

杨尚雪,李 珣,王晓晔,等. 水蛭素对冷冻前后猪精液中超氧化物歧化酶活性及 mRNA 表达的影响[J]. 江苏农业科学,2015,43(10):275-278. doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2015.10.091

水蛭素对冷冻前后猪精液中超氧化物歧化酶活性及 mRNA 表达的影响

杨尚雪¹, 李 珣¹, 王晓晔¹, 石博妹¹, 唐胤晟^{2,3}, 许春荣^{2,3}, 唐荣福², 胡传活¹

(1. 广西大学动物科技学院,广西南宁 530005;2. 广西畜禽品种改良站,广西南宁 530001;

3. 广西科达畜禽改良有限责任公司,广西南宁 530001)

摘要:课题组前期试验表明,0.08% 水蛭素能够显著提高冻后猪精液质量。为研究其作用机理,用含不同浓度(0.04%、0.08%、0.12%)水蛭素的稀释液稀释美系长白公猪精液,分别检测平衡后及冻融后精液中超氧化物歧化酶的活性和 mRNA 表达量的变化。结果表明:(1)不含水蛭素的冷冻稀释液显著降低新鲜猪精液超氧化物歧化酶活性($P < 0.05$),而含有 0.08% 水蛭素的冷冻稀释液处理的猪精液超氧化物歧化酶活性分别在平衡组与冷冻组最高($P > 0.05$);(2)含有 0.08% 水蛭素的猪精液平衡及冻融后的超氧化物歧化酶 mRNA 表达量最高,但差异不显著($P > 0.05$)。总之,添加 0.08% 水蛭素对冷冻前后猪精液超氧化物歧化酶活性及 mRNA 表达无显著影响。

关键词:猪精液;冷冻保存;水蛭素;超氧化物歧化酶;酶活性;mRNA 表达量

中图分类号: S828.3⁺4 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2015)10-0275-04

冷冻保存过程对精子质膜产生物理和化学应激,降低精子冻后质量,影响活力与受精能力^[1]。这些损伤均与冷冻保存过程引起精子质膜脂质过氧化反应而产生大量的活性氧(reactive oxygen species,ROS)有关^[2-4]。用于冷冻保存的新鲜猪精液中添加合适的冷冻稀释液非常重要。研究表明,稀释液中添加抗氧化剂能有效防止氧化应激伤害精子,常见的如半胱氨酸、维生素 E 可以延长冻后精子寿命^[5-9]。水蛭素提取自水蛭的唾液腺,是由 65~66 个氨基酸残基所组成的单链多肽,具有降血脂、抗肿瘤、抗凝血等多种药理活性,广泛用于临床治疗各种疾病^[10]。近年来,研究发现水蛭素具有抗氧化作用,本课题的前期研究也表明,0.08% 的水蛭素能显著改善冻后猪精液质量,但其作用机理尚不明了。本试验用添加不同浓度水蛭素的冷冻稀释液稀释精液后,检测平衡及冷冻解冻后猪精液中固有抗氧化酶——超氧化物歧化酶(superoxide dismutase,SOD)活性及其 mRNA 表达量的变化,以期从 SOD 活性及分子水平阐明水蛭素对冷冻前后猪精液中 SOD 功能及浓度的影响,为深入探讨水蛭素提高冻后猪精液质量的机制提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

收稿日期:2014-10-08

基金项目:国家现代农业产业技术体系广西生猪创新团队项目(编号:nycytxgxtld-03-15)。

作者简介:杨尚雪(1989—),女,河南郑州人,硕士研究生,主要从事动物解剖及组织胚胎学研究。E-mail:412866984@qq.com。

通信作者:唐荣福(1974—),男,广西桂林人,硕士,高级畜牧师,主要从事猪的繁殖与育种研究。E-mail:tr988@hotmail.com;胡传活(1964—),男,广西平南人,博士,副教授,主要从事动物解剖及组织胚胎学研究。E-mail:hch64815@gxu.edu.cn。

1.1.1 主要试剂 异丙醇、无水乙醇和氯仿为天津市科密欧化学试剂有限公司产品,三羟甲基氨基甲烷(Tris)、蛋白酶抑制剂(PMSF)、青霉素与链霉素均为北京索莱宝科技有限公司产品,卵黄取自广西南宁市富凤农牧有限公司生产的初产鸡蛋,水蛭素(活力单位为 1 250 U/g)为南宁市净雪皇生物工程技术有限公司产品,BCA 蛋白浓度测定试剂盒和 SOD 检测试剂盒均为碧云天生物技术有限公司产品,RIPA 裂解液、Trizol、HiScript Q 1st Strand cDNA Synthesis Kit (qPCR)和 2 × Taq Master Mix 均购于南京诺唯赞生物科技有限公司,PCR 引物由上海生工生物工程有限公司合成。

1.1.2 主要仪器 程序降温仪(法国卡苏公司)、冰箱(海尔集团)、电子恒温水浴锅(北京长安科学仪器厂)、移液枪(Eppendorf)、离心机(上海安亭科学仪器厂)、0.25 mL 塑料细管(Minitube)、梯度 PCR 仪(Biometra)、水平电泳槽及电泳仪电源(北京凯元仪器有限公司)、iMARK 酶标仪(Bio-rad)。

1.1.3 精液来源 新鲜精液采自 3 头广西科达畜禽改良有限责任公司健康、性欲旺盛的美系长白种公猪。采用手握法采精,收集富含精子段的精液于预温的洁净烧杯中,1 h 内送达实验室处理。用 8 层纱布过滤后,检查相关的精液质量指标(精子活力、畸形率及密度)。精子活力 > 0.7、畸形率 < 20% 的精液继续用于后续试验。

1.2 试验方法

1.2.1 分组 试验分组见表 1。

1.2.2 冷冻稀释液配制 用电子天平按配方(葡萄糖 1.65%、柠檬酸 2.22%、Tris 3.63%、NAC 0.03%、青霉素 0.09%、链霉素 0.15%、甘油 9.00%、蛋黄 30.00%)^[11]准确称取各种试剂,双蒸水溶解定容,5 000 r/min 离心 15 min。

1.2.3 精液冷冻程序 用 10 层纱布包裹精液,放在室温下缓慢降温。原精与含有不同浓度(0.04%、0.08%、0.12%)水蛭素的稀释液室温下等温稀释,稀释比为 1:2(先加入 1

表 1 猪精液冷冻处理分组

处理方式	组别	猪精液	水蛭素浓度 (%)	冷冻稀释液
不平衡不冷冻	1	+	0	-
	2	+	0	+
仅平衡不冷冻	3	+	0	+
	4	+	0.04	+
	5	+	0.08	+
	6	+	0.12	+
既平衡又冷冻	7	+	0	+
	8	+	0.04	+
	9	+	0.08	+
	10	+	0.12	+

注：“+”表示含有，“-”表示不含有；“平衡”表示细管分装后的精液在 5℃ 冰箱内放置 4 h，“冷冻”表示细管分装后的精液经程序降温仪降温至 -140℃，并在液氮中存放 5 min 以上。

份与原精等量的稀释液，混合均匀，平衡 15 min 后，再加入另 1 份与原精等量的稀释液)。0.5 mL 塑料细管分装，10 层以上纱布包裹后将细管放入冰箱内，5℃ 下平衡 4 h。取出细管，检查平衡后精子活力合格后，放入程序降温仪：5 ~ -5℃，3℃/min；-5 ~ -42℃，100℃/min；-42 ~ -140℃，30℃/min。冷冻程序运行完成后，取出细管迅速投入液氮中。

1.2.4 冷冻精液解冻方法 从液氮中取出细管，迅速投入 37℃ 水浴，快速晃动 30 ~ 60 s。

1.2.5 SOD 活性检测

1.2.5.1 细胞总蛋白的提取 将各组精液从 0.5 mL 塑料细管中倒入 2.0 mL 离心管中，轻微振荡，吸取 500 μL 加入 1 000 μL 冷的裂解液（每 1 mL 冷的 RIPA 裂解液中加入 2 μL PMSF 混合物，混匀后置冰上备用），混匀后，在 4℃ 条件下振荡 15 min，在 4℃、14 000 r/min 条件下离心 15 min。快速将上清吸入另一预冷的干净离心管，用于后续试验。

1.2.5.2 BCA 蛋白浓度测定 按照说明书进行，步骤如下：先配制成 25 mg/mL 的蛋白标准溶液，取适量 25 mg/mL 蛋白标准液，灭菌生理盐水稀释至终浓度为 0.5 mg/mL；其次配制 BCA 工作液（BCA 试剂 A：BCA 试剂 B = 50：1），充分混匀；

表 2 引物序列

基因名称	产物大小(bp)	方向及序列
<i>SOD</i>	162	sense:5'-TGGACAAATCTGAGCCCTAACG-3'; antisense:5'-TTCCTTGTGAAACCGAGCC-3'
<i>GAPDH</i>	549	sense:5'-AGTCTGGAGTGAACGGATTTC-3'; antisense:5'-CAGTCTTCTGGGTGGCAGTGAT-3'

SOD 与 *GAPDH* 的最优退火温度的确定是根据 DNA 分子的熔点 (T_m) 设置温度梯度，比较相同 RT-PCR 反应体系和循环圈数下不同温度的 RT-PCR 产物的表达水平，表达量最高的温度为最优退火温度，最终 *SOD* 与 *GAPDH* 的最优退火温度为 58℃；*SOD* 与 *GAPDH* 的最优循环圈数的确定是通过设置不同循环圈数，比较相同 RT-PCR 反应体系和退火温度下不同循环圈数的 RT-PCR 产物的表达水平，到达平台期的第 1 个循环圈数即为最优循环数，最终 *SOD* 为 38 圈，*GAPDH* 为 36 圈。

用 Quantity One 分析系统分析 DNA 条带光密度，进行统计分析。

1.2.7 数据处理 采用 SPSS 17.0 统计软件包进行统计。数据采用“平均数 ± 标准差”描述，采用单因素方差分析，各

然后将标准品按 0、1、2、4、8、12、16、20 μL 加到 96 孔板的标准品孔中，加灭菌生理盐水补足到 20 μL；加 10 μL 样品到 96 孔板的样品孔中，加灭菌生理盐水到 20 μL；最后各孔加入 200 μL BCA 工作液，37℃ 放置 20 min 后，测定吸光度 $D_{595\text{ nm}}$ ，根据标准曲线计算出样品的蛋白浓度。

1.2.5.3 SOD 酶活性测定 采用 WST-8 法，步骤如下：首先配制适量的 WST-8/酶工作液以及反应启动工作液；然后取 20 μL 待测样品到 96 孔板中，加入 160 μL WST-8/酶工作液以及 20 μL 反应启动工作液，相应的空白对照 1 为 20 μL SOD 检测液、160 μL WST-8/酶工作液和 20 μL 反应启动工作液，空白对照 2 为 40 μL SOD 检测液和 160 μL WST-8/酶工作液，空白对照 3 为 20 μL 待测样品、20 μL SOD 检测液和 160 μL WST-8/酶工作液；37℃ 孵育 30 min；测定吸光度 $D_{450\text{ nm}}$ 。SOD 酶活力单位的定义：在上述黄嘌呤氧化酶耦联反应体系中抑制百分率为 50% 时，反应体系中的 SOD 酶活力定义为 1 个酶活力单位 (U)。

1.2.6 SOD mRNA 表达水平的检测

1.2.6.1 细胞总 RNA 的提取 将各组精液从 0.5 mL 塑料细管中倒入 2.0 mL 离心管中，加入 1 mL RNA isolater，上下颠倒混匀，加入 200 μL 氯仿，剧烈振荡，4℃ 静置 10 min，12 000 g、4℃ 离心 15 min，小心吸取上层水相 500 μL 至含有 600 μL 异丙醇的离心管中，上下颠倒混匀，4℃ 静置 10 min，12 000 g、4℃ 离心 10 min，去上清，加入 1 mL 75% 乙醇洗涤，12 000 g、4℃ 离心 5 min，弃上清，将离心管倒扣在灭菌卫生纸上 3 min，加入 4 μL 灭菌三蒸水溶解沉淀。

1.2.6.2 cDNA 合成 cDNA 合成反应液体系：RNase free ddH₂O 3 μL，50 μmol/L Oligo dT₂₃ VN 1 μL，2 × RT Mix 10 μL，HiScript™ II Enzyme Mix 2 μL，总 RNA 4 μL。上述体系配制均在冰上进行，完成后，50℃ 水浴 45 min。

1.2.6.3 反转录聚合酶链式反应 (RT-PCR) RT-PCR 反应液体系：ddH₂O 6.5 μL，2 × Taq Plus Master Mix 12.5 μL，模板 DNA 4 μL，10 μmol/L 引物 1、引物 2 (表 2) 各 1 μL。上述体系配制在冰上进行。PCR 反应条件：94℃ 预变性 5 min；94℃ 30 s，58℃ 30 s，72℃ 30 s，循环 X 次；72℃ 延伸 7 min。

种检验的显著性水平平均设定为 $P < 0.05$ 。

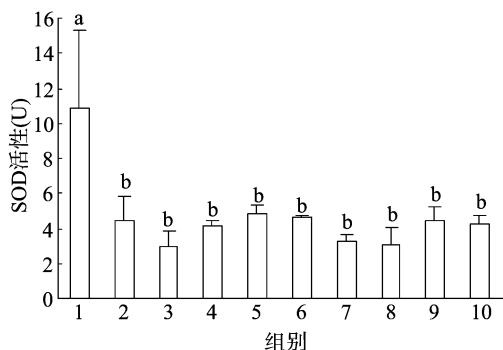
2 结果与分析

2.1 SOD 活性试验

由图 1 可知，新鲜精液在不添加冷冻稀释液且不平衡不冷冻 (第 1 组) 的条件下，SOD 活性最高 ($P < 0.05$)，添加不含水蛭素的冷冻稀释液 (第 2 组) 后，SOD 活性显著降低 ($P < 0.05$)；除第 1 组外，其他各组无显著差异 ($P > 0.05$)，但添加 0.08% 水蛭素精液的 SOD 活性 (第 5 组与第 9 组) 分别在平衡组与冻融组中最高 ($P > 0.05$)。

2.2 SOD mRNA 表达水平试验

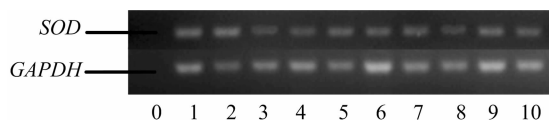
由图 2、图 3 可知，新鲜精液在不添加冷冻稀释液且不平衡不冷冻 (第 1 组) 的条件下，*SOD* mRNA 表达量最高，添加



不同小写字母表示差异显著 ($P < 0.05$)。图3同

图1 不同试验分组下 SOD 活性大小

不含水蛭素的冷冻稀释液 (第 2 组) 后, 与第 1 组相比 SOD mRNA 表达降低, 但差异不显著 ($P > 0.05$); 仅平衡的猪精液添加 0.08% 的水蛭素 (第 5 组) 与不含水蛭素既平衡又冷冻 (第 3 组) 相比 SOD mRNA 表达高但差异不显著 ($P > 0.05$), 与新鲜精液 (第 1 组) 无显著差异 ($P > 0.05$); 既平衡又冷冻的猪精液添加 0.08% 的水蛭素 SOD mRNA 表达比不含水蛭素既平衡又冷冻 (第 7 组) 的高 ($P > 0.05$), 与新鲜精液 (第 1 组) 无显著差异 ($P > 0.05$)。



“0”表示阴性对照即灭菌三蒸水替代 cDNA 的产物电泳图, 无条带, 说明本试验成立; 1~10 分别表示不同试验分组下精液 PCR 产物电泳图, 具体分组见表 1

图2 不同试验分组下 SOD RT-PCR 产物电泳图

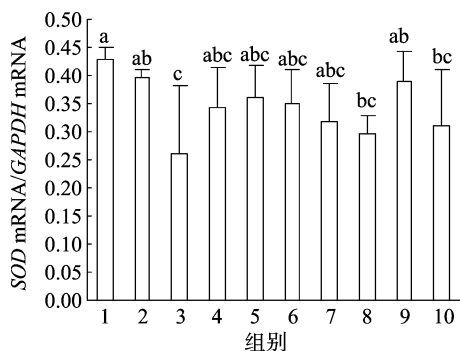


图3 不同试验分组下 SOD mRNA 的表达

3 讨论

ROS 对维持正常精子的功能至关重要, 如受精能力的获得、染色质凝集的促进、质膜的重建以及胞内信号转导的激活等^[12-14]。正常情况下, 精子体内的促氧化与抗氧化水平相互平衡。然而, 这一平衡状态被冷冻保存过程打破了, 产生了大量富余的 ROS, 引起精子氧化应激造成损伤。在冷冻稀释液中添加合适浓度的抗氧化剂对于清除多余的 ROS 保护精子非常重要。超氧阴离子自由基 ($O_2^- \cdot$) 是生物体内正常代谢的产物, 但其不正常的积累将使细胞膜的脂质发生过氧化作用而引起膜裂变, 导致细胞损伤甚至细胞死亡^[15]。SOD 是消除 $O_2^- \cdot$ 最有效、最重要的抗氧化酶, 其催化自由基 $O_2^- \cdot$ 发

生歧化作用生成 O_2 与 H_2O_2 , 然后 H_2O_2 被体内如过氧化氢酶、谷胱甘肽过氧化物酶及谷胱甘肽还原酶等抗氧化酶清除, 因而 SOD 是体内防止自由基损伤的第一道防线, 是生物体内最重要的抗氧化酶^[16]。SOD 广泛存在于动物、植物和微生物体内, 在医药、食品、化妆品中有广泛的应用前景^[17]。从 SOD 水平的高低可以看出机体抗氧化系统的状态。

水蛭素是从药用水蛭中提取的含有 65 或 66 个氨基酸残基的多肽链^[18-19]。其性味咸、苦、平, 有小毒, 入肝经, 具有破血逐瘀之功效, 主要用于血瘀经闭及跌打损伤等^[20-22], 随着对水蛭素研究的深入, 发现其具有抗凝血、抗血栓形成以及抗氧化应激等多重效用。牟忠祥等的研究结果表明, 水蛭素组灌胃干预后的荷瘤鼠, 其血清中 SOD 水平明显升高, 提示自由基被清除后, 脂质过氧化过程受到阻断, 使水蛭素组荷瘤鼠丙二醛含量下降^[23]。郭应信等对大鼠随意皮瓣淤血模型的试验结果表明, 水蛭素能提高淤血皮瓣局部 SOD 水平, 减少丙二醛含量, 减轻局部炎症反应^[24]。Ou 等研究发现水蛭素可以清除晶状体上皮细胞内 ROS, 上调 SOD 水平^[25-26]。添加 0.08% 水蛭素对冷冻前后猪精液 SOD 活性有升高作用, 但影响不显著。这与其他研究结果部分相似, 都说明水蛭素有清除 ROS、升高 SOD 活性的作用, 只是本结果不显著, 这可能是因为 SOD 无统一的检测标准及表示方法^[17]。

不含水蛭素的冷冻稀释液显著降低了新鲜猪精液 SOD 活性, 对 SOD mRNA 表达亦有降低影响, 说明不含水蛭素的冷冻稀释液对新鲜精液有一定的抑制作用, 猜测可能是由于冷冻稀释液中含有 Tris, 其为弱碱, 具有刺激性, 能够抑制酶活性^[27]。

4 结论

本试验研究发现, 添加 0.08% 水蛭素对冷冻前后猪精液 SOD 活性及 mRNA 表达影响不显著。

参考文献:

- [1] Alvarez J G, Storey B T. Evidence for increased lipid peroxidative damage and loss of superoxide dismutase activity as a mode of sublethal cryodamage to human sperm during cryopreservation[J]. Journal of Andrology, 1992, 13(3): 232-241.
- [2] Wang Y, Sharma R K, Agarwal A. Effect of cryopreservation and sperm concentration on lipid peroxidation in human semen[J]. Urology, 1997, 50(3): 409-413.
- [3] Chatterjee S, Gagnon C. Production of reactive oxygen species by spermatozoa undergoing cooling, freezing, and thawing[J]. Molecular Reproduction and Development, 2001, 59(4): 451-458.
- [4] Lasso J L, Noiles E E, Alvarez J G, et al. Mechanism of superoxide dismutase loss from human sperm cells during cryopreservation[J]. Journal of Andrology, 1994, 15(3): 255-265.
- [5] Bilodeau J F, Blanchette S, Gagnon C, et al. Thiols prevent H_2O_2 -mediated loss of sperm motility in cryopreserved bull semen[J]. Theriogenology, 2001, 56(2): 275-286.
- [6] Funahashi H, Sano T. Select antioxidants improve the function of extended boar semen stored at 10 °C[J]. Theriogenology, 2005, 63(6): 1605-1616.
- [7] Askari H A, Check J H, Peymer N, et al. Effect of natural antioxidants

- tocopherol and ascorbic acids in maintenance of sperm activity during freeze – thaw process[J]. Archives of Andrology,1994,33(1):11 – 15.
- [8] Cerolini S, Maldjian A, Surai P, et al. Viability, susceptibility to peroxidation and fatty acid composition of boar semen during liquid storage[J]. Animal Reproduction Science, 2000, 58 (1/2): 99 – 111.
- [9] Pena F J, Johannisson A, Wallgren M, et al. Antioxidant supplementation *in vitro* improves boar sperm motility and mitochondrial membrane potential after cryopreservation of different fractions of the ejaculate[J]. Animal Reproduction Science, 2003, 78(1/2): 85 – 98.
- [10] 张希成, 李 刚, 范青梅. 水蛭的药理作用与临床应用[J]. 中医中药杂志, 2006, 3(17): 123 – 126.
- [11] 胡传话. 牛、猪精液冷冻保存技术相关问题的研究[D]. 南宁: 广西大学, 2009: 77 – 93.
- [12] Kodama H, Kuribayashi Y, Gagnon C. Effect of sperm lipid peroxidation on fertilization[J]. Journal of Andrology, 1996, 17 (2): 151 – 157.
- [13] de Lamirande E, Jiang H, Zini A, et al. Reactive oxygen species and sperm physiology[J]. Reviews of Reproduction, 1997, 2(1): 48 – 54.
- [14] Pons – Rejraji H, Sion B, Saez F, et al. Role of reactive oxygen species (ROS) on human spermatozoa and male infertility [J]. Gynécologie Obstétrique & Fertilité, 2009, 37(6): 529 – 535.
- [15] 林祥潮, 黄晓东. 中药对超氧阴离子自由基清除率的测定[J]. 广州化学, 2012, 37(1): 32 – 36.
- [16] 陈 勉, 朱希强. 超氧化物歧化酶在医药临床上的研究和应用[J]. 食品与药品, 2009, 11(5): 44 – 47.
- [17] 张晓燕. 超氧化物歧化酶的研究现状及在食品中的应用综述[J]. 扬州职业大学学报, 2002, 6(1): 34 – 37.
- [18] Dodt J, Müller H P, Seemüller U, et al. The complete amino acid sequence of hirudin, a thrombin specific inhibitor; application of colour carboxymethylation[J]. FEBS Letters, 1984, 165(2): 180 – 184.
- [19] Harvey R P, Degryse E, Stefani L, et al. Cloning and expression of a cDNA coding for the anticoagulant hirudin from the bloodsucking leech, *Hirudo medicinalis*[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1986, 83 (4): 1084 – 1088.
- [20] 周小明, 陆再英. 水蛭素对培养的兔动脉平滑肌细胞增殖的抑制作用[J]. 中国循环杂志, 1996, 11(2): 103 – 105.
- [21] Nasir M A, Toth C A, Mittra R A. Recombinant hirudin for prevention of experimental postoperative intraocular fibrin[J]. American Journal of Ophthalmology, 1996, 121(5): 554 – 560.
- [22] Ogiuchi T, Hirashima Y, Nakamura S, et al. Tissue factor and cancer procoagulant expressed by glioma cells participate in their thrombin – mediated proliferation[J]. Journal of Neuro – Oncology, 2000, 46(1): 1 – 9.
- [23] 牟忠祥, 任青华, 张 博, 等. 中药水蛭素对荷瘤鼠超氧化物歧化酶及丙二醛水平的影响[J]. 实用医学杂志, 2010, 26(17): 3103 – 3104.
- [24] 郭应信, 殷国前, 李佳荃. 天然与重组水蛭素对大鼠随意皮瓣淤血模型超氧化物歧化酶、丙二醛、内皮素变化的影响[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2011, 15(24): 4453 – 4456.
- [25] Ou Y, Liao G, Yuan Z, et al. Protective effect of recombinant hirudin variant III against galactose – mediated rat lens epithelial cell damage[J]. Current Eye Research, 2012, 37(3): 187 – 194.
- [26] Ou Y, Geng P, Liao G Y, et al. Intracellular GSH and ROS levels may be related to galactose – mediated human lens epithelial cell apoptosis; role of recombinant hirudin variant III[J]. Chemico – Biological Interactions, 2009, 179(2/3): 103 – 109.
- [27] Desmarais W T, Bienvenue D L, Bzymek K P, et al. The 1.20 Å resolution crystal structure of the aminopeptidase from *Aeromonas proteolytica* complexed with Tris; a tale of buffer inhibition[J]. Structure, 2002, 10(8): 1063 – 1072.
- Branch, 1998: 613 – 615.
- [10] Green K R, Abang M M, Iloba C. A rapid bioassay for screening yam germplasm for response to anthracnose[J]. Tropical Science, 2000, 40: 132 – 138.
- [11] Onyeka T J, Petro D, Etienne S, et al. Optimizing controlled environment assessment of levels of resistance to yam anthracnose disease using tissue culture – derived whole plants[J]. Journal of Phytopathology, 2006, 154(5): 286 – 292.
- [12] Onyeka T J, Péto D, Ano G, et al. Resistance in water yam (*Dioscorea alata*) cultivars in the french west indies to anthracnose disease based on tissue culture – derived whole – plant assay[J]. Plant Pathology, 2006, 55(5): 671 – 678.
- [13] 王 智. 山药种质资源抗性鉴定、抗病机制研究和遗传多样性分析[D]. 郑州: 河南农业大学, 2004.
- [14] 李 越, 刘云龙, 李 凡, 等. 非洲菊根腐病品种抗病性鉴定及病原菌的致病性分化[J]. 云南农业大学学报, 2008, 23(1): 33 – 35, 41.
- [15] Akem C N. Yam die – back and its principal cause in the yam belt of Nigeria[J]. Pakistan Journal of Biological Science, 1999, 2(4): 1106 – 1109.
- [16] 陈吉良. 薯蓣炭疽病病原菌分离鉴定及抑菌制剂的筛选[D]. 海口: 海南大学, 2011.

(上接第 175 页)

- [4] Kutama A S, Auyo M I, Binta S B, et al. Combating yam anthracnose in Nigeria; a review[J]. Standard Research Journal of Agricultural Science, 2013, 1(3): 21 – 26.
- [5] Abang M M, Hoffmann P, Winter S, et al. Vegetative compatibility among isolates of *Colletotrichum gloeosporioides* from yam (*Dioscorea* spp.) in Nigeria[J]. Journal of Phytopathology, 2004, 152(1): 21 – 27.
- [6] Abang M M, Fagbola O, Smalla K, et al. Two genetically distinct populations of *Colletotrichum gloeosporioides* Penz. causing anthracnose disease of yam (*Dioscorea* spp.) [J]. Journal of Phytopathology, 2005, 153(3): 137 – 142.
- [7] Frézal L, Jacqua G, Neema C. Etude de la diversité génétique de *Colletotrichum gloeosporioides*, agent causal de l'anthracnose de l'igname blanche en Guadeloupe. [C]//Tours, France; Proceedings of the 7th International Conference on Plant Diseases, 2003.
- [8] Frézal L. Etude de la diversité génétique de *Colletotrichum gloeosporioides*, responsable de l'anthracnose de l'igname alata (*Dioscorea alata*) en Guadeloupe [D]. Paris, France; Université de Paris – Sud, 2005.
- [9] Abang M M, Green K R, Wanyera N W, et al. Characterization of *Colletotrichum gloeosporioides* Penz. from yam (*Dioscorea* spp.) in Nigeria [C]. Ibadan, Nigeria; I Proceedings of the 7th Triennial Symposium of the International Society for Tropical Root Crops, African