

刘 威,尹 鹏,王子浩,等. 茶树等木本植物炭疽菌种群遗传分化研究[J]. 江苏农业科学,2017,45(11):42-44.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2017.11.011

茶树等木本植物炭疽菌种群遗传分化研究

刘 威¹,尹 鹏¹,王子浩¹,叶乃兴²

(1. 信阳农林学院茶学院,河南信阳 464000; 2. 福建农林大学园艺学院/中国乌龙茶产业协同创新中心,福建福州 350002)

摘要:从福建省不同地区茶树及其他木本植物上分离获得 38 株炭疽病菌,采用 rDNA-ITS 序列分析方法对供试菌株进行系统发育分析和种群分化研究。结果表明,炭疽菌不同种群遗传多样性丰富且存在遗传差异,供试不同寄主来源炭疽病菌在 rDNA-ITS 基因序列上存在一定的特异性,但不明显。供试炭疽病菌存在一定的寄主专化性,不具有地理来源特异性。序列比较结果显示,菌株间的 ITS 序列同源性较高,但仍存在多种不同类型的碱基变异,包括碱基的缺失、突变、插入等。

关键词:茶树;木本植物;炭疽病菌;遗传多样性;ITS 序列分析

中图分类号: S435.711 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2017)11-0042-03

炭疽病是刺盘孢属真菌(*Colletotrichum* Corda) 侵染植物引起的病害,种类繁多,寄主范围广泛,有记录的寄主植物种类至少有 176 属 190 种,包括果树、林木、蔬菜、牧草、花卉等^[1],且不同种类的炭疽菌生物学、生理学特性多存在差异。炭疽病菌侵染茶树,引起茶树感染炭疽病,该病的发生可影响茶树的生长,降低茶叶的产量与品质^[2]。炭疽病菌种间、种内存在较多变异,甚至不同寄主之间也会存在一定的遗传多样性,这些遗传变化影响炭疽病菌的侵染特性、寄主选择性、致病力、生物学特性,及对茶树炭疽病的防治效果。为深入了解炭疽病菌的遗传多样性特征,rDNA-ITS 序列分析、限制性片段长度多态性分析等多种分子标记技术已得到广泛应用^[3-4]。

绝大多数真菌 rDNA-ITS 区域基因序列具有广泛的多态性,多数表现为种内基因序列相对一致,而种间差异明显的特点^[5]。鉴于 rDNA-ITS 序列片段长度小且易于分析的特点,可以从其序列差异中得到足够的信息用于种内系统发育分析,现在已被广泛应用在真菌性病害的分类鉴定和病害诊断中^[6-8]。本研究通过分析从福建省不同地区寄主为茶树或其他木本植物上分离获得的炭疽菌 rDNA-ITS 区域序列异同,探讨福建省不同寄主来源炭疽病菌以及不同地区茶树炭疽菌的遗传多样性,将对今后炭疽病的防治工作提供参考。

1 材料与方法

1.1 供试菌株

从福建省茶树上采集炭疽病菌标本,经单孢分离获得

25 株病原菌菌株,寄主为非茶树木本植物的 13 株炭疽病菌菌株由福建农林大学植物保护学院提供,组成供试 38 株不同采集地区、不同寄主植物的炭疽病菌标本,菌株编号、种名、寄主植物、拉丁学名、采集地、GenBank 登录号等信息如表 1 所示。38 株菌株均用马铃薯蔗糖琼脂(PSA)平板培养基保存于 4~8℃ 冰箱中备用。

用真菌 rDNA-ITS 通用引物 ITS1(5'-TCCGTAGGT-GAACCTGCGG-3')、ITS4(5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3')对供试 38 株菌株进行 PCR 扩增^[9]。试验 PCR 反应的体系及其组成成分:5 ng 模板 DNA、1 μL 上游引物、1 μL 下游引物、5 μL PCR 缓冲液、0.5 μL DNA 聚合酶、4 μL dNTPs。反应程序:95℃ 预变性 5 min;95℃ 52 s、56℃ 55 s、72℃ 60 s,共循环 30 次;71.5℃ 延伸 11 min。扩增反应结束后,用微量移液器吸取 4 μL 扩增产物,用 1.0% 琼脂糖凝胶电泳法检测其含量,切取电泳条带经纯化后送上海华大基因科技有限公司进行测序。

1.2 茶树等炭疽菌遗传多样性分析

将供试 38 株炭疽病菌菌株的 ITS 基因序列用 MEGA 6.0 软件的邻结法(Neighbor-Joining,简称 NJ)构建菌株的系统发育树,以自展法对其进行检测,循环 1 000 次。采用软件 DNAMAN 6.0 计算各菌株变异位点和碱基含量,并选用 Kimura 2-parameter 计算菌株间的遗传距离。对供试的 38 株植物炭疽病菌 rDNA-ITS 基因序列进行遗传多样性检测分析,比较茶树炭疽菌与其他木本植物炭疽菌的序列差异。

2 结果分析

2.1 rDNA-ITS 区 PCR 扩增结果

利用通用引物 ITS1、ITS4 对 38 株供试炭疽菌菌株的 rDNA-ITS 区域扩增,均能扩增获得 1 条特异性条带,序列大小约为 580 bp。扩增的部分结果如图 1 所示。

2.2 遗传多样性分析

由图 2 可知,在遗传距离约为 0.02 处,38 株炭疽病菌菌株的进化树可分为 3 个类群,分别是 Q₁、Q₂、Q₃,其自检支持率分别为 98%、99%、99%;其中 Q₁ 群中包含的菌株最多,

收稿日期:2016-11-06

基金项目:国家重点研发计划(编号:2016YFD0200905);河南省科技攻关项目(编号:152102110158);信阳农林学院青年教师基金(编号:201501016)。

作者简介:刘 威(1985—),男,河南驻马店人,硕士,讲师,主要从事茶树生理生态与质量安全研究。Tel:(0376)6687018;E-mail:liuweitea@163.com。

通信作者:叶乃兴,硕士,教授,主要从事茶树栽培育种与品质调控研究。Tel:(0591)83789461;E-mail:ynxtea@126.com。

表 1 供试菌株材料信息

序号	编号	种名	寄主植物	拉丁学名	采集地点	GenBank 登录号
1	FTG	<i>Colletotrichum fruticola</i>	铁观音	<i>Camellia sinensis</i> cv. Tieguanyin	福建农林大学	KC845286
2	FHD	<i>C. fioriniae</i>	黄旦	<i>C. sinensis</i> cv. Huangdan	福建农林大学	KC845278
3	FSX	<i>C. siamense</i>	福建水仙	<i>C. sinensis</i> cv. Fujianshuixian	福建农林大学	KC845276
4	FRG	<i>C. siamense</i>	肉桂	<i>C. sinensis</i> cv. Rougui	福建农林大学	KC845279
5	FJG	<i>C. siamense</i>	金观音	<i>C. sinensis</i> cv. Jinguanyin	福建农林大学	KC845275
6	FHG	<i>C. camelliae</i>	黄观音	<i>C. sinensis</i> cv. Huangguanyin	福建农林大学	KP635400
7	FFA	<i>C. siamense</i>	福安大白茶	<i>C. sinensis</i> cv. Fuanabaicha	福建农林大学	KC845274
8	FFB	<i>C. siamense</i>	福鼎大白茶	<i>C. sinensis</i> cv. Fudingdabaicha	福建农林大学	KC845285
9	FFH	<i>Colletotrichum</i> sp.	福鼎大毫茶	<i>C. sinensis</i> cv. Fudingdahaocha	福建农林大学	—
10	RTG	<i>C. fruticola</i>	铁观音	<i>C. sinensis</i> cv. Tieguanyin	福建省泉州市永春县	KF921292
11	RFS	<i>C. karstii</i>	佛手	<i>C. sinensis</i> cv. Foshou	福建省泉州市永春县	KC845281
12	YFS	<i>C. camelliae</i>	佛手	<i>C. sinensis</i> cv. Foshou	福建省泉州市永春县	KP635398
13	ZLH	<i>Colletotrichum</i> sp.	福云 6 号	<i>C. sinensis</i> cv. Fuyun6	福建省宁德市周宁县	—
14	ZRG	<i>C. camelliae</i>	肉桂	<i>C. sinensis</i> cv. Rougui	福建省宁德市周宁县	KP635397
15	ZTG	<i>C. fruticola</i>	铁观音	<i>C. sinensis</i> cv. Tieguanyin	福建省宁德市周宁县	KC845283
16	ZHG	<i>C. fruticola</i>	黄观音	<i>C. sinensis</i> cv. Huangguanyin	福建省宁德市周宁县	KC845277
17	ZHD	<i>C. camelliae</i>	黄旦	<i>C. sinensis</i> cv. Huangdan	福建省宁德市周宁县	KP635401
18	ZJX	<i>C. fioriniae</i>	金萱	<i>C. sinensis</i> cv. Jinxuan	福建省宁德市周宁县	KC845287
19	WHG	<i>C. fruticola</i>	黄观音	<i>C. sinensis</i> cv. Huangguanyin	福建武夷山市	KF921293
20	WSX	<i>C. fruticola</i>	福建水仙	<i>C. sinensis</i> cv. Fujianshuixian	福建武夷山市	KC845282
21	WRG	<i>C. fruticola</i>	肉桂	<i>C. sinensis</i> cv. Rougui	福建武夷山市	KC845290
22	ATG	<i>C. fruticola</i>	铁观音	<i>C. sinensis</i> cv. Tieguanyin	福建省泉州市安溪县	KC845284
23	AHD	<i>C. fruticola</i>	黄旦	<i>C. sinensis</i> cv. Huangdan	福建省泉州市安溪县	KC845288
24	AMX	<i>C. karstii</i>	毛蟹	<i>C. sinensis</i> cv. Maoxie	福建省泉州市安溪县	KC845280
25	ABS	<i>C. camelliae</i>	本山	<i>C. sinensis</i> cv. Benshan	福建省泉州市安溪县	KP635399
26	ML	<i>C. gloeosporioides</i>	茉莉	<i>Jasminum sambac</i> (L.) Ait.	福建省福州市闽侯县	KC845255
27	YT	<i>C. gloeosporioides</i>	油茶	<i>C. oleifera</i> Abel	福建省福州市	KC845254
28	YW	<i>C. boninense</i>	鱼尾葵	<i>Caryota ochlandra</i>	福建农林大学	KC845266
29	HQ	<i>C. musae</i>	云南黄素馨	<i>Jasminum mesnyi</i>	福建农林大学	KC845260
30	LG	<i>C. gloeosporioides</i>	雷公藤	<i>Tripterygium wilfordii</i>	福建农林大学	KC845257
31	MG	<i>C. acutatum</i>	芒果	<i>Mangifera indica</i>	福建农林大学	KC845256
32	BL	<i>C. gloeosporioides</i>	番石榴	<i>Psidium guajava</i>	福建省福州市	KC845265
33	TA	<i>C. acutatum</i>	桃树	<i>Prunus persica</i>	福建省福州市闽侯县	KC845269
34	XJ	<i>C. viniferum</i>	香蕉	<i>Musa Paradisiaca</i>	福建省莆田市	KC845268
35	PT	<i>C. acutatum</i>	葡萄	<i>Vitis vinifera</i>	福建省莆田市	KC845270
36	GJ	<i>C. acutatum</i>	柑橘	<i>Citrus reticulata</i>	福建省莆田市	KC845262
37	PP	<i>C. acutatum</i>	枇杷	<i>Eriobotrya japonica</i>	福建省莆田市	KC845271
38	CT	<i>C. gloeosporioides</i>	刺桐	<i>Erythrina variegata</i>	福建省泉州市	KC845264

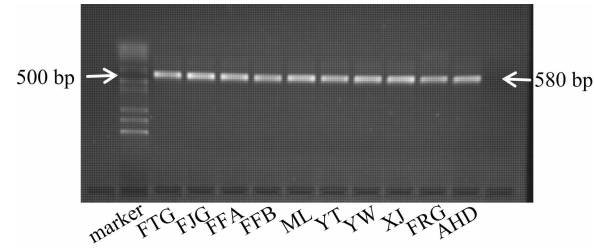


图1 各菌株 PCR 扩增电泳检测结果(部分)

共 26 株,超过菌株总数的 68%,其中有 19 个茶树炭疽菌,7 个其他木本植物炭疽菌。把 Q₁ 群可以再分为 3 个小群,分别为 F₁、F₂、F₃,F₁、F₂ 中菌株的寄主全为茶树,F₃ 中菌株的寄主则全为其他木本植物;Q₂ 群中 3 个菌株也可以分为 2 类,其中 AMX、RFS 为一类,寄主为茶树,YW 寄主为鱼尾葵,是非茶木本植物;Q₃ 也可以再分为 3 个分支,分别为 F₄、F₅、F₆,F₆ 中菌株的寄主全部为茶树,F₄、F₅ 中菌株的寄主全部为非茶树木本植物。从整个聚类树来看,HQ 与 F₁ 较近,且 Q₁、Q₂、

Q₃ 中菌株寄主既有茶树又有非茶木本植物,这说明供试炭疽菌存在一定的寄主专化性,但不具有严格的寄主专化性。在 F₁ 群中,菌株 RTG 与其余菌株存在较大的遗传差异;在 F₂ 群中,ZRG 与其余菌株存在较大的遗传差异。

2.3 供试植物炭疽菌 rDNA - ITS 序列差异比较

38 株炭疽病病菌菌株的 T、A、C、G 碱基出现的平均概率分别为 23.6%、23.4%、27.5%、25.5%,寄主为茶树的炭疽菌 T、A、C、G 碱基出现的平均概率分别为 23.8%、23.5%、27.1%、25.6%,其他木本植物 T、A、C、G 碱基出现的平均概率分别为 23.1%、23.3%、28.2%、25.4%,由此可以看出,寄主为茶树与其他木本植物炭疽菌的各碱基出概率差别不明显。各菌株 rDNA 基因存在一些碱基差异,以 T 碱基为例,出现的概率为 21.9%~25.2%,茶树与其他木本植物病原菌没有明显差异。25 株寄主为茶树的菌株基因序列长度为 507~527 bp,其他木本植物基因序列长度为 506~526 bp,两者差别不大。供试菌株 rDNA - ITS 序列长度多样性不丰富。采

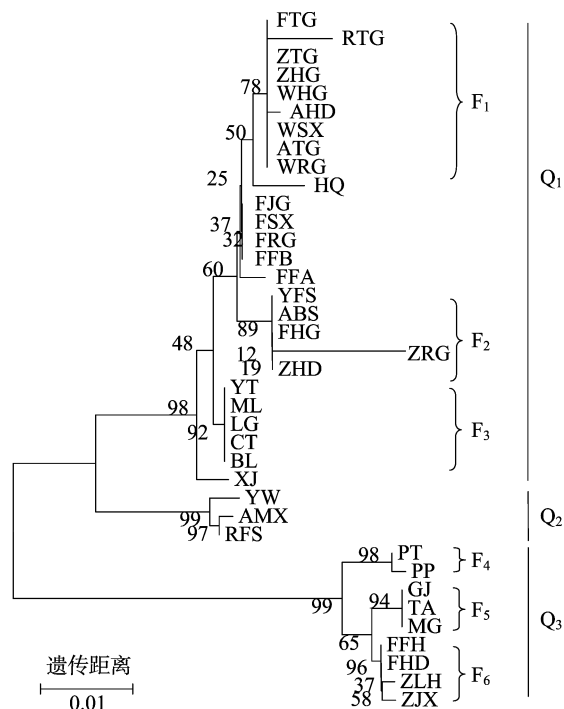


图2 38株炭疽病菌的 NJ 系统进化树

用 MEGA 5.1 计算 38 株炭疽病病菌菌株之间的遗传距离,发现全部菌株的平均遗传距离约为 0.046,说明各菌株间的遗传距离较小,其中最大遗传距离为 0.119,最小遗传距离为 0。

多基因序列比对的部分结果如图 3 所示,碱基的变异多出现在 ITS1 区,炭疽菌种间与种内均存在丰富的遗传多样性,比较 38 株供试菌株 ITS 序列,发现侵染茶树的炭疽病病菌在第 5 bp 基因位点上均比侵染其他木本植物的炭疽病病菌多 1 个 A 碱基(图 3 中箭头所指位置),这可能与病原菌与寄主长期互作有关系。

3 结论与讨论

研究表明,以基因序列为基础的核酸分析技术来评价物种之间的亲缘关系是可行的,rDNA 基因区域中 18S 与 28S 区域相对保守,属内差别不大,可用于属的分类鉴定,ITS 区域序列多样性丰富,被普遍应用于真菌种的鉴定中^[10]。

本研究通过扩增供试 38 株炭疽病病菌的 rDNA - ITS 序列,并对其基因序列进行研究,发现供试菌株之间存在丰富的碱基序列差异,序列比较结果表明,菌株间的 ITS 序列同源性较高,但仍存在多种不同类型的碱基及序列变异,包括碱基的缺失、突变、插入等,这与 ITS 区段为非结构基因、进化速度比结构基因快有关^[11]。与其他木本植物炭疽菌相比,茶树炭疽菌在 5 bp 基因位点上存在特异的碱基 A,这一碱基变异可能与炭疽病病菌适应寄主茶树有关,还需扩大供试其他木本植物范围进行验证,进一步研究该变异与病原菌感染性的关系。ITS 序列的变异虽不一定是造成炭疽菌能侵染茶树的原因,但这些变异可能使病原菌更易侵染茶树或者在茶树体内更好地生长。此外,还需对与病原菌侵染寄主直接相关的基因进行研究,以便更好地了解炭疽病病菌侵染茶树的内在机制。

遗传多样性检测分析结果表明,供试茶树炭疽菌rDNA-ITS基因序列与其他植物炭疽菌存在一定的特异性,

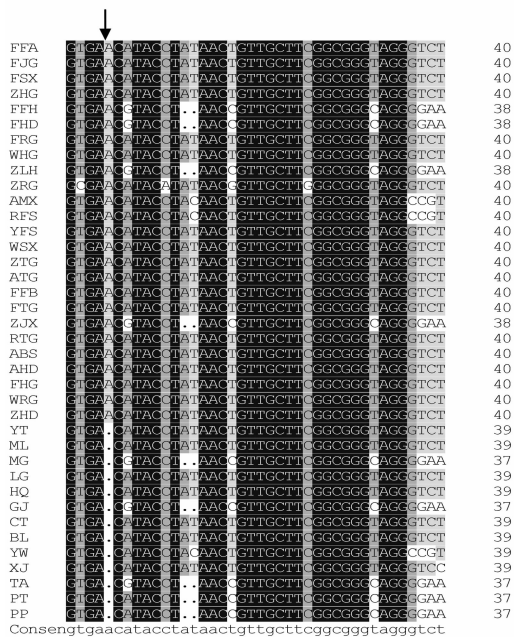


图3 供试菌株多基因序列比对结果(部分)

但特异性不明显。同一采集地区的供试菌株在聚类图上没有相似性,说明供试菌株在福建省内没有地理来源特异性。

参考文献:

- [1] 刘诗胤,邱海萍,姜 华,等. 浙江地区不同寄主来源的炭疽菌 ITS 序列 PCR-RFLP 多态性分析[J]. 浙江农业学报,2012,24(1):61-65.
- [2] 谭济才. 茶树病虫害防治学[M]. 2 版. 北京:中国农业出版社,2011:10-18.
- [3] Hyde K D, Cai L, Ehc M K, et al. *Colletotrichum*: a catalogue of confusion[J]. Fungal Diversity,2009,39(2):1-17.
- [4] Karén O, Hogberg N, Dahlberg A, et al. Inter- and intraspecific variation in the ITS region of rDNA of ectomycorrhizal fungi in Fennoscandia as detected by endonuclease analysis[J]. New Phytologist, 1997,136(2):313-325.
- [5] 陈剑山,郑服丛. ITS 序列分析在真菌分类鉴定中的应用[J]. 安徽农业科学,2007,35(13):3785-3786,3792.
- [6] 牛宪立,姬可平,吴 群,等. rDNA ITS 区序列分子标记技术在植物学研究中的应用[J]. 生物信息学,2009,7(4):268-271.
- [7] 白树猛,田 黎. ITS 序列分析在真菌分类鉴定和分子检测中的应用[J]. 畜牧与饲料科学,2009,30(1):52-53,189.
- [8] Chen J, Xu L L, Liu B, et al. Taxonomy of *Dactylella* complex and *Vermispora*. I. Generic concepts based on morphology and ITS sequences data[J]. Fungal Diversity,2007,26(1):73-83.
- [9] Guerber J C, Liu B, Correll J C, et al. Characterization of diversity in *Colletotrichum acutatum sensu lato* by sequence analysis of two gene introns, mtDNA and intron RFLPs, and mating compatibility [J]. Mycologia,2003,95(5):872-895.
- [10] 杨腊英,黄华平,唐复润,等. 香蕉炭疽菌 rDNA ITS 区的分子鉴定与检测[J]. 植物病理学报,2006,36(3):219-225.
- [11] Xu P F, Han Y P, Wu J J, et al. Phylogenetic analysis of the sequences of rDNA internal transcribed spacer (ITS) of *Phytophthora sojae* [J]. Acta Genetica Sinica,2007,34(2):180-188.