

基于 RAPD 标记分析葡萄孢属类似真菌 *Amphobotrys ricini* 的遗传多样性

张蕊¹ 于琳² 李国庆¹ 张静¹

1. 华中农业大学植物科学技术学院/湖北省作物病害监测和安全控制重点实验室/
农业微生物学国家重点实验室, 武汉 430070;

2. 广东省农业科学院植物保护研究所/广东省植物保护新技术重点实验室, 广州 510640

摘要 采用 RAPD 分子标记对我国 15 个地区 2 种寄主植物(铁苋菜和蓖麻)上分离得到的葡萄孢属类似真菌 *Amphobotrys ricini* 的 81 个菌株以及来自美国的 1 个 *A. ricini* 菌株进行了遗传多样性分析。结果显示:筛选出的 8 条 RAPD 引物共扩增出 63 条 DNA 带,其中有 49 条 DNA 条带为多态性条带,多态性条带比率(PPB)为 77.8%。多态性信息含量(PIC)值变化范围在 0.47~0.84,平均值为 0.72,观测等位基因数(N_a)的均值为 2.000 0、有效等位基因数(N_e)的均值为 1.357 7、Nei's 基因多样性指数(H)的均值为 0.227 5、Shannon 信息指数(I)的均值为 0.363 1。UPGMA 聚类分析表明,遗传相似系数变化范围在 0.55~1.00,以遗传相似系数 0.70 为阈值时,可分为 5 个类群(A、B、C、D、E),在遗传相似系数 0.74 处,B 类群又可以分为 B1 和 B2 两个亚群。分析结果表明,*A. ricini* 群体内遗传变异与菌株地理来源、寄主植物有一定相关。

关键词 葡萄孢属类似真菌; *Amphobotrys ricini*; RAPD; 遗传多样性; UPGMA

中图分类号 Q 949.3 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2018)05-0032-08

葡萄孢属类似真菌 *Amphobotrys ricini* 主要危害大戟科植物,包括蓖麻^[1]、地锦^[2]、虎刺梅^[3]、猩猩草^[4]、大戟^[5]、狗尾红和佛肚树^[6],危害植物组织造成茎腐、枯斑、花腐、果腐等症状。近几年该病害又进一步加重,Yu 等^[7]首次报道了在中国 *A. ricini* 可以侵染铁苋菜(*Acalypha australis*)引起铁苋菜灰霉病,Amiri 等^[8]首次报道 *A. ricini* 可以侵染草莓引起草莓灰霉病,由此可见,*A. ricini* 的寄主范围不仅只有大戟科的植物,该菌可能是一些重要经济作物上的潜在病原菌。

关于 *A. ricini* 的分类和命名也经历了漫长的过程。Godfrey^[9]首次从蓖麻上发现该菌,将其命名为 *Sclerotinia ricini* Godfrey; Whetzel^[10]将这个菌归到葡萄孢盘菌属(*Botryotinia*)里,根据其有性型将其命名为 *Botryotinia ricini* (Godfrey) Whetzel; Buchwald^[11]确定其无性型属于葡萄孢属(*Botrytis*),将其无性型命名为 *Botrytis ricini* N. F. Buchw.。Hennebert^[12]通过形态学比较分析葡萄孢属及其类似属真菌的特点,将该菌划分为葡萄孢属

类似真菌,根据该菌分生孢子梗形态建立了 *Amphobotrys* 属,且该属真菌只有 1 个种,将其命名为 *Amphobotrys ricini* (N. F. Buchw.) Hennebert。

目前对 *Amphobotrys ricini* 的相关研究较少,尚未有关于该病菌遗传多样性的研究。RAPD (randomly amplified polymorphic DNA) 是一种基于聚合酶链式反应,并利用 10 个碱基的单链引物对基因组 DNA 进行扩增的分子标记技术。这项技术是由 Williams 和 Welsh 带领的团队最先发展起来的^[13-14]。与随机片段长度多态性(RFLP)、扩增片段长度多态性(AFLP)、简单重复序列标记(SSR)相比,RAPD 分子标记具有操作简单、无需知道研究对象的基因组信息、无需合成特定的引物序列、能反映整个基因组的变化以及技术成本低等优点,因而被广泛应用于植物病原真菌研究中的各个领域^[15-19]。Kandan 等^[15]采用 RAPD 标记对 32 株高粱靶斑病菌(*Bipolaris sorghicola*)进行分析,从 50 条 RAPD 引物中共筛选出 10 条重复性好的引物,多态性比率为 100%,结果表明 32 株高粱靶斑病菌存在显著的

收稿日期: 2018-05-03

基金项目: 国家自然科学基金项目(31301615)

张蕊,硕士研究生,研究方向:植物病原真菌, E-mail: 2567264059@qq.com

通信作者: 张静,博士,副教授,研究方向:植物病原真菌, E-mail: zhangjing1007@mail.hzau.edu.cn

遗传分化。Gnanasing 等^[16]以 14 个稻瘟病菌 (*Magnaporthe grisea*) 作为供试菌株,采用 RAPD 和 SCAR 标记技术获得了检测和鉴定稻瘟病菌的特异 SCAR 标记引物。Khan 等^[17]利用 RAPD 技术对 3 株菜豆壳孢菌 (*Macrophomina phaseolina*) 分析发现 3 株菜豆壳孢菌存在遗传变异,且遗传变异与菌株对向日葵和鹰嘴豆的致病力有关。RAPD 技术因其方便高效的优势也广泛应用于灰霉病菌群体研究中,并取得了一些成果。范咏梅等^[18]采用 RAPD 技术分析了 12 个灰霉菌株的遗传多样性,结果表明 12 个灰霉菌株可划分为 4 个菌群,且灰霉菌株的遗传距离与菌株来源的地理距离存在明显相关性。Kumari 等^[19]采用 RAPD 技术对来自印度和尼泊尔不同寄主上的 79 个灰葡萄孢菌株的遗传变异进行分析,结果也表明不同遗传聚类群体与菌株地理来源和寄主植物存在明显相关性。范璇^[20]利用 RAPD 和 SCAR 分子标记技术获得了检测和鉴定蚕豆、葡萄以及葱属植物上 11 个灰葡萄孢物种的特异性 PCR 引物。

本研究以笔者所在课题组 2011 至 2013 年在湖北、云南及广西等地的铁苋菜和蓖麻上分离的 81 个 *A. ricini* 菌株以及 1 个来自美国的 *A. ricini* 菌株作为试验材料,前期采用形态学和 ITS 序列将其鉴定为 *A. ricini*,并发现 *A. ricini* 在 PDA 培养基上的培养形态存在明显的变异。因此,为了揭示 *A. ricini* 群体的遗传多样性规律及其与地理来源和寄主的关系,笔者从分子水平上对该病菌的遗传分化进行分析,旨在为该病害流行规律的研究和有效防治奠定理论基础。

1 材料与方法

1.1 试验菌株

试验菌株为 2011 至 2013 年从湖北、云南、广西 2 种寄主植物(铁苋菜和蓖麻)上分离得到的 81 个 *A. ricini* 菌株以及来自美国的 1 个 *A. ricini* 菌株(菌株编号:MUCL 1030,保存于 Belgian Coordinated Collections of Microorganisms)(表 1)。根据形态学(菌落形态和分生孢子显微形态)和 ITS 序列测定鉴定分析结果显示,所有菌株均为 *A. ricini*。

1.2 主要培养基

PDA 培养基:200 g 去皮马铃薯,20 g 葡萄糖,13 g 琼脂粉,加蒸馏水定容至 1 000 mL。

LB 培养基:10 g 胰蛋白胨,5 g 酵母提取物,

10 g NaCl,加去离子水定容至 1 000 mL,用 5 mol/L NaOH 调节 pH 至 7.0。

LA 培养基:在 1 000 mL LB 培养基中加入 13 g 琼脂粉。

以上培养基均经过 121 °C 高压蒸汽灭菌 25~30 min 后使用。

1.3 主要试剂

DNA 提取缓冲液:2% 十六烷基三甲基溴化铵 (CTAB, w/V), 2% 聚乙烯吡咯烷酮 (PVP, w/V), 100 mmol/L Tris-HCl (pH=8.0), 25 mmol/L 乙二胺四乙酸二钠 (Na₂EDTA), 2.0 mol/L NaCl。

电泳缓冲液 (10×TBE Buffer): 108 g Tris, 7.44 g Na₂EDTA, 55 g 硼酸,加去离子水定容至 1 000 mL。

1% 或 1.5% 琼脂糖凝胶:1 g 或 1.5 g 琼脂糖中加入 100 mL 0.5×TBE Buffer,微波炉中低火加热 3 min 至融化均匀。

1.4 菌丝的培养与收集

对于产分生孢子的菌株,将菌株接种在 PDA 平板上,20 °C 下培养 3 d,收集分生孢子,用灭菌的无菌水配置成孢子悬液,然后用移液枪吸取 500 μL 涂在铺满玻璃纸的 PDA 平板上,20 °C 培养 3 d,收集菌丝备用;对于不产生分生孢子的菌株,将菌株接种于 PDA 平板上,20 °C 下培养 3 d,挑取菌丝边缘的鲜嫩菌丝转接到铺满玻璃纸的 PDA 平板上,20 °C 培养 3 d,收集菌丝备用。

1.5 基因组 DNA 的提取和检测

将收集的菌丝在液氮中研磨成粉末,采用 CTAB 法提取病原菌基因组 DNA^[21]。使用 1% 的琼脂糖凝胶电泳对提取的 DNA 进行检测,同时用超微量分光光度计(岛津 BioSpec-nano)检测提取的 DNA 的 OD₂₆₀/OD₂₈₀ 值在 1.9~2.0,纯度较好,可用于 RAPD 分析。将所有菌株的 DNA 质量浓度稀释为 100 ng/μL,置于 -20 °C 冰箱保存备用。

1.6 RAPD 引物筛选

用于初筛的 50 条 RAPD 随机引物^[18,20,22]由北京奥科股份有限公司合成,以不同来源的 8 个 *A. ricini* 菌株 (EZA-32、QJB-1a、PE-1、XTA-1a、JZA-5a、SYA-2b、WHA-1、HCA-9a) 作为 RAPD 引物筛选的供试菌,然后对产物进行电泳检测,选取重复性高、条带多且清晰的引物,对产生 3 条以上 DNA 条带的初筛选引物进行 PCR 扩增,并重复 3

表 1 供试菌株信息

Table 1 Information of strains used in this study

菌株 Isolate	寄主 Host	采集地点 Location of collection	采集时间 Date of collection	UPGMA 归类 UPGMA type
EZA-19	铁苋菜 <i>Acalypha australis</i>	湖北鄂州 E'zhou, Hubei	2012.09.25	A
EZA-21	铁苋菜 <i>Acalypha australis</i>	湖北鄂州 E'zhou, Hubei	2012.09.25	A
EZA-22	铁苋菜 <i>Acalypha australis</i>	湖北鄂州 E'zhou, Hubei	2012.09.25	A
EZA-24	铁苋菜 <i>Acalypha australis</i>	湖北鄂州 E'zhou, Hubei	2012.10.11	A
EZA-28	铁苋菜 <i>Acalypha australis</i>	湖北鄂州 E'zhou, Hubei	2013.09.16	A
EZA-33	铁苋菜 <i>Acalypha australis</i>	湖北鄂州 E'zhou, Hubei	2011.10.15	A
EZA-27	铁苋菜 <i>Acalypha australis</i>	湖北鄂州 E'zhou, Hubei	2013.09.16	D
EZA-32	铁苋菜 <i>Acalypha australis</i>	湖北鄂州 E'zhou, Hubei	2013.09.27	E
TMA-3b	铁苋菜 <i>Acalypha australis</i>	湖北天门 Tianmen, Hubei	2011.10.12	A
TMA-4b	铁苋菜 <i>Acalypha australis</i>	湖北天门 Tianmen, Hubei	2011.10.12	A
TMB-5a	铁苋菜 <i>Acalypha australis</i>	湖北天门 Tianmen, Hubei	2011.10.12	A
TMB-1b	铁苋菜 <i>Acalypha australis</i>	湖北天门 Tianmen, Hubei	2011.10.12	A
TMB-4b	铁苋菜 <i>Acalypha australis</i>	湖北天门 Tianmen, Hubei	2011.10.12	A
TMB-5b	铁苋菜 <i>Acalypha australis</i>	湖北天门 Tianmen, Hubei	2011.10.12	A
QJA-1a	铁苋菜 <i>Acalypha australis</i>	湖北潜江 Qianjiang, Hubei	2011.10.11	A
QJA-1b	铁苋菜 <i>Acalypha australis</i>	湖北潜江 Qianjiang, Hubei	2011.10.11	A
QJB-1a	铁苋菜 <i>Acalypha australis</i>	湖北潜江 Qianjiang, Hubei	2011.10.12	A
QJB-4a	铁苋菜 <i>Acalypha australis</i>	湖北潜江 Qianjiang, Hubei	2011.10.12	A
QJC-1a	铁苋菜 <i>Acalypha australis</i>	湖北潜江 Qianjiang, Hubei	2011.10.11	A
QJC-3a	铁苋菜 <i>Acalypha australis</i>	湖北潜江 Qianjiang, Hubei	2011.10.11	A
QJC-1b	铁苋菜 <i>Acalypha australis</i>	湖北潜江 Qianjiang, Hubei	2011.10.11	A
GAA-1a	铁苋菜 <i>Acalypha australis</i>	湖北公安 Gong'an, Hubei	2011.10.12	A
GAA-2a	铁苋菜 <i>Acalypha australis</i>	湖北公安 Gong'an, Hubei	2011.10.12	A
GAA-3a	铁苋菜 <i>Acalypha australis</i>	湖北公安 Gong'an, Hubei	2011.10.12	A
GAA-2b	铁苋菜 <i>Acalypha australis</i>	湖北公安 Gong'an, Hubei	2011.10.12	A
SYA-4a	铁苋菜 <i>Acalypha australis</i>	湖北十堰 Shiyan, Hubei	2011.10.12	A
SYA-5a	铁苋菜 <i>Acalypha australis</i>	湖北十堰 Shiyan, Hubei	2011.10.12	A
SYA-2b	铁苋菜 <i>Acalypha australis</i>	湖北十堰 Shiyan, Hubei	2011.10.12	A
SYA-5b	铁苋菜 <i>Acalypha australis</i>	湖北十堰 Shiyan, Hubei	2011.10.12	A
SYA-2d	铁苋菜 <i>Acalypha australis</i>	湖北十堰 Shiyan, Hubei	2011.10.12	A
XTA-1a	铁苋菜 <i>Acalypha australis</i>	湖北仙桃 Xiantao, Hubei	2011.10.11	A
XTA-3a	铁苋菜 <i>Acalypha australis</i>	湖北仙桃 Xiantao, Hubei	2011.10.11	A
XTA-9a	铁苋菜 <i>Acalypha australis</i>	湖北仙桃 Xiantao, Hubei	2011.10.11	A
XTA-10a	铁苋菜 <i>Acalypha australis</i>	湖北仙桃 Xiantao, Hubei	2011.10.11	A
XTA-11a	铁苋菜 <i>Acalypha australis</i>	湖北仙桃 Xiantao, Hubei	2011.10.11	A
XTA-1b	铁苋菜 <i>Acalypha australis</i>	湖北仙桃 Xiantao, Hubei	2011.10.11	A
XTB-4b	铁苋菜 <i>Acalypha australis</i>	湖北仙桃 Xiantao, Hubei	2011.10.11	A
JZA-5a	铁苋菜 <i>Acalypha australis</i>	湖北荆州 Jingzhou, Hubei	2011.10.13	A
JZA-6a	铁苋菜 <i>Acalypha australis</i>	湖北荆州 Jingzhou, Hubei	2011.10.13	A
JZA-2b	铁苋菜 <i>Acalypha australis</i>	湖北荆州 Jingzhou, Hubei	2011.10.13	A
JZA-4b	铁苋菜 <i>Acalypha australis</i>	湖北荆州 Jingzhou, Hubei	2011.10.13	A
WHA-1	铁苋菜 <i>Acalypha australis</i>	湖北武汉 Wuhan, Hubei	2011.10.17	A
WHA-8	铁苋菜 <i>Acalypha australis</i>	湖北武汉 Wuhan, Hubei	2011.12.20	A
WHA-11	铁苋菜 <i>Acalypha australis</i>	湖北武汉 Wuhan, Hubei	2012.11.12	A
WHA-3b	铁苋菜 <i>Acalypha australis</i>	湖北武汉 Wuhan, Hubei	2011.11.31	A
WHB-1a	铁苋菜 <i>Acalypha australis</i>	湖北武汉 Wuhan, Hubei	2011.10.17	A
WHB-4a	铁苋菜 <i>Acalypha australis</i>	湖北武汉 Wuhan, Hubei	2011.10.17	A
WHB-1b	铁苋菜 <i>Acalypha australis</i>	湖北武汉 Wuhan, Hubei	2011.10.17	A
WHB-3b	铁苋菜 <i>Acalypha australis</i>	湖北武汉 Wuhan, Hubei	2011.10.17	A
HCA-9a	铁苋菜 <i>Acalypha australis</i>	湖北汉川 Hanchuan, Hubei	2011.10.10	A
HCA-5b	铁苋菜 <i>Acalypha australis</i>	湖北汉川 Hanchuan, Hubei	2011.10.10	A
HCA-8b	铁苋菜 <i>Acalypha australis</i>	湖北汉川 Hanchuan, Hubei	2011.10.10	A
HCA-14b	铁苋菜 <i>Acalypha australis</i>	湖北汉川 Hanchuan, Hubei	2011.10.10	A
HCA-18b	铁苋菜 <i>Acalypha australis</i>	湖北汉川 Hanchuan, Hubei	2011.10.10	A
HCA-21b	铁苋菜 <i>Acalypha australis</i>	湖北汉川 Hanchuan, Hubei	2011.10.10	A
HCB-5a	铁苋菜 <i>Acalypha australis</i>	湖北汉川 Hanchuan, Hubei	2011.10.10	A

续表 1 Continued Table 1

菌株 Isolate	寄主 Host	采集地点 Location of collection	采集时间 Date of collection	UPGMA 归类 UPGMA type
HCB-5b	铁苋菜 <i>Acalypha australis</i>	湖北汉川 Hanchuan, Hubei	2011.10.10	A
ZJA-2a	铁苋菜 <i>Acalypha australis</i>	湖北枝江 Zhijiang, Hubei	2011.10.13	A
ZJA-3a	铁苋菜 <i>Acalypha australis</i>	湖北枝江 Zhijiang, Hubei	2011.10.13	A
ZJA-2b	铁苋菜 <i>Acalypha australis</i>	湖北枝江 Zhijiang, Hubei	2011.10.13	A
ZJA-6b	铁苋菜 <i>Acalypha australis</i>	湖北枝江 Zhijiang, Hubei	2011.10.13	A
QCA-2a	铁苋菜 <i>Acalypha australis</i>	湖北蕲春 Qichun, Hubei	2011.10.16	A
QCA-3a	铁苋菜 <i>Acalypha australis</i>	湖北蕲春 Qichun, Hubei	2011.10.16	A
QCA-1b	铁苋菜 <i>Acalypha australis</i>	湖北蕲春 Qichun, Hubei	2011.10.16	A
QCA-3b	铁苋菜 <i>Acalypha australis</i>	湖北蕲春 Qichun, Hubei	2011.10.16	A
HGA-2a	铁苋菜 <i>Acalypha australis</i>	湖北黄冈 Huanggang, Hubei	2011.10.24	A
HGA-3a	铁苋菜 <i>Acalypha australis</i>	湖北黄冈 Huanggang, Hubei	2011.10.24	A
HGA-2b	铁苋菜 <i>Acalypha australis</i>	湖北黄冈 Huanggang, Hubei	2011.10.24	A
ZXA-2	铁苋菜 <i>Acalypha australis</i>	湖北钟祥 Zhongxiang, Hubei	2012.09.27	A
ZXA-3	铁苋菜 <i>Acalypha australis</i>	湖北钟祥 Zhongxiang, Hubei	2012.09.27	A
ZXA-4	铁苋菜 <i>Acalypha australis</i>	湖北钟祥 Zhongxiang, Hubei	2012.09.27	A
PE-1	蓖麻 <i>Ricinus communis</i> L.	云南普洱 Pu'er, Yunnan	2012.11.23	(B1/B)
PE-2	蓖麻 <i>Ricinus communis</i> L.	云南普洱 Pu'er, Yunnan	2012.11.23	(B1/B)
PE-3	蓖麻 <i>Ricinus communis</i> L.	云南普洱 Pu'er, Yunnan	2012.11.23	(B1/B)
PE-4	蓖麻 <i>Ricinus communis</i> L.	云南普洱 Pu'er, Yunnan	2012.11.23	(B1/B)
PE-5	蓖麻 <i>Ricinus communis</i> L.	云南普洱 Pu'er, Yunnan	2012.11.23	(B1/B)
PE-6	蓖麻 <i>Ricinus communis</i> L.	云南普洱 Pu'er, Yunnan	2012.11.23	(B1/B)
PE-7	蓖麻 <i>Ricinus communis</i> L.	云南普洱 Pu'er, Yunnan	2012.11.23	(B1/B)
PE-8	蓖麻 <i>Ricinus communis</i> L.	云南普洱 Pu'er, Yunnan	2012.11.23	(B1/B)
PE-10	蓖麻 <i>Ricinus communis</i> L.	云南普洱 Pu'er, Yunnan	2012.11.23	(B1/B)
TL-11	蓖麻 <i>Ricinus communis</i> L.	广西田林 Tianlin, Guangxi	2012.02.09	(B2/B)
MUCL 1030	蓖麻 <i>Ricinus communis</i> L.	美国 USA	—	C

次。对产物进行电泳检测，从而筛选出稳定的随机引物进行下一步的试验。

1.7 RAPD-PCR 扩增

对反应条件和程序进行优化，确定的 PCR 反应体系为 25 μ L，包括 12.5 μ L Master Mix(擎科)，20 μ mol/L 引物，50 ng 模板 DNA，扩增反应在热循环仪(S1000™ Thermal Cycler)上进行。扩增程序为：94 $^{\circ}$ C，5 min，1 个循环；94 $^{\circ}$ C，1 min；36 $^{\circ}$ C，2 min；72 $^{\circ}$ C，2 min，45 个循环，最后 72 $^{\circ}$ C，10 min，16 $^{\circ}$ C 保存^[19]。反应结束后，PCR 产物用 1.5% 的琼脂糖胶在 0.5 \times TBE 缓冲液中电泳 1 h(120 V)。经 Gel-Red 染色后，在凝胶成像系统中(培清 JS-680D 凝胶成像分析仪)照相。

1.8 数据处理与分析

根据 RAPD 扩增结果读取有多态性的 DNA 条带，对于所有的多态性 DNA 条带进行记录，其中有 DNA 条带的记为“1”，没有 DNA 条带的记为“0”，构建“0”和“1”组成的矩阵表。然后记录每条引物扩增的总 DNA 条带数和多态性 DNA 条带数，根据 PIC_CALC Version 0.6 软件计算多态信息含量(PIC)的值^[23]。使用 POPGENE version1.32 软件计算群体的遗传多样性参数(观测等位基因数 N_a 、有效等位基因数 N_e 、Nei's 基因多样性指数 H 和

Shannon 信息指数 I)^[24]。使用 NTSYSpc2.1e 软件中的 SAHN 程序和 UPGMA 方法进行聚类分析，并通过 Tree plot 模块生成聚类图^[25]。

2 结果与分析

2.1 RAPD 扩增结果

选取不同来源的 8 个 *A. ricini* 菌株(EZA-32、QJB-1a、PE-1、XTA-1a、JZA-5a、SYA-2b、WHA-1、HCA-9a)用于随机引物初筛，结果显示：共获得 8 条随机引物可以产生稳定清晰的 DNA 条带。随机引物的编号及 RAPD 扩增结果见表 2。利用筛选出的 8 条随机引物分别对 82 个供试菌株进行 RAPD-PCR 扩增，扩增片段长度范围在 100~1 500 bp，总共产生 63 条清晰的 DNA 条带，49 条为多态性 DNA 条带，多态性 DNA 条带比率为 77.8%。8 条随机引物扩增产生的总的 DNA 条带数最多为 9 条，最少为 6 条，每条随机引物平均扩增出 7.9 条 DNA 条带，多态性 DNA 条带数最多为 8 条，最少为 4 条，每条随机引物平均可扩增出 6.1 条多态性 DNA 条带。8 条随机引物的多态性比率存在差异，其中，引物 OPA-02 多态性百分率最高，达 88.9%，引物 OPA-11 和 S4 次之，为 87.5%，引物 OPF-10 多态性百分率最低，为 55.6%。

表 2 筛选出的 8 条 RAPD 引物扩增结果

Table 2 The amplification results of eight RAPD primers screened

引物 Primers	总条带数 Total bands	多态性条带数 Polymorphic bands	多态性比率/% Polymorphic rate	扩增片段大小/bp Fragments size	参考文献 Reference
S1	7	5	71.4	250~1 000	[18]
S4	8	7	87.5	100~1 400	[18]
S5	6	4	66.7	380~1 000	[18]
OPF-10	9	5	55.6	125~1 000	[18]
OPA-02	9	8	88.9	250~1 500	[20]
OPA-11	8	7	87.5	200~1 500	[20]
OPA-13	9	7	77.8	150~1 200	[20]
OPW-04	7	6	85.7	270~1 200	[20]
总计 Total	63	49	77.8	100~1 500	

2.2 遗传多样性分析

多态信息含量(PIC)是衡量多态性水平的一个指标,不同引物之间的 PIC 值存在差异,其中引物 S4 的值最高,为 0.84,引物 S5 的值最低,为 0.47(表 3),平均值为 0.72,说明不同的引物之间多态性水平存在较大差异,A. ricini 群体具有相对较高的遗传多态性。由 POPGEN 软件分析可得观测等位

基因数(N_a)为 2.000 0,有效等位基因数(N_e)值最高为 1.651 4,最低为 1.128 8,平均值为 1.357 7,Nei's 基因多样性指数(H)最高为 0.355 9,最低为 0.106 6,平均值为 0.227 5,Shannon 信息指数(I)最高为 0.515 9,最低为 0.205 1,平均值为 0.363 1,其中,8 条随机引物中, N_e 值、 H 值和 I 值最高的引物为 S4,最低的引物为 OPW-04(表 3)。

表 3 8 条 RAPD 引物的遗传多样性参数

Table 3 Genetic diversity parameters of eight RAPD primers

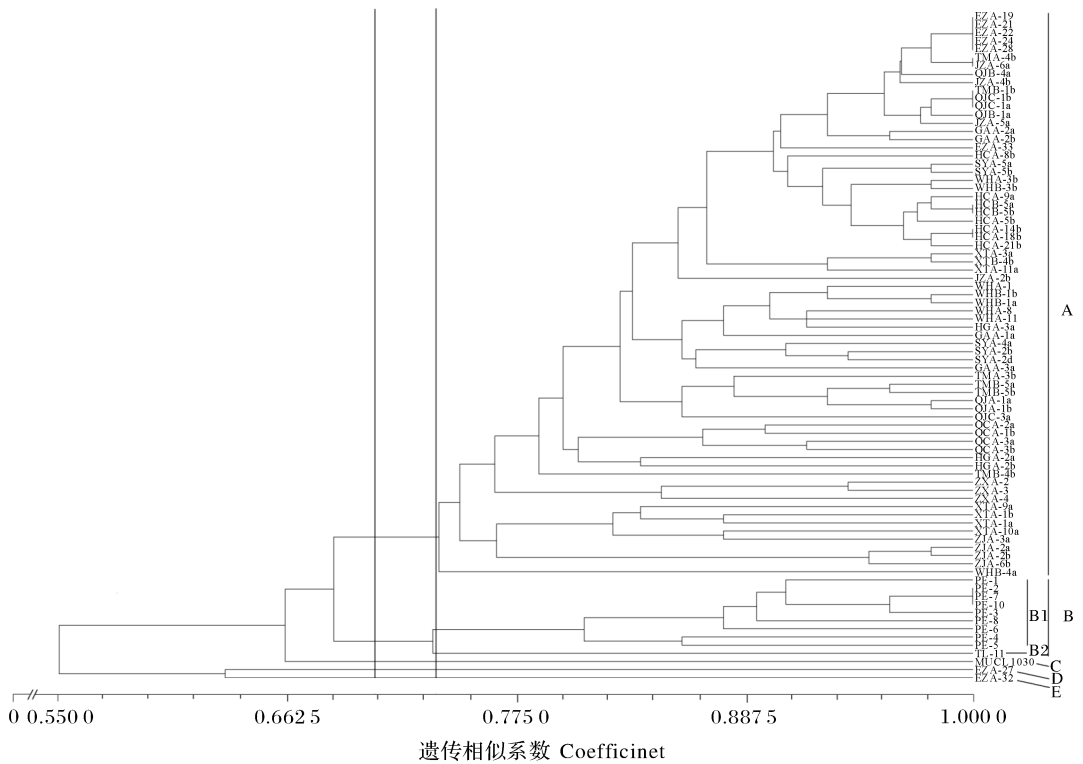
引物 Primers	多态性信息含量/% Polymorphism information content (PIC)	观测等位基因数 Observed number of alleles(N_a)	有效等位基因数 Effective number of alleles (N_e)	基因多样性指数 Gene diversity index (H)	Shannon 指数 Shannon index (I)
S1	0.72	2.000 0	1.448 4	0.296 0	0.465 6
S4	0.84	2.000 0	1.651 4	0.355 9	0.515 9
S5	0.47	2.000 0	1.330 2	0.197 4	0.313 3
OPF-10	0.75	2.000 0	1.395 8	0.264 2	0.425 5
OPA-02	0.79	2.000 0	1.135 7	0.113 4	0.215 4
OPA-11	0.69	2.000 0	1.300 6	0.194 2	0.317 2
OPA-13	0.78	2.000 0	1.470 4	0.292 2	0.447 1
OPW-04	0.73	2.000 0	1.128 8	0.106 6	0.205 1
平均值 Average	0.72	2.000 0	1.357 7	0.227 5	0.363 1

2.3 RAPD 聚类分析

由图 1 可以看出,在相似性系数 0.70 处,82 个供试菌株划分为 5 个类群(A、B、C、D、E),其中 A 类群包括了 97% 的来自湖北省的菌株,总共包括 69 个菌株,分别采自湖北省的 13 个地区,来自同一地区的大部分菌株聚在一起,少部分具有相同地理来源的菌株聚在不同的亚群中。例如来自湖北汉川的 8 个菌株聚在 2 个亚群中,来自湖北武汉的 8 个菌株聚在 4 个亚群中,来自湖北天门的 6 个菌株则聚在 5 个亚群中,因此,不同地理来源的菌株具有不同程度的遗传分化。B 类群包括来自云南普洱的 9 个菌株以及广西田林的 1 个菌株 TL-11。C 类群包括来自美国的 1 个菌株 MUCL 1030,而 D 类群和 E 类群分别包括 1 个来自湖北鄂州的菌株 EZA-27 和

EZA-32。在相似系数为 0.74 时,B 类群又可分为 2 个亚类,B1 亚类包括来自云南普洱的全部菌株,B2 亚类为来自广西田林的 1 个菌株 TL-11。因此,供试菌株 RAPD 类群的划分与菌株的地理来源具有一定的相关性(图 1,表 1)。

供试菌株 RAPD 类群的划分与菌株的寄主来源具有一定的相关性(图 1,表 1)。分离自铁苋菜的 71 个菌株被划分为 3 个 RAPD 类群(A、D、E),其中 97% 的菌株聚在 A 类群中。分离自蓖麻的 11 个菌株被划分为 2 个 RAPD 类群(B、C),其中 90.9% 的菌株聚在 B 类群中。由此可见,不同寄主来源的 A. ricini 群体已产生明显的遗传分化,且遗传多样性较为丰富。



A-E:在遗传相似系数 0.70 处划分的 5 个 RAPD 类群;B1、B2: B 类群在遗传相似系数 0.74 处划分的 2 个亚群。A-E:82 *A. ricini* strains could be divided into five RAPD groups at the GS of 0.70; B₁、B₂: B group could be divided into two subgroups at the GS of 0.74.

图 1 82 个 *A. ricini* 菌株的 UPGMA 聚类分析图

Fig.1 UPGMA cluster analysis dendrogram for 82 *A. ricini* strains

3 讨论

传统的形态学多样性分析能从表型上反映菌株之间的差异,但是不能体现遗传背景的差异,容易受到外界环境的干扰。RAPD 分子标记由于其方便高效,无需知道研究对象的基因组信息便可以反映出研究对象的遗传差异,因此在遗传多样性研究中具有广泛的应用。但是由于 RAPD 分子标记是通过具有 10 个碱基的随机引物来体现遗传差异的,因此筛选多态性强、重复性好的 RAPD 引物尤为重要。

本研究选用的 50 条 RAPD 随机引物中,获得的 8 条随机引物表现出较好的多态性,显示了 RAPD 分子标记的高效性。其中 8 条随机引物对每个供试菌株扩增的条带数不等,在 6~9 条之间,扩增片段的 DNA 大小为 100~1 500 bp,不同引物产生多态性片段的比例存在差异(表 2)。由表 2 可知,引物 OPA-02 多态性位点频率达 88.9%,而引物 OPF-10 为 55.6%,说明 *A. ricini* 菌株间存在较高的遗传分化。同一 RAPD 引物对不同物种的扩增结果存在较大差异,例如在 *A. ricini* 的近缘物种灰

葡萄孢(*Botrytis cinerea*)中,引物 S1 可以产生 11 条 DNA 条带,全部为多态性条带,多态性位点频率为 100%;引物 S4 可以产生 14 条 DNA 条带,多态性频率为 85.7%;引物 S5 可以产生 11 条 DNA 条带,多态性频率为 90.9%^[17],引物 S1 和 S5 对灰葡萄孢具有更好的多态性,而引物 S4 对 *A. ricini* 的多态性频率较高,为 87.5%(表 2)。因此,本研究中使用的 RAPD 分子标记体系,对研究分析 *A. ricini* 种内的遗传多样性及鉴定具有重要的参考意义。

筛选出的 8 条随机引物共扩增出 63 条 DNA 条带,其中多态性条带 49 条,多态性比率为 77.8%(表 2),多态性信息含量(PIC)值变化范围在 0.47~0.84 之间,平均值为 0.72,说明菌株之间的多态性较高(表 3)。Shannon 指数(*I*)是衡量群体遗传多样性水平的一个参数,值越大,表明群体的遗传多样性水平越高^[26-27],8 条引物的 Shannon 指数(*I*)变化范围为 0.205 1~0.515 9,平均值为 0.363 1,其中引物 S4 的 *I* 值最大(表 3),说明相比较其他引物来说,引物 S4 可以更好地衡量 *A. ricini* 群体的遗传多样性水平。8 条引物的基因多样性指数(*H*)在

0.106 6~0.355 9 之间,其中引物 S4 值最高,引物 OPW-04 值最低(表 3)。8 条引物的 Shannon 多样性指数的高低与其基因多样性指数变化一致。

在遗传相似系数 0.74 处,97%的来自湖北的菌株聚为一支,100%的来自云南的菌株聚为一支,来自广西的 1 个菌株 TL-11 菌株聚为一支,来自美国的菌株 MUCL 1030 单独聚为一支。说明相同地理来源的菌株其遗传背景更为相似,在聚类上趋为一支,这可能与不同地区的气候条件、种植模式和农药使用情况等因素相关,使得该病原菌在遗传进化上显示不同的分化程度,本研究结果表明,*A. ricini* 菌株 RAPD 类群的划分与菌株的采集地点具有一定的相关性。另外,在遗传相似系数 0.70 处,97%的分离自铁苋菜的菌株聚为一支,91%的分离自蓖麻的菌株聚为一支,这可能是由于寄主与病原菌在长期的相互作用中,寄主影响了病原菌的遗传结构,从而使病原菌群体显示出不同的分化程度,此研究结果表明,*A. ricini* 菌株 RAPD 类群的划分与菌株的寄主来源也具有一定的相关性。另外在该研究中还发现来自湖北鄂州的分离自铁苋菜上的 2 个菌株 EZA-27 和 EZA-32 与湖北省内的其他分离自铁苋菜上的菌株存在较大的遗传分化,在聚类上分为独立的 2 支,具体原因尚待进一步的研究。

本研究用于遗传多样性分析的菌株 86.6%采自于湖北省铁苋菜,供试菌株的地理分布和分离寄主的不均衡,以及采样过程中的人为误差都可对研究结果产生影响,另外,筛选的随机引物是否能真实地反映研究群体的遗传差异也会对试验结果产生重要的影响。因此,在后续的研究中需要均衡菌株的地理来源和寄主来源,进一步增加菌株的数量,此外还要增加初筛引物的数量进而筛选出更稳定以及多态性好的引物。总之,不同寄主植物种类、数量以及植物所处地理环境的不同均可能对 *A. ricini* 种群遗传分化起作用,下一步有待从多因素分析探讨 *A. ricini* 种群遗传分化原因。

参 考 文 献

- [1] GODFREY G H. Gray mold of castor bean [J]. Journal of agricultural research, 1923, 23: 679-716.
- [2] HOLCOMB G E, JONES J P, WELLS D W, et al. Blight of prostate spurge and cultivated Poinsettia caused by *Amphobotrys ricini* [J]. Plant disease, 1989, 73: 74-75.
- [3] SANOAMUANG M. First report of gray mold blight caused by *Amphobotrys ricini* on crown of thorns in Thailand [J]. Plant disease, 1996, 80: 223. doi:10.1094/PD-80-0223D.
- [4] BARRETO R W, EVANS H C. Fungal pathogens of *Euphorbia heterophylla* and *E. hirta* in Brazil and their potential as weed biocontrol agents [J]. Mycopathologia, 1998, 141: 21-36.
- [5] ALWADIE H M, BAKA Z A M. New records of fungal pathogens of *Euphorbia inarticulata* from Aseer region, south-west Saudi Arabia [J]. Archives of phytopathology and plant protection, 2003, 36: 195-209.
- [6] LIMA B V, SOARES D J, PERREIRA O L, et al. Natural infection of *Acalypha hispida* and *Jatropha podagrica* inflorescences by *Amphobotrys ricini* in Brazil [J]. Australasian plant disease notes, 2008, 3: 5-7.
- [7] YU L, ZHANG J, XU F, et al. First report of *Amphobotrys ricini* causing gray mold disease on *Acalypha australis* in central China [J]. Plant disease, 2012, 96 (3): 460. http://dx.doi.org/10.1094/PDIS-11-11-0929.
- [8] AMIRI A, ONOFRE R B, PERES N A, et al. First report of gray mold caused by *Botryotinia ricini* (*Amphobotrys ricini*) on strawberry in United States [J]. Plant disease, 2016, 100 (5): 1007-1008.
- [9] GODFREY G H. *Sclerotinia ricini* nov sp. on the castor bean (*Ricinus communis* L.) [J]. Phytopathology, 1919, 9: 565-567.
- [10] WHETZEL H H. A synopsis of the genera and species of the *Sclerotiniaceae*, a family of stromatic inoperculate discomycetes [J]. Mycologia, 1945, 37(6): 648-714.
- [11] BUCHWALD N F. Studies in the *Sclerotiniaceae*. I. Taxonomy of the *Sclerotiniaceae* [J]. Aarsskrift, 1949, 32: 75-191.
- [12] HENNEBERT G L. *Botrytis* and *Botrytis*-like genera [J]. Persoonia, 1973, 7: 183-204.
- [13] WILLIAMS J G K, KUBELIK A R, LIVAK K J, et al. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers [J]. Nucleic acids research, 1990, 18 (22): 6531-6535.
- [14] WELSH J, HONEYCUTT R J, MCCLELLAND M, et al. Parentage determination in maize hybrids using the arbitrarily primed polymerase chain reaction (AP-PCR) [J]. Theoretical and applied genetics, 1991, 82(4): 473-475.
- [15] KANDAN A, AKHTAR J, SINGH B, et al. Genetic diversity analysis of fungal pathogen *Bipolaris sorghicola* infecting *Sorghum bicolor* in India [J]. Journal of environmental biology, 2016, 37(6): 1323-1330.
- [16] GNANASING L G, MANIKANDAN R, RAGUCHANDER T, et al. SCAR marker specific to detect *Magnaporthe grisea* infecting finger millets (*Eleusine coracana*) [J]. Journal of applied microbiology, 2016, 121(3): 778-786.
- [17] KHAN A N, SHAIR F, MALIK K, et al. Molecular identification and genetic characterization of *Macrophomina phaseolina* strains causing pathogenicity on sunflower and chickpea [J]. Frontiers in microbiology, 2017, 8: 1309. ttps://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01309.

- [18] 范咏梅, 陈林凤, 郝敬喆, 等. 新疆灰霉病菌多态性及其致病力分化分析[J]. 中国生态农业学报, 2010, 18(3): 548-555.
- [19] KUMARI S, TAYAL P, SHARMA E, et al. Analyses of genetic and pathogenic variability among *Botrytis cinerea* isolates [J]. Microbiological research, 2014, 169: 862-872.
- [20] 范璇. 主要果蔬作物灰霉病菌分子检测及鉴定研究[D]. 武汉: 华中农业大学, 2015.
- [21] MÖLLER E M, BAHNWEIG G, SANDERMANN H, et al. A simple and efficient protocol for isolation of high molecular weight DNA from filamentous fungi, fruit bodies, and infected plant tissues [J]. Nucleic acids research, 1992, 20: 6115-6116.
- [22] 吴德喜, 王扬, 王学英, 等. 葡萄孢菌遗传多态性 DNA 分子指纹 RAPD 分析[J]. 西南农业大学学报, 2003, 25(4): 290-292.
- [23] 杨柳, 汪斌, 童治军, 等. 25 份普通烟草草质资源遗传多样性的 SSR 标记分析[J]. 福建农林大学学报, 2013, 42(2): 171-175.
- [24] 刘娟, 廖康, 曼苏尔·那斯尔, 等. 新疆杏品种(系)遗传多样性分析及 DNA 指纹图谱库构建[J]. 中国农业科学, 2015, 48(4): 748-758.
- [25] 白盼, 李荣华, 郭培国, 等. 19 个亚洲国家大麦种质材料的遗传多样性分析[J]. 麦类作物学报, 2012, 32(2): 215-222.
- [26] 范净, 陈启亮, 杨晓平, 等. 砂梨种质资源花粉量及花粉萌发率的遗传多样性分析[J]. 华中农业大学学报, 2016, 35(4): 20-24.
- [27] 李廷刚, 张路, 周善跃, 等. 山东省番茄灰霉病菌种类与遗传多样性研究[J]. 中国农学通报, 2013, 29(10): 137-143.

RAPD-based analysis of genetic diversity of *Botrytis*-like fungus *Amphobotrys ricini*

ZHANG Rui¹ YU Lin² LI Guoqing¹ ZHANG Jing¹

1. College of Plant Science and Technology, Huazhong Agricultural University / The Key Laboratory of Crop Diseases Monitoring and Safety Control, Hubei Province / Provincial State Key Laboratory of Agricultural Microbiology, Wuhan 430070, China ;
2. Plant Protection Research Institute, Guangdong Academy of Agricultural Sciences / Guangdong Provincial Key Laboratory of High Technology for Plant Protection, Guangzhou 510640, China

Abstract In this study, genetic diversity among 82 *Amphobotrys ricini* strains (81 strains from castor bean *Ricinus communis* L. and copperleaf *Acalypha australis* in China, 1 strain from USA) was studied based on RAPD technology. The results showed that eight RAPD primers produced 63 DNA bands in total, of which 49 DNA bands were polymorphic DNA bands with the percentage of polymorphic DNA bands (PPB) reaching up to 77.8%. Polymorphism information content (PIC) values ranged from 0.47 to 0.84 with a mean value of 0.72. The number of observation alleles (N_a) was 2.000 0, the number of effective alleles (N_e) was 1.357 7, Nei's genetic diversity index (H) was 0.227 5 and Shannon information index (I) was 0.363 1. UPGMA cluster analysis showed that genetic similarity (GS) ranged from 0.55 to 1.00 among the 82 investigated *A. ricini* strains. Samples could be divided into 5 groups (A, B, C, D, E) at the GS of 0.70 and B group could be divided into B1 and B2 subgroups at the GS of 0.74. The RAPD groups had a certain correlation with the geographical origin and the host of the strains. In summary, the study revealed the genetic diversity of the *A. ricini* population and its relationship with geographical origin and host.

Keywords *Botrytis*-like fungus; *Amphobotrys ricini*; RAPD; genetic diversity; UPGMA

(责任编辑: 边书京)