

中国枣树干腐病菌 (*Botryosphaeria dothidea*) 群体遗传多样性的 ISSR 分析

冯慧静¹, 文才艺¹, 尹新明², 洪坤奇¹, 臧睿^{1*}

(¹河南农业大学植物保护学院, 郑州 450002; ²信阳农林学院, 河南信阳 464001)

摘要:【目的】从分子水平上揭示我国枣树干腐病菌群体的遗传特点, 探究其遗传变异的规律。【方法】采用正交实验设计的方法, 对影响 ISSR-PCR 扩增的 4 个因素进行研究。采用 ISSR 分子标记, 对 161 株供试病原菌进行 PCR 扩增, 通过 PopGene 和 Arlequin 软件对其群体遗传多样性和遗传分化情况进行分析。【结果】从 40 条 ISSR 引物中筛选到 10 条扩增多态性良好的引物, 建立了适合枣树干腐病菌 ISSR-PCR 扩增的体系。采用该体系共在 132 个位点扩增出条带, 其中多态性位点 129 个, 多态性位点百分率为 97.93%。PopGene 结果显示, 在物种水平上, 供试病原菌的基因多样性指数和 Shannon 信息指数分别为 0.256 3 和 0.397 8。分子方差分析表明, 不同地理种群间的遗传变异占总变异量的 7.94%, 不同地理种群内的各自然种群间的遗传变异占总变异量的 24.46%, 自然种群内各分离株的遗传变异占总变异量的 67.58%。聚类分析结果表明, 在遗传相似系数为 0.19 时, 可将 9 个病原菌自然种群划分为 6 个不同的聚类群。【结论】我国枣树干腐病菌 (*B. dothidea*) 群体具有丰富的遗传多样性, 群体内多样性大于群体间多样性。自然种群内各分离株的遗传变异是我国枣树干腐病菌遗传变异的主要来源。我国枣树干腐病菌的各自然种群之间的遗传亲缘关系与其地理来源无明显相关性。

关键词: 枣树干腐病; ISSR-PCR 扩增; 正交设计; 群体遗传

中图分类号: S665.1 文献标志码: A 文章编号: 1009-9980(2017)08-0977-11

Population genetic diversity analysis of Chinese jujube branch canker pathogens (*Botryosphaeria dothidea*) in China using ISSR markers

FENG Huijing¹, WEN Caiyi¹, YIN Xinming², HONG Kunqi¹, ZANG Rui^{1*}

(¹College of Plant Protection, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, Henan, China; ²Xinyang Agriculture and Forestry University, Xinyang 464001, Henan, China)

Abstract: 【Objective】The Chinese jujube branch canker, caused by Ascomycete *Botryosphaeria dothidea* was a catastrophic branch disease in China and caused significant yield losses. An investigation of the disease incidence showed that the average disease incidence of Lizao grafted by Junzao, Huizao or Suanzao reached 48.65% in Jiaocheng county of Shanxi province. Because of the lack of the researches on the pathogenic fungal population genetic characteristics, there was no commercial disease-resistant variety which could be used in the agricultural production practice. The jujube branch canker pathogen (*B. dothidea*) was found at the molecular level. 【Methods】The DNA of different *B. dothidea* isolates obtained from different Chinese producing areas in North China were extracted by using the Cetyltrimethylammonium bromide (CTAB) method. The DNA quality and concentration were detected by NanoDrop 1000 ultraviolet and visible spectrophotometer and 1% agarose electrophoresis. The ISSR primers were screened by regular PCR using five *B. dothidea* isolates from Shandong and Henan provinces, the PCR annealing tem-

收稿日期: 2017-03-06 接受日期: 2017-06-26

基金项目: 国家自然科学基金青年项目 (No. 31301609); 旱区作物逆境生物学国家重点实验室开放基金 (CSBAA2015008); 河南现代农业产业技术体系 (S2014-11-G03)

作者简介: 冯慧静, 硕士, 研究方向为植物病害综合治理。Tel: 18703635116, E-mail: 952947183@qq.com

*通信作者 Author for correspondence. Tel: 13721446172, E-mail: zangrui@henau.edu.cn

perature was set according to the primers' T_m temperature. The orthogonal designed experiments were used to screen the optimal inter simple sequence repeat amplification protocol at three levels of four factors. The four factors included dNTP, primers, Mg^{2+} and *Taq* enzyme, which could deeply affect the DNA fragment number of ISSR-PCR amplification. The DNA of 161 *B. dothidea* isolates was used as the template in the ISSR-PCR amplification. If the particular size DNA fragment appeared, 1 was used to stand for its appearance. If the fragment did not appear, 0 was used to stand for the deficiency. The DNA fragments of ISSR-PCR amplification with all screened primers were transformed into a 1 or 0 matrix. The population genetic diversity and genetic variation were analyzed by using POPGENE Version 1.32. The frequency of the same DNA fingerprint was detected by using DCFA Version 1.1 software. The analysis of molecular variance (AMOVA) program in the Arlequin Version 3.11 software was used to detect the population genetic variation source. The dendrogram relationship of different natural populations was analyzed by using the unweighted pair-group mean average (UPGMA) method in the SHAM module on the basis of genetic distance data. The dendrogram of different natural populations was generated by the tree-plot module in NYSTS Version 2.10. **【Results】**The agarose electrophoresis results showed that the DNA band is bright and integral, and there is no significant degradation in the DNA samples. The phenomenon indicated that the DNA quality is good enough to be used in the ISSR-PCR amplification reaction. Ten ISSR primers which can amplify more polymorphic loci were screened from 40 ISSR primers. An optional PCR amplification protocol was established according to the results of the orthogonal designed experiments. It was described as $0.30 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ dNTP, $0.4 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ISSR primer, $2.00 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Mg^{2+} and 0.25 U *Taq* enzyme in the volume of the $25.0 \text{ } \mu\text{L}$ reaction. The protocol and primers were used to amplify the tested isolates' DNA. Totally, 132 loci were detected of which 129 loci were polymorphic; the polymorphic loci percentage was 97.93%. The POPGENE analysis results showed that the Nei's gene diversity index (H) and Shannon's information index (I) were 0.256 3 and 0.397 8 at the species level. The Shannon's information index of the Henan geographical population was 0.386 4, it is the maximum value, which indicated that there was abundant genetic diversity in this geographical population. There were significant differences among the geographical population on the parameters of the polymorphic loci percentage. The value of Nm (Number of migrants per generation) showed that the gene flow existed between any two geographical populations. The Nm value between Henan and Shandong was 3.605 2, which showed that the gene flow between the two geographical populations was the strongest. The AMOVA results revealed that the genetic variations among geographical groups and within geographical groups were respectively 7.96% and 24.16%, and about 67.58% of the total variation located within populations. The dendrogram based on ISSR markers showed that the nine natural populations can be clustered into six clusters at the threshold of the genetic similar coefficient 0.19. The Xinzheng and Liulin natural populations located in cluster II, similarly, Lingbao, Zhucheng and Yangling shared the same cluster III. This phenomenon showed that the natural populations from different geographical populations can be clustered into the same cluster. **【Conclusion】**The ISSR-PCR was a very useful and strong tool to detect the pathogenic fungal population genetic diversity. The populations of Chinese jujube branch canker pathogens (*B. dothidea*) in North China possessed abundant genetic diversity. The intra-population genetic diversity was much more abundant than the inter-population variation. The main genetic variation came from the isolates within the same natural populations. There was no significant correlation between the genetic relationships and their geographical originals among the natural populations. These findings will pave the way for insight into the pathogenic epidemic rules and establishing an effective disease control strategy in the future.

Key words: Chinese jujube branch canker; ISSR-PCR amplification; Orthogonal design; Population genetic

大枣(*Ziziphus jujuba* Mill.)是我国最具代表性的特色水果之一^[1]。近年来,随着人们对大枣营养价值和药用价值认识的深入,大枣的市场需求越来越大,大枣的种植面积也不断扩大。然而,由于单一高产枣树品种的大面积推广,枣树病害问题日益突出,已经成为制约大枣产业可持续发展的重要因素之一。其中,枣树枝干干腐病以分布广、危害重、防治难而备受关注^[2-3]。据调查,2009年山西省定植5~6 a(年)的以骏枣、灰枣、酸枣等为砧木的梨枣,初始发病率即高达48.65%^[1]。经过形态学观察和分子鉴定,将其病原鉴定为七叶树壳梭孢(*Fusicoccum aesculi* Corda),其有性态为茶蔗子葡萄座腔菌(*Botryosphaeria dothidea* Ces.& de Not)^[1]。目前,对于该病害主要采用化学药剂进行防治,筛选到了世高、凯润、多菌灵和爱因思等药剂^[3]。然而,杀菌剂的大量使用不仅污染了环境,而且在一定程度上会增强病菌的抗药性,同时果实上农药残留的问题,对消费者的身体健康也会造成一定的影响。培育抗病品种是解决植物病害最为经济和有效的途径^[4]。对病原菌的群体组成进行研究,不仅有利于枣树抗性育种工作的顺利开展,同时也可以为更深入地了解病害发生规律和制定高效的病害防治策略奠定基础。

ISSR(inter-simple sequence repeat)技术,即简单重复序列区间扩增技术,以稳定性好、DNA用量少、引物设计简单、操作简便、灵敏度高、重复性强的优点成为微生物群体研究中普遍使用的一种技术。由于SSR在真核生物中的普遍存在,并且具有进化变异速度快的特点,所以锚定引物的ISSR技术可以灵敏地检测到基因组中发生差异的位点^[5]。而且,由于ISSR技术能提供较大数目的DNA片段,可以对基因组内的多态位点进行扫描,因而是一种用于分析物种、种群、不同品系、甚至个体间遗传差异的理想方法^[5-6]。Zhou等^[7]用ISSR方法成功区分了*Botryosphaeria* sp.相关的无性型真菌。赵嘉平^[8]采用ISSR方法,不仅成功鉴定出引起杨树溃疡的*B. dothidea*、*B. rhodina*、*B. parva*、*B. obtusa*和*B. stevensii*等多种病原菌,而且发现*B. dothidea*种内存在一定的遗传分化。

目前,我国枣树干腐病的相关研究刚刚起步,对于病原菌的群体遗传规律还缺乏相应的研究,笔者拟采用ISSR分子标记的方法,对我国不同地区枣树干腐病病原菌(*B. dothidea*)群体的遗传多样性进行

研究,以期揭示我国枣树干腐病菌群体遗传结构特点及其与地理来源之间的关系,为后期病害流行规律的研究和防治策略的制订,以及抗病育种工作的顺利开展奠定理论基础。

1 材料和方法

1.1 供试菌株

2014—2015年分别从河南、陕西、山西和山东省大枣的主产区采集具有典型干腐病症状的枣树枝,采用组织块分离法,获得枣树干腐病菌的纯培养分离株。并从纯培养分离株菌落边缘截取菌饼(直径为5 mm),然后将其放入5%水琼脂(WA)平板中央,25℃黑暗培养2~3 d,在显微镜下挑取单菌丝,放入马铃薯葡萄糖平板(PDA)中央,25℃黑暗培养3 d,获得病原菌的单菌丝纯培养物。本研究共获得枣树干腐病菌单菌丝分离株161株(表1),现保存于河南农业大学植物保护学院生物防治研究室-80℃超低温冰箱中。

表1 枣树干腐病菌的采集地点和数目

Table 1 The samples collected location and isolates number of Chinese jujube branch canker fungi used in this study

省份 Provinces	县(市) County	分离株数目 Isolates number
河南 Henan	新乡 Xinxiang	79
	新郑 Xinzheng	17
	灵宝 Lingbao	9
陕西 Shaanxi	杨凌 Yangling	11
	彬县 Binxian	14
山西 Shanxi	太谷 Taigu	15
	柳林 Liulin	6
山东 Shandong	沂水 Yishui	5
	诸城 Zhucheng	5

1.2 供试的ISSR引物

供试的ISSR引物参考Wang等^[9]和Burgess等^[10]发表的ISSR引物序列,由上海生工生物工程有限公司合成。具体的引物序列见表2。

1.3 病原菌营养体的培养和收集

按照无菌操作法要求,用无菌接种针挑取保存于20%甘油中的枣树干腐病菌菌饼,放入PDA平板中央,25℃黑暗培养3 d后,用直径为5 mm的打孔器在菌落边缘截取菌饼,将所获得的菌饼放入盛有50 mL PD培养基(马铃薯200 g,葡萄糖20 g,蒸馏水1 000 mL)的150 mL三角瓶中,每瓶中放入5块菌饼,25℃黑暗条件下静置培养3~5 d,待菌丝体长满液面时,用无菌的纱布过滤收集菌丝体,多余的水分

表2 供试 ISSR 引物序列及其退火温度

Table 2 The sequences and annealing temperature of inter-simple sequence repeat (ISSR) primers used in this study

引物名称 Primers name	引物序列 Primers sequences(5'-3')	T _m 值 T _m value/°C	退火温度 Annealing temperature/°C	引物名称 Primers name	引物序列 Primers sequences(5'-3')	T _m 值 T _m value/ °C	退火温度 Annealing temperature/°C
VCA01	(CA) ₆ AC	47.1	50.0	VCA21	(GTC) ₆	61.9	59.0
VCA02	(GT) ₆ CC	50.0	54.0	VCA22	(GTG) ₆	61.9	59.0
VCA03	(CA) ₆ GT	47.1	50.0	VCA23	(AAT) ₆	34.5	40.0
VCA04	(GA) ₆ GG	50.0	54.0	VCA24	(CAA) ₆	48.2	50.0
VCA05	(AG) ₈ TA	52.7	54.0	VCA25	(CAC) ₄ GC	55.9	53.0
VCA06	(CT) ₈ TG	55.0	54.0	VCA26	(GAG) ₄ GC	55.9	53.0
VCA07	(TG) ₈ GT	55.0	54.0	VCA27	(CTC) ₄ GC	55.9	53.0
VCA08	(CT) ₈ GC	57.3	54.0	VCA28	(GTA) ₆	48.2	50.0
VCA09	(AG) ₈ TC	55.0	52.0	VCA29	(AAG) ₆	48.2	50.0
VCA10	(CT) ₈ AC	55.0	54.0	VCA30	(GACA) ₄	51.5	51.0
VCA11	(GA) ₈ T	52.2	52.0	VCA31	(GATA) ₈	56.9	54.0
VCA12	(AC) ₈ T	52.2	52.0	VCA32	(GAGT) ₈	67.2	59.0
VCA13	(AG) ₈ S	54.6	52.0	VCA33	(GGGT) ₄	61.8	58.0
VCA14	(AG) ₈ YT	53.9	54.0	U01	DDB(CCA) ₅	60.3	57.0
VCA15	(AG) ₈ YC	56.2	55.0	U02	DHB(CGA) ₅	60.3	57.0
VCA16	(AC) ₈ YC	56.2	53.0	U03	YHY(GT) ₅ G	48.1	50.0
VCA17	(AC) ₈ YT	53.9	54.0	U04	HVH(GTG) ₅	59.9	58.0
VCA18	(TG) ₈ RC	56.2	54.0	U05	NDB(CA) ₅ C	56.2	54.0
VCA19	(CT) ₈ RT	53.9	52.0	U06	NDV(CT) ₈	56.1	54.0
VCA20	(AT) ₈ ST	36.8	40.0	U07	HBDB(GACA) ₄	57.8	57.0

注: D=G或A, B=G或T, H=A或C, R=G或A, S=G或C, Y=T或C。

Note: D=G or A, B=G or T, H=A or C, R=G or A, S=G or C, Y=T or C.

用无菌滤纸吸干。吸干水分的菌丝体用无菌的2 mL离心管收集约250 mg,然后用Paraflim封口膜封住离心管管口,用接种针在封口膜上扎约10个小孔,最后将离心管插入离心管板,放入冷冻干燥机(-80 °C, 12 h)中进行冷冻干燥,干燥的菌丝可以用于病菌DNA的提取。

1.4 病菌DNA基因组的提取

病原菌DNA采用CTAB(cetyltrimethylammonium bromide)法^[11]提取,DNA的完整性采用1.0%琼脂糖凝胶电泳进行检测,DNA的浓度和纯度采用Nano-Drop 1000微量紫外可见分光光度计进行检测。

1.5 ISSR-PCR扩增引物的筛选

以来自河南新郑(3株)和山东沂水(2株)的5株枣树干腐病菌分离株DNA为模板,根据各条引物的T_m值±2 °C的方法初步确定其进行ISSR-PCR扩增的退火温度。扩增体系采用25.0 μL的体系,其中包括10×Taq buffer 2.50 μL, 25 mmol·L⁻¹ MgCl₂ 2.0 μL, 10 mmol·L⁻¹ dNTP 0.25 μL, 10 μmol·L⁻¹ ISSR引物 1.0 μL, Taq DNA聚合酶(5 U·μL⁻¹) 0.25 μL, DNA

模板为1.0 μL(=100 ng),用无菌的去离子水补足25.0 μL。每个分离株2次重复。

PCR的扩增程序为:94 °C预变性4 min,接着进行35个循环:94 °C变性1 min,根据T_m值确定退火温度退火1 min,72 °C延伸3 min。72 °C终延伸10 min,于4 °C保存。ISSR-PCR扩增完成后,取扩增产物10 μL,于120 V电压下,在2%的琼脂糖凝胶中电泳60 min,经EB染色液染色10 min,用蒸馏水漂洗2次,然后在凝胶照相系统中进行观察照相。以扩增结果稳定、多态性条带多的引物作为枣树干腐病菌群体遗传分析的引物。

1.6 ISSR-PCR扩增体系的优化

利用L₆(3⁴)正交设计表,对影响ISSR-PCR扩增的主要因素(dNTP浓度、引物浓度、Mg²⁺浓度和Taq酶量)在3个不同水平上进行正交组合形成不同的扩增体系,确定适合枣树干腐病菌进行ISSR-PCR的最佳扩增体系(表3)。

ISSR-PCR扩增体系采用25.0 μL的扩增体系,除了前述4种影响因素外,还包括10×Taq buffer

表3 ISSR-PCR 正交试验设计表($L_9(3^4)$)
Table 3 ISSR-PCR of orthogonal designed tables according to $L_9(3^4)$

序号 No.	因素 Factors			
	c(dNTP)/ (mmol·L ⁻¹)	c(引物) Primers/(μmol·L ⁻¹)	c(Mg ²⁺)/ (mmol·L ⁻¹)	Taq 酶量 Taq enzyme/U
1	0.2	0.2	2	0.125
2	0.2	0.3	3	0.250
3	0.2	0.4	4	0.500
4	0.3	0.2	3	0.500
5	0.3	0.3	4	0.125
6	0.3	0.4	2	0.250
7	0.4	0.2	4	0.250
8	0.4	0.3	2	0.500
9	0.4	0.4	3	0.125

2.50 μL, DNA 模板 1.0 μL (=100 ng)。对 PCR 影响较大的4个因素,按照表3中的量进行加样,最后用无菌的去离子水补齐扩增体系中不足的部分。试验中每种组合2次重复。ISSR-PCR 扩增程序为:94 °C 预变性 4 min,接着进行 35 个循环:94 °C 变性 1 min,52 °C 退火 1 min,72 °C 延伸 3 min。72 °C 终延伸 10 min,于 4 °C 保存。PCR 扩增产物的电泳、拍照方法同 1.5。

1.7 ISSR-PCR 扩增及其扩增条带的统计分析

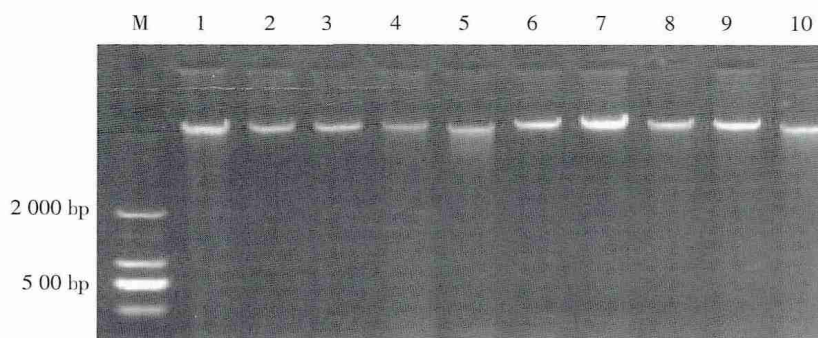
用 1.6 所建立的 PCR 扩增体系,对分离自我国不同大枣产区的 161 株枣树干腐病菌分离株进行

ISSR-PCR 扩增。扩增结束后通过 2% 的琼脂糖凝胶电泳进行检测,用凝胶照相系统进行拍照,采用人工读带法进行条带的统计。在谱带分析中,对于同一引物的扩增产物,每条清晰的条带都作为一个遗传位点进行统计。首先确定条带的大小,然后根据条带的有无,有记为 1,无记为 0,构建 0、1 二元矩阵,从而将图像信息转化为数据信息,并将其保存成 Excel 文件格式。然后利用 POPGENE version 1.32 软件计算病菌群体遗传多样性和遗传分化等指数^[12-14]。通过 DCFA1.1 软件计算枣树干腐病菌不同群体的 ISSR 各种指纹类型出现的频率。并用 Arlequin3.11 软件中的 AMOVA (analysis of molecular variance) 程序对病原菌群体遗传变异进行分析。最后再次通过 POPGENE 软件计算不同种群的遗传距离,并用 NT-sys-2.0 软件中的 UPGMA (unweighted pair-group mean average) 方法对其进行聚类分析,通过 Tree plot 模块生成聚类图^[14-15]。

2 结果与分析

2.1 总 DNA 提取

由图 1 可以看出,通过 CTAB 法提取的枣树干腐病菌总量 DNA 主带清晰,无明显的 RNA 带,基本无



M. DL2000 DNA 标准分子质量;泳道 1~10. *B. dothidea* 分离株。

M. DL2000 DNA marker; Lane 1-10. *B. dothidea* isolates.

图 1 枣树干腐病菌总量 DNA 琼脂糖凝胶电泳分析

Fig. 1 The total DNA of some *B. dothidea* isolates on the agarose gel

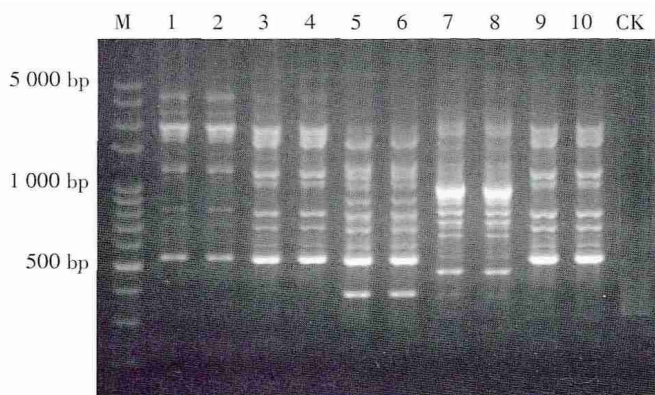
降解,完整性较好,可以满足 ISSR-PCR 扩增的需要。

2.2 ISSR-PCR 扩增引物的筛选

以不同地理来源的 *B. dothidea* 分离株 DNA 为模板,经过 PCR 扩增,共从 40 条 ISSR 引物中,筛选到 10 条 PCR 扩增条带亮、多态性条带多的引物。即 VCA09、VCA13、VCA16、VCA21、VCA22、VCA25、VCA26、VCA27、U01 和 U02(图 2)。

2.3 ISSR-PCR 扩增体系的优化

正交实验的扩增结果(图 3)显示,由 4 个因素在 3 个水平上的 9 种不同浓度组合形成的 PCR 扩增体系,其扩增产物是不同的。由图 3 可知,第 1、2、3 组合在 dNTP 浓度不变的情况下,随着引物浓度、Mg²⁺ 浓度以及 Taq 酶量的不断增加,PCR 扩增产物的条带越来越少,越来越暗。但第 2 种组合,扩增条带虽然模糊,但是数目较多,可以满足 ISSR 分析的需要,

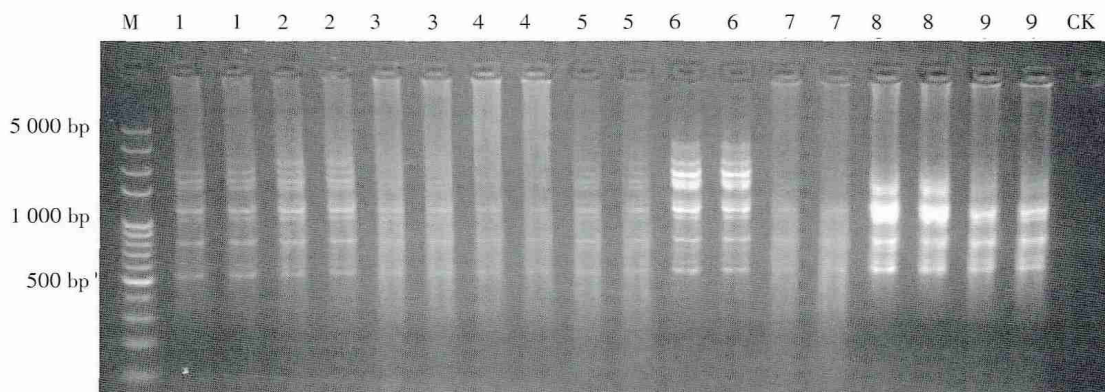


M. DL2000 DNA 标准分子质量;CK. 阴性对照;泳道 1~10. *B. dothidea* 分离株 HNXZav12、HNXZz42、HNXZa14、SDYSc017、SDYSc027, 每个分离株 2 次重复。

M. DL2000 DNA marker; CK. Negative control with no DNA template; Lane 1-10. *B. dothidea* isolates HNXZav12, HNXZz42, HNXZa14, SDYSc017, SDYSc027, two repeats of every isolates.

图 2 引物 U02 的 ISSR-PCR 扩增分析

Fig. 2 The ISSR-PCR amplified profile using U02 primer



M. DL2000 DNA 标准分子质量;泳道 1~9. 正交设计 9 种不同的处理;CK. 阴性对照。

M. DL2000 DNA marker; Lane 1-9. Nine different treatments in the orthogonal design experiment; CK. Negative control.

图 3 正交实验设计的 ISSR-PCR 反应体系扩增分析

Fig. 3 The ISSR-PCR amplification profile based on the orthogonal design experiment

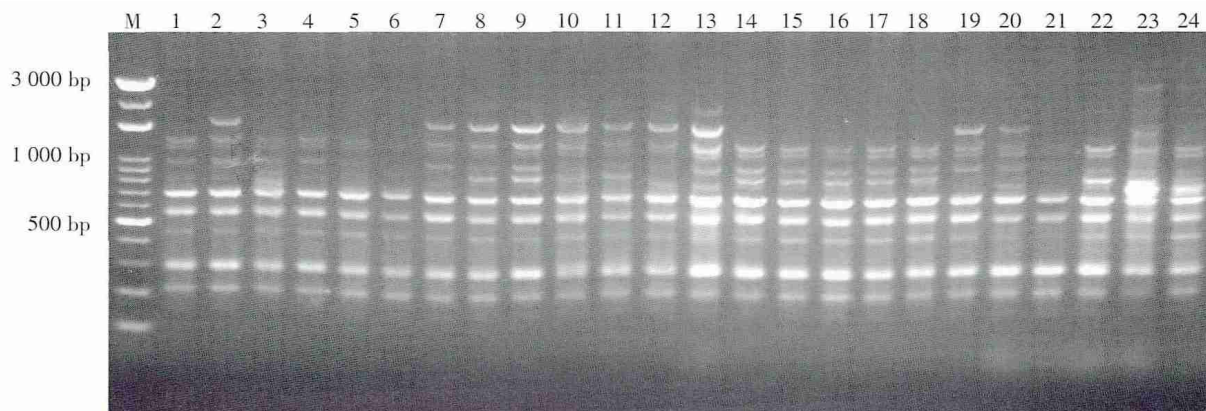
是一种备选组合。第 4、5、7 组合由于扩增出的条带少,且扩增条带清晰度较差,不能满足 ISSR-PCR 扩增的要求。第 8、9 组合扩增的条带虽然较亮,但其条带数目较少,不能满足 ISSR-PCR 统计的要求。第 6 种组合,扩增的条带较亮,条带数目较多,可以满足 ISSR-PCR 扩增的需要,是备选组合。第 2 和第 6 组合相比,组合 6 扩增出的条带不但清晰,而且多态性和重复性好,是理想的组合。因此,确定组合 6 为枣树干腐病菌 ISSR-PCR 扩增的最佳组合,即 25 μL 的 PCR 反应体系中含 0.30 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ dNTP、0.4 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ISSR 引物、2.00 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Mg^{2+} 和 0.25 U 的 *Taq* 酶。

2.4 中国不同地区枣树干腐菌群遗传多样性

分析

利用正交实验筛选到的 ISSR-PCR 扩增体系和 10 条多态性较好的引物,对供试的 161 株病原菌单菌丝分离株进行了 PCR 扩增。经 PCR 扩增,共从基因组的 132 个位点扩增出条带,其中多态性的位点 129 个,多态性位点百分率为 97.73%。从引物 VCA13 和 VCA21 对部分病菌的 ISSR-PCR 扩增结果中可以看出,VCA13 的第 2、7、8、9、10、11、12、13、19、20、23 和 24 泳道,VCA21 的第 1、2、3、4、9、10、11、15、17、20 泳道的 PCR 扩增条带带型和其他泳道明显不同。此种现象表明,我国的枣树干腐病菌存在丰富的遗传多样性(图 4,图 5)。

通过 Popgene 软件对我国河南、陕西等 4 个省份

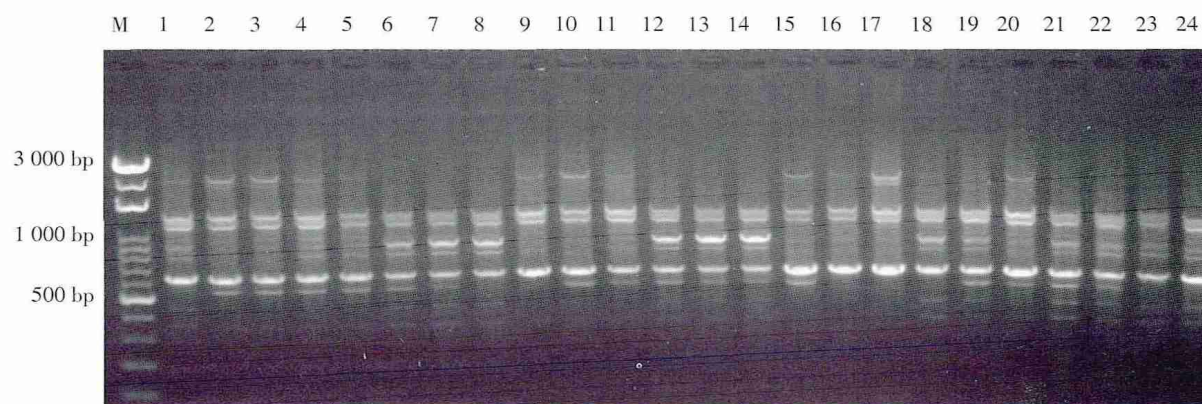


M. 100 bp DNA marker;泳道 1~24. 来自不同省份的 *B. dothidea* 分离株。

M. 100 bp DNA marker; Lane 1 to 24: *B. dothidea* isolates from different provinces.

图4 引物 VCA13 对我国不同地区枣树干腐病菌分离株的 ISSR-PCR 扩增分析

Fig. 4 The ISSR-PCR amplification of 24 *B. dothidea* isolates using the primer VCA13



M. 100 bp DNA marker;泳道 1~24. 来自不同省份的 *B. dothidea* 分离株。

M. 100 bp DNA marker; Lane 1 to 24: *B. dothidea* isolates from different provinces.

图5 引物 VCA21 对我国不同地区枣树干腐病菌分离株的 ISSR-PCR 扩增分析

Fig. 5 The ISSR-PCR amplification of 24 *B. dothidea* isolates using the primer VCA21

枣树干腐病菌病原菌群体遗传多样性分析的结果(表4)显示,我国4个省份枣树干腐病菌病原菌群体有效等位基因数(N_e)差异较小,但不同地理种群的基因

多样性指数(H)、多态性位点数(NP)和多态性位点百分率存在较大差异。河南群体的基因多样性指数最高,而山东群体的基因多样性指数最低。在物种

表4 中国4省份枣树干腐病菌的群体遗传多样性分析

Table 4 The population genetic diversity of *B. dothidea* isolates from four Chinese jujube producing provinces

地理群体 Geographical Population	菌株数 Isolates No.	等位基因观测数 Observed number of alleles, N_a	有效等位基因数 Effective number of alleles, N_e	Nei's基因多 样性指数 Nei's gene diversity index, H	Shannon 信息指数 Shannon's information index, I	多态性位点数 Number of polymorphic loci, NP	多态性位点百分率 Percentage of polymorphic loci, P/%
河南 Henan	105	1.954 5	1.410 4	0.248 6	0.386 4	126	95.45 a
陕西 Shaanxi	25	1.598 5	1.249 2	0.157 3	0.248 7	79	59.85 b
山西 Shanxi	21	1.560 6	1.310 0	0.179 6	0.271 6	74	56.06 b
山东 Shandong	10	1.462 1	1.250 7	0.152 7	0.233 0	61	46.21 c
群体平均水平 Population average level	40	1.643 9	1.305 1	0.184 6	0.285 0	85	64.39
物种水平 Species level	161	1.977 3	1.423 9	0.256 3	0.397 8	129	97.73

注:不同小写字母表示差异达 $P < 0.05$ 显著水平。

Note: The different small letters indicate significant difference ($P < 0.05$).

水平上,病菌的基因多样性指数和Shannon信息指数分别为 $H=0.256\ 3>0.200$ 和 $I=0.397\ 8>0.300$,表明我国4个省份枣树干腐病病菌(*B. dothidea*)具有比较丰富的遗传多样性。

2.5 中国不同地区枣树干腐病菌群体遗传结构与分化

用Popgen软件对我国不同地区的枣树干腐病菌群体遗传结构进行分析,结果表明,我国4个省份枣树干腐病病菌群体有一定的遗传分化,遗传分化系数(G_{st})为0.239 1,即群体间的变异占总变异的

23.91%,群体内的变异占总变异的76.09%,群体内多样性大于群体间多样性。各地区的群体遗传分化存在比较明显的差异。其中,河南群体遗传分化程度最大($G_{st}=0.368\ 9$),山西($G_{st}=0.219\ 2$)和山东($G_{st}=0.146\ 8$)次之,陕西最低($G_{st}=0.082\ 5$)。并且,不同种群之间的居群每代迁移数(N_m)各不相同,但其值均大于1,表明不同的种群之间存在一定的基因流动。河南和山西种群之间的居群每代迁移数较高($N_m=3.605\ 2$),表明这2个种群的病原菌之间存在着比较强的遗传物质交流(表5)。

表5 中国4省份枣树干腐病病菌群体遗传分化分析

Table 5 The population genetic differentiation of *B. dothidea* isolates from four Chinese jujube producing provinces in China

地理区域群体 Geographical population	总遗传多样性 Gene diversity in the species, Ht	群体内遗传多样性 Gene diversity within population, Hs	群体间遗传多样性 Gene diversity among population, Dst	遗传分化系数 Coefficient of population genetic differentiation, G _{st}	居群每代迁移数 Number of migrants per generation, N _m
河南 Henan	0.251 2	0.158 6	0.092 6	0.368 9	0.855 5
陕西 Shaanxi	0.155 8	0.143 0	0.012 8	0.082 5	5.557 6
山西 Shanxi	0.183 4	0.143 2	0.040 2	0.219 2	1.781 3
山东 Shandong	0.152 7	0.130 3	0.022 4	0.146 8	2.905 4
群体水平 Group level	0.242 5	0.184 6	0.057 9	0.239 1	1.591 3
河南/陕西 Henan/Shaanxi	-	-	-	-	2.942 1
河南/山西 Henan/Shanxi	-	-	-	-	3.605 2
河南/山东 Henan/Shandong	-	-	-	-	2.695 4
陕西/山西 Shaanxi/Shanxi	-	-	-	-	1.926 1
陕西/山东 Shaanxi/Shandong	-	-	-	-	1.381 4
山西/山东 Shanxi/Shandong	-	-	-	-	2.704 9

注:“-”代表无实际意义。下同。

Note:“-” means no practical meaning. The same below.

Arlequin软件的分子方差分析(AMOVA)结果也证明,我国枣树干腐病菌群体存在一定的遗传分化。4个地理种群间的遗传变异仅占总变异量的7.96%,不同地理种群内的各自然种群间的遗传变异占总变异量的24.46%,种群内遗传变异占总变异量的67.58%,是我国枣树干腐病菌遗传变异的主要来源(表6)。

2.6 中国不同地区枣树干腐病菌的聚类分析

采用Ntsys软件对我国枣树干腐病菌4个地理种群内的9个自然种群(灵宝、新郑、新乡、杨凌、彬县、太谷、柳林、沂水和诸城自然种群)进行聚类分析的结果(图6)表明,在遗传相似系数为0.19时,可供试的9个自然种群聚为6个不同的聚类群。其中类群II包括新郑和柳林2个自然种群,类群III包括

表6 中国4省份枣树干腐病菌种群间和种群内分子变异的AMOVA分析

Table 6 The analysis of molecular variance (AMOVA) among and within the populations of *B. dothidea* isolates from four Chinese jujube producing provinces in China

变异来源 Source of variance	自由度 Degree of freedom, DF	平方和 Sum of square, SS	变异组分 Variance component, VC	总变异百分率 Percentage of variation, PV/%	F检测 F statistics	概率值 Probability value, P
地理种群间 Among geographical groups	3	391.135	1.512	7.96	0.079 6	<0.001
地理种群内各自然种群间 Among populations within geographical groups	5	380.034	4.649	24.46	0.265 8	<0.001
种群内 Within population	152	1 952.210	12.843	67.58	0.324 2	<0.001
总计 Total	160	2 723.379	19.005	-	-	-

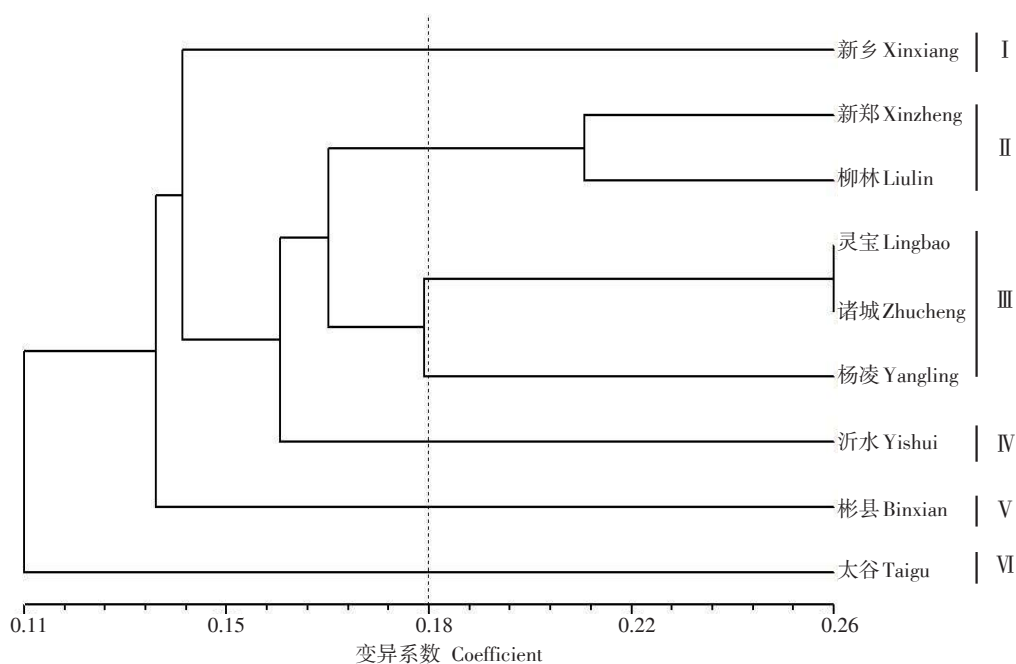


图6 中国4省份9个自然种群的UPGMA聚类分析

Fig. 6 The UPGMA dendrogram of nine populations of *B. dothidea* from four provinces based on ISSR markers

灵宝、诸城和杨凌3个自然种群,其余4个类群(I, IV, V和VI)则分别由来自新乡、沂水、彬县和太谷的4个自然类群形成。分属于不同地理种群的自然种群可以聚为一个类群(类群II和III)的现象表明,不同的地理种群之间存在一定的基因交流,但各自然种群之间的遗传亲缘关系与其地理来源之间没有明显的相关性。

3 讨论

笔者通过正交实验设计,建立了适合枣树干腐病菌ISSR扩增的体系,为研究病原菌群体遗传特性奠定了一定的基础。在试验中,笔者对严重影响PCR扩增的引物、dNTP、 Mg^{2+} 和Taq酶等因素进行了分析,扩增所用DNA模板的质量浓度统一为 $100\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$,确保试验可以获得稳定可靠的结果。然而,有报道指出ISSR扩增的模板DNA浓度,对试验也有一定的影响^[16]。DNA模板浓度对试验有何影响,能在多大程度上影响试验结果,还需要今后进行更为详细的研究。

茶藨子葡萄座腔菌(*B. dothidea*)是一种分布范围广、寄主范围宽的常见病原真菌^[17-18]。从寒带、温带到热带都有分布,其不仅可以侵染苹果^[19]、梨^[20]、桃^[21]、葡萄^[22]、蓝莓^[23]、大枣^[1]等果树,也可以侵染杨树^[24]、桉树^[25]等经济林木,还可以侵染牡丹^[26]等木本

花卉植物。为了适应寄主和生境的巨大差别,病原菌之间应该有较强的遗传差异。彭斌等^[27]通过ISSR-PCR标记发现了64个苹果轮纹病菌(*B. dothidea*)可分为2个不同的类群。Xu等^[28]通过对37株来自于不同寄主的*B. dothidea*分离株的核糖体小亚基(small subunit, SSU)完整序列进行分析,发现SSU序列在3个不同位置上存在4个插入突变,并以此将供试的分离株划分为4个不同的基因型。本研究通过ISSR分子标记分析,揭示了我国不同地区枣树干腐病菌(*B. dothidea*)群体存在比较丰富的遗传多样性,通过聚类分析可将其划分为6个聚类群,表明不同群体之间存在一定的遗传差异,该结论与前两者的研究结果相一致。

葡萄座腔菌属真菌属于子囊菌,病原菌在田间通过有性生殖产生子囊孢子的现象在苹果轮纹病(*B. dothidea*)的研究中已经有过相关的报道^[29]。有性生殖不仅是病菌渡过不良环境的一种方式,而且也是病菌发生遗传变异的重要途径。然而,笔者在病样采集和分离时,并没有观察到病菌有性子实体的存在。但ISSR分子标记的结果却显示病原菌群体的确有较大的遗传差异。这种遗传差异是来自于不同寄主之间病原菌的交互侵染,还是来自于病菌的有性生殖,还需要进一步的研究。

本研究结果显示,我国不同地区的枣树干腐病

菌群体之间存在一定的基因交流($N_m > 1$),但在用DCFA软件对供试菌株的指纹图谱出现的频率进行统计时,没有发现来自不同地区的病菌分离株具有同一谱带的现象,因此,病菌不同种群之间存在基因交流的结论还缺乏直接的分子证据。为了使试验结果更加准确可靠,还需要再采用其他分子标记做更加深入的研究。

4 结论

从40条ISSR引物中筛选到10条扩增多态性良好的引物,并通过正交设计筛选到了适合枣树干腐病菌(*B. dothidea*)进行ISSR-PCR扩增的体系,即25 μL 的反应体系中包括0.3 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ dNTP、0.4 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 引物、2 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ Mg^{2+} 和0.25 U的*Taq*酶。采用该体系对供试的161株病菌进行了扩增,10条引物在132个位点扩增出条带,其中多态性位点129个,多态性位点百分率为97.93%。病原菌群体遗传多样性分析结果显示,我国枣树干腐病菌(*B. dothidea*)群体具有丰富的遗传多样性,群体内多样性大于群体间多样性。不同地理种群间的遗传变异占总变异量的7.94%,不同地理种群内的各自然种群间的遗传变异占总变异量的24.46%,自然种群内各分离株的遗传变异占总变异量的67.58%,是我国枣树干腐病菌遗传变异的主要来源。聚类分析结果表明,在遗传相似系数为0.19时,可将9个病原菌自然种群划分为6个不同的聚类群,存在不同来源的自然种群共享一个聚类群的现象,该现象表明我国枣树干腐病菌的各自然种群之间的遗传亲缘关系与其地理来源无明显相关性。

参考文献 References :

- [1] 赵晓军,周建波,赵子俊,赵志慧,吕国忠. 枣树干腐病原菌的鉴定[J]. 菌物学报,2009,28(3):332-335.
ZHAO Xiaojun, ZHOU Jianbo, ZHAO Zijun, ZHAO Zhihui, LÜ Guozhong. The pathogen causing stem dry rot of *Ziziphus jujuba* [J]. *Mycosystema*, 2009, 28(3): 332-335.
- [2] 赵晓军,周建波,任璐. 枣树干腐病生物学特性研究[J]. 山西农业大学学报(自然科学版),2011,31(5):434-439.
ZHAO Xiaojun, ZHOU Jianbo, REN Lu. Study on biological characteristics of *Fusicoccum aesculi* [J]. *Journal of Shanxi Agricultural University (Natural Science Edition)*, 2011, 31(5): 434-439.
- [3] 赵晓军,周建波,王英,赵子俊,张鑫. 枣树新病害(干腐病)病原菌对不同杀菌剂的室内活性测定[J]. 山西农业科学,2008,36(1):88-89.
ZHAO Xiaojun, ZHOU Jianbo, WANG Ying, ZHAO Zijun, ZHANG Xin. Toxicities of nine fungicides against the pathogen of dry decay disease—a new jujube disease [J]. *Journal of Shanxi Agricultural Sciences*, 2008, 36(1): 88-89.
- [4] ABE K, KOTODA N, KATO H, SOEJIMA J. Resistance sources to *Valsa* canker (*Valsa ceratosperma*) in a germplasm collection of diverse *Malus* species [J]. *Plant Breeding*, 2007, 126(4): 449-453.
- [5] ZIETIEWICZ E, RAFALSKI A, LABUDA D. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR) – anchored polymerase chain reaction amplification [J]. *Genomics*, 1994, 20(2): 176-183.
- [6] KANTETY R V, ZENG X P, BENNETZEN J L, ZEHR B E. Assessment of genetic diversity in dent and popcorn (*Zea mays* L.) inbred lines using inter-simple sequence repeat (ISSR) amplification [J]. *Molecular Breeding*, 1995, 1(4): 365-373.
- [7] ZHOU S G, SMITH D R, STANOSZ G R. Differentiation of *Botryosphaeria* species and related anamorphic fungi using inter simple or short sequence repeat (ISSR) fingerprinting [J]. *Mycological Research*, 2001, 105(8): 919-926.
- [8] 赵嘉平. 树木溃疡病菌-葡萄座腔菌属及相关真菌系统分类研究[D]. 北京:中国林业科学研究院,2007.
ZHAO Jiaping. The phylogenetic taxonomy of *Botryosphaeria* and other related genus in China [D]. Beijing: Chinese Academy of Forestry, 2007.
- [9] WANG S B, MIAO X X, ZHAO W G, HUANG B, FAN M Z, LI Z Z. Genetic diversity and population structure among strains of the entomopathogenic fungus, *Beauveria bassiana*, as revealed by inter-simple sequence repeats (ISSR) [J]. *Mycological Research*, 2005, 109(12): 1364-1372.
- [10] BURGESS T, WINGFIELD M J, WINGFIELD B W. Simple sequence repeat markers distinguish among morphotypes of *Sphaeropsis sapinea* [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2001, 67(1): 354-362.
- [11] SAMBROOK J, RUSSELL D W, HUANG P J. Molecular cloning: A laboratory manual. Cold spring harbor laboratory press (Chinese edition)[M]. 3rd ed. Beijing: Science Press, 1989: 461-516.
- [12] 陈曦,汤庚国,郑玉华,王雷宏. 苹果属山荆子遗传多样性的RAPD分析[J]. 西北植物学报,2008,28(10):1954-1959.
CHEN Xi, TANG Gengguo, ZHENG Yuhua, WANG Leihong. RAPD analysis of genetic diversity of *Malus baccata* (L.) Borkh. [J]. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*, 2008, 28(10): 1954-1959.
- [13] 王建锋,陈长卿,陆宁海,彭云良,詹刚明,黄丽丽,康振生. 四川省小麦条锈菌群体遗传多样性的SSR分析[J]. 菌物学报,2010,29(2):206-213.
WANG Jianfeng, CHEN Changqing, LU Ninghai, PENG Yunliang, ZHAN Gangming, HUANG Lili, KANG Zhensheng. SSR analysis of population genetic diversity of *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici* in Sichuan province, China [J]. *Mycosystema*, 2010, 29(2): 206-

- 213.
- [14] 臧睿,黄丽丽,李正力,高小宁,康振生. 陕西省苹果树腐烂病菌(*Valsa mali*)基因多态性的ISSR分析[J]. 植物保护学报, 2012, 39(1): 51-57.
ZANG Rui, HUANG Lili, LI Zhengli, GAO Xiaoning, KANG Zhengsheng. Polymorphism analysis of *Valsa mali* isolated from Shaanxi province using ISSR markers [J]. Acta Phytophylacica Sinica, 2012, 39(1): 51-57.
- [15] 陆宁海,郑文明,王建锋,詹刚明,黄丽丽,康振生. 陇南地区小麦条锈菌群体遗传多样性SSR分析[J]. 中国农业科学, 2009, 42(8): 2763-2770.
LU Ninghai, ZHENG Wenming, WANG Jianfeng, ZHAN Gangming, HUANG Lili, KANG Zhensheng. SSR analysis of population genetic diversity of *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici* in Longnan region of Gansu, China [J]. Scientia Agricultura Sinica, 2009, 42(8): 2763-2770.
- [16] 刘海燕,侯丽娟,李卫,杨家荣,肖蕊. 棉花黄萎病菌ISSR反应体系优化及其遗传多样性分析[J]. 植物保护学报, 2010, 37(5): 425-430.
LIU Haiyan, HOU Lijuan, LI Wei, YANG Jiarong, XIAO Rui. Optimization of ISSR reaction and analysis of genetic diversity of *Verticillium dahliae* in cotton [J]. Acta Phytophylacica Sinica, 2010, 37(5): 425-430.
- [17] SLIPPERS B, ROUX J, WINGFIELD M J, WALT F J J, JAMI F, MEHL J W M, MARAIS G J. Confronting the constraints of morphological taxonomy in the *Botryosphaeriales* [J]. Persoonia Molecular Phylogeny & Evolution of Fungi, 2014, 33(1): 155-168.
- [18] CROUS P W, SLIPPERS B, WINGFIELD M J, RHEEDER J, MARASAS W F, PHILIPS A J L, ALVES A, BURGESS T, BARBER P, GROENEWALD J Z. Phylogenetic lineages in the Botryosphaeriaceae [J]. Studies in Mycology, 2006, 55: 235-253.
- [19] 赵娜,张伟伟,高小宁,林月莉,康振生,黄丽丽. 中国部分省份苹果轮纹病菌及相关类群的系统学关系[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2011, 39(10): 123-133.
ZHAO Na, ZHANG Weiwei, GAO Xiaoning, LIN Yueli, KANG Zhensheng, HUANG Lili. Phylogenetic relationships of *Botryosphaeria dothidea* and its allies in China [J]. Journal of Northwest A & F University (Natural Science Edition), 2011, 39(10): 123-133.
- [20] ZHAI L F, ZHANG M X, LÜ G, CHEN X R, JIA N N, HONG N, WANG G P. Biological and molecular characterization of four *Botryosphaeria* species isolated from pear plants showing stem wart and stem canker in China [J]. Plant Disease, 2014, 98(6): 716-726.
- [21] WANG F, ZHAO L N, LI G H, HUANG J B, HSIANG T. Identification and characterization of *Botryosphaeria* spp. causing gummosis of peach trees in Hubei province, central China [J]. Plant Disease, 2011, 95(11): 1378-1384.
- [22] YAN J Y, XIE Y, ZHANG W, WANG Y, LIU J K, KYDE K D, SEEM R C, ZHANG G Z, WANG Z Y, YAO S W, BAI X J, DISANAYAKE A J, PENG Y L, LI X H. Species of Botryosphaeriaceae involved in grapevine dieback in China [J]. Fungal Diversity, 2013, 61(1): 221-236.
- [23] XU C N, ZHANG H J, ZHOU Z S, HU T L, WANG S T, WANG Y N, CAO K Q. Identification and distribution of Botryosphaeriaceae species associated with blueberry stem blight in China [J]. European Journal of Plant Pathology, 2015, 143(4): 737.
- [24] 程燕林,吕全,梁军,张星耀. 杨树溃疡病病原-葡萄座腔菌科真菌间关系的系统学初探[J]. 中国森林病虫, 2011, 30(6): 12-17.
CHENG Yanlin, LÜ Jun, LIANG Jun, ZHANG Xingyao. Relationships among fungi of Botryosphaeriaceae causing poplar canker [J]. Forest Pest and Disease, 2011, 30(6): 12-17.
- [25] SLIPPERS B, FOURIE G, CROUS P W, COUTINHO T A, WINGFIELD B D, CARNEGIE A, WINGFIELD M J. Speciation and distribution of *Botryosphaeria* spp. on native and introduced *Eucalyptus* trees in Australia and South African [J]. Studies in Mycology, 2004, 50(2): 343-358.
- [26] 赵丹,康业斌. 牡丹溃疡病-葡萄座腔菌引起的新病害[J]. 植物病理学报, 2012, 42(5): 258-531.
ZHAO Dan, KANG Yebin. Peony canker- a new disease caused by *Botryosphaeria dothidea* in China [J]. Acta Phytopathologica Sinica, 2012, 42(5): 258-531.
- [27] 彭斌,刘丽锋,吴会杰,田莉莉,周增强,古勤生. 苹果轮纹病菌种内遗传多样性研究[J]. 中国农业科学, 2011, 44(6): 1125-1135.
PENG Bin, LIU Lifeng, WU Huijie, TIAN Lili, ZHOU Zengqiang, GU Qinsheng. The intraspecific genetic diversity of pathogenic fungi of apple ring rot [J]. Scientia Agricultura Sinica, 2011, 44(6): 1125-1135.
- [28] XU C, WANG C S, SUN X Y, ZHANG R, GLEASON M L, WIJI T, SUN G Y. Multiple group I intron in the small-subunit rDNA of *Botryosphaeria dothidea*: implication for intraspecific genetic diversity [J]. PloS One, 2013, 8(7): 1-9.
- [29] 肖洲焯,李保华,国立耘. 葡萄座腔菌(*Botryosphaeria dothidea*)的有性阶段在我国苹果主产区的发生[J]. 果树学报, 2013, 30(6): 1005-1010.
XIAO Zhouye, LI Baohua, GUO Liyun. The occurrence of sexual stage of *Botryosphaeria dothidea* in apple main producing areas of China [J]. Journal of Fruit Science, 2013, 30(6): 1005-1010.