

陕西省苹果黑星病菌遗传多样性的 AFLP 分析

付 洁, 罗泽青, 李逢源, 王 凯, 卫雪娇, 杨家荣

(西北农林科技大学 植物保护学院, 陕西省农业分子生物学重点实验室, 陕西 杨凌 712100)

【摘要】 **【目的】**明确陕西省苹果黑星病菌的遗传多样性, 为苹果抗病育种和黑星病菌的综合防治提供理论依据。**【方法】**利用 25 对 AFLP 引物, 对采自陕西兴平、旬邑的 46 个苹果黑星病菌菌株进行群体结构和遗传多样性分析。**【结果】**25 对 AFLP 引物共扩增出 421 个条带, 其中多态性条带 326 个, 占总带数的 77.4%; 陕西兴平和旬邑苹果黑星病菌 AFLP 多态位点比率为 22.57%~69.83%, 平均为 47.74%; 等位基因观测数为 1.23~1.70, 平均为 1.48; 有效等位基因数为 1.16~1.46, 平均为 1.33; Nei 氏基因多样性指数为 0.09~0.27, 平均为 0.19; Shannon 信息指数为 0.14~0.39, 平均为 0.27; 各类群间的 Nei 氏遗传相似系数为 0.815 1~0.948 7, 遗传距离为 0.052 7~0.204 4; 总的遗传多样性为 0.29, 群体内遗传多样性为 0.18, 群体间遗传多样性为 0.11, 遗传分化系数为 0.38; 陕西苹果黑星病菌菌株分为 2 大类, 分离自旬邑嘎啦、兴平嘎啦、旬邑富士的菌株聚为一类, 分离自旬邑红星、兴平红星、旬邑秦冠、兴平秦冠的菌株聚为另一类。**【结论】**陕西苹果黑星病菌菌株的遗传多样性与地理来源没有明显的相关性, 而与寄主品种具有一定相关性。

【关键词】 苹果黑星病菌; AFLP; 遗传多样性; 陕西省

【中图分类号】 S436.611.1⁺9

【文献标识码】 A

【文章编号】 1671-9387(2010)12-0172-07

Genetic diversity of *Venturia inaequalis* of Shaanxi province with AFLP analysis

FU Jie, LUO Ze-qing, LI Feng-yuan, WANG Kai, WEI Xue-jiao, YANG Jia-rong

(College of Plant Protection and Shaanxi Key Laboratory of Molecular Biology for Agriculture,
Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: **【Objective】** The study was to demonstrate genetic diversity of *Venturia inaequalis* in Shaanxi, and to provide the basis for disease-resistant breeding and integrated control of apple scab. **【Method】** The genetic diversity and colony formation were analyzed for forty-six strains of *V. inaequalis* from apple field by combination of 25 pairs of primers using AFLP technology in Xingping and Xunyi. **【Result】** The results showed that 421 bands were amplified, of which 326 bands were polymorphic, the rate of polymorphic bands was 77.4%. The rate of AFLP polymorphic sites was 22.57%~69.83% in *V. inaequalis* between Xingping and Xunyi and the value of average was 47.74%; the number of alleles per locus was 1.23~1.70, and the average number of alleles 1.48; the effective number of alleles was 1.16~1.46, and the average number of alleles 1.33; the Nei's gene diversity was 0.09~0.27, and the average 0.19; Shannon's information index was 0.14~0.39, and the average 0.27; the index of genetic similarity of different groups was 0.815 1~0.948 7, the genetic distance 0.052 7~0.204 4; the total genetic diversity was 0.29, the varitations within collections 0.18, the varivations among the collections 0.11, the index of genetic

* **【收稿日期】** 2010-08-05

【基金项目】 教育部长江学者和创新团队发展计划项目(200558); 欧盟科技合作项目(ICA4-CT-2001-10001); 高等学校学科创新引智计划项目(B07049)

【作者简介】 付 洁(1978—), 女, 黑龙江双城人, 在读博士, 主要从事植物病理学研究。E-mail: fujie1129@nwsuaf.edu.cn

【通信作者】 杨家荣(1956—), 男, 四川蓬溪人, 教授, 博士生导师, 主要从事植物病害综合治理研究。

E-mail: yjrong@nwsuaf.edu.cn

variations 0.38. Based on the data of AFLP analysis, the apple scab strains can be classified into two categories. Xunyi Gala, Xingping Gala and Xunyi Fuji were clustered together; Xunyi Red Star, Xingping Red Star, Xunyi Qinguan and Xingping Qinguan were clustered. 【Conclusion】 The genetic diversity was not correlated in different geography in *V. inaequalis* in Shaanxi, but there were differences in different hosts.

Key words: *Venturia inaequalis*; AFLP; genetic diversity; Shaanxi province

黑星病(*Venturia inaequalis* (Cooke) Wint.)是苹果的主要病害之一,具有流行速度快、为害严重、难于防治等特点,该病广泛分布于世界各苹果产区,是欧洲、美洲苹果产区危害最严重的病害之一,每年均造成严重的经济损失^[1]。苹果黑星病在我国主要分布在辽宁、黑龙江、新疆伊犁、甘肃以及陕西、山东的部分苹果产区,曾多次大流行^[2],已给我国苹果产业造成了严重的影响。

种植抗病性品种是目前预防苹果黑星病的重要手段之一。通过研究苹果黑星病菌的遗传多样性,可以了解不同菌株的亲缘关系,明确菌株的来源、变异方式及变异程度等,从而为抗病育种提供参考依据。目前,国内外学者已经应用分子生物学技术对苹果黑星病菌群体的遗传多样性进行了大量研究。Tenzer 等^[3-4]用 RAPD 分子标记方法先后对来源于瑞士不同地区的 4 个苹果黑星病菌菌株以及欧洲 5 个不同国家的 11 个苹果黑星病菌菌株进行了遗传多样性分析,结果表明,各国内部菌株间遗传差异很小,但在阿尔卑斯山脉南北两侧的菌种种群间存在显著差异。Xu 等^[5]利用 3 对 AFLP 荧光标记引物对来自英国、印度和中国的苹果黑星病菌进行了群体遗传学分析,结果表明,来自中国和英国的菌株种群差异很大。陆遥等^[6]、胡小平等^[7]、付洁等^[8]应用 SSR 分子标记技术,分别对英国和法国、中国渭北旱塬、中英印三国的苹果黑星病菌进行了遗传多样性分析,结果表明,苹果黑星病菌变异较快,且易受人

为活动的影响,但不同地理生境来源的菌株可能存在一定的基因多样性,而这种多样性正是苹果抗病育种中需要加以利用的。因此,研究苹果黑星病菌的群体遗传多样性,对指导苹果抗病育种具有十分重要的实际意义。

到目前为止,利用不同分子标记(RAPD、AFLP、SSR 等)进行的苹果黑星病菌遗传多样性分析,都是基于在大的地理跨度收集的相对较小的分离系样本中进行的,这些大范围的研究对了解这种弱寄生菌的演化和大范围流行动态预测具有重要价值。但是,对较小地理范围内相对较多的分离系进行分子遗传多样性分析,将有助于了解区域内病菌群体的结构特点以及病菌的变异机制和分布动态。本研究利用 25 对 AFLP 引物,对分离自陕西省兴平、旬邑的苹果黑星病菌群体结构进行了分析,以期更深入地了解该地区苹果黑星病菌自然群体的遗传多样性和遗传分化情况。

1 材料与方法

1.1 供试菌株

供试苹果黑星病菌株为 2002-06 采自陕西省旬邑和兴平的富士、红星、嘎啦、秦冠苹果病叶上的单孢分离物,共 46 株(表 1),保存于西北农林科技大学植物保护学院植保资源与病虫害治理教育部重点实验室。

表 1 供试苹果黑星病菌编号、采集地点及寄主品种
Table 1 The isolates number, origin and host variety of *V. inaequalis*

菌株编号 Isolate No.	采集地点 Collecting location	苹果品种 Variety	菌株编号 Isolate No.	采集地点 Collecting location	苹果品种 Variety
XYG-1	陕西旬邑 Xunyi, Shaanxi, China	嘎啦 Gala	XYG-11	陕西旬邑 Xunyi, Shaanxi, China	嘎啦 Gala
XYG-2	陕西旬邑 Xunyi, Shaanxi, China	嘎啦 Gala	XYG-12	陕西旬邑 Xunyi, Shaanxi, China	嘎啦 Gala
XYG-3	陕西旬邑 Xunyi, Shaanxi, China	嘎啦 Gala	XYG-13	陕西旬邑 Xunyi, Shaanxi, China	嘎啦 Gala
XYG-4	陕西旬邑 Xunyi, Shaanxi, China	嘎啦 Gala	XPG-1	陕西兴平 Xingping, Shaanxi, China	嘎啦 Gala
XYG-5	陕西旬邑 Xunyi, Shaanxi, China	嘎啦 Gala	XPG-2	陕西兴平 Xingping, Shaanxi, China	嘎啦 Gala
XYG-6	陕西旬邑 Xunyi, Shaanxi, China	嘎啦 Gala	XPG-3	陕西兴平 Xingping, Shaanxi, China	嘎啦 Gala
XYG-7	陕西旬邑 Xunyi, Shaanxi, China	嘎啦 Gala	XPG-4	陕西兴平 Xingping, Shaanxi, China	嘎啦 Gala
XYG-8	陕西旬邑 Xunyi, Shaanxi, China	嘎啦 Gala	XPG-5	陕西兴平 Xingping, Shaanxi, China	嘎啦 Gala
XYG-9	陕西旬邑 Xunyi, Shaanxi, China	嘎啦 Gala	XPG-6	陕西兴平 Xingping, Shaanxi, China	嘎啦 Gala
XYG-10	陕西旬邑 Xunyi, Shaanxi, China	嘎啦 Gala	XPG-7	陕西兴平 Xingping, Shaanxi, China	嘎啦 Gala

续表 1 Continued table 1

菌株编号 Isolate No.	采集地点 Collecting location	苹果品种 Variety	菌株编号 Isolate No.	采集地点 Collecting location	苹果品种 Variety
XPG-8	陕西兴平 Xingping, Shaanxi, China	嘎啦 Gala	XYH-2	陕西旬邑 Xunyi, Shaanxi, China	红星 Starking
XPG-9	陕西兴平 Xingping, Shaanxi, China	嘎啦 Gala	XYH-3	陕西旬邑 Xunyi, Shaanxi, China	红星 Starking
XPG-10	陕西兴平 Xingping, Shaanxi, China	嘎啦 Gala	XPH-1	陕西兴平 Xingping, Shaanxi, China	红星 Starking
XPG-11	陕西兴平 Xingping, Shaanxi, China	嘎啦 Gala	XPH-2	陕西兴平 Xingping, Shaanxi, China	红星 Starking
XPG-12	陕西兴平 Xingping, Shaanxi, China	嘎啦 Gala	XPQ-1	陕西兴平 Xingping, Shaanxi, China	秦冠 Qinguan
XYF-1	陕西旬邑 Xunyi, Shaanxi, China	富士 Fuji	XPQ-2	陕西兴平 Xingping, Shaanxi, China	秦冠 Qinguan
XYF-2	陕西旬邑 Xunyi, Shaanxi, China	富士 Fuji	XPQ-3	陕西兴平 Xingping, Shaanxi, China	秦冠 Qinguan
XYF-3	陕西旬邑 Xunyi, Shaanxi, China	富士 Fuji	XPQ-4	陕西兴平 Xingping, Shaanxi, China	秦冠 Qinguan
XYF-4	陕西旬邑 Xunyi, Shaanxi, China	富士 Fuji	XPQ-5	陕西兴平 Xingping, Shaanxi, China	秦冠 Qinguan
XYF-5	陕西旬邑 Xunyi, Shaanxi, China	富士 Fuji	XPQ-6	陕西兴平 Xingping, Shaanxi, China	秦冠 Qinguan
XYF-6	陕西旬邑 Xunyi, Shaanxi, China	富士 Fuji	XYQ-1	陕西旬邑 Xunyi, Shaanxi, China	秦冠 Qinguan
XYF-7	陕西旬邑 Xunyi, Shaanxi, China	富士 Fuji	XYQ-2	陕西旬邑 Xunyi, Shaanxi, China	秦冠 Qinguan
XYH-1	陕西旬邑 Xunyi, Shaanxi, China	红星 Starking	XYQ-3	陕西旬邑 Xunyi, Shaanxi, China	秦冠 Qinguan

1.2 试 剂

限制性内切酶 *EcoR* I和 *Mse* I、T4 连接酶, *Taq* DNA 聚合酶及 dNTPs 等均购于 Fermentas 公司。

1.3 供试引物

选用真菌遗传多样性分析常用的接头及引物序

列(表 2)进行试验,所有接头和引物序列均由上海生物工程技术服务有限公司合成。25 对选择性扩增引物由表 2 中的 *EcoR* I 选择性扩增引物 E1、E2、E3、E4、E5 分别与 *Mse* I 选择性扩增引物 M1、M2、M3、M4、M5 配对组合而成。

表 2 供试 AFLP 接头及引物序列

Table 2 Sequences of AFLP adapters and primers used in this study

接头/引物 Adapter/primer	名称 Name	序列(5'→3') Sequence(5'→3')
<i>EcoR</i> I 接头 <i>EcoR</i> I adapter	正向引物 Forward primer	CTCGTAGACTGCGTACC
	反向引物 Reverse primer	AATTGGTACGCAGTCTAC
<i>Mse</i> I 接头 <i>Mse</i> I adapter	正向引物 Forward primer	GACGATGAGTCCTGAG
	反向引物 Reverse primer	TACTCAGGACTCAT
预扩增引物 Primer combinations used in pre-amplification	<i>EcoR</i> I -C	GACTGCGTACCAATTC
	<i>Mse</i> I -A	GATGAGTCCTGAGTAA
	E1	GACTGCGTACCAATTC AAC
	E2	GACTGCGTACCAATTC GC
	E3	GACTGCGTACCAATTC AG
	E4	GACTGCGTACCAATTC ACC
	E5	GACTGCGTACCAATTC AGG
	M1	GATGAGTCCTGAGTAACTA
	M2	GATGAGTCCTGAGTAAAGAC
	M3	GATGAGTCCTGAGTAACTG
选择性扩增引物 Primer combinations used in selective-amplification	M4	GATGAGTCCTGAGTAAATC
	M5	GATGAGTCCTGAGTAAAGT

1.4 苹果黑星病菌 DNA 的提取及质量检测

将冰箱中保存的苹果黑星病菌株转接到马铃薯蔗糖液体培养基(PS)中,于 18 ℃、120 r/min 摇床上暗培养 20 d,过滤菌丝,用 HETO 型真空冷冻干燥浓缩系统(FD21, Heto2-Holten A/S)冻干 24 h,备用。菌丝 DNA 的提取参照胡小平等^[9]改进的 SDS 法,并稍作改动:将 50 mg 苹果黑星病菌菌丝体研磨成粉末状,加入 DNA 提取裂解液 600 μL,65 ℃水浴 30 min;加入苯酚、氯仿各 300 μL,12 600 r/min 离心 5 min,取上清,再次加入苯酚、氯仿,12 600 r/min 离心后取上清;加入 400 μL 异丙醇,室温静置 10 min,12 600 r/min 离心 5 min,弃上清;沉淀连续 2 次加入 500 μL

体积分数 70%乙醇,12 600 r/min 离心 5 min 后弃上清;将沉淀溶入 3~5 mL TE 溶液中,-20 ℃保存备用。用 756 PC 型紫外分光光度计(上海光谱仪器有限公司)分别在 260 和 280 nm 波长处测定 DNA 溶液的吸光值,并根据检测结果将 DNA 稀释成 0.1 μg/μL 的工作液,置-20 ℃冰箱中待用。

1.5 苹果黑星病菌的 AFLP 扩增

1.5.1 酶 切 试验选用 *EcoR* I/*Mse* I 双酶切组合对苹果黑星病菌 DNA 进行酶切,双酶切反应体系为 40 μL,其中模板 DNA (0.1 μg/μL)2 μL,10×Buffer 6 μL, *EcoR* I (10 U/μL)0.2 μL, *Mse* I (10 U/μL)0.2 μL, ddH₂O 31.6 μL,在涡旋器上振

动混匀,12 000 r/min离心 5 s,37 ℃酶切 3.5 h。

1.5.2 连 接 连接反应体系为 50 μL:双酶切产物 40 μL、10×Reaction Buffer 1 μL, *Eco*R I 接头(5 mmol/L)1 μL、*Mse* I 接头(5 mmol/L)1 μL、T4 连接酶(5 U/μL)1 μL, ddH₂O 6 μL。反应条件为 16 ℃连接过夜(约 12 h)。

1.5.3 预扩增 预扩增反应体系为 20 μL:ddH₂O 7.6 μL, 10×PCR Buffer 2.0 μL, dNTPs(2.5 mmol/L)1.6 μL, Mg²⁺(25 mmol/L)1.6 μL, 引物 *Eco*R I -A Primer(10 mmol/L)1.0 μL、引物 *Mse* I -C Primer(10 mmol/L)1.0 μL, 连接产物 10×稀释液 5.0 μL, *Taq* DNA 聚合酶(10 U/μL)0.2 μL。扩增程序为:94 ℃ 5 min;94 ℃ 30 s,52 ℃ 30 s,72 ℃ 60 s,29 个循环;72 ℃ 10 min,4 ℃ 保存。

1.5.4 选择性扩增 选择性扩增反应体系为 20 μL:ddH₂O 7.6 μL, 10×PCR Buffer 2.0 μL, dNTPs(2.5 mmol/L)1.6 μL, Mg²⁺(25 mmol/L)1.6 μL, 引物 *Eco*R I 选择性扩增引物(10 mmol/L)1.0 μL、引物 *Mse* I 选择性扩增引物(10 mmol/L)1.0 μL, 连接产物 10×稀释液 5.0 μL, *Taq* DNA 聚合酶(10 U/μL)0.2 μL。选择性扩增程序为:94 ℃ 5 min;94 ℃ 30 s,60 ℃ 30 s,72 ℃ 60 s,12 个循环(每次循环退火温度降低 0.7 ℃);94 ℃ 30 s,51 ℃ 30 s,72 ℃ 60 s,23 个循环;72 ℃ 5 min,4 ℃ 保存。

1.6 选择性扩增产物的检测

在选择性扩增产物内加入等体积的 Loading Buffer,95 ℃变性 5 min 后,立刻转移到冰水中冷却待用。取上述扩增产物样品,采用 60 g/L 变性聚丙烯酰胺凝胶电泳和银染的方法进行检测。

1.7 统计分析

对选择性扩增产物电泳图谱中的条带进行统计,在 100~1 000 bp,有条带的记为“1”,无条带记为“0”,只记录清晰易辨、在重复试验中稳定出现的条带。建立二元数据“0,1”矩阵。

使用 POPGENE version 1.32 软件^[10] 计算多态性位点数(*NP*)、多态性位点比率(*P*)、等位基因观测数(*Na*)、有效等位基因数(*Ne*)、Nei 氏基因多样性指数(*H*)、Shannon 信息指数(*I*)、Nei 氏遗传相似性系数(*GS*)和遗传距离(*GD*)。 $GS=2N_{ij}/(N_i+N_j)$ 。式中: N_{ij} 是菌株 *i* 和菌株 *j* 共有的扩增片段数目, N_i 为菌株 *i* 中出现的扩增片段数目, N_j 为菌株 *j* 中出现的扩增片段数目。应用 Nei 氏基因多度法^[11] 计算遗传分化系数(*Gst*): $Gst=Dst/Ht$, $Dst=Ht-Hs$ 。式中: Dst 为群体间遗传多样性, Hs 为群体内的遗传多样性, Ht 为总遗传多样性。用 NT-SYSPc-2.11F 软件进行数据分析,用 SHAN 程序中的 UPGMA 方法进行聚类分析,通过 Tree plot 模块生成聚类图^[12]。

2 结果与分析

2.1 苹果黑星病菌 DNA 质量的检测

紫外分光光度计检测结果显示,所提取的苹果黑星病菌基因组 DNA 的 A₂₆₀/A₂₈₀ 值均在 1.8 以上,表明提取的苹果黑星病菌 DNA 纯度符合 AFLP 分析的要求。

2.2 苹果黑星病菌的 AFLP 扩增结果

25 对 AFLP 引物在 46 个供试苹果黑星病菌株基因组中共扩增出 421 条带,其中多态性条带 326 条,占总带数的 77.4%。各引物所揭示的遗传多样性水平不尽相同,其中引物 E4/M2、E4/M3 和 E2/M4 扩增的位点较多,均超过 20 个;E5/M3、E3/M2 扩增的位点较少,均为 13 个。平均每对引物扩增出 16.84 个位点、13.04 个多态性位点。引物组合 E2/M1 扩增所得到的多态性位点比率最高,达 86.7%;引物组合 E1/ M4 扩增所得到的多态性位点比率最低,为 50.0%。

2.3 苹果黑星病菌的遗传多样性分析

苹果黑星病菌的遗传多样性分析结果见表 3。

表 3 陕西苹果黑星病菌的遗传多样性指数
Table 3 Genetic diversity index of *V. inaequalis* from Shaanxi

类群编号 Collections ID	多态性 位点数 <i>NP</i>	多态性 位点比率/% <i>P</i>	等位基因 观测数 <i>Na</i>	有效等位 基因数 <i>Ne</i>	Nei 氏基因多样 性指数 <i>H</i>	Shannon 信息 指数 <i>I</i>
旬邑嘎啦 XYG	168	63.18	1.63	1.44	0.25	0.36
兴平嘎啦 XPG	205	69.83	1.70	1.46	0.27	0.39
旬邑富士 XYF	129	55.11	1.55	1.34	0.20	0.29
旬邑红星 XYH	64	38.95	1.39	1.29	0.16	0.23
兴平红星 XPH	21	22.57	1.23	1.16	0.09	0.14
兴平秦冠 XPQ	102	49.17	1.49	1.34	0.19	0.28
旬邑秦冠 XYQ	53	35.39	1.35	1.25	0.14	0.21
平均 Average	106	47.74	1.48	1.33	0.19	0.27

由表 3 可知,陕西兴平和旬邑苹果黑星病菌遗传多样性水平较低,多态位点比率为 22.57%~69.83%,平均为 47.74%;等位基因观测数为 1.23~1.70,平均为 1.48;有效等位基因数为 1.16~1.46,平均为 1.33;Nei 氏基因多样性指数为 0.09~0.27,平均为 0.19;Shannon 信息指数为 0.14~0.39,平均为 0.27。不同地理来源的苹果黑星病菌间几乎无遗传差异,不同品种苹果的苹果黑星病菌间有一定的遗传差异。

2.4 苹果黑星病菌的遗传结构分析

AFLP 标记揭示的总遗传多样性和群体内的遗传多样性分别为 0.29 和 0.18,群体间遗传多样性为 0.11,遗传分化系数为 0.38,群内变异占总变异

的 62%,群体间变异占总变异的 38%,群体内遗传多样性大于群体间遗传多样性。

2.5 遗传距离和遗传一致度分析

为了进一步分析苹果黑星病菌群体间的遗传分化程度,计算了陕西兴平、旬邑苹果黑星病菌的 Nei 氏遗传相似性系数和遗传距离。由表 4 可知,群体的 Nei 氏遗传相似性系数为 0.815 1~0.948 7,遗传距离为 0.052 7~0.204 4,说明群体间的相似程度较高,遗传变异较小;其中,来自兴平嘎啦的菌株和旬邑嘎啦种群之间相似性最高($GS=0.948\ 7$),遗传距离最近($GD=0.052\ 7$);兴平红星和旬邑嘎啦种群之间相似性最低($GS=0.815\ 1$),遗传距离最远($GD=0.204\ 4$)。

表 4 7 个类群间的 Nei 氏遗传距离(GD)和遗传相似性系数(GS)

Table 4 The genetic distance and genetic similarity of seven *V. inaequalis* groups from Shaanxi

类群编号 Collections ID	旬邑嘎啦 XYG	兴平嘎啦 XPG	旬邑富士 XYF	旬邑红星 XYH	兴平红星 XPH	兴平秦冠 XPQ	旬邑秦冠 XYQ
旬邑嘎啦 XYG		0.948 7	0.898 4	0.867 4	0.815 1	0.855 9	0.846 2
兴平嘎啦 XPG	0.052 7		0.942 2	0.872 9	0.840 0	0.895 6	0.868 7
旬邑富士 XYF	0.107 2	0.059 5		0.870 2	0.845 0	0.893 6	0.852 3
旬邑红星 XYH	0.142 3	0.135 9	0.139 0		0.859 3	0.868 1	0.856 5
兴平红星 XPH	0.204 4	0.174 4	0.168 4	0.151 6		0.900 0	0.867 6
兴平秦冠 XPQ	0.155 5	0.110 2	0.112 5	0.141 4	0.105 4		0.930 2
旬邑秦冠 XYQ	0.167 0	0.140 7	0.159 9	0.154 9	0.142 0	0.072 4	

注:右方为 Nei 氏遗传相似性系数,左方为 Nei 氏遗传距离。
Note:Genetic similarity (right diagonal) and genetic distance(left diagonal).

2.6 苹果黑星病菌的聚类结果

聚类结果(图 1)表明,供试的苹果黑星病菌聚为 2 大类,第Ⅰ大类由分离自旬邑富士、旬邑嘎啦和兴平嘎啦的黑星病菌株组成;第Ⅱ大类由分离自旬邑红星、旬邑秦冠、兴平红星、兴平秦冠的黑星病菌株组成。2 大类中都包含有分离自兴平和旬邑的菌株,而全部的富士和嘎啦品种上的黑星病菌被聚为一类,全部的秦冠和红星品种上的黑星病菌被聚为另一类。这表明旬邑和兴平两地黑星病菌遗传相似性较高,群体之间存在高频率的基因漂流,不同苹果品种上的黑星病菌间遗传相似性相对较低,变异度较高。可见,陕西兴平和旬邑两地的苹果黑星病菌间遗传多样性与地理来源无关,而与其寄主品种间存在一定的相关性。

3 讨 论

陕西省是我国苹果主要生产基地之一,2005 年种植面积已达 43 万 hm²,位居全国第一,年产量达 550 万 t,占世界总产量的 10%左右。苹果黑星病是世界各苹果产区危害较为严重的病害之一,该病自 1997 年首次在陕西省发现以来,先后有 3 次大流

行,严重威胁着陕西苹果产业的发展^[7]。

Xu 等^[5]研究表明,中国不同地理、品种来源的苹果黑星病菌株没有显著差异。本研究利用 25 对 AFLP 引物对采自陕西兴平和旬邑不同苹果品种上的 46 株黑星病菌进行遗传多样性分析,结果表明,陕西兴平和旬邑两地的苹果黑星病菌间遗传多样性与地理来源无关,而与其寄主品种间存在一定的相关性,这与 Xu 等^[5]的研究结果存在一定差异,其原因可能是由于 AFLP 引物不同所致。另外,胡小平等^[7]利用 SSR 分子标记技术对陕西兴平和旬邑苹果黑星病菌菌株的遗传多样性进行了研究,结果显示,菌株的遗传多样性与地理来源具有一定相关性,这与本研究结果不同,其原因可能是由于分子标记种类不同所致。

在农田生态系统中,仅存在农作物对病原菌单方面的选择,即寄主对病原菌的定向选择和稳定化选择,病原菌群体的致病性遗传结构因寄主的选择而变化。根据 van der Plank 的稳定化选择理论,寄主品种的多样性可导致病原物群体组成的多样性^[13]。病原菌的致病性与寄主的抗病性是息息相

关的,贾莉^[14]对苹果抗黑星病的研究结果表明,秦冠属于高抗品种,富士和嘎啦属于中感品种。本研究发现,嘎啦、富士上的苹果黑星病菌聚为一类,红星、秦冠上的苹果黑星病菌聚为另一类,这说明陕西

苹果黑星病菌的遗传多样性与品种的相关性可能是由于病原菌的致病性或寄主的抗病性不同所致,这一点尚有待于进一步研究证实。

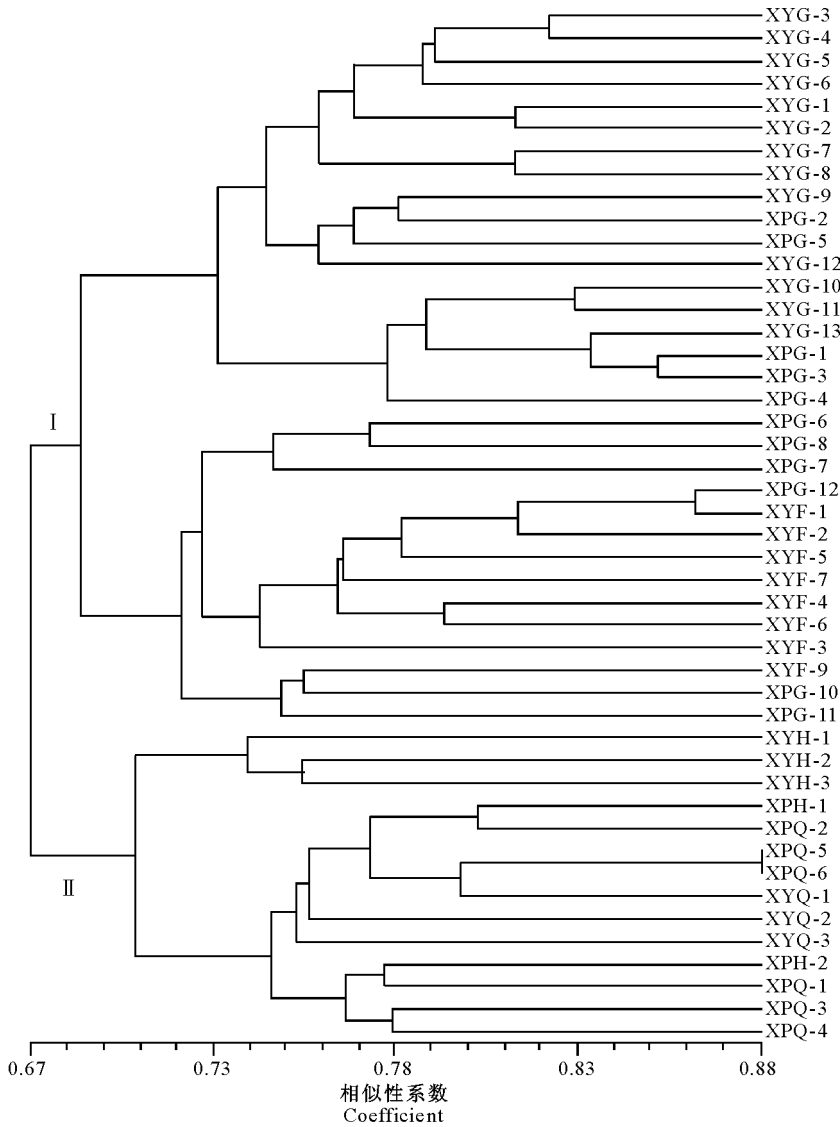


图 1 陕西苹果黑星病菌聚类树状图

Fig. 1 The dendrogram of *Venturia inaequalis* from Shaanxi province

[参考文献]

[1] 胡小平. 陕西苹果黑星病流行规律及其病原菌遗传多样性的 SSR 分析 [D]. 陕西杨凌:西北农林科技大学,2004.
Hu X P. Epidemiology of apple scab in Shaanxi and genetic diversity of *Venturia inaequalis* with SSR Markers [D]. Yangling, Shaanxi: Northwest A&F University, 2004. (in Chinese)

[2] 商鸿生. 苹果黑星病菌检疫 [J]. 植物检疫, 2006, 20(4): 249-252.
Shang H S. Quarantne of *Venturia inaequalis* [J]. Plant Quarantne, 2006, 20(4): 249-252. (in Chinese)

[3] Tenzer I, Gessler C. Subdivision and genetic structure of four populations of *Venturia inaequalis* in Switzerland [J]. European Journal of Plant Pathology, 1997, 103(6): 565-571.

[4] Tenzer I, Gessler C. Genetic diversity of *Venturia inaequalis* across Europe [J]. European Journal of Pant Pathology, 1999, 105(6): 545-552.

[5] Xu X M, Yang J R, Thakur V, et al. Population variation of apple scab (*Venturia inaequalis*) isolates from Asia and Europe [J]. Plant Disease, 2008, 92(2): 247-252.

[6] 陆 遥, 付 洁, 毛 岚, 等. 英法两国不同生理小种苹果黑星病菌遗传多样性的 SSR 分析 [J]. 西北农林科技大学学报: 自然科学版, 2008, 36(6): 170-174.

Lu Y, Fu J, Mao L, et al. Genetic diversity of different races of *Venturia inaequalis* from UK and France with SSR markers [J]. Journal of Northwest A&F University: Natural Science Edition, 2008, 36(6): 170-174. (in Chinese)

[7] 胡小平, 董艳玲, 苟建军, 等. 苹果黑星病菌遗传多样性的 SSR 分析 [J]. 植物病理学报, 2008, 38(3): 329-332.

Hu X P, Dong Y L, Gou J J, et al. Genetic diversity of *Venturia inaequalis* populations based on SSR analysis [J]. Acta Phytopathologica Sinica, 2008, 38(3): 329-332. (in Chinese)

[8] 付 洁, 商 蓓, 罗泽青, 等. 中国、英国、印度苹果黑星病菌 SSR 遗传多样性分析 [J]. 菌物学报, 2010, 29(2): 303-309.

Fu J, Shang B, Luo Z Q, et al. Genetic diversity analysis of *Venturia inaequalis* isolates from China, United Kingdom and India using SSR markers [J]. Mycosystema, 2010, 29(2): 303-309. (in Chinese)

[9] 胡小平, 杨家荣, 商文静, 等. 苹果黑星病菌 DNA 提取方法研究 [J]. 西北农林科技大学学报: 自然科学版, 2004, 32(4): 41-43.

Hu X P, Yang J R, Shang W J, et al. Study on the method for DNA extraction of *Venturia inaequalis* [J]. Journal of Northwest A&F University: Natural Science Edition, 2004, 32(4): 41-43. (in Chinese)

[10] Yeh F C, Yang R C, Boyle T B J. POPGENE, the user-friendly share are for population genetic analysis [J]. Molecular Biotechnology Center, 1997, 24: 112-118.

[11] Nei M. Molecular evolutionary genetics [M]. New York: Columbia University Press, 1987.

[12] Rohlf F J. NTSYS-pc numerical taxonomy and multivariate analysis system [M]. New York: State University of New York Press, 1993.

[13] 朱有勇. 遗传多样性与作物病害持续控制 [M]. 北京: 科学出版社, 2007.

Zhu Y Y. Genetic diversity for crop diseases' sustainable management [M]. Beijing: Science Press, 2007. (in Chinese)

[14] 贾 莉. 苹果黑星菌致病力分化及生物学特性研究 [D]. 陕西杨凌: 西北农林科技大学, 2007.

Jia L. Studies on biological characters of *Venturia inaequalis* and differentiation of *Venturia inaequalis* of apple in pathogenicity [D]. Yangling, Shaanxi: Northwest A&F University, 2007. (in Chinese)

(上接第 171 页)

[13] 徐汝梅. 昆虫种群生态学 [M]. 北京: 北京师范大学出版社, 1987: 97-107.

Xu R M. Insect population ecology [M]. Beijing: Beijing Normal University Press, 1987: 97-107. (in Chinese)

[14] 庞雄飞, 梁广文. 害虫种群系统的控制 [M]. 广州: 广东科技出版社, 1995: 15-24.

Pang X F, Liang G W. The control of the pest population system [M]. Guangzhou: Guangdong Science and Technology Press, 1995: 15-24. (in Chinese)

[15] Varley G C, Gradwell G R. Recent advance in insect population dynamics [J]. Annual Review of Entomology, 1970, 15: 1-24.

[16] 冀贞阳. “对牛弹琴”效益可观 [J]. 中国农村科技, 1999(9): 31.

Ji Z Y. Considerable benefits of “casting pearls before swine” [J]. China Rural Technology, 1999(9): 31. (in Chinese)

[17] 黄玉贞. 梨小食心虫的发生及综合防治 [J]. 新疆农业科技, 2003(增刊 1): 60.

Huang Y Z. The occurrence and integrated control of oriental fruit moth [J]. Xinjiang Agricultural Science and Technology, 2003, (S1): 60. (in Chinese)

[18] 管致和. 昆虫学通论 [M]. 北京: 农业出版社, 1980: 137.

Guan Z H. General theory of entomology [M]. Beijing: Agriculture Press, 1980: 137. (in Chinese)