

# 云南省水稻稻瘟病菌无毒基因 *AVR-Pia* 变异及水稻抗性基因 *Pia* 的有效性

王 群<sup>1</sup> 陆 琳<sup>2</sup> 何成兴<sup>1</sup> 伏 雪<sup>1</sup> 许明辉<sup>3</sup> 李进斌<sup>1\*</sup>

(1. 云南省农业科学院农业环境资源研究所, 昆明 650205; 2. 云南省农业科学院花卉研究所, 昆明 650205; 3. 云南省农业科学院生物技术与种质资源研究所, 昆明 650205)

**摘要:** 为进一步了解田间稻瘟病菌 *Magnaporthe oryzae* 群体中 *AVR-Pia* 基因的分布及变异, 利用水稻单基因系 IRBLA-C 水稻品种对自云南省 13 个市(州)采集分离得到的 471 株稻瘟病菌菌株进行抗性基因 *Pia* 有效性测定; 利用无毒基因 *AVR-Pia* 特异性标记对 471 株稻瘟病菌菌株进行 PCR 检测和测序, 并分析稻瘟病菌群体中无毒基因 *AVR-Pia* 的分布及 DNA 结构变异; 利用有效性结果和 PCR 检测结果对 471 株菌株进行反应型划分, 筛选鉴定菌株; 利用鉴定菌株对云南省 112 份地方稻种进行 *Pia* 基因鉴定。结果表明, 在 471 株稻瘟病菌菌株中, 对含有 *Pia* 基因的水稻单基因系 IRBLA-C 表现为抗病和感病的菌株数分别为 139 株和 332 株, 所占比例分别为 29.5% 和 70.5%; 在 471 株稻瘟病菌菌株中, 分别有 244 株和 227 株菌株含有无毒基因 *AVR-Pia* 和不含有无毒基因 *AVR-Pia*, 所占比例分别为 51.8% 和 48.2%, 无毒基因 *AVR-Pia* 主要为完全缺失变异; 在 471 株稻瘟病菌菌株中, A<sup>-</sup> 和 V<sup>+</sup> 反应型菌株数分别为 56 株和 161 株, 共 217 株, 占总菌株数的 46.1%, 在 13 个市(州)稻瘟病菌群体中, A<sup>-</sup> 和 V<sup>+</sup> 反应型菌株所占比例差异较大, 其中在普洱市、红河哈尼族彝族自治州、昭通市、玉溪市 4 个市(州)的比例较大, 分别为 77.8%、57.1%、52.1% 和 50.0%; 在 112 份云南省地方稻种质资源中, 有 20 份地方稻品种含有抗性基因 *Pia*, 主要分布在 9 个市(州)中。表明云南省 13 个市(州)绝大部分水稻产区水稻 *Pia* 基因已丧失抗性, 含 *Pia* 基因的水稻种质在云南省分布较广。

**关键词:** 水稻; 稻瘟病菌; 进化; 效应子; 无毒基因 *AVR-Pia*

## Variation of avirulence gene *AVR-Pia* of *Magnaporthe oryzae* and the effectiveness of rice blast resistance gene *Pia* in Yunnan Province

WANG Qun<sup>1</sup> LU Lin<sup>2</sup> HE Chengxing<sup>1</sup> FU Xue<sup>1</sup> XU Minghui<sup>3</sup> LI Jinbin<sup>1\*</sup>

(1. Agricultural Environment and Resources Research Institute, Yunnan Academy of Agricultural Sciences, Kunming 650205, Yunnan Province, China; 2. Flower Research Institute, Yunnan Academy of Agricultural Sciences, Kunming 650205, Yunnan Province, China; 3. Institute of Biotechnology and Genetic Resources, Yunnan Academy of Agricultural Sciences, Kunming 650205, Yunnan Province, China)

**Abstract:** In order to further know distribution and variation of *AVR-Pia* of *Magnaporthe oryzae*, total 471 isolates of *M. oryzae* from 13 cities (prefectures) in Yunnan Province of China were used for pathogenicity test to examine the effectiveness of rice blast resistance gene *Pia* using monogenic line IRBLA-C. Genomic DNA of 471 isolates of *M. oryzae* collected and isolated from different rice-growing-regions in Yunnan Province of China were used for PCR amplification and sequencing to examine the existence and structure variation of *AVR-Pia* using gene specific PCR markers. The reaction types were

classified base on the effectiveness and PCR detection results, and from which to screen the isolates to identify *Pia*. The *Pia* was identified among 112 local rice varieties collected from Yunnan Province by using the identification isolates. The results showed that 139 and 332 isolates among the 471 rice blast isolates were avirulent and virulent to the *Pia*-containing monogenic line IRBLA-C, with the proportion of 29.5% and 70.5%, respectively. Among 471 rice blast isolates, 244 isolates of *M. oryzae* carry *AVR-Pia* and 227 isolates without *AVR-Pia*, accounting for 51.8% and 48.2%, respectively. The *AVR-Pia* mainly showed the mutation of complete deletion manner. The 56 and 161 isolates were belonging to the reactive type of  $A^-$  and  $V^+$  respectively, and with the total proportion of 46.1% among 471 detected isolates. The proportion of types  $A^-$  and  $V^+$  were different in 13 cities (prefectures) of Yunnan Province, the proportion of  $A^-$  and  $V^+$  was higher in the isolates population from Puer City, Honghe Hani and Yi Autonomous Prefecture, Zhaotong City, and Yuxi City, the proportion was 77.8%, 57.1%, 52.1% and 50.0%, respectively. A total of 20 of 112 local rice varieties holding rice blast resistance gene *Pia*, and the 20 local rice varieties mainly distributed in nine cities (prefectures) of Yunnan Province. Those results showed that *Pia* had limited effects in most of rice production areas in 13 cities (prefectures) of Yunnan Province, and the rice germplasm containing *Pia* gene was widely distributed in Yunnan Province.

**Key words:** rice; *Magnaporthe oryzae*; evolution; effector; *AVR-Pia*

由稻瘟病菌 *Magnaporthe oryzae* 引起的稻瘟病是全球水稻产区最具毁灭性的病害。主效和微效抗性基因的利用是控制稻瘟病最经济、生态友好的方法。到目前为止,水稻中已有 84 个主效基因被鉴定出,其中 24 个主效基因已被克隆(国家水稻数据中心 [http://www.ricedata.cn/gene/gene\\_pi.htm](http://www.ricedata.cn/gene/gene_pi.htm)),已有部分主效基因被广泛用于水稻抗性育种中。然而随着抗稻瘟病水稻的长期种植,稻瘟病菌受到定向选择压力,病原菌中的无毒基因发生快速地适应性变异,导致抗性水稻品种的抗性丧失(Khang et al., 2008)。因此,鉴定各水稻产区稻瘟病菌的无毒基因,分析其无毒基因的分布及变异情况,可为水稻抗病育种和抗病基因的合理利用提供依据。

水稻主效抗病基因与相应无毒基因 *AVR* 之间的互作符合“基因对基因”的互作模式(Yasuda et al., 2015),即稻瘟病菌中的无毒基因能被水稻中相对应的主效抗性基因识别,已有 *AVR-Pita* (Orbach et al., 2000)、*AVR-Pizt* (Li et al., 2009)、*AVR1-CO39* (Farman & Leong, 1998)、*ACE1* (Fudal et al., 2005)、*AVR-Pia*、*AVR-Pii*、*AVR-Pik/km/kp* (Yoshida et al., 2009)、*PWL1* (Kang et al., 1995)、*PWL2* (Sweigard et al., 1995)、*AVR-Pib* (Zhang et al., 2015)、*AVR-Pi9* (Wu et al., 2015) 和 *AVR-Pi54* (Ray et al., 2016) 12 个无毒基因被克隆。为了逃避水稻主效抗性基因的识别,稻瘟病菌中的无毒基因具有快速改变能力,其变异方式主要有缺失突变(部分缺失和完全缺失)、点

突变和插入突变 3 种。不同无毒基因,其变异方式也不同,如无毒基因 *ACE1* 在外显子区的转座元件发生插入突变(Fudal et al., 2005);无毒基因 *AVR-Pizt* 和 *AVR-Pita1* 中发生 Pot3 插入突变(Kang et al., 2001; Zhou et al., 2007; Li et al., 2009);无毒基因 *AVR-Pib* 中发生转座元件的插入、缺失突变(部分和完全缺失)、点突变 3 种变异方式(Zhang et al., 2015),以上这些变异导致产生新的毒性位点,使无毒功能丧失。无毒基因 *AVR-Pia* 从日本菌株 Ina168 中克隆,编码由 85 个氨基酸组成的分泌蛋白,含有 2 个保守的 motif,该蛋白能被水稻抗性基因 *Pia* 蛋白所识别,并引起防御响应(Yoshida et al., 2009)。*Pia* 基因位于水稻第 11 号染色体短臂上(Wang et al., 2001),由 2 个相邻的 *NBS-LRR* 基因构成(Okuyama et al., 2011)。Cesari et al. (2013) 研究结果表明,水稻中抗性蛋白 RGA4/RGA5 通过直接结合的方式识别稻瘟病菌效应子 *AVR-Pia* 和 *AVR-CO39*,稻瘟病菌无毒基因 *AVR-Pia* 与水稻 RGA5 中的 RATX1 结构域直接互作,释放 RGA4,进而激活抗病反应(Césari et al., 2014; Ortiz et al., 2017)。在湖南省的 182 株稻瘟病菌群体中,86.8% 以上的菌株含有无毒基因 *AVR-Pia* (Xing et al., 2017),而在我国北方谷子主产区的 76 株谷瘟病菌群体中,仅有 42.1% 菌株含有无毒基因 *AVR-Pia*,无毒基因 *AVR-Pia* 的变异类型主要为无毒基因 *AVR-Pia* 的完全缺失突变(任世龙等, 2018)。然而,云南省水稻产区无毒基因 *AVR-Pia* 的分布及

变异状况、水稻抗性基因 *Pia* 的抗性持久性及有效性尚不清楚。

本研究利用水稻单基因系 IRBLa-C 水稻品种对自云南省 13 个市(州)采集的 471 株稻瘟病菌菌株进行抗性基因 *Pia* 有效性测定;利用无毒基因 *AVR-Pia* 特异性标记,对 471 株菌株进行 PCR 检测和测序,分析稻瘟病菌群体中无毒基因 *AVR-Pia* 的分布及 DNA 结构变异;利用有效性结果和 PCR 检测结果对 471 株菌株进行反应型划分,筛选鉴定菌株;利用鉴定菌株对云南省 112 份地方稻种进行 *Pia* 基因的鉴定,以期对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

供试水稻品种和菌株:含有抗性 *Pia* 基因的水稻单基因系 IRBLa-C 水稻品种、20 世纪 90 年代自云南省 13 个市(州)采集鉴定的 112 份地方稻水稻品种(表 1),均于云南省农业科学院生物技术与种质资源研究所种质库保存,水稻感病对照品种为丽江新团黑谷,由本实验室保存。于 2010—2014 年自云南省 13 个市(州)水稻产区采集并分离的 471 株稻瘟病菌单孢菌株(表 1),于  $-20^{\circ}\text{C}$  保存。

培养基:燕麦琼脂培养基:燕麦片 30 g、琼脂 15 g、葡萄糖 10 g、蒸馏水 1 L;LB(Luria-Broth)液体培养基:葡萄糖 10 g、酵母粉 3 g、蒸馏水 1 L,  $121^{\circ}\text{C}$  灭菌 25 min。

试剂及仪器:  $2\times\text{Taq}$  PCR Master Mix 试剂、DNA Marker D2000,天根生化科技(北京)有限公司;其它试剂均为国产分析纯。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;100 型保湿箱,青州市迪生自动化设备有限公司。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 稻瘟病菌孢子悬浮液的制备

将供试 471 株稻瘟病菌单孢菌株分别接种到燕麦琼脂培养基上,于  $25^{\circ}\text{C}$  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  $4\times 10^5$  个/mL 的孢子悬浮液,加入 0.02% Tween-20 后备用。

#### 1.2.2 抗性基因 *Pia* 对云南省稻瘟病菌的有效性测定

将含有抗性基因 *Pia* 的水稻单基因系 IRBLa-C 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  $15\text{ cm}\times 9.5\text{ cm}\times 5.3\text{ cm}$  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长 30 m、宽 12 m 的日光温室内育苗,待水稻苗长至 3~4 叶时,分别喷雾接种浓度为  $4\times 10^5$  个/mL 的 471 株稻瘟病菌孢子悬浮液 20 mL。接种后先将育苗盒置于温度  $24\sim 26^{\circ}\text{C}$ 、相对湿度 100% 的保湿箱内培养 18~20 h,再移回温室内培养,7~10 d 后待感病对照品种充分发病后,调查单基因系 IRBLa-C 水稻品种稻瘟病发病情况。根据发病情况并进行分级,分级标准: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。参照李成云等(1997)方法,将发病级别为 0~2 级的菌株视为对含有 *Pia* 基因的水稻单基因系 IRBLa-C 水稻品种表现为抗病,将发病级别为 3~5 级的菌株视为对含有 *Pia* 基因的水稻单基因系 IRBLa-C 水稻品种表现为感病,分别计算抗病菌株百分比和感病菌株百分比。

#### 1.2.3 稻瘟病菌菌株 *AVR-Pia* 基因 PCR 检测及测序

利用无毒基因 *AVR-Pia* 特异性标记对稻瘟病菌单孢菌株进行 PCR 特异性检测。将 471 株稻瘟病菌单孢菌株接种到燕麦琼脂培养基上,于  $25^{\circ}\text{C}$  活化培养 7 d 后,将菌丝块接种到 LB 液体培养基中,于  $25^{\circ}\text{C}$ 、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  $-20^{\circ}\text{C}$  保存。利用 *AVR-Pia* 基因特异性标记引物 pex22F (5'-ACACAACAACCTCCATTA-3') 和 pex22R (5'-CGGCAGAAATCATAGTAT-3') (Yoshida et al., 2009) 对 *AVR-Pia* 位点进行 PCR 扩增,引物由英潍捷基(上海)贸易有限公司合成。50  $\mu\text{L}$  反应体系:  $2\times\text{Taq}$  PCR Master Mix 25  $\mu\text{L}$ 、10  $\mu\text{mol/L}$  上下引物各 1  $\mu\text{L}$ 、基因组 DNA 2  $\mu\text{L}$ 、 $\text{ddH}_2\text{O}$  21  $\mu\text{L}$ 。PCR 反应程序:  $95^{\circ}\text{C}$  预变性 3 min;  $95^{\circ}\text{C}$  变性 30 s,  $60^{\circ}\text{C}$  退火 30 s,  $72^{\circ}\text{C}$  延伸 30 s, 29 个循环;  $72^{\circ}\text{C}$  再延伸 7 min。于  $4^{\circ}\text{C}$  保存,阴性 PCR 扩增产物重复 3 次。用 1.5% 琼脂糖对产物进行电泳检测,并用凝胶成像系统进行拍照,阳性产物和阴性产物为含有无毒基因 *AVR-Pia* 和不含有无毒基因 *AVR-Pia* 的菌株。

表1 本研究所用的自云南省采集的稻瘟病菌菌株及地方稻种

Table 1 Isolates of *Magnaporthe oryzae* and local rice varieties used in this study collected from Yunnan Province

采集地 Location	稻瘟病菌菌株 Isolate		地方水稻品种 Local rice variety	
	菌株数 No. of isolates	菌株编号 Code of isolates	稻种数量 No. of accessions	水稻品种 Rice variety
保山市 Baoshan City	119	YNC1-YNC119	7	小花壳、大白谷1、严霜谷、小禄糯、朝鲜糯、旱板所、花禄丰 Xiaohuake, Dabaigu 1, Yanshuanggu, Xiaolunuo, Chaoxiannuo, Hanbansuo, Hualufeng
楚雄市 Chuxiong City	43	YNX1-YNX43	0	-
大理市 Dali City	0	-	2	大理早粳、红苕花谷(红褐壳) Dalizaoxian, Hongcenuagu(Hongheke)
西双版纳傣族自治州 Xishuangbanna Dai Autonomous Prefecture	18	YNB1-YNB18	15	毫补卡、切些谷、长毛谷2、曼丫谷、毫解戛、大红谷、八月 糯、毫短、老来红、千哥2、毫鼋哄咬、毫好鼋、毫鼋咬、早糯、 珍白18 Haobuka, Qiexiegu, Changmaogu 2, Manyagu, Haojiejia, Dahonggu, Bayuenuo, Haoduan, Laolaihong, Qiange 2, Haoyu- anhongyao, Haohaoyuan, Haoyuanyao, Hannuo, Zhenbai 18
昆明市 Kunming City	31	YNK1-YNK31	1	长芒谷 Changmanggu
丽江市 Lijiang City	22	YNL1-YNL22	11	矮花白、老来红、红米麻黏、大麻黏、红苕大定、小白谷、红毛 羊谷、白杂1号、54752、选6号、七河大红谷 Aihuabai, Laolaihong, Hongmimazhan, Damazhan, Hongmang- dading, Xiaobaigu, Hongmaoyanggu, Baiza1, 54752, Xuan 6, Qihedahonggu
临沧市 Lincang City	17	YNA1-YNA17	18	山令谷、背子糯、盐发谷、大黄皮糯、老楞谷、矮桩谷、冷水糯1、 黄皮糯、大玉谷、二老鼠牙、鸡叫糯、冷水麻线谷、冷水糯2、 黄瓜糯、小红谷、花二早、水白石甸、本地饭谷 Shanlinggu, Beizhuo, Yanfagu, Dahuangpinuo, Laolenggu, Ai- zhuanggu, Lengshuino 1, Huangpinuo, Dayugu, Erlaoshuya, Jijiaonuo, Lengshuimaxianggu, Lengshuino 2, Huangguanuo, Xiaohonggu, Huaerzao, Shuibaishidian, Bendifang
怒江傈僳族自治州 Nujiang of the Lisu Autonomous Prefecture	0	-	3	咱略、早早谷、红壳老鼠牙 Zanlue, Zaohangu, Hongkelaoshuya
德宏傣族景颇族自治州 Dehong Dai and Jingpo Autonomous Prefecture	63	YND1-YND60	7	毫安弄、白长芒谷、香谷、毫磨牙、毫安弄灭闷、糯谷、红心糯 Haoanlong, Baichangmanggu, Xianggu, Haomoya, Haoanlongmiemen, Nuogu, Hongxinuo
红河哈尼族彝族自治州 Honghe Hani and Yi Autonomous Prefecture	21	YNH1-YNH21	7	水稻白、马尾谷、冷水谷、弯谷、高脚糯、地谷、九谷 Shuidaobai, Maweigu, Lengshuigu, Wangu, Gaojiaonuo, Digu, Jiugu
普洱市 Puer City	9	YNS1-YNS9	22	老造谷1、细元江、成都矮、大播谷、齐头谷、扩杂列、早红 谷、毫转2、扎西玛2、毫变鼋、大花壳、大红谷1、烂地谷、小 花谷、大花糯、蚂蚱谷2、紫糯、大黄糯、旧地谷、冲腿、俄嘎、 熬格纳 Laozaogu 1, Xiyuanjiang, Chengduai, Dabogu, Qitougu, Kuo- zalie, Zaohonggu, Haozhuan 2, Zhaxima 2, Haobianyuan, Da- huake, Dahonggu 1, Landigu, Xiaohuagu, Dahuanuo, Mazh- agu 2, Zinuo, Dahuangnuo, Jiudigu, Chongtui, Ega, Aogena
曲靖市 Qujing City	17	YNQ1-YNQ17	0	-
文山市 Wenshan City	14	YNW1-YNW14	6	小白阳谷、五里香、蚂蚱谷、红秆蚂蚱谷、大白谷2、小花谷 Xiaobaiyanggu, Wulixiang, Mazhagu, Hongganmazhagu, Dabaigu 2, Xiaohuagu
玉溪市 Yuxi City	24	YNY1-YNY24	8	早谷、大麻线谷、大白谷3、粳粳谷、猪屎糯、小硬糯、 兰杆乌咀白谷、接骨糯 Hangu, Damaxianggu, Dabaigu 3, Babagu, Zhushinuo, Xiaoyingnuo, Langanwujubaigu, Jiegunuo
昭通市 Zhaotong City	73	YNT1-YNT73	5	三百棒、瘦田谷、白云黏、五百粒、白节子千千谷 Sanbaibang, Shoutianggu, Baiyunzhan, Wubaili, Baijieziqianqianggu
合计 Total	471		112	

为进一步明确无毒基因 *AVR-Pia* 的突变位置, 随机挑选了42个PCR阳性产物进行克隆和纯化, 并送英潍捷基(上海)贸易有限公司进行测序, 测序结果采用DNASTAR 7.1.0软件以GeneBank中*AVR-Pia*基因的原始序列(GenBank登录号为AB498873)为参照进行序列比对分析。

#### 1.2.4 云南省稻瘟病菌菌株的反应型

根据稻瘟病菌菌株*AVR-Pia*基因的PCR检测结果和抗性基因*Pia*的测定结果, 将供试菌株划分为4种不同的反应型, 即A<sup>+</sup>、A<sup>-</sup>、V<sup>+</sup>和V<sup>-</sup>。含有*AVR-Pia*基因且对含有*Pia*基因的水稻单基因系IRBLa-C表现抗病的菌株为A<sup>+</sup>反应型; 不含有*AVR-Pia*基因且对水稻单基因系IRBLa-C表现为抗病的菌株为A<sup>-</sup>反应型; 含有*AVR-Pia*基因且对水稻单基因系IRBLa-C表现为感病的菌株为V<sup>+</sup>反应型; 不含有*AVR-Pia*基因且对水稻单基因系IRBLa-C表现为感病的菌株为V<sup>-</sup>反应型。A<sup>+</sup>和V<sup>-</sup>这2种反应型表明菌株有无*AVR-Pia*基因与其对单基因系IRBLa-C表现为抗感之间存在一一对应关系; 相反, A<sup>-</sup>、V<sup>+</sup>这2种反应型中菌株有无*AVR-Pia*基因与其对单基因系IRBLa-C表现为抗感之间不存在一一对应关系。从反应型A<sup>+</sup>和V<sup>-</sup>中分别筛选代表菌株YNC20和YNC30, 用于地方稻种的鉴定。

#### 1.2.5 云南省地方稻种抗性基因*Pia*的鉴定

将筛选的代表菌株YNC20和YNC30按照1.2.1方法制备浓度为4×10<sup>5</sup>个/mL的孢子悬浮液。将112份云南省地方稻水稻品种和感病对照品种丽江新团黑谷种子催芽后于35 cm×25 cm×9 cm塑料育苗盒内播种, 每个品种播种1行, 每行播种10粒, 将育苗盒置于云南省农业科学院农业环境资源研究所所长30 m、宽12 m的日光温室内育苗, 待水稻苗长至3~4叶时, 分别喷雾接种浓度均为4×10<sup>5</sup>个/mL的鉴定菌株YNC20和YNC30的孢子悬浮液20 mL。接种后发病情况调查、分级标准、抗感鉴定及计算同1.2.2。

## 2 结果与分析

### 2.1 抗性基因*Pia*对云南省稻瘟病菌的有效性

在供试的471株稻瘟病菌单孢菌株中, 对含有*Pia*基因的水稻单基因系IRBLa-C表现为抗病和感病的菌株分别为139和332株, 所占比例分别为29.5%和70.5%(表2)。曲靖市、临沧市、文山市、德宏傣族景颇族自治州、保山市、昆明市、昭通市、西双版纳傣族自治州、普洱市、楚雄市、红河哈尼族彝族自治州红河州、玉溪市和丽江市的稻瘟病菌群体中,

对水稻单基因系IRBLa-C表现为感病的菌株分别为16、15、12、50、90、23、53、6、12、25、11、10和9株, 所占比例分别为94.1%、88.2%、85.7%、79.4%、75.6%、74.2%、72.6%、66.7%、66.7%、58.1%、52.4%、41.7%和40.9%(表2), 表明云南省13个市(州)大部分水稻抗性基因*Pia*已丧失抗性。

### 2.2 云南省稻瘟病菌无毒基因*AVR-Pia*分布及变异

经PCR检测, 供试的471株稻瘟病菌单孢菌株中有244株菌株含有无毒基因*AVR-Pia*, 有227株菌株不含有无毒基因*AVR-Pia*, 所占比例分别为51.8%和48.2%(表2)。在普洱市、红河哈尼族彝族自治州、丽江市、德宏傣族景颇族自治州、玉溪市、昭通市、昆明市、保山市、西双版纳傣族自治州、曲靖市、文山市、楚雄市和临沧市稻瘟病菌群体中, 含有无毒基因*AVR-Pia*的菌株数分别为8、18、15、37、14、42、17、62、8、7、4、10和2株, 所占比例分别为88.9%、85.7%、68.2%、58.7%、58.3%、57.5%、54.8%、52.1%、44.4%、41.2%、28.6%、23.3%和11.8%, 其中在普洱市、红河哈尼族彝族自治州、丽江市、德宏傣族景颇族自治州、玉溪市、昭通市、昆明市、保山市8个市(州)稻瘟病菌群体中, 超过52.1%的菌株含无毒基因*AVR-Pia*, 而在西双版纳傣族自治州、曲靖市、文山市、楚雄市和临沧市5个市(州)稻瘟病菌群体中, 仅11.8%~44.4%的菌株含无毒基因*AVR-Pia*(表2), 表明无毒基因*AVR-Pia*在云南省各稻瘟病菌群体中的分布差异较大。

经测序结果分析发现, 42株稻瘟病菌菌株的*AVR-Pia*编码区核苷酸组成均与已报道序列(GenBank登录号为AB498873)完全一致, 表明云南省稻瘟病菌无毒基因*AVR-Pia*主要为完全缺失变异。

### 2.3 云南省稻瘟病菌菌株的反应型

在471株稻瘟病菌单孢菌株中, A<sup>+</sup>和V<sup>-</sup>反应型的菌株数分别为83株和171株菌, 共254株, 占总菌株数的53.9%; A<sup>-</sup>和型V<sup>+</sup>反应型的菌株数分别为56株和161株, 共217株, 占总菌株数的46.1%(表3)。在13个市(州)稻瘟病菌群体中, A<sup>+</sup>和V<sup>-</sup>反应型菌株所占比例差异较大, 其中在普洱市、红河哈尼族彝族自治州、昭通市、玉溪市4个市(州)所占比例较大, 分别为77.8%、57.1%、52.1%、50.0%, 在丽江市和临沧市所占比例较小, 分别为27.3%和23.5%(表3), 说明云南省13个市(州)绝大部分水稻产区稻瘟病菌无毒基因*AVR-Pia*位点的基因组组成较复杂。

表2 水稻抗性基因 *Pia* 对云南省稻瘟病菌菌株的有效性及其无毒基因 *AVR-Pia* 的PCR检测结果Table 2 Effectiveness of rice blast resistance gene *Pia* against *Magnaporthe oryzae* isolates and PCR detection results of *AVR-Pia* genes of *Magnaporthe oryzae* in Yunnan Province

采集地 Location	抗性基因 <i>Pia</i> 有效性的测定结果 Effectiveness of rice blast resistance gene <i>Pia</i> by pathogenicity assay					无毒基因 <i>AVR-Pia</i> 的检测结果 PCR detection results of <i>AVR-Pia</i> gene			
	菌株数 No. of isolates	抗病菌株数 No. of resistance isolates		感病菌株数 No. of susceptible isolates		含有 <i>AVR-Pia</i> 的菌株数 No. of isolates with <i>AVR-Pia</i>		不含有 <i>AVR-Pia</i> 的菌株数 No. of isolates without <i>AVR-Pia</i>	
		所占比例 Percentage/%	所占比例 Percentage/%	所占比例 Percentage/%	所占比例 Percentage/%	所占比例 Percentage/%	所占比例 Percentage/%	所占比例 Percentage/%	所占比例 Percentage/%
保山市 Baoshan City	119	29	24.4	90	75.6	62	52.1	57	47.9
楚雄市 Chuxiong City	43	18	41.9	25	58.1	10	23.3	33	76.7
西双版纳傣族自治州 Xishuangbanna Dai Autonomous Prefecture	18	6	33.3	12	66.7	8	44.4	10	55.6
昆明市 Kunming City	31	8	25.8	23	74.2	17	54.8	14	45.2
丽江市 Lijiang City	22	13	59.1	9	40.9	15	68.2	7	31.8
临沧市 Lincang City	17	2	11.8	15	88.2	2	11.8	15	88.2
德宏傣族景颇族自治州 Dehong Dai and Jingpo Autonomous Prefecture	63	13	20.6	50	79.4	37	58.7	26	41.3
红河哈尼族彝族自治州 Honghe Hani and Yi Autonomous Prefecture	21	10	47.6	11	52.4	18	85.7	3	14.3
普洱市 Puer City	9	3	33.3	6	66.7	8	88.9	1	11.1
曲靖市 Qujing City	17	1	5.9	16	94.1	7	41.2	10	58.8
文山市 Wenshan City	14	2	14.3	12	85.7	4	28.6	10	71.4
玉溪市 Yuxi City	24	14	58.3	10	41.7	14	58.3	10	41.7
昭通市 Zhaotong City	73	20	27.4	53	72.6	42	57.5	31	42.5
合计 Total	471	139	29.5	332	70.5	244	51.8	227	48.2

表3 云南省471株稻瘟病菌菌株的反应型

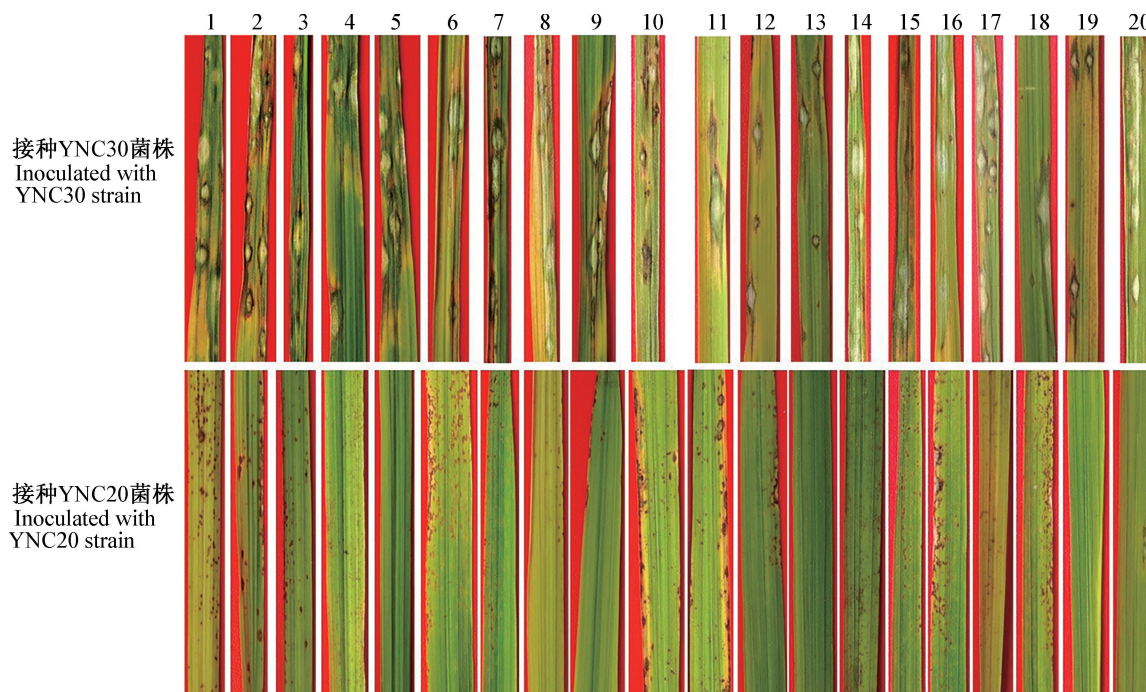
Table 3 Reaction types of 471 isolates of *Magnaporthe oryzae* collected from Yunnan Province

采集地 Location	菌株数 No. of isolates	不同反应型菌株数量 No. of different reaction types				A <sup>+</sup> 和V <sup>-</sup> 反应型菌株 A <sup>+</sup> and V <sup>-</sup> reaction type isolates		A <sup>-</sup> 和V <sup>+</sup> 反应型菌株 A <sup>-</sup> and V <sup>+</sup> reaction type isolates	
		A <sup>+</sup>	V <sup>-</sup>	A <sup>-</sup>	V <sup>+</sup>	菌株数 No. of isolates		所占比例 Percentage/%	
						No. of isolates	Percentage/%	No. of isolates	Percentage/%
保山市 Baoshan City	119	16	44	13	46	60	50.4	59	49.6
楚雄市 Chuxiong City	43	7	22	11	3	29	67.4	14	32.6
西双版纳傣族自治州 Xishuangbanna Dai Autonomous Prefecture	18	3	7	3	5	10	55.6	8	44.4
昆明市 Kunming City	31	5	11	3	12	16	51.6	15	48.4
丽江市 Lijiang City	22	11	5	2	4	16	72.7	6	27.3
临沧市 Lincang City	17	0	13	2	2	13	76.5	4	23.5
德宏傣族景颇族自治州 Dehong Dai and Jingpo Autonomous Prefecture	63	10	23	3	27	33	52.4	30	47.6
红河哈尼族彝族自治州 Honghe Hani and Yi Autonomous Prefecture	21	8	1	2	10	9	42.9	12	57.1
普洱市 Puer City	9	2	0	1	6	2	22.2	7	77.8
曲靖市 Qujing City	17	1	10	0	6	11	64.7	6	35.3
文山市 Wenshan City	14	0	8	2	4	8	57.1	6	42.9
玉溪市 Yuxi City	24	8	4	6	6	12	50.0	12	50.0
昭通市 Zhaotong City	73	12	23	8	30	35	47.9	38	52.1
合计 Total	471	83	171	56	161	254	53.9	217	46.1

## 2.4 地方稻种资源中抗性基因*Pia*的鉴定及分布

在112份云南省地方稻种质资源中,有20份地方稻品种对YNC30菌株感病且对YNC20抗病(图1),说明这些水稻品种中含有抗性基因*Pia*,有74份

地方稻品种对YNC30和YNC20菌株均抗病,有4份地方稻品种对YNC30和YNC20菌株均感病,有14份地方稻品种对YNC30菌株抗病且对YNC20菌株感病,所占比例分别为17.9%、66.1%、3.6%和12.5%(表4)。



1~20: 八月糯、白长芒谷、红岑花谷(红褐壳)、严霜谷、旱谷、成都矮、大花壳、大红谷1、旱糯、毫安弄、毫磨牙、毫安弄灭闷、大白谷2、小白阳谷、地谷、大理早粳、小禄糯、大麻线谷、大白谷3和矮花白稻种。1~20: Landrace varieties of Bayuenuo, Baichangmanggu, Hongcenhuagu (Hongheke), Yanshuanggu, Hangu, Chengduai, Dahuake, Dahonggu 1, Hannuo, Haoanlong, Haomoya, Haoanlongmiemen, Dabaigu 2, Xiaobaiyanggu, Digu, Dalizaoxian, Xiaolunuo, Damaxianggu, Dabaigu 3 and Aihuabai, respectively.

图1 含*Pia*基因的20份云南省地方稻种在接种稻瘟病菌菌株YNC30和YNC20后的发病症状

Fig. 1 Disease symptoms of the isolates of YNC30 and YNC20 on 20 local rice varieties with *Pia* gene from Yunnan Province

含有抗性基因*Pia*的20份地方稻品种主要分布在9个市(州)中,其中德宏傣族景颇族自治州有4份,分别为毫安弄、白长芒谷、毫磨牙和毫安弄灭闷品种;普洱市有3份,分别为成都矮、大花壳、大红谷3品种;玉溪市有3份,分别为旱谷、大麻线谷、大白谷3品种;西双版纳傣族自治州有2份,分别为八月糯和旱糯品种;保山市有2份,分别为严霜谷和小禄糯品种;文山市有2份,分别为小白阳谷和大白谷2品种;大理市有2份,分别为大理早粳和红岑花谷(红褐壳)品种;红河哈尼族彝族自治州有1份,为地谷品种;丽江市有1份,为矮花白品种,表明含*Pia*基因的水稻种质在云南省分布较广(表4)。

## 3 讨论

本研究自云南省13个市(州)采集并分离的471株稻瘟病菌单孢菌株中,70.5%菌株对水稻抗性基因

*Pia*致病,表明随着含有*Pia*的水稻品种长期种植,稻瘟病菌对水稻品种的适应性逐步增强,形成大量能侵染含有*Pia*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,表明无毒基因*AVR-Pia*在不同水稻产区已普遍发生变异,在生产中对含有*Pia*基因水稻品种の利用应十分谨慎。

已有研究表明,位于端粒区域的无毒基因*AVR-Pia*、*AVR-Pital*、*AVR-Pik*具有高度的不稳定性(Yoshida et al., 2009; Jia et al., 2000; Dai et al., 2010),极易发生变异,而无毒基因的缺失(有/无多态性)可能是病原菌为了克服寄主植物抗性基因而快速变异的主要机制(Chuma et al., 2011)。本研究结果表明,42株菌株中*AVR-Pia*编码区序列与已报道的序列完

全一致,并未发现SNP、插入等变异方式,说明云南省水稻产区稻瘟病菌无毒基因 *AVR-Pia* 主要通过基因完全缺失的变异方式逃避水稻抗性基因 *Pia* 的识别,此结果与Yoshida et al. (2009)、Sone et al.(2013)、Huang et al.(2014)和廖静静等(2019)研究结果一

致。另外,本研究结果显示,51.8% 菌株含有 *AVR-Pia*,而湖南省稻瘟病菌群体中86.8% 菌株含有 *AVR-Pia*(Xing et al., 2017),说明无毒基因 *AVR-Pia* 在不同水稻产区的进化速率差异较大,这可能与种植的水稻品种和环境等因素有关。

表4 云南省13个市(州)112份地方稻种抗性基因 *Pia* 的鉴定及分布

Table 4 Identification and distribution of the *Pia* gene in 112 local rice varieties from 13 cities (prefectures) in Yunnan Province

采集地 Location	数量 No. of accessions	对 YNC30 菌株感病且 对 YNC20 菌株抗病的 品种		对 YNC30 和 YNC20 菌株均抗病的品种		对 YNC30 和 YNC20 菌 株均感病的品种		对 YNC30 菌株抗病 且对 YNC20 菌株感 病的品种	
		Varieties susceptible to YNC30 and resistance to YNC20		Varieties resistant to YNC30 and YNC20		Varieties susceptible to YNC30 and YNC20		Varieties resistant to YNC30 and suscepti- ble to YNC20	
		数量 No.	所占比例 Percent- age/%	数量 No.	所占比例 Percent- age/%	数量 No.	所占比例 Percentage/%	数量 No.	所占比例 Percent- age/%
保山市 Baoshan City	7	2	28.6	5	71.4	0	0.0	0	0.0
大理市 Dali City	2	2	100.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0
西双版纳傣族自治州 Xishuangbanna Dai Autonomous Prefecture	15	2	13.3	11	73.3	0	0.0	2	13.3
昆明市 Kunming City	1	0	0.0	1	100.0	0	0.0	0	0.0
丽江市 Lijiang City	11	1	9.1	8	72.7	0	0.0	2	18.2
临沧市 Lincang	18	0	0.0	14	77.8	1	5.6	3	16.7
怒江傈僳族自治州 Nujiang of the Lisu Autonomous Prefecture	3	0	0.0	1	33.3	1	33.3	1	33.3
德宏傣族景颇族自治州 Dehong Dai and Jingpo Autonomous Prefecture	7	4	57.1	3	42.9	0	0.0	0	0.0
红河哈尼族彝族自治州 Honghe Hani and Yi Autonomous Prefecture	7	1	14.3	5	71.4	0	0.0	1	14.3
普洱市 Puer City	22	3	13.6	16	72.7	0	0.0	3	13.6
文山市 Wenshan City	6	2	33.3	4	66.7	0	0.0	0	0.0
玉溪市 Yuxi City	8	3	37.5	3	37.5	1	12.5	1	12.5
昭通市 Zhaotong City	5	0	0.0	3	60.0	1	20.0	1	20.0
合计 Total	112	20	17.9	74	66.1	4	3.6	14	12.5

在植物与病原菌漫长的互动与协同进化过程中,病原菌 *AVR* 基因被植物中相应 *R* 基因识别,并触发有效防御响应,病原菌 *AVR* 基因的分化受宿主 *R* 基因和环境条件的影响。本研究结果显示,34.2% 的有毒菌株含有 *AVR-Pia*(V<sup>+</sup>反应型),意味着这些菌株中可能含有一个额外的因子对毒力起着关键作用,并导致这些菌株中 *AVR-Pia* 的表达受到未知机制的阻碍,此推测需要进一步通过对无毒基因 *AVR-Pia* 的多个等位基因、表达模式及启动子区的结构等进行深入研究来证实。对水稻单基因系 IRBLa-C 无毒的 139 株菌株中,有 56 株菌株不含 *AVR-Pia* 基

因,即 11.9% 的无毒菌株不含 *AVR-Pia* 基因(A<sup>-</sup>反应型),这表明无毒基因 *AVR-Pia* 引物可能对这些菌株不具有特异性,与 Lu et al.(2018)关于 *AVR-Pii* 基因的研究结果相似。

云南省是亚洲栽培稻的起源中心之一,该省分布着普通野生稻、药用野生稻和疣粒野生稻 3 个野生稻种,云南省农业科学院收集保存了 5 000 多份的稻种资源。蒋志农(1995)利用鉴别菌株对其中的 227 份云南省粳稻栽培品种进行抗性基因的鉴定,发现 15.0% 品种含有 *Pia* 基因,与本研究的鉴定中 17.9% 地方稻种资源中含有 *Pia* 的结果相似,且本研



究鉴定持含有 *Pia* 的 20 份云南省地方稻种分布于云南省的 9 个市(州), 分布地区较广, 在稻瘟病菌与水稻长期互作及协同进化过程中, 无毒基因 *AVR-Pia* 受到了水稻抗性基因 *Pia* 的定向选择, 稻瘟病菌群体中产生了大量对基因 *Pia* 有毒的菌株。因此, 在云南省水稻抗性育种中应避免使用持有 *Pia* 基因的水稻种质作抗性亲本。本研究通过致病性测定及 *AVR-Pia* 的分子鉴定筛选出 2 株鉴定菌株, 并对抗性基因 *Pia* 进行鉴定, 其中 74 份地方稻种对 2 株鉴定菌株均表现为抗病, 表明这 74 份稻种中可能含有其它抗性基因, 由于一株稻瘟病菌菌株中可能含有多个 *AVR* 基因, 水稻中也含有多个 *R* 基因, 只要 2 个相对的 *R* 和 *AVR* 基因在一起就能表现为抗性, 因此, 需要进一步鉴别才能确定水稻中所含的抗性基因。Fang et al. (2018) 筛选出 25 株不同致病型的鉴别菌株, 可用于抗性基因的鉴定, 下一步可利用此鉴定菌株对本研究水稻中所含有的抗性基因进行鉴定。

目前稻瘟病菌中已克隆了 *AVR-Pia*、*AVR-Pita*、*AVR-Pizt*、*AVR1-CO39*、*ACE1*、*AVR-Pii*、*AVR-Pik/km/kp*、*PWL1*、*PWL2*、*AVR-Pib*、*AVR-Pi9* 和 *AVR-Pi54* 共 12 个无毒基因, 本研究仅分析了无毒基因 *AVR-Pia* 在云南省水稻产区的分布及变异, 其它无毒基因在云南省水稻产区的分布及变异状况以及单个稻瘟病菌菌株中各个无毒基因的组成类型及其毒性功能的变异等还有待进一步深入研究。

### 参 考 文 献 (References)

- CÉSARI S, KANZAKI H, FUJIWARA T, BERNOUX M, CHALVON V, KAWANO Y, SHIMAMOTO K, DODDS P, TERAUCHI R, KROJ T. 2014. The NB-LRR proteins RGA4 and RGA5 interact functionally and physically to confer disease resistance. *The EMBO J*, 33(17): 1941–1959
- 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-Pia* and *AVR1-CO39* by direct binding. *Plant Cell*, 25(4): 1463–1481
- CHUMA I, ISOBE C, HOTTA Y, IBARAGI K, FUTAMATA N, KUSABA M, YOSHIDA K, TERAUCHI R, FUJITA Y, NAKAYASHI 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
- DAI Y, JIA Y, CORRELL J, WANG X, WANG Y. 2010. Diversification evolution of the avirulence gene *AVR-Pita1* in field isolates of *Magnaporthe oryzae*. *Fungal Genetics and Biology*, 47(12): 974–980
- 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]
- FANG WW, LIU CC, ZHANG HW, XU H, ZHOU S, FANG KX, PENG YL, ZHAO WS. 2018. Selection of differential isolates of *Magnaporthe oryzae* for postulation of blast resistance genes. *Phytopathology*, 108(7): 878–884
- FARMAN ML, LEONG SA. 1998. Chromosome walking to the *AVR1-CO39* avirulence gene of *Magnaporthe grisea*: discrepancy between the physical and genetic maps. *Genetics*, 150(3): 1049–1058
- FUDAL I, BÖHNERT HU, THARREAU D, LEBRUN MH. 2005. Transposition of MINE, a composite retrotransposon, in the avirulence gene *ACE1* of the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. *Fungal Genetics and Biology*, 42(9): 761–772
- 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
- JIA YL, MCADAMS SA, BRYAN GT, HERSHEY HP, VALENT B. 2000. Direct interaction of resistance gene and avirulence gene products confers rice blast resistance. *The EMBO Journal*, 19(15): 4004–4014
- JIANG Z. 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]
- KANG S, LEBRUN MH, FARRALL L, VALENT B. 2001. Gain of virulence caused by insertion of a Pot3 transposon in a *Magnaporthe grisea* avirulence gene. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 14(5): 671–674
- KANG S, SWEIGARD JA, VALENT B. 1995. The *PWL* host specificity gene family in the blast fungus *Magnaporthe grisea*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 8(6): 939–948
- KHANG CH, PARK SY, LEE YH, VALENT B, KANG S. 2008. Genome organization and evolution of the *AVR-Pita* avirulence gene family in the *Magnaporthe grisea* species complex. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 21(5): 658–670
- 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 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 *AVR-Piz-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
- LIAO JJ, XIE H, WANG DD, HE XH. 2019. Polymorphism analysis of *Avr-Pia*, *Avr-Pital* and *Avr-Pii* in indica/japonica-borne *Magnaporthe oryzae* isolates in Yuanyang County, Yunnan. *Journal of Plant Protection*, 46(5): 1057–1064 (in Chinese) [廖静静, 谢华, 王殿东, 何霞红. 2019. 云南省元阳县籼/粳型稻瘟病菌无毒基因 *Avr-Pia*、*Avr-Pital* 和 *Avr-Pii* 多样性分析. 植物保护学报, 46(5): 1057–1064]
- LU L, WANG Q, JIA Y, BI YQ, LI CY, FAN HC, LI JB. 2018. Selection and mutation of the avirulence gene *AVR-Pii* of the rice blast fungus *Magnaporthe oryzae*. *Plant Pathology*, 68(1): 127–134
- 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]
- OKUYAMA Y, KANZAKI H, ABE A, YOSHIDA K, TAMIRU M, SAITOH H, FUJIBE T, MATSUMURA H, SHENTON M, GALAM DC, et al. 2011. A multifaceted genomics approach allows the isolation of the rice *Pia*-blast resistance gene consisting of two adjacent NBS-LRR protein genes. *The Plant Journal*, 66(3): 467–479
- ORBACH MJ, FARRALL L, SWEIGARD JA, CHUMLEY FG, VALENT B. 2000. A telomeric avirulence gene determines efficacy for the rice blast resistance gene *Pi-ta*. *Plant Cell*, 12(11): 2019–2032
- ORTIZ D, DE GUILLEN K, CESARI S, CHALVON V, GRACY J, PADILLA A, KROJ T. 2017. Recognition of the *Magnaporthe oryzae* effector *AVR-Pia* by the decoy domain of the rice NLR immune receptor RGA5. *Plant Cell*, 29(1): 156–168
- RAY S, SINGH PK, GUPTA DK, MAHATO AK, SARKAR C, RA-  
THOUR 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
- REN SL, BAI H, WANG YF, QUAN JZ, DONG ZP, LI ZY, XING JH. 2018. Identification and analysis of *Magnaporthe oryzae* of fox-tail 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]
- SONE T, TAKEUCHI S, MIKI S, SATOH Y, OHTSUKA K, ABE A, ASANO K. 2013. Homologous recombination causes the spontaneous deletion of *AVR-Pia* in *Magnaporthe oryzae*. *FEMS Microbiology Letters*, 339(2): 102–109
- SWEIGARD JA, CARROLL AM, KANG S, FARRALL L, CHUMLEY FG, VALENT B. 1995. Identification, cloning, and characterization of *PWL2*, a gene for host species specificity in the rice blast fungus. *Plant Cell*, 7(8): 1221–1233
- 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 Z, TARAMINO G, YANG D, LIU G, TINGEY SV, MIAO GH, WANG GL. 2001. Rice ESTs with disease-resistance gene- or defense-response gene-like sequences mapped to regions containing major resistance genes or QTLs. *Molecular Genetics and Genomics*, 265(2): 302–310
- WU J, KOU Y, BAO J, LI Y, TANG M, ZHU X, PONAYA A, XIAO G, LI J, LI C, et al. 2015. Comparative genomics identifies the *Magnaporthe oryzae* avirulence effector *AvrPi9* that triggers *Pi9*-mediated blast resistance in rice. *The New Phytologist*, 206(4): 463–475
- XING JJ, JIA YL, PENG ZR, SHI YF, HE Q, SHU F, ZHANG WH, ZHANG Z, DENG HF. 2017. Characterization of molecular identity and pathogenicity of rice blast fungus in Hunan Province of China. *Plant Disease*, 101(4): 427–561
- YASUDA N, MITSUNAGA T, HAYASHI K, KOIZUMI S, FUJITA Y. 2015. Effects of pyramiding quantitative resistance genes *pi21*, *Pi34*, and *Pi35* on rice leaf blast disease. *Plant Disease*, 99(7): 904–909
- 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 S, WANG L, WU W, HE L, YANG X, PAN Q. 2015. Function and evolution of *Magnaporthe oryzae* avirulence gene *Avr-Pib* responding to the rice blast resistance gene *Pib*. *Scientific Reports*, 5: 11642
- ZHOU E, JIA Y, 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

(责任编辑:张俊芳)