

利用 UP-PCR、ISSR 和 AFLP 标记分析玉米 丝黑穗病菌遗传多样性

张小飞 高增贵* 庄敬华 赵 辉 赵柏霞 隋 鹤

(沈阳农业大学 植物免疫研究所, 沈阳 110161)

摘要: 利用 UP-PCR、ISSR 和 AFLP 分子标记方法研究了我国主要玉米产区 34 株玉米丝黑穗病菌的遗传多样性。从供试引物中筛选获得具多态性的 UP-PCR 引物 9 个、ISSR 引物 11 个和 AFLP 引物组合 22 对, 分别扩增出 113、72 和 293 条谱带, 多态性条带比率分别为 91.15%、84.7% 和 83.27%。聚类分析表明, 玉米丝黑穗病菌存在丰富的遗传变异, 与地理来源无明显相关性。3 种分子标记的遗传相似系数矩阵相关性分析表明, UP-PCR 与 AFLP 具有较高的相关性, 相关系数为 0.698; UP-PCR 与 ISSR、ISSR 与 AFLP 的相关系数分别为 0.659 和 0.633。从多态性水平、稳定性和可操作性可以看出, UP-PCR 技术更适于分析玉米丝黑穗病菌遗传多样性。此外, UP-PCR、ISSR 和 AFLP 标记划分的类群与鉴别寄主划分的致病类型之间存在一定的相关性, 吻合率分别为 50.0%、60.0% 和 47.6%。

关键词: 玉米丝黑穗病菌; UP-PCR; ISSR; AFLP; 遗传多样性

Genetic diversity of *Sporisorium reilianum* by UP-PCR, ISSR and AFLP analysis

Zhang Xiaofei Gao Zenggui* Zhuang Jinghua Zhao Hui Zhao Baixia Sui He

(Institute of Plant Immunology, Shenyang Agricultural University, Shenyang 110161, Liaoning Province, China)

Abstract: Genetic diversity of 34 isolates of *Sporisorium reilianum* from main corn producing areas in China was analyzed by UP-PCR (universally primed PCR), ISSR (internal simple sequence repeat) and AFLP (amplified fragment length polymorphism). The results showed that 9 primers of UP-PCR, 11 primers of ISSR and 22 primers of AFLP generated 113, 72 and 293 polymorphic bands, accounted for 91.15%, 84.7% and 83.27% 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 AFLP, which was 0.698, was higher than that between UP-PCR and ISSR, or ISSR and AFLP, which were 0.659 or 0.633 respectively, by the analysis of genetic similarity coefficient matrix from three kinds of molecular markers. The UP-PCR technique was suitable for the genetic diversity analysis of *S. reilianum* in view of the level of polymorphism, stability and operability. In addition, there was a certain correlation between the groups divided by UP-PCR, ISSR and AFLP molecular markers and the pathogenic types identified by host identification, coincidence rate were 50.0%, 60.0%, and 47.6% respectively.

Key words: *Sporisorium reilianum*; UP-PCR; ISSR; AFLP; genetic diversity

基金项目: 国家“十一五”科技支撑计划(2006BAD08A06), 辽宁省教育厅重点实验室项目(LS2010149)

作者简介: 张小飞, 男, 1982 年生, 博士研究生, 研究方向为分子植物病理学, email: zhangxiaofei1982@gmail.com

* 通讯作者(Author for correspondence), email: gaozenggui@sina.com, Tel: 024-88487149

收稿日期: 2009-09-18

玉米丝黑穗病是由丝轴黑粉菌 *Sporisorium reilianum* (Kühn) Clinton 引起的世界性病害,在我国北方春玉米产区发生较为严重,每年造成减产达 30 万吨左右^[1-2]。王晓鸣等^[3]报道,2002 年黑龙江省玉米丝黑穗病发病面积达 44 万 hm^2 ,占黑龙江省玉米种植面积的 20% 以上,田间平均发病率为 15%,个别地块高达 80%。关于玉米丝黑穗病菌遗传多样性和致病性分化已有一些报道^[4-6],长期以来,该病菌生理分化类型主要通过鉴别寄主划分,从表型上直接反映出病原菌与寄主的互作关系,此方法费时、费力,并且易受环境条件及寄主生长条件的影响。目前,分子标记技术已越来越多地被用于分析植物病原真菌的遗传多样性,国外已利用 UP-PCR (universally primed, PCR) 即通用引物 PCR 技术进行生防木霉菌^[7]生物多样性和种类鉴定,以及立枯丝核菌^[8]、镰孢菌^[9]等植物病原菌遗传多样性的研究。Zietkiewicz 等^[10]和贾少锋等^[11]利用 ISSR (internal simple sequence repeat) 分子标记分析小麦白粉菌的遗传多样性;谷守芹等^[12]利用 ISSR 分子标记分析玉米大斑病菌的遗传多样性。AFLP (amplified fragment length polymorphism) 技术则应用于群体遗传多样性^[13-14]、瓜类枯萎病菌专化型研究^[15]及玉米大斑病菌生理小种研究等^[16]。而应用 UP-PCR、ISSR 和 AFLP 等分子标记方法进行玉米丝黑穗病菌群体遗传变异及类群划分的研究尚未见报道。本试验利用 UP-PCR、ISSR 和 AFLP 标记方法,从分子水平上分析玉米丝黑穗病菌遗传多样性,并系统分析了玉米丝黑穗病菌遗传多样性与致病性的相互关系,从分子水平探索玉米丝黑穗病菌种群演变和进化,以期病原菌致病类型划分提供分子生物学辅助技术。

1 材料与方 法

1.1 材 料

供试 34 株玉米丝黑穗病菌分别采自我国不同玉米产区的大田,经过单孢分离、培养和致病类型鉴定,分属于 6 个致病类型^[17]。供试菌株的名称、地理来源和致病类型见表 1。玉米丝黑穗病菌致病类型划分采用国家“十五”攻关项目“玉米重大病虫害可持续控制技术研究”课题组统一制定的鉴别寄主鉴定体系,鉴别寄主采用从我国 6 类玉米种质系统,即四平头、旅大红骨、Lancaster、BSSS (Reid)、PA 和 PB 资源中筛选出的黄早四、B73、丹 340、掖 478、Mo17 和齐 319 等 6 个自交系。

主要试剂与仪器: *Taq* DNA 聚合酶、限制性内切酶 *Mse*I 和 *Eco*rI、T4-DNA 连接酶、dNTP,均为 MBI 公司产品; Marker DL 2000,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。其它试剂均为国产分析纯。PCR Express Thermal Cycler HBPX 220,英国 Thermo Hybrid 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。

1.2 DNA 提取与 PCR 扩增

供试菌株接种于 PD 液体培养基中, 25℃ 振荡培养 10 天,收集菌丝后于冷冻干燥机上冻干 40 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,具体操作参照其说明书。

1.3 UP-PCR 标记分析

UP-PCR 分析参照文献[18],所用引物分别为 0.3-1 (= N21)、0.3-2、3-1、3-2、AA2M2、AS4、AS15、AS15inv、L15、L15/AS19、L21、L45、HE45 等,由上海生工生物工程技术有限公司合成。PCR 反应体系为 20 μL 体系,其中 10 $\times$ buffer 2 μL 、25 mmol/L MgCl_2 2 μL 、10 mmol/L dNTP 0.6 μL 、5 U/ μL *Taq* 酶 0.2 μL 、10 $\mu\text{mol/L}$ 引物 1.5 μL 、25 ng DNA 模板 1 μL 、ddH₂O 12.7 μL 。反应程序为 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。4℃ 保存。扩增反应在 PCR Express Thermal Cycler HBPX 220 上进行。

1.4 ISSR 标记分析

ISSR 反应总体系为 25 μL , 包括: 1. 25 U *Taq* DNA 聚合酶、10 $\mu\text{mol/L}$ 引物 1 μL 、10 mmol/L dNTP 0.5 μL 、10 $\times$ PCR 缓冲液 2.5 μL 、DNA 模板 25 ng。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 引物中选出,并由上海生工生物工程技术有限公司合成。筛选后的 11 个引物为: ISSR2: (AG)₈C, ISSR5: (AC)₈T, ISSR6: (AG)₈CTT, ISSR7: (AG)₈CTC, ISSR11: (GGAGA)₂GAG, ISSR12: ACTCGT(GA)₇, ISSR13: CGTACTCGT(GA)₇, ISSR14: AGTACGAGT (TC)₇, ISSR15: CGTAGT(CA)₇, ISSR17: ACGACTACG(GT)₇ 和 ISSR18: ACTACGACT(TG)₇。

PCR 反应程序: 94℃ 5 min; 94℃ 30 s, 50~56℃ 45 s, 72℃ 2 min, 37 个循环; 72℃ 10 min。反应结束后 4℃ 保存。扩增产物在 1.5% 琼脂糖凝胶中电泳

表 1 DNA 多态性研究的供试菌株
Table 1 Isolates tested for polymorphism of DNA

菌株 Isolate	电泳 序号 Code	来源 Source	寄主品种 Cultivar	致病类型 Pathogenic type	菌株 Isolate	电泳 序号 Code	来源 Source	寄主品种 Cultivar	致病类型 Pathogenic type
CD0501	1	河北承德 Chengde, Hebei	屯玉 51 Tunyu 51	Ⅲ	DT0620	18	山西大同 Datong, Shanxi	晋单 36 Jindan 36	Ⅵ
BC0503	2	吉林白城 Baicheng, Jilin	吉星 909 Jixing 909	Ⅳ	DT0621	19	山西大同 Datong, Shanxi	晋单 24 Jindan 24	Ⅴ
JL0604	3	吉林公主岭 Gongzhuling, Jilin	DF402	Ⅰ	DT0622	20	山西大同 Datong, Shanxi	中单 321 Zhongdan 321	Ⅳ
LY0605	4	吉林公主岭 Gongzhuling, Jilin	613	Ⅴ	HEB0623	21	黑龙江哈尔滨 Harbin, Helongjiang	海玉 6 号 Haiyu 6	Ⅱ
CC0606	5	吉林公主岭 Gongzhuling, Jilin	四单 19 Sidan 19	Ⅰ	JMS0624	22	黑龙江佳木斯 Jiamusi, Helongjiang	粘苞米 Nianbaomi	Ⅲ
SC0607	6	四川成都 Chengdu, Sichuan	未知品种 Unknown	Ⅳ	SB0625	23	黑龙江绥滨 Suibin, Heilongjiang	绥玉七号 Suiyu 7	Ⅲ
YL0608	7	陕西杨凌 Yangling, Shaanxi	正大 12 Zhengda 12	Ⅰ	SB0626	24	黑龙江绥滨 Suibin, Heilongjiang	绿单一号 Lvdan 1	Ⅱ
SY0609	8	辽宁沈阳 Shenyang, Liaoning	黄早四 Huangzaosi	Ⅱ	SH0627	25	黑龙江绥滨农场 Suibin Farm, Heilongjiang	绥玉七号 Suiyu 7	Ⅱ
TA0610	9	山东泰安 Tai'an, Shandong	郑单 958 Zhengdan 958	Ⅱ	JMS0628	26	黑龙江佳木斯 Jiamusi, Heilongjiang	绿单三号 Lvdan 3	Ⅱ
JN0611	10	山东济南 Jinan, Shandong	鲁单 984 Ludan 984	Ⅱ	BD0629	27	河北保定 Baoding, Hebei	农大 3138 Nongda 3138	Ⅴ
JN0612	11	山东济南 Jinan, Shandong	108	Ⅳ	BD0630	28	河北保定 Baoding, Hebei	屯玉 5 号 Tunyu 5	Ⅱ
NM0613	12	内蒙古呼和浩特 Hohhot, Inner Mongolia	哲单 7 号 Zhedan 7	Ⅲ	TL0631	29	辽宁铁岭 Tieling, Liaoning	东单 8 号 Dongdan 8	Ⅲ
NM0614	13	内蒙古呼和浩特 Hohhot, Inner Mongolia	白玉米 Baiyumi	Ⅱ	DL0634	30	辽宁大连 Dalian, Liaoning	丹 3034 Dan 3034	Ⅰ
SN0615	14	山西太原 Taiyuan, Shanxi	农大 108 Nongda 108	Ⅲ	DL0635	31	辽宁大连 Dalian, Liaoning	9801	Ⅲ
TY0616	15	山西太原 Taiyuan, Shanxi	晋单 44 号 Jindan 44	Ⅲ	JZ0636	32	辽宁锦州 Jinzhou, Liaoning	锦丹 413 Jindan 413	Ⅲ
TY0617	16	山西太原 Taiyuan, Shanxi	沈单 10 Shendan 10	Ⅳ	JZ0637	33	辽宁锦州 Jinzhou, Liaoning	联玉 Lianyu	Ⅲ
SN0619	17	山西太原 Taiyuan, Shanxi	农大 3138 Nongda 3138	Ⅳ	SY0638	34	辽宁沈阳 Shenyang, Liaoning	黄早四 Huangzaosi	Ⅲ

1 h,EB 染色,在紫外分析仪上检测扩增产物并照相。

1.5 AFLP 标记分析

AFLP 分析参考 Vos 等^[19]流程进行。酶切采用双酶切组合,AFLP 接头,引物由上海生工生物工程技术服务有限公司合成。筛选后的引物组合为 E3/M3、E6/M7、E9/M6、E6/M6、E13/M15、E11/M5、E14/M15、E14/M12、E2/M12、E16/M16、E9/M10、

E8/M10、E5/M11、E3/M2、E3/M1、E2/M16、E11/M4、E2/M16、E4/M12、E15/M5、E1/M13和E13/M12。AFLP 选择性扩增产物于 95 ℃变性 10 min,在 6% 聚丙烯酰胺变性胶上电泳分离,采用银染方法显影。

1.6 统计分析

根据 Nei-Li 相似系数法^[20]求得菌株 i 和 j 之间的相似系数GSij。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 和 AFLP 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 和 AFLP 标记的相似系数矩阵进行 Mantel 检验,进行相关性分析。

2 结果与分析

2.1 扩增结果分析

用条带清晰、多态性高的 9 个通用引物对 34 株玉米丝黑穗病菌进行 UP-PCR 扩增。结果表明,不同引物扩增的条带数存在差异,其中引物 L15 扩增的条带数最多,为 14 条;引物 3-2 扩增条带数最少,

为 10 条。9 个引物共产生了 113 条 DNA 条带,大小分布于 250 ~ 2 000 bp 之间,其中 103 条(91.15%)具有多态性,平均每条引物扩增出 12.6 条带(图 1)。在 9 个引物的扩增图谱中,有两条几乎所有菌株都有的公共带,也有很多特异带,具有明显的遗传分化现象,菌株间存在丰富的遗传多样性。

筛选条带清晰、多态性高的 11 条 ISSR 引物,对供试 34 个菌株 DNA 进行扩增,能扩增出 72 条带,平均每条引物扩增出 6.5 条带,其中 61 条是多态性条带,比率(PPB)为 84.7%,扩增产物片段大小为 100 ~ 2 000 bp。扩增条带最多的是 ISSR18(图 2),共 8 条,最少的是 ISSR15,只扩增出 4 条,而多态性最高的引物是 ISSR5、ISSR7、ISSR13 和 ISSR15,达 100%。

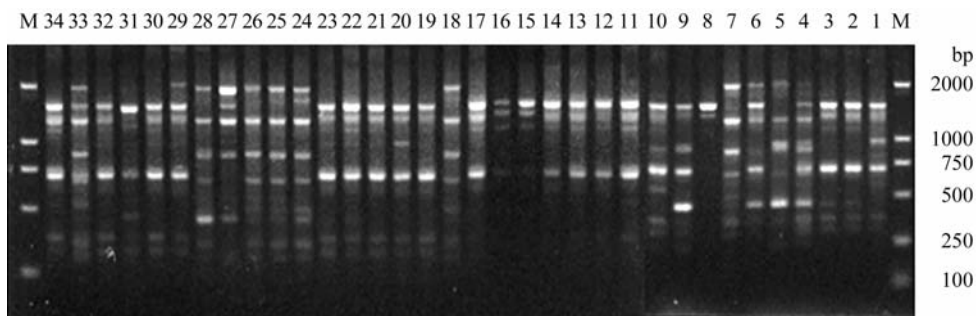


图 1 引物 L15 对玉米丝黑穗病菌的 UP-PCR 扩增图谱

Fig. 1 UP-PCR patterns of *Sporisorium reilianum* by the primer of L15

注:M: Marker DL2000; 1~34: 34 个菌株(见表 1)。Note: M: Marker DL2000; 1-34: isolates listed as in Table 1.

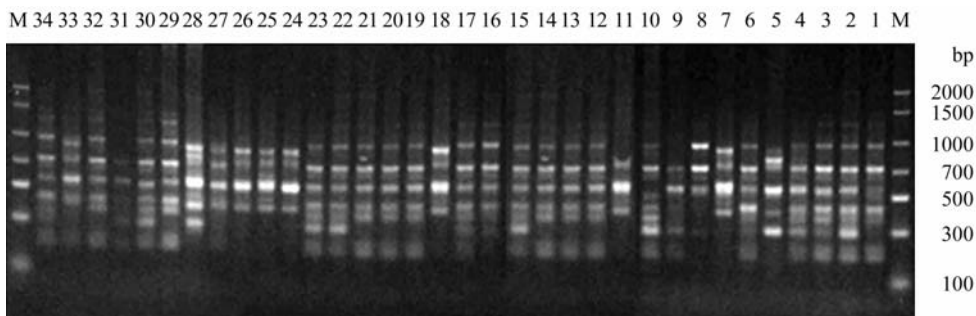


图 2 引物 ISSR18 对玉米丝黑穗病菌的 ISSR 扩增图谱

Fig. 2 ISSR patterns of *Sporisorium reilianum* by the primer of ISSR18

注:M: Marker DL2000; 1~34: 34 个菌株(见表 1)。Note: M: Marker DL2000; 1-34: isolates listed as in Table 1.

22 对引物共扩增出 293 条带,每对引物平均扩增条带 13.3 条,其中多态性条带 244 条,每组引物平均扩增多态性条带 11.1 条,占扩增总带数的 83.27%。条带数最多的引物组合为 E6/M7,共扩增出 25 条;最少的引物组合为 M12/E4,共扩增出 7 条。同一引物扩增出来的图谱菌株之间差异不同,

有的菌株之间差异明显,如 E11/M4 扩增出 14 条,其中有 5 条共同条带,相同遗传位点占 35.71%,说明病菌群体内有一定遗传相似性。图 3 为引物 M12/E13 对部分供试菌株的扩增结果。

2.2 遗传相似性分析

根据 3 种分子标记结果分别计算 34 个菌株间的

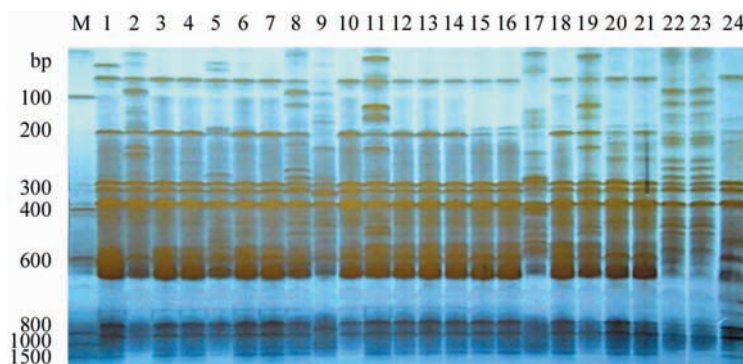


图 3 引物 M12/E13 对玉米丝黑穗病菌的 AFLP 扩增图谱

Fig. 3 AFLP patterns of *Sporisorium reilianum* by the primer combination of M12/E13

Note: M: 100 bp DNA marker; 1: CD0501, 2: JL0604, 3: LY0605, 4: CC0606, 5: SC0607, 6: NM0613, 7: NM0614, 8: SN0615, 9: TY0616, 10: TY0617, 11: DT0620, 12: DT0621, 13: DT0622, 14: HEB0623, 15: JMS0624, 16: SB0625, 17: SB0626, 18: SH0627, 19: JMS0628, 20: BD0629, 21: DL0634, 22: JZ0636, 23: JZ0637, 24: SY0638.

遗传相似系数,其中 UP-PCR 相似系数范围为 0.47 ~ 0.95,平均为 0.71;ISSR 相似系数范围为 0.49 ~ 0.96,平均为 0.72;AFLP 相似系数范围为 0.50 ~ 0.94,平均为 0.72,3 种分子标记方法的平均遗传相似系数基本一致,说明 3 种分子标记技术均能揭示玉米丝黑穗病菌具有丰富的遗传多态性,都显示了玉米丝黑穗病菌菌株之间存在相当程度的遗传分化和遗传差异。对 34 份玉米丝黑穗病菌菌株的 UP-PCR、ISSR 和 AFLP 标记的相似系数矩阵进行 Mantel 检验,得到两两之间相似系数矩阵的相关系数。结果显示,两两矩阵之间呈显著相关 ($P = 0.001 < 0.05$),UP-PCR 和 AFLP 具有较高的相关性,其相关系数 $r = 0.698$;UP-PCR 与 ISSR 相关系数 $r = 0.659$;而 ISSR 与 AFLP 相关性最低,其相关系数 $r = 0.633$ 。

2.3 聚类分析

在 UP-PCR 聚类图中,相似系数 0.72 处做切割线 L_1 时,可将 34 个菌株划分为 6 个类群。UG I、UG III 和 UG V 各只有 1 个菌株,分别为 DL0635、SY0609 和 LY0605,且是 3 个不同的致病类型,与致病类型分组无明显相关性;UG II 包含 BC0503、TA0610、JN0611、JN0612、BD0630、SN0619、YL0608 和 TL0631 共 8 个菌株,占总数的 23.5%,以致病类型 II 和致病类型 IV 为主,其中有 3 个菌株为致病类型 IV,分别为 BC0503、SN0619 和 JN0612,与致病性分组吻合率为 27.3%;UG IV 包括 JMS0628 和 DL0634 两个菌株,都属于致病类型 II,与致病类型分组吻合率为 22.2%;其余 21 个菌株(61.7%)归为 UG VI 类群,此类群包括了弱致病类型 (I + II + III) 的 15 个菌株:CD0501、JL0604、CC0606、SN0615、

TY0616、NM0613、NM0614、JZ0636、JZ0637、SY0638、SB0625、SB0626、DT0621、HEB0623 和 SH0627,分别来自于河北、吉林、辽宁等地,与鉴别寄主划分的致病类型吻合率为 50.0% (图 4)。

ISSR 标记聚类分析结果表明,在相似系数为 0.77 处做切割线 L_2 时,34 个菌株被划分为 5 个类群。IG I 包括 TA0610、JN0611、JN0612、SN0619、BD0630 和 DL0634 共 6 个菌株,占总数的 17.6%,其中 JN0612、SN0619 两个菌株属于致病类型 IV,吻合率为 20%;IG II 中只有 YL0608 一个菌株,为致病类型 I;IG IV 中的 BD0629 为致病类型 V,吻合率为 33.3%;IG III 只包含 LY0605 (致病类型 V) 和 JMS0628 (致病类型 II) 两个菌株,与致病力分组不相关;IG V 包括其余的 24 个菌株,其中弱致病类型 (I + II + III) 18 个:CD0501、JL0604、CC0606、TL0631、SN0615、TY0616、SY0638、JZ0636、NM0613、NM0614、JZ0637、SH0627、JMS0624、SB0625、SB0626、HEB0623、SY0609、DL0635,分别来自河北、吉林、黑龙江等地,与鉴别寄主划分的致病类型有一定相关性,吻合率达到 60.0% (图 5)。

AFLP 标记聚类分析结果表明,在相似系数为 0.7 处做切割线 L_3 时,34 个菌株被划分为 5 个类群 (图 6)。其中 AG I 只包含 1 个来自大连的菌株 DL0635,为致病类型 III;AG II 包括 YL0608、SY0609、TA0610、JN0611、JN0612、SN0619 和 BD0630 7 个菌株,以致病类型 II 和致病类型 IV 为主,其中,与致病类型 IV 相同的有 2 个菌株,分别为 SN0619 和 JN0612,吻合率为 18.2%;AG III 包含 SH0627、JMS0628 和 DL0634 3 个菌株,都属于致病类型 II,

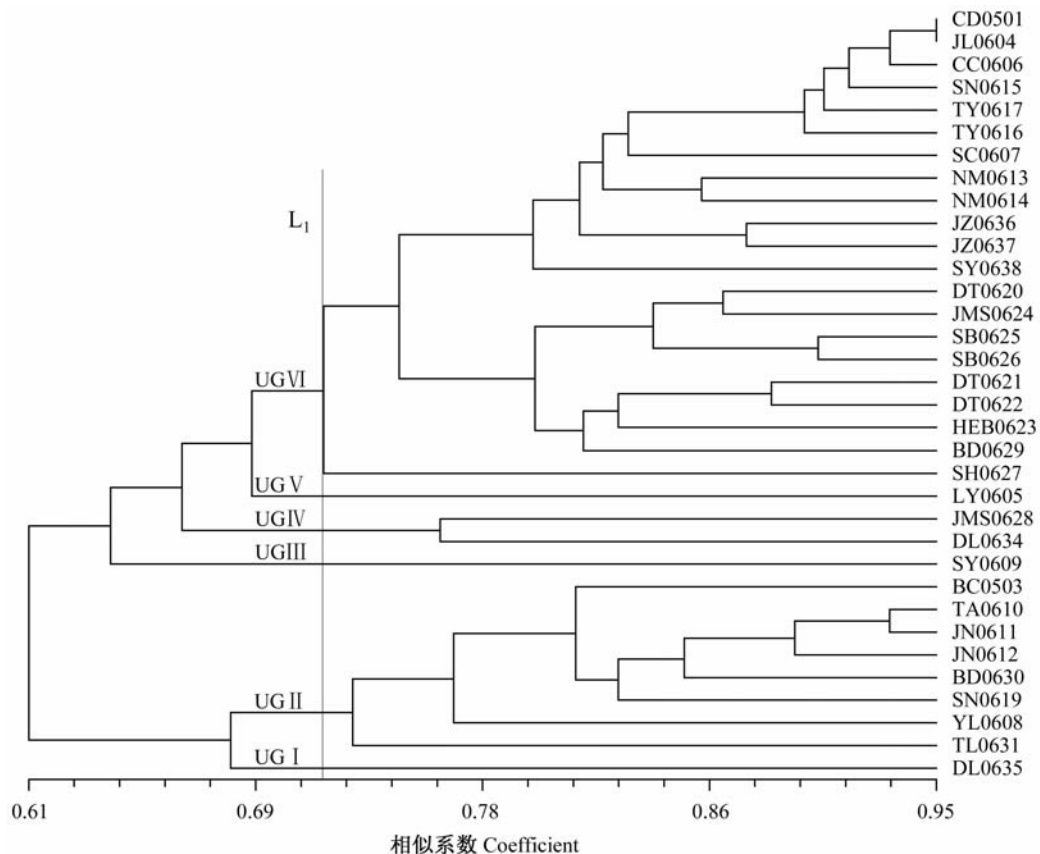


图 4 基于 UP-PCR 分子标记的聚类树状图

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

吻合率为 33.3% ; AG IV 包括 BC0503、JL0604 和 LY0605 3 个菌株,分属于 3 个不同的致病类型,与致病类型分组不相关; AG V 包括了其余的 20 个菌株,占供试菌株的 73.5%,其中属弱致病类型(I + II + III)的 14 个: CD0501、CC0606、NM0614、SN0615、HEB0623、JMS0624、SB0625、SB0626、TY0616、NM0613、TL0631、JZ0636、JZ0637、SY0638,与鉴别寄主划分的致病类型的吻合率为 47.6%。

3 讨论

本试验应用 UP-PCR、ISSR 和 AFLP 分子标记技术对我国玉米丝黑穗病菌 DNA 遗传多样性进行了系统研究。结果表明,3 种分子标记技术均能揭示玉米丝黑穗病菌具有丰富的遗传多样性,且菌株间存在一定的遗传分化现象,这与贺字典等^[21]、马军韬等^[22]利用 RAPD 技术对玉米丝黑穗病菌进行的遗传多态性分析结果一致。本试验所用 3 种分子标记聚类结果相似但不完全相同,可能是由于不同分子标记技术的原理和检测手段不同,所表达的

DNA 水平上的遗传变异也不同,故在分类结果上存在一定差异^[23],因此,将三者综合起来分析,能提供更丰富的信息。通过对 3 种分子标记的遗传相似系数矩阵进行相关性分析,UP-PCR 与 AFLP 具有较高的相关性,但与 AFLP 相比,UP-PCR 费用较低、反应体系具有一定的通用性,且多态条带比率较高(达 91.15%),可作为分析玉米丝黑穗病菌遗传多样性的理想的分子标记方法。此外,本试验还发现 3 种分子标记聚类图中,不同类群内包含了来自多个采样区的菌株,如 AG IV 包括来自河北、吉林、黑龙江等地区的菌株,表明遗传多样性与地理来源没有明显的相关性。

本试验结果表明,3 种分子标记划分的类群与利用鉴别寄主鉴定划分的致病类型之间存在一定的相关性,但分子标记聚类的个别类群与致病性分组相关性不明显,说明 DNA 水平上的变化还不能完全反映所有病菌菌株致病力的分化。原因可能是分子标记技术与菌株本身的整个基因组遗传差异有关,而致病类型则是依据人工接种鉴别寄主通过抗感反

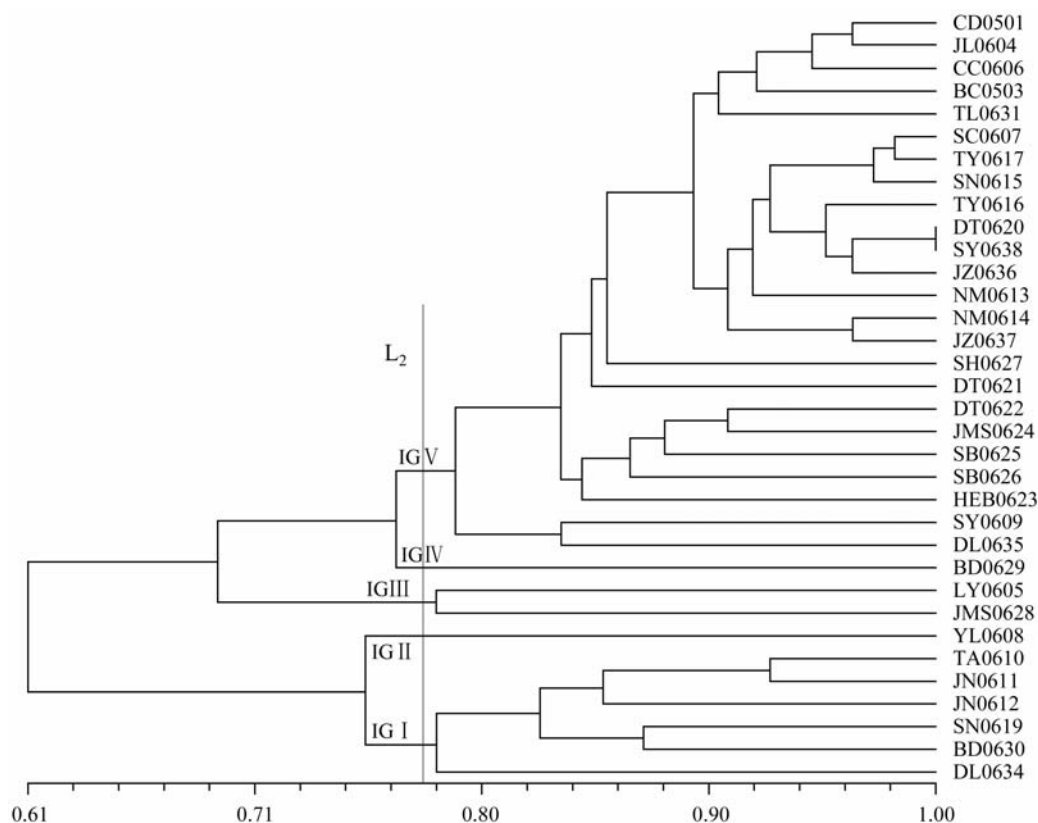


图 5 基于 ISSR 分子标记的聚类树状图

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

应划分的,受鉴别寄主病菌互作、试验条件及人为评判标准的影响,客观上存在误差^[24]。因此,将分子标记技术和传统的植物病理学技术结合起来,有利于更好地监测玉米丝黑穗病菌生理分化,指导玉米抗病育种和品种的合理布局。

3 种分子标记技术对不同地区玉米丝黑穗病菌的 DNA 多态性分析结果显示,菌株间的遗传相似系数范围变化较大,说明玉米丝黑穗病菌具有较高的遗传多样性(变异)。鉴于此,应密切注意其病菌生理分化动态变化。由于病菌数量有限,本试验仅对玉米丝黑穗病菌生理分化进行了初步划分,更细致的划分,还有待深入研究。

参 考 文 献 (References)

- [1] 晋齐鸣, 王晓鸣, 王作英, 等. 东北春玉米区玉米丝黑穗病大发生原因及对策. 玉米科学, 2003(1): 86-87
- [2] 董怀玉, 徐秀德, 姜钰, 等. 辽宁省玉米丝黑穗病发生原因分析及防治建议. 辽宁农业科学, 2003(2): 39-40
- [3] 王晓鸣, 晋齐鸣, 石洁, 等. 玉米病害发生现状与推广品种抗性对未来病害发展的影响. 植物病理学报, 2006, 36(1): 1-11
- [4] 华致甫, 白宝璋, 赵晓军. 玉米丝黑穗菌生理分化的研究. 吉林农业大学学报, 1995, 17(2): 32-37
- [5] 姜钰, 徐秀德, 刘志恒, 等. 玉米丝黑穗病菌种群遗传多样性研究. 沈阳农业大学学报, 2007, 38(4): 522-526
- [6] 刘显君, 王振华, 刘长华, 等. 东北地区玉米丝黑穗病菌类型分化的初步研究. 玉米科学, 2008, 16(6): 103-107
- [7] Bulat S A, Lubeck M, Mironenko N, et al. UP-PCR analysis and ITS1 ribotyping of strains of *Trichoderma* and *Glucocladium*. Mycological Research, 1998, 102(8): 933-943
- [8] Lubeck M, Poulsen H. UP-PCR cross blot hybridization as a tool for identification of anastomosis groups in the *Rhizoctonia solani* complex. FEMS Microbiology Letters, 2001, 201(1): 83-89
- [9] 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, β -tubulin sequences and UP-PCR hybridization analysis. International Journal of Food Microbiology, 2004, 95(3): 267-285
- [10] Zietkiewicz E, Rafalski A, Labuda D. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. Genomics, 1994, 20(2): 176-183

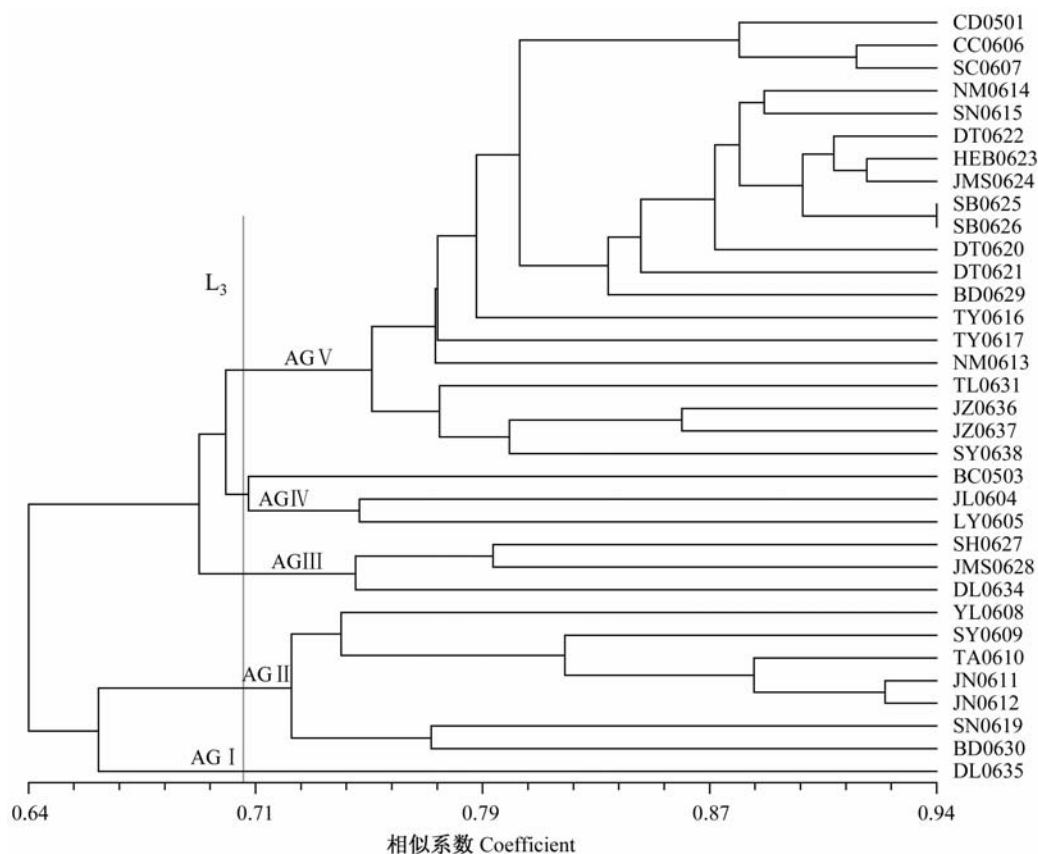


图 6 基于 AFLP 分子标记的聚类树状图

Fig. 6 Dendrogram of the cluster analysis of *Sporisorium reilianum* isolates based on their genetic similarity from AFLP data

- [11] 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. 植物保护学报, 2007, 34(5): 493 - 499
- [12] 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. 植物保护学报, 2008, 35(5): 427 - 432
- [13] Hill M, Witsenboer H, Zabeau M, et al. PCR based fingerprinting using AFLPs as a tool for studying genetic relationships in *Lactuca* spp. Theoretical and Applied Genetics, 1996, 93(8): 1202 - 1210
- [14] Chen H, Yi G J, Xu X B. Identification of the kiwifruit germ plasmas in Jiangxi Province by AFLP and its classification significance. Chinese Journal of Biochemistry and Molecular Biology, 2007, 23(2): 122 - 129
- [15] 段会军, 姬惜珠, 张彩英, 等. 几种瓜类枯萎病菌专化型的 AFLP 分析. 河北农业大学学报, 2005, 28(5): 71 - 74
- [16] 侯晓强, 范永山, 董金皋, 等. 玉米大斑病菌有性杂交 F1 代菌株的生理小种鉴定和 AFLP 分析. 植物保护学报, 2006, 33(3): 257 - 262
- [17] 张小飞, 高增贵, 庄敬华, 等. 玉米丝黑穗病菌致病性分化研究. 玉米科学, 2010, 18(2): 100 - 103
- [18] 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. 植物保护, 2009, 35(2): 95 - 98
- [19] Vos P, Hogers R, Bleeker M, et al. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. Nucleic Acids Research, 1995, 23(21): 4407 - 4414
- [20] Nei M, Li W H. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1979, 76(10): 5269 - 5273
- [21] 贺字典, 陈捷, 高增贵, 等. 玉米丝黑穗病菌 DNA 多态性的初步研究. 玉米科学, 2007, 15(4): 133 - 136
- [22] 马军韬, 王殿修, 宫秀杰, 等. 6 省区玉米丝黑穗病菌遗传多样性分析. 玉米科学, 2008, 16(6): 139 - 143
- [23] 袁力行, 傅骏骅, Warburton M, 等. 利用 RFLP、SSR、AFLP 和 RAPD 标记分析玉米自交系遗传多样性的比较研究. 遗传学报, 2000, 27(8): 725 - 733
- [24] 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. 菌物学报, 2008, 27(2): 267 - 276