

2011 年鄂西地区水稻稻瘟病菌遗传多样性的分析

李 泌, 王春台, 周杰, 徐 鑫*

(中南民族大学生命科学学院/生物技术国家民委重点实验室, 武陵山区特色资源植物种质保护与利用湖北省重点实验室, 湖北武汉 430074)

摘要 [目的]扩大鄂西地区稻瘟病菌菌库, 分析其群体结构。[方法]收集鄂西不同地区 2011 年间的感病稻秆, 分离保存稻秆上的穗颈瘟病菌, 通过 RAPD、rep-Pot2-PCR、REMAP 3 种标记对分离的菌株进行分子标记。[结果]从 9 个稻秆上共分离得到 29 个稻瘟病菌。遗传多样性分析结果表明, 相似性水平在 75% 时, 2011 年供试菌株可分为 5 个遗传宗谱, 宗谱 3(7 个菌株)和 4(19 个菌株)为优势宗谱, 其余 3 个为稀有宗谱。[结论] 2011 年鄂西地区稻瘟病菌由 5 个遗传宗谱组成。

关键词 水稻稻瘟病菌; 鄂西地区; 遗传多样性

中图分类号 S435.111.4⁺1 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2014)14-04249-03

Genetic Diversity of *Magnaporthe oryzae* in Western Hubei Province in 2011

LI Mi, XU Xin et al (Hubei Provincial Key Laboratory for Protection and Application of Special Plants in Wuling Area of China, Key Laboratory of State Ethnic Affairs Commission for Biological Technology, College of Life Science, South-Central University for Nationalities, Wuhan, Hubei 430074)

Abstract [Objective] To enlarge the physiological race library of *Magnaporthe oryzae* in Western Hubei Province, analyze the population structure. [Method] The *Magnaporthe oryzae* spores were isolated from the infected rice panicles, which were collected from western Hubei Province area in 2011. Cluster analysis of the test samples was conducted by RAPD, REMAP and rep-Pot2-PCR. [Result] 29 *Magnaporthe grisea* strains were isolated from 9 panicles. The result of cluster analysis showed there were 5 genetic lineages at similarity coefficient of 0.75. Lineages III and IV, which included 7 strains and 19 strains, respectively, were dominant lineage. [Conclusion] *Magnaporthe oryzae* in West Hubei Province in 2011 was divided into 5 genetic lineages.

Key words *Magnaporthe oryzae*; Western Hubei Province; Genetic diversity

稻瘟病是由 *Magnaporthe oryzae* 引起的一类真菌病害, 是水稻的三大病害之一。稻瘟病具有发生地域广、流行频率高、危害影响重等特点。防治稻瘟病的方法主要有药物防治和抗性品种筛选 2 种方法, 受环境和成本等因素的制约, 目前主要以选择抗性品种为主。但由于稻瘟病生理小种遗传和致病的多样性, 同一水稻产区抗性品种在推广种植数年之后抗性会逐渐减弱, 甚至完全丧失^[1-2]。因此, 利用现有抗性基因和发现新的抗性基因, 收集生理小种, 调查演变趋势, 对合理布局抗病品种, 长期、有效地防治稻瘟病具有重要意义。

鄂西地区地处武陵山区北端。该地区属于中亚热带温湿季风气候, 雾露多、日照少、湿度大、雨热同季, 降水分布不均匀, 极易引起稻瘟病的发生^[3]。同时由于境内海拔高低悬殊, 气候垂直差异明显, 地形地貌复杂, 水稻种植的品种和时间也存在明显差异, 使得该地区稻瘟病菌生理小种具有品种丰富、组成复杂、致病力强等特点, 是研究稻瘟病的代表性地区^[4]。恩施地区常年水稻种植面积达 4 万 hm², 据统计因稻瘟病危害常年损失 10%~20%, 严重的可达 40%~50%, 局部农田甚至颗粒无收^[5]。

目前, 对于鄂西地区稻瘟病的研究多集中在水稻抗病品种的选育上, 对稻瘟病菌生理小种多样性的研究相对缺乏^[6-8]。笔者前期收集了 2010 年鄂西地区的稻瘟病菌, 构建

了该地区稻瘟病菌生理小种菌库, 分析了稻瘟病菌生理小种的组成结构^[9]。笔者通过收集的 2011 年稻瘟病菌, 采用 3 种不同分子标记分析其遗传结构, 为鄂西地区水稻抗病品种的选育和布局提供依据和参考。

1 材料与方法

1.1 材料 水稻感病稻秆均取自湖北恩施自治州 5 个不同地区, 以水稻穗颈部发病为主。每个感病植株取 7 个稻秆, 保留发病部位, 将稻秆截至 7 cm 左右, 记录品种、地点、日期。材料取回后置于 37 ℃烘箱中 3 d 后保存于 4 ℃冰箱中。

1.2 稻瘟病菌单孢的分离

1.2.1 稻秆的处理。保存的稻秆于 70% 乙醇浸泡 2 min 后水洗 3~5 次。取灭菌平皿(95 mm × 15 mm), 底层铺单层纱布, 一端用吸水滤纸做成枕头状垫高。将洗好的稻秆倾斜置于平皿中, 加适量无菌水保持平皿底层湿润。在平皿上做好相应标记, 置 27 ℃培养箱中培养 3 d, 同一类型的稻秆每次培养 3 个。

1.2.2 单孢的分离。配制 1% 氯霉素的水琼脂平板, 用洗耳球轻轻吹打已长满孢子的稻秆, 使孢子均匀洒落在上述培养基上。将平皿倒扣在显微镜载物台上, 10 倍镜下观察。调整视野使视野中只有一个孢子, 转动物镜用已蘸有印泥的针头在平皿上标记出相应位置。用接种针将标记位置的孢子挑出来转移到燕麦培养基中培养, 每个稻秆挑取 7 个单孢。

1.3 稻瘟病菌的保存 将灭菌滤纸条均匀覆盖在燕麦培养基上, 每个平皿里放约 4 个滤纸条。将分离纯化后的菌株接种在覆盖滤纸条的培养基中, 放入 27 ℃培养箱中培养。待菌长满平皿, 将滤纸条挑入 5 ml 离心管中并置于内含硅胶的玻璃干燥器中干燥 30~60 d。用封口膜包好离心管管口, 将干燥的菌株放在 -80 ℃冰箱中保存待用。

基金项目 湖北省自然科学基金创新群体“武陵山区稻瘟病菌收集分类与抗病育种研究”(2011CDA125); 湖北省自然科学基金面上项目“稻瘟病抗性新品种的培育”(2013CFB453)。

作者简介 李泌(1988-), 男, 湖北黄冈人, 硕士研究生, 研究方向: 植物病理。* 通讯作者, 副教授, 博士, 从事分子生物学方面的研究。

收稿日期 2014-04-24

1.4 稻瘟病菌的形态观察 将分离的稻瘟病菌统一接种到燕麦培养基上,培养 7 d 后用照相机拍照记录每个菌株的菌落形态。根据每个菌株的气生菌丝发达程度、菌体颜色、菌体边缘等特点,对菌株进行形态学上的初步分类。

1.5 供试菌株 DNA 的分子标记扩增 将菌株进行液体培养,收集菌丝提取基因组 DNA^[10],运用 RAPD、rep-Pot2 和 REMAP 分子标记进行 PCR 扩增检测^[11-14]。使用 NTSYS 软件的 UGMPA 算法对扩增结果进行聚类分析^[15]。

2 结果与分析

2.1 感病材料稻瘟病菌分离结果 将不同年份间的材料按照编号和分离得到的单个菌落依次统计,从 2011 年的 9 个稻秆上成功分离得到 29 个菌株,编号为 A1~A29(表 1)。

2.2 稻瘟病菌的分子多态性分析 用筛选出的 16 条 RAPD 标记,3 条 ISSR 标记,以及 1 对 Pot2 标记(表 2)对分离的菌株 DNA 分别进行 RAPD、REMAP、rep-Pot2-PCR 扩增。电泳结果显示,多数菌株能扩增出 3~8 条带,扩增的片段大小为 0.2~5.0 kb(图 1)。所有供试菌群由上述引物通过 PCR 扩

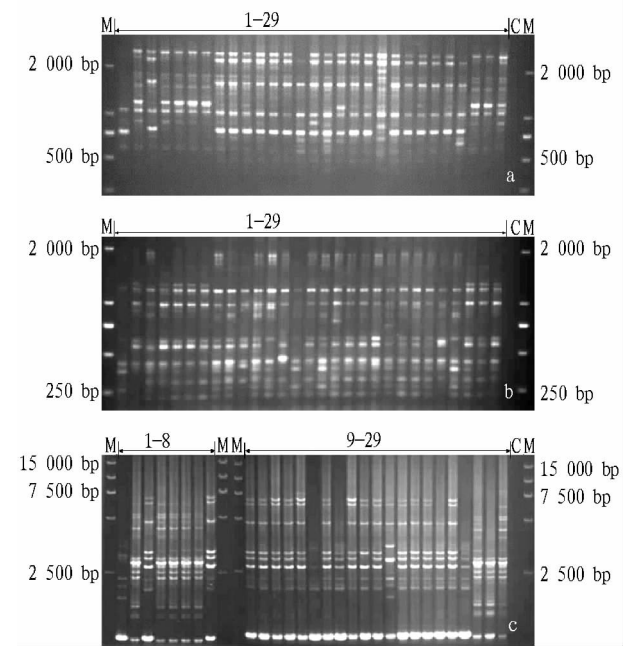
增共得到 54 条具有多态性的条带。把条带扩增情况转换成二进制数据,利用 NTSYS 软件对结果进行聚类分析(图 2)。UPGMA 聚类分析结果显示,该套分子标记可以将 2011 年所有供试材料进行有效区分和聚类。相似性水平在 75%时,可将 2011 年供试菌株分为 5 个遗传宗谱。其中宗谱 3 包含 7 个菌株;宗谱 4 包含 19 个菌株,为优势宗谱;宗谱 1、宗谱 2 和组宗谱 5 仅包含 1 个菌株,为稀有宗谱。(图 2)。

表 1 2011 年稻瘟病菌单孢分离结果

样本编号	采集地点	海拔//m	品种名称	分离数量
A1	恩施两河	1005	377 优 234	1
A2~A4	恩施两河	1005	蜀恢 527	3
A5~A8	恩施两河	1005	乐优 107	4
A9~A12	恩施两河	1005	内子优 638	4
A13	恩施两河	1005	金优 207	1
A14~A19	恩施两河	1005	宜香优 325	6
A20	恩施两河	1005	宜香优 58	1
A21~A26	恩施白果	990	17HCB269	6
A27~29	恩施两河	1005	恩恢 995	3

表 2 引物序列

引物类型	引物名称	引物序列	引物类型	引物名称	引物序列
RAPD	S520	ACGGCAAGGA	RAPD	SI219	CTGATCGCGG
	SI014	TGTGGCCGAA		SI243	GACTGGGAGG
	SI032	GACGCGAACC		SI261	GGGATGGAAC
	SI033	ACGCTGCGAC		SI267	AGACCCTTGG
	SI053	CAGCCGTTC		SI289	GAGGTCTAC
	SI076	CTGCCGTGCTC	REMAP	LTR	TGTCACAGACCTGAAGAACA
	SI087	CCGTCCATCC		ISSR1	AGAGAGAGAGAGAGAGC
	SI125	GGGTGCAGTT		ISSR4	GAGAGAGAGAGAGAGAC
	SI169	GTGGTCCAGA		ISSR6	ACACACACACACACACG
	SI189	AGTCCCCCTC	rep-Pot2	Pot2-1	CGGAAGCCCTAAAGCTGTTT
	SI198	GGGAGCGAGT		Pot2-2	CCCTCATTCGTCACACGTTT



注:a. RAPD(引物 SI032)扩增结果; b. REMAP(引物 ISSR1)扩增结果; c. rep-Pot2 扩增结果; M: 标准分子量(DL2000、DL15000); 1~29:2011 供试菌株编号; C:空白对照。

图 1 稻瘟病菌分子标记扩增结果

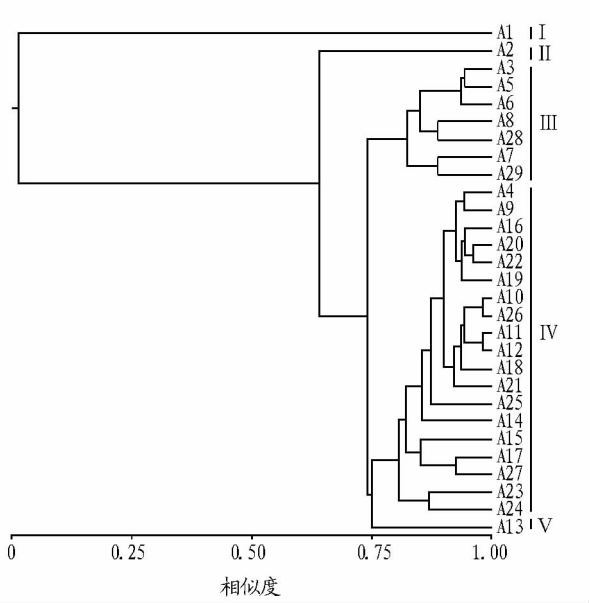


图 2 稻瘟病菌菌群聚类分析结果

3 讨论

对稻瘟病的遗传结构和聚类分析多采用 RAPD、REMAP 或 rep-Pot2-PCR 等分子标记单独分型^[16-18]。该研究将 3 种分子标记相结合,聚类分析结果显示,该方法可有效地将穗

颈瘟进行区分和分类,从而建立了一套鉴定鄂西地区水稻穗颈瘟的分子标记体系。此后每年采集的穗颈瘟材料都可通过该套分子标记体系进行鉴定和聚类,从而有效研究该地区穗颈瘟的动态变化。

利用该套分子标记对 2011 年菌群的遗传结构进行了分析,体现了优势谱系和稀有谱系共存的特征。与 2010 年菌群结构^[9]相比,2 年间遗传结构没有发生明显变化。

由于 2010 和 2011 年采集的穗颈瘟病菌在宿主材料(水稻品种)上差异较大,可能会影响到其组成和结构。因此,下一步研究拟采用水稻稻瘟病抗性标准材料^[19-20],在孕穗期接种穗颈瘟病菌,进一步调查其毒性,分析该地区穗颈瘟的毒性与其动态变化的关系,从而为该地区水稻抗病品种的选育和布局提供依据和参考。

参考文献

[1] ZEIGLER R S, THOME J, NELSON R J, et al. Linking blast population analysis to rice breeding: a proposed strategy for durable resistance[M]// ZEIGLER R S, LEONG S, TENG P S, et al. Rice Blast Disease. Wallingford England: Commonwealth Agricultural Bureaux International, 1994: 267 - 292.

[2] 肖丹凤, 张佩胜, 王玲, 等. 中国稻瘟病菌种群分布及优势生理小种的研究进展[J]. 中国水稻科学, 2013(3): 312 - 320.

[3] 吴双清, 王林, 卿明凤. 水稻区试品种抗稻瘟病鉴定结果分析[J]. 中国稻米, 2011, 17(4): 53 - 55.

[4] 李求文, 杨隆维, 吴双清, 等. 武陵山区水稻抗稻瘟病品种的选育与利用[J]. 种子, 2008, 27(3): 95 - 97.

[5] 杨隆维, 李继辉, 王光建, 等. 武陵山区杂交水稻育种目标与策略初探[J]. 杂交水稻, 2004, 19(6): 13 - 17.

[6] 袁利群, 杨隆维, 向极钎, 等. 三交育种在三系杂交水稻抗瘟育种中的应用研究[J]. 杂交水稻, 2003(6): 10 - 12.

[7] 谭艳平, 王春台, 刘兵, 等. 武陵山区抗稻瘟病新组合长优 72 的选育及应用[J]. 安徽农业科学, 2013(1): 57 - 58.

[8] 吕泽文, 李求文, 秦光才, 等. 武陵山区国家水稻品种试验回顾和建议[J]. 中国种业, 2013(8): 38 - 40.

[9] 龙子文, 周杰, 王春台, 等. 鄂西地区稻瘟病菌生理小种文库的构建及初步鉴定[J]. 安徽农业科学, 2012(24): 12065 - 12067.

[10] 吴发红, 黄东益, 黄小龙, 等. 几种真菌 DNA 提取方法的比较[J]. 中国农学通报, 2009(8): 62 - 64.

[11] GEOGRE 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 sequence[J]. Phytopathology, 1998, 88(3): 223 - 228.

[12] NGUEKO R B, SHEN Y, WANG H K, et al. Genetic diversity analysis of *Magnaporthe grisea* from some blast nurseries of Hunan province using random amplified polymorphic DNA[J]. Journal of Zhejiang University (Agric. & Life Sci.), 2004, 30(4): 355 - 362.

[13] CHADHA S, GOPALAKRISHNA T. Comparative assessment of REMAP and ISSR marker assays for genetic polymorphism studies in *Magnaporthe grisea*[J]. Current Science, 2007, 93: 5 - 10.

[14] SCHULMAN A H, FLAVELL A J, PAUX E, et al. The Application of LTR Retrotransposons as Molecular Markers in Plants[M]. Methods in Molecular Biology, 2012, 859: 115 - 150.

[15] ROHLF F J. NTSYSpc: Numerical Taxonomy System, ver. 2. 20[M]. Setauket, NY: Exeter Publishing, Ltd., 2008.

[16] SILVA G B, PRABHU A S, FILIPPI M C C, et al. Genetic and phenotypic diversity of Exeter Publishing, Ltd.: *Magnaporthe oryzae* Exeter Publishing, Ltd.: from leaves and panicles of rice in commercial fields in the State of Goiás, Brazil[J]. Tropical Plant Pathology, 2009, 34(2): 77 - 86.

[17] 汪尚, 索娜娜, 赵红燕, 等. 反转录转座子分子标记及其在植物研究中的应用[J]. 杭州师范大学学报: 自然科学版, 2012(5): 410 - 415, 442.

[18] 曾凡松, 杨小林, 史文琦, 等. 湖北省恩施和远安稻区稻瘟病菌群体 DNA 的指纹分析及宗谱多样性检测[J]. 华中农业大学学报, 2009(6): 669 - 674.

[19] 李进斌, 李成云, 张庆, 等. 22 个垂抗稻瘟病基因在云南的利用价值评价[J]. 云南大学学报: 自然科学版, 2008(S1): 12 - 20.

[20] 朱小源, 杨祁云, 杨健源, 等. 抗稻瘟病单基因系对水稻稻瘟病菌小种鉴别力分析[J]. 植物病理学报, 2004(4): 361 - 368.

(上接第 4248 页)

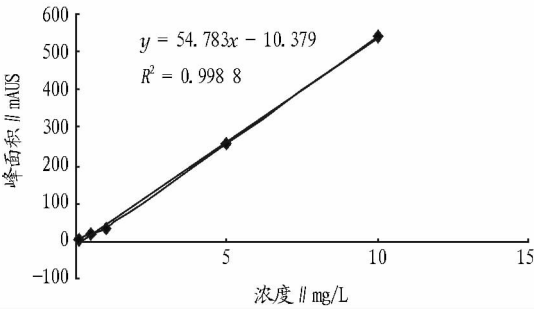


图 1 精恶唑禾草灵的标准曲线

壤、植株和小麦中,每个处理重复 3 次,按上述提取、净化及测定步骤进行添加回收率试验,结果见表 1。由表 1 可知,精恶唑禾草灵在土壤中平均回收率为 83.0% ~ 89.8%,相对标准偏差为 4.4% ~ 8.8%;精恶唑禾草灵在植株中的平均回收率为 93.1% ~ 108.3%,相对标准偏差为 3.5% ~ 14.8%;精恶唑禾草灵在小麦中的平均回收率为 84.7% ~ 96.6%,相对标准偏差为 4.4% ~ 8.5%;该方法的平均回收率高,相对标准偏差小,符合农药残留量测定的要求。

2.3 灵敏度 国家标准(GB2763-2012)规定精恶唑禾草灵在小麦中的残留限量为 0.1 mg/kg,根据《农药登记残留试验准则》要求,最低检测浓度弃置了常用的计算方法,纳入了实测结果。该方法中精恶唑禾草灵在液相色谱仪器的最小检

出量为 2.0×10^{-9} g,精恶唑禾草灵的最低检测浓度,土壤为 0.005 mg/kg,植株为 0.025 mg/kg,麦粒为 0.01 mg/kg,均低于规定的最高残留限量,完全满足小麦中精恶唑禾草灵农药残留检测的要求。

表 1 精恶唑禾草灵添加回收率

样品	浓度 mg/kg	回收率/%			平均回 收率/%	RSD %
		1	2	3		
土壤	0.005	89.1	85.0	74.9	83.0	8.8
	0.100	95.0	81.3	93.1	89.8	8.3
	0.300	86.6	82.4	90.0	86.3	4.4
小麦	0.025	114.8	120.0	105.0	108.3	14.8
	0.100	88.7	98.5	102.9	96.7	7.5
	0.500	94.3	89.6	95.5	93.1	3.5
植株	0.010	87.7	98.3	103.9	96.6	8.5
	0.500	84.6	91.1	78.4	84.7	7.5
	1.000	90.3	82.7	86.2	86.4	4.4

3 结论

该方法采用液相色谱分析方法测定精恶唑禾草灵在土壤、植物和小麦中的残留量,方法的准确度、灵敏度和精密度符合农药残留分析要求。该研究结果表明,该方法简便可行,精恶唑禾草灵和杂质分离完全,结果重复性好。

参考文献

[1] 李新苗. 7.5% 精恶唑禾草灵防除春小麦田野燕麦药效试验[J]. 中国农学通报, 2004(3): 218 - 219.

[2] 贾福艳. 精恶唑禾草灵在土壤及甘蓝中残留动态及在土壤中吸附特性研究[D]. 南京: 南京农业大学, 2009.