

DNA 指纹分析在植物病原真菌群体遗传研究中的应用*

单卫星¹ 陈受宜² 康振生¹ 李振岐¹

(1 西北农业大学植保系, 陕西杨陵 712100; 2 中国科学院遗传研究所, 北京 100101)

摘要 在总结植物病原真菌遗传标记的应用发展过程基础上, 着重以重复序列为基础的 DNA 分子标记的应用, 综述了近年来 DNA 指纹分析在植物病原真菌群体遗传分析中的应用。还简要讨论了群体遗传分析对植物病理学的深远影响

关键词 植物病原真菌, DNA 指纹分析, 群体遗传

中图分类号 Q949.320.3

自从 18 世纪马铃薯晚疫病在欧洲流行成灾以来, 人们就已开始有目的地培育抗病新品种, 并在生产中发挥了重要作用。现代农业生产条件下, 随着一批批作物品种丧失抗病性, 抗病性丧失问题已逐渐成为作物稳产增产的重要限制因素。已经明确, 病原菌的致病性变异是导致作物品种抗病性丧失的直接原因。然而, 由于缺乏适宜的遗传标记, 对病原菌的群体生物学的认识非常有限。近 10 年来分子生物学的迅速发展, 使得在 DNA 水平精确揭示病原菌的群体遗传特征成为可能。揭示病原菌的群体遗传结构及其动态变化规律, 对抗病育种与认识病原菌致病性变异的分子机理和毒性进化规律, 以及开发更为有效的病害防治战略将产生深远影响。

1 植物病原真菌的遗传标记

1.1 经典遗传标记

形态学标记广泛用于高等动植物的遗传分析。然而, 自然发生于植物病原真菌群体中的这类标记非常少见。对一些病原真菌, 可通过人工诱变获得一些形态突变体, 但对玉米小斑病菌和稻瘟病菌的研究表明, 这类突变体的致病力往往大幅度下降^[1,2]。

有性亲合性和无性不亲合性标记由于其易于根据形态进行鉴定而广泛用于一些病原真菌的遗传分析^[3,4]。对于卵菌、子囊菌和一些担子菌, 有性亲合性常由单一位点的一对等位基因控制, 而在担子菌中则由一个或两个位点的复等位基因控制。无性异核体的形成要求在数个位点上具备相同的等位基因。因此决定有性亲合性和无性亲合性的基因可提供大量易于鉴定的表型标记, 成为开展某些病原真菌群体生物学研究的有力工具。

毒性基因广泛用于遵循基因对基因假说的病原真菌的遗传分析, 特别是对诸如锈菌、白粉菌和霜霉菌等活体营养病菌, 至今仍作为最主要的手段开展其群体生物学研究。但是, 目前对致病性分化研究得比较明确的病原真菌种类有限。此外, 毒性基因作为遗传标

收稿日期: 1994-12-05

* 国家攀登计划资助项目

记是根据鉴别寄主对病菌侵染的反应确定的,反映的是表现型而非基因型,受到寄主植物强烈的选择作用,因而往往不能客观地反映自然条件下病原菌的群体遗传特征。

抗药性和营养缺陷型突变体亦作为某些病原真菌群体生物学的重要研究手段。自然发生的这类突变菌系已成功地用于病原菌的群体遗传研究(比如大麦白粉菌(*Erysiphe graminis* f. sp. *Hordei*)对化学农药 triadimenol 的抗性^[5]),或病原菌在田间的种群动态分析(如马铃薯晚疫病病菌对甲霜灵(metalaxyl)的抗性^[6])。然而,人工诱变获得的突变体的寄生适合度往往下降,特别是在利用多个抗性标记时,这种影响尤为突出。

1.2 分子标记

80年代同工酶分子标记开始广泛用于植物病原真菌的群体生物学研究,使得对病原菌群体的认识迈上一个新台阶。然而,同工酶标记的数量有限,尽管已建立了检测多达57种同工酶的方法^[7],但对同一种生物极少超过15种,对植物病原真菌更少^[8]。此外,每种同工酶都需要确定提取和检测的最佳条件,而且一些同工酶的活性表现有时空特异性(即发育阶段和组织特异性)。因此,同工酶在检测种内遗传分化方面受到很大限制^[9]。

随机扩增多态性DNA(RAPD)分子标记是90年代由Williams和Welsh两个研究小组同时提出的一类遗传标记^[10,11]。以PCR技术为基础的RAPD方法简便、快速,便于分析大量样品,理论上通过采用足够数量的随机引物便可检测到生物种群内微小的遗传变异。RAPD分析技术已迅速应用于植物病原真菌的遗传分析,在寻找性状连锁标记和追踪病原菌的传播与流行等方面应用尤为突出^[12,13]。RAPD技术亦有其缺点,它不能区分同合子和异合子,对实验条件及操作者技术水平有较高要求,否则造成结果不稳定。

限制性片段长度多态性(RFLP)分析方法的建立为生物群体的遗传分析提供了大量的分子标记。单碱基对的置换、插入或缺失以及染色体片段的倒转和易位等变异均可通过RFLP分析检测出来。已有的研究表明,RFLP分子标记可有效地检测病原真菌的种内遗传分化。RFLP标记反映物种的基因型,没有同工酶的时空表达特征,可检测基因组中非转录区发生的变异,因此尤为适合于生物种群的遗传多样性分析。生物基因组中存在大量的重复序列(repetitive sequences),其中散布的重复序列可作为探针进行指纹分析。近年来的研究表明,非转录区多由重复序列组成,而重复序列与基因组的进化密切相关^[14]。通过对重复序列的深入研究,可望为揭示病原菌毒性变异机制提供重要线索。DNA指纹分析通过提供大量稳定的、遗传上中性的分子标记,正在积极地推动着对病原菌群体生物学的认识进程,它的最大缺点是基础投入大,操作技术比较复杂。本文着重以重复序列为基础的RFLP分析,综述近年来DNA指纹分析在植物病原真菌群体遗传研究中的应用。

2 DNA 分子遗传标记的应用

2.1 马铃薯晚疫病病菌的群体遗传

通过克隆和鉴定病菌基因组中的中度重复序列^[15],并以其为探针,W. E. Fry小组系统分析了墨西哥中部和北部^[16]及荷兰^[17]等国家和地区的晚疫病病菌的群体遗传结构,在分子水平取得了晚疫病病菌远程传播^[18]乃至洲际迁移^[19,20]的证据,明确了在墨西哥中部地区该病菌群体遗传结构最为复杂,极可能是马铃薯晚疫病病菌的发源地。而在墨西哥西北部以及其他国家和地区,病菌群体多由简单的一个或数个克隆组成;在一些地区还检测到了较

为复杂的病菌群体遗传结构,对比早期收集的遗传上简单的晚疫病菌群体,在分子水平证实了晚疫病菌的远距离传播和有性生殖方式的存在^[18~20]。通过分析病菌群体遗传结构的变迁,对及时调整病害防治策略以期更有效地控制晚疫病具有重要意义。

2.2 稻瘟病菌的群体遗传

Hamer 等分离得到的中度重复序列 MGR586^[21],为近年来对稻瘟病菌群体遗传特征的深入认识奠定了基础。着重病菌的毒性与 DNA 多态性的相互关系,Levy 等^[22]用 MGR586 作探针,通过对美国南方水稻产区 1959~1988 年收集的 79 个稻瘟病菌标样进行的 DNA 指纹分析,发现该病菌以 DNA 指纹图谱为基础划分的谱系(lineage)与毒性特征之间存在密切关系,亦即每个谱系内仅有一或两个致病类型(小种),他们认为美国稻瘟病菌群体是由数个谱系组成的,因此为系统分析美国稻瘟病菌的群体结构以及小种毒性演化规律指出了方向。然而,Xia 等^[23]用同一探针对阿肯色州 13 个分离物的 DNA 指纹分析结果表明,美国稻瘟病菌群体存在更多的谱系,病菌的毒性特征与谱系之间存在更为复杂的关系。Levy 等^[24]进一步对哥伦比亚育种圃内采自 15 个品种上的 151 个标样的 DNA 指纹分析,发现该群体由 6 个遗传上分化明显的谱系组成,病菌的谱系与寄主品种以及毒性特征之间存在密切联系,即每个谱系仅由有限的数个毒性特征极为接近的致病类型(小种)组成,仅对数量有限的一些品种致病。这表明,病菌的谱系的遗传背景限制了其对品种的专一性和毒性的进化。这些进展对抗病品种的抗病性评价颇有启示,在抗源材料鉴定中仅考虑供试菌系的毒性特征而不顾及其他遗传背景的多样性,这样培育的抗病品种进入田间丧失的抗病性的可能性大为增加。抗病育种过程中供试病菌群体应由尽可能多的遗传背景复杂的菌系组成,以更有效地培育具有持久抗病性的品种,仅仅通过对有限数量的小种的抗病性分析难以预测育成品种的抗性持久性。

2.3 小麦颖枯病菌(*Septoria tritici*)的群体遗传

B. A. McDonald 小组对颖枯病菌的群体遗传作了深入细致的分析。通过 RFLP 分析,发现这一病菌群体在很小范围内乃至同一病斑内都存在很高的遗传多样性^[25,26],为颖枯病菌以子囊孢子为重要的接种体来源的观点提供了分子水平证据。并发现美国国内相距 705 km 的两个该菌群体,存在菌源交流^[27]。虽然对病菌远距离传播的机制尚不明确,但对以色列、德国、加拿大、丹麦、埃塞俄比亚、叙利亚、土耳其以及英国等遍及全球的分离物的分析表明,病菌还存在洲际传播问题,推测染病麦种极可能是颖枯病菌远程传播的重要途径^[13]。这对抗病品种策略、抗病品种的合理使用以及植物检疫等产生重要影响。

2.4 其他

Milgroom 等^[28]用克隆的中度重复序列 PMS5.1 对由 39 个分离物组成的板栗疫病病菌群体进行了 DNA 指纹分析,从而得到该病菌的繁殖特征是以有性生殖为主的证据。McDonald 等^[30]对大麦颖枯病菌的 RFLP 分析,在分子水平支持了该病菌的子囊孢子最重要的初侵染来源的假说。分离鉴定的一个中度重复序列能有效地区分供试病菌群体中的所有基因型,这对进一步开展颖枯病菌的群体生物学和流行病学研究奠定了基础。

3 DNA 指纹分析在植物病害防治中的应用

3.1 抗病育种策略

抗病育种在植物病害防治中占据主导地位,在生产实践中发挥了重要作用。然而,由

于作物品种抗病性丧失问题日益突出,培育抗病新品种的进程往往滞后于病原菌的毒性进化。在育种过程中通常以单个或数个病菌小种接种来评价品种的抗病性,对供试病菌群体的遗传背景并不清楚,这是新育成品种抗病性难以持久的原因之一。通过对一些病原菌的群体遗传结构的研究,认识到在抗病性鉴定中了解供试病菌群体毒性特征以外其他遗传背景的多样性可能更为重要,这是培育和鉴定具有持久抗病性和广泛适应性品种的有希望的途径之一。对病菌群体遗传特征的研究为在病原菌毒性易变区鉴定品种抗病性提供了分子水平的证据。现有的研究表明,在毒性易变区病原菌的遗传结构往往最为复杂。通过比较不同生态病菌群体遗传结构的演化,除了可合理评估培育限于特定地区使用的抗病品种的可行性外,亦可为检疫对象的确定提供依据。

3.2 品种抗病性的合理使用问题

对病原菌群体的遗传分析揭示了病菌不同群体遗传结构上的差异,这是合理用品种抗病性的理论基础。目前,大多数抗病品种的抗病基因比较单一,抗病性大多由单基因或寡基因控制,因此应用于田间,存在丧失抗病性的危险。在病原菌群体遗传结构复杂的流行区,其潜在危险性更大。虽然对病菌毒性变异分子机理尚不完全清楚,但遗传背景复杂的病菌群体能更快地适应这种抗病基因单一的品种,导致抗病品种丧失抗性;同样,遗传结构复杂的病原菌群体亦容易产生对化学农药的抗性。总之,遗传背景复杂的病菌群体能够更迅速、更有效地适应逆境条件。因此,在病菌群体遗传结构简单的病害流行区应采用现有的抗病基因较单一的品种,以更有效地控制病害;而在病菌群体遗传背景复杂的病害流行区则宜使用多基因抗病品种。由于病原菌毒性易变区往往还是病害的大流行体系中的接种体策源地,通过减少耕作面积等行政措施,牺牲局部保存整体,亦有助于病害总体上的控制。通过明确我国小麦条锈病菌的流行体系,确定病原菌的毒性易变区,虽然尚未对病原菌的群体遗传特征作深入的分析,但通过毒性调查,品种抗病性的合理布局已成功用于生产实践,对有效地控制锈病发挥了重要作用。

4 结束语

进入 80 年代以来,分子生物学的发展为微生物群体遗传研究注入了活力,通过提供大量的分子标记,极大地推动了植物病原真菌群体遗传学的研究^[15,28]。尤其引人注目的是对重复序列的鉴定和应用,由于这些散布于基因组中的中度重复序列在 RFLP 分析中能够扫描较多的区域,在认识病原真菌的群体遗传结构及其动态上发挥了重要作用。目前已对一些重要病原真菌作了较为细致的 DNA 指纹分析,这对制定抗病育种战略及确定抗病品种的合理布局正产生深远的影响。重复序列还由于其种的乃至种下致病类群的特异性而成功地用于病原菌的分子检测^[31,32]、致病类型^[33]和专化型的区分,以及病原真菌基因组连锁图谱的快速构建,极大地促进了病理学和遗传学基础研究。此外,由于重复序列与转座因子密切相关,而转座因子在生物基因组的进化中起重要作用^[14],因此对重复序列的深入研究可望为揭示病原菌致病性变异的分子机理以及毒性演化规律提供线索。在这方面,对果蝇属的重复序列的研究已取得一系列重要进展,这为开展植物病原真菌重复序列在基因组进化中的作用的研究提供了良好模式。目前,B. A. McDonald 小组已开始以小麦颖枯病菌为试材,研究各种重复序列在世界范围内的该病菌分离物中的分布

(B. A. McDonald, 私人通信), 以期为揭示病原菌毒性变异机制探索一条新路。

参 考 文 献

- 1 Chumley F G, Parsons K, Valent B. Genetic determinants of pathogenicity and host specificity in *Pyricularia*. *J Cell Biochem*, 1986, Suppl. 10c: 4 (Abstr.)
- 2 Fry W E, Yoder O C, Apple A E. Influence of naturally occurring marker genes on the ability of *Cochliobolus heterostrophus* to induce field epidemics of southern corn leaf blight. *Phytopathology*, 1984, 74: 175~178
- 3 Glass N L, Kulda G A. Mating type and vegetative incompatibility in filamentous ascomycetes. *Annu Rev Phytopathol*, 1992, 30: 201~224
- 4 Leslie J F. Fungal vegetative compatibility. *Annu Rev Phytopathol*, 1993, 31: 127~150
- 5 Brown J K M, Jessop A C, Rezanoor H N. Genetic uniformity in barley and its powdery mildew pathogen. *Proc R Soc Lond B*. 1991, 249: 83~90
- 6 Kadish D, Cohen Y. Fitness of *Phytophthora infestans* isolates from metalaxyl-sensitive and resistant populations. *Phytopathology*, 1988, 78: 912~915
- 7 Vallejos C E. Enzyme activity staining. In: Tanksley S D, Orton F J, eds. *Isozymes in Plant Genetics and Breeding*, New York: Elsevier, 1983: 469~516
- 8 Newton A C. Markers in pathogen populations. In: Day P R, Jellis G J, eds. *Genetics and plant pathogenesis*. Oxford: Blackwell Scientific, 1987
- 9 Micheltore R W, Hulbert S H. Molecular markers for genetic analysis of phytopathogenic fungi. *Annu Rev Phytopathol*, 1987, 25: 383~404
- 10 Williams J G K, Kubelik A R, Livak K J, et al. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res*, 1990, 18: 6531~6535
- 11 Welsh J, McClland M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Res*, 1990, 18: 7213~7218
- 12 Arnau J, Housego A P, Oliver R P. The use of RAPD markers in the genetic analysis of the plant pathogenic fungus *Cladosporium fulvum*. *Curr Genet*, 1994, 25: 438~444
- 13 McDermott J M, McDonald B A. Gene flow in plant pathosystems. (*Annu Rev Phytopathol*). 1993, 31: 353~373
- 14 McDonald J F. Evolution and consequences of transposable elements. *Curr Opin Genet Developm*, 1993, 3: 855~864
- 15 Goodwin S B, Drenth A, Fry W E. Cloning and genetic analysis of two highly polymorphic moderately repetitive nuclear DNAs from *Phytophthora infestans*. *Curr Genet*, 1992a, 22: 107~115
- 16 Goodwin S B, Spielman C J, Matuszak J M, et al. Clonal diversity and genetic differentiation of *phytophthora infestans* populations in northern and central Mexico. *Phytopathology*, 1992b, 82: 955~961
- 17 Drenth A, Goodwin S B, Fry W E, et al. Genotypic diversity of *Phytophthora infestans* in the Netherlands revealed by DNA polymorphisms. *Phytopathology*, 1993, 83: 1087~1092
- 18 Goodwin S B, Cohen B A, Deahl K L, et al. Migration from northern Mexico as the possible cause of recent genetic changes in populations of *Phytophthora infestans* in the United States and Canada. *Phytopathology*, 1994, 84: 553~558
- 19 Drenth A, Tas I C Q, Govers F. DNA fingerprinting uncovers a new sexually reproducing population of *Phytophthora infestans* in the Netherlands. *Europ J Plant Pathol*, 1994, 100: 97~107
- 20 Sujkowski L S, Goodwin S B, Dyer A T, et al. Increased genotypic diversity via migration and possible occurrence of sexual reproduction of *Phytophthora infestans* in Poland. *Phytopathology*, 1994, 84: 201~207
- 21 Hamer J E, Farrall L, Orbach M J, et al. Host Species-specific conservation of a family of repeated DNA sequences in the genome of a fungal plant pathogen. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1989, 86: 9981~9985

- 22 Levy M, Romao J, Marchetti M A, *et al.* DNA fingerprinting with a dispersed repeated sequence resolves patho-
type diversity in the rice blast fungus. *Plant Cell*, 1991, 3: 95~102
- 23 Xia J Q, Correll J C, Lee F N, Marchette M A, *et al.* DNA fingerprinting to examine microgeographic variation in
the Magnaporthe grisea (*Pyricularia grisea*) Population in two rice fields in Arkansas. *Phytopathology*, 1993, 83:
1029~1035
- 24 Levy M, Correa-Victoria F J, Zeigler R S, *et al.* Genetic diversity of the rice blast fungus in a disease nursery in
Columbia. *Phytopathology*, 1993, 83: 1427~1433
- 25 McDonald B A, Martinez J P. DNA restriction fragment length polymorphisms among *Mycosphaerella graminicola*
(anamorph *Septoria tritici*) isolates collected from a single wheat field. *Phytopathology*, 1990b, 80: 1368~1373
- 26 McDonald B A, Martinez J P. Restriction fragment length polymorphisms in *Septoria tritici* occur at a high fre-
quency. *Curr Genet*, 1990a, 17: 133~138
- 27 Boeger J M, Chen R S, McDonald B A. Gene flow between geographic populations of *Mycosphaerella graminicola*
(anamorph *Septoria tritici*) detected with restriction fragment length polymorphism markers. *Phytopathology*,
1993, 83: 1148~1154
- 28 Fry W E, Goodwin S B, Matuszak J M, *et al.* Population genetics and intercontinental migrations of *Phytophthora*
infestans. *Annu Rev Phytopathol*, 1992, 30: 107~129
- 29 Milgroom M G, Lipari S E, Powell W A. DNA fingerprinting and analysis of population structure in the chestnut
blight fungus, *Cryptonectria parasitica*. *Genetics*, 1992, 131: 297~306
- 30 McDonald B A, Miles J, Nelson L R, *et al.* Genetic variability in nuclear DNA in field populations of *Stagonospora*
nodorum. *Phytopathology*, 1994, 84: 250~255
- 31 Rollo F, Amici A, Foresi F, *et al.* Construction and characterization of a cloned probe for detection of *Phoma tra-*
cheiphila in plant tissues. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1987, 26: 352~357
- 32 Wigglesworth M D, Nesmith W C, Schardl C L, *et al.* Use of specific repetitive sequences in *Peronospora tabacina*
for the early detection of the tobacco blue mold pathogen. *Phytopathology*, 1994, 84: 425~430
- 33 Taylor J L, Borgmann I E. An Unusual repetitive element from highly virulent isolates of *Leptosphaeria maculans*
and evidence of its transfer to a weakly virulent isolate. *Mol Plant-Microbe Interact*, 1994, 7: 181~188

Application of DNA Fingerprinting in Population Genetic Analysis of Plant Pathogenic Fungi

Shan Weixing¹ Chen Shouyi² Kang Zhensheng¹ Li Zhengqi¹

(1 Department of Plant Protection, Northwestern Agricultural University, Yangling, Shaanxi 712100)

(2 Institute of Genetics, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101)

Abstract Based on the review of the application development of genetic markers for genetic characterization of plant pathogenic fungi, the application of DNA fingerprinting in population genetic analysis of plant pathogenic fungi is comprehensively reported with the focus on repetitive sequences based DNA markers, and the impact of population genetics on plant pathology is briefly discussed as well.

Key words plant pathogenic fungi, DNA fingerprinting, population genetics