

2007-2008 年江苏省稻瘟病菌遗传多样性

杨 豪^{1,2}, 任春梅¹, 陈毓苓¹, 范永坚¹, 程兆榜¹, 周益军^{1,2}

(1. 江苏省农业科学院 植物保护研究所, 江苏 南京 210014; 2. 南京农业大学 植物保护学院, 江苏 南京 210095)

摘要: 利用致病性测定及 Pot2-rep-PCR 技术对 2007、2008 年采集自江苏省五大稻区的稻瘟病菌株进行多样性分析, 这 2 年的菌株被划分为 10 个小种和 14 个系谱, 其中 ZG1 为优势小种, JSL5 为优势系谱。研究结果表明: 江苏稻瘟病菌具有丰富的多样性, 但与 1999-2002 年的群体结构比较时发现, 群体结构趋于简单; 对病原菌的时空分布分析发现, 不同的年份、不同的地区之间稻瘟菌的群体结构差异明显; 结合致病型与遗传系谱分析时发现, 致病类型与遗传系谱并没有一一对应的关系, 但致病性和遗传系谱的地区变化有一定的相似性, 这说明致病性和 DNA 分子水平上多态性检测在宏观上具有共同点, 在一定程度上都能反映稻瘟病菌的多样性。

关键词: 稻瘟病菌; 致病性; 群体结构; 多样性

中图分类号: S435.111.4⁺1 文献标识码: A 文章编号: 1000-7091(2011)04-0135-06

Genetic Diversity of *Magnaporthe grisea* from Rice in Jiangsu in 2007 and 2008

YANG Hao^{1,2}, REN Chun-mei¹, CHEN Yu-ling¹, FAN Yong-jian¹,
CHENG Zhao-bang¹, ZHOU Yi-jun^{1,2}

(1. Institute of Plant Protection, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Nanjing 210014, China;

2. College of Plant Protection, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

Abstract: Pathogenicity determination and Pot2rep-PCR techniques were used to analyze the diversity of *Magnaporthe grisea* from Jiangsu in 2007 and 2008, respectively. They were divided into 10 Physiological race and 14 lineages, in which ZG1 and JSL5 are dominant. The results showed that the rice blast fungus are rich in diversity in Jiangsu, but when compared with the group structure of 1999-2002, it tends to be more simple; By analyzing temporal and spatial distribution of *M. grisea*, we found that Population structure of *M. grisea* varied significantly between years and different rice cultivation areas of Jiangsu; By combining pathotypes and genetic lineages analysis, no obvious corresponding relationship was found between them. There is a certain similarity in region variations between pathotypes and genetic lineages, which indicated that there is something in common between pathotypes and DNA polymorphism examination at the macro-level, therefore, to a certain extent, they can reflect the diversity of *Magnaporthe grisea* all.

Key words: *Magnaporthe grisea*; Pathogenicity; Population structure; Variation

由稻瘟病菌 (*Magnaporthe grisea*, 无性阶段: *Pyricularia grisea*) 引发的水稻稻瘟病是水稻生产上的重要病害之一。目前选育和利用抗病品种仍是防治该病最经济有效的措施^[1]。稻瘟病菌存在着品种专化性和致病性分化, 具有丰富的遗传多样性及易变异特性, 从而导致一些抗病品种推广 2~3 年后即丧失抗病性。研究稻瘟病菌的致病性变异规律和

群体遗传结构对于深入理解其生物学特性、指导抗病品种选育或生产上利用抗病品种布局进行病害防治等均具有重要意义。

最初对稻瘟病菌群体结构的研究主要是利用生理小种鉴别品系对稻瘟病菌进行生理小种鉴定, 该方法在一定程度上推动了抗病育种和稻瘟病防治工作的发展, 至今仍在全世界范围内广泛应用。但该

收稿日期: 2011-01-25

基金项目: 国家支撑计划 (2006BAD02A16; 2006BAD08A04); 公益性行业专项 (200803008) 资助

作者简介: 杨 豪 (1981-) 男, 江苏淮安人, 硕士研究生, 主要从事水稻病害研究。

通讯作者: 程兆榜 (1969-) 男, 江苏盐城人, 研究员, 主要从事水稻病害研究。

周益军 (1957-) 男, 江苏淮安人, 研究员, 博士生导师, 主要从事植物病理学研究。

方法同时也存在一些缺点,如鉴定结果受到环境条件等多种因素干扰,没有统一的鉴别品系,不利于国际交流等等,尚有待于进一步的拓展和改进。自 20 世纪 80 年代末,从分子水平上揭示生物多样性的研究在稻瘟病菌中广泛应用,这些方法均有各自的优势和局限性,如 RFLP 技术所示结果具有较高可靠性、不需任何诱变剂处理、数量无限制,但所需模板 DNA 量大,操作复杂^[2]; SCAR 特异性好,不足之处是不能提供完整的信息、实验稳定性差等^[3]; Pot2-Rep-PCR 指纹分析法快速、简便、多态性强及特异性高^[4],可用于大样本的分析,能从一定程度上反映稻瘟病菌的遗传特性,近年来得到了广泛使用。

江苏位处长江、淮河下游,主要种植粳稻,其稻瘟病菌群体具有一定的特殊性,前人对江苏历年稻瘟病菌的致病性和遗传多样性均有研究^[5-7]。为进一步了解近年来江苏稻瘟病菌的变化动态,本试验采用用三套鉴别品系及 Pot2-Rep-PCR 技术研究了 2007-2008 年稻瘟病菌群体结构组成,旨在为稻瘟病控制和遗传变异提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 供试菌株 供试菌株共 199 个,2007 年和 2008 年采自江苏五大稻区(太湖稻区由于发病较轻,没有采到稻瘟病标样)不同水稻品种上的穗颈瘟样品经单孢分离后稻秸保存,单孢分离方法参照柴荣耀等^[8]的方法。

1.1.2 供试品种 用于致病性测定的水稻品种为中国统一稻瘟病菌生理小种鉴别品种(特特勃、珍龙 13、四丰 43、东农 363、关东 51、合江 18、丽江黑谷)、日本清泽系列单基因鉴别品种(新 2 号、爱知旭、藤板 5 号、草笛、露明、福锦、K1、NO4、城堡 1 号、K60、BL1、K59 和 K3)、丽江新团黑谷近等基因系鉴别品种(F-124-1、F-128-1、F-129-1、F-145-2、F-80-1 和 F-98-1)。这些品种对不同生理小种的鉴别作用以及所含有的抗病基因类型见周益军等^[9]。

1.2 方法

表 1 2007、2008 年江苏稻瘟菌的致病型组成

Tab. 1 Variation of *M. grisea* pathotypes in Jiangsu in 2007 and 2008

年份 Year	小种组成 Distribution of races									
	B15	B31	C13	C15	D3	D1	E1	E3	F1	G1
2007	4.04	5.05	4.04	5.05	12.12	-	1.01	6.06	36.36	26.26
2008	2.66	2.66	-	5.33	-	1.33	1.33	2.66	33.33	50.70
合计 Total	6.7	7.71	4.04	10.38	12.12	1.33	2.34	8.72	69.69	76.96

2.1.2 日本清泽系列品种对稻瘟病菌的毒性测定 利用日本清泽系鉴别品种将 2 年的菌株划分为

1.2.1 致病性测定方法 用单孢菌株在产孢培养基(玉米粉、稻秆粉培养基)上培育 7 d,黑光灯光照处理 3 d,用无菌水洗下培养基表面的孢子,配成 5×10^5 个/mL 的孢子悬浮液待用,将 20~25 d 苗龄的水稻幼苗(3~4 叶龄)置于接种箱内(70 cm × 45 cm × 33 cm),用真空泵进行喷雾接种,每箱 30 mL,每处理接种 20 株以上稻苗,3 次重复。接种后在箱内放置 24 h 后移入遮荫棚内,白天每隔 1 h 喷水 10 min 保湿,晚上加盖薄膜保温,7~10 d 后调查发病情况。

1.2.2 菌株基因组 DNA 的制备 用 CTAB/NaCl 微量法制备稻瘟病菌基因组 DNA,方法参见周益军、杜宜新等^[10,11]。

1.2.3 Pot2-rep-PCR 扩增 PCR 扩增采用的引物 Pot2-1: 5'-CGGAAGCCCTAAAGCTGTTT-3'; Pot2-2: 5'-CCCTCATTCGTCACACGTTT-3',由宝(大连)生物工程有限公司合成。25 μ L rep-PCR 反应体系与 PCR 扩增循环参照程兆榜、周益军等^[5,10]。

1.2.4 扩增结果检测和 Synergel 凝胶电泳 Rep-PCR 扩增产物用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测,选出代表性样品用 0.5% Agarose + 0.75% Synergel 凝胶电泳,EB 染色。Bio-rad 凝胶成像系统照相。

1.2.5 数据统计与分析 用 Quantity One 软件的 UPGA (Unweighted pair-group average) 聚类分析得到反映菌株亲缘关系的树状图。

2 结果与分析

2.1 2007、2008 年江苏省稻瘟病菌毒性多样性分析

2.1.1 两年江苏省稻瘟病菌中国生理小种组成与趋势 2007-2008 年成功接种 174 个菌株,根据中国统一鉴别品种可分为 6 个群 10 个生理小种,其中 F1 和 G1 仍为优势小种。与 2000、2001、2002、2008 年 G1 小种出现频率 65.00%, 56.90%, 60.38%^[12], 50.70% 相比,2007 年 G1 小种出现频率下降较多。2007 年和 2008 年小种类型变化不大,但与 2000、2001 和 2002 年^[12]的小种数分别为 17、26、15 相比有明显减少。

41 个小种,这较 2001、2002 年有较大差异。与 2002 年的 67 个小种相比小种类型明显减少,优势小种出

现相对分散,2007、2008 年的优势小种 311.2、311.3、13、13.2、11、37 出现频率分别为 6.89%、10.91%、16.09%、9.19%、10.34%、4.59%,其余小种出现频率都在 0.57%~2.87% 之间,小种组成年度差异显著,这和中国的统一鉴别品种结果在趋势上是一致的。

2.1.3 LTH 近等基因品种对江苏稻瘟病菌致病性测定 用 LTH 近等基因系将江苏 2007 年和 2008 年菌株分别划分为 9 和 10 个反应型,其中反应型 R、R、R、R、R、R 出现频率最高分别为 31.30% 和 37.30%,但与 2000、2001、2002 年出现的反应类型分别为 17、25、27 个相比,这 2 年的反应类型数量下

降明显,优势反应类型也发生了变化。

2.1.4 对已知抗瘟基因克服频率 2007 年和 2008 年菌株克服抗性基因 Pi-ta、pi-ta2、pi-kp、pi-b、Pi-k、Pi-km 的频率分别为 40.40%、42.70%;48.50%、38.70%;45.50%、42.70%;33.30%、17.30%;18.20%、5.30%;51.00%、42.70%。由此认为目前江苏田间主栽品种中含有抗性基因 Pi-k 的品种抗病性仍然较好,该抗性基因在江苏稻区有比较高的应用价值,而刘永锋认为 Pi-kh 的抗非常高,适合在抗性育种中应用。含这 6 个抗病基因的品种抗病性比 2001 年 2002 年都有所提高,在这些基因被推广应用后会有何种表现,尚待观察。

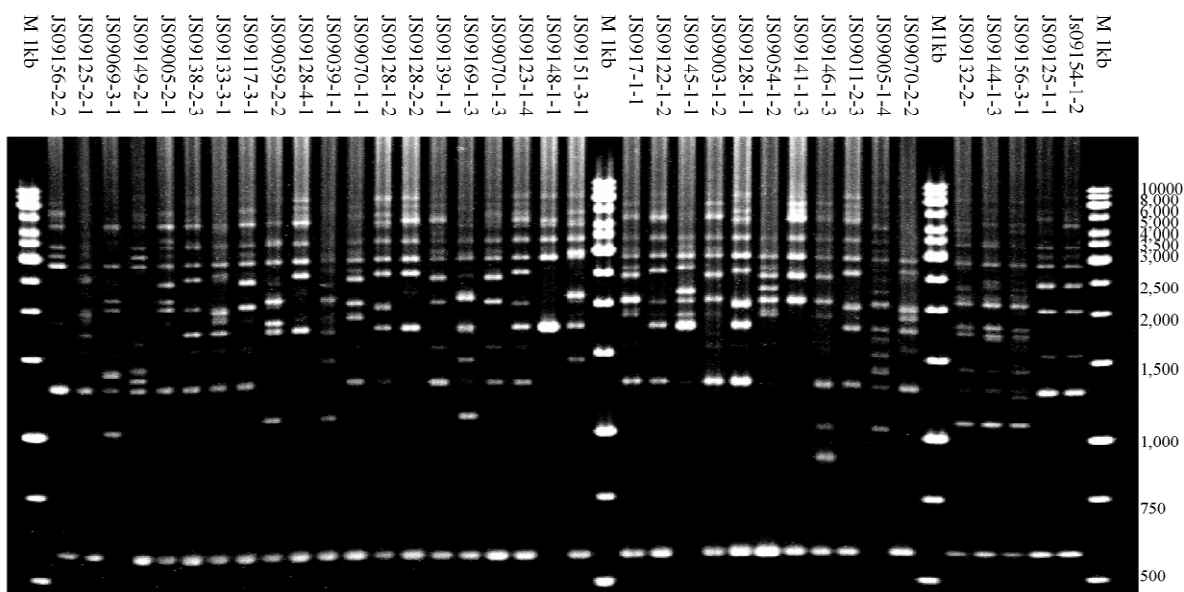


图 1 江苏稻区部分稻瘟菌株 Pot2-rep-PCR 指纹图谱

Fig. 1 Pot2-rep-PCR fingerprint for *M. grisea* from rice in Jiangsu

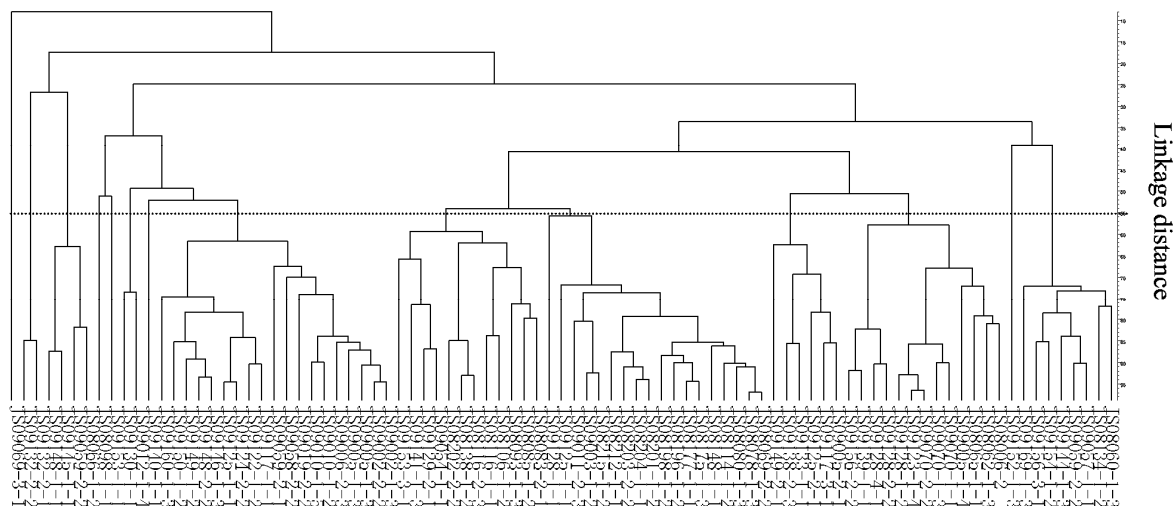


图 2 江苏稻区菌株单型聚类分析树状图

Fig. 2 Dendrogram of *M. grisea* isolates from Jiangsu by rep-PCR fingerprints

2.2 2007、2008 年江苏稻瘟菌遗传多样性分析

2.2.1 稻瘟菌的 rep-PCR 分析与系谱划分

Pot2-1、Pot2-2 一对引物对 199 个江苏省稻瘟菌基因组 DNA 进行 rep-PCR 扩增得到 27 个不同的片段,

分子量在 600 ~ 10 000 bp 之间,少数菌株有大片段分子量出现;Synergel 电泳分析,得到 89 个不同的单型,图 1 所示为代表菌株的指纹图谱。利用 UP-GA 聚类分析,以彼此间遗传距离小于 55% 为界,将 199 菌株划分为 14 个遗传系谱。菌株的对应系谱与彼此间的亲缘关系如图 2,其中 JSL3、JSL5、JSL6、JSL7 是江苏稻区的优势系谱,所占比例分别为 16.08%、25.13%、15.07%、14.07% (图 3)。

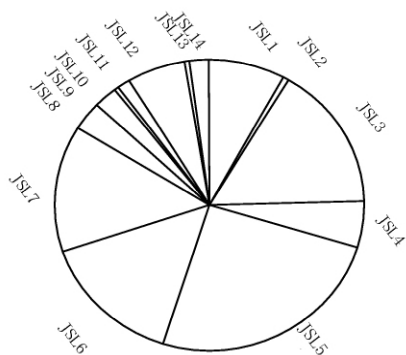


图 3 江苏稻瘟病菌系谱组成

Fig. 3 Distribution of *M. grisea* lineages in Jiangsu

2.2.2 病菌系谱的地区分布 由图 4 可知,江苏稻瘟病菌的群体遗传结构有明显的地区差异,同一稻区群体可有多个系谱,不同系谱可分布在同一稻区,不同稻区系谱组成明显不同。其中淮北稻区、沿海稻区、里下河稻区分别含有 12、10、10 个系谱,优势系谱分别 JSL6、JSL5 以及 JSL5 和 JSL3,群体结构比较复杂;丘陵稻区含有 8 个系谱,优势系谱为 JSL3 和 JSL7,群体结构相对简单。

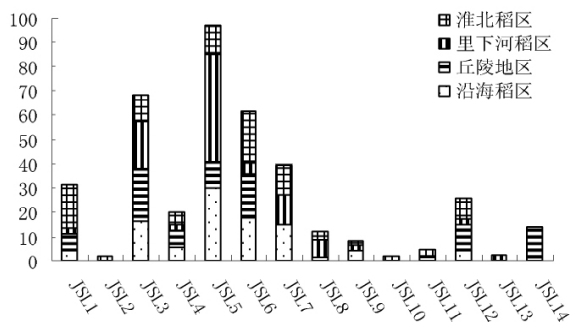


图 4 江苏不同稻瘟病菌系谱地区分布

Fig. 4 *M. grisea* lineages from different areas in Jiangsu

各个系谱在不同地区的分布也是有差异的。JSL3、JSL4、JSL5、JSL6、JSL7 在各个稻区都有分布,可以看出优势系谱的分布都比较广,这与白娟等^[7]的研究结果是一致的,JSL2、JSL10 只在淮北稻区出现,JSL13、JSL14 分别只出现在里下河稻区和丘陵稻区,这 4 个系谱分布较窄,是江苏稻区的稀有系谱,其余 4 个系谱分布在 2 ~ 3 个稻区,其中 JSL3、

JSL5、JSL6、JSL7 是江苏稻区的优势系谱。与白娟等 2004 年结果比较分析可以看出,淮北稻区、沿海稻区里的群体结构仍然比较复杂,里下河稻区的群体结构趋于复杂,丘陵稻区趋于简单。

2.2.3 病菌群体结构的年度间差异 比较两年稻瘟菌群体中系谱的组成差异明显 (图 5),采集的 2008 年的菌株群体含有 12 个系谱,而 2007 年只含有 8 个系谱。这可能是由于 2007 年江苏省是稻瘟病的轻度发生年,病害发生的品种和地区都相对单一造成的。结合前人对江苏稻区稻瘟菌株 1999 - 2002 年指纹图谱分析研究,其年度间的变异是很显著的,从整个江苏稻区情况看也较前几年简单。主要原因可能是单一品系水稻的推广,品种布局变化和气候差异等。

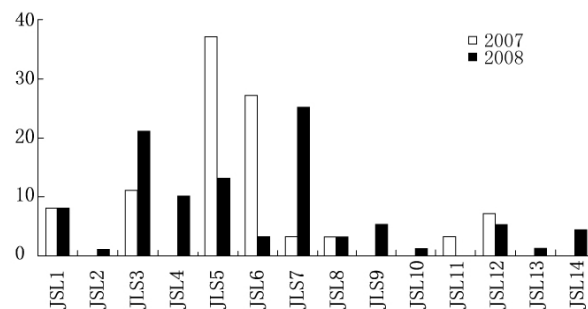


图 5 不同年度间稻瘟病菌系谱变化动态

Fig. 5 Variation of *M. grisea* lineages from different years in Jiangsu

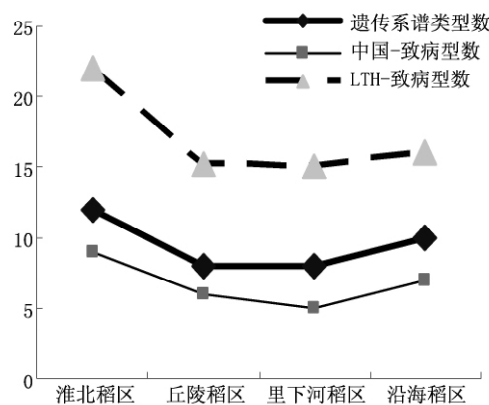


图 6 不地区稻瘟病菌致病型及系谱变化动态

Fig. 6 Variation of *M. grisea* genetic lineages and pathotypes from different areas in Jiangsu

2.2.4 中国-致病类型与系谱的关系 如表 2 所示同一小种出现在不同的系谱中,如优势 ZG1 小种出现在 JSL1、JSL2、JSL3、JSL4、JSL5、JSL6、JSL7、JSL8、JSL10、JSL11、JSL12、JSL13、JSL14 等 13 个遗传系谱中,分别很广,而优势遗传系谱 JSL5 也出现在 ZB15、ZB31、ZC13、ZC15、ZE1、ZE3、ZF1、ZG1 等 8 个不同的小种中,小种和系谱之间无明显的对应关

系,这与前人的研究结果是一致的^[6,11,13-15]。但是比较不同地区的致病类型与遗传系谱类型(图6)时发现,在沿海稻区和淮北稻区的致病性分别出现8个和9个,而遗传系谱分别出现了10个和11个,都较丘陵稻区和里下河稻区复杂,而4个稻区的系谱

类型数、中国7个鉴别品系和LTH近等基因系所鉴定得到的小种类型数的趋势都是相同的,即当系谱类型较复杂时,小种类型数也越多,这说明致病型和遗传系谱是有一定的相关性的,这两种方法在说明江苏菌株复杂性上趋势是一致的。

表2 江苏省稻瘟病菌致病型与遗传谱系的对照

Tab. 2 Pathotypes and genetic lineages of *M. grisea* in Jiangsu

中国-小种 类型	系谱类型													
	JSL1	JSL2	JSL3	JSL4	JSL5	JSL6	JSL7	JSL8	JSL9	JSL10	JSL11	JSL12	JSL13	JSL14
B15			2		1	1	2							
B31			2		2	1		1			1			
C13			1		1	2								
C15			1		1	3	2					2		
D1									1					
D3	1		1			7	1	1			1			
E1					1				1					
E3					4	3		1						
F1	3		14		20	5	11	2	3			3		
G1	12	1	5	3	13	8	9	1		1	6	6	1	3

3 讨论与结论

本研究所用菌株均采自田间自然发病的穗颈瘟标样,采集时遵循多点、多面、寄主品种多样的原则,能够很好的反映江苏省田间稻瘟病菌的群体结构和变异动态。

研究结果把江苏省5个不同的生态稻作区采集的199个菌株分成10个中国小种和14个DNA水平上密切相关的遗传系谱,14个系谱在全省分散存在,其中JSL3、JSL5、JSL6、JSL7为优势系谱,表明江苏省稻瘟菌群体结构具有明显的多样性和复杂性;而与2002年的研究比较时发现,小种与遗传系谱类型都在减少,并且在10个中国小种没有出现新的小种类型,可以看出群体结构趋于简单,通过指纹图谱分析病菌的单型与1999-2002年的差异也比较大,总体来讲江苏稻区菌株的变异比较大。这可能是由于水稻品种布局发生改变,抗病品种的推广,致使品种单一化趋势变大。

利用Rep-PCR对稻瘟病菌进行遗传多态性分析,同以传统上不同鉴别品种或不同基因型鉴别品种反应的表型划分的生理小种比较分析,可以清楚的看到同一系谱内有多个小种,同一小种内也有不同的系谱,不是简单的一一对应关系,这可能是通过rep-PCR扩增得到的DNA指纹是中性的分子标记,反映的是稻瘟病菌在DNA水平上的差异,而生理小种则是根据菌株对品种的抗、感表型进行划分,这涉及到稻瘟病菌侵染水稻的过程中多种基因

表达和调控,并且稻瘟病菌与水稻互作的结果还受到气候、环境等多种因素的影响。但对不同地区的小种与系谱类型进行研究时发现当小种类型较多的稻区系谱类型也较复杂,二者在宏观上是有一定的相关性。要进一步的把二者结合起来对病原菌的群体结构及变异进行分析研究,使其更好的为抗病育种和利用遗传多样性控制稻瘟病的危害与流行提供理论依据。

比较分析2007、2008年采集的稻瘟菌株群体结构发现,江苏稻区稻瘟病菌群体年度间的变化是很显著的,与1997-2002年江苏稻区稻瘟病菌群体结构相比^[5,6,7,9,10],群体结构趋于简单,这可能由于品种布局发生改变,抗单一病害或虫害的水稻品系推广,致使江苏稻区的水稻品种类型减少所致。

参考文献:

- [1] 潘汝谦,康必鉴. 水稻对稻瘟病菌群体的抗病性鉴定与评价[J]. 华南农业大学学报, 2003, 24(2): 30-33.
- [2] Sharma T R, Chauhan R S, Singh B M, et al. RAPD and pathotype analyses of Magnaporthe grisea populations from the North-western Himalayan region of India [J]. Journal of Phytopathology, 2002, 150(11-12): 649-656.
- [3] Claudio B, Rosana P, Vianello B, et al. Development of microsatellite markers for the genetic analysis of Magnaporthe grisea [J]. Genetics and Molecular Biology, 2000, 23(4): 753-762.
- [4] George M, Nelson R J, Zeigler R S, et al. A rapid method for DNA fingerprinting of rice blast fungus Pyricularia

- grisea [J]. *Phytopathology* ,1998 ,88:223 - 229.
- [5] 程兆榜,周益军,陆凡,等. 1999 年江苏省稻瘟病菌群体遗传结构分析 [J]. *江苏农业学报* ,2000 ,17(4): 223 - 226.
- [6] 熊如意,周益军,白娟,等. 2002 年江苏省水稻稻瘟病菌致病性及遗传多样性研究 [J]. *植物病理学报* ,2005 ,35(1):93 - 96.
- [7] 白娟,周益军,程兆榜,等. 2000 和 2001 年江苏省稻瘟病菌的群体结构 [J]. *南京农业大学学报* ,2004 ,27(2):43 - 46.
- [8] 柴荣耀,金敏忠. 介绍一种单孢直接挑取获得单孢菌株的方法 [J]. *植物保护* ,1991 ,17(5):53.
- [9] 周益军,程兆榜,范永坚,等. 用不同类型的水稻鉴别品种鉴定江苏稻瘟病菌的致病性 [J]. *作物学报* ,2003 ,29(2):268 - 273.
- [10] 周益军. 稻瘟病菌遗传多样性和致病性诱变研究 [D]. 南京:南京农业大学,2000.
- [11] 杜宜新,杨秀娟,阮宏椿,等. 福建稻瘟病菌遗传系谱与致病型的关系 2009 ,38(2):124 - 128.
- [12] 刘永锋,陈志谊,胡明,等. 江苏省稻瘟病菌群体分布及优势小种的毒力研究 [J]. *中国水稻科学* ,2004 ,18(4):351 - 356.
- [13] Borromeo E S ,Nelson R J ,Bonman M J *et al.* Genetic differentiation among isolates of *Pyricularia grisea* infecting rice and weed hosts [J]. *Phytopathology* ,1993 ,83: 393 - 399.
- [14] Zeigler R S ,Cuoc L X ,Scot R P *et al.* The Relationship between lineage and virulence in *Pyricularia grisea* in the Philippines [J]. *Phytopathology* ,1995 ,85(4):443 - 451.
- [15] 杨水英,肖崇刚,杨静,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(5):535 - 538.
- [16] 卢代华,叶慧丽,龚学书,等. 四川部分稻瘟病菌的 DNA 指纹分析 [J]. *四川农业大学学报* ,2003 ,21(2): 126 - 128 ,144.
- [17] Kaehroo P ,Leong S A ,Chattoo B. A rapid method of isolation of genomic DNA from filamentous fungi [J]. *International Rice research Notes* ,1996 ,21(2):47 - 48.

《植物遗传资源学报》征订启事

《植物遗传资源学报》是中国农业科学院作物科学研究所和中国农学会主办的学术期刊,为全国中文核心期刊、中国科技核心期刊、中国农业核心期刊、全国优秀农业期刊。该刊为中国科技论文统计源期刊、中国科学引文数据库来源期刊(核心期刊)、中国核心期刊(遴选)数据库收录期刊、中国学术期刊综合评价数据库统计源期刊,又被《中国生物学文摘》和中国生物学文献数据库、中文科技期刊数据库收录。据中国期刊引证研究报告统计 2010 年度《植物遗传资源学报》影响因子 1.081。

报道内容为大田、园艺作物、观赏、药用植物、林用植物、草类植物及其一切经济植物的有关植物遗传资源基础理论研究、应用研究方面的研究成果、创新性学术论文和高水平综述或评论。诸如种质资源的考察、收集、保存、评价、利用、创新,信息学、管理学等;起源、演化、分类等系统学;基因发掘、鉴定、克隆、基因文库建立、遗传多样性研究。

双月刊,大 16 开本,128 页。定价 20 元,全年 120 元。各地邮局发行。

邮发代号:82 - 643。国内刊号 CN11 - 4996/S,国际统一刊号 ISSN1672 - 1810。

本刊编辑部常年办理订阅手续,如需邮挂每期另加 3 元。

地址:北京市中关村南大街 12 号 中国农业科学院《植物遗传资源学报》编辑部

邮编:100081 电话:010 - 82105794 010 - 82105796(兼传真)

网址:www.zwyczy.cn

E-mail:zwyczyxb2003@163.com zwyczyxb2003@sina.com