

# 利用 UP-PCR、ISSR 标记分析玉米弯孢叶斑病菌遗传多样性

王晓东,高增贵,姚 远,刘 限,苏 家,李婉莹

(沈阳农业大学 植物免疫研究所,辽宁 沈阳 110866)

**摘要:**为明确辽宁省和安徽省玉米弯孢叶斑病菌的生理分化和遗传多样性及其近缘关系。利用 UP-PCR、ISSR 分子标记方法,对采集于辽宁省和安徽省 30 株玉米弯孢叶斑病菌进行了遗传多样性分析。从供试引物中筛选获得具有多态性好且稳定的 UP-PCR 引物 4 个、ISSR 引物 12 个,分别扩增出 27 条谱带和 76 条谱带,多态性条带比率分别为 77.78% 和 89.47%。聚类分析结果表明,UP-PCR 阈值在 0.662 处菌株被分为 7 个类群,ISSR 阈值在 0.681 处菌株被分为 8 个类群,玉米弯孢叶斑病菌存在丰富的遗传变异,与地理来源无明显相关性。从稳定性、可操作性和多态性水平来看,ISSR 技术更适用于分析玉米弯孢叶斑病菌的遗传多样性。

**关键词:**玉米;弯孢叶斑病菌;UP-PCR;ISSR;遗传多样性

**中图分类号:**Q78;S432.4 **文献标识码:**A **文章编号:**1000-7091(2014)03-0227-07

## Genetic Diversity of *Curvularia lunata* by UP-PCR and ISSR Analysis

WANG Xiao-dong, GAO Zeng-gui, YAO Yuan, LIU Xian, SU Jia, LI Wan-ying

(Institute of Plant Immunology, Shenyang Agricultural University, Shenyang 110866, China)

**Abstract:** In order to understand the physiological differentiation, the genetic diversity and the relationship of *Curvularia lunata* in Liaoning Province and Anhui Province. Genetic diversity of 30 isolates of *Curvularia lunata* from the major corn producing areas of Liaoning Province and Anhui Province in China was analyzed by UP-PCR (Universally primed PCR) and ISSR (Internal simple sequence repeat). The results showed that 4 primers of UP-PCR, 12 primers of ISSR Genetic 27 and 76 polymorphic bands, accounted for 77.78% and 89.47% of total bands respectively. These molecular markers revealed the genetic diversity of the strains tested, and there was no significant correlation between variation and region. The correlation between UP-PCR and ISSR, the dendrogram based on UP-PCR results revealed that the 30 isolates were clustered into 7 groups at the threshold of genetic similar coefficient of 0.662, while ISSR were clustered into 8 groups at the threshold of genetic similar coefficient of 0.681. The ISSR technique was suitable for the genetic diversity analysis of *C. lunata* in view of the level of stability, operability and polymorphism.

**Key words:** Maize; *Curvularia lunata*; UP-PCR; ISSR; Genetic diversity

玉米弯孢叶斑病又称黄斑病,属于半知菌亚门弯孢霉属真菌,优势致病菌是新月弯孢菌(*Curvularia lunata*(Wakker) Boed)。玉米弯孢叶斑病菌除为害玉米外,还可侵染水稻、高粱籽粒和叶片,导致黑霉粒和变色米,引起水稻叶鞘腐败病<sup>[1]</sup>,此外还可以寄生番茄和辣椒等的果实。近年来,国内外对玉米弯孢叶斑病菌的遗传多样性已进行了初步研

究<sup>[2-3]</sup>。分析植物病原菌的遗传多样性越来越多地应用分子标记技术,利用 UP-PCR (Universally primed, PCR) 即通用引物 PCR 技术进行生防木霉菌生物多样性的鉴定和种类的鉴定<sup>[4]</sup>,以及立枯丝核菌<sup>[5]</sup>和镰孢菌<sup>[6]</sup>等植物病原真菌遗传多样性的研究。谷守芹等<sup>[7]</sup>利用 ISSR (Internal simple sequence repeat) 分子标记技术介导分析玉米丝黑穗病菌的遗

收稿日期:2014-03-12

基金项目:国家“十二五”技术支撑项目(2012BAD19B04;2013BAD07B03)

作者简介:王晓东(1986-),女,吉林四平人,在读硕士,主要从事玉米病害研究。

通讯作者:高增贵(1966-),男,内蒙古准格尔人,研究员,博士,主要从事玉米病害和蔬菜病害生物防治等研究。

传多样性;Zietkiewicz 等<sup>[8]</sup>利用 ISSR 分子标记技术分析小麦白粉病菌的遗传多样性。鄢洪海等<sup>[9-10]</sup>,隋鹤等<sup>[11]</sup>研究表明,玉米弯孢叶斑病菌存在明显的致病性分化和遗传多态性<sup>[9-11]</sup>,为了更好地分析玉米弯孢叶斑病菌的遗传多样性与致病性的强弱以及地域之间的相互关系,在病原菌生理分化传统鉴别寄主鉴定的基础上,本研究采用 UP-PCR 和 ISSR 这 2 种分子标记技术对玉米弯孢叶斑病菌的遗传多样性进行了系统分析,从分子水平探索玉米弯孢叶斑病菌种群演变和地域间差异。

## 1 材料和方法

### 1.1 供试材料和鉴别寄主

玉米弯孢叶斑病标样分别采自辽宁省沈阳、铁岭、大连、丹东等地市县(菌株编号:LN-)和安徽省蒙城、宿州、灵璧等地市(菌株编号:AH-)的玉米生产田。经过分离和单孢纯化培养,从中选出有代表性菌株 30 株。采用传统鉴定和分子生物学技术分别进行病原菌致病性分化鉴定和遗传多样性分析。玉米弯孢叶斑病原菌生理分化鉴别寄主为沈 135、Mo17、B73、鲁原 92、78599-1、E28、掖 478、黄早四等 8 个自交系(表 1)。

### 1.2 主要试剂与仪器

2 × PCR mix,天根生化科技有限公司;Marker D2000,大连 TaKaRa 公司;琼脂糖,Sigma 进口;快捷型 DNA 提取试剂盒,天根生化科技有限公司;Gold View 双核酸染料,沈阳鼎国生物技术有限公司;其他试剂均为国产分析纯。PCR Express Thermal Cycler HBPX 220,英国 Thermo Hybaid Limited 生产;DYY-III 稳压稳流电泳仪,北京市六一仪器厂;凝胶成像分析系统,美国科达公司。

### 1.3 病原菌致病性分化鉴定

采用叶克苁等<sup>[12]</sup>和王宏等<sup>[13]</sup>的喷雾法,略有改进。试验于沈阳农业大学植物免疫研究所温室内进行。将 8 个鉴别寄主玉米自交系种子催芽,播种于育苗钵,每钵 3 株,每个鉴别寄主 3 次重复。待玉米植株 7~8 叶期,选取苗长势、株高基本一致的玉米苗进行喷雾接种。玉米弯孢叶斑病菌孢悬液浓度为  $1 \times 10^5 \sim 1 \times 10^6$  个/mL,加入 0.1% 吐温-20,用喷雾器将菌悬液均匀接种于鉴别寄主上,25 °C 下保湿培养 24 h。发病后记录鉴别寄主的抗感水平。调查标准,1 级:叶片上无病斑或仅有零星病斑,病斑占叶面积少于或等于 5%;3 级:叶片上有少量病斑,占叶面积 6%~10%;5 级:叶片上病斑比较多,占叶面积 11%~30%;7 级:叶片有病斑相连,占叶面积

31%~70%;9 级:整个叶片基本为病斑覆盖,叶片枯死。1 级和 3 级记为“R”,5 级记为“M”,7 级和 9 级记为“S”。

表 1 供试玉米弯孢叶斑病菌

Tab.1 The *Curvularia lunata* of corn

菌株编号 Number	玉米品种 Strains	采集地点 Collection sites
LN-XM-1	宁玉 339	辽宁省沈阳新民市
LN-TL-2	先玉 508	辽宁省铁岭市
LN-XM-3	世宗 338	辽宁省沈阳新民市
LN-TL-4	铁研 39	辽宁省铁岭市
LN-TL-5	铁研 38	辽宁省铁岭市
LN-DL-6	大连 55	辽宁省大连市
LN-DL-7	大连 2	辽宁省大连市
LN-FC-8	凤城-2	辽宁省丹东市凤城
LN-DL-9	大连 25	辽宁省大连市
AH-LB-10	天禾 3 号	安徽省灵璧市
LN-DL-11	大连 42	辽宁省大连市
LN-DL-12	大连 30	辽宁省大连市
AH-LB-13	天禾 5 号	安徽省灵璧市(娄庄王庄村)
AH-MC-14	皖玉 9 号	安徽省蒙城(南坪镇钱小村)
AH-MC-15	豫玉 32	安徽省蒙城(李大寨村)
AH-SZ-16	皖玉 10 号	安徽省宿州农科所试验地
LN-SY-17	沈玉 21	辽宁省沈阳市
LN-WFD-18	高优 8 号	辽宁省瓦房店市
LN-WFD-19	中科 1 号	辽宁省瓦房店市
LN-TL-20	铁研 30	辽宁省铁岭市
LN-DD-21	丹玉 206	辽宁省丹东市
LN-SY-22	沈农 135	辽宁省沈阳市
LN-DL-23	大连 75	辽宁省大连市
LN-DL-24	大连 38	辽宁省大连市
AH-JX-25	豫玉 34	安徽省兼县(白土镇费村)
AH-JX-26	金农 118	安徽省兼县(官桥镇)
LN-SY-27	辽单 565	辽宁省沈阳市
LN-TL-28	铁研 270	辽宁省铁岭市
LN-DD-29	丹玉 69	辽宁省丹东市
XLN-WFD-30	明玉 35	辽宁省瓦房店市

### 1.4 DNA 提取与 PCR 扩增

用打孔器打 4 个供试菌株的菌饼于 PD 液体培养基中,28 °C 振荡培养 7 d,经灭菌的 4 层纱布过滤,用无菌水冲洗菌丝 3 次,收集菌丝后冷冻干燥 48 h,加液氮研磨成干粉。基因组 DNA 提取采用快捷型 DNA 提取试剂盒,总 DNA 提取电泳图如图 1。

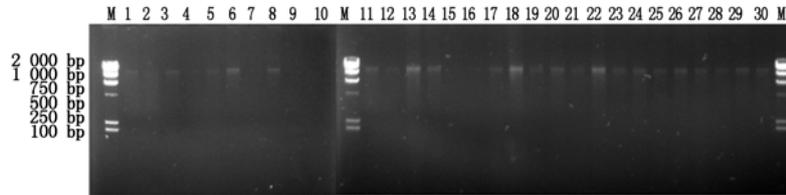
### 1.5 UP-PCR 标记分析

参考张小飞等和赵柏霞等<sup>[14-15]</sup>的方法,所用引物分别为 L15/AS19、AS4、L45、0.3-2、HE45、0.3-1(N21)、AS15inv、3-1、3-2、AA2M2、AS15、L15、L21 等,由上海生工生物工程技术有限公司合成。UP-PCR 反应体系为 20 μL,其中 2 × PCR mix 10 μL、10 μmol/L 引物 1 μL、25 ng DNA 模板 1 μL、ddH<sub>2</sub>O 8 μL。

PCR 反应程序:94 °C 2 min,55 °C 40 s,72 °C

30 s;92 °C 20 s,50 ~55 °C 40 s,72 °C 30 s,29 个循环;72 °C 延伸 2 min,4 °C 保存。扩增反应在 PCR Express Thermal Cycler HBPX 220 上进行。扩增后

产物在 1.2% 琼脂糖凝胶电泳中电泳 30 min,在紫外分析仪上检测扩增产物并照相。



M. Marker D2000;1 ~30. 1 ~30 个菌株。图 2 ~3 同。

M. Marker D2000;1 - 30. Isolated listed as in Tab. 1. The Same as Fig. 2 - 3.

图 1 样品 DNA 分子量的检测结果

Fig. 1 Molecular weight of DNA of the isolates

### 1.6 ISSR 标记分析

综合钱韦等<sup>[16]</sup>、贾少峰等<sup>[17]</sup>和段会军等<sup>[18]</sup>的 ISSR 分析方法,所用引物是从加拿大哥伦比亚大学的 100 条 ISSR 引物中筛选而出,并由上海生工生物工程技术有限公司合成。筛选后的引物为 12 条。ISSR 反应总体系为 20 μL,包括 2 × PCR mix 10 μL,10 μmol/L 引物 1 μL,25 ng DNA 模板 1 μL, ddH<sub>2</sub>O 8 μL。

PCR 反应程序:94 °C 5 min;94 °C 30 s,50 ~55 °C 45 s,72 °C 2 min,37 个循环;72 °C 10 min,4 °C 保存。扩增反应在 PCR Express Thermal Cycler HBPX 220 上进行。扩增产物在 1.5% 琼脂糖凝胶电泳中电泳 30 min,在紫外分析仪上检测扩增产物并照相。

### 1.7 统计分析

根据 Nei-Li 相似系数法<sup>[19]</sup>求得菌株 i 和 j 之间的相似系数 GS<sub>ij</sub>。利用 NTSYS2.1 分析软件计算菌株间的 Dice 相似系数,利用 UPGMA 法进行聚类分析,构建聚类树状图,并计算 UP-PCR、ISSR 标记划分的类群与鉴别寄主划分的类群之间的吻合率。吻合率(%) = (共同菌株数/组内总菌株数) × 100。使用 NTSYS 软件中的 MxComp 程序对 UP-PCR、ISSR 标记的相似系数矩阵进行 Mantel 检验和相关性分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 玉米弯孢叶斑病菌致病性分析

从辽宁省和安徽省不同玉米生产田采集的 85 份病害标样中共分离获得玉米弯孢叶斑病菌 104 株,经过单孢纯化培养,从中选出有代表性菌株 30 株进行了致病性测定,见表 2。结果表明,接种 8 d 后,除菌株 AH-MC-14 外,鉴别寄主沈农 135 对所有菌株均表现为抗性;鉴别寄主 Mo17 对菌株 LN-XM-1、LN-TL-5、LN-DL-11、AH-LB-13、AH-MC-15、LN-SY-17、LN-DL-24、LN-SY-27、LN-TL-28、LN-DD-29 表

现为感病,对其余菌株均表现为抗性;鉴别寄主 B73 除对菌株 LN-DL-23 表现抗性外,对其余菌株均表现为感病;鉴别寄主鲁原 92 对菌株 LN-FC-8、LN-DL-9、LN-DL-12、AH-MC-14、LN-TL-20、LN-DL-23 表现为抗性,对其余菌株表现为感病(表 2);鉴别寄主 78599-1 对菌株 LN-DL-6、LN-FC-8、LN-DL-9、AN-LB-10、AH-LB-13、LN-WFD-19、LN-SY-22、LN-DL-23 表现为抗性,对其他菌株均表现为感病;鉴别寄主 E28 和掖 478 除对菌株 LN-DL-12 表现为抗性外,对其他菌株均表现为感病;鉴别寄主黄早四除对菌株 LN-DL-9 和 LN-DL-12 表现为抗性,对其余菌株均表现为感病。本实验室前人研究了辽宁省瓦房店市和辽宁省丹东市玉米弯孢叶斑病菌致病性,研究表明,玉米弯孢叶斑病菌存在明显的生理分化现象和遗传多样性。本试验在前人基础上研究了辽宁省大连市、铁岭市、沈阳新民市、沈阳市以及安徽省灵璧市、宿州市和蒙城市玉米弯孢叶斑病菌的致病性和遗传多样性。结果表明,辽宁省菌株 LN-XM-1、LN-XM-3、LN-DL-11 和 LN-DL-24 和安徽省菌株 AH-JX-26、LN-SY-27 均为强致病菌株,分别来源于辽宁省沈阳新民市、辽宁省大连市和安徽省宿州市,说明菌株的致病性存在地域性差异,且菌株遗传多样性非常丰富,说明玉米弯孢叶斑病菌致病性强弱与菌株地理来源无关。

### 2.2 扩增结果分析

用条带清晰、多态性高的 4 个通用引物对 30 株玉米弯孢叶斑病菌进行 UP-PCR 扩增,引物筛选结果如表 3。结果表明,不同引物扩增的条带数存在差异,其中引物 AS4 扩增的条带数最多,为 9 条;引物 3-2 扩增条带数最少,为 4 条。4 个通用引物共产生了 27 条 DNA 条带,大小分布于 100 ~ 2 000 bp,平均每条引物扩增出 6.75 条带(图 2),其中 21 条具有多态性,比率(PPB)为 77.78%。在 4 个引物的扩增图谱中,有 3 条几乎所有菌株都有的公共带,也

有很多特意带,具有明显的遗传分化现象,菌株间存在丰富的遗传多样性。

表 2 病菌在鉴别寄主上反应型测定结果

Tab. 2 The results of reaction type indentified on differential host

菌株代号 Code of isolate	鉴别寄主 Differential host							
	沈 135	Mo17	B73	鲁原 92	78599-1	E28	掖 478	黄早四
LN-XM-1	R	S	S	S	S	S	S	S
LN-TL-2	R	R	M	M	M	S	S	S
LN-XM-3	R	R	S	S	S	S	S	S
LN-TL-4	R	R	M	M	M	S	S	S
LN-TL-5	R	M	M	M	M	S	S	S
LN-DL-6	R	R	M	M	R	S	S	S
LN-DL-7	R	R	M	M	M	S	S	S
LN-FC-8	R	R	M	R	R	M	M	S
LN-DL-9	R	R	M	R	R	M	M	R
AH-LB-10	R	R	M	M	R	S	S	S
LN-DL-11	R	S	S	M	S	S	S	M
LN-DL-12	R	R	M	R	M	R	R	R
AH-LB-13	R	M	M	S	R	S	M	S
AH-MC-14	M	R	S	R	M	M	R	S
AH-MC-15	R	M	M	M	M	S	S	S
AH-SZ-16	R	R	S	M	M	S	S	S
LN-SY-17	R	S	M	M	M	S	S	S
LN-WFD-18	R	R	M	M	M	M	M	M
LN-WFD-19	R	R	M	M	R	S	S	S
LN-TL-20	R	R	M	R	S	S	S	S
LN-DD-21	R	R	M	M	S	S	S	S
LN-SY-22	R	R	M	M	R	S	M	M
LN-DL-23	R	R	R	R	R	S	S	S
LN-DL-24	R	S	S	S	S	S	S	S
AH-JX-25	R	R	M	M	S	S	S	M
AH-JX-26	R	R	S	S	M	S	S	S
LN-SY-27	R	S	S	M	M	S	S	S
LN-TL-28	R	M	M	M	M	S	S	S
LN-DD-29	R	M	M	M	M	S	M	S
LN-WFD-30	R	R	S	M	M	S	S	M

表 3 UP-PCR 扩增引物筛选结果

Tab. 3 Screening amplification primers of UP-PCR

引物 Primers	核苷酸碱基序列(5'-3') Nucleotide sequence(5'-3')	UP-PCR 标记数 Scored bands	多态性标记数 Polymorphic bands	多态性位点频率/% Percentage of polymorohix loci
3-1	TAAGGTGGCGCCAGT	6	3	50.0
3-2	TAAGGGCGGTGCCAG	4	3	75.0
AS19	GAGGCTGGCGGCTAG	8	7	87.5
AS4	TGTGGGCGCTCGACAC	9	8	88.9
合计 Total		27	21	77.78

筛选条带清晰、多态性高的 12 条 ISSR 引物,筛选结果如表 4。对供试的 30 个菌株 DNA 进行扩增,能扩增出 76 条带,平均每条引物扩增出 6.3 条带,扩增产物片段大小为 100 ~ 2 500 bp,其中 68 条是多态性条带,比率(PPB)为 89.47%。其中,有 7 条几乎所有菌株都有的公共带。扩增条带最多的是

ISSR11(图 3),共 12 条,最少的是 ISSR10 和 ISSR21,分别扩增出 3 条。

### 2.3 遗传相似性分析

根据 2 种分子标记结果分别计算 30 个菌株间的遗传相似系数,其中 UP-PCR 相似系数为 0.54 ~ 0.96,平均为 0.75;ISSR 相似系数为 0.53 ~ 0.93,

平均为 0.73;2 种分子标记方法的平均遗传相似系数基本一致。2 种分子标记技术均能揭示玉米弯孢叶斑病菌具有丰富的遗传多态性,菌株之间存在相当程度的遗传分化和遗传差异。30 株玉米弯孢叶

斑病菌菌株的 UP-PCR 和 ISSR 标记的相似系数矩阵的 Mantel 检验结果表明,两者之间的相似系数矩阵存在显著相关。

表 4 ISSR 扩增引物筛选结果

Tab.4 Screening amplification primers of ISSR

引物 Primers	核苷酸碱基序列(5'-3') Nucleotide sequence(5'-3')	ISSR 标记数 Scored bands	多态性标记数 Polymorphic bands	多态性位点频率/% Percentage of polymorphix loci
ISSR10	AGTCGTAGT(ACA)4AC	3	3	100.0
ISSR11	ACGACTACG(GTG)4GT	12	12	100.0
ISSR12	ACTACGACT(TG)6GT	6	6	100.0
ISSR13	AGAGAGAGAGAGAGAGT	7	6	85.7
ISSR17	GAGAGAGAGAGAGAGAA	4	3	75.0
ISSR21	ACACACACACACACACYA	3	1	33.3
ISSR25	GAGAGAGAGAGAGAGAYC	8	8	100.0
ISSR26	GAGAGAGAGAGAGAGAYG	7	7	100.0
ISSR27	CACACACACACACACARG	5	4	80.0
ISSR28	ACACACACACACACACYT	7	5	71.4
ISSR34	BDBCACACACACACACA	6	6	100.0
ISSR36	HVHTGTGTGTGTGTGTG	8	7	87.5
合计 Total		76	68	89.47

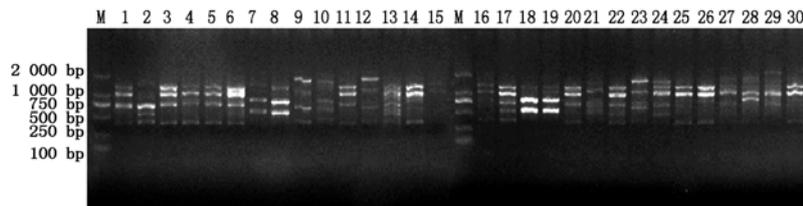


图 2 引物 AS4 对玉米弯孢菌叶斑病菌的 UP-PCR 扩增图谱

Fig.2 UP-PCR patterns of *Curvularia hunata* by the primer of AS4

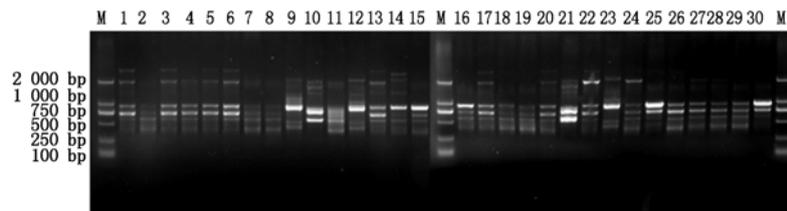


图 3 引物 ISSR1 对玉米弯孢菌叶斑病菌的 ISSR 扩增图谱

Fig.3 ISSR patterns of *Curvularia hunata* by the primer of ISSR11

## 2.4 聚类分析

在 UP-PCR 聚类图中(图 4),在相似系数 0.662 处做切割线  $L_1$  时,可将 30 个菌株划分为 7 个类群(UP-PCR groups,简称 UGs),分别为 UG I、UG II、UG III、UG IV、UG V、UG VI、UG VII。其中,UG I 包含 LN-DL-6 和 AH-LB-13,分别来自大连和安徽,且它们均是中等致病类型,说明玉米弯孢叶斑病菌致病性强弱与地理来源无明显相关性;UG II 包含 2 个菌株分别为 LN-SY-27 和 LN-DD-29;UG III 包括 LN-DD-21 和 LN-TL-28 共 2 个菌株;UG IV 包括 LN-DL-7、LN-FC-8、LN-WFD-18 和 LN-WFD-19 共 4 个菌株;UG V 包括 4 个菌株,分别为 LN-TL-2、LN-DL-9、AH-10 和 LN-DL-23;UG VI 包含 3 个菌株,为 LN-SY-17、LN-DY-22 和 LN-DL-24,UG VII 包含的菌株数最

多,分别为 LN-XM-1、LN-XM-3、LN-TL-4、LN-TL-5、LN-DL-11、LN-DL-12、AH-MC-14、AH-15、AH-16、LN-TL-20、AH-JX-25、AH-JX-26、LN-WFD-30,占总数的 43.3%。其中,LN-TL-4 和 LN-TL-5 以及 AH-JX-26 和 LN-WFD-30 相似程度最高,相似系数为 0.96,表明两菌株同源性强,不存在显著的遗传变异。

ISSR 聚类分析结果表明(图 5),在相似系数 0.681 处做切割线  $L_2$  时,30 个菌株被划分为 8 个类群(ISSR groups,简称 IGs),分别为 IG I、IG II、IG III、IG IV、IG V、IG VI、IG VII、IG VIII。其中,IG II 和 IG VI 均包含 1 个菌株,分别为 LN-DL-23 和 LN-TL-2;IG I、IG III、IG IV 和 IG V 各包含 2 个菌株,分别为 AH-10 和 LN-DD-21、LN-DL-9 和 LN-DL-12、LN-WFD-18 和 LN-WFD-19、LN-DL-7 和 LN-FC-8;IG VII

包含菌株最多为 11 个, 分别为 AH-16、LN-SY-17、LN-TL-20、LN-DY-22、LN-DL-24、AH-JX-25、AH-JX-26、LN-SY-27、LN-TL-28、LN-DD-29 和 LN-WFD-30; IG VIII 包含 LN-XM-1、LN-XM-3、LN-TL-4、LN-TL-5、

LN-DL-6、LN-DL-11、AH-LB-13、AH-MC-14 和 AH-15。其中, LN-XM-1 和 LN-XM-3 以及 LN-TL-5 和 LN-DL-6 相似程度最高, 相似系数为 0.93, 表明两菌株同源性强。

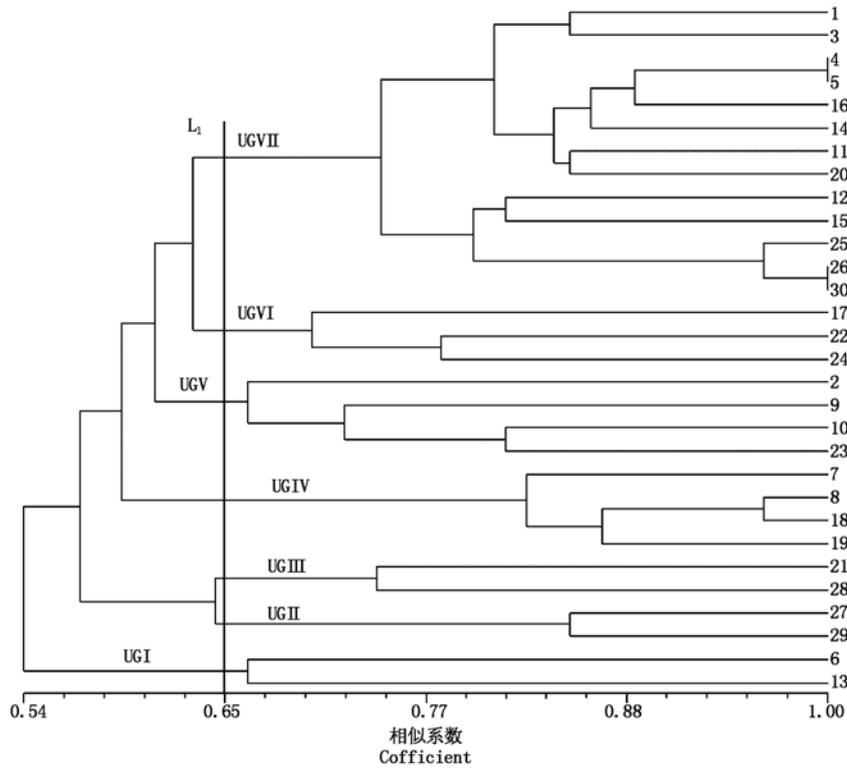


图 4 基于 UP-PCR 分子标记的聚类树状图

Fig. 4 Dendrogram of the cluster analysis of *Curvularia lunata* isolates based on their genetic similarity from UP-PCR data

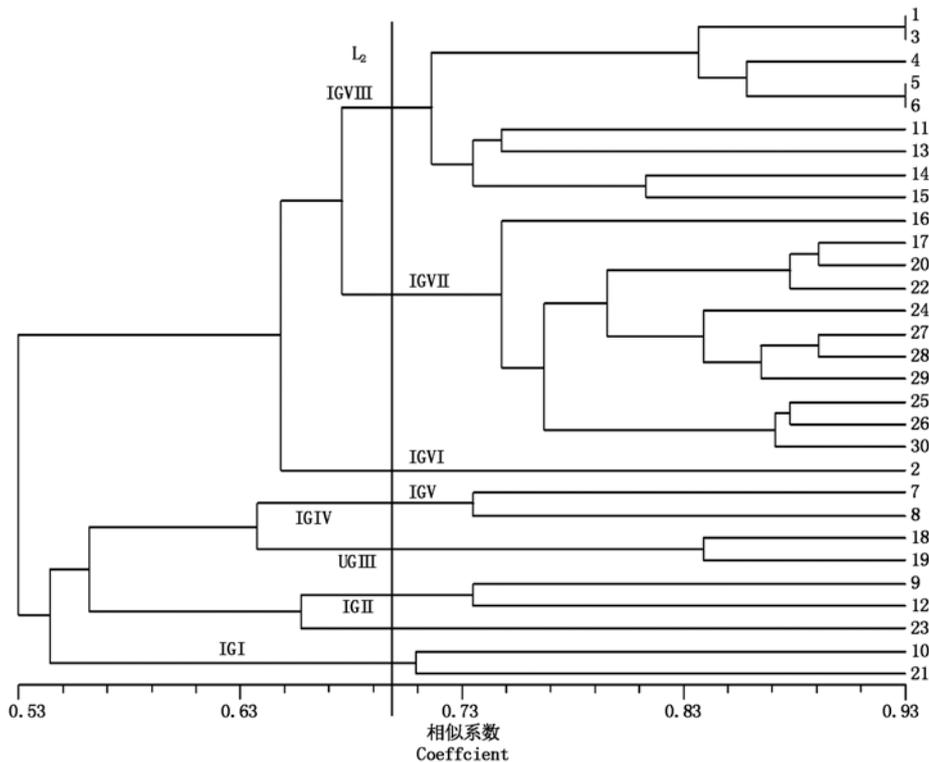


图 5 基于 ISSR 分子标记的聚类树状图

Fig. 5 Dendrogram of the cluster analysis of *Curvularia lunata* isolates based on their genetic similarity from ISSR data

### 3 结论与讨论

本实验室曾对辽宁省(东北地区)玉米弯孢叶斑病菌致病性进行了研究,结果表明,该病菌存在明显的生理分化和遗传多样性。本研究较系统地研究了辽宁省与安徽省部分地区玉米弯孢叶斑病菌的致病差异和遗传多样性。筛选获得 4 条 UP-PCR 引物和 12 条 ISSR 引物,对辽宁省和安徽省玉米主产区弯孢叶斑病菌进行了扩增,扩增条带清晰;UP-PCR 引物共扩增出 27 条条带,平均每条引物扩增出 6.75 条条带,多态性条带占总条带的 77.78%,ISSR 引物共扩增出 76 条条带,平均每条引物扩增出 6.3 条条带,多态性条带占总条带的 89.47%。说明弯孢叶斑病菌基因型较多,遗传资源较丰富。聚类分析表明,UP-PCR 在相似系数为 0.94 时,供试的 30 株弯孢叶斑病菌全部被分开,ISSR 在相似系数为 0.93 时,供试的 30 株弯孢叶斑病菌全部被分开。2 种分析方法均表明,玉米弯孢叶斑病菌具有丰富的遗传多样性和一定的遗传分化现象。UP-PCR 在相似系数为 0.662 时,将 30 个菌株划分为 7 个群,ISSR 在相似系数为 0.681 时,将 30 个菌株划分为 8 个类群,这与鄢洪海等<sup>[10]</sup>研究结果相一致。玉米弯孢叶斑病菌的致病性传统鉴别寄主鉴定结果表明,安徽省灵璧市、辽宁省大连市和沈阳新民市均有强致病菌株的分布,致病性的强弱与地理来源不相关,这与隋鹤等<sup>[11]</sup>研究结果相一致。利用 UP-PCR 和 ISSR 这 2 种分析标记的遗传多样性聚类结果相似但是不完全相同,可能由于不同分子标记技术检测手段和原理不同,所表达的 DNA 水平上的遗传变异也不相同,结果上存在一定程度的差异。

本试验结果表明,2 种分子标记划分的类群与利用常规方法鉴定划分的致病类型间存在一定的相关性,个别类群与致病性分组相关性不明显,说明 DNA 水平的变化不能完全反映所有病原菌菌株致病力的分化。原因可能是分子标记技术与病原菌菌株整个基因组的遗传变异有关,而致病类型是依据人工接种鉴别寄主通过抗感反应人为划分的,受鉴别寄主-病菌间的互作、试验条件和人为评定标准的影响,客观上存在误差。因此,将传统的植物病理学技术鉴定病原菌的致病类型和分子标记技术相结合,能够提供更加丰富的遗传信息,指导玉米抗病育种和品种的合理布局,有利于更好的监测玉米弯孢叶斑病菌的生理分化。

#### 参考文献:

[1] 李富华,叶华智,王玉涛,等. 玉米弯孢叶斑病的研究

- 进展[J]. 玉米科学,2004,12(2):97-101,107.
- [2] 王晓鸣,焦志亮,戴发超,等. 玉米弯孢菌叶斑病病原菌遗传多样性研究[C]//中国菌物学会第三届会员代表大会暨全国第六届菌物学学术讨论会论文集. 北京:2003.
- [3] 焦志亮. 玉米弯孢菌叶斑病病原菌遗传多样性分析和玉米种质抗病性鉴定[D]. 北京:中国农业科学院,2000.
- [4] Bulat S A, Lübeck M, Mironenko N, et al. UP-PCR analysis and ITS1 ribotyping of strains of *Trichoderma* and *Gliocladium*[J]. Mycological Research, 1998, 102(8):933-943.
- [5] Lübeck M, Poulsen H. UP-PCR cross blot hybridization as a tool for identification of anastomosis groups in the *Rhizoctonia solani* complex[J]. FEMS Microbiology Letters, 2001, 201(1):83-89.
- [6] Yli-Mattila T, Mach R L, Alekhina I A, et al. Phylogenetic relationship of *Fusarium langsethiae* to *Fusarium poae* and *Fusarium sporotrichioides* as inferred by IGS, ITS,  $\beta$ -tubulin sequences and UP-PCR hybridization analysis[J]. International Journal of Food Microbiology, 2004, 95(3):267-285.
- [7] 谷守芹,范永山,李坡,等. 玉米大斑病菌 ISSR 反应体系的优化和遗传多样性分析[J]. 植物保护学报, 2008, 35(5):427-432.
- [8] Zietkiewicz E, Rafalski A, Labuda D. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification[J]. Genomics, 1994, 20(2):176-183.
- [9] 鄢洪海,陈捷. 玉米弯孢叶斑病菌生理分化和分子生物学研究[J]. 植物病理学报, 2002, 32(3):288.
- [10] 鄢洪海. 玉米弯孢叶斑病菌生理分化与遗传多态性研究[J]. 玉米科学, 2009, 17(1):139-142.
- [11] 隋鹤,高增贵,薛春生,等. 寄主选择压力下玉米弯孢菌致病性分化及生物学特性研究[J]. 中国农学通报, 2010, 26(4):239-243.
- [12] 叶克苾,郭馨梅,魏志刚,等. 玉米抗弯孢菌叶斑病的快速鉴定方法[J]. 西北农业学报, 2011, 20(4):168-172.
- [13] 王宏,吕国忠,纪明山,等. 玉米杂交种对弯孢菌叶斑病抗性鉴定[J]. 沈阳农业大学学报, 2000, 31(5):476-478.
- [14] 张小飞,高增贵,庄敬华,等. 应用 UP-PCR 进行玉米丝黑穗病菌遗传多样性研究[J]. 植物保护, 2009, 35(2):95-98.
- [15] 赵柏霞,高增贵,庄敬华,等. 应用 UP-PCR 进行瓜类保护地土壤镰孢菌多样性分析[J]. 中国蔬菜, 2009(10):46-50.
- [16] 钱韦,葛颂,洪德元,等. 采用 RAPD 和 ISSR 标记探讨中国疣粒野生稻的遗传多样性[J]. 植物学报, 2000, 42(7):741-750.
- [17] 贾少峰,段霞瑜,周益临,等. 小麦白粉菌 ISSR 分子标记体系构建及其分离菌株的多样性分析[J]. 植物保护学报, 2007, 34(5):493-499.
- [18] 段会军,张彩英,李喜焕,等. 基于 RAPD、ISSR 和 AFLP 对西瓜枯萎病菌遗传多样性的评价[J]. 菌物学报, 2008, 27(2):267-276.
- [19] Nei M, Li W H. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1979, 76(10):5269-5273.