

不同年度重庆稻瘟病菌群体遗传结构与致病型的变化

韩海波¹, 杨水英^{2*}, 熊艳², 青玲², 孙现超², 勾治琴¹, 江艳冰²

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

摘要: 采用 rep-PCR 分子指纹技术对 2006—2007 年重庆地区的稻瘟病菌进行了遗传结构分析。结果表明, 供试菌株分别扩增到 2~17 条 DNA 带。经 UPGMA 聚类分析, 在 0.80 遗传相似水平下, 73 个供试菌株划分为 12 个遗传谱系。结合传统的植病学方法, 测定了分布于各个遗传谱系中的 66 个稻瘟病菌菌株的致病型。66 个菌株分属为 ZA、ZB、ZC、ZF、ZG 共 5 群 22 个致病型, 其中 ZA、ZB 群占优势, ZA11、ZB11 为优势致病型。与 2002 年重庆稻瘟病菌 70 个菌株的遗传谱系和致病型进行对比发现, 不同年度间重庆稻瘟病菌的谱系和致病型存在一定的动态变化, 近年来呈现出更为复杂多变的遗传多样性。

关键词: 稻瘟病菌; rep-PCR; 遗传谱系; 致病型

中图分类号: S435.111.4⁺1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-3268(2010)02-0057-04

The Yearly Variation of the Genetic Lineages and Pathotypes of *Magnaporthe grisea* in Chongqing

HAN Hai-bo¹, YANG Shui-ying^{2*}, XIONG Yan², QING Ling²,
SUN Xian-chao², GOU Zhi-qin¹, JIANG Yan-bing²

(1. Fuling Institute of Agricultural Science, Chongqing 408000, China;

2. College of Plant Protection, Southwest University, Chongqing 400715, China)

Abstract: The population structure of *Magnaporthe grisea* isolates collected from Chongqing area was determined with the rep-PCR technique. Each isolate was amplified with 2—17 DNA bands. Clustering analysis with UPGMA classified 73 isolates into 12 genetic lineages at a genetic similarity of 0.8. The pathotypes of 66 *Magnaporthe grisea* isolates in the genetic lineage were tested by traditional plant pathology. The 66 isolates were divided into 5 groups (ZA, ZB, ZC, ZF, ZG) and 22 pathotypes. ZA and ZB were the dominant groups and ZA11, ZB11 were the major pathotypes. The genetic lineages and pathotypes of *Magnaporthe grisea* changed in different years, and the genetic diversity became more complicated and changeable in recent years.

Key words: *Magnaporthe grisea*; rep-PCR; Genetic lineage; Pathotype

稻瘟病菌 (*Magnaporthe grisea*) 群体是一个高度易变的群体, 病菌群体结构的组成与变化直接影响病害的发生与流行。长期以来, 人们利用传统的植病学

方法对病菌群体的表现型结构做了大量研究, 但因条件和技术的限制, 传统方法划分的致病型难以从本质上反映稻瘟病菌的群体结构。自 Hamer 等从稻瘟病

收稿日期: 2009-09-02

基金项目: 重庆市自然科学基金项目 (CSTC, 2006BB1318)

作者简介: 韩海波 (1969—), 男, 重庆涪陵人, 高级农艺师, 本科, 主要从事稻瘟病防治研究。E-mail: flshhb@126.com

* 通讯作者: 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。

E-mail: yangshuiying123@sina.com

菌基因组克隆到1重复DNA序列以来,各国学者利用RFLP、RAPD、SCAR标记、SSR标记以及rep-PCR等多种分子指纹技术从DNA水平上揭示病菌的群体遗传结构^[1-12],快速、准确地监测病菌群体结构的组成与变化。

重庆具有复杂的生态地理条件和适宜的气候条件,有利于稻瘟病的发生流行。近年来重庆稻瘟病发生严重,部分地区暴发成灾。鉴此,分别利用rep-PCR分子指纹技术和传统方法,对2006—2007年重庆稻瘟病菌群体遗传结构和致病型进行了分析,并与2002年病菌的遗传结构和致病型进行了比较,以期揭示病菌群体遗传变异的规律,为指导品种合理布局、抗稻瘟病育种提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 供试菌株的来源

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。

1.2 菌株的培养

单孢菌株经活化后,接于含蔗糖15g、酒石酸胺5g、硝酸胺1g、磷酸氢二钾1g、硫酸镁0.5g、氯化钠0.1g、氯化钙0.15g、酵母膏0.5g、酪蛋白水解物0.5g、水1000mL的液体培养基。28℃振荡培养3~4d,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(1.5mL)中。加入650μL的DNA提取液(100mmol/L Tris HCl pH 8.0, 100mmol/L EDTA, 250mmol/L NaCl, 及1% SDS, wt./vol), 50μL的20% SDS, 75μL的5mol/L NaCl, 65μL的10% CTAB, 保温(65℃, 1h), 离心(12000r/min)10min, 取上清液加入等体积的氯仿-异戊醇(24:1)后, 离心(12000r/min)5min, 取上清液加入0.6倍体积的冷异丙醇, 冰冻(-20℃, 20min), 离心(12000r/min)15min, 弃上清液, 70%的酒精漂洗, 干燥, 加入200μL 1×TE。提取的DNA用0.8%琼脂糖胶电泳检测, 终浓度稀释为50ng/μL。

1.4 rep-PCR扩增条件^[19]

25μL反应体系中, 每个引物浓度为0.5μmol/L(前引物Pot2-1序列为5'-CGGAAGCCCTA-AAGCTGTTT-3', 后引物Pot2-2序列为5'-CCCTCATTCGTCACACGTTT-3'), 1×B9缓冲

液(10mmol/L Tris, pH 9.2, 25mmol/L KCl, 1.5mmol/L MgCl₂, 15mmol/L [NH₄]₂SO₄), 185μmol/L dNTP, 2.5U Taq酶, 模板DNA 50ng, 扩增循环为95℃预变性2.5min; 94℃变性1min, 62℃退火1min, 65℃延伸10min, 4次循环; 94℃变性30s, 62℃退火1min, 65℃延伸10min, 26次循环; 65℃延伸15min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(100V/8h)检测。使用NTSYS-pc计算机软件UPGMA分析程序, 进行聚类分析。

1.6 稻瘟病菌致病型测定^[14]

按全国稻瘟病菌致病型联合试验组的统一方法测定。

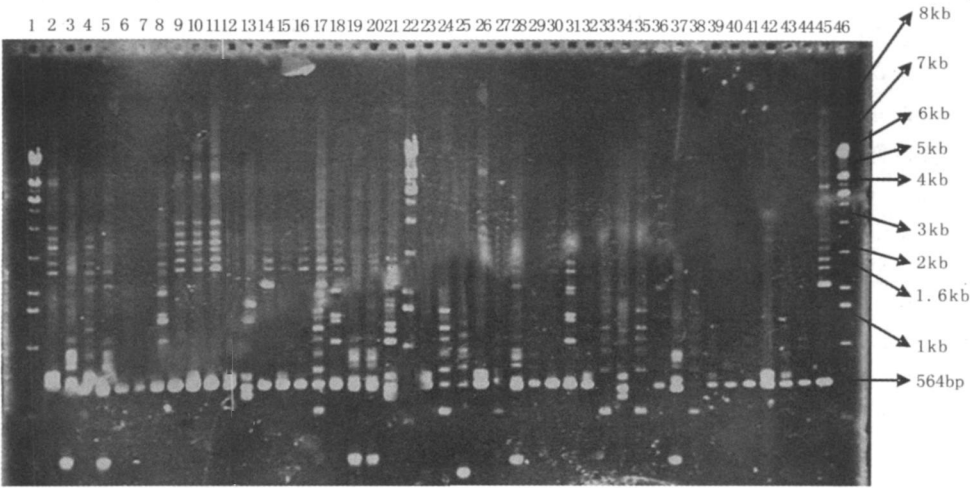
2 结果与分析

2.1 稻瘟病菌的群体遗传结构

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, 所有供试菌株分别扩增到2~17条DNA带, 大小从230bp到8kb左右, 但大多集中在564bp到5kb(图1)。使用NTSYS-pc计算机软件, 应用UPGRAM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个菌株, 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3个菌株; 第5、8、10谱系各有2个菌株; 其余谱系各有1个菌株。

2.2 稻瘟病菌菌株致病型测定结果

对供试菌株中分布于12个遗传谱系的其中66个菌株按全国统一的稻瘟菌致病型鉴定方法进行致病型测定。测定结果为: 66个菌株分属为ZA、ZB、ZC、ZF、ZG共5群22个致病型, 其中ZA群、ZB群占优势, 分别有31个菌株(占47.0%)、27个菌株(占40.9%)。ZA、ZB群的分化较强, ZA群有10个致病型, 分别是ZA1、ZA3、ZA9、ZA11、ZA15、ZA17、ZA27、ZA31、ZA59、ZA63; ZB群有8个致病型, 分别是ZB1、ZB3、ZB9、ZB11、ZB15、ZB25、ZB27、ZB31。ZC、ZF、ZG群的分化较弱, ZC有2个致病型, 分别是ZC11、ZC15; ZF、ZG群各有1个致病型, 分别为ZF1、ZG1。ZA11、ZB11为优势致病型(表1), 出现频率分别为19.7%、15.2%。



1、22、46泳道为 Marker (1kb DNA Ladder+ *Hind* III Marker); 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

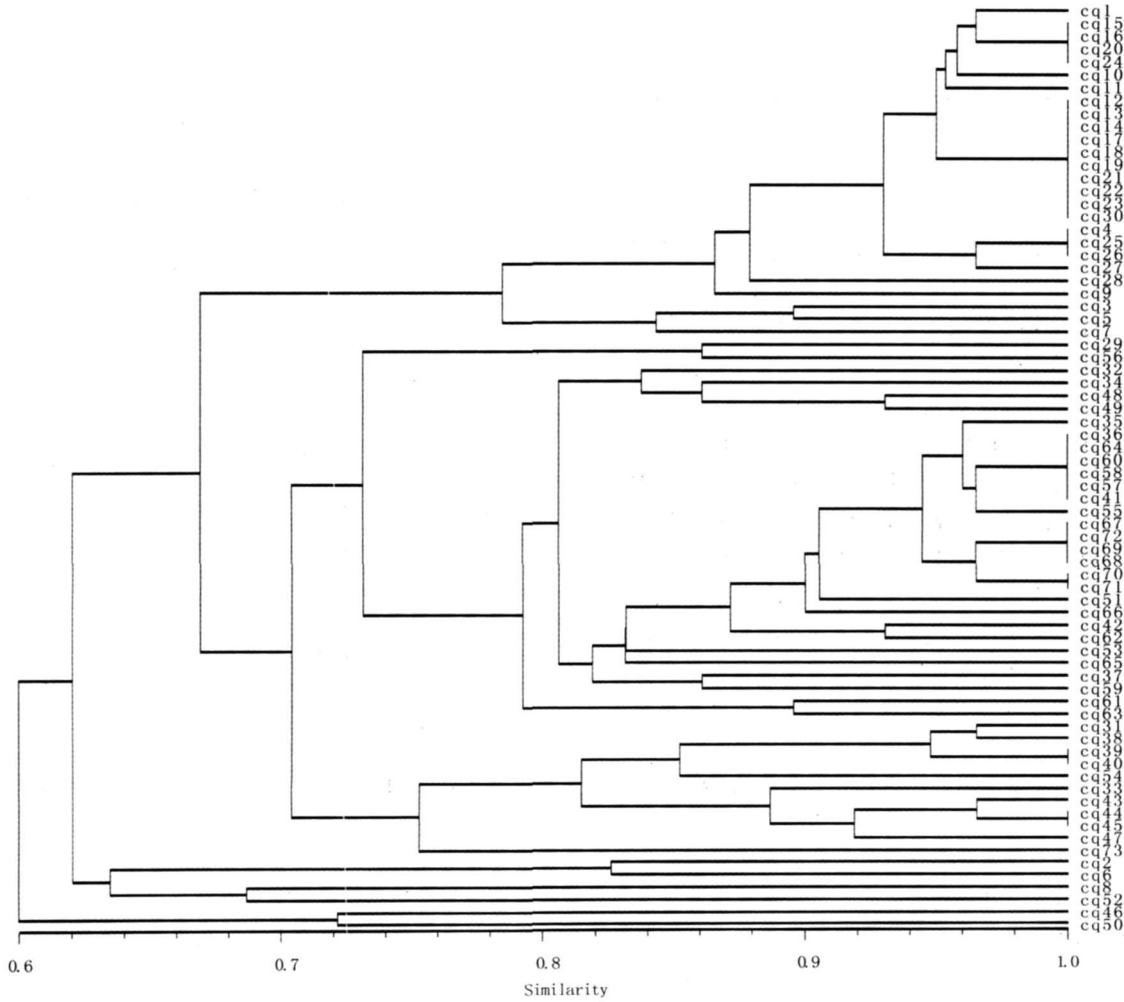


图 2 稻瘟病菌菌株 DNA 指纹图谱的聚类分析

2.3 不同年度稻瘟病菌的遗传谱系与致病型的变化
与 2002 年重庆稻瘟病菌 70 个菌株的 DNA 指纹

图谱和致病型进行比较^[19], 发现重庆稻瘟病菌的遗传谱系和致病型在不同年份间存在一定的动态变化,

近年来呈现出更为复杂多变的遗传多样性。2006—2007 年重庆稻瘟病菌在 0.80 遗传相似水平下分为 12 个遗传谱系,较突出的优势谱系有 3 个,即第 7、9、12 谱系;次要遗传谱系有 4 个,即第 5、8、10、11 谱系,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%,2002 年在相同遗传

传相似水平(0.8)下划为 9 个遗传谱系,有 2 个单菌株构成的特异性谱系(占 22.2%)。2002 年病菌的致病型分为 5 群,15 个致病型,ZA 群占优势,ZA1、ZA3、ZB1 为优势致病型;2006—2007 年病菌的致病型更为复杂,分为 5 群 22 个致病型,优势致病型也发生了变化,ZA11、ZB11 为优势致病型。

表 1 稻瘟病菌菌株的致病型测定结果

致病型	菌株号	菌株数	致病型	菌株号	菌株数
ZA1	8、26、4、19	4	ZB3	6	1
ZA3	52、26	2	ZB9	59、3	2
ZA9	45	1	ZB11	2、44、38、31、53、 66、67、41、32、24	10
ZA11	46、65、72、57、34、9、 27、25、18、17、1、50、56	13	ZB15	36、35	2
ZA15	70	1	ZB25	7、12	2
ZA17	21	1	ZB27	37、39、29、5、22、10	6
ZA27	30、23	2	ZB31	47、63、64	3
ZA31	43、58	2	ZC11	73、11、16	3
ZA59	71、15	2	ZC15	33	1
ZA63	69、14、13	3	ZF1	52、61	2
ZB1	51	1	ZG1	40、55	2

注:表中的菌株号省略了 cq

3 讨论

病菌在长期的进化过程中,其群体结构不断地变化。长期以来,人们利用传统的植病学方法研究病菌群体表现型结构,包括病菌的致病型、对药剂的敏感性等。病菌致病型的组成与变异直接关系到病害的发生与流行,但在传统致病型的鉴定过程中,会受各种环境和人为因素的影响,不能准确地反映病菌的群体结构。随着分子标记技术的迅猛发展,各国学者从基因型水平对稻瘟病菌群体结构进行了较细致地研究,并快速、准确地监测病菌群体结构的组成与变化^[1-12]。本试验在研究病菌群体表现型结构的基础上,利用 rep-PCR 分子指纹技术对重庆 2006—2007 年的稻瘟病菌群体进行了分析。结果显示,重庆地区稻瘟病菌具有丰富的遗传多样性,73 个供试菌株划分为 12 个遗传谱系,其中的 66 个菌株分属为 ZA、ZB、ZC、ZF、ZG 共 5 群 22 个致病型。与杨水英等^[10]2002 年对重庆稻瘟病菌群体的研究结果进行比较发现,近年来重庆稻瘟病菌群体遗传结构复杂化,遗传谱系和优势致病型均发生了变化,这正是近年来重庆稻瘟病发生加重的原因之一。为此,加强病菌群体遗传结构变化动态的监测,可及时、准确地对病害的发生作出预警,并为品种合理布局及抗性育种提供依据。

参考文献:

[1] Hamer J E, Farall L, Ortach M J, et al. Host species-spe-

cific conservation of a family of repeated DNA sequences in genome of a fungal plant pathogen[J] . Proc Natl Acad Sci 1989, 86: 9981-9985.
[2] Kumar J, Nelson R J, Zeigler R S. Population structure and dynamics of *Magnaporthe grisea* in the Indian Himalayas [J] . Genetics, 1999, 152(3): 971-984.
[3] 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.
[4] Levy M, Romao J, Marchetti M A, et al. DNA fingerprinting with dispersed repeated sequence resolves pathotype diversity in the rice blast fungus[J] . Plant Cell, 1991, 3: 95-102.
[5] George M L G, 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.
[6] McCouch S R, Kochert G, Yu Z H, et al. Molecular mapping of rice chromosomes[J] . Theory Appl Genet, 1988, 76: 815-820.
[7] 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.
[8] Leung H, Borromeo E S, Bernardo M A, et al. Genetic analysis of virulence in the rice blast fungus *Magnaporthe grisea* [J] . Phytopathology, 1988, 78: 1227-1233.

(下转第 119 页)

- 业科学, 1985(2): 88-91.
- [27] 丁永乐, 宋瑞芳, 肖春生. 桂阳烤烟田间不同栽培方式土壤速效养分动态变化[J]. 中国农学通报, 2007, 23(6): 410-413.
- [28] 曹正梅, 董树亭. 覆膜栽培玉米的土壤生态效应研究进展[J]. 山东农业大学学报, 1999, 30(4): 489-492.
- [29] Doran J W. Soil microbial and biochemical changes associated with reduced tillage[J]. Soil Sci Soc Am J, 1980(44): 765-771.
- [30] 戴冕. 烟根的形成与发展[J]. 中国烟草, 1982(1): 43-49.
- [31] 天镜, 郭月清. 烟草栽培[M]. 北京: 中国农业出版社, 1996.
- [32] 韩锦峰, 汪耀富. 土壤水分对烤烟根系发育和根系活力的影响[J]. 中国烟草, 1992(3): 14-17.
- [33] Chaplin J, Miner H. Production factors affecting chemical componenmts of tobacco leaf[J]. Tobacco Science, 1980(6): 3-63.
- [34] 钟翔, 申昌优, 郭伟, 等. 地膜覆盖对烤烟生态、产量和品质影响效果研究[J]. 江西农业科技, 1997(1): 13-16.
- [35] 熊瑛, 吕强, 王小东, 等. 液体地膜覆盖对烟苗生长发育的影响[J]. 河南农业科学, 2007(7): 31-34.
- [36] 王以慧, 厉昌坤, 董小卫, 等. 不同覆膜移栽方式对烤烟根系发育及烟叶产量和质量的影响[J]. 中国烟草科学, 2006(2): 44-47.
- [37] 魏洪武. 烟叶覆盖栽培试验研究[J]. 烟草科技, 1994(4): 37-39.
- [38] 王军, 谢玉华, 罗慧红, 等. “前膜后草”覆盖栽培对烟田土壤环境及烟株生长发育的影响[J]. 广东农业科学, 2007(5): 29-32.
- [39] 祖朝龙, 熊振敏, 强文化. 烤烟地膜覆盖栽培关键技术分析[J]. 安徽农业科学, 1997, 25(3): 221-222, 292.
- [40] 位辉琴, 杨兴有, 刘国顺, 等. 不同覆膜处理对烤烟生长及蔗糖转化酶、硝酸还原酶活性的影响[J]. 河南农业大学学报, 2006, 40(1): 18-21.
- [41] 魏洪武. 秸秆覆盖对烤烟产量和品质的影响[J]. 土壤肥料, 1995(4): 25-26.
- [42] 马京民, 马聪. 覆盖栽培对烤烟叶绿素、酶活性及丙二醛含量的影响[J]. 中国农学通报, 2006, 22(11): 169-172.
- [43] Wu L, Zhu Z, Liang Y, *et al.* Plasticfilmmulching cultivation; a new technology for resource saving water N fertilizer and reduced environmental pollution [M] //Host W J. Plant nutrition Food security and sustainability of agroecosystems. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 2001: 1024-1025.
- [44] 中国农业科学院烟草研究所. 中国烟草栽培学[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1987.
- [45] 商洁, 喻会平. 烤烟地膜覆盖栽培不同揭膜时间对产量及质量的影响[J]. 种子, 2003(1): 64-65.
- [46] 方明, 曹圣金, 史雄斌, 等. 稻草覆盖栽培在湖南烟区烤烟生产上的应用研究[J]. 现代农业科技, 2009(18): 82-83.
- [47] 郭利, 李娅, 曹祥练, 等. 烤烟地膜覆盖不同栽培方式试验研究[J]. 现代农业科技, 2008(16): 175-177.
- [48] 郑宪滨, 张正杨, 刘国顺, 等. 秸秆覆盖对烟田土壤性状和烟叶质量的影响[J]. 河南农业科学, 2007(10): 47-50.
- [49] 介晓磊, 黄元炯, 刘世亮, 等. 河南平原区烤烟“前膜后秸”覆盖栽培效果初报[J]. 中国农学通报, 2005, 21(8): 148-152.
- [50] 李法云, 付宝荣, 尚德隆, 等. 我国农业持续发展面临的环境问题及对策[J]. 辽宁大学学报, 1999, 26(1): 78-83.
- [51] 赵素荣, 张书荣, 徐霞, 等. 农膜残留污染研究[J]. 农业环境与发展, 1998(3): 7-10.

(上接第 60 页)

- [9] 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.
- [10] 杨水英, 肖崇刚, 韩海波, 等. 重庆稻瘟病菌遗传谱系与生理小种的关系研究[J]. 西南农业大学学报, 2002, 24(6): 535-538.
- [11] 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.
- [12] 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.
- [13] Rohlf F J. Numerical taxonomy and multivariate analysis system[M]. Exeter Software, 2000.
- [14] 全国稻瘟病菌生理小组联合试验组. 我国稻瘟病菌生理小种研究[J]. 植物病理学报, 1980, 10(2): 71-82.