

玉米大斑病菌 ISSR 反应体系的优化 和遗传多样性分析

谷守芹¹ 范永山^{1,2} 李坡¹ 董金皋^{1*}

(1. 河北农业大学真菌毒素实验室, 保定 071001; 2. 唐山师范学院生命科学系, 唐山 063000)

摘要: 以玉米大斑病菌基因组 DNA 为模板, 采用单因素水平优化的方法对 DNA 聚合酶的来源及浓度、引物浓度、dNTPs 浓度、DNA 模板浓度、 T_m (退火温度)、PCR 反应循环数等重要参数进行摸索和优化, 建立了玉米大斑病菌 ISSR-PCR 优化反应体系, 并从 40 条 ISSR 引物中筛选出 9 条多态性较好的 ISSR 引物。对来自河北、河南、辽宁等玉米主产区的 44 个菌株进行 ISSR 分析表明, ISSR 标记在我国玉米大斑病菌中存在较高的多态性, 多态性条带占 40.3%。聚类分析显示, 在阈值为 0.8 时菌株被分为 7 个类群。对 ISSR 揭示的玉米大斑病菌的遗传多样性与菌株交配型、地理来源之间的关系进行分析, 结果显示菌株的遗传多样性与交配型间的关系密切, 而与其地理来源无明显相关性。

关键词: 玉米大斑病菌; 简单重复序列区间; 影响条件; 遗传多样性

Optimization of ISSR reaction and genetic diversity analysis of *Exserohilum turcicum*

Gu Shouqin¹ Fan Yongshan^{1,2} Li Po¹ Dong Jingao^{1*}

(1. Mycotoxin Laboratory Agricultural University of Hebei, Baoding 071001, Hebei Province, China; 2. Life Science Department, Tangshan Teacher's College, Tangshan 063000, Hebei Province, China)

Abstract: By means of the single-factor experiments and using DNA of *Exserohilum turcicum* as the template, a suitable ISSR-PCR amplification system was established and optimized in the *Taq* DNA polymerase source and concentration, primers, dNTPs concentration, concentration of DNA template, melting temperature (T_m) and the number of amplification cycles. Among the 40 ISSR primers tested in the research, 9 polymorphic primers were screened to study the genetic diversity between 44 isolates of *E. turcicum* coming from the major corn planting areas in China. 40.3% polymorphic bands were amplified among the tested isolates, indicating the high genetic diversity in the population of *E. turcicum* in China. The dendrogram based on ISSR results revealed that the 44 isolates were clustered into seven groups at the threshold of genetic similar coefficient 0.8, which proved that the genetic diversity was evidently correlated with mating types, and there was no distinct relation between the fungal genetic diversity and their geographic distribution.

Key words: *Exserohilum turcicum*; inter-simple sequence repeat (ISSR); affecting factors; genetic diversity

基金项目: 国家自然科学基金项目(30471126)

作者简介: 谷守芹, 女, 1967年生, 副教授, 主要从事植物分子病理学研究, email: gushouqin@126.com

* 通讯作者(Author for correspondence), email: dongjingao@126.com

收稿日期: 2008-03-28

玉米大斑病(northern corn leaf blight)是玉米重要的叶部病害,在我国主要分布于北方和高海拔山区等冷凉玉米种植区,常造成严重的经济损失^[1-2]。引起玉米大斑病的病原菌为大斑突脐孢 *Exserohilum turcicum* (Pass.) Leonard et Suggs, 属半知菌亚门真菌。

迄今为止,已有多种 DNA 分子标记技术被广泛应用于群体遗传多样性的研究,如限制性片段长度多态性(restriction fragment length polymorphism, RFLP)、随机扩增多态性(random amplified polymorphism DNA, RAPD)、微卫星(microsatellite)或 SSR (simple sequence repeat)和扩增限制性片段多态性分析(amplified fragment length polymorphism, AFLP)等^[3-7]。

目前,在对玉米大斑病菌的研究中已经应用的 DNA 分子标记技术主要有 RAPD 和 AFLP^[8-9]。RAPD 标记多态性较好,但存在稳定性差、假阳性高的缺陷。AFLP 标记多态性很高,但其操作程序复杂、费用较高。这些多态性分子标记技术在玉米大斑病菌群体遗传多样性研究中均有一定的局限性。寻找一种高效、稳定、实用的分子标记技术对研究玉米大斑病菌群体遗传多样性具有重要意义。简单重复序列区间(inter-simple sequence repeat, ISSR)分析是一种基于简单重复序列(SSR)的分子标记技术^[10-11],是以一条在 SSR 序列 3'或 5'端加 1~3 个锚定核苷酸的寡聚核苷酸为引物,对位于反向排列的 SSR 之间的 DNA 序列进行 PCR 扩增。该技术具有引物设计简单、重复性强、操作过程简便、无需使用同位素、可以揭示更高层次的 DNA 多态性等优点^[12]。

近几年,ISSR 分子标记越来越多的被用来分析植物病原真菌的遗传多样性^[13-14]。但国内外尚未见利用 ISSR 分子标记技术研究玉米大斑病菌遗传多样性的报道。作者对影响 ISSR-PCR 反应体系的重要因素进行系统研究,建立并优化玉米大斑病菌 ISSR 分析体系,以期明确菌群内的遗传多样性。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种及其培养

供试玉米大斑病菌菌株共 44 个,分别来自河北、河南、辽宁、黑龙江、山东、四川、吉林等 7 个玉米主产区(表 1),由河北农业大学真菌毒素实验室保

存。将供试菌株接种到 PDA 平皿上,25℃ 黑暗培养约 10 天,待菌落长满平皿时用直径 5 mm 打孔器打取菌盘,将菌盘接入 150 mL 改良 Fries 培养基内,每瓶 5~6 个菌盘,25℃ 100 r/min 黑暗振荡培养 10 天。滤去培养液,用灭菌水冲洗菌丝,吸水纸吸干水分后,将菌丝置于 -80℃ 超低温冰箱保存备用。

1.1.2 试剂及引物

Taq DNA 聚合酶分别购于 Promega 公司(M1665s)、TaKaRa 公司(DR100A)和上海生工生物工程公司(ET-101)。dNTPs、DNA marker 等购于上海生工生物工程公司。用于 ISSR-PCR 分析的 40 条 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(<http://www.michaelsmith.ubc.ca>)中选出,并由上海生工生物工程公司合成。

1.2 方法

1.2.1 菌株 DNA 提取

对 44 个已经纯化的菌株进行扩繁,收集菌丝用于基因组 DNA 的提取。DNA 的提取采用 CTAB 法^[15],提取的 DNA 用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测,用紫外分光光度法测定 DNA 质量和浓度,OD₂₆₀/OD₂₈₀ 值在 1.8~2.0 之间说明 DNA 纯度较高,符合试验要求。

1.2.2 ISSR-PCR 反应体系的优化

选用的 DNA 模板均为菌株 9921 的基因组 DNA,ISSR 引物为 113:(AG)₈TC。在 25 μL ISSR 反应体系中,*Taq* DNA 聚合酶用量分别为 0.5、0.75、1.0、1.5 U;引物浓度梯度为 0.2、0.5、0.6、0.8 μmol/L;DNA 模板浓度梯度为 10、20、30、40、50 ng; dNTPs 浓度梯度为 0.05、0.1、0.2、0.3、0.4 mmol/L。ISSR 扩增程序为:95℃ 预变性 3 min; 94℃ 变性 30 s, 48℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 2 min, 循环 30、35、40 或 45 次;最后 72℃ 延伸 10 min, 4℃ 保存。取 6 μL PCR 扩增产物上样,用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳分离,EB 染色,在 BioRad 凝胶成像系统、Quantity One 软件辅助下分析检测并照相。

1.2.3 引物筛选和基于 ISSR-PCR 的遗传多样性分析

利用优化的 ISSR 反应体系和扩增条件对 40 条 ISSR 引物进行比较,筛选多态性较强的引物,并确定其适宜的退火温度。用多态性较好的引物对所有供试菌株进行 ISSR 扩增。

对电泳谱带进行统计,有带记为 1,无带记为 0。

表 1 供试菌株特征

Table 1 The characteristics of isolates used in the experiment

组别* 菌株	地理来源	生理小种	交配型	组别* 菌株	地理来源	生理小种	交配型	
Group Isolate	Geographical source	Physiological race	Mating type	Group Isolate	Geographical source	Physiological race	Mating type	
IGI	9911 河北赤城 Chicheng, Hebei	2	a	IGII	9940 辽宁灿岩 Canyon, Liaoning	12	A	
	9961 河北蔚县 Weixian, Hebei	1	a		20 河北保定 Baoding, Hebei	2	A	
	0130 辽宁凌源 Lingyuan, Liaoning	1	a	IGIII	0127 吉林白城 Baicheng, Jilin	1	Aa	
	9950 辽宁抚顺 Fushun, Liaoning	0	A		0117 吉林安图 Antu, Jilin	13	A	
	0306 河北兴隆 Xinglong, Hebei	0	Aa		0122 河北宽城 Kuancheng, Hebei	N	a	
	0316 河北丰宁 Fengning, Hebei	123N	Aa	0129 河北承德 Chengde, Hebei	2	a	IGIV	
	0115 河南灵宝 Lingbao, Henan	13	A	9921 河北保定 Baoding, Hebei	1	a		
	0109 辽宁普兰店 Pulandian, Liaoning	2	A	9952 河北迁安 Qian'an, Hebei	1	a		
	0110 河北涞源 Laiyuan, Hebei	0	A	0112 河北涞源 Laiyuan, Hebei	0	a		
	0323 河北保定 Baoding, Hebei	1	A	0322 河北遵化 Zunhua, Hebei	23	A		
	0301 辽宁凌源 Lingyuan, Liaoning	1	A	0181 河北保定 Baoding, Hebei	2	a		
	9926 河北饶阳 Raoyang, Hebei	1N	A	0320 四川广元 Guangyuan, Sichuan	23N	A		
	9924 辽宁喀左 Kazuo, Liaoning	0	a	0311 河北承德 Chengde, Hebei	1	Aa		
	0121 黑龙江牡丹江 Mudanjiang, Heilongjiang	12	A	0312 黑龙江牡丹江 Mudanjiang, Heilongjiang	123	Aa		
IGII	9940 山东济宁 Jining, Shandong	2	A	0313 河北易县 Yixian, Hebei	0	Aa		
	9934 山东诸城 Zhucheng, Shandong	1N	A	IGV	0104 河北保定 Baoding, Hebei	3		A
	9902 河北保定 Baoding, Hebei	2	a		0102 辽宁宽甸 Kuandian, Liaoning	0		Aa
	0124 河北大城 Dacheng, Hebei	1	A	0107 河北磁县 Cixian, Hebei	0	a		
	9941 山东栖霞 Qixia, Shandong	1	a	IGVI	9954 河北保定 Baoding, Hebei	0		a
	9915 河北宣化 Xuanhua, Hebei	1	A		9914 河北宣化 Xuanhua, Hebei	13	A	
	9918 河北定州 Dingzhou, Hebei	3	A		0307 河北保定 Baoding, Hebei	1	a	
	9956 山东平度 Pingdu, Shandong	0	A	IGVII	0123 辽宁新宾 Xinbin, Liaoning	1	a	

注: * ISSR 聚类分析结果。Note: * The cluster results based on ISSR analyses.

计算多态性条带所占比例,并利用 DPS 数据处理系统进行遗传相似系数测定和 UPGMA 聚类分析,建立聚类树状图,同时分析聚类结果与菌株来源、生理小种及菌株交配型之间的关系。

2 结果与分析

2.1 ISSR-PCR 反应体系的优化

3 种 *Taq* DNA 聚合酶在扩增谱带数目上无明显差异,说明只是酶的活性存在一定差异,对扩增结果没有明显影响。对 *Taq* DNA 聚合酶量进行的分析表明,在 25 μ L 反应体系中加入 1.0 U 的 *Taq* DNA 聚合酶即可获得清晰、稳定的扩增条带(图 1)。在所设置的 4 个引物浓度梯度内,均能扩增出条带,在浓度为 0.6 μ mol/L 时扩增出的条带清晰、丰富、重复性较好(图 2)。dNTPs 的浓度也对扩增有一定影响,除浓度为最低的 0.05 mmol/L 时扩增的条带很弱外,其余浓度均能扩增出条带,在浓度为 0.2 mmol/L

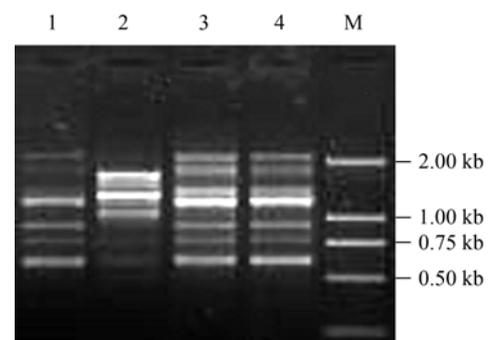


图 1 *Taq* DNA 聚合酶浓度对玉米大斑病菌 ISSR-PCR 反应的影响

Fig. 1 Effects of *Taq* DNA polymerase concentrations on ISSR reaction of *Exserohilum turcicum*

注:1~4 为 *Taq* DNA 聚合酶浓度 0.5、0.75、1.0、1.5 U; M: DNA 分子量标记 DL 2000。Note: 1-4, *Taq* DNA polymerase concentrations 0.5, 0.75, 1.0 and 1.5 U, respectively; M, DNA marker, DL 2000.

时扩增出的条带较丰富、清晰、重复性较好。在5个DNA浓度梯度中均能产生有效的扩增,在25 μL 反应体系中DNA模板用量为30 ng时扩增出的条带明亮、清晰。试验所设置的4个循环数均能检测到扩增条带,其中30次和35次循环扩增的谱带有较高的亮度和清晰度,40次和45次循环导致一些谱带亮度过强,掩盖了临近的弱带(图3)。综合以上试验结果,最终确定ISSR引物113的适宜反应体系,即25 μL 反应体系中含0.2 mmol/L dNTPs, 0.6 $\mu\text{mol/L}$ 引物, 1.0 U *Taq* DNA聚合酶, 1 \times PCR反应缓冲液(Mg^{2+} plus), 30 ng DNA为模板;扩增程序为:94 $^{\circ}\text{C}$ 3 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 48 $^{\circ}\text{C}$ 1 min, 72 $^{\circ}\text{C}$ 2 min, 30~35个循环;72 $^{\circ}\text{C}$ 10 min。

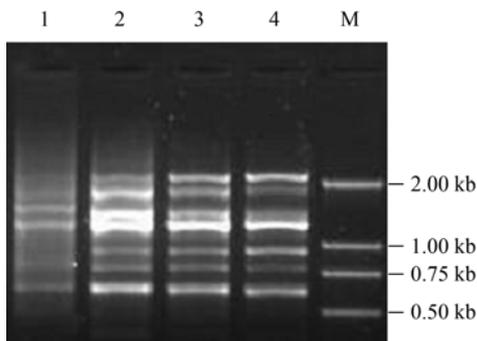


图2 引物浓度对玉米大斑病菌ISSR反应的影响

Fig. 2 Effect of primer concentrations on ISSR reaction of *Exserohilum turcicum*

注:1~4为引物浓度0.2、0.5、0.6、0.8 $\mu\text{mol/L}$; M: DNA分子量标记DL 2000。Note: 1-4, primer concentrations 0.2, 0.5, 0.6, and 0.8 $\mu\text{mol/L}$, respectively; M, DNA marker, DL 2000.

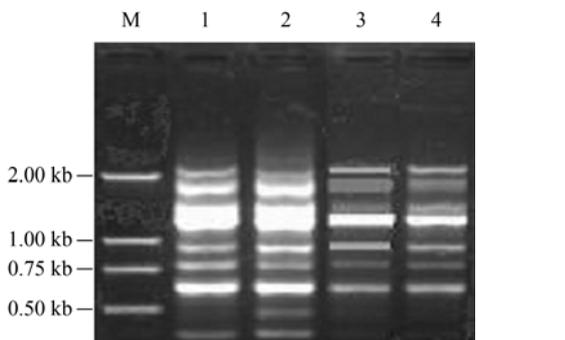


图3 反应循环数对玉米大斑病菌ISSR-PCR反应的影响

Fig. 3 Effect of cycle number on ISSR-PCR of *Exserohilum turcicum*

注:1~4为ISSR-PCR反应循环数45、40、35、30; M: DNA分子量标记DL 2000。Note: 1-4, cycle number 45, 40, 35, 30 respectively; M, DNA marker, DL 2000.

2.2 引物的筛选及菌株的ISSR-PCR扩增

退火温度是影响PCR扩增的重要因素之一,一般情况下,退火温度偏低,背景模糊、弱带较多;而退火温度偏高,片段少,不利于长片段的扩增。利用针对引物113的优化ISSR-PCR扩增反应条件对其它供试引物进行筛选,发现114、125和131等8条引物未产生扩增条带,103、102、107等10条引物扩增出的谱带弱且弥散,115、133、141等13条引物扩增出的谱带偏弱,而101、104、105等9条引物(表2)扩增产生的谱带清晰、稳定,通过摸索不同引物的适宜退火温度,扩增产生的谱带数都在5条以上。用筛选出的9条适宜引物,采用以上优化的ISSR-PCR体系,对44份供试菌株的基因组DNA进行ISSR-PCR扩增。结果表明,扩增条带分子量均在500~2000 bp之间,9条ISSR引物共扩增出62条谱带,平均每条引物扩增出6.89条带,其中存在多态性的条带数为25条,多态性条带比例为40.3%。表明玉米大斑病菌菌株存在丰富的遗传多样性,ISSR标记可以很好地揭示供试菌株间的遗传差异和亲缘关系。

表2 适宜玉米大斑病菌遗传多样性分析的ISSR引物

Table 2 Suitable primers for ISSR analysis of *Exserohilum turcicum*

引物编号 Primer no.	引物序列5'~3' Sequence of primer 5'-3'	退火温度($^{\circ}\text{C}$) Annealing temperature
101	CTCTCTCTCTCTCTCT	45.9
104	ATGATGATGATGATGATG	45.2
105	GGATGGATGGATGGAT	48.0
112	AGAGAGAGAGAGAGACTA	52.0
113	AGAGAGAGAGAGAGACTC	54.0
116	GTGCTGCTGCTGCTGCTG	60.0
117	AGAAGAAGAAGAAGAAGA	56.0
118	GTCGTCGTCGTCGTCGTC	59.5
121	GTCCGTCGTCGTCGTC	61.8

2.3 基于ISSR的玉米大斑病菌遗传多样性分析

统计稳定清晰的谱带,进行聚类分析,建立树状图(图4)。供试菌株在阈值为0.8时,可分为7个类群(表1)。其中,IGI包括14个菌株,占总数的31.8%;IGII包括10个菌株,占22.7%;IGIII包括4个菌株,占9.1%;IGIV包括9个菌株,占20.5%;IGV包括3个菌株,占6.8%;IGVI包括3个菌株,占6.8%;IGVII包括1个菌株,占2.3%。进一步分

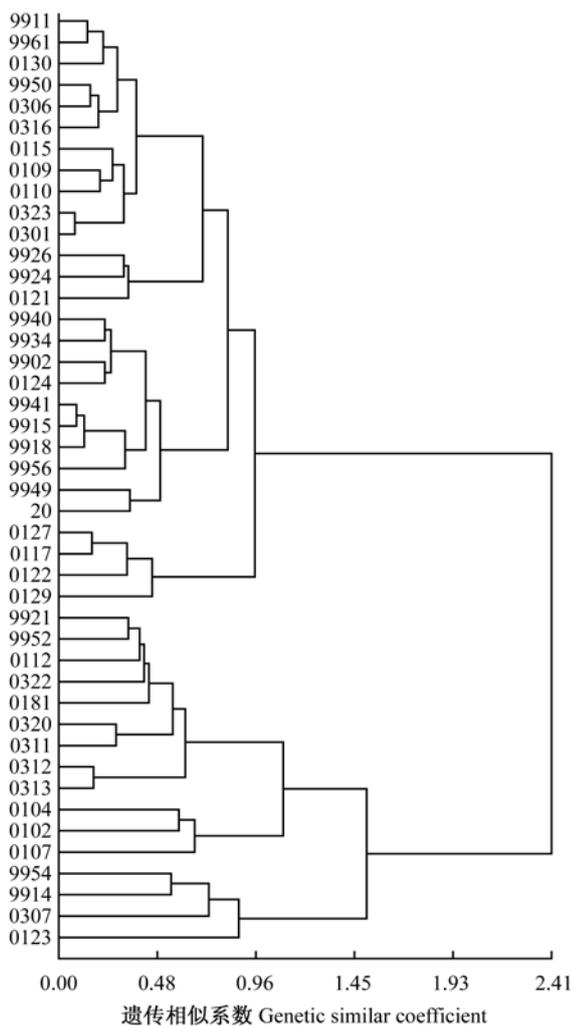


图 4 玉米大斑病菌基于 ISSR-PCR 的聚类分析结果

Fig. 4 Cluster analysis of *Exserohilum turcicum* based on ISSR-PCR

析发现,来自同一地区的菌株被划分在不同的类群中,所以基于 ISSR 多态性划分的玉米大斑病菌菌株类群与菌株地理来源之间没有明显的相关性。在研究中还发现,玉米大斑病菌的 IGs 与生理小种之间也没有明显的相关性,1 号小种分布在除 IGV、IGVII 以外的 5 个 IG 群中,仍是优势小种。从聚类结果中可以看出,同一种交配型的菌株大半部分聚在一起,从某种程度上反映了菌株的交配型与遗传多样性间在分子水平上存在一定的联系。

3 讨论

确定 ISSR-PCR 反应的退火温度是决定试验成败的关键因素之一。通常 PCR 反应中的退火温度比引物的 T_m 值低 5 ~ 10 °C,但本研究发现玉米大斑病菌 ISSR 反应的适宜退火温度与引物的 T_m 值之

间关系并不完全一致,有些引物的适宜退火温度与 T_m 值相差 1 ~ 2 °C,如 104、105;有些引物的适宜退火温度比 T_m 值高,如 121;有的引物适宜退火温度与 T_m 值相同,如 113。这可能是由于引物本身 GC 含量不同、引物内或引物间分子作用力大小不同所致^[16]。

为确保 ISSR-PCR 结果的可靠性及可重复性,当首次在某生物上应用该项技术时应对其 ISSR-PCR 分析体系进行优化^[16]。本研究选择了影响 ISSR-PCR 的重要因素进行系统研究,如退火温度、*Taq* DNA 聚合酶及其浓度、引物浓度、dNTPs 浓度、DNA 模板量、循环次数等,分别进行单因素 4 ~ 6 个水平试验,建立 ISSR 反应的优化体系。该体系的建立为进一步在 DNA 分子水平上对玉米大斑病菌的遗传变异、生理分化以及遗传变异与致病性分化之间关系的研究提供了又一种技术手段。

Borchardt 等^[17-18]利用 RAPD 分子标记技术对欧洲中部及热带地区的玉米大斑病菌菌群结构进行了研究,发现大部分菌株表现了较高的寄生适合度和稳定的迁移性,同时发现菌群间存在丰富的遗传多样性,来自同一地域的菌株较来自不同地域的菌株间存在更为密切的亲缘关系。Ferguson 等^[19]也利用 RAPD 标记,分析了美国东部地区玉米大斑病菌的菌群结构,结果表明,区域内的遗传多态性改变明显大于地域外。本试验应用 ISSR 分子标记技术对中国玉米大斑病菌 DNA 遗传多样性进行了系统研究,发现 ISSR 分子标记与供试菌株的地理来源和生理小种归属没有明显的相关性,这可能是由于 ISSR 分子标记是根据菌株本身的遗传差异建立的,而生理小种是依据人工接种鉴别寄主通过抗感反应划分的,受鉴别寄主-病菌互作、试验条件及人为评判标准的影响,客观上存在着自然规律和人为行为的误差。本研究发现,玉米大斑病菌 DNA 遗传多样性与菌株的交配型之间存在一定程度的相关性,从理论上讲,菌株的交配型是受 DNA 分子上特定基因控制的,二者之间一定存在某种必然联系。但由于本研究主要是对所建立的体系的检测,采用的群体较小,因此,有必要进一步深入研究 ISSR 分析和菌株交配型所揭示的玉米大斑病菌多样性的关系。同时,在后续的工作中应对供试菌株的其它特性如产毒特性及致病性作进一步研究,以期对获得的 ISSR 分子标记的遗传信息作进一步诠释。

参考文献(References)

- [1] Raymundo A D, Hooper A L. Measuring the relationship between northern corn leaf blight [*Helminthosporium turcicum*] and yield losses. *Plant Disease*, 1981, 65(4): 325 - 327
- [2] Perkins J M, Pederson W L. Disease development and yield losses associated with northern leaf blight on corn. *Plant Disease*, 1987, 71(1): 940 - 943
- [3] Mukai Y, Suyama Y, Tsumura Y, et al. A linkage map for sugi (*Cryptomeria japonica*) based on RFLP, RAPD, and isozyme loci. *Theoretical and Applied Genetics*, 1995, 90(6): 835 - 840
- [4] Bai D, Brandle J, Reeleder R. Genetic diversity in North American ginseng (*Panax quinquefolius* L.) grown in Ontario detected by RAPD analysis. *Genome*, 1997, 40(1): 111 - 115
- [5] Jiang H F, Liao B S, Ren X P, et al. Comparative assessment of genetic diversity of peanut (*Arachis hypogaea* L.) genotypes with various levels of resistance to bacterial wilt through SSR and AFLP analyses. *Journal of Genetics and Genomics*, 2007, 34(6): 544 - 554
- [6] 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
- [7] Chen H, Yi G J, Xu X B. Identification of the kiwifruit germplasms in Jiangxi Province by AFLP and its classification significance. *Chinese Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 2007, 23(2): 122 - 129
- [8] 桂秀梅, 张金林, 董金皋, 等. 玉米大斑病菌 RAPD 分析最佳反应体系的建立. *河北农业大学学报*, 2005, 28(1): 56 - 61
- [9] 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
- [10] Ziekiewicz E, Rafalski A, Labuda D. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR) - anchored polymerase chain reaction amplification. *Genomics*, 1994, 20(2): 176 - 183
- [11] Sánchez de la Hoz M P, Dávila J A, Loarce Y, et al. Simple sequence repeat primers used in polymerase chain reaction amplification to study genetic diversity in barley. *Genome*, 1996, 39(1): 112 - 117
- [12] McGregor C E, Lambert C A, Greyling M M, et al. A comparative assessment of DNA fingerprinting techniques (RAPD, ISSR, AFLP and SSR) in tetraploid potato (*Solanum tuberosum* L.) germplasm. *Euphytica*, 2000, 113(2): 135 - 144
- [13] Mishra P K, Tewari J P, Clear R M, et al. Genetic diversity and recombination within populations of *Fusarium pseudograminearum* from western Canada. *Microbiology*, 2006, 9(1): 65 - 68
- [14] Pawlowska T E. Genetic processes in arbuscular mycorrhizal fungi. *FEMS Microbiology Letters*, 2005, 251(2): 185 - 192
- [15] Stewart C N, Via L E. A rapid CTAB DNA isolation technique useful for RAPD fingerprinting and other PCR applications. *BioTechniques*, 1993, 14(5): 748 - 749
- [16] 代红艳, 张志宏, 周传生, 等. 山楂 ISSR 分析体系的建立和优化. *果树学报*, 2007, 24(3): 313 - 318
- [17] Borchardt D S, Welt H G, Geiger H H. Molecular marker analysis of European *Setosphaeria turcica* populations. *European Journal of Plant Pathology*, 1998, 104(6): 611 - 617
- [18] Borchardt D S, Welt H G, Geiger H H. Genetic structure of *Setosphaeria turcica* populations in tropical and temperate climates. *Phytopathology*, 1998, 88(4): 322 - 329
- [19] Ferguson L M, Carson M L. Spatial diversity of *Setosphaeria turcica* sampled from the eastern United States. *Phytopathology*, 2004, 94(8): 892 - 900