

利用 28S rDNA D1/D2 区和 ITS rDNA 序列 鉴定甜瓜白粉病病原菌

刘建利

(北方民族大学生物科学与工程学院, 宁夏 银川 750021)

摘要: 为了明确宁夏干旱带压砂甜瓜白粉病病原菌, 从病原菌分生孢子中提取 DNA, PCR 扩增 ITS rDNA 和 28S rDNA D1/D2 区段, 测序后进行 BLAST 比对。结果表明, 病原菌的 ITS rDNA 和 28S rDNA D1/D2 序列与菜豆叉丝单囊壳白粉菌 *Podosphaera phaseoli* 凤仙花叉丝单囊壳白粉菌 *P. balsaminae* 菊科叉丝单囊壳白粉菌 *P. fusca* 苍耳单囊壳白粉菌 *P. xanthii* 瓜类单囊壳白粉菌 *P. fuliginea* 等叉丝单囊壳属 *Podosphaera* 的多个种的 ITS rDNA 和 28S rDNA D1/D2 序列之间相似度均大于 99%, 鉴定甜瓜白粉病病原菌为叉丝单囊壳属 *Podosphaera*。

关键词: 甜瓜白粉病; ITS rDNA; 28S rDNA D1/D2

Identification of pathogen of melon powdery mildew with 28S rDNA D1/D2 and ITS rDNA

Liu Jianli

(College of Biological Sciences and Engineering, Beifang University for Nationalities,
Yinchuan 750021, Ningxia Hui Autonomous Region, China)

Abstract In order to investigate the pathogen of melon powdery mildew in lands overlaid with sands in Ningxia droughty area, ITS rDNA and 28S rDNA D1/D2 of pathogen amplified by PCR were sequenced and analyzed by BLAST in GenBank after DNA had been extracted from conidia of pathogen. The results showed that ITS rDNA and 28S rDNA D1/D2 sequence of pathogen had more than 99% of similarity to the species of *Podosphaera phaseoli*, *P. balsaminae*, *P. fusca*, *P. xanthii*, *P. fuliginea*, suggesting the pathogen of melon powdery mildew belonged to *Podosphaera*.

Key words melon powdery mildew; ITS rDNA; 28S rDNA D1/D2

甜瓜白粉病 (melon powdery mildew) 为甜瓜的常见病, 俗称“白毛病”, 发生普遍, 严重影响甜瓜生产, 可使甜瓜减产达 60%, 同时影响甜瓜的成熟度和含糖量, 导致甜瓜的品质下降^[1]。目前, 对瓜类白粉病病原菌鉴定主要依靠观察病原菌闭囊壳、分生孢子及萌发方式等显微形态^[2], 或用鉴定寄主法鉴定其生理小种^[3-4]。但由于白粉病病原菌无性阶段形态相似, 有性阶段的闭囊壳不经常出现, 鉴定寄主法需进行活体试验, 工作量较大、周期长^[5-6], 给

白粉病病原菌分类鉴定工作增加难度。rDNA 转录内间隔区 (internal transcribed spacer, ITS) 和 28S rDNA D1/D2 区已被广泛应用于菌物鉴定、系统发育和亲缘关系等研究^[7-9], 如利用 ITS 序列鉴定番茄、黄瓜、小麦等植物白粉病病原菌^[10-12], 利用 28S rDNA D1/D2 区序列鉴定橡树、朴树白粉病病原菌^[13-14]等, 但应用 ITS 和 28S rDNA D1/D2 区研究甜瓜白粉病迄今未见报道。本试验通过分析宁夏中部干旱带压砂甜瓜白粉病病原菌 ITS rDNA 和 28S

基金项目: 宁夏回族自治区自然科学基金 (NZ0958)

作者简介: 刘建利, 男, 1973 年生, 讲师, 研究方向为微生物分子生物学, email: lj7523@126.com, Tel: 13995006446

收稿日期: 2010-04-29

rDNA D1/D2序列, 鉴定其分类地位。

1 材料与方法

1.1 材料

供试菌株: 甜瓜白粉病病原菌分生孢子, 于2009年9月从宁夏自治区中卫市兴仁镇甜瓜品种“玉金香”发病植株上采集。菜豆叉丝单囊壳白粉菌 *Padospheera phaseoli* (GQ927253.1, AB462771.1)、凤仙花叉丝单囊壳白粉菌 *P. balsaminiae* (FJ625796.1, AB462788.1)、菊科单囊壳白粉菌 *P. fusca* (EF137860.1, AB462776.1)、苍耳单囊壳白粉菌 *P. xanthii* (AB046985.1, AB022410.2)、瓜类叉丝单囊壳白粉菌 *P. fuliginea* (EU 294368.1)、飞扬草叉丝单囊壳白粉菌 *P. euphorbiae-hirta* (AB462770.1)、狗肝菜叉丝单囊壳白粉菌 *P. diclpterae* (AB462795.1)和二孢白粉菌 *Erysiphe cichomacearum* (AF229018), 以上病菌序列号均来自 NCBI。

试验仪器和试剂: 分子量标准 λ DNA HindIII ladder和 DNA marker D 购自 Biobasic 公司; Taq DNA 聚合酶和 dNTP等分子生物学试剂, 购自北京全式金生物公司; 其它生化试剂均为国产分析纯。

1.2 方法

1.2.1 基因组 DNA 提取: 参照 Chelex-100 方法^[15-16], 取约 500个分生孢子置于 1.5mL离心管中, 然后加入 50 μ L 5% Chelex-100 混匀, 56 $^{\circ}$ C水浴 4h, 旋涡震荡混匀。沸水浴 10min, 旋涡震荡混匀, 12000r/min离心 5min, 取 20 μ L上清在 1%琼脂糖凝胶电泳检测。

1.2.2 PCR扩增: ITS rDNA引物: ITS1: 5'-CGT AAC AAG GTT TCC GTA GG-3'; ITS4 5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3'。28S D1/D2区引物: NL1: 5'-GCA TAT CAA TAA GCG GAG GAA AAG-3'; NL4 5'-GGT CCG TGT TTC AAG ACG G-3'。PCR反应体系: 10 $\times$ PCR 反应缓冲液 (含 Mg^{2+}) 2.5 μ L, 10mmol/L dNTP 0.5 μ L, 10 μ mol/L 正反向引物各 0.5 μ L, 5U/ μ L Taq酶 0.5 μ L, 基因组 DNA 10 μ L, 双蒸水补足 25 μ L。PCR 程序: 94 $^{\circ}$ C预变性 5min, 94 $^{\circ}$ C变性 30s, 55 $^{\circ}$ C复性 45s, 72 $^{\circ}$ C延伸 60s, 30个循环; 72 $^{\circ}$ C延伸 5min。扩增产物在 1%琼脂糖凝胶电泳检测后直接测序。

1.2.3 序列分析: 将白粉病病原菌 ITS rDNA 和 28S rDNA D1/D2序列用 BLAST 在 NCBI核酸数据库中比对分析, 用 ClustalX 2.0 将序列及其近缘种序列

比对排序, 以最短序列为标准, 手工调整, 对齐 5'和 3'端。用 Mega 4.0 中邻接法 (NJ) 构建系统发育树, 应用自展法 (bootstrap) 检验系统发育树, 自展数据集为 1000次, 去掉支持率 < 70% 分支。

2 结果与分析

2.1 DNA提取

采用 Chelex-100法从甜瓜白粉病病原菌分生孢子中提取到基因组 DNA, 大小约 25~27kb 呈带状, 有拖尾现象, 说明有部分降解, 而且纯度不高 (图 1)。根据亮度判断, 浓度约为 20~30 ng/ μ L, 可满足 PCR 要求。

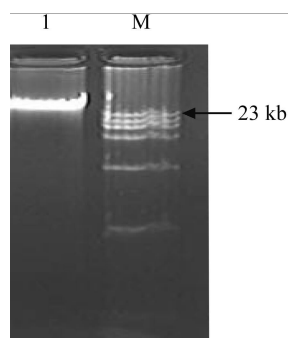


图 1 病原菌基因组 DNA 电泳图

Fig 1 Agarose-gel electrophoresis of genomic DNA

注: M: λ DNA HindIII ladder; 1: 基因组 DNA。Note: M: λ DNA/HindIII ladder; 1: genomic DNA.

2.2 PCR扩增结果

取基因组 DNA 10 μ L, 约 200~300 ng 作为模板, 分别用 ITS rDNA 引物和 28S D1/D2区引物扩增, 得到扩增条带 (图 2), 扩增产物大小约为 600~650 bp, 与理论长度吻合。

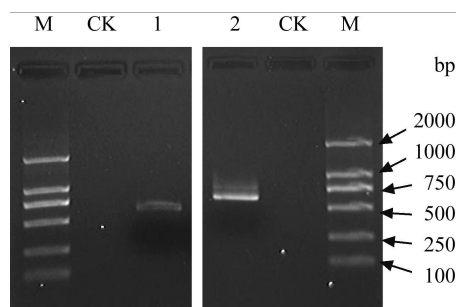


图 2 PCR扩增电泳图

Fig 2 Agarose-gel electrophoresis of PCR amplification products

注: CK: 对照; 1: 28S D1/D2区 PCR 产物; 2: ITS rDNA PCR 产物。Note: M: DNA marker; CK: control; 1: PCR amplification product of 28S D1/D2; 2: PCR amplification product of ITS rDNA.

2 3 ITS rDNA 序列分析

将 ITS rDNA 序列命名为 nxmpm-ITS 用 BLAST 在 GenBank 中搜索同源序列发现, nxmpm-ITS 与菜豆叉丝单囊壳白粉菌 (GQ927253.1)、凤仙花叉丝单囊壳白粉菌 (FJ625796.1)、菊科叉丝单囊壳白粉菌 (EF137860.1)、苍耳单囊壳白粉菌 (AB046985.1)、瓜类叉丝单囊壳白粉菌 (EU294368.1) 的 ITS rDNA

序列之间相似度均大于 99%。因此, 可以确定宁夏中部干旱带压砂甜瓜白粉病病原菌属于叉丝单囊壳属 *Podosphaera*, 但难以确定到种。选择部分 BLAST 结果, 以二孢白粉菌的 ITS 序列 (AF229018) 为外群 (outgroup), 构建系统进化树, nxmpm-ITS 与叉丝单囊壳属 *Podosphaera* 内许多种聚成一类 (图 3)。

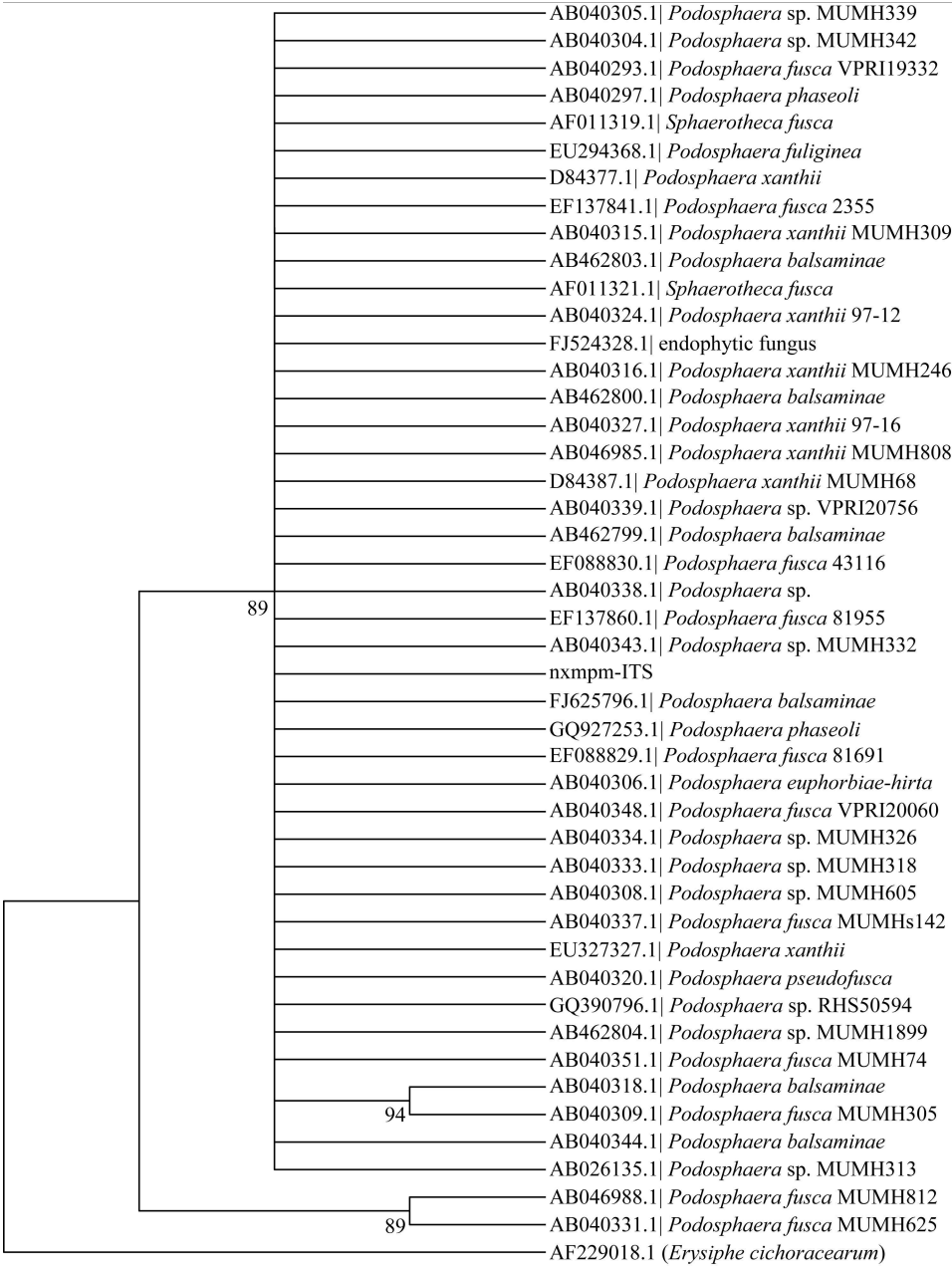


图 3 基于 ITS rDNA 序列分析的系统发育树

Fig 3 Phylogenetic tree based on ITS rDNA sequence analysis

2 4 28S rDNA D1/D2区序列分析

将 28S rDNA D1/D2序列命名为 nxmpm-28S D1/D2 用 BLAST 在 GenBank 中搜索同源序列, 发现

nxmpm-ITS 与苍耳单囊壳白粉菌 (AB022410.2)、凤仙花叉丝单囊壳白粉菌 (AB462788.1)、菊科单囊壳白粉菌 (AB462776.1)、菜豆叉丝单囊壳白粉菌

(AB462771.1)、飞扬草叉丝单囊壳白粉菌(AB462770.1)、狗肝菜叉丝单囊壳白粉菌(AB462795.1)序列相似度均大于99%。可以确定,白粉病病原菌为叉丝单囊壳属 *Podosphaera*, 与基于

ITS rDNA序列比对分析结果一致,但种分类依然难以确定。选择部分 BLAST 结果,以二孢白粉菌(AB077687.1)28S 部分序列为外群,构建系统进化树(图4)。

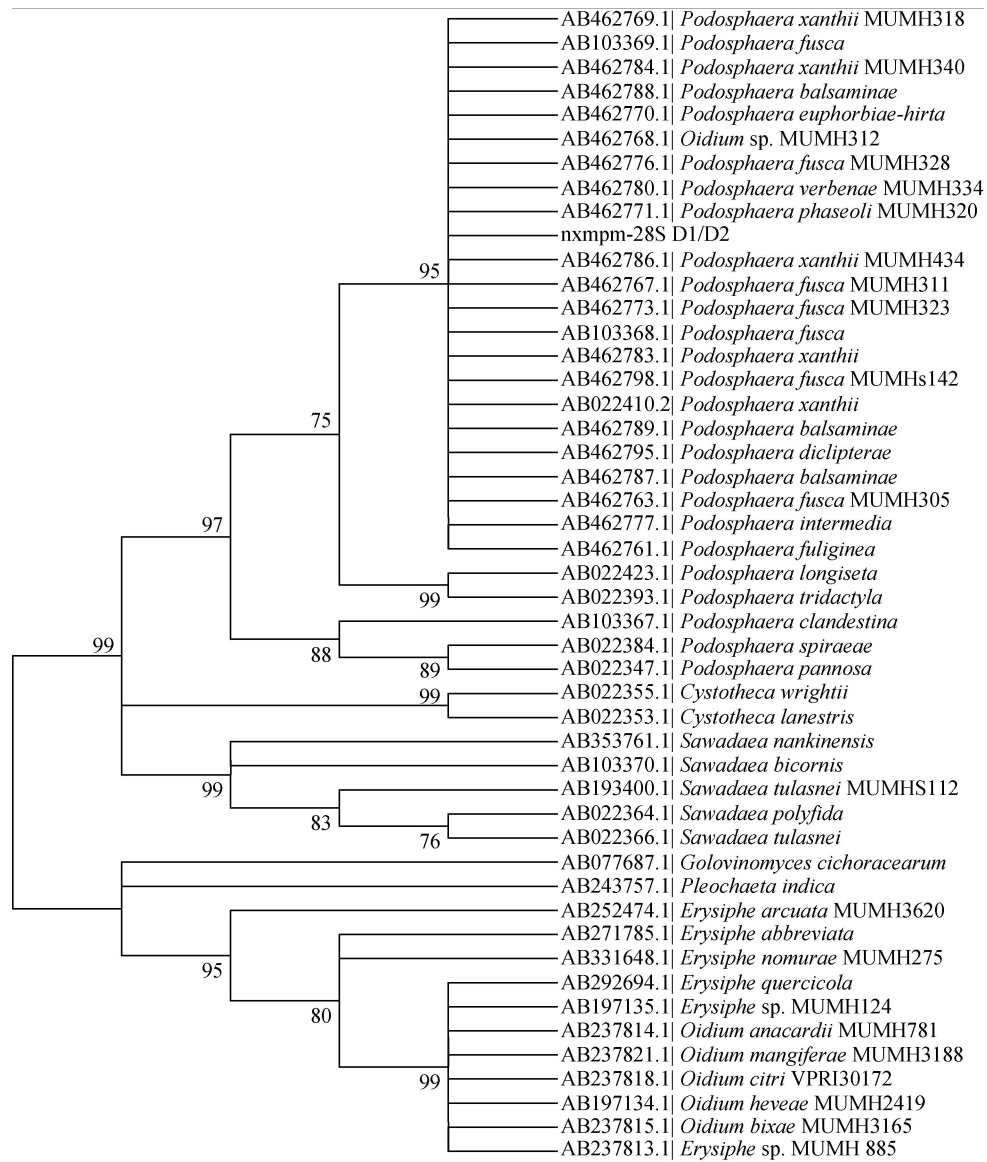


图 4 基于 28S rDNA D1/D2区域序列分析的系统发育树

Fig 4 Phylogenetic tree based on 28S rDNA D1/D2 domain sequence analysis

3 讨论

郑儒永和余永年^[17]研究认为,我国甜瓜白粉病病原菌属白粉菌属葫芦科白粉菌 *Erysiphe curchi-cacearum* 和单囊壳属瓜单囊壳菌 *Sphaerotheca cucur-bitae*,魏景超^[18]则认为属二孢白粉菌 *Erysiphe ci-choracearum* 和单囊壳属单囊壳白粉菌 *Sphaerotheca fu liginea*, 并认为后者较为常见。以上都是根据病菌

有性阶段、无性阶段显微形态特征以及寄主范围进进行分类。本研究根据病原菌核酸保守序列进行分类,结果显示,宁夏中部干旱带压砂甜瓜白粉病病原菌为叉丝单囊壳属 *Podosphaera* 的某个种,与前人提出的4个属相矛盾。但作者发现,在AF011321.1和AF011319.1序列说明中,注释 *Sphaerotheca* 是 *Podosphaera* 的异名,因此,传统分类中认为叉丝单囊壳属和单囊壳属是完全不同的两个属可能不准

确,应考虑修订为同一属。

本研究比对结果显示,叉丝单囊壳属多个种的 ITS rDNA 和 28S rDNA D1/D2 序列相似度都大于 99%,与同一种内微生物 ITS rDNA 和 28S rDNA D1/D2 相似度小于 1% 的原则相矛盾。但作者在 AB103368.1 序列注释中发现,菊科叉丝单囊壳白粉菌寄主并不是菊科植物,而是瓜类;在 AB103369.1 序列注释中也发现,菊科叉丝单囊壳白粉菌寄主为苍耳属植物。因此,郑儒永和余永年^[17]参考病原菌寄主范围进行叉丝单囊壳属内种的分类不完全准确,寄生在不同物种上的白粉病菌,有可能是同一种不同专化型。作者认为,根据 ITS rDNA 和 28S rDNA D1/D2 区核酸保守序列等结果进行叉丝单囊壳属内种的分类较为合理。

参 考 文 献 (References)

- [1] 王志强,刘声锋,于蓉. 压砂西瓜甜瓜主要病虫害及防治技术. 北方园艺, 2007(3): 189-190
- [2] 梁巧兰,徐秉良,颜惠霞,等. 南瓜白粉病病原菌鉴定及寄主范围测定. 菌物学报, 2010, 29(5): 636-643
- [3] 刘东顺,程鸿,孔维萍,等. 甘肃甜瓜主产区白粉病菌生理小种的鉴定. 中国蔬菜, 2010(6): 28-32
- [4] Xu ZH, Shou W L, Huang KM, et al. Determination of physiological race of powdery mildew and its virulence to different melon genotypes. Acta Agriculturae Zhejiangensis, 1999, 11(5): 245-248
- [5] 包海清,许勇,杜永臣,等. 海南三亚地区葫芦科作物白粉病菌生理小种分化的鉴定. 长江蔬菜, 2008(1): 49-51
- [6] 王娟,宫国义,郭绍贵,等. 北京地区瓜类蔬菜白粉病菌生理小种分化的初步鉴定. 中国蔬菜, 2006(8): 7-9
- [7] 严进,施宗伟,宋福,等. 河北和山东鸭梨果实上链格孢菌鉴定. 植物保护学报, 2009, 36(1): 37-43
- [8] 赵思峰,方许阳,姜海荣,等. 新疆加工番茄腐霉根腐病原鉴定及其 rDNA 的 ITS 区段分析. 植物保护学报, 2009, 36(3): 219-224
- [9] 白彦彦,贾建华,梁慧燕. 假丝酵母属疑难菌株大亚基 rDNA D1/D2 区域序列分析及其分类学意义. 菌物系统, 2002, 21(1): 27-32
- [10] 刘微,刘淑艳,李玉,等. 番茄白粉病的病原菌鉴定. 植物病理学报, 2009, 39(1): 11-15
- [11] 曾晓薇,骆勇,周益林,等. 基于小麦白粉病菌 rDNA ITS 序列的 PCR 分子检测. 植物病理学报, 2008, 38(2): 211-214
- [12] 王娜,马雅军,代光辉,等. 黄瓜霜霉病和白粉病病原菌的 rDNA-ITS 序列分析. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2007, 35(10): 155-158
- [13] Kiss I, Khosla K, Jankovics T, et al. A morphologically ill-founded powdery mildew species *Pleochaeta indica* is recognized as a phylogenetic species based on the analysis of the nuclear ribosomal DNA sequences. Mycological Research, 2006, 110: 1301-1308
- [14] Takamatsu S, Braun U, Linka isang S, et al. Phylogeny and taxonomy of the oak powdery mildew *Erysiphe alphitoides sensu lato*. Mycological Research, 2007, 111: 809-826
- [15] Hirata T, Takamatsu S. Nucleotide sequence diversity of rDNA internal transcribed spacers extracted from conidia and cleistothecia of several powdery mildew fungi. Mycoscience, 1996, 37: 283-288
- [16] Khodaparast SA, Takamatsu S, Hedjaroude GA. Phylogenetic analysis of Iranian powdery mildew fungi using nucleotide sequences of 28S ribosomal DNA. Journal of Agriculture Science and Technology, 2005, 7: 49-58
- [17] 郑儒永,余永年. 中国真菌志: 白粉菌目. 北京: 科学出版社, 1987
- [18] 魏景超. 真菌鉴定手册. 上海: 上海科学技术出版社, 1979