

香蕉枯萎病菌遗传多态性及其致病力分化

刘文波, 孙亮, 万三连, 王慕瑾, 张宇, 邬国良, 缪卫国, 郑服丛
(海南省热带生物资源可持续利用重点实验室/海南大学环境与植物保护学院, 海南海口 570228)

摘要:为了明确我国香蕉主要种植区香蕉枯萎病菌(*Fusarium oxysporum* f.sp.cubense, FOC)的致病力及其遗传多态性,本研究采用对寄主鉴定和 RAPD 技术分析来自海南、广西、广东、福建、云南的 FOC 生理小种、致病力分化及遗传多态性。结合巴西蕉和粉蕉鉴定与 RAPD 技术,与香蕉枯萎病菌 1 号(FOC1)和 4 号生理小种(FOC4)对比,55 个 FOC 菌株中,有 28 个菌株属于 1 号生理小种,海南 10 个、广西 8 个、广东 4 个、福建 4 个、云南 2 个;27 个菌株属于 4 号生理小种,海南 20 个、广西 4 个、广东 1 个、福建 1 个、云南 1 个。强致病力菌株有 23 个,中致病力菌株有 15 个,弱致病力菌株有 17 个;通过遗传多态性分析,9 条引物 PCR 扩增供试菌株,共扩增出 136 条谱带,其中多态性的条带有 126 条,多态性位点频率为 93.4%,在遗传阈值为 0.68 时,55 个供试菌株与 FOC1 和 FOC4 划分为 4 个 RAPD 菌群,除 1 号生理小种 BF26 菌株单独形成 IV 菌群外,4 号生理小种和其余 1 号生理小种均未单独形成菌群, I、II、III 菌群同时含有 1 号和 4 号生理小种。因此,我国香蕉种植区香蕉枯萎病菌仍以 1 号和 4 号生理小种为主,但是生理小种的遗传分化在分子水平上趋于复杂化,香蕉枯萎病菌群体具有丰富的多态性,其致病力的强弱和菌株遗传关系无直接的相关性,跟地理分布也没有相关性,香蕉枯萎病菌的遗传多态性可能更多依赖其寄主。这些结果为香蕉的抗病育种、品种的合理布局以及香蕉枯萎病的综合防治提供理论依据。

关键词:香蕉枯萎病菌;生理小种;遗传多态性;RAPD;聚类分析

中图分类号:S432.1

文献标识码:A

文章编号:1004-874X(2013)17-0071-08

Polymorphism analysis of *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense and its pathogenicity differentiation in China

LIU Wen-Bo, SUN Liang, WAN San-Lian, WANG Mu-Jin, ZHANG-yu,
WU Guo-Liang, MIAO Wei-Guo, ZHENG Fu-Cong

(Hainan Key Laboratory for Sustainable Utilization of Tropical Bioresource/
College of Environment and Plant Protection, Hainan University, Haikou 570228, China)

Abstract: In order to clarify the pathogenicity and genetic polymorphisms of *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense (FOC), which caused banana fusarium wilt, in the main banana growing areas of China, the race type, pathogenicity differentiation and genetic polymorphism of 55 FOC isolates from Hainan, Guangxi, Guangdong, Fujian and Yunnan provinces, were analyzed by Identification host and Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) methods. According to the results of Brazil banana and Fenjiao banana identification, and RAPD analysis, compared with the identified FOC race 1 (FOC1) and FOC race 4 (FOC4), 28 of 55 FOC isolates were race 1, such as 10 from Hainan, 8 from Guangxi, 4 from Guangdong, 4 from Fujian, and 2 from Yunnan; 27 of 55 FOC isolates were race 4, such as 20 from Hainan, 4 from Guangxi, 1 from Guangdong, 1 from Fujian, and 1 from Yunnan. In 55 FOC isolates, there was 23 strong pathogenicity isolates, 15 moderate pathogenicity isolates, and 17 weak pathogenicity isolates. DNA of the tested isolates were amplified with 9 candidate primers by PCR, and produced 136 bands, including 126 polymorphic bands, and polymorphic loci frequency of 93.4%. Based on RAPD result, in the genetic threshold of 0.68, 55 FOC isolates, FOC1 and FOC4 were divided into 4 RAPD groups. In addition to race 1 BF26 isolate separately formed IV group, all race 4 isolates or the rest of race 1 isolates were not formed one group alone. I, II and III groups contain both race 1 and race 4 respectively. Therefore, race type of FOC in China banana plantation still is race 1 and race 4. However, the genetic differentiation of FOC races tends to be complex at the molecular level, the group of FOC has a wealth of polymorphism, the pathogenicity of FOC isolates is no direct correlation with its genetic relationship, and no correlation with its geographical distribution, genetic polymorphisms of FOC may be more dependent on their host. These results may provide the theoretic foundation for disease-resistance breeding, rational distribution of variety and integrated control of banana fusarium wilt.

Key words: *Fusarium oxysporum* f.sp.cubense; Race; Genetic polymorphism; RAPD; Cluster analysis

香蕉是我国重要的热带水果之一,香蕉枯萎病是香蕉生长过程中危害较大的一种病害,是由尖孢镰刀菌古

收稿日期:2013-05-13

基金项目:国家重大基础研究计划项目(2010CB116112);国家自然科学基金(31160359);国家农业产业技术体系建设(CARS-34-GW8);教育部博士点基金(20104601110004);海南大学科研启动资金(kyqd1006)

作者简介:刘文波(1978-),男,在读硕士生,E-mail:saucher@163.com

通信作者:郑服丛(1956-),男,教授,E-mail:zhengfucong@126.com

巴专化型(*Fusarium oxysporum* f. sp. cubense, FOC)侵染引起的一种世界毁灭性病害^[1],该病最早于 1874 年在澳大利亚被发现,1910 年巴拿马因该病造成很大损失,因此又称巴拿马病;香蕉枯萎病菌在我国广东、广西、福建、海南、云南和台湾的部分地区均有分布^[2],病园发病率为 10%~40%,严重危害时可达 90%以上^[3]。香蕉枯萎病菌有 4 个生理小种,1 号生理小种(简称 FOC1)世界性分布,侵染大密哈(AAA)、苹果(AAB)、丝(AAB)、台湾拉屯旦(AAB)、IC2(AAAA);2 号生理小种(简称 FOC2)仅局限在中美洲,只侵染杂种三倍体棱香蕉 Bluggoe (ABB);3 号生理小种

(简称 FOC3) 只侵染野生的蝎尾蕉属 *Heliconia*; 4 号生理小种(简称 FOC4) 侵染所有的卡文迪许品种(AAA)、台湾拉屯旦(AAB)、大密哈、蜡烛蕉(AA)、布古(ABB)^[4]。香蕉枯萎病菌致病力分化十分明显^[5]和遗传间变异比较丰富^[6]。20 世纪初期香蕉主要种植区因种植 Cavendish 抵御了 FOC1 的危害, 但 20 世纪 60 年代, 香蕉再次受到枯萎病的严重危害, 1967 年台湾首次确认存在新的生理小种, 即 FOC4^[6], 至今为止, 因为 FOC4, 包括中国大陆在内很多香蕉种植区都遭受了该病原菌的严重侵袭^[7]。因此, 监测和研究香蕉枯萎病菌不同生理小种遗传特性, 明确 FOC 生理小种类型, 鉴别 FOC 优势生理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, 也是当前香蕉枯萎病控病亟待解决的问题。目前, 已报道为害我国香蕉的枯萎病菌主要是 FOC1 和 FOC4^[8]。1995 年 Bentley 等^[9]对来自全球 42 个香蕉枯萎病菌(FOC1 和 FOC4) 菌株进行了 RAPD 分析, 在 0.5 的遗传水平上分为 6 个菌群, 其中来自中国的菌株仅涵盖台湾; 2004 年刘景梅等^[10]对来自广东 18 个香蕉枯萎病菌(FOC1 和 FOC4) 菌株进行了 RAPD 分析, 生理小种既有共同带又有各自的特异带, 而同一生理小种内各菌株间谱带差异较小; 2005 年谢艺贤、漆艳香等^[11-12]对来自海南的 18 个香蕉枯萎病菌(FOC1 和 FOC4) 菌株进行了生理小种鉴定和 RAPD 分析, FOC1 和 FOC4 在不同的香蕉上病害严重度达到显著差异, 并在 0.55 的遗传水平上分为 2 个菌群; 2009 年廖林凤等^[13]对来自广东 18 个(FOC1 和 FOC4) 和广西 9 个(FOC1) 香蕉枯萎病菌菌株进行 RAPD 分析, 在遗传相似系数 0.67 时, 可将供试菌株划分为 3 个 RAPD 群(RGs)。一些研究者虽然分别对我国香蕉种植区枯萎病菌遗传分化及其致病力做了研究, 但缺乏对我国整个香蕉种植区枯萎病菌遗传多态性系统研究, 同时随着近几年全球气候及耕作制度和品种等都发生了较大变化, 需要持续监测和掌控我国香蕉枯萎病菌的变异情况。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 RAPD 技术和寄主鉴定方法, 监测病原菌致病性分化, 分析了不同来源的菌株遗传多态性, 以了解不同香蕉枯萎病菌致病力分化和亲缘关系, 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 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 供试菌株 为 2010—2012 年采自海南、广西、广东、福建和云南等省各县蕉区的 55 个香蕉枯萎病菌, 经单孢分离获得纯化的菌株备用, 并使用香蕉枯萎病菌菌株 1 号生理小种 FOC1 和 4 号生理小种 FOC4 (本实验室鉴定保存) 及棉花枯萎病菌 7 号生理(FOV7) 小种作对照, 菌株编号、来源见表 1。

1.1.2 供试寄主 参照李敏慧等^[14]方法, 采用 6~7 叶期粉蕉(ABB Group) 和巴西蕉(Cavendish, AAA Group) 2 种香蕉品种作为香蕉枯萎病菌致病性测试和生理小种鉴定的寄

主, 均由中国热带农业科学院香蕉组培中心提供的组培苗。

1.2 试验方法

1.2.1 病原菌的小种鉴定及其致病力测定 香蕉枯萎病菌的小种鉴定和致病力相结合, 将采自海南、广西、广东、福建和云南等省各县蕉区 55 个菌株和 2 个标准菌株, 配成最终浓度为 1×10^6 的菌悬液, 采用伤根浸菌法^[14], 每植株 50 mL 菌液, 先接种粉蕉(ABB Group), 每个菌株分别接种粉蕉 6 株, 观察病原菌对寄主的致病性程度, 统计和分析发病率及其致病力强弱的结果; 将接种粉蕉发病的菌株, 继续接种巴西蕉(Cavendish, AAA Group), 当发现第一个病株时, 每隔 7 d 记载 1 次, 40 d 后观察致病性, 统计发病率及其致病力的结果。接种发病期间, 温度保持在 26~30℃ 之间, 湿度保持在 60~80% 之间。

病害外部症状和球茎症状分级标准以及病害严重度(disease severity index, DSI) 参照张欣等^[15]的方法, 香蕉外部症状病害严重度记为 DSIL, 球茎的记为 DSIR; 香蕉枯萎病菌致病力由(DSIL) 和(DSIR) 综合评价。外部症状病害严重度小于 2.0、球茎症状病害严重度小于 3.0 时, 记为弱致病力; 外部症状病害严重度在 2.0~3.0 之间、球茎症状病害严重度在 3.0~4.0 之间, 记为中致病力; 外部症状病害严重度大于 3.0、球茎症状病害严重度大于 4.0 时, 记为强致病力。

1.2.2 DNA 提取 菌株均采用马铃薯葡萄糖培养液(PDB)^[16] 培养。挑取直径 0.5 cm 的菌丝块接种 100 mL 液体培养基, 在 28℃ 120 rpm 恒温震荡培养 5 d。双层纱布过滤菌液, 并用灭菌蒸馏水冲洗菌丝 2 次, 所得菌丝经冷冻干燥后, 放入超低温冰箱备用; 用 OMEGA Fungal gDNA Kit 试剂盒提取 DNA, 用蛋白核酸测定仪(Bio-rad) 测定模板 DNA 的 OD_{260}/OD_{280} 值, 确定其纯度和浓度, -20℃ 冰箱保存备用。

1.2.3 病原菌的分子鉴定 将采自海南、广西、广东、福建和云南等省各县蕉区 55 个菌株, FOC1 和 FOC4 2 个标准菌株和棉花枯萎病菌 7 号生理小种作为对照, 在 DNA 上的 rDNA ITS 区段进行 PCR 验证。

rDNA-ITS 区扩增: 镰刀菌 PCR-ITS 的鉴定参照王晓英等^[17]方法, 镰刀菌的特性性引物: Fu3: 5'-CCG AGT TTA CAA CTC CCA AA -3', Fu4: 5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT Gc-3'; 尖孢镰刀菌 PCR-ITS 的鉴定参照 Steinberg 等^[18]方法, 尖孢镰刀菌的特性性引物: Fof: 5'-ACA TAC CAC TTG TTG CCT CG -3', For: 5'-CGC CAA TCA ATT TGA GGA ACG -3'; 尖孢镰刀菌巴西致病变种 4 号生理小种 PCR-ITS 的鉴定参照 Lin 等^[19]方法, 尖孢镰刀菌巴西致病变种 4 号生理小种的特性性引物: Foc1: 5'-CAG GGG ATG TAT GAG GAG GC -3', Foc2: 5'-GTG ACA GCG TCG TCT AGT TCC -3'。PCR 反应体系 (25 μ L): 10 \times PCR Buffer (Mg²⁺ Plus) 2.5 μ L, dNTPs (各 2.5 mmol/L) 2 μ L; 引物 Fu3/Fu4 各 1 μ L; 模板 DNA 1 μ L; dd H₂O 17.5 μ L。PCR 的扩增程序: 94℃ 预变性 5 min; 94℃ 变性 30 s; 56~58℃ (根据引物的退火温度) 退火 30 s; 72℃ 延伸 1 min; 最

表 1 香蕉枯萎病菌菌株编号、来源、致病力及 RAPD 组

序号	菌株	小种	来源	致病力	RAPD 组	序号	菌株	小种	来源	致病力	RAPD 组
1	Foc1	1	FOC1	中	I	30	BF28	4	云南西双版纳	强	II
2	Foc2	4	FOC4	中	II	31	BF29	4	海南儋州	强	II
3	BF1	1	广西玉林	中	I	32	BF30	4	海南海口	中	II
4	BF2	1	广西玉林	弱	I	33	BF31	1	海南海口	强	II
5	BF3	4	广西玉林	弱	II	34	BF32	4	海南东方	强	II
6	BF4	4	广西北海	中	II	35	BF33	4	海南东方	强	II
7	BF5	1	广西北海	强	I	36	BF34	4	海南东方	弱	II
8	BF6	1	广西北海	弱	I	37	BF35	4	海南澄迈	中	II
9	BF7	1	广西钦州	强	I	38	BF36	4	海南澄迈	弱	I
10	BF8	4	广西钦州	中	II	39	BF37	4	海南乐东	强	II
11	BF9	1	广西钦州	中	I	40	BF38	4	海南乐东	中	II
12	BF10	4	广西南宁	中	II	41	BF39	4	海南乐东	强	II
13	BF11	1	广西南宁	弱	I	42	BF40	4	海南昌江	强	II
14	BF12	1	广西南宁	弱	II	43	BF41	4	海南三亚	中	II
15	BF13	1	广东珠海	强	III	44	BF42	4	海南三亚	弱	II
16	BF14	4	广东广州	中	II	45	BF43	4	海南临高	中	II
17	BF15	1	广东博罗	弱	I	46	BF44	4	海南五指山	弱	II
18	BF16	1	广东中山	强	I	47	BF45	4	海南文昌	弱	I
19	BF17	1	广东龙门	中	I	48	BF46	4	海南文昌	强	I
20	BF18	1	福建泉州	弱	I	49	BF47	4	海南琼海	弱	II
21	BF19	4	福建泉州	弱	III	50	BF48	1	海南琼海	强	I
22	BF20	1	福建漳州	中	III	51	BF49	1	海南琼海	中	I
23	BF21	1	福建平和	强	III	52	BF50	1	海南昌江	弱	I
24	BF22	1	福建漳州	强	III	53	BF51	1	海南定安	弱	I
25	BF23	1	云南西双版纳	弱	II	54	BF52	1	海南定安	强	I
26	BF24	1	云南河口	强	II	55	BF53	1	海南五指山	强	I
27	BF25	1	海南琼中	强	II	56	BF54	4	海南三亚	强	II
28	BF26	1	海南琼中	强	IV	57	BF55	4	海南乐东	强	I
29	BF27	1	海南儋州	中	II	58	FOV7	7	江苏南京	-	-

注:(1)FOC1:1号生理小种;FOC4:4号生理小种;FOV7:棉花枯萎病菌7号生理小种。(2)致病力强弱的划分依据:外部症状病害严重度<2.0、球茎症状病害严重度<3.0时,记为弱;外部症状病害严重度在2.0~3.0之间、球茎症状病害严重度在3.0~4.0之间,记为中;外部症状病害严重度>3.0、球茎症状病害严重度>4.0时,记为强。

后72℃延伸10 min;35个循环。用1%琼脂糖凝胶电泳检测并拍照,所得产物经OMEGA胶回收试剂盒回收,克隆到TaKaRapMD18-T Vector载体,转化DH5α大肠杆菌感受态细胞,涂板验证阳性克隆送上海生工生物工程有限公司测序。

1.2.4 病原菌的RAPD扩增 采用上海生工合成的34条10碱基随机引物(表2),对样品进行PCR扩增。PCR

的反应体系(25 μL),10×PCRBuffer (Mg²⁺Plus)2.5 μL; dNTPs(各2.5 mmol/L)2 μL;引物(10 μmol/L)1.0 μL;模板DNA1.5 μL;Taq聚合酶(5 μmol/L)0.2 μL;补足水至25 μL。PCR扩增程序:94℃预变性5 min;94℃变性1 min,36~38℃(根据引物的退火温度)复性1 min(各引物的退火温度不同);72℃延伸2 min;最后一次延伸温度为72℃,7 min;45个循环。16℃下冷却保存至取出。

表 2 RAPD 分析所用引物及其序列

引物编号	引物序列(5'→3')	引物编号	引物序列(5'→3')
OPA-01	CAGGCCCTTC	OPJ-12	GTCCCGTGGT
OPA-04	AATCGGGCTG	OPM-15	GACCTACCAC
OPA-07	GAAACGGGTG	OPM-19	CCTTCAGGCA
OPA-10	GTGATCCAG	OPQ-05	CCGCGTCTTG
OPB-01	GTTTCGCTCC	OPT-05	GGGTTTGGCA
OPB-02	TGATCCCTGG	OPV-18	TGGTGGCGTT
OPB-03	CATCCCCTG	UBC-137	GGTCTCTCCC
OPB-04	GGACTGGAGT	UBC-186	GTGCGTCGCT
OPB-07	GGTGACGCAG	UBC222	AAGCCTCCCC
OPB-08	GTCCACACGG	S-74	TGCGTGCTTG
OPB-14	TCCGCTCTGG	S-121	ACGGATCCTG
OPB-20	GGACCCTTAC	S-124	GGTGATCAGG
OPD-03	GTCGCCGTCA	S-130	GGAAGCTTGG
OPD-20	ACCCGGTCAC	S-146	AAGACCCTC
OPE-04	GTGACATGCC	S-148	TCACCACGGT
OPE-15	ACGCACAACC	S-158	GGACTGCAGA
OPF-05	CCGAATTCCC	S-1177	ACGGCACTCC

根据各引物扩增的电泳照片选择清晰且可重复出现的条带记为 1, 同一位置不出现的为 0, 由此生成 0 和 1 原始矩阵数据。采用 NTSYS-PC2.10 软件中的 SAHN 和 UPGMA(Unweighted pair group mean average) 方法对数据进行聚类分析, 计算多态性百分率, 通过 Tree plot 模块生成系统树状图。同时, 我们还采用 NTSYS-PC2.10 软件中的 DCENTER 和 EIGEN 方法对数据进行主坐标分析 (principal coordinate analysis)。多态性百分率(%)= 特征谱带数/总谱带数×100。

2 结果与分析

2.1 香蕉枯萎病菌小种鉴定及致病力分析

2.1.1 我国香蕉种植区仍以 1 号和 4 号生理小种为主 57 个供试菌株首先采用浸根淋菌法接种粉蕉, 然后再接种巴西蕉。试验结果表明, 菌株在粉蕉和巴西蕉上产生的枯萎病症状无明显差异, 接种 15 d 后, 植株开始出现轻微的枯萎病症状, 下部叶片开始从边缘褪绿、变黄, 球茎出现典型的变褐、坏死; 30 d 下部叶片萎蔫, 剖开球茎呈现红棕色或褐色; 接种 40 d 后蕉苗表现出叶片相继下垂, 由黄色变成褐色而干枯, 部分叶片没有变黄直接垂挂下来, 但球茎内部呈深红色或者棕褐色。所有菌株均能侵染粉蕉, 产生典型的枯萎病症状(图 1, 封二)。与 1 号生理小种 FOC1 和 4 号生理小种 FOC4 对比后, 55 个供试菌株中有 28 个只侵染粉蕉, 属于 1 号生理小种, 分别为海南 10 个、广西 8 个、广东 4 个、福建 4 个、云南 2 个; 另 27 个菌株不仅侵染粉蕉还侵染巴西蕉, 属于 4 号生理小种, 分别为海南 20 个、广西 4 个、广东 1 个、福建 1 个、云南 1 个(表 1)。因此, 在我国各主要香蕉种植区香蕉枯萎病菌仍以 1 号和 4 号生理小种为主, 从供试的香蕉枯萎病菌生理小种鉴定结果看, 其中海南以 4 号生理小种居多, 比 1 号生理小种多 50%, 并且海南省巴西蕉种植面积占整个香蕉种植面积的 80%^[20], 因而 4 号生理小种应是海南的优势种。

2.1.2 香蕉枯萎病菌致病力差异较大, 强致病力菌株居多 根据张欣等(2012)香蕉枯萎病的致病力分级标准统计数据, 综合外部症状和球茎症状的病害严重程度, 依据致病力

分级标准, 对 57 个供试菌株进行致病力评价(表 1)。试验结果表明, 供试的 57 个香蕉枯萎病菌菌株, 致病力有较大差异, 其中强致病力的菌株有 23 个, 病指在 4.1~5.4 之间, 分别为海南 15 个、广西 2 个、广东 2 个、福建 2 个、云南 2 个, 占供试菌株的 41.8%; 中致病力菌株有 15 个, 病指在 2.7~3.8 之间, 分别为海南 7 个、广西 5 个、广东 2 个、福建 1 个, 占供试菌株的 27.3%; 弱致病力菌株有 17 个, 病指在 1.0~2.3 之间, 分别为海南 8 个、广西 5 个、广东 1 个、福建 2 个、云南 1 个, 占供试菌株的 30.9%。我国香蕉种植区中, 海南、广东、福建和广西均存在强、中、弱 3 种致病力类型菌株, 云南主要为强和弱两种致病力类型菌株。

2.2 分子鉴定与寄主鉴定结果一致

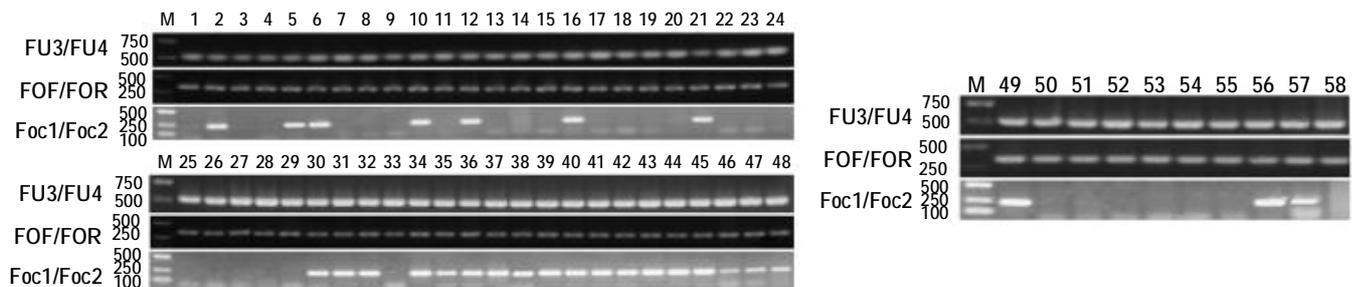
2.2.1 镰刀菌特异 PCR-ITS 鉴定, 供试菌株均为镰刀菌 供试的菌株从形态学上首先认为属于镰刀菌属, 用镰刀菌特异性引物 Fu3/Fu4 进行 PCR 分子鉴定(图 2), 结果显示, 55 个供试菌株与 FOC1 和 FOC4 以及棉花 FOV7 均产生 516 bp 的单一一条带, 经测序与王晓英等^[7]结果一致, 均为镰刀菌。

2.2.2 尖孢镰刀菌特异 PCR-ITS 鉴定, 供试菌株均为尖孢镰刀菌 用尖孢镰刀菌特异性引物 FOF/FOR 进行 PCR 分子鉴定(图 2), 结果显示, 55 个供试菌株与 3 个对照菌株均产生 340 bp 条带, 经测序和 Steinberg 等^[18]报道的尖孢镰刀菌特异序列同源性 100%, 均为尖孢镰刀菌。

2.2.3 PCR-ITS 鉴定出 28 株尖孢镰刀菌古巴专化型 4 号生理小种 用尖孢镰刀菌 4 号生理小种特异性引物 FOC1/FOC2 进行 PCR 分子鉴定, 结果(图 2)显示, 55 个供试菌株有 28 株均产生 242 bp 的条带, 与 4 号生理小种 FOC4 产生的条带大小一致, 经测序和 Lin 等(2009)报道的 *F. oxysporum* f.sp. *cubense* 4 号生理小种特异序列同源性 100%。这个结果与本文利用寄主鉴定的结果一致(表 1)。而其他 27 株 FOC、1 号生理小种 FOC1 和棉花枯萎病菌 7 号小种均未产生 242 bp 条带。

2.3 DNA 多态性

在所测试的 34 个引物中, 从中筛选得到 9 条多态性和扩增重复性好、条带清晰、扩增结果比较明显的引



M: Marker2000; 1-57: 香蕉枯萎病菌菌株; 58: 棉花枯萎病菌菌株, 菌株的顺序同表 1。Fu3/Fu4: 镰刀菌特异性引物 PCR 扩增; FOF/FOR: 尖孢镰刀菌特异性引物 PCR 扩增; FOC1/FOC2: 尖孢镰刀菌古巴专化型 4 号生理小种特异性引物 PCR 扩增。

图 2 58 个镰刀菌特异性引物 PCR 扩增电泳结果

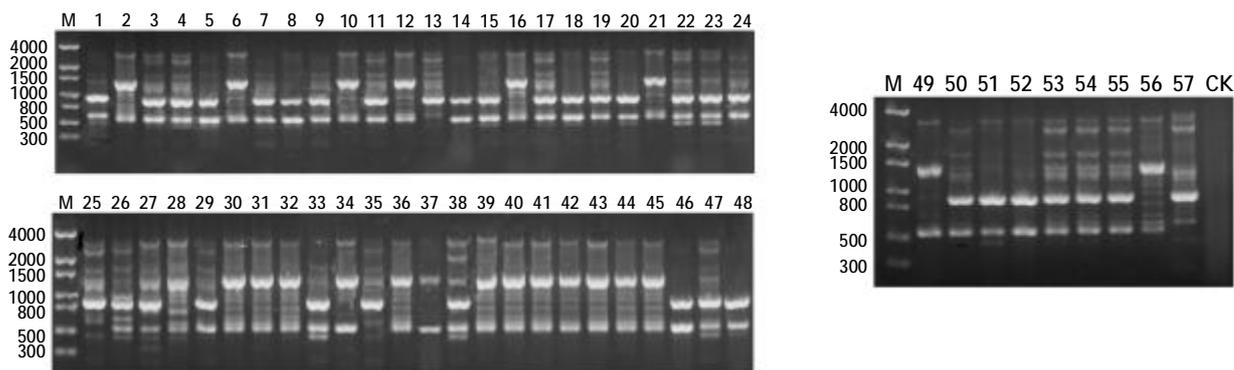
物(表3)。9条引物对供试57株香蕉枯萎病菌基因组DNA均有PCR扩增产物出现,并且重复性较好。不同引物扩增出的条带数不等,如引物UBC-222、S-74多态性条带分别为21条和17条,引物OPB-02多态性条带为7条;但9条引物产生的条带数总体在8~21之间,平均

表3 香蕉枯萎菌 DNA 扩增产生的 RAPD 位点统计结果

随机引物	RAPD 位点	多态性 位点	多态性位 点频率
OPB02	8	7	87.5
OPB14	14	9	64.3
OPD20	16	15	93.8
OPE15	15	15	100
OPQ05	17	16	100
OPT05	14	13	92.9
S1177	13	13	100
S74	18	17	94.4
UBC222	21	21	100
总计	136	126	92.6

每条引物 15.1 条。在 DNA 分子量为 200~4 000 bp 间,9 条引物对 57 个香蕉枯萎病菌菌株进行 PCR 扩增,共扩增出 136 条谱带,其中具有多态性的条带有 126 条,多态性位点频率为 93.4%。不同引物产生多态性片段的比例差别较大(表 3),引物 OPE-15、OPQ-05、S-1177、UBC-222 多态性位点频率达到 100%,而引物 OPB-14 只有 64.3%,表明香蕉枯萎菌不同菌株间具丰富的 DNA 多态性。

确定为 1 号生理小种的菌株,在不同省之间有 1 条共同条带,位于 800 bp,仅广东、福建有 2 条共同的条带,分别位于 800 bp 和 600 bp(图 3);确定为 4 号生理小种的菌株,在不同省之间谱带差异较大,来自广东、福建和云南的菌株分别在 1 200 bp 和 600 bp 有共同条带,来自广西的菌株,除 5 号菌株缺失 1 200 bp 条带外,其他均含有 1 200 bp 和 600 bp 条带;来自海南的菌株,除 46、47、49、49、56 号菌株缺失 1 200 bp 条带,以及 35 号菌株缺 600 bp 条带外,其他均含有 1 200 bp 和 600 bp 条带(图 3)。



M:Marker4000; 1~57号:代表菌株顺序,同表1的顺序;CK:去离子水对照

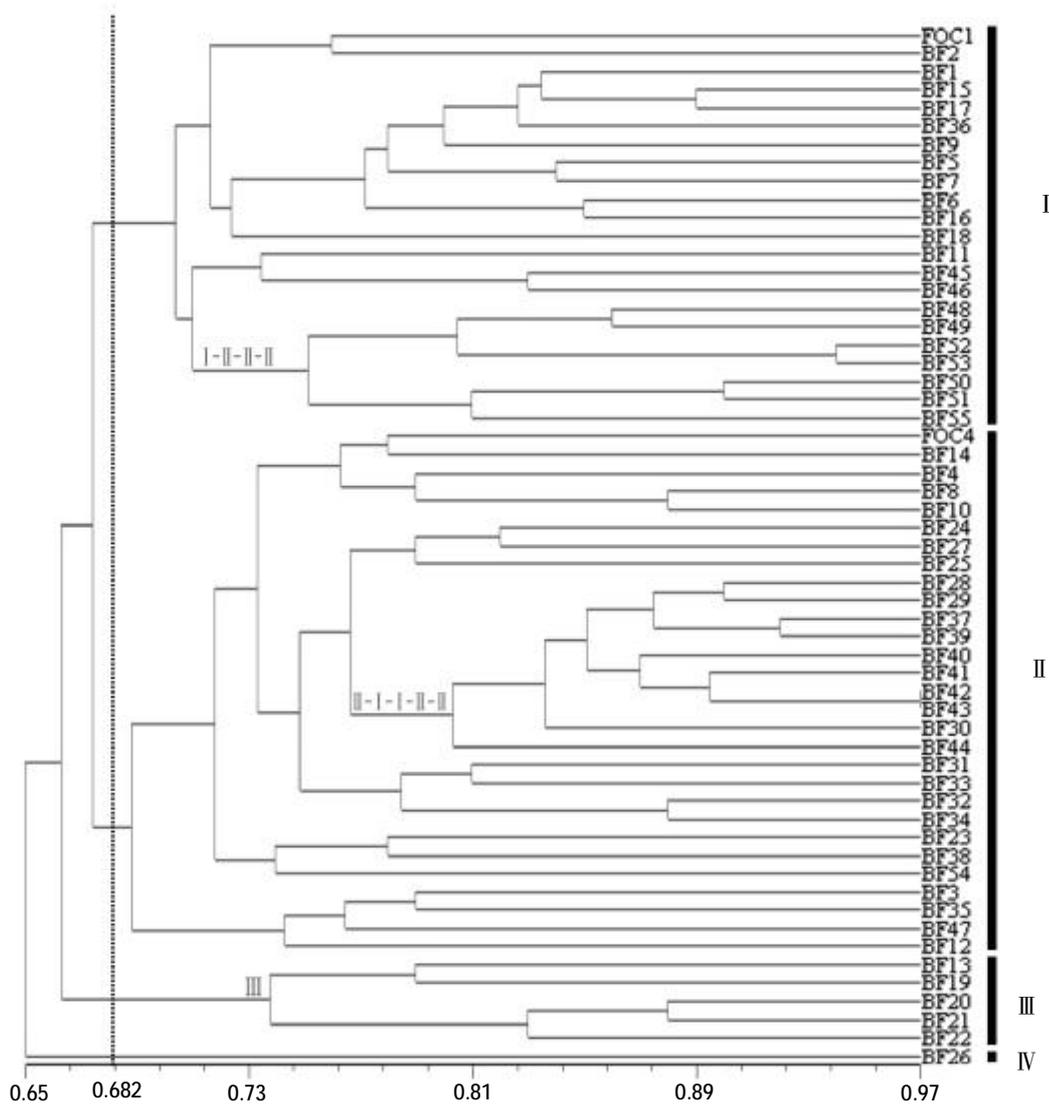
图3 引物OPQ05扩增的RAPD图谱

2.4 遗传多样性

2.4.1 中国香蕉枯萎菌分为4个RAPD菌群 为了进一步说明57株香蕉枯萎病菌的遗传分化关系,根据供试菌株RAPD-PCR扩增条带的有无,以(1,0)记数,形成原始矩阵,根据Nei's遗传距离,采用UPGMA法进行聚类分析建立树状图(图4)。采自中国不同地区1号生理小种和4号生理小种,经过RAPD扩增及聚类分析后,在0.68阈值处可分为4个菌群,分别命名为I、II、III和IV菌群,其中I菌群包含FOC1和其他21个菌株,其中海南有10个菌株,1号生理小种占6个,4号生理小种占4个;广西有7个菌株,均为1号生理小种;广东3个菌株,均为1号生理小种;福建1个菌株,为1号生理小种;1号生理小种占I菌群的81%。II菌群包含FOC4及其他27个菌株,其中海南有19个菌株,1号生理小种占4个,4号生理小种占15个;广西有5个菌株,1号生理小种占4个,4号生理小种占1个;广东有1个菌株,为1号生理小种;云南有3个菌株,1号生理小种占2个,4号生理小

种占1个;4号生理小种占II菌群的75%。III菌群包含5个菌株分别来自福建和广东,福建4个菌株,1号生理小种有3个,4号生理小种1个;广东为1个1号生理小种;IV菌群只含1个菌株,来自海南琼中,属于1号生理小种。因此,我国香蕉枯萎病菌1号生理小种和4号生理小种主体菌群(I和II)还保持较近的亲缘关系,但RAPD菌群分类结果突显这两个生理小种遗传背景已趋于复杂,除1号生理小种BF26菌株单独形成IV菌群外,4号生理小种和其余1号生理小种均没有单独形成菌群,I、II、III菌群同时含有1号和4号生理小种,这和以往国内研究结果不一致。BF26不仅和4号生理小种具有较远的亲缘关系,而且和1号生理小种主体菌群(I)具有较远的亲缘关系。

各省份的FOC遗传关系也较为复杂,海南采集的30个菌株中,分别被划分在4个菌群,其中1号生理小种BF26菌株被单独划分在IV菌群,和来自I菌群的广西1号生理小种BF12的遗传距离最远为0.80;广东的5个菌



RAPD 扩增及聚类分析后在 0.68 阈值处可分为 4 个菌群,分别命名为 I、II、III 和 IV 菌群,其中 I 菌群包括 21 个菌株和 FOC1; II 菌群包含包括 28 个菌株和 FOC4; III 菌群包含 5 个菌株,IV 群只有 BF26

图 4 57 株香蕉枯萎菌 RAPD 聚类分析

株中有 3 个菌株划分 I 菌群,其他两个分属 II 和 III 菌群;广西的 12 个菌株被划分在 I 和 II 菌群;云南参试的 3 个菌株均划分在 II 菌群;福建的 5 个菌株中有 4 个菌株划分在 III 菌群,另一个划分在 I 菌群。和海南相比,尽管其他 4 个省份的菌株采集量相对较少,但从遗传距离来看,福建大部分菌株遗传距离较近,而广东、广西和云南 3 个省的菌株,在省菌群间具有较远的遗传距离,来自广西的 BF9 与 BF12 遗传距离为 0.71,来自广东的 BF14 和 BF17 遗传距离为 0.51,来自福建的 BF18 和 BF19 遗传距离为 0.40 等。这些结果说明各省份香蕉枯萎病菌小种遗传分化明显,在分子水平上均存在较大的差异,但 55 株供试株菌中,区域分化的特点不明显,致病力跟遗传之间无相关性,通过对寄主致病力确定的菌株生理小种却与遗传性具有较好相关性。

RAPD 扩增及聚类分析后在 0.68 阈值处可分为 4 个菌群,分别命名为 I、II、III 和 IV 菌群,其中 I 菌群包括 21

个菌株和 FOC1; II 菌群包含包括 28 个菌株和 FOC4; III 菌群包含 5 个菌株,IV 群只有 BF26。

2.4.2 遗传分化的主坐标分析 聚类分析更多反映个体间的关系,而采用主坐标分析反映群体间的距离关系^[20]。应用 NTSYS2.10 软件,基于遗传相似系数,对 57 个菌株进行主坐标分析,绘制出主坐标的二维散点图,前 3 个主坐标解释的变异分别为 13.94%、8.28%、6.48%,变异幅度较小,显示将 57 个基因型分成了 3 个主要集中区(图 5),主坐标分析二维散点(图 5)和聚类分析(图 4)比较发现,聚类分析中 II 菌群中亚组 II - I - I - II - I - II - I 和主坐标分析中 A 组完全一致,聚类分析中 I 菌群中的亚组 I - II - II - II 和主坐标分析中的 B 组完全一致,聚类分析中 III 菌群和主坐标分析中的 C 组完全一致,其他菌株之间的亲缘关系和主坐标分析的结果基本相同,但也有差别。因此,从主坐标分析二维散点图说明 FOC 群体内个体间变异没有明显的地理生态分布关系。

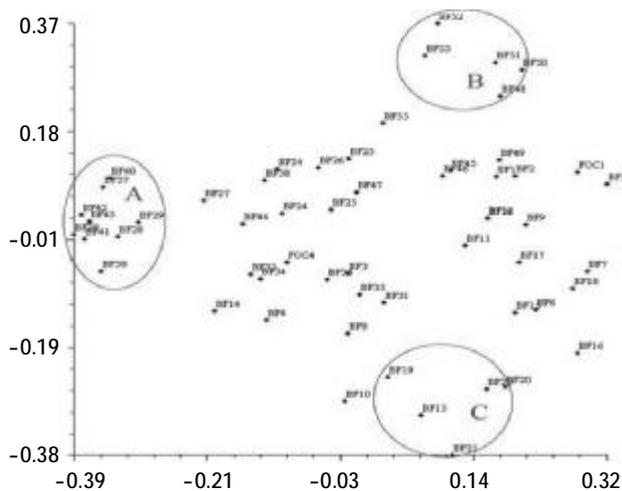


图5 基于RAPD的57个FOC菌株的主坐标分析二维散点图

3 结论与讨论

香蕉枯萎病菌属于镰刀菌,遗传变异强,致病力或者生理小种改变,往往会给抗病育种及病害有效防控造成极大的阻碍^[14]。因此,为进一步了解近几年我国香蕉枯萎病菌生理小种变异及其遗传多样性,采用分子鉴定与寄主鉴定手段,我们较系统研究了中国海南、广东、广西、福建和云南5个省香蕉种植区FOC的生理分化及遗传多样性,尽管部分省份菌株样本较少,但仍能再次监测和确认目前5省存在1号和4号生理小种,未发现有其他生理小种,尤其鉴定广西存在8个1号生理小种,同时还有4个4号生理小种,这和最近首次报道利用寄主鉴定广西存在4号生理小种的结果一致^[22];本研究也进一步弥补了云南和福建FOC遗传多态性及其生理小种方面的研究。

遗传多样性是生物体所携带的遗传信息总和,遗传多样性越丰富,变异越高就越容易扩展到其他新的环境中生存,RAPD的分子标记是DNA分子间遗传物质内核苷酸序列变异为基础的遗传标记,反映是DNA水平遗传多态性^[23]。漆艳香等^[12]对采自海南和广东的18个(FOC1和FOC4)菌株进行RAPD分析,15个引物扩增产生97个RAPD标记,其中76条为多态性带,占78.4%,在0.19的遗传相似系数上18个(FOC1和FOC4)菌株划分为4个RAPD群组,来自海南的1号生理小种统一分在I群,4号生理小种也统一分在II群;来自广东东莞的1号和4号生理小种分在III和IV群;廖林凤等^[13]对采自广东的18个(FOC1和FOC4)、广西的9个(FOC1)菌株进行RAPD分析,11个引物扩增产生94个RAPD标记,在0.7的遗传相似系数上划分为3个RG群组,1号生理小种均聚类在RG II群,同时广东的6个1号生理小种聚类在RG II群的1亚群,广西的4个1号生理小种聚类在RG II群的2亚群;4号生理小种均聚在RG I群。这和我们的研究结果不完全一致,在本研究中,筛选出的9条引物,扩增产生136条RAPD条带,多态性条带有126条,占RAPD总条带的93.4%,比前人扩增的更加丰富;分析55个菌株,将其分成了4个RAPD群,60.7% 1号生理小

种分在I菌群,有39.3%的1号小种分别分在其他3个菌群;81.5% 4号生理小种主要分在II菌群,18.5%分在其他菌群,1号和4号生理小种并未独立成群,而是出现1号和4号同分在一个RAPD菌群的情况(图4),Bentley等^[9]也曾报道采用RAPD将FOC分成2个群组,每个群组均含有1,2或者4号生理小种。另外鉴定为1号生理小种的BF26菌株,却与1号生理小种所在主体菌群(I)具有较远的亲缘关系。这些说明我国香蕉枯萎病菌小种间在分子水平上遗传分化趋于复杂,香蕉枯萎病菌生理小种是否会出现新的生理分化,或者现有的寄主鉴定是否能完全满足生理小种研究的需求,都值得进一步的探讨。

本研究对采自中国香蕉主产区的55个枯萎菌菌株进行RAPD遗传标记,产生136个RAPD标记,其中126条(93.4%)为多态性带,聚类(GS)分析和主坐标(PCA)分析结果基本一致,但也有差别。在0.68的遗传相似系数上55个(FOC1和FOC4)菌株划分为4个群组,这4个群组中,I菌株和II菌株还可以分为几个亚群。不同人的研究,菌株的选择之间有差异,但是遗传距离在0.19~0.7之间都能很好的把供试菌株划分为不同的菌群^[9-13]。

海南供试30个菌株,1号生理小种占33.3%,4号生理小种占66.7%,强、中、弱致病力菌株分别占50%、23.3%和26.7%,不同致病型或者生理小种分别分布在海南采集地13县市。通过聚类分析(图4)和主坐标分析(图5)分析,来自海南琼中的FOC菌株BF26,在遗传距离0.65被单独划分为IV菌群,鉴定为1号生理小种,与其他54个FOC菌株和2个已知生理小种均有较大的遗传距离,其表现为强致病力,BF26是否具有特殊的遗传特性还有待进一步研究;同样,在遗传距离为0.97的地方,也出现了2个强致病性菌株BF52和BF53,分别来自海南定安和三亚,这2个菌株被单独划分在同一个亚菌群,并且和同属I菌群的其他菌株具有较远的遗传距离;谢艺贤等^[11]也曾报道来自海南三亚的一个强致病力菌株,被单独划分在一个菌群。因此,作为我国香蕉种植主要地区,以及南繁基地和国际旅游岛,频繁的种质间的交流及适宜的气候等条件,对香蕉枯萎病菌的遗传变异创造了有利的条件,从我们的研究结果显示海南香蕉枯萎病菌遗传多样性复杂,多态性丰富。

香蕉枯萎病菌分子遗传特征性标记主要依靠DNA上的rDNA ITS区段进行PCR验证。先前研究表明,通过扩增特异序列区别4号或者1号生理小种^[9],扩增结果往往产生1条约242 bp的特异条带,或者产生两条不同的特异条带,1号小种产生205 bp条带,4号产生252 bp条带^[24]。利用三重PCR进行扩增产生4条不同的特异性条带,1号生理小种产生354 bp和729 bp条带,4号生理小种产生593 bp和729 bp的条带^[25]。在我们研究中,采用了Lin等^[19]报道的引物序列扩增55个菌株,能很好鉴定出4号生理小种。我们在RAPD多态性条带分析中发现,1号生理小种都含有1条共同条带,位于800 bp,而4号小种共同条带主要位于1200 bp和600 bp,通过测序在NCBI以

及 ABI 等数据库中 BLAST, 未发现有同源性序列(数据未显示), 这段序列是否可以作为香蕉枯萎病菌小种划分的特征序列, 或者和病原菌的致病性存在一定关系, 这些都有待作进一步的研究。

综合上述结果, 中国香蕉种植区仍以 1 号和 4 号生理小种为主, 但是生理小种的遗传分化在分子水平上趋于复杂化, 香蕉枯萎病菌群体具有丰富的多态性, 采用 RAPD 标记分析香蕉枯萎病菌的遗传多样性是可行的。FOC 致病力的强弱和菌株遗传关系无直接的相关性, 跟地理分布也没有相关性, 生理小种的鉴定来自病原菌对寄主的致病性, 因此, 香蕉枯萎病菌的遗传多态性可能更多依赖其寄主。

参考文献:

- [1] Hwang S C, Ko W H. Cavendish Banana Cultivars Resistant to Fusarium Wilt Acquired through Somaclonal Variation in Taiwan[J]. Plant Disease, 2004,88 (6):580-588.
- [2] 林时迟,张绍升,周乐峰,等.福建省香蕉枯萎病鉴定[J].福建农业大学学报, 2000,29(4):465-469.
- [3] 张欣. 香蕉枯萎病菌遗传多态性及绿色荧光蛋白基因转化的研究[D]. 儋州:华南热带农业大学, 2007:12-22.
- [4] Persley G J.Banana and plantain breeding strategies [M]. Austria:State Mutual Book&Periodical Service.Ltd., 1987.
- [5] Groenewald S, Berg N V D, Marasas W F O et al. The application of high-throughput AFLP in assessing genetic diversity in fusarium oxysporum f.sp.cubense [J].Mycological Research, 2006,110(3):297-305.
- [6] Noelani V D B,Dave K.B,Ingo H,Paul R.J.B, et al.,Tolerance in banana to Fusarium wilt is associated with early up-regulation of cell wall-strengthening genes in the roots[J]. Molecular Plant Pathology, 2007, 8(3), 333-341.
- [7] 何欣,黄启为,杨兴明,等.香蕉枯萎病致病菌筛选及致病菌浓度对香蕉枯萎病的影响[J].中国农业科学, 2010,43(18):3809-3816.
- [8] 孙勇,曾会才,彭明,等.香蕉枯萎病致病分子机理与防治研究进展[J].热带作物学报, 2012,33(4):759-766.
- [9] Bentley S,Pegg K G ,Dale J L. Genetic variation among a world-wide collection of isolates of Fusarium oxysporum f. sp. cubense analysed by RAPD-PCR fingerprinting [J].Mycological Research, 1995, 99: 1378-1384.
- [10] 刘景梅,王璧生,陈霞.广东香蕉枯萎病菌生理小种 RAPD 技术的建立[J].广东农业科学.2004,4:43-45.
- [11] 谢艺贤,张欣,漆艳香,等.香蕉枯萎病菌的致病性测定及其 RAPD 分析[J].热带作物学报, 2005,26(2):175-180.
- [12] 漆艳香,谢艺贤,张欣,等.海南省香蕉枯萎菌生理小种的 RAPD 分析[J].菌物学报, 24(3):2005, 394-399.
- [13] 廖林凤,董章勇,王振中,等.香蕉枯萎病菌 RAPD 分析及 4 号生理小种的快速检测[J].植物病理学报, 2009,39 (4): 353-361.
- [14] 李敏慧,习平根,姜子德,等.广东香蕉枯萎病菌生理小种的鉴定[J].华南农业大学学报. 2007,28(2):38-41.
- [15] 张欣,张贺,蒲金基,等.香蕉枯萎病菌 4 号小种致病力分化的初步研究[J].中国农学通报, 2012,28(04):172-178.
- [16] 方中达.植病研究方法[M].第三版.北京:中国农业出版社, 1998: 46-53.
- [17] 王晓英,刘秀梅.串珠镰刀菌分离菌株 PCR 筛选鉴定方法的研究[J].中国食品卫生杂志, 2005,17(2):145-150.
- [18] Steinberg N B,Labuschagne N ,Viljoen A.Isolation and characterization of nonpathogenic Fusarium Oxysporum isolates from the rhizosphere of healthy banana plant[J]. Plant Pathology, 2006,55: 207-216.
- [19] Lin Y H , Chang J Y, Liu E T, et al. Development of a molecular marker for specific detection of Fusarium oxysporum f. sp. cubense race 4 [J]. European Journal of Plant Pathology , 2009,123:353-365.
- [20] 王长林.香蕉新品系选育及生产试验[D]. 儋州:华南热带农业大学, 2007:1-2.
- [21] 孔秋生,李锡香,向长萍,等.萝卜种质资源亲缘关系的 RAPD 分析[J]. 2004,5(2):156-160.
- [22] 莫贱友,秦碧霞,郭堂勋,等.广西香蕉枯萎病原菌 4 号生理小种的分子检测与鉴定[J].南方农业学报,2012,43(9):1312-1315.
- [23] 杨秀娟,王舒婷,姚锦爱,等.基于标记的福建省稻曲病菌遗传多样性分析[J].农业生物技术学报,2011,19(6):1110-1119.
- [24] 吕伟成,张绍升,林志远.一步双重 PCR 检测香蕉枯萎病菌生理小种[J].中国农学通报,2009,25(1):237-240.
- [25] 李敏慧,余雄涛,王鸿飞,等.香蕉枯萎病菌 1 号和 4 号生理小种的快速检测与鉴定[J].中国农业科学, 2012,45(19):3971-3979.



欢迎订阅 2014 年《中国稻米》杂志

《中国稻米》是由农业部主管,中国水稻研究所主办,全国农业技术推广服务中心等单位协办的全国性水稻科学技术期刊。设有“专论与研究”、“品种与技术”、“各地稻米”、“综合信息”等栏目,兼具学术性、技术性、知识性、信息性等特点。据《中国科技期刊引证报告》(核心版)统计,《中国稻米》2012 年的影响因子为 0.616。2008 年度还有一篇文章被评为中国百篇最具影响的国内文章。适合我国水稻产区各级技术人员及农业与粮食行政管理人员、科研教学人员和

稻农阅读。本刊为双月刊,标准大 16 开本,单月 20 日出版。每期定价 10.00 元,全年 60.00 元,公开发行,邮发代号:32-31,国内刊号:CN33-1201/S,国际统一刊号:ISSN 1006-8082, E-mail:zgdm@163.com,网址:www.zgdm.net,欢迎新老读者到当地邮局订阅,也可直接到本刊编辑部订阅。

地址:浙江省杭州市体育场路 359 号 邮政编码:310006
电话(传真):0571-63370271,63370368