

# 江淮流域小麦赤霉病菌的遗传多样性

张 旭<sup>1</sup>, 邢锦城<sup>1,2</sup>, 马鸿翔<sup>1</sup>, 温云平<sup>1,3</sup>, 陆维忠<sup>1</sup>, 袁 生<sup>3</sup>

(1. 江苏省农业科学院 农业生物技术研究所 农业部华东作物遗传改良与育种重点实验室 /江苏省农业生物学重点实验室, 江苏 南京 210014; 2 南京农业大学 农学院, 江苏 南京 210097; 3 南京师范大学 生命科学学院, 江苏 南京 210097)

摘要: 小麦赤霉病是温暖潮湿和半潮湿地区麦类作物的重要病害。小麦感染赤霉病后, 不仅减产严重、品质变劣, 而且病菌产生的毒素还会对人畜健康产生危害。引起小麦赤霉病的镰刀菌至少有 20种, 鉴定病原菌及种群结构对赤霉病的防治具有重要意义。针对我国江淮流域江苏、河南、安徽、湖北省的赤霉病菌株, 利用 7对种属特异性引物进行种属鉴定, 在此基础上依据 RAPD 和 AFLP 分子标记进行遗传多样性分析。研究结果表明, 所有供试菌株均属于禾谷镰刀菌 (*Fusarium graminearum* Schw), 分子标记 Shannon 多样性指数 (*I*) 以及 Nei氏基因多样性 (*h*) 均显示江淮流域禾谷镰刀菌具有较为丰富的遗传多样性。遗传标记相似系数变异范围为 0.57 ~ 0.99 表明菌株间存在明显的遗传多样性。以相似系数 0.63 为阈值, 可将供试菌株划分为 3类, 亚类分析表明江淮流域收集菌株具有一定的地域性分布。

关键词: 小麦赤霉病; 禾谷镰刀菌; RAPD; AFLP; 遗传多样性

中图分类号: S435.121.4<sup>+</sup>5 文献标志码: A 文章编号: 1000- 2286(2010)06- 1146- 06

## Genetic Diversity of *Fusarium* spp Isolates in Yangtze- Huahe River Valley

ZHANG Xu<sup>1</sup>, XING Jin-cheng<sup>1,2</sup>, MA Hong-xiang<sup>1</sup>,  
WEN Yun-ping<sup>1,3</sup>, LU Weir-zhong<sup>1</sup>, YUAN Sheng<sup>3</sup>

(1. Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Key Laboratory of crop genetic improvement and breeding in East China, Ministry of Agriculture, Key laboratory of Jiangsu Province for Agrobiology, Nanjing 210014, China; 2 College of Agriculture, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China; 3 College of Life Sciences, Nanjing Normal University, Nanjing 210097, China)

**Abstract** Wheat *Fusarium* head blight (FHB), caused by *Fusarium* spp., is one of the worldwide destructive diseases of wheat in the warm, semi-humid and humid regions. The disease not only causes significant yield losses and grain quality reduction, but also induces toxin in contaminated seeds, which is harmful to human beings and livestock. Identification of *Fusarium* species and understanding genetic population have great significance to prevention and cure of FHB since FHB can be induced by at least 20 species. In the present study, 32 single-spore isolates of *Fusarium* spp. collected and purified from Jiangsu, Henan, Anhui and Hubei Provinces were identified by species-specific PCR detection. Randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) and amplified fragment length polymorphic (AFLP) markers were used to evaluate the genetic

收稿日期: 2010- 09- 10 修回日期: 2010- 10- 26

基金项目: 公益性行业 (农业) 科研专项 (nyhyzx07- 3- 15)、现代农业产业技术体系 (nycyk- 03)、国际科技合作项目 (2009DFA 32020) 和江苏省国际科技合作项目 (BZ2008065)

作者简介: 张旭 (1973- ), 女, 博士, 副研究员, 主要从事小麦抗病遗传研究, E-mail xuzhang@ jias.ac.cn

diversity among *Fusarium* isolates. The results indicated that all isolates belonged to *F. graminearum* since they could amplify PCR products only by *F. graminearum* specific primers pairs Fg11. Isolates expressed high genetic diversity in percentage of polymorphic bands (PPB), Shannon's information index (*I*) and Nei's gene diversity (*h*) calculated by software PopGene version 1.32. The marker-based genetic similarity (*G<sub>s</sub>*) among *F. graminearum* isolates ranged from 0.57 to 0.99 with a mean of 0.82 indicating high degree of genetic diversity in the population. The dendrogram constructed after polymorphic marker data revealed that *Fusarium* population could be classified into 3 groups at 0.63 similarity coefficient. Furthermore, formation of subgroups suggested that genetic diversity was related to geographic separation.

**Key words** *Fusarium* head blight; *Fusarium Graminearum*; RAPD; AFLP; genetic diversity

由镰刀菌 (*Fusarium*) 引起的小麦赤霉病是中国长江中下游冬小麦产区和东北春小麦区的重要病害<sup>[1]</sup>。镰刀菌侵染小麦后产生的以脱氧雪腐镰刀菌烯醇 (DON) 为主的次生代谢物, 可引起人畜急慢性中毒, 甚至诱发癌变等<sup>[2-4]</sup>。禾谷镰刀菌 (*Fusarium graminearum*) 是最早被发现的小麦赤霉病致病菌, 也是很多国家和地区的主要致病种。

小麦赤霉病致病菌种的复杂性, 仅依靠常规形态学方法对镰刀菌进行分类难于全面揭示其遗传差异。近年来, 在镰刀菌的分类研究中, 已由单一的表型鉴定发展到与分子生物学技术相结合。Schilling 等<sup>[5]</sup>用 RAPD 技术合成了可区分禾谷镰刀菌和黄色镰刀菌的特异性引物。Nicholson 等<sup>[6]</sup>利用特异引物和 QC-PCR 技术确定植物组织中镰刀菌的种类和数量, 利用 RFLP 技术, 发现来自同一田块中小麦赤霉病病穗上存在 4 种镰刀菌。刘伟成等<sup>[7]</sup>利用 RAPD 标记对我国东北地区引致小麦赤霉病的两种镰刀菌进行种群分析。Waaijijk 等<sup>[8]</sup>利用菌种特异性 PCR 引物可以区分产生 DON 或 NM 的菌株, 并发现禾谷镰刀菌是 2000 与 2001 年荷兰小麦赤霉病的优势致病菌种。Prashant 等<sup>[9]</sup>利用荧光-PCR 技术对 5 种镰刀菌进行了准确鉴定。Yang 等<sup>[10]</sup>收集了长江流域 8 个省市的 1 894 个大麦赤霉病菌株, 利用种属特异性 PCR 引物及 SNP 标记进行种群鉴定。Qu<sup>[11]</sup>利用 SCAR 及 AFLP 标记对我国禾谷镰刀菌和亚洲镰刀菌进行地域分布及遗传多样性分析。随着分子生物学技术的发展, 镰刀菌分子鉴定技术也将逐渐完善。

本研究应用 RAPD 和 AFLP 结合的方法分析我国江淮麦区采集的赤霉病菌株, 以了解我国江淮流域赤霉病致病菌的种群结构, 研究基因型与来源的关系, 从而为抗赤霉病育种以及病害防治提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 供试菌株

研究所用菌株共 32 株, 分别采集自江苏省南京市、扬州市、苏州市, 安徽省合肥市, 湖北省武汉市及河南省周口市。菌株均由小麦赤霉病病穗经单孢分离得到, 供试菌株的编号及地区来源等见表 1。

表 1 供试菌株及来源

Tab 1 Origin of the *Fusarium* isolates

编号 No	菌株 Isolates	来源 Source	编号 No	菌株 Isolates	来源 Source	编号 No	菌株 Isolates	来源 Source
01	F15	江苏省南京市 Nanjing	12	yz7	江苏省扬州市 Yangzhou	23	hB	安徽省合肥市 Hefei
02	F34	江苏省南京市 Nanjing	13	su1	江苏省苏州市 Suzhou	24	h4	安徽省合肥市 Hefei
03	7136	江苏省南京市 Nanjing	14	su2	江苏省苏州市 Suzhou	25	wh2	湖北省武汉市 Wuhan
04	8019	江苏省南京市 Nanjing	15	su3	江苏省苏州市 Suzhou	26	wh3	湖北省武汉市 Wuhan
05	13084	江苏省南京市 Nanjing	16	su4	江苏省苏州市 Suzhou	27	wh5	湖北省武汉市 Wuhan
06	nj1	江苏省南京市 Nanjing	17	su5	江苏省苏州市 Suzhou	28	wh6	湖北省武汉市 Wuhan
07	nj2	江苏省南京市 Nanjing	18	su6	江苏省苏州市 Suzhou	29	hg-1	湖北省武汉市 Wuhan
08	yz2	江苏省扬州市 Yangzhou	19	su7	江苏省苏州市 Suzhou	30	Zhou1	河南省周口市 Zhoukou
09	yz3	江苏省扬州市 Yangzhou	20	su8	江苏省苏州市 Suzhou	31	Zhou2	河南省周口市 Zhoukou
10	yz4	江苏省扬州市 Yangzhou	21	hf1	安徽省合肥市 Hefei	32	Zhou3	河南省周口市 Zhoukou
11	yz5	江苏省扬州市 Yangzhou	22	hf2	安徽省合肥市 Hefei			

### 1.2 赤霉菌种型鉴定

赤霉菌经 CTAB 方法提取基因组 DNA。参照 W aalw ijk 等<sup>[8]</sup>、D ohan 等<sup>[12]</sup>、P arny 等<sup>[13]</sup>方法, 利用 7 对种属特异性引物(表 2), 采用 multiplex PCR 技术进行基因型分析。

表 2 赤霉菌种属特异引物

Tab 2 Species-specific primers used for characterizing *Fusarium* spp

种属 Species	引物 Primers	序列 Sequence	扩增片段大小 /bp Size	参考文献 Reference
禾谷镰刀菌 <i>Fusarium graminearum</i>	Fg11F Fg11R	CTCCGATATGTTGCGTCAA GGTAGGTATCCGACATGGCAA	450	[6]
燕麦镰刀菌 <i>F. avenaceum</i>	FaF FaR	CAAGCATTGTCGCCACTCTC GTTTGGCTCTACCGGACTG	920	[12]
黄色镰刀菌 <i>F. culmorum</i>	Fc01F Fc01R	ATGGTGAACTCGTCGTGGC CCCTTCTTACGCCAATCTCG	570	[6]
梨孢镰刀菌 <i>F. poae</i>	Fp8F Fp8R	ACGACGAAGGTGTTATG GGTGAAGAGCCTGTTTGCTTG	1600	[13]
层出镰刀菌 <i>F. proliferatum</i>	TH5F TH5R	GATAACGTCCAAGCTACG GGGTCGTTTCAGCTCAAGG	330	[8]
雪腐镰刀菌 <i>(nivale) Microdochium nivale var. majus</i>	Y13NF Y13NR	ACCAGCCGATTTGTGTTATG GGTCAAGAGG CAGAGTTCC	310	[12]
雪腐镰刀菌 ( <i>majus</i> ) <i>M. nivale var majus</i>	Mm2F Mm2R	TGCAACGTGCCAGAAGCT AATCGGCGCTGTCTA CTA AAAAGC	750	[12]

### 1.3 RAPD 分析

采用张旭等<sup>[14]</sup>方法, 随机选取 320 个 RAPD 引物, 对菌株 F15 与 F34 预筛选后, 选用 16 个谱带清晰且多态性较高的引物(表 3)对所有供试菌进行检测。

表 3 用于所有菌株检测的 RAPD 引物序列

Tab 3 RAPD primer sequences for fungus detection

序号 Code	序列 Sequence	序号 Code	序列 Sequence	序号 Code	序列 Sequence
S4	GGACTGGAGT	S1245	ACA CCTGCCA	S1432	GGCAGAGTGTG
S71	AAAGCTGCGG	S1254	GTGCCGCATC	S1448	GGCAGGCAAG
S313	TGGCGCAGTG	S1383	TTAGCGCCCC	S1450	AAGAGGCCAG
S1020	GGAAGGTGAG	S1418	CTGGCGTGTC	S1490	CTCTGGGCT
S1033	ACGGGTCAGA	S1427	GTGGCCGATG		
S1149	TGGAAGCACC	S1431	CCTGGGTCAG		

### 1.4 AFLP 分析

采用 Zhang 等<sup>[15]</sup>的方法, 通过 EcoRI MseI 双酶切并连接后进行预扩增和选择性扩增。选择性扩增引物组合为 E-ACG/M-CCA; E-CGG/M-AGA; E-AA/M-AGA。扩增产物经 6% 变性聚丙烯酰胺凝胶电泳后, 银染法显色。

### 1.5 数据分析

以 RAPD 和 AFLP 检测结果分析遗传多样性。统计电泳图谱中的可重复性条带, 按扩增片段的出现与否分别赋值“1”和“0”, 构建引物扩增结果的 0/1 数据库。应用 PopGene 1.32 软件获得与遗传多样性相关指数: 多态位点百分率 (PPB)、有效等位基因数 ( $N_e$ )、 $N_e$  S 基因多样性指数 ( $h$ )、Shannon 信息指数 ( $I$ ) 等。利用 NTSYSpc- pc version 2.0 软件计算遗传相似系数 ( $G_s$ ), 进行遗传多样性分析, 构建树状聚类图。

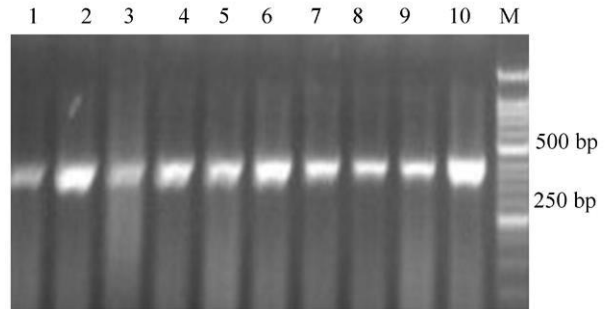
## 2 结果与分析

### 2.1 病原菌种型鉴定

7对种属特异性引物 multiplex PCR 鉴定结果表明, 只有禾谷镰刀菌特异引物 Fg11能在病菌中扩增出 450 bp 大小的 PCR 产物, 其余 6对引物均无扩增产物(图 1), 说明供试菌株均为禾谷镰刀菌, 也表明江淮流域小麦产区赤霉病优势菌群为禾谷镰刀菌。

### 2.2 RAPD 标记多态性

16个引物在 32个菌株中均能扩增出稳定的片段, 其中引物 S1383, S313和 S1450在菌株间平均能扩增出 8 6, 8 78和 8 12个片段; 引物 S1491和 S1432在菌株间平均扩增片段为 2 51和 3 19个(图 2)。共检测出 43个稳定的等位变异, 每个位点的等位变异数在 1~2 平均为 1.94 每位点的有效等位基因数  $N_e$  为 1.03~1.99,  $N_e$  的基因多样性指数为 0.03~0.50, Shannon 信息指数 ( $I$ ) 为 0.08~0.69 表明禾谷镰刀菌菌株之间存在丰富的遗传多样性。

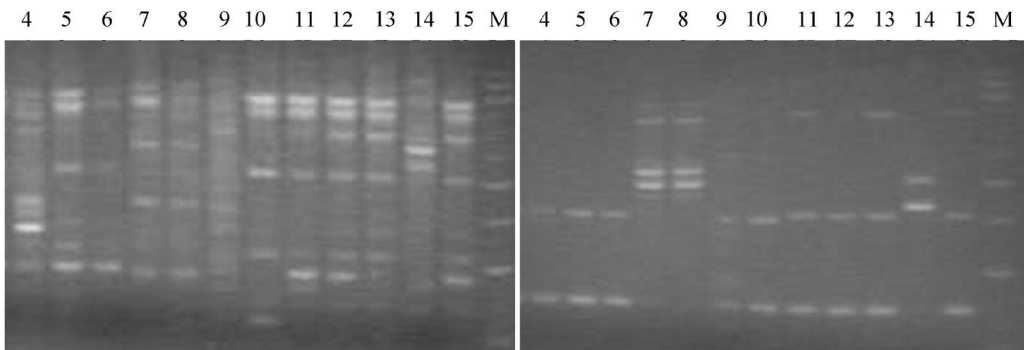


1- 10 分离菌株, M: 50 bp 分子量标准。

1- 10 isolates, M: 50 bp DNA Ladder

图 1 部分赤霉病菌株 multiplex PCR 扩增结果

Fig 1 Multiplex PCR results of *Fusarium* spp. isolates



4- 15 分离菌株, M: 100 bp 分子量标准。

4- 15 isolates, M: 100 bp DNA Ladder.

图 2 引物 S313(左)和 S1432(右)的 RAPD 扩增结果

Fig 2 RAPD products of *F. graminearum* amplified by S313 (left) and S1432 (right)

### 2.3 AFLP 标记多态性

3对 AFLP 引物共检测出 48个稳定的等位变异, AFLP 位点的有效等位基因数  $N_e$  为 1.06~2.00,  $N_e$  的基因多样性指数为 0.06~0.50, Shannon 信息指数 ( $I$ ) 为 0.14~0.69。结果显示, AFLP 标记与 RAPD 标记均能够客观地反映出各菌株间的遗传差异。AFLP 标记显示的多态性略高于 RAPD 标记, 但并未达到显著性差异。

### 2.4 树状聚类图

根据分子标记数据计算的遗传相似系数矩阵进行聚类分析, 绘制树状聚类图(图 3)。结果表明: 菌株间  $G_s$  值变化范围为 0.57~0.99 平均值为 0.82。其中来自苏州的菌株 su4 与 su6 的  $G_s$  值最大(0.99), 遗传距离最小, 亲缘关系最近。

来自于相同地区的菌株以较高的相似系数首先聚为一类, 如以平均遗传相似系数 0.82 为阈值, 来自江苏苏州的 8 个菌株和来自河南周口 3 个菌株均能分别聚为一类, 以遗传相似系数 0.80 为阈值, 来自安徽合肥的 4 个菌株也聚为一类, 说明赤霉病菌具有一定的地域分布性, 来自于同一地区的菌株具有一定的遗传同质性。

以相似系数 0.63 为阈值, 32 个菌株可分为 3 类: 第 1 类即 A 类, 包括来自苏州、合肥、周口的菌株,

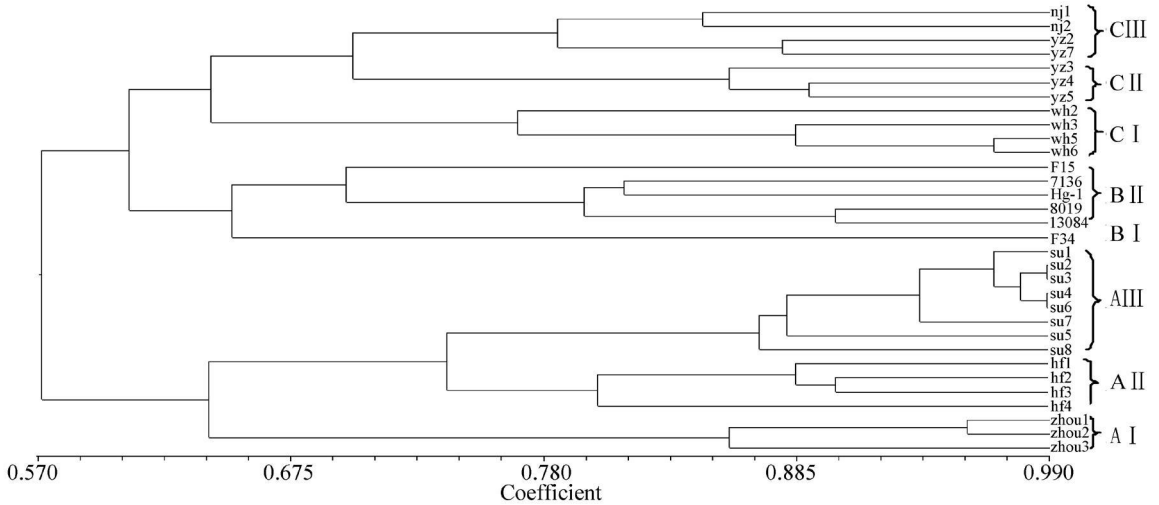


图 3 赤霉病菌株分子标记树状聚类图

Fig 3 Dendrogram constructed after RAPD and AFLP data of *Fusarium graminearum*

根据遗传相似性,进一步可以分为 3 个亚类,且与地域分布完全一致;第 2 类为 B 类,包括来自南京的 5 个菌株和来自武汉的菌株 Hg-1,其中南京菌株 F34 自成 B I 类, Hg-1 与其他南京菌株同属 B II 类,且与菌株 7136 遗传关系最近,遗传相似系数为 0.813;第 3 类包括来自扬州的菌株和来自南京、武汉的部分菌株,其中来自武汉的菌株自成 C I 亚类,来自扬州的菌株 yz3、yz4、yz5 聚为 C II 亚类,来自南京和扬州其余的菌株则聚为 C III 亚类。

### 3 讨论

#### 3.1 江淮麦区小麦赤霉病主要致病镰刀菌种类

我国从小麦赤霉病病穗上分离得到的镰刀菌多达 26 个种(变种)<sup>[16]</sup>,欧洲有 17 个镰刀菌种属与赤霉病相关<sup>[17]</sup>,常见的小麦赤霉病致病镰刀菌也有 7 种之多<sup>[18]</sup>。明确小麦赤霉病菌种型及其组成与分化,有利于针对性地采取防治对策,对小麦赤霉病的防治具有重要意义。20 世纪 80 年代,从我国 22 个省市自治区收集到的菌株中,大部分地区禾谷镰刀菌菌株出现频率都在 90% 以上。徐雍皋等<sup>[19]</sup>对我国 14 个省市的小麦赤霉病镰刀菌进行鉴定,共鉴定出 8 个种,其中禾谷镰刀菌属于优势致病种。2002—2004 年,黄小红等<sup>[20]</sup>从四川省 26 个市县收集到 345 个菌株,共鉴定出 7 个种,其中禾谷镰刀菌出现频率为 94.5%,其余菌种出现频率均小于 2.6%。

Waalwijk 等<sup>[11]</sup>发展了 multiplex PCR 技术,可以同时高通量鉴别常见的 7 个镰刀菌种属,其中 Fg11 是禾谷镰刀菌的种属特异性引物。本试验从江苏、湖北、河南、安徽等地采来的小麦病穗上分离 32 个菌株,经 multiplex PCR 分析,结果表明,从江苏、湖北、河南、安徽等地采集分离得到的代表性菌株,均只能扩增出 450 bp 的特异性条带,表明禾谷镰刀菌是我国江淮流域小麦主产区的优势致病种。

#### 3.2 禾谷镰刀菌聚类分析研究

本研究中 RAPD、AFLP 标记聚类分析结果,显示出菌株的遗传多样性和菌株的地域分布有一定的相关性。6 个地区中有 3 个地区即江苏苏州、河南周口及安徽合肥的菌株以较高的相似系数首先聚为一类,来自武汉的 5 个菌株中有 4 个菌株也可以聚为一类,说明赤霉病菌具有一定的地域分布性,来自于同一地区的菌株具有一定的遗传同质性。这与刘伟成等<sup>[7]</sup>的研究结果相一致。

然而,聚类结果并没能把所有的菌株按来源聚类,有些来源于同一地区的菌株也会以较大的遗传距离而分到不同的组。来自南京的菌株分为 B、C 两大类,分别与扬州和武汉的菌株聚在一起,说明禾谷镰刀菌存在较为复杂的遗传多样性,还可能存在着生态环境等其他影响因素<sup>[11]</sup>。

本研究表明,应用 AFLP 和 RAPD 等分子生物学技术确定该禾谷镰刀菌的菌系类群,能够提供群体结构的信息,也可以使我们更充分地了解我国赤霉病菌的种群结构和生态分布情况,提高病害预测的准确性,有针对性地培育抗病品种,对有效控制该病及我国农业的其他生产领域也具有重要意义。

## 参考文献:

- [1] Ma H X, Yao J B, Zhou M P, et al. Molecular breeding for wheat *Fusarium* head blight resistance in China [J]. Cereal Research Communication, 2008, 36( suppl B): 203– 212.
- [2] Bai G, Shaner G E. Management and resistance in wheat and barley to *Fusarium* head blight [J]. Annual Review of Phytopathology, 2004, 42(1): 135– 161.
- [3] 李东华, 孙艺, 罗雪云. 脱氧雪腐镰刀菌烯醇对中国仓鼠肺纤维细胞的遗传毒性 [J]. 中国食品卫生杂志, 1992, 4(2): 40.
- [4] 李斌, 郭红卫. AFB和 DON对大鼠原代肝细胞 DNA损伤的研究 [J]. 中国公共卫生, 2001, 17(12): 1115– 1116.
- [5] Medaner T, Schilling A G. Genetic variation of aggressiveness in individual field populations of *Fusarium graminearum* and *Fusarium culmorum* tested on young plants of winter-rye [J]. European Journal of Plant Pathology, 1996, 102(9): 823– 830.
- [6] Nicholson P, Simpson D R, Weston G, et al. Detection and quantification of *Fusarium culmorum* and *Fusarium graminearum* in cereals using PCR assays [J]. Physiological and Molecular Plant Pathology, 1998, 53(1): 17– 37.
- [7] 刘伟成, 席景会, 李宏宇, 等. 东北地区小麦赤霉病菌 DNA 随机扩增多态性分析 [J]. 菌物系统, 2002, 21(1): 63– 70.
- [8] Waalwijk C, Kastelein P, de Vries I, et al. Major changes in *Fusarium* spp. in wheat in the Netherlands [J]. European Journal of Plant Pathology, 2003, 109(7): 743– 754.
- [9] Prashant K M, Roland T V, Aikstair C. Development of a PCR based assay for rapid and reliable identification of pathogenic *Fusarium* [J]. FEMS Microbiology Letters, 2003, 218(2): 329– 332.
- [10] Yang L, van der Lee T, Yang X, et al. *Fusarium* populations on Chinese barley show a dramatic gradient in mycotoxin profiles [J]. Phytopathology, 2008, 98(6): 719– 727.
- [11] Qu B, Li H P, Zhang J B, et al. Geographic distribution and genetic diversity of *Fusarium graminearum* and *F. asiaticum* on wheat spikes throughout China [J]. Plant Pathology, 2008, 57(1): 15– 24.
- [12] Doohan F M, Parry D W, Jenkinson P, et al. The use of species-specific PCR-based assays to analyse *Fusarium* ear blight of wheat [J]. Plant Pathology, 1998, 47(2): 197– 205.
- [13] Parry D W, Nicholson P. Development of a PCR assay to detect *Fusarium poae* in wheat [J]. Plant Pathology, 1996, 45(2): 383– 391.
- [14] 张旭, 臧宇辉, 刘朝晖, 等. 小麦抗白粉病基因 Pm17 在亲本和 F<sub>2</sub> 代抗感集群中的 RAPD 分析 [J]. 江苏农学院学报, 1998, 19(2): 67– 70.
- [15] Zhang X, Zhou M P, Ren L J, et al. Molecular Characterization of *Fusarium* head blight resistance from wheat variety Wangshu bai [J]. Euphytica, 2004, 139(1): 59– 64.
- [16] 全国赤霉病研究协作组. 我国小麦赤霉病穗部镰刀菌种类、分布和致病性 [J]. 上海师范学院学报, 1984, 13(3): 69– 82.
- [17] Parry D W, Jenkinson P, Mcleod L. *Fusarium* ear blight (scab) in small grain cereals— a review [J]. Plant Pathology, 1995, 44(2): 207– 238.
- [18] Nicholson P, Gosman N, Draeger R, et al. The *Fusarium* head blight pathosystem [M] // Buck H T, Nisi J E, Salomon N. Wheat production in stressed environments. New York, Springer Press, 2007: 23– 36.
- [19] 徐雍皋, 杨志胜. 小麦赤霉病菌致病种的鉴定 [J]. 南京农学院学报, 1980, 3(1): 119– 126.
- [20] 黄小红, 叶华智. 四川省小麦赤霉病菌的种群组成 [J]. 西南农业学报, 2005, 18(3): 281– 286.