

黑龙江省稻瘟病菌育性及其交配型分析

张晓玉 张亚玲 靳学慧* 周弋力 孟 峰 武菁菁

(黑龙江八一农垦大学, 黑龙江省植物抗性研究中心, 大庆 163319)

摘要: 为明确黑龙江省采集自不同年份、不同地区的稻瘟病菌 *Magnaporthe oryzae* 的育性能力和交配型分布, 采用2株标准菌株 GUY11 (*MAT1-2*) 和 KA3 (*MAT1-1*) 对2016—2017年黑龙江省西部、东部、中部3个地区经单孢分离的241株稻瘟病菌进行育性测定, 并利用PCR技术对其交配型进行检测。结果表明, 黑龙江省西部、东部、中部的241株稻瘟病菌中可育性菌株比例为11.62%, 其中雌性菌株、雄性菌株、两性菌株分别占1.66%、4.56%和1.25%, 不能判断其性别的未知菌株占4.15%。采集自不同地区、不同年份的稻瘟病菌可育性差异均较大, 西部、东部、中部地区可育性菌株出现频率分别为13.25%、7.27%和12.62%; 2016年采集的稻瘟病菌可育性较高, 可育性菌株出现频率为25.30%。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%, 交配型为 *MAT1-2* 的菌株出现频率为8.30%。不同地区稻瘟病菌的交配型亦有差异, 交配型为 *MAT1-1* 的菌株在黑龙江省东部地区出现频率最高, 为72.73%, 在中部、西部地区的出现频率次之, 分别为61.17%和46.99%。表明黑龙江省水稻种植区的稻瘟病菌同时存在2种交配型菌株, 其交配型存在丰富的多态性, 但其可育性及交配型分布不均衡。

关键词: 稻瘟病菌; 有性生殖; 交配型; 育性; PCR

Analysis of the fertility and mating type of rice blast fungus *Magnaporthe oryzae* in Heilongjiang Province

ZHANG Xiaoyu ZHANG Yaling JIN Xuehui* ZHOU Yili MENG Feng WU Jingjing

(Research Center of Plant Resistance in Heilongjiang, Heilongjiang Bayi Agricultural University,
Daqing 163319, Heilongjiang Province, China)

Abstract: In order to clarify the distribution of fertility and mating types of *Magnaporthe oryzae* collected from different regions of Heilongjiang Province and in different years, 241 isolates of *M. grisea* collected from western, eastern and central regions of Heilongjiang Province from 2016 to 2017 were tested for their mating types and fertility with two standard test isolates GUY11 (*MAT1-2*) and KA3 (*MAT1-1*) and their mating types were detected by PCR. The results showed that the percentage of fertile isolates in 241 isolates of *M. oryzae* was 11.62%, of which female isolates, male isolates and amphipathic isolates accounted for 1.66%, 4.56% and 1.25%, respectively, and unknown isolates that could not judge their sex accounted for 4.15%. The fertility of rice blast fungus collected from different regions and in different years varied greatly. The frequency of fertility isolates in western, eastern and central regions was 13.25%, 7.27% and 12.62%, respectively. The frequency of fertility isolates of *M. oryzae* collected in 2016 was higher (25.30%). There were two mating types of *MAT1-1* and *MAT1-2* existing simultaneously in Heilongjiang Province: mating type *MAT1-1* was dominant, the frequency was 58.92%, and the frequency of mating type *MAT1-2* was 8.30%. The mating types of *M. oryzae* in differ-

基金项目: 黑龙江省农垦总局科技攻关项目(HNK125A-08-06, HNK135-02-02), 黑龙江省教育厅项目(12521376)

* 通信作者 (Author for correspondence), E-mail: Jxh2686@163.com

收稿日期: 2019-03-27

ent regions also differed greatly. The isolate with mating type *MAT1-1* occurred the most frequently in the eastern part of Heilongjiang Province, the frequency was 72.73%, followed by the frequencies of the central and western regions, accounting for 61.17% and 46.99%, respectively. The results indicated that there were two mating isolates in the rice-growing areas of Heilongjiang Province, and the mating type was rich in polymorphism, but the distribution of fertility and mating type was imbalanced.

Key words: *Magnaporthe oryzae*; sexual reproduction; mating type; fertility; PCR

稻瘟病是由 *Magnaporthe oryzae* 引起的一种水稻常见真菌病害,其潜育期短、流行速度快(陈竹锋等,2017)。水稻作为黑龙江省的主要粮食作物之一,年均播种面积达 430 万 hm^2 以上,但常年发生稻瘟病(马军韬等,2017)。由于稻瘟病菌生理小种多,其毒性易发生改变,使新的抗病品种在推广种植 3~5 年后“丧失”抗性,造成严重的产量和经济损失(田大刚,2017)。稻瘟病菌作为异宗配合的子囊真菌,其交配型由具有 2 个等位基因 *MAT1-1* 和 *MAT1-2* 的 *MAT* 基因调控(Debuchy et al., 2010; 杨阳等, 2015),只有 2 个不同交配型的可育性菌株在对峙培养条件下才能诱导产生有性态(Arie et al., 2000),稻瘟病菌在自然条件下是否发生有性生殖尚未有准确定论(任世龙等,2018)。通过研究稻瘟病菌的有性生殖,可以为稻瘟病菌无毒基因的定位和克隆提供遗传分析材料,对揭示稻瘟病菌的种群遗传和进化研究具有重要意义(蔡江桥等,2005)。

自 Kato & Yamaguchi (1982) 于 1979 年首次证明在实验室条件下稻瘟病菌可发生有性生殖,从而使有关稻瘟病菌有性态的研究工作大量开展。如 Sirisathaworn et al. (2017) 发现泰国稻瘟病菌仅表现出一种交配型 *MAT1-2*,遗传多样性水平较低; Park et al. (2008) 和 Urak et al. (2008) 分别在韩国和美国加利福尼亚州中北部检测出一种交配型 *MAT1-1*。这表明稻瘟病菌在田间缺乏有性生殖和重组,意味着该病原真菌不存在通过有性生殖繁殖的可能性。

我国关于稻瘟病菌的有性生殖研究起步相对较晚(沈瑛等,1989),虽然对于稻瘟病菌的可育性和交配型的地理分布已有报道,如李文强等(2007)研究结果表明宁夏稻瘟病菌只存在交配型 *MAT1-1*; 蔡江桥等(2005)通过对广东省稻瘟病菌群体进行研究,发现可育性菌株皆为雄性菌株且以交配型 *MAT1-2* 占绝对优势;但黑龙江省稻瘟病菌的有性态和交配型分布尚未见报道。黑龙江省位于中国东北部,气候温差较大,水稻种植主要以粳稻为主,以第一、二、三、四积温带为主要种植区域(邸淑娴,2018);常年遭受稻瘟病危害,发生严重时可造成绝产(宋成艳,

2011)。研究稻瘟病菌的育性及交配型分布,不仅可获得高育性菌株,为稻瘟病菌无毒基因的研究提供作图群体,而且可以了解其对稻瘟病菌遗传结构的影响,对稻瘟病防控提供有价值的信息。因此,本研究通过标准菌株对黑龙江省稻瘟病菌进行育性分析,基于 PCR 技术对稻瘟病菌交配型进行检测,明确黑龙江省采集自不同地区、不同年份的稻瘟病菌的育性能力和交配型分布,以期对稻瘟病菌有性态在黑龙江省存在的可能性及稻瘟病菌的遗传变异机制研究提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 材料

供试菌株:1 对标准菌株 GUY11 和 KA3,交配型分别为 *MAT1-2* 和 *MAT1-1*,同为两性可育性菌株,均由福建农林大学王宗华教授、王宝华副教授课题组赠予。于 2016—2017 年从黑龙江省西部、东部、中部 3 个地区的水稻产区采集穗颈瘟标样,经单孢分离、纯化培养后得到 241 株供试稻瘟病菌。其中西部地区包括肇源县、泰来县、齐齐哈尔市、甘南县、杜尔伯特蒙古族自治县;东部地区包括密山市、依兰县、绥滨县、富锦市、虎林市、桦川县;中部地区包括绥化市、通河县、汤原县、铁力市、尚志市、庆安县、方正县、延寿县、望奎县、五常市、木兰县。

培养基:马铃薯葡萄糖琼脂(potato dextrose agar, PDA)培养基:马铃薯 200 g、葡萄糖 20 g、琼脂粉 15 g、蒸馏水 1 L;燕麦琼脂(oat meal agar, OMA)培养基:燕麦 50 g、蔗糖 20 g、琼脂 20 g、蒸馏水 1 L;酵母浸粉葡萄糖(yeast dextrose broth, YDB)培养液:葡萄糖 10 g、酵母浸粉 4 g、蒸馏水 1 L。

试剂和仪器:常规 PCR 试剂,宝生物工程(大连)有限公司;真菌 DNA 提取试剂盒,美国 Omega 生物技术公司。6331 型梯度 PCR 仪,德国 Eppendorf 公司;Gel Doc™ XR+凝胶成像系统,美国 Bio-Rad 公司;DYY-6C 型电泳仪,北京市六一仪器厂;Sigma 3-18K 型高速冷冻离心机,北京思达兴业仪器有限公司。

1.2 方法

1.2.1 供试稻瘟病菌育性的测定

参照王宝华(2001)方法,将供试菌株与标准菌株在OMA平板上对峙培养,即将241株稻瘟病菌分别采用三点接菌法与2株标准菌株接在同一OMA平板上,形成三角形。在28℃下黑暗培养5~7 d,待菌落边缘相遇后,然后在20℃下光照培养15~20 d,直至菌株间产生明显而成熟的子囊壳。与MATI-1型标准菌株形成子囊壳的菌株,其交配型则为MATI-2型,反之亦然;而与标准菌株不能形成子囊壳的则不能确定其交配型,称之为未知菌株。参照李成云等(1992)方法判定供试菌株的性别。当子囊壳生于标准菌株一边时为雄性,子囊壳生于供试菌株一边时为雌性,在标准菌株和待测菌株菌落交界处两侧各有一列子囊壳的记为两性。随机挑2~4个子囊壳置于载玻片上,用盖玻片压碎后在显微镜下观察产生子囊、子囊孢子的发育形成情况。

1.2.2 供试稻瘟病菌交配型分析方法

采用分子生物学方法检测供试稻瘟病菌的交配型。分别将单孢分离的241株稻瘟病菌放入PDA平板活化培养5 d后,用打孔器打取直径为6 mm的

菌碟放入YDB培养液中,28℃恒温振荡培养7 d后用真空泵抽干菌液和水分,放入灭菌离心管中冷冻保存,使用真菌DNA提取试剂盒分别提取241株稻瘟病菌的基因组DNA。参照李文强等(2007)稻瘟病菌交配型基因序列设计2对引物(表1),引物均由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。20 μL PCR反应体系:正反向引物各1 μL、dNTP Mix 2 μL、模板DNA 1 μL、缓冲液2 μL、*rTaq* DNA聚合酶0.1 μL、ddH₂O 12.9 μL。PCR扩增程序:94℃预变性3 min;94℃变性30 s,46℃退火30 s,72℃延伸20 s,共35个循环;最后72℃延伸10 min后4℃保存。取PCR扩增产物5 μL在1.2%琼脂糖凝胶上于150 V恒压电泳检测20 min。电泳完成后于凝胶成像系统上观察有无条带并照相,条带清晰者记为+,无带者记为-,基因型以1和2表示。为深入了解稻瘟病菌交配型的分布,同时对黑龙江省稻瘟病菌群体进行交配型多样性分析(Zhang et al., 2017),主要以交配型多样性系数 H 对不同地区间及不同年份间稻瘟病菌交配型的多样性分布进行分析。 $H=N/(N-1) \times (1-\sum X_i^2)$,式中, N 为群体总菌株数量, X_i 为某交配型在其群体中的出现频率。采用Excel 2016进行数据处理。

表1 稻瘟病菌交配型基因的引物序列

Table 1 Primer sequences for mating genes of *Magnaporthe oryzae*

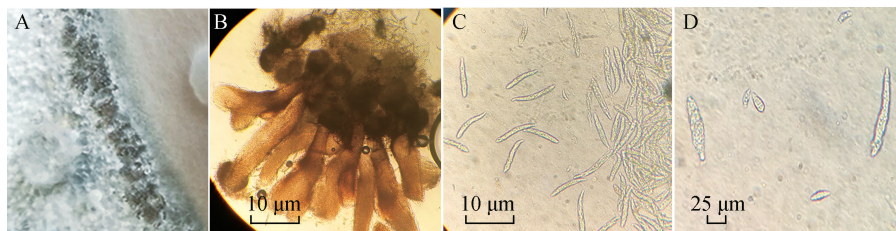
交配型基因 Mating type gene	引物序列(5'-3') Primer sequence (5'-3')	退火温度/℃ Annealing temperature	预期片段大小/bp Expected fragment size
MATI-1	F: AGCCTCATCAACGGCAA	46	372
MATI-1	R: GGCACGAACATGCGATG		
MATI-2	F: CTCAATCTCCGTAGTAG	52	376
MATI-2	R: ACAGCAGTATAGCCTAC		

2 结果与分析

2.1 供试稻瘟病菌的育性分析

对峙培养结果显示,供试稻瘟病菌有性杂交20 d后在菌株交界处即产生肉眼可观察到的呈带状分布

的黑色子囊壳(图1-A),子囊壳底部呈椭圆形至球形,壳口处着生长长的喙(图1-B),使用接种针挑取子囊壳置于载玻片上,轻轻按压可使成熟的子囊壳释放出子囊及子囊孢子(图1-C、D),1个子囊中通常含有8个子囊孢子,子囊孢子有隔膜。



A: 菌株交配形成的子囊壳带; B: 成熟子囊壳; C: 子囊壳释放出的子囊及子囊孢子; D: 游离子囊孢子。

A: The ascospore shell formed by the mating of the isolates; B: the mature ascospore shell under the microscope;

C: the ascus and ascospores released from the ascospore shell; D: the ascospores in the free state.

图1 黑龙江省稻瘟病菌有性生殖诱导结果

Fig. 1 Sexual reproduction induction in *Magnaporthe oryzae* from Heilongjiang Province

2.2 黑龙江省稻瘟病菌有性态形成情况

对峙培养结果表明,241株稻瘟病菌中仅28株菌株能与标准菌株KA3或GUY11产生后代子囊壳,占供试菌株数的11.62%,其中雌性菌株4株、雄性菌株11株、两性菌株3株,分别占供试菌株数的1.66%、4.56%和1.25%,还有10株菌株由于子囊壳长在交界处的融合带上而不能判断其性别,将其称之为未知菌株,占4.15%;仅有26株菌株能产生子囊孢子,占供试菌株数的10.79%(表2)。有213株菌株与标准菌株对峙培养后均不产生子囊壳,将其

称之为不育菌株。

2.2.1 不同地区稻瘟病菌有性态形成情况

黑龙江省西部地区共有83株菌株,可育性菌株出现频率为13.25%,东部地区共有55株菌株,可育性菌株出现频率为7.27%,中部地区共有103株菌株,可育性菌株出现频率为12.62%(表2)。总体来看,黑龙江省西部地区稻瘟病菌可育性菌株出现频率比东部地区、中部地区稻瘟病菌可育性菌株出现频率稍高,表明稻瘟病菌的育性与菌株来源具有一定相关性。

表2 黑龙江省不同地区稻瘟病菌有性态形成情况

Table 2 Formation of the perfect stage of *Magnaporthe oryzae* populations from different regions of Heilongjiang Province

地区 Region	采集地 Collection site	总菌株数 Total no. of strains	有性态形成 Perfect stage		菌株数(出现频率/%) No. of strains (Frequency/%)				形成子囊孢子 Ascospore formation	
			菌株数 No. of strains	出现频率/% Frequency	雌性 Female	雄性 Male	两性 Bisexual	未知 Unknown	菌株数 No. of strains	出现频率/% Frequency
西部 Western region	肇源县 Zhaoyuan County	33	0	0.00	0(0.00)	0(0.00)	0(0.00)	0(0.00)	0	0.00
	泰来县 Tailai County	22	10	45.45	2(9.09)	2(9.09)	0(0.00)	6(27.27)	9	40.91
	齐齐哈尔市 Qiqihar City	3	0	0.00	0(0.00)	0(0.00)	0(0.00)	0(0.00)	0	0.00
	甘南县 Gannan County	7	1	14.29	0(0.00)	1(14.29)	0(0.00)	0(0.00)	1	14.29
	杜尔伯特蒙古族自治县 Duerbote Mongolia Autonomous County	18	0	0.00	0(0.00)	0(0.00)	0(0.00)	0(0.00)	0	0.00
合计 Total		83	11	13.25	2(2.41)	3(3.61)	0(0.00)	6(7.23)	10	12.05
东部 Eastern region	密山市 Mishan City	10	1	10.00	0(0.00)	1(10.00)	0(0.00)	0(0.00)	1	10.00
	依兰县 Yilan County	13	2	15.39	0(0.00)	0(0.00)	1(7.69)	1(7.69)	2	15.38
	绥滨县 Suibin County	18	0	0.00	0(0.00)	0(0.00)	0(0.00)	0(0.00)	0	0.00
	富锦市 Fujin City	4	0	0.00	0(0.00)	0(0.00)	0(0.00)	0(0.00)	0	0.00
	虎林市 Hulin City	7	1	14.29	0(0.00)	0(0.00)	0(0.00)	1(14.29)	1	14.29
合计 Total		55	4	7.27	0(0.00)	1(1.82)	1(1.82)	2(3.64)	4	7.27
中部 Central region	绥化市 Suihua City	17	6	35.29	2(11.76)	4(23.53)	0(0.00)	0(0.00)	6	35.29
	通河县 Tonghe County	8	3	37.5	0(0.00)	0(0.00)	1(12.50)	2(25.00)	3	37.50
	汤原县 Tangyuan County	3	1	33.33	0(0.00)	1(33.33)	0(0.00)	0(0.00)	1	33.33
	铁力市 Tieli City	10	1	10.00	0(0.00)	1(10.00)	0(0.00)	0(0.00)	0	0.00
	尚志市 Shangzhi City	17	1	5.88	0(0.00)	1(5.88)	0(0.00)	0(0.00)	1	5.88
	庆安县 Qing'an County	10	1	10.00	0(0.00)	0(0.00)	1(10.00)	0(0.00)	1	10.00
	方正县 Fangzheng County	9	0	0.00	0(0.00)	0(0.00)	0(0.00)	0(0.00)	0	0.00
	延寿县 Yanshou County	7	0	0.00	0(0.00)	0(0.00)	0(0.00)	0(0.00)	0	0.00
	望奎县 Wangkui County	14	0	0.00	0(0.00)	0(0.00)	0(0.00)	0(0.00)	0	0.00
	五常市 Wuchang City	5	0	0.00	0(0.00)	0(0.00)	0(0.00)	0(0.00)	0	0.00
合计 Total		103	13	12.62	2(1.94)	7(6.80)	2(1.94)	2(1.94)	12	11.65

2.2.2 2016—2017年稻瘟病菌有性态形成情况

在2016年和2017年,黑龙江省稻瘟病菌菌株的可育性差异较大。2016年供试菌株共83株,可育性菌株为21株,出现频率为25.30%,其中有4株雌性菌株、6株雄性菌株、2株两性菌株和9株未知菌株,

出现频率分别为4.82%、7.23%、2.41%和10.84%,此外21株可育性菌株均可产生子囊孢子。2017年供试菌株共158株,其中可育性菌株为7株,出现频率为4.43%,其中有5株雄性菌株、1株两性菌株和1株未知菌株,出现频率分别为3.16%、0.63%和0.63%,

未见雌性菌株(表3)。表明稻瘟病菌菌株的采集时间不同,其可育性也存在一定差异。

表3 2016—2017年黑龙江省稻瘟病菌有性态形成情况

Table 3 Formation of the perfect stage of *Magnaporthe oryzae* populations from rice sampled from 2016 to 2017 in Heilongjiang Province

年份 Year	总菌株数 Total no. of strains	有性态形成 Perfect stage		菌株数(出现频率/%) No. of strains (Frequency/%)				子囊孢子形成 Ascospore formation	
		菌株数 No. of strains	出现频率/% Frequency	雌性 Female	雄性 Male	两性 Bisexual	未知 Unknown	菌株数 No. of strains	出现频率/% Frequency
2016	83	21	25.30	4(4.82)	6(7.23)	2(2.41)	9(10.84)	21	25.30
2017	158	7	4.43	0(0.00)	5(3.16)	1(0.63)	1(0.63)	5	3.16
总计 Total	241	28	11.62	4(1.66)	11(4.56)	3(1.25)	10(4.15)	26	10.79

2.3 黑龙江省稻瘟病菌的交配型分析

利用2对特异性引物检测供试稻瘟病菌交配型 *MAT1-1* 和 *MAT1-2* 的分布,结果表明 *MAT1-1* 特异性引物扩增得到大小为 372 bp 的片段, *MAT1-2* 特异性引物扩增得到大小为 376 bp 的片段(图2)。PCR 检测结果显示,黑龙江省稻瘟病菌交配型分布并不

均衡,241株稻瘟病菌株中交配型为 *MAT1-1* 的菌株共 142 株,出现频率为 58.92%,交配型为 *MAT1-2* 的菌株共 20 株,出现频率为 8.30%,19 株菌株为双交配型,出现频率为 7.88%,其余 60 株未检测出其交配型,出现频率为 24.90%(表4)。

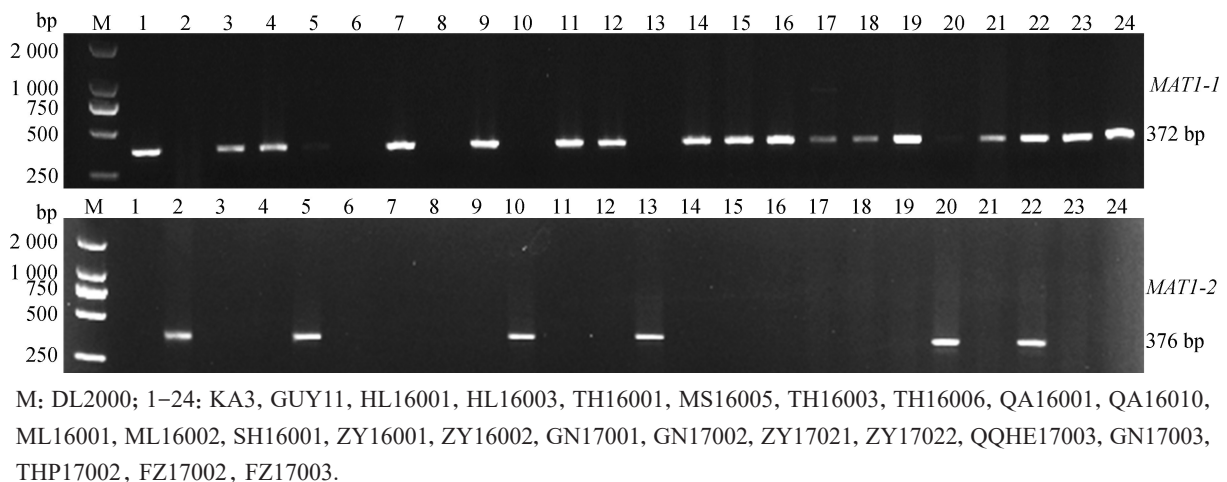


图2 随机选择的24株稻瘟病菌交配型基因PCR检测电泳图

Fig. 2 Electrophoretogram of PCR detection of the mating type genes of 24 strains of *Magnaporthe oryzae*

2.3.1 各地区稻瘟病菌的交配型分析

黑龙江省西部地区稻瘟病菌中交配型 *MAT1-1*、*MAT1-2*、双交配型和未知交配型的出现频率分别为 46.99%、8.43%、9.64% 和 34.94%;东部地区稻瘟病菌中交配型出现频率依次为 72.73%、1.82%、1.82% 和 23.63%;中部地区稻瘟病菌中交配型出现频率依次为 61.17%、11.65%、9.71% 和 17.47%(表4),表明黑龙江省稻瘟病菌群体结构差异明显。黑龙江省供试稻瘟病菌群体的交配型多样性指数为 0.580,其中,西部、东部、中部地区稻瘟病菌群体的交配型多样性指数分别为 0.649、0.422、0.577,表明西部地区稻瘟病菌群体的多态性比东部和中部稻瘟病菌群体的多态性更高。

2.3.2 2016—2017年稻瘟病菌的交配型分析

将2016—2017年采集的241株稻瘟病菌进行交

配型分析,2016年供试菌株共83株,有35株菌株的交配型为 *MAT1-1*,出现频率为 42.17%,有15株菌株的交配型为 *MAT1-2*,出现频率为 18.07%,有12株菌株为双交配型,出现频率为 14.46%,剩余21株菌株未被检测出交配型,出现频率为 25.30%;2017年供试菌株共158株,有107株菌株的交配型为 *MAT1-1*,出现频率为 67.72%,有5株菌株的交配型为 *MAT1-2*,出现频率为 3.17%,有7株菌株为双交配型,出现频率为 4.43%,剩余39株菌株未被检测出交配型,出现频率为 24.68%(表5)。2016年稻瘟病菌群体的交配型多样性指数为 0.713,2017年稻瘟病菌群体的交配型多样性指数为 0.481,表明2016年稻瘟病菌群体的多态性比2017年稻瘟病菌群体的多态性更高。

表 4 黑龙江省不同地区稻瘟病菌交配型的 PCR 测定结果

Table 4 PCR-based mating-type assay of *Magnaporthe oryzae* from different counties (cities) of Heilongjiang Province

地区 Region	采集地 Collection site	总菌株数 Total no. of strains	MAT1-1		MAT1-2		双交配型 MAT1-1 and MAT1-2		未知菌株 Unknown	
			菌株数 No. of strains	出现频率/% Frequency	菌株数 No. of strains	出现频率/% Frequency	菌株数 No. of strains	出现频率/% Frequency	菌株数 No. of strains	出现频率/% Frequency
西部 Western region	肇源县 Zhaoyuan County	33	17	51.52	0	0.00	1	3.03	15	45.45
	泰来县 Tailai County	22	6	27.27	6	27.27	5	22.73	5	22.73
	齐齐哈尔市 Qiqihar City	3	2	66.67	1	33.33	0	0.00	0	0.00
	甘南县 Gannan County	7	6	85.71	0	0.00	0	0.00	1	0.00
	杜尔伯特蒙古族自治县 Duerbote Mongolia Autonomous County	18	8	44.44	0	0.00	2	11.11	8	44.44
合计 Total		83	39	46.99	7	8.43	8	9.64	29	34.94
东部 Eastern region	密山市 Mishan City	10	5	50.00	0	0.00	0	0.00	5	50.00
	依兰县 Yilan County	13	9	69.23	1	10.00	1	10.00	2	20.00
	绥滨县 Suibin County	18	16	88.89	0	0.00	0	0.00	2	11.11
	富锦市 Fujin City	4	4	100.00	0	0.00	0	0.00	0	0.00
	虎林市 Hulin City	7	4	57.14	0	0.00	0	0.00	3	42.86
	桦川县 Huachuan County	3	2	66.67	0	0.00	0	0.00	1	33.33
合计 Total		55	40	72.73	1	1.82	1	1.82	13	23.63
中部 Central region	通河县 Tonghe County	8	1	12.50	3	37.50	2	25.00	2	25.00
	铁力市 Tieli City	10	7	70.00	0	0.00	0	0.00	3	30.00
	绥化市 Suihua City	17	5	29.41	6	35.29	6	35.29	0	0.00
	尚志市 Shangzhi City	17	11	64.71	0	0.00	1	5.88	5	29.41
	方正县 Fangzheng County	9	7	77.78	0	0.00	1	11.11	1	11.11
	延寿县 Yanshou County	7	7	100.00	0	0.00	0	0.00	0	0.00
	望奎县 Wangkui County	14	14	100.00	0	0.00	0	0.00	0	0.00
	五常市 Wuchang City	5	2	40.00	2	40.00	0	0.00	1	20.00
	庆安县 Qing'an County	10	7	70.00	1	10.00	0	0.00	2	20.00
	木兰县 Mulan County	3	2	66.67	0	0.00	0	0.00	1	33.33
	汤原县 Tangyuan County	3	0	0.00	0	0.00	0	0.00	3	100.00
合计 Total		103	63	61.17	12	11.65	10	9.71	18	17.47

表 5 2016—2017 年黑龙江省稻瘟病菌交配型分子测定结果

Table 5 Polymerase chain reaction-based mating-type assay of *Magnaporthe oryzae* from 2016 to 2017 in Heilongjiang Province

年份 Year	总菌株数 Total no. of strains	MAT1-1		MAT1-2		双交配型 MAT1-1 and MAT1-2		未知菌株 Unknown	
		菌株数 No. of strains	出现频率/% Frequency	菌株数 No. of strains	出现频率/% Frequency	菌株数 No. of strains	出现频率/% Frequency	菌株数 No. of strains	出现频率/% Frequency
2016	83	35	42.17	15	18.07	12	14.46	21	25.30
2017	158	107	67.72	5	3.17	7	4.43	39	24.68
总计 Total	241	142	58.92	20	8.30	19	7.88	60	24.90

3 讨论

虽然在自然界中还未发现稻瘟病菌的有性生殖,但是其室内相关试验研究已开展,目前尚未见有关黑龙江省稻瘟病菌群体交配型测定的详尽报道,本研究是首次对黑龙江省稻瘟病菌群体的育性状态及其交配型分布进行了测定。本试验通过对稻瘟病菌有性后代的初步观察,发现 1 个成熟的子囊壳中可释放出子囊及子囊孢子,1 个子囊中通常含有 8 个

子囊孢子,子囊孢子有细胞及隔膜。关于稻瘟病菌有性后代结构已有学者对其进行深度研究,顾卓侃等(2016)和郭晓宇等(2018)分别利用卡氏白、尼罗红和荧光蛋白染色观察稻瘟病菌有性世代的结构,进一步证实了子囊孢子结构与稻瘟病菌分生孢子结构有着明显差异,子囊孢子呈钝菱形,通常有 3 个隔膜,4 个细胞,并且每个细胞中均含有 1 个细胞核;而稻瘟病菌分生孢子呈倒梨形或长椭圆形,且在形

态上较子囊孢子大。

本研究发现黑龙江省稻瘟病菌的育性很低,在供试稻瘟病菌中可育性菌株仅占11.62%,但在可育性菌株中仅有2株菌株不能形成子囊孢子,其余可育性菌株均可形成子囊孢子,说明黑龙江省可育性稻瘟病菌有较强的繁殖能力。陆凡等(2000)、蔡江桥等(2005)报道江苏省和广东省稻瘟病菌群体的可育率分别为22.77%和85.9%;刘富梁(2004)研究发现云南省稻瘟病菌群体的可育率为35.05%;Zeng et al.(2009)研究结果表明福建省和贵州省稻瘟病菌群体的育性频率分别为90.9%和72.6%,与本试验结果相比可育率均较高,造成这一差异的原因可能与病原菌对不同地理环境的适应性有关。但Consolo et al.(2005)对采集自阿根廷的250株稻瘟病菌菌株进行育性分析,发现与标准菌株GUY11进行杂交的菌株均未产生有性后代,仅有7.2%的菌株与标准菌株KA9形成有性后代,并且可育性菌株均不能形成子囊及子囊孢子,这与本试验结果类似;Saleh et al.(2012)对来自55个国家的3 800株稻瘟病菌进行育性分析,发现雌性可育性菌株几乎都存在于亚洲国家,占73.82%;这与上述各报道结果相吻合。

由于标准菌株与待测菌株配合力弱,本试验采用PCR技术检测稻瘟病菌的交配型,发现黑龙江省水稻种植区的稻瘟病菌存在MATI-1和MATI-2两种交配型,且以交配型MATI-1占优势,出现频率为58.92%,交配型为MATI-2的菌株仅占8.30%,而且目前尚未发现同一地区的可育性菌株存在相反的交配型,这就意味着在自然条件下黑龙江省稻瘟病菌很难存在有性生殖。国内外研究学者对稻瘟病菌交配型进行了大量研究,结果显示稻瘟病菌交配型分布呈极不平衡状态,或以交配型MATI-1为主导地位或以MATI-2为主导地位。如Consolo et al.(2005)对来自阿根廷的稻瘟病菌进行基因检测发现仅存在MATI-1交配型;Samanta et al.(2014)对来自印度的46株稻瘟病菌进行交配型检测,有70%的菌株为交配型MATI-1,有30%的菌株为交配型MATI-2;Li et al.(2016)对采集自中国云南省的稻瘟病菌进行交配型测定,发现有37.3%的菌株为交配型MATI-1,62.7%的菌株为交配型MATI-2;蔡江桥等(2005)研究结果表明,广东省稻瘟病菌群体交配型分布呈极不平衡状态,交配型为MATI-2的菌株占绝对优势地位,达98.3%;Zeng et al.(2009)对福建、贵州、广东、云南、江苏各省稻瘟病菌进行交配型分析,发现福建省和广东省稻瘟病菌主要以交配型MATI-2为主,江苏省稻瘟病菌则仅存在交配型MATI-1,云南

省和贵州省稻瘟病菌中2种交配型均同时存在,且云南省稻瘟病菌的2种交配型比例为1:1。可见,不同地区的稻瘟病菌其交配型分布差异较大。

黑龙江省稻瘟病菌的有性生殖能力和交配型分布可能与其地理环境、气候类型和不同采集年份有关。供试菌株中2017年菌株所占比例大,而2017年菌株的可育性极低,这可能是导致本研究中黑龙江省稻瘟病菌有性生殖能力弱的原因之一,也有可能是由于供试菌株与标准菌株的亲和能力弱、标准菌株育性下降等原因引起的。黑龙江省水稻种植区稻瘟病菌虽然同时存在2种交配型,但是由于稻瘟病菌的可育率较低,且同一地区的可育性菌株只有一种交配型,因此在自然界中黑龙江省稻瘟病菌是否存在有性生殖还需进一步研究验证。

致谢: 福建农林大学王宗华教授、王宝华副教授课题组赠予标准菌株GUY11和KA3,特此致谢!

参 考 文 献 (References)

- ARIE T, KANEKO I, YOSHIDA T, NOGUCHI M, NOMURA Y, YAMAGUCHI I. 2000. Mating-type genes from asexual phytopathogenic ascomycetes *Fusarium oxysporum* and *Alternaria alternata*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 13(12): 1330-1339
- CAI JQ, WANG L, PAN QH. 2005. Mating type and fertility of the rice blast fungus population derived from Guangdong Province, China. *Scientia Agriculture Sinica*, 38(4): 837-842 (in Chinese) [蔡江桥, 王玲, 潘庆华. 2005. 广东省稻瘟病菌群体交配型及育性的比较研究. *中国农业科学*, 38(4): 837-842]
- CHEN ZF, JIN MN, LIU JC, LI ZX, QIU SJ, ZHOU XY, TANG XY. 2017. Development of a HRM-based functional marker for rice blast resistance gene *Pi2*. *Molecular Plant Breeding*, 15(3): 938-943 (in Chinese) [陈竹锋, 金名捺, 刘金成, 李早霞, 丘式浚, 周向阳, 唐晓艳. 2017. 基于HRM体系开发抗稻瘟病基因 *Pi2* 特异性分子标记. *分子植物育种*, 15(3): 938-943]
- CONSOLO VF, CORDO CA, SALERNO GL. 2005. Mating-type distribution and fertility status in *Magnaporthe grisea* populations from Argentina. *Mycopathologia*, 160(4): 285-290
- DEBUCHY R, BERTEAUX-LECELLIER V, SILAR P. 2010. Mating systems and sexual morphogenesis in ascomycetes. //BORKOVICH KA, EBBOLE DJ. *Cellular and molecular biology of filamentous fungi*. Washington, DC: ASM Press, pp. 501-535
- DI SX. 2018. Establishment of pesticide residue assessment method in paddy field based on MaxEnt model. Master Thesis. Harbin: Northeast Forestry University (in Chinese) [邸淑娴. 2018. 基于MaxEnt模型的寒地稻田农残评估方法的建立. 硕士学位论文. 哈尔滨: 东北林业大学]
- GU ZK, LI L, WANG JY, CHAI RY, WANG YL, ZHANG Z, MAO XQ, QIU HP, SUN GC. 2016. Observation of sexual structure of *Magnaporthe oryzae* via Calcofluor white and Nile red staining. *Scientia Agriculture Sinica*, 30(6): 668-672 (in Chinese) [顾卓侃, 李玲, 王教瑜, 柴荣耀, 王艳丽, 张震, 毛雪琴, 邱海萍, 孙国

- 昌. 2016. 利用卡氏白和尼罗红染色观察稻瘟病菌有性世代的结构. 中国水稻科学, 30(6): 668–672]
- GUO XY, LI L, DONG B, WANG JY, CHAI RY, ZHANG Z, MAO XQ, QIU HP, HAO ZN, WANG YL, et al. 2018. Lighting the cellular structures of sexual generation in *Magnaporthe oryzae* with fluorescent proteins and fluorescent dyes. Chinese Journal of Cell Biology, 40(7): 1138–1145 (in Chinese) [郭晓宇, 李玲, 董波, 王教瑜, 柴荣耀, 张震, 毛雪琴, 邱海萍, 郝中娜, 王艳丽, 等. 2018. 利用荧光蛋白标记研究稻瘟病菌有性世代的细胞结构. 中国细胞生物学学报, 40(7): 1138–1145]
- KATO H, YAMAGUCHI T. 1982. The perfect state of *Pyricularia oryzae* Cav. from rice plants in culture. Annals of the Phytopathological Society of Japan, 48(4): 607–612
- LI CY, LI JY, SHEN R, FUJITO Y. 1992. Cross-fertility of rice blast fungus *Pyricularia grisea*. Southwest China Journal Agriculture Sciences, 5(1): 53–58 (in Chinese) [李成云, 李家瑞, 沈锐, 藤田佳克. 1992. 稻瘟病菌的有性世代形成能: 云南省稻瘟病菌的有性世代研究之三. 西南农业学报, 5(1): 53–58]
- LI JB, LU L, JIA YL, WANG Q, FUKUTA Y, LI CY. 2016. Characterization of field isolates of *Magnaporthe oryzae* with mating type, DNA fingerprinting, and pathogenicity assays. Plant Disease, 100(2): 298–303
- LI WQ, WANG YC, ZHENG XB. 2007. Mating type and fertility of *Magnaporthe grisea* populations from rice in Ningxia Hui Autonomous Region, China. Chinese Journal of Rice Science, 21(6): 650–656 (in Chinese) [李文强, 王源超, 郑小波. 2007. 宁夏稻瘟病菌的交配型与育性. 中国水稻科学, 21(6): 650–656]
- LIU FL. 2004. Study of fertility of rice blast pathogen in 8 counties of Yunnan Province and identification of dual mater isolates. Master Thesis. Wuhan: Huazhong Agricultural University (in Chinese) [刘富梁. 2004. 云南省八县稻瘟病菌育性研究和双交配型菌株确认. 硕士学位论文. 武汉: 华中农业大学]
- LIU F, ZHENG XB, WANG FM, ZHANG WH, LIU YF, FAN YJ. 2000. Genetic analysis on segregation of pathogenicity in sexual progeny from a cross of *Magnaporthe grisea* isolates from rice field. Journal of Nanjing Agricultural University, 23(4): 41–45 (in Chinese) [陆凡, 郑小波, 王法明, 张文芸, 刘永锋, 范永坚. 2000. 两个田间稻瘟病菌株杂交后代的致病性分离及其遗传学分析. 南京农业大学学报, 23(4): 41–45]
- MA JT, ZHANG GM, ZHANG LY, DENG LW, WANG YL, WANG Y. 2017. Analysis of blast-resistance of rice germplasm and pathogenicity of rice blast fungus *Magnaporthe oryzae* in Heilongjiang Province. Journal of Plant Protection, 44(2): 209–216 (in Chinese) [马军韬, 张国民, 张丽艳, 邓凌韦, 王永力, 王英. 2017. 黑龙江省水稻种质抗瘟性及稻瘟病菌致病性分析. 植物保护学报, 44(2): 209–216]
- PARK SY, MILGROOM MG, HAN SS, KANG S, LEE YH. 2008. Genetic differentiation of *Magnaporthe oryzae* populations from scouting plots and commercial rice fields in Korea. Phytopathology, 98(4): 436–442
- REN SL, YANG ZL, BAI H, WANG YF, QUAN JZ, DONG ZP, LI ZY, XING JH. 2018. Cloning of mating type genes from foxtail millet blast and molecular detection of *Magnaporthe oryzae* mating type genes in different region. Acta Agriculturae Boreali-Sinica, 33(3): 56–62 (in Chinese) [任世龙, 杨振立, 白辉, 王永芳, 全建章, 董志平, 李志勇, 邢继红. 2018. 谷瘟病菌交配型基因克隆和不同地区交配型基因检测. 华北农学报, 33(3): 56–62]
- SALEH D, XU P, SHEN Y, LI C, ADREIT H, MILAZZO J, RAVIGNÉ V, BAZIN E, NOTTÉGHÉ JL, FOURNIER E, et al. 2012. Sex at the origin: an Asian population of the rice blast fungus *Magnaporthe oryzae* reproduces sexually. Molecular Ecology, 21(6): 1330–1344
- SAMANTA S, DHUA U, NAYAK S, BEHERA L, MUKHERJEE AK. 2014. Mating types analysis of *Magnaporthe oryzae* populations by molecular methods. The Open Biotechnology Journal, 8(1): 6–12
- SHEN Y, YUAN XP, JIN MZ, CHAI RY. 1989. Preliminary study on the perfect stage of *Pyricularia oryzae*. Acta Phytopathologica Sinica, 19(3): 184 (in Chinese) [沈瑛, 袁筱萍, 金敏忠, 柴荣耀. 1989. 稻瘟病菌有性世代初步研究. 植物病理学报, 19(3): 184]
- SONG CY. 2011. Appraisal and utilization of the resistance of new rice varieties (lines) to rice blast in Heilongjiang Province. Plant Protection, 37(4): 142–145 (in Chinese) [宋成艳. 2011. 黑龙江省水稻新品种(系)抗稻瘟病性鉴定及利用. 植物保护, 37(4): 142–145]
- SIRISATHAWORN T, SRIRAT T, LONGYA A, JANTASURIYARAT C. 2017. 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. Agriculture and Natural Resources, 51(1): 7–14
- TIAN DG. 2017. Proteomic analysis of *Piz-t*-mediated rice blast resistance and application of the resistance locus. Ph. D Thesis. Fuzhou: Fujian A&F University (in Chinese) [田大刚. 2017. *Piz-t*介导稻瘟病抗性的蛋白质组学分析及抗病基因座的应用. 博士学位论文. 福州: 福建农林大学]
- URAK RZ, DOUHAN GW, WONG F. 2008. Mating-type distribution of the rice blast pathogen *Pyricularia grisea* in California. UCR Undergraduate Research Journal, 2: 61–65
- WANG BH. 2001. Identification of mating type and genetic analysis of sexual progeny of *Magnaporthe oryzae*. Master Thesis. Fuzhou: Fujian Agriculture and Forestry University (in Chinese) [王宝华. 2001. 稻瘟病菌交配型鉴定及其有性后代的遗传分析. 硕士学位论文. 福州: 福建农林大学]
- YANG Y, MA SX, JIA H, LIU WW, CAO ZY, DONG JG. 2015. The occurrence and fertility analysis of bisexual isolates of *Setosphaeria turcica*. Journal of Plant Protection, 42(6): 921–926 (in Chinese) [杨阳, 马双新, 贾慧, 刘微微, 曹志艳, 董金皋. 2015. 玉米大斑病菌两性交配型菌株的出现频率及其育性分析. 植物保护学报, 42(6): 921–926]
- ZENG J, FENG SJ, CAI JQ, WANG L, LIN F, PAN QH. 2009. Distribution of mating type and sexual status in Chinese rice blast populations. Plant Disease, 93(3): 238–242
- ZHANG YL, ZHU QL, YAO YX, ZHAO ZH, CORRELL JC, WANG L, PAN QH. 2017. The race structure of the rice blast pathogen across southern and northeastern China. Rice, 10(1): 46