河南农业科学，2012，41(9)：87-90
Journal of Henan Agricultural Sciences

河南省几种白粉菌的 ITS 序列分析

马原松，裴冬丽，王文静，李成伟*
（商丘师范学院 生命科学学院 植物与微生物互作重点实验室，河南 商丘 476000）

摘要：采用改良 CTAB 法提取河南省 5 种植物白粉菌 DNA，扩增其 rDNA 内转录间隔区(ITS)序列，并进行亲缘关系分析。结果表明：寄生于凤仙、豇豆和菊芋的叉丝单囊壳属白粉菌，其 ITS 序列聚在一支，遗传距离小，亲缘关系近；寄生在大叶黄杨上的冬青卫矛白粉菌和番茄上的新番茄粉孢菌，其 ITS 序列聚在另外一支。此分析结果与 5 种白粉菌的形态学分类结果相一致，说明 ITS 序列分析技术可以为病原菌的分类鉴定及系统发育等研究提供依据。

关键词：白粉菌；亲缘关系；内转录间隔区
中图分类号：Q344^{+}.3　　**文献标志码**：A　　**文章编号**：1004-3268(2012)09-0087-04

ITS Sequence Analysis of Several Powdery Mildew from Henan Province

MA Yuan-song，PEI Dong-li，WANG Wen-jing，LI Cheng-wei*
（Key Laboratory of Plant-Microbe Interactions，Department of Life Science，Shangqiu Normal University，Shangqiu 476000，China）

Abstract：The DNA of five powdery mildews from Henan province were extracted by modified CTAB method，and then the rDNA ITS sequences were amplified to analyze the phylogenetic relationship. The result showed that three ITS sequences of *Podosphaera* section from *Impatiens balsamina*，*Vigna unguiculata* and *Helianthus tuberosus* were in one cluster for their small genetic distances and close genetic relationships，and the ITS sequences of *Erysiphe* sp. from *Euonymus japonicus* and *Odium neolycopersici* from tomato were in another cluster，which was consistent with the classification by the morphological characteristics. Therefore，the application of ITS sequences can provide important theoretical basis for pathogen classification and phylogenetic relationship analysis.

Key words：powdery mildew；phylogenetic relationship；internal transcribed spacer (ITS)

植物白粉菌是一类广泛传播的植物病原专性寄生真菌，属于子囊菌亚门(Ascomycotina)、核菌纲(Pyrenomycetes)、白粉菌目(Erysiphales)、白粉菌科(Erysiphaceae)。白粉菌目的分类以菌丝的寄生部位、闭囊壳内子囊数目、外部的附属丝形态及分生孢子形态等为主要依据，包含 1 个科、21 个属和 500 多个种，每种白粉菌都有特定的寄主，能够感染9 000多种单子叶植物和 650 多种双子叶植物[1-2]。白粉菌主要侵染叶片，发病初期多在叶面上出现白色霉点，之后会逐渐扩展为霉斑，最后扩大连成一片，使整个叶面布满白色粉状物，后期在白色霉斑上会出现许多黑色小颗粒[3]。

传统的白粉菌分类以其形态特征为主要依据，但白粉菌各个种之间的分类性状无显著的差别，通常在鉴定某个种时，需与已知种类的性状逐个进行比较，还需要在易混淆的几个种之间进行鉴别，同时由于环

收稿日期：2012-03-28
基金项目：国家自然科学基金项目(30600413)；河南省科技厅基础与前沿技术研究项目(122300410226)；河南省教育厅自然科学基金项目(2011A180024)
作者简介：马原松(1970-)，男，河南汝南人，副教授，主要从事分子植物病原体互作研究。E-mail：mysong987@163.com
*通讯作者：李成伟(1972-)，男，河南民权人，教授，博士，主要从事分子植物病原体互作和分子育种研究。E-mail：lichengweiwau@hotmail.com

© 1994-2013 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

境的影响，病菌较易发生变异，使形态鉴定的结果不能准确客观地反映白粉菌真实的亲缘进化关系，因此，传统分类具有一定的难度和局限性[4]。分子生物学的快速发展对真菌分类学产生了积极的促进作用。核糖体 rDNA 内转录间隔区（internal transcribed spacer，ITS）不加入成熟核糖体，所以 ITS 片段在进化过程中承受的自然选择压力非常小，因此能容忍更多的变异，在绝大多数的真核生物中表现出极为广泛的序列多态性，即使是亲缘关系非常接近的 2 个种在 ITS 序列上也可能表现出差异，显示最近的进化特征。由于 ITS 的序列分析能实质性地反映出属间、种间以及菌株间的碱基对差异，且 ITS 序列片段较小、易于分析，目前已被广泛应用于真菌属内不同种间或近似属间的系统发育研究[5-6]。本研究对在河南省不同地区收集到的不同植物体上发生的白粉菌进行 rDNA ITS 序列分析，构建白粉菌系统发育树，从分子系统学角度探讨不同白粉菌的亲缘关系，以期为病原菌的分类鉴定及系统发育等研究提供依据，为筛选抗原及抗病育种奠定基础。

1 材料和方法

1.1 试验材料

4 种白粉菌标样采自河南省商丘市，其寄主植物分别为：番茄、凤仙、豇豆和菊芋，1 种白粉菌标样采自河南省周口市，寄主植物为大叶黄杨。

1.2 孢子收集

由于白粉菌为专性寄生菌，只能在活体寄主上生存，因此，直接从新鲜寄主植物表面用干净的小毛笔刷下分生孢子，将其收集于 1.5 mL 的离心管中，并尽快带回实验室，在 －20 ℃ 冰箱中保存，以备提取 DNA[7]。

1.3 试验方法

1.3.1 总 DNA 的提取 取少量白粉菌加入 50 μL 2%的 CTAB 提取液研磨，加 5 倍体积的 2%CTAB 提取液，58 ℃水浴 1 h（期间上下颠倒离心管若干次）后冷却至室温；加等体积氯仿∶异戊醇（24∶1）混匀，4 ℃、10 000 r/min 离心 10 min；取上清，加 1/10 体积的 10%的 CTAB，振荡后加等体积的氯仿∶异戊醇（24∶1），4 ℃、1 000 r/min 离心 10 min；取上清，加等体积的异丙醇，振荡摇匀，于 －20 ℃ 放置 30 min；4 ℃、12 000 r/min 离心 15 min；取上清，以 70%乙醇洗 2 次，晾干沉淀（超净工作台上），加适量无菌 ddH_2O，－20 ℃下保存备用[8]。利用 1%琼脂糖凝胶电泳检测所提取 DNA 的完整度。

1.3.2 ITS 区序列扩增 ITS 区扩增引物采用真菌核糖体 rDNA 通用引物 ITS1（5′-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3′）和 ITS4（5′-TCCTCCGCTTATTGATATGC 3-′）[9]，由宝生物工程（大连）有限公司合成。PCR 反应体系 20 μL：10×Buffer 2 μL、dNTP 1.6 μL、引物 ITS1 和 ITS4 各 0.6 μL、模板 DNA 0.5 μL、*Taq* 聚合酶 0.5 μL、灭菌重蒸水 14.2 μL。PCR 扩增条件为：94 ℃预变性 3 min；94 ℃变性 45 s，50 ℃退火 40 s，72 ℃延伸 1 min，循环 35 次；72 ℃延伸 10 min[8]。PCR 产物经 1%琼脂糖凝胶电泳、溴化乙锭染色后，利用凝胶成像系统（Genosens 1500）观察结果并照相。

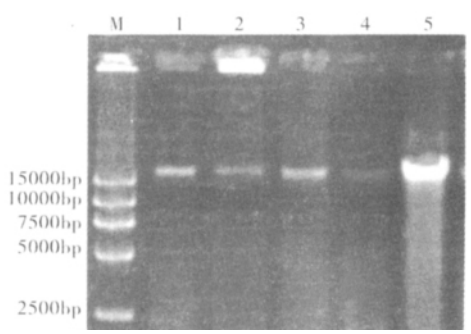
1.3.3 序列测定 将 PCR 扩增产物纯化后克隆至 pMD18-T 载体上，转化至 *E. coli* DH5α 感受态细胞中，并将阳性克隆菌株送至南京金思瑞生物科技有限公司测序。

1.3.4 序列分析 利用 Clustal X 程序将不同植物白粉病菌的 ITS 序列匹配排列，用 MEGA 4.0 软件对上述序列进行碱基含量和多态位点分析，并基于 Kimura-2-Parameter 双参数模型，采用邻近距离法（neighbor joining，NJ）构建系统进化树以推演系统发生关系。同时采用 bootstrap 法，经 1 000 次循环检验系统树的可靠性。

2 结果与分析

2.1 白粉菌总 DNA 提取及 ITS 序列扩增结果

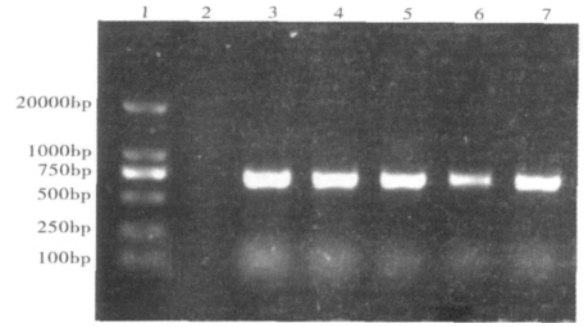
采用 CTAB 法提取 5 种白粉菌的总 DNA，电泳结果显示，均获得了分子量大小约为 15 kb 的 DNA 条带（图 1）。采用真菌核糖体 ITS 区段的通用引物 ITS1 和 ITS4，对白粉菌基因组 DNA 进行扩增，均得到 1 条 600 bp 左右的 DNA 片段（图 2）。测序结果表明，该片段包括了完整的核糖体 ITS 序列，5 种白粉病菌的 ITS 区序列长度为 603～642 bp，其中 18S 序列长度 30～70 bp，ITS1 长度 174～218 bp，5.8S 长度 152～156 bp，ITS2 长度 141～183 bp，28S 长度 11～60 bp（表 1）。



M. Marker；1. 凤仙；2. 豇豆；3. 菊芋；4. 大叶黄杨；5. 番茄

图 1 5 种白粉菌基因组 DNA 电泳图谱

© 1994-2013 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net



1. Marker; 2. 阴性对照; 3. 凤仙; 4. 豇豆; 5. 菊芋; 6. 大叶黄杨; 7. 番茄

图 2　5 种白粉菌 ITS 序列扩增结果

2.2　白粉病菌 ITS 序列分析和进化树构建结果

对 5 种植物白粉病菌 ITS 序列用 Clustal X 同源对齐,必要时进行手工排序,比对结果如图 3 所示。这 5 条 ITS 序列中,FJ625796、GQ927253 和 GQ927254 序列接近,其中 FJ625796 和 GQ927253 序列完全相同,与 GQ927254 序列之间存在 1 个碱基的差异,这 3 条序列与 HQ012432、EU828521 具有较大的差异,较多碱基缺失的位点达 4 处,另外还有一些几个碱基缺失的情况。

表 1　5 种白粉菌的 ITS 序列长度

白粉菌种类	登录号	寄主植物	ITS 各区段位点					
			ITS	18S	ITS1	5.8S	ITS2	28S
凤仙白粉菌(*Podosphaera balsaminae*)	FJ625796	凤仙	603	1－69	70－244	245－400	401－542	543－603
菜豆叉丝单囊壳白粉菌(*Podosphaera phaseoli*)	GQ927253	豇豆	603	1－69	70－244	245－400	401－544	545－603
棕丝单囊白粉菌(*Podosphaera fusca*)	GQ927254	菊芋	603	1－69	70－244	245－400	401－544	545－603
大叶黄杨白粉菌(*Erysiphe* sp.)	HQ012432	大叶黄杨	642	1－70	71－289	290－446	447－630	631－642
新番茄粉孢菌(*Odium neolycopersici*)	EU828521	番茄	640	1－30	31－249	250－402	403－582	583－640

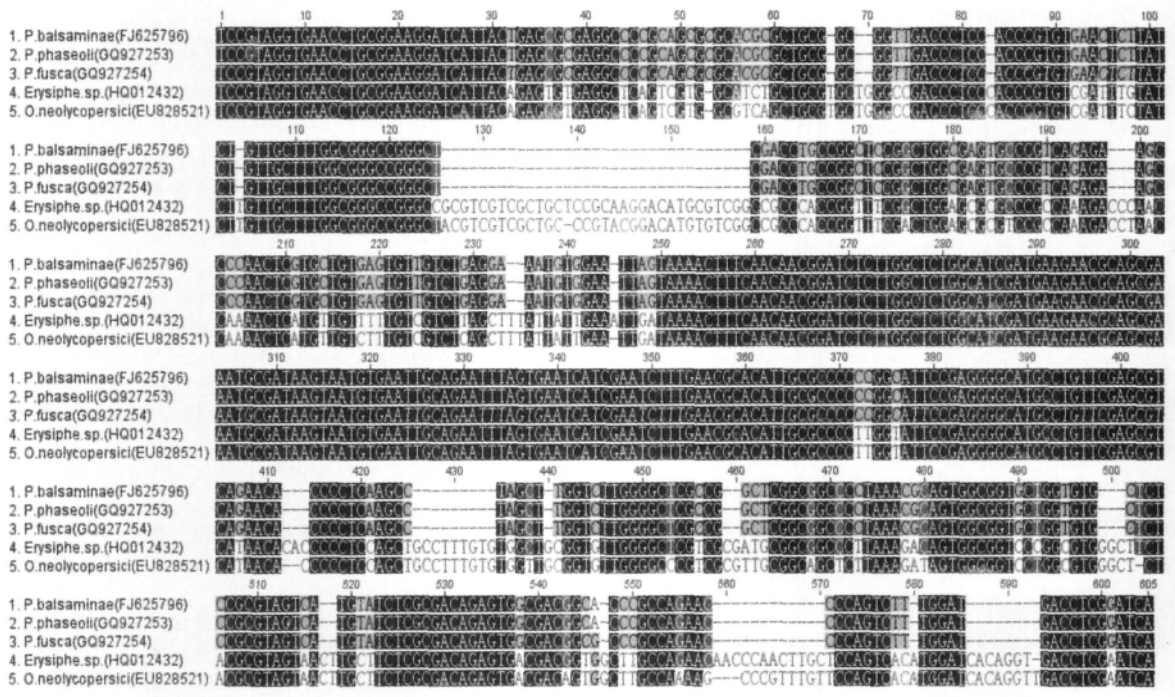


图 3　5 种白粉菌 ITS 序列的对比分析

用 MEGA 4.0 软件分析处理,构建系统进化树(图 4)。从图 4 可以看出,5 个物种形成了 2 个进化距离较远的大分支。寄生在凤仙(FJ625796)、豇豆(GQ927253)和菊芋(GQ927254)的叉丝单囊壳属白粉菌间的遗传距离较小,亲缘关系近,其 ITS 序列紧密聚在一支,这与其形态学分类结果相一致;寄生在大叶黄杨(HQ012432)上的冬青卫矛白粉菌和寄生在番茄(EU828521)上的新番茄粉孢菌聚在另外一支。

© 1994-2013 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

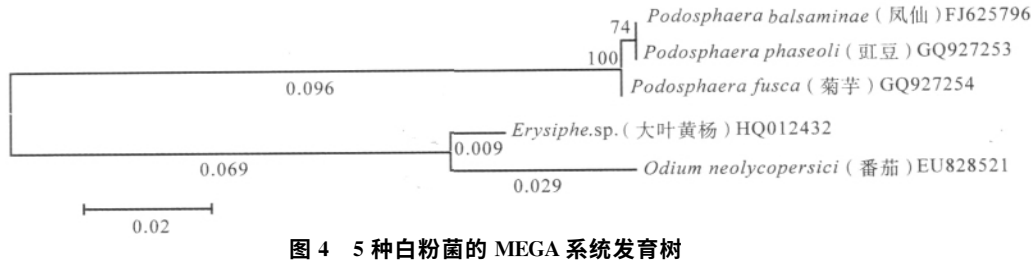


图 4 5 种白粉菌的 MEGA 系统发育树

3 讨论

植物白粉病害是一个较为模糊的定义，病原菌种类繁多，利用传统的病菌分类方法，具有分类性状无极显著差别、在一定程度上受人为因素的干扰、易混淆的缺点，不能充分反映物种的进化关系；而且多种病原菌仅具有无性阶段，没有有性阶段，使病原菌鉴定时更为困难[10]。分子生物学技术的发展为系统分类研究者开辟了新途径，目前应用于真菌分类研究的分子生物学技术主要有限制性片段长度多态性(RFLP)、DNA 扩增片段长度多态性(AFLP)、扩增多态性 DNA(RAPD)、核糖体 rDNA 内转录间隔区(ITS)序列分析技术等[11]。甘丽萍等[7]利用 RAPD 标记对甘肃兰州等地的 12 种白粉菌种间的亲缘关系进行了研究。魏松红等[12]利用 RAPD 对东北春麦区小麦白粉病菌生理小种进行了鉴定。但陈作红等[13]、孙文秀等[14]认为，RAPD 技术在研究真菌系统发育时具有一定的局限性。

ITS 序列作为一种遗传分子标记，与形态标记、细胞学标记和生化标记相比，具有明显的优越性。ITS 区受外界环境影响较小，进化速度快，既具保守性又在科、属、种水平上具有特异性，而且序列长度适中，含足够量的遗传信息，为病原菌的分类鉴定及系统发育等研究提供了重要依据[5]。本课题组之前对来自河南省不同地区的 5 种白粉菌进行了显微形态学分析和初步鉴定[15]。本研究克隆了这 5 种白粉菌的 ITS 序列，并进行了分析，结果表明，这 5 种白粉菌形成了 2 个进化距离较远的大分支。其中凤仙、豇豆和菊芋白粉菌序列紧密聚在一起，从其支长可以看出，这 3 株菌的遗传差异不大，表明这 3 种菌株有着较近的亲缘关系。而另外一支包括大叶黄杨和番茄白粉菌序列，从分支的长度来看，它们的亲缘关系相对较远。根据序列比对分析的结果，这 2 个大支代表类群的进化差异，主要体现在若干处碱基的插入或者缺失。

分析结果表明，由 5 种白粉菌 ITS 序列分析的亲缘关系与传统形态学分类的鉴定结果是一致的，这与前人的研究报道一致。Hirata 等[16]采用 rDNA ITS序列分析，对白粉菌单丝壳属的 79 个种进行了亲缘进化分析，结果表明，通过 ITS 分子系统发生进行的分类与通过形态学及病原菌的侵染性进行的分类是一致的。因此，根据 ITS 序列进行的分类能够反映白粉菌之间的亲缘关系。本课题组将对河南省不同地区的白粉菌进行系统研究与鉴定，进一步了解各地白粉菌的种类，并及时监测其小种分化，为开展白粉病检测和防治提供理论依据。

参考文献：

[1] Chaure P, Gurr S J, Spanu P. Stable transformation of *Erysiphe graminis*, an obligate biotrophic pathogen of barley[J]. Nat Biotechnol, 2000, 18: 205-207.

[2] Takamatsu S. Phylogeny and evolution of the powdery mildew fungi (Ersiphales, Asomycota) inferred from nuclear ribosomal DNA sequences[J]. Mycroscience, 2004, 45: 147-157.

[3] 乔体尚，王美玲. 山西省小麦白粉病菌毒性结构初步分析[J]. 山西农业科学，1996，24(1)：53-56.

[4] 刘淑艳，李玉. 几种主要分子生物学技术在菌物系统学研究中的应用[J]. 吉林农业大学学报，2000，22(3)：45-51.

[5] 赵杰. ITS 序列分析及其在植物真菌病害分子检测中的应用[J]. 陕西农业科学，2004(4)：35-37.

[6] 张怡，张佩佩，马晓萌，等. 河南两地市小麦白粉病菌的分子鉴定和进化分析[J]. 华北农学报，2012，27(1)：189-192.

[7] 甘丽萍，王生荣. 12 种白粉菌种间 RAPD 亲缘关系研究[J]. 西北农林科技大学学报：自然科学版，2006，34(8)：133-138.

[8] 王文静，裴冬丽，马原松，等. 商丘地区番茄白粉菌的鉴定[J]. 河南大学学报：自然科学版，2009，39(5)：505-508.

[9] White T J, Bruns T, Lee S. Analysis of phylogenetic relationships by amplification and direct sequencing of ribosomal RNA genes[C]// Innis M A. PCR protocols: A guide to methods and applications. New York: Academic Press, 1990: 315-322.

[10] 秦旭升，刘学敏，周艳玲，等. 植物病原真菌中 DNA 分子鉴定技术[J]. 植物生理学通讯，2000，36(4)：342-347.

[11] 赵瑞琳. RAPD 在真菌分类鉴定上的应用[J]. 热带农业科技，2004，27(3)：23-26.

[12] 魏松红，王罡，张领兵，等. 东北春麦区小麦白粉病菌生理小种鉴定及其 RAPD 分析[J]. 吉林农业大学学报，2001，23(2)：35-37，40.

[13] 陈作红，张志光，张天晓. 鹅膏菌属真菌分析及亲缘关系的研究[J]. 菌物系统，2000，19(2)：51-55.

[14] 孙文秀，张修国. 不同来源辣椒疫霉菌的系统发育分析[J]. 河南农业科学，2009(2)：74-76.

[15] 李成伟，姚晓惠，裴冬丽，等. 几种白粉病菌的显微形态学分析[J]. 河南农业科学，2008(5)：68-71.

[16] Hirata T, Cunnington J H, Paksiri U, *et al*. Evolutionary analysis of subsection *Magnicellulatae* of *Podosphaera* section *Sphaerotheca* (Erysiphales) based on the rDNA internal transcribed spacer sequences with special reference to host plants[J]. Can J Bot, 2000, 78(12): 1521-1530.

© 1994-2013 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net