

棉花黄萎病菌菌株在线粒体基因组存在差异

The Difference in Mitochondrial DNA between Two Pathogenic Strains of *Verticillium dahliae*

张金祥¹, 简桂良², 李颖^{1*}, 王迪¹

(1. 中国农业大学生物学院微生物系, 北京, 100094; 2. 中国农业科学院植物保护研究所)

我国棉花黄萎病的致病菌是大丽轮枝菌 (*Verticillium dahliae* Kleb.), 由于其致病性分化明显, 变异性强, 给防治造成较大困难。国内外一些学者试图从核基因组中探寻与致病性相关的基因或分子探针, 而更多的工作则着眼于对菌株的鉴定和分类以及致病类型的研究。

自 20 世纪 60 年代有人首次直接观察到线粒体 DNA 以后, 对线粒体 DNA 的研究逐步深入。线粒体不但为细胞的各种生理活动提供所需的能量, 而且在细胞凋亡、老化及程序化死亡中起着至关重要的作用。由于没有自我修复能力, 线粒体 DNA 缺陷, 会引起多种退化性疾病, 线粒体 DNA 也日趋引起人们的关注。但以往采用的各种分子标记的方法大多针对菌株的全基因组, 因此得出的结果是核基因组及其线粒体基因组的综合信息。

本实验以从感病棉秆中分离到的棉花黄萎病菌为材料, 在分析了它们菌落形态、产孢特点、致病力水平等表型特征的基础上, 选择了两株表型特征有明显差异的菌株, 严格控制培养条件, 并将供试菌株核基因组与线粒体基因分别纯化, 采用 RAPD 技术, 先在线粒体基因组 (mtDNA) 寻找菌株间差异。

1 材料和方法

1.1 供试菌株

棉花黄萎病菌菌株 V250 和 V991, 从患病棉秆中分离获得, 由中国农业科学院植保所提供。

1.2 方法

1.2.1 菌株致病力的测定。将菌株在 PDA 平板上培养 7 d, 首先观察比较菌落特征, 然后接种于查氏培养液中, 23~25 °C 摇床培养 3 d, 收集分生孢子, 制成浓度为 1.2×10^7 个 \cdot ml⁻¹ 的孢子悬液, 采用纸钵撕底蘸根的方法, 接种至鄂荆 1 号健

康棉苗, 在回接第 10 d、20 d、30 d 后, 分别进行致病力调查。

1.2.2 线粒体 DNA 的提取。将控制培养时间一致的菌株分别接种于液体完全培养基 (CM) 中, 23 °C 摇床培养 3 d; 过滤得到菌丝体, 用无菌水洗涤 2~3 次; 将菌丝体冷冻干燥后, 加液氮研磨, 用差速离心的方法提取线粒体, 经 Janus Green 染料染色, 镜检线粒体颗粒。参照 Kemble R J (1987) 的方法提取线粒体 DNA, 0.8% 琼脂糖凝胶电泳估测 DNA 的浓度和分子量。

1.2.3 线粒体 DNA 的 RAPD 分析。随机选用 Operon 公司的 D、K、T 组引物, 共 43 种, 以菌株 V250 和 V991 的线粒体 DNA 为模板, 进行 RAPD 分析。各取 8 μ l 扩增产物, 经 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳后, 用 EB 染色, 在紫外灯下观察并拍照。

1.2.4 差异片段的回收及测序。用离心柱型琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒 (北京天为时代科技公司) 回收并纯化差异片段, 将其连接至 pGME-T 载体 (Promega), 电转化 E. coli DH10B 感受态细胞, 复壮培养, 挑选阳性转化子, 经酶切验证后, 送上海生工生物公司测序。将测序结果在 GenBank 中进行同源检索。

2 结果与讨论

2.1 菌株致病力比较

菌株在平板培养时的特征有较大区别, 最主要的特征是 V250 生长后期出现大量黑色微菌核, 而 V991 不产菌核。V991 菌株回接至健康棉苗, 5 d 后, 棉苗出现病症, 20 d 后少数棉苗的叶子已经全部脱落, 病情指数为 25.0, 并且棉秆上出现褐色的斑点; 其 30 d 后的病情指数达到 45.61。而 V250 的 20 d、30 d 病情指数分别为 0.94、15.57, 两菌株的致病力存在明显的差异, 菌

株 V991 致病力强,而菌株 V250 致病力弱。患病棉苗都表现为叶子变软、褪绿失水,出现不规则枯

斑,甚至脱落,属于典型的落叶型。两菌株的平板培养特征及致病力差异见表 1。

表 1 两菌株的培养特征及其致病力比较

Table 1 Comparison of phenotypic characters between two strains

	V250	V991
菌落特征	菌丝生长不均匀,表面凸凹不平 中间呈现束状突起的菌丝团	菌丝生长紧密 边缘平整
边缘绒毛状	呈现清晰的同心圆	
微菌核	大量,黑色	无
30 d 后发病率	35.85%	73.68%
30 d 后病情指数	15.57	45.61

2.2 线粒体 DNA 的 RAPD 分析

将提取的 mtDNA 经过 0.8% 琼脂糖凝胶电泳,仅在 50 kb 左右有一条带。选用 Operon 公司 D、K、T 组的 43 种随机引物,分别对两菌株 mtDNA 进行 RAPD 分析。结果大多数引物的扩增产物为 1~8 条,分别在 200~2000 bp 之间,未发现差异。但随机引物 OPT-01 (5'-GGGC-CACTCA-3') 的扩增产物在两个供试菌株中出现了明显的差异,菌株 V991 多出一条 1.1 kb 的 DNA 带,而菌株 V250 则没有此条带,5 次重复扩增结果一致,由此看来这条差异带是稳定存在的。

2.3 差异片段的序列分析

将差异片段回收后与 pGME-T 载体 (Promega) 连接并电转化 E. coli DH10B。用碱裂解法提取阳性克隆的质粒,经测序表明,差异片段全序列共计 1095 bp,在 GenBank 中注册号为 AY623622。

经过在 GenBank 中进行同源检索,发现可以参考的信息十分有限,目前只有蜡蚧轮枝菌 (*Verticillium lecanii*) 公布了线粒体 DNA 的全序列 (AF487277),为 24499 bp,其主要的与产能有关的功能基因也基本明确,但与本研究获得的差异片段没有同源性。供试菌株线粒体 DNA 为 50 kb 左右,其大小是蜡蚧轮枝菌的线粒体 DNA (24.5 kb) 的 2 倍,虽然同属轮枝菌,但推测两种

菌株线粒体基因组存在较大不同。将获得的差异序列与另一个大丽轮枝菌线粒体 rRNA 小亚基序列 (S76140) 进行比较,正向阅读,只有 612 个碱基与 S76140 有 41.17% 的同源性;反向比较,其中 597 个碱基与 S76140 有 37.10% 的同源性。将差异序列在 GenBank 中同源检索,没有发现其它同源序列,该片段可能是菌株 V991 特有的。

本实验中发现了不同致病力菌株在线粒体基因组中的差异片段,由于其与现有公布的序列没有很高的同源性,这段序列上也没有发现明确的阅读框架,还不能肯定差异片段所编码的信息。

尽管人们对于线粒体基因组的分析存在一些有益的争论,特别是 mtDNA 分子结构在物种中的多样性、可能发生重组、核基因对线粒体基因组的调节等问题上均发现一些证据,认为对线粒体基因组的分子标记应慎重。目前大多数线粒体的研究结果来源于动、植物,而在真菌,特别是在丝状真菌的研究中,对于线粒体基因组的分析还不多见。由于提取线粒体及纯化其 DNA 的技术是成熟的,在致病菌遗传背景不清的情况下,首先选择较小的线粒体基因组进行 RAPD 分析或采用其它分子标记的方法,可以获得稳定的结果。因此,在建立标准方法的基础上,拟扩大菌株数量进一步分析,以便对差异来源提出可靠的理论依据。

●