

利用 Nt 突变体和 RAPD 标记研究玉米弯孢叶斑病菌的营养体亲和性

窦艳萍, 武忠伟, 王振河, 赵现方 (河南科技学院生命科学学院, 河南新乡 453003)

摘要 分别利用 Nt 突变体技术和 RAPD 标记, 对来自河南省不同地区的 10 个新月弯孢菌株的营养体亲和性进行了研究。结果显示: 利用 Nt 突变体技术将供试菌株分为 3 个 VCGs; 利用 RAPD 标记, 以 0.5 为阈值将供试菌株分为 3 个遗传类型; 来自同一个 VCGs 的菌株属于同一个遗传类型, 表明 Nt 突变体技术可用于玉米弯孢叶斑病菌菌株间亲缘关系的研究。

关键词 玉米弯孢叶斑病菌; Nt 突变体; RAPD 标记; 营养体亲和性

中图分类号 S435.131 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2006)19-4859-02

Study on Vegetative Compatibility of Maize Curvularia Leaf Spot Fungus with Nt Mutants and RAPD Fingerprint

DOU Yan-ping et al (Department of Bio-engineering, Henan Institute of Science and Technology, Xinxiang, Henan 453003)

Abstract Vegetative compatibility of 10 isolates of *Curvularia lunata* from different areas of Henan province was analyzed with nitrate non-utilizing (Nt) mutants and RAPD fingerprints techniques. Results showed: All isolates belonged to 3 different vegetative compatibility groups (VCGs). The isolates mentioned above can be divided into 3 genotypes based on threshold 0.5 of genetic distance with RAPD fingerprint. The isolates involved in the same VCG also belonged to one genotype. The results indicated that Nt mutant technique could be used in the study on the genetic relationships among isolates of maize *Curvularia* leaf spot fungus.

Key words Maize *curvularia* leaf spot fungus; Nt mutant; RAPD fingerprint; Vegetative compatibility

营养体亲和性是病原真菌较为稳定的遗传特征, 由于基因连锁关系, 一些具有营养体亲和性的基因就可能成为高频率的基因。利用营养体亲和性技术可以研究病原真菌的种内分化, 进而了解病害流行趋势并对其进行监测, 尽早做好预防工作。Puhalla^[1] 最先提出用营养体亲和群(VCG)来划分尖孢镰孢的不同专化型, 主要根据硝酸盐利用缺陷型突变株(Nt 突变体)的配对互补现象, 判断菌株间的遗传相似性, 进而将其归为不同的营养体亲和群。VCG 技术对于研究未知其有性世代的半知菌菌株间的遗传关系有重大意义。

DNA 随机扩增多态性(RAPD)分析是基于 PCR 原理的一种分子生物学技术, 可用于真菌的遗传多态性研究。这已在很多真菌的研究中得以证实, 如镰刀菌^[2]、大麦白粉病菌^[3]、稻瘟病菌^[4]、玉米灰斑病菌^[5]和高粱丝黑穗病菌^[6]等。

笔者分别利用 Nt 突变体技术和 RAPD 标记对来自河南省不同地区的新月弯孢菌株进行研究, 以了解其遗传背景, 为该病害的预测预报和玉米抗病育种工作提供理论依据。

1 材料与方 法

1.1 供试菌株 从河南省不同玉米种植区分离出 10 个新月弯孢(*Curvularia lunata*) 分离物(表 1)。

表 1 供试菌株及其地理来源

菌株	来源	菌株	来源
XY1	信阳	ZK2	周口
LH1	漯河	ZK3	周口
LH2	漯河	XX1	新乡
LH3	漯河	XC1	许昌
ZK1	周口	JZ1	焦作

1.2 利用 Nt 突变体测营养体亲和性

1.2.1 培养基。PDA 培养基: 用于菌株的分离, 单孢纯化, 培养及保存; KPS 培养基(PSA + KClO₃): 用于 Nt 突变体的诱导; MM 培养基: 用于 Nt 突变体的鉴定; MO₂ 培养基、MH 培

培养基: 用于 Nt 突变体类型的划分。后 3 种培养基的配方见文献 [1]。

1.2.2 Nt 突变体的诱导和鉴定。将供试菌株在 PDA 培养基上活化, 挑取菌落边缘幼嫩菌丝块约 2 mm², 接种于含 2.0% KClO₃ 的 KPS 培养基上, 在 25℃ 恒温暗培养, 观察菌落生长情况。如出现不规则生长(非辐射状菌落), 假定其为 Nt 突变体。在每一不规则菌落区的边缘挑取菌丝, 转入 MM 培养基, 若不产生气生菌丝或菌落很薄, 证明其形成了硝酸盐营养缺陷型(Nt)突变体, 之后将其转入 PDA 斜面, 保存备用。

1.2.3 Nt 突变体生理表型的划分。将稳定的 Nt 突变株分别转入 MO₂ 和 MH 培养基。根据突变株对 2 种培养基中氮源的利用能力, 将其分为不同的生理表现类型(表 2)。

表 2 不同类型 Nt 突变体的表现型

突变体类型	不同氮源培养基上的生长情况	
	MO ₂	MH
Nt1	+	+
NtM	+	-
Nt3	-	+

注: + 表示有明显气生菌丝产生, - 表示菌丝只在培养基内扩展。

1.2.4 营养体亲和性的测定。在 MM 平板中央放置某菌株的任一个特殊类型(NtM 或 Nt3)突变体, 周围近等距离放置其他菌株的 Nt1 型突变株, 间距约 1.5 cm, 于 25℃ 下黑暗培养。如在 2 菌株的突变体菌落交界处有明显的气生菌丝形成, 表明这 2 个菌株属于同一营养体亲和群(VCG); 反之, 2 菌株属于不同的营养体亲和群。

1.3 RAPD 扩增

1.3.1 基因组 DNA 的提取与检测。将供试菌株在 PDA 平板上活化, 用无菌水洗菌丝配成孢子悬液。取适量孢子悬液接种于盛有 100 ml PD 培养液的三角瓶中, 置于 29℃ 恒温摇床, 130 r/min 振荡培养 4~5 d。用无菌纱布过滤获取菌丝, 根据 CTAB 法提取菌丝基因组 DNA。取 5 μl 模板 DNA 经 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 的有无, 之后置于 -20℃ 冰箱中保存。

1.3.2 引物筛选。从由上海生物工程有限公司合成的 60 条 10 bp 随机引物中筛选出带型清晰、重复性好的 8 条(表

基金项目 河南科技学院重点科研基金资助项目。

作者简介 窦艳萍(1977-), 女, 内蒙古达拉旗人, 讲师, 从事微生物学研究。

收稿日期 2006-06-25

3), 用于供试菌株的 RAPD 扩增和 DNA 图谱分析。

表3 引物及其碱基组成

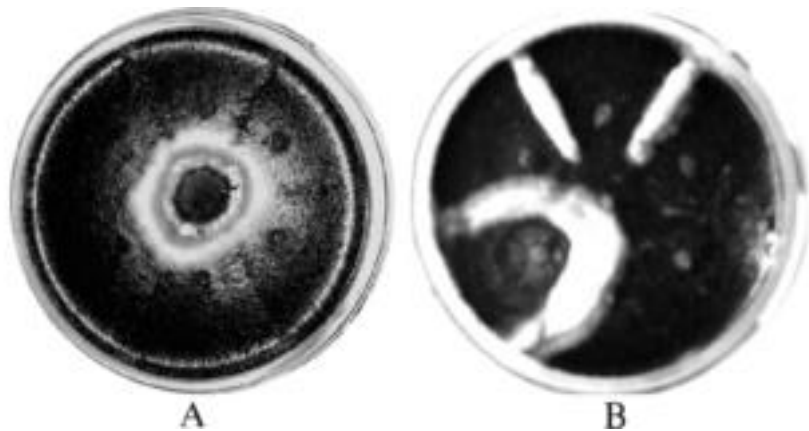
引物	碱基组成(5-3)	引物	碱基组成(5-3)
S8	GTCACACGG	S6	AGCCAGCGAA
S18	CCACAGCAGT	S7	GACCGCTGT
S20	GGACCCCTAC	S13	GTCGCCGTC
S22	TGCCGAGCTG	S1	AGCGCCATTG

1.3.3 RAPD 扩增。采用 25 μ 反应体系:10 \times PCR 反应缓冲液 2.5 μ ;10 mmol/L dNIP 2 μ ;10 μ mol/L 随机引物 1 μ ;2.5 U Taq 酶 0.5 μ ;模板 DNA 1 μ ;重蒸水 18 μ 。反应循环参数为:94 变性 2 min;94 变性 20 s,35 退火 30 s,68 延伸 1 min,共 40 个循环;最后 68 延伸 6 min。取扩增产物 10 μ ,加 2 μ 上样缓冲液混匀,点入含溴化乙锭(EB)的 1.0% 琼脂糖凝胶孔中,在 1 \times TAE 缓冲液中电泳,之后在 254 nm 紫外光下检测。200 bp DNA ladder 为北京天为时代科技有限公司产品。

1.3.4 数据分析。利用 DPS 统计软件的 UPGMA 法(非加权配对算术平均法)处理结果,得到所有供试菌株的亲缘关系聚类图。

2 结果与分析

2.1 利用 Nt 突变体划分营养体亲和群 将来自不同分离株的不同类型的 Nt 突变体配对培养时得到了明显的亲和现象(图1),即两型突变体菌落交界处形成了旺盛的气生菌丝带。对 10 个供试菌株两两测定,将其划分为 3 个营养体亲和群(VCGs)。XY1、LH2、LHB、ZK1、XC1 和 ZK2 属于 VCG1;LH1、XX1 和 JZ1 属于 VCG2;ZK3 单独属于 VCG3。测定结果表明:新月弯孢菌种内不同分离株间遗传背景有差异;Nt 突变体技术可以用于玉米弯孢病菌营养体亲和



注:A.NtM 型突变体与周围的 Nt1 型突变体间产生的旺盛白色气生菌丝带;B.NtM 型突变体与周围的 Nt1 型突变体间,及 Nt1 型突变体间的旺盛白色气生菌丝带。

图1 不同菌株的两型突变体间的亲和现象

群的划分,菌株间亲和与否很容易判断。

2.2 利用 RAPD 标记划分遗传类型 对 10 个测试菌株的菌丝基因组进行 DNA 扩增,利用 DPS 软件处理结果,得到其遗传距离聚类图(图2)。在遗传距离 0.5 处,将测试菌株分为 3 类:XY1、LH2、LHB、ZK1、XC1 和 ZK2;LH1、XX1 和 JZ1;ZK3。由图 2 可以看出,除菌株 XY1 与 LH2、LHB 与 ZK1 间有较近的亲缘关系外,其他菌株间的亲缘关系均较远,尤其是 ZK3 单独属一个遗传类型,在遗传距离 1.00 处才与其他测试株归为一个遗传组。这表明新月弯孢菌种内存在明显的遗传分化。

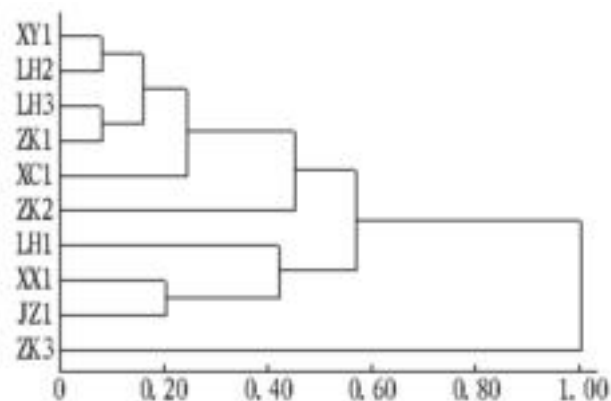


图2 测试菌株的遗传聚类

3 小结与讨论

利用 Nt 突变体进行营养体亲和性测定时,部分 Nt1 型突变体间也出现了白色气生菌丝带,其原因有待进一步研究。不同菌株两型突变体间的亲和测定将供试菌株分为 3 个 VCG,RAPD 扩增后进行遗传聚类也将供试菌株分为 3 个遗传类型,且 3 个 VCG 与 3 个遗传类型相对应。因此,Nt 突变体技术可用于玉米弯孢叶斑病菌营养体亲和性的研究。该方法具有费用低、操作简便、结果容易识别等优点,结合 DNA 的分子标记技术可以更好地了解病原菌的遗传背景。2 种技术研究的结果均表明,来自河南省的玉米弯孢叶斑病菌存在遗传分化现象。因此,要提高警惕,以防气候条件变化、品种更换等造成该病害再度流行和暴发。

参考文献

- [1] PUHALA J E. Classification of *Fusarium oxysporum* on the basis of vegetative compatibility[J]. *Can J Bot*, 1985, 63: 179 - 183.
- [2] BENILEY S, PEGG K G, DALE J L. Genetic variation among a world wide collection of isolates of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* analyzed by RAPD PCR fingerprinting[J]. *Mycological Research*, 1995, 99(11): 1378 - 1384.
- [3] WOLFE M S, BRANDLE U, KOLLER B, et al. *Balea mildew* in Europe: population biology and host resistance[J]. *Euphytica*, 1992, 63(2): 125 - 139.
- [4] 鲁国东, 王宝华, 赵志颖, 等. 福建稻瘟菌群体遗传多样性 RAPD 分析[J]. *福建农业大学学报*, 2000, 29(1): 54 - 59.
- [5] 王桂清, 高增贵, 唐树戈, 等. 玉米灰斑病菌的遗传多样性研究[J]. *植物病理学报*, 2005, 35(1): 187 - 189.
- [6] 徐秀德, 董怀玉, 姜钰, 等. 高粱丝黑穗病菌种内分化的 RAPD 分析[J]. *菌物系统*, 2003, 22(2): 56 - 61.