

# AFLP 技术在植物病原真菌研究上的应用

陈文霞, 张莉<sup>\*</sup> (石河子大学农学院植保系, 新疆石河子 832003)

**摘要** 简述了 AFLP 技术的原理和优点, 着重论述了该技术在病原真菌致病性分化、植物抗病基因定位、互作基因的表达与调控、菌株间亲缘关系及病原真菌遗传多样性方面的研究应用。

**关键词** 植物病原真菌; AFLP; 致病性; 基因定位; 遗传多样性

**中图分类号** S188 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2009)14-06363-02

## The Application of AFLP Technique in the Research of Plant Pathogenic Fungi

CHEN Wen-xia et al (Department of Plant Protection, College of Agriculture, Shihezi University, Shihezi, Xinjiang 832003)

**Abstract** The study introduces the theory and the advantages of AFLP technique. It emphatically discusses the application of AFLP technique in the research of pathogenicity of plant pathogenic fungi, gene mapping of disease resistant gene, expression and regulation of interactive gene, phylogenetic relationships among strains and genetic diversity of pathogenic fungi.

**Key words** Plant pathogenic fungi; AFLP; Pathogenicity; Gene mapping; Genetic diversity

随着分子生物学技术向各学科的不断渗透, 植物病原真菌分子群体遗传学获得了极大地发展。目前, 分子遗传标记如 SSR、RFLP、RAPD、电泳核型分析、核酸序列分析、REMI 等分子技术的建立为深入认识植物病原真菌的群体生物学开辟了新的途径。其中, AFLP 技术以其独特的优点为研究植物病原真菌的遗传群体提供了更为准确与系统的工具。

### 1 AFLP 技术的原理及优越性

AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism, 扩增片段长度多态性) 是荷兰 Keyne 公司 Zabeau, Mare 和 Vos Piter 于 1993 年创立的一种分子标记技术。该分子技术不仅具备其他分子标记的特点, 还在一定程度上克服了其他分子标记的缺陷, 因而一诞生便迅速被应用于动植物遗传分析的各个领域。

**1.1 原理** AFLP 的原理是基于对植物基因组总 DNA 双酶切经 PCR 扩增后的限制片段进行选择。具体是植物基因组 DNA 经限制性内切酶双酶切后, 形成分子量大小不等的随机限制性片段, 将特定双链接头连接在这些 DNA 片段的末端, 形成一个带接头的特异片段, 作为 DNA 扩增的模板。接头序列以及与其相连的限制位点作为随后进行的限制性片段扩增的引物结合位点。对于 PCR 产物, AFLP 作了修饰, 将引物与酶切片段识别序列结合起来, 其引物从 5'~3' 依次为: 核心序列、酶切识别序列、3' 端选择碱基序列。这样就只有那些两端序列能与选择核苷酸配对的限制性酶切片段被扩增, 然后用变性聚丙烯酰胺凝胶电泳方法将扩增的 DNA 片段分离, 即可使某一品种出现特定的 DNA 带谱 (即扩增片段长度多态性), 而在另一品种中可能无此谱带产生。因此, 这种通过引物诱导及 DNA 扩增后得到的 DNA 多态性可作为一种分子标记。

**1.2 优越性** AFLP 是 RFLP 和 RAPD 的结合, 它既克服了 RFLP 技术复杂、RAPD 稳定性差、标记呈显性遗传的缺点, 同时又兼有两者之长。此外, 还表现出独特的优越性: DNA 用量少; 标记通过改变限制性内切酶和选择性碱基种类与

数目调节扩增的条带数, 具有较强的多态分辨能力; 标记异常丰富, 变性聚丙烯酰胺凝胶电泳一次可以检测到 100~150 个扩增产物, 不需预先知道 DNA 的信息, 可在短时间内检测到 DNA 样品之间的细微差别, 提供大量的信息, 这是其他分子标记技术难以比拟的。

### 2 AFLP 技术在植物病原真菌研究上的应用

AFLP 作为一种较新的分子标记, 近 10 年来获得了很大进步, 并展示出良好的发展前景, 已广泛应用于生命科学研究的诸多领域, 如动物学、植物学、微生物学等方面。笔者从以下几个方面阐述了 AFLP 技术在植物病原真菌上的研究。

**2.1 用于病原真菌致病性分化的研究** 邹亚飞等用 AFLP 技术对棉花黄萎病菌的落叶型和非落叶型选用 8 对 AFLP 引物进行 PCR 扩增, 共得到 169 条多态性标记做系统聚类分析, 将上述菌系分为 2 大类<sup>[1]</sup>。根据聚类分析建立树状图, 发现菌系与地理来源存在一定的相关性, 而依据菌系致病力强弱分类则相关关系不大。段会军等对采自河北省 46 个西瓜枯萎病菌菌株和 4 个已知生理小种的菌株进行了致病性测定和 AFLP 分析<sup>[2]</sup>, 将 50 个菌株划分为 3 个类群。结果得出, 河北省西瓜枯萎病菌存在明显的致病性分化, 其 AFLP 类群划分与致病性鉴定划分的生理小种之间存在一定相关性, 但与菌株的地理来源无关。侯晓强等对玉米大斑病菌有性杂交 F<sub>1</sub> 代菌株的生理小种进行了 AFLP 分析, 比较生理小种鉴定和 AFLP 分析结果<sup>[3]</sup>, 发现不同菌株具有不同的遗传传递能力并且生理小种分化和 AFLP 分子遗传多态性间有一定的相关性, 但不能完全对应, 不存在遗传谱系就等于小种的简单对应关系。Peil 等对 *Melampsora larici-epitea* 的 3 个专化型的 5 个生理小种进行了 AFLP 分析, 鉴定了 213 个 AFLP 标记, 其中有一些标记是不同专化型专有的<sup>[4]</sup>。根据系统分析将这 5 个致病类型分为不同的类群; 而用 Shannon index 分析, 不同地点的变异系数是高于小种间的变异系数, 不同采集地点的变异系数高于不同地区的, 说明菌系与地理来源存在一定的相关性。

综上所述, 通过 AFLP 技术分析划分的菌株类群与生理小种之间存在一定相关性, 但与菌株地理来源的相关性不同的研究者有不同的结果。

**2.2 用于植物抗病基因的标定** AFLP 技术强有力的多态

**基金项目** 教育部春晖计划科研合作项目 (Z2004-2-65060); 石河子大学“263”人才培养工程项目。

**作者简介** 陈文霞 (1981-), 女, 新疆伊宁人, 硕士, 从事植物病原真菌及真菌病害方面的研究。<sup>\*</sup> 通讯作者, 博士, 副教授。

**收稿日期** 2009-03-02

性检出能力与高效的多态性扩增产物克隆方法相结合,为寻找与目的基因紧密连锁的分子标记提供了有力的工具。通过标记质量性状的相关分析,就能将质量性状的基因定位到相关的染色体区段上。

张娜等利用 AFLP 技术对小麦抗叶锈基因 *Lr45* 进行了标记,其扩增片段与大麦属 *VulgareHorrl* 基因部分序列同源性达 86%<sup>[5]</sup>。张增艳等对小麦新种质 YW243 抗条锈病新基因进行遗传分析,得到 2 个 AFLP 标记与抗条锈病基因 *YrX* 连锁较紧密<sup>[6]</sup>。杨文香对小麦抗叶锈近等基因系和 TcLr44 × Thatcher F<sub>2</sub> 代分离群体材料,获得 4 个抗叶锈基因 *Lr44* 的分子标记<sup>[7]</sup>。Riccardo Aversano 等用 AFLP 技术对马铃薯晚疫病病菌进行研究,筛选到了 2 个 AFLP 标记,其中有一个标记与 *Rpi-abpt* 共分离,这个标记与番茄 BAC 基因有高度的相似性,结果得到基因 *Rpi-abpt* 是 *R* 基因家族的一个成员<sup>[8]</sup>。Riccardo Aversano 对 2 个抗马铃薯晚疫病的茄科植物 *S. bulbocastanum* 和 *S. cardiophyllum* 分别标记到了 13 和 16 个特异性的 AFLP 标记<sup>[9]</sup>。刘润堂等将簇毛麦的抗白粉病基因导入小麦,选育出高产、抗白粉病的小麦新品种和农艺性状较好、抗白粉病的小麦新种质<sup>[10]</sup>。经 AFLP 分析,确定 4 个抗白粉病种质均为含有一段簇毛麦 DNA 的易位系,并得到 3 个与抗性基因紧密连锁的标记。YiHongWang 等用 AFLP 对甜瓜抗枯萎病菌基因 *Fom-2* 进行了标记,鉴定出了 2 个标记与抗病基因 *Fom-2* 紧密连锁<sup>[11]</sup>。Thomas 等以番茄与野生种 *Lyopersicon pennellii* 种间杂交的 F<sub>2</sub> 群体为试验材料,发现 42 000 条 AFLP 带纹与番茄抗叶霉病基因 *Cf-9* 紧密连锁,其中 3 个标记与 *Cf-9* 表现共分离<sup>[12]</sup>。寿森炎对番茄高抗与高感青枯病品种及其 F<sub>2</sub> 代抗病和感病基因池进行 AFLP 分析,发现一个特异条带与暂定名为 *RRS2342* 的抗青枯病基因紧密连锁<sup>[13]</sup>。

**2.3 用于互作基因的表达与调控** 吴茂森等用 AFLP 技术对 X<sub>oo</sub> 接种处理不同时间的水稻细胞进行基因表达谱分析,结果在测定的大约 4 000 个水稻 cDNA 片段中,363 个 (9.1%) 是差异性表达的,其中 295 个受 X<sub>oo</sub> 诱导上调表达,68 个被抑制下调表达<sup>[14]</sup>。构建了水稻-X<sub>oo</sub> 感病组合在细胞水平上互作的基因表达谱,从基因组水平上识别了一批受 X<sub>oo</sub> 诱导或抑制表达、与水稻感病反应相关的基因,这些新基因的发现为开展水稻感病功能基因组学的研究提供了材料。

**2.4 用于病原真菌的遗传多样性的研究** AFLP 以其信息量大、灵敏度高、能够检测亲缘关系非常近的材料之间的差异,并且可准确分析菌株群体的遗传结构和遗传多样性水平而倍受人们关注。

何月秋等对 3 个起始菌株和 9 个致病性变异菌株进行分析,其中 49 对引物可以区别出不同菌株类型,辨别变异菌株与其起始菌株的关系以及起始菌株间的亲缘关系<sup>[15]</sup>。结果还表明,致病性及其他特征变异似乎与条带数缺失多少相关联。Sivaramkrishnan 等研究了鸭嘴豆枯萎病菌的 43 个菌株的基因多样性,用 RAPD 和 AFLP 分析了来自印度 9 个洲的 4 个生理小种,其中 AFLP 技术可以检测到已知种以外的更多不同小种<sup>[16]</sup>。Jan Fahleson 等用 AFLP 技术分析了黄萎

病菌 76 个菌株的遗传多样性,根据聚类分析划分为三大类群:从 *Brassica napus* 上分离的 35 个欧洲菌和来自 *B. oleracea* 的 5 个菌株归为一类,这一组表现出较高的遗传相似性,包括 3 个早期被归为 *Verticillium longisporum* 的菌株,表明这组的所有菌株都可能是 *V. longisporum*; *V. dahliae* 为第二类,而第三类包含 4 个 *V. albo-atrum*<sup>[17]</sup>。郭军等对我国 40 个马铃薯晚疫病病菌菌株进行研究,结果表明,所有供试菌株可划分为 17 种 AFLP 基因型分布于 3 个组中,平均每 2 个菌株为 1 个特有的基因型<sup>[18-19]</sup>,这与欧洲马铃薯晚疫病菌株的 AFLP 基因型多样性较一致,菌株的亲缘关系与病菌的地理来源、采集年份无相关性。潘雅蛟等采用 AFLP 技术分析了来自北京昌平同一块稻田中不同水稻品种和育种中间材料上稻曲病菌的遗传多样性,结果表明,同一块稻田中稻曲病菌菌株间的相似性系数达 0.72 以上,来自同一小区的多数菌株能聚成亚类;发现从同一水稻品种分离的菌株没有特异性的 AFLP 谱带<sup>[20]</sup>。

### 3 结语

随着分子生物学技术的不断普及和社会经济的不断进步,分子标记技术会越来越常规化和实用化。AFLP 以其独特的优点及其分析的优越性,将会在遗传作图、基因定位、生物多样性、遗传育种、基因克隆、系统发育和序列分析等相关领域中发挥更重要的作用,具有更广阔的发展前景。

### 参考文献

- [1] 邹亚飞,简桂良,马存,等.棉花黄萎病菌致病型的 AFLP 分析[J].植物病理学报,2003,33(2):135-141.
- [2] 段会军,张彩英,李喜焕,等.河北省西瓜枯萎病菌生理小种鉴定与 AFLP 分析[J].中国农业科学,2007,40(5):925-931.
- [3] 侯晓强,范永山,董金皋,等.玉米大斑病菌有性杂交 F<sub>1</sub> 代菌株的生理小种鉴定和 AFLP 分析[J].植物保护学报,2006,33(3):257-262.
- [4] PEI M H, BAYON C, RUIZ C, et al. Genetic variation in *Melampsora larici-epitea* on biomass willows assessed using AFLP [J]. European Journal of Plant Pathology, 2002, 108: 229-236.
- [5] 张娜,杨文香,闫红飞,等.小麦抗叶锈病基因 *Lr45* 的 AFLP 分子标记[J].中国农业科学,2005,38(7):1364-1368.
- [6] 张增艳,曾祥艳,林志珊,等.小麦新种质 YW243 抗条锈病新基因的 AFLP 标记[J].中国农学通报,2005,21(12):56-59.
- [7] 杨文香,贾璇.小麦抗叶锈基因 *Lr44* 的 AFLP 分子标记[J].河北农业大学学报,2005,28(2):67-70.
- [8] RICCARDO AVERSANO, RAFFAELLA ERCOLANO MARIA, FRUSCIANTE LUIGI, et al. Resistance traits and AFLP characterization of diploid primitive tuber-bearing potatoes [J]. Genet Resour and Crop, Evolution, 2007, 54(8):1797-1806.
- [9] RICCARDO AVERSANO. High-resolution mapping and analysis of the resistance locus *Rpi-abpt* against *Phytophthora infestans* in potato [J]. Molecular Breeding, 2005, 16: 33-43.
- [10] 刘润堂,白建荣,温琪芬,等.小麦白粉病抗性基因的导入及 AFLP 分析[J].植物遗传资源学报,2003,4(4):331-333.
- [11] WANG Y H, THOMAS CLAUDE E, DEAN RALPH A. Genetic mapping of a fusarium wilt resistance gene (*Fom-2*) in melon (*Cucumis melo* L.) [J]. Molecular Breeding, 2000, 6: 379-389.
- [12] THOMAS C M. Identification of amplified restriction fragment polymorphism (AFLP) markers tightly linked to the tomato *Cf-9* gene for resistance to *Cladosporium fulvum* [J]. The Plant Journal, 1995, 8(5):785-794.
- [13] 寿森炎,冯壮志,苗立祥,等.番茄抗青枯病基因的 AFLP 分子标记[J].遗传,2006,28(2):195-199.
- [14] 吴茂森,田峰,齐放军,等.水稻与白叶枯病菌互作的基因表达谱分析与差异性表达基因的识别[J].中国农业科学,2007,40(2):277-282.
- [15] 何月秋,HEI LEUNG, ZEIGLER ROBERT S, 等.稻瘟病菌变异菌株的 AFLP 分析[J].菌物系统,2002,21(3):363-369.
- [16] SIVARAMAKRISHNAN S, SEETHA K. Genetic variability of Fusarium wilt pathogen isolates of chickpea (*Cicer arietinum* L.) assessed by molecular markers [J]. Mycopathologia, 2002, 155(3):171-178.

表1 不同产地及不同生长年限的栽培秦艽中龙胆苦苷含量 (n=5)

Table 1 Gentiopicroside content in cultivated Qinjiao of different habitats and growth years (n=5)

编号 Serial number	栽培地 Cultivation area	生长年限//年 Growth years	龙胆苦苷含量//% Gentiopicroside content	RSD %
1	原州	1	13.34	0.97
2	原州	2	14.20	1.86
3	隆德	1	15.12	1.22
4	隆德	2	16.31	1.02
5	隆德	3	15.98	0.96
6	彭阳	2	14.56	1.50
7	彭阳	3	14.11	1.01
8	银川	1	12.97	1.12
9	银川	2	14.02	1.23
10	贺兰	2	14.55	0.87
11	贺兰	3	13.87	1.74

注:采集时间均为秋季。

Note: The acquisition time is in autumn.

表2可知,不同采收季节和不同施用肥料对栽培秦艽中龙胆苦苷的含量有一定影响。草木灰与农家肥栽培的秦艽中龙胆苦苷的含量较其他肥料高,且秋季采集的栽培秦艽中龙胆苦苷的含量高于春季采集的。

表2 不同季节采收和不同施用肥料的栽培秦艽中龙胆苦苷含量 (n=5)

Table 2 Gentiopicroside content in cultivated Qinjiao of different collection periods and fertilizer (n=5)

编号 Serial number	肥料 Fertilizer	采收季节 Collection season	龙胆苦苷含量//% Gentiopicroside content	RSD %
1	草木灰	春季	15.34	1.02
2		秋季	16.20	0.79
3	过磷酸钙	春季	14.12	1.63
4		秋季	14.31	1.12
5	尿素	春季	13.98	1.32
6		秋季	14.56	1.96
7	磷肥+尿素	春季	14.11	2.10
8		秋季	14.67	1.32
9	农家肥	春季	15.02	1.45
10		秋季	16.15	1.11
11	对照	春季	12.81	0.97
12		秋季	13.54	1.74

注:生长年限均为3年。表3同。

Note: The growth years are three year. The same as table 3.

2.3 不同施肥水平对龙胆苦苷含量的影响 按“1.2.3”步骤操作,制备供试液,对不同施肥水平的栽培秦艽(隆德县)中龙胆苦苷进行了含量测定。由表3可知,不同施肥水平对

表3 不同施肥水平的栽培秦艽中龙胆苦苷含量 (n=5)

Table 3 Gentiopicroside content in cultivated Qinjiao of different fertilizer levels (n=5)

编号 Serial number	肥料 Fertilizer//kg/hm <sup>2</sup>		龙胆苦苷含量//% Gentiopicroside content	RSD %
	尿素 Carbamide	磷肥 Phosphate fertilizer		
1	1.0	10.0	13.34	0.77
2	1.0	15.0	13.85	1.41
3	1.0	20.0	14.12	1.22
4	3.0	10.0	14.13	1.08
5	3.0	15.0	14.45	0.93
6	3.0	20.0	14.56	1.50
7	5.0	10.0	14.21	1.24
8	5.0	15.0	14.67	1.12
9	5.0	20.0	16.34	0.86

栽培秦艽中龙胆苦苷的含量有影响。尿素、磷肥为5.0、20.0 kg/hm<sup>2</sup>混合肥料栽培的秦艽中龙胆苦苷的含量较其他比例尿素和磷肥的混合肥料高。

### 3 讨论

(1)通过试验的方法考察了生态及人工因素对宁夏栽培秦艽中龙胆苦苷含量的影响,为了解秦艽栽培过程中存在的影响因素,以及科学合理地推广栽培秦艽的技术提供重要依据。

(2)从测量结果看,宁夏境内气候条件特殊,适合大面积种植秦艽,且栽培秦艽中龙胆苦苷含量远远地高于药典要求,特别是隆德等地相对海拔低,气候湿润,适合于中药材生长,可以大面积种植。

(3)2年生栽培秦艽中龙胆苦苷的含量最高,但是2年生药材与3年生药材相比产量太低,故采收2年生药材经济效益不高。综合考虑应在秋季采收3年生栽培秦艽为宜。

(4)科学施肥是提高中药材质量的重要措施,从试验结果看,单一使用草木灰和复合使用尿素、磷肥为5.0、20.0 kg/hm<sup>2</sup>栽培秦艽时龙胆苦苷的含量最高。

### 参考文献

- [1] 夏光成, 萧培根, 马毓泉. 中药秦艽原植物的研究[J]. 药学学报, 1965(6): 399.
- [2] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典一部2000年版[M]. 北京: 化学工业出版社, 2000: 222.
- [3] 邢世瑞. 宁夏中药资源[M]. 银川: 宁夏人民出版社, 1987: 101.
- [4] 张恩迪, 郑汉臣. 中国濒危野生药用动植物资源的保护[M]. 上海: 第二军医大学出版社, 2000: 28.
- [5] 白晓朝. RP-HPLC测定宁夏秦艽中龙胆苦苷的含量[J]. 安徽农业科学, 2008, 36(27): 11798-11799.

(上接第6364页)

- [17] JAN FAHLESON, ULF LAGERCRANTZ. Estimation of genetic variation among *Verticillium* isolates using AFLP analysis[J]. European Journal of Plant Pathology, 2003, 109: 361-371.
- [18] KNAPOVA G, GISI U. Phenotypic and genotypic structure of *Phytophthora infestans* populations on potato and tomato in France and Switzerland[J]. Plant Pathology, 2002, 51: 641-653.

- [19] COOKE D E L, YOUNG V, BIRCH P R J, et al. Phenotypic and genotypic diversity of *Phytophthora infestans* populations in Scotland (1995-1997)[J]. Plant Pathology, 2003, 52: 181-192.
- [20] 潘雅姣, 樊金娟, 付彬英, 等. 采用 AFLP 技术分析稻曲病菌的遗传多样性 I: 同一块稻田中稻曲病菌的遗传结构[J]. 植物病理学报, 2006, 36(4): 337-341.