

尖孢镰刀菌磷脂脂肪酸的遗传多样性分析

肖荣凤 刘 波* 朱育菁 潘志针 陈梅春 詹 洪

(福建省农业科学院农业生物资源研究所, 福州 350003)

摘要: 为明确尖孢镰刀菌 *Fusarium oxysporum* 不同专化型菌株的遗传多样性, 利用 MIDI 微生物脂肪酸鉴定系统分析了来源于 5 个专化型的 27 株菌株的磷脂脂肪酸种类和含量, 并进行了磷脂脂肪酸聚类分析。结果表明, 供试尖孢镰刀菌中共检测到 9 种脂肪酸, 在兰氏距离为 25.98 时分为 3 个类群, 即主要脂肪酸、微量脂肪酸和偶现脂肪酸, 其中主要脂肪酸有 16:0、18:0、18:1cis9 (ω 9) 和 18:2cis9, 12/18:0a, 含量共占总磷脂脂肪酸的 96.41%; 微量脂肪酸有 14:0、15:0、16:1cis9 (ω 7) 和 20:0, 偶现脂肪酸仅有 17:1 (ω 11)。不同专化型菌株的主要脂肪酸仅 18:2cis9, 12/18:0a 存在显著差异, 微量脂肪酸除 15:0 外其余 3 种均有显著差异。聚类分析结果表明, 以供试的全部 27 株菌株聚类时, 其磷脂脂肪酸与寄主专化型间无明显相关性, 以寄主来源为同科 (葫芦科或茄科) 的菌株聚类时, 其磷脂脂肪酸与寄主专化型间存在着一定的对应关系。

关键词: 尖孢镰刀菌; 专化型; 磷脂脂肪酸; 遗传多样性

Genetic diversity of *Fusarium oxysporum* isolates revealed by phospholipid fatty acids (PLFAs) biomarkers

Xiao Rongfeng Liu Bo* Zhu Yujing Pan Zhizhen Chen Meichun Zhan Hong

(Research Institute of Agricultural Bio-Resources, Fujian Academy of Agricultural Sciences,
Fuzhou 350003, Fujian Province, China)

Abstract: In order to explore the genetic diversity of the formae speciales of *Fusarium oxysporum*, 27 isolates belonging to five formae speciales were tested with MIDI microbial phospholipid fatty acids (PLFAs) identification system. The varieties and contents of PLFAs were detected and then analyzed by using cluster method. The tested isolates had nine varieties of fatty acids, which could be divided into three groups (predominant, minor and casual fatty acids), while the Lance distance was 25.98. The predominant fatty acids were 16:0, 18:0, 18:1cis9 (ω 9) and 18:2cis9, 12/18:0a, accounting for 96.41% of the total PLFA content, while 14:0, 15:0, 16:1cis9 (ω 7) and 20:0 were the minor fatty acids and 17:1 (ω 11) was the only casual fatty acid. Among different formae speciales, 18:2cis9, 12/18:0a was the only predominant fatty acid that had significant difference, whereas all of the minor fatty acids differed significantly except 15:0. The cluster analysis results showed that there was no obvious correlation between fatty acid groups and host formae speciales. However, a corresponding relationship was found between phospholipid fatty acids and formae speciales among the isolates from the host crops within the same family, such as Cucurbitaceae and Solanaceae.

Key words: *Fusarium oxysporum*; formae speciales; phospholipid fatty acid; genetic diversity

尖孢镰刀菌 *Fusarium oxysporum* 是农作物上重要的土传性真菌病原菌, 寄主范围广泛, 可危害 100 多种作物, 一般造成 10%~30% 产量损失, 甚至绝收 (Kaur et al., 2010; 刘波等, 2013)。尖孢镰刀菌种内具有高度的寄主专化性, 根据其对寄主植物种类和品种的致病性, 可分化成不同的专化型, 有些专化型又可进一步划分出生理小种和变种 (Kaur et al., 2010)。因该菌具有丰富的遗传多样性, 且极易发生变异, 导致菌株间的差异较大, 因此仅靠传统的形态学分类和致病性检测进行种间及种内鉴定, 难以准确揭示物种的进化关系。随着分子生物学的不断发展, 如 ISSR、RFLP 和 AFLP 等分子标记技术因其准确性和规范性较好, 在植物病原菌遗传多样性研究中被广泛应用 (段会军等, 2008; Dinolfo et al., 2014; 肖荣凤等, 2015), 但是, 这些方法在引物设计和筛选方面工作量较大, 因此, 仍有必要寻求其它可揭示菌株遗传进化关系的方法。

微生物细胞结构中普遍含有脂肪酸成分, 与其 DNA 具有高度同源性 (Brown, 1996)。脂肪酸含量和结构具有种属特征, 组成相对稳定, 不受生化反应变异及质粒丢失等因素的影响; 而且菌株的脂肪酸可通过仪器全自动检测与分析, 具有特异性识别, 结果可靠、操作简便快捷等优点。不同种类微生物脂肪酸在组成和含量上有较大差异, 同一种类微生物的脂肪酸组成也有差异 (Matsumoto, 2006; 刘波等, 2012)。细菌的主要脂肪酸有 12:0、14:0、14:0、16:0 和 20:0 等, 真菌的主要脂肪酸有 18:00、18:1cis9(ω 9) 和 18:3cis6, 9, 12(ω 6) 等, 放线菌的主要脂肪酸有 10Me16:0 和 10Me18:0 (Zelles et al., 1995; 刘波等, 2010; Zhu et al., 2012)。目前, 脂肪酸已应用在微生物种类鉴定 (刘国红等, 2012)、芽胞杆菌系统发育 (刘国红等, 2015)、菌株脂肪酸种类与致病性关系分析 (刘波等, 2009) 及菌株脂肪酸种类与寄主专化型关系分析 (刘波等, 2012) 等方面, 特别是磷脂脂肪酸 (phospholipid fatty acids, PLFAs) 生物标记法已逐渐在土壤 (刘波等, 2010; Narendrula-Kotha & Nkongo-lo, 2017)、植物 (蓝江林等, 2012; Zhu et al., 2012) 和动物 (刘波等, 2008) 中的微生物分类与遗传多样性研究中得到广泛应用。

目前, 利用磷脂脂肪酸进行真菌种类鉴定及其遗传多样性的研究较少, 仅对镰刀菌 *Fusarium* (Matsumoto, 2006; 刘波等, 2012; 王毅芳等, 2016)、青霉菌 *Penicillium* (Lopes da Silva et al., 1998)、致病疫霉 *Phytophthora infestans* (Larkin & Groves, 2003) 及水

稻丝核菌 *Rhizoctonia oryzae* (Lanoiselet et al., 2005) 进行了相关研究。因此, 本研究收集番茄、茄子、西瓜、甜瓜和苦瓜 5 种不同寄主专化型和地理来源的尖孢镰刀菌共 27 株, 拟利用 MIDI 微生物脂肪酸鉴定系统进行菌株的磷脂脂肪酸种类与含量检测分析, 并探讨菌株磷脂脂肪酸与其寄主专化型的关系, 旨在利用磷脂脂肪酸分析不同专化型尖孢镰菌菌株的遗传多样性, 以期为更深入地揭示尖孢镰刀菌磷脂脂肪酸与其遗传多样性的关系, 并为该病原菌的种系演化和其引致病害的防治提供理论指导。

1 材料与方法

1.1 材料

供试菌株: 尖孢镰刀菌不同寄主专化型菌株共 27 株, 均已通过鉴别寄主致病力测定证实了其寄主专化型, 包括 6 株尖孢镰刀菌番茄专化型 *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* 菌株 (来自杭州市的 FJAT-282、福州市的 FJAT-9205、FJAT-9208、FJAT-9212、FJAT-9214 和保定市的 FJAT-9394)、5 株尖孢镰刀菌茄子专化型 *F. oxysporum* f. sp. *melongenae* 菌株 (来自漳州市的 FJAT-9105、厦门市的 FJAT-9725、FJAT-9825、FJAT-30309 和 FJAT-30313)、5 株尖孢镰刀菌甜瓜专化型 *F. oxysporum* f. sp. *melonis* 菌株 (来自宁德市的 FJAT-9230、福州市的 FJAT-9062、FJAT-9171、FJAT-9173 和 FJAT-30295)、5 株尖孢镰刀菌苦瓜专化型 *F. oxysporum* f. sp. *momordicae* 菌株 (来自福州市的 FJAT-3009、FJAT-3014、FJAT-3017、FJAT-3021 和 FJAT-3027) 和 6 株尖孢镰刀菌西瓜专化型 *F. oxysporum* f. sp. *niveum* 菌株 (来自福州市的 FJAT-141、FJAT-219、FJAT-644、FJAT-30265、FJAT-30285 和 FJAT-30292)。除菌株 FJAT-282 和 FJAT-9394 分别为浙江大学与河北农业科学院赠送外, 余者均由本研究室从福建省内不同地区采集、分离、鉴定与保存。

培养基: 马铃薯葡萄糖琼脂 (potato dextrose agar, PDA) 培养基: 马铃薯 200 g、葡萄糖 20 g、琼脂 18 g, 蒸馏水 1 000 mL; 沙氏葡萄糖肉汤 (Sabouraud dextrose broth, SDB) 培养基 (购于 Fisher 公司): SDB 成品 30 g (动物组织胃蛋白酶消化物 5 g、酪蛋白酶消化物 5 g、葡萄糖 20 g), 蒸馏水 1 000 mL。

试剂及仪器: MIDI 磷脂脂肪酸标准品, 型号 No.1200-A, 美国 MIDI 公司; 氢氧化钠和盐酸为优级纯, 甲醇、正己烷和甲基叔丁基乙醚均为色谱级, 国药集团化学试剂有限公司。7890A 气相色谱仪, 美国安捷伦科技公司。

1.2 方法

1.2.1 尖孢镰刀菌磷脂脂肪酸的提取及检测

磷脂脂肪酸提取步骤参照美国MIDI公司的微生物识别系统操作手册,将尖孢镰刀菌菌株在PDA培养基上活化5 d,挑取边缘菌丝体接种到SDB培养液中,25℃、150 r/min摇床培养3~4 d,过滤冷冻干燥后取约10 mg菌丝置于干燥、干净的带螺旋盖试管中。加入1 mL皂化试剂(NaOH 45 g、甲醇150 mL和去离子水150 mL),混匀振荡5~10 s,100℃水浴5 min,室温冷却,观测试管确定不漏气后,振荡5~10 s,再次100℃水浴25 min;迅速冷却后加入2 mL甲基化试剂(6 mol/L盐酸325 mL和甲醇275 mL),混匀5~10 s后80℃水浴10 min,移出后用流动自来水迅速冷却至室温;加入1.25 mL萃取试剂正己烷200 mL,拧紧盖子,温和地混合旋转10 min,利用干净、干燥的胶头滴管取出样本下层的水相部分;在上层溶液中加入3 mL洗涤试剂(NaOH 10.8 g和水900 mL),拧紧盖子,温和地混合旋转5 min,待溶液分层后吸取上层液体于GC样品管中待测。

提取样品采用7890A型气相色谱仪进行磷脂脂肪酸检测。条件为:二阶程序升高柱温,170℃起始,5℃/min升至260℃,而后以40℃/min升温至310℃,维持90 s;汽化室温度250℃、检测器温度300℃;载气为氢气,流速为2 mL/min,尾吹气为氮气,流速为30 mL/min;柱前压力为68.95 kPa;进样量为1 μ L,进样分流比为100:1。

1.2.2 尖孢镰刀菌磷脂脂肪酸种类与含量的分析

将气相色谱检测的尖孢镰刀菌磷脂脂肪酸结果通过Sherlock MIS 4.5和LGS 4.5软件进行数据处理与输出,并利用林营志等(2009)编写的PLFAEco程序将磷脂脂肪酸检测数据转换成以尖孢镰刀菌菌株为样本、以检测到的磷脂脂肪酸种类与含量为指标的数据矩阵文本,分析供试尖孢镰刀菌磷脂脂肪酸种类分布情况。将所得数据文本转置成以磷脂脂肪酸种类为样本、以不同菌株的磷脂脂肪酸含量为指标构建分析矩阵,以兰氏距离为相关尺度,采用最长距离法进行聚类,将检测到的所有磷脂脂肪酸种类根据含量高低分为主要脂肪酸、微量脂肪酸和偶现脂肪酸3个类群,统计各类群磷脂脂肪酸含量占总磷脂脂肪酸含量的百分率。统计不同寄主专化型菌株中各种类磷脂脂肪酸含量,采用方差分析法比较不同种类磷脂脂肪酸含量与菌株寄主专化型的关系。

1.2.3 尖孢镰刀菌磷脂脂肪酸与寄主专化型关系

根据1.2.2测得的所有磷脂脂肪酸种类为指标

(Hering et al., 1999; Matsumoto, 2006),以尖孢镰刀菌菌株为样本,对数据进行中心化转化,以马氏距离为相关尺度,采用可变平均法进行聚类。根据张述义等(2013)和肖荣凤等(2015)对尖孢镰刀菌ISSR的遗传多样性研究结果,分别进行全部菌株聚类 and 按同科寄主来源(茄科或葫芦科)菌株聚类,分析尖孢镰刀菌磷脂脂肪酸与寄主专化型的关系。

1.3 数据分析

试验数据采用DPS 7.05软件进行处理和聚类分析,应用Duncan氏新复极差法对不同寄主专化型菌株的磷脂脂肪酸含量进行差异显著性检验。

2 结果与分析

2.1 尖孢镰刀菌磷脂脂肪酸种类与含量的分析

2.1.1 菌株磷脂脂肪酸种类的分布

供试27株尖孢镰刀菌共检测到9种磷脂脂肪酸,其中7种为所有菌株共有的,分别为十四烷酸14:0、十五烷酸15:0、十六烷酸16:0、顺-9-十六碳烯酸16:1cis9(ω 7)、十八烷酸18:0、十八烯酸18:1cis9(ω 9)和亚油酸18:2cis9,12/18:0a,另外2种仅在部分菌株中可检测到,分别为十七烯酸17:1(ω 11)和二十烷酸20:0(表1)。17:1(ω 11)仅在甜瓜专化型菌株FJAT-9230、FJAT-30295和西瓜专化型菌株FJAT-30292这3株菌株中检测到;而20:0仅在番茄专化型菌株FJAT-282、甜瓜专化型菌株FJAT-9062、苦瓜专化型菌株FJAT-3009、FJAT-3017、FJAT-3021和西瓜专化型菌株FJAT-141这6株菌株中未检测到。

2.1.2 菌株不同种类磷脂脂肪酸的含量分析

聚类分析结果表明,当兰氏距离 $\lambda=25.98$ 时,可将9种磷脂脂肪酸分成3个类群,类群I为主要脂肪酸,包含4种磷脂脂肪酸,分别为16:0、18:0、18:1cis9(ω 9)和18:2cis9,12/18:0a;类群II为微量脂肪酸,包含4种磷脂脂肪酸,分别为14:0、15:0、16:1cis9(ω 7)和20:0;类群III为偶现脂肪酸,包含1种磷脂脂肪酸17:1(ω 11),仅在葫芦科的3株菌株中有检测到(图1)。4种主要脂肪酸的含量占总磷脂脂肪酸的96.41%,4种微量脂肪酸的含量占总磷脂脂肪酸的2.73%,而偶现脂肪酸17:1(ω 11)的含量尚不到总磷脂脂肪酸的1.00%(表1)。

2.1.3 不同专化型菌株的磷脂脂肪酸含量分析

尖孢镰刀菌不同专化型的磷脂脂肪酸含量分析结果表明,4种主要脂肪酸仅18:2cis9,12/18:0a的含量在不同专化型菌株中差异显著($P<0.05$),苦瓜专化型的最高,为47.23%,其次为甜瓜专化型和番茄

专化型,分别为40.33%和40.70%,茄子专化型和西瓜专化型的最少,分别为36.55%和36.35%;4种微量脂肪酸除15:0外,在不同专化型中均有显著差异($P<0.05$),且不同专化型菌株的高含量脂肪酸均不同,14:0含量在西瓜专化型中最高,16:1cis9(ω 7)含量在苦瓜专化型中最高,20:0含量在茄子专化型中最高(表2)。说明主要脂肪酸对菌株专化型的影响较小,而微量脂肪酸对菌株专化型的影响较大。

表 1 供试 27 株尖孢镰刀菌菌株的磷脂脂肪酸含量测定结果
Table 1 Detection of the content of phospholipid fatty acids from 27 isolates of *Fusarium oxysporum* %

菌株 Isolate	14:0	15:0	16:0	16:1cis9(ω 7)	17:1(ω 11)	18:0	18:1cis9(ω 9)	18:2cis9,12/18:0a	20:0
FJAT-282	0.46	0.79	18.38	1.12	0.00	3.98	18.51	56.76	0.00
FJAT-9205	0.49	0.26	24.86	0.89	0.00	10.35	25.91	36.11	0.41
FJAT-9208	0.68	0.37	25.79	0.94	0.00	10.16	24.90	36.21	0.29
FJAT-9212	0.50	0.16	24.61	1.00	0.00	10.33	25.01	37.88	0.49
FJAT-9214	0.59	0.25	24.48	1.13	0.00	8.11	22.18	42.49	0.34
FJAT-9394	0.42	0.20	24.39	0.52	0.00	12.55	26.16	34.74	0.40
FJAT-9105	0.54	0.16	23.39	1.41	0.00	8.76	27.36	37.71	0.45
FJAT-9725	0.59	0.27	25.86	0.90	0.00	12.15	29.40	29.96	0.39
FJAT-9825	0.59	0.25	22.80	1.13	0.00	10.82	26.90	36.35	0.43
FJAT-30309	0.51	0.26	24.41	1.25	0.00	11.38	31.95	29.18	0.53
FJAT-30313	0.38	0.54	21.76	1.91	0.00	6.55	17.98	49.53	0.35
FJAT-9062	0.47	0.65	21.96	1.62	0.00	4.45	18.68	51.84	0.00
FJAT-9171	0.51	0.27	24.10	1.16	0.00	8.34	26.52	37.91	0.37
FJAT-9173	0.49	0.25	24.20	1.22	0.00	7.89	27.61	37.20	0.58
FJAT-9230	0.69	0.16	23.90	1.09	0.16	13.32	28.20	31.76	0.49
FJAT-30295	0.86	0.17	19.40	3.56	0.99	6.75	19.92	42.96	0.58
FJAT-3009	0.46	0.58	21.62	2.53	0.00	3.61	20.05	50.67	0.00
FJAT-3014	0.56	0.31	24.38	1.61	0.00	6.03	26.36	39.57	0.27
FJAT-3017	0.35	0.50	21.35	2.47	0.00	3.82	21.31	49.68	0.00
FJAT-3021	0.38	0.26	21.54	2.28	0.00	5.19	21.17	48.23	0.00
FJAT-3027	0.39	0.45	21.30	2.32	0.00	5.31	20.71	48.00	0.25
FJAT-141	0.45	0.65	22.04	1.46	0.00	8.03	28.95	38.01	0.00
FJAT-219	0.59	0.28	24.15	1.29	0.00	8.28	26.57	38.26	0.35
FJAT-644	0.57	0.39	24.49	0.77	0.00	13.02	28.88	31.14	0.38
FJAT-30265	0.75	0.47	26.08	1.23	0.00	9.47	24.87	36.67	0.27
FJAT-30285	0.63	0.53	25.02	1.26	0.00	10.11	24.98	36.50	0.54
FJAT-30292	0.89	0.14	23.38	2.60	0.51	10.63	20.25	37.51	0.47

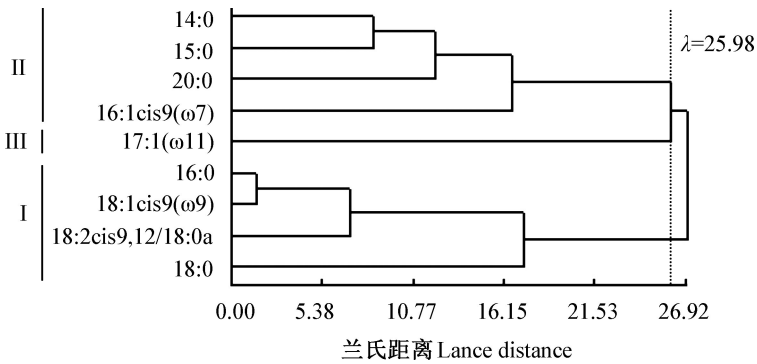


图 1 尖孢镰刀菌磷脂脂肪酸的聚类结果
Fig. 1 Clustering analysis of phospholipid fatty acids for *Fusarium oxysporum* isolates

表2 尖孢镰刀菌不同寄主专化型菌株的磷脂脂肪酸含量分析

Table 2 Phospholipid fatty acid content of *Fusarium oxysporum* isolates in different formae speciales %

脂肪酸 Fatty acid	番茄专化型 <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i>	茄子专化型 <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>melongenae</i>	甜瓜专化型 <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>melonis</i>	苦瓜专化型 <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>momordicae</i>	西瓜专化型 <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>niveum</i>
14:0	0.52±0.04 ab	0.52±0.04 ab	0.60±0.08 a	0.43±0.04 b	0.65±0.06 a
15:0	0.34±0.09 a	0.30±0.06 a	0.30±0.09 a	0.42±0.06 a	0.41±0.07 a
16:0	23.75±1.09 a	23.64±0.70 a	22.71±0.92 a	22.04±0.59 a	24.19±0.57 a
16:1cis9(ω7)	0.93±0.09 b	1.32±0.17 b	1.73±0.47 ab	2.24±0.16 a	1.44±0.25 b
18:0	9.25±1.20 a	9.93±1.02 a	8.15±1.46 a	4.79±0.46 b	9.92±0.74 a
18:1cis9(ω9)	23.78±1.20 a	26.72±2.36 a	24.19±2.02 a	21.92±1.13 a	25.57±1.32 a
18:2cis9, 12/18:0a	40.70±3.40 ab	36.55±3.66 b	40.33±3.38 ab	47.23±1.98 a	36.35±1.08 b
20:0	0.32±0.07 ab	0.43±0.03 a	0.40±0.11 a	0.10±0.06 b	0.34±0.08 a

表中数据为平均数±标准误。同行不同字母表示经Duncan氏新复极差法检验在 $P<0.05$ 水平差异显著。Data are mean±SE. Different letters in the same row indicate significant difference at $P<0.05$ level by Duncan's new multiple range test.

2.2 尖孢镰刀菌磷脂脂肪酸与寄主专化型的关系

2.2.1 供试全部尖孢镰刀菌的磷脂脂肪酸聚类分析

供试27株尖孢镰刀菌磷脂脂肪酸聚类分析结果表明,当马氏距离 $\lambda=16.20$ 时,可将5个寄主专化型的

菌株分为6个类群,但并不能完全按寄主专化型进行归类,不同专化型菌株在不同类群中会交叉存在。如菌株FJAT-282、FJAT-9214和FJAT-9062归为一类,但包含2株番茄专化型和1株甜瓜专化型(图2)。

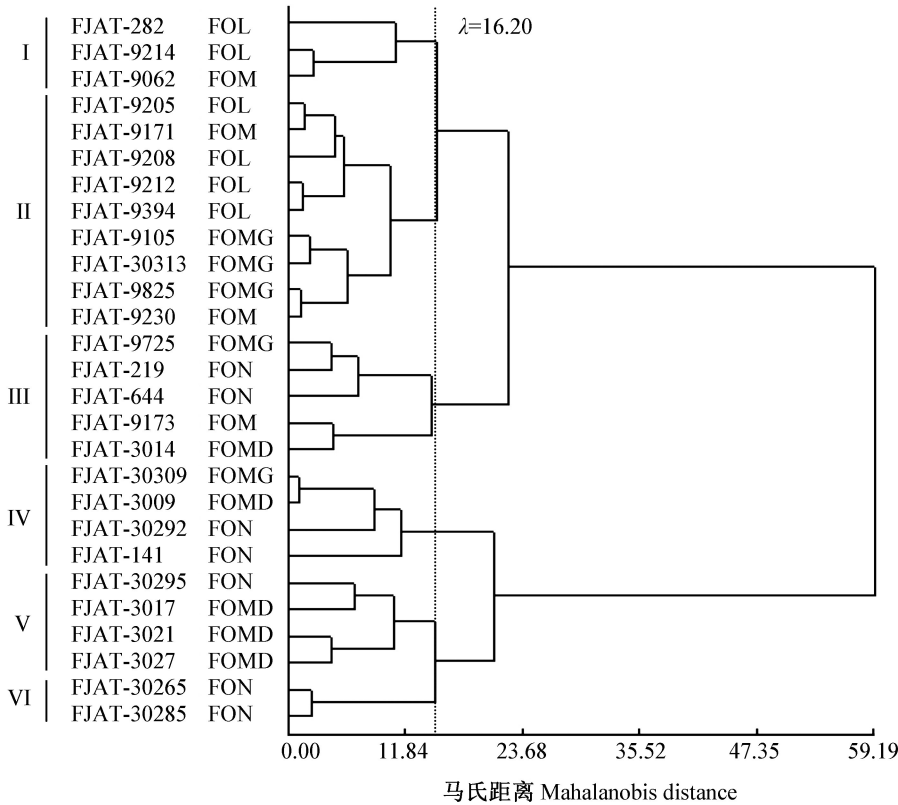


图2 不同寄主专化型尖孢镰刀菌菌株磷脂脂肪酸的聚类分析

Fig. 2 Cluster analysis of the phospholipid fatty acids of *Fusarium oxysporum* isolates from different formae speciales

FOL: 番茄专化型; FOM: 甜瓜专化型; FOMG: 茄子专化型; FOMD: 苦瓜专化型; FON: 西瓜专化型。FOL: *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*; FOM: *F. oxysporum* f. sp. *melonis*; FOMG: *F. oxysporum* f. sp. *melongenae*; FOMD: *F. oxysporum* f. sp. *momordicae*; FON: *F. oxysporum* f. sp. *niveum*.

2.2.2 茄科作物尖孢镰刀菌的磷脂脂肪酸聚类分析

茄科作物尖孢镰刀菌的磷脂脂肪酸聚类分析结果表明,当马氏距离 $\lambda=17.12$ 时,可将11株菌株分为2个类群,类群I含6株菌株,均为番茄专化型(FOL),类群II含5株菌株,均为茄子专化型(FOMG)(图3)。表明来源于同科寄主的菌株可根据寄主专化型划分为不同的类群。

2.2.3 葫芦科作物尖孢镰刀菌的磷脂脂肪酸聚类分析

葫芦科作物尖孢镰刀菌的磷脂脂肪酸聚类分析结果表明,当马氏距离 $\lambda=14.69$ 时,可将16株菌株分为3个类群,类群I含3株菌株,分别为FJAT-9062、

FJAT-9171和FJAT-9173,均属甜瓜专化型(FOM);类群II含10株菌株,分别为2株甜瓜专化型(FOM)菌株FJAT-9230和FJAT-30295,5株苦瓜专化型(FOMD)菌株FJAT-3009、FJAT-3014、FJAT-3017、FJAT-3021和FJAT-3027,3株西瓜专化型(FON)菌株FJAT-219、FJAT-644和FJAT-30265;类群III含3株菌株,分别为FJAT-141、FJAT-30285和FJAT-30292,均属西瓜专化型(FON)(图4)。表明在以尖孢镰刀菌磷脂脂肪酸生物标记为指标的进化过程,来自苦瓜专化型的尖孢镰刀菌在甜瓜专化型和西瓜专化型的尖孢镰刀菌之间起着过渡性进化作用。

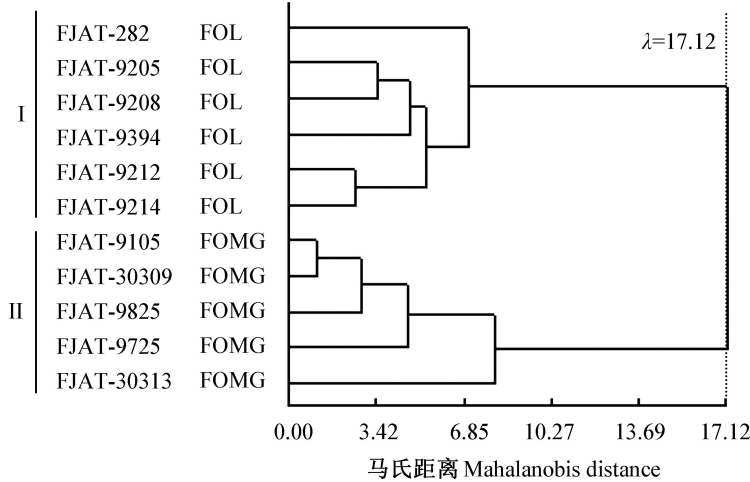


图3 茄科作物不同专化型尖孢镰刀菌菌株磷脂脂肪酸的聚类分析

Fig. 3 Cluster analysis of the phospholipid fatty acids of *Fusarium oxysporum* isolates from Solanaceae crops
FOL: 番茄专化型; FOMG: 茄子专化型。FOL: *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*; FOMG: *F. oxysporum* f. sp. *melongenae*.

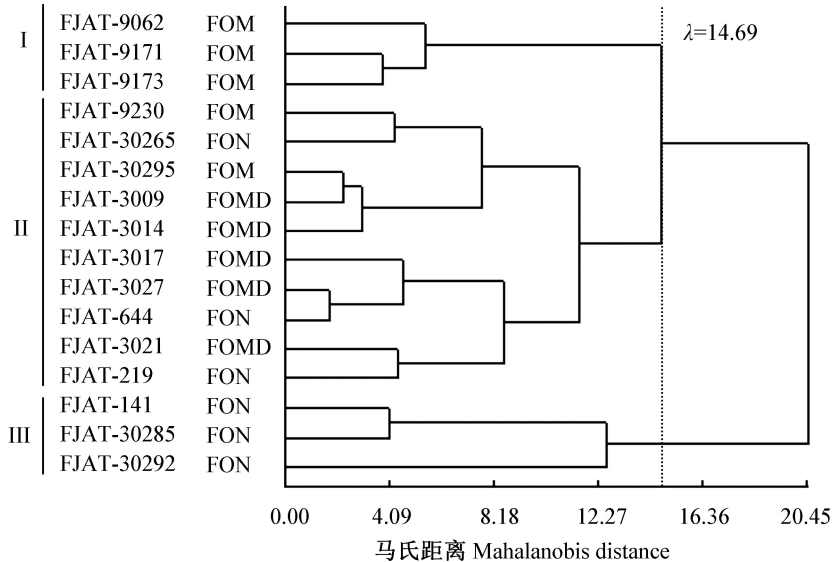


图4 葫芦科作物不同专化型尖孢镰刀菌菌株磷脂脂肪酸的聚类分析

Fig. 4 Cluster analysis of the phospholipid fatty acids of *Fusarium oxysporum* isolates from Cucurbitaceae crops
FOM: 甜瓜专化型; FOMD: 苦瓜专化型; FON: 西瓜专化型。FOM: *F. oxysporum* f. sp. *melonis*; FOMD: *F. oxysporum* f. sp. *momordicae*; FON: *F. oxysporum* f. sp. *niveum*.

3 讨论

不同寄主专化型尖孢镰刀菌的主要磷脂脂肪酸种类略有差异。Hering et al.(1999)测得的尖孢镰刀菌棉花专化型的主要脂肪酸有 16:0、16:1cis9、18:0、18:1cis9 和 18:2cis9, 12; Matsumoto(2006)测定结果显示尖孢镰刀菌番茄专化型的主要脂肪酸为 16:0、18:0、18:1cis9(ω9)和 18:2cis9(ω6);刘波等(2012)测得尖孢镰刀菌西瓜专化型、古巴专化型和萎蔫专化型主要脂肪酸为 14:0、16:0、18:0 和 18:2cis9, 12/18:0a;王毅芳等(2016)研究表明,尖孢镰刀菌番茄专化型、棉花专化型、黄瓜专化型和茄子专化型的主要脂肪酸为 18:0、18:1cis9(ω9)和 18:2cis9, 12/18:0a;本研究表明,尖孢镰刀菌番茄专化型、茄子专化型、西瓜专化型、甜瓜专化型和苦瓜专化型的主要脂肪酸有 16:0、18:0、18:1cis9(ω9)和 18:2cis9, 12/18:0a, 所测得的主要脂肪酸种类与前述研究结果较为一致,仅个别脂肪酸种类有差异,可能与菌株的寄主专化型不同有关。

不同专化型尖孢镰刀菌的磷脂脂肪酸含量也存在差异。本研究测得主要脂肪酸含量占总脂肪酸的 96.41%,该结果与 Matsumoto(2006)和王毅芳等(2016)的研究结果(大于90%)基本一致。但王毅芳等(2016)研究认为不同寄主专化型菌株间 18:1cis9(ω9)的含量差别最大,其次是 18:2cis9, 12/18:0a 和 18:00。本研究结果则表明,不同寄主专化型菌株间主要脂肪酸仅 18:2cis9, 12/18:0a 的含量存在差异,而微量脂肪酸 14:0、16:1cis9(ω7)和 20:0 的含量在不同寄主专化型菌株间存在显著差异。

尖孢镰刀菌的遗传变异存在复杂性和多样性,影响着该病原菌的种系演化及其引致病害的防治,明确其遗传变异对后续田间作物品种种植的合理布局与病原菌的遗传变异监测具有重要意义。本研究对不同寄主专化型尖孢镰刀菌磷脂脂肪酸的遗传多样性分析结果表明,当5个不同寄主专化型的全部菌株进行聚类分析时,其磷脂脂肪酸遗传多样性与寄主专化型无明显相关性,若进一步对菌株按同科(葫芦科或茄科)寄主来源分别聚类时,菌株的磷脂脂肪酸与寄主专化型存在一定的相关性,如茄科作物的2个专化型可以完全区分开来,该结果与肖荣凤等(2015)对这些菌株进行的ISSR遗传多态性分析结果具有一致性;也与张述义等(2013)和王建明等(2011)对其它尖孢镰刀菌遗传多样性的ISSR分析结果具有相似性。但是,本研究中葫芦科作物尖

孢镰刀菌的3个专化型的磷脂脂肪酸聚类结果显示,类群II除包含所有的苦瓜专化型外,还包括2株甜瓜专化型和3株西瓜专化型菌株,说明磷脂脂肪酸与尖孢镰刀菌寄主专化型的系统发育存在着对应关系,但个别菌株例外,存在一定的误差。刘波等(2012)和王毅芳等(2016)研究均表明,磷脂脂肪酸与尖孢镰刀菌寄主专化型的系统发育存在着对应关系,但是利用磷脂脂肪酸划分尖孢镰刀菌寄主专化型的准确率仅为93%,此结果也印证了本研究所得结果。Hering et al.(1999)利用脂肪酸方法对尖孢镰刀菌棉花专化型的不同生理小种(小种1~6)进行遗传分类时,也认为存在一定的误差;Matsumoto(2006)研究表明,使用常规MIDI脂肪酸提取方法,不同专化型菌株间会有少数菌株出现交叉,但是通过优化MIDI脂肪酸提取方法后,可准确区分尖孢镰刀菌的不同专化型。因此,磷脂脂肪酸生物标记法用于菌株的遗传多态性研究具有可行性,但本研究中由于供试菌株数量有限,可能导致结果存在一定的局限性,下一步有待收集更多不同寄主专化型与不同地理来源的菌株进行深入研究。

参 考 文 献 (References)

- Brown JKM. 1996. The choice of molecular marker methods for population genetic studies of plant pathogens. *New Phytologist*, 133 (1): 183–195
- Donlfo MI, Castañares E, Stenglein SA. 2014. Characterization of a *Fusarium poae* world-wide collection by using molecular markers. *European Journal of Plant Pathology*, 140(1): 119–132
- Duan HJ, Zhang CY, Li XH, Guo XM, Ma ZY. 2008. Assessment of genetic diversity in *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum* by RAPD, ISSR and AFLP analysis. *Mycosystema*, 27(2): 267–276 (in Chinese) [段会军, 张彩英, 李喜焕, 郭小敏, 马峙英. 2008. 基于RAPD、ISSR和AFLP对西瓜枯萎病菌遗传多样性的评价. *菌物学报*, 27(2): 267–276]
- Hering O, Nirenberg HI, Köhn S, Deml G. 1999. Characterization of isolates of *Fusarium oxysporum* Schlecht. f. sp. *vasinfectum* (Atk.) Snyder. & Hans. races 1–6, by cellular fatty acid analysis. *Journal of Phytopathology*, 147(9): 509–514
- Kaur R, Kaur J, Singh RR. 2010. Nonpathogenic *Fusarium* as a biological control agent. *Plant Pathology Journal*, 9(3): 79–91
- Lan JL, Liu B, Jiao HM, Zhu YJ, Su MX, Shi H. 2012. Community and diversity of endophytic bacteria in *Musa nana*. *Journal of Tropical and Subtropical Botany*, 20(3): 285–291 (in Chinese) [蓝江林, 刘波, 焦会民, 朱育菁, 苏明星, 史怀. 2012. 香蕉植株内生细菌群落多态性研究. *热带亚热带植物学报*, 20(3): 285–291]
- Lanoiselet VM, Cothier EJ, Cothier NJ, Ash GJ, Harper JD. 2005. Comparison of two total cellular fatty acid analysis protocols to differentiate *Rhizoctonia oryzae* and *R. oryzae-sativae*. *Mycologia*, 97

- (1): 77–83
- Larkin RP, Groves CL. 2003. Identification and characterization of isolates of *Phytophthora infestans* using fatty acid methyl ester (FAME) profiles. *Plant Disease*, 87(10): 1233–1243
- Lin YZ, Liu B, Zhang QF, Fu XR. 2009. The development of the program PLFAEco for analysis of the phospholipid fatty acids (PLFAs) biomarkers detected from the microbial community in soil samples. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 25(14): 286–290 (in Chinese) [林营志, 刘波, 张秋芳, 傅秀荣. 2009. 土壤微生物群落磷脂脂肪酸生物标记分析程序 PLFAEco. *中国农学通报*, 25(14): 286–290]
- Liu B, Hu GP, Xiao RF. 2012. Identification of the characteristics for forma specials of *Fusarium oxysporum* Schl. based on the analysis of fatty acid biomarkers. *Scientia Agricultura Sinica*, 45(24): 4998–5012 (in Chinese) [刘波, 胡桂萍, 肖荣凤. 2012. 尖孢镰刀菌寄主专化型脂肪酸生物标记鉴别特性. *中国农业科学*, 45(24): 4998–5012]
- Liu B, Hu GP, Zheng XF, Zhang JF, Xie HA. 2010. Analysis on microbial diversity in the rhizosphere of rice by phospholipid fatty acids biomarkers. *Chinese Journal of Rice Science*, 24(3): 278–288 (in Chinese) [刘波, 胡桂萍, 郑雪芳, 张建福, 谢华安. 2010. 利用磷脂脂肪酸(PLFAs)生物标记法分析水稻根际土壤微生物多样性. *中国水稻科学*, 24(3): 278–288]
- Liu B, Huang JS, Xiao RF, Che JM, Chen QH, Ge CB, Hao XJ, Hu GP, Huang SF, Lan JL, et al. 2013. Biology and biological control of *Fusarium oxysporum*. Beijing: Science Press, pp. 447–448 (in Chinese) [刘波, 黄俊生, 肖荣凤, 车建美, 陈庆河, 葛慈斌, 郝晓娟, 胡桂萍, 黄素芳, 蓝江林, 等. 2013. 尖孢镰刀菌生物学及其生物防治. 北京: 科学出版社, pp. 447–448]
- Liu B, Lan JL, Che JM, Lin YZ, Wang QH, Zhu YJ. 2009. Fatty acid type of *Ralstonia solanacearum* strains and the relationship with pathogenicity. *Scientia Agricultura Sinica*, 42(2): 511–522 (in Chinese) [刘波, 蓝江林, 车建美, 林营志, 王秋红, 朱育菁. 2009. 青枯雷尔氏菌脂肪型与致病性的关系. *中国农业科学*, 42(2): 511–522]
- Liu B, Zheng XF, Zhu CX, Lan JL, Lin YZ, Lin B, Ye YH. 2008. The diversity of PLFAs biomarkers for the microbial community in the stroma cushion of non-pollution pigsty. *Acta Ecologica Sinica*, 28(11): 5488–5498 (in Chinese) [刘波, 郑雪芳, 朱昌雄, 蓝江林, 林营志, 林斌, 叶耀辉. 2008. 脂肪酸生物标记法研究零排放猪舍基质垫层微生物群落多样性. *生态学报*, 28(11): 5488–5498]
- Liu GH, Lin YZ, Liu B, Lin NQ. 2012. Comparison of *Bacillus* species identification based on ITS and fatty acid analysis. *Fujian Journal of Agricultural Sciences*, 27(2): 173–180 (in Chinese) [刘国红, 林营志, 刘波, 林乃铨. 2012. 芽胞杆菌种类脂肪酸鉴定与分子鉴定方法的比较. *福建农业学报*, 27(2): 173–180]
- Liu GH, Liu B, Lin YZ, Tang JY. 2015. The comparison of *Bacillus* species classification based on fatty acid and 16S rRNA gene. *Biotechnology Bulletin*, 31(3): 146–153 (in Chinese) [刘国红, 刘波, 林营志, 唐建阳. 2015. 基于脂肪酸生物标记与 16S rRNA 的芽胞杆菌系统发育分析比较. *生物技术通报*, 31(3): 146–153]
- Lopes da Silva T, de Sousa E, Pereira PT, Ferrão AM, Roseiro JC. 1998. Cellular fatty acid profiles for the differentiation of *Penicillium* species. *FEMS Microbiology Letters*, 164(2): 303–310
- Matsumoto M. 2006. Comparison of two fatty acid analysis protocols to characterize and differentiate *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* and *F. oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*. *Mycoscience*, 47(4): 190–197
- Narendrula-Kotha R, Nkongolo KK. 2017. Microbial response to soil liming of damaged ecosystems revealed by pyrosequencing and phospholipid fatty acid analyses. *PLoS ONE*, 12(1): e0168497
- Wang JM, Li RQ, Chang YD, He R, Li XF, Xu YM, Gao JM. 2011. ISSR analysis of genetic diversity of *Fusarium oxysporum* and *F. redolens*. *Acta Phytopathologica Sinica*, 41(4): 337–344 (in Chinese) [王建明, 李蕊倩, 畅引东, 何瑞, 李新风, 徐玉梅, 高俊明. 2011. 尖孢镰刀菌及芬芳镰孢菌遗传多样性的 ISSR 分析. *植物病理学报*, 41(4): 337–344]
- Wang YF, Yang ZH, Zhu JH, Zhang D, Zhao DM, Zhang J. 2016. Rapid identification of four formae speciales of *Fusarium oxysporum* using fatty acid markers. *Mycosystema*, 35(5): 569–576 (in Chinese) [王毅芳, 杨志辉, 朱杰华, 张岱, 赵冬梅, 张健. 2016. 利用脂肪酸生物标记对尖孢镰孢寄主专化型的快速鉴定. *菌物学报*, 35(5): 569–576]
- Xiao RF, Chen YP, Zhu YJ, Zhan H, Liu B, Ge CB. 2015. Genetic diversity of pathogenic *Fusarium oxysporum* strains by ISSR markers. *Chinese Journal of Tropical Crops*, 36(11): 2007–2014 (in Chinese) [肖荣凤, 陈燕萍, 朱育菁, 詹洪, 刘波, 葛慈斌. 2015. 尖孢镰刀菌致病性菌株遗传多样性的 ISSR 分析. *热带作物学报*, 36(11): 2007–2014]
- Zelles L, Bai QY, Rackwitz R, Chadwick D, Beese F. 1995. Determination of phospholipid- and lipopolysaccharide-derived fatty acids as an estimate of microbial biomass and community structures in soils. *Biology and Fertility of Soils*, 19(2/3): 115–123
- Zhang SY, Li XF, Wei XY, Wang JM. 2013. Genetic diversity of 33 *Fusarium oxysporum* strains: an ISSR analysis. *Chinese Journal of Ecology*, 32(5): 1195–1202 (in Chinese) [张述义, 李新风, 韦晓艳, 王建明. 2013. 33 株尖孢镰刀菌遗传多样性的 ISSR 分析. *生态学杂志*, 32(5): 1195–1202]
- Zhu YJ, Hu GP, Liu B, Xie HA, Zheng XF, Zhang JF. 2012. Using phospholipid fatty acid technique to analysis the rhizosphere specific microbial community of seven hybrid rice cultivars. *Journal of Integrative Agriculture*, 11(11): 1817–1827

(责任编辑:李美娟)