

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*
55 (6) :691 - 699; 4 June 2015
ISSN 0001 - 6209; CN 11 - 1995/Q
<http://journals.im.ac.cn/actamicrocn>
doi: 10.13343/j.cnki.wsxb.20140404

利用 ISSR-PCR 技术分析香蕉枯萎病菌的遗传多样性

张贺[#], 张欣[#], 蒲金基, 漆艳香, 陆英, 喻群芳, 张辉强, 谢艺贤^{*}

中国热带农业科学院环境与植物保护研究所, 农业部热带作物有害生物综合治理重点实验室, 海南 海口 571101

摘要: 【目的】应用简单序列重复区间 (inter-simple sequence repeats, ISSR) 分子标记技术对全国主要香蕉产区 95 个香蕉枯萎病菌菌株进行 ISSR 分析, 了解其遗传多样性, 为香蕉品种的合理布局及枯萎病的防治提供理论依据。【方法】选用 8 条引物, 对香蕉枯萎病菌进行 ISSR-PCR 分析, 采用 NTSYSpc v2.10e 软件分析其遗传结构。【结果】从 33 条随机引物中筛选出 8 条重复性好、特异性高的引物, 共产生 52 个 ISSR 分子标记, 其中 92.3% 的片段具有多态性。菌株间的 Nei 遗传距离 (D) 为 0.57 - 1.00, 供试菌株以遗传距离为 0.68 阈值可以分为 A、B、C、D、E、和 F 共 6 个类群, 所占的比例分别为 51.06%、5.20%、2.08%、39.58%、1.04%、1.04%。【结论】病原菌菌株间的遗传变异很大, 差别很明显, ISSR 聚类组群的划分与病原菌的寄主和小种有很明显的相关性。

关键词: 香蕉枯萎病菌, 遗传多样性, ISSR 分析

中图分类号: Q939 **文章编号:** 0001-6209(2015)06-0691-09

香蕉 (*Musa spp.*) 是仅次于柑橘的世界第二大水果, 也是仅次于水稻、小麦和玉米的世界第四大粮食作物, 全球共有 130 多个国家和地区种植^[1]。由尖孢镰刀古巴专化型 (*Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*) 引起的香蕉枯萎病 (*Fusarium wilt of banana*) 是世界性的毁灭性病害, 目前, 该病原菌共发现 4 个小种: 1 号小种世界性分布, 为害粉蕉、大密哈等香蕉品系, 但不感染 Cavendish 类香蕉; 2 号小种分布于中美洲地区, 为害杂种三倍体的 Bluggoe 及近缘品种和部分 Jamaica 品种; 3 号小种仅为害蝎尾蕉属 (*Heliconia spp.*) 植物; 4 号小种几乎遍布世界香蕉种植区, 不仅为害 Cavendish 类香蕉, 还能危害 1 号、2 号小种所能侵染的所有品种, 毒性大, 目

前尚无免疫的栽培品种^[2]。研究表明, 香蕉枯萎病菌致病力分化十分明显^[3]和遗传间变异比较丰富^[4]。因此, 研究该病原菌不同小种遗传多样性, 明确其小种类型, 鉴别优势小种及其致病力的强弱等, 对保护我国香蕉产区的安全意义重大。目前, 对该病原菌遗传多样性研究的报道不少, 但未见对我国较全面收集菌株的报道。如, 1995 年 Bentley 等^[5]对来自全球 42 个香蕉枯萎病菌 (1、2 和 4 号小种) 菌株进行了 RAPD 分析, 其中来自中国的菌株仅涵盖台湾; 2005 年谢艺贤^[6]、漆艳香^[2]等对来自海南、广东的 18 个香蕉枯萎病菌菌株 (1 和 4 号小种) 进行了 RAPD 分析, 在 0.19 的遗传距离水平上, 来自海南省的 1 号小种和 4 号小种分别聚为不

基金项目: 国家香蕉产业技术体系综合防控岗位 (CARS-32-04); 海南省重点科技计划项目 (ZDXM20130044)

^{*} 通信作者。Tel: +86-898-66969241; E-mail: yixian81@126.com

作者简介: [#]共同第一作者。张贺 (1983 -), 男, 安徽太和人, 硕士, 助理研究员, 主要从事植物病理学研究; 张欣 (1972 -), 男, 湖北公安人, 博士, 副研究员, 主要从事植物病理学研究。

收稿日期: 2014-08-15; 修回日期: 2015-01-09

同的 RAPD 组,同样,来自广东省的不同小种也分别聚在不同的 RAPD 组;2009 年廖林凤^[7]等对来自广东和广西的 30 个香蕉枯萎病原菌进行 RAPD 分析,在遗传相似系数 0.67 时,供试菌株可分为 2 个 RAPD 群,即 1 号小种和 4 号小种分别聚为 1 个 RAPD 群;2012 年汤浩^[8]等对 17 个来自珠海地区的香蕉枯萎病菌进行 AFLP 分析所得结果与廖林凤的一致,即 1 号小种和 4 号小种分别聚为一类。虽有 关于我国香蕉种植区枯萎病菌遗传分化的报道,但对我国整个香蕉种植区枯萎病菌遗传多态性系统研究尚未见报道,且国内外尚未见文献报道采用 ISSR 分子标记技术研究香蕉枯萎病原菌的遗传变异性。为探索不同地区间香蕉枯萎病菌的遗传关系,本试验采集中国广东、广西、福建、云南和海南等 5 个主要香蕉种植区枯萎病菌菌株,采用 ISSR 技术分析不同来源菌株的遗传多态性,对制定有效防控策略和采取合理防治措施具有重要理论指导意义。

1 材料和方法

1.1 供试菌株

香蕉枯萎病菌:自 2001 年 12 月至 2010 年 1 月,采集自我国香蕉主产区福建、广东、广西、海南和云南等 5 省区 95 个香蕉枯萎病菌菌株,单孢分离纯化、鉴定保存,部分菌株为福建省农业科学院刘波研究员(菌株编号为:FOC118-FOC121, FOC123-FOC126)、广东省华南农业大学姜子德教授(菌株编号为:FOC018、FOC038)、广东省农业科学院果树研究所李春雨博士(菌株编号为:FOC108-FOC117)和广西壮族自治区农业科学院微生物所付岗博士(菌株编号为:FOC131-FOC136)交流所得;西瓜枯萎病菌 [*Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum* (E. F. Smith) Snyder et Hamsen],由中国热带农业科学院郑肖兰博士惠赠。菌株相关信息见表 1。

1.2 病原菌基因组 DNA 的提取

将适量病原菌接种于 PD 培养液、28℃ 培养 7 d 后,无菌纱布过滤培养液获得病原菌的菌丝体,并用无菌蒸馏水冲洗菌丝 2 次,干燥冷冻备用。参照 Biomiga 真菌 DNA 提取试剂盒说明书提取 gDNA。取适量 gDNA 进行琼脂糖凝胶电泳,检测 DNA 质量。

1.3 ISSR 反应体系和反应参数

经筛选最佳反应体系为:25 μ L 的 PCR 反应体

系中,1.0 U Taq DNA 聚合酶 0.15 μ L,15 ng 模板 DNA 1 μ L,0.15 mmol/L dNTP 2.0 μ L,1.5 mmol/L MgCl₂ 3 μ L,10 μ mol/L 引物 1 μ L。PCR 扩增条件:94℃ 预变性 5 min;94℃ 变性 30 s,梯度 PCR 仪筛选最适退火温度 48 - 57.1℃ 退火 45 s,72℃ 延伸 1.5 min,40 个循环;72℃ 延伸 10 min。

1.4 ISSR 引物筛选

参考文献 [9] 选取常用于真菌遗传变异研究的 33 条 ISSR 引物,选取 5 个 1 号小种菌株(菌株编号:FOC018、FOC019、FOC095、FOC126、FOC133)和 5 个 4 号小种菌株(菌株编号:FOC037、FOC038、FOC049、FOC125、FOC199)的 gDNA 等量混合成 DNA 模板,在 25 μ L 反应体系中进行扩增筛选,从供试 33 个引物中筛选扩增条带较多、信号强、背景清晰的引物,用于全部 DNA 样品的扩增。

1.5 病原菌 ISSR-PCR 扩增反应

根据前期实验筛选 ISSR 引物、最佳反应体系和 PCR 扩增条件,分别使用 8 条 ISSR 引物对 95 个香蕉枯萎病原菌菌株和 1 个来自海南省的西瓜枯萎病原菌菌株进行 PCR 扩增,并电泳检查实验结果。

1.6 数据分析

数据分析主要采用分析软件依据分子标记的迁移率及其有无统计二元数据(条带有记为 1、无记为 0)计算相关参数。软件 NTSYSpc v2.10e^[9] 可以分析种内菌株间 Nei 遗传距离^[10],再由 Nei 遗传距离构建种内菌株间的 UPGMA 聚类图。

2 结果和分析

2.1 ISSR 引物的筛选

对 33 条 ISSR 引物的 PCR 扩增产物,经 1.2% 琼脂糖凝胶电泳检查经梯度 PCR 仪所扩增的产物,结果显示:供试的 33 条 ISSR 引物多数能够对供试的香蕉枯萎病原菌 1 号小种和 4 号小种的混合 gDNA 扩增出条带,但条带的数量、清晰度以及是否有拖尾等方面有很明显的差异,有些引物的扩增产物拖尾十分严重,难以清晰地辨别条带数量,如 UBC819、UBC820、UBC821 和 UBC835 等;而有些引物则扩增的条带十分稀少,如 UBC841 和 UBC851 等。供试的 33 条 ISSR 引物中有 8 条引物(UBC801、UBC811、UBC825、UBC826、UBC827、UBC835、UBC856 和 UBC889)能够对混合的病原菌

DNA 扩增出条带清晰度高、多且均为分布、无拖尾以及所扩增出的片段大小跨度合理, 8 条 ISSR 引物

在所确定的最佳退火温度的 ISSR-PCR 扩增结果见图 1。

表 1. 供试菌株信息

Table 1. Information of tested isolates

Code	Source	Host	Race	Pathogenicity	ISSR group	Code	Source	Host	Race	Pathogenicity	ISSR group
FOC001-F-1-M	Dongfang, Hainan	Dwarf banana	1	Middle	A I	FOC111-F-4-M	Yunfu, Guangdong	Dwarf banana	4	Middle	A II
FOC004-F-1-M	Sanya, Hainan	Dwarf banana	1	Middle	A I	FOC140-F-4-M	Wenchang, Hainan	Dwarf banana	4	Middle	B
FOC005-F-1-S	Sanya, Hainan	Dwarf banana	1	Strong	A I	FOC196-F-4-W	Sanya, Hainan	Dwarf banana	4	Weak	B
FOC009-F-1-M	Danzhou, Hainan	Dwarf banana	1	Middle	A I	FOC202-F-4-W	Qiongzong, Hainan	Dwarf banana	4	Weak	B
FOC011-F-1-W	Danzhou, Hainan	Dwarf banana	1	Weak	A I	FOC220-F-4-W	Qionghai, Hainan	Dwarf banana	4	Weak	B
FOC013-F-1-M	Baisha, Hainan	Dwarf banana	1	Middle	A I	FOC247-F-4-W	Danzhou, Hainan	Dwarf banana	4	Weak	B
FOC014-F-1-M	Dongfang, Hainan	Dwarf banana	1	Middle	A I	FOC163-F-1-M	Tuenchang, Hainan	Dwarf banana	1	Middle	C
FOC016-F-1-M	Haikou, Hainan	Dwarf banana	1	Middle	A I	FOC150-B-4-W	Baoting, Hainan	Brazilian banana	4	Weak	C
FOC017-F-1-M	Haikou, Hainan	Dwarf banana	1	Middle	A I	FOC020-F-1-S	Sanming, Fujian	Dwarf banana	1	Strong	D I
FOC018-F-1-S	South China Agric. Univ.	Dwarf banana	1	Strong	A I	FOC047-B-4-S	Zhongshan, Guangdong	Brazilian banana	4	Strong	D I
FOC019-F-1-S	Haikou, Hainan	Dwarf banana	1	Strong	A I	FOC070-B-4-S	Dongguan, Guangdong	Brazilian banana	4	Strong	D I
FOC021-F-1-S	Fujian	Dwarf banana	1	Strong	A I	FOC091-B-4-M	Xuwen, Guangdong	Brazilian banana	4	Middle	D I
FOC051-F-1-S	Hekou, Yunnan	Dwarf banana	1	Strong	A I	FOC092-B-4-M	Leizhou, Guangdong	Brazilian banana	4	Middle	D I
FOC066-F-1-M	Qionghai, Hainan	Dwarf banana	1	Middle	A I	FOC113-B-4-S	Zhaoqing, Guangdong	Brazilian banana	4	Strong	D I
FOC108-F-1-M	Zhongshan, Guangdong	Dwarf banana	1	Middle	A I	FOC115-B-4-S	Huizhou, Guangdong	Brazilian banana	4	Strong	D I
FOC119-F-1-W	Zhangzhou, Fujian	Dwarf banana	1	Weak	A I	FOC022-B-4-S	Changjiang, Hainan	Brazilian banana	4	Strong	D II
FOC126-F-1-M	Zhangzhou, Fujian	Dwarf banana	1	Middle	A I	FOC034-B-4-S	Sanya, Hainan	Brazilian banana	4	Strong	D II
FOC131-F-1-M	Nanning, Guangxi	Dwarf banana	1	Middle	A I	FOC036-B-4-S	Chengmai, Hainan	Brazilian banana	4	Strong	D II
FOC132-F-1-S	Pubei, Guangxi	Dwarf banana	1	Strong	A I	FOC037-B-4-S	Haikou, Hainan	Brazilian banana	4	Strong	D II
FOC134-F-1-S	Nanning, Guangxi	Dwarf banana	1	Strong	A I	FOC038-B-4-S	South China Agric. Univ.	Brazilian banana	4	Strong	D II
FOC142-F-1-S	Wanning, Hainan	Dwarf banana	1	Strong	A I	FOC043-B-4-S	Ledong, Hainan	Brazilian banana	4	Strong	D II
FOC144-F-1-S	Lingshui, Hainan	Dwarf banana	1	Strong	A I	FOC049-F-1-S	Hekou, Yunnan	Dwarf banana	4	Weak	D II
FOC-151-F-1-M	Wuzhishan, Hainan	Dwarf banana	1	Middle	A I	FOC053-B-4-S	Dongfang, Hainan	Brazilian banana	4	Strong	D II
FOC162-F-1-S	Qiongzong, Hainan	Dwarf banana	1	Strong	A I	FOC056-B-4-S	Sanya, Hainan	Brazilian banana	4	Strong	D II
FOC174-F-1-S	Ledong, Hainan	Dwarf banana	1	Strong	A I	FOC077-B-4-M	Baisha, Hainan	Brazilian banana	4	Middle	D II
FOC175-F-1-M	Baoting, Hainan	Dwarf banana	1	Middle	A I	FOC088-B-4-S	Xuwen, Guangdong	Brazilian banana	4	Strong	D II
FOC189-F-1-S	Chengmai, Hainan	Dwarf banana	1	Strong	A I	FOC090-B-4-S	Lingao, Hainan	Brazilian banana	4	Strong	D II
FOC190-F-1-M	Baisha, Hainan	Dwarf banana	1	Middle	A I	FOC105-B-4-M	Wuming, Guangxi	Brazilian banana	4	Middle	D II
FOC191-F-1-S	Qiongzong, Hainan	Dwarf banana	1	Strong	A I	FOC107-B-4-S	Wanning, Hainan	Brazilian banana	4	Strong	D II
FOC212-F-1-S	Dingan, Hainan	Dwarf banana	1	Strong	A I	FOC109-B-4-W	Guangdong	Brazilian banana	4	Weak	D II
FOC216-F-1-S	Qionghai, Hainan	Dwarf banana	1	Strong	A I	FOC112-F-4-S	Huizhou, Guangdong	Dwarf banana	4	Strong	D II
FOC222-F-1-S	Wenchang, Hainan	Dwarf banana	1	Strong	A I	FOC114-B-4-S	Guangzhou, Guangdong	Brazilian banana	4	Strong	D II
FOC225-F-1-M	Wenchang, Hainan	Dwarf banana	1	Middle	A I	FOC116-B-4-S	Pubei, Guangxi	Brazilian banana	4	Strong	D II
FOC232-F-1-S	Wenchang, Hainan	Dwarf banana	1	Strong	A I	FOC117-B-4-S	Zhuhai, Guangdong	Brazilian banana	4	Strong	D II
FOC234-F-1-S	Wenchang, Hainan	Dwarf banana	1	Strong	A I	FOC118-B-4-S	Zhangzhou, Fujian	Brazilian banana	4	Strong	D II
FOC235-F-1-M	Wenchang, Hainan	Dwarf banana	1	Middle	A I	FOC120-B-4-W	Zhangzhou, Fujian	Brazilian banana	4	Weak	D II
FOC240-F-1-S	Lingao, Hainan	Dwarf banana	1	Strong	A I	FOC121-B-4-S	Putian, Fujian	Brazilian banana	4	Strong	D II
FOC248-F-1-S	Danzhou, Hainan	Dwarf banana	1	Strong	A I	FOC123-B-4-M	Putian, Fujian	Brazilian banana	4	Middle	D II
FOC007-F-4-M	Changjiang, Hainan	Dwarf banana	4	Middle	A I	FOC124-B-4-S	Zhangzhou, Fujian	Brazilian banana	4	Strong	D II
FOC050-F-4-W	Mengla, Yunnan	Dwarf banana	4	Weak	A I	FOC135-B-4-S	Wuming, Guangxi	Brazilian banana	4	Strong	D II
FOC110-F-4-W	Shunde, Guangdong	Dwarf banana	4	Weak	A I	FOC166-B-4-W	Guangdong	Brazilian banana	4	Weak	D II
FOC136-B-4-W	Pubei, Guangxi	Brazilian banana	4	Weak	A I	FOC167-B-4-W	Guangzhou, Guangdong	Brazilian banana	4	Weak	D II
FOC125-B-4-W	Xianyou, Fujian	Brazilian banana	4	Weak	A I	FOC168-B-4-W	Gaozhou, Guangdong	Brazilian banana	4	Weak	D II
FOC145-F-4-W	Ledong, Hainan	Dwarf banana	4	Weak	A I	FOC199-B-4-S	Nanning, Guangxi	Brazilian banana	4	Strong	D II
FOC149-F-4-W	Baoting, Hainan	Dwarf banana	4	Weak	A I	FOC200-B-4-S	Xuwen, Guangdong	Brazilian banana	4	Strong	D II
FON-W	Hainan	Watermelon	-	-	-	FOC201-A-4-S	Danzhou, Hainan	Short Gongjiao	4	Strong	D II
FOC095-F-1-M	Jinghong, Yunnan	Dwarf banana	1	Middle	A II	FOC246-B-4-M	Lingao, Hainan	Brazilian banana	4	Middle	E
FOC133-F-1-M	Nanning, Guangxi	Dwarf banana	1	Middle	A II	FOC165-B-4-W	Shantou, Guangdong	Brazilian banana	4	Weak	F

2.2 ISSR 引物的扩增

通过 8 条 ISSR 引物分别对供试 95 个香蕉枯萎病原菌菌株和 1 个西瓜枯萎病原菌菌株(表 1)进行 ISSR-PCR 扩增, 供试病原菌之间的遗传变异十分丰富, 8 条 ISSR 引物所扩增的条带数为 5 - 8、多态性比率为 50% - 100%、片段大小范围为 200 - 2000 bp, 各引物所扩增的条带数、多态性比率见表 2。

8 条 ISSR 引物对病原菌的扩增多态性十分明显, 条带清晰易于分辨、无拖尾现象, 也有个别菌株出现未扩增出任何条带的现象。8 条 ISSR 引物对 96 个菌株共扩增得到 3176 条条带, 多态性条带共计 2792 条, 条带多态性比为 87. 91%, 部分 ISSR 引物的扩增图片见图 2。香蕉枯萎病原菌 1 号小种和 4 号小种之间的特征带并不十分明显。

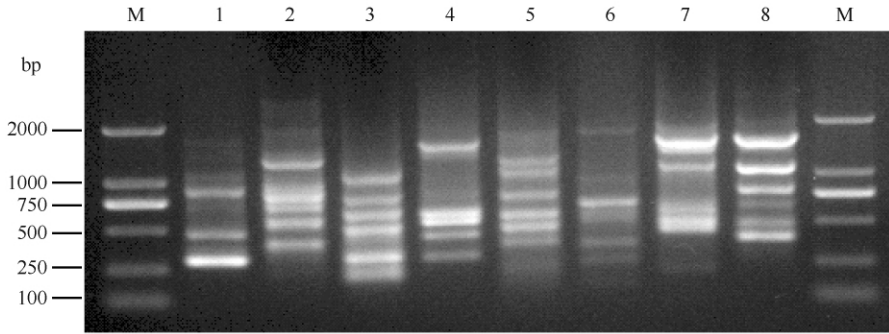


图 1. ISSR 引物最适退火温度的扩增结果

Figure 1. Amplification of ISSR - PCR at the optimized annealing temperature. M: DL2000 DNA Marker; 1 - 8: ISSR primers of UBC801, UBC811, UBC825, UBC826, UBC827, UBC835, UBC856 and UBC889.

表 2. ISSR 引物的扩增结果

Table 2. The amplification results of ISSR primers

Primers name	Primer sequence	Annealing Temperature/°C	Total amplified bands	Polymorphic bands	Polymorphism rate/%
UBC801	(AT) ₈ T	50.0	8	8	100
UBC811	(GA) ₈ C	53.6	6	6	100
UBC825	(AC) ₈ T	51.2	6	6	100
UBC826	(AC) ₈ C	54.8	7	6	85.7
UBC827	(AC) ₈ G	51.2	8	8	100
UBC835	(AG) ₈ YC	57.1	6	6	100
UBC856	(AC) ₈ YA	48.0	6	3	50.0
UBC889	DBD(AC) ₇	53.0	5	5	100

2.3 中国香蕉枯萎病病原菌 ISSR 聚类分析

应用 NTSYSpc 2.10e 软件对供试的 95 个香蕉枯萎病病原菌和 1 个西瓜枯萎病病原菌的遗传变异进行分析, 计算出菌株间的 Nei 遗传距离 (D) 为 0.57 - 1.00, 而基于 Nei 遗传距离利用 UPGMA 方法绘制的系统发育树 (图 3)。

结果表明, 96 个供试菌株以遗传距离为 0.68 阈值可以分为 A、B、C、D、E、和 F 共 6 个类群, 所占的比例分别为 51.06%、5.20%、2.08%、39.58%、1.04%、1.04%。

A 类群所包含的 49 个菌株又可以分为 2 个亚类群 (A I 和 A II), A I 类群所包含的 46 个菌株的寄主以粉蕉为主、病原菌的小种以 1 号小种为主, A I 类群寄主为粉蕉的菌株有 43 个占粉蕉寄主菌株数 (55 个菌株) 的 78.18%, A I 类群 1 号小种菌株有 38 个占 1 号小种总菌株数 (42 个菌株) 的 90.48%, A I 类群还包含了 1 个西瓜枯萎病病原菌菌株 (FON-W); A II 类群包含 3 菌株, 其寄主均为粉蕉, 1 号小种的菌株有 2 个 (FOC095-F-1-M、FOC133-F-1-M)、4 号小种的菌株有 1 个 (FOC111-

F-4-M)。

B 类群包含了 5 个菌株, 其寄主均为粉蕉、小种属性为 4 号小种。

C 类群包含了 2 个菌株, 1 个是寄生于粉蕉的 1 号小种 (FOC163-F-1-M)、另 1 个是寄生于巴西蕉的 4 号小种 (FOC150-B-4-W)。

D 类群所包含的 38 个菌株又可以分为 2 个亚类群 (D I 和 D II), 寄主为巴西蕉的菌株数为 34 个、占巴西蕉寄主总数的 87.18%, 4 号小种菌株数为 37 个, 占 4 号小种菌株总数的 69.81%。D I 类群所包含的 7 个菌株的寄主以巴西蕉为主、病原菌以 4 号小种为主, 仅有 1 个菌株 (FOC020-F-1-S) 例外; D II 类群所包含的 31 个菌株的寄主以巴西蕉为主、病原菌均为 4 号小种, 仅有 3 个菌株例外, 这 3 个菌株有 2 个的寄主为粉蕉 (FOC049-F-4-W、FOC112-F-4-S)、1 个的寄主为矮秆贡蕉 (FOC201-A-4-S)。

E 类群仅包含 1 个菌株 (FOC246-B-4-M), 寄主为巴西蕉的中致病力的 4 号小种, 分离自海南省临高县波莲镇。

F 类群仅包含 1 个菌株 (FOC165-B-4-W), 寄主

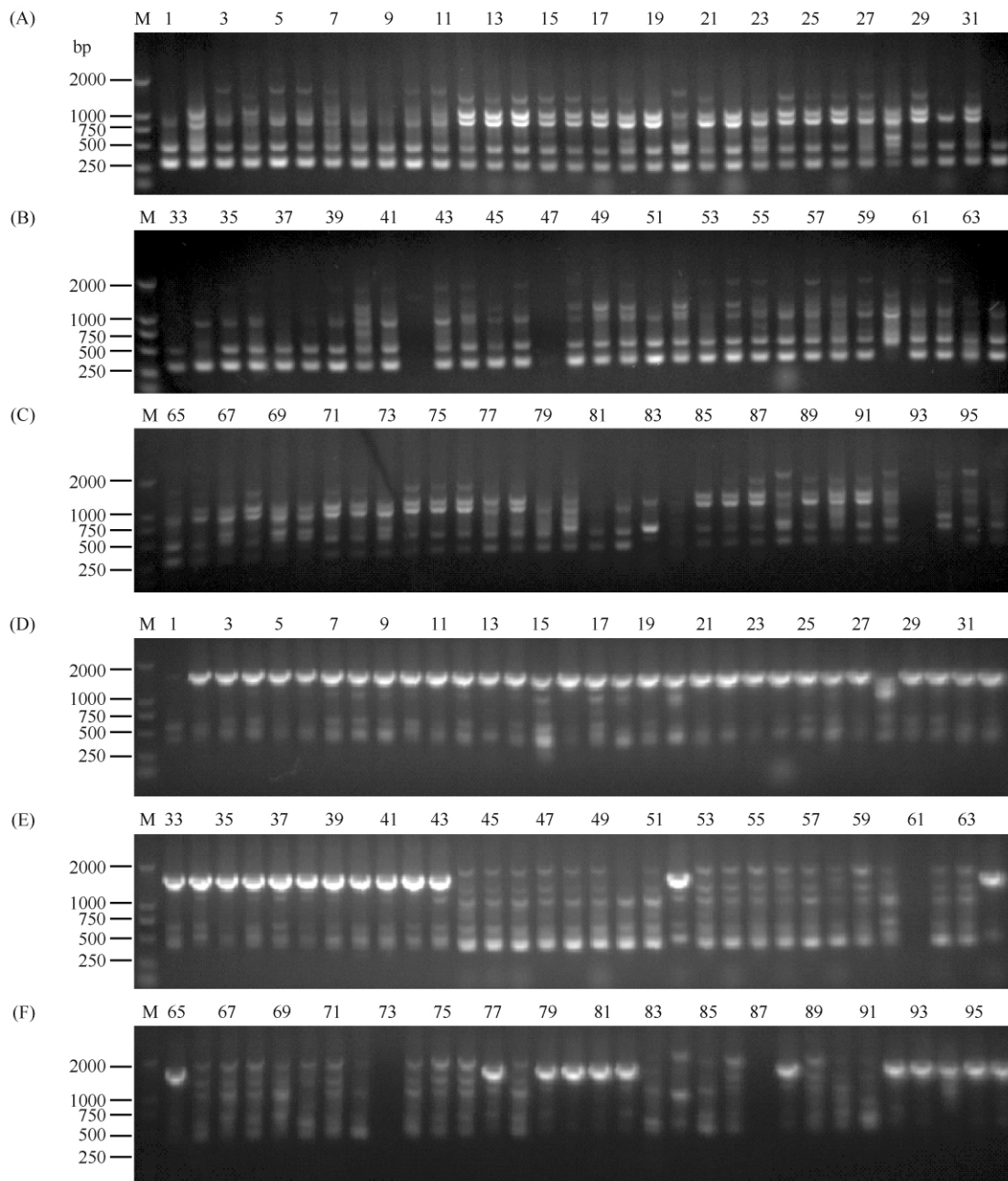


图 2. 引物 UBC801 和 UBC856 对供试菌株的 ISSR-PCR 扩增结果

Figure 2. ISSR banding patterns of FOC with primer UBC801 and UBC856. A, B and C: The primer UBC801, D, E and F: The primer UBC856. M: DL2000 DNA Marker; 1 - 95: Strains.

为巴西蕉的弱致病力的 4 号小种, 分离自广东省汕头市澄海区。

96 个菌株间的遗传变异很大, 各菌株间差别很明显, ISSR 聚类组与病原菌的寄主和小种有很明显的相关性。

3 讨论

多位学者通过 AFLP、SSR、DNA 序列分析、RAPD、ISSR、ERIC、ITS + 5.8S 序列的限制性酶切片段等多种分子生物学的方法研究镰孢菌的遗传变异^[11-14], 认为镰孢菌是一种十分复杂的种群, 遗传

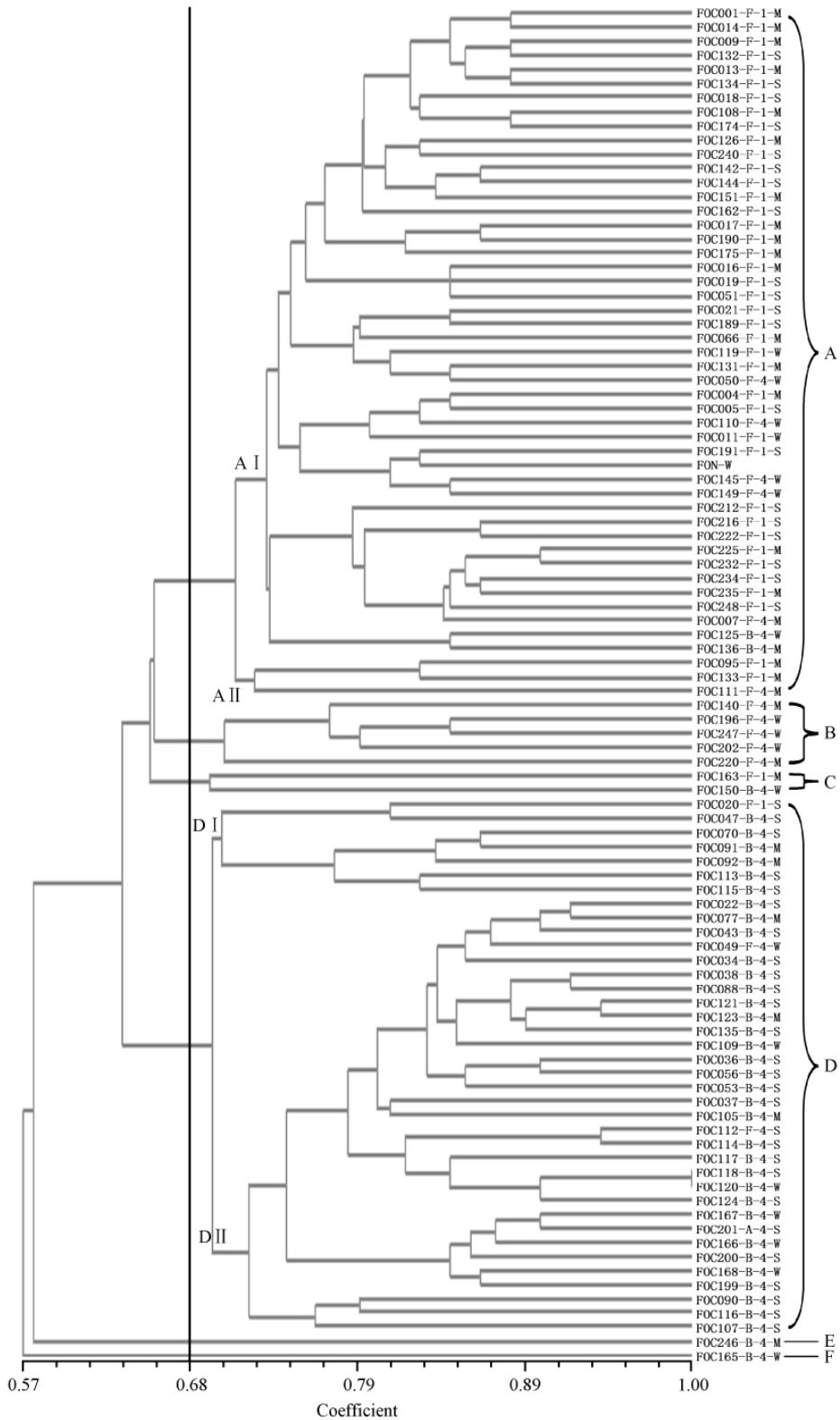


图 3. 基于 ISSR 标记的 96 个菌株的系统发育树

Figure 3. Phylogenetic tree of 96 isolates based on ISSR marker data.

多样性十分丰富, 菌株之间差异性非常明显, 对环境的适应能力也很强, 与寄主在协同进化过程中产生不同的病原菌专化型^[15]。香蕉枯萎病菌作为镰孢菌中的一员, 也不例外。Leong^[14]等、Bentley^[16]等、Bhuvanendra Kumar^[17]等通过对香蕉枯萎病菌的系统性研究也认为菌株间的遗传变异丰富。香蕉枯萎病菌病原菌的小种划分是依据病原菌对不同香蕉品种的致病力而划分的, 各个小种与寄主的协同进化会导致小种内菌株间遗传差异增大, 而同一小种内不同菌株侵染相同的香蕉品种, 则有可能形成新的异源的、同源的专化型或基因型^[15]。

本研究中分离自粉蕉的菌株多聚集在一起、分离自巴西蕉的菌株也有类似现象, 通常相同寄主的分离菌聚为同一进化支, 而这些进化支中包含了病原菌的不同小种, 表明了香蕉枯萎病菌与寄主之间的协同进化关系, 与 Bentley^[16]等、Donnell^[18]等、Chai^[19]等、Groenewald^[20]等、Leong^[14,21]等、Bhuvanendra Kumar^[17]等和 Maria da Silva^[22]等的研究结果相同。

香蕉枯萎病菌病原菌 1 号小种 (FOC191-F-1-S) 与西瓜枯萎病菌病原菌 (*Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum*) 聚在同一个进化分支上, 二者之间的遗传相似系数为 0.83, 且与另外两个 4 号小种 (FOC145-F-4-W、FOC149-F-4-W) 聚集在略大的分支上, 遗传相似系数为 0.81, 说明西瓜枯萎病菌病原菌与香蕉枯萎病菌病原菌之间有一定的亲缘关系, 这与 Donnell^[18]等在研究尖孢镰孢菌不同的专化型之间的亲缘关系时所得到的结果类似。

本研究表明病原菌 ISSR 类群与致病力之间有一定的关系, 巴西蕉上分离的弱致病力 4 号小种往往会和粉蕉上分离的 1 号小种聚为一个大的类群, 强致病力菌株多能相互聚集在一起, 而中、弱致病力菌株则聚集在一起。这与 Carter^[23]等和纪莉景^[24]在研究禾谷镰孢菌菌株致病力强弱与进化类群的相关性结果类似。

通过对香蕉枯萎病菌病原菌的遗传变异研究结果表明, 病原菌的遗传变异与地理来源有一些相关性, 与 Leong^[21]等的研究结果相同。王子迎^[25]等通过相同的方法分析来自中国和美国的大豆疫霉群体之间的相似性, 认为美国的大豆疫霉不可能起源于中国黑龙江省和福建省。可见, 通过 ISSR 标记分析病原菌菌株间的遗传相似性, 然后根据相似性确定病

原菌的起源具有一定的可行性。

参考文献

- [1] 魏守兴, 陈业渊. 香蕉周年生产技术. 北京: 中国农业出版社, 2008.
- [2] Qi YX, Xie YX, Zhang X, Pu JJ, Zhang HQ. RAPD Analysis of Physiologic Races of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* in Hainan. *Mycosystema*, 2005, 24 (3): 394-399. (in Chinese)
漆艳香, 谢艺贤, 张欣, 蒲基金, 张辉强. 海南省香蕉枯萎病菌生理小种的 RAPD 分析. 菌物学报, 2005, 24 (3): 394-399.
- [3] Groenewald S, Berg NVD, Marasas WF, Viljoen A. The application of high-throughput AFLP in assessing genetic diversity in *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*. *Mycological Research*, 2006, 110 (3): 297-305.
- [4] Persley GJ. Banana and plantain breeding strategies. Austria: State Mutual Book & Periodical Service Ltd., 1987.
- [5] Bentley S, Pegg KG, Dale JL. Genetic variation among a world-wide collection of isolates of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* analysed by RAPD-PCR fingerprinting. *Mycological Research*, 1995, 99: 1378-1384.
- [6] Xie YX, Zhang X, Qi YX, Pu JJ, Liu ZX, Zhang HQ. Pathogenicity and RAPD Analysis of Pathogens of Banana Wilt. *Chinese Journal of Tropical Crops*, 2005, 26 (2): 175-180. (in Chinese)
谢艺贤, 张欣, 漆艳香, 蒲基金, 刘志昕, 张辉强. 香蕉枯萎病菌的致病性测定及其 RAPD 分析. 热带作物学报, 2005, 26 (2): 175-180.
- [7] Liao LF, Dong ZY, Wang ZZ, Ji CY. RAPD analysis of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* and rapid detection for FOC4. *Acta Phytopathologica Sinica*, 2009, 39 (4): 353-361. (in Chinese)
廖林凤, 董章勇, 王振中, 纪春艳. 香蕉枯萎病菌 RAPD 分析及 4 号生理小种的快速检测. 植物病理学报, 2009, 39 (4): 353-361.
- [8] Tang H, Yu GH, Cheng P, Cao YJ. Genetic Diversity of Zhuhai Isolates of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* Revealed by AFLP Analysis. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2012, 28 (13): 204-209. (in Chinese)
汤浩, 喻国辉, 程萍, 曹永军. 珠海香蕉枯萎病菌遗传多样性的 AFLP 分析. 中国农学通报, 2012, 28 (13): 204-209.
- [9] Qi YX, Xie YX, Zhang X, Pu JJ, Zhang HQ, Huang SL, Zhang H. Molecular and Pathogenic Variation

- Identified Among Isolates of *Corynespora cassiicola*. *Molecular Biotechnology*, 2009, 41 (2) : 145-151.
- [10] Rohlf FJ. NTSYSpc: Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System, Version 2.10 Exeter Software, New York, 2001.
- [11] Nei M. Genetic distance between populations. *The American Naturalist*, 1972, 106 (949) : 283-292.
- [12] Bogale M, Wingfield BD, Wingfield MJ, Steenkamp ET. Characterization of *Fusarium oxysporum* isolates from Ethiopia using AFLP, SSR and DNA Sequence analyses. *Fungal Diversity*, 2006, 23: 51-66.
- [13] Bayraktar H, Dolar FS, Maden S. Use of RAPD and ISSR Marker in Detection of Genetic Variation and Population Structure among *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* Isolates on Chickpea in Turkey. *Journal of Phytopathology*, 2008, 156 (3) : 146-154.
- [14] Leong SK, Latiffah Z, Baharuddin S. Genetic diversity of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense* iaolates from Malaysia. *African Journal of Microbiology Research*, 2010, 4 (11) : 1026-1037.
- [15] Takkenn F, Rep M. The arms race between tomato and *Fusarium oxysporum* *Molecular Plant Pathology*, 2010, 11 (2) : 309-314.
- [16] Bentley S, Pegg KG, Moore NY, Davis RD, Buddenhagen IW. Genetic variation among vegetative compatibility groups of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense* analyzed by DNA fingerprinting. *Phytopathology*, 1998, 88 (12) : 1283-1293.
- [17] Bhuvanendra Kumar H, Udara Shankar AG, Chandra Nayaka S, Ramachandra Kinik, Shetty HS, Parkash HS. Biochemical characterization of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense* isolates from India. *African Journal of Biotechnology*, 2010, 9 (4) : 523-530.
- [18] Donnell KO, Kistler HC, Cigelnik E, Ploetz RC. Multiple evolutionary origins of the fungus causing Panama disease of banana: Concordant evidence from nuclear and mitochondrial gene genealogies. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1998, 95 (5) : 2044-2049.
- [19] Chai M, Ho YW, Liew KW, Asif JM. Biotechnology and in vitro mutagenesis for banana improvement. In: Molan J and Swennen R. *Banana Improvement: Cellular, Molecular Biology, and Included Mutations*. Enfield NH, USA: Science publishers Incorporate, 2004.
- [20] Groenewald S, Van Den Berg N, Marasas WF, Viljoen A. The application of high-throughput AFLP's in assessing genetic diversity in *Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense*. *Mycological Research*, 2006, 110 (3) : 297-305.
- [21] Leong SK, Latiffah Z, Baharuddin S. Molecular Characterization of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense* of Banana. *American Journal of Applied Sciences*, 2009, 6 (7) : 1301-1307.
- [22] Maria da Silva C, Hinz RH, Stadnik MJ, Pereira A, Tcacenco FA. Genetic diversity by molecular markers in *Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense* in Santa Catarina State. *Ciência Rural*, 2010, 40 (12) : 2480-2485.
- [23] Carter JP, Rezanoor HN, Holden D, Desjardins AE, Plattner RD, Nicholson P. Variation in Pathogenicity associated with the Genetic Diversity of *Fusarium graminearum*. *European Journal of Plant Pathology*, 2002, 108 (6) : 273-583.
- [24] 纪莉景. 中国不同生态地区禾谷镰刀菌种群分化及遗传多样性分析. 河北农业大学博士学位论文. 2007.
- [25] Wang ZY, Wang YC, Zhang ZG, Zheng XB. Genetic relationships among Chinese and American isolates of *Phytophthora sojae* by ISSR markers. *Biodiversity Science*, 2007, 15 (2) : 215-223. (in Chinese)
- 王子迎, 王源超, 张正光, 郑小波. 中国和美国大豆疫霉群体遗传结构的 ISSR 分析. *生物多样性*, 2007, 15 (2) : 215-223.

Genetic diversity analysis of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* populations from China using Inter-Simple Sequence Repeats-PCR (ISSR-PCR) technique

He Zhang[#], Xin Zhang[#], Jinji Pu, Yanxiang Qi, Ying Lu, Qunfang Yu, Huiqiang Zhang, Yixian Xie^{*}

Environment and Plant Protection Institute, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, Key Laboratory of Integrated Pest Management on Tropical Crops, Ministry of Agriculture, Haikou 571101, Hainan Province, China

Abstract: [Objective] We used Inter-Simple Sequence Repeats (ISSR) markers to reveal the genetic diversity of 95 *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (FOC) isolates from banana in China, for the rational control of the disease. [Methods] Eight primers were chosen for analyzing FOC isolates to study their genetic diversity by ISSR-PCR. All isolates were clustered using Unweighted Pair-Group Method with Arithmetic means (UPGMA) analysis by NTSYSpc v2.10e software. [Results] A total of 52 sites were generated, among them 92.3% were polymorphic. Genetic distance was 0.57 to 1.00 based on the Nei's standard. Isolates were grouped into six distinct clusters (A, B, C, D, E and F) based on ISSR analysis using a genetic distance threshold of 0.68, the proportion of 51.06%, 39.58%, 5.20%, 2.08%, 1.04%, and 1.04%, respectively. [Conclusion] There were high levels of genetic variation among the FOC isolates, and the ISSR clustering groups had obvious correlation with hosts and races of the pathogen.

Keywords: *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*, genetic diversity, ISSR

(本文责编: 张晓丽)

Supported by the Earmarked Fund for China Agriculture Research System (CARS-32-04) and by the Keystone Science and Technology Plan of Hainan Province (ZDXM20130044)

^{*} Corresponding author. Tel: +86-898-66969241; E-mail: yixian81@126.com

[#] Those authors contributed equally to this work.

Received: 15 August 2014 / Revised: 9 January 2015