林业科学研究 2009, 22(1): 144~147
Forest Research

文章编号: 1001-1498(2009)01-0144-04

内蒙古中西部杨树内生真菌链格孢属(*Alternaria* Nees)的RAPD分析

袁秀英, 白红霞, 白玉明

(内蒙古农业大学林学院, 内蒙古 呼和浩特 010019)

关键词: 杨树; 内生真菌; 链格孢属; RAPD分析
中图分类号: S792.11 文献标识码: A

RAPD Analysis of *Alternaria* of Endophyte in Poplar in the Middle-west Area of Inner Mongolia

YUAN Xiu-ying, BAI Hong-xia, BAI Yu-ming

(The Forest College of Inner Mongolia Agricultural University, Huhhot 010019, Inner Mongolia, China)

Abstract: A total of 25 isolates of *Alternaria* sp. from different localities and host plants were amplified with 6 RAPD primers selected from 50 primers. 69 RAPD markers were obtained, 62 of them were varied. 89.86% of them were polymorphic. The genetic distance and phylogenetic tree were constructed by use of PopGen32. Isolates were divided into 7 groups. The results showed that genetic divergence of all strains were closely related to their host plants and localities.

Key words: poplar; endophyte; *Alternaria* sp.; RAPD

内生真菌(endophyte或endophytic fungi)是指生活在植物体内或在其生活史的一定阶段处于植物体内的一类真菌, 包括菌根真菌和植物病原真菌[1]。从目前已经研究过的植物看, 已有很多分离到内生真菌, 因此, 可以推断内生真菌在植物内是普遍存在的[2]。2004—2005年, 先后从呼和浩特市地区及达拉特旗、四子王旗、额济纳旗采集的杨树(*Populus* spp.)中分离获得内生真菌, 发现链格孢属(*Alternaria* Nees)广泛分布于各杨树植株中, 因此对分离的链格孢属菌株进行种间遗传多样性分析。

链格孢属真菌是一种分布广、适应性强、极为常见的真菌, 在人工培养条件下, 孢子形态有趋同倾向, 其属级特征明显而种级特征变异较大, 利用形态学方法易于鉴定到属而难于鉴定到种。[3-4]由于RAPD技术具有简单、快速、灵敏度高的特点, 已被广泛应用于真菌的系统学研究。大量国内外研究成果表明, RAPD分析技术用于链格孢属下种间及种内遗传分析是可行的[3-5]。本文采用RAPD分析方法对获得的杨树内生真菌链格孢属菌株进行遗传多样性分析, 并探讨了遗传多样性与宿主及地理分布的相互关系。

1 材料与方法

1.1 菌种来源

供试的链格孢菌株均属于杨树的内生真菌, 其来源见表1。

1.2 菌体培养

采用玻璃纸法培养菌丝: 试管斜面活化后, 接入PDA平板中, 25℃培养2~3天, 转接入铺有玻璃纸的平板中, 平板培养基为PDA培养基(加80 u·mL^{-1}青霉素), 每皿接入5 mm见方的小菌块4~5块, 均匀分布于玻璃纸表面。25℃培养3~48 h, 小

收稿日期: 2007-03-10
基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30660149)
作者简介: 袁秀英(1954—), 女, 内蒙古磴口人, 教授, 主要从事森林病理学研究.
© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

心取出接种菌块, 用刀片从玻璃纸表面刮去菌丝, 收集于 1.5 mL离心管中, -20 ℃保存备用[6]。

表 1　供试链格孢属菌株的来源

序号	宿主派别	分离部位	宿主年龄 /a	来源
1	胡杨派	干皮	5~10	额济纳旗
2	胡杨派	木质部	40	额济纳旗
3	胡杨派	木质部	100	额济纳旗
4	胡杨派	干皮	100	额济纳旗
5	青杨派	叶	20~30	和林格尔县
6	青杨派	枝皮	5~10	达拉特旗
7	青杨派	叶	20~30	和林格尔县
8	白杨派	干皮	1~5	和林格尔县
9	青杨派	叶	10~20	武川县
10	白杨派	枝皮	1~5	和林格尔县
11	青杨派	叶	5~10	四子王旗
12	青杨派	枝皮	5~10	四子王旗
13	青杨派	叶	5~10	四子王旗
14	青杨派	叶	10~20	武川县
15	青杨派	干皮	10~20	四子王旗
16	青杨派	枝皮	10~20	武川县
17	青杨派	枝皮	1~5	和林格尔县
18	青杨派	叶	10~20	榆林镇
19	青杨派	枝皮	10~20	榆林镇
20	青杨派	枝皮	20~30	四子王旗
21	青杨派	木质部	10~20	武川县
22	青杨派	叶	5~10	达拉特旗
23	青杨派	枝皮	5~10	达拉特旗
24	青杨派	枝皮	10~20	达拉特旗
25	青杨派	干皮	10~20	榆林镇

注: 白杨派 (Sect *Leuce* Duby)、青杨派 (Sect *Tacamahaca* Spach)、胡杨派 (Sect *Turanga* Bge.)。

1.3　DNA的提取

采用 CTAB法。称取 0.5 g菌丝样品, 放入研钵中, 加液氮研磨成粉, 然后转移至离心管中, 加入 2 mL、65 ℃预热的 CTAB buffer (2% CTAB, 1.4 mmol NaCl, 20 mmol EDTA, 100 mmol Tris-HCl, 2% PVP, 0.2% 巯基乙醇, pH 值 8.0), 充分混匀后于 65 ℃下孵育 90 min, 加入等体积的氯仿 /异戊醇 (24∶1), 混匀, 4 ℃下 10 000 r·min^{-1}离心 10 min, 取上清液, 加入 2/3体积 -20 ℃预冷的异丙醇混匀, 放置 5 min后出现絮状沉淀, 8 000 r·min^{-1}离心 5 min, 去掉上清液; 将沉淀溶于 0.6 mL CTAB buffer中, 待充分溶解后加入等体积的氯仿 /异戊醇 (24∶1), 4 ℃下 10 000 r·min^{-1}离心 10 min, 取上清液, 加入等体积 -20 ℃预冷的异丙醇混匀, 放置 5 min后出现絮状沉淀, 8 000 r·min^{-1}离心 5 min, 用 70%的乙醇洗涤沉淀 2次, 待乙醇彻底挥发后加入 150 μL三蒸水溶解 DNA, 置于 4 ℃冰箱保存备用。

1.4　引物筛选

随机引物采用上海生工公司 S系列引物 (引物序列中"G+C"含量为 60% ~70%), 经预备实验选择扩增产物稳定、重复性好的引物, 用于所有供试菌株的随机扩增多态性分析。

1.5　PCR扩增体系

反应体系总体积为 25 μL, 包括: 10×Buffer 2.5 μL; Mg^{2+} 2 mmol·L^{-1}; dNTP 250 μmol·L^{-1}; TaqDNA聚合酶 1.5 U; 10碱基随机引物 30 ng·μL^{-1}; DNA 10~50 ng。按顺序分别加入 PCR管充分混匀。反应在 GeneAmp PCR System 9700 PCR仪上进行。扩增程序为: 94 ℃变性 2 min, 以后 94 ℃变性 40 s, 37 ℃退火 1 min, 72 ℃延伸 1 min, 共 40个循环, 最后 72 ℃延伸 6 min[5]。电泳时采用 1 kb DNA ladder Plus(上海生工公司)为 DNA marker指示扩增片段的大小。扩增产物在 1%的琼脂糖凝胶中电泳分离, 用 0.5×TBE电泳缓冲液, 上样 10 μL, 3~4 V·cm^{-1}电泳 90 min, 溴化乙锭染色, 用 ULTRA CAM Digital Imaging型凝胶成像系统 254 nm紫外光下检测、拍照, 重复 3次。

1.6　数据处理

每个样品的扩增带存在时赋值"1", 不存在时赋值"0", 重复过程中稳定出现的带均记为"1", 建立原始数据矩阵。计算各样品间的相似系数 $S = 2N_{AB}/N_A + N_B + N_{AB}$ (其中 N_A 为 A 样品特有的带数, N_B 为 B 样品特有的带数, N_{AB} 为样品 A、B 共有的带数)。遗传距离 $D = 1 - S$。用 PopGen32进行聚类分析, 采用 UPGMA(非加权对数算术平均法)聚类。

2　结果与分析

2.1　菌丝的 DNA提取

采用 CTAB法提取链格孢菌 DNA时, 应在菌丝生长 1~2天内提取, 电泳检测结果表明此时 DNA片段清晰、整齐, 适用于进行 RAPD扩增。

2.2　引物筛选结果

从 S1~S50这 50个随机引物中筛选出 6个扩增产物稳定、重复性好、具多态性的引物, 其序列分别是:

S22: 5′-TGCCGAGCTG-3′;
S23: 5′-AGTCAGCCAC-3′;
S24: 5′-AATCGGGCTG-3′;
S27: 5′-GAAACGGGTG-3′;
S38: 5′-AGGTGACCGT-3′;
S42: 5′-GGACCCAACC-3′。

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

用 6个引物对所有供试菌株进行扩增, 共获得 69条 DNA条带, 其中 62条为多态性条带, 多态率为 89. 86%。6个引物中 S42引物对 14号菌株未扩增出任何条带, 其他引物 ×菌株组合均可扩增到 1~10条带, 引物扩增的 DNA产物长度范围很广, 在 200~ 4 000 bp之间。

2 3 系统聚类与菌株来源相关性分析

用筛选出的 6个随机引物分别对 25个链格孢菌株进行 RAPD扩增, 均得到清晰的电泳图谱。图 1是引物 S38的扩增结果。

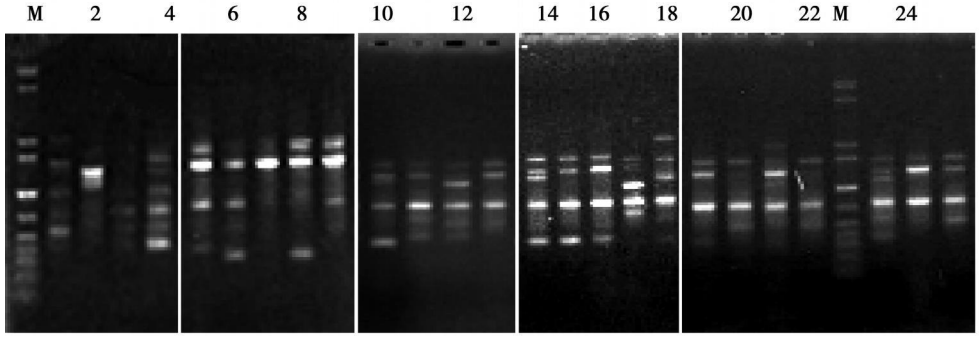

图 1 引物 S38对 25个链格孢菌株扩增的电泳图谱

菌株之间的聚类结果 (图 2) 表明, 在遗传距离 16. 8~ 17. 7之间, 可将供试的菌株分为 7组: 8、14、24号 3个菌株为单菌株组; 1、2、3、4号 4个菌株在遗传距离 16 8处被聚为第Ⅳ组; 19、20、21、22、23、25号 6个菌株在 14 1处聚为第Ⅴ组; 17、18号 2个菌株在 15. 8处聚为第Ⅵ组; 余下的 5、6、7、9、10、11、12、13、15、16号 10个菌株在 15. 0处聚为第Ⅶ组。25个菌株以不同的遗传距离聚于不同的类群, 分析表明武川县、四子王旗、和林格尔县、达拉特旗和榆林镇几个地区, 来源相同的菌株分布于不同遗传聚类组内, 来源不同的菌株被聚在同一遗传聚类组, 几个地区的供试菌株遗传分化不明显, 这表明菌株间具有遗传组成上的相似性; 而额济纳旗的菌株均来源自胡杨 (*P. euphratica* Oliv.)却很明显地被分离出来, 可见菌株的遗传分化与宿主及采集地区有一定的相关性。

2 4 不同地理来源菌株间的聚类结果分析

文中采集杨树地点达拉特旗位于库布其沙漠东北部, 气候干旱, 风大沙多, 四季温差大, 日照充足; 榆林镇位于呼和浩特市以东, 大青山地区; 四子王旗位于呼和浩特市以北, 内蒙古高原南沿, 荒漠化草原地带, 干旱、少雨、风大; 武川县位于呼和浩特市以北, 地处大青山北坡, 内蒙古高原南沿, 高寒干旱少雨; 和林格尔县位于呼和浩特市南部, 全县 80% 是丘陵山区; 额济纳旗地处巴丹吉林沙漠, 气候干燥少雨, 这里的年降水量多年来平均不足 50 mm, 且四季多大风天气, 温差大。地区之间的聚类结果 (图 3)

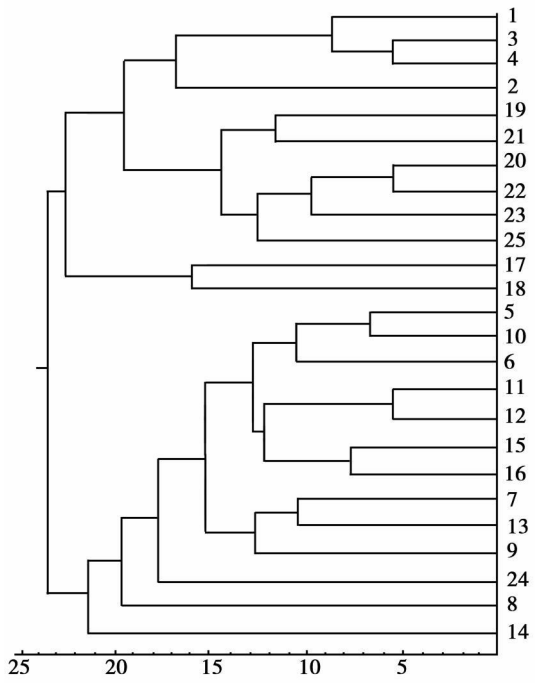

图 2 采用 6个引物对 25个链格孢菌株进行 RAPD分析形成的树状聚类图

表明: 武川县、四子王旗这两个生境最相似的地方链格孢菌株之间的差距也最小, 它们与接下来的和林格尔县、达拉特旗和榆林镇几个地区菌株之间的遗传距离相差也较小, 但额济纳旗菌株与其他地区之间的区别很明显。可见, 当气候和生境条件相差较小时菌株之间的遗传差距不明显, 反之这种差距就很显著, 菌株的遗传分化与环境和采集地有一定的相关性。

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

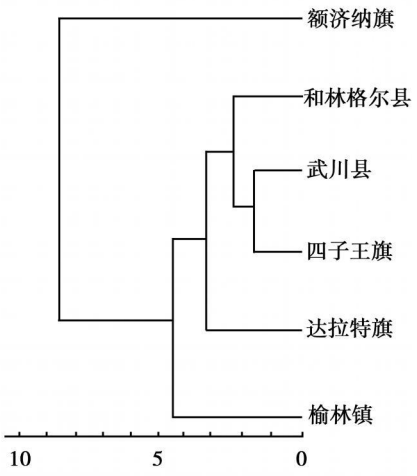

图 3　对不同地区进行 RAPD分析形成的树状聚类图

3　小结与讨论

RAPD分析作为一种快速、灵敏的分子标记已广泛应用于真菌的种间、种内遗传多样性分析以及种性鉴定等, 表现出很强的多态性[7]。在对真菌遗传背景了解甚少的情况下, 采用随机引物扩增多态性 DNA分子标记对内生真菌链格孢进行多态性分析是行之有效的, 可提高分类的客观性、真实性和正确性。

通过对菌株之间进行聚类未发现扩增产物完全一致的菌株, RAPD分组与供试菌株的地理来源呈一定的相关性。生境相差较小的几个地区供试菌株遗传分化不明显, 这表明菌株间具有遗传组成上的相似性; 而额济纳旗的菌株却很明显的被分离出来, 可见菌株的遗传分化与采集地区、宿主有一定的相关性。即: 当宿主及生境相差不大时杨树内生真菌链格孢菌株之间的遗传分化很不明显, 而当宿主及环境条件相差较远时菌株之间的遗传分化就会明显。

地区之间的聚类结果表明, 各地区的生境差别大小与菌株的遗传分化之间表现出一定的对应关系. 当地区之间的综合环境条件差别大时这种菌株之间的遗传分化就表现得明显。菌株之间的聚类结果和地区之间的聚类结果是一致的, 即: 只有环境条件差异达到一定程度时菌株之间的这种遗传差距才会明显地表现出来, 供试菌株遗传分化与宿主及其地理来源呈一定的相关性。关于杨树内生真菌菌株间差异是否与地理来源、宿主相关的研究, 对研究和应用内生真菌具有重要指导意义。

本文采用玻璃纸法培养菌丝, 给菌丝的收集带来很大方便。对于易于产孢且菌丝老化快的真菌, 用玻璃纸法培养可提高菌丝收集率, 有效防止孢子含量高而影响基因组 DNA产率和质量问题的发生。

一些宿主和来源都相同的菌株, 如菌株序号为 23号和 24号、18号和 19号却被聚到不同遗传聚类组内, 说明这些地区的杨树内生真菌在同一属内有丰富的多样性, 这可能在种的水平上反映了内生真菌的宿主及组织专一性特点, 应在这方面进行进一步的研究与探讨。

参考文献:

[1] 梁　宇, 高玉葆. 内生真菌对植物生长发育及抗逆性的影响 [J]. 植物学通报, 2000, 17(1): 52- 59
[2] 郭良栋. 内生真菌研究进展 [J]. 菌物系统, 2001, 20(1): 148- 152
[3] 王洪凯, 张天宇, 张　猛. 链格孢属真菌分类研究进展 [J]. 山东农业大学学报: 自然科学版, 2001, 32(3): 406- 410
[4] 沈瑞清, 康萍芝, 张丽荣. 链格孢属 (*Altemaria* Nees) 与形态相似属区别的研究进展 [J]. 宁夏农林科技, 2003, 6: 60- 61
[5] 王洪凯, 张天宇. 链格孢属小孢子种的 RAPD分析 [J]. 菌物系统, 2003, 22(1): 35- 41
[6] 曾大兴. 适于 RAPD分析的真菌 DNA提取方法 [J]. 生物技术, 2003, 13(2): 20- 21
[7] 陈作红, 张志光, 张天晓. 鹅膏菌属真菌 RAPD分析及亲缘关系研究 [J]. 菌物系统, 2000, 19(1): 51- 55
[8] 王建营, 郑小波. 苎麻疫霉群体的 RAPD分析 [J]. 菌物系统, 2003, 22(2): 228- 234
[9] 田呈明, 康振生, 李振歧, 等. 落叶松-杨栅锈菌遗传分化的 RAPD分析 [J]. 林业科学, 2000, 36(5): 54- 58
[10] 王继春, 任金平, 刘小梅, 等. 吉林省稻瘟病病菌 RAPD分析 [J]. 吉林农业大学学报, 2004, 26(4): 363- 366

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net