

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

苏 家, 高 增 贵, 姚 远, 刘 限, 王 晓 东, 李 婉 莹

(沈阳农业大学 植物免疫研究所, 辽宁 沈阳 110866)

摘 要:利用 ISSR 分子标记技术对 32 株不同的尖孢镰孢菌进行遗传多样性分析,从遗传多样性角度探讨尖孢镰孢菌专化型。结果表明:11 条引物共扩增出 109 条带,其中多态性条带 99 条,占总条带数的 90.82%,扩增的条带大小为 120~2 000 bp。供试的 32 株尖孢镰孢菌的遗传相似系数在 0.64~0.91,在相似系数 0.705 的条件下菌株被分为 5 个类群。同一类群中,相同寄主菌株之间的遗传相似性与菌株的地理来源无明显的相关性。

关键词:尖孢镰孢菌;ISSR-PCR;遗传多样性

中图分类号:S 436.42 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2014)17-0097-05

瓜类枯萎病又称蔓割病、萎蔫病,是由尖孢镰孢菌(*Fusarium oxysporum*)侵染作物维管束引致的一类萎蔫症典型的土传病害。能够侵染植物的维管束,致使植物枯萎,萎蔫直至死亡^[1-2]。近年来随着保护地瓜类栽培面积的扩大,该病危害日渐加重,损失巨大^[3]。尖孢镰孢菌专化性较强且复杂,瓜类枯萎镰孢菌已报道有 8 个专化型^[4],传统的镰孢菌分类鉴定主要是以形态特征和生理生化指标作为该病原真菌分类鉴定的主要依据,因受多种外界因素的影响,会产生很大的不确定性,利用分子水平的鉴定技术来研究越来越受到重视^[5-6]。ISSR(internal simple sequence repeat)技术的产物多态性较 RFLP、SSR、RAPD 更加丰富,可以提供更多的关于基因组的信息,而且更加稳定可靠,试验重复性更好^[7-10],且 ISSR 标记技术具有高度的灵敏度和遗传多态性,能够区分尖孢镰孢菌种内不同个体分子水平上的遗传差异,可以作为尖孢镰孢菌种内分类鉴定指标^[7,11]。该研究利用 ISSR 分子标记技术系统分析了辽宁省瓜类枯萎病菌遗传多样性,以期对培育抗病品种以及对枯萎病的可持续控制提供理论指导。

第一作者简介:苏家(1987-),女,黑龙江齐齐哈尔人,硕士研究生,研究方向为蔬菜病害。E-mail:baobaoxiang@126.com

责任作者:高增贵(1966-),男,内蒙古准格尔旗人,博士,研究员,博士生导师,研究方向为玉米病害和蔬菜病害生物防治。E-mail:gaozenggui@sina.com

基金项目:沈阳市科技攻关专项资助项目(F12-119-3-00);辽宁省科技攻关资助项目(2011214002)。

收稿日期:2014-03-24

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 供试菌株 采集自辽宁省不同地区,通过组织分离培养、单胞纯化后,选择具代表性菌株 32 个。采集地点、采集编号、寄主名称见表 1。

1.1.2 供试引物 从加拿大哥伦比亚大学公布的 100 条序列中选出 33 个引物,并由上海生工生物工程公司合成。

1.2 试验方法

1.2.1 菌丝的培养 将供试菌株在 PDA 培养基上 28℃ 恒温培养 6 d,然后取菌落边缘生长旺盛的菌丝块接入盛有 100 mL PD 培养液的 250 mL 三角瓶中,28℃、120 r/min 震荡培养 7 d 后,用 2 层纱布过滤并收集菌丝体,去掉多余的水分,冷冻干燥后,用液氮研磨成粉状,分装入离心管,保存到-20℃的冰箱,备用。

1.2.2 基因组 DNA 的提取及电泳检测 研磨好的粉状菌丝采用试剂盒法提取尖孢镰孢菌基因组 DNA,将提取好的 DNA 收集在离心管中,稀释到 5~50 ng 备用。采用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 条带并用紫外凝胶成像系统观察基因组提取效果,照相记录。

1.2.3 供试引物筛选 将提取的 32 个 DNA 混合作为 DNA 模板,利用合成的 ISSR 引物,退火温度在 48~57℃ 范围内设计了 10 个温度梯度。25 μL 反应体系中进行扩增,选取条带较多、信号强、背景清晰的引物。筛选好的引物用于 32 个菌株的 DNA 扩增。

1.2.4 PCR 扩增反应及产物电泳检测 参照黄欣阳^[12] ISSR-PCR 扩增反应程序的方法:95℃ 预变性 3 min,94℃ 变性 45 s,48~57℃ 退火 45 s,72℃ 延伸 2 min,35 个

表 1

供试菌株及来源

Table 1

The tested isolates and their locations

序号 Sequence No.	菌株编号 No. of isolates	寄主 Host	采集地点 Collection sites	序号 Sequence number	菌株编号 No. of isolates	寄主 Host	采集地点 Collection sites
1	FT. AS. 0824	甜瓜	鞍山	17	FT. SY. 0812	甜瓜	沈阳
2	FX. SY. 0830	西瓜	沈阳	18	FT. SY. 1202	甜瓜	沈阳
3	FT. SY. 0506	甜瓜	沈阳	19	FX. 0974	西瓜	新民
4	FT. SY. 0811	甜瓜	沈阳	20	FT. SY. 1203	甜瓜	沈阳
5	FX. 0408	西瓜	新民	21	T. FS. 0809	甜瓜	抚顺
6	FX. 0976	西瓜	新民	22	FH. SY. 0954	黄瓜	沈阳
7	T. FS. 0807	甜瓜	抚顺	23	FT. FS. 0818	甜瓜	抚顺
8	FT. SY. 1211	甜瓜	沈阳	24	FT. SY. 0820	甜瓜	沈阳
9	FT. SY. 0816	甜瓜	沈阳	25	FX. SY. 0831	西瓜	沈阳
10	FT. SY. 0804	甜瓜	沈阳	26	FT. BN. 0101	甜瓜	沈阳
11	FT. SY. 0507	甜瓜	沈阳	27	T. FS. 0801	甜瓜	抚顺
12	FT. SY. 0810	甜瓜	沈阳	28	FT. SY. 0822	甜瓜	沈阳
13	FT. SY. 0808	甜瓜	沈阳	29	FH. AS. 06	黄瓜	鞍山
14	FT. AS. 0825	甜瓜	鞍山	30	FT. SY. 0302	甜瓜	沈阳
15	FT. 0304	甜瓜	沈阳	31	FF. SY. 0101	番茄	沈阳
16	X. FC1001	西瓜	凤城	32	FT. JZ. 0301	甜瓜	锦州

循环;最后 72℃ 延伸 8 min。ISSR 扩增反应体系:PCR 反应体系为 25 μ L,其中包含:2.5 μ L 10 \times PCR Buffer (Mg^{2+} free);2.0 μ L $MgCl_2$;2.0 μ L 2.5 mM dNTP;1 μ L 50 μ M ISSR 引物;0.2 μ L 5 U/ μ L *Taq* 聚合酶;1.0 μ L 30 ng/ μ L DNA;16.3 μ L dd H_2O 。电泳检测:采用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测。称取 0.45 g 琼脂糖,量取 30 mL 的 1 \times TAE 用微波炉加热使胶完全融化,混匀,待凝胶温度在 55℃ 左右的时候加入 4 μ L 核酸染料,混匀。将电泳槽安装好梳子,将胶倒入槽中,冷却 30 min 后,将梳子拔出,将胶放入电泳槽中,加入 1 \times TAE 使胶块完全淹没。吸取 4 μ L DNA 溶液,加入 2 μ L 的核酸染料,充分混匀后加入到点样孔中,加入 5 μ L Marker DL 2 000 (天根生物公司),打开电泳仪,电压 90 V,电泳时间为 40 min。电泳结束后在紫外凝胶成像系统观察拍照。

1.2.5 构建系统进化树 电泳图谱中每条扩增带均代表了引物与模板 DNA 互补的 1 个位点,可记为 1 个分子标记。将 PCR 扩增的 DNA 条带转换成二进制数据,记录每条引物对每个菌株的扩增结果,电泳图谱中相同迁移位置上有扩增带的记为 1,无带的记为 0。利用 NTSYSpc (Version 2.10e) 软件计算供试菌株间的遗传相似系数,并进行聚类 (UPGMA) 分析。

2 结果与分析

2.1 尖孢镰孢菌的形态特征

按照 Booth^[1] 的分类系统结合《农业植物病理学》^[13] 等鉴定方法对镰孢菌进行形态学鉴定。尖孢镰孢菌属的特征为菌落的气生菌丝白色,绒毛状,在 PDA 培养基上底部呈淡粉色或淡紫色。小型分生孢子无色,产生快,量大,长椭圆形,单胞;大型分生孢子无色,产生慢,量少,纺锤形或镰刀形,1~5 个隔膜(多为 3 个)。

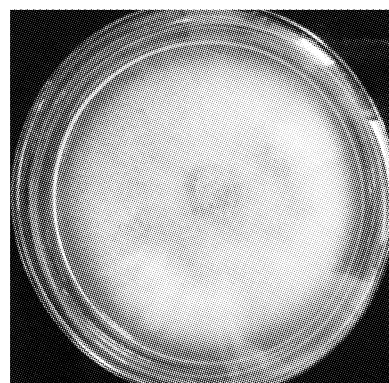


图 1 尖孢镰孢菌菌落生长情况

Fig. 1 Hypha form of *F. oxysporum*

图 2 尖孢镰孢菌大型分生孢子和小分生孢子

Fig. 2 Microconidia and macroconidia of *F. oxysporum*

2.2 基因组 DNA 的提取

将 32 株病原菌用试剂盒法提取 DNA,经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测,由图 3 可知,32 个样品均可扩增出单一清晰的 DNA 条带,无弥散现象。

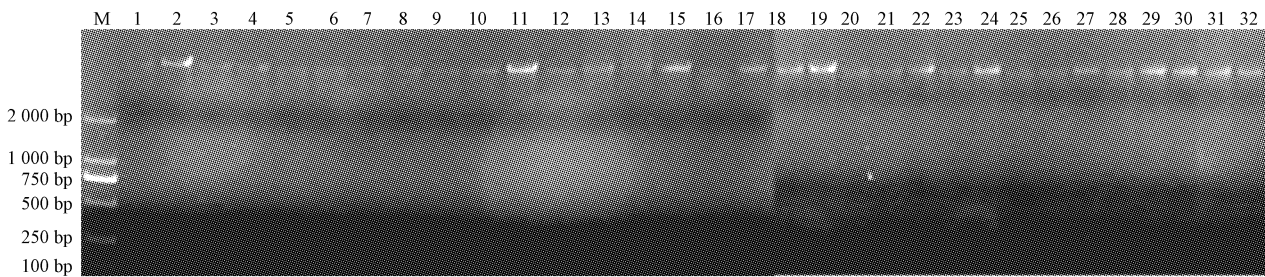


图 3 尖孢镰孢菌基因组 DNA 电泳检测结果
Fig. 3 The genomic DNA electrophoresis results of *Fusarium* sp.

2.3 ISSR-PCR 扩增结果

对分离自不同地区的 3 种瓜类作物枯萎病株的 32 株尖孢镰孢菌的 DNA 进行 ISSR-PCR 扩增,从 33 个引物中筛选出多态性明显,扩增条带清晰的 11 条引物,包括 UBC808、UBC840、UBC855、UBC856、UBC885、UBC841(图 4)、UBC884(图 5)、UBC889(图 6)、UBC887、

UBC835、UBC891(表 2),不同引物共扩增出 109 条条带,平均每个引物扩增出 9.91 条条带。扩增片段的 DNA 分子量为 120~2 000 bp。其中 UBC891 号引物产生的条带最多,达到 14 条,UBC840 号引物产生的条带最少,为 7 条。退火温度范围为 48~57℃。

表 2 11 个 ISSR 引物对尖孢镰孢菌的扩增结果

Table 2 Amplification results of <i>F. oxysporum</i> isolates with 11 ISSR primers				
引物 Primers	序列(5'~3') Sequence(5'~3')	退火温度 Temperature/℃	扩增条带 No. of amplified bands/条	多态性条带 No. of polymorphic bands/条
1 UBC808	AGAGAGAGAGAGAGAGC	53	10	7
2 UBC835	AGAGAGAGAGAGAGAGYC	52	9	9
3 UBC840	GAGAGAGAGAGAGAGAYT	52	7	7
4 UBC841	GAGAGAGAGAGAGAGACTC	55	10	7
5 UBC855	ACACACACACACACACYT	51	11	9
6 UBC856	ACACACACACACACACYA	56	9	9
7 UBC884	HBHAGAGAGAGAGAGAG	57	10	9
8 UBC885	BHBGAGAGAGAGAGAGA	52	10	10
9 UBC887	AGTACGAGTTCTCTCTCTCTCTC	48	8	7
10 UBC889	DBDACACACACACACAC	50	11	11
11 UBC891	ACTACGACTTGTGTGTGTGTGTG	57	14	14

2.4 聚类分析

根据 ISSR-PCR 扩增多态性,利用 NTSYS 2.10e 软件的 UPGMA 法对 32 株供试菌株建立聚类树状图(图 7)。聚类结果表明,供试的 32 株尖孢镰孢菌菌株类群间的遗传相似系数在 0.64~0.91。当遗传相似系数为 0.705 时,供试菌株可被分成 5 个类群,即 IG1、IG2、IG3、IG4、IG5。其中在相似系数为 0.91 时,菌株 FT. SY. 1202 与菌株 FT. SY. 0812 被归为一类,说明来自沈阳的

2 个菌株遗传变异较小,具有较相近的亲缘关系。在相似系数为 0.844 处,菌株 FX. 0976 和 FX. 0408 被归为一类。在类群 IG1 中相同寄主,相同来源地的菌株,但被分在了不同的亚群中,如菌株 FT. SY. 0302 与菌株 FT. SY. 0822。而有的菌株来源于相同的寄主,但地理来源不同,却被化分在了同一个亚群中,如菌株 T. FS. 0801 与北宁 FT. BN. 0101。可见菌株的分类、寄主以及菌株的地理来源三者是没有明显的关系^[14]。

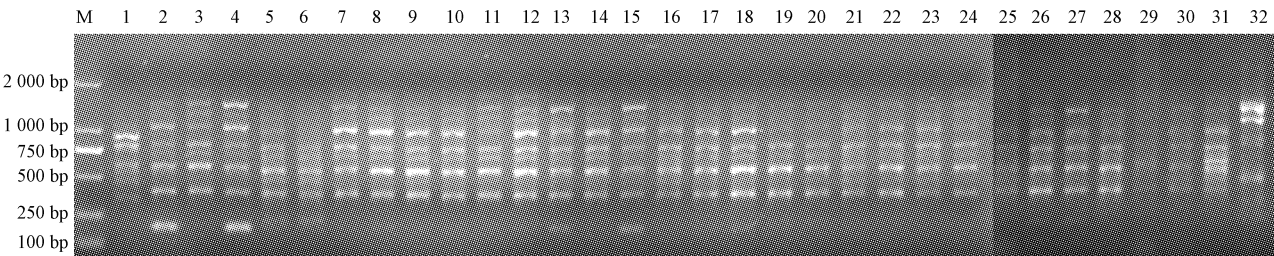


图 4 引物 841 扩增结果
Fig. 4 Amplification results of primer 841

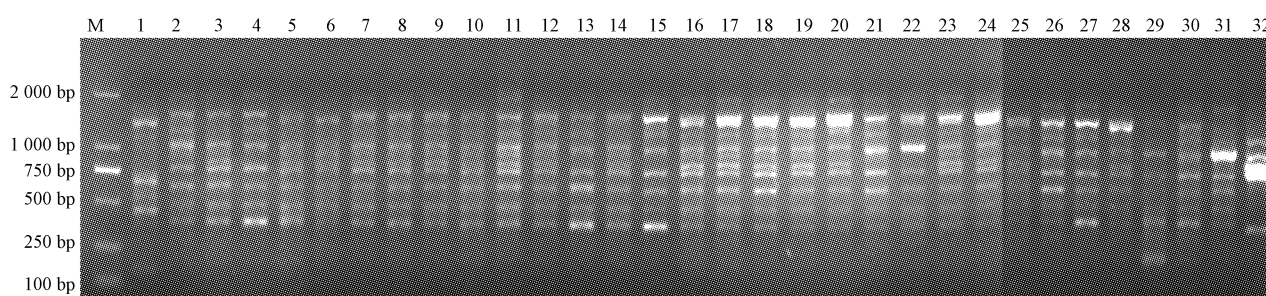


图 5 引物 884 扩增结果

Fig. 5 Amplification results of primer 884

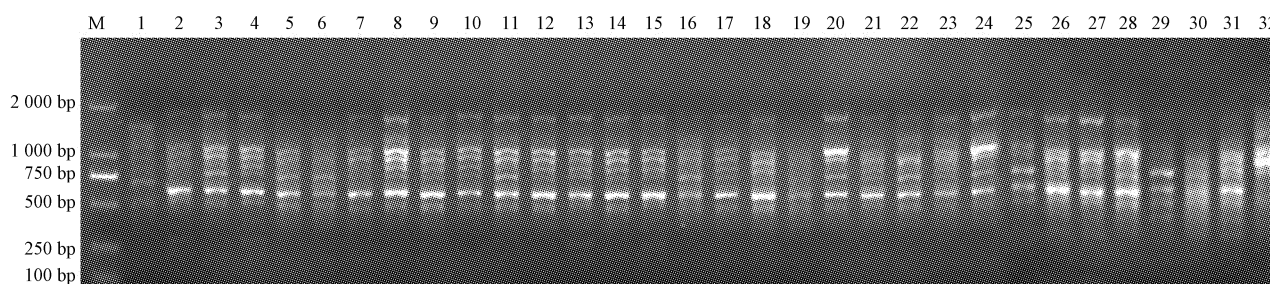


图 6 引物 889 扩增结果

Fig. 6 Amplification results of primer 889

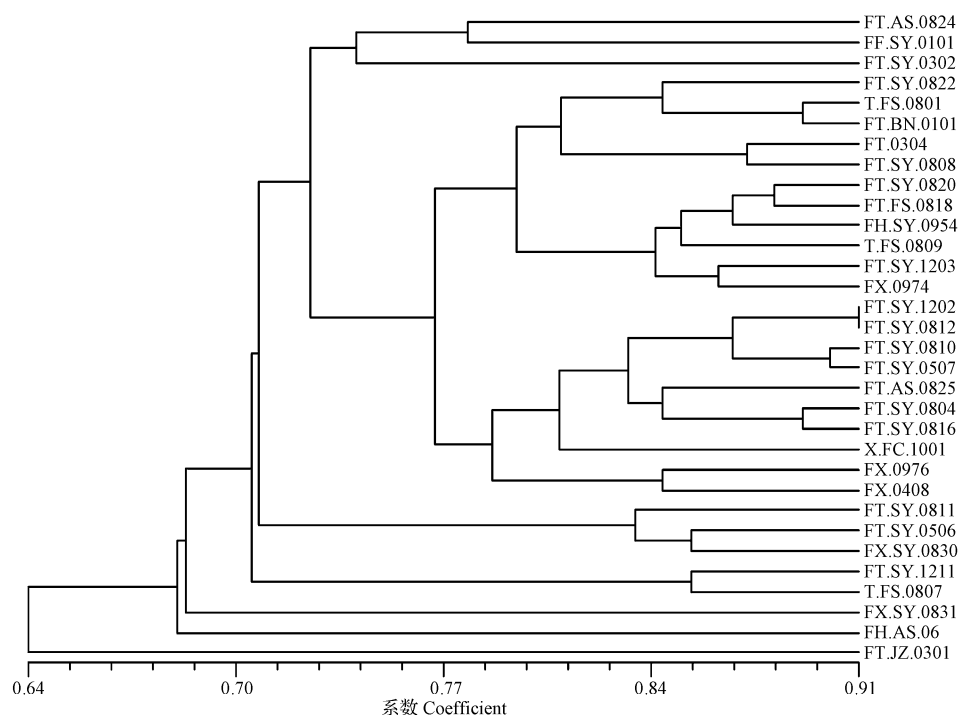


图 7 尖孢镰刀菌 32 个菌株的 ISSR-PCR 聚类分析

Fig. 7 Dendrograms of 32 *F. oxysporum* isolates with ISSR PCR

3 结论与讨论

该研究利用 11 条引物对 32 株尖孢镰孢菌进行 ISSR-PCR 扩增, 扩增条带清晰, 平均每条引物可产生

9.91 条条带, 多态性条带占总条带数的 90.82%。说明尖孢镰孢菌的基因型较多, 遗传资源比较丰富。聚类分析表明, 在相似系数为 0.91 时, 供试的 32 株尖孢镰孢菌能够被全部区分开。说明可以利用此技术对尖孢镰孢

菌种内遗传多态性进行研究分析。张述义等^[11]尖孢镰孢菌种内菌株间的遗传相似系数大于 0.6,同时李新风等^[15]和王建明等^[16]也得出相近的结论。研究表明,32 个菌株间的遗传相似系数为 0.64,可以推测尖孢镰孢菌种内的遗传相似系数大于 0.6。筛选的引物中(AG)_n或者(GA)_n个数占到了 11 条引物的 54%, (AC)_n个数占到了总引物数的 27%。可以推测尖孢镰孢菌中含有丰富的二核苷酸串联重复序列 AG(GA)和 AC。这与刘珊珊^[17]研究结论一致。IG5 中包括 FT. JZ. 0301,其它的甜瓜菌株都分布在 IG1~IG4 中。说明寄主为甜瓜的菌株 FT. JZ. 0301 与其它地区的甜瓜菌株遗传相似系数最小,亲缘关系最远,或许是由于来自于锦州的菌株 FT. JZ. 0301 的地理位置较其它菌株的来源地更远。这与苑琳等^[18]指出胡麻枯萎病菌种内 ISSR 类群与地理来源存在相关性的结论较相似。该研究表明在遗传相似系数为 0.854、0.874 处,菌株 FT. SY. 0506 和 FX. SY. 0830 被归为一类,FT. SY1203 和 FX. 0974 被归为一类。可见来自甜瓜与西瓜枯萎病菌的遗传背景比较相似。

参考文献

- [1] Booth C. 镰刀菌属[M]. 陈其煥,译. 北京:中国农业出版社,1988.
- [2] 肖荣凤. 瓜类尖孢镰刀菌生理分化特性研究[D]. 福州:福建农林大学,2007.
- [3] 刘志恒. 瓜类枯萎病[J]. 新农业,2002(5):42-43.
- [4] 戚佩坤. 瓜类枯萎病菌专化型研究简介[J]. 华南农业大学学报,1995,16(4):110-114.
- [5] 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.
- [6] 李蕊倩,何瑞,张跃兵,等. 镰刀菌 ISSR 标记体系的建立及遗传多样性分析[J]. 中国农业科学,2009,42(9):3139-3146.
- [7] Bayraktar H, Dolar F S, Maden S. Use of RAPD and ISSR markers in detection of genetic variation and population structure among *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* isolates on chickpea in Turkey[J]. Journal of Phytopathology, 2008, 156:146-154.
- [8] Ramesh V, Kantety, Zeng X P, et al. Assessment of genetic diversity in dent and popcorn (*Zea mays* L.) inbred lines using inter-simple sequence repeat (ISSR) amplification [J]. Molecular Breeding, 1995, 1:365-373.
- [9] Ratnaparkhe M B, Tekeoglu M, Muehlbauer F J. Inter-simple-sequence-repeat (ISSR) polymorphisms are useful for finding markers associated with disease resistance gene clusters [J]. Theor Appl Genet, 1998, 97:515-519.
- [10] 王建波. ISSR 分子标记及其在植物遗传学研究中的应用[J]. 遗传, 2002, 24(5):613-616.
- [11] 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.
- [12] 黄欣阳. 中国辣椒叶斑病病原学及分子检测研究[D]. 沈阳:沈阳农业大学,2013.
- [13] 董金皋. 农业植物病理学[M]. 2 版. 北京:中国农业出版社,2007.
- [14] Wang S B, Miao X X, Zhao W G, et al. Genetic diversity and population structure among strains of the entomopathogenic fungus, *Beauveria bassiana*, as revealed by inter-simple sequence repeats (ISSR) [J]. Mycological Research, 2005, 109(12):1364-1372.
- [15] 李新风,张光明,畅引东,等. 21 株马特组镰孢菌遗传多样性的 ISSR 分析[J]. 应用生态学报,2012,23(5):1339-1344.
- [16] 王建明,李蕊倩,畅引东,等. 尖孢镰刀菌及芬芳镰刀菌遗传多样性的 ISSR 分析[J]. 植物病理学报,2001,41(4):337-344.
- [17] 刘姗姗. 胡麻(*Linum usitatissimum* L.)枯萎病原真菌鉴定及 ISSR 分子标记分析[D]. 呼和浩特:内蒙古大学,2012.
- [18] 苑琳,刘姗姗,路福平,等. 尖孢镰刀菌胡麻专化型(*Fusarium oxysporum* f. sp. *lini*) ISSR 标记聚类分析[J]. 中国油料作物学报,2012,34(2):15-21.

Assessment of Genetic Diversity Among *Fusarium* Wilt Pathogens of the Cucurbits Detected by ISSR Markers

SU Jia, GAO Zeng-gui, YAO Yuan, LIU Xian, WANG Xiao-dong, LI Wan-ying

(Institute of Plant Immunology, Shenyang Agricultural University, Shenyang, Liaoning 110866)

Abstract: Genetic variation among 32 *Fusarium oxysporum* isolates was analysed by using inter-simple sequence repeat (ISSR) polymorphism, forma specialis of *Fusarium oxysporum* Schl. were researched from the perspective of genetic diversity. The results showed that a total of 109 bands were amplified with 11 ISSR primers, 99 bands were polymorphic, the rate was 90.82%. The amplified fragment sizes ranged from 120 to 2 000 bp. The genetic similarity among 32 *F. oxysporum* isolates ranged from 0.64 to 0.91 and all the strains could be divided into 5 groups at the level of 0.705. In the same group, there was no distinct relation between the genetic similarity and geographic origin of the strains isolated from the same hosts.

Keywords: *Fusarium oxysporum*; ISSR-PCR; genetic diversity