

鄂西南地区稻瘟病菌群体交配型和育性分析

李伟康¹,董岩¹,韩旭晨¹,王春台¹,伍华明²,徐鑫^{1*}

(1 中南民族大学 a.生命科学学院;b.武陵山区特色资源植物种质保护与利用湖北省重点实验室;
c.生物技术国家民委重点实验室,武汉 430074;2 来凤富民种业产销专业合作社,湖北 恩施 445700)

摘要 稻瘟病是武陵山区水稻产量与品质的主要制约因素,前期研究表明该地区稻瘟病菌群体的交配型和育性是导致其致病性强的潜在原因.本研究对2017—2018年鄂西南地区分离的237株稻瘟病菌进行了交配型基因分子标记鉴定、高分辨率熔解曲线分析、致病性鉴定以及育性分析.结果表明,武陵山区稻瘟病菌群体同时存在两种交配型,两年间两种交配型的比率发生了改变.2017年交配型 $MATI-1$ 占据优势,2018年菌株交配型则以 $MATI-2$ 为主;2017年 $MATI-1$ 菌株成功侵染的数量相较于 $MATI-2$ 菌株较多,2018年 $MATI-2$ 菌株成功侵染的数量相较于 $MATI-1$ 菌株较多.两年间两种交配型的比率发生了改变,该变化趋势与不同交配型的侵染成功率一致,推测该地区稻瘟病菌的毒力与其交配型相关.上述分离的稻瘟病菌对峙培养结果仅3株产生有性结构,但两两组合杂交分析未检测到之间存在育性.研究为进一步通过该地区稻瘟病菌群体结构特点预测稻瘟病菌群体的流行演替奠定了基础.

关键词 稻瘟病菌;交配型;育性

中图分类号 S435.111.41 文献标志码 A 文章编号 1672-4321(2025)04-0484-06

doi:10.20056/j.cnki.ZNMDZK.20250407

Analysis of mating type and fertility of *Magnaporthe oryzae* population in Southwest Hubei

LI Weikang¹, DONG Yan¹, HAN Xuchen¹, WANG Chuntai¹, WU Huaming², XU Xin^{1*}

(1 South-Central Minzu University, a. College of Life Sciences; b. Hubei Provincial Key Laboratory for Protection and Application of Special Plant Germplasm in Wuling Area of China; c. Key Lab for Biotechnology of State Ethnic Affairs Commission, Wuhan 430074, China; 2 Laifeng Fumin Seed Industry Production and Marketing Specialized Cooperative Organization, Enshi 445700, Hubei China)

Abstract Rice blast disease is the main limiting factor of rice yield and quality in the Wuling Mountain region. Previous studies have shown that the mating type and fertility of *Magnaporthe oryzae* (*M. oryzae*) population in this region are the potential causes of its strong pathogenicity. In this experiment, 237 isolates of *M. oryzae*, collected from Southwest Hubei Province in 2017-2018, were characterized using molecular markers of mating type genes, evaluated for pathogenicity, high resolution melting analysis and analyzed for fertility. The results revealed that there were two mating types in *M. oryzae* population in Wuling Mountain area, with the ratio of these types shifting over the course of two years. The mating type $MATI-1$ was dominant in 2017, while $MATI-2$ was the main mating type of isolates in 2018. The number of successful infection of $MATI-1$ isolates was more than that of $MATI-2$ isolates in 2017, while $MATI-2$ isolates had a higher rate of successful infections in 2018. A shift in the ratio of two mating types over the two-year period, which was consistent with the success rate of infection associated with different mating types. This suggests that the pathogenicity of *M. oryzae* in this region was related to its mating type. The results of confrontation culture of the above isolates showed that only 3 isolates produced sexual structure. However, no fertility was detected between them by the pairwise combination cross analysis.

收稿日期 2024-01-15

* 通信作者 徐鑫(1978-),男,教授,研究方向:遗传学,E-mail:xinxu@mail.scuec.edu.cn

基金项目 国家自然科学基金资助项目(30971563);湖北省自然科学基金资助项目(2018CFB476);湖北省自然科学基金重点项目(滚动创新群体)(2015CFA015)

This study laid a foundation for further predicting the epidemic succession of *M. oryzae* population through the population structural characteristics in this region.

Keywords *Magnaporthe oryzae*; mating type; fertility

水稻是全球一半以上人口的粮食来源,研究表明水稻产量每年须以3%的速度增长才能满足人类对其需求^[1]. 稻瘟病是导致全球水稻产量减少和品质下降的最主要因素,每年可导致10%~35%的减产,当植株发病严重时甚至会引起绝收^[2]. 病原菌稻瘟病菌是一种可以在水稻各个发育期对水稻全株进行侵染的真菌,其无性态属于无性态类梨孢属真菌,称为稻梨孢(*Pyricularia oryzae*),有性态属于子囊菌门巨座壳属真菌,称为稻巨座壳菌(*Magnaporthe oryzae*).

稻瘟病菌作为异宗配合的子囊真菌,其交配型由单个交配型基因 *MAT*(mating type)位点上的两个等位基因即 *MATI-1* 和 *MATI-2* 调控. 在对峙培养条件下,两种不同交配型的具有育性的菌株可以诱导产生有性态. 然而,关于稻瘟病菌在自然条件下是否发生有性生殖,目前还没有确切的结论^[3].

由于稻瘟病菌具有有性繁殖潜力,其交配类型被认为是预测遗传多样性和毒力程度的有用标准,而交配类型分布在世界范围内具有明显的多样性. 如 PARK^[4]、URAK^[5] 和李文强^[6] 等分别在韩国、美国加利福尼亚州中北部和宁夏稻瘟病菌只检测出一种交配型 *MATI-1*; 而 SIRISATHAWORN 等^[7] 研究结果表明泰国稻瘟病菌遗传多样性水平较低,仅表现出一种交配型 *MATI-2*. IMAM 等^[8] 在印度检测到了 *MATI-1* 和 *MATI-2* 两种交配型.

在之前的研究中,一般采用 *MAT* 分子标记扩增的方式对交配型进行研究^[4-8]. 尽管这种方法可行,但它存在一些缺点,例如无法区分显性纯合子和杂合子基因型,以及提供的信息不完整.

武陵山区稻田多分布在沟、漕及峡谷中,水稻生长期间多湿寡照,导致稻瘟病发病范围广,病原菌种群数量大,生理小种变异频繁. 由于其独特的自然条件,是我国稻瘟病防治的重点地区,也是调查和研究稻瘟病原菌的理想地区. 为了保存并研究武陵山区稻瘟病菌的天然资源库,本研究团队从2010年起在鄂西南建立了10个不同生态环境的稻瘟病观测采样基地,构建了武陵山区稻瘟病菌生理小种文库,为研究武陵山区稻瘟病菌流行演替规律打下了坚实的材料基础^[9-13]. 在前期研究中在武陵山区稻瘟病菌菌株中发现了两种交配型的存在,推断

有性重组是该区稻瘟病菌群体丰富遗传多样性的潜在机制^[14]. 本研究进一步对2017—2018年分离的稻瘟病菌株开展交配型基因分子标记鉴定以及育性分析,并结合致病性鉴定的结果,对该地区稻瘟病菌的致病性与交配型之间的关系进行了分析.

1 材料和方法

1.1 稻瘟病菌样品

菌株:实验室2017—2018年从鄂西南地区采集的感穗颈瘟稻秆上分离的稻瘟病菌. 分离、活化保藏步骤参考论文^[15]. 其中2017年的分离保存稻瘟病菌菌株104个,2018年的分离保存稻瘟病菌菌株133个,共计237株.

1.2 稻瘟病菌致病性鉴定

稻瘟病菌采用燕麦培养基,致病性鉴定采用三个标准水稻鉴别品系的组合,其中包含日本水稻鉴别品种12个,中国鉴别品种7个,单基因系鉴别品种21个. 将稻瘟病菌孢子悬浮液(浓度为 3×10^5 个/mL)吹打至生长至三叶或四叶期的鉴别品种叶片表面,在95%湿度、25℃的环境下暗光静置1d. 取出后保持环境湿度在50%以上,于16h光照/8h暗光的条件下培养6d. 根据国际水稻所调查标准对植株的感(S)及抗(R)的类型进行统计. 具体方法和步骤详见本实验室论文^[14].

1.3 交配型基因扩增

稻瘟病菌基因组DNA的提取采用CTAB法,具体方法和步骤如文献所示^[16]. 交配型基因PCR扩增的程序及引物序列详见参考文献^[17].

1.4 HRM(high resolution melting)分析

根据NCBI数据库中交配型基因序列设计了*MAT*基因进行HRM分析的qPCR引物(表1). 熔解曲线的分析程序:95℃变性15s,60℃退火10s,72℃延伸30s,以1.6℃/s的速率升温. 并采用QuantStudio™ Design & Analysis Software软件对结果进行HRM分析.

1.5 育性分析

两株交配型不同的高可育亲本对分离自鄂西南地区2年共237株稻瘟病菌在实验室条件下的对峙培养及育性分析,对产生育性的菌株在同样的实

表1 交配型基因qPCR扩增引物

Tab. 1 qPCR amplification primers of mating type gene

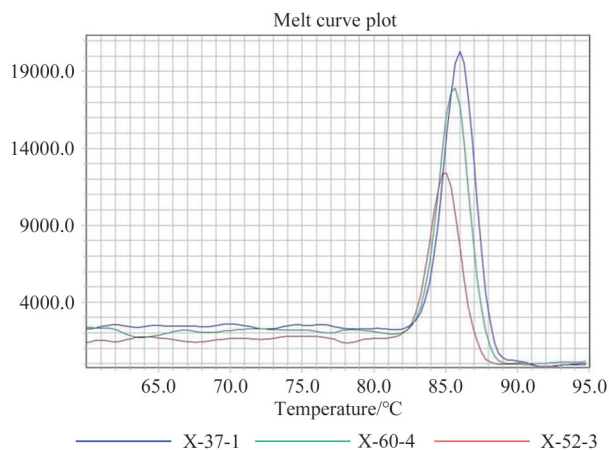
引物名称	引物序列(5'-3')
<i>MAT1-1-F</i>	ATTGACTTTGCCATGTTGG
<i>MAT1-1-R</i>	TGTCAGACCCTCTTCCGTG
<i>MAT1-2-F</i>	CGCCCAAATCAACAATTCCAACAA
<i>MAT1-2-R</i>	CTCCTGAAAGCGCCTCAAGTTG

验条件下进行两两组合进行杂交,对是否有育性进行鉴定和分析,具体方法和步骤详见参考文献[17].

2 结果与讨论

2.1 交配型基因频率

为了判断不同菌株相同交配型基因是否具有差异,选取3株毒性具有差异且都具有 *MAT1-1* 的菌株进行HRM分析.通过qPCR图像可知,不同的菌株间 T_m 值存在显著差异(图1).说明它们的 *MAT1-1* 基因序列有差异.采用生物信息学工具 Clustal Omega 对测序结果进行比对分析,分析结果如图2所示.菌株 X-52-3 在 *MAT1-1* 的 50 位处由碱基 C 突变为碱基 T,菌株 X-60-4 在 *MAT1-1* 的 270 位处由碱基 A 突变为碱基 G. qPCR 结果与测序结果相吻合,可用于检测基因突变,为基因分型提供了新的解决思路.

图1 *MAT1-1* 基因的qPCR熔解曲线Fig. 1 qPCR Melting curve of *MAT1-1* gene

根据交配型基因扩增的结果,2017年菌株的交配型以 *MAT1-2* 为主,占据了 53.85% 的比例,而 *MAT1-1* 占据了 46.15%. 相比之下,2018年的交配型分布发生了变化,*MAT1-1* 占据了优势地位,达到了 62.41%,而 *MAT1-2* 则占据了 40.6%. 值得注意的是,有4株菌株同时表现出两种交配型(图3).

进一步对不同地区的稻瘟病菌群体交配型分析发现,鹤峰地区两年间只检测到了 *MAT1-2* 一种

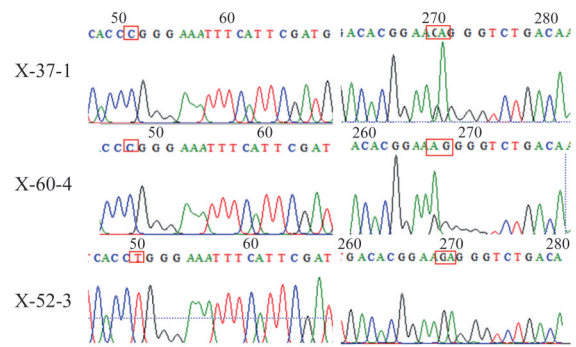
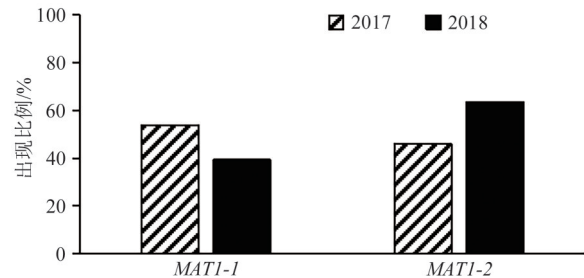
图2 *MAT1-1* 交配型基因不同 T_m 值序列比对Fig. 2 Sequence alignment of *MAT1-1* mating type genes with different T_m values

图3 2017—2018年菌株交配型出现比例

Fig. 3 The proportion of mating types of isolates from 2017 to 2018

交配型,来凤和柏杨地区两年间都以 *MAT1-1* 为主,咸丰和建始两地由2017年交配型以 *MAT1-1* 为主转变为2018年以 *MAT1-2* 为主,且建始地区2018年并未检测到交配型 *MAT1-1*. 2017和2018年的菌株交配型分布存在差异,这可能意味着菌群遗传结构正在发生变化.通过有性生殖,新的突变可能产生,从而导致相应的抗性水稻品种失去抗性.除了鹤峰地区外,其他地区都存在两种交配型同时存在的现象(建始地区在2018年仅存在 *MAT1-2*,表2).以上结果表明,武陵山区稻瘟病群体同时存在两种交配型,是该地区菌群致病性变异的潜在原因.

2.2 致病性鉴定

对 *MAT* 型数据进行分组探究不同交配型的侵染率.40个鉴定品种中,24个鉴定品种在两年间均表现为 *MAT1-2* 型菌株成功侵染的数量多于 *MAT1-1* 型菌株.其余的16个鉴定品种中,15个鉴定品种在2017年时 *MAT1-1* 型侵染成功数量多,到2018年则变为 *MAT1-2* 型侵染数量多.仅有一个鉴定品种(关东51)在2017年时 *MAT1-2* 型侵染成功数量多,到2018年变为 *MAT1-1* 型侵染数量多(图4).两年间 *MAT1-2* 型菌株侵染成功的比例增大,且整体上 *MAT1-2* 型侵染成功的数量多于 *MAT1-1* 型.推测鄂西南地区稻瘟病菌群体是由于部分 *MAT1-2* 型菌株毒性高于 *MAT1-1* 型菌株,导致群体致病性发生了

表 2 2017—2018 年鄂西南地区稻瘟病菌不同交配型出现频率
Tab. 2 Frequency of different mating types of *M. oryzae* in Southwest Hubei Province from 2017 to 2018

地区	年份	交配型/%		
		<i>MATI-1</i>	<i>MATI-2</i>	<i>MATI-1</i> & <i>MATI-2</i>
柏杨	2017年	87.50	12.50	0.00
	2018年	48.98	46.94	4.08
鹤峰	2017年	0.00	100.00	0.00
	2018年	0.00	100.00	0.00
建始	2017年	85.19	14.81	0.00
	2018年	0.00	100.00	0.00
来凤	2017年	83.33	16.67	0.00
	2018年	92.31	7.69	0.00
咸丰	2017年	83.33	16.67	0.00
	2018年	16.13	80.65	3.23
宣恩	2017年	5.88	94.12	0.00
	2018年	5.56	88.89	5.56
忠路	2017年	16.67	83.33	0.00
野三关	2018年	88.89	11.11	0.00

变化.

2.3 育性分析

对上述 237 株稻瘟病菌在实验室条件下进行对峙培养及分析,发现仅 3 株稻瘟病菌可与两亲本之一在交界处形成子囊壳带结构(图 5(a)). 而剩余的稻瘟病菌无法与亲本产生有性结构,在其接触边缘只能观察到气生菌丝的存在(图 5(b)). 将 3 株产生育性的菌株在同样的实验条件下进行两两组合进行杂交,但在 20 d 之后并未发现子囊壳带结构的存在,说明在分离的稻瘟病菌间没有检测到育性.

3 结论

传统的交配型检测方法,如 PCR 扩增后进行琼脂糖凝胶电泳,既耗时又费力,难以进行大规模检测. 而本实验中,稻瘟病菌的交配型基因通过溶解

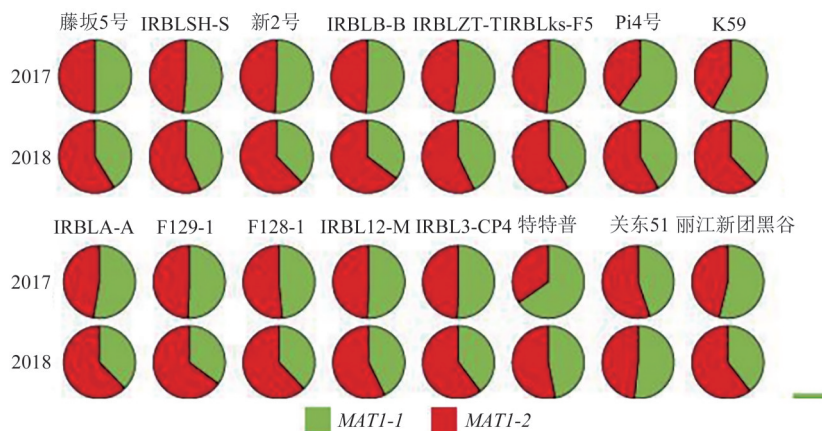
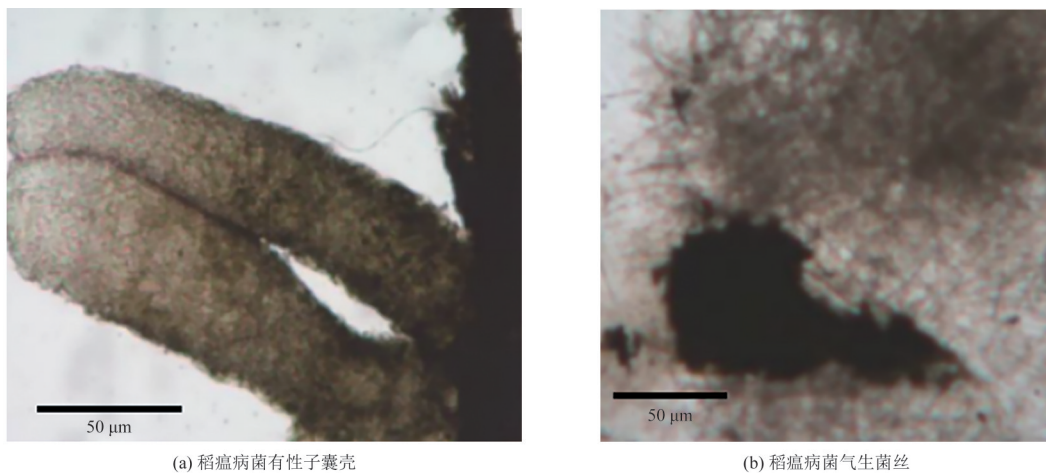


图 4 不同 MAT 型的稻瘟病菌成功侵染比例

Fig. 4 The successful infection proportion of different MAT types of *M. oryzae*



(a) 稻瘟病菌有性子囊壳

(b) 稻瘟病菌气生菌丝

图 5 稻瘟病菌有性子囊壳及气生菌丝的镜检

Fig. 5 Microscopic examination of perithecia and aerial hyphae of *M. oryzae*

曲线检测,其结果与测序结果相一致,印证了HRM分析技术能够快速、准确地鉴别交配型基因分型。这一方法显著缩短了检测时间,并可应用于大规模的交配型检测。此外,该方法不仅适用于异宗配合的子囊真菌交配型的检测,还有望在丝状真菌交配型检测领域进行推广^[18]。这对于研究真菌遗传变异具有重要意义。

通过对鄂西南地区 2017—2018 年收集到的病菌进行交配型基因的 MAT 标记及致病性鉴定,发现致病性与交配型基因存在一定联系。实验结果推测鄂西南地区不同交配型的稻瘟病菌之间的毒力具有一定区别,鄂西南地区稻瘟病菌群体可能是由于部分 MAT1-2 型菌株毒性高于 MAT1-1 型菌株,导致群体交配型基因频率发生变化。董丽英等^[19]对云南省分离的 99 个稻瘟病菌交配型测定发现 MAT1-1 和 MAT1-2 菌株分别占 60.9% 和 39.1%。张晓玉等^[20]对黑龙江省稻瘟病菌交配型进行测定发现黑龙江省稻瘟病菌群体中同时存在 MAT1-1 和 MAT1-2 两种交配型,主要以交配型 MAT1-1 占优势,出现频率为 58.92%。稻瘟病交配型地区上的差异明显,致病性上没有明显差异,说明不同交配型的稻瘟病菌之间的毒力或许无明显区别。稻瘟病菌起源于云南、老挝等地区,张晓玉等^[20]在黑龙江等地也检测到了双交配型菌株以及育性菌株的存在,这一方面说明了稻瘟病菌在我国分布较广,同时有性菌株的存在可能会造成群体的遗传物质更容易发生新的变异,导致部分前期抗病数据在后续作用较低。汪文娟等^[21]虽然在广东省也检测到了 1 株双交配型植株,但绝大部分还是只检测到了 MAT1-2 型,说明稻瘟病菌在田间还是以无性繁殖为主。稻瘟病菌交配型与致病性之间的关系有待于进一步的研究。

2018 年在鄂西南地区稻瘟病菌群体中出现了同时具有两种交配型菌株的存在,可能这期间是鄂西南地区群体刚开始少量进行有性生殖的时间点^[14]。尽管鄂西南地区的稻瘟病菌在与云南农科院的高可育菌株在培养基上相遇后可以产生子囊壳带结构以及有性后代,但是鄂西南地区的菌株之间没有产生有性结构。王宝华等^[17]对福建地区 277 个稻瘟病菌菌株育性进行检测,其中 184 株菌株为可育菌株。李文强等^[6]对宁夏地区 460 个稻瘟病菌菌株育性进行检测,其中 363 株菌株为可育菌株。推测鄂西南地区 2017—2018 年采集的稻瘟病菌未出现有性结构可能是由于该地区稻瘟病菌在实验室条件下育性较低。

本研究结果表明武陵山区稻瘟病菌 2017—2018 年存在 MAT1-1 基因比例下降, MAT1-2 基因比例上升的趋势,且该变化趋势与不同交配型的侵染成功率一致。2017—2018 年群体结构的剧烈改变推测是由于在自然条件下其通过有性生殖产生有性后代从而导致稻瘟病菌遗传多样性增加导致,同时双交配型菌株及无交配型菌株的出现暗示着其在自然条件下存在着一定有性生殖的可能。本研究对鄂西南地区稻瘟病菌群体的交配型、致病力及育性之间的关系进行了分析,为预测该地区稻瘟病菌群体的流行演替规律奠定了基础。

参 考 文 献

- [1] WILSON R A, TALBOT N J. Under pressure: Investigating the biology of plant infection by *Magnaporthe oryzae* [J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2009, 7(3): 185-195.
- [2] 徐鑫,姜伟高,梁华兵,等. 稻瘟病抗性基因 *Pita2* 的克隆及其介导的防御相关基因表达分析[J]. *中南民族大学学报(自然科学版)*, 2021, 40(1): 26-31.
- [3] DAYAKAR B V, NARAYANA N N, GNANAMANICKAM S S. Cross compatibility and distribution of mating type alleles of the rice blast fungus *Magnaporthe grisea* in India [J]. *Plant Disease*, 2000, 84: 700-704.
- [4] PARK S Y, MILGROOM M G, HAN S S, et al. Genetic differentiation of *Magnaporthe oryzae* populations from scouting plots and commercial rice fields in Korea [J]. *Phytopathology*, 2008, 98(4): 436-442.
- [5] URAK R Z, DOUHAN G W, WONG F. Mating-type distribution of the rice blast pathogen *Pyricularia grisea* in California [J]. *UCR Undergraduate Research Journal*, 2008, 2: 61-65.
- [6] 李文强,王源超,郑小波. 宁夏稻瘟病菌的交配型与育性[J]. *中国水稻科学*, 2007, 21(6): 650-656.
- [7] SIRISATHAWORN T, SRIRAT T, LONGYA A, et al. Evaluation of mating type distribution and genetic diversity of three *Magnaporthe oryzae* avirulence genes, *PWL-2*, *AVR-Pii* and *Avr-Piz-t*, in Thailand rice blast isolates [J]. *Agriculture and Natural Resources*, 2017, 51(1): 7-14.
- [8] IMAM J, ALAM S, MANDAL N, et al. Molecular diversity and mating type distribution of the rice blast pathogen *Magnaporthe oryzae* in North-East and Eastern India [J]. *Indian Journal of Microbiology*, 2015, 55(1): 108-113.
- [9] 韩豪杰,韩旭晨,谭艳平,等. 鄂西南地区 24 个水稻品种稻瘟病发病比较[J]. *中国农学通报*, 2020, 36(16): 115-119.
- [10] 田珂,杨武,李泌,等. 鄂西南地区 2012—2014 年

- 稻瘟病菌致病性变化分析[J]. 华中农业大学学报, 2017, 36(5): 10-14.
- [11] 韩豪杰. 鄂西南地区无毒基因 *Avr-piz1* 和 *Avr-pita* 变异机理及 2018 年稻瘟病菌群体多态性分析[D]. 武汉: 中南民族大学, 2020.
- [12] 韩旭晨. 鄂西南地区无毒基因 *Avr-Pia* 和 *Avr-pi54* 变异机理和动态变化及 2019—2020 年稻瘟病菌群体多态性分析[D]. 武汉: 中南民族大学, 2022.
- [13] 杨武. 鄂西南地区 2016—2017 年稻瘟病菌群体多态性分析[D]. 武汉: 中南民族大学, 2019.
- [14] XU X, TANG X, HAN H, et al. Pathogenicity, mating type distribution and avirulence gene mutation of *Magnaporthe oryzae* populations in the Wuling Mountain region of China [J]. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 2021, 101716.
- [15] 李泌, 王春台, 周杰, 等. 2011 年鄂西南地区水稻稻瘟病菌遗传多样性分析[J]. 安徽农业科学, 2014, (14): 4249-4251.
- [16] MOLINARI C, TALBOT N J. A basic guide to the growth and manipulation of the blast fungus, *Magnaporthe oryzae*[J]. *Microbiology section*, 2022, 2(8): e523.
- [17] 王宝华, 李海明, 鲁国东, 等. 稻瘟病菌群体育性分析的主要影响因子研究[J]. 植物病理学报, 2007, 37(2): 144-150.
- [18] 房文文, 姜艳芳, 王海凤, 等. 利用 HRM 标记检测山东省稻瘟病菌群体的交配型分布[J]. 山东农业科学, 2022, 54(5): 134-138.
- [19] 董丽英, 刘树芳, 田维遼, 等. 云南省稻瘟病菌群体的致病性分析及交配型分布[J]. 植物保护学报, 2023, 50(2): 316-324.
- [20] 张晓玉, 张亚玲, 靳学慧, 等. 黑龙江省稻瘟病菌育性及其交配型分析[J]. 植物保护学报, 2020, 47(1): 93-100.
- [21] 汪文娟, 苏菁, 陈深, 等. 广东省侵染美香占 2 号的稻瘟病菌致病性及无毒基因变异分析[J]. 中国农业科学, 2022, 55(7): 1346-1358.

(责编&校对 姚春娜)