



# 大麦条纹病原菌的 RAPD 遗传多样性分析及 大麦亲本抗性评价

侯静静<sup>1,2</sup>, 何智宏<sup>3</sup>, 司二静<sup>1,2</sup>, 姚立蓉<sup>1,2</sup>, 汪军成<sup>1,2</sup>, 马占军<sup>1</sup>,  
李葆春<sup>1,4</sup>, 杨 轲<sup>1,2</sup>, 孟亚雄<sup>1,2</sup>, 马小乐<sup>1,2</sup>, 王化俊<sup>1,2</sup>

(1. 甘肃省干旱生境作物学重点实验室/甘肃省作物遗传改良与种质创新重点实验室, 兰州 730070;

2. 甘肃农业大学 农学院, 兰州 730070; 3. 甘肃省林业科技推广总站, 兰州 730046;

4. 甘肃农业大学 生命科学技术学院, 兰州 730070)

**摘 要** 为了明确大麦条纹病菌—麦类核菌(*Pyrenophora graminea*) 在甘肃省河西走廊地区不同地理位置的遗传差异性, 并鉴定大麦亲本品种对其抗性, 运用 RAPD(Random Amplified Polymorphic DNA) 技术, 对甘肃农业大学农学院麦类实验室保存的 20 个采自河西不同地区的大麦条纹病菌株进行遗传多样性分析, 采用“夹心法”对 30 种大麦亲本材料进行抗性评价。结果表明, 在遗传相似系数(GS)为 0.716 6 时可将 20 个麦类核菌(*P. graminea*) 菌株划分为 4 类, 菌株 XTB 和 JT 聚为一类, 且这 2 个菌株的地理位置相隔较远, 菌株 YC 和 HYH 各自单独为一类, 剩余 16 个菌株聚为一类; 20 个供试菌株中, 菌株 QQ 和 SW、菌株 HZ 和 QWC 的遗传相似系数(Genetic Similarity, GS)均为 0.936 5, 遗传相似性最高, 遗传距离值分别为 0.052 3 和 0.045 5。菌株 YC 的遗传相似系数最小, 为 0.624 1, 与其他菌株间的遗传距离范围是 0.372 2~0.633 0, 得出不同地理来源的麦类核菌菌株存在一定的遗传差异性; 在供试菌株中, 菌株 CJZ 和 SW 的地理位置接近, 遗传距离小, 而菌株 SW 和 QWC、HZZ 和 SW、SSB 和 HZ 之间的地理位置均相隔较远, 但两两之间的遗传距离值均较小, 得出菌株间地理位置的远近差异与遗传距离的大小无显著相关性。抗性鉴定结果显示, 30 份供试的大麦亲本品种对菌株 QWC 的抗病性差异较大, 鉴定出 6 份高感大麦条纹病品种, 19 份感病品种, 5 份抗病品种, 其中‘Isotta’的抗性最差, ‘甘啤 6 号’抗性最好。综上所述, 引起甘肃河西走廊地区大麦条纹病的病原菌群体存在较高遗传差异性, 且其亲缘关系的远近与地理差异无明显相关性; 鉴定大麦亲本抗性, 得到抗感大麦品种组合‘甘啤 6 号’和‘Isotta’。

**关键词** 大麦条纹病; 麦类核菌; RAPD 分析; 遗传多样性; 抗性评价

**中图分类号** S435.123

**文献标志码** A

**文章编号** 1004-1389(2020)04-0512-09

大麦(*Hordeum vulgare* L.) 是禾本科大麦属 1a 生草本植物, 啤酒大麦是甘肃省优势特色产业<sup>[1]</sup>。大麦条纹病(Barley leaf stripe) 是大麦的主要病害之一, 在大麦种植区普遍发生<sup>[2-3]</sup>。国际范围内在地中海和北欧地区发病较为严重<sup>[4-5]</sup>。中国长江流域的沪、赣、浙、湘等地发病较重, 病株死亡率高达 30%~40%<sup>[6]</sup>。甘肃啤酒大麦和青稞的种植地同样发生该病害, 发病严重时能造成 10%~30% 的减产<sup>[7]</sup>。由于耕作制度的变化以及多年的连茬种植, 该病害发生日趋严重, 对于该病

病原抗性研究显得尤为重要。现已得知, 该病是由种子带菌引起的系统侵染性真菌病害, 其病原菌的无性阶段为禾内脐蠕孢(*Drechslera graminea* (Rabenh & Schlecht) Schoemaker)<sup>[8]</sup>, 有性阶段为麦类核菌(*Pyrenophora graminea*)<sup>[9]</sup>。

运用分子标记技术研究该病原菌的遗传差异性, 可以对大麦条纹病防治与抗性育种方面提供理论依据。分子标记技术包括许多类型, 如 IRAP、RAPD、RFLP、AFLP、SSR 等<sup>[10]</sup>。其中 RAPD(random amplified polymorphic DNA) 技

**收稿日期:** 2019-05-29 **修回日期:** 2019-07-23

**基金项目:** 国家大麦青稞产业技术体系(CARS-05-03B-03); 甘肃省科技重大专项计划(17ZD2NA016); 甘肃农业大学学科建设专项基金(GAU-XKJS-2018-082, 083); 甘肃省科技支撑计划(1604NKCA052)。

**第一作者:** 侯静静, 女, 在读硕士研究生, 从事作物遗传育种研究。E-mail: 528725294@qq.com

**通信作者:** 王化俊, 男, 博士, 教授, 主要从事麦类作物遗传育种研究。E-mail: whujun@yahoo.com

术是通过 PCR(Polymerase Chain Reaction)扩增产物片段的多态性来揭示待测基因组 DNA 的遗传多态性<sup>[11]</sup>。该技术的引物为随机多态单引物,且与模板配对稳定,其操作方便快捷,退火温度低等特点极大地提高了分析效率<sup>[12]</sup>。Jawhar 等<sup>[13]</sup>对叙利亚地区不同地理来源的麦类核菌(*P. graminea*)进行 RAPD 遗传多态性分析,结果得出不同地理来源菌株之间有明显差异性,表明 RAPD 可快捷准确地检测病原菌遗传多样性。Zein 等<sup>[14]</sup>运用 IRAP 和 ITS-RFLP 2 种标记方法分析麦类核菌(*P. graminea*)的遗传多样性,得出 2 种标记方式均能很好地揭示多样性。Bayraktar 等<sup>[15]</sup>研究表明,运用 ISSR 分析可将供试的麦类核菌(*P. graminea*)菌株划分为 4 个簇,用 ITS-RFLP 分析结果显示菌株间无差异。在大麦条纹病抗性评价研究方面,Mueller 等<sup>[16]</sup>在德国萨克森联邦州对 620 份大麦品种进行大麦条纹病的抗性鉴定,结果得出,超过 186 份品种在田间表现为抗性。

甘肃省的大麦种植区域广泛,河西走廊地区的生态环境多样,大麦条纹病原菌在该地区的遗传多样性及大麦亲本对该病菌的抗性尚未明确。因此本研究以河西地区的麦类核菌(*P. gra-*

*minea*)为研究对象,运用 RAPD 分子标记技术进行遗传多态性分析,采用“夹心法”鉴定大麦亲本材料对其抗性<sup>[17]</sup>,以期为大麦条纹病病害的防控和抗性育种提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

1.1.1 供试菌株 20 个供试菌株于 2009 和 2012 年采自河西走廊啤酒大麦种植区域,均采集于大麦条纹病发病植株的叶片部位,由甘肃农业大学麦类课题组保存并进行致病机理的研究。供试菌株信息如表 1 所示。

1.1.2 供试大麦品种 抗性评价的 30 份大麦品种由甘肃省干旱生境作物学重点实验室/甘肃省作物遗传改良与种质创新重点实验室提供,来自国内外不同大麦产区。

1.1.3 培养基的配制 使用的培养基为马铃薯葡萄糖琼脂培养基(Potato Dextrose Agar, PDA),将新鲜马铃薯削皮去芽眼切成 1 cm<sup>2</sup> 的小方块,称取重量 200 g,加 1 L 蒸馏水煮沸 20 min,过滤去残渣,在滤液中加入 20 g 葡萄糖和 17 g 琼脂,玻璃棒搅拌混匀,加蒸馏水定容至 1 L,高压蒸汽灭菌。

表 1 供试菌株信息

Table 1 Information of *Pyrenophora graminea*

| 编号<br>Number | 菌株<br>Strain | 来源<br>Source                   | 年份<br>Year | 编号<br>Number | 菌株<br>Strain | 来源<br>Source                 | 年份<br>Year |
|--------------|--------------|--------------------------------|------------|--------------|--------------|------------------------------|------------|
| 1            | CH           | 张掖市陈户 Chenhu, Zhangye          | 2012       | 11           | XSB          | 金昌市下三坝 Xiasanba, Jinchang    | 2012       |
| 2            | QQ           | 张掖市清泉 Qingquan, Zhangye        | 2012       | 12           | SS           | 武威市泗水 Sishui, Wuwei          | 2012       |
| 3            | YC           | 金昌市永昌 Yongchang, Jinchang      | 2009       | 13           | XTB          | 张掖市新天堡 Xintianbao, Zhangye   | 2012       |
| 4            | SSB          | 金昌市上四坝 Shangsiba, Jinchang     | 2009       | 14           | DQ           | 玉门市东渠 Dongqu, Yumeng         | 2012       |
| 5            | JT           | 白银市景泰 Jingtai, Baiyin          | 2009       | 15           | SSS          | 白银市三个山 Sangesan, Baiyin      | 2012       |
| 6            | SD           | 张掖市山丹 Shandan, Zhangye         | 2009       | 16           | TB           | 武威市头坝 Toubu, Wuwei           | 2012       |
| 7            | HZ           | 武威市猴庄 Houzhuang, Wuwei         | 2012       | 17           | HZZ          | 张掖市花寨子 Huazhaizi, Zhangye    | 2012       |
| 8            | CJZ          | 金昌市柴家庄 Chaijiazhuang, Jinchang | 2012       | 18           | SW           | 金昌市双湾 Shuangwan, Jinchang    | 2012       |
| 9            | GL           | 武威市古浪 Gulang, Wuwei            | 2009       | 19           | HYH          | 武威市黄羊河 Huangyanghe, Wuwei    | 2012       |
| 10           | QZ           | 武威市渠中 Quzhong, Wuwei           | 2012       | 20           | QWC          | 兰州市秦王川 Qinwangchuan, Lanzhou | 2009       |

### 1.2 试验方法

1.2.1 菌株遗传多样性的 RAPD 分析 参照真菌基因组 DNA 提取方法来提取 20 个供试麦类核菌(*P. graminea*)菌株基因组 DNA<sup>[18]</sup>。用超微量分光光度计测定其 OD<sub>230</sub>/OD<sub>260</sub> 值, OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> 值和浓度,用 1% 琼脂糖凝胶电泳进行检测,最终置于 -20 ℃ 冰箱保存,备用。由华大基

因公司(BGI)合成随机多态单引物<sup>[13,19]</sup>。

RAPD 扩增体系优化试验的引物为 OPK3 (序列:5'-CCAGCTTAGG-3'),DNA 模板为菌株 SD,将 DNA 模板浓度、2 × MasterMix (BIOTEKE,PR1701)添加量和循环数分别设置两个水平,30 ng/μL 和 60 ng/μL,5 μL 和 7 μL,40 和 45(表 2),PCR 反应程序如表 3 所示。扩增

产物经 GoldView II (GV II) 染色, 1.5% 琼脂糖凝胶电泳分离, 紫外光凝胶成像系统显像, 拍照。

表 2 RAPD 优化设置

Table 2 Optimal setting of RAPD

| 样品编号<br>Sample<br>number | DNA 浓度/(ng/ $\mu$ L)<br>DNA<br>concentration | 2 $\times$<br>Master<br>Mix/ $\mu$ L | 循环数<br>Cycle<br>numbers |
|--------------------------|----------------------------------------------|--------------------------------------|-------------------------|
| 1                        | 30                                           | 5                                    | 40                      |
| 2                        | 60                                           | 5                                    | 40                      |
| 3                        | 30                                           | 7                                    | 40                      |
| 4                        | 60                                           | 7                                    | 40                      |
| 5                        | 30                                           | 5                                    | 45                      |
| 6                        | 60                                           | 5                                    | 45                      |
| 7                        | 30                                           | 7                                    | 45                      |
| 8                        | 60                                           | 7                                    | 45                      |

表 3 扩增程序

Table 3 PCR program

| 步骤<br>Step | 温度/ $^{\circ}$ C<br>Temperature | 时间/min<br>Time |
|------------|---------------------------------|----------------|
| 1          | 94                              | 4              |
| 2          | 94                              | 0.75           |
| 3          | 37                              | 0.75           |
| 4          | 72                              | 1.5            |
| 5          | 72                              | 5              |
| 6          | 4                               | 60             |

注:第 4 步于 72  $^{\circ}$ C 转到步骤 2, 重复 40 或者 45 个循环。

Note: Go to step 2 and repeat 40 or 45 cycles.

运用筛选出的多态单引物和优化后的扩增体系对 20 个供试菌株基因组 DNA 进行 RAPD-PCR 扩增和 DNA 指纹图谱分析, 将电泳结果 DNA 图谱中的无条带 DNA 记为 0, 有条带记为 1, 建立 0, 1 型二元矩阵。各菌株间遗传相似性系数(Genetic Similarity, GS)的计算采用软件 NT-SYSpC 2. 10e 完成<sup>[20]</sup>, 聚类分析图的构建采用 UPGMA(Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean)法<sup>[21]</sup>。

1. 2. 2 大麦亲本抗性评价 采用“夹心法”, 以实验室前期鉴定出的大麦条纹病强致病性菌株 QWC 来接种侵染 30 份供试大麦亲本材料<sup>[22]</sup>。首先进行大麦种子预处理, 将种子置于 200 mL 锥形瓶, 加入  $\varphi=70\%$  酒精震荡 30 s, 移除上清, 加入无菌水, 震荡后吸除, 重复 3 次, 再加入  $\varphi=5\%$  次氯酸钠震荡 5 min, 除上清, 加入无菌水, 震荡去上清, 重复 3 次, 然后将种子置于无菌滤纸上吸干水分, 接着将处理后的种子放置于 PDA 菌

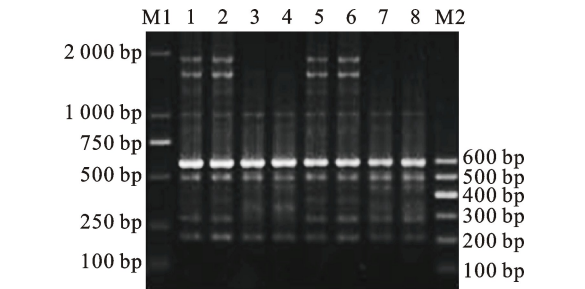
丝平板上, 最后, 在种子上层覆盖一层同样的 PDA 菌丝平板, 菌丝面接触种子。

试验以大麦种子置于空白 PDA 平板培养基间作为对照, 每个大麦品种设置 30 粒种子。4  $^{\circ}$ C 黑暗生化培养箱中侵染生长 20 d, 然后移栽至花盆中。培养条件为 12 h(光照)/12 h(黑暗), 温度为 20  $^{\circ}$ C(光照)/12  $^{\circ}$ C(黑暗), 湿度为 40% 的环境中生长。观察大麦发病情况, 统计感病率。参考 Pecchioni 等<sup>[23]</sup>方法进行大麦条纹病抗性等级评价: 高感(HS): 感病率 $>40\%$ ; 感病(S): 感病率 15%~40%; 抗病(R): 感病率 5%~15%; 高抗(HR): 感病率 $<5\%$ ; 免疫(I): 感病率=0%。

2 结果与分析

2. 1 RAPD 扩增体系优化

如图 1 所示, 在 10  $\mu$ L 的反应体系中, 当变量仅为 DNA 模板浓度时, 30 ng/ $\mu$ L 和 60 ng/ $\mu$ L 两个水平的扩增结果无显著差异, 如 1 和 2, 3 和 4, 5 和 6, 7 和 8 号泳道两两对比所得; 当变量为扩增循环数时, 40 和 45 的扩增结果同样差异不明显, 如 1 和 5, 2 和 6, 3 和 7, 4 和 8 号泳道两两对比所示; 但是 5  $\mu$ L 和 7  $\mu$ L 的 2 $\times$ MasterMix 对扩增结果有较大差异, 泳道 1 和 3, 2 和 4, 5 和 7, 6 和 8 号两两对比可以看出, 5  $\mu$ L 较 7  $\mu$ L 的扩增条带清晰, 且在 1 000 bp 到 2 000 bp 间多出两条条带。鉴于此, 本试验的 RAPD-PCR 扩增反应体系为: 1  $\mu$ L 引物(10  $\mu$ mol/L), 1  $\mu$ L DNA 模板(30 ng/ $\mu$ L), 5  $\mu$ L 的 2 $\times$ MasterMix(BIOTEKE, PR1701), 加 ddH<sub>2</sub>O 至 10  $\mu$ L。PCR 反应循环参数如表 3 所示。扩增产物经 GoldView II (GV II) 染色, 1% 琼脂糖凝胶电泳分离, 拍照。



M1. DL2000 DNA Marker; 1~8. 表 2 所示的 8 种不同扩增体系; M2. DNA Marker I

M1. DL2000 DNA marker; 1—8. Eight different amplification systems in table 2; M2. DNA Marker I

图 1 PCR 体系优化的扩增结果

Fig. 1 Amplification results of optimized PCR system

2.2 RAPD 图谱和聚类分析

筛选出 30 对具有多态性且条带清晰的随机单引物(表 4)进行 RAPD-PCR 试验,共获得 63 条多态性条带,总条带数为 138 条,多态性条带数

占总条带数的 45.65%。其中引物 S2082,S61,S9,S6 和 S1 的多态性比率均为 100%,引物 S82 的多态性比率最小,为 12.50%。

表 4 RAPD 分析引物序列和多态性条带

Table 4 Sequence of primers and number of polymorphic fragments obtained by RAPD analysis

| 编号<br>Number | 引物<br>Primer | 序列(5'→3')<br>Sequence<br>(5'→3') | 多态性条带数<br>Polymorphic<br>bands<br>number | 总条带数<br>Total<br>bands<br>number | 编号<br>Number | 引物<br>Primer | 序列(5'→3')<br>Sequence<br>(5'→3') | 多态性条带数<br>Polymorphic<br>bands<br>number | 总条带数<br>Total<br>bands<br>number |
|--------------|--------------|----------------------------------|------------------------------------------|----------------------------------|--------------|--------------|----------------------------------|------------------------------------------|----------------------------------|
| 1            | OPK3         | CCAGCTTAGG                       | 4                                        | 7                                | 16           | S94          | GGATGAGACC                       | 1                                        | 5                                |
| 2            | S2096        | CTCCACGACT                       | 2                                        | 5                                | 17           | S87          | GAACCTGCGG                       | 1                                        | 6                                |
| 3            | S2094        | CTTTGCGCAC                       | 2                                        | 8                                | 18           | S84          | AGCGTGTCTG                       | 3                                        | 9                                |
| 4            | S2093        | TCGGTGAGTC                       | 2                                        | 3                                | 19           | S82          | GGCACTGAGG                       | 1                                        | 8                                |
| 5            | S2089        | CCCCTTTTCC                       | 3                                        | 4                                | 20           | S81          | CTACGGAGGA                       | 2                                        | 6                                |
| 6            | S2088        | GGGAAGCGTC                       | 2                                        | 4                                | 21           | S67          | GTCCCGACGA                       | 1                                        | 4                                |
| 7            | S2086        | CAGCGGGTCA                       | 4                                        | 8                                | 22           | S66          | GAACGGACTC                       | 2                                        | 6                                |
| 8            | S2085        | GGAACGCTAC                       | 1                                        | 7                                | 23           | S61          | TTCGAGCCAG                       | 2                                        | 2                                |
| 9            | S2084        | CCCAAGCGAA                       | 3                                        | 6                                | 24           | S55          | CATCCGTGCT                       | 1                                        | 3                                |
| 10           | S2083        | TGGA CTGGT                       | 2                                        | 3                                | 25           | S35          | TTCCGAACCC                       | 3                                        | 4                                |
| 11           | S2082        | ACGCTGTAG                        | 4                                        | 4                                | 26           | S9           | TGGGGGACTC                       | 1                                        | 1                                |
| 12           | S2062        | CCTCCCCAAG                       | 2                                        | 3                                | 27           | S8           | GTCCACACGG                       | 1                                        | 2                                |
| 13           | S1080        | TGATGGCGTC                       | 2                                        | 4                                | 28           | S6           | TGCTCTGCCC                       | 3                                        | 3                                |
| 14           | S442         | ACGTAGCGTC                       | 2                                        | 3                                | 29           | S3           | CATCCCCCTG                       | 3                                        | 4                                |
| 15           | S95          | ACTGGGACTC                       | 1                                        | 4                                | 30           | S1           | GTTTCGCTCC                       | 2                                        | 2                                |

采用 UPGMA 法构建分子系统发育树,结果显示(图 2):菌株 HZ 和 QWC、菌株 QQ 和 SW 之间的遗传相似系数(GS)均为 0.936 5,为 20 个供试菌株间遗传相似性最高,且它们地理位置各不相同,分别在武威市、兰州市、张掖市和金昌市,其次是来自金昌市的菌株 SSB 和 CJZ 间的 GS 为 0.921 6。菌株 YC 的遗传相似性系数(GS)为 0.624 1,采自金昌市永昌县,在供试菌株间最小,与其余 19 个菌株间的遗传差异较大,次之是武威市黄羊河镇的菌株 HYH,遗传相似性系数(GS)为 0.674 1。供试的 20 个不同地区麦类核菌(*P. graminea*)间的遗传相似系数(GS)范围为 0.624 1~0.936 5,在遗传相似系数为 0.716 6 时可将 20 个菌株划分为 4 类,菌株 XTB 和 JT 为一类,且这两个菌株的地理位置相隔较远,前者在张掖市,后者在白银市,GS 最小的菌株 YC 单独为一类,次小的菌株 HYH 独自为一类,剩余 16 个菌株聚为一类,其中,菌株 TB 与其他 15 个菌株差异较大,GS 为 0.748 1 时菌株 SS、CH、SD、GL、DQ、QZ 和 SSS 聚在一起,剩余 8 个菌株聚在

一起。综上可得不同地理来源的麦类核菌(*P. graminea*)菌株间存有一定的遗传差异性。

如图 3 所示,试验中 20 个菌株间遗传距离为 0.052 3~0.819 1,图中数值与对角相应的方格颜色相一致。可以看出,菌株 TB 和 YC 间的遗传距离最大,对应方格颜色为深蓝色,说明这两个不同地理位置菌株之间的亲缘关系最远,分别采自武威市头坝村和金昌市永昌县。菌株 QQ 和菌株 SW 的遗传距离最小,对应方格颜色为深红色,说明两菌株亲缘关系最近,遗传差异较小,采自张掖市清泉镇和金昌市双湾镇。在供试的 20 个不同地区菌株中,菌株 SW 和 QWC,菌株 HZZ 和 SW,菌株 SSB 和 HZ 之间的地理位置均相隔较远,但遗传距离均较小,仅有 0.069 9、0.065 3 和 0.088 0。菌株 JT 和 SSS,菌株 YC 和 XSB 的地理位置较接近,但遗传距离较大,分别为 0.438 3 和 0.633 0。同时也存在地理位置接近遗传距离小和地理位置远遗传距离大的菌株,例如菌株 CJZ 和 SW,菌株 XTB 和 YC,遗传距离分别为 0.078 0 和 0.607 9,得出地理位置间的远近差异

与菌株遗传距离的大小无显著相关性。

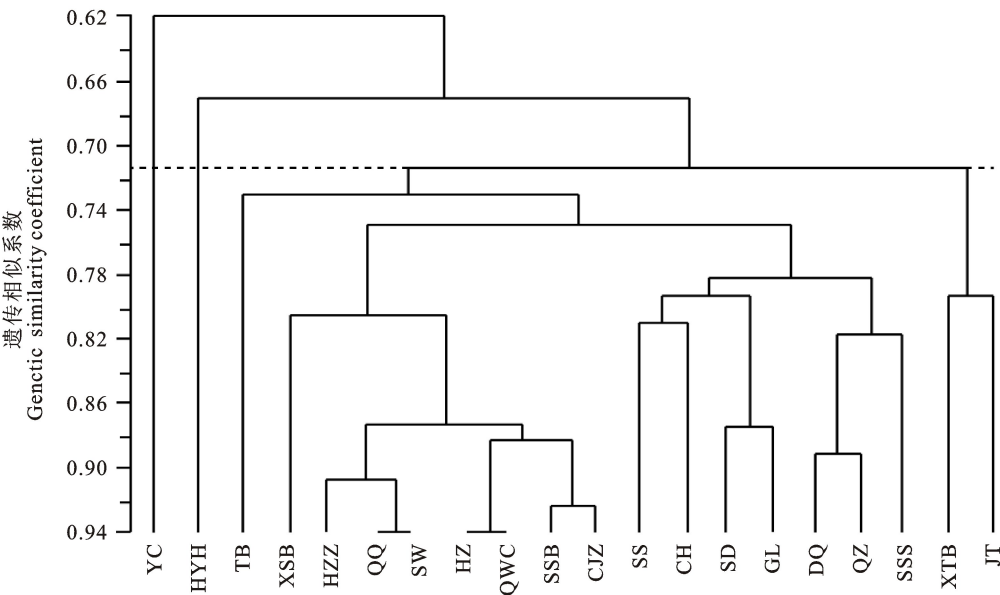


图 2 基于 RAPD 分析的 20 个菌株间遗传相似系数的 UPGMA 法聚类图  
Fig. 2 Phylogenetic tree constructed by UPGMA of similarity index matrix among 20 tested isolates based on RAPD analysis

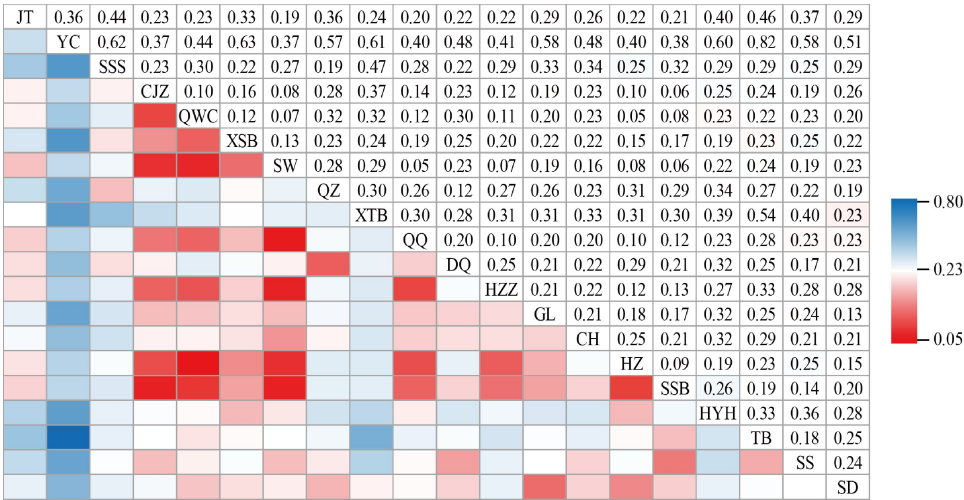


图 3 基于 RAPD 分析的 20 个菌株之间的遗传距离  
Fig. 3 Genetic distance of 20 strains based on RAPD markers

2.3 大麦亲本抗性评价

用甘肃农业大学农学院麦类实验室前期筛选到的强致病性麦类核菌 (*P. graminea*) 菌株 QWC 对 30 个大麦材料进行苗期抗大麦条纹病鉴定(表 5)<sup>[22]</sup>。试验未筛选出免疫(I)及高抗品种(HR),筛选得到抗病品种(R)为 5 个,分别为‘J04970’‘Z200V038V’‘Z1450008W’‘Z1’和‘甘啤 6 号’,均具有一定的抗病能力,感病率为

5%~15%,在 30 份供试品种中占到 16.67%;品种‘P002-3’‘2039040Q’‘TRADITION’‘Z040P111Q’‘Isotta’和‘Z02751407’的感病率均>40%,属于高感品种(HS),占供试品种数的 20%;其余 19 个感病品种(S)的感病率不尽相同,抗大麦条纹病能力存在一定差异性,感病率介于 15%~40%。在供试的 30 份大麦亲本材料中,抗病性结果表现出较大差异,品种‘甘啤 6 号’感病

率为 10.84%,对菌株 QWC 的抗性最好,品种 ‘Isotta’的抗病能力最差,感病率达到 73.53%。

表 5 大麦亲本抗性鉴定  
Table 5 Resistant identification of barley varieties

| 编号<br>Number | 品种<br>Variety       | 感病率/%<br>Susceptibility<br>rate | 抗性等级<br>Resistance<br>level | 编号<br>Number | 品种<br>Variety      | 感病率/%<br>Susceptibility<br>rate | 抗性等级<br>Resistance<br>level |
|--------------|---------------------|---------------------------------|-----------------------------|--------------|--------------------|---------------------------------|-----------------------------|
| 1            | 2039040Q            | 46.15                           | HS                          | 16           | 苏盐 0014 Suyan 0014 | 15.79                           | S                           |
| 2            | Z221V035W           | 16.67                           | S                           | 17           | Isotta             | 73.53                           | HS                          |
| 3            | Z0273089T           | 37.50                           | S                           | 18           | PRE5TGE            | 15.15                           | S                           |
| 4            | ND14636             | 15.00                           | S                           | 19           | Z1                 | 14.29                           | R                           |
| 5            | 农牧 36 Nongmu 36     | 15.22                           | S                           | 20           | P002-3             | 46.15                           | HS                          |
| 6            | Z200V038V           | 11.11                           | R                           | 21           | 甘啤 6 号 Ganpi 6     | 10.84                           | R                           |
| 7            | 02 单 954 02 dan 954 | 29.17                           | S                           | 22           | Z02751407          | 48.39                           | HS                          |
| 8            | 78                  | 19.35                           | S                           | 23           | EMPRESS            | 15.15                           | S                           |
| 9            | J04970              | 12.00                           | R                           | 24           | Z122V026W          | 30.00                           | S                           |
| 10           | Z0315024T           | 33.33                           | S                           | 25           | Z122V021W          | 17.24                           | S                           |
| 11           | Z040P111Q           | 52.17                           | HS                          | 26           | Marnie             | 15.22                           | S                           |
| 12           | 18 晚熟 18 wanshu     | 16.67                           | S                           | 27           | TRADITION          | 50.00                           | HS                          |
| 13           | Z1450008W           | 14.71                           | R                           | 28           | Z0305023T          | 25.00                           | S                           |
| 14           | Z0273140T           | 18.18                           | S                           | 29           | Z010J045T          | 15.56                           | S                           |
| 15           | Z202V017W           | 24.32                           | S                           | 30           | Z193V020W          | 17.24                           | S                           |

注:高感(HS).感病率>40%;感病(S).感病率 15%~40%;抗病(R).感病率 5%~15%;高抗(HR).感病率<5%;免疫(I).感病率=0%。  
Note: HS=highly susceptible (susceptibility rate>40%); S=susceptible (susceptibility rate 15%–40%) R=moderately resistant (susceptibility rate 5%–15%); HR=highly resistant (susceptibility rate<5%); I=immunology (susceptibility rate=0%).

3 讨论与结论

3.1 不同地理位置菌株遗传多样性分析

Jawhar 等<sup>[13]</sup>和郑果<sup>[24]</sup>采用 RAPD 分子标记技术研究麦类核菌(*P. graminea*)菌株的遗传多样性时,筛选到的 RAPD 多态性引物分别只有 2 条和 9 条,本试验筛选出 30 对多态性引物, RAPD 引物筛选的越多,不同地理位置麦类核菌的遗传差异性表现越明显。在 Bakonyi 等<sup>[25]</sup>的相关研究中,遗传相似系数(GS)为 0.868 0~0.976 0,本试验中 GS 为 0.624 1~0.936 5,与之相比范围更广,更好地揭示了麦类核菌(*P. graminea*)菌株间遗传差异性。

通过优化后的 RAPD 扩增体系进行试验,共获得 63 条多态性条带。在遗传相似系数(GS)为 0.716 6 时将供试的 20 个菌株划分为 4 类,其中菌株 HZ 和 QWC、菌株 QQ 和 SW 之间的遗传相似系数(GS)均为 0.936 5,20 个供试菌株间遗传相似性最高,且它们地理位置各不相同,但共同聚为一类。菌株 SW 和 QWC,菌株 HZZ 和 SW,菌

株 SSB 和 HZ 之间的地理位置均相隔较远,但遗传距离均较小,仅有 0.069 9、0.065 3 和 0.088 0。同时也存在地理位置接近遗传距离小和地理位置远遗传距离大的菌株,例如菌株 CJZ 和 SW,菌株 XTB 和 YC。因此得出不同地区所分离的麦类核菌菌株间亲缘关系的远近与地理差异无明显相关性,与司二静等<sup>[22]</sup>运用 ISSR 方法分析结果相一致。李登辉等利用 8 对 AFLP 选择性引物组合对 19 份麦类核菌进行多态性扩增,试验菌株划分为 4 个类群,相似系数(GS)为 0.83,同样得出菌株间遗传距离的远近与其地理分布无明显规律<sup>[26]</sup>。

综合 RAPD 分析结果得出甘肃河西地区麦类核菌菌株间有较大遗传差异,但菌株遗传特性与地理分布区域无明显相关性。菌株间之所以存在较大遗传差异,推测可能与河西不同地区的海拔、光照、温度、湿度等环境因素造成的遗传变异有关。条纹病菌株遗传特性与地理位置无明显相关性,可能与大麦条纹病的是种传病害的特性有关,其病原菌—麦类核菌(*P. graminea*)的菌丝不

存在胚中,它在果皮薄壁细胞之间的种子中存活,在果壳和种皮中生长<sup>[27-28]</sup>,不同地理位置所分离的麦类核菌聚为一类的原因可能是种子带菌传播所致。

### 3.2 大麦亲本抗性评价

本试验采用强致病性菌株 QWC 鉴定 30 个大麦品种的苗期抗病性,结果表明,同一麦类核菌(*P. graminea*)菌株侵染不同大麦亲本材料,大麦条纹病抗性差异较大,与 Bayraktar 等<sup>[15]</sup>的相关研究结果相似。本研究中,鉴定筛选出 6 份高感品种、19 份感病品种和 5 份抗病品种,抗大麦条纹病品种分别为‘1J04970’‘甘啤 6 号’‘Z200V038V’‘Z1450008W’和‘Z1’。所有供试材料中,‘甘啤 6 号’感病率为 10.84%,对菌株 QWC 的抗性最好,‘Isotta’的抗病能力最差,感病率达到 73.53%,共同组成大麦条纹病的抗感组合。Mueller 等<sup>[16]</sup>采用自然侵染和“夹心法”侵染两种方式鉴定 610 份大麦材料的大麦条纹病抗性,发现品种‘HOR 333’‘HOR 11475’‘OU J362’和‘BGRC 5592’在两种方式中都显示出抗性。吴宽然<sup>[29]</sup>鉴定 115 份大麦品种的抗性,得到抗性品种 31 份、中抗 24 份、中感 54 份、高感 7 份,其中二棱品种的平均感病率较六棱品种高。张万霞等<sup>[30]</sup>鉴定 191 份大麦材料,抗条纹病品种 89 份,其中‘单 2’‘单 6’和‘Harrington’农艺性状优良,具有较好的利用前景。孙立军等<sup>[31]</sup>筛选优异大麦种质资源,发现国内‘豫大麦 1 号’‘东阳三月黄’‘乌米大麦’等品种,国外‘Konal’‘ZF2262’‘岗 12’等品种对大麦条纹病都具有良好抗性。本试验未筛选到免疫及高抗品种,可能由于试验品种数量较少,菌株类型单一,后期将选择较多大麦品种材料和强致病性菌株进行抗性鉴定,筛选出更加优良的大麦条纹病抗感品种组合,为大麦条纹病病害的防控,抗性育种及病原菌研究奠定基础。

### 参考文献 Reference:

- [1] 张 弢,李万荣,毛竹馨,等.河西地区啤酒大麦需水规律及土壤水分变化特征研究[J].中国农学通报,2019,35(14):89-93.  
ZHANG T,LI W R,MAO ZH X,*et al.* Water demand rule of beer barley and soil moisture variation characteristics in Hexi region[J].*Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2019,35(14):89-93.
- [2] GHANNAM A,ALEK H,DOUMANI S,*et al.* Deciphering the transcriptional regulation and spatiotemporal distribution of immunity response in barley to *Pyrenophora graminea* fungal invasion[J].*BMC Genomics*, 2016,17(1):256.
- [3] ZAD J,AGHAKHANI M,ETEBARIAN R,*et al.* Barley leaf stripe disease[J].*Meded Rijksuniv Gent Fak Landbouwkde Toegep Biol Wet*,2002,67(2):279-281.
- [4] BISELLI C,URSO S,BERNARDO L,*et al.* Identification and mapping of the leaf stripe resistance gene *Rdg1a* in *Hordeum spontaneum*[J].*Theoretical and Applied Genetics*,2010,120(6):1207-1218.
- [5] BULGARELLI D,COLLINS N C,TACCONI G,*et al.* High-resolution genetic mapping of the leaf stripe resistance gene *Rdg2a* in barley[J].*Theoretical & Applied Genetics*, 2004,108(7):1401-1408.
- [6] 蒋耀培,唐国来,汤月忠,等.沪郊大麦条纹病重发原因与防治技术探讨[J].上海农业科技,2009(5):131-132.  
JIANG Y P,TANG G L,TANG Y ZH,*et al.* Discussion on causes and prevention techniques of barley stripe disease in Shanghai suburbs[J].*Shanghai Agricultural Science and Technology*,2009(5):131-132.
- [7] 牛小霞.河西地区大麦条纹病的发病规律及防治措施[J].现代化农业,2014(2):2-4.  
NIU X X. Occurrence regularity and control measures of barley stripe disease in Hexi area[J].*Modernizing Agriculture*,2014(2):2-4.
- [8] 杜文芳,左磊丽,何 敏,等.药剂拌种对大麦条纹病的防治效果[J].植物保护,2013,39(3):190-192.  
DU W F,ZUO L L,HE M,*et al.* Control efficiency of fungicides by seed dressing on barley stripe disease[J].*Plant Protection*,2013,39(3):190-192.
- [9] BAKRI Y,ARABI MIE,JAWHAR M. Heterogeneity in the ITS of the ribosomal DNA of *Pyrenophora graminea* isolates differing in xylanase and amylase production[J].*Microbiology*,2011,80(4):492-495.
- [10] 常佳迎,刘树森,马红霞,等.黄淮海地区夏玉米弯孢叶斑病菌遗传多样性分析[J].中国农业科学,2019(5):822-836.  
CHANG J Y,LIU SH S,MA H X,*et al.* Genetic diversity analysis of *Curvularia lunata* in summer maize in Huang-Huai-Hai region[J].*Scientia Agricultura Sinica*, 2019(5):822-836.
- [11] 王 阳,李邱华,李松林,等.电子束辐照百合鳞茎后对生长发育的影响及 RAPD 分析[J].西北农业学报,2013,22(3):140-147.  
WANG Y,LI Q H,LI S L,*et al.* The effects and RAPD analysis of electron beam irradiation on growth and development of Lily[J].*Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*,2013,22(3):140-147.
- [12] 王文艳,王力荣,初建青,等.桃 RAPD 扩增产物的不同电泳检测及其序列特征[J].西北农业学报,2011,20(6):141-146.  
WANG W Y,WANG L R,CHU J Q,*et al.* Analysis of different electrophoresis and sequencing of RAPD amplification products in peach[J].*Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*,2011,20(6):141-146.
- [13] JAWHAR M,SANGWAN R S,ARABI M I E. Identification of *Drechslera graminea* isolates by cultural charac-

- ters and RAPD analysis[J]. *Cereal Research Communications*, 2000, 28(1/2): 87-93.
- [14] ZEIN I, JAWHAR M, ARABI M I E. Efficiency of IRAP and ITS-RFLP marker systems in accessing genetic variation of *Pyrenophora graminea* [J]. *Genetics and Molecular Biology*, 2010, 33(2): 328-332.
- [15] BAYRAKTAR H, AKAN K. Genetic characterization of *Pyrenophora graminea* isolates and the reactions of some barley cultivars to leaf stripe disease under greenhouse conditions[J]. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, 2012, 36(3): 329-339.
- [16] MUELLER K J, VALE G, ENNEKING D. Selection of resistant spring barley accessions after natural infection with leaf stripe (*Pyrenophora graminea*) under organic farming conditions in Germany and by sandwich test[J]. *Journal of Plant Pathology*, 2003, 85(1): 9-14.
- [17] SKOU J P, HAAHR V. Screening for and inheritance of resistance to barley leaf stripe (*Drechslera graminea*) [J]. *Barley Genetics*, 1988, 18: 50-52.
- [18] AISAMSRAI T H, SCHMID J. A simple method for extraction of fungal genomic DNA[J]. *Letters in Applied Microbiology*, 2010, 30(1): 53-56.
- [19] 余磊, 邹琳, 陈小龙, 等. 石榴枯萎病菌的遗传多样性研究[J]. *植物病理学报*, 2011, 41(4): 345-351.
- YU L, ZOU L, CHEN X L, *et al.* Genetic diversity analysis of *Ceratocystis fimbriata* strains isolated from China [J]. *Acta Phytopathologica Sinica*, 2011, 41(4): 345-351.
- [20] 贺小伦, 周海峰, 袁虹霞, 等. 河南和河北冬小麦区假禾谷镰孢的遗传多样性[J]. *中国农业科学*, 2016, 49(2): 272-281.
- HE X L, ZHOU H F, YUAN H X, *et al.* Genetic diversity of *Fusarium pseudograminearum* collected from Henan and Hebei winter wheat regions[J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2016, 49(2): 272-281.
- [21] MANSOUR E, KHALED A B, TRIKI T, *et al.* Evaluation of genetic diversity among south tunisian pomegranate (*Punica granatum* L.) accessions using fruit traits RAPD markers[J]. *Sexual Medicine*, 2018, 17(1): 109-119.
- [22] 司二静, 杨淑莲, 李葆春, 等. 甘肃省大麦条纹病原菌致病力分化、rDNA-ITS 及遗传多样性分析[J]. *植物保护学报*, 2017, 44(1): 84-92.
- SI E J, YANG SH L, LI B CH, *et al.* Pathogenic analysis, rDNA-ITS and genetic diversity of *Pyrenophora graminea* in Gansu province[J]. *Journal of Plant Protection*, 2017, 44(1): 84-92.
- [23] PECCHIONI N, VALE G, TOUBIA-RAHME H, *et al.* Barley-*Pyrenophora graminea* interaction: QTL analysis and gene mapping[J]. *Plant Breeding*, 1999, 118(1): 29-35.
- [24] 郑果. 大麦条纹病原菌及防治研究[D]. 兰州: 甘肃农业大学, 2011.
- ZHENG G. Study of Pathogen and Chemical Control of Barley Leaf Stripe[D]. Lanzhou: Gansu Agricultural University, 2011: 3-4.
- [25] BAKONYI J, JUSTESEN A F. Genetic relationship of *Pyrenophora graminea*, *P. teres* f. *maculata* and *P. teres* f. *teres* assessed by RAPD analysis[J]. *Journal of Phytopathology*, 2007, 155(2): 76-83.
- [26] 李登辉, 郭焕强, 马丽, 等. 我国大麦条纹病菌 (*Pyrenophora graminea*) 群体遗传多样性 AFLP 分析[J]. *植物保护*, 2016, 42(4): 71-76.
- LI D H, GUO H Q, MA L, *et al.* Genetic diversity analysis of *Pyrenophora graminea* populations in China, the causal organism of barley leaf stripe by using AFLP method[J]. *Plant Protection*, 2016, 42(4): 71-76.
- [27] KUMAR J. Studies on the effect of stripe disease of barley [*Drechslera graminea* (Rabenh.) Shoemaker] on seed quality and its management[D]. Haryana: CCS Haryana Agricultural University, 2003: 9-11.
- [28] BULGARELLI D, BISELLI C, COLLINS N C, *et al.* The CC-NB-LRR-Type Rdg2a resistance gene confers immunity to the seed-borne barley leaf stripe pathogen in the absence of hypersensitive cell death[J]. *PLoS ONE*, 2010, 5(9): e12599.
- [29] 吴宽然. 大麦条纹病菌种群遗传结构分析及抗性种质鉴定[D]. 浙江: 浙江师范大学, 2013.
- WU K R. Analysis of genetic structure of *Drechslera graminea* populations and identification of resistance barley germplasm to barley stripe[D]. Zhejiang: Zhejiang Normal University, 2013.
- [30] 张万霞, 孙立军, 张京, 等. 优异大麦种质资源的抗性鉴定和评价[J]. *植物遗传资源科学*, 2001, 2(3): 18-21.
- ZHANG W X, SUN L J, ZHANG J, *et al.* Evaluation of disease resistance and salt tolerance for barley superior germplasm[J]. *Journal of Plant Genetic Resources*, 2001, 2(3): 18-21.
- [31] 孙立军, 陆炜, 张京, 等. 中国大麦种质资源鉴定评价及其利用研究[J]. *中国农业科学*, 1999, 32(2): 24-31.
- SUN L J, LU W, ZHANG J, *et al.* Evaluation and utilization of barley germplasm resources of China[J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 1999, 32(2): 24-31.

## RAPD Genetic Diversity Analysis of *Pyrenophora graminea* and Evaluation of Barley Parent Resistance

HOU Jingjing<sup>1,2</sup>, HE Zhihong<sup>3</sup>, SI Erjing<sup>1,2</sup>, YAO Lirong<sup>1,2</sup>,  
WANG Juncheng<sup>1,2</sup>, MA Zhanjun<sup>1</sup>, LI Baochun<sup>1,4</sup>, YANG Ke<sup>1,2</sup>,  
MENG Yaxiong<sup>1,2</sup>, MA Xiaole<sup>1,2</sup> and WANG Huajun<sup>1,2</sup>

(1. Gansu Provincial Key Lab of Aridland Crop Science/Gansu Provincial Key Lab of Crop Improvement & Germplasm Enhancement, Lanzhou 730070, China; 2. College of Agronomy, Gansu Agricultural University, Lanzhou 730070, China; 3. Forestry Sci-tech Extension Station of Gansu Province, Lanzhou 730046, China; 4. College of Life Sciences and Technology, Gansu Agriculture University, Lanzhou 730070, China)

**Abstract** In order to clarify the genetic diversity of *Pyrenophora graminea* at different geographical locations in Hexi of Gansu province and identify the resistance of barley parental varieties, RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) technique was used to analyze the genetic diversity of 20 strains of barley streak disease collected from different areas of Hexi in Gansu province. The resistances of 30 barley parents were evaluated by sandwich method. The results showed that 20 strains of *P. graminea* could be divided into four groups when the genetic similarity (GS) was 0.7166; the strains XTB and JT were clustered into one group and the geographical locations of these two strains showed a long distance. The strains YC and HYH were clustered into two groups, and the other 16 strains were clustered into one group. Among the 20 strains tested, the genetic similarities of strains QQ and SW, HZ and QWC were the highest, GS reached 0.936 5, and the genetic distances were 0.052 3 and 0.045 5 respectively. The genetic similarity of strain YC was the lowest, which was 0.624 1, and the genetic distance between YC and the other strains were 0.372 2—0.633 0, it was concluded that there were some genetic differences among the strains of *Pyrenophora graminea* from different geographical sources. In the tested strains, the geographical location of strain CJZ was closed to the one of SW, which showed the minimum genetic distance, while geographical locations of strains SW and QWC, HZZ and SW, SSB and HZ showed long distance, but the genetic distance between every two strains was relatively small, it was concluded that there was no significant correlation between the distance of geographical locations and the size of genetic distance. The results of resistance identification showed that the resistance of 30 barley parents to strain QWC varied greatly. 6 highly susceptible barley stripe varieties, 19 susceptible varieties and 5 resistant varieties were identified, among which ‘Isotta’ had the lowermost resistance and ‘Ganpi 6’ had the highest resistance. In summary, the pathogenic bacteria causing barley leaf stripe in Hexi of Gansu had high genetic diversity, and there was no significant correlation between the genetic distance and the geographical difference. The group of resistant variety ‘Ganpi 6’ and susceptible variety ‘Isotta’ was obtained by identifying the resistance of barley parents. This study provides a theoretical basis for prevention and control of barley stripe disease and resistance breeding.

**Key words** Barley leaf stripe; *Pyrenophora graminea*; RAPD analysis; Genetic diversity; Resistance evaluation

**Received** 2019-05-29

**Returned** 2019-07-23

**Foundation item** The National Barley Highland Barley Industry Technology System of China (No. CARS-05-03B-03); the Gansu Major Science and Technology Special Project (No. 17ZD2NA016); the Special Project for Academic Disciplines Construction of Gansu Agricultural University (No. GAU-XKJS-2018-082, 083); Gansu Science and Technology Support Program (No. 1604NKCA052).

**First author** HOU Jingjing, female, master student. Research area: crop genetics and breeding. E-mail: 528725294@qq.com

**Corresponding author** WANG Huajun, male, Ph. D, professor. Research area: genetics and breeding of wheat. E-mail: whuajun@yahoo.com

(责任编辑: 郭柏寿 Responsible editor: GUO Baishou)