

葛拟锈病菌 rDNA-ITS的序列分析

吉同宾¹, 李敏慧², 吴云³, 习平根², 谭万忠¹, 姜子德²

(¹西南大学植物保护学院, 重庆 400715; ²华南农业大学生物防治教育部工程研究中心, 广东广州 510642;

³ USDA Forest Service-Forest Health Technology Enterprise Team, Morgantown, WV 26505, USA)

摘要: 分别从罹拟锈病的野葛 *Pueraria lobata*(Willd.) Ohwi、粉葛 *P. thomsonii* Benth. 和山葛 *P. montana*(Lour.) Merr. 获得病原物拟锈病菌(集壶菌) *Synchytrium* sp. 的孢子囊堆, 用其作材料进行了不同 DNA 提取方法的效果比较, 同时对来自以上 3 种不同植物菌株的核糖体 DNA(rDNA)-ITS 进行了克隆和序列分析. 结果表明: 改良的氯化苄法提取基因组 DNA 的效率最高, 但单孢子囊直接进行 PCR 扩增也可以满足 ITS 的克隆和分析; 来源于野葛和粉葛菌株的 ITS1-5.8S-ITS2 分别为 856 bp 和 907 bp, 两者同源性为 92%; 而山葛菌株的 ITS1-5.8S-ITS2 为 1 148 bp, 与野葛和粉葛菌株的同源性分别为 54% 和 55%. 由此推断, 粉葛与野葛上的菌株可能为相同种的不同变种, 而山葛上的菌株为另一个种; 或者 3 种植物上的菌株分别为 3 个不同的集壶菌种.

关键词: 葛拟锈病菌; 野葛; 粉葛; 山葛; 序列分析

中图分类号: S435.121.49 文献标识码: A 文章编号: 1001-411X(2007)02-0042-05

rDNA-ITS Sequence Analysis of *Synchytrium puerariae* on *Pueraria* spp.

JI Tong-bin¹, LI Min-hui², WU Yun³, XI Ping-gen², TAN Wan-zhong¹, JIANG Zi-de²

(¹ College of Plant Protection, Southwest University, Chongqing 400715, China;

² Engineering Research Center of Biological Control, Ministry of Education, South China Agric. Univ., Guangzhou 510642, China; ³ USDA Forest Service-Forest Health Technology Enterprise Team, Morgantown, WV 26505, USA)

Abstract: Four different DNA extraction methods were used to obtain genomic DNA of *Synchytrium* sp. from the sori isolated from *Pueraria lobata* (Willd.) Ohwi, *P. thomsonii* Benth., *P. montana* (Lour.) Merr.. The modified method using benzyl chloride is the most efficient one to extract genomic DNA. rDNA-ITS can be successfully amplified directly from a single sporangium by PCR. The ITS sequence length of the isolates from *P. lobata* and *P. thomsonii* are 856 bp and 907 bp respectively shared 92% sequence similarity; the ITS sequences from *P. montana* are 1 148 bp, with 54% and 55% sequence similarity to the isolates from *P. lobata* and *P. thomsonii* respectively. The results indicated that the isolates from *P. lobata* and *P. thomsonii* are different varieties of the same species or two closely related species and the isolates from *P. montana* are another species of *Synchytrium*, or a more distantly related species.

Key words: *Synchytrium puerariae*; *Pueraria lobata*; *Pueraria thomsonii*; *Pueraria montana*; sequence analysis

在美国,野葛 *Pueraria lobata* (Willd.) Ohwi 是一种外来入侵杂草,1876 年由日本传入,现已蔓延美国 12 个州^[1]. 由于它抗逆性强,缺少天敌,所以生长迅速,蚕食了许多自然植被. 森林里的高大乔木被野葛覆盖,难以进行光合作用,使得这些树木不能够健

康生长甚至死亡;工业上,野葛也造成了很大的破坏,野葛沿着电线杆、电线蔓延,很容易压断电线,并造成重大事故^[2]. 亚洲是野葛的原产地,在我国,除新疆、西藏外,野葛均有分布^[3],在其上也记载了多种植食性昆虫^[4-5]和严重危害的病害^[6],但鲜见有

收稿日期:2007-01-12

作者简介:吉同宾(1981—),男,硕士研究生;通讯作者:姜子德(1962—),男,教授,博士,E-mail:zdjiang@scau.edu.cn

基金项目:中美杂草综合治理合作项目

危害农林生产的报道. 葛拟锈病菌(葛集壶菌) *Synchytrium puerariae* Miy, 异名: 小集壶菌 *Synchytrium minutum* (Pat) Gaum., 是葛属 *Pueraria* 植物上的内生、专性寄生菌^[7], 引起拟锈病, 在野葛、粉葛 *P. thomsonii* Benth.、山葛 *P. montana* (Lour.) Merr. 的茎、叶柄和叶片上造成拟锈斑点, 可导致植物扭曲变形最终死亡^[6,8], 但在美国并没有发现此病. 为给美国引进该真菌生物防治野葛所进行的风险性评估提供材料, 应对这一形态简单真菌在分子水平上进行比较分析, 以明确其侵染葛属不同植物的菌株是否真正为同一种类, 以及通过试验明确各菌株的寄主范围. 现将葛拟锈病菌核糖体 DNA (rDNA) - ITS 的序列分析结果介绍如下.

1 材料与方法

1.1 供试菌株

菌株 SPL-1、SPL-2 分别来自广州市凤凰山和火炉山的野葛, 菌株 SPT-1 和 SPT-2 均来自广州市人和镇的粉葛, 菌株 SPM-1、SPM-2 分别来自广州市凤凰山和火炉山的山葛.

1.2 方法

1.2.1 DNA 提取 菌株为 SPL-1, 各提取方法所用的孢子囊均为 1 mg, 提取后 DNA 均溶于 15 μ L 的 TE 缓冲液, 取 1 μ L DNA 溶液于 8 g/L 琼脂糖凝胶电泳检验效果. SDS 法参照 McDonald 等^[9]的方法; 氯化苄法参照朱衡等^[10]的方法; 改良的氯化苄法先将孢子囊进行液氮研磨, 其他同朱衡等^[10]的方法; Caiqing 法参照 Caiqing 等^[11]的方法.

1.2.2 rDNA - ITS 序列的 PCR 扩增 (1) 不同方法提取 DNA 的扩增: 扩增引物为真菌核糖体 DNA 转录间隔区 (ITS) 通用引物 ITS4 (5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3') 和 ITS5 (5'-GGA AGT AAA AGT CGT AAC AAG G-3')^[12]. PCR 反应体系组成成分为: 10 $\times$ PCR 缓冲液 (含 Mg^{2+}) 2.5 μ L, 2.5 mmol/L dNTP 2.0 μ L, 5 μ mol/L 引物各 1.0 μ L, *Taq* DNA 聚合酶 1.0 U, DNA 模板 1 μ L, 加 ddH₂O 至 25.0 μ L. PCR 反应程序为: 94 $^{\circ}$ C 预变性 4 min; 94 $^{\circ}$ C 30 s, 56 $^{\circ}$ C 40 s, 72 $^{\circ}$ C 1 min, 35 个循环; 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min. 同时, 以此反应体系和程序, 但不加提取的基因组 DNA 模板, 只挑取压破的单个孢子囊于配制好的反应体系中, 以测试单孢子囊的扩增效果. PCR 产物于 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳检测. (2) 6 个菌株的单孢子囊 PCR 扩增: 以压破的单个孢子囊为模板, 方法同(1).

1.2.3 rDNA-ITS 序列的克隆与测序 选各菌株单孢子囊 PCR 扩增产物于 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳, 切

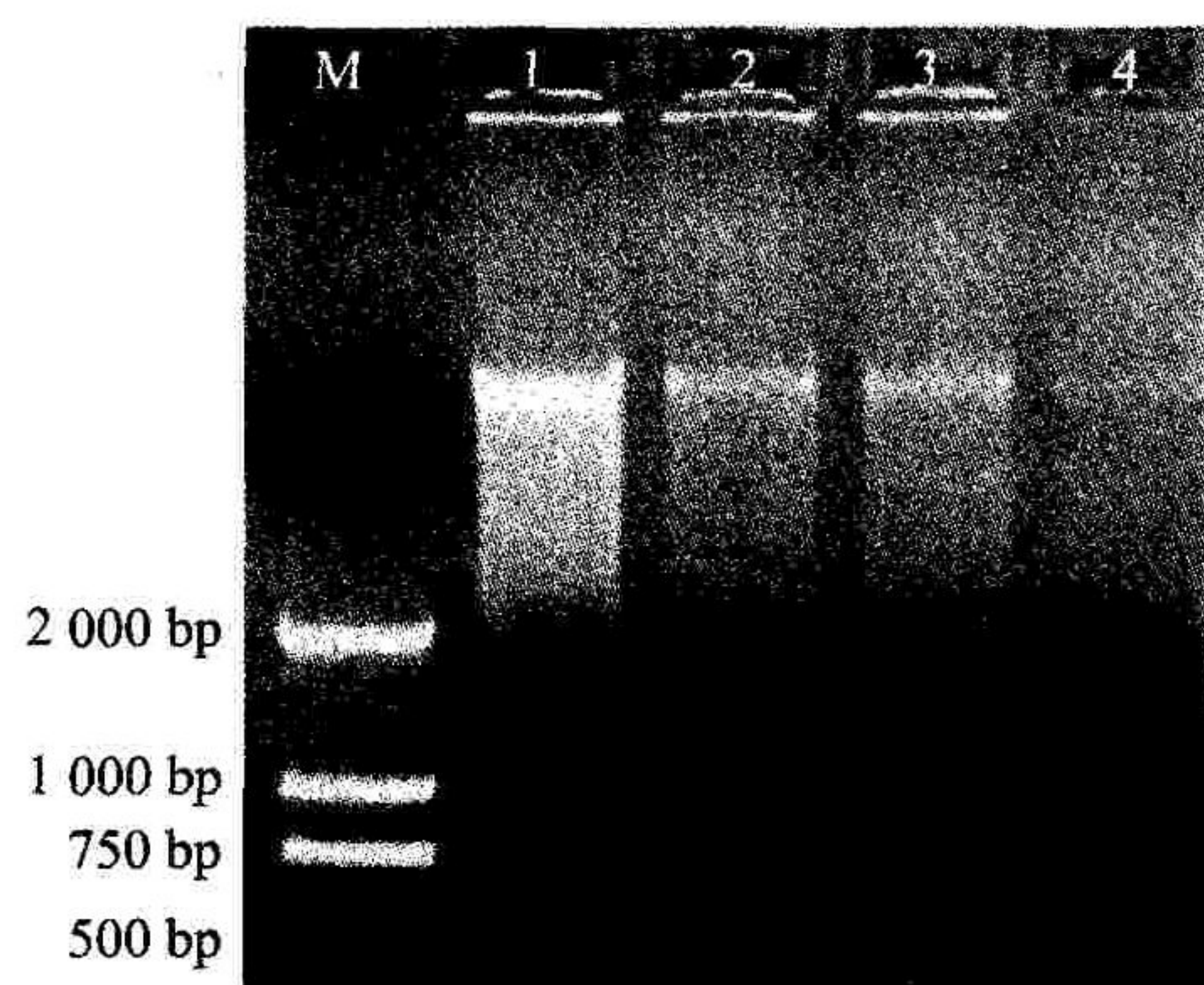
取其目的条带, 采用 H. Q. & Q. 凝胶回收试剂盒 (安徽优晶生物工程有限公司生产) 进行回收和纯化; 然后, 将纯化后的适量 DNA 片段连接至 pMD18-T 载体上, 再转化至 *E. coli* JM109 宿主细胞中, 蓝白斑筛选阳性克隆, 并进行单菌落 PCR 检测. 选 PCR 阳性克隆菌落进行扩大培养, 送英骏生物技术有限公司测序. 双向测序结果用 DNASTAR 软件包的 SeqMan 软件进行拼接并输出全部序列.

1.2.4 rDNA-ITS 序列分析 将获得的 ITS 序列删除 18S 和 28S 的部分序列后, 在 NCBI 数据库中已与报道的序列进行同源性比较, 选取同源性较高的 2 个集壶菌 ITS 序列 (*Synchytrium depiciens* SD, GenBank 登录号: AY997094; *Synchytrium macrosporum* SM, GenBank 登录号: AY997095), 以及与集壶菌同科的 *Chytridium confervae* (CC) ITS 序列 (GenBank 登录号: AY349119) 作为外围群, 用 Clustal X (1.83) 对所有序列进行对准; 然后用软件 MEGA (3.1) 分析计算遗传距离, 用邻接法 (neighbor-joining method) 聚类分析和构建系统进化树, 并以自展 (bootstrap) 作可信度分析 (重复 1 000 次).

2 结果与分析

2.1 DNA 提取

4 种提取方法所提取的 DNA 经电泳检测, 均有条带, 其中以改良氯化苄法提取的 DNA 浓度最高, 条带最亮, 氯化苄法和 SDS 法次之, Caiqing 法的条带最弱 (图 1). 该结果表明, 氯化苄的确具有强的破壁作用, 不经过液氮研磨也能达到液氮研磨后再经 SDS 裂解的提取效果; 若液氮研磨后再采用氯化苄



M: DL 2000 marker, 1: 改良氯化苄法, 2: 氯化苄法, 3: SDS 法, 4: Caiqing 法

M: DL 2000 marker, 1: modified method using benzyl chloride, 2: method using benzyl chloride, 3: method using SDS, 4: method of Caiqing

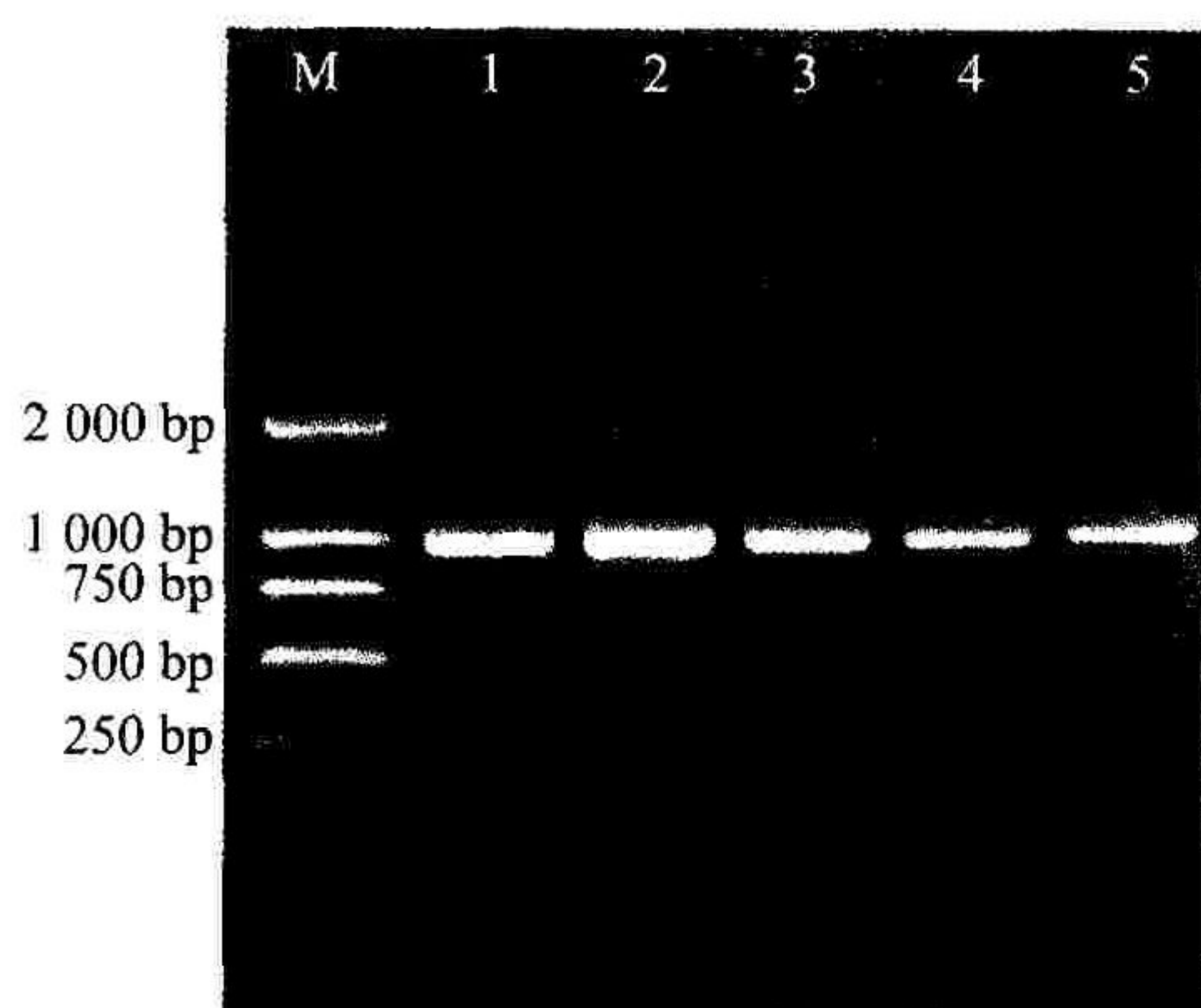
图 1 不同方法提取的 DNA 凝胶电泳分析

Fig. 1 Agarose gel analysis on DNA with different extraction methods

法则还能较大地增加 DNA 产量。

2.2 PCR 扩增

4 种方法提取 DNA 的扩增均可获得一致的近 1 000 bp 的片段,单孢子囊直接 PCR 扩增也能获得清晰、明亮的条带(图 2),表明对该菌进行单孢子囊直接 PCR 扩增获得 ITS 片段不仅可行,而且也减少了工作量。

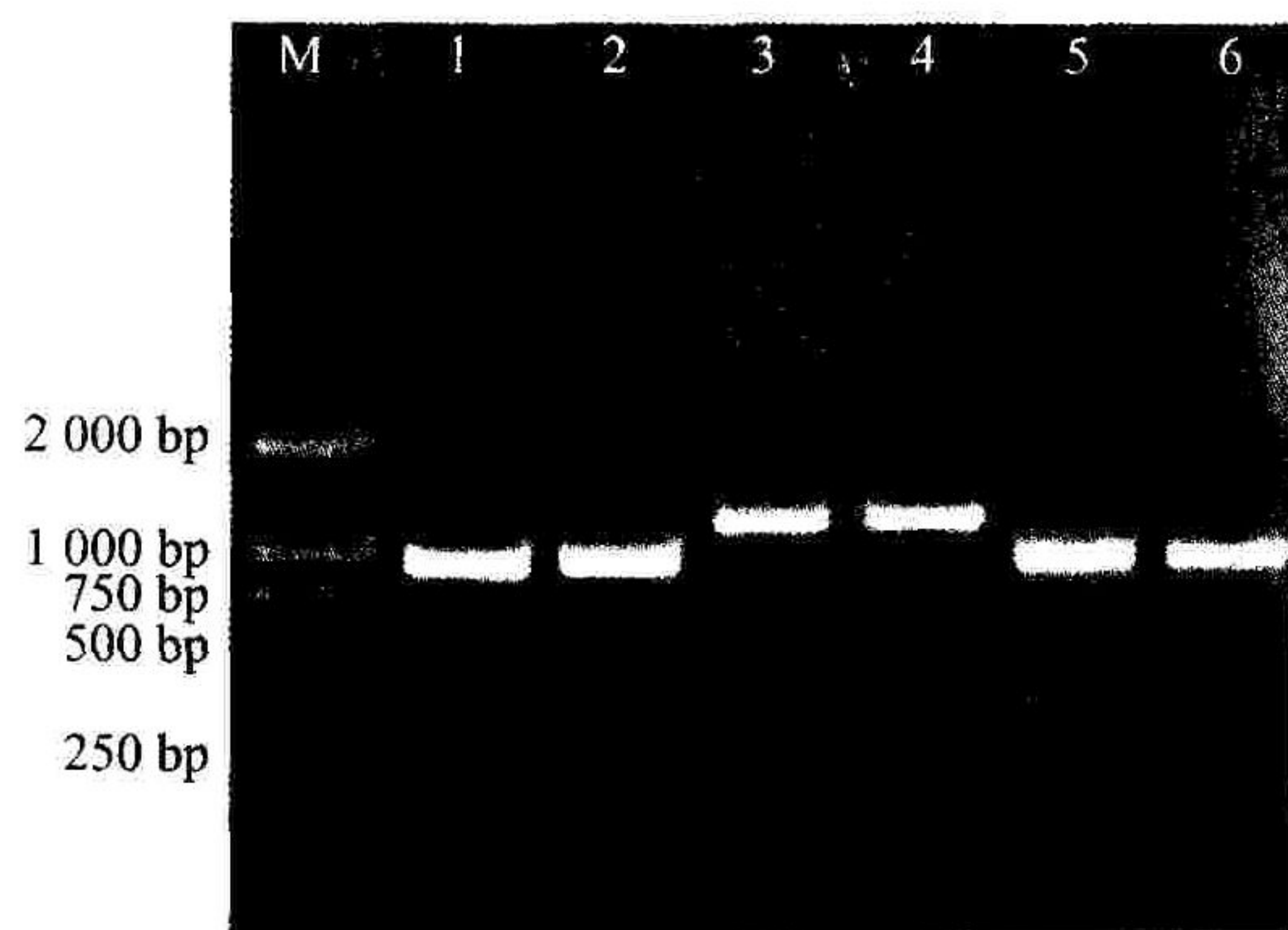


M: DL 2000 marker 1: 改良氯化苄法, 2: 氯化苄法, 3: SDS 法, 4: Caiqing 法, 5: 单孢子囊直接 PCR

M: DL 2000 marker 1: modified method using benzyl chloride, 2: method using benzyl chloride, 3: method using SDS, 4: method of Caiqing, 5: PCR with single sporangium

图 2 不同方法提取 DNA 作为模板的 PCR 产物凝胶电泳分析
Fig. 2 Agarose gel analysis on PCR products of DNA template with different extraction methods

来源于 3 个不同寄主的 6 个菌株单孢子囊 PCR 扩增产物的电泳结果显示:来自山葛的菌株 SPM-1、SPM-2 的扩增片段约为 1 200 bp,而 SPL-1、SPL-2、SPT-1 和 SPT-2 扩增的片段约为 1 000 bp(图 3)。



M: DL 2000 marker, 1: SPL-1, 2: SPL-2, 3: SPM-1, 4: SPM-2, 5: SPT-1, 6: SPT-2

图 3 不同菌株的单孢子囊 PCR 产物凝胶电泳分析
Fig. 3 Agarose gel analysis on PCR products from different single sporangium

2.3 ITS 的克隆与测序

经纯化的各菌株单孢子囊 PCR 扩增片段与 pMD18-T 载体连接后,可成功地转化至 *E. coli*

JM109 宿主细胞;单菌落的 PCR 检测结果表明,目的片段被成功克隆.通过对所测序列进行拼接,并去掉部分载体和引物序列,其中 SPL-1 和 SPL-2 为 925 bp, SPT-1 和 SPT-2 为 976 bp, SPM-1 和 SPM-2 分别为 1 217 bp 和 1 216 bp。

2.4 ITS 序列分析

去掉 18S 和 28S 部分序列,并经 Clustal X (1.83)对序列进行对准(图 4)可见:SPL-1 和 SPL-2 的 ITS1-5.8S-ITS2 序列相同,长度为 856 bp; SPT-1 和 SPT-2 的相同,为 907 bp;但 SPM-1 和 SPM-2 的序列分别为 1 148 bp 和 1 147 bp,且有 3 个碱基的差异;6 个菌株的 5.8S 序列基本相同,但来自不同寄主的菌株在 ITS1 和 ITS2 区域存在差异,其中来自山葛的菌株序列与来自野葛和粉葛的菌株序列存在明显的差异.由 MEGA(3.1)构建的 8 个集壶菌菌株和 1 个壶菌菌株的 ITS1-5.8S-ITS2 系统发育树(图 5)表明:来自野葛的菌株与来自粉葛的菌株尽管有 63 个碱基的差异,但仍能得到 100% 的自展支持率将他们聚在一个分支,其同源率为 92%,意味着这 2 个寄主上的菌株亲缘关系较近;而来自山葛的 SPM-1 和 SPM-2 被聚在另一个分支,与来自野葛和粉葛菌株的相似性只有 54% 和 55% (表 1),意味着山葛上的菌株与野葛和粉葛上的菌株亲缘关系均较远.鉴于集壶菌 ITS 进化速率较快,属内不同种的 ITS 序列变异较大,如来自 GenBank 的 *Synchytrium decipiens* 和 *Synchytrium macrosporum* 两序列相似性为 42%,这 2 个菌株与本研究的几个菌株的相似性也均较小(表 1),故可推断:来自野葛和粉葛的菌株可能为相同种的不同变种,而来自山葛的菌株极有可能是另一个种;由于野葛上菌株与粉葛上菌株的 ITS 区的确存在一定的差异,也可推断他们分别为 3 个独立的集壶菌种。

表 1 集壶菌株 rDNA-ITS 的相似性¹⁾

Tab. 1 rDNA-ITS sequence similarities of *Synchytrium* spp.

菌株 isolate	SPL-1	SPL-2	SPT-1	SPT-2	SPM-1	SPM-2	SD	SM	CC
SPL-1	100%	92%	92%	54%	54%	31%	24%	18%	
SPL-2		92%	92%	54%	54%	31%	24%	18%	
SPT-1			100%	55%	55%	32%	25%	18%	
SPT-2				55%	55%	32%	25%	18%	
SPM-1					99%	30%	20%	15%	
SPM-2						31%	20%	15%	
SD							42%	29%	
SM								29%	
CC									

1): SD: *Synchytrium decipiens*; SM: *Synchytrium macrosporum*; CC: *Chytridium confervae*

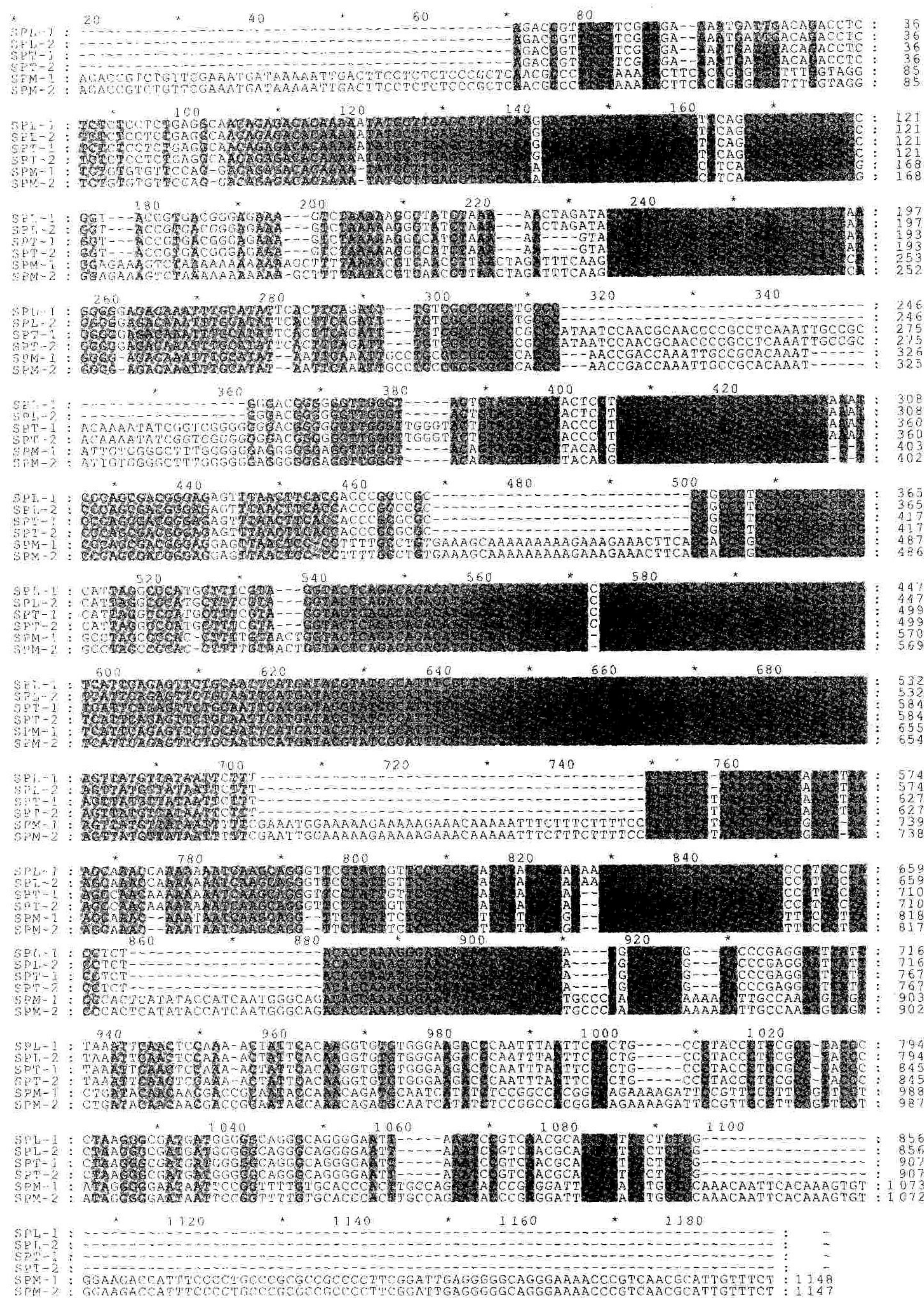
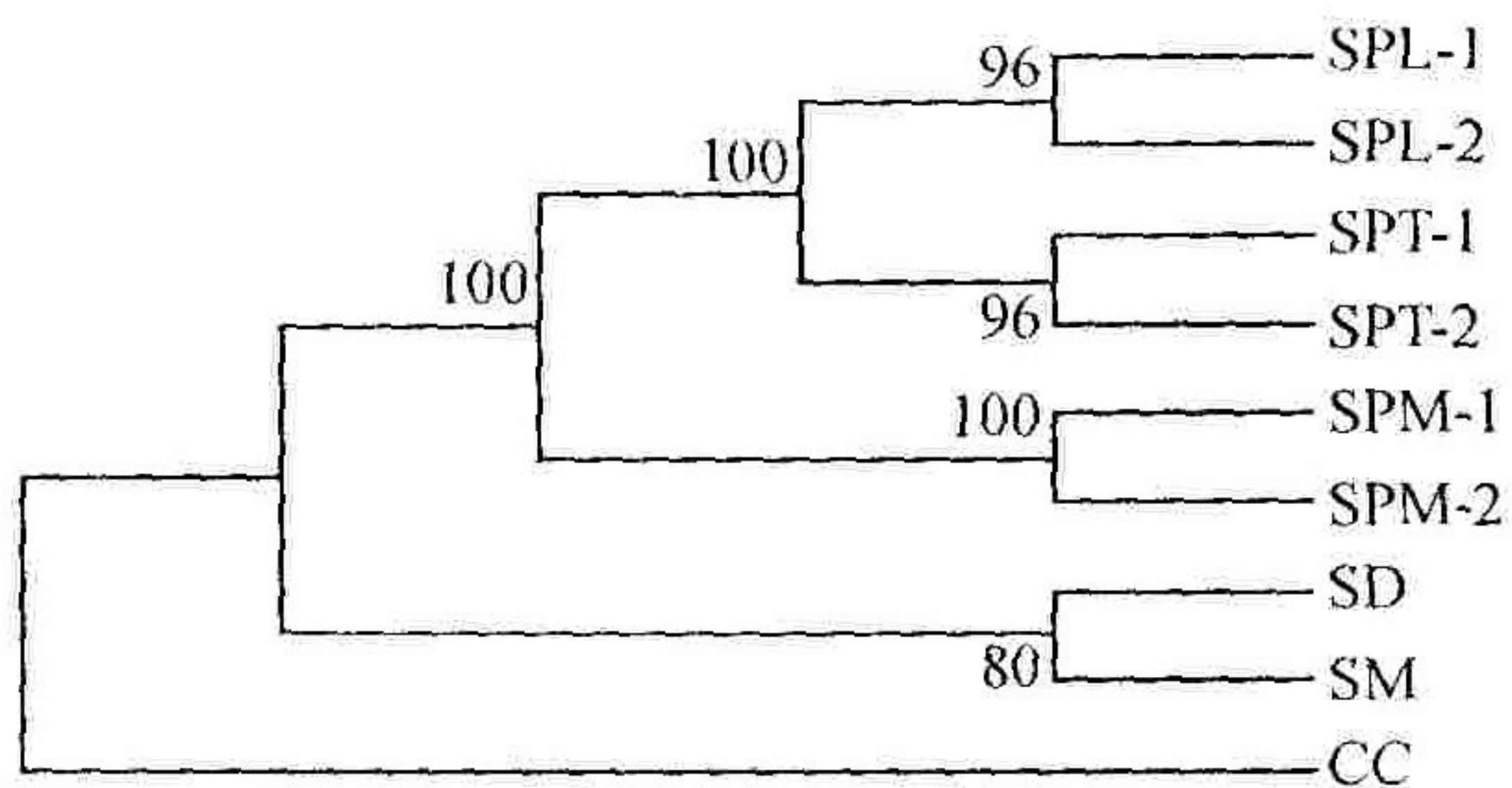


图4 野葛、粉葛、山葛上集壶菌 rDNA-ITS 序列比对

Fig. 4 Alignment results of rDNA-ITS sequences of *Synchytrium* spp. from *Pueraria lobata*, *P. thomsonii* and *P. montana*SD: *Synchytrium decipiens*; SM: *Synchytrium macrosporum*; CC: *Chytridium conservae*图5 以 *Chytridium conservae* 为外围基于 ITS 序列的 8 个集壶菌株的系统发育树Fig. 5 Phylogenetic tree based on ITS sequence from 8 *Synchytrium* spp. used *Chytridium conservae* as outgroup

3 讨论与结论

用改良氯化苜法、氯化苜法和 SDS 法可提取较高含量菌株基因组 DNA,但由于需要的孢子囊较多,程序也较复杂,在应用上受到一定的限制.本研究将单个孢子囊压破并直接进行 PCR 扩增不仅简便,也保证了模板的纯度,在正常的 PCR 反应体系和扩增程序条件下可以达到与提取 DNA 作为模板的同样效果,扩增产物的电泳条带清晰明亮,适于进行片段的回收和克隆.本研究 1 次扩增就能成功检测出目标条带,这与龙良鲲等^[13]的结果不同,可能与模板是含有多个游动孢子的孢子囊,每个游动孢子都有一

套完整的基因组有关。

核糖体基因转录间隔区 (internal transcribed space, ITS) 适于真菌种级的亲缘关系分析, 现已广泛应用于 *Alternaria*、*Colletotrichum*、*Phomopsis*、*Phytophthora*、*Rhizoctonia* 等多个重要植物病原真菌属种级水平的分类鉴定上^[14-18]。集壶菌结构简单, 可用于分类的形态特征十分有限, 其赖以生存的寄主植物种类对分类尤为重要。笔者对来源于3个不同寄主上的菌株进行光学显微观察时, 未发现各菌株在形态学上的差异。1995年张奠湘等^[19]根据形态分析, 认为粉葛应是一个特征明显的种, 山葛仍可作为野葛的变种; 2003年曾明等^[20]利用 rDNA-ITS 序列分析对葛藤的几个不同种进行了分类, 认为粉葛与野葛的亲缘关系近, 可作为野葛的变种, 而山葛与野葛、粉葛亲缘关系较远, 应为一个独立的种。本研究来源于3个寄主植物菌株的 ITS 序列分析结果表明, 来自粉葛与野葛的菌株间亲缘关系较近, 而来自山葛的菌株与前2个寄主上的相差较远。该趋势与曾明等^[20]对3种寄主植物的研究结果一致, 充分显示了病原菌与寄主植物的协同进化关系。根据本研究结果, 笔者认为粉葛与野葛上的菌株可能为相同种的不同变种, 而山葛上的菌株应为另一个种; 或者3种植物上的菌株分别为3个不同的集壶菌种。

致谢: 特别感谢美国 Laragen Inc. 李金亮博士对本研究提出的宝贵建议!

参考文献:

- [1] WINBERRY J J, JONES D M. Rise and decline of the 'miracle vine': Kudzu in the southern landscape [J]. Southeast Geog, 1973(13): 63-67.
- [2] TERRILL T H, GELAYE S, MAHOTIERE S, et al. Effect of cutting date and frequency on yield and quality of kudzu in the southern United States [J]. Grass and Forage Science, 2003, 58: 178-183.
- [3] 李沛琼, 傅立国, 洪涛. 中国高等植物: 第7卷 [M]. 青岛: 青岛出版社, 1998: 211-214.
- [4] 李建丰, 古德就, 田明义. 葛藤天敌紫茎甲生物学特性初步观察 [J]. 昆虫天敌, 2004, 26(1): 43-47.
- [5] 李建丰, 田明义, 古德就. 葛藤节肢动物类群组分及主要种类数量动态 [J]. 华南农业大学学报, 2004, 25(1): 56-58.
- [6] 冯岩, 黄丽华, 陈健. 广州地区粉葛拟锈病病原鉴定 [J]. 植物保护, 1999, 25(1): 11-13.
- [7] ALEXOPOULOS C J, BLACKWELL M, MIMS C W. 菌物学概论 [M]. 4版. 姚一建, 李玉, 张克勤, 等译. 北京: 中国农业出版社, 2002: 87-88.
- [8] MIKIO N. Electron microscopy of hypertrophied tissue of *Pueraria lobata* infected with *Synchytrium minutum* [J]. 岛根大农研报, 1982, 16: 152-158.
- [9] McDONALD M B, ELLIOT L J, SWEENEY P M. DNA extraction from dry seeds for RAPD analyses in variety identification studies [J]. Seed Sci. & Technol, 1994, 22: 171-176.
- [10] 朱衡, 翟峰, 朱立煌. 利用氯化苜法提取适于分子生物学分析的真菌 DNA [J]. 真菌学报, 1994, 13(1): 13-40.
- [11] CAIQING M, RINKEVICH B. A simple, reliable, and fast protocol for *thraustochytrid* DNA extraction [J]. Marine Biotechnology, 2001, 2(3): 100-102.
- [12] WHITE T J, BRUNS T, LEE S, et al. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics [M]. San Diego: Academic Press, 1990: 315-322.
- [13] 龙良鲲, 姚青, 羊宋贞, 等. 一株丛枝菌根真菌的形态与分子鉴定 [J]. 华南农业大学学报, 2006, 27(4): 40-42.
- [14] COOKE D E L, DRENTH A, DUNCAN J M. A molecular phylogeny of *Phytophthora* and related oomycetes [J]. Fungal Genetics and Biology, 2000, 30: 17-32.
- [15] 陈永青, 姜子德, 戚佩坤. RAPD 分析与 ITS 序列分析在拟茎点霉分类鉴定上的应用 [J]. 菌物系统, 2002, 21(1): 39-46.
- [16] AFANADOR-KAFURI L, MINZ D, MAYMON M. et al. Characterization of *Colletotrichum* isolates from tamarillo, passiflora, and mango in Colombia and identification of a unique species from the genus [J]. Phytopathology, 2003, 93(5): 579-587.
- [17] GRONBERG H, PAULIN L, SEN R, et al. ITS probe development for specific detection of *Rhizoctonia* spp. and *Suillus bovinus* based on southern blot and liquid hybridization-fragment length polymorphism [J]. Mycol Res, 2003, 107(4): 428-438.
- [18] PRYOR B M, GILBERTSON R L. Relationships and taxonomic status of *Alternaria radicina*, *A. carotiincultae*, and *A. petroselini* based upon morphological, biochemical, and molecular characteristics [J]. Mycologia, 2002, 94(1): 49-61.
- [19] 张奠湘, 陈忠毅. 葛属 (*Pueraria* DC.) 的分支分析 [J]. 热带亚热带植物学报, 1995, 3(1): 35-40.
- [20] 曾明, 马雅军, 郑水庆, 等. 中药葛根及其近缘种的 rDNA-ITS 序列分析 [J]. 中国药理学杂志, 2003, 38(3): 173-175.

【责任编辑 周志红】