

我国烟草赤星病菌遗传多样性的 ISSR 分析

李六英¹ 窦彦霞¹ 马冠华^{1*} 陈 娅¹ 林凡力¹ 王秋月²

(1. 西南大学植物保护学院, 重庆 400716; 2. 重庆市农业科学院特色作物研究所, 重庆 402160)

摘要: 为明确我国烟草赤星病的 2 种主要致病菌链格孢菌 *Alternaria alternata* 和长柄链格孢菌 *A. longipes* 的地理差异与遗传结构, 采用 ISSR 标记对分离自 9 个省市的 135 株烟草赤星病菌进行遗传多样性分析。结果显示, 通过正交优化试验建立的烟草赤星病菌 ISSR-PCR 最佳反应体系稳定性较好, 筛选出 17 条多态性高且稳定的引物, 共扩增出 192 条谱带, 其中有 177 条具有多态性, 多态率为 92.19%。UPGMA 聚类分析结果显示, 链格孢菌和长柄链格孢菌的遗传相似性系数分别在 0.67~1.00 和 0.66~1.00 之间, 遗传相似性系数为 0.83 时可使链格孢菌和长柄链格孢菌分别划分为 5 个和 6 个亚群, 其中前者不同地理种群间表现出地理相关性, 后者不同菌株随机分组。烟草赤星病菌种群的基因多态性和遗传多样性丰富, 链格孢菌和长柄链格孢菌的群体间遗传分化系数分别为 0.36 和 0.37, 均存在遗传分化; 群居每代迁移数分别为 0.89 和 0.85, 不同地理种群间存在基因交流; 2 种烟草赤星病菌的遗传分化结构表现出相似性。表明我国烟草赤星病菌中的链格孢菌和长柄链格孢菌均存在丰富的遗传多样性, 且二者进化方向相似, ISSR 标记能较好地揭示烟草赤星病菌种群间的亲缘关系和遗传差异性, 可用于其遗传多样性分析。

关键词: 烟草赤星病; 简单序列重复区间; 遗传多样性

Genetic diversity analysis of tobacco brown spot pathogens in China by ISSR

Li Liuying¹ Dou Yanxia¹ Ma Guanhua^{1*} Chen Ya¹ Lin Fanli¹ Wang Qiuyue²

(1. College of Plant Protection, Southwest University, Chongqing 400716, China; 2. Institute of Characteristic Crops Research, Chongqing Academy of Agricultural Sciences, Chongqing 402160, China)

Abstract: In order to understand the geographical differences and genetic structure of *Alternaria alternata* and *A. longipes*, the two main pathogens of tobacco brown spot in China, genetic diversity analysis of 135 strains of tobacco brown spot pathogens isolated from nine provinces or cities were conducted by using ISSR. The results showed that the stability of ISSR-PCR system established by orthogonal optimization test was high; 17 ISSR primers were screened out with high polymorphism and stable amplification; a total of 192 bands were detected, and 177 of them were polymorphic, with the polymorphic rate up to 92.19%. UPGMA cluster analysis showed that the genetic similarity coefficients of *A. alternata* were between 0.67 and 1.00, while those of *A. longipes* were between 0.66 and 1.00. When the genetic similarity coefficient was selected as 0.83, *A. alternata* and *A. longipes* strains tested in this study were divided into five and six subgroups, respectively. Among them, the different geographic populations of *A. alternata* showed geographical correlation, but *A. longipes* populations were grouped randomly. PopGene analysis results revealed that the genetic diversity and genetic differentiation of *A. alternata* and *A. longipes* groups in China were abundant, and the coefficients of population genetic differentiation were 0.36 and 0.37, respectively. The numbers of migrants per generation were 0.89 and 0.85,

基金项目: 中国烟草总公司重庆市公司资助项目(NY20140401070002), 中国烟草总公司湖南省公司资助项目(201543050024056)

* 通信作者 (Author for correspondence), E-mail: nikemgh@swu.edu.cn

收稿日期: 2017-12-20

respectively, indicating frequent gene flow between *A. alternata* and *A. longipes* in different geographic regions. The population genetic structure of the two types of pathogens was similar. In conclusion, there was abundant genetic diversity in *A. alternata* and *A. longipes* in China, and their evolutionary directions were similar. ISSR markers could be used to reveal the genetic relationship and genetic diversity of the pathogens of tobacco brown spot.

Key words: tobacco brown spot; inter-simple sequence repeats (ISSR); genetic diversity

烟草赤星病主要是由链格孢属的链格孢菌 *Alternaria alternata* (Fries) Keissler 和长柄链格孢菌 *A. longipes* (Ell. & Ev.) Mason 在烟株成熟后期引起的叶部病害 (Luo et al., 2009; Mo et al., 2012)。该病于 1892 年在美国被首次报道 (Lamondia, 2001), 于 1916 年在我国北京市首次发现, 1963 年开始在河南省及山东省的烟草种植区流行, 2004—2008 年间烟草叶斑病致使烟草生产损失达 0.32 亿~1.23 亿元, 叶部病害中尤以烟草赤星病为重 (陈庆园等, 2009)。现今烟草赤星病在我国每年发病面积约 10 万 hm^2 , 发生普遍且危害严重, 是烟叶上仅次于病毒病的重要病害 (张万良等, 2011)。而烟草属于收获叶片的经济作物, 在国民经济中占据重要地位, 发病后的烟叶品质下降, 商品价值降低。

化学药剂防治一直是烟草赤星病的主要控制手段, 但长期大量使用导致病原菌抗药性和农药残留等问题日益严重。并且, 我国的烟草赤星病菌组成较复杂, 除了链格孢菌与长柄链格孢菌外, 还发现烟草链格孢 *A. nicotianae*、细极链格孢 *A. tenuissima* 和鸭梨链格孢 *A. yaliinficiens* 也可致病。了解病原菌的遗传背景信息有助于制定有效的病害防治措施。目前, 对烟草赤星病的病原菌鉴定 (唐承成等, 2015; 耿莉娜等, 2016)、基因组分析 (Hou et al., 2016)、生物及化学防治 (Ning et al., 2014; 黄艳飞等, 2016) 等有较多研究报道, 而对烟草赤星病菌的群体遗传多样性分析仅限于云南省 (胡中会等, 2011) 和河南省 (祖艳青, 2013) 的病原菌种群。因此, 全面分析烟草赤星病菌的群体遗传多样性具有重要价值。

目前, 简单序列重复区间 (inter-simple sequence repeats, ISSR) 扩增多态性分子标记技术因其操作简单、稳定性强、多态性丰富及耗资少等优点 (Reddy et al., 2002), 已广泛应用于病原菌的遗传多样性研究 (Kandan et al., 2015; 刘娟等, 2015)、作物遗传图谱构建 (Santos et al., 2017)、亲缘关系分析 (Khorshidi et al., 2017) 和分子标记辅助育种 (Alam et al., 2015; Mavuso et al., 2016) 等方面。胡中会等 (2011) 和祖艳青 (2013) 均采用 ISSR 和 RAPD 标记技术分别研究了云南省及河南省烟草赤星病菌的遗传多样

性, 均表明 ISSR 标记技术是研究赤星病菌遗传多样性较好的方法。因此, 本研究采用 ISSR 标记技术, 从分子水平分析我国 9 个省市烟草赤星病菌的群体遗传多样性, 了解烟草赤星病菌的遗传分化, 明确不同地域种群间的遗传关系, 以期研究该病害流行规律以及分析不同种群的致病力分化提供基础依据。

1 材料与方法

1.1 材料

供试菌株: 2014—2016 年从我国重庆、四川、云南、湖北、广西、贵州、河南、湖南和吉林 9 个省市的烟草生产区采集典型的烟草赤星病样 300 份, 经组织分离和单孢纯化后进行系统的形态学观察、致病性测定和 ITS 序列分析, 获得 70 株链格孢菌和 65 株长柄链格孢菌。分离的烟草赤星病菌菌株编号由来源省市的大写首字母加样本号组成, 首字母相同时, 加上第 2 个字母并小写, 如“GZ8”表示从贵州省采集到的第 8 份样品上分离的菌株, “HeN5”则表示从河南省采集到的第 5 份样品上分离的菌株。

培养基及试剂: 马铃薯葡萄糖琼脂 (potato dextrose agar, PDA) 培养基: 马铃薯 200 g、葡萄糖 20 g、琼脂粉 17 g、蒸馏水 1 L。dNTP Mixture、Taq DNA 聚合酶、10×PCR Buffer (Mg^{2+} Free)、 MgCl_2 及 6×Loading Buffer, 日本 TaKaRa 公司; ISSR 引物、1×TAE、DNA Marker 和 DNA 快速抽提试剂盒, 生工生物工程 (上海) 股份有限公司; 其余试剂均为国产分析纯。

仪器: A&B 2720 型 PCR 仪, 美国应用生物系统公司; ScanDrop 核酸浓度测定仪, 成都亿科康德有限公司; Dolphin-Doc Weal Tec 凝胶成像系统、DYY-6C 型电泳仪, 上海精密实验设备有限公司。

1.2 方法

1.2.1 烟草赤星病菌的 DNA 提取

所有供试菌株在 PDA 平板上 25℃ 培养 7 d 后刮取适量菌丝于研钵中, 加入液氮研磨成粉。参照说明书用真菌基因组 DNA 快速抽提试剂盒提取病菌 DNA, 经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测, 并用核酸浓度测定仪检测 DNA 浓度和质量, 统一稀释到 30 ng/ μL 后于 -20℃ 保存待用。

1.2.2 ISSR-PCR反应体系的正交优化

基于预试验选取引物UBC873为正交试验引物,采用L16(4⁴)正交试验设计原理,在25 μL总反应体系中,对影响较大的Mg²⁺、dNTP、*Taq*酶和引物4个因素,分别设置4个浓度水平共16个处理进行优化(表1),其余参数固定为1×PCR Buffer、30 ng

DAN模板。其中,Mg²⁺浓度分别设为1.00、1.50、2.00、2.50 mmol/L,dNTP浓度分别设为0.10、0.15、0.20、0.25 mmol/L,*Taq*酶浓度分别设为0.50、0.75、1.00、1.25 U/μL,引物浓度分别设为0.20、0.30、0.40、0.50 μmol/L。每个反应体系分别设2次重复。筛选出最优反应体系。

表1 PCR反应的各因素水平L₁₆(4⁴)正交试验设计
Table 1 L₁₆(4⁴) orthogonal design of the factors and levels for PCR reaction system

处理编号 No.	Mg ²⁺ 浓度 (mmol/L) Concentration of Mg ²⁺	dNTP 浓度 (mmol/L) Concentration of dNTP	<i>Taq</i> 酶浓度 (U/μL) Concentration of <i>Taq</i> polymerase	引物浓度 (μmol/L) Concentration of primer
1	1.00	0.10	0.50	0.20
2	1.00	0.15	0.75	0.30
3	1.00	0.20	1.00	0.40
4	1.00	0.25	1.25	0.50
5	1.50	0.10	0.50	0.20
6	1.50	0.15	0.75	0.30
7	1.50	0.20	1.00	0.40
8	1.50	0.25	1.25	0.50
9	2.00	0.10	0.50	0.20
10	2.00	0.15	0.75	0.30
11	2.00	0.20	1.00	0.40
12	2.00	0.25	1.25	0.50
13	2.50	0.10	0.50	0.20
14	2.50	0.15	0.75	0.30
15	2.50	0.20	1.00	0.40
16	2.50	0.25	1.25	0.50

1.2.3 供试菌株ISSR引物筛选及扩增谱带统计分析

从加拿大哥伦比亚大学公布的100条ISSR引物中筛选出40条初筛引物,从中再筛选扩增条带清晰且稳定性高的引物,并进行梯度优化以获得最适退火温度。利用最优反应体系和筛选的引物扩增供试烟草赤星病菌后,对扩增谱带进行统计分析。同一引物的扩增产物,每条清晰条带为1个遗传位点,对清晰的条带赋值为“1”,不存在或不清晰的条带赋值为“0”,建立起0~1二元矩阵数据库。使图片信息转为数据信息,并保存为Excel文件格式。

1.2.4 供试菌株群体遗传多样性分析

为分析不同地理来源烟草赤星病菌的遗传多样性,将供试菌株按CQ、SC、YN、HuB、GX、GZ、HeN、HuN和JL共9个地理种群(居群)进行ISSR标记分析。链格孢菌70株,其中重庆市9株、四川省10株、云南省10株、湖北省10株、广西壮族自治区8株、贵州省7株、河南省7株、湖南省4株和吉林省5株;长柄链格孢菌65株,其中重庆市6株、四川省5株、云南省5株、湖北省5株、广西壮族自治区7株、贵州省8株、河南省8株、湖南省11株和吉林省10株。通过NTsys 2.10e软件基于0~1二元矩阵数据库,采用非

加权组平均法(unweighted pair-group method with arithmetic means,UPGMA)构建烟草赤星病菌的树状聚类图,进行遗传多样性分析。

1.2.5 供试菌株群体遗传变异与分化分析

采用PopGene 1.32软件计算和分析供试烟草赤星病菌群体的遗传变异和分化。其中,反应基因数量和状况的参数包括多态性条带数(number of polymorphic loci, *NP*)、多态位点百分率(percentage of polymorphic loci, *PPB*)、等位基因观测数(observed number of alleles, *Na*)和有效等位基因数(effective number of alleles, *Ne*);反应基因多样性的参数包括Nei's基因多样性指数(gene diversity, *H*)和香农-威纳信息指数(Shannon-Weiner index, *I*);反应基因流强度的参数为居群每代迁移数(number of migrants per generation, *Nm*);反应群体基因多样性的参数包括基因分化系数(coefficient of genetic differentiation among population within species, *G_{ST}*)、总群体基因多样性(*H_T*)、群体内基因多样性(*H_S*)和群体间基因多样性(*D_{ST}*)。计算公式为: $H_T=H_S+D_{ST}$, $G_{ST}=D_{ST}/H_T$ 。另外,基于Nei's遗传距离构建赤星病菌的群居树图。

2 结果与分析

2.1 烟草赤星病菌基因组DNA的提取

用DNA提取试剂盒提取了分离自9个省市的135株烟草赤星病菌基因组DNA,其 A_{260}/A_{280} 值在1.8~2.0之间,纯度较好,可以进行ISSR标记分析。

2.2 烟草赤星病菌ISSR-PCR扩增体系的优化

Mg^{2+} 、dNTP、*Taq*酶和引物4种因素在4个水平上的16种不同浓度组合体系的扩增效果呈现出较

大差异(图1)。其中,组合7、8、9、14、15和16未能扩增出条带;组合3和6扩增出少量条带且组合6的条带很弱;组合1、2、4、5、10、11、12和13均能扩增出多态性丰富的条带,经重复验证,组合2的稳定性最好。因此,确定组合2为烟草赤星病菌的ISSR-PCR最优反应体系,即25 μ L反应体系中 Mg^{2+} 浓度为1.00 mmol/L、dNTP浓度为0.15 mmol/L、引物浓度为0.30 μ mol/L、*Taq*酶浓度为0.75 U/ μ L。

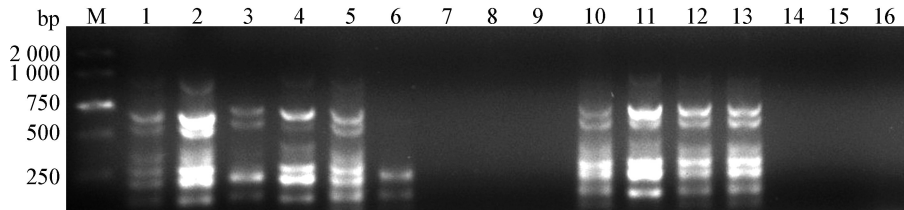


图1 烟草赤星病菌的ISSR-PCR正交试验电泳图谱

Fig. 1 Orthogonal electrophoregram of ISSR-PCR products of *Alternaria alternata* and *A. longipes*

M: DL2000; 1~16: 正交设计编号。M: DL2000; 1~16: orthogonal design codes.

2.3 ISSR引物筛选及扩增检测烟草赤星病菌结果

从40条ISSR引物中筛选出17条扩增条带清晰、多态性及稳定性好的引物用于ISSR标记,且都能找到合适的退火温度,分布于46.00~55.40℃之间。用17条引物分别扩增135株烟草赤星病菌,共获得192条谱带,平均扩增条带数为11.29个,多态性条带数为177个,多态率达92.19%(表2)。同一引物扩增的图谱较相似,也有一定的差异(图2)。不同引物扩增的遗传图谱差异较大,多态性谱带数在7~15之间,扩增条带大小介于100~3 000 bp之间。表明烟草赤星病菌存在丰富的遗传多样性,ISSR标记可用于烟草赤星病菌的遗传多样性分析。

2.4 烟草赤星病菌遗传多样性的ISSR聚类分析

ISSR标记基于UPGMA聚类分析表明,链格孢菌和长柄链格孢菌的遗传相似水平分别在0.67~1.00和0.66~1.00之间,分别在遗传相似性系数为0.67和0.66时划分为2个大群;当遗传相似性系数为0.83时,链格孢菌种群可划分为5个亚群,分别占链格孢菌群总菌株数的5.72%、1.43%、7.14%、57.14%和28.57%(图3),长柄链格孢菌种群可划分为6个亚群,分别占长柄链格孢菌群总菌株数的4.62%、6.15%、52.31%、9.23%、21.54%和6.15%(图4)。在链格孢菌的聚类分组中,来自同一省市的菌株间相似系数较高,大多紧密聚在一起,与地理来源呈现出一定的相关性。而长柄链格孢菌的聚类分组与地理来源无明显相关性,不同地理来源的菌株分组表现出随机性。

2.5 烟草赤星病菌的群体遗传变异与遗传分化

2.5.1 烟草赤星病菌的群体遗传变异

链格孢菌的9个地理种群的多态位点百分率(*PPB*)*在5.65%~55.93%之间*,大小顺序为HuB>GX>GZ>CQ>HeN>JL>HuN>SC>YN,与观察到的等位基因数(*Na*)大小顺序一致,但有效等位基因数均比实际观测到的少(表3)。长柄链格孢菌的9个地理种群*的PPB在1.69%~67.23%之间*,大小顺序为HuN>GZ>JL>HuB>HeN>CQ>SC>GX>YN,同样与观察到的等位基因数大小顺序一致,有效等位基因数均比实际观测到的少(表4)。除云南种群外,2种病原菌不同地理种群的*PPB*大小顺序差异较大,云南种群的链格孢菌和长柄链格孢菌种内差异均较小,*PPB*分别为5.65%和1.69%。

链格孢菌总样本的Nei's基因多样性指数(*H*)为0.23,不同地理种群的*H*值在0.02~0.23之间,其中湖北种群*H*值最大,基因多样性最丰富,其次是广西种群,云南种群最低。长柄链格孢菌总样本的*H*值为0.25,不同地理种群的*H*值在0.01~0.27之间,其中湖南种群的基因多样性最丰富,其次是贵州种群,云南种群最低。链格孢菌种群的香农-威纳信息指数(*I*)从高到低为HuB>GX>GZ>CQ>HeN>JL>HuN>SC>YN,总样本的*I*值为0.37;长柄链格孢菌种群的*I*值从高到低为HuN>GZ>HuB>JL>HeN>CQ>SC>GX>YN,总样本的*I*值为0.38。表明我国烟草赤星病菌中的链格孢菌和长柄链格孢菌都具有丰富的遗传多样性,种内不同地理种群间均存在遗传分化。

表 2 烟草赤星病菌的多态性 ISSR 引物序列及 ISSR-PCR 扩增结果
Table 2 ISSR primer sequences with high polymorphism and amplification results of *Alternaria alternata*
and *A. longipes* in ISSR-PCR study

引物 Primer	核苷酸碱基序列 Nucleotide sequence (5'-3')	退火温度 Annealing temperature (°C)	扩增条带数 Scored bands	多态性条带 Polymorphic bands	多态位点百分率 Percentage of polymorphic loci (%)
UBC808	(AG) ₈ C	47.50	10	9	90.00
UBC809	(AG) ₈ G	47.50	15	13	86.67
UBC810	(GA) ₈ T	52.40	9	9	100.00
UBC825	(AC) ₈ T	49.10	10	8	80.00
UBC826	(AC) ₈ C	55.40	10	10	100.00
UBC827	(AC) ₈ G	46.00	13	13	100.00
UBC836	(AG) ₈ YA	46.00	9	8	88.89
UBC841	(GA) ₈ YC	47.50	9	9	100.00
UBC855	(AC) ₈ YT	46.00	14	14	100.00
UBC856	(AC) ₈ YA	46.00	14	13	92.86
UBC857	(AC) ₈ YG	49.10	15	14	93.33
UBC861	(ACC) ₆	47.50	7	7	100.00
UBC873	(GACA) ₄	46.00	10	10	100.00
UBC880	(GGAGA) ₃	47.50	8	8	100.00
UBC881	(GGGTG) ₃	47.50	11	8	72.73
UBC890	VHV(GT) ₇	47.50	12	9	75.00
UBC891	HVH(TG) ₇	47.50	16	15	93.75
总计 Sum			192	177	
平均 Average			11.29	10.41	92.19

Y 代表简并碱基 C 或者 T, R 代表简并碱基 A 或者 G。Y represents degenerate base C or T, and R represents degenerate base A or G.

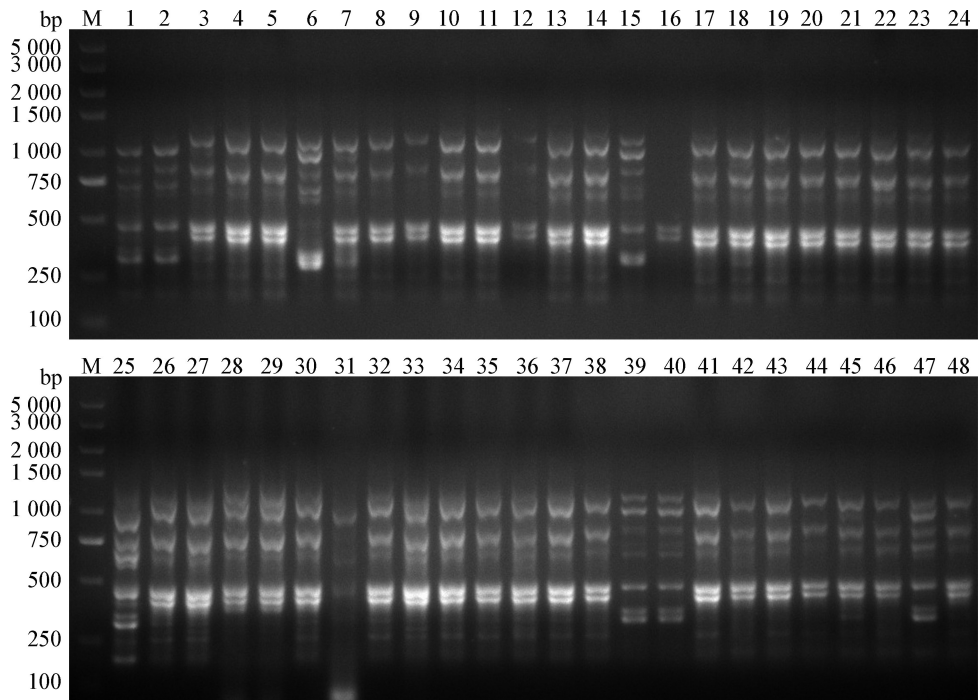


图 2 引物 UBC856 扩增部分烟草赤星病菌基因组的电泳图谱
Fig. 2 Electrophoretogram of some strains of *Alternaria alternata* and *A. longipes* amplified with primer UBC856
M: DL5000; 1~24: 链格孢菌; 25~48: 长柄链格孢菌。M: DL5000; 1-24: *A. alternata*; 25-48: *A. longipes*.

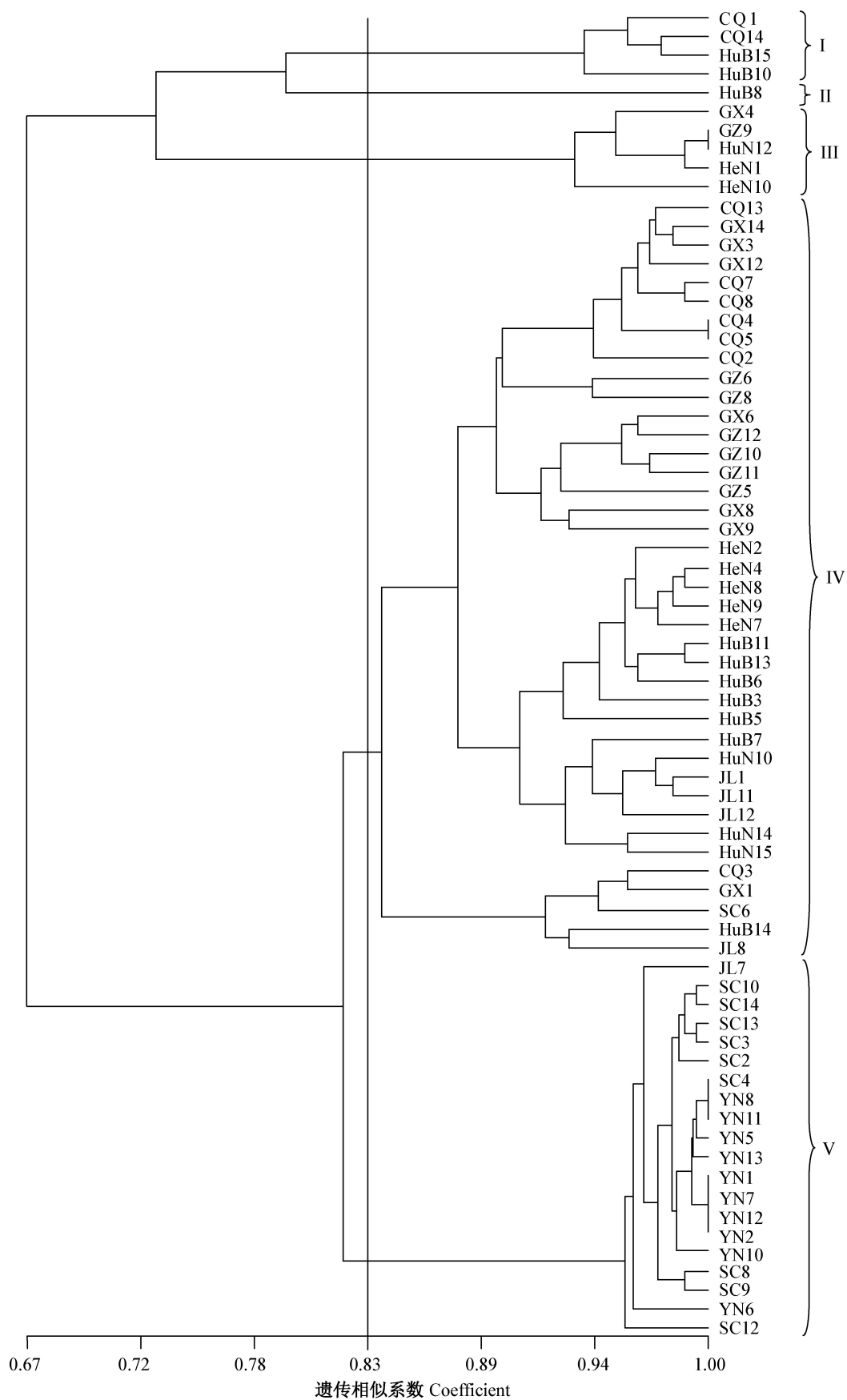


图3 17个ISSR引物扩增70株链格孢菌的聚类图

Fig. 3 Dendrogram for 70 strains of *Alternaria alternata* amplified with 17 ISSR primers

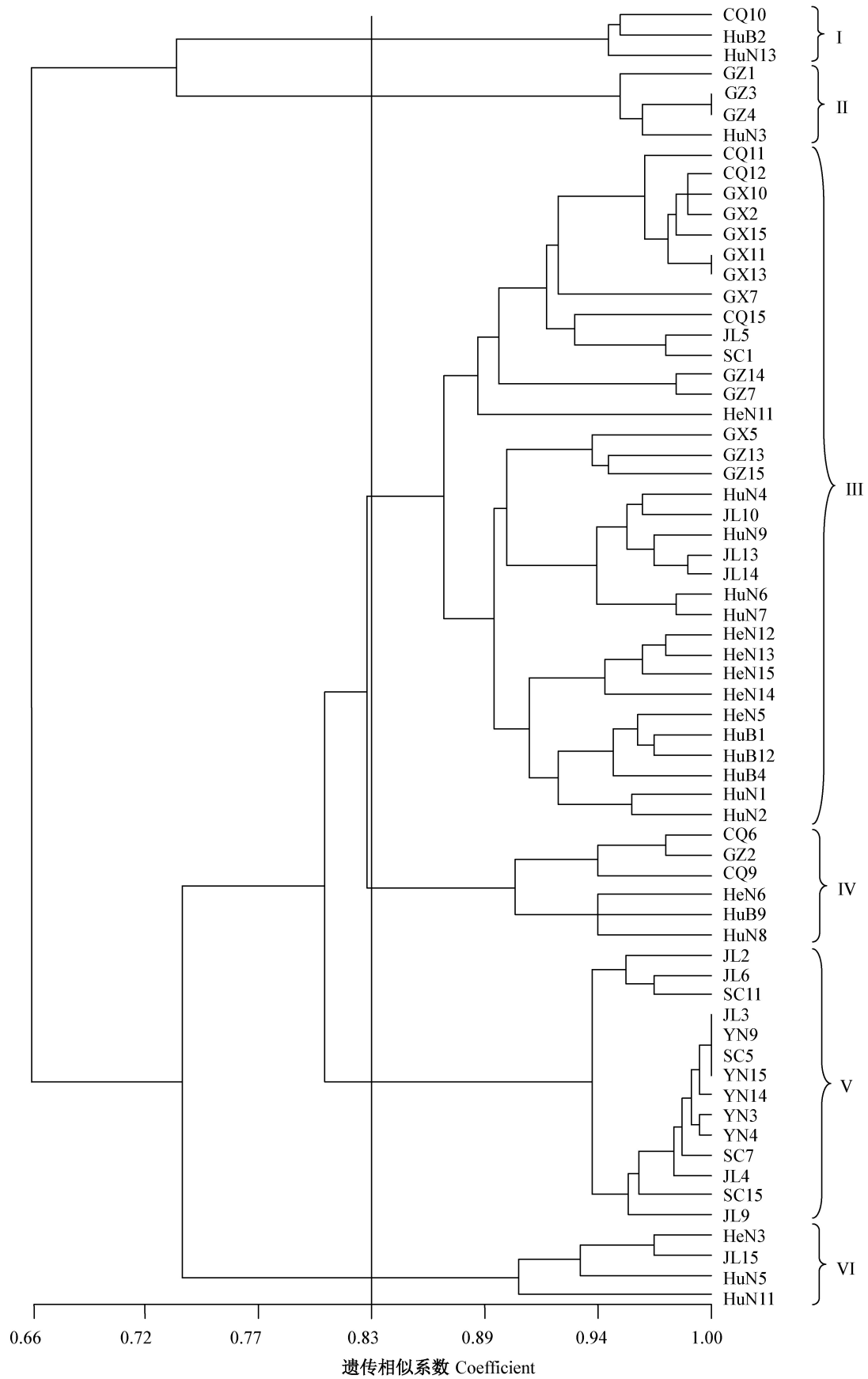


图4 17个ISSR引物扩增65株长柄链格孢菌的聚类图

Fig. 4 Dendrogram for 65 strains of *Alternaria longipes* amplified with 17 ISSR primers

表3 不同来源链格孢菌种群的遗传变异

Table 3 Genetic variations of different populations of *Alternaria alternata*

种群 Population	样本数 Sample size	多态性条带数 No. of polymorphic loci	多态位点百分率 Percentage of polymorphic loci (%)	等位基因观测数 Observed no. of alleles	有效等位基因数 Effective no. of alleles	Nei's 基因多样性指数 Nei's gene diversity index	香农-威纳信息指数 Shannon-Weiner index
重庆 Chongqing (CQ)	9	71	40.11	1.40±0.49	1.31±0.43	0.17±0.22	0.24±0.31
广西 Guangxi (GX)	8	85	48.02	1.48±0.50	1.34±0.41	0.19±0.22	0.27±0.31
贵州 Guizhou (GZ)	7	77	43.50	1.43±0.50	1.32±0.41	0.18±0.22	0.26±0.31
河南 Henan (HeN)	7	66	37.29	1.37±0.48	1.30±0.42	0.16±0.22	0.23±0.31
湖北 Hubei (HuB)	10	99	55.93	1.56±0.50	1.41±0.43	0.23±0.22	0.33±0.31
湖南 Hunan (HuN)	4	57	32.20	1.32±0.47	1.26±0.41	0.14±0.21	0.20±0.30
吉林 Jilin (JL)	5	61	34.46	1.34±0.48	1.26±0.41	0.14±0.21	0.20±0.29
四川 Sichuan (SC)	10	56	31.64	1.31±0.46	1.22±0.35	0.12±0.19	0.18±0.28
云南 Yunnan (YN)	10	10	5.65	1.06±0.23	1.04±0.17	0.02±0.10	0.03±0.14
总样本 Total	70	152	85.88	1.86±0.35	1.38±0.33	0.23±0.17	0.37±0.23

表4 不同来源长柄链格孢菌种群的遗传变异

Table 4 Genetic variations of different populations of *Alternaria longipes*

种群 Population	样本数 Sample size	多态性条带数 No. of polymorphic loci	多态位点百分率 Percentage of polymorphic loci (%)	等位基因观测数 Observed no. of alleles	有效等位基因数 Effective no. of alleles	Nei's 基因多样性指数 Nei's gene diversity index	香农-威纳信息指数 Shannon-Weiner index
重庆 Chongqing (CQ)	6	71	40.11	1.40±0.49	1.31±0.41	0.17±0.22	0.24±0.31
广西 Guangxi (GX)	7	25	14.12	1.14±0.35	1.08±0.23	0.04±0.12	0.07±0.18
贵州 Guizhou (GZ)	8	85	48.02	1.48±0.50	1.37±0.41	0.20±0.22	0.29±0.31
河南 Henan (HeN)	8	73	41.24	1.41±0.49	1.31±0.41	0.17±0.22	0.24±0.31
湖北 Hubei (HuB)	5	79	44.63	1.44±0.50	1.37±0.45	0.20±0.23	0.28±0.32
湖南 Hunan (HuN)	11	119	67.23	1.67±0.47	1.49±0.41	0.27±0.21	0.39±0.30
吉林 Jilin (JL)	10	83	46.89	1.47±0.50	1.31±0.39	0.18±0.21	0.26±0.30
四川 Sichuan (SC)	5	55	31.07	1.31±0.46	1.25±0.41	0.13±0.21	0.19±0.30
云南 Yunnan (YN)	5	3	1.69	1.02±0.13	1.01±0.10	0.01±0.05	0.01±0.08
总样本 Total	65	151	85.31	1.85±0.36	1.40±0.32	0.25±0.17	0.39±0.23

2.5.2 烟草赤星病菌的群体遗传分化

链格孢菌9个地理种群的总体遗传多样性、群体内的遗传多样性和群体间的遗传多样性分别为0.18、0.12和0.06,长柄链格孢菌9个地理种群的总体遗传多样性、群体内的遗传多样性和群体间的遗传多样性分别为0.24、0.15和0.09。群体水平上,链格孢菌和长柄链格孢菌地理种群间的遗传分化系数分别为0.36和0.37,即地理种群间遗传多样性占总群体多样性的36.00%和37.00%,表明2种烟草赤星病菌的不同地理种群间均存在一定程度的遗传分化。链格孢菌地理种群间、长柄链格孢菌地理种群间以及2种烟草赤星病菌种群间的总体群居每代迁移数分别为0.89、0.85和1.26(表5)。表明链格孢

菌和长柄链格孢菌的地理种群间存在着较广泛的基因交流,地理种群内各自然种群间存在丰富的遗传多样性和基因多态性。

基于Nei's遗传距离构建链格孢菌和长柄链格孢菌遗传结构图,结果表明,链格孢菌和长柄链格孢菌都可分为2个大组,均是一组包含重庆(CQ)、湖北(HuB)、湖南(HuN)、河南(HeN)、广西(GX)和贵州(GZ)6个种群,另一组包含吉林(JL)、四川(SC)和云南(YN)3个种群(图5)。2种烟草赤星病菌在整体遗传结构上表现出相似性。不同省市的烟草赤星病菌遗传结构之间都有一定的差异,2种烟草赤星病菌都是重庆种群(CQ)与云南种群(YN)间的遗传分化最大,遗传距离最远。

表 5 烟草赤星病菌种群的群体遗传多样性及遗传分化

Table 5 The population genetic diversity and population differentiation within and among <i>Alternaria alternata</i> and <i>A. longipes</i>						
项目 Item	菌株数 No. of strains	总体遗传多样性 Dente gene diversity in the species	种群内遗传多样性 Genetic diversity within population	种群间遗传多样性 Genetic diversity among populations	遗传分化系数 Coefficient of population genetic differentiation	群居每代迁移数 No. of migrants per generation
链格孢菌 <i>A. alternata</i>	70	0.18±0.02	0.12±0.01	0.06	0.36	0.89
长柄链格孢菌 <i>A. longipes</i>	65	0.24±0.03	0.15±0.01	0.09	0.37	0.85
物种水平 Species level	135	0.26±0.03	0.18±0.02	0.08	0.28	1.26

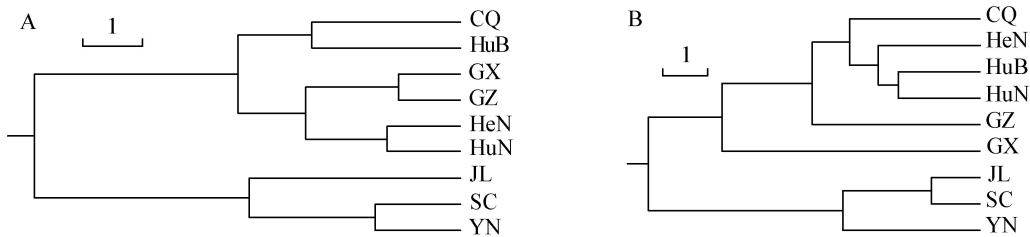


图 5 基于 Nei's 遗传距离的链格孢菌(A)和长柄链格孢菌(B)群居树图

Fig. 5 Dendrogram of nine populations of *Alternaria alternata* (A) and *A. longipes* (B) based on Nei's genetic distance
CQ: 重庆; HuB: 湖北; GX: 广西; GZ: 贵州; HeN: 河南; HuN: 湖南; JL: 吉林; SC: 四川; YN: 云南. CQ: Chongqing; HuB: Hubei; GX: Guangxi; GZ: Guizhou; HeN: Henan; HuN: Hunan; JL: Jilin; SC: Sichuan; YN: Yunnan.

3 讨论

ISSR 标记是一种基于微卫星序列发展起来的新的分子标记(Martins et al., 2003),具有经济简便、稳定高效和 DNA 多态性高等特点,已广泛用于病原菌遗传多样性等方面的研究(Kandan et al., 2015; Santos et al., 2017)。但 ISSR-PCR 扩增反应的最适条件难于确立,本研究采用正交试验设计方法对影响 ISSR-PCR 体系的主要因子 Mg^{2+} 、dNTP、*Taq* 酶和引物分别在 4 个水平上进行了探讨,并通过梯度 PCR 试验获得了各引物的最适退火温度,建立了烟草赤星病菌的 ISSR-PCR 最优体系。Grünig et al. (2001)报道称退火温度较高则反应体系更稳定可靠,而本研究优化的引物退火温度普遍较低,并且所建最佳体系与胡中会等(2011)和祖艳青(2013)报道的有所差异,这可能与试验条件及样品来源不同有关,体系优化试验结果表明 ISSR 引物的退火温度较低时也能稳定扩增,且具有理想的扩增效果。

本研究应用 ISSR 标记对采集分离自我国 9 个省市的烟草赤星病菌——链格孢菌和长柄链格孢菌进行了遗传多样性分析,用 17 条引物分别扩增 135 株赤星病菌,共获得 192 个扩增谱带位点,多态性谱带 177 个,多态率为 92.19%,不同引物扩增的遗传图谱差异较大,表明 ISSR 标记可较好地揭示我国烟草赤星病菌——链格孢菌和长柄链格孢菌的遗传多样性,与胡中会等(2011)和祖艳青(2013)的研究结果一致。UPGMA 聚类分析结果显示,链格孢菌和长

柄链格孢菌都存在较高的遗传分化,遗传相似系数为 0.83 时可将其分别划分为 5 个和 6 个亚群,其中链格孢菌的聚类分组与地理来源存在一定相关性。Kale et al. (2012)采用 ISSR 标记分析采自印度亚麻籽上 20 株链格孢菌的遗传关系,聚类结果表明来自同一地点的菌株聚在一起,本研究中链格孢菌基于 ISSR 的聚类结果与其相似。而长柄链格孢菌的聚类图谱与地理来源无明显相关性,来自不同省市的菌株随机分组,地理来源相同的材料虽然生境相似,但由于选择方向不同或寄主品种多样,也可能形成遗传差异较大的类型,因此被归入不同类群(曾亮等, 2013),本研究中 2 种烟草赤星病菌与地理来源相关性表现不同的原因有待进一步深入研究。

长期以来,烟草赤星病菌的拉丁学名在 *A. alternata* 和 *A. longipes* 之间混乱并用(Lucas et al., 1971), Hou et al. (2016)通过比较分析二者基因组,明确了链格孢菌和长柄链格孢菌基因组序列相似度较高,实际为亲缘关系很近的 2 个不同种。本研究通过分析 2 种赤星病菌的遗传距离,发现二者遗传分化结构较相似。大量研究表明,链格孢菌和长柄链格孢菌是烟草赤星病的主要致病菌,此外还有极少的细极链格孢、鸭梨链格孢和烟草链格孢。本研究中的烟草赤星病菌来自我国大部分产烟省市,具有较好的代表性,但只发现了链格孢菌和长柄链格孢菌,虽然本研究较为系统地探究了这 2 种病菌的遗传多样性,但还应结合病菌的致病力分化和相关寄主品种等方面深入分析与病菌遗传多样性的关系以及其它

3 种致病菌的遗传多样性, 这将为更有效地制定烟草赤星病防控策略提供理论支持。

参 考 文 献 (References)

- Alam MA, Juraimi AS, Rafii MY, Hamid AA, Arolu IW, Latif MA. 2015. Genetic diversity analysis among collected purslane (*Portulaca oleracea* L.) accessions using ISSR markers. *Comptes Rendus Biologies*, 338(1): 152
- Chen QY, Shang SH, Lu N. 2009. Analysis on loss caused by main leaf disease of flue-cured tobacco in Guizhou. *Guizhou Agricultural Sciences*, 37(9): 95–98 (in Chinese) [陈庆园, 商胜华, 陆宁. 2009. 贵州烤烟叶部主要病害危害损失调查与分析. *贵州农业科学*, 37(9): 95–98]
- Geng LN, Shuai H, Zhao M, Jiang HL, Li NJ, Xia Q, Tang M, Chen YY. 2016. Identification of tobacco brown spot pathogen in Wuxi County of Chongqing. *Jiangsu Agricultural Sciences*, 44(8): 181–183 (in Chinese) [耿莉娜, 帅红, 赵敏, 江厚龙, 李钠钾, 夏茜, 唐梅, 陈益银. 2016. 重庆巫溪烟区烟草赤星病原鉴定. *江苏农业科学*, 44(8): 181–183]
- Grünig CR, Sieber TN, Holdenrieder O. 2001. Characterisation of dark septate endophytic fungi (DSE) using inter-simple-sequence-repeat-anchored polymerase chain reaction (ISSR-PCR) amplification. *Mycological Research*, 105(1): 24–32
- Hou YJ, Ma X, Wan WT, Long N, Zhang J, Tan YT, Duan SC, Zeng Y, Dong Y. 2016. Comparative genomics of pathogens causing brown spot disease of tobacco: *Alternaria longipes* and *Alternaria alternata*. *PLoS ONE*, 11(5): e0155258
- Hu ZH, Zhao LH, Kong BH, Chen HR, Fan JH, Liu F, Li XP, Cai H, Yang GH, Qin XY, et al. 2011. Comparison analysis of molecular methods ISSR and RAPD used for assessment of genetic diversity in *Alternaria alternata*. *Southwest Chinese Agricultural Science Bulletin*, 27(24): 262–267 (in Chinese) [胡中会, 赵立华, 孔宝华, 陈海如, 范静华, 刘飞, 李小鹏, 蔡红, 杨根华, 秦西云, 等. 2011. 烟草赤星病菌遗传多样性 ISSR 和 RAPD 标记比较分析. *中国农学通报*, 27(24): 262–267]
- Huang YF, Wang HC, Chen QY, Wang J, Zhang CQ, Lu HX. 2016. Inhibitory activities of six fungicides against mycelial growth and conidial germination of *Alternaria alternata*. *Chinese Journal of Pesticide Science*, 18(2): 263–267 (in Chinese) [黄艳飞, 汪汉成, 陈庆元, 王进, 张长青, 鲁红学. 2016. 六种杀菌剂对烟草赤星病菌菌丝生长和分生孢子萌发的抑制作用. *农药学报*, 18(2): 263–267]
- Kale SM, Pardeshi VC, Gurjar GS, Gupta VS, Gohokar RT, Ghorpade PB, Kadoo NY. 2012. Inter-simple sequence repeat markers reveal high genetic diversity among *Alternaria alternata* isolates of Indian origin. *Journal of Mycology and Plant Pathology*, 42(2): 194–200
- Kandan A, Akhtar J, Singh B, Dixit D, Chand D, Roy A, Rajkumar S, Agarwal PC. 2015. Molecular diversity of *Bipolaris oryzae* infecting *Oryza sativa* in India. *Phytoparasitica*, 43(1): 5–14
- Khorshidi S, Davarynejad GH, Samiei L, Moghaddam M. 2017. Study of genetic diversity of pear genotypes and cultivars (*Pyrus communis* L.) using inter-simple sequence repeat markers (ISSR). *Erwerbs-Obstbau*, 60(2): 1–10
- Lamondia JA. 2011. Outbreak of brown spot of tobacco caused by *Alternaria alternata* in Connecticut and Massachusetts. *Plant Disease*, 85(2): 230
- Liu J, Liao K, Zhao SR, Cao Q, Sun Q, Liu H. 2015. The core collection construction of Xinjiang wild apricot based on ISSR molecular markers. *Scientia Agricultura Sinica*, 48(10): 2017–2028 (in Chinese) [刘娟, 廖康, 赵世荣, 曹倩, 孙琪, 刘欢. 2015. 利用 ISSR 分子标记构建新疆野杏核心种质资源. *中国农业科学*, 48(10): 2017–2028]
- Lucas GB, Pero RW, Snow JP, Harvan D. 1971. Analysis of tobacco for *Alternaria* toxins, alternariol and alternariol monomethyl ether. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 19(6): 1274–1275
- Luo YY, Zhu ML, Yang JK, Lu ZB, Bi W, Zhang KQ. 2009. A spreading colony formed method for rapid evaluation of dicarboximide fungicides resistance level of field tobacco brown spot disease. *Annals of Microbiology*, 59: 173
- Martins M, Tenreiro R, Oliveira MM. 2003. Genetic relatedness of Portuguese almond cultivars assessed by RAPD and ISSR markers. *Plant Cell Reports*, 22(1): 71–78
- Mavuso C, Wu YP, Chen FC, Huang BH, Lin SJ. 2016. Genetic diversity analysis of *Jatropha curcas* L. accessions cultivated in Taiwan using inter simple sequence repeats (ISSR) markers. *Agroforestry Systems*, 90(3): 417–431
- Mo JG, Chen QY, Yu F. 2012. Analysis of meteorological condition for infection of the pathogen of tobacco brown spot (*Alternaria alternata*). *Plant Disease and Pests*, 3(2): 24–27
- Ning DF, Song AL, Fan FL, Li ZJ, Liang YC. 2014. Effects of slag-based silicon fertilizer on rice growth and brown-spot resistance. *PLoS ONE*, 9(7): e102681
- Reddy MP, Sarla N, Siddiq EA. 2002. Inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism and its application in plant breeding. *Euphytica*, 128(1): 9–17
- Santos PS, dos Santos Freitas L, Silva Santana JG, Muniz EN, Rabbani ARC, da Silva AVC. 2017. Genetic diversity and the quality of Mangabeira tree fruits (*Hancornia speciosa* Gomes-Apocynaceae), a native species from Brazil. *Scientia Horticulturae*, 226: 372–378
- Tang CC, Zeng C, Jiang YL, Yang B. 2015. Identification of pathogenic fungi of tobacco brown spot in Guizhou Province. *Hubei Agricultural Sciences*, 54(15): 3656–3658 (in Chinese) [唐承成, 曾琛, 姜于兰, 杨波. 2015. 贵州省烟草赤星病原菌的鉴定. *湖北农业科学*, 54(15): 3656–3658]
- Zeng L, Yuan QH, Wang F, Wang Y. 2013. Genetic diversity analysis of *Agropyron* germplasm resources by ISSR. *Acta Prataculturae Sinica*, 22(1): 260–267 (in Chinese) [曾亮, 袁庆华, 王方, 王瑜. 2013. 冰草属植物种质资源遗传多样性的 ISSR 分析. *草业学报*, 22(1): 260–267]
- Zhang WL, Di ZG, Xie YJ, Li GZ. 2011. Research advance in tobacco brown spot. *Acta Agriculturae Jiangxi*, 23(1): 122–124 (in Chinese) [张万良, 翟争光, 谢扬军, 栗广增. 2011. 烟草赤星病研究进展. *江西农业学报*, 23(1): 122–124]
- Zu YQ. 2013. Identification and genetic diversity study on brown spot pathogen and endogenous *Alternaria* of tobacco in Henan Province. Master Thesis. Zhengzhou: Henan Agricultural University (in Chinese) [祖艳青. 2013. 河南省烟草赤星病菌及内生链格孢的鉴定和遗传多样性研究. 2013. 硕士学位论文. 郑州: 河南农业大学]

(责任编辑: 李美娟)