

# 稻瘟病菌群体遗传结构的研究进展

臧 威<sup>1,2,3</sup> 李柱刚<sup>2,4\*</sup> 孙剑秋<sup>1,3</sup> 严善春<sup>1</sup>

(东北林业大学林学院 哈尔滨 150040) (黑龙江省农业科学院生物技术研究中心 哈尔滨 150040)

(齐齐哈尔大学生命科学与工程学院 齐齐哈尔 161006) (黑龙江省作物与家畜分子育种重点实验室 哈尔滨 150086)

**摘要** 稻梨孢引起的稻瘟病是世界水稻生产的最重要病害,严重影响水稻的产量和米质。文中综述了分子标记技术在稻瘟病菌群体遗传结构研究上的应用,分析了病原菌遗传宗谱的特点及其与致病谱的关系,探讨了导致稻瘟病菌群体遗传结构发生变化的相关因素。

**关键词** 稻瘟病 稻梨孢 分子标记技术 群体遗传结构

中图分类号:Q933 文献标识码:A 文章编号:0253-2654(2007)03-0591-04

## Advances on Population Genetics of Rice Blast Fungus

ZANG Wei<sup>1,2,3</sup> LI Zhu-Gang<sup>2,4\*</sup> SUN Jian-Qiu<sup>1,3</sup> YAN Shan-Chun<sup>1</sup>

(College of Forestry, Northeast Forestry University, Harbin 150040)

(Research Center of Biotechnology, Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, 150040)

(College of Life Science and Engineering, Qiqihar University, Qiqihar 161006)

(Key Laboratory of Molecular Breeding of Crop and Livestock in Heilongjiang, Harbin 150086)

**Abstract** Rice blast caused by *Pyricularia grisea* was the most important disease in the rice production and seriously influenced the yield and quality. This paper reviewed the application of molecular markers to the analysis of genetic population of structure in blast pathogen and stated the quality of genetic lineages. At the same time the relationship between pathotype and genetic lineages of blast pathogens was analyzed and the relative factors resulting in the changes of blast pathogen population structure were studied.

**Key words** Rice blast, *Pyricularia grisea*, Molecular marker, Genetic structure of population

稻瘟病(rice blast)是世界水稻生产上最具毁灭性的病害之一<sup>[1]</sup>,又称稻热病、火烧病、黑节病和掐脖瘟等,病原为 *Magnaporthe grisea*(Hebert)Barr. 其无性型为 *Pyricularia grisea* Sacc.。水稻发病后严重影响产量和米质,所以稻瘟病的防治受到人们的普遍重视和广泛关注。实践证明,防治水稻稻瘟病最经济有效的措施是选育和利用抗病品种<sup>[2,3,4]</sup>。可是由于稻瘟病菌在漫长的进化过程中形成了遗传上的多样性和复杂性,往往会由于病原菌小种的变异而使抗病品种的抗性不稳定,因此从病原菌本身的遗传研究着手,了解稻瘟病菌的群体结构及遗传多样性并阐明小种的变异规律,对于水稻稻瘟病的防治具有重要意义。但是传统的研究方法容易受气候条件和人为因素的影响而缺乏稳定性和可比性,因此从分子水平探究稻瘟病菌的遗传变异规律,培育对稻瘟病抗性持久稳定的水稻品种,对于促进水稻生产的持续发展非常重要。

## 1 稻瘟病菌的生理分化

20世纪20~30年代,日本佐佐木等首先开展了稻瘟病菌生理分化的研究,确定了稻瘟病菌生理小种的存在。我国于70年代末全面开展了相关研究,根据稻瘟病菌对水稻不同品种的致病性差异,将其区分为不同的生理小种。在我国,稻瘟病菌生理小种的7个鉴别寄主为特特普(Tetep)、珍龙13、四丰43、东农363、关东51、合江18和丽江新团黑谷等。

为了更好地分析稻瘟病菌生理小种的时间动态变化,我国的许多省市已经鉴定了生理小种的组成情况。不同地区稻瘟病菌生理小种的组成情况不尽相同,但每个省份都有各自的优势种群<sup>[5,6,7]</sup>。稻瘟病菌的生理分化十分复杂,某个地区的优势小种会随时间发生变化,地理位置接近的地区稻瘟病菌生理小种的群体组成可能也会存在较大差异<sup>[6]</sup>。影响稻瘟病菌小种组成及时空分布变化的因素是多

\* 通讯作者 Tel: 0451-86661820, E-mail: lizhugang@163.com

收稿日期:2007-01-15,修回日期:2007-03-16

方面的,包括栽培品种的影响、气象和环境条件的影响等,其中栽培品种单一化或者说抗病基因单一化是最主要的原因,也就是说,种植多样性的水稻品种将有利于稻瘟病菌的稳定化选择。

稻瘟病菌生理小种监测对制定抗病育种策略、水稻品种的合理布局以及病害测报和防治具有重要意义。目前利用全国统一鉴别寄主,按统一方法对病菌生理小种进行监测是切实可行的。可是由于水稻品种的更换,稻瘟病菌致病性的变异,仅靠我国70年代筛选的7个统一鉴别寄主,远不能辨别潜在致病小种的上升动态,所以必须在利用7个鉴别寄主的同时,增加新推广品种作为辅助鉴别品种,这样对潜在致病小种的监测结果将会更准确。

## 2 稻瘟病菌群体结构的研究方法

近年来,分子生物学的发展为微生物群体遗传学研究提供了新的有效手段,利用分子生物学方法对稻瘟病菌的群体结构进行研究已经成为热点。尤其从20世纪80年代后期以来,随着建立在以DNA多态性为基础的分子标记技术的发展和运用,为稻瘟病持久抗性的研究注入了新活力。目前,在稻瘟病菌的群体结构研究中广泛应用的分子标记方法主要有限制性片段长度多态性(RFLP)方法、随机扩增多态性DNA(RAPD)技术、特异性扩增片断(SCAR)标记、简单重复序列(SSR)标记及Rep-PCR技术。

基于MGR586探针的RFLP指纹分析是研究稻瘟病菌群体结构、遗传多样性以及克隆稻瘟病菌特定基因的一个有用的遗传标记之一。RFLP指纹分析可以有效地检测病原真菌的种内遗传分化、反映物种的基因型和检测基因组中非转录区发生的变异,尤为适合于生物种群的遗传多样性分析。但是由于RFLP技术所需模板DNA量大,操作复杂,而且费时费力,因此不适合普通实验室使用,也不适合对大群体的分析<sup>[8]</sup>,使其已逐渐被90年代发展起来的RAPD技术所替代。

RAPD技术是研究DNA多态性的一种有效的遗传标记方法。由于RAPD技术具有所需样品DNA少,不需要分子杂交和对目标材料进行深入的分子生物学研究,简单、快速和多态性检出率高等优点,已成为近年来研究真菌群体遗传结构的一种主要分子标记方法之一<sup>[9]</sup>,成功地应用于稻瘟病菌群体遗传学的研究中。鲁国东等<sup>[10]</sup>使用21个引物对稻瘟病菌群体进行了RAPD分析,证明了稻瘟病菌群体具有丰富的遗传多样性。

SCAR标记是另一种基于PCR的分子标记,它通过1对特异引物(一般20~24个核苷酸)来扩增单个基因组序列,其引物一般根据RAPD产物两端的序列合成。SCAR标记对反应条件的敏感程度低,因此特异性和重复性较好,能够用于分析稻瘟病菌的遗传变异及其群体结构<sup>[11]</sup>。但是因为这种标记技术不能提供完整的信息、实验重复稳定性较差等,

人们已经逐渐采用微卫星标记技术进行研究,使分子标记的可靠性进一步提高。

简单重复序列(SSR)标记是近年来发展起来的建立在PCR基础上的DNA分子标记。SSR是由1~6个核苷酸为基本重复单位组成的长达几十个核苷酸的重复序列,它广泛分布于整个基因组中,而且其两端的序列一般为相对保守的单拷贝序列,据此可以设计特异引物进行SSR-PCR,以扩增串联重复序列。根据串联重复数的不同,就可以解释微卫星DNA的多态性。由于SSR标记可在短时间内一次性分析大量样品,而且具有多态性高,易于检测及结果稳定可靠等优点,在研究水稻抗稻瘟病育种及稻瘟病菌遗传多样性等方面得到了广泛的应用,成为第二代较理想的分子标记。已有的研究表明,病原真菌中的SSR一般都有2~5个等位点,利用稻瘟病菌基因组中数量丰富、分布广泛的SSR标记,能够为群体研究提供大量遗传信息,而且还可通过基因组中位置已知的SSR标记,很快筛选到与无毒基因(AVR)等重要功能基因连锁的标记,在此基础上可以进行无毒基因的精细定位、克隆,探索无毒基因与相应抗性基因互作的规律。张连洪等曾利用稻瘟病菌70-15全基因组草图和SSR技术成功获得了稻瘟病菌无毒基因*AVR-Pik<sup>m</sup>*的精细定位<sup>[12]</sup>。我们为了了解稻瘟病菌群体遗传动态和遗传结构,以便揭示水稻品种与病原菌互作的内在联系,研究了从黑龙江省有代表性的水稻产区采集的稻瘟病标样,分离获得单孢菌株共230余个,应用SSR分子标记技术进行了群体遗传组成和遗传多样性的分析,但是研究发现,SSR标记技术也有自身的局限性,如对某些未测序物种,SSR引物的开发仍然比较繁琐,工作量大而且效率低,SSR-PCR过程中易产生干扰带,使检测过程中带形不好判别,这都在一定程度上限制了该方法的使用。

目前,以Pot2-PCR为基础的Rep-PCR指纹分析法已经在稻瘟病菌的研究中得到应用。*M. grisea*基因组上的Pot2基因为一段1857bp,具有43bp完整的末端反向重复,在稻瘟病菌的单倍体基因组上约有100个拷贝,是主要的DNA重复序列之一。George<sup>[13]</sup>根据Pot2区段设计引物,采用Pot2-Rep-PCR的方法分析了稻瘟病菌的群体结构,证明该方法在研究稻瘟病菌生理小种的进化和群体动态中具有极大的潜力。由于该方法具有快速、简便、多态性强及特异性高等优点,在本质上反映稻瘟病菌的遗传特性,因而近年来得到了较为广泛的使用。

## 3 稻瘟病菌群体的遗传宗谱

稻瘟病菌是DNA水平上密切相关的菌株构成的类群,遗传宗谱相对稳定。对遗传宗谱的研究,使人们能够更准确地掌握稻瘟病在各个流行地区病原菌的群体结构及遗传变异的信息。

目前人们对不同国家和地区的稻瘟病菌遗传宗谱进

行了大量分析,已经发现美洲和欧洲的群体结构相对简单。Claudia应用MGR探针检测美国南部和波多黎各的121个菌株,结果表明其稻瘟病菌的遗传宗谱可以确定为8个谱系<sup>[14]</sup>;Eizenga分析了美国商业稻田中的稻瘟病菌群体组成,结果只统计出7个MGR586指纹群<sup>[15]</sup>;加利福尼亚、欧洲及哥伦比亚的菌株也具有类似的简单群体<sup>[16]</sup>。美国、欧洲、哥伦比亚等地的稻瘟病菌群体结构单一,可能是无性繁殖的结果。但是亚洲的稻瘟病菌群体结构却比较复杂,从菲律宾的对稻瘟病抗性不同的水稻品种上单孢分离了1516个菌株,结果将其分为13个谱系<sup>[17]</sup>。印度东部和南部广泛分布着29个稻瘟病菌谱系,印度喜马拉雅山区的*M. grisea*群体结构也是呈多样性和动态变化的<sup>[16]</sup>。我国稻瘟病菌的遗传宗谱也呈现出丰富的多样性,吴伟怀等<sup>[18]</sup>通过分子指纹分析法对稻瘟病菌进行了遗传结构分析,结果发现广东省、江苏省及云南省的稻瘟病菌具有丰富的遗传多样性。曾千春<sup>[19]</sup>等采用Pot2-Rep-PCR指纹图谱法对稻瘟病菌进行了扩增,也发现我国稻瘟病菌在DNA水平上的变异比较高,具有很丰富的多态性,说明稻瘟病菌无性系具有丰富的遗传多样性。

#### 4 稻瘟病菌的遗传宗谱与致病谱的关系

稻瘟病菌的遗传宗谱与其致病谱之间是否有一定的关系是受到普遍关注的问题。人们从研究稻瘟病菌的群体遗传结构入手,探究稻瘟病菌的变异规律,寻找病菌系谱与致病性的关系,克服依据鉴别寄主来区分病菌生理小种的方法的局限性。Claire指出美国南部稻瘟病菌的遗传宗谱与其致病谱具有一对一的关系<sup>[20]</sup>,就是说两者呈简单对应关系。王建飞等也发现,稻瘟病菌的指纹类型与致病型间存在一定的对应<sup>[21]</sup>,但是有一些学者认为稻瘟病菌的遗传宗谱与其致病谱之间并没有一对一的关系,即两者呈复杂对应关系。Chen等<sup>[17]</sup>发现,从菌株遗传宗谱能够准确推测其致病型的概率只有33%,而从菌株致病型能够准确推测其遗传宗谱的概率也只有65%,他们对分属于6群的234个稻瘟病菌单孢菌株进行了致病谱测定,共揭示出71种致病型,6群中均出现多致病型现象,即稻瘟病菌宗谱和致病谱之间无明显关联,但针对某一品种而言,某一宗谱的独立有一定的相似性。另外,我国的卢代华<sup>[22]</sup>认为稻瘟病菌的遗传宗谱与生理小种致病型之间不存在一一对应的关系。熊如意等<sup>[23]</sup>对江苏省水稻稻瘟病菌的致病性及遗传多样性的研究结果表明,同一系谱内有多个致病型,同一致病型内也有不同的系谱,说明稻瘟病菌宗谱和致病谱之间并不是一一对应的关系。Chen等运用Rep-PCR指纹技术研究了我国13个地区*Pyricularia grisea*的遗传多样性,也发现指纹类型与致病型无关<sup>[24]</sup>。

从以上的研究结果可以看出,稻瘟病菌的遗传宗谱与其致病谱之间的关系还无法定论,在实际分析应用中,将两

者相互结合起来进行研究可能会更有意义。

#### 5 稻瘟病菌的群体结构随时空及寄主品种的变化规律

稻瘟病菌的变异性与稻瘟病的防治密切相关,一直是人们争论和关注的焦点。Gopal对菲律宾的稻瘟病菌进行连续监测,发现每个月稻瘟病菌生理小种的组成都有所不同,甚至发现一个生理小种的单孢分离物也能够不断产生新的小种<sup>[25]</sup>。然而另一种观点却认为生理小种是相对稳定的,Isabelle对菲律宾稻瘟病菌进行研究时发现,只有一小部分单孢后代与其亲代反应稍有不同<sup>[26]</sup>。出现上述互相矛盾的结论可能是由于环境、鉴别寄主状态的差异以及人为的主观判断造成的。Isabelle<sup>[26]</sup>还发现,基于MGR-RFLP划定的稻瘟病菌遗传宗谱,其组成与分布因时空而异,绝大多数分布于特定的稻瘟病区。卢代华等<sup>[22]</sup>在研究四川省的稻瘟病菌时认为,群体结构具有明显的时空特点,不同年度间稻瘟病菌群体存在一定的亲缘关系,又各自拥有当年的特异性宗谱,在空间上,不同稻作区表现出不同的病菌群体变化规律。雷财林等<sup>[27]</sup>利用Pot-PCR指纹分析法研究了我国北方稻区的稻瘟病菌群体结构和遗传变异,发现稻瘟病菌的组成与分布具有不同的时空分布特征,但是影响稻瘟病菌时空分布的机制还有待于进一步的研究。

#### 6 影响稻瘟病菌群体遗传多样性的因素

##### 6.1 稻瘟病菌繁殖方式对群体遗传多样性的影响

稻瘟病菌一般以无性繁殖为主,很难发现稻瘟病菌的有性世代,因此无性繁殖对稻瘟病菌群体遗传结构的影响要明显高于有性繁殖。Claudia等<sup>[14]</sup>通过MGR586探针,对稻瘟病菌进行DNA指纹分析,发现群体遗传结构主要由无性宗谱组成,而有性杂交对稻瘟病菌致病性的变异并不重要。Kwangwon研究认为<sup>[16]</sup>,无性繁殖是导致美国、欧洲、哥伦比亚等地稻瘟病菌群体结构单一的主要原因。我们认为,尽管有性繁殖对稻瘟病菌群体遗传结构的影响较小,但是有性杂交导致稻瘟病菌的遗传变异肯定是稻瘟病菌遗传多样性的一种潜在的原因。

##### 6.2 寄主的选择作用对稻瘟病菌群体遗传结构的影响

从寄主群体与稻瘟病菌互作的观点出发,寄主的选择作用是影响稻瘟病菌群体遗传结构的主要因素,因为水稻品种的单一化种植会造成对稻瘟病菌群体的定向选择,所以产生了新的优势小种。杨雪燕等提出水稻品种抗性遗传结构的稳定化和简单化,是造成稻瘟病菌群体的遗传多样性和致病型多样性减少的主要因素<sup>[28]</sup>。刘永锋等<sup>[29]</sup>认为稻瘟病菌优势小种的存在是因为目前主栽品种占栽培面积的比例过大所造成的,可见寄主的选择作用对群体结构的影响非常重要。另外,防治策略、迁移、遗传漂变等也是影响群体遗传结构的因素之一。稻瘟病菌群体遗传结构的变化是

多个影响因素共同作用的结果。

目前,运用分子标记技术对水稻稻瘟病菌群体遗传结构的研究已经取得了很大的进展,但是要解决水稻稻瘟病持久抗性弱的问题,必须进一步监测稻瘟病菌群体遗传结构的变化规律,掌握其变化动态和潜在的变化趋势,同时研究清楚水稻抗性品种的防御机制<sup>[30]</sup>,这样将稻瘟病菌遗传结构和水稻抗病品种遗传特性结合起来研究才更科学、更有意义。

### 参考文献

- [ 1 ] 陈 罡, 钟 鸣, 侯玉柱, 等. 种子, 2006, **25**(5): 20 ~ 23.
- [ 2 ] 张建福, 凌忠专, 王国英, 等. 分子植物育种, 2006, **4**(3): 359 ~ 364.
- [ 3 ] 付崇允, 王玉平, 马玉清, 等. 作物学报, 2006, **32**(6): 799 ~ 804.
- [ 4 ] 洪彦彬, 杨祁云, 林佩珍, 等. 西北农林科技大学学报, 2006, **34**(4): 96 ~ 100.
- [ 5 ] 刘晓梅, 任金平, 郭晓莉, 等. 吉林农业科学, 2005, **30**(3): 43 ~ 45.
- [ 6 ] 张亚玲, 靳学慧. 植物保护, 2006, **32**(2): 31 ~ 34.
- [ 7 ] 金 良, 鲁远源, 张 鹤, 等. 重庆大学学报(自然科学版), 2006, **29**(7): 111 ~ 113.
- [ 8 ] Sharma T R, Chauhan R S, Singh B M, *et al.* Journal of Phytopathology, 2002, **150**: 649 ~ 656.
- [ 9 ] Dion W, Tharreau D, Notteghem J L, *et al.* Mol. Plant Microbe Interact, 2000, **13**(2): 217 ~ 227.
- [ 10 ] 鲁国东, 王宝华, 赵志颖, 等. 福建农业大学学报, 2000, **29**(1): 54 ~ 59.
- [ 11 ] Claudio B, Rosana P, Vianello B, *et al.* Genetics and Molecular Biology, 2000, **23**(4): 753 ~ 762.
- [ 12 ] 张连洪, 燕继晔, 赵文生, 等. 植物病理学报, 2006, **36**(2): 116 ~ 122.
- [ 13 ] George M, Nelson R J, Zeigler R S, *et al.* Phytopathology, 1998, **88**: 223 ~ 229.
- [ 14 ] Claudia K, Joëlle M, Sophie R, *et al.* Fungal Genetics and Biology, 2003, **40**(3): 207 ~ 214.
- [ 15 ] Eizenga G C, Agrama H A, Lee F N, *et al.* Crop Sci, 2006, **46**: 1870 ~ 1878.
- [ 16 ] Kwangwon L, Pratibha S, Wen C C, *et al.* Fungal Genetics and Biology, 2006, **43**(10): 694 ~ 706.
- [ 17 ] Chen D, Robert S, Zeigler R S, *et al.* Phytopathology, 1995, **85**(9): 1011 ~ 1020.
- [ 18 ] 吴伟怀, 王 玲, 何艺郡, 等. 中国农业科学, 2004, **37**(11): 1628 ~ 1635.
- [ 19 ] 曾千春, 范静华, 王云月, 等. 遗传学报, 2004, **31**(6): 610 ~ 615.
- [ 20 ] Claire V, Nicholas J T. Advances in Applied Microbiology, 2005, **57**: 177 ~ 215.
- [ 21 ] 王建飞, 鲍永美, 李培富, 等. 中国水稻科学, 2006, **20**(1): 109 ~ 112.
- [ 22 ] 卢代华, 叶慧丽, 廖华明, 等. 植物保护学报, 2005, **32**(1): 23 ~ 28.
- [ 23 ] 熊如意, 周益军, 白 娟, 等. 植物病理学报, 2005, **35**(1): 93 ~ 96.
- [ 24 ] Chen Q H, Wang Y C, Zheng X B. Journal of Phytopathology, 2006, **154**(6): 361 ~ 369.
- [ 25 ] Gopal I, Chattoo B B. FEMS Microbiology Letters, 2003, **227**(1): 121 ~ 126.
- [ 26 ] Isabelle F, Heidi U B, Didier T, *et al.* Fungal Genetics and Biology, 2005, **42**(9): 761 ~ 772.
- [ 27 ] 雷财林, 王久林, 蒋琬如, 等. 作物学报, 2000, **26**(6): 769 ~ 776.
- [ 28 ] 杨雪燕, 王 玲, 何艺郡, 等. 中国农业科学, 2004, **37**(10): 1468 ~ 1473.
- [ 29 ] 刘永锋, 陈志谊, 胡 明, 等. 中国水稻科学, 2004, **18**(4): 351 ~ 356.
- [ 30 ] Rehmeyer C, Li W X, Kusaba M, *et al.* Nucleic Acids Research, 2006, **34**(17): 4685 ~ 4701.