

不同寄主来源寄生疫霉菌株的群体遗传分析

申贵 王源超* 郑小波

(南京农业大学植物保护学院 农业部病虫害监测与治理重点开放实验室 南京 210095)

摘要: 从300条RAPD随机引物中筛选出扩增多态性丰富的13条引物对寄主来源不同的29个寄生疫霉 (*Phytophthora parasitica*) 菌株进行基因组DNA遗传多样性分析。用筛选出的13条引物对供试菌株进行RAPD PCR扩增, 共产生139条DNA标记条带, 其中133条为多态性条带, 多态检测率为95.7%。利用PopGene versio 1.31软件对供试菌株间的遗传距离进行聚类分析并构建系统树状图, 供试29个菌株被划分为5个遗传聚类组, 不同菌株间具有丰富的遗传多样性。其中寄主为烟草、腊梅、丝兰属植物和西番莲的菌株的遗传结构与其寄主来源具有明显的相关性, 而寄主为刺槐和番茄的菌株与其寄主来源相关性较小, 来源于不同寄主植物的菌株之间遗传距离较远。结果提示在寄生疫霉与其不同寄主植物的长期协同进化过程中, 寄主对病原菌的遗传结构具有一定的影响。

关键词: 寄生疫霉, 寄主, 遗传相关性

■热门文章

■最新更新

VARIATION AMONG PHYTOPHTHORA PARASITICA STRAINS ISOLATED FROM DIFFERENT HOST-PLANTS

SHEN Gui, WANG Yuan-Chao, ZHENG Xiao-Bo

Key Lab of Monitoring and Management of Plant Disease and Insects of Chinese Ministry of Agriculture, College of Plant Protection, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095

Abstract: Genomic fingerprints of 29 isolates of *Phytophthora parasitica* from different hosts were analyzed by using 13 RAPD primers selected from 300 random primers with abundant polymorphisms. Genomic DNA from different isolates were amplified with selected 13 primers and 139 marked bands were produced, in which 133 bands accounted for 95.7% of the total bands produced were polymorphic. The genetic distance was calculated and phylogenetic tree was constructed by the software of PopGene version 1.31, and the 29 tested isolates were divided into five genetic groups. It showed that the genetic diversity was very rich among the tested isolates. The isolates from *Nicotiana tabacum* (tobacco), *Nicotiana glutinosa* (tobacco), *Chimonanthus praecox* (wintersweet), *Yucca gloriosa* (beargrass) and *Passiflora edulis* (passionflower) were clustered into one group, respectively, and showed high relativity with the hosts. The similarity of *Lycopersicon esculentum* (tomato) isolates was about 60.9%, and they could be clustered in two distinct groups. The similarity of the five isolates from *Sophora chinensis* (sophora) was about 66.7%~88.4%, and they also were clustered into two groups when the phylogenetic tree was constructed at the value point of 0.2 of the genetic distance. The results suggested that the host plants could have some effect on the genomic structure of the pathogen during the co-evolution between pathogen and hosts.

Key words: *Phytophthora parasitica*, host, genetic relationship

寄生疫霉 (*Phytophthora parasitica*) 是一种危害严重的植物病原菌, 寄主范围广泛, 主要侵染烟草、番茄、茄子、刺槐、腊梅、丝兰属植物等60多种植物 (郑小波, 1997)。侵染烟草引起的烟草黑胫病是烟草重要根茎病害之一, 王智发等 (1987) 和朱贤朝等 (1987) 对我国烟草黑胫病菌的生理小种进行了划分及王革等 (1997) 对云南烟草黑胫病菌致病力分化和交配型进行了初步的研究, 张修国等 (2000) 对云南省烟草黑胫病菌株的亲缘关系作了研究, 发现不同地理来源的烟草黑胫病菌亲缘关系相近。这些研究仅针对寄主为烟草的寄生疫霉, 并未就不同寄主来源的寄生疫霉进行遗传分析。而在传统疫霉菌分类中, 根据寄主来源的不同, 寄生疫霉被划分为寄生疫霉烟草变种 (*P. parasitica* var. *nicotianae*) 和寄生疫霉寄生变种 (*P. parasitica* var. *parasitica*), 这两个变种的分类地位至今还存在许多争议 (郑小波, 1997)。在长期的协同进化过程中, 寄主植物是否会对寄生疫霉的遗传结构发生影响, 这种影响对这两个变种的划分是否具有生物学意义, 在国内均未见报道。本文以不同寄主和地区来源的寄生疫霉为供试材料, 试图了解寄生疫霉种内菌株间的遗传多样性, 为寄生疫霉菌种下群体的划分提供理论基础, 同时为了解植物和病原菌协同进化过程中, 寄主对病原菌进化的作用提供实验数据。

1 材料和方法

1.1 供试菌株

本实验选用分离自普通烟、心叶烟、刺槐、番茄、腊梅、茄子、丝兰属、西番莲和扶桑等9种不同寄主植物的29个寄生疫霉菌株用于基因组DNA的提取和指纹图谱分析 (表1)。

表1 供试寄生疫霉菌株编号、寄主、采集地和泳道号

Table1 The isolate number, hosts, localities of *P. parasitica* tested

菌株编号 Isolate No. 寄主 Host 采集地 Locality

N1 普通烟 *Nicotiana tabacum* 云南 Yunnan

N2 普通烟 云南 Yunnan

N3 普通烟 云南 Yunnan

N4 普通烟 云南 Yunnan

N5 普通烟 云南 Yunnan

N6 普通烟 云南 Yunnan

N7 普通烟 云南 Yunnan

N8 普通烟 云南 Yunnan

N9 普通烟 云南 Yunnan

N10 普通烟 山东 Shandong

N11 普通烟 山东 Shandong

N12 普通烟 不详 unknown

N13 普通烟 不详 unknown
 N14 心叶烟 *Nicotiana glutinosa* 南京 Nanjing
 CH1 刺 槐 *Sophora chinensis* 南京 Nanjing
 CH2 刺 槐 南京 Nanjing
 CH3 刺 槐 南京 Nanjing
 CH4 刺 槐 南京 Nanjing
 CH5 刺 槐 南京 Nanjing
 T1 番 茄 *Lycopersicum esculentum* 南京 Nanjing
 T2 番 茄 *Lycopersicum esculentum* 南京 Nanjing
 L1 腊 梅 *Chimonanthus praecox* 南京 Nanjing
 L2 腊 梅 *Chimonanthus praecox* 南京 Nanjing
 Q1 茄 子 *Solanum melongena* 南京 Nanjing
 F1 丝兰属 *Yucca gloriosa* 不详 unknown
 F2 丝兰属 *Yucca gloriosa* 不详 unknown
 X1 西番莲 *Passiflora edulis*. 福建 Fujian
 X2 西番莲 *Passiflora edulis*. 福建 Fujian
 H1 扶 桑 *Hibiscus yosa-sinensi* 北京 Beijing

1.2 菌丝体的培养与收集

供试菌株在60g/l 利马豆培养基上,于25°C、黑暗中生长3 d后,沿菌落边缘切取20块1 mm×1 mm大小的菌丝块转移到20% (v/v) 番茄汁培养液中(郑小波, 1997),将三角瓶置于25°C、黑暗条件下,在转速为100 rpm摇床上振荡培养5 d,收集菌丝体,用吸水纸吸干后冷冻干燥24 h,然后将菌丝研磨成粉状待用。

1.3 寄生疫霉基因组DNA的提取 参照朱衡等(1994)的方法。

1.4 引物的筛选

要求筛选出的引物扩增出的RAPD图谱条带数量适中,条带清晰可辨,主带明显、稳定。供筛选的随机引物300条,均购自上海生工生物工程公司。参试引物编号如下: S16~S100, S131~S300, S331~S335, S340~S345, S361~S365, S416~S425, S450~S456, S490~S495, S500~S505。

1.5 RAPD反应

PCR反应体系总体积25μL,各反应组分终浓度为: 2.5μL的10×buffer, 3.5mmol/l的MgCl₂, 0.15mmol/l的dNTP, 1.2U的Taq酶(promega公司), 10 pmol的primer, 10 ng模板DNA。反应程序为: 94°C预变性4 min; 进循环, 94°C变性10 sec, 37°C退火40 sec, 72°C延伸1 min and 10 sec, 共45个循环; 最后72°C延伸10 min。每次PCR反应均设置不含DNA模板的空白对照。反应结束后取8μL扩增产物于15g/l琼脂糖凝胶中在4V/cm电压下行电泳。在紫外灯下检测PCR产物并拍照。

1.6 数据处理

检查各引物在每个菌株上的扩增图谱,统计可重复性条带,有带记为1,无带记为0。RAPD结果的数据均用PopGene version 1.31聚类分析软件处理,该软件遗传距离和遗传变异分析依据Nei(1978)的公式。

2 结果与分析

2.1 引物的筛选

从300条随机引物中共筛选出条带清晰、可重复性好的13条引物。引物编号及碱基序列和DNA多态性条带见表2。

表2 筛选出的引物以及扩增的DNA条带数

Table 2 Number of fragments amplified with 13 primers selected from 300 random primers
 随机引物 Random primers 碱基序列 (5', -3',) Nucleotide sequences (5', -3',) RAPD条带数 RAPD bands 多态性条带数 Polymorphic bands

引物编号	S47	S75	S98	S132	S144	S147	S170	S225	S300	S361	S493	S503	S504	总数	Total
碱基序列	TTGGCACGGG	GACGGATCAG	GGCTCATGTG	ACGGTACCAG	GTGACATGCC	AGATGCAGCC	ACAACGCGAG	TCCGAGAGGG	AGCCGTGGAA	CATTCGAGCC	GGAGTGGACA	ACACAGAGGG	CCCGTAGCAC	9	10
RAPD条带数	10	11	8	9	13	15	13	11	10	10	10	10	10	139	8
多态性条带数	9	11	8	9	11	8	9	11	8	9	11	8	9	113	13

以上述13条引物对供试的29个菌株进行RAPDs分析。

2.2 DNA指纹图谱特征及菌株来源的相关性分析

利用选定的13条寡核苷酸引物对供试的29个菌株进行遗传标记,获得大量的指纹图谱。如表2所示,供试13条随机引物中,单个引物所标记出的DNA指纹谱带数范围为8~15条,多态性谱带范围在8~15条之间;供试13条引物所标记出的总的DNA指纹谱带数为139条,其中多态性条带133条,多态检测率为95.7%,结果表明供试寄生疫霉菌株表现出丰富的遗传多态性。

以引物S170对不同寄主和地区来源的29个菌株的RAPD电泳结果为例(图1),该引物对29个菌株的RAPD扩增产物的指纹谱带大多集中在250bp~1000bp之间,寄主为普通烟和心叶烟的寄生疫霉的RAPD指纹图谱相似;寄主刺槐的菌株CH1、CH2比CH3、CH4、CH5的谱带多出两条分子量小于500bp的条带,但是在5条主带上基本相同;而寄主为番茄的T1、T2菌株的指纹图谱差异较大,T1仅有3条带,而T2还有另外5条谱带;寄主为腊梅的菌株L1和L2的谱带相同;而寄主为茄子的菌株Q1则与其它不同来源的菌株的谱带表现出较大的差异;寄主分别为丝兰属植物和西番莲的菌株F1、F2和X1、X2的谱带分别相同;而寄主为扶桑的菌株H1又显示与其它菌株有一些差异的谱带。结果表明引物S170对29个寄生疫霉菌株的RAPD指纹图谱有丰富的遗传多态性。

2.3 系统聚类树状图与菌株来源相关性分析

根据所筛选的13条随机引物进行的RAPD指纹图谱分析,采用PopGen Version 1.31聚类分析软件计算菌株间的遗传距离与遗传相似性。根据菌株间的遗传距离绘制了29个供试菌株的系统聚类树状图(图2)。

从图2可知,以遗传距离0.24为阈值将供试29个菌株划分为5个遗传聚类组(I、II、III、IV、V)。寄主为烟草的菌株的遗传相似性在76.5%~92.8%之间,其14个菌株在III聚类组;来自刺槐的5个菌株间的遗传相似性在66.7%~88.4%之间,分别归于IV和V聚类组;寄主为番茄的菌株的相似性为60.9%,而来自腊梅、丝兰属植物的菌株的相似性分别为91.3%和95.6%,寄主为茄子的菌株和扶桑的菌株与其它菌株的相似性分别在29.3%~72.5%和43.0%~84.3%之间(PopGen Version 1.31聚类分析软件计算的菌株间的遗传距离与遗传相似性数据未列出);除茄子菌株Q1和番茄菌株T1因与其它菌株的遗传距离较大而分别单独成一组(I、II)外,来自扶桑、腊梅、番茄的1个菌株(T2)及来自刺槐的2个菌株(CH4和CH5)在同一聚类V。以上结果表明来自同一寄主的菌株间遗传相似性较高,而不同寄主菌株间差别较大。

图2还显示来自南京、云南和山东的普通烟菌株归于同一聚类组III中,而来自同一地区南京的不同寄主的菌株分别在不同的聚类组中,如来自南京的心叶烟菌株N14及刺槐、番茄、腊梅和茄子的菌株分别在5个不同聚类组中,表明寄生疫霉的聚类树状图与菌株的地区来源没有相关性。

3 结论与讨论

利用RAPD标记技术对不同寄主来源的寄生疫霉菌株亲缘关系分析结果表明,多数供试寄生疫霉菌株的遗传结构与其寄主来源具有明显的相关性,而与地理来源并无明显相关性,表明在寄生疫霉与寄主植物的长期协同进化过程中,寄主对病原菌的遗传结构产生了显著的影响。

寄生疫霉寄主范围广泛,在我国除东北烟区外在各烟区均严重发生,在不同地区往往是某一交配型占绝对优势。郑小波等(1989,1990)发现在我国的华东地区主要是A2交配型,而东北、华北和华南地区主要为A1交配型(Ho et al.,1983;郑小波等,1989,1990)。王革等(1997)报道寄生疫霉在云南省除占绝对优势的A2交配型外,另有占14.6%的A0交配型。这些结果说明寄生疫霉在某一地区通常是有性生殖不占优势,有性生殖过程的基因重组可能不是导致寄生疫霉致病力分化和其他生物学性状多样化的主要原因(Ann & Ko,1990;郑小波等,1992)。此外没有证据表明无性重组在疫霉菌的遗传变异中发挥作用(郑小波,1997)。

地理因素和寄主植物是影响病原菌遗传结构变异的主要环境因子。关于地理环境对寄生疫霉菌株多态性的影响已有一些报道。张修国等(2000)利用RAPDs技术对云南省不同地区的烟草黑胫病菌菌株进行了亲缘关系分析,证明不同菌株间具有丰富的遗传多样性,但是黑胫病菌菌株的遗传聚类组的划分与菌株的地理来源没有明显的相关性,表明地理来源不是导致黑胫病菌遗传多样性的主要原因,本文的研究也发现14个烟草黑胫病菌菌株之间的遗传相似性较高,属于同一聚类组,而其余来自不同寄主的菌株间的遗传相似性在50.7%~82.7%之间,其相似性比寄主为烟草的菌株间的相似性小,与张修国等的研究结果相似。推测可能是全国范围内频繁的烟草运输进一步同化了寄主为烟草的寄生疫霉遗传物质,对烟草的生产活动可能已经影响到了病原菌寄生疫霉的遗传背景。

为了进一步澄清寄主植物对寄生疫霉的遗传多样性的影响,我们筛选了不同寄主来源的寄生疫霉菌株进行遗传分析。结果显示寄生疫霉菌株之间的遗传多样性与其寄主来源具有明显的相关性。但是由于寄生疫霉的寄主植物有六十多种,而且很多寄主上的寄生疫霉菌株不易获得,因此本研究选择了寄主分别为烟草、刺槐等9种植物的部分寄生疫霉为材料,但是研究结果已经可以表明寄主来源比其地理来源对寄生疫霉菌株的遗传多样性的影响更大。进一步搜集更多的寄生疫霉菌株对深入阐明寄生疫霉的遗传结构和寄主来源之间的关系具有重要的帮助。

尽管许多植物病原菌种下不同菌株可以侵染多种寄主植物,但是从某种寄主上分离的病原菌通常对其原寄主植物致病力更强,这表明在寄主与病原菌的长期协同进化过程中,寄主对病原菌的长期选择对病原菌的致病力产生了影响,这种影响对病原菌的遗传物质多样性的作用有多大,最终是否会种下群体的划分提供遗传依据,迄今为止未见报道。寄生疫霉菌种下群体的分类比较混乱,多数研究者认为根据其致病性的差异可以分为寄生疫霉烟草变种(*P. parasitica* var. *nicotianae*)和寄生疫霉寄生变种(*P. parasitica* var. *parasitica*)。但是由于变种的划分应该根据其形态学特征而不是致病性,而且对形态学及血清学的研究指出,两个变种间存在许多相似性,不存在变种的差异,因此许多学者对这种分类方法持有争议(郑小波,1997)。本研究的结果表明尽管形态学性状没有明显的差别,但是寄生疫霉的烟草菌株与其它寄主来源菌株之间的确存在一定的遗传距离,本文结果也为将寄生疫霉划分为烟草和寄生两个变种提供了遗传学支持。

参考文献

- Ann P J, Ko W H, 1990. Growth rate and colony morphology of progenies of zoospores and selfed oospores of *Phytophthora parasitica*. *Mycologia*, 82(6): 693 ~ 697
- Ho H H, Yu Yong-nian, Zhuang Wen-ying, Liang Zhi-rong, 1983. Mating types of heterothallic species of *Phytophthora* in China I. *Acta Mycologica Sinica*, 2(3): 187 ~ 191
- Nei M, 1978. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics*

Wang G (王革), Zheng X- B (郑小波), Lu J- Y (陆家云), Li T- F (李天飞), 1997. On virulence differentiation of the causal organism of tobacco black shank in Yunnan province. Journal of Nanjing Agricultural University (南京农业大学学报), 20(4): 30~35 .(in Chinese)

Wang Z- F (王智发), Liu Y- R (刘延荣), Xie C- S (谢成颂), 1987. A identification of physiological races of the black shank pathogen (*Phytophthora parasitica* var. *nicotianae*) in China. Journal of Shandong Agricultural University (山东农业大学学报), 18(1): 1~8. (in Chinese)

Zhang X- G (张修国), Luo W- F (罗文富), Yang Y- L (杨艳丽), Zhang S- G (张世光), Zhang T- Y (张天宇), 2000. Genetic relationships of *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae* analysed by RAPD. Mycosystema (菌物系统) 19(1): 39~44. (in Chinese)

Zheng X- B (郑小波), 1997. General studies and the research techniques on *Phytophthora*. Beijing: China Agricultural Press (中国农业出版社), 1~123. (in Chinese)

Zheng X- B (郑小波), Lu J- Y (陆家云), 1989. Studies on *Phytophthora* species in Fujian, Zhejiang, Jiangsu and Shanghai Acta Mycologica Sinica (真菌学报), 8(3): 161~163. (in Chinese)

Zheng X- B (郑小波), Lu J- Y (陆家云), 1990. Distribution of *Phytophthora* species and mating type in east and northeast of China. Journal of Nanjing Agricultural University (南京农业大学学报), 13(3): 61~64.. (in Chinese)

Zheng X- B (郑小波), Lu J- Y (陆家云), 1992. Genetics of *Phytophthora drechsleri* II: The inheritance of mating types. Acta Mycologica Sinica (真菌学报), 11(2):134~141. (in Chinese)

Zhu H (朱衡), Qu F (瞿峰), Zhu L- H (朱立煌), 1994. Isolation of genomic DNAs from fungi using benzyl chloride. Acta Mycologica Sinica (真菌学报), 13(1): 34~40. (in Chinese)

Zhu X- C (朱贤朝), Guo Z- Y (郭振业), Liu B- A (刘保安), 1987. A identification of physiological races of the black shank pathogen (*Phytophthora parasitica* var. *nicotianae*) in Shandong province. Acta Phytopathologica Sinica (植物病理学报), 17(2): 90~95. (in Chinese)

编辑: 作者: 来源: 加入日期: 2004-8-18 16:41:

[发送给好友](#)

■相关链接

- [中国森林病虫害防治现状与展望](#)
- [江苏省农作物病害发生防治概况](#)
- [植物抗病相关基因研究进展](#)
- [利用RGA-PCR方法进行水稻抗瘟基因分子标记](#)
- [水稻品种抗瘟遗传多样性研究](#)
- [小麦赤霉病*Gibberella zeae*抗多菌灵种群动态变化](#)
- [A major gene for resistance to carbendazim in field isolates of *Gibberella zeae* from China](#)
- [玉蜀黍赤霉的营养亲和性及其对多菌灵的抗性在菌丝融合过程中的遗传学研究](#)