝镰孢菌 1 株,层出镰孢菌 1 株。敦化罹病植株分离出 2 种镰孢菌共 47 株,其中腐皮镰孢菌 15 株,尖镰孢菌 32 株(表 1)。

表 1 核酸序列分析鉴定的镰刀菌种类

Table 1 *Fusarium* species identified by sequence analysis

分离物 编号 Isolate number	ITS			TEF1- α			RPB2			建议标识 Suggested identification
	登录号	相似度	置信度	登录号	相似度	置信度	登录号	相似度	置信度	
	Accession number	Query coverage/%	Percent identity/%	Accession number	Query coverage/%	identity/%	Accession number	Query coverage/%	identity/%	
GZL-A-7	KT272101	96.0	97.7	n/a	—	—	n/a	—	—	<i>F. solani</i>
GZL-A-9	JX270137	95.0	98.6	n/a	—	—	MH582414	99.0	99.0	<i>F. solani</i>
GZL-A-21	JX270137	99.0	100.0	MH628130	99.0	99.0	n/a	—	—	<i>F. solani</i>
GZL-A-22	EU721674	100.0	99.0	LT746223	100.0	99.0	n/a	—	—	<i>F. solani</i>
GZL-A-23	KY436161	99.0	99.0	KY091148	99.0	100.0	MF276969	96.0	100.0	<i>F. solani</i>
GZL-A-24	n/a	—	—	n/a	—	—	MF276969	99.0	99.0	<i>F. solani</i>
GZL-A-25	EU721674	99.0	99.0	KY697892	99.0	100.0	MH582414	99.0	99.0	<i>F. solani</i>
GZL-A-26	EU721674	98.0	99.0	KY697892	99.0	100.0	MH582414	99.0	99.0	<i>F. solani</i>
GZL-A-27	JN232138	98.0	99.0	LT991908	99.0	100.0	MH582414	99.0	99.0	<i>F. solani</i>
GZL-A-28	JN232138	99.0	99.0	MG857199	99.0	100.0	MH582414	99.0	99.0	<i>F. solani</i>
GZL-A-29	EU721674	99.0	99.0	n/a	—	—	MH582414	99.0	99.0	<i>F. solani</i>
GZL-A-30	KY436161	99.0	99.0	KY091148	99.0	100.0	MF276969	99.0	99.0	<i>F. solani</i>
GZL-A-31	MG811577	100.0	99.0	KY697892	99.0	100.0	MH582414	99.0	99.0	<i>F. solani</i>
GZL-A-32	JN232138	98.0	99.0	MG857199	99.0	100.0	MH582413	99.0	99.0	<i>F. solani</i>
GZL-A-33	KY436161	98.0	99.0	KY091148	100.0	100.0	MF276931	100.0	99.0	<i>F. solani</i>
GZL-A-35	JN232138	99.0	100.0	LT991908	99.0	100.0	MF276966	100.0	99.0	<i>F. solani</i>
GZL-A-36	JN232138	99.0	99.0	MG857199	99.0	100.0	MH582414	100.0	99.0	<i>F. solani</i>
GZL-A-37	EU721674	98.0	100.0	KY697892	99.0	100.0	MH582413	99.0	99.0	<i>F. solani</i>
GZL-A-38	KY436161	98.0	100.0	n/a	—	—	n/a	—	—	<i>F. solani</i>
GZL-A-39	JN232138	98.0	99.0	MH628130	99.0	100.0	n/a	—	—	<i>F. solani</i>
GZL-A-41	KY436161	99.0	99.0	n/a	—	—	MF276931	100.0	99.0	<i>F. solani</i>
GZL-A-42	KY436161	99.0	99.0	KY091148	100.0	100.0	MF276931	99.0	100.0	<i>F. solani</i>
GZL-A-43	KY436161	98.0	99.0	KY091148	100.0	100.0	MF276966	99.0	99.0	<i>F. solani</i>
GZL-A-44	JN232138	99.0	99.0	MG857199	99.0	100.0	MH582414	99.0	99.0	<i>F. solani</i>
GZL-A-46	EU721674	98.0	100.0	KY697892	99.0	100.0	MH582414	99.0	100.0	<i>F. solani</i>
GZL-A-48	n/a	—	—	MG857199	99.0	100.0	MF276962	99.0	99.0	<i>F. solani</i>
GZL-A-49	JN232138	98.0	99.0	n/a	—	—	MH582414	97.0	99.0	<i>F. solani</i>
GZL-B-3	MG561938	99.0	99.8	LT615305	99.0	99.5	MH300583	99.0	98.8	<i>F. solani</i>
GZL-B-5	MG561938	99.0	100.0	LT615305	100.0	99.7	MH300583	100.0	99.5	<i>F. solani</i>
GZL-B-6	MG561938	100.0	99.8	LT615305	98.0	99.9	MH300583	99.0	99.3	<i>F. solani</i>
GZL-B-9	MH518313	97.0	99.8	LT615305	99.0	99.7	n/a	—	—	<i>F. solani</i>
GZL-B-10	MK764995	99.0	99.0	LT615305	99.0	99.8	MH300583	99.0	99.1	<i>F. solani</i>

续表 1

分离物 编号 Isolate number	ITS			TEF1- α			RPB2			建议标识 Suggested identification
	登录号	相似度	置信度	登录号	相似度	置信度	登录号	相似度	置信度	
	Accession	Query	Percent	Accession	Query	Percent	Accession	Query	Percent	
	number	coverage/%	identity/%	number	coverage/%	identity/%	number	coverage/%	identity/%	
GZL-B-12	MK764995	99.0	99.3	LT615305	99.0	99.9	MH300587	100.0	99.5	<i>F. solani</i>
GZL-B-17	MK325275	99.0	99.4	XM_018889622	99.0	99.6	FN552104.1	99.0	99.5	<i>F. verticillioides</i>
GZL-B-24	MF401578	99.0	100.0	LT615305	99.0	99.3	MF276966	99.0	99.0	<i>F. solani</i>
GZL-B-29	JN400703	99.0	99.4	MH828019	99.0	99.9	KX434986	99.0	99.4	<i>F. oxysporum</i>
GZL-B-30	MK713368	97.0	99.8	MH828019	100.0	99.9	KX434986	99.0	99.9	<i>F. oxysporum</i>
GZL-B-31	JN400703	99.0	100.0	MH828019	100.0	99.4	KX434986	99.0	99.9	<i>F. oxysporum</i>
GZL-G-3-1	KX583231	99.0	100.0	LT615305	100.0	99.2	MF276966	99.0	99.3	<i>F. solani</i>
GZL-G-4	KF999012	99.0	100.0	KY091148	99.0	100.0	n/a	—	—	<i>F. solani</i>
GZL-G-5	MF461624	99.0	100.0	KY091148	99.0	99.0	n/a	—	—	<i>F. solani</i>
GZL-G-6	KY436161	100.0	99.0	KY091148	99.0	100.0	n/a	—	—	<i>F. solani</i>
GZL-G-7	KP881516	96.0	98.7	KY091148	99.0	100.0	n/a	—	—	<i>F. solani</i>
GZL-G-8	KP267008	100.0	99.0	KY091148	99.0	99.0	n/a	—	—	<i>F. solani</i>
GZL-G-9	KY436161	98.0	99.0	n/a	—	—	n/a	—	—	<i>F. solani</i>
GZL-G-10	MF510823	99.0	100.0	KY091148	99.0	99.0	n/a	—	—	<i>F. solani</i>
GZL-Y-2	KY436161	99.0	96.0	KY091148	99.0	100.0	MF276966	100.0	99.0	<i>F. solani</i>
GZL-Y-3	KY436161	98.0	99.0	n/a	—	—	KJ374812	100.0	99.0	<i>F. solani</i>
GZL-Y-4	KY436161	99.0	99.0	KY091148	99.0	100.0	MF276966	99.0	99.0	<i>F. solani</i>
GZL-Y-5	KY436161	98.0	99.0	KY091148	99.0	100.0	MF276966	99.0	99.0	<i>F. solani</i>
GZL-Y-6	KY436161	96.0	98.0	n/a	—	—	MF276966	99.0	99.0	<i>F. solani</i>
GZL-Y-8	n/a	—	—	GQ922928	99.0	100.0	MF276966	99.0	99.0	<i>F. solani</i>
GZL-Y-8-2	KY013237	99.0	99.8	LT615305	99.0	99.5	MF276966	99.0	99.5	<i>F. solani</i>
GZL-Y-10	KY436161	97.0	99.0	KY091148	100.0	100.0	MF276966	98.0	99.0	<i>F. solani</i>
GZL-Y-11	n/a	—	—	KY091148	99.0	100.0	KJ374812	99.0	99.0	<i>F. solani</i>
GZL-Y-15	n/a	—	—	KY091148	99.0	100.0	MF276966	100.0	100.0	<i>F. solani</i>
DH-A1-2	MN068915	99.0	99.6	MH828020	99.0	99.8	KX434966	99.0	99.7	<i>F. oxysporum</i>
DH-A1-4	MK429839	99.0	99.5	MH828019	99.0	99.8	KX434966	99.0	99.8	<i>F. oxysporum</i>
DH-A1-5	MG561938	99.0	99.8	LT615305	99.0	99.9	MH300587	99.0	99.2	<i>F. solani</i>
DH-A1-8	MH844100	99.0	95.0	LT615305	99.0	99.9	MH300587	99.0	99.5	<i>F. solani</i>
DH-A1-9	MK713368	98.0	100.0	MH828020	99.0	99.8	KX434986	99.0	99.7	<i>F. oxysporum</i>
DH-A1-10	JN400703	99.0	99.6	MH828019	99.0	99.8	KX434986	100.0	99.7	<i>F. oxysporum</i>
DH-A1-14	MH858040	99.0	99.8	MH828019	99.0	99.9	KX434986	99.0	99.8	<i>F. oxysporum</i>
DHA3-2	JN400703	99.0	99.8	MH828019	100.0	99.9	KX434988	99.0	99.5	<i>F. oxysporum</i>
DHA3-3	MG561938	99.0	100.0	LT615305	99.0	99.8	MH300583	99.0	98.9	<i>F. solani</i>
DHA3-5	KY617035	99.0	100.0	LT615305	99.0	99.8	MH300583	100.0	99.7	<i>F. solani</i>
DHA3-7	JN400703	99.0	99.8	LT615305	99.0	99.9	MH300587	99.0	98.8	<i>F. solani</i>
DHA3-9	EU152473	99.0	99.8	KT323851	99.0	99.8	KX434988	99.0	99.2	<i>F. oxysporum</i>
DHA3-10	MG561938	100.0	100.0	LT615305	97.0	99.8	MH300583	99.0	99.0	<i>F. solani</i>
DHA3-11	MG561938	99.0	100.0	LT615305	99.0	99.9	MH300583	100.0	99.6	<i>F. solani</i>
DHA3-12	NR_159865	99.0	99.8	LT615305	99.0	99.2	MH300583	99.0	99.5	<i>F. solani</i>
DHA3-14	MG561938	99.0	99.8	LT615305	99.0	99.7	MH300587	99.0	99.5	<i>F. solani</i>

续表 1

分离物 编号 Isolate number	ITS			TEF1-α			RPB2			建议标识 Suggested identification
	登录号	相似度	置信度	登录号	相似度	置信度	登录号	相似度	置信度	
	Accession number	Query coverage/%	Percent identity/%	Accession number	Query coverage/%	Percent identity/%	Accession number	Query coverage/%	Percent identity/%	
DHA3-16	MG561938	99.0	99.5	LT615305	99.0	99.7	MH300587	99.0	99.5	<i>F. solani</i>
DHA3-17	MG561938	100.0	99.3	LT615305	99.0	100.0	MH300587	99.0	99.3	<i>F. solani</i>
DHA6-1	MK673832	100.0	99.8	LT615299	96.0	99.9	MH582226	99.0	99.7	<i>F. solani</i>
DHA6-2	NR_159865	99.0	99.8	LT615299	99.0	99.9	MH582226	100.0	100.0	<i>F. solani</i>
DHA6-4	KU594265	100.0	99.4	LT615299	99.0	99.9	MH582226	99.0	100.0	<i>F. solani</i>
DHA6-11	MH578608	100.0	99.4	KT323864	100.0	100.0	n/a	—	—	<i>F. oxysporum</i>
DHA6-22	n/a	—	—	KT323864	100.0	100.0	n/a	—	—	<i>F. oxysporum</i>
DHA6-26	n/a	—	—	KT323864	99.0	100.0	n/a	—	—	<i>F. oxysporum</i>
DHA6-27	MK626710	100.0	100.0	KT323864	99.0	100.0	n/a	—	—	<i>F. oxysporum</i>
DHA6-28	MH913114	100.0	100.0	n/a	—	—	n/a	—	—	<i>F. oxysporum</i>
DHA6-29	MH913114	100.0	100.0	n/a	—	—	n/a	—	—	<i>F. oxysporum</i>
DHA6-30	MH913114	100.0	100.0	KT323864	100.0	100.0	KX434988	100.0	99.5	<i>F. oxysporum</i>
DHA6-32	MH578609	99.0	99.6	n/a	—	—	n/a	—	—	<i>F. oxysporum</i>
DHA10-1	KM817208	99.0	99.8	MH828019	99.0	99.8	n/a	—	—	<i>F. oxysporum</i>
DHA10-2	KT803066	99.0	100.0	MH828019	99.0	99.8	KX434988	99.0	99.6	<i>F. oxysporum</i>
DHA10-3	KU671041	99.0	99.6	MH828019	99.0	99.9	KX434988	99.0	99.5	<i>F. oxysporum</i>
DHA10-4	KU671041	99.0	99.8	MH828019	99.0	99.6	KX434988	100.0	99.8	<i>F. oxysporum</i>
DHA10-5	KU671046	99.0	99.8	MH828019	99.0	99.1	KX434988	99.0	99.5	<i>F. oxysporum</i>
DHA10-7	MF663655	97.0	99.6	KT323864	99.0	99.7	KX434988	99.0	99.4	<i>F. oxysporum</i>
DHA10-9	EU152473	99.0	99.2	MH828019	99.0	99.9	KX434986	99.0	99.6	<i>F. oxysporum</i>
DHA10-12	KU671046	99.0	99.8	MH828019	99.0	99.6	KX434986	99.0	99.6	<i>F. oxysporum</i>
DHA10-13	JN400703	99.0	99.4	MH828019	99.0	99.8	KX434988	99.0	99.5	<i>F. oxysporum</i>
DHA10-14	JN400703	99.0	99.4	MH828019	99.0	100.0	KX434986	99.0	99.8	<i>F. oxysporum</i>
DHA10-15	JN400703	99.0	99.6	MH828019	99.0	99.6	KX434988	99.0	99.5	<i>F. oxysporum</i>
DHA10-16	JX045827	99.0	99.8	MH828019	99.0	99.7	KX434986	99.0	99.7	<i>F. oxysporum</i>
DHA10-17	KU671046	99.0	99.6	MH828019	99.0	100.0	KX434988	99.0	99.9	<i>F. oxysporum</i>
DH-G-3	MH266069	98.0	99.0	n/a	—	—	n/a	—	—	<i>F. oxysporum</i>
DH-G-4	KP266972	99.0	99.0	n/a	—	—	n/a	—	—	<i>F. oxysporum</i>
DH-R-5	JN400703	100.0	99.4	MH828019	99.0	100.0	KX434986	99.0	99.8	<i>F. oxysporum</i>
DH-R-9	JN400703	99.0	99.2	MH828019	99.0	99.8	KX434986	99.0	99.7	<i>F. oxysporum</i>
6-38	MH858428	98.0	99.1	LT841259	99.0	99.7	MH935990	99.0	99.9	<i>F. proliferatum</i>
A-9	MG561938	99.0	99.8	LT615305	98.0	98.7	MH300587	100.0	99.5	<i>F. solani</i>

n/a:无。
n/a: Not available.

2.2 镰孢菌的分离物的形态学鉴定

进一步对代表分离物进行形态学确认,以典型镰孢菌菌株为例,形态学鉴定结果表明:DH-R-5(图 1-A)和 DH-A6-30(图 1-B)菌株,在 PDA 培养基上,气生菌丝呈羊绒状,分别呈白色、淡粉红色,培养基背面分别呈淡黄色、橘黄色,生长速度较快,7 d 时菌落直径分别为 57 和 65 mm,大型分子孢子数量很

少,小型分生孢子数量极多,0 ~ 1 隔,多数无隔,卵形、长椭圆形或短棒形。在 CMC 培养基上菌丝为白色,大型分生孢子为美丽型,1 ~ 3 隔,多为 3 隔;分生孢子长宽为(7.19 ~ 30.14) μm × (2.45 ~ 4.45) μm,综合形态与分子鉴定确认 DH-R-5 和 DH-A6-30 菌株为尖镰孢菌(*F. oxysporum*)。

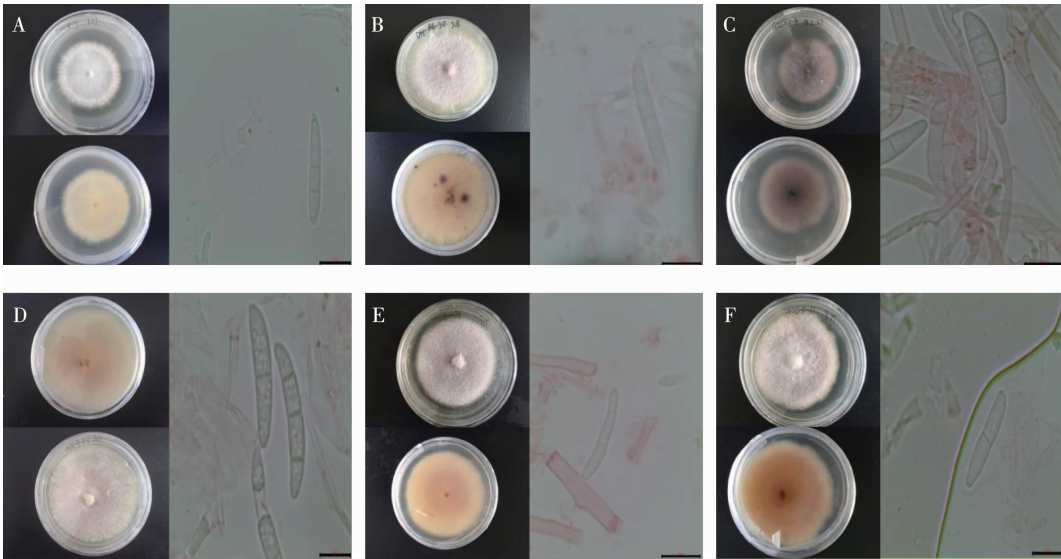
GZL-Y-4(图 1-C)和 GZL-Y-8-2(图 1-D)菌株,

在 PDA 培养基上,气生菌丝呈羊绒状,分别为白色和深褐色,而 GZL-Y-4 中间呈黑色,外圈菌落呈浅褐色,GZL-Y-8-2 菌株在培养基背面菌落呈雪白色,中部略带紫色。7 d 时菌落直径分别为 61 和 41 mm,产孢量十分丰富,小型分生孢子椭圆形或卵形,0~1 隔,多为 1 隔。在 CMC 培养基上菌丝为白色,大型分生孢子呈马特型、顶孢钝,分隔常见为 2~3 隔,分生孢子长宽为(12.71~30.55) μm \times (3.96~6.86) μm ,综合形态与分子鉴定确认 GZL-Y-4 和 GZL-Y-8-2 菌株为腐皮镰孢菌(*F. solani*)。

6-38(图 1-E)菌株,在 PDA 培养基上,气生菌丝呈羊绒状、为白色,菌落大部分呈橙红色,中部略带紫色,菌落背面呈橙黄色,7 d 时菌落直径为 68 mm,小型分生孢子丰富,卵状或短棒状,隔膜为 0~1,多

为 1 隔。在 CMC 培养基上菌丝为白色,未发现大型分生孢子,分生孢子长宽度为(7.39~22.03) μm \times (1.70~3.01) μm ,综合形态与分子鉴定确定 6-38 为层出镰孢菌(*F. proliferatum*)。

GZL-B-17(图 1-F)菌株,在 PDA 培养基上,气生菌丝呈羊毛状至粉状,菌落大部分呈橙红色,中部略带紫色,菌落背面呈橘红色,7 d 时菌落直径 61 mm,小型分生孢子丰富,通常呈链状生长,棒槌形,0~1 隔,多为无隔。在 CMC 培养基上菌丝为白色,大型分生孢子多为纺锤形,两端渐细,分生孢子长宽度为(9.37~19.79) μm \times (3.08~4.12) μm ,综合形态与分子鉴定确定 GZL-B-17 为轮枝镰孢菌(*F. verticillioides*)。



A:DH-R-5; B:DH-A6-30; C:GZL-Y-4; D:GZL-Y-8-2; E:6-38; F:GZL-B-17; 标尺: 10 μm 。
A: DH-R-5; B: DH-A6-30; C: GZL-Y-4; D: GZL-Y-8-2; E: 6-38; F: GZL-B-17; Scale bar: 10 μm .

图 1 吉林省公主岭和敦化地区大豆根腐病镰孢菌典型菌落和分生孢子
Fig. 1 Typical colonies and conidia of *Fusarium* isolates from soybean root rot in Gongzhuling and Dunhua, Jilin province

2.3 基于 ITS、TEF1- α 和 RPB2 多基因联合系统发育分析

分别对 ITS、TEF1- α 和 RPB2 3 基因数据矩阵序列进行比对分析,最终获得了 3 个基因矩阵,序列总长度为 2 553 bp。其中,ITS 基因 624 bp,保守位点 75 个,变异位点 528 个,简约信息位点 346 个;TEF1- α 基因 960 bp,保守位点 177 个,变异位点 779 个,简约信息位点 685 个;RPB2 基因 969 bp,保守位点 124 个,变异位点 845 个,简约信息位点 768 个。DAMBE(xia' test)对联合序列进行核酸饱和度检测的结果表明:联合序列未饱和,可以建树(Iss < Iss. c)。PAUP 的异质性检验结果表明,3 个保守基因序列间不冲突($P = 0.01$)可以合并分析,利用 PhyloSuite v1. 1. 1. 6 完成 ML 树构建,总共 55 条序列参与系统发育树构建,其中 27 条序列为本研究分

离纯化的镰孢菌序列,27 条序列源自于 NCBI 具有代表性的镰孢菌序列,并以 Bipolaris oryzae 作为外群。ML 树 3 个数据集 ITS、TEF1- α 、RPB2 的最佳核苷酸替换模型为 K2P + R2、TN + F + G4、TNe + R3。参与 ML 法构建系统发育树的 55 条序列主要被分为 5 个类群。在类群 I 中 6-38 与层出镰孢菌以较高的自举值(93. 1/99)聚为一类;在类群 II 中 DH-A1-2、DH-A1-4、DH-A1-9、DH-A1-10、DH-A1-14、DH-R-5、DH-R-9、DH-A3-9、DH-A10-7、DH-A10-9、DH-A10-13、DH-A10-14、DH-A10-15、DH-A6-30、GZL-B-31 与尖镰孢菌以极高的自举值(100/100)聚为一类;在类群 III 中 GZL-B-17 与轮枝镰孢菌以极大的自举值(100/100)聚为一类;在类群 V 中 GZL-Y-8-2、GZL-B-5、GZL-B-、GZL-B-10、GZL-B-12、DH-A3-10 与腐皮镰孢菌以自举值(98. 2/68)聚为一类(图 2)。

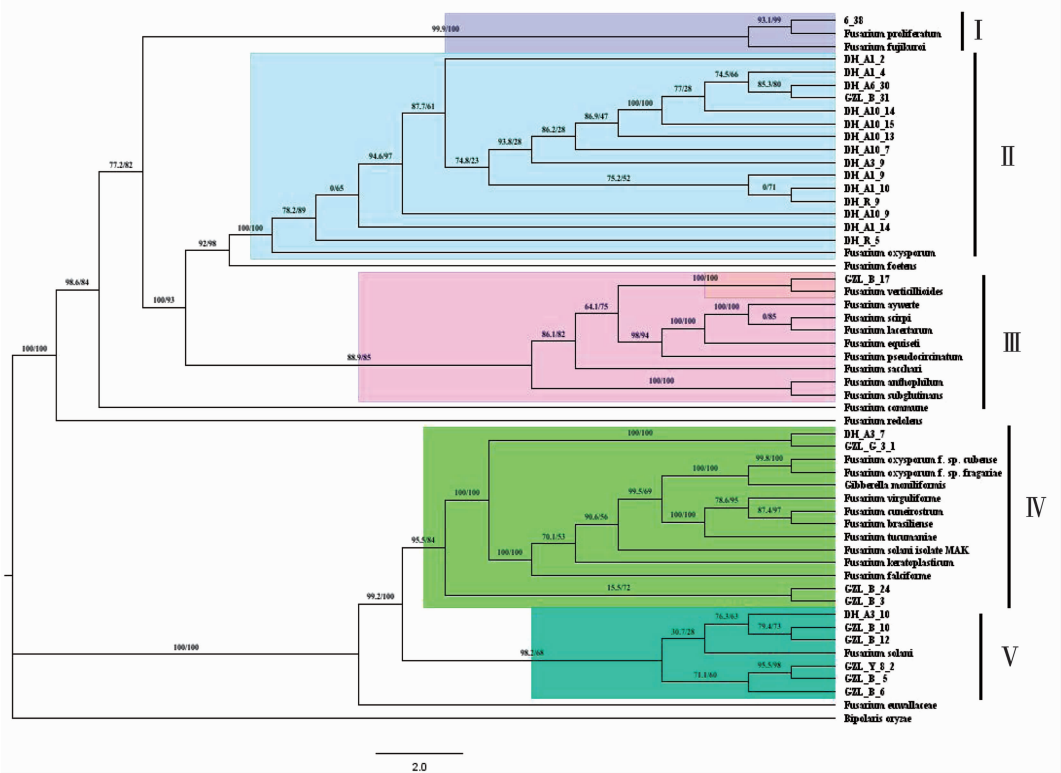


图 2 基于 ML 法重建的 *ITS*、*TEF1-α* 和 *RPB2* 联合基因系统发育树

Fig. 2 Phylogenetic trees constructed with maximum likelihood methods based on the concatenated sequences from *ITS*, *TEF1-α* and *RPB2* genes

2.4 镰孢菌分离物的致病性分析

除了分离物 GZL-A-7、GZL-A-9、GZL-A-21 对合丰 55 无致病性之外,其余 101 株分离物对合丰 55 均具有不同的致病性。在 67 株腐皮镰孢菌中,无致病性占 4.5%,中度感病占 49.3%,感病占 23.9%,高度感病占 22.3%;在 35 株尖孢镰孢菌中,中度感

病占 2.9%,感病占 14.2%,高度感病占 82.9%;轮枝镰孢菌和层出镰孢菌均对寄主造成感病。培养

的分离物能造成接种部位表面轻微变褐,茎内部无

明显症状,严重的能造成接种植株根系几乎全部变褐、腐烂坏死,植株死亡(图 3)。



CK:对照; MS:中感; S:感; HS:高感。
CK:Control; MS:Middle sense; S:Sense; HS:High sense.

图 3 根腐程度的分级
Fig. 3 Classification of root lesion

3 讨 论

本研究从吉林省公主岭和敦化采集大豆罹病植株,进行病原真菌的分离与鉴定,发现 85.2% 分离物为镰孢菌,共 4 种镰孢菌,分别为腐皮镰孢菌、尖镰孢菌、轮枝镰孢菌、层出镰孢菌。其中,公主岭大豆发病区以腐皮镰孢菌为主,其分离频率达 89.66%;而敦化地区大豆发病区以尖镰孢菌为主,其分离频率达 68.09%。从致病性角度来看,这两个地区分离出的尖镰孢菌和约 96% 的腐皮镰孢菌均对合丰 55 有不同程度的致病性。这与王晓艳等^[31]对吉林省大豆根腐病镰孢菌优势种群研究结果基本一致,但是与王晓艳等分离病原菌种类却不相同,其对吉林省大豆根腐病镰孢菌进行分离鉴定,发现 6 种病原菌,分别为尖镰孢菌、腐皮镰孢菌、禾谷镰孢菌、半裸镰孢菌、木贼镰孢菌、厚垣镰孢菌,而本研究新发现了 2 种镰孢菌分别为轮枝镰孢菌、层出镰孢菌。导致这种差异可能是由于环境因子、轮作方式、土壤演替过程和生物因子等因素造成的^[32],也可能与取样的时间和地域有关。

目前,多基因联合系统发育分析在植物病原菌鉴定中被广泛应用。例如,曾莉莎等^[33]利用 *ITS*、*TEF-1α*、*IGS*、*histone H3* 和 *β-tubulin* 等多基因联合进行系统发育分析,评价了源自于不同寄主的尖镰孢菌古巴专化型(*Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*, *Foc*)病原菌之间以及与其它尖镰孢菌的血缘关系。本研究中 GZL-B-17 菌株的 *ITS* 与 *F. verticillioides* (MK325275) 相似度高达 99%,置信度为 99.36%;*TEF1-α* 与 *F. verticillioides* (XM_018889622) 相似度高达 99%,置信度为 99.57%;*RPB2* 与串珠镰孢菌(*Gibberella moniliformis*) (FN552104.1) 相似度高达 99%,置信度为 99.54%,而与 *F. verticillioides* (MH935996) 的相似度为 96%,置信度为 99.41%。GZL-B-17 菌株 3 个基因序列的一致性分析结果不同,在 *ITS* 和 *TEF1-α* 上与轮枝镰孢菌相似度较高,而在 *RPB2* 上与串珠镰孢菌相似度较高,说明如果只通过单个保守基因难以使其结果鉴定更加精确。但是通过多基因联合系统发育析发现 GZL-B-17 与轮枝镰孢菌以极大的自举值(BP = 100)聚为一类,为轮枝镰孢菌。研究结果表明 *ITS*、*TEF-1α*、*RPB2* 基因联合系统发育分析可以为快速、精准鉴定病原菌的种类提供理论依据。

4 结 论

通过对吉林省敦化和公主岭发病区发病植株上病原菌的分离与鉴定,发现造成这两个地区大豆根腐病的镰孢菌主要为 4 种,分别为腐皮镰孢菌、尖镰孢菌、轮枝镰孢菌、层出镰孢菌。公主岭优势病

原菌以腐皮镰孢菌为主,而敦化优势病原菌以尖镰孢菌为主。本研究在结合传统形态学鉴定基础上,对分离出的镰孢菌进行 *ITS*、*TEF1-α*、*RPB2* 保守区序列一致性分析和多基因系统发育分析,进一步确定了吉林省敦化和公主岭大豆根腐镰孢菌种类,提高了鉴定的客观性和准确性,为吉林省大豆根腐病防治提供科学依据。

参考文献

[1] Roy K W, Rupe J C, Hershman D E, et al. Sudden death syndrome of soybean [J]. Plant Disease, 1997, 81 (10): 1100-1111.

[2] Binod B S, Jordan L B, Prashant S, et al. Investigation of the *Fusarium virguliforme* transcriptomes induced during infection of soybean roots suggests that enzymes with hydrolytic activities could play a major role in root necrosis [J]. PLoS One, 2017, 12 (1): e0169963.

[3] Hartman G L, Chang H X, Leandro L F. Research advances and management of soybean sudden death syndrome [J]. Crop Protection, 2015, 73: 60-66.

[4] Hartman G L, Huang Y H, Nelson R L, et al. Germplasm evaluation of *Glycine max* for resistance to *Fusarium solani*, the causal organism of sudden death syndrome [J]. Plant Disease, 1999, 81 (5): 515-518.

[5] Zhou Q, Chen Y, Yang Y, et al. Effect of inoculum density and quantitative PCR-based detection of *Rhizoctonia solani* AG-2-1 and *Fusarium avenaceum* on canola [J]. Crop Protection, 2014, 59: 71-77.

[6] Zhang J X, Xue A G, Cober E R, et al. Prevalence, pathogenicity and cultivar resistance of *Fusarium* and *Rhizoctonia* species causing soybean root rot [J]. Canadian Journal of Plant Science, 2013, 93 (2): 221-236.

[7] Zhang J X, Xue A G, Zhang H J, et al. Response of soybean cultivars to root rot caused by *Fusarium* species [J]. Canadian Journal of Plant Science, 2010, 90 (5): 767-776.

[8] Xue A G, Cober E, Voldeng H D, et al. Evaluation of the pathogenicity of *Fusarium graminearum* and *Fusarium pseudograminearum* on soybean seedlings under controlled conditions [J]. Canadian Journal of Plant Pathology, 2007, 29 (1): 35-40.

[9] Diaz A, Munkvold G P, Leandro L F. First report of *Fusarium proliferatum* causing root rot on soybean (*Glycine max*) in the United States [J]. Plant Disease, 2011, 95 (10): 1316-1316.

[10] Diaz A, Leandro L F, Munkvold G P. Aggressiveness of *Fusarium* species and impact of root infection on growth and yield of soybean [J]. Phytopathology, 2013, 103 (8): 822-832.

[11] Ellis M L, Díaz Arias M M, Leandro L F, et al. First report of *Fusarium armeniacum* causing seed rot and root rot on soybean (*Glycine max*) in the United States [J]. Plant Disease, 2012, 96 (11): 1693-1693.

[12] Chang K F, Hwang S F, Conner R L, et al. First report of *Fusarium proliferatum* causing root rot in soybean (*Glycine max* L.) in Canada [J]. Crop Protection, 2015, 67: 52-58.

[13] Costa S S, Matos K S, Tessmann D J, et al. *Fusarium paranaense* sp. nov. a member of the *Fusarium solani* species complex causes root rot on soybean in Brazil [J]. Fungal Biology, 2016, 120 (1):

51-60.

[14] Leslie J F. *Fusarium* spp. from corn, sorghum, and soybean fields in the central and eastern United States [J]. *Phytopathology*, 1990, 80(4): 343-350.

[15] Kuhnem P R, Del Ponte E M, Dong Y, et al. *Fusarium graminearum* isolates from wheat and maize in New York show similar range of aggressiveness and toxigenicity in cross-species pathogenicity tests[J]. *Phytopathology*, 2015, 105(4): 441-448.

[16] Harris L J, Balcerzak M, Johnston A, et al. Host-preferential *Fusarium graminearum* gene expression during infection of wheat, barley, and maize [J]. *Fungal Biology*, 2016, 120 (1): 111-123.

[17] 韩庆新, 辛惠普. 大豆根腐病主要病原菌对大豆幼苗致病性的初步研究[J]. *大豆科学*, 1990, 9(2): 157-162. (Han Q X, Xin H P. A preliminary study on the pathogenicity of the main pathogens causing soybean seedling root rot[J]. *Soybean Science*, 1990, 9(2): 157-162.)

[18] 李长松, 罗瑞梧, 杨崇良, 等. 黄淮地区大豆根腐病菌分离鉴定及其致病性研究[J]. *植物保护学报*, 1996, 23(2): 187-188. (Li C S, Luo R W, Yang C L, et al. Isolation and identification of the pathogenic fungi causing soybean root rot in Yellow River and Huaihe River basins[J]. *Journal of Plant Protection*, 1996, 23(2): 187-188.)

[19] 杨帅. 大豆镰刀菌根腐病病原种类及大豆抗病种质资源筛选 [D]. 南京: 南京农业大学, 2012. (Yang S. Soybean *Fusarium* root rot pathogen species and soybean germplasm screening[D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2012.)

[20] Chang X L, Dai H, Wang D P, et al. Identification of *Fusarium* species associated with soybean root rot in Sichuan province, China [J]. *European Journal of Plant Pathology*, 2018, 151(5): 1-15.

[21] Leslie J F, Summerell B A. The *Fusarium* laboratory manual[M]. UK: Blackwell Publish Professional, 2006.

[22] Leslie J F, Anderson L L, Bowden R L, et al. Inter- and intra-specific genetic variation in *Fusarium*[J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2007, 119(1-2): 25-32.

[23] O'Donnell K, Ward T J, Robert V A R, et al. DNA sequence-based identification of *Fusarium*: Current status and future directions[J]. *Phytoparasitica*, 2015, 43(5): 583-595.

[24] 陈锋菊, 李百元, 杨冰, 等. 一种经济快速提取丝状真菌基因组 DNA 的方法[J]. *生命科学研究*, 2010, 14(2): 122-149. (Chen F J, Li B Y, Yang B, et al. An economical and rapid extraction method for genomic DNA from filamentous fungi[J]. *Life Science Research*, 2010, 14(2): 122-149.)

[25] White T J, Bruns T, Lee S, et al. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics [J]. *PCR Protocols*, 1990, 38: 315-322.

[26] Matheny P. Improving phylogenetic inference of mushrooms with *RPB1* and *RPB2* nucleotide sequences(*Inocybe*; Agaricales) [J]. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 2005, 35(1): 1-20.

[27] Zhang D, Gao F L, Jakovli I, et al. PhyloSuite: An integrated and scalable desktop platform for streamlined molecular sequence data management and evolutionary phylogenetics studies[J]. *Molecular Ecology Resources*, 2020, 20(1): 348-355.

[28] 喻锦秀, 吴品珊, 高必达, 等. 大豆猝死综合症病原菌北美种的 PCR 鉴定[J]. *植物病理学报*, 2007, 37(1): 36-41. (Yu J X, Wu P S, Gao B D, et al. Use of allele-specific PCR of translation elongation factor 1- α gene to identify soybean sudden death syndrome pathogen(*Fusarium virguliforme*) [J]. *Acta Phytopathologica Sinica*, 2007, 37(1): 36-41.)

[29] 洪坚平, 贺冰, 郭明霞. 山西镰刀菌[M]. 北京: 中国林业出版社, 2015. (Hong J P, He B, Guo M X. Shanxi *Fusarium* [M]. Beijing: China Forestry Publishing House, 2015.)

[30] 姚艳. 黄淮地区大豆品种对根部主要病原真菌的抗性研究 [D]. 南京: 南京农业大学, 2016: 34-36. (Yang Y. Resistance research of soybean varieties to the major of roots fungal pathogens in the Huang-Huai region[D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2016: 34-36.)

[31] 王晓艳, 文景芝. 东北三省大豆根腐镰孢菌种类及其致病力分析[J]. *中国油料作物学报*, 2011, 33(4): 391-395. (Wang X Y, Wen J Z. Species and pathogenicity of *Fusarium* causing soybean root rot in northeast China[J]. *Chinese Journal of Oil Crop Sciences*, 2011, 33(4): 391-395.)

[32] Mandeel Q A. Biodiversity of the genus *Fusarium* in saline soil habitats[J]. *Journal of Basic Microbiology*, 2010, 46(6): 480-494.

[33] 曾莉莎, 吕顺, 刘文清, 等. 基于多基因序列分析对尖孢镰孢菌古巴专化型(香蕉枯萎病菌)生理小种的鉴定[J]. *菌物学报*, 2014, 33(4): 867-882. (Zeng L S, Lyu S, Liu W Q, et al. The identification on race of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* based on multi-gene sequence analysis[J]. *Mycosystema*, 2014, 33(4): 867-882.)