

黄瓜霜霉病和白粉病病原菌的 rDNA-ITS 序列分析

王 娜¹, 马雅军¹, 代光辉², 王喆之³

(1 第二军医大学 病原生物学教研室, 上海 200433; 2 上海交通大学 农业与生物学院, 上海 201101;

3 陕西师范大学 生命科学学院, 陕西 西安 710062)

[摘 要] 为了应用分子特征确定黄瓜霜霉病和白粉病的病原菌种类, 扩增、测定了上海地区黄瓜霜霉病菌和白粉病菌的核糖体 DNA 内转录间隔区(rDNA-ITS)序列, 依据 rDNA-ITS 序列特征分析了两种病原菌种类, 以及与近缘种的差异性。结果显示, 黄瓜霜霉病菌的 rDNA-ITS1 和 rDNA-ITS2 长度分别为 141 和 406 bp, rDNA-ITS1 GC 含量为 41.13%, rDNA-ITS2 GC 含量为 46.80% (闵行区株和金山区株) 或 46.55% (浦东新区株), rDNA-ITS 序列在种内保守性很高, 种间差异性亲缘关系呈正相关, 分子特征证实研究的黄瓜霜霉病病原菌为古巴拟霜霉菌; 黄瓜白粉病菌的 rDNA-ITS1 和 rDNA-ITS2 长度分别为 136 和 89 bp, GC 含量分别为 59.56% 和 66.29%, rDNA-ITS 序列在研究材料中保守, 与瓜类单囊壳(*Sphaerotheca cucurbitae*)完全相同, 但与形态鉴别的结果 *Sphaerotheca fuliginea* 差异高达 4.5%, 提示黄瓜白粉病病原菌的种类需进一步澄清和确定。

[关键词] 黄瓜霜霉病菌; 黄瓜白粉病菌; 核糖体 DNA

[中图分类号] S436.421.1

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2007)10-0155-04

rDNA-ITS sequence analysis of cucumber downy mildew and cucumber powdery mildew's pathogen

WANG Na¹, MA Ya-jun¹, DAI Guang-hui², WANG Zhe-zhi³

(1 Department of Etiologic Biology, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China;

2 College of Agriculture and Biology, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 201101, China;

3 College of Life Sciences, Shaanxi Normal University, Xi'an, Shaanxi 710062, China)

Abstract: To determine the pathogenic species of cucumber downy mildew and cucumber powdery mildew by molecular marker, rDNA-ITS region of the cucumber downy mildew and cucumber powdery mildew's pathogen from Shanghai was amplified and sequenced. The intra-/interspecific sequence difference was analyzed by rDNA-ITS sequence. The results showed that the lengths of rDNA-ITS1 and rDNA-ITS2 were 141 bp and 406 bp, and their GC contents were 41.13% and 46.80% (sm1/sm2) / 46.55% (sm3) with cucumber downy mildew's pathogen, respectively. The rDNA-ITS sequence was highly intraspecific conservative, and interspecific difference was related with their kin relationship. *Pseudoperonospora cubensis* was identified as pathogen of cucumber downy mildew by molecular marker. The length of rDNA-ITS1 and rDNA-ITS2 were 136 bp and 89 bp, and GC contents were 59.56% and 66.29% with cucumber powdery mildew's pathogen, respectively. rDNA-ITS sequence was conservative in this study, and was the same as *Sphaerotheca cucurbitae*. But the sequence difference between the strains of Shanghai in this study and *S. fuliginea* was 4.5%, which was identified by morphology. It was suggested that the pathogenic species of

[收稿日期] 2006-09-05

[基金项目] 上海市科技攻关计划(03dz19314)

[作者简介] 王 娜(1980-), 女, 河南西华人, 助教, 主要从事微生物学研究。

[通讯作者] 马雅军(1964-), 女, 陕西澄城人, 副教授, 博士, 主要从事病原生物学研究。E-mail: yajunm@yahoo.com.cn

cucumber powdery mildew should be clarified and determined in future.

Key words: cucumber downy mildew's pathogen; cucumber powdery mildew's pathogen; rDNA-ITS

黄瓜霜霉病和白粉病均为黄瓜栽培中的主要病害,流行范围很广。黄瓜霜霉病俗称“跑马干”、“黑毛”或“瘟病”,黄瓜感病后,整株叶片迅速干枯、死亡,对黄瓜产量和品质造成严重的影响,据记载其病原体是古巴拟霜霉菌(*Pseudoperonospora cubensis*)^[1]。黄瓜白粉病主要危害植株的叶片、其次是植株叶柄及茎,叶片染病后,菌丝不断生长,形成圆形白色菌落,直至布满整个叶片,俗称“白毛病”。黄瓜白粉病的病原体记载较为混乱,《中国真菌志》记载为瓜类单囊壳(*Sphaerotheca cucurbitae*)和葫芦科白粉菌(*Erysiphe cucurbitacearum*)^[2],也有研究认为是 *E. cichoracearum* 和 *S. fuliginea*,并认为后者更为常见^[3]。因此,若要有效防治上述 2 种黄瓜病害,首先必须澄清其病原体的种类。

近年来的研究显示,核糖体 DNA 内转录间隔区(Ribosomal DNA internal transcribed spacer, rDNA-ITS)进化速度较快,其序列特征适于真菌近缘种的鉴别和系统发育研究^[4-5],但目前国内尚未见黄瓜霜霉病和白粉病病原菌 rDNA-ITS 序列分析的报道。为此,本研究对黄瓜霜霉病和白粉病病原菌的 rDNA-ITS 序列进行了测定和分析,以期从分子水平澄清这 2 种黄瓜病害的病原菌种类。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 病菌来源 黄瓜霜霉病菌分别采自上海市闵行区(sm1 株)、金山区(sm2 株)和浦东新区(sm3 株)蔬菜保护地患霜霉病的黄瓜植株;黄瓜白粉病菌分别采自上海市闵行区(bf1 株)、浦东新区(bf2 株)和松江区(bf3 株)蔬菜保护地患白粉病的黄瓜植株。2 种黄瓜病害均由上海交通大学农业与生物学院植物病理研究室依据症状和病理特征认定,其病原菌依据形态特征确认,分别为古巴拟霜霉菌和 *S. fuliginea*。

1.1.2 试验仪器和试剂 电热恒温水浴箱,上海医疗器械五厂生产;PTC-100 型 PCR 仪,BIO-RAD 公司产品;Taq DNA 聚合酶、10 ×PCR 缓冲液和 dNTP,购自上海生工生物工程技术服务有限公司;凝胶回收试剂盒,QIA GEN 公司产品。

1.2 2 种黄瓜病原菌基因组 DNA 的提取 基因组 DNA 提取参照文献[6]的方法,并加以

优化。用手指轻弹染病的叶片,使病菌孢子及菌丝落在滴加缓冲液的载玻片上,在解剖镜下用针将孢子和菌丝压碎后转移至离心管,加入 10 μL Tween20,60 °C 水浴 3 h 后,12 000 r/min 离心 5 min,取上清液,-20 °C 保存,待用。

1.3 2 种黄瓜病原菌 rDNA-ITS 的扩增和测序

1.3.1 rDNA-ITS 扩增引物的合成 黄瓜霜霉病菌和白粉病菌的 rDNA-ITS 扩增采用套式 PCR 进行。第一轮扩增引物相同,为真菌的通用引物^[7-9]: ITS5 5'-GGA AGT AAA AGT CGT AAC AAG G-3',P3 5'-GCC GCT TCA CTC GCC GTT AC-3'。第二轮扩增引物,霜霉病菌根据文献[5]报道的古巴拟霜霉菌序列设计:psm1 5'-AAC TTT CCA CGT GAA CTG TAT-3',psm2 5'-TGA GAT GCC GCG CGA CCG AAG-3';白粉病菌根据 *S. fuliginea* 的 rDNA-ITS 序列(AB026144)^[10]设计:pbf1 5'-GTA GGT GAA CCT GCG GAA GGA T-3',pbf3:5'-CGC GAG ATA CAT GAC TAC GC-3'。引物由上海生工生物工程技术服务有限公司合成。

1.3.2 扩增和测序 PCR 扩增 rDNA-ITS 的反应体系总体积为 50 μL,其中含 10 mmol/L Tris(pH 8.3),50 mmol/L KCl,1.5 mmol/L MgCl₂,0.1 mg/mL BSA,4 种 dNTP 各 0.1 mmol/L,Taq DNA 聚合酶 1.5 U,成对的上、下游引物各 0.1 μmol/L,以及病菌基因组 DNA 2 μL。扩增程序:94 °C(热变性 90 s;94 °C 30 s,50 °C 30 s,72 °C 30 s,30 个循环。PCR 扩增产物经 10 g/L 琼脂糖凝胶(含 0.5 μg/mL 溴化乙锭)电泳后,在紫外灯下观察结果。割胶回收纯化 PCR 产物,用四色荧光标记双脱氧链终止法测序,序列测定由上海联众基因科技研究院在 PE-ABI377 全自动测序仪上完成。

1.4 序列分析

将测序结果用 Clustal X(Version 1.8),以及 Bioedit(Version 5.0.9)软件包比对排序,辅之以手工调整,分析计算其差异性。黄瓜霜霉病菌和黄瓜白粉病菌的近缘种序列从 GenBank 中获得。

2 结果与分析

2.1 黄瓜霜霉病菌 rDNA-ITS 区序列的特征 黄瓜霜霉病菌上海市 3 个地理株(sm1,sm2 和

sm3)的 rDNA-ITS 区均获得特异扩增,片段长 709 bp,依据文献[5]可划分为:部分 rDNA-ITS1(1~141 bp),5.8 S 全长(142~303 bp)和部分 rDNA-ITS2(304~709 bp)。rDNA-ITS1 长度为 141 bp,GC 含量为 41.13%;rDNA-ITS2 长度为 406 bp,GC 含量为 46.80%(sm1 和 sm2 株)或 46.55%(sm3 株)。以上序列在 GenBank 注册号为:sm1 株(DQ025515)、sm2 株(DQ025516)、sm3 株(DQ025517)。黄瓜霜霉病菌地理株间的序列特征比较结果显示,sm1 株和 sm2 株序列完全相同,sm3 株在 rDNA-ITS2 区的 640 位点与 sm1 株和 sm2 株存在 G→A 个单碱基转换。

将本研究测得的序列与已公布的黄瓜霜霉病菌分离株和 5 个近缘种序列进行比对排序。结果显示,本研究的 sm1 株与古巴拟霜霉菌奥地利 HV222 分离株(GenBank 注册号为:A Y198306)序列完全相同,与我国的南京分离株(GenBank 注册号为:A Y744946)存在 2 处单碱基差异(rDNA-ITS2 区 465 位点 C→A 和 652 位点 A→C),提示本研究材料应为古巴拟霜霉菌;与近缘种比对发现,sm1 株与同属的漳草假霜霉(*Pseu. humuli* GenBank 注册号为:A Y198305)存在 3 处单碱基差异(380 位点 C→A、563 位点 G→A 和 640 位点 G→A),与荨麻假霜霉(*Pseu. urticae* GenBank 注册号为:A Y198307)有 22 个位点差异;与近缘属斜尖状孢子菌属(*Peronospora*)的柱头生霜霉 *P. stigmaticola*(GenBank 注册号为:A Y198295)、*P. tranzscheliana*(GenBank 注册号为:A Y198294)和菊花霜霉 *P. radii*(GenBank 注册号为:A Y198296)相比差异性较大,分别为 7.1%、7.5%和 7.7%。序列的碱基差异多分布于 rDNA-ITS1 区和 rDNA-ITS2 区,5.8 S 编码区序列非常保守。

2.2 黄瓜白粉病菌 rDNA-ITS 区序列特征

上海市黄瓜白粉病菌 3 个地理株(bf1、bf2 和 bf3 株)的 rDNA-ITS 区均获得特异扩增,扩增片段长 379 bp,依据文献[10]可划分为:部分 rDNA-ITS1(1~136 bp),5.8 S 全长(137~290 bp)和部分 rDNA-ITS2(291~379 bp)。rDNA-ITS1 长度为 136 bp,GC 含量为 59.56%;rDNA-ITS2 长度为 89 bp,GC 含量为 66.29%。以上序列在 GenBank 的注册号分别为:bf1 株(DQ025518)、bf2 株(DQ025519)和 bf3 株(DQ025520)。上海市黄瓜白粉病菌 3 个地理株的序列完全相同,将其序列在 GenBank 中进行 Blast 搜索,结果显示其与瓜类单

囊壳日本 MUMH65 分离株(GenBank 注册号为:AB026146)无任何差异,而与 *S. fuliginea*(GenBank 注册号为:AB026144)的差异性为 4.5%,提示黄瓜白粉病病原菌的种类需进一步澄清和确定。

将本研究测得的序列与已报告的相应黄瓜白粉病菌,以及近缘种进行序列比对排序^[10-13]。结果显示,本研究的黄瓜白粉病菌的序列与瓜类单囊壳日本 MUMH65 分离株(GenBank 注册号为:AB026146)完全相同,与 *S. balsaminae*(GenBank 注册号为:AB040318)和 *S. fusca*(GenBank 注册号为:AB026148)相比分别存在 2 个和 4 个位点的差异,与 *S. fuliginea*(GenBank 注册号为:AB026144)和 *S. aphanis*(GenBank 注册号为:AB000938)相比分别存在 17 和 31 个位点的变异,而与 *E. cichoracearum*(GenBank 注册号为:AF229018)差异更大,为 73 个碱基。种间序列的碱基差异多分布于 rDNA-ITS1 或 rDNA-ITS2 区,而 5.8 S 非常保守。

3 讨论

本研究结果表明,黄瓜霜霉病菌——古巴拟霜霉菌上海分离株的 rDNA-ITS 序列与我国南京及奥地利的分离株序列差异极小,可见该序列在种内非常保守。古巴拟霜霉菌的 rDNA-ITS 序列与同属的 2 种和斜尖状孢子菌属的 3 种相比,种间差异大小与菌种的亲缘关系呈正相关,进一步证实文献[4]提出的 rDNA-ITS 序列特征是真菌鉴别的理想分子标志的观点。笔者在生物信息学分析时发现,同一菌种不同分离株的序列差异性从无到极大,甚至出现大片段的缺失,其原因与样本鉴定的准确性有关,比较时应谨慎选择。另外本试验还发现,古巴拟霜霉菌与漳草假霜霉菌种间序列差异极小,与种内差异类似,应进一步探讨两者的分类地位。

本研究黄瓜白粉病菌上海分离株的 rDNA-ITS 序列与来源于日本的瓜类单囊壳 MUMH65 分离株^[10]完全相同,而与 *S. fuliginea* 和 *E. cichoracearum*^[13]差异较大。而葫芦科白粉菌目前尚无 rDNA-ITS 序列资料,无法比对。由此可见,黄瓜白粉病原菌的种类鉴别仍较混乱,本研究样本是依据形态特征鉴别的种类,为 *S. fuliginea*,与《中国真菌志》记载的病原菌不同,又与 *S. fuliginea* 的分子特征存在差异,提示上海市以及我国的黄瓜白粉病原菌的种类需进一步澄清和确定。

黄瓜霜霉病和黄瓜白粉病的病原菌均为专性寄生菌,仅能依靠植物体存活,尚不能体外培养。研究

者在提取病菌的基因组 DNA 时,在病株上很难分离获得纯的材料。为避免混入宿主或其他杂物的基因组 DNA 影响 PCR 扩增,本试验借鉴小麦腥黑穗病菌孢子的获取方法^[6],采用弹孢法收集病原菌样本,并在解剖镜下除去杂质后抽提基因组 DNA,然后采用套式 PCR 扩增,即有效地提高了纯度,又较好地解决了模板量少的问题。

[参考文献]

- [1] 魏景超. 真菌鉴定手册[M]. 上海科学技术出版社,1979:49.
- [2] 中国科学院中国孢子植物志编辑委员会. 中国真菌志(第一卷)白粉菌目[M]. 北京:科学出版社,1987:78,316.
- [3] 裘维蕃. 农业植物病理学[M]. 北京:农业出版社,1979:465.
- [4] 余仲东,张星耀,曹支敏. 真菌核糖体基因间隔区研究概况[J]. 西北林学院学报,2000,15(2):107-112.
- [5] Voglmayr H. Phylogenetic relationships of *Peronospora* and related genera based on nuclear ribosomal ITS sequences[J]. Mycol Res,2003,107(10):1132-1142.
- [6] 易建平,陶庭典,潘良文,等. 套式 PCR 直接检测印度腥黑穗病菌冬孢子[J]. 植物检疫,2002,16(4):197-200.
- [7] Motoaki K, Takashi T. Phylogeny of *Alternaria* fungi known to produce host-specific toxins on the basis of variation in internal transcribed spacers of ribosomal DNA [J]. Curr Genet, 1995,28:491-498.
- [8] Tetsuya H, Susumu T. Nucleotide sequence diversity of rDNA internal transcribed spacers extracted from conidia and cleistothecia of several powdery mildew fungi[J]. Mycoscience,1996,37:283-288.
- [9] White T J, Bruns T, Lee S, et al. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics [M]. California: Academic Press,1990.
- [10] Takamatsu S, Hirata T, Sato Y. A parasitic transition from trees to herbs occurred at least twice in tribe Cystothecaceae (Erysiphaceae): evidence from nuclear ribosomal DNA [J]. Mycol Res,2000,104:1304-1311.
- [11] Hirata T, Cunningham J H, Paksiri U, et al. Evolutionary analysis of subsection *Magnicellulatae* of *Podosphaera* section *Sphaerotheca* (Erysiphales) based on the rDNA ITS sequences with special reference to host plants[J]. Can J Bot, 2000,78:1521-1530.
- [12] Takamatsu S, Hirata T, Sato Y. Phylogenetic analysis and predicted secondary structures of the rDNA internal transcribed spacers of the powdery mildew fungi (Erysiphaceae) [J]. Mycoscience,1998,39:441-453.
- [13] Kiss L, Cook R T A, Saenz G S, et al. Identification of two powdery mildew fungi, *Oidium neolycopersici* sp. nov. and *O. lycopersici*, infecting tomato in different parts of the world [J]. Mycol Res,2001,105(6):684-697.
- [11] 胡小平,杨家荣,梅娜,等. 苹果黑星病菌培养基的比较研究[J]. 西北农业学报,2003,12(4):51-52.
- [12] 胡小平,杨家荣,梅娜,等. 苹果黑星病菌中国菌株生物学特性研究[J]. 植物病理学报,2004,34(3):283-286.
- [13] 胡小平,杨家荣,商文静,等. 苹果黑星病菌 DNA 提取方法研究[J]. 西北农林科技大学学报:自然科学版,2004,32(4):45-47.
- [14] 胡小平. 陕西苹果黑星病流行规律及其病原菌遗传多样性的 SSR 分析[D]. 中国杨凌:西北农林科技大学,2004
- [15] Stewart T M, Yang L H. Control options for apple scab (*Venturia inaequalis*) in Shaanxi province of China[J]. Agricultural Research in the Arid Areas,2000,18(1):65-72.
- [16] 胡小平,王长发. SAS 基础及统计实例教程[M]. 西安:西安地图出版社,2001,147-181.
- [17] Frey C N, Keitt G W. Studies of spore dissemination of *Venturia inaequalis* in relation to seasonal development of apple scab[J]. Jour Agric Res,1925,30:529-540.
- [18] Tenzer I, Gessler C. Subdivision and genetic structure of populations of *Venturia inaequalis* in Switzerland[J]. European Journal of Plant Pathology,1997,103:565-571.

(上接第 154 页)