

DOI:10.11937/bfyy.201711026

# 东北地区甜瓜枯萎病菌遗传多样性分析

延 涵, 杨瑞秀, 姚 远, 张 璐, 王素娜, 高增贵

(沈阳农业大学 植物免疫研究所, 辽宁 沈阳 110866)

**摘 要:**以 44 株来自东北不同地区甜瓜枯萎病株的尖孢镰孢菌为试材, 采用 SRAP 分子标记技术, 研究了甜瓜枯萎病菌的遗传多样性, 以探究其遗传多样性与地理来源的关系。结果表明: 从 100 对 SRAP 引物中筛选出多态性强、重复性好的 8 组 SRAP 引物组合, 共扩增出 53 条条带, 其中多态性条带 53 条, 多态性比率为 100%, 平均每对引物扩增得到 6.63 条多态性条带。通过聚类分析, 44 株供试菌株相似系数为 0.47~0.98, 不同菌株之间的亲缘关系较近, 遗传多样性较为丰富, 但是仍存在遗传差异, 且与地理来源没有明显的相关性。

**关键词:**甜瓜; 尖孢镰孢菌; 遗传多样性; SRAP; 聚类分析

**中图分类号:**S 652.603.2 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2017)11-0130-05

甜瓜枯萎病是由尖孢镰孢菌甜瓜专化型(*F. oxysporum* f. sp. *meloni*)引起的一种土壤传播病害, 该病从甜瓜的苗期到成株期均可发病, 直接导致瓜秧枯萎死亡<sup>[1]</sup>。随着我国甜瓜种植面积的不断加大, 由此带来的连作重茬等导致甜瓜病害日益严重, 甜瓜枯萎病已成为造成甜瓜减产的重要因素之一, 该病害正迅速地蔓延、扩张, 在全国各地的甜瓜种植区均有发生, 尤其在东北三省及其他我国主要的甜瓜种植区发生严重, 对生产带来了不可估量的影响和损失<sup>[2]</sup>。尖孢镰孢菌具有复杂的遗传多样性, 增加了甜瓜枯萎病的防治难度。相关扩增多态性(SRAP)是由 LI 等<sup>[3]</sup>开发的一种基于 PCR 的分子标记技术, SRAP 技术已经广泛用于植物以及植物病原菌的遗传多样性分析, 并有许多相关报道<sup>[3-6]</sup>。SRAP 标记技术具有简便快捷、多态性高、稳定等特点, 是进行遗传多样性研究、种质鉴定、遗传连锁图的构建、基因连锁标记的寻找与基因定位和比较基因组学研究等的有效工具, 现已被广泛应用于西瓜、甜瓜、西葫芦、黄瓜等多种作物的遗传多样性分析<sup>[7-8]</sup>。该研究采用 SRAP 分子标记技术, 对从甜瓜

枯萎病病株上分离得到的尖孢镰孢菌进行遗传多样性分析, 以期揭示东北地区甜瓜枯萎病相关的尖孢镰孢菌的遗传多样性水平, 为监测与控制甜瓜枯萎病的流行、抗病育种、生物防治等提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

供试菌株为分离自东北地区甜瓜枯萎病株的尖孢镰孢菌, 菌株分离信息见表 1。

表 1 供试菌株

Table 1			Tested isolates in the study		
序号 No.	菌株编号 Code of isolate	采集地点 Collection site	序号 No.	菌株编号 Code of isolate	采集地点 Collection site
1	FC-01	辽宁省凤城市	23	QH-02	黑龙江省齐齐哈尔市
2	FC-02	辽宁省凤城市	24	QH-03	黑龙江省齐齐哈尔市
3	FC-03	辽宁省凤城市	25	MDJ-01	黑龙江省牡丹江市
4	SY-01	辽宁省沈阳市	26	MDJ-02	黑龙江省牡丹江市
5	SY-02	辽宁省沈阳市	27	MDJ-03	黑龙江省牡丹江市
6	SY-03	辽宁省沈阳市	28	MDJ-04	黑龙江省牡丹江市
7	SY-04	辽宁省沈阳市	29	MDJ-05	黑龙江省牡丹江市
8	JZ-01	辽宁省锦州市	30	QTH-01	黑龙江省七台河市
9	BX-01	辽宁省本溪市	31	QTH-02	黑龙江省七台河市
10	FX-01	辽宁省阜新市	32	SYS-01	黑龙江省双鸭山市
11	LY-01	吉林省辽源市	33	SYS-02	黑龙江省双鸭山市
12	SY-01	吉林省松原市	34	JMS-01	黑龙江省佳木斯市
13	YJ-01	吉林省延吉市	35	JMS-02	黑龙江省佳木斯市
14	YJ-02	吉林省延吉市	36	JMS-03	黑龙江省佳木斯市
15	YJ-03	吉林省延吉市	37	JMS-04	黑龙江省佳木斯市
16	YJ-04	吉林省延吉市	38	SH-01	黑龙江省绥化市
17	LJ-01	吉林省龙井市	39	SH-02	黑龙江省绥化市
18	LJ-02	吉林省龙井市	40	SH-03	黑龙江省绥化市
19	LJ-03	吉林省龙井市	41	DQ-01	黑龙江省大庆市
20	WQ-01	吉林省汪清县	42	HEB-01	黑龙江省哈尔滨市
21	HC-01	吉林省辉春市	43	HEB-02	黑龙江省哈尔滨市
22	QH-01	黑龙江省齐齐哈尔市	44	TL-01	内蒙古自治区通辽

**第一作者简介:**延涵(1992-), 女, 内蒙古包头人, 硕士研究生, 研究方向为甜瓜枯萎病。E-mail:18609830557@163.com

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

**基金项目:**公益性行业(农业)科研专项经费资助项目(201503110-04); 辽宁省联合基金资助项目(2015020759)。

**收稿日期:**2017-02-03

PDA 培养基:马铃薯 200 g,葡萄糖 20 g,琼脂 18 g,蒸馏水 1 000 mL。

## 1.2 试验方法

1.2.1 菌株培养 各菌株在 PDA 培养基上培养,保持培养箱温度为 28 ℃。

1.2.2 DNA 提取 将 PDA 上培养的供试菌株用 5 mm 打孔器打取菌饼 3 枚,接种于 PDA 培养基中,28 ℃振荡培养 5 d 后,用灭菌的双层纱布过滤出菌丝,并用无菌水冲洗 2 次,用滤纸吸干菌体表面水分后,真空冷冻干燥,研磨成粉末,−80 ℃保存。利用植物 DNA 提取试剂盒(TaKaRa,大连)提取 44 个菌株的 DNA,将提取产物经 1%琼脂糖凝胶 80 V 稳压电泳 30 min,并使用微量分光光度计检测其浓度,−20 ℃保存备用。

1.2.3 SRAP 引物筛选 委托上海生工生物公司合成 10 条正向及 10 条反向随机引物(表 2),共搭配形成 100 对引物<sup>[9-10]</sup>。从供试菌株中随机选取 13 株进行 PCR 扩增,筛选出条带清晰、多态性丰富且稳定的 8 对引物组合进行 SRAP 分析。

1.2.4 SRAP 分析 SRAP 扩增反应体系:总体积 20 μL,1.0 U *Taq* DNA 聚合酶,1.5 mmol · L<sup>-1</sup> MgCl<sub>2</sub>,0.2 mmol · L<sup>-1</sup> 4×dNTP,上下游引物各 0.5 μmol · L<sup>-1</sup>,20 ng DNA 模版。扩增反应程序为:94 ℃预变性 5 min;94 ℃变性 1 min,35 ℃复性 1 min,72 ℃延伸 1 min,共 5 个循环;94 ℃变性 1 min,50 ℃复性 1 min,72 ℃延伸 1 min,共 35 个循环;72 ℃延伸 10 min。PCR 扩增产物用 2%的琼脂糖凝

胶分离,在凝胶成像仪采集分离图像,记录试验数据。

## 1.3 数据分析

对供试菌株的 PCR 扩增电泳图谱进行分析,同一迁移率位置上,有条带记作‘1’,没有条带记作‘0’,并组成二元数据矩阵,采用 NYSYS-2.1 软件进行遗传多样性分析,采用 UPGMA 方法生成聚类分析图。

表 2 SRAP 引物序列

Table 2 Sequences of SRAP primers

名称	上游引物	名称	下游引物
Name	Forward primers(5'-3')	Name	Reverse primers(3'-5')
Me1	TGAGTCCAAACCGGATA	Em1	GACTGCGTACGAATTAAT
Me2	TGAGTCCAAACCGGAGC	Em2	GACTGCGTACGAATTTGC
Me3	TGAGTCCAAACCGGAGT	Em3	GACTGCGTACGAATTGAC
Me4	TGAGTCCAAACCGGATT'	Em4	GACTGCGTACGAATTTGA
Me5	TGAGTCCAAACCGGAAG	Em5	GACTGCGTACGAATTAAC
Me6	TGAGTCCAAACCGGTAA	Em6	GACTGCGTACGAATTGCA
Me7	TGAGTCCAAACCGGACT	Em7	GACTGCGTACGAATTCAG
Me8	TGAGTCCAAACCGGATG	Em8	GACTGCGTACGAATTCTG
Me9	TGAGTCCAAACCGGACA	Em9	GACTGCGTACGAATTTCA
Me10	TGAGTCCAAACCGGGAT	Em10	GACTGCGTACGAATTATG

## 2 结果与分析

### 2.1 SRAP 扩增

对 100 对 SRAP 引物组合进行筛选,扩增出了 8 条带清晰、多态性丰富、分布均匀且稳定性好条带,可以用于全部菌株的 SRAP 分析。不同引物组合扩增出 4~8 条带,平均每对引物组合扩增出 6.63 条带,多态百分率均为 100%。同时对 PCR 反应的退火温度进行了优化(表 3)。为部分引物组合对供试菌株的扩增结果。

表 3 8 对 SRAP 引物组合对尖孢镰孢菌的扩增结果

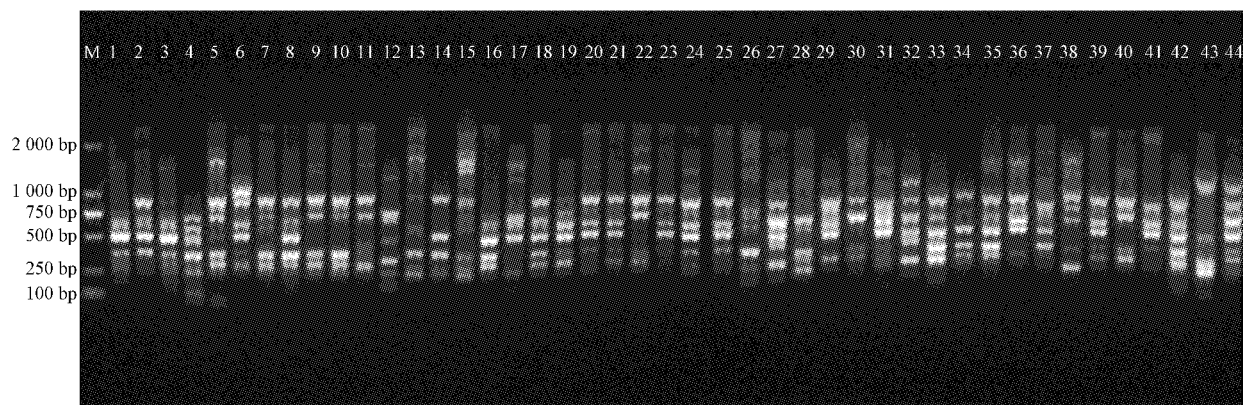
Table 3 Amplification results of *F. oxysporum* isolates with 8 pairs of SRAP primer combinations

引物组合	第一轮扩增退火温度	第二轮扩增退火温度	总位点数	多态位点数	多态位点百分率
Primer combinations	The first round of the annealing temperature/℃	The second round of the annealing temperature/℃	No. of loci	No. of polymorphic loci	Percentage of polymorphic loci/%
Me1/Em3	31.0	54.4	4	4	100
Me4/Em5	34.4	59.7	7	7	100
Me5/Em7	32.0	56.8	8	8	100
Me7/Em7	38.0	54.4	7	7	100
Me8/Em2	33.2	55.6	7	7	100
Me8/Em7	35.6	59.0	7	7	100
Me8/Em10	36.8	55.0	7	7	100
Me9/Em4	35.6	59.0	6	6	100

### 2.2 聚类分析

对 8 对引物组合的扩增结果进行聚类分析,绘制树状聚类图。由图 3 可知,44 株供试的尖孢镰孢菌菌株种群间的相似遗传系数在 0.47~0.98,在遗传相似系数 0.587 处,供试菌株被分为 5 个类群。其

中,遗传相似系数为 0.98 时,FC-01 和 FC-03 被归为一类,说明来自辽宁省凤城市的 2 株菌株遗传变异较小。在 A 类群中,共有 29 株菌株被聚为一类,分别来自辽宁省凤城市、沈阳市,吉林省延吉市、龙井市,黑龙江省齐齐哈尔市、哈尔滨市、绥化市等地,表



注:M, DL 2 000 Marker; 1~44, 菌株编号, 同表 1。下同。

Note: M, DL 2 000 Marker; 1~44, Isolate code in Table 1. The same as below.

图 1 引物组合 Me4/Em5 的扩增结果

Fig. 1 SRAP amplification result by primer Me4/Em5

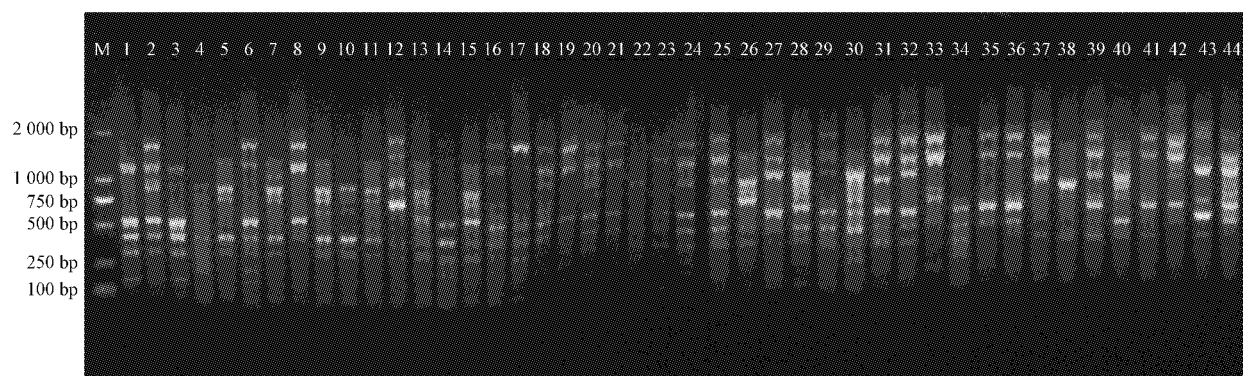


图 2 引物组合 Me8/Em10 的扩增结果

Fig. 2 SRAP amplification result by primer Me8/Em10

明来自东北不同地区的菌株亲缘关系较近,遗传变异性较小。在 B 类群中,来自辽宁省本溪市的 BX-01、辽宁省阜新市的 FX-01、黑龙江省七台河市的 QTH-01 以及来自黑龙江省双鸭山市的 SYS-02 聚成了一个类群,这 4 个菌株的遗传变异性较小,其中 BX-01 单独聚为一类。C 类群被分为 2 个亚群,辽宁省沈阳市的 SY-01 和黑龙江省绥化市的 SH-02 在一个亚群,亲缘关系较近。黑龙江省哈尔滨市的 HEB-02 和黑龙江省大庆市的 DQ-01 分别单独聚类为 D 类群和 E 类群。聚类分析结果表明,不同地理来源的菌株可以被聚为 5 个类群,说明了地理位置对菌株的遗传多样性影响较小,尖孢镰孢菌的遗传基础与地理来源的相关性并不严格,但是不同地理来源的菌株仍有一定的差异性。

### 3 讨论

目前已有多种分子标记技术(AFLP、RAPD、

ISSR、UP-PCR 等)应用于尖孢镰孢菌的遗传多样性研究,但是这些分子标记技术对 DNA 模板质量要求高、对浓度变化不敏感、或者易受环境和人为操作影响。SRAP 作为一种新型的分子标记技术,在甜瓜枯萎病菌的研究中具有较高的多态性,较好的稳定性,且产物多、信息量大、操作简便、引物通用,无需基因组或者转录组信息就能获得大量标记<sup>[11-12]</sup>。SRAP 分子标记技术可以用于甜瓜枯萎病菌遗传多样性及群体遗传结构的研究,能够客观的反映供试菌株的遗传关系<sup>[13-14]</sup>。该研究利用 SRAP 标记对采集自东北地区的 44 株甜瓜枯萎病致病的尖孢镰孢菌进行遗传多样性分析,结果表明,扩增产物清晰稳定,在不同菌株之间能够扩增出多态性较高的 DNA 片段。

SRAP 技术已广泛应用于真菌的遗传多样性研究,有关植物病原真菌的 SRAP 聚类群与菌株地理

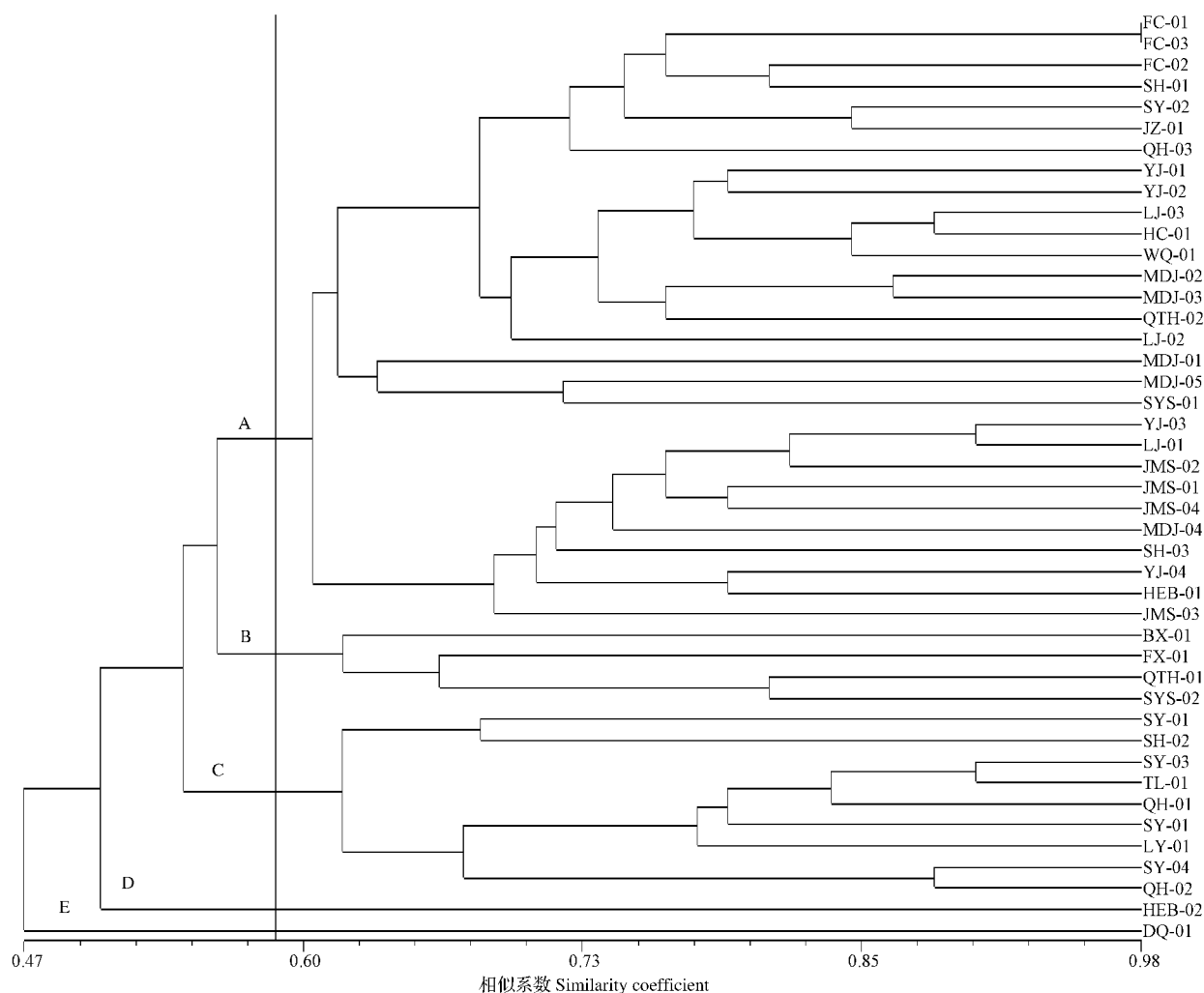


图3 44株尖孢镰孢菌的SRAP-PCR聚类分析

Fig. 3 Cluster analysis of 44 *F. oxysporum* isolates with SRAP-PCR

来源的关系有报道是相关的<sup>[15-16]</sup>。但多数报道无明显的相关性。该试验中8对SRAP引物组合对供试44株尖孢镰孢菌扩增结果表明,其相似系数在0.47~0.98,东北地区的甜瓜枯萎病种群的遗传多样性较为丰富,各菌株间的遗传相似性与其地理来源没有明显的相关性。这一结果与苏家等<sup>[17]</sup>采用ISSR分子标记技术研究尖孢镰孢菌菌群结构的结果较为相似,与李其利等<sup>[18]</sup>采用ISSR技术研究西甜瓜枯萎病菌群结构的结果较为相似。由于该研究中采集到的病菌数量有限只能对尖孢镰孢菌作初步划分,若对其进一步更细致地划分尚需进行相关的鉴定工作和更全面的比较研究。

#### 参考文献

- [1] 张天华,房焕香.甜瓜常见病害的综合防治技术[J].河南农业,2015(5):29-30.
- [2] 王献慧,魏林,梁志怀,等.镰刀菌属遗传多样性的ISSR分析[J].长江蔬菜,2012(16):12-15.
- [3] 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(2): 455-461.
- [4] CASTONGUAY Y, CLOUTIER J, BERTRAND A, et al. SRAP polymorphisms associated with superior freezing tolerance in alfalfa (*Medicago sativa* spp. *sativa*) [J]. Theoretical and Applied Genetics, 2010, 120(8): 1611.
- [5] CHEN B Y, HU Q, DIXELIUS C, et al. Genetic diversity in *Sclerotinia sclerotiorum* assessed with SRAP markers [J]. Biodiversity Science, 2010, 18(5): 509-515.
- [6] PASQUALI M, KOMJATI H, LEE D, et al. SRAP technique efficiently generates polymorphisms in *Puccinia striiformis* isolates [J]. Journal of Phytopathology, 2010, 158(10): 708-711.
- [7] 彭邵峰,张党权,陈永忠,等.14个油茶良种遗传多样性的SRAP分析[J].中南林业科技大学学报,2011,31(1):80-85.
- [8] ANEJ A 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.

[9] MA Y, QU S, XU X, et al. Genetic diversity analysis of Klotz: Using SRAP marker[J]. American Journal of Plant Sciences, 2015(18): 2860-2866.

[10] CHEN S Y, DAI T X, CHANG Y T, et al. Genetic diversity among *Ocimum* species based on ISSR, RAPD and SRAP markers[J]. Australian Journal of Crop Science, 2013(10): 34-38.

[11] 王瑜, 袁庆华, 李向林, 等. 与苜蓿褐斑病(CLS)抗性基因连锁的 SRAP 标记研究[J]. 中国农业科学, 2010, 43(2): 438-442.

[12] VALDEZ-OJEDA R, JAMES-KAY A, KU-CAUICH J R. Genetic relationships among a collection of *Musa*, germplasm by fluorescent-labeled SRAP[J]. Tree Genetics and Genomes, 2014, 10(3): 465-476.

[13] 吴莺莺, 彭方仁, 郝明灼, 等. 油茶 SRAP-PCR 反应体系的建立[J]. 南京林业大学学报(自然科学版), 2011, 35(5): 112-116.

[14] TANG L, XIAO Y, LI L, et al. Analysis of genetic diversity among Chinese *Auricularia auricular*: Cultivars using combined ISSR and SRAP markers[J]. Current Microbiology, 2010, 61(2): 132-140.

[15] 孙祖霞, 刘兆磊, 陈素梅, 等. 荷花 SRAP-PCR 反应体系的优化与确立[J]. 南京农业大学学报, 2011, 34(6): 53-58.

[16] PADMAKAR B, KANUPRIYA C, LATHA P M, et al. Development of SRAP and SSR marker-based genetic linkage maps of guava (*Psidium guajava* L.)[J]. Scientia Horticulturae, 2015, 192: 158-165.

[17] 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原菌遗传多样性[J]. 北方园艺, 2014(17): 97-101.

[18] 李其利, 胡风云, 郭堂勋, 等. 利用 ISSR 初步分析广西西瓜蔓枯病菌的遗传多样性[J]. 南方农业学报, 2014, 45(1): 49-52.

## Diversity Analysis of *Fusarium oxysporum* in Northeast of China

YAN Han, YANG Ruixiu, YAO Yuan, ZHANG Lu, WANG Suna, GAO Zenggui  
(College of Protection, Shenyang Agricultural University, Shenyang, Liaoning 110866)

**Abstract:** Forty four isolates *Fusarium oxysporum* from melon in various areas of the Northeast were used as test materials, the genetic diversity were analyzed by SRAP, in order to explore the relationship between genetic diversity and geographical origin. The results indicated that 8 pairs primers which had rich product and high polymorphism were selected, generated a total of 53 reproducible bands, 53 of which were polymorphic, and similarity coefficient was 100%, with an average of 6.63 for each pair of primers. By cluster analysis, the similarity coefficients of 44 strains *Fusarium oxysporum* were ranged from 0.47 to 0.98, rich genetic variation existed among the tested isolates and there was no correlation between SRAP group and the geographic origin.

**Keywords:** melon; *Fusarium oxysporum*; genetic diversity; SRAP; cluster analysis

## 甜瓜的食用禁忌

## 知识窗

1. 凡脾胃虚寒, 腹胀便溏者忌食。
2. 有吐血、咳血病史患者, 胃溃疡及心脏病者宜慎食。
3. 甜瓜不宜与田螺、螃蟹、油饼等共同食用。
4. 忌用菜刀削甜瓜。因为菜刀常接触生肉、鱼、生蔬菜, 会把寄生虫或寄生虫卵带到甜瓜上。
5. 忌饭后立即吃甜瓜。饭后立即吃甜瓜, 会造成胀气和便秘。因此, 吃甜瓜宜在饭后 2 h 内或饭前 1 h。
6. 忌食用甜瓜过多。有人认为甜瓜营养丰富, 就大量食用甜瓜, 其实这是不科学的。尽管甜瓜的营养再丰富, 但营养并不全面, 尤其是蛋白质及脂肪相对较少, 而这 2 种物质也是产妇所不能缺少的。
7. 忌吃甜瓜不漱口。甜瓜属于水果, 还是含有多种发酵糖类物质, 对牙齿有较强的腐蚀性, 食用后若不漱口, 口腔中的残渣易造成龋齿。
8. 忌吃甜瓜时太凉。刚从冰箱拿出来的甜瓜, 要放在室温里过一会儿再吃, 也可以将甜瓜用温水加热一下再食用, 此外吃甜瓜时要注意清洁, 彻底清洗干净和去皮后再吃, 以免发生腹泻。

(摘自: 搜狗百科)