

侵染优质稻美香占2号的稻瘟病菌生理小种鉴定及无毒基因分析

汪文娟^{1,2} 苏菁² 杨健源² 陈深² 鲁国东^{1*} 朱小源^{2*}

(1. 福建农林大学植物保护学院, 闽台作物有害生物生态防控国家重点实验室, 福州 350002;

2. 广东省农业科学院植物保护研究所, 广东省植物保护新技术重点实验室, 广州 510640)

摘要: 为明确优质稻种美香占2号的抗瘟性, 并为其合理布局以及与不同品种的轮换种植提供科学依据, 利用7个中国鉴别品种和11个抗稻瘟病单基因系, 对2013—2017年自广东省美香占2号品种上分离获得的50株稻瘟病菌 *Magnaporthe oryzae* 菌株进行生理小种鉴定和无毒基因型分析。结果显示, 50株稻瘟病菌菌株被鉴定为11个生理小种, 其中优势小种分别为C13、B13、B01、B05和C05; 50株稻瘟病菌菌株对IRBLkh-K3(仅含 *Pik-h* 基因)、NIL-e1(仅含 *Pi50* 基因)、IRBL9-W(仅含 *Pi9* 基因)和IRBLzt-T(仅含 *Piz-t* 基因)4个抗稻瘟病单基因系表现出极低的毒性, 频率分别为4%、6%、6%和8%; 对IRBLz-Fu(仅含 *Piz* 基因)、IRBLkp-K60(仅含 *Pik-p* 基因)和IRBLi-F5(仅含 *Pii* 基因)3个抗稻瘟病单基因系表现出相对较高的毒性, 频率分别为88%、86%和80%; 自美香占2号以及其它4个主栽品种上获得的70株稻瘟病菌菌株被聚为不同类群; 2003—2007年供试菌株中无毒基因 *AvrPi9*、*AvrPiz-t*、*AvrPi50* 和 *AvrPik-h* 的出现频率较高, 无毒基因 *AvrPi1*、*AvrPita2*、*AvrPi2* 和 *AvrPish* 的出现频率中等, 无毒基因 *AvrPii*、*AvrPik-p* 和 *AvrPiz* 的出现频率较低。

关键词: 美香占2号; 稻瘟病; 无毒基因型; 致病性

Identification of physiological race and analysis avirulent genes for isolates of rice blast infecting from rice variety of Meixiangzhan 2

WANG Wenjuan^{1,2} SU Jing² YANG Jianyuan² CHEN Shen² LU Guodong^{1*} ZHU Xiaoyuan^{2*}

(1. State Key Laboratory of Ecological Pest Control for Fujian and Taiwan Crops, College of Plant Protection,

Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, Fujian Province, China; 2. Guangdong Provincial

Key Laboratory of High Technology for Plant Protection, Plant Protection Research Institute, Guangdong

Academy of Agricultural Sciences, Guangzhou 510640, Guangdong Province, China)

Abstract: In order to improve the blast resistance of Meixiangzhan 2, rational distribution and rotation planting of different varieties, 50 *Magnaporthe oryzae* isolates collected from the host of Meixiangzhan 2 in Guangdong Province from 2013 to 2017, were tested for their pathogenicity and the corresponding avirulence genotypes against seven Chinese differential cultivars and 11 blast monogenic lines. The results showed that 11 physiological races were identified and the predominant races were C13, B13, B01, B05 and C05, respectively. 50 *M. oryzae* isolates showed extremely low virulent to IRBLkh-K3 (only including *Pik-h* gene), NIL-e1 (only including *Pi50* gene), IRBL9-W (only including *Pi9* gene), and IRBLzt-T (only including *Piz-t* gene) four blast monogenic lines with frequency of 4%, 6%, 6% and 8%, respectively, and showed relatively high virulent to IRBLz-Fu (only including *Piz*

基金项目: 国家重点研发项目(2016YFD0300707), 广东省自然科学基金(2018B030311035, 2020A1515011213)

* 通信作者 (Authors for correspondence), E-mail: gdlufafu@163.com, ricedisease@gdpri.com

收稿日期: 2019-08-09

gene), IRBLkp-K60 (only including *Pik-p* gene) and IRBLi-F5 (only including *Pii* gene) three blast monogenic lines with frequency of 88%, 86% and 80%, respectively. 70 *M. oryzae* isolates isolated from Meixiangzhan 2 and the other four main varieties were clustered into different groups. From 2013 to 2017, the occurrence frequency of avirulent genes *AvrPi9*, *AvrPiz-t*, *AvrPi50*, and *AvrPik-h* in all strains was higher, the occurrence frequency of avirulent genes *AvrPi1*, *AvrPita2*, *AvrPi2*, and *AvrPish* in all strains was medium, and the occurrence frequency of avirulent genes *AvrPii*, *AvrPik-p*, and *AvrPiz* in all strains was lower.

Key words: Meixiangzhan 2; rice blast; genotype of avirulence; pathogenicity

水稻是世界上最重要的粮食作物,全球一半以上的人口以稻米为主食(Gnanamanickam, 2009)。由稻瘟病菌(有性态:*Magnaporthe oryzae*;无性态:*Pyricularia oryzae*)引起的稻瘟病是全球水稻生产上最具毁灭性的病害(Couch & Kohn, 2002),每年由该病害引起的水稻减产高达10%~30%(Miah et al., 2012; Nalley et al., 2016; Deng et al., 2017)。近年来,在中国水稻主产区水稻稻瘟病区域性和间歇性暴发,严重影响粮食的生产安全(朱小源等, 2008)。培育和种植具有广谱抗病性的水稻品种是持续控制该病害的有效途径(Ashkani et al., 2015; Tanweer et al., 2015)。由主效抗瘟基因控制的抗病品种在推广种植3~5年后,常由于稻瘟病菌致病性的分化、无毒基因的变性,导致新的毒性小种产生及优势化而丧失抗瘟性,成为高度易感病的品种,引发稻瘟病的再暴发与流行(Marcel et al., 2010; Liu et al., 2011)。病原菌致病性及无毒基因的分析有助于病原菌变异的精准监测,为利用抗性基因持续控制病害提供科学依据。

国内外病原菌致病性及无毒基因变异方面的研究主要集中在区域病原菌群体结构及其演变规律的分析,对于某一主推水稻品种上病原菌变异动态的研究报道较少(兰波等, 2015; Wang et al., 2017; Zhang et al., 2019)。了解侵染主推水稻品种的稻瘟病菌群体的动态变化,更有利于精准指导不同稻区主推品种的布局及后续轮换品种的选择。随着国内外水稻抗稻瘟病近等基因系和单基因系的育成,单基因系已成为稻瘟病菌致病性及无毒基因分析的主要鉴别品种(Tsunematsu et al., 2000; 史明乐等, 2015; 马军韬等, 2017)。如朱小源等(2004)利用水稻品种抗性聚类分析及主成分因子分析法,组建了一套由9个单基因系构成的稻瘟病菌单基因系鉴别品种,其对我国籼稻区稻瘟病菌的致病性有较强的鉴别力,随后又发展了含抗病基因*Piz-t*和*Pi50*的2个单基因系在内的共11个单基因系构成的稻瘟病菌

单基因系鉴别品种(未发表);汪文娟等(2012;2015;2018)利用7个中国稻瘟病菌生理小种鉴别品种和11个单基因系鉴别品种,分别对分离自粤晶丝苗2号、五优308和广8A系列杂交组合等华南高产和稳产型主栽品种的稻瘟病菌进行了致病性分析。近年来广东省水稻生产上推广的优质水稻品种繁多,导致田间稻瘟病菌生理小种的多样性丰富,生理小种结构复杂多变;从而致使大多数具有优良农艺性状的优质稻种丧失抗瘟性。因此,利用中国鉴别品种和单基因系鉴别品种鉴定优质品种上的病原菌生理小种及无毒基因类型,对优质抗病品种的选育以及合理布局有着重要的指导意义。

水稻稻瘟病对华南稻区粮食生产的危害一直持续存在,美香占2号是当前华南优质稻品种之一,近年来成为华南稻区的主推品种(赵雷等, 2018)。随着该品种连续多年大面积推广种植,其抗瘟性逐渐下降,该品种感染稻瘟病菌生理小种的类型与结构尚未清楚。监测主栽优质品种稻瘟病菌的致病性分化及无毒基因频率变化情况,可为延长抗病品种的抗性及其在生产上的合理布局提供科学依据(马军韬等, 2015; Selisana et al., 2017)。本研究利用7个中国鉴别品种和11个抗稻瘟病单基因系鉴别品种分别对自华南美香占2号上采集并分离的50株稻瘟病菌菌株进行生理小种鉴定和致病性测定,基于测定结果进行聚类分析和无毒基因型分析,明确该品种与其它主栽品种的差异及稻瘟病菌群体的变异趋势,以期为合理使用该品种以及选择后续轮换品种提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料

供试病样及病原菌菌株:于2013—2017年分别自广东省韶关市的南雄市、仁化县和曲江区,惠州市的博罗县、惠阳县和龙门县,河源市的龙川县和连平县,阳江市江城区,茂名市高州县,云浮市罗定县,汕

尾市海丰县,清远市连山县共13个市区县的水稻种植区的优质常规稻美香占2号上采集50个穗颈瘟病样。自常规稻种粤晶丝苗2号上分离的稻瘟病菌菌株YJ1、YJ2、YJ3、YJ4和YJ5(汪文娟等,2012),自杂交稻天优998上分离的稻瘟病菌菌株TY10、TY11、TY13、TY17和TY2(朱小源等,2008),自杂交稻五优308上分离的稻瘟病菌菌株WY-1301、WY-1302、WY-1303、WY-1305和WY-1307(汪文娟等,2015),自广8优杂交稻组合上分离的稻瘟病菌菌株GY12-535、GY14-376、GY12-716、GY12-721和GY13-493(汪文娟等,2018),用于稻瘟病菌的聚类分析。所有菌株均由广东省农业科学院植物保护研究所保存。

供试水稻和玉米品种:7个中国稻瘟病菌生理小种鉴别品种,分别为特特普、珍龙13、四丰43、东农363、关东51、合江18、丽江新团黑谷,均由广东省农业科学院植物保护研究所繁殖,保存。11个抗稻瘟病单基因系鉴别品种分别为IRBL9-W(仅含*Pi9*基因)、IRBLz5-CA(仅含*Pi2*基因)、IRBLz-Fu(仅含*Piz*基因)、IRBLkh-K3(仅含*Pik-h*基因)、IRBL1-CL(仅含*Pil*基因)、IRBLkp-K60(仅含*Pik-p*基因)、IRBLta2-Re(仅含*Pita²*基因)、IRBLsh-S(仅含*Pish*基因)、IRBLi-F5(仅含*Pii*基因)、IRBLzt-T(仅含*Piz-t*基因)、NIL-e1(仅含*Pi50*基因),前9个抗稻瘟病单基因系是本课题组以前构建的单基因鉴别系(朱小源等,2004),种子来源于国际水稻研究所;后2个是新增的单基因鉴别系,分别来自国际水稻研究所和广东省农业科学院植物保护研究所(Zhu et al., 2012)。感病对照品种为丽江新团黑谷,不含任何抗瘟基因。玉米品种为秋乐368,来源于广东科邦饲料科技有限公司,取籽粒供试。

培养基:酵母固体培养:可溶性淀粉10g、酵母浸出膏4g、琼脂粉20g、蒸馏水1L;玉米培养基:浸泡过夜的干玉米粒250g/瓶;水琼脂培养基:琼脂粉10g、蒸馏水0.5L,121℃湿热灭菌30min。

试剂及仪器:硫酸铵,广州化学试剂厂;其它试剂均为国产分析纯。LRH-250A真菌生化培养箱,韶关市泰宏医疗器械有限公司;25L有油空气压缩机(喷雾器),常州格力博工具有限公司;L301生物显微镜,广州永程实验仪器有限公司。

1.2 方法

1.2.1 水稻稻瘟病原菌分离、繁殖及产孢

采用单孢分离方法对病原菌进行分离。用0.5%强氯精对田间采集的50个穗颈瘟标样表面消毒2min,无菌水清洗3~4次后置于灭菌培养皿中,

放入25℃生化培养箱中培养,约3d左右产生霉层,利用孢子振落法将病穗颈部新萌发的分生孢子振落到有水琼脂培养基的载玻片上,在光学显微镜下挑取单个分生孢子进行单孢分离,将单个分生孢子挑取到酵母固体培养基上进行单孢保存。将保存的单孢菌株转移至酵母固体培养基上进行活化,置于25℃生化培养箱中培养7d以上,将长满菌丝体的培养基转接到高温高压灭菌的玉米培养基上进行繁殖,于25℃培养约13d。用高温、高压灭菌的无菌水洗去玉米粒表面的菌丝体,并将玉米粒置于长25cm、宽19cm、高2cm的消毒搪瓷盘中,上面覆盖一层湿的无菌纱布,在28℃培养室内于日光灯下培养3~4d,进行光照诱导产孢,待玉米粒上培养的菌株产生大量分生孢子后,用无菌水洗下玉米粒上的孢子,用2层塑料细纱网滤去玉米残渣,配成浓度为 1×10^5 个/mL的孢子悬浮液,备用。

1.2.2 水稻稻瘟病菌生理小种的鉴定

于2017年11月在广东省农业科学院植物保护研究所实验室内利用7个中国稻瘟病菌鉴别品种对2013—2017自华南稻区优质品种美香占2号上采集和分离的50株稻瘟病菌菌株进行生理小种鉴定。将7个中国稻瘟病菌生理小种鉴别品种催芽后分别穴播于长30cm、宽20cm、高5cm的育秧盘中,每个材料播种1盘,每盘播10~12粒种子,每个材料设3个重复,共播21盘。待水稻苗长至1叶1心、2叶1心和3叶1心时,每盆施硫酸铵约0.5g,共施肥3次。待水稻苗长至3~4叶时,采用人工喷雾法接种浓度为 1×10^5 个/mL的稻瘟病菌孢子悬浮液,每盘接种50mL。将接种后的水稻苗于25℃、相对湿度100%、全黑暗条件下培养24h后,转至25~28℃玻璃温室内光照条件下培养96~144h,直至水稻苗完全发病后,参照Bonman et al. (1986)方法对水稻苗的整体发病情况进行调查。参照国际水稻研究所的稻瘟病圃苗瘟分级标准进行分级:0级:无任何病斑;1级:仅有针点状的病斑;2级:有稍大褐色点状病斑,0.50≤直径<1.00mm;3级:圆形至椭圆形灰色病斑,边缘褐色,1.00≤直径<2.00mm;4级:2条叶脉之间椭圆形或狭长纺锤形病斑,病斑面积<2%叶面积;5级:典型稻瘟病斑,2%≤受害叶面积所占比例<10%;6级:典型稻瘟病斑,10%≤受害叶面积所占比例<25%;7级:典型稻瘟病斑,25%≤受害叶面积所占比例<50%;8级:典型稻瘟病斑,50%≤受害叶面积所占比例<75%;9级:典型稻瘟病斑,受害叶面积所占比例≥75%。将0~3级归为无毒菌株,4~9级为有毒菌株,统计有毒菌株数

量,计算有毒菌株频率,有毒菌株频率=有毒菌株数量/接种总菌株数量 $\times 100\%$ 。

1.2.3 水稻稻瘟病菌致病性测定及聚类分析

于2018年3月在广东省农业科学院植物保护研究所实验室利用11个抗稻瘟病单基因系和感病对照品种丽江新团黑谷对2013—2017自华南稻区优质品种美香占2号上采集和分离的50株稻瘟病菌菌株进行致病性测定。将11个抗稻瘟病单基因系和感病对照品种丽江新团黑谷催芽后穴播于长30 cm、宽20 cm、高5 cm的育秧盘中,每个材料播种1盘,每盘播10~12粒种子,每个材料设2个重复,共播22盆,水稻苗管理、接种、发病情况调查、病害分级及有毒/无毒类型等方法同1.2.2。

利用聚类分析软件 Circular Tree 将菌株对除 *Pi50* 基因外的10个抗稻瘟病单基因系的有毒/无毒类型结果转化为1/0的数据格式,按照R语言的作图流程,对2013—2017年自美香占2号分离的50株单孢分离菌株及分别自天优998、粤晶丝苗2号、五优308和广8优品种分离的20株菌株进行聚类分析。

1.2.4 水稻稻瘟病菌无毒基因型分析

水稻与稻瘟病菌之间的相互作用符合“基因对基因”学说(Flor, 1971),即当供试菌株接种到某个水稻单基因系后,表现为抗病反应型,则表明该供试菌株含有的无毒基因类型与抗瘟单基因系携带的抗瘟基因类型相匹配。根据此方法,观察50株供试菌株接种到11个水稻抗稻瘟病单基因系后表现出的抗/感反应型,并分析2013—2017连续5年间自优质品种美香占2号分离的稻瘟病菌菌株携带无毒基因的情况。

2 结果与分析

2.1 水稻稻瘟病菌生理小种的鉴定

自华南稻区优质品种美香占2号上分离的50株

菌株被鉴定为C07、D07、B31、D05、B15、C15、B01、B05、C05、B13和C13生理小种,其中优势生理小种为C13、B13、B01、B05和C05,占总供试菌株的比例分别为24%、16%、12%、12%和12%(图1)。所有菌株都对特特普品种无毒,仅有10%的菌株对关东51有毒,有90%的菌株对四丰43有毒,有80%的菌株对合江18有毒(表1)。

2.2 水稻稻瘟病菌的致病性及聚类分析

自华南稻区优质品种美香占2号上分离的50株稻瘟病菌菌株对11个水稻抗稻瘟病单基因系的毒性频率具有丰富的多样性,其中对IRBLkh-K3(仅含 *Pik-h* 基因)、NIL-e1(仅含 *Pi50* 基因)、IRBL9-W(仅含 *Pi9* 基因)和IRBLzt-T(仅含 *Piz-t* 基因)4个水稻抗稻瘟病单基因系表现出极低的毒性,频率分别为4%、6%、6%和8%;对IRBLz-Fu(仅含 *Piz* 基因),IRBLkp-K60(仅含 *Pik-p* 基因)和IRBLi-F5(仅含 *Pii* 基因)3个水稻抗稻瘟病单基因系表现出相对较高的毒性,频率分别为88%、86%和80%(表2),所有菌株都可侵染感病对照品种丽江新团黑谷。

聚类分析结果显示,自美香占2号上及其它4个主栽品种上分离的70株稻瘟病菌菌株可聚类为不同的类群,自粤晶丝苗2号和天优998上分离的10株稻瘟病菌菌株分别聚在2个独立的类群;自美香占2号、五优308和广8优上分离的60株稻瘟病菌菌株归属的类群相互交错(图2)。

2.3 水稻稻瘟病菌无毒基因型及变化趋势

2013—2017自优质品种美香占2号上获得的稻瘟病菌菌株无毒基因中,无毒基因 *AvrPi9*、*AvrPiz-t*、*AvrPi50* 和 *AvrPik-h* 的出现频率较高,大于90%;无毒基因 *AvrPii1*、*AvrPita2*、*AvrPi2* 和 *AvrPish* 的出现频率中等,大于60%;无毒基因 *AvrPii*、*AvrPik-p* 和 *AvrPiz* 的出现频率较低,小于20%(图3)。

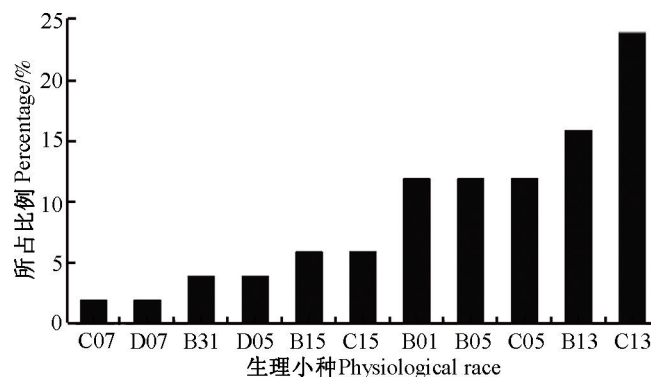


图1 经7个中国鉴别品种鉴定的华南稻区稻瘟病菌生理小种的分布

Fig. 1 Distribution of *Magnaporthe oryzae* physiological race in South China rice areas identified by seven Chinese differentials

表1 自华南稻区优质品种美香占2号上分离的50株稻瘟病菌菌株对7个中国鉴别品种的致病性

Table 1 Pathogenic reaction of 50 *Magnaporthe oryzae* strains isolated from the high quality variety Meixiangzhan 2 in South China against seven Chinese blast differentials

菌株 Strain	对7个中国鉴别品种的致病性 Pathogenicity against 7 Chinese blast differentials							生理小种 Race
	特特普 Tetep	珍龙 13 Zhenlong 13	四丰 43 Sifeng 43	东农 363 Dongnong 363	关东 51 Guandong 51	合江 18 Hejiang 18	丽江新团黑谷 Lijiangxintuanheigu	
GD15-204	A	V	V	V	V	V	V	B01
GD15-205	A	V	V	V	V	V	V	B01
GD15-214	A	V	V	V	V	V	V	B01
GD15-196	A	V	V	V	V	V	V	B01
GD15-206	A	V	V	V	A	V	V	B01
GD17-165	A	V	V	V	V	V	V	B01
GD13-591	A	V	V	V	A	V	V	B05
GD15-198	A	V	V	V	A	V	V	B05
GD15-210	A	V	V	V	A	V	V	B05
GD17-171	A	V	V	V	A	V	V	B05
GD17-202	A	V	V	V	A	V	V	B05
GD17-380	A	V	V	V	A	V	V	B05
GD13-369	A	V	V	A	A	V	V	B13
GD13-667	A	V	V	A	A	V	V	B13
GD14-004	A	V	V	A	A	V	V	B13
GD14-073	A	V	V	A	A	V	V	B13
GD15-076	A	V	V	A	A	V	V	B13
GD16-006	A	V	V	A	A	V	V	B13
GD16-189	A	V	V	A	A	V	V	B13
GD17-181	A	V	V	A	A	V	V	B13
GD13-452	A	V	V	A	A	A	V	B15
GD15-211	A	V	V	A	A	A	V	B15
GD16-034	A	V	V	A	A	A	V	B15
GD13-389	A	V	A	A	A	A	V	B31
GD15-195	A	V	A	A	A	A	V	B31
GD13-394	A	A	V	V	A	V	V	C05
GD14-186	A	A	V	V	A	V	V	C05
GD16-196	A	A	V	V	A	V	V	C05
GD16-197	A	A	V	V	A	V	V	C05
GD17-001	A	A	V	V	A	V	V	C05
GD17-314	A	A	V	V	A	V	V	C05
GD13-382	A	A	V	V	A	A	V	C07
GD13-012	A	A	V	A	A	V	V	C13
GD13-027	A	A	V	A	A	V	V	C13
GD13-358	A	A	V	A	A	V	V	C13
GD14-002	A	A	V	A	A	V	V	C13
GD14-003	A	A	V	A	A	V	V	C13
GD14-084	A	A	V	A	A	V	V	C13
GD14-295	A	A	V	A	A	V	V	C13
GD15-074	A	A	V	A	A	V	V	C13
GD16-185	A	A	V	A	A	V	V	C13
GD16-187	A	A	V	A	A	V	V	C13
GD17-312	A	A	V	A	A	V	V	C13
GD17-313	A	A	V	A	A	V	V	C13
GD13-193	A	A	V	A	A	A	V	C15
GD14-192	A	A	V	A	A	A	V	C15
GD17-125	A	A	V	A	A	A	V	C15
GD13-395	A	A	A	V	A	V	V	D05
GD15-097	A	A	A	V	A	V	V	D05
GD13-354	A	A	A	V	A	A	V	D07
有毒菌株数量 No. of virulent strain	0	25	45	22	5	40	50	
有毒菌株频率/% Frequency of virulent strain	0	50	90	44	10	80	100	

A: 无毒型; V: 有毒型。A: Avirulence; V: virulence.

表2 自华南稻区优质品种美香占2号上分离的50株稻瘟病菌对11个水稻抗稻瘟病单基因系的致病性

Table 2 Pathogenicity of 50 *Magnaporthe oryzae* strains isolated from the high quality variety Meixiangzhan 2 in South China against 11 monogenic blast-resistant lines

菌株 Strain	对11个水稻抗稻瘟病单基因系的致病性 Pathogenicity against 11 monogenic rice blast-resistant lines										
	IRBL9-W (<i>Pi9</i>)	IRBLz5- CA(<i>Pi2</i>)	IRBLz-Fu (<i>Piz</i>)	IRBLkh- K3(<i>Pik-h</i>)	IRBL1-CL (<i>Pi1</i>)	IRBLkp- K60(<i>Pik-p</i>)	IRBLta2- Re(<i>Pita</i> ²)	IRBLsh-S (<i>Pish</i>)	IRBLi-F5 (<i>Pii</i>)	IRBLzt-T (<i>Piz-t</i>)	NIL-e1 (<i>Pi50</i>)
GD13-012	A	A	V	A	A	V	V	A	V	A	A
GD13-027	A	A	V	A	A	V	A	V	V	A	A
GD13-193	A	A	A	A	A	V	A	A	A	A	A
GD13-354	A	A	V	A	A	V	A	A	V	A	A
GD13-369	A	A	A	A	A	V	A	A	V	A	A
GD13-382	A	V	V	V	A	V	A	A	V	A	A
GD13-389	A	A	V	A	V	A	A	A	A	A	A
GD13-394	A	V	V	A	A	V	A	A	A	A	A
GD13-395	A	A	V	A	A	V	A	A	V	A	A
GD13-452	A	A	A	A	A	A	A	V	A	A	A
GD13-591	A	A	V	A	A	V	A	A	V	A	A
GD13-667	A	A	V	A	A	V	V	A	V	A	A
GD13-358	A	A	V	A	A	V	A	A	V	A	A
GD14-002	A	A	V	A	A	A	A	A	V	V	V
GD14-003	A	V	V	A	V	V	A	V	V	A	A
GD14-004	A	V	V	A	A	V	A	V	V	A	A
GD14-073	A	V	V	A	A	V	V	V	V	A	A
GD14-084	A	A	V	A	A	V	A	V	V	A	A
GD14-186	A	V	V	A	A	V	V	A	V	A	A
GD14-192	A	V	V	A	A	V	A	V	V	A	A
GD14-295	V	A	V	A	A	V	A	A	A	A	A
GD15-074	A	A	V	A	A	V	A	A	V	A	A
GD15-076	A	A	V	A	A	V	A	A	V	A	A
GD15-097	A	V	A	A	A	A	V	A	A	A	A
GD15-198	A	V	V	A	A	V	A	A	V	A	A
GD15-204	A	A	V	A	A	V	A	V	V	V	A
GD15-205	V	V	V	A	A	V	A	V	V	A	V
GD15-210	A	V	V	A	A	V	A	A	V	A	A
GD15-211	A	A	V	A	A	V	A	A	V	A	A
GD15-214	A	A	V	A	A	V	V	V	V	A	A
GD15-195	A	A	V	A	A	V	A	A	A	A	A
GD15-196	V	V	V	A	A	V	V	V	V	A	A
GD15-206	A	A	V	A	A	V	A	A	V	A	A
GD16-006	A	A	V	A	A	A	A	A	V	V	A
GD16-034	A	A	V	A	A	A	A	A	A	V	A
GD16-185	A	A	V	A	A	V	V	V	V	A	A
GD16-187	A	A	V	V	V	V	A	V	V	A	A
GD16-189	A	A	V	A	A	V	A	V	V	A	A
GD16-196	A	V	V	A	A	V	A	V	V	A	A
GD16-197	A	V	V	A	A	V	V	V	V	A	A
GD17-001	A	A	V	A	A	V	A	A	A	A	A
GD17-125	A	V	A	A	V	A	V	V	A	A	A
GD17-165	A	V	V	A	A	V	A	A	V	A	A
GD17-171	A	A	A	A	A	V	A	A	V	A	A
GD17-202	A	V	V	A	A	V	A	V	V	A	V
GD17-181	A	V	V	A	V	V	A	A	V	A	A
GD17-312	A	A	V	A	A	V	A	A	V	A	A
GD17-313	A	A	V	A	A	V	V	A	V	A	A

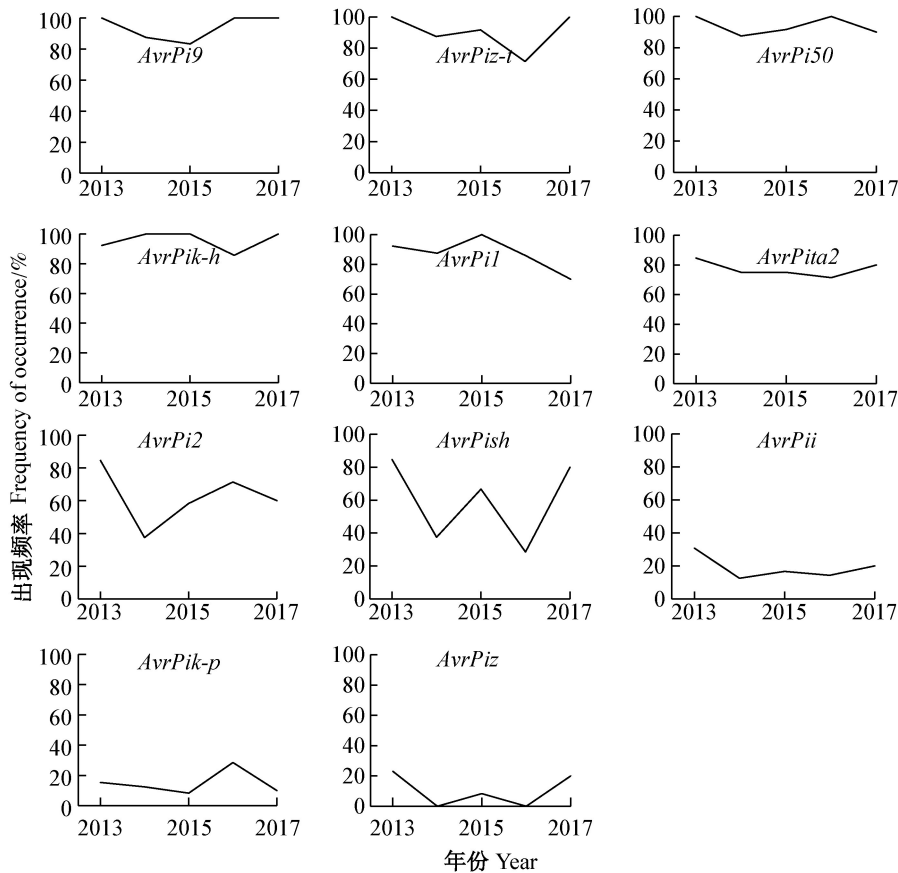


图3 2013—2017年自美香占2号上分离的50株稻瘟病菌菌株中11个无毒基因的出现频率变化
Fig. 3 Frequency changes of 11 avirulence genes of 50 *Magnaporthe oryzae* strains isolated from variety Meixiangzhan 2 from 2013 to 2017

在这5年间中,无毒基因 *AvrPi9*、*AvrPiz-t*、*Avr-Pi50* 和 *AvrPik-h* 较平稳,变化不明显;无毒基因 *Avr-Pita²* 变化不明显,无毒基因 *AvrPil* 和 *AvrPi2* 呈逐年下降的趋势,无毒基因 *AvrPish* 呈明显波动变化;无毒基因 *AvrPii* 呈下降的趋势,无毒基因 *AvrPik-p* 变化不明显,无毒基因 *AvrPiz* 呈较明显的波动变化,其中在2014和2016年未检测到含 *AvrPiz* 的无毒菌株(图3)。

3 讨论

中国鉴别品种包含了3个籼稻品种和4个粳稻品种,其分别对籼稻区和粳稻区的生理小种有较高鉴别能力(凌忠专等,2000),与其它鉴别品种相比,更适用于我国各稻区稻瘟病菌群体生理小种结构的研究。Zhang et al.(2019)利用7个中国鉴别品种对黑龙江省2006—2015年收集的稻瘟病菌群体生理小种结构的动态变化进行分析,明确了黑龙江省稻瘟病菌的优势小种为ZD1、ZD3、ZD5和ZE1及季节和稻区位置对稻瘟病菌群体动态变化的影响;郭丽颖等(2015)利用7个中国鉴别品种对2012年采自黑

龙江省齐齐哈尔、佳木斯、哈尔滨、绥化4个市的130株稻瘟病菌菌株进行了鉴定,共鉴定出7个群38个生理小种,优势生理小种为ZD5、ZD7、ZA53、ZA61、ZA55和ZA21;陈小林等(2017)利用中国7个稻瘟病菌鉴别品种对广西壮族自治区2012—2014年分离获得的稻瘟病菌单孢菌株进行生理小种鉴定,共鉴定出ZA、ZB、ZC、ZD、ZE、ZF、ZG七个群24个生理小种,其中优势种群为ZB,优势生理小种为ZB9和ZB13。本研究结果显示,自广东省粤北、粤中和粤中南等不同稻区美香占2号上分离的稻瘟病菌生理小种具有丰富的多样性,利用中国7个鉴别品种共鉴定出11个生理小种,其中优势生理小种为C13、B13、B01、B05和C05,所有菌株都对鉴别品种特特普无毒,仅有10%的菌株对关东51有毒,表明鉴别品种特特普和关东51携带的抗性基因可用于美香占2号种植区的水稻抗性改良。

中国鉴别品种除了丽江新团黑谷外,其它6个鉴别品种都具有2个或2个以上的抗病基因(Bonman et al., 1986)。为了准确鉴定华南籼稻区的稻瘟

病菌生理小种,最理想的鉴别品种是建立适用于华南稻区的单基因系鉴别品种。本研究利用华南稻区适用的11个抗稻瘟病单基因系鉴别品种,对自美香占2号分离的菌株进行了生理小种无毒基因型鉴定,结果显示无毒基因 *AvrPi9*、*AvrPiz-t*、*AvrPi50* 和 *AvrPik-h* 出现的频率较高,无毒基因 *AvrPi1* 和 *AvrPi2* 的出现频率逐年下降,无毒基因 *AvrPii*、*AvrPiz* 和 *AvrPik-p* 的出现频率较低。因此,推断在美香占2号感病稻区,可选择含 *Pi9*、*Piz-t*、*Pi50* 或 *Pik-h* 抗性基因的品种进行轮换种植,含 *Pi1* 或 *Pi2* 基因的品种应谨慎使用,含 *Piz*、*Pii*、*Pik-p* 基因的品种应避免使用。Zhou et al. (2006) 和 Su et al. (2015) 研究结果表明,虽然 *AvrPiz-t*、*AvrPi50*、*AvrPi2* 及 *AvrPiz* 等抗性基因均是等位同源基因,然而这些抗性基因的结构却具有多样性和复杂性,本研究结果也表明,*Piz-t*、*Pi50*、*Pi2* 及 *Piz* 等抗性基因在与稻瘟病菌互作中具有丰富的多样性,含这些抗性基因的品种可在抗病品种布局中轮换使用。

本研究结果表明,自美香占2号和其它主栽品种上分离获得的稻瘟病菌在致病性以及无毒基因型上存在一定的共性与差异。无毒基因 *AvrPi9* 在自美香占2号、天优998(朱小源等,2008)、粤晶丝苗2号(汪文娟等,2012)、五优308(汪文娟等,2015)和广8优系列组合(汪文娟等,2018)上所分离菌株中的频率均很高,但是,无毒基因 *AvrPii* 和 *AvrPita*² 在自天优998上所分离菌株中的出现频率为100%(杨健源等,2009),在自粤晶丝苗2号上所得离菌株中,无毒基因 *AvrPiz* 和 *AvrPik-h* 的出现频率较高(汪文娟等,2012),无毒基因 *AvrPi2* 和 *AvrPik-h* 在自五优308上所分离菌株中的出现频率最高(汪文娟等,2015),在自广8优系列组合上所分离菌株中,无毒基因 *AvrPi2* 的出现频率较高(汪文娟等,2018),本研究结果显示,在自美香占2号上所分离菌株中,出现频率较高的是无毒基因 *Pi50* 和 *AvrPiz-t*。此外,自美香占2号以及其它4个主栽品种上分离的稻瘟病菌菌株被聚为不同的类群,自粤晶丝苗2号和天优998上所分离菌株的无毒基因型分别聚在2个独立的类群中,明显不同于自美香占2号上分离的大部分菌株。因此,为减轻病原菌无毒基因型单一化的选择压力,在美香占2号种植稻区,可重点引入含 *Pi9*、*Piz-t*、*Pi50*、*Pik-h* 基因的抗病品种,同时可与粤晶丝苗2号和天优998等基因型类似的品种进行轮换种植。

近年来,稻瘟病抗性基因研究取得较大进展,鉴定克隆的抗性基因已达27个(Deng et al., 2017),但

与其匹配的无毒基因研究严重滞后,已鉴定的无毒基因仅有 *PWL1*、*PWL2*、*Avr1-CO39*、*AvrPita*、*ACE1*、*AvrPiz-t*、*AvrPia*、*AvrPii*、*AvrPik/km/kp*、*AvrPib*、*AvrPi9* 及 *AvrPi54* 这12个(Wu et al., 2015; Zhang et al., 2015; Ray et al., 2016)。目前病菌无毒基因型群体变异研究仍需借助于含已知抗性基因的鉴别系(单基因系或近等基因系)。本研究利用单基因系鉴别水稻稻瘟病菌致病性和无毒基因型,存在一定的不足。利用不同遗传背景的水稻品种创建的抗稻瘟病单基因系,其鉴定结果受不同来源品种的影响较大(Telebanco-Yanoria et al., 2008)。随着越来越多的稻瘟病菌无毒基因的克隆,基于抗稻瘟病单基因系抗感性分析,结合无毒基因型功能性分子标记诊断,将更有效地用于稻瘟病菌群的无毒基因分析及水稻品种抗病基因有效性推断。

参 考 文 献 (References)

- ASHKANI S, RAFII MY, SHABANIMOFRAD M, MIAH G, SAHEBI M, AZIZI P, TANWEER FA, AKHTAR MS, NASEHI A. 2015. Molecular breeding strategy and challenges towards improvement of blast disease resistance in rice crop. *Frontiers in Plant Science*, 6: 886
- BONMAN JM, DE DIOS TIV, KHIN MM. 1986. Physiologic specialization of *Pricularia oryzae* in the Philippines. *Plant Disease*, 70 (8): 767-769
- CHEN XL, YAN Q, LI RF, LI KH, WEI SF, HUANG FK, WEI LL. 2017. Physiological races identification and genetic diversity analysis of *Magnaporthe oryzae* in Guangxi Province. *Southwest China Journal of Agricultural Sciences*, 30(4): 767-772 (in Chinese) [陈小林, 颜群, 李瑞芳, 李焜华, 韦善富, 黄凤宽, 韦丽丽. 2017. 广西稻瘟病菌生理小种鉴定及遗传多样性分析. *西南农业学报*, 30(4): 767-772]
- COUCH BC, KOHN LM. 2002. A multilocus gene genealogy concordant with host preference indicates segregation of a new species, *Magnaporthe oryzae*, from *M. grisea*. *Mycologia*, 94(4): 683-693
- DENG YW, ZHAI KR, XIE Z, YANG DY, ZHU XD, LIU JZ, WANG X, QIN P, YANG YZ, ZHANG GM, et al. 2017. Epigenetic regulation of antagonistic receptors confers rice blast resistance with yield balance. *Science*, 355(6328): 962-965
- FLOR HH. 1971. Current status of the gene-for-gene concept. *Annual Review of Phytopathology*, 9: 275-296
- GNANAMANICKAM SS. 2009. Rice and its importance to human life.//Biological control of rice diseases. Dordrecht: Springer, pp. 1-11
- GUO LY, ZHAO HW, WANG JG, LIU HL, SUN J, SONG W, JIANG SD, XING W, ZOU DT. 2015. Identification of physiological race of rice blast fungus and disease resistance and genetic diver-

- sity analysis on major cultivars in Heilongjiang Province. Journal of Nuclear Agricultural Sciences, 29(8): 1444-1454 (in Chinese) [郭丽颖, 赵宏伟, 王敬国, 刘化龙, 孙健, 宋微, 姜思达, 兴旺, 邹德堂. 2015. 黑龙江省稻瘟病菌生理小种鉴定和主栽水稻品种抗病性及遗传多样性分析. 核农学报, 29(8): 1444-1454]
- LAN B, YANG YQ, CHANG DD, XU PD, LI XM. 2015. Pathogenicity differentiation of rice blast pathogen (*Magnaporthe grisea*) based on Lijiangxintuanheigu. Journal of Huazhong Agricultural University, 34(1): 28-32 (in Chinese) [兰波, 杨迎青, 常冬冬, 徐沛东, 李湘民. 2015. 基于丽江新团黑谷的稻瘟病菌致病性分化. 华中农业大学学报, 34(1): 28-32]
- LING ZZ, MEW T, WANG JL, LEI CL, HUANG N. 2000. Development of Chinese near-isogenic lines of rice and their differentiating ability to pathogenic races of *Pyricularia grisea*. Scientia Agricultura Sinica, 33(4): 1-8 (in Chinese) [凌忠专, Mew T, 王久林, 雷财林, 黄宁. 2000. 中国水稻近等基因系的育成及其稻瘟病菌生理小种鉴别能力. 中国农业科学, 33(4): 1-8]
- LIU WD, ZHOU XY, LI GT, LI L, KONG LG, WANG CF, ZHANG HF, XU JR. 2011. Multiple plant surface signals are sensed by different mechanisms in the rice blast fungus for appressorium formation. PLoS Pathogens, 7(1): e1001261
- MA JT, ZHANG GM, XIN AH, ZHANG LY, DENG LW, WANG YL, WANG Y, XIAO JL, REN Y. 2015. Pathogenicity of *Magnaporthe oryzae* isolates from rice cultivar Kongyu163. Acta Phytopathologica Sinica, 45(5): 494-500 (in Chinese) [马军韬, 张国民, 辛爱华, 张丽艳, 邓凌韦, 王永力, 王英, 肖佳雷, 任洋. 2015. 源于水稻品种空育163的稻瘟病菌菌株致病性分析. 植物病理学报, 45(5): 494-500]
- 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]
- MARCEL S, SAWERS R, OAKELEY E, ANGLIKER H, PASZKOWSKI U. 2010. Tissue-adapted invasion strategies of the rice blast fungus *Magnaporthe oryzae*. Plant Cell, 22(9): 3177-3187
- MIAH G, RAFII MY, ISMAIL MR, PUTEH AB, RAHIM HA, ASFALIZA MA, LATIF MA. 2012. Blast resistance in rice: a review of conventional breeding to molecular approaches. Molecular Biology Reports, 40(3): 2369-2388
- NALLEY L, TSIBOE F, DURAND-MORAT A, SHEW A, THOMA G. 2016. Economic and environmental impact of rice blast pathogen (*Magnaporthe oryzae*) alleviation in the United States. PLoS ONE, 11(12): e0167295
- RAY S, SINGH PK, GUPTA DK, MAHATO AK, SARKAR C, RATHOU R, SINGH NK, SHARMA TR. 2016. Analysis of *Magnaporthe oryzae* genome reveals a fungal effector, which is able to induce resistance response in transgenic rice line containing resistance gene, *Pi54*. Frontiers in Plant Science, 7: 1140
- SELISANA SM, YANORIA MJ, QUIME B, CHAIPANYA C, LU G, OPULENCIA R, WANG GL, MITCHELL T, CORRELL J, TALBOT N, 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
- SHI MY, LIU ZH, CHEN YL, TIAN AN, YAO LQ, REN CM, MIAO Q, YU HS, CHENG ZB. 2015. Population diversity of *Magnaporthe oryzae* of Jiangsu and Liaoning japonica rice area. Acta Phytopathologica Sinica, 45(2): 158-166 (in Chinese) [史明乐, 刘志恒, 陈毓苓, 田蔓楠, 姚恋秋, 任春梅, 缪倩, 于汉寿, 程兆榜. 2015. 苏辽粳稻区稻瘟病菌群体多样性比较. 植物病理学报, 45(2): 158-166]
- SU J, WANG WJ, HAN JL, CHEN S, WANG CY, ZENG LX, FENG AQ, YANG JY, ZHOU B, ZHU XY. 2015. Functional divergence of duplicated genes results in a novel blast resistance gene *Pi50* at the *Pi2/9* locus. Theoretical and Applied Genetics, 128(11): 2213-2225
- TANWEER FA, RAFII MY, SIJAM K, RAHIM HA, AHMED F, LATIF MA. 2015. Current advance methods for the identification of blast re-istance genes in rice. Comptes Rendus Biologies, 338(5): 321-334
- TELEBANCO-YANORIA MJ, IMBE T, KATO H, TSUNEMAYSU H, EBRON LA, VERA CRUZ CM, KOBAYASHI N, FUKUTA Y. 2008. A set of standard differential blast isolates (*Magnaporthe grisea* (Hebert) Barr.) from the Philippines for rice (*Oryza sativa* L.) resistance. Japan Agricultural Research Quarterly, 42(1): 23-34
- TSUNEMATSU H, YANORIA MJT, EBRON LA, HAYASHI N, ANDO I, KATO H, IMBE T, KHUSH GS. 2000. Development of monogenic lines of rice for blast resistance. Breeding Science, 50(3): 22-234
- WANG WJ, SU J, YANG JY, WEI XY, CHEN KL, CHEN Z, CHEN S, ZHU XY. 2018. Analysis of *Magnaporthe oryzae* avirulent genes in the infected hybrid rice combinations derived from a sterile line of Guang 8A. Scientia Agricultura Sinica, 51(24): 4633-4646 (in Chinese) [汪文娟, 苏菁, 杨健源, 韦小燕, 陈凯玲, 陈珍, 陈深, 朱小源. 2018. 源于广8A杂交稻组合的稻瘟病菌无毒基因型分析. 中国农业科学, 51(24): 4633-4646]
- WANG WJ, SU J, ZHANG J, LI YL, CHEN S, ZENG LX, YANG JY, ZHU XY. 2012. Pathogenicity analysis of the rice blast fungus isolated from the blast panicles of Yuejingsimiao 2. Guangdong Agricultural Sciences, 39(23): 59-61 (in Chinese) [汪文娟, 苏菁, 张杰, 李亦龙, 陈深, 曾列先, 杨健源, 朱小源. 2012. 源于粤晶丝苗2号穗瘟的稻瘟病菌致病性分析. 广东农业科学, 39(23): 59-61]
- WANG WJ, WEI XY, CHEN KL, CHEN WQ, CHEN Z, YANG JY, ZHU XY. 2015. Pathogenicity analysis on *Magnaporthe grisea* of hybrid combination Wuyou308. Guangdong Agricultural Sciences, 42(14): 70-73 (in Chinese) [汪文娟, 韦小燕, 陈凯玲, 陈尉芹, 陈珍, 杨健源, 朱小源. 2015. 源自杂交稻组合五优308稻瘟病菌致病性分析. 广东农业科学, 42(14): 70-73]

- WANG XY, JIA YL, WAMISHE Y, JIA MH, VALENT B. 2017. Dynamic changes in the rice blast population in the United States over six decades. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 30(10): 803–812
- WU J, KOU YJ, BAO JD, LI Y, TANG MZ, ZHU XL, PONAYA A, XIAO G, LI JB, LI CY, et al. 2015. Comparative genomics identifies the *Magnaporthe oryzae* avirulence effector *AvrPi9* that triggers *Pi9*-mediated blast resistance in rice. *New Phytologist*, 206(4): 1463–1475
- YANG JY, CHEN YT, CHEN S, YANG WX, CHEN XL, ZENG XL, ZHU XY. 2009. Race identification and pathogenicity analysis of the blast fungus isolated from a hybrid rice “Tian You 998”. // *Proceedings of the Annual Meeting of Chinese Society for Plant Pathology (2009)*. Beijing: China Agricultural Science and Technology Press, pp. 121–122 (in Chinese) [杨健源, 陈玉托, 陈深, 杨维新, 陈喜劳, 曾列先, 朱小源. 2009. 源自杂交稻组合“天优998”稻瘟病菌小种鉴定及其致病性分析. // 中国植物病理学会2009年学术年会论文集. 北京: 中国农业科学技术出版社, pp. 121–122]
- ZHANG SL, WANG L, WU WH, HE LY, YANG XF, PAN QH. 2015. Function and evolution of *Magnaporthe oryzae* avirulence gene *AvrPib* responding to the rice blast resistance gene *Pib*. *Scientific Reports*, 5: 11642
- ZHANG YL, WANG JY, YAO YX, JIN XH, CORRELL J, WANG L, PAN QH. 2019. Dynamics of race structures of the rice blast pathogen population in Heilongjiang Province, China from 2006 through 2015. *Plant Disease*, 103(11): 2759–2763
- ZHAO L, ZHOU SC, WANG CR, LI H, HUANG DQ, WANG ZD, ZHOU DG, CHEN YB, WU YK. 2018. Pedigree analysis and breeding and application of green widely adaptive good quality rice varieties. *Chinese Bulletin of Life Sciences*, 30(10): 1100–1107 (in Chinese) [赵雷, 周少川, 王重荣, 李宏, 黄道强, 王志东, 周德贵, 陈宜波, 吴玉坤. 2018. 绿色广适性优质稻品种的系谱分析及育种应用研究. *生命科学*, 30(10): 1100–1107]
- 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
- ZHU XY, CHEN S, YANG JY, ZHOU SC, ZENG LX, HAN JL, SU J, WANG L, PAN QH. 2012. The identification of *Pi50(t)*, a new member of the rice blast resistance *Pi2/Pi9* multigene family. *Theoretical and Applied Genetics*, 124(7): 1295–1304
- ZHU XY, YANG JY, CHEN YT, YANG WX, CHEN XL, ZENG LX, CHEN S. 2008. Race identification and pathogenicity test of the blast fungus causing the resistance breakdown of hybrid rice Tianyou 998. *Guangdong Agricultural Sciences*, (12): 84–86 (in Chinese) [朱小源, 杨健源, 陈玉托, 杨维新, 陈喜劳, 曾列先, 陈深. 2008. 引致天优998抗性丧失的稻瘟病菌小种鉴定及其致病性测定. *广东农业科学*, (12): 84–86]
- ZHU XY, YANG QY, YANG JY, LEI CL, WANG JL, LING ZZ. 2004. Differentiation ability of monogenic lines to *Magnaporthe grisea* in indica rice. *Acta Phytopathologica Sinica*, 34(4): 361–368 (in Chinese) [朱小源, 杨祁云, 杨健源, 雷财林, 王久林, 凌忠专. 2004. 抗稻瘟病单基因系对籼稻稻瘟病菌小种鉴别力分析. *植物病理学报*, 34(4): 361–368]

(责任编辑:张俊芳)