

张佳峰, 吴娥娇, 罗桂火, 等. 致病疫霉 *ATP6* 基因单倍型与地理因素的相关性分析[J]. 江苏农业科学, 2017, 45(8): 75–78.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2017.08.021

致病疫霉 *ATP6* 基因单倍型与地理因素的相关性分析

张佳峰, 吴娥娇, 罗桂火, 祝 雯, 詹家绥

(福建农林大学植物病毒研究所/福建省植物病毒学重点实验室, 福建福州 350002)

摘要:致病疫霉(*Phytophthora infestans*)是马铃薯晚疫病的病原菌,对世界马铃薯的生产造成严重影响。*ATP6* 编码 *ATP* 合酶 α 亚基的第 6 个亚单位,对 *ATP* 合酶的功能及生物的生存生殖至关重要。本研究对来自我国 7 个群体 140 株马铃薯晚疫病病菌的 *ATP6* 基因进行核苷酸序列及其遗传结构和地理因素(海拔、经度和年平均气温)的相关分析。结果表明:7 个群体中只有 2 种单倍型 *Hapl-1* 和 *Hapl-2*,其中 *Hapl-1* 在群体中所占比例与当地的海拔呈显著正相关,与年平均气温和经度呈显著负相关,而 *Hapl-2* 在群体中的比例与当地的海拔、年平均气温和经度的相关正好与 *Hapl-1* 相反。群体间的遗传分化度(F_{ST})与群体间直线距离呈显著正相关($r=0.659, P=0.001$)。本研究表明,马铃薯致病疫霉 *ATP6* 基因单倍型分布和群体地理因素之间具有显著相关关系,该结果为了解致病疫霉的进化趋势和致病疫霉的防治提供了理论依据。

关键词:马铃薯晚疫病病菌;*ATP6* 基因;单倍型多样性;地理因素;核苷酸序列

中图分类号: S435.32 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2017)08-0075-04

马铃薯晚疫病是由致病疫霉(*Phytophthora infestans* de Bary)引起的毁灭性病害,可侵染马铃薯和番茄等茄科植物^[1-2],每年造成直接经济损失高达百亿美元^[3-4]。21 世纪以来,随着马铃薯种植面积不断扩大,我国马铃薯种植面积和产量已居世界第一,马铃薯已经成为全球性食物,是水稻、小麦和玉米之后的全球第四大粮食作物^[5-6]。

线粒体基因组的突变率低,单亲遗传,常被用于研究生物的进化模式^[7-10]。目前为止,已有超过 150 个植物、动物、真菌、原生动物的线粒体基因组被测序^[11]。因此,通过了解线粒体基因遗传多样性有助于了解致病疫霉群体结构和变异特点,进而探究不同地理区域下的群体遗传结构。

马铃薯生产具有较强的地域性,在全国不同地区形成各具特色的栽培方式和栽培类型,从生产上来看,中国马铃薯的生产栽培区域为 4 个,分别是北方一季作区、中原二季作区、南方冬作区、西南混作区^[12],各地理区域气候特征差异较大。胡珍珠等对我国北方马铃薯主产区致病疫霉群体遗传结构进行分析,结果表明,我国北方马铃薯主产区致病疫霉群体存在较为丰富的遗传多样性,且其遗传多样性与地理来源密切相关^[13];云南马铃薯晚疫病群体遗传多样性在地理分布上也存在差异显著^[14];气候变暖对马铃薯晚疫病发生发展的影响研究表明马铃薯晚疫病的发生发展与流行的适应气象条件,单因子作用并不显著^[15];短暂的温度起伏也会导致个体产生不同的表型^[16];同时,随着地区年均温的改变加剧会导致更多

的遗传变异^[17-18];经纬度、海拔、年平均气温、降水量以及紫外强度对当地马铃薯晚疫病病菌的发生造成很大的影响^[19-21]。本研究对我国 7 个不同地理环境的致病疫霉菌群体的 *ATP6* 基因进行遗传多样性分析,以探究致病疫霉遗传多样性的空间分布以及遗传结构与地理因素(海拔、经度和年均温)的相关性,以期对晚疫病的防控提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 供试菌株

根据 SSR 基因型的不同从源自我国云南曲靖(2010 年)、广西南宁(2010 年)、贵州安顺(2011 年)、福建福州(2010 年)、福建霞浦(2011 年)、甘肃定西(2010 年)和宁夏渭南(2010 年)7 个马铃薯栽培地区,共计 815 株致病疫霉菌中选取 140 株无性系,寄主均为马铃薯。

1.2 方法

1.2.1 样本的采集与纯化 在发病区选 1 块田地,病株间隔 2 m 以上,每个病株上选择具有典型症状的单个病斑的病叶,在水琼脂培养基上保湿培养 12~24 h,用接种针挑取单根菌丝,接种于含抗生素(利福平 10 mg/L、氨苄青霉素 100 mg/L)的选择性黑麦培养基上^[22]。

1.2.2 培养基的制备 黑麦培养基的配置:将 50 g 黑麦浸泡 12 h,匀浆机粉碎,60 ℃ 水浴浸泡 2 h,4 层纱布过滤,定容至 1 L 并且加入 12 g 琼脂糖加热溶化,于 121 ℃ 高压灭菌 20 min。冷却到 60 ℃ 左右倒平板,接菌后在 18 ℃ 避光培养 7~10 d。将纯化的菌株接种到黑麦冻存管或者黑麦培养基斜面上,13 ℃ 避光长期保存菌种^[23]。

1.2.3 致病疫霉 DNA 的提取和线粒体 *ATP6* 基因的扩增 收集在黑麦培养基中培养 10 d 的致病疫霉菌丝,冷冻干燥并且粉碎后使用 BIOMIGA 试剂公司订购的 Bio MIGA Plant g DNA Kit(GD2611-02 250 poeps)试剂盒提取 DNA,将提取的基因组 DNA 保存于 -40 ℃ 备用。利用 DNAMAN 以及 Primer

收稿日期:2016-11-15

基金项目:国家马铃薯产业技术体系(编号:CARS-10);福建省自然科学基金(编号:2016J01111)。

作者简介:张佳峰(1989—),男,甘肃白银人,硕士研究生,研究方向为马铃薯晚疫病病菌群体遗传学。E-mail:18259049245@163.com。
通信作者:祝 雯,博士,助理研究员,主要从事植物病原群体遗传学研究。E-mail:zhuw@fafu.edu.cn。

Premier 5 软件设计并在上海铂尚生物技术有限公司合成引物 (F, 5′ - GAAGCTGCTGCATGCTATTGG - 3′; R, 5′ - GCGACCTATAGCGTCACAAGC - 3′),对致病疫霉 7 个群体的 *ATP6* 基因片段进行扩增。PCR 采用 Blend *Taq* DNA 聚合酶进行扩增,PCR 反应在 Life Pro Themeral Cycler PCR 仪上进行。反应体系为 25 μL,包括 1 μL 模板 DNA、0.25 μL *Taq* DNA 聚合酶、2.5 μL dNTP、2.5 μL 10 × buffer,加无菌水补至 25 μL。PCR 扩增程序为:94 ℃ 3 min;94 ℃ 30 s,55 ℃ 50 s,72 ℃ 90 s,循环 35 次;72 ℃ 10 min。将 PCR 产物进行 1.2% 琼脂糖凝胶电泳后,利用 G:BOX 凝胶成像系统进行观察拍照。

1.2.4 测序和数据处理 将琼脂糖凝胶电泳检测结果中条带单一的 PCR 扩增产物样品送于上海铂尚生物有限公司进行 PCR 产物测序。将测序所获得的序列通过 DNAMAN 软件进行拼接,使用 MEGA 5.05^[24] 软件中的 Muscle(Codons) 子程序进行多重比对。通过 NCBI 在线 BLAST 比对验证同源性,利用 DnaSP 5.10.1^[25] 软件分析致病疫霉遗传多样性参数来评估遗传多样性,包括单倍型数 (number of haplotypes detected, *H*)、核苷酸多样性 (nucleotide diversity, π)、单倍型多样性 (haplotype diversity, *Hd*)、多态性位点数 (number of segregating site, *S*) 等^[26-27]。利用 Arlequin v 3.4.1.3^[28] 软件计算群体间 F_{ST} ,根据 F_{ST} 的值来判断群体分化程度。采样地点当年的年平均气温、海拔以及经度则通过 World Climate (<http://www.world-climate.com>) 以及 Google Earth (<http://www.earthol.com/>) 来查询^[29],同时利用经纬度距离计算器来计算采样点之间的直线距离。

2 结果与分析

全国 7 个群体中只出现 2 个多态性位点(表 1)。单倍型多样性(*Hd*)在地区间存在差异,福州、霞浦、甘肃、宁夏、云南群体的单倍型多样性(*Hd*)值均小于 0.5,核苷酸多样性(π)值均小于 0.005,然而贵州、广西群体的单倍型多样性值大于 0.5,但是核苷酸多样性值仍然小于 0.005。通过对 7 个群体的单倍型多样性比较发现,贵州群体的单倍型多样性平均值最高,为 0.525,云南群体的单倍型多样性平均值最低,为 0.111。贵州群体 *ATP6* 基因表现出较高的遗传多样性,云南群体 *ATP6* 基因表现出较低的遗传多样性(表 1)。

表 1 7 个致病疫霉群体 <i>ATP6</i> 遗传多样性参数						
群体	<i>N</i>	<i>S</i>	π	θ_{Site}	<i>h</i>	<i>Hd</i>
福州	21	1	0.000 53	0.000 39	2	0.381
霞浦	32	1	0.000 23	0.000 34	2	0.166
甘肃	20	1	0.000 47	0.000 39	2	0.337
贵州	16	1	0.000 73	0.000 42	2	0.525
宁夏	16	1	0.000 17	0.000 42	2	0.125
广西	20	1	0.000 70	0.000 39	2	0.505
云南	15	1	0.000 19	0.000 40	2	0.111
总体	140	2	0.000 70	0.000 43	2	0.503

7 个群体总共存在 2 种单倍型,分别命名为 *Hapl* - 1 和 *Hapl* - 2 (图 1)。甘肃、宁夏以及云南地区主要以单倍型 *Hapl* - 1 为主;霞浦和福州主要以单倍型 *Hapl* - 2 为主;而在贵州和广西,*Hapl* - 1 和 *Hapl* - 2 所占比例接近(表 2)。

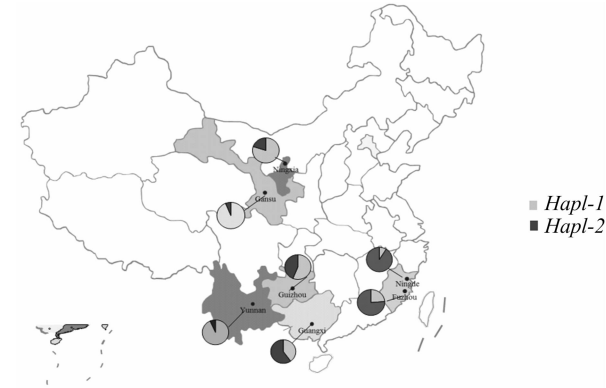


图 1 7 个致病疫霉群体 *ATP6* 单倍型地理分布

表 2 7 个致病疫霉群体 *ATP6* 单倍型比例

群体	<i>ATP6</i> 单倍型比例	
	<i>Hapl</i> - 1	<i>Hapl</i> - 2
福州	0.238	0.762
霞浦	0.088	0.912
甘肃	0.938	0.062
宁夏	0.800	0.200
广西	0.400	0.600
云南	0.933	0.067
贵州	0.562	0.438

以 *ATP6* 基因为分子标记,根据群体间的 F_{ST} 值判断群体的分化程度并结合 K_{ST} 、 Z 和 S_{nn} 等 3 种方法检验遗传分化的显著水平,评估群体分化状况。群体间最高分化为霞浦和宁夏群体 (F_{ST} = 0.823),其次为云南和霞浦群体 (F_{ST} = 0.819)(表 3)。根据 2 个群体间的 F_{ST} 和 2 个群体间的直线距离进行相关性分析,结果表明,2 个群体间的 F_{ST} 和 2 个群体间的直线距离呈显著正相关(r = 0.659, P = 0.001)(图 2)。

表 3 7 个致病疫霉群体间遗传分化系数

群体	F_{ST}					
	贵州	福州	广西	甘肃	宁夏	霞浦
福州	0.154					
广西	-0.005	0.010				
甘肃	0.072	0.453	0.248			
宁夏	0.270	0.636	0.444	0.021		
霞浦	0.433	0.049	0.228	0.685	0.823	
云南	0.256	0.626	0.431	0.012	-0.069	0.819

注:0 < F_{ST} ≤ 0.05,轻微分化;0.05 < F_{ST} ≤ 0.15,中度分化;0.15 < F_{ST} ≤ 0.25,高度分化; F_{ST} > 0.25,严重分化。

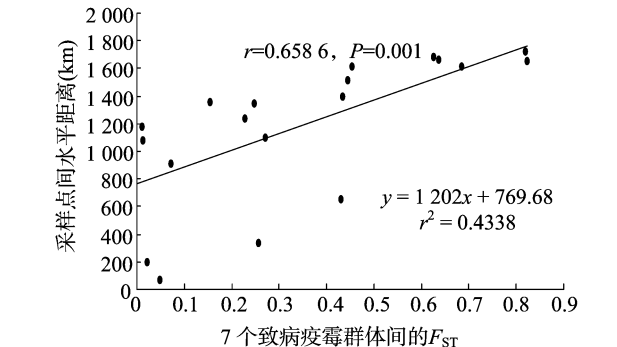


图 2 7 个致病疫霉群体间 F_{ST} 和采样点间直线距离相关性

采样地点地理因素因子(表 4)以及不同地区单倍型分布比例(图 3)的相关性分析表明,*Hapl-1* 比例与采样地区海拔呈现正相关($r=0.951, P=0.001$),*Hapl-2* 比例和采样地区海拔呈现负相关($r=-0.951, P=0.001$),说明随着采样地区海拔的升高,*Hapl-1* 比例越高,*Hapl-2* 比例越低;*Hapl-1* 比例和采样地区年平均气温呈现负相关($r=-0.752, P=0.051$),而 *Hapl-2* 比例和采样地区年平均气温呈现正相关($r=0.752, P=0.051$),说明 *Hapl-1* 比例随着采样地区年平均气温升高而降低,*Hapl-2* 比例随着年平均气温升高而升高;*Hapl-1* 比例与采样地区经度呈现负相关($r=-0.894, P=0.007$),*Hapl-2* 比例与采样地区经度呈现正相关($r=0.894, P=0.007$),说明随着采样地区采样地区经度的升高,

表 4 7 个致病疫霉群体地区所处地理位置和年平均气温

群体地区	经度	纬度	海拔(m)	年平均气温(℃)
福州	119°17'E	26°05'N	10	20.5
甘肃	105°43'E	34°35'N	2 089	11.7
广西	108°22'E	22°50'N	78	22.6
贵州	105°56'E	26°16'N	1 330	14.7
霞浦	119°59'E	26°54'N	31	20.3
宁夏	106°14'E	36°01'N	1 778	7.0
云南	102°43'E	25°03'N	2 677	15.6

Hapl-1 比例降低、*Hapl-2* 比例上升。

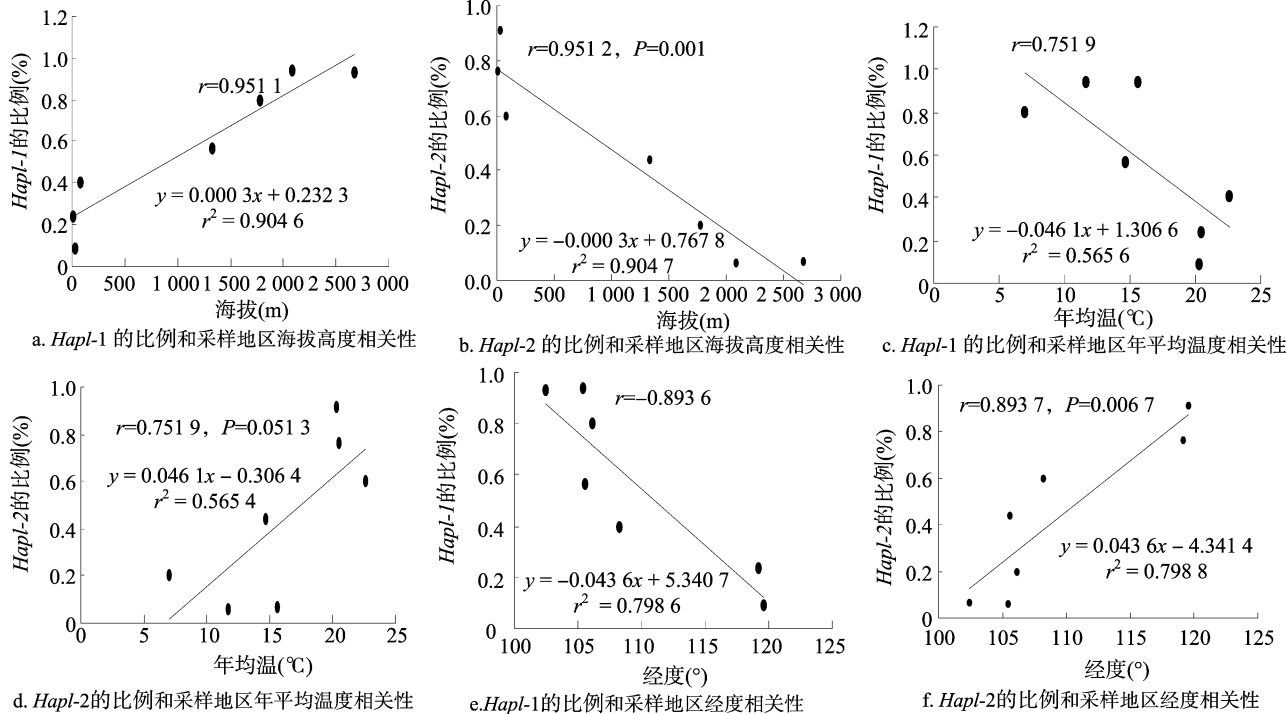


图3 7 个致病疫霉群体*ATP6* 单倍型百分比与采样地区当年海拔、经度、年平均气温相关性

3 讨论与结论

对我国 7 个不同群体采集筛选的共计 140 个致病疫霉 *ATP6* 基因进行扩增和核苷酸分析,同时进行 *ATP6* 基因遗传结构和部分地理因素之间的相关性分析。结果表明,有 2 种单倍型 *Hapl-1* 和 *Hapl-2*,其中 *Hapl-1* 与海拔呈正相关,与年平均气温和经度呈负相关,而 *Hapl-2* 与海拔呈负相关,与年平均气温和经度呈正相关。群体间的 F_{ST} 与群体间水平距离成显著相关关系。

有研究表明,地理环境因素是影响晚疫病流行的关键因素^[30-32],本研究结果也表明,*ATP6* 基因单倍型比例与采样地区海拔、经度以及年平均气温具有相关性。同时 *ATP6* 基因与呼吸作用相关^[33],海拔、年均气温和经度均可以影响生物的呼吸作用,本试验间接证明这些地理因素与晚疫病发生和致病疫霉群体分布具有相关性。

从生产上来看,中国马铃薯的生产栽培区域有各自特有的气象因素和农业生态系统,各生态区域气候特征差异较大。

地区间致病疫霉群体遗传结构各有不同。群体间 F_{ST} 和采样点间垂直距离呈现正相关($r=0.659, P=0.001$)。这一结果证实,进化理论中提到的地区间隔是导致种群地区间遗传分化的重要原因,地理位置越靠近分化程度越低^[34-35]。

目前我国对致病疫霉遗传分化的原因多处于对遗传多样性的了解,对地区间分化原因以及形成机制很少探讨。本研究利用分子生物学和群体遗传学原理,初步分析我国不同地区马铃薯晚疫病病菌的遗传多样性及形成的可能机制,为马铃薯防治提供依据。但本研究选择单个线粒体基因,在未来研究中,采取多个基因联合方法来对此结论进行进一步验证,为制定长期、有效和环境友好型的致病疫霉防治方案提供科学依据。

参考文献:

[1]Turkensteen L J. Durable resistance of potatoes against *Phytophthora infestans*[M]//Jacob T, Parlevliet J E. Durability of disease resistance. Berlin:Springer Netherlands,1993:115-124.

- [2] Erwin D C, Ribeiro O K. *Phytophthora* diseases worldwide[J]. Plant Pathology, 1998, 47(2): 224–225.
- [3] 李汝刚. 马铃薯抗晚疫病遗传工程研究获得重大突破[J]. 植物保护, 1997, 23(5): 12–13.
- [4] Fry W E, Goodwin S B. Re-emergence of potato and tomato late blight in the United States[J]. Plant Disease, 1997, 81(12): 1349–1357.
- [5] Birch P J, Bryan G, Fenton B, et al. Crops that feed the world 8: potato are the trends of increased global production sustainable? [J]. Food Security, 2012, 4(4): 477–508.
- [6] 杨丽娜, 段国华, 覃雁瑜, 等. 2012 年云南省会泽县马铃薯晚疫病菌小种结构分析[J]. 热带作物学报, 2016, 37(1): 158–163.
- [7] Avila-Adame C, Gómez-Alpizar L, Zismann V, et al. Mitochondrial genome sequences and molecular evolution of the Irish potato famine pathogen, *Phytophthora infestans* [J]. Current Genetics, 2006, 49(1): 39–46.
- [8] Segawa R D, Aotsuka T. The mitochondrial genome of the Japanese freshwater crab, *Geothelphusa dehaani* (Crustacea: Brachyura): evidence for its evolution via gene duplication [J]. Gene, 2005, 355(355): 28–39.
- [9] Rogaev E I, Moliaka Y K, Malyarchuk B A, et al. Complete mitochondrial genome and phylogeny of Pleistocene mammoth *Mammuthus primigenius* [J]. PLoS Biology, 2006, 4(3): e73.
- [10] Boore J L. Complete mitochondrial genome sequence of *Urechis caupo*, a representative of the phylum Echiura [J]. BMC Genomics, 2004, 5(1): 67.
- [11] Chesnick J M, Goff M, Graham J, et al. The mitochondrial genome of the stramenopile alga *Chrysodidymus synuroideus*. Complete sequence, gene content and genome organization [J]. Nucleic Acids Research, 2000, 28(13): 2512–2518.
- [12] Wang B, Ma Y, Zhang Z, et al. Potato viruses in China [J]. Crop Protection, 2011, 30(9): 1117–1123.
- [13] 胡珍珠, 杨志辉, 丁明亚, 等. 我国北方马铃薯生产区致病疫霉群体遗传结构分析[J]. 河南农业科学, 2015, 44(7): 83–88.
- [14] 赵志坚, 曹继芬, 杨明英, 等. 用两个微卫星标记分析云南马铃薯晚疫病菌的遗传多样性[J]. 中国农业科学, 2008, 41(11): 3610–3617.
- [15] 姚晓红, 许彦平, 姚新琪. 气候变暖对马铃薯晚疫病发生发展的影响[J]. 安徽农业科学, 2010, 38(21): 11315–11317, 11444.
- [16] Winkler W C, Breaker R R. Regulation of bacterial gene expression by riboswitches [J]. Annual Review of Microbiology, 2005, 59(59): 487–517.
- [17] Lee C E. Evolutionary genetics of invasive species [J]. Trends in Ecology & Evolution, 2002, 17(8): 386–391.
- [18] Somero G N. The physiology of climate change: how potentials for acclimatization and genetic adaptation will determine ‘winners’ and ‘losers’ [J]. The Journal of Experimental Biology, 2010, 213(6): 912–920.
- [19] Alizon S, Hurford A, Mideo N, et al. Virulence evolution and the trade-off hypothesis: history, current state of affairs and the future [J]. Journal of Evolutionary Biology, 2009, 22(2): 245–259.
- [20] Altizer S, Ostfeld R S, Johnson P T, et al. Climate change and infectious diseases: from evidence to a predictive framework [J]. Science, 2013, 341(6145): 514–519.
- [21] Baumann H, Conover D O. Adaptation to climate change: contrasting patterns of thermal-reaction – norm evolution in Pacific versus Atlantic silversides [J]. Proceedings Biological Sciences, 2011, 278(1716): 2265–2273.
- [22] Wu E J, Yang L N, Zhu W, et al. Diverse mechanisms shape the evolution of virulence factors in the potato late blight pathogen *Phytophthora infestans* sampled from China [J]. Scientific Reports, 2016, 6: 26182.
- [23] 吴娇娥, 沈国桢, 刘训达, 等. 水杨酰胺对致病疫霉生长及其对噬菌酯敏感性的影响 [J]. 农药学报, 2015, 17(4): 384–390.
- [24] Tamura K, Peterson D, Peterson N, et al. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods [J]. Molecular Biology and Evolution, 2011, 28(10): 2731–2739.
- [25] Sgarbi G, Baracca A, Lenaz G, et al. Inefficient coupling between proton transport and ATP synthesis May be the pathogenic mechanism for NARP and Leigh syndrome resulting from the T8993G mutation in mtDNA [J]. The Biochemical Journal, 2006, 395(3): 493–500.
- [26] Kung M L, Ga H B, James A C, et al. Distribution patterns and introduction pathways of the Cosmopolitan brown alga *Colpomenia peregrina* using *mtcox3* and *atp6* sequences [J]. Journal of Applied Phycology, 2014, 26(1): 491–504.
- [27] Cárdenas M, Grajales A, Sierra R, et al. Genetic diversity of *Phytophthora infestans* in the Northern Andean region [J]. BMC Genetics, 2011, 12(1): 23.
- [28] Excoffier L, Lischer H E. Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows [J]. Molecular Ecology Resources, 2010, 10(3): 564–567.
- [29] Yang L N, Zhu W, Wu E J, et al. Trade-offs and evolution of thermal adaptation in the Irish potato famine pathogen *Phytophthora infestans* [J]. Molecular Ecology, 2016, 25(16): 4047–4058.
- [30] 谭宗九, 王文泽, 丁明亚, 等. 气象因素对马铃薯晚疫病发生流行的影响 [J]. 中国马铃薯, 2001, 15(2): 96–98.
- [31] 王利亚, 孙茂林, 杨艳丽, 等. 云南马铃薯晚疫病区域性流行学的研究 [J]. 西南农业学报, 2005, 18(2): 157–162.
- [32] 池再香, 杜正静, 陈忠明, 等. 2009—2010 年贵州秋、冬、春季干旱气象要素与环流特征分析 [J]. 高原气象, 2012, 31(1): 176–184.
- [33] 杨福愉. ATP 合酶: 一个最小的蛋白质分子转动马达 [J]. 医学分子生物学杂志, 2005, 2(4): 243–249.
- [34] 祝雯, 付海静, 杨丽娜, 等. 福建省部分地区马铃薯晚疫病霉群体遗传多样性分析 [J]. 激光生物学报, 2013, 22(3): 267–272.
- [35] 祝雯, 詹家绥. 植物病原物的群体遗传学 [J]. 遗传, 2012, 34(2): 157–166.