

doi:10.11937/bfyy.20180371

# 中国北方苹果炭疽病病原菌 遗传多样性的 ISSR 分析

符丹丹<sup>1</sup>, 张红梅<sup>1</sup>, 孙建瑞<sup>1</sup>, 赵君峰<sup>1</sup>, 张 荣<sup>2</sup>, 孙广宇<sup>2</sup>

(1. 河南科技大学 食品与生物工程学院, 微生物资源开发与利用重点实验室, 河南 洛阳 471023;

2. 西北农林科技大学 植物保护学院, 旱区作物逆境生物学国家重点实验室, 陕西 杨凌 712100)

**摘 要:**以我国北方不同地理来源的 67 株炭疽菌菌株为试材, 采用 ISSR 分子标记聚类分析的方法, 研究了苹果炭疽病病原菌的群体遗传多样性和群体遗传结构, 以期研究苹果炭疽病的流行和防治规律提供参考依据。结果表明:10 条引物共扩增出 65 个位点的多态性条带, 多态率 100.00%。物种水平的聚类分析结果显示, 在遗传相似系数 0.76 水平时, 代表性炭疽菌菌株可区分为 7 个亚群, Nei's 基因多样性指数( $H$ )均大于 0.2 水平, Shannon 信息指数( $I$ )也均大于 0.3 水平, 证明我国北方苹果炭疽病病原菌具有丰富的遗传多样性。通过对 3 个地理种群的遗传结构分析发现, 遗传分化系数( $G_{st}$ )显示渤海湾区最高, 说明渤海湾区的遗传多样性最为丰富, 内部的遗传分化较大, 但每代迁移数  $N_m < 1$ , 说明种群内的基因交流受到抑制; 而后 2 个地区黄河故道区和西北高原区的  $G_{st}$  值均较小, 但种群的每代迁移数  $N_m$  较大, 说明这 2 个种群遗传分化较小, 种群遗传变异主要来自于群落内, 种群内都存在丰富的基因交流。综合 3 个地理种群每代迁移数  $N_m = 0.72$ , 说明 3 个地区之间存在一定的菌源交流。

**关键词:**苹果炭疽病; 炭疽菌属; ISSR 分子标记; 遗传多样性

**中图分类号:**S 436.611.1<sup>+</sup>2 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2018)13-0016-09

苹果炭疽病是苹果生产中的一种重要病害, 在世界各国的苹果种植区普遍发生。该病害可引起生长期的果实腐烂和落果, 采后贮藏期的果实腐烂, 给苹果生产造成重大损失。目前苹果炭疽病的防治还主要以化学防治为主, 但随着各种新型农药的大规模使用, 不但使病原菌对药品的耐药性加强, 还对环境乃至人们的身体健康造成伤害, 因此物理与生物防治以及筛选优良的苹果树

抗病品种才是今后工作发展的方向。因此对苹果炭疽病病原菌种群的遗传多样性研究还应深入, 才有利于遗传育种工作的快速展开。

目前, 常用于植物病原菌种群遗传多样性分析的分子生物学技术主要有 RFLP (restriction fragment length polymorphism)、RAPD (random amplified polymorphic DNA)、AFLP (amplified fragment length polymorphism) 和 ISSR 等。GONZÁLEZ 等<sup>[1]</sup>利用 RFLP 技术分析了美国和巴西的苹果炭疽菌的遗传多样性, 其中围小丛壳 (*Glomerella cingulata*) 分为 7 个分支, 胶孢炭疽菌和尖孢炭疽菌各分为 2 个分支; LEE 等<sup>[2]</sup>应用 RAPD 技术研究韩国苹果炭疽菌的遗传多样性, 聚类分析将胶孢炭疽菌分为 4 个分支, 尖孢炭疽菌分为 2 个分支。在这些分子标记方法中,

**第一作者简介:**符丹丹(1979-), 女, 博士, 讲师, 研究方向为真菌分类学。E-mail: fudandanly@126.com.

**责任作者:**孙广宇(1963-), 男, 博士, 教授, 博士生导师, 研究方向为真菌分子系统学及生物多样性。E-mail: sgy@nwsuaf.edu.cn.

**基金项目:**国家自然科学基金资助项目(31171797)。

**收稿日期:**2018-03-21

RFLP 技术操作繁琐、检测周期长且成本较高; RAPD 技术对反应条件敏感, 重复性不高; AFLP 技术重复性高, 但操作繁琐、费用较高; 而 ISSR 技术是由 ZIETKIEWICZ 等<sup>[3]</sup>于 1994 年创建的分子标记, 具有多态性好、稳定性强、重复性高且操作简单等优点。该试验旨在利用 ISSR-PCR 反应体系及筛选的引物对采集自我国北方苹果产区苹果炭疽病原菌的遗传多样性进行分析, 以期研究苹果炭疽病的流行和防治规律提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 供试菌株

遗传多样性分析选用采自辽宁、山东、河南和陕西的 67 株苹果炭疽病原菌(表 1)。所有试验菌株均保藏于西北农林科技大学真菌研究室。

表 1 供试苹果炭疽病菌分离株的来源、宿主和采集地点  
Table 1 The geographic origins and host of the test isolates

序号 No.	菌株编号 Coda of isolates	采集人及时间 Collector and collecting time/(年-月)	采集地点 Geographic origins
1	F10PGCJJ1	庄杰丽, 2010-10	辽宁兴城市
2	F10PGCJJ3	庄杰丽, 2010-10	辽宁兴城市
3	F10PGHLD3	庄杰丽, 2010-10	辽宁兴城市
4	F10PGSLZ3	庄杰丽, 2010-10	辽宁兴城市
5	F10PGWFT2	庄杰丽, 2010-10	辽宁绥中县
6	F10PGBYS01	庄杰丽, 2010-10	辽宁庄河市
7	F10PGBYS03	庄杰丽, 2010-10	辽宁庄河市
8	F10PGBYS04	庄杰丽, 2010-10	辽宁庄河市
9	F10PGBYS05	庄杰丽, 2010-10	辽宁庄河市
10	F10PGBYS07	庄杰丽, 2010-10	辽宁庄河市
11	F10PGBYS08	庄杰丽, 2010-10	辽宁庄河市
12	F10PGBYS09	庄杰丽, 2010-10	辽宁庄河市
13	F10PGBYS10	庄杰丽, 2010-10	辽宁庄河市
14	F10PGBYS12	庄杰丽, 2010-09	辽宁庄河市
15	F11PGYT02	符丹丹, 2011-09	山东省烟台市
16	F11PGYT03	符丹丹, 2011-09	山东省烟台市
17	F11PGYT04	符丹丹, 2011-09	山东省烟台市
18	F11PGYT11	符丹丹, 2011-09	山东省烟台市
19	F12PGSQ01	符丹丹, 2012-09	河南省商丘市
20	F12PGSQ02	符丹丹, 2012-09	河南省商丘市
21	F12PGSQ04	符丹丹, 2012-09	河南省商丘市
22	F12PGSQ05	符丹丹, 2012-09	河南省商丘市
23	F12PGSQ06	符丹丹, 2012-09	河南省商丘市
24	F12PGXY01	符丹丹, 2012-09	河南省夏邑县
25	F12PGXY02	符丹丹, 2012-09	河南省夏邑县
26	F12PGXY03	符丹丹, 2012-09	河南省夏邑县

表 1(续)

Table 1(Continued)

序号 No.	菌株编号 Coda of isolates	采集人及时间 Collector and collecting time/(年-月)	采集地点 Geographic origins
27	F12PGXY04	符丹丹, 2012-09	河南省夏邑县
28	F12PGXY05	符丹丹, 2012-09	河南省夏邑县
29	F12PGMJ01	符丹丹, 2012-08	河南省孟津县
30	F11PGZH01	符丹丹, 2011-09	河南省郑州市
31	F11PGZH02	符丹丹, 2011-09	河南省郑州市
32	F11PGZH03	符丹丹, 2011-09	河南省郑州市
33	F11PGZH04	符丹丹, 2011-09	河南省郑州市
34	F11PGZH10	符丹丹, 2011-09	河南省郑州市
35	F11PGZH11	符丹丹, 2011-09	河南省郑州市
36	F11PGZH12	符丹丹, 2011-09	河南省郑州市
37	F11PGZH23	符丹丹, 2011-09	河南省郑州市
38	F12PGZH30	符丹丹, 2011-09	河南省郑州市
39	F12PGZH31	符丹丹, 2011-09	河南省郑州市
40	F12PGZH32	符丹丹, 2011-09	河南省郑州市
41	F12PGZH35	符丹丹, 2011-09	河南省郑州市
42	F12PGZH37	符丹丹, 2011-09	河南省郑州市
43	F12PGZH41	符丹丹, 2011-09	河南省郑州市
44	F12PGZH44	符丹丹, 2011-09	河南省郑州市
45	F12PGZH48	符丹丹, 2011-09	河南省郑州市
46	F10PGQX02	朱明旗, 2010-10	陕西省乾县
47	F11PGQX03	符丹丹, 2011-09	陕西省乾县
48	F11PGQX05	符丹丹, 2011-09	陕西省乾县
49	F11PGQX06	符丹丹, 2011-09	陕西省乾县
50	F11PGQX17	符丹丹, 2011-09	陕西省乾县
51	F11PGQX23	符丹丹, 2011-09	陕西省乾县
52	F11PGQX26	符丹丹, 2011-09	陕西省乾县
53	F12PGQX41	符丹丹, 2012-09	陕西省乾县
54	F12PGDL01	符丹丹, 2012-08	陕西省大荔县
55	F11PGLQ04	符丹丹, 2011-09	陕西省礼泉县
56	F11PGLQ05	符丹丹, 2011-09	陕西省礼泉县
57	F11PGLQ06	符丹丹, 2011-09	陕西省礼泉县
58	F11PGLQ22	符丹丹, 2011-09	陕西省礼泉县
59	F11PGLQ23	符丹丹, 2011-09	陕西省礼泉县
60	F11PGLQ25	符丹丹, 2011-09	陕西省礼泉县
61	F12PGLQ30	符丹丹, 2011-08	陕西省礼泉县
62	F12PGLQ33	符丹丹, 2011-08	陕西省礼泉县
63	F12PGLQ34	符丹丹, 2011-08	陕西省礼泉县
64	F12PGLQ35	符丹丹, 2011-08	陕西省礼泉县
65	F12PGLQ36	符丹丹, 2011-08	陕西省礼泉县
66	F12PGLQ37	符丹丹, 2011-08	陕西省礼泉县
67	F12PGLQ38	符丹丹, 2011-08	陕西省礼泉县

1.1.2 试剂

DNA 标准分子量 DS<sup>TM</sup>2 000, 广州东盛生物科技有限公司; 十六烷基三甲基溴化铵(CTAB)、琼脂糖、buffer、dNTP、Mg<sup>2+</sup>、Taq DNA 聚合酶, 均购自西安沃尔森生物技术有限公司; 供试引物为哥伦比亚大学公布的 10 条引物(表 2), 由上海生工生物工程技术有限公司合成。

表2 ISSR引物  
Table 2 Primers for ISSR

引物 Primer	序列 Sequence
807	AGA GAG AGA GAG AGA GT
810	GAG AGA GAG AGA GAG AT
816	CAC ACA CAC ACA CAC AT
825	ACA CAC ACA CAC ACA CT
835	AGA GAG AGA GAG AGA GYC
841	GAG AGA GAG AGA GAG AYC
855	ACA CAC ACA CAC ACA CYT
864	ATG ATG ATG ATG ATG ATG
886	VDV CTC TCT CTC TCT CT
889	DBD ACA CAC ACA CAC AC

注: Y=(C,T); B=(C,G,T); D=(A,G,T); V=(A,C,G)。

### 1.1.3 仪器

BX51 显微镜、DP72 数码成像系统, 日本奥林巴斯株式会社; PowerPac™ 电泳仪、S1000™ PCR 扩增仪、Universal Hood II 凝胶成像系统, 伯乐生命医学产品(上海)有限公司; Nanodrop 2000 核酸蛋白检测仪, 美国赛默飞世尔科技(中国)有限公司; 5804R 冷冻高速离心机, 德国艾本德(中国)有限公司。

## 1.2 试验方法

### 1.2.1 病原菌鉴定

根据 SUTTON<sup>[4]</sup> 分类系统对采自辽宁、山东、河南和陕西的 67 株菌株进行形态学鉴定。将分离株接种于 PDA 培养基上, 12 h 光暗交替条件下 25 ℃ 培养, 待菌落长满全皿后, 观察分离株分生孢子形态及培养特征。

### 1.2.2 基因组 DNA 的提取

供试菌株在 PDA 培养基上 25 ℃ 恒温培养 7 d, 用接种针挑取菌丝置于离心管中, 用改良的 CTAB 法<sup>[5]</sup> 提取基因组 DNA。提取的 DNA 用核酸蛋白检测仪测定浓度与纯度。

### 1.2.3 ISSR-PCR 产物的扩增和电泳检测

扩增反应体系为: 总反应体积 25 μL, 其中 2.5 mmol · L<sup>-1</sup> Mg<sup>2+</sup> 2 μL, 0.1 mmol · L<sup>-1</sup> dNTP 2 μL, 2 U Taq DNA 聚合酶 0.4 μL, 0.8 μmol · L<sup>-1</sup> 引物 1 μL, 1 μL DNA 模板(含量 50 ng), Buffer 缓冲液 2.5 μL, 其余部分用水补足。扩增程序为 94 ℃ 预变性 5 min, 94 ℃ 变性 30 s, 51 ℃ 退火 1 min, 72 ℃ 延伸 1.5 min, 40 个循环, 最后 72 ℃ 延伸 10 min。PCR 扩增产物用

1.0% 的琼脂糖凝胶电泳检测(1×TAE 电泳缓冲液, 130 V 电压), 上样 2.5 μL, 荧光染料 EZVISION One 染色, 扩增产物在凝胶成像系统下观察并拍照。

## 1.3 数据分析

利用优化好的反应体系和筛选好的多态性较好的引物对供试菌株进行 ISSR-PCR 扩增。扩增结果通过 Marker DL 2 000 估计所扩增片段大小, 若扩增带存在则赋值为“1”, 不存在则赋值为“0”, 统计后建立数据矩阵表。用 NTSYS-PC2.10e 软件进行聚类分析, 分析菌株亲缘关系与其菌落类型和地理来源的相关性。用 POP-GENE v1.32 软件计算遗传多样性参数。 $N_a$ : 观察等位基因数;  $N_e$ : 有效等位基因数;  $H$ : Nei's 基因多样性指数;  $I$ : Shannon 信息指数;  $NP$ : 多态性位点数;  $P$ : 多态性位点百分率<sup>[6-7]</sup>。

## 2 结果与分析

### 2.1 病原菌鉴定

将供试的病原菌菌株按地理来源分为渤海湾区、黄河故道区和西部高原地区 3 个不同的种群, 其中来自渤海湾区的 18 株, 包括绥中县王凤台镇 1 株、兴城市双树乡 2 株、元台子乡 1 株、葫芦岛市 1 株、庄河市步云山乡 9 株, 以及山东省烟台的菌株 4 株; 黄河故道区分离到 27 株, 包括商丘市的菌株 5 株、商丘夏邑县的菌株 5 株、郑州的菌株 16 株、还有洛阳孟津的菌株 1 株; 西部高原地区分离到 22 株, 包括乾县的 8 株、大荔的 1 株和礼泉的 13 株。

从形态学上来区分, 供试菌株具有典型的两端钝圆或一端渐尖、圆柱状的分生孢子, 归属于胶孢炭疽菌群 *C. gloeosporioides*。胶孢炭疽菌群大部分菌株的菌落疏松如棉絮状, 颜色浅灰色; 个别菌株菌落致密如毡状, 气生菌丝较纤细, 颜色深灰色至灰黑色。而具有两端渐尖梭状的分生孢子, 归属于尖孢炭疽菌群 *C. acutatum*。尖孢炭疽菌群菌株为灰白色菌落, 大部分产孢能力较强, 能在菌落中产生粉红色色素, 个别菌株产孢能力较弱。

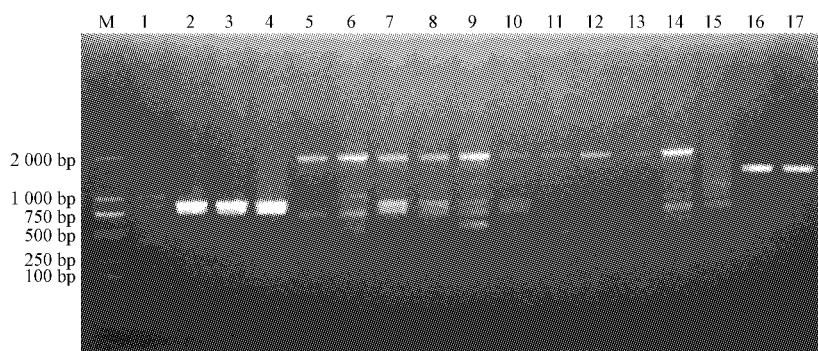
### 2.2 中国北方不同产区苹果炭疽病病原菌种群的 ISSR 分析

用所筛选的 10 个 ISSR 引物<sup>[8]</sup> 对供试的 67

株苹果炭疽菌进行 PCR 扩增,共扩增出 65 个多态性位点,多态率 100%,说明这些引物对于苹果炭疽菌具有较好的多态性。

引物 810 对其中 17 株不同地点不同分类的供试菌株的扩增结果如图 1 所示,共扩增出 9 条多态性条带,扩增条带最多的是泳道 9、14 的菌株 F10PGBYS01 和 F12PGXY01,均扩增出 5 条多

态性条带;扩增条带最少的是 16、17 泳道的菌株 F12PGXY04 和 F12PGXY03,各扩增了 1 条条带;其余泳道分别扩增出 2~4 条多态性条带,虽然多态性条带不多,但不同菌株多态性条带分布的位点各不相同,可见引物 810 对该地区的苹果炭疽菌的多态性较好。



注:M. DNA Marker  $DS^{TM}2\ 000$ ;1. F12PGSQ02;2. F10PGCJJ1;3. F11PGYT02;4. F12PGMJ01;5. F11PGLQ22;6. F10PGBYS12;7. F10PGBYS04;8. F10PGBYS08;9. F10PGBYS01;10. F12PGLQ30;11. F11PGZH23;12. F11PGQX17;13. F11PGZH02;14. F12PGXY01;15. F12PGSQ01;16. F12PGXY04;17. F12PGXY03.

图 1 引物 810 对 17 株中国各地菌株的 ISSR-PCR 扩增结果

Fig. 1 ISSR-PCR amplification of 17 tested strains in China with primer 810

### 2.3 苹果炭疽病原菌不同地理种群的群体遗传多样性分析

按地理来源可将所有供试的苹果炭疽病原

菌分为 3 个地理种群,第 1 种群为来自环渤海湾的 18 株菌株(图 2);第 2 个种群为来自黄河故道区的 27 株菌株(图 3);第 3 个种群为来自西北黄

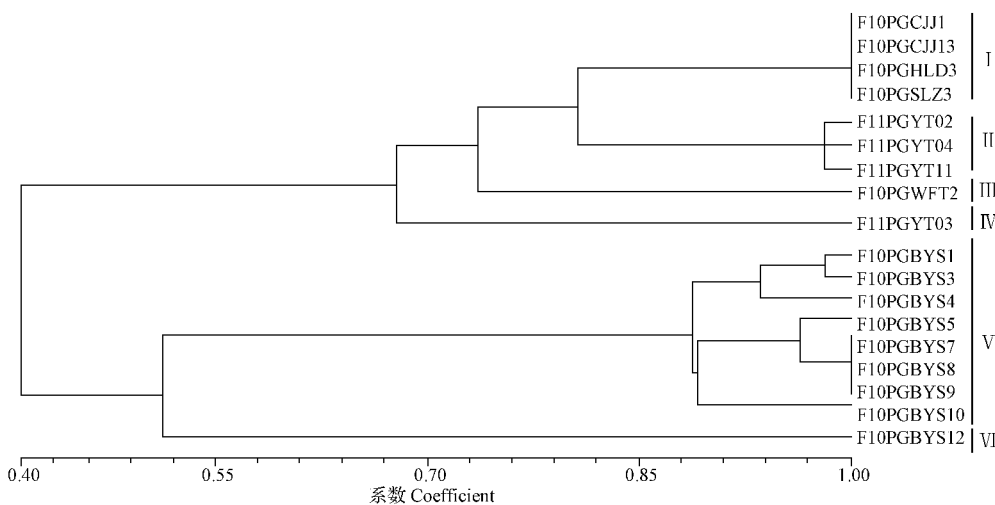


图 2 渤海湾产区苹果炭疽病原菌的聚类分析

Fig. 2 Cluster analysis of *Colletotrichum* isolates causing bitter rot of apple in Bohai gulf

土高原产区的 22 株菌株(图 4)。利用 POP-GENE 1.32 软件对 3 个不同地理种群供试菌株的群体遗传多样性进行统计,由表 3 可知,苹果炭疽菌种群具有比较丰富的遗传多样性,不同地理来源的多态性位点数  $NP$  各不相同,渤海湾区为 56,黄河故道区最高为 63,而西部地区为 53;因而它们的多态性位点百分率也不同,分别为 86.15%、96.92%和 81.54%; $Nei's$  遗传多样性指数( $H$ ) 3 个地区分别为 0.253 8、0.273 7 和

0.277 5,均在 0.2 以上,而 3 个地区的 Shannon 信息指数( $I$ )分别为 0.391 1、0.427 6 和 0.416 7,也均在 0.3 以上,说明 3 个不同地理区域的种群遗传多样性水平均较高。从 3 个不同地区的细分地理种群来看,渤海湾区的  $H$  值和  $I$  值最低,另外 2 个地区种群的  $H$  值和  $I$  值均比渤海湾区高得多,证明黄河故道区和西北高原区的遗传多样性比渤海湾区要更为丰富。

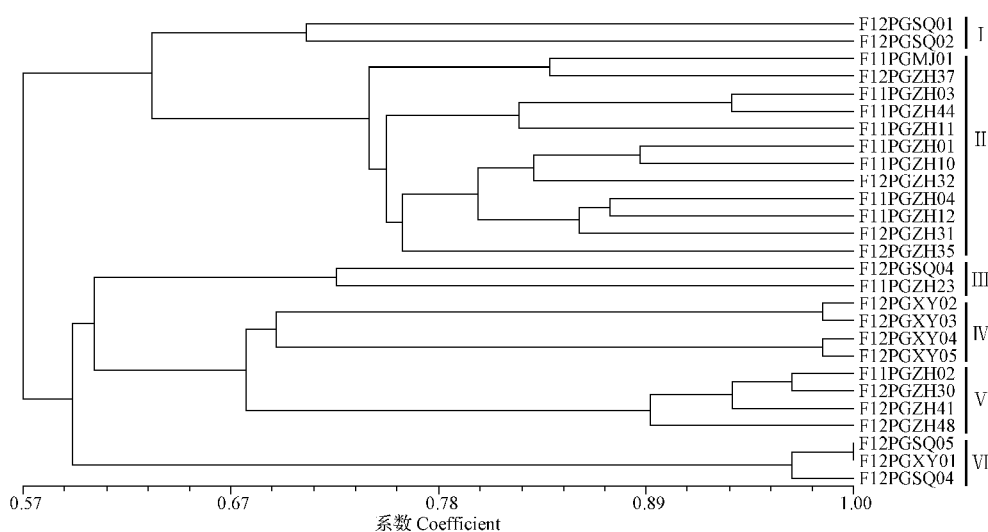


图 3 黄河故道产区苹果炭疽病菌的聚类分析

Fig. 3 Cluster analysis of *Colletotrichum* isolates causing bitter rot of apple in old course of Yellow River

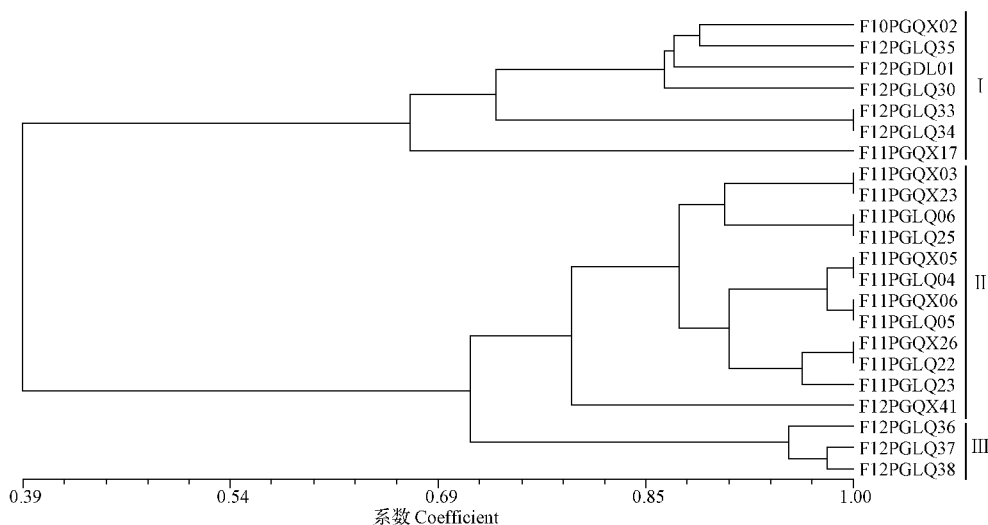


图 4 西北黄土高原区苹果炭疽病原菌的聚类分析

Fig. 4 Cluster analysis of *Colletotrichum* isolates causing bitter rot of apple in the Northwestern Loess Plateau

表 3 中国北方苹果炭疽菌 3 个不同地理种群的遗传多样性水平

Table 3 Genetic diversity within three geographical groups of *Colletotrichum* sp. in north of China

地理种群 Geographical group	菌株数 Isolates number	观察等位 基因数 <i>N<sub>a</sub></i>	有效等位 基因数 <i>N<sub>e</sub></i>	Nei's 基因 多样性指数 <i>H</i>	Shannon 信息指数 <i>I</i>	多态性位 点数 <i>NP</i>	多态性位 点百分率 <i>P</i> /%
渤海湾产区 Bohai gulf area	18	1.861 5	1.408 3	0.253 8	0.391 1	56	86.15
黄河故道区 Old course of Yellow River	27	1.969 2	1.435 8	0.273 7	0.427 6	63	96.92
西北黄土高原区 Northwestern Loess Plateau	22	1.815 4	1.476 1	0.277 5	0.416 7	53	81.54
中国 China	67	2.000 0	1.559 0	0.332 9	0.503 8	65	100.00

2.4 苹果炭疽病原菌不同地理种群的群体遗传结构与分化

利用 POPGENE 1.32 软件中的 Nei's 指数法对 3 个不同地理种群供试菌株的群体遗传多样性进行统计,由表 4 可知,总遗传多样性(*H<sub>t</sub>*)3 个地区分别为渤海湾区最高为 0.313 3,黄河故道区 0.285 7,而西北高原区最低为 0.270 9;群体内遗传多样性(*H<sub>s</sub>*)分别为渤海湾区最低 0.112 7,黄河故道区最高 0.259 5,而西北高原区居中为 0.258 4;3 个地理区域的遗传分化系数(*G<sub>st</sub>*)显示渤海湾区最高为 0.640 3,群体内遗传变异占总变异的 36%,说明遗传分化主要存在于群体间,而

每代迁移数(*N<sub>m</sub>*)最小,仅为 0.280 8(小于 1),说明该地区的基因交流受到了抑制,这和渤海湾区内 3 个地理种群隔海相望的地理隔离情况一致;黄河故道区的 *G<sub>st</sub>* 值为 0.091 6,群体内遗传变异占总变异的 90.8%,说明遗传变异主要存在于群体内,基因流 *N<sub>m</sub>* 为 4.957 1,说明黄河故道区不同种群间存在比较广泛的基因流动;西北高原区的 *G<sub>st</sub>* 值为 0.045 9,群体内遗传变异占总变异的 95.4%,说明遗传变异主要存在于群体内,基因流 *N<sub>m</sub>* 为 10.396 7,说明该地区菌源交流最为广泛。综合,3 个地理种群 *N<sub>m</sub>* 的分析结果,总 *N<sub>m</sub>* 值为 0.721 9,说明 3 个地区间存在一定的基因流动。

表 4 中国北方苹果炭疽菌 3 个不同地理种群的遗传分化及基因流

Table 4 Genetic diversity within three geographical groups of *Colletotrichum* sp. in north of China

地理种群 Geographical group	菌株数 Isolates number	总遗传多样性 <i>H<sub>t</sub></i>	群体内遗传 多样性 <i>H<sub>s</sub></i>	遗传分化系数 <i>G<sub>st</sub></i>	每代迁移数 <i>N<sub>m</sub></i>
渤海湾区 Bohai gulf area	18	0.313 3	0.112 7	0.640 3	0.280 8
黄河故道区 Old course of Yellow River	27	0.285 7	0.259 5	0.091 6	4.957 1
西北黄土高原区 Northwestern Loess Plateau	22	0.270 9	0.258 4	0.045 9	10.396 7
中国北方 North of China	67	0.329 9	0.194 9	0.409 2	0.721 9

2.5 中国北方各产区苹果炭疽病原菌综合聚类分析

从对中国北方苹果炭疽病原菌 3 个地理种群的聚类分析中可以看出(图 5),渤海湾区与黄河故道区这 2 个种群聚为一个枝,说明这 2 个地理种群间因为基因流动较多因而遗传关系较近,只有西北高原区单独为一枝,说明其遗传关系较前二者较远。

从物种水平来看,为得到试验误差最小的聚类分析图,将分离所得的苹果炭疽病原菌菌株按照种群分类和地域分布挑选最具代表性的 17 株进行 ISSR-PCR 扩增,10 条引物共在 95 个位点扩增出明显条带,其中多态性位点为 95 个,多

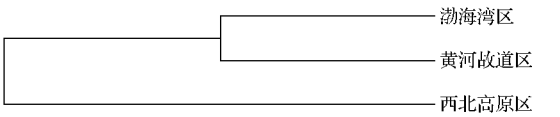


图 5 中国北方各产区代表性苹果炭疽菌的聚类分析

Fig. 5 Clustering analysis of representative strains isolated from bitter rot in north of China

态性百分率为 100%。

17 株代表性苹果炭疽菌菌株的聚类结果如图 6 所示,在遗传相似系数 0.52 水平,供试菌株被划分为 2 个大的类群,即胶孢复合群和尖孢复合群。其中胶孢复合群在相似系数 0.76 处,可分为 5 个类群,类群 I 包括河南夏邑县采集的

F12PGXY03 和 F12PGXY04; 类群 II 包括河南商丘和夏邑的菌株 F12PGSQ01 和 F12PGXY01; 类群 III 包含了分别分自河南、陕西、山东和辽宁各省的 5 株代表性菌株: F12PGSQ02、F11PGLQ22、F11PGYT02、F10PGCJJ1、F12PGMJ01; 类群 IV 为采自河南郑州的菌株 F11PGZH02; 类群 V 包含了分自陕西和河南的 3 株菌株(F11PGQX17、

F12GLQ30 和 F11PGZH23), 这 3 株菌株与其它胶孢群的菌株有着较大的遗传差异。在相似系数 0.53 处, 第 2 个大类群分别可分为类群 VI 和 VII, 其中类群 VI 是由采自辽宁的 3 株菌株(F10PGBYS01、F10PGBYS04 和 F10PGBYS08)组成; 最后一个类群 VII 则由菌株 F10PGBYS12 代表。

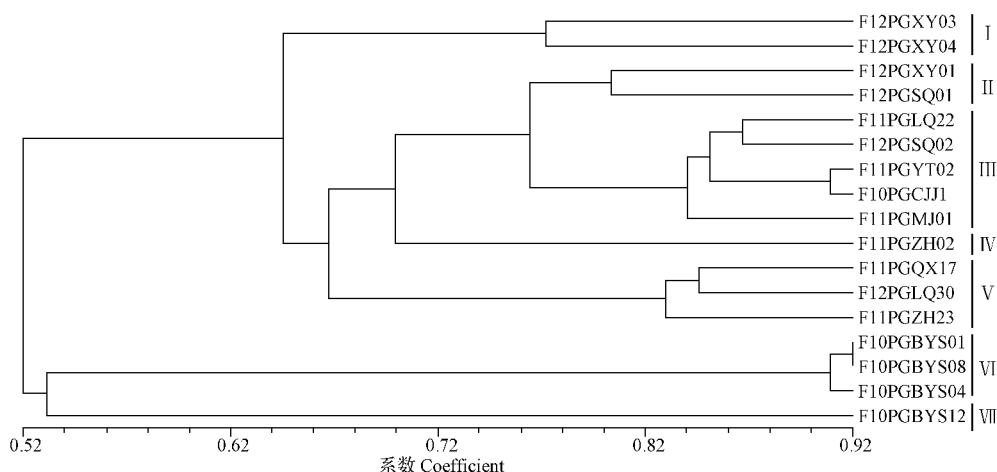


图 6 中国北方苹果炭疽菌的聚类分析

Fig. 6 Cluster analysis of *Colletotrichum* strains isolated from bitter rot in north of China

### 3 结论与讨论

ISSR 是针对微卫星序列研究发展的一种分子标记方法, 针对微卫星序列设计的引物实际上是对基因组上所有微卫星位点进行全面的扫描, 目前已在很多植物及植物病原菌的 DNA 指纹图谱构建、遗传多样性与亲缘关系等研究中广泛应用<sup>[9-12]</sup>。因此不同的物种所优化的引物可能差异很大, 而相同物种不同菌株之间的引物扩增的条带也可能有很大差异。如该研究所优化的 10 条引物与其它菌的 ISSR 引物就有较大差别, 且条带数量与清晰度也各有不同。ISSR 分析虽然可能在某些相近种上的分辨力不及多基因分析方法, 但在某些种上甚至具有比多基因分析更敏感的分辨力, 加上 ISSR 分子标记还具有操作简便、扩增的稳定性强、试验消耗较低和对实验室设备以及样品 DNA 的要求均不高等优点, 可广泛应用于大量菌株样本的检测, 将 ISSR 分析中分类相同的菌株挑取代表性菌株进行多基因分析, 既节约试验成本, 又可得到更精确的结果。

炭疽菌(*Colletotrichum*)分布广泛、宿主繁多, 是一类重要的植物病原真菌<sup>[13-14]</sup>。苹果炭疽病的病原菌是一种弱寄生菌, 分生孢子是在苹果的枯伤枝处或是形成僵果以菌丝或形成分生孢子盘来越冬, 而传播也主要靠风吹雨溅, 传播距离和范围均十分有限<sup>[15]</sup>。但由于果树品种的引进<sup>[16-17]</sup>和苹果进口检疫工作的不到位, 苹果炭疽叶枯病从 2008 年在河南商丘地区小范围爆发<sup>[18]</sup>, 到现在已开始向安徽、江苏、山东、河北、山西和陕西扩展<sup>[19-20]</sup>。为了更好的防治炭疽病, 该试验以苹果炭疽病菌为研究对象, 利用筛选的 10 条多态性引物和优化 ISSR-PCR 反应体系对我国北方不同地理来源的 67 株代表性苹果炭疽菌菌株进行 ISSR 聚类分析, 物种水平的聚类分析结果显示, 在遗传相似系数 0.76 水平时, 代表性苹果炭疽菌菌株可区分为 7 个亚群, 显示 ISSR 聚类分析方法在苹果炭疽病原菌种级水平及种群水平均具有很好的区分能力, 通过对苹果炭疽菌种群多样性的研究; 还证明这些病原菌种间存在明显的遗传分化。从对中国 3 个地理种群的聚类

分析中可以看出,渤海湾区与黄河故道区这2个种群菌群交流更为密切,基因流动较多因而遗传关系较近,而西北高原区因其地缘关系,遗传关系较前二者较远。通过对这些病原菌种群遗传多样性、群体遗传结构和菌源传播关系的深入了解,对于研究苹果炭疽病的流行和防治规律具有重要的意义。

### 参考文献

- [1] GONZÁLEZ E, SUTTON T B, CORRELL J C. Clarification of the etiology of *Glomerella* leaf spot and bitter rot of apple caused by *Colletotrichum* spp. based on morphology and genetic, molecular, and pathogenicity tests[J]. *Phytopathology*, 2006, 96(9):982-992.
- [2] LEE D H, KIM D H, JEON Y A, et al. Molecular and cultural characterization of *Colletotrichum* spp. causing bitter rot of apples in Korea[J]. *The Plant Pathology Journal*, 2007, 23(2):37-44.
- [3] ZIETKIEWICZ E, RAFALSKI A, LABUDA D. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain-reaction amplification[J]. *Genomics*, 1994, 20(2):176-183.
- [4] SUTTON B C. The *Coelomycetes*[M]. England: Commonwealth Mycological Institute, 1980.
- [5] BARNES I, GAUR A, BURGESS T, et al. Microsatellite markers reflect intra-specific relationships between isolates of the vascular wilt pathogen *Ceratocystis fimbriata* [J]. *Molecular Plant Pathology*, 2001, 2(6):319-325.
- [6] 王建峰. 陕西、甘肃、四川三省小麦条锈菌分子群体遗传结构研究[D]. 杨凌:西北农林科技大学, 2010.
- [7] 臧睿, 黄丽丽, 李正力, 等. 陕西省苹果树腐烂病菌基因多态性的 ISSR 分析[J]. *植物保护学报*, 2012, 39(1):51-57.
- [8] 符丹丹, 庄杰丽, 张荣, 等. 苹果炭疽病原菌 ISSR-PCR 反应体系的优化及遗传多样性分析[J]. *植物保护学报*, 2013, 40(3):231-236.
- [9] 段丽君, 曹有龙, 周军. 枸杞 ISSR 反应体系的优化与应用[J]. *西北农林科技大学学报*, 2009, 37(12):133-145.
- [10] 朱桂清, 迟文娟, 吴限鑫, 等. 东北小麦白粉菌遗传多样性及地域关联性分析[J]. *河南农业科学*, 2015, 44(3):77-82.
- [11] 赵秀香, 苏燕妮, 伏颖, 等. 烟草靶斑病菌 (*Rhizoctonia solani*) ISSR 反应体系的优化及遗传多样性分析[J]. *沈阳农业大学学报*, 2016, 47(1):97-102.
- [12] 苏家, 高增贵, 姚远, 等. 利用 ISSR-PCR 分子标记技术分析瓜类枯萎病病原菌遗传多样性[J]. *北方园艺*, 2014(17):97-101.
- [13] CANNON P F, DAMM U, JOHNSTON P R, et al. *Colletotrichum*-current status and future directions[J]. *Studies in Mycology*, 2012, 73:181-213.
- [14] DEAN R, van KAN J A L, PRETORIUS Z A, et al. The top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology[J]. *Molecular Plant Pathology*, 2012, 13(7):414-430.
- [15] GIARETTA D R, BOGO A, COELHO C M M, et al. ITS-rDNA phylogeny of *Colletotrichum* spp. causal agent of apple *Glomerella* leaf spot[J]. *Ciencia Rural*, 2010, 40(4):806-812.
- [16] ALANIZ S, HEMANDEZ L, DAMASCO D, et al. First report of *Colletotrichum acutatum* and *C. fragariae* causing bitter rot of apple in Uruguay[J]. *Plant Disease*, 2012, 96(3):458.
- [17] SPOLTI P, VALDEBENITO-SANHUEZA R M, LARANJEIRA F F, et al. Comparative spatial analysis of the sooty blotch/flyspeck disease complex, bull's eye and bitter rots of apples[J]. *Plant Pathology*, 2012, 61:271-280.
- [18] 孙共明, 刘利民, 朱其高, 等. 苹果新病害:炭疽菌叶枯病的发生与防控[J]. *果农之友*, 2011(12):21.
- [19] 宋清, 王素侠, 杨春亮, 等. 苹果炭疽菌叶枯病的研究初报[J]. *落叶果树*, 2012, 44(2):29-30.
- [20] 李保华, 王彩霞, 董向丽. 我国苹果主要病害研究进展与病害防治中的问题[J]. *植物保护*, 2013, 39(5):46-54.

## Genetic Diversity Analysis of *Colletotrichum* spp. on Apple in North of China Based on ISSR Markers

FU Dandan<sup>1</sup>, ZHANG Hongmei<sup>1</sup>, SUN Jianrui<sup>1</sup>, ZHAO Junfeng<sup>1</sup>, ZHANG Rong<sup>2</sup>, SUN Guangyu<sup>2</sup>

(1. College of Food & Bioengineering, Henan University of Science and Technology/Key Laboratory of Microbial Resources Exploitation and Utilization, Luoyang, Henan 471023; 2. College of Plant Protection, Northwest A & F University/State Key Laboratory of Crop Stress Biology for Arid Areas, Yangling, Shaanxi 712100)

**Abstract:** To discuss the genetic diversity of pathogens associated with apple bitter rot at the molecular level, ISSR markers were applied to analyze the genetic diversity of 67 strains of *Colletotrichum* spp. causing bitter rot of apple in order to supply references for studying the epidemiology and control of apple bitter rot. The results showed that a total of 65 polymorphic bands were amplified with



10 screened primers, and the polymorphic loci percentage was 100.00%. Clustering analysis based on ISSR markers revealed that tested strains were clustered into seven groups at 0.76 genetic similarity coefficient by UPGMA. The results of genetic diversity of 67 strains from different geographical groups showed that Nei's gene diversity index ( $H$ ) and Shannon's information index ( $I$ ) were respectively greater than 0.2 and 0.3, which indicated that the genetic diversity all over China was considerably abundant. The results of population genetic structure of three geographical groups showed that  $G_{ST}$  of the population from Bohai gulf area was the highest, indicating that the genetic diversity of this population was the most abundant and genetic differentiation among groups was bigger. The number of migrants per generation ( $N_m$ ) of this group was less than 1, indicating that gene flow among groups was restrained. The  $G_{ST}$  of the other population were lower but  $N_m$  were higher, indicating that genetic differentiation were lower and genetic variations existed within groups. There was significant gene flow within groups of old course of Yellow River and Northwestern Loess Plateau. The total  $N_m$  was 0.72, indicating that there was pathogen exchange among three geographical groups.

**Keywords:** apple bitter rot; *Colletotrichum*; ISSR molecular marker; genetic diversity

## 欢迎订阅 2018 年《北方园艺》

主 管: 黑龙江省农业科学院  
刊 号: CN 23-1247/S

主 办: 黑龙江省农业科学院、黑龙江省园艺学会  
邮发代号: 14-150

半月刊 每月 15、30 日出版 单价: 15.00 元 全年: 360.00 元  
投稿网址: [www.haasep.cn](http://www.haasep.cn)

全国各地邮局均可订阅, 或直接向编辑部汇款订阅

《北方园艺》是园艺类综合性学术期刊, 设有研究论文、研究简报、设施园艺、园林花卉、资源环境生态、贮藏加工检测、中草药、食用菌、专题综述、产业论坛、不定期刊登栏目(农业经纬、农业经济、农业信息技术)、实用技术、新品种(彩版); 刊载文章力求体现科研—生产—技术服务的全产业链, 汇聚园艺行业最新科研成果, 跟踪园艺学科最新研究热点, 期待广大作者、读者、编委一如既往的支持我们。

中文核心期刊(1992—2014)  
美国化学文摘社(CAS)收录期刊

中国农业核心期刊  
2015、2016 年期刊数字影响力 100 强

地址: 黑龙江省哈尔滨市南岗区学府路 368 号《北方园艺》编辑部  
邮编: 150086 电话: 0451-86674276 信箱: bfybjb@163.com

