

海南省田间稻瘟病菌中 *AvrPiz-t* 基因位点变异



张敏 肖倩 阮孙美 张攀 胡吉会 陈亚莉 罗琼*

(云南农业大学植物保护学院, 云南生物资源保护与利用国家重点实验室, 昆明 650201)

摘要: 为评估在水稻育种中被广泛利用的广谱抗稻瘟病基因 *Piz-t* 的有效性, 对不同年份分离自海南省陵水黎族自治县和三亚市水稻的 273 株田间稻瘟病菌株中的 *AvrPiz-t* 位点变异及其与菌株致病性的相关性进行系统研究。结果表明, 海南省田间菌株中无毒基因 *AvrPiz-t* 位点的变异频率为 0~100.00%, 陵水黎族自治县菌株中的变异频率远远高于三亚市菌株。在菌株中共鉴定到 3 种 *AvrPiz-t* 位点变异类型, 分别为基因位点完全缺失、DNA 重复元件 MGR583 在基因位点启动子区 -10 bp 上游和编码区 218 bp 下游插入。所有 *AvrPiz-t* 位点变异的菌株对携带 *Piz-t* 抗病基因的单基因水稻系 IRBL-11 均表现出强的致病性。陵水黎族自治县菌株中 *AvrPiz-t* 位点的变异频率呈逐年增加趋势, 2021 年 94 株菌株中 *AvrPiz-t* 位点的变异频率为 100.00%, 其中 51.06% 的菌株变异是 MGR583 在启动子区 -10 bp 上游插入, 表明 DNA 重复元件 MGR583 在 *AvrPiz-t* 位点插入是 *AvrPiz-t* 从无毒到有毒进化的重要机制之一。

关键词: 稻瘟病菌; 无毒基因; *AvrPiz-t*; 毒性变异; MGR583 元件

Variations of the *AvrPiz-t* gene locus in field *Magnaporthe oryzae* strains collected from Hainan Province

Zhang Min Xiao Qian Ruan Sunmei Zhang Pan Hu Jihui Chen Yali Luo Qiong*

(State Key Laboratory for Conservation and Utilization of Bio-Resources in Yunnan, College of Plant Protection, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, Yunnan Province, China)

Abstract: To evaluate the effectiveness of the broad-spectrum blast resistance gene *Piz-t* widely used in rice resistance breeding, the investigation of *AvrPiz-t* (the *Magnaporthe oryzae* avirulence gene) locus variation in 273 field strains collected from Lingshui and Sanya of Hainan Province were carried out, and the correlation between pathogenicity and *AvrPiz-t* locus variation of strains was analyzed. The results showed that the variation frequency of *AvrPiz-t* locus in Hainan field strains ranged from 0 to 100.00%, and the variation frequency in the isolates from Lingshui was much higher than that in the isolates from Sanya. Three variant types of *AvrPiz-t* locus were identified in 273 field strains, including whole-gene deletion, the insertion of the repeat DNA element MGR583 at 10 bp upstream or 218 bp downstream from the transcription start site (TSS). All the tested isolates with variant *AvrPiz-t* locus were virulent to the monogenic rice line IRBL-11 containing cognate R gene *Piz-t*. The variation frequency of *AvrPiz-t* locus among the Lingshui isolates displayed a rising trend year by year. It is noteworthy that the variation frequency of *AvrPiz-t* locus in the 94 isolates collected from Lingshui in 2021 was 100.00%, of which, 51.06% was caused by MGR583 insertion at 10 bp upstream from the TSS. The results indicated that the insertion of the DNA element MGR583 at *AvrPiz-t* locus was one of the important factor driving evolution of the blast fungal isolates in Hainan field from avirulence to virulence

基金项目: 国家自然科学基金(31960568), 国家重点研发计划(2016YFD0100601)

* 通信作者 (Author for correspondence), E-mail: qiongbf@aliyun.com

收稿日期: 2022-05-30

to the blast resistance gene *Piz-t*.

Key words: *Magnaporthe oryzae*; avirulence gene; *AvrPiz-t*; virulence variation; MGR583 element

稻瘟病菌 *Magnaporthe oryzae* 是一种丝状子囊真菌,隶属于半知菌亚门丛梗孢纲(杨武,2019)。在适宜条件下,稻瘟病菌可通过分生孢子在水稻生长发育的各个时期侵染水稻的不同部位,引起叶瘟、颈瘟、穗瘟。稻瘟病的发生导致每年平均10%~35%的水稻产量损失(胡朝芹等,2017;Li et al.,2019)。选育和利用抗病品种是防治稻瘟病最经济有效的方法。然而因田间稻瘟病菌的快速适应性变异,新毒性菌株出现,常导致一个抗病品种大面积推广种植3~5年后便逐渐丧失了抗性(Skamnioti & Gurr,2009;Damchuay et al.,2020;Peng et al.,2021)。无毒基因变异是导致稻瘟病菌毒性变异、新毒性菌株出现和品种丧失抗性的主要原因(Huang et al.,2014)。抗病(resistant,R)基因以“基因对基因”方式能有效阻止携带对应无毒(avirulence,Avr)基因的菌株(小种)的侵染(Silue & Notteghem,1992;Kaur et al.,2021)。因此,*Avr*基因位点在田间稻瘟病菌菌株中的存在情况可作为对应*R*基因有效性的指标(Selisana et al.,2017)。

抗稻瘟病基因 *Piz-t* 位于水稻第6号染色体短臂上,2006年从水稻 Toride 1 克隆(Zhou et al.,2006)。*Piz-t* 通过靶标蛋白 APIP5 间接识别效应蛋白 *AvrPiz-t*,进而触发效应因子激发的免疫,抵抗稻瘟病菌侵染(Wang et al.,2016;Chen et al.,2022)。*Piz-t* 对稻瘟病菌具有广谱抗性(周江鸿等,2003;杨健源等,2008;王群等,2021),作为重要的抗性基因资源,在水稻抗病育种中被广泛利用,仅黑龙江省就有77.08%主栽品种中有 *Piz-t* 基因(周弋力等,2018)。因此,田间稻瘟病菌菌株中无毒基因 *AvrPiz-t* 位点的变异研究是 *Piz-t* 抗病基因资源有效利用和抗病品种田间合理布局的重要基础。原始无毒基因 *AvrPiz-t* 是从菌株 81278ZB15 中鉴定的,编码区全长327 bp,编码108个氨基酸组成的预测分泌蛋白(Li et al.,2009)。*AvrPiz-t* 基因位点完全缺失、转座子元件的插入和编码区核苷酸序列变异均可导致其无毒功能的丧失。Li et al.(2009)研究表明,70-15 和 GUY11 菌株中 *AvrPiz-t* 起始密码子上游462 bp处转座子 Pot3 插入和 *AvrPiz-t* 第41位缬氨酸被丙氨酸取代(A41V)变异均导致 *AvrPiz-t* 无毒功能丧失。Chen et al.(2014)对来自38个国家和地区的711株稻瘟病菌菌株中 *AvrPiz-t* 位点启动子区和编码区序

列进行分析,共鉴定出8个编码蛋白变异体的 *AvrPiz-t* 单倍型(I~VIII);2种启动子区的插入突变(包括-41 bp处逆转座子 Inago2 插入和-462 bp处1870 bp的DNA片段插入)和1种编码区插入突变(211 bp处1858 bp的DNA片段插入),说明编码区核苷酸序列变异和启动子区域转座元件插入均能使稻瘟病菌逃避水稻中*R*基因 *Piz-t* 的识别使水稻感病。

气候条件和种植水稻材料等不同导致稻瘟病菌中 *AvrPiz-t* 从无毒到有毒进化的速度和策略有所不同。Wang et al.(2020)对来自云南省不同地区312株菌株分析发现,无毒 *AvrPiz-t* 位点在菌株中的存在频率为64.74%,并鉴定到H1(启动子区198 bp的 Inago2 插入)和H7(编码区单核苷酸A的插入突变)2个毒性单倍型。郭敬玮等(2021)对云南省罗平县120株菌株研究发现,菌株中无毒 *AvrPiz-t* 位点存在频率100.00%。Selisana et al.(2017)研究发现,77株菲律宾田间菌株中 *AvrPiz-t* 位点的存在频率只有2.70%,菌株主要通过 *AvrPiz-t* 基因位点的完全缺失,从无毒到有毒进化进而逃避寄主中 *Piz-t* 基因的识别。海南省气候湿热,可全年种植水稻,是我国重要的水稻冬季南繁基地,每年冬季全国各地育种单位聚集海南省进行水稻冬繁,田间水稻材料遗传背景丰富多样,形成了有利于稻瘟病菌多样性进化的独特稻田生态系统。本研究对2016年、2017年、2019年、2020年和2021年海南省273株田间稻瘟病菌单孢菌株中无毒基因 *AvrPiz-t* 变异及其与致病性的相关性进行研究,对田间菌株中 *AvrPiz-t* 位点变异趋势进行初步分析,以期水稻抗病育种中抗病基因资源 *Piz-t* 的合理利用及水稻品种的田间布局提供有价值的信息,为深入研究海南稻田生态系统中稻瘟病菌毒性变异机制奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

供试菌株:2016年、2017年、2019年和2021年分离自海南省陵水黎族自治县(简称陵水)水稻南繁基地田间水稻材料的单孢菌株189株,其中2016年菌株40株,分离自水稻材料武运粳30、江南香糯、抗2611/陵宁1号和中花11;2017年菌株47株,分离自水稻材料K55/A5232、K55/A5692和江南香糯;2019年菌株8株,分离自水稻材料18冬0630和粳

稻;2021年菌株94株,分离自水稻材料江南香糯和武运粳30。2020年分离自海南省三亚市田间水稻材料20H645、20H797、20H798、20H1140、20H1149和20H1706,单孢菌株84株。供试的273株菌株均为本实验室分离鉴定和保存。

供试水稻:感病对照丽江新团黑谷,不含任何抗病基因;以丽江新团黑谷为背景育成的单基因水稻系IR-BL-11(携带单个抗病基因 *Piz-t*),以上供试水稻种子均由云南农业大学植物保护学院何月秋教授提供。

供试培养基:马铃薯蔗糖琼脂(potato saccharose agar, PSA)培养基成分为马铃薯200 g、蔗糖20 g、琼脂粉13 g,蒸馏水定容至1 L;马铃薯蔗糖肉汤(potato saccharose broth, PSB)培养基成分为马铃薯200 g、蔗糖20 g,蒸馏水定容至1 L;番茄燕麦培养基成分为番茄汁200 mL、燕麦片40 g、可溶性淀粉18 g、琼脂粉18 g,蒸馏水定容至1 L。

试剂及仪器:Easy *Taq*[®] DNA Polymerase 试剂盒,北京全式金生物技术股份有限公司;KOD FX Neo(No. KFX-201),广州创维生物科技有限公司;琼脂粉,北京索莱宝科技有限公司;其他试剂均为国产分析纯。96孔PCR板,北京兰杰柯科技有限公司;单层Mira cloth滤布,德国Merck KGaA Darmstadt公司;Applied biosystems 2720 Thermal Cycler PCR仪,新加坡Life technologies公司;SAGECREATION凝胶成像仪,北京赛制创业科技有限公司;JY200C电泳仪,北京君意电泳设备有限公司;HP Scanjet G4010专业影像扫描仪,中国惠普有限公司;GH-400BC隔水式恒温培养箱,北京市永光明医疗仪器有限公司。

1.2 方法

1.2.1 水稻幼苗种植

挑选饱满健康的丽江新团黑谷及其单基因水稻系IRBL-11成熟种子,75%酒精浸泡消毒40 s,蒸馏水冲洗3次以上,用20%次氯酸钠溶液浸泡40 min,蒸馏水冲洗3次以上,蒸馏水浸泡吸胀24 h,转移至铺有滤纸的培养皿中保湿萌发。萌发的种子播种在自制育苗板(剪去96孔PCR板管底部自制育苗板)上,喷施自来水培养7~10 d后,换用营养液,营养液参照Li et al.(2021)方法进行配制,每4~5 d更换1次营养液,生长到3~4叶期的水稻幼苗用于稻瘟病菌致病性鉴定。每株菌株接种不少于20株水稻幼苗。

1.2.2 菌株菌丝收集和基因组DNA提取

在无菌条件下,将滤纸片保存的菌株菌丝体置于PSA培养基上活化培养4 d,挑取8~15个菌落边

缘菌丝块放入装有100 mL PSB培养基的250 mL三角瓶中,28 °C、180 r/min下恒温摇床培养4 d,用定性滤纸过滤收集菌丝,37 °C恒温培养箱内烘干,加液氮研磨成粉末状,转移至2 mL离心管中,-20 °C冰箱内保存备用。采用常规CTAB法提取菌丝基因组DNA(李金璐等,2020),风干后加入30 mL ddH₂O溶解,取1 μL用1%凝胶电泳检测,单一条带明亮、清晰时,则可用于后续试验。

1.2.3 无毒基因位点PCR扩增检测

根据NCBI上 *AvrPiz-t*(登录号:EU837058)基因DNA序列(开放阅读框区327 bp,5'非编码区200 bp,3'非编码区100 bp)(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/>),用Vector NTI Advance 11.5.1软件设计 *AvrPiz-t1*(F:5'-GACTGGTAGCATTGTGTTTC-CATT-3'/R:5'-GAATTCAGCCGAAGATACAAAA-3')和 *AvrPiz-t2*(F:5'-GACTGGTAGCATTGTGTTTCC-ATT-3'/R:5'-GGAGGAGAGAACATCAGTGGA-3') 2对特异引物用于菌株中 *AvrPiz-t* 位点的PCR扩增检测,以真菌通用引物ITS1/4(F:5'-TCCGTAGGT-GAACCTGCGG-3'/R:5'-TCCTCCGCTTATTGATA-TGC-3')为扩增对照,引物由北京擎科生物技术有限公司合成。所有菌株先用引物 *AvrPiz-t1* 进行扩增,经过至少3次重复均不能扩增出产物的菌株,再用引物 *AvrPiz-t2* 进行扩增。2对引物6次以上重复都不能扩增出产物的菌株,即为该基因位点缺失菌株。

10 μL PCR扩增体系:10×PCR Buffer 1.0 μL、2.5 mmol/L dNTP 0.8 μL、*Taq* 酶1 unit、DNA模板10 ng、10 μmol/L正、反向引物各0.5 μL,ddH₂O补足至10 μL。扩增程序:94 °C预变性5 min;94 °C变性30 s,58 °C退火30 s,72 °C延伸1 min,32个循环;72 °C再延伸5 min。PCR产物加2 μL 6×Loading buffer混匀,在1%琼脂糖凝胶上,120 V电泳20 min,紫外凝胶成像系统观察并拍照。电泳检测存在并且条带明亮的PCR产物送擎科生物技术有限公司进行测序。

测序结果用Vector NTI Advance 11.5.1软件进行比对分析,插入序列通过NCBI Blast(<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast>)进行同源序列搜索。采用Excel 2013软件统计并计算基因位点存在/缺失频率、菌株变异频率和菌株年均变异频率。基因位点存在/缺失频率=检测到基因位点存在或缺失的菌株数/分析菌株总数×100%;菌株变异频率=检测到基因位点变异(缺失+核苷酸序列变异)的菌株数/分析菌株总数×100%;菌株年均变异频率=某年菌株中检

测到基因位点变异的菌株数/某年的菌株总数 \times 100%。

1.2.4 *AvrPiz-t*位点变异的菌株与致病性的相关性

根据菌株中 *AvrPiz-t* 位点变异分析结果,选取不同类型的代表性菌株分别接种水稻丽江新团黑谷及以丽江新团黑谷为背景育成的含 *Piz-t* 单个抗病基因的水稻系 IRBL-11,进行致病性分析。

吸取 700 μ L 在 PSB 培养基中培养 4 d 的菌丝液,方法同 1.2.2,均匀涂布于番茄燕麦固体培养基上,自然光照下培养 4 d,无菌水洗下孢子,单层 Miracloth 滤布过滤,调节孢子浓度为 1.5×10^5 个/mL,加入 0.04% 明胶摇匀,备用。将配制好的孢子悬浮液,用 100 mL 的塑料喷雾瓶均匀喷雾接种 3~4 叶期水稻幼苗 20 株以上,确保每个水稻叶片上都有悬浮液滴。在温度 28 $^{\circ}$ C、相对湿度 95% 下黑暗培养 24 h,然后进行 12 h 光照、12 h 黑暗交替培养 5~7 d,当感病对照品种充分发病时调查发病情况。发病级别参照王

韵茜等(2018)方法划分,采用 6 级分级法:0 级,无任何病斑;1 级,有零星直径 <0.5 mm 的褐色病斑;2 级,有少数 0.5 mm \leq 直径 <1 mm 的褐色病斑;3 级,出现 1 mm \leq 直径 <3 mm 的圆形至椭圆形病斑,中央灰白色,边缘褐色;4 级,典型的纺锤形病斑,直径 ≥ 3 mm,病斑稍有融合或无融合;5 级,典型的纺锤形病斑,直径 ≥ 3 mm,病斑融合成片。

2 结果与分析

2.1 菌株中无毒基因 *AvrPiz-t* 位点存在/缺失频率

海南省 273 株菌株中有 201 株菌株能成功扩增出 *AvrPiz-t* 特异片段,72 株菌株经 2 对引物反复扩增均未扩增出产物。*AvrPiz-t* 基因位点在海南省 273 株菌株中的平均存在频率为 73.62%,陵水菌株中存在频率 (50.00%~82.98%) 普遍低于三亚市菌株 (98.81%),同时发现不同年份的陵水菌株中 *AvrPiz-t* 位点的存在频率不同(表 1)。

表 1 *AvrPiz-t* 位点在海南省稻瘟病菌菌株中的存在/缺失频率

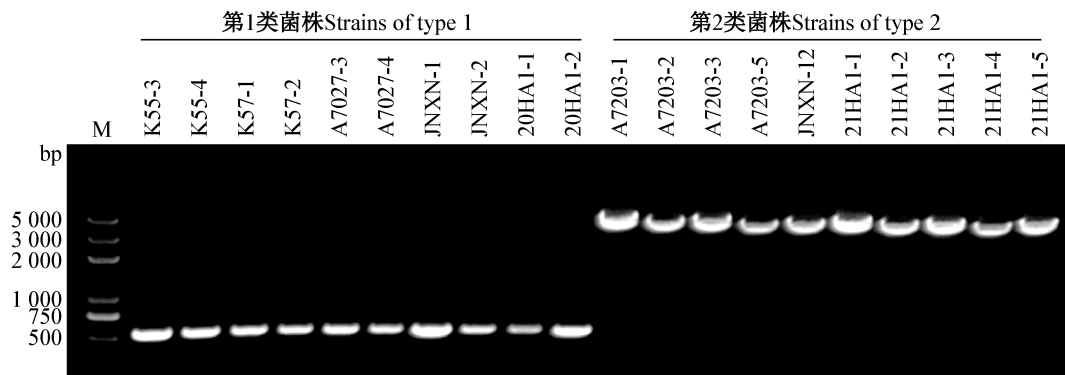
Table 1 The presence/absence frequency of *AvrPiz-t* locus in field *Magnaporthe oryzae* strains collected from Hainan Province

来源 Source	年份 Year	菌株数 Number of strain	扩增出特异片段的菌株数 The number of strains with specific fragment was amplified	存在频率 Frequency of presence/%	缺失频率 Frequency of absence/%
陵水 Lingshui	2016	40	27	67.50	32.50
	2017	47	39	82.98	17.02
	2019	8	4	50.00	50.00
	2021	94	48	51.06	48.94
三亚 Sanya	2020	84	83	98.81	1.19
总计 Total		273	201	73.62	26.38

2.2 无毒基因 *AvrPiz-t* 位点的 PCR 扩增和序列比对分析

在供试的 273 株菌株中,能稳定扩增出特异 PCR 产物的菌株有 201 株,根据电泳条带大小分为 2 类,第 1 类有 148 株,包括 K55-3、K55-4、K57-1、K57-2、A7027-3、A7027-4、JNXN-1、JNXN-2、20HA1-1、

20HA1-2 等,扩增片段与预期扩增片段大小(557 bp)一致;第 2 类扩增片段大于 5 000 bp 的菌株,有 53 株,包括 A7203-1、A7203-2、A7203-3、A7203-5、JNXN-12、21HA1-1、21HA1-2、21HA1-3、21HA1-4、21HA1-5 等,远远大于预期扩增片段(图 1)。



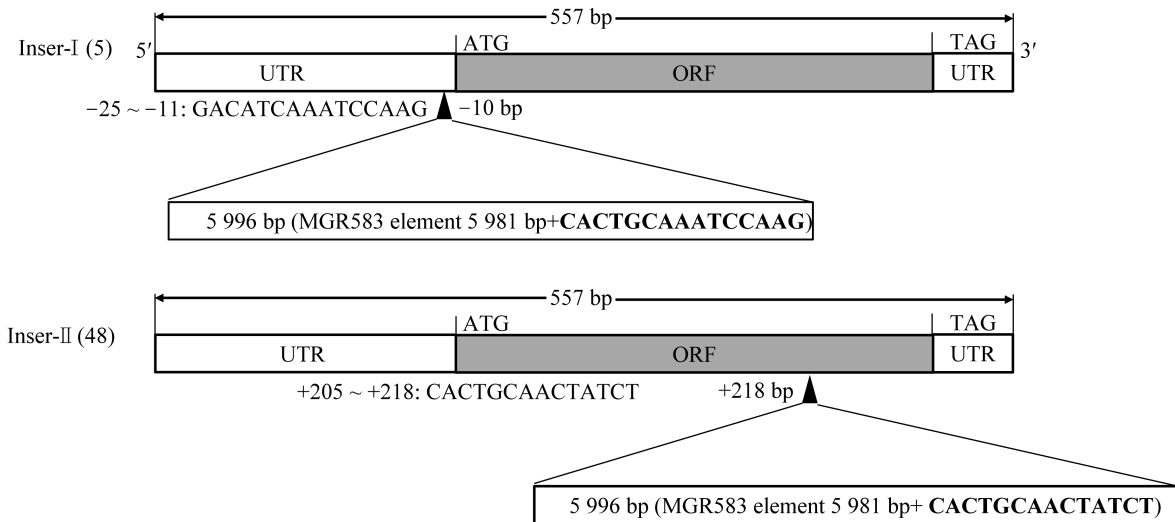
M: Trans 2KPLUS marker.

图 1 部分菌株中 *AvrPiz-t* 位点的 PCR 扩增

Fig. 1 PCR amplification of the *AvrPiz-t* locus in some field *Magnaporthe oryzae* strains

对 201 株菌株的 PCR 产物进行测序分析, 发现第 1 类菌株与野生型无毒基因 *AvrPiz-t* (登录号: EU837058) DNA 序列完全一致。第 2 类菌株中有 5 株菌株中的片段大小为 6 554 bp, 均为在 *AvrPiz-t* 基因启动子区域-10 bp 上游有一段 5 996 bp 的片段插入(Inser-I); 有 48 株菌株中的片段大小为 6 555 bp, 均为在 *AvrPiz-t* 编码区的第 218 位核苷酸后有一段

5 996 bp 的片段插入(Inser-II)(图 2)。插入序列与 DNA 重复元件 MGR (*Magnaporthe grisea* repeat) 583 (登录号: AF018033) 核苷酸序列的一致性为 99%。MGR583 在启动子区域插入时, 重复了插入位置上游 15 bp 的 DNA 序列(GACATCAAATCCAAG), 在基因编码区插入时, 重复了插入位置上游 14 bp 的 DNA 序列(CACTGCAACTATCT)(图 2)。



包含完整 ORF 的预期扩增序列为 557 bp。实心箭头指示插入位点, 黑色加粗的碱基序列为与插入位点上游相同的一段重复序列。The expected amplification sequence containing the complete ORF is 557 bp. Black solid arrows indicate the insertion site. The base sequences in black bold are the repetitive sequences same as upstream of the insertion site.

图 2 *AvrPiz-t* 基因位点插入变异

Fig. 2 Insertion variations of the *AvrPiz-t* gene locus

2.3 海南省陵水田间菌株中 *AvrPiz-t* 位点变异趋势

通过对陵水 4 年田间稻瘟病菌菌株中 *AvrPiz-t* 位点变异(位点缺失变异+序列变异)情况的进一步研究发现, 菌株中 *AvrPiz-t* 基因位点变异与水稻品种的遗传背景有一定的关系, 2016 年分离自抗 2611/陵宁 1 号和江南香糯水稻品种的菌株中 *AvrPiz-t* 位点均为野生型, 而分离自武运梗 30 和中花 11 水稻品种的菌株中, *AvrPiz-t* 位点的变异频率分别为 50.00% 和 80.00%; 2017 年分离自 K55/A5232、K55/A5232 和江南香糯水稻品种的菌株中, *AvrPiz-t* 位点的变异频率分别为 13.33%、55.56% 和 7.14%(表 2)。

不同年份分离自相同水稻品种的菌株中 *AvrPiz-t* 位点发生变异的频率呈现逐年增加的趋势, 如 2016、2017 和 2021 年从江南香糯水稻品种分离的菌株中, *AvrPiz-t* 位点的变异频率分别为 0、7.14% 和 100.00%(表 2)。表明相同遗传背景的水稻材料多年长期种植, 会加大田间稻瘟病菌菌株的选择压力。此外, 2021 年无论是分离自武运梗 30 还是江南

香糯水稻品种的所有菌株, 通过 *AvrPiz-t* 基因位点的完全缺失或 MGR583 重复元件的插入均发生了变异, 且变异频率 100.00%。

2.4 *AvrPiz-t* 位点变异的菌株与致病性的相关性

随机选取了 4 个分别代表携带野生型 *AvrPiz-t* 基因位点、基因位点完全缺失、启动子区 MGR583 重复元件插入和编码区 MGR583 重复元件插入的菌株 20HC2-11、21HA4-10、A7203-3 和 21HA3-1 进行致病性鉴定。结果显示, 含野生型 *AvrPiz-t* 基因位点的菌株 20HC2-11 对感病对照丽江新团黑谷表现强致病, 而对携带抗病基因 *Piz-t* 的单基因水稻系 IRBL-11 不致病。3 株 *AvrPiz-t* 基因位点发生变异的菌株 21HA4-10、A7203-3 和 21HA3-1 对水稻丽江新团黑谷和单基因水稻系 IRBL-11 都表现出很强的致病性(图 3)。

3 讨论

本研究结果表明, 在供试的海南省 273 株稻瘟病菌菌株中, 能扩增出特异产物的菌株有 201 株, 其中有 53 株菌株中检测到 DNA 重复元件 MGR583 在

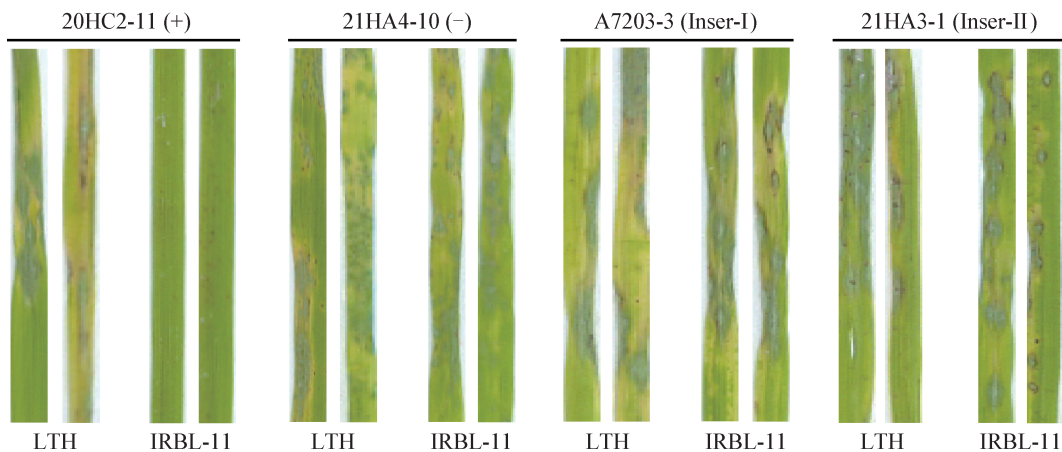
AvrPiz-t 基因位点的插入,其余 148 个菌株(54.21%) 中为野生型 *AvrPiz-t* 基因位点。致病性鉴定结果表明,DNA 重复元件 MGR583 在 *AvrPiz-t* 位点的插入

是导致菌株中 *AvrPiz-t* 从无毒到有毒有进化的重要机理。

表 2 海南陵水田间菌株中 *AvrPiz-t* 位点变异趋势

Table 2 Variation trend of the *AvrPiz-t* locus in field strains from Lingshui, Hainan

年份 Year	水稻材料 Rice material	菌株数 No. of strains	野生型菌株数 No. of wild-type strains	变异频率 Variant frequency/%	年均变异频率 Annual average variation frequency/%
2016	武运梗 30 Wuyunjing 30	10	5	50.00	32.50
	江南香糯 Jiangnanxiangnuo	10	10	0.00	
	抗 2611/陵宁 1 号 Kang2611/Lingning No.1	10	10	0.00	
	中花 11 Zhonghua11	10	2	80.00	
2017	K55/A5232	15	13	13.33	17.57
	K55/A5692	18	8	55.56	
	江南香糯 Jiangnanxiangnuo	14	13	7.14	
2019	18 冬 0630 18 dong0630	4	4	0.00	50.00
	梗稻 Jingdao	4	0	100.00	
2021	武运梗 30 Wuyunjing 30	35	0	100.00	100.00
	江南香糯 Jiangnanxiangnuo	59	0	100.00	



+: 表示该菌株包含野生型 *AvrPiz-t* 位点; -: 表示该菌株中 *AvrPiz-t* 基因位点完全缺失; Inser-I: 表示该菌株中 *AvrPiz-t* 启动子区 -10 bp 上游插入了 MGR583 重复元件; Inser-II: 表示该菌株中 *AvrPiz-t* 编码区 218 bp 下游插入了 MGR583 重复元件。+: Indicating the strain contains the wild-type *AvrPiz-t*; -: indicating the *AvrPiz-t* locus was completely absent in this strain; Inser-I: indicating MGR583 element was inserted at -10 bp upstream of *AvrPiz-t* promoter region of; Inser-II: indicating MGR583 element was inserted at 218 bp downstream of *AvrPiz-t* encoding region.

图 3 4 种 *AvrPiz-t* 等位基因代表性菌株的致病性

Fig. 3 Pathogenicity of strains represented four types of *AvrPiz-t* allele

有研究表明,转座子 Pot3、逆转座子 Inago2 和 Inago2 solo-LTR 在 *AvrPiz-t* 基因位点插入,导致了菌株中 *AvrPiz-t* 无毒功能丧失(Li et al., 2009; Chen et al., 2014; Wang et al., 2020)。MGR583 是一个由 LINE-like (long interspersed element-like) 元件和逆转座子 Pot3 组成的 5 981bp 的 DNA 重复元件(Hamer et al., 1989; Kachroo et al., 1997),在所有水稻和大多数非水稻病原的稻瘟病菌中有较高的拷贝数,

可能是导致不同稻瘟病菌菌株进化的重要原因之一(Dobinson et al., 1993; Kachroo et al., 1997)。本研究首次发现 MGR583 重复元件在海南省陵水田间稻瘟病菌菌株中 *AvrPiz-t* 位点高频率的插入,导致了海南省陵水田间菌株中 *AvrPiz-t* 从无毒到有毒的进化;尤其是在 2021 年海南省陵水田间菌株中 *AvrPiz-t* 基因位点的变异频率为 51.06%。表明在海南省陵水稻田生态系统中,DNA 重复元件 MGR583 在

AvrPiz-t 基因位点的插入已成为 *Avr-Piz-t* 基因从无毒到有毒进化的重要机理。三亚市菌株中 *AvrPiz-t* 基因位点的变异频率(1.19%)远远低于陵水菌株(17.57%~100.00%),推测很可能与两地田间种植水稻的遗传背景、气候环境差异有关。本研究中三亚市只有2020年1年的数据,而2020年陵水又没有数据,因此陵水和三亚市2个水稻冬繁基地田间稻瘟病菌多样性、菌株中无毒基因的存在/缺失变异及影响因素还有待进一步系统研究。

尤其值得注意的是,2021年51.06%的陵水田间菌株中 *AvrPiz-t* 无毒丧失是由DNA重复元件MGR583插入所引起,而98.94%的菌株中 *AvrPib* 无毒丧失是1 861 bp的Pot3逆转座子在基因位点启动子区-126 bp上游插入所致(未发表)。即相同菌株中不同无毒基因变异的分子基础不同,这很可能与不同无毒基因所处的染色体位置(基因组环境)不同有关。2021年菌株中转座元件异常活跃的原因还有待进一步研究。

参 考 文 献 (References)

- Chen CX, Chen ML, Hu JN, Zhang WJ, Zhong ZH, Jia YL, Allaux L, Fournier E, Tharreau D, Wang GL. 2014. Sequence variation and recognition specificity of the avirulence gene *AvrPiz-t* in *Magnaporthe oryzae* field populations. *Fungal Genomics & Biology*, 4(1): 426-431
- Chen RZ, Deng YW, Ding YL, Guo JX, Qiu J, Wang B, Wang CS, Xie YY, Zhang ZH, Chen JX, et al. 2022. Rice functional genomics: decades' efforts and roads ahead. *Science China Life Sciences*, 65(1): 33-92
- Damchuay K, Longya A, Sriwongchai T, Songkumarn P, Parinthatwong N, Darwell K, Talumphai S, Tasanasuwan P, Jantasuriyarat C. 2020. High nucleotide sequence variation of avirulent gene, *AVR-Pital*, in Thai rice blast fungus population. *Journal of Genetics*, 99(1): 45
- Dobinson KF, Harris RE, Hamer JE. 1993. Grasshopper, a long terminal repeat (LTR) retroelement in the phytopathogenic fungus *Magnaporthe grisea*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 6(1): 114-126
- Guo JW, Xiao Q, Li YR, Cai WH, Zhou CY, Hu YC, Luo Q. 2021. Studies on characterizations and avirulence genes of field *Magnaporthe oryzae* strains from Luoping of Yunnan Province, China. *Acta Phytopathologica Sinica*, 51(2): 235-247 (in Chinese) [郭敬玮, 肖倩, 李怡然, 蔡文辉, 周昌银, 胡元川, 罗琼. 2021. 云南罗平田间稻瘟菌株性状及无毒基因研究. *植物病理学报*, 51(2): 235-247]
- Hamer JE, Farrall L, Orbach MJ, Valent B, Chumley FG. 1989. Host species-specific conservation of a family of repeated DNA sequences in the genome of a fungal plant pathogen. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 86(24): 9981-9985
- Hu CQ, Liu JY, Wang YQ, Yang R, Wang BK, He YQ, Zeng QC, Luo Q. 2017. Mapping of *Pizy6(t)*, a gene conferring resistance to the rice blast strain LP11, in *Oryza sativa* subsp. *japonica* cultivar Ziyu44. *Chinese Bulletin of Botany*, 52(1): 61-69 (in Chinese) [胡朝芹, 刘剑宇, 王韵茜, 杨睿, 汪秉琨, 何月秋, 曾千春, 罗琼. 2017. 粳稻子预44抗LP11稻瘟病菌基因 *Pizy6(t)* 的定位. *植物学报*, 52(1): 61-69]
- Huang J, Si WN, Deng QM, Li P, Yang SH. 2014. Rapid evolution of avirulence genes in rice blast fungus *Magnaporthe oryzae*. *BMC Genetics*, 15(1): 45
- Kachroo P, Ahuja M, Leong SA, Chattoo BB. 1997. Organisation and molecular analysis of repeated DNA sequences in the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. *Current Genetics*, 31(4): 361-369
- Kaur B, Bhatia D, Mavi GS. 2021. Eighty years of gene-for-gene relationship and its applications in identification and utilization of *R* genes. *Journal of Genetics*, 100(2): 50
- Li JL, Zhang H, Jiao ZY, Liu JY, Han GY, Zhuo XX, Luo Q. 2020. Identification of blast disease resistance-related genes by genomic sequence comparison of rice variety Ziyu 44 and Jiangnanxiangnuo. *Chinese Journal of Rice Science*, 34(1): 8-16 (in Chinese) [李金璐, 张慧, 焦泽宇, 刘剑宇, 韩光煜, 卓晓轩, 罗琼. 2020. 水稻子预44和江南香糯基因组比较鉴定稻瘟病抗性相关基因. *中国水稻科学*, 34(1): 8-16]
- Li JL, Zhang H, Yang R, Zeng QC, Han GY, Du YL, Yang J, Yang GH, Luo Q. 2021. Identification of miRNAs contributing to the broad-spectrum and durable blast resistance in the Yunnan local rice germplasm. *Frontiers in Plant Science*, 12: 749919
- Li W, Wang BH, Wu J, Lu GD, Hu YJ, Zhang X, Zhang ZG, Zhao Q, Feng Q, Zhang HY, et al. 2009. The *Magnaporthe oryzae* avirulence gene *AvrPiz-t* encodes a predicted secreted protein that triggers the immunity in rice mediated by the blast resistance gene *Piz-t*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 22(4): 411-420
- Li WT, Chern M, Yin JJ, Wang J, Chen XW. 2019. Recent advances in broad-spectrum resistance to the rice blast disease. *Current Opinion in Plant Biology*, 50: 114-120
- Peng ZR, Li L, Wu SH, Chen XL, Shi YF, He Q, Shu F, Zhang WH, Sun PY, Deng HF, et al. 2021. Frequencies and variations of *Magnaporthe oryzae* avirulence genes in Hunan Province, China. *Plant Disease*, 105(12): 3829-3834
- Selisana SM, Yanoria MJ, Quime B, Chaipanya C, Lu G, Oplencia R, Wang GL, Mitchell T, Correll J, Talbot NJ, et al. 2017. Avirulence (*AVR*) gene-based diagnosis complements existing pathogen surveillance tools for effective deployment of resistance (*R*) genes against rice blast disease. *Phytopathology*, 107(6): 711-720
- Silue D, Notteghem JL. 1992. Identification of a cross between two compatible isolates of *Magnaporthe grisea* (Hebert) Barr and genetic analysis of avirulence/virulence of rice. *Journal of Phytopathology*, 135(1): 77-83

- Skamnioti P, Gurr SJ. 2009. Against the grain: safeguarding rice from rice blast disease. *Trends in Biotechnology*, 27(3): 141–150
- Wang Q, Bi YQ, Kong CS, Jin GM, Yang MY, Li JB. 2021. Three avirulence genes composition and pathotype structure among *Magnaporthe oryzae* isolates from six rice growing areas of Yunnan Province. *Journal of Plant Protection*, 48(4): 723–731 (in Chinese) [王群, 毕云青, 孔垂思, 金桂梅, 杨明英, 李进斌. 2021. 云南省六个水稻产区稻瘟病菌三个无毒基因的组成及其致病型. *植物保护学报*, 48(4): 723–731]
- Wang Q, Li JB, Lu L, He CX, Li CY. 2020. Novel variation and evolution of *AvrPiz-t* of *Magnaporthe oryzae* in field isolates. *Frontiers in Genetics*, 11: 746
- Wang RY, Ning YS, Shi XT, He F, Zhang CY, Fan JB, Jiang N, Zhang Y, Zhang T, Hu YJ, et al. 2016. Immunity to rice blast disease by suppression of effector-triggered necrosis. *Current Biology*, 26(18): 2399–2411
- Wang YQ, Su YH, Yang R, Li X, Li J, Zeng QC, Luo Q. 2018. Rice blast resistance of wild rice in Yunnan. *Chinese Bulletin of Botany*, 53(4): 477–486 (in Chinese) [王韵茜, 苏延红, 杨睿, 李鑫, 李晶, 曾千春, 罗琼. 2018. 云南疣粒野生稻稻瘟病抗性. *植物学报*, 53(4): 477–486]
- Yang JY, Chen S, Zeng LX, Li YL, Chen Z, Zhu XY. 2008. Evaluation on resistance of major rice blast resistance genes to *Magnaporthe grisea* isolates collected from indica rice in Guangdong Province, China. *Chinese Journal of Rice Science*, 22(2): 190–196 (in Chinese) [杨健源, 陈深, 曾列先, 李亦龙, 陈珍, 朱小源. 2008. 稻瘟病主效抗性基因对广东省籼稻稻瘟病菌的抗性评价. *中国水稻科学*, 22(2): 190–196]
- Yang W. 2019. Study on genetic diversity of *Magnaporthe oryzae* in south-west Hubei Province between 2016–2017. Master thesis. Wuhan: South-Central University for Nationalities (in Chinese) [杨武. 2019. 鄂西南地区2016—2017年稻瘟病菌群体多态性分析. 硕士学位论文. 武汉: 中南民族大学]
- Zhou B, Qu SH, Liu GF, Dolan M, Sakai H, Lu GD, Bellizzi M, Wang GL. 2006. The eight amino-acid differences within three leucine-rich repeats between *Pi2* and *Piz-t* resistance proteins determine the resistance specificity to *Magnaporthe grisea*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 19(11): 1216–1228
- Zhou JH, Wang JL, Jiang WR, Lei CL, Ling ZZ. 2003. Virulence genes diversity and geographic distribution of *Pyricularia grisea* in China. *Acta Agronomica Sinica*, 29(5): 646–651 (in Chinese) [周江鸿, 王久林, 蒋婉如, 雷财林, 凌忠专. 2003. 我国稻瘟病菌毒力基因的组成及其地理分布. *作物学报*, 29(5): 646–651]
- Zhou YL, Zhang YL, Yu LP, Liu DY, Jin XH. 2018. Detection and analysis of blast resistance gene and non-toxic gene of *Magnaporthe grisea* of main rice varieties in Heilongjiang Province. // Jin XH. Academic Annual Conference of Botanical China Society of Plant Pathology in 2018. Beijing: China Agricultural Science and Technology Press, pp. 397 (in Chinese) [周弋力, 张亚玲, 于连鹏, 刘殿宇, 靳学慧. 2018. 黑龙江省主栽水稻品种抗瘟基因检测及稻瘟病菌无毒基因检测分析. // 靳学慧. 中国植物病理学会第十一届全国会员代表大会暨2018年学术年会. 北京: 中国农业科学技术出版社, pp. 397]

(责任编辑:王璇)