

亚欧美栗疫病菌群体的遗传多样性

徐陈贤, 周晓云, 王克荣*

(南京农业大学植物病理学系, 南京 210095)

摘要: 从 120 个随机引物中筛选出条带清晰、主带明显、重复性好的 9 个引物, 对来自不同地域和寄主的 7 个群体的 142 个栗疫病菌菌株进行 RAPD 分析。9 个引物共扩增出条带 124 条, 其中多态性条带 111 条, 多态性比率为 89.52%。利用 Popgen3.2 软件对供试群体进行遗传多样性分析和 UPGMA 聚类。结果表明, 中国地区 4 个群体间的遗传相似性较大, 与美国、意大利和日本群体间的相似性较小; 美国和意大利群体间的遗传相似性较大, 且它们与日本群体间的相似性大于与中国群体间的相似性。病原菌群体的遗传变异率为 0.2351, 其中在地区水平上, 82.34% 由群体内的变异引起, 17.66% 由群体间的差异引起, 群体间的基因流动值为 2.3311; 而在寄主水平上, 则 79.42% 由群体内的变异引起, 20.58% 由群体间的差异引起, 群体间的基因流动值为 1.9297。

关键词: 栗疫病菌; 随机扩增片段多态性; 遗传多样性; 基因流

Genetic diversity of *Cryphonectria parasitica* populations in Asia, Europe and North America

XU Chen-Xian, ZHOU Xiao-Yun, WANG Ke-Rong* (Department of Plant Pathology, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095 China). *Acta Ecologica Sinica*, 2005, 25(2): 232~236.

Abstract: To study the population structure of the chestnut blight fungus *Cryphonectria parasitica*, a total of 142 isolates representing seven geological regions including China, Japan, Italy, and the United States were subject to random amplified polymorphic DNAs (RAPDs) analysis. Among the 120 random primers tested, nine were found to generate distinct DNA fragments. Our studies have shown that 89.52% of 124 RAPD fragments were polymorphic and the Jianyang population of China was the most polymorphic (66.94%), whereas the Japanese population was the least polymorphic (37.1%).

When analyzed at the host level, gene diversity of total populations (H_T) was estimated at 0.1887. However, the gene diversity occurred mainly within populations (79.42%), not between populations (20.58%). The estimated average gene flow (N_m) between populations was 1.9297 and the ratio of polymorphic RAPD fragments obtained from the populations that have *Castanea crenata* as the host was the highest (72.58%). Additionally, the gene diversity (H) of the population isolated from *C. henryi* was highest at 0.2263, whereas the ratio of polymorphic RAPD fragments and gene diversity (H) of the population from *C. sativa* were among the lowest. Furthermore, the gene diversity of the total populations (H_T) was 0.2351 and that within populations (H_s) was 0.1936 at region level. 82.34% of gene diversity was attributable to the diversity within populations than between populations (17.66%, G_{st} = 0.1766). Finally, the gene flow estimate between populations (N_m) was 2.3311, denoting that there was gene flow between populations.

Our results conclude that the population gene diversities (H_T) are the greatest in China. The genetic similarities of RAPD frequencies among populations indicate that Chinese populations are similar to each other, but are distinct from populations of Japan, Italy, and the United States. Interestingly, there is less differentiation between Japanese and American populations and

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30070494)

收稿日期: 2003-10-28; **修订日期:** 2004-06-25

作者简介: 徐陈贤 (1978~), 女, 江苏张家港人, 硕士, 主要从事植物病原真菌分子生物学研究。

* 通讯作者 Author for correspondence. E-mail: wkr01@njau.edu.cn

致谢: 路易斯安那州立大学健康科学中心 (LSUHSC, Department of Pediatrics) 王平博士给予帮助, 特此致谢

Foundation item: National Natural Science Foundation of China (No. 30070494)

Received date: 2003-10-28 **Accepted date:** 2004-06-25

Biography: XU Chen-Xian, Master, mainly engaged in molecular biology of plant pathogenic fungi.

between Japanese and Italian populations than that between Japanese and Chinese populations despite the fact that Japan is geographically closer to China.

Key words: *Cryphonectria parasitica*; random amplified polymorphic DNA; genetic diversity; gene flow

文章编号:1000-0933(2005)02-0232-05 中图分类号:Q346⁺.5; S436.64 文献标识码:A

栗疫病菌 [*Cryphonectria parasitica* (Murr.) Barr] 是引起栗树主枝杆发病并枯死的一种子囊菌。1904 年,美国首次发现栗疫病,此后 40 多年间,由于该病的流行,美洲栗遭到了灭种的威胁^[1,2]。1938 年意大利北部发现栗疫病,以后欧洲各国陆续报道此病发生,欧洲栗也遭到了严重的危害^[3,4]。我国的栗疫病分布广泛,发生历史悠久^[5]。

研究栗疫病菌的群体结构对于了解栗疫病的发生、流行和进行病害的生物防治具有十分重要的意义^[6]。欧洲(意大利、法国)的栗疫病能较快地受到控制,主要因为当地病菌的营养体亲和群(vegetative compatibility group, VCG)数量少,低毒力菌株在群体中扩散较快^[7];美国群体中 VCG 比较复杂,是采用低毒力菌株进行生物防治效果不理想的主要原因之一^[8];在中国,219 个栗疫病菌菌株中就检测到 131 个 VCGs^[9],因此采用低毒力菌株进行中国栗疫病的生物防治必须考虑此因素。据报道,北美的栗疫病菌是 19 世纪末从东亚地区传入^[10],欧洲的栗疫病菌则是 20 世纪 20 年代传入的^[11],但其来源尚不清楚。因此,研究比较亚洲(中国、日本)、美国 and 欧洲栗疫病菌不同生态条件下的群体结构,了解各地区不同树种病害的发生发展和病菌群体间的遗传关系,对确定病害的有效控制途径相当重要。本研究以 RAPD 为标记,对来自不同地区和不同寄主的栗疫病菌群体遗传结构进行比较,目的在于了解不同生态环境(区域、寄主)下病菌群体间的亲缘关系和群体的遗传变异情况。

1 材料与方法

1.1 实验材料

①供试菌株 供试的所有 142 个栗疫病菌菌株来自 7 个群体,分别为中国辽宁、北京、江苏、福建、日本、意大利和美国马里兰州(表 1)。②培养基 采用马铃薯葡萄糖琼脂培养基^[12]。

表 1 参试栗疫病菌群体来源及其寄主
Table 1 Hosts and locations of *Cryphonectria parasitica* populations

群体编号 Population No.	菌株数 <i>N</i>	采集地点 Location	分离时间 Date collected	寄主 Host
1	16	江苏宜兴 Yixing, Jiangsu	Oct. 1987	板栗 <i>Castanea mollissima</i>
2	22	北京怀柔 Huairou, Beijing	Jun. 1991	板栗 <i>C. mollissima</i>
3	24	辽宁丹东 Dandong, Liaoning	Jun. 1991	日本栗 <i>C. crenata</i>
4	16	福建建阳 Jianyang, Fujian	Mar. 1992	锥栗 <i>C. henryi</i>
5	18	意大利 Bergamo, Italy	Nov. 1993	欧洲栗 <i>C. sativa</i>
6	20	日本茨城 Ibaraki, Japan	Oct. 1992	日本栗 <i>C. renata</i>
7	26	美国马里兰 Maryland, America	Jul. 1991	美洲栗 <i>C. dentata</i>

1.2 研究方法

(1)菌株保存与活化 将灭菌滤纸(2cm×2cm)置于 PDA 平板表面,接种菌丝体于 25℃ 下培养。菌丝体长满滤纸后,将滤纸取下放入纸袋(5cm×5cm)中,干燥后置于密封容器中放在-20℃ 下保存。使用时取出少量滤纸片,放在 PDA 平板上于 25℃ 下培养,活化后使用。

(2)菌丝收集 待测菌株在 PDA 平板上培养 3d 后,从菌落边缘挑取 3mm×3mm 的幼嫩菌丝块,移入铺有灭菌玻璃纸的 PDA 平板中央(每菌株培养 3 皿),25℃ 下黑暗培养 7d 后,用解剖刀从玻璃纸上刮取菌丝体,移入 7ml 离心管中,冷冻干燥后,捣碎成均匀的粉末,置-20℃ 冰箱中冷冻保存备用。

(3)基因组 DNA 的提取 提取缓冲液(Extraction Buffer):50mmol/L Tris-HCl (pH8.0),100mmol/L EDTA (pH8.0),1mol/L NaCl,1%CTAB。提取程序见文献^[13]。

(4)RAPD反应体系和扩增程序 引物筛选和 RAPD 分析采用相同的 PCR 反应体系和扩增程序。反应体系:反应体积为 25μl,各反应成分的终浓度分别为 3.5mmol/L MgCl₂、0.3mmol/L dNTP、0.8μmol/L 引物,1u Taq 酶,25ng DNA。扩增程序:94℃ 预变性 4 min;进入循环,94℃ 变性 10 s,37℃ 退火 40 s,72℃ 延伸 70 s,共 45 个循环;最后 72℃ 延伸 10 min。每次 PCR 反应设不加 DNA 模板的空白对照。扩增反应在 MJ Research PTC-200 上进行。

(5)电泳检测 取 PCR 产物 5μl 加 1μl 上样缓冲液,于 1.4% 的琼脂糖凝胶上电泳,稳压(4 V/cm)电泳 3 h。DNA 分子量标准物(Marker DNA Ladder, Taara Biotech 公司的 DL-2000)。用 Bio-Rad 凝胶成像系统检查电泳结果并照相保存。

(6)数据处理 检查每个菌株在每条引物上的扩增图谱,统计可重复性条带,有带或强带记为 1,没有条带或弱带记为 0。运用

Popgen3.2 软件计算栗疫病菌群体的多态性比例、基因多样性指数(H)、总遗传多样性(H_T)、群体内遗传多样性(H_S)、群体间的遗传相似度,并依据遗传相似度进行 UPGMA 聚类分析^[14]。

2 结果与分析

2.1 引物筛选

从 120 个随机引物中共筛选出条带清晰、重复性好的 9 个引物。引物编号、碱基序列和扩增结果见表 2。

2.2 遗传多样性

9 个引物在各群体菌株共扩增出 124 个清晰可靠的条带,其中 111 条为多态性条带,多态性条带的比例为 89.52%。平均每个引物扩增出的条带为 13.8 条,多态性条带为 12.3 条。引物 A-09 扩增出的条带最多,共扩增出 18 条清晰稳定的条带,有 17 条为多态性条带。引物 E-12、O-19、W-02 扩增出的条带数较少,均为 11 条。所有扩增片段的长度均在 250~3000bp 之间(图 1)。

各群体的遗传多样性见表 3。福建建阳群体(来自湖南的 1 个寄主为锥栗的菌株也归入此群体)的多态性条带数目最多,为 83 条,多态性比例为 66.94%;江苏宜兴和北京怀柔的栗疫病菌群体所扩增的多态性条带数目相当,多态性比例相似,分别为 58.06%和 59.68%;来自国外的 3 个群体多态性比例都不高,尤其是日本的菌株群体,多态性比例只有 37.1%。不同群体的基因多样性指数(H)也不相同,与多态性比例基本一致。福建建阳群体的 H 值最高,为 0.2263;江苏宜兴和北京怀柔的 H 值接近,在中国菌株中为基因多样性比较小的群体。总体上,中国群体的 H 值要大于国外群体。

表 3 还显示出在寄主水平上,多态性比例最高的是分离自日本栗的群体,为 72.58%;分离自锥栗的群体基因多样性指数(H)最高,为 0.2263;分离自欧洲栗的栗疫病菌群体多态性比例和基因多样性指数均最低。

表 2 筛选出的引物碱基序列和扩增的条带数

Table 2 Nucleotide sequence and amplification characters of primers

随机引物编号	碱基序列	扩增条带数	多态性条带数
No. of primer	Nucleotide sequence	Amplified bands	Polymorphic bands
A-09	GGGTAACGCC	18	17
B-17	AGGGAACGAG	17	15
E-12	TTATCGCCCC	11	11
I-05	TGTTCCACGG	12	12
O-19	GGTGCACGTT	11	10
Q-14	GGACGCTTCA	14	13
V-07	GAAGCCAGCC	14	10
W-02	ACCCGCCAA	11	10
Y-19	TGAGGGTCCC	16	13
合计 Total		124	111

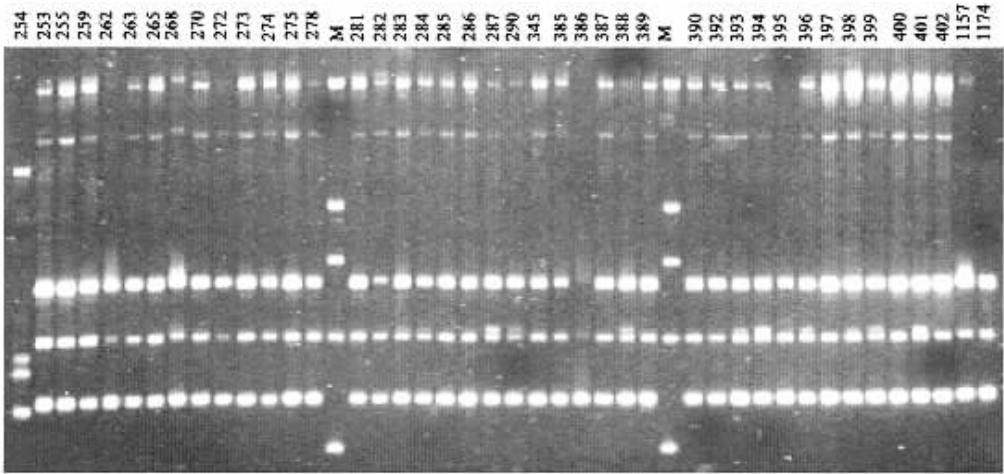


图 1 引物 O-19 在部分栗疫病菌株中的扩增图谱;

Fig. 1 Vertical RAPD patterns obtained in some *Cryphonectria parasitica* isolates with the primer O-19

M Marker DL2000 (Takara Biotech)

2.3 遗传结构

从地域水平上看,栗疫病菌群体的 H_T 为 0.2351,其中 H_S 为 0.1936,表明有 82.34%的遗传多样性发生在群体内(G_{st} 为 0.1766)。群体间的基因流(N_m)为 2.3311,表明不同群体间有一定的基因流动。而从寄主水平上分析,与地域间的结果相似; H_T 为 0.1887,遗传多样性分化主要发生在群体内(占 79.42%),只有 20.58%的遗传多样性分化发生在群体间。群体间的基因流(N_m)为 1.9297。

辽宁丹东和福建建阳这两个地区栗疫病菌群体的遗传相似性最高,为 0.9607;其次是江苏宜兴和北京怀柔的栗疫病菌群体之间的遗传相似性较高(0.9486);美国马里兰群体与北京怀柔群体的遗传相似性最低,只有 0.8641(表 4)。7 个群体的 UPGMA 聚类图如图 2 所示。

表 3 栗疫病菌群体的遗传多样性

Table 3 Genetic diversity of <i>C. parasitica</i> populations				
群体 Population	多态性条带数 Polymorphic bands	多态性比例 Ratio(%)	基因多样性 (H)Gene diversity	
地域水平 At region level	江苏宜兴 ^①	72	58.06	0.1873
	北京怀柔 ^②	74	59.68	0.1875
	辽宁丹东 ^③	79	63.71	0.2002
	福建建阳 ^④	83	66.94	0.2263
	意大利 ^⑤	55	44.35	0.1315
	日本 ^⑥	46	37.10	0.1141
	美国 ^⑦	58	46.77	0.1641
寄主水平 At host level	板栗 ^⑧	88	70.97	0.2108
	锥栗 ^⑨	83	66.94	0.2263
	日本栗 ^⑩	90	72.58	0.2107
	欧洲栗 ^⑪	55	44.35	0.1315
	美洲栗 ^⑫	58	46.77	0.1641
合计 Total	111	89.52	0.2433	

①Yixing, Jiangsu; ②Huairou, Beijing; ③Dandong, Liaoning; ④Jianyang, Fujian; ⑤Italy; ⑥Japan; ⑦America; ⑧*Castanea mollissima*; ⑨*C. henryi*; ⑩*C. crenata*; ⑪*C. sativa*; ⑫*C. dentata*

3 讨论

RAPD 与其他的分子分析技术相比简单得多,而且检测灵敏,方便,多态性强。在植物病原真菌群体遗传学研究中,采用 RAPD 为遗传标记,在寻找性状连锁标记和追踪病原菌的传播与流行等方面优点尤为突出^[15]。

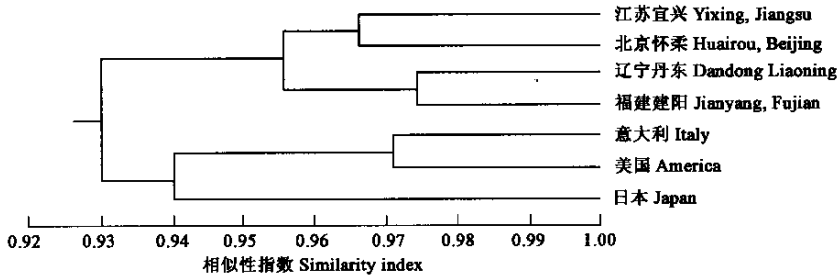


图 2 不同地区栗疫病菌群体 UPGMA 聚类图

Fig. 2 UPGMA dendrogram of *C. parasitica* populations at region level

表 5 不同树种上栗疫病菌群体间的相似性系数
Table 5 The similar coefficients between populations of *C. parasitica* from different chestnut species

寄主 Host	板栗 <i>Castanea mollissima</i>	锥栗 <i>C. henryi</i>	日本栗 <i>C. crenata</i>	欧洲栗 <i>C. sativa</i>
锥栗 <i>C. henryi</i>	0.9414			
日本栗 <i>C. crenata</i>	0.9465	0.9650		
欧洲栗 <i>C. sativa</i>	0.9313	0.9282	0.9247	
美洲栗 <i>C. dentata</i>	0.9256	0.9228	0.9379	0.9506

分离自日本栗和锥栗的群体遗传相似性最高,为 0.9650。总体上,寄主为板栗、锥栗和日本栗的这 3 个来自东亚的群体相似性较高,而欧洲栗和美洲栗的栗疫病菌群体之间更相似(表 5)。5 个群体的 UPGMA 聚类图如图 3 所示。

表 4 不同地区栗疫病菌群体间的相似性系数

Table 4 The similar coefficients between populations of <i>Cryphonectria parasitica</i> from different regions						
地区 Region	宜兴 Yixing	怀柔 Huairou	丹东 Dandong	建阳 Jianyang	意大利 Italy	日本 Japan
怀柔 Huairou	0.9486					
丹东 Dandong	0.9132	0.9237				
建阳 Jianyang	0.9229	0.9262	0.9607			
意大利 Italy	0.9005	0.9139	0.9103	0.9047		
日本 Japan	0.9094	0.9128	0.9295	0.9206	0.9352	
美国马里兰 Maryland, USA	0.9072	0.8641	0.9017	0.9166	0.9535	0.9324

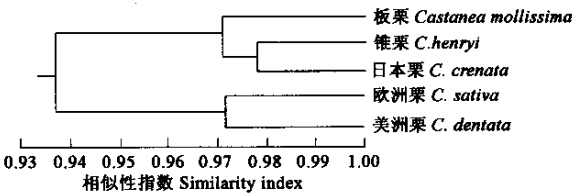


图 3 不同寄主栗疫病菌群体 UPGMA 聚类图

Fig. 3 UPGMA dendrogram of *C. parasitica* populations at host level

对寄主植物的遗传多样性和群体遗传结构进行研究可以推测其抗性潜力,同样,了解病原菌群体的遗传结构能为病害的防治提供有用信息。栗疫病传入美国的 50a 间,广泛侵染美洲栗,几乎毁灭了美洲栗的自然群体^[1];侵入欧洲后,又引起了欧洲栗疫病的大流行^[4]。中国的栗疫病从来没有发生象欧美那样的大暴发,主要原因可能是中国板栗栽培历史悠久,遗传多样性高,在与栗疫病菌共同进化过程中逐渐形成对栗疫病的抗性。欧洲利用低毒力菌株进行栗疫病的生物防治取得了成功,而在美国却没有什么效果。原因就在于欧洲的栗疫病菌相对于美国的遗传多样性比较低,容易利用低毒性菌株进行病菌群体内转化病毒^[1],表明病害的发生历史长短与病菌群体结构的多样性有很强的相关性。本研究得出的栗疫病菌群体的遗传多样性为 0.2433,

与以往采用 RFLP 方法所得结果(0.23)相似^[16],但大于同工酶的研究结果(0.16)^[6]。

本实验中无论从地域角度或寄主角度分析,结果都很相似,这是因为实验中的有些群体来源兼有地域和寄主的独特性特征,如除了日本栗分布在日本和我国辽宁两地域外,美国群体只来自美洲栗而意大利群体只来自欧洲栗。因此,从本实验结果很难分析群体间的差异是由于地域间距离造成的遗传分化还是由于寄主的选择差异产生的,因为不同种的栗树对栗疫病的抗性存在着很大差异^[1,10];抑或两方面对病菌群体的遗传变异都有较大作用。

Milgroom 等利用 RFLP 方法研究栗疫病菌群体的遗传多样性表明中国栗疫病菌群体的遗传多样性比北美的高^[17],本研究对比中国、日本、北美和欧洲意大利群体的遗传多样性,结果也表明中国各群体菌株的遗传多样性比日本、欧洲和美国的都高,从已经研究的病菌营养体亲和群数量上也得到了证明^[9],这可能表明中国栗疫病比其他地区的栗疫病发生的历史更长,与寄主共同经历了更久的共进化的过程。

据报道,美国的栗疫病菌是 19 世纪末从东亚传入的^[10]。Shear 和 Stevens 曾报道美国的栗疫病菌是从中国传入的^[5],然而 Milgroom 等采用 RFLP 和 DNA 指纹图谱技术证明美国的栗疫病菌可能从日本传入而非来自中国^[18]。本研究采用 RAPD 为标记,通过中日欧美群体间的遗传相似性分析,结果表明美国马里兰和意大利 Bergamo 群体与日本茨城群体间的遗传相似性大于与中国各群体的相似性,进一步证明美国的栗疫病菌可能来自日本。

RAPD 分析表明栗疫病菌在地域和寄主水平上,群体之间的基因流分别为 2.3311 和 1.9297,表明在群体间有一定的基因流发生,但这种水平的基因流平均估计值可能由于中国地区间病菌的经常交流而得到提高,在中国各群体间,其遗传相似性系数很高,这和中国各地域间频繁引种(引进树苗)有很大关系^[16],因此,群体间基因流的平均估计值可能会使人们对来自不同国家的病菌群体间的基因流产生误会。

References:

- [1] Anagnostakis S L. Biological control of chestnut blight. *Science*, 1982, **215**: 466~471.
- [2] Merkel H W. A deadly fungus on the American chestnut. *New York Zoological Society 10th Annual Report*, 1905. 97~103.
- [3] Grette J. Les formes hypovirulents d. *Endothia parasitica* et les espoirs de lutte contre le chancre du chataignier. *C R Séance Acad. Agric. Fr.*, 1965, **51**: 1033~1037.
- [4] Grente J. and Berthelay-sautet S. Biological control of chestnut blight in France. In: *Proceedings of the American chestnut symposium*. 30~34. MacDonald W L, Ceeh F C, Luchok J and Smith C eds. *Morgantown*. West Virginia University Books, 1978.
- [5] Shear C L and Stevens N E. The chestnut-blight parasitica (*Endothia parasitica*) from China. *Science*, 1913, **38**: 295~297.
- [6] Ding G Y, Wang K R and Zhou E X. Comparison of population structures of *Cryphonectria parasitica*. *Mycosystema*, 1997, **16**: 281~290.
- [7] Anagnostakis S L, Hau B and Kranz, J. Diversity of vegetative compatibility groups of *Cryphonectria parasitica* in Connecticut and Europe. *Plant Dis.*, 1986, **70**: 536~538.
- [8] Anagnostakis S L and Kranz J. Population dynamics of *Cryphonectria parasitica* in a mixed-hardwood forest in Connecticut. *Phytopathology*, 1987, **77**: 751~754.
- [9] Wang K R, Shao J Y and Lu J Y. On vegetative compatibility of *Cryphonectria parasitica* in Jiangsu and Anhui. *Journal of Nanjing Agricultural University*, 1991, **14**(4): 44~48.
- [10] Anagnostakis S L. Chestnuts and the introduction of chestnut blight. *Rep. (Annual) N. Nut. Growers's Assoc.*, 1992, **83**: 39~42.
- [11] Heiniger U and Rigling D. Biological control of chestnut blight in Europe. *Annual Rev. Phytopathol.*, 1994, **32**: 581~599.
- [12] Fang Z D. *Methods in plant diseases research*. 3ed, Beijing: China Agriculture Press, 1998. 46.
- [13] Wang K R and Chen R H. RAPD patterns characteristic for VCGs of cotton Verticillium wilt pathogen, *Verticillium dahliae*. *Agricultural Sciences in China*, 2002, **1**: 890~895.
- [14] Nei M. Genetic distance between populations. *American Naturalist*, 1972, **106**: 283~292.
- [15] Arnau J, Housego A P and Oliver R P. The use of RAPD markers in the genetic analysis of the plant pathogenic fungus *Cladosporium fulvum*. *Curr. Genet.*, 1994, **25**: 438~444.
- [16] Wang K R and Milgroom M G. Genetic diversity of chestnut blight pathogen, *Cryphonectria parasitica*, in eastern China. *Acta Mycologica Sinica*, 1996, **15**: 135~142.
- [17] Milgroom M G, Lipari S E and Wang K R. Comparison of genetic diversity in the chestnut blight fungus, *Cryphonectria (Endothia) parasitica* from China and the US. *Mycol. Res.*, 1992, **96**: 1114~1120.
- [18] Milgroom M G, Wang K R, Zhou Y, et al. Intercontinental population structure of the chestnut blight fungus, *Cryphonectria parasitica*. *Mycologia*, 1996, **88**: 179~190.

参考文献:

- [6] 丁国云,王克荣,周而勋. 栗疫病菌群体的遗传结构. 菌物系统, 1997, **16**(4): 281~290.
- [9] 王克荣,邵见阳,陆家云. 苏皖地区栗疫病菌营养体亲和性研究. 南京农业大学学报, 1991, **14**: 44~48.
- [12] 方中达. 植物研究方法. 第 3 版, 北京: 中国农业出版社, 1998. 46.
- [16] 王克荣, 丁国云, 周而勋. 中国东部栗疫病菌群体的遗传分化. 真菌学报, 1996, **15** (2): 135~142.