

海南稻作区稻瘟病菌 *AvrPik* 等位基因的 变异监测与多样性分析

危艺可¹, 王倩¹, 吴伟怀^{2*}, 陆英², 贺春萍², 梁艳琼², 易克贤^{2*}

(1. 海南大学植物保护学院, 热带农林生物灾害绿色防控教育部重点实验室, 海口 570228; 2. 中国热带农业科学院
环境与植物保护研究所, 农业农村部热带作物有害生物综合治理重点实验室, 海口 571101)

摘要 海南省地处热带。由于具有国内其他地区无可比拟的光温资源优势, 每年有大量的水稻材料在南繁区繁育与种植, 给稻瘟病菌的变异及传播带来了极大的便利。自 20 世纪 70 年代以来, *Pik* 等位基因已被广泛地用作水稻抗稻瘟病育种的主要抗源。为了解海南稻瘟病菌 *AvrPik* 等位基因的变异及多样性, 本研究从海南稻作区采集穗茎瘟病样, 通过单孢分离获得 100 株稻瘟病菌株。利用 *AvrPik* 基因特异性引物扩增病原菌 DNA, 所得 PCR 产物经克隆、测序后与参考序列进行比对分析。结果从 100 株菌株中鉴定出 *AvrPik_A*、*AvrPik_B*、*AvrPik_D*、*AvrPik_E* 和 *AvrPik_F* 共 5 种等位基因类型。其中 *AvrPik_D* 类型最多, 出现频率为 50.00%; 其次为 *AvrPik_E* 类型, 出现频率为 32.08%; 第三为 *AvrPik_B* 类型, 出现频率为 8.49%。在 *AvrPik* 等位基因核苷酸多样性方面, 非信号肽区域多样性要明显高于信号肽区域。就群体受到的选择压而言, 南繁种植区与常规种植区的稻瘟病菌群体的 K_a/K_s 值均大于 1, 分别为 2.703 1 和 1.236 6, 表明, 无论是南繁区还是常规种植区, *AvrPik* 等位基因均受到了强烈的正选择压, 且南繁区群体受到的选择压更强。上述 5 种不同基因型的代表菌株中菌株 20MG48 (*AvrPik_F*) 长势最快, 其产孢量却最少。本研究初步明确了海南稻作区 *AvrPik* 等位基因的群体结构, 为本稻作区抗性品种的布局以及抗瘟育种计划提供参考。

关键词 稻瘟病菌; *AvrPik* 等位基因; 多样性

中图分类号: S 435.111.41 **文献标识码:** A **DOI:** 10.16688/j.zwbh.2021682

Variation monitoring and diversity analysis of *AvrPik* alleles of *Magnaporthe oryzae* in rice-growing areas of Hainan

WEI Yike¹, WANG Qian¹, WU Weihuai^{2*}, LU Ying², HE Chunping², LIANG Yanqiong², YI Kexian^{2*}

(1. College of Plant Protection, Key Laboratory of Green Prevention and Control of Tropical Plant Diseases and Pests, Ministry of Education, Hainan University, Haikou 570228, China; 2. Institute of Environment and Plant Protection, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, Key Laboratory of Integrated Pest Management on Tropical Crops, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Haikou 571101, China)

Abstract Hainan province is located in the tropical region. Because of the incomparable advantages of light and temperature resources in Hainan over the other regions in China, a large number of rice varieties are bred and planted in off-season breeding areas in Hainan every year, which brings great convenience to the variation and transmission of *Magnaporthe oryzae*. The major resistant gene *Pik* for rice blast and its alleles have been extensively exploited as sources of genetic resistance in rice breeding programs since 1970s. In order to understand the variation and diversity of *AvrPik* alleles in *Magnaporthe oryzae* in rice-growing areas of Hainan, 100 *M. oryzae* strains were isolated from the rice growing areas of Hainan. The *AvrPik* genes were cloned from the genomic DNA, sequenced and then compared with the reference sequences. Finally, five main allele genotypes including *AvrPik_A*, *AvrPik_B*, *AvrPik_D*, *AvrPik_E* and *AvrPik_F* were identified. The frequencies of

收稿日期: 2021-12-06 修订日期: 2022-03-15

基金项目: 海南省重大科技计划(zdkj201901)

* 通信作者 E-mail: 吴伟怀 weihuaiwu2002@163.com; 易克贤 yikexian@126.com

AvrPik_D, *AvrPik_E* and *AvrPik_B* were 50.00%, 32.08%, 8.49%, respectively. In terms of the nucleotide diversity of *AvrPik* alleles, the nucleotide diversity of non-signal peptide regions was obviously higher than that of signal peptide regions. In terms of selection pressure on populations, the *Ka/Ks* ratios of *M. oryzae* populations from off-season breeding area and the conventional cultivation area were all greater than 1 (2.703 1 and 1.236 6, respectively). These results indicated that *AvrPik* alleles in both growing areas were subjected to strong positive selection pressure, and the pressure on *AvrPik* alleles in off-season breeding area were stronger than that in the conventional area. The hypha of strain 20MG48 (*AvrPik_F*) grew fastest, but its spore production was the least among the five representative strains. The population structure of *AvrPik* alleles was preliminarily clarified in rice-growing areas of Hainan province, which provides a reference for the planting of resistant varieties and the breeding program for blast resistance in the rice growing area.

Key words *Magnaporthe oryzae*; *AvrPik* alleles; diversity

海南省地处热带,素有“天然大温室”之美称,具有国内其他地区无可比拟的光温资源优势,是我国著名的南繁基地。几十年来,“南繁”在加速水稻品种改良、原原种扩繁和制种方面为国家农业发展做出了巨大贡献。我国育成的杂交水稻新组合中80%以上经过了南繁加代选育。生产上使用品种的更新周期由过去的10年以上缩短到目前的5~7年^[1]。南繁已经成为新品种选育的“孵化器”和“加速器”,而南繁基地则被誉为中国种业的“硅谷”^[2]。与此同时,南繁成为“全国和世界危险性有害生物的汇集地及中转站”的风险也逐渐加大。生物安全将成为南繁最大的威胁,如控制不力,海南将成为有害生物的大“染缸”。就水稻稻瘟病而言,作为水稻新品种培育、种子生产和质量鉴定的南繁基地,每年都有大批的种子、种苗频繁出入基地,给稻瘟病菌的变异及传播带来了极大的便利。

稻瘟病是全球水稻生产上最具毁灭性的病害之一^[3]。种植抗病品种是防治该病最经济、环保的策略。然而,水稻寄主特异抗性的表达不仅取决于该品种本身的抗病基因型,还取决于稻瘟病菌的无毒基因型^[4-5]。因此,准确地了解稻瘟病菌无毒基因的群体结构及其变异规律,是实现抗性品种合理培育与利用,以及病情预测预报所面临的课题。

Pik 位点是位于水稻第11号染色体长臂近端粒处的一个主效抗稻瘟病位点。由于该位点具有 *Pi-k*、*Pi-kp*、*Pi-km*、*Pi-kh* 等多个等位基因^[6-12],且均对水稻稻瘟病具有较高的抗性,因此,自20世纪70年代以来,这些基因被广泛地用作水稻抗稻瘟病育种的主要抗源^[6, 10, 13-14]。目前该位点的合理持续应用仍有很大的挖掘潜力^[6, 13, 15-17]。与 *Pik* 等位基

因对应的无毒基因为 *AvrPi-k/-kp/-km/-kh* (后续简写为 *AvrPik*)^[16, 18-20]。

无毒基因 *AvrPik* 从稻瘟病菌 *Magnaporthe oryzae* 日本菌株 Ina168 中发现,编码由113个氨基酸组成的分泌蛋白,含有2个保守结构域,该蛋白能被水稻抗性基因 *Pik* 编码的蛋白识别,并引起防御响应^[18]。田间稻瘟病菌群体中 *AvrPik* 等位基因既有基因存在/缺失,又有单碱基突变,Yoshida 等检测了日本田间稻瘟病菌菌株的 *AvrPik* 等位基因型,并将不同点突变类型命名为 *AvrPik_A*、*AvrPik_B*、*AvrPik_C*、*AvrPik_D*、*AvrPik_E* 等^[18]。Wu 等分析了来自我国广东、湖南、黑龙江、辽宁的240株稻瘟病菌菌株的 *AvrPik* 等位基因,发现在编码区共存在16个SNP (single nucleotide polymorphism, SNP),其中4个SNP在所测试的菌株中广泛存在,且与 *Pik* 等位基因之间存在阶梯性“军备竞赛”关系^[19]。Zhang 等利用 *Avr* 基因特异性引物对1975年—2009年从美国南部商业农田采集的258株稻瘟病菌基因组DNA进行PCR扩增及测序,检测出 *AvrPik_F*、*AvrPik_G*、*AvrPik_H*、*AvrPik_I*、*AvrPik_J*、*AvrPik_K* 等新类型^[21]。然而,海南作为水稻的南繁区以及重要生产区,其稻瘟病菌无毒基因 *AvrPik* 的群体结构及其变异仍不清楚。为此本文开展了海南稻作区无毒基因群体结构的研究,研究结果将有助于抗瘟材料的创制及应用,对保障国家粮食安全和种业发展安全具有不可替代的作用。

1 材料与方法

1.1 病样采集与单孢分离

在水稻生长季节,从海南三亚、陵水、乐东、保

亭、东方、琼中、白沙、屯昌、琼海、定安、文昌等地水稻田采集穗茎瘟病样。获得的稻瘟病样品于室内常温保湿,24 h 后于超净台上进行单孢分离。用于本研究的 100 个菌株来源信息见表 1。其中 61 个菌株

来自三亚、陵水、乐东、保亭和东方的南繁育种区,39 个菌株来自琼中、白沙、屯昌、琼海、定安和文昌的常规种植区。所获菌株保存于中国热带农业科学院环境与植物保护研究所。

表 1 供试稻瘟病菌株采集信息
Table 1 Collection information of *Magnaporthe oryzae* isolates in this study

菌株号 Strain no.	采集地 Origin
MG14, MG110, MG112~MG116, MG118, MG120~MG123, MG127~MG129, MG131~MG132, MG134, MG146, MG1915, MG1924, MG1927, MG1940, MG1943, MG1976, 20MG142, 20MG158, 20MG167, 20MG168, 20MG172, 20MG183, 20MG189	三亚
20MG43, 20MG48, 20MG51, 20MG54, 20MG56, 20MG63, 20MG66, 20MG69, 20MG71, 20MG81, 20MG87, 20MG99, 20MG102, 20MG103, 20MG105, 20MG108, 20MG122, 20MG131, 20MG136	陵水
MG12, MG15, MG17	乐东
MG24, MG27	保亭
20MG5, 20MG10, 20MG24, 20MG27, 20MG39	东方
MG34, MG35, MG36, MG37	琼中
20MG198, 20MG201, 20MG204, 20MG206, 20MG207, 20MG210	白沙
MG44, MG45, MG47	屯昌
MG42, MG43	琼海
MG54, MG55, MG56, 20MG365, 20MG368, 20MG369, 20MG371, 20MG373, 20MG376, 20MG379, 20MG382, 20MG384, 20MG385	定安
20MG213, 20MG215, 20MG218, 20MG220, 20MG221, 20MG223, 20MG226, 20MG229, 20MG232, 20MG235, 20MG237	文昌

1.2 菌丝体的培养及 DNA 提取

将单孢菌株从 PDA 试管转移至 PDA 平板培养,5 d 后挑取 2~3 个菌丝块于液体培养基(1%葡萄糖,0.3%酵母粉)中,28℃,180 r/min 振荡培养 4~5 d。用灭菌纱布和滤纸过滤收集菌丝体,冻干后于-20℃冰箱中保存备用。病原菌基因组总 DNA 提取参照 OMEGA 真菌 DNA 小量提取试剂盒说明书进行。

1.3 PCR 扩增与 *AvrPik* 基因克隆测序

参照 GenBank 登录号 AB498875~AB498879 的序列设计 *AvrPik* 等位基因的特异性引物 *AvrPik*F (5'-GAAGGTCACGTTTGAAGAGG-3') 和 *AvrPik*R (5'-ATTATCTTATGAGCCGT-CAACCA-3')。引物由英潍捷基(广州)贸易有限公司合成。以该引物扩增各菌株的总 DNA,预期大小为 615 bp。PCR 反应总体积为 20 μ L:包含 10 $\times$ PCR buffer 2 μ L,10 $\times$ dNTPs 1.6 μ L,*rTaq* 酶 0.2 μ L,10 μ mol/L 正、反向引物各 0.5 μ L,模板 DNA 1.0 μ L,ddH₂O 14.2 μ L。PCR 扩增条件为:94℃预变性 3 min;94℃变性 30 s,60℃退火 15 s,72℃延伸 50 s,34 个循环;72℃延伸 5 min,最后于 4℃保存。PCR 产物经 1.2%琼脂糖凝胶电泳检测,

根据扩增产物的纯度直接或回收后与克隆载体 pEASY™连接。连接产物转化大肠杆菌感受态细胞,经蓝白斑筛选后选取 3 个阳性克隆送英潍捷基(广州)贸易有限公司测序。

1.4 *AvrPik* 等位基因的 FNP 分型

每个克隆的序列去除载体序列后,以 AB498875~AB498879 标准序列^[18]作为参考,对编码区第 136、139、143、200、233、234 等 6 个功能性核苷酸多态性位点(functional nucleotide polymorphism, FNP)进行比对。上述位点碱基如与 AB498876 一致则该序列(菌株)记为 *AvrPik*_A 型;如与 AB498877 一致则该序列(菌株)记为 *AvrPik*_B 型;如与 AB498878 一致则该序列(菌株)记为 *AvrPik*_C 型;如与 AB498875 一致则该序列(菌株)记为 *AvrPik*_D 型;如与 AB498879 一致则该序列(菌株)记为 *AvrPik*_E 型。其余类型则参照 Zhang 等^[21]。

1.5 DNA 核苷酸多态性与选择压分析

核苷酸多态性主要由 Tajima's π 指标^[22]来反映。 π 值通过软件 DnaSP version 5.0^[23]计算。选择压通过 *Ka/Ks* 值来反映。利用 DnaSP version 5.0 分别计算 *Ka* (非同义替换率, non-synonymous substitution rate)与 *Ks* (同义替换率, synonymous

substitution rate),进而计算 Ka/Ks 值。如果 $Ka/Ks>1$,则认为存在正选择效应;如果 $Ka/Ks=1$,则认为存在中性选择效应;如果 $Ka/Ks<1$,则认为存在负选择效应。

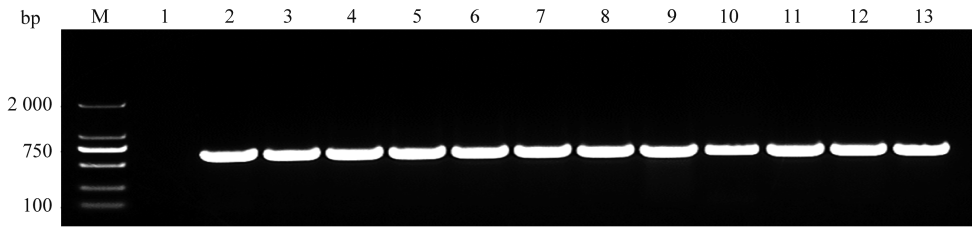
1.6 具有不同 *AvrPik* 等位基因类型菌株培养观察
经序列比对筛选,选取具有不同 *AvrPik* 等位基因类型的菌株,于 PDA 平板上培养,10 d 后测量菌落直径。于超净台中,加少量灭菌蒸馏水用药勺将气生菌丝刮洗干净,置于自制产孢箱 28℃ 培养 2~4 d,加 1 mL 灭菌双蒸水(ddH₂O)配制孢子悬浮

液,于显微镜下观察分生孢子形态,通过血球计数板计算产孢量。

2 结果与分析

2.1 *AvrPik* 等位基因关键 FNP 位点分型

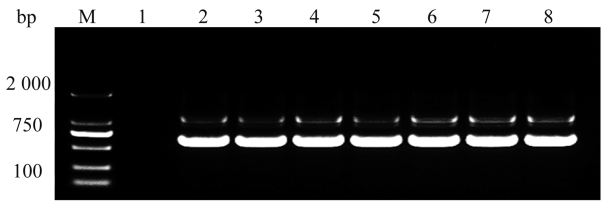
利用 *AvrPikF*/*AvrPikR* 引物扩增菌株 DNA,100 个菌株 DNA 中有 93 个菌株 DNA 扩增出预期大小(615 bp)的特异条带(图 1),其余 7 个菌株扩增出双条带,其中一条与目标条带大小一致(615 bp),另外一条略大于目标条带(1 115 bp)(图 2)。



M: DL2000分子量标准; 1: ddH₂O对照; 2-13: 依次为菌株MG14、MG110、MG112、MG113、MG114、MG115、MG116、MG118、MG120、MG121、MG122和MG123的*AvrPik*基因条带
M: DL 2000 DNA marker; 1: ddH₂O control; 2-13: *AvrPik* gene fragments amplified from MG14, MG110, MG112, MG113, MG114, MG115, MG116, MG118, MG120, MG121, MG122, and MG123 strains, respectively

图 1 部分稻瘟病菌株的 *AvrPikF*/*AvrPikR* 引物扩增结果

Fig. 1 *AvrPik* gene fragments of some *Magnaporthe oryzae* strains amplified by *AvrPikF*/*AvrPikR* primers



M: DL2000分子量标准; 1: ddH₂O对照; 2-8: 依次为菌株20MG102、20MG103、20MG105、20MG108、20MG122、20MG131和20MG136的扩增条带
M: DL 2000 DNA marker; 1: ddH₂O control; 2-8: Fragments amplified from 20MG102, 20MG103, 20MG105, 20MG108, 20MG122, 20MG131, and 20MG136 strains, respectively

图 2 部分稻瘟病菌株 *AvrPikF*/*AvrPikR* 引物扩增出双条带
Fig. 2 Double bands amplified by *AvrPikF*/*AvrPikR* primers in some *Magnaporthe oryzae* strains

93 个条带单一菌株的 PCR 产物克隆后经测序比对发现,其中 6 个菌株(20MG158、20MG167、20MG201、20MG204、20MG206、MG42)存在两种不同类型的 *AvrPik* 等位基因,因此共得到 99 条 DNA 序列。而 7 个双条带的菌株(20MG102、20MG103、20MG105、20MG108、20MG122、20MG131、20MG136),经胶回收测序后序列比对表明,同一样品的两个条带均含有完整且相同的 *AvrPik* 等位基因,只是比目标条带大的条带(1 115 bp)在编码区终

止密码子后有一个 500 bp 的序列插入,故均只保留目标条带序列用于后续分析。

最终,从供试的 100 个菌株中共获得了 106 条 *AvrPik* 等位基因序列。其中来自南繁区菌株序列 63 条,常规种植区菌株序列 43 条。经与已报道的参考序列进行比对,在 342 bp 的编码区中存在 6 个 FNP 位点(# 136、# 139、# 143、# 200、# 233、# 234)。最终鉴定出 *AvrPik_A*、*AvrPik_B*、*AvrPik_D*、*AvrPik_E*、*AvrPik_F* 共 5 种 *AvrPik* 等位基因型(表 2)。其中 *AvrPik_D* 检出最多,其检出频率为 50.00%,为优势类型;其次为 *AvrPik_E*,其检出频率为 32.08%。然而,在这 106 条菌株序列中没有检测到 *AvrPik_C* 类型。

2.2 *AvrPik* 等位基因核苷酸多样性与选择压分析

将测序获得的 106 条序列输入 MEGA 软件进行比对,发现 *AvrPik* 等位基因的编码区中共存在 62 个 SNP 位点,其中 9 个同义突变(# 43、# 87、# 96、# 111、# 150、# 162、# 246、# 249、# 279),53 个非同义突变。非同义突变中 C136A、C139G、G143A、C200A、T233A、G234A 位点普遍存在,即关键的 6 个 FNP 位点。

表 2 *AvrPik* 等位基因 FNP 位点分析¹⁾

Table 2 FNP position analysis of *AvrPik* alleles

菌株及参考序列 Strain and reference sequence	功能性核苷酸 多态性位点(FNP) Functional nucleotide polymorphism position						编码氨基酸位点 Encoded amino acid position					等位基因型 Allele genotype	出现频率/% Frequency of haplotype
	136	139	143	200	233	234	46	47	48	67	78		
AB498875	C	C	G	C	T	G	H	P	G	A	M	<i>AvrPik_D</i>	—
AB498876	A	G	A	C	T	G	N	A	D	A	M	<i>AvrPik_A</i>	—
AB498877	A	G	A	C	T	A	N	A	D	A	I	<i>AvrPik_B</i>	—
AB498878	A	C	G	A	T	G	N	P	G	D	M	<i>AvrPik_C</i>	—
AB498879	A	C	G	C	T	G	N	P	G	A	M	<i>AvrPik_E</i>	—
—	A	G	A	C	A	G	N	A	D	A	K	<i>AvrPik_F</i> ^[21]	—
20MG56, 20MG69	A	G	A	C	T	G	N	A	D	A	M	<i>AvrPik_A</i>	1. 89
MG14, MG1940, MG1943, MG1976, 20MG142, 20MG168, 20MG172, 20MG183, 20MG189	A	G	A	C	T	A	N	A	D	A	I	<i>AvrPik_B</i>	8. 49
MG112, MG115, MG116, MG118, MG120, MG121, MG122, MG123, MG127, MG128, MG129, MG131, MG132, MG134, MG146, MG1915, MG1924, MG1927, 20MG158-1, 20MG167-1, 20MG66, 20MG102, 20MG103, 20MG105, 20MG108, 20MG122, 20MG131, 20MG136, MG17, MG27, 20MG5, 20MG10, MG34, MG35, MG36, MG37, 20MG201-1, 20MG204-1, 20MG206-2, 20MG207, 20MG210, MG42-1, 20MG365, 20MG368, 20MG379, 20MG385, 20MG218, 20MG220, 20MG221, 20MG223, 20MG226, 20MG229, 20MG232	C	C	G	C	T	G	H	P	G	A	M	<i>AvrPik_D</i>	50. 00
MG110, MG113, MG114, 20MG158-2, 20MG167-2, 20MG51, MG12, MG15, MG24, 20MG24, 20MG27, 20MG39, 20MG198, 20MG201-2, 20MG204-2, 20MG206-1, MG44, MG45, MG47, MG42-2, MG43, MG54, MG55, MG56, 20MG369, 20MG371, 20MG373, 20MG376, 20MG382, 20MG384, 20MG213, 20MG215, 20MG235, 20MG237	A	C	G	C	T	G	N	P	G	A	M	<i>AvrPik_E</i>	32. 08
20MG43, 20MG48, 20MG54, 20MG63, 20MG71, 20MG81, 20MG87, 20MG99	A	G	A	C	A	G	N	A	D	A	K	<i>AvrPik_F</i>	7. 55

1) 第 136、139、143、200 位核苷酸分别对应 46、47、48 以及 67 位氨基酸,而第 233 和 234 位核苷酸共同编码 78 位氨基酸。
Nucleotides at position 136, 139, 143 and 200 correspond to amino acids at position 46, 47, 48 and 67, respectively, while nucleotides at 233 and 234 encode amino acids at position 78.

进一步从结构域与群体水平方面分析 *AvrPik* 等位基因核苷酸多样性。在结构域水平上,整个编码区共检测到 62 个 SNP 位点,其中 7 个来自信号肽区,55 个来自非信号肽区。非信号肽区的核苷酸多样性(0. 008 92)明显高于信号肽区(0. 002 97)。

表明 *AvrPik* 等位基因核苷酸多样性在这两个结构域之间存在明显差异(表 3)。在群体方面,南繁区与常规种植区群体检测出变异位点数分别为 43 个和 24 个,其对应的核苷酸多样性也是南繁区(0. 009 26)高于常规种植区(0. 005 02)(表 3)。

表 3 *AvrPik* 等位基因核苷酸多样性分析¹⁾

Table 3 Nucleotide diversity analysis of *AvrPik* alleles

结构域或群体 Domain or population			变异位点数 Number of variation sites	核苷酸多态性 Nucleotide polymorphism	<i>K_a</i>	<i>K_s</i>	<i>K_a/K_s</i>
结构域	Domain	编码区	62	0. 007 82	50. 148 7	22. 666 1	2. 212 5
		非信号肽区	55	0. 008 92	56. 405 8	27. 451 3	2. 054 8
		信号肽区	7	0. 002 97	20. 741 0	6. 433 8	3. 223 8
群体	Population	南繁区	43	0. 009 26	21. 290 7	7. 876 5	2. 703 1
		常规种植区	24	0. 005 02	4. 776 7	3. 862 8	1. 236 6

1) *K_a* 为非同义替换率,*K_s* 为同义替换率。
K_a represents non-synonymous substitution rate; *K_s* represents synonymous substitution rate.

结构域与群体的 Ka/Ks 检验表明, Ka/Ks 值在非信号肽区与信号肽区分别为 2.054 8 与 3.223 8。可见 *AvrPik* 等位基因受到正选择压作用(表 3)。在群体方面,南繁区(2.703 1)的 Ka/Ks 值明显高于常规种植区(1.236 6)。表明,南繁区的 *AvrPik* 等位基因受到了强烈的正选择压,且强于常规种植区受到的选择压(表 3)。

2.3 不同 *AvrPik* 等位基因的菌株生长特性比较

经序列比对确认后,选取只在 6 个 FNP 位点存在差异(其余位点均一致)的菌株,即 20MG56 (*AvrPik_A*)、20MG189 (*AvrPik_B*)、20MG108 (*AvrPik_D*)、20MG27 (*AvrPik_E*)、20MG48

(*AvrPik_F*)共 5 个菌株进行表型观察。培养 10 d 后,5 个菌株的菌落形态均为圆形;除 20MG27 (*AvrPik_E*)菌丝体为黑灰色外,其余菌株菌丝均为灰白色(图 3)。在生长速率方面,菌株 20MG48 (*AvrPik_F*)生长最快,其平均菌落直径为 65.8 mm;菌株 20MG189 (*AvrPik_B*)生长最慢,其平均菌落直径为 46.9 mm(表 4)。显微镜观察显示,各个菌株的孢子形态无差异。在产孢方面,菌株 20MG189 (*AvrPik_B*)和 20MG108 (*AvrPik_D*)的产孢量较大,平均产孢数分别为 8.75×10^7 个/皿和 8.55×10^7 个/皿;菌株 20MG48 (*AvrPik_F*)的产孢量最少,平均产孢数为 9.0×10^6 个/皿(表 4)。

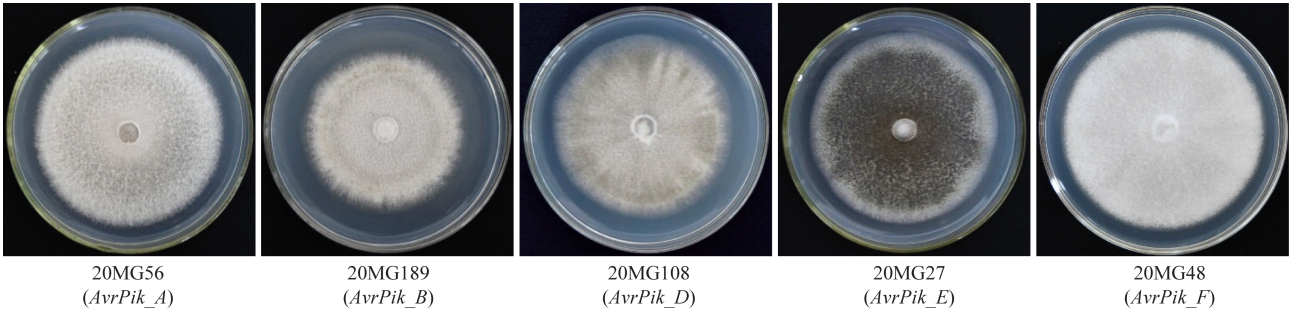


图 3 不同 *AvrPik* 等位基因稻瘟病菌菌株在 PDA 培养基上培养 10 d 的菌落形态

Fig. 3 Colony characteristics of *Magnaporthe oryzae* isolates with different *AvrPik* alleles cultured on PDA medium for 10 days

表 4 含不同 *AvrPik* 等位基因稻瘟病菌菌株的
菌落生长与产孢特性¹⁾

Table 4 Characteristics of colony growth and sporulation of *Magnaporthe oryzae* isolates with different *AvrPik* alleles

菌株编号 Strain no.	平均菌落直径/mm Average colony diameter	平均产孢量/ $\times 10^6$ 个 $\cdot$ 皿 ⁻¹ Average sporulation
20MG56	(59.3 $\pm$ 4.61)ab	(23.5 $\pm$ 5.28)b
20MG189	(46.9 $\pm$ 0.66)c	(87.5 $\pm$ 16.26)a
20MG108	(56.4 $\pm$ 3.01)ab	(85.5 $\pm$ 15.19)a
20MG27	(52.7 $\pm$ 2.40)bc	(20.0 $\pm$ 5.65)b
20MG48	(65.8 $\pm$ 3.15)a	(9.0 $\pm$ 1.70)b

1) 同列不同小写字母表示不同菌株间差异显著($P < 0.05$)。
Different lowercase letters in the same column indicate significant differences among different strains at 0.05 level.

3 结论与讨论

海南省虽然不是中国的稻米生产大省,但得天独厚的气候优势使其成为全国杂交水稻种子生产大省。海南杂交水稻种子生产优势区域规划面积约为 1.27 万 hm^2 ,主要集中在北部的临高,南部的乐东、三亚、陵水及周边地区^[1]。与南繁基地形成鲜明对

比的是,常规水稻生产分布于全岛,多为小农户生产模式,管理粗放,部分稻田稻瘟病、白叶枯病、稻飞虱、稻纵卷叶螟等病虫害发生严重^[2]。由于水稻生产在海南尚未形成一个高效产业,故在水稻病虫害防控及科研投入方面还比较薄弱。针对海南稻瘟病菌的研究主要侧重于水稻品种对稻瘟病的抗性调查、鉴定与评价方面^[2, 24]。

然而,无论是南繁育种区还是常规水稻种植区,稻瘟病均是水稻生产所面临的障碍。因此,系统、准确地了解海南稻瘟病菌的群体遗传结构及其变异规律是一个不可回避的课题。朱名海等对 6 个无毒基因(*ACE1*、*AvrPia*、*AvrPik*、*AvrPita*、*AvrPiz-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了 PCR 检测,初步明确了这 6 个无毒基因在南繁区稻瘟病菌菌株中的分布规律^[25]。本研究利用 *AvrPik* 基因特异性引物对海南稻作区分离的 100 株穗茎瘟菌株进行 DNA 扩增并对 PCR 产物进行克隆和序列分析。结果鉴定出 *AvrPik_A*、*AvrPik_B*、*AvrPik_D*、*AvrPik_E* 和

AvrPik_F 共 5 种主要等位基因类型,其中 *AvrPik_D* 类型最多,出现频率为 50.00%。2012 年 Kanzaki 等^[26]对来自欧洲(3 个)、美洲(6 个)、非洲(7 个)、亚洲(23 个)共计 39 个稻瘟病菌菌株的 *AvrPik* 等位基因型进行了分析,其中 *AvrPik_D* 为主要类型,本研究结果与其一致。不同的是 Kanzaki 等没有检测出 *AvrPik_B* 类型,而本研究未检测出 *AvrPik_C* 类型。Li 等对我国云南省东南、西南、东北以及西北稻作区的 366 个稻瘟病菌株进行检测,发现 *AvrPik* 等位基因检出率为 66.7%~90.3%,并且除 *AvrPik_A*、*B*、*C*、*D*、*E* 类型之外,还鉴定出 5 个不同的等位基因类型^[27]。由此可见,*AvrPik* 等位基因存在地理分化,在不同水稻生产区出现了不同的变异,因此在生产应用过程中,种植含有 *Pik* 等位基因抗性品种时,应掌握目标区域 *AvrPik* 等位基因类型的组成和分布情况,科学地进行水稻稻瘟病抗性品种布局,有的放矢地开展抗瘟育种工作。

对南繁区与常规种植区病原菌群体核苷酸多样性及其所承受的选择压分析表明,南繁区病原菌 *AvrPik* 等位基因的核苷酸多样性与选择压均高于常规种植区。其原因可能是两个区域稻种资源的抗性水平存在差异。与常规种植区相比,南繁区稻种资源更丰富,每年有大量包括 *Pik* 等位基因在内的抗源材料或抗性品种进入南繁区选育、加代种植等。而在稻瘟病菌与水稻长期协同进化过程中,*AvrPik* 等位基因受到了水稻抗性基因 *Pik* 的定向选择,与此同时,*AvrPik* 等位基因为了逃避 *Pik* 等位基因的识别产生了更加丰富的变异。

本研究观察了 5 个含有不同 *AvrPik* 等位基因型的代表菌株的生长特性和产孢能力。结果表明,5 个菌株在菌落生长以及产孢能力方面存在一定差异。这一结果与郭敬玮等对云南罗平 120 个田间稻瘟病菌株性状研究结果一致^[28]。本研究中 5 个菌株的差异是否与 *AvrPik* 等位基因型相关联,还有待选取更多的田间菌株进行培养比较,以及进一步通过克隆与遗传转化,获得单个基因的阳性克隆子进行深入研究。

参考文献

- [1] 钟兆飞. 海南省杂交水稻种子产销情况分析[J]. 杂交水稻, 2014, 29(3): 35-37.
- [2] 唐清杰, 严小微, 孟卫东. 海南水稻生产现状分析及发展对策[J]. 杂交水稻, 2015, 30(1): 1-5.
- [3] ZHANG Shijie, XU Jinrong. Effectors and effector delivery in *Magnaporthe oryzae* [J/OL]. PLoS Pathogens, 2014, 10(1): e1003826. DOI: 10.1371/journal.ppat.1003826.
- [4] ZHANG Shulin, WANG Ling, WU Weihuai, et al. Function and evolution of *Magnaporthe oryzae* avirulence gene *AvrPib* responding to the rice blast resistance gene *Pib* [J/OL]. Scientific Reports, 2015, 5(1): 11642. DOI: 10.1038/srep11642.
- [5] ORTIZ D, GUILLEN K D, CESARI S, et al. Recognition of the *Magnaporthe oryzae* effector AVR-Pia by the decoy domain of the rice NLR immune receptor RGA5 [J]. Plant Cell, 2017, 29(1): 156-168.
- [6] 陈子强, 田大刚, 梁廷敏, 等. 229 份水稻品种及重要育种材料抗稻瘟病 *Pik* 位点基因型鉴定[J]. 福建农业学报, 2016, 31(6): 553-559.
- [7] SHARMA T R, MADHAV M S, SINGH B K, et al. High-resolution mapping, cloning and molecular characterization of the *Pik-h* gene of rice, which confers resistance to *Magnaporthe grisea* [J]. Molecular Genetics and Genomics, 2006, 274(6): 569-578.
- [8] LI Luoye, WANG Ling, JING Jinxue, et al. The *Pik^m* gene, conferring stable resistance to isolates of *Magnaporthe oryzae*, was finely mapped in a crossover-cold region on rice chromosome 11 [J]. Molecular Breeding, 2007, 20(2): 179-188.
- [9] XU Xin, HAYASHI N, WANG Chuntai, et al. Efficient authentic fine mapping of the rice blast resistance gene *Pik-h* in the *Pik* cluster, using new *Pik-h*-differentiating isolates [J]. Molecular Breeding, 2008, 22(2): 289-299.
- [10] WANG Ling, XU Xiaoke, LIN Fei, et al. Characterization of rice blast resistance genes in the *Pik* cluster and fine mapping of the *Pik-p* locus [J]. Phytopathology, 2009, 99(8): 900-905.
- [11] YUAN Bin, ZHAI Chun, WANG Wenjuan, et al. The *Pik-p* resistance to *Magnaporthe oryzae* in rice is mediated by a pair of closely linked CC-NBS-LRR genes [J]. Theoretical & Applied Genetics, 2011, 122(5): 1017-1028.
- [12] ZHAI Chun, ZHANG Yu, YAO Nan, et al. Function and interaction of the coupled genes responsible for *Pik-h* encoded rice blast resistance [J/OL]. PLoS ONE, 2014, 9(6): e98067. DOI: 10.1371/journal.pone.0098067.
- [13] 张羽, 冯志峰, 崔明珠, 等. 稻瘟病抗性基因 *Pik-m* 在陕西省稻种资源中的分布状况[J]. 分子植物育种, 2013, 11(3): 311-316.
- [14] ZHAI Chun, LIN Fei, DONG Zhongqiu, et al. The isolation and characterization of *Pik*, a rice blast resistance gene which emerged after rice domestication [J]. New Phytologist, 2011, 189(1): 321-334.
- [15] 刘辉, 孟德龙, 查日扬, 等. 江苏水稻品种稻瘟病主效抗性基因鉴定及应用评价[J]. 福建农业学报, 2015, 30(5): 452-458.
- [16] ZDRZAEK R, KAMOUN S, TERAUCHI R, et al. The rice NLR pair *Pik-p-1/Pik-p-2* initiates cell death through receptor

- cooperation rather than negative regulation [J/OL]. PLoS ONE, 2020, 15 (9): e0238616. DOI: 10.1371/journal.pone.0238616.
- [17] PENG Zhirong, LI Ling, WU Shenghai, et al. Frequencies and variations of *Magnaporthe oryzae* avirulence genes in Hunan province, China [J]. Plant Disease, 2021, 105(12): 3829–3834.
- [18] YOSHIDA K, SAITOH H, FUJISAWA S, et al. Association genetics reveals three novel avirulence genes from the rice blast fungal pathogen *Magnaporthe oryzae* [J]. Plant Cell, 2009, 21(5): 1573–1591.
- [19] WU Weihuai, WANG Ling, ZHANG Shu, et al. Stepwise arms race between *AvrPik* and *Pik* alleles in the rice blast pathosystem [J]. Molecular Plant Microbe Interactions, 2014, 27 (8): 759–769.
- [20] MAIDMENT J H R, FRANCESCHETTI M, MAQBOOL A, et al. Multiple variants of the fungal effector AVR-*Pik* bind the HMA domain of the rice protein OsHIPP19, providing a foundation to engineer plant defense [J/OL]. Journal of Biological Chemistry, 2021, 296: 100371. DOI: 10.1016/j.jbc.2021.100371.
- [21] ZHANG Zhen, JIA Yulin, WANG Yanli, et al. A rapid survey of avirulence genes in field isolates of *Magnaporthe oryzae* [J]. Plant Disease, 2020, 104(3): 717–723.
- [22] TAJIMA F. Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism [J]. Genetics, 1989, 123 (3): 585–595.
- [23] LIBRADO P, ROZAS J. DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data [J]. Bioinformatics, 2009, 25(11): 1451–1452.
- [24] 唐清杰, 王效宁, 云勇, 等. 海南普通野生稻稻瘟病的抗性鉴定与评价[J]. 中国野生植物资源, 2010, 29(6): 8–10.
- [25] 朱名海, 赵美, 舒灿伟, 等. 南繁区稻瘟病菌无毒基因的检测[J]. 华中农业大学学报, 2017, 36(4): 21–25.
- [26] KANZAKI H, YOSHIDA K, SAITOH H, et al. Arms race co-evolution of *Magnaporthe oryzae* AVR-*Pik* and rice *Pik* genes driven by their physical interactions [J]. The Plant Journal, 2012, 72(6): 894–907.
- [27] LI Jinbin, WANG Qun, LI Chengyun, et al. Novel haplotypes and networks of AVR-*Pik* alleles in *Magnaporthe oryzae* [J/OL]. BMC Plant Biology, 2019, 19(1): 204. DOI: 10.1186/s12870-019-1817-8.
- [28] 郭敬玮, 肖倩, 李怡然, 等. 云南罗平田间稻瘟菌株性状及无毒基因研究[J]. 植物病理学报, 2021, 51(2): 235–247.
- (责任编辑: 杨明丽)
-
- (上接 31 页)
- [99] LU Bai, LIU Qingchao, CEN Yijing, et al. A new sesquiterpene lactone glucoside and other constituents from *Inula sal-soioides* with insecticidal activities on striped flea beetle (*Phyllotreta striolata* Fabricius) [J]. Natural Product Research, 2018, 32(5): 552–557.
- [100] 杨舒媚, 郑维娜, 王玉焱, 等. 苦瓜叶提取物对黄曲条跳甲成虫的拒食作用[J]. 中国生物防治学报, 2010, 26(S1): 34–39.
- [101] 颜振敏, 侯有明, 罗万春. 马缨丹提取物对黄曲条跳甲成虫的生物活性[J]. 昆虫知识, 2005(6): 664–668.
- [102] 陈焕瑜, 胡珍娣, 包华理, 等. 植物源杀虫剂对黄曲条跳甲的控制效果[J]. 广东农业科学, 2013, 40(5): 76–77.
- [103] 郑丽祯, 傅建伟, 陈小龙, 等. 黄曲条跳甲对毒死蜱敏感性差异的生化机制[J]. 昆虫知识, 2009, 46(2): 256–259.
- [104] 李美. 黄曲条跳甲 P450 基因介导抗吡蚜灵机制的研究[D]. 广州: 仲恺农业工程学院, 2015.
- [105] 郑岩明, 刘霞, 姜莉莉, 等. 噻虫胺等七种杀虫剂对黄曲条跳甲的毒力[J]. 农药学报, 2015, 17(2): 230–234.
- [106] SHEN Guangmao, OU Shiyuan, HE Chu, et al. Full length sequencing reveals novel transcripts of detoxification genes along with related alternative splicing events and lncRNAs in *Phyllotreta striolata* [J/OL]. PLoS ONE, 2021, 16 (3): e0248749. DOI: 10.1371/journal.pone.0248749.
- [107] LUNDIN O. Consequences of the neonicotinoid seed treatment ban on oilseed rape production - What can be learnt from the Swedish experience? [J]. Pest Management Science, 2021, 77(9): 3815–3819.
- [108] 熊腾飞, 林庆胜, 冯夏. 种子丸粒化包衣处理后氟啶虫胺胍的消解动态及对黄曲条跳甲的防控效果[J]. 应用昆虫学报, 2019, 56(4): 826–831.
- [109] 张静, 陈利标, 闫超, 等. 2%噻虫胺·氟氯氰菊酯颗粒剂对黄曲条跳甲的防治效果[J]. 热带作物学报, 2019, 40(8): 1606–1610.
- [110] 陈秀, 张正炜, 赵莉, 等. 5 种杀虫剂对青菜黄曲条跳甲的毒力测定及田间药效[J]. 植物保护, 2020, 46(2): 272–275.
- [111] 陈海燕, 秦双, 林珠凤, 等. 1.0%联苯菊酯·噻虫胺颗粒剂防治芥菜黄曲条跳甲田间药效试验[J]. 农业开发与装备, 2019(4): 109.
- [112] 吴燕君, 赵蓁, 杨春萍, 等. 新型药剂对速生叶菜上叶甲科害虫的控制效果[J]. 浙江农业科学, 2020, 61(2): 272–274.
- [113] 狄蕊, 吴水祥, 聂宁, 等. 溴氰虫酰胺等 4 种农药防治小青菜黄曲条跳甲的效果[J]. 浙江农业科学, 2020, 61(2): 284–285.
- [114] 王果红, 刘光华, 熊艺霖, 等. 10%溴虫氟苯双酰胺悬浮剂防治甘蓝黄曲条跳甲试验[J]. 现代农业科技, 2021(12): 116–117.
- [115] 李霜霜, 钟春燕. 黄曲条跳甲化学防治研究现状[J]. 南方农业, 2019, 13(18): 18–19.
- [116] NAGALINGAM T, COSTAMAGNA A C. Two methods for rearing the striped flea beetle *Phyllotreta striolata* (Coleoptera: Chrysomelidae) under laboratory conditions [J]. The Canadian Entomologist, 2019, 151(5): 677–683.
- (责任编辑: 杨明丽)