

西瓜枯萎病菌遗传多样性的相关序列扩增多态性分析

刘丽芳^{1,2}, 肖姬玲², 张屹², 朱菲莹², 魏林³, 梁志怀^{1,2*}

(1. 湖南大学研究生院隆平分院, 长沙 410125; 2. 湖南省农业生物技术研究所, 长沙 410125;

3. 湖南省植物保护研究所, 长沙 410125)

摘要 对30个西瓜枯萎病菌 *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum* 菌株基因组 DNA 进行相关序列扩增多态性 (SRAP) 分子标记分析, 以探究其遗传多样性与地理来源的关系。采用尖孢镰刀菌西瓜专化型 *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum* 0、1、2 号生理小种的基因组 DNA 为模板, 对 225 对 SRAP 引物进行筛选, 筛选出 20 对多态性、重复性较好且条带清晰的引物, 对 30 个菌株进行 PCR 扩增, 共扩增出 386 条带, 其中多态性条带有 371 条, 多态性比率为 96.11%, 平均每对引物扩增出 19.3 个位点和 18.55 个多态性位点。UPGMA 法聚类分析结果显示, 供试菌株两两之间的遗传相似系数范围为 0.69~0.90, 平均为 0.79, 说明尖孢镰刀菌西瓜专化型的遗传多样性较为丰富。基于 SRAP 标记聚类分析表明, 30 个菌株在遗传相似系数为 0.70 处被划分为 3 个类群, I 类群包含 24 个菌株, 其中 18 个来自湖南省, II 类群只包含 1 个来自黑龙江省哈尔滨市的菌株, 它和另一个来自黑龙江地区的菌株被划分到不同的类群, 且遗传距离相对较远; III 类群包含了 5 个菌株, 其中 3 个来自海南三亚, 其余两个来自湖南省。根据菌株的分布情况来看, 菌株的聚集与地理来源没有明显的相关性。

关键词 西瓜枯萎病菌; SRAP 分析; 遗传多样性

中图分类号: S 436.5 **文献标识码:** A **DOI:** 10.16688/j.zwbh.2017435

Genetic diversity analysis of *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum* by sequence-related amplified polymorphism

LIU Lifang^{1,2}, XIAO Jiling², ZHANG Yi², ZHU Feiying², WEI Lin³, LIANG Zhihui^{1,2}

(1. Longping Branch, Graduate School of Hunan University, Changsha 410125, China;

2. Hunan Agricultural Biotechnology Research Institute, Changsha 410125, China;

3. Hunan Plant Protection Institute, Changsha 410125, China)

Abstract In order to explore the relationship between genetic diversity and geographical origin, genomic DNA of 30 strains of *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum* isolates were analyzed by sequence-related amplified polymorphism (SRAP) molecular markers. With genomic DNA of *F. oxysporum* f. sp. *niveum* race 0, race 1 and race 2 as templates, 20 pairs of primers which had rich product and high polymorphism and repeatability were screened from total 225 pairs of SRAP primers. The 20 pairs of SRAP primers generated a total of 386 reproducible bands by PCR with the genomic DNA from 30 tested materials as templates. 371 bands were polymorphic, with polymorphism ratio of 96.11%. On average, the bands amplified by each primer combination were 19.3 including 18.55 polymorphism bands. The UPGMA cluster analysis revealed that the genetic similarity coefficient of all the stains was ranged from 0.69 to 0.90, averaged 0.79, indicating the genetic diversity of *F. oxysporum* f. sp. *niveum* was abundant. Based on SRAP marker clustering analysis results, 30 isolates were classified into 3 groups with genetic similarity of 0.70. Group I contains 24 isolates, with 18 isolates from Hunan Province. Group II only contains one strain from Harbin City, Heilongjiang Province. The two strains from Harbin City were divided into different groups and the genetic distance was relatively far. Group III contains 5 isolates, 3 from Sanya, Hainan Province and two from Hunan Province. As far as the strains distribution was concerned, there was no significant correlation between the aggregation of the strains and the geographical origin.

Key words *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum*; SRAP analysis; genetic diversity

收稿日期: 2017-11-16 修订日期: 2018-01-08

基金项目: 国家公益性行业(农业)科研专项(201503110-03);湖南省自然科学基金(2016JJ2075);湖南省现代农业蔬菜产业技术体系建设专项

* 通信作者 E-mail: liangzhihui@163.com

我国是西瓜 *Citrullus lanatus* 生产与消费第一大国。西瓜枯萎病是由尖孢镰刀菌西瓜专化型 *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum* (FON) 引起的一种世界性真菌土传性病害。西瓜产业中,西瓜枯萎病已成为导致产量、品质下降最为严重的病害之一,利用抗病品种和嫁接换根是防治该病最经济、有效的措施^[1]。国际上公认的西瓜枯萎病菌有 4 个生理小种,即生理小种 0 号、1 号、2 号和 3 号。生理小种 3 号由 Zhou^[2] 于 2010 年鉴定分离,能导致兼抗生理小种 0、1 和 2 号的野生种质 PI296431-FR 感病,2017 年在美国的佛罗里达州也被分离鉴定^[3],但在中国尚未见报道。

相关序列扩增多态性(sequence-related amplified polymorphism, SRAP) 是一种基于 PCR 的显性标记系统的 DNA 分子标记技术,由美国加州大学的 Li^[4] 于 2001 年提出。该技术利用独特的引物对开放阅读框(open reading frames, ORFs) 进行扩增,上游引物对外显子进行特异扩增,下游引物对内含子区域、启动子区域进行特异扩增,因个体不同以及物种的内含子、启动子与间隔长度不等而产生多态性,具有简便、稳定、产率高和便于得到选择条带序列等特点。目前,SRAP 技术已广泛用于植物遗传多样性的分析^[5-7]。

本研究以尖孢镰刀菌西瓜专化型 0 号、1 号和 2 号生理小种为标准试验材料,对其进行差异分析和遗传多样性分析,并筛选得到了 20 对多态性好的 SRAP 引物组合,利用筛选的 20 对 SRAP 引物对收集到的湖南省内大部分地区及省外部分西瓜主产区枯萎病菌进行多态性分析,为监测与防控西瓜枯萎病的流行提供基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试验材料

尖孢镰刀菌西瓜专化型 *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum* (FON) 0、1、2 号生理小种由北京市农林科学院惠赠;各地区收集分离的菌株详情见表 1。

1.1.2 试剂及仪器

SRAP 引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成,Trans Tap DNA Polymerase High Fidelity (HiFi)、dNTPs、DNA 分子量标准 Trans DNA Marker I,均购于全式金生物技术有限公司;T100 PCR 仪,购于美国 Bio-Rad 公司;电泳仪,北京六一仪器厂生产。

表 1 供试菌株信息

Table 1 Information of tested isolates

编号 Number	采集地 Source	编号 Number	采集地 Source
1	湖南省株洲市株洲县	16	湖南省永州市江华县
2	湖南省郴州市临武县-2	17	海南省三亚市天涯区-1
3	广东省肇庆市怀集县	18	海南省三亚市天涯区-2
4	湖南省益阳市桃江县	19	湖南省衡阳市衡南县-1
5	湖南省岳阳市临湘县	20	湖南省益阳市沅江市
6	湖南省株洲市天元区	21	湖南省邵阳市邵东县
7	湖南省株洲市茶陵县	22	湖南省衡阳市衡南县-2
8	湖南省长沙市宁乡市	23	海南省三亚市天涯区-3
9	湖南省怀化市溆浦县-1	24	湖南省衡阳市南岳区
10	湖南省湘西土家族苗族自治州吉首市	25	海南省海口市琼山区-1
11	湖南省怀化市溆浦县-2	26	海南省海口市琼山区-2
12	安徽省淮南市凤台县	27	河南省周口市扶沟县
13	湖南省怀化市辰溪县-1	28	湖南省怀化市沅陵县
14	黑龙江省哈尔滨市阿城区-2	29	湖南省怀化市辰溪县-2
15	黑龙江省哈尔滨市阿城区-1	30	湖南省娄底市双峰县

1.2 研究方法

1.2.1 DNA 提取

供试菌株基因组 DNA 的提取参考曾东方等^[8]的研究方法。

1.2.2 SRAP 扩增反应

SRAP 的反应体系参考 Li^[4] 的方法,并加以改进。反应体系为 12 μ L,其中 ddH₂O 7.6 μ L,HiFi buffer I 1.2 μ L,2.5 mol/L dNTPs 1.0 μ L,HiFi 酶 0.2 μ L,DNA 模板 1.0 μ L,上下游引物各 0.5 μ L。PCR 反应程序为:94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min;94 $^{\circ}$ C 变性 1 min,35 $^{\circ}$ C 复性 1 min,72 $^{\circ}$ C 延伸 2 min,5 个循环;94 $^{\circ}$ C 变性 1 min,55 $^{\circ}$ C 复性 1 min,72 $^{\circ}$ C 延伸 2 min,34 个循环;最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。

1.2.3 SRAP 引物的筛选及 PCR 产物的检测

采用 0、1、2 号生理小种的基因组 DNA 为模板,用合成的 225 对 SRAP 随机组合引物对其进行 PCR 扩增,产物通过 8% 聚丙烯酰胺变性胶进行电泳^[9],140 v 恒电压电泳 1.5 h,电泳结束后采用银染法^[10]进行染色并拍照记录,对扩增结果进行比较分析。从中选择多态性和重复性较好的引物对 30 株供试菌株的基因组 DNA 进行 PCR 扩增,并进行电泳图谱分析。

1.2.4 电泳谱带的记录与数据分析^[7,9]

根据电泳结果,电泳图谱中每条扩增条带均代表了引物与模板 DNA 互补的一个结合位点,可记为一个分子标记,在电泳图谱中相同迁移位置上有扩增带的记为 1,无扩增带的记为 0,如有数据缺失

的情况则用其他数字代替,然后将 PCR 扩增的 DNA 条带数据统计成 01 矩阵。并用 NTSYS 软件计算两两菌株间的 Dice 相似系数,利用 UPGMA 法进行聚类分析建立聚类树状图。

2 结果与分析

2.1 SRAP 引物筛选

根据 SRAP 引物筛选的扩增结果,从 225 对引

物中筛选出 20 对扩增条带清晰、多态性明显、扩增稳定的引物对: ME1 + EM4、ME1 + EM5、ME1 + EM6、ME4 + EM1、ME4 + EM2、ME4 + EM3、ME5 + EM1、ME5 + EM5、ME5 + EM12、ME5 + EM15、ME6 + EM2、ME6 + EM6、ME8 + EM1、ME8 + EM5、ME11 + EM1、ME12 + EM9、ME12 + EM15、ME14 + EM2、ME14 + EM3、ME14 + EM7,具体引物序列见表 2。

表 2 筛选的引物序列

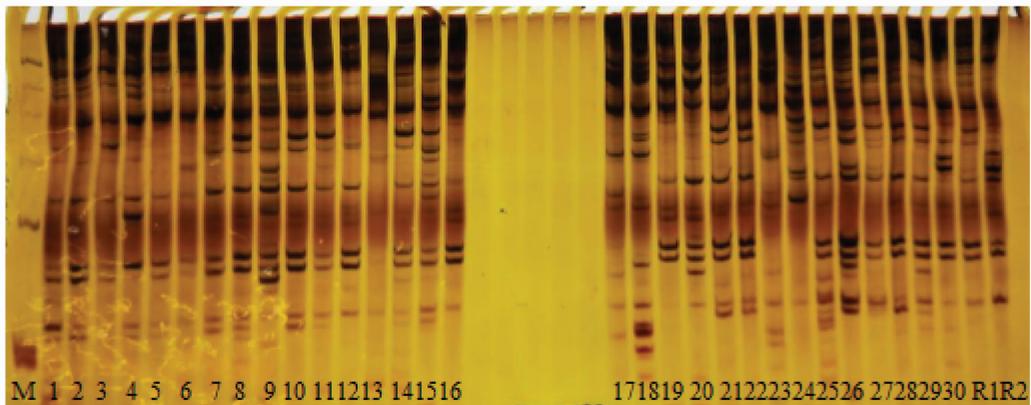
Table 2 Sequences of the screened primers

上游引物 Upstream primer	序列(5'-3') Sequence	下游引物 Downstream primer	序列(5'-3') Sequence
ME1	TGAGTCCAAACCGGATA	EM1	GACTGCGTACGAATTAAT
ME4	TGAGTCCAAACCGGACC	EM2	GACTGCGTACGAATTTGC
ME5	TGAGTCCAAACCGGACT	EM3	GACTGCGTACGAATTGAC
ME6	TGAGTCCAAACCGGACA	EM4	GACTGCGTACGAATTTGA
ME8	TGAGTCCAAACCGGAAG	EM5	GACTGCGTACGAATTAAC
ME11	TGAGTCCAAACCGGTGC	EM6	GACTGCGTACGAATTGCA
ME12	TGAGTCCAAACCGGTCT	EM7	GACTGCGTACGAATTCAA
ME14	TGAGTCCAAACCGGTAA	EM9	GACTGCGTACGAATTCTA
		EM12	GACTGCGTACGAATTCTC
		EM15	GACTGCGTACGAATTGGT

2.2 尖孢镰刀菌 SRAP 引物扩增的多态性

采用筛选出的 20 对引物,对 30 株的供试尖孢镰刀菌菌株进行了 SRAP-PCR 扩增。共扩增出 386 条带,其中多态性条带有 371 条,平均每对引物扩增出 19.3 个位点和 18.55 个多态性位点,多态性比率为 96.11%(引物组合 ME12 + EM15 的扩增结果见图 1)。说明尖孢镰刀菌西瓜专化型的

遗传多样性丰富且遗传差异性较大。在这 20 对 SRAP 引物中,不同的引物组合扩增出来的条带数存在一定的差异,其中引物组合 ME5 + EM5 和 ME12 + EM9 扩增出来的条带数最多,达到了 25 条;引物组合 ME14 + EM2 扩增出来的条带数最少,只有 13 条,同时这几个引物组合的多态性比率均为 100%(表 3)。



M: DNA 分子量标准 Trans DNA Marker I; 1~30: 编号为 1~30 的尖孢镰刀菌电泳结果; R1: 1 号生理小种; R2: 2 号生理小种
M: Trans DNA Marker I; 1~30: The electrophoretic result of *Fusarium oxysporum* f.sp. *niveum* strains No.1 to No.30; R1: Race 1; R2: Race 2

图 1 ME12+EM15 引物扩增结果

Fig. 1 Amplified result of FON isolates by ME12+EM15

2.3 SRAP 聚类分析

用 NTSYS 软件计算两两菌株间的相似系数并利

用 UPGMA 法进行聚类分析建立聚类树状图(图 2),结果表明,供试尖孢镰刀菌西瓜专化型菌株两两之

间的遗传相似系数范围为 0.69~0.90, 平均为 0.79。说明这 30 个西瓜枯萎病菌遗传分化较大, 群体遗传多样性比较丰富。在遗传相似系数为 0.70 处, 可以把供试菌株划分为 3 个类群: I 类群包含 24 个菌株, 占总数的 80%, 其中 18 个来自湖南省, 占总数的 75%, 6 个分别来自广东(3 号)、安徽(12 号)、黑龙江(14 号)、海南(25/26 号)和河南(27 号)省, 占总数的 25%。在遗传相似系数为 0.75 处, 该类群又可进一步被划分为多个亚群, 其中来自湖南省株洲市天元区的 6 号菌株和来自海南海口的 26 号菌株各自独立成为一个亚群, 与其他来自同一地区的菌株的遗传距离相对较远, 其余菌株组成的亚群遗传距离较近, 由图还可得知来自

湖南省以外的 6 个菌株分布在不同的亚群; II 类群只包含 1 个菌株, 是来自黑龙江省哈尔滨市的 15 号菌株, 该菌株和来自同一地区的 14 号菌株分属于不同的类群, 且遗传距离相对较远; III 类群包含 5 个菌株, 其中 17、18、23 号菌株关系较近, 均来自海南三亚, 其余两个分别来自湖南省的怀化辰溪县(13 号)和衡阳南岳区(24 号), 且来自湖南省衡阳南岳区 24 号菌株与来自海南三亚的 3 个菌株关系更近。进一步分析发现来自同一地区的菌株被划分在不同的类群中, 而同一类群中包括了不同地区的菌株。所以基于 SRAP 多态性而划分的西瓜枯萎病菌菌株类群与菌株地理来源没有明显的相关性。

表 3 20 对引物对 30 个西瓜枯萎病菌菌株的 SRAP 分析结果

Table 3 Pattern analysis of 30 FON isolates amplified by 20 pairs of SRAP primer

引物组合 Primer combination	总条带数/条 Total bands	多态性条带/条 Polymorphic bands	多态性比率/% Percent of polymorphic bands	引物组合 Primer combination	总条带数/条 Total bands	多态性条带/条 Polymorphic bands	多态性比率/% Percent of polymorphic bands
ME1+EM4	24	22	91.67	ME6+EM2	22	22	100
ME1+EM5	23	23	100	ME6+EM6	19	18	94.74
ME1+EM6	21	18	85.71	ME8+EM1	15	15	100
ME4+EM1	16	15	93.75	ME8+EM5	20	20	100
ME4+EM2	21	21	100	ME11+EM1	15	14	86.67
ME4+EM3	18	18	100	ME12+EM9	25	25	100
ME5+EM1	18	16	88.89	ME12+EM15	16	15	93.75
ME5+EM5	25	25	100	ME14+EM2	13	13	100
ME5+EM12	22	19	86.36	ME14+EM3	16	16	100
ME5+EM15	19	19	100	ME14+EM7	18	17	94.44

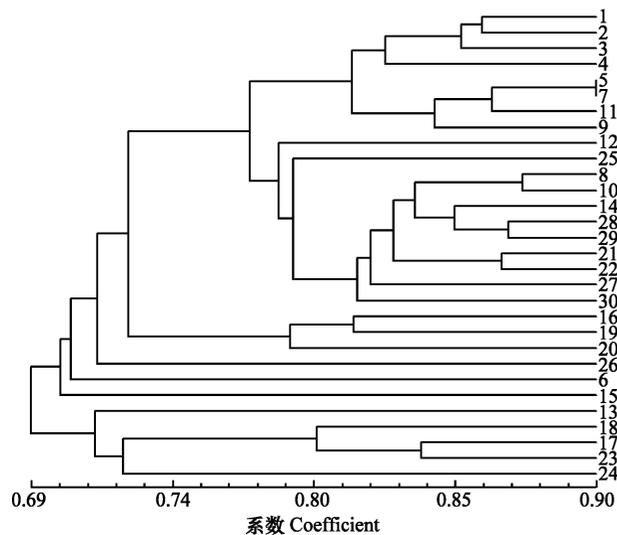


图 2 30 个西瓜枯萎病菌菌株的 SRAP 聚类树状图

Fig. 2 Dendrogram of 30 FON isolates based on SRAP marker clustering analysis

3 讨论

利用 SRAP 进行的遗传多样性分析结果表明, 这 30 个西瓜枯萎病菌的遗传距离变化在 0.69~0.90 之间, 平均为 0.79, 从分子水平上说明群体遗传多样性比较丰富。可能的原因是西瓜枯萎病的病菌主要依靠种子进行传播, 而种子的来源途径广泛, 同一地区的种子可能来源不一致, 不同地区的种子也可能来自同一地区^[11]。

本研究筛选出了 20 对 SRAP 引物组合, 共扩增出 386 条带, 平均每对引物扩增出 19.3 个位点, 多态性比率为 96.11%, 高于苏家等^[12]利用 ISSR-PCR 分子标记技术得到的多态性比率(90.82%), 也高于段会军等^[13]利用 AFLP 分子标记技术得到的多态性比率(33.6%), 表明尖孢镰刀菌基因组 DNA 在 SRAP 分子标记区域的分子遗传多态率高, 且在种内存在丰

富的遗传多样性。但低于李伟^[11]等利用 RAPD-PCR 分子标记技术得到的多态性比率(97.18%)。而段会军等^[14]利用 RAPD、ISSR 和 AFLP 三种分子标记进行对比发现 RAPD 不能将绝大部分菌株分开,说明不同的分子标记技术因为所揭示的遗传位点不同,所以在分类结果上会存在差异。

基于 SRAP 聚类分析结果将各个地区 30 个西瓜枯萎病菌划分为 3 个类群,SRAP 类群的划分与地域之间没有直接的关系。段会军等^[14]用 AFLP 分子标记技术分析表明,尖孢镰刀菌西瓜专化型不同菌株间的亲缘关系与地理来源关系不明显;延涵等^[15]利用 SRAP 分子标记技术分析得出,44 株供试甜瓜枯萎病菌菌株之间的亲缘关系与地理来源没有明显相关性。而田叶韩等^[16]用 SRAP 分子标记技术分析认为尖孢镰刀菌苦瓜专化型不同菌株间的亲缘关系与地理来源有一定的相关性;张述义等^[17]用 ISSR 分子标记分析了 33 株尖孢镰刀菌遗传多样性,表明寄主来源相同的供试菌株间遗传相似性与其地理来源也有一定的相关性。由于本研究采集到的样本有限,若需更全面地了解还需更深更全面的研究分析。

参考文献

- [1] NAVEENKUMAR R, MUTHUKUMAR A, MOHANAPRIYA R. Occurrence, virulence and evaluation of essential oils against *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum* causing wilt of watermelon [J/OL]. International Journal of Plant Research, 2017, 30:4. doi:10.5958/229-4473.2017.00181.1.
- [2] ZHOU X G, EVERTS K L, BRUTON B D. Race 3, a new and highly virulent race of *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum* causing Fusarium wilt in watermelon [J]. Plant Disease, 2010, 94(1):92-98.
- [3] AMARADASA S, SANCHEZ T, BECKHAM K A, et al. First

Report of *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum* race 3 causing wilt of watermelon in Florida, USA [J]. Plant Disease, 2018, 102(5):1029.

- [4] LI G, QUIROS C F. Sequence-related amplified polymorphism (SRAP), a new marker system based on a simple PCR reaction: its application to mapping and gene tagging in Brassica [J]. Theoretical and Applied Genetics, 2001, 103:455-461.
- [5] ANEJA B, YADAV N R, CHAWLA V, et al. Sequence-related amplified polymorphism (SRAP) molecular marker system and its applications in crop improvement [J]. Molecular Breeding, 2012, 30(4):1635-1648.
- [6] GUENNI K, AOUADI M, CHATTI K, et al. Analysis of genetic diversity of Tunisian pistachio (*Pistacia vera* L.) using sequence-related amplified polymorphism (SRAP) markers. [J]. Genetics and Molecular Research, 2016, 15(4):gmr15048760.
- [7] 白玲玲,刘行风,陈政瑜,等.基于 SRAP 标记的黄瓜霜霉菌遗传多样性分析[J].植物保护,2017,43(4):145-150.
- [8] 曾东方,陈盼,何一正,等.冻融法快速提取真菌微量培养物基因组 DNA[J].生物技术,2010,20(6):49-51.
- [9] 马洪平,潘明洪,彭丹丹,等.四川白三叶根瘤菌 SRAP 遗传多样性分析[J].中国草地学报,2016,38(6):36-44.
- [10] 伊六喜,斯钦巴特尔,张辉,等.胡麻种质资源遗传多样性及亲缘关系的 SRAP 分析[J].西北植物学报,2017,37(10):1941-1950.
- [11] 李伟,孙文秀.西瓜枯萎病菌致病型的遗传多样性分析[J].河南农业科学,2008,37(2):70-74.
- [12] 苏家,高增贵,姚远,等.利用 ISSR-PCR 分子标记技术分析瓜类枯萎病病原菌遗传多样性[J].北方园艺,2014(17):97-101.
- [13] 段会军,张彩英,李喜焕,等.河北省西瓜枯萎病菌生理小种鉴定与 AFLP 分析[J].中国农业科学,2007,40(5):925-931.
- [14] 段会军,张彩英,李喜焕,等.基于 RAPD、ISSR 和 AFLP 对西瓜枯萎病菌遗传多样性的评价[J].菌物学报,2008,27(2):267-276.
- [15] 延涵,杨瑞秀,姚远,等.东北地区甜瓜枯萎病菌遗传多样性分析[J].北方园艺,2017(11):130-134.
- [16] 田叶韩,侯圆圆,彭彩云,等.瓜类枯萎病菌遗传多样性和亲缘关系的 SRAP 分析[J].应用生态学报,2017,28(3):947-956.
- [17] 张述义,李新风,韦晓艳,等.33 株尖孢镰刀菌遗传多样性的 ISSR 分析[J].生态学杂志,2013,32(5):1195-1202.

(责任编辑:杨明丽)

(上接 133 页)

- [92] ZHU Shiming, MALMQVIST E, LI Wansha, et al. Insect abundance over Chinese rice fields in relation to environmental parameters, studied with a polarization-sensitive CW near-IR lidar system [J]. Applied Physics B, 2017, 123(7):211.
- [93] 何新江.嵌入式水稻灯诱害虫图像采集与处理系统的研究[D].杭州:浙江理工大学,2016.
- [94] 娄丽霞.基于 Android 的高风险果实蝇图像识别系统研究与实现[D].南昌:江西农业大学,2015.
- [95] MUKUNDARAJAN H, HOL F J H, CASTILLO E A, et al. Using mobile phones as acoustic sensors for high-throughput mosquito surveillance [J]. Elife, 2017, 6:e27854.

[96] 曾娟,杜永均,姜玉英,等.我国农业害虫性诱监测技术的开发和应用[J].植物保护,2015,41(4):9-15.

- [97] CHEN Y, WHY A, BATISTA G, et al. Flying insect classification with inexpensive sensors [J]. Journal of Insect Behavior, 2014, 27(5): 657-677.
- [98] POTAMITIS I, RIGAKIS I. Large aperture optoelectronic devices to record and time-stamp insects' wingbeats [J]. IEEE Sensors Journal, 2016, 16(15): 6053-6061.
- [99] 张洁.基于图像识别的农作物害虫诊断技术研究与应用[D].合肥:中国科学技术大学,2014.

(责任编辑:田喆)