

海南南繁区水稻纹枯病菌的遗传多样性与致病力分化

朱名海 彭丹丹 舒灿伟 周而勋*

(华南农业大学 农学院/广东省微生物信号与作物病害重点实验室, 广州 510642; *通讯联系人, E-mail: exzhou@scau.edu.cn)

Genetic Diversity and Pathogenicity Differentiation of *Rhizoctonia solani* AG-1 IA from South China Crop Breeding Area in Hainan Province

ZHU Minghai, PENG Dandan, SHU Canwei, ZHOU Erxun*

(Guangdong Province Key Laboratory of Microbial Signals and Disease Control/College of Agriculture, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China; *Corresponding author, E-mail: exzhou@scau.edu.cn)

Abstract: 【Objective】 In order to clarify the genetic differentiation and the correlation between genetic diversity and pathogenicity of *Rhizoctonia solani* AG-1 IA in South China Crop Breeding Area, the genetic diversity, population genetic structure, pathogenicity and the correlation between genetic diversity and pathogenicity of 60 *R. solani* AG-1 IA isolates collected from the core region (Sanya, Ledong and Lingshui) and non-core region (Qiongzong, Tunchang and Ding'an) of South China Crop Breeding Area were comparatively analyzed 【Method】 by using AFLP molecular marker technique and detached leaf inoculation method. 【Result】 The cluster analysis results showed that the genetic diversity of *R. solani* AG-1 IA in the core region was relatively higher. The analysis results of population genetic structure showed that the percentage of polymorphic loci (PPL), Nei's gene diversity index (H), Shannon's information index (I) and gene flow (N_m) in the core population were 82.24%, 0.1932, 0.3062 and 2.5627, respectively, higher than those of non-core population with PPL, H , I and N_m being 67.49%, 0.1535, 0.2447 and 0.9365, respectively. However, the genetic differentiation coefficient (G_{st}) in the core population was 0.1633, lower than that of non-core population whose G_{st} was 0.3481. 【Conclusion】 These results showed that the degree of genetic variation of the isolates from core region was higher than that of the isolates from non-core region. Much gene flow among the core populations and little gene flow among the non-core populations existed, but the genetic variation of both regions was mainly within the population. Overall, the degree of genetic differentiation in the isolates of core region was higher. The results of pathogenicity and correlation between genetic diversity and pathogenicity showed that most isolates from core region belonged to the medium pathotypes and most isolates from non-core region belonged to the medium or strong pathotypes, but there was no correlation between pathogenicity and AFLP lineage.

Key words: South China Crop Breeding Area; *Rhizoctonia solani* AG-1 IA; genetic diversity; population genetic structure; pathogenicity differentiation; AFLP

摘要: 【目的】为明确南繁区水稻纹枯病菌(*Rhizoctonia solani* AG-1 IA)的遗传分化及遗传多样性与致病力的关系, 【方法】采用 AFLP 分子标记技术和离体叶片接种法对南繁核心区(三亚、乐东、陵水)和非核心区(琼中、屯昌和定安)共 60 株水稻纹枯病菌的遗传多样性、遗传结构和致病力分化进行了测定, 并分析了遗传多样性与致病力之间的关系。【结果】聚类分析结果表明, 核心区菌株的遗传多样性相对更高; 群体遗传结构分析表明, 核心区群体的多态性位点百分率(PPL)、Nei 基因多样性指数(H)、Shannon 信息指数(I)和基因流(N_m)分别为 82.24%、0.1932、0.3062 和 2.5627, 高于非核心区群体的 67.49%、0.1535、0.2447 和 0.9365; 而核心区群体的基因分化系数(G_{st})为 0.1633, 低于非核心区群体的 0.3481。【结论】核心区菌株的遗传变异程度比非核心区菌株高; 核心区不同群体间存在较多的基因交流, 而非核心区菌株间的基因交流较少, 但遗传变异均主要来自于群体内; 总体而言, 核心区菌株的遗传分化程度更高。菌株的致病力及其与菌株遗传多样性的相关性分析表明, 核心区菌株以中等致病型为主, 而非核心区菌株则以中、强致病型为主, 但与菌株的 AFLP 谱系之间的相关均未达显著水平。

关键词: 南繁区; 水稻纹枯病菌; 遗传多样性; 遗传结构; 致病力分化; AFLP

中图分类号: S435.111.4⁺2

文献标识码: A

文章编号: 1001-7216(2019)02-0176-10

收稿日期: 2018-04-17; 修改稿收到日期: 2018-05-30。

基金项目: 国家公益性行业(农业)科研专项(201403075)。

海南南繁区位于我国海南岛南部的三亚市、陵水县、乐东县和保亭县等地，该地区得天独厚的光温气候资源对我国水稻、玉米和棉花等农作物的繁育起到了巨大的作用，是我国最具影响力的农业科技试验基地，所以也叫国家南繁育种基地。尤其是在目前世界种业竞争激烈的情况下，南繁区对加快我国农作物育种进程起到了巨大的推动作用，被誉为“中国种业科技硅谷”^[1]。

水稻纹枯病是最具毁灭性的水稻病害之一^[2]，随着水稻种植方式的改变、矮秆高产品种的推广以及化肥施用量的增加，为害程度不断加重。根据中国植物保护学会微信公众号的报道，2018 年我国水稻纹枯病总体偏重发生^[3]。立枯丝核菌(*Rhizoctonia solani* Kühn)是一种土传性的、腐生能力很强的病原真菌，不产生分生孢子。由于该真菌是一个庞大的复合种，所以种下要进行融合群分类。到目前为止，该菌被划分为 14 个融合群(anastomosis group, AG)，共 18 个融合亚群^[4]。水稻纹枯病菌是其中的一个融合亚群，即 *R. solani* AG-1 I A，主要是以菌丝体或菌核形式在土壤中存活并引起初侵染^[5]。对该菌的遗传多样性、遗传结构及遗传多样性与致病力之间的关系进行研究，是了解其演变规律，准确预测水稻纹枯病发生和流行趋势的重要基础。

近年来，各种分子标记技术在植物病原真菌的遗传多样性研究上发挥了巨大的作用。这些分子标记技术主要有 RFLP^[6]、RAPD^[7]、SSR^[8]、ISSR^[9]、AFLP^[10-12]和 SRAP^[20]等。AFLP 是一种既可靠又高效的分子标记技术，具有多态性高、DNA 用量少、检测效率高、重复性好、对 DNA 模板浓度变化不敏感等优点^[12]。Taheri 等^[10]对从印度水稻分离得到的 110 个立枯丝核菌菌株(其中，AG-1 I A 菌株 96 个，AG-1 I B 菌株 1 个，AG-1 I C 菌株 2 个和 AG-Bb 菌株 11 个)进行了 AFLP 分析，发现聚类分析的结果与这些菌株的融合群属性一致；进一步的分析表明，影响水稻纹枯病菌

(*R. solani* AG-1 I A) 群体遗传结构的主要因素是地理来源，寄主品种对此影响不大。范文艳等^[11]对黑龙江省 13 个水稻种植地区共 29 个水稻纹枯病菌进行了 AFLP 分析和致病力测定，测定结果表明黑龙江省的水稻纹枯病菌具有较明显的致病性分化，并且病原菌的遗传谱系与致病性鉴定之间存在一定相关性。

农作物品种在南繁区繁育过程中，大陆与南繁区之间的水稻种子或无性繁殖材料调运频繁。为了研究种子或无性繁殖材料上所携带的病原菌对南繁区水稻纹枯病菌的遗传多样性和致病力的影响，本研究以分离自南繁核心区(三亚市、陵水县、乐东县和保亭县)和非核心区(琼中县、屯昌县和定安县)的水稻纹枯病菌为研究材料，对其遗传多样性、遗传结构及其致病力之间的关系进行研究，了解南繁区水稻纹枯病菌遗传本质上的差异及其致病力分化的现状，为南繁区水稻繁育及其纹枯病防治提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 供试菌株

分别于 2014 年 3、5、6 和 10 月分 4 批次从南繁核心区的三亚市、陵水县和乐东县以及非核心区的琼中县、屯昌县和定安县的水稻田中采集表现典型水稻纹枯病症状的病鞘或病叶 100 多份，按照周而勋等^[13]的快速简便分离法进行病原菌的分离、纯化，初步获得病原菌菌株。这些菌株经细胞核染色^[14]和融合群测定^[15]最终确定为立枯丝核菌(*R. solani*)AG-1 I A 融合亚群菌株(即水稻纹枯病菌)。最后，每县(市)选取 10 个代表菌株用于遗传多样性和致病力分析，供试菌株的详细情况见表 1。

1.2 菌丝收集与 DNA 提取

挑取新活化的水稻纹枯病菌菌丝块，接种到装有 100 mL PDB 培养基(马铃薯 200.0 g，葡萄糖 20.0 g，去离子水 1000 mL)的 500 mL 三角瓶中，

表 1 海南南繁核心区和非核心区水稻纹枯病菌

Table 1. *Rhizoctonia solani* AG-1IA isolates collected from the core and non-core regions of South China Crop Breeding Area in Hainan Province.

区域 Region	采集地点 Sampling location	采集时间 Sampling date	菌株编号 Isolate No.
核心区 Core region	三亚 Sanya	2014-05-28	SY1, SY2, SY3, SY4, SY5, SY6, SY7, SY8, SY9, SY10
	乐东 Ledong	2014-06-01	LD1, LD2, LD3, LD4, LD5, LD6, LD7, LD8, LD9, LD10
	陵水 Lingshui	2014-03-15, 2014-10-27	LS1, LS2, LS3, LS4, LS5, LS6, LS7, LS8, LS9, LS10
非核心区 Non-core region	琼中 Qiongzong	2014-06-02	QZ1, QZ2, QZ3, QZ4, QZ5, QZ6, QZ7, QZ8, QZ9, QZ10
	屯昌 Tunchang	2014-06-03	TC1, TC2, TC3, TC4, TC5, TC6, TC7, TC8, TC9, TC10
	定安 Ding'an	2014-06-04	DA1, DA2, DA3, DA4, DA5, DA6, DA7, DA8, DA9, DA10

表 2 AFLP 所用接头和引物
Table 2. Adapters and primers for AFLP.

序号 Code	接头或引物 Adapter or primer	序列 Primer sequence(5'→3')	引物用途 Purpose
Ea	EcoR I 接头 EcoR I adapter	CTCGTAGACTGCGTACC CATCTGACGCATGGTTAA	连接 Ligation
Em	Mse I 接头 Mse I adapter	GACGATGAGTCCTGAG TACTCAGGACTCAT	连接 Ligation
E0	EcoR I +0	GACTGCGTACCAATTTC	预扩增 Pre-amplification
E1	EcoR I +AA	GACTGCGTACCAATTCAA	选择性扩增 Selective amplification
E2	EcoR I +AT	GACTGCGTACCAATTTCAT	选择性扩增 Selective amplification
E3	EcoR I +AC	GACTGCGTACCAATTTCAC	选择性扩增 Selective amplification
E4	EcoR I +AG	GACTGCGTACCAATTTCAG	选择性扩增 Selective amplification
E5	EcoR I +TA	GACTGCGTACCAATTCTA	选择性扩增 Selective amplification
E6	EcoR I +TT	GACTGCGTACCAATTCTT	选择性扩增 Selective amplification
E7	EcoR I +TC	GACTGCGTACCAATTCTC	选择性扩增 Selective amplification
E8	EcoR I +TG	GACTGCGTACCAATTCTG	选择性扩增 Selective amplification
M0	Mse I +0	GATGAGTCCTGAGTAA	预扩增 Pre-amplification
M1	Mse I +CAA	GATGAGTCCTGAGTAACAA	选择性扩增 Selective amplification
M2	Mse I +CAT	GATGAGTCCTGAGTAACAT	选择性扩增 Selective amplification
M3	Mse I +CAC	GATGAGTCCTGAGTAACAC	选择性扩增 Selective amplification
M4	Mse I +CAG	GATGAGTCCTGAGTAACAG	选择性扩增 Selective amplification
M5	Mse I +CTA	GATGAGTCCTGAGTAACTA	选择性扩增 Selective amplification
M6	Mse I +CTT	GATGAGTCCTGAGTAACTT	选择性扩增 Selective amplification
M7	Mse I +CTC	GATGAGTCCTGAGTAACTC	选择性扩增 Selective amplification
M8	Mse I +CTG	GATGAGTCCTGAGTAACTG	选择性扩增 Selective amplification

25℃、150 r/min 下摇菌培养 3~5 d 后抽滤收取菌丝，用于提取 DNA(采用 OMEGA SP Fungal DNA Mini Kit)。

1.3 AFLP 的接头和引物

AFLP 接头和引物的序列详情见表 2，由北京奥科鼎盛生物科技有限公司合成。

1.4 AFLP 分析

1.4.1 基因组 DNA 的酶切和连接

限制性内切酶 *EcoR* I、*Mse* I 和 *T*₄ 连接酶均购自 NEB 公司，酶切体系为 20 μL，DNA 模版量为 300.0 ng，37℃ 下酶切 3 h；连接体系为 25 μL，*Mse* I 接头和 *EcoR* I 接头的浓度分别为 5 μmol/L 和 50 μmol/L，16℃ 下连接过夜。

1.4.2 预扩增和选择性扩增

PCR 所用的预混液购自 TaKaRa 公司。预扩增体系为 25 μL，其中，连接产物 5 μL，10 μmol/L *EcoR* I 和 *Mse* I 预扩增引物各 1 μL，混匀后进行常规 PCR；选择性扩增体系为 25 μL，其中，预扩增 20 倍稀释产物 5 μL，10 μmol/L *EcoR* I 和 *Mse* I 选择性扩增引物各 1 μL，混匀后进行降落(Touch-down) PCR。

1.4.3 变性聚丙烯酰胺凝胶电泳及银染检测

6% 变性聚丙烯酰胺凝胶 80W 恒功率电泳 2 h，采用 Brant 等^[16]的方法(略有改动)进行银染检测，胶板晾干后拍照保存。

1.5 致病力测定

水稻纹枯病菌的致病力测定以及致病力分级标准参照周而勋等^[15]的离体叶片接种法。供试水稻为中感水稻品种 Jasmine 85。

1.6 数据处理

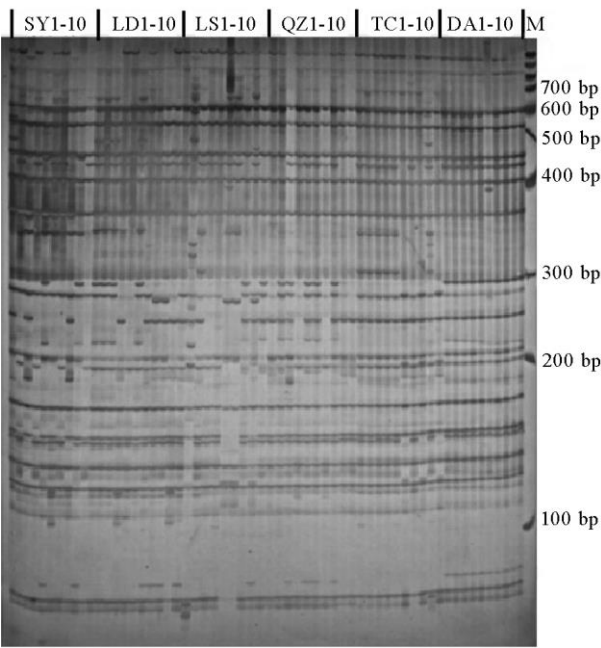
1) 用 Excel 软件对原始数据进行初步处理，并用 SPSS 17 中的 Duncan 新复极差法对菌株的致病力进行差异显著性分析。

2) 根据扩增带的有无对电泳图谱进行读取，取得“01”数据矩阵表；用 NTSYSpc 2.1 软件进行聚类分析；用 POPGENE32 1.32 软件计算相关的遗传多样性指标：多态性位点百分率 *PPL*、*Nei* 基因多样性 *H*、*Shannon* 信息指数 *I*、群体总基因多样性 *H*_t、群体内基因多样性 *H*_s、基因分化度 *G*_{st}、基因流 *N*_m、遗传一致性 *In* 和遗传距离 *D*。

2 结果与分析

2.1 不同引物组合对水稻纹枯病菌 DNA 扩增的多态性

本研究从 64 对随机引物组合中筛选了 8 对条带较丰富且多态性较高的引物组合用于 AFLP 分析，分别为 E1/M2、E2/M3、E2/M7、E3/M2、E3/M4、E6/M3、E6/M5 和 E6/M8。扩增片段的长度多为 100~600 bp(图 1)，共扩增出 366 条条带，平均每对引物组合可检测到 45.75 条条带，其中



M—分子标记。

M, DNA ladder marker

图 1 引物组合 E3/M2 扩增的水稻纹枯病菌 AFLP 图谱
Fig. 1. AFLP amplification results of *Rhizoctonia solani* AG-1 IA with the primer combination E3/M2.

331 条具有多态性，平均每对引物组合可检测到 41.38 条多态性条带，多态性条带百分率为 90.44%(表 3)。可见南繁核心区和非核心区水稻纹枯病菌个体间存在丰富的遗传多样性。

2.2 遗传多样性分析

在相似系数为 0.82 处，从上到下依次可将它们分为 9 组。核心区和非核心区的水稻纹枯病菌菌株在 4 个谱系中有交叉分布，说明核心区和非核心区菌株之间存在一定的基因交流，亲缘关系较接近；核心区菌株一共分布在 9 个谱系里，而非核心区菌株仅分布在 4 个谱系中，表明核心区菌株间的遗传分化程度更高；其中，陵水菌株一共分散在 6 个谱系里，说明该地区的菌株遗传分

化程度最高，而定安菌株仅分布在一个谱系里，说明定安地区的菌株遗传分化程度最低(图 2，表 4)。

2.3 遗传结构分析

由表 5 可知，南繁区水稻纹枯病菌群体的多态性位点百分率(PPL)为 90.44%。其中，核心区群体的 PPL 值为 82.24%，高于非核心区群体的 67.49%，6 个群体的 PPL 值为 16.39%~74.59%，6 个群体的 PPL 值大小代表遗传变异的程度为陵水>屯昌>三亚>乐东>琼中>定安。南繁区水稻纹枯病菌群体总的 *I* 值为 0.3009，其中，核心区群体的 *I* 值为 0.3062，也高于非核心区的 0.2447，6 个群体间的 *I* 值为 0.0761~0.3250，根据 *I* 值遗传变异由高到低的顺序依次为陵水>三亚>屯昌>乐东>琼中>定安；南繁区水稻纹枯病菌群体总的 *H* 值为 0.1869，其中，核心区群体的 *H* 值为 0.1932，也高于非核心区的 0.1535，各群体的 *H* 值为 0.0503~0.2082，6 个群体的 *H* 值依次为陵水>三亚>屯昌>乐东>琼中>定安。以上各项遗传多样性参数的比较分析结果表明，南繁核心区和非核心区水稻纹枯病菌的遗传多样性在各群体间有一定的差异，核心区水稻纹枯病菌群体的遗传多样性分化高于非核心区。

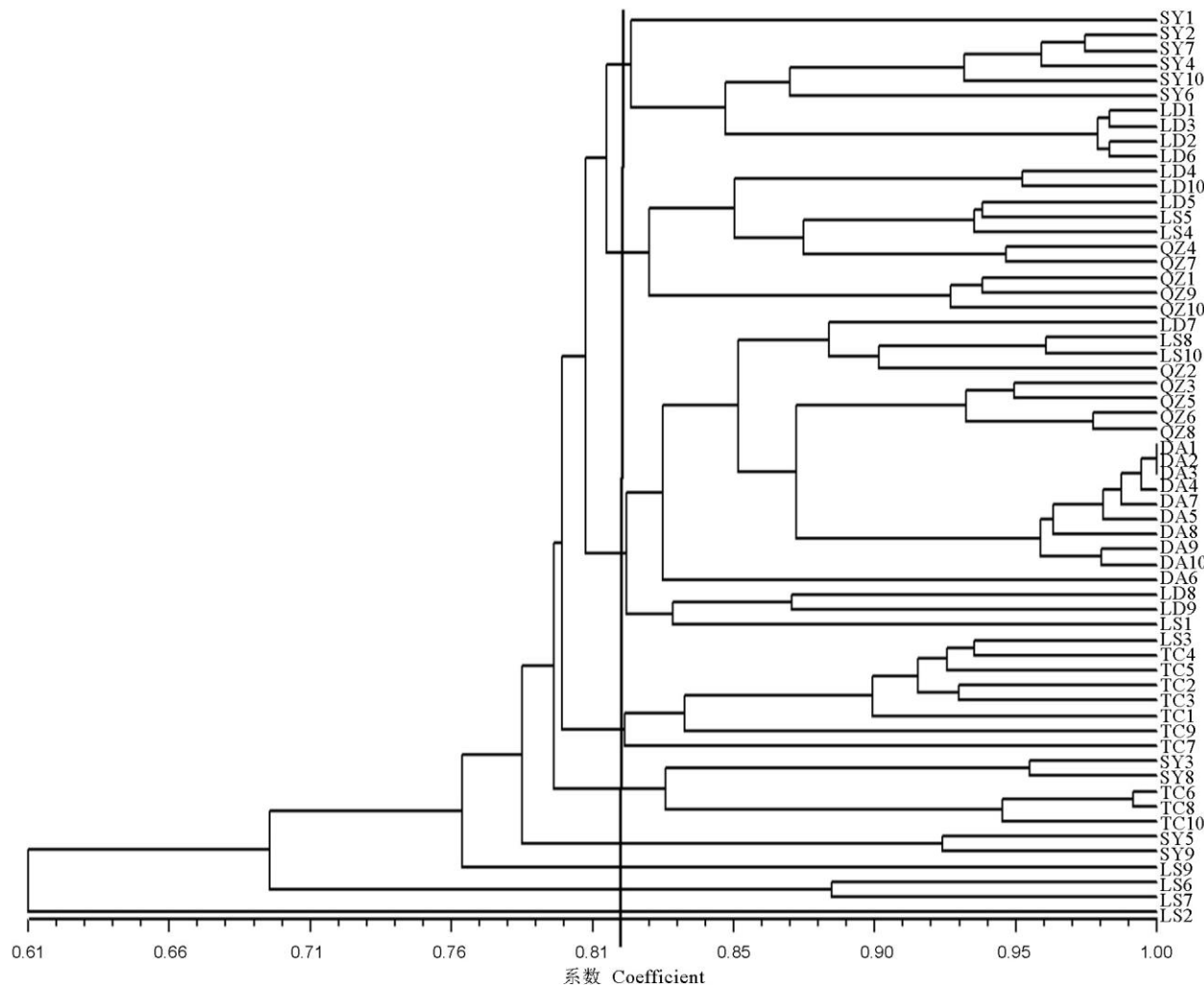
由表 6 可知，南繁区水稻纹枯病菌群体总的基因分化度[$G_{st}=(H_t-H_s)/H_t$]为 0.2997，其中，核心区水稻纹枯病菌群体的 G_{st} 为 0.1633，非核心区水稻纹枯病菌群体的 G_{st} 为 0.3481；南繁区水稻纹枯病菌群体总的基因流 [$N_m=0.5(1-G_{st})/G_{st}$] 为 1.1682。其中，核心区水稻纹枯病菌群体的 N_m 值为 2.5627，非核心区水稻纹枯病菌群体的 N_m 值为 0.9365，表明核心区水稻纹枯病菌群体间有较多基因交流，非核心区水稻纹枯病菌群体间的基因交流则相对较少，群体间的遗传分化相对较大，但遗传变异均主要发生在群体内。

由表 7 可知，遗传一致性 I_n 最高(遗传距离 D

表 3 南繁核心区和非核心区水稻纹枯病菌 AFLP 引物组合的扩增结果

Table 3. Amplification results of *Rhizoctonia solani* AG-1 IA from the core and non-core regions of South China Crop Breeding Area with AFLP primer combinations.

引物组合 Primer combination	扩增条带数 Amplification band number	多态性条带数 Polymorphic band number	多态性条带百分率 Percentage of polymorphic bands/%
E1/M2	63	60	95.24
E2/M3	39	34	87.18
E2/M7	44	33	75.00
E3/M2	57	48	84.21
E3/M4	38	37	97.37
E6/M3	52	49	94.23
E6/M5	38	37	97.37
E6/M8	35	33	94.29
合计 Total	366	331	90.44



右侧编号为水稻纹枯病菌菌株编号。

The column on the right represent isolates of *Rhizoctonia solani* AG-1 I A.

图 2 海南南繁核心区和非核心区水稻纹枯病菌的聚类分析

Fig. 2. Clustering dendrogram of *Rhizoctonia solani* AG-1 IA from the core and non-core regions of South China Crop Breeding Area in Hainan Province.

最小)的群体为陵水和屯昌，遗传一致性 I_n 最低(遗传距离 D 最大)的群体为三亚和定安。基于遗传一致性的群体聚类分析(图 3)表明，在遗传一致性(I_n)

值为 0.9360 时，非核心区的屯昌群体与核心区各群体聚为一组，非核心区的琼中群体和定安群体各聚为一组，进一步证明核心区群体的遗传分化

表 4 海南南繁核心区和非核心区水稻纹枯病菌 AFLP 谱系分析

Table 4. AFLP lineage analyses of *Rhizoctonia solani* AG-1 IA in the core and non-core regions of South China Breeding Area in Hainan Province.

AFLP 谱系 AFLP lineage	菌株编号 Isolate No.	菌株来源 Isolate origin	致病型 Pathotype
I	SY1, SY2, SY4, SY6, SY7, SY10, LD1, LD2, LD3, LD6	三亚、乐东 Sanya, Ledong	弱、中、强 Weak, medium, high
II	LD4, LD5, LD10, LS4, LS5, QZ1, QZ4, QZ7, QZ9, QZ10	乐东、陵水、琼中 Ledong, Lingshui, Qiongzong	弱、中、强 Weak, medium, high
III	LD7, LD8, LD9, LS1, LS8, LS10, QZ2, QZ3, QZ5, QZ6, QZ8, DA1, DA2, DA3, DA4, DA5, DA6, DA7, DA8, DA9, DA10	乐东、陵水、琼中、定安 Ledong, Lingshui, Qiongzong, Dingan	弱、中、强 Weak, medium, high
IV	LS3, TC1, TC2, TC3, TC4, TC5, TC7, TC9	陵水、屯昌 Lingshui, Tunchang	弱、中、强 Weak, medium, high
V	SY3, SY8, TC6, TC8, TC10	三亚、屯昌 Sanya, Tunchang	弱、中 Weak, medium
VI	SY5, SY9	三亚 Sanya	弱、中 Weak, medium
VII	LS9	陵水 Lingshui	强 High
VIII	LS6, LS7	陵水 Lingshui	中、强 Medium, high
IX	LS2	陵水 Lingshui	弱 Weak

表 5 海南南繁核心区和非核心区水稻纹枯病菌不同群体的遗传多样性分析

Table 5. Genetic diversity analyses of different *Rhizoctonia solani* AG-1 IA populations from the core and non-core regions of South China Crop Breeding Area in Hainan Province.

群体 Population	菌株数 Number of isolates	总位点数 Total number of loci	多态性位点数 Number of polymorphic loci	多态性位点百分率 Percentage of polymorphic loci/%	Shannon 信息指数 Shannon's information index(I)	Nei 基因多样性指数 Nei's gene diversity Index(H)
三亚 Sanya	10	366	160	43.72	0.2149	0.1417
乐东 Ledong	10	366	148	40.44	0.2035	0.1351
陵水 Lingshui	10	366	273	74.59	0.3250	0.2082
琼中 Qiongzong	10	366	128	34.97	0.1695	0.1112
屯昌 Tunchang	10	366	166	45.36	0.2119	0.1387
定安 Ding'an	10	366	60	16.39	0.0761	0.0503
核心区 Core region	30	366	301	82.24	0.3062	0.1932
非核心区 Non-core region	30	366	247	67.49	0.2447	0.1535
总计 Total	60	366	331	90.44	0.3009	0.1869

表 6 海南南繁核心区和非核心区水稻纹枯病菌群体的遗传分化和基因流

Table 6. Genetic differentiation and gene flow of *Rhizoctonia solani* AG-1 IA populations from the core and non-core regions of South China Crop Breeding Area in Hainan Province.

群体 Population	群体总基因多样性 Total genetic diversity in populations (H_t)	群体内基因多样性 Genetic diversity within population (H_s)	基因分化度 Genetic differentiation coefficient (G_{st})	基因流 Gene flow (N_m)
核心区 Core region	0.1932	0.1617	0.1633	2.5627
非核心区 Non-core region	0.1535	0.1001	0.3481	0.9365
总计 Total	0.1869	0.1309	0.2997	1.1682

表 7 海南南繁核心区和非核心区水稻纹枯病菌群体的遗传一致性和遗传距离

Table 7. Genetic identity and genetic distance of *Rhizoctonia solani* AG-1 IA populations from the core and non-core regions of South China Crop Breeding Area in Hainan Province.

群体 Population	三亚 Sanya	乐东 Ledong	陵水 Lingshui	琼中 Qiongzong	屯昌 Tunchang	定安 Ding'an
三亚 Sanya		0.9382	0.9433	0.9236	0.9317	0.8862
乐东 Ledong	0.0638		0.9511	0.9397	0.9343	0.8978
陵水 Lingshui	0.0583	0.0502		0.9330	0.9515	0.8948
琼中 Qiongzong	0.0795	0.0622	0.0693		0.9225	0.9145
屯昌 Tunchang	0.0708	0.0679	0.0497	0.0807		0.8979
定安 Ding'an	0.1208	0.1078	0.1111	0.0894	0.1077	

左下角为遗传距离，右上角为遗传一致性。

The lower left corner is the genetic distance, and the upper right corner is the genetic consistency.

程度大于非核心区的。

2.4 致病力测定结果

由表 8 可知，所有菌株对 Jasmine 85 水稻品种均有一定的致病性，同时各菌株之间又存在一定的致病力分化。致病型的统计分析(表 9)表明，核心区和非核心区菌株的致病型有一定的差异，核心区菌株强、中、弱类型的出现比例分别为 16.7%、63.3%、20.0%；而非核心区菌株强、中、弱类型的出现比例分别为 36.7%、46.7%、15.7%，说明核心区菌株以中等致病型为主，而非核心区菌株则以中、强致病型为主。强致病力菌株中，屯昌地区出现的比例最高，为 50.0%，三亚地区未发现此类型菌株；中等致病型菌株中，乐

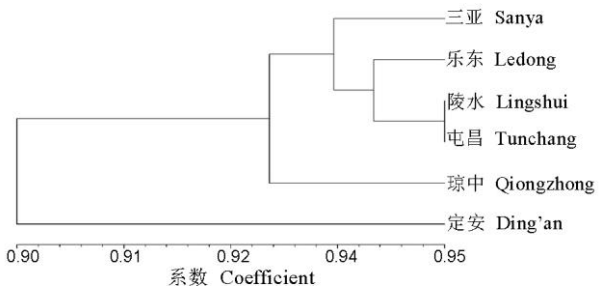


图 3 基于 Nei 遗传一致性的南繁核心区和非核心区水稻纹枯病菌群体聚类分析结果

Fig. 3. Clustering dendrogram of *Rhizoctonia solani* AG-1 IA from the core and non-core regions of South China Crop Breeding Area based on Nei's genetic consistency.

表 8 海南南繁核心区和非核心区的水稻纹枯病菌致病力

Table 8. Pathogenicity test of *Rhizoctonia solani* AG-1 IA from the core and non-core regions of South China Crop Breeding Area in Hainan Province.

菌株编号 Isolate no.	平均致病力 Average pathogenicity	致病型 ^a Pathotype ^a	5% 显著水平 ^b ($P=0.05$) ^b	1% 极显著水平 ^b ($P=0.01$) ^b
SY1	3.83±1.17	中 Medium	abcdefgh	ABCDEF
SY2	3.67±1.37	中 Medium	abcdefghi	ABCDEF
SY3	2.17±1.47	弱 Weak	i	FG
SY4	2.83±1.33	弱 Weak	efghi	BCDEF
SY5	4.00±1.26	中 Medium	abcdefg	ABCDEF
SY6	3.00±1.67	中 Medium	defghi	ABCDEF
SY7	3.17±1.33	中 Medium	cdefghi	ABCDEF
SY8	4.00±2.00	中 Medium	abcdefg	ABCDEF
SY9	2.83±1.83	弱 Weak	efghi	BCDEF
SY10	3.83±0.75	中 Medium	abcdefgh	ABCDEF
LD1	3.00±0.63	中 Medium	defghi	ABCDEF
LD2	2.17±1.72	弱 Weak	i	FG
LD3	3.33±0.82	中 Medium	bcdefghi	ABCDEF
LD4	3.67±0.82	中 Medium	abcdefghi	ABCDEF
LD5	3.83±0.75	中 Medium	abcdefgh	ABCDEF
LD6	4.17±0.98	强 High	abcdef	ABCDEF
LD7	3.17±0.41	中 Medium	cdefghi	ABCDEF
LD8	3.83±1.60	中 Medium	abcdefgh	ABCDEF
LD9	3.50±1.64	中 Medium	abcdefghi	ABCDEF
LD10	4.00±1.10	中 Medium	abcdefg	ABCDEF
LS1	3.67±1.03	中 Medium	abcdefghi	ABCDEF
LS2	2.50±1.38	弱 Weak	ghi	DEF
LS3	3.33±1.37	中 Medium	bcdefghi	ABCDEF
LS4	3.00±0.63	中 Medium	defghi	ABCDEF
LS5	0.67±0.52	弱 Weak	j	G
LS6	3.00±1.10	中 Medium	defghi	ABCDEF
LS7	4.17±0.75	强 High	abcdef	ABCDEF
LS8	4.50±0.84	强 High	abcd	ABCD
LS9	4.33±0.82	强 High	abcde	ABCDE
LS10	5.00±0.00	强 High	a	A
QZ1	3.00±1.41	中 Medium	defghi	ABCDEF
QZ2	3.83±0.98	中 Medium	abcdefgh	ABCDEF
QZ3	3.33±0.82	中 Medium	bcdefghi	ABCDEF
QZ4	4.83±0.41	强 High	ab	AB
QZ5	4.67±0.52	强 High	abc	ABC
QZ6	4.33±1.21	强 High	abcde	ABCDE
QZ7	4.67±0.82	强 High	abc	ABC
QZ8	4.00±0.89	中 Medium	abcdefg	ABCDEF
QZ9	4.00±1.26	中 Medium	abcdefg	ABCDEF
QZ10	3.00±1.10	中 Medium	defghi	ABCDEF
TC1	4.17±1.33	强 High	abcdef	ABCDEF
TC2	4.33±0.82	强 High	abcde	ABCDE
TC3	4.67±0.82	强 High	abc	ABC
TC4	2.67±1.75	弱 Weak	fghi	CDEF
TC5	4.17±1.17	强 High	abcdef	ABCDEF
TC6	2.67±0.52	弱 Weak	fghi	CDEF
TC7	5.00±0.00	强 High	a	A
TC8	3.83±0.98	中 Medium	abcdefgh	ABCDEF
TC9	3.50±1.64	中 Medium	abcdefghi	ABCDEF
TC10	2.83±1.83	弱 Weak	efghi	BCDEF
DA1	3.67±1.51	中 Medium	abcdefghi	ABCDEF
DA2	2.33±0.82	弱 Weak	hi	EFG
DA3	3.33±1.03	中 Medium	bcdefghi	ABCDEF
DA4	3.00±1.67	中 Medium	defghi	ABCDEF
DA5	3.00±1.55	中 Medium	defghi	ABCDEF
DA6	4.50±0.84	强 High	abcd	ABCD
DA7	4.50±0.55	强 High	abcd	ABCD
DA8	3.33±1.63	中 Medium	bcdefghi	ABCDEF
DA9	3.67±0.82	中 Medium	abcdefghi	ABCDEF
DA10	2.67±0.82	弱 Weak	fghi	CDEF

a: 致病型。强—病级值在 4.0 以上; 中—病级值为 3.0~4.0; 弱—病级值在 3.0 以下。b—表中数据采用 Duncan 新复极差法(DM)进行差异显著分析。不同小写字母和大写字母分别表示处理间在 5% ($P=0.05$) 或 1% ($P=0.01$) 水平上差异显著。平均数±标准差。

a, Pathotypes. Strong, The value of disease grade is above 4.0; Medium, The value of disease grade is between 3.0 and 4.0; Weak, The value of disease grade is under 3.0. b, Data in the table were analyzed with the Duncan's multiple range test, different lowercase and uppercase letters in the same column are significantly different among treatments at 5% ($P=0.05$) or 1% ($P=0.01$) levels, respectively. Average±standard deviation.

表 9 海南南繁核心区和非核心区水稻纹枯病菌的致病型

Table 9. Pathotypes of *Rhizoctonia solani* AG-1 IA from the core and non-core regions of South China Crop Breeding Area in Hainan Province.

区域 Region	市（县） County	菌株数(所占比例) No. of isolates (Percentage/%)			合计 Total
		强致病型 High	中致病型 Medium	弱致病型 Weak	
核心区 Core region	三亚 Sanya	0(0.00)	7(70.00)	3(30.00)	10
	乐东 Ledong	1(10.00)	8(80.00)	1(10.00)	10
	陵水 Lingshui	4(40.00)	4(40.00)	2(20.00)	10
	合计 Total	5(16.70)	19(63.33)	6(20.00)	30
非核心区 Non-core region	琼中 Qiongzong	4(40.00)	6(60.00)	0(0.00)	10
	屯昌 Tunchang	5(50.00)	2(20.00)	3(30.00)	10
	定安 Ding'an	2(20.00)	6(60.00)	2(20.00)	10
	合计 Total	11(36.70)	14(46.70)	5(15.70)	30

东地区出现的比例最高，为 80.0%，屯昌地区出现的比例最小，为 20.0%；弱致病型菌株中，三亚和屯昌地区出现的比例最高，为 30.0%，琼中地区未发现此类型菌株。同时，由上述表 4 的结果也可以看出，菌株 AFLP 谱系与其致病力相关未达显著水平。

3 讨论

3.1 南繁区水稻纹枯病菌 DNA 的 AFLP 分析

本研究一共筛选出 8 对引物组合用于南繁核心区和非核心区 60 个水稻纹枯病菌的 AFLP 分析，不同引物的多态性条带百分率为 75.00%~97.37%，所有引物的总多态性条带百分率为 90.44%，表明菌株间存在较高的遗传多样性。

3.2 南繁区水稻纹枯病菌的遗传多样性分析

南繁核心区和非核心区水稻纹枯病菌的聚类分析表明，核心区菌株一共分布在 9 个谱系里，而非核心区菌株只分布在 4 个谱系中，表明核心区菌株间的遗传分化程度更高；其中，定安县的菌株只分布在一个谱系里，说明该地区的菌株遗传分化程度最低。出现这种现象的原因与南繁区水稻种子的复杂来源及其携带的病原菌有关，因为核心区的水稻种子来源相对非核心区更复杂，而离热带气候区稍远的定安县由于不太适合水稻种子的冬春繁殖要求，故主要为当地的水稻品种，所以该地区水稻纹枯病菌的遗传分化程度便出现了较低的现象。

3.3 南繁区水稻纹枯病菌的遗传多样性与致病力相关性分析

南繁核心区和非核心区 60 个水稻纹枯病菌菌株聚类群的划分与这些菌株的致病力划分的比较分析表明，核心区和非核心区水稻纹枯病菌的遗传谱系与其致病力强弱之间相关不显著；这与陈

涛^[17]、黄雯雯^[18]、吴荷芳^[19]和张优^[20]等的研究结果一致；但范文艳等^[11]对黑龙江省水稻纹枯病菌的致病力分化与 AFLP 分析研究却发现，病原菌遗传聚类群的划分与菌株的致病类型之间存在一定的相关性。因此，水稻纹枯病菌的致病力与其遗传宗谱之间的关系尚无统一的结论。诚然，由于目前有关水稻纹枯病菌的遗传谱系与其致病力相关性的报道中，大部分研究均认为水稻纹枯病菌的遗传谱系与其致病力之间无明显的相关性，可见水稻纹枯病菌的遗传谱系与其致病力之间的关系较复杂，而不是简单的正相关关系，需要进行进一步的探究。

3.4 南繁区水稻纹枯病菌的群体遗传结构分析

南繁核心区和非核心区水稻纹枯病菌群体的遗传多样性指数分析表明，南繁核心区群体的遗传分化程度高于非核心区，这可能与核心区相对更复杂的水稻品种来源以及水稻纹枯病菌菌核较低的迁移能力有关。

南繁核心区和非核心区水稻纹枯病菌各群体的遗传分化分析表明，核心区和非核心区水稻纹枯病菌各居群间有一定的基因交流，群体间的遗传变异相对较小，但相比而言，核心区群体间有较多的基因交流，而非核心区群体间的基因交流相对较少，其群体间的遗传变异程度相对更明显，因为水稻纹枯病菌主要以菌核的形式进行传播，而非核心区的地形较核心区要复杂很多，对菌核的传播具有一定的限制作用。同时也说明了非核心区水稻纹枯病菌群体的地理分布对其遗传分化产生了一定的影响。Wang 等^[7]对我国南方 6 个地区的 180 株水稻纹枯病菌进行了 RAPD 分析，也发现这些菌株间具有丰富的遗传多样性，各群体的菌株间存在较高水平的基因漂流现象，致使这些变异大部分发生在种群内。本实验室之

前曾采用 ISSR 技术对我国华南地区的 72 株水稻纹枯病菌进行了遗传多样性和遗传结构分析, 同样发现这些菌株间存在高水平的遗传差异, 各群体菌株间存在明显的基因交流现象, 并且大部分变异出现在种群内^[9]。本研究结果与之前的研究结果较相似。

南繁核心区和非核心区水稻纹枯病菌群体的遗传一致性和遗传距离分析表明, 非核心区屯昌县水稻纹枯病菌群体的亲缘关系与核心区各群体较接近, 作者推测可能是因为在该县所采集的水稻纹枯病菌均来自海南省屯昌县农业科学研究所基地, 而这个基地的水稻品种丰富且多来自全国各地, 与核心区较频繁的水稻品种交流较相似, 故遗传差异较接近。

参考文献:

- [1] 陈冠铭, 李劲松, 曹兵. 发挥南繁资源优势, 促进种业科技创新. *安徽农学通报*, 2012, 18(1): 27-29.
Chen G M, Li J S, Cao B. Make the most of resource advantages of Hainan national multiplication, promoting sci-tech innovations of seed industry. *Anhui Agric Sci Bull*, 2012, 18(1): 27-29. (in Chinese with English abstract)
- [2] Moni Z R, Ali M A, Alam M S, Rahman M A, Bhuiyan M R, Mian M S, Iftekharuddaula K M, Latif M A, IqbalKhan M A. Morphological and genetic variability among *Rhizoctonia solani* isolates causing sheath blight disease of rice. *Rice Sci*, 2016, 23(1): 42-50.
- [3] 中国植物保护学会. 2018 年农作物重大病虫害重于往年, 累计将发生 50 亿亩次[EB/OL]. <http://mp.weixin.qq.com/s/8cRq7ohkSH1HAzHiE-qiIA>, 2018-01-12.
Chinese Society of Plant Protection. The major diseases and insect pests of crops are more severe than those in previous years, and a total of 5 billion mu will occur [EB/OL]. <http://mp.weixin.qq.com/s/8cRq7ohkSH1HAzHiE-qiIA>: 2018-01-12. (in Chinese with English abstract)
- [4] 舒灿伟, 曹琦琦, 赵美, 江绍锋, 周而勋. 立枯丝核菌不同融合群 G 蛋白 β 亚基基因克隆与分子进化分析. *华北农学报*, 2017, 32(5): 7-12.
Shu C W, Cao Q Q, Zhao M, Jiang S F, Zhou E X. Cloning and sequence analysis of G-protein beta-subunit genes in different anastomosis groups of *Rhizoctonia solani*. *Acta Agric Boreali-Sin*, 2017, 32(5): 7-12. (in Chinese with English abstract)
- [5] Feng S J, Shu C W, Wang C J Z, Jiang S F, Zhou E X. Survival of *Rhizoctonia solani* AG-1 IA, the causal agent of rice sheath blight, under different environmental conditions. *J Phytopathol*, 2017, 165(1): 44-52.
- [6] 周而勋, 曹菊香, 杨媚, 朱西儒. 我国南方六省(区)水稻纹枯病菌遗传多样性的研究. *南京农业大学学报*, 2002, 25(3): 36-40.
Zhou E X, Cao J X, Yang M, Zhu X R. Studies on the genetic diversity of *Rhizoctonia solani* AG-1-IA from six provinces in the southern China. *J Nanjing Agric Univ*, 2002, 25(3): 36-40. (in Chinese with English abstract)
- [7] Wang L, Liu L M, Wang Z G, Huang S W. Genetic structure and aggressiveness of *Rhizoctonia solani* AG1-IA, the cause of sheath blight of rice in southern China. *J Phytopathol*, 2013, 161(11-12): 753-762.
- [8] 王玲, 左示敏, 张亚芳, 陈宗祥, 黄世文, 潘学彪. 中国南方八省(自治区)水稻纹枯病菌群体遗传结构的 SSR 分析. *中国农业科学*, 2015, 48(13): 2538-2548.
Wang L, Zuo S M, Zhang Y F, Chen Z X, Huang S W, Pan X B. SSR analysis of population genetic structure of rice sheath blight causing agent *Rhizoctonia solani* AG1-IA collected from eight provinces (Autonomous Region) in southern China. *Sci Agric Sin*, 2015, 48(13): 2538-2548. (in Chinese with English abstract)
- [9] Shu C W, Zou C J, Chen J L, Tang F, Yi R H, Zhou E X. Genetic diversity and population genetic structure of *Rhizoctonia solani* AG-1 IA, the causal agent of rice sheath blight, in south China. *Can J Plant Pathol*, 2014, 36(2): 179-186.
- [10] Taheri P, Gnanamanickam S, Höfte M. Characterization, genetic structure, and pathogenicity of *Rhizoctonia* spp. associated with rice sheath diseases in India. *Phytopathology*, 2007, 97(3): 373-383.
- [11] 范文艳, 文景芝, 金丽娜, 马建, 陈瑾. 黑龙江省水稻纹枯病菌的致病力分化与 AFLP 分析. *植物保护*, 2008, 34(6): 57-61.
Fan W Y, Wen J Z, Jin L N, Ma J, Chen J. Pathogenic differentiation and AFLP analysis of the rice sheath blight strains from Heilongjiang. *Plant Prot*, 2008, 34(6): 57-61. (in Chinese with English abstract)
- [12] 朱名海, 皮磊, 舒灿伟, 周而勋. 南繁区稻瘟病菌遗传多样性和群体遗传结构的 AFLP 分析. *中国水稻科学*, 2017, 31(3): 320-326.
Zhu M H, Pi L, Shu C W, Zhou E X. AFLP analyses of genetic diversity and population genetic structure of *Magnaporthe oryzae* from South China Crop Breeding Area. *Chin J Rice Sci*, 2017, 31(3): 320-326. (in Chinese with English abstract)
- [13] 周而勋, 杨媚. 从植物病组织中分离丝核菌的快速、简便技术. *华南农业大学学报*, 1998, 19(1): 125-126.

- Zhou E X, Yang M. A rapid and simple technique for the isolation of *Rhizoctonia solani* from diseased plant tissues. *J South China Agric Univ*, 1998, 19(1): 125-126. (in Chinese with English abstract)
- [14] 黄江华, 杨媚, 周而勋, 戚佩坤. 丝核菌细胞核染色技术的研究. 仲恺农业技术学院学报, 2001, 14(4): 13-17.
Huang J H, Yang M, Zhou E X, Qi P K. Studies on the nuclear staining techniques for *Rhizoctonia* spp. *J Zhongkai Agrotechnol Coll*, 2001, 14(4): 13-17. (in Chinese with English abstract)
- [15] 周而勋, 杨媚. 广东省水稻纹枯病菌的致病力和融合群研究. 广东农业科学, 1999, 26(5): 36-38.
Zhou E X, Yang M. Studies on the pathogenicity and anastomosis group of *Rhizoctonia solani* in Guangdong province. *Guangdong Agric Sci*, 1999, 26(5): 36-38. (in Chinese)
- [16] Brant J B, Gustavo C A, Peter M G. Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrylamide gels. *Anal Biochem*, 1991, 196(1): 80-83.
- [17] 陈涛, 张震, 柴荣耀, 王教瑜, 毛雪琴, 邱海萍, 杜新法, 姜华, 王立安, 王艳丽, 孙国昌. 浙江省水稻纹枯病菌的遗传分化与致病力研究. 中国水稻科学, 2010, 24(1): 67-72.
Chen T, Zhang Z, Chai R Y, Wang J Y, Mao X Q, Qiu H P, Du X F, Jiang H, Wang L A, Wang Y L, Sun G C. Genetic diversity and pathogenicity variation of different *Rhizoctonia solani* isolates in rice from Zhejiang Province, China. *Chin J Rice Sci*, 2010, 24(1): 67-72. (in Chinese with English abstract)
- [18] 黄雯雯, 王玲, 刘连盟, 刘恩勇, 黄世文. 安徽省水稻纹枯病菌致病力分化与遗传多样性. 浙江农业学报, 2011, 23(1): 111-116.
Huang W W, Wang L, Liu L M, Liu E Y, Huang S W. Preliminary study on the pathogenic differentiation and genetic diversity of rice sheath blight pathogen strains from Anhui Province. *Acta Agric Zhejiang*, 2011, 23(1): 111-116. (in Chinese with English abstract)
- [19] 吴荷芳, 王晓宇, 罗楚平, 陈志谊. 江苏省水稻纹枯病菌遗传多样性分析与致病力研究. 江苏农业学报, 2013 29(1): 51-59.
Wu H F, Wang X Y, Luo C P, Chen Z Y. Genetic diversity and pathogenicity of *Rhizoctonia solani* isolates from Jiangsu province. *Jiangsu J Agric Sci*, 2013 29(1): 51-59. (in Chinese with English abstract)
- [20] 张优, 魏松红, 王海宁, 李帅, 李思博, 罗文芳. 东北地区水稻纹枯病菌遗传多样性和致病性分析. 沈阳农业大学学报, 2017, 48(1): 9-14.
Zhang Y, Wei S H, Wang H N, Li S, Li S B, Luo W F. Genetic diversity and pathogenicity of *Rhizoctonia solani* isolates causing sheath blight disease of rice in northeast region. *J Shenyang Agric Univ*, 2017, 48(1): 9-14. (in Chinese with English abstract)