不同寄主来源寄生疫霉菌株的遗传变异分析

申 贵 王源超* 郑小波

(南京农业大学植物保护学院农业部病虫害监测与治理重点开放实验室, 南京 210095)

摘要: 从 300 条 RAPD 随机引物中筛选出扩增多态性丰富的 13 条引物, 对寄主来源不同的 29 个寄生疫霉(*Phytophthora parasitica*) 菌株进行基因组 DNA 遗传变异分析。用筛选出的 13 条引物对供试菌株进行 RAPD-PCR 扩增, 共产生 139 条 RAPD 条带, 其中 133 条为多态性条带, 多态检测率为 95.7%。利用 PopGene Version 1.31 软件对供试菌株间的遗传距离进行聚类分析并构建系统树状图, 供试 29 个菌株被划分为 5 个遗传聚类组, 不同菌株间具有丰富的遗传变异。其中寄主为烟草(*Nicotiana* spp.)、腊梅(*Chimonanthus praecox*)、凤尾兰(*Yucca gloriosa*)和西番莲(*Passiflora edulis*)的菌株的遗传结构与其寄主来源具有明显的相关性, 而寄主为刺槐(*Sophora chinensis*)和番茄(*Lycopersicon esculentum*)的菌株与其寄主来源的相关性较小, 来源于不同寄主植物的菌株之间遗传距离较远。结果提示在寄生疫霉与其不同寄主植物的长期协同进化过程中, 寄主对病原菌的遗传结构具有一定的影响。

关键词: 寄生疫霉, 寄主, 遗传相关性, 协同进化

中图分类号: Q933 文献标识码: A 文章编号: 1005 - 0094(2003)06 - 0486 - 05

Genetic variation among *Phytophthora parasitica* strains isolated from different host plants

SHEN Gui, WANG Yuan-Chao*, ZHENG Xiao-Bo

Key Laboratory of Monitoring and Management of Plant Disease and Insects of Ministry of Agriculture of China, College of Plant Protection, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095

Abstract: Genomic fingerprints of 29 isolates of the pathogen *Phytophthora parasitica* from different hosts were analyzed by using 13 RAPD primers selected from 300 random primers with abundant polymorphisms. Genomic DNA from different isolates were amplified with the 13 selected primers and 139 marked bands were produced, of which 133 bands were polymorphic, accounting for 95.7% of the total bands produced. Based on the genetic distance, a dendrogram was constructed with the software PopGene Version 1.31, and the 29 tested isolates were divided into five genetic groups. Analysis showed that the genetic variation was very rich among the tested isolates. The isolates from *Nicotiana tabacum* (tobacco), *N. glutinosa* (tobacco), *Chimonanthus praecox* (wintersweet), *Yucca* spp. (beargrass) and *Passiflora edulis* (passionflower) were clustered into one group, and showed high relativity with their hosts. The similarity of *Lycopersicon esculentum* (tomato) isolates was about 60.9%, and they could be clustered into two distinct groups. The similarity of the five isolates from *Sophora chinensis* (sophora) was about 66.7% ~ 88.4%, and they were also clustered into two groups when the dendrogram was constructed at the value point of 0.24 of the genetic distance. The results indicate that the host plants could have some effect on the genomic structure of the pathogen during the co-evolution between pathogen and their hosts.

Key words: *Phytophthora parasitica*, host, genetic relationship, co-evolution

寄生疫霉(*Phytophthora parasitica*)是一种危害 (*Nicotiana* spp.)、番茄(*Lycopersicon esculentum*)、茄严重的植物病原菌, 寄主范围广泛, 主要侵染烟草 子(*Solanum melongena*)、刺槐(*Sophora chinensis*)、

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30270865), 教育部跨世纪优秀人才基金资助项目
收稿日期: 2002 - 11 - 26; 接受日期: 2003 - 06 - 17
作者简介: 申贵, 男, 1977 年 12 月出生, 南京农业大学植保学院博士生, 主要从事真菌遗传与分子生物学研究。
* 通讯作者 Author for correspondence. E-mail: wangyc@njau.edu.cn

腊梅(*Chimonanthus praecox*)、丝兰属(*Yucca*)植物等 60 多种植物(郑小波,1997)。它侵染烟草引起的烟草黑胫病是烟草重要的根茎病害之一。王智发等(1987)和朱贤朝等(1987)对我国烟草黑胫病菌的生理小种进行了划分;王革等(1997)对云南烟草黑胫病菌致病力分化和交配型进行了初步的研究;张修国等(2000)对云南省烟草黑胫病菌株的亲缘关系作了研究,发现不同地理来源的烟草黑胫病菌亲缘关系相近。这些研究仅针对寄主为烟草的寄生疫霉,并未就不同寄主来源的寄生疫霉进行遗传分析。而在传统疫霉菌分类中,根据寄主来源的不同,寄生疫霉被划分为寄生疫霉烟草变种(*P. parasitica* var. *nicotianae*)和寄生疫霉寄生变种(*P. parasitica* var. *parasitica*),这两个变种的分类地位至今还存在许多争议(郑小波,1997)。在长期的协同进化过程中寄主植物是否会对寄生疫霉的遗传结构发生影响,这种影响对这两个变种的划分是否具有生物学意义,在国内外均未见报道。本文以不同寄主和地区来源的寄生疫霉为供试材料,试图了解寄生疫霉种内菌株间的遗传多样性,为寄生疫霉菌种下群体的划分提供理论基础,同时为了解植物和病原菌协同进化过程中寄主对病原菌进化的作用提供实验数据。

1 材料和方法

1.1 供试菌株

本实验选取分离自普通烟、心叶烟、刺槐、番茄、腊梅、茄子、丝兰属、西番莲和扶桑等 9 种不同寄主植物的 29 个寄生疫霉菌株用于基因组 DNA 的提取和指纹图谱分析(表 1)。

1.2 菌丝体的培养与收集

供试菌株在 60 g/L 利马豆培养基(LBA)上,于 25℃、黑暗下生长 3 天后,沿菌落边缘切取 20 块 1 mm×1 mm 大小的菌丝块转移到 20%(v/v)番茄汁培养液中(郑小波,1997)。将三角瓶置于 25℃、黑暗条件下,在转速为 100 rpm 的摇床上振荡培养 5 天,收集菌丝体,用吸水纸吸干后冷冻干燥 24 h,然后将菌丝研磨成粉状待用。

1.3 寄生疫霉基因组 DNA 的提取

参照朱衡等(1994)的方法。

1.4 引物的筛选

要求筛选出的引物扩增出的 RAPD 图谱条带数

表 1 供试寄生疫霉菌株编号、寄主、采集地和泳道号
Table 1 The isolate number , hosts , localities and lane number of *P. parasitica* tested strains

菌株编号 Isolate no.	寄主 Host	采集地 Locality	泳道号 Lane no.
N1	普通烟 <i>Nicotiana tabacum</i>	云南 Yunnan	2
N2	普通烟 <i>N. tabacum</i>	云南 Yunnan	3
N3	普通烟 <i>N. tabacum</i>	云南 Yunnan	4
N4	普通烟 <i>N. tabacum</i>	云南 Yunnan	5
N5	普通烟 <i>N. tabacum</i>	云南 Yunnan	6
N6	普通烟 <i>N. tabacum</i>	云南 Yunnan	7
N7	普通烟 <i>N. tabacum</i>	云南 Yunnan	8
N8	普通烟 <i>N. tabacum</i>	云南 Yunnan	9
N9	普通烟 <i>N. tabacum</i>	云南 Yunnan	10
N10	普通烟 <i>N. tabacum</i>	山东 Shandong	11
N11	普通烟 <i>N. tabacum</i>	山东 Shandong	12
N12	普通烟 <i>N. tabacum</i>	不详 Unknown	13
N13	普通烟 <i>N. tabacum</i>	不详 Unknown	14
N14	心叶烟 <i>N. glutinosa</i>	南京 Nanjing	15
CH1	刺槐 <i>Sophora chinensis</i>	南京 Nanjing	16
CH2	刺槐 <i>S. chinensis</i>	南京 Nanjing	17
CH3	刺槐 <i>S. chinensis</i>	南京 Nanjing	18
CH4	刺槐 <i>S. chinensis</i>	南京 Nanjing	19
CH5	刺槐 <i>S. chinensis</i>	南京 Nanjing	20
T1	番茄 <i>Lycopersicum esculentum</i>	南京 Nanjing	21
T2	番茄 <i>L. esculentum</i>	南京 Nanjing	22
L1	腊梅 <i>Chimonanthus praecox</i>	南京 Nanjing	23
L2	腊梅 <i>C. praecox</i>	南京 Nanjing	24
Q1	茄子 <i>Solanum melongena</i>	南京 Nanjing	25
F1	凤尾兰 <i>Yucca gloriosa</i>	不详 Unknown	26
F2	凤尾兰 <i>Y. gloriosa</i>	不详 Unknown	27
X1	西番莲 <i>Passiflora edulis</i>	福建 Fujian	28
X2	西番莲 <i>P. edulis</i>	福建 Fujian	29
H1	扶桑 <i>Hibiscus rosa-sinensis</i>	北京 Beijing	30

量适中、条带清晰可辨、主带明显、稳定。供筛选的随机引物共 300 条,均购自上海生工生物工程公司。参试引物编号如下:S16~S100,S131~S300,S331~S335,S340~S345,S361~S365,S416~S425,S450~S456,S490~S495,S500~S505。

1.5 RAPD 反应

PCR 反应体系总体积 25 μL,各反应组分终浓度为 2.5 μL 的 10×buffer,3.5 mmol/L 的 MgCl₂,0.15 mmol/L 的 dNTP,1.2 U 的 Taq 酶(Promega 公司),10 pmol 的 primer,10 ng 模板 DNA。反应程序为 94℃预变性 4 min;进入循环,94℃变性 10 sec,37℃退火 40 sec,72℃延伸 1 min 10 sec,共 45 个循环;最后 72℃延伸 10 min。每次 PCR 反应均设置不含 DNA 模板的空白对照。反应结束后取 8 μL 扩增产物于 15 g/L 琼脂糖凝胶中在 4 V/cm 电压下进行电泳。在紫外灯下检测 PCR 产物并拍照。

表 2 筛选出的引物以及扩增的 RAPD 条带数
Table 2 Number of fragments amplified with 13 primers selected from 300 random primers

随机引物 Random primers	碱基序列(5'-3') Nucleotide sequences (5'-3')	RAPD 条带数 No. of RAPD bands	多态性条带数 No. of polymorphic bands
S47	TTGGCACGGG	9	8
S75	GACGGATCAG	10	9
S98	GGCTCATGTG	11	11
S132	ACGGTACCAG	8	8
S144	GTGACATGCC	9	9
S147	AGATGCAGCC	13	11
S170	ACAACGCGAG	15	15
S225	TCCGAGAGGG	13	13
S300	AGCCGTGGAA	11	11
S361	CATTTCGAGCC	10	8
S493	GGAGTGGACA	10	10
S503	ACACAGAGGG	10	10
S504	CCCGTAGCAC	10	10
总数 Total		139	133

1.6 数据处理

检查各引物在每个菌株上的扩增图谱,统计可重复性条带,有带记为 1,无带记为 0。RAPD 结果的数据均用 PopGene Version 1.31 聚类分析软件处理,该软件遗传距离和遗传变异分析依据 Nei (1978) 的公式。

2 结果与分析

2.1 引物的筛选

从 300 条随机引物中共筛选出条带清晰、可重复性好的 13 条引物。引物编号及碱基序列和 DNA 多态性条带数见表 2。

以上述 13 条引物对供试的 29 个菌株进行 RAPD 分析。

2.2 DNA 指纹图谱特征及菌株来源的相关性分析

利用选定的 13 条寡核苷酸引物对供试的 29 个菌株进行遗传标记,获得大量的指纹图谱。如表 2 所示,供试的 13 条随机引物中,单个引物所标记出的 DNA 指纹谱带数范围为 8~15 条,多态性谱带范围在 8~15 条之间,供试 13 条引物所标记出的总的 DNA 指纹谱带数为 139 条,其中多态性条带 133 条,多态检测率为 95.7%,表明供试寄生疫霉菌株有丰富的遗传多态性。

以引物 S170 对不同寄主和地区来源的 29 个菌株的 RAPD 电泳结果为例(图 1),该引物对 29 个菌株的 RAPD 扩增的指纹谱带大多集中在 250~1000 bp 之间,寄主为普通烟与寄主为心叶烟的寄生疫霉的 RAPD 指纹图谱相似;寄主为刺槐的菌株 CH1、

图 1 随机引物 S170 对 29 个寄生疫霉菌株的 RAPD 扩增图谱
泳道 1, 阴性对照; 泳道 2~15 对应的菌株为 N1~N14; 泳道 16~20 对应 CH1~CH5; 泳道 21、22 分别对应 T1、T2; 泳道 23、24 分别对应 L1、L2; 泳道 25 为 Q1; 泳道 26、27 为 F1、F2; 泳道 28、29 为 X1、X2; 泳道 30 为 H1; M, 标准核酸分子量标记 (DL2000)
Fig. 1 RAPD fingerprints of 29 isolates amplified with random primer S170
Lane 1, negative control; Lanes 2~15, isolates N1~N14; Lanes 16~20, CH1~CH5; Lanes 21 and 22, T1 and T2; Lanes 23 and 24, L1 and L2; Lanes 25, Q1; Lanes 26 and 27, F1 and F2; Lanes 28 and 29, X1 and X2; Lane 30, H1; M, DNA molecular weight marker (DL2000)

CH2 比 CH3、CH4、CH5 的谱带多出两条分子量小于 500 bp 的条带,但是在 5 条主带上基本相同;而寄主为番茄的 T1、T2 菌株的指纹图谱差异较大:T1 仅有 3 条带,而 T2 还有另外 5 条谱带;寄主为腊梅的菌株 L1 和 L2 的谱带相同;而寄主为茄子的菌株 Q1 则与其他不同来源的菌株的谱带表现出较大的差异;寄主为丝兰属植物的菌株 F1、F2 的谱带相同;寄主为西番莲的菌株 X1、X2 的谱带相同;而寄主为扶桑的菌株 H1 又显示与其他菌株有一些差异的谱带。结果表明引物 S170 对 29 个寄生疫霉菌株的 RAPD 指纹图谱有丰富的遗传多态性。

2.3 系统聚类树状图与菌株来源相关性分析

根据所筛选的 13 条随机引物进行的 RAPD 指纹图谱分析,采用 PopGene Version 1.31 聚类分析软件计算菌株间的遗传距离与遗传相似性。根据菌株间的遗传距离绘制了 29 个供试菌株的系统聚类树状图(图 2)。

从图 2 可知,以遗传距离 0.24 为阈值将供试的 29 个菌株划分为 5 个遗传聚类组(Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ、Ⅳ、

图 2 利用 UPGMA 法构建的 29 个寄生疫霉菌株的聚类树状图
Fig. 2 A dendrogram of 29 isolates of *P. parasitica* constructed by UPGMA method

V)。寄主为烟草的菌株的遗传相似性在 76.5% ~ 92.8% 之间,其 14 个菌株在Ⅲ聚类组;来自刺槐的 5 个菌株间的遗传相似性在 66.7% ~ 88.4% 之间,分别归于Ⅳ和Ⅴ聚类组;寄主为番茄的菌株的相似性为 60.9%;而来自腊梅、丝兰属植物的菌株的相似性分别为 91.3% 和 95.6%;寄主为茄子的菌株和寄主为扶桑的菌株与其他菌株的相似性分别在 29.3% ~ 72.5% 和 43.0% ~ 84.3% 之间(用 PopGene Version 1.31 聚类分析软件计算的菌株间的遗传距离与遗传相似性数据未列出);除茄子菌株 Q1 和番茄菌株 T1 因与其他菌株的遗传距离较大而分别单独成一组(Ⅰ、Ⅱ)外,来自扶桑、丝兰属植物、腊梅以及番茄的 1 个菌株(T2)、刺槐的 2 个菌株(CH4 和 CH5)在同一聚类组Ⅴ。以上结果表明,来自同一寄主的菌株间遗传相似性较高,而来自不同寄主的菌株间差别较大。

图 2 还显示,来自南京、云南和山东的以普通烟为寄主的菌株归于同一聚类组Ⅲ中,而同样来自南京但寄主不同的菌株分别在不同的聚类组中。如来自南京的心叶烟菌株 N14 及刺槐、番茄、腊梅和茄子的菌株分别在 5 个不同的聚类组中,表明寄生疫霉的聚类树状图与菌株的地区来源没有相关性。

3 结论与讨论

利用 RAPD 标记技术对不同寄主来源的寄生疫霉菌株间的亲缘关系分析结果表明,多数供试寄生疫霉菌株的遗传结构与其寄主来源具有明显的相关性,而与地理来源并无明显的相关性,表明在寄生疫霉与寄主植物的长期协同进化过程中,寄主对病原菌的遗传结构产生了显著的影响。

寄生疫霉因寄主范围广泛,在我国除东北烟区外在各烟区均严重发生,在不同地区往往是某一交配型占绝对优势。郑小波和陆家云(1989,1990)发现在我国的华东地区主要是 A² 交配型,而东北、华北和华南地区主要为 A¹ 交配型(Ho et al., 1983; 郑小波,陆家云,1989,1990)。王革等(1997)报道寄生疫霉在云南省除占绝对优势的 A² 交配型外,另有占 14.6% 的 A⁰ 交配型。这些结果说明寄生疫霉在某一地区通常是有性生殖不占优势,有性生殖过程的基因重组可能不是导致寄生疫霉致病力分化和其他生物学性状多样化的主要原因(Ann & Ko, 1990; 郑小波,陆家云,1992)。此外没有证据表明

无性重组在疫霉菌的遗传变异中发挥作用(郑小波, 1997)。地理因素和寄主植物是影响病原菌遗传变异的主要环境因子。关于地理环境对寄生疫霉菌株多态性的影响已有一些报道。张修国等(2000)利用 RAPD 技术对云南省不同地区的烟草黑胫病菌菌株进行了亲缘关系分析, 证明不同菌株间具有丰富的遗传变异, 但是黑胫病菌菌株的遗传聚类组的划分与菌株的地理来源没有明显的相关性, 表明地理来源不是导致黑胫病菌遗传变异的主要原因。本文的研究也发现 14 个烟草黑胫病菌菌株之间的遗传相似性较高, 属于同一聚类组, 而其余来自不同寄主的菌株间的遗传相似性在 50.7% ~ 82.7% 之间, 其相似性比以烟草为寄主的菌株间的相似性小, 这个结果与张修国等(2000)的研究结果相似。推测可能是全国范围内频繁的烟草运输进一步同化了以烟草为寄主的寄生疫霉的遗传物质, 烟草的生产活动可能已经影响到了其病原菌寄生疫霉的遗传背景。为了进一步澄清寄主植物对寄生疫霉的遗传变异的影响, 我们筛选了不同寄主来源的寄生疫霉菌株进行遗传分析。结果显示寄生疫霉菌株的遗传变异与其寄主来源具有明显的相关性。但是由于寄生疫霉的寄主植物有六十多种, 而且很多寄主上的寄生疫霉菌株不易获得, 因此本研究仅选择了寄主分别为烟草、刺槐等 9 种植物的部分寄生疫霉为材料, 但是研究结果已经可以表明寄主来源比其地理来源对寄生疫霉菌株的遗传多样性的影响更大。进一步搜集更多的寄生疫霉菌株对深入阐明寄生疫霉的遗传结构和寄主来源之间的关系具有重要的意义。

尽管许多植物病原菌种下不同菌株可以侵染多种寄主植物, 但是从某种寄主上分离的病原菌通常对其原寄主植物的致病力更强, 这表明在寄主与病原菌的长期协同进化过程中, 寄主对病原菌的长期选择对病原菌的致病力产生了影响, 这种影响对病原菌的遗传物质多样性的作用有多大, 最终是否会对种下群体的划分提供遗传依据, 迄今为止未见报道。寄生疫霉种下群体的分类比较混乱, 多数研究者认为根据其致病力的差异可以分为寄生疫霉烟草变种(*P. parasitica* var. *nicotianae*)和寄生疫霉寄生变种(*P. parasitica* var. *parasitica*)。但是由于变种的划分应该根据其形态学特征而不是致病力, 而且有关形态学及血清学的研究指出, 两个变种间存在

很多相似性, 不存在变种的差异, 因此许多学者对这种分类方法持有争议(郑小波, 1997)。本研究的结果也表明尽管形态学性状没有明显的差别, 但是寄生疫霉的烟草菌株与其他寄主来源菌株之间的确存在一定的遗传距离, 本文结果也为将寄生疫霉划分为烟草和寄生两个变种提供了遗传学支持。

参考文献

- Ann P. J. and Ko W. H. 1990. Growth rate and colony morphology of progenies of zoospores and selfed oospores of *Phytophthora parasitica*. *Mycologia*, **82**(6): 693 - 697.
- Ho H-H, Yu Yong-Nian, Zhuang Wen-Ying and Liang Zhi-Rong. 1983. Mating types of heterothallic species of *Phytophthora* in China I. *Acta Mycologica Sinica* (真菌学报), **2**(3): 187 - 191.
- Nei M. 1978. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics*, **89**: 583 - 590.
- Wang G (王革), Zheng X-B (郑小波), Lu J-Y (陆家云) and Li T-F (李天飞). 1997. On virulence differentiation of the causal organism of tobacco black shank in Yunnan Province. *Journal of Nanjing Agricultural University* (南京农业大学学报), **20**(4): 30 - 35. (in Chinese)
- Wang Z-F (王智发), Liu Y-R (刘延荣) and Xie C-S (谢成颂). 1987. A identification of physiological races of the blank shank pathogen (*Phytophthora parasitica* var. *nicotianae*) in China. *Journal of Shandong Agricultural University* (山东农业大学学报), **18**(1): 1 - 8. (in Chinese)
- Zhang X-G (张修国), Luo W-F (罗文富), Yang Y-L (杨艳丽), Zhang S-G (张世光) and Zhang T-Y (张天宇). 2000. Genetic relationships of *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae* analysed by RAPD. *Mycosystema* (菌物系统), **19**(1): 39 - 44. (in Chinese)
- Zheng X-B (郑小波). 1997. *General Studies and the Research Techniques on Phytophthora*. China Agricultural Press, Beijing, 1 - 123. (in Chinese)
- Zheng X-B (郑小波) and Lu J-Y (陆家云). 1989. Studies on *Phytophthora* species in Fujian, Zhejiang, Jiangsu and Shanghai. *Acta Mycologica Sinica* (真菌学报), **8**(3): 161 - 163. (in Chinese)
- Zheng X-B (郑小波) and Lu J-Y (陆家云). 1990. Distribution of *Phytophthora* species and mating type in east and northeast of China. *Journal of Nanjing Agricultural University* (南京农业大学学报), **13**(3): 61 - 64. (in Chinese)
- Zheng X-B (郑小波) and Lu J-Y (陆家云). 1992. Genetics of *Phytophthora drechsleri*. II. The inheritance of mating types. *Acta Mycologica Sinica* (真菌学报), **11**(2): 134 - 141. (in Chinese)
- Zhu H (朱衡), Qu F (瞿峰) and Zhu L-H (朱立煌). 1994. Isolation of genomic DNAs from fungi using benzyl chloride. *Acta Mycologica Sinica* (真菌学报), **13**(1): 34 - 40. (in Chinese)
- Zhu X-C (朱贤朝), Guo Z-Y (郭振业) and Liu B-A (刘保安). 1987. A identification of physiological races of the black shank pathogen (*Phytophthora parasitica* var. *nicotianae*) in Shandong Province. *Acta Phytopathologica Sinica* (植物病理学报), **17**(2): 90 - 95. (in Chinese)