

· 研究报告 ·

## 2019–2021年我国南方稻区白叶枯病菌的毒力与遗传多样性调查研究

田传玉<sup>1,2†</sup>, 方妍力<sup>1,2†</sup>, 沈晴<sup>3</sup>, 王宏杰<sup>1,2</sup>, 陈析丰<sup>1</sup>, 郭威<sup>1</sup>, 赵开军<sup>2</sup>, 王春连<sup>2,4\*</sup>, 纪志远<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>浙江师范大学生命科学学院, 金华 321004; <sup>2</sup>中国农业科学院作物科学研究所/农作物基因资源与基因改良国家重大科学工程, 北京 100081; <sup>3</sup>苏州市植物保护植物检疫站, 苏州 215006; <sup>4</sup>中国农业科学院三亚国家南繁研究院, 三亚 572024

**摘要** 种植抗病品种一直是防控水稻白叶枯病(bacterial blight, BB)最有效的措施。近年来, 白叶枯病在我国多地呈现“老病新发”态势。为查明近期白叶枯病成灾的原因, 2019–2021年间, 在南方8省(海南、云南、广西、广东、福建、湖南、浙江和江苏)病害重发生田块采集叶片, 分离获得野生白叶枯病菌(*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*, Xoo)。通过对主效毒性因子基因型 $tal$ e (transcription activator-like effectors)进行Southern杂交检测, 将新分离的97株Xoo菌株划分为10个基因型, 其中基因型V是优势种群代表。选取各基因型的代表菌株, 剪叶接种携带主要抗病基因( $R$  gene)的水稻(*Oryza sativa*)品种, 毒力测试结果显示,  $Xa3$ 和 $Xa4$ 等传统抗病基因对田间大部分菌株已经丧失抗性,  $Xa7$ 和 $Xa23$ 等优异抗病基因对白叶枯病仍具有广谱抗性。研究结果表明, 近期“老病新发”的主要原因可能是水稻新品种选育过程中忽视了优异抗白叶枯病基因资源的引入, 挖掘与利用优异抗病基因资源仍是防控白叶枯病最理想的途径。

**关键词** 白叶枯病, 抗病基因,  $tal$ e, 菌株毒力, 水稻

田传玉, 方妍力, 沈晴, 王宏杰, 陈析丰, 郭威, 赵开军, 王春连, 纪志远 (2023). 2019–2021年我国南方稻区白叶枯病菌的毒力与遗传多样性调查研究. 植物学报 58, 743–749.

由水稻黄单胞菌稻致病变种(*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*, Xoo)引起的白叶枯病(bacterial blight, BB)是水稻(*Oryza sativa*)最重要的细菌性病害(Niño-Liu et al., 2006; Ji et al., 2018)。水稻感染白叶枯病后一般减产20%–30%, 严重时可达60%以上, 甚至绝收, 严重威胁水稻生产和粮食安全。长期的生产实践证明, 种植抗病品种是控制白叶枯病最经济、有效和环保的措施; 但在长期的抗性选择压力下, 病原菌易发生变异, 导致抗病品种在田间丧失抗性。近几年, 白叶枯病在我国南方稻区呈现“老病新发”态势, 病害为害加剧。例如, 2020年浙江兰溪晚稻白叶枯病大面积爆发, 减产逾3成。“知己知彼, 百战百胜”, 田间病原菌的实际毒力情况是布局抗病品种等病害综合防控措施的重要依据, 但目前缺少病害爆发区域内Xoo菌株遗传多样性及毒力等方面的调查数据

(Ji et al., 2014)。

水稻-Xoo互作系统已经成为植物-病原物互作研究的经典模式, 在植物病理学以及植物抗病性研究中发挥重要作用(White and Yang, 2009; Xu et al., 2017)。转录激活类因子(transcription activator-like effectors, TALE)是Xoo最重要的毒性因子, 病原菌通过三型分泌系统(type III secretion system, T3SS)将TALE蛋白注射到水稻细胞内; 在水稻胞内转运蛋白的作用下, TALE最终进入寄主细胞核, 并特异性结合目的基因启动子区的EBE (effector-binding element)序列, 通过转录激活靶基因的表达操纵植物的抗(感)病性(Perez-Quintero and Szurek, 2019)。病原菌最初的目的是通过提高感病基因(susceptibility gene,  $S$  gene)的表达量来增强植物的感病性, Xoo携带的TALE成员很多可以特异性激活OsSWEET家族

收稿日期: 2022-08-03; 接受日期: 2023-02-09

基金项目: 国家重点研发计划(No.2021YFD1200501-5)、国家自然科学基金(No.U20A2035)和中央级公益性科研院所基本科研业务费专项(No.Y2022QC001)

† 共同第一作者

\* 通讯作者。E-mail: wangchunlian@caas.cn; jizhiyuan@caas.cn

成员的表达, 如 *OsSweet11/Xa13* 和 *OsSweet14/Os-11N3* (Yang et al., 2006; Antony et al., 2010; Zhou et al., 2015)。SWEET (*sugars will eventually be exported transporters*) 基因的诱导表达可以促进植物细胞内糖分的外渗, 有利于病原菌攫取糖分, 促进其在植物组织内的增殖与转移, 提高了寄主的感病性 (Breia et al., 2021)。在水稻-Xoo长期的协同进化过程中, 为了规避病原菌的操纵, 常通过水稻自然变异或人工突变来破坏EBE序列, 阻断TALE蛋白与靶基因的识别和互作, 中和感病性 (Oliva et al., 2019; Xu et al., 2019)。此外, 植物也会通过类似的策略主动防御病原菌的进攻。*E* (*executor*) 基因是一类新型的植物抗病基因 (*resistance gene, R gene*), 其启动子区含有可以特异性“捕获”TALE蛋白的EBE序列 (Nowack et al., 2022; Ji et al., 2022)。目前, 仅在水稻和辣椒 (*Capsicum annuum*) 中发现6个*E*基因成员, 包括 *Xa7*、*Xa10*、*Xa23*、*Xa27*、*Bs3* 和 *Bs4C-R*。一般情况下, *E*基因处于“静默”状态, 病原菌侵入后无毒性的TALE蛋白 (如 *AvrXa7*、*AvrXa10* 和 *AvrXa23*) 被转运到植物细胞核, 结合到*E*基因的EBE序列上激活*E*基因表达。*E*基因的表达触发植物的先天免疫抗性 (*effector-triggered immunity, ETI*), 伴随有侵染区域的过敏反应 (*hypersensitive reaction, HR*), 快速的细胞死亡限制了病斑的扩展, 最终使植物表现出强抗病性。

水稻的另一种主动防御策略是通过NLR (*nucleotide-binding leucine-rich repeat*) 类抗病蛋白“捕获”TALE蛋白 (Ji et al., 2020; Zhang et al., 2020)。NLR蛋白 (如 *XA1*、*XA2* 和 *XA14*) 可以广谱识别具有典型结构特征的TALE蛋白并激发抗病性, 但水稻黄单胞菌 (包括水稻细菌性条斑病菌 (*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola, Xoc*)) 进化的iTALE (*interfering TALE*) 可以抑制NLR蛋白介导的抗病反应 (Ji et al., 2016)。遗憾的是, 目前田间大部分菌株已经携带iTALE, *XA1* 类NLR抗病蛋白的广谱抗病性已在生产上丧失了作用。

TALE蛋白毒性和无毒性的两面特征决定了*tale*基因型是影响Xoo菌株的小种专化性的重要因素 (Doyle et al., 2013; Boch et al., 2014)。2019–2021年, 在我国南方稻区白叶枯病重发生田块采集病叶, 经分离获得129株Xoo菌株, 通过Southern杂交对新分离的Xoo菌株进行*tale*基因型检测分析, 接种含有

典型抗病基因的水稻材料并调查田间菌株的实际毒力水平, 探究近期白叶枯病在我国南方稻区发生的原因, 旨在为抗病资源发掘与利用、品种培育与布局等病害综合防控措施制定提供依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 病原物培养与植物材料管理

水稻白叶枯病菌在营养肉汤 (Nutrient Broth, NB) 培养基 (1 g·L<sup>-1</sup> Yeast Extract, 3 g·L<sup>-1</sup> Beef Extract, 5 g·L<sup>-1</sup> Polypeptone, 10 g·L<sup>-1</sup> Sucrose) 或营养琼脂 (Nutrient Agar, NA) 培养基 (固体, NB中加入15 g·L<sup>-1</sup> 琼脂糖) 上培养。测试水稻 (*Oryza sativa* L.) (IR24和JG30等品种) 种植于中国农业科学院作物科学研究所网室和海南省三亚市中国农业科学院作物科学研究所南繁基地内, 所有材料均为常规水肥管理, 生长至孕穗期后人工接种白叶枯病原物。

### 1.2 白叶枯病叶采集与病原物分离

从我国南方水稻白叶枯病重发生田块采集具典型病害症状的叶片, 每份样品取1片代表性叶片, 在病健交界处用剪刀剪取约1 cm<sup>2</sup>的叶段。叶段先后在75%乙醇和无菌水中浸泡10秒钟完成表面消毒; 将消毒的叶段用研磨棒 (Axygen, 杭州) 在1.5 mL的离心管中捣碎, 加入500 μL NB培养基, 静置30分钟。悬浮组织液, 用接种环蘸取组织液在NA平板上划线, 挑取黄单胞菌单克隆。分离得到单克隆, 经特异性引物 (张华等, 2008) 检测后, 于-80°C冰箱保存备用。

### 1.3 白叶枯病菌DNA提取与*tale*基因型检测

将平板上新鲜活化的Xoo单菌落转接于NB液体培养基中, 28°C、180 r·min<sup>-1</sup>振荡培养24–36小时后用于提取基因组DNA。选用Axygen公司AxyPrep基因组DNA小量试剂盒 (Axygen, 杭州) 提取细菌基因组DNA, 参照产品使用说明书进行操作。

Southern杂交所需溶液参考地高辛试剂盒 (Roche, 德国) 说明书。基因组DNA经内切酶*Bam*HI消化处理后, 于1%琼脂糖凝胶中, 恒压2 V·cm<sup>-1</sup>电泳20–26小时。凝胶的变性和转膜方法参照《分子克隆实验指导》第二版 (Sambrook et al., 1989), 采用虹吸法转膜。检测*tale*基因选用的探针为*avrXa23* (GU-

732172) *Bam*HI片段(Wang et al., 2014), 探针标记与洗膜方法参照地高辛试剂盒说明书。

#### 1.4 白叶枯病菌的剪叶接种与毒力调查

将 *Xoo* 野生菌株接种到NB培养基中培养24小时, 4 000 ×g离心收集菌体, 用灭菌水悬浮洗涤菌体2次, 然后定容至OD<sub>600</sub>值为1.0。用剪刀蘸取菌液, 通过剪叶接种水稻, 测试水稻品种见表2。每菌株接种5张以上叶片, 接种实验重复2次。接种后15天量取病斑长度, 病斑长度>5 cm的记为感病。接种实验分别于2021年7月在北京中国农业科学院作物科学研究所网室及2022年3月在海南省三亚市中国农业科学院作物科学研究所南繁基地完成。

用Microsoft Excel录入数据、分析结果并作图。用SPSS 17.0软件进行统计分析, 根据不同方法的适用条件, 选择独立样本t检验或单因素方差分析法进行显著性检验。

## 2 结果与讨论

### 2.1 水稻黄单胞菌的分离与分子检测

2019–2021年, 从南方8省(海南、云南、广西、广东、福建、湖南、浙江和江苏)采集病叶标本共103份, 其中有98份分离出水稻黄单胞菌。挑取的病原菌单克隆经特异性引物(张华等, 2008) (OSF1: 5'-TCTGTTG-TGAAAGCCCTG-3', OSR1: 5'-CGGAGCTATATG-CCGTGC-3'; XooCf: 5'-ATATTGGGCTGGTGGGT-GATC-3', XooCR: 5'-TTGGTACGCGATGCCCTTT-GCGACGG-3')检测(图1A), 共分离保存白叶枯病菌129株, 选取代表性采样点的97株菌株用于后续研究。在PCR分子检测过程中, 从福建、浙江和海南等地区的样品中还分离出水稻细菌性条斑病菌(图1B), 说明在这些地区存在白叶枯病与细菌性条斑病(bacterial leaf streak, BLS)混合发生的情况。

### 2.2 水稻黄单胞菌新菌株 *tale* 基因型检测

以 *avrXa23* (GenBank: GU732172.1) 的 *Bam*HI酶切片段为探针, 选用国际标准菌株中毒力较强的代表株系PXO99和PXO86为对照, 经Southern杂交检测, 97株 *Xoo* 菌株被划分为10个 *tale* 基因型(图2)。Southern杂交结果还显示, 相同基因型的 *Xoo* 菌株大多分离自

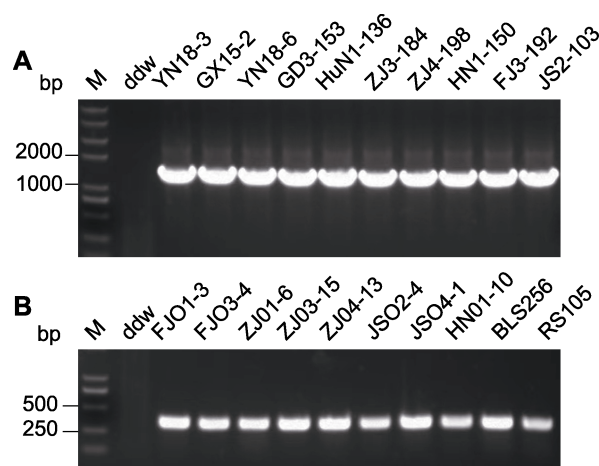


图1 2019–2021年我国南方稻区感病叶片上分离获得的水稻黄单胞菌株PCR检测

(A) 白叶枯病菌的特异性PCR检测; (B) 细菌性条斑病菌的特异性PCR检测。M: 分子量标准; ddw: 空白对照

Figure 1 PCR-based detection of *Xanthomonas oryzae* strains isolated from diseased leaves of Southern China in 2019–2021

(A) Specific PCR detection from *Xoo* strains; (B) Specific PCR detection from *Xoc* strains. M: Marker; ddw: Control

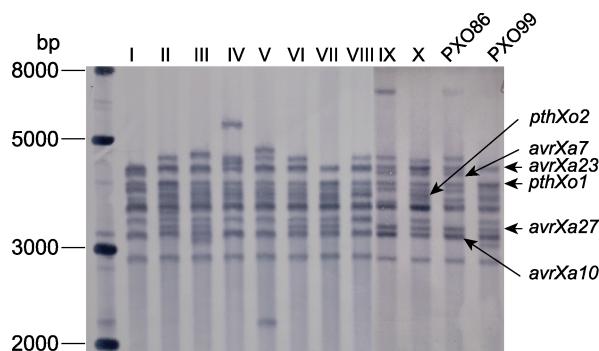


图2 2019–2021年我国南方稻区分离获得的 *Xoo* 菌株 *tale* 基因Southern杂交检测

I–X: 分离菌株代表基因型; PXO86: 菲律宾2号小种; PXO99: 菲律宾6号小种

Figure 2 Southern blot analysis of *tale* genes of *Xoo* strains collected from Southern China in 2019–2021

I–X: Genotypes of isolated strains in this study; PXO86: Philippine race 2; PXO99: Philippine race 6

同一或相邻地区; 其中, 3个基因型(IV、V和VIII)出现频率相对较高(表1), 说明该类基因型菌株属于优势种群。根据条带分子量, 推测本研究分离到的 *Xoo* 菌株基本均携带与无毒基因(*avrXa23*和*avrXa10*)以及

表1 2019–2021年我国南方稻区分离获得的Xoo菌株*tale*基因型  
Table 1 *tale* genotypes of Xoo strains collected from Southern China in 2019–2021

<i>tale</i> genotype	Representative strains	Distribution	Number of strains	Frequency (%)	Putative <i>tale</i> gene
I	YN18-3	Yunnan, Guangxi	4	4.12	<i>pthXo1</i> , <i>avrXa7</i> , <i>avrXa23</i>
II	GX15-2, YN17-8	Yunnan, Guangxi	2	2.06	<i>pthXo1</i> , <i>pthXo2</i> , <i>avrXa23</i> , <i>avrXa27</i>
III	YN17-2, YN18-6	Yunnan, Guangdong	8	8.25	<i>pthXo1</i> , <i>pthXo2</i> , <i>avrXa10</i> , <i>avrXa23</i> , <i>avrXa27</i>
IV	GX15-4, GD3-153	Guangxi, Guangdong, Yunnan	18	18.56	<i>pthXo1</i> , <i>pthXo2</i> , <i>avrXa23</i>
V	ZJ1-121, HuN1-136	Zhejiang, Hunan, Jiangsu	27	27.84	<i>pthXo1</i> , <i>pthXo2</i> , <i>avrXa23</i>
VI	ZJ3-184	Zhejiang, Guangdong	5	5.15	<i>pthXo1</i> , <i>pthXo2</i> , <i>avrXa23</i> , <i>avrXa27</i>
VII	ZJ4-198	Zhejiang, Jiangsu	4	4.12	<i>pthXo1</i> , <i>pthXo2</i> , <i>avrXa23</i> , <i>avrXa27</i>
VIII	GD1-105, HN1-150	Guangdong, Hainan, Zhejiang, Guangxi	22	22.68	<i>pthXo1</i> , <i>pthXo2</i> , <i>avrXa23</i>
IX	FJ3-192	Fujian, Guangxi	4	4.12	<i>pthXo1</i> , <i>avrXa7</i> , <i>avrXa10</i> , <i>avrXa23</i> , <i>avrXa27</i>
X	JS2-103	Jiangsu, Zhejiang	3	3.09	<i>pthXo1</i> , <i>pthXo2</i> , <i>avrXa7</i> , <i>avrXa10</i> , <i>avrXa23</i> , <i>avrXa27</i>

主效毒性因子(*pthXo1*)分子量一致的片段; 仅在3个基因型(I、IX和X)中检测到与*avrXa7*分子量大小一致的条带; 有4个基因型(I、IV、V和VIII)中未检测到与*avrXa27*分子量相近的条带。因此, 我们推测携带*Xa23*等*R*基因的水稻在田间表现广谱抗病性, 而*avrXa27*等不能赋予水稻新品种广谱抗病性。

从基因型的地域分布上看, 云南、广东、广西和浙江地区Xoo的基因型种类多、遗传多样性水平高, 表明这些区域白叶枯病暴发成灾的风险相对较高(表1)。本研究检测到频次最高的基因型为V (27.84%), 从条带类型和数量来看, 基因型V的*tale*基因条带类型和数量最多, 暗示Xoo菌株进化的趋势可能是携带更多、更丰富的*tale*基因, 间接证明TALE是Xoo最重要的毒性因子, 也是菌株毒性变异的主要因素。与标准菌株PXO86和PXO99相比, 本研究新分离的Xoo菌株条带数量明显增加。PXO86和PXO99为分离自20世纪80年代菲律宾的强毒菌株, 从*tale*基因型上判断, 我国的Xoo菌株已经发生了很大变异, 提示白叶枯病在我国的危害风险在不断加大。

2.3 各基因型代表菌株的毒力调查分析

从*tale*基因型检测结果推测, 分离自南方8省的Xoo菌株携带的主要毒性因子包括*pthXo1*、*pthXo2*和*avrXa7*。为调查评估新分离的白叶枯菌株的毒力情况, 本研究选用8个携带已知抗病基因的水稻材料及3个IR24的野生稻渗入系(5024、4059和4064)作为抗性

测试品种, 其中KΔSWEET是感病品种Kitaake的EBE<sub>PthXo1</sub> (突变型: TGCATCTCCCCCTACCAC)和EBE<sub>AvrXa7</sub> (突变型: TATATAAACCCCCTCAGGTG-CTAA)编辑突变体。从10个基因型中选取1个代表菌株, 通过剪叶接种水稻材料, 15天后量取病斑长度(表2)。

接种结果显示, 优势基因型(IV、V和VIII)菌株毒性较强, 在感病对照品种IR24和JG30上的病斑接近或大于10 cm; 生产上广泛应用的传统抗病基因*Xa3* (IRBB3)和*Xa4* (IRBB4)对大部分(>60%基因型)菌株已经丧失抗性, 不再具有育种价值, 而广谱抗病基因*xa5*、*Xa7*和*Xa23*仍对大部分测试的新菌株具有抗性; Kitaake是EBE<sub>PthXo2</sub>的天然突变体, ZJ4-198 (VII)在KΔSWEET上的病斑长度为7.83 cm, 说明ZJ4-198可能携带特殊PthXo2类主效毒性因子, 可激活OsSweet13<sub>Kil</sub>的表达。5024、4059和4064是本研究团队前期构建的野生稻渗入系, 携带新的抗白叶枯病基因。本研究的接种实验表明, 3个新的野生稻渗入系携带的抗病基因对测试菌株具有广谱抗病性, 可作为培育抗病品种的新资源。

各代表菌株接种结果(表2)还显示, 强毒菌株(基因型II、V、VII和VIII等)在多个材料(IRBB3、IRBB4和4064等)上可造成长度大于5 cm的病斑(感病)。从地域上看, 强毒菌株在云南、广西、广东、湖南、浙江、海南和江苏等地均有分布, 但各地强毒菌株的基因型存在一定差异, 分布在浙江的强毒菌株基因型最

**表2** 携带不同抗性基因的水稻品种中Xoo 10个*tale*基因型代表菌株的毒力评价**Table 2** Virulence evaluation of 10 *tale* genotypes of Xoo strains in rice cultivars containing different *R* genes

Strains	<i>tale</i> ge- notype	IR24	JG30	IRBB3	IRBB4	IRBB5	IRBB7	IRBB21	IRBB27	CBB23 KΔSWEET	5024	4059	4064	
YN18-3	I	2.17± 1.21 b	11.00± 1.25 a	0.50± 0.32 b	0.50± 0.69 b	0.50± 0.04 b	0.10± 0.00 b	0.50± 0.31 b	0.50± 0.01 b	0.30± 0.01 b	1.90± 0.40 b	0.10± 0.00 b	0.35± 0.01 b	0.35± 0.05 b
GX15-2	II	9.00± 0.69 b	14.00± 0.82 a	8.67± 2.75 b	7.17± 0.05 c	1.67± 0.02 c	2.50± 0.01 d	4.44± 0.45 c	0.10± 0.00 d	1.88± 0.03 d	2.13± 0.45 d	0.10± 0.00 d	0.11± 0.02 d	14.33± 1.25 a
YN18-6	III	9.83± 0.02 b	18.83± 0.96 a	15.67± 0.01 a	3.50± 0.03 c	0.40± 0.01 d	0.48± 0.17 d	0.50± 0.00 d	0.32± 0.01 d	0.10± 0.02 d	1.40± 0.01 d	0.20± 0.01 d	0.60± 0.01 d	2.42± 0.01 d
GD3-153	IV	8.17± 0.90 b	17.00± 2.58 a	8.67± 2.98 b	0.50± 0.01 d	0.10± 0.00 d	0.10± 0.02 d	3.38± 0.02 c	0.50± 0.02 d	0.10± 0.01 d	1.08± 1.92 d	0.10± 0.00 d	0.10± 0.01 d	7.00± 1.63 b
HuN1-136	V	9.50± 0.58 b	11.33± 2.08 a	5.17± 0.94 c	6.75± 1.34 c	0.10± 0.02 d	0.10± 0.01 d	14.83± 1.25 a	0.20± 0.01 d	0.10± 0.10 d	0.75± 0.22 d	3.50± 0.01 c	1.17± 0.02 d	9.92± 1.21 b
ZJ3-184	VI	6.33± 0.37 b	14.50± 1.83 a	7.75± 0.02 b	0.20± 0.03 c	0.10± 0.00 c	2.75± 0.02 c	0.10± 0.00 c	0.10± 0.00 c	0.88± 0.32 c	0.35± 0.15 c	0.10± 0.00 c	1.33± 0.01 c	2.50± 0.14 c
ZJ4-198	VII	9.50± 1.21 b	12.00± 1.07 a	6.67± 1.70 c	7.33± 1.61 c	1.75± 0.32 d	0.10± 0.01 d	2.42± 0.03 d	0.10± 0.00 d	0.10± 0.01 d	7.83± 0.21 c	0.10± 0.02 d	0.50± 0.01 d	5.83± 0.25 c
HN1-150	VIII	10.33± 0.69 b	17.17± 1.29 a	14.00± 0.94 a	6.17± 1.12 c	0.33± 0.01 d	0.53± 0.25 d	3.86± 0.01 d	8.67± 3.34 c	1.21± 0.24 d	1.10± 0.24 d	4.00± 0.95 d	4.83± 0.05 c	8.17± 0.14 c
FJ3-192	IX	6.67± 1.97 b	8.17± 1.34 ab	4.75± 1.15 bc	4.92± 0.69 bc	0.10± 0.00 c	5.08± 0.37 b	1.00± 0.01 c	0.10± 0.02 c	1.42± 1.28 c	1.50± 0.37 c	0.83± 0.01 c	2.67± 0.01 c	10.33± 0.17 a
JS2-103	X	4.83± 0.96 c	12.83± 0.75 a	7.17± 0.69 b	1.67± 1.18 d	0.50± 0.00 d	1.93± 0.07 d	2.17± 0.00 d	0.10± 0.00 d	0.25± 0.07 d	1.58± 0.43 d	0.50± 0.02 d	0.10± 0.00 d	4.83± 2.89 c

采用剪叶接种15天后的水稻病斑长度(cm)作为毒力评价指标, 数值为平均值±标准差。同一行不同小写字母表示差异显著( $P<0.05$ )。

Lesion length (cm) of 15 days post-inoculation by leaf clipping in rice was used as an index for virulence assessment, and the values are means±standard deviations (SD). Values within a line followed by different lowercase letters are significantly different at  $P<0.05$ .

丰富, 提示病原菌可能通过某种途径(如种子调运和雨水传播)发生交流。浙江是台风集中登陆点与通过路径, 病原菌的交流与进化是否与台风有关联, 是值得研究的科学问题。

## 2.4 讨论

新品种培育需重视优异抗白叶枯病基因的引入。自20世纪90年代以来, 由于植物保护综合防控技术和作物分子育种技术水平的提高, 白叶枯病未能在生产上造成类似20世纪60–80年代的严重损失。但近几年白叶枯病“老病新发”, 结合对种植品种的初步调查, 我们认为主要原因是新品种培育过程中忽视了优异抗病基因的引入。以2020年浙江兰溪、金华和富阳等地区为例, 这些地区白叶枯病发病严重, 本研究从该地区的嘉禾优、华浙优和春优43等品种中分离得到大量的V型菌。V型菌虽然可以克服Xa3、Xa4和Xa21等生产应用较早的抗病基因, 但仍无法克服Xa7和Xa23等优异抗病基因。

长期以来, 我国水稻育种骨干亲本携带的抗白叶

枯病基因是Xa3和Xa4等, 由于抗性选择压力及病原物的变异, 强毒菌株上升为优势菌群, 传统抗病基因资源在田间丧失抗性; 区域性成灾和检疫性病害等特点也造成白叶枯病在水稻病情汇报中未得到足够重视, 影响育种过程中抗病基因的更换和轮替, 造成病害暴发频次增加。本研究分离获得的Xoo菌株接种结果提示, 种植抗病品种仍是目前控制水稻细菌性病害最经济、有效且环保的措施。现有的优异抗白叶枯病基因资源包括xa5、Xa7和Xa23等, 对新分离自病害重发生区的Xoo菌株仍具有广谱抗病性, 水稻抗病育种中需要重新重视抗白叶枯病基因的引入。

田间病原菌毒力和遗传多样性等的监测需常态化。植物-病原菌间的相互斗争没有终点, 作物病害暴发往往伴随着病原菌的变异(Zhou and Zhang, 2020)。“知己知彼, 百战不殆”, 田间病原菌遗传多样性和毒力监测对于保障我国水稻生产不可或缺, 是指导品种培育和抗病品种布局的主要依据。本研究在*tale*基因型检测中, 发现新分离的菌株多携带近似*avrXa7*和*avrXa23*的片段; 剪叶接种的结果也证明,

*Xa7*和*Xa23*等抗病基因对病害暴发区域内的菌株具有优异抗病性。考虑到基因的抗病特征及常规育种程序等因素,我们建议水稻抗病育种中选用显性的*Xa7*和*Xa23*等基因。目前,抗水稻细菌性条斑病基因资源稀缺,在白叶枯病和细菌性条斑病均发生严重的区域,水稻品种培育过程中可以考虑引入*xa5*基因。*xa5*可以提高水稻对两大水稻细菌性病的抗性,但由于其为隐性基因,在育种中利用相对不方便,因此挖掘广谱优异抗细菌性条斑病基因资源势在必行。

此外,还需重视新的优异抗病基因资源的挖掘与利用。近年来,水稻-黄单胞菌互作的机理研究取得突破性进展,科研人员通过基因编辑等生物技术方法成功创制了一批广谱且持久抗细菌病害的水稻材料。但在国内生物安全法规等因素的限制下,新创制的抗病材料目前还无法直接应用于水稻新品种的培育,挖掘和利用天然或人工诱变基因资源是目前水稻抗病育种的主要途径。野生稻中蕴含着大量的优异基因资源(如*Xa21*和*Xa23*),是抗白叶枯病基因的重要来源。目前正在建设中的三亚世界野生稻种质资源圃,将实现入圃保存1万份野生稻种质资源的目标,旨在更好地助力种质资源保护及开发利用,进而推动种业振兴与农业科技原始创新。

**致谢** 感谢中国水稻研究所黄世文研究员、云南省农业科学院粮食作物研究所陈于敏研究员、福建省农业科学院水稻研究所张建福研究员、南京农业大学宋从凤教授、广西农业科学院梁云涛研究员以及广东省农业科学院王福军副研究员在本研究样品采集过程中提供的帮助。

## 参考文献

张华, 姜英华, 胡白石, 刘凤权, 许志刚 (2008). 利用PCR技术专化性检测水稻细菌性条斑病菌. 植物病理学报 **38**, 1–5.

Antony G, Zhou JH, Huang S, Li T, Liu B, White F, Yang B (2010). Rice *xa13* recessive resistance to bacterial blight is defeated by induction of the disease susceptibility gene *Os-11N3*. *Plant Cell* **22**, 3864–3876.

Boch J, Bonas U, Lahaye T (2014). TAL effectors-pathogen strategies and plant resistance engineering. *New Phytol* **204**, 823–832.

Breia R, Conde A, Badim H, Fortes AM, Gerós H, Granell A (2021). Plant SWEETs: from sugar transport to plant-pathogen interaction and more unexpected physiological roles. *Plant Physiol* **186**, 836–852.

Doyle EL, Stoddard BL, Voytas DF, Bogdanove AJ (2013). TAL effectors: highly adaptable phyto-bacterial virulence factors and readily engineered DNA-targeting proteins. *Trends Cell Biol* **23**, 390–398.

Ji CH, Ji ZY, Liu B, Cheng H, Liu H, Liu SZ, Yang B, Chen GY (2020). *Xa1* Allelic *R* genes activate rice blight resistance suppressed by interfering TAL effectors. *Plant Commun* **1**, 100087.

Ji ZY, Guo W, Chen XF, Wang CL, Zhao KJ (2022). Plant executor genes. *Int J Mol Sci* **23**, 1524.

Ji ZY, Ji CH, Liu B, Zou LF, Chen GY, Yang B (2016). Interfering TAL effectors of *Xanthomonas oryzae* neutralize *R*-gene-mediated plant disease resistance. *Nat Commun* **7**, 13435.

Ji ZY, Wang CL, Zhao KJ (2018). Rice routes of countering *Xanthomonas oryzae*. *Int J Mol Sci* **19**, 3008.

Ji ZY, Zakria M, Zou LF, Xiong L, Li Z, Ji GH, Chen GY (2014). Genetic diversity of transcriptional activator-like effector genes in Chinese isolates of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola*. *Phytopathology* **104**, 672–682.

Niño-Liu DO, Ronald PC, Bogdanove AJ (2006). *Xanthomonas oryzae* pathovars: model pathogens of a model crop. *Mol Plant Pathol* **7**, 303–324.

Nowack MK, Holmes DR, Lahaye T (2022). TALE-induced cell death executors: an origin outside immunity? *Trends Plant Sci* **27**, 536–548.

Oliva R, Ji CH, Atienza-Grande G, Huguet-Tapia JC, Perez-Quintero A, Li T, Eom JS, Li CH, Nguyen H, Liu B, Auguy F, Sciallano C, Luu VT, Dossa GS, Cunnac S, Schmidt SM, Slamet-Loedin IH, Vera Cruz C, Szurek B, Frommer WB, White FF, Yang B (2019). Broad-spectrum resistance to bacterial blight in rice using genome editing. *Nat Biotechnol* **37**, 1344–1350.

Perez-Quintero AL, Szurek B (2019). A decade decoded: spies and hackers in the history of TAL effectors research. *Annu Rev Phytopathol* **57**, 459–481.

Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989). Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd edn. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory.

Wang CL, Qin TF, Yu HM, Zhang XP, Che JY, Gao Y, Zheng CK, Yang B, Zhao KJ (2014). The broad bacterial blight resistance of rice line CBB23 is triggered by a novel transcription activator-like (TAL) effector of *Xanthomonas*

- oryzae* pv. *oryzae*. *Mol Plant Pathol* **15**, 333–341.
- White FF, Yang B (2009). Host and pathogen factors controlling the rice-*Xanthomonas oryzae* interaction. *Plant Physiol* **150**, 1677–1686.
- Xu ZY, Xu XM, Gong Q, Li ZY, Li Y, Wang S, Yang YY, Ma WX, Liu LY, Zhu B, Zou LF, Chen GY (2019). Engineering broad-spectrum bacterial blight resistance by simultaneously disrupting variable TALE-binding elements of multiple susceptibility genes in rice. *Mol Plant* **12**, 1434–1446.
- Xu ZY, Zou LF, Ma WX, Cai LL, Yang YY, Chen GY (2017). Action modes of transcription activator-like effectors (TALEs) of *Xanthomonas* in plants. *J Integr Agric* **16**, 2736–2745.
- Yang B, Sugio A, White FF (2006). *Os8N3* is a host disease-susceptibility gene for bacterial blight of rice. *Proc Natl Acad Sci USA* **103**, 10503–10508.
- Zhang BM, Zhang HT, Li F, Ouyang YD, Yuan M, Li XH, Xiao JH, Wang SP (2020). Multiple alleles encoding atypical NLRs with unique central tandem repeats in rice confer resistance to *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. *Plant Commun* **1**, 100088.
- Zhou JH, Peng Z, Long JY, Sosso D, Liu B, Eom JS, Huang S, Liu SZ, Vera Cruz C, Frommer WB, White FF, Yang B (2015). Gene targeting by the TAL effector PthXo2 reveals cryptic resistance gene for bacterial blight of rice. *Plant J* **82**, 632–643.
- Zhou JM, Zhang YL (2020). Plant immunity: danger perception and signaling. *Cell* **181**, 978–989.

## Genotypic Diversity and Pathogenicity of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* Isolated from Southern China in 2019–2021

Chuanyu Tian<sup>1, 2†</sup>, Yanli Fang<sup>1, 2†</sup>, Qing Shen<sup>3</sup>, Hongjie Wang<sup>1, 2</sup>, Xifeng Chen<sup>1</sup>, Wei Guo<sup>1</sup>  
Kaijun Zhao<sup>2</sup>, Chunlian Wang<sup>2, 4\*</sup>, Zhiyuan Ji<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>College of Life Sciences, Zhejiang Normal University, Jinhua 321004, China; <sup>2</sup>National Key Facility for Crop Gene Resources and Genetic Improvement (NFCRI), Institute of Crop Sciences, Chinese Academy of Agriculture Sciences (CAAS), Beijing 100081, China; <sup>3</sup>Suzhou Municipal Plant Protection and Quarantine Station, Suzhou 215006, China; <sup>4</sup>National Nanfan Research Institute (Sanya), Chinese Academy of Agricultural Sciences, Sanya 572024, China

**Abstract** Although resistant cultivars have been widely employed as the most economical and effective way to control bacterial blight (BB) in rice, the outbreak of BB reoccurred in Southern China in recent years. In order to investigate the cause for the recent outbreak of BB in China, we collected the rice leaves with typical BB symptom from paddies in eight southern provinces (Hainan, Yunnan, Guangxi, Guangdong, Fujian, Hunan, Zhejiang, and Jiangsu) in 2019 to 2021. A total of 97 *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (*Xoo*) strains isolated from the BB-diseased leaves were divided into 10 genotypes by Southern hybridization detection of *transcription activator-like effectors* (*tale*), of which genotype V was the representative of the dominant population. The representative strains of each genotype were applied to inoculated rice accessions with different resistance (*R*) gene. The inoculation results revealed that traditional major *R* genes such as *Xa3* and *Xa4* were only effective against a small number of the newly isolated *Xoo* strains, whereas *Xa7* and *Xa23* still had broad-spectrum resistance to all (or the majority of) these strains. We concluded that the cause for the recent outbreak of rice BB in Southern China is most likely the insufficient use of effective BB resistance genes in the new rice varieties. Exploring and utilizing excellent resistance gene resources is still the most ideal way to prevent and control BB.

**Key words** bacterial blight, resistance gene, *transcription activator-like effector*, strain virulence, rice

Tian CY, Fang YL, Shen Q, Wang HJ, Chen XF, Guo W, Zhao KJ, Wang CL, Ji ZY (2023). Genotypic diversity and pathogenicity of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* isolated from Southern China in 2019–2021. *Chin Bull Bot* **58**, 743–749.

† These authors contributed equally to this paper

\* Authors for correspondence. E-mail: wangchunlian@caas.cn; jizhiyuan@caas.cn

(责任编辑: 朱亚娜)