

云南省元阳县籼/粳型稻瘟病菌无毒基因 *Avr-Pia*、*Avr-Pita1* 和 *Avr-Pii* 多样性分析

廖静静^{1,2} 谢 华¹ 王殿东^{1*} 何霞红^{2*}

(1. 长江师范学院, 重庆 408000; 2. 云南农业大学, 生物资源保护与利用国家重点实验室, 昆明 650201)

摘要: 为明确云南省元阳县籼/粳型稻瘟病菌中无毒基因的多样性及差异, 采用接种鉴别品种方法和PCR技术对9株粳型菌株和21株籼型菌株中无毒基因 *Avr-Pia*、*Avr-Pita1* 和 *Avr-Pii* 的多样性进行分析。结果显示, 30株稻瘟病菌菌株中无毒基因 *Avr-Pia*、*Avr-Pita1* 和 *Avr-Pii* 的平均出现频率分别为33.3%、76.7%和0, *Avr-Pia*、*Avr-Pita1* 在籼型菌株和粳型菌株中的出现频率分别为4.8%和100.0%、66.7%和100.0%。*Avr-Pia* 主要为存在/缺失的多样性, 籼/粳型菌株对水稻品种 Achiasahi (*Pia*) 的致病率分别为100.0%和11.1%; *Avr-Pita1* 可划分为3个类群, 除菌株CH1195属于PO类群外, 籼型菌株均属于J1类群, 粳型菌株则属于J2/J3类群; 籼/粳型菌株对水稻品种 K1 (*Pita*) 的致病率分别为100.0%和0, 且籼/粳型菌株 *Avr-Pita1* 蛋白序列在第83位和第192位氨基酸差异明显。*Avr-Pii* 在30株稻瘟病菌菌株中均未检出, 籼/粳型菌株对水稻品种 Fujisaka No. 5 (*Pii*) 的致病率分别为100.0%和0。表明 *Avr-Pia* 和 *Avr-Pita1* 在粳型菌株中的出现频率高于籼型菌株且变异程度低, 粳型菌株中可能存在其它无毒基因使其不能侵染 Fujisaka No. 5。

关键词: 穗颈瘟; 籼/粳型稻瘟病菌; 无毒基因; 多样性

Polymorphism analysis of *Avr-Pia*, *Avr-Pita1* and *Avr-Pii* in indica/japonica-borne *Magnaporthe oryzae* isolates in Yuanyang County, Yunnan

Liao Jingjing^{1,2} Xie Hua¹ Wang Diandong^{1*} He Xiaohong^{2*}

(1. Yangtze Normal University, Chongqing 408000, China; 2. State Key Laboratory for Conservation and Utilization of Bio-Resources, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, Yunnan Province, China)

Abstract: In order to clarify the polymorphism and differences of avirulence genes in indica (IB)/japonica-borne (JB) rice blast fungus, the inoculation of differential varieties and PCR technique were performed to analyze the polymorphism and differences of *Avr-Pia*, *Avr-Pita1* and *Avr-Pii* in nine JB isolates and 21 IB isolates from Yuanyang. The results showed that the average occurrence frequencies of *Avr-Pia*, *Avr-Pita1* and *Avr-Pii* in 30 isolates of *Magnaporthe oryzae* were 33.3%, 76.7% and 0, respectively. The occurrence frequencies of *Avr-Pia* and *Avr-Pita1* in IB/JB isolates were 4.8%, 100.0% and 66.7%, 100.0%, respectively. *Avr-Pia* mainly showed the polymorphism of presence/absence. The pathogenicity rate of IB/JB isolates against Achiasahi (*Pia*) was 100.0% and 11.1%, respectively. *Avr-Pita1* could be divided into three groups: CH1195 belonged to PO group, and the other IB isolates belonged to J1 group; JB isolates were classified as J2/J3 group. The pathogenicity rate of IB/JB isolates against K1 (*Pita*) was 100.0% and 0, respectively. The *Avr-Pita1* protein sequence had significant difference in the 83th and 192th amino acid positions between IB and JB isolates. *Avr-Pii* was not detected in the rice blast fungus of Yuanyang. The pathogenicity rate of IB/JB isolates against Fujisaka No. 5 (*Pii*) was 100.0%

基金项目: 长江师范学院引进人才科研启动项目(2017KYQD61), 云南省自然科学基金(2016FD025)

* 通信作者 (Authors for correspondence), E-mail: ddwangwill@163.com, 57104556@qq.com

收稿日期: 2018-09-12

and 0, respectively. The results indicated that the frequencies of *Avr-Pia* and *Avr-Pita1* in the JB isolates was higher than those in the IB isolates, and the variation degree was low. Other avirulence genes might existed in JB isolates which resulted in their non-pathogenicity against Fujisaka No. 5.

Key words: panicle blast; Indica/Japonica-borne rice blast fungus; avirulence gene; polymorphism

随着单一水稻品种的大面积种植,引起稻瘟病大暴发,导致水稻严重减产甚至绝收(Zhuge & Bonman, 1989; Zhu et al., 2000)。而利用籼/粳稻多样性种植可有效控制稻瘟病发生,如Zhu et al. (2000)利用黄壳糯和汕优22/汕优63多样性种植,使稻瘟病发生率降低95.3%,水稻增产6.5%~8.7%。水稻多样性种植控制稻瘟病发生的原理包括多样性种植对稻瘟病菌稳定的选择压力(朱有勇等, 2004; 高东等, 2010; 白秀红等, 2012), 对田间小气候的改善(高东等, 2010; 2011), 以及病原-寄主的协同进化(Gallet et al., 2016; Liao et al., 2016)等多个方面。

稻瘟病菌-水稻的协同进化主要是稻瘟病菌中无毒基因和水稻抗病基因的协同进化。由于籼/粳稻中抗病基因种类和数目的差异(Wu et al., 2015), 引起稻瘟病菌中无毒基因分布及致病性差异, 由此Gallet et al. (2016)首先提出了稻瘟病菌对水稻亚种的适应性进化理论, Liao et al. (2016)则将稻瘟病菌划分为籼型和粳型菌株。目前稻瘟病菌中已定位的无毒基因有40个, 已克隆12个, 其中无毒基因*Avr-Pita*是第1个发现与水稻中*Pita*基因一对一互作的无毒基因, 该基因位于染色体亚端粒, 突变频率较高, 是1 032个稻瘟病菌分泌蛋白中核酸多样性水平最高的(Zhou et al., 2007; Yoshida et al., 2009; 甘玉姿等, 2018)。*Avr-Pia*和*Avr-Pii*表现存在/缺失(presence/absence)多态性, 可能与基因位于染色体端粒有关, 也可能与无毒基因紧密关联的重复序列的多态性相关(Yasuda et al., 2006; Huang et al., 2014)。目前对稻瘟病菌中无毒基因的多样性(Li et al., 2011; Singh et al., 2014)、遗传变异(Zhou et al., 2007; Li et al., 2014)、群体进化(Huang et al., 2014; Saleh et al., 2014)及基因型和表型差异分析(甘玉姿等, 2018; 任世龙等, 2018)等都有较多研究, 但对籼/粳型稻瘟病菌(indica/japonica-borne isolates)中无毒基因基因型和表型差异的分析鲜有报道。

本研究通过对云南省元阳县籼/粳型稻瘟病菌中无毒基因*Avr-Pia*、*Avr-Pita1*和*Avr-Pii*的基因型和表型差异分析, 确定稻瘟病菌对水稻亚种的适应性进化, 以期对籼/粳稻多样性种植控制稻瘟病发生提供理论依据, 为后续深入研究其它无毒基因提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

供试菌株及水稻品种: 分别于2009、2011、2012和2013年从云南省红河州元阳县59个GPS位点采集穗颈瘟材料, 经单孢分离获得573株菌株, 通过微卫星分析划分成粳型菌株和籼型菌株2大类群, 从中选择9株粳型菌株CH1185、CH1205、CH1190、CH1207、CH1192、CH1184、CH1188、CH1186、CH1209和21株籼型菌株CH1208、CH1180、CH1189、CH1195、CH1322、CH1378、CH1179、CH1182、CH1176、CH1358、CH1178、CH1198、CH1367、CH1368、CH1383、CH1177、CH1387、CH1173、CH1290、CH1193、CH1197作为供试菌株。无毒基因*Avr-Pia*、*Avr-Pita1*和*Avr-Pii*的鉴别品种分别为Aichiasahi (*Pia*)、K1 (*Pita*)和Fujisaka No.5 (*Pii*), 由法国农业科学院提供。栽培基质Neuhaus S, 德国Klasmann-Deilmann公司。

培养基: 米糠培养基: 米糠20 g、酵母浸粉2 g、琼脂15 g、蒸馏水1 L, 121℃灭菌20 min。液体培养基: 葡萄糖10 g、KNO₃ 3 g、KH₂PO₄ 2 g、酵母浸粉2 g、蒸馏水1 L, 121℃灭菌20 min。使用前在培养基中加入1 mL浓度为500 000 U的青霉素溶液。

试剂及仪器: Novozym TM 234酶, 丹麦Novo Industries公司; Triton X-100, 美国Sigma-Aldrich公司; 十二烷基磺酸钠(sodium dodecyl sulfate, SDS), 上海伊卡生物技术有限公司; Tris base, 韩国Biosharp公司; Gene Ruler 1 kb Plus DNA Ladder, 美国Thermo Fisher公司; PCR试剂盒, 美国Promega公司; 其它试剂均为国产分析纯。Vortex-genie 2涡旋振荡器, 美国Scientific Industries公司; 5417R高速冷冻离心机, 德国Eppendorf公司; NanoDrop 2000紫外-可见光分光光度计, 美国Thermo Fisher公司; T100 PCR仪、SYS-TEM Gel-Doc XR凝胶成像系统, 美国Bio-Rad公司; DYCP-31DN电泳仪, 北京六一仪器厂。

1.2 方法

1.2.1 供试稻瘟病菌温室接种

将供试稻瘟病菌菌株分别接种至米糠培养基中, 25℃、12 h光暗交替培养7~10 d, 在培养皿中加入5 mL无菌水, 用塑料涂布器反复刮取平板表面的

菌丝制成菌悬液,再过滤制成分生孢子悬浮液,利用血球计数板计算分生孢子悬浮液浓度为 1×10^6 个/mL。

供试水稻播种于塑料盆中,每个水稻品种播种6粒。播种后置于20~30℃温室培养4周,管理方法参照 Berruyer et al.(2003)。将分生孢子悬浮液用0.5%明胶稀释成浓度为 5×10^4 个/mL,使用高压喷枪叶片喷洒接种30 mL。接种后将植株移至25℃、相对湿度95%的黑暗培养间处理18 h,第2天移至28℃、相对湿度90%、12h光暗交替的培养间,接种7 d后按照1~6级标准评价菌株的致病性。1级:没有病斑,未侵染;2级:过敏反应(hypersensitive response,HR)病斑,即点状病斑;3级:圆形病斑直径小于1 mm;4级:圆形病斑直径大于1 mm;5级:典型菱形病斑,边缘棕褐色;6级:典型菱形病斑,没有棕褐色边缘;其中3~6级为感病病斑(Gallet et al.,2016)。

1.2.2 供试稻瘟病菌DNA提取

将滤纸片保存的供试稻瘟病菌菌株接种到米糠培养基中,25℃、12 h光暗交替培养3~4 d,从最外缘刮取菌丝接种到液体培养基中。25℃黑暗培养4~5 d后采用 Adreit et al.(2007)方法提取稻瘟病菌总DNA。用无菌牙签从液体培养基中获得菌丝,除水后将菌丝放入2 mL离心管中;加入1.5 mL Novozym TM 234酶溶液涡旋混匀,室温下放置2 h后以

2 900 r/min 离心2~3 min,弃上清液;加入65℃预热的细胞裂解缓冲液600 μ L,65℃恒温处理1 h;加入氯仿和异戊醇(24:1)混合液600 μ L颠倒混匀至乳状,2 900 r/min离心10 min,将水相转移到1.5 mL无菌离心管中;加入于-20℃预冷的异丙醇600 μ L,颠倒混匀后-20℃沉淀1 h,2 900 r/min离心7 min后弃上清液;加入70%乙醇500 μ L洗涤,2 900 r/min离心2 min,弃上清液;重复洗涤1次;将DNA置于超净工作台上吹干后,加入TE 100 μ L和RNA酶1 μ L,37℃放置30~60 min;利用分光光度计测量DNA浓度,制备10 ng/ μ L的模板DNA,于-20℃保存备用。

1.2.3 *Avr-Pia*、*Avr-Pita1* 和 *Avr-Pii* 扩增及序列分析

根据表1中无毒基因参考序列设计引物序列,由北京华大基因研究中心有限公司合成。20 μ L PCR反应体系:5 $\times$ Buffer 4 μ L、dNTP 1 μ L、上下游引物(表1)各0.25 μ L、Go TaqG2 0.2 μ L、超纯水12.3 μ L、DNA模板2 μ L。扩增程序:95℃预变性2 min;95℃变性30 s,55℃退火30 s,72℃延伸不同时间(表1),35次循环;72℃延伸5 min。PCR扩增产物用1.5%琼脂糖凝胶电泳检测。基于*Avr-Pita1*外显子序列采用MEGA 7软件邻接法对稻瘟病菌菌株和Chuma et al.(2011)中参考菌株构建系统发育树并进行序列分析,Bootstrap设置为1 000(Kumar et al.,2016)。

表1 无毒基因 *Avr-Pia*、*Avr-Pita1* 和 *Avr-Pii* 扩增引物

Table 1 Primers used for amplification of *Avr-Pia*, *Avr-Pita1* and *Avr-Pii*

效应子 Effector	引物序列(5'-3') Sequence of primer (5'-3')	片段大小 Size (bp)	GenBank 登录号 GenBank accession no.	延伸时间(s) Extension time	参考文献 Reference
<i>Avr-Pia</i>	F: ACCCGCCAGCCCCATACACGAA R: CCTGGTTTCATCGTCGAGTGGT	536	AB498873.1	60	Yoshida et al., 2009
<i>Avr-Pii</i>	F: TCCGCTGACTGGGGGCAACA R: CTGTCCGCGCTCGTTTGAA	829	AB498874.1	30	Yoshida et al., 2009
<i>Avr-Pita1</i>	F: TTCGTAGGAACCCAATCTTCAAAA- TGCTTTTTTATTCAATTATTTTTTTTC R: AACGTCGTATGGGTATGCCCCACCA- CAATATTTATAACGTGCACATTGTGCA	930	AB607333.1	80	Chuma et al., 2011

2 结果与分析

2.1 供试稻瘟病菌中 *Avr-Pia* 的多样性

对水稻品种 Aichiasahi 的致病性结果表明,30株稻瘟病菌菌株的平均致病率为73.3%,其中粳型菌株仅CH1209致病,致病率为11.1%,籼型菌株致病率为100.0%(图1-a)。无毒基因 *Avr-Pia* 具有存在/缺失的多样性,在30株稻瘟病菌菌株中平均出现频率为33.3%,其中在9株粳型菌株中出现频率为100.0%,在21株籼型菌株中仅CH1290含有该基因,出现频率为4.8%(图1-b)。含 *Avr-Pia* 基因的10株稻瘟病菌菌株中该基因编码区(coding sequence,

CDS)序列完全一致。

2.2 供试稻瘟病菌中 *Avr-Pita1* 的多样性

对水稻品种 K1 的致病性结果表明,30株稻瘟病菌平均致病率为70.0%,籼型菌株和粳型菌株致病率分别为100.0%和0(图2-a)。在30株稻瘟病菌菌株中无毒基因 *Avr-Pita1* 的平均出现频率为76.7%,在粳型菌株中的出现频率为100.0%,籼型菌株中的出现频率为66.7%(图2-b)。23株稻瘟病菌 *Avr-Pita1* 的外显子序列聚类分析结果表明(图3),元阳县稻瘟病菌菌株可以划分为3个类群,分别为J1、J2/J3(为1个类群)、PO类群,其中仅CH1195属于PO类群。

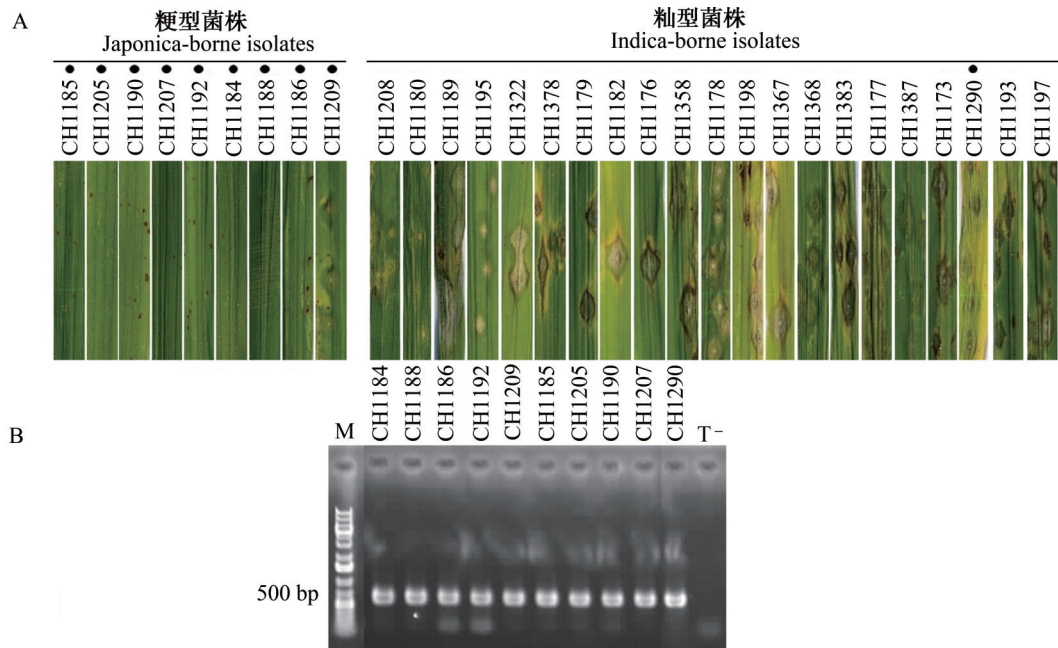


图1 30株稻瘟病菌中 *Avr-Pia* 的存在/缺失多样性

Fig. 1 The presence/absence diversity of *Avr-Pia* in 30 *Magnaporthe oryzae* strains

A: 稻瘟病菌分生孢子悬浮液接种水稻品种 Aichiasahi 后的表型, 黑色圆点表示该菌株中含有 *Avr-Pia* 基因。B: 30 株稻瘟病菌中扩增出 *Avr-Pia* 条带的菌株; M: 1 kb plus marker; T: 空白对照。A: The phenotype of *M. oryzae* strains after infected with Aichiasahi; the black points indicate that the strain harbors *Avr-Pia* gene. B: The genotype of *M. oryzae* strains with *Avr-Pia* band; M: 1 kb plus marker; T: negative control.

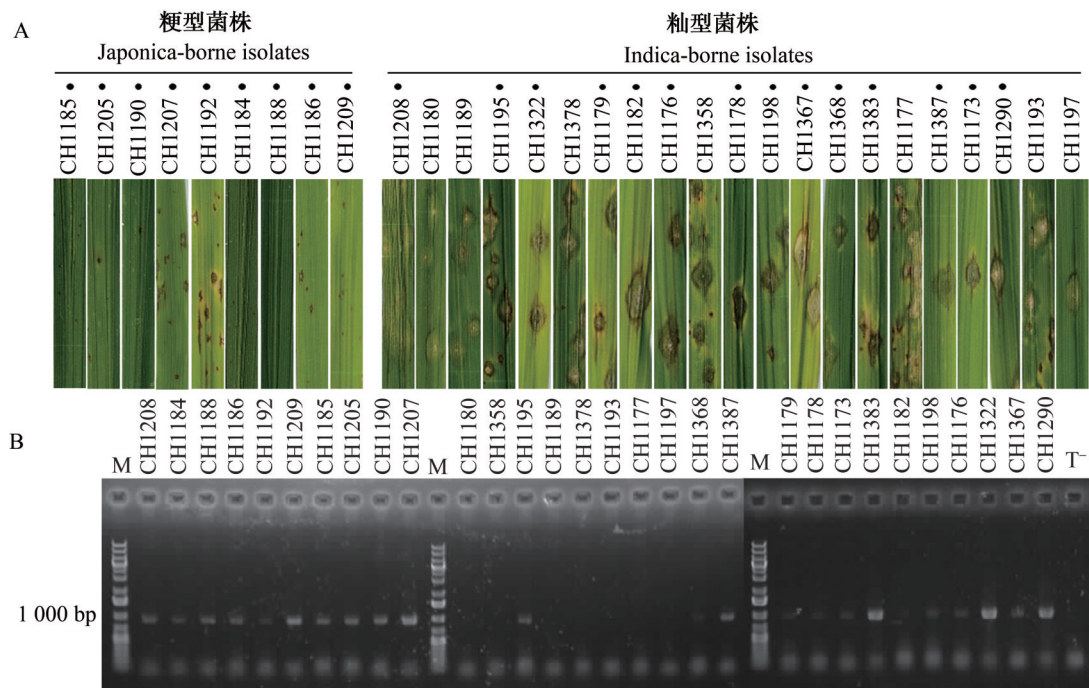


图2 30株稻瘟病菌中 *Avr-Pita1* 的多样性

Fig. 2 The diversity of *Avr-Pita1* in 30 *Magnaporthe oryzae* strains

A: 稻瘟病菌分生孢子悬浮液接种水稻品种 K1 后的表型, 黑色圆点表示该菌株中含有 *Avr-Pita1* 基因。B: 30 株稻瘟病菌中扩增出 *Avr-Pita1* 条带的菌株; M: 1 kb plus marker; T: 空白对照。A: The phenotype of *M. oryzae* strains after infected with K1, the black points indicate that the strain harbors *Avr-Pita1* gene. B: The genotype of *Avr-Pita1* in 30 *M. oryzae* strains. M: 1 kb plus marker; T: negative control.

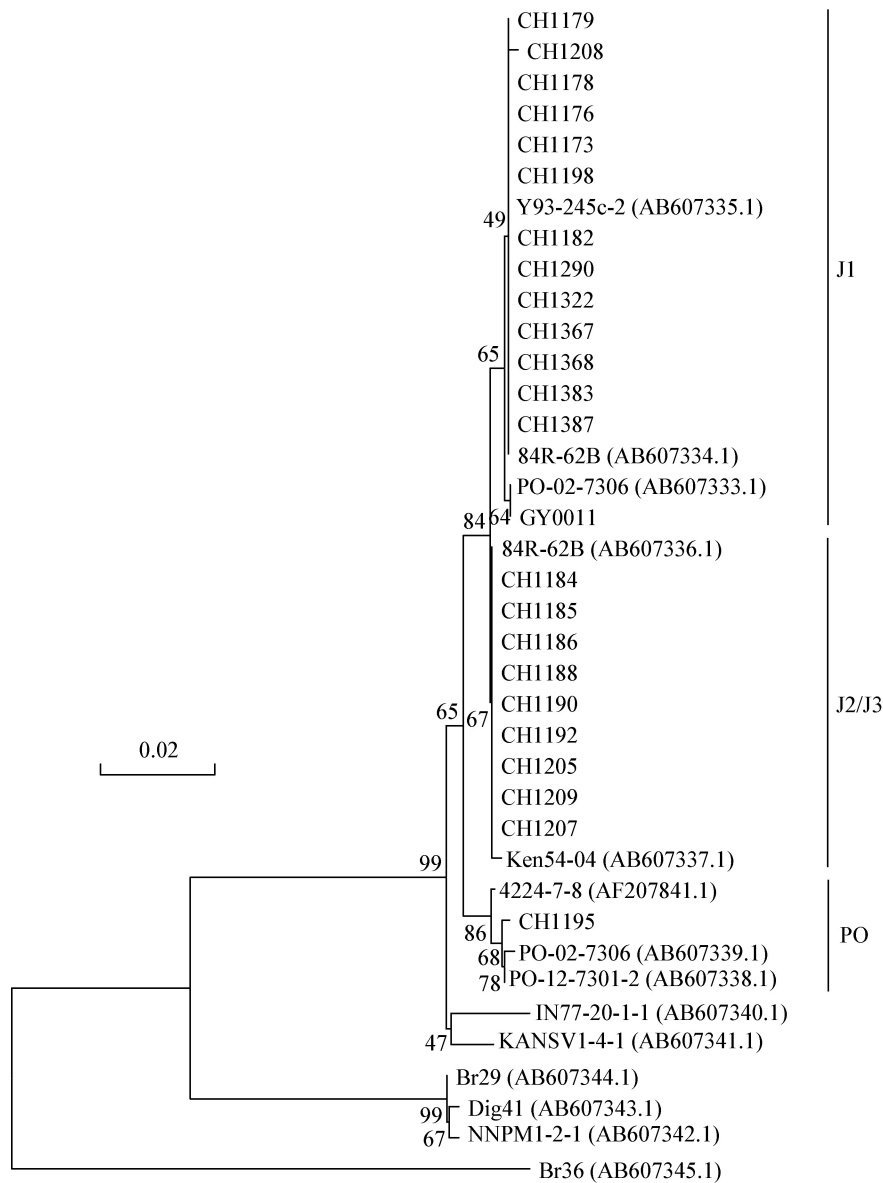


图3 基于稻瘟病菌中 *Avr-Pita1* 外显子序列采用邻接法构建稻瘟病菌菌株及参考菌株的系统发育树

Fig. 3 The phylogenetic tree of rice blast strains and reference strains constructed by neighbor-joining method based on the exon sequences of *Avr-Pita1* in *Magnaporthe oryzae*

Avr-Pita1 蛋白质序列比对分析结果表明, 菌株 CH1195 属于 PO 类群, 但与菌株 PO-02-7306 和 PO-12-7301-2 蛋白质序列在第 60 位(半胱氨酸/丝氨酸)和第 192 位(半胱氨酸/苯丙氨酸)有差异。而菌株 CH1208 第 181 位氨基酸为精氨酸, 其它籼型菌株则为组氨酸。籼/粳型菌株的差异发生在第 83 位和第 192 位氨基酸, 粳型菌株中分别为天冬氨酸和酪氨酸, 而籼型菌株中分别为天冬酰胺和半胱氨酸(表 2)。

2.3 供试稻瘟病菌中 *Avr-Pii* 的多样性

30 株稻瘟病菌中 *Avr-Pii* 的检测结果表明, 籼型菌株和粳型菌株对 Fujisaka No. 5 的致病性分别为 100.0% 和 0, 而该基因的出现频率均为 0, 阳性对照菌株 CD0073 中含有该基因(图 4)。

3 讨论

本研究结果表明, 所检测的 3 种主要无毒基因在籼/粳型稻瘟病菌中差异较大, 该研究结果与 Liao et al. (2016) 关于云南省元阳县籼/粳型水稻亚种中抗病基因分布的结果相吻合, 表明籼/粳型稻瘟病菌无毒基因的分布及致病性是稻瘟病菌对水稻亚种适应性进化的结果。本研究发现 *Avr-Pia* 在 30 株稻瘟病菌菌株中的平均出现频率为 33.3%, 但是在粳型菌株中的出现频率为 100.0%, 该结果与 *Avr-Pia* 在世界范围内的低分布频率差异较大 (Yoshida et al., 2009; Cesari et al., 2013), 且显著高于我国南繁区该基因的平均检出率 16.7% (朱名海等, 2017), 而与云

南省 11 个地区该基因的出现频率较一致 (30.2%) (Li et al., 2011), 但粳型菌株中该基因 100.0% 的出现频率则较特殊。可能是粳型菌株寄主 (主要为粳稻) 含有的抗病基因较少, 未对粳型菌株造成较大的选择压力。Gallet et al. (2016) 和 Liao et al. (2016) 分析了不同水稻亚种中抗病基因的分布情况, 发现粳稻抗病基因数目显著低于籼稻, 而先天免疫水平则显著高于籼稻。由此, 粳型菌株需要保留更多的无毒基因来突破先天免疫水平较高而抗性基因较少的粳稻以成功侵染繁殖。Avr-Pita 主要表现存在/缺失

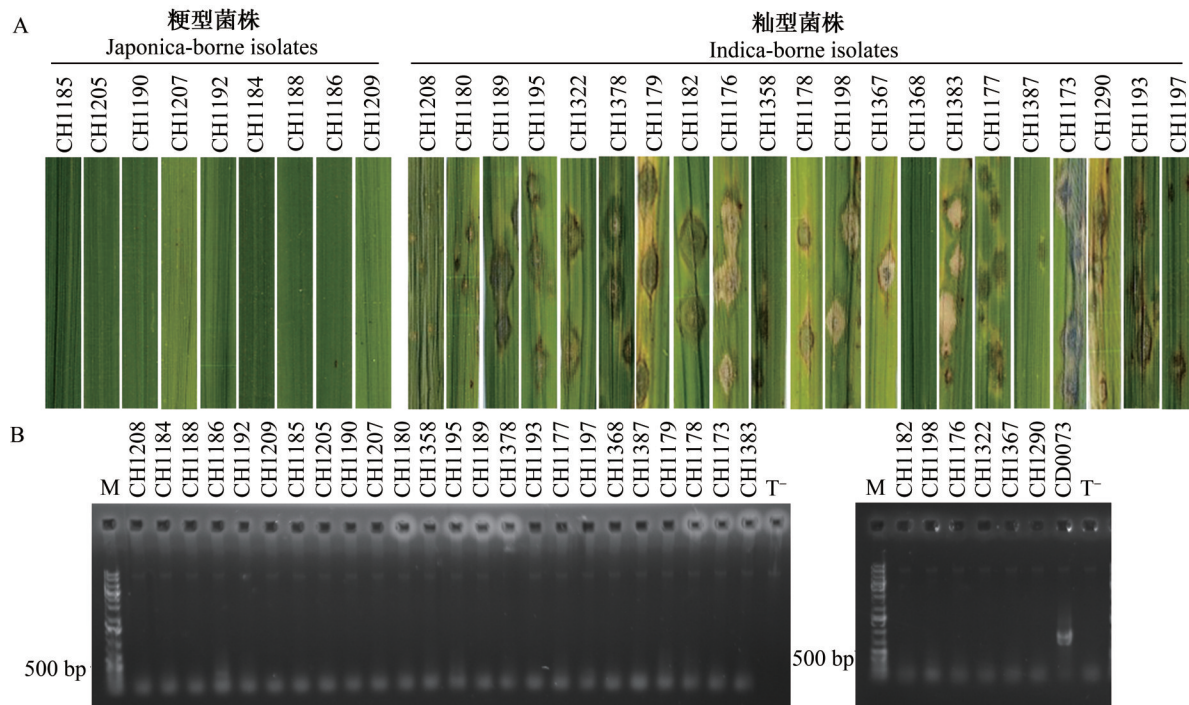
多样性, 这可能与该基因位于染色体端粒有关, 也可能与无毒基因紧密关联的重复序列的多样性相关 (Huang et al., 2014; Yasuda et al., 2006)。除此之外, 该基因也可能通过其它变异方式丧失无毒性。如任世龙等 (2018) 发现在谷瘟病菌中 Avr-Pia 编码区 212 位碱基突变 (C/T) 可能会使 Avr-Pia 丧失无毒基因功能。在本研究菌株 CH1209 和 CH1290 中, Avr-Pia 在 CDS 区与参考菌株序列完全一致, 但这 2 株稻瘟病菌对鉴别品种 Achiasahi 致病, 则可能在启动区域存在变异, 需要进一步探索。

表 2 Avr-Pita1 蛋白质序列的差异

Table 2 The variations of Avr-Pita1 protein sequences

菌株 Strain	毒性 Avirulence/Virulence	分组 Group	60	82	83	88	104	119	136	174	181	192	195
PO-02-7306	-	PO	C	N	D	R	K	E	G	V	H	C	H
PO-12-7301-2	-	PO	S	N	D	R	K	E	G	V	H	C	H
CH1195	-	PO	S	N	D	R	K	E	G	V	H	F	H
84R-62B	+	J2	S	S	D	K	N	E	E	I	H	Y	D
Ken54-04	+	J3	S	S	D	K	N	Q	E	I	H	Y	D
CH1184	+	J2/J3	S	S	D	K	N	E	E	I	H	Y	D
CH1185	+	J2/J3	S	S	D	K	N	E	E	I	H	Y	D
CH1186	+	J2/J3	S	S	D	K	N	E	E	I	H	Y	D
CH1188	+	J2/J3	S	S	D	K	N	E	E	I	H	Y	D
CH1190	+	J2/J3	S	S	D	K	N	E	E	I	H	Y	D
CH1192	+	J2/J3	S	S	D	K	N	E	E	I	H	Y	D
CH1205	+	J2/J3	S	S	D	K	N	E	E	I	H	Y	D
CH1209	+	J2/J3	S	S	D	K	N	E	E	I	H	Y	D
CH1207	+	J2/J3	S	S	D	K	N	E	E	I	H	Y	D
Y93-245c-2	-	J1	S	S	N	K	N	E	E	I	H	C	D
84R-62B	-	J1	S	S	N	K	N	E	E	I	H	C	D
PO-02-7306	-	J1	S	S	N	K	N	E	G	I	H	C	D
CH1198	-	J1	S	S	N	K	N	E	E	I	H	C	D
CH1173	-	J1	S	S	N	K	N	E	E	I	H	C	D
CH1176	-	J1	S	S	N	K	N	E	E	I	H	C	D
CH1178	-	J1	S	S	N	K	N	E	E	I	H	C	D
CH1179	-	J1	S	S	N	K	N	E	E	I	H	C	D
CH1182	-	J1	S	S	N	K	N	E	E	I	H	C	D
CH1208	-	J1	S	S	N	K	N	E	E	I	R	C	D
CH1290	-	J1	S	S	N	K	N	E	E	I	H	C	D
CH1322	-	J1	S	S	N	K	N	E	E	I	H	C	D
CH1367	-	J1	S	S	N	K	N	E	E	I	H	C	D
CH1368	-	J1	S	S	N	K	N	E	E	I	H	C	D
CH1383	-	J1	S	S	N	K	N	E	E	I	H	C	D
CH1387	-	J1	S	S	N	K	N	E	E	I	H	C	D

+和-分别表示 Avr-Pita1 为无毒基因和毒性基因。C: 半胱氨酸; D: 天冬氨酸; E: 谷氨酸; F: 苯丙氨酸; G: 甘氨酸; H: 组氨酸; I: 异亮氨酸; K: 赖氨酸; N: 天冬酰胺; Q: 谷氨酰胺; R: 精氨酸; S: 丝氨酸; V: 缬氨酸; Y: 酪氨酸。+ and - indicate the avirulence and virulence of Avr-Pita1. C: Cysteine; D: aspartic acid; E: glutamic acid; F: phenylalanine; G: glycine; H: histidine; I: isoleucine; K: lysine; N: asparagine; Q: glutamine; R: arginine; S: serine; V: valine; Y: tyrosine.

图4 30株稻瘟病菌中 *Avr-Pii* 的多样性Fig. 4 The diversity of *Avr-Pii* in 30 *Magnaporthe oryzae* strains

A: 稻瘟病菌分生孢子悬浮液接种水稻品种 Fujisaka No. 5 后的表型。B: 30 株稻瘟病菌和阳性对照 CD0073 中 *Avr-Pii* 的基因型; M: 1 kb plus marker; T: 空白对照。A: The phenotype of *M. oryzae* strains after infected with Fujisaka No. 5. B: The genotype of *Avr-Pii* in 30 *M. oryzae* strains and positive control CD0073; M: 1 kb plus marker; T: negative control.

Avr-Pita 是稻瘟病菌中多样性水平最高的无毒基因 (Valent & Khang, 2010; Chuma et al., 2011), 且出现频率也非常高。Li et al. (2014) 发现该基因在云南省 366 株稻瘟病菌中的平均出现频率为 59.6%, 在云南省西南地区的出现频率最高为 72.4%。本研究中, *Avr-Pita1* 在元阳县稻瘟病菌中的平均出现频率为 76.7%, 在籼型菌株中的出现频率为 66.7%, 而在粳型菌株中的出现频率为 100.0%, 与 Li et al. (2014) 的研究结果有一定差异, 尤其是粳型菌株中该基因的出现频率差异较大。*Avr-Pita1* 蛋白序列分析表明该基因氨基酸的变异与其分类结果一致, 且与 Chuma et al. (2011) 的 PO、J1 和 J2/J3 类群划分一致。除菌株 CH1195 外, 粳型菌株和籼型菌株 *Avr-Pita1* 蛋白序列差异为第 83 位和第 192 位氨基酸的变异, 这与 Chuma et al. (2011) 的研究结果一致。因此, 粳型菌株和籼型菌株致病性的差异很大程度上可能是由于这 2 个位点突变引起的, 但具体哪一位点突变致使 *Avr-Pita1* 毒性改变则需要进一步探索。

Avr-Pii 也主要是表现存在/缺失的多样性, 该基因在云南省稻瘟病菌中的出现频率为 40.3% (Li et al., 2011), 在谷瘟病菌中的出现频率为 21.1% (任世龙等, 2018)。本研究选用 Fujisaka No. 5 作为鉴定

Avr-Pii 无毒基因的鉴别品种, 发现该基因的出现频率为 0。而在该鉴别品种中, 除含有 *Pii* 基因外, 还含有 *Piks* 基因 (Tsunematsu et al., 2000)。表明粳型菌株对 Fujisaka No. 5 不致病可能是含有 *Avr-Piks*, 或可能存在其它未被鉴定的无毒基因与该鉴别品种中未被鉴定的抗病基因互作。因此, 籼型菌株中都不含有无毒性的 *Avr-Pii* 和 *Avr-Piks*, 而粳型菌株中可能含有 *Avr-Pii* 或 *Avr-Piks*。

目前稻瘟病菌中已定位的无毒基因有 40 个, 其中已克隆的有 12 个 (甘玉姿等, 2018), 本研究仅分析了 3 种无毒基因 *Avr-Pia*、*Avr-Pita1* 和 *Avr-Pii*, 其它无毒基因在籼/粳型稻瘟病菌中的多样性还有待进一步深入研究, 且在其它水稻种植区是否存在类似现象也需要进一步探索。

参考文献 (References)

- Adreit H, Andriantsimialona SD, Utami DW, Nottoghem JL, Lebrun MH, Tharreau D. 2007. Microsatellite markers for population studies of the rice blast fungus, *Magnaporthe grisea*. *Molecular Ecology Notes*, 7(4): 667–670
- Bai XH, Gao D, Yu L, Su Y. 2012. Genetic diversity of rice landraces from Yuanyang Hani's terraced wetland in Yunnan, China. *Molecular Plant Breeding*, 10(3): 1017–1024 (in Chinese) [白秀红, 高

- 东, 余磊, 苏源. 2012. 云南元阳梯田湿地水稻地方品种遗传多样性分析. 分子植物育种, 10(3): 1017–1024]
- Berruyer R, Adreit H, Milazzo J, Gaillard S, Berger A, Dioh W, Lebrun MH, Tharreau D. 2003. Identification and fine mapping of *Pi33*, the rice resistance gene corresponding to the *Magnaporthe grisea* avirulence gene *ACE1*. Theoretical and Applied Genetics, 107(6): 1139–1147
- Cesari S, Thilliez G, Ribot C, Chalvon V, Michel C, Jauneau A, Rivas S, Alaux L, Kanzaki H, Okuyama Y, et al. 2013. The rice resistance protein pair RGA4/RGA5 recognizes the *Magnaporthe oryzae* effectors *AVR-Pita* and *AVR1-CO39* by direct binding. The Plant Cell, 25(4): 1463–1481
- Chuma I, Isobe C, Hotta Y, Ibargi K, Futamata N, Kusaba M, Yoshida K, Terauchi R, Fujita Y, Nakayashiki H, et al. 2011. Multiple translocation of the *AVR-Pita* effector gene among chromosomes of the rice blast fungus *Magnaporthe oryzae* and related species. PLoS Pathogens, 7(7): e1002147
- Gallet R, Fontaine C, Bonnot F, Milazzo J, Tertois C, Adreit H, Ravigné V, Fournier E, Tharreau D. 2016. Evolution of compatibility range in the rice-*Magnaporthe oryzae* system: an uneven distribution of *R* genes between rice subspecies. Phytopathology, 106: 348–354
- Gan YZ, Xiao G, Deng QY, Wu J, Bai B, Lu XY, Zhou B. 2018. The sequence and function analysis of *AVR-Pita* gene family of rice blast fungus, *Magnaporthe oryzae* in Philippines. Chinese Journal of Biological Control, 34(3): 488–498 (in Chinese) [甘玉姿, 肖贵, 邓启云, 吴俊, 柏斌, 卢向阳, 周波. 2018. 菲律宾稻瘟病菌生理小种中 *AVR-Pita* 及其同源基因的序列与功能分析. 中国生物防治学报, 34(3): 488–498]
- Gao D, He XH, Zhu SS. 2011. Sustainable management on pests by agro-biodiversity. Acta Ecologica Sinica, 31(24): 7617–7624 (in Chinese) [高东, 何霞红, 朱书生. 2011. 利用农业生物多样性持续控制有害生物. 生态学报, 31(24): 7617–7624]
- Gao D, He XH, Zhu YY. 2010. Review of advances in mechanisms of sustainable management of pests by agro-biodiversity. Chinese Journal of Plant Ecology, 34(9): 1107–1116 (in Chinese) [高东, 何霞红, 朱有勇. 2010. 农业生物多样性持续控制有害生物的机理研究进展. 植物生态学报, 34(9): 1107–1116]
- Huang J, Si WN, Deng QM, Li P, Yang SH. 2014. Rapid evolution of avirulence genes in rice blast fungus *Magnaporthe oryzae*. BMC Genetics, 15: 45
- Kumar S, Stecher G, Tamura K. 2016. MEGA 7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. Molecular Biology and Evolution, 33(7): 1870–1874
- Liao JJ, Huang HH, Meusnier I, Adreit H, Ducasse A, Bonnot F, Pan L, He XH, Kroj T, Fournier E, et al. 2016. Pathogen effectors and plant immunity determine specialization of the blast fungus to rice subspecies. eLife, 5: e19377
- Li JB, Lu L, Jia YL, Li CY. 2014. Effectiveness and durability of the rice *Pi-ta* gene in Yunnan Province of China. Phytopathology, 104(7): 762–768
- 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
- Ren SL, Bai H, Wang YF, Quan JZ, Dong ZP, Li ZY, Xing JH. 2018. Identification and analysis of *Magnaporthe oryzae* of foxtail millet avirulence genes. Scientia Agricultura Sinica, 51(6): 1079–1088 (in Chinese) [任世龙, 白辉, 王永芳, 全建章, 董志平, 李志勇, 邢继红. 2018. 谷瘟病菌无毒基因型鉴定及分析. 中国农业科学, 51(6): 1079–1088]
- Saleh D, Milazzo J, Adreit H, Fournier E, Tharreau D. 2014. South-east Asia is the center of origin, diversity and dispersion of the rice blast fungus, *Magnaporthe oryzae*. New Phytologist, 201(4): 1440–1456
- Singh PK, Thakur S, Rathour R, Variar M, Prashanthi SK, Singh AK, Singh UD, Sharma V, Singh NK, Sharma TR. 2014. Transposon-based high sequence diversity in *Avr-Pita* alleles increases the potential for pathogenicity of *Magnaporthe oryzae* populations. Functional & Integrative Genomics, 14(2): 419–429
- 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: 229–234
- Valent B, Khang CH. 2010. Recent advances in rice blast effector research. Current Opinion in Plant Biology, 13(4): 434–441
- Wu YY, Xiao N, Yu L, Pan CH, Li YH, Zhang XX, Liu GQ, Dai ZY, Pan XB, Li AH. 2015. Combination patterns of major *R* genes determine the level of resistance to the *M. oryzae* in rice (*Oryza sativa* L.). PLoS ONE, 10(6): e0126130
- Yasuda N, Noguchi MT, Fujita Y. 2006. Partial mapping of avirulence genes *AVR-Pii* and *AVR-Pia* in the rice blast fungus *Magnaporthe oryzae*. Canadian Journal of Plant Pathology, 28: 494–498
- 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
- Zhou EX, Jia YL, Singh P, Correll JC, Lee FN. 2007. Instability of the *Magnaporthe oryzae* avirulence gene *AVR-Pita* alters virulence. Fungal Genetics and Biology, 44(10): 1024–1034
- Zhu MH, Zhao M, Shu CW, Zhou EX. 2017. Detection of avirulence genes in *Magnaporthe oryzae* from South China crop breeding area. Journal of Huazhong Agricultural University, 36(4): 21–25 (in Chinese) [朱名海, 赵美, 舒灿伟, 周而勋. 2017. 南繁区稻瘟病菌无毒基因的检测. 华中农业大学学报, 36(4): 21–25]
- Zhu YY, Chen HR, Fan JH, Wang YY, Li Y, Chen JB, Fan JX, Yang SS, Hu LP, Leung H, et al. 2000. Genetic diversity and disease control in rice. Nature, 406: 718–722
- Zhu YY, Hei L, Chen HR, Wang YY, Tang KR, Zhao XQ, Zhou JY, Tu JH, Li Y, He XH, et al. 2004. Using resistance genes diversity for sustainable rice disease control. Scientia Agricultura Sinica, 37(6): 832–839 (in Chinese) [朱有勇, Hei L, 陈海如, 王云月, 汤克仁, 赵学谦, 周金玉, 涂建华, 李炎, 何霞红, 等. 2004. 利用抗病基因多样性持续控制水稻病害. 中国农业科学, 37(6): 832–83]
- Zhuge GZ, Bonman JM. 1989. Rice blast in pure and mixed stands of rice varieties. Chinese Journal of Rice Science, 3(1): 11–16