

不同来源辣椒疫霉菌的遗传多样性分析

孙文秀, 张修国* (1. 长江大学生命科学学院, 湖北荆州 434025; 2. 山东农业大学植保学院植物病理系, 山东泰安 271018)

摘要 [目的] 探索来自辣椒寄主和土壤的辣椒疫霉菌的遗传多样性。[方法] 通过利用12个10碱基随机引物对来自我国4个不同地理区域的22个辣椒疫霉菌株的亲缘关系进行RAPD分析。[结果] 受试22个菌株共产生101条谱带, 其中多态性为99条, 占98.02%, 说明受试辣椒疫霉菌具有丰富的遗传多样性。根据引物扩增的DNA指纹图谱, 运用UPGMA分析法, 以遗传相似系数0.5为阈值, 将供试22个菌株划分为3个遗传聚类组(I、II、III)。RAPD标记技术分析表明, 来辣椒寄主和土壤的菌株的全基因组DNA扩增图谱差异很大。[结论] 供试菌株具有丰富的遗传多样性, 来自不同遗传背景的菌株差异显著, 聚类组的划分与菌株的来源有一定的相关性。

关键词 辣椒疫霉菌; 遗传多样性; DNA指纹图谱

中图分类号 S436.481.1+9 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2008)16-06695-03

Analysis of Genetic Diversity of *Phytophthora capsici* from Different Sources

SUN Wen-xiu et al (College of Life Science, Yangtze University, Jingzhou, Hubei 434025)

Abstract [Objective] The research aimed to explore the genetic diversity of *Phytophthora capsici* from pepper host and soil. [Method] Through using twelve 10-base random primers, the genetic relationships of 22 strains of *Phytophthora capsici* from 4 different areas in China were analyzed by RAPD. [Result] 22 tested strains produced 101 spectral bands, in which polymorphisms were 99, accounting for 98.02%, which indicated that the abundant genetic diversities existed among the tested *Phytophthora capsici*. By using UPGMA analysis, with the genetic similarity coefficient 0.5 as the threshold, the 22 *Phytophthora capsici* were classified into three cluster groups (I, II, III) according to the DNA fingerprints spectrum of primer amplification. The RAPD marker technology showed that large differences existed in the DNA amplified spectrum of complete genome of strains from pepper host and soil. [Conclusion] The tested strains had abundant genetic diversities. Strains from different genetic backgrounds were notably different. There was certain relationship between the classification of cluster groups and the sources of strains.

Key words *Phytophthora capsici*; Genetic diversity; DNA fingerprint spectrum

辣椒疫病(*Phytophthora capsici* Leonion) 是重要的辣椒根茎病害之一, 在我国各辣椒生产区发生程度逐年加重, 严重年份给辣椒生产造成巨大的经济损失。Lanour 等利用 RFLP 技术对墨西哥 7 个地区的辣椒疫霉菌进行了时空遗传结构的调查和分析, 发现不同地区之间的辣椒疫霉菌存在分散的异型杂交和不频繁的基因漂移现象^[1-2]。Silva 等对西班牙西北部地区的辣椒疫霉菌株的 RAPD 遗传多样性进行了分析, 结果表明 RAPD 结果与其致病力没有明显的相关性^[3]。我国学者除张修国等^[4]和王建营等^[5]分别对我国烟草寄生疫霉(*P. parasitica* var. *nicotiana*) 和苕麻疫霉(*P. boehmeriae*) 的群体遗传变异与时间、空间的关系进行了分析外, 对该类病原真菌基因型的研究资料积累较少。辣椒疫霉(*P. capsici*) 除谢丙炎等^[6]和王源超等^[7]分别开展过分子生物学研究外, 尚未开展其群体遗传变异及其基因型划分的研究。前人只对辣椒寄主上辣椒疫霉菌的相关特征进行了研究, 而对土壤中辣椒疫霉菌则研究较少, 对两者遗传多样性的研究国内外均未见报道。

核酸分子生物学技术的发展为人们利用遗传物质 DNA 的多态性对物种的亲缘关系进行分析提供了便利。目前, DNA 分子杂交、RAPD、RFLP 和 AFLP 等技术已广泛应用于疫霉菌的分类、演化和检测。RAPD 方法方便、快速、灵敏, 分析遗传信息量大, 能够识别 DNA 链上多态性片段, 并广泛应用于卵菌的遗传多态性的分析^[8-10]。笔者在发现寄主和土壤中辣椒疫霉菌形态上有差异后, 利用 RAPD 技术对分别来自辣椒寄主和土壤的辣椒疫霉菌的遗传多样性进行了研究。

1 材料与方 法

1.1 供试菌株 选用来自杭州、武汉、长沙和广州地区辣椒

病株和病土中的 22 个辣椒疫霉菌株, 用于总 DNA 提取和指纹图谱分析。其中来自寄主上辣椒疫霉菌株由组织分离法获得, 而来自土壤中的辣椒疫霉菌株用组织诱饵法(SHZPH 43、SHZPH18、SHZPH06、SCSPH14、SCSPH08、SCSPH03) 和平板稀释法(SGDPH44、SGDPH51、SHZPH53、SHZPH17) 获得。其菌株编号、来源和采集地点见表 1。

表 1 供试辣椒疫霉菌株编号、来源和采集地点

Table 1 Strain number, sources and sampling site of tested *P. capsici*

菌株编号	来源	采集地点
Strain No.	Source	Sampling site
SGDPH44	土壤 Soil	广东广州 Guangzhou, Guangdong
SGDPH51	土壤 Soil	广东广州 Guangzhou, Guangdong
GDPH07	寄主 Host	广东广州 Guangzhou, Guangdong
GDPH17	寄主 Host	广东广州 Guangzhou, Guangdong
GDPH72	寄主 Host	广东广州 Guangzhou, Guangdong
SCSPH14	土壤 Soil	湖南长沙 Changsha, Hunan
SCSPH08	土壤 Soil	湖南长沙 Changsha, Hunan
SCSPH03	土壤 Soil	湖南长沙 Changsha, Hunan
HBPH08	寄主 Host	湖北武汉 Wuhan, Hubei
HBPH06	寄主 Host	湖北武汉 Wuhan, Hubei
HBPH03	寄主 Host	湖北武汉 Wuhan, Hubei
HBPH15	寄主 Host	湖北武汉 Wuhan, Hubei
SHZPH43	土壤 Soil	浙江杭州 Hangzhou, Zhejiang
SHZPH18	土壤 Soil	浙江杭州 Hangzhou, Zhejiang
SHZPH06	土壤 Soil	浙江杭州 Hangzhou, Zhejiang
SHZPH53	土壤 Soil	浙江杭州 Hangzhou, Zhejiang
SHZPH17	土壤 Soil	浙江杭州 Hangzhou, Zhejiang
HZPH34	寄主 Host	浙江杭州 Hangzhou, Zhejiang
HZPH54	寄主 Host	浙江杭州 Hangzhou, Zhejiang
HZPH31	寄主 Host	浙江杭州 Hangzhou, Zhejiang
HZPH29	寄主 Host	浙江杭州 Hangzhou, Zhejiang
HZPH51	寄主 Host	浙江杭州 Hangzhou, Zhejiang

1.2 DNA 的提取与检测 供试 22 个菌株, 移植于盛有 150 ml 燕麦液体培养基的三角瓶中, 28℃ 摇床培养 7~10 d, 将用

基金项目 山东省优秀中青年科学家基金项目(05BS02017)。

作者简介 孙文秀(1979-), 女, 山东潍坊人, 博士, 讲师, 从事分子植物病理学研究。* 通讯作者, 博士生导师, 教授。

收稿日期 2008-03-24

灭菌纱布过滤获取的菌丝体置于研钵内经液氮研磨至粉末状,采用CTAB法提取DNA,取模板DNA 5 μl于1%琼脂糖凝胶电泳检测DNA的有无,置于-20℃冰柜长期保存。

1.3 引物的筛选 从由美国Operon公司生产的100个寡聚核苷酸随机引物中筛选出扩增图带数多且清楚的12个随机引物,用于对受试辣椒疫霉菌株进行全基因组DNA遗传标记和指纹图谱分析(表2)。

表2 选用引物扩增的DNA片段数

Table 2 Number of DNA fragments amplified with selected primers

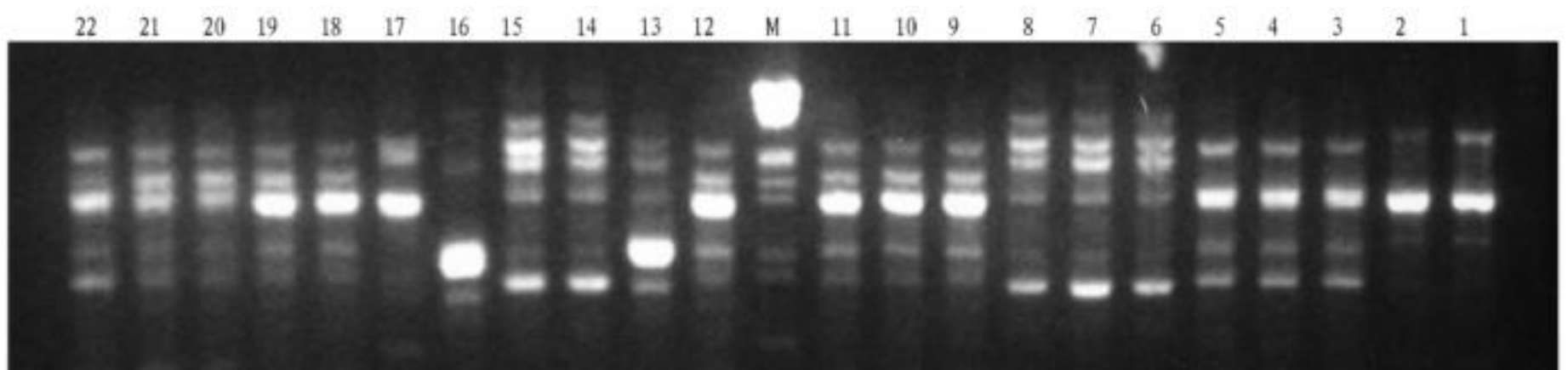
引物名称 Primer name	序列(5'-3') Sequences	扩增带数 Number of amplified bands	多态性带数 Number of polymorphic bands
OPD41	ACCGCGAAGG	9	9
OPD42	GGACCCAACC	8	8
OPD44	TCTGGTGAGG	4	4
OPD45	TGAGCGGACA	8	7
OPD48	GTTGTGCCCCA	11	11
OPD53	GGGGTGACGA	7	7
OPD58	GAGAGCCAAC	8	7
OPD65	GATGACCGCC	6	6
OPD71	AAAGCTGCGG	10	10
OPD74	TCCGTCCTTG	9	9
OPD75	GACGGATCAG	8	8
OPD84	AGCGTGICTG	13	13
总数Total		101	99
多态率 %			98.02
Percentage of polymorphism			

1.4 RAPD 反应程序 扩增反应在PE热循环仪上进行。25 μl反应体系中含有1×PCR buffer,2.5 mmol/L MgCl₂,1.5 U Taq酶,0.2 mmol/L dNTPs,0.2 μmol/L随机引物,15~20 ng模板DNA。反应程序为:94℃ 2 min,94℃ 1 min,36℃ 30 s,72℃ 2 min,40个循环,最后72℃ 10 min。扩增产物在含溴化乙锭的1.2%琼脂糖凝胶中电泳3~4 h,结果在透射紫外灯下观察并照相。每个引物对22个菌株的扩增均重复3次。

1.5 扩增产物的分析 将电泳获得的全基因组DNA指纹图谱中的每一条RAPD图带的有无作为统计参数,有的记为1,无的记为0,在重复扩增过程中稳定出现的带无论强弱均记为0。按下式计算任意两个样品间的遗传距离(D): $D=1-F$, $F=2N_{xy}/(N_x+N_y)$,F为自然度, N_{xy} 为个体X、Y经RAPD扩增反应分子量相同的图带总数, N_x 、 N_y 分别代表个体X、Y经RAPD扩增反应的图带总数。根据遗传距离(D)利用UPGMA法构建系统树状图。

2 结果与分析

2.1 DNA 指纹图谱特征与菌株来源相关性分析 利用所选的12个寡聚核苷酸随机引物对供试22个菌株进行遗传标记,获得大量的DNA指纹图谱。图1显示了引物OPD58对来自寄主和土壤的22个菌株的遗传标记扩增情况,表2显示了供试12个随机引物对22个供试菌株的遗传标记结果。供试单个引物所标记出的DNA片段为4~13条。供试12个引物所标记出的总DNA指纹图带数为101条,多态性图带数为99条,多态检测率为98.02%,结果表明:供试菌株表现出丰富的遗传多态性。



注:1.SGDPH44;2.SGDPH51;3.GDPH07;4.GDPH17;5.GDPH72;6.SCSPH14;7.SCSPH08;8.SCSPH03;9.HBPH08;10.HBPH06;11.HBPH03;12.HBPH15;13.SHZPH43;14.SHZPH18;15.SHZPH06;16.SHZPH53;17.SHZPH17;18.HZPH34;19.HZPH54;20.HZPH31;21.HZPH29;22.HZPH51.

Note:1.SGDPH44;2.SGDPH51;3.GDPH07;4.GDPH17;5.GDPH72;6.SCSPH14;7.SCSPH08;8.SCSPH03;9.HBPH08;10.HBPH06;11.HBPH03;12.HBPH15;13.SHZPH43;14.SHZPH18;15.SHZPH06;16.SHZPH53;17.SHZPH17;18.HZPH34;19.HZPH54;20.HZPH31;21.HZPH29;22.HZPH51.

图1 引物OPD58对22个菌株的RAPD扩增图谱

Fig.1 RAPD amplification pattern of 22 strains with primer OPD58

DNA指纹图谱表明,不同的引物对供试22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无直接的相关性。同一引物对来自同一地区寄主和土壤辣椒疫霉菌全基因组DNA进行PCR扩增,所标记出的DNA指纹图谱差异较大;同一引物对来自不同地区寄主上的辣椒疫霉菌全基因组DNA进行PCR扩增,所标记出的DNA指纹图谱相似性较大;而对来自不同地区土壤中的辣椒疫霉菌全基因组DNA进行PCR扩增,所标记出的DNA指纹图谱差异较大。由图1可看出,来自同一地区寄主上辣椒疫霉菌株被标记出的DNA指纹图谱基本相同,而同一地区土壤SHZPH18、SHZPH43、SHZPH06、SHZPH53和SHZPH17菌株被标记出的

DNA指纹图谱则差异很大。结果表明,从DNA指纹图谱中难以发现扩增片段与菌株来源相关的规律,即DNA指纹图谱未反映出供试菌株与菌株各自不同的直接相关性。

2.2 供试菌株系统聚类树状图的遗传分化与菌株来源相关性的分析 从供试菌株全基因组PCR扩增DNA片段系统聚类树状图(图2)可以看出,受试22个菌株被划分为3个遗传聚类组(、、)。来源于寄主上的12个辣椒疫霉菌株属于遗传聚类组,而来源于土壤中用诱饵法获得的6个辣椒疫霉菌株属于遗传聚类组,其余来源于土壤中用平板稀释法获得的4个辣椒疫霉菌株则属于遗传聚类组。同时,遗传聚类组又可划分为3个遗传聚类亚组,即来源于杭州的

HZPH51、HZPH29、HZPH31、HZPH54 和 HZPH34 菌株属于一个遗传聚类亚组,而来源于武汉的 HBPH15、HBPH03、HBPH06 和 HBPH08 菌株属于一个遗传聚类亚组,其余来源于广州的 GDPH72、GDPH17 和 GDPH07 则属于一个遗传聚类亚组。聚类结果表明,菌株间的遗传相似性与菌株的遗传背景有一定的相关性。来自于寄主上辣椒疫霉菌株与来自于土壤中辣椒疫霉菌株分属不同的遗传聚类组,而土壤中辣椒疫霉菌株又因分离方法的不同分属不同的遗传聚类组。

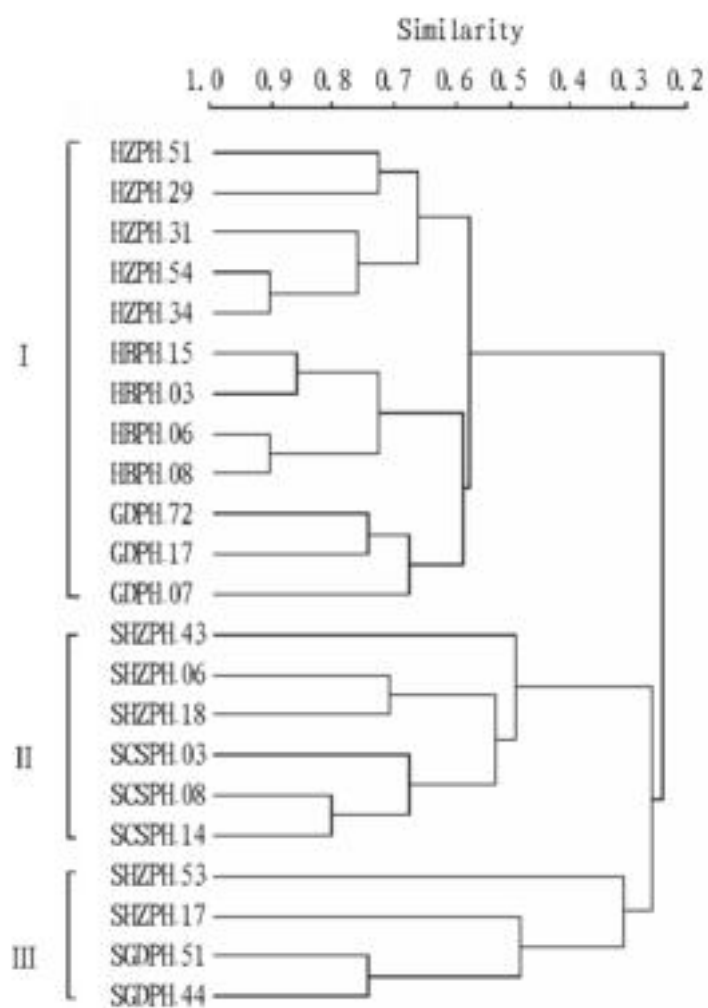


图2 根据RAPD 指纹图谱利用UPGMA 法构建的22 个辣椒疫霉菌株基因组分子树状图

Fig.2 Phylogenetic tree of 22 isolates of *P. capsici* based on RAPD fingerprint by UPGMA method

3 讨论

利用 RAPD 标记技术对辣椒疫霉菌亲缘关系分析表明:供试菌株具有丰富的遗传多样性,22 个菌株的亲缘关系因遗传背景不同而发生分化,辣椒寄主上的 12 个菌株也因地区不同而表现丰富的遗传多样性。供试 22 个菌株由于寄主和土壤这两个大的环境不同,使分别来自二者的辣椒疫霉菌株表现出不同的菌落形态,从而推断二者的基因型有所不同。利用 RAPD 技术对其全基因组 DNA 进行 PCR 扩增,从结果可以看出推测是正确的。此外,来自土壤中的辣椒疫霉菌株又分为两个大的遗传聚类组,此两个遗传聚类组菌株的分离方法不同。用组织诱饵法获得的菌株已表现出一定的致病性,从伤口侵染辣椒叶片和果实;而用平板稀释法获得的菌株则可能不具有致病性,是土壤中的腐生菌,从而表现出不

同的遗传多样性。

利用 RAPD 标记技术已对多种植物病原卵菌的群体多样性进行了研究。Fry 等对墨西哥地区的马铃薯晚疫病病菌 (*Phytophthora infestans*) 群体进行了 DNA 指纹分析,发现该地区的马铃薯晚疫病病菌含有不同的致病基因型,这可能与该地区马铃薯晚疫病病菌有性生殖交配型的历史分布有关^[11]。Miller 等通过对来自不同年份干旱条件下的马铃薯晚疫病病菌进行 DNA 指纹的 RAPD 分析,将受试马铃薯晚疫病病菌划分为多个基因型,结果表明,该病菌群体遗传变异可能与时间和长期的干旱气候条件有关^[12]。但是,对于来自两种截然不同环境的植物病原卵菌的群体遗传分化的报道国内外几乎没有。笔者利用 RAPD 标记技术对来自辣椒寄主和土壤的辣椒疫霉菌的遗传多样性进行了分析,发现来自二者的菌株的全基因组 DNA 扩增图谱差异很大。

由于 RAPD 标记技术是利用随机引物对供试样品的全基因组 DNA 进行随机扩增,这样就可能导致某段 DNA 不能有效的扩增,而且一些分子量相近的 DNA 片段得不到分离,这就使 RAPD 指纹图带数的统计不够精确,存在一定的误差,说明 RAPD 技术还存在一定的局限性。因此,利用 RAPD 标记技术对物种亲缘关系分析时,还有待于大量数据的积累和分析。

参考文献

- [1] LAMOUR K H, HAUSBECK MK. Investigating the spatiotemporal genetic structure of *Phytophthora capsici* in Michigan [J]. *Phytopathology*, 2001, 91(10): 973 - 980.
- [2] LAMOUR K H, HAUSBECK MK. The spatiotemporal genetic structure of *Phytophthora capsici* in Michigan and implications for disease management [J]. *Phytopathology*, 2002, 92(6): 681 - 684.
- [3] SILVAR C, MERINO F, DIAZ J. Diversity of *Phytophthora capsici* in Northwest Spain: Analysis of virulence, nitroaryl response, and molecular characterization [J]. *Plant Disease*, 2006, 90(9): 1135 - 1142.
- [4] 张修国, 罗文富, 杨艳丽, 等. 烟草黑胫病菌株亲缘关系的 RAPD 分析 [J]. *菌物系统*, 2000, 19(1): 39 - 44.
- [5] 王建营, 郑小波. 苎麻疫霉群体的 RAPD 分析 [J]. *菌物系统*, 2003, 22(2): 228 - 234.
- [6] 谢丙炎, 朱国仁. 辣椒疫霉产毒共分离 RAPD 标记的研究 [J]. *菌物系统*, 2000, 19(1): 34 - 38.
- [7] 王源超, 丁国云, 马志超, 等. 棉花疫病菌和辣椒疫病菌核糖体基因 ITS 区域的克隆和序列分析 [J]. *南京农业大学学报*, 2000, 23(3): 33 - 36.
- [8] CHANG T T, YANG W W, WANG W Y. Use of random amplified polymorphic DNA markers for the detection of genetic variation in *Phytophthora cinnamomi* in Taiwan [J]. *Bull Acad Sin*, 1996, 37: 165 - 171.
- [9] MENG X Q, SHOEMAKER R C, YANG X B. Analysis of pathogenicity and genetic variation among *Phytophthora sojae* isolates using RAPD [J]. *Mycol Res*, 1999, 103: 173 - 178.
- [10] PURWANTARA A, DRENTH A, FLETT S P, et al. Diversity of *Phytophthora dandestina* isolated from subterranean clover in southern Australia: Analysis of virulence and RAPD profiles [J]. *Eur J Plant Pathol*, 2001, 107: 305 - 311.
- [11] FRY WE, GOODWINS B, MATUSZAK J M, et al. Population genetics and intercontinental migrations of *Phytophthora infestans* [J]. *Annu Rev Phytopathol*, 1992, 30: 107 - 129.
- [12] MILLER, JOHNSON. Competitive fitness of *Phytophthora infestans* isolates under semi-arid field conditions [J]. *Phytopathology*, 1999, 90: 220 - 227.

(上接第 6694 页)

1997, 19(4): 79 - 81.

- [15] WANG J L, LI X H, CHEN W M, et al. The variation of shandong local soybean variety lipoygenase [J]. *Shandong Agricultural Sciences*, 1999(3): 24 - 25.

- [16] DING A L, FUC Z, CHANG R Z, et al. The identifying of soybean lipoygenase [J]. *Acta Agronomica Sinica*, 1994, 20(3): 373 - 374.

- [17] FUNK MO, WHITNEY MA, HAUSKNECHT E C, et al. Resolution of the isoenzymes of soybean lipoygenase using isoelectric focusing and chromatofocusing [J]. *Analytical Biochemistry*, 1984, 146: 246 - 251.