

文 静,刘铁志,赵 冰. 内蒙古 4 种白粉菌的 ITS 序列分析[J]. 江苏农业科学,2014,42(12):50-52.

doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2014.12.014

内蒙古 4 种白粉菌的 ITS 序列分析

文 静,刘铁志,赵 冰

(赤峰学院生命科学院,内蒙古赤峰 024000)

摘要:采用 chelex-100 法提取内蒙古地区 4 种白粉菌的基因组 DNA,扩增其 rDNA 内转录间隔区序列 ITS,连接载体测序,并基于 ITS 序列进行亲缘关系分析。结果表明,4 种白粉菌形成 3 个进化距离较远的分支;寄生在豌豆和田旋花上的豌豆白粉菌和旋花白粉菌的 ITS 序列紧密聚在 1 支,其亲缘关系较近,同属白粉菌属;寄生在紫花苜蓿上的托罗斯内丝白粉菌和寄生在山桃上的三指单囊白粉菌各自成 1 支,与形态学分类结果相一致。ITS 序列可用于内蒙古地区白粉菌分类鉴定研究。

关键词:白粉菌;内转录间隔区;亲缘关系;内蒙古;序列分析

中图分类号: S432.4⁺4 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2014)12-0050-03

白粉菌(powdery mildews)是重要的植物病原菌,目前至少报道了 25 个属 873 种,其中,有性型 16 个属,无性型 9 个属^[1],由白粉菌引起的植物病害统称为白粉病。白粉病在世界各地均有发生,寄主植物至少有 1 617 属 9 838 种被子植物^[2]。近年来,我国由于玻璃温室、塑料大棚和密植等栽培模式和耕作制度的改变,为作物白粉病的发生创造了良好的环境,常常造成瓜果、蔬菜和花卉等白粉病的大流行,白粉病发生相当普遍和严重,给农业生产带来重大的经济损失。在许多地区,如芍药、醉蝶花、荷兰菊等观赏花卉白粉病的发病率几乎达到 100%,林木和牧草白粉病更是随处可见。

内蒙古自治区是典型的中温带季风气候地区,植物种类复杂多样,为专性寄生的白粉菌提供了优越的生长发育条件,通过经典分类方法已鉴定出白粉菌 10 属 123 个种和变种,寄主植物多达 58 科 211 属 400 多种和变种^[3]。农业是内蒙古的主要产业之一,为避免白粉菌对农业造成的经济损失,对内蒙古自治区农作物白粉菌进行系统分类研究很有必要。近几年,随着分子生物学的发展,对白粉菌系统分类研究已由传统的经典分类向分子生物方法分类过渡。本试验对内蒙古自治区采集的白粉菌样本进行 rDNA-ITS 序列分析及比对,构建白粉菌系统发育树,从分子系统学角度探讨不同白粉菌之间的亲缘关系,以期为白粉菌的分类鉴定及系统发育等方面的研究提供依据,为该地区植物白粉病的有效防治及物种多样性的研究提供科学依据及资料。

1 材料与方法

1.1 菌种样本采集

在内蒙古自治区采集 4 种白粉菌样本,寄主分别是豌豆(标本号:CFSZ 5159)、田旋花(标本号:CFSZ7249)、紫花苜蓿

(标本号:CFSZ7253)、山桃(标本号:CFSZ7257),保存于赤峰学院生命科学院菌物实验室。

1.2 白粉菌孢子收集

白粉菌是专性寄生菌,只在活体寄主上生存,因此,将病菌样本尽快带回实验室,在新鲜寄主植物表面,用灭菌的解剖针在显微镜下挑取大概数百个分生孢子,将其置于 1.5 mL 离心管中-20℃冰箱中保存,以备提取基因组 DNA。

1.3 主要试剂

Chelex-100,购自美国伯乐公司;Taq 酶、XbaI、Hind III、质粒 DNA 提取试剂盒、PCR 产物纯化试剂盒和 pMD 18-T Vector,均购自大连宝生物公司;通用引物 ITS1:5'-TCCG-TAGGTGAACCTGCCG-3'、ITS4:5'-TCCTCCGCTTATT-GATATGC-3'、ITS5:5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3'、ITS6:5'-AGGTAATCCCGTTGTTTC-3'^[4],均由大连宝生物公司合成。

1.4 白粉菌基因组 DNA 的提取

选取数百个分生孢子置于 1.5 mL 离心管中,加入 50 μL 5% Chelex-100,56℃温育数小时;涡旋振荡仪剧烈振荡,沸水浴 8 min;再次剧烈振荡,15 000 g 离心 5 min;上清移入另一离心管中,-20℃保存备用^[5]。

1.5 ITS 序列的 PCR 扩增

采用巢式 PCR 方法,以提取的基因组 DNA 作为模板进行 PCR 扩增。一次 PCR 总体积为 50 μL,反应参数为:94℃ 2 min;94℃ 30 s,55℃ 30 s,72℃ 30 s,循环 30 次;72℃ 10 min。二次 PCR 总体积为 50 μL,反应参数为:94℃ 2 min;94℃ 30 s,60℃ 30 s,72℃ 30 s,循环 30 次;72℃ 10 min。将 PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳检测。

1.6 PCR 产物的克隆及序列测定

PCR 产物的回收与纯化参照 TaKaRa DNA Fragment Purification Kit 试剂盒说明进行,并与 pMD 18-T 载体连接转化于 DH5α 感受态细胞,用 PCR 法和 XbaI、Hind III 双酶切法筛选阳性克隆菌株,送大连宝生物生物技术有限公司测序。

1.7 ITS 序列的生物信息学分析

利用 Clustal X 程序将 4 种不同植物白粉病菌的 ITS 序列

收稿日期:2013-12-30

基金项目:赤峰学院引进人才基金(编号:ZRRC200608)。

作者简介:文 静(1978—),女,内蒙古包头人,硕士,讲师,主要从事分子生物学研究。Tel:(0476)8300377;E-mail:wenjing1997@sina.com。

匹配排列,用 MEGA 6.0 软件对序列进行比对分析,基于 kimura-2-parameter 双参数模型,采用邻近距离法(NJ 法)构建系统进化树以推演系统发生关系,同时,采用 bootstrap 法,经 1000 次循环检验系统进化树的可靠性。

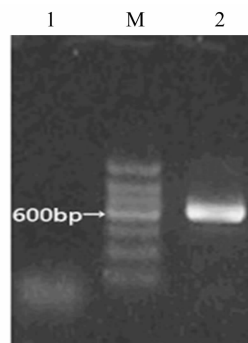
2 结果与分析

2.1 PCR 扩增结果

由图 1、图 2 可见,采用真菌通用引物 ITS5 和 ITS6 作为外引物,ITS1 和 ITS4 作为内引物,对 4 种白粉菌基因组 DNA 进行扩增,均得到 600 bp 左右的 DNA 片段。测序结果表明,该片段包括了完整的核糖体内转录间隔区 ITS1 和 ITS2 序列、部分 18S rDNA、全部 5.8S rDNA 序列及部分 28S rDNA 序列。

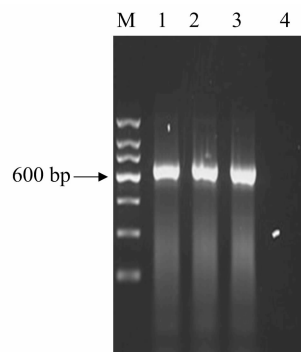
2.2 白粉病菌 ITS 序列分析和进化树的构建

将已测得的序列去掉 5'和 3'端的载体序列,得到 4 种白粉菌的 ITS 序列,用 Clustal X 软件中 Alignment 程序对 ITS 序列进行多重比对,结果由表 1、图 3 可见,4 种白粉菌部分 18S rDNA、全部 5.8S rDNA 序列和部分 28S rDNA 序列非常保守,而内转录间隔区 ITS1 和 ITS2 序列变化较大。基于 ITS 序列,利用 MEGA 6.0 对 4 种白粉菌进行系统发育分析和进化树的构建,由图 4 可见,4 种白粉菌形成 3 个进化距离较远的大分支;寄生在豌豆(CFSZ 5159)和田旋花(CFSZ7249)上的白粉菌遗传距离较小,亲缘关系较近,其 ITS 序列紧密聚在 1 支;寄生在紫花苜蓿(CFSZ7253)上的托罗斯内丝白粉菌和寄生在山桃(CFSZ7257)上的三指单囊白粉菌各自成 1 支,ITS 序列分析结果与其在形态学上的分类结果相一致。



M—marker; 1—阴性对照; 2—CFSZ7257菌株

图1 CFSZ7257 菌株 ITS 序列扩增结果



M—marker; 1—CFSZ 5159; 2—CFSZ7249; 3—CFSZ7253; 4—阴性对照

图2 CFSZ 5159 等 3 种白粉菌 ITS 序列扩增结果

表 1 4 种白粉菌 ITS 序列分析

白粉菌种类	标本号	寄主	序列(bp)					
			总长	18S	ITS1	5.8S	ITS2	28S
豌豆白粉菌(<i>Erysiphe pisi</i>)	CFSZ 5159	豌豆	648	1~31	32~252	253~406	407~592	593~648
旋花白粉菌(<i>Erysiphe convolvuli</i>)	CFSZ7249	田旋花	647	1~31	32~250	251~404	405~591	592~647
托罗斯内丝白粉菌(<i>Leveillula taurica</i>)	CFSZ7253	紫花苜蓿	648	1~31	32~241	242~396	397~592	593~648
三指单囊白粉菌(<i>Podosphaera tridactyla</i>)	CFSZ7257	山桃	567	1~31	32~209	210~363	364~511	512~567

3 结论

本研究对来自于内蒙古自治区不同属的 4 种白粉菌进行 ITS 序列克隆,已成功克隆出白粉菌的 ITS 序列包括内转录间隔区 ITS1 和 ITS2、部分 18S rDNA、全部 5.8S rDNA 序列及部分 28S rDNA 序列。通过序列对比分析发现,部分 18S rDNA、全部 5.8S rDNA 序列和部分 28S rDNA 序列核糖体编码区非常保守,适合亲缘关系较远的类群分析^[6],而 ITS1 和 ITS2 变化较大,可用于亲缘关系较近类群的分析。基于 ITS 序列比对,利用 MEGA 6.0 对 4 种白粉菌进行系统发育分析和进化树的构建,内蒙古自治区 4 种白粉菌种属间亲缘关系的结果与传统的形态学分类结果相一致,这表明 ITS 序列可用于白粉菌属内和属间的亲缘关系和分类分析。

本研究获得了一种通过扩增 ITS 序列进行亲缘关系和分类分析快速而有效的方法,这为内蒙古自治区白粉菌分子系统学的研究和植物白粉病的防治,提供了理论参考和相关依据。

参考文献:

- [1] Braun U, Cook R A. Taxonomic manual of the erysipales (powdery mildews) [M]. Utrecht: CBS - KNAW Fungal Biodiversity Centre, 2012: 1-707.
- [2] Amano K. Host range and geographical distribution of the powdery mildew fungi [M]. 2nd ed. Tokyo: Japan Scientific Societies Press, 1986.
- [3] 刘铁志. 内蒙古白粉菌志 [M]. 呼和浩特: 内蒙古科学技术出版社, 2010: 1-322.
- [4] Takamatsu S, Limkaisang S, Braun U. Phylogenetic relationships and generic affinity of *Uncinula septata* inferred from nuclear rDNA sequences [J]. Mycoscience, 2005, 46(1): 9-16.
- [5] Hirata T, Takamatsu S. Nucleotide sequence diversity of rDNA internal transcribed spacers extracted from conidia and cleistothecia of several powdery mildew fungi [J]. Mycoscience, 1996, 37(3): 283-288.
- [6] Bruns T D, White T J, Taylor J W. Fungal molecular systematics [J]. Annual Review of Ecology and Systematics, 1991, 22: 525-564.

<i>L. taurica</i> (CFSZ7253)	TCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTACAGAGCGTGAAGACCTCGGCCCTCCACAG	60
<i>P. tridactyla</i> (CFSZ7257)	TCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTACCGAGCGCGAGGCCACGAGGGCGCCTGTC	60
<i>E. pisi</i> (CFSZ5159)	TCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTACAGAGTGCAGGGCTCAGTCGTGGCATCTGC	60
<i>E. convolvuli</i> (CFSZ7249)	TCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTACAGAGTGCAGGGCTCCGTCGTGGCATCAGC	60

<i>L. taurica</i> (CFSZ7253)	CGCAAGCTGGTGCAGGGACACATGCCGGGTCGACCTCCACCCGTGTGCTACT-CGTC	119
<i>P. tridactyla</i> (CFSZ7257)	---CTGTGTT-----GGCTGACCTCCACCCGTGTGAATTATATC	97
<i>E. pisi</i> (CFSZ5159)	TGCGTGCTGG-----GCCGACCTCCACCCGTGTGCTACT-TGTA	99
<i>E. convolvuli</i> (CFSZ7249)	TGCGTACTGG-----GCCGACCTCCACCCGTGTGCTACTTTGTA	100
	..	* * . * * * * * * * * *
<i>L. taurica</i> (CFSZ7253)	TCCTGTTGCTTTGGCAGGCCGACT-----GCCTAGCG	151
<i>P. tridactyla</i> (CFSZ7257)	TATTGTTGCTTTGGCGGGCCGGGCTCGAC-----	126
<i>E. pisi</i> (CFSZ5159)	TCTTGTGCTTTGGCGGGCCGGGCGCGTCTGCTGCTGCCGATGGACCTGCGTCGGCGG	159
<i>E. convolvuli</i> (CFSZ7249)	TCTTGTGCTTTGGCGAGCCGGGCGGTGCTGCTGCTGCCGATGGGATGCGTCGG---	157
	* * * * * * * * * *	
<i>L. taurica</i> (CFSZ7253)	GTCTCTGGGCTCTCGGGCTGGAGTGCCTGCCAGAGA---CTATTCAACTCGTGTCTG	208
<i>P. tridactyla</i> (CFSZ7257)	---CTGCCGGCTCCGGCTGGGGAGTGCCCGCCAGAGAAGCCC---CAACTCGTGTCTG	179
<i>E. pisi</i> (CFSZ5159)	CCGCCACCGGTTTCGACTGGAGCGCGCCGCCAAAGACCAACCAAACTCATGTTGTT	219
<i>E. convolvuli</i> (CFSZ7249)	CCGCCACCGGTTTCGACGGGAGCGTGCCCGCCAAAGACCAACCAAACTCATGTTGTT	217
	* * * * * * * * * *	
<i>L. taurica</i> (CFSZ7253)	GATGAAGTCTGAGCAATAAAAAATAAAGTAAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGCT	268
<i>P. tridactyla</i> (CFSZ7257)	AGTGTG---TCTGAGTGAATGTGAATTAATAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGCT	236
<i>E. pisi</i> (CFSZ5159)	TGTCGCTCTCAGCTTTAATGAAAAATGATAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGCT	279
<i>E. convolvuli</i> (CFSZ7249)	TGTCGCTCTCAGCTTTAATGAAAAATGATAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGCT	277
	. * : * : : * : : : * * * * * * * * * *	
<i>L. taurica</i> (CFSZ7253)	CTGGCATCGATGAAGAACGCGAGCAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTAGTG	328
<i>P. tridactyla</i> (CFSZ7257)	CTGGCATCGATGAAGAACGCGAGCAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTAGTG	296
<i>E. pisi</i> (CFSZ5159)	CTGGCATCGATGAAGAACGCGAGCAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTAGTG	339
<i>E. convolvuli</i> (CFSZ7249)	CTGGCATCGATGAAGAACGCGAGCAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTAGTG	337

<i>L. taurica</i> (CFSZ7253)	AATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTGGGTAACCTCCTAGGGCATGCGCTGT	388
<i>P. tridactyla</i> (CFSZ7257)	AATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTGGGTAACCTCCTAGGGCATGCGCTGT	355
<i>E. pisi</i> (CFSZ5159)	AATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTGGGTAACCTCCTAGGGCATGCGCTGT	398
<i>E. convolvuli</i> (CFSZ7249)	AATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTGGGTAACCTCCTAGGGCATGCGCTGT	396

<i>L. taurica</i> (CFSZ7253)	CGAGCGTCATAACAACCCGTCGAGCCGACTAGGCTTGGTCTTGGGGCTC---GCCCGCATT	446
<i>P. tridactyla</i> (CFSZ7257)	CGAGCGTCAGAACCCCTCAAGCCTAGCTTGGTCTTGGGG-----CTCG	400
<i>E. pisi</i> (CFSZ5159)	CGAGCGTCATAACAC---CCCTCCAGCTGCCGTTGTGTGGCTGCGGTGTTGGGGCTCGTG	457
<i>E. convolvuli</i> (CFSZ7249)	CGAGCGTCATAACAACCCCTCCAGCTGCCGTTGTGTGGCTGCGGGCTTGGGGCTCGTCG	456
	***** * * * * * . * * :	
<i>L. taurica</i> (CFSZ7253)	CGGCGCGCGGCTCTTAAACGCACTGGCGGTGCCGTTGGTGC---TTTCCGCTAGTCACAT	505
<i>P. tridactyla</i> (CFSZ7257)	CCGGCTGGCGGCCCTTAAACGCACTGGCGGTGCCGTTGGTGC---CCGTGA---GTCAT	456
<i>E. pisi</i> (CFSZ5159)	CGATGCGCGGCCCTTAAAGACAGTGGCGGTCCCGCGCTGGGCTCTACCGGTAGTAACCT	517
<i>E. convolvuli</i> (CFSZ7249)	CGCTGCGCGGCCCTTAAAGACAGTGGCGGTCCCGCGTGGGCTCTACCGGTAGTAACCT	516
	* *	
<i>L. taurica</i> (CFSZ7253)	TTCTCGCGCGAGGGCAG---AATCCGGACCCAGCCAGCAACCACAAAGTCCGACGCGCTCT	563
<i>P. tridactyla</i> (CFSZ7257)	GTATCTCGCGACAGAGCGCGGACCGGACCTGCCAG-----	491
<i>E. pisi</i> (CFSZ5159)	GCTTCTCGCGACAGAGTGACGCGGTGGCTTGCCAG-----AACAAACCCCT	563
<i>E. convolvuli</i> (CFSZ7249)	GCTTCTCGCGACAGAGTGACGCGGTGGCTTGCCAG-----AACAACTCT	562
	* * * * * * . . . * * * * * .	
<i>L. taurica</i> (CFSZ7253)	GCGCGGCGACTTTTGTACTTCTTGTGTGACCTCGAATCAGGTAGGGATACCCGCTGAA	623
<i>P. tridactyla</i> (CFSZ7257)	-----AACCCCAATTTTCTTGATGACCTCGAATCAGGTAGGGATACCCGCTGAA	542
<i>E. pisi</i> (CFSZ5159)	ATTGGGTCCAGTCACATGGATCAGGTTGACCTCGAATAGGTAGGAATACCCGCTGAA	623
<i>E. convolvuli</i> (CFSZ7249)	TTTGGTTCAGTCACATGGATCAGGTTGACCTCGAATCAGGTAGGAATACCCGCTGAA	622
	. : : *	
<i>L. taurica</i> (CFSZ7253)	CTTAAGCATATCAATAAGCGGAGGA	648
<i>P. tridactyla</i> (CFSZ7257)	CTTAAGCATATCAATAAGCGGAGGA	567
<i>E. pisi</i> (CFSZ5159)	CTTAAGCATATCAATAAGCGGAGGA	648
<i>E. convolvuli</i> (CFSZ7249)	CTTAAGCATATCAATAAGCGGAGGA	647

图3 4 种白粉菌 ITS 序列的对比分析

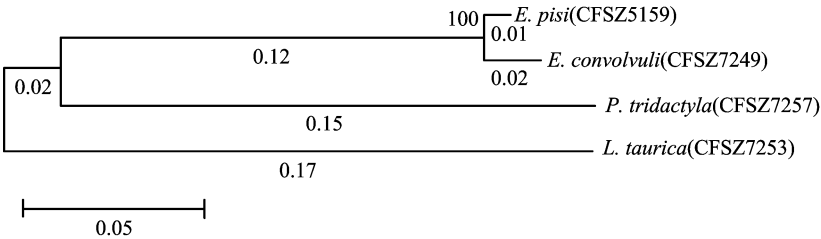


图4 4 种白粉菌的 MEGA 系统发育树