

文章编号: 1001-1498(2000) 04-0423-08

林木病原真菌的群体分化研究

吴小芹

(南京林业大学 森林资源与环境学院, 江苏 南京 210037)

摘要: 从重组、突变、迁移与基因流动以及选择等方面探讨了林木病原真菌群体遗传多样性的主要动因, 从表型观察、致病力和抗药力等特性的人工选择、营养体亲和性测定以及同工酶分析和 DNA 分析(RFLP、RAPD、AFLP、RAMS)等现代分子标记技术几方面讨论了研究林木病原真菌群体分化的主要方法与技术, 并着重论述了 RAPD 技术在林木病原真菌群体分化研究(如病原真菌的系统分类、亲缘关系与进化、致病性检测与流行性分析)中的应用。

关键词: 林木病原真菌; 群体分化; 分子标记

中图分类号: S718.81 文献标识码: A

群体遗传学是应用数学和统计学等方法研究生物群体的遗传结构及其变化规律的学科。它的起源可追溯到孟德尔以前的进化学说。本世纪 20 ~ 30 年代, 一批英国和美国的数理统计学家、遗传学家和生理生化学家用严密的数学模型发现了群体内基因和基因型的动力学, 扩展了孟德尔和达尔文的原理, 从而形成发展了群体遗传学。植物病原真菌的群体遗传学研究起步甚晚, 由于在研究手段上缺少合适的标记以及操作上的一些困难, 使得人们对植物病原真菌群体遗传进程的了解滞后于其它真核生物^[1]。林木病原真菌这方面的研究更是少见。然而, 近几年来随着分子检测手段和其它研究方法的不断创新和运用, 林木病原真菌群体遗传学的研究已迅速成为国内外林木病理学研究的一个新的热点或生长点。

1 林木病原真菌群体分化的主要动因

群体遗传学是在群体而非个体的水平上研究生物群体的遗传结构和变化规律, 其研究内容涉及到揭示生物群体内遗传多样性的形成和变化机制等问题。从群体遗传观点看来, 一个种是由许多地理分布与生态环境不同的种群组成的, 这些种群之间具有较大的遗传变异。在进行遗传多样性研究时, 首先考虑的就是种内水平的遗传变异。在林木病原真菌的群体进化过程中, 尽管真菌的寄生性和致病性等特征基本保持稳定, 但在一定的内外因子影响下, 其群体也会发生程度不同的变异与分化。

1.1 重组

在自然群体中, 基因重组是改变群体中基因和基因型频率的重要因素之一。对林木病原真菌而言, 有性重组和无性重组(体细胞重组和交流)使其产生了新的基因型, 这有利于它们适应不断变化的环境。特别是重组可使病原菌产生新致病型的小种, 从而导致新的病害或新一轮病害的流行。病原菌新小种的形成往往是寄主植物垂直抗病性丧失的主要原因。这种例子在农业病害中较为多见。在林木病害中, 虽然大多数寄主的抗病性是受多基因控制的, 但也会出现抗病性因病原物新专化型或小种的产生或引入而丧失的情况。典型一例是, 本世纪中叶以前我国未发现茶生柱锈菌(*Cronartium ribicola* Fischer)引起五针松疱锈病(该病当时在欧美广泛流行); 然而, 1956 年在我国东北红松(*Pinus koraiensis* Sieb. et Zucc.)林中首次发现了该病危害,

收稿日期: 1999-10-15

基金项目: 国家“九五”攻关项目(95-04-01)部分内容

作者简介: 吴小芹(1957-), 女, 福建惠安人, 副教授, 博士。

据研究该病的发生与流行即是由于病原菌产生的新的类型——马先蒿专化型(*C. ribicola* f. sp. *pedicularis*)之故^[2]。

在许多真菌中, 营养体不亲和机制也进一步增强了有性重组(通过至少保证一些远缘杂交)所产生的多样性^[3]。至于体细胞重组和交流的过程既可发生在菌丝融合的同种真菌之间, 也可发生在不同种的真菌之间。如新西兰研究证实, 在新西兰均未发现有性世代的两种不同的的杨栅锈菌即松杨栅锈菌(*Melampsora larici-populina* Kleb.) 和 *M. medusae* 之间发生了相互作用, 其杂交结果产生了一种具新毒力专化型组合的杂交锈菌 *M. medusae-populina*^[4]。

1.2 突变

除基因重组外, 突变亦是导致病原真菌群体产生新的变异或新的致病型的主要因素。真菌在进化上较原始、个体小、结构简单。因此, 外界高温、有毒物质和物理射线以及其它一些环境因素等均能使其发生突变。林木病原真菌的一切突变型都涉及到 DNA 的改变。突变对群体产生有效多样性的程度受遗传突变率、病原菌的倍体(ploidy)水平、病原菌群体的大小以及由突变表型所赋予的选择优势的影响^[5]。突变的发生既涉及到背景基因型, 也涉及到觉察的或不觉察的环境影响。目前, 关于自然界生物种群自发突变的真正机制仍了解甚少^[6]。因此, 单从表型效应或单从分子机制都难以准确地估计真菌的突变率。

1.3 迁移与基因流动

迁移和随迁移产生的群体间的基因流动对病原真菌群体的遗传结构变化也起重要作用。迁移的结果可导致新病原菌群体在某地(该地区原无此群体)的建立, 如栗疫病菌(*Cryphonectria parasitica*)引入北美, 致病疫霉(*Phytophthora intestans* (Mont.) de Bary)引入欧洲等均引起了很大的危害。在已存在某病原菌群体的地方, 迁移和基因流动也可使群体中的毒性基因传播扩散。同时, 迁移和基因流动也影响到群体的遗传分化水平。白松疱锈病菌(*C. ribicola* Fischer)的锈孢子在单个人工林或天然林内的遗传多样性较高, 然而, 相距 1000 km 以上地理区域之间的遗传分化水平却较低^[7]。这说明群体间的基因流动降低了地区间的遗传差异; 而若繁殖体是来自一个群体中的少数个体时, 取样效应超过了群体间的基因流动效应, 就使得该群体的遗传差异增大。另外, 由于病原真菌繁殖期配子的随机取样而引起的随机遗传漂变也会造成群体中等位基因频率出现随机波动。

1.4 选择

选择对林木病原真菌群体遗传结构和多样性具有重要影响。在自然群体中具有不同变异的基因个体在生存和生殖上是不等价的。自然选择的主导作用就在于通过差别生殖保存那些有利于传宗接代的基因或基因组合, 使其频率不断增加, 淘汰那些不利的基因或基因组合, 从而定向地改变群体的基因频率, 产生新的生物类型。林木病原真菌群体分化进程的重要动力之一是病原菌与其寄主和环境的相互作用, 而这种作用的体现之一就在于寄主和环境诱发的选择。如在大量使用杀菌剂或抗性品种的选择压力下, 病原真菌为了生存而形成了新的毒性类型。日本长期用多氧霉素防治梨黑斑病(*Alternaria alternata* (Fr.) Keissl.), 多氧霉素的主要防效在于抑制真菌细胞壁的几丁质合成。然而, 由于抗药性选择的结果, 1971 年人们从田间获得了抗多氧霉素的致病菌系, 这是在日本出现病原真菌抗药分离系的首次记录^[8]。

2 研究林木病原真菌群体分化的主要途径与技术

根据群体遗传结构的平衡模型理论, 群体内存在着大量的遗传变异。也就是说, 大多数基因座是多态的。就林木病原真菌而言, 这种种内群体的遗传多样性亦称基因多态性, 可在不同的水平上进行检测, 包括形态、生理、病理以及分子水平等。其研究途径主要有以下几方面:

2.1 直接观察形态特征差异

这包括用肉眼或借助显微镜直接观察真菌菌落的形态、颜色, 繁殖体孢子的颜色和生长萌发特性等方面的形态特征差异。在一些子囊菌中, 分生孢子颜色是隐性的突变系对研究其遗传变异和重组就具有重要意

义^[9]。根据菌落和孢子堆颜色、孢子萌发产生单或双芽管等表型性状,李传道将杨盘单隔孢菌(*Marssonina populi* (Lib.) Magn)划分为2个专业化型,它们对不同杨树寄主的致病力表现出差异^[10]。用RAPD分子标记分析也得出了相同的结果^[11]。这说明表型差异在某种程度上反映了一定的内在遗传变异状况。

2.2 致病力和抗药力等特性的人工选择

主要包括两方面:(1)毒性基因的人工选择。这主要是利用有关毒力(接种)试验来测定病原菌的致病性变异。王克荣等^[12]从中国东部收集了36个栗疫病菌菌株,经接种苹果(*Malus pumila* Mill.)和板栗(*Castanea mollissima* Blume)枝条,结果证实菌株间存在明显的毒力分化,可分为强、中、弱毒力3种类型。但病原菌的特异性毒力通常并不能用作可选择的特征,因为毒力有时是隐性的。而且,由于缺少通用的检测致病性的方法,使用不同的寄主,不同的测定方法可能结果不同。同时,致病性还会受到寄主-病原菌-环境条件相互作用的影响。(2)利用病原菌的抗药性和营养缺乏型突变系这些显性标志来进行选择。在田间群体中,由于杀菌剂的病菌分离系似乎并不降低其适应性,因此,抗药性可作为一个易于记录的特征标志^[1]。Adachi等^[8]就对链格孢(*A. alternata* (Fr.) Keissl.)的抗药性与遗传多态性的关系进行了研究探讨。

2.3 营养体亲合性测定

自1923年Cayley首次报道发现了植物病原真菌营养体亲和与不亲和现象后,营养体亲和性测定便被逐步发展应用于病原真菌群体的遗传结构、基因分化和小种分类等研究中。特别是利用营养体亲和性来区分立枯丝核菌(*Rhizoctonia solani* Kühn)种下类群的方法已在世界范围内被普遍接受。在营养体亲和过程中,除核质交流外,细胞质交流较常发生。栗疫病菌和榆枯萎病菌(*Ophiostoma novo-ulmi*)等的高毒菌系向低毒菌系转化即与这些病菌细胞中获得具dsRNA的类病毒粒子有关^[13]。因此,营养体亲和性研究对深入了解病原菌的流行传播和生物防治也具有重要意义。许多研究已表明,栗疫病菌营养体亲和性的多样性与栗疫病生物防治的有效性呈负相关^[14]。

2.4 现代分子标记技术

从分子水平揭示生命现象的本质和规律是生物科学研究的一个飞跃。现代分子生物学技术的发展,给真菌群体遗传研究注入了新的生命力。以上方法的局限在于所研究的差异是表型而非基因型的。因此可以说,林木病原真菌群体遗传学的研究是随着分子检测手段的发展而进入实质性研究阶段的。分子水平检测包括同工酶分析、氨基酸序列测定以及近20年发展起来的DNA水平变异分析等。分子标记技术为大规模进行林木病原真菌的遗传分析创造了有利的条件。

2.4.1 同工酶分析 在植物病理学领域,同工酶分析技术最初主要作为划分植物病原真菌种或亚种的辅助分类方法;同时,在生理小种、专业化型和营养体亲和群等的划分上也作为一种验证手段;尔后亦应用于比较研究植物抗感病后体内的生理生化反应等方面;近十几年来,则较多地应用于病原真菌许多种的群体遗传研究中。Damaj^[15]应用同工酶技术分析了双核丝核菌(*Rhizoctonia*)代表17个菌丝融合群的50个分离系的遗传相关性。同工酶分析还被用于研究推测种内群体中有性生殖的发生率和群体起源以及传播路径等。Lindel^[16]对南非Cape和Mpumalange两个地区樟疫霉(*Phytophthora cinnamomi* Rands)的群体结构进行同工酶分析表明,南非这两个群体的基因和基因多样性水平很低,每基因座上的等位基因数量也很少,而且在多基因座同工酶遗传型的区域分布上未见特异类型,这些反映出南非樟疫霉群体的有性生殖很少发生。通常真菌的遗传多样性水平在其起源中心获得的分离系中是最高的,这一点通过对致病疫霉的同工酶研究而得到揭示和证实。将来自墨西哥这假定的该菌起源中心的分离系与来自世界其它地方的该菌分离系进行同工酶比较分析,结果前者的同工酶等位基因、有性繁殖的发生率和遗传多样性水平均高于后者^[17, 18]。

同工酶分析技术具有许多优点,但也存在一些先天不足,这主要是蛋白质中仅约30%的可溶性的,并且在编写这些蛋白质的结构基因的DNA序列之差异中,只有25%会导致电荷的变化而被电泳所检测^[19]。特别在一些病原真菌中,如锈菌,其同工酶变异的水平很低,这样在自然群体中用同工酶分析技术就很难识别足够的多态性来分析群体分化状况^[1]。另外,同工酶易受生物个体发育阶段的影响而表现为多态性不够稳定^[20]。

2.4.2 DNA分析 从DNA分析水平上进行生物遗传多态性的检测是进行生物基因组研究的基础。DNA遗传标记较其它遗传标记具有明显的优点。首先,可供检测的DNA标记数量很多,这是同工酶技术所无法相比的;其二, DNA标记不像其它遗传标记那样随组织或发育阶段而异,从任何组织均能确定分子位点的基因型;第三, DNA标记不受环境影响,这种稳定性排除了由于环境差异所造成的表型变异;第四, DNA标记通常没有或不具备很强的抑制其它作用的效应。目前应用于林木病原真菌群体遗传学研究的主要有以下几种:

RFLP(Restriction Fragment Length Polymorphism)限制性片段长度多态性

在林木病原真菌群体遗传学领域RFLP主要应用于研究病原真菌的群体遗传变异及种群起源等问题。Correll等^[21]对松脂溃疡病菌(*Fusarium subglutinans* f. sp. *pini*)的加利福尼亚群体(209个菌株)和佛罗里达群体(116个菌株)用线粒体DNA的RFLPs检测其遗传多样性,结果在该病菌各菌株间没有发现限制性片段长度多态性,但在所有非松树上寄生的*F. subglutinans*菌株与*F. s. pini*之间线粒体DNA的RFLPs却不同。这表明松树上寄生的菌系代表了*F. subglutinans*种群中一个独立的交配群体。Milgroom等^[22, 23]运用RFLP系统研究了栗疫病菌群体在美国的遗传分化以及跨大陆的种群结构。发现在美国13个亚群体中所有位点上的等位基因频率存在明显差异,研究将此分化水平归于亚群体中的限制性基因流动。接着从中国、日本、北美和欧洲收集791个菌株在8个RFLP位点测定等位基因,结果多数位点不连接,56%的基因多样性归因于亚群体内的多样性,地区间种群基因的多样性为37%。北美和欧洲亚种群相似,其RFLP等位基因频率和DNA指纹与日本亚种群的相似程度比中国的大。由此认为北美的栗疫病菌是从日本引入的。

RFLP的应用为生物群体遗传学研究提供了大量的分子标记。但由于限制性核酸内切酶种类有限,一些生物DNA序列抗限制性酶的内切作用,而且RFLP需进行分子杂交,这就牵涉到需要大量高质量的DNA以及特异探针的制备、同位素标记、转膜、杂交等一系列技术,在操作分析上都比较复杂和费时。对一些林木病原真菌来说,例如生体营养性(Biotrophic)的锈菌,就难以采用RFLP,因为这些真菌非常难培养。因此RFLP的应用在广度上受到较大的限制。

RAPD(Random Amplified Polymorphic DNA)随机扩增多态DNA

RAPD是在PCR技术上,以任意顺序的寡聚脱氧核苷酸作为PCR反应引物,对基因组DNA进行扩增而显示多态性的一种分子标记技术。RAPD引物没有特异性,合成一套引物可用于不同生物基因组的分析(而RFLP标记具有种族特异性),且不需要克隆制备探针、同位素标记及Southern杂交等,具有所需DNA样品量少,分析速度快等优点。RAPD既克服了同工酶位点偏少的缺点,又避免了RFLP操作技术复杂的弊端,因而在动植物和菌物研究中得到了广泛的应用,是检测种下变异的一种方便有效的分子标记技术。当然,RAPD也有其不足,即它是显隐性位点,无法在F₂代中知道基因型是纯合的或杂合的,故在育种应用上受到一定限制。

AFLP(Amplification Fragment Length Polymorphisms)扩增片段长度多态性

1991年Gaetano-Anolles等^[24]用很短的5个、8个或10个碱基的寡核苷酸片断作引物,随机扩增动植物、真菌、细菌及病毒DNA获得成功,并称之为扩增片段长度多态性(AFLP)。AFLP是一种将RFLP与PCR相结合的技术,它用聚丙烯酰胺凝胶电泳结合银染方法来检查RAPD产物,比通常用琼脂糖平板电泳结合溴化乙锭染色,在紫外光下检查RAPD产物的方法更灵敏,且信息量大,可产生无限的标记数目。但其操作繁琐、较难分析,且大剂量同位素的使用也使人们轻易不愿采用。

RAMS(Random Amplified Microsatellites)随机扩增微卫星

RAMS是Zietkiewicz等^[25]1994年证实的一种通过微卫星(2-4个碱基)引物测定动植物遗传变异的新方法。由于Zietkiewicz等没有赋予他们的新技术以简单的短名,故Hantula等^[30]提出以首字母RAMS简称该技术。微卫星是指以少数几个核苷酸为单位多次串联重复的DNA序列。由于微卫星寡核苷酸的重复次数在同一物种的不同基因型间差异很大,即微卫星的拷贝数在个体间呈现高度变异,因而这一技术很快便发展为一种分子标记。

RAMS是以聚合酶链反应(PCR)为基础,用含有微卫星序列的引物在5'端进行简并锚定。因此,它的特

点是微卫星分析的优点与 RAPD 分析的普遍性结合起来, 重复性高。Hantula 等^[26]应用 RAMS 成功地从欧洲赤松 (*Pinus sylvestris* L.)、欧洲冷杉 (*Abies alba* Mill.)、欧洲云杉 (*Picea abies* (L.) Karst.) 和垂枝桦 (*Betula pendula* Roth) 上分离的 *Armillaria cepistipes*、*Gremmeniella abietina* (Lagerb.) Morelet、*Heterobasidion annosum*、*Phytophthora cactorum* (Leb. et Cohn) Schroö、*Phlebiopsis gigantea* 和血痕韧革菌 (*Stereum sanguinolentum* (Alb. et Schw.) Fr.) 中检测到种间和种内的 DNA 多态性。运用 RAMS 就有可能用 CGA 引物将 *G. abietina* 内属于北美和欧洲小种的分离系区分开来。由于在微卫星内的进化速度比在 DNA 的大部分其它类型内要高得多^[27], 因此通过 RAMS 发现多态性的可能性要比大部分其它技术包括 RAPDs 要大得多^[26]。如在 RAPD 分析中每个引物最多只有 1~2 个的 RAPD 标记可用于区分 *G. abietina* 小种^[28], 而在 RAMS 分析中, CGA 引物则可产生 6~7 个小种特异的 RAMS 标记。在北美, 白松疱锈病菌是外来菌, 其群体似乎相当均质同型, 为此筛选了 40 个 RAPD 引物用于检测两个多态性标记。然而当采用 CGA、GT 和 ACA 引物时, 每个引物都检测出大量的多态性, 包括长度片断多态性^[30]。另外, 由于 RAMS 片断具有很高的重复性, 甚至当模板和引物浓度分别变化 1 000 倍或 6 倍时。因此, RAMS 确是一种研究真菌遗传变异富有前景的分子标记技术。

3 RAPD 在植物病原真菌群体变异研究中的应用

RAPD 是一种建立在 PCR 技术基础上的检测种一级水平基因多态性的有效遗传标记。这一技术的开发和利用, 为深入研究林木病原真菌的群体遗传变异提供了有力的工具。

3.1 病原真菌的系统分类

目前, RAPD 广泛应用于生物分类方面, 在 DNA 分子水平上鉴别生物不同种、亚种、变种、地理类型及单株间的差异。在病原真菌分类研究应用上, 主要用于鉴别相似种或种下生理小种和地理型的变异及遗传分化上。Hoegger 等^[29]用 RAPD 标记分析了瑞士榆枯萎病菌 *Ophiostoma ulmi* 和 *O. novo-ulmi* 的群体结构, 将 79 个瑞士菌株与来自美国、葡萄牙、加拿大、爱尔兰、比利时、波兰、南斯拉夫和伊朗的菌株进行比较, 根据 RAPD 图谱所作的树状图明显将 *O. ulmi* 和 *O. novo-ulmi* 分成两大类, 这就支持了 Brasier 提出的将它们分成 2 个不同种的观点^[30] (以前将后者作为前者的侵袭性亚种)。且在 *O. novo-ulmi* 中又可进一步划分为欧亚 (EAN) 和北美 (NAN) 两个小种, 此与利用分类特性所得结果一致。分析可见 EAN 和 NAN 两个小种内仍存在着大量的遗传多样性。

3.2 病原真菌的亲缘关系与进化

由于 RAPD 标记可用来制作生物系统发育关系 (特别是种内水平) 的树状图, 这就使研究病原真菌的亲缘关系、系统发育与分子进化成为可能。秦国夫等^[31]对中国密环菌 (*Armillaria mellea* (vahl: Fr.) Karst) 的 5 个生物种 (A、B、C、D、E) 及欧洲 2 个生物种 (*A. gallica* 和 *A. ostoyae*) 之间的分子系统学关系进行了 RAPD 分析, 结果 7 个菌株明显分为 4 个群: ①生物种 A 和 C; ②E 和 D; ③ *A. ostoyae*; ④ *A. gallica* 和 B。研究将生物种 A 和 C 归为一个族; 将中国生物种 B 定名为 *A. gallica*, 但两者的遗传距离较大, 说明地理隔离导致了生物种内较大的遗传分化。Huang 等^[32]在 43 个美国和中国的松针褐斑病菌 (*Mycosp haerella dearnessii* Barr.) 分离系中用 RAPD 检测到分子多态性, 美国北部的分离系组成特殊的“北部群”, 而美国南部和中国的分离系组成了彼此关联的“南部群”。根据分子数据所产生的树状图所示, 美国南部似乎是目前中国松针褐斑病菌种群的来源地。这一结果使人容易产生这样的推测和质疑, 或许是随着 70 年代中国从美国大量引种湿地松和火炬松等国外松而使该病菌群体跨大陆流入中国。

3.3 病原真菌的致病性检测

RAPD 在研究测定病原真菌种内致病性分化上具有独特的优势。通过 RAPD 分析, Goodwin 等^[33]和 Schafer 等^[34]对油菜黑胫病菌 (*Leptosphaeria maculans*), Manulis 等^[35]对侵染香石竹 (*Dianthus fragrans* Fisch) 的 *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* 的毒性和非毒性菌系进行了快速检测区分和鉴定。Goodwin 等^[33]

对 *L. maculans* 的进一步研究还发现在所有毒性分离系之间存在较高的相似性,这说明该病菌地理分隔时间不长。1992 年 Guthrie 等^[36]分别从非洲、亚洲(印度)、美洲(美国)和拉丁美洲(波多黎各)获得不同地理来源的高粱炭疽病菌(*Colletotrichum graminicola*)分离系并对此进行 RAPD 分析,结果发现,来自波多黎各的分离系其 RAPD 图谱明显不同于其它地区,且该分离系的同源性最高,这反映了该群体是一地理上隔离的基因群。由此暗示,RAPD 技术在确定植物病害检疫对象(种下水平)上也具有应用潜力。

3.4 病原真菌的流行病学分析

掌握病原真菌遗传变异的细微结构是了解其群体遗传学和流行病学的一个重要方面。Hamelin^[37]用 RAPD 研究了白松疱锈病菌单核单倍体(性孢子)和双核(锈孢子)阶段遗传多样性的等级结构,以求弄清其不同孢子阶段对该病流行病学的影响。分子变异分析表明,不同锈孢子在单个溃疡斑内遗传变异占总遗传多样性的 69%~74%,同一立地不同溃疡斑之间的变异率为 2.7%~24%,而不同立地之间的变异度则仅占总遗传多样性的 2.7%~6.7%。溃疡斑内性孢子之间的 RAPD 图谱也发现同一规律。上述研究结果与由于锈孢子和夏孢子的长距离迁移导致地理区域之间的遗传分化水平低和由于有性重组和性孢子的媒介传播导致同一立地较高遗传分化的假定相一致。这表明,该锈菌群体中锈孢子和夏孢子的远程传播对病害流行起了重要的作用。Delye 等^[38]为了确定葡萄白粉病菌(*Uncinula necator* Schw.) Burr.) 以无性(菌丝)或有性(闭囊壳)形式越冬的分离系之间是否存在遗传差异,对来自欧洲和印度的 90 个该菌分离系进行了 RAPD 分析。聚类分析将其分为三大组。第 3 组分为 2 个亚组, -1 亚组全为印度分离系, -2 亚组全为欧洲分离系,说明这两个亚群体具有共同的起源。以前研究报道该菌分生孢子需强风速或叶子的大量振动才能释放,但目前研究所发现的在地理起源和分离系的遗传相似性之间的相对呼应以及流行数据则暗示 *U. necator* 的分生孢子既不容易也不可能大量由风传播,人类活动例如感病葡萄枝之间的贸易可能是接种体传播的主要原因。

Hansson 等^[39]从瑞典北部 11 个地方的欧洲赤松和扭叶松(*Pinus contorta*)感病株中收集 81 个 *Gremmeniella abietina* 菌系,运用 RAPD 分析地理分隔群体之间和其内在的遗传变异情况。结果不管这些分离系取自何种松树,其遗传相似程度同一地区大于不同地区,这表明该病菌缺少寄主专化性,这在病害管理实践中具有重要意义。因为据此分析,可能存在该病菌从感病的扭叶松林传播蔓延至邻近的乡土树种欧洲赤松更新林中的巨大危险。

此外,RAPD 技术在构建基因连锁图谱或分子遗传图谱或进行基因定位(如定位抗病基因)以及基因克隆(分离、克隆控制重要性状的基因,如抗病基因和共生固氮基因等)等方面都有较广泛的应用。

参考文献:

- [1] Michelmore R W, Hulbert S H. Molecular markers for genetic analysis of phytopathogenic fungi[J]. Ann Rev Phytopathol, 1987, 25: 383 ~ 404.
- [2] 李传道. 森林病害的流行与治理[M]. 北京: 中国林业出版社, 1995.
- [3] Brasier C M. Inter-mycelial recognition systems in *Ceratocystis ulmi*: Their physiological properties and ecological importance[A]. In: Jennings D H, Rayner A D M eds. The Ecology and Physiology of the Fungal Mycelium[M]. Cambridge, Cambridge Univ. Press, 1984. 451 ~ 497.
- [4] Spiers A G, Hopcroft D H. Comparative studies of the poplar rusts *Melampsora medusae*, *M. larici-populina* and their interspecific hybrid *M. medusae-populina*[J]. Mycol Res, 1994, 98: 889 ~ 903.
- [5] Budon J J. Genetic variation in pathogen population and its implication for adaptation to host resistance[A]. In: Jacobs T H, Parlevliet J E eds. Durability of Disease Resistance[M]. Amsterdam: Kluwer Academic Publishers, 1992. 41 ~ 56.
- [6] 王喜忠, 杨玉华. 群体遗传学原理[M]. 成都: 四川大学出版社, 1992.
- [7] Hamelin R C, Beaulieu J, Plourde A. Genetic diversity in population of *Cronartium ribicola* in plantations and natural stands of *Pinus strobus*[J]. Theor Appl Genet, 1995, 91: 1214 ~ 1221.
- [8] Adachi Y, Watanabe H, Tsuge T. Relationships between genetic polymorphisms and fungicide resistance within

- A. alternata* [J]. *Phytopathology*, 1996, 86: 1248 ~ 1254.
- [9] Fincham J R S, Day P R, Radford A. Fungal genetics [M]. London: Blackwell Scientific, 1979. 636.
- [10] 李传道, 杨盘单孢隔孢菌 *Massonina populi* (Lib.) Magn 的两个专化型 [J]. 南京林学院学报, 1984, 8(4): 10 ~ 16.
- [11] 韩政敏. 我国杨生褐盘二孢菌 (*Massonina brunnea*) 分化的研究 [D]. 南京: 南京林业大学, 1997.
- [12] 王克荣, 周而勋, 丁国云, 等. 栗疫病菌的培养性状、毒力与 dsRNA 的关系 [J]. 植物病理学报, 1996, 26(4): 341 ~ 346.
- [13] Brasier C M. The unexpected element: mycovirus involvement in the outcome of two recent pandemics, Dutch elm disease and chestnut blight [A]. In: Burdon J J, Leather S R eds. *Pests, Pathogens and Plant Communities* [M]. Oxford: Blackwell Scientific Publications, 1990. 289 ~ 307.
- [14] Liu Y-C, Cortesi P, Double M L, et al. Diversity and multilocus genetic structure in populations of *Cryphonectria parasitica* [J]. *Phytopathology*, 1996, 96(12): 1344 ~ 1351.
- [15] Damaj M, Jabaji-Hare S H, Charest P M. Isozyme variation and genetic relatedness in binucleate *Rhizoctonia* species [J]. *Phytopathology*, 1993, 83(8): 864 ~ 871.
- [16] Linde C, Drenth A, Kemp C H J, et al. Population structure of *Phytophthora cinnamomi* in South Africa [J]. *Phytopathology*, 1997, 87(8): 822 ~ 827.
- [17] Spielman L J, Drenth A, Davidse L C, et al. A second world-wide migration and population displacement of *Phytophthora infestans*? [J]. *Plant Pathol*, 1991, 40: 422 ~ 430.
- [18] Tooley P W, Fry W E, Villareal Gonzalez M J. Isozyme characterization of sexual and asexual *Phytophthora infestans* Populations [J]. *J Hered*, 1985, 76: 431 ~ 435.
- [19] Weir B S. 遗传学数据分析 [M]. 徐云碧, 等译. 北京: 中国农业出版社, 1996.
- [20] Burdon J J. The structure of pathogen populations in natural plant communities [J]. *Ann Rev Phytopathol*, 1993, 31: 305 ~ 323.
- [21] Correll J C, Cordon T R, McCain A H. Genetic diversity in California and Florida populations of the pitch canker fungus *Fusarium subglutinans* f. sp. pini [J]. *Phytopathol*, 1992, 82(4): 415 ~ 420.
- [22] Milgroom M G, Lipari S E. Population differentiation in the chestnut blight fungus, *Cryphonectria parasitica*, in eastern North America [J]. *Phytopathology*, 1995, 85(2): 155 ~ 160.
- [23] Milgroom M G, Wang K R, Zhou Y, et al. Intercontinental population structure of the chestnut blight fungus, *Cryphonectria parasitica* [J]. *Mycol*, 1996, 88(2): 179 ~ 190.
- [24] Gaetano-Anolles G et al. DNA amplification fingerprinting using very short arbitrary oligonucleotide primers [J]. *Biotechnology*, 1991, 9: 553 ~ 557.
- [25] Zietkiewicz E, Rafalski A, Labuda D. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)—anchored polymerase chain amplification [J]. *Genomics*, 1994, 20: 176 ~ 183.
- [26] Hantula J, Dusabenyagasani M, Hamelin R C. Random amplified microsatellites (RAMS)—a novel method for characterizing genetic variation within fungi [J]. *Eur J For Path*, 1996, 26: 159 ~ 166.
- [27] Charlesworth B, Sniegowski P, Stephan W. The evolution dynamics of repetitive DNA in eukaryotes [J]. *Nature*, 1994, 371: 215 ~ 220.
- [28] Hamelin R C, Ouellette G B, Bernier L. Identification of *Gremmeniella abietina* races with random amplified polymorphic DNA markers [J]. *Appl Environ Microbiol*, 1993, 59: 1752 ~ 1755.
- [29] Hoegger P J, Binz T, Heiniger U. Detection of genetic variation between *Ophiostoma ulmi* and the NAN and EAN races of *O. novo-ulmi* in Switzerland using RAPD markers [J]. *Eur J For Path*, 1996, 26: 57 ~ 68.
- [30] Brasier C M. *Ophiostoma novo-ulmi* sp. nov, causative agent of current Dutch elm disease pandemics [J]. *Mycopathologia*, 1991, 115: 151 ~ 161.
- [31] 秦国夫, 贺伟, 沈瑞祥. 中国蜜环菌生物种的 RAPD 分析 [J]. 真菌学报, 1996, 15(1): 26 ~ 33.
- [32] Huang Z Y, Smalley E B, Guries R P. Differentiation of *Mycosphaerella dearnessii* by cultural characters and RAPD analysis [J]. *Phytopathology*, 1955, 85: 522 ~ 527.
- [33] Goodwin P H, Annis S L. Rapid identification of genetic variation and pathotype of *Lophotia maculans* by random

amplified polymorphic DNA assay[J]. Appl Environ Microbiol, 1991, 57: 2482.

- [34] Schafer C, Wostemeyer J. Random primer dependent PCR differentiates aggressive from non-aggressive isolates of the oilseed rape pathogen *Phoma ligam* (*Leptosphaeria maculans*)[J]. J Phytopathol, 1992, 13: 124.
- [35] Manulis S, Kogan N, Reuven M, et al. Use of the RAPD technique for identification of *Fusarium oxysporum* f. sp. Dianthi[J]. Phytopathology, 1994, 84: 98 ~ 101.
- [36] Guthrie P A I, Magill C W, Frederiksen R A, et al. Random amplified polymorphic DNA markers: A system for identifying and differentiating isolates of *Colletotrichum graminiicola*[J]. Phytopathology, 1992, 82: 832 ~ 835.
- [37] Hamelin R C. Genetic diversity between and within cankers of the white pine blister rust[J]. Phytopathology, 1996, 86: 875 ~ 879.
- [38] Delye C, Laigret F, Corio-Coster M F. RAPD analysis provide insight into the biology and epidemiology of *Uncinula necator*[J]. Phytopathology, 1997, 87(7): 670~ 677.
- [39] Hansson P, Wang X R, Szmidt A E, et al. RAPD variation in *Gremmeniella abietina* attacking *Pinus sylvestris* and *Pinus contorta* in northern Sweden[J]. Eur J For Path, 1996, (26): 45 ~ 55.

A Study on the Population Differentiation of Tree-pathogenic Fungi

WU Xiao-qin

(Faculty of Forest Resources and Environment, Nanjing Forestry University, Nanjing 210037, Jiangsu, China)

Abstract: The factors affecting the genetic diversity of tree-pathogenic population were studied from the aspects of gene recombination, mutation, migration and gene flow. The main research methods and techniques of population differentiation were discussed from the viewpoints of artificial selection of phenotypic observation, virulence and drug resistance, the determination of vegetation affinity and analysis of isozyme, RFLP, RAPD, AFLP, RAMS. The application of RAPD was described in detail.

Key words: tree-pathogen; population differentiation; molecular marker