

重庆稻瘟病菌群体遗传多样性分析

杨水英¹, 韩海波², 孙现超¹, 邸仕忠², 熊艳¹, 青玲^{1*}

(1. 西南大学 植物保护学院, 重庆 400715; 2. 重庆市涪陵区农业科学研究所, 重庆 408000)

摘要: 采用 rep-PCR 指纹技术, 对 73 个重庆稻瘟病菌菌株进行了 DNA 指纹扩增。结果表明, 菌株间显示了 DNA 指纹的多态性, 供试菌株分别扩增出 2~17 条 DNA 带。经 UPGMA 聚类分析, 在 0.80 遗传相似水平下, 供试菌株分为 12 个遗传谱系, 其中谱系 L7, L9, L12 为优势谱系。重庆稻瘟病菌的群体结构呈现多样性和复杂性, 菌株的遗传谱系与原寄主品种和地理分布之间均表现出较明显的相关性。

关键词: 稻瘟病菌; 遗传多样性; rep-PCR

中图分类号: S435.114.4⁺1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-3268(2008)11-0076-04

Population Structure of *Magnaporthe grisea* from Rice in Chongqing

YANG Shui-ying¹, HAN Hai-bo², SUN Xian-chao¹, DI Shi-zhong², XIONG Yan¹, QING Ling^{1*}

(1. College of Plant Protection, Southwest University, Chongqing 400715, China;

2. Fuling Institute of Agricultural Science, Chongqing 408000, China)

Abstract: DNA fingerprints of 73 *Magnaporthe grisea* isolates collected from the rice in Chongqing were tested with the rep-PCR technique. Polymorphism of DNA fingerprints existed among the isolates. The tested isolates showed 2–17 DNA bands after amplification. UPGMA analysis clustered 73 isolates into 12 genetic lineages at 0.8 genetic similarity. Of these lineages, L7, L9 and L12 were dominate lineages. The results indicated that genetic structure of *M. grisea* population in Chongqing was multiplicity and complexity, and the results also revealed that genetic lineage isolates were directly related to variety and geography distribution.

Key words: *Magnaporthe grisea*; Genetic diversity; rep-PCR

稻瘟病 (*Magnaporthe grisea*) 是世界性真菌病害, 也是我国水稻的三大病害之一^[1]。重庆复杂的生态地理条件和适宜的气候有利于稻瘟病的发生流行, 尤其是近年来由于大量主栽品种抗性降低或丧失, 稻瘟病发生加重, 发病面积均在 18 万 hm^2 以上, 部分地区暴发成灾, 严重威胁重庆水稻的安全生产。品种抗性丧失主要是由于稻瘟病菌群体内小种或致病性的变化所致。为此, 研究稻瘟病菌的群体遗传结构可以更好地了解稻瘟病菌的变异规律和动态, 为抗病品种选育、抗性品种合理布局 and 更换及病害防治提供理论依据^[2]。目前, 在稻瘟病菌的群体

结构研究中广泛应用的分子标记方法主要有 RFLP, RAPD, SCAR 标记, SSR 标记及 rep-PCR 技术^[3~12]。本研究采用 rep-PCR 技术分析重庆不同生态稻区的稻瘟病菌群体结构差异, 探讨病菌的遗传谱系与寄主品种、地理分布之间的关系。

1 材料和方法

1.1 供试菌株

73 个供试菌株为 2006—2007 年采集自重庆部分区县(市)稻作区的穗颈瘟标样, 经单孢分离、纯化获得。

收稿日期: 2008-04-24

基金项目: 重庆市自然科学基金项目 (CSTC, 2006BB1318)

作者简介: 杨水英 (1972-), 女, 重庆长寿人, 副教授, 硕士, 主要从事分子植物病理学研究。

通讯作者: 青玲 (1972-), 女, 四川西昌人, 副教授, 主要从事分子植物病理学研究。

1.2 菌株的培养

单孢菌株经活化后, 接于含蔗糖 15 g、酒石酸胺 5 g、硝酸胺 1 g、磷酸氢二钾 1 g、硫酸镁 0.5 g、氯化钠 0.1 g、氯化钙 0.15 g、酵母膏 0.5 g、酪蛋白水解物 0.5 g、水 1000 mL 的液体培养基。28℃振荡培养 3~4 d, 滤去培养液后的菌丝体用液氮研磨成粉末用于 DNA 提取。

1.3 DNA 的提取^[10]

将菌丝体粉末移于离心管(1.5 mL)中。加入 650 μL 的 DNA 提取液(100 mmol/L TrisHCl pH 8.0, 100 mmol/L EDTA, 250 mmol/L NaCl, 及 1% SDS, wt./vol), 50 μL 20% SDS, 75 μL 5 mol/L NaCl, 65 μL 10% CTAB, 保温(65℃, 1 h), 离心(12000 r/min)10 min, 取上清液加入等体积的氯仿-异戊醇(24:1)后, 离心(12000 r/min)5 min, 取上清液加入 0.6 倍体积的冷异丙醇, 冰冻(-20℃, 20 min), 离心(12000 r/min)15 min, 弃上清液, 70% 的酒精漂洗, 干燥, 加入 200 μL 1×TE。提取的 DNA 用 0.8% 琼脂糖胶电泳检测, 终浓度稀释为 50 ng/μL。

1.4 rep-PCR 扩增条件^[19]

25 μL 反应体系中, 每个引物浓度为 0.5 μmol/L (前引物 Pot2-1 序列为 5'-CGGAAGCCCTAAAGCT-GTTT-3', 后引物 Pot2-2 序列为 5'-CCCTCAT-TCGTACACGTTT-3'), 1×B9 缓冲液(10 mmol/L Tris, pH9.2, 25 mmol/L KCl, 1.5 mmol/L MgCl₂, 15 mmol/L [(NH₄)₂SO₄], 185 μmol/L dNTP, 2.5 U Taq 酶, 模板 DNA 50 ng, 扩增循环为 95℃预变性

2.5 min; 94℃变性 1 min, 62℃退火 1 min, 65℃延伸 10 min, 4 次循环; 94℃变性 30 s, 62℃退火 1 min, 65℃延伸 10 min, 26 次循环; 65℃延伸 15 min 后扩增完毕, 4℃保存待检。

1.5 扩增产物检测与分析^[13]

扩增产物用 0.5% 琼脂糖+0.75% Synergel 电泳(100 V/8 h)检测。使用 NTSYS-pc 计算机软件 UPGMA 分析程序, 进行聚类分析。

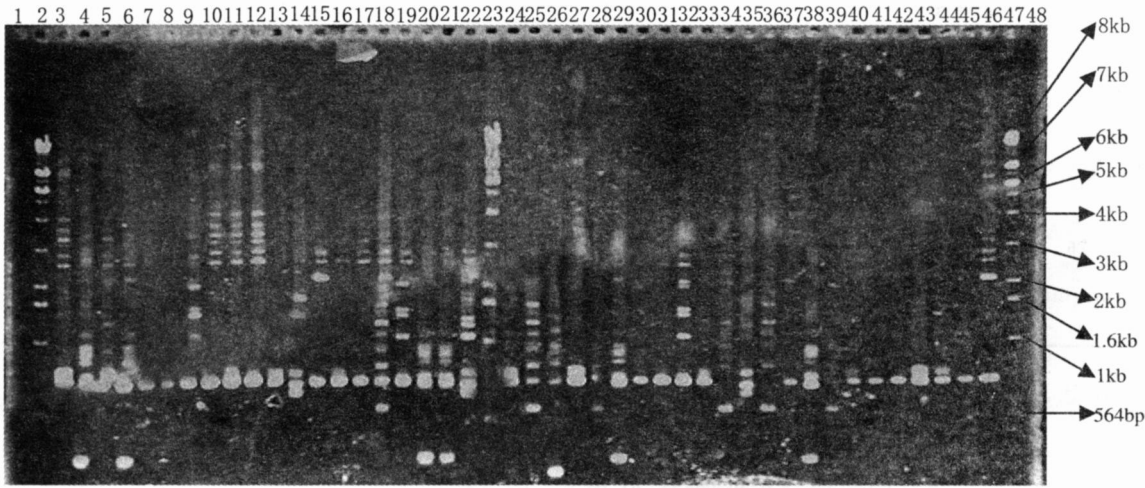
2 结果与分析

2.1 稻瘟病菌的群体遗传组成

用 Pot2-1 和 Pot2-2 引物对 73 个供试稻瘟病菌株进行 rep-PCR 扩增, 扩增产物用 0.5% 琼脂糖+0.75% Synergel 电泳检测。检测结果显示, 所有供试菌株均分别扩增到 2~17 条 DNA 带, 大小从 230 bp 到 8 kb 左右, 但大多集中在 564 bp 到 5 kb 之间(图 1)。使用 NTSYS-pc 计算机软件, 应用 UPGMA 分析程序, 将供试菌株扩增带谱进行聚类分析, 在 0.80 遗传相似水平下, 供试菌株分为 12 个遗传谱系(图 2)。其中, 第 7, 9, 12 为优势谱系, 第 7 谱系有 10 个菌株, 第 9 谱系有 26 菌株, 第 12 谱系有 23 个菌株, 分别占总数的 13.70%, 35.62%, 31.51%; 第 11 谱系有菌株 3 个; 第 5, 8, 10 谱系各有 2 个菌株; 其余谱系各有菌株 1 个。

2.2 稻瘟病菌群体遗传组成与寄主品种的关系

不同品种的稻瘟病菌群体遗传组成不同(表 1)。主栽品种冈优系列、II 优系列、D 优系列的稻瘟病菌群体遗传构成较复杂, 分别包含在 6 个、4 个、



1, 22, 46 泳道为 Marker (1kb DNA Ladder+ Hind III Marker); 从左自右 2-21 泳道分别为 cq31- cq50 号菌株; 23-45 泳道分别为 cq51- cq73 号菌株

图 1 部分稻瘟病菌菌株的 rep-PCR 扩增结果

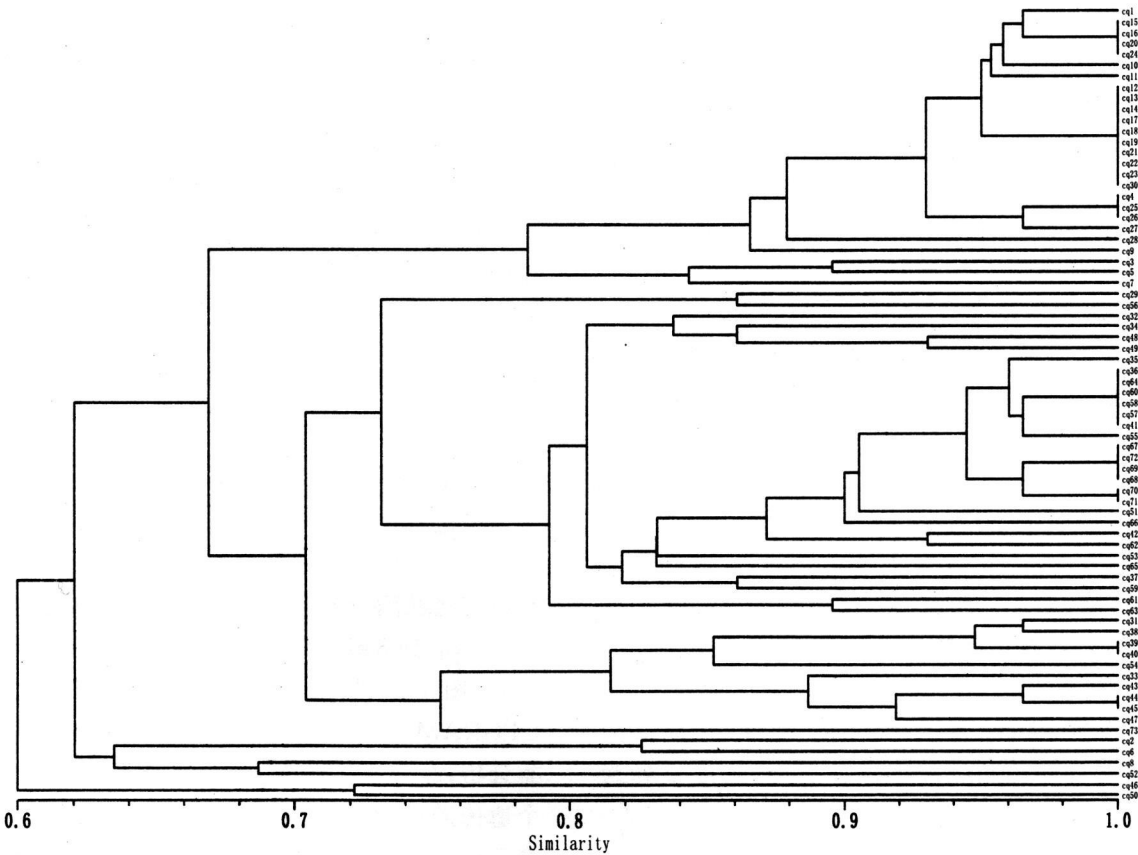


图 2 稻瘟病菌菌株 DNA 指纹图谱的聚类分析

5 个遗传谱系。菌株的遗传谱系与原寄主品种有较明显的相关性。D 优系列上分离的 9 个菌株, 有 4 个属于谱系 L7, 占 44.4%; II 优系列上分离的 12 个菌株, 有 9 个属于谱系 L12, 占 75.0%; 冈优系列上分离的 22 个菌株, 有 12 个属于谱系 L9, 占 54.5%, 故谱系 L7, L9, L12 分别是品种 D 优系列、冈优系

表 1 稻瘟病菌菌株的遗传谱系与水稻品种的相互关系

遗传谱系	菌株数	不同水稻品种上分离的菌株															
		冈优系列	Ⅱ优系列	D 优系列	Q 优系列	辐优系列	威优77	中优系列	金优系列	西农优系列	渝特优	准两优527	为天9号	宜香9303	川丰6号	倍丰3号	糯谷
L1	1												1				
L2	1			1													
L3	1																1
L4	1	1															
L5	2	1			1												
L6	1			1													
L7	10	2	1	4		1		1								1	
L8	2				1												1
L9	26	12	1		1	4	1		1						2	1	3
L10	2			1			1										
L11	3	2	1														
L12	23	4	9	2	1					2	1	1	1		2		

列、II 优系列的优势谱系。

2.3 稻瘟病菌群体遗传组成与地理分布的关系

各个遗传谱系菌株的地理分布见表 2。从表 2 可以看出, 谱系 L9 分布最广, 在 7 个不同稻区均有分布。其次是谱系 L12, L7, 分别在 6 个、4 个稻区有分布。不同稻区的遗传结构不同, 同一稻区的病

菌存在多个不同的遗传谱系。酉阳稻区的病菌主要属于谱系 L7(占该稻区菌株数的 53.8%), 黔江、南川稻区的病菌主要属于谱系 L9(分别占该稻区菌株数的 84.6%, 62.5%), 涪陵稻区的病菌主要属于谱系 L12(占该稻区菌株数的 65.2%), 也就是谱系 L7, L12 分别是酉阳、涪陵的优势谱系, L9 是黔江、

南川稻区共同的优势谱系。江津、武隆、奉节、万州稻区的优势谱系不明显。

表 2 稻瘟病菌菌株遗传谱系的地理分布

遗传谱系	菌株数	黔江	南川	江津	垫江	涪陵	武隆	奉节	酉阳	万州
L1	1	1								
L2	1		1							
L3	1			1						
L4	1				1					
L5	2				2					
L6	1					1				
L7	10			1		1	1		7	
L8	2		1	1						
L9	26	11	5			6	1	1	1	1
L10	2	1							1	
L11	3				3					
L12	23		1		1	15		1	4	1

3 讨论

1) 稻瘟病菌群体是一个高度易变的群体, 其群体遗传结构发生变化导致品种抗性丧失, 定期监测病菌群体遗传结构变化动态有助于改善抗病基因的布局, 防止病菌毒性变异, 延长抗病品种的使用寿命^[14]。笔者就 2006—2007 年重庆稻瘟病菌 73 个菌株进行了 DNA 指纹分析, 在 0.80 遗传相似水平下, 将供试菌株分为 12 个遗传谱系, 显示出较突出的优势谱系, 次要遗传谱系有 4 个, 即 L5, L8, L10, L11, 占 33.3%, 而 1 个菌株即成 1 个谱系的特异性谱系出现的情况较多, 有 5 个, 占 41.7%, 构成了极为复杂多变的遗传多样性特征, 这可能与重庆复杂的生态地理环境及水稻品种多样化的生产实际有关。

比较 2002 年对重庆稻瘟病菌 70 个菌株 DNA 指纹图谱的研究^[15], 发现重庆稻瘟病菌的谱系在不同年份间存在一定的动态变化, 近年来具有了更为复杂多变的遗传多样性。2002 年重庆稻瘟病菌群体在相同遗传相似水平(0.8)下划为了 9 个遗传谱系, 有 2 个单菌株构成特异性谱系(占 22.2%)。稻瘟病菌遗传结构变异受寄主品种、气候条件和种植结构等因素的影响, 是需要这些因素共同作用的, 是一个进化过程。病菌遗传结构复杂化, 说明病菌群体适应环境的能力变强, 更容易克服寄主的抗病性, 这也是近年来重庆稻瘟病发生加重的原因之一。为此, 应加强病菌群体遗传结构变化动态的监测, 及时、准确地作出预警。

2) 从本研究结果可看出, 重庆稻区稻瘟病菌的遗传谱系与原寄主品种关系密切, 主栽品种冈优系列、II 优系列、D 优系列的稻瘟病菌群体遗传构成较复杂, 但均具有优势谱系。这是病原物与寄主互作

和协同进化的结果。稻瘟病菌的遗传谱系与地理分布的关系也较为密切, 不同稻区的遗传结构不同, 同一稻区的病菌存在多个不同的遗传谱系, 这是病原物与生态环境相适应的结果。了解一稻区病菌的遗传谱系组成情况, 对合理布局抗病品种具有重要意义。

参考文献:

[1] 陈利锋, 徐敬友. 农业植物病理学[M]. 北京: 中国农业出版社, 2005.

[2] 周益军, 白娟, 程兆榜, 等. 我国稻瘟病菌群体多样性研究[J]. 中国水稻科学, 2004, 18(3): 277—280.

[3] 臧威, 李柱刚, 孙剑秋, 等. 稻瘟病菌群体遗传结构的研究进展[J]. 微生物学通报, 2007, 34(3): 591—594.

[4] Hamer J E, Farall L, Ortach M J, *et al.* Host species-specific conservation of a family of repeated DNA sequences in genome of a fungal plant pathogen[J]. Proc Natl Acad Sci, 1989, (86): 9981—9985.

[5] Kumar J, Nelson R J, Zeigler R S. Population structure and dynamics of *Magnaporthe grisea* in the Indian Himalaya[J]. Genetics 1999, 152(3): 971—984.

[6] 朱衡, 蒋琬如, 陈美玲, 等. 稻瘟病菌株的 DNA 指纹及其与小种致病性相互关系的研究[J]. 作物学报, 1994, 20(3): 257—263.

[7] Williams J G K, Kubelik A R, Lavak K J, *et al.* DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers[J]. Nucleic Acids Research, 1990, 18(22): 6531—6535.

[8] 胡铁柱, 王玲, 冯熙路, 等. 稻瘟病菌群体的分子遗传学研究——由 5 个亚群体组成的广东省稻瘟病菌群体遗传结构的分析[J]. 中国农业科学, 2003, 36(12): 1476—1483.

[9] Levy M, Romao J, Marchetti M A, *et al.* DNA fingerprinting with a dispersed repeated sequence resolves pathotype diversity in the rice blast fungus[J]. Plant Cell 1991(3): 95—102.

[10] George M L C, Nelson R J, Zeigler R S, *et al.* Rapid population analysis of *Magnaporthe grisea* by using rep-PCR and endogenous repetitive DNA sequences[J]. Phytopathology, 1998, 88: 223—229.

[11] McCouch S R, Kochert G, Yu Z H, *et al.* Molecular mapping of rice chromosomes[J]. Theory Appl Gene, 1988, 76: 815—820.

[12] Wang G L, Mackill D J, Bonman J M, *et al.* RFLP mapping of genes conferring complete and partial resistance to blast in a durably resistant rice cultivar[J]. Genetics, 1994, 136: 1421—1433.

[13] Rohlf F J. NTSYS-pc Numerical taxonomy and multivariate analysis system[M]. Exeter Publishing Co Ltd, 1989.

[14] 王宗华, 鲁国东, 谢联辉, 等. 对植物病原真菌群体遗传研究范畴及其意义的认识[J]. 植物病理学报, 1998, 28(1): 5—9.

[15] 杨水英, 肖崇刚, 韩海波, 等. 重庆稻瘟病菌不同菌株 DNA 指纹图谱分析[J]. 西南农业大学学报, 2002, 24(3): 235—237.