

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

王 群 毕云青 孔垂思 金桂梅 杨明英 李进斌*

(云南省农业科学院农业环境资源研究所, 昆明 650205)

摘要: 为明确水稻抗性基因 *Piz-t*、*Pib* 和 *Pii* 的有效性, 利用无毒基因 *AvrPiz-t*、*AvrPib* 和 *AvrPii* 的特异性引物对自云南省6个水稻产区采集并分离获得的348株稻瘟病菌 *Magnaporthe oryzae* 菌株进行PCR扩增检测, 并测定其对仅含 *Piz-t*、*Pib* 和 *Pii* 基因的水稻抗性单基因系 IRBLzt-T、IRBLb-B 和 IRBLi-F5 品种的致病性, 明确这3个无毒基因在云南省水稻产区组成及分布。结果表明, 在348株稻瘟病菌菌株中, 分别有51.7%、46.8% 和 15.8% 的菌株含有无毒基因 *AvrPiz-t*、*AvrPib* 和 *AvrPii*, GT8、GT2、GT5、GT6、GT1、GT3、GT4 和 GT7 基因型菌株检测频率分别为 24.7%、21.8%、21.0%、16.7%、4.9%、4.0%、3.4% 和 3.4%; 分别有 4.9%、29.2%、41.1% 和 24.7% 的菌株含有 3、2、1 和 0 个无毒基因; 云南省稻瘟病菌群体总多样性指数水平较高, 为 2.81, 其中滇中水稻产区的最高, 为 2.97; 在348株稻瘟病菌菌株中, 分别有 89.1%、63.2% 和 38.5% 的菌株对单基因系 IRBLzt-T、IRBLb-B 和 IRBLi-F5 表现为不致病, 表明对 *Piz-t* 基因和 *Pib* 基因的抗性利用价值较 *Pii* 基因高; PT1、PT2、PT3、PT4、PT5、PT6、PT7 和 PT8 致病型菌株检测频率分别为 23.0%、30.2%、8.9%、2.0%、21.8%、5.2%、4.6% 和 4.3%, 其中 PT2、PT1 和 PT5 为云南省稻瘟病菌的主要致病型。表明云南省6个水稻产区稻瘟病菌3个无毒基因的分布及组成差异较大, 群体多样性水平较高。

关键词: 稻瘟病菌; 无毒基因; 基因型; 致病型

Three avirulence genes composition and pathotype structure among *Magnaporthe oryzae* isolates from six rice growing areas of Yunnan Province

Wang Qun Bi Yunqing Kong Chuisi Jin Guimei Yang Mingying Li Jinbin*

(Agricultural Environment and Resources Research Institute, Yunnan Academy of Agricultural Sciences, Kunming 650205, Yunnan Province, China)

Abstract: In order to clarify the resistance effectiveness of the three *R* genes (*Piz-t*, *Pib* and *Pii*), *AvrPiz-t*, *AvrPib* and *AvrPii* were detected by PCR amplification using specific markers from 348 *Magnaporthe oryzae* isolates collected from six rice production areas of Yunnan Province. The pathogenicity of these isolates was determined by inoculation on monogenic lines IRBLzt-T, IRBLb-B and IRBLi-F5, which holds *R* gene *Piz-t*, *Pib* and *Pii*, respectively. PCR amplification results showed that the percentages of isolates with *Avrpiz-t*, *Avrpib* and *AvrPii* genes were 51.7%, 46.8% and 15.8% respectively among the 348 tested isolates; the percentages of isolates with genotypes GT8, GT2, GT5, GT6, GT1, GT3, GT4 and GT7 were 24.7%, 21.8%, 21.0%, 16.7%, 4.9%, 4.0%, 3.4% and 3.4% respectively; and the percentages of isolates holding 3, 2, 1 and 0 avirulence genes were 4.9%, 29.2%, 41.1% and 24.7%,

基金项目: 云南省重点项目(2017FA013), 国家自然科学基金(31460454), 云南省人才培养项目(2015HB076), 云南省科技人才与平台计划(202005AE160003), 云南省重点研发计划(2019IB007)

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

收稿日期: 2020-06-05

respectively. The overall genotype diversity level was high (2.81) for all isolates from Yunnan Province, and the highest diversity (2.97) was detected in central Yunnan among the six regions. Pathogenicity test showed that 89.1%, 63.2% and 38.5% of the isolates were avirulent to IRBLzt-T, IRBLb-B and IR-BLi-F5, respectively. It indicated that the resistance utilization values of *Piz-t* and *Pib* were higher than that of *Pii*; the eight pathotypes PT1, PT2, PT3, PT4, PT5, PT6, PT7 and PT8 accounted for 23.0%, 30.2%, 8.9%, 2.0%, 21.8%, 5.2%, 4.6% and 4.3% of all the 348 isolates, respectively. PT2, PT1 and PT5 were the main pathotypes of rice blast in Yunnan.

Key words: *Magnaporthe oryzae*; avirulence genes; genotypes; pathotypes

稻瘟病是世界水稻产区最具毁灭性的病害之一,由稻瘟病菌 *Magnaporthe oryzae* 引起。主效和微效抗性基因的利用是控制稻瘟病最经济、生态友好的措施。水稻抗性(resistance, *R*)基因和稻瘟病菌无毒(avirulence, *Avr*)基因互作符合Flor的基因对基因学说,即当2个基因同时存在才能相互作用引发水稻的抗性反应,反之缺少两者中任何一个基因,水稻都感病,即无毒基因与相应的主效抗性基因相互识别能够激发植物的抗性反应(Dai et al., 2010)。而病原菌为了生存通过突变或缺失或插入等无毒基因的变异方式逃避抗性基因的识别,从而达到侵染植物的目的(McDonald & Linde, 2002; Singh et al., 2011)。稻瘟病菌的高度、快速变异使水稻抗性品种在种植3~5年后就丧失抗性。因此,掌握水稻产区稻瘟病菌无毒基因的分布、变异及致病性情况对于抗性育种及其抗性基因的合理布局具有重要意义。

到目前为止,已有35个稻瘟病 *R* 基因和12个稻瘟病菌 *Avr* 基因被克隆(Wang et al., 2017),且 *Piz-t*、*Pib* 和 *Pii* 等稻瘟病抗性基因已被广泛用于稻瘟病抗性育种中,如Yokoo(2005)利用Toride 1号作为 *Piz-t* 基因的供体亲本培育成了3个云南优良品种;凌忠专等(1986)采用花药培养法由Toride 2和京西17杂交组合培育成东北地区主要粳稻品种京华9号(含 *Piz-t* 基因)。*Pib* 基因主要来自国际水稻所的籼稻品种IR系列和来自日本的粳稻品种BL1,其中IR系列被广泛应用于我国南方地区的籼稻育种中,BL1主要应用于东北地区的粳稻育种中。20世纪90年代日本和中国联合利用印尼和马来西亚品种为供体和日本品种杂交育成持有 *Pib* 基因的BL1~BL7七个系列品种(Yokoo, 2005)。部分水稻品种已被鉴定持有 *Piz-t*、*Pib* 和 *Pii* 三个抗性基因,如云南省8个地方品种和8个粳稻品种被鉴定持有 *Piz-t* 基因(朱有勇, 1988; 蒋志农, 1995); 华南328个籼型杂交稻品种中3.35%的品种被鉴定持有 *Piz-t* 基因(汪文娟等, 2017); 我国56个水稻主栽品种中有9个籼稻品种和

2个粳稻品种持有 *Pib* 基因(时克等, 2009); 黑龙江省推广面积达6 667 hm²以上的36个主栽品种中有4个品种持有 *Pib* 基因(刘华招等, 2011); *Pii* 基因在南方稻区有一定的利用价值,在北方稻区有一定的局限性; 江苏省连云港市195份高抗水稻品种中有28个品种持有 *Pii* 基因,且在田间具有较高的抗性(刘辉等, 2015); 华南328份籼型杂交稻品种中67.78%的品种持有 *Pii* 基因(汪文娟等, 2017)。关于稻瘟病菌中无毒基因 *AvrPiz-t*、*AvrPib* 和 *Avr-Pii* 的检测及致病性也有报道,其中大部分省份稻瘟病菌菌株对 *Piz-t* 基因的致病频率较低,如195株江西省稻瘟病菌菌株对 *Piz-t* 基因的致病频率为17.95%(兰波等, 2010),467株云南省稻瘟病菌菌株对 *Piz-t* 基因的致病频率为14.80%(Li et al., 2011); *AvrPiz-t* 基因在江西、云南、黑龙江及辽宁省的检测频率也较高,如335株黑龙江省稻瘟病菌菌株中 *AvrPiz-t* 基因的检测频率为85.67%(孟峰等, 2019),26株辽宁省稻瘟病菌菌株中 *AvrPiz-t* 基因的检测频率达84.60%(王世维等, 2014); 467株云南省稻瘟病菌菌株对 *Pib* 基因的致病频率为34.00%(Li et al., 2011),195株江西省稻瘟病菌菌株对 *Pib* 基因的致病频率为98.45%(兰波等, 2010),335株黑龙江省稻瘟病菌菌株中 *AvrPib* 基因的检测频率为75.52%(孟峰等, 2019); 福建省、云南省稻瘟病菌菌株对 *Pii* 基因的致病频率分别为53.31%和59.7%(Li et al., 2011; 阮宏椿等, 2017),而黑龙江省哈尔滨市稻瘟病菌对 *Pii* 基因的致病频率高达80.00%以上(马军韬等, 2015)。综上所述, *Piz-t*、*Pib* 和 *Pii* 这3个基因在水稻稻瘟病防控中仍然有一定的利用价值,尤其是 *Piz-t* 基因具有较高的利用价值,但抗性基因的利用依赖于田间病原菌群体中无毒基因的组成、分布及功能。

为了合理布局,高效利用 *Piz-t*、*Pib* 和 *Pii* 这3个稻瘟病抗性基因,本研究利用稻瘟病菌相应无毒基因 *AvrPiz-t*、*AvrPib* 和 *Avr-Pii* 特异性标记对云南省6个水稻产区稻瘟病菌菌株进行PCR检测,分析稻瘟病

菌群体中这3个无毒基因的分布、组成类型及其多样性;利用分别持有水稻抗性基因 *Piz-t*、*Pib* 和 *Pii* 水稻单基因系对云南省6个水稻产区的稻瘟病菌菌株进行了致病性测定,分析稻瘟病菌的致病型及其相应抗性基因的利用价值,以为云南省水稻抗性育种及水稻品种合理布局提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

供试菌株和水稻品种:于2010—2014年自云南省滇中、滇东北、滇西北、滇东南、滇西南和滇西6个水稻产区水稻上采集具有典型稻瘟病症状的病叶,经分离共获得348株稻瘟病菌单孢菌株,于-20℃保存,依据菌株的寄主水稻的籼粳分型将菌株划分为籼稻菌或粳稻菌;含抗性 *Piz-t*、*Pib* 和 *Pii* 基因的水稻单基因系 IRBLzt-T、IRBLb-B 和 IRBLi-F5 水稻品种及感病对照品种丽江新团黑谷,均为云南省农业科学院农业环境资源研究所粮食作物病害研究室保存。

培养基:燕麦琼脂培养基成分为燕麦片30 g、琼脂15 g、葡萄糖10 g、蒸馏水1 L,121℃湿热高压灭菌25 min;LB(Luria-Bertani)液体培养基成分为葡萄糖10 g、酵母粉3 g、蒸馏水1 L,121℃湿热高压灭菌25 min。

试剂及仪器:PCR Master Mix 试剂、DNA Marker D2000,天根生化科技(北京)有限公司;其他试剂均为国产分析纯。100型保湿箱,青州市迪生自动化设备有限公司;C1000 PCR 仪、PowerPac™ Basic 电泳仪和 ChemiDoc™ XRS+凝胶成像系统,美国 Bio-Rad 公司;DYCP-31DN 电泳槽,北京六一仪器厂;MGC-400B 光照培养箱,上海一恒科学仪器有限公司。

1.2 方法

1.2.1 云南省稻瘟病菌菌株无毒基因PCR检测

将供试的348株稻瘟病菌单孢菌株分别接种到燕麦琼脂培养基上,于25℃活化培养7 d后,将菌丝块接种到LB液体培养基中,于25℃全黑暗下培养6~8 d,收集菌丝,采用CTAB法(Tai & Tanksley, 1990)提取稻瘟病菌菌丝全基因组DNA,并于-20℃保存。分别利用无毒基因 *AvrPiz-t* 特异性标记引物 AvztF(5'-CCAACGTAGAGCGTATGC-3')/AvztR(5'-TCCGTTGAAGCAACAGGATC-3')(Li et al., 2009)、*Avr-Pib* 特异性标记引物 AvrPibF1(5'-GGA-CAAGGGAGGCAAATCTAAC-3')/AvrPibR1(5'-A-

TGCCGACAATGCGAGGTAT-3')(Zhang et al., 2015)、*Avr-Pii* 特异性标记引物 F1(5'-AAATCCCCTTTTATTTCCTTCCA-3')/R1(5'-CCATAACCGCA-TTTGGAGCATT-3')(Yoshida et al., 2009)对稻瘟病菌 *AvrPiz-t*、*AvrPib* 和 *Avr-Pii* 位点进行PCR扩增,引物均由英潍捷基(上海)贸易有限公司合成。20 μL PCR反应体系:PCR Master Mix 10 μL、10 μmol/L 上下引物各0.4 μL、基因组DNA 0.8 μL,加入 ddH₂O 8.4 μL。PCR反应程序:95℃预变性3 min;95℃变性30 s,55℃/60℃(*AvrPiz-t* 和 *AvrPib* 特异性标记引物退火温度为55℃,*Avr-Pii* 特异性标记引物退火温度为60℃)退火30 s,72℃延伸30 s,30个循环;72℃再延伸7 min,于4℃保存。用1.5%琼脂糖胶对扩增引物进行电泳检测,并用凝胶成像系统进行拍照,阳性产物和阴性产物分别为菌株含有无毒基因和不含有无毒基因的菌株,计算无毒基因的检测频率。

1.2.2 云南省稻瘟病菌菌株基因型划分

根据3个无毒基因 *AvrPiz-t*、*AvrPib* 和 *Avr-Pii* 的PCR扩增结果将其划分为8种基因型菌株,即GT1~GT8(表1)。计算各水稻产区基因型组成多样性指数,即Shannon-Wiener多样性指数(马克平和刘玉明,1994),Shannon-Wiener多样性指数 $=-\sum_{i=1}^S P_i \ln P_i$,式中 P_i 为第 i 种基因型的比例, $P_i = N_i/N$, N_i 为第 i 种基因型的个体数, N 为全部基因型的个体总数, S 为基因型数量。

1.2.3 云南省稻瘟病菌菌株致病性测定

将供试348株稻瘟病菌单孢菌株分别接种到燕麦琼脂培养基上,于25℃下全黑暗培养,待菌丝长满培养基表面时,用灭菌水洗去气生菌丝,置于日光灯下约40 h促其产孢,用灭菌蒸馏水洗下孢子,制成浓度为 $3 \times 10^5 \sim 5 \times 10^5$ 个/mL 的孢子悬浮液,加入0.02% Tween-20 后备用。

将含有抗性基因 *Piz-t*、*Pib* 和 *Pii* 的水稻单基因系 IRBLzt-T、IRBLb-B 和 IRBLi-F5 水稻品种和水稻感病对照品种丽江新团黑谷种子催芽后于15 cm×9.5 cm×5.3 cm 塑料育苗盒内播种,每个品种均播种1行,每行播种5粒,将育苗盒置于云南省农业科学院农业环境资源研究所的长度12 m、宽度30 m 日光温室内育苗。待水稻苗长至3~4叶时,采取喷雾接种法将浓度为 $3 \times 10^5 \sim 5 \times 10^5$ 个/mL 的稻瘟病菌孢子悬浮液均匀接种到水稻叶片上,每盒接种20 mL 孢子悬浮液。接种后先将育苗盒置于温度24~26℃、相对湿度100%的保湿箱内黑暗培养18~20 h,再移

回温室内培养, 7~10 d后调查水稻稻瘟病的发病情况, 感病对照品种发病充分, 表明接种有效。根据发病情况进行分级, 分级标准如下: 0级, 无病斑; 1级, 只有针尖大小的褐色斑点; 2级, 产生直径1~2 mm的梭形或不规则形病斑; 3级, 产生直径3~7 mm大小的灰色病斑, 病斑有褐色边缘; 4级, 产生较多无褐色边缘的大型病斑; 5级, 产生许多大型的病斑且

病斑相互融合。感病对照品种发病充分后, 病情达4级及以上, 此次接种有效。参照李成云等(1997)方法, 将发病级别为0~2级的稻瘟病菌菌株视为不致病型菌株, 将发病级别为3~5级的稻瘟病菌菌株视为致病型菌株, 分别计算致病型菌株和不致病型菌株检测频率。

表1 基于PCR扩增结果的基因型划分

Table 1 Defined genotypes based on PCR amplification

无毒基因 Avirulent gene	GT1	GT2	GT3	GT4	GT5	GT6	GT7	GT8
<i>AvrPiz-t</i>	+	+	+	-	+	-	-	-
<i>AvrPib</i>	+	+	-	+	-	+	-	-
<i>Avr-Pii</i>	+	-	+	+	-	-	+	-

+, -: 菌株含有和不含有无毒基因。+, -: Strains with and without avirulent gene.

1.2.4 云南省稻瘟病菌菌株致病型划分

根据稻瘟病菌菌株对含抗性基因 *Piz-t*、*Pib* 和

Pii 单基因系的致病性测定结果, 将供试菌株划分为8种致病型菌株, 即PT1~PT8(表2)。

表2 基于致病性反应的致病型划分

Table 2 Defined pathotypes based on disease reaction

抗性基因 Resistance gene	PT1	PT2	PT3	PT4	PT5	PT6	PT7	PT8
<i>Piz-t</i>	R	R	R	S	R	S	S	S
<i>Pib</i>	R	R	S	R	S	R	S	S
<i>Pii</i>	R	S	R	R	S	S	R	S

R, S: 抗病反应和感病反应。R, S: Resistance or susceptible reaction.

2 结果与分析

2.1 云南省稻瘟病菌的PCR检测结果

经无毒基因 *AvrPiz-t*、*AvrPib* 和 *Avr-Pii* 特异性引

物检测后, 分别有180、163和55株菌株含有无毒基因 *AvrPiz-t*、*AvrPib* 和 *Avr-Pii*, 检测频率分别为51.7%、46.8%和15.8%(表3)。

表3 云南省6个水稻产区稻瘟病菌3个无毒基因的PCR检测结果及多样性指数

Table 3 PCR detection results of three avirulence genes and diversity index among *Magnaporthe oryzae* isolates from six rice production regions in Yunnan Province

水稻产区 Rice production region	菌株数 No. of isolates	<i>AvrPiz-t</i>		<i>AvrPib</i>		<i>Avr-Pii</i>		Shannon-Wiener 多样性指数 Shannon-Wiener diversity index
		菌株数 No. of strains	检测频率 Test frequency/%	菌株数 No. of strains	检测频率 Test frequency/%	菌株数 No. of strains	检测频率 Test frequency/%	
滇中 Central, Yunnan	54	30	55.6	25	46.3	19	35.2	2.97
滇东北 Northeastern, Yunnan	72	55	76.4	26	36.1	7	9.7	2.47
滇西北 Northwestern, Yunnan	15	6	40.0	11	73.3	2	13.3	2.41
滇东南 Southeastern, Yunnan	33	16	48.5	18	54.5	5	15.2	2.77
滇西南 Southwestern, Yunnan	28	17	60.7	19	67.9	4	14.3	2.55
滇西 Western, Yunnan	146	56	38.4	64	43.8	18	12.3	2.68
合计 Total	348	180	51.7	163	46.8	55	15.8	2.81

在滇东北、滇西南、滇中、滇东南、滇西北和滇西, *AvrPiz-t* 基因检测频率分别为 76.4%、60.7%、55.6%、48.5%、40.0% 和 38.4%; *AvrPib* 基因检测频率分别为 36.1%、67.9%、46.3%、54.5%、73.3% 和 43.8%; *Avr-Pii* 基因检测频率分别为 9.7%、14.3%、35.2%、15.2%、13.3% 和 12.3%。3 个无毒基因在云南省不同水稻产区稻瘟病菌群体中的分布差异较大, 其中 *AvrPiz-t* 基因在滇东南、滇西和滇西北检测频率低于 50.0%, 其余地区均大于 50.0%, 在滇东北检出频率最高, 为 76.4%; *AvrPib* 基因在滇东北、滇中和滇西检测频率低于 50.0%, 其余地区均大于 50.0%, 在滇西北检出频率最高, 达 73.3%; *Avr-Pii* 基因在滇中检出频率略高于 35.0% 外, 其余 5 个水稻产区的检出频率均较低, 小于 16.0% (表 3)。因此,

可以初步判断云南省对 *Piz-t*、*Pib* 基因的利用价值高于对 *Pii* 基因的利用价值; *Pii* 基因仅在滇中有一定的利用价值, 在其余 5 个水稻产区已基本丧失抗性。

2.2 云南省稻瘟病菌的基因型及多样性指数

在 348 株菌株中共检测到 8 种不同基因型 (表 4)。其中 GT8 检测频率最高, 为 24.7%; 其余依次为 GT2、GT5、GT6、GT1、GT3、GT4 和 GT7, 检测频率依次 21.8%、21.0%、16.7%、4.9%、4.0%、3.4% 和 3.4%; 在 348 株菌株中, 含有 1 个无毒基因的菌株数最多, 为 143 株, 检测频率为 41.1%; 含有 2 个无毒基因的菌株数为 102 株, 检测频率为 29.2%; 持有 3 个无毒基因的菌株数为 17 株, 检测频率为 4.9%; 3 个无毒基因均不持有的菌株数为 86 株, 检测频率为 24.7%。

表 4 云南省 6 个水稻产区稻瘟病菌菌株的基因型及分布

Table 4 Frequencies of the three avirulence-gene genotypes among *Magnaporthe oryzae* isolates from six rice production regions in Yunnan Province

基因型 Geno- type	菌株数 No. of strains	检测 频率 Test frequen- cy/%	含无毒 基因数 No. of aviru- lence genes	滇中 Central, Yunnan		滇东北 Northeastern, Yunnan		滇西北 Northwestern, Yunnan		滇东南 Southeastern, Yunnan		滇西南 Southwestern, Yunnan		滇西 Western, Yunnan	
				菌株数 No. of strains	检测 频率 Test frequen- cy/%	菌株数 No. of strains	检测 频率 Test frequen- cy/%	菌株数 No. of strains	检测 频率 Test frequen- cy/%	菌株数 No. of strains	检测 频率 Test frequen- cy/%	菌株数 No. of strains	检测 频率 Test frequen- cy/%	菌株数 No. of strains	检测 频率 Test frequen- cy/%
GT1	17	4.9	3	7	13.0	2	2.8	1	6.7	1	3.0	3	10.7	3	2.1
GT2	76	21.8	2	10	18.5	14	19.4	2	13.3	9	27.3	11	39.3	30	20.5
GT3	14	4.0	2	6	11.1	3	4.2	1	6.7	2	6.1	1	3.6	1	0.7
GT4	12	3.4	2	3	5.6	2	2.8	0	0.0	1	3.0	0	0.0	6	4.1
小计 Total	102	29.2		19	35.2	19	26.4	3	20.0	12	36.4	12	42.9	37	25.3
GT5	73	21.0	1	7	13.0	36	50.0	2	13.3	4	12.1	2	7.1	22	15.1
GT6	58	16.7	1	5	9.3	8	11.1	8	53.3	7	21.2	5	17.9	25	17.1
GT7	12	3.4	1	3	5.6	0	0.0	0	0.0	1	3.0	0	0.0	8	5.5
小计 Total	143	41.1		15	27.9	44	61.1	10	66.6	12	36.3	7	25.0	55	37.7
GT8	86	24.7	0	13	24.1	7	9.7	1	6.7	8	24.2	6	21.4	51	34.9
合计 Total	348	100.0		54	100.0	72	100.0	15	100.0	33	100.0	28	100.0	146	100.0

不同水稻产区稻瘟病菌群体中所包含的基因型比例差异较大。在滇中、滇东北、滇西北、滇东南、滇西南和滇西稻瘟病菌群体中, GT1 基因型菌株检测频率分别为 13.0%、2.8%、6.7%、3.0%、10.7% 和 2.1%, 持有 2 个无毒基因的基因型菌株检测频率分别为 35.2%、26.4%、20.0%、36.4%、42.9% 和 25.3%; 持有 1 个无毒基因的基因型菌株检测频率分别为 27.9%、61.1%、66.6%、36.3%、25.0% 和 37.7% (表 4)。

云南省 6 个水稻产区稻瘟病菌群体的 Shannon-Wiener 多样性指数水平较高且不同水稻产区稻瘟病菌群体的 Shannon-Wiener 多样性指数水平存在一定差异, 其中滇中最高, 为 2.97, 其次依次为滇东南、滇西、滇西南、滇东北、滇西北 (表 3)。

2.3 云南省稻瘟病菌菌株的致病性

在 348 株菌株中, 对分别含有 *Piz-t*、*Pib* 和 *Pii* 基因的水稻单基因系 IRBLzt-T、IRBLb-B 和 IRBLi-F5

表现为不致病的菌株数分别为310、220和134株,检测频率分别为89.1%、63.2%和38.5%。滇中、滇东北、滇西北、滇东南、滇西南和滇西6个水稻产区稻瘟病菌群体对IRBLzt-T不致病菌株检测频率依次为90.7%、84.7%、93.3%、84.8%、50.0%和86.3%;对IRBLb-B不致病菌株检测频率依次为74.1%、66.7%、100.0%、54.5%、53.6%和50.7%;对IRBLi-F5不致病菌株检测频率依次为53.7%、30.6%、53.3%、18.2%、64.3%和34.9%,表明在3个抗性基因中,*Piz-*

*t*基因对稻瘟病菌的抗性利用价值最高,其次是*Pib*基因,*Pii*基因的抗性利用价值最低。*Piz-t*基因在6个水稻产区中均有利用价值,其中滇西南地区抗性利用价值低于其他5个水稻产区,且粳稻区高于籼稻区;*Pib*基因在6个水稻产区中均有利用价值,其中滇西北地区抗性利用价值最高,且粳稻区略高于籼稻区;*Pii*基因除在滇中、滇西北和滇西南有一定的利用价值外,在其他3个水稻产区检测频率均低于50.0%,要谨慎使用(表5)。

表5 云南省6个水稻产区稻瘟病菌菌株对3个抗性基因的致病性

Table 5 Pathogenicity on three monogenic rice lines of *Magnaporthe oryzae* isolates from six rice production regions of Yunnan Province

水稻产区 Rice production region	总菌株数 Total isolate	水稻单基因系IRBLzt-T (含 <i>Piz-t</i> 基因)		水稻单基因系IRBLb-B (含 <i>Pib</i> 基因)		水稻单基因系IRBLi-F5 (含 <i>Pii</i> 基因)	
		Rice monogenic line IRBLzt-T (holding <i>Piz-t</i> gene)		Rice monogenic line IRBLb-B (holding <i>Pib</i> gene)		Rice monogenic line IRBLi-F5 (holding <i>Pii</i> gene)	
		不致病菌株数 No. of avirulence isolates	检测频率 Test frequency/%	不致病菌株数 No. of avirulence isolates	检测频率 Test frequency/%	不致病菌株数 No. of avirulence isolates	检测频率 Test frequency/%
滇中 Central, Yunnan	54	49	90.7	40	74.1	29	53.7
滇东北 Northeastern, Yunnan	72	61	84.7	48	66.7	22	30.6
滇西北 Northwestern, Yunnan	15	14	93.3	15	100.0	8	53.3
滇东南 Southeastern, Yunnan	33	28	84.8	18	54.5	6	18.2
滇西南 Southwestern, Yunnan	28	14	50.0	15	53.6	18	64.3
滇西 Western, Yunnan	146	126	86.3	74	50.7	51	34.9
籼稻区 Indica rice region	149	109	73.2	69	46.3	63	42.3
粳稻区 Japonica rice region	199	183	92.0	141	70.9	71	35.7

2.4 云南省稻瘟病菌菌株的致病型

6个水稻产区稻瘟病菌菌株致病型存在较大差异。在348株菌株中,PT1、PT2、PT3、PT4、PT5、PT6、PT7、PT8致病型菌株数分别为80、105、31、7、76、18、16和15株,检测频率分别为23.0%、30.2%、8.9%、2.0%、21.8%、5.2%、4.6%和4.3%,其中PT2、PT1和PT5致病型菌株检测频率较高,超过20.0%,为云南省稻瘟病菌菌株的主要致病型。在滇西南和滇西水稻产区中,8种致病型菌株均有分布;在滇东北水稻产区,除PT8外其他7种致病型菌株均有分布;在滇东南水稻产区,除PT5和PT7外其他6种致病型菌株均有分布;在滇中水稻产区,除PT6和PT7外其他6种致病型菌株均有分布;在滇西北水稻产区,仅分布PT1、PT2和PT6这3种致病型菌株(表6)。

3 讨论

云南省是亚洲栽培稻的起源中心之一,分布有普通野生稻、药用野生稻和疣粒野生稻3个野生稻种,稻种资源极其丰富。云南省农业科学院收集保存了5 000多份稻种资源,经稻瘟病抗性鉴定发现抗病的多属陆稻和籼稻,大多分布于云南省西南部西双版纳傣族自治州和思茅市,且抗病品种数量和抗性程度有由南部和西南部向北部和西北部逐渐减弱的趋势,1986—1990年蒋志农(1995)对4 561份地方品种进行抗性鉴定,得出相似的结论。本研究发现云南省6个水稻产区稻瘟病菌群体中*AvrPiz-t*、*AvrPib*和*Avr-Pii*三个无毒基因的检出频率及无毒菌株频率分布差异均较大,说明云南省各水稻产区

稻瘟病菌群体多样性较丰富,6个水稻产区稻瘟病菌无毒基因型组成也存在差异,且 Shannon-Weiner 多样性指数分析也显示云南省稻瘟病菌无毒基因组成多样性丰富,这与云南省稻种资源蕴含丰富的抗性基因有关。6个水稻产区中,滇中 Shannon-Wiener 多样性指数最高,其次依次为滇东南、滇西、滇西南、滇东北、滇西北,无毒基因组成的多样性趋势基本符合由南向北减弱的趋势,与蒋志农(1995)对云南省 5 000 多份稻种资源稻瘟病抗性鉴定结果类似,表明

丰富的稻种资源已对云南省稻瘟病菌无毒基因的多样性产生了一定的影响,这也是水稻与稻瘟病菌长期互动与协同进化的一个间接表现。滇中 Shannon-Wiener 多样性指数最高,究其原因可能是该地区处于籼粳交界区,小生境气候均有分布,且该地区农业经济较发达,持有不同抗性基因的水稻品种均种植较多,从而使该地区稻瘟病菌群体受到的选择压力也较其他地区强,因此形成较丰富多样的无毒基因型。

表6 云南省6个水稻产区稻瘟病菌菌株的致病型及分布

Table 6 Distribution and pathotype of *Magnaporthe oryzae* isolates on three monogenic lines in six rice production regions of Yunnan Province

致病型 Pathotype	菌株数 No. of the iso- lates	检测 频率 Test frequen- cy/%	滇中 Central, Yunnan		滇东北 Northeastern, Yunnan		滇西北 Northwestern, Yunnan		滇东南 Southeastern, Yunnan		滇西南 Southwestern, Yunnan		滇西 Western, Yunnan	
			菌株数 No. of the iso- lates	检测 频率 Test frequen- cy/%										
PT1	80	23.0	23	42.6	14	19.4	8	53.3	5	15.2	9	32.1	21	14.4
PT2	105	30.2	15	27.8	24	33.3	6	40.0	11	33.3	3	10.7	46	31.5
PT3	31	8.9	4	7.4	6	8.3	0	0.0	1	3.0	1	3.6	19	13.0
PT4	7	2.0	7	13.0	17	23.6	0	0.0	11	33.3	1	3.6	40	27.4
PT5	76	21.8	2	3.7	1	1.4	0	0.0	0	0.0	1	3.6	3	2.1
PT6	18	5.2	0	0.0	9	12.5	1	6.7	2	6.1	2	7.1	4	2.7
PT7	16	4.6	0	0.0	1	1.4	0	0.0	0	0.0	7	25.0	8	5.5
PT8	15	4.3	3	5.6	0	0.0	0	0.0	3	9.1	4	14.3	5	3.4
合计 Total	348	100.0	54	100.0	72	100.0	15	100.0	33	100.0	28	100.0	146	100.0

根据基因对基因学说,稻瘟病菌群体中无毒基因的类型决定了相应抗性基因的有效性。本研究显示 *Piz-t* 和 *Pib* 基因在云南省的利用价值高于 *Pii* 基因, *Pii* 基因除在滇中有一定的抗性价值外,在其余地区抗性已丧失,其相应无毒基因 *Avr-Pii* 在稻瘟病菌菌株群体中的检测频率低于 20%。61.5% 的菌株对水稻抗性基因 *Pii* 致病,暗示 *Avr-Pii* 基因受到的选择压力较强,并逃避了水稻抗性基因 *Pii* 的识别,这可能与长期种植含 *Pii* 基因的水稻品种有关。在二者互作中,稻瘟病菌对水稻品种逐步适应,并形成大量能侵染含有 *Pii* 抗性基因水稻品种的菌株,这与马军韬等(2015; 2017a, b)对黑龙江省稻瘟病菌群体、杜宜新等(2016)对福建省稻瘟病菌群体、兰波等(2014)对江西省稻瘟病菌群体的研究结果相似,说明在不同水稻产区 *Avr-Pii* 适应性变异普遍发生,生产中应谨慎利用持有 *Pii* 基因的水稻品种。

根据稻瘟病菌无毒基因类型及分布可对各水稻产区水稻品种进行科学的种植和育种,从而达到绿色、经济、友好防控稻瘟病。在滇中 3 种抗性基因均有一定的利用价值,因此可以交替轮换使用或按适当比例种植各水稻品种;在滇东可以种植以持有 *Piz-t* 基因为主的水稻品种,并适当搭配一定比例含 *Pib* 基因或其他抗性基因的水稻品种;在滇西北可以种植以 *Pib* 基因为主的水稻品种,适当搭配一定比例含 *Piz-t* 基因或其他抗性基因的水稻品种;在滇西南可以交替轮换种植含 *Piz-t* 基因和 *Pib* 基因的水稻品种;在滇东南及滇西 *Piz-t* 基因及 *Pib* 基因利用价值相当,可搭配种植一些含其他抗性基因的水稻品种。除了结合水稻品种布局,水稻育种还要根据田间稻瘟病菌群体动态变异而变化。

本研究仅分析了 12 个已克隆稻瘟病菌无毒基因中的 3 个,其他无毒基因在云南省各水稻产区稻

瘟病菌群体中的组成多样性及其致病型结构还有待进一步深入研究。同时,稻瘟病菌 *AvrPiz-t*、*AvrPib* 和 *Avr-Pii* 的时空表达模式等还需进一步深入研究。

参 考 文 献 (References)

- Dai YT, Jia YL, Correll J, Wang XY, Wang YL. 2010. Diversification and evolution of the avirulence gene *AVR-Pita1* in field isolates of *Magnaporthe oryzae*. *Fungal Genetics and Biology*, 47(12): 973-980
- Du YX, Ruan HC, Shi NN, Gan L, Yang XJ, Chen FR. 2016. Pathogenicity analysis of *Magnaporthe grisea* against major *Pi*-genes and main rice varieties in Fujian Province. *Journal of Plant Protection*, 43(3): 442-451 (in Chinese) [杜宜新, 阮宏椿, 石姐姐, 甘林, 杨秀娟, 陈福如. 2016. 福建省稻瘟病菌对主要抗瘟基因及主栽品种的致病性分析. *植物保护学报*, 43(3): 442-451]
- Jiang ZN. 1995. Yunnan rice. Kunming: Yunnan Science and Technology Press, pp. 180-198 (in Chinese) [蒋志农. 1995. 云南稻作. 昆明: 云南科技出版社, pp.180-198]
- Lan B, Li XM, He LG. 2010. Analysis on avirulence genes of *Magnaporthe oryzae* Barr. in rice from Jiangxi Province. *Acta Agriculturae Universitatis Jiangxiensis*, 32(2): 271-275 (in Chinese) [兰波, 李湘民, 何烈干. 2010. 江西省稻瘟病菌的无毒基因分析. *江西农业大学学报*, 32(2): 271-275]
- Lan B, Yang YQ, Xu PD, Li XM, He LG. 2014. Analysis of the resistance of rice major *Pi*-genes to the *Magnaporthe oryzae* isolates in Jiangxi Province. *Journal of Plant Protection*, 41(2): 163-168 (in Chinese) [兰波, 杨迎青, 徐沛东, 李湘民, 何烈干. 2014. 水稻主要抗瘟基因品系对江西省稻瘟病菌分离株系的抗性分析. *植物保护学报*, 41(2): 163-168]
- Li CY, Luo CX, Hayashi N, Naito H. 1997. Segregation for pathogenicity of 3 crosses in rice blast fungus, *Magnaporthe grisea*. *Journal of Plant Protection*, 24(4): 293-296 (in Chinese) [李成云, 罗朝喜, 林长生, 内藤秀树. 1997. 稻瘟病菌三个杂交组合后代菌株的致病性分离. *植物保护学报*, 24(4): 293-296]
- Li JB, Yang J, Liu L, He HM, He XH, Zhu YY, Li CY. 2011. Geographic distribution of avirulence genes in rice blast fungus in Yunnan Province, China. *Journal of Resources and Ecology*, 2(2): 181-185
- 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
- Ling ZZ, Li MF, Zhang PC, Li ZJ, Wang JL, Zhang P. 1986. Introduction of *Piz-t* gene and its application effect. *Beijing Agricultural Sciences*, (1): 11-15 (in Chinese) [凌忠专, 李梅芳, 仇丕冲, 李志坚, 王久林, 张萍. 1986. *Piz-t* 基因的导入及其应用效果. *北京农业科学*, (1): 11-15]
- Liu H, Meng DL, Cha RY, Xu DY. 2015. Identification and evaluation on blast resistance of rice varieties in Jiangsu. *Fujian Journal of Agricultural Sciences*, 30(5): 452-458 (in Chinese) [刘辉, 孟德龙, 查日扬, 徐大勇. 2015. 江苏水稻品种稻瘟病主效抗性基因鉴定及应用评价. *福建农业学报*, 30(5): 452-458]
- Liu HZ, Liu Y, Liu HL, Xu ZJ, Chen WF. 2011. Distribution of two blast resistance genes *Pib* and *Pita* in major rice cultivars in Heilongjiang Province in China. *Journal of Northeast Agricultural University*, 42(4): 27-32 (in Chinese) [刘华招, 刘延, 刘化龙, 徐正进, 陈温福. 2011. 黑龙江省种植品种中稻瘟病抗性基因 *Pib* 和 *Pita* 的分布. *东北农业大学学报*, 42(4): 27-32]
- Ma JT, Zhang GM, Xin AH, Zhang LY, Deng LW, Wang YL. 2015. Resistance analysis of blast-resistance genes and resistance evaluation and utilization of rice varieties in Harbin. *Journal of Plant Protection*, 42(2): 160-168 (in Chinese) [马军韬, 张国民, 辛爱华, 张丽艳, 邓凌韦, 王永力. 2015. 哈尔滨地区抗瘟基因抗性分析及水稻品种抗性评价与利用. *植物保护学报*, 42(2): 160-168]
- Ma JT, Zhang GM, Zhang LY, Deng LW, Wang YL, Wang Y. 2017a. Pathogenicity of *Magnaporthe grisea* and optimization of differential system in some regions of Heilongjiang. *Journal of Plant Protection*, 44(1): 75-83 (in Chinese) [马军韬, 张国民, 张丽艳, 邓凌韦, 王永力, 王英. 2017a. 黑龙江省部分地区稻瘟病菌致病性分析及鉴别体系优化. *植物保护学报*, 44(1): 75-83]
- Ma JT, Zhang GM, Zhang LY, Deng LW, Wang YL, Wang Y. 2017b. 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. 2017b. 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]
- Ma KP, Liu YM. 1994. Measurement of biotic community diversity I: α diversity (Part 2). *Chinese Biodiversity*, (4): 231-239 (in Chinese) [马克平, 刘玉明. 1994. 生物群落多样性的测度方法 I: α 多样性的测度方法(下). *生物多样性*, (4): 231-239]
- McDonald BA, Linde C. 2002. Pathogen population genetics, evolutionary potential, and durable resistance. *Annual Review of Phytopathology*, 40: 349-379
- Meng F, Zhang YL, Jin XH, Zhang XY, Jiang J. 2019. Detection and analysis of *Magnaporthe oryzae* avirulence genes *AVR-pib*, *AVR-Pik* and *AvrPiz-t* in Heilongjiang Province. *Scientia Agricultura Sinica*, 52(23): 4262-4273 (in Chinese) [孟峰, 张亚玲, 靳学慧, 张晓玉, 姜军. 2019. 黑龙江省稻瘟病菌无毒基因 *AVR-Pib*、*AVR-Pik* 和 *AvrPiz-t* 的检测与分析. *中国农业科学*, 52(23): 4262-4273]
- Ruan HC, Shi NN, Du YX, Gan L, Yang XJ, Dai YL, Chen FR. 2017. Analysis on resistance of *Pi* gene to predominant races of *Magnaporthe oryzae* in Fujian Province, China. *Chinese Journal of Rice Science*, 31(1): 105-110 (in Chinese) [阮宏椿, 石姐姐, 杜宜新, 甘林, 杨秀娟, 代玉立, 陈福如. 2017. 水稻抗性基因 *Pi* 对福建省稻瘟病菌优势菌群的抗性分析. *中国水稻科学*, 31(1): 105-110]
- Shi K, Lei CL, Cheng ZJ, Xu XT, Wang JL, Wan JM. 2009. Distribu-

- tion of two blast resistance genes *Pita* and *Pib* in major rice cultivars in China. *Journal of Plant Genetic Resources*, 10(1): 21–26 (in Chinese) [时克, 雷财林, 程治军, 许兴涛, 王久林, 万建民]. 2009. 稻瘟病抗性基因 *Pita* 和 *Pib* 在我国水稻主栽品种中的分布. *植物遗传资源学报*, 10(1): 21–26]
- Singh RP, Hodson DP, Huerta-Espino J, Jin Y, Bhavani S, Njau P, Herrera-Foessel S, Singh PK, Singh S, Govindan V. 2011. The emergence of Ug99 races of the stem rust fungus is a threat to world wheat production. *Annual Review of Phytopathology*, 49: 465–481
- Tai TH, Tanksley SD. 1990. A rapid and inexpensive method for isolation of total DNA from dehydrated plant tissue. *Plant Molecular Biology Reporter*, 8(4): 297–303
- Wang BH, Ebbole DJ, Wang ZH. 2017. The arms race between *Magnaporthe oryzae* and rice: diversity and interaction of *Avr* and *R* genes. *Journal of Integrative Agriculture*, 16(12): 2746–2760
- Wang SW, Zheng WJ, Zhao JM, Wei SH, Wang Y, Zhao BH, Liu ZH. 2014. Identification and analysis of *Magnaporthe oryzae* avirulence genes in Liaoning Province. *Scientia Agricultura Sinica*, 47(3): 462–472 (in Chinese) [王世维, 郑文静, 赵家铭, 魏松红, 王妍, 赵宝海, 刘志恒]. 2014. 辽宁省稻瘟病菌无毒基因型鉴定及分析. *中国农业科学*, 47(3): 462–472]
- Wang WJ, Zhou JY, Wang CY, Su J, Feng JQ, Chen B, Feng AQ, Yang JY, Chen S, Zhu XY. 2017. Distribution of eight rice blast resistance genes in indica hybrid rice in China. *Chinese Journal of Rice Science*, 31(3): 299–306 (in Chinese) [汪文娟, 周继勇, 汪聪颖, 苏菁, 封金奇, 陈炳, 冯爱卿, 杨健源, 陈深, 朱小源]. 2017. 八个抗稻瘟病基因在华南籼型杂交水稻中的分布. *中国水稻科学*, 31(3): 299–306]
- Yokoo M. 2005. Introduction of *Piz-t* and *Pib* genes for blast disease resistance from indica varieties and their utilization for genetic researches in rice. *Japan Agricultural Research Quarterly*, 39(4): 239–245
- Yoshida K, Saitoh H, Fujisawa S, Kanzaki H, Matsumura H, Yoshida K, Tosa Y, Chuma I, Takano Y, Win J, et al. 2009. Association genetics reveals three novel avirulence genes from the rice blast fungal pathogen *Magnaporthe oryzae*. *The Plant Cell*, 21(5): 1573–1591
- 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
- Zhu YY. 1988. Studies on the resistant gene of rice to the blast. *Journal of Yunnan Agricultural University*, 3(1): 37–44 (in Chinese) [朱有勇]. 1988. 稻瘟病抗性基因研究. *云南农业大学学报*, 3(1): 37–44]

(责任编辑:张俊芳)