

玉米弯孢菌叶斑病菌致病性分化的 RAPD 鉴定

鄢洪海

(青岛农业大学 植物保护学院, 山东 青岛 266109)

摘要: 从 60 条随机引物中选择 12 对组合, 对玉米弯孢叶斑病菌基因组 DNA 进行随机扩增, 共扩增出 128 条遗传标记。根据这些标记使用 Statistic 统计软件对菌株之间相互关系进行聚类分析, 结果表明: 菌株间最高相似系数是为 87%, 最低为 47%。22 个供试菌株在连锁距离 0.4 范围内全部聚在一起, 树状图上的菌株可分成 5~6 组。a 组包括: 98-36、98-25、98-17、98-07、98-01 和 98-28 6 个菌株, 是遗传基础最接近的一组。

关键词: 玉米弯孢叶斑病菌; 致病性分化; DNA; 多态性

中图分类号: S435.131 文献标识码: A 文章编号: 1000-7091(2009)增刊-0258-04

Study on RAPD for Physiological Differentiation of *Curvularia lunata* in Maize

YAN Hong-hai

(College of Plant Protection Qingdao Agricultural University, Qingdao 266109, China)

Abstract: One hundred and twenty-eight piece of belt signs are multiplied through selecting 12 pairs of associations from 60 piece of random decoy and multiplying *Curvularia lunata* randomly. According to the signs, pathogen's mutual relations are analyzed. The result is that the highest similarity degree of the pathogen is 87% and the lowest is 47%. Twenty-two experimental pathogen all gather together by all stems on 0.4 to the stem in the linked together. The pathogen forming tree shape can be divided into 5 or 6 groups. Group a consists of 6 pathogen, they are 98-36, 98-25, 98-17, 98-07, 98-01 and 98-28, which is the most approximate one on heredity base.

Key words: *Curvularia lunata*; Pathogenicity differentiation; DNA; Much appearances of heredity

玉米弯孢菌叶斑病自 1995、1996 在我国部分省市爆发以来, 近十几年持续发生, 已经成为玉米生产上主要病害, 并由以前东北和华北个别地区受害严重, 迅速扩展到全国各玉米产区。研究表明: 玉米弯孢菌叶斑病菌存在生理分化现象, 玉米弯孢菌叶斑病近期严重发生主要是病菌产生强致病性类型, 致使大部分主推玉米品种抗性丧失^[1, 2]。本研究尝试运用 RAPD 技术对采集于我国各主要玉米产区的玉米弯孢叶斑病菌株进行分析, 目的在于检测基因型和病原菌致病性之间的关系。

1 材料和方法

1.1 供试菌株

供试 22 个菌株采自辽宁、吉林、北京、山东、河北等我国主要玉米产区。所有菌株均为经组织分离

后, 单孢纯化培养菌株。菌株编号、电泳序号、采集地点和时间见表 1。

1.2 菌株的培养及总 DNA 提取

采用 Richard 培养液扩增玉米弯孢叶斑病菌, 菌体培养好后用去离子水反复冲洗, 最后用滤纸吸干菌体表面的水分放于离心管中, -40°C 冷冻干燥后备用^[3-5]。

采用 CTAB/NaCl 方法制备微量 DNA。

1.3 供试菌株的 RAPD

1.3.1 供试菌株的 RAPD 引物筛选 供试引物由上海生物工程公司和美国 Operon 公司生产的 10 个碱基随机引物。根据扩增产物在 1.5% 琼脂糖电泳条件下谱带有无、多少、可重复性, 确定扩增效果较好的引物及组合为扩增引物。

收稿日期: 2009-01-20

基金项目: 国家“九五”科技攻关项目(96005010303); 青岛市自然科学基金项目(05-JC-55)

作者简介: 鄢洪海(1964-), 男, 山东德州人, 副教授, 博士, 主要从事植物病理生理学教学和科研工作。

表 1 DNA 多态性研究的供试菌株

Tab. 1 Isolates tested in polymorphism of DNA			
菌株代号 Code of isolate	电泳序号 Sequence in electrophoresis	采集地点和时间 Location and time for isolate collection	备注
96-01	1	顺义 Shunyi	1996
98-36	2	济南 Jinan	1998
98-28	3	保定 Baoding	1998
98-06	4	成都 Chengdu	1998
98-10	5	瓦房店 Wafangdian	1998
98-30	6	新乡 Xinxiang	1998
98-18	7	瓦房店 Wafangdian	1998
98-01	8	绥中 Suizhong	1998
98-19	9	丹东 Dandong	1998
97-03	10	怀柔 Huairou	1997
98-02	11	昌图 Changtu	1998
98-41	12	莱阳 Laiyang	1998
98-11	13	瓦房店 Wafangdian	1998
98-16	14	哈尔滨 Harbin	1998
98-14	15	营口 Yingkou	1998
98-04	16	左家 Zuojiā	1998
98-05	17	岫岩 Xiuyan	1998
98-25	18	滦县 Luanxian	1998
98-07	19	沈阳 Shenyang	1998
98-17	20	瓦房店 Wafangdian	1998
96-05	21	延庆 Yanqing	1996
98-15	22	承德 Chengde	1998

1.3.2 PCR 扩增反应条件 PCR 反应体系为 25 μ L 体系: 10 \times Buffer 2 μ L、MgCl₂ 1.5 μ L、dNTP 0.5 μ L、Taq 酶 0.25 μ L、DNA 模板 1 μ L、引物_(S_x+S_y) (S_x、S_y 代表不同的引物, x \neq y) 各 0.5 μ L、灭菌重蒸水 18.75 μ L, 加完药品后, 在反应液表面覆盖 20 μ L 灭菌石蜡

油。PCR 反应在 PE 热循环仪(480 型)上进行, PCR 反应程序 94 $^{\circ}$ C 1 min、34 $^{\circ}$ C 1 min、72 $^{\circ}$ C 2 min, 进行 40 个循环后 72 $^{\circ}$ C 10 min。扩增结果在含有 2.5%EB 的 1.5%琼脂糖上电泳, 用 EAGLEEYE 凝胶成像仪检测扩增谱带, 记录电泳结果。

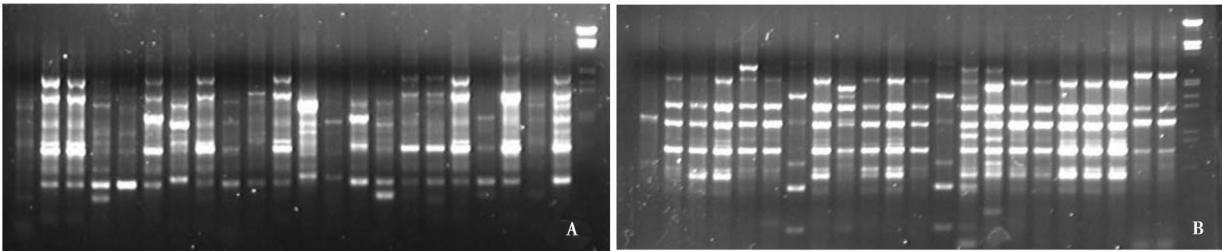
每个 RAPD 扩增谱带均看作一个遗传位点, 扩增谱带有的记为 1, 无的记为 0, 将图谱转化成由 1 和 0 组成的数据表, 将所得数据输入 Statistic 统计软件, 形成相似系数矩阵。再采用 UPGMA 法进行聚类分析, 并绘出供试菌株亲缘关系聚类分析图。

2 结果与分析

2.1 引物筛选及 RAPD 扩增结果

从 120 多条引物中筛选出扩增效果较好的引物共计 26 对组合, 有 16 个组合能使所有 22 个菌株都能扩增出 RAPD 谱带, 12 个组合能使 22 菌株扩增的 RAPD 谱带中, 有 1 条以上共同谱带, 总谱带超过 9 条。12 个引物组合共扩增出 128 个 RAPD 标记。多态性标记 100 个, 占扩增段总数的 78%。12 个引物组合扩增出的 DNA 片段大小范围为 3530~564 bp, 而绝大多数为 2027~564 bp。

图 1—A, B 以及其他引物组合扩增出的各菌株 DNA 多态性标记图谱都有差异。在有的图谱中供试菌株之间谱带较相似, 而有的图谱菌株间差异明显, DNA 遗传多态性非常丰富。



A. 引物是 AGTCGGGTGG+CTGGGTGAGT; B. 引物是 TGAGCGGACA+ACCTGAACGG。
A. Primer AGTCGGGTGG+CTGGGTGAGT; B. Patterns TGAGCGGACA+ACCTGAACGG。
图 1 玉米弯孢叶斑病菌各引物的 RAPD 扩增图谱(菌株序号: 自左向右, 1~22, 23 为 Marker)
Fig. 1 RAPD patterns of *Civularia lunata* in maize leaf spot by different primers(Isolate sequence; from left to right, 1~22, 23 by Marker)

2.2 病菌菌株间的相似性及聚类分析结果

供试菌株相似系数最高的两个菌株是 98-25 和 98-17, 为 87%, 最低的两个菌株是 98-18 和 98-06, 为 47%。供试 22 个菌株通过不加权对平均聚类法在连锁距离 0.4 范围内全部聚在一起, 形成的树状图见图 2, 从树状图上看, 可将 22 个菌株分成 5~6 组, 其中的 a, b, c 3 个组区分明显。a 组包括: 98

-36、98-25、98-17、98-07、98-01 和 98-28 6 个菌株; b 组包括: 98-06、98-10、96-05、98-15 和 98-41 5 个菌株; c 组包括: 98-30、98-04、98-05、98-02 和 97-03 5 个菌株; 剩下的菌株分属于 d, e, f 组, d 组包括: 98-16、98-14 2 个菌株, e 组包括: 96-01、98-19 2 个菌株, F 组包括: 98-11 和 98-18 菌株。

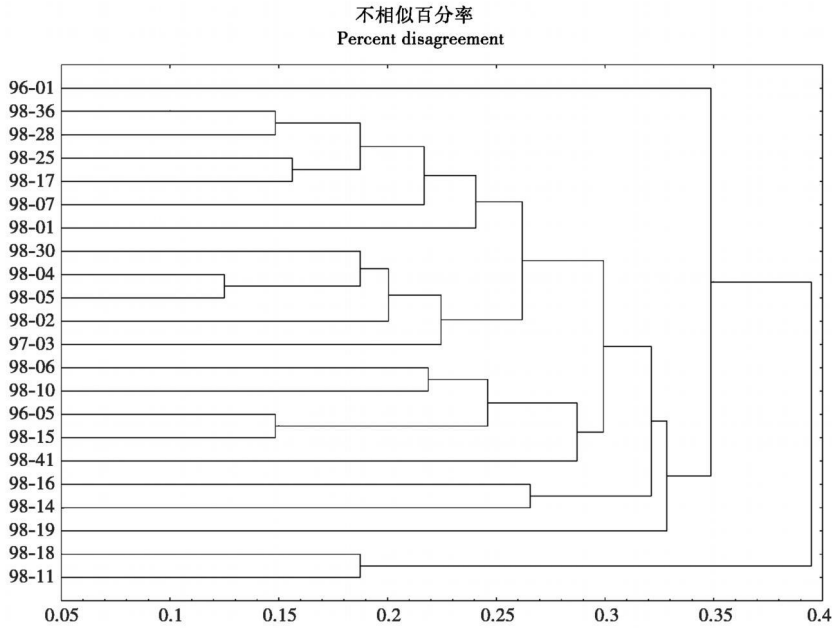


图 2 玉米弯孢叶斑病菌在 DNA 水平上的聚类分析树状图

Fig. 2 Cluster analysis of *Curvularia lunata* Isolates in DNA level

2.3 病菌 DNA 遗传分化与寄主鉴别上的鉴定结果比较分析

从表 2 看出,病菌分化在 DNA 水平上划分结果和在鉴别寄主上测定的致病性分化结果有较大相似性。DNA 水平划分的 a 组 6 个菌株包括了鉴别寄主鉴定结果致病类型 A 组的全部 4 个菌株:98-17、98-25、98-28 和 98-01,反映 98-17、98-25、98-28 和 98-01 菌株不仅在致病性上,而且在遗传背景上也具有一致性;DNA 水平划分的 b 组与寄主鉴定的

致病类型 B 组相似,有 98-06、98-10、96-05 和 98-41 4 个菌株相同,一致率达到 80%;DNA 水平划分的 c 组 5 个菌株与寄主鉴定的致病分化鉴定的致病类型 C 组菌株基本相同,如 98-02、98-05、98-30、97-03 都分别在两个组内;DNA 水平上 d 组与寄主鉴定的致病类型 D 组相关,有一个菌株 98-16 相同;两种分组方法中 f 组和 F 组也相关,它们在各自分组中都属于比较特殊的类型,致病性弱,菌体为白色(正常野生菌株黑色,致病性强)。

表 2 病菌 RAPD 分组与寄主鉴定分组比较

Tab. 2 Comparison of physiological differential groups of <i>Curvularia lunata</i> determined by differential host and RAPD			
寄主鉴定分组 ^[1] Pathogenicity grouping on differential	菌株代号 Isolates	RAPD 鉴定分组 RAPD grouping	菌株代号 Isolates
A	98-25 98-28 98-17 98-01	a	98-28 98-25 98-17 98-01 98-07 98-36
B	98-36 98-41 98-06 96-05 98-07 98-10	b	98-41 98-15 96-05 98-10 98-06
C	98-30 98-02 98-15 97-03 98-05	c	98-30 98-02 98-04 97-03 98-05
D	98-04 98-16	d	98-14 98-16
E	98-19	e	98-19
F	98-18 98-11	f	98-11 98-18

注:菌株下带“—”为两种分组方法中对应组相同的菌株。
Note:—, Means the common isolate in the two groups divided by the two grouping.

3 结论与讨论

3.1 玉米弯孢叶斑病菌具有丰富的遗传多态性

从供试的菌株与菌株之间遗传基础看,最高相似为 87%,最低为 47%,玉米弯孢叶斑病菌具有丰富的遗传多态性,这种 DNA 水平上多态性与该病菌不同菌株之间形态特征差异较大很相像;该菌在分生孢子形态上菌株之间(特别不同地域的菌株之间)

差异较显著,常见有 3 种类型:长椭圆形、圆三角形和“Y”字型;在培养形态上也易发生变异,有的菌株能产生大量的黄色素,有的产生棕红色素,有的培养过程中产生大量气生菌丝,有的还能产生白化类型^[6 7]。

3.2 病菌 DNA 水平的分化是致病性分化的根本原因

在 DNA 水平上玉米弯孢叶斑病菌株存在着明

显的遗传分化,而且这种遗传分化与通过鉴别寄主测定的病菌致病性分化关系较密切。采用鉴别寄主鉴定方法划分出的致病类型 A 组的全部 4 个菌株通过 RAPD 基因组扩增也完全聚在一个类群中,致病类型划分的 B 组和 C 组菌株也与对应的类群较吻合,证明病菌致病性分化是基因分化的结果,两种鉴定方法结果紧密相关。

3.3 病菌的生理分化区域性不明显

同属于一种分化类型的菌株分布于多个地区,如在 DNA 水平上亲缘关系密切的致病类型 A 组 6 个菌株来自 3 个省:辽宁、河北和山东,98—25 和 98—28 同来自河北省保定地区,98—17、98—07 和 98—01 分属于辽宁省的瓦房店、沈阳、绥中。B 组的 5 个菌株分别属于新乡、左家、铁岭和北京 4 个地区;C 组和 D 组也都不属于同一个地区。这与采用鉴别寄主鉴定的结果一致,说明地域可能不是影响病菌致病性变异的主要原因,玉米品种和病菌的遗传背景和生理生化基础作用可能更直接^[1,2]。

3.4 DNA 分子标记是玉米弯孢叶斑病菌致病性分化鉴定的有效辅助手段

RAPD 技术已用于多种真菌遗传变异的分析和研究,并证明是一种快速有效的方法^[3-5,8,9]。病菌致病性分化是一种表型特征,但对于玉米弯孢菌叶斑病菌致病性分化来说近期还没有一套理想的鉴别寄主,因此可以采用 RAPD 标记技术作为一种辅助鉴定手段,通过遗传变异反映病菌致病性分化。即能从遗传本质上分析玉米弯孢叶斑病菌群体遗传特性,又能经济试用地紧密跟踪反映病菌生产实际中致病性分化的现实情况,指导生产合理利用品种抗

病性。

致谢:本研究是在中国农科院植保所植物病虫害生物学国家重点实验室完成的,中国农科院品种资源研究所戴发超和王晓明研究员提供了部分菌株,对他们为试验提供的帮助表示衷心感谢。

参考文献:

- [1] 陈捷,鄢洪海,高增贵,等.玉米弯孢叶斑病菌生理分化及鉴定技术[J].植物病理学报,2003,33(2):121—125.
- [2] 戴法超,王晓明.玉米弯孢菌叶斑病研究[J].植物病理学报,1998,28(2):123—129.
- [3] 伍尚忠,罗林.广东省稻瘟病菌 DNA 指纹分析及谱型结构[J].植物病理学报,1998,28(4):323—330.
- [4] 刘学敏,陈爱宜.运用随机扩增多态性 DNA 标记检测中国东北大豆灰斑病菌株遗传变异[J].植物病理学报,1998,28(1):43—48.
- [5] 孙广宇.新月弯孢不同分离物的 RAPD 及 ITS 区的 PCR—RFIP 分析[J].吉林农业大学学报,1998.
- [6] 鄢洪海,陈捷,高增贵,等.玉米弯孢叶斑病菌白化菌株初报[J].菌物系统,2002,21(4):604—606.
- [7] Carlier J. DNA Restriction fragment length polymorphisms *Mycosphaerella* species that cause banana leaf spot diseases [J]. *Phytopathology*, 1994, 84(7): 751—756.
- [8] Czerwenka—Wenkstetten—IM. First report and pathogenicity of *Myrothecium roridum*, *Curvularia eragrostidis*, and *C. lunata* on seeds of *Stiga hemonthica* in Nigeria[J]. *Plant—Disease*, 1997, 81(7): 832.
- [9] Yao C L. Detection and identification of *Peronosclerospora sachari* in maize by DNA hybridization[J]. *Phytopathology*, 1991, 81(8): 901—905.