

57 株镰孢菌 ISSR 分子标记及其遗传多样性分析

孙常青¹ 屈非¹ 王晋¹ 韵晓冬¹ 李新风²

(1. 山西省农业科学院 作物科学研究所, 太原 030031;

2. 山西农业大学 农学院, 山西 太谷 030801)

摘要 为明确美丽组尖孢镰孢菌和李瑟组镰孢菌种间和种内的差异与亲缘关系,以采自不同寄主的 57 株镰孢菌(*Fusarium*)为研究对象,采用 ISSR-PCR 标记技术对其进行遗传多样性分析,结果表明:利用 11 条引物对供试的 3 种菌株进行 ISSR-PCR 扩增,共扩增出 121 条条带,其中多态性位点为 117 个,多态性比例为 96.7%,平均每条引物产生条带为 11 条。说明镰孢菌基因组 DNA 的 SSR 区域具有明显的多态性,镰孢菌的遗传多样性采用 ISSR 技术是可行的分析。聚类分析结果表明:57 个菌株间的遗传相似系数为 0.568~0.992,当相似系数为 0.568 时,供试菌株可明显分为两大类群,第一类群 IG-I 为 1~35,全部为美丽组尖孢镰孢菌,第二类群 IG-II 为 36~57,全部为李瑟组镰孢菌;第二类群又可以分为两大亚类群,第一亚类为轮枝镰孢菌,第二亚类为层生镰孢菌。ISSR 类群划分与镰孢菌菌种分类之间具有一定的相关性,而与其地理来源无相关性。本研究镰孢菌种间与种内均表现出明显的遗传差异。

关键词 镰孢菌; 遗传多样性; ISSR 技术; 形态学分类

中图分类号 S432.1

文章编号 1007-4333(2019)05-0098-08

文献标志码 A

Genetic diversity of 57 *Fusarium* strains based on ISSR analysis

SUN Changqing¹, QU Fei¹, WANG Jin¹, YUN Xiaodong¹, LI Xinfeng²

(1. Institute of Crop Sciences, Shanxi Academy of Agricultural Sciences, Taiyuan 030031, China;

2. College of Agriculture, Shanxi Agricultural University, Taigu 030801, China)

Abstract In order to understand the genetic difference and phylogenetic relationship within and between the *Fusarium* species in *Fusarium oxysporum* and Lee harp *Fusarium* group, the genetic diversity of 57 *Fusarium* strains separated from different disease plants was examined by inter-simple sequence repeats (ISSR). A total of 11 primers were used to amplify three *Fusarium* isolates. The results showed that 121 fragments were amplified, among which the number of polymorphic loci was 117 accounting for 96.7% of the total amplified fragments. Each primer produced 11 fragments on average. The genetic diversity was analyzed according to the amplified results and the ISSR analysis was adopted to investigate the genetic diversity. A total of 57 *Fusarium* strains showed genetic similarity coefficient between 0.568 – 0.992. When the genetic similarity coefficient was set at 0.568, these tested strains could be clearly divided into two groups; The first group included No. 1 to 35 strains, which belonged to *F. oxysporum*; The second group included No. 36 to 57 strains, which belonged to Lee harp *Fusarium* group. The second group had 2 subgroups: The first subgroup was *F. verticillioides*, and the second subgroup was *F. proliferatum*. There was a certain level correlation between the classification of ISSR groups and the classification of *Fusarium* strains, and there was no correlation with the geographical origin of the strains. In conclusion, the 57 *Fusarium* strains showed significant genetic differences between species and within species.

Keywords *Fusarium*; genetic diversity; ISSR technology; morphological taxonomy

收稿日期: 2018-09-05

基金项目: 山西省重点研发项目(201703D221010-1)

第一作者: 孙常青, 副研究员, 主要从事植物病害与防治研究, E-mail: schqty@126.com

镰孢菌属(*Fusarium* spp.)是最重要的植物病原真菌之一,寄主植物达 100 多种。镰孢菌寄生于各种寄主植物,引起根腐、茎腐、茎基腐、花腐和穗腐等多种病害^[1-2]。镰孢菌是一个庞大、复杂、易变异的家族,在形态和生理方面对于环境有很强的适应性,其本身极易发生变异,种内生理分化现象明显,因而其分类较复杂^[3-4]。自 Wollenweber 等^[5]于 1935 年首次提出该属的分类系统,后续有研究提出了至少 10 个镰孢菌属的分类系统^[6]。传统镰孢菌种的鉴定依据主要是其形态学特征,该方法易受人为因素干扰,难以准确地揭示各菌种之间的进化关系,另外同种内不同专化型和生理小种的划分,还需进行大量的致病性试验,给分类鉴定带来了诸多不便^[7]。分子生物学方法可以从分子水平更科学地反映镰孢菌属各种间的系统发育和亲缘关系^[8-11],主要有核酸序列分析与 DNA 分子标记 2 种方法。目前,一般结合形态学特点与基因序列分析对镰孢菌种进行鉴定,包括核糖体内转录间隔区序列(ITS),转录延伸因子 I 的 α 亚基基因(EF-1 α), β 微管蛋白基因(β -tubulin)等序列,O'Donnell 等^[12]发现(EF-1 α)序列对镰孢菌种具有非常广泛的分类作用。已有研究表明种下同一专化型的菌株并不一定为同一单元进化群,说明上述方法不完全适于镰孢菌种内遗传分化研究。AFLP、RFLP 及 RAPD 等多种分子标记方法被用于镰孢菌的遗传分化与分类研究^[13-15],其中 AFLP 技术在镰孢菌分类学研究中发挥了较大的作用,通常认为遗传相似度高于 60%~70%为同种菌株,不同种菌株相似度均低于 40%^[16]。AFLP 技术可以作为镰孢菌种间乃至种下分类学研究较为准确的检测工具。但该技术存在分析费用高、操作复杂、对 DNA 纯度及内切酶质量要求高等缺点^[17-18]。RFLP 技术提取 DNA 的工作量大^[19]。RAPD 技术具有可重复性低的缺点^[20]。

简单序列重复区间扩增多态性(Inter-simple sequence repeat,ISSR),即 ISSR 标记技术,该技术依据生物中广泛存在 SSR 的特点,利用生物基因组中常出现的 SSR 设计引物,扩增出反向排列的间隔不大的重复序列间的基因组片断。与其他标记技术相比,具有重复性好、多态性丰富的优点。与基因序列分析技术相比,其无需克隆和测序,费用低、操作简便,且可以检测基因组许多位点的差异,目前已被广泛应用于各物种的遗传多样性及相关领域^[21]。该技术在研究镰孢菌种内及种间的遗传多样性上具

有独特的优势,如针对尖镰孢菌 *F. oxysporum*、禾谷镰孢菌 *F. graminearum*、梨孢镰孢菌 *F. poae* 与黄色镰刀菌(*F. culmorum*)等进行了研究^[22-29]。

美丽组 Section Elegans 与李瑟组 (Section Liseola) 是镰孢菌属中 2 个重要的组,由 Wollenweber 和 Reinking^[5]首次建立。Booth^[30]认为这两组镰孢菌中各自包含 1 种变种。近年来针对这 2 组镰孢菌成员进行了生物学种和系统发育学种的研究,将这些组内的成员进一步分成许多新种。李瑟组主要包括与有性阶段为藤仓赤霉复合种(GFC)相对应无性阶段的 *Fusarium*;原来形态学种中的尖镰孢菌也被证明是尖孢镰孢复合种(*Fusarium oxysporum* species complex,FOSC),但这些新种多数都是在研究相对少量菌株的基础上建立的,因此,还有待于进一步研究验证。其中美丽组中的尖镰孢菌(*F. oxysporum*)、李瑟组中的拟轮枝镰孢菌(*F. verticillioides*)与层生镰孢菌(*F. proliferatum*)均为生产上常见的植物病原菌,尖镰孢菌可引起多种植物的枯萎病,拟轮枝与层生镰孢菌又是近年来发生严重的玉米穗腐、茎基腐病等病害的主要病原菌,均可对生产造成严重为害。本研究拟采用 ISSR 分子标记技术,对 57 株 3 种不同镰孢菌的遗传多态性进行深入研究,分析其种间与种内的遗传关系,为建立镰孢菌的 DNA-ISSR 指纹图谱鉴定体系和快速准确的 ISSR 分子检测技术提供理论基础,也为系统发育和分类鉴定提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 供试菌株

供试的 57 株镰孢菌由山西农业大学农学院植物病理学实验室提供,均为不同寄主专化型的单孢分离物,根据 Leslie 和 Summerell^[16]的镰孢菌分类手册与 Booth^[30]分类系统对供试菌株进行形态学鉴定^[16,30],其种名、寄主与采集地点见表 1。除 2 号菌株未能确定其分类地位外,其中 1 号、3~35 号菌株为美丽组尖镰孢菌,38~39 号、43~46 号为李瑟组层生镰孢菌,其他菌株为李瑟组拟轮枝镰孢菌。

1.1.2 供试引物

从加拿大英属哥伦比亚大学 University of British Columbia 所公布的序列中选出用于 ISSR-PCR 反应的 11 条 ISSR 引物序列^[31],供试引物由北京赛百盛生物技术有限公司合成。

表 1 供试菌株及来源
Table 1 Strains tested and their sources

编号 Code	寄主 Host	菌株 Strain	采集地 Sampling field	编号 Code	寄主 Host	菌株 Strain	采集地 Sampling field
1	绿豆	尖孢镰孢菌	山西省祁县	30	兰花	尖孢镰孢菌	河北省保定市
2	绿豆	尖孢镰孢菌	山西省祁县	31	兰花	尖孢镰孢菌	山西省太原市
3	蚕豆	尖孢镰孢菌	山西省太谷县	32	茄子	尖孢镰孢菌	山西省祁县
4	菜豆	尖孢镰孢菌	山西省太谷县	33	西瓜	尖孢镰孢菌	山西省太谷县
5	大豆	未知	山西省太谷县	34	番茄	尖孢镰孢菌	山西省太原市
6	黄瓜	尖孢镰孢菌	山西省夏县	35	西瓜	尖孢镰孢菌	山西省祁县
7	黄瓜	尖孢镰孢菌	山西省夏县	36	蚕豆	拟轮枝镰孢菌	山西省太谷县
8	黄瓜	尖孢镰孢菌	山西省太谷县	37	蚕豆	拟轮枝镰孢菌	山西省太谷县
9	黄瓜	尖孢镰孢菌	山西省太原市	38	菜豆	层生镰孢菌	山西省太谷县
10	黄瓜	尖孢镰孢菌	山西省太谷县	39	菜豆	层生镰孢菌	山西省太谷县
11	西瓜	尖孢镰孢菌	山西省太谷县	40	大豆	拟轮枝镰孢菌	山西省太谷县
12	黄瓜	尖孢镰孢菌	山西省太原市	41	豇豆	拟轮枝镰孢菌	山西省太谷县
13	西瓜	尖孢镰孢菌	山西省夏县	42	菜豆	拟轮枝镰孢菌	山西省阳城县
14	西瓜	尖孢镰孢菌	山西省太谷县	43	辣椒	层生镰孢菌	山西省太谷县
15	西葫芦	尖孢镰孢菌	山西省太谷县	44	辣椒	层生镰孢菌	四川省重庆市
16	番茄	尖孢镰孢菌	山西省太谷县	45	黄瓜	层生镰孢菌	山西省临汾市
17	番茄	尖孢镰孢菌	山西省大同市	46	黄瓜	层生镰孢菌	山西省太谷县
18	辣椒	尖孢镰孢菌	山西省太谷县	47	茄子	拟轮枝镰孢菌	山西省阳城县
19	茄子	尖孢镰孢菌	山西省祁县	48	茄子	拟轮枝镰孢菌	山西省阳城县
20	茄子	尖孢镰孢菌	山西省五寨县	49	茄子	拟轮枝镰孢菌	山西省太谷县
21	茄子	尖孢镰孢菌	山西省阳城县	50	茄子	拟轮枝镰孢菌	山西省汾阳市
22	茄子	尖孢镰孢菌	山西省祁县	51	番茄	拟轮枝镰孢菌	山西省太谷县
23	棉花	尖孢镰孢菌	山西省太谷县	52	番茄	拟轮枝镰孢菌	山西省太谷县
24	棉花	尖孢镰孢菌	山西省襄汾县	53	胡麻	拟轮枝镰孢菌	山西省大同市
25	棉花	尖孢镰孢菌	山西省运城市	54	胡麻	拟轮枝镰孢菌	山西省大同市
26	胡麻	尖孢镰孢菌	山西省大同市	55	胡麻	拟轮枝镰孢菌	山西省大同市
27	芝麻	尖孢镰孢菌	山西省襄汾县	56	土豆	拟轮枝镰孢菌	山西省太谷县
28	芝麻	尖孢镰孢菌	山西省祁县	57	棉花	拟轮枝镰孢菌	山西省太谷县
29	兰花	尖孢镰孢菌	河北省保定市				

1.2 方法

1.2.1 菌丝培养及模板 DNA 制备

菌丝培养:在查彼培养液中接种镰孢菌菌株,并于 27℃ 恒温振荡培养 7 d 后过滤菌丝并烘干。

模板 DNA 制备:采用改进的 SDS 法提取镰孢菌基因组 DNA^[32]后,经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳,采用 GIS 凝胶成像分析,参照 DNA-Marker 确定其分子量大小,用微量紫外分光光度计定量后,加无菌超

纯水稀释为 20 ng/ μ L,置于-20 $^{\circ}$ C 备用。

1.2.2 ISSR 反应体系及反应参数

ISSR 扩增反应体系:反应体系共 20 μ L,包括 0.4 μ mol 引物,0.15 mmol/L 4 $\times$ dNTP,20 ng 模板 DNA,1.0 U TaqDNA 聚合酶,2.0 mmol/L MgCl₂^[25]。PCR 扩增反应程序:94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min,单循环,94 $^{\circ}$ C 变性 45 s,退火 45 s 后 72 $^{\circ}$ C 延伸 2 min,40 个循环后 72 $^{\circ}$ C 延伸 7 min。每条引物的退火温度设置 3 个梯度,分别为引物合成单推荐温度、高于推荐温度 1 $^{\circ}$ C 和高于推荐温度 2 $^{\circ}$ C 3 个温度,反应结束后,用 1.5% 琼脂糖凝胶(含 0.5 mg/L 核酸染色剂)分离扩增产物,用 GIS 凝胶成像系统进行拍照分析。

1.2.3 电泳谱带记录及数据统计分析

电泳分离 ISSR-PCR 产物后,记录每管反应的扩增结果。电泳图谱中每条扩增带代表引物与模板 DNA 互补的 1 对结合位点,可记录为 1 个分子标记。将 PCR 扩增的 DNA 条带转换为二进制数据,有条带的记为 1,无条带的为 0,统计为 0/1 矩阵。采用软件 NTSYSpc (Version 2.10e) 进行聚类分析并构建种间及种内的系统聚类图。

2 结果与分析

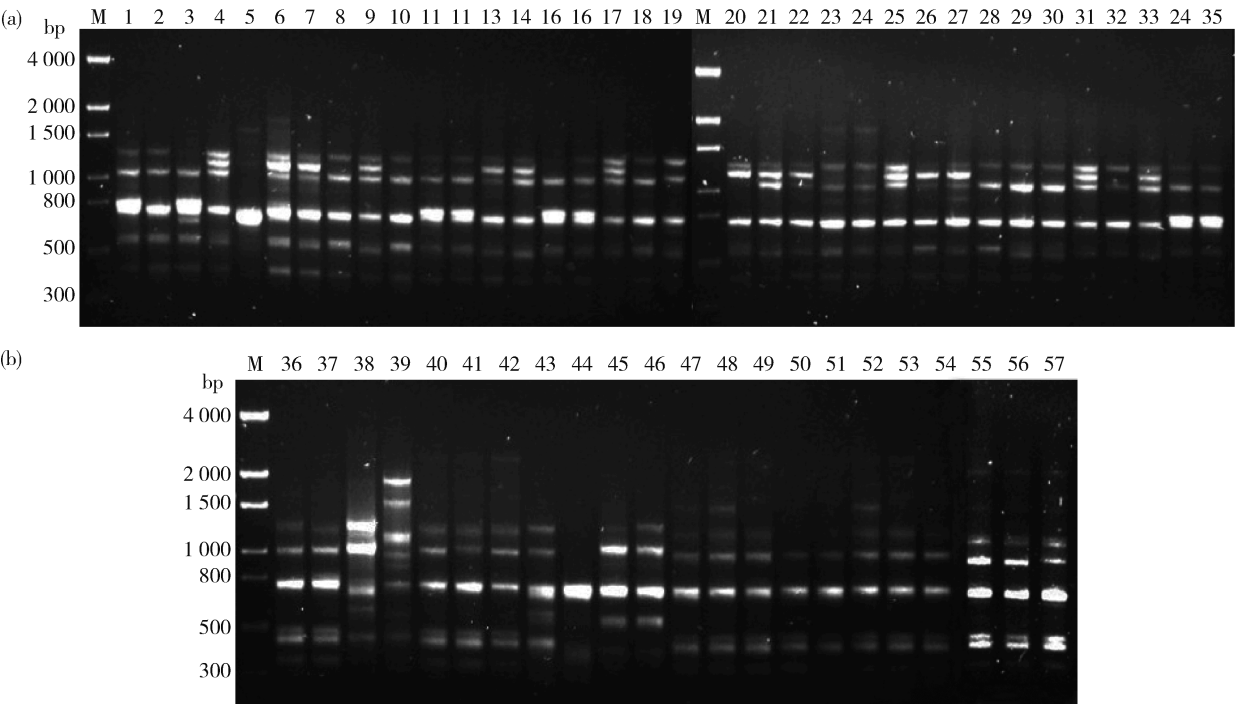
2.1 供试菌株 ISSR-PCR 扩增结果

供试的 11 条 ISSR 引物,除引物 884 退火温度为 54 $^{\circ}$ C 扩增效果最好外,其余引物最适宜退火温度均为 52 $^{\circ}$ C。11 条引物对 57 个菌株的 ISSR-PCR 扩增条带明显且稳定清晰,不同菌株之间的差异也很明显,引物 808 号的部分扩增结果见图 1。所筛选的引物均可用于镰孢菌遗传多态性分析。

供试菌株的 ISSR-PCR 扩增结果表明 11 条引物共扩增出 121 条谱带,大多分布于 300~2 000 bp。其中,特征性条带(多态性位点)为 117 个,多态性比例为 96.7%。不同引物的扩增条带数不相等,条带数在 5~14 条,平均每条引物产生 11 个条带。其中 809 号引物扩增条带数最少(5 条),而 807、889、891 号引物扩增出的条带数最多(14 条)。

2.2 供试镰孢菌聚类分析及遗传相似性分析

57 株镰孢菌的 ISSR-PCR 聚类分析结果见图 2。结果表明供试镰孢菌类群间的相似系数 0.568~0.992,在遗传相似系数为 0.568 时,可明显



M, Marker; 1~35 为尖镰孢菌; 36~37, 40~42 和 47~57 为拟轮枝镰孢菌; 38~39 和 43~46 为层生镰孢菌。下同。

M, Marker; 1~35, *Fusarium oxysporum*; 36~37, 40~42 and 47~57, *F. verticillioides*; 38~39 and 43~46,

F. Proliferatum. The same below.

图 1 808 号引物对 57 个镰孢菌基因组 DNA 的 ISSR-PCR 扩增效果

Fig. 1 Amplification results of 57 *Fusarium* strains with primer no. 808

表 2 11 条引物对 57 株镰孢菌的扩增结果

Table 2 Amplification results of 57 *Fusarium* isolates with 11 ISSR primers

引物号 Primer No.	序列 Sequence	退火 温度/℃ T _m	扩增条带 No. of amplified bands	多态性条带 No. of polymorphic bands	多态性比例/% Percentage of polymorphic bands
807	(AG) ₈ T	52	14	13	92.9
808	(AG) ₈ C	52	12	11	91.7
809	(AG) ₈ G	52	5	5	100.0
812	(GA) ₈ A	52	9	8	88.9
831	(AC) ₈ YA	52	12	12	100.0
835	(AG) ₈ YC	52	9	9	100.0
884	HBH(AG) ₇	54	11	10	90.9
885	BHB(GA) ₇	52	10	10	100.0
888	BDB(CA) ₇	52	11	11	100.0
889	DBD(AC) ₇	52	14	14	100.0
891	HVH(TG) ₇	52	14	14	100.0
合计 Total			121	117	96.7

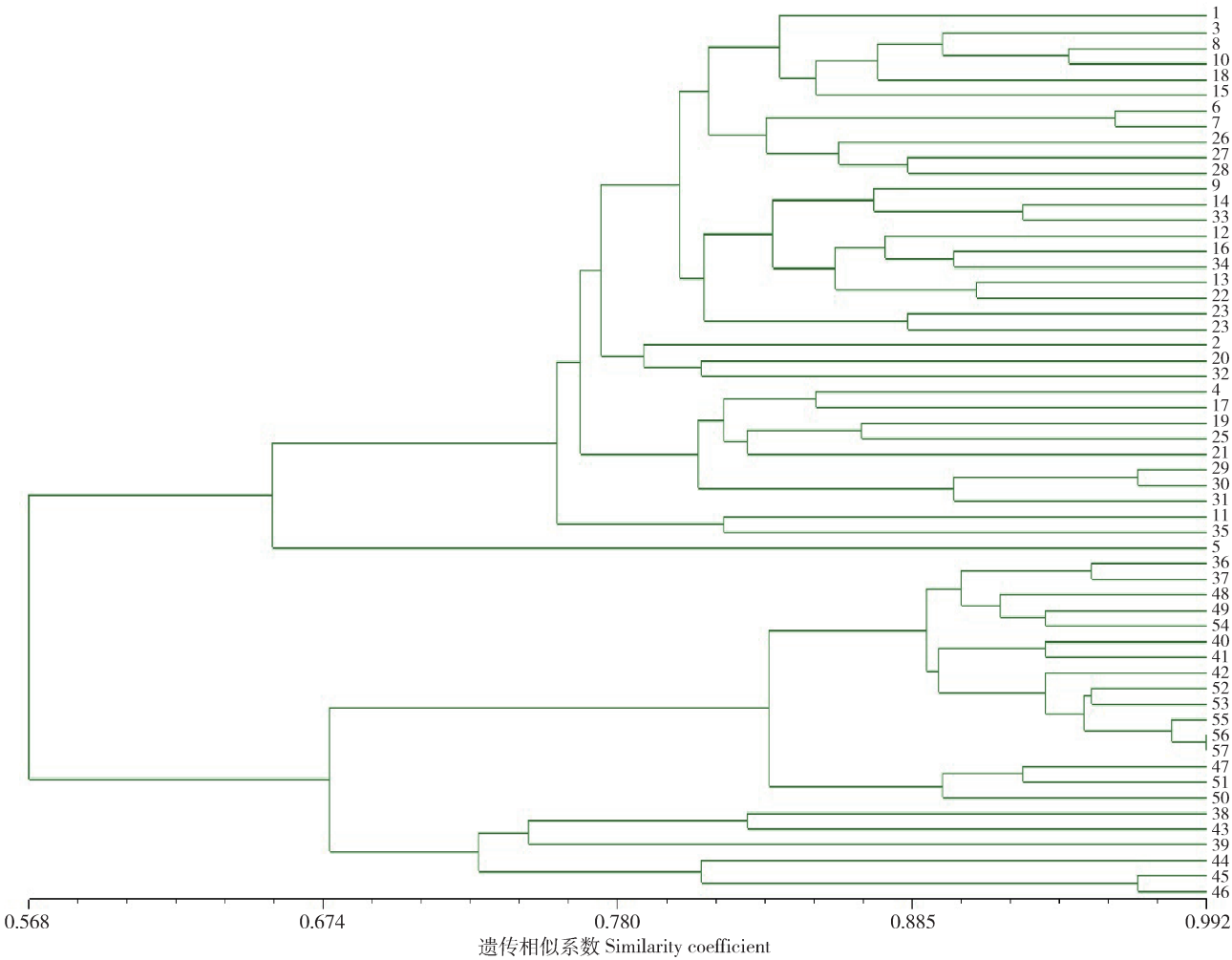


图 2 镰孢菌属 57 个菌株的 ISSR 聚类分析图

Fig. 2 Dendrograms of 57 *Fusarium* isolates with ISSR-PCR

分成2个类群。除5号菌株外,第一类群(IG-I)包含34株菌,全部为美丽组尖孢镰孢菌,第二类群(IG-II)21株镰孢菌均属于李瑟组镰孢菌,2组菌株之间遗传差异明显。在遗传相似数为0.656时,IG-I又可划分为2个亚类群,5号菌单独为1个亚类群,即IG-I-ii,其余34株菌尖孢镰孢菌全部聚在亚类群IG-I-i,说明虽然2个亚类群亲缘关系较近,但仍存在显著的遗传差异。在遗传相似数为0.676时,IG-II可划分为2个亚类群,其中36、37、40、41、42、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56和57号菌株聚在亚类群IG-II-i,全部为轮枝镰孢菌,38、39、43、44、45和46号菌株聚在亚类群IG-II-ii,全部为层生镰孢菌。2个亚类群又可以进一步被划分为多个亚群。当遗传相似系数为0.992时,供试57株菌全部被分开。这说明同种内各菌株间也存在明显的遗传分化现象。

利用NTSYS软件对57个菌株两两之间的遗传相似系数进行计算,供试菌株的遗传相似性系数间于0.421~0.992,平均为0.680。其中56号和58号菌株间的相似系数最大为0.992,遗传距离最小,亲缘关系最近,而3号和42号菌株间的遗传相似系数最小为0.421,遗传距离最大,亲缘关系最远。两类群(即IG-I与IG-II)间的相似系数是0.568,第二类群(IG-II)内2个亚类群(IG-II-i与IG-II-ii)间的相似系数是0.676。第一类群内各菌株间的平均相似系数是0.680,形态学鉴定为尖孢镰孢菌(IG-I-i亚类群)的各菌株间平均遗传相似系数为0.789,第二类群(IG-II)内经形态学鉴定为拟轮枝镰孢菌(IG-II-i)的各菌株间的平均相似系数是0.834,形态学鉴定为层生镰孢菌(IG-II-ii)的各菌株间的平均相似系数是0.729。可见供试两组镰孢菌间的遗传相似系数小于种间的相似系数,种间遗传相似系数又小于种内各菌株间的相似系数。

3 讨论与结论

ISSR聚类分析与遗传相似性分析结果表明ISSR类群划分与形态学类群相吻合,与李新风等^[33]关于腹状镰孢菌和茄病镰孢菌的结果存在一定差异。在不同遗传相似系数水平下,镰孢菌组内各菌种间的亲缘关系较组间更近,种内又较种间近,且种内各菌株间遗传分化明显。镰孢菌的不同种之间和同种内的不同菌株间,不仅在形态性状上表现一定程度的差异,在DNA分子水平上也表现出较

大差异,且通过ISSR分子标记技术更能反映菌株间的亲缘关系,从而对传统分类学所反映的亲缘关系能做出更科学的评价。Dubey和Singh^[22]研究尖孢镰孢菌及Dinolfo等^[34]研究梨孢镰孢菌的遗传分化及段会军等^[26]利用ISSR技术分析西瓜枯萎病菌的遗传多样性,也得出了一致的结论。因此,ISSR分子标记技术作为1种简单有效的分子标记方法,进行镰孢菌种间种内遗传多样性分析,对于研究不同地区镰孢菌种群结构,指导镰孢菌病害抗病育种工程具有重要的实践意义。

本试验中2个ISSR类群的菌株分别为美丽组与李瑟组镰孢菌,2类群间的遗传相似系数 <0.6 ,拟轮枝镰孢菌与层生镰孢菌种间的遗传相似系数为 $0.6\sim0.7$,种内各菌株间相似系数均 >0.7 。王建明等^[35]分析美丽组尖孢镰刀菌和芬芳镰刀菌及李新风等对马特组21株3种镰孢菌进行ISSR遗传多样性分析,结果表明,镰孢菌ISSR类群的划分与其形态学类群有一定的关联性,与本结论一致。但同时也得出镰孢菌种内各菌株间平均遗传相似系数均 >0.6 的结果,与本研究结论存在差异。因此,有关镰孢菌不同分类阶元上的类群划分与遗传相似系数的关系还有待于进一步研究探讨。

通过对不同种镰孢菌菌株、相同寄主不同地理来源的同种镰孢菌菌株及同一地区不同寄主的同种镰孢菌进行遗传多样性分析,结果表明镰孢菌属不同镰孢菌种间种内均存在较大的遗传分化,且和其地理来源及寄主无明显相关性。肖容凤等^[36]、Yuan等^[37]分别对不同寄主和地理来源的致病尖孢镰孢菌进行了遗传多样性分析,得出与本研究相同的结果。而陈慧^[38]、刘珊珊^[39]、刘东等^[40]、李新风^[33]等分别研究了马铃薯枯萎病原尖孢镰孢菌、胡麻枯萎病原尖孢镰孢菌、尖孢镰孢菌黄瓜专化型及茄病镰孢菌,结果表明来源于同一专化型或同科寄主的供试菌株间的遗传相似性与其地理来源呈一定相关性,来自同一地区的菌株相似性相对较高,反之较低。造成这种结果的原因可能与地理来源分布范围与生态条件差异程度等有关。此外,本试验中,来自相同寄主的同种菌株数量有限,仅仅通过数量不多菌株间的关系,来体现基于ISSR的遗传多样性同种地理分布间的关系有一定局限性,还需要通过更多的样本对比研究,以得出准确和科学的结论。

参考文献 References

- [1] 姬广海, 吴亚鹏, 张乃明, 杨云亮. 芦荟根腐病原菌的鉴定[J]. 植物病理学报, 2007, 37(2): 207-209
- Ji G H, Wu Y P, Zhang N M, Yang Y L. Identification of the pathogen associated with root rot disease of aloe[J]. *Acta Phytopathologica Sinica*, 2007, 37(2): 207-209 (in Chinese)
- [2] 孙顺娣. 豌豆不同品种对茄病镰刀菌感病性及其毒素敏感性之间的相关性[J]. 植物病理学报, 1995, 25(2): 155-160
- Sun S D. Correlation between susceptibility for *Fusarium solani* and sensitivity for its toxins in different varieties of pea[J]. *Acta Phytopathologica Sinica*, 1995, 25(2): 155-160 (in Chinese)
- [3] 陈鸿逵, 王拱辰. 浙江镰刀菌志[M]. 杭州: 浙江科学技术出版社, 1991: 1-5
- Chen H K, Wang G C. *The Fusarium of Zhejiang Province* [M]. Hangzhou: Zhejiang Science and Technology Press, 1991: 1-5 (in Chinese)
- [4] 李新凤, 王建明, 张作刚, 郝晓娟, 张祖维, 田宏先. 尖镰孢菌 EST-SSR 遗传多样性分析及通用性评价[J]. 植物保护学报, 2015, 42(5): 777-786
- Li X F, Wang J M, Zhang Z G, Hao X J, Zhang Z W, Tian H X. Analysis of genetic diversity and cross-species transferability based on *Fusarium oxysporum* EST-SSR markers[J]. *Journal of Plant Protection*, 2015, 42(5): 777-786 (in Chinese)
- [5] Wollenweber H W, Reinking O A. *The Genus Fusarium: Its Description, Harmful effect and Controlling* [M]. Berlin: Paul Parey Press, 1935
- [6] 张素轩. 镰刀菌属分类进展[J]. 真菌学报, 1991, 10(2): 85-94
- Zhang S X. Advances in the taxonomy of the genus *Fusarium* [J]. *Acta Mycologica Sinica*, 1991, 10(2): 85-94 (in Chinese)
- [7] 李新凤, 张作刚, 王建明, 高俊明, 田宏先. 尖镰孢 EST-SSR 信息分析及分子标记建立[J]. 中国农业科学, 2014, 47(20): 3982-3991
- Li X F, Zhang Z G, Wang J M, Gao J M, Tian H X. EST-SSR information analysis and markers development in *Fusarium oxysporum* [J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2014, 47(20): 3982-3991 (in Chinese)
- [8] O'Donnell K. Progress towards a phylogenetic classification of *Fusarium* [J]. *Sydowia*, 1996, 48: 57-70
- [9] Yli-Mattila T, Paavanen-Huhtala S, Bulat S A, Alekhina I A, Nirenberg H I. Molecular, morphological and phylogenetic analysis of the *Fusarium avenaceum*/F *tricinctum* species complex: A polyphasic approach [J]. *Mycological Research*, 2002, 106(6): 655-669
- [10] Konstantinova P, Yli-Mattila T. IGS-RFLP analysis and development of molecular markers for identification of *Fusarium poae*, *Fusarium langsethiae*, *Fusarium sporotrichioides* and *Fusarium kyushuense* [J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2004, 95(3): 321-331
- [11] Visentin I, Tamiotti G, Valentino D, Portis E, Karlovsky P, Moretti A, Cardinale F. The ITS region as a taxonomic discriminator between *Fusarium verticillioides* and *Fusarium proliferatum* [J]. *Mycological Research*, 2009, 113(10): 1137-1145
- [12] 李新凤, 王建明. 镰孢菌的分类鉴定[M]. 北京: 中国农业科学技术出版社, 2012
- Li X F. *Isolation and Identification of Fusarium* [M]. Beijing: China Agricultural Science and Technology Press, 2012 (in Chinese)
- [13] 高慧, 王晓, 郭庆港, 李社增, 鹿秀云, 马平. 河北省棉花枯萎菌遗传多样性及致病力分化[J]. 植物保护学报, 2014, 41(3): 311-319
- Gao H, Wang X G, Guo Q G, Li S Z, Lu X Y, Ma P. Phylogenetic and pathogenic analyses of *Fusarium oxysporum* f sp *vasinfectum* isolates in Hebei Province by AFLP technique [J]. *Journal of Plant Protection*, 2014, 41(3): 311-319 (in Chinese)
- [14] Mishra R K, Pandey B K, Singh V, Mathew A J, Pathak N, Zeeshan M. Molecular detection and genotyping of *Fusarium oxysporum* f sp *psidii* isolates from different agro-ecological regions of India [J]. *Journal of Microbiology*, 2013, 51(4): 405-412.
- [15] Durai M, Dubey S C, Tripathi A. Genetic diversity analysis and development of SCAR marker for detection of Indian populations of *Fusarium oxysporum* f sp *ciceris* causing chickpea wilt [J]. *Folia Microbiology*, 2012, 57(3): 229-235
- [16] Leslie J F, Summerell B A. *The Fusarium Laboratory Manual* [M]. Iowa: Blackwell Publishing, 2006
- [17] 张艳菊, 陈霞, 刘东, 秦智伟, 周秀艳, 蒲子婧. 黄瓜枯萎病菌遗传多样性的 AFLP 分析[J]. 植物病理学报, 2011, 41(3): 301-304
- Zhang Y J, Chen X, Liu D, Qin Z W, Zhou X Y, Pu Z J. AFLP analysis of genetic diversity of *Fusarium oxysporum* f sp *cucumainum* [J]. *Acta Phytopathologica Sinica*, 2011, 41(3): 301-304 (in Chinese)
- [18] Groenewald S, van den Berg N, Marasas W F O, Viljoen A. 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
- [19] 张宝俊, 张家榕, 郭明霞, 李志岗, 王建明. 镰刀菌 rDNA ITS 的 PCR-RFLPs 分析[J]. 农业生物技术学报, 2007, 15(3): 545-546
- Zhang B J, Zhang J R, Guo M X, Li Z G, Wang J M. PCR-RFLPs analysis of rDNA ITS of *Fusarium* [J]. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 2007, 15(3): 545-546 (in Chinese)
- [20] Rodríguez-Molina M C, Morales-Rodríguez M C, Palo C, Osuna M D, Iglesias M J, García J A. Pathogenicity, vegetative compatibility and RAPD analysis of *Fusarium oxysporum* isolates from tobacco fields in Extremadura [J]. *European Journal of Plant Pathology*, 2013, 136(3): 639-650
- [21] 张述义, 李新凤, 韦晓艳, 王建明. 33 株尖孢镰刀菌遗传多样性的 ISSR 分析[J]. 生态学杂志, 2013, 32(5): 1195-1202
- Zhang S Y, Li X F, Wei X Y, Wang J M. Genetic diversity of 33 *Fusarium oxysporum* strains: An ISSR analysis [J]. *Chinese Journal of Ecology*, 2013, 32(5): 1195-1202 (in Chinese)
- [22] Dubey S C, Singh S R. Virulence analysis and oligonucleotide

- fingerprinting to detect diversity among Indian isolates of *Fusarium oxysporum* f sp ciceris causing chickpea wilt[J]. *Mycopathologia*, 2008, 165(6): 389-406
- [23] Baysal Ö, Siragusa M, Gümrükcü E, Zengin S, Carimi F, Sajeve M, Jaime A, Teixeira da Silva J A. Molecular characterization of *Fusarium oxysporum* f melongenae by ISSR and RAPD markers on eggplant[J]. *Biochemical Genetics*, 2010, 48(5-6): 524-537
- [24] Bayraktar H, Dolar F S, Maden S. Use of RAPD and ISSR markers in detection of genetic variation and population structure among *Fusarium oxysporum* f sp ciceris isolates on chickpea in Turkey[J]. *Journal of Phytopathology*, 2008, 156(3): 146-154
- [25] 李蕊倩, 何瑞, 张跃兵, 徐玉梅, 王建明. 镰刀菌 ISSR 标记体系的建立及遗传多样性分析[J]. 中国农业科学, 2009, 42(9): 3139-3146
- Li R Q, He R, Zhang Y B, Xu Y M, Wang J M. Establishment of ISSR reaction system of *Fusarium* and its analysis of genetic diversity[J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2009, 42(9): 3139-3146 (in Chinese)
- [26] 段会军, 张彩英, 李喜焕, 郭小敏, 马峙英. 基于 RAPD、ISSR 和 AFLP 对西瓜枯萎病菌遗传多样性的评价[J]. 菌物学报, 2008, 27(2): 267-276
- Duan H J, Zhang C Y, Li X H, Guo X M, Ma Z Y. Assessment of genetic diversity in *Fusarium oxysporum* f sp niveum by RAPD, ISSR and AFLP analysis[J]. *Mycosystema*, 2008, 27(2): 267-276 (in Chinese)
- [27] Dinolfo M I, Stenglein S A, Moreno M V, Nicholson P, Jennings P, Salerno G L. ISSR markers detect high genetic variation among *Fusarium poae* isolates from Argentina and England[J]. *European Journal of Plant Pathology*, 2010, 127(4): 483-491
- [28] Mishra K P, Fox R T V, Culham A. Inter simple sequence repeat and aggressiveness analyses revealed high genetic diversity recombination and long-range dispersal in *Fusarium culmorum*[J]. *Annals of Applied Biology*, 2003, 143(3): 291-301
- [29] Mishra P K, Tewari J P, Clear R M, Turkington T K. Genetic diversity and recombination within populations of *Fusarium pseudograminearum* from western Canada[J]. *International Microbiology: The Official Journal of the Spanish Society for Microbiology*, 2006, 9(1): 65-68
- [30] Booth C. 镰刀菌属[M]. 陈其焜译, 北京: 中国农业出版社, 1988
- Booth C. *The Genus Fusarium*[M]. Chen Q Y translated, Beijing: China Agriculture Press, 1988 (in Chinese)
- [31] Naef A, Défago G. Population structure of plant pathogenic *Fusarium* species in overwintered stalk residues from Bt-transformed and non-transformed maize crops[J]. *European Journal of Plant Pathology*, 2006, 116(2): 129-143
- [32] 周延清. DNA 分子标记技术在植物研究中的应用[M]. 北京: 化学工业出版社, 2005: 143-161
- Zhou Y Q. *DNA Molecular-Marker in the Research of Plants* [M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2005: 143-161 (in Chinese)
- [33] 李新风, 张光明, 畅引东, 王建明, 李蕊倩, 李亚立. 21 株马特组镰刀菌遗传多样性的 ISSR 分析[J]. 应用生态学报, 2012, 23(5): 1339-1344
- Li X F, Zhang G M, Chang Y D, Wang J M, Li R Q, Li Y L. Genetic diversity of 21 *Fusarium* strains in section Martiella based on ISSR analysis[J]. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2012, 23(5): 1339-1344 (in Chinese)
- [34] Dinolfo M I, Stenglein S A, Moreno M V, Nicholson P, Jennings P, Salerno G L. ISSR markers detect high genetic variation among *Fusarium poae* isolates from Argentina and England[J]. *European Journal of Plant Pathology*, 2010, 127(4): 483-491
- [35] 王建明, 李蕊倩, 畅引东, 何瑞, 李新风, 徐玉梅, 高俊明. 尖孢镰刀菌及芬芳镰刀菌遗传多样性的 ISSR 分析[J]. 植物病理学报, 2011, 41(4): 337-344
- Wang J M, Li R Q, Chang Y D, He R, Li X F, Xu Y M, Gao J M. ISSR analysis of genetic diversity of *Fusarium oxysporum* and *F. redolens* [J]. *Acta Phytopathologica Sinica*, 2011, 41(4): 337-344 (in Chinese)
- [36] 肖荣凤, 陈燕萍, 朱育菁, 詹洪, 刘波, 葛慈斌. 尖孢镰刀菌致病性菌株遗传多样性的 ISSR 分析[J]. 热带作物学报, 2015, 36(11): 2007-2014
- Xiao R F, Chen Y P, Zhu Y Y, Zhan H, Liu B, Ge C B. Genetic diversity of pathogenic *Fusarium oxysporum* strains by ISSR markers[J]. *Chinese Journal of Tropical Crops*, 2015, 36(11): 2007-2014 (in Chinese)
- [37] Yuan L, Lu F P, Liu S S, Wang X, Zhang R X, Li Z Q, Zhang H. ISSR analysis of *Fusarium oxysporum* Schl in Hebei Province[C]. *International Symposium on Biomedicine and Engineering*, 2011, 341-344
- [38] 陈慧. 马铃薯枯萎病病原菌鉴定及 *Fusarium oxysporum* 遗传多样性的研究[D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2015
- Chen H. Study on identification of pathogen in diversity of *Fusarium* wilt and genetic diversity of *Fusarium oxysporum* [D]. Hohhot: Inner Mongolia Agricultural University, 2015 (in Chinese)
- [39] 刘姗姗. 胡麻(*Linum usitatissimum* L.) 枯萎病病原真菌鉴定及 ISSR 分子标记分析[D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2012
- Liu S S. A study of the isolation, identification and inter-simple sequence repeat (ISSR) analysis of *Fusarium oxysporum* f sp Lini on linseed (*Linum usitatissimum* L.) [D]. Hohhot: Inner Mongolia Agricultural University, 2012 (in Chinese)
- [40] 刘东, 代丽婷, 蒲子婧, 苗笛, 马柏壮, 张艳菊. 黄瓜枯萎病菌毒力、营养体亲和性及 ISSR 分析[J]. 植物病理学报, 2012, 42(5): 456-465
- Liu D, Dai L T, Pu Z J, Miao D, Ma B Z, Zhang Y J. Virulence vegetative compatibility and ISSR analysis of *Fusarium oxysporum* f sp cucumarinum [J]. *Acta Phytopathologica Sinica*, 2012, 42(5): 456-465 (in Chinese)