

水稻 *Pi2/9* 位点 3 个抗瘟基因的抗菌谱 及稻瘟病菌遗传多样性分析

江南^{1a,2}, 王素华^{1a,2}, 李智强^{1a,2}, 文婷^{1a,2}, 梁毅^{1a,2}, 吴俊³,
杨婷婷^{1a,2}, 戴良英^{1b,2}, 王国梁^{1a,2*}, 刘雄伦^{1a,2*}

(1.湖南农业大学 a.农学院; b.生物安全科学技术学院, 湖南 长沙 410128; 2.作物基因工程湖南省重点实验室, 湖南 长沙 410128; 3.国家杂交水稻工程技术研究中心, 湖南 长沙 410125)

摘 要: 采用 35 个不同来源的稻瘟病菌菌株, 对 3 个稻瘟病抗性基因 *Pi9*、*Pi2*、*Pizt* 的供体亲本和以日本晴为遗传背景的转基因近等基因系进行室内接种鉴定, 比较分析 3 个基因的抗菌谱差异。结果表明: *Pi9* 和 *Pi2* 的抗菌谱较广, 抗性频率均达到 94.2%, *Pi9* 对菌株 ROR1 和 X2007A-7 表现感病, *Pi2* 对菌株 CHNOS60-2-3 和 RB14 表现感病, *Pizt* 抗菌谱较窄, 抗性频率仅为 60%, 使用 13 对 SSR 引物分析其中 20 个稻瘟病菌菌株的遗传多样性, 可划分为 4 个宗谱, 菌株的遗传宗谱和来源相关性不显著, 与致病性有一定的相关性。

关 键 词: 水稻; 稻瘟病菌; 抗性基因; 抗菌谱; 病原菌遗传多样性

中图分类号: S435.111.1; S425.111.4⁺1 文献标志码: A 文章编号: 1007-1032(2012)05-0506-05

Analysis of the antimicrobial spectrum of three rice blast resistance genes at *Pi2/9* locus and genetic diversity of rice blast strains

JIANG Nan^{1a,2}, WANG Su-hua^{1a,2}, LI Zhi-qiang^{1a,2}, WEN Ting^{1a,2}, LIANG Yi^{1a,2}, WU Jun³
YANG Ting-ting^{1a,2}, DAI Liang-ying^{1b,2}, WANG Guo-liang^{1a,2*}, LIU Xiong-lun^{1a,2*}

(1.a.College of Agronomy; b.College of Bio-Safety Science and Technology, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China; 2.Key Laboratory of Crop Genetic Engineering, Changsha 410128, China; 3.China National Hybrid Rice Research and Development Center, Changsha 410125, China)

Abstract: In this study, 35 blast strains, rice lines including the donors of blast resistant genes and rice transgenic lines with the genetic background of Nipponbare were employed for antimicrobial spectrum analysis of three blast resistant genes *Pi9*, *Pi2* and *Pizt*. The results showed that *Pi9* and *Pi2* both have a broad spectrum of resistance with a resistance frequency of 94.2%, while *Pizt* have a narrow spectrum of resistance with a resistance frequency of only 60%. The blast strains ROR1, X2007A-7 are compatible to *Pi9*, and CHNOS60-2-3, RB14 are compatible to *Pi2*. In addition, 13 pairs of SSR markers were used for analysis of the genetic diversity of 20 out of the 35 blast strains, the results showed these 20 strains were classified into 4 lineages which showed certain relationship with pathogenicities but no significant correlation with the origin of the strains.

Key words: rice; *Pyricularia oryzae*; resistance gene; resistance spectrum; genetic diversity

稻瘟病是水稻最主要的病害之一, 稻瘟病不仅造成水稻产量损失, 还导致稻米品质下降, 全球每

年因稻瘟病造成的损失达 50 亿美元^[1-3]。种植抗病品种是防治稻瘟病最为经济和有效的策略, 但由于

收稿日期: 2012-04-28

基金项目: 国家自然科学基金项目(31171526)

作者简介: 江南(1984—), 男, 湖北襄阳人, 博士研究生, 主要从事水稻分子生物学研究, jiangnan1984731@126.com; 王素华同为第一作者, susannawang512@163.com; *通信作者, xionglun@yahoo.com; wang.620@osu.edu

大面积种植抗病基因单一的品种,使得大多数抗病品种在推广数年后抗病性逐步丧失,造成病害的流行^[4-7],因此,抗稻瘟病基因的发掘和合理利用是当今抗病育种的关键。目前,已鉴定的稻瘟病主效抗性基因和 QTL 超过 80 个,其中 21 个基因已被克隆^[8-9]。*Pi9*、*Pi2* 和 *Pizt* 是从水稻第 6 号染色体短臂近着丝粒区域的 *Pi2/9* 位点克隆的 3 个稻瘟病抗性基因,并且 *Piz(t)*、*Pi26(t)*、*Pigm(t)*、*Pi40(t)*、*Pi50(t)* 也被定位在该区域,这些基因都具有较广的抗谱^[10-15]。已有研究显示,*Pi9*、*Pi2*、*Pizt* 的供体亲本 75-1-127、5173、Toride 的抗谱存在一定的差异^[11]。为了剔除供体亲本材料中其他抗病基因及遗传背景的影响,笔者通过使用不同来源的稻瘟病菌菌株对 *Pi9*、*Pi2*、*Pizt* 的日本晴背景的转基因株系(近等基因系)进行室内接种鉴定,比较了 3 个基因的抗谱差异,并对其中的 20 个稻瘟病菌菌株进行遗传多样性分析,以期合理有效地利用 3 个稻瘟病抗性基因提供依据。

1 材料与方 法

1.1 材 料

3 个抗稻瘟病基因供体亲本 75-1-127(*Pi9*)、5173(*Pi2*)、Toride(*Pizt*) ; 日本晴背景转基因株系 *Pi2*#5-8-4-2()、*Pi2*#5-8-4-3()、*Pi2*#5-8-4-5(III)、NPB-*Pi9*#12()、*Pizt*#11-14-2-2()、*Pizt*#11-15-2-2()、*Pizt*#11-15-2-3()。

35 个稻瘟病菌菌株来自于不同国家或地区:其中有 6 个菌株来源于国外,分别为 IC-17(美国)、ES6(西班牙)、PO6-6(菲律宾)、ROR1、KJ201(韩国)、RB11(日本);25 个菌株来源于中国不同省份,分别为 CHNOS60-2-3(云南),110-2、318-2、220-1-1、193-1-1、87-4、236-1、236-2、CHL438、CHL440、CHL446、CHL471、CHL473、X2007A-7(湖南),E2007046A2、E2007038A3(湖北),CHL1743、RB4、RB7、RB9(广东),CHL506、RB16、RB18(福建),CHL645(贵州),95097AZC13(省份不详);4 个菌株(RB14、RB15、RB17、RB22)来源不详。

根据稻瘟病菌基因组序列设计 13 对 SSR 引物^[16]: P99-100、P233-234、P319-320、P43-44、P47-48、P37-38、P607-608、P657-658、P505-506、P63-64、P77-78、P83-84、P427-428。

1.2 方 法

1.2.1 水稻育苗

水稻材料分批播于透明塑料盆(长 20 cm、宽 15 cm、高 30 cm)中,育苗基质为未添加腐殖质的花卉营养土,每桶 6~8 个材料,以日本晴作为感病对照。幼苗置于 26~28 °C 的人工气候箱,每天 12 h 光照、12 h 黑暗培养;当幼苗生长至二叶期时,浇施适量尿素;四叶期分别用单个菌株进行室内喷雾法活体接种。

1.2.2 稻瘟病菌接种及调查

将稻瘟病菌接种到燕麦培养基上,在 26~28 °C 的培养箱内暗培养 7~10 d。用蒸馏水将培养基表面的菌丝洗下,晾干后光照条件下产孢,5~7 d 后用于接种。

用 0.025% Tween-20 水溶液从培养基上洗下孢子,孢子悬浮液终含量为 1×10^5 cfu/mL。接种后在 26 °C 黑暗条件保湿 24 h,26~28 °C、正常光照条件下高湿培养,5~7 d 后调查发病情况。按 Bonman^[17]的 0~5 级标准对接种的材料进行分级,0~1 级为抗病(R),2~3 级为中抗(MR),4 级为中感(MS),5 级为感病(S)。

1.2.3 稻瘟病菌基因组 DNA 的提取与基因型分析

稻瘟病菌在液体培养基中培养 4 d 后,采用 CTAB 法^[18]提取基因组 DNA。PCR 反应体系为 10 μ L,其中模板 100 ng,10 \times Buffer 扩增缓冲液 1 μ L,10 mmol/L dNTPs 0.2 μ L,10 mmol/L 上下游引物各 0.5 μ L,1 U *rTaq* 聚合酶,加 ddH₂O 至 10 μ L。反应条件为 95 °C 预变性 5 min;94 °C 变性 30 s,55 °C 复性 30 s,72 °C 延伸 1 min,共 35 个循环,72 °C 终延伸 10 min。扩增产物用 8% 聚丙烯酰胺凝胶电泳检测。

1.2.4 数据处理

根据微卫星引物扩增结果,建立 SSR 的 0-1 数据库。每个样品的电泳条带按“有”或“无”记录,有电泳条带有时赋值为 1,否则为 0。应用 NTSYS-PC 进行聚类分析,构建树状聚类图。通过 NTSYS-PC 分析,以标准化变量的相关系数作为统计量,对 20 个供试菌株进行聚类。

2 结果与分析

2.1 *Pi9*、*Pi2*、*Pizt* 基因的稻瘟病抗谱

3 个抗病基因的供体亲本材料及其日本晴背景的转基因近等基因系对 35 个稻瘟病菌菌株的抗谱见表 2。转基因株系与供体亲本的抗谱基本一致。*Pi2* 转基因株系对菌株 ROR1、110-2、193-1-1、

X2007A-1、CHL1743、RB15 和 RB12 菌株的抗性程度表现得比供体亲本更高。*Pi9* 与 *Pi2* 抗谱较广, 抗性频率达到 94.29%。*Pi2* 仅对 CHNOS60-2-3 和 RB14 表现为感病。*Pi9* 对 ROR1 与 XA2007A-7 表现为感病。虽然 *Pizt* 和 *Pi2* 的氨基酸序列高度同源, 但二者的抗谱差异较大, *Pizt* 抗谱较窄, 抗性频率仅为 60%。

表 2 *Pi9*、*Pi2*、*Pizt* 转基因近等基因系的稻瘟病抗谱

Table 2 Resistance spectra of transgenic lines with *Pi9*, *Pi2*, *Pizt* to rice blast

菌株	抗性										
	5173		75-1-127				Toride			日本晴	
IC-17*	MR	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S
ES6	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S
P06-6	R	R	R	R	R	R	MS	MS	MS	MS	S
ROR1	MR	R	R	R	S	S	R	R	R	R	S
KJ201*	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S
95097AZC13	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S
CHNOS60-2-3	S	S	S	S	R	R	R	R	R	R	S
110-2*	MR	R	R	R	R	R	R	R	R	R	MS
318-2*	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S
220-1-1	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S
193-1-1*	MR	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S
87-4	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S
236-1	R	R	R	R	R	R	S	S	S	S	S
236-2*	R	R	R	R	R	R	S	S	S	S	S
CHL438*	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	MS
CHL440*	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	MS
CHL446	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	MS
CHL471*	R	R	R	R	MR	MR	R	R	R	R	S
CHL473	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S
X2007A-7*	MR	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S
E2007046A2*	R	R	R	R	R	R	S	S	S	S	S
E2007038A3*	R	R	R	R	R	R	S	S	S	S	S
CHL1743*	MR	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S
RB4*	R	R	R	R	R	R	S	S	S	S	S
RB7	R	R	R	R	R	R	S	S	MS	S	S
RB9	R	R	R	R	R	R	S	S	S	S	S
CHL506*	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S
RB16*	R	R	R	R	R	R	MS	MS	MS	MS	S
RB18*	R	R	R	R	R	R	S	S	S	S	S
CHL645	R	R	R	R	R	R	R	R	R	MR	S
RB11	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S
RB14*	S	S	S	S	R	R	S	S	S	S	S
RB15*	MR	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S
RB17	R	R	R	R	R	R	S	S	MS	S	S
RB22*	MR	R	R	R	R	R	S	S	S	S	S
抗性频率	94.29%	94.29%	94.29%	94.29%	94.29%	94.29%	60.00%	60.00%	60.00%	60.00%	

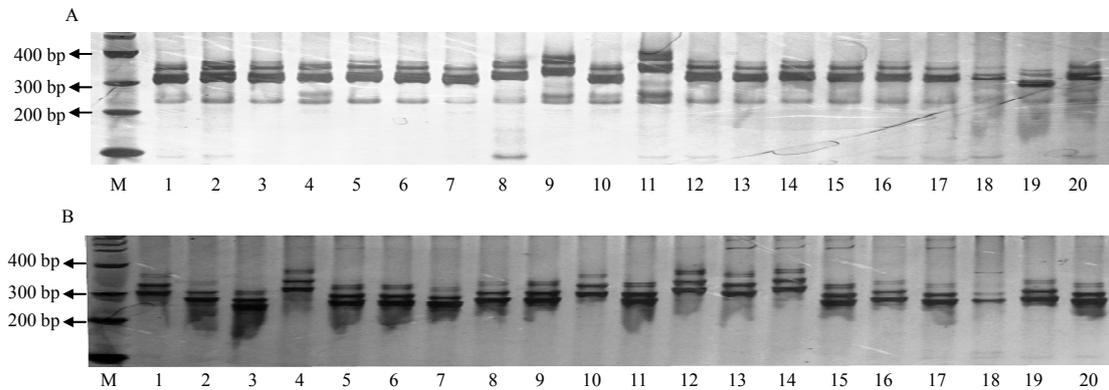
* 为进行遗传多样性分析的稻瘟病菌菌株。

2.2 稻瘟病菌菌株的遗传多样性

利用 13 对 SSR 引物对 20 个不同来源的菌株进行多态性分析(图 1) 筛选出 7 对多态性较高的引物: P43-44、P47-48、P77-78、P83-84、P99-100、

P233-234、P427-428, 在 200~400 bp 区间共扩增出 39 条多态性带型。聚类分析结果将 20 个菌株分为 4 个系谱群。I 型系谱仅有 RB16; II 型系谱仅有 IC-17; III 型系谱包括 CHL471、318-2、193-1-1、

110-2、E2007046A2、CHL438、KJ201、RB22、RB18 等 9 个菌株；IV 型光谱包括 CHL1743、236-2、CHL506、RB4、X2007A-7、RB15、E2007038A3、RB14、CHL440 等 9 个菌株(图 2)。



A 引物 P77-78 对菌株基因型的鉴定结果；B 引物 P99-100 对菌株基因型的鉴定结果；M DNA ladder；1 CHL1743；2 RB16；3 236-2；4 KJ201；5 E2007046A2；6 110-2；7 RB14；8 RB15；9 CHL471；10 E2007038A3；11 318-2；12 RB22；13 CHL506；14 RB18；15 CHL438；16 RB4；17 CHL440；18 193-1-1；19 IC-17；20 X2007A-7。

图 1 SSR 标记对稻瘟病菌菌株的基因型鉴定结果

Fig. 1 Genotyping of rice blast strains with SSR markers

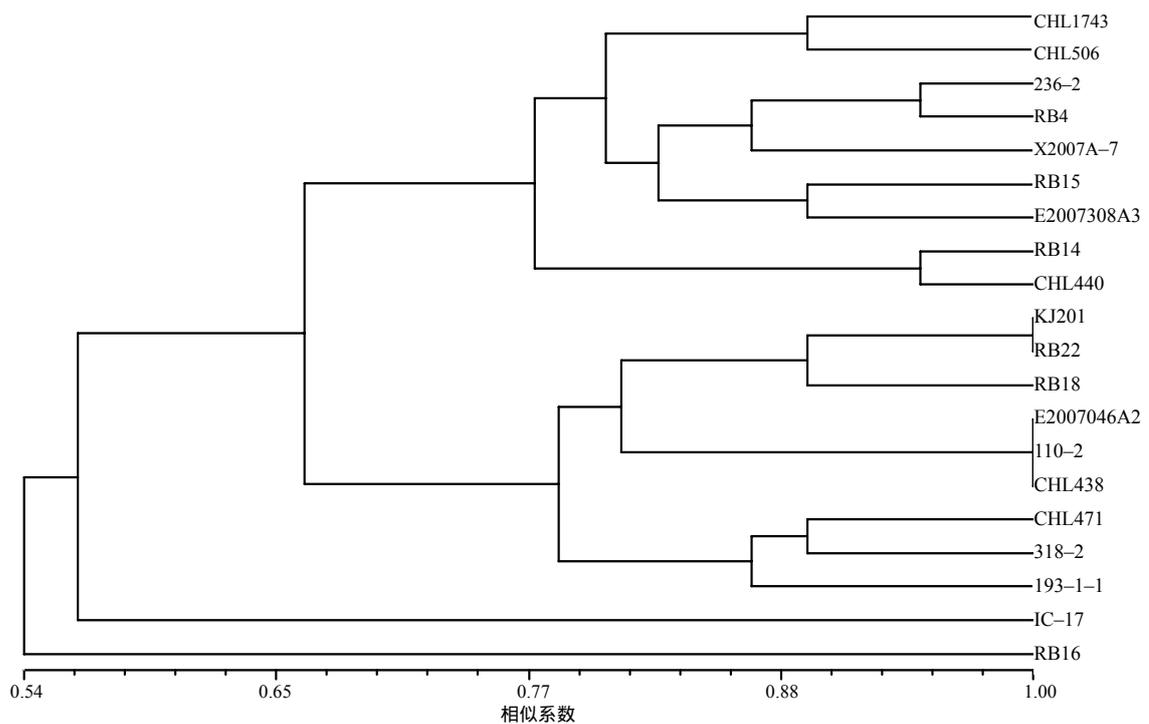


图 2 菌种间的遗传聚类分析结果

Fig. 2 Cluster analysis of the 20 rice blast strains

KJ201 与 RB22 之间，E2007046A2、110-2、CHL438 之间差异极小。CHL1743 与 CHL506 之间，236-2 与 RB4 之间，RB15 与 E2007038A3 之间，RB14 与 CHL440 之间，KJ201、RB22 与 RB18 之间，CHL471 与 318-2 之间差异不显著。RB16 和 IC-17 与其他菌株差异较为显著。来自韩国的菌株 KJ201 与国内菌株 RB22 差异极小，平行进化；国

内菌株 RB16 及菲律宾菌株 IC-17 与其他菌株差异显著，独成一类，证明地理位置并不是造成这些菌种间差异的主要原因。湖南和广东各有 3 个菌株对 *Piz2* 致病，仅有的 2 个湖北菌株对 *Piz2* 均表现致病，236-2、RB4、X2007A-7、E2007038A3 在进化上处于同一分支，且对 *Piz2* 均致病。

3 讨论

使用不同来源的稻瘟病菌菌株对 *Pi9*、*Pi2*、*Pizt* 基因的供体亲本材料与日本晴背景的转基因近等基因系进行接种鉴定, 抗谱结果显示, 转基因株系的抗谱与供体亲本基本一致, 证明 3 个基因在供体亲本中对于抗性的贡献率远大于其他抗性相关基因。对于部分稻瘟病菌菌株, *Pi2* 转基因株系的抗性水平比其供体亲本更高, 这可能是 *Pi2* 与受体材料的其他基因互作的结果。*Pi9*、*Pi2* 的抗谱较广, *Pizt* 抗谱较窄。*Pi2* 与 *Pizt* 是直系同源关系, 亲缘关系较近, 两者仅在 LRR 结构域存在 8 个氨基酸的差异, 但是它们的抗谱差异较大, *Pi2* 的抗性频率达到 94.29%, 而 *Pizt* 仅为 60%。*Pi9* 与 *Pi2/Pizt* 是旁系同源, 它与 *Pi2* 抗性频率同为 94.29%, 但对其致病的菌株是完全不同的, 因此, 抗病基因的亲缘关系与其抗谱的差异大小并没有明显的相关性。对于供试的 20 个稻瘟病菌菌株进行遗传多样性分析, 它们被分为 4 个遗传宗谱, 地理位置并不是造成菌种间差异的主要原因, 但其亲缘关系与致病性有一定的关系。

参考文献:

- [1] Khush G S, Jena K K. Current status and future prospects for research on blast resistance in rice (*Oryza sativa* L.)[C]//Wang G L, Valent B. Advances in Genetics, Genomics and Control of Rice Blast Disease. New York: Springer, 2009: 1-10.
- [2] 孙国昌, 杜新法, 陶荣祥. 水稻稻瘟病防治研究进展和 21 世纪初研究设想[J]. 植物保护, 2000, 6(1): 33-35.
- [3] Zeigler R S, Thome J, Nelson J, et al. Lineage exclusion: A proposal for linking blast population analysis to resistance breeding[C]//Zeigler R S, Teng P S, Leong S A. Rice Blast Disease. Wallingford: CAB International, 1994: 267-292.
- [4] 刘二明, 叶华智, 孙雁, 等. 水稻抗瘟性分类及品种与病菌谱系互作[J]. 湖南农业大学学报: 自然科学版, 2005, 31(2): 147-152.
- [5] 孟军, 赵明富, 何月秋. 稻瘟病菌重组研究概要[J]. 江西农业大学学报, 2005, 27(3): 422-424.
- [6] 刘二明, 刘志贤, 魏林, 等. 湖南两类稻瘟病生态系病菌群体遗传多样性研究[J]. 湖南农业大学学报: 自然科学版, 2003, 29(3): 211-215.
- [7] 文婷, 梁毅, 江南, 等. 利用 *Pi9* 基因序列标记辅助选择改良籼稻稻瘟病抗性[J]. 湖南农业大学学报: 自然科学版, 2012, 38(3): 262-266.
- [8] Liu J L, Wang X J, Mitchell T, et al. Recent progress and understanding of the molecular mechanisms of the rice-*Magnaporthe oryzae* interaction[J]. Mol Plant Pathol, 2010, 11(3): 419-427.
- [9] 勤忠, 林菲, 冯淑杰, 等. 水稻稻瘟病抗性基因的定位及克隆研究进展[J]. 中国农业科学, 2009, 42(5): 1601-1615.
- [10] Qu S H, Liu G F, Zhou B, et al. The broad-spectrum blast resistance gene *Pi9* encodes a nucleotide-binding site-leucine-rich repeat protein and is a member of a multigene family in rice[J]. Genetics, 2006, 172(3): 1901-1914.
- [11] Zhou B, Qu S H, Liu G F, et al. The eight amino-acid differences within three leucine-rich repeats between *Pi2* and *Pizt* resistance proteins determine the resistance specificity to *Magnaporthe grisea*[J]. Mol Plant Microbe Interact, 2006, 19(11): 1216-1228.
- [12] Conaway-Bormans C A, Marchetti M A, Johnson C W, et al. Molecular markers linked to the blast resistance gene *Piz* in rice for use in marker-assisted selection[J]. Theor Appl Genet, 2003, 107(6): 1014-1020.
- [13] Wu J L, Fan Y Y, Li D B, et al. Genetic control of rice blast resistance in the durably resistant cultivar Gumei 2 against multiple isolates[J]. Theor Appl Genet, 2005, 111(1): 50-56.
- [14] Deng Y W, Zhu X D, Shen Y, et al. Genetic characterization and fine mapping of the blast resistance locus *Pigm(t)* tightly linked to *Pi2* and *Pi9* in a broad-spectrum resistant Chinese variety[J]. Theor Appl Genet, 2006, 113(4): 705-713.
- [15] Jeung J U, Kim B R, Cho Y C, et al. A novel gene, *Pi40(t)*, linked to the DNA markers derived from NBS-LRR motifs confers broad spectrum of blast resistance in rice[J]. Theor Appl Genet, 2007, 115(8): 1163-1177.
- [16] Adreit H, Santoso, Andriantsimialona D, et al. Microsatellite markers for population studies of the rice blast fungus, *Magnaporthe grisea*[J]. Molecular Ecology Notes, 2007, 7(4): 667-670.
- [17] Bonman J M, Vergel De Dios T I, Khin M M. Physiologic specialization of *Pyricularia oryzae* in the Philippines[J]. Plant Dis, 1986, 70(8): 767-769.
- [18] 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.

责任编辑: 罗慧敏