



甘肃玉米灰斑病病原鉴定及遗传多样性分析

戴子淙^{1,2}, 高建昊^{1,2}, 张小杰³, 洪流²,
王春明², 周天旺², 陈杰新⁴, 郭成^{1,2}

(1. 甘肃农业大学 植物保护学院, 兰州 730070; 2. 甘肃省农业科学院 植物保护研究所, 兰州 730070;
3. 甘肃农业大学 草业学院, 兰州 730070; 4. 平凉市农业科学院, 甘肃平凉 744000)

摘要 为掌握甘肃地区玉米灰斑病的发生分布、病原种类及遗传多样性,于2021—2022年调查了该病害在甘肃的分布范围,对采集的灰斑病样品进行分离与鉴定,并采用ISSR分子标记技术对甘肃玉米灰斑病菌的遗传多样性进行分析。结果表明,玉米灰斑病在甘肃陇南和陇东大部分地区均有发生,并已扩展至陇中地区;经形态学和分子生物学鉴定甘肃地区玉米灰斑病病原菌为玉米尾孢(*Cercospora zeina*);16条ISSR引物共扩增出74条条带,多态性条带73条,比例为98.65%。甘肃省陇南地区种群遗传多样性最为丰富,且与陕西省的遗传距离最小(0.0214)、遗传相似度最高(0.9789),陇东地区次之。在遗传相似系数为0.63时,可以将所有菌株分为4个亚群,亚群1中有28个菌株,其中包括16株陇南地区菌株、5株陇东地区菌株和7株来自陕西地区的菌株;亚群2中只有1个陇南地区菌株;亚群3中有10个菌株,包括陇南地区4个、陇东地区1个和5个陕西菌株;亚群4有2个菌株,陇东地区和陕西菌株各1个,4大类群分别包含来自不同地域的菌株。以上结果说明,同陇东地区相比,陇南地区与陕西地区的菌株遗传相似度更高,且亚群内遗传多样性与地理来源之间无明显的相关性。

关键词 甘肃;玉米灰斑病;分布;玉米尾孢;遗传多样性

玉米(*Zea mays* L.)是中国种植面积最大、总产量最高的粮食作物,还是优良的饲料作物和化工原料,在国民经济中占据主导地位^[1]。玉米灰斑病是由尾孢属真菌引起的一种世界性玉米病害^[2],主要危害植株叶片,同时也侵染玉米苞叶和叶鞘^[3]。严重时病斑汇合连片使叶片枯死,从而影响玉米灌浆,造成籽粒干瘪、千粒质量下降。通常会造成玉米产量损失10%~30%,严重时可达60%以上,甚至造成绝收^[4]。由于全球气候变化异常,栽培措施不断变革,玉米品种引种频繁,如今该病害成为中国近年来上升很快、为害较严重的病害之一^[5],已在全国至少17省(自治区、直辖市)87个地市(自治州)发生^[6],严重威胁中国玉米的产量和质量。

目前,全球已知玉米灰斑病的致病菌有4种:玉蜀黍尾孢(*Cercospora zeae-maydis*)、玉米尾孢(*C. zeina*)、高粱尾孢玉米变种(*C. sorghi*

var. *maydis*),还有1个未确定种(*Cercospora* sp.)^[7-8]。中国玉米灰斑病的致病菌主要有玉米尾孢和玉蜀黍尾孢,二者在形态上极为相似,在侵袭力和毒力方面未表现出显著不同,但在生长特性、生态适应性和分子特征方面存在差异^[9]。北方以玉蜀黍尾孢菌为主,南方则以玉米尾孢菌为主。玉蜀黍尾孢灰斑病最早于1991年在中国辽宁发现^[3],之后迅速蔓延到吉林、黑龙江^[10]以及内蒙古自治区,目前已扩展至山西、山东、北京、天津、安徽等9个省^[6]。玉米尾孢菌则最早于2001年出现在中国云南地区^[9],2003年在云南西南部爆发,很快成为云南高海拔山区的玉米主要病害,在季风、气候等因素影响下逐年向北扩散至贵州、重庆、四川等地,并迅速取代玉蜀黍尾孢成为西南地区灰斑病的主要致病菌^[11],并有向北方玉米区扩展的态势。已有报道在河北、河南、陕西、四川、湖南和湖北等地均检出两种玉米灰斑病病

收稿日期:2023-03-11 修回日期:2023-04-23

基金项目:嘉峪关市科技计划(22-26);甘肃省青年科技托举工程人才(2020-18)。

第一作者:戴子淙,女,硕士研究生,从事植物病理学研究。E-mail:3284551196@qq.com

通信作者:郭成,男,博士,副研究员,从事玉米病害及抗病性鉴定研究。E-mail:gsguoch@126.com

原^[9,12]。

甘肃省是中国北方春播玉米的主产区之一^[13],玉米种植区域主要集中在河西走廊、陇东地区、甘肃中部及陇南山地^[14]。近几年甘肃省农业科学院植物保护研究所玉米与杂粮作物病害研究室对甘肃玉米灰斑病发生重点区域及周边地区进行监测,发现该病害已经由陇东、陇南地区扩展至甘肃中部,且有扩散趋势。目前中国对于玉米灰斑病病原学和发生流行规律的研究与报道有很多,但尚未见有关甘肃地区玉米灰斑病的系统性研究。因此,摸清甘肃地区玉米灰斑病的发生分布、病原种类及种群的遗传变异情况,以便进一步监测预警该病害的发生流行,同时为该病害的综合治理提供技术支撑,这对保障甘肃乃至西北地区玉米产业的绿色发展具有重要意义。

1 材料与方法

1.1 病害调查和样品采集

甘肃省农业科学院植物保护研究所玉米与杂粮作物病害研究室于2021—2022年对甘肃省陇南、陇东和中部地区进行调查并采集样品,玉米灰斑病调查参照中华人民共和国农业行业标准, NY/T1248.11-2016“玉米抗病虫性鉴定技术规范—第11部分:灰斑病”^[15]。调查地点涉及甘肃7个市46个县镇,共采集样品60份。

1.2 供试材料

供试培养基:水琼脂培养基(WA)成分为琼脂15 g、水1 L;马铃薯葡萄糖琼脂培养基(PDA)成分为马铃薯200 g、葡萄糖20 g、琼脂15 g、水1 L;玉米叶粉碳酸钙琼脂培养基(MLPCA)成分为玉米叶粉15 g、CaCO₃ 3 g、琼脂15 g、水1 L^[16]。

试剂及仪器:2×Power Taq PCR Master Mix、DL2000 DNA Marker均购自近岸蛋白质科技有限公司;TBE购自北京索莱宝科技有限公司;真菌基因组DNA快速抽提试剂盒(B518229-0100)购自上海生工生物工程股份有限公司;PCR引物均由上海生工生物工程股份有限公司合成。

1.3 病原菌的分离纯化

参考谭世麒^[5]的方法进行分离。病健交界处剪取5 mm×5 mm左右组织块,无菌水冲洗表面,使用75%酒精浸洗约30 s,无菌水漂洗3次。将处理好的叶片平铺在叠有湿润滤纸的WA上,25℃培养5~10 d。待生长出菌丝后挑取至PDA上培养。单孢纯化采用方中达^[17]的方法并

加以改进。将分离物在PDA上25℃恒温黑暗培养15~20 d后,刮取菌丝于试管内,加入3~5 mL的无菌水震荡,制成孢子悬浮液均匀涂布至WA上(每10 μL孢子悬浮液在10倍镜下观察每个视野有1~2个孢子即可)。利用体式显微镜挑取单个孢子至PDA培养基,25℃培养5~10 d,即可获得纯化菌株。

1.4 形态学鉴定

参考刘可杰等^[18]的方法,将纯化菌株转接于PDA和MLPCA上培养。PDA培养基置于25℃黑暗培养30 d,观察并记录菌落的形态特征、生长直径等状况;MLPCA培养基置于25℃培养箱中黑暗培养5~7 d。利用接种针轻刮菌落表面制成简易玻片,观察菌丝及分生孢子梗的形态特征,测量40~50个分生孢子大小,求取平均值。

1.5 分子生物学鉴定

纯化菌株在PDA上培养30 d左右刮取菌丝,待干燥后装入无菌离心管,经液氮充分冷冻后研磨成粉末,用真菌基因组DNA快速抽取试剂盒提取菌株DNA。将玉米灰斑病致病菌H3组蛋白通用引物CyIH3F和CyIH3R作为尾孢菌阳性对照对供试菌株进行PCR扩增,通过产物的片段大小判断是否为*Cercospora*。采用*C. zeae-maydis*、*C. zeina*、未知种*Cercospora* sp.的特异性引物组合CzeaeHIST/CyIH3R、CzeinaHIST/CyIH3R、CmaizeHIST/CyIH3R对全部菌株进行尾孢菌种的特异性检测,明确病原种类。在此基础上,采用对尾孢属不同种具有多态性扩增的引物CZM2F/CZM2R进一步鉴别*C. zeae-maydis*、*C. zeina*和*C. sorghi* var. *maydis*(高粱尾孢玉米变种),引物序列见表1。参考赵立萍^[19]的PCR反应体系:DNA模板2.0 μL,上下游引物各1.0 μL,Mix 12.5 μL,ddH₂O补足25 μL。PCR反应程序:94℃预变性5 min,94℃45 s,55℃30 s,72℃60 s,35个循环,72℃最终延伸10 min。取5.0 μL PCR产物在1.0%的琼脂糖凝胶上进行电泳检测,检验基因扩增结果。

将PCR产物送至上海生工生物工程股份有限公司进行H3组蛋白基因测序,测序结果在NCBI网站上进行比对,并从GenBank数据库下载同源性较高的H3组蛋白基因序列,利用MEGA7.0软件采用邻近相接法构建系统发育树(Bootstrap=1 000)。

表 1 鉴定玉米灰斑病的引物组合

Table 1 Species-specific primers for identification of maize gray leaf spot pathogen

引物名称 Primer	引物序列(5'→3') Primer sequence	产物大小/bp Product size
CYIH3F	AGGTCCACTGGTGGCAAG	389
CYIH3R	AGCTGGATGTCCTTGGA	389
CzeaeHIST	TCGACTCGTCTTTCACTTG	284
CzeinaHIST	TCGAGTGGCCCTCACCGT	284
CmaizeHIST	TCGAGTCATTCGACTTCC	284
CZM2F	GCGACCCTGCCGTTT	310
CZM2R	CTCAGCCGGAGACTTCG	760/310/1 020

1.6 ISSR 遗传多样性分析

参考张小飞等^[20]、赵立萍^[19]和陈思文^[21]筛选的多态性丰富的 16 条 ISSR 引物(表 2),对 28 株甘肃菌株进行 ISSR 扩增,并选择 13 株陕西菌株作为参照(表 3)。ISSR 反应体系同“1.5”节,反应程序参考赵立萍 ISSR-PCR 扩增所用程序。

取 5.0 μL PCR 产物在 1.0 %的琼脂糖凝胶上进行电泳检测,用凝胶成像系统拍照并用 Excel 2019 统计条带数(同一位置有条带记为 1,无条带记为 0)。利用 Popgen 32 软件和 NTSYS-pc2.10 version 软件进行分析。

表 2 供试 ISSR 引物

Table 2 Tested ISSR primers

引物名称 Primer	引物序列(5'→3') Primer sequence	退火温度/℃ Optimal Tm	引物名称 Prime	引物序列(5'→3') Primer sequence	退火温度/℃ Optimal Tm
UBC808	AGAGAGAGAGAGAGAGC	52.3	UBC836	AGAGAGAGAGAGAGAGYA	48.4
UBC809	AGAGAGAGAGAGAGAGG	48.0	UBC840	GAGAGAGAGAGAGAGACTT	47.0
UBC810	GAGAGAGAGAGAGAGAT	44.9	UBC841	GAGAGAGAGAGAGAGACTC	48.5
UBC816	CACACACACACACACAT	49.6	UBC864	ATGATGATGATGATG	36.2
UBC823	TCTCTCTCTCTCTCTCC	48.0	UBC884	HBHAGAGAGAGAGAGAG	45.7
UBC825	ACACACACACACACACT	50.8	UBC889	DBDACACACACACACAC	49.7
UBC834	AGAGAGAGAGAGAGAGYT	48.7	UBC890	VHVGTTGTGTGTGTGTGT	52.0
UBC835	AGAGAGAGAGAGAGAGYT	48.7	UBC891	HVHTGTGTGTGTGTGTGTG	50.0

2 结果与分析

2.1 玉米灰斑病分布地域

2021—2022 年对甘肃省陇南、陇东、中部地区共计 46 个乡镇进行实地调查,发现玉米灰斑病在陇南市成县、康县、徽县和两当县发生严重,其中徽县的柳林镇、银杏树镇和栗川镇部分田块灰斑病病株率达到 100%,病级 3~5 级;徽县伏家镇病株率 100%,病级为 1~3 级;成县红川镇、抛沙镇病株率达到 100%,病级 5~7 级;两当县城关镇、金洞乡病株率分别为 100%和 50%,病级均为 1~3 级,属偏重发生。天水市的秦州区、秦安县、麦积区和陇南市的礼县、西和县灰斑病的平均病株率为 8.2%~16.7%,属中度发生。平凉市的泾川县、崇信县、华亭县、崆峒区;庆阳市的合水

县、环县、镇原县、西峰区;陇南市的武都区 and 宕昌县灰斑病的平均病株率小于 5%,属轻度发生。甘肃中部兰州市榆中县、白银市会宁县和定西市安定区该病害零星发生。病害分布区域见图 1。

2.2 形态学鉴定结果

病菌在 PDA 培养基上生长缓慢,菌落致密,近圆形,边缘呈平滑或不规则状,菌落正面灰白至灰黑色,背面铁灰色,偶有十字状开裂,1~2 周后菌落表面萌发出白色絮状菌丝,培养 20 d 菌落直径为 7~14 mm,生长速率为 0.5~0.65 mm/d。光学显微镜下观察,分离菌株的分生孢子梗呈淡橄榄色或棕褐色,有 1~5 个隔膜,一般 3~14 根簇生,直或膝状弯曲;分生孢子单生,呈半透明状,为倒棍棒状或纺锤形,薄壁,光滑,顶端微钝,有 1~10 个隔膜,大小在 (42.4~100.5) μm ×

(4.5~10.8) μm ,平均为 65.6 $\mu\text{m}\times 7.6 \mu\text{m}$ 。同致。形态学鉴定表明,分离菌株均为玉米尾孢赵立萍等^[9]、刘庆奎等^[10]报道的形态学特征一(*C. zeina*)。菌落及孢子形态见图 2。

表 3 供试菌株来源

Table 3 Source of isolates used in this experiment

菌株编号 Strain number	采集地 Location	菌株编号 Strain number	采集地 Location
GS-LN-CHC	甘肃省陇南市成县红川镇 Hongchuan Town, Chengxian County, Longnan, Gansu Province	GS-PL-JCLB-1	甘肃省平凉市泾川县荔堡镇 Libao Town, Jingchuan County, Pingliang, Gansu Province
GS-LN-CPS	甘肃省陇南市成县抛沙镇 Paosha Town, Chengxian County, Longnan, Gansu Province	GS-PL-JCLB-2	甘肃省平凉市泾川县荔堡镇 Libao Town, Jingchuan County, Pingliang, Gansu Province
GS-LN-CDC-1	甘肃省陇南市成县店村镇 Diancun Town, Chengxian County, Longnan, Gansu Province	GS-PL-KTBS	甘肃省平凉市崆峒区白水镇 Baishui Town, Kongtong District, Pingliang, Gansu Province
GS-LN-CDC-2	甘肃省陇南市成县店村镇 Diancun Town, Chengxian County, Longnan, Gansu Province	GS-PL-LTSZ-1	甘肃省平凉市灵台县什字镇 Shizi Town, Lingtai County, Pingliang, Gansu Province
GS-LN-CCG-1	甘肃省陇南市成县城关镇 Chengguan Town, Chengxian County, Longnan, Gansu Province	GS-PL-LTSZ-2	甘肃省平凉市灵台县什字镇 Shizi Town, Lingtai County, Pingliang, Gansu Province
GS-LN-CCG-2	甘肃省陇南市成县城关镇 Chengguan town, Chengxian County, Longna, Gansu Province	GS-QY-ZYSX	甘肃省庆阳市镇原县 Zhenyuan County, Qingyang, Gansu Province
GS-LN-CCG-3	甘肃省陇南市成县城关镇 Chengguan Town, Chengxian County, Longnan, Gansu Province	GS-QY-QC	甘肃省庆阳市庆城县 Qingcheng County, Qingyang, Gansu Province
GS-LN-CXC	甘肃省陇南市成县小川镇 Xiaochuan Town, Chengxian County, Longnan, Gansu Province	SX-BJLY-1	陕西省宝鸡市麟游县 Lingyou County, Baoji, Shaanxi Province
GS-LN-KCB	甘肃省陇南市康县长坝镇 Changba Town, Kangxian County, Longnan, Gansu Province	SX-BJCC-1	陕西省宝鸡市陈仓区 Chencang District, Baoji, Shaanxi Province
GS-LN-KCG	甘肃省陇南市康县城关镇 Chengguan Town, Kangxian County, Longnan, Gansu Province	SX-BJQS-1	陕西省宝鸡市岐山县 Qishan Town, Baoji, Shaanxi Province
GS-LN-KDB	甘肃省陇南市康县豆坝镇 Douba Town, Kangxian County, Longnan, Gansu Province	SX-QYNZ-1	陕西省宝鸡市千阳县 Qianyang County, Baoji, Shaanxi Province
GS-LN-KNB	甘肃省陇南市康县碾坝镇 Nianba Town, Kangxian County, Longnan, Gansu Province	SX-QYNZ-2	陕西省宝鸡市千阳县 Qianyang County, Baoji, Shaanxi Province
GS-LN-XHXY	甘肃省陇南市西和县西峪镇 Xiyu Town, Xihe County, Longnan, Gansu Province	SX-XYYP-1	陕西省咸阳市永寿县永平镇 Yongping Town, Yongshou County, Xianyang, Shaanxi Province
GS-LN-XHSL-1	甘肃省陇南市西和县十里镇 Shili Town, Xihe County, Longnan, Gansu Province	SX-XYYP-2	陕西省咸阳市永寿县永平镇 Yongping Town, Yongshou County, Xianyang, Shaanxi Province
GS-LN-XHSL-2	甘肃省陇南市西和县十里镇 Shili Town, Xihe County, Longnan, Gansu Province	SX-XYYP-3	陕西省咸阳市永寿县永平镇 Yongping Town, Yongshou County, Xianyang, Shaanxi Province
GS-LN-HFJ-1	甘肃省陇南市徽县伏家镇 Fujia Town, Huixian County, Longnan, Gansu Province	SX-TC-1	陕西省铜川市耀州区官庄镇 Guanzhuang Town, Yaozhou District, Tongchuan, Shaanxi Province
GS-LN-HFS-2	甘肃省陇南市徽县栗川镇 Lichuan Town, Huixian County, Longnan, Gansu Province	SX-TC-2	陕西省铜川市耀州区官庄镇 Guanzhuang Town, Yaozhou District, Tongchuan, Shaanxi Province
GS-LN-HFS-3	甘肃省陇南市徽县栗川镇 Lichuan Town, Huixian County, Longnan, Gansu Province	SX-TC-3	陕西省铜川市耀州区官庄镇 Guanzhuang Town, Yaozhou District, Tongchuan, Shaanxi Province
GS-LN-HFS-4	甘肃省陇南市徽县栗川镇 Lichuan Town, Huixian County, Longnan, Gansu Province	SX-YL-1	陕西省咸阳市杨陵区揉谷镇 Rougu Town, Yangling District, Xianyang, Shaanxi Province
GS-LN-LQS	甘肃省陇南市礼县岐山镇 Qishan Town, Lixian County, Longnan, Gansu Province	SX-YL-2	陕西省咸阳市杨陵区揉谷镇 Rougu Town, Yangling District, Xianyang, Shaanxi Province
GS-TS-QZHQ	甘肃省天水市秦州区华岐镇 Huaqi Town, Qinzhou District, Tianshui, Gansu Province		

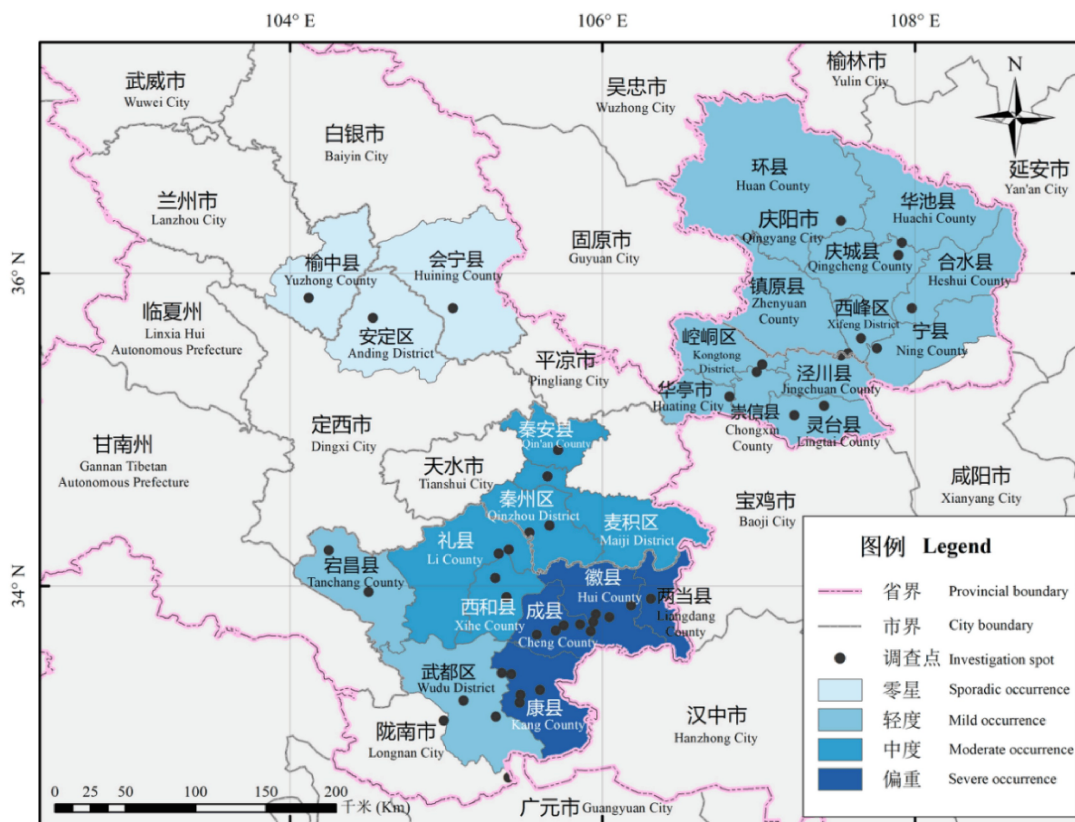
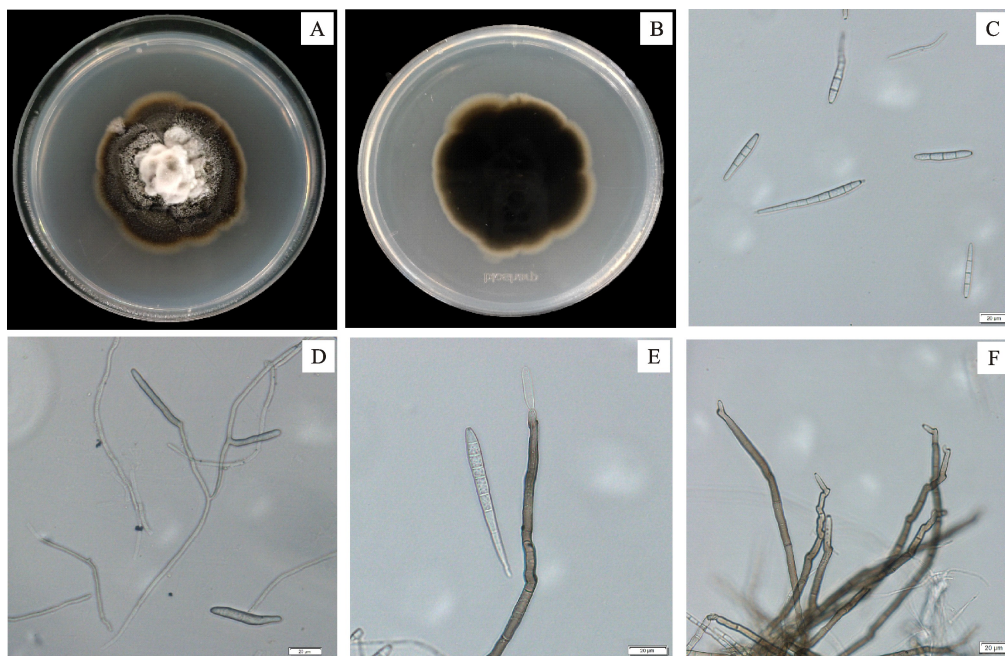


图 1 甘肃玉米灰斑病分布范围及调查地点

Fig. 1 Distribution and location of maize gray spot in Gansu



A. 菌落正面; B. 菌落背面(培养 30 d); C. 分生孢子; D. 分生孢子及分生孢子梗; E. 发育中的分生孢子; F. 分生孢子梗

A. Front side of colony; B. Back side of colony(cultivate for 30 days); C. Conidia; D. Conidia and conidiophores; E. Developing conidia; F. Conidiophores

图 2 病原菌菌株在 PDA 上的菌落及分生孢子形态

Fig. 2 Morphological characters of colonies, and conidia of isolate on PDA medium

2.3 分子生物学鉴定结果

利用 H3 组蛋白通用引物 CyIH3F 和 CyIH3R 作为尾孢属真菌阳性对照对供试菌株进行 PCR 扩增,扩增出目的片段大小均为 389 bp(图 3),可初步确定供试菌株均为 *Cercospora*。采用 4 对特异性引物进行 PCR 扩增,仅 *C. zeina* 的特异组合 CzeinaHIST 和 CyIH3R 扩增出 284 bp 的目标片段,*C. zeae-maydis* 和未知种 *Cercospora* sp. 的特异引物组合并未扩增出条带。以 CZM2F 和 CZM2R 的引物组合扩增仅获得 310 bp 的 *C. zeina* 特征条带(图 4),未扩增出代表 *C. zeae-maydis*(760 bp)和 *C. sorghi* var. *maydis*(1 020 bp)的条带。

将 PCR 产物测序结果上传至 NCBI 基因库进行比对,结果表明:28 株菌株同玉米尾孢(*C. zeina*)序列同源性最高。利用 MEGA7.0 软件以玉米大斑凸脐孢菌(*Exserohilum turcicum*)为

外类群,玉蜀黍尾孢(*Cercospora zeae-maydis*)为内类群构建系统发育树(Bootstrap=1 000),结果显示供试的 28 株菌株均能与玉米尾孢(*C. zeina*)聚为一支(图 5)。通过对两种鉴定结果进行分析比较认为,分子鉴定结果与形态学鉴定结果一致,此次分离出的 28 株菌株均为玉米尾孢(*C. zeina*)。

2.4 ISSR 遗传多样性分析

对供试的 41 株玉米灰斑病菌(甘肃 28 株,陕西 13 株)进行 ISSR 扩增,结果表明:扩增条带的分子碱基数为 100~2 000 bp(图 6),16 条 ISSR 引物共扩增出 74 条条带,平均每条引物扩增出 4.63 条条带,其中多态性的条带数为 73 条,多态性条带比例为 98.65%,不同引物扩增出的遗传图谱差异较大,同一引物下不同菌株的条带相似但不完全一致,这表明玉米灰斑病菌群体有丰富的遗传多样性。将建立的 0、1 矩阵,利用 Popgen

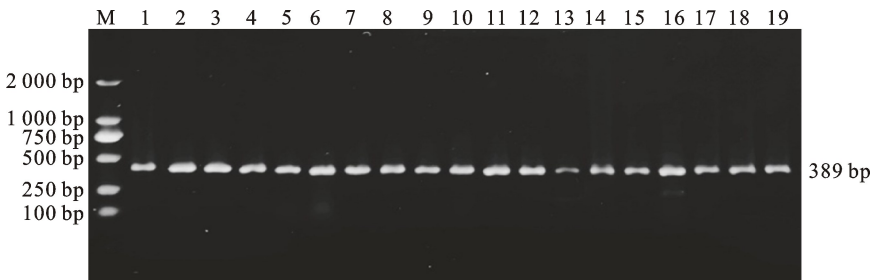
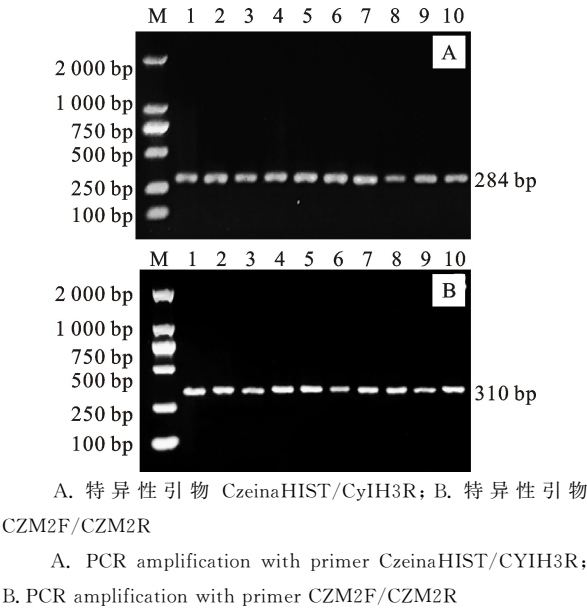


图 3 H3 组蛋白基因通用引物对部分玉米灰斑病菌株的鉴定结果

Fig. 3 Identification of H3 gene in some strains of *Cercospora* from maize



A. 特异性引物 CzeinaHIST/CyIH3R; B. 特异性引物 CZM2F/CZM2R
A. PCR amplification with primer CzeinaHIST/CYIH3R;
B. PCR amplification with primer CZM2F/CZM2R

图 4 玉米灰斑病特异性引物对部分菌株的鉴定结果

Fig. 4 Identification of some *Cercospora* strains with species-specific primers

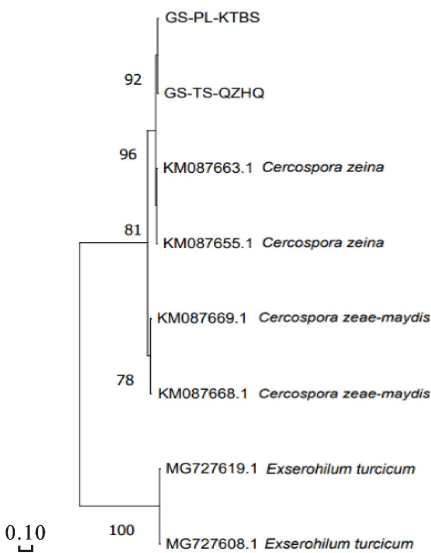


图 5 基于 H3 组蛋白 rDNA 序列构建的玉米灰斑病原菌相关种的系统发育树

Fig. 5 Phylogenetic tree of *Cercospora* strains from maize based on H3 histone rDNA sequences

软件分析,结果显示(表 4),Nei's 基因多样性指数和 Shannon 信息指数均以陇南地区为最高,分别为 0.311 5 和 0.464 9,该地区菌株的基因丰富度最高;陕西省次之,分别为 0.294 3 和 0.448 0,陇东地区分别为 0.265 3 和 0.397 0;3 个地区的有效等位基因数在 1.452 1~1.541 5,平均有效等位基因数为 1.493 6;多态位点百分率在 74.32~91.89,平均为 85.58;多态位点数在 55~68,平均为 63.33。陇南地区有效等位基因数、Nei's 基因多样性指数、Shannon 信息指数、多态性位点数和多态位点百分率最高,表明陇南地区

菌株遗传多样性最为丰富。

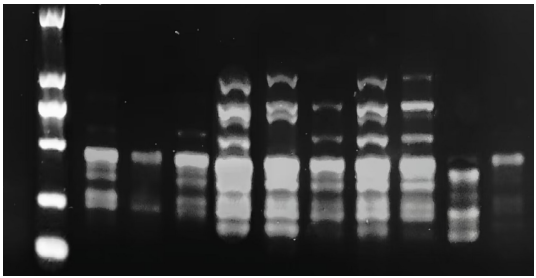


图 6 引物 UBC889 对不同菌的 ISSR-PCR 扩增
Fig. 6 ISSR-PCR amplification of different *Cercospora zeina* isolates using primer UBC889

表 4 不同地区玉米灰斑病菌遗传变异参数

Table 4 Genetic variation parameters of maize leaf spot pathogen in different regions

地理种群 Geographical groups	等位基因数 Number of alleles	有效等位 基因数 Effective number of alleles	Nei's 基因多 样性指数 Nei's gene diversity	Shannon 信息指数 Shannon's information index	多态性 位点数 Number of polymorphic loci	多态位点 百分率 % Percentage of polymorphic loci
陇南地区 South Gansu	1.918 9	1.541 5	0.311 5	0.464 9	68	91.89
陇东地区 East Gansu	1.743 2	1.452 1	0.265 3	0.397 0	55	74.32
陕西省 Shaanxi	1.905 4	1.487 2	0.294 3	0.448 0	67	90.54
平均值 Average	1.855 8	1.493 6	0.290 4	0.436 6	63.33	85.58

如表 5 所示,甘肃 2 个地区中陇南地区与陕西省的遗传距离最小(为 0.021 4),遗传相似度最高(为 0.978 9);陇东地区与陕西省的遗传距离最远(为 0.048 7),遗传相似度最低(为 0.952 4);而陇东地区与陇南地区的遗传距离为 0.037 3,遗传相似度为 0.963 3,介于二者之间;表明这 3 个地区间病原菌的遗传相关性较高且不同地区种群间的遗传分化程度有差异,甘肃陇南地区与陕西省玉米灰斑病原之间遗传距离小,亲缘关系更近。

利用 NTSYS-pc version 2.10 软件对供试的 41 个菌株进行聚类分析。结果显示(图 7),供试

菌株间的相似系数为 0.59~0.92,不同菌株间相似程度有显著差异。遗传相似系数为 0.63 时,可以将所有菌株分为 4 个亚群,亚群 1 中有 28 个菌株,其中包括 16 株陇南地区菌株、5 株陇东地区菌株和 7 株来自陕西地区的菌株;亚群 2 中只有 1 个陇南地区菌株;亚群 3 中有 10 个菌株,包括陇南地区 4 个、陇东地区 1 个和 5 个陕西菌株;亚群 4 有 2 个菌株,陇东地区和陕西菌株各 1 个。4 大类群分别包含来自不同地域的菌株,结果说明亚群内遗传多样性与地理来源之间无明显相关性。

表 5 不同地区玉米灰斑病菌遗传相似度和遗传距离

Table 5 Genetic similarity and genetic distance of maize leaf spot pathogen in different regions

地理种群 Geographical groups	陇南地区 South Gansu	陇东地区 East Gansu	陕西省 Shaanxi
陇南地区 South Gansu	* * * *	0.963 3	0.978 9
陇东地区 East Gansu	0.037 3	* * * *	0.952 4
陕西省 Shaanxi	0.021 4	0.048 7	* * * *

注:对角线上方为遗传相似度,对角线下方为遗传距离。

Note: Nei's genetic identity (above diagonal) and genetic distance (below diagonal).

3 结论与讨论

为明确近期玉米灰斑病在甘肃省的发病情况,甘肃省农业科学院植物保护研究所玉米与杂粮作物病害研究室于 2021—2022 年对甘肃省玉

米种植区进行调查,结果显示甘肃 7 个市(州)46 个乡镇玉米灰斑病均有发生和危害,其中陇南市的徽县、成县和康县等部分地区发病最重,天水市、平凉市及庆阳市发病较轻,甘肃中部的兰州市榆中县、白银市会宁县和定西市安定区也有零星

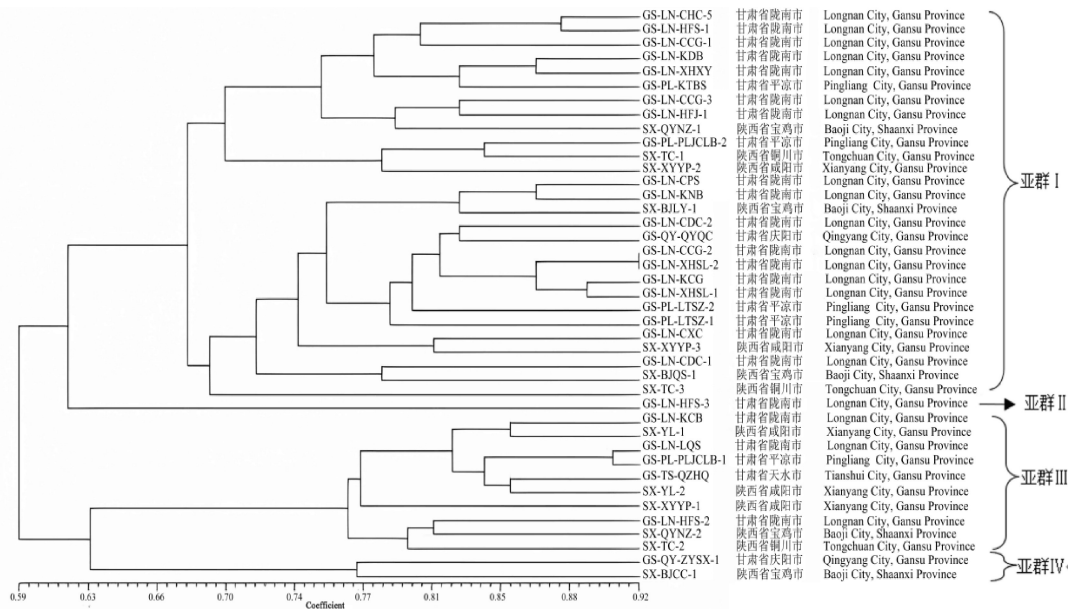


图 7 NTSYS 聚类图谱

Fig. 7 NTSYS cluster map

发生。对比郭成等^[22] 2015 年仅在甘肃陇南地区发现玉米灰斑病的结果,该病害已扩展至甘肃陇东地区和陇中地区,发病地区数量呈明显增加趋势。如今玉米灰斑病已成为甘肃玉米生产的潜在危害之一,应警惕该病害进一步向甘肃其他地区继续扩散的可能。

本试验对甘肃玉米灰斑病标样进行分离,经形态学和分子生物学方法将其病原菌确定为玉米尾孢(*C. zeina*)。与玉蜀黍尾孢相比较,玉米尾孢具有更强的致病力,且与寄主的适合度更高^[19]。高海拔高湿度的环境条件更加适宜尾孢灰斑病的发生和流行^[23]。目前由玉米尾孢菌引起高度感染的地区,如云南海拔 1 200~2 100 m 的山区,四川省海拔 1 000 m 以上的地区等,均位于海拔较高的玉米种植区。甘肃省海拔 1 500~3 000 m,且陇南地处秦巴山地,雨量丰沛、气候凉爽湿润,适宜尾孢灰斑病生存,这与该地区发病较重的调查结果相一致。作为一种气传病害,玉米灰斑病的病原可随气流远距离传播。有研究表明尾孢菌正以云南为中心沿着贵州、四川、湖南、湖北、陕西和河南一线向中国黄淮海夏玉米区及北方春玉米区扩散^[6]。但甘肃省农业科学院植物保护研究所玉米与杂粮作物病害研究室在与甘肃接壤的四川省广元市一带并未调查到该病害的发生分布,同时甘肃与四川省接壤的陇南市文县该病害仅为零星发生,而同陕西省相接的陇南市康县、

成县、两当县等地发病较重,因此推断病原菌可能借助由太平洋暖湿气流带来的东南向西北的水汽输送从陕西传至甘肃。为进一步探究陕西与甘肃病原菌之间的潜在联系,本研究对甘肃省陇南、陇东及陕西省的玉米灰斑病菌株进行 ISSR 遗传多样性分析,结果显示多态性条带比例为 98.65%,这表明玉米灰斑病菌群体有丰富的遗传多样性。这与张小飞等^[12]、任智惠等^[24] 研究得出玉米灰斑病菌菌株间具有丰富的遗传多样性的结论一致。Popgen 分析结果显示 Nei's 基因多样性指数在 0.265 3~0.311 5,Shannon 信息指数在 0.397 0~0.464 9,表明甘肃玉米尾孢菌种群存在较高的遗传变异,这与赵立萍^[19] 研究发现玉米尾孢种群存在较高的遗传变异这一结论相一致,但与刘庆奎^[23] 研究认为在玉米灰斑病菌中存在的遗传变异不高的结论不一致。这可能是各地不同地区的病原菌受气候、人工作业等诸多因素对遗传变异的影响表现出差异导致的。其中陇南地区和陕西省的遗传相似度高达 0.978 9,陇东地区和陕西省的遗传相似度高达 0.952 4,说明甘肃省玉米灰斑病菌与陕西省玉米灰斑病菌的亲缘关系较近,这与赵立萍^[19]、Duan 等^[25] 关于陕西和甘肃玉米灰斑病菌种群遗传相似度高的结论一致,说明这两个地理种群之间存在密切的遗传交流。当遗传相似系数为 0.63 时,可以将所有菌株分为 4 个亚群,4 个亚群分别包含来自不同地域的菌株,结果

说明亚群内遗传多样性与地理来源之间无明显的相关性,这与张小飞等^[20]、任智惠等^[24]研究结论一致。玉米尾孢菌从陕西西部与甘肃接壤的汉中、宝鸡、咸阳一带随风雨进入陇南及陇东地区,并逐年向中部扩展。因此,需警惕未来数年该病害有可能通过甘肃陇东地区进入宁夏南部和陕西北部等地,以防对玉米生产造成威胁。

本研究初步明确了玉米灰斑病在甘肃省的地域分布、病原种类以及病原菌遗传多样性,仍需开展病害监测预警和发生规律等方面的相关研究,旨在为该病害的综合防控提供技术支撑。

参考文献 Reference:

- [1] 郭成,王宝宝,邓东,等. 甘肃玉米茎腐病病菌禾谷镰孢复合种遗传多样性[J]. 西北农业学报, 2022, 31(3): 345-354.
GUO CH, WANG B B, DENG D, *et al.* Genetic diversity of *Fusarium graminearum* species complex from maize *Fusarium* stalk rot in Gansu[J]. *Acta Agriculturae Boreali-occidentalis Sinica*, 2022, 31(3): 345-354.
- [2] 张小飞,李 晓,崔丽娜,等. 西南地区玉米灰斑病病原种类分子鉴定[J]. 西南农业学报, 2014, 27(3): 1079-1081.
ZHANG X F, LI X, CUI L N, *et al.* Molecular identification of race from maize gray leaf spot in southwest China[J]. *Southwest China Journal of Agricultural Sciences*, 2014, 27(3): 1079-1081.
- [3] 吴纪昌,马丽君,孙 义,等. 玉米一种新病害—尾孢菌叶斑病(*Cercospora zeaemaydis*)大发生[J]. 玉米科学, 1992(1): 67-68.
WU J CH, MA L J, SUN Y, *et al.* Large incidence of *Cercospora zeaemaydis*, a new disease of maize[J]. *Journal of Maize Sciences*, 1992(1): 67-68.
- [4] 孙铭泽,宋茂兴,吕香玲,等. 玉米自交系齐 319 对玉米灰斑病的抗性遗传分析[J]. 玉米科学, 2017, 25(6): 161-166.
SUN M Z, SONG M X, LÜ X L, *et al.* Studies on effect of gray leaf spot to yield loss and yield characters[J]. *Journal of Maize Sciences*, 2017, 25(6): 161-166.
- [5] 谭世麒. 陕西玉米灰斑病病原菌鉴定及防控药剂和抗病品种的筛选[D]. 陕西杨凌: 西北农林科技大学, 2019.
TAN SH Q. Pathogen identification of corn gray leaf spot in Shaanxi and screening effective fungicides and resistant variety for disease control[D]. Yangling Shaanxi: Northwest A&F University, 2019.
- [6] 刘可杰,董怀玉,王丽娟. 我国玉米灰斑病菌的种类及其分布调查[J]. 植物保护, 2021, 47(5): 266-270.
LIU K J, DONG H Y, WANG L J. Investigation on the species and distribution of pathogen causing gray leaf spot of maize in China [J]. *Journal of Plant Protection*, 2021, 47(5): 266-270.
- [7] CARSON M L, GOODMAN M M. Pathogenicity, aggressiveness, and virulence of three species of *Cercospora* associated with gray leaf spot of maize[J]. *Maydica*, 2006, 51(1): 89-92.
- [8] MEISEL B, KORSMAN J, KLOPPERS F J, *et al.* *Cercospora zeina* is the causal agent of grey leaf spot disease of maize in southern Africa[J]. *European Journal of Plant Pathology*, 2009, 124(4): 577-583.
- [9] 赵立萍,王晓鸣,段灿星,等. 中国玉米灰斑病发生现状与未来扩散趋势分析[J]. 中国农业科学, 2015, 48(18): 3612-3626.
ZHAO L P, WANG X M, DUAN C X, *et al.* Occurrence status and future spreading areas of maize gray leaf spot in China[J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2015, 48(18): 3612-3626.
- [10] 刘庆奎,秦子惠,张小利,等. 中国玉米灰斑病病原菌的鉴定及其基本特征研究[J]. 中国农业科学, 2013, 46(19): 4044-4057.
LIU Q K, QIN Z H, ZHANG X L, *et al.* Identification of *Cercospora* species associated with maize gray leaf spot in China[J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2013, 46(19): 4044-4057.
- [11] 常佳迎,刘 莉,刘树森,等. 黄淮海地区夏玉米灰斑病病原菌鉴定及主栽品种抗性分析[J]. 植物病理学报, 2019, 49(6): 808-817.
CHANG J Y, LIU L, LIU SH S, *et al.* Identification of causal agent of gray leaf spot and resistance of important hybrids in Huanghuaihai summer maize region[J]. *Acta Phytopathologica Sinica*, 2019, 49(6): 808-817.
- [12] 张小飞,李 晓,崔丽娜,等. 西南地区玉米灰斑病病原种类分子鉴定[J]. 西南农业学报, 2014, 27(3): 1079-1081.
ZHANG X F, LI X, CUI L N, *et al.* Molecular identification of race from maize gray leaf spot in southwest China [J]. *Southwest China Journal of Agricultural Sciences*, 2014, 27(3): 1079-1081.
- [13] 许小明,徐玉霞,董 奇,等. 甘肃省河东地区玉米种植适宜性评价和区划[J]. 干旱地区农业研究, 2018, 36(3): 230-235, 243.
XU X M, XU Y X, DONG Q, *et al.* Suitability evaluation and regionalization of maize planting in Hedong area of Gansu province[J]. *Agricultural Research in the Arid Areas*, 2018, 36(3): 230-235, 243.
- [14] 刘宾华. 甘肃省玉米产业的发展现状及对策[J]. 江西农业, 2020(4): 132.
LIU B H. Status of development of maize industry in Gansu province and countermeasures [J]. *Jiangxi Agriculture*, 2020(4): 132.
- [15] 中华人民共和国农业部. 中华人民共和国农业行业标准—玉米抗病虫性鉴定技术规范第 11 部分: 灰斑病 NY/T 1248. 11-2016[S]. 北京: 中国农业出版社, 2007.
The Ministry of Agriculture of the People's Republic of China. Standards of Agricultural Industry of the People's Republic of China—Technical Specification for Identifica-

- tion of Corn Resistance—Part 11: Gray Leaf Spot NY/T1248. 11-2016 [S]. Beijing: China Agricultural Press, 2007.
- [16] 徐秀德,董怀玉,姜 钰,等. 玉米灰斑病抗性鉴定技术[J]. 植物保护学报, 2003, 42(2): 129-132.
- XU X D, DONG H Y, JIANG Y, *et al.* The technique for identification of resistance to gray leaf spot on maize[J]. *Journal of Plant Protection*, 2003, 42(2): 129-132.
- [17] 方中达. 植病研究方法[M]. 第 3 版. 北京: 中国农业出版社, 1998.
- FANG ZH D. Method in Plant Pathological Research[M]. Third Edition. Beijing: Chinese Agricultural Press, 1998.
- [18] 刘可杰,徐 婧,胡 兰,等. 引起玉米灰斑病的 2 种尾孢菌生物学特性比较[J]. 沈阳农业大学学报, 2016, 47(3): 342-346.
- LIU K J, XU J, HU L, *et al.* Comparison of biological characteristics of two *Cercospora* species causing maize gray leaf spot [J]. *Journal of Shenyang Agricultural University*, 2016, 47(3): 342-346.
- [19] 赵立萍. 玉米灰斑病病原菌及玉米尾孢遗传变异研究[D]. 北京: 中国农业科学院, 2016.
- ZHAO L P. Identification of pathogen causing maize gray leaf spot and genetic variaty in *Cercospora zeina* population[D]. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2016.
- [20] 张小飞,李 晓,崔丽娜,等. 我国玉米灰斑病菌遗传多样性的 ISSR 分析[J]. 植物保护学报, 2015, 42(6): 908-913.
- ZHANG X F, LI X, CUI L N, *et al.* Genetic diversity analysis of *Cercospora* spp. by ISSR in China[J]. *Journal of Plant Protection*, 2015, 42(6): 908-913.
- [21] 陈思文. 玉米灰斑病菌生理分化及品种抗性研究[D]. 沈阳: 沈阳农业大学, 2017.
- CHEN S W. The physiological differentiation of *Cercospora zeae-maydis* and varieties resistance research [D]. Shenyang: Shenyang Agricultural University, 2017.
- [22] 郭 成,徐生军,金社林. 2015 年甘肃玉米病虫害发生情况调查报告[J]. 甘肃农业科技, 2016(4): 1-3.
- GUO CH, XU SH J, JIN SH L. Investigation report on the occurrence of corn diseases and pests in Gansu in 2015[J]. *Gansu Agricultural Science and Technology*, 2016(4): 1-3.
- [23] 刘庆奎. 玉米灰斑病致病菌鉴定及其遗传多样性研究[D]. 北京: 中国农业科学院, 2013.
- LIU Q K. Identification and genetic diversity of *Cercospora* species causing gray leaf spot in maize[D]. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2013.
- [24] 任智慧,苏前富,孟玲敏,等. 吉林省玉米灰斑病菌 RAPD 分析[J]. 玉米科学, 2011, 19(6): 118-121.
- REN ZH H, SU Q F, MENG L M, *et al.* RAPD analysis of *Cercospora zeae-maydis* in Jilin province[J]. *Journal of Maize Sciences*, 2011, 19(6): 118-121.
- [25] DUAN C X, ZHAO L P, WANG J, *et al.* Dispersal routes of *Cercospora zeina* causing maize gray leaf spot in China [J]. *Journal of Integrative Agriculture*, 2022, 21(10): 2943-2956.

Identification and Genetic Diversity Analysis of Pathogen of Maize Gray Leaf Spot in Gansu

DAI Zicong^{1,2}, GAO Jianhao^{1,2}, ZHANG Xiaojie³, HONG Liu²,
WANG Chunming², ZHOU Tianwang², CHEN Jiexin⁴ and GUO Cheng^{1,2}

(1. College of Plant Protection, Gansu Agricultural University, Lanzhou 730070 China; 2. Institute

of Plant Protection, Gansu Academy of Agricultural Sciences, Lanzhou 730070, China;

3. College of Grassland Science, Gansu Agricultural University, Lanzhou 730070;

4. Pingliang Academy of Agricultural Sciences, Pingliang Gansu 744000 China)

Abstract In order to understand the occurrence and distribution of maize gray leaf spot and its pathogen species and genetic diversity in Gansu Province, the distribution range of the disease in Gansu Province was investigated during 2021 to 2022. The samples of gray leaf spot were isolated and identified, and the genetic diversity of the pathogen was analyzed by ISSR molecular marker technology. The results showed that the gray leaf spot occurred in most areas of eastern and southern Gansu, and extended to central Gansu. The pathogen of gray leaf spot was identified as *Cercospora zeina* by morphology and molecular biology. A total of 74 bands were amplified by 16 ISSR primers, with 73 polymorphic bands, accounting for 98.65%. The genetic diversity of Longnan population was the most abundant, and the minimum genetic distance from Shaanxi Province was 0.021 4, and the highest genetic similarity was 0.978 9, followed by Longdong region. When the genetic similarity coefficient was 0.63, all strains could be divided into four subgroups. There were 28 strains in subgroup 1, including 16 strains from Longnan, five strains from East Gansu and seven strains from Shaanxi. There was only one strain from Longnan in subgroup 2. There were 10 strains in subgroup 3, including four strains from Longnan, one strain from East Gansu and five strain from Shaanxi. There were two strains in subgroup 4, one strain from Shaanxi, and one strain from Longdong. The four groups contained strains from different regions. The above results showed that compared with East Gansu area, the genetic similarity of strains from Longnan and Shaanxi was higher, and there was no significant correlation between genetic diversity and geographical origin.

Key words Gansu Province; Gray leaf spot; Distribution; *Cercospora zeina*; Genetic diversity

Received 2023-03-11

Returned 2023-04-23

Foundation item Science and Technology Plan of Jiayuguan City(No. 22-26); Science and Technology Support Youth Talents Engineering of Gansu Province(No. 2020-18).

First author DAI Zicong, female, master student. Research area: plant pathology. E-mail: 3284551196@qq.com

Corresponding author GUO Cheng, male, Ph. D, associate professor. Research area: maize diseases and resistance identification. E-mail: gsguoch@126.com

(责任编辑:郭柏寿 Responsible editor: GUO Baishou)