

辽宁省主栽水稻品种抗稻瘟病基因的鉴定及分析

王 妍^{1,2}, 郑文静², 王 辉², 张丽霞², 王世维³, 赵家铭², 刘志恒¹

(¹ 沈阳农业大学植物保护学院, 沈阳 110161; ² 辽宁省农业科学院, 沈阳 110161; ³ 中国农业大学, 北京 100193)

摘要: 鉴定主栽水稻品种及育种骨干亲本的抗瘟基因型, 有助于了解不同抗病基因在品种中的分布, 为抗病品种选育及品种布局提供参考。本研究选取辽宁省 24 份水稻材料, 根据 7 个抗稻瘟病基因的保守区设计引物, 扩增各品种的编码区序列, 对扩增的序列进行对比分析, 鉴定各基因在 24 个品种中的分布情况。结果表明: 辽宁省 24 个主栽水稻品种均不携带 *Pi21*/*Pi36*/*Pi37* 或其抗病等位基因, 而 *Pid2*/*Pid3*/*Pita* 和 *Pik*/*Piks*/*Pikm*/*Pikp* 在 24 个品种中以不同突变类型及不同频率出现, 其中, 在 2 个品种中检测到 *Pid2* 抗病基因及 *Pid3* 的抗病等位基因; 4 个品种检测到 *Pita* 的抗病等位基因, *Pita* 的等位基因中新发现的几处碱基突变并未影响抗病基因的功能; 所有品种中均无与 *Pik* 及其复等位基因完全一致的序列, 但利用携带 *AVR-pik* 的稻瘟病菌接种鉴定结果表明, 辽粳 454 和沈农 265 携带的 *Pik* 等位基因可能仍具有抗病基因功能。

关键词: 辽宁省; 主栽水稻品种; 抗病基因; 鉴定分析

Identification and Analysis of Rice Blast Resistance Gene Alleles in 24 Rice Cultivars from Liaoning Province

WANG Yan^{1,2}, ZHENG Wen-jing², WANG Hui², ZHANG Li-xia²,
WANG Shi-wei³, ZHAO Jia-ming², LIU Zhi-heng¹

(¹ Plant Protection College, Shenyang Agriculture University, Shenyang 110161;

² Liaoning Innovation Center of the Academy of Agriculture Sciences, Shenyang 110161;

³ Department of Plant Pathology, China Agricultural University, Beijing 100193)

Abstract: Identification on rice blast resistance genes in main rice cultivars would contribute to understand the distribution of resistance genes, which can guide rice disease resistant varieties breeding and cultivating. In this study, 24 cultivars from Liaoning province were used to study the distribution of resistance genes and the function of their alleles. Primers were designed according to the conservative region sequence of nine genes to amplify the coding region of 24 cultivars. The amplification results from 24 cultivars were compared, which suggested that the 24 cultivars from Liaoning province did not carry the *Pi21*/*Pi36*/*Pi37* and their resistant alleles. However, *Pid2*, *Pid3*, *Pita* and *Piks*/*Piks*/*Pikm*/*Pikp* existed in the 24 varieties with different genotypes and mutation frequencies. Among these resistance genes, the resistance alleles of *Pid2* and *Pid3* were detected in 24 cultivars. The alleles of *Pita* were detected in four cultivars and the new mutations did not change the function of the *Pita*. The same sequences of *Piks*/*Piks*/*Pikm*/*Pikp* were not found in the 24 cultivars. After being inoculated with rice blast fungus carried *AVR-Pik*, Liaojing454 and Shennong265 were all resistant to the pathogens, which showed that the alleles carried by Liaojing454 and Shennong265 might serve resistance functions.

Key words: Liaoning province; main rice cultivars; resistance genes; identification analysis

收稿日期: 2014-12-19 修回日期: 2015-01-15 网络出版日期: 2015-04-10

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.4996.S.20150410.1613.008.html>

基金项目: 辽宁省博士启动基金项目 (20121143, 2013020074)

第一作者研究方向为植物病原真菌学。E-mail: 8806wy@163.com

通信作者: 郑文静, 研究方向为分子植物病理学。E-mail: zwj27@126.com

刘志恒, 研究方向为植物病原真菌学。E-mail: lzhh1954@163.com

水稻是世界上最重要的粮食作物之一,稻瘟病(*Pyricularia grisea* CAV.)是由稻瘟病菌(*Magnaporthe oryzae*)引起的广泛发生在世界各稻区的主要病害,发病后致使产量损失严重,在晨露时间较长的山区或丘陵地区甚至经常出现颗粒无收的现象^[1],严重影响了水稻生产及粮食安全。产生这种现象一方面是由于目前生产上推广的水稻品种多不携带主效抗稻瘟病基因;另一方面,由于稻瘟病菌变异较快,很多已经定位或克隆的抗病基因容易对流行的菌株丧失抗性,因此育成具有主效抗病基因或多基因聚合的水稻品种对稻瘟病的控制尤为重要。

目前已至少报道了 68 个抗稻瘟病位点共 83 个主效基因,这些基因成簇地分布于除水稻第 3 染色体外的所有染色体上(http://www.ricedata.cn/gene/gene_pi.htm, 2012-6-20.)。其中,最大的 3 个基因簇分别位于水稻的第 6、11 和 12 染色体。如第 6 染色体上已定位了 14 个抗性基因,第 11 染色体上定位了 22 个抗性基因,第 12 染色体上则已定位了 16 个抗性基因。已克隆的稻瘟病抗性基因有 23 个,分别为 *Pb1*、*Pia*、*Pib*、*Pid2*、*Pid3*、*Pik*、*Pik-h*、*Pi54*、*Pik-m*、*Pik-p*、*Pish*、*Pit*、*Pita*、*Piz-t*、*Pil*、*Pi2*、*Pi5*、*Pi9*、*pi21*、*Pi25*、*Pi36*、*Pi37*、*Pi56*、*PiCO39*。稻瘟病抗性基因 *Pik* 位于第 11 染色体长臂,是 *Pik* 座位上 5 个等位基因中的 1 个,对许多中国稻瘟病小种有较强的、稳定的抗性。*Pik* 与其他几个复等位基因之间有 2 个重要的氨基酸差异位点,229 I/252 II^[2]。*Pik-1* 和 *Pik-2* 2 个基因的组合是表达 *Pik* 抗性所必需的^[3]。*Pita* 基因编码一个长度为 928 个氨基酸的细胞质膜受体蛋白,该蛋白含 NBS 结构域和富亮氨酸结构域(LRD),感病水稻品种中的 *Pita* 等位基因与抗性水稻品种中 *Pita* 等位基因仅有 1 个氨基酸残基的差别,即在第 918 氨基酸处,抗病品种是丙氨酸而感病品种则是丝氨酸^[4]。*Pi2*、*Pi9*、*Pi50*、*Pigm*、*Piz*、*Piz-t* 同为 *Piz* 位点上的复等位基因。*Pi9* 抗谱相当广,对来自 13 个国家的 43 个稻瘟病菌株均表现出很高的抗性^[5]; *Pi2* 也为广谱抗病基因,对从中国收集的 792 个稻瘟小种中的绝大部分表现抗性^[6]。*Pi2* 与 *Piz-t* 的编码产物仅在 3 个 LRRs 区域有 8 个氨基酸的差异;而在这 8 个突变氨基酸中,仅有 1 个位于 xxLxLxx 基序中^[7]。*Pid2* 定位于水稻第 6 染色体上近着丝粒区域,其抗感差异是因一个单碱基突变造成的,即抗病蛋白的第 441 位氨基酸由异亮氨酸(I)突变为感病蛋白的甲硫氨

酸(M)^[8]。在大部分被测的粳稻品种中 *Pid3* 基因转录起始位点开始的第 2208 位核苷酸处的 CAG 被突变为 TAG,导致粳稻中的 *Pid3* 基因成为了假基因。同时,这个位点的突变却没有在籼稻、非洲栽培稻或是 AA 组的野生稻中被检测到。这些结果都说明粳稻品种 *Pid3* 假基因化是发生在籼稻分化以后的。*Pi36* 定位于水稻第 8 染色体短臂上,其抗性的产生是由于第 590 个氨基酸发生了置换(丝氨酸取代天冬氨酸)^[9]。*Pi37* 位于水稻第 1 染色体长臂上,抗性的获得是因第 239 位(丙氨酸突变为缬氨酸)和第 247 位氨基酸(蛋氨酸突变为异亮氨酸)发生置换引起的^[10]。

选育具有特定抗稻瘟病基因的水稻品种,需首先对育种亲本所具有的抗稻瘟病基因进行准确鉴定,之后再通过杂交、回交等结合分子标记辅助选择来育成抗病水稻品种。植物与病原菌在长期的选择中共同进化,为适应不断变化的病原菌致病型,植物的抗病基因也在发生不断的变化(Arme-race)^[11],从而在此过程中可以出现多种有利的抗病等位基因。相反,有些品种的抗病基因退化后无法识别病原物的激发子,在共同演化的过程中就会慢慢退出品种种植的舞台。因此,鉴定水稻品种中抗稻瘟病的基因,了解基因的突变频率和规律,并鉴定不同基因型的抗病性,发现抗性较强的抗病等位基因类型,对于抗病品种的选育具有重要意义。目前在水稻品种稻瘟病抗病基因鉴定中广泛应用的方法以分子标记为主,如时克等^[12]利用源于 *Pita* 和 *Pib* 基因本身的特异性分子标记检测分析了我国 58 份水稻主栽品种的 *Pita* 和 *Pib* 抗性基因型,结果表明 4 个籼稻品种携带 *Pita* 和 *Pib* 2 个基因;4 个籼稻品种和 5 个粳稻品种携带抗性基因 *Pita*;5 个籼稻品种和 2 个粳稻品种携带抗性基因 *Pib*。殷得所等^[13]开发出了与 *Pi9* 基因紧密连锁的共显性 STS 标记 PB9-1,用于 *Pi9* 基因的分子标记辅助选择,结合田间农艺性状和分子标记辅助选择,培育出 8 个 *Pi9* 基因纯合的回交后代株系。随着分子生物学及生物信息学技术的发展,芯片及测序技术也开始应用于植物的基因型鉴定。我国水稻种质资源丰富,但目前仍缺乏对这些水稻品种的遗传多样性分析、精准表型和基因型鉴定。每份水稻品种中所携带的抗病基因及等位基因的变异尚不清楚,不同等位基因的频率、分布和效应更无从得知。这已经成为开发标记、克隆基因和改良品种所遇到的瓶颈。因此,探索合适的抗稻瘟病基因鉴定的方法、开发连锁程度较高的标记,

鉴定具有抗病功能的等位基因等对于水稻抗稻瘟病育种具有重要意义。

本研究选取辽宁省 24 个主栽水稻品种,鉴定了 *Pi21*、*Pi36*、*Pi37*、*Pid2*、*Pid3*、*Pita* 和 *Pik/piks/pikm/pikp* 在这些品种中的基因突变状况,并利用含有相应无毒基因的稻瘟病菌接种,鉴定了不同等位基因的抗病性。研究结果可为抗病品种选育及不同抗病基因的进化研究提供参考。

1 材料与方法

1.1 供试水稻材料

供试水稻材料主要包括辽宁省近 10 年的主栽品种或育种骨干亲本,均由辽宁省农科院作物分子改良实验室提供(表 1)。

表 1 供试水稻品种
Table 1 Rice varieties in this study

序号 Number	品种名 Varieties	序号 Number	品种名 Varieties
1	秋田小町 Qiutianxiaoding	13	辽农 979 Liaonong 979
2	丽江新团黑谷 LTH	14	盐粳 456 Yanjing 456
3	辽粳 454 Liaojing 454	15	辽粳 371 Liaojing 371
4	辽盐 241 Liaoyan 241	16	千重浪 2 号 Qianchonglang 2
5	秋光 Qiuguang	17	沈稻 7 Sehndao 7
6	辽粳 294 Liaojing 294	18	沈农 265 Shennong 265
7	盐丰 47 Yanfeng 47	19	铁粳 4 Tiejing 4
8	C418	20	辽盐 2 Liaoyan 2
9	辽星 1 Liaoxing 1	21	越光 Yueguang
10	辽粳 9 Liaojing 9	22	港源 8 号 Gangyuan 8
11	辽粳 101 Liaojing 101	23	港育 129 Gangyu 129
12	辽开 79 Liaokai 79	24	辽粳 287 Liaojing 287

1.2 抗病鉴定圃田间自然鉴定稻瘟病抗性

于病害重发区辽宁省东港市大孤山镇抗病鉴定圃进行田间自然鉴定,该地区雾露时间长,水稻出穗期的日平均气温达到 22~26℃,具有利于发病的地理环境条件,历年稻瘟病发生均非常严重。供试品种为 1 个小区,插 5 行,每行 10 丛,行株距为 30 cm×16 cm,2 次重复。病圃四周插植 3~6 行诱发品种 C418。在水稻全生育期保持适当水层,适当增施一些氮肥,根据病圃害虫、杂草发生种类和程度使用杀虫剂、除草剂,不喷施杀菌剂。于 9 月末(蜡熟期)调查各品种穗颈瘟发生的情

况,按全国稻瘟菌生理小种联合试验组制定的统一标准进行记载和评定。

1.3 人工接种鉴定

1.3.1 稻瘟病菌产胞培养 将稻瘟病菌分别移植于燕麦片番茄汁琼脂培养基上,25~27℃条件下培养 5~7 d,待菌丝长满后,用灭菌的棉签擦掉气生菌丝后保湿培养,稻瘟病菌会产生大量孢子。

1.3.2 喷雾接种鉴定 待鉴别品种稻苗长至 4 叶 1 心时,将上述扩繁培养的各菌株分生孢子分别用 120 mL 无菌水清洗,用双层纱布过滤装入三角瓶中,配制孢子悬液(浓度为 120 倍显微镜视野下有 20 个左右孢子),分别隔离喷雾接种。接种后 24 h,用塑料膜覆于塑料盘上方的铁架上保湿,在塑料膜上覆盖遮阳网防止阳光直射。

1.3.3 致病反应型调查 于接种后 10 d 调查,致病反应型参照全国稻瘟病菌科研协作组统一标准进行评定。

1.4 水稻基因组提取

采用改良的 CTAB 法进行水稻基因组 DNA 提取^[14],并保存于-20℃备用。

1.5 引物设计

在线查找抗稻瘟病基因的序列(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>),利用 Primer 6.0 软件,根据两基因的 CDS 序列设计引物,由北京奥科生物科技有限公司合成,引物序列见表 2。

1.6 PCR 扩增及电泳

利用表 2 的引物,对 24 个品种中的抗病基因进行检测,PCR 反应体系如下:2×Taq PCR Master Mix10 μL, F 引物 1 μL, R 引物 1 μL,模板 DNA 1 μL,加 ddH₂O 至总体积 20 μL。

PCR 反应程序为:95℃预变性 5 min;95℃变性 30 s,55~61℃退火 1 min,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,34 个循环,72℃延伸 5 min。

5 μL PCR 产物与 1 μL 6×Loading buffer 混合液混合后,在 1% 琼脂糖凝胶中电泳,goldview 染色后,在凝胶成像系统下拍照。

1.7 PCR 产物测序及序列比对

PCR 产物委托上海美吉生物科技有限公司完成测序,为保证序列的准确性,利用 F 和 R 引物对扩增子分别测序,2 次重复,测序后根据 Chromas 峰图确认序列的结果,采用 DNAMAN 及 ClustalX version 1.83 软件对测序结果进行比对分析。

表 2 抗病基因 CDS 序列引物

Table 2 Primer pairs utilized for amplifying the CDS region of genes

基因名称 Genes name	引物 Primer		引物序列 Primer sequences(5' - 3')
<i>Pita</i>	Primer1	F	GCTAGATGACTACTACCTCCTC
		R	TATCTTGCAA ATGCGTCCGG ATA
	Primer2	F	CCTG TAGCTTTGGC ATGCTGTGG
		R	TCATTCCGAG CGACGATTCT TTG
	Primer3	F	ACTTCATGTT TGTCTGTACA
		R	TCAAACAATC ATCAAGTCAG
<i>Pikm1/pikp1/piks1/pikl</i>	Primer1	F	ATGGAGGCGGCTGCCATGGC
		R	ACCATATGGT GTGCTAAGTG TA
	Primer2	F	CATCTCATCGACAACATATCAGC
		R	ACTGATTGGA GTGTTCTCTCA CGT
	Primer3	F	AAGCT CTGATCAACG GTATTCCA
		R	GAGATTATCA TGCTGTGCCT GTG
<i>Pikm2/pikp2/piks2/pik2</i>	Primer1	F	ATGGAGTTGGTGGTAGGTGCTTC
		R	TCCTGCAGCC TGATTGGTGT ATT
	Primer2	F	TCCTCTTGATTGATGACATTTGG
		R	ATATCTCCGT CATATGTCTC TCT
	Primer3	F	GACCTGCCTAAGTCAATAGTCCAG
		R	TCATGCAGTGACGATGCCATCAAC
<i>Pi36</i>	Primer1	F	TCAACCACAGCTAGCTAGCAAGC
		R	GAGCTCCTGT ACAGTCAACA TCT
	Primer2	F	AGGTTGCAACAATTATCAGCG
		R	TTATGTAGAC AGCCTAAGGA C
	Primer3	F	CTACCTGTGTGGATTAACATC
		R	GTTGATATGA TGGTCGACTA CGT
<i>Pi37</i>	Primer1	F	CAC TTGTTACAGCTGCAGTAGT
		R	TGGAAGTACA TCTCGTCTAG AAG
	Primer2	F	ATTCCTTACATAGGCAAGCTATC
		R	GAATGACCAA GTATCTAAGA TTG
	Primer3	F	GAAGCTATGTGTATACAAC
		R	CATAACCTCA GGCACCTGAC
<i>Pi21</i>	Primer1	F	ATGGGTATATTGGTCATCTTGG
		R	CTTCACGTCG TACTCCACCT
	Primer2	F	ACTGCAAGCTGGTGCCGTAC
		R	TCACATGATG GAGCAGGCGTT
<i>Pid3</i>	Primer1	F	TGGCCAGTGAAGCAGTGCAGGT
		R	GCGTCCAATG CACACAATTGCG
	Primer2	F	GAATTATGATGTGGCGTTACTT
		R	GCTTGGAGAT TTTAGTACGCCT
	Primer3	F	TTGTAAAGCTTCCATTGGCGAT
		R	GAATGAATGT CCTGACTGA
<i>Pid2</i>	Primer1	F	GTAGTATGCTCCTCAGCTATAT
		R	TCGAAGCCGG CGTATAACATCA
	Primer2	F	GATATGTAGGCACTAACTTCTTC
		R	GAGCATCACTGTTGTAGTCCGAC

由于部分基因含有内含子,扩增全序列测序准确率差,所以将外显子区域分段分别扩增测序
Some genes contained introns which produced poor accuracy when these genes were amplified,so the exon region were seperated to amplify and sequence

2 结果与分析

2.1 辽宁省 24 个水稻主栽品种抗稻瘟病表型鉴定

2012–2013 年连续 2 年于病害重发区抗病鉴定圃对 24 个水稻品种及骨干亲本进行田间诱发鉴定,结果表明 2 年的鉴定结果基本一致,其中表现高抗的品种有 4 个,分别为辽开 79、辽农 979、港源 8 号及港育 129;另外,辽粳 454、辽粳 294、铁粳 4、辽粳 9、沈农 265 及盐粳 456 也对稻瘟病表现中抗至抗病;而其余 14 个品种均表现中感至高感,其中无抗稻瘟病基因的丽江新团黑谷 2 年的鉴定结果均为高感,表明抗病鉴定圃的田间鉴定结果可靠(表 3)。

表 3 24 个品种 2012–2013 年田间表型鉴定
Table 3 Identification of 24 cultivars under natural conditions in 2013 and 2012

序号 No.	品种名称 Varieties name	2012 年 In 2012	2013 年 In 2013	综合抗性 Comprehensive resistance
1	秋田小町 Qiutianxiaoding	S	S	MS
2	丽江新团黑谷 LTH	HS	HS	S
3	辽粳 454 Liaojing 454	MR	MR	MR
4	辽盐 241 Liaoyan 241	S	S	S
5	秋光 Qiuguang	MS	S	S
6	辽粳 294 Liaojing 294	MR	MR	MR
7	盐丰 47 Yanfeng 47	S	S	S
8	C418	HS	HS	HS
9	辽星 1 Liaoxing 1	S	S	S
10	辽粳 9 Liaojing 9	R	R	R
11	辽粳 101 Liaojing 101	MS	S	S
12	辽开 79 Liaokai 79	HR	HR	HR
13	辽农 979 Liaonong 979	HR	HR	HR
14	盐粳 456 Yanjing 456	HR	R	R
15	辽粳 371 Liaojing 371	S	S	S
16	千重浪 2 号 Qianchonglang 2	S	S	S
17	沈稻 7 Shendao 7	MR	MS	MS
18	沈农 265 Shennong 265	R	R	R
19	铁粳 4 Tiejing 4	MR	MR	MR
20	辽盐 2 Liaoyan 2	MS	MS	MS
21	越光 Yueguang	S	S	S
22	港源 8 号 Gangyuan 8	HR	HR	HR
23	港育 129 Gangyu 129	HR	HR	HR
24	辽粳 287 Liaojing 287	MS	S	S

2.2 抗病基因的序列扩增结果及分析

2.2.1 抗稻瘟病基因 *Pita* 在 24 个水稻品种中的分布情况

以 24 个品种的 DNA 为模板,将 *pita* 抗病基因的 CDS 序列分成 3 段扩增,电泳结果显示 24 个供试品种均可扩增出特定大小的 DNA 片段,测序结果表明,与已公布的基因序列相比,24 个品种中共检测到 31 个 SNP,其中同义突变有 8 个,非同义突变 23 个,表明 *Pita* 抗病基因所处区域多态性较为丰富。根据氨基酸序列的差异,24 个品种的序列可分为 15 种单体型(图 1–A),其中港源 8 号(22)与已公布的 *Pita* 的 CDS 序列一致。而辽粳 454(3)、辽粳 9(10)及沈农 265(18 种)在第 918 位氨基酸处为丙氨酸,与已报道的 *Pita* 抗病等位基因一致,但在其他区域仍存在 69 个碱基的差异。为明确几个品种携带的等位基因是否仍具有抗病基因的功能,本研究采用具无毒基因 *AVR-pita*(I、II、III、IV)的稻瘟病菌对辽粳 454、沈农 265、辽粳 9 及港源 8 号分别接种,结果显示 4 个品种对 4 个菌株均表现为抗病(图 1–B),表明这几个品种所携带的等位基因均可识别无毒基因 *AVR-pita*,仍具有抗病基因的功能,可能是本研究发现的 *pita* 抗病等位基因的新类型。其余 20 个品种在第 918 位氨基酸处均为丝氨酸,表明这些品种均不携带 *Pita* 抗病基因或其抗病等位基因。

2.2.2 抗病基因 *Pik* 及其复等位基因 *piks/pikp/pikm* 在 24 个品种中的的序列鉴定及分析

以 24 个主栽水稻品种的 DNA 为模板,根据 CDS 序列设计引物,电泳结果显示 24 个供试品种均可扩增出特异性片段。为了鉴定多态性位点,利用 ClustalX 多重序列比对软件比较了 24 个品种的测序结果(图 2–A)。据报道,抗病基因 *Pik* 被定位在第 11 条染色体上,*Pik* 座上包含至少 5 个复等位基因,*Pik*、*Pik-m*、*Pik-p*、*Pik-h* 和 *Pik-s*,且需 *pik1* 和 *pik2* 2 个基因共同起作用^[15]。氨基酸序列比对的结果显示,*Pik2* 在所有品种中检测到的等位基因类型都与报道的序列一致。但是,*Pik1* 在所有品种中检测到的等位基因类型根据第 229 和 252 位氨基酸的不同可分为 2 类。其中,沈农 265、辽粳 454、盐粳 456、港源 8 号、港育 129 和沈稻 7 在 229 位和 252 位氨基酸处是 E/H,与 *Pik* 一致,但辽粳 454 和沈农 265 中检测到的 *Pik* 等位基因与 *Pik* 仍有 6 个氨基酸的差异。本研究将这 2 个品种接种携带无毒基因 *Avr-Pik-D* 的稻瘟菌,结果显示,这 2 个品种都对稻瘟菌表现抗病,因此,认为这 2 个品种所携带的 *Pik* 等位

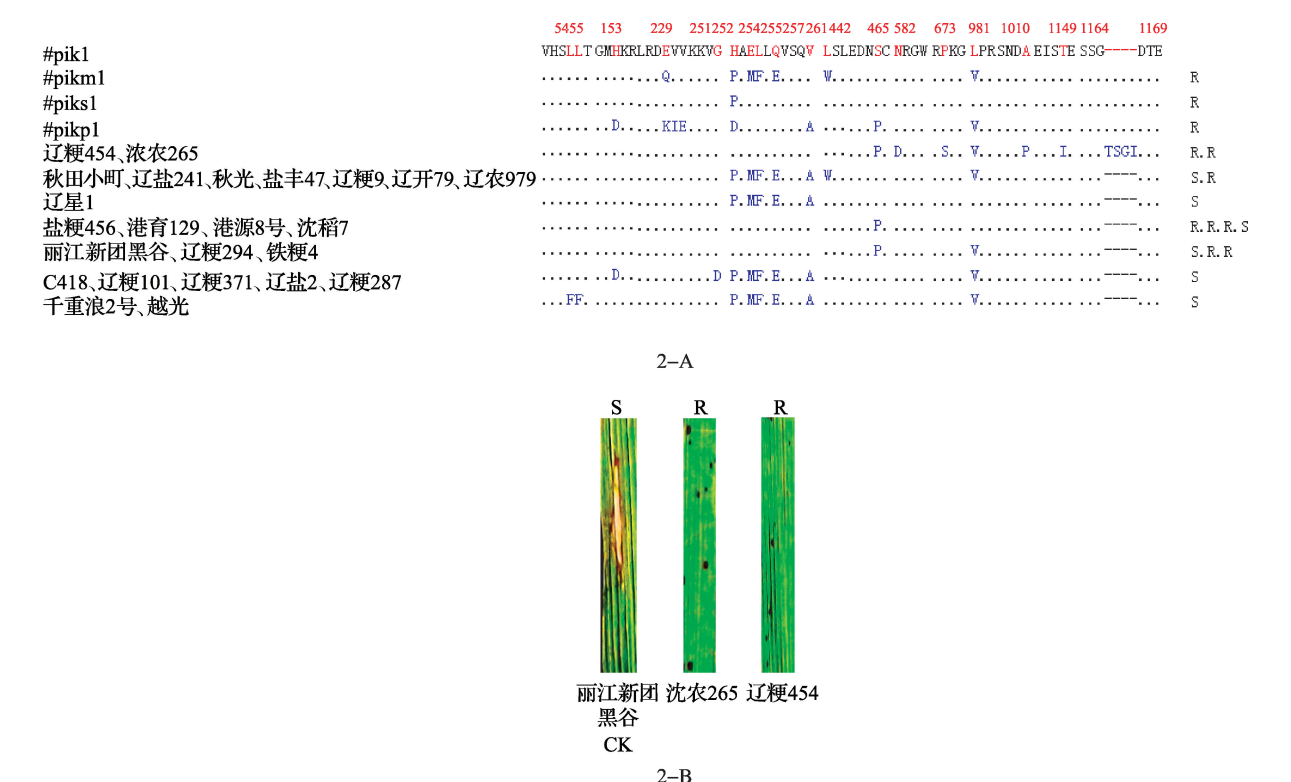


图 2 *Pik/Piks/Pikp/Pikm* 的氨基酸序列比较和接种鉴定

Fig. 2 Amino acids sequence comparison and inoculation result to *Pik/Piks/Pikp/Pikm* gene

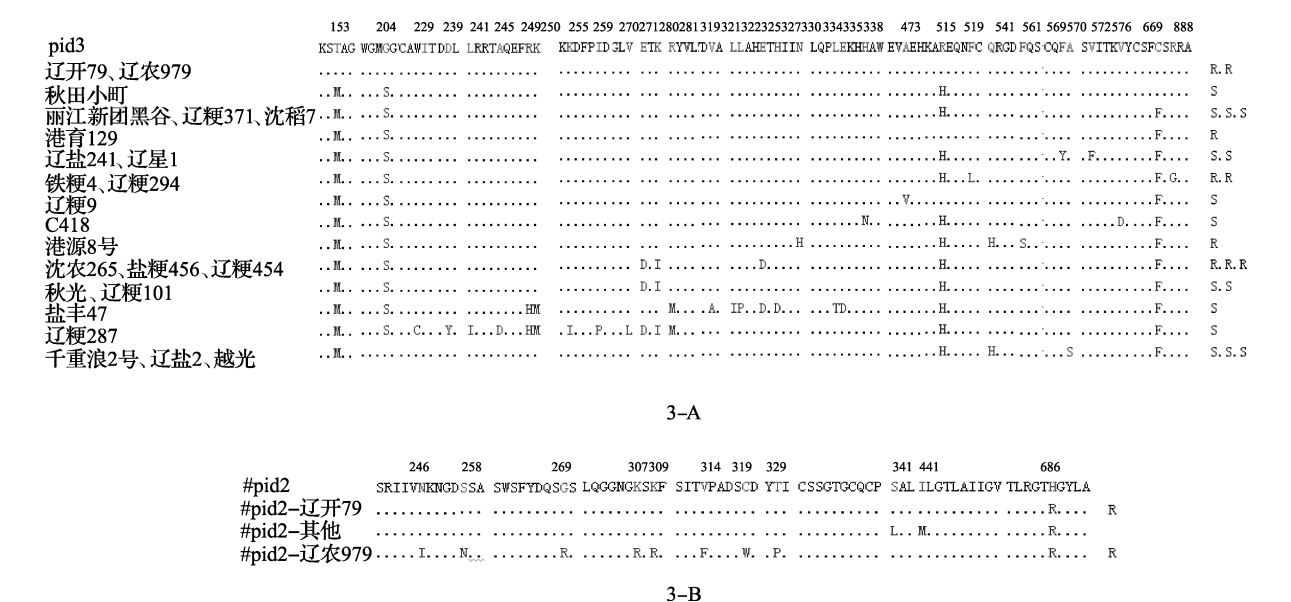


图 3 *Pid2*、*Pid3* 的氨基酸序列比较

Fig. 3 Amino acids sequence comparison result to *Pid2/Pid3* gene

基因,与 *Pi21* 抗病基因相比,没有与 *Pi21* 基因组完全一致的序列(图 4),结果表明参试品种均不携带 *Pi21* 抗病基因。

2.2.5 抗稻瘟病基因 *Pi36*、*Pi37* 在 24 个水稻品种中的分布情况 根据该基因序列设计引物,对 24 个品种进行扩增,发现所有参试品种均存在特异性扩增产物。对扩增产物测序后结果表明,参试的所有品种 2 个基因的特异性位点均与感病等位基因一致^[9-10],故判断参试的水稻品种均不携带 *Pi36* 和 *Pi37* 抗病基因(图 5)。

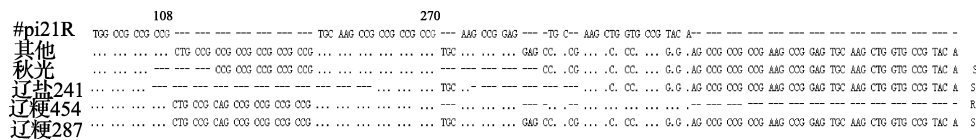


图4 *Pi21* 的氨基酸序列比较

Fig. 4 Amino acids sequence comparison result to *Pi21* gene

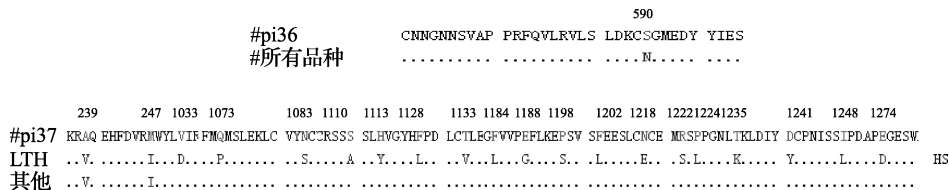


图5 *Pi36*/*Pi37* 的氨基酸序列比较

Fig. 5 Amino acids sequence comparison result to *Pi36* and *Pi37* gene

3 讨论

3.1 不同稻瘟病基因在进化上的差异

不同的抗病基因具有不同的进化模式。根据抗病基因之间序列交换的频率,抗病基因可分为 Type I 类和 Type II 两类^[17]。Type I 类抗病基因同源体之间发生频繁的序列交换,通常以嵌合体形式存在,而这种特定的嵌合体在自然界中出现的频率很低,基因之间没有明显的等位关系。Type II 类抗病基因相对比较保守,同源体之间很少发生序列交换,通常只有点突变和缺失突变的差异,基因之间有明显的等位关系。序列交换是抗病基因进化的重要因素。在玉米、生菜、亚麻和番茄中,基因簇内的同源体之间都能检测到频繁的序列交换,且这些基因的进化类型多属于 Type II 类^[18-26]。本研究发现,10 个抗稻瘟病基因均以不同等位基因的形式存在于各品种中,在进化上应属于 Type II 类。但 10 个基因所在位点发生重组互换的频率差异较大,如 *Pita*、*Pid3*、*Pik* 及 *Pi21*, 24 个品种中分别检测到 17 种、15 种、9 种及 5 种等位基因,发生重组的几率较高;而 *Pi36*、*Pi37* 和 *Pid2* 基因在进化上相对保守,如 *Pi36* 的等位基因在 24 个品种中均只检测到一种类型,即参试 24 个水稻品种中该基因处序列完全一致,且均为感病等位基因型。*Pi37* 和 *Pid2* 两个基因也只检测到两种类型。这种差异可能与基因间的序列相似性、物理距离以及是否成簇分布有关^[27]。

3.2 抗稻瘟病基因与稻瘟病菌无毒基因的共同进化

植物与病原菌之间的互动遵循的是经典的基因对基因学说^[28],当病原菌的无毒基因可被相应的抗病基因识别时可引发局部防卫反应,这种防御反应

包含一个局部的、快速的细胞死亡,被称为 HR 反应,伴随着产生一些抗菌化合物、木质素形成和氧化破裂^[29]。无毒基因通过快速地演变以适应 R 基因的进化。植物抗病基因对无毒基因的识别促进了其相应无毒基因的突变,这种突变一般为非同义突变^[30]。研究表明,无毒基因也可能通过其他途径,使得病原菌能够逃避寄主植物的识别而导致植物丧失抗性^[31]。无毒基因的进化,被认为是在无毒基因-抗病基因互作(直接或间接互作)中起着至关重要的作用^[32]。

W. W. Lu 等^[33]的研究表明,抗病基因 *Pik* 与无毒基因 *AVR-pik* 间存在明显的协同进化关系,且遵循 Arm-race 进化模式。本研究中, *Pita* 基因在 24 个品种中鉴定出 15 种基因型,包含 31 个 SNP, *Pik* 抗病基因在 24 个品种中也鉴定出 7 种基因型,结果表明,2 个基因在北方的水稻品种间遗传差异明显,多态性丰富。此前,笔者及其团队曾对 2012-2013 年辽宁省各地区稻瘟病菌的无毒基因型做过研究,结果表明当地病原菌所携带的 *AVR-Pita* 包含 6 种类型,且序列与已克隆基因均存 9~11 个 SNP,变异能力较强^[34]; *Avr-Pik* 也检测到 4 种类型。综合分析辽宁省主栽水稻品种携带的抗病基因及病原菌携带的无毒基因鉴定结果,可以看出在辽宁省的水稻品种及稻瘟病菌中 *Pita* 与 *AVR-pita*、*pik* 与 *AVR-pik* 间亦存在 Arm-race 协同进化的分子模式。

水稻对稻瘟病的抗性符合“基因对基因”互作的分子机制,且 R 基因和 AVR 基因的互作表现为品种对小种的专化性抗性,所以水稻的抗病性常因病原菌基因型的变化而丧失,因此鉴定水稻品种的抗稻瘟病基因型,挖掘具有抗病功能的新的等位基因尤其重要。虽然我国种质库现存的水稻资源非常丰

富,但仍缺乏对这些种质资源的精准表型鉴定、遗传多样性分析和基因型鉴定。每个品种所包含的基因和它的等位基因以及不同等位基因的频率、分布和效应尚不清楚,这已成为开发标记、克隆基因和分子设计育种的瓶颈。因此,挖掘新基因和寻找优异等位基因将是今后研究的重点。

参考文献

- [1] 陈能刚,陈惠查,阮仁超,等. 水稻抗稻瘟病种质资源的研究进展[J]. 贵州农业科学,2010,38(12):7-10
- [2] Costanzo S, Jia Y L. Sequence variation at the rice blast resistance gene *Pi-km* locus: Implications for the development of allele specific markers[J]. Plant Sci, 2010, 178(6): 523-530
- [3] Zhai C, Lin F, Dong Z Q, et al. The isolation and characterization of *Pik*, a rice blast resistance gene which emerged after rice domestication[J]. New Phytol, 2011, 189(1): 321-334
- [4] Bryan G T, Wu K S, Farrall L, et al. A single amino acid difference distinguishes resistant and susceptible alleles of the rice blast resistance gene *Pi-ta* [J]. Plant Cell, 2000, 12 (11): 2033-2046
- [5] 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]. Mol Genet Genomics, 2002, 267(4): 472-480
- [6] Chen H L, Chen B T, Zhang D P, et al. Pathotypes of *Pyricularia grisea* in rice fields of central and southern China[J]. Plant Dis, 2001, 85(8): 843-850
- [7] Zhou B, Qu S H, Liu G F, et al. The eight amino-acid differences within three leucine-rich repeats between *Pi2* and *Piz-t* resistance proteins determine the resistance specificity to *Magnaporthe grisea* [J]. Mol Plant-Microbe In, 2006, 19(11): 1216-1228
- [8] Chen X W, Shang J J, Chen D X, et al. A B-lectin receptor kinase gene conferring rice blast resistance[J]. Plant J, 2006, 46(5): 794-804
- [9] Liu X Q, Lin F, Wang L, et al. The in silico map-based cloning of *Pi36*, a rice coiled coil nucleotide binding-site-leucine-rich-repeat gene that confers race-specific resistance to the blast fungus[J]. Genetics, 2007, 176(4): 2541-2549
- [10] Lin F, Chen S, Que Z, et al. The blast resistance gene *Pi37* encodes a nucleotide binding site-leucine-rich repeat protein and is a member of a resistance gene cluster on rice chromosome 1 [J]. Genetics, 2007, 177(3): 1871-1880
- [11] Paterson S, Vogwill T, Buckling A, et al. Antagonistic coevolution accelerates molecular evolution [J]. Nature, 2010, 464 (7286): 275-278
- [12] 时克,雷财林,程治军,等. 稻瘟病抗性基因 *Pita* 和 *Pib* 在我国水稻主栽品种中的分布[J]. 植物遗传资源学报,2009,10(1):21-26
- [13] 殷得所,夏明元,李进波,等. 抗稻瘟病基因 *Pi9* 的 STS 连锁标记开发及在分子标记辅助育种中的应用[J]. 中国水稻科学, 2011, 25(1): 25-30
- [14] 邱福林,王和和,陈洁,等. 利用于水稻突变体大量筛选的 DNA 微量快速提取法 [J]. 中国水稻科学, 2006, 20 (3): 329-332
- [15] Ashikawa I, Hayashi N, Yamane H, et al. Two adjacent nucleotide-binding site-leucine-rich repeat class genes are required to confer *Pikm*-specific rice blast resistance[J]. Genetics, 2008, 180(4): 2267-2276
- [16] Fukuoka S, Saka N. Loss of function of a proline-containing protein confers durable disease resistance in rice[J]. Science, 2009, 325(5943): 998-1001
- [17] Kuang H, Woo S S, Meyers B C, et al. Multiple genetic processes result in heterogeneous rates of evolution within the major cluster disease resistance genes in lettuce[J]. Plant Cell, 2004, 16(11): 2870-2894
- [18] Caicedo A L, Schaal B A, Kunkel B N. Diversity and molecular evolution of the *RPS2* resistance gene in *Arabidopsis thaliana* [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1999, 96(1): 302-306
- [19] Cooley M B, Pathirana S, Wu H J, et al. Members of the *Arabidopsis* HRT/RPP8 family of resistance genes confer resistance to both viral and oomycete pathogens [J]. Plant Cell, 2000, 12 (5): 663-676
- [20] Dodds P N, Lawrence G J, Ellis J G. Six amino acid changes confined to the leucine-rich repeat beta-strand/beta-tum motif determine the difference between the P and P2 rust resistance specificities in flax[J]. Plant Cell, 2001, 13(1): 163-178
- [21] Ellis J G, Lawrence G J, Luck J E, et al. Identification of regions in alleles of the flax rust resistance gene L that determine differences in gene-for-gene specificity [J]. Plant Cell, 1999, 11 (3): 495-506
- [22] McDowell J M, Dhandaydham M, Long T A, et al. Intragenic recombination and diversifying selection contribute to the evolution of downy mildew resistance at the RPP8 locus of *Arabidopsis* [J]. Plant Cell, 1998, 10(11): 1861-1874
- [23] Meyers B C, Chin D B, Shen K A, et al. The major resistance gene cluster in lettuce is highly duplicated and spans several megabases [J]. Plant Cell, 1998, 10(11): 1817-1832
- [24] Paraiske M, Hammond-Kosack K E, Golstein C, et al. Novel disease resistance specificities result from sequence exchange between tandemly repeated genes at the Cf-4/9 locus of tomato [J]. Cell, 1997, 91(6): 821-832
- [25] Song W Y, Pi L Y, Wang G L, et al. Evolution of the rice Xa21 disease resistance gene family [J]. Plant Cell, 1997, 9 (8): 1279-1287
- [26] Vander Hoom R A, Kruijt M, Roth R, et al. Intragenic recombination generated two distinct *Cf* genes that mediate AVR9 recognition in the natural population of *Lycopersicon pimpinellifolium* [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2001, 98(18): 10493-10498
- [27] Mondragon-Palomino M, Gaut B S. Gene conversion and the evolution of three leucine-rich repeat gene families in *Arabidopsis thaliana* [J]. Mol Biol Evol, 2005, 22(12): 2444-2456
- [28] Flor H H. Current status of the gene-for-gene concept [J]. Annu Rev Phytopathol, 1971, 9(1): 275-296
- [29] Dangl J L, Jones J D G. Plant pathogens and integrated defence responses to infection [J]. Nature, 2001, 411 (6839): 826-833
- [30] 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
- [31] Fudal I, Ross S, Brun H, et al. Repeat-induced point mutation (RIP) as an alternative mechanism of evolution toward virulence in *Leptosphaeria maculans* [J]. Mole Plant Microbe In, 2009, 22(8): 932-941
- [32] Rouxel T, Balesdent M H. Avirulence genes [M] // Wiley J. Encyclopedia of Life Sciences. USA: John Wiley & Sons Ltd, 2010: 1-13
- [33] Lu W W, Desveaux D. The coevolutionary arms race between pathogen and plant host [J]. Mol Plant Pathol, 2011, 12 (1): 93-102
- [34] 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