

# 32株不同地理来源金黄壳囊孢菌株的亲缘关系分析

徐明<sup>1,2</sup>, 徐旭凌<sup>1</sup>, 吴小芹<sup>1</sup>

(1. 南京林业大学, 江苏 南京 210037; 2. 江苏省林业科学研究院, 江苏 南京 211153; )

**摘要:** 本研究运用RAPD技术对从我国10个省29个市收集的32个金黄壳囊孢 [*Cytospora chrysosperma* (Pers.) Fr.] 菌株进行了基因组DNA的多态性研究, 从分子水平上分析该病菌的遗传多样性及其亲缘关系, 发现32个菌株根据聚类分析分为2大类, 一是中西部类群, 另一个是东部沿海类群; 来自不同地区相同品种的菌株和同一地区不同品种的菌株的DNA多样性存在差异; 同一组内的DNA多样性亦有差异; 金黄壳囊孢江苏菌株遗传相似性与山东最近, 两者同属于东部沿海类群, 32株金黄壳囊孢菌株的亲缘性有明显的地域性分布, 说明该菌具有丰富的种内遗传多样性, 为进一步了解该菌的流行特点和实施综合治理提供参考依据。

**关键词:** 金黄壳囊孢; DNA分子标记; 亲缘关系; RAPD技术

## RAPD Analysis of Genetic Relationship among 32 *Cytospora* in Different Geographic Origin

Xu Ming<sup>1,2</sup>, Xu Xue-ling<sup>1</sup>, Wu Xiao-qin<sup>1</sup>

(1. Nanjing Forestry University, Nanjing 210037, China; 2. Forestry Academy of Jiangsu Province, Nanjing 211153, China; )

**Abstract:** In this study, RAPD analysis study of the relationship for 32 *Cytospora* in different geographic origin of 10 provinces and 29 cities in China. This paper analyzed the genetic diversity and the phylogenetic relationships from the molecular level. The results indicate that 32 different strains were divided into two large clusters. One is the central and western group. The other group is the east coast group. The genetic similarity of Jiangsu strain is close to Shandong. The both two strains are belonged to the east coast group. 32 *Cytospora* strains have a distinct geographical distribution. This conclusion provided a reference to understand the epidemic characteristics and comprehensive control of *Cytospora* deeply.

**Key word:** *Cytospora chrysosperma* (Pers.)Fr.; DNA molecular markers;genetic relationship;random amplified polymorphic DNA

杨树烂皮病在我国分布地域广，受害寄主多，发生危害比较严重，近两年在江苏也多有发生，杨树烂皮病的发生导致江苏部分地区杨树大量死亡，严重威胁了江苏杨树的生长，制约了江苏杨树产业的发展。杨树烂皮病的病原菌为金黄壳囊孢菌[*Cytospora chrysosperma* (Pers.) Fr.]引起。

DNA分子标记是以DNA多态性为基础的遗传标记，因其遗传稳定且遗传方式简单，所以可通过基因组DNA多态性的分析来鉴定生物的亲缘关系。从遗传学观点来看，遗传多样性也就意味着基因多样性，它决定了物种进化的潜势。一个物种的遗传变异越丰富，对环境变化的适应性也就越大。掌握病原真菌遗传变异的细微结构是进行群体遗传学和流行病学研究的一个重要方面。因此，为了从根本上弄清杨树烂皮病菌金黄壳囊孢的种内变异情况，了解该菌对寄主与环境变化适应的潜能，本研究运用RAPD技术对从我国10个省29个市收集的32个金黄壳囊孢菌株进行了基因组DNA的多态性研究，以期从分子水平上分析该病菌的遗传多样性及其亲缘关系，为进一步了解该菌的流行特点和实施综合治理提供参考依据<sup>[1-3]</sup>。

## 1 材料与方法

### 1.1 金黄壳囊孢菌株的收集

供试的32株金黄壳囊孢菌株来自我国北京，四川，陕西，江苏，山东等10个省29个市。寄主为北京杨，毛白杨，箭杆杨，新疆杨等多种杨树，柳树和桂花，如表1。

### 1.2 菌体的制备

将保存于PDA斜面的各供试菌株分别移植于90mm的PDA平板，在25℃无光照恒温箱内生长4d。用5mm的灭菌接种环切取边缘生长旺盛的带菌培养基块，接种至铺有灭菌隔离膜的PDA平板上，于上述同一条件下生长4d，而后获取菌丝体并将其迅速放入-20℃低温冰箱中冷冻保存备用<sup>[4-5]</sup>。

### 1.3 菌体基因组DNA的提取

菌体基因组DNA的提取采用改进CTAB法 [6-7]。

### 1.4 PCR扩增体系和反应条件

扩增体系：采用20 μ L反应体系，模板DNA 1 μ L，引物1 μ L,mix10 μ L,去离子水8 μ L，总共20 μ L。

扩增反应条件：第1步，预变性，94℃，4min；第2步，94℃变性，1min；退火，1min，退火温度是PCR反应条件中最关键的一步，选取35℃、36℃、37℃、38℃、39℃、40℃、41℃、42℃、43℃9个梯度，选取最适退火温度；72℃延伸，2min；循环40次；第3步，最后1次延伸，72℃，10min<sup>[8-9]</sup>。

### 1.5 引物筛选

选取137个随机引物，先用4个DNA模板样品进行PCR反应,根据扩增结果，即条带的有无，条带的多少及亮度，从上述引物初筛出有扩增产物的引物；再用8个DNA模板样品进行PCR反应，根据扩增条带的数量、特异性和可重复性对有产物的引物进行复筛。最后，选出具稳定多态性引物用于全部32个DNA模板样品的PCR扩增<sup>[10]</sup>。

### 1.6 数据分析

根据扩增电泳条带的有无构建0，1矩阵，有条带则赋值为“1”，无则赋值为“0”，数据录入采用NTEDIT，数据分析采用NTSYS-PC软件<sup>[11-13]</sup>。

表 1. 32 株金黄壳囊孢 (*Cytospora chrysosperma*) 菌株  
Table 1. 32 *Cytospora* strains from 10 provinces 29 cities in China

编号 (No.)	代号 (Code)	来源(Origin)	寄主 (Host)	编号 (No.)	代号 (Code)	来源(Origin)	寄主 (Host)
1	83589	四川蒲江	杨树	17	8801	江苏新沂	杨树
2	80327	北京植物园	北京杨	18	8888	山东	杨树
3	5341	北京	杨树	19	83590	四川成都	杨树
4	81311	陕西武功	毛白杨	20	8310	陕西宝鸡	垂柳
5	83956	陕西茂林	214 杨	21	8254	甘肃敦煌	新疆杨
6	80000	辽宁	杨树	22	8202	甘肃景泰	钻天杨
7	83594	四川资阳	桂花	23	8133	内蒙古满归	大青杨
8	83598	四川雅红	杨树	24	8142	内蒙古乌兰浩特	白林 2 号
9	83595	四川简阳	桂花	25	8205	甘肃景泰	钻天杨
10	5342	黑龙江	杨树	26	8243	甘肃天水	旱柳
11	83596	四川龙泉驿	桂花	27	8104	内蒙古加格达奇	黑杨
12	6934	北京	毛白杨	28	8284	青海乐都	披榆
13	5340	北京	箭杆杨	29	8300	青海乐都	塔青
14	5339	北京平谷县	杨树	30	8228	甘肃张掖	二白杨
15	83593	四川内江	桂花	31	82860	黑龙江哈尔滨	杨树
16	83601	四川汶川	杨树	32	8211	甘肃武威	二白杨

表 2. 32 株金黄壳囊孢菌株 DNA 样本浓度

Table 2. DNA samples' concentration of 32 *Cytospora* strains

样本号 No.	DNA 浓度 (μg/mL) DNA concentration	样本号 No.	DNA 浓度 (μg/mL) DNA concentration
1	110.55	17	1234.92
2	279.55	18	648.59
3	121.21	19	958.59

样本号 No.	DNA 浓度 (μg/mL) DNA concentration	样本号 No.	DNA 浓度 (μg/mL) DNA concentration
4	428.05	20	176.74
5	108.71	21	162.0
6	721.26	22	694.7
7	122.65	23	555.0
8	165.62	23	305.5
9	809.96	25	1577.4
10	123.76	26	690.7
11	379.34	27	778.0
12	705.12	28	707.4
13	239.07	29	1437.1
14	465.61	30	766.6
15	958.81	31	387.8
16	845.49	32	833.1

## 2 结果与分析

### 2.1 金黄壳囊孢菌株DNA的提取与检测

将用改进 CTAB 法提取的不同地理来源的 32 株金黄壳囊孢的 DNA 进行电泳检测, 结果显示 32 个 DNA 样本电泳均只有 1 条带, 说明所提取的 DNA 具有良好的完整性, 可作为 RAPD 的模板。经检测 DNA 浓度如表 2, 统一稀释至 100μg/mL 备用。

### 2.2 退火温度的选择

选取 35℃、36℃、37℃、38℃、39℃、40℃、41℃、42℃、43℃9 个梯度的温度对 8 个 DNA 模板进行退火温度的筛选, 每张照片为 2 个温度, 结果如图 1。由下图结果可以看出, 退火温度在 35℃、36℃、37℃时, 只有微弱的条带, 退火温度在 38℃、39℃、40℃、41℃时, 条带略有增强, 但是亮度较弱, 部分引物跑不出条带, 退火温度在度为 42℃时, 所有 8 株菌均有较多且较亮条带, 退火温度为 43℃时, 部分条带较亮, 但是仍有部分条带较暗或模糊。综合以上 9 种温度, 发现 42℃为最佳退火温度。

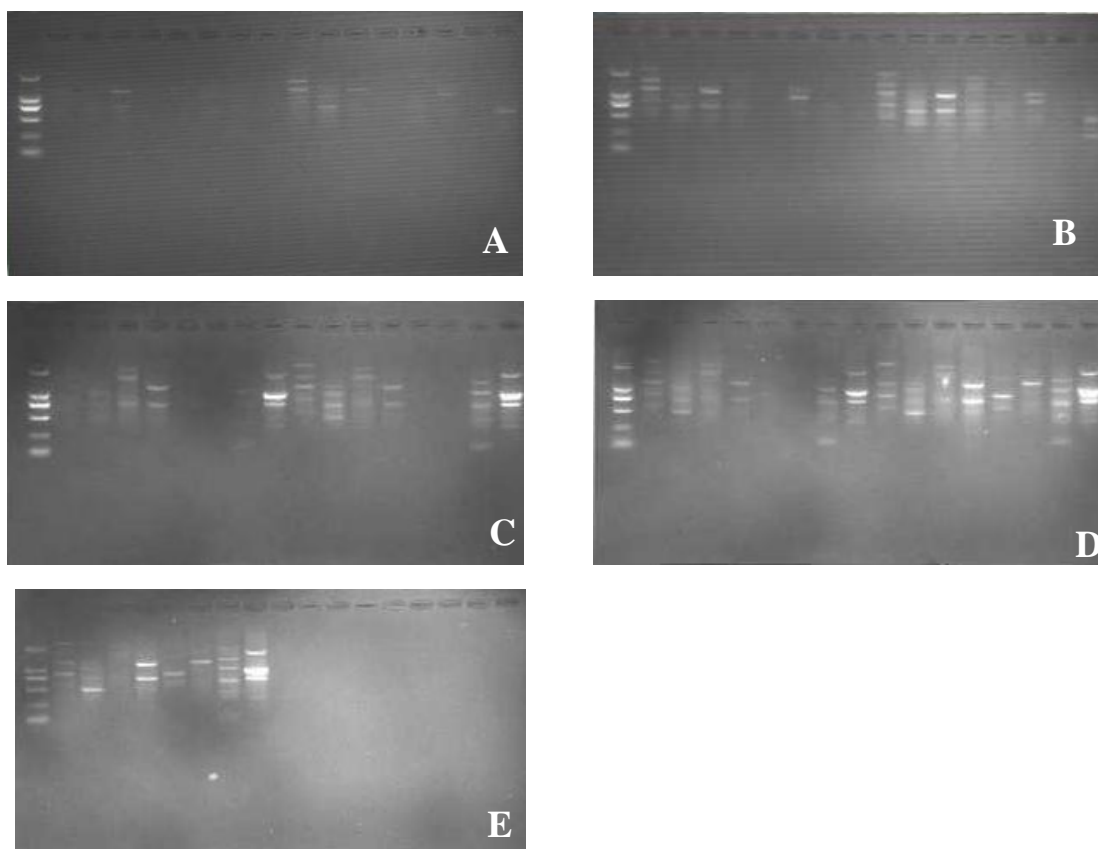


图1 不同退火温度下DNA的扩增图谱

Table 1 RAPD patterns of different annealing temperature

\*注: A.35℃, 36℃; B.37℃, 38℃; C.39℃, 40℃; D.41℃, 42℃; E.43℃

### 2.3 引物的筛选

选取上海生物工程有限公司提供的随机引物 137 个,对供试的 32 株金黄壳囊孢菌进行随机引物扩增筛选,最终选定 10 个引物,其多态性均为 100%,引物序列见表 3。

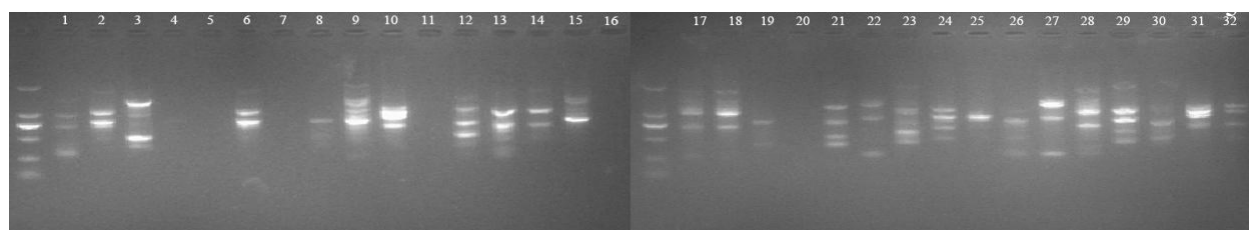
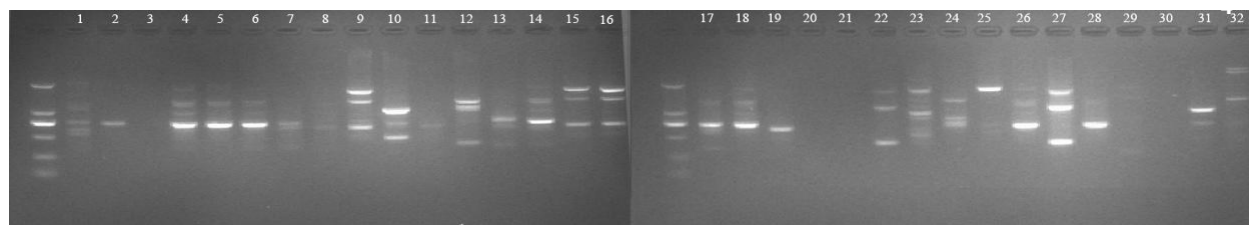
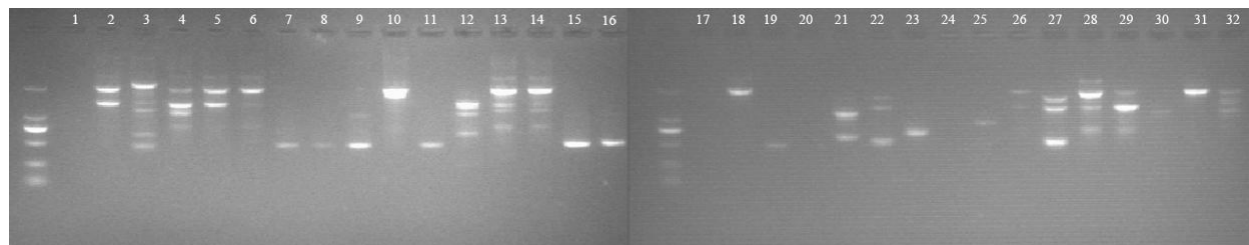
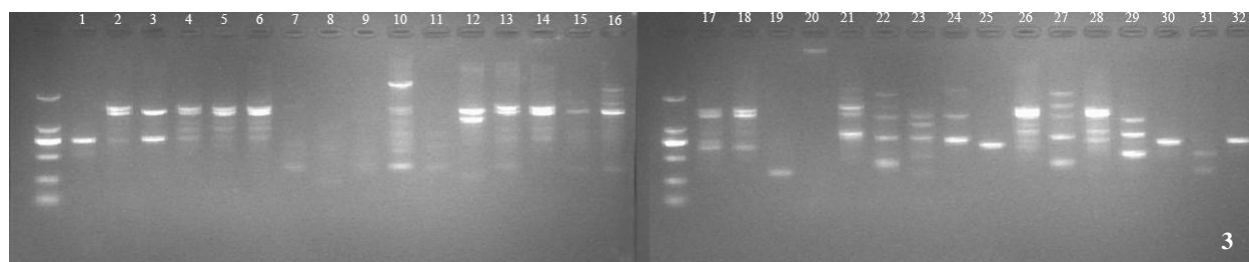
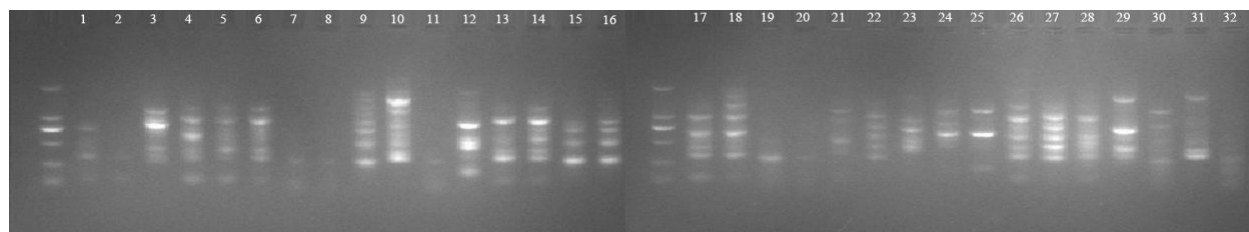
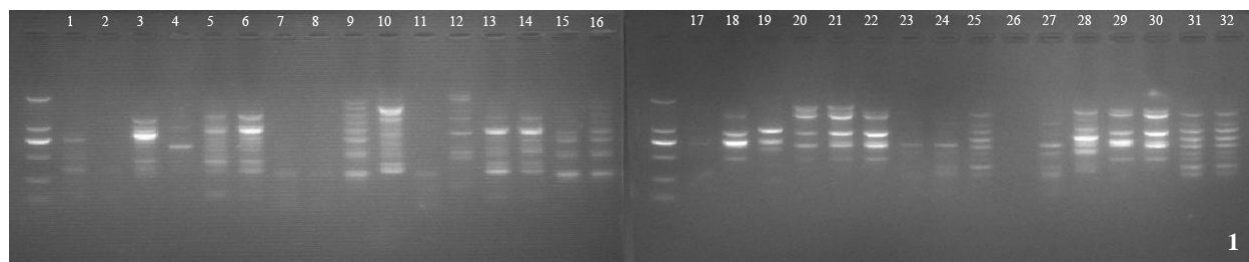
扩增产物经电泳检测后得出反映 DNA 片段多态性的 10 张电泳图谱,如图 2。

表 3. 引物及其序列

Table 3. Primers and sequence

序号	编号 Number	序列 sequence
1	Ya	AAAGTGCGGC
2	Y4	GGACTGGAGT
3	Y6	TGCTCTGCC
4	Y9	TGGGGGACTC
5	Y10	CTGCTGGGAC
6	Y11	TGGACCGGTG

序号	编号 Number	序列 sequence
7	Y12	AAAGTCGCGG
8	Y66	TCGGCGATAG
9	Y101	TCAGGGAGGT
10	Yb	TCACGTCCAC



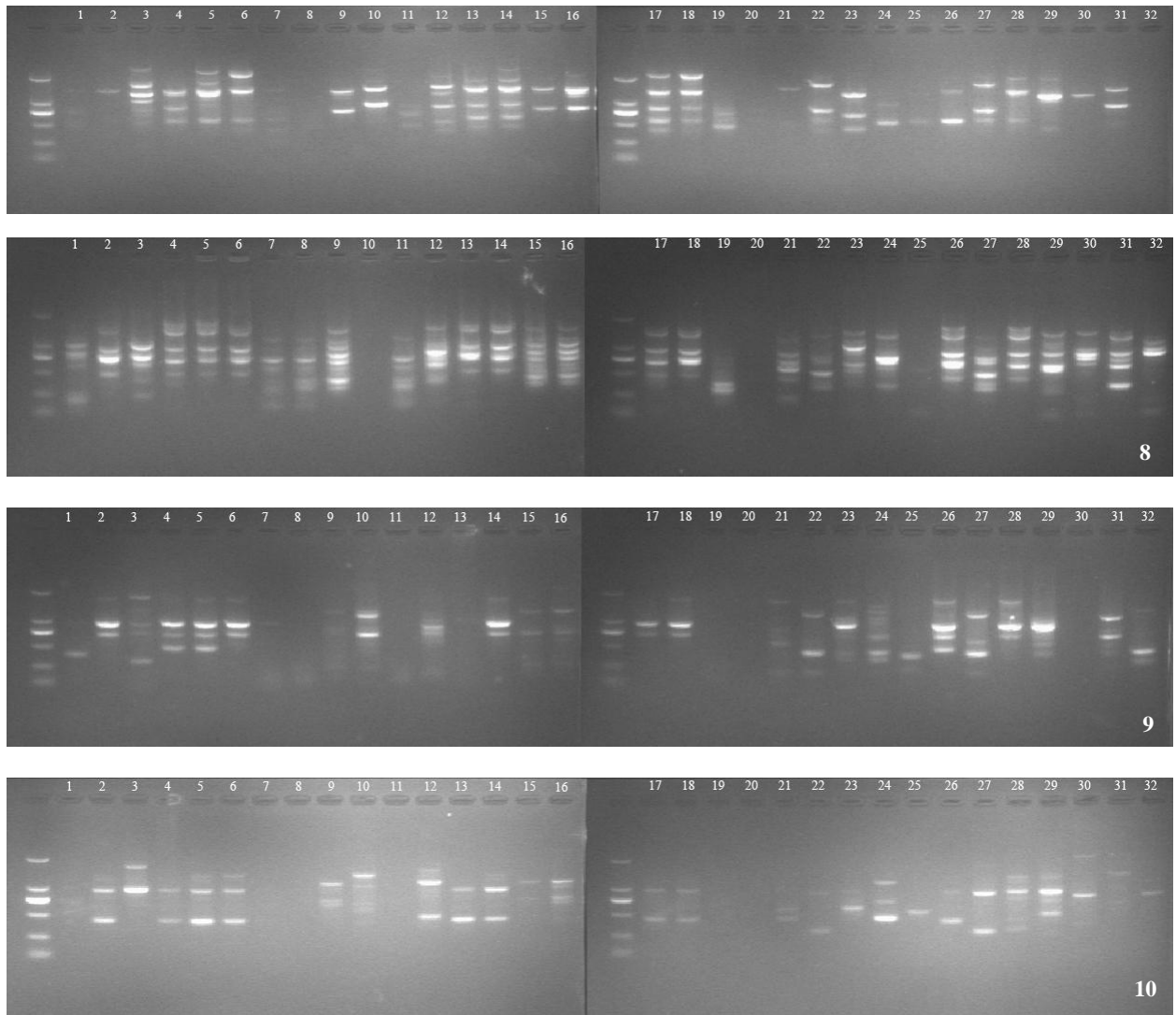


图 2 10 种引物对 32 种金黄壳囊孢菌 DNA 的扩增电泳图谱\*

Fig. 2 RAPD patterns of 32 *Cytospora* produced by 10 primers

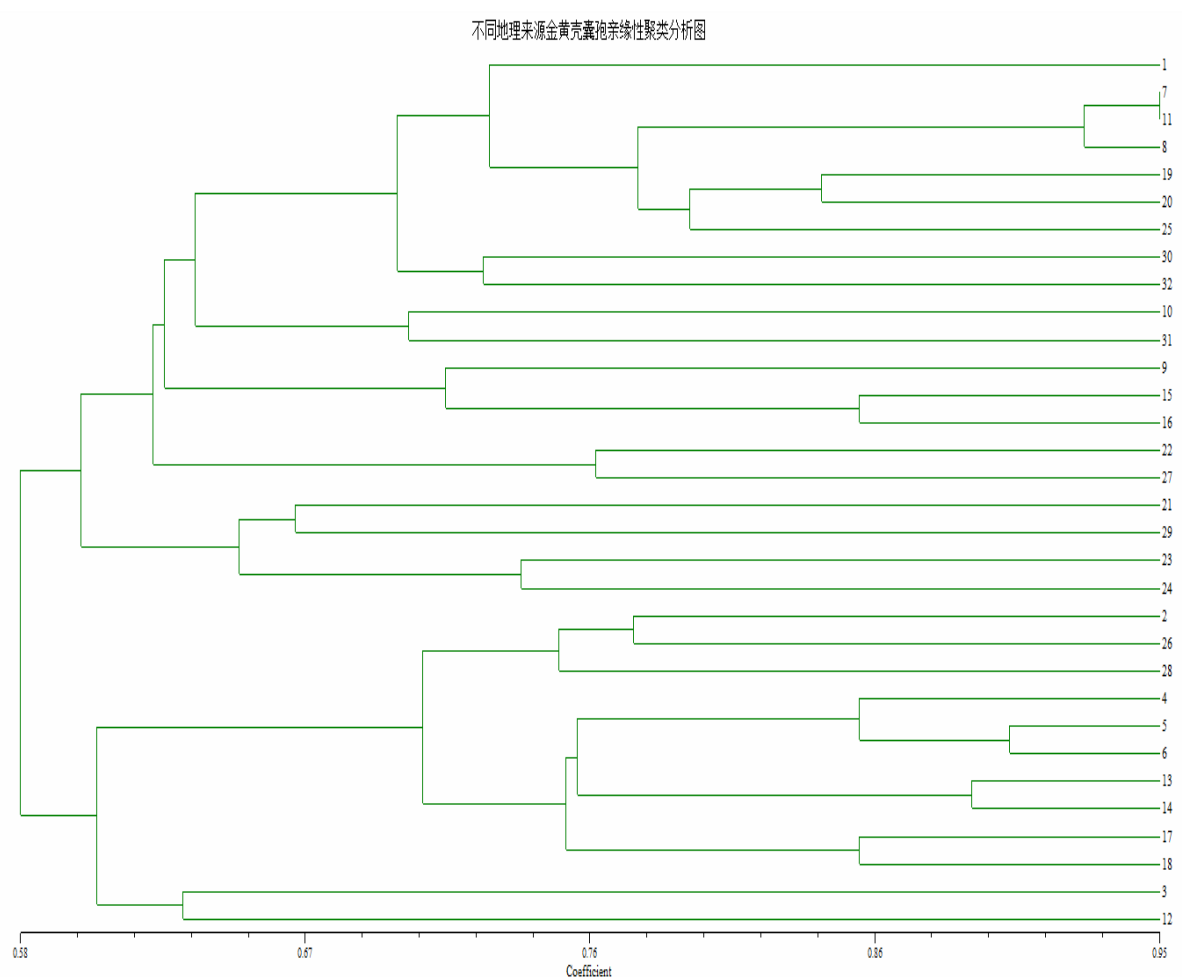
\*注: 1. 随机引物Ya; 2. 随机引物Y4; 3. 随机引物Y6; 4. 随机引物Y9; 5. 随机引物Y10; 6. 随机引物Y11; 7. 随机引物Y12; 8. 随机引物Y66; 9. 随机引物Y101; 10. 随机引物Yb







遗传相似度(Genetic similarity)或遗传距离(Genetic distance)是衡量群体RAPD变异水平的重要指标。根据条带的有无,将0,1矩阵录入NTEDIT软件,经NTSYS-PC软件分析<sup>[14][15]</sup>,结果显示如(表4),32个菌株间的遗传相似度变化较大。其中17号菌株(江苏新沂)与18号菌株(山东)的遗传相似度达到了0.852,遗传距离较近。第27号菌株(内蒙古加格达奇 黑杨)与29号菌株(青海乐都 塔青)其相似性最小值为0.4444。7号菌株(四川资阳 桂花)和11号菌株(四川龙泉驿 桂花)相似性最大,为0.951。另外来自四川的7号,8号和11号菌株遗传相似性达到了0.938。13号菌株(北京 箭杆杨)与14号菌株(北京平谷 杨树)的遗传相似度达到了0.889,来自甘肃的30和32号菌株的遗传相似性为0.728,来自黑龙江的10号和31号菌株的遗传相似性为0.703,由此可以看出,地理来源在同一省内的,遗传相似度都较高,大部分都达到了0.7以上。另外,22号菌株(甘肃景泰 钻天杨)和27号菌株(内蒙古加格达奇 黑杨)的遗传相似性为0.765,26号菌株(甘肃天水 旱柳)与28号菌株(青海乐都 披榆)的遗传相似性为0.753,可以看出地理来源较近的,即相邻2省间遗传相似度也都较高。从总体水平上看,中国金黄壳囊孢菌株群体内的遗传变异较为丰富,遗传多样性与地域性还是有较大的联系。



金黄壳囊孢菌株被分为 2 大类群。其中第一大类群包括四川，黑龙江和内蒙古的所有菌株，以及甘肃，青海，陕西的大部分菌株。在第一大类群中又分为 5 个小的类群，分别为四川类群，甘肃类群，黑龙江类群，四川陕西甘肃类群，甘肃内蒙青海类群。四川，甘肃，青海，内蒙古，陕西均为内陆中西部地区，黑龙江为我国北部地区，与四川，甘肃，青海，内蒙古，陕西几省连成一片，很明显该病害的病原菌亲缘性有较显著的地域性分布；第二大类包括北京的所有菌株，江苏，山东，辽宁的菌株，以及甘肃，青海，陕西各一株菌。来自不同地区相同品种上的菌株和同一地区不同品种的菌株的 DNA 多样性存在差异；同一组内的 DNA 多样性亦有差异，说明该菌具有丰富的种内遗传多样性；江苏，北京，山东，辽宁均为我国东部沿海地区，这四个地区的病原菌亲缘性也有较明显的地域性分布。由该图可明显看出江苏菌株与山东菌株的亲缘关系最近，与北京，辽宁菌株亲缘关系也较近。

### 3 结论与讨论

本研究选取的32个金黄壳囊孢菌株来自我国10个省29个市，基本上涵盖了我国有杨树烂皮病发生及有金黄壳囊孢菌株存在的大部分地区，在树种及地理分布上均具有一定的代表性，基本上能反映我国杨树烂皮病发生的实际情况。经RAPD分析表明，本次实验未发现扩增产物完全一致的菌株，RAPD分组与供试菌株的地理来源呈较明显的相关性。所有来源的32个菌株以不同的相似性系数分为2大聚类，一是中西部类群，包括四川，甘肃，青海，内蒙古，陕西以及黑龙江6省，这与张星耀的部分观点基本一致[16]。另外一个为东部沿海类群。来自不同地区相同品种上的菌株和同一地区不同品种的菌株的DNA多样性存在差异；同一组内的DNA多样性亦有差异，说明该菌具有丰富的种内遗传多样性。包括江苏，北京，山东，辽宁四个省市，其中江苏菌株与山东菌株亲缘关系最近，与北京，辽宁菌株亲缘性关系也较近，这四个地区的病原菌亲缘性也有较明显的地域性分布。很有可能江苏菌株是由山东传入江苏境内或者是江苏从北京或辽宁引进杨树种源而来，但是具体是何原因还有待于做进一步调查研究。总的来说我国金黄壳囊孢病菌群体存在较丰富的遗传多样性及明显的地理分化现象。

本研究采用RAPD技术快速有效地检测出了我国金黄壳囊孢菌基因组DNA的变化，RAPD技术为快速监测金黄壳囊孢菌的种群遗传变异提供了方便有效的手段，并对分析种内的亲缘关系以及病害发生与流行等都具有重要的实践指导意义。但由于RAPD技术是以基因组DNA为模板，因此供试材料间基因组的差异，可能会对结果产生影响。今后的研究应立足采用分子标记技术，并结合形态学特征、地理环境及气候类型等因素，更深入地探讨金黄壳囊孢种间的

基因系统发育关系。

### 参考文献:

- [1] 陈宏宇,文景芝. 大豆疫霉菌遗传多样性的RAPD分析. 中国油料作物学报[J], 2006,28(3):330-334.
- [2] 余仲东,曹支敏,原彝彝. 松杨栅锈菌遗传多样性初步分析. 应用生态学报[J],2006, 17(11):2102-2106.
- [3] 金莹,李钧敏,赵晓兰,郑婷婷,陈旭林等. 医化废水驯化过程中细菌遗传多样性的RAPD分析. 环境科学研究[J], 2008, 21(3):151-154.
- [4] 吴小芹,黄敏仁,尹佟明.中国松树枯梢病菌遗传多态性的 RAPD 分析.林业科学[J],2000,36(4):32-37.
- [5] 吴小芹,熊大斌.松枯梢病菌RAPD分子水平遗传距离分析.南京林业大学学报[J],2006,30(1):13-16.
- [6] 曾大兴,戚佩坤,姜子德. 香蕉炭疽病菌菌株亲缘关系的RAPD分析.菌物系统[J],2001,20(3) :324-329.
- [7] 张修国,罗文富,杨艳丽,张世光,张天宇. 烟草黑胫病菌株亲缘关系的RAPD分析. 菌物系统[J], 2000, 19(1):39-44.
- [8] Ye G N,Hemmat M,Lodhi M A,et al. Long primers for RAPD map ping and finger printing of grape and pear[J].Biotechniques,1996,20(3) :368-371.
- [9] 吴燕民,裴东,奚声珂,等.运用RAPD对核桃属种间亲缘关系的研究[J].园艺学报,2000,27(1) :17-22.
- [10] 王桂清,陈捷. 23个玉米灰斑病菌菌株亲缘关系的血清学研究. 玉米科学[J],2005, 13(2) :121-12.
- [11] VIDAL J R,M ORENO S, G ORCENA et al.On the genetic relationships and origins of six grape cultivar of Galicia (Spain) using RAPD markers[J].Amer of Enology and Viticulture.1999,50(1) :69-75.
- [12] JAIN PK,SAINI ML,PATHAK H,et al.Analysis of genetic varition diferent banana (Musa species) variety using random amplified polymorphic DNAs (RAPDs)[J].African Journal of Biotechnology,2007,6:1987-1989.
- [13] Nyasse S,Grivet L,Risterucci A M,et al. Diversity of Phytophthora megakarya in Central and West Africa revealed by isozyme and RAPD makers [J]. Mycological Research,1999,103(10) :1225- 1234.
- [14] 孙文秀,张修国,贾永健等.不同地区辣椒疫霉菌遗传多样性的RAPD分析.植物病理学报[J].2005,35(4) :340-344.
- [15] Meng XQ, Shoemaker RC,Yang XB. Analysis of pathogenicity and genetic variation among *Phytophthora sojae* isolates using RAPD.Mycological Research [J].1999,103(2) :173-178.
- [16] 张星耀,陈海燕等金黄壳囊孢菌(*Cytospora chrysosperma*)的培养性状和营养体亲和性.西北农林科技大学学报[J].2007,35(3):99-105.

### 作者简介

徐明, (1982-), 男, 在读博士, 研实员。主要研究方向: 从事林业有害生物防治技术研究工作。电话: 02552745800-8105, Email:Xuming2009@126.com