

# 东北小麦白粉菌遗传多样性及其地域关联性分析

朱桂清,迟文娟,吴限鑫,曹远银\*  
(沈阳农业大学 植物保护学院,辽宁 沈阳 110866)

**摘要:**利用 ISSR 分子标记技术,分析从辽宁春麦区及山东、河南、湖北冬麦区收集并鉴定的 26 个小麦白粉菌生理小种的遗传多态性,并探讨菌株遗传多态性与其来源地的关联性。用 18 条 ISSR 引物对各小种的 DNA 进行扩增,其中 8 条引物能产生稳定的多态性图谱。多态性聚类分析结果显示,26 个小麦白粉菌菌株可聚为 4 类,菌株的 DNA 多态性与其毒性多态性之间存在一定程度的关联性。依据 ISSR 聚类分析结果,辽宁春麦区和其他 3 省的优势小种、次优势小种按相应类群聚在一起,尤其是主要小种 11 号、411 号与近邻山东冬麦区的小种聚为一类。说明东北春麦区小麦白粉病菌与南部冬麦区尤其是山东的小麦白粉病菌具有较高的亲缘关系,为东北春麦区白粉病初菌源来自山东等南部冬麦区的早期推论提供了 DNA 分子佐证。

**关键词:**小麦白粉菌;简单重复序列间扩增;遗传多样性;地域相关性

**中图分类号:** S435.121      **文献标志码:** A      **文章编号:** 1004-3268(2015)03-0077-06

## Analysis of Genetic Diversity and Geographic Relationship of *Blumeria graminis* f. sp. *tritici* in Northeastern Wheat Region

ZHU Guiqing,CHI Wenjuan,WU Xianxin,CAO Yuanyin\*  
(College of Plant Protection,Shenyang Agricultural University,Shenyang 110866,China)

**Abstract:** The genetic diversity of 26 *Blumeria graminis* f. sp. *tritici* races collected from Liaoning spring wheat region and Shandong, Henan and Hubei winter wheat regions was analyzed by ISSR (inter-simple sequence repeat)-PCR, and the relationship with their geographic sources was also explored. During 18 random primers used, eight primers could produce stable DNA polymorphism map. According to the DNA polymorphism cluster analysis, 26 races clustered into four groups. To some extent, the correlation existed between virulence polymorphism and DNA polymorphism of *Blumeria graminis* from above four provinces. Based on the DNA polymorphism cluster analysis result, the most predominant races and the sub-predominant races from the above regions could come together into same clusters, especially the most predominant races 11 and 411 of Liaoning and Shandong provinces. The above molecular evidence indicated a high phylogenetic relationship between the population of *Blumeria graminis* in northeast spring wheat region and those in Hubei, Henan, especially Shandong winter wheat regions, supporting the early speculation that the initial inoculum source of wheat powdery mildew in northeast spring wheat region comes from Shandong province and other southern winter wheat regions.

**Key words:** *Blumeria graminis* f. sp. *tritici*; ISSR; genetic diversity; geographic relationship

小麦白粉菌 (*Blumeria graminis* f. sp. *tritici*) 引起的小麦白粉病是我国小麦生产上最严重的病害之一<sup>[1-2]</sup>。长期以来,鉴别寄主一直是鉴定小麦白粉菌生理小种及毒性基因类别和分析病原菌群体毒力

收稿日期:2014-08-29  
基金项目:国家公益性行业(农业)科研专项(2013016);国家 973 课题(2013CB127701);国家十二五科技支撑计划(2012BAD19B04)  
作者简介:朱桂清(1959-),女,辽宁沈阳人,高级实验师,本科,主要从事小麦病害研究。E-mail:zhugq1959@126.com  
\* 通讯作者:曹远银(1955-),男,湖南澧县人,研究员,博士,主要从事植物免疫学研究。E-mail:caoyy66@aliyun.com

演化的最基本手段<sup>[3]</sup>,但随着分子生物学技术的发展,DNA 分子标记技术在小麦白粉菌群体演化研究中显示了更高的可靠性<sup>[4-6]</sup>。就国内而言,多种 DNA 分子标记技术在省内和省间小麦白粉菌的种群进化分析中发挥了重要作用。魏松红等<sup>[7]</sup>利用可得到稳定图谱的 11 条引物对 1999、2000 年小麦白粉病菌的生理小种进行了 RAPD(随机扩增多态性 DNA 标记)分析鉴定,扩增结果可将供试菌系区分开来。霍云凤等<sup>[8]</sup>用 AFLP(扩增片段长度多态性)标记分析了河南省小麦白粉菌群体的遗传多样性。赵紫慧等<sup>[9]</sup>利用 SSR(简单重复序列)标记分析了山东和河北两省小麦白粉菌的遗传多样性,发现遗传变异主要发生在群体内部,省间菌株存在一定的遗传分化。Zietkiewicz 等<sup>[10]</sup>提出的 ISSR(简单重复序列间扩增)标记技术因经济简便在植物病原菌的遗传进化分析中一直被广泛应用,如蒙进芳等<sup>[11]</sup>利用该技术分析了华山松对疱锈菌感病性的遗传特征,王子迎等<sup>[12]</sup>分析了我国和美国大豆疫霉群体的遗传结构,李海莲<sup>[13]</sup>分析了我国不同地区的 14 个茄子黄萎病菌株系的 DNA 指纹,Zhou 等<sup>[14]</sup>对葡萄座腔菌的种和相应的渐变态真菌进行了 DNA 指纹区分。贾少锋等<sup>[15]</sup>则利用中国农业科学院植物保护研究所白粉病研究组所保存的小麦白粉菌群体的 33 个菌株开发设

计了 ISSR 引物,并分析了其多态性,结果表明,供试小麦白粉菌群体存在较高的多态性。

东北春麦区小麦白粉菌被认为来自山东胶东半岛冬麦区<sup>[1]</sup>,但这个结论是根据高空降雨云图资料推断得出的,尚未取得直接证据。为了明确东北毗邻的南部冬麦区与东北春麦区两地间的小麦白粉菌种群的 ISSR 多态性相似性比较结果是否能为上述结论提供 DNA 水平的直接佐证,本研究收集了东北春麦区及山东、河南、湖北冬麦区的小麦白粉菌种群的 223 个菌株,选取其中 26 个有代表性的菌株,开展了 ISSR 多态性与其来源地的关联性分析研究。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 小麦白粉菌株 26 个供试菌株(表 1)来源于 2007、2008 年田间采集的小麦白粉病菌,经单孢子堆分离、纯化和生理小种鉴定<sup>[16]</sup>后,利用小密穗(万能感病品种)进行菌种保存与扩繁,孢子粉收集于 1.5 mL 离心管中并置于 -80 ℃ 冰箱保存以供提取 DNA。

1.1.2 ISSR 引物 用于 ISSR-PCR 反应的 18 条 ISSR 引物及其退火温度<sup>[13]</sup>见表 2,由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

表 1 ISSR-PCR 分析采用的 26 个小麦白粉病菌株来源及所属小种类型

菌株编号	来源	小种	菌株编号	来源	小种	菌株编号	来源	小种
1	辽宁	7	10	河南	35	19	辽宁	611
2	河南	11	11	辽宁	55	20	山东	611
3	辽宁	11	12	辽宁	77	21	辽宁	631
4	山东	11	13	辽宁	311	22	湖北	631
5	湖北	11	14	河南	331	23	河南	711
6	辽宁	17	15	辽宁	411	24	辽宁	731
7	湖北	21	16	山东	411	25	山东	731
8	辽宁	23	17	辽宁	431	26	湖北	731
9	湖北	31	18	山东	431			

表 2 用于 ISSR-PCR 反应的 18 条 ISSR 引物特性

引物编号	序列	退火温度/℃	引物编号	序列	退火温度/℃	引物编号	序列	退火温度/℃
1	(AG) <sub>8</sub> T	52	7	(AG) <sub>8</sub> YC	52	13	BHB(GA) <sub>7</sub>	52
2	(AG) <sub>8</sub> C	50	8	(GA) <sub>8</sub> YT	52	14	DVD(TC) <sub>7</sub>	55
3	(CA) <sub>8</sub> T	50	9	(GA) <sub>8</sub> YC	52	15	BDB(CA) <sub>7</sub>	56
4	(TC) <sub>8</sub> C	50	10	(CA) <sub>8</sub> RC	52	16	DBD(AC) <sub>7</sub>	54
5	(AC) <sub>8</sub> T	50	11	(GGAGA) <sub>3</sub>	50	17	VHV(GT) <sub>7</sub>	52
6	(AG) <sub>8</sub> YT	50	12	HBH(GA) <sub>7</sub>	55	18	HVH(TG) <sub>7</sub>	52

注:R = A/G,Y = C/T,B = C/G,T,D = A/G/T,H = A/C/T,V = A/C/G。

1.2 方法

1.2.1 小麦白粉病菌的收集 将小密穗播种于温室内直径 7 cm 的花盆中,花盆编号后在其缘口上平行放置 2 块载玻片,玻片上垂直放置玻璃圆筒罩,筒

上口蒙 4 层纱布以防其他菌株污染。幼苗长至 1 叶 1 心后采用白粉病菌单菌落以抖落法接种,7 ~ 14 d 后,分生孢子菌落长至适量时,移至超净工作台上摇动花盆将其抖落到载玻片上,再用细毛笔将其刷进

1.5 mL 离心管中(可多次收集,每管 30 ~ 50 mg 孢子),每收集完 1 盆将超净工作台用酒精擦拭灭菌,并让过滤的无菌风吹 5 min,以保证菌株间不互相污染。将收集好孢子的离心管置于 - 20 ℃ 装有变色硅胶的干燥器中保存备用。

1.2.2 菌株 DNA 的提取 26 个供试小麦白粉菌株基因组 DNA 的提取采用改进的 SDS 法<sup>[17]</sup>。DNA 浓度采用 U - 3010 紫外分光光度计(日立公司)进行测定,并通过凝胶电泳法观察 DNA 完整性和纯度,OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> 值为 1.60 ~ 1.85,质量浓度为 0.9 ~ 3.2 μg/mL,DNA 质量满足 ISSR 扩增反应的要求。

1.2.3 菌株的 ISSR 扩增及检测 小麦白粉病菌 ISSR 反应总体系为 20 μL:10 × PCR Buffer 2.0 μL, MgCl<sub>2</sub> (25 mmol/L) 1.5 μL, dNTP (10 mmol/L) 0.4 μL,引物 (15 μmol/L) 0.4 μL, Taq DNA 聚合酶 (5 U/L) 0.2 μL, DNA 模板 (1 ng/μL) 1.0 μL, ddH<sub>2</sub>O 14.5 μL。反应条件为:94 ℃ 变性 5 min; 94 ℃ 变性 30 s,退火温度 45 s,72 ℃ 延伸 1.5 min, 35 个循环;72 ℃ 延伸 10 min。

ISSR - PCR 扩增结果用琼脂糖凝胶电泳进行检测。

1.2.4 小麦白粉病菌生理小种 ISSR 多态性分析 根据 26 个小麦白粉病菌菌株 ISSR 扩增条带的有、

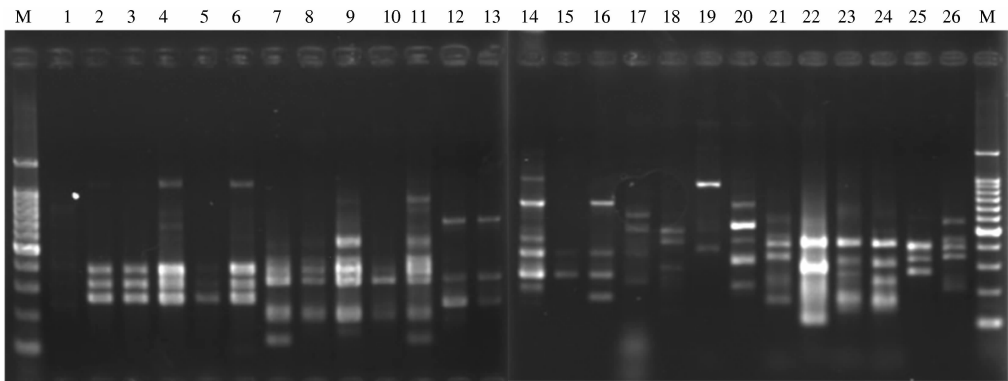
无进行编号,分别记为 1 和 0。利用 NTSYS 2.10e 统计软件对 ISSR 数据进行分析。采用 UPGMA 法构建小麦白粉病菌生理小种分子多态性聚类分析树状图。

1.2.5 小麦白粉病菌毒性多态性分析 对供试的 26 个菌株毒性进行鉴定。将 20 个已知抗白粉病基因 (*Pm*) 的小麦品种(系)和作为对照的小密穗的第 1 片叶在人工离体培养室进行离体叶段培养,室内温度控制在 18(暗) ~ 20 ℃ (光),14 h/10 h 光暗培养。将纯化的小麦白粉菌的单孢子堆分离物以抖落法对其进行接种,待小密穗上出现清晰可数的病斑时(5 ~ 7 d),调查并记录各种单基因系品种离体叶段的病级反应,病级反应型和小麦白粉病菌生理小种鉴定的反应型记载标准一致,病害分级参照盛宝钦<sup>[18]</sup>的标准。0 ~ 2 级为非毒性,3 ~ 4 级为毒性。根据毒性鉴定的结果,有毒性的记为 1,无毒性的记为 0,进行 UPGMA 聚类分析。

2 结果与分析

2.1 ISSR 引物扩增结果

用 18 条 ISSR 引物对 26 个小麦白粉病菌株进行了扩增,不同引物扩增出的条带数量、亮度都不相同,呈现不同程度的多态性。从电泳图谱(图 1—4)



M 为 200 bp DNA Ladder; 泳道编号分别对应菌株编号。下同

图 1 ISSR 引物 6 对 26 个菌株的扩增结果

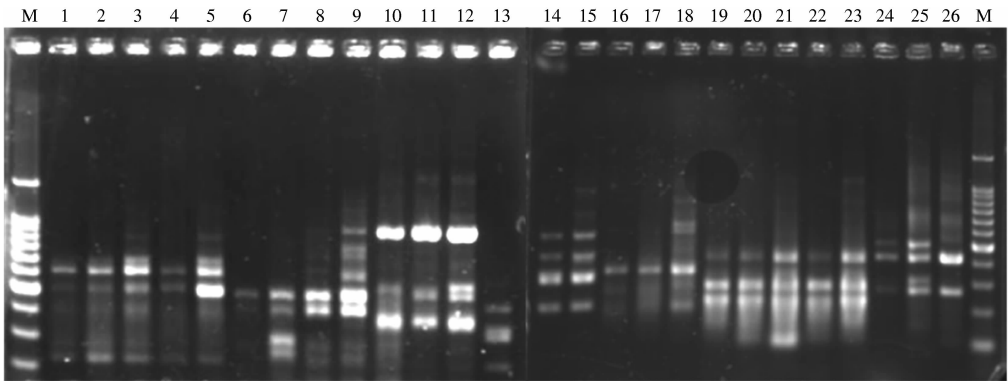


图 2 ISSR 引物 9 对 26 个菌株的扩增结果

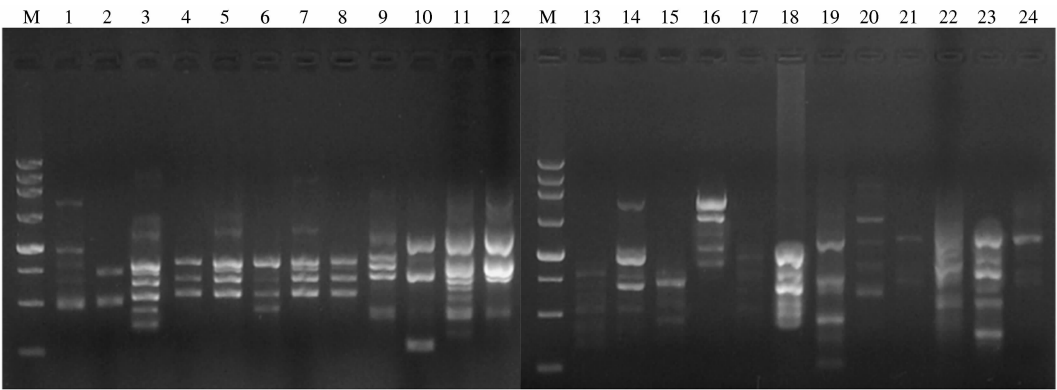


图 3 ISSR 引物 10 对 24 个菌株的扩增结果

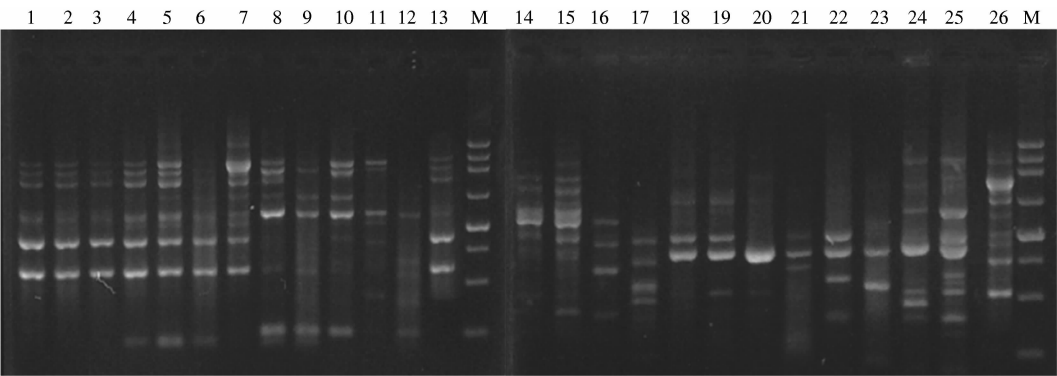


图 4 ISSR 引物 16 对 26 个菌株的扩增结果

可以看出,各引物扩增条带大致分布于 0.2 ~ 2.4 kb,其中有 8 条引物的扩增结果比较明显,得到了稳定的多态性谱带,编号分别为 6、7、8、9、10、16、17、18。

**2.2 26 个小麦白粉病菌株的毒性多态性分析结果**

对 26 个小麦白粉病菌株进行了毒性鉴定,结果(表 3)表明,各菌株具有不同的毒力谱,对其毒性进行聚类分析(图 5)表明,条带相似系数为 0.52 ~ 1.00,在相似系数 0.70 处将其聚为 3 类:第 1 类包括 21 个菌株,辽宁的 11 号、311 号、411 号、431 号、611 号、631 号、731 号小种,山东的 11 号、411 号、431 号、731 号、611 号小种,河南的 35 号、11 号、711 号、331 号小种,湖北的 11 号、31 号、21 号、631 号、731 号小种;第 2 类包括 3 个菌株,分别为辽宁的 17 号小种、55 号小种和 77 号小种;第 3 类包括 2 个菌株,为辽宁的 7 号小种和 23 号小种。

表 3 26 个小麦白粉病菌株毒性分析

菌株 编号	$P_m$																			
	1	2	3c	5	6	2+6	7	8	4+8	1+2+9	12	13	17	18	19	20	21	22	23	24
1	0	4	4	0	0	0	2	2	0	4	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0
2	4	0	0	4	4	0	3	4	0	4	0	0	3	0	3	0	0	3	0	2
3	4	2	4	4	2	2	2	3	0	4	2	0	2	0	3	4	0	3	0	0
4	4	0	4	4	4	0	4	4	0	4	2	2	0	0	4	0	0	0	0	3
5	4	0	0	4	4	2	4	4	0	4	0	0	4	0	2	0	0	3	0	4
6	4	4	4	4	3	1	2	4	2	4	2	0	4	0	0	0	0	0	0	0
7	4	0	0	4	4	4	4	1	0	4	0	2	4	0	3	0	0	4	0	2
8	3	4	4	0	2	0	2	1	0	4	1	0	4	0	0	0	0	1	1	0
9	4	0	4	4	4	4	4	4	0	4	2	3	4	0	4	0	0	0	0	3
10	4	2	0	4	4	3	2	4	0	4	0	0	2	0	3	0	0	0	0	3
11	3	4	4	3	4	4	4	3	0	4	2	0	4	0	2	4	0	2	2	2
12	4	4	4	1	4	4	4	4	0	4	2	0	4	3	3	3	0	2	2	4
13	4	0	4	4	4	0	4	4	3	4	3	2	4	0	3	2	0	2	2	4
14	4	0	3	4	4	4	2	4	0	4	0	2	3	0	3	3	0	4	4	2
15	3	0	0	4	4	1	4	4	0	4	0	4	4	0	4	0	0	0	0	4
16	4	0	0	4	4	0	4	4	0	4	0	0	4	0	0	0	0	2	0	2
17	4	1	4	4	4	4	4	4	0	4	0	3	4	0	4	0	0	4	0	0
18	4	0	4	4	4	0	4	4	0	4	0	3	4	0	4	0	0	2	0	0
19	3	0	4	4	4	0	4	4	0	4	3	3	4	0	4	3	0	0	3	4

续表 3 26 个小麦白粉病菌株毒性分析

菌株 编号	$P_m$																			
	1	2	3c	5	6	2+6	7	8	4+8	1+2+9	12	13	17	18	19	20	21	22	23	24
20	4	0	3	4	4	2	4	4	0	4	3	0	4	0	2	0	0	4	0	3
21	4	1	4	4	4	4	4	4	1	4	2	3	4	0	4	0	0	4	0	3
22	3	0	2	4	4	4	4	3	0	4	0	2	3	0	4	0	0	4	0	4
23	4	0	4	4	4	0	4	4	4	4	0	0	3	0	4	4	0	3	4	4
24	3	1	4	4	4	4	4	4	0	4	4	3	4	0	3	4	0	2	4	4
25	4	2	4	4	4	4	4	4	0	4	0	3	4	0	4	0	0	3	0	4
26	4	0	4	4	4	3	4	3	0	4	3	1	4	0	4	0	0	0	0	4

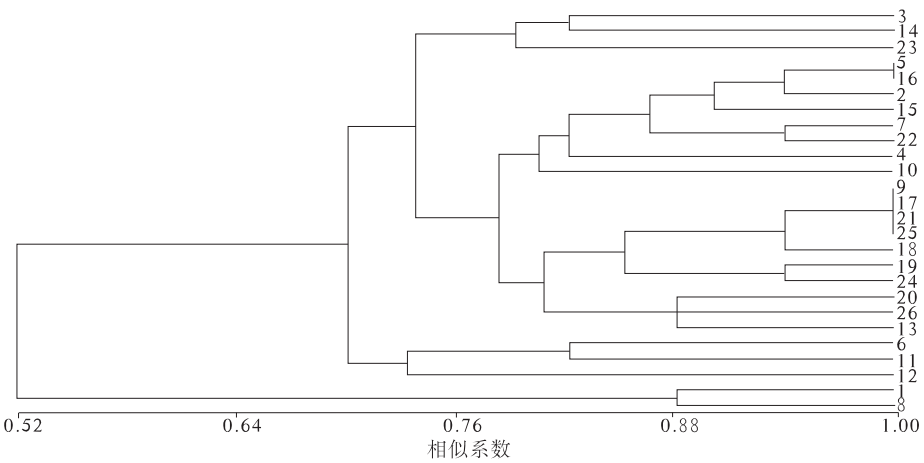


图 5 26 个小麦白粉病菌株的毒性聚类分析

2.3 26 个小麦白粉病菌株 ISSR 多态性分析结果

对 ISSR 引物扩增 26 个小麦白粉病菌株的多态性条带进行分析,建立了 ISSR 聚类分析图(图 6),结果表明多态性条带相似系数为 0.56~0.82,在相似系数 0.61 处将其聚为 4 类:第 1 类包括 13 个菌株,分别为辽宁的 11 号、17 号、7 号、411 号小种,山东的 11 号、411 号小种,河南的 35 号、11 号、711 号、331 号小种,湖北的 11 号、31 号、21 号小种;第 2 类包括 2 个菌株,分别为山东的 611 号小种和辽宁的 311 号小种;第 3 类包括 10 个菌株,分别为辽宁的 431 号、55 号小种、611 号、631 号、731 号小种,山东的 431 号、731 号小种,湖北的 631 号、731 号小种,辽宁的 77 号

小种;第 4 类包括 1 个菌株,为辽宁的 23 号小种。  
毒性多态性与 ISSR 多态性聚类比较结果显示,在 2 种多态性聚类图中均聚在一起的主要有 3 大类,第 1 类包括辽宁的 11 号、411 号小种,山东的 11 号、411 号小种,河南的 35 号、11 号、711 号、331 号小种,湖北的 11 号、31 号、21 号小种;第 2 类包括辽宁的 311 号小种与山东的 611 号小种;第 3 类包括辽宁的 431 号、611 号、631 号、731 号小种,山东的 431 号、731 号小种,湖北的 631 号、731 号小种。总体来看,26 个菌株中有 21 个菌株的毒性多态性与基因多态性存在相关性,此外根据 ISSR 多态性分类比根据毒性多态性分类多分出 1 个组群,更加精细。

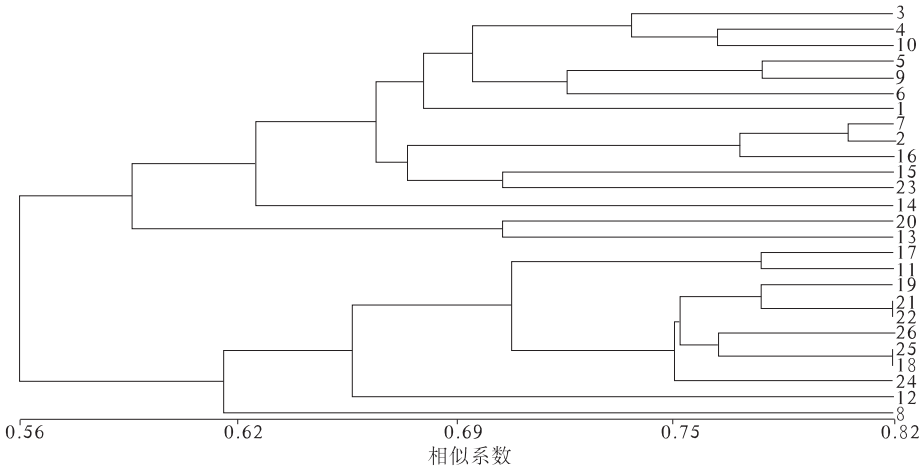


图 6 26 个小麦白粉病菌株的 ISSR 标记多态性聚类分析

### 3 结论与讨论

盛宝钦等<sup>[19]</sup>把我国小麦白粉病的发生大致分为 3 个病区,即我国云贵川麦区小麦白粉病病窝区,长江中下游麦区重发区,黄淮海麦区和宁夏、内蒙及东北麦区一般性发病区。我国小麦白粉病的传播途径也是由南向北远距离传播。东北春麦区寒冬漫长,6 个月以上无生长的小麦白粉病菌寄主,当地小麦白粉病菌不可能存活成为翌年的初菌源,因而,其初菌源只能来自南方麦区。杨家书等<sup>[1]</sup>对东北春麦区小麦白粉病菌初菌源来源地进行了研究,认为其初侵染菌源主要来自白粉病常发的胶东半岛冬麦区,指出‘高空气旋及对应的吹向东北的气流,东北麦区降雨日与随后的病害始发期吻合’现象是可靠证据。

本研究利用东北春麦区辽宁的 12 个菌株和南部冬麦区山东、河南、湖北的 14 个菌株为材料,分析其 DNA 的 ISSR 分子标记多态性相似性,结果显示,辽宁春麦区和其他 3 省的优势小种、次优势小种<sup>[20]</sup>按相应类群聚在一起,尤其是主要小种 11 号、411 号与近邻山东冬麦区的小种聚为一类。根据聚类分析的原理,说明南部冬麦区,尤其山东冬麦区与辽宁春麦区白粉菌 DNA 的 ISSR 标记多态性具有相似性,两地间的白粉菌存在基因交流,即辽宁以南的山东、河南、湖北,尤其山东为东北春麦区提供了小麦白粉菌菌源。因此,本研究的结果可作为之前‘东北春麦区小麦白粉病菌初菌源主要来自山东胶东半岛冬麦区’<sup>[1]</sup>这一观点的佐证。研究结果还显示,小麦白粉病菌毒性多态性与病菌 DNA 的 ISSR 多态性之间表现出一定的关联性。

#### 参考文献:

- [1] 杨家书,葛泉卿,吴畏,等. 东北春麦区小麦白粉菌的侵染循环[J]. 植物病理学报,1992,22(1):35-39.
- [2] 张怡,张佩佩,马晓萌,等. 河南两地市小麦白粉病菌的分子鉴定和进化分析[J]. 华北农学报,2012,27(1):189-192.
- [3] 王锡锋,张忠山,刘红彦,等. 小麦白粉病菌群体生理小种和毒性基因结构分析与评价[J]. 华北农学报,1996,11(2):43-49.
- [4] O'Dell M, Wolfe M S, Flavell R B, et al. Molecular variation in populations of *Erysiphe graminis* on barley, oats and rye[J]. Plant Pathology, 1989,38(3):340-351.
- [5] Brown J K M, Jessop K C, Rezanoor H N. Genetic uniformity in barley and its powdery mildew pathogen[J]. Biological Sciences, 1991,246:83-90.
- [6] McDermott J M, Brandle U, Dutly F, et al. Genetic variation in powdery mildew of barley: Development of RAPD, SCAR and VNTR markers[J]. Phytopathology, 1994,84(11):1316-1321.
- [7] 魏松红,王罡,张领兵,等. 东北春麦区小麦白粉病菌生理小种鉴定及其 RAPD 分析[J]. 吉林农业大学学报,2001,23(2):35-37,40.
- [8] 霍云凤,曹丽华,段霞瑜,等. 河南省西部山区小麦白粉菌群体遗传多样性分析[J]. 植物保护学报,2010,37(6):481-486.
- [9] 赵紫慧,黄江,陆鸣,等. 山东省和河北省小麦白粉菌毒性与遗传多样性分析[J]. 作物学报,2013,39(8):1377-1385.
- [10] 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.
- [11] 蒙进芳,普晓兰,刘文赞,等. 华山松对疱锈菌感性遗传分析的 ISSR-PCR 反应体系建立及引物筛选[J]. 西南林学院学报,2007,27(2):41-45.
- [12] 王子迎,王源超,张正光,等. 中国和美国大豆疫霉群体遗传结构的 ISSR 分析[J]. 生物多样性,2007,15(3):215-223.
- [13] 李海莲. 茄子黄萎病原菌鉴定及其 ISSR 分子指纹分析[D]. 南京:南京农业大学,2005.
- [14] Zhou S G, Smith D R, Stanosz G R. Differentiation of *Botryosphaeria* species and related anamorphic fungi using inter-simple or short sequence repeat (ISSR) fingerprinting[J]. USA Mycological Research, 2001,105(8):919-926.
- [15] 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.
- [16] 曹远银,于基成,刘秋,等. 小麦白粉病纯化菌种保存方法[J]. 植物保护学报,2005,32(3):271-274.
- [17] 孙仲桂,曹远银,韩建东,等. 小麦秆锈菌夏孢子 DNA 提取方法的比较研究[J]. 湖北农业科学,2010,49(6):1281-1284.
- [18] 盛宝钦. 用反应型记载小麦苗期白粉病[J]. 植物保护,1988,14(1):49.
- [19] 盛宝钦,向齐君,段霞瑜,等. 我国小麦白粉病小种毒力变异动态简报[J]. 植物保护,1995,21(1):4.
- [20] 曹远银,迟文娟,张晓蕾,等. 2004—2008 年东北春麦区小麦白粉病菌种群毒性动态分析[J]. 植物保护学报,2009,36(3):213-218.