

马铃薯和番茄晚疫病菌全基因组 DNA 的 RAPD 多态性分析

张艺萍¹, 罗文富^{2*}, 杨艳丽²

(1. 云南省农业科学院花卉研究所, 云南 昆明 650205;

2. 云南农业大学, 云南省植物病理重点实验室, 云南 昆明 650201)

摘要: 对采集自云南省元谋等9个县的35个马铃薯和番茄晚疫病菌株用RAPD的方法进行了分子指纹的研究。马铃薯晚疫病菌和番茄晚疫病菌全基因组DNA指纹研究结果表明, 两类晚疫病菌有丰富的遗传多态性, 在不同的相似水平上可以划分为许多不同的遗传组群。来自不同寄主的菌株间有一定的遗传差异, 但马铃薯晚疫病菌和番茄晚疫病菌不能完全划分为两个不同的组群, 而是交叉分布在不同的遗传组群中。

关键词: 致病疫霉; 马铃薯; 番茄; 遗传多态性; RAPD

中图分类号: S 436.412 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-390X(2007)03-0352-06

Research on the Genetic Diversity of *Phytophthora infestans* from Potato and Tomato

ZHANG Yi-ping¹, LUO Wen-fu², YANG Yan-li²

(1. Flower Institute, Yunnan Agricultural Academy of Sciences, Kuiming 650205, China;

2. The Key Laboratory for Plant Pathology of Yunnan Province, Y A U, Kunming 650201, China)

Abstract: This paper is researched on the molecular fingerprint of 35 isolates of *Phytophthora infestans* from 9 counties of Yunnan province by RAPD. The results showed the isolates from potato and tomato had abundant genetic diversity. The analysis of clustering indicated all isolates were clustered into different genetic similarity group at different similarity level. It is showed the isolates from potato and tomato had genetic difference. But the isolates from potato and tomato could not clustered into two different genetic group, they could clustered different genetic group.

Key words: *Phytophthora infestans*; potato; tomato; genetic diversity; RAPD

近年来利用分子生物技术,对马铃薯晚疫病菌进行了分子指纹的研究,绘制晚疫病菌的连锁图谱;分析一个地区晚疫病菌的基因结构及其变化;分析采自不同寄主上的菌株基因结构的差异;研究晚疫病菌的来源;研究有性生殖的发生情况^[1]。

RAPD(Random Amplified Polymorphic DNAs)即随机引物多态性DNA,是由WILLAMS等于1990年发展起来的一项新的分子标记技术,其技术的本质是PCR反应^[2]。RAPD技术在晚疫病菌中多用

于研究种内群体遗传分析。MAHUKU对1994~1996年采自加拿大的141个菌株进行RAPD分析,将其分为21个组,分析表明97%的变异来自于种群内,3%变异来源于种群间^[3]。GHINIRE对尼泊尔致病疫霉的菌株进行RAPD分析,将两种交配型划分为不同的组群^[4]。

笔者曾用交叉接种的方法对来自马铃薯和番茄的晚疫病菌进行寄主专化性的研究,表明两类晚疫病菌中都含有一定数量的菌株具有寄主专化性

收稿日期: 2006-09-20 * 通讯作者

作者简介: 张艺萍(1977-),女,云南大理人,硕士,主要从事花卉病害方面的研究。 E-mail:blackfarinj@126.com

(未发表),本研究采用 RAPD 分子指纹分析方法,对来自不同地区的 35 个马铃薯和番茄晚疫病菌株进行了遗传多态性的分析。

1 材料与方法

1.1 供试菌株

选取不同地点的马铃薯和番茄两种寄主上的致病疫霉菌株,共 35 个菌株,其中,马铃薯晚疫病菌 22 株,番茄晚疫病菌 13 株(见表 1),用来做分子指纹分析。

表 1 用于 RAPD 标记的致病疫霉供试菌株

Tab. 1 Isolates of *Phytophthora infestans* used for RAPD assay

序号 number	菌株编号 code of isolates	寄主 host	菌株来源 origin of isolates
1	TYN13	番茄 tomato	昆明 Kunming 云南农业大学 YAU
2	TYN14	番茄 tomato	云南农业大学 YAU
3	YTN16	番茄 tomato	云南农业大学 YAU
4	YNT37	番茄 tomato	南农业大学 YAU
5	YTN80	番茄 tomato	云南农业大学 YAU
12	SZ64	番茄 tomato	嵩明县 Songming County 县城附近 Near county
9	JQL44	番茄 tomato	建水县 Jianshui County 曲江 Qujiang
10	JQL59	番茄 tomato	曲江 Qujiang
11	JDZ38	番茄 tomato	东坝 Dongba
13	YWLX21	番茄 tomato	元谋县 Yuanmou County 物贸乡 Wumao Town
6	TLY08	番茄 tomato	通海县 Tonghai County 老鸦营 Laoyaying
7	TLY10	番茄 tomato	老鸦营 Laoyaying
8	TLY45	番茄 tomato	老鸦营 Laoyaying
14	TL01	马铃薯 potato	老鸦营 Laoyaying
15	TL02	马铃薯 potato	老鸦营 Laoyaying
16	TL05	马铃薯 potato	老鸦营 Laoyaying
17	TL07	马铃薯 potato	老鸦营 Laoyaying
18	GSP23	马铃薯 potato	泸西县 Luxi County 圭山 Guishan
19	GSP26	马铃薯 potato	圭山 Guishan
20	GSP27	马铃薯 potato	圭山 Guishan
21	GSP28	马铃薯 potato	圭山 Guishan
22	GSP31	马铃薯 potato	圭山 Guishan
23	GSP32	马铃薯 potato	圭山 Guishan
24	GSP35	马铃薯 potato	圭山 Guishan
25	GSP39	马铃薯 potato	圭山 Guishan
26	PLM24	马铃薯 potato	陆良县 Luliang County 眉毛山 Meimaoshan
27	PLLM40	马铃薯 potato	眉毛山 Meimaoshan
28	PLMJ04	马铃薯 potato	眉毛山脚 meimaoshanjiao
29	PLX52	马铃薯 potato	薛官堡 Xueguanpu
30	PLX61	马铃薯 potato	薛官堡 Xueguanpu
31	PLG11	马铃薯 potato	果河 Guohe
32	PZDN13	马铃薯 potato	中甸县 Zhongdian County 尼西 Nixi
33	PZDL06	马铃薯 potato	喇嘛寺 Lamasi
34	PZDZ27	马铃薯 potato	中心镇 Zhongxin Town
35	MLN06	马铃薯 potato	马龙县 Malong County 农业局种薯基地 Farm of Seed, Agricultural Bureau

1.2 DNA 提取和浓度检测

基因组总 DNA 的提取参考《分子克隆实验指南》中介绍的方法并稍作改进, DNA 浓度的检测参考《分子克隆实验指南》中介绍的方法进行^[5,6]。

1.3 随机引物的筛选

选用 OPA, OPB, OPE, OPF, OPG, OPM, OPN 7 组共 107 个寡聚核苷酸引物(上海生工), 分别扩增从马铃薯和番茄上分离得到的 35 个致病疫霉菌株, 根据扩增结果, 从中筛选出扩增条带多、清晰且重复性好的引物作为本试验的 RAPD 分析扩增引物。

1.4 RAPD 扩增条件

扩增反应采用 25 μ L 反应体系, 其中 10 \times Buffer (pH 9.0 500 mmol/L Tris - HCl, 1.0% Triton X - 100) 2.5 μ L, 25 mmol/L MgCl₂ 2 μ L, 2.5 mmol/L dNTP (Takala 公司) 2 μ L, 2Utaq 酶(上海生工), 每个引物 5 pmol, 10 ~ 30 ng 模板 DNA^[7]。扩增反应在 Eppendorf 热循环仪(Eppendorf 公司)上进行。扩增循环为 94 $^{\circ}$ C 预变性 3 min, 94 $^{\circ}$ C 变性 1 min, 35 $^{\circ}$ C 退火 1 min, 72 $^{\circ}$ C 延伸 2 min, 45 个循环, 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。每个引物均进行 3 次重复扩增。

1.5 扩增产物检测

RAPD 产物每个样品取 10 μ L 在 0.5 \times TBE (pH 7.8 89 mmol/L Tris - Cl, 89 mmol/L 硼酸和 2 mmol/L EDTA) 缓冲液中经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳, 溴化乙锭 (0.5 μ g/mL) 染色后, 置于 Image Master 紫外成像系统(Pharmacia Biotech)上观察并摄像。

1.6 扩增产物的分析方法

1.6.1 DNA 扩增带的统计

电泳图谱中的每一条带(DNA 片段)均为一个

分子标记。代表一个引物结合位点。根据各分子标记的迁移率及其有无转化为二进制数据(0, 1 表), 即有带记为 1, 无带记为 0, 在重复扩增中稳定出现的带无论强弱均记为 1^[8]。

1.6.2 遗传多样性的数据处理

按下列公式计算任意两个物种 X, Y 之间的相似系数和遗传距离, 得出相似性矩阵。 $S = 2 \times N_{xy} / (N_x + N_y) \times 100$, $D = 1 - S/100$ 。其中 S 代表相似系数, D 代表遗传距离, N_{xy} 为模板 X 和模板 Y 经扩增后共有的扩增条带数, N_x 为 X 单独具有的 DNA 扩增条带数, N_y 为 Y 单独具有的扩增条带数。或利用 Statistic 软件, 用非加权组对平均数聚类法 UPGMA (Unweighted pair group method with arithmetic mean) 构建遗传系统树状图谱。

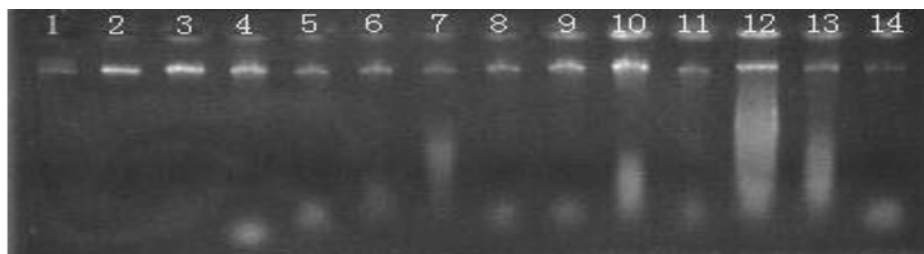
2 结果与分析

2.1 致病疫霉全基因组 DNA 的检测结果

采用本试验提取法获得的总 DNA 片段, 经 0.8% 琼脂糖凝胶电泳, 溴化乙锭染色后, 在 Image Master 紫外成像系统(Pharmacia Biotech)上观察并摄像, 与标准 λ DNA (浓度梯度为 25 ng, 50 ng, 100 ng) 相比较, 估测出样品浓度大约在 25 ~ 100 ng/ μ L, 可以不经稀释直接用于 RAPD 扩增(图 1)。

2.2 引物筛选结果

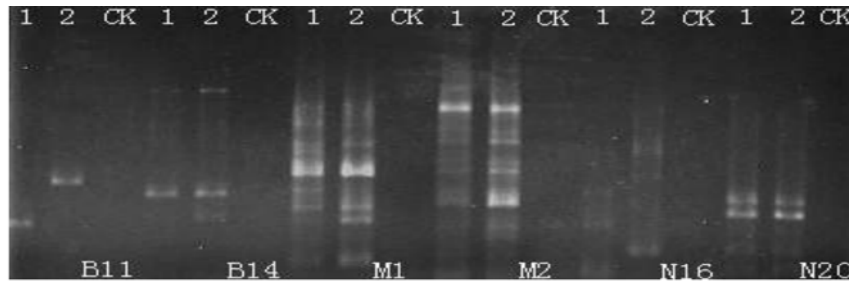
根据扩增结果, 筛选出 6 个扩增较好的引物 OPB - 11, OPB - 14, OPM - 01, OPM - 02, OPN - 16, OPN - 20 作为 RAPD 扩增的引物(图 2)。



1-3泳道分别为标准 λ DNA 的不同浓度梯度: 25 ng, 50 ng, 100 ng; 4-14泳道为不同供试菌株的全基因组 DNA。
Lanes 1-3: Standard λ DNA: 25 ng, 50 ng, 100 ng; Lanes 4-14: DNA of isolates

图 1 供试菌株总 DNA 浓度检测结果

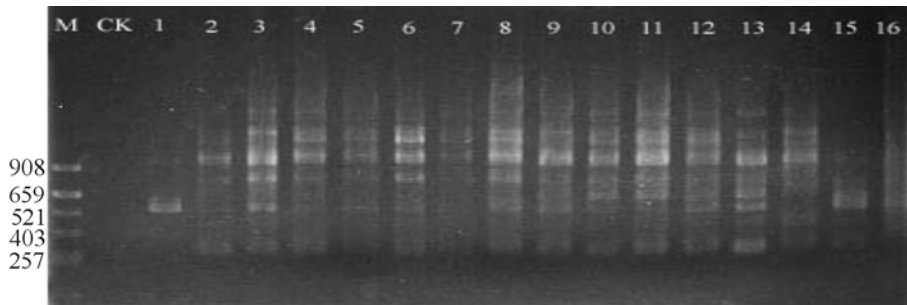
Fig. 1 Concentration of DNA of *Phytophthora infestans* □



CK为阴性对照; 1泳道为马铃薯晚疫病菌株; 2泳道为番茄晚疫病菌株。
CK: Sterilized Water; Lane 1: RAPD amplification of *Phytophthora infestans* from potato;
Lane 2: RAPD amplification of *Phytophthora infestans* from tomato. 1: TL02, 2: TYN13

图2 随机引物筛选的RAPD谱带结果

Fig. 2 Profile of RAPD amplification with different random primer



M为pBR322DNA/AluI Marker; CK为阴性对照; 1~16为部分供试菌株随机引物RAPD扩增结果。
M: DNA Marker; CK: Sterilized Water; Lane 1~16: RAPD amplification of *Phytophthora infestans*
1: PLG11, 2: PLMJ04, 3: PZDN13, 4: PLLM40, 5: GSP39, 6: PLX61, 7: MLN06, 8: PZDL06,
9: YNT37, 10: JDZ38, 11: JQL59, 12: TYN14, 13: YWLX12, 14: JQL44, 15: YNT80, 16: TLY45

图3 部分供试菌株用OPM-01随机引物扩增的RAPD谱带结果

Fig. 3 RAPD amplification of the some isolates with random primer OPM-01

表2 35个菌株中扩增的多态性RAPD谱带数

Tab. 2 Amplified polymorphic DNA bands obtained from 35 isolates

引物 primer	引物序列(5'-3') primer sequence	谱带数 amplified band	多态带数 polymorphic band	遗传多样性值/% genetic diversity
OPB-11	GTAGACCCGT	14	14	100.00
OPB-14	TCCGCTCTGG	7	5	71.43
OPM-01	GTTGGTGGCT	10	8	80.00
OPM-02	ACAACGCCTC	17	16	94.12
OPN-16	AAGCGACCTG	8	7	87.50
OPN-20	GGTGCTCCGT	7	6	85.71
总数 total	6	63	56	88.89

2.3 马铃薯晚疫病菌和番茄晚疫病菌全基因组 DNA 的 RAPD 多态性分析

2.3.1 马铃薯晚疫病菌和番茄晚疫病菌的遗传多态性分析

用筛选的6个引物对35个菌株进行扩增,扩增结果见表2。从表2中可以看出,供试单个引物所标记出的DNA片段范围为7~17,多态性片段

范围在5~16,供试6个引物对35个菌株所标出的总的DNA指纹图带数为63条,表现多态性的带数为56条,多态率为88.89%。

2.3.2 马铃薯晚疫病菌和番茄晚疫病菌多态性与菌株来源的相关性分析

DNA指纹图谱表明不同的引物对供试35个菌株的全基因组DNA进行遗传标记,其DNA指纹

图谱与菌株来源未有直接的相关性,同一引物对来自马铃薯或番茄的致病疫霉菌株全基因组 DNA 进行 PCR 扩增,所标记出的 DNA 指纹图谱相似性较大,但也有一定的差异。对照表 1 和图 3 发现,引物 OPM - 01 对马铃薯上的 PLG11, PLMJ04, PZDN13 菌株和番茄上的 JQL44, YNT80, TLY45 菌株 DNA 的扩增指纹图谱明显不同。但来自马铃薯上的 PZDL06 菌株和番茄上的 YNT37, JDZ38 菌株 DNA 的扩增指纹图谱基本相同,其它引物对受试菌株所标记的 DNA 指纹图谱也有类似的结果。

由以上分析可知,云南省马铃薯和番茄晚疫病菌的全基因组 DNA 存在稳定的遗传多态性。从 DNA 指纹图谱中看出来来自不同寄主的菌株间有一定的遗传差异,这可能是导致两类菌株中部分菌株具有寄主专化性的原因。

2.3.3 不同引物对马铃薯晚疫病菌和番茄晚疫病菌的扩增效果分析

对于供试 35 个样品的 RAPD 标记,不同的引物扩增谱带差异显著,OPM - 02 可扩增出 17 条谱带,OPB - 14, OPN20 均只扩增出 7 条,且谱带数有较大的差异。

引物 OPB - 11 多态检出率为 100%,由此可见该引物的多态性识别位点能力相对较强,可以通过 RAPD 或 SSR 分子标记方法用于该病原菌的广谱多态性和同源性的分析。

2.4 马铃薯晚疫病菌和番茄晚疫病菌株的遗传亲缘关系分析

2.4.1 马铃薯晚疫病菌和番茄晚疫病菌遗传组群的划分

使用 Statistic 软件,应用 UPGMA 非加权组对平均数聚类法,将 6 个引物的扩增带谱记为 0,1 表,进行统计聚类分析。结果见图 4,可以看出,致病疫霉在分子水平上分化很明显。在不同的相似水平可划分为不同的遗传组群,若在 0.61 相似水平上划分,可以将 35 个致病疫霉菌株(22 个来自马铃薯,13 个来自番茄)分为 2 个组群;在 0.63 相似水平上划分,可分为 3 个组群;在 0.65 相似水平

上划分,可分为 4 个组群;在 0.67 相似水平上划分,可分为 5 个组群;在 0.69 划分,可分为 7 个组群;在 0.71 相似水平上划分,可分为 12 个组群;在 0.73 相似水平上划分,可划分 16 个组群。

2.4.2 马铃薯晚疫病菌和番茄晚疫病菌的遗传组群与菌株来源的关系

从图 4 的聚类结果分析,若在 0.76 相似水平上划分,可将 35 个致病疫霉(22 个来自马铃薯,13 个来自番茄)划分为 20 个组群,其中 8 个组群中既包括马铃薯晚疫病菌又包括番茄晚疫病菌株,如来自昆明的番茄菌株 YNT16 和圭山的马铃薯菌株 GSP23,来自通海的番茄菌株 TLY10 和圭山的马铃薯菌株 GSP26,来自建水的番茄菌株 JQL59 和通海的马铃薯菌株 TL02 等都分别聚在同一个组群中,这表明马铃薯晚疫病菌和番茄晚疫病菌可交叉分布在不同的组群中,两类菌株有很近的遗传亲缘关系。

3 讨论

从 DNA 指纹图谱中可以看出番茄晚疫病菌和马铃薯晚疫病菌有十分相近的遗传亲缘关系,云南省的马铃薯和番茄晚疫病菌具有丰富的遗传多样性,来自不同寄主的菌株间有一定的遗传差异,这可能是导致两类菌株中部分菌株具有寄主专化性的原因。

朱杰华等用 RAPD 技术对马铃薯晚疫病菌 A2 交配型的分析认为,马铃薯晚疫病菌的 DNA 多态性与 A2 交配型有一定相关性^[9]。MAHUKU 用 RAPD 划分的致病疫霉组群与由交配型, Gpi 同工酶谱带或对瑞毒霉反应划分的组群并无相关性^[3]。HSIAMANG 用 RPAD 技术对 *Sclerotinia homoeocarpa* 的寄主特异性分析也表明,来自不同寄主上的菌株并不能划分在相同的组群^[10]。这可能与 RAPD 所揭示的 DNA 差异有关, RAPD 指纹标记技术是利用随机引物对供试样品全基因组 DNA 随机扩增,这样可能导致对生物个体的某一特殊 DNA 保守片段不能得到有效的扩增。所以,这方面的工作有待于进一步研究。

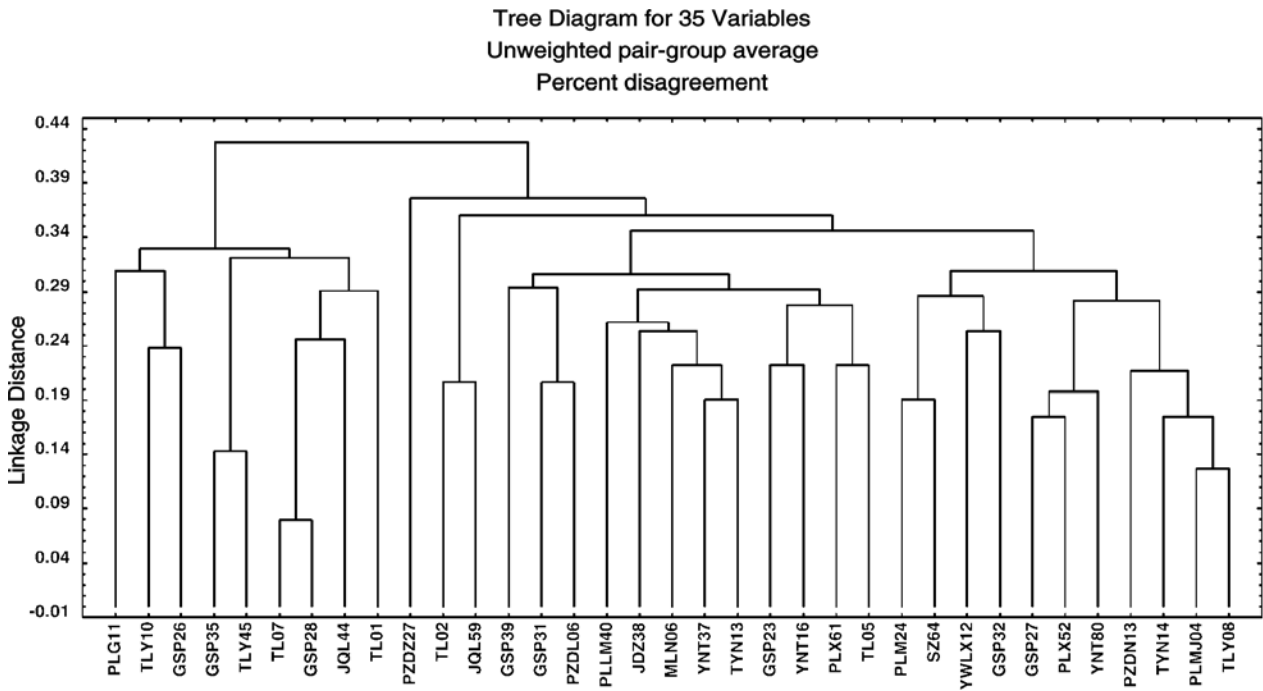


图4 35个致病疫霉菌株RAPD分子指纹聚类分析结果

Fig. 4 Clustering dendrogram based on RAPD amplification of 35 isolates

[参考文献]

[1] 邵铁梅,朱杰华,郑秀银. 现代生物技术在马铃薯晚疫病病菌 (*Phytophthora infestans*) 研究中的应用[J]. 中国马铃薯, 2002, 16(2): 87-91.

[2] WILLAMS J G K., KUBELIK A R., et al. DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers [J]. Nucleic Acids Res., 1990, 18: 6531.

[3] MAHUKU G, PETERS R D, PLATTF H W. Random amplification polymorphic DNA (RAPD) analysis of *Phytophthora infestans* isolates collection in Canada during 1994-1996 [J]. Plant Pathology, 2000, 49: 252-260.

[4] GHINIRE S R, HYDE K D, HODGKISS, I J, et al. Variations in the *Phytophthora infestans* populations in Nepal as revealed by nuclear and mitochondrial DNA polymorphisms [J]. Phytopathology, 2003, 93: 236-243.

[5] J·萨姆布鲁克, E·F·弗里奇, T·曼尼阿蒂斯. 分子克隆实验指南[M]. 金冬雁, 黎孟枫译. 北京: 科学出版社, 1996.

[6] ROADER U, BRODA P. Rapid preparation of DNA from filamentous fungi [J]. Letters in Applied Microbiology, 1985, (1): 17-20.

[7] 傅俊江, 李麓芸, 徐湘, 等. 一种提高 RAPD 技术扩增效率的有效方法 [J]. 遗传, 2000, 22(4): 251-252.

[8] 彭秀玲, 袁汉英. 基因工程实验技术 (第2版) [M]. 长沙: 湖南科学技术出版社, 1997.

[9] 朱杰华, 伍宁丰. 马铃薯晚疫病病菌 A2 交配型与 DNA 多态性相关关系研究 [J]. 河北农业大学学报, 2001, 24(2): 77-89.

[10] HSIANG T, MA X L, YANG L, et al. Analysis of RAPD data for detection of host specialization in *Sclerotinia homoeocarpa* [J]. Plant pathology, 2000, 49: 269-275.