

稗草病原真菌 AAE 的分子鉴定及其粗蛋白诱导水稻的稻瘟病抗性

王 玲¹ 黄世文^{1,2,*} 王全永^{1,2} 鄂志国¹ 王 磊¹ 张建萍¹ 朱德峰¹ 傅 强¹

(¹ 中国水稻研究所, 浙江 杭州 310006 ; ² 广西大学 农学院, 广西南宁 530003 ; * 通讯联系人, E mail : shiwenhuang666@yahoo . com . cn)

Molecular Identification of Barnyardgrass Pathogenic Fungus AAE and Its Protein Induced Rice Resistance Against *Magnaporthe grisea*

WANG Ling¹ , HUANG Shi wen^{1,2,*} , WANG Quan yong^{1,2} , E Zhi guo¹ , WANG Lei¹ , ZHANG Jian ping¹ , ZHU De feng¹ , FU Qiang¹

(¹ China National Rice Research Institute , Hangzhou 310006 , China ; ² Agricultural College , Guangxi University , Nanning 530003 , China ; * Corresponding author , E mail : shiwenhuang666@yahoo . com . cn)

Abstract : Strain AAE is a pathogenic fungus isolated from infected barnyardgrass (*Echinochloa* sp .) samples . Crude protein of AAE could induce the resistance of rice seedlings against *Magnaporthe grisea* by significantly alleviating the occurrence of rice blast and the blast severity was reduced by 23 . 55 % . The internal transcribed space (ITS) sequence of the AAE was amplified by PCR and subsequently sequenced . BLAST search of this conserved sequence in GenBank indicated that AAE belongs to *Alternaria* genus , and the accession number of GenBank is EF192234 . The ITS based phylogenetic tree was also constructed . Strain AAE and *Alternaria alternata* were on the same clade , sharing 99 . 2 % homology . By combining morphological characteristics with phylogenetic analysis , AAE was identified as *Alternaria alternata* .

Key words : *Alternaria alternata* ; induced resistance ; *Magnaporthe grisea* ; internal transcribed space ; phylogenetic analysis

摘 要 : 从感病稗草标样上分离到一株病原真菌 AAE , 其粗蛋白预处理的水稻幼苗接种稻瘟病菌后 , 稻瘟病的发病显著减轻 , 诱抗效果达 23 . 55 % 。 用 PCR 技术扩增了该菌的内转录间隔区基因序列 , 并进行了测序 , GenBank 登录号为 EF192234 。 BLAST 同源检索结果显示与该序列高度同源的均为链格孢属的内转录间隔区基因序列 。 选取同源性高的菌株的内转录间隔区基因序列进行系统发育分析 , 发现菌株 AAE 与 *Alternaria alternata* 处于同一分枝 , 相似性为 99 . 2 % , 结合形态特征将它鉴定为 *Alternaria alternata* 。

关键词 : 链格孢菌 ; 诱导抗性 ; 稻瘟病菌 ; 内转录间隔区 ; 系统发育分析

中图分类号 : Q933 ; S435 . 111 . 4 + 1 ; S482 . 2

文献标识码 : A

文章编号 : 1001-7216(2008)03-0327-04

稻瘟病是由 *Magnaporthe grisea* 引起的一种病害 , 广泛分布于栽培水稻的国家和地区 , 是水稻三大病害之一 , 每年都造成严重损失 , 如 1975 - 1990 年间全世界 11 % ~ 30 % 的水稻因稻瘟病而颗粒无收^[1] 。 20 世纪 90 年代以来 , 我国稻瘟病的年发生面积均在 380 万 hm² 以上 , 年损失稻谷达数亿 kg^[1] 。 长期的生产实践证明 , 水稻抗稻瘟病品种的选育和生物防治稻瘟病是行之有效的措施 。 但由于抗瘟品种的单一化和稻瘟病菌生理小种复杂易变 , 往往造成抗病品种在推广种植 3 ~ 5 年后即因产生能侵染该品种的优势小种而导致水稻品种的抗性丧失 。 近年来 , 利用生物因子诱导水稻对稻瘟病的抗病性发展非常迅速 , 如用表达 *Harpin* 基因的大肠杆菌 DH5 菌悬液处理水稻可提高对稻瘟病的抗性^[2] ; 用非致病性的稻瘟病菌菌株控制由稻瘟病菌引起的稻瘟病^[3] ; 将拮抗细菌用于稻瘟病的防治^[4] 等。

在真菌学研究中 , 传统的菌物分类以形态特征和生理生化指标为基础 , 但大部分菌物的种类多、分布广、形态特征复杂 , 且少数形态特征和生理生化指标随着环境的变化而不稳定 。 近年来分子生物学技术在真菌学研究中得到了广泛而深入的应用 , 一些分类地位不明确、亲缘关系不清楚的物种通过该技术得到了验证^[5] 。 真菌的核糖体基因序列由于存

在高度保守区和可变区被认为是目前真菌分子系统学研究的理想部位^[6] , 尤其是 5 . 8S rDNA 及其两侧的内转录间隔区 (internal transcribed space , ITS) 序列适用于种级水平的分类研究^[7] 。 本研究报道了从自然感病稗草上分离筛选到的一株生防菌株 AAE^[8] , 该菌株的粗蛋白能诱导水稻对稻瘟病的抗性 , 并根据其形态培养特征以及 ITS 序列分析 , 对该菌株进行了初步鉴定。

1 材料与方 法

1 . 1 供试材料

供试菌种 AAE 由本实验室从感病稗草标样中分离保存 。 稻瘟病菌 (*Magnaporthe grisea*) TH16 菌株由本实验室保存 。 供试的水稻品种为原丰早。

收稿日期 : 2007-03-07 ; 修改稿收到日期 : 2007-05-22。

基金项目 : 农业部农业科技跨越计划资助项目 (2005 跨 001 , 2005 跨 002) ; 浙江省科技计划资助项目 (2006C34008) ; 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金资助项目 (CNRRI , 2006RG013) ; 超级稻配套栽培技术开发与技术集成资助项目 ; 水稻重大病虫害防控技术资助项目 (2006BAD08A04) 。

第一作者简介 : 王 玲 (1981 -) , 女 , 硕士 , 研究实习员。

1.2 培养基

PDA 培养基 (马铃薯 200 g、葡萄糖 20 g、琼脂 20 g 加蒸馏水至 1000 mL) 用于稻瘟病菌和菌株 AAE 的培养; PDB 培养基 (马铃薯 200 g、葡萄糖 20 g、加蒸馏水至 1000 mL) 用于发酵培养。

1.3 真菌蛋白的提取

将在 PDB 培养基中培养好的菌液抽成菌饼, 用液氮研磨成细粉, 加入 0.05 mol/L 磷酸缓冲液 (pH 7.8), 混合均匀, 于 4、8 000 r/min 下离心 15 min (下同)。取上清加入固体硫酸铵至 90% 饱和度, 4 下静置过夜, 离心, 收集沉淀。用适量 0.05 mol/L Tris HCl 缓冲液 (pH 8.0) 溶解后, 在相同的缓冲液中透析 24 h, 其间更换 3 次缓冲液, 离心, 收集的上清液即为 AAE 真菌蛋白粗提液, 置 4 下保存。取少量粗提液做 SDS PAGE 电泳检测^[9], 其余置 -20 冰箱中保存。

1.4 稻瘟病菌孢子的培养

采用大麦粒培养基接种稻瘟病菌, 于 28 下培养 10 d, 加适量灭菌水冲洗菌丝, 沥干水摊一薄层于灭菌瓷盘中, 置于黑暗下保湿培养 3~4 d, 将长满稻瘟病菌孢子的大麦粒于 28 下烘干备用。

1.5 真菌蛋白处理对稻瘟病的抑制作用

将含 0.05% Tween 20 的 100 μg/mL 粗蛋白液喷雾于 3 叶 1 心期稻苗上, 直至全部植株叶片湿润为止。以含 0.05% Tween 20 双蒸水喷雾作对照。2 d 后将浓度为 5 × 10⁵ 个/mL 的稻瘟菌孢子悬浮液均匀喷于稻苗叶片上。在 28 的恒温暗室内保湿培养 24 h 后继续置于室温下培养。7 d 后记载每株苗发病最严重叶片的病斑数目、病斑大小 (长和宽), 分级记载病级^[10], 计算病情指数及诱导效果。病情指数 = (各级病叶数 × 相对级数值) / (调查总数 × 9) × 100; 诱抗效果 = (对照病情指数 - 处理病情指数) / 对照病情指数 × 100%。

1.6 菌株 AAE 的鉴定

1.6.1 菌株培养性状和形态特征观察

将菌株移植于 PDA 培养基平板上, 恒温培养 7 d 后观察菌株的形态培养特征, 洗下孢子, 取分生孢子悬浮液滴在玻片上, 在显微镜下观察分生孢子梗和分生孢子的形态。

1.6.2 ITS 基因序列测定和系统发育分析

CTAB 法抽提菌丝体总 DNA^[11]。使用通用引物 ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') 和 ITS2 (5'-TCCTCGCTTATTGATATGC-3') 进行 ITS 片段的 PCR 扩增^[12]。PCR 产物用 DNA 纯化试剂盒 Agrose Gel DNA Purification Kit Ver 2.0 回收纯化, 再进行双向测序。通过

BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 对测序结果进行分析, 并在 GenBank 中注册。调出 GenBank 中与菌株 AAE 的 ITS 同源性高并经过菌种鉴定的序列, 用 ClustalW 进行多重序列比对, 软件 MEGA2.1 按 Neighbor Joining 法构建系统发育树, 系统树各分枝的置信度由 1000 次自展法 (Bootstrap) 重复检测获得。

2 结果与分析

2.1 真菌蛋白的 SDS PAGE 分离结果

AAE 菌株粗蛋白用 SDS PAGE 分离到 20 条左右分子量在 14~97 kD 的条带, 有 11 条较明显的主带 (图 1)。

2.2 真菌蛋白处理水稻对稻瘟病菌的诱导抗性作用

真菌粗蛋白预处理提高了水稻对稻瘟病的抗性, 表现为发病时间迟, 病斑扩散慢。平均病斑数量减少了 26.87%, 病斑长度缩短了 34.68%, 病斑宽度减小了 36.36%, 差异显著, 对水稻幼苗的诱抗效果达到了 23.55% (表 1)。结果表明, 粗蛋白预处理后水稻自身的抗性得到了明显增强。

2.3 菌株 AAE 的鉴定

2.3.1 培养性状和形态特征

菌株在 PDA 培养基上菌落平展, 棉絮状, 灰褐色, 背面褐色, 表面长有白色绒毛状的菌丝。菌丝体埋生, 菌丝淡褐色、光滑, 具隔膜, 常分枝, 宽 2.0~3.5 μm。分生孢子梗端生或侧生, 单生或簇生, 直立。分生孢子单生或短链生, 倒棍棒形、倒梨形, 淡褐色至褐色, 光滑, 有 3~7 个横隔膜, 1~3 个

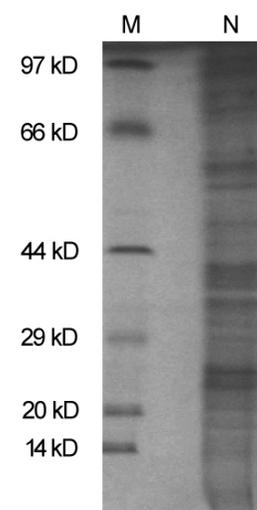


图 1 AAE 菌株粗蛋白 SDS PAGE 分析

Fig.1. SDS PAGE analysis of AAE crude protein.

M - 标准谱带; N - AAE 菌株蛋白。

M, Protein molecular weight marker; N, AAE strain protein.

表 1 经 AAE 粗蛋白预处理的水稻幼苗接种稻瘟病菌后的发病情况

Table 1. Disease severity of rice seedlings pre treated with crude protein of AAE by *Magnaporthe oryzae*.

处理 Treatment	每张叶片的病斑数 Number of lesions per leaf	病斑长度 Lesion length /cm	病斑宽度 Lesion width /cm	病情指数 Disease index	诱抗效果 Effect of induced resistance/%
AAE 粗蛋白预处理 Pre treated with AAE crude protein	3.89 ± 0.23 b	1.13 ± 0.19 b	0.14 ± 0.02 b	45.67 ± 3.56 b	23.55 ± 0.25
对照 CK	5.32 ± 0.22 a	1.73 ± 0.21 a	0.22 ± 0.04 a	58.54 ± 4.21 a	-

同一列中, 数据后跟不同小写字母者表示差异达 5% 显著水平。

Within a column, data followed by different lowercase letters indicate significant difference at P < 0.05 level.

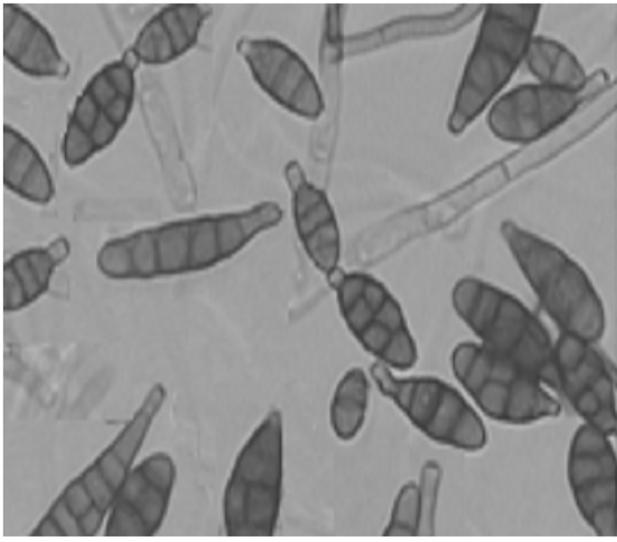
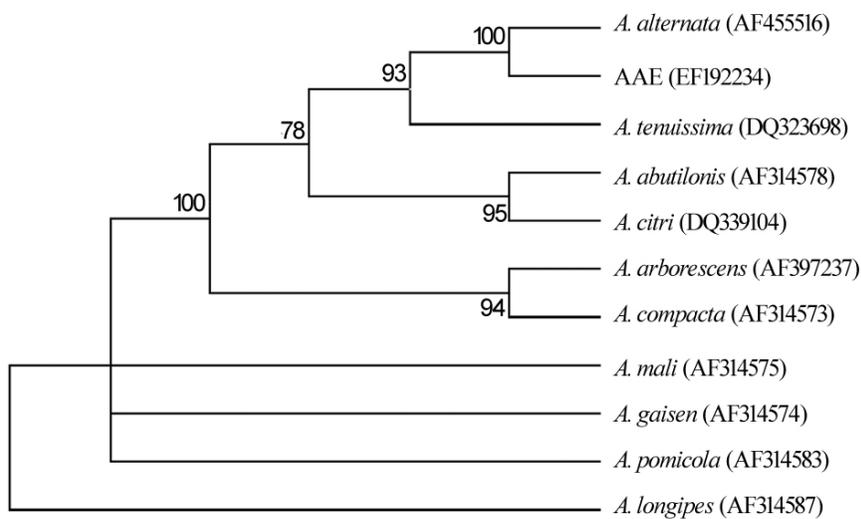


图2 菌株 AAE 的分生孢子形态

Fig. 2 . Conidia of AAE fungus .

图3 菌株 AAE 与 *Alternaria* 属其他种构建的以 ITS 基因序列为基础的系统发育树Fig. 3 Neighbor Joining tree showing the phylogenetic relationships among AAE and other ITS based related species of *Alternaria* from GenBank .

纵、斜隔膜,隔膜处一般不缢缩,大小(18.0~35.0) $\mu\text{m} \times$ (8.0~14.5) μm ,具短喙,锤状或少数近圆柱状,部分分生孢子的顶端有短柱状的假喙(图2)。

2.3.2 菌株 AAE 的 ITS 序列测定和系统发育分析

用 PCR 技术扩增了该菌的 ITS 基因序列,并进行了测序(GenBank 登录号为 EF192234)。用 Clustalw 软件将该序列与 GenBank 中所有序列进行比对,结果发现,在亲缘关系相近的序列中,前 70 个菌株中 90% 为 *Alternaria* 属的菌株,从 GenBank 数据库调集 *Alternaria* 属有效发表种典型菌株的 ITS 基因序列进行比较,按 Neighbor Joining 法构建系统发育树(图3)。结果表明,菌株 AAE 与链格孢属的 *A. alternata* 和 *A. tenuissima* 系统发育关系最密切,分别以 99.2% 和 98.6% 的 ITS 基因序列相似性聚为一簇,其中 AAE 与 *A. alternata* 发育关系更近,单独构成一个分枝,且以很高的分枝值相聚(bootstrap value 为 100)表明这两者具有非常近的亲缘关系。

3 讨论

近年来,病原菌致病相关基因及其产物在非寄主植物上的作用,以及在非寄主植物上引起的过敏性反应(hypersensi-

tive response, HR) 和系统获得抗性(systemic acquired resistance, SAR)过程中的识别、信号传导和调控防卫基因表达等,成为了分子生物学和分子植物病理学研究的热门领域。Wei 等^[13] 从梨火疫病病菌(*Erwinia amylovora*) 中分离和表达能够激发非寄主烟草产生 HR 的 HarpinEa 蛋白激发子。董汉松等^[14] 证明,非特异性激发子 HarpinEa 诱导的 SAR 是由水杨酸这一信号传导分子途径进行的。Perez 等^[15] 认为由疫霉属(*Phytophthora*) 和腐霉属(*Pythium*) 的某些种产生的低分子量蛋白 elicitors 和糖蛋白具有无毒基因(avr) 激发子活性,可诱导 HR 和 SAR。从交链孢菌、稻瘟病菌、木霉菌和镰刀菌等多种真菌中筛选、分离、纯化出的一种新型蛋白也能激活植物体内免疫系统,提高植物自身免疫力^[16]。本研究的结果表明,真菌粗蛋白预处理水稻幼苗提高了对稻瘟病菌的抗性,表现为幼苗病斑数少、发病时间迟、病斑扩散慢,对水稻幼苗的诱抗效果达到了 23.55%。这说明真菌粗蛋白预处理可以诱导水稻对稻瘟病的抗病性,其诱导抗病性的机理可能是产生了特异性的蛋白激发子。本研究室将进一步对诱导水稻抗稻瘟病的信号传导蛋白分子进行分离、纯化。

链格孢属最初是由 Nees 以 *Alternaria tenuis* Nees 为模式种建立的^[11],该属真菌分生孢子具有纵横隔膜,与匍柄霉属 *Stemphylium*、细基格孢属 *Ulocladium*、假格孢属 *Nimbya*、小匙孢属 *Mystrosporiella* 和陷孢属 *Sirosporium* 等属的真菌在形态上极为相似^[17-19],且其形态易受生存环境的影响而发生较大幅度变异,仅靠分生孢子的形态不容易区分。本研究在菌株 AAE 形态分类的基础上,对其 rDNA 的 ITS 区段进行了序列分析。从 GenBank 上查找同源性高的菌株 ITS 序列,建立以 ITS 序列分析为基础的系统发育树,可以看出该菌株与 *Alternaria alternata* 在系统发育树状图中形成一个亚分枝,两者聚在同一分枝上的 Bootstrap 支持率为 100,结果与来自形态学方面的证据相符,进一步将它确定为 *Alternaria alternata*。

参考文献:

- [1] 孙国昌,杜新法,陶荣祥,等.水稻稻瘟病防治策略和 21 世纪研究展望.植物病理学报,1998,28(4):289-292.
- [2] 赵立平,梁元存,刘爱新,等.表达 harpin 基因的大肠杆菌 DH5(pCPP430)诱导植物抗病性的研究.高技术通讯,1997,9:14.
- [3] Manandhar H K, Jorgensen H J L, Mathur S B, et al. Suppression of rice blast by preinoculation with avirulent *Pyricularia oryzae* and nonrice pathogen *Bipolaris sorokiniana*. *Phytopathology*, 1998, 88(7):735-739.
- [4] 林福呈,徐 站,林维挺,等.稻瘟病菌的拮抗细菌筛选.浙江农业大学学报,1998,24(6):591-594.
- [5] 王源超,张正光,郑小波.核糖体基因 ITS 作为苜蓿疫霉、恶疫霉分类辅助性状的研究.菌物系统,2000,19(4):485-491.
- [6] Brower A V Z, Desalle R, Vogler A. Gene tree, species trees, and systematics: A cladistic perspective. *Ann Rev Ecol Syst*, 1996, 27:423-450.
- [7] Bruns T D, White T J, Taylor J W. Fungal molecular systematics. *Ann Rev Ecol Syst*, 1991, 22:525-564.
- [8] 黄世文,卢继英,赵 航,等.稗草病原菌防御性接种防治稻

- 瘟病研究初报. 中国水稻科学, 2005, 19(4): 384-386.
- [9] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989: 16-34.
- [10] International Network for Genetic Evaluation of Rice (INGER). Standard Evaluation System for Rice. 4th edn. Manila: International Rice Research Institute, 1996: 17-19.
- [11] Edwards K, Johnstone C, Thompson C. A simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR analysis. *Nucl Acids Res*, 1991, 19: 1349.
- [12] White T J, Bruns T, Lee S. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics//PCR Protocols: A Guide to Methods and Application. New York: Academic Press Inc., 1990: 315-322.
- [13] Wei Z M, Lady R J, Zumoff C H, et al. Harpin, elicitor of the hypersensitive response produced by the plant pathogen *Erwinia amylovora*. *Science*, 1992, 257(5066): 85-88.
- [14] 董汉松. 植物抗病防卫基因表达调控与诱导抗性遗传的机制. 植物病理学报, 1996, 26: 289-293.
- [15] Perez V, Huet J C, Nespoulous C, et al. Mapping the elicitor and necrotic sites of phytophthora elicitors with synthetic peptides and reporter genes controlled by tobacco defense gene promoters. *Mol Plant Microbe Int*, 1997, 10: 750-760.
- [16] 邱德文. 微生物蛋白农药研究进展. 中国生物防治, 2004, 20(2): 91-94.
- [17] 王洪凯, 张天宇, 张 猛. 链格孢属真菌分类研究进展. 山东农业大学学报, 2001, 32(3): 406-410.
- [18] 赵国柱, 张天宇, 曹爱新, 等. 基于 rDNA ITS 序列分析 *Alternaria* 与相似属的关系及 *A. leucanthemi* 的分类地位. 菌物学报, 2006, 25(4): 184-191.
- [19] 沈瑞清, 康萍芝, 张丽荣. 链格孢属 (*Alternaria* Nees) 与形态相似属区别的研究进展. 宁夏农林科技, 2003(6): 60-61.