

黑龙江省稻瘟病菌无毒基因的检测

张崎峰¹, 靳学慧², 蔡鑫鑫¹, 李金良¹, 陈海军¹

(1. 黑龙江省农业科学院 黑河分院, 黑龙江 黑河 164300; 2. 黑龙江八一农垦大学, 黑龙江 大庆 163319)

摘要:为了探索黑龙江省稻瘟病菌无毒基因的分布情况,通过分子标记法对黑龙江省 19 个地区的 204 个稻瘟病菌的菌株进行 PCR 扩增,检测是否含有无毒基因 *Avr-pita*、*AVR-CO39*、*PWL2* 和 *PWL3*。结果表明:各基因的出现频率差异较大,*PWL2* 的出现频率较大,为 52.94%,*PWL3* 最低,出现频率为 0,*Avr-pita* 和 *AVR-CO39* 的出现频率分别为 39.22%和 37.75%。黑龙江省稻瘟病菌的群体结构复杂,在不同地区甚至相同地区的菌株中无毒基因的存在情况都有明显的差异。

关键词:黑龙江省;稻瘟病菌;无毒基因;分子标记

中图分类号:S435.111.4⁺1

文献标识码:A

文章编号:1002-2767(2014)12-0070-04

水稻稻瘟病是水稻产区危害最严重的病害之一,流行年份一般减产 10%~20%,严重的达 40%~50%^[1]。目前比较有效的预防措施是种植抗病的水稻品种,但稻瘟病菌变异快,常导致生产中抗病品种推广 3~5 a 后即丧失抗性,成为感病品种。因此,只有加深对水稻与稻瘟病菌互作机制的了解,才能有效长久地预防稻瘟病。稻瘟病菌与水稻寄主之间的互作符合 Flor 的“基因对基因”学说,了解无毒基因的分布情况,有助于选择具有相应抗病基因的水稻品种进行合理布局^[2-5]。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 供试菌株

2006 年在黑龙江省 19 市(县)

对 60 个品种(系)采集了近千份水稻穗颈瘟标样,采用眉毛挑单孢法^[6]分得 204 个菌株。

1.1.2 引物设计 将分离菌株在 PDA 培养基上活化后,接种在马丁氏液体培养基中,28℃、120 r·min⁻¹振荡培养 10~12 d,滤出菌丝,根据 SDS-CTAB 法提取 DNA^[7]。

根据 GenBank 中登录的 *Avr-pita*, *AVR-CO39*, *PWL2* 和 *PWL3* 四个无毒基因序列,采用 Primer 3 引物设计程序,设计出各无毒基因的特异性引物,并由上海生工生物工程有限公司合成,引物序列见表 1。

Taq DNA 聚合酶、dNTP 和 Marker 均购自大连宝生物工程有限公司。

表 1 引物序列

Table 1 The primer sequence

基因 Avr-genes	引物序列 Primer sequences		片段长度/bp Length of targeted fragments
<i>Avr-pita</i>	5'-aatcgaccggtttccgctt-3'	5'-gtagattgaccgcgattcc-3'	1189
<i>AVR-CO39</i>	5'-aattgcataatcgctgcgat-3'	5'-gtcaagctcagaactttgtt-3'	918
<i>PWL2</i>	5'-atgaaatgcaacaacatcatc-3'	5'-cctcacacttaagttaacac-3'	495
<i>PWL3</i>	5'-caacaacttttcgccatgaa-3'	5'-atcctattcagtcgtcgtat-3'	436

收稿日期:2014-07-16

基金项目:黑龙江省科技攻关资助项目(GB06B105-2);黑龙江省农垦总局科技攻关资助项目(HNKXIV-01-04-02)

第一作者简介:张崎峰(1983-),男,黑龙江省鹤岗市人,硕士,助理研究员,从事植物病理学研究和玉米抗病育种工作。E-mail:hhzqf83@163.com。

通讯作者:靳学慧(1962-),男,教授,硕士研究生导师,从事植物病理学的教学与科研工作。E-mail:jxhbyndzky@yahoo.com.cn。

1.1.3 供试对照菌株 供试的阳性对照和阴性对照菌株见表 2。

1.2 方法

PCR 体系反应体系(20 μL):*Taq* DNA 聚合酶 1.0 U, Mg²⁺ 2.0 mmol·L⁻¹, DNA 100 ng·μL⁻¹, dNTP 50 μmol·L⁻¹, 正向和反向引物 0.4 μmol·L⁻¹, ddH₂O 补足体积至 20 μL。

表 2 对照菌株

Table 2 The positive and negative strains

阳性对照 Positive control	特性 Characters	阴性对照 Negative control	特性 Characters
JMSK	含有无毒基因 <i>Avr-pita</i>	MLXN	不含无毒基因 <i>Avr-pita</i>
MSX	含有无毒基因 <i>AVR-CO39</i>	BQX	不含无毒基因 <i>AVR-CO39</i>
DQZY	含有无毒基因 <i>PWL2</i>	MSJD	不含无毒基因 <i>PWL2</i>
WSJZ	含有无毒基因 <i>PWL3</i>	NOPL	不含无毒基因 <i>PWL3</i>

PCR 程序为 94℃ 预变性 5 min;94℃ 变性 30 s; 45~60℃ 退火 50 s(具体依据引物的 G/C 含量来定);72℃ 延伸 30~60 s,具体依据目的片段长度而定;35 个循环;72℃ 延伸 10 min。取扩增产物 5 μL 加 Lording Buffer 进行上样,2% 琼脂糖凝胶电泳,用紫外凝胶成像系统拍照^[8]。

2 结果与分析

2.1 各无毒基因的扩增结果

204 个菌株基因检测结果见图 1~图 4,经 PCR 扩增后,与阳性对照同时在相应位置扩增出相同特异性条带的,说明该菌株含有待测基因,而与阴性对照相同,都没扩增出特异性条带的说明不含待测基因。

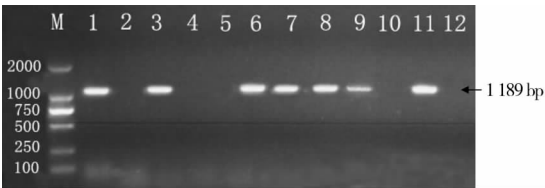


图 1 无毒基因 *Avr-pita* 的 PCR 扩增结果

M: 标准分子量 (DL2000); 1: JMSK (阳性对照); 2: MLXN (阴性对照); 3: JMSA-1 (牡丹江市); 4: YLSY-1 (依兰县); 5: HNTS-1 (桦南县); 6: HGDH-4 (鹤岗市); 7: NCKZ-2 (密山市); 8: HNTS-2 (桦南县); 9: LBJB-3 (萝北县); 10: HLYD-2 (呼兰县); 11: LSBNL-2 (绥滨县); 12: JDXH-4 (鸡东县)

Fig. 1 The PCR amplification of avirulence gene *Avr-pita*

M: Marker (DL2000); 1: JMSK (Positive control); 2: MLXN (Negative control); 3: JMSA-1 (Mudnajiag city); 4: YLSY-1 (Yilan county); 5: HNTS-1 (Huanan county); 6: HGDH-4 (Hegang city); 7: NCKZ-2 (Mishan city); 8: HNTS-2 (Huanan county); 9: LBJB-3 (Luobei county); 10: HLYD-2 (Hulan county); 11: SBNL-2 (Suibin county); 12: JDXH-4 (Jidong county)

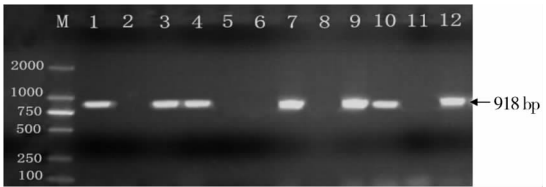


图 2 无毒基因 *AVR-CO 39* 的 PCR 扩增结果

M: 标准分子量 (DL2000); 1: MSX (阳性对照); 2: BQX (阴性对照); 3: SBDD-1 (绥滨县); 4: FJQN-1 (富锦市); 5: BQBZ-5 (宝清县); 6: TLJQ-1 (铁力市); 7: TJQJ-4 (同江县); 8: HGDH-12 (鹤岗市); 9: JMSB-5 (佳木斯市); 10: JDXH-4 (鸡东县); 11: HNTS-7 (桦南县); 12: NCKX-1 (密山市)

Fig. 2 The PCR amplification of avirulence gene *AVR-CO 39*

M: Marker (DL2000); 1: MSX (Positive control); 2: BQX (Negative control); 3: SBDD-1 (Suibin county); 4: FJQN-1 (Fujin city); 5: BQBZ-5 (Baoqing county); 6: TLJQ-1 (Tieli city); 7: TJQJ-4 (Tongjiang county); 8: HGDH-12 (Hegang city); 9: JMSB-5 (Jiamusi city); 10: JDXH-4 (Jidong county); 11: HNTS-7 (Huanan county); 12: NCKX-1 (Mishan city)

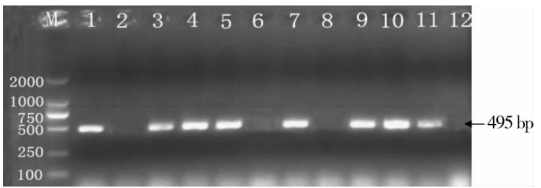
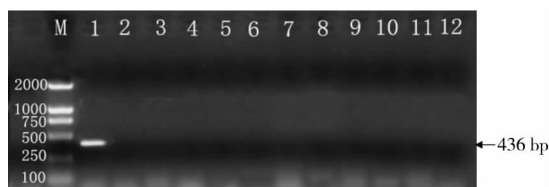


图 3 无毒基因 *PWL2* 的 PCR 扩增结果

M: 标准分子量 (DL2000); 1: DQZY (阳性对照); 2: MSJD (阴性对照); 3: NCKZ-2 (密山市); 4: ZYWD-2 (肇源县); 5: PKWT-2 (林口县); 6: HNTS-3 (桦南县); 7: HLSZ-7 (呼兰县); 8: FZYX-2 (方正县); 9: LBJB-6 (萝北县); 10: MLLZ-2 (木兰县); 11: TL-4 (铁力市); 12: EJYS-3 (二九一农场)

Fig. 3 The PCR amplification of avirulence gene *PWL 2*

M: Marker (DL2000); 1: DQZY (Positive control); 2: MSJD (Negative control); 3: NCKZ-2 (Mishan city); 4: ZYWD-2 (Zhaoyuan county); 5: PKWT-2 (Linko county); 6: HNTS-3 (Huanan county); 7: HLSZ-7 (Hulan county); 8: FZYX-2 (Fangzheng county); 9: LBJB-6 (Luobei county); 10: MLLZ-2 (Mulan county); 11: TL-4 (Tieli city); 12: EJYS-3 (291 Farm)

图4 无毒基因 *PWL3* 的PCR扩增结果

M: 标准分子量 (DL2000); 1: WSJZ (阳性对照); 2: NOPL (阴性对照); 3: SBDD-1 (绥滨县); 4: FJQN-1 (富锦市); 5: BQBZ-5 (宝清县); 6: TLJQ-1 (铁力市); 7: TJQJ-4 (同江县); 8: HGDH-12 (鹤岗市); 9: JMSB-5 (佳木斯市); 10: JDXH-4 (鸡东县); 11: HNTS-7 (桦南县); 12: NCKX-1 (密山市)

Fig. 4 The PCR amplification of avirulence gene *PWL3*

M: Marker (DL2000); 1: WSJZ (Positive control); 2: NOPL (Negative control); 3: SBDD-1 (Suibin county); 4: FJQN-1 (Fujin city); 5: BQBZ-5 (Baoqing); 6: TLJQ-1 (Tieli city); 7: TJQJ-4 (Tongjiang county); 8: HGDH-12 (Hegang city); 9: JMSB-5 (Jiamusi city); 10: JDXH-4 (Jidong county); 11: HNTS-7 (Huanan county); 12: NCKX-1 (Mishan city)

2.2 各无毒基因在黑龙江省的分布情况

黑龙江省 19 个市(县)的 204 个菌株对 4 个无毒基因的检测结果见表 3, 扩增频率最高的为 52.94%, 为无毒基因 *PWL2*, 有 108 个菌株在 495 bp 位置处扩增出特异性片段。其次为 *Avr-pita*, 基因出现频率为 39.22%, 有 80 个菌株在 1 189 bp 处扩增出特异性片段。*AVR-CO39* 的基因频率为 37.75%, 有 77 个菌株在 918 bp 处扩增出特异性片段。204 个菌株中没有检测到无毒基因 *PWL3*。

2.3 不同地区各无毒基因出现频率的比较

由表 4 可知, *PWL3* 在各地区的菌株中均未检测到, 其它 3 个无毒基因在黑龙江省各地区的出现频率存在较明显的差异。例如: 宝清县的 5 个供试菌株中没有检测到 *AVR-CO39*, *Avr-pita* 和 *PWL2* 分别检测到 1 和 4 个, 木兰县的 9 个菌株中, 没有检测到 *Avr-pita* 基因, *AVR-CO39* 和 *PWL2* 分别检测到 5 和 6 个, 鸡东县 4 个菌株中没有检测到 *PWL2* 基因, 而 *Avr-pita* 和 *AVR-CO39* 基因分别检测到 2 和 1 个。其它地区不同

表 3 不同无毒基因的出现频率

Table 3 The frequency of different avirulence gene

测试的无毒基因 Avirulence gene	供测的菌株总数 Total number of strains	含有无毒基因的菌株数 Number of strains with avirulence gene	平均出现频率/% Frequency
<i>Avr-pita</i>	204	80	39.22
<i>AVR-CO39</i>	204	77	37.75
<i>PWL2</i>	204	108	52.94
<i>PWL3</i>	204	0	0

表 4 黑龙江省不同地区的无毒基因分布情况

Table 4 The distribution of avirulence gene in different regions of Heilongjiang province

菌株来源 Source of strains	供试菌株数 Number of tested strains	无毒基因 <i>Avr-pita</i>		无毒基因 <i>AVR-CO39</i>		无毒基因 <i>PWL2</i>	
		出现个数 Number	出现频率/% Frequency	出现个数 Number	出现频率/% Frequency	出现个数 Number	出现频率/% Frequency
鹤岗市 Hegang city	14	6	42.86	4	28.57	4	28.57
同江市 Tongjiang city	12	3	25.00	6	50.00	1	8.33
宝清县 Baoqing county	5	1	20.00	0	0	4	80.00
肇源县 Zhaoyuan county	18	2	11.11	5	27.78	10	55.56
依兰县 Yilan county	13	5	38.46	4	30.77	7	53.85
绥滨县 Suibin county	8	5	62.50	4	50.00	3	37.50
萝北县 Luobei county	14	8	57.14	5	35.71	8	57.14
富锦市 Fujin city	10	4	40.00	6	60.00	8	80.00
佳木斯市 Jiamusi city	14	6	42.86	7	50.00	9	64.29
桦南县 Huanan county	10	4	40.00	2	20.00	6	60.00
密山市 Mishan city	15	8	53.33	6	40.00	7	46.67
木兰县 Mulan county	9	0	0	5	55.56	6	66.67
铁力市 Tieli city	8	5	62.50	3	37.50	5	62.50
方正县 Fangzheng county	6	2	33.33	1	16.67	3	50.00

续表 4
Continuing Table 4

菌株来源 Source of strains	供试菌株数 Number of tested strains	无毒基因 <i>Avr-pita</i>		无毒基因 AVR-CO39		无毒基因 PWL2	
		出现个数 Number	出现频率/% Frequency	出现个数 Number	出现频率/% Frequency	出现个数 Number	出现频率/% Frequency
呼兰县 Hulan county	11	5	45.45	5	45.45	10	90.10
牡丹江市 Mudanjiang city	15	7	46.67	6	40.00	8	53.33
林口县 Linko county	10	3	30.00	5	50.00	4	40.00
二九一农场 The 291 farm	8	4	50.00	2	25.00	5	62.50
鸡东县 Jidong county	4	2	50.00	1	25.00	0	0

无毒基因的出现频率也均不相同,由此可见,黑龙江省各市(县)稻瘟病菌群体中不同基因的分布情况存在比较明显的差异。

2.4 相同基因在不同地区出现频率的比较

由表 4 可知,相同的无毒基因在不同地区的检测结果各不相同,如 *Avr-pita* 在绥滨县和铁力市的出现频率为 62.50%,而在木兰县没有检测到该基因;基因 AVR-CO39 在富锦市的出现频率为 60%,而在宝清县没有检测到该基因;基因 *PWL2* 在呼兰县的出现频率高达 90.1%,而在鸡东县没有检测到该基因,由此可见,黑龙江省稻瘟病菌的群体结构复杂,相同基因在不同地区的存在情况存在着较大的差异,各地区已形成了具本地区特点的稻瘟病菌群体结构。

3 结论与讨论

通过采自黑龙江省 19 个县(市)60 个水稻品种(系)的稻瘟病标样,分离获得的 204 个有效单孢菌株,利用 204 个菌株对无毒基因 *Avr-pita*、AVR-CO39、*PWL2*、*PWL3* 进行检测,发现稻瘟病菌群体结构复杂,无毒基因具有明显的地域特征。具体表现在:(1)4 个无毒基因在黑龙江省出现频率差异较大,*PWL2* 分布较广,出现基因频率达 52.94%,与该基因对应的抗性基因在当地抗病育种中有相对较大的利用价值。其它基因应因地制宜与其它抗性基因联合使用。(2)相同基因在各地区的差异较大。(3)不同地区相同基因的出现频率也存在较大的差异。

稻瘟病菌的无毒基因与水稻抗瘟基因之间的关系符合 Flor 提出的基因对基因学说。有些研究认为,如某地区检测出某一无毒基因的出现频率较高,若种植含有与其对应的抗性基因的水稻品种,稻瘟病的发病几率可能会有所降低;有些研究认为无毒基因是显性表达的,有的则认为无毒基因是以全或无的方式表达^[9],有人认为病原菌对不同品种的致病性是受不同基因控制的,并且不同品种所持

有的无毒基因数量也不相同,还有人认为无毒基因是否为显性表达有待进一步研究。水稻品种与病原菌互作呈现出一定的复杂性^[10-13],这需要今后更多的科研工作者进行进一步的研究,为无毒基因与品种的互作机制提供理论基础。

参考文献:

[1] 靳学慧,马汇泉. 农业植物病理学[M]. 赤峰:内蒙古科学技术出版社,1999.

[2] 李祥晓,王倩,罗生香,等. 黑龙江省稻瘟病菌无毒基因分析及抗病种质资源筛选[J]. 作物学报, 2012, 38(12): 2192-2197.

[3] 王世维,郑文静,赵家铭,等. 辽宁省稻瘟病菌无毒基因型鉴定及分析[J]. 中国农业科学, 2014, 47(3): 462-472.

[4] 雷财林,凌忠专,王久林,等. 北方稻区稻瘟病菌生理小种变化与抗病育种策略[J]. 作物杂志, 2000(3): 14-15.

[5] 李亚,刘二明,戴良英,等. 湖南稻瘟病菌群体遗传多样性与病菌致病型的关系[J]. 中国水稻科学, 2007, 21(3): 304-308.

[6] 林代福. 单孢分离的眉毛挑针法[J]. 山地农业生物学报, 2003, 22(5): 462-463.

[7] He Y Q. An improved protocol for fungal DNA preparation[J]. Mycosystema, 2000, 19(3): 434.

[8] 张崎峰,靳学慧,蔡鑫鑫,等. 用 SSR 标记法对黑龙江省稻瘟病菌无毒基因的检测[J]. 中国农学通报, 2010, 26(10): 250-254.

[9] Valent B, Farrall L, Chumley F G. Magrroporthe grisea gene for pathogenicity and virulenc identified through a series of backcrosses[J]. Genetics, 1991, 127: 87-101.

[10] 陆凡. 江苏省稻瘟病菌遗传多样性研究[D]. 南京:南京农业大学, 2000.

[11] De Wit P J G M. Molecnlar cliaacterization of gene for gene systems in plant-fungus interactions and the application of avirulence genes in control of plant patliogens[J]. Annual Review of Phytopathology, 1992, 30: 391-418.

[12] Dioh W, Tharreau D, Nottteghem J L, et al. Mapping of avirulence genes In the Rice Blast Fungus, *Magnaporthe grisea* with RFLP and RAPD Markers [J]. Molecular Plant-Microbe Interact, 2000, 13: 217-227.

[13] Silue D, Nottteghem J L, Tharreau D. Evidence of a gene-for-gene relationship in the *Oryza saliva-Magnaporthe grisea* pathosystem [J]. Phytopathology, 1992a, 82: 577-580.