

鸭跖草叶点霉的致病性与 dsRNA 及 RAPD 类群的相关分析

胡汉桥¹, 于莉¹, 李赤¹, 张锐²

(1 湛江海洋大学 农学院, 广东 湛江 524088; 2 湛江海洋大学 生物化学中心, 广东 湛江, 524088)

摘要:用随机引物扩增多态性(RAPD)和纤维素法对鸭跖草叶点霉 *Phyllosticta commelimecola* 的基因组遗传多样性和 dsRNA 进行测定, 分析遗传多样性和 dsRNA 与菌株的致病力的关系。结果表明菌株间存在明显的培养类型和致病力分化现象, 菌株的致病力从南到北逐渐减弱。选择东北地区有代表性的菌株, 进行 dsRNA 测定和 RAPD 分析, 在所测定的菌株中有 10 个含有 dsRNA, 2 个不含 dsRNA, 菌株致病力强弱与 dsRNA 无相关性。通过 RAPD 扩增和聚类分析, 在类间距离 15 以下可将 12 个鸭跖草叶点霉分为 5 个类群。辽宁省和吉林省的菌株亲缘关系较近, 黑龙江省的菌株与辽宁、吉林的菌株亲缘关系远, 同一 RAPD 类群中表现出相似的致病力。

关键词:鸭跖草; 叶点霉; dsRNA; RAPD; 聚类分析

中图分类号: S451

文献标识码: A

文章编号: 1001-411X(2005)02-0035-04

Relationship between pathogenicity of *Phyllosticta commelimecola* of *Commelina communis* with dsRNA and RAPD groups

HU Han-qiao¹, YU Li¹, LI Chi¹, ZHANG Rui²

(1 Agricultural College of Zhanjiang Ocean University, Zhanjiang 524088, China;

2 Biochemistry Center of Zhanjiang Ocean University, Zhanjiang 524088, China)

Abstract: The genetic polymorphism and dsRNA of *Phyllosticta commelimecola* from Northeastern of China were determined by RAPD and cellulose methods. The relationship between the genetic polymorphism and dsRNA and pathogenicity was analyzed. The results showed that there were obvious differences in culture types and pathogenicity of these strains, and the pathogenicity of the strains decreased from southern to northern. The typical strains were subject to dsRNA and RAPD analyses. Among 12 strains tested, 10 strains contained dsRNA and 2 without dsRNA. It was indicated that there was not relationship between dsRNA and pathogenicity. The isolates could be divided into 5 groups under the Hierarchical cluster distance of 15. There was close relationship between the isolates of Jilin Province and Liaolin Province, however, the strains of Helongjiang Province had distant relationship with the strains of Jilin and Liaolin Province. The pathogenicity of the strains under the same RAPD group was similar.

Key words: *Commelina communis*; *Phyllosticta commelimecola*; dsRNA; RAPD; cluster analysis

鸭跖草 *Commelina communis* 是国内重要商品粮基地东北地区农田主要难防杂草之一。化学除草剂对该草的防除效果不理想, 使用寄生在鸭跖草上的病原真菌控制农田鸭跖草的发生是一个重要防除途径^[1]。至今为止, 已记录了约 80 多种真菌致病于约 70 种杂草。

一些病原真菌已应用于杂草的防治中^[2]。植物病原真菌中存在致病力分化的现象, 造成其致病力分化的原因有多种^[3~5]。不同真菌的致病力与随机引物扩增多态性 DNA (RAPD) 类群之间也存在复杂的关系^[6]。鸭跖草叶点霉 *Phyllosticta commelimecola* Young

是鸭跖草上一种重要的病原真菌,对该菌的研究目前只停留在分类、致病性及毒素的测定等方面^[7-9].本研究测定了鸭跖草叶点霉生物学特性及致病力,分析了其致病性与 dsRNA 及 RAPD 种群的关系,对于研究该菌致病力的遗传变异至关重要,为有效利用该菌提供理论依据同时也为有效地防治该杂草提供致病力强且致病性稳定的菌株.

1 材料与方法

1.1 材料

所采鸭跖草叶点霉 *Phyllosticta commelinae* 标本,来自东北三省不同地区,病区分布自 41°N~49°N.所用的随机引物由上海癌基因研究中心合成,筛选出 18 个引物(表 1)对叶点霉菌进行 RAPD 分析.

表 1 筛选的随机引物编号及其核苷酸序列(5'→3')

Tab. 1 The numbers and sequences of selected primers

编号 number	核苷酸序列 sequence	编号 number	核苷酸序列 sequence
01	CAGGCCCTTC	10	CCCAAGGTCC
02	CATCCCCCTG	11	CCAGATGCAC
03	TGCGCCCTTC	12	GAGTCTCAGG
04	GTCCACACGG	13	AAGCCTCGTC
05	GATGACCGCC	14	AAGTGC CGG
06	GTCCCGACGA	15	GGCAGGCAAG
07	GTCGCGTCA	16	ACGAGAGGCA
08	GGTCTACACC	17	GGCACTGAGG
09	CACCGTATCC	18	CGCCTAGGTA

1.2 方法

1.2.1 菌株的分离 切取病害标本病斑边缘组织,放于载玻片上,加入 1 滴灭菌水,置于显微镜下,待分生孢子从孢子器中溢出后,吸取孢子液,平铺在琼脂培养基上,于 20~22℃下培养,将发芽的孢子转入 PSA 中.

1.2.2 致病力的测定 从待测菌株挑取菌块置 PSA 平板上,20℃培养 6 d 后,用内径 0.5 cm 打孔器切下菌块,接种于盆栽三叶期鸭跖草的叶片上,每片叶接

种 1 个菌块,以 PSA 培养基为空白对照,置于塑料微栅保湿 4 d 后保持 20~22℃和 12 h 光照,15 d 后观察发病情况.根据病斑面积占叶面积的大小划分菌种的致病类型:强致病力为病斑面积占叶面积的 50%以上;中等致病力为病斑面积占叶面积的 25.0%~49.9%;弱致病力为病斑面积占叶面积的 24.9%以下.

1.2.3 培养性状的测定 取各地区致病力最强的菌株,将各菌株在 PSA 培养基上活化后,用打孔器取菌块接种于 PSA 培养基上,20℃培养 6 d 后,观察各菌株的培养特性,测定各菌株的生长速率.

1.2.4 菌株的 dsRNA 检测方法 取各地区致病力最强的菌株,按梁平彦^[3]的方法提取 dsRNA,最后用 50 μL TE (pH8.0)溶解,采用琼脂糖凝胶电泳检测 dsRNA.

1.2.5 DNA 的提取及 RAPD 扩增及聚类分析 菌株在 PSA 培养基上活化后,挑取多个小菌块置于 PS 液体培养基上,25℃下低速振荡培养 3 d.将培养的菌体用蒸馏水洗 3 次,吸干水分,采用 CTAB 法提取各菌株的 DNA. RAPD 反应程序如下:反应混合物于 94℃变性 2 min;进入循环,94℃1 min,37℃1 min,72℃2 min,共 45 个循环;最后 72℃保温 10 min.扩增产物在 10 g/L 琼脂糖中电泳,照相.将多态性的扩增条带,进行数值化,用 SPSS9.0 软件进行聚类分析.

2 结果与分析

2.1 致病力测定

自东北地区 12 个市县农田的鸭跖草上分离的叶点霉接种叶片 15 d 后,调查发病的结果表明,菌株间存在明显的致病力分化现象,黑龙江省菌株致病力弱,而辽宁、吉林省的菌株致病力变化较大,大部份菌株的致病力强,少数菌株的致病力弱.菌株的致病力从南到北有逐渐减弱的趋势.选取三省致病力强弱不同的菌株各 4 个为代表(黑龙江省菌株的致病力都弱),测出其致病力,结果如表 2.

表 2 所选菌株及其致病力

Tab. 2 The selected strains and their pathogenicity

菌株号 number	来源 source	致病力 pathogenicity	菌株号 number	来源 source	致病力 pathogenicity
1	黑龙江省纳河市	低	7	黑龙江省嫩江县	低
2	吉林省吉林市	高	8	吉林省梅河口市	中
3	黑龙江省佳木斯市	低	9	黑龙江省牡丹江市	低
4	辽宁省锦州市	中	10	吉林省通化市	中
5	辽宁省营口市	低	11	吉林省图门市	低
6	辽宁省辽阳市	高	12	辽宁省兴城市	高

2.2 培养类型及与致病力的关系

各菌株的培养类型及其地理分布的结果见表 3。从表 3 可见, 各菌株的菌落特征除了菌落的形态和产生厚垣孢子一致外, 在菌落的颜色、生长速度的快

慢和产生分生孢子器的多少方面均存在差异, 东北地区的菌株存在培养类型分化现象。各菌株的致病力与各性状之间没有明显的相关性。

表 3 鸭跖草叶点霉的培养特性及其地理分布

Tab. 3 The culture characteristics and geographic distribution of <i>P. commedimecola</i>					
颜色 color	形态 morphology	生长速度 growth rate	产孢 sporulation		地理分布 places
			分生孢子器	厚垣孢子	
			conidiocarp	chlamydospore	
白色	圆	中	很少	多	辽宁省: 兴城市、锦州市
白色	圆	中	中	多	黑龙江省: 嫩江县、纳河市
白色	圆	慢	中	多	黑龙江省: 佳木斯市、牡丹江市
白色	圆	慢	很少	多	吉林省: 通化市
红色	圆	中	很少	多	吉林省: 梅河口市、吉林市
黑色	圆	慢	很少	多	辽宁省: 辽阳市; 吉林省: 图门市

2.3 菌株的 dsRNA 及与致病力的关系

供试部分菌株的 dsRNA 琼脂糖凝胶电泳结果如图 1 所示。从 4 号和 7 号菌株的 dsRNA 琼脂糖凝胶电泳图谱 (图 1) 可以看出, 7 号和 C 两菌株中存在 dsRNA, 经电泳后出现 2 个片段, 其中第 1 条带为菌株的基因组 DNA, 第 2 条带是菌株的 dsRNA, 它们的大小出现在 2.0 kb 左右。在所测定的 12 个菌株中有 10 个菌株含有 dsRNA, 其中有 2 个菌株致病力强, 3 个菌株致病力中等和 5 个低致病力菌株。不含 dsRNA 的菌株分别为吉林省图门市菌株和辽阳市菌株, 它们分别为强致病力和弱致力菌株。在不同致病力类型的菌株中均检测到 dsRNA, dsRNA 的有无和致病力的强弱无相关性。



4, 7: 菌株号 strain no.; C: λ /Hind III+ Eco RI

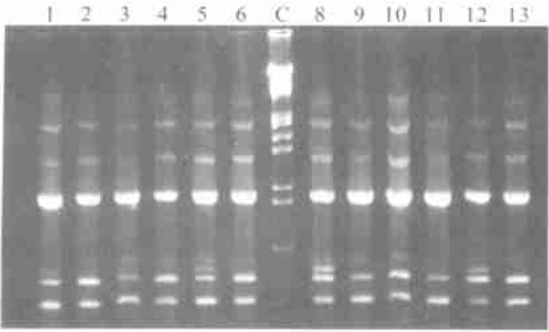
图 1 鸭跖草叶点霉的 dsRNA 电泳图谱

段 104 条, 平均每个引物扩增片段数为 5.78。有多态性的条带共有 43 条, 多态性的条带占总条带数的 39.8%。不同的引物对 12 个菌株进行 RAPD 扩增, 各菌株间扩增图谱差别明显, 表现出明显的多态性。其中 12 号引物对 12 个菌株 DNA 扩增的结果见图 2。

从图 3 聚类结果可以看出在类间距 15 以下 12 个菌株可以分为 5 群。来自辽宁省营口市 的 5 号菌株、吉林省图门市 11 号菌株及黑龙江省的纳河市 1 号菌株、牡丹江市 9 号菌株和佳木斯市的 3 号菌株属于第 1 类群, 致病力弱; 来自吉林省吉林市的 2 号菌株和辽宁省兴城市的 12 号菌株属第 2 类群, 致病力强; 来自辽宁省辽阳市的 6 号菌株和吉林省通化市的 10 号菌株属于第 3 类群, 致病力强; 来自辽宁省锦州市的 4 号菌株和吉林省梅河口的 8 号菌株属于第 4 类群, 致病力中; 来自黑龙江省嫩江县的 7 号菌株单独属于第 5 类群, 致病力弱。从菌株的 RAPD 聚类图谱上可以看出除辽宁省营口市 的 5 号菌株、吉林省图门市 的 11 号菌株与黑龙江省 3 个菌株同属一个类群外, 其他的辽宁省菌株和吉林省菌株分属 3 个类群, 它们遗传物质亲缘关系较近, 而在第 1 类群中辽宁省营口市 的菌株、吉林省图门市 的菌株在类间距 5 以下也同属一个类群, 更进一步说明这 2 个省菌株的亲缘关系相近。黑龙江省的 4 个菌株中, 3 个菌株同属第 1 类群, 它们的遗传物质亲缘关系较近。这些结果说明菌株的地理分布与菌株的类间距离有一定的关系。同一类群的菌株由于其遗传物质的亲缘关系较近, 它们表现出较一致的致病力, 说明 RAPD 类群与致病力有一定的相关性。

2.4 叶点霉菌株 RAPD 分析及与致病力的关系

筛选的 18 种随机引物对 12 个叶点霉菌株的基因组 DNA 进行 RAPD 扩增, 所有的引物在 12 个菌株上都扩增出条带, 相对分子质量在 0.1 kb~3.0 kb 之间, DNA 片段数在 3~12 之间, 18 个引物共扩增出片



1~6, 8~13: 菌株号 strain no.; C: λ HindIII+ EcoRI

图 2 引物 12 对鸭跖草叶点霉 12 个菌株 DNA 的 RAPD 电泳图

Fig. 2 RAPD electrophoresis map of 12 strains from *P. commelimecola* by primer 12

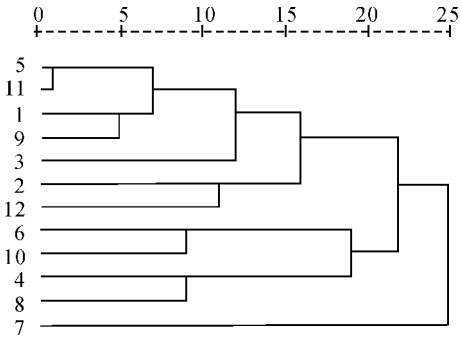


图 3 各菌株亲缘关系聚类分析图

Fig. 3 Hierarchical cluster map of relationship of strains

3 讨论与结论

鸭跖草叶点霉的致病力测定中发现, 东北地区的鸭跖草叶点霉的致病力从南部向北部逐渐减弱, 这与农田调查的结果一致. 因此在东北地区选择叶点霉作为生防菌来控制鸭跖草时, 应从辽宁、吉林选择强致病力菌株. 对菌株的 dsRNA 检测的结果表明, 3 种不同致病力类型的菌株都存在着 dsRNA 有无的问题, 菌株 dsRNA 的有无与致病力并无相关性. 这与以往的一些研究结果相似^[5, 10] 也有人提出菌株的致病力与 dsRNA 之间的关系并不是简单的有无关系, dsRNA 携带的遗传信息影响真菌的致病力^[3]. 这进一步从分子水平上说明了该菌致病力与 dsRNA 关系的复杂性.

以往的研究认为, 一些寄生程度较低的植物病原真菌群体的致病力与 DNA 扩增多态性有较好的相关性^[9]. 本研究也得出了鸭跖草叶点霉的地理分布与其 RAPD 类群有较好的相关性的结论. 这可能是由于该菌是一种寄生程度较低的真菌. 对鸭跖草叶点霉不同的 RAPD 类群的致病力分析表明, 同一类群中菌株的致病力表现较一致, 这在一定程度上说明致病力的强弱是由于遗传物质的差异造成的.

扩增产物进行电泳时, 弱带的产生有多种原因^[14]. 因此在统计多态性时应去掉弱带的多态性, 这样就会减少试验过程中的误差. 这可能是本试验中多态性条带出现频率低的原因.

参考文献:

[1] 涂鹤龄. “八五”农田草害治理重大成就[A]. 张泽溥. 中国有害生物综合治理文集[C]. 北京: 中国农业科技出版社, 1996. 1 114—1 115.

[2] 强 胜. 生物除草剂的研究概况[J]. 杂草科学, 1996, (2): 11—13.

[3] 高智谋, 郑小波, 苏恩平, 等. 苎麻疫霉对棉苗致病力的遗传与变异研究[J]. 植物病理学报, 1998, 28(4): 331—336.

[4] 梁平彦, 陈开英, 周淑敏. 栗疫菌低毒力菌株 dsRNA 的分离及转移[J]. 微生物学报, 1992, 32: 253—261.

[5] 王克荣, 周而勋, 丁国云. 栗疫病菌的培养性状、毒力与 dsRNA 的关系[J]. 植物病理学报, 1996, 26(4): 341—346.

[6] ZANZINGER D H, CORREL J C. High frequency of finding double-stranded RNA in naturally occurring isolates of *Rhizoctonia solani*[J]. J Gen Virol, 1984, 65: 1 601—1 605.

[7] 陈万权, 冯 洁, 秦庆明. DNA 分子标记在植物真菌病研究中的应用[J]. 植物保护学报, 1999, 26(3): 277—282.

[8] WEIDEMAN G J, BOONE D M. Taxonomy of *Phyllosticta vaccinii* and a new name for the true anamorph of *Biotryosphaeria vaccinii*[J]. Mycologia, 1982, 74: 59—65.

[9] CROUS P W, PALM M E. Systematics of selected folicolous fungi associated with leaf spots of proteaceae[J]. Mycol Res, 1999, 103(10): 1 299—1 304.

[10] FINKLER A, BEN-ZVI B S, KOLTIN Y, et al. Isolation of a virus from virulent strains of *Rhizoctonia solani*[J]. J Gen Virol, 1985, 66: 1 221—1 232.

[11] POOLERM R, RITCHIE D F, HARTUNG J S. Genetic relationship among strains of *Xanthomonas fragariae* based on RAPD PCR REP PCR and ERIC PCR and generation of multiplexed PCR primers useful for the identification of this pathogen[J]. Appl Environ Microbiol, 1996, 62(9): 3 121—3 127.

[12] PEROS J, BERGER G. Diversity within natural progenies of the grapevine dieback fungus *Eutypa lata*[J]. Curr Genet, 1999, 36(50): 301—309.

[13] 胡春根, 郝 玉, 邓秀新, 等. RAPD 分析用的 DNA 提取方法[J]. 遗传, 1998, 20(4): 31—33.

[14] 汪小全, 邹喻苹, 张大明, 等. RAPD 应用于多样性和系统学研究中的问题[J]. 植物学报, 1996, 38(12): 954—962.

【责任编辑 周志红】