

冬瓜枯萎病菌核糖体 rDNA ITS区的克隆与序列分析

王翠霞,徐金茹,习雨琳,白雪菲,温晓蕾,段会军

(河北农业大学,河北省作物种质资源重点实验室,河北 保定 071001)

摘要:采用镰刀菌核糖体基因转录间隔区 (ITS)通用引物,PCR扩增冬瓜枯萎病菌核糖体基因 ITS区,并对产物进行克隆和序列分析;利用 Mega 4.1 软件对序列及 GeneBank中以葫芦科为寄主的镰刀菌不同专化型 ITS序列进行聚类。冬瓜枯萎病菌 ITS全长 1 063 bp,其中包括 18S rDNA 一部分序列,5.8S rDNA,ITS1和 ITS2全部序列及 28S rDNA 部分序列。聚类结果将 15个菌株 ITS序列划分为 2个类群,类群 I包括 4个菌株,分别为 2个西瓜枯萎病菌株和 2个甜瓜枯萎病菌株;类群 II包括 11个菌株,其中冬瓜枯萎病菌株就在该类群中,其余为甜瓜枯萎病菌株 5个、西瓜枯萎病菌株 3个、黄瓜枯萎病菌株、丝瓜枯萎病菌株和葫芦枯萎病菌株各 1个。

关键词:冬瓜;冬瓜枯萎病菌;ITS

中图分类号: S436.5 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-7091(2010)01-0080-04

Cloning and Sequencing of rDNA ITS Regions in *Fusarium oxysporum* f. sp. *benincasae*

WANG Cui-xia, XU Jin-ru, XI Yu-lin, BAI Xue-fei, WEN Xiao-lie, DUAN Hui-jun

(Agricultural University of Hebei, Key Laboratory of Crop Germplasm Resources of Hebei, Baoding 071001, China)

Abstract: The internal transcribed spacer regions (ITS) of the rDNA from *Fusarium oxysporum* f. sp. *Benincasae* were amplified with the polymerase chain reaction through the universal primers and sequenced, meanwhile the ITS of different formae specialis of *Fusarium oxysporum* for the host to Cucurbitaceae were clustered. The total length of ITS in *Fusarium oxysporum* f. sp. *benincasae* was 1 063 bp, including partial 18S rDNA, 5.8S rDNA, ITS1, ITS2 and partial 28S rDNA. Cluster results showed that 15 isolates were classified into two groups. Group I included 2 *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum* and 2 *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis*. Group II included 11 isolates, among them *Fusarium oxysporum* f. sp. *benincasae* belonged to the group, the others were 5 *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis*, 3 *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum*, 1 *Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerinum*, 1 *Fusarium oxysporum* f. sp. *luffae* and 1 *Fusarium oxysporum* f. sp. *Lagenariae*, respectively.

Key words: *Fusarium oxysporum* f. sp. *benincasae*; Internal transcribed spacer regions

瓜类枯萎病是瓜类生产上危害最严重的病害之一。目前该病遍及美国、中国、意大利、以色列、日本和印度等几十个国家。我国南北方西瓜种植区都有不同程度发生,重茬地一般发病率在 30%以上,严重地块达 80%,甚至造成绝产。近些年来瓜类枯萎病害频频发生,并有蔓延趋势,严重影响了瓜类产量和品质,使农民遭受巨大经济损失。

全世界已知道的尖孢镰刀菌专化型有 80 多种。

国外报道瓜类枯萎病菌尖孢镰刀菌有 7 个专化型,即西瓜、甜瓜、丝瓜、葫芦、黄瓜、苦瓜和冬瓜专化型。随着生物技术的发展,为了从根本上改变快速识别和跟踪微生物的能力,国内外学者从不同角度对病原菌的分子检测进行了大量研究,如 RAPD^[1,2]、AFLP^[3,4]、RFLP^[5,6]等,而核糖体 DNA (rDNA)是目前研究真菌 DNA 序列的重点。rDNA 保守序列广泛,有着不同进化水平的区域序列,可用于不同等级

收稿日期:2009-08-21

基金项目:河北省自然科学基金资助项目(C2007000547)

作者简介:王翠霞(1984-),女,河北邯郸人,硕士,主要从事瓜类抗病育种研究。

通讯作者:段会军(1965-),男,河北保定人,教授,博士,主要从事瓜类抗病育种研究。

真菌分类鉴定^[7,8]。核糖体 DNA 上的内转录间隔区 (Internal transcribed spacer, ITS)是存在于 18S *rDNA*和 5.8S *rDNA*之间以及 5.8S和 28S *rDNA*的区域,该区域受外界环境因素的影响较小,与编码区域相比具有进化速度慢的特点,在种内不同菌株之间高度保守,而在真菌种间存在极大变化,表现出极大的序列多态性,可为真菌学研究提供丰富遗传信息。

目前,采用镰刀菌核糖体基因转录间隔区 ITS通用引物已将瓜类枯萎病菌除冬瓜专化型以外的其他专化型 ITS区段克隆。本研究拟采用相同的通用引物对冬瓜枯萎病菌进行扩增,克隆其 ITS区段。用 Mega 4.1 软件对该序列以及 GeneBank 中登录的以葫芦科为寄主的镰刀菌不同专化型的 ITS进行聚类分析,为以葫芦科为寄主的不同专化型分类奠定基础。

1 材料和方法

1.1 供试菌株

冬瓜枯萎病菌,由北京市农业科学研究院李兴红女士提供。

1.2 冬瓜枯萎病菌的培养

将供试的冬瓜枯萎病菌在铺有玻璃纸的 PDA 平板培养基上,26℃ 生化培养箱培养 7 d后,提取 DNA。

1.3 冬瓜枯萎病菌基因组 DNA (gDNA)的提取

基因组 DNA提取采用 CTAB 法,具体步骤如下:

将培养好的菌丝连同玻璃纸转至预冷研钵中,液氮研磨成粉末。将粉末置于 1.5 mL 离心管内,以 5 mL/g 的比例加入 CTAB 提取液,65℃ 水浴 40~60 min。冷却至室温后,加入等体积的酚:氯仿:异戊醇 (25:24:1)混合液,轻轻摇匀,10 000 r/min,离心 10 min。吸取上层水相,加入 1/10 体积 10% CTAB-0.7 mol/L NaCl,轻轻摇匀,再加入等体积的氯仿:异戊醇 (24:1),轻轻摇匀,10 000 r/min,离心 10 min。吸取上层水相,加入等体积冰冻异丙醇,轻轻振动,置于 -20℃ 使 DNA 沉淀。继续 10 000 r/min,离心 10 min。小心倒掉上层水相,用 75%乙醇洗涤沉淀 2次,风干。加适量 TE 溶解,-20℃ 保存,备用。

1.4 冬瓜枯萎病菌 *rDNA* 的 PCR 扩增

1.4.1 PCR 引物 采用镰刀菌核糖体基因转录间隔区 (ITS)的通用引物进行 PCR 扩增。

引物 F: 5'-TTTACAACCTCCCAAACCC-3'

引物 R: 5'-ATTACGCCAGCATCCTTGC-3'

1.4.2 PCR 扩增 PCR 反应混合液总体积为 20 μ L:包括 2 μ L 10 \times PCR 反应缓冲液,2.5 mmol/L 的 dNTP 1.2 μ L,引物各 0.5 μ L,5 U/ μ L 的 *Taq*酶 0.2 μ L,模板 1.0 μ L,双蒸水补足到 20 μ L,混匀,离心后加一滴矿物油。

PCR 反应程序为:94℃ 预变性 5 min;94℃ 变性 40 s,54℃ 退火 30 s,72℃ 延伸 1 min,31 个循环;72℃ 延伸 7 min。反应结束后,取 8 μ L 样品于 1.0%琼脂糖凝胶电泳,并用 Bio-Rad 凝胶成像系统照相。

1.5 PCR 产物的纯化、克隆和测序

利用 UNIQ-10 柱式 DNA 凝胶回收试剂盒回收 PCR 扩增产物,回收后的 DNA 连接到 PGM-T-vector 中,转化大肠杆菌 TOP10 感受态细胞,鉴定阳性转化子后,送菌液进行测序。

1.6 序列比对和系统发育分析

将本研究获得的 ITS 序列和 GenBank 中的葫芦科 6 个专化型 (其中还包括甜瓜属的 7 个小种和西瓜属的 4 个小种) ITS 序列分析其同源性,然后采用 Clustal X (version 1.81) 软件中的 Alignment 程序对所有同源序列进行多重对位排列 (Multiple alignments)。

用 MAGE (version 4.1) 软件包进行系统发育分析和进化树的构建。

2 结果与分析

2.1 冬瓜枯萎病菌 gDNA 质量检测

通过测定所提冬瓜 gDNA 在 OD₂₆₀和 OD₂₈₀的吸收值,结果表明,所提取 DNA 的 OD₂₆₀/OD₂₈₀均大于 1.6,蛋白质及其他杂质含量较少。通过琼脂糖凝胶电泳检测基因组 DNA,结果显示所提取 DNA 质量较好,可进行下一步试验 (图 1)。

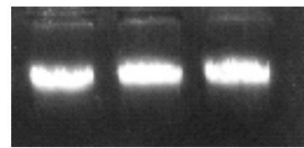
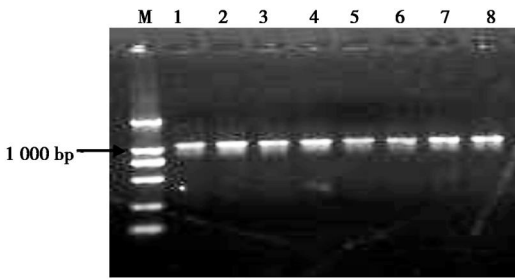


图 1 冬瓜枯萎病菌基因组 DNA 琼脂糖凝胶电泳检测

Fig 1 gDNA electrophoretic analysis of *Fusarium oxysporum* f. sp. *Benincasae*

2.2 冬瓜枯萎病菌 gDNA 的 PCR 扩增结果

运用镰刀菌 ITS 区的通用引物对冬瓜枯萎病菌 gDNA 进行扩增,得到一条 1 000 bp 左右的特异性条带,且没有其他片段的干扰,无拖带现象,所扩增的条带特异性较好 (图 2)。



M. DL2000 Marker; 1 ~ 8. 扩增结果。

M. DL2000 Marker; 1 - 8. IIS PCR production

图 2 冬瓜枯萎病菌 IIS-PCR产物琼脂糖凝胶电泳分析

Fig 2 Electrophoretic analysis of IIS-PCR production in

Fusarium oxysporum f.sp. benincasae

TTTACAACCTCCCAAACCCCTGTGAACATACCACTTGTTCCTCGGCGGATCAG
CCCGCTCCCGGTAAAACGGGACGGCCCGCCAGAGGACCCCTAACTCTGTTT
CTATATGTAACCTCTGAGTAAAACCATAAATAAATCAAACTTTCAACAACGGA
TCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCAAAATGCGATAAGTAATGTG
AATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGCCA
GTATTCTGGCGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTCAACCCTCAAGCACAGCT
TGGTGTGGGACTCGCGTTAATTCGCGTTCCTCAAATTGATTGGCGGTCACGTC
GAGCTTCCATAGCGTAGTAGTAAAACCCCTCGTTACTGGTAATCGTCGCGGCCA
CGCCGTTAAACCCCAACTTCTGAATGTTGACCTCGGATCAGGTAGGAATACCC
GCTGAACCTTAAGCATATCAATAAGCGGAGGAAAAGAAACCAACAGGGATTGC
CCTAGTAACGGCGAGTGAAGCGGCAACAGCTCAAATTTGAAATCTGGCTCTCG
GGCCCGAGTTGTAATTTGTAGAGGATACTTTTGATGCGGTGCCTTCCGAGTTCC
CTGGAACGGGACGCCATAGAGGGTGAGAGCCCCGTCTGGTTGGATGCCAAAT
CTCTGTAAAGTTCCTTCAACGAGTCGAGTAGTTTGGGAATGCTGCTCTAAATG
GGAGGTATATGTCTTCTAAAGCTAAATACCGGCCAGAGACCGATAGCGCACAA
GTAGAGTGATCGAAAGATGAAAAGCACCTTTGAAAAGAGAGTTAAAAAGTACG
TGAAATTGTTGAAAAGGAAGCGTTTATGACCAGACTTGGGCTTGGTTAATCAT
CTGGGGTTCTCCCAAGTGCACCTTTCCAGTCCAGGCCAGCATCAGTTTTCCTCC
GGGGGATAAAGGCGGCGGGAATGTGGCTCTCTTCGGGGAGTGTTATAGCCAC
CGTGTAATACCCTGGGGGGGACTGAGGTTTCGCGCATCTGCAAGGATGCTGGCG
TAAT

图 3 冬瓜枯萎病菌 IIS序列

Fig 3 Sequencing results of IIS in *Fusarium oxysporum* f.sp. benincasae

2.4 冬瓜枯萎病菌 rDNA 的 IIS系统发育分析

采用 Mega4.1 软件包对测序的冬瓜枯萎病菌 IIS与葫芦科的其他小种 IIS进行对位排序后建立系统进化树(图 4)。结果显示 15 个菌株的 IIS被划分为 2 个类群。类群 I 包括 4 个菌株的 IIS,即 2 个西瓜枯萎病菌株 (AY354395.1 和 AY354394.1) 和 2 个甜瓜枯萎病菌株 (AY354391.1 和 AY354392.1)。类群 II 包括 11 个菌株,分别为:冬瓜 IIS序列(标记为 *Fusarium oxysporum*)、黄瓜枯萎病菌 (DQ452450.1)、甜瓜枯萎病菌 (DQ535184.1, AY188919.1, AY354390.1, DQ016233.1, AY354393.1)、西瓜枯萎病菌 (AY354396.1, AY354397.1)、丝瓜枯萎病 (AY354399.1) 和葫芦枯萎病菌 (AY354398.1)。由此说明,镰刀菌在以葫芦科为寄主的几个专化型中, IIS序列相对比较保守,而且发育关系较近。

2.3 冬瓜枯萎病菌 IIS序列分析

测序结果显示,冬瓜 IIS区全长为 1 063 bp,其中包括 18 S rDNA 的一部分序列,5.8 S rDNA, IIS1 和 IIS2 全部序列及 28 S rDNA 的部分序列。采用 ClustaX Multiple Alignment 将所得冬瓜枯萎病菌的序列与镰刀菌在以葫芦科为寄主的其他几个专化型进行对位排序后,结果显示:同源性在 96% 之上,且与 Genbank 中的 AY188919.1, DQ535184.1, DQ452450.1, AY354396.1, AY354399.1 序列同源性达到 99%,说明 IIS 区在种内的保守性较强。所测冬瓜枯萎病菌 IIS 序列全长如图 3。

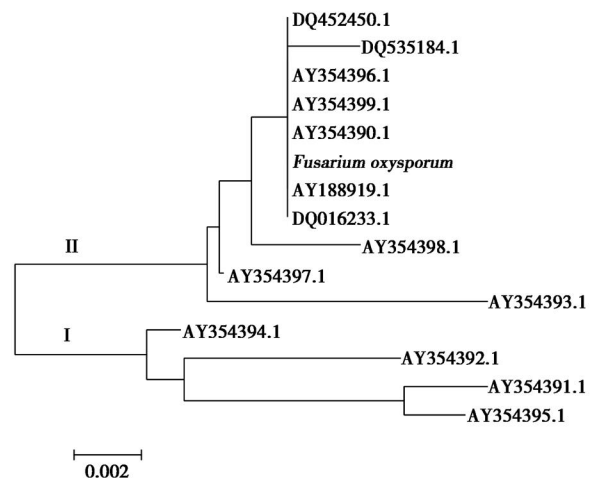


图 4 基于葫芦科为寄主的枯萎病菌 IIS 构建的 NJ 系统发育树

Fig 4 Phylogenetic tree of IIS sequence in different formae speciales of *Fusarium oxysporum* for the host to cucurbitaceae

3 讨论

本研究采用镰刀菌核糖体基因转录间隔区域 (ITS)通用引物, PCR扩增冬瓜枯萎病菌核糖体基因的 ITS区, 获得了冬瓜枯萎病菌的 ITS全长, 其中包括 18 S rDNA 部分序列, 5.8 S rDNA, ITS1和 ITS2全部序列及 28 S rDNA部分序列。说明在镰刀菌中核糖体基因转录间隔区域存在广泛的保守域, 可以用作引物的结合位点。该方法比经典的序列分析方法更快速、更准确地克隆镰刀菌核糖体基因转录间隔区域。目前, 在疫霉菌^[9,10]、锈菌^[11]、黑粉菌^[12]、轮枝菌^[13]等植物病原菌的核糖体基因转录间隔区域克隆充分证明了这一点。

真菌核糖体内转录间隔区是位于核糖体大小亚基 rRNA 基因之间的区域, 被 5.8S rRNA 基因分隔为 ITS1和 ITS2片段。通常认为 ITS区比大小亚基 rRNA 基因以及 5.8S rRNA 基因有着更高的进化率, 可以提供真菌较高秩别, 如种及种以上的分类水平鉴定的依据。但是, 本研究结果发现 15个菌株被划分为 2个类群, 其中冬瓜枯萎病菌株同甜瓜枯萎病菌株、西瓜枯萎病菌株、黄瓜枯萎病菌株、丝瓜枯萎病菌株和葫芦枯萎病菌株在一个类群中。说明 ITS区段在瓜类枯萎病菌核糖体基因转录间隔区域高度保守, 进化较慢, 用该区设计引物很难将瓜类的几个专化型区分开。因此, 冬瓜 ITS序列可以作为相似性比对的依据。

本研究虽然没能将冬瓜枯萎病菌专化型同其他葫芦科为寄主的西瓜专化型、甜瓜专化型、丝瓜专化型、黄瓜等专化型分开, 但是, 发现冬瓜枯萎病菌和西瓜枯萎病菌的 AY354397.1, AY354394.1, AY354395.1菌株和甜瓜枯萎病菌的 AY354392.1, AY354391.1菌株被划分在 2个不同类群中, 所以本研究结果为利用 ITS作为靶序列来设计特异性引物将该冬瓜枯萎病菌与类群 I中的西瓜和甜瓜枯萎病菌分开提供了分子依据。

参考文献:

- [1] Woo S L, Zoina A, Del-Sorbo G, *et al* Characterization of *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* by pathogenic races, VCGs, and RAPD [J]. *Phytopathology*, 1996, 86 (9): 966 - 973.
- [2] Wyss P, Bontante P. Amplification of genomic DNA of arbuscular mycorrhizal (AM) fungi by PCR using short arbitrary

- primers [J]. *Mycol Res*, 1993 (97): 1351 - 1357.
- [3] Tooley P W, O'Neill N R, Goley E D, *et al* Assessment of diversity in *Claviceps africana* and other *Claviceps* species by RAM and AFLP analyses [J]. *Phytopathology*, 2000, 90 (10): 1126 - 1130.
- [4] Bao J R, Fravel D R, O'Neill N R, *et al* Genetic analysis of pathogenic and nonpathogenic *Fusarium oxysporum* from tomato plants [J]. *Canadian Journal of Botany*, 2002, 80 (3): 271 - 279.
- [5] Manicom B Q, Baayen R P. Restriction fragment length polymorphisms in *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* and other *Fusaria* from *dianthus* species [J]. *Plant Pathology*, 1993 (42): 851 - 857.
- [6] Okoli C A N, Carder J H, Barbara D J. Restriction fragment length polymorphisms (RFLPs) and their relationships of some host-adapted isolates of *Verticillium dahliae* [J]. *Plant Pathology*, 1994, (43): 33 - 40.
- [7] Aanen D K, Kuypers T W, Hoekstra R F. A widely distributed ITS polymorphism within a biological species of the ectomycorrhizal fungus *Hebeloma velutipes* [J]. *Mycol Res*, 2001, 105 (3): 284 - 290.
- [8] Amicucci A, Zambonelli A, Giomaro G. Identification of ectomycorrhizal fungi of the genus *tuber* [J]. *Mol Ecol*, 1998, 7 (3): 273 - 277.
- [9] Cooke D E L, Williams N A, Duncan J M. The uses of ITS regions in *Phytophthora* species [C]. *Annual Report of the Scottish Crop Research Institute for 1996* Dunde: Scottish Crop Research Institute, 1997: 151 - 154.
- [10] Cooke D E L, Duncan J M, Drenth, *et al* A molecular phylogeny of *Phytophthora* and related oomycetes [J]. *Fungal Genetics and Biology*, 2000, 30: 17 - 32.
- [11] Kropp B R, Hansenda, Wolp, *et al* A study on the phylogeny of the Dyer's woad rust fungus and other species of *Puccinia* from crucifers [J]. *Phytopathology*, 1997, 87: 565 - 571.
- [12] Laurene L, Lisa A C, Lori M C, *et al* Intermittent transcribed spacer sequence based phylogeny and polymerase chain reaction restriction fragment length polymorphism differentiation of *Tillia walkeri* and T [J]. *Indica Phytopathology*, 2001, 91: 935 - 940.
- [13] Collopy D, Largeteau-Manoum, Romaine C. Molecular phylogenetic analyses of *Verticillium fungicola* and related species causing dry bubble disease of the cultivated button mushroom, *Agaricus bisporus* [J]. *Phytopathology*, 2001, 91: 905 - 912.