河南农业科学,2015,44(5):97-101
Journal of Henan Agricultural Sciences
doi:10.15933/j.cnki.1004-3268.2015.05.022

利用 PCR 技术测定东北、华北致病疫霉线粒体单倍型

贾京珠[1],杨志辉[1],朱杰华[1*],赵冬梅[1],蒋继志[2]
(1.河北农业大学 植物保护学院,河北 保定 071000;
2.河北大学 生命科学学院,河北 保定 071002)

摘要:为了明确东北、华北地区致病疫霉群体的线粒体单倍型组成与多样性,采用 PCR 的方法对 2013 年采自两地区 5 省(区)的 163 株致病疫霉菌株的线粒体单倍型进行了测定和分析。由高变区 HVRi 所区分的Ⅰ型菌株所占比例为 38.65%,Ⅱ型菌株占 61.35%;高变区 HVRii 所区分的 R_1 型、R_2 型和 R_3 型菌株所占比例分别为 1.85%、4.90%和 93.25%。东北和华北两地区的优势线粒体单倍型均为ⅠR_3 型与ⅡR_3 型,其在群体中的比例分别为 36.81%和 56.44%。不同省(区)间致病疫霉线粒体单倍型组成存在一定差异,ⅡR_2 型菌株仅在河北和辽宁省有少量分布,所占比例仅为4.91%;ⅠR_1 型菌株仅存在于黑龙江,所占比例仅为 1.84%。东北和华北地区致病疫霉线粒体单倍型整体表现一致,不同省(区)之间多态性不同,说明致病疫霉的线粒体单倍型与地理来源之间有很大关系。

关键词:致病疫霉;线粒体单倍型;多态性;PCR
中图分类号:S435.32　　**文献标志码**:A　　**文章编号**:1004-3268(2015)05-0097-05

Identification and Analysis of Mitochondrial Haplotypes of *Phytophthora infestans* in Northeast and North China by PCR

JIA Jingzhu[1],YANG Zhihui[1],ZHU Jiehua[1*],ZHAO Dongmei[1],JIANG Jizhi[2]
(1. College of Plant Protection,Agricultural University of Hebei,Baoding 071000,China;
2. College of Life Science,Hebei University,Baoding 071002,China)

Abstract: To understand the composition and polymorphism of mitochondrial haplotypes of *Phytophthora infestans* in Northeast and North China, one hundred and sixty three *P. infestans* isolates were collected from five provinces (region) of the two areas in 2013 and their mitochondrial haplotypes were identified and analyzed by PCR. The results showed that the percentage of type Ⅰ was 38.65% and the rest 61.35% belonged to type Ⅱ, which were distinguished by HVRi. The percentages of type R_1, R_2 and R_3, which were distinguished by HVRii, were 1.85%, 4.90% and 93.25%, respectively. Haplotypes ⅠR_3 and ⅡR_3 were dominant and widely distributed in the Northeast and the North China. The percentages of haplotypes ⅠR_3 and ⅡR_3 were 36.81% and 56.44%, respectively. The composition of mitochondrial haplotypes of *P. infestans* was weakly different in the tested five provinces (region). Only a few strains with ⅡR_2 occurred in Hebei and Liaoning provinces, and its percentage was 4.91%. Haplotype ⅠR_1 only distributed in Heilongjiang province, and its percentage was 1.84%. Mitochondrial haplotypes of *P. infestans* were similar in the Northeast and the North China, however their polymorphism was different in the

收稿日期:2014-11-10
基金项目:公益性(农业)行业科技专项(201303018);现代农业产业技术体系建设专项(CARS-10-P12)
作者简介:贾京珠(1990-),女,河北赵县人,在读硕士研究生,研究方向:分子植物病理学。E-mail:jjzh310@163.com
*通讯作者:朱杰华(1963-),女,河北昌黎人,教授,博士,主要从事植物病理学研究。E-mail:zhujiehua356@126.com

five tested provinces(region). Therefore, the mitochondrial haplotypes of *P. infestans* had a certain relationship to their geographical origin.

Key words: *Phytophthora infestans*; mitochondrial haplotypes; polymorphism; PCR

东北和华北地区是我国重要的马铃薯种薯繁育基地和商品薯生产基地,由致病疫霉(*Phytophthora infestans*)引起的晚疫病是该区域最重要的气传流行病害[1]。植物病原物群体遗传结构的变化影响着植物病害的发生和流行[2],致病疫霉线粒体 DNA 单倍型是致病疫霉群体结构研究中的重要参考因素之一,因此对致病疫霉线粒体单倍型的测定有助于了解其群体的组成及变化,可为该区域致病疫霉群体动态演化研究和中长期病害防控策略制定提供参考。位于细胞质中的线粒体 DNA 为单亲遗传且进化速度快[3],现已成为多种生物类群中研究群体遗传结构的一种理想分子标记[4-5]。在致病疫霉研究中,Carter 等[6]于 1990 年首次提出通过对线粒体基因组利用多种限制性内切酶进行酶切,即采用 RFLP 方法对致病疫霉线粒体多样性进行鉴定,该方法可鉴定Ⅰa、Ⅰb、Ⅱa 和Ⅱb 4 种致病疫霉线粒体 DNA 单倍型,但是由于致病疫霉线粒体基因组 DNA 提取复杂,该方法应用较少。目前广泛用于致病疫霉线粒体单倍型测定的 PCR - RFLP 方法是 Griffith 等[7]于 1998 年提出的,该方法与 RFLP 法相比,不需要提纯线粒体基因组,而是通过 2 对特异性引物对基因组 DNA 进行 PCR 扩增后,再利用特定的限制性内切酶酶切来进行线粒体单倍型的鉴定,其操作比 RFLP 法简便,因此被大量采用,但却存在与 RFLP 法鉴定不一致的问题[8]。Yang 等[8]在对致病疫霉线粒体基因组多态性分析基础上提出的 PCR 方法,不仅操作简单,而且所区分的单倍型更丰富,能检测出 $ⅠR_1$、$ⅠR_2$、$ⅠR_3$、$ⅡR_1$、$ⅡR_2$ 和 $ⅡR_3$ 共 6 种线粒体单倍型。齐明星[9]采用 PCR - RFLP 和 PCR 2 种方法测定了 2000—2010 年东北和华北 22 株致病疫霉,前者测定结果均为Ⅱa 型,而后者检测出 $ⅠR_3$、$ⅡR_2$ 和 $ⅡR_3$ 共 3 种线粒体单倍型,说明 PCR 测定致病疫霉线粒体单倍型的方法较 PCR - RFLP 方法又有了很大提升。致病疫霉线粒体单倍型被广泛用于致病疫霉群体遗传多态性[9]以及群体起源和迁移方面[10-11]的研究。赵志坚等[12]利用线粒体 DNA 单倍型这一标记研究了云南致病疫霉群体的演化特征。李洪浩等[13]利用线粒体 DNA 单倍型研究了四川致病疫霉群体特征。Ristaino 等[14]研究了英格兰、爱尔兰和欧洲致病疫霉的线粒体单倍型,发现Ⅰa型线粒体单倍型可以长期稳定存在。尽管利用 PCR - RFLP 方法检测我国不同地区致病疫霉线粒体单倍型的报道很多[12-13,15],但利用 PCR 方法对我国东北和华北地区致病疫霉线粒体单倍型进行大批次检测还未见报道。为此,利用 PCR 方法测定我国东北和华北地区致病疫霉群体的线粒体单倍型,以明确东北和华北地区致病疫霉群体线粒体单倍型的组成及特点,为今后致病疫霉群体动态演化研究提供参考。

1 材料和方法

1.1 试验时间、地点

本试验于 2013 年在河北农业大学植物保护学院马铃薯病害研究室完成。

1.2 试验材料

供试菌株:选用 2013 年采自河北、内蒙古、黑龙江、吉林、辽宁等 5 省(区)13 个县共 163 株致病疫霉进行线粒体单倍型的测定分析,其中河北省 39 株,内蒙古 43 株,吉林省 30 株,黑龙江省 23 株,辽宁省 28 株,其中东北 3 省 81 株和内蒙古海拉尔 15 株均由河北大学马铃薯病害研究室蒋继志教授惠赠。

供试培养基:黑麦培养基,其中黑麦 60 g/L、蔗糖 20 g/L、琼脂 12 ~ 15 g/L。

1.3 方法

1.3.1 致病疫霉基因组 DNA 的提取及检测 将供试菌株分离纯化后接种在黑麦培养基上,7 ~ 10 d 后刮取菌丝,用灭菌滤纸将菌丝上的水分吸干,置于 2 mL 的离心管中,经高通量样品研磨仪充分研磨后,采用改良的 CTAB 法[12]提取致病疫霉基因组 DNA。采用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 的质量,用 Eppendorf Biophotometer 蛋白核酸测定仪测定其浓度。将 DNA 质量浓度稀释到 50 ng/μL 左右,-20 ℃保存备用。

1.3.2 致病疫霉线粒体 DNA(mtDNA)单倍型的测定 采用 Yang 等[8]以 PCR 为基础的新方法测定东北和华北地区的致病疫霉 mtDNA 单倍型。引物信息见表 1。

表 1 致病疫霉 mtDNA 单倍型测定所用引物及序列

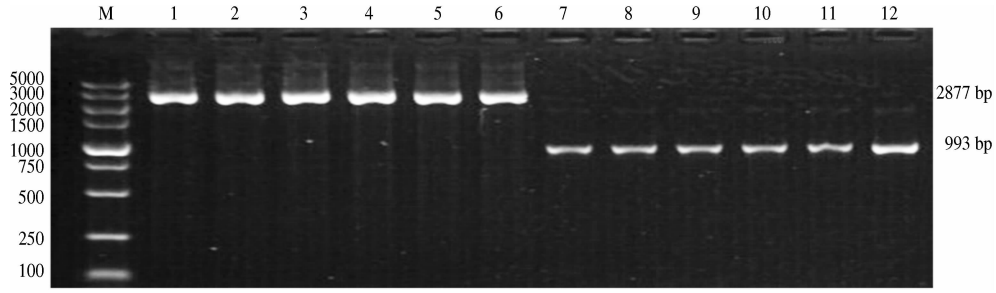
引物名称	序列
InDel - F	5′ - GTGGGTTCGAGTCCCACTAA - 3′
InDel - R	5′ - CTCACCCGTTCGCTATGTTT - 3′
RSU - F	5′ - ACGGAATTATCGGAAGATTT - 3′
RSU - R	5′ - AAATCCCTTTTATACTGTAATTTGAT - 3′

InDel－F/R 和 RSU－F/R 的扩增反应体系均为 25 μL:1 μL DNA,12.5 μL Mastermix,上下游引物(10 μmol/L)各 1 μL,9.5 μL ddH_2O。引物 InDel－F/R 的扩增反应程序为:95 ℃预变性 2 min;95 ℃变性 45 s,65 ℃退火 3 min,72 ℃延伸 3 min,27 个循环;72 ℃延伸 10 min,4 ℃保存;引物 RSU－F/R 的扩增反应程序为:95 ℃预变性 2 min;95 ℃变性 45 s,45 ℃退火 45 s,72 ℃延伸 45 s,30 个循环;72 ℃延伸 7 min,4 ℃保存。将扩增产物分别采用 1.2% 和 2.5% 的琼脂糖凝胶电泳检测,于凝胶成像仪中拍照。

2　结果与分析

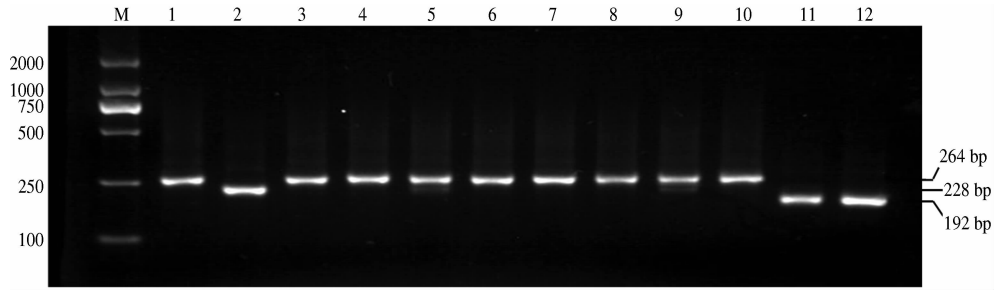
2.1　代表性致病疫霉菌株的 mtDNA 单倍型测定结果

通过 PCR 方法测定了采自东北和华北地区 163 株致病疫霉的线粒体单倍型,所选的 12 株代表菌株在高变区 HVRi 和 HVRii 上的扩增产物凝胶电泳结果分别见图 1 和图 2,共检测出 ⅠR_1(图 1—2,泳道 11—12)、ⅠR_3(图 1—2,泳道 7—10)、ⅡR_2(图 1—2,泳道 2)和 ⅡR_3(图 1—2,泳道 1、3—6)4 种线粒体单倍型。



M 为 Marker,1—12 为菌株编号,图 2 相同,且菌株编号对应。泳道 1—6 扩增出的为 Ⅱ 型条带,泳道 7—12 为 Ⅰ 型条带

图 1　代表性菌株在高变区 HVRi 的扩增子电泳图谱

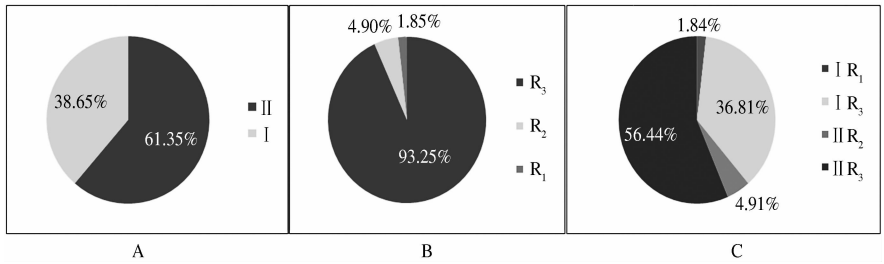


泳道 1、3—10 扩增出的为 R_3 型条带,泳道 2 为 R_2 型条带,泳道 11—12 为 R_1 型条带

图 2　代表性菌株在高变区 HVRii 的扩增子电泳图谱

2.2　东北、华北地区致病疫霉在线粒体 2 个高变区类型的比较

在供试的 163 株致病疫霉菌株中,高变区 HVRi 所区分的 Ⅰ 型和 Ⅱ 型菌株数分别为 63 株和 100 株,其百分比分别为 38.65% 和 61.35%,Ⅱ 型菌株所占比例明显高于 Ⅰ 型菌株(图 3A)。根据高变区 HVRii 扩增子长度不同所区分的 R_1、R_2 和 R_3 型菌株数量差异极大,R_3 占绝对优势,共 152 株,占 93.25%,而 R_1 和 R_2 型菌株数量均很少,分别为 3 株和 8 株,其所占百分比分别为 1.85% 和 4.90%(图 3B)。这表明在东北和华北地区致病疫霉群体的线粒体单倍型以 ⅠR_3 型和 ⅡR_3 型为主,共计 152 株,所占百分比为 93.25%;而 ⅡR_2 和 ⅠR_1 2 种单倍型数量很少,共计 11 株,仅占 6.75%(图 3C)。



A. 高变区 HVRi 所区分的 Ⅰ/Ⅱ 型所占比例;B. 高变区 HVRii 所区分的 $R_1/R_2/R_3$ 型所占比例;C. 4 种 mtDNA 单倍型所占比例

图 3　东北和华北地区致病疫霉不同线粒体单倍型分布情况

2.3 东北和华北不同省(区)致病疫霉线粒体单倍型的比较

在被测的东北和华北 5 省(区)致病疫霉菌株中,$\mathrm{I}R_3$ 和 $\mathrm{II}R_3$ 是各省(区)共有的 2 种线粒体单倍型。但二者在不同省(区)所占比例不同,河北、内蒙古和辽宁以 $\mathrm{II}R_3$ 为主,$\mathrm{I}R_3$ 数量相对偏少;黑龙江以 $\mathrm{I}R_3$ 为主,而 $\mathrm{II}R_3$ 相对较少;吉林二者数量相当。除内蒙古和吉林 2 省(区)仅发现 $\mathrm{I}R_3$ 和 $\mathrm{II}R_3$ 2 种单倍型外,河北省和辽宁省还发现了少量 $\mathrm{II}R_2$ 型,菌株数分别为 6 株和 1 株,黑龙江还发现了 3 株 $\mathrm{I}R_1$ 型。同时,在吉林还发现线粒体单倍型与地理来源密切相关,从四平市采集的 16 个菌株均为 $\mathrm{II}R_3$ 型,而在敦化所采集的 14 个菌株均为 $\mathrm{I}R_3$ 型。

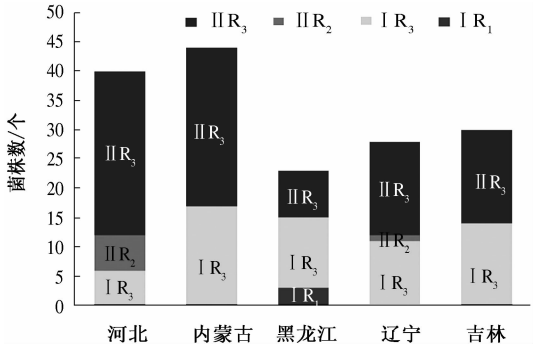


图 4 致病疫霉 4 种线粒体单倍型在东北和华北地区各省(区)的分布情况

3 结论与讨论

3.1 致病疫霉线粒体单倍型不同检测方法的比较

以 PCR 技术为基础的线粒体单倍型检测新方法[8]与之前普遍采用的 PCR - RFLP[7]方法相比,能够更详细、更客观地揭示致病疫霉的线粒体单倍型多态性。宋俊丽[15]利用 PCR - RFLP 方法对 94 株宁夏致病疫霉菌株的线粒体 DNA 单倍型进行了分析,发现所有被测菌株均为 Ⅰa 型,而齐明星[9]利用 PCR 的方法测定了以上菌株,除发现 92 株为 $\mathrm{I}R_1$ 外,还发现了 $\mathrm{I}R_2$ 和 $\mathrm{II}R_3$ 各 1 株。Guo 等[16]以 PCR - RFLP 法检测发现,1997—2003 年采自我国北方地区的 48 株致病疫霉线粒体单倍型均为 Ⅱa 型。齐明星[9]采用 2 种方法检测了 2000—2010 年采自东北和华北地区的致病疫霉菌株,发现 PCR - RFLP 方法检测到的线粒体单倍型与 Guo 等[16]的检测结果一致,而以 PCR 为基础的新方法则发现了 $\mathrm{I}R_3$、$\mathrm{I}R_2$ 和 $\mathrm{I}R_3$ 3 种线粒体单倍型。本研究对华北和东北的致病疫霉群体进行了大批次检测,共发现 $\mathrm{I}R_3$、$\mathrm{II}R_3$、$\mathrm{I}R_1$ 和 $\mathrm{II}R_2$ 4 种线粒体单倍型。由此可见,PCR 测定致病疫霉线粒体单倍型的方法能够检测出更多类型的线粒体单倍型,进一步显示了该方法的优势。

3.2 东北和华北地区致病疫霉线粒体多态性分析

东北、华北地区致病疫霉群体间线粒体单倍型的多态性差异较小。在线粒体基因组高变区 HVRi,东北和华北致病疫霉群体中 Ⅰ 型、Ⅱ 型比例相差不大,而在高变区 HVRii 均以 R_3 型为主。这一方面可能与 2 个地区致病疫霉群体本身遗传结构的高度相似性有关,也可能与线粒体单倍型分子标记多态性较低有关,可采用多态性更高的 SSR[17]或 AFLP[18]等分子标记对其群体多态性进行测定与评估。但 2 个地区不同省(区)间致病疫霉的线粒体单倍型分布明显不同,多样性差异明显。内蒙古和吉林仅发现了 $\mathrm{I}R_3$ 和 $\mathrm{II}R_3$ 2 种优势基因型,而河北、辽宁和黑龙江发现了 3 种线粒体单倍型,除 $\mathrm{I}R_3$ 和 $\mathrm{II}R_3$ 2 种优势基因型外,河北和辽宁还发现了 $\mathrm{II}R_2$ 菌株,而黑龙江发现了 $\mathrm{I}R_1$ 菌株,在局部地区致病疫霉的线粒体单倍型与地理来源密切相关。

参考文献:

[1] 张洪伟,李继刚,郑建坡,等. 马铃薯晚疫病抗性相关基因 *StDIR1* 的克隆与表达[J]. 华北农学报,2012,27(2):23-29.

[2] 王宗华,鲁国东,谢联辉,等. 对植物病原真菌群体遗传研究范畴及其意义的认识[J]. 植物病理学报,1998,28(1):5-9.

[3] 熊庆,刘作易. 线粒体 DNA 的研究与应用[J]. 西南农业学报,2002,15(3):111-115.

[4] Tanaka K,Takizawa T,Murakoshi H,*et al*. Molecular phylogeny and diversity of Myanmar and Bhutan mithun based on mtDNA sequences[J]. Animal Science Journal,2011,82(1):52-56.

[5] Miller J M, Hallager S, Monfort S L, *et al*. Phylogeographic analysis of nuclear and mtDNA supports subspecies designations in the ostrich (*Struthio camelus*)[J]. Conservation Genetics,2011,12(2):423-431.

[6] Carter D A, Archer S A, Buck K W, *et al*. Restriction fragment length polymorphisms of mitochondrial DNA of *Phytophthora infestans*[J]. Mycological Research,1990,94(8):1123-1128.

[7] Griffith G W, Shaw D S. Polymorphisms in *Phytophthora infestans*: Four mitochondrial haplotypes are detected after PCR amplification of DNA from pure cultures or from host lesions[J]. Applied and Environmental Microbiology,1998,64(10):4007-4014.

[8] Yang Z, Qi M, Qin Y, *et al*. Mitochondrial DNA polymorphisms in *Phytophthora infestans*: New haplotypes are

identified and re-defined by PCR[J]. Journal of Microbiological Methods,2013,95(2):117-121.

[9] 齐明星.致病疫霉线粒体单倍型 PCR 检测方法的建立及应用[D].保定:河北农业大学,2014.

[10] Fry W E, Goodwin S B, Matuszak J M, *et al*. Population genetics and intercontinental migrations of *Phytophthora infestans* [J]. Annual Review of Phytopathology, 1992,30(1):107-130.

[11] May K J, Ristaino J B. Identity of the mtDNA haplotype(s) of *Phytophthora infestans* in historical specimens from the Irish potato famine [J]. Mycological Research, 2004,108(5):471-479.

[12] 赵志坚,曹继芬,李灿辉,等.云南致病疫霉交配型、甲霜灵敏感性、mtDNA 单倍型及其群体演替研究[J].中国农业科学,2007,40(4):727-734.

[13] 李洪浩,彭化贤,席亚东,等.四川马铃薯晚疫病菌交配型、生理小种、甲霜灵敏感性及 mtDNA 单倍型组成分析[J].中国农业科学,2013,46(4):728-736.

[14] Ristaino J B, Hu C H, Fitt B D. Evidence for presence of the founder Ⅰa mtDNA haplotype of *Phytophthora infestans* in 19th century potato tubers from the Rothamsted archives[J]. Plant Pathology,2013,62(3):492-500.

[15] 宋俊丽.2010 年宁夏致病疫霉群体特征的研究[D].保定:河北农业大学,2012.

[16] Guo J, Van der Lee T, Qu D Y, *et al*. *Phytophthora infestans* isolates from Northern China show high virulence diversity but low genotypic diversity [J]. Plant Biology, 2009,11(1):57-67.

[17] Rakoczy-Trojanowska M, Bolibok H. Characteristics and a comparison of three classes of microsatellite-based markers and their application in plants [J]. Cellular and Molecular Biology Letters,2004,9(2):221-238.

[18] Van der Lee T, De Witte I, Drenth A, *et al*. AFLP linkage map of the oomycete *Phytophthora infestans*[J]. Fungal Genetics and Biology,1997,21(3):278-291.

****

(上接第 66 页)

[10] 武丽,徐晓燕,黄义德,等.植物生长调节剂·营养元素在烤烟生产上的应用[J].安徽农业科学,2004,32(4):786-788.

[11] 王寒,陈建军,林锐峰,等.粤北地区移栽期对烤烟成熟期生理生化指标和经济性状的影响[J].中国烟草学报,2013,19(6):71-76.

[12] 张继,刘声国,潘和平,等.植物生长调节剂对烤烟生长发育和产值的影响[J].现代农业科技,2014(16):135.

[13] 曹建康,姜微波,赵玉梅.果蔬采后生理生化实验指导[M].北京:中国轻工业出版社,2007.

[14] 高俊凤.植物生理学实验技术[M].西安:世界图书出版公司,2000.

[15] 符云鹏,刘国顺,刘学芝.烤烟叶片发育过程中氨基酸含量变化的研究[J].中国烟草学报,1998,4(1):15-19.

[16] 郭启芳,马千全,孙灿,等.外源甜菜碱提高小麦幼苗抗盐性的研究[J].西北植物学报,2004,24(9):1680-1686.

[17] 李新梅,孙丙耀,谈建中.甜菜碱与植物抗逆性关系的研究进展[J].农业科学研究,2006,27(3):66-70.

[18] 孟凤,郁松林,郑强卿,等.甜菜碱与植物抗逆性关系之研究进展[J].中国农学通报,2008,24(4):225-228.

[19] 许良忠,关立婷,梁静静,等.一种肉桂酸酯类化合物及其应用:中国,2013100437540[P].2014-06-18.

[20] 吴金龙,岳从永,戴伟民.一种合成肉桂酰胺类化合物的方法:中国,2005100602079[P].2007-05-09.