

# 苦瓜枯萎病菌的鉴定及其遗传多样性分析

陈振东<sup>1,2,3</sup>, 袁高庆<sup>1</sup>, 黎起秦<sup>1\*</sup>, 秦健<sup>1</sup>, 蒋雅琴<sup>3</sup>, 黄如葵<sup>2,3</sup>

(<sup>1</sup>广西大学农学院, 南宁 530004; <sup>2</sup>广西作物遗传改良生物技术重点开放实验室, 南宁 530007;

<sup>3</sup>广西农业科学院蔬菜研究所, 南宁 530007)

**摘要:**对分离获得的 32 株苦瓜枯萎病菌菌株进行形态学特征和寄主专化型测定,结果表明,测试的苦瓜枯萎病菌株均为尖孢镰刀菌苦瓜专化型 (*Fusarium oxysporum* f. sp. *momordicae*),这些菌株可以侵染苦瓜和瓠瓜幼苗,但不侵染其他葫芦科瓜类作物。对苦瓜枯萎病菌菌株的 rDNA-ITS 区 (ITS1、5.8S 和 ITS2) 序列进行扩增测序,结果显示其序列长度均为 456 bp;聚类分析表明测序菌株与镰刀菌属中尖孢镰刀菌不同专化型的菌株聚为一群。利用 RAPD 标记技术分析苦瓜枯萎病菌的遗传多样性,结果显示苦瓜枯萎病菌株与其他葫芦科瓜类作物枯萎病菌株间的遗传相似系数范围为 0.59~0.99,当遗传相似系数为 0.85 时,供试的 48 个菌株分成 10 个类群 ( $G_{1-10}$ )。在 RAPD 聚类树中所有苦瓜枯萎病菌株聚在一个分支上 ( $G_1$  群),菌株间的遗传相似系数范围为 0.92~1.00,具有较高的遗传相似性,且菌株的聚群与地理来源存在一定的相关性。

**关键词:**尖孢镰刀菌苦瓜专化型; rDNA-ITS; RAPD-PCR; 遗传多样性

## Identification and genetic diversity of *Fusarium oxysporum* isolates from bitter gourd

CHEN Zhen-dong<sup>1,2,3</sup>, YUAN Gao-qing<sup>1</sup>, LI Qi-qin<sup>1</sup>, QIN Jian<sup>1</sup>, JIANG Ya-qin<sup>3</sup>, HUANG Ru-kui<sup>2,3</sup> (<sup>1</sup> College of Agriculture, Guangxi University, Nanning 530004, China; <sup>2</sup> Guangxi Crop Genetic Improvement and Biotechnology Lab, Nanning 530007, China; <sup>3</sup> Vegetable Research Institute, Guangxi Academy of Agricultural Sciences, Nanning 530007, China)

**Abstract:** Thirty-two *Fusarium oxysporum* isolates obtained from wilt bitter gourd in different regions of China were identified by morphology and formae speciales test. The results showed that all isolates were *Fusarium oxysporum* f. sp. *momordicae* (*FOM*). These isolates could only infect the seedlings of bitter gourd and bottle gourd, but not the other cucurbit species. Amplifying and sequencing results of the rDNA-ITS of isolates showed that the total length of rDNA-ITS (ITS1, 5.8S and ITS2) of *FOM* isolate was 456 base pairs. The clustering analysis of rDNA-ITS indicated that *FOM* and *F. oxysporum* f. spp. isolates could be gathered into one group. Meanwhile the results of the genetic diversity analysis with RAPD molecular marker showed that the genetic similarity coefficient of *FOM* isolates and the other formae speciales of *F. oxysporum* isolates from cucurbit hosts was ranging from 0.59 to 0.99; forty-eight isolates could be divided into ten RAPD groups ( $G_{1-10}$ ) when the genetic similarity coefficient reached 0.85. In RAPD dendrogram, all the *FOM* isolates were gathered into one phylogenetic branch (group  $G_1$ ) with the genetic similarity coefficient ranged from 0.92 to 1.00, which indicated a high genetic similarity existed in these isolates, and classification of phylogenetic group was related to geographic origin in some extents.

**Key words:** *Fusarium oxysporum* f. sp. *momordicae*; formae speciales; rDNA-ITS; RAPD-PCR; genetic diversity

收稿日期: 2013-05-31; 修回日期: 2013-12-19

基金项目: 广西自然科学基金项目(2012GXSFBA053038)

通讯作者: 黎起秦,教授,主要从事植物病理学研究;E-mail: qqli5806@gxu.edu.cn

第一作者: 陈振东,男,广西平南人,助理研究员,博士研究生,主要从事蔬菜病理学研究;E-mail: czd3808@gxaas.net。

中图分类号: S432.1

文献标识码: A

文章编号: 0412-0914(2014)01-0036-10

苦瓜(*Momordica charantia*)枯萎病在我国的华南、华东、西南和台湾等地区<sup>[1-6]</sup>以及国外的印度、日本和菲律宾等国家<sup>[7-9]</sup>的苦瓜产区均可发生,引起苦瓜整株萎蔫死亡,是苦瓜生产上危害最为严重的一种土传病害,严重制约了苦瓜产业的发展<sup>[10]</sup>。

1983年Sun等<sup>[11]</sup>首次报道了引起苦瓜枯萎病的病原为尖孢镰刀菌苦瓜专化型(*Fusarium oxysporum* f. sp. *momordicae*, FOM)。目前已知的葫芦科瓜类枯萎病尖孢镰刀菌的专化型(formae speciales)至少有8种<sup>[12,13]</sup>,而各专化型菌株的形态非常接近,不同的专化型仍主要依赖特殊寄主或较窄的寄主范围进行区分<sup>[3,4]</sup>。2008年,Cumagun等<sup>[14]</sup>对来自菲律宾的21个苦瓜枯萎病菌株进行硝酸盐利用缺陷(Nitrate-non-utilizing, nit)突变体诱导和营养体亲和性测定,获得4个营养体亲合群(Vegetative compatibility groups, VCGs),发现大部分菌株属于同一个营养体亲合群,表现较低的遗传多态率( $VCG_{div} = 0.19$ )。目前尚未见有关中国尖孢镰刀菌苦瓜专化型菌株在镰刀菌种间的分子系统发育关系及种内遗传多样性的系统报道。

本文在病原表型鉴定和寄主专化型测定的基础上,对苦瓜枯萎病菌核糖体基因内转录间隔区(rDNA-ITS)序列进行了分析,评价ITS序列在苦瓜枯萎病菌鉴定中的作用;并用随机扩增多态性DNA(random amplified polymorphic DNA, RAPD)技术研究苦瓜枯萎病菌及其近缘株系在尖孢镰刀菌种内的遗传差异性,从而为今后开展病原的快速鉴定和苦瓜的抗病分子育种研究提供科学依据。

## 1 材料与方 法

### 1.1 供试菌株

分别对采自广西、广东、福建和湖南等地的苦瓜枯萎病样本用组织分离法<sup>[15]</sup>分离病原物,获得32株苦瓜枯萎病单孢纯化菌株,用柯赫氏法则对这些菌株进行寄主回接测定,以确认其病原,然后对这些菌株进行形态学和寄主专化型测定。

用于遗传多样性分析的菌株,除分离得到的32株菌株外,另增加16株瓜类枯萎病尖孢镰刀菌不同专化型的近缘菌株,包括:由中国普通微生物

保藏管理中心(China General Microbiological Culture Collection Center, CGMCC)和中国农业微生物菌种保藏管理中心(Agricultural Culture Collection of China, ACCC)提供的2株黄瓜枯萎病菌、2株西瓜枯萎病菌,以及由广西农科院蔬菜研究所病理实验室分离、鉴定和保存的12株瓜类作物枯萎病菌株(其中西瓜枯萎病菌2株,甜瓜枯萎病菌1株,瓠瓜枯萎病菌2株,丝瓜枯萎病菌3株,冬瓜枯萎病菌4株)。所有供试的48个菌株的名称、寄主及来源见表1。

### 1.2 苦瓜枯萎病菌形态学特征及寄主专化型测定

将苦瓜枯萎病菌株分别移至马铃薯蔗糖培养基(potato sugar agar, PSA)平板上,在26℃恒温下暗培养7d,观察各菌株的菌落、分生孢子、产孢细胞和厚垣孢子的形态和颜色,测量其大小。

专化型测定的寄主植物有苦瓜、冬瓜、节瓜、西瓜、甜瓜、黄瓜、瓠瓜、丝瓜和南瓜,由广西农科院蔬菜研究所提供。育苗前先用0.1%升汞液进行种子消毒,经灭菌水冲洗后播种至灭菌基质中;待苗长至两叶一心时,将苗轻轻拔出洗净根部,将其放入浓度为 $1 \times 10^6$  cfu · mL<sup>-1</sup>的病原菌孢子悬浮液中浸根30min;然后移至装有灭菌基质的营养钵,移到温度为26~28℃的温室中。以清水作对照,各菌株接种每一寄主植物30株,每处理3次重复,接种后隔天观察发病情况,25d后统计发病率和死亡率。

### 1.3 苦瓜枯萎病菌的rDNA-ITS序列分析

采用改进的CTAB(cetyltrimethylammonium bromide)法<sup>[16]</sup>提取供试菌株基因组DNA,置于-20℃冰箱中保存。用真菌rDNA-ITS序列的通用引物ITS4(5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3')和ITS5(5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3')<sup>[17]</sup>对32个苦瓜枯萎病菌菌株的基因组DNA进行扩增,引物由生工生物工程(上海)有限公司合成。扩增体系25μL:有10×PCR buffer 2.5μL、MgCl<sub>2</sub>(2.5mmol · L<sup>-1</sup>)2μL、Taq酶(5U · μL<sup>-1</sup>)0.2μL、dNTPs(10mmol · L<sup>-1</sup> each)1.0μL、引物ITS4(10μmol · L<sup>-1</sup>)1.0μL、引物ITS5(10μmol · L<sup>-1</sup>)1.0μL、DNA模板20ng、

Table 1 Isolates of *Fusarium oxysporium* used in the study

Isolate	Host	Source
GD-1	Bitter gourd	GZ, Guangdong, China
GD-2	Bitter gourd	GZ, Guangdong, China
FJ-11	Bitter gourd	FZ, Fujian, China
FJ-15	Bitter gourd	FZ, Fujian, China
HY-1	Bitter gourd	HY, Hunan, China
HY-2	Bitter gourd	HY, Hunan, China
WT-1	Bitter gourd	NN, Guangxi, China
WT-4	Bitter gourd	NN, Guangxi, China
CGMCC3.2830	Cucumber	CGMCC
ACCC30220	Cucumber	ACCC
ACCC30024	Watermelon	ACCC
ACCC31354	Watermelon	ACCC
FONZH133	Watermelon	ZZ, Henan, China
FON8	Watermelon	NN, Guangxi, China
FOMXJ151	Muskmelon	CJ, Xinjiang, China
FJAT 173	Bottle gourd	FZ, Fujian, China
FJAT 175	Bottle gourd	FZ, Fujian, China
FLUGD1	Luffa	GZ, Guangdong, China
FLUGD2	Luffa	GZ, Guangdong, China
FLUGD3	Luffa	GZ, Guangdong, China
FBENX102	Wax gourd	NX, Guangxi, China
FBENN3	Wax gourd	NN, Guangxi, China
FBEYL5	Wax gourd	YL, Guangxi, China
FBEGL1	Wax gourd	GL, Guangxi, China
SC-1	Bitter gourd	CD, Sichuan, China
CQ-1	Bitter gourd	CQ, Chongqing, China
QT-1	Bitter gourd	NN, Guangxi, China
AS-1	Bitter gourd	NN, Guangxi, China
AS-8	Bitter gourd	NN, Guangxi, China
AS-9	Bitter gourd	NN, Guangxi, China
AS-10	Bitter gourd	NN, Guangxi, China
AS-11	Bitter gourd	NN, Guangxi, China
AS-12	Bitter gourd	NN, Guangxi, China
AS-13	Bitter gourd	NN, Guangxi, China
AS-14	Bitter gourd	NN, Guangxi, China
AS-15	Bitter gourd	NN, Guangxi, China
AS-16	Bitter gourd	NN, Guangxi, China
AS-17	Bitter gourd	NN, Guangxi, China
AS-19	Bitter gourd	NN, Guangxi, China
AS-20	Bitter gourd	NN, Guangxi, China
AS-21	Bitter gourd	NN, Guangxi, China
AS-22	Bitter gourd	NN, Guangxi, China
AS-23	Bitter gourd	NN, Guangxi, China
AS-24	Bitter gourd	NN, Guangxi, China
AS-25	Bitter gourd	NN, Guangxi, China
AS-26	Bitter gourd	NN, Guangxi, China
AS-27	Bitter gourd	NN, Guangxi, China
AS-28	Bitter gourd	NN, Guangxi, China

CGMCC: China General Microbiological Culture Collection Center; ACCC: Agricultural Culture Collection of China; GZ: Guangzhou city; FZ: Fuzhou city; HY: Hengyang city; CD: Chengdu city; CQ: Chongqing city; NN: Nanning city; ZZ: Zhengzhou city; CJ: Changji city; NX: Nanxiao city; YL: Yulin city; GL: Guilin city.

ddH<sub>2</sub>O 15.3 μL;设 1 个反应管用双蒸水代替模板 DNA 作对照。反应程序:94℃ 预变性 10 min;94℃ 变性 1 min,55℃ 退火 1 min,72℃ 延伸 2 min,共 25 个循环;72℃ 延伸 10 min,4℃ 保存备用。以 100 bp plus II DNA Ladder(北京天根生物技术有限公司)为标准分子量,取 5 μL PCR 产物经 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测,在 UVItc<sup>®</sup> 凝胶成像系统上观察并拍照。

将 PCR 产物送上海生工测序后,与 GenBank 数据库的核苷酸序列进行 BLAST 同源性比对分析。从 GenBank 数据库中下载参照镰刀菌菌株的 rDNA-ITS 区序列,用 Clustal X (version 1.83) 软件中的 Alignment 程序进行多重比对 (Multiple alignment),采用 Mega (Version 4.0) 软件包<sup>[18]</sup> 邻接法 (neighbor-joining) 构建分子系统发育树,用 Bootstrap 进行系统发育树置信度检测,自展数据集为 1 000 次。

#### 1.4 苦瓜枯萎病菌的遗传多样性分析

从 65 条十碱基寡聚核苷酸随机引物中筛选扩增条带清晰、多态性好的随机引物,对 48 个供试菌株进行指纹图谱分析。RAPD-PCR 反应体系 25 μL:2×Es Taq MasterMix (含有 2×Es Taq PCR Buffer,3 mmol·L<sup>-1</sup> MgCl<sub>2</sub>,Es Taq 酶和 400 μmol·L<sup>-1</sup> dNTP Mix,北京康为世纪生物科技有限公司)12.5 μL,随机引物 (10 μmol·L<sup>-1</sup>)2.0 μL,模板 DNA 30 ng,ddH<sub>2</sub>O 8.5 μL。每次 PCR 均设不含模板 DNA 的空白对照。每个随机引物扩增反应重复 3 次。反应程序:94℃ 预变性 10 min;94℃ 变性 1 min,37℃ 退火 45 s,72℃ 延伸 1 min,共 30 个循环;72℃ 延伸 10 min,4℃ 保存备用。PCR 产物检测方法同 1.3。所用引物及 Marker DL 2 000 均购自生工生物工程(上海)有限公司。

采用有带记为“1”、无带记为“0”的方法记录 PCR 扩增的 DNA 条带。利用 NTSYSpc (Version 2.10e) 软件计算菌株间的 Dice 遗传相似系数,采用非加权组平均法 (unweighted pair-group method with arithmetic means,UPGMA) 构建系统聚类图。

## 2 结果与分析

### 2.1 苦瓜枯萎病菌的形态特征及专化型

苦瓜枯萎病菌在 PSA 培养基上气生菌丝浓

密,棉絮状,白色至淡紫色,菌落背面白色或淡紫色。小型分生孢子椭圆形或卵圆形,呈假头状生于产孢细胞上,大小 9.6 (8.5~13.5) μm×2.6 (2.4~3.1) μm;大型分生孢子镰刀形,顶端细胞稍弯曲,足细胞明显,3~5 个隔膜,多为 3 个隔膜,大小 27.7 (20.3~45.5) μm×3.4 (2.7~4.9) μm;产孢细胞短,单瓶梗,大小 16.4 (6.2~27.5) μm×2.8 (2.5~3.6) μm;厚垣孢子球形或长圆形,有疣突,单生、顶生,直径 9.3 (7.6~13.8) μm。依据 Leslie 等<sup>[19]</sup> 和 Wang 等<sup>[20]</sup> 关于镰刀菌的形态鉴定方法,初步确定引起苦瓜枯萎病的病原物为美丽组尖孢镰刀菌 (*F. oxysporum*)。

测试的苦瓜枯萎病菌株对苦瓜幼苗的发病率为 100.0%,死亡率在 73.3%~100.0%。被侵苗表现出明显矮化、子叶皱缩、真叶发黄、根部褐变、植株萎蔫枯死等典型症状。同时,这些菌株也可侵染瓠瓜 [*Lagenaria siceraria* (Molina) Standl.] 幼苗:长瓠子 (var. *clavata* Hara) 发病率在 83.3%~100.0%,死亡率在 40.0%~96.7%;短瓠子 (var. *clavata* Hara) 发病率在 86.7%~100.0%,死亡率在 46.7%~96.7%;园扁葫芦 [var. *depressa* (Ser.) Hara] 发病率在 0.0%~40.0%,死亡率在 0.0%~23.3%;长颈葫芦 (var. *cougourda* Hara) 发病率在 10.0%~53.3%,死亡率在 0.0%~10.0%,被侵幼苗表现矮化、子叶枯死、真叶发黄、维管束变褐、植株凋萎等症状;但是,测试菌株均不侵染冬瓜、节瓜、西瓜、甜瓜、黄瓜、丝瓜和南瓜等瓜类幼苗。

依据上述结果,可确定供试的 32 株苦瓜枯萎病菌株均为尖孢镰刀菌苦瓜专化型 (*Fusarium oxysporum* f. sp. *momordicae*)。

### 2.2 苦瓜枯萎病菌的 rDNA-ITS 序列分析

2.2.1 rDNA-ITS 序列测定及同源性分析 用引物 ITS4/ITS5 从 32 个苦瓜枯萎病菌株的基因组 DNA 中扩增出大小约 540 bp 的片段(图 1)。对扩增产物测序,并在 GenBank 数据库中进行 BLAST 分析,结果显示苦瓜枯萎病菌株与 GenBank 数据库中的不同寄主专化型尖孢镰刀菌菌株的同源性均在 95% 以上。用 Clustal X 软件对测序菌株及 GenBank 数据库中 2 个尖孢镰刀菌苦瓜专化型菌株 JH-1、SJ-KG (序列号分别为:GU126688、

GU445364)的 rDNA-ITS 区序列进行对位比较,结果显示这些菌株的 rDNA-ITS 区 (ITS1、5.8S 和 ITS2)序列长度均为 456 bp,且碱基顺序完全相同。图 1 为 5 个不同地理来源的代表性菌株 GD-1、FJ-11、WT-1、HY-1、AS-9 的 rDNA-ITS 序列扩增产物的电泳结果,GenBank 登录序列号为:JN00-5749-JN005753。

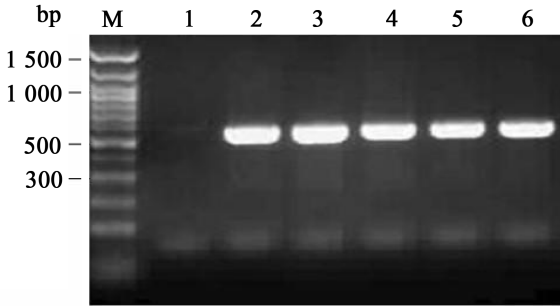


Fig. 1 Agarose electrophoresis of ITS-PCR products with the primers ITS4/ITS5

M: 100 bp DNA Ladder; Lane 1: Negative control; Lane 2 to 6: ITS-PCR production of GD-1、FJ-11、WT-1、HY-1 和 AS-9.

2.2.2 基于 rDNA-ITS 区序列的聚类分析 将测序的 32 个苦瓜枯萎病菌株的 rDNA-ITS 区序列与 GenBank 数据库中下载的 21 个相关菌株的 rDNA-ITS 区序列进行一致性比对,构建系统发育树 (图 2)。下载的序列来自 13 个尖孢镰刀菌 (*F. oxysporum*) 不同专化型菌株、3 个胶孢镰刀菌 (*F. subglutinans*) 菌株、2 个梨孢镰刀菌 (*F. poae*) 菌株和 3 个腐皮镰刀菌 (*F. solani*) 菌株。系统树中设定的外围群为腐皮镰刀菌。在一致性比对中,发现苦瓜枯萎病菌株与尖孢镰刀菌西瓜专化型菌株 (序列号:EU588396) 的 rDNA-ITS 区序列仅有一个碱基差异,与另外 12 个尖孢镰刀菌专化型菌株的 rDNA-ITS 区序列完全一致,与其他镰刀菌菌株的 rDNA-ITS 区序列有较多的碱基差异。系统树显示,53 个镰刀菌菌株被分成 4 个类群。同为尖孢镰刀菌的 45 个不同专化型菌株均归在类群 I 中,包括 32 个自测的苦瓜枯萎病菌株、来自 GenBank 数据库中的 2 个尖孢镰刀菌苦瓜专化型菌株 JH-1 和 SJ-KG、9 个其他瓜类作物枯萎病尖孢镰刀菌专

化型菌株、1 个尖孢镰刀菌番茄专化型菌株和 1 个尖孢镰刀菌百合专化型菌株,进化枝的自展支持率为 97%;类群 II 包括 3 个胶孢镰刀菌菌株,进化枝的自展支持率为 65%;类群 III 包括 2 个梨孢镰刀菌菌株,进化枝的自展支持率为 99%;类群 IV 由外围群的 3 个腐皮镰刀菌菌株构成,进化枝的自展支持率为 100%。从聚类分析结果可以看出,利用 rDNA-ITS 序列分析可以区分镰刀菌属的不同种,但不能将尖孢镰刀菌苦瓜专化型菌株与种内的其他专化型菌株区分开来。

### 2.3 苦瓜枯萎病菌的遗传多样性分析

2.3.1 RAPD 引物筛选和扩增结果 从供试的 65 条随机引物筛选出扩增重复性好、对每个菌株均具有鉴别能力的多态性随机引物 18 条,对 48 个尖孢镰刀菌菌株基因组 DNA 进行扩增,共获得条带 261 条,其中多态性条带 253 条,多态性比例为 96.9%;不同引物扩增条带数在 8~21 条,平均每个引物产生多态性条带 14.1 条,扩增片段大小在 150~2 200 bp 之间。引物 S174 的扩增图谱 (图 3) 表明,条带强弱和分子量大小反映了引物对菌株 DNA 序列不同基因位点拷贝数量的差异以及菌株间在基因位点上同源程度的差异,表明尖孢镰刀菌各瓜类专化型菌株在种内存在丰富的遗传多样性。不同引物扩增苦瓜枯萎病菌基因组 DNA,产生的条带数在 5~13 条之间,共获得条带 141 条,其中多态性条带 44 条,平均每个引物产生多态性条带 2.4 条,多态性比例为 31.2%。引物在苦瓜枯萎病菌菌株间产生多态性条带较少,表明苦瓜枯萎病菌菌株间的分子遗传多态率较低。

2.3.2 聚类分析 根据 RAPD 标记扩增结果计算菌株间的遗传相似系数,用 UPGMA 法对数据进行聚类分析,建立聚类树状图 (图 4)。从树状图可以看出,48 个尖孢镰刀菌菌株间的遗传相似系数在 0.59~0.99 之间,平均为 0.79。当相似系数为 0.85 (L 线) 时,48 个菌株被划分成 10 个类群 (Groups,  $G_{1-10}$ ),聚类结果说明尖孢镰刀菌各瓜类专化型菌株遗传分化大。其中  $G_1$  类群包含了 32 个苦瓜枯萎病菌株,遗传相似系数范围在 0.92~1.00,平均为 0.96,遗传相似性高; $G_2$  类群包括 3 个丝瓜专化型菌株和 4 个冬瓜专化型菌株; $G_3$  类

群包括 1 个黄瓜专化型菌株和 1 个甜瓜专化型菌株;其他 7 个黄瓜、西瓜、葫芦专化型菌株分布在

同分支上 ( $G_4 \sim G_{10}$ ), 表现为显著的遗传差异, 遗传相似性低。

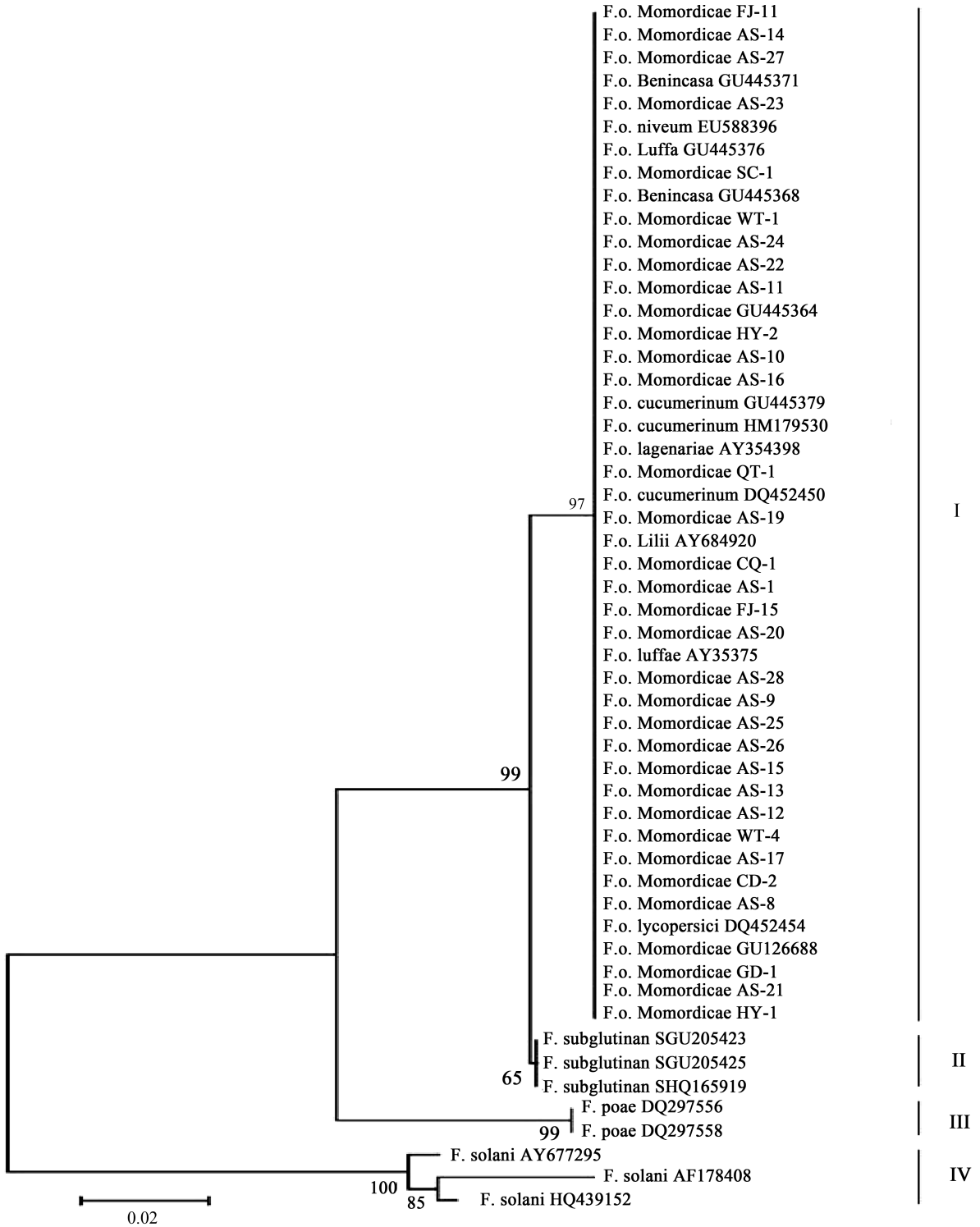


Fig. 2 Phylogenetic tree of ITS sequence in different species of *Fusarium*

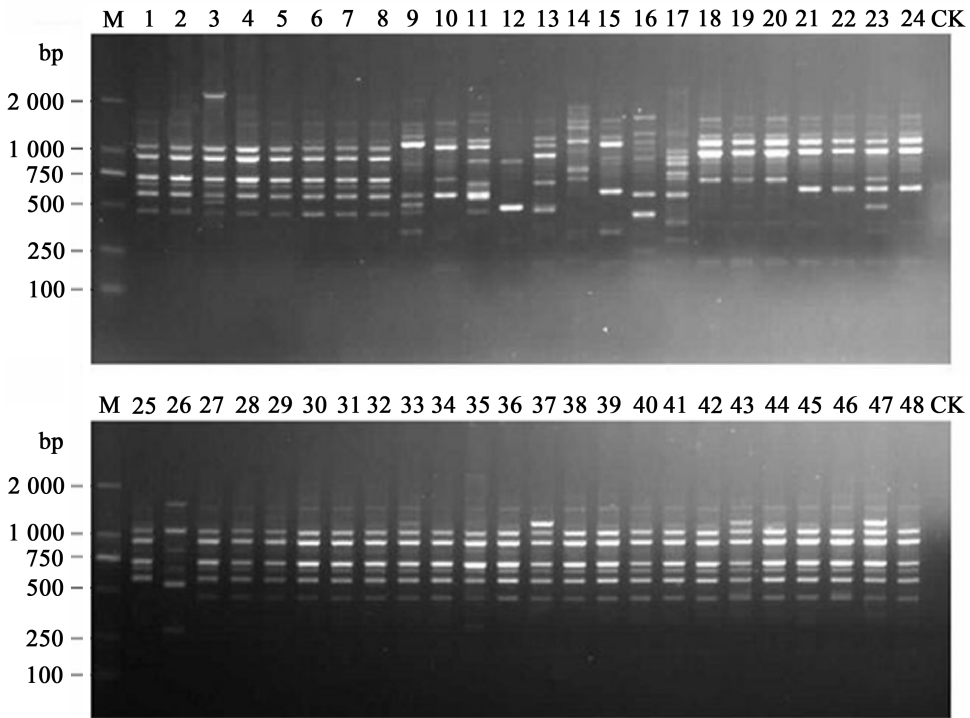


Fig. 3 RAPD fingerprints of 48 *Fusarium oxysporum* isolates obtained with primer S174

M: Marker DL2 000; Lane 1-8 and 25-48: *F. oxysporum* isolates from wilted bitter melon plants; Lane 9-10: *F. oxysporum* f. sp. *cucumerinum* (CGMCC3.2830, ACCC30220); Lane 11-14: *F. oxysporum* f. sp. *niveum* (ACCC30220, ACCC30024, ACCC31354, FONZH133, FON8); Lane 15: *F. oxysporum* f. sp. *melonis* (FOMXJ151); Lane 16-17: *F. oxysporum* f. sp. *lagenariae* (FJAT173, FJAT175); Lane 18-20: *F. oxysporum* f. sp. *luffae* (FLUGD1, FLUGD2, FLUGD3); Lane 21-24: *F. oxysporum* f. sp. *benincasae* (FBENX102, FBENN3, FBEYL5, FB EGL1); CK: Negative control.

### 3 讨论

葫芦科植物枯萎病菌专化型菌株的致病性较为复杂,Zhu 等<sup>[1]</sup>用分离自广东的苦瓜枯萎病菌接种瓠瓜和葫芦幼苗,其发病率分别为 75.5% 和 25.6%,因此认为作专化型鉴定时有必要接种瓠瓜和葫芦。本研究用不同地理来源的 32 株苦瓜枯萎病菌接种苦瓜幼苗,发病率为 100.0%,死亡率在 73.3%~100.0%;接种瓠瓜的不同变种,发病率为 0.0%~100.0%,死亡率为 0.0%~96.7%,表明瓠瓜可能是尖孢镰刀菌苦瓜专化型菌株的次要寄主,这与 Zhu 等<sup>[1]</sup>的报道一致。

镰刀菌属分种的主要依据是培养物的形态特征,然而由于形态特征容易受到培养条件和其它因素的影响,而且许多种未发现性阶段,给鉴定工作带来一定的困难。ITS 序列已广泛应用于植物病原菌近亲类群的鉴定和系统发育分析,是病原菌

系统发育及分类鉴定的重要依据<sup>[21~24]</sup>。本研究利用 rDNA-ITS 区序列构建分子系统发育树,发育树中苦瓜枯萎病菌株和其他美丽组尖孢镰刀菌专化型菌株聚在一起,与李瑟组胶孢镰刀菌株、枝孢组梨孢镰刀菌株和马特组腐皮镰刀菌株区分在不同的进化枝上,表明 rDNA-ITS 区序列反映了镰刀菌种间存在不同程度的差异,可作为鉴定苦瓜枯萎病菌的辅助手段,但难以区分尖孢镰刀菌苦瓜专化型菌株与其他尖孢镰刀菌瓠瓜类专化型菌株<sup>[25,26]</sup>,仍需依赖于菌株对寄主的致病性鉴定实现种内的区分。如要实现尖孢镰刀菌苦瓜专化型菌株的分子快速鉴定,仍需发掘除 ITS 序列之外的其它特异性序列。

RAPD 多态性标记技术在研究病原菌的遗传多样性中已有广泛应用,由 RAPD 标记构建的聚类群与病原菌致病力、地理来源、生理小种或营养

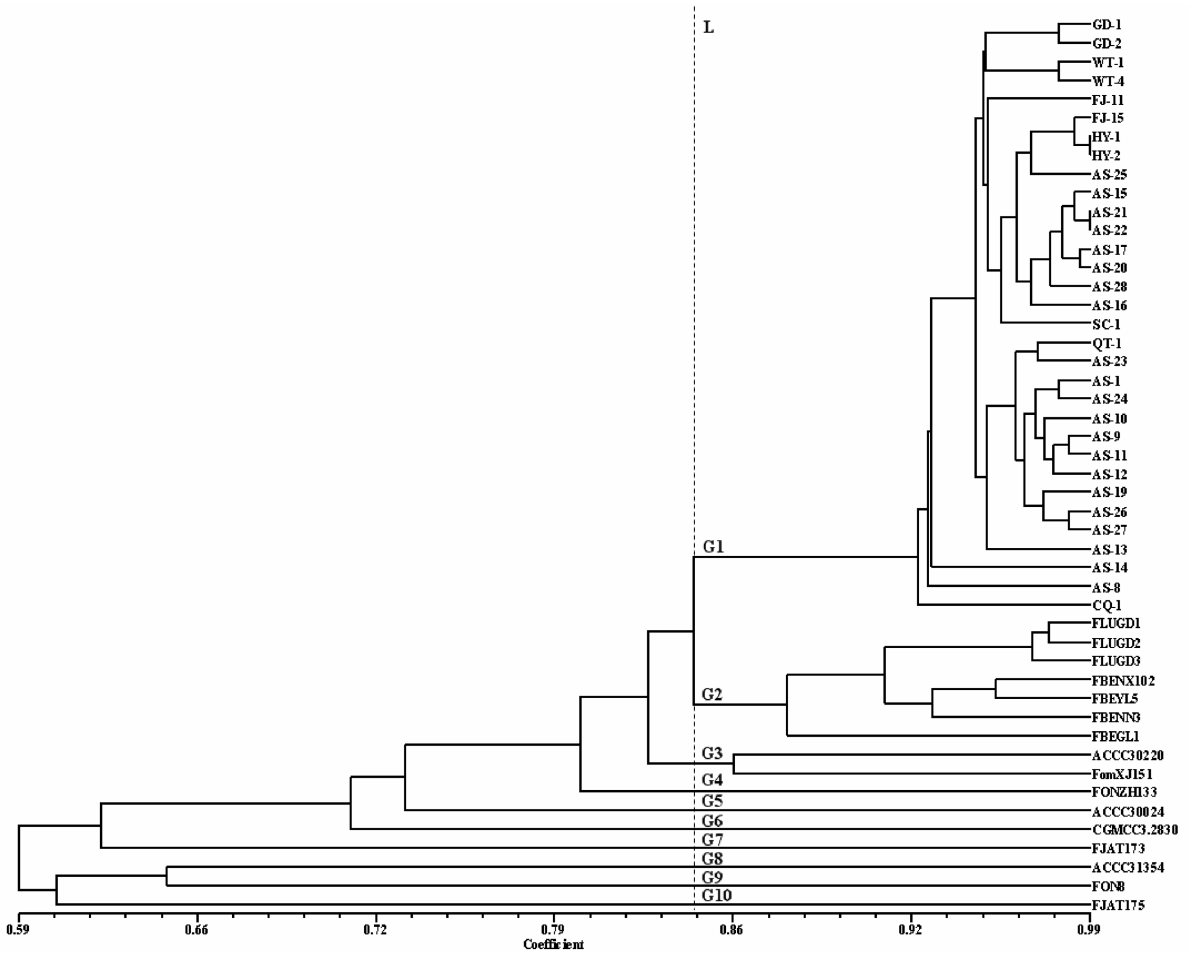


Fig. 4 Dendrogram of 48 *Fusarium oxysporum* isolates based on RAPD data using Dice coefficient of similarity and UPGMA cluster analysis

体亲和群等存在一定的对应关系,反映了病原菌种间或种内遗传背景的差异<sup>[27~31]</sup>。本文通过对苦瓜枯萎病菌与其他瓜类作物枯萎病菌近缘株系进行 RAPD 标记聚类分析,可以看出苦瓜枯萎病菌株全部聚在 G<sub>1</sub> 类群中,相似系数高,菌株间的多态率较低,说明苦瓜枯萎病菌遗传分化不大,遗传背景和亲缘关系相似,这可能与其致病性和较窄的寄主范围等因素有关。在测试的苦瓜枯萎病菌株中,除来自福建的两个菌株(FJ-1、FJ-2)遗传距离相对较远而未能聚在一起外,其他菌株如来自广州的 GD-1 和 GD-2 聚在同一分支上,来自衡阳的 HY-1 和 HY-2 聚在同一分支上,来自南宁的 WT-1 和 WT-2 聚在同一分支上,反映了地域同源性较强的菌株不存在明显的遗传分化,菌株的聚类与其地理来源存在一定的相关性,这可能是由于病原菌与不同地区

的环境条件及种植品种长期互作选择、协同进化引起的现象。聚类树中类群 G<sub>1</sub> 与类群 G<sub>2</sub> 聚在一起,与其他类群存在较远的遗传距离,表明侵染苦瓜的尖孢镰刀菌菌株与侵染丝瓜、冬瓜的尖孢镰刀菌菌株亲缘关系更为相近。尖孢镰刀菌不同瓜类作物专化型菌株之间虽然在形态学表型特征上相同或相近,但是分子遗传相似性差异显著,表明尖孢镰刀菌种内存在丰富的遗传多样性,生理分化复杂。

RAPD 指纹图谱信息量丰富,可以通过寻找病原菌专一性 DNA 标记,制作特异探针或转换成更加稳定的特异标记,应用于植物病原的鉴定和诊断<sup>[32,33]</sup>。本研究利用 RAPD 分子标记分析不同葫芦科作物枯萎病菌的遗传背景,发现了一些尖孢镰刀菌苦瓜专化型菌株的特征性差异条带。筛选特



异条带,用于制作鉴定尖孢镰刀菌苦瓜专化型菌株的特异探针的研究工作正在进行中。

## 参考文献

- [1] Zhu T S, Qi P K. Study on the pathogen of bitter gourd wilt in Guangdong (in Chinese) [J]. Journal South China Agricultural University (华南农业大学学报), 1998, 19(4): 14-18.
- [2] Xiao C H, Yu X M, He Y Y. Studies on the biological characteristics of the pathogen of cucurbit wilt (in Chinese) [J]. Plant Protection (植物保护), 2008, 34(2): 83-85.
- [3] Yang Y, Zhou Q, Ji H, et al. Isolation and identification of *Fusarium* species from wilted bitter gourd (in Chinese) [J]. Acta Agriculturae Zhejiangensis (浙江农业学报), 2010, 22(3): 354-357.
- [4] Su M X, Xiao R F, Zhu Y J, et al. Identification and determination of *Fusarium* pathogen inside the tissue of *Momordica charantia* (in Chinese) [J]. China Vegetables (中国蔬菜), 2010, 16: 62-66.
- [5] Rao X Q, Li R K. Studies on identification of resistance to bitter gourd wilt at seedling stage with the filtrate of *Fusarium oxysporum* Schl. f. sp. *momordicae* (in Chinese) [J]. Acta Agriculturae Universitatis Jiangxiensis (江西农业大学学报), 1999, 21(3): 367-369.
- [6] Lin Y S, Huang C H, Kuo M S. Occurrence and dissemination of *Fusarium* wilt of bitter gourd in Taiwan [J]. Plant Pathology Bulletin, 1996, 5(1): 38-46.
- [7] Rakholiya K B, Jani S M, Chheladiya K K, et al. *Fusarium* wilt of bitter gourd [J]. Indian Phytopathology, 2003, 56(4): 503.
- [8] Imamura Y, Kawagoe Y, Kuno K, et al. Occurrence of *Fusarium* wilt caused by *Fusarium oxysporum* in balsam pears [*Momordica charantia*] in Miyazaki, Japan and analysis of the pathogen based on the rDNA IGS sequence [J]. Kyushu Plant Protection Research, 2007, 53: 1-8.
- [9] Cumagun C J R, Aguirre J A, Relevante C A, et al. Pathogenicity and aggressiveness of *Fusarium oxysporum* Schl. in bottle gourd and bitter gourd [J]. Plant Protection Science, 2010, 46(2): 51-58.
- [10] Guo T X, Mo J Y. Resistance to the blight disease (*Fusarium oxysporum* f. sp. *momordicae*) of several bitter gourd varieties (in Chinese) [J]. Guangxi Agricultural Sciences (广西农业科学), 2007, 38(4): 408-410.
- [11] Sun S K, Huang J W. A new *Fusarium* wilt of bitter gourd in Taiwan [J]. Plant Disease, 1983, 67(2): 226-227.
- [12] Wu Y C, Wang S Z. A preliminary study on pathogen and forma specialis identification of gourd wilt (in Chinese) [J]. Acta Phytopathologica Sinica (植物病理学报), 1994, 24(1): 95.
- [13] Qi P K. A Survey on the *Fusarium oxysporum* f. spp. of *Cucurbitaceae* (in Chinese) [J]. Journal South China Agricultural University (华南农业大学学报), 1995, 16(4): 110-114.
- [14] Joseph C, Cumagun R, Oribiana Z C, et al. Vegetative compatibility among *Fusarium oxysporum* isolates from bitter gourd and bottle gourd in the Philippines [J]. Journal of Plant Protection Research, 2008, 48(3): 283-293.
- [15] Leslie J F, Summerell B A. The *Fusarium* laboratory manual [M]. USA: Blackwell Publishing, 2006, 16-17.
- [16] Groenewald S, Van Den Berg N, Marasas W F O, et al. The application of high-throughput AFLP's in assessing genetic diversity in *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* [J]. Mycological Research, 2006, 110(3): 297-305.
- [17] Liu C L, Wen J Z, Yang M X, et al. Application of rDNA-ITS in molecular test of phytopathogenic fungi (in Chinese) [J]. Journal of Northeast Agricultural University (东北农业大学学报), 2007, 38(1): 101-106.
- [18] Tamura K, Dudley J, Nei M, et al. MEGA4: Molecular evolutionary genetics anylysis (MEGA) software version 4.0 [J]. Molecular Biology and Evolution, 2007, 24(8): 1596-1599.
- [19] Leslie J F, Summerell B A. The *Fusarium* laboratory

- manual[M]. USA: Blackwell Publishing, 2006, 212-218.
- [20] Wang G C, Zheng Z, Ye Q M, *et al.* Guide to identification of common *Fusarium* species[M]. Beijing: China Agricultural Science and Technology Press (北京:中国农业科学技术出版社), 1996, 1-97.
- [21] Taylor J W, Jacobson D I, Kroken S, *et al.* Phylogenetic species recognition and species concepts in fungi[J]. *Fungal Genetics and Biology*, 2000, 31(1): 21-32.
- [22] Ninet B, Jan I, Bontems O, *et al.* Molecular identification of *Fusarium* species in Onychomycoses[J]. *Dermatology*, 2005, 210(1): 21-25.
- [23] Cooke D E L, Drenth A, Duncan J M, *et al.* A molecular phylogeny of *Phytophthora* and related oomycetes[J]. *Fungal Genetics and Biology*, 2000, 30(1): 17-32.
- [24] Visentin I, Tamietti G, Valentino D, *et al.* The ITS region as a taxonomic discriminator between *Fusarium verticillioides* and *Fusarium proliferatum* [J]. *Mycological Research*, 2009, 113(10): 1137-1145.
- [25] Zheng X F, Lan J L, Cao Y, *et al.* Identification and ITS sequence analysis of *Fusarium* wilt pathogens from the cucurbits crops (in Chinese)[J]. *Scientia Agricultura Sinica* (中国农业科学), 2008, 41(12): 4077-4084.
- [26] Yu Z D, Liu X Y, Cao Z M. ISSR marker and ITS sequence study of *Melampsora larici-populina* (in Chinese)[J]. *Scientia Agricultura Sinica* (中国农业科学), 2006, 39(6): 1159-1165.
- [27] Shafagh N, Rastegar M F, Jafarpour B. Physiological race and genetic diversity determination of *Fusarium oxysporum* f. sp. *Melonis* by differential hosts and molecular marker RAPD in Northern and Rzaevi Khorasan Provinces [J]. *Research Journal of Biological Sciences*, 2008, 3(7): 790-793.
- [28] Baysal Ö, Siragusa M, Zengin S, *et al.* Molecular characterization of *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonigenae* by ISSR and RAPD markers on eggplant[J]. *Biochemical Genetics*, 2010, 48(5-6): 524-537.
- [29] Belabid L, Baum M, Fortas Z, *et al.* Pathogenic and genetic characterization of Algerian isolates of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lentis* by RAPD and AFLP analysis[J]. *African Journal of Biotechnology*, 2004, 3(1): 25-31.
- [30] Vakalounakis D J, Wang Z, Fragkiadakis G A, *et al.* Characterization of *Fusarium oxysporum* iisolates obtained from Cucumber in China by pathogenicity, VCG, and RAPD[J]. *Plant Disease*, 2004, 88(6): 645-649.
- [31] Vakalounakis D J, Fragkiadakis G A. Genetic Diversity of *Fusarium oxysporum* Isolates from Cucumber: Differentiation by Pathogenicity, Vegetative Compatibility, and RAPD Fingerprinting[J]. *Phytophological*, 1999, 89(2): 161-168.
- [32] Wang P H, Lo H S, Yeh Y. Identification of *F. o. cucumerinum* and *F. o. luffae* by RAPD-generated DNA probes[J]. *Applied Microbiology*, 2001, 33(5): 397-401.
- [33] Lievens B, Claes L, Vakalounakis D J, *et al.* A robust identification and detection assay to discriminate the cucumber pathogens *Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerinum* and f. sp. *radicis-cucumerinum* [J]. *Environmental Microbiology*, 2007, 9(9): 2145-2161.