

葡萄孢菌全基因组 DNA 遗传多态性 RAPD 分析

Analysis the Genetic Divergence of *Botrytis* by RAPD^{*}

吴德喜¹ 王 扬¹ 王学英¹ 张立新² 黄国品³ 孔令平³

(1 云南农业大学, 云南省植物病理重点实验室, 昆明 650201)

(2 云南省林业科学院, 昆明 650204) (3 云南省烟草鲁甸县公司, 鲁甸 657100)

中图分类号: Q 949.331⁺.3; Q751 文献标识码: A 文章编号: 1004-390X(2000)03-0282-02

应用随机扩增多态性 DNA(RAPD)分子标记技术,从 Operon Technologies 公司的 OPA 和 OPB 组随机引物中筛选出 OPA01, OPA02, OPA05, OPA06, OPA07, OPA11, OPA12, OPA13, OPA18, OPA19, OPB01, OPB06, OPB20 等 13 个寡聚核苷酸引物,对采自云南、西藏、四川等地的 B01, B02 两种不同寄主的 *B. cinerea* 和 B03 (*B. vieiao*), B05 (*B. convoluta*), B06 (*B. linzhii*), B10 (*B. paeoniae*), B11 (*B. paeonialla*), B12 (*B. yunnanensis*), B13 (*B. multiformis*), B14 (*B. acladiopsis*)等 10 个 *Botrytis* 属菌种以及 B09 (*Homobotrys fagapyruma*)全基因组 DNA 进行随机扩增,进行遗传相似性分析,现将结果简要报告如下:

1 材料与方法

1.1 DNA 提取检测

供试菌株在 PDA 平皿培养基上培养后收集菌丝,液氮冷冻磨碎,采用酚、氯仿 DNA 抽提法,最后 DNA 加 TE 缓冲液溶解,电泳法检测浓度后统一稀释成大约 10~40 ng/ μ L 浓度 DNA 液冰冻备用。

1.2 引物筛选

用 OPA, OPB 组,共 40 个寡核苷酸引物,分别扩增含有 11 种菌 DNA 的混合模板,从中筛选出效果良好的引物用于供试菌种全基因组 DNA 随机扩增。

1.3 RAPD 扩增

RAPD 反应体系:2 μ L 反应缓冲液(10 mmol/L Tris-HCl pH 9.0, 50 mmol/L KCl, 1.5 mmol/L MgCl₂, 0.01% 明胶, 0.1% TritonX-100)(华美生物工程公司), 0.2 mmol/L 每种 dNTPs(Pharmacia Biotech), 0.5 pmol 引物, 0.5 U Taq DAN 聚合酶, 10~40 ng 模板 DNA。扩增程序:94 $^{\circ}$ C, 5 min, 1 个循环;94 $^{\circ}$ C, 1 min, 36 $^{\circ}$ C, 2 min, 72 $^{\circ}$ C, 2 min, 45 个循环;最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。PCR 扩增仪:Hema 880 型基因扩增仪(珠海黑马医学仪器公司)。

扩增完毕,在 1.5% 琼脂糖凝胶(含 0.5 ng/mL EB)中电泳 3.5 h(0.5 \times TBE 电泳缓冲液,电压 3 V/cm),紫外观察,计算机采集记录结果。

1.4 扩增结果分析

首先,将电泳图谱中的每一条带进行 1(有带)、0(无带)转化,然后根据 Nei 和 Li 的公式相似性系数 $S_{xy} = 2N_{xy}/(N_x + N_y)$ (N_{xy} 是个体 X 和个体 Y PCR 扩增后分子量相同的 DNA 片段总数, N_x 、 N_y 分别是样本 X, 样本 Y PCR 扩增产物的 DNA 片段总数),遗传距离 $D = 1 - S_{xy}$ 分析计算相似性系数、遗传距离,进行遗传多态性水平的度量分析。

2 结果与分析

13 个引物共扩增出 152 条 200~2 000 bp RAPD 片段,其中多态性片段 145 条,多态率 95.39%(附表)。对多态性片段采用 Nei 和 Li 的

* 收稿日期: 2000-04-18

作者简介: 吴德喜(1969-),男,云南马龙人,讲师,主要从事真菌资源研究和利用。

公式计算相似性系数、遗传距离如附表。

附表 11 个供试菌种的相似性(上半部分)和遗传距离(下半部分)

Tab. Matrix with similarity S (top half) and genetic D (bottom half) among 11 species

D/S _{xy}	B01	B02	B03	B05	B06	B09	B10	B11	B12	B13	B14
B01	-	81.19	73.91	59.13	57.14	33.06	57.14	56.86	51.92	50.51	47.92
B02	0.188 1	-	80.90	66.07	62.07	32.20	56.88	64.65	55.45	56.25	51.61
B03	0.260 9	0.191 0	-	66.02	63.55	29.36	54.00	60.00	52.17	62.07	54.76
B05	0.408 7	0.339 3	0.339 8	-	87.69	28.79	63.41	65.49	67.83	60.00	57.94
B06	0.428 6	0.379 3	0.364 5	0.123 1	-	27.94	62.99	61.54	62.18	57.89	55.86
B09	0.669 4	0.678 0	0.706 4	0.712 1	0.720 6	-	32.56	31.93	31.40	32.76	37.17
B10	0.428 6	0.431 2	0.460 0	0.365 9	0.370 1	0.674 4	-	69.09	66.07	61.68	63.46
B11	0.431 4	0.353 5	0.400 0	0.345 1	0.384 6	0.680 7	0.309 1	-	68.63	61.86	57.45
B12	0.480 8	0.445 5	0.478 3	0.321 7	0.378 2	0.686 0	0.339 3	0.313 7	-	62.63	60.42
B13	0.494 9	0.437 5	0.379 3	0.400 0	0.421 1	0.672 4	0.383 2	0.381 4	0.373 7	-	74.73
B14	0.520 8	0.483 9	0.452 4	0.420 6	0.441 4	0.628 3	0.365 4	0.425 5	0.395 8	0.252 7	-

结果是 2 种不同寄主 *B. cinerea* B01 和 B02 之间遗传距离为 0.188 1, 相似率 81.19%; 10 个 *Botrytis* 之间平均遗传距离为 0.379 8, 相似率 62.02%; 形态上与 *Botrytis* 较为相似的 *Homobotrys fagapyruma* B09 和 10 个 *Botrytis* 之间平均遗传距离为 0.682 9, 相似率 31.71%。

遗传距离和相似率分析初步表明,从形态学分类地位的 *Botrytis* 种内遗传相似率在 80% 左右,种间遗传相似率在 60% 左右,相似属间遗传相似率在 30% 左右。

3 讨论

随机扩增多态性 DNA (Random Amplified Polymorphic DNA) 是由 Williams 和 Welsh 两个研究小组几乎同时建立和发展起来的一项 DNA 分

子水平上的大分子多态性检测技术 RAPD 以通常为 10 bp 长度的寡聚核苷酸为随机引物,通过 PCR 进行 DNA 扩增。由于 RAPD 具有简便、灵敏、对材料要求不高等特点,被广泛用于物种的分类及进化研究^[1]。

在真菌的分类、进化研究中,RAPD 用于种内不同菌株和属内不同种间的鉴定研究报道较多^[2,3,4]。而用于相似属鉴定则未见报道。本文相似属间遗传差异最大,证明了王学英等人鉴定的在形态上与 *Botrytis* 相似的 *Homobotrys fagapyruma* (待发表)和葡萄孢属菌种之间确实有较大的遗传差异。同时,通过本文对 *Botrytis* 种间、种内研究结果和 C.J.B. Van Der Vlugt-bergmans 等人的研究证明^[5],RAPD 技术对葡萄孢菌的遗传分类研究还是比较适合。