

拟轮枝镰孢菌 EST-SSR 信息分析与标记开发

李新凤¹ 王建明^{1*} 姜晓东¹ 郝晓娟¹ 张祖维² 田宏先³

(1. 山西农业大学农学院, 太谷 030801; 2. 山西农业大学动物科技学院, 太谷 030801;

3. 山西省农业科学院高寒区作物研究所, 大同 037000)

摘要: 为开发可用于拟轮枝镰孢菌 *Fusarium verticillioides* 及其近缘种遗传多样性分析的 SSR 引物, 利用生物信息学方法和 PCR 技术, 通过对从 NCBI 下载的 87 086 条拟轮枝镰孢菌的 EST 序列信息进行分析, 设计 EST-SSR 引物, 检测其在拟轮枝镰孢菌及其近缘种中的扩增情况, 并用筛选出的多态性引物对 15 株拟轮枝镰孢菌进行 SSR 遗传多样性分析。结果表明, 在 EST 序列中, 共查找到 11 952 个 SSR 位点, 592 种重复基元, SSR 出现频率为 1.09%, 重复基元出现数量最多的为三核苷酸 (54.00%), 其中 (CAA/TTG)_n 基元出现频率最高。设计的 25 对 EST-SSR 引物在拟轮枝镰孢菌种内的有效扩增率和多态率分别为 80.00% 与 32.00%, 对 5 种近缘镰孢菌种的通用率和多态率分别为 40.00% 和 8.00%。遗传多样性分析结果表明, 在相似系数为 0.664 水平下, 供试菌株可划分为 4 个 SSR 类群, 但类群的划分与菌株的地理来源无关; 不同菌株间存在明显的遗传分化。表明基于拟轮枝镰孢菌 EST 序列开发的 SSR 引物可用于拟轮枝镰孢菌及其近缘种的遗传多样性分析。

关键词: 拟轮枝镰孢菌; EST-SSR; 信息分析; 遗传多样性; 通用性

EST-SSR information analysis and marker development for genetic diversity analysis of *Fusarium verticillioides*

Li Xinfeng¹ Wang Jianming^{1*} Jiang Xiaodong¹ Hao Xiaojuan¹ Zhang Zuwei² Tian Hongxian³

(1. College of Agriculture, Shanxi Agricultural University, Taigu 030801, Shanxi Province, China; 2. College of Animal Science and Veterinary Medicine, Shanxi Agricultural University, Taigu 030801, Shanxi Province, China; 3. Research Institute of Alpine Crops, Shanxi Academy of Agricultural Sciences, Datong 037000, Shanxi Province, China)

Abstract: To develop EST-SSR markers for genetic diversity analysis of *Fusarium verticillioides* and related *Fusarium* spp. strains, the SSRs of *Fusarium verticillioides* were analyzed and EST-SSR primers were designed based on 87 086 ESTs obtained from NCBI database using bioinformatics method and PCR technology. The genetic diversity of 15 *F. verticillioides* strains were analyzed with the polymorphic primers screened. The results showed that a total of 11 952 SSRs loci were detected with a frequency of 1.09%, and 592 types of motifs were identified in *F. verticillioides* ESTs. The most abundant motif was trimucleotide repeats (54.00%). (CAA/TTG)_n occurred more often than other repeat motifs. The effective amplification rate of the 25 designed primers in *F. verticillioides* strains was 80.00%, and 32.00% of these primers were polymorphic. The rates of amplification transferability and polymorphism in five *Fusarium* spp. strains were 40.00% and 8.00%, respectively. The genetic diversity results indicated that all the strains were clustered into four groups with a similarity coefficient of 0.664, and there was no correlation between SSR grouping and the geographic origins of strains. Obvious genetic diversity

基金项目: 山西省科技基础条件平台建设项目(2015091004-0104), 山西农业大学引进人才博士科研启动基金(2013YJ09)

* 通信作者 (Author for correspondence), E-mail: jm.w@sohu.com

收稿日期: 2016-12-06

existed among the strains. The results indicated that the EST-SSR markers could be used to analyze the genetic diversity of *F. verticillioides* and related species in *Fusarium*.

Key words: *Fusarium verticillioides*; EST-SSR; information analysis; genetic diversity; transferability

拟轮枝镰孢菌 *Fusarium verticillioides* 是一种重要的植物病原菌,可侵染玉米、大豆等多种作物,引起茎基腐、穗腐和根腐等病害,除影响作物的产量和品质外,还能产生伏马菌素、T-2毒素等,使人畜中毒而影响健康(Han et al., 2014)。该菌种内各菌株间的致病性分化明显,产毒能力差异大,种群多样性和遗传多样性丰富(Covarelli et al., 2012; Venturini et al., 2013),且其形态学特征易受环境条件影响,因此,开发可用于拟轮枝镰孢菌分类鉴定与种内遗传多样性分析的分子标记具有重要的理论与实践意义。

目前应用于拟轮枝镰孢菌遗传多样性分析的分子标记技术主要有随机扩增多态性DNA标记(random amplified polymorphic DNA, RAPD)、扩增片段长度多态性(amplified fragment length polymorphism, AFLP)、微卫星标记(simple sequence repeat, SSR)等(Aiyaz et al., 2016; Tsehay et al., 2016)。EST-SSR标记是基于物种表达序列标签(expressed-sequence tags, EST)数据库建立的SSR,与其它标记技术相比,该标记不仅具有多态性高、共显性和重复性好、经济便捷等特点,且由于其在物种间具有较高的通用性,更适用于比较物种间的基因组。目前,EST-SSR标记已被广泛用于植物遗传多样性、群体遗传结构、遗传图谱、基因发掘和比较基因组学等方面的研究(Liu et al., 2014; Arias et al., 2016),如梁照文等(2015)与Alam et al. (2015)分别对检疫性杂草毒莠苣 *Lactuca serriola* 与其近缘种,以及来自马来西亚7个州的马齿苋 *Portulaca oleracea* 进行了EST-SSR遗传多样性分析。有关植物病原菌EST-SSR标记的研究报道还较少,Dracatos et al. (2006)、Sipahi et al. (2015)和Wan et al. (2013)分别开发了可用于黑麦冠锈菌 *Puccinia coronata*、小麦叶锈菌 *Puccinia triticina* 和杨树锈菌 *Melampsora* spp. 遗传多样性分析的EST-SSR标记,并对其在近缘种中的有效性进行了评价;Frenkel et al. (2012)开发了用于葡萄白粉病菌 *Erysiphe necator* 群体遗传结构分析的EST-SSR标记;Mahfooz et al. (2012)与李新风等(2014; 2015)成功开发了尖镰孢菌 *F. oxysporum* 的EST-SSR标记,而未见有关拟轮枝镰孢菌EST-SSR方面

的研究报道。

本研究采用生物信息学方法,从GenBank数据库中公布的拟轮枝镰孢菌EST序列中筛查简单重复序列SSR,分析其在拟轮枝镰孢菌转录组中的分布规律和特点,设计拟轮枝镰孢菌EST-SSR引物,并检测其有效性、分析其多态性以及评价其在近缘种中的通用性,以期开发可用于镰孢菌分类鉴定、比较基因组学以及功能基因等相关研究的新型SSR标记提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料

供试菌株:拟轮枝镰孢菌分离于山西省各地区不同样地的感染玉米穗腐病、茎基腐病的病株上,共15株,其中自太谷分离有8株,自大同分离3株,自阳城分离2株,自汾阳和临汾分离各1株。尖镰孢菌 *Fusarium oxysporum* 分别分离自祁县绿豆、太谷菜豆、夏县黄瓜与祁县茄子上;腐皮镰孢菌 *F. Solani* 分离自太谷甜瓜、太谷菜豆、运城棉花、长治樱花上;半裸镰孢菌 *F. semitectum* 分离自太谷菜豆、太谷蚕豆、运城茄子、太谷番茄上;木贼镰孢菌 *F. equiseti* 分离自太谷茄子、太谷番茄、太谷番茄、运城棉花上;禾谷镰孢菌 *F. graminearum* 分离自太谷棉花、太谷西瓜、临汾黄瓜与番茄上,以上近缘镰孢菌每种各4株,共20株。结合Booth分类系统(Booth, 1988)与Leslie分类方法(Leslie & Summerell, 2006)对所有供试菌株进行形态学鉴定,并通过 *EF-1α* (*tef*) 基因序列分析方法进行分子鉴定。

查彼(Czapek)培养液:NaNO₃ 2 g、K₂HPO₄ 1 g、KCl 0.5 g、MgSO₄ 0.5 g、FeSO₄ 0.01 g、蔗糖 30 g、蒸馏水 1 000 mL。

试剂及仪器: *Taq*DNA Polymerase、Dntp、DNA marker、RNaseA,生工生物工程(上海)股份有限公司;CTAB、Tris,美国Sigma公司;其余试剂均为国产分析纯试剂。T-1PCR基因扩增仪、Gel DocTM XR+凝胶成像分析系统,美国Bio-Rad公司;DYY-11型电脑三恒多用电泳仪,北京六一仪器厂。

1.2 方法

1.2.1 拟轮枝镰孢菌EST-SSR信息分析

于2015年9月17日自GenBank/dbEST(<http://>

www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez)中下载拟轮枝镰孢菌的EST序列。利用Phred软件筛选符合条件的EST序列,并通过Phrap软件(<http://www.phrap.org>)将重复序列与载体序列去除后,拼接得到较高质量的EST序列。然后利用SSRhunter离线软件,结合人工搜索,对所得拟轮枝镰孢菌EST序列中的SSR进行搜索。搜索标准为:含有六碱基、五碱基、四碱基、三碱基、二碱基,且重复基元长度大于等于12 bp(六碱基重复次数 ≥ 3 次、五碱基重复次数 ≥ 3 次、四碱基重复次数 ≥ 3 次、三碱基重复次数 ≥ 4 次、二碱基重复次数 ≥ 6 次),统计和分析SSR基元种类及其出现频率。出现频率 $f_c=c/n \times 100\%$, c 为搜索到的SSR数量, n 为无冗余的EST数量。

1.2.2 拟轮枝镰孢菌 EST-SSR 引物的设计

以出现频率最高的核苷酸重复基元为靶标位点,随机选取25个SSR位点,根据EST序列中SSR两端的保守序列,利用软件Primer Premier 5.0(http://redb.ncpgr.cn/modules/redbtools/primer_5.php)设计25对拟轮枝镰孢菌EST-SSR引物。引物设计的主要参数:引物长度为18~25 bp, GC含量40%~60%,退火温度 T_m 值为50~65℃,SSR旁邻序列不小于20 bp,PCR扩增产物长度在100~500 bp之间,Primer Premier 5.0评分高于85。供试引物均由生工生物工程(上海)有限公司合成。

1.2.3 引物的有效性与多态性及通用性检测

镰孢菌DNA的提取:将供试菌株活化后接种到查彼培养液中,于25℃恒温振荡培养5 d,然后抽滤菌丝,将其烘干,参考Lodhi et al.(1994)方法并略加改进提取镰孢菌基因组DNA。

选用合成的25对SSR引物对地理来源不同的15株拟轮枝镰孢菌进行PCR扩增,并检测其在拟轮枝镰孢菌种内的有效性与多态性,将筛选出的有效扩增引物用于20株近缘镰孢菌的PCR扩增,分析其在5种近缘镰孢菌种中的通用性。20 μ L PCR反应体系:1 U *Taq* DNA聚合酶、10 mmol/L dNTP 0.4 μ L、25 mmol/L $MgCl_2$ 1.6 μ L、20 ng模板DNA、10 μ mol/L上下游引物各0.5 μ L、10 $\times$ Buffer 2.0 μ L,加ddH₂O补至20 μ L。PCR反应程序:94℃预变性4 min;94℃变性40 s,55~62℃,退火40 s,72℃延伸40 s,共35个循环;最后72℃延伸7 min。扩增结束后,用6%的非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳分离扩增产物,参考Bassam & Caetano-Anollés(1993)方法进行银染显色,并记录扩增结果。

1.2.4 EST-SSR 遗传多样性与聚类分析

选取能够扩增出与预期产物大小一致的多态性引物,分析其在拟轮枝镰孢菌种内的扩增结果,以0、1矩阵记录电泳谱带,同一迁移位置无带的记为0,有带的记为1。利用NTSYSpc 2.10e软件计算供试拟轮枝镰孢菌两两间的遗传相似系数,用SHAN程序中的非加权组平均法进行聚类分析,构建供试拟轮枝镰孢菌菌株的系统聚类图。

2 结果与分析

2.1 拟轮枝镰孢菌 EST-SSR 组成与分布特点

试验结果表明,在下载拼接的87 086条拟轮枝镰孢菌EST序列中,共有SSR位点11 952个,分布在10 933条EST序列中,SSR位点出现频率为1.09%。在EST序列中,含有1个以上SSR位点共958条,其中含有5个SSR位点2条,含有4个SSR位点9条,含有3个SSR位点34条。

在拟轮枝镰孢菌EST-SSR序列中,共592种核苷酸重复基元类型,二核苷酸、三核苷酸、四核苷酸、五核苷酸、六核苷酸重复基元的重复基元类型分别为7、29、112、201和243种;二、三、四、五、六核苷酸重复基元占总SSR的比例分别为1.98%、49.40%、19.03%、9.18%、20.41%,三核苷酸重复类型(5 904个)为主导重复基元,其次为六核苷酸重复序列(2 439个);二核苷酸、三核苷酸、四核苷酸、五核苷酸、六核苷酸重复基元的出现频率分别为2.17%、54.00%、20.81%、10.03%和22.31%,其中出现频率最高的是三核苷酸重复类型。

在592种重复基元类型中,三核苷酸(CAA/TTG) n 形式的出现频率最高,为7.17%,占全部SSR比例的6.56%;其次为六核苷酸重复基元(GA-CAAC/GTTGTC) n 和(CGACAA) n ,出现频率分别为6.70%和5.83%;三核苷酸(CTT/AAG) n 的出现频率为5.11%;其余各重复基元类型的出现频率均小于3.74%(表1)。

2.2 EST-SSR 引物的有效性与多态性检测

在设计25对引物中,能在拟轮枝镰孢菌种内有效扩增的引物有20对,其有效扩增率为80.00%;有17对能够扩增出与预期产物大小相近的片段,且同时具有多态性的引物为8对,扩增多态率为32.00%。8对多态性SSR引物,在15株拟轮枝镰孢菌中扩增出27个产物片段,其中多态性条带24条,占总扩增条带数的88.89%。引物LZ4和LZ18扩增的条带最多,均为5条;引物LZ22和LZ24扩增的条

带最少,为2条(表2)。

2.3 EST-SSR引物的通用性评价

采用筛选出的20对引物对5种近缘镰孢菌进行扩增,结果显示,引物LZ4在5种供试镰孢菌中均能

有效扩增,且均具有明显的多态性;LZ14在腐皮镰孢菌中无扩增,而在其它菌种中均能有效扩增,但无多态性;LZ7在5种供试镰孢菌中均能有效扩增,且无多态性(图1)。

表1 拟轮枝镰孢菌EST中重复基元及其出现频率
Table 1 The major motifs and their frequencies in *Fusarium verticillioide* ESTs

重复类型 Repeat type	基元种数 Number of motif type	基元 Repeat motif	数量 Number	占总SSR的比例 Proportion in all SSRs (%)	出现频率 Frequency (%)
二核苷酸 Di-nucleotide	7	AC/GT	62	0.52	0.57
		TC/GA	60	0.50	0.55
三核苷酸 Tri-nucleotide	29	CAA/TTG	784	6.56	7.17
		CTT/AAG	559	4.68	5.11
		GAC/GTC	409	3.42	3.74
		GAG/CTC	380	3.18	3.48
		AGA/TCT	358	3.00	3.27
		ACG/CGT	300	2.51	2.74
		TTC/GAA	299	2.50	2.73
		CCT/AGG	290	2.43	2.65
		GCT/AGC	239	2.00	2.19
		ACA/TGT	229	1.92	2.09
		TGA/TCA	223	1.87	2.04
		TGG/CCA	213	1.78	1.95
		CAG/CTG	206	1.72	1.88
		CCG/CGG	203	1.70	1.86
		GGT/ACC	158	1.32	1.45
		TCC/GGA	139	1.16	1.27
		ATC/GAT	134	1.12	1.23
		AAC/GTT	133	1.11	1.22
		GTG/CAC	130	1.09	1.19
		CGA/TCG	121	1.01	1.11
四核苷酸 Tetra-nucleotide	112	GGC/GCC	92	0.77	0.84
		ATG/CAT	84	0.70	0.77
		TGC/GCA	64	0.54	0.59
		CTCA/TGAG	99	0.79	0.91
		TTTC/GAAA	91	0.76	0.83
		TATT/AATA	72	0.64	0.66
		AGCG/CGCT	67	0.56	0.61
		CTTC/GAAG	65	0.54	0.59
		ATCT/AGAT	64	0.54	0.59
		TCCA/TGGA	62	0.52	0.57
五核苷酸 Penta-nucleotide	201	CTAC/GTAG	60	0.50	0.55
		CAATC/GATTG	91	0.76	0.83
六核苷酸 Hexa-nucleotide	243	GACAAC/GTTGTC	732	6.12	6.70
		CGACAA	637	5.33	5.83

出现频率小于0.5%的基元未列出。The repeat motifs with the frequency less than 0.5% are not listed.

表2 8对EST-SSR引物对15株拟轮枝镰孢菌的扩增结果

Table 2 Amplification results of 15 *Fusarium verticillioides* strains with eight polymorphic EST-SSR primers

引物编号 Primer code	引物序列 (5'-3') Primer sequence	重复基元 Repeat motif	退火温度 T_m (°C)	预期产物 (bp) Expected fragment	扩增条带 Number of bands	多态性条带 Number of polymorphic bands	多态率 Percentage of polymorphism (%)
LZ2	F: TGTCCGAGTCGTCTGAAT R: AGAAGAAGGGCAAATGG	(TCC)6	57	378	3	2	66.67
LZ4	F: GCGTTGAGATACCCTTTCG R: GGTGGTGGTTTCCGTGAG	(AAC)9	60	214	5	5	100.00
LZ5	F: TTCACAACGACCGTATTTC R: CTGCTGCTATCACTTCCAC	(CAT)6	58	344	4	4	100.00
LZ14	F: GTCTCGTCCAGATTCTTATT R: GTTGTGGGTGCTTGTTG	(CAC)8	59	160	3	3	100.00
LZ18	F: GCGTTGAGATACCCTTTCG R: GGTGGTGGTTTCCGTGAG	(AAC)9	60	214	5	5	100.00
LZ22	F: GTCTCCCGAGTAGTTGGC R: AATAGTGGCGGTGCGTAG	(AGC)6	60	386	2	1	50.00
LZ23	F: GTCTCCCGAGTAGTTGGC R: TAGTGGCGGTGCGTAGTG	(AGC)6	62	379	3	2	66.67
LZ24	F: CCGAAGAGGAGAACGAGC R: GGTCCGCAACATAGAGGG	(GCA)6	60	403	2	2	100.00
合计 Total					27	24	88.89

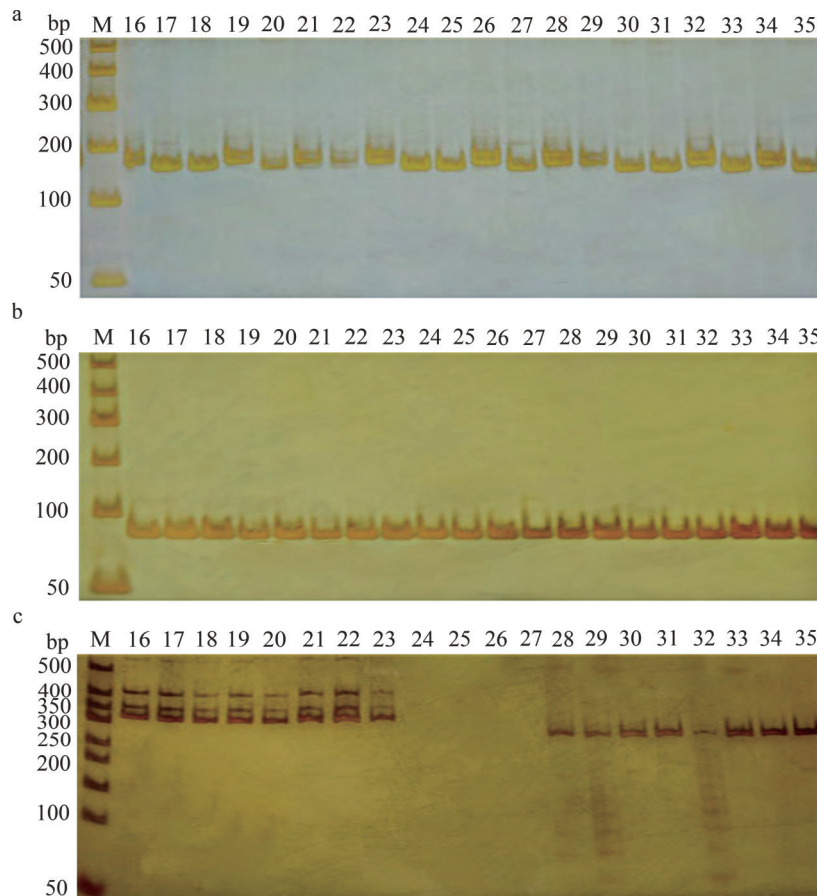


图1 3种拟轮枝镰孢菌EST-SSR引物在5种镰孢菌中的扩增结果

Fig. 1 Amplification of three *Fusarium verticillioides* EST-SSR markers in five *Fusarium* species

a: 引物 LZ4; b: 引物 LZ7; c: 引物 LZ14。16~19: 尖镰孢菌; 20~23: 腐皮镰孢菌; 24~27: 半裸镰孢菌; 28~31: 木贼镰孢菌; 33~35: 禾谷镰孢菌。a: Primer LZ4; b: primer LZ7; c: primer LZ14. 16~19: *F. oxysporum*; 20~23: *F. solani*; 24~27: *F. semitectum*; 28~31: *F. equiseti*; 33~35: *F. graminearum*.

在 5 种近缘镰孢菌种中,供试引物平均通用率与平均多态率分别为 66.00% 和 19.00%。在尖孢镰孢菌、腐皮镰孢菌、半裸镰孢菌、木贼镰孢菌和禾谷镰孢菌中能有效扩增的引物数分别为 17 对(85.00%)、11 对(55.00%)、11 对(55.00%)、12 对(60.00%)、15 对(75.00%),其中具有多态性的引物分别为 6 对(30.00%)、5 对(25.00%)、3 对(15.00%)、2 对(10.00%)和 3 对(15.00%);供试 20 对引物中有

17 对能够在尖孢镰孢菌种中通用,明显高于其在另外 4 种镰孢菌中的通用率(表 3)。在 5 种镰孢菌中均能有效扩增的引物为 10 对,占供试引物总数的 50.00%,均显示多态性的引物仅有 2 对,分别为引物 LZ4 和引物 LZ18,占供试引物总数的 10.00%。设计的 25 对引物 5 种近缘镰孢菌种的通用率和多态率分别为 40.00% 和 8.00%。

表 3 拟轮枝镰孢菌 EST-SSR 引物在 5 种镰孢菌中的通用性与多态性

Table 3 Transferability and polymorphism analysis of *Fusarium verticillioides* EST-SSR primers in five *Fusarium* species

镰孢菌种 Species	引物数 No. of primers	通用引物数(通用率) No. of transferable primers (Ratio)	多态性引物数目(比率) No. of polymorphic primers (Ratio)
尖孢镰孢菌 <i>F. oxysporum</i>	20	17(85.00%)	6(30.00%)
腐皮镰孢菌 <i>F. solani</i>	20	11(55.00%)	5(25.00%)
半裸镰孢菌 <i>F. semitectum</i>	20	11(55.00%)	3(15.00%)
木贼镰孢菌 <i>F. equiseti</i>	20	12(60.00%)	2(10.00%)
禾谷镰孢菌 <i>F. graminearum</i>	20	15(75.00%)	3(15.00%)
平均值 Average	20	13.2(66.00%)	3.8(19.00%)

2.4 EST-SSR 遗传多样性与聚类分析

供试的拟轮枝镰孢菌菌株间遗传相似系数为 0.507~0.933,平均为 0.678,其中分离自太谷的 2 号菌株与分离自大同的 15 号菌株间遗传相似系数最小,分离自阳城的 5 号和 7 号菌株间遗传相似系数最大。晋南地区各菌株间遗传相似系数 0.733~0.933,晋中地区为 0.547~0.813,晋北地区为 0.720~0.867。说明各供试菌株间遗传分化明显。

从聚类分析结果可以看出,当遗传相似系数为 0.664 时,15 株拟轮枝镰孢菌被分成 4 个 SSR 类群。

第 I 类包含分离自晋中地区太谷的 4 株菌和分离自晋南地区临汾的 1 株菌;第 II 类只有分离自太谷的菌株 Taigu4;第 III 类的 3 株菌全部分离自晋中地区,其中 1 株来自汾阳,2 株来自太谷;第 IV 类群包括分离自晋东南地区阳城的 2 株菌、晋中地区太谷的 1 株菌,以及分离自晋北地区大同的全部菌株。表明部分地理来源相同的菌株分散在不同的 SSR 类群,而部分地理来源不同的菌株却聚在同一 SSR 类群,说明 SSR 类群的划分与菌株的地理来源没有相关性(图 2)。

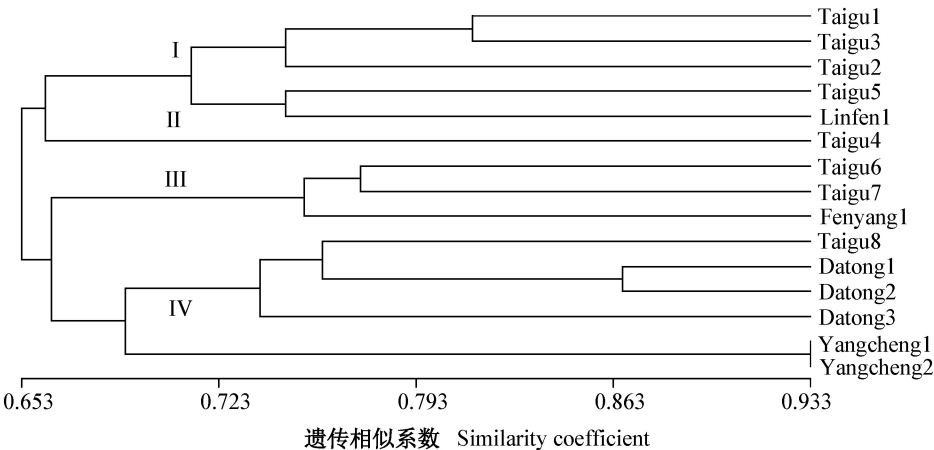


图 2 山西省 15 株拟轮枝镰孢菌的 SSR 聚类分析图

Fig. 2 Dendrogram of 15 *Fusarium verticillioides* strains based on SSR-PCR in Shanxi Province

3 讨论

本试验结果表明,从 87 086 条拟轮枝镰孢菌 EST 序列中共查找到 11 952 个 SSR 位点,共 592 种重复基元类型。三核苷酸重复基元出现的数量最多,其中出现频率最高的是(CAA/TTG) n 基元形式。设计合成的 25 对 SSR 引物中,20 对引物能够在拟轮枝镰孢菌种内有效扩增,其中多态性引物有 8 对。在 5 种近缘镰孢菌种中通用的引物为 10 对,其中有 2 对在 5 种镰孢菌种中均显示多态性。拟轮枝镰孢菌的遗传多样性分析结果表明,当相似系数为 0.664 时,供试菌株可划分为 4 个 SSR 类群,但类群的划分与地理来源无关。不同菌株间存在明显的遗传分化,而且开发的 SSR 引物在近缘镰孢菌中有一定的通用性,说明基于拟轮枝镰孢菌 EST 序列开发的 SSR 引物可用于拟轮枝镰孢菌及其近缘种的遗传多样性分析。

Kim et al. (2008) 与 Leviansky et al. (2008) 认为,微卫星并非随机分布在全基因组序列中,编码区主导序列为三核苷酸与六核苷酸重复序列,二核苷酸、四核苷酸、五核苷酸重复序列则多出现在非编码区域,本试验结果也证明这一结论,即拟轮枝镰孢菌 EST-SSR 分布存在明显的偏倚性,三核苷酸重复序列为主导序列,占总 SSR 的 49.40%,其次为六核苷酸重复序列,占总 SSR 的 20.41%。Mahfooz et al. (2015)、Kim et al. (2008) 与 Kumar et al. (2013) 的研究也得出了类似结果。这种现象可能与编码区域由框移突变引起的非三核苷酸 SSR 受抑制有关。

本研究基于 EST 序列开发 SSR 引物,合成的引物在拟轮枝镰孢菌种内的有效扩增率和多态率分别为 80.00% 与 32.00%,这一结果与任旭等(2012)和 Leyva-Madrigal et al. (2014) 基于拟轮枝镰孢菌全基因组序列开发 SSR 引物的有效扩增率和多态率不尽相同,这可能与所扩增 SSR 位点分布、引物数量、核苷酸重复类型及供试菌株等因素有关,具体原因还有待于进一步研究证实。

8 对多态性 SSR 引物在 15 株拟轮枝镰孢菌中共扩增出 24 条多态性条带,多态性比率为 88.89%,供试菌株间的平均遗传相似系数为 0.678,说明供试引物在拟轮枝镰孢菌种内能检测到丰富的遗传多样性,这一结果与李新凤等(2015)关于尖镰孢菌 EST-SSR 遗传多样性分析的研究结论一致。表明本研究开发的 SSR 引物可用于拟轮枝镰孢菌的遗传多样性分析,为今后将其用于遗传图谱的构建奠定了科学基础。

一般情况下,同属不同种植物间 EST-SSR 引物扩增成功率为 50.00%~100.00% (Peakall et al., 1998),不同种真菌间的扩增成功率为 34.00% (Dutech et al., 2005; Varshney et al., 2005)。Dracatos et al. (2006) 利用 55 对黑麦冠锈菌 EST-SSR 引物对 6 种真菌进行了扩增,成功率为 22%~53%; Kumar et al. (2013) 检测到 70.00% 的尖镰孢菌 EST-SSR 引物在潮湿镰孢菌中通用。本研究设计合成的引物中,有 40.00% 能够在 5 种近缘镰孢菌中有效扩增,说明真菌 EST-SSR 引物在其近缘种中具有较高的通用率,这可能与亲缘关系越近的种、SSR 所包含基因的同源性越高有关,同时也进一步证实基于近缘镰孢菌 EST 序列开发镰孢菌通用的 SSR 标记引物是可行的。

参 考 文 献 (References)

- Aiyaz M, Divakara ST, Mudili V, Moore GG, Gupta VK, Yli-Mattila T, Nayaka SC, Niranjana SR. 2016. Molecular diversity of seed-borne *Fusarium* species associated with maize in India. *Current Genomics*, 17(2): 132-144
- Alam MA, Juraimi AS, Rafii MY, Hamid AA, Arolu IW, Latif MA. 2015. Application of EST-SSR marker in detection of genetic variation among purslane (*Portulaca oleracea* L.) accessions. *Brazilian Journal of Botany*, 38(1): 119-129
- Arias M, Hernandez M, Remondegui N, Huvenaaers K, van Dijk P, Ritter E. 2016. First genetic linkage map of *Taraxacum koksaghyz* Rodin based on AFLP, SSR, COS and EST-SSR markers. *Scientific Reports*, 6: 31031
- Bassam BJ, Caetano-Anollés G. 1993. Silver staining of DNA in polyacrylamide gels. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 42(2/3): 181-188
- Booth C. 1988. The genus *Fusarium* (Chen QY translated). Beijing: China Agriculture Press (in Chinese) [Booth C. 1988. 镰刀菌属 (陈其焜译). 北京: 中国农业出版社]
- Covarelli L, Stifano S, Beccari G, Raggi L, Lattanzio VMT, Albertini E. 2012. Characterization of *Fusarium verticillioides* strains isolated from maize in Italy: fumonisin production, pathogenicity and genetic variability. *Food Microbiology*, 31(1): 17-24
- Dracatos PM, Dumsday JL, Olle RS, Cogan NOI, Dobrowolski MP, Fujimori M, Roderick H, Stewart AV, Smith KF, Forster JW. 2006. Development and characterization of EST-SSR markers from the crown rust pathogen of ryegrass (*Puccinia coronata* f. sp. *lolii*). *Genome*, 49(6): 572-583
- Dutech C, Enjalbert J, Fournier E, Delmotte F, Barrès B, Carlier J, Tharreau D, Giraud T. 2007. Challenges of microsatellite isolation in fungi. *Fungal Genetics and Biology*, 44(10): 933-949
- Frenkel O, Portillo I, Brewer MT, Pérois JP, Cadle-Davidson L, Milgroom MG. 2012. Development of microsatellite markers from the transcriptome of *Erysiphe necator* for analysing population struc-

- ture in North America and Europe. *Plant Pathology*, 61(1): 106–119
- Han Z, Tangni EK, Huybrechts B, Munaut F, Scauflaire J, Wu A, Callebaut A. 2014. Screening survey of co-production of fusaric acid, fusarin C, and fumonisins B1, B2 and B3 by *Fusarium* strains grown in maize grains. *Mycotoxin Research*, 30(4): 231–240
- Kim TS, Booth JG, Gauch HG Jr., Sun Q, Park J, Lee YH, Lee K. 2008. Simple sequence repeats in *Neurospora crassa*: distribution, polymorphism and evolutionary inference. *BMC Genomics*, 9: 31
- Kumar S, Rai S, Maurya DK, Kashyap PL, Srivastava AK, Anandaraj M. 2013. Cross-species transferability of microsatellite markers from *Fusarium oxysporum* for the assessment of genetic diversity in *Fusarium udum*. *Phytoparasitica*, 41(5): 615–622
- Leslie JF, Summerell BA. 2006. *The Fusarium laboratory manual*. Iowa: Blackwell Publishing
- Levdanský E, Sharon H, Osherov N. 2008. Coding fungal tandem repeats as generators of fungal diversity. *Fungal Biology Reviews*, 22(3/4): 85–96
- Leyva-Madriz KY, Larralde-Corona CP, Calderón-Vázquez CL, Maldonado-Mendoza IE. 2014. Genome distribution and validation of novel microsatellite markers of *Fusarium verticillioides* and their transferability to other *Fusarium* species. *Journal of Microbiological Methods*, 101: 18–23
- Li XF, Wang JM, Zhang ZG, Hao XJ, Zhang ZW, Tian HX. 2015. Analysis of genetic diversity and cross-species transferability based on *Fusarium oxysporum* EST-SSR markers. *Journal of Plant Protection*, 42(5): 777–786 (in Chinese) [李新风, 王建明, 张作刚, 郝晓娟, 张祖维, 田宏先. 2015. 尖镰孢菌 EST-SSR 遗传多样性分析及通用性评价. *植物保护学报*, 42(5): 777–786]
- Li XF, Zhang ZG, Wang JM, Gao JM, Tian HX. 2014. EST-SSR information analysis and markers development in *Fusarium oxysporum*. *Scientia Agricultura Sinica*, 47(20): 3982–3991 (in Chinese) [李新风, 张作刚, 王建明, 高俊明, 田宏先. 2014. 尖镰孢 EST-SSR 信息分析及分子标记建立. *中国农业科学*, 47(20): 3982–3991]
- Liang ZW, Tong ML, Gao ZF, Zhang BJ, Fu JG, Fan XH. 2015. Development and utility of EST-SSR marker in quarantine weed *Lactuca serriola*. *Journal of Plant Protection*, 42(4): 578–583 (in Chinese) [梁照文, 童明龙, 高振峰, 张宝俊, 伏建国, 范晓虹. 2015. 检疫性杂草毒莠苣 EST-SSR 标记的开发及应用. *植物保护学报*, 42(4): 578–583]
- Liu CX, Yuan DJ, Lin ZX. 2014. Construction of an EST-SSR-based interspecific transcriptome linkage map of fibre development in cotton. *Journal of Genetics*, 93(3): 689–697
- Lodhi MA, Ye GN, Weeden NF, Reisch BI. 1994. A simple and efficient method for DNA extraction from grapevine cultivars and *Vitis* species. *Plant Molecular Biology Reporter*, 12(1): 6–13
- Mahfooz S, Maurya DK, Srivastava AK, Kumar S, Arora DK. 2012. A comparative in silico analysis on frequency and distribution of microsatellites in coding regions of three formae speciales of *Fusarium oxysporum* and development of EST-SSR markers for polymorphism studies. *FEMS Microbiology Letters*, 328(1): 54–60
- Mahfooz S, Srivastava A, Srivastava AK, Arora DK. 2015. A comparative analysis of distribution and conservation of microsatellites in the transcripts of sequenced *Fusarium* species and development of genic-SSR markers for polymorphism analysis. *FEMS Microbiology Letters*, 362(17): 131
- Peakall R, Gilmore S, Keys W, Morgante M, Rafalski A. 1998. Cross-species amplification of soybean (*Glycine max*) simple sequence repeats (SSRs) within the genus and other legume genera: implications for the transferability of SSRs in plants. *Molecular Biology and Evolution*, 15(10): 1275–1287
- Ren X, Zhu ZD, Li HJ, Duan CX, Wang XM. 2012. SSR marker development and analysis of genetic diversity of *Fusarium verticillioides* isolated from maize in China. *Scientia Agricultura Sinica*, 45(1): 52–66 (in Chinese) [任旭, 朱振东, 李洪杰, 段灿星, 王晓鸣. 2012. 轮枝镰孢 SSR 标记开发及在玉米分离群体遗传多样性分析中的应用. *中国农业科学*, 45(1): 52–66]
- Sipahi H, Yumurtaci A, Mert ZR. 2015. Development of novel markers, using computationally extracted classitype EST-SSRs, in wheat leaf rust fungus *Puccinia triticina*. *Genetika*, 47(3): 917–926
- Tsehaye H, Elameen A, Tronsmo AM, Sundheim L, Tronsmo A, Assefa D, Brurberg MB. 2016. Genetic variation among *Fusarium verticillioides* isolates associated with Ethiopian maize kernels as revealed by AFLP analysis. *Europe Journal of Plant Pathology*, 146(4): 807–816
- Varshney RK, Graner A, Sorrells ME. 2005. Genic microsatellite markers in plants: features and applications. *Trends in Biotechnology*, 23(1): 48–55
- Venturini G, Assante G, Laura TS, Vercesi A. 2013. Pathogenicity variation in *Fusarium verticillioides* populations isolated from maize in northern Italy. *Mycoscience*, 54(4): 285–290
- Wan ZB, Liu M, Yang WX, Zhang XY, Yin TM. 2013. Microsatellite analysis of expressed sequence tags and development of EST-SSR markers for *Melampsora* spp. *Plant Diseases and Pests*, 4(6): 21–26

(责任编辑:王璇)