

棉花枯萎病菌异核体的三个不同核型分离子 DNA 碱基组成及18S rDNA 序列*

李颖 关国华 蒋永申 李秀玉

(中国农业大学生物学院 北京 100094)

摘要: 从棉花枯萎病菌 (*Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum*) 异核体菌株 Ag149 的菌落角变处分离得到 3 个培养特征和致病性差异明显的单孢分离子。分别测定了这 3 个分离子的总 DNA 和核 DNA 的碱基组成, 以及它们的 18S rDNA 的部分序列 (1477 个碱基对)。它们的总 DNA (G + C) mol% 差异在 0.1% ~ 0.4% 之间; 核 DNA (G + C) mol% 的差异在 0.4% ~ 0.8% 范围内; 而 18S rDNA 的部分序列则完全相同。

关键词: 棉花枯萎病菌, DNA 碱基组成, 18S rDNA 序列

中图分类号: Q949.32 文献标识码: A 文章编号: 0253-2654 (2001) 05-006-04

GC CONTENT AND 18S rDNA SEQUENCE IN THREE NUCLEAR TYPE SEGREGANTS ISOLATED FROM A HETEROKARYON OF *FUSARIUM OXYSPORUM* F. SP. *VASINFECTUM*

LI Ying GUAN Guo-Hua JIANG Yong-Shen LI Xiu-Yu

(College of Biological Sciences, China Agricultural University, Beijing 100094)

Abstract: Three nuclear type segregants were isolated from a heterokaryon of *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* strain Ag149. Their cultural character and pathogenicity were different. The differences of their GC content for total DNA and nuclear DNA were between 0.1% to 0.4% and 0.4% to 0.8% respectively, as measured by thermal denaturation method. The 18S rDNA partial sequences of 1477 base pairs in these segregants were identical.

Key words: *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum*, G + C content, 18S rDNA sequence

真菌的异核现象普遍存在, 而且在环境的胁迫下不断变化着表现形式, 以此稳定地保持着其生命活力。本课题组于六十年代开始研究真菌的异核现象及变异规律, 除了发现镰刀菌异核体一般可分离得到 3 种色素不同和菌落质地各异的不同核型分离子以外^[1], 还阐明了一些真菌的频繁变异与其所处环境有关^[2]。随着分子生物学技术的发展和广泛应用, 陈希等以研究真菌异核机制为目的, 曾分离到水稻恶苗病菌的 3 种不同核型的分离子, 并将菌株核 DNA 作为主要分析目标, 经 80 种随机引物的 RAPD 分析和 DNA 指纹分析, 没有发现分离子之间在核 DNA 上有明显差异, 由此判断, 3 个分离子之间可能仅有少数碱基不同^[3]。为证明此判断是否具有普遍性, 我们又选择另一种镰刀菌——棉花枯萎病菌为材料进行表观性状及核 DNA 的多项分析。在前期实验中,

* 国家自然科学基金资助项目 (No. 39770395)

Project granted by the Chinese National Natural Fund (No. 39770395)

收稿日期: 2000-02-14 修回日期: 2000-04-14

通过切割单根菌丝尖端得到异核体菌株,并经单孢分离纯化、继代培养稳定7~8代后得到3种不同核型的分离子,分别编号为Ag149-I, Ag149-II和Ag149-III。它们在孢子生成量、色素产生及菌落质地上明显不同,特别是致病性上差异较大,其中异核体菌株Ag149致病率为65.2%, Ag149-I和Ag149-II的致病率分别为57.1%和42.9%,而Ag149-III无致病能力(待发表)。本文报道了这3种分离子的总DNA和核DNA碱基组成,及其18S rRNA基因序列分析的结果。

1 材料与方法

1.1 菌株及试剂

野生型棉花枯萎病菌株,分离自河南安阳棉田,由中国农科院植保所孙文姬研究员提供。经切割菌丝尖端,得到异核体菌株Ag149,从其菌落不同角变处挑取单孢分离纯化,并稳定7~8代后,获得3个不同核型的分离子:Ag149-I, Ag149-II和Ag149-III。

高保真DNA聚合酶Taq plusI、dNTPs、限制性内切酶、T4 DNA连接酶、PCR产物回收试剂盒、质粒提取试剂盒及DNA分子量标准等购自上海生工生物工程公司和基因公司;pGEM^R-T Easy载体购自Promega公司;感受态细胞*E. coli* DH5 α 由本室制备;其他试剂购自华美生物工程公司和鼎国生物工程公司。

1.2 方法

1.2.1 菌株的培养及总DNA提取与核DNA的纯化:菌株经PDA斜面活化后接种于马铃薯蔗糖液体培养基中,置26 $^{\circ}$ C~28 $^{\circ}$ C振荡培养60h,离心收集并洗涤孢子,用无菌水调节孢子悬液为10⁸/mL,吸取0.5mL接种于100mL完全培养液中,26 $^{\circ}$ C~28 $^{\circ}$ C振荡培养12~14h后,过滤出尚无分叉的幼嫩菌丝,用无菌水洗涤多次,经冷冻干燥后采用液氮研磨破碎菌丝体,并用CTAB法^[4]提取总DNA,用氯化铯超速离心分离纯化得到核DNA^[5]。将DNA溶解于0.1mol/L SSC溶液中,在紫外分光光度计上检查DNA纯度,使DNA纯度达到A₂₆₀:A₂₈₀:A₂₃₀=1.0:0.515:0.45,并调整样品浓度在A₂₆₀=0.2~0.5范围内。

1.2.2 (G+C) mol%的测定:按参考文献[6,7]方法进行,以大肠杆菌*E. coli* K12菌株的DNA为参比。实验在UV/VIS分光光度计(Lambda Bio 20, Perkin Elmer公司)上进行。待测样品的总DNA和核DNA分别于不同时间重复测定3次。测定温度设在65 $^{\circ}$ C~90 $^{\circ}$ C,升温速度为0.5 $^{\circ}$ C/min,仪器自动记录上述条件下260nm的DNA吸光值并绘出曲线,在一阶导数图上得出T_m值,按公式(G+C) mol% = 51.2 + 2.08 (T_mX - T_mR)推算出核酸的碱基组成,其中:T_mX:待测菌株T_m值;T_mR:*E. coli* K12菌株DNA的T_m值。

1.2.3 18S rDNA序列测定:通过查阅GenBank内收录的*Fusarium*属18S rDNA序列,比较同源性,确定合成正向引物和反向引物,它们的核酸序列分别为FWD: 5' -ccaatgcccttcggggctca-3'; REV: 5' -ccacctctctgggcagctcc-3',由上海生工生物工程公司合成。以菌株核DNA为模板,经PCR扩增目的基因序列。反应体系中各种试剂的确定,参考Skouboe, P. 等方法^[8]。PCR反应在Hybaid PCR仪上进行,反应条件为:94 $^{\circ}$ C变性1min;60 $^{\circ}$ C退火1min,72 $^{\circ}$ C延长2min,25个循环,最后72 $^{\circ}$ C延长补齐10min。新鲜的PCR产物经Kit (Qigen)回收后,连接于pGEM^R-T Easy载体(Promega公司),转化*E. coli*

DH5 α 菌株, 蓝白筛选出阳性克隆, 经提取质粒, 酶切鉴定正确后, 送赛百盛公司测序。先采用通用引物 M13-F 和 M13-R 进行测序, 根据测序结果再设计另外两条引物, F-18: 5'-cctttccctctggaac-3'; 和 R-19: 5'-gcagacaatcactccacc-3' 继续测序, 直到两端序列完全对接。

2 结果

2.1 菌株 DNA 的碱基组成

以大肠杆菌 *E. coli* K12 DNA 为参比, 经热变性法所测出的 3 个分离子的 (G+C) mol% (见表 1)。3 个样品的 (G+C) mol% 均低于大肠杆菌 (51.2%)。它们的总 DNA 中 GC 含量分别为 46.5%, 46.8% 和 46.9%, 差异范围为 0.1%~0.4%; 核 DNA 中 GC 含量分别为 46.9%, 47.3% 和 47.7%, 差异范围为 0.4%~0.8%。菌株间总 DNA 与核 DNA 的 (G+C) mol% 很接近。每个样品核 DNA 的 GC 比例均略高于其总 DNA, 其中 Ag149-I 较低, 而 Ag149-III 略高于其它两个样品。

表 1 3 个菌株 DNA 碱基组成

菌号	总 DNA (G+C) mol%	核 DNA (G+C) mol%
Ag149-I	46.5	46.9
Ag149-II	46.8	47.3
Ag149-III	46.9	47.7

2.2 18S rDNA 序列

本实验以 3 个不同核型分离菌株核 DNA 分别为模板, 每个菌株经 PCR 扩增获得 18S rDNA 部分序列共计 1477bp 的单一片段。将此片段回收连接至 T-载体后测序证明, Ag149-I, Ag149-II 和 Ag149-III 菌株在这段序列上高度同源, 没有发现碱基的差异。比较 GenBank 中已登录的镰刀菌不同种的 18S rDNA 部分序列, 发现它们的碱基差异也都很小; 但在已有的资料中, 尚未见有关镰刀菌异核体分离子的 18S rDNA 序列分析的报道。上述 3 个异核体分离子的序列已送交 GenBank, 登录号分别为: AF219122, AF219123 和 AF219124。

3 讨论

为寻找真菌异核现象的缘由, 本课题组开展了多项研究, 包括分离、收集异核体菌株, 探讨同核分离子的分离依据及稳定因素。本研究以植物致病菌-棉花枯萎病菌为材料, 发现其异核体菌株和从它的菌落角变处分离得到的 3 个稳定的不同核型分离子之间, 存在着明显的表现差异, 特别是表现在致病性上。

基因组核酸的碱基组成, 是菌株表现特性的基础, 因此, 人们常常以测定菌株 DNA 的碱基组成, 作为对未知分离物的鉴定依据。Szeci A. 等^[9,10]比较镰刀菌属不同成员 DNA 的热变曲线, 采用对 11 种镰刀菌测定出的 (G+C) mol% 这一物理参数, 作为分类的依据之一。本实验根据前人的经验, 分析了 3 个不同核型菌株间 DNA (G+C) mol% 的差异。发现测试菌株间在 DNA 碱基组成上虽然有所不同, 但差异很小。无论是总 DNA 或是核 DNA, 3 个分离子之间的差异低于 0.9%。一些学者从真菌分类的角度提出, 如果两个菌株之间 GC 含量差别在 4%~5% 之间, 可以认为是同种内的不同菌株。但如两个菌株 DNA 的碱基组成相同或基本类似, 而在 DNA 序列上有差异, 也可能造成菌株之间在表现特性上的明显区别。这 3 个分离子菌株虽然在 GC 含量上的差异很小, 但有可能在 DNA 碱基排列上不同, 因而引起它们的表现差异。Ag149-I 菌株在产色素培养基上无色素产生, 且致病能力最强, 其 DNA (G+C) mol% 在 3 个分离子中最低; 而 Ag149-III 在培养过程中

产生红棕色色素, 没有致病能力, 其 DNA (G + C) mol% 最高。

3个菌株在蛋白质合成场所核糖体小亚基 18S rDNA 部分序列 1477 个碱基对中百分之百同源, 这一方面肯定了3个菌株的归属, 另一方面说明 18S rDNA 的序列不能反映异核体的不同分离离子间的差异。

研究真菌异核机制的重要前提是保证获得来源于一个异核体菌落不同角变处稳定的分离离子。本实验肯定了上述3种分离离子虽然在表观特性上很不相同, 但归属于同一系统发育地位, 没有改变它们的分类位置, 仍然属于同一种。由于3个分离离子之间在培养特征和致病性上差异显著, 因此, 目前正在进行的针对菌株核 DNA 与线粒体 DNA 的 RAPD 分子标记实验有可能提供异核体及其不同核型分离离子间在 DNA 序列上的差异。同时, mRNA 差异显示实验也将为分离致病基因提供线索。

参考文献

- [1] Min Y N, Lin P C, Yu T F. *Sinenta Sinica*, 1966, 15 (3): 371 ~ 378.
- [2] 徐孝华, 顾桂芬, 俞大绥. *真菌学报*, 1988, 7 (3): 160 ~ 165.
- [3] 陈希, 李秀玉, 顾耀祖. *微生物学报*, 1996, 36 (5): 385 ~ 388.
- [4] Mattila T, Paavanen S, Hannukkala A, *et al.* *Plant Pathology*, 1996, 45: 126 ~ 134.
- [5] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. *Molecular Cloning: A laboratory Manual*. 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory: Cold Spring Harbor, NY. 1989.
- [6] Marmur J, Doty P. *Journal of Molecular Biology*, 1962, 5, 109 ~ 118.
- [7] English J T, Laday M, Bakonyi J, *et al.* *Mycological Research*, 1999, 103 (8): 1003 ~ 1008.
- [8] Skouboe P, Frisvad J C, Taylor J W, *et al.* *Mycological Research*, 1999, 103 (7): 873 ~ 881.
- [9] Szecsi A, Dobrovolszky A. *Mycopathologica*, 1985, 89 (2): 95 ~ 100.
- [10] Szecsi A, Dobrovolszky A. *Mycopathologica*, 1985, 89 (2) © 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>