

文章编号: 1001-411X(2002)02-0022-05

不同品种水稻纹枯病菌遗传多样性及致病力分化

易润华¹, 梁承邨¹, 朱西儒¹, 周而勋²

(1 中国科学院华南植物所, 广东 广州 510650; 2 华南农业大学资源环境学院, 广东 广州 510642)

摘要: 运用 RAPD 分子标记技术分析了从 6 个水稻品种上采集的 40 个水稻纹枯病菌菌株的遗传多样性. 筛选出的 10 条引物共扩增出 98 条 RAPD 谱带, 其中 81 条具有多态性, 多态率为 82.65%, 菌株间的遗传相似性系数(以 Nei's 基因一致度表示)变幅为 0.5644~0.9307. 用 UPGMA 法可以将供试菌株分成 4 个 RAPD 聚类组群(I、II、III、IV), 相同寄主来源的菌株基本上聚集在同一组群内, 表明同一寄主来源的菌株间具有较近的亲缘关系. 在温室条件下, 致病力测定结果表明所有菌株对 Tetep 都有致病性, 病情指数变幅在 0.40~11.83 之间. 分析结果表明, 纹枯病菌群体存在丰富的遗传多样性, 不同寄主上的水稻纹枯病菌群体间发生了很大的遗传分化($F_{ST}=0.632$), 这种遗传差异与寄主的选择作用有一定的关系. RAPD 聚类组群的划分和菌株的寄主来源有一定的相关性, 但致病力差异与菌株的寄主来源及 RAPD 组群没有直接相关性.

关键词: 水稻; 纹枯病菌; 遗传多样性; 致病力; RAPD

中图分类号: S435.111.42

文献标识码: A

立枯丝核菌 [*Rhizoctonia solani* Kühn, 有性型 *Thanatephorus cucumeris* (Frank) Donk] 是土壤习居菌, 分布范围广, 危害 260 多种植物. 立枯丝核菌根据菌丝融合现象共分 14 个融合群 (Anastomosis group, AG), 分别为 AG-1 至 AG-13 和 AG-BI, 每一融合群根据其培养性状、寄主、以及生理生化等特性分成不同的种内类群 (Intraspecific group, ISG), AG-1 有 IA、IB、IC 3 个 ISGs, 水稻纹枯病是由 AG-1 IA 引起的^[1~3].

近年来药剂的研制和推广使得仅靠药剂防治和栽培条件的改善就可以减轻水稻纹枯病的危害, 但从长远的角度来看, 应该改善品种的抗性^[4], 这就需要对水稻纹枯病菌群体遗传结构进行了解. 目前水稻抗纹枯病育种工作没有取得突破性的进展, 其中原因之一就是水稻纹枯病菌自然群体的遗传结构了解不够, 特别是水稻品种对水稻纹枯病菌群体影响的了解更少.

本研究运用 RAPD 分子标记技术研究了 6 个水稻品种上纹枯病菌的群体遗传多样性并分析了致病力差异与 RAPD 组群、菌株的寄主来源三者之间的关系, 以期水稻抗纹枯病育种工作及抗源的筛选提供一些理论依据.

1 材料与方法

1.1 菌株的来源

1999 年 11 月 17 日从华南农业大学试验农场 6 个不同的水稻品种上采集的 40 个水稻纹枯病菌株用于 DNA 提取, PCR 扩增及致病力测定. 菌株 HH-10、HH-15、HH-17、HH-18、HH-19、HH-2、HH-20、HH-24、HH-5 来源于华航 1 号; 菌株 PQZ-12、PQZ-15、PQZ-18、PQZ-19、PQZ-21、PQZ-23、PQZ-7 来源于培杂青珍; 菌株 YN-1、YN-10、YN-25、YN-3、YN-5、YN-8 来源于越南糯; 菌株 YZ-16、YZ-19、YZ-20、YZ-5 来源于优杂 102; 菌株 YZA-15、YZA-16、YZA-2、YZA-20、YZA-23、YZA-5、YZA-7、YZA-8 来源于粤杂 954; 菌株 YZB-11、YZB-15、YZB-16、YZB-6、YZB-8、YZB-9 来源于粤杂 128.

1.2 致病力测定

采用温室人工接种测定不同菌株的致病力. 将水稻品种 Tetep 栽到盆中, 每一盆栽 10 个单株, 保持每盆的水肥条件一致. 待水稻长到 2~3 个分蘖后, 将带有菌的稻壳均匀的撒到盆中, 每盆接种相同质量的稻壳, 保持稳定的温湿度. 接种 20 d 后调查, 病情分级按病斑大小占水稻茎秆周长的百分数分为 0~9 级, 病斑大小占水稻茎秆周长的 10% 以下划分为 0 级, 90% 以上为 9 级.

收稿日期: 2001-08-09

作者简介: 易润华(1973-), 男, 博士研究生.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(39870438)

1.3 DNA 提取

菌株 DNA 提取按 McDonald^[5] 的方法经适当改动进行. 将菌株接种到装有 70 mL PDB(马铃薯 200 g, 葡萄糖 20 g, 水 1 L)培养基的 250 mL 三角瓶内, 25 °C 静置培养 2~4 d. 在菌核形成前收集菌丝, 经灭菌水冲洗 2~3 次, 用灭菌滤纸挤压吸干. 取 0.1~0.2 g 吸干的新鲜菌丝在研钵中加少许石英砂、800 μ L CTAB(十六烷基三乙基溴化铵)提取缓冲液(含 0.7 mol/L NaCl, 100 mmol/L Tris-HCl, pH 8.0, 20 mmol/L EDTA, 10 g/L PVP-360, 20 g/L CTAB, φ 为 0.1% β -巯基乙醇, 直接研磨. DNA 沉淀后用 300 μ L 1 mol/L NaCl 重新溶解, 加 3 μ L 10 mg/mL RNase 液, 37 °C 保温 40 min 降解 RNA. 纯化 DNA 溶解在 100 μ L TE(含 10 mmol/L Tris-HCl, 1 mmol/L EDTA, pH=8.0)缓冲液, -20 °C 保存备用.

1.4 引物筛选

从 100 个 10 bp 的寡聚核苷酸随机引物(SarGon 公司购买)中筛选出了扩增图带数多且清晰的 10 个引物用于 RAPD 扩增, 进行 DNA 遗传标记和 DNA 指纹图谱分析(表 1).

表 1 选用的 10 条随机引物的碱基序列、每碱基扩增的 RAPD 条带数及多态性带数

Tab. 1 Sequence of ten random primers, the total number of DNA fragments and number of polymorphic bands obtained from RAPD amplification.

RAPD 引物 primers	碱基序列 5' → 3' nucleotide sequences(5' → 3')	RAPD 总条带数 total number of RAPD bands	多态性条带数 polymorphic bands
S167	CAGCGACAAG	11	8
S190	ACCGTTTCCAG	9	7
S189	TCCTGGTCCC	9	8
S181	CTACTGCGCT	12	11
S179	AATGGGGAG	9	8
S177	GGTGGTGATG	7	5
S174	TGACGGCGGT	12	12
S172	AGAGGCACA	13	11
S163	CAGAAGCCCA	8	6
S143	CCAGATGCAC	8	5
总计 total		98	81

1.5 PCR 扩增

PCR 反应在 PCR 仪 (Perkin Elmer 2400) 上进行.

反应体系总体积 20 μ L, 工作液含 50 mmol/L KCl, 10 mmol/L Tris-HCl, 1 g/L Triton X-100, 3.0 mmol/L MgCl₂, Taq DNA 聚合酶 1.0 U(在 74 °C 反应温度条件下, 在 30 min 内将 10 nmole dNTP 全部转化为三氯乙酸不溶物所需的酶量定义为 1 U, 华美生物工程公司), 1 pmol/L 的随机引物, 6 ng/ μ L 左右 DNA 模板.

PCR 扩增经 94 °C 预变性 2.5 min 后进入循环, 94 °C 变性 1 min, 36 °C 复性 1 min, 72 °C 延伸 3 min, 38 个循环后 72 °C 延伸 15 min. PCR 产物在 1 \times TBE(89 mmol/L Tris 碱, 89 mmol/L 硼酸, 2 mmol/L 乙二醇四乙酸, pH 8.0)缓冲液下经 15 g/L 琼脂糖凝胶电泳和溴化乙锭染色后, 用凝胶成像系统拍照, 打印.

1.6 数据分析

电泳后根据 λ DNA 各酶切片段大小估计扩增出的片段大小. DNA 指纹图谱中的每一条 RAPD 谱带均为 1 个分子标记, 并代表引物结合位点, 根据扩增带的有无分别记为 1 或 0. 根据 Lynch 和 Milligan^[6] 方法计算基因多样性 (H) 和群体遗传分化系数 (F_{ST}). 以 Nei^[7] 公式计算两菌株间的遗传一致度, 用非加权配对算术平均法 (Unweighted pair group method using arithmetic average, UPGMA) 聚类方法, 用 Popgene 1.32 软件^[8] 分析 0/1 矩阵, 生成菌株遗传分化树形图.

2 结果与分析

2.1 致病力测定

所有的菌株对水稻品种 Tetep 都有致病性, 并且产生典型的纹枯病症状. 开始在水稻茎基部与水面交界处产生不规则病斑, 病斑水浸状, 后扩大形成黄色病斑.

不同的菌株致病力有很大的差异 ($P=0.05$). 菌株 PQZ-23 具有最强的致病力, 菌株 HH-20 致病力最弱, 它们的病情指数分别为 11.83 和 0.40, 菌株的平均病情指数为 4.41(偏差 1.740). 从粤杂 954、粤杂 128 和华航 1 号采集的菌株 YZA-16、YZB-15 和 HH-20 的致病力都比较弱. 在相同水稻品种上采集到的菌株致病力的差异显著. 如品种粤杂 954 上的菌株 YZA-20 的致病力较强, 病情指数为 11.32; 而致病力弱的菌株 YZA-16 的病情指数为 0.51(表 2).

表2 水稻纹枯病菌株病情指数

Tab. 2 The percentage of disease index on Tetep inoculated with isolates of *R. solani* AG-1 IA

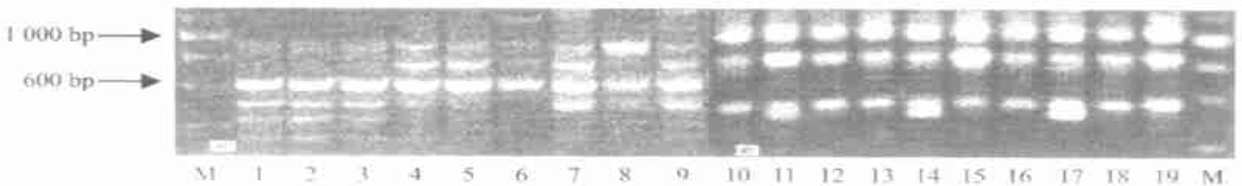
菌株编号 code of isolates	$PDI^{1)}$	菌株编号 code of isolates	PDI	菌株编号 code of isolates	PDI	菌株编号 code of isolates	PDI
HH-10	1.91 mnop ^b	PQZ-15	4.29 hijkl	YN-5	1.98 mnop	YZB-16	0.47 p
HH-15	1.52 nop	PQZ-18	2.04 mnop	YN-8	1.92 mnop	YZB-6	1.57 nop
HH-17	1.33 nop	PQZ-19	6.65 defg	YZ-16	4.48 hijk	YZB-8	5.46 fgghi
HH-18	8.75 bc	PQZ-21	5.27 fgghi	YZ-19	1.72 mnop	YZB-9	4.53 hijk
HH-19	6.93 def	PQZ-23	11.83 a	YZ-20	7.85 bcd	YZA-16	0.51 p
HH-2	8.92 bc	PQZ-7	4.05 ijkl	YZ-5	2.63 lmno	YZA-2	5.91 efgh
HH-20	0.40 p	YN-1	7.31 cde	YZA-15	4.77 hij	YZA-20	11.32 a
HH-24	9.38 b	YN-10	3.43 jklm	YZA-8	7.57 cde	YZA-23	1.34 nop
HH-5	2.77 klmn	YN-25	4.98 ghij	YZB-11	4.59 hij	YZA-5	6.10 defgh
PQZ-12	5.93 efgh	YN-3	1.53 nop	YZB-15	0.80 op	YZA-7	1.73 mnop

1) 病情指数(PDI)的计算见文献^[9]; 同列数据后面具有相同字母者示在0.05水平差异不显著(Duncan's法)

2.2 PCR扩增结果

10个随机引物扩增结果表明不同引物对供试菌株扩增的DNA谱带数不尽相同,多则13条,如引物S172,少则7条,如引物S177;同一引物对不同的菌株所扩增出的DNA指纹数目也不相同,少的为1条,多的为13条。10个引物在所有供试菌株中总共扩增出98条0.2~2.0 kb的DNA谱带,平均每引物9.8条,多态性带81条,遗传多态性值为82.65%。

在10个引物的扩增图谱中部分菌株具相同的DNA谱带,部分菌株有不同的DNA谱带,有些引物扩增出的主要DNA片段为所有菌株所共有(图1),说明在菌株间既具有较近的亲缘关系,又存在一定程度的遗传差异。菌株的DNA指纹图谱与菌株的寄主来源没有直接的相关性。



泳道1~9为引物S189扩增图谱,10~19为引物S167扩增图谱,M为200 bp的标记物
S189; 1~9 S167; 10~19, M; 200 bp Marker

图1 引物S189和S167的PCR扩增谱带

Fig. 1 Random amplified polymorphic DNA banding patterns of *R. solani* AG-1 IA with primers S189 and S167

2.3 菌株的聚类分析

从图2中可以看出,在相似性系数为0.58时可以将40个菌株明显地聚类成4个不同的RAPD组群(I、II、III、IV)。各组群如下:

组群I:由华航1号和优杂102上的菌株组成,共13个菌株;组群II:由越南糯、培杂青珍和粤杂954上的菌株组成,共5个菌株;组群III:由培杂青珍、越南糯、粤杂128上的菌株组成,共14个菌株;组群IV:由粤杂954、越南糯、培杂青珍上的菌株组成,共8个菌株。

在同一个RAPD遗传聚类群内,相同寄主来源

的菌株常常聚在一起,如组群I由从优杂102和华航1号分离到的菌株聚成,其中从优杂102上分离到的菌株YZ-20、YZ-16、YZ-19聚在一起后,再与其他菌株聚类在一起,表明相同寄主上菌株的亲缘关系比较近。

同一水稻品种上的纹枯病菌群体由不同的RAPD群组成,例如从越南糯上分离的6个菌株则分别聚类在RAPD群II、III、IV内,表示它们之间的亲缘关系较远。而从华航1号分离得到的9个菌株都聚集在RAPD群I内,并且它们之间聚类间距也比较小,说明它们具有较近的亲缘关系。

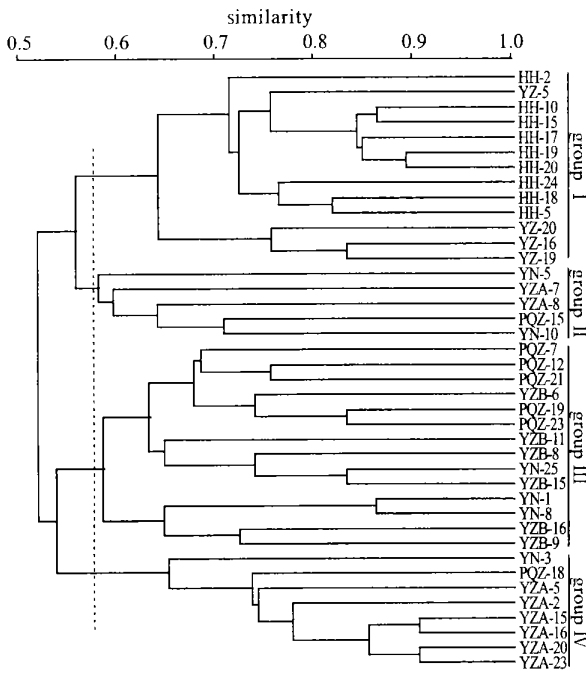


图 2 水稻纹枯病菌 DNA 指纹图谱系统聚类分析树形图

Fig. 2 Dendrogram derived from random amplified polymorphic DNA analysis of *Rhizoctonia solani* AG-1 IA by using UPGMA method

2.4 水稻纹枯病菌群体遗传分析

对从华南农业大学试验农场 6 个不同水稻栽培品种上采集的 40 个菌株的扩增产物的 DNA 指纹图谱进行分析, 得出不同栽培品种和相同栽培品种上的水稻纹枯病菌株间的平均基因多样性如表 3, 从表中可以看出同一品种上水稻纹枯病菌群体内菌株间的基因多样性 (H_j) 范围为 0.119 ~ 0.201, 平均基因

多样性 (H_w) 为 0.171. 来自不同品种的群体间基因多样性 (H_{ij}) 范围为 0.224 ~ 0.347, 平均基因多样性 (H_B) 为 0.293. 把所有栽培品种分离到的菌株组成一个总群体, 其平均基因多样性 ($H_T = H_B + H_w$) 为 0.463. 群体间遗传分化系数 ($F_{ST} = H_B / H_T$) 为 0.632, 说明不同寄主上的水稻纹枯病菌群体存在着明显的遗传分化.

3 结论与讨论

本试验的所有菌株都是从华南农业大学试验农场的 6 个水稻品种上密集型采集的, 所有菌株生长在一个相同气候环境中, 菌株间的遗传差异受地理环境的影响比较小. 使用 RAPD 分子检测到不同水稻品种上的纹枯病菌存在着丰富的遗传多样性, 菌株间的遗传相似性系数范围 0.564 4 ~ 0.930 7, 说明菌株间的遗传差异主要来自品种的选择作用.

研究寄主与病原菌的关系对指导抗病育种和病害的防治具有十分重要的指导意义. 植物和病原菌在漫长的进化过程中相互斗争相互依存, 如果植物没有可遗传的抗性、病原菌没有可遗传的致病性, 在进化中都会被对方淘汰掉. 笔者从华南农业大学试验农场采集的菌株致病力差异十分明显、菌株间的遗传分化比较大. 相同寄主上的菌株的亲缘关系比较近, 而不同寄主上的菌株则相距较远. 来自相同寄主的水稻纹病菌在系统聚类图上有聚为一类的趋向, 但有些菌株偏离较远, 这说明一个水稻品种在生长期主要受到亲缘关系比较近的菌株侵染, 但是同时也受亲缘关系远的菌株的侵染.

表 3 不同水稻品种的纹枯病菌群体间基因多样性 (H_{ij}) 和群体内菌株间基因多样性 (H_j)¹⁾

Tab. 3 The observed gene diversity (H_{ij}) of between-populations and the observed gene diversity (H_j) of within-*Rhizoctonia solani* AG-1 IA populations from different rice varieties

	华航 1 号 Huahang no. 1	培杂青珍 Peiza Qinzhen	越南糯 Yuenannuo	优杂 102 Youza 102	粤杂 954 Yueza 954	粤杂 128 Yueza128
华航 1 号 Huahang no. 1	(0.154)					
培杂青珍 Peiza Qinzhen	0.297	(0.183)				
越南糯 Yuenannuo	0.347	0.270	(0.201)			
优杂 102 Youza 102	0.224	0.291	0.332	(0.119)		
粤杂 954 Yueza 954	0.329	0.260	0.297	0.324	(0.166)	
粤杂 128 Yueza 128	0.323	0.239	0.280	0.312	0.270	(0.200)

1) 对角线括号内的数字表示同一寄主的水稻纹枯病菌群体内菌株平均基因多样性

UPGMA 聚类分析表明菌株的毒力变异和 RAPD 聚类群及菌株的寄主来源没有直接的相关性, 但不同菌株在 Tetep 上的致病力差异十分显著. 在相同的水稻寄主上, 强毒力和弱毒力菌株共存, 如最强毒力的菌株 PQZ-23 和弱毒性菌株 PQZ-18 (病情指数为 2.04) 都从培杂青珍分离得到. 强毒力和弱毒力菌株并不因为毒力的差异大而表现为亲缘远, 相反还具

有较近的亲缘关系, 它们同时聚类在一 RAPD 组群中, 如强毒性菌株 PQZ-23 和弱毒性菌株 YZB-15、YZB-16 都聚类在 RAPD 群 III 内. 而 Pascual^[10] 认为毒力差异和 RAPD 聚类有一定程度的一致性, 强毒力菌株和弱毒力菌株分别聚类在不同的 RAPD 类群中. 两者结果不同的原因可能是采用不同的品种测定致病力对结果有一定的影响; 或是毒性基因的表

达同时受其他基因的影响^[1],或由于在试验中采用的DNA扩增引物不同而使毒性强的菌株与毒性弱的菌株聚集在相同或不同的RAPD组群成为可能.具有复杂遗传结构的植物病原菌群体对环境的适宜能力强,可以更快地克服品种的抗性.水稻抗纹枯病育种工作至今还没有取得突破性进展其中原因之一可能就是纹枯病菌在自然界中存在丰富的遗传多样性.

本研究利用RAPD指纹标记技术对不同水稻品种上的纹枯病菌间的亲缘关系进行了初步的分析和探讨,有一定的理论与实践意义.理论意义:水稻纹枯病菌株群体具有丰富的遗传多样性,群体遗传结构受寄主的影响,菌株的亲缘关系因品种不同而表现为聚为一类的趋向,但不同品种上有的菌株间亲缘关系也比较接近,遗传聚类组的划分和菌株寄主来源有一定的相关性.致病力分化和菌株的来源、遗传聚类组的划分没有直接的相关性.实践意义在于为水稻抗纹枯病品种及抗源的筛选提供了理论依据,即在抗病品种的选育过程中用不同的混合群体(指的是各种不同表现型和/或基因型个体混合体)对材料进行筛选,这样可能会更快、更有效地筛选出抗性品种.

致谢:本文承蒙华南农业大学李华平教授审阅并提出宝贵意见,特此致谢!

参考文献:

[1] OGOSHI A. Ecology and pathogenicity of anastomosis and in-

traspecific groups *Rhizoctonia solani* Kühn[J]. Ann Rev Phytopathol. 1987, 25: 125—143.

[2] OUS H. Rice Diseases[M]. Kew: the Cambrian News Ltd, 1985. 272—286.

[3] PARMETER J R, SHERWOOD R T, PLATT W D. Anastomosis grouping among isolates of *Thanatephorus cucumeris*[J]. Phytopathology, 1969, 59: 1 270—1 278.

[4] 沙学延,张红生,朱立宏.水稻抗纹枯病研究进展(综述)[A].朱立宏.主要农作物抗病性遗传研究进展[C].南京:江苏科学技术出版社,1990.131—138.

[5] MCDONALD B A, MARTINEZ J P. DNA restriction fragment length polymorphism in *Septoria tritici* occur at a high frequency [J]. Current Genetics 1990 17: 133—138.

[6] LYNCH M L, MILLIGAN B G. Analysis of population genetic structure with RAPD markers[J]. Molecular Ecology, 1994, 3: 91—99.

[7] NEI M. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals[J]. Genetics 1978, 89: 583—590.

[8] YEH F C, BOYLE T J B. Population genetic analysis of co-dominant and dominant markers and quantitative traits[J]. Belgian Journal of Botany. 1997, 129: 157.

[9] VISWANATHAN V, MARIAPPAN V. Fungicidal controls of sheath blight [J]. IRRN, 1980, 5(5): 15.

[10] PASCUAL C B, TODA T, RAYMONDO A D, et al. Characterization by conventional techniques and PCR of *Rhizoctonia solani* isolates causing banded leaf sheath blight in maize [J]. Plant Pathology, 2000, 49: 108—118.

[11] THOMPSON J N, BURDON J J. Gene-for-gene coevolution between plant and parasites [J]. Nature, 1992, 360(12): 121—125.

Genetic Diversity and Virulence Variation of Rice Sheath Blight Pathogen (*Rhizoctonia solani* AG—1 IA) from Different Rice Varieties

YI Run-hua¹, LIANG Cheng-ye¹, ZHU Xi-ru¹, ZHOU Er-xun²

(1 South China Institute of Botany, the Chinese Academy of Sciences, Guangzhou 510650, China;

2 College of Resources and Environment, South China Agric. Univ., Guangzhou 510642, China)

Abstract: Forty isolates of rice sheath blight pathogen (*Rhizoctonia solani* AG—1 IA) from six rice varieties were analysed for genetic diversity by using random amplified polymorphic DNA (RAPD) technique. Of 98 RAPD bands that were amplified with 10 arbitrary decamer primers, 82.65% were polymorphic. Analysis of amplified polymorphic DNA fragments showed that Nei's genetic identity were 0.564 4~0.930 7, the tested isolates were classified as 4 RAPD groups (I, II, III, IV), and the isolates from the same host were fallen into the same group by using UPGMA cluster analysis. The results of virulence test in greenhouse indicated that all isolates were virulent to rice variety Tetep, and the range of disease index varied from 0.40 to 11.83. It was suggested for genetic analysis that there was abundant genetic diversity existing in rice sheath blight fungal population, and that the genetic variation was very significant within populations from different rice varieties ($F_{ST}=0.632$), and that host selection affected the population genetic structure of *Rhizoctonia solani* AG—1 IA. The RAPD cluster groups were in line to some extent with host origin of isolates, but virulence variation was not related to host origin of isolates and RAPD groups.

Key words: rice; *Rhizoctonia solani* AG—1 IA; genetic diversity; virulence; RAPD