

简报

水稻白叶枯病菌的 RAPD 分型

朱 衡¹ 章 琦² 王春莲² 杨文才² 朱立煌¹

(中国科学院遗传研究所 北京 100101)¹

(中国农业科学院作物研究所 北京 100081)²

对植物病原菌的分型是生物技术应用的新领域,水稻白叶枯病菌 (*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*) 是亚洲地区水稻的主要病害。前人曾根据不同菌株在 5 个鉴别品种上的反应型将中国白叶枯病菌分为 7 个致病型⁽¹⁾。近来,Leach 等⁽²⁾已开始利用基因组特异的重复顺序对白叶枯病菌株进行 DNA 指纹分析,章 琦等⁽³⁾也利用相同的探针对我国部分菌株进行了 RELP 分型,其结果与传统病理学的分类结果有相符之处,但又有相当的不同,说明传统分类结果尚有许多值得探索之处。

与 RFLP 相比,RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) 具有简便和快速的优点,而且相当灵敏,在动植物基因组分型 (genome typing) 上已得到较为广泛的应用^(4,5)。我们利用 RAPD 标记对我国 28 个菌株进行分型,发现随机引物 A-14 可用以区分所研究的 28 个菌株。进而对扩增带型进行了相似百分率分析,并利用另一随机引物 A-13 作了进一步分析。本文是用 RAPD 方法尝试对部分水稻白叶枯病菌分型的首次报道。

1 材料和方法

1.1 菌株和培养

由中国科学院作物所提供 28 个来自我国 14 个省市的属于 7 个致病型的水稻白叶枯病菌株。细菌在 5ml 马铃薯液体培养基上于 28℃ 振荡培养 15 h。

1.2 DNA 提取

采用由朱 衡等⁽⁶⁾提出的氯化苜法。

1.3 RAPD 分析

RAPD 反应参照 Williams⁽⁷⁾提供的条件并稍作调整。扩增反应体积为 50μl,含 10mmol/L Tris-HCl, pH8.3; 50mmol/L KCl; 2.5mmol/L MgCl₂; 100μmol/L 四种 dNTP (Boehringer), 0.25μmol/L 引物; 5ng 基因组 DNA 和 1 单位 Taq 酶 (中国科学院遗传研究所)。扩增在 PE 公司的 DNA Thermal Cycler 480 上进行: 94℃ 2min; 94℃ 1min, 36℃ 1min, 72℃ 2min 共 45 个循环,最后 72℃ 10min。所用引物序列如下 (Opron 公司): A14: TCTGTGCTGG A-13: CAGCACCCAC。

1.4 统计分析

RAPD 电泳结果均进行了 3 次重复,大部分带型可以重复,少量不能重复者在统计时忽略不计。根据扩增条带的有无,共统计出 37 个出现扩增带的位置,对多态性片段的统计采用 Nei 和 Li⁽⁸⁾的公式:

$$S_{xy} = 2N_{xy} / (N_x + N_y)$$

计算各菌株间的相似百分率。其中 N_{xy} 代表菌株 x 和 y 共有的条带数, N_x 和 N_y 分别代表 x 和 y 菌株的总条带数。

2 结果和讨论

对我国 28 个水稻白叶枯病菌株的 RAPD 扩增结果见图 1,反映出其基因组的复杂性和多样性。扩增带分布较广,数目从 5 条到 20 条不等。在所有 28 个菌株中无法找到一条所有菌株的共有带。28 个菌株彼此间的 S_{xy} 值列于表 1。结果显示 S_{xy} 值分布相当广泛,从 96%~0。大部分组间的 S_{xy} 值分布于

本研究受到 863 高技术计划生物技术领域的资助。
本文于 1994 年 3 月 14 日收到。

50%~80%，平均值为58%。

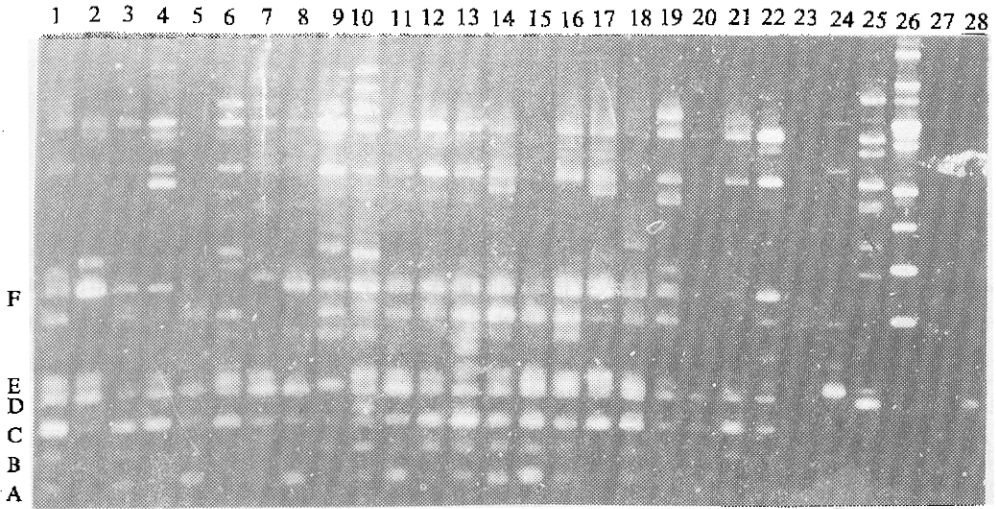


图1 引物 A-14 对 28 个白叶枯病株进行 RAPD 扩增的结果

图中各序号代表的菌株与表 3 相同, 扩增的 DNA 在 1.8% 的琼脂糖凝胶上电泳分离

表 1 28 个白叶枯病菌株的相似百分率

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28
2	74																											
3	79	78																										
4	55	63	56																									
5	63	62	83	38																								
6	50	48	40	82	33																							
7	63	63	53	53	46	48																						
8	56	63	71	44	50	40	67																					
9	58	48	60	58	44	54	82	60																				
10	65	58	52	59	29	55	50	52	69																			
11	76	78	82	67	67	61	56	59	70	69																		
12	70	70	74	70	69	64	70	74	80	71	91																	
13	80	67	67	56	63	59	64	67	74	67	67	70																
14	72	63	78	64	63	42	53	56	58	80	76	70	80															
15	67	67	86	44	83	30	40	57	50	43	71	78	67	78														
16	83	74	78	64	63	58	63	56	67	67	86	80	80	82	67													
17	78	70	74	70	59	48	60	53	56	57	82	75	77	96	63	87												
18	76	78	82	57	67	43	67	59	52	54	80	73	67	76	71	67	77											
19	72	73	67	64	53	67	55	48	67	73	83	77	64	80	57	80	85	57										
20	59	71	77	59	73	42	57	62	53	55	75	67	60	71	62	71	67	63	60									
21	70	71	75	60	57	45	47	63	73	72	74	74	70	70	63	80	67	63	61	80								
22	75	67	70	58	67	54	57	60	69	69	87	88	74	58	60	80	72	70	74	63	64							
23	53	50	73	27	80	24	33	36	35	30	57	50	44	53	73	53	38	57	44	60	46	47						
24	60	59	63	40	57	36	35	38	45	48	63	57	43	50	63	60	57	63	61	40	56	55	46					
25	42	57	40	58	22	69	48	50	62	55	61	64	52	50	30	58	56	43	67	42	55	62	12	27				
26	15	9	9	15	0	29	35	27	29	39	8	15	28	23	9	15	22	16	28	0	17	14	0	17	21			
27	80	71	75	50	71	45	59	50	55	67	74	67	61	70	75	80	76	80	70	53	67	64	62	78	36	25		
28	63	62	83	38	80	22	31	46	44	38	67	71	53	63	83	63	59	67	53	55	57	56	67	71	22	10	71	

根据表 1 结果,以 60%的相似率为界将彼此间 S_{xy} 值高于 60%的菌株归为一簇 (Cluster),结果列于表 2。菌株 ZHE35、LN43、BJ2、BJ4、BJ7 与其它菌株间的 S_{xy} 值较低,平均只有 54%、51%、47% 和 16%,因此单独组成一簇。在簇 1 的 11 个菌株中,均有 A、B、C 和 D 4 条带;簇 2 的 5 个菌株都有 A、B、C、D、E 和 F 6 条带。簇 1 中除了 JS49-6 属于致病型 7 和 Janlling691 的致病型尚未确定外,其余均属致病型 1。而 JS49-6 的 RFLP 分型结果也与其致病型不同 (表 3),表明对这个菌株的传统分类需进一步探究。簇 2 中的 5 个全为致病型 2,与传统结果相符。致病型 1 的菌株还被划分入簇 3、8 和 10,这与 RFLP 对致病型 1 分类的结果相类似^[9],说明传统分类得到的致病型 1 可能还存在若干组。在致病型 2 中也存在同样的情况。

· 表 2 28 个白叶枯病菌株的 RAPD 分型

簇	菌 株
1	JS49-6 SC38 LN44 HB23 HW32 HB24 BJ11 BJ12 BJ74 Janlling691 HB25
2	HB17 NX42 BJ8 KS1-21 BJ9
3	HLJ72 BJ3
4	YUN5 BJ10
5	ZHE173 FJ1
6	ZHE35
7	LN43
8	BJ2
9	BJ4
10	BJ7
11	GD1358

北京地区的菌株的致病型非 1 即 2,表现单一,但 RFLP 和 RAPD 分型结果均显示出其组成复杂,如表 2 和表 3 所示其中 BJ7 的表现更为特异 (图 1)。为此,我们又利用引物 A-13 作进一步分析 (图 2),结果表明其特异性仍很高。这一结果说明将 BJ7 单独划成一簇是合理的。同样, BJ10、BJ2 和 BJ4 也被证明可以单独划分出来。可见,北京地区白叶枯病菌的组成较为复杂。进一步的研究将扩大分析菌株的数量以证明引物 A-14 在白叶枯病菌分型上的广泛适用性。

19 20 21 22 23 24 25 26 27 28

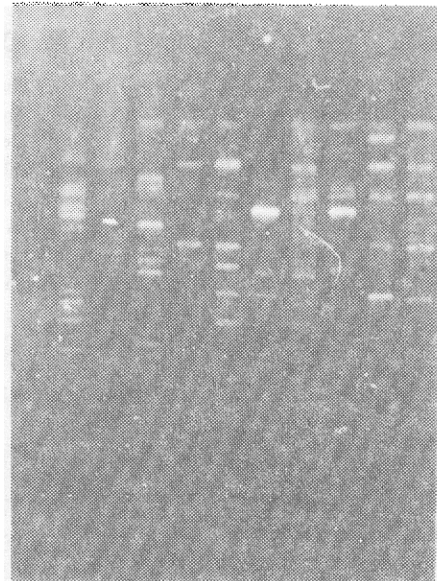


图 2 引物 A-13 对 11 个白叶枯病菌株进行 RAPD 扩增的结果
图中各序号代表的菌株与表 3 相同,扩增的 DNA
在 1.8% 的琼脂糖凝胶上电泳分离

表 3 28 个白叶枯病菌株的 RFLP 分型*

菌株	序号	RFLP 分型		
		致病型	pBSavr Xa10	pJEL101
HB17	(1)	2	1	1
JS49-6	(2)	7	1	1
SC38	(3)	1	1	1
HLJ72	(4)	1	2	2
LN44	(5)	1	3	2
BJ3	(6)	1	4	4
ZHE173	(7)	4	5	2
ZHE35	(8)	4	5	2
FJ1	(9)	4	5	2
NZ42	(10)	2	6	1
HB32	(11)	1	6	6
HW32	(12)	1	6	1
HB24	(13)	1	6	6
BJ8	(14)	2	8	1
BJ11	(15)	1	9	9
BJ12	(16)	1	9	9
BJ72	(17)	1	9	9
LN43	(18)	6	10	10
GD1358	(19)	5	11	11
Janlling691	(20)	?	12	12
KS1-21	(21)	2	13	13
HB25	(22)	1	14	2
YUN5	(23)	3	15	15
BJ2	(24)	1	1	2
BJ4	(25)	2	1	1
BJ7	(26)	1	3	1
BJ9	(27)	2	1	1
BJ10	(28)	2	1	1

* : 据章 琦等^[3]。

参 考 文 献

- [1] Fang C, Xu Z, Wu S *et al.* Acta Phytopathologica Sinica, 1990, 20 (2): 81~88.
- [2] Leach J E, White F W, Rhoads M L *et al.*, Mol Plant-Microbe Interact, 1990, 5: 238~246.
- [3] Zhang Q, Leach J E, Nelson R J *et al.* Chinese J Rice Sci, 1995, 9: 7~14.
- [4] Welsh J, McClelland M. Nucleic Acid Research, 1991, 19: 5275~5279.
- [5] Devos K M, Gale M D. TAG. 1992, 84: 567~572.
- [6] Zhu H, Qu F, Zhu L H *et al.* Nucleic Acid Research, 1993, 21: 5279~5280.
- [7] Williams J G K, Kubelik A R, Livak K J *et al.* Nucleic Acid Research, 1990, 18: 6531~6535.
- [8] Nei M, Li W H. Proc Natl Acad Sci, 1979, 76: 5269~5273.

RAPD Typing of Rice Blight Pathogen

Xanthomonas oryzae pv. *oryzae*Zhu Heng¹ Zhang Qi² Wang Chunlian² Yang Wencai² Zhu Lihuang¹*(Institute of Genetics, Academia Sinica, Beijing 100101)*¹*(Institute of Crop Breeding and Cultivation, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081)*²

Abstract By using RAPD method to amplify 28 Chinese rice blight isolates' DNAs, primer A-14 (Opron product) was used to assign them into 11 clusters. This result was comparable with their phenotype characterization and RELP typing. Besides, random primer A-13 was also used to analyze some doubtful isolates.

Key words RAPD, rice blight disease, typing