

中国稻瘟病菌交配型的地理分布及其 能育菌株的亲缘关系

沈 瑛¹, J. L. Notteghe², J. Milazzo³, 袁筱萍¹, H. Adreit³,
赵新华¹, 王艳丽¹, D. Tharreau³

(¹中国水稻研究所, 杭州 310006; ²法国生物和植物病理大学; ³法国国际农艺研究和发展中心)

摘要: 用国际 4 个稻瘟病菌的标准菌株, 测定我国 17 省、市 378 个稻瘟病菌的交配型及其能育菌株的地理分布, 并用 13 对引物的 PCR 产物对其 73 个能育菌株进行 SCARs 分析, 初步明确了我国稻瘟病菌交配型的地理分布及其能育菌株的亲缘关系, 并对该菌有性生殖在田间存在的可能性进行了讨论。

关键词: 稻瘟病菌; 能育菌株; 地理分布; SCARs; 亲缘关系

Geographic Distribution of Mating Type in *Magnaporthe grisea* and Its Relationship Between Fertile Isolates in China

SHEN Ying¹, J. L. Notteghe², J. Milazzo³, YUAN Xiaoping¹,
H. Adreit³, ZHAO Xinhua¹, WANG Yanli¹, D. Tharreau³

(¹ China National Rice Research Institute, Hangzhou 310006;

²INRA, UFR de Biologie, Ecologie et Pathologie Vegetales, ²Place Viala, 34060 Montpellier, France;

³CIRAD, TA 73/09, 34398 Montpellier, Cedex 05, France)

Abstract: Three hundred and seventy-eight isolates of *Magnaporthe grisea* were collected from 17 provinces (cities) in China and their geographic distribution of mating type and its fertility was tested with 4 standard isolates, KA3 and THI 2 (Matl .1) and Gyl1 and THI 6 (Matl .2) provided by CIRAD. Seventy-three fertile isolates of them were tested with polymorphic SCARs analysis by use PCR markers of 13 primer pairs. Preliminary results showed that the geographic distribution of *M. grisea* existed among isolates from the same location as well as different location and its relative relationship between fertile isolates of the fungus in China. The existence of sexual reproduction of *M. grisea* was explored in the field as well.

Key words: *Magnaporthe grisea*; Fertile isolates; Geographic distribution; SCARs; Relative relationship

稻瘟病由 *Magnaporthe grisea* 引起^[1,2], 该菌为一异宗配合的子囊菌, 除可寄生水稻外, 还寄生于其它禾本科植物^[1,3,4]。其有性生殖于室内人工合成培养基上获得已被国内外学者所证实^[5~12], 在多数稻区内, 该菌通常以无性繁殖为主, 只有在田间发现两种交配型并与其雌性能育菌株共存的情况下, 方可证实该菌的有性生殖存在于田间, 但迄今难以用

常规的指纹分析方法来验证其能否生存于田间的寄主。该方法在研究该菌的系统进化上尚存在一定的局限性, 且其适用的地域范围较小^[4,13,14]。本研究在成功发现我国部分稻区存在有雌性能育菌株的基础上^[3,15], 与法国国际农艺研究和发展中心 (CIRAD) 合作, 采用特异性扩增片段 (SCARs) 的方法^[10], 分析我国主要稻区稻瘟病菌的交配型和地理

收稿日期: 2001-01-15

基金项目: 国家科技部生物技术和开发中心“中法先进研究计划”生物领域合作项目 (国科生字 [1997] 155 号)

作者简介: 沈 瑛 (1937-), 女, 江苏无锡人, 研究员, 主要从事水稻品种资源的评价和利用及寄主与病原菌的互作机制研究。Tel: 0571-63370374;

Fax: 0571-63371745; E-mail: shenyng@public.fy.hz.zj.cn

分布及其能育菌株的亲缘关系^[7,8],结合病菌的致病型测定及其非致病基因的分析^[4,16],以期获得该菌有性繁殖能存在于田间寄主的假说依据,为探明稻瘟病菌的致病基因与水稻抗病基因之间的互作机制及其有效防治提供新的思路。

1 材料与方法

1.1 菌株的纯化培养及其性别鉴定

将采自我国 17 省、市不同类型水稻植株上的 378 个稻瘟病菌株,在法国 CIRAD 的植物病理和微生物实验室内进行纯化培养,并与法国 CIRAD 提供的 4 个国际稻瘟病菌标准菌株 KA3 和 THI 2(交配型 1.1)及 Guy11 和 THI 6(交配型 1.2),于水稻米糠酵母洋菜培养基上及 20℃ 的连续光照下对峙培养 15d 左右,于显微镜下根据培养基上子囊壳在两菌菌丝

交界处的着生部位及其形态特征鉴别其雌雄性别。

1.2 病菌基因组 DNA 的提取

将经冰冻干燥后的菌丝团,于研钵中研成粉末,按 Dr. D. Tharreau 方法^[10]提取 DNA,然后溶于 TE 缓冲液中(10 mmol Tris-HCl, pH 7.5, 1 mmol EDTA)至最终浓度 5 ng/ml, -20℃ 冰箱中保存。

1.3 引物

用于 SCARs 的供试引物有 H60.85, Y16, D16, P90.4, H61.15, H61.17, C71.4, H60.84, J131.4, E10, P91.9, J160.9, J160.7, Cut, G18 共 15 对(表 1),先用 CH5、CH64 和 CH85 号菌株进行 PCR 反应,根据其扩增后条带的有无、数量及其可重复性,从中确定 13 对引物(D16 和 J160.7 除外)用于 73 个测试菌株的扩增,引物序列见表 1^[10]。

表 1 13 对多态 SCARs 分析的引物序列、扩增条件、等位基因数及其长度范围

Table 1 Primer sequences, amplification condition, size and number of alleles (N = 232 individuals) of 13 *Magnaporthe grisea* polymorphic SCARs

位点 Locus	引物序列 Primer sequence(5' ~ 3')	退火温度 Annealing temp. (°C)	等位基因数 No. of alleles	长度范围 Size range (bp)
C71.4	F: TGCCGCCTGCTCTAAGTAAA R: TATCCTTCACCAACGACACC	60	3	Null, 1030 ~ 1050
CUT1	F: TATAGCGTTGACCTTGTGGA R: TAAGCATCTCAGACCGAACC	60	3	Null, 800 ~ 1370
E10	F: ACCAGGTGACGTCGATAAGC R: CTGACGCCAAAAGCAAGTTA	55	4	Null, 1250 ~ 1700
H60.84	F: GGACAAGCAAGACAAGGTAT R: CGACAAAGCAGAGAAAGAGG	60	2	Null, 670
H60.85	F: CATCTACAACCCGAGCAAGG R: TGTAAAACAGCCCATCAAAG	60	3	Null, 400 ~ 600
H61.15	F: TGTATGATGCGAGCGGACTT R: TGGACTGGGTATTGTTGAGC	60	4	Null, 100 ~ 1500
H61.17	F: AGTGGTGGATACGAGCAGGG R: AGGAAACACAAAGCGAGGAT	60	2	Null, 950
J131.4	F: CCTAACCCAGTTCCTCCGTAT R: TATGCTCCCAATTTTATTA	55	2	Null, 1270
J160.9	F: TTGACTGTATTGTTGCCGTT R: GGGCGACACGTTGAAGAGTT	60	3	Null, 800 ~ 1100
P90.4	F: CGGCAAATACTTCCACCATA R: GGTCTTCGTTGAGCACATA	60	2	Null, 285
P91.9	F: ACCCACTCGTGACCTTTA R: CGGACGCTTGATTGCTGTTA	55	6	Null, 1150 ~ 1700
Y16	F: ATTTAGAAGGCAGGGGTGTC R: TGTGTGAAAACAAGGCAAGC	53	3	Null, 300 ~ 800
G18	F: CCAAGCATCCTCCACCATT R: TCACGTCGTCAGTTCAAGA	55	1	Null, 420

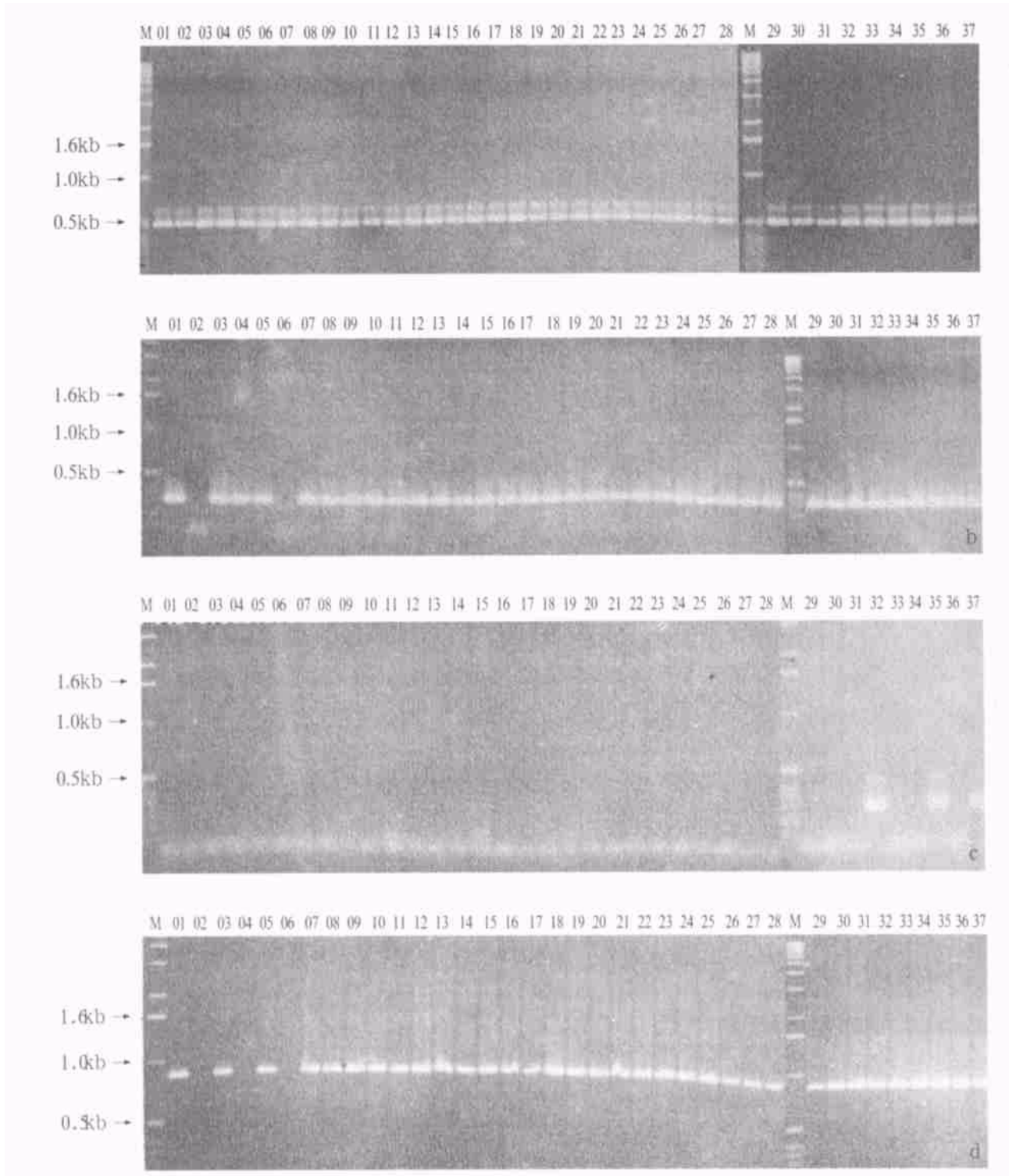
1.4 PCR 扩增条件

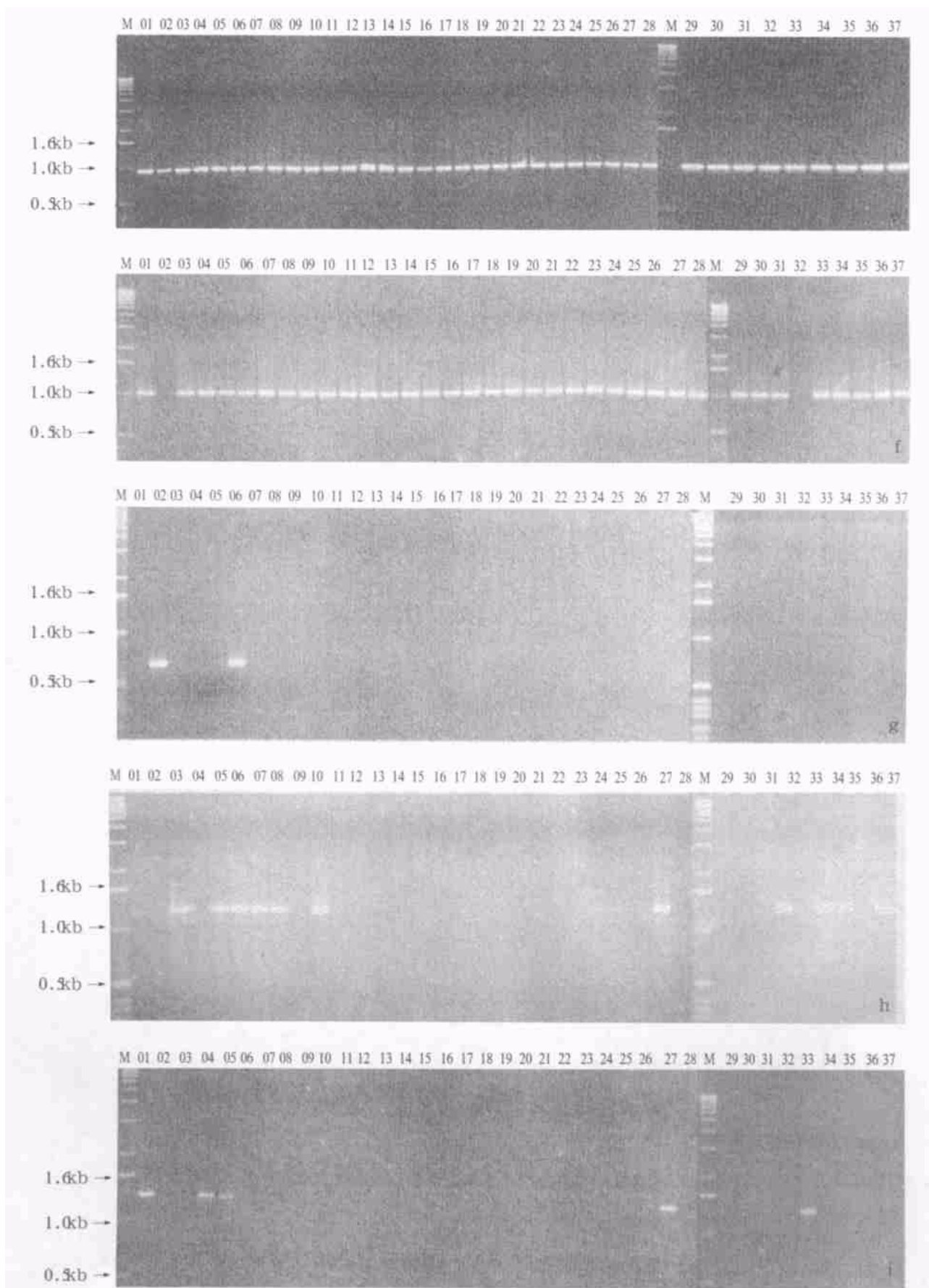
用于 SCARs 的 PCR 反应总体积为 25 μl, 其中含

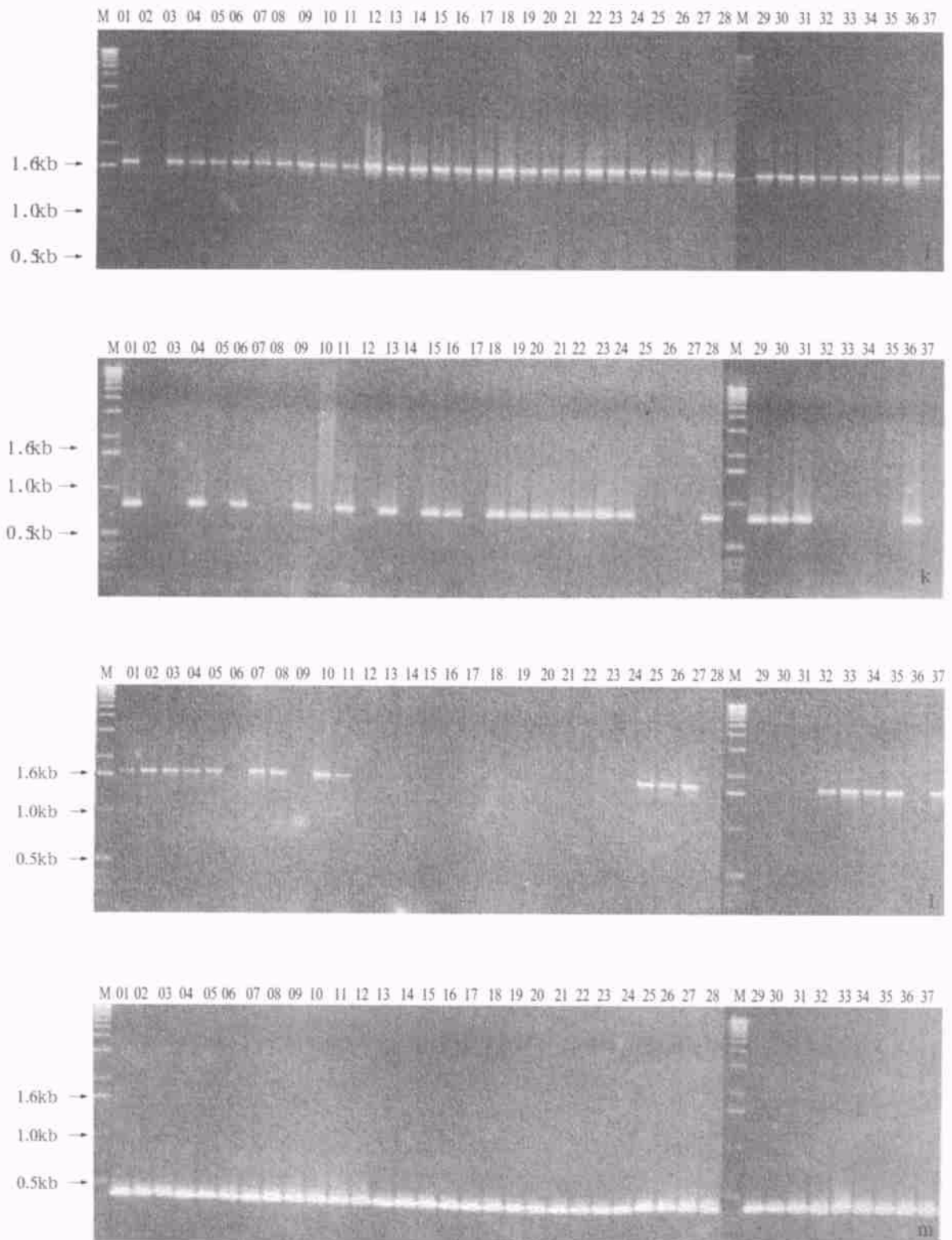
有 50 ng 的模板 DNA(2.5 μl), 0.3 μmol/L 引物 [Up (1 μl) & Lp (1 μl)], 50 μmol/L dNTP (1 μl), 2.5 μl 10 ×

扩增反应缓冲液,即 50 mmol/L KCl, 10 mmol/L Tris-HCl (室温 pH 8.3), 1.5 mmol/L MgCl₂(0.75 μ l), 1 U Taq (0.1 μ l) DNA 聚合酶,超纯水加至 25 μ l。然后在每个样品中加 2 滴石蜡油,上面紧紧覆盖一张蜡纸,以免菌株间彼此污染。PCR 反应在 PTC-100 热循环仪上进行。用于 SCARs 反应的温度循环是 94 $^{\circ}$ C 15 min, 并连续进行 94 $^{\circ}$ C 1 min, 60 $^{\circ}$ C 或 55 $^{\circ}$ C 1 min,

72 $^{\circ}$ C 1 min 共 30 个循环,后接 72 $^{\circ}$ C 15 min。每样品中加 0.25% 溴酚兰(3 μ l), 每孔点样 10 μ l, 以 1 g/100 ml 的琼脂糖凝胶于 1 \times TBE(0.09 mol/L Tris-borate, 0.002 mol/L EDTA) 中电泳 2~2.5h, 然后将扩增产物分别在含有溴化乙锭(1 μ g/ml) 的溶液中浸泡 5~10 min 后移至清水中飘洗 10~20 min, 在紫外灯下观察并自动照相记录(图 1)。







a. SCAR H60 .85 ; b. SCAR Y16 ; c. SCAR P90 .4 ; d. SCAR H61 .15 ; e. SCAR H61 .17 ; f. SCAR C71 .4 ; g. SCAR H60 .84 ; h. SCAR J131 .4 ; i. SCAR E10 ; j. SCAR P91 .9 ; k. SCAR J160 .9 ; l. SCAR Cut ; m. SCAR G18 ; M=1 kb Ladder

图 1 13 对引物对我国 37 个稻瘟病菌株的 PCR 扩增图谱

Fig. 1 Migration of PCR/ digestion of amplification products were carried out on 1 % agarose and stained with ethidium bromide from 37 isolates of *M. gisea* in China with 13 pairs of primers showing polymorphic markers

1.5 聚类分析

各引物的 PCR 反应分别进行 2~3 次,将大部分可重复的带型列入统计范围,对少数不能重复者则于统计时忽略不计,根据其扩增条带的有无分别记载为 1 或 0,聚类分析利用 NTSYS 2 软件包在 PC 机上进行,采用 UPGMA (Ultrametric Pairwise Grouping Method using Arithmetic mean) 方法分析其亲缘关系,并产生树状图(图 2)。

2 结果与分析

2.1 稻瘟病菌的交配型及其出现频率

378 个中国稻瘟病菌株和 4 个国际稻瘟病标准菌株对峙培养的结果表明,148 个为交配型 1.1 (9 个是雌性菌株),94 个为交配型 1.2 (17 个为雌性菌株),135 个菌株与标准菌株经对峙培养后均不能产生子囊孢子,分别占测定总数的 39.2%、24.8% 和 36%。这与 Yaegashi 和 Yamada^[18]从来自 6 国 130 个菌株中观测到的交配型菌株的分布情况(交配型 1.1、交配型 1.2 和不育的比例分别为 20%、32% 和 48%)基本类似。各省交配型 1.1、交配型 1.2 和不育之间的频率也差异较大,分别在 0~73%、0~67% 和 0~64% 之间,在广西仅测到交配型 1.1,辽宁省和上海市只测到交配型 1.2,因此,病菌标样的采集地点对交配型的比例影响很大(表 2)。

2.2 稻瘟病菌的雌性能育菌株及其地理分布

测定结果还表明,稻瘟病菌的雌性能育菌株主要分布在中国的云南、湖北、湖南、贵州、广东、浙江等省,其中湖北省的雌性菌株占参测菌株的 67%,表 2 我国稻瘟病菌交配型及其雌性能育菌株的地理分布

其次是云南和湖南省,分别占参测菌株的 14.3% 和 10.6%;而雌性菌株分别只占交配型 1.1 和交配型 1.2 的 6% 和 18%,在贵州、湖北、湖南和浙江省均存在有交配型 1.1 和交配型 1.2 的雌性菌株,而在广东和云南省只分别测到交配型 1.1 和交配型 1.2 的雌性菌株,这与采集标样的地理位置有极大关系(表 2)。

2.3 稻瘟病菌株的 SCARs 标记及其亲缘关系

运用法国(CIRAD)成功的 SCARs 方法^[10],分别对来自云南、湖南、浙江、海南、陕西 5 省的 73 个稻瘟病菌能育菌株进行分子标记。根据 13 对引物扩增供试分离物的 SCARs 反应结果,均可获得较为稳定的电泳谱带,其扩增片段的分子量一般在 0.3~1.8 kb 之间,等位基因数^[10]分别为 1、2、3、4、6(表 1),而相似率水平介于 0~42% 之间,菌株群体间的亲缘关系见图 2。根据其相似率可将参测菌株区分为 6 组(I、II、III、IV、V、VI),每组菌株的相似率略有差异,其中 I 组的相似率为 39%~42%,II、III、IV、V、VI 组的相似率分别为 23%~28%,21%~22%,16%~18%,14%~15%,8%~10%。云南菌株遍及 I、II、III、IV、V、VI 6 组,而相似率最高和最低的 I 组和 VI 组菌株仅来自云南;湖南和浙江菌株的分布基本相同,前者分布在 I、II、III、V 4 组;后者分布于 II、III、V 3 组,而陕西和海南各分布在 II 和 V 组。由此可见,来源于不同省份的菌株之间具有明显而复杂的亲缘关系。尽管本试验测定的菌株数量有限,但仍然能反映出该菌的遗传多样性并可进行远距离传播^[4,16]。

Table 2 Distribution of mating type and female fertility isolates of *Magnaporthe grisea* in China

采样省份/市 Provinces/Cities	菌株数 Number				不育 Nd	总数 Total	频率 Frequency				
	交配型 1.1		交配型 1.2				交配型 1.1 Matl .1	交配型 1.2 Matl .2	不育 Nd	雌性 Female	交配型 1.1/ 交配型 1.1 + 交配型 1.2 Matl .1 / Matl .1 + Matl .2
	雄性 Male	雌性 Female	雄性 Male	雌性 Female							
福建 Fujian	13	0	9	0	12	34	0.38	0.26	0.35	0	0.59
广东 Guangdong	6	2	8	0	6	22	0.36	0.36	0.28	0.09	0.5
广西 Guangxi	0	0	5	0	5	10	0	0.5	0.5	0	0
贵州 Guizhou	14	1	5	1	13	34	0.44	0.18	0.38	0.06	0.71
海南 Hainan	2	0	2	0	2	6	0.33	0.33	0.33	0	0.5
河北(京、津) Hebei (Beijing, Tianjin)	10	0	2	0	2	14	0.71	0.14	0.14	0	0.83
湖北 Hubei	1	1	1	3	0	6	0.33	0.67	0	0.67	0.33
湖南 Hunan	7	3	11	2	24	47	0.21	0.28	0.51	0.11	0.43
江西 Jiangxi	1	0	2	0	5	8	0.13	0.25	0.63	0	0.33
辽宁 Liaoning	4	0	0	0	7	11	0.36	0	0.64	0	1
上海 Shanghai	8	0	0	0	3	11	0.73	0	0.27	0	1
陕西 Shaanxi	5	0	1	0	10	16	0.31	0.06	0.63	0	0.83
四川 Sichuan	13	0	10	0	2	25	0.52	0.4	0.08	0	0.57
云南 Yunnan	18	0	12	9	24	63	0.29	0.33	0.38	0.14	0.48
浙江 Zhejiang	37	2	9	2	20	70	0.56	0.16	0.29	0.06	0.78
总计 Total	139	9	77	17	135	378	0.39	0.25	0.36	0.07	0.61

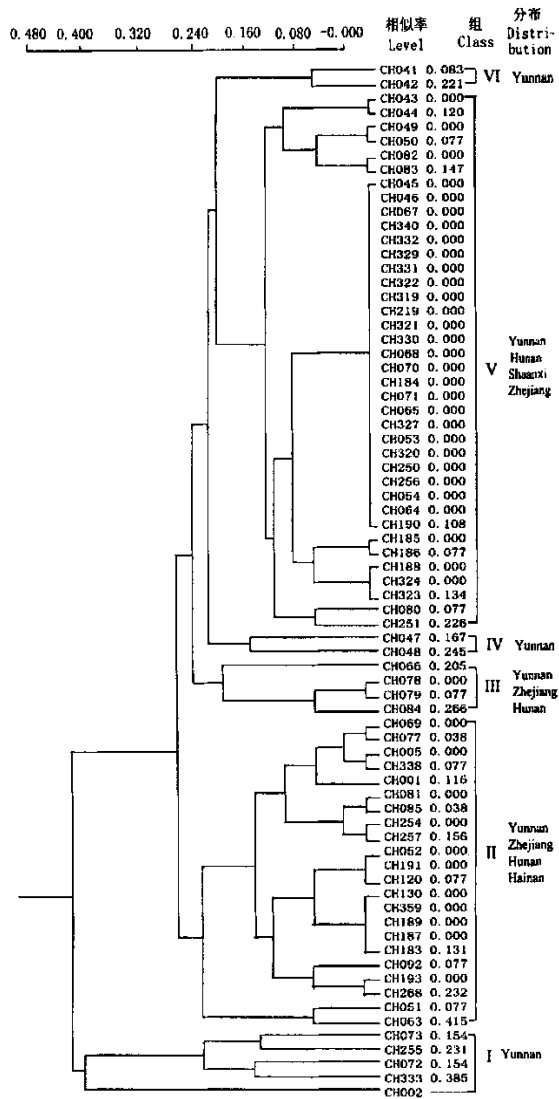


图 2 我国 73 个稻瘟病菌能育菌株的亲缘关系树状图

Fig. 2 Dendrogram showing relationships among 73 fertile isolates of *Magnaporthe grisea* in China

3 讨论

3.1 随着分子生物学的发展,采用常规的指纹分析难以验证稻瘟病菌的有性生殖是否存在于禾本科寄主,在研究系统进化上尚存在适用地域范围小的局限性^[4,7,8,14,16]。本文运用 13 对引物的 PCR 产物对其 73 个能育菌株进行 SCARs 分析,发现除 SCARs J13.14, E10, P90.4 和 H60.84 外,多数引物可在其供试菌株上产生一条长度范围不同的相同谱带(图 1),表明稻瘟病不同分离菌之间具有较高的相似度,且差异明显^[4,14,16]。

供试引物还可将不同的参测菌株分为若干 SCARs 类型,将这些引物扩增出来的 SCARs 特征图

谱综合起来可有效地将其区分,用 SCARs 标记还能较好地分析稻瘟病菌的遗传变异及其群体结构和交配型等位基因的系统进化^[1,2],倘若图距足够小,SCARs 标记能用于检测并跟踪目的基因在世代间的传递信息。本研究结果虽初步明确了该菌交配型的地理分布及其能育菌株的亲缘关系,然而,要精确分析该菌的交配型及其能育菌株与 DNA 多态性之间的关系,还需进行大量、细致的生物学测定,从中筛选出致病性稳定且差异明显的能育菌株作基因组 DNA 多态性的分析,才能在更高层次上揭示该菌能育菌株与其 DNA 多态性之间的亲缘关系^[18]。

3.2 由于我国新品种层出不穷地推广种植和频繁交换,致使寄主与病原菌相互竞争后出现的有性杂交、异核现象、准性生殖以及物化等因素而导致的突变等现象都将引发病原物种群组成和遗传结构发生改变而出现丰富的遗传多样性。由于各省、区测定的菌株数量有限,且有些省份没有提供病菌标样,其结果尚有一定的局限性。本文通过稻瘟病菌交配型的测定,已初步明确其雌性能育菌株主要分布在中国的云南、湖北、湖南、贵州、广东、浙江等省山区、丘陵地带,由于采集的病标样有限,在平原地区尚未测到雌性菌株。几乎所有供测菌株的能育力极低,通常是雌性不育或有时雄性不育,其雌性能育菌株所占测定菌株数的比例亦互不均等,且雌性能育菌株的出现频率很低(广东、贵州、湖南和浙江省的出现频率为 6%~11%),其余两省较高,云南为 14.3%,湖北为 66.7%。尽管可以通过大量菌株的检测以鉴定其育性良好的杂交组合,然而,笔者还没有发现如 Guy11 那样的雌性能育菌株并能将其能育性传递至后代的特点,以进行病菌致病性的遗传分析^[8,9]。因此,本文的研究结果仅能反映我国稻瘟病菌雌性能育菌株地理分布的概貌,而雌性能育菌株在中国主栽稻区的获得,结合病菌的致病型测定及其非致病基因的分析,将为稻瘟病菌有性态的深入研究及其防治策略提供新思路。

3.3 检测稻瘟病菌株交配型及其雌性能育菌株的出现频率需要征集大量的田间菌株,同时需要能育力强、已知交配型的标准菌株。本研究运用 SCAR 标记的方法,着重分析了云南和湖南两省的能育菌株于田间存在有性生殖的可能性,但由于对水稻致病的供试菌株的能育力极低,几乎所有的菌株均为雌性不育,而且在大多成功的杂交组合中分离到的子囊孢子存活率亦很低。在自然界仅发现该菌的无

性态,但在实验室条件下,通过将提高了能育性的亲和菌株同时接种在稻株上可获得子囊壳,如果稻瘟病菌的有性生殖发生在水稻上,亦许是罕见的或不可能进行病害的全过程^[7,8]。值得注意的是,对于除水稻以外诸如黍类等一些禾本科寄主的致病菌株,其能育力很强,对水稻致病的菌株似乎丧失了有性生殖的能力,其实这只是该过程尚未完成,其中一些菌株仍然可育。可以认为,不同的交配型菌株均属于经过长时间的遗传分离的无性系,笔者从两地鉴定的3个交配类型(交配型1.1,交配型1.2,未知)均可观测到(表2)。因此,尽管于某地同时获得两种交配型的菌株,但这些菌株是互交不育的。这种遗传的多态性表明,在同一块稻田内流行的稻瘟病可能是该菌无性的群体所致,尚不能阐明其有性生殖存在于田间。

References :

- [1] Barr M E. Magnaporthe, telimenella and typonectria (Physosporellaceae). Mycologia . 1977 ,69 :952 - 956 .
- [2] Giatong, et al . Pathogenic variability and cytology of monoclinal subcultures of *Pyricularia oryzae* . Phytopathology ,1969 ,59 :1152 - 1157 .
- [3] Shen Y, et al . Studies on the perfect stage of *Pyricularia oryzae* in China .Scientia Agricultura Sinica , 1994 , 27(1) :25 - 29 .(in Chinese)
沈 瑛,等 . 我国稻瘟病菌有性态的研究 . 中国农业科学, 1994 ,27(1) :25 - 29 .
- [4] Shen Y, et al . Molecular probes for epidemiological studies of the rice blast fungus . Journal of Southwest Agricultural university ,1998 , 20(5) :401 - 408 .(in Chinese)
沈 瑛,等 . 分子探针在稻瘟病流行病学中的应用研究 . 西南农业大学学报, 1998 , 20(5) :401 - 408 .
- [5] Hebert T T, The perfect stage of *Pyricularia grisea* . Phytopathology , 1971 ,61 :83 - 87 .
- [6] Kato H, et al . The perfect stage of *Pyricularia oryzae* CAV. in culture . Ann . Pytopath . Soc . Japan , 1982 ,48 :607 - 612 .
- [7] Kolmer J A, et al . Genetic relationships between fertility and pathogenicity and virulence to rice in *Magnaporthe grisea* . Can . J . Bot . 1988 ,66 :891 - 897 .
- [8] Levy M, et al . DNA fingerprinting resolves pathotype diversity in a plant pathogenic fungus . The Plant Cell . 1991 ,3 :95 - 102 .
- [9] Silue D, et al . Production of perithecia of *Magnaporthe grisea* on rice plants . Mycological Research , 1990 , 94 :1151 - 1152 .
- [10] Tharreau D. Developpement et Utilisation de Marqueurs SCAR Pour L' analyse des Populations de *Magnaporthe grisea* 1996 ~ 1997 . Université Victor Segalen Bordeaux II PhD thesis
- [11] Valent B, et al . Genetic studies of fertility and pathogenicity in *Magnaporthe grisea* (*Pyricularia oryzae*) . Iowa State Journal of Research , 1986 ,60 :569 - 594 .
- [12] Yaegashi H . On the sexuality of blast fungi , *Pyricularia* sp . , Ann . Phytopath . Soc . Japan , 1977 ,43 :432 - 439 .
- [13] Hamer J E, et al . Molecular probes for rice blast disease . Science , 1991 ,252 :632 - 633 .
- [14] Zhu P L, et al . Genetic diversity and pathotype structure of *Magnaporthe grisea* in partial rice growing areas of Southern China . Journal of Agricultural Biotechnology ,1995 ,3(2) :64 - 68 .(in Chinese)
朱培良,等 . 我国南方部分稻区稻瘟病菌的群体结构 . 农业生物技术学报, 1995 , 3(2) :64 - 68 .
- [15] Shen Y, et al . Inducing of the perfect stage in *Pyricularia oryzae* and the pathogenicity of its progeny . Southwest China journal of Agricultural Sciences , 1995 ,8(3) :74 - 79 .(in Chinese)
沈 瑛,等 . 稻瘟病菌有性态的诱导及其后代的致病性 . 西南农业学报, 1995 ,8(3) :74 - 79 .
- [16] Shen Y, et al . The genetic diversity and geographic distribution of *Magnaporthe grisea* in China . Scientia Agricultura Sinica ,1996 ,29 (4) :39 - 46 .(in Chinese)
沈 瑛,等 . 我国稻瘟病菌的遗传多样性及其地理分布 . 中国农业科学, 1996 ,29(4) :39 - 46 .
- [17] Liu X M, et al . Use of random amplified polymorphic DNA markers for the detection of genetic variation in *Cercosporidium soijum* of Northeast China . Acta Phytopathologica Sinica ,1998 ,28 (1) :43 - 48 .(in Chinese)
刘学敏,等 . 应用随机扩增多态性 DNA 标记检测中国东北大豆灰斑病菌株遗传变异 . 植物病理学报, 1998 ,28(1) :43 - 48 .
- [18] Yaegashi H, et al . Pathogenic race and mating type of *Pyricularia oryzae* from Soviet Union , China , Nepal , Thailand , Indonesia and Colombia . Ann . Phytopath . Soc . Japan , 1986 , 52 :225 - 234 .