

中国、日本和菲律宾水稻白叶枯病菌 遗传多样性比较分析

郑 伟 刘晓辉 成国英 林兴华*

(华中农业大学作物遗传改良国家重点实验室和植物科学技术学院 武汉 430070)

摘 要: 用 IS-PCR 和 Rep-PCR 对 19 个来自中国、日本和菲律宾的水稻白叶枯病菌(*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*)群体进行遗传多样性分析。4 个专化引物中的 IS1113 和 ERIC 能较好的区分三国水稻白叶枯病菌。UPGMA 聚类结果表明, 三国菌株主要呈现第 2 簇和第 3 簇遗传型; 中国和菲律宾菌株在第 2 簇和第 3 簇遗传型基础上有各自的特异性分化。病原菌的遗传分簇与致病群之间没有相关性。

关键词: 水稻, 白叶枯病原菌, 遗传多样性

Genetic Diversity of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* Strains from China, Japan and Philippines

ZHENG Wei LIU Xiao-Hui CHENG Guo-Ying LIN Xing-Hua*

(Key Laboratory of Crop Genetic Improvement, College of Plant Science and Technology,
Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070)

Abstract: The IS-PCR and Rep-PCR were used to analyze 19 strains of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* from China, Japan and Philippines. Four specific primers, especially, IS1113 and ERIC could distinguish the strains from different countries. Using UPGMA analysis, most strains were in group 2 and 3. No relationship were observed between UPGMA groups and pathotypes.

Keywords: Rice, *Xanthomonas oryzae* pv. *Oryzae*, Genetic diversity

由水稻白叶枯病菌(*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*)引发的水稻白叶枯病是水稻生产上的重要病害。筛选和种植抗病品种是抵抗白叶枯病的最经济有效的方法。研究表明, 水稻品种对白叶枯病原菌的抗性符合基因对基因互作模式。因此, 进行病菌的遗传多样性比较, 对研究不同国度及区域的白叶枯病菌的毒力分化, 以及抗病品种的合理布局、轮换和相互间的交流, 都具有十分重要的意义。

随着分子技术的发展, 使病原菌基因组 DNA 变异、病原菌毒力和致病性变异及其相互关系的研究得到进一步深入。Adhikari 等^[1] 利用水稻白叶枯病菌的插入序列 IS1112、IS1113 和 ERIC 重复序列 (Repetitive sequence-based PCR) 引物, 研究尼泊尔的水稻白叶枯病菌的遗传多样性, 发现利用分子标记划分的单元型(Haplotype)与病菌致病型之间存在一定的相关性。Ochiai 等^[2] 以 IS1112 为探针研究斯

里兰卡水稻白叶枯病菌遗传多样性时发现, 以 IS1112 为标记获得的遗传聚类结果与病菌的致病型之间存在一定的相关性, 以 IS1112 为探针可以获得丰富的遗传信息。Ardales 等^[3]以 IS1113 为探针分析菲律宾水稻白叶枯病菌群体的遗传多样性和系统发育结构, 发现菲律宾病原菌群体存在时间和地域差异。Zhang 等^[4]和王春连等^[5]利用 IS-PCR、Rep-PCR 和 RFLP 对中国水稻白叶枯病菌群体的遗传多样性也进行了评价。Ochiai 等^[6]在完成了日本白叶枯病菌株 MAFF311018 全基因组测序后, 发现基因组中包含大量的无毒基因及插入序列(插入序列的数量高达 611 个), 而且由插入序列获得的病菌进化分类与病菌致病型存在着对应关系, 由此可见插入序列因子在基因组进化中具有重要作用。

本研究拟通过利用国内外广泛应用的 IS-PCR 和 Rep-PCR 技术对 19 个来自中国、日本和菲律宾水稻白叶枯病原菌进行遗传多样性及其与致病性关系的研究, 为国际间抗源的合理布局和交换提供参考依据。

1 实验材料与方法

1.1 水稻白叶枯病菌

本实验共用 19 个水稻白叶枯病原菌。其中中国的 7 个致病型代表菌株(0163-1、js97-2、js158-2、zh173、gd1358、os198 和 os225), 日本的 3 个生理小种代表菌株(T7133、T7147 和 T7174), 菲律宾的 9 个生理小种代表菌株(Pxo61、Pxo71、Pxo79、Pxo86、Pxo99、Pxo112、Pxo145、Pxo280

和 Pxo339)。

1.2 参试品种

IRBB3(*Xa3*)、IRBB4(*Xa4*)、IRBB5(*xa5*)、IRBB14(*Xa14*)、M41(*Xa15*)、Asominori(*Xa17*)、丰锦(*Xa18*)、XM5(*Xa19*)、XM6(*Xa20*)和 Java14(*Xa1+Xa3+Xa12*) 10 个近等基因系或品种。

1.3 方法

1.3.1 水稻种植和病菌接种鉴定: 水稻在 5 月 10 日播种, 6 月 12 日移栽; 每排 10 蔸, 株行距 15 cm × 28 cm, 单本种植, 本田施复合肥 60 kg/亩, 追施尿素 10 kg/亩, 防虫不防病。

菌株在接种前用 PSA 斜面上复壮, 用无菌水冲洗菌苔, 接种浓度为 3×10⁸ CFU/mL。在水稻孕穗期采用剪刀剑叶接种, 每品种接种 20 片叶。20 天后调查病斑长度, 计算 10 片叶和病斑的平均长度, 病斑与叶长的比率。病斑与叶长的比率小于或等于 0.25, 定为抗病(R); 大于 0.25 定为感病(S), 即 R≤0.25<S (依据方中达等^[7])。

1.3.2 DNA 提取: 将活化的菌株接种在 PSA 斜面培养基上, 28℃ 恒温培养 18 h~24 h, 洗下菌苔, 取 1.5 mL 菌液离心收集菌体, 加入 150 μL 裂解液 (100 mmol/L Tris-HCl, pH8.0; 50 mmol/L EDTA, pH8.0; 500 mmol/L NaCl), 再加上 20 μL 10% SDS, 混匀, 65℃ 水浴 15 min, 离心取上清, 加入等体积的氯仿, 混匀离心取上清, 加入两倍体积的无水乙醇沉淀 DNA, 70% 乙醇冲洗沉淀, 室温晾干, TE 溶解备用。

1.3.3 IS-PCR 和 Rep-PCR 扩增: IS-PCR 和 Rep-PCR 扩增参照 Adhikari 等^[1]和王春连等^[5]所述方法进行 (见表 1)。

表 1 引物序列和 PCR 反应条件
Table1 Primers sequences and PCR Conditions

引物名称和引物序列 Primer sequences		PCR 反应条件 PCR Conditions					
		变性 Denaturation	PCR 循环 PCR circle				延伸 Elongation
			变性 Denaturation	复性 Renatu- ration	延伸 Elonga- tion	循环数 Circles	
J3	5 -GCTCAGGTCAGGTGGCCTGG-3	94 , 5 min	94 , 1 min	68 , 1 min	72 , 2 min	30	72 , 10 min
IS1112	JELIRI 5 -CGAGTCCAGTCCAGCGGAGG-3	94 ,	94 ,	60 ,	72 ,	30	72 ,
	JELIR2 5 -GCGGGGAGCTTCAGAAGAGG-3	5 min	1 min	1 min	2 min		10 min
IS1113	TX1 5 -TGTAGTGGACCTTCGAA-3	94 ,	94 ,	50 ,	72 ,	30	72 ,
	TX2 5 -ACGAGCGATTGATCATG-3	5 min	1 min	1 min	2 min		10 min
ERIC	ERICIR 5 -ATGTAAGCTCCTGGGGATTAC- 3	94 ,	94 ,	52 ,	72 ,	35	72 ,
	ERIC2 5 -AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG-3	5 min	1 min	1 min	3 min		10 min

反应液组成为模板 DNA 50 ng~100 ng、0.2 mmol/L dNTPs、1×PCR buffer、2 mmol/L MgCl₂、引物各 0.25 μmol/L 和 1U Taq 酶(终浓度), 最后用双蒸水补足 20 μL。

1.4 数据分析

根据 PCR 产物指纹带位的有无, 分别转换为 1 或 0 两个数码。采用 UPGMA (unweighted pair-group method with arithmetic analysis) 聚类分析法, 推断白叶枯病菌菌系之间的基因组遗传多样性与毒力分化关系, 本研究以 PCR 谱型指纹带位相似率达 70% 为界进行分簇。

2 结果与分析

2.1 IS-PCR 和 Rep-PCR 谱型分析

本研究采用 3 个 IS-PCR 和 1 个 Rep-PCR 引物对 19 个参试菌株的基因组 DNA 进行 PCR 扩增(见图 1)。

以引物 J3 扩增的片段大小范围为 200 bp~1.2 kb, 有 1~4 条指纹主带, 共有 10 种谱型。其中中国菌株有 5 种分子谱型(见图 1 中谱型 1~5), 日本菌株有 2 种分子谱型(谱型 2、3), 菲律宾菌株有 6 种分子谱型(谱型 5~10)。可见, 以 J3 为引物扩增, 可较好的区分中国和菲律宾菌株(他们只共有 1 种分子谱型

5); 不能有效的区分中国菌株与日本菌株(日本菌株获得的 2 种分子谱型都与中国菌株的谱型重复)。以引物 IS1112 扩增的片段大小范围为 200 bp~2 kb, 有 2~7 条指纹主带, 共有 13 种谱型。其中中国菌株有 7 种分子谱型(谱型 1~7), 日本菌株有 2 种分子谱型(谱型 8、9), 菲律宾菌株有 8 种分子谱型(谱型 3、5~7、10~13)。可见, 以 IS1112 为引物扩增, 可区分中国菌株和日本菌株(两者之间无共同的分子谱型); 但不能很好的区分中国菌株和菲律宾菌株(两者之间有 4 种分子谱型重复)。

以引物 IS1113 扩增的片段大小范围为 200 bp~3 kb, 有 1~10 条指纹主带, 共有 15 种谱型。其中中国菌株有 6 种分子谱型(谱型 1~6), 日本菌株有 2 种分子谱型(谱型 2、7), 菲律宾菌株有 8 种分子谱型(谱型 8~15)。可见, 以 IS1113 为引物扩增, 可较好的区分中国、日本和菲律宾菌株(仅中国和日本菌株有分子谱型 2 重复)。

以引物 ERIC 扩增的片段大小范围为 200 bp~3 kb, 有 4~13 条指纹主带, 共有 14 种谱型。其中中国菌株有 6 种分子谱型(谱型 1~6), 日本菌株有 2 种分子谱型(谱型 6、7), 菲律宾菌株有 7 种分子谱型(谱型 8~14)。可见, 以 ERIC 为引物扩增, 可较好的区分中国、日本和菲律宾菌株(仅中国和日本菌株有分子谱型 6 重复)。

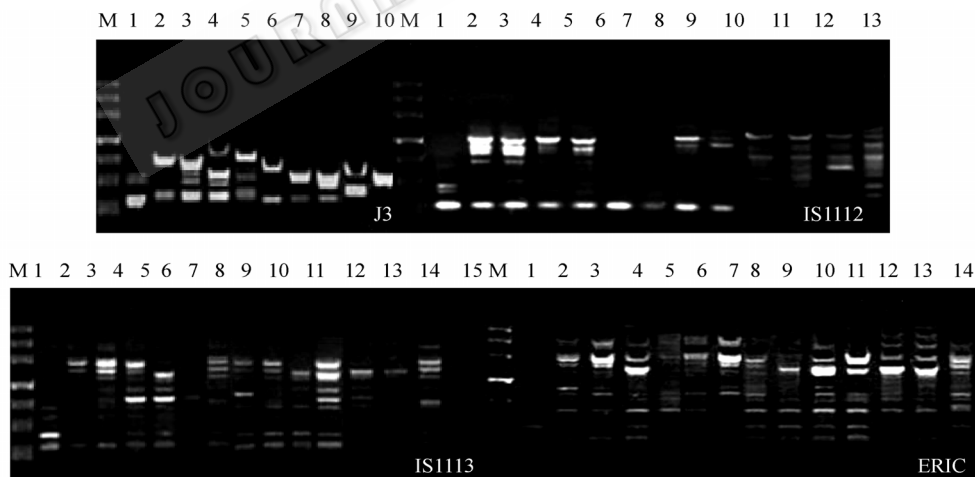


图 1 水稻白叶枯病原菌基因组 DNA 的 IS-PCR 和 Rep-PCR 指纹带型

Fig. 1 IS-PCR and Rep-PCR fingerprinting patterns of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* genomic DNA
Marker: 4.5 kb, 3 kb, 2 kb, 1.2 kb, 0.8 kb, 0.5 kb, 0.2 kb

2.2 UPGMA 聚类分析

以 70% 为界, 利用 UPGMA 对 3 种 IS-PCR 和 1 种 Rep-PCR 引物 PCR 扩增结果进行综合聚类分析, 可以将 19 个菌株分为 5 簇(见图 2)。第一簇只包括 1 个中国菌株 0163-1。第二簇有 5 个菌株, 包括 2

个中国菌株菌株 os198 和 os225(占该簇菌株数的 40%), 2 个日本菌株 T7147 和 T7174(占该簇菌株数的 40%), 以及 1 个菲律宾菌株 Pxo86(占该簇菌株数的 20%)。第三簇共有 9 个菌株, 包括 4 个中国菌株菌株 js97-2、js158-2、zh173 和

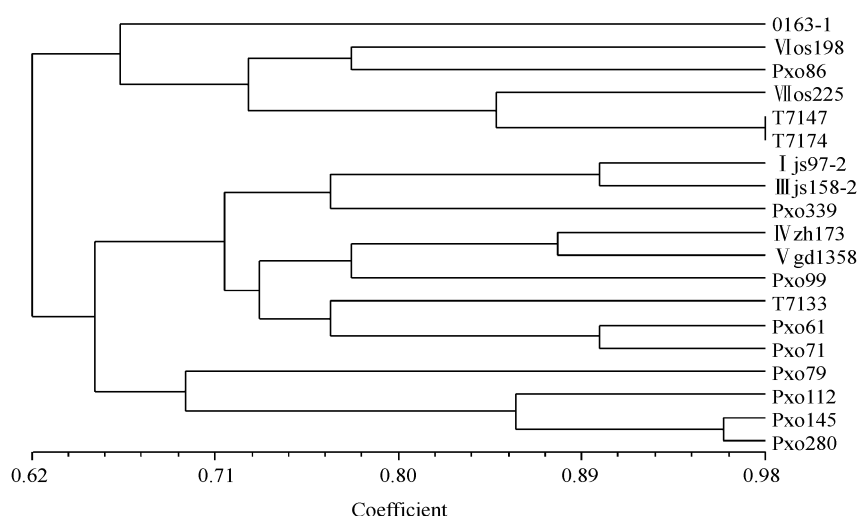


图2 采用UPGMA聚类分析法分析19个白叶枯病原菌的3种IS-PCR和1种Rep-PCR引物谱型的树型结构图

Fig. 2 Dendrogram constructed with UPGMA on the basis of 3 IS-PCR primers and 1 Rep-PCR primer for 19 strains of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*

gd1358(占该簇菌株数的44.4%), 4个菲律宾菌株Pxo61、Pxo71、Pxo99和Pxo339(占该簇菌株数的44.4%), 和1个日本菌株T7133(占该簇菌株数的11.1%)。第四簇仅有1个菲律宾菌株Pxo79。第五簇只有3个菲律宾菌株Pxo112、Pxo145和Pxo280。

从上述UPGMA聚类分析结果可见, 3个菌株被分为5簇, 一簇有1个菌株, 占参试菌的5.3%, 二簇有5个菌株, 占参试菌的26.3%, 三簇有9个菌株, 占参试菌的47.4%, 四簇有1个菌株, 占参试菌的5.3%, 五簇有3个菌株, 占参试菌的15.8%; 可见二簇和三簇菌是三国菌株的主要遗传型; 其中日本菌株分布在二簇和三簇中, 中国菌株分布在一、二、三簇, 以第三簇为主, 菲律宾菌株分布在二、三、四、五簇中, 以第三和第五簇为主; 该结果表明, 3国菌株在遗传上有密切的系统发育关系, 同时也有一定的区域性分化。

2.3 病原型分析与分子分析的关系比较

致病群的划分是依据参试菌株在10个鉴别品种上的抗感表现, 即R和S的数量。其中0~10群是按“S”(感病)表现, 沿鉴别寄主从左到右的排列顺序依次递增而划分; 11~18群是按“R”(抗性)表现, 沿鉴别寄主从右到左的排列顺序逐步递增而划分; 以群号加“-数字”区分群内不同反应型。

本研究参试的19个菌株分属于11个致病群16种反应型(详见表2)。其中中国的7个菌株分属于5个致病群5种反应型, 日本的3个菌株分属于3个致病群3种反应型, 菲律宾的9个菌株分属于7个致病群9种反应型。除0致病群(包括中国菌株

0163-1、js97-2和菲律宾菌株Pxo280)和4致病群(包括中国菌株IVzh173和Vlos198)之外, 其余均为单一致病反应型对应单一菌株。

分析“病菌致病群”与“以4种引物对病菌DNA进行的PCR扩增所得的分子谱型”之间关系可见, 同一谱型的菌株表现出不同的致病群, 同一致病群的菌株可被扩增出不同分子谱型; 如以引物J3扩增的谱型为例, 在谱型2中包括有js97-2、js158-2、T7147和T7174等菌株, 而它们却分属0、13、16-3和2等4个不同的致病群; 而0致病群的3个菌株0163-1、js97-2和Pxo280却分属于1、2和10三种分子谱型。其他3种引物PCR扩增所得的分子谱型与致病群之间也没有相应关系。

对病菌致病群与UPGMA聚类结果进行对比, 结果也表明二者之间没有相关性。同一簇中的菌株可以分属于不同种类的致病群, 如第二簇中的菌株分属于致病群4、15-1、16-3、2和18-1, 其它簇菌株也呈类似情况; 而属于同一种致病反应型的菌株可以划归为不同的簇中, 如属于0致病群的中国菌株0163-1和I js97-2与菲律宾菌株Pxo280, 分属于第一簇、第三簇和第五簇。

从上述的对比结果可见, 分子谱型和UPGMA聚类结果与致病群分化之间没有对应关系。

3 讨论

3.1 中国、日本和菲律宾水稻白叶枯病菌分子检测结果比较

本研究采用IS-PCR和Rep-PCR两种方法, 4个

表 2 中国、菲律宾、日本的代表菌株在 10 个近等基因系或品种上的致病型
Table 2 Pathotypes of Chinese and Japanese and Philippine strains to the reaction patterns tested on ten Differential Host Varieties

品种 Differential host varieties 抗病基因 R gene	丰锦 Fengjin	XM5	IRBB14	IRBB3	XM6	IRBB4	M41	Java14	IRBB5	Asominori	致病群 Pathotypes
	<i>Xa18</i>	<i>Xa19</i>	<i>Xa14</i>	<i>Xa3</i>	<i>Xa20</i>	<i>Xa4</i>	<i>Xa15</i>	<i>Xa1+3+12</i>	<i>xa5</i>	<i>Xa17</i>	
0163-1	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	0
js97-2	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	0
Js158-2	S	S	S	S	S	R	S	S	R	R	13
Zh173	S	S	S	S	R	R	R	R	R	R	4
GD1358	S	S	R	S	R	R	R	R	R	R	17-1
Os-198	S	S	S	S	R	R	R	R	R	R	4
Os-225	S	S	S	S	R	R	S	R	R	R	15-1
T7133	S	S	S	R	S	S	R	R	R	R	15-3
T7147	S	S	R	R	S	S	R	R	R	R	16-3
T7174	S	S	R	R	R	R	R	R	R	R	2
Pxo61	S	S	S	R	R	R	R	S	R	R	16-2
Pxo71	S	S	S	R	R	R	R	R	R	R	3
Pxo79	S	S	S	S	S	R	R	R	R	R	5
Pxo86	S	R	R	R	S	R	R	R	R	R	18-1
Pxo99	S	S	S	S	S	S	S	R	R	R	7
Pxo112	S	S	R	R	R	R	S	R	R	R	17-2
Pxo145	S	S	S	R	R	R	S	R	R	R	16-1
Pxo280	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	0
Pxo339	R	S	S	R	S	S	R	R	R	R	16-4

引物对 19 个来自中国、日本和菲律宾水稻白叶枯病原菌株的基因组 DNA 进行 PCR 分析, 结果表明, 菲律宾菌株的分子谱型最多, 中国菌株次之, 日本菌株最少。虽然 4 个引物都能一定程度的区分 3 国的水稻白叶枯病原菌株的遗传性, 但以 IS1113 和 ERIC 的分辨率最高。

UPGMA 聚类分析的结果表明, 3 国菌株共分 5 簇, 二簇和三簇菌是三国菌株的主要遗传型, 占参试菌的 73.7%; 其中日本菌株分布在二簇和三簇中, 中国菌株分布在一、二、三簇, 以第三簇为主, 菲律宾菌株分布在二、三、四、五簇中, 以第三和第五簇为主; 该结果表明, 3 国菌株在遗传上有密切的系统发育关系, 同时也有一定的区域性分化。

3.2 中国、日本和菲律宾水稻白叶枯病菌病原型检测结果与分子检测结果比较

以 10 个近等基因系为鉴别品种, 对 19 个菌株进行了致病性测定, 结果表明, 在这套鉴别寄主上, 中国、日本和菲律宾菌株的病原型分化明显, 除了 0 致病群(包括中国菌株 0163-1、I js97-2 和菲律宾菌株 Pxo280)和 4 致病群(包括中国菌株 IVzh173 和 Vlos198)之外, 其余致病反应型均为各国菌株所特有。说明这 3 国的菌株之间存在有致病性差异。

IS-PCR 和 REP-PCR 检测结果和 UPGMA 聚类结果表明, 这 3 国的菌株具有地理来源差异。但是

本实验中 PCR 检测结果和聚类分析结果均未发现与病原菌的致病性之间具有相关性。

参 考 文 献

[1] Adhikari TB, Mew TW, Leach JE. Genotypic and Pathotypic Diversity in *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* in Nepal. *Phytopathology*, 1999, **89**(7): 687–694.

[2] OCHIAI H, HORINO O, MIYAJIMA K, *et al.* Genetic Diversity of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* Strains from Sri Lanka. *Phytopathology*, 2000, **90**(4): 415–421.

[3] Ardales EY, Leung H, Vera Cruz CM, *et al.* Hierarchical analysis of spatial variation of the rice bacterial blight pathogen across diverse agroecosystems in the Philippines. *Phytopathology*, 1996, **86**: 241–252.

[4] Zhang Qi, Leach JE, Nelson RJ, *et al.* Genetic structure of rice bacterial blight pathogen population in China. *Acta Agronomica Sinica* (作物学报), 1997, **23**(2): 150–158.

[5] 王春连, 章 琦, 周永力, 等. 我国长江以南地区水稻白叶枯病原菌遗传多样性分析. *中国水稻科学*, 2001, **15**(2): 131–136.

[6] OCHIAI H, INOUE Y, TAKEYA M, *et al.* Genome sequence of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* suggests contribution of large numbers of effector genes and insertion sequences to its race diversity. *JARG*, 2005, **39**(4): 275–287.

[7] 方中达, 许志刚, 过崇俭, 等. 中国水稻白叶枯病菌致病型的研究. *植物病理学报*, 1990, **20**(2): 82–88.