

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*
50(4):524-529; 4 February 2010
ISSN 0001-6209; CN 11-1995/Q
<http://journals.im.ac.cn/actamicrocn>

大豆疫霉菌一个 DNA 指纹分析重复序列探针的鉴定

殷丽华¹, 王秦虎¹, 宁峰¹, 朱晓莹¹, 左豫虎², 单卫星^{1,3*}

(¹ 西北农林科技大学植物保护学院, 杨凌 712100)

(² 黑龙江八一农垦大学农学院, 大庆 163319)

(³ 陕西省农业分子生物学重点实验室, 杨凌 712100)

摘要:【目的】大豆疫霉菌指纹分析的建立和黑龙江与新疆大豆疫霉菌群体的群体遗传分析。【方法】利用生物信息学方法寻找大豆疫霉菌 (*Phytophthora sojae*) 的中度重复序列, 并对黑龙江和新疆大豆疫霉菌进行 DNA 指纹分析。【结果】分析得到一个中度重复序列, 定名为 PS1227。Southern blot 分析表明 PS1227 在大豆疫霉菌基因组中约有 34 条可辨的介于 1.5-23 kb 之间的杂交条带, 其中 21 个杂交条带在 49 个供试菌系中表现多态性。单游动孢子分析表明 PS1227 指纹特征在病菌无性生殖阶段表现稳定。利用 PS1227 标记, 本实验发现采自黑龙江 HP4002、SY6 和 GJ0105 菌系分别与新疆的 DW303、71228 和 71222 菌系具有完全相同的指纹特征。【结论】获得一个可用于大豆疫霉菌流行病学和群体生物学的指纹分析序列 PS1227, 在分子水平证实了新疆大豆疫霉菌可能由黑龙江传入。

关键词: 大豆疫霉菌; 中度重复序列; RFLP; 指纹分析; 遗传多样性

中图分类号: Q933 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2010) 04-0524-06

大豆疫霉根腐病是一种世界性大豆病害, 其危害面积大、程度重, 被列为大豆毁灭性病害之一^[1]。利用抗病品种仍然是国内外防治大豆疫霉根腐病的主要手段^[2], 然而这种防治措施是面对群体而非个体的, 病菌遗传上的多样性和复杂性会通过小种的变异使抗病品种的抗病性难以持久。因此, 了解大豆疫霉根腐病菌的群体结构及遗传多样性将为合理布局抗病品种、延缓现有抗病基因抗性丧失提供依据, 同时也为培育具有持久抗病性的作物品种提供参考^[3]。然而由于缺乏多态性高、稳定性好的遗传标记, 目前有关我国大豆疫霉菌的分子群体遗传工作的报导很少。王子迎等^[4-5]利用随机扩增多态性 DNA (RAPD) 和简单序列重复区间扩增多态性 (ISSR) 标记、比较分析了中国和美国大豆疫霉菌群体遗传多样性的工作, 在分子水平获得了美国大豆

疫霉菌不大可能来源于中国的证据。徐静静等^[6]应用 SSR 标记对新疆大豆疫霉菌的来源进行研究, 发现新疆菌系与黑龙江菌系的遗传关系最近, 推测新疆大豆疫霉菌可能从黑龙江传入。

真核生物包括植物病原真菌基因组中存在可观的 DNA 重复序列^[7-10]。由于散布的中度重复序列可以同时分析基因组中多个遗传位点, 因此为认识病菌的群体生物学和流行病学提供了一类重要的遗传标记^[11-13]。比如, Hamer 等^[14]分离得到的中度重复序列 MGR586, 积极地推动了对稻瘟病菌群体遗传特征的深入认识。小麦条锈菌中一个中度重复的 DNA 序列家族 (PSR 序列) 的鉴定和克隆^[15], 推动了小麦条锈菌及其与寄主互作的群体生物学研究, 并且在分子水平上首次证实了小麦条锈菌的远距离传播^[16]。

基金项目: 国家自然科学基金 (30571204); 高等学校学科创新引智计划资助 (B07049)

* 通信作者。Tel: +86-29-87080102; Fax: +86-29-87080062; E-mail: wxshan@nwsuaf.edu.cn

作者简介: 殷丽华 (1983-), 女, 山东荣城人, 硕士研究生, 研究方向为植物免疫学。E-mail: yinlhua@gmail.com

收稿日期: 2009-10-09; **修回日期:** 2009-12-01

本研究通过对大豆疫霉菌全基因组序列进行的生物信息学和分子生物学分析,寻找和确定其中的中度重复的、可用于群体遗传分析的序列;以获得的序列为探针通过 DNA 指纹分析确认大豆疫霉菌的远距离传播情况,为进一步研究大豆疫霉菌的群体生物学和流行病学奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 主要试剂和仪器:化学试剂为美国 Amresco 或 Sigma 公司产品。限制性内切酶和 Klenow 酶等分子生物学试剂购自 TaKaRa 公司;DNA 引物由南京金斯特公司合成; [α - 32 P] dCTP 购自北京福瑞公司。Hybond - XL 尼龙膜(美国 GE 公司);荧光影像检测仪(日本 Fuji Photo Film 公司荧光影像检测仪 FLA7000)。

1.1.2 大豆疫霉菌菌系及其分离培养条件:从 2006 - 2008 年,分别于黑龙江省和新疆维吾尔自治区采集大豆疫霉根腐病病样,采用病组织直接分离法^[17]和从老化病组织中分离大豆疫霉菌的方法^[18]共分离得到大豆疫霉菌 307 个分离物,另有 3 个菌系是由石河子大学李国英教授惠赠。采用胡萝卜培养基(CA)分离和培养大豆疫霉菌。在前期工作利用割裂扩增多态性序列(CAPS)和简单序列重复(SSR)两种标记方法对所获得菌系进行的群体遗传结构分析(未发表结果)的基础上,选取新疆与黑龙江大豆疫霉菌遗传背景相似的 45 个菌系为材料进行分析(详见表 1)。

1.2 大豆疫霉菌基因组中度重复序列的鉴定

利用 JGI 网站(http://genome.jgi-psf.org/Physol_1/Physol_1.home.html)公布的大豆疫霉基因组序列^[19],从重叠群 1(scaffold 1)开始,以 1000 bp 为步长,用 1000 bp 的窗口扫描基因组,把当前窗口截获的序列作为查询序列,利用 NCBI BLAST 软件^[20]与大豆疫霉基因组比对,统计得分大于 250 bits 的片段(约大于 120 bp)的数目,并依据重复片段数目进行排序。利用 Perl 实现上述算法。

根据获得的中度重复序列设计引物,制备限制性片断长度多态性(Restriction Fragment Length Polymorphism, RFLP)探针。分别用 *Bam*HI、*Eco*RI、*Hind*III、*Pst*I 和 *Xho*I 酶切大豆疫霉菌基因组 DNA,用上述探针进行 Southern 杂交。对于可取得较清晰指纹图谱的酶切探针组合,以大豆疫霉菌 4 个基本基因型的代表模式菌系^[21]为参照进行多态性检测。

表 1 大豆疫霉菌菌系及其来源

Table 1 <i>Phytophthora sojae</i> isolates used in this study		
Isolates	Source	Year
LG1002	Linkou Heilongjiang(黑龙江林口县)	2006
HP4002	Hulin Heilongjiang(黑龙江虎林市)	2006
HP4004	Hulin Heilongjiang(黑龙江虎林市)	2006
HP3010	Hulin Heilongjiang(黑龙江虎林市)	2006
HP3001	Hulin Heilongjiang(黑龙江虎林市)	2006
HP3006	Hulin Heilongjiang(黑龙江虎林市)	2006
MP1003	Mishan Heilongjiang(黑龙江密山市)	2006
LX2005	Baoqing Heilongjiang(黑龙江宝清县)	2007
LX3005	Baoqing Heilongjiang(黑龙江宝清县)	2007
LX3016	Baoqing Heilongjiang(黑龙江宝清县)	2007
GJ0105	Baoqing Heilongjiang(黑龙江宝清县)	2007
GJ0107	Baoqing Heilongjiang(黑龙江宝清县)	2007
GJ0108	Baoqing Heilongjiang(黑龙江宝清县)	2007
X209	Baoqing Heilongjiang(黑龙江宝清县)	2007
X219	Baoqing Heilongjiang(黑龙江宝清县)	2007
X102	Baoqing Heilongjiang(黑龙江宝清县)	2007
SY2 - 9	Baoqing Heilongjiang(黑龙江宝清县)	2007
SY37	Baoqing Heilongjiang(黑龙江宝清县)	2007
SY6	Baoqing Heilongjiang(黑龙江宝清县)	2007
SY33	Baoqing Heilongjiang(黑龙江宝清县)	2007
JNC05	Fujin Heilongjiang(黑龙江富锦市)	2007
597 - 201	Fujin Heilongjiang(黑龙江富锦市)	2007
DNZ - 3	Fujin Heilongjiang(黑龙江富锦市)	n/a
DNZ - 47	Fujin Heilongjiang(黑龙江富锦市)	n/a
DNZ - 5	Fujin Heilongjiang(黑龙江富锦市)	n/a
ZYH23	Fujin Heilongjiang(黑龙江富锦市)	n/a
ZYH10	Fujin Heilongjiang(黑龙江富锦市)	n/a
ZYH8	Fujin Heilongjiang(黑龙江富锦市)	n/a
ZYH4	Fujin Heilongjiang(黑龙江富锦市)	n/a
ZYH17	Fujin Heilongjiang(黑龙江富锦市)	n/a
ZYH15	Fujin Heilongjiang(黑龙江富锦市)	n/a
ZYH13	Fujin Heilongjiang(黑龙江富锦市)	n/a
ZYH9	Fujin Heilongjiang(黑龙江富锦市)	n/a
ZYH5	Fujin Heilongjiang(黑龙江富锦市)	n/a
ZYH2	Fujin Heilongjiang(黑龙江富锦市)	n/a
ZYH3	Fujin Heilongjiang(黑龙江富锦市)	n/a
ZYH6	Fujin Heilongjiang(黑龙江富锦市)	n/a
71222	Xinyuan Xinjiang(新疆新源县)	2007
71216	Xinyuan Xinjiang(新疆新源县)	2007
71213	Xinyuan Xinjiang(新疆新源县)	2007
71228	Xinyuan Xinjiang(新疆新源县)	2007
71214	Xinyuan Xinjiang(新疆新源县)	2007
71226	Xinyuan Xinjiang(新疆新源县)	2007
DW303	Shawan Xinjiang(新疆沙湾县)	2007
DW101	Shawan Xinjiang(新疆沙湾县)	2007

Note: n/a, not available.

游动孢子是疫霉菌的单核繁殖体,通过制备大豆疫霉菌的单游动孢子系,分析无性繁殖后代的指纹图谱,确定指纹标记在病菌有丝分裂(无性繁殖)过程中的遗传稳定性。

1.3 大豆疫霉菌基因组 DNA 提取和 DNA 指纹分析

收集大豆疫霉菌菌丝经液氮速冻后于 -80℃ 保

存备用。疫霉菌菌丝总 DNA 的提取使用尿素法^[22]。参考分子克隆实验指南^[23]的方法,取大豆疫霉菌基因组 DNA 2 μg ,用限制性内切酶酶切 16 h,0.8% 琼脂糖凝胶电泳,毛细管虹吸印迹法转膜于尼龙膜上。随机引物法制备³²P 标记的探针,65 $^{\circ}\text{C}$ 杂交过夜。杂交和洗膜采用常用条件^[23],通过荧光影像检测仪曝光和扫描结果。

1.4 数据统计与分析

每个杂交条带都作为一个遗传位点考虑^[16],杂交条带的有无分别记为 1 和 0,再利用 NTSYSpc Version 2.10e 软件,采用 UPGMA (unweighted pair-group method with arithmetic averages) 构建系统树状图谱。

2 结果

2.1 中度重复序列的筛选和鉴定

通过 BLAST 将大豆疫霉菌基因组与自身比对,初步从中鉴定到 20 次以上的重复序列 15145 个(含冗余)。

选取 7 个候选中度重序列进行 Southern 验证,获得一个具有良好指纹特征的探针序列,命名为 PS1227 (GenBank accession number GU244585)。经 JGI 网上序列比对,该探针序列在大豆疫霉菌基因组中重复约 100 次,分散在 89 个重叠群中。

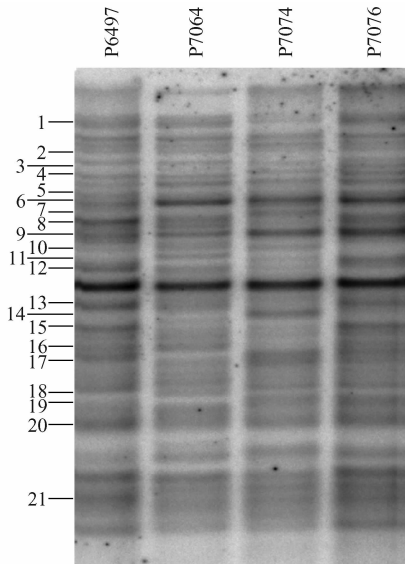


图 1 探针序列 PS1227 的大豆疫霉菌指纹分析

Fig. 1 Autoradiogram showing DNA fingerprinting in *Phytophthora sojae*. *Phytophthora sojae* genomic DNA was digested with *Hind*III and hybridized with probe PS1227. P6497, P7064, P7074, and P7076 are the reference strains representing 4 major genotypes in *P. sojae*^[21], respectively. Polymorphic bands are indicated on the left.

探针序列 PS1227 与 *Hind*III 酶切组合时可取得良好的指纹特征图谱。在每个供试菌系中约有 34 条 1.5 – 23 kb 的杂交条带,其中 21 个杂交条带在 49 个供试菌系中表现多态性(图 1)。为确定此探针序列标记的遗传稳定性,制备了数个大豆疫霉菌菌系的系列单游动孢子系(5 – 10 个单游动孢子系/菌系)并进行 Southern 杂交。游动孢子是疫霉菌的单核孢子,通过分析单游动孢子系,可有效地检测生长发育阶段主要为多核状态的疫霉菌的遗传变异。单游动孢子系的分析结果表明 PS1227 指纹特征在病菌无性繁殖过程中是稳定遗传的(见图 2,大豆疫霉菌 HP3005 菌系的 5 个单游动孢子分析结果)。大豆疫霉菌生长 5 d 细胞核大约分裂 20 次^[24]。本实验是取固培 7 d 后的边缘菌块制备游动孢子,经历了大约 28 次有丝分裂。

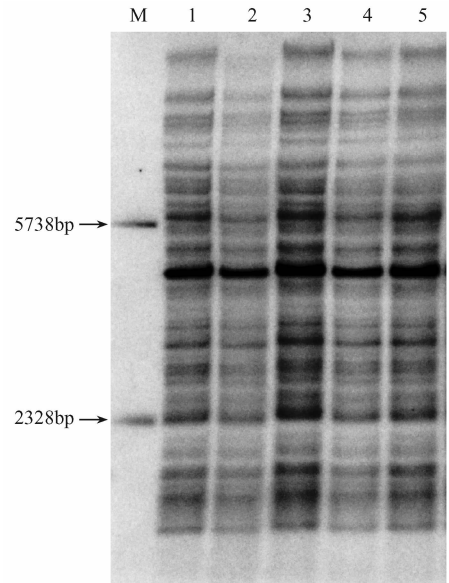


图 2 探针序列 PS1227 的遗传稳定性分析

Fig. 2 Analysis of mitotic stability of PS1227 fingerprints in *Phytophthora sojae*. The genomic DNA of five single zoospore progenies (lanes 1 – 5) of *Phytophthora sojae* isolate HP3005 was digested by *Hind*III and hybridized with PS1227 probe.

2.2 代表菌系的指纹分析

以 PS1227 为探针序列,对选取的 45 个采自新疆和黑龙江而且遗传背景相似的大豆疫霉菌菌系进行 DNA 指纹分析,部分菌系的指纹图谱见图 3。

对 DNA 指纹分析结果进行系统聚类分析,在 63% 的指纹相似性水平上可将 49 个供试菌系划分为 4 个基因型(图 4)。采自黑龙江的 HP4002、SY6 和 GJ0105 菌系分别与新疆的 DW303、71228 和 71222 菌系具有完全相同的指纹特征,表明新疆与黑龙江之间存在菌源交流。

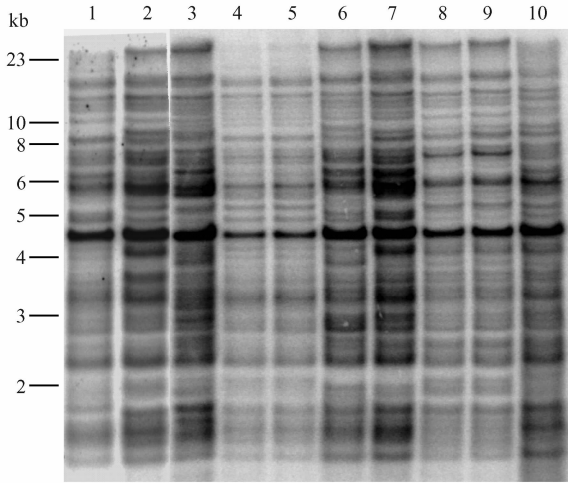


图3 探针序列 PS1227 与大豆疫霉菌代表菌系的 Southern 杂交

Fig. 3 DNA fingerprinting patterns of the representative *Phytophthora sojae* isolates revealed by *Hind*III digestion of genomic DNA and hybridization with probe PS1227.

Lanes 1 - 10 are isolates LX2005, GJ0105, ZYH5, ZYH2, ZYH3, HP3010, DNZ - 5, 71214, 71226 and DW101, respectively.

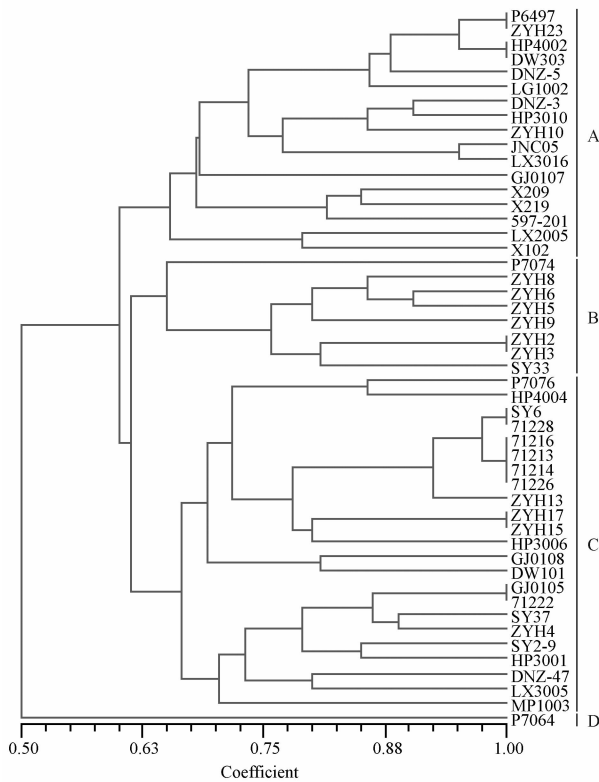


图4 基于探针序列 PS1227 指纹分析的大豆疫霉菌遗传相似性的 UPGMA 聚类分析

Fig. 4 UPGMA dendrogram of genetic relationships among the *Phytophthora sojae* isolates.

3 讨论

随着高通量测序技术的进步,越来越多的病原微生物的基因组完成测序^[25-27],为研究病原微生物提供了重要的遗传资源,利用生物信息学方法从基因组序列中挖掘各种信息已成为推动认识病原微生物致病机理、遗传变异机制以及群体生物学特征等方面的重要方法。

由于病原微生物基因组中中度重复序列的散布特点、可分析基因组中多个遗传位点,为认识病菌的群体生物学和流行病学提供了一类重要的遗传标记。目前,对植物病原菌群体生物学的认识多基于毒性分析,但是毒性基因受到寄主的强烈选择压力,不能客观的反映病菌群体的遗传特征^[15]。在本研究中,通过基因组序列的生物信息学分析和分子生物学验证,获得可用于大豆疫霉菌指纹分析的探针序列,并通过指纹分析新疆和黑龙江大豆疫霉菌遗传背景相似的代表菌系,获得黑龙江省和新疆大豆疫霉菌存在菌源交流的分子证据。

本研究鉴定的 PS1227 探针序列具有中度重复和散布特征,基因组分析表明 PS1227 序列散布于许多重叠群中,因此其同源位点可能是独立遗传的;另外,PS1227 提供较高水平的 DNA 多态性并且可以稳定遗传,在 49 个供试菌系中,34 个杂交条带中 21 个表现多态性。通过对大豆疫霉菌模式菌系的分析,基于 PS1227 探针序列的指纹分析结果与 Forster 等^[21]的分析结果一致,因此在遗传上极可能是中性的。Forster 等^[21]利用一系列核 DNA 和线粒体 DNA 标记,对 48 个美国大豆疫霉菌菌系进行了遗传多样性研究,确定了 4 个基本基因型。在本研究中,代表 4 个基因型的 P6497、P7064、P7074 和 P7076 模式菌系在 17 个遗传位点呈现多态性,在 63% 的相似水平上被划分为 4 个聚类组(基因型),与 Forster 等的研究结果一致。Forster 等^[21]利用一系列在遗传上极可能是中性的核 DNA 和线粒体 DNA 标记,对 48 个美国大豆疫霉菌菌系进行了遗传多样性研究,确定了 4 个基本基因型。

中度重复的 PS1227 序列探针的这些特点为客观的认识大豆疫霉菌的群体生物学、流行病学研究以及病菌近等基因系的检测等提供了有力工具,可望推动大豆疫霉菌的流行病学和群体生物学研究。

在本研究中,通过鉴定 DNA 指纹特征相同的黑龙江和新疆大豆疫霉菌分离物,在分子水平上证实了新疆大豆疫霉菌是由黑龙江传入的。新疆是新兴的大豆产区,与黑龙江省纬度相近,存在异地调种情

况^[28]。大豆疫霉菌可通过夹杂在种子间的病残体、带菌土壤以及染病的种子^[29]作远距离传播。我国大豆疫霉根腐病于1989年首次在东北地区发现^[30],2006年在新疆发现^[31]。因此推测新疆大豆疫霉菌可能部分或全部来自黑龙江省。需要加强国内检疫,防止更多基因型的大豆疫霉菌传入新兴大豆产区。一般而言,病菌群体遗传多样性水平的增加,可更有效地产生更多的毒性和抗药性类型等遗传变异,从而使病菌更易克服品种的抗病性和对杀菌剂产生抗性,增加病害防治的难度。

致谢 感谢美国 Virginia Polytechnic Institute and State University 的 Brett Tyler 教授提供 P6497、P7064、P7074 和 P7076 菌系的 DNA。感谢石河子大学李国英教授惠赠部分大豆疫霉菌菌系。

参考文献

- [1] Schmitthenner AF. Problems and progress in control of *Phytophthora* root rot of soybean. *Plant disease*, 1985, 69: 362-368.
- [2] 张淑珍, 丁广文, 李文滨, 等. 大豆疫霉根腐病研究进展. 中国油料作物学报 (*Chinese Journal of Oil Crop Sciences*), 2004, 26: 102-107.
- [3] 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. 植物病理学报 (*Acta Phytopathologica Sinica*), 1998, 28: 5-9.
- [4] 王子迎, 王源超, 张正光, 等. 中国和美国大豆疫霉菌群体遗传结构的 RAPD 比较分析. 科学通报 (*Chinese Science Bulletin*), 2006, 51: 1913-1919.
- [5] 王子迎, 王源超, 张正光, 等. 中国和美国大豆疫霉菌群体遗传结构的 ISSR 分析. 生物多样性 (*Biodiversity Science*), 2007, 15: 215-223.
- [6] 徐静静, 董立明, 王晓鸣, 等. 新疆大豆疫霉的来源分析. 新疆农业大学学报 (*Journal of Xinjiang Agricultural University*), 2009, 32: 23-27.
- [7] 单卫星, 陈受宜, 康振生, 等. DNA 指纹分析在植病真菌群体遗传研究中的应用. 西北农业大学学报 (*Journal of Northwest A & F University*), 1995, 23: 84-89.
- [8] Scherer S, Stevens DA. A *Candida albicans* dispersed, repeated gene family and its epidemiologic applications. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1988, 85: 1452-1456.
- [9] Panabieres F, Le Berre JY. A family of repeated DNA in the genome of the oomycete plant pathogen *Phytophthora cryptogea*. *Current Genetics*, 1999, 36: 105-112.
- [10] Mao YX, Tyler BM. The *Phytophthora sojae* genome contains tandem repeat sequences which vary from strain to strain. *Fungal Genetics and Biology*, 1996, 20: 43-51.
- [11] Goodwin SB, Drenth A, Fry WE. Cloning and genetic analyses of two highly polymorphic, moderately repetitive nuclear DNAs from *Phytophthora infestans*. *Current Genetics*, 1992, 22: 107-115.
- [12] Goodwin SB, Spielman LJ, Matuszak JM, et al. Clonal diversity and genetic differentiation of *Phytophthora infestans* populations in northern and central Mexico. *Phytopathology*, 1992, 82: 955-961.
- [13] Goodwin SB, Cohen BA, Deahl KL, et al. Migration from northern Mexico as the probable cause of recent genetic changes in populations of *Phytophthora infestans* in the United States and Canada. *Phytopathology*, 1994, 84: 553-558.
- [14] Hamer JE, Farrall L, Orbach MJ, et al. Host species-specific conservation of a family of repeated DNA sequences in the genome of a fungal plant pathogen. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1989, 86: 9981-9985.
- [15] 单卫星, 陈受宜, 张耕耘, 等. 小麦条锈菌一个中度重复 DNA 序列家族的鉴定. 中国科学 (*Science in China*), 1997, 27: 241-246.
- [16] Shan WX, Chen SY, Kang ZS, et al. Genetic diversity in *Puccinia striiformis* Westend. f. sp. *tritici* revealed by pathogen genome-specific repetitive sequence. *Canadian Journal of Botany*, 1998, 76: 587-595.
- [17] 王晓鸣, 朱振东, 马淑梅, 等. 大豆疫霉选择性分离技术研究. 植物病理学报 (*Acta Phytopathologica Sinica*), 1998, 28: 78.
- [18] 宁峰, 朱晓莹, 殷丽华, 等. 从老化病组织中高效分离大豆疫霉菌的方法. 西北农林科技大学学报 (*Journal of Northwest A & F University*), 2009, 37: 139-143.
- [19] Tyler BM, Tripathy S, Zhang XM, et al. *Phytophthora* genome sequences uncover evolutionary origins and mechanisms of pathogenesis. *Science*, 2006, 313: 1261-1266.
- [20] Altschul SF, Madden TL, Schaffer AA, et al. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research*, 1997, 25: 3389-3402.
- [21] Forster H, Tyler BM, Coffey MD. *Phytophthora sojae* races have arisen by clonal evolution and by rare outcrosses. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 1994, 7: 780-791.
- [22] Shan W, Hardham AR. Construction of a bacterial artificial chromosome library, determination of genome size, and characterization of an *Hsp70* gene family of *Phytophthora nicotianae*. *Fungal Genetics and Biology*, 2004, 41: 369-380.
- [23] Sambrook J, Russell DW. 分子克隆实验指南. 黄培堂, 汪嘉玺, 朱厚础, 等译. 第三版. 北京: 科学出版社, 2002: 487-509, 721-725.

- [24] Chamnanpant J, Shan WX, Tyler BM. High frequency mitotic gene conversion in genetic hybrids of the oomycete *Phytophthora sojae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2001, 98: 14530-14535.
- [25] Dean RA, Talbot NJ, Ebbole DJ, et al. The genome sequence of the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. *Nature*, 2005, 434: 980-986.
- [26] Cuomo CA, Guldener U, Xu JR, et al. The *Fusarium graminearum* genome reveals a link between localized polymorphism and pathogen specialization. *Science*, 2007, 317: 1400-1402.
- [27] Buell CR, Joardar V, Lindeberg M, et al. The complete genome sequence of the *Arabidopsis* and tomato pathogen *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2003, 100: 10181-10186.
- [28] 魏建军, 罗赓彤, 张力. 新疆实现大豆超高产的品种与综合栽培技术. *新疆农垦科技 (Xinjiang Farmland Reclamation Science & Technology)*, 2008, 31: 21-22.
- [29] 周肇蕙, 严进. 大豆疫病的检疫研究——种子带菌及检验技术. *植物检疫 (Plant Quarantine)*, 1996, 10: 257-261.
- [30] 沈崇尧, 苏彦纯. 中国大豆疫霉根腐病的发现及初步研究. *植物病理学报 (Acta Phytopathologica Sinica)*, 1991, 21: 298.
- [31] 王华, 李国英, 战勇, 等. 新疆大豆根腐疫病鉴定初报. *新疆农业科学 (Xinjiang Agricultural Sciences)*, 2006, 43: 106-108.

Identification of a repetitive sequence element for DNA Fingerprinting in *Phytophthora sojae*

Lihua Yin¹, Qinhu Wang¹, Feng Ning¹, Xiaoying Zhu¹, Yuhu Zuo², Weixing Shan^{1,3*}

(¹ College of Plant Protection, Northwest A & F University, Yangling, 712100, China)

(² Agricultural Department, Heilongjiang August First Land Reclamation University, Daqing 163319, China)

(³ Shaanxi Key Laboratory of Molecular Biology for Agriculture, Northwest A & F University, Yangling 712100, China)

Abstract: [**Objective**] Establishment of DNA fingerprinting in *Phytophthora sojae* and an analysis of genetic relationship of Heilongjiang and Xinjiang populations. [**Methods**] Bioinformatics tools were used to search repetitive sequences in *P. sojae* and Southern blot analysis was employed for DNA fingerprinting analysis of *P. sojae* populations from Heilongjiang and Xinjiang using the identified repetitive sequence. [**Results**] A moderately repetitive sequence was identified and designated as PS1227. Southern blot analysis indicated 34 distinct bands ranging in size from 1.5 kb-23 kb, of which 21 were polymorphic among 49 isolates examined. Analysis of single-zoospore progenies showed that the PS1227 fingerprint pattern was mitotically stable. DNA fingerprinting showed that the *P. sojae* isolates HP4002, SY6 and GJ0105 of Heilongjiang are genetically identical to DW303, 71228 and 71222 of Xinjiang, respectively. [**Conclusion**] A moderately repetitive sequence designated PS1227 which will be useful for epidemiology and population biology studies of *P. sojae* was obtained, and a PS1227-based DNA fingerprinting analysis provided molecular evidence that *P. sojae* in Xinjiang was likely introduced from Heilongjiang.

Keywords: *Phytophthora sojae*; moderately repetitive sequence; restriction fragment length polymorphism (RFLP); DNA fingerprinting; genetic diversity

(本文责编:王晋芳)