

# 南繁区稻瘟病菌无毒基因的检测

朱名海 赵美 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

**摘要** 为明确南繁区稻瘟病菌(*Magnaporthe oryzae*)无毒基因的分布情况,对6个无毒基因(*ACE1*、*Avr-Pia*、*Avr-Pik*、*Avr-Pita*、*Avr-Piz-t*和*PWL2*)在南繁核心区和非核心区60个稻瘟病菌菌株中的分布情况进行PCR检测。结果发现,这6个无毒基因在核心区和非核心区的检出率分别为100.00%和96.67%、33.33%和0.00%、100.00%和100.00%、96.67%和90.00%、73.33%和100.00%以及100.00%和73.33%。该结果说明除了无毒基因*Avr-Pia*在南繁非核心区的稻瘟病菌中未检测到外,其余无毒基因在2个区域的稻瘟病菌中均存在,其中无毒基因*Avr-Pik*在2个区域的稻瘟病菌中分布率最高,均为100%,其他无毒基因在2个区域的稻瘟病菌中表现出一定的分布率差异。

**关键词** 南繁区;核心区;非核心区;稻瘟病菌;无毒基因

**中图分类号** S 435.111.41 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2017)04-0021-05

南繁区是我国植物育种工作者对海南岛农作物繁育基地的统称。一般来说,五指山以南的三亚、乐东、陵水、保亭等地称为南繁核心区,而五指山以北各地区则称为南繁非核心区。南繁区作为我国农作物繁育的重要农业科技实验基地,在我国的水稻等农作物新品种扩繁、杂交育种以及种子推广方面发挥了不可或缺的作用<sup>[1-2]</sup>。稻瘟病是由稻巨座壳 [*Magnaporthe oryzae* (Hebert) Barr, 无性态为稻梨孢 *Pyricularia oryzae* Cav.] 引起的最具毁灭性的三大水稻病害之一<sup>[3]</sup>。当前,种植水稻抗病品种是防治该病最经济有效的方法,但由于稻瘟病菌容易变异、产生新的生理小种,致使水稻抗病品种在种植一段时间后会失去抗性<sup>[4-7]</sup>。稻瘟病菌与寄主水稻之间的特异性互作关系符合基因对基因假说<sup>[8-9]</sup>。在自然环境中,植物和病原物是共同进化的,寄主植物会随着环境的不断变化而发生变异从而产生新的抗病基因;同时,病原物也会发生相应的变异,以产生相应的致病基因克服寄主的抗性<sup>[10]</sup>。因此,摸清稻瘟病菌无毒基因的分布规律及其演变机制对于水稻抗性品种的合理布局具有重要的理论和实践意义。本研究以分离自南繁核心区和非核心区的稻瘟病菌为研究材料,对其无毒基因(*ACE1*、*Avr-Pia*、

*Avr-Pik*、*Avr-Pita*、*Avr-Piz-t*和*PWL2*)进行检测,旨在了解南繁区稻瘟病菌无毒基因的分布规律,为不同抗瘟性水稻品种的种植和南繁育种工作提供重要的指导。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1) 供试菌株。2014年10月和2015年5月先后2次从南繁核心区的海南省三亚市、陵水县、保亭县和非核心区的琼中县、屯昌县、定安县的水稻田中分别采集表现典型稻瘟病症状的穗颈瘟标本上百份,采用病组织保湿培养法<sup>[11]</sup>进行菌株的分离,经纯化得到单孢菌株,再经形态和ITS鉴定<sup>[12]</sup>,获得所需的稻瘟病菌菌株(表1)。

2) 引物设计。根据GenBank中稻瘟病菌6个无毒基因,即*ACE1*(AJ704622)、*Avr-Pia*(AB498873)、*Avr-Pik*(AB498875)、*Avr-Pita*(AF207841)、*Avr-Piz-t*(EU837058)和*PWL2*(U26313)的核苷酸序列,利用Primer 5软件进行特异引物设计,由上海生工生物工程技术有限公司合成引物,引物的详细情况见表2。

收稿日期: 2016-10-20

基金项目: 国家公益性行业(农业)科研专项(201403075)

朱名海, 硕士, 技术员. 研究方向: 植物病原真菌及真菌病害. E-mail: 1083353468@qq.com

通信作者: 周而勋, 博士, 教授. 研究方向: 植物病原真菌及真菌病害. E-mail: exzhou@scau.edu.cn

表 1 南繁核心区和非核心区稻瘟病菌的详细信息

Table 1 The details of *Magnaporthe oryzae* isolated from the core and non-core regions of South China Crop Breeding Area

区域 Region	县/市 County	采集地点 Sampling location	菌株编号 Isolate No.	采集时间 Sampling date	
南繁核心区 Core region	三亚 Sanya	育才镇国营立才农场 State-owned Licai farm in Yucai town	P1、P2、P3	2015-05-20	
		吉阳镇大茅村 Damao village in Jiyang town	P4、P5、P6	2014-10-24	
		吉阳镇罗蓬村 Luopeng village in Jiyang town	P7、P8	2014-10-24	
	乐东 Ledong	育才镇雅亮村 Yaliang village in Yucai town	P9、P10	2014-10-29	
		抱由镇城郊 The suburb of Baoyou town	P11、P12、P13	2014-10-22	
		利国镇新丰田洋 Xinfeng Tianyang in Ligu town	P14、P15、P16	2014-10-20	
		千家镇农技实验站 The agricultural experiment station of Qianjia town	P17、P18、P19、P20	2014-10-20	
		保亭 Baoting	加茂镇灶长村 Zaozhang village in Jiamao town	P21、P22、P23、P24、25、 P26、P27、P28、P29、P30	2015-05-15
		琼中 Qiongzong	长征镇长征农场 Changzheng farm in Changzheng town	P31、P32、P33、P34、35、 P36、P37、P38、P39、P40	2015-05-18
南繁非核心区 Non-core Region	屯昌 Tunchang	屯城镇良史村 Liangshi village in Tuncheng town	P41、P42、P43、P44、P45、 P46、P47、P48、P49、P50	2015-05-18	
	定安 Ding'an	新竹镇新序村 Xinxu village in Xinzhu town	P51、P52、P53、P54、P55、 P56、P57、P58、P59、P60	2015-05-17	

表 2 南繁核心区和非核心区稻瘟病菌无毒基因特异引物

Table 2 Specific primers for the avirulence genes of *Magnaporthe oryzae* in the core and non-core regions of South China Crop Breeding Area

无毒基因 Avirulence gene	引物序列 (5'→3') Primer sequence	退火温度/℃ Annealing temperature	预期片段大小/bp Expected fragment size
<i>ACE1</i>	F: GCTTCTGGTTCCTGGGGT R: GGATTGCCTGGGACTGCT	55	660
<i>Avr-Pia</i>	F: TTCACAACGAGATAAAGGCAT R: TGAGACAAATAAGAACAGGAG	55	429
<i>Avr-Pik</i>	F: CCATTCATTTGCTCCTTGT R: ATTATCCGCCCTCTCA	55	619
<i>Avr-Pita</i>	F: CCGTGACAACACTACCATGGAAC R: CTAAGCGTCCGGAGGCTTTAA	58	1 173
<i>Avr-Piz-t</i>	F: GCGTATGCTGTCAACACAGA R: TGGAACCGACCATCATAACG	58	916
<i>PWL2</i>	F: CATCCCTTACTCCGCACTT R: TCTTTCGCCTTTGTGCTT	54	632

## 1.2 检测方法

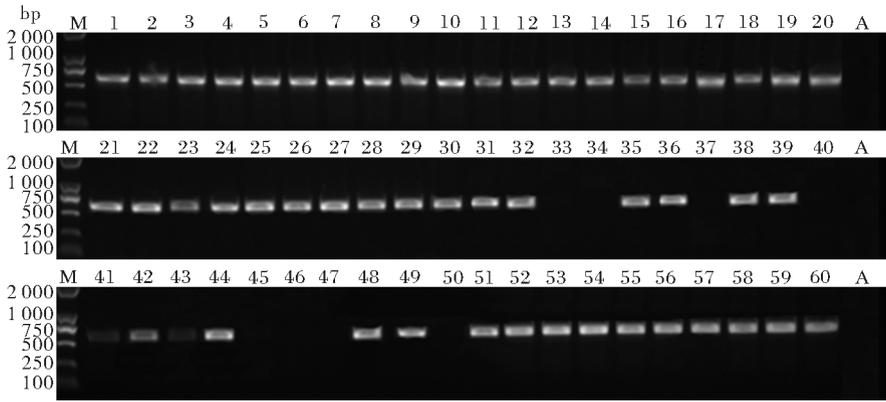
PCR 检测所需的 Mix 和 Marker 均购自北京全式金生物技术有限公司。PCR 体系为 25  $\mu$ L, 包括模板 DNA 30 ng, 10 $\times$ PCR Mix 12.5  $\mu$ L, 引物 (10  $\mu$ mol/L) 各 1.0  $\mu$ L。PCR 扩增程序为 94  $^{\circ}$ C 预变性 5 min, 94  $^{\circ}$ C 变性 50 s, 退火 (根据不同引物而定), 72  $^{\circ}$ C 延伸 50 s, 30 个循环, 最后 72  $^{\circ}$ C 再延伸 10

min。最后将 PCR 扩增产物进行琼脂糖凝胶电泳检测, 根据特异条带的有无, 判断其是否含有该无毒基因。阴性对照则不加模板按同样的程序进行。

## 2 结果与分析

### 2.1 稻瘟病菌无毒基因的扩增结果

稻瘟病菌的基因组 DNA 经特异引物 PCR 扩



1~60 为菌株 P1~60, A 为阴性对照; M 为 Trans2K DNA Marker。Numbers 1 to 60 represent the isolates of P1 to P60; A: Negative control; M: Trans2K DNA Marker.

图 1 稻瘟病菌无毒基因 *PWL2* 的检测结果

Fig.1 The detection result of avirulence gene *PWL2* of *Magnaporthe oryzae*

增后,出现相应无毒基因片段大小条带的菌株被认为含有该无毒基因,而无扩增条带出现的菌株则被认为不含有该无毒基因(图 1)。

### 2.2 无毒基因在南繁核心区和非核心区分布情况的比较

稻瘟病菌 6 个无毒基因的检测结果列于表 3。由表 3 可以看出,稻瘟病菌无毒基因 *Avr-Pik* 的检出率最高,在南繁核心区和非核心区的检出率均为 100.00%,在 2 个区域的平均检测率为 100.00%;其次是 *ACE1* 基因,在核心区的检出率为 100.00%,在非核心区的检出率为 96.67%,在 2 个区域的平均检出率为 98.33%;而 *Avr-Pia* 基因的检出率最低,在核心区的检出率为 33.33%,在非核心区未检测到该无毒基因,在 2 个区域的平均检出率为 16.67%。

*Avr-Pita*、*Avr-Piz-t* 和 *PWL2* ) 在南繁区(核心区和非核心区)的平均检出率分别为 98.33%、16.67%、100.00%、93.33%、86.67% 和 86.67%。由此可见,除 *Avr-Pik* 基因外,其余无毒基因在南繁区的分布率均有一定的差异,并且除 *Avr-Pia* 基因外,其余无毒基因在南繁区的分布率均较高。

由表 3 还可看出,除 *Avr-Pia* 基因未能在非核心区的 3 个县市检测到外,其他 5 个无毒基因在核心区和非核心区均有分布,这 5 个无毒基因(*ACE1*、*Avr-Pik*、*Avr-Pita*、*Avr-Piz-t* 和 *PWL2*) 在核心区和非核心区的检出率分别为 100.00% 和 96.67%、100.00% 和 100.00%、96.67% 和 90.00%、73.33% 和 100.00%、100.00% 和 73.33%。由此可见,除 *Avr-Pik* 基因和 *Avr-Piz-t* 基因外,其他无毒基因在核心区的分布率要高于非核心区。

表 3 南繁核心区和非核心区稻瘟病菌 6 个无毒基因的检出率

Table 3 The detection rates of 6 avirulence genes of *Magnaporthe oryzae* in the core and non-core regions of South China Crop Breeding Area

市(县) County	菌株数量 Number of isolate	无毒基因检出率/% Detection rate of avirulence gene					
		<i>ACE1</i>	<i>Avr-Pia</i>	<i>Avr-Pik</i>	<i>Avr-Pita</i>	<i>Avr-Piz-t</i>	<i>PWL2</i>
三亚 Sanya	10	100.00	30.00	100.00	100.00	70.00	100.00
乐东 Ledong	10	100.00	20.00	100.00	100.00	100.00	100.00
保亭 Baoting	10	100.00	50.00	100.00	90.00	50.00	100.00
琼中 Qiongzhong	10	100.00	0.00	100.00	80.00	100.00	60.00
屯昌 Tunchang	10	100.00	0.00	100.00	100.00	100.00	60.00
定安 Ding'an	10	90.00	0.00	100.00	90.00	100.00	100.00
核心区 Core regions	30	100.00	33.33	100.00	96.67	73.33	100.00
非核心区 Non-core regions	30	96.67	0.00	100.00	90.00	100.00	73.33
平均值 Average		98.33	16.67	100.00	93.33	86.67	86.67

### 2.3 无毒基因在南繁区不同县市分布情况的比较

对各个无毒基因在南繁区不同县市的分布情况(表3)进行比较,结果发现,ACEI基因在三亚、乐东、保亭、琼中和屯昌的检出率均为100.00%,在定安的检出率为90.00%;*Avr-Pia*基因在三亚、乐东和保亭的检出率分别为30.00%、20.00%和50.00%,在琼中、屯昌和定安均未检测到;*Avr-Pik*基因在三亚、乐东、保亭、琼中、屯昌和定安的检出率均为100.00%;*Avr-Pita*基因在三亚、乐东和屯昌的检出率均为100.00%,在保亭和定安的检出率为90.00%,在琼中的检出率为80.00%;*Avr-Piz-t*基因在乐东、琼中、屯昌和定安的检出率均为100.00%,在三亚和保亭的检出率分别为70.00%、50.00%;*PWL2*基因在三亚、乐东、保亭和定安的检出率均为100.00%,在琼中和屯昌的检出率均为60.00%。由此可见,除*Avr-Pik*基因外,各个无毒基因在南繁区不同县市的分布均表现出一定的差异。

## 3 讨论

本研究对稻瘟病菌6个无毒基因在南繁核心区和非核心区60个稻瘟病菌菌株的分布情况进行了PCR检测,结果表明,除*Avr-Pik*基因在南繁非核心区未检测到外,其余无毒基因在南繁区的分布率均有一定的差异,并且除*Avr-Pia*基因外,其余无毒基因在南繁区的分布率均较高。Li等<sup>[13]</sup>分析了云南省11个地(州)稻瘟病菌中无毒基因的出现频率及地理分布情况,同样发现,除西双版纳地区外,其余10个地(州)稻瘟病菌中无毒基因的检出率均差异不显著;同时也发现,*Aw-Pi9*、*Avr-Piz*和*Avr-Piz-t*这3个无毒基因在11个地(州)的出现频率均较高,平均检出率都在80%以上。但张崎峰等<sup>[14]</sup>对*Avr-pita*、*Avr-CO39*、*PWL2*和*PWL3*这4个无毒基因在黑龙江省19个地区的204个稻瘟病菌菌株中的分布率进行检测,却发现这些无毒基因的出现频率差异较大,并且检出率均较低。

稻瘟病菌无毒基因与水稻寄主抗性基因之间的相互作用符合基因对基因学说。因此,了解某个无毒基因在某地区的分布情况对于该地区相应抗病品种的合理选育具有重要的指导作用。有研究表明,如果某一无毒基因在某一地区的分布较广,种植含有与其相对应的抗病基因的水稻品种,则稻瘟病的发生率会有所降低<sup>[15]</sup>。由南繁核心区和非核心区

60个稻瘟病菌的无毒基因PCR检测结果可知,ACEI基因、*Avr-Pik*基因和*Avr-Pita*基因在核心区和非核心区各地的检测率均大于80.00%,说明具有与这3个无毒基因相对应抗病基因的水稻品种在南繁区具有较大的利用价值;*Avr-Piz-t*基因和*PWL2*基因分别在非核心区和核心区的检出率为100.00%,说明具有与这2种无毒基因相对应的抗病基因的水稻品种在这2个区域具有重要的利用价值。

本研究也存在诸多不足之处,主要表现在以下2个方面:(1)由于在样品采集过程中笔者和带领人员对水稻的品种及抗性特性等均不熟悉,所采集到的菌株数亦偏少;另外,由于几乎每个水稻品种都会含有不同数量的抗病基因,根据“基因对基因假说”,能引起其发病的菌株则为不含相应无毒基因的稻瘟菌菌株。因此,田间分离的稻瘟菌菌株是经过水稻品种的筛选的,不能很好地反映田间实际菌株无毒基因的分布情况。(2)本研究采用的PCR检测技术虽然具有灵敏、迅速、高效等优点,但检测到的只是该无毒基因的特定片段,不能获取这些无毒基因的点突变、表达和功能等信息,而基因的点突变、插入和缺失等变化都有可能使无毒基因的功能发生改变而失去无毒基因的作用;如能结合室内接种鉴定实验,将会使本结果更严谨,但由于笔者所在实验室实验条件的限制,未能进行相应的验证试验。以上问题在文献<sup>[14]</sup>中也同样存在。这些问题希望在以后的研究工作中加以解决。

## 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[J].安徽农学通报,2012,18(1): 27-29.
- [2] 胡凝,姚克敏,袁潜华,等.海南南繁区水稻基因飘流的最大阈值距离及其时空分布特征[J].中国农业科学,2014,47(23): 4551-4562.
- [3] 朱名海,杨媚,周而勋.水稻3种重要病原真菌遗传多样性的研究进展[J].仲恺农业工程学院学报,2015,28(3): 1-6.
- [4] ZHANG Q.Strategies for developing green super rice[J].Proceedings of the national academy of sciences,2007,104(42): 16402-16409.
- [5] ZHANG H,ZHENG X,ZHANG Z.The *Magnaporthe grisea* species complex and plant pathogenesis[J].Molecular plant pathology,2016,17(6): 796-804.
- [6] 兰波,杨迎青,常冬冬,等.基于丽江新团黑谷的稻瘟病菌致病性分化[J].华中农业大学学报,2015,34(1): 28-32.

- [7] MIAH G, RAFII M Y, ISMAIL M R, et al. Blast resistance in rice: a review of conventional breeding to molecular approaches[J]. *Molecular biology reports*, 2013, 40(3): 2369-2388.
- [8] SILUÉ D, NOTTEGHEM J L, THARREAU D. Evidence of a gene-for-gene relationship in the *Oryza sativa*-*Magnaporthe grisea* pathosystem[J]. *Phytopathology*, 1992, 82(5): 577-580.
- [9] FLOR H H. Current status of the gene-for-gene concept[J]. *Annual review of phytopathology*, 1971, 9(1): 275-296.
- [10] ALLEN R L, BITTNER-EDDY P D, GRENVILLE-BRIGGS L J, et al. Host-parasite coevolutionary conflict between *Arabidopsis* and downy mildew[J]. *Science*, 2004, 306(5703): 1957-1960.
- [11] 金晓春,李志新,张海生,等.稻瘟病菌分离及保存方法研究[J]. *安徽农业科学*, 2008, 36(17): 7308, 7390.
- [12] 赵杰. ITS序列分析及其在植物真菌病害分子检测中的应用[J]. *陕西农业科学*, 2004(4): 35-37.
- [13] LI J B, YANG J, LIU L, et al. Geographic distribution of avirulence genes in rice blast fungus in Yunnan Province, China[J]. *Journal of resources and ecology*, 2011, 2(2): 181-185.
- [14] 张崎峰,靳学慧,蔡鑫鑫,等.黑龙江省稻瘟病菌无毒基因的检测[J]. *黑龙江农业科学*, 2014(12): 70-74.
- [15] VALENT B, FARRALL L, CHUMLEY F G. *Magnaporthe grisea* genes for pathogenicity and virulence identified through a series of backcrosses[J]. *Genetics*, 1991, 127(1): 87-101.

## Detection of avirulence genes in *Magnaporthe oryzae* from South China Crop Breeding Area

ZHU Minghai ZHAO Mei SHU Canwei ZHOU Erxun

*Guangdong Province Key Laboratory of Microbial Signals and Disease Control, College of Agriculture, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China*

**Abstract** In order to clarify the distribution of the avirulence genes in *Magnaporthe oryzae* (Hert) Barr [anamorph: *Pyricularia oryzae* Cav.] from South China Crop Breeding Area, 6 avirulence genes including *ACE1*, *Avr-Pia*, *Avr-Pik*, *Avr-Pita*, *Avr-Piz-t* and *PWL2* in 60 isolates of *M. oryzae* in core and non-core regions were detected by using PCR technique. The results showed that the detection rates of the 6 avirulence genes in rice blast pathogen populations in core and non-core regions were 100.00% and 96.67%, 33.33% and 0.00%, 100.00% and 100.00%, 96.67% and 90.00%, 73.33% and 100.00%, 100.00% and 73.33%, respectively. All the avirulence genes existed in *M. oryzae* in both regions except the *Avr-Pia* gene, which was not detected in the non-core region. Among them, the *Avr-Pik* gene had the highest distribution rate of 100% in both regions, and differences of distribution rates existed for the other avirulence genes in the rice blast fungus in the two regions.

**Keywords** South China Crop Breeding Area; core region; non-core region; *Magnaporthe oryzae*; avirulence genes

(责任编辑:边书京)