

广东省水稻纹枯病菌遗传多样性与致病力分化的研究

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研究所, 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: 利用随机引物扩增多态性 DNA(RAPD)分子标记技术分析了来自广东省 7 个县市 48 个水稻纹枯病菌菌株的遗传多样性。以筛选出的 10 个随机引物对菌株进行 RAPD-PCR 扩增, 共产生了 98 个 RAPD 分子标记, 其中 89.9% 的片段具有多态性。48 菌株间的遗传相似性系数(以 Nei 基因一致度表示)在 0.56-0.949 之间, 用 UPGMA 聚类分析可将它们分为 5 个 RAPD 遗传聚类群(A、B、C、D、E), 相同地区来源的菌株基本上聚类在同一组群内。在温室中对供试菌株进行致病性测定, 结果表明所有菌株对水稻品种 Tetep 都有致病性, 菌株间致病力差异显著($\alpha=0.05$), 病情指数范围为 0.73-18.7, 平均感病指数为 5.24。试验分析结果表明水稻纹枯病菌具有丰富的遗传多样性, 不同县市的菌株存在很大的遗传分化现象($F_{ST}=0.579$), RAPD 遗传聚类组群的划分与菌株的地理来源有明显的相关性, 但菌株的致病力差异与菌株的来源、遗传聚类组群的划分没有明显的相关性。

关键词: 水稻; 立枯丝核菌; 遗传多样性; 致病力; 遗传分化; RAPD

中图分类号: S435.111.42 **文献标识码:** A **文章编号:** 1005-3395(2002)02-0161-10

Genetic Diversity and Virulence Variation of Rice Sheath Blight Strains (*Rhizoctonia solani* AG-1 IA) from Guangdong Province

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 Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

Abstract: Forty-eight rice sheath blight strains (*Rhizoctonia solani* AG 1-IA) from seven counties in Guangdong province were analyzed for genetic diversity using RAPD technique. Ninety-eight RAPD bands were amplified with 10 arbitrary decamer primers, among which 89.9% were polymorphic. Analysis of amplified polymorphic DNA fragments showed that the Nei's similarity coefficients of isolates were 0.560-0.949. The tested isolates could be classified into 5 RAPD groups (A, B, C, D, and E), and most of the isolates from the same area clustered in a same group by using UPGMA analyses. The virulence test carried out in greenhouse showed that all isolates were virulent to rice variety Tetep, the disease index(DI) ranged from 0.73 to 18.7, the mean DI was 5.24, and the virulence variation was significant ($\alpha=0.05$). The analysis showed that there existed abundant genetic diversity among rice sheath

收稿日期: 2001-07-30 接受日期: 2001-11-19

基金项目: 国家自然科学基金(39870438)资助

blight fungal populations, and the genetic variation was very significant in *R. solani* AG 1-IA population from different counties in Guangdong province ($F_{ST}=0.579$). The RAPD clustering groups had obvious correlation with geographical origin, but the virulence variation had no significant correlation with geographical origin and with RAPD groups.

Key words: Rice; *Rhizoctonia solani*; Genetic diversity; Virulence; Genetic variation; RAPD

水稻纹枯病是世界范围普遍发生的流行病害, 其发生与栽培管理条件有密切关系, 但未象稻瘟病、白叶枯病那样引起人们的关注。抗纹枯病水稻品种资源的缺乏, 抗病育种工作进展缓慢, 以及近年来农田增施氮肥和田间管理不善, 致使纹枯病日趋严重, 影响了水稻的高产稳产。

水稻纹枯病是由瓜亡革菌 [*Thanatephorus cucumeris* (Frank) Donk, 无性型为立枯丝核菌 *Rhizoctonia solani* Kühn] 所致。根据菌丝融合现象立枯丝核菌可分为 14 个融合群 (Anastomosis group, AG), 从 AG-1 至 AG-13 和 AG-BI, 每一融合群再根据培养性状、寄主以及生理生化等特性分成不同的种内类群 (Intraspecific group, ISG), 其中 AG-1 融合群有 IA、IB、IC 三个 ISG, 水稻纹枯病是由 AG-1 IA 引起的^[1-3]。该菌是土壤习居菌, 菌核为初侵染源, 在土壤中能存活 1-2 年, 分布范围广, 危害的寄主多, 适应能力强, 因而防治十分困难。20 世纪 80 年代我国对水稻纹枯病菌的研究比较重视, 对该病的发生发展规律, 病害的预测, 病害的管理等方面进行了研究^[4-8]。但是对我国水稻纹枯病菌的群体遗传结构方面的研究未见报道, 在国际上 Rosewich^[9]做过这方面的研究。

分子标记技术已广泛应用于植物病理学的研究。通过 RAPD 技术分析扩增出的多态性 DNA 片段长度可以了解群体内不同个体之间的遗传差异^[10-12]。本研究运用 RAPD 分子技术对广东省不同地区的水稻纹枯病菌进行 DNA 指纹图谱分析及致病力研究, 了解不同来源地菌株的亲缘关系及致病力分化情况, 为水稻纹枯病防治和抗纹枯病水稻育种工作提供一些理论依据。

1 材料和方法

1.1 供试菌株

从广东省 7 个县市采集具纹枯病典型症状的病株分离得到 48 个稻纹枯病菌株, 用于 DNA 提取和 RAPD 扩增及致病力的测定 (表 1)。

1.2 致病力测定

温室(25-28℃)用人工接种法测定不同菌株的致病力。水稻 (*Oryza sativa* L.) 品种 Tetep 盆栽, 每盆栽 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, 将带菌的稻壳均匀的撒到盆中, 每盆控制相同的接种量, 保持相对稳定的温湿度。接种 20 d 后调查病情。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, 10% 以下为 0 级、10%-20% 为 1 级, 依次类推, 90% 以上为 9 级。病情指数(DI) = \sum (各病级分蘖数 × 该病级) × 100 / (接种总分蘖数 × 最大病级)。

表 1 菌株的采集地及采集时间(1999 年)

Table 1 Sampling sites and date of the isolates of *Rhizoctonia solani* AG-1 IA (1999)

菌株编号 Code of isolates	采集地 Sampling site	采集时间 Sampling date (M/D)	菌株编号 Code of isolates	采集地 Sampling site	采集时间 Sampling date(M/D)	菌株编号 Code of isolates	采集地 Sampling site	采集时间 Sampling date(M/D)
DY-11	东源 Dongyuan	7/17	NX-15	南雄 Nanxiong	7/19	JX-21	揭西 Jiexi	7/16
DY-17	东源 Dongyuan	7/17	NX-17	南雄 Nanxiong	7/19	JX-24	揭西 Jiexi	7/16
DY-20	东源 Dongyuan	7/17	NX-4	南雄 Nanxiong	7/19	JX-25	揭西 Jiexi	7/16
DY-23	东源 Dongyuan	7/17	NX-6	南雄 Nanxiong	7/19	SY-12	广州 Guangzhou	7/8
DY-3	东源 Dongyuan	7/17	NX-7	南雄 Nanxiong	7/19	SY-15	广州 Guangzhou	7/8
DY-5	东源 Dongyuan	7/17	QJ-1	曲江 Qujiang	7/17	SY-16	广州 Guangzhou	7/8
DY-7	东源 Dongyuan	7/17	QJ-2	曲江 Qujiang	7/17	SY-2	广州 Guangzhou	7/8
DY-9	东源 Dongyuan	7/17	QJ-20	曲江 Qujiang	7/17	SY-24	广州 Guangzhou	7/8
GZ-1	高州 Gaozhou	7/7	QJ-22	曲江 Qujiang	7/17	SY-25	广州 Guangzhou	7/8
GZ-12	高州 Gaozhou	7/7	QJ-24	曲江 Qujiang	7/17	SY-4	广州 Guangzhou	7/8
GZ-3	高州 Gaozhou	7/7	QJ-25	曲江 Qujiang	7/17	SY-6	广州 Guangzhou	7/8
GZ-4	高州 Gaozhou	7/7	QJ-8	曲江 Qujiang	7/17	SY-7	广州 Guangzhou	7/8
GZ-6	高州 Gaozhou	7/7	JX-11	揭西 Jiexi	7/16	ZJ-10	湛江 Zhanjiang	7/6
NX-1	南雄 Nanxiong	7/19	JX-14	揭西 Jiexi	7/16	ZJ-17	湛江 Zhanjiang	7/6
NX-11	南雄 Nanxiong	7/19	JX-17	揭西 Jiexi	7/16	ZJ-21	湛江 Zhanjiang	7/6
NX-13	南雄 Nanxiong	7/19	JX-20	揭西 Jiexi	7/16	ZJ-22	湛江 Zhanjiang	7/6

1.3 DNA 提取

用经适当改进的 McDonald^[13]方法。将菌株接种到装有 70 ml PDB (马铃薯 200 g, 葡萄糖 20 g, 水 1 000 ml) 培养基的 250 ml 三角瓶内, 25℃ 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。(1) 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, 1.0% PVP-360(w/v), 2.0% CTAB(w/v)), 0.1% β -巯基乙醇, 研磨充分后转入 1.5 ml Eppendorff 管中 65℃ 保温 30-60 min, 保温期间轻摇 3-4 次。(2) 冷却至室温加等体积氯仿: 异戊醇(24:1), 充分混匀, 5 000 \times g 离心 5 min。(3) 取上清液重复(2)一次。(4) 取上清液加等体积的 CTAB 沉淀液(1% CTAB(w/v), 50 mmol/L Tris-HCl, pH8.0, 10 mmol/L EDTA)充分摇匀, 5 000 \times g 离心

5 min 弃上清液,加 1 mol/L NaCl 300 μ l 重新溶解,3 μ l 10 g L⁻¹ RNase 液,37 $^{\circ}$ C 保温 40 min 降解 RNA。(5) 加等体积氯仿:异戊醇充分混匀,静置 10 min,8 000 \times g 离心 10 min。(6) 将上清液加入 2.5 体积的冷冻无水乙醇,待 DNA 析出后,8 000 \times g 离心 5 min,弃上清液。(7) 70% 酒精洗 2-3 次,弃 70% 酒精,晾干。用 100 μ l TE(含 10 mmol/L Tris-HCl, 1 mmol/L EDTA pH 8.0)缓冲液充分溶解,-20 $^{\circ}$ 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(SanGon 公司)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 2)。

表 2 所选引物及其序列

Table 2 Primers used in the study and their sequence

RAPD 引物 RAPD 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	9
S190	ACCGTTCCAG	9	8
S189	TCCTGGTCCC	10	9
S181	CTACTGCGCT	11	10
S179	AATGCGGGAG	10	9
S177	GGTGGTGATG	7	6
S174	TGACGGCGGT	12	12
S172	AGAGGGCACA	13	12
S163	CAGAAGCCCA	8	7
S143	CCAGATGCAC	7	7
	总计 Total	98	88

1.5 PCR 扩增程序

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, 0.1% Triton X-100, 3.0 mmol/L MgCl₂, Taq DNA 聚合酶 1.0 U(华美生物工程公司), 1 pmol/L 的随机引物, 6 ng μ l⁻¹ 左右 DNA 模板。

PCR 扩增经 94 $^{\circ}$ C 预变性 2.5 min 后进入循环,94 $^{\circ}$ C 变性 1 min,36 $^{\circ}$ C 复性 1 min,72 $^{\circ}$ C 延伸 3 min, 38 个循环 72 $^{\circ}$ C 延伸 15 min。PCR 产物在 1 \times TBE 缓冲液(89 mmol/L Tris 碱, 89 mmol/L 硼酸, 2 mmol/L 乙二胺四乙酸, pH 8.0)下经 1.5% 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 谱带均为一个分子标记,并代表引物结合位点,根据分子量大小及带的有无分别记为 1 或 0,有 DNA 扩增条带记为 1,没有记为 0,弱带或强带均记为 1。根据 Lynch 和 Milligan^[14]方法计算基因多样度和群体遗传分化系数。以 Nei^[15]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(UPGMA)聚类,用 Popgene 1.32 软件^[16]分析 0/1 矩阵,生成菌株遗传分化树形图。

2 结果和分析

2.1 致病力测定

在温室(25-28℃)下,各菌株都产生典型的纹枯病病症。发病初期,在近水面的叶鞘上出现水渍状,暗绿色,边缘不清楚的小斑点,以后逐渐扩大形成椭圆形或云纹状斑块。病斑中央灰绿色至灰褐色,或草黄色或灰白色,边缘暗褐色,有的病斑中心半透明。病斑多时互相连接形成大的不规则云纹斑,病斑长的达 8.2 cm。有的菌株在水稻茎秆上形成菌核,有的在茎秆间形成白色的菌丝网。

所有菌株对水稻品种 Tetep 都有致病性,未发现无毒性菌株的存在。菌株在 Tetep 上的致病力差异显著($\alpha=0.05$),病情指数范围在 0.73-18.7 之间(表 3),大部分菌株表现为中等致病力,菌株的平均病情指数为 5.24。从东源采集的菌株 DY-9 毒性最强,病情指数为 18.7,而菌株 DY-17 和菌株 NX-17 的致病力最弱,病情指数为 0.73。致病力与地理来源的相关性不明显,但从揭西采集的菌株致病力比其它地方强些,平均病情指数为 6.77。

表 3 水稻纹枯病菌株病情指数
Table 3 Disease index of rice variety Tetep infected by *Rhizoctonia solani* AG-1 IA

菌株编号 Code of isolates	病情指数 Disease index	菌株编号 Code of isolates	病情指数 Disease index	菌株编号 Code of isolates	病情指数 Disease index
DY-11	3.54 lmnopqr*	JX-20	4.08 ijklmnopq	QJ-24	7.77 de
DY-17	0.73 t	JX-21	6.07 efghijk	QJ-25	4.92 hijklmno
DY-20	6.14 efghijk	JX-24	12.8 b	QJ-8	2.43 pqrst
DY-23	11.2 bc	JX-25	7.38 defg	SY-12	4.29 ijklmnopq
DY-3	6.87 efghi	NX-1	3.03 nopqrst	SY-15	9.82 c
DY-5	5.29 ghijklmn	NX-11	5.69 efghijkl	SY-16	2.88 nopqrst
DY-7	3.62 lmnopqr	NX-13	5.03 hijklmno	SY-2	6.9 efghi
DY-9	18.7 a	NX-15	1.13 st	SY-24	6.38 efghij
GZ-1	3.67 lmnopq	NX-17	0.73 t	SY-25	4.98 hijklmno
GZ-12	9.24 cd	NX-4	3.28 mnopqrs	SY-4	3.88 klmnopq
GZ-3	7.65 def	NX-6	5.59 fghijklm	SY-6	1.33 rst
GZ-4	3.42 lmnopqrs	NX-7	2.84 nopqrst	SY-7	2.74 opqrst
GZ-6	7.02 efghi	QJ-1	2.90 nopqrst	ZJ-10	3.72 lmnopq
JX-11	6.75 efghi	QJ-2	2.06 oqrst	ZJ-17	4.78 hijklmnop
JX-14	4.72 ijklmnop	QJ-20	3.12 nopqrs	ZJ-21	7.10 defgh
JX-17	6.36 efghij	QJ-22	4.31 ijklmnopq	ZJ-22	2.86 nopqrst
平均值 Mean	5.24				
偏差 Deviation	1.99				

*Duncan 新复极差测验, 均数间具有相同字母表示差异不显著。Means in a each column followed by the same letter are not significantly different according to Duncan's test ($\alpha=0.05$).

2.2 RAPD 扩增结果

利用筛选好的 10 条随机引物对 48 个菌株进行 RAPD 分子标记, 获得了大量的清晰可重复的 DNA 指纹图谱(图 1)。单个引物所标记的 DNA 片段大小在 200-2 000 bp 之间, 每条引物对水稻纹枯病菌扩增的 DNA 条带数不同, 在 7-13 条之间, 多态性片段带数在 6-12 条(表 2), 10 个引物总共扩增出 98 条 DNA 指纹带, 多态性图带数为 88 条,

多态性测率为 89.90%, 表明不同菌株之间表现出丰富的遗传多样性。

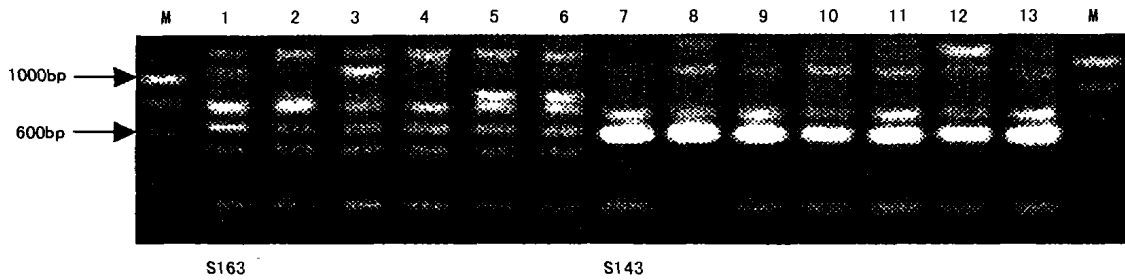


图 1 引物 S163 和 S143 对部分水稻纹枯病菌菌株扩增的 RAPD 指纹图谱

Fig. 1 RAPD banding patterns of *Rhizoctonia solani* AG-1 IA with primer S163 and S143
泳道 1-6 为引物 S163 PCR 扩增结果, 7-13 为引物 S143 PCR 扩增结果, M 为 λ DNA
标准分子。Lanes 1 to 6 show amplified DNA bands with prime S163, and lanes
7 to 13 with S143. M, 100 bp λ DNA marker.

DNA 指纹图谱表明没有特异性扩增片段与菌株的地理来源有关, 即与菌株的来源无直接的相关性。用同一引物对水稻纹枯病菌菌株进行扩增, 所标记的指纹图谱在地区内及地区间的菌株均表现出较大差异。10 条引物扩增出的 DNA 谱带不能将不同地理来源的菌株区分开来, 许多引物扩增出的 DNA 片段为所有菌株共有, 这些片段在进化上也许属于保守序列, 是否可以用来作为检测水稻纹枯病菌的分子标记需要进一步研究。

2.3 菌株的聚类分析

从 Nei's 遗传距离生成的树形图(图 2)可以看出, 在相似性系数为 0.7 时, 48 个水稻纹枯病菌明显聚成 A、B、C、D、E 5 个类群。类群 A 的菌株地理来源复杂, 包括东源菌株 7 个, 南雄菌株 3 个, 揭西和湛江菌株各 2 个, 高州菌株 1 个。类群 B 包括曲江菌株 6 个, 广州和南雄菌株各 1 个。类群 C 包括揭西和南雄菌株各 5 个, 湛江和高州菌株各 2 个。类群 D 基本上由广州菌株聚集而成, 包括 8 个广州菌株和 1 个曲江菌株。类群 E 仅由 2 个高州菌株聚类组成。

水稻纹枯病菌菌株间系统聚类比较复杂。同一地区的菌株分属多个不同的 RAPD 聚类组群, 但以 1-2 个 RAPD 聚类组群为优势群, 在每个组群中同一地理来源的菌株先聚类在一起。从树形图中可见, 广州市水稻纹枯病菌分别聚类于组群 B 和 D, 以组群 D 为主要的组群, 其中 SY-24 聚类在 B 组群中。曲江菌株以组群 B 为优势群, 而 QJ-1 聚类在组群 D 时明显偏离该组的广州菌株。这表明具有相同遗传背景的 RAPD 遗传聚类群主要集中在 1-2 个地区, 这可能是同一地区的菌株在相同的气候和自然环境下, 自然选择的频率和强度基本相同, 使菌株间的亲缘关系比较近。

2.4 群体遗传分化

对广东省 7 个县市菌株的扩增产物的 DNA 指纹图谱进行分析, 得出菌株间的平均基因多样性指数如表 4, 从表中可以看出各县市内菌株间的基因多样性指数(H_i)范围为 0.181-0.228。各县市内菌株间平均基因多样性指数(H_w)为 0.204, 各县市群体间基因多

样性指数范围为 0.249-0.310, 各县市群体间平均基因多样性指数(H_B)为 0.282。广东省总群体平均基因多样性指数($H_T = H_B + H_w$)为 0.486。群体分化系数($F_{ST} = H_B / H_T$)为 0.579, 说明广东省不同县市水稻纹枯病菌群体间存在着明显的遗传分化。

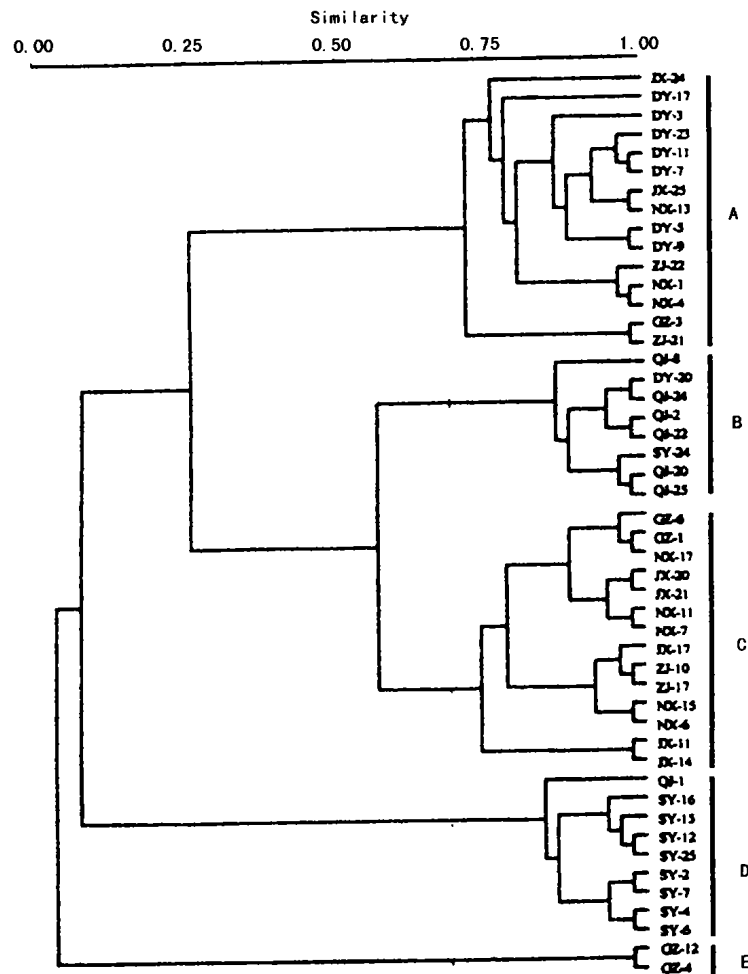


图 2 水稻纹枯病菌 DNA 指纹图谱系统聚类分析树形图
 Fig. 2 Phenogram derived from random amplified polymorphic DNA analysis of *Rhizoctonia solani* AG-1 IA by UPGMA

3 讨论

本试验结果表明:水稻纹枯病菌株间的遗传分化和 RAPD 遗传聚类群的分布受地理因素的影响, 相同地区菌株的遗传分化小, 而不同地区的分化大。不同个体之间的遗传变异比较大, 菌株间的遗传相似性系数(以 Nei's 基因一致度表示)在 0.5612-0.949 之间, 相同地理来源的菌株具有更近的亲缘关系(平均基因多样性指数为 0.204), 不同地

理来源的菌株间的亲缘关系较远(平均基因多样性指数为 0.282)。Jin^[17]利用同工酶技术分析了 21 个水稻纹枯病菌的遗传多样性,认为来源较近的菌株具有高的遗传相似性系数,相似性系数在 49%–100%。我们的结论与此一致。

表 4 不同地理来源水稻纹枯病菌群体间基因多样性指数(H_p)和群体内菌株间基因多样性指数(H_i)
Table 4 Gene diversity indexes of interpopulations (H_p) and intrapopulation (H_i) of *Rhizoctonia solani* AG-1 IA from different geographical locations

	广州 Guangzhou	曲江 Qujiang	揭西 Jiexi	南雄 Nanxiong	湛江 Zhanjiang	高州 Gaozhou	东源 Dongyuan
广州 Guangzhou	(0.195)						
曲江 Qujiang	0.273	(0.196)					
揭西 Jiexi	0.274	0.275	(0.189)				
南雄 Nanxiong	0.279	0.249	0.251	(0.181)			
湛江 Zhanjiang	0.274	0.295	0.286	0.247	(0.217)		
高州 Gaozhou	0.310	0.304	0.305	0.286	0.289	(0.228)	
东源 Dongyuan	0.310	0.290	0.293	0.266	0.281	0.278	(0.226)

* 对角线括号内的数字表示同一县市水稻纹枯病菌群体内菌株平均基因多样性指数。Numbers in parentheses along diagonal are means of gene diversity indexes of intrapopulations in the same county.

我们从广东省 7 个气候条件差异明显的地区采集的菌株分别代表广东省不同的气候条件和农田生态系统,南雄和曲江位于粤北高山地区,土壤相对贫瘠,属于内陆性气候,夏秋高温炎热,冬天干燥寒冷,早造种植迟;湛江和高州位于粤西地区,受台风气候的影响,雨水较多,气候炎热,冬季温暖,早造种植比较早;揭西和东源属于粤东,气温比粤西稍低,海洋性气候,土壤肥沃;广州市属于珠江三角洲是冲积地,土壤肥沃,气候温和。这些环境条件对水稻纹枯病菌基因型的分布具有一定的选择作用,造成不同地菌株的遗传分化程度高,同一地区的菌株面临环境选择的压力相同,因而分化程度低。由于地区间环境条件的差异导致基因型在空间分布的差异^[18],使相同地理来源菌株间亲缘关系近,而不同地理来源的菌株间遗传差异大。

广东省水稻纹枯病菌群体存在着遗传分化程度不同的 5 个 RAPD 遗传聚类群,各遗传聚类群的分布主要受地理条件和环境因素的影响,以镶嵌式分布在广东各地。Liu^[19]认为水稻纹枯病菌至少存在两种不同类型的菌株,Tu^[20]报道在日本存在有 6 个生理小种,Nandi 和 Chakravarti^[21]用 9 个水稻品种鉴定出 4 个致病型。Rosewich^[9]利用 7 个单拷贝 AFLPs 标记分析德克萨斯州水稻纹枯病菌的群体遗传结构,鉴定出 36 个多位点 RFLP 基因型,发现来自相同采样点菌株的多位点 RFLP 基因型基本相同,而不同采样点菌株往往不同。与我们发现来自同一地区的菌株基本属于同一 RAPD 遗传聚类群的结果一致。相同遗传类群的分布以一地区为主,其它的地区也有少量分布,这可能是由于基因流引起的。

水稻纹枯病菌的致病力与 RAPD 遗传聚类组群、地理来源的相关性不明显,聚类在相同的 RAPD 组群和相同的地理来源的菌株的致病力变化比较大,病情指数差异显著($\alpha=0.05$)。植物病原菌的毒性与 DNA 多态性之间的关系比较复杂。Levy 等^[22]利用稻瘟

病菌中度重复序列 MGR586 作探针,对美国稻瘟病菌进行 DNA 指纹分析,发现以 DNA 指纹图谱划分的谱系与毒性特征间存在着密切的关系,Roelfs^[23]报道小麦茎秆锈病菌 (*Puccinia graminis* f. sp. *tritici*) 的毒性与同工酶多态性有相关性,Kolmer^[24]报道小麦叶锈病菌 (*P. recondita* f. sp. *tritici*) 的 DNA 多态性与毒性的相关性比较低。关于水稻纹枯病菌的致病力与分子多态性的关系至今未见文献报道,我们研究的水稻纹枯病菌的致病力与 RAPD 组群的相关性不明显。从东源采集的菌株表现出最强和最弱两种毒性,它们都聚集在 RAPD 组群 A 内。Baker 和 Martinson^[25]认为 *R. solani* 的野生型菌株产生担孢子能提高菌株间基因重组的频率,在产生的新基因型中可能有很高程度的毒性变异。水稻纹枯病菌细胞多核,菌株之间容易发生菌丝融合的现象,菌株间的遗传变异可以通过重组或突变来实现:水稻纹枯病菌在自然和人工诱导条件下很少产生担孢子,但其对菌株的遗传变异可能起到十分重要的作用。

利用分子标记找到与植物病原菌致病性连锁的标记,了解致病型的地理分布、毒性基因漂流(迁移)的方式和途径、毒性基因发生遗传变异的机制对植物病害的防治、抗病育种工作以及品种基因型的布局具有十分重要的指导意义。水稻品种的抗病性是由寄主和病原菌相互作用的结果,利用 DNA 分子标记技术更有利于了解寄主与病原菌之间的互作本质。不同水稻品种上纹枯病菌的群体遗传分化及致病力差异如何还需要进一步研究。

参考文献:

- [1] Ou S H. Rice Diseases [M]. 2nd ed. Commonwealth Mycological Institute, Great Britain: the Cambrian News Ltd., 1985. 272-286.
- [2] Parmeter J R, Sherwood R T, Platt W D. Anastomosis grouping among isolates of *Thanatephorus cucumeris* [J]. Phytopathol, 1969, 59: 1270-1278.
- [3] Ogoshi A. Ecology and pathogenicity of anastomosis and intraspecific groups *Rhizoctonia solani* Kühn [J]. Ann Rev Phytopathol, 1987, 25: 125-143.
- [4] 过崇俭,陈志谊,王法明. 水稻纹枯病菌(*Thanatephorus cucumeris* (Frank) Donk)致病力分化及品种抗性鉴定技术的研究 [J]. 中国农业科学, 1985, 18(5): 50-57.
- [5] 李祥,侯明生,胡汉桥. 湖北省水稻纹枯病菌菌丝融合群鉴定 [J]. 华中农业大学学报, 1993, 12(1): 14-17.
- [6] 刘力,葛起新. 华东地区立枯丝核菌融合群鉴定 [J]. 浙江农业大学学报, 1987, 13(3): 227-233.
- [7] 彭绍裘,范坤成. 水稻纹枯病研究论文选集 [C]. 长沙: 湖南省农业科学院植物保护研究所, 1997.
- [8] 谭方河,谭家凤. 西南地区立枯丝核菌优势融合群致病性的研究 [J]. 四川农业大学学报, 1991, 9: 149-155.
- [9] Rosewich U L, Pettway R E, McDonald B A, et al. High levels of gene flow and heterozygote excess characterize *Rhizoctonia solani* AG-1 IA (*Thanatephorus cucumeris*) from Texas [J]. Fungal Gene Biol, 1999, 28: 148-159.
- [10] Brown J K M. The choice of molecular marker methods for population genetic studies of plant pathogen [J]. New Phytol, 1996, 133: 183-193.
- [11] Cantone F A, Vandenberg J D. Intraspecific diversity in *Paecilomyces fumosoroseus* [J]. Mycol Res, 1998, 102(2): 209-215.
- [12] McDonald B A. The population genetics of fungi: Tools and techniques [J]. Phytopathol, 1997, 87(4): 448-453.
- [13] McDonald B A, Martine Z J P. DNA restriction fragment length polymorphism in *Septoria tritici* occur at a high frequency [J]. Curr Genet, 1990, 17: 133-138.
- [14] Lynch M L, Milligan B G. Analysis of population genetic structure with RAPD markers [J]. Mol Ecol, 1994, 3: 91-99.

- [15] Nei M. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals[J]. *Genetics*, 1978, 89: 583-590.
- [16] Yeh F C, Boyle T J B. Population genetic analysis of co-dominant and dominant markers and quantitative traits [J]. *Belgian J Bot*, 1997, 129: 157.
- [17] Jin M S, Korpradiskul V. Isozyme analysis of genetic diversity among isolates of *Rhizoctonia solani* anastomosis group-1 IA (AG-1 IA) [J]. *Mycosystema*, 1998, 17(4): 331-338.
- [18] 张启发, 段国录, 杨官品. 中国大麦叶绿体 DNA 和核糖体 RNA 基因限制片段长度多型性[J]. *遗传学报*, 1992, 19(2): 131-139.
- [19] Liu Z L, Sinclair J B. Differentiation of intraspecific groups within anastomosis group 1 of *Rhizoctonia solani* using ribosomal DNA internal transcribed spacer and isozyme comparisons [J]. *Can J Plant Pathol*, 1993, 15: 272-280.
- [20] Tu J C. Physiological specialization of strains of *Pellicularia* isolated from rice plants [J]. *Plant Dis Report*, 1968, 52: 323-326.
- [21] Nadi S, Chakrabarti N K. Differential virulence of isolates of *Corticium sasakii*, the sheath blight pathogen to some rice cultivars and the type of resistance offered by the host plant [J]. *Z Pflkrankh Pflschutz*, 1984, 91: 182-185.
- [22] Levy M, Romao J, Marchetti 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.
- [23] Roelf A P, Groth J V. A comparison of virulence phenotype in wheat stem rust populations reproducing sexually and asexually[J]. *Phytopathol*, 1980, 70: 855-862.
- [24] Kolmer J A, Liu J Q, Sies M. Virulence and molecular polymorphism in *Puccinia recondita* f. sp. tritici in Canada [J]. *Phytopathol*, 1995, 85: 276-285.
- [25] Baker R, Martinson C A. Epidemiology and diseases caused by *Rhizoctonia solani*. In: Parmeter Jr. J R. *Rhizoctonia solani*, Biology and Pathology [M]. Berkely California: University of California Press, 1970. 172-178.