

江西省稻瘟病菌的无毒基因分析

兰波¹, 李湘民^{1*}, 何烈干^{1,2}

(1. 江西省农业科学院 植物保护研究所 有害生物控制重点实验室, 江西 南昌 330200; 2. 江西农业大学 农学院, 江西 南昌 330045)

摘要:以 30 个水稻抗稻瘟病近等基因系或单基因系为材料, 在水稻苗期接种, 测定来自江西省水稻产区 195 个稻瘟病菌单孢菌株的致病性。结果表明, 江西省稻瘟病菌群体含有 29 个与测试抗病基因相对应的无毒基因, 但未检测到无毒基因 *Avr-a(2)*, 其中 60.00% 菌株表现出强致病性。病菌群体对抗瘟基因 *Pi-z'*, *Pi-1(1)*, *Pi-z* 和 *Pi-k* 表现出较低的毒力频率, 表明这些抗瘟基因在江西省可作抗源单独或聚合使用。2006 - 2008 年江西省稻瘟病菌群体中分别出现了 24, 27, 29 个无毒基因, 其中有 24 个无毒基因在各年份均有分布, *Avr-a(1)*, *Avr-a(2)*, *Avr-i*, *Avr-ks(1)*, *Avr-ks(2)*, *Avr-ta*, *Avr-b*, *Avr-t*, *Avr-sh(2)*, *Avr-k^m*, *Avr-ta(C)*, *Avr-ta²*, *Avr-k^p(C)*, *Avr-b(C)*, *Avr-3(1)* 和 *Avr-5(t)* 等 16 个无毒基因的出现频率均低于 30%, 提示在江西省内与之相对应的抗瘟基因在抗稻瘟病育种中应慎用。江西省稻瘟病菌单孢菌株无毒基因组合数目为 0 ~ 18 个, 数字相对较小。

关键词: 稻瘟病菌; 毒力频率; 无毒基因; 江西省

中图分类号: S435.111.4⁺1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-2286(2010)02-0271-05

Analysis on Avirulence Genes of *Magnaporthe oryzae* Barr. in Rice from Jiangxi Province

LAN Bo¹, LI Xiang-min^{1*}, HE Lie-gan^{1,2}

(1. Institute of Plant Protection, Jiangxi Academy of Agricultural Sciences, Nanchang 330200, China; 2. College of Agronomy, JAU, Nanchang 330045, China)

Abstract: Pathogenicity of 195 *Magnaporthe oryzae* single spore isolates from Indica rice in Jiangxi during 2006 - 2008 was studied using 30 blast-resistant monogenic lines at the seedling stage. The results indicated that 29 avirulence genes, which corresponded to the resistance genes, were detected in Jiangxi isolates, while *Avr-a(2)* failed to be detected, and 60.00% isolates had stronger pathogenicity. The virulence frequency of the isolate group to resistance genes *Pi-z'*, *Pi-1(1)*, *Pi-z* and *Pi-k*, 23 was lower, which suggested that these resistance genes could be used as resistance resources in rice breeding in Jiangxi Province. 24, 27 and 29 avirulence genes were detected in the isolates collected in the period from 2006 - 2008 respectively. 24 avirulence genes were detected each year. Avirulence genes *Avr-a(1)*, *Avr-a(2)*, *Avr-i*, *Avr-ks(1)*, *Avr-ks(2)*, *Avr-ta*, *Avr-b*, *Avr-t*, *Avr-sh(2)*, *Avr-k^m*, *Avr-ta(C)*, *Avr-ta²*, *Avr-k^p(C)*, *Avr-b(C)*, *Avr-3(1)* and *Avr-5(t)* occurred at a frequency of below 30%, it revealed that resistance genes which corresponded to these avirulence genes might not be suitable to apply in breeding rice of resistance for controlling blast in Jiangxi Province. The number of avirulence gene combinations ranged 0 - 18, and the number is comparatively small.

收稿日期: 2009 - 11 - 27 修回日期: 2010 - 01 - 14

基金项目: 江西省自然科学基金项目 (2007GZ0755) 和江西省科技支撑重点项目 (2007 - 2009)

作者简介: 兰波 (1981 -), 男, 助理研究员, 硕士, 主要从事水稻真菌病害研究, E-mail: lanbo0611@yahoo.cn; * 通讯作者: 李湘民, 研究员, 博士, E-mail: xmli025@yahoo.com.cn

Key words: virulence frequency; *Magnaporthe oryzae*; avirulence; genes; Jiangxi Province

由真菌 *Magnaporthe oryzae* (无性代为 *Pyricularia oryzae*) 引起的稻瘟病是一种毁灭性的、严重影响水稻高产、稳产的重要病害。每年均有不同程度的发生, 流行年份, 重病地区一般减产 10% ~ 20%, 重的达 40% ~ 50%, 局部田块甚至颗粒无收^[1]。2004 - 2006 年江西省稻瘟病连续 3 年大发生, 发生面积分别为 53 万 hm^2 , 58 万 hm^2 和 43 万 hm^2 , 累计绝产面积超过 5 300 hm^2 。

对稻瘟病菌系统研究的证据表明, 水稻与稻瘟病菌之间的特异互作, 符合 Flor“基因对基因”假说^[2-3]。也就是说, 水稻有一抗病基因, 稻瘟菌中就会有相对应的无毒基因, 这种特异互作使水稻表现为抗病反应。无毒基因是基因对基因病害的病原菌中决定寄主植物品种特异抗性表达与否的基因, 其缺失、表达破坏或功能区域的变异将导致病原菌群体中产生新的毒性小种, 继而导致含有对应抗病基因的作物品种抗病性的丧失^[4-5]。在应用上, 对稻瘟病菌无毒基因的了解有助于指导抗病品种的选育、布局 and 轮用, 以有效地控制稻瘟病。

1 材料与方 法

1.1 材 料

供试的 195 个单孢菌株是 2006 - 2008 年从江西省各县、市的水稻产区采集并分离到的。供试品种为国际水稻研究所 (IRRI) 提供的 6 个 CO39 近等基因系, 即 C101LAC (Pi1), C101A51 (P/2), C104PKT (P/3), C101PKT (Pi4a), C105TTP - 4 - L23 (Pi4b) 和轮回亲本品种 CO39; 由 RR1 - 日本合作育成的 24 个水稻抗稻瘟病单基因系 (广东农科院朱小源教授转赠), 即 *IRBLa - A*, *IRBLa - C*, *IRBLi - F5*, *IRBLks - F5*, *IRBLks - S*, *IRBLk - Ka*, *IRBLk^p - K60*, *IRBLk^h - K3*, *IRBLz - Fu*, *IRBLz^s - CA*, *IRBLz^t - T*, *IRBLta - K1*, *IRBLta - CT2*, *IRBLb - B*, *IRBLt - K59*, *IRBLsh - S*, *IRBLsh - B*, *IRBL1 - CL*, *IRBL3 - CP4*, *IRBL5 - M*, *IRBL7 - M*, *IRBL9 - W*, *IRBL12 - M*, *IRBL19 - A*, 其携带的抗瘟基因和供体见表 1。

1.2 方 法

致病性测定参照陈福如等^[6]的方法。病情调查参照周江鸿等^[7]的方法。单个菌株对所有测试水稻品种的致病率^[8] = 感病的水稻品种数 / 所有测试的水稻品种数 $\times 100\%$; 菌株群体对单个水稻品种的毒力频率 = 对测试水稻品种有毒力的菌株数 / 所有菌株数 $\times 100\%$ 。

2 结果与分析

2.1 江西省稻瘟病菌对 30 个已知水稻抗瘟基因的致病性

从 195 个供试稻瘟病菌株对 30 个已知水稻抗瘟基因的致病性测定结果来看, 强致病力和较强致病力的菌株所占的比例较高, 按照致病率 (PF) 70% 为强致病力、50% \leq PF < 70% 为较强致病力, 20% \leq PF < 50% 为中等致病力、PF < 20% 为弱致病力的标准划分, 江西省稻瘟病群体中强致病力菌株 117 个、较强致病力菌株 61 个、中等致病力菌株 17 个, 分别占供试菌株总数的 60.00%、31.28% 和 8.72%, 没有测试到弱致病力菌株。这说明强致病性和较强致病性菌株在江西省稻瘟病菌群体中占优势, 即江西稻瘟病菌以广谱强致病性菌株为主。

2.2 江西省稻瘟病菌对 30 个水稻抗瘟基因的毒力频率

从表 1 可知, 195 个稻瘟病菌群体对 30 个水稻抗瘟基因均表现毒力, 毒力频率最高的抗性基因为 *Pi - a(2)*, 其频率为 100%, 最小的是 *Pi - z*, 其频率为 17.95%, 平均毒力频率为 69.20%。毒力频率超过 50% 的有 23 个抗性基因, 占总数的 76.7%。含 *Pi - a(2)*, *Pi - ks(1)*, *Pi - b*, *Pi - k^m*, *Pi - ta(C)*, *Pi - k^c(C)* 等基因的水稻品种其毒性频率都超过了 90%, 表明含这些抗瘟基因的水稻品种在江西省内已丧失了抗性。

毒力频率较低的抗瘟基因有 *Pi - z*, *Pi - 1(1)*, *Pi - z^s* 和 *Pi - k*, 其频率分别为 17.95%、26.67%、27.46% 和 29.23%。说明含有这些抗瘟基因的水稻品种在江西省内可以应用。

表 1 江西稻瘟病菌对不同抗瘟基因的毒力频率

Tab 1 Virulence frequency of *M. oryzae* isolates from Jiangxi to 30 resistant - blast genes

供体 Donor	已知基因 Known gene	毒力频率 / % Frequency	供体 Donor	已知基因 Known gene	毒力频率 / % Frequency
CO39	<i>Pi - a(2)</i>	100	Shin 2	<i>Pi - sh(1)</i>	71. 79
Aichi - asahi	<i>Pi - a(1)</i>	82. 05	BL1	<i>Pi - sh(2)</i>	84. 10
Fujisaka 5	<i>Pi - I</i>	84. 10	荔支江 Lizijiang	<i>Pi - k(C)</i>	37. 11
Fujisaka 5	<i>Pi - k^s(1)</i>	93. 30	华北大米 North grain	<i>Pi - k^m</i>	94. 36
Shin 2	<i>Pi - k^s(2)</i>	80. 51	Tadukan	<i>Pi - ta(C)</i>	91. 24
Kanto51	<i>Pi - k</i>	29. 23	Tadukan	<i>Pi - ta²</i>	77. 44
K60	<i>Pi - kp</i>	38. 97	Pusur	<i>Pi - k^p(C)</i>	97. 95
K3	<i>Pi - k^h</i>	60. 10	Tijahaja	<i>Pi - b(C)</i>	77. 44
Fukunishiki	<i>Pi - z</i>	63. 59	C101LAC	<i>Pi - 1(1)</i>	26. 67
C101A51	<i>Pi - z^s</i>	27. 46	C104PKT	<i>Pi - 3(1)</i>	69. 23
Toride 1	<i>Pi - z^t</i>	17. 95	Shin 2	<i>Pi - 5(t)</i>	78. 97
C105TTP2L9	<i>Pi - ta(2)</i>	76. 92	R L29	<i>Pi - 7(t)</i>	70. 26
C101PKT	<i>Pi - ta</i>	84. 67	WHD - IS - 75 - 1 - 127	<i>Pi - 9(t)</i>	36. 41
BL1	<i>Pi - b</i>	98. 45	R L10	<i>Pi - 12(t)</i>	47. 94
K59	<i>Pi - t</i>	89. 23	Aichi - asahi	<i>Pi - 19(t)</i>	88. 21

来源不同且具有相同名称的基因后面加“(C)”,“(1)”,“(2)”以示区别,其中来源于中国的后面加 C。(1)和(2)是具有相同的基因名称、从不同的供体亲本中分离得到。

(C), (1) and (2) were attached to the same genes, but derived from different donor parents, to distinguish from each other, (C) was attached to the genes from China

2.3 2006 - 2008年江西省稻瘟病菌所含无毒基因的分析

结果显示(表 2),2006 - 2008年江西省稻瘟病菌分别出现了 24,27,29个不同来源的无毒基因,出

表 2 江西省稻瘟病菌无毒基因在 2006 - 2008年间的分布

Tab 2 Distribution of the avirulence gene of *M. oryzae* isolates from Jiangxi during 2006 - 2008

无毒基因 Avirulence gene	出现频率 / % Occurrence frequency			无毒基因 Avirulence gene	出现频率 / % Occurrence frequency		
	2006年	2007年	2008年		2006年	2007年	2008年
<i>Avr - a(1)</i>	19. 61	15. 52	18. 60	<i>Avr - sh(1)</i>	19. 61	20. 69	38. 37
<i>Avr - a(2)</i>	0. 00	0. 00	0. 00	<i>Avr - sh(2)</i>	5. 88	13. 79	23. 26
<i>Avr - I</i>	5. 88	12. 07	24. 42	<i>Avr - k(C)</i>	66. 67	70. 69	53. 49
<i>Avr - ks(1)</i>	5. 88	5. 17	8. 13	<i>Avr - k^m</i>	0. 00	0. 00	12. 79
<i>Avr - ks(2)</i>	5. 88	5. 17	25. 58	<i>Avr - ta(C)</i>	9. 80	6. 89	9. 30
<i>Avr - k</i>	62. 74	74. 13	61. 63	<i>Avr - ta²</i>	13. 73	15. 52	29. 07
<i>Avr - k^p</i>	39. 21	43. 10	84. 88	<i>Avr - k^p(C)</i>	0. 00	1. 72	3. 49
<i>Avr - k^h</i>	41. 18	55. 17	26. 75	<i>Avr - b(C)</i>	15. 69	20. 69	29. 07
<i>Avr - z</i>	19. 61	22. 41	55. 81	<i>Avr - 1(1)</i>	88. 24	67. 24	58. 14
<i>Avr - z^s</i>	54. 90	70. 69	83. 72	<i>Avr - 3(1)</i>	29. 41	29. 31	29. 07
<i>Avr - z^t</i>	72. 55	77. 58	90. 69	<i>Avr - 5(t)</i>	13. 73	12. 07	31. 39
<i>Avr - ta(2)</i>	5. 88	10. 34	41. 86	<i>Avr - 7(t)</i>	60. 78	5. 17	27. 91
<i>Avr - ta</i>	0. 00	8. 62	29. 07	<i>Avr - 9(t)</i>	54. 90	46. 55	80. 23
<i>Avr - b</i>	0. 00	0. 00	3. 49	<i>Avr - 12(t)</i>	56. 86	60. 34	43. 02
<i>Avr - t</i>	11. 76	10. 34	10. 47	<i>Avr - 19(t)</i>	0. 00	8. 62	20. 93

现频率不低于 70% 的无毒基因分别为 2, 4, 4 个, 分别占无毒基因总数的 6.67%, 13.33%, 13.33%。2006 - 2008 年无毒基因出现频率的平均值分别是 26.01%, 26.32%, 35.15%。比较 2006 - 2008 年各年无毒基因出现的频率可以得知, 3 年频率平均值逐年增加, 2006 年除 *Avr-a(2)*, *Avr-ta*, *Avr-b*, *Avr-k^m*, *Avr-k^p(C)*, *Avr-19(t)* 外, 2007 年除 *Avr-a(2)*, *Avr-b*, *Avr-k^m* 外, 2008 年除 *Avr-a(2)* 外, 其余所有的无毒基因在各年份均有分布, 其中 *Avr-k*, *Avr-z¹*, *Avr-z⁵*, *Avr-1(1)* 与 *Avr-k(C)* 5 种无毒基因在各个年份出现频率都高于 50%, 说明与之相对应的抗性基因的水稻品种在江西省内可以应用。此外, 无毒基因 *Avr-a(2)* 在 3 年中均未检测到, 表明相对应的抗病基因 *pi-a(2)* 完全丧失了对江西省稻瘟病菌的抗性。

从表 3 我们可以得知, 195 个菌株中分别含有 0 ~ 18 个数目不等的基因组合, 其中含有 5, 6, 7, 9, 13 个无毒基因组合的病菌较多, 其分别占群体的 7.18%, 6.15%, 13.85%, 9.23%, 13.33%, 出现频率高的基因其参与组合的频率也高。

表 3 2006 - 2008 年江西省稻瘟病菌无毒基因组合

Tab 3 The avirulence gene combination of *M. oryzae* isolates during 2006 - 2008

无毒基因组合数目 No. of avirulence gene combination	菌株出现数 No. of isolates	基因组合频率 / % Frequency of gene combination	无毒基因组合数目 No. of avirulence gene combination	菌株出现数 No. of isolates	基因组合频率 / % Frequency of gene combination
0	7	3.59	10	8	4.10
1	7	3.59	11	8	4.10
2	5	2.56	12	6	3.08
3	7	3.59	13	26	13.33
4	5	2.56	14	6	5.13
5	14	7.18	15	3	3.08
6	12	6.15	16	10	5.13
7	27	13.85	17	9	8.21
8	9	8.21	18	8	4.10
9	18	9.23			

3 讨论

本研究结果表明, 江西省多数稻瘟病菌对携带这些已知抗病基因的水稻品种具有较强的致病能力。病菌的毒力频率不仅可以反映出病原物的毒性, 还可以反映出寄主的抗病性。从毒力结果分析, 含 *Pi-k*, *Pi-z⁵*, *Pi-z¹*, *Pi-1(1)* 等基因的水稻品种均表现出弱病力, 说明这些抗病基因对病菌具有较宽的抗谱, 在水稻抗病育种中有较大的利用价值, 可作为有效的抗病基因使用。抗病基因还可以通过基于组合手段 (互补、重叠或累加) 将这些抗瘟基因聚合于一体, 对育成抗瘟基因的新品种和延长抗瘟品种的应用年限具有重要的作用。

江西省稻瘟病菌含有 29 个与测试抗病基因相对应的无毒基因, 并以不同的频率出现在不同的年份, 其中以 2008 年出现的次数和频率最高。 *Avr-a(1)*, *Avr-a(2)*, *Avr-i*, *Avr-ks(1)*, *Avr-ks(2)*, *Avr-ta*, *Avr-b*, *Avr-t*, *Avr-sh(2)*, *Avr-k^m*, *Avr-ta(C)*, *Avr-ta²*, *Avr-k^p(C)*, *Avr-b(C)*, *Avr-3(1)*, *Avr-5(t)* 等 16 个无毒基因的出现频率均低于 30%, 由此可知, 与之相对应的抗病基因已基本丧失抗性, 所以在江西省内与之相对应的抗瘟基因在抗稻瘟病育种中应慎用。

杨秀娟等^[8]报道福建省 2003 - 2006 年采集并分离到的 87 个稻瘟病单孢菌株中, 无毒基因组合数目是 8 ~ 40, 且含有 17, 14, 23, 18 和 16 个无毒基因组合的病菌较多; 而本项研究表明, 195 个江西省稻瘟病单孢菌株无毒基因组合数目是 0 ~ 18 个, 且含有 5, 6, 7, 9, 13 个无毒基因组合的菌株较多。由于菌株含有的无毒基因数越多, 其致病性就越弱, 这说明江西省稻瘟病菌群体的致病性强于福建省稻瘟病菌群体。显然, 这与江西省的地理生态环境、水稻品种的选用及布局有关。

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 [J]. 植物病理学报, 1998, 28(4): 289 - 292
- [2] Flor H. Current status of the gene: for gene concept[J]. Ann Rev Phytopath, 1971, 9: 275 - 296
- [3] Silue D, Tharreau D, Notteghem J L. Evidence for a gene: Gene relationship in the *Oryza sativa* - *Magnaporthe grisea* patho-system [J]. Phytopathology, 1992, 82: 577 - 580.
- [4] 石军,龙美西,曲广林,等. 稻瘟病菌无毒基因研究进展 [J]. 中国生物工程杂志, 2006, 26(12): 112 - 116
- [5] 张连洪,燕继晔,赵文生,等. 稻瘟菌无毒基因 AVR - *Pik^m* 的定位 [J]. 植物病理学报, 2006, 36(2): 116 - 122
- [6] 陈福如,阮宏椿,杨秀娟,等. 稻瘟病苗瘟叶瘟和穗颈瘟的相关性分析 [J]. 中国农学学报, 2006, 22(7): 440 - 443.
- [7] 周江鸿,王久林,将琬如,等. 我国稻瘟病菌毒力基因的组成及其地理分布 [J]. 作物学报, 2003, 29(5): 646 - 651.
- [8] 杨秀娟,阮宏椿,陈福如,等. 福建省稻瘟病菌致病性及其无毒基因分析 [J]. 植物保护学报, 2007, 34(4): 337 - 342

(上接第 264 页)

- [8] 潘根生, Masaki T, 小西茂毅. 茶根尖细胞各胞器分部的分离及其铝的分布 [J]. 浙江农业大学学报, 1991, 17(3): 255 - 258
- [9] Zheng S J, Lin X Y, Yang J L, et al The kinetics of aluminum adsorption and desorption by root cell walls of an aluminum resistant wheat (*Triticum aestivum* L.) cultivar [J]. Plant and Soil, 2004, 261(1): 85 - 90
- [10] Zhong H, Lauchli A. Changes of cell wall composition and polymer size in primary roots of cotton seedlings under high salinity [J]. Journal of Experimental Botany, 1993, 44(4): 773 - 778
- [11] Taylor K A, Buchanan - Smith A. Colorimetric for the quantitation of uronic acids and a specific assay for galacturonic acid [J]. Analytical Biochemistry, 1992, 201(1): 190 - 196
- [12] El - Nawawi S A, Heikal Y A. Production of a low ester pectin by deesterification of high ester citrus pectin [J]. Carbohydrate Polymers, 1995, 27(3): 191 - 195.
- [13] Lugany M, Poschenrieder C, Barceló. Monitoring the aluminum - induced inhibition of root elongation in four maize cultivars differing in tolerance to aluminum and proton toxicity [J]. Physiologia Plantarum, 1995, 93(2): 265 - 271.
- [14] Ryan P R, Ditomaso J M, Kochian L V. Aluminum toxicity in roots: An investigation of spatial sensitivity and the role of the root cap [J]. Journal of Experimental Botany, 1993, 44(2): 437 - 446
- [15] Liu Q, He L S, Wang Z Y, et al Differential aluminum resistance and organic acid anions secretion in triticale [J]. Communications in Soil Science and Plant Analysis, 2007, 38(15): 1991 - 2004.
- [16] Schmohl N, Horst W J. Cell wall pectin content modulates aluminum sensitivity of *Zea mays* L. cells grown in suspension culture [J]. Plant Cell and Environment, 2000, 23(7): 735 - 742
- [17] Tabuchi A, Matsumoto H. Changes in cell - wall properties of wheat (*Triticum aestivum* L.) roots during aluminum - induced growth inhibition [J]. Physiologia Plantarum, 2001, 112(3): 353 - 358
- [18] Schmohl N, Pilling J, Fisahn J, et al Pectin methyl esterase modulates aluminum sensitivity in *Zea mays* and *Solanum tuberosum* [J]. Physiologia Plantarum, 2000, 109(4): 419 - 427.