



# 海南三亚和黄淮海地区玉米小斑病菌致病性及遗传多样性分析

常佳迎, 刘树森, 石洁, 郭宁, 张海剑, 马红霞, 杨春风

(河北省农林科学院植物保护研究所/农业农村部华北北部作物有害生物综合治理重点实验室/河北省农业有害生物综合治理工程技术研究中心, 河北保定 071000)

**摘要:** 【目的】明确海南三亚玉米南繁基地和黄淮海玉米主产区的玉米小斑病菌 (*Bipolaria maydis*) 菌株的致病性差异, 以及遗传多样性和亲缘关系的远近, 为海南三亚南繁基地育种过程中玉米品种的抗病性筛选提供理论依据, 并对玉米品种在黄淮海地区的推广种植提供参考。【方法】对采集自海南三亚和黄淮海地区的玉米小斑病病叶进行病原菌分离, 经过形态学和分子生物学方法对分离到的菌株进行鉴定, 共获得 61 株玉米小斑病菌菌株。采用人工喷雾接种法对 61 株小斑病菌菌株的致病力进行鉴定; 并选取 16 条扩增条带清晰、重复性好、多态性高的引物进行 ISSR-PCR 扩增, 利用 Popgen32 生物软件计算群体间的遗传距离和遗传相似性, 并利用 NTsys2.10e 软件进行聚类分析, 构建海南三亚与黄淮海地区小斑病菌的聚类图。【结果】致病性测定结果表明, 海南三亚地区未分离到弱致病力菌株, 强致病力菌株个数占三亚地区总菌株的 57.1%; 黄淮海地区分离到的弱致病力菌株占黄淮海地区总菌株的 47.5%, 强致病力菌株占黄淮海地区总菌株的 17.5%。遗传多样性分析结果表明, 在群体平均水平上, Nei's 基因多样性指数 ( $H$ ) 为 0.2820, Shannon's 信息指数 ( $I$ ) 为 0.4197, 表明玉米小斑病菌具有一定的遗传变异; 不同地理种群间的遗传相似系数为 0.9028—0.9618, 遗传距离为 0.0390—0.1023, 表明整体遗传相似系数较高, 遗传距离较近; 但不同地理种群间仍存在不同程度的遗传分化, 其中, 河南与河北的菌株群体遗传相似系数最高 ( $GS=0.9618$ ), 亲缘关系最近; 河南和三亚地区的菌株群体遗传相似系数最低 ( $GS=0.9028$ ), 亲缘关系相对较远。聚类分析结果表明, 三亚地区菌株和黄淮海地区菌株在相似系数为 0.722 时, 明显被分为两大类群。【结论】黄淮海玉米主产区与海南三亚玉米南繁基地的玉米小斑病菌在致病力上存在一定差异, 三亚地区强致病力菌株的分离频率高于黄淮海地区。黄淮海地区与三亚地区的菌株群体具有丰富的遗传多样性, 且遗传多样性与地理来源有一定关系, 地域相邻的菌株遗传关系较近; 但三亚地区与黄淮海地区的菌株遗传相似系数相对较高, 亲缘关系较近, 且两种群间存在一定基因交流。因此, 三亚地区作为玉米的南繁基地, 其自然发病条件下筛选出对小斑病具有抗性的玉米品种或抗性亲本材料, 对黄淮海地区小斑病抗性的逐年提高具有一定的影响, 有利于减轻黄淮海地区病害的发生。

**关键词:** 玉米小斑病菌; 玉米小斑病; 南繁基地; 海南三亚; 黄淮海地区; 致病性; 遗传多样性

## Pathogenicity and Genetic Diversity of *Bipolaria maydis* in Sanya, Hainan and Huang-Huai-Hai Region

CHANG JiaYing, LIU ShuSen, SHI Jie, GUO Ning, ZHANG HaiJian, MA HongXia, YANG ChunFeng

(Plant Protection Institute of Hebei Academy of Agricultural and Forestry Sciences/Key Laboratory of IPM on Crops in Northern Region of North China, Ministry of Agriculture and Rural Affairs/IPM Centre of Hebei Province, Baoding 071000, Hebei)

收稿日期: 2019-09-04; 接受日期: 2019-10-23

基金项目: 国家现代农业产业技术体系 (CARS-02)

联系方式: 常佳迎, E-mail: cji198908@163.com. 通信作者石洁, E-mail: shij99@163.com

**Abstract: 【Objective】** The objective of this study is to clarify the pathogenicity differences, genetic diversity and relationship among the *Bipolaria maydis* strains from southern maize breeding base of Sanya, Hainan and Huang-Huai-Hai region, and to provide a theoretical basis for screening resistance of maize varieties under natural disease conditions in the breeding process. It also provides a reference for the popularization and utilization of maize varieties in Huang-Huai-Hai region. **【Method】** The pathogens were isolated from diseased leaves collected from Sanya, Hainan and Huang-Huai-Hai region, and a total of 61 strains were obtained by identification of morphology and molecular biology. The pathogenicity of 61 strains was identified by an artificial spray inoculation method, and 16 primers with clear, repetitive and polymorphic bands were used for ISSR-PCR. Popgen32 software was used to calculate the genetic distance and genetic similarity among the populations, and NTsys2.10e software was used for cluster analysis and constructing a cluster map of the pathogens in Sanya, Hainan and Huang-Huai-Hai region. **【Result】** The results of pathogenicity test showed that there was no weak pathogenic strain and 57.1% strong pathogenic strains isolated from Sanya, Hainan, while that of Huang-Huai-Hai region accounted for 47.5% and 17.5%, respectively. The results of genetic diversity analysis showed that the Nei's gene diversity index (H) was 0.2820 and Shannon's information index (I) was 0.4197 on the average level of population, indicating that there was a certain genetic variation in the pathogen. The genetic similarity coefficient was 0.9028-0.9618 and the genetic distance was 0.0390-0.1023 among different geographical populations, which indicated that the overall genetic similarity coefficient was relatively high and the genetic distance was close, but there were still different degrees of genetic differentiation among different geographical populations. Among which, the genetic similarity coefficient of strains in Henan and Hebei was the highest (GS=0.9618), and the genetic relationship was the closest; the genetic similarity coefficient of strains in Henan and Sanya was the lowest (GS=0.9028), and the genetic relationship was relatively far. The cluster analysis showed that the strains in Sanya and Huang-Huai-Hai region were obviously divided into two groups when the similarity coefficient was 0.722. **【Conclusion】** There are some differences in *B. maydis* pathogenicity between the main maize producing area of Huang-Huai-Hai region and the southern maize breeding base of Sanya, Hainan. The isolation frequency of the strong pathogenic strains in Sanya was higher than that in Huang-Huai-Hai region. The strain populations in Huang-Huai-Hai region and Sanya region have rich genetic diversity, and genetic diversity has a certain relationship with geographical origin. The genetic relationship of the strains in the adjacent regions was relatively close. However, the genetic similarity coefficient of strains between Sanya region and Huang-Huai-Hai region is relatively high, the genetic relationship is close, and also there are some gene exchanges between the two populations. Therefore, selection of resistant maize varieties or resistant parent materials under natural conditions in southern maize breeding base of Sanya has a certain effect on the yearly increase of resistance to southern corn leaf blight in Huang-Huai-Hai region, which is helpful to reduce the occurrence of disease in Huang-Huai-Hai region.

**Key words:** *Bipolaria maydis*; southern corn leaf blight; southern maize breeding base; Sanya, Hainan; Huang-Huai-Hai region; pathogenicity; genetic diversity

## 0 引言

**【研究意义】** 玉米是中国主要的粮食作物之一, 具有很高的营养价值, 也是重要的饲料作物和工业原料, 其经济地位不容忽视。随着玉米种植面积的逐年增长, 栽培模式向轻简化发展, 生产上对抗病品种的需求日益迫切。目前, 有能力采用人工接种技术选育抗病品种的单位 and 育种家较少, 在常年发病较重区域设置自然鉴定圃是育种家的首选。海南省三亚市作为玉米育种扩繁加代的一个重要地区, 其小斑病发生较为普遍。能否依据品种(系)在海南田间小斑病的自然发病结果, 淘汰抗性差的品种(系), 选择抗性较好的品种(系), 并在黄淮海夏玉米种植区应用是一个亟待解决的问题。因此, 明确三亚地区与黄淮海地区病原菌致病性和遗传多样性上的差异, 对育种过程中玉

米品种小斑病抗性筛选及其在黄淮海地区种植具有重要意义。**【前人研究进展】** 玉米小斑病是黄淮海和南方玉米种植区主要的叶部病害之一, 其致病菌为玉蜀黍平脐孺孢(*Bipolaris maydis*), 可在玉米全生育期侵染引起病症, 具有较强的侵染性和致病力<sup>[1-3]</sup>。在适宜的条件下, 玉米小斑病菌可在接种 24 h 后侵染引起叶片坏死<sup>[4]</sup>, 随后在病斑上产生的分生孢子可借助气流传播, 成为再侵染源<sup>[5]</sup>。玉米小斑病的发生和流行严重影响了玉米的产量和品质, 发病较轻的地块可造成 10%—30% 的产量损失, 重病田减产高达 80%<sup>[6-8]</sup>。研究表明, 小斑病菌不同菌株在菌丝生长速率、产孢量、菌落特征等生物学特性方面存在差异<sup>[9-10]</sup>; 不同菌株对相同玉米品种的致病性存在明显差异<sup>[1-3]</sup>。简单序列重复区间扩增多态性(inter-simple sequence repeat, ISSR) 分子标记技术具有操作简单、稳定性好、多态

性高等优点<sup>[11-12]</sup>, 目前广泛应用于病原菌的遗传多样性分析, 如玉米灰斑病菌 (*Cercospora* spp.)<sup>[13]</sup>、玉米大斑病菌 (*Exserohilum turcicum*)<sup>[14]</sup>、玉米圆斑病菌 (*Bipolaris zeicola*)<sup>[15]</sup>等。郭云燕等<sup>[16]</sup>利用 ISSR 分子标记技术对不同省份间的玉米南方锈病病原菌 (*Puccinia polysora*) 进行分析, 探讨了其病原菌初侵染来源; 马红霞等<sup>[17]</sup>采用 ISSR-PCR 方法对不同地区的禾谷镰孢 (*Fusarium graminearum*) 复合种进行了遗传多样性分析, 结果表明不同地理种群间遗传多样性与地理来源有关; 常佳迎等<sup>[18]</sup>采用 ISSR 分子技术分析了黄淮海地区不同年份的弯孢叶斑病菌 (*Curvularia lunata*), 结果表明年度间菌株具有一定差异, 推测菌株的初侵染源为外来菌源; 梅玉云<sup>[19]</sup>和廖蕾<sup>[20]</sup>采用 ISSR 分子标记技术分别对安徽省不同地区和福建省不同地区的小斑病菌进行遗传多样性分析, 结果表明小斑病菌群体存在丰富的遗传多样性, 同一省份内不同地区菌株的亲缘关系与地理来源有一定的相关性。【本研究切入点】玉米小斑病菌具有较强的寄主适应性和致病力, 且来自同一省份不同地区的菌株致病性和遗传多样性存在差异, 但海南三亚地区与黄淮海地区的病原菌致病性和亲缘关系并未明确报道。【拟解决的关键问题】对采集自海南三亚和黄淮海地区的玉米小斑病菌菌株进行致病性和遗传多样性差异分析, 了解两地菌株的致病性差异和亲缘关系的远近, 明确三亚地区自然发病条件下筛选获得的玉米材料在黄淮海地区是否具有种植价值, 以期为周年内两代抗病育种工作的顺利进行提供参考。

## 1 材料与方法

试验于 2018 年 10 月至 2019 年 6 月在河北省农林科学院植物保护研究所完成。

### 1.1 材料

供试菌株: 2018 年 9 月从河北、河南和山东省采集夏玉米小斑病病叶, 2019 年 2 月从海南省三亚市采集南繁玉米小斑病病叶, 放置于标本夹中, 待水分去除后转入干燥信封袋中保存备用。采用常规病害组织分离法<sup>[21]</sup>和单孢纯化法<sup>[22]</sup>获得病原菌, 对获得的病原菌进行形态学和分子生物学鉴定 (ITS 序列分析), 共获得 61 株玉蜀黍平脐蠕孢 (表 1)。

供试品种: 选用小斑病感病自交系 B73 进行病原菌致病性测定。

### 1.2 致病性分析

#### 1.2.1 病原菌扩繁

将分离获得的 61 个菌株分别转

接至 PDA 培养基平板上, 黑暗条件下 30℃培养 5 d 后, 转接到高粱粒培养基上培养 10 d, 用无菌水将分生孢子洗下, 制成分生孢子悬浮液 ( $1 \times 10^5$  个/mL), 加入 0.01%吐温 20 (V/V) 备用。

1.2.2 室内致病性测定 在花盆 (上口直径: 11.5 cm, 下口直径: 10.5 cm, 高: 8.5 cm) 中种植玉米自交系 B73, 每盆种植 4 株, 共种植 61 盆, 待玉米苗长至 3 叶期, 采用人工喷雾接种的方法, 喷施分生孢子悬浮液, 每个菌株喷施 1 盆, 且均匀喷施等量 (10 mL) 的分生孢子悬浮液。接菌后保湿 48 h, 7 d 后调查发病情况, 测量病斑大小, 记录病斑特征, 采用透明刻度板 (5 mm 方格) 评估发病面积。

### 1.3 遗传多样性分析

1.3.1 模板 DNA 的制备 将分离获得的 61 个菌株分别接种到 PDA 培养基上, 30℃培养 7 d, 收集气生菌丝。采用真菌基因组提取试剂盒 (北京艾德来生物科技有限公司), 按照说明书提取各菌株的 DNA。采用 ND2000 微量紫外分光光度计 (Thermo, USA) 测定所获得的 DNA 质量和浓度, 统一稀释至  $30 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ , 于 -20℃保存备用。

1.3.2 ISSR 分析 根据梅玉云<sup>[19]</sup>和廖蕾<sup>[20]</sup>的研究, 选取 16 条 ISSR 引物用于本试验 (表 2)。ISSR 反应体系: DNA 模板  $1 \mu\text{L}$  ( $30 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ ),  $2 \times \text{EsTaq Master Mix}$   $10 \mu\text{L}$ , Primer ( $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ )  $1.5 \mu\text{L}$ , 加  $\text{ddH}_2\text{O}$  补足至  $20 \mu\text{L}$ 。PCR 反应程序: 95℃预变性 5 min, 94℃变性 40 s, 退火 (视不同引物而定) 45 s, 72℃延伸 1.5 min, 30 个循环, 最后 72℃延伸 10 min。

PCR 扩增产物在 1.8%琼脂糖凝胶上以 100 V, 电流 100 mA 电泳 55 min, 使用 GelDoc XR+凝胶成像系统照相。

1.3.3 数据分析 统计并记录 ISSR 电泳图谱条带, 在相同大小的位置有条带的标记为 1, 无条带的标记为 0。采用 Popgen32 软件进行数据分析, 计算海南三亚和黄淮海地区群体间的 Shannon's 多样性指数、群体间的遗传距离和遗传相似性<sup>[23-24]</sup>; 利用 NTsys2.10e 软件, 采用 clustering 模块中的 SAHN 按照非加权组平均法 (UPGMA) 进行聚类分析, 并构建系统聚类图。

## 2 结果

### 2.1 不同地区小斑病菌的致病性分析

致病性测定结果表明, 61 株小斑病菌在玉米自交系 B73 上的致病力、病斑大小和病斑形状存在明显差

表 1 黄淮海地区和海南三亚小斑病菌的致病性测定

Table 1 Pathogenicity of *B. maydis* in Huang-Huai-Hai region and Sanya, Hainan

菌株编号 Strain number	采样地点 Collection site	平均发病面积 Average disease area (%)	病斑大小 Lesion size (mm)	致病力 Pathogenicity	病斑描述 Lesion description		
					病斑颜色 Lesion color	形状 Shape	褐色边缘 Brown edge
HB1802-1	河北省保定市满城区 Mancheng, Baoding, Hebei	7.50	(2-8) × (1-2)	弱 Weak	浅黄色 Light yellow	长方形 Rectangle	-
HB1802-2	河北省保定市满城区 Mancheng, Baoding, Hebei	16.75	(1-7) × (1-1.5)	中 Moderate	深褐色 Dark brown	椭圆形 Oval	+
HB1803-1	河北省邯郸市邯郸县 Handan, Handan, Hebei	7.50	(2-7) × (1-2)	弱 Weak	黄褐色 Yellow brown	长方形 Rectangle	-
HB1803-2	河北省邯郸市肥乡县 Feixiang, Handan, Hebei	27.75	(2-8) × (1-2)	中 Moderate	浅黄色 Light yellow	长方形 Rectangle	+
HB1803-3	河北省邯郸市肥乡县 Feixiang, Handan, Hebei	5.00	(3-8) × (1-1.5)	弱 Weak	黄褐色 Yellow brown	长方形 Rectangle	+
HB1804-1	河北省廊坊市香河县 Xianghe, Langfang, Hebei	1.75	(2-9) × (1-3)	弱 Weak	浅黄色 Light yellow	长方形 Rectangle	-
HB1804-2	河北省廊坊市固安县 Gu'an, Langfang, Hebei	76.75	(4-7) × (1-2)	强 Strong	浅黄色 Light yellow	长方形 Rectangle	-
HB1804-3	河北省廊坊市固安县 Gu'an, Langfang, Hebei	4.25	(5-8) × (1-2)	弱 Weak	黄褐色 Yellow brown	长方形 Rectangle	-
HB1804-4	河北省廊坊市香河县 Xianghe, Langfang, Hebei	8.75	(1-3) × (1-1)	弱 Weak	黄褐色 Yellow brown	长方形 Rectangle	+
HB1804-5	河北省廊坊市固安县 Gu'an, Langfang, Hebei	7.75	(4-6) × (1-1.5)	弱 Weak	浅黄色 Light yellow	椭圆形 Oval	-
HB1804-6	河北省廊坊市固安县 Gu'an, Langfang, Hebei	10.25	(5-7) × (1-2)	中 Moderate	黄褐色 Yellow brown	长方形 Rectangle	+
HB1807-1	河北省唐山市滦南县 Luannan, Tangshan, Hebei	1.25	(3-9) × (1.5-2)	弱 Weak	浅黄色 Light yellow	椭圆形 Oval	-
HB1807-2	河北省唐山市乐亭县 Laoting, Tangshan, Hebei	8.25	(2-9) × (1-2)	弱 Weak	黄褐色 Yellow brown	长方形 Rectangle	+
HB1807-3	河北省唐山市滦南县 Luannan, Tangshan, Hebei	20.00	(3-8) × (1-2)	中 Moderate	深褐色 Dark brown	椭圆形 Oval	+
HB1807-4	河北省唐山市开发区 Development Zone, Tangshan, Hebei	9.50	(3-8) × (1-2)	弱 Weak	深褐色 Dark brown	长方形 Rectangle	+
HB1807-5	河北省唐山市开发区 Development Zone, Tangshan, Hebei	85.50	(3-5) × (1-2)	强 Strong	浅黄色 Light yellow	长方形 Rectangle	-
HB1807-6	河北省唐山市乐亭县 Laoting, Tangshan, Hebei	81.25	(1-5) × (1-2)	强 Strong	黄褐色 Yellow brown	椭圆形 Oval	+
HB1807-7	河北省唐山市乐亭县 Laoting, Tangshan, Hebei	72.00	(3-7) × (1-2)	强 Strong	黄褐色 Yellow brown	椭圆形 Oval	+
HB1807-8	河北省唐山市迁安 Qian'an, Tangshan, Hebei	13.25	(2-6) × (1-2)	中 Moderate	浅黄色 Light yellow	椭圆形 Oval	-
HB1807-9	河北省唐山市迁安 Qian'an, Tangshan, Hebei	24.50	(1-4) × (1-2)	中 Moderate	黄褐色 Yellow brown	椭圆形 Oval	+
HB1807-10	河北省唐山市玉田县 Yutian, Tangshan, Hebei	9.50	(2-8) × (1-1.5)	弱 Weak	浅黄色 Light yellow	长方形 Rectangle	-
HB1807-11	河北省唐山市开发区 Development Zone, Tangshan, Hebei	58.00	(2-6) × (1-2)	强 Strong	浅黄色 Light yellow	椭圆形 Oval	+

续表 1 Continued table 1

菌株编号 Strain number	采样地点 Collection site	平均发病面积 Average disease area (%)	病斑大小 Lesion size (mm)	致病力 Pathogenicity	病斑描述 Lesion description		
					病斑颜色 Lesion color	形状 Shape	褐色边缘 Brown edge
HB1807-12	河北省唐山市滦南县 Luannan, Tangshan, Hebei	2.75	$(4-8) \times (1-2)$	弱 Weak	浅黄色 Light yellow	长方形 Rectangle	-
HB1808-1	河北省衡水市深州市 Shenzhou, Hengshui, Hebei	27.50	$(3-9) \times (1-1.5)$	中 Moderate	深褐色 Dark brown	长方形 Rectangle	+
HB1808-2	河北省衡水市深州市 Shenzhou, Hengshui, Hebei	13.50	$(2-9) \times (1-2)$	中 Moderate	深褐色 Dark brown	长方形 Rectangle	+
HB1808-3	河北省衡水市深州市 Shenzhou, Hengshui, Hebei	17.50	$(3-8) \times (1-2)$	中 Moderate	浅黄色 Light yellow	长方形 Rectangle	-
HB1808-4	河北省衡水市深州市 Shenzhou, Hengshui, Hebei	9.50	$(2-5) \times (1-2)$	弱 Weak	浅黄色 Light yellow	椭圆形 Oval	-
HN1802-1	河南省鹤壁市浚县 Xunxian, Hebi, Henan	12.50	$(4-9) \times (1-2)$	中 Moderate	深褐色 Dark brown	长方形 Rectangle	-
HN1802-2	河南省鹤壁市浚县 Xunxian, Hebi, Henan	3.25	$(1-8) \times (1-1.5)$	弱 Weak	浅黄色 Light yellow	长方形 Rectangle	-
HN1802-3	河南省鹤壁市浚县 Xunxian, Hebi, Henan	12.50	$(4-6) \times (1-1.5)$	中 Moderate	深褐色 Dark brown	椭圆形 Oval	-
HN1802-4	河南省鹤壁市浚县 Xunxian, Hebi, Henan	9.50	$(4-7) \times (1-1.5)$	弱 Weak	深褐色 Dark brown	长方形 Rectangle	-
HN1803-1	河南省安阳市滑县 Huaxian, Anyang, Henan	13.25	$(1-7) \times (1-1.5)$	中 Moderate	深褐色 Dark brown	长方形 Rectangle	+
HN1804-1	河南省新乡市辉县 Huixian, Xinxiang, Henan	15.00	$(5-8) \times (1-1.5)$	中 Moderate	深褐色 Dark brown	长方形 Rectangle	+
HN1807-1	河南省漯河市召陵区 Zhaoling, Luohe, Henan	77.50	$(1-8) \times (1-2)$	强 Strong	黄褐色 Yellow brown	长方形 Rectangle	+
HN1807-2	河南省漯河市源汇区 Yuanhui, Luohe, Henan	3.25	$(3-7) \times (1-2)$	弱 Weak	浅黄色 Light yellow	长方形 Rectangle	-
HN1807-3	河南省漯河市临颍县 Linying, Luohe, Henan	4.00	$(3-8) \times (1-2)$	弱 Weak	深褐色 Dark brown	长方形 Rectangle	+
HN1810-1	河南省周口市西华县 Xihua, Zhoukou, Henan	13.50	$(4-6) \times (1-1.5)$	中 Moderate	深褐色 Dark brown	椭圆形 Oval	+
SD1811-1	山东青岛市平度市 Pingdu, Qingdao, Shandong	6.50	$(3-8) \times (1-1.5)$	弱 Weak	浅黄色 Light yellow	长方形 Rectangle	+
SD1811-2	山东省青岛市平度市 Pingdu, Qingdao, Shandong	3.50	$(2-8) \times (1-1.5)$	弱 Weak	黄褐色 Yellow brown	长方形 Rectangle	+
SD1812-1	山东省东营市利津县 Lijin, Dongying, Shandong	36.25	$(2-9) \times (1-2)$	强 Strong	深褐色 Dark brown	椭圆形 Oval	-
SY-1	海南省乐东黎族自治县九所镇 Jiusuo, Ledong Li Autonomous County, Hainan	20.00	$(3-7) \times (1-1.5)$	中 Moderate	深褐色 Dark brown	长方形 Rectangle	+
SY-2	海南省乐东黎族自治县九所镇 Jiusuo, Ledong Li Autonomous County, Hainan	18.75	$(1-8) \times (1-2)$	中 Moderate	黄褐色 Yellow brown	长方形 Rectangle	+
SY-3	海南省乐东黎族自治县九所镇 Jiusuo, Ledong Li Autonomous County, Hainan	21.25	$(1-9) \times (1-2)$	中 Moderate	黄褐色 Yellow brown	椭圆形 Oval	-
SY-4	海南省乐东黎族自治县九所镇 Jiusuo, Ledong Li Autonomous County, Hainan	18.25	$(1-7) \times (0.5-2)$	中 Moderate	浅黄色 Light yellow	长方形 Rectangle	-
SY-5	海南省乐东黎族自治县九所镇 Jiusuo, Ledong Li Autonomous County, Hainan	70.25	$(2-8) \times (1-1.5)$	强 Strong	黄褐色 Yellow brown	长方形 Rectangle	-

续表 1 Continued table 1

菌株编号 Strain number	采样地点 Collection site	平均发病面积 Average disease area (%)	病斑大小 Lesion size (mm)	致病力 Pathogenicity	病斑描述 Lesion description		
					病斑颜色 Lesion color	形状 Shape	褐色边缘 Brown edge
SY-6	海南省三亚市吉阳区	57.00	(2-8) × (1-1.5)	强 Strong	深褐色	长方形	-
	Jiyang, Sanya, Hainan				Dark brown	Rectangle	
SY-7	海南省三亚市吉阳区	52.00	(2-8) × (1-2)	强 Strong	深褐色	长方形	+
	Jiyang, Sanya, Hainan				Dark brown	Rectangle	
SY-8	海南省三亚市吉阳区	25.00	(4-7) × (1-2)	中 Moderate	黄褐色	长方形	-
	Jiyang, Sanya, Hainan				Yellow brown	Rectangle	
SY-9	海南省三亚市吉阳区	10.25	(1-8) × (1-2)	中 Moderate	黄褐色	椭圆形	-
	Jiyang, Sanya, Hainan				Yellow brown	Oval	
SY-10	海南省三亚市天涯区	33.75	(1-7) × (0.5-2)	强 Strong	黄褐色	长方形	-
	Tianya, Sanya, Hainan				Yellow brown	Rectangle	
SY-11	海南省三亚市天涯区	52.50	(1-9) × (1-1.5)	强 Strong	浅黄色	长方形	-
	Tianya, Sanya, Hainan				Light yellow	Rectangle	
SY-12	海南省乐东黎族自治县九所镇	54.50	(2-8) × (1-1.5)	强 Strong	浅黄色	长方形	-
	Jiusuo, Ledong Li Autonomous County, Hainan				Light yellow	Rectangle	
SY-13	海南省三亚市海棠区	24.50	(2-9) × (1-1.5)	中 Moderate	浅黄色	椭圆形	-
	Haitang, Sanya, Hainan				Light yellow	Oval	
SY-14	海南省三亚市海棠区	67.50	(5-8) × (1-2)	强 Strong	深褐色	长方形	+
	Haitang, Sanya, Hainan				Dark brown	Rectangle	
SY-15	海南省三亚市海棠区	23.25	(5-8) × (1-1.5)	中 Moderate	黄褐色	椭圆形	+
	Haitang, Sanya, Hainan				Yellow brown	Oval	
SY-16	海南省三亚市海棠区	86.25	(1-7) × (0.5-1.5)	强 Strong	浅黄色	椭圆形	-
	Haitang, Sanya, Hainan				Light yellow	Oval	
SY-17	海南省三亚市海棠区	92.50	(1-8) × (1-2)	强 Strong	浅黄色	长方形	-
	Haitang, Sanya, Hainan				Light yellow	Rectangle	
SY-18	海南省乐东黎族自治县九所镇	64.00	(4-8) × (1-2)	强 Strong	浅黄色	长方形	-
	Jiusuo, Ledong Li Autonomous County, Hainan				Light yellow	Rectangle	
SY-19	海南省三亚市陵水县	12.25	(3-8) × (1-1.5)	中 Moderate	浅黄色	长方形	-
	Lingshui, Sanya, Hainan				Light yellow	Rectangle	
SY-20	海南省三亚市陵水县	38.75	(2-8) × (1-1.5)	强 Strong	黄褐色	长方形	+
	Lingshui, Sanya, Hainan				Yellow brown	Rectangle	
SY-21	海南省三亚市陵水县	38.25	(3-8) × (1-1.5)	强 Strong	深褐色	椭圆形	+
	Lingshui, Sanya, Hainan				Dark brown	Oval	

“-”：无褐色边缘 No brown edge; “+”：有褐色边缘 With brown edges

异。病斑形状可分为：受叶脉限制的长方形和不受叶脉限制的椭圆形，有明显褐色边缘和无褐色边缘；病斑颜色分为浅黄色、黄褐色和深褐色（表 1）。依据《中华人民共和国农业行业标准——玉米抗病虫性鉴定技术规范（NY/T1248.2—2016）》的分级标准，并根据发病面积将致病力划分为强、中、弱 3 个等级，发病面积≤10%为弱致病力菌株；10%<发病面积≤30%为中等致病力菌株；发病面积>30%为强致病力菌株。由表 1 可见，黄淮海地区 40 个菌株中有 19 个为弱致病力菌株，占黄淮海地区总菌株的 47.5%，14

个菌株为中等致病力菌株，占黄淮海地区总菌株的 35.0%，7 个为强致病力菌株，占黄淮海地区总菌株的 17.5%；海南三亚地区的 21 个菌株中无弱致病力菌株，9 个中等致病力菌株，占三亚地区总菌株的 42.9%，其余 12 个菌株为强致病力菌株，占三亚地区总菌株的 57.1%。观察结果表明，在玉米品种上形成的病斑颜色深、无褐色边缘的菌株致病力普遍较强。

2.2 不同地区小斑病菌的遗传多样性

2.2.1 不同地区小斑病菌的遗传多态性分析 选取的 16 条引物具有较好的多态性，共获得 177 个条带，

分布在 100—10 000 bp，其中多态性条带 140 个，占 79.10%。不同引物扩增获得的条带数目为 7—17 条，平均每个引物获得 9 个多态性条带，其中引物 808 获得条带数最多（17 条），引物 812 获得的条带数最少，仅为 7 条；16 条引物的多态性条带比率为 44.44%—100.00%（表 2）。

将 61 株小斑病菌按省份分为 4 个地理种群，其遗传多态性分析如表 3 所示。在群体平均水平上，多态性位点为 140 个，多态性位点平均比率为 79.10%，观察等位基因数（Na）为 1.7910，有效等位基因数（Ne）为 1.4904，Nei's 基因多样性指数（H）为 0.2820，Shannon's 信息指数（I）为 0.4197，表明玉米小斑病菌具有一定的遗传变异。

不同地理来源的种群间，H 值在 0.1717—0.2783，I 值在 0.2505—0.4072，表明不同地理种群间的玉米小斑病菌遗传多样性具有一定差异。总体而言，河北（0.2783）和海南三亚（0.2437）种群遗传多样性较高，河南（0.2137）种群次之，山东（0.1717）种群较低（表 3），基因多样性指数的差异可能受分析所用种群中菌株数量的影响。

分析得到 4 个地理种群总基因多样性（Ht）为

0.2664，各地理种群内基因多样性（Hs）为 0.2268，地理群体间的基因多样性（Dst）为 0.0396，表明相同省份来源的菌株具有较近的亲缘关系。地理种群间的基因分化系数（Gst）为 0.1484，这说明不同地理种群间遗传变异占种群总遗传变异的 14.84%，大部分遗传变异（85.16%）发生在种群内。根据遗传分化系数估算的基因流的值  $Nm=2.8690 (>1)$ ，表明地理种群间存在一定的基因交流。

**2.2.2 不同地区小斑病菌的遗传相似性分析** 为进一步分析玉米小斑病菌各地理种群间的遗传分化程度，将分离到的 61 株小斑病菌按省份分组，计算 Nei's 遗传相似性（GS）和遗传距离（GD）（表 4）。不同地理种群间的遗传相似系数为 0.9028—0.9618，遗传距离为 0.0390—0.1023。遗传相似系数均  $>0.9000$ ，遗传距离最大仅为 0.1023，表明整体遗传相似系数较高，遗传距离较近；但不同地理种群间仍存在不同程度的遗传分化。其中，河南与海南的菌株群体遗传相似系数相对较低（ $GS=0.9028$ ），遗传距离较远（ $GD=0.1023$ ），亲缘关系相对较远；河北与河南的遗传相似系数相对较高（ $GS=0.9618$ ），遗传距离相对较近（ $GD=0.0390$ ），亲缘关系较近。

表 2 ISSR 引物扩增结果

Table 2 The amplification result with used ISSR primers

引物 Primer	序列 Sequence (5'-3')	退火温度 Tm (°C)	扩增条带数 Number of amplified bands	多态性条带 Number of polymorphic bands	多态性比率 Polymorphism percent (%)
807	(AG) <sub>8</sub> T	46	10	8	80.00
808	(AG) <sub>8</sub> C	46	17	14	82.35
812	(GA) <sub>8</sub> A	45	7	7	100.00
825	(AC) <sub>8</sub> T	50	8	5	62.50
834	(AG) <sub>8</sub> YT	48	14	14	100.00
835	(AG) <sub>8</sub> YC	50	12	11	91.67
841	(GA) <sub>8</sub> YC	48	16	14	87.50
856	(AC) <sub>8</sub> YA	50	8	7	87.50
857	(AC) <sub>8</sub> YG	51	12	8	66.67
880	(GGAGA) <sub>3</sub>	47	12	11	91.67
884	HBHA(GA) <sub>6</sub> G	46	10	8	80.00
885	BHB(GA) <sub>7</sub>	46	11	8	72.73
887	DVD(TC) <sub>7</sub>	45	12	6	50.00
888	BDB(CA) <sub>7</sub>	49	9	4	44.44
889	DBD(AC) <sub>7</sub>	49	9	8	88.89
891	HVH(TG) <sub>7</sub>	50	10	7	70.00
总计 Total			177	140	79.10

2.2.3 不同地区菌株间亲缘关系的聚类分析 利用 NTsys2.10e 软件对 61 株小斑病菌进行 ISSR 聚类分析，菌株间具有丰富的遗传多样性，相似系数在 0.71—0.95（图 1）。在相似系数为 0.722 时，所有的菌株被分成两大群（Group 1 和 Group 2）。在相似系数为 0.74 时，Group 1 可分为 2 个亚群，subgroup I 包含 1

个河南菌株，2 个三亚菌株，13 个河北菌株；subgroup II 包含 2 个山东菌株，2 个三亚菌株，9 个河南菌株，11 个河北菌株。Group 2 包含 1 个山东菌株，3 个河北菌株，17 个三亚菌株。根据 ISSR 聚类分析结果，黄淮海地区的菌株多分布于 Group 1，而三亚地区的菌株群体多分布于 Group 2。

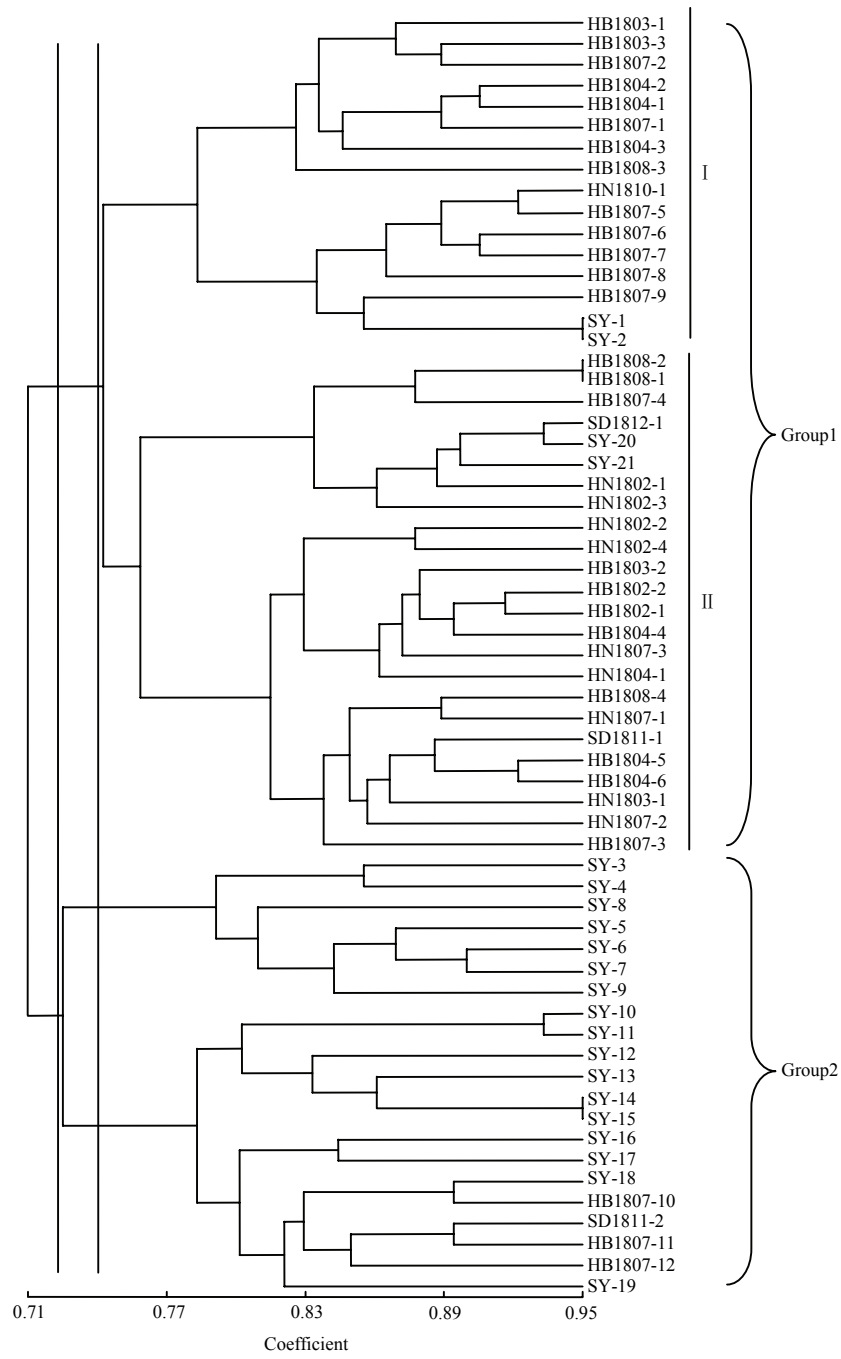


图 1 玉米小斑病菌的 UPGMA 聚类分析  
Fig. 1 Dendrogram obtained by UPGMA clustering for *B. maydis*



表 3 玉米小斑病菌不同地理种群的遗传多样性水平

Table 3 Genetic diversity parameters among different geographic populations of *B. maydis*

	多态性位点 Number of polymorphic loci	多态性比率 Polymorphism percent (%)	观察等位基因数 Observed number of alleles (Na)	有效等位基因 Effective number of alleles (Ne)	基因多样性指数 Nei's gene diversity index (H)	Shannon's 信息指数 Shannon's information index (I)
河北 HB	127	71.75	1.7175	1.4930	0.2783	0.4072
河南 HN	100	56.50	1.5650	1.3822	0.2137	0.3134
山东 SD	75	42.37	1.4237	1.3060	0.1717	0.2505
三亚 SY	121	68.36	1.6836	1.4186	0.2437	0.3637
群体水平 Population level	140	79.10	1.7910	1.4904	0.2820	0.4197

表 4 玉米小斑病菌不同地理种群间的遗传相似性和遗传距离

Table 4 Genetic similarity and genetic distance among different geographic populations of *B. maydis*

种群 Group	河北 HB	山东 SD	河南 HN	三亚 SY
河北 HB	****	0.9455	0.9618	0.9404
山东 SD	0.0560	****	0.9351	0.9116
河南 HN	0.0390	0.0671	****	0.9028
三亚 SY	0.0614	0.0925	0.1023	****

对角线上方为遗传相似系数，下方为遗传距离 Nei's genetic similarity coefficient (above diagonal) and genetic distance (below diagonal)

3 讨论

研究表明，玉米小斑病菌致病力分化十分明显<sup>[25]</sup>，且小斑病菌的毒力与地理位置无关<sup>[26]</sup>，不同菌株对相同玉米品种/自交系的致病力不同，且形成的病斑类型均有明显差异<sup>[1-3]</sup>。在中国玉米产区具有强致病力和中等致病力的小斑病菌菌株占有明显优势<sup>[27-28]</sup>。本研究结果表明，不同菌株在同一个玉米自交系上造成的病斑类型不同，病斑大小也存在一定差异。海南三亚地区未分离到弱致病力菌株，强致病力菌株占三亚地区总菌株的 57.1%，为优势种群；黄淮海地区分离到的弱致病力菌株占黄淮海地区总菌株的 47.5%，为主要种群，强致病力菌株占 17.5%，因此海南三亚地区强致病力菌株的分离频率高于黄淮海地区。推测可能是受黄淮海玉米种植区推广抗病品种的影响，导致病原菌的致病力减弱；而在海南三亚地区进行材料的南繁，不考虑材料的抗病性，其南繁材料中大部分对小斑病表现更为敏感，因此在三亚也聚集了更多的强致病力菌株。

本研究通过对分离自黄淮海地区和海南三亚地区的 61 株玉米小斑病菌的 ISSR 片段多样性进行分析，共获得 140 个多态性条带，多态性比率为 79.10%，表明黄淮海地区和三亚地区的小斑病菌具有丰富的遗传

变异，不同地理种群间小斑病菌的遗传多样性具有一定差异，这与梅玉云<sup>[19]</sup>和廖蕾<sup>[20]</sup>的研究结果一致。不同地理种群间的遗传相似系数和遗传距离表明，整体遗传相似系数较高，遗传距离较近；但地理种群间存在地域相邻，遗传关系相对较近，遗传相似系数较高的特点。聚类分析显示，海南三亚与黄淮海地区的小斑病菌具有一定地理隔离，且小斑病菌的遗传亲缘关系与地理来源有一定的相关性；但 Group 1 中包含 4 个三亚地区的菌株而 Group 2 包含 4 个黄淮海地区的菌株，同时遗传分化系数估算的基因流的值  $Nm=2.8690 (>1)$ ，表明黄淮海和海南三亚地区地理种群间存在一定的基因交流，可能是在育种材料的调运过程中随种子、穗轴苞叶等传播，以及北上气流的影响，导致部分菌株在三亚和黄淮海地区的交叉定殖。鉴于海南的小斑病菌致病力更强，今后应加强该病害的检疫和监测工作。

王群<sup>[29]</sup>对 299 份山东省玉米引种备案品种（系）和 101 份黄淮海玉米趋势试验品种（系）进行玉米小斑病的抗性鉴定，结果显示表现为高抗和抗病的品种占 96.25%，没有表现高感的玉米品种；施艳等<sup>[30]</sup>鉴定了 2015—2017 年河南省夏玉米品种对小斑病的抗性，结果表明中抗品种占主要地位，而具有抗性的品种比率呈逐年上升趋势，且同一品种在不同年份抗性表现

较为稳定; 陆银萍<sup>[31]</sup>采用人工喷雾法检测了安徽省 2010—2014 年参与鉴定的 696 个玉米品种对小斑病的抗性, 发现抗性等级为高抗和中抗的品种占鉴定总数的比例呈总体上升趋势; 由此可见, 黄淮海地区近年来的主栽品种对小斑病的抗性提高, 可能得益于育种过程中对品种抗病性的筛选。同时, 建议育种家对已经形成的有望生产应用的组合在海南三亚地区开展小斑病抗性鉴定工作, 也可在品种选配中采用在三亚表现抗小斑病的亲本, 在较高压力下确定新品种的抗性水平, 组配出抗小斑病的品种。

海南三亚作为玉米南繁育种的重要基地, 其小斑病发生普遍, 本研究结果证明三亚地区强致病力菌株所占比例较黄淮海地区高, 三亚地区菌株与黄淮海地区菌株的整体遗传相似系数较高, 遗传距离较近, 且两地之间的菌株存在一定的基因交流。因此, 在三亚地区田间育种过程中, 根据田间自然发病情况对品种的抗病性进行筛选具有一定意义, 有利于筛选出对小斑病抗性较好的玉米品种。因黄淮海地区弱致病菌群占主要地位, 因此对于在海南田间小斑病发生较重的玉米品种(系), 若其他田间性状(如产量等)表现较好, 可在黄淮海田间进行多点抗性测试, 进一步明确其抗性后, 再决定是否淘汰。

## 4 结论

黄淮海玉米主产区与海南三亚玉米南繁基地的玉米小斑病菌在致病力上存在一定差异, 黄淮海玉米主产区小斑病菌菌株以弱致病菌群为主, 海南三亚以强致病菌群为主。遗传多样性分析结果表明, 黄淮海地区与三亚地区的菌株群体具有丰富的遗传多样性, 两地菌株整体遗传相似系数较高, 遗传距离较近, 且两地之间的菌株存在一定的基因交流。三亚地区作为玉米的南繁基地, 其自然发病条件下筛选出具有小斑病抗性的玉米品种或抗性亲本材料, 对于黄淮海玉米种植区小斑病抗性的逐年提高有一定的影响, 其筛选具有应用价值。

## References

- [1] 李玥仁, 商鸿生, 胡必德. 陕西省玉米小斑病菌致病性分化研究. 植物保护学报, 1993, 20(1): 90, 96.  
LI Y R, SHAGN H S, HU B D. Pathogenic specialization of *Bipolaris maydis* in Shaanxi Province. *Acta Phytomycol Sinica*, 1993, 20(1): 90, 96. (in Chinese)
- [2] 陆宁海, 吴利民, 郎剑锋, 霍云凤, 石明旺. 新乡地区玉米小斑病

菌小种群结构及致病性分析. 河南科技学院学报(自然科学版), 2016, 44(1): 23-27.

- LU N H, WU L M, LANG J F, HUO Y F, SHI M W. Analysis on population structure and pathogenicity differentiation of *Bipolaris maydis* in Xinxiang. *Journal of Henan Institute of Science and Technology (Natural Science Edition)*, 2016, 44(1): 23-27. (in Chinese)
- [3] 代玉立, 甘林, 阮宏椿, 石姐姐, 杜宜新, 陈福如, 杨秀娟. 福建省丙环唑不同敏感性玉米小斑病菌的遗传多样性和致病性. 植物病理学报, 2019, 49(1): 64-74.  
DAI Y L, GAN L, RUAN H C, SHI N N, DU Y X, CHEN F R, YANG X J. Genetic diversity and pathogenicity of different propiconazole-sensitive isolates of *Bipolaris maydis* in Fujian Province. *Acta Phytomycol Sinica*, 2019, 49(1): 64-74. (in Chinese)
- [4] TOTH R, SMITH D R. Histopathological changes in susceptible corn inoculated with *Helminthosporium maydis* race O. *Mycopathologia*, 1982, 77(2): 75-82.
- [5] 王晓梅, 吕平香, 李莉莉, 见德宝, 杨信东. 玉米小斑病重要流行环节的初步定量研究. II 病斑产孢、孢子飞散、杀菌剂筛选. 吉林农业大学学报, 2007, 29(2): 128-132.  
WANG X M, LÜ P X, LI L L, JIAN D B, YANG X D. Preliminary quantitative studies on important epidemic links of *Bipolaris maydis*. II. Lesion sporulation, spore dispersion and fungicide screening. *Journal of Jilin Agricultural University*, 2007, 29(2): 128-132. (in Chinese)
- [6] 董金皋. 农业植物病理学. 2 版. 北京: 中国农业出版社, 2013: 98-103.  
DONG J G. *Agricultural Plant Pathology*. 2nd ed. Beijing: China Agriculture Press, 2013: 98-103. (in Chinese)
- [7] ULLSTRUP A J. The impacts of the Southern corn leaf blight epidemics of 1970-1971. *Annual Review of Phytopathology*, 1972, 10: 37-50.
- [8] 张晓慧. 皖北地区玉米小斑病的发生及综合防治. 现代农业科技, 2019(7): 90.  
ZHANG X H. Occurrence and integrated control of corn leaf blight in North Anhui. *Modern Agricultural Science and Technology*, 2019(7): 90. (in Chinese)
- [9] 赵真真, 郑训梅, 叶子园, 戴婧, 陈方新, 梅玉云. 安徽省玉米小斑病菌生物学特性的研究. 生物学杂志, 2018, 35(6): 60-63.  
ZHAO Z Z, ZHENG X M, YE Z Y, DAI J, CHEN F X, MEI Y Y. Biological characteristics of *Bipolaris maydis* in Anhui Province. *Journal of Biology*, 2018, 35(6): 60-63. (in Chinese)
- [10] 代玉立, 甘林, 阮宏椿, 廖蕾, 石姐姐, 杜宜新, 陈福如, 杨秀娟.

- 福建省玉米小斑病菌的生物学特性研究. 中国农学通报, 2016, 32(31): 131-137.
- DAI Y L, GAN L, RUAN H C, LIAO L, SHI N N, DU Y X, CHEN F R, YANG X J. Biological characteristics of *Bipolaris maydis* in Fujian Province. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2016, 32(31): 131-137. (in Chinese)
- [11] 文静. ISSR 分子标记技术在植物病原菌研究中的应用. 安徽农业科学, 2010, 38(36): 20658-20660.
- WEN J. Application of ISSR molecular marker technique in plant pathogens research. *Journal of Anhui Agricultural Sciences*, 2010, 38(36): 20658-20660. (in Chinese)
- [12] 李海生. ISSR 分子标记技术及其在植物遗传多样性分析中的应用. 生物学通报, 2004, 39(2): 19-21.
- LI H S. ISSR molecular marker technology and its application in plant genetic diversity analysis. *Bulletin of Biology*, 2004, 39(2): 19-21. (in Chinese)
- [13] 张小飞, 李晓, 崔丽娜, 邹成佳, 李菁, 龙永昌. 我国玉米灰斑病菌遗传多样性的 ISSR 分析. 植物保护学报, 2015, 42(6): 908-913.
- ZHANG X F, LI X, CUI L N, ZOU C J, LI J, LONG Y C. Genetic diversity analysis of *Cercospora* spp. by ISSR in China. *Journal of Plant Protection*, 2015, 42(6): 908-913. (in Chinese)
- [14] 谷守芹, 范永山, 李坡, 董金皋. 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.
- GU S Q, FAN Y S, LI P, DONG J G. Optimization of ISSR reaction and genetic diversity analysis of *Exserohilum turcicum*. *Acta Phytophylacica Sinica*, 2008, 35(5): 427-432. (in Chinese)
- [15] 张小飞, 李晓, 崔丽娜, 邹成佳, 杨晓蓉, 向运佳. 玉米圆斑病 (*Bipolaris zeicola*) 遗传多样性 ISSR 分析. 植物保护, 2015, 41(3): 30-34.
- ZHANG X F, LI X, CUI L N, ZOU C J, YANG X R, XIANG Y J. Genetic diversity analysis of corn leaf spot caused by *Bipolaris zeicola* with ISSR markers. *Plant Protection*, 2015, 41(3): 30-34. (in Chinese)
- [16] 郭云燕, 陈茂功, 孙素丽, 武小菲, 江凯, 朱振东, 李洪杰, 何月秋, 王晓鸣. 中国玉米南方锈病病原菌遗传多样性. 中国农业科学, 2013, 46(21): 4523-4533.
- GUO Y Y, CHEN M G, SUN S L, WU X F, JIANG K, ZHU Z D, LI H J, HE Y Q, WANG X M. Genetic diversity of *Puccinia polysora* Underw. in China. *Scientia Agricultura Sinica*, 2013, 46(21): 4523-4533. (in Chinese)
- [17] 马红霞, 孙华, 郭宁, 张海剑, 石洁, 常佳迎. 禾谷镰孢复合种毒素化学型及遗传多样性分析. 中国农业科学, 2018, 51(1): 82-95.
- MA H X, SUN H, GUO N, ZHANG H J, SHI J, CHANG J Y. Analysis of toxigenic chemotype and genetic diversity of the *Fusarium graminearum* species complex. *Scientia Agricultura Sinica*, 2018, 51(1): 82-95. (in Chinese)
- [18] 常佳迎, 刘树森, 马红霞, 石洁, 郭宁, 张海剑. 黄淮海地区夏玉米弯孢叶斑病菌遗传多样性分析. 中国农业科学, 2019, 52(5): 822-836.
- CHANG J Y, LIU S S, MA H X, SHI J, GUO N, ZHANG H J. Genetic diversity analysis of *Curvularia lunata* in summer maize in Huang-Huai-Hai region. *Scientia Agricultura Sinica*, 2019, 52(5): 822-836. (in Chinese)
- [19] 梅玉云. 安徽省玉米小斑病菌的生物学特性与群体遗传多样性研究[D]. 合肥: 安徽农业大学, 2016.
- MEI Y Y. Biological characteristics and population genetic diversities of *Bipolaris maydis* in Anhui Province[D]. Hefei: Anhui Agricultural University, 2016. (in Chinese)
- [20] 廖蕾. 福建省玉米小斑病菌生物学特性和遗传多样性研究[D]. 福州: 福建农业大学, 2017.
- LIAO L. Study on biological characteristics and genetic diversity of *Cochliobolus heterostrophus* in Fujian Province[D]. Fuzhou: Fujian Agriculture and Forestry University, 2017. (in Chinese)
- [21] 常佳迎, 刘莉, 刘树森, 石洁, 郭宁, 张海剑, 刘粤阳. 黄淮海地区夏玉米灰斑病病原菌鉴定及主栽品种抗性分析. 植物病理学报, 2019, 49(6): 808-817.
- CHANG J Y, LIU L, LIU S S, SHI J, GUO N, ZHANG H J, LIU Y Y. Identification of causal agent of gray leaf spot and resistance of important hybrids in Huanghuaihai summer maize region. *Acta Phytopathologica Sinica*, 2019, 49(6): 808-817. (in Chinese)
- [22] 张天宇. 介绍一项用于单孢子分离和制片以备显微摄影的显微操作技术. 真菌学报, 1983, 2(3): 197-200.
- ZHANG T Y. A technique using micromanipulator for isolating single spores and preparing slide for photomicrograph. *Acta Mycologica Sinica*, 1983, 2(3): 197-200. (in Chinese)
- [23] NEI M. Genetic distance between populations. *The American Naturalist*, 1972, 106(949): 283-292.
- [24] NEI M. Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1973, 70(12): 3321-3323.
- [25] 代玉立, 甘林, 滕振勇, 石姐妞, 阮宏椿, 杜宜新, 廖蕾, 陈福如, 杨秀娟. 福建省玉米小斑病菌致病力的分化. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2018, 46(4): 92-97, 106.
- DAI Y L, GAN L, TENG Z Y, SHI N N, RUAN H C, DU Y X, LIAO L, CHEN F R, YANG X J. Pathogenicity differentiation of *Cochliobolus heterostrophus* in Fujian. *Journal of Northwest A&F*

- University (Natural Science Edition)*, 2018, 46(4): 92-97, 106. (in Chinese)
- [26] WANG M, WANG S Q, MA J, YU C J, GAO J X, CHEN J. Detection of *Cochliobolus heterostrophus* races in South China. *Journal of Phytopathology*, 2017, 165(10): 681-691.
- [27] 王利智, 康志钰, 吴毅歆, 周惠萍, 毛自朝, 何月秋. 云南省玉米小斑病菌生理小种的初步鉴定. 云南大学学报(自然科学版), 2010, 32(3): 352-357.
- WANG L Z, KANG Z Y, WU Y X, ZHOU H P, MAO Z C, HE Y Q. Preliminary identification of physiological races of *Bipolaris maydis* in Yunnan. *Journal of Yunnan University (Natural Science Edition)*, 2010, 32(3): 352-357. (in Chinese)
- [28] 赵聚莹, 蒋晓丽, 贾海民, 李术臣, 石洁, 张海剑. 黄淮海地区玉米小斑病菌生理小种鉴定与评价. 河北农业科学, 2012, 16(9): 47-49.
- ZHAO J Y, JIANG X L, JIA H M, LI S C, SHI J, ZHANG H J. Identification and evaluation of physiological races of *Bipolaris maydis* in Huanghuaihai region. *Journal of Hebei Agricultural Sciences*, 2012, 16(9): 47-49. (in Chinese)
- [29] 王群. 山东省玉米品种(系)对病害的田间抗性鉴定[D]. 泰安: 山东农业大学, 2018.
- WANG Q. Field identification of maize cultivars (lines) resistance to diseases in Shandong Province[D]. Taian: Shandong Agricultural University, 2018. (in Chinese)
- [30] 施艳, 燕照玲, 王珂, 赵清爽, 席靖豪, 李冠楠, 刘焱昆, 袁虹霞, 李洪连. 河南省夏玉米品种对 6 种主要病害的抗性评价. 河南农业科学, 2019, 48(6): 95-98, 105.
- SHI Y, YAN Z L, WANG K, ZHAO Q S, XI J H, LI G N, LIU Y K, YUAN H X, LI H L. Evaluation of resistant summer maize varieties against six main diseases in Henan Province. *Journal of Henan Agricultural Sciences*, 2019, 48(6): 95-98, 105. (in Chinese)
- [31] 陆银萍. 安徽省玉米新品种(系)对玉米主要病害的抗病性研究[D]. 合肥: 安徽农业大学, 2015.
- LU Y P. New maize varieties (lines) of resistance to main diseases of maize in Anhui Province[D]. Hefei: Anhui Agricultural University, 2015. (in Chinese)

(责任编辑 岳梅)