

中图分类号: S532 文献标识码: B 文章编号: 1672-3635(2013)06-0365-05

黑龙江省链格孢属病原菌的 RAPD 分析

姚亮亮¹, 丁俊杰¹, 张铨哲^{2*}, 顾鑫¹, 杨晓贺¹, 赵海红¹, 申宏波³, 刘伟¹

(1. 农业部佳木斯作物有害生物科学观测实验站, 黑龙江省农业科学院佳木斯分院, 黑龙江 佳木斯 154007;

2. 东北农业大学农学院, 黑龙江 哈尔滨 150030; 3. 黑龙江农业职业技术学院, 黑龙江 佳木斯 154007)

摘要: 利用 RAPD 技术分别对分离自黑龙江省各地区的 90 株链格孢属病原菌进行了遗传多样性分析。利用 NTSYS 2.0 进行链格孢属病原菌的聚类分析。RAPD 分析结果表明, 引物 OPE-19 扩增后产生的各个群体间相似性系数分布在 0.60~1.00。在 68.0% 相似性水平上可划分为 3 个主要 RAPD 组群和 8 个次要 RAPD 组群。聚类分析结果表明, 黑龙江省链格孢属病原菌 RAPD 组群与寄主植物和分离地区之间没有相关性。

关键词: 链格孢属病原菌; RAPD; 马铃薯早疫病菌

RAPD Analysis of *Alternaria* Pathogens in Heilongjiang Province

YAO Liangliang¹, DING Junjie¹, ZHANG Xuanzhe^{2*}, GU Xin¹, YANG Xiaohu¹, ZHAO Haihong¹, SHEN Hongbo³, LIU Wei¹

(1. Observation and Experiment Station of Crop Pests of Jiamusi, Ministry of Agriculture/ Jiamusi Branch of Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Jiamusi, Heilongjiang 154007, China; 2. College of Agronomy, Northeast Agricultural University, Harbin, Heilongjiang 150030, China; 3. Heilongjiang Agricultural College of Vocational Technology, Jiamusi, Heilongjiang 154007, China)

Abstract: To understand the genetic diversity of 90 *Alternaria* pathogen isolates collected from Heilongjiang Province, the genotypic characteristics was performed by using random amplified polymorphic DNA (RAPD), and cluster analysis of *Alternaria* pathogens was carried out by using NTSYS program. RAPD results indicated that the similarity coefficients of RAPD group amplified by the primer OPE-19 ranged from 0.60 to 1.00. According to RAPD analysis by using the primer OPE-19, 90 isolates were separated into three major RAPD groups and eight minor groups at the similarity level of 68.0%. The cluster analysis results suggested that RAPD groups not be correlated with the host plants and locations where the isolates were collected.

Key Words: *Alternaria* pathogens; RAPD; *Alternaria solani*

链格孢属(*Alternaria* Nees)病原菌属于半知菌亚门丝孢纲丛梗孢目黑色菌科, 是农作物的主要致病菌之一, 在全球分布非常广泛。全世界已描述的近 500 个链格孢属病原菌的种分类单位中 95% 以上链格孢属病原菌可兼性寄生于植物, 引起农作物病害^[1]。链格孢属病原菌中存在着丰富的遗传多样性。Welsh 和 McClelland^[2] 采用随机扩增多态性 DNA (Random amplified polymorphic DNA, RAPD) 技术, 用 5 个 RAPD 随机引物扩增了 35 个 *A. solani*

和 *A. alternata* 菌株的基因组 DNA, 通过聚类分析, 两个种之间有明显的区别, 但每个种内的相似性大小与地理来源、寄主和致病性强弱关系不大。孙霞^[3] 筛选出的 9 个随机引物对 57 个链格孢属病原菌进行 RAPD 分析, 共得到 142 个多态性带, 平均每个引物 15.8 条带。聚类结果显示, 大孢子种和小孢子种能明确区分成两组群。RAPD 被广泛应用于链格孢属病原菌遗传多样性研究中, 但在国内还未见同时对 *A. solani*, *A. porri* 及 *A. brassicola* 进行遗传多样性分

收稿日期: 2013-11-28

基金项目: 国家农业部 948 项目“马铃薯地上茎体栽培模式配套与示范”(2011-Z52)。

作者简介: 姚亮亮(1985-), 男, 硕士, 实习研究员, 主要从事作物病害及综合防治技术研究。

*通信作者(Corresponding author): 张铨哲, 教授, 主要从事作物病害及综合防治技术研究, E-mail: zhe3850@yahoo.com.cn。

析。为了了解黑龙江省 *A. solani*, *A. brassicola* 及 *A. porri* 的遗传结构, 从而达到科学监测 *A. solani*, *A. brassicola* 及 *A. porri* 菌群结构动态变化的目的。本研究将利用 RAPD 分子标记测定 3 种链格孢属病原菌的遗传多样性, 为 *A. solani*, *A. porri* 及 *A. brassicola* 群体遗传变异的研究提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

链格孢属病原菌的采集: 2007~2009 年在黑龙江省哈尔滨市、齐齐哈尔市、牡丹江市、鹤岗市、佳木斯市和加格达奇市 6 个地区采集分别被 *A. solani* 侵染的马铃薯叶片, 被 *A. porri* 侵染的大葱叶片及被 *A. brassicola* 侵染的甘蓝叶片。切成小片, 用 70% 酒精清洗 3~5 s, 10% 升汞清洗 1~2 min, 用灭菌过的

滤纸吸干。在 25℃ 下放到 PDA 培养基上恒温培养, 收集菌丝, 转到 PDA 斜面上于 -20℃ 保藏。

1.2 方法

1.2.1 提取 DNA

采用 Goodwin 等^[4] 的方法提取基因组 DNA。

1.2.2 DNA 浓度与纯度的检测

利用紫外分光光度法将保存的 DNA 溶液用超纯水稀释一定倍数, 测定其 A260 和 A280, DNA 纯度依据 A260/A280 判定, 比值在 1.8 以上的 DNA 符合要求。

1.2.3 RAPD 分子标记

选用 OPE 的 1 组共 20 个寡聚核苷酸引物(表 1), 分别扩增从马铃薯上分离的 8 个链格孢属病原菌, 根据扩增结果, 从中筛选出扩增条带多、清晰且重复性、差异性好的 4 个引物。

表 1 试验使用的 RAPD 引物序列

Table 1 Oligonucleotide RAPD primers used in experiment

引物编号 Primer code	序列(5'→3') Sequence	引物编号 Primer code	序列(5'→3') Sequence
OPE-01	CCCAAGGTCC	OPE-11	GAGTCTCAGG
OPE-02	GGTGC GGGA	OPE-12	TTATCGCCCC
OPE-03	CCAGATGCAC	OPE-13	CCCGATTCCG
OPE-04	GTGACATGCC	OPE-14	TGCGGCTGAG
OPE-05	TCAGGGAGGT	OPE-15	ACGCACAACC
OPE-06	AAGACCCCTC	OPE-16	GGTGACTGTG
OPE-07	AGATGCAGCC	OPE-17	CTACTGCCGT
OPE-08	TCACCACGGT	OPE-18	GGACTGCAGA
OPE-09	CTTCACCCGA	OPE-19	ACGGCGTATG
OPE-10	CACCAGGTGA	OPE-20	AACGGTGACC

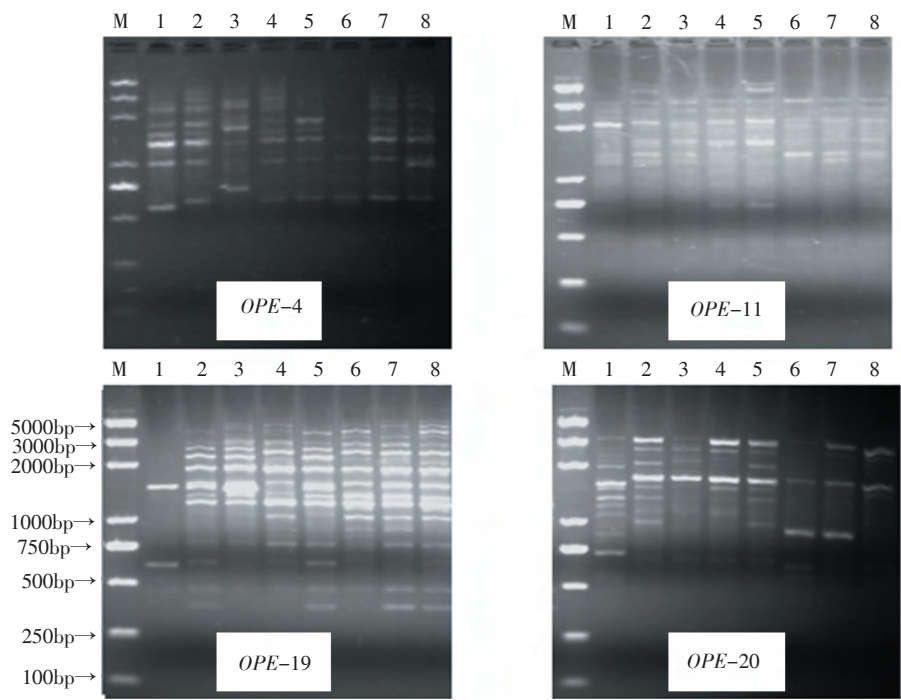
1.3 数据统计与分析

对琼脂糖凝胶电泳图谱及聚丙烯酰胺凝胶电泳图谱进行统计。将电泳图谱上清晰且可重复出现的条带记为“1”, 同一位置没有条带记为“0”, 同时忽略条带强弱的差异, 生成“0”和“1”组成的原始矩阵。统计各引物的位点。利用 NTSYSpc 2.1 软件进行数据处理, 使用 SAHN 程序进行聚类分析, 采用 UPGMA 法(Unweighted pair-group method arithmetic averages, 非加权配对算术平均法)进行聚类分析, 并通过 Tree plot 模块生成聚类图(Phenogram)。

2 结果与分析

在 20 个 OPE 引物中 OPE-4、OPE-11、OPE-19、OPE-20 扩增效果较好, 其中 OPE-19 扩增的条带清晰、条带数多, 而且特异性条带数最多(图 1)。因此, 本研究利用 OPE-19 引物扩增了 90 个链格孢属病原菌, 并分析链格孢属病原菌的遗传多样性。

为了分析链格孢属病原菌的遗传多样性, 本试验利用 OPE-19 引物扩增了 90 株链格孢属病原菌的基因组 DNA。根据 OPE-19 电泳图谱中扩增条带



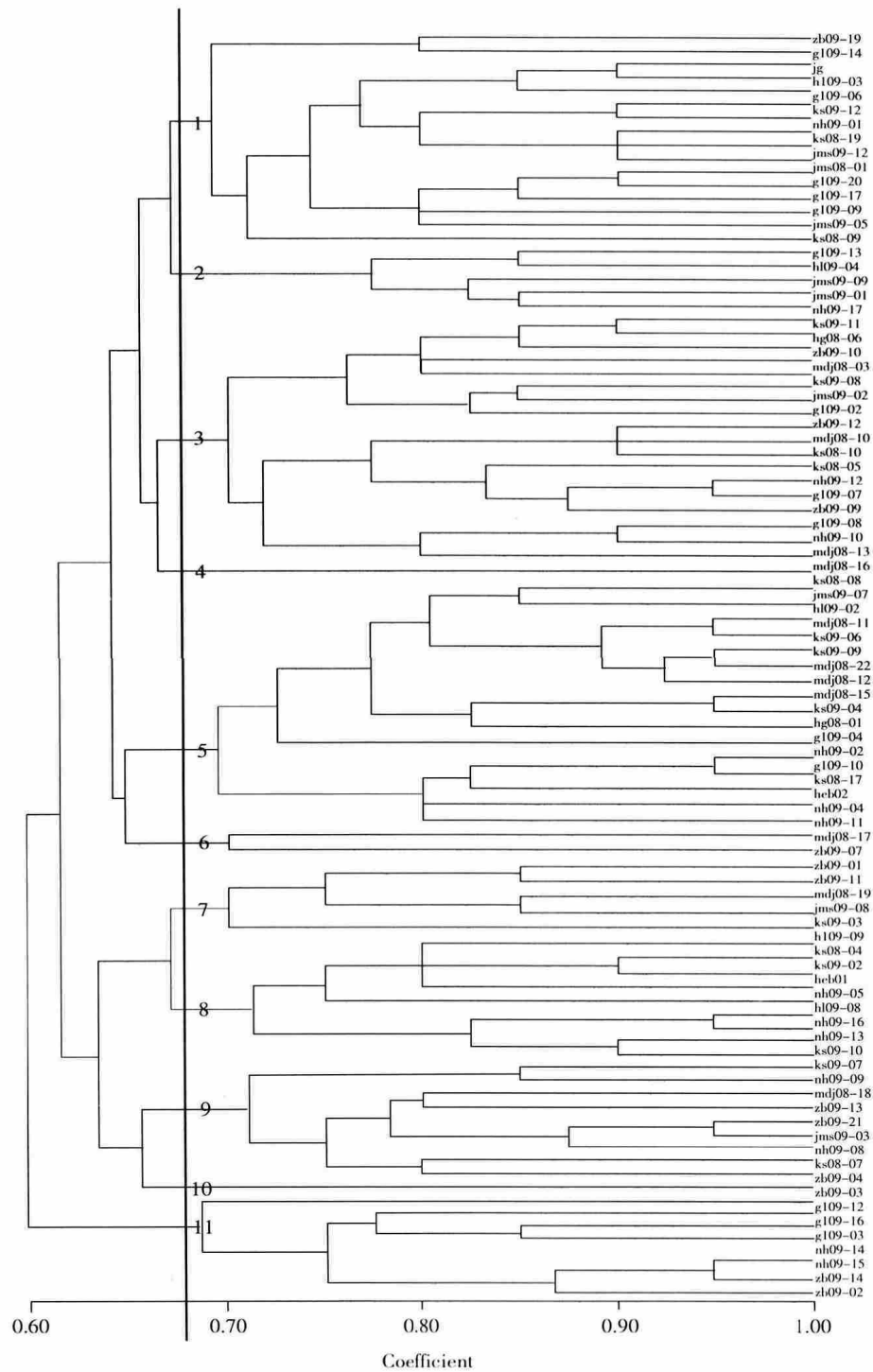
M: DL2000 plus DNA Marker; 1~8: 分别为 8 个链格孢菌的基因组 DNA 的图谱。
M: DL2000 plus DNA Marker; 1~8: RAPD profiles of 8 *Alternaria* isolates genomic DNAs amplified.

图 1 不同 RAPD 引物扩增 8 个链格孢菌的基因组 DNA 的图谱
Figure 1 RAPD profiles of eight *Alternaria* isolates genomic DNAs amplified by using different RAPD primers

的有无，对 DNA 扩增条带进行统计。OPE-19 对 90 个不同链格孢属病原菌的扩增结果显示共扩增出 18 条条带，其中差异性片段是 11 条。利用 NTSYS 分析表明，在被测定的所有链格孢属病原菌中由 OPE-19 引物扩增后产生的各个群体间相似性系数分布在 0.560~1.000 之间。RAPD 分析结果显示，在 68.0% 相似性水平上可划分为 3 个主要 RAPD 组群和 8 个次要 RAPD 组群(图 2)。

3 个主要 RAPD 组群 RG₁、RG₃ 和 RG₅ 分别是由 16 个菌株、18 个菌株和 16 个菌株组成的。在 11 个 RAPD 组群中，同时含有 3 种链格孢属病原菌的组群有 3 个，RG₁ 组群由哈尔滨市分离的芸苔链格孢菌(6 个)和葱链格孢菌(1 个)，以及加格达奇市(1 个)、佳木斯市(3 个)、牡丹江市(1 个)和齐齐哈尔市(4 个)分离的茄链格孢菌组成；RG₃ 组群由哈尔滨市分离的芸苔链格孢菌(3 个)和葱链格孢菌(3 个)，以及佳木斯市(1 个)、牡丹江市(4 个)、齐齐哈尔市(6 个)和鹤岗市(1 个)分离的茄链格孢菌组成；RG₁₁ 组群由哈尔滨市分离的芸苔链格孢菌(3

个)和葱链格孢菌(3 个)，以及齐齐哈尔市分离的茄链格孢菌(2 个)组成；RG₅ 组群由哈尔滨市分离的芸苔链格孢菌(2 个)，以及哈尔滨市(1 个)、牡丹江市(5 个)、齐齐哈尔市(7 个)和鹤岗市(1 个)分离的茄链格孢菌组成；RG₆ 组群由哈尔滨市分离的葱链格孢菌(1 个)和牡丹江市分离的茄链格孢菌(1 个)组成；RG₇ 组群由哈尔滨市分离的葱链格孢菌(2 个)和佳木斯市(1 个)、牡丹江市(1 个)和齐齐哈尔市(1 个)分离的茄链格孢菌组成；RG₈ 组群由哈尔滨市分离的葱链格孢菌(2 个)和佳木斯市(1 个)、牡丹江市(2 个)和齐齐哈尔市(4 个)分离的茄链格孢菌组成；RG₂ 组群由佳木斯市(2 个)、牡丹江市(1 个)和齐齐哈尔市(2 个)分离的茄链格孢菌组成；RG₈ 组群由哈尔滨市(1 个)、牡丹江市(2 个)和齐齐哈尔市(6 个)分离的茄链格孢菌组成；RG₄ 只包含一个佳木斯分离的茄链格孢菌；RG₁₀ 只包含一个哈尔滨市分离的葱链格孢菌。以上结果说明 RAPD 组群与寄主植物和分离地区之间没有相关性。



图中1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11分别表示RG₁, RG₂, RG₃, RG₄, RG₅, RG₆, RG₇, RG₈, RG₉, RG₁₀, RG₁₁;
命名为zb的菌种均为*A. porri*, 命名为gl的菌种均为*A. brassicola*, 其余菌种均为*A. solani*。

1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, and 11 represent RG₁, RG₂, RG₃, RG₄, RG₅, RG₆, RG₇, RG₈, RG₉, RG₁₀, and RG₁₁; zb before the number represents *A. porri*, gl before the number *A. brassicola*, and others *A. solani*.

图2 黑龙江省各地区和不同寄主植物上分离的90个不同的链格孢属病原菌基于RAPD(引物OPE-19)DNA指纹的聚类分析

Figure 2 Dendrograms of 90 *Alternaria* pathogen isolates collected from different locations and host plants based on RAPD(primer OPE-19) DNA fingerprints in Heilongjiang

3 讨 论

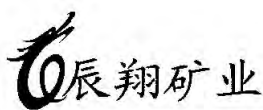
本研究利用 RAPD 技术分析了采自黑龙江省 6 个地区的不同寄主上分离的 90 个链格孢属病原菌的遗传多样性, 比较了 RAPD 图谱遗传多态性与寄主植物和孢子类型之间的相关性。Mahuku 等^[5]的研究结果显示, RAPD 标记对基因组学提供有用信息。因为 RAPD 无论在启动位点内或启动位点之间能检测到基于碱基序列的变化, 包括插入、缺失、置换和倒置。RAPD 分析结果表明, 3 种链格孢种 *A. solani*, *A. brassicola* 及 *A. porri* 的种间亲缘关系很近, 但是在种内存在着明显的变异。*A. solani* 分布在 10 个 RAPD 组群上; *A. brassicola* 分布在 4 个 RAPD 组群上; *A. porri* 分布在 7 个 RAPD 组群上。以上结果表明链格孢菌属真菌具有丰富的遗传多样性。聚类分析图中可以看出, *A. solani*, *A. brassicola* 及 *A. porri* 同时分布在一个 RAPD 组群上, 因此仅靠 RAPD 标记并不能区分 3 种链格孢属病原菌。这些结果与王洪凯等^[6]以及 Roberts 等^[7]的研究结果一致。

RAPD 分析结果显示, 在 68.0% 相似性水平上可划分为 3 个主要组群和 8 个次要组群(图 2)。结果还显示, 牡丹江市和齐齐哈尔市分离的马铃薯早疫病菌分别划分为 8 个 RAPD 组群。Goodwin^[8]报道, 遗传多样性最多的地区是病菌起源中心。根据这一结论, 我们初步推测黑龙江省

马铃薯早疫病可能是由牡丹江和齐齐哈尔地区为起源中心开始扩散。

[参 考 文 献]

- [1] 方中达. 植物研究方法 [M]. 北京: 中国农业出版社, 2007.
- [2] Welsh J, McClelland M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers [J]. *Nucleic Acids Research*, 1990, 18(24): 7213-7218.
- [3] 孙霞. 链格孢属真菌现代分类方法研究 [D]. 山东农业大学, 2006.
- [4] Goodwin S B, Drenth A, Fry W E. Cloning and genetic analyses of two highly polymorphic, moderately repetitive nuclear DNAs from *Phytophthora infestans* [J]. *Current Genetics*, 1992, 22: 107-115.
- [5] Mahuku G, Peters R D, Platt H W, *et al.* Random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis of *Phytophthora infestans* isolates collected in Canada during 1994 to 1996 [J]. *Plant Pathology*, 2000, 49(2): 252-260.
- [6] 王洪凯, 张天宇, 张猛. 链格孢属真菌分类研究进展 [J]. *山东农业大学学报*, 2001, 32(3): 406-410.
- [7] Roberts R G, Reymond S T, Anderson B. RAPD fragment pattern analysis and morphological segregation of small-spored *Alternaria* species and species group [J]. *Mycological Research*, 2000, 104(2): 151-160.
- [8] Goodwin S B. The population genetics of *Phytophthora* [J]. *Phytopathology*, 1997, 87: 462-473.



辰翔矿业有限公司

专业生产马铃薯育种——膨胀蛭石

河北灵寿县辰翔矿业有限公司位于河北省石家庄市灵寿县, 是一家专业生产蛭石片、膨胀蛭石、珍珠岩的企业, 已有 30 多年的发展历史。辰翔公司根据马铃薯育种特点, 研发了育种专用膨胀蛭石。本公司生产的马铃薯专用膨胀蛭石性价比高, 已在国内十几家马铃薯育种公司应用, 并得到一致好评。本公司蛭石产品型号齐全, 也可根据客户需求订制生产。

如果您对我们的产品感兴趣, 欢迎致电联系, 索要资料、样品。

联系人: 薛 刚 15613123526、15833992815

地 址: 河北省石家庄市灵寿县燕川工业区

电 话: 0311-82616100 (传真)