

夏橙绿斑病原藻分离株的遗传多样性研究

王大平

(重庆文理学院 生命科学与技术学院, 重庆 永川 402160)

摘要: 从不同地域发生的夏橙绿斑病中分离出 4 株虚幻球藻, 对其进行了表型研究, 并利用 ISSR 技术对 4 株虚幻球藻分离株的遗传多样性进行了分析。结果表明: 这 4 株虚幻球藻分离株的表型存在一定差异, 并表现出多样性。从 100 个 ISSR 随机引物中筛选出 9 个引物, 共扩增出条带 98 条, 其中多态性条带数为 57 条, 多态性比率为 58.2%。虚幻球藻 CS 与虚幻球藻 JA 的遗传距离为 0.1852, 距离较近, 遗传相似性较大, 而其与另 2 株的遗传距离以及另 2 株之间的遗传距离均较远, 遗传相似性较小, 遗传分化明显, 说明从夏橙绿斑病中分离获得的 4 株虚幻球藻分离株基因型也有差异, 存在着遗传多样性。

关键词: 夏橙绿斑病; 虚幻球藻; ISSR; 遗传多样性

中图分类号: S 666.4 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0009(2010)06-0147-03

夏橙绿斑病是夏橙的主要病害之一, 在夏橙产区的夏橙叶片和果实上均有发生, 爆发时严重影响夏橙的树势、果实品质和产量, 给夏橙种植业造成巨大的经济损失。该病由绿藻门虚幻球藻属虚幻球藻 (*Apatococcus lobatus*) 寄生^[1] 所致, 关于该病原藻株间具有明显的变异和分化现象尚未见报道。2006 年 4~5 月, 课题组从不同地域夏橙树上获得了表型有一定差异的 4 株虚幻球藻分离株, 并利用 ISSR 技术对其进行了遗传多样性分析, 以期为进一步研究夏橙绿斑病及防治提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

作者简介: 王大平(1965-), 男, 四川大竹人, 博士, 教授, 现从事园艺及园林植物教学与研究。E-mail: wdp600@126.com。

基金项目: 重庆市教委重点科研资助项目(KJ051205)。

收稿日期: 2009-12-20

4 株虚幻球藻是从不同地域的夏橙树叶片和果实上的绿斑病中分离获得。4 株虚幻球藻的来源及来源地特征见表 1。

表 1 4 株虚幻球藻的来源及来源地特征

藻株代号	来源	来源地特征
CS	重庆长寿区狮子镇	该镇为丘陵地 有一长寿湖 夏橙种植在长寿湖两岸的缓坡上, 有长寿湖的大水体效应。
JA	四川江安古贤坝	该坝地势低、平坦, 夏橙种植于此坝上, 周围有长江的大水体效应。
YY	重庆云阳宝坪镇	该镇地势高, 由大山组成 夏橙种植在山的下坡位 周围无大水体效应。
ZX	重庆忠县新立镇	该镇地势高, 较平坦, 通风好, 周围无大水体效应。

1.2 试验方法

1.2.1 藻株分离与培养 将采集的田间具绿斑病的夏橙叶片、果实样本, 用无菌水冲洗多次后取其表面绿色污斑, 接种于 BG-11^[2] 固体培养基上, 于光照培养箱(温

Study of Pollen Chromosome Doubling of Asiatic Hybrids Avignon

SUN Xiao-mei, JIA Lian, YANG Hong-guang, CUI Wen-shan, WANG Ya-bin
(Shenyang Agricultural University Forestry College, Shenyang, Liaoning 110161)

Abstract: The methods to doubled pollen chromosome of *Avignon* were studied. Using flower buds of *Avignon* as materials, the meiosis processes of pollen mother cells were observed. In order to know when 2n pollen could be induced, the relations between flower buds length and pollen mother cells developmental stages were studied. Then it induced doubling pollen chromosome with various concentrations of colchicines in different treatments. The results indicated that the best time for 2n pollen induction was that the length of flower buds was 1.0~2.4 cm. The highest percentage of unreduced pollen obtained by treating flower buds for 3 days with 0.1% colchicines was 33.2%.

Key words: *Avignon*; meiosis; 2n pollen

度 25℃, 光强 400 μmol · m⁻² · s⁻¹) 中富集培养, 然后用稀释涂布平板法得到单藻落, 进而平板划线分离, 反复多次, 获得藻株的纯培养。将分离所得纯藻株接种在 BG-11 固体培养基上和添加 2 g/L 葡萄糖的 BG-11 液体培养基中, 于光照培养箱 (温度 25℃, 光强 400 μmol · m⁻² · s⁻¹) 下培养, 以备进行表型观察和提取 DNA。

1.2.2 DNA 提取 采用改良 CTAB 法³⁾ 提取基因组 DNA, 提取的 DNA 质量和浓度采用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳和紫外分光光度计测定。将其样品调整其浓度为 50 ng/μL, -20℃ 下保存。

1.2.3 ISSR 扩增 试验所用 100 条 ISSR 引物由上海生工生物工程技术有限公司合成。PCR 反应体系: 反应体积为 25 μL, 体系中包括 10× PCR buffer 2.5 μL, 25 mmol MgCl₂ 1.5 μL, 2.5 mmol dNTP 1.5 μL, 5 μmol 引物 1.2 μL, Taq DNA 聚合酶 0.25 μL, 模板 DNA 15 ng, 以双蒸灭菌水补齐至 25 μL。PCR 扩增程序: 94℃ 预变性 3 min; 进入循环, 94℃ 变性 30 s, 53℃ 退火

1 min, 72℃ 延伸 90 s 共 35 次循环; 最后 72℃ 延伸 7 min。

1.2.4 电泳检测及数据分析方法 将 PCR 扩增产物用 1.5% 的琼脂糖凝胶在 1× TBE 缓冲液中电泳, 电压为 90 V, 待溴酚蓝迁移至琼脂糖凝胶的 2/3 处, 取出胶, 在 EB 中染色 30 min, 然后用水洗 10 min, 用凝胶成像系统拍照, 记录。取重复性好且清晰的扩增条带用于统计分析。扩增带按有或无记录, 有带记为 1, 无带记为 0。根据 Nei 和 Li (1979) 的方法⁴⁾ 计算遗传距离, 然后应用 PHYLIP 软件包, 进行 UPGMA 聚类分析。

2 结果与分析

2.1 虚幻球藻分离株特点

使用 BG-11 固体培养基, 通过分离、纯化培养, 根据藻孢分离株的培养性状和在光学显微镜下观察藻孢形态特征, 经鉴定此 4 株藻分离株均属绿藻门胶毛藻科虚幻球藻属的虚幻球藻, 其表型有一定差异, 并呈现出多样性, 其特征见表 2。

表 2 4 株虚幻球藻分离株的特征

藻株代号	藻孢形状和大小	藻孢形态	色素体大小和分布	藻落特征
CS	球形, 直径 5~18 μm	单胞 或常由 2 至多个细胞叠在一起	色素体大 1 个, 侧位, 环状的有相等的 2 片	藻孢生长快, 藻落大, 藻体深绿色
JA	球形或椭圆形 直径 8~15 μm	单胞 或常由 2 至多个细胞叠在一起	色素体较大, 1 个, 侧位, 环状的多为不等的 2 片	藻孢生长较快, 藻落较大, 藻体绿色
YY	球形, 直径 6~13 μm	单胞 或偶有 2 至多个细胞叠在一起	色素体较小, 1 个, 侧位或居中	藻孢生长较慢, 藻体较小, 浅绿色
ZX	球形或椭圆形 直径 5~11 μm	单胞 或偶有 2 至多个细胞叠在一起	色素体小 1 个, 居中	藻孢生长慢, 藻落小, 藻体黄绿色

2.2 虚幻球藻分离株的 ISSR 引物筛选及多态性分析

从 100 条 ISSR 引物中筛选出扩增产物 DNA 条带比较清晰、多态性条带数目比较多的 9 条 ISSR 引物用于对 4 株虚幻球藻分离株 DNA 的 PCR 扩增。由表 3 可知, 所选的 9 条引物对 4 株材料扩增的 DNA 总条带数为 98 条, 平均每条引物的扩增条带数为 10.89 条; 多态性条带数为 57 条, 多态性比率为 58.2%; 不同引物扩增出的条带数差别较大, 少至 4 条, 多至 19 条; 扩增片段主要分布于 100~2 000 bp。这表明虚幻球藻分离株的 DNA 多态性是比较丰富的, 选用的 ISSR 随机引物能够较好地反映出供试病原藻株间的遗传多样性。图 1 为引物 857、848 和 842 对 4 株虚幻球藻分离株的扩增电泳图谱。

表 3 9 个 ISSR 引物对 4 株虚幻球藻分离株 PCR 扩增结果

引物编号	碱基序列	扩增条带数	多态性条带数	多态性条带占百分比/%
808	(AG) ₈ C	19	8	42.1
826	(AC) ₈ C	16	11	68.8
835	(AG) ₈ YC	8	5	62.5
842	(GA) ₈ YG	7	4	57.1
848	(CA) ₈ RG	9	7	77.8
851	(CA) ₈ RG	10	6	60.0
855	(AC) ₈ YT	9	5	55.6
857	(AC) ₈ YG	16	7	43.8
858	(TC) ₈ RT	4	4	100.0
合计		98	57	

注: R=(A, G) Y=(C, T)

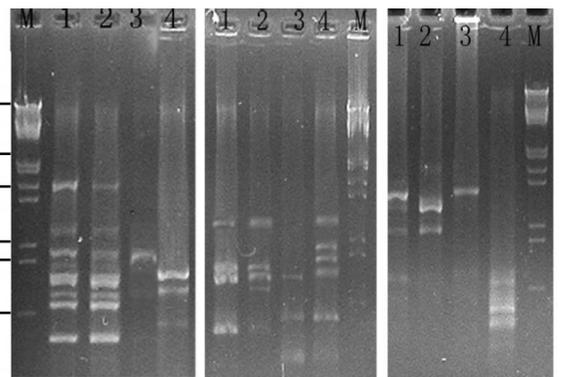


图 1 引物 857(左)、848(中)和 842(右)的扩增电泳图谱
注: 泳道 1-4: 藻株 CS; 藻株 JA; 藻株 YY; 藻株 ZX; M: 分子量标准。

2.3 虚幻球藻分离株的遗传多样性及聚类分析

对所得数据按 Nei 和 Li 的方法计算出 4 株虚幻球藻分离株之间的遗传距离 (表 4), 利用 PHYLIP 软件包根据 UPGMA 法建立聚类分析树状图 (图 2)。结果表明, 4 株虚幻球藻分离株的遗传距离变幅为 0.1852~0.9355, 平均遗传距离为 0.6969。其中藻株 CS 和藻株 JA 的遗传距离为 0.1852, 遗传距离较小, 遗传分化也较小, 遗传多样性较低, 因此遗传相似性较高, 表明它们为亲缘关系较近的 2 个分离株, 可被聚为一类; 藻株 CS 和藻株 ZX、藻株 JA 和藻株 ZX、藻株 CS 和藻株 YY 的遗传距离分别为 0.6098、0.7436 和 0.8182, 遗传距离居中;

藻株 JA 和藻株 YY、藻株 ZX 和藻株 YY 的遗传距离分别为 0.9355 和 0.8889, 遗传距离较大, 遗传相似性较低, 遗传多样性较高, 藻株间存在较大的遗传分化, 说明它们间的分子遗传背景差异较大, 这可能与病原藻生长的环境有很大的关系。

表 4 4 株虚幻球藻分离株间的遗传距离

藻株代号	CS	JA	YY	ZX
CS	0			
JA	0.1852	0		
YY	0.8182	0.9355	0	
ZX	0.6098	0.7436	0.8889	0

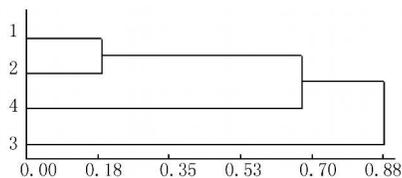


图 2 4 株虚幻球藻分离株的聚类分析图
注: 1: 藻株 CS; 2: 藻株 JA; 3: 藻株 YY; 4: 藻株 ZX。

3 讨论

我国具有丰富多样的地理及生态环境, 不同地域的虚幻球藻必然具有特定的特征。该试验从不同地域的夏橙树叶片和果实上的绿斑病中分离出 4 株虚幻球藻分离株, 通过在 BG-11 固体培养基和 BG-11 液体培养基上培养和观察, 它们不仅在藻孢形状和大小、藻孢形态以及藻孢中色素体大小和分布方面都有一定区别, 而且藻落特征方面也有一定差异, 说明 4 株虚幻球藻分离株

表型存在的差异以及呈现出的多样性可能与来自不同的地理与生态环境有很大的关系。

基因突变是病原群体产生群体基因频率改变和遗传多样性的主要原因之一^[5], 植物病原体的遗传多样性同时也是病原体适应寄主和地理气候环境的结果。从筛选出的 9 条 ISSR 引物对 4 株虚幻球藻进行 DNA 的 PCR 扩增、电泳和聚类分析结果来看, 多数引物对 4 株材料都能扩增出 4 至数条相同的特征带, 但每条引物对 4 株材料都显示出不同程度的多态性, 它们间的分子遗传背景有一定差异, 说明来自不同地域的 4 株虚幻球藻分离株在基因水平的统一性, 又由于地域间的距离和生态差异产生遗传分化, 基因型也存在差异, 有的遗传相似性较高, 有的遗传相似性较低, 从而表明虚幻球藻分离株存在着遗传多样性。今后在进一步调查分析虚幻球藻分离株遗传多样性时应适当加大样本数量, 以便使分析得出的虚幻球藻分离株遗传多样性数据更加准确。

参考文献

- [1] 王大平, 李道高. 夏橙绿斑病病原鉴定及其化学防治[J]. 植物保护学报, 2006, 33(2): 146-150.
- [2] Castenolz R W. Culturing methods for Cyanobacteria[J]. Method Enzyme 1988(3): 68-95.
- [3] 陈颖, 刘根齐, 李文彬, 等. 3 种小球藻 DNA 提取方法的比较[J]. 植物生理学通讯, 2001, 37(3): 242-244.
- [4] Nei M, Li W H. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases[J]. Proceedings of National Academy of Sciences of United States of America, 1979, 76: 5269-5273.
- [5] Gaigouri S, Bernier L, Hajlaoui M R, et al. Genetic variability and population structure of the wheat foot rot fungus *Fusarium culmorum*, in Tunisia[J]. Eur J Plant Pathol, 2003, 109(8): 807-815.

Study on Genetic Diversity of *Apatococcus lobatus* Isolated from Valencia Orange Green Spot Disease

WANG Da-ping

(Institute of Life Science and Technology, Chongqing University of Arts and Sciences, Yongchuan, Chongqing 402160)

Abstract: Four isolates of *Apatococcus lobatus* were achieved from Valencia orange green spot disease in different areas. Their phenotypes were studied. And the genetic diversity of 4 strains *Apatococcus lobatus* were analyzed by using ISSR techniques. The results showed that the four isolates of *Apatococcus lobatus* had phenotypic difference and abundant diversity. Among the 100 random primers tested, 9 primers were found to generate distinct DNA fragments. There were 98 bands among 4 isolates of *Apatococcus lobatus* and 57 bands (58.2%) belonged to polymorphism bands. Genetic distance was 0.1852 between CS strain and JA strain of *Apatococcus lobatus*, which had the most genetic comparability. While a little genetic comparability was also observed between its and YY strain of *Apatococcus lobatus*, ZX strain of *Apatococcus lobatus*, and its had a distinct differentiation. The results of ISSR analyses showed that there were differences in their gene types, but also genetic diversity in isolates of *Apatococcus lobatus* from Valencia orange green spot disease.

Key words: valencia orange green spot disease; *Apatococcus lobatus*; ISSR; genetic diversity