

青海省茄果类蔬菜灰霉病菌灰葡萄孢的遗传多样性

关致远, 马永强, 咸文荣*

青海大学农林科学院 青海省有害生物重点实验室, 青海 西宁 810016

摘要: 为明确青海省侵染茄果类蔬菜的灰葡萄孢菌 *Botrytis cinerea* 遗传多样性及群体遗传结构, 采用 ISSR 分子标记技术对分离得到的 213 株茄果类蔬菜灰葡萄孢菌进行了遗传多样性分析, 12 条引物共扩增出 243 个多态性位点。基于 ISSR 数据的聚类分析显示, 213 个菌株在 0.65 相似系数水平上可划分为 9 个类群。5 个地理种群间 Nei's 基因多样性指数 (H) 为 0.437 0, 多态位点百分率 (P) 达 100%, 有效等位基因数 (N_e) 为 1.807 3, Shannon 信息指数 (I) 为 0.625 6, 观测等位基因数为 2.000 0。遗传分化系数 (G_{st}) 为 0.203 6, 基因流 (N_m) 为 1.956 4。灰葡萄孢菌群体遗传变异主要来源于种群内部 (85%)。基于 0.89 相似系数, 5 个地理种群可划分为 2 个主要类群和 3 个亚群。从 PCoA 分析看出 5 个种群间存在部分交叉, 但整体呈现地理聚集趋势。3 个寄主划分的种群间, 存在种群间的遗传变异仅为 2%。较地理来源种群来看, 种群遗传距离近, 遗传相似度高。在 PCoA 分析中, 大部分种群单株形成了交叉紧密, 少部分菌株较离散。

关键词: 灰葡萄孢菌; 遗传多样性分析; ISSR 分析标记

[引用本文]

关致远, 马永强, 咸文荣, 2026. 青海省茄果类蔬菜灰霉病菌灰葡萄孢的遗传多样性. 菌物学报, 45(2): 250154

Guan ZY, Ma YQ, Xian WR, 2026. Genetic diversity of *Botrytis cinerea* on solanaceous vegetables in Qinghai Province, northwest China. Mycosystema, 45(2): 250154

资助项目: 青海省重点研发与转化计划(2024-NK-107)

This work was supported by the Qinghai Provincial Key Research and Development and Transformation Program (2024-NK-107).

*Corresponding author. E-mail: xianwr@sina.com

ORCID: GUAN Zhiyuan (0009-0001-4369-7181)

Received: 2025-05-22; Accepted: 2025-07-03

Genetic diversity of *Botrytis cinerea* on solanaceous vegetables in Qinghai Province, northwest China

GUAN Zhiyuan, MA Yongqiang, XIAN Wenrong*

Key Laboratory of Pests and Diseases of Qinghai Province, Academy of Agriculture and Forestry Sciences, Qinghai University, Xining 810016, Qinghai, China

Abstract: In order to clarify the genetic diversity and population genetic structure of *Botrytis cinerea* on solanaceous vegetables in Qinghai Province, 213 strains of *Botrytis cinerea* isolated from solanaceous vegetables were analyzed by ISSR molecular marker technology. A total of 243 polymorphic loci was amplified by 12 primers. Cluster analysis based on ISSR data showed that 213 strains could be divided into 9 groups at the level of 0.65 similarity coefficient. The Nei's gene diversity index (H) was 0.437 0, the percentage of polymorphic loci (P) was 100%, the effective number of alleles (N_e) was 1.807 3, the Shannon's information index (I) was 0.625 6, and the observed number of alleles was 2.000 0. The genetic differentiation coefficient (G_{st}) was 0.203 6, and the gene flow (Nm) was 1.956 4. The genetic variation of *B. cinerea* mainly occurred within the population (85%). Based on the similarity coefficient of 0.89, the five geographical populations could be divided into two main groups and three subgroups. The PCoA analysis reveals that although there is some degree of overlap among the populations, they generally exhibit a geographically clustery tendency. The genetic variation among the three host populations is only 2%. Compared with the geographical origin population, the population genetic distance is close and the genetic similarity is high. In the PCoA analysis, most of the individual strains formed a close cross, and a small number of strains were discrete.

Keywords: *Botrytis cinerea*; genetic diversity analysis; ISSR analysis markers

茄果类蔬菜(辣椒、番茄、茄子)在生长发育过程中,经常会受到各种病害的侵袭,导致产量和品质的下降。灰霉病是设施蔬菜常见且比较难防治的一种病害,花、果、叶、茎均可发病,造成严重减产(李娜 2015)。灰霉病是由灰葡萄孢属 *Botrytis* spp.引起的一种真菌性病害,可危害茄果类、葫芦科、蔷薇科等 470 多种植物(Staats *et al.* 2005)。研究表明,灰葡萄孢菌 *Botrytis cinerea* Pers.是茄果类蔬菜灰霉病的主要致病菌(张静 2010; García *et al.* 2015; 叶艳英等 2015)。灰葡萄孢菌喜低温高湿,病菌发育的最适温度为 20–23 °C,相对湿度持续在 90%以上利于发病。因此,遇连阴天、棚内低温高湿、光照弱、通风不良的条件下,病害易流行(Alison *et al.* 2016)。青海属高原大陆性气候,降水量少,日温差大,由于这些特点,青海省蔬果类蔬菜种植主要以设

施种植为主。而灰霉病发病适宜温度与绝大多数棚室蔬菜生长的适宜温度相近,并且大棚内湿度高,使该病发生更加普遍和严重,一旦开始发病,会突然暴发和蔓延(赵霞 2020)。以辣椒为例,一般损失率为 15%–20%,严重时达 30%–50%,最高可达 100%,常导致叶片大量腐烂,失去食用价值(郝永娟等 2011)。

在灰葡萄孢菌遗传多样性及种群结构研究中, RFLP (Giraud *et al.* 1997)、RAPD (van der Vlugt-Bergmans *et al.* 1993)和 SSR (Fournier *et al.* 2002)标记技术应用最为广泛,研究证实该病原菌存在显著的群体内遗传变异,表现出高度的遗传多态性(张艳杰等 2017)。冯宝珍和李培谦(2020)的研究表明来源于茄子上的灰葡萄孢菌具有明显的遗传多样性。并通过 RAPD 将 15 株病原菌分为 4 个类群。余文贵等(2011)用 SSR 分

子标记将番茄、草莓、莴苣上采集的 29 株灰葡萄孢菌分为 3 类,并且分类结果与采集地点高度一致。ISSR 的应用较少,冯晓菲等(2019)对四川省 10 个县的 195 株草莓上的灰葡萄孢菌进行遗传多样性分析,使用了 6 条 ISSR 引物扩增出 63 个多态性位点,研究结果表明灰葡萄孢菌具有丰富的遗传多样性。李廷刚等(2013)采用 ISSR 分子标记技术分析山东省番茄灰葡萄孢菌的遗传多样性,结果表明该地区菌株遗传多样性水平较低,但菌株遗传关系与其地理分布显著相关。本文利用 ISSR 技术进行遗传多样性分析,解析灰葡萄孢菌遗传多样性与其地理来源、种群和寄主的关联,揭示其传播与适应性规律,为精准分区用药、抗病育种和抗药性治理等灰霉病综合防治策略提供依据。

1 材料与方法

1.1 菌株来源

于 2023 年 5 月至 2024 年 8 月,在青海省主要设施茄果类蔬菜种植地进行样本采集工作,已在海西蒙古族藏族自治州(简称海西州)、海东市、西宁市、黄南藏族自治州(简称黄南州)和海南藏族自治州(简称海南州)共 5 个地区进行采样工作,对采集到的典型病样进行分离鉴定,得到 213 株灰葡萄孢菌菌株(表 1),其中从番茄分离得到 115 株(含有 HMF、QHF),辣椒分离得到 72 株(含有 HML、QHL),茄子分离得到 26 株(含有 HMQ、QHQ)。

1.2 DNA 提取

本研究采用 CTAB 法挑取病原菌菌丝,提取 *B. cinerea* 基因组 DNA。刮取事先培养好的病原菌菌丝置于 2.0 mL 离心管中,加入 2 mm 直径的无菌钢珠,加入 700 μ L 的 CTAB 提取液,用组织破碎仪 30 r/s 破碎 2 min, 10 000 r/min 离心 3 min,减少泡沫,加入 700 μ L 三氯甲烷,充分混匀,4 $^{\circ}$ C 放置 40 min,在高速离心机上 12 000 r/min, 4 $^{\circ}$ C 离心 10 min。吸取 500 μ L 上清液至 1.5 mL 离心管中,并加入 500 μ L 异丙醇,置于-20 $^{\circ}$ C 冰箱内 2 h 或过夜。在高速离心机上

4 $^{\circ}$ C、12 000 r/min 离心 10 min,取出并倒掉上清液后用 1 000 μ L 75%的无水乙醇洗涤,倒掉无水乙醇后开盖烘干内部未挥发的无水乙醇,加入 50 μ L 无菌无酶水,保存于-20 $^{\circ}$ C 冰箱内。用微量核酸测定仪初步测定提取的 DNA 质量,将其稀释到一定浓度,放入-20 $^{\circ}$ C 保存备用。

1.3 ISSR 引物及 PCR 扩增

随机抽取 8 个菌株进行 ISSR 引物筛选,选用王子迎等(2007)及黄燕(2012)报道的 10 条引物,以及 10 条由杨凌天润奥科生物科技有限公司设计的灰葡萄孢菌多态性引物,筛选出 12 个条带清晰、条带数较多的引物(表 2),用于后续试验,对条带清晰度较低的进行 8 梯度实验,确定各引物的最佳退火温度。

PCR 反应体系(10 μ L): DNA 模板 1 μ L,引物 1 μ L, 2 \times Taq PCR Master Mix 5 μ L,加 ddH₂O 补足至 10 μ L。PCR 反应程序: 95 $^{\circ}$ C 预变性 3 min; 94 $^{\circ}$ C 变性 40 s,退火 40 s(退火温度见表 2), 72 $^{\circ}$ C 延伸 60 s,共 35 个循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min, 4 $^{\circ}$ C 保存。PCR 扩增产物采用 8% 非变性聚丙烯酰胺凝胶进行电泳分离。电泳结束后,采用硝酸银染色方案对凝胶进行显色。

1.4 数据分析

利用最优反应体系和筛选的引物扩增供试茄果类蔬菜灰葡萄孢菌后,对扩增谱带进行统计分析,使图片信息转为数据信息,同一引物的扩增产物,每条清晰条带为 1 个基因位点,产物扩增片段的出现则赋值“1”,产物扩增片段不清晰或不出现则赋值“0”,建立起 0 和 1 矩阵,汇总并保存为 Excel 文件。应用 Popgene 32 软件计算和分析遗传多样性相关指数:群体间和群体内的 Shannon's 指数、Nei's 指数、等位基因数、有效等位(Nei 1972; Leyronas *et al.* 2015a);并根据不同地理来源,不同作物来源划分的各个群体,得到种群间 Nei's 遗传距离,利用 NTSYS pc 2.10e 软件中 clustering 中的 SAHN 软件建立个体间遗传关系聚类图和各群体间遗传关系聚类图。并利用 Genalex 基于各种群的遗传相似系数进行 PCoA 分析。

表 1 供试灰葡萄孢供试菌株

Table 1 Tested strains of *Botrytis cinerea*

采样地区	菌株编号	地点	经度	纬度	海拔
Sampling area	Strain	Location	Longitude	Latitude	Altitude/m
HXZ	HMF (1, 3A, 4, 6A, 6B, 7, 8, 10, 12, 13)	格尔木市	94.49	36.39	2 780.00
	HMF (29, 30, 31, 33)	Golmud City	95.03	36.38	2 824.20
	HMF (34-1, 34-2A, 34-2B)	德令哈市	97.18	37.31	2 822.02
HANZ	HMQ (7, 8, 9, 10, 11), HML34, HMF (25, 26, 27, 28A)	都兰县	98.10	36.31	2 950.00
	HMF (55, 56, 61A, 61B, 62)	Dulan County	101.39	35.95	2 308.50
HUNZ	HML (23-1, 23-2, 24-1, 24-2, 24-3, 54, 77)	贵德县	101.99	35.98	2 235.20
	HMF (53, 53-2, 53-3, 54, 54-2, 54-3)	Guide County	101.88	36.10	2 010.20
HDS	HML (25, 56), HMF (79, 80)	尖扎县	101.84	36.87	2 458.30
	HMQ6, HMF (20, 21, 23), HML32-1	互助县	102.22	36.47	2 050.30
XNS	HMF (81, 82, 83, 104, 105, 106)	Huzhu County	102.27	35.89	1 938.90
	HML (59B, 60, 62)	Ping'an District	102.06	36.45	2 217.20
	HML53	化隆县	102.40	36.52	2 245.00
	HML (5, 6-1, 6-4)	Hualong County	102.39	36.62	2 336.00
	HML8	Ledu District	102.31	36.47	2 003.60
	HML (43, 49, 50, 51), HMF (47, 48, 49, 51)		102.39	36.58	2 167.80
	HML52-5		102.50	36.45	1 893.10
	HML44-2, HMF52, HMF52-2		102.57	36.44	1 851.80
	HML (46, 47, 48)		102.28	35.55	1 898.80
	HML (27, 28, 29, 30-1)	循化县	102.28	35.86	1 924.00
	HML (64-1, 66, 67, 68, 69-2), HMF (87, 88, 89-1, 89-2, 91, 92, 93)	Xunhua County	102.29	35.88	1 894.90
	HML (70, 72, 73, 74, 75)		102.81	36.15	2 115.80
	HMQ (13, 14)	民和县	102.86	36.31	1 810.40
	HMF (71A, 71B, 72, 73, 74, 75, 76)	Minhe County	101.75	36.73	2 278.10
	HMF (63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70)	城北区	101.68	36.53	2 476.00
	QHQ (1, 2, 3, 6), QHL, QHF (1, 2, 3, 6, 8, 9, 11, 12)	Chengbei District	101.72	36.86	2 351.40
	HMF (44, 45, 46)	城中区	101.69	36.81	2 419.50
	HML (35, 36, 36-2, 36-3)	Chengzhong District	101.61	37.02	2 492.18
	HML37, HMF (35, 36A, 36B, 36-2, 36-2A, 36-3, 37A)	大通县	101.63	37.01	2 496.00
	HMQ (15, 16A, 16B, 18), HML16	Datong County	101.60	37.01	2 487.90
HMF (37B, 37-2, 37-3, 38, 38-2, 38-3)		101.60	37.03	2 516.68	
HML15, HMF (16, 16-2, 16-4, 17, 18)		101.22	36.71	2 632.90	
HMQ (4-1, 4-2, 5-2, 5-3, 5-4)		101.19	36.73	2 692.70	
HMQ (12, 19-1, 19-2, 21, 20)	湟源县	101.51	36.70	2 639.30	
HML42, HMF (40, 41-1, 41-2, 42, 42-2)	Huangyuan County	101.50	36.69	2 369.90	
HMF (94, 95, 96)		101.53	36.71	2 378.90	
HML84		101.50	36.74	2 424.00	
HML (81, 82)	湟中区	101.51	36.71	2 347.40	
HMF (97, 98, 99)		101.50	36.75	2 422.10	
HMF (84, 85, 86)	Huangzhong District	101.56	36.78	2 536.00	
HML (19, 19-2, 19-5, 20-1, 20-2)		101.56	36.77	2 514.60	
HML (21-1, 21-2, 22-1, 22-2, 22-3, 22-4)					
HML (39, 40, 40-2, 40-3, 40-4, 41)					
HML38, HMF39B					

注: HXZ, 海西蒙古族藏族自治州(海西州); HANZ, 海南藏族自治州(海南州); HUNZ, 黄南藏族自治州(黄南州); HDS, 海东市; XNS, 西宁市。下同

Note: HXZ, Haixi Mongol and Tibetan Autonomous Prefecture; HANZ, Hainan Tibetan Autonomous Prefecture; HUNZ, Huangnan Tibetan Autonomous Prefecture; HDS, Haidong City; XNS: Xining City. The same below.

表 2 用于扩增的 ISSR 引物序列及退火温度
Table 2 ISSR primer sequence and annealing temperature

引物 Primer	序列 Sequence (5'→3')	退火温度 Annealing temperature /°C
808	AGAGAGAGAGAGAGAGC	48.3
818	CACACACACACACACAG	52
809	AGAGAGAGAGAGAGAGG	48.3
889	AGTCGTAGTACACACACACACAC	60.3
ILE23	ACAGAGAGAGAGAGAGC	52
ILE11	AGAGAGAGAGAGAGAGT	50
ILE131	CACCACACACACACACA	52
ILE79	ACAACACACACACACAC	50
ISSR9	GAGGAGAGAGAGAGAGG	54
ILE120	CACGAGAGAGAGAGAGA	52
ILE67	GAGAGAGAGAGAGAGACC	56
ILE46	GAGAGAGAGAGAGAGACT	54

2 结果与分析

2.1 所有 213 株灰葡萄孢菌遗传多样性分析

本文采用 12 个 ISSR 引物,对病原菌共 213 个样本进行 PCR 扩增。12 条 ISSR 引物共扩增多态性条带 243 条。对 213 株灰葡萄孢菌进行聚类分析,在相似系数 0.65 的水平上,213 株菌被分为 9 个类群(图 1)。类群 8 包含的菌株数量最多,为 65 株菌株,其中西宁市 58 株,黄南州 7 株;类群 1 有 17 株菌,均来自海西州;类群 2 包含 22 株菌株,分别是来自海西州的 10 株,海东市的 12 株;类群 3 包含的 13 株菌株均来自海东市;类群 4 的 9 株菌均来自海东市乐都区;类群 5 包含 41 株菌株,其中西宁市 3 株,海东市 38 株;类群 6 的 24 株菌株均来自西宁市大通县;类群 7 的 7 株菌株也都来自西宁市大通县;类群 9 有 15 株菌,其中 10 株来自黄南州,5 株来自海南州。

2.2 灰葡萄孢菌地理种群间的遗传多样性分析

2.2.1 灰葡萄孢菌地理种群间群体遗传多样性水平

从地理水平将采集到的病原菌划分为 5 个种群,在群体水平上,Nei's 基因多样性指数(H)为 0.437 0, Shannon 信息指数(I)为 0.625 6,多态位点百分率(P)为 100%,有效等位基因数(N_e)为 1.807 3,观测等位基因数为 2.000 0,说明等位基因的分布在 5 个地理区间比较均匀(表 3)。病原菌的遗传多样性水平在不同地区之间具有一定差异,5 个地理种群结果显示多态性条带比

的均值为 84.03%。5 个种群多态位点百分率依次为:海东市>西宁市>海西州>黄南州>海南州。5 个地理种群的 Nei's 基因多样性指数为 0.197 1–0.412 3, Shannon 信息指数为 0.288 3–0.595 8, 5 个地理种群的其余遗传多样性指标变化与 Nei's 基因多样性指数变化基本一致。上述结果表明青海省茄果类蔬菜上的灰葡萄孢菌不同地理种群之间具有丰富的遗传多样性。

2.2.2 灰葡萄孢菌地理种群间群体遗传分化

通过 Popgene32 软件分析,从地理水平划分的 5 个种群的遗传分化系数(G_{st})为 0.203 6 ($G_{st}<0.5$, 种群间的遗传分化极明显),种群内遗传多样性(H_s)均值为 0.339 0,种群间遗传多样性(D_{st})均值为 0.086 6 ($D_{st}=H_t-H_s$) (表 4)。5 个不同地理来源的种群内差异比种群间差异明显。5 个地理种群间的基因流(N_m)为 1.956 4。

ISSR 的分子方差分析(AMOVA)揭示 5 个地理种群里,有 15%的遗传变异存在于群间,85%的遗传变异量存在于种群内(表 5),低于基因分化系数所体现的 20.36%。

2.2.3 灰葡萄孢菌的同源性分析

对青海省不同地理来源的茄果类蔬菜灰葡萄孢菌 5 个种群的遗传距离及遗传相似度求平均值,5 个种群的平均遗传距离为 0.161 5,平均遗传相似度为 0.852 7(表 6)。5 个种群的遗传距离范围是 0.076 6–0.292 0。其中海西州与海南州距离最大(0.292 0),其次是海南州与海东市(0.231 4);西宁市与海东市遗传距离最小(0.076 6),其次是海西州与海东市(0.091 7)。病原菌 5 个种群的遗传相似度范围为 0.746 8–0.926 2。其中海西州与海南州遗传相似度最低(0.746 8);海南州与海东市的结果表明,遗传距离越远遗传相似度越低。

2.2.4 灰葡萄孢菌地理种群间群落结构分析

利用 NTSYS-pc 软件,基于 5 个地理种群的 UPGMA 聚类分析可知这 5 个种群之间的亲缘关系(图 2)。5 个种群之间的亲缘关系并不高,在相似系数为 0.89 水平上,5 个地理种群被划分为 2 个亚群,海西州、海东市和西宁市的遗传距离相近,共同组成一个亚群,黄南州和海南州组成一个类群。

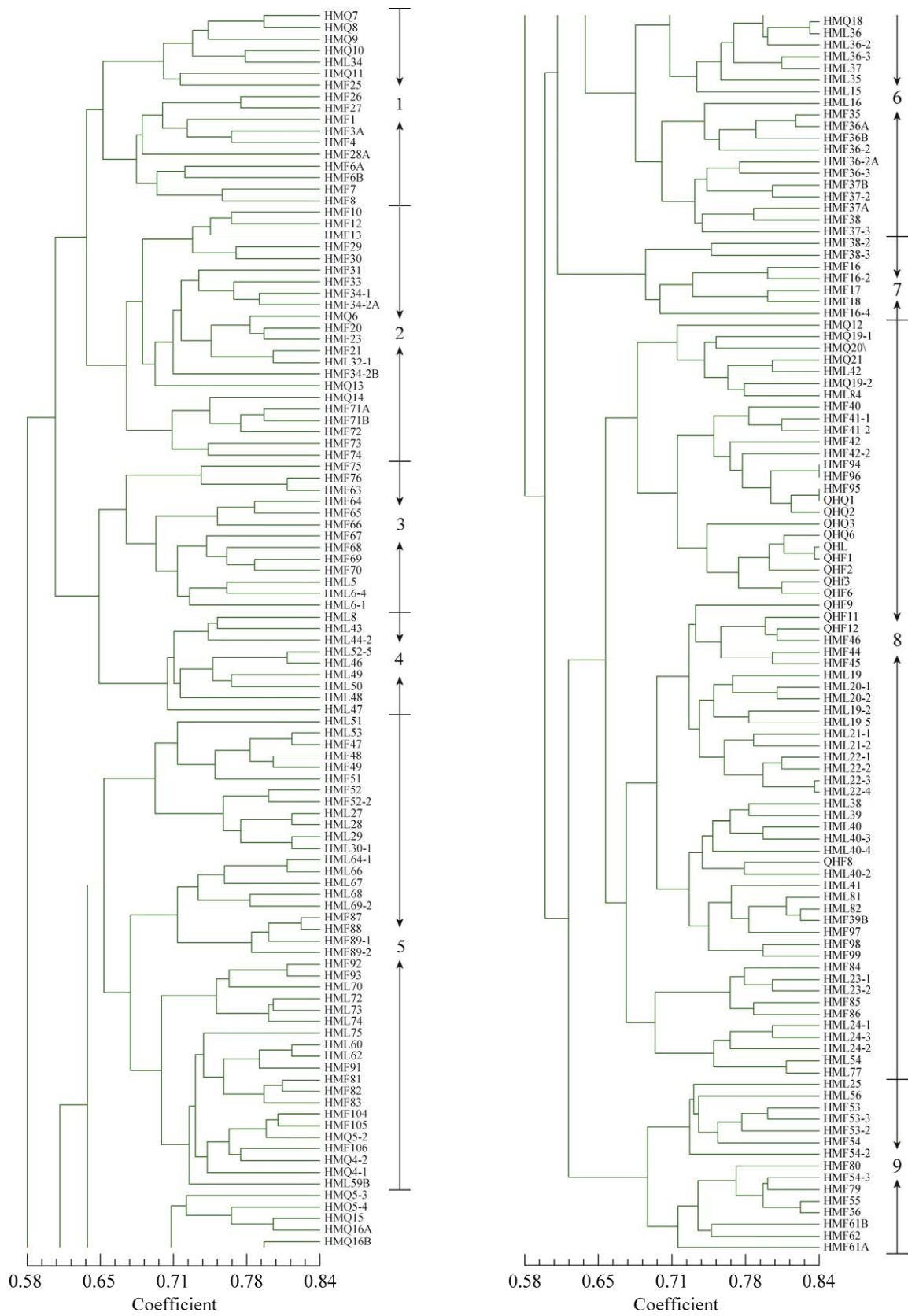


图 1 所有 213 株灰葡萄孢菌聚类图
 Fig. 1 Cluster diagram of 213 strains of *Botrytis cinerea*.

表 3 灰葡萄孢菌 5 个地理种群的 ISSR 遗传多样性分析

Table 3 ISSR genetic diversity analysis of five geographical populations of *Botrytis cinerea*

种群 Population	多态位点百分率 Percentage of polymorphic loci (P)/%	观测等位基因数 Number of observed alleles (Na)	有效等位基因数 Effective numbers of alleles (Ne)	Nei's 基因多样性指数 Nei's gene diversity index (H)	Shannon 信息指数 Shannon's information index (I)
HDS	99.18	1.991 8	1.749 8	0.412 3	0.595 8
HANZ	50.21	1.502 1	1.352 0	0.197 1	0.288 3
HXZ	90.53	1.905 3	1.643 5	0.361 8	0.527 9
HUNZ	81.48	1.814 8	1.562 5	0.318 5	0.466 5
XNS	98.77	1.987 7	1.730 4	0.405 1	0.587 4
Average	84.03	1.840 3	1.607 6	0.339 0	0.493 2
Population level	100.00	2.000 0	1.807 3	0.437 0	0.625 6

表 4 灰葡萄孢菌 5 个不同地理来源种群遗传多样性 Nei's 分析

Table 4 Nei's analysis of genetic diversity of five different geographical populations of *Botrytis cinerea*

总遗传变异 Total genetic variation (Ht)	种群内变异 Variation within population (Hs)	遗传分化系数 Genetic differentiation coefficient (Gst)	基因流 Gene flow (Nm)
0.425 6	0.339 0	0.203 6	1.956 4

表 5 灰葡萄孢菌 5 个不同地理来源种群间和种群内分子方差分析(AMOVA)

Table 5 Molecular variance analysis (AMOVA) among and within five different geographical sources of *Botrytis cinerea*

变异来源 Source of variation	自由度 Df	平方和 Sum of square	方差分量 Variance component	变异百分率 Percentage of variation/%	P 值 P value
种群间 Among populations	4	1 202.230	7.178	15	<0.001
种群内 Within populations	208	8 758.071	42.106	85	
总体 Total	212	9 960.300	49.284	100	

表 6 灰葡萄孢菌 5 个地理种群的遗传相似度和遗传距离

Table 6 Genetic similarity and genetic distance of five geographical populations of *Botrytis cinerea*

种群 Population	HDS	HANZ	HXZ	HUNZ	XNS
HDS	****	0.793 5	0.912 4	0.848 0	0.926 2
HANZ	0.231 4	****	0.746 8	0.879 3	0.819 3
HXZ	0.091 7	0.292 0	****	0.815 6	0.880 5
HUNZ	0.164 8	0.128 6	0.203 8	****	0.905 4
XNS	0.076 6	0.199 3	0.127 3	0.099 4	****

注: ****上方为遗传相似度, ****下方为遗传距离

Note: Genetic similarity is above ****, and genetic distance is below ****.

2.2.5 灰葡萄孢菌地理种群的主坐标分析

主坐标分析(principal coordinate analysis, PCoA)是一种基于距离矩阵的多元统计方法,用于可视化样本间的相似性或差异性,图中的小点代表个体。根据 ISSR 的试验数据对 5 个地理种群的 213 个个体进行 PCoA 分析(图 3),通过观察二维散点图发现,种群海西州与海东市的部分单株相互交叉着聚在一起,关系较为密切,海东市少部分与西宁市交叉,大部分黄南州和海南州交叉,海南州仅与西宁市和黄南州有交叉,发现

5 个种群间存在部分交叉,但整体呈现地理聚集趋势。这也与 UPGMA 聚类分析的结果相近,与 PCoA 分析相比,UPGMA 聚类分析亲缘关系来看,单株分析比种群间的紧密性更强。

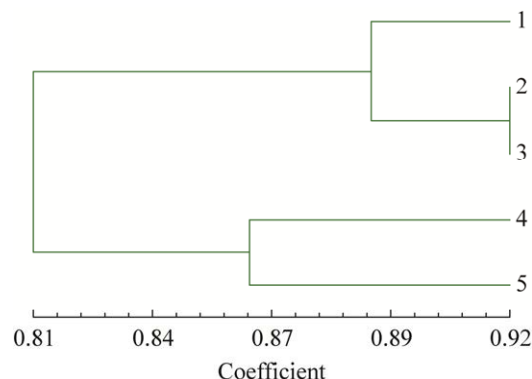


图 2 灰葡萄孢菌 5 个地理种群的种群聚类图 1: 海西州; 2: 海东市; 3: 西宁市; 4: 黄南州; 5: 海南州
Fig. 2 Species clusters of five geographical populations of *Botrytis cinerea*. 1: Haixi Mongol and Tibetan Autonomous Prefecture population; 2: Haidong City population; 3: Xining City population; 4: Huangnan Tibetan Autonomous Prefecture population; 5: Hainan Tibetan Autonomous Prefecture population.

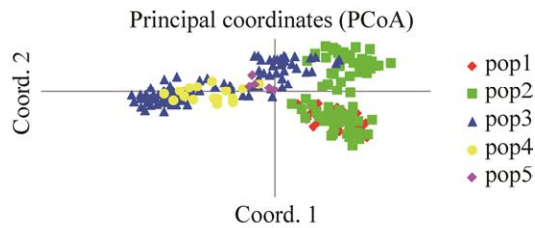


图 3 灰葡萄孢菌 5 个地理种群 213 个单株 PCoA 分析 pop1: 海西州; pop2: 海东市; pop3: 西宁市; pop4: 海南州; pop5: 海南州

Fig. 3 PCoA analysis of 213 individual plants of five geographical populations of *Botrytis cinerea*. pop1: Haixi Mongol and Tibetan Autonomous Prefecture population; pop2: Haidong City population; pop3: Xining City population; pop4: Huangnan Tibetan Autonomous Prefecture population; pop5: Hainan Tibetan Autonomous Prefecture population.

2.3 灰葡萄孢菌寄主种群间的遗传多样性分析

2.3.1 灰葡萄孢菌寄主种群间群体遗传多样性水平

从不同寄主植物上采得的病原菌被划分为 3 个种群, 群体水平上, 有效等位基因数(N_e)为 1.810 2, 观测等位基因数为 2.000 0, Nei's 基因多样性指数为 0.437 8, Shannon 信息指数为 0.626 5 (表 7)。病原菌的遗传多样性水平在不同寄主之间具有一定差异。结果显示多态位点百分率的均值为 99.31%。3 个种群多态性条带比率依次为: 番茄>辣椒>茄子。3 个种群的 Nei's 基

因多样性指数为 0.413 4–0.436 6, Shannon 信息指数为 0.596 8–0.624 8。

2.3.2 灰葡萄孢菌寄主种群间群体遗传分化

ISSR 的分子方差分析(AMOVA)揭示 3 个寄主植物划分的种群里, 有 2%的遗传变异存在于种群间, 98%的遗传变异量存在于种群内(表 8)。

2.3.3 灰葡萄孢菌的同源性分析

对青海省不同寄主分离得到的灰葡萄孢菌 3 个种群进行分析(表 9), 3 个种群的遗传距离及遗传相似度的平均值为 0.021 4 和 0.978 7。3 个种群的遗传距离范围为 0.014 0–0.030 6。茄子和辣椒遗传距离最大, 是 0.030 6, 番茄与茄子和番茄与辣椒的遗传距离次之, 分别是 0.019 8 和 0.014 0, 3 个种群的遗传相似度范围为 0.969 8–0.986 1。较地理种群来看, 从不同寄主植物划分的 3 个种群遗传距离很近, 遗传相似度很大。

2.3.4 灰葡萄孢菌寄主种群间群落结构分析

从不同寄主分离得到的病原菌划分的 3 个种群, 用 UPGMA 聚类分析显示了这 3 个种群之间的亲缘关系较地理种群相近(图 4), 这也与遗传距离和遗传相似度得到的结果相互印证。在相似系数为 0.98 水平上, 番茄和辣椒聚为一个类群, 茄子单独作为一个类群。

表 7 灰葡萄孢菌在 3 个寄主种群间的 ISSR 遗传多样性分析

Table 7 ISSR genetic diversity analysis of *Botrytis cinerea* in three host populations

种群 Population	多态位点百分率 Percentage of polymorphic loci (P)%	观测等位基因数 Number of observed alleles (N_a)	有效等位基因数 Effective numbers of alleles (N_e)	Nei's 基因多样性指数 Nei's gene diversity index (H)	Shannon 信息指数 Shannon's information index (I)
番茄 Tomato	100.00	2.000 0	1.807 2	0.436 6	0.624 8
辣椒 Capsicum	99.59	1.995 9	1.777 6	0.425 6	0.612 4
茄子 Eggplant	98.35	1.983 5	1.750 5	0.413 4	0.596 8
Average	99.31	1.993 1	1.778 4	0.425 2	0.611 3
Population level	100.00	2.000 0	1.810 2	0.437 8	0.626 5

表 8 灰葡萄孢菌 3 个不同寄主来源种群间和种群内分子方差分析(AMOVA)

Table 8 Molecular variance analysis (AMOVA) among and within three different hosts of *Botrytis cinerea*

变异来源 Source of variation	自由度 Df	平方和 Sum of square	方差分量 Variance component	变异百分率 Percentage of variation/%	P 值 P value
种群间 Among populations	2	224.203	1.065	2	<0.001
种群内 Within populations	210	9 736.098	46.362	98	
总体 Total	212	9 960.300	47.428	100	

表 9 不同寄主划分的 3 个种群的遗传相似度和遗传距离
Table 9 Genetic similarity and genetic distance of three populations divided by different hosts

群体	番茄	辣椒	茄子
Population	Tomato	Capsicum	Eggplant
番茄 Tomato	****	0.986 1	0.980 3
辣椒 Capsicum	0.014 0	****	0.969 8
茄子 Eggplant	0.019 8	0.030 6	****

注: ****上方为遗传相似度, ****下方为遗传距离
Note: Genetic similarity is above ****, and genetic distance is below ****.

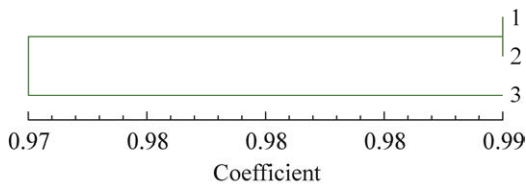


图 4 灰葡萄孢菌 3 个不同寄主植物种群的种群聚类图
1: 番茄种群; 2: 辣椒种群; 3: 茄子种群
Fig. 4 Species clusters of three different host plant populations of *Botrytis cinerea*. 1: Population on tomato; 2: Population on capsicum; 3: Population on eggplant.

2.3.5 灰葡萄孢菌寄主种群的 PCoA 主坐标分析

根据 ISSR 的试验数据将灰葡萄孢菌按照不同寄主划分为 3 个种群, 并且分别对各群体种群的 213 个个体进行 PCoA 分析(图 5), 通过二维散点图显示, 大部分种群单株交叉紧密, 少部分菌株较离散, 表明在这 3 个群体划分中, 各菌株显示出较高的相似性, 这一结果与 UPGMA 相似。

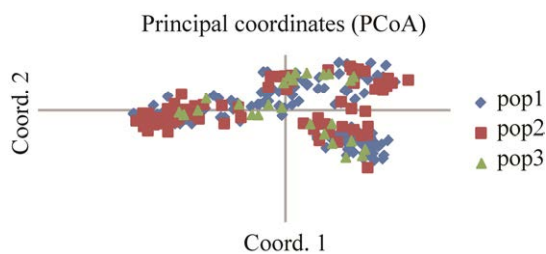


图 5 3 个寄主种群灰葡萄孢菌 213 个单株 PCoA 分析
pop1: 番茄种群; pop2: 辣椒种群; pop3: 茄子种群
Fig. 5 PCoA analysis of 213 individual strains of *Botrytis cinerea* on three host populations. pop1: Population on tomato; pop2: Population on capsicum; pop3: Population on eggplant.

3 讨论

本研究对青海省茄果类蔬菜主产区 213 株灰葡萄孢菌采用 ISSR 分子标记技术进行了遗传

多样性和种群结构分析, 采用 12 条 ISSR 引物扩增出 243 个多态性条带, ISSR 聚类分析将 213 株菌株在 0.65 相似系数水平上划分为 9 个类群, 不同菌株间存在一定的基因交流。地理来源的 5 个种群, Nei's 基因多样性指数(H)为 0.437 0, Shannon 信息指数为 0.625 6, 多态位点百分率(P)为 100%, 有效等位基因数(N_e)为 1.807 3, 观测等位基因数 2.000 0, 说明等位基因的分布在 5 个地理区间比较均匀。遗传分化系数(G_{st})为 0.203 6 ($G_{st} < 0.5$, 种群间的遗传分化极明显), 种群内遗传多样性(H_s)均值为 0.339 0, 种群间遗传多样性(D_{st})均值为 0.086 6。5 个不同地理来源种群的种群内差异比种群间差异明显。基因流(N_m)为 1.956 4, 根据 Wright (1931)所提出的, 当基因流水平(N_m) < 1.0 时, 遗传漂变主导种群分化; 当 N_m 处于 1.0–4.0 区间时, 基因流的均质化效应可有效抑制遗传漂变, 维持种群遗传结构稳定。从种群遗传分化来看, 灰葡萄孢菌种群间的遗传变异占 20.36%, 种群内占 79.64%。这与 Rajaguru & Shaw (2010)的研究结果相同; 黄燕(2012)利用 ISSR 技术对采自国内 8 个省市的蚕豆赤斑病的病原菌进行了群体遗传多样性分析, 结果表明不同地理区域灰葡萄孢菌种群间存在一定的遗传变异, 等位基因位点数和多样性指数的增大与各种群内病原菌数量的增加有关。ISSR 的分子方差分析(AMOVA)揭示 5 个地理种群里, 有 15% 的遗传变异存在于群间, 85% 的遗传变异量存在于种群内, 也验证了上面的结果。5 个种群的平均遗传距离为 0.161 5, 平均遗传相似性为 0.852 7, 地理种群间的遗传距离较远, 遗传相似性较低。通过 UPGMA 聚类分析, 在相似系数为 0.89 水平上, 5 个地理种群被划分为 2 个类群 3 个亚群。对 5 个地理种群的 213 个个体进行 PCoA 分析, 发现 5 个种群间存在部分交叉, 但整体呈现地理聚集趋势。不同寄主来源的 3 个种群, 有效等位基因数为 1.810 2, Nei's 基因多样性指数为 0.437 8, Shannon 信息指数为 0.626 5, 仅 2% 的遗传变异存在于种群间。较地理来源种群来看, 种群遗传距离很近, 遗传相似性很大, 并且亲缘关系相近。在 PCoA 分析中, 大部分种群单株交

叉紧密,少部分菌株较离散,表明在这3种群体划分中,各菌株显示出较高的相似度,这一结果与UPGMA相似。本研究在青藏高原独特的高寒干旱气候与广阔地理隔离条件下,系统性解析青海灰葡萄孢菌的遗传分化模式,填补了高海拔地区灰葡萄孢研究的空白。

Calpas (2004)基于RAPD分子标记技术对加拿大灰葡萄孢菌株进行群体遗传分析,揭示了病原菌遗传多样性与地理来源具有相关性。范咏梅等(2010)通过RAPD对中国新疆地区12株不同寄主来源的灰葡萄孢菌株进行遗传分析,结果显示在0.7相似系数下,菌株聚类形成5个主要遗传谱系,其聚类特征与地理分布呈现一定关联性,这与本实验的研究结果相同。值得注意的是,有研究表明灰葡萄孢菌遗传多样性与寄主植物存在一定的相关性(Muñoz & Campos 2013)。也有研究表明(Thompson & Latorre 1999)遗传多样性与地理来源、寄主来源之间并无显著的相关性,Wessels (2012)基于SSR标记对南非梨园菌株的群体遗传分析结果进一步支持该结论:尽管检测到高遗传多样性水平($H=0.83$),但群体间遗传分化指数仅为0.03 ($F_{st}=0.03$),表明地理隔离效应对遗传结构的塑造作用有限。本实验结果表明遗传多样性与地理位置呈现一定关联性,范咏梅等(2010)分析可能的原因是菌株采集区域的限制,包括气候生态条件和地理位置,青海省海西州、海东市、黄南州、西宁市和海南州的地理位置相隔较远,且海拔差距较大。并且气候差异较大,海西州以高原干旱大陆性气候为主,降水极少、干燥多风,冬季严寒且沙尘频发;西宁市和海东市气候相对温和湿润(属高原大陆性气候),降水方面整体呈现“西早东润”格局。Leyronas *et al.* (2015b)对616个菌株进行分析后发现,根据遗传特征的相似程度,这些菌株可以分成8个集群。结果表明,温度和湿度等气候条件的变化会明显影响菌群的遗传结构,这一发现说明气候因素在灰葡萄孢菌的传播和变异过程中可能起到重要作用。灰葡萄孢菌具有高度遗传多样性特征,其群体内的遗传多样性显著高于群体间差异,且多样性分布与寄主植物种类、地理分布及

气候环境等因素存在关联,但具体作用机制仍有待进一步解析。

作者贡献

马致远: 论文构思及撰写、实验、软件分析;
马永强: 论文指导与编辑写作; 咸文荣: 实验设计, 论文构思, 审核及指导。

利益冲突声明

该研究不存在任何潜在利益冲突的商业或财务关系。

[REFERENCES]

- Alison W, Allen L, Steve A, Roy K, 2016. Interface of the environment and occurrence of *Botrytis cinerea* in pre-symptomatic tomato crops. *Crop Protection*, 90: 27-33
- Calpas JT, 2004. Development of a biological control for *Botrytis stem canker* of greenhouse tomatoes caused by *Botrytis cinerea* Pers. PhD Dissertation, University of Alberta, Alberta. 1-179
- Fan YM, Chen LF, Hao JZ, Jing ZM, 2010. Polymorphism analysis of *Botrytis cinerea* and its pathogenicity differentiation in Xinjiang. *Chinese Journal of Eco-Agriculture*, 18(3): 548-555 (in Chinese)
- Feng BZ, Li PQ, 2020. Genetic diversity of gray mold pathogens on eggplants. *Journal of Shanxi Agricultural University (Natural Science Edition)*, 40(2): 60-65 (in Chinese)
- Feng XF, Gong CW, Wang XG, 2019. Genetic diversity of *Botrytis cinerea* in major strawberry-growing regions of Sichuan Province. *Mycosystema*, 38(7): 1033-1045 (in Chinese)
- Fournier E, Giraud T, Loiesau A, Vautrin D, Estoup A, Solignac M, Cornuet JM, Brygoo Y, 2002. Characterization of nine polymorphic micrisatellite loci in the fungus *Botrytis cinerea* (Ascomycota). *Molecular Ecology Notes*, 2: 253-255
- García T, Gutiérrez J, Veloso J, Gago-Fuentes R, Díaz J, 2015. Wounding induces local resistance but systemic susceptibility to *Botrytis cinerea* in pepper plants. *Plant Physiology*, 176: 202-209
- Giraud T, Fortini D, Levis C, Leroux P, Brygoo Y, 1997. RFLP markers show genetic recombination in *Botryotinia fuckeliana* (*Botrytis cinerea*) and transposable elements reveal two sympatric species. *Molecular Biology and Evolution*, 14(11): 1177-1185
- Hao YJ, Wang WL, Liu CY, Wang Y, Huo JF, 2011. Diagnosis and control of main diseases of sweet (chili)

- pepper in protected field. *Northern Horticulture*, 2011(20): 150-152 (in Chinese)
- Huang Y, 2012. Identification of pathogens causing chocolate spot on broad bean (*Vicia faba*) and resistance resource screening. MS Thesis, Hebei Normal University of Science and Technology, Qinhuangdao. 1-59 (in Chinese)
- Leyronas C, Bryone F, Duffaud M, Troulet C, Nicot PC, 2015a. Assessing host specialization of *Botrytis cinerea* on lettuce and tomato by genotypic and phenotypic characterization. *Plant Pathology*, 64(1): 119-127
- Leyronas C, Halkett F, Nicot PC, 2015b. Relationship between the genetic characteristics of *Botrytis* sp. airborne inoculum and meteorological parameters, seasons and the origin of air masses. *Aerobiologia*, 31(3): 1-14
- Li N, 2015. Studies on diversity of *Botrytis cinerea* isolated from tomato and strawberry. MS Thesis, Huazhong Agricultural University, Wuhan. 1-68 (in Chinese)
- Li YG, Zhang L, Zhou SY, Li M, Li BD, 2013. The study on species and genetic diversity of *Botrytis cinerea* populations in Shandong Province. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 29(10): 137-143 (in Chinese)
- Muñoz G, Campos F, 2013. Genetic characterization of *Botrytis cinerea*, isolates collected from pine and eucalyptus nurseries in Bio-Bio Region, Chile. *Forest Pathology*, 43(6): 509-512
- Nei M, 1972. Genetic distance between populations. *The American Naturalist*, 106(949): 283-292
- Rajaguru BAP, Shaw MW, 2010. Genetic differentiation between hosts and locations in populations of latent *Botrytis cinerea* in southern England. *Plant Pathology*, 59(6): 1081-1090
- Staats M, van Baarlen P, van Kan JAL, 2005. Molecular phylogeny of the plant pathogenic genus *Botrytis* and the evolution of host specificity. *Molecular Biology and Evolution*, 22: 333-346
- Thompson JR, Latorre BA, 1999. Characterization of *Botrytis cinerea* from table grapes in Chile using RAPD-PCR. *Plant Disease*, 83: 1090-1094
- van der Vlugt-Bergmans CJB, Brandwagt BF, Van't Klooster JW, Wagemakers CAM, van Kan JAL, 1993. Genetic variation and segregation of DNA polymorphisms in *Botrytis cinerea*. *Mycological Research*, 97: 1193-1200
- Wang ZY, Wang YC, Zhang ZG, 2007. Genetic relationships among Chinese and American isolates of *Phytophthora sojae* by ISSR markers. *Biodiversity Science*, 15(3): 215-223 (in Chinese)
- Wessels AB, 2012. Genetic characterization and fungicide resistance profiles of *Botrytis cinerea* in rooibos nurseries and pear orchards in the western cape of South Africa. MS Thesis, Stellenbosch University, Stellenbosch. 1-94
- Wright S, 1931. Evolution in Mendelian populations. *Genetics*, 16: 97-159
- Ye YY, Xiong CH, Yuan JX, Wen XY, He TF, Xiao LZ, 2015. Research progress on pepper gray mold disease. *Modern Horticulture*, 2015(17): 26-28 (in Chinese)
- Yu WG, Dong YL, Zhao LP, Chen HG, Yang ML, Zhao TM, 2011. Genetic diversity analysis of SSR in *Botrytis cinerea*. *Jiangsu Agricultural Sciences*, 39(4): 18-20 (in Chinese)
- Zhang J, 2010. Studies on taxonomy of *Botrytis* species in Hubei Province and diversity of *B. cinerea*. PhD Dissertation, Huazhong Agricultural University, Wuhan. 1-117 (in Chinese)
- Zhang YJ, Shen FY, Xu HP, Li YN, Liu DQ, 2017. Research advances in the diversity of *Botrytis cinerea*. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 25(6): 954-968 (in Chinese)
- Zhao X, 2020. Causes and countermeasures of difficult prevention and control of vegetable gray mold. *Agriculture of Henan*, 2020(7): 43-46 (in Chinese)
- ### [附中文参考文献]
- 范咏梅, 陈林凤, 郝敬喆, 竞中梅, 2010. 新疆灰霉病菌多态性及其致病力分化分析. *中国生态农业学报*, 18(3): 548-555
- 冯宝珍, 李培谦, 2020. 茄子灰霉病原菌遗传多样性分析. *山西农业大学学报(自然科学版)*, 40(2): 60-65
- 冯晓菲, 贡常委, 王学贵, 2019. 四川省草莓主产区灰葡萄孢菌的遗传多样性. *菌物学报*, 38(7): 1033-1045
- 郝永娟, 王万立, 刘春艳, 王勇, 霍建飞, 2011. 保护地甜(辣)椒主要病害的诊断与防治. *北方园艺*, 2011(20): 150-152
- 黄燕, 2012. 蚕豆赤斑病病原菌的鉴定及抗性资源筛选. 河北科技师范学院硕士论文, 秦皇岛. 1-59
- 李娜, 2015. 湖北省保护地番茄/草莓灰霉病菌多样性研究. 华中农业大学硕士论文, 武汉. 1-68
- 李廷刚, 张路, 周善跃, 李敏, 李宝笃, 2013. 山东省番茄灰霉病菌种类与遗传多样性研究. *中国农学通报*, 29(10): 137-143
- 王子迎, 王源超, 张正光, 2007. 中国和美国大豆疫霉群体遗传结构的ISSR分析. *生物多样性*, 15(3): 215-223
- 叶艳英, 熊春晖, 袁经相, 温先阳, 何庭发, 肖林长, 2015. 辣椒灰霉病的研究进展. *现代园艺*, 2015(17): 26-28
- 余文贵, 董友磊, 赵丽萍, 陈怀谷, 杨玛丽, 赵统敏, 2011. 灰霉病菌 SSR 遗传多样性分析. *江苏农业科学*, 39(4): 18-20
- 张静, 2010. 湖北省灰霉病菌区系和灰葡萄孢菌多样性研究. 华中农业大学博士论文, 武汉. 1-117
- 张艳杰, 沈凤英, 许换平, 李亚宁, 刘大群, 2017. 灰葡萄孢菌多样性研究进展. *农业生物技术学报*, 25(6): 954-968
- 赵霞, 2020. 蔬菜灰霉病防治难的原因及防治对策. *河南农业*, 2020(7): 43-46