

中国主产棉区黄萎病菌的 RAPD 分析

刘学堂¹ 郭金城¹ 张元恩² 宋晓轩³ 孙君灵³

(1 中国农业科学院棉花研究所, 安阳 455112 2 中国农业大学植物科技学院植病系, 北京;

3 农业部棉花遗传改良重点实验室, 安阳)

摘 要 在提取我国 12 个省主产棉区 26 个菌系 gDNA 的基础上, 采用 OPY 和 OPB 两组随机引物, 对这些菌系的基因组进行了 PCR 扩增和聚类分析, 40 个引物中, 12 个引物扩增出满意的适合于分析的多态性谱带。聚类分析将 26 个菌系分为 A、B 两个群, V_a 菌系 (*Verticillium albo-atrum*) 属于单独的 A 群, B 群则包括了所有的大丽轮枝菌系 (*Verticillium dahliae*)。B 群又分为 Ba(Cs Yc) 及 Bb 两个亚群。Bb 亚群下面分 3 个组, Bb1(AV 2 AV 3 及 Ly), Bb2(Sa Ji Ke 及 Yc) 和 Bb3 Bb3 是最大的一个组, 包括供试的 3 个大丽轮枝菌落叶型的 3 个菌系 (V_{D-8} T₉ V₄₄) 和其他大部分非落叶型的菌系。不同的单孢之间 RAPD 分析的结果 (引物 OPY 06 检测出单孢之间 2 06kb 的差异条带) 从分子水平证实了单孢间变异的发生。对河南安阳 4 个菌株单独聚类分析则表现出致病性测定与 RAPD 分析有一定的相关性。

关键词 棉花黄萎病菌 gDNA 提取 RAPD 分析 致病力测定 相关性

棉花黄萎病在我国发生范围广, 危害面积大, 且缺乏有效的控制方法, 长期以来, 一直是严重威胁我国棉花生产的主要病害之一。进入 90 年代以来, 由于环境条件适宜棉花黄萎病病原菌的传播与扩展, 使各棉区黄萎病危害更趋严重^[1]。棉花黄萎病菌是植物病害中系统侵染、土壤传播、抗逆性强、致病性变异较大的病原菌之一, 整体研究水平远较其他病害滞后, 尤其在分子生物学领域起步更晚, 1990 年始见报道, 至今文献仍很有限。为了有效地控制棉花黄萎病菌, 有必要对我国不同棉区的黄萎病菌的遗传结构进行分析, 明确我国主产棉区棉花黄萎病菌的亲缘关系并进行系统分类, 在此基础上, 结合抗病鉴定, 指导我国抗病品种的选育及合理布局^[2]。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 实验菌种 1995 年采自我国主产棉区河南安阳 (AV 1 AV 2 AV 3 AV 4)、商丘 (Sq)、祁县 (Qx)、内黄 (Nh)、河北邯郸 (Hd)、元氏 (Ys)、冀县 (Jx)、河间 (Hj)、山东巨野 (Ju)、滨州 (Bz)、山西运城 (Yc)、陕西三原 (Sy)、江苏常熟 (Cs)、四川简阳 (Ji)、湖北沙杨 (Sa) 的黄萎病代表菌系; 美国 T₉ 菌系 (落叶型)、V_{D-8} 菌系 (落叶型)、辽宁辽阳菌系 (Ly)、新疆库尔勒 (Ke) 菌系 (中国农业科学院棉花研究所植保室提供); 美国 V_a 菌系、V₄₄ 菌系 (落叶型)、P₃₋₁₁₅ 菌系 (中

国农业大学植保系棉病室提供)。

1.1.2 主要仪器及试剂 三羟甲基氨基甲烷 (Tris-base)、乙二胺四乙酸二钠 (EDTA) 和琼脂糖, 十六烷基三甲基溴化胺 (CTAB), β -巯基乙醇 NJ4800PCR扩增仪。

1.1.3 DNA 提取 buffer及配制 10% CTAB-0.7 mol/L NaCl CTAB 10 g NaCl 4.09 g 加水 100 mL \times CTAB buffer 100 mmol/L Tris (pH 8.0), 10 mmol/L EDTA (pH 8.0), 1.4 mol/L NaCl 2% (w/v) CTAB, 2% β -巯基乙醇。

1.1.4 RAPD Kit (1000次) $10\mu\text{L}$ primer stock (用前稀释至 $100\mu\text{L}$); $10\times$ buffer 2.5 mL, dNTP (2.5 mmol/L) 1 mL, Taq 酶 1000 U, Water 5 mL

1.2 方法

1.2.1 棉花黄萎病菌的单孢分离及菌丝体的培养 (1)单孢分离 单孢分离采用常规稀释平板法, 为了保证获得真正的单孢菌系, 用 $30\mu\text{L}$ 的网筛对培养物进行过滤, 进一步除去菌核及多细胞的菌丝体, 这样培养的孢子液不用稀释可直接用接菌环涂平板。25℃培养 36 h 后, 观察到极小的透明的单菌落出现后, 挑取单菌落转入另一培养皿继续培养观察 5 d 待菌落生长正常并产生典型的菌核后, 再转管保存于冰箱 -4℃备用。

(2)菌丝体的培养 取单孢菌体至 Czapek 培养液中振荡培养 (25℃) 15 d 用滤纸过滤获得菌丝体, 蒸馏水冲洗干净营养液后, -20℃保存备用。

1.2.2 gDNA 的提取与纯化 (CTAB 法) 菌丝体经蒸馏水冲洗后吸干水分, 加液氮将菌丝体研磨成细粉状, 再加 5 倍体积的提取 buffer 混匀, 58℃水浴 1 h 冷却至室温, 加等体积的氯仿、异戊醇 (24:1), 混匀, 10000 rpm 离心 10 min 后取上清液, 加 1/10 体积的 10% 的 CTAB 0.7 mol/L 的 NaCl 摇匀并重复上一步骤, 取上清液, 加入等体积的异丙醇, 轻轻摇荡, 6000 rpm 离心 5 min, 倒置片刻, 然后加入 TE 缓冲液溶解沉淀, 加 RNase 至终浓度为 $100\mu\text{g/mL}$, 37℃保温 2 h, 加等体积的苯酚 (Tris 饱和酚, pH 8.0), 混匀, 10000 rpm 离心 10 min, 取上清液, 加入等体积的酚、氯仿、异戊醇 (25:24:1), 抽提两次, 再加入等体积的氯仿抽提后取上清液, 加 2 倍体积的无水乙醇沉淀 DNA, 8000 rpm 离心 5 min 弃上清液, 70% 乙醇洗盐, 倒置片刻, 真空干燥后溶于一定体积的 TE 缓冲液中, -20℃保存。

1.2.3 棉花黄萎病菌 gDNA 的 RAPD 分析 每 $25\mu\text{L}$ 反应体系组成如下: $10\times$ buffer 2.5 μL , dNTP (2.5 mmol/L) 1 μL , primer 2 μL , 模板 DNA 1 μL (约 50 ng), 水 18.3 μL , Taq 酶 0.2 μL (1U)。

设定反应程序, 运行 PCR 仪, RAPD 运行程序如下:

94℃ 10 min 1 cycle, 94℃ 1 min 1 cycles, 36℃ 1 min 35 cycles
72℃ 2 min 35 cycles, 72℃ 10 min 1 cycle

2 结果与分析

2.1 棉花黄萎病菌 gDNA 的提取与纯化

采用 CTAB 法提取了 26 个菌系的 DNA, OD₂₆₀/OD₂₈₀=1.56 产量 27 $\mu\text{g/g}$ 鲜菌丝, 片段长度 25~49.5 kb 条带清晰, 基本上无拖带现象。说明提取的 DNA 降解少, 断裂现象也较轻。在用 CTAB 法提取棉花黄萎病菌的 DNA 时, DNA 的纯化采用酚抽提 1 次, 酚、氯仿抽

提 2 次, 以除去蛋白, 氯仿抽提 1 次, 以除去痕量酚。DNA 的纯度 (OD260/OD280) 达到 1.86 可以满足 RAPD 分析的要求

2.2 引物的筛选及不同单孢的 RAPD 分析

为了避免不必要的重复和浪费, 在前人工作的基础上, 挑选了其他真菌 RAPD 分析中已用过的 OPY 及 OPB 两组共 40 个 RAPD 引物, 首先采用 Va VD-8 V44 JY 及 Ke 菌系对 40 个引物进行了筛选。40 个引物中, 24 个引物未扩增出任何条带, 16 个引物 ((OPB05 OPB07 OPB15 OPY01 OPY02 OPY06 OPY07 OPY11 OPY12 OPY13 OPY14 OPY15 OPY16 OPY17 OPY18 OPY20) 扩增出多态性条带, 可用以棉花黄萎病菌 gDNA 的 RAPD 分析 (OPY13 OPY14 的 PCR 扩增结果, 见图 1)

从培养性状来看, 虽然棉花黄萎病菌不同单孢之间的变异发生率非常之低, 但确实有变异发生。为了从分子水平验证这种变异的发生及为严格取样提供进一步的分子依据, 本实验选取来自于美国的棉花黑白轮枝菌的培养性状无差异的 4 个单孢作为研究对象, 采用已筛选的 16 个引物进行

PCR 扩增。除 OPY06 外, 其余 15 个引物均对 4 个单孢扩增出 3~13 条不等明显而稳定的条带, 4 个单孢之间无明显的差异, 一定程度上证明了棉花黄萎病菌的不同单孢之间变异极少发生或发生率极低。OPY06 引物对 4 个单孢共扩增出 11 条带 (图 2), 分子量分布于 3606~3806 bp 之间, 其中第三条带 (分子量从大到小) 分子量为 2.06 kb 为 1.4 单孢所共有, 而 2.3 单孢没有这条带。阴性对照无任何条带出现, 表现出 1.4 单孢的基因组与 2.3 单孢的基因组相比发生了微小的变异, 同时也从分子水平证实了棉花黄萎病菌不同单孢基因组之间确实发生了变异, 这种变异有可能是通过一些表型性状的改变, 也有可能仅仅是部分序列的变化, 并不从表型上加以体现, 只有通过分子水平上的遗传分析才能鉴别出来。但不管怎样, 单孢之间确实有可能发生变异, 在

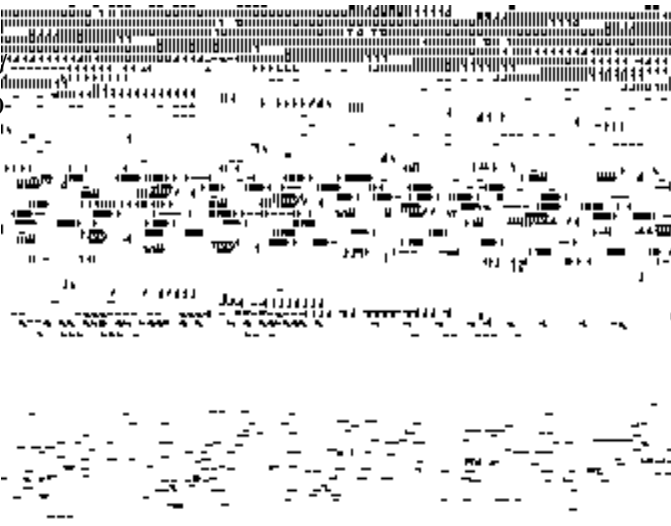


图 1 引物筛选的 RAPD 图谱 (引物 OPY13 OPY14)

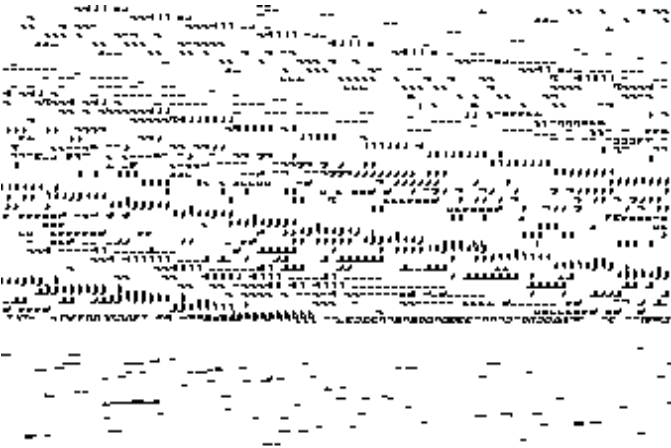


图 2 黄萎病菌 Va 菌系 4 个单孢的 RAPD 图谱
(引物 OPY06 OPY07)

进行分子生物学研究取样时一定尽可能地选取表型等各种条件一致的单孢, 以免造成实验上的取样误差

2 3 我国主产棉区棉花黄萎病菌的 RAPD 分析

2 3 1 引物扩增结果 应用筛选的 16 个引物, 对我国主产棉区棉花黄萎病菌的 26 个代表菌系进行了 PCR 扩增, 结果表明: 16 个引物均扩增出多态性的 RAPD 图谱, 其中 4 个引物 (OPY06 O PY 11 O PY 12 O PY 16) 扩增出的 RAPD 图谱或因部分菌系未扩增出条带, 或因多态性差, 而不能用于 RAPD 分析, 其他 12 个菌系均扩增出清晰、多态性好的条带, 分子量大小在 4 0 kb~ 125 bp 之间

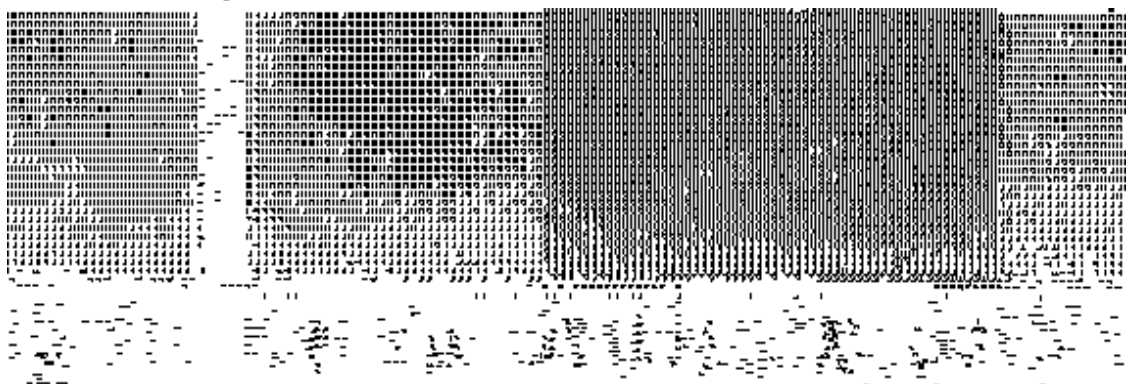


图 3 棉花黄萎病菌 RAPD 图谱 (O PY02)

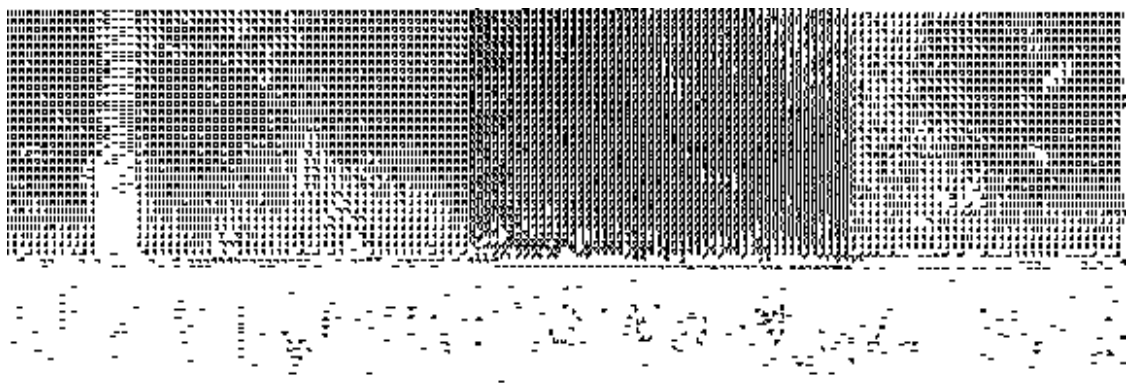


图 4 棉花黄萎病菌 RAPD 图谱 (O PB05)

2 3 2 RAPD 分析 供试的 26 个棉花黄萎病菌系经 12 个随机引物扩增, 得出反映 DNA 片段多态性的 12 张电泳图谱, 部分随机引物的扩增产物电泳图谱如图 3 4 所示 (因版面所限, 每组引物仅列出 1 个引物扩增产物的电泳图谱) 对每一个引物扩增产物的条带进行数据编码 (在图谱上相同迁移率的位置上, 对应每一菌株编码为 1, 无则为 0) 12 个随机引物的

扩增图谱经数据化, 得出原始数据表, 输入计算机, 用 SAS 软件进行平均连锁聚类分析, 根据聚类图画出反映菌株之间亲缘关系的树状图 (图 5)。从图 5 可以看到: 供试的 26 个菌系在 Normalized RM S distance 1.698363 的水平上分成 A、B 两群, A 群包括来自于美国的棉花黄萎病菌的一个种——黑白轮枝菌系, B 群包括所有来自于美国和中国主产各棉区的棉花黄萎病菌的另外一个种——大丽轮枝菌系。B 群在 Normalized RM S distance 1.120448 的水平上被分为 Ba (包括 Cs 及 Jy 菌系, Cs 与 Jy 之间又存在一定的距离) Bb (包括其余 23 株大丽轮枝菌系) 两个亚群。在 Bb 亚群内又可分成平行的 3 个组: AV 2 AV 3 及 Ly 菌系属于 Bb1 组; Sa Ji K e 及 Y c 4 个菌系属于 Bb2 组; Bb3 组是最大的一个组, 又可分为 6 个平行的亚组。供试的所有落叶型菌系 V_{D-8} T₉ V₄₄ 被分成了单独的一个亚组 (Bb31), 其中 V_{D-8} 菌系与美国的 V₄₄ 落叶型菌系亲缘关系稍近而与 T₉ 的亲缘关系较远, Q_x 和 AV 1 菌系被分成一个亚组 (Bb32), P₃₋₁₁₅ J_x H_d 菌系被分到 Bb33 亚组, 而 H_j 菌系被分成单独的一个亚组 Bb34, J_u N_h AV 4 和 SY 菌系属于 Bb35 亚组, Y_s 和 S_q 则属于 Bb36 亚组。同时从树状图还可以看出: 随着 Normalized RM S distance 的降低, 亚组内又可再分为若干亚亚组, 供试菌株之间有明显的个体差异, 没有检测到基因组序列完全相同的两个菌株。

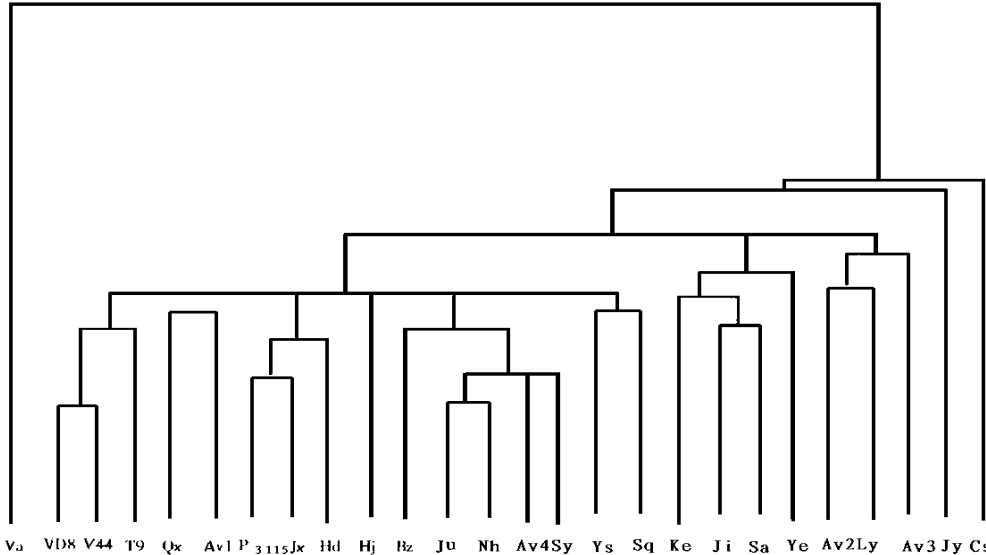


图 5 棉花黄萎病菌的 RAPD 图谱的聚类分析树状图

2.4 安阳棉花黄萎病菌 4 个致病型的致病力测定及 RAPD 分析

2.4.1 黄萎病菌安阳菌系 4 个典型菌株致病性测定 棉花黄萎病菌安阳菌系的 4 个典型菌株采自河南安阳中棉所棉花黄萎病重发生地的各类黄萎病典型症状, 按照田间症状表现和培养性状的不同特点将安阳菌系分为 4 个类型 (表 1)。田间症状与分离结果表明: AV 1 及 AV 4 菌株典型症状表现为雨后温度骤然回升后, 黄萎病株病情急剧扩展, 1~2 d 内, 迅速扩展至整株 2/3 以上, 叶片不呈现典型的西瓜皮症状, 而是呈现整叶黄化, 并迅速萎蔫, 变色皱缩后脱落, 也有个别的黄化后即脱落, 症状有点类似江苏的落叶型菌系, 但正常气候条件下, 仍表现典

型的症状,这又与落叶型菌系有所区别 AV 2和 AV 3菌系田间症状表现为典型的西瓜皮症状,发展也较为缓慢

采用纸钵栽培,于棉苗一叶一心时蘸根接种(孢子液浓度 10^7 μ m L), 15 d后调查发病情况(5 d 1次),实验采用 5个品种(中棉所 12号、中棉所 17号、中棉所 19号、岱 50和中杂 028)作为重复,结果见表 2

表 1 棉花黄萎病菌系安阳菌系
4个菌株的培养性状

菌株	培 养 性 状
AV 1	外延菌丝无或极少,菌落黑色,密布黑色菌核
AV 2	外延菌丝及内圈菌核各占一半,菌落由中心至边缘颜色逐渐变淡,菌核逐渐稀疏
AV 3	外围为稀疏的黑色菌核,内圈为白色的菌丝
AV 4	分离后培养期不形成黑色菌核,连续转接后可形成稀疏的菌核

表 2 棉花黄萎病菌安阳菌系 4个菌株致病力测定

菌株	病 情 指 数						显著性 (0.05)
	中棉所 12号	中棉所 17号	中棉所 19号	岱 50	中杂 028	平均值	
AV 1	21.2	20.6	23.3	21.5	39.1	25.14	A
AV 2	13.4	23.6	17.9	18.0	13.3	17.24	B
AV 3	16.1	22.8	15.2	20.5	18.0	18.52	B
AV 4	28.5	25.5	21.5	32.2	46.3	30.8	A
平均	19.8	23.1	19.5	23.1	29.2	—	—

从表 2可以看出,棉花黄萎病菌安阳菌系的 4个菌株致病力明显不同,以 AV 4菌株致病力最强,对 5个品种的平均病指达到 30.8 其次是 AV 1菌株,病情指数达 25.14 均明显高于其他两个菌株,但两个菌株间差异不显著 AV 2和 AV 3菌株对 5个品种的平均病情指数为 17.24和 18.52 AV 3的致病力略高于 AV 2 但两者差异不显著。以致病力测定可以将安阳菌系 4个菌株分为两个致病组。

各菌株对同一品种的致病力不同,同一菌株对不同品种的致病力也表现一定的差异 4个菌株对中棉所 17号的致病力差异不大,最高与最低病指仅相差 4.9 以 AV 4菌株致病力稍强,依次是 AV 2 AV 3 AV 1菌系;对中棉所 19号的致病力以 AV 1菌株最强,病指为 23.3 其次是 AV 4菌株,病指为 21.5 AV 2和 AV 3菌株致病力较弱,病指分别为 17.9和 15.2 对岱 50和中杂 028的致病力均以 AV 4菌株最强,且病指与其他菌株差异较大,病指分别为 32.5 和 46.3 岱 50依次是 AV 1菌株 AV 3 AV 2菌株,病指分别为 21.5 20.5和 18.0 中杂 028依次是 AV 3 AV 1 AV 2菌株,病指分别为 39.1 18.0和 13.3

5个品种间以对安阳菌系的 4个菌株的综合抗病性为依据,对棉花黄萎病菌的抗性以中棉所 19号最高,其次是中棉所 12号、中棉所 17号、岱 50 中杂 028

2.4.2 棉花黄萎病菌安阳 4个菌株的 RAPD 分析 采用筛选的 12个 RAPD 引物,对安阳菌系 4个菌株 gDNA 的扩增结果进行单独的统计和聚类分析,结果表明,安阳菌系 4个菌株分成两个组,第一组包含致病性较强的 AV 1和 AV 4菌株,但 AV 4菌株和 AV 1菌株之间遗传距离也不一样;致病性较弱的 AV 3和 AV 2菌株被分在另一个组。这 4个菌株的单独的聚类分析结果显示,棉花黄萎病菌的致病性与 RAPD 分组有一定的相关性 但由于分析的样品少,很难说具有广泛的代表性

3 结论与讨论

CTAB法提取棉花黄萎病菌 gDNA 的操作中, β -巯基乙醇、EDTA、NaCl 的浓度及 pH 值至关重要, 但菌丝体的培养及预处理如果稍为马虎, 也同样提取不到理想的 DNA。菌丝体经过滤后一定要用蒸馏水冲洗干净, 并用 TE 冲洗 1 次, 然后尽量吸干水分, 可保证提取 DNA 的量。千万注意菌丝体培养时, 不要使之染上任何色素, 慎用抗生素, 否则, 难以提取到 DNA。

来源于我国 12 个主产棉省的 26 个黄萎病菌菌系的 RAPD 分析结果, 体现了不同地域棉花黄萎病菌遗传学上的关系, 部分地域上邻近的菌系被聚于一类(亚群、组或亚组), 从一定程度上体现了地域与遗传学上的相关性, 但大部分菌系地域上的接近与遗传学上分类无必然的联系。这与国内外报道的结果一致^[4]。

棉花黄萎病菌安阳菌系的 4 个菌株, 致病力的测定与 RAPD 分类相关性很好, 均将 4 个菌株分成两组, 一组包括强致病力的 AV 1 和 AV 4 菌株, 一组包括致病力相对较弱的 AV 2 和 AV 3 菌株, 但由于其余 24 个菌系未做致病力测定, 4 个菌株很难证实有广泛的代表性。因此, RAPD 分类与棉花黄萎病菌致病性的关系, 有待于进一步研究^[5]。

本研究得出如下结论:

棉花黄萎病菌 gDNA 的提取中, CTAB 法提取的 gDNA 具有提取的片段长、纯度高、稳定、降解轻的特点, 非常适合棉花黄萎病菌 DNA 的提取。

RAPD 引物 OPY 06 检测出 V_a 的 4 个不同单孢之间存在一条 2.06 kb 谱带的变异。1.4 单孢所共有, 2.3 单孢则无此带, 进而从分子水平验证了单孢之间确实发生了变异。

用 OPB、OPY 两组随机引物, 对来自 12 个主产棉省的 26 个菌系的 gDNA 进行 PCR 扩增, 16 个引物(OPB05、OPB07、OPB15、OPY01、OPY02、OPY06、OPY07、OPY11、OPY12、OPY13、OPY14、OPY15、OPY16、OPY17、OPY18、OPY20) 扩增出稳定的多态性谱带。

采用筛选的 12 个引物对 26 个菌系扩增出的电泳图谱, 聚类分析, 将之分为两个群, V_a 菌系属于单独的 A 群, 其余所有供试的大丽轮枝菌系属于 B 群。B 群又可分为 Ba(Cs、Yc) 及 Bb 两个亚群。Bb 亚群下面 3 个组, Bb1(AV 2、AV 3 及 Ly)、Bb2(Sa、Ji、Ke 及 Yc) 和 Bb3。Bb3 是最大的一个组, 包括供试的 3 个大丽轮枝落叶型的 3 个菌系(V_{D-8}、T₉、V₄₄) 和其他大部分非落叶型的菌系。

安阳菌系以致病力的差别将之分为两个组, 致病力较强的 AV 1 和 AV 4 菌株在一个组, AV 3 和 AV 2 菌株致病力相对较弱, 属于另一个组, 对四个菌株的扩增结果单独统计并聚类分析, 也被分成两个对应的组, 体现出 RAPD 分析与致病性的相关性。但由于样品少, 难以具有广泛的代表性。

参 考 文 献

- 1 沈其益主编. 中国棉花病害. 北京: 科学出版社, 1993
- 2 Welsh J, *et al*. Nucleic Research, 1990, 18(22): 6531~ 6535
- 3 惠东威. RAPD 技术及其应用. 生物过程进展, 1992, 12(6): 1~ 5
- 4 Barasubiyé T, *et al*. Discrimination between alfalfa and potato isolates of *V. albo-atrum* using RAPD marker. Mycological Research, 1995, 99(12): 1507~ 1512
- 5 Ram say J R. RAPD-PCR identification of *Verticillium dahliae* isolate with differential pathogenicity on

cotton Australian Journal of Agricultural Research 1996 47(5): 681- 693

RAPD Analysis of Cotton *Verticillium* Wilt Pathogens

Liu Xuetang Guo Jincheng

(Cotton Research Institute, Chinese Academy of Agricultural
Sciences, Anyang, Henan Province 455112)

Zhang Yuan'en

(Department of Plant Diseases, College of Plant Sciences and Technology,
China Agricultural University, Beijing)

Song Xiaoxuan Sun Junling

(Key Lab of Cotton Genetic Improvement of Agricultural Ministry, Anyang)

Abstract DNA extracted by CTAB method has longer fragment, higher purity and better stability. So it is suitable for the DNA extraction of cotton *Verticillium* wilt pathogen. The RAPD analysis has been performed with 26 cotton *Verticillium* strains in 40 primers (OPY, OPB), 12 primers amplified polymorphic DNA patterns. By the cluster analysis, 26 strains are divided into 2 clusters (A, B). *V. alboatrum* belong to cluster A, cluster B comprises the other *Verticillium* strains (25 strains); cluster B can be divided into 2 subclusters including Ba and Bb, subcluster Bb followed by 3 groups Bb1, Bb2, Bb3. The group Bb3 is the largest group, including defoliating strains (T₉, V_{D-8}, V₄₄) and majority of *Verticillium dahliae* strains. The result of RAPD analysis of 4 Anyang strains showed the correlation of pathogenicity of cotton *Verticillium* wilt pathogen with RAPD analysis. RAPD analysis of different single spores also proved that the genomic variation may be occur among different single spores from one species.

Key words Cotton; *Verticillium* wilt pathogen; DNA extraction; RAPD analysis