

稗草致病菌——尖角突脐孢菌菌株 RAPD 指纹图谱的分析

陈 勇¹ 倪汉文^{2*}

(¹ 解放军军需大学农副业生产系 长春 130062)

(² 中国农业大学农学与生物技术学院农药与植物检疫系 北京 100094)

摘 要: 以我国主要稻区的稗草植株上分离的 17 株尖角突脐孢菌菌株为试验材料, 采用改良的 SDS 法提取其基因组 DNA, 并运用优化的 RAPD 分析体系对其进行了分子标记遗传差异研究。从 25 个随机引物中筛选出 20 个扩增效果好的引物, 对全部试验材料进行了 RAPD 扩增, 共得到 239 条有效带, 其中多态性带 229 条 (占 95.8%)。依据扩增结果建立了 17 株尖角突脐孢菌基因型的 DNA 指纹图谱并对其进行了有效区分。根据 RAPD 分析结果计算了菌株间的遗传距离, 分析了它们的遗传差异并进行了聚类分析, 结果表明, RAPD 分子标记技术是能够用于杂草致病菌资源的鉴定的, 并可以进一步应用于特定性状的基因标记研究。

关键词: 尖角突脐孢菌, RAPD 分析, 指纹图谱, 遗传差异, 菌株鉴定

中图分类号: Q939-64 文献标识码: A 文章编号: 1001-6209(2003)04-0409-08

稗 (*Echinochloa crus-galli* (L.) Beauv.) 是世界十大恶性杂草之一, 为水稻田危害最严重的杂草。与水稻的伴生性强, 极难清除, 亦发生于潮湿旱地, 危害棉花、大豆等秋熟旱作物。目前主要采用化学防除稗草。利用真菌除草剂防治稗草将是一条有效的新途径。经研究发现尖角突脐孢菌 (*Exserohilum monoceras*) 具有作为防除稗草的潜力^[1-3]。

真菌, 是一种遗传多样性很丰富的生物种群, 不同生态型、不同地域、以及不同时期分离的真菌, 它们的遗传特性表现不同, 而且种内变异很大, 使得真菌在形态分类鉴定上十分困难。对真菌菌种种下的分类鉴定, 可采用传统的形态学、生理生化特性、免疫学和同工酶等手段^[4], 通过病理学手段, 研究其专化型, 分离鉴别出专化型毒素^[5]。在菌种内菌株间分类鉴定需要极其专业的技术人员, 而且很难做到简单快速, 至今尚无一个通用、高效、简便的鉴定方法。

近年来分子生物学技术的不断发展和完善, DNA 指纹图谱应运而生^[6], 把种质资源的研究提高到一个新水平。其中 DNA 随机扩增产物多态性 (Random Amplified Polymorphic DNA, 简称 RAPD) 分子标记技术, 已成为近年来发展最快、应用最广的一种标记技术。提出后短短几年中已广泛应用于连锁标记检测主基因、建立遗传图谱、确定染色体的同源发生、基因的染色体定位、图谱分析以及分类、杂种和品种的鉴定等方面^[6]。这些技术很快应用到微生物分类鉴定上^[7], 但是应用于真菌除草研究还不多^[8]。目前这方面的研究很

基金项目: 国家“十五”攻关项目 (2001BA509B07)

* 通讯作者。Tel: 86-10-62891302; Fax: 86-10-62891055; E-mail: hanwenni@cau.edu.cn

作者简介: 陈 勇 (1969-) 男, 江西石城人, 讲师, 博士, 主要从事微生物除草剂研究。E-mail: chyyg@yahoo.com

收稿日期: 2002-10-21, 修回日期: 2003-03-27

薄弱,亟待进一步加强研究和解决。分子生物学技术作为一种功能强大的实验手段,如广泛应用于微生物除草剂的菌种改良、生物测定及环境风险评价等方面,将会极大地加快微生物除草剂的研发速度,更多的微生物除草剂产品服务于人类。本试验试图通过研究建立一种简单、快捷、自动化程度高的方法以鉴定稗草致病真菌菌种资源。

1 材料和方法

1.1 菌株

试验材料为尖角突脐孢菌真菌,分离自吉林、黑龙江、北京、湖北、江西、广东、贵州、山东、江苏等地采集稗草具病斑的叶片上。试验用的 17 个菌株为:32、DL5、DR7、18、X27、PB2、S43、PX2、16、DJ1、PX4、G9、J15、Z1、PB3、PX51 和 N5,各菌株在马铃薯葡萄糖培养液 PDB 中,28℃ 下振荡培养 7d,使之长成菌丝团,分别取各菌株的菌丝用于提取基因组 DNA。

1.2 试剂和仪器

气热式 PCR 扩增仪:型号是 HDTDCM02S220,英国 Hybaid 公司生产,购自生命科学国际集团。

Kit10 碱基随机引物:其中 20 个引物购自上海生工生物工程技术有限公司,序列号为 S01 ~ S20;另外 5 个引物使用美国 Operon 公司生产的,购自中国科学院遗传研究所,序列号为 opp01 ~ opp05。

标准 DNA 为 GeneRuler™ 100bp DNA Ladder Plus,购自上海生工生物工程技术有限公司。

1.3 尖角突脐孢菌基因组 DNA 提取

1.3.1 DNA 提取法:参考范树田等^[9]和王建荣等^[10]方法并改良。由各菌株在 PDB 或酵母培养液中 28℃ 下振荡培养 7d,使之长成菌丝团。分别收集菌丝团,用 200 ~ 300mL 无离子水漂洗 3 次,滤纸抽滤并抽干水分,分别用液氮冷冻并快速研磨,将研磨成粉状的菌丝体装入离心管中,保存在 -70℃ 或 -20℃ 的冰箱中。分别将上述处理的新鲜菌丝粉约 100mg 加入 1.5mL 灭菌离心管中,并加入 300 ~ 400μL 提取缓冲液[100mmol/L Tris-HCl (pH8.0);50mmol/L EDTA;500mmol/L NaCl;1%β-巯基乙醇;2%SDS],混匀后,置于 65℃ 水浴中温育 10 ~ 20min,加入 100μL 预冷 5mol/L 乙酸钾,充分混匀,冰浴 30min,用氯仿:异戊醇(24:1)100μL 抽提两次,加入 400μL 异丙醇混合,-20℃ 冷冻 30min 沉淀 DNA;然后 4℃10000r/min 离心 10min;用 70% 酒精洗沉淀物 1 ~ 2 次,晾干;100μL TE(10mmol/L Tris-HCl,0.1mmol/L EDTA,pH8.0)溶解,加入 20μL 3mmol/L 的乙酸铵(pH5.2)和 200μL 无水酒精沉淀,-20℃ 冷冻 30min,10000r/min 离心 10min;70% 酒精洗 1 次,风干;加入 50μL TE 溶解,-20℃ 保存。

1.3.2 DNA 的含量及纯度检测:采用两种方法。(1)分光光度计法:取 4μL TE 溶解 DNA 溶液,加入 396μL TE 在 Pharmacia 的 Ultraspec III 紫外/可见分光光度计上测定,记录 DNA 浓度值。将 DNA 稀释至 100ng/μL。(2)电泳法:取已经稀释好的 DNA 溶液 5μL,用 0.7% 琼脂糖凝胶电泳检查 DNA 质量,观察主带是否清晰,有无降解,是否含有 RNA,并对照 λDNA/Hind III + EcoR I DNA 分子量标准估测 DNA 片段大小。

1.4 RAPD 扩增

反应体系(20 μ L) 2 μ L 模板 DNA(20ng/ μ L) 2 μ L Dntp 2 μ L MgCl₂(20mmol/ μ L) 2 μ L 引物(20ng/ μ L) 2 μ L 缓冲液 0.5 μ L Taq-G 聚合酶(2.5U/ μ L) 9.5 μ L 重蒸水。扩增条件为 94℃ 20s 35℃ 1min 72℃ 1min 两个循环 94℃ 1s 35℃ 10s 72℃ 1min 8 个循环 94℃ 1s 32℃ 10s 72℃ 1min 35 个循环 最后 72℃ 10min。在对相关参数进行优化筛选后确定适合真菌基因组 DNA RAPD 扩增的反应体系。

共筛选 25 个引物 其中筛选出有扩增反应带的 20 个引物 至少重复两次。

RAPD 产物观察:扩增产物用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测分析。

1.5 引物筛选和品种 RAPD 鉴定

选用 Kit 10 碱基随机引物对供试真菌进行 RAPD 扩增 统计 RAPD 标记(引物名+片段大小) 用于建立供试真菌种质基因型的 RAPD 指纹图谱。

多态性百分率 = 特征谱带数 \times 100 / 总谱带数 (%)

1.6 数据分析

每个样品扩增条带按有或无记录 扩增条带存在时赋值为 1 否则赋值为 0。应用 RAPDistance Package Version 1.14 软件对数据化扩增结果进行遗传差异分析和聚类分析。

2 结果和分析

2.1 真菌基因组 RAPD 分析体系的优化

采用改良的 DNA 提取方法提取真菌基因组 DNA 经电泳检测 主带清晰 无降解。分光光度计检测 A_{260}/A_{280} 的值在 1.7 ~ 1.9 之间 符合 RAPD 反应的要求。

RAPD 对反应体系要求较严格 扩增反应中许多成分的变化都可能直接影响到扩增的结果。对影响 RAPD 反应结果的主要因素 模板 DNA 浓度、Taq DNA 聚合酶浓度、Mg²⁺ 浓度、dNTP 浓度、引物浓度及循环次数和变性温度等进行优化试验 确定了最优的反应体系。反应体系(20 μ L) 2 μ L 模板 DNA(20ng/ μ L) 2 μ L dNTP 2 μ L MgCl₂(20mmol/ μ L) 2 μ L 引物(20ng/ μ L) 2 μ L 缓冲液 0.5 μ L Taq-G 聚合酶(2.5U/ μ L) 9.5 μ L 重蒸水。反应程序为: 94℃ 20s 35℃ 1min 72℃ 1min 两个循环 94℃ 1s 35℃ 10s 72℃ 1min 8 个循环 94℃ 1s 32℃ 10s 72℃ 1min 35 个循环 最后 72℃ 10min。

2.2 引物筛选及 RAPD 标记多态性

采用上述优化的反应体系 以供试材料的真菌基因组 DNA 为模板 筛选 Operon 公司和上海生工 Kit 引物。首先以菌株 X27、32 和 16 为材料筛选合适的引物。选用 25 个引物扩增 结果发现 除引物 S2、S9、S16、S18、S19 不能扩增出谱带外 20 个引物能对上述 3 份材料同时有效扩增。利用这 20 个引物对 17 份材料进行扩增 17 个引物扩增产物都具有多态性且扩增效果好。共扩增出 239 条带 其中多态性带为 229 条 多态性百分率为 95.8%(见表 1)。可见 该真菌 RAPD 显示出丰富的多态性。不同引物扩增的带数不同 范围在 5 ~ 17 条之间。平均每条引物扩增 12 条带。其多态性依引物的不同而有所差别。239 条带中有 10 条单态性带 这一现象说明真菌遗传背景的共同性和变异多样性。

表 1 多态性引物的扩增结果

Table 1 Amplified results of 17 fungus genotypes with selected primers

No.	Primer	Sequence	Amplified Bands	Polymorphic bands	Percentage of polymorphic bands/%
1	OPP01	AAGTGCACGG	12	12	100.0
2	OPP02	GGCAGGCAAG	10	10	100.0
3	OPP03	ACGAGAGGCA	12	11	91.7
4	OPP04	GGCACTGAGG	17	16	94.1
5	OPP05	CGCCTAGGTA	16	15	93.8
6	S1	GTTTCGCTCC	13	13	100.0
7	S3	CATCCCCCTG	14	14	100.0
8	S4	GGACTGGAGT	12	12	100.0
9	S5	TGCGCCCTTC	14	14	100.0
10	S6	TGCTCTGCCC	12	11	91.7
11	S7	GGTGACGCAG	10	10	100.0
12	S8	GTCCACACGG	14	12	85.7
13	S10	CTGCTGGGAC	11	9	81.8
14	S11	GTAGACCCGT	5	4	80.0
15	S12	CCTTGACGCA	11	11	100.0
16	S13	TTCCCCGCT	8	8	100.0
17	S14	TCCGCTCTGG	11	11	100.0
18	S15	GGAGGGTGTT	13	13	100.0
19	S18	CCACAGCACT	14	14	100.0
20	S20	GGACCCTTAC	10	9	90.0
Count	20		239	229	95.8

2.3 指纹图谱构建和菌种特征性带鉴定

20 个随机引物在 17 个供试材料上都获得了 DNA 指纹图谱。从筛选的 20 个引物的扩增结果看(表 1),这些引物均可用于区别供试的真菌菌株。不同引物扩增的带数不同,同一引物在不同的供试材料上具有不同的指纹图谱。以此为基础构建真菌菌株的 RAPD 指纹图谱。图 1 为应用引物 S4 构建的供试 17 个真菌基因型的指纹图谱。该引物共扩增出 12 条带,其中多态性带为 12,多态性百分率为 100 %。S4 对 17 个真菌基因型扩增的谱带数分别为 8、4、7、7、6、6、5、6、5、7、6、4、6、8、3、5 和 8。S4 对各菌株扩增的多态性带见表 2。

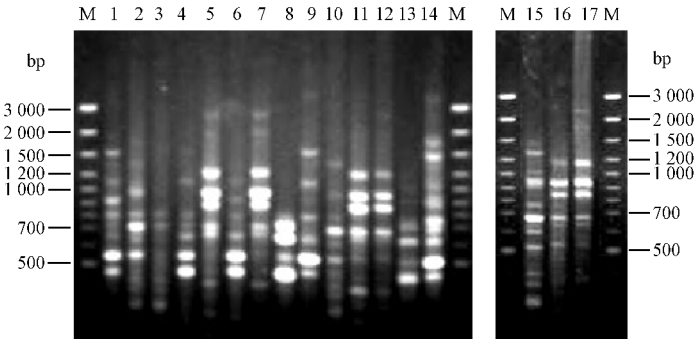


图 1 引物 S4 扩增的 17 株尖角突脐孢菌基因型的 RAPD 指纹图谱

Fig.1 RAPD fingerprint of 17 fungus genotypes amplified with primer S4

M. Marker ; 1. 18 2. DJ1 3. PX51 4. S43 5. PB3 6. DL5 7. G9 8. N5 9. PX4 ;
10. Z1 11. X27 12. 32 13. DR7 14. 16 15. PX2 16. PB2 17. J15.

表 2 RAPD 多态性分析

Table 2 Analysis of RAPD polymorphism

Marker	DNA genotype																
	18	DJ1	PX51	S43	PB3	DL5	G9	N5	PX4	Z1	X27	32	DR7	16	PX2	PB2	J15
S4-1700														1	1		
S4-1500	1								1					1			
S4-1200					1		1				1	1			1		
S4-1100	1	1		1		1			1					1	1	1	
S4-980		1			1		1			1	1	1			1	1	1
S4-900	1				1		1				1	1		1	1	1	
S4-800	1	1	1	1		1		1	1	1							
S4-700	1	1	1	1	1		1	1				1	1	1	1	1	1
S4-680										1	1	1			1		
S4-650	1			1	1	1	1	1	1		1	1	1				
S4-550	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
S4-450	1	1	1	1	1	1		1	1	1	1		1	1			

根据对 17 个真菌基因型所建立的 RAPD 指纹图谱 ,可以看出用 S4 及其它引物构建的 17 个真菌菌株基因型扩增带型互不相同 ,并且各个试材基因型分别拥有自己的特征谱带。利用这些谱带可以将供试的 17 个真菌基因型区分开。S4 对 17 个真菌株基因型扩增的多态性带为 :S4-1700 ,S4-1500 ,S4-1200 ,S4-1100 ,S4-980 ,S4-900 ,S4-800 ,S4-700 ,S4-680 , S4-650 ,S4-550 ,S4-450。

2. 4 遗传差异分析

为了比较和研究真菌不同菌株间的遗传差异 ,利用筛选出的引物对试材扩增得到的 RAPD 数据 ,计算了不同试材间的遗传距离(表 3)。结果表明 ,17 个真菌基因型间的遗传距离差异很大。菌种间表现的形态上和生态上越近 ,遗传距离越小 ,反之遗传距离大。从

总体看,在形态上和生态上表现最相近的菌株 32 与菌株 X27,它们的遗传距离最小,为 0.34259,在形态性状、经济性状等方面存在很大差异的菌株 J15 与菌株 DR7,它们的遗传距离最大,为 0.8333。上述结果表明,利用遗传距离的差异,可简单快速地对真菌菌种种下的菌株进行分类鉴定。

表 3 尖角突脐胞菌 17 株菌株间的 RAPD 遗传距离

Table 3 RAPD-based genetic distance within different genotypes

Geno-type	16	DR7	32	X27	Z1	PX4	N5	G9	DL5	PB3	S43	PX51	DJ1	18	J15	PB2	PX2
01	0.0																
02	0.5801	0.0															
03	0.6478	0.6870	0.0														
04	0.6214	0.7185	0.3425	0.0													
05	0.7266	0.7333	0.7266	0.7375	0.0												
06	0.5629	0.5075	0.6283	0.6216	0.6622	0.0											
07	0.6535	0.5754	0.7440	0.7460	0.7520	0.5555	0.0										
08	0.6620	0.7746	0.5714	0.5041	0.7214	0.6513	0.7769	0.0									
09	0.6206	0.5483	0.7432	0.7449	0.7241	0.4710	0.5652	0.7034	0.0								
10	0.6577	0.7755	0.5238	0.4796	0.6879	0.6209	0.7686	0.3652	0.7066	0.0							
11	0.6714	0.5565	0.7445	0.7730	0.7142	0.5724	0.6396	0.7832	0.4745	0.7586	0.0						
12	0.7867	0.7606	0.8110	0.8307	0.6238	0.7153	0.7500	0.7857	0.7177	0.7862	0.6818	0.0					
13	0.6687	0.7467	0.7161	0.6928	0.5857	0.6257	0.7721	0.7358	0.7142	0.6645	0.6959	0.6240	0.0				
14	0.6000	0.6136	0.7565	0.7741	0.7466	0.5827	0.6976	0.7987	0.6028	0.7763	0.5923	0.7633	0.6792	0.0			
15	0.7382	0.8333	0.6917	0.6538	0.7372	0.7484	0.8139	0.6461	0.7947	0.5781	0.8000	0.8333	0.6734	0.7987	0.0		
16	0.7266	0.7872	0.7173	0.6616	0.7777	0.7051	0.8000	0.6541	0.7328	0.5877	0.8041	0.7903	0.6711	0.7712	0.4272	0.0	
17	0.7721	0.8082	0.7142	0.6592	0.7122	0.7025	0.7954	0.7183	0.7631	0.6853	0.7746	0.7952	0.6137	0.7597	0.6766	0.7214	0.0

2. 5 聚类分析

为了进一步确定 17 个真菌菌株基因型间的遗传关系,利用 RAPD 遗传距离矩阵按非加权配对算术平均法(Unweighted pair group method using agrithmetic average ,UPGMA)进行聚

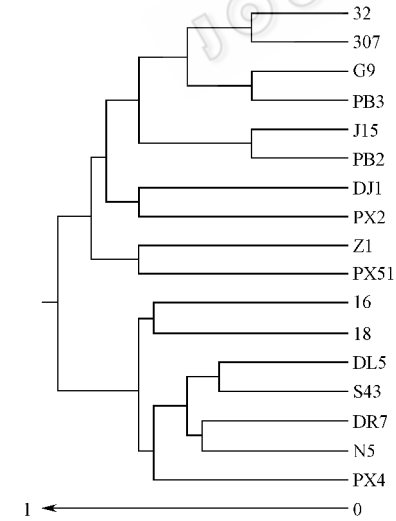


图 2 17 株尖角突脐胞菌基因型 RAPD 分析聚类图

Fig. 2 Dendrogram of 17 fungi genotypes constructed from RAPD-based genetic distance

类分析,构建了各供试基因型的亲缘关系图(图 2)。结果表明,17 个供试真菌基因型可明显区分为两大类群,其中有分离自旱地生态型的菌株归为一类,另一类为对离体玉米叶表现较强的侵染能力群体,而且菌落生长表现明显较旺盛。前者包括两个组,菌 Z1 和菌 PX51 归为一组,该组内各菌株在形态上的特性趋于一致,菌落大小和形态较为一致,菌的分生孢子是所有试材的菌株中较大的两株,对稗草的致病力表现都较差;菌株 32 和菌株 X27 合并,与菌株 G9 和 PB3 合并,然后与菌株 J15 和 PB2 合并,最后与菌 DJ1 和 PX2 合并归为一组,其中菌株 32 和菌株 X27 对稗草具有较强的致病力,菌株 J15、菌株 PB2、菌株 DJ 和菌株 PX2 均分离自旱地生长的稗草植株上。后者包括两个组,菌株 16 和菌株 18 归为一组,该组各菌株在形态分类鉴定上也比较一致;菌株 DL5 和 S43 合并,与菌株 DR7 和菌株 N5 合并,后与菌 PX4 合并归为一组。上述结果基本表

明了各个菌株之间的亲缘关系及遗传变异情况,也说明了真菌基因型遗传背景具有共同性和变异多样性。

从图 2 可见,该菌株群可分为上下两个区,与前面的生理特性试验结果最为一致的是,各菌生长速率的不同变化。经连续 5 次观察菌落直径的平均值看,下半区的各菌株生长速率明显较快,5 次平均值都超过 4.2cm,如菌株 PX4、N5、DR7、18、S43、16 和 DL5,且与菌株 PX51 和 Z1 相比较有极显著差异。上半区表现为与菌 32 和 X27 遗传距离越远,生长速率越慢, PX51 菌株仍最小,其它依次为菌株 Z1、DJ1、J15、PB2、G9、PX2、PB3、32 和 X27。

试验结果还表明, RAPD 可以用作同种真菌的不同菌株间差异和亲缘关系的分析和比较。可以用作鉴定该菌株的依据。还可以推测菌株致病力的差异是与遗传物质上的差异相对应的。通过从自然发生的稗草病害植株上,筛选致病力较强的菌株是有其理论上依据的。

3 讨论

3.1 RAPD 反应体系

RAPD 分析一般采用 Williams 等^[1]的反应体系,但该反应体系并不适合所有的物种。在对真菌进行 RAPD 分析之前要反复进行 RAPD 反应条件的优化实验,只有研究出合适的反应条件,才能获得稳定的、可重复的实验结果。研究结果表明,只要反应条件不变,反应体系中试剂来源和浓度保持一致,并严格控制反应程序的各个环节及循环参数的稳定性, RAPD 技术不仅灵敏度高,而且可以克服其可重复性差的缺点,其重复结果是不难得到的。

3.2 RAPD 分析在真菌品种资源多样性研究中的应用

国内学者利用 RAPD 技术对真菌菌种进行的研究,普遍认为 RAPD 分析可以达到对菌种不同种质资源进行鉴定的要求^[5]。真菌是一种比较容易变性的生物,通常在进化过程中,随着后代增加和延续,菌种极易受外界因素的影响,发生形态上和生态上的变异特点,从而在漫长的进化过程中逐渐形成了许多种群、菌株群、变种和生态型。它们在形态性状、经济性状等方面存在很大差异。但它们的基因型情况如何?如何利用分子生物学方法来研究这些问题?研究选用 20 个引物对 17 个尖角突脐孢菌菌株基因组 DNA 进行了 RAPD 分析,共扩增出 239 条带,其中有 229 条带为多态性带,多态性百分率为 95.8%。一方面说明尖角突脐孢菌种群内存在着许多基因型上的差异,另一方面表明 RAPD 技术可以鉴定该菌种质基因型的差别。

3.3 菌种的 DNA 指纹图谱鉴定

在 RAPD 分析中,每一条扩增带对应着 DNA 分子上的一个位点。多态性扩增带的出现意味着样品 DNA 分子在该位点存在变异,这种变异的原因是突变、插入、缺失或颠换引起的变化。这种位点和基因型的差异就是 DNA 指纹图谱和鉴定菌种的基础。菌种特有的遗传标记可作为重要的分子性状用于真菌菌种的鉴定^[6]。试验中选用 20 个引物对 17 个基因型扩增,获得了 239 条带,即检测了 239 个基因位点,其中 229 个位点发生变异,说明检测效率是很高的。变异的存在产生了菌种的特征性带,依据此我们亦可以进行特定性状的分子标记研究。

致谢 在该研究过程中,得到中国农业大学肖新国博士的帮助,在此表示感谢!

参 考 文 献

- [1] 陈 勇,倪汉文. 尖角突脐孢对稻田稗草的防除效果. 植物保护学报, 2001, **28**(1): 75 ~ 78.
- [2] Zhang W M, Watson A K. Efficacy of *Exserohilum monoceras* for the control of *Echinochloa* species in rice (*Oryza sativa*). *Weed Science*, 1997, **45**(1): 144 ~ 150.
- [3] Hetherington S D, Tuat N V, Auld B A, *et al.* The development of a bioherbicide for *Echinochloa crus-galli* based on the fungal pathogen *Exserohilum monoceras*. In Vietnam. Proceedings of the 18th Asian-Pacific Weed Science Society Conference. Beijing Standards Press of China. 2001. 377 ~ 381.
- [4] Simmons E G. Alternaria themes and variations (54-62). *Mycotaxon*, 1993, **46**: 171 ~ 199.
- [5] Jones R W, Lanini W T, Hancock J G. Plant growth response to the phytotoxin viridiol produced by the fungus *Gliocladium vi-rens*. *Weed Science*, 1988, **36**: 683 ~ 687.
- [6] Okoli C, Shilling D G, Smith R L, *et al.* Genetic diversity in purple nutsedge (*Cyperus rotundus* L.) and yellow nutsedge (*Cyperus esculentus* L.). *Biological Control*, 1997, **8**: 111 ~ 118.
- [7] 刘学敏, 赵 骞, 曲金玲, 等. 运用随机扩增多态性 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.
- [8] Marcone C, Ragozzino A, Seemuller E. Detection of bermudagrass white leaf in Italy and characterization of the associated phytoplasma by RFLP analysis. *Plant Disease*, 1997, **81**: 862 ~ 866.
- [9] 范树田, Wood T. 一种快速简便提取真菌染色体 DNA 的方法. 遗传, 1991, **13**(5): 33.
- [10] 王建荣, 张曼夫. 真菌高分子量核 DNA 的提纯. 遗传, 1992, **14**(6): 29 ~ 30.
- [11] 雷建军, 袁娅苏. RAPD 技术及其在蔬菜育种上的应用. 中国蔬菜, 1995, **50**: 53 ~ 55.

Analysis of RAPD Fingerprinting in *Exserohilum monoceras* Strains

Chen Yong¹ Ni Hanwen^{2*}

(¹ Department of Agronomy, Quartermaster University of PLA, Changchun 130062, China)

(² Department of Pesticides and Plant Quarantine, College of Agronomy and Biotechnology, China Agricultural University, Beijing 100094, China)

Abstract : *Exserohilum monoseras* is a potential agent for barnyardgrass (*Echinochloa crus-galli*) control. This study was to evaluate the genetic diversity of this fungus with 17 strains isolated from different rice growing regions of China by the random amplified polymorphic DNA (RAPD). Among 25 arbitrary primers, 20 primers could get enough amplified bands for all the strains. A total 239 products were amplified. Polymorphic bands were 95.8% of the total products. The 17 strains could be identified based on RAPD fingerprinting established in this study. Genetic distance calculation and cluster analysis resulted in great genetic variation among the strains. The genetic similarity was related with the morphology and the pathogenicity of the strains. The results showed that RAPD maker could be applied in the utilization and the identification of weed pathogen resources.

Key words : *Exserohilum monoceras*, RAPD analysis, Fingerprinting, Genetic diversity, Strain identification