



舒灿伟, 曾蕊, 杨媚, 等. 香蕉枯萎病菌 4 个生理小种核糖体 DNA 内转录间隔区的 RFLP 分析[J]. 华南农业大学学报, 2017, 38(3):52-56.

香蕉枯萎病菌 4 个生理小种核糖体 DNA 内转录间隔区的 RFLP 分析

舒灿伟, 曾蕊, 杨媚, 周而勋

(华南农业大学 农学院/广东省微生物信号与作物病害防控重点实验室, 广东 广州 510642)

摘要:【目的】明确香蕉枯萎病菌 *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* 4 个生理小种的系统发育关系。【方法】利用 PCR 扩增该病菌 4 个生理小种的核糖体 DNA 内转录间隔区 (Internal transcribed spacer, ITS), 利用 *Alu* I、*Hpa* II 和 *Taq* I 3 种限制性内切酶对这些小种的 ITS 产物进行 RFLP 分析。【结果】PCR 扩增结果表明: 来自 4 个生理小种的 8 个菌株均可扩增得到 568 bp 的 ITS 单一片段, 但这些生理小种间的片段没有明显的多态性; 对这些生理小种 ITS 产物进行 RFLP 分析发现, 不同生理小种之间的差异很小。【结论】PCR-RFLP 技术不适用香蕉枯萎病菌生理小种的分析鉴定。

关键词:香蕉枯萎病菌; 生理小种; 内部转录间隔区; 聚合酶链式反应; 限制性片段长度多态性
中图分类号:S436.67 **文献标志码:**A **文章编号:**1001-411X(2017)03-0052-05

RFLP analysis of the ribosomal DNA ITS regions of four physiological races of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*

SHU Canwei, ZENG Rui, YANG Mei, ZHOU Erxun

(College of Agriculture, South China Agricultural University/Guangdong Province Key Laboratory of Microbial Signals and Disease Control, Guangzhou 510642, China)

Abstract:【Objective】To clarify the phylogenetic relationship of four physiological races of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (*Foc*), the causal agent of fusarial wilt of banana. 【Method】The ribosomal DNA internal transcribed spacer (ITS) regions of the four physiological races of *Foc* were first amplified using PCR technique, and then RFLP analysis of the ITS products of these races were performed using three restriction endonucleases including *Alu* I, *Hpa* II and *Taq* I. 【Result】A single 568 bp ITS fragment was amplified specifically from eight strains belonging to four races, respectively, but there was no obvious polymorphism among these races. RFLP analysis of the ITS products from these races showed that the differences among races were very small. 【Conclusion】PCR-RFLP technique was unsuitable to be used as the identification basis for the physiological races of *Foc*.

Key words:*Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* ; physiological race; internal transcribed spacer (ITS); polymerase chain reaction (PCR); restriction fragment length polymorphism (RFLP)

香蕉枯萎病是由尖镰孢古巴专化型 *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* 引起的香蕉毁灭性病害^[1],在亚洲、非洲和澳洲等香蕉产区均有分布,给全球的香蕉产业造成严重的经济损失。据报道,香蕉枯萎病菌有4个生理小种,不同的生理小种侵染的香蕉品种及所造成的病害程度不同,分布区域也不同^[2]。我国目前存在的1号和4号生理小种危害性最大。1号生理小种最易侵染大蜜啥(Gros Michel)、Apple和 Silk 等香蕉品系,而4号生理小种毁灭性最大,能侵染大蜜啥、矮香蕉和 Cavendish 等香蕉品系^[3]。2号和3号生理小种在我国尚未发现,2号生理小种在中美洲侵染三倍体杂种煮食蕉和某些 Jamaica 四倍体等,3号生理小种被报道只危害芭蕉科的野生羯尾蕉 *Heliconia* spp.^[4]。

目前对香蕉枯萎病菌4个生理小种分子鉴定的报道较少。应用核糖体DNA(Ribosomal DNA, rDNA)ITS序列的保守性鉴定菌种是植物病原菌分子鉴定中较常用的方法^[5-8]。基于DNA限制性片段长度多态性(Restriction fragment length polymorphism, RFLP)的遗传标记技术目前已成为对生物物种及种以下单元分类的常用方法^[5, 9-12]。

本研究利用真菌通用引物 ITS4/ITS5 对香蕉枯萎病菌不同生理小种的 ITS 序列进行扩增,并进行 RFLP 分析,旨在寻找香蕉枯萎病菌不同生理小种 ITS 序列的差异,阐明该方法是否可用于区分香蕉枯萎病菌的不同生理小种。

1 材料与方法

1.1 材料

1号生理小种 WG02 菌株、2号生理小种 WG03 菌株、3号生理小种 WG04 菌株、4号生理小种 WG05 菌株由澳大利亚 Bentley 博士惠赠。4号生理小种 Z13 和 Z16 菌株,1号生理小种 Z14 和 Z15 菌株,由华南农业大学植物病理系研究室姜子德教授提供。

限制性内切酶 *Alu* I、*Hpa* II 和 *Taq* I 购于宝生物工程(大连)有限公司。

1.2 方法

1.2.1 真菌总DNA的提取及ITS序列的扩增 提取以上4个生理小种8个菌株的基因组DNA,具体方法参照 OMEGA 公司的真菌 DNA 提取试剂盒说明书。以香蕉枯萎病菌4个生理小种8个菌株的基因组DNA为模板,采用 ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') 和 ITS5 (5'-GGAAGTAAAGTCGTAA-CAAGG-3') 引物 PCR, 扩增体系如下: 10 × 缓冲液 2.5 μL, 2.5 mmol · L⁻¹ dNTP 2 μL, 5 μmol · L⁻¹ 引物各 1 μL, 5 U · μL⁻¹ *Taq* 酶 0.2 μL, 模板 DNA 约 30 ng, ddH₂O 17.5 μL。PCR 扩增程序为: 95 °C 预变性 3 min, 94 °C 变性 45 s, 56 °C 复性 45 s, 72 °C 延伸

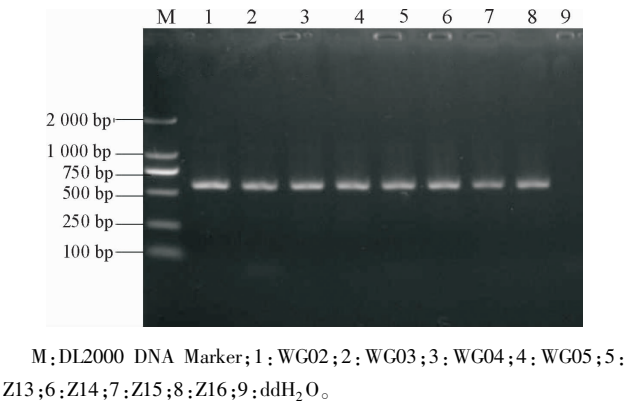
1.5 min, 30 个循环; 72 °C 延伸 10 min。反应结束后取 5 μL PCR 产物电泳。将阳性 PCR 产物纯化、连接和克隆,挑选出阳性转化子,送北京奥科基因公司测序,每个菌株重复测序3次。PCR 产物的测序结果用 DNA-MAN 软件和 BLAST 进行序列比对和同源性分析。

1.2.2 ITS-RFLP 分析 将 15 μL ITS-PCR 产物, 0.5 μL 内切酶(5 U), 2 μL 酶切缓冲液和 2.5 μL ddH₂O 依次加入 0.2 mL PCR 管内,短暂离心混匀后,放入所需温度的水浴锅中反应 4 h, 其中 *Alu* I、*Hpa* II 限制性内切酶反应温度为 37 °C, *Taq* I 限制性内切酶反应温度为 65 °C, 酶切产物通过电泳检测。

2 结果与分析

2.1 不同生理小种 ITS-PCR 扩增

利用 ITS4/ITS5 和优化的扩增条件,对香蕉枯萎病菌4个生理小种共8个菌株的 rDNA-ITS 区进行了扩增。PCR 扩增结果表明,8个菌株扩增出的特异性条带大小一致,位于 500 ~ 700 bp, 经测序确定其大小为 568 bp(图1)。



M: DL2000 DNA Marker; 1: WG02; 2: WG03; 3: WG04; 4: WG05; 5: Z13; 6: Z14; 7: Z15; 8: Z16; 9: ddH₂O。
图1 香蕉枯萎病菌4个生理小种的 ITS-PCR 扩增产物
Fig.1 ITS-PCR products of four physiological races of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*

2.2 不同生理小种 ITS 的序列分析

对4个生理小种8个菌株的 ITS 区段进行克隆并测序,结果均得到 568 bp 的片段。用 DNAMAN 对8个菌株的 ITS 全长序列进行比对,结果(图2)发现,8个菌株只在第344、390和409个碱基处存在差异:在344 bp处,除3号生理小种(WG04)的碱基为 C 外,其他的均为 T;在390 bp处,除4号生理小种(Z13、Z16)的碱基为 C 外,其余的均为 T;在409 bp处,1号和2号生理小种的为 T,3号和4号生理小种的为 C。用 DNAMAN 对4个生理小种8个菌株进行序列比对,相似性高达 99.85%。国内、外的1号生理小种 ITS 序列基本相同;除 WG05 外,国内、外的4号生理小种的 ITS 序列基本相同。WG02 和 WG03 ITS 序列完全相同。与 GenBank 中的已知序列进行相似性比对,发现其与 GenBank 中的尖镰孢 *F. oxys-*

WG02.seq	GCCAGTATTCTGGCGGGCATGCC	TGTTTCGAGCGTCATTTC	360
WG03.seq	GCCAGTATTCTGGCGGGCATGCC	TGTTTCGAGCGTCATTTC	360
WG04.seq	GCCAGTATTCTGGCGGGCATGCC	CGTTTCGAGCGTCATTTC	360
WG05.seq	GCCAGTATTCTGGCGGGCATGCC	TGTTTCGAGCGTCATTTC	360
Z13.seq	GCCAGTATTCTGGCGGGCATGCC	TGTTTCGAGCGTCATTTC	360
Z14.seq	GCCAGTATTCTGGCGGGCATGCC	TGTTTCGAGCGTCATTTC	360
Z15.seq	GCCAGTATTCTGGCGGGCATGCC	TGTTTCGAGCGTCATTTC	360
Z16.seq	GCCAGTATTCTGGCGGGCATGCC	TGTTTCGAGCGTCATTTC	360
Consensus	gccagttattctggcgggcatgcc	gttcgagcgtcatttc	
WG02.seq	AACCCTCAAGCACAGCTTGGTGTGGGACT	TCGCGTTAAATT	400
WG03.seq	AACCCTCAAGCACAGCTTGGTGTGGGACT	TCGCGTTAAATT	400
WG04.seq	AACCCTCAAGCACAGCTTGGTGTGGGACT	TCGCGTTAAATT	400
WG05.seq	AACCCTCAAGCACAGCTTGGTGTGGGACT	TCGCGTTAAATT	400
Z13.seq	AACCCTCAAGCACAGCTTGGTGTGGGACT	CCGCGTTAAATT	400
Z14.seq	AACCCTCAAGCACAGCTTGGTGTGGGACT	TCGCGTTAAATT	400
Z15.seq	AACCCTCAAGCACAGCTTGGTGTGGGACT	TCGCGTTAAATT	400
Z16.seq	AACCCTCAAGCACAGCTTGGTGTGGGACT	CCGCGTTAAATT	400
Consensus	aaccctcaagcacagcttgggtgtgggac	cgcgttaatt	
WG02.seq	CGCGTTCCTCAAATTGATTGGCGGTCACGTCGAGCTTCCA		440
WG03.seq	CGCGTTCCTCAAATTGATTGGCGGTCACGTCGAGCTTCCA		440
WG04.seq	CGCGTTCCTCAAATTGATTGGCGGTCACGTCGAGCTTCCA		440
WG05.seq	CGCGTTCCTCAAATTGATTGGCGGTCACGTCGAGCTTCCA		440
Z13.seq	CGCGTTCCTCAAATTGATTGGCGGTCACGTCGAGCTTCCA		440
Z14.seq	CGCGTTCCTCAAATTGATTGGCGGTCACGTCGAGCTTCCA		440
Z15.seq	CGCGTTCCTCAAATTGATTGGCGGTCACGTCGAGCTTCCA		440
Z16.seq	CGCGTTCCTCAAATTGATTGGCGGTCACGTCGAGCTTCCA		440
Consensus	cgcgttcc caaattgattggcgggtcacgtcgagcttcca		

WG02、WG03、WG04、WG05 分别为国外的 1~4 号生理小种菌株;Z13 和 Z16 为国内的 4 号生理小种菌株;Z14 和 Z15 为国内的 1 号生理小种菌株。

图 2 香蕉枯萎病菌 4 个生理小种的 ITS 序列比对

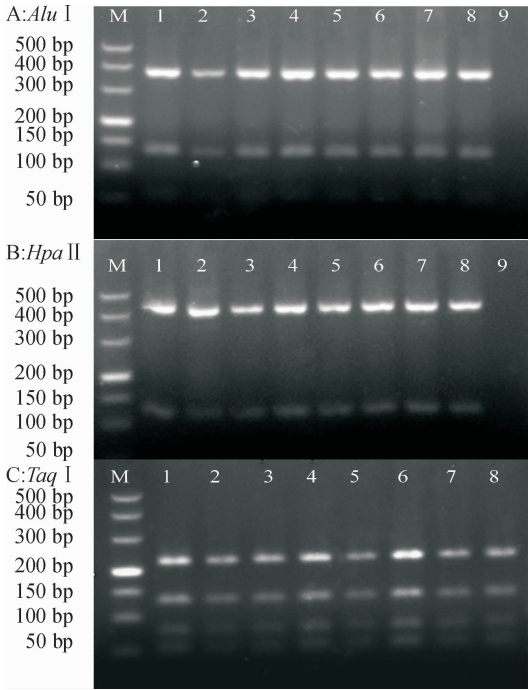
Fig. 2 ITS sequences alignment of four physiological races of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*

porum 的序列相似性高达 100%,表明 ITS 序列可以作为鉴定尖镰孢 *F. oxysporum* 的依据。

2.3 不同生理小种 ITS-RFLP 分析

3 种限制性内切酶 (*Alu* I、*Hpa* II、*Taq* I) 对 ITS 扩增产物的酶切图谱见图 3。由图 3A 可看出, *Alu* I 对供试的 4 个生理小种 8 个菌株均有 2 个共同的酶切位点,供试菌株只有 1 种酶切图谱,每个菌株的 ITS 片段被酶切为大约 380、130 和 50 bp 的 3 个片段,50 bp 左右的片段很模糊甚至不容易观察到。由图 3B 可看出, *Hpa* II 对供试菌株的酶切位点较少,且比较保守;4 个生理小种 8 个菌株均有 1 个共同的酶切位点,每个菌株的 ITS 片段被酶切为大约 430 和 130 bp 的 2 个片段;供试菌株只有 1 种酶切图谱。由图 3C 可以看出, *Taq* I 对供试的 8 个菌株的酶切位点较多,均有 3 个共同的酶切位点,每个菌株的 ITS 片段被酶切为大约 240、140、90 和 60 bp 的 4 个片段;供试菌株只有 1 种酶切图谱。

从上述 ITS 酶切图谱的分析中可知,3 种内切酶对香蕉枯萎病菌 4 个生理小种 8 个菌株所产生的酶切带型一致,并不能将香蕉枯萎病菌的不同生理小种区分开来,表明该病菌的种内 rDNA ITS 区段比较保守,遗传多样性有限。



M: DL500 Marker; 1: WG02; 2: WG03; 3: WG04; 4: WG05; 5: Z13; 6: Z14; 7: Z15; 8: Z16; 9: ddH₂O。

图 3 香蕉枯萎病菌 4 个生理小种 ITS-PCR 产物的酶切图谱
Fig. 3 Restriction patterns of ITS-PCR products of four physiological races of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*

3 讨论与结论

rDNA 已被广泛应用于植物病原菌亲缘关系以及致病性相关的研究。ITS 区段在核基因组中是高度保守的,可用与它们序列互补的通用引物对 ITS 区进行 PCR 扩增、序列对比^[8, 13] 以及 RFLP 分析^[11, 14-15]。Mills 等^[16] 用 RFLP 区分不同地理来源和不同果树寄主的胶孢炭疽病菌 *Colletotrichum gloeosporioides*,但不能区分不同地理来源芒果上的胶孢炭疽病菌的菌株。张瑞萍等^[17] 通过 rDNA-ITS 序列分析法成功鉴定出大豆根腐病菌 *F. oxysporum* 的菌株。李志芳等^[6] 用 ITS-RFLP 快速鉴定了棉花上的 6 种主要病原真菌,其 ITS-RFLP 产物大小各异、具有多态性,参考标准电子图谱可准确鉴定其种类。ITS-RFLP 技术在担子菌的鉴定方面也有很多成功的例子^[18-20],表明该技术适用性强。

本研究利用真菌通用引物 ITS4/ITS5 对香蕉枯萎病菌 4 个生理小种 8 个菌株的 ITS 进行了克隆和序列分析以及 ITS-RFLP 比较研究。结果表明,4 个生理小种菌株的 ITS 序列只有 3 个碱基的差异,序列相似性高达 99.85%,与 GenBank 中尖镰孢菊花专化型 *F. oxysporum* f. sp. *chrysanthemi* (编号 DQ452449.1)、尖镰孢黄瓜专化型 *F. oxysporum* f. sp. *cucumerinum* (编号 DQ452450.1) 和一品冠(仙客来)枯萎病菌 *F. oxysporum* f. sp. *cyclaminis* strain ATCC 16061 (编号 DQ452451.1) 的序列相似性为 99% 以上,表明尖镰孢不同专化型在 rDNA-ITS 序列上差异性较小,因而 rDNA-ITS 区段序列在一定程度上不适合于种内专化型及生理小种的鉴定。

通过序列比对,发现香蕉枯萎病菌 1 号生理小种的 3 个菌株(WG02, Z14 和 Z15)的 rDNA-ITS 区段序列完全一致,而 4 号生理小种的 3 个菌株(WG05, Z13 和 Z16)的 rDNA-ITS 区段序列存在着一定程度的差异,可以推断现阶段香蕉枯萎病菌 4 号生理小种的变异频率比 1 号生理小种快,这与王文华^[7] 的研究结果一致,其原因可能是地域差异导致的生理分化。

通过比对香蕉枯萎病菌 4 个生理小种 8 个供试菌株的序列,还发现 4 号生理小种(Z13、Z16)在 390 bp 与 409 bp 位点的碱基为 C,而 1 号生理小种在此位点的碱基为 T。笔者推测,4 号生理小种在 rDNA-ITS 区段序列这 2 个位点上存在着专一性,为通过 rDNA-ITS 序列比对鉴定 4 号和 1 号生理小种提供了一定的理论依据。

本研究采用 3 种不同的限制性内切酶进行了 ITS-RFLP 分析,均未能将 4 个生理小种的 8 个菌株区分开,再次证实了其 ITS 序列的保守性。曾莉莎等^[21] 通过 ITS 遗传进化树将 18 个香蕉枯萎病菌分为 4 个分支,其中 1 号生理小种、2 号生理小种及非致病性香蕉枯萎病菌共享 1 个分支,3 号生理小种和 4 号生理小种也共享 1 个分支,提出了 ITS 不能代表香蕉枯萎病菌的种间亲缘关系,不适合做系统发育分析。本研究对 ITS 片段进行 RFLP 分析,结果获得的酶切谱带很单一,在一定程度上可能是因为内切酶种类太少,或者是因为单酶切的局限性等。尽管单个内切酶在一定程度上可以区分一些种和小种,如 *Alu* I 能够将大豆灰斑病菌 *Cercospora sojina* Harra^[22] 与其他种分开,但是仅有的单个酶对菌株进行鉴定是不可靠的,因为种内该位点可能存在多态性,酶切位点的突变也可能带来错误的结果。因此,为了更好地鉴定和监测香蕉枯萎病菌的生理小种,应结合 4 个生理小种的致病性试验^[7],同时选择 *TEF-1α*、*IGS*、*histone H3* 等基因^[21] 以及复合限制性内切酶进行 RFLP 分析,以获得更为有力的证据和更为准确的鉴定结果。

参考文献:

[1] GHAG S B, SHEKHAWAT U K S, GANAPATHI T R. Fusarium wilt of banana: Biology, epidemiology and management[J]. Int J Pest Manage, 2015, 61(3): 250-263.

[2] 杨旸. 香蕉枯萎病菌两个生理小种 *fgb* 和 *fmk* 基因的克隆与序列分析[D]. 广州: 华南农业大学, 2010.

[3] 吕顺, 曾莉莎, 刘文清, 等. 大蕉枯萎病原菌鉴定及 *TEF-1α* 序列分析[J]. 植物病理学报, 2014, 44(4): 337-348.

[4] 刘景梅, 王璧生, 陈霞, 等. 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.

[5] FOULY H M. ITS ribosomal DNA phylogeny of *Gaeumannomyces graminis*[J]. Arab J Biotech, 2002, 7(1): 45-52.

[6] 李志芳, 冯自力, 赵丽红, 等. 棉花主要真菌病害病原菌 ITS-RFLP 快速鉴定方法[J]. 中国棉花, 2013, 40(12): 13-16.

[7] 王文华. 香蕉枯萎镰刀菌 1、4 号小种 rDNA-ITS 序列分析及 4 号小种遗传转化体系建立[D]. 海口: 海南大学, 2007.

[8] 王洪凯, 张天宇, 张猛. 应用 5.8S rDNA 及 ITS 区序列分析链格孢种级分类[J]. 菌物学报, 2001, 20(2): 168-173.

- [9] BURGERMEISTER W, BRAASCH H, METGE K, et al. ITS-RFLP analysis, an efficient tool for differentiation of *Bursaphelenchus* species[J]. *Nematology*, 2009, 11(5): 649-668.
- [10] MARTÍNEZ-CULEBRAS P V, RAMÓN D. An ITS-RFLP method to identify black *Aspergillus* isolates responsible for OTA contamination in grapes and wine[J]. *Int J Food Microbiol*, 2007, 113(2): 147-153.
- [11] VIAUD M, PASQUIER A, BRYGOO Y. Diversity of soil fungi studied by PCR-RFLP of ITS [J]. *Mycol Res*, 2000, 104(9): 1027-1032.
- [12] ERLAND S, HENRION B, MARTIN F, et al. Identification of the ectomycorrhizal basidiomycete *Tylospora fibrillosa* Donk by RFLP analysis of the PCR-amplified ITS and IGS regions of ribosomal DNA [J]. *New Phytol*, 1994, 126(3): 525-532.
- [13] 陈永青, 姜子德, 戚佩坤. RAPD 分析与 ITS 序列分析在拟茎点霉分类鉴定上的应用[J]. *菌物学报*, 2002, 21(1): 39-46.
- [14] GARDES M, BRUNS T D. ITS-RFLP matching for identification of fungi[J]. *Methods Mol Biol*, 1996, 50: 177-186.
- [15] PANDEY A K, REDDY M S, SURYANARAYANAN T S. ITS-RFLP and ITS sequence analysis of a foliar endophytic *Phyllosticta* from different tropical trees[J]. *Mycol Res*, 2003, 107(4): 439-444.
- [16] MILLS P R, SREENIVASAPRASAD S, BROWN A E. Detection and differentiation of *Colletotrichum gloeosporioides* isolates using PCR [J]. *FEMS Microbiol Lett*, 1992, 98(1/2/3): 137-143.
- [17] 张瑞萍, 王家军, 魏嵘, 等. 一株大豆腐霉菌(PSHH1) rDNA 的 ITS 序列鉴定[J]. *大豆科学*, 2015, 34(5): 867-873.
- [18] 岳万松. 云南牛肝菌的分子鉴定及其多糖抗氧化性研究[D]. 昆明: 云南民族大学, 2015.
- [19] 刘新锐, 谢宝贵, 熊芳, 等. 高温平菇种质资源的 ITS-RFLP 分析[J]. *热带作物学报*, 2010, 31(9): 1509-1513.
- [20] 张文娟, 康帅, 魏锋, 等. 基于 ITS 序列分析鉴别冬虫夏草与古尼虫草[J]. *药物分析杂志*, 2015(9): 1551-1555.
- [21] 曾莉莎, 吕顺, 刘文清, 等. 基于多基因序列分析对尖孢镰孢菌古巴专化型(香蕉枯萎病菌)生理小种的鉴定[J]. *菌物学报*, 2014, 33(4): 867-882.
- [22] 张俊华, 张明, 韩英鹏, 等. 大豆灰斑病菌生理小种 PCR-RFLP 分子检测[J]. *中国油料作物学报*, 2010, 32(1): 128-131.

【责任编辑 霍 欢】