

玉米圆斑病菌(*Bipolaris zeicola*) 遗传多样性 ISSR 分析

张小飞, 李晓*, 崔丽娜, 邹成佳, 杨晓蓉, 向运佳

(四川省农业科学院植物保护研究所, 农业部西南作物有害生物综合治理重点实验室, 成都 610066)

摘要 利用简单序列重复间隔区(inter-simple sequence repeats, ISSR)标记对玉米圆斑病菌(*Bipolaris zeicola*)的遗传多样性进行了分析。筛选出 9 个扩增多态性好且稳定的通用引物,共扩增出 47 条 DNA 条带,大小分布于 250~2 000 bp 之间,其中多态性条带为 33 条,为总条带数的 70.21%。遗传距离为 0.91 处时,所有菌株被聚为 6 个组。ISSR 标记可以揭示菌株间的亲缘关系及差异性,可用于玉米圆斑病菌遗传多样性研究。此外,通过分子标记划分的类群与利用寄主反应型之间存在一定相关性,但其关系并不密切。

关键词 玉米圆斑病菌; 简单序列重复区; 遗传多样性; 聚类分析

中图分类号: S 435.131 **文献标识码:** A **DOI:** 10.3969/j.issn.0529-1542.2015.03.006

Genetic diversity analysis of corn leaf spot caused by *Bipolaris zeicola* with ISSR markers

Zhang Xiaofei, Li Xiao, Cui Lina, Zou Chengjia, Yang Xiaorong, Xiang Yunjia

(Institute of Plant Protection, Sichuan Academy of Agricultural Sciences, Key Laboratory of Integrated Pest Management on Crops in Southwest, Ministry of Agriculture, P. R. China, Chengdu 610066, China)

Abstract Genetic diversity of 24 *Bipolaris zeicola* isolates, isolated from different locations in Southwest China, were analyzed with ISSR (inter-simple sequence repeats) markers. The results showed that a total of 47 bands were amplified using 9 primers. The length of these bands ranged from 250–2 000 bp, and 33 of the bands were polymorphic, accounting for 70.21% of the total. At a similar level of 0.91, all isolates were clustered into six distinct groups. ISSR analysis could reveal the phylogenetic relationships and difference between the tested isolates of *B. zeicola*. In addition, there was a correlation between the groups divided by molecular markers and the pathogenic types identified by host reaction type, but the correlation was not significant.

Key words *Bipolaris zeicola*; inter-simple sequence repeats; genetic diversity; cluster analysis

玉米圆斑病在世界范围内广泛发生,病原为玉米平脐蠕孢(*Bipolaris zeicola*)。国内于 20 世纪 60 年代中后期至 70 年代在吉林省玉米自交系‘吉 63’及其选育的品种上严重发生,使圆斑病在吉林省多次流行成灾,成为当时影响玉米生产的重要病害^[1]。随后在辽宁、内蒙古、四川、云南等地报道了玉米圆斑病的发生^[2-5]。近几年该病已经蔓延到很多地区,并且随着生产水平的提高、品种的更换,有逐年加重发生的趋势,对玉米生产带来很大的影响。目前在玉米圆斑病的研究和描述中,对玉米圆斑病菌生物

学特性、生理分化、品种抗病性、毒素等方面已有相关报道^[6-8],而对玉米圆斑病菌遗传多样性研究报道较少。

玉米圆斑病菌有明显的生理分化现象,现已报道玉米圆斑病菌有 5 个生理小种,Ullstrup 报道了 1 号和 2 号 2 个生理小种^[9];Nelson 和 Dodd 等分别报道了 3 号和 4 号小种^[10-11];Welz 等报道了 0 号小种^[12],迄今还没有新的小种报道。圆斑病菌小种鉴定主要是根据引起病斑形状的不同来区分,其中 0 号小种无致病性;1 号小种有寄主专化性,可分泌专

收稿日期: 2014-04-23 修订日期: 2014-07-23

基金项目: 现代农业(玉米)产业技术体系项目(CARS-02-15);四川省财政创新能力提升工程项目(2015QNTG-011)

* 通信作者 E-mail:lixiaomaize@163.com

化性毒素 HC-toxin,能在感病的玉米品种上引起大的卵圆形坏死斑;2 号小种无寄主专化性,在寄主上产生枯黄的小型斑点;3 号小种无寄主专化性,对绝大多数的玉米品种有致病性,产生狭长的条形斑;4 号小种对含有 B73 遗传背景是自交系致病,在一些杂交品种上产生大的带有同心轮纹的坏死斑。我国已经报道有 3 个小种^[13],分别为 1 号、2 号、3 号小种,主要分布于我国的东北和西南地区。白金铠将我国发生的玉米圆斑病病菌鉴定为 1 号和 2 号两个生理小种^[14],孙广宇报道玉米条斑型叶斑病是由 3 号生理小种引起^[15],0 号与 4 号小种在我国暂无报道。

ISSR(inter-simple sequence repeats)是一种基于微卫星序列发展起来的分子标记,具有简便迅速、稳定高效、DNA 多态性高等优点,具有比 RAPD 更高的可重复性和稳定性,且扩增时退火温度比较高,保证 PCR 扩增的可重复性^[16]。目前 ISSR 分子标记技术在作物的遗传多样性研究、遗传图谱构建、分子标记辅助育种及品种纯度鉴定方面得到了广泛应用,已被用于玉米丝黑穗病菌、玉米大斑病菌、小麦白粉病菌、镰孢菌等植物病原菌的遗传多样性研究^[17-20]。关于利用 ISSR 技术对玉米圆斑病菌的研究尚无公开报道,因此,这一标记技术在圆斑病菌的遗传多态性研究上具有重要的理论价值和广阔的应用前景。本研究探索了 ISSR 分子标记技术在玉米圆斑病菌研究中的应用,在确定 ISSR 的可行性的同时,从 DNA 水平上了解探索不同来源的玉米圆斑病菌的遗传多样性与致病反应型的相互关系。

1 材料与方法

1.1 供试菌株

自四川、湖北和云南等地采集典型玉米圆斑病病斑,采用单孢分离法^[21]共获得 24 个分离物。通过对病原菌形态学鉴定及其 rDNA ITS 序列分析,确认分离物属于玉米平脐蠕孢(*Bipolaris zeicola*)(见表 1)。以玉米大斑病菌(*Exserohilum turcicum*)、玉米小斑病菌(*Bipolaris maydis*)作为对照菌株。

1.2 DNA 提取

供试 24 个菌株接种于马铃薯葡萄糖液体培养基中(马铃薯 200 g,葡萄糖 20 g,水 1 000 mL),25 ℃振荡培养 7 d,收集菌丝后冷冻干燥,加液氮研磨成干粉。基因组 DNA 提取采用康为试剂公司的 DNA 提取试剂盒,具体操作参照试剂盒说明书。

表 1 遗传多态性研究的供试菌株

Table 1 Isolates tested in polymorphic studies

菌株编号 Strain No.	采集地点 Collection site	病斑形状 Leaf spot shape
GZ1101	贵州贵阳	线形
GZ1110	贵州遵义	线形
YN1102	云南德宏	圆形
YN1103	云南德宏	线形
YN1104	云南德宏	线形
YN1114	云南德宏	线形
YN1139	云南德宏	圆形
YN1140	云南德宏	圆形
YN1141	云南德宏	圆形
SC1116	四川成都	穗腐
SC1111	四川成都	线形
SC1113	四川青神	线形
SC1118	四川青神	线形
SC1115	四川南充	线形
HB1107	湖北宜昌	线形
HB1108	湖北宜昌	圆形
HB1109	湖北宜昌	线形
HB1134	湖北宜昌	线形
HB1135	湖北宜昌	线形
HB1136	湖北宜昌	线形
HB1137	湖北宜昌	线形
HB1138	湖北宜昌	线形
HB1106	湖北宜昌	线形
JL1147	吉林公主岭	圆形

1.3 供试菌株 ISSR 扩增

1.3.1 供试引物

ISSR 引物是根据植物病原真菌基因组 DNA 重复序列的特征,从加拿大哥伦比亚大学提供的 100 条 ISSR 引物中筛选出 9 条扩增条带清晰,多态性好的引物(见表 2),并由上海生工生物工程公司合成。

1.3.2 PCR 扩增反应条件优化

PCR 反应体系为 20 μL,其中 10×buffer 2 μL, MgCl₂ 2 μL (25 mmol/L),dNTP 0.6 μL (10 mmol/L), Taq 酶 0.2 μL (5 U/μL),引物 1.5 μL (10 μmol/L), DNA 模板 1 μL (25 ng) ddH₂O 12.7 μL。

1.3.3 PCR 扩增反应程序

94 ℃ 2 min、55 ℃ 40 s、72 ℃ 30 s 1 个循环;92 ℃ 20 s、55 ℃ 40 s、72 ℃ 30 s 29 个循环;72 ℃ 2 min 1 个循环,程序结束后进入 4 ℃保持。扩增反应在 Prime 基因扩增仪(英国 TECHNE)上进行。

1.4 PCR 产物检测

取 PCR 产物 5 μL 进行电泳检测,电泳凝胶为 1.5% 的琼脂糖,电压为 4 V/cm。Marker 为 DL2000(大连 TaKaRa 公司)。紫外分析仪检测扩增效果,并拍照、记录。

1.5 数据统计分析

参照扩增图谱,出现条带赋值为“1”,无条带赋

值为“0”，用 NTSYS-PC 软件中的 STMQUAL 程序计算 DNA 相似系数，并用 UPGMA 程序构建遗传相关聚类图。

2 结果与分析

2.1 基因组 DNA 提取

采用基因组 DNA 提取试剂盒提取了供试菌株的基因组 DNA。利用超微量分光光度计 (Nano-

Drop2000) 测得 DNA 浓度为 200 ~ 500 ng/ μ L, A_{260}/A_{280} 在 1.8~2.0 之间,表明 DNA 纯度较好,适合 PCR 分析。统一稀释至 50 ng/ μ L 备用。

2.2 ISSR 扩增结果

利用玉米圆斑病菌基因组混合 DNA 进行引物筛选,筛选出 9 个条带清晰、稳定、分布合理、重复性好的 ISSR 引物。筛选出的引物编号及其核苷酸序列见表 2。

表 2 9 个 ISSR 引物的扩增结果分析
Table 2 Analysis of ISSR-PCR with 9 primers

引物 Primer	核苷酸碱基序列 Nucleotide sequence 5'-3'	退火温度/ $^{\circ}$ C Annealing temperature	ISSR 标记数 No. of amplified bands	多态性标记数 No. of polymorphic bands	多态性位点频率/% Percentage of polymorphic loci
ISSR 1	(AG) ₈ T	52	4	2	50.00
ISSR 4	(TC) ₈ C	42	3	2	66.67
ISSR 6	(AG) ₈ CTT	49	9	9	100.00
ISSR 10	(CA) ₈ AGC	53	3	3	100.00
ISSR 12	ACTCGT(GA) ₇	53	7	1	14.29
ISSR 14	AGTACGAGT(TC) ₇	53	6	3	50.00
ISSR 15	CGTAGT(CA) ₇	58	6	5	83.33
ISSR 16	AGTCGTAGT(AC) ₇	58	3	2	66.67
ISSR 17	ACGACTACG(GT) ₇	61	6	6	100.00
合计 Total			47	33	70.21

用筛选出的 9 个通用引物分别对 24 株玉米圆斑病菌和 1 株玉米大斑病菌、1 株玉米小斑病菌进行 ISSR 扩增,扩增结果表明,不同引物的扩增条带数不同,并且玉米大斑病菌和玉米小斑病菌扩增带型与玉米圆斑病菌差异明显。单独统计供试的 24 株玉米圆斑病菌,共扩增出 47 条 DNA 条带;多态性条带为 33 条,为总条带数的 70.21%(表 2),大小分布于 250~2 000 bp 之间。9 个引物的扩增图谱中,都有 2 条以上的共同谱带,但是在个别遗传位点上存在一定的差异。玉米圆斑病菌菌株间扩增图谱既表现出种内的稳定性,又反映出不同菌株之间的差异。由引物 ISSR1 对部分菌株的扩增结果(图 1)可以看出,菌株 YN1102、YN1103 有一条特异性条带与其他菌株差异较大,而这两个菌株对寄主的反应型明显不同。对照菌株玉米大斑病菌(*Exserohilum turcicum*)与供试圆斑病菌带型差异较大,在约 500 bp 处扩出一条亮的条带,和其他菌株差异明显。而玉米小斑病菌(*Bipolaris maydis*)在 500~2 000 bp 有 2 条特异性条带,也与其他菌株明显有区别。

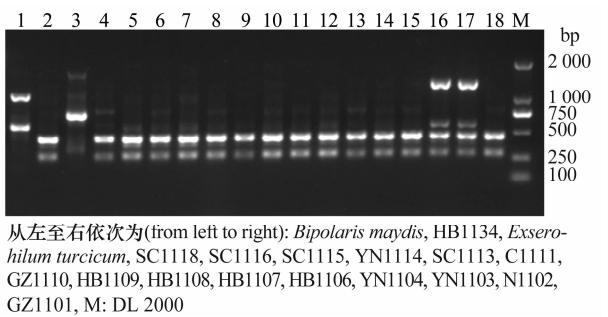


图 1 引物 ISSR1 对部分供试菌株的扩增图谱
Fig. 1 Amplification products with primer ISSR1 for some isolates

2.3 聚类分析

聚类分析表明,供试菌株间的相似系数在 0.78~1.00 之间,不同菌株间相似程度明显不同。其中,菌株 YN1104 和 GZ1110, YN1102 和 YN1103 相似系数都为 1.00,表明两个菌株同源性强,不存在显著的遗传变异。而菌株 HB1134 与 YN1102 相似程度最低,为 0.78,在 DNA 水平上存在明显差异。ISSR 扩增结果聚类图可知(图 2),当相似系数在 0.8 左右时,可将供试玉米圆斑病菌与玉米大斑

病菌、玉米小斑病菌明显区别开,所有的玉米圆斑病菌菌株聚为一大类群。在相似系数为 0.91 左右时,可将 24 个菌株划分为 6 个类群(*Bipolaris zeicola* Groups,称 BGs),即 BG I、BG II、BG III、BG IV、BG V、BG VI。BG I 群包括 GZ1101、YN1102、YN1103 共 3 个菌株,占总数的 12.5%。BG II 群包括 YN1104、GZ1110、HB1109 等共 11 个菌株,占总数的 45.8%,BG III 群包括 YN1139、YN1140、YN1141 等 3 个菌株,BG IV 群包括 SC1113、HB1138、HB1136、HB1137 等 4 个菌株,BG V 包括 HB1108、JL1147 等 2 个菌株,BG VI 只有一个来自湖北的菌株 HB1134。玉米圆斑病菌各菌株表现出了一定的遗传多样性。此外,从聚类图可以看出,BG I、BG II 两个大群里内包含了来自各个采样区的菌株,表明

遗传多样性与地理来源之间无明显的相关性。而在类群 BG III、BG V 均为对寄主产生圆形病斑的菌株,仅有 YN1102 被聚在了 BG I 类群中,可见,通过 ISSR 分子标记划分的类群与利用寄主鉴定的致病类型之间存在一定的相关性,但其关系并不密切,不能完全吻合。这可能是由于 ISSR 分子标记是根据菌株本身的整个基因组遗传差异建立的,反映病菌遗传多样性的实质,而致病类型则是依据在寄主上反应类型划分的,受鉴别寄主病菌互作及人为评判标准的影响。这说明 DNA 水平上的变化还不能完全反映所有病原菌致病力的分化。因此,将分子标记技术和传统的植物病理学技术结合起来,有利于更好地研究玉米圆斑病菌生理分化动态,指导玉米圆斑病抗病育种和品种的合理布局。

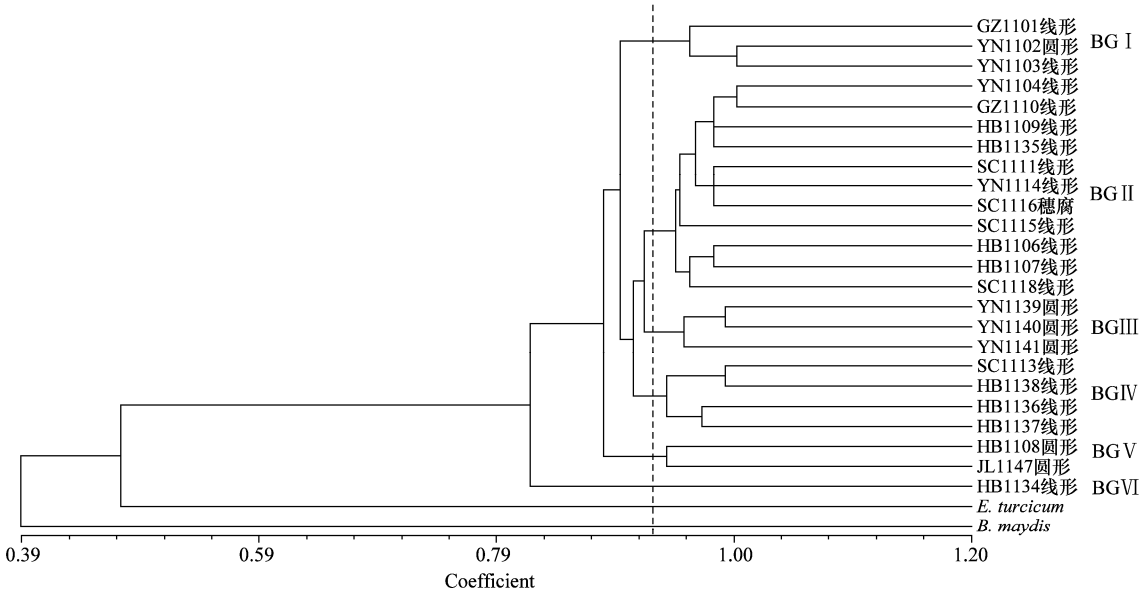


图 2 供试菌株在 DNA 水平上的聚类分析图

Fig. 2 Cluster analysis of the isolates tested at DNA level

3 结论与讨论

ISSR 分子标记结果稳定性高,不受样品形态及环境因子的限制^[22-23],ISSR 引物核苷酸链的延长,退火温度较高,扩增的稳定性也大大增强^[24],本试验对不同地区采集分离的玉米圆斑病菌进行 ISSR 分子标记和表型性状的遗传分析,结果显示各菌株间的遗传相似系数变化较大,可将 24 个菌株划分为 6 个类群(*Bipolaris zeicola* Groups,称 BGs),玉米圆斑病菌表现出了明显的分化现象。聚类结果说明 ISSR 技术可用于玉米圆斑菌株亲缘关系分析,能客

观地反映其遗传基础上的差异。同时对采集分离的圆斑病菌在不同寄主上引起的病斑反应型进行了田间鉴定,通过人工接种后 3 d 左右开始发病,发病初期病斑为黄褐色点状,随后有的纵向扩展,表现为不均匀的线形病斑,有的只是横向扩展,表现为圆形病斑。聚类结果显示,通过 ISSR 分子标记划分的类群与利用鉴别寄主鉴定的致病反应型(生理小种)之间存在一定相关性,但其关系并不密切。ISSR 分子标记遗传多样性与供试菌株的地理来源之间无明显的相关性,不同的类群里包含了来自各个地区的菌株。由于采集到的病菌数量有限,本研究只对供试菌株

做了初步的划分,尚需进行仔细的鉴定工作和更全面的比较研究,寻找更多的 ISSR 多态性标记进一步深入揭示玉米圆斑病菌遗传多样性与致病反应型(生理小种)的关系,同时对田间病菌群体进行分析,研究田间玉米圆斑病菌的群体结构和进化。

目前,圆斑病菌小种的划分尚未确立一套类似于玉米大斑病菌那样的具有抗病单基因为背景的材料,其划分小种的依据主要以病原菌在寄主上的病斑反应类型及致病性的强弱,而致病性强弱与病菌产生的专化性毒素有关,可以对寄主专化性毒素进行研究,分析各小种致病基因的差异^[25]。由于玉米圆斑病菌种内分化尚无统一的鉴别寄主,病原菌小种鉴定主要以病原菌在不同寄主上的病斑类型及病斑大小作为依据^[26-27],并且小种生理分化有可能受寄主品种、环境条件等诸多因子影响,因此采用鉴别寄主鉴定与分子标记结合是比较科学的监测病菌分化的手段,既能从遗传本质上反映病菌的特征,又能揭示寄主-病菌亲合与非亲合互作的遗传变异机制,为今后深入研究病菌致病机制和寄主抗性机制以及从根本上解决该病害防治问题奠定基础。

参考文献

- [1] 周善平. 玉米圆斑病发生调查报告[J]. 植物保护, 1982, 8(6):23.
- [2] 傅波, 王传仕. 玉米圆斑病在瓦房店市严重发生[J]. 植物保护, 1995, 21(2):52.
- [3] 李淑荣, 李惠春, 刘淑杰, 等. 玉米圆斑病的发生与防治[J]. 内蒙古农业科技, 1999(6):42-43.
- [4] 王景山. 玉米圆斑病的发生与防治[J]. 玉米科学, 2004, 12(S1):114, 117.
- [5] 张小飞, 崔丽娜, 李晓, 等. 西南地区玉米线形圆斑病生物学特性和品种抗性鉴定[J]. 玉米科学, 2013, 21(1):128-133.
- [6] 董国菊, 申晚霞. 重庆地区玉米圆斑病菌生物学特性的测定[J]. 西南大学学报(自然科学版), 2010, 32(12):8-13.
- [7] 薛春生, 王月, 张美丽, 等. 玉米圆斑病菌毒素的理化性质及致病作用[J]. 贵州农业科学, 2011, 39(4):87-89.
- [8] 朱晞, 黄梧芳. 玉米圆斑病菌(*Helminthosporium carbonum*)致病毒素研究初报[J]. 河北农业大学学报, 1991, 14(2):45-49.
- [9] Ullstrup A. Two physiologic races of *Helminthosporium maydis* in the corn belt [J]. Phytopathology, 1941, 31(3):508-521.
- [10] Nelson R R, Blanco M, Dalmacio S, et al. A new race of *Hel-*

minthosporium carbonum on corn [J]. Plant Disease Report, 1973, 57(10):822-823.

- [11] Dodd J L, Hooker A L. Previously undescribed pathotype of *Bipolaris zeicola* on corn [J]. Plant Disease, 1990, 74(7):530.
- [12] Welz G, Leonard K J. Genetic variation in field population of races 0, 2 and 3 of *Bipolaris zeicola* in 1987 [J]. Phytopathology, 1988, 78(12):1574.
- [13] 张天宇, 孙广宇. 中国真菌志. 第 30 卷. 蠕形分生孢子真菌 [M]. 北京: 科学出版社, 2010.
- [14] 白金铠, 潘顺法, 姜晶春. 玉米圆斑病菌生理小种鉴定结果 [J]. 植物病理学报, 1982, 12(3):61-64.
- [15] 孙广宇, 王琴, 张荣, 等. 条斑型玉米圆斑病病原鉴定及其生物学特性研究[J]. 植物病理学报, 2006, 36(6):494-500.
- [16] 徐玉梅, 刘小妹, 王建明. ISSR 标记技术在植物病原真菌研究中的应用[J]. 中国农学通报, 2011, 27(9):358-361.
- [17] 张小飞, 高增贵, 庄敬华. 利用 UP-PCR、ISSR 和 AFLP 标记分析玉米丝黑穗病菌遗传多样性[J]. 植物保护学报, 2010, 37(3):241-248.
- [18] 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.
- [19] 贾少锋, 段霞瑜, 周益林, 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.
- [20] 李蕊倩, 何瑞, 张跃兵, 等. 镰刀菌 ISSR 标记体系的建立及遗传多样性分析[J]. 中国农业科学, 2009, 42(9):3139-3146.
- [21] 高金欣, 高增贵, 张小飞, 等. 一种简捷的玉米大斑病菌单孢分离方法[J]. 微生物学通报, 2010, 37(10):1548-1550.
- [22] Jian S G, Tang T, Zhong Y, et al. Variation in inter-simple sequence repeat (ISSR) in mangrove and non-mangrove populations of *Heritiera littoralis* (Sterculiaceae) from China and Australia [J]. Aquatic Botany, 2004, 79(1):75-86.
- [23] Reddy M P, Sarla N, Siddiq E A. Inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism and its application in plant breeding [J]. Euphytica, 2002, 128(1):9-17.
- [24] 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.
- [25] Stankovic S, Levic J, Ivanovic D. Genetic variability of maize pathogens in Serbia [J]. Genetika, 2007, 39(2):227-240.
- [26] Ullstrup A J. Further studies on a species of *Helminthosporium* parasitizing corn [J]. Phytopathology, 1944, 34(2):214-222.
- [27] Dodd J L, Hooker A L. Previously undescribed pathotype of *Bipolaris zeicola* on corn [J]. Plant Disease, 1990, 74(7):530.

(责任编辑: 田 喆)