

姜兆远,刘晓梅,李莉,等. 吉林省稻瘟病菌无毒基因 *AvrPi9* 鉴定及分析[J]. 江苏农业科学,2017,45(10):27-29.  
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2017.10.007

# 吉林省稻瘟病菌无毒基因 *AvrPi9* 鉴定及分析

姜兆远<sup>1</sup>, 刘晓梅<sup>1</sup>, 李莉<sup>1</sup>, 邹晓威<sup>1</sup>, 任金平<sup>1</sup>, 袁媛<sup>2</sup>, 张铁新<sup>3</sup>, 王继春<sup>1</sup>, 吴宪<sup>1</sup>, 朱峰<sup>1</sup>, 孙辉<sup>1</sup>

(1. 吉林省农业科学院, 吉林长春 130033; 2. 吉林省农业技术推广总站, 吉林长春 130021; 3. 吉林农业大学, 吉林长春 130118)

**摘要:**为了明确无毒基因 *AvrPi9* 在吉林省不同稻区的分布及变异情况,将 PCR 检测技术与接种鉴定技术相结合,分析 2014 年吉林、长春、通化、四平、延边、松原、白城、辽源等稻区的 24 株优势单孢菌株中无毒基因 *AvrPi9* 的情况。结果表明,24 个优势稻瘟病菌株含无毒基因 *AvrPi9* 的比率较高,5 个稻区的优势菌株 100% 含有无毒基因 *AvrPi9*,松原稻区 1 株优势菌株 PCR 检测到无毒基因 *AvrPi9*,但对 *Pi9* 单基因品系 IRBL9-W 仍有致病性,说明该菌株无毒基因结构发生了变化,其他 PCR 结果均与接种结果相一致。

**关键词:**稻瘟病;抗病基因;无毒基因;*AvrPi9*;接种鉴定;PCR 检测

**中图分类号:** S435.111.4<sup>+</sup>1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2017)10-0027-03

稻瘟病是世界范围内的主要水稻病害之一。在我国各水稻栽培地区均经常发生稻瘟病,吉林省也是稻瘟病经常流行的主要地区,如果不防治可导致稻谷损失 30% 以上,局部田块甚至出现绝收的情况<sup>[1]</sup>。稻瘟病的病原为稻巨壳壳(*Magnaporthe oryzae* B. C. Couch),隶属于子囊门巨壳属。其无性阶段为稻梨孢(*Piricularia oryzae* Cavara),属于子囊菌无性型梨孢属。稻瘟病是完全符合基因对基因假说的病害<sup>[2-3]</sup>,稻瘟病的发生程度取决于田间菌群的无毒基因类型,当种植的水稻所含抗病基因与田间菌群所含的无毒基因相对应时,水稻则表现抗病;若水稻的抗病基因与菌群的无毒基因不对应,则表现感病,在适宜的气候条件下极易造成灾变。种植抗瘟品种是防治稻瘟病最经济有效的方法,但一个抗病品种在推广 3~5 年后就失去对当地稻瘟病菌的抗性<sup>[4]</sup>,主要是由稻瘟病菌变异及其上升为优势菌群所致。引起稻瘟病菌变异的因素很多<sup>[5-10]</sup>,但田间稻瘟病致病性的变异实质是田间无毒基因功能的缺失或获得<sup>[11]</sup>。吉林省是优质粳稻主产区,粳稻种植面积超过 70 万  $\text{hm}^2$ <sup>[12]</sup>,稻瘟病的控制对我国优质米的保障尤为重要。

截至 2015 年 3 月,已至少报道了 69 个抗稻瘟病位点共

84 个主效基因,其中 24 个基因已被成功克隆<sup>[13]</sup>,抗瘟基因中 *Pi9* 抗谱较广,对来自 13 个国家的 43 个稻瘟病菌株均表现出很高的抗性<sup>[14]</sup>,抗瘟基因 *Pi9* 对应的无毒基因 *AvrPi9* 已被克隆<sup>[15]</sup>,因此明确吉林省稻瘟病菌无毒基因 *AvrPi9* 分布情况对吉林省稻区水稻品种布局具有较好的指导意义。

## 1 材料与方法

### 1.1 供试品种

以单基因等基因系品种 IRBL9-W(*Pi9*)、蒙古稻(感病对照)为供试材料。

### 1.2 稻瘟病样采集及菌株筛选

2014 年从吉林、长春、通化、四平、延边、松原、白城、辽源各稻区采集穗颈瘟标样,通过振荡法分别获得 10 个单孢菌株,从中选出 3 株菌丝生长较好、产孢子能力强的优势菌株,共获得 24 个稻瘟病优势菌株,所有菌株均由吉林省农业科学院植物保护研究所水稻病害课题组保存。

### 1.3 菌丝的培养及孢子收集

取 4 块直径约为 5 mm 的斜面培养稻瘟病菌菌块于 PDA 平板上,27℃ 条件下在 PDA 培养基上培养 7 d 后,移至产孢培养基上,再培养 5~7 d,无菌条件下洗去表面菌丝,将菌丝收集到 2 mL 的离心管中同时放入 2 粒玻璃珠,置于 -80℃ 冰箱中保存,将洗掉菌丝的平板进行 12 h—12 h 光—暗培养 3 d,用无菌水洗涤并稀释孢子悬浮液终浓度为  $2 \times 10^5$  个/mL,用于接种。

### 1.4 接种检测

将 IRBL9-W 播于 16 穴苗盘内,同时播 2 穴蒙古稻,在稻苗 3 叶期时进行喷雾接种。接种在温室内进行,接种后于

收稿日期:2016-11-03

基金项目:吉林省科技厅青年基金(编号:20150520119JH);北方水稻种质抗稻瘟病鉴定评价项目(编号:2016NWB036-12-9)。

作者简介:姜兆远(1980—),男,山东临沂人,博士,副研究员,主要从事水稻病害综合防治研究。E-mail:jzy\_80@163.com。

通信作者:任金平,研究员,主要从事水稻病害综合防治研究。E-mail:15043461118@163.com。

- [6]唐贺,高英凯,苗永旺. 4 个黄牛群体黑素皮质受体 1(*MC1R*) 基因变异研究[J]. 畜牧兽医学报,2010,41(6):639-643.
- [7]杨永升,邓学梅,李宁,等. *MC1R* 是控制鸡黑色素形成的候选主效基因[J]. 生物化学与生物物理进展,2004,31(6):500-505.
- [8]腾召纯,陆晓屏,王玉祥,等. *MC1R* 基因 *Taq* I PCR-RFLP 标记与他留乌骨鸡羽色性状的相关性研究[J]. 中国家禽,2013,35(20):11-14.

- [9]郑嫩珠,黄虹虹,陈晖,等. 半番鸭 *MC1R* 基因 SNP 位点的发现和 PCR-RFLP 多态性分析[J]. 中国家禽,2009,31(18):11-13,18.
- [10]辛清武,郑嫩珠,朱志明,等. 8 个鸭群体 *MC1R* 基因 A399G 位点变异分析[J]. 中国农学通报,2014,30(35):69-73.
- [11]夏波. 鸭 *MC1R* 基因突变与羽毛颜色差异相关性研究[D]. 雅安:四川农业大学,2008.

24~28 ℃暗箱保湿 16 h,6~7 d 后进行调查,采用 0~9 级标准调查发病率<sup>[16]</sup>。设 3 次重复,蒙古稻发病率达 5 级及以上。

1.5 稻瘟病菌 28 S rDNA 检测及 *AvrPi9* 分析

将-80 ℃超低温冰箱保存的菌株置于液氮中,2 min 后将样品置于高通量组织细胞研磨破碎仪中进行破碎。DNA 提取方法按试剂盒说明书进行。

根据 NCBI 上公布的稻瘟病菌 28S 核糖体 RNA 基因 (GenBank: KM484999. 1) 设计引物 28SF - TAGGACGC-CGAACCTCTCTGA, 28SR - GGTATTACGCAACGGGCTA; 根据 NCBI 上公布的无毒基因 *AvrPi9* (GenBank: KM004023. 1) 起始密码子前 1 170 bp 到起始密码子后 254 bp 设计引物 *AvrPi9* F - GAGATTGTCAGAGAAGTCCGA, *AvrPi9*R - GCTTATTAC-CCATCATCGC。

反应程序为 94 ℃预变性 5 min;随后 30 个扩增循环: 94 ℃变性 1 min,55 ℃(*AvrPi9* 引物 52 ℃)退火 30 s,72 ℃延伸 30 s(*AvrPi9* 引物 90 s);最后 72 ℃延伸 10 min,4 ℃保存。PCR 扩增产物采用 0.8% 琼脂糖凝胶电泳成像分析。

2 结果与分析

2.1 接种检测分析

将 24 株菌株孢子悬液均匀的喷雾接种在 IRBL9 - W 和蒙古稻叶片上,结果如表 1 所示,24 株菌株均能侵染蒙古稻,且病级都达 5 级及以上。吉林稻区的 2 号菌株、通化稻区 9 号菌株和松原稻区的 16 号菌株均能侵染 IRBL9 - W,病级达到 4 级水平;松原稻区的 18 号菌株在 IRBL9 - W 水稻上产生病斑达到 5 级水平,其他菌株均不能侵染 IRBL9 - W。根据基因对基因假说,未侵染水稻的稻瘟菌含有对应的无毒基因,侵染水稻的菌株不含有对应的无毒基因,因此,24 个菌株中有 20 个菌株含有无毒基因 *AvrPi9*。其中长春、四平、延边、白城及辽源等稻区的供试菌株都含有无毒基因 *AvrPi9*,而吉林、通化及松原分别检测到 1、1、2 株不含有无毒基因 *AvirPi9* 的菌株。

2.2 稻瘟病菌 28S rDNA 检测及无毒基因 *AvrPi9* 基因分析

根据稻瘟病菌 28S rDNA 序列设计引物检测 24 个优势菌株的 DNA,所有供试菌株均扩增到 342 bp 大小的特异性片段 (图 1),说明该方法提取的稻瘟病菌 DNA 完全可以用于稻瘟病菌无毒基因的 PCR 检测分析。

根据设计的引物扩增 24 个菌株的无毒基因 *AvrPi9*,经检测吉林地区 2 号菌株、通化地区株 9 号菌株、松原地区 16 号菌株未扩增出目的条带,与接种鉴定结果一致,而松原的 18 号菌株扩增出目的条带,与接种鉴定结果不一致,说明 18 号菌株无毒基因 *AvrPi9* 结构可能发生了改变。其他菌株均扩增到 1 425 bp 大小的目的条带 (图 2),PCR 检测结果与接种鉴定结果一致。

3 结论与讨论

3.1 结论

接种鉴定与 PCR 检测结果表明,长春、四平、延边、白城及辽源稻区供试稻瘟病菌优势菌株均含有无毒基因 *AvrPi9* 且不能侵染 IRBL9 - W 叶片;吉林、通化和松原稻区分别有

表 1 接种检测结果

稻区	菌号	IRBL9 - W 病级	蒙古稻病级	<i>AvrPi9</i> 基因
吉林	1	0	5	+
	2	4	5	-
	3	0	6	+
长春	4	0	5	+
	5	0	7	+
	6	0	5	+
通化	7	0	5	+
	8	0	5	+
	9	4	6	-
四平	10	0	7	+
	11	0	7	+
	12	0	7	+
延边	13	0	6	+
	14	0	5	+
	15	0	5	+
松原	16	4	7	-
	17	0	5	+
	18	5	5	-
白城	19	0	6	+
	20	0	6	+
	21	0	5	+
辽源	22	0	5	+
	23	0	5	+
	24	0	5	+

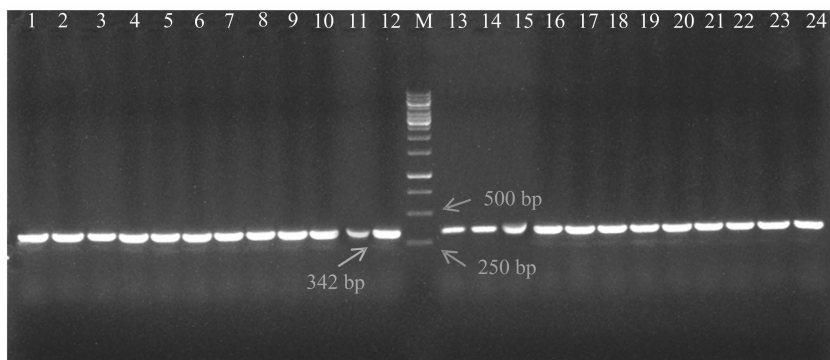
注:“+”表示检测到 *AvrPi9* 基因;“-”表示未检测到 *AvrPi9* 基因。

1、2 株稻瘟病菌优势菌株不存在 *AvrPi9* 无毒基因结构且能够侵染 IRBL9 - W 叶片;松原稻区有 1 株菌株存在 *AvrPi9* 基因结构但可以侵染 IRBL9 - W 叶片,具体原因需要进一步研究分析。

3.2 讨论

本研究从 2014 年吉林、长春、通化、四平、延边、松原、白城、辽源各稻区栽培稻上分离病菌鉴定了 24 株稻瘟病菌优势菌株。吉林省位于中纬度欧亚大陆的东侧,地处长白山脉,东部为山区、半山区,中部为松辽平原区,西部为草原区。从东南向西北由湿润气候过渡到半湿润气候再到半干旱气候,有明显的季节变化和地域差异<sup>[17]</sup>。根据地域特点吉林省稻区可以划分为平原稻作区、半山区稻作区、山区冷凉稻作区及高寒山区稻作区,不同稻区活动积温存在显著差异,水稻品种覆盖极早熟至晚熟所有熟期的品种。根据各地区生产水平,吉林省可分为 8 个稻作区域<sup>[18]</sup>,所分离的 8 个地区稻瘟病菌优势菌株基本代表了吉林省稻瘟病菌优势菌群遗传特点,分析这些菌株的无毒基因 *AvrPi9*,对了解吉林省整体稻瘟病菌菌群 *AvrPi9* 的变化和特点有重要的参考价值。

2014 年吉林省各稻区整体稻瘟病菌无毒基因 *AvrPi9* 存在频率较高。松原地区 3 株优势菌株中存在 1 株优势菌株含无毒基因 *AvrPi9*,该菌株分离自吉粳 88,由于吉粳 88 种植面积逐年缩小,该优势菌株群可能存在下降的趋势。吉林、通化及松原稻区 PCR 未检测到无毒基因 *AvrPi9* 的菌株均分离自稻花香品种。稻花香 2 号品种目前对吉林省稻瘟病菌具有一定的抗性,但在稻田中已经出现零星发病的稻穗,稻花香种植



1~3—吉林菌株；4~6—长春菌株；7~9—通化菌株；10~12—四平菌株；M—GeneRuler 1 kb DNA Ladder；13~15—延边菌株；16~18—松原菌株；19~21—白城菌株；22~24—辽源菌株。下图同

图1 稻瘟病菌 28S rDNA 检测结果

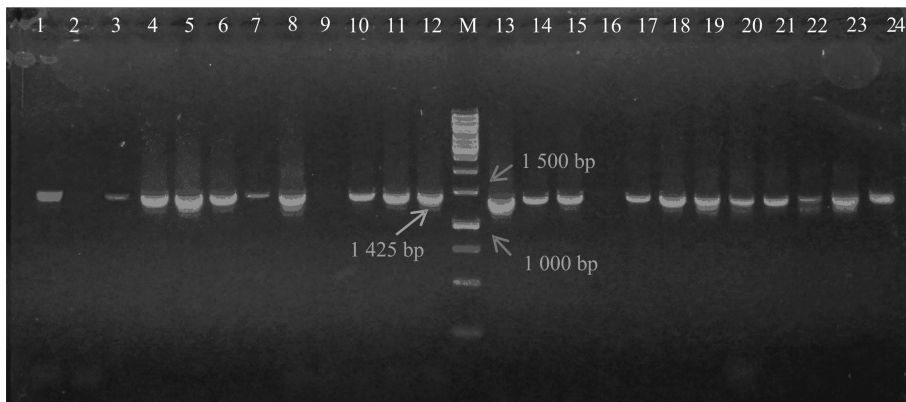


图2 吉林省稻瘟病菌无毒基因 *AvrPi9* 分析结果

面积在吉林省各稻区呈逐年增加的趋势,因此该稻瘟病菌优势菌群富集可能是吉林省未来稻瘟病暴发的原因。所得结果对含 *Pi9* 抗病基因水稻育种及推广具有重要的参考价值。

#### 参考文献:

- [1] 陈温福,潘文博,徐正进. 我国粳稻生产现状及发展趋势[J]. 沈阳农业大学学报,2006,37(6):801-805.
- [2] Silue D, Nottoghem 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.
- [3] Flor H H. Current status of the gene-for-gene concept[J]. Annual Review of Phytopathology, 1971, 9(1):275-296.
- [4] 雷财林,凌忠专,王久林,等. 北方稻区稻瘟病菌种生理小种变化与抗病育种策略[J]. 作物杂志, 2000(3):14-16.
- [5] Ou S H. Pathogen variability and host resistance in rice blast disease[J]. Annual Review of Phytopathology, 2003, 18(1):167-187.
- [6] Giatgong P, Frederiksen R A. Pathogenic variability and cytology of monoconidial subcultures of *Piricularia oryzae* [J]. Phytopathology, 1969(8):1152.
- [7] Quamaruzzaman M, Ou S H. Monthly changes of pathogenic races of *Piricularia oryzae* in a blast nursery [J]. Phytopathology, 1970, 60(8):1266-1269.
- [8] Jeon J, Choi J, Lee G W, et al. Experimental evolution reveals genome-wide spectrum and dynamics of mutations in the rice blast fungus, *Magnaporthe oryzae* [J]. PLoS One, 2013, 8(5):e65416.
- [9] 王军,宫丹妮,杨杰,等. 江苏省粳稻品种抗稻瘟病基因型与穗颈瘟抗性分析[J]. 江苏农业学报, 2016, 32(2):250-256.
- [10] 王伟舵,于俊杰,聂亚锋,等. 2011—2014 年江苏省稻瘟病菌种群动态及毒力变化[J]. 江苏农业学报, 2015, 31(2):285-289.
- [11] 姚琳,王剑,卢代华,等. 稻瘟病菌无毒基因研究进展[J]. 中国农学通报, 2014, 30(4):232-237.
- [12] 周广春,孟维初,全东兴,等. 吉林省水稻生产及增产潜力研究[J]. 沈阳农业大学学报, 2012, 43(6):688-692.
- [13] 国家水稻数据中心. 稻瘟病主效抗性基因列表 [DB/OL]. (2012-06-20) [2015-11-03]. [http://www.ricedata.cn/gene/gene\\_pi.htm](http://www.ricedata.cn/gene/gene_pi.htm).
- [14] Liu G, Lu G, Zeng L, et al. Two broad-spectrum blast resistance genes, *Pi9(t)* and *Pi2(t)*, are physically linked on rice chromosome 6[J]. Molecular Genetics and Genomics, 2002, 267(4):472-480.
- [15] Wu J, Kou Y, Bao J, et al. Comparative genomics identifies the *Magnaporthe oryzae* avirulence effector *AvrPi9* that triggers *Pi9*-mediated blast resistance in rice [J]. New Phytologist, 2015, 206(4):1463-1475.
- [16] 钱前,郭龙彪,曾大力等水稻分子育种技术指南[M]. 北京:科学出版社, 2012.
- [17] 万立民. 基于 GIS 的吉林省耕地地力评价[D]. 长春:东北师范大学, 2014.
- [18] 侯立刚,周广春,严永峰,等. 吉林省水稻发展现状与未来发展对策[J]. 北方水稻, 2015, 45(2):73-76.