

福建省稻瘟病菌田间种群无毒基因的变异检测

项旭跃, 曹雪琦*, 魏立婧, 郑华坤**, 鲁国东**

福建农林大学生物农药与化学生物学教育部重点实验室, 福建福州 350002

摘要: 稻瘟病严重威胁福建省水稻生产。稻瘟病菌田间种群无毒基因的变异监测是实现优质抗稻瘟病水稻品种合理布局和轮换、有效预防因抗性丧失导致的稻瘟病爆发成灾的重要措施。本研究以福建省 3 个水稻主产区采集并分离的 113 个稻瘟病菌单孢菌株为材料, 检测其无毒基因的变异情况。首先, 利用 24 个已知抗性的水稻单基因系对它们进行致病性测定, 分析致病频率、毒力频率、无毒基因的存在频率和无毒基因的组合频率。结果显示, 福建省建阳、宁化和上杭 3 个水稻主产区的稻瘟病菌田间菌株对 24 个水稻单基因系的致病频率分别为 12.50%~95.83%、29.17%~100%和 4.55%~86.36%。3 个水稻主产区菌株均对 *Pik^s*、*Pib*、*Pi3* 和 *Pi12* 表现为强毒性, 而建阳和宁化菌株还对其他 12 个抗性基因表现为强毒力 (毒力频率 $\geq 70\%$), 包括 *Pia*、*Pii*、*Piz*、*Pita*、*Pit*、*Pis^h*、*Pi5*、*Pi7*、*Pi19*、*Pi20*、*Pita²* 和 *Pi11*。其次, 本研究还设计了 8 个无毒基因 *Avr-Pita*、*Avr-Pib*、*Avr-Pik*、*Avr-Piz-t*、*Avr-Pii*、*Avr-Pi9*、*Avr-Pi54* 和 *Avr-Co39* 的特异性引物, 对单孢菌株进行基因型鉴定。结果显示, 所有菌株均未检测到 *Avr-Co39*, 表明这些稻瘟菌株中均不携带该无毒基因。此外, *Avr-Pib* 的出现频率也很小, 仅为 37.17%, 但是该比例仍远超致病性测定中推测的 *Avr-Pib* 所占比例, 表明检测到的 *Avr-Pib* 中很大一部分存在突变。为此, 对 *Avr-Pib* 基因部分扩增产物进行测序, 发现这些菌株的 *Avr-Pib* 在启动子区发生了缺失、插入和替换等突变。此外, 部分菌株的 *Avr-Pik* 或 *Avr-Piz-t* 也存在启动子单核苷酸变异, 而上杭菌株 *Avr-Pi9* 和宁化菌株 *Avr-Piz-t* 则均存在编码区的突变。这些位点的突变均可能导致无毒基因功能的缺失。研究还表明, 携带 *Pi1*、*Piz^s*、*Pi9* 和 *Pik*、*Pik^h*、*Pik^m* 位点的水稻品种仍适合在福建地区种植。

关键词: 水稻; 稻瘟病菌; 致病性; 无毒基因

中图分类号: S435.111.41 文献标识码: A

Detection of Avirulence Gene Variation in the Field Population of Rice Blast Fungus in Fujian, China

XIANG Xuyue, CAO Xueqi*, WEI Lijing, ZHENG Huakun**, LU Guodong**

Key Laboratory of Biopesticide and Chemical Biology, Ministry of Education, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou, Fujian 350002, China

Abstract: Rice blast is the major disease that threatens rice production in Fujian. Investigation of the variation of avirulence genes (AVRs) in the field population of rice blast fungus could facilitate the release and rotation of the resistance varieties, and subsequently prevent the burst of rice blast disease caused by the loss of rice blast resistance. We firstly investigated the pathogenicity and genetic variation of a field population consisting of 113 *Magnaporthe oryzae* monoconidial strains isolated from three different major rice planting regions in Fujian province. For pathogenicity and virulence assays of the strains, spray inoculation was performed using 24 monogenic lines carrying 24 different major blast resistance genes. The results showed that the pathogenicity frequency of strains isolated from Jianyang, Ninghua and Shanghang were ranged from 12.50% to 95.83%, 29.17% to 100% and 4.55% to 86.36%, respectively. All strains showed strong pathogenicity toward the monogenic lines carrying *Pik^s*、*Pib*、*Pi3* and *Pi12*, while strains isolated from

收稿日期 2022-04-24; 修回日期 2022-07-02

基金项目 福建省农业引导性 (重点) 项目 (No. 2019N0003); 福建农林大学科技创新专项基金项目 (No. CXZX2018051)。

作者简介 项旭跃 (1997—), 男, 硕士研究生, 研究方向: 植物病理学; *同等贡献作者: 曹雪琦 (1996—), 女, 硕士研究生, 研究方向: 植物病理学。**通信作者 (Corresponding author): 鲁国东 (LU Guodong), E-mail: gdlufafu@163.com; 郑华坤 (ZHENG Huakun), E-mail: huakunzheng@163.com。

Jiayang and Ninghua also showed strong pathogenicity toward the monogenic lines carrying other 12 resistance genes, including *Pia*, *Pii*, *Piz*, *Pita*, *Pit*, *Pis^h*, *Pi5*, *Pi7*, *Pi19*, *Pi20*, *Pita²* and *Pi11*. To investigate the genetic variation of AVR genes in the above strains, we performed genotyping of 8 AVR genes: *Avr-Pia*, *Avr-Pib*, *Avr-Pik*, *Avr-Piz-t*, *Avr-Pii*, *Avr-Pi9*, *Avr-Pi54*, and *Avr-Co39*. As expected, *Avr-Co39* was absent in all the strains, indicating that all the strains collected in the three regions of Fujian province did not carry the AVR gene. The frequency of *Avr-Pib* in the 113 strains was also very low (37.17%). However, the ratio was much higher than that of the functional *Avr-Pib* (4.32%), indicating some loss-of-function mutations of *Avr-Pib* in the Fujian field population. We compared the sequence of selected AVR genes amplified from some field isolates to the reference sequences, and found variation in the promoter region of *Avr-Pib*, as well as *Avr-Pik* and *Avr-Piz-t*. Besides, we also found mutations in the coding region of *Avr-Pik* and *Avr-Pita* amplified from some of the Fujian field isolates. Our results suggested that rice cultivars carrying *Pi1*, *Piz⁵*, *Pi9*, *Pik*, *Pik^h* and *Pik^m* still could be used in Fujian Province.

Keywords: rice; *Magnaporthe oryzae*; pathogenicity; avirulence gene

DOI: 10.3969/j.issn.1000-2561.2023.02.017

稻瘟病是由丝状子囊真菌稻瘟病菌 (*Pyricularia oryzae*; syn. *Magnaporthe oryzae*) 引起的病害, 严重威胁水稻生产^[1]。水稻是福建省最主要的粮食作物。但是, 丘陵地带形成的高温高湿的地理环境导致稻瘟病常年流行, 严重威胁福建省水稻产量和质量^[2]。当前稻瘟病最主要的防控策略是培育和种植抗病水稻品种, 并适时施用化学农药。但是, 化学农药的使用会造成环境污染, 并且需在发病早期施用才有效果, 例如三环唑可抑制黑色素形成、只在附着胞发育过程中发挥作用^[3]。目前福建省的水稻主栽品种携带一些主效抗病基因^[4]。这些品种通常会因为稻瘟病菌田间群体无毒基因的快速变异而丧失抗性^[5-9]。因此, 加强对福建省田间稻瘟病菌群体无毒基因分布及其变异特征的检测, 可有效指导福建省抗病水稻品种的布局 and 轮换, 对于实现稻瘟病的绿色生态防控具有重要意义。

目前稻瘟病菌群体无毒基因鉴定主要有 2 种方式: 一是利用携带不同抗病基因的单基因系进行致病性分析; 二是通过扩增和检测已克隆无毒基因的序列。自 1967 年 ALKINS 等^[10]建立第一套稻瘟病菌鉴别品种以来, 包括我国在内的很多国家均建立了稻瘟病菌鉴别体系^[11]。目前, 比较常用的单基因鉴别品种有国际水稻研究所 ‘丽江新团黑谷’ 为背景育成的 24 个单基因系品种和以 ‘Co39’ 为背景育成的 5 个单基因系品种。这些鉴定品系已在云南^[12]、福建^[13]、海南^[14]和黑龙江^[15-17]等地稻瘟病菌田间菌株毒性鉴定方面得到广泛应用。但该方法费时费力、受环境影响较大, 且无法及时反馈给稻瘟病田间防控提供参考。随着分子生物学技术的发展, 尤其是稻瘟病菌无毒

基因的克隆, 使稻瘟病菌谱系与无毒基因之间的关系基本实现一一对应, 同时也方便了田间稻瘟病菌毒性变异的实时监测。

为了检测无毒基因在福建省稻瘟病菌田间群体的分布情况, 本研究利用抗瘟单基因系对从福建省 3 个水稻主产区分离的 113 个单孢菌株进行致病力分析, 并对 8 个无毒基因 (*Avr-Pita*、*Avr-Pib*、*Avr-Pik*、*Avr-Piz-t*、*Avr-Pii*、*Avr-Pi9*、*Avr-Pi54* 和 *Avr1-Co39*) 的基因型进行检测。研究结果可为福建省水稻品种的合理布局提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 病样采集、单孢分离及保存 2018—2019 年从福建省 3 个水稻主要栽培地区的水稻品种上采集并分离得到稻瘟菌单孢株 113 株, 其中建阳 23 株, 宁化 68 株, 上杭 22 株 (表 1)。稻瘟病菌单孢分离采用保湿培养法^[18], 将发病的水稻穗颈剪下, 于 75% 酒精消毒后, 用无菌蒸馏水冲洗 3 次, 置于培养箱中光照诱导产孢。1~2 d 后, 在显微镜下用针挑转移法^[19]分离单孢至贴有滤纸片的米糠培养基上 (40 g/L 米糠、18 g/L 琼脂粉), 置于 28℃ 培养箱中光照培养 7 d 后, 收集滤纸片低温干燥保存。

1.1.2 供试水稻品种 供试水稻为国际水稻研究所 ‘丽江新团黑谷’ (LTH) 为背景育成的 24 个单基因系水稻品种^[20]。

1.2 方法

1.2.1 致病性检测 水稻栽培: 将 24 个单基因系水稻品种种子先进行催芽处理, 然后将发芽的种子播种于塑料育苗盘中, 每行播种 4 个品种, 共

表 1 3 个产区分离的稻瘟菌株

Tab. 1 *M. oryzae* strains isolated from three production areas

产区 Production area	编号 No.	菌株名称 Strain name	产区 Production area	编号 No.	菌株名称 Strain name	产区 Production area	编号 No.	菌株名称 Strain name
建阳	1	JY2018001	宁化	16	NH2018016	宁化	54	NH2019054
	2	JY2018002		17	NH2019017		55	NH2018055
	3	JY2018003		18	NH2019018		56	NH2019056
	4	JY2018004		19	NH2019019		57	NH2019057
	5	JY2018005		20	NH2019020		58	NH2019058
	6	JY2018006		21	NH2019021		59	NH2019059
	7	JY2018007		22	NH2019022		60	NH2019060
	8	JY2018008		23	NH2019023		61	NH2019061
	9	JY2018009		24	NH2019024		62	NH2019062
	10	JY2018010		25	NH2019025		63	NH2019063
	11	JY2018011		26	NH2019026		64	NH2019064
	12	JY2018012		27	NH2019027		65	NH2019065
	13	JY2018013		28	NH2019028		66	NH2019066
	14	JY2018014		29	NH2019029		67	NH2019067
	15	JY2018015		30	NH2019030		68	NH2019068
宁化	16	JY2018016	31	NH2019031	上杭	1	SH2019001	
	17	JY2018017	32	NH2019032		2	SH2019002	
	18	JY2018018	33	NH2019033		3	SH2019003	
	19	JY2018019	34	NH2019034		4	SH2019004	
	20	JY2018020	35	NH2019035		5	SH2019005	
	21	JY2018021	36	NH2019036		6	SH2019006	
	22	JY2018022	37	NH2019037		7	SH2019007	
	23	JY2018023	38	NH2019038		8	SH2019008	
	1	NH2018001	39	NH2019039		9	SH2019009	
	2	NH2018002	40	NH2019040		10	SH2019010	
	3	NH2018003	41	NH2019041		11	SH2019011	
	4	NH2018004	42	NH2019042		12	SH2019012	
	5	NH2018005	43	NH2019043		13	SH2019013	
	6	NH2018006	44	NH2019044		14	SH2019014	
	7	NH2018007	45	NH2019045		15	SH2019015	
8	NH2018008	46	NH2019046	16	SH2019016			
9	NH2019009	47	NH2019047	17	SH2019017			
10	NH2019010	48	NH2019048	18	SH2019018			
11	NH2019011	49	NH2019049	19	SH2019019			
12	NH2019012	50	NH2019050	20	SH2019020			
13	NH2019013	51	NH2019051	21	SH2019021			
14	NH2019014	52	NH2019052	22	SH2019022			
15	NH2019015	53	NH2019053					

6 行，每穴 15~20 粒种子。每天浇水，隔天浇营养液，待水稻长至三叶一心时进行喷雾接种。

孢子悬浮液的制备及接种：先将保存在滤纸片的菌株在 CM 培养基上活化培养，生长 3~5 d 后转移至米糠培养基上产孢培养。待米糠培养基长满菌丝后，用灭菌盖玻片刮掉菌丝，置于光照培养箱中光照培养 2~3 d。至培养基上布满灰色霉层时，用含有 0.02%吐温的双蒸水将孢子洗脱下

来，制备孢子悬浮液（ $5 \times 10^4 \sim 10 \times 10^4$ 个/mL）。然后将孢子悬浮液均匀地喷洒到水稻叶片表面。接种完成后置于接种室黑暗处理 24 h，然后在自然光照下放置 5~7 d，保持适宜的温度湿度有利于发病^[21]。

1.2.2 分级标准及病情调查 接种 5~7 d 后，参照 IRRI 的调查标准对水稻叶片上的病斑进行调查^[22]，如果同一株水稻叶片上的病斑类型不一

致,则以病斑最为严重的类型为准。病斑反应型的记载标准参照 VALENT 等^[23]的方法。

统计供试菌株对各水稻品种的毒力频率 (VF) 和致病频率 (PF), 毒力频率不仅可以表示病原物种内一系列菌株对一个寄主品种的毒力, 还可以用来衡量一个品种对病原物群体的抗性^[24-25]。计算公式: $VF=(\text{有毒菌株数量}/\text{菌株总数量})\times 100\%$; $PF=(\text{感病水稻品种数}/\text{供试水稻品种总数})\times 100\%$ 。其中, $PF\geq 70\%$, 为强致病力菌株; $50\%\leq PF<70\%$, 为较强致病力菌株; $20\%\leq PF<50\%$, 为中等致病力菌株; $PF<20\%$, 为弱致病力菌株^[13, 26]。毒力频率的强弱分级标准与致病频率相似。

1.2.3 无毒基因体外扩增与测序分析 稻瘟菌基因组 DNA 提取: 在 2 mL 的离心管中加入 200 mL 石英砂和 400 mL DNA 1 mol/L KCl 溶液; 取一小块含有菌丝的培养基加入 2 mL 离心管, 65 Hz, 120 s 振荡破碎; 12 000 r/min 离心 10 min; 吸取 200 mL 上清至新的 1.5 mL 无菌的离心管, 加入 500 mL 预冷的无水乙醇, -20°C 放置 1 h; 12 000 r/min 离心 10 min; 加入 1 mL 70% 乙醇; 7500 r/min 离心 5 min 后, 弃上清; 用枪头将残余溶液吸干, 放置 5 min, 加入 100 mL ddH₂O, 于 -20°C 保存备用。

PCR 扩增体系 (18 μL): 16 μL 1.1 \times T3 Super PCR Mix(擎科公司), 0.5 μL Primer F, 0.5 μL Primer R, 1 μL 模板 DNA。扩增 8 个无毒基因所用引物如表 2 所示, 其中扩增 *Avr-Pita*、*Avr-Pii*、*Avr-Pi9*、*Avr-Co39* 的引物参照 SELISANA 等^[27], 其

表 2 本研究所用引物

Tab. 2 Primers used in this study

无毒基因 Avirulence gene	引物序列 (5'-3') Primer sequence (5'-3')
<i>Avr-Pita</i> ^[27]	F: CAGGCATACATTGGAGAGCC R: CCCTCCATTCCAACACTAAC
<i>Avr-Pib</i>	F: AAGTCCTTCCATTACCCTA R: GCAATAACCATCCAGCCATA
<i>Avr-Pik</i>	F: AATTTATTCAACTGCCACTCTG R: AACCTCGTCAAACCTCCCTA
<i>Avr-Piz-t</i>	F: ATCAAATGAACACCAGGAA R: CCAGCCGAAGATACAAAA
<i>Avr-Pii</i> ^[27]	F: GGTAGATATCCGCTGACTGG R: ACTGTCCGCCGCTCGTTTGG
<i>Avr-Pi9</i> ^[27]	F: CCCATGTGTGCTTATCGCGTG R: GACTTGAGAGAACTGCATGTC
<i>Avr-Pi54</i>	F: CCAACATCATCATCACCACCT R: TAACCCAGAGAGAGCCACCCA
<i>Avr-Co39</i> ^[27]	F: TGCCGCATTTTGCTAACCG R: GCGAATCCATAGACAAGGAC

余无毒基因的引物为本研究根据 NCBI 所载基因序列自行设计。扩增产物送生工生物工程 (上海) 股份有限公司进行测序, 测序结果通过 NCBI (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) 进行比对分析。

2 结果与分析

2.1 福建稻瘟病菌对单基因系水稻品种的致病性分析

为了研究福建省稻瘟病菌群体无毒基因的分布情况, 首先利用 24 个单基因系水稻品种对从建阳、宁化和上杭分离的 113 个单孢菌株进行致病力和毒力频率分析。

2.1.1 稻瘟病菌致病力分析 对 24 个单基因系水稻的接种结果显示, 建阳 23 个稻瘟菌株的致病频率介于 12.50%~95.83% 之间。其中强致病力菌株、较强致病力菌株、中等致病力和弱致病力菌株数分别为 14、7、1、1 个 (表 3), 占检测菌株总数的 60.87%、30.43%、4.35%、4.35%。表明强致病力的菌株在该区域占优势, 即建阳地区多数菌株对这些已知抗性的水稻品种具有强致病力。对宁化地区采集的 68 个稻瘟菌株的致病性检测结果显示, 这 68 株稻瘟病菌对 24 个单基因系水稻的致病频率介于 29.17%~100% 之间。其中强致病力菌株、较强致病力菌株、中等致病力和弱致病力菌株数分别为 37、21、10、0 个, 占检测菌株总数的 54.41%、30.88%、14.71%、0%。表明强致病力菌株在宁化地区占优势。对上杭地区采集的 22 个稻瘟菌株的致病性检测结果显示, 这 22 株稻瘟病菌对 24 个单基因系水稻的致病频率介于 4.55%~86.36% 之间。其中强致病力菌株、较强致病力菌株、中等致病力和弱致病力菌株数分别为 4、6、9、3 个, 占检测菌株总数的 18.18%、27.27%、40.91%、13.64%。表明中等致病力菌株在上杭地区占优势。

综合分析 3 个地区稻瘟菌株的致病力情况 (表 3), 发现其中强致病力菌株、较强致病力菌株、中等致病力和弱致病力菌株数分别为 55、34、20、4 个, 占检测菌株总数的 48.67%、30.09%、17.70%、3.54%, 说明福建省这 3 个地区的稻瘟菌株具有较强的致病力。

2.1.2 福建稻瘟病菌毒力频率分析 通过致病性分析结果显示, 建阳、宁化和上杭 3 个地区不同稻瘟群体对 24 个抗性单基因系水稻呈现出不同的毒力水平 (表 4)。其中, 建阳地区 23 株稻瘟

表 3 稻瘟菌株致病频率
Tab. 3 Pathogenicity frequency of *M. oryzae* strain

产区 Production area	强致病力 Number of strongest viru- lence strain	较强致病 力菌株数 Number of stronger viru- lence strain	中等致病 力菌株数 Number of moderate viru- lence strain	弱致病力 菌株数 Number of weak viru- lence strain
建阳	14	7	1	1
宁化	37	21	10	0
上杭	4	6	9	3
合计	55	34	20	4
占比/%	48.67	30.09	17.70	3.54

病菌对 *Pit* 的毒力频率 (VF) 最高, 达到 100%; 宁化地区 68 株稻瘟病菌对 *Pib* 的毒力频率最高, 达到 100%; 上杭地区 22 株稻瘟病菌对 *Pib*、*Pik^s* 的毒力频率最高, 达到 86.36%。根据毒力频率进一步将 3 个地区稻瘟菌株对不同抗性单基因系水稻的毒力水平划分为强毒力 (VF ≥ 70%), 中等毒力 (20% ≤ VF < 50) 和弱毒力 (VF < 20%) 3 个等级。分析发现, 建阳和宁化地区菌株对 *Pia*、*Pii*、*Pik^s*、*Piz*、*Pib*、*Pit*、*Pis^h*、*Pi3*、*Pi5*、*Pi7*、*Pi12*、*Pi19*、*Pi20*、*Pita²*、*Pi11*、*Piz^t* 和 *Pita* 均表现为强毒力, 而上杭地区菌株则对 *Pik^s*、*Pib*、*Pi3* 和 *Pi12* 表现为强毒力, 表明携带以上抗性基因的水稻品种不再适宜在相应的地区推广。建阳地区和宁化地区菌株未对任何检测的抗性基因表现出弱毒性, 而上杭地区菌株对 6 个抗性基因 *Pik*、*Pik^p*、*Pik^h*、*Pi1*、*Pi9* 和 *Pik^m* 表现为弱毒性。建阳和宁化地区菌株表现为中等毒力的抗性基因与上杭地区菌株表现为弱毒力的抗性基因一致, 表明上杭稻瘟菌株的毒力频率相对最低, 并且含有 *Pik*、*Pik^p*、*Pik^h*、*Pi1*、*Pi9* 和 *Pik^m* 这 6 个抗性基因的水稻品种仍然适合在这 3 个地区推广。

综合分析 3 个地区稻瘟菌株的毒力频率 (表 4), 发现这 113 个稻瘟菌株对 *Pib* 的毒力频率最高, 达到 95.58%; 并对其中 9 个抗性基因 *Pii*、*Pik^s*、*Pib*、*Pi3*、*Pi12*、*Pi19*、*Pi20*、*Pita²*、*Pi11* 表现出强毒力, 表明携带这 9 个抗性基因的水稻品种不再适合在福建省推广; 此外, 所有菌株对 7 个抗性基因 *Pik*、*Pik^p*、*Pik^h*、*Piz^s*、*Pi1*、*Pi9* 和 *Pik^m* 表现出中等毒力, 表明携带这 7 个抗性基因的水稻目前仍适合在福建省推广。

通过 3 个地区稻瘟病菌群体对 24 个水稻单基因系品种抗瘟基因的毒力频率来计算无毒基因的存在频率 (存在频率=1-毒力频率), 发现建阳地

区 *Avr-Pit*、*Avr-Pi19*、*Avr-Pi11* 的存在频率最低, 分别为 0%、4.35%、4.35%; 宁化地区 *Avr-Pib*、*Avr-Pi12*、*Avr-Pita²* 的存在频率最低, 分别为 0%、2.94%、4.41%; 上杭地区 *Avr-Pik^s*、*Avr-Pib* 的存在频率最低, 仅为 13.64%。综合分析 3 个地区稻瘟菌株的毒力频率 (表 4), 发现这 113 个稻瘟菌株中 *Pib*、*Pii*、*Pik^s*、*Piz*、*Piz^t*、*Pita*、*Pib*、*Pit*、*Pi3*、*Pi7*、*pi12*、*Pi19*、*Pi20*、*Pita²* 和 *Pi11* 这 14 个 *Pi* 基因对应的无毒基因的存在频率较低, 尤其 *Avr-Pib* 的存在频率仅为 4.42%。以上结果表明上述 14 个抗性基因在相应的地区已无利用价值。

表 4 稻瘟病菌群体对 24 个水稻抗瘟单基因系的毒力频率
Tab. 4 Virulence frequency of *M. oryzae* isolates to 24 resistance blast genes

编号 No.	抗瘟基因 Resistance gene	毒力频率 Virulence frequency/%			
		建阳 Jiayang	宁化 Ninghua	上杭 Shanghang	合计 Total
K1	<i>Pia</i>	82.61	70.59	50.00	69.03
K3	<i>Pii</i>	73.91	89.71	63.64	81.42
K4	<i>Pik^s</i>	82.61	91.18	86.36	88.50
K6	<i>Pik</i>	34.78	38.24	18.18	33.63
K7	<i>Pik^p</i>	26.09	39.71	9.09	30.97
K8	<i>Pik^h</i>	21.74	23.53	4.55	28.32
K9	<i>Piz</i>	78.26	73.53	63.64	72.57
K10	<i>Piz^s</i>	69.57	48.53	22.73	47.79
K11	<i>Piz^t</i>	60.87	88.24	40.91	73.45
K12	<i>Pita</i>	82.61	73.53	50.00	70.80
K14	<i>Pib</i>	91.30	100.00	86.36	95.58
K15	<i>Pit</i>	100.00	75.00	68.18	78.76
K17	<i>Pis^h</i>	73.91	54.41	40.91	55.75
K18	<i>Pi1</i>	47.83	26.47	4.55	26.55
K19	<i>Pi3</i>	86.96	92.65	77.27	88.50
K20	<i>Pi5</i>	86.96	72.06	31.82	67.26
K21	<i>Pi7</i>	86.96	85.29	45.45	77.88
K22	<i>Pi9</i>	34.78	41.18	18.18	35.40
K23	<i>Pi12</i>	91.30	97.06	77.27	92.04
K24	<i>Pi19</i>	95.65	91.18	54.55	84.96
K25	<i>Pik^m</i>	26.09	35.29	4.55	27.43
K26	<i>Pi20</i>	86.96	94.12	59.09	85.84
K27	<i>Pita²</i>	86.96	95.59	68.18	88.50
K30	<i>Pi11</i>	95.65	94.12	63.64	89.38

2.2 稻瘟病菌无毒基因检测

为进一步检测福建省 3 个不同的水稻种植地区 113 个稻瘟菌株中已克隆无毒基因的变异情况, 本研究通过 PCR 扩增的方法对不同无毒基因

的存在/缺失多态性进行分析,并通过测序的方法检测其中一些菌株无毒基因的序列突变。

2.2.1 福建省不同地区无毒基因存在/缺失多态性检测 通过分析 8 个无毒基因在福建省 3 个水稻种植地区的分布情况,由表 5 可知,这几个无毒基因在 3 个地区的出现频率具有较大的差异。

Avr-Pik、*Avr-Pi54*、*Avr-Pii* 在福建省 3 个区域的检出频率均超过 90% (表 5),说明这 3 个基因在这些区域分布广泛。*Avr-Pita* 在建阳地区未

检测到,但在宁化和上杭地区的检出频率较高,均超过 60%。*Avr-Pib* 在这 3 个地区的检出频率均较低。*Avr-Piz-t* 在上杭地区的检出频率较低,仅为 9.09%。但是所有菌株中均未检测到 *Avr-Co39* 产物条带,表明福建省这 3 个地区的稻瘟病菌均未携带这个无毒基因。此外,*Avr-Pib* 的出现频率也较小,仅为 37.17%,但是该数值仍远超致病性鉴定的结果 (4.42%),表明检测到的 *Avr-Pib* 中部分是存在突变的。

表 5 稻瘟群体无毒基因检出频率
Tab. 5 Frequency of avirulence genes of *M. oryzae*

地区 Region	菌株数 Number of strain	无毒基因检出频率 Frequency of avirulence genes%							
		<i>Avr-Pib</i>	<i>Avr-Pik</i>	<i>Avr-Pii</i>	<i>Avr-Piz-t</i>	<i>Avr-Pi9</i>	<i>Avr-Pita</i>	<i>Avr-Pi54</i>	<i>Avr-Co39</i>
建阳	23	21.74	100.00	95.65	78.26	86.96	0.00	100.00	0.00
宁化	68	45.59	98.53	92.65	80.88	91.18	85.29	97.06	0.00
上杭	22	27.27	100.00	100.00	9.09	90.91	68.18	100.00	0.00
合计	113	37.17	99.12	94.69	66.37	84.07	64.60	98.23	0.00

2.2.2 无毒基因序列分析 除了缺失突变,无毒基因还可能不存在不同形式的突变。为此,通过 PCR 扩增不同菌株无毒基因进行测序分析。

(1) 无毒基因 *Avr-Pib* 序列分析。将 4 个宁化田间稻瘟菌株 PCR 产物测序结果与 NCBI 数据库中 *Avr-Pib* 的参考序列进行比对,结果显示,这

4 个菌株中 *Avr-Pib* 的 ORF 序列均未发生突变,突变主要发生在起始密码子(ATG)前的 15~32 bp 之间,突变类型包括缺失、插入和替换(图 1)。这些突变虽然未改变编码的氨基酸序列,但是可能影响该基因的表达,从而导致无毒基因功能的丧失。

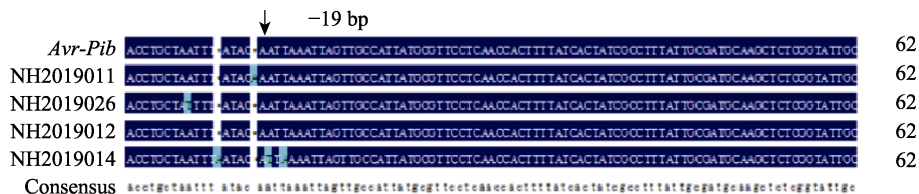


图 1 不同稻瘟菌株 *Avr-Pib* 序列比对结果

Fig. 1 Sequence alignment of *Avr-Pib* from different *M. oryzae* isolates

(2) 无毒基因 *Avr-Pik^h* 序列分析。将宁化稻瘟菌株 NH2019056 和 NH2019059 的测序结果与 NCBI 数据库中 *Avr-Pik^h* 的序列进行比对,结果显示(图 2),这 2 个宁化菌株中 *Avr-Pik^h* 的突变均发生在启动子区域,包括-296、-279、-246、-45 bp。此外, NH2019056 在-432 bp 处还有一个额外的点突变。这些位点的差异可能影响 *Avr-Pik^h* 正常的时空表达模式,从而使该基因无毒功能的丧失。

(3) 无毒基因 *Avr-Pita* 序列分析。将宁化稻瘟菌株 NH2019010 和 NH2019012 扩增的 *Avr-Pita* 产物测序与数据库中 *Avr-Pita* 进行比对,发现 NH2019010 和 NH2019012 菌株突变类型和所对应的位点一致,并且均为碱基替换(图 3),共发

生 7 处碱基替换,分别是 24 bp 处碱基 C 变为 T, 62 bp 处碱基 G 变为 A, 80 bp 处碱基 A 变为 G, 129 bp 处碱基 T 变为 G, 224 bp 处碱基 A 变为 G, 323 bp 处碱基 G 变为 T, 337 bp 处碱基 A 变为 G。将测序后得到的 NH2019010 和 NH2019012 菌株 CDS 序列翻译成氨基酸序列,并与标准的 *Avr-Pita* 氨基酸序列进行比对,在第 21 个氨基酸由丝氨酸(Ser)变为天冬酰胺(Asn), 27 位由赖氨酸(Lys)变为脯氨酸(Pro), 43 位由天冬酰胺(Asn)变为赖氨酸(Lys), 在 75 位由谷氨酸(Glu)变为甘氨酸(Gly), 108 位由甘氨酸(Gly)变为缬氨酸(Val), 113 位由异亮氨酸(Ile)变为缬氨酸(Val)。这 2 个宁化菌株 *Avr-Pita* 中 6 个氨基酸的改变可能改变蛋白质的结构和活性,从而导致

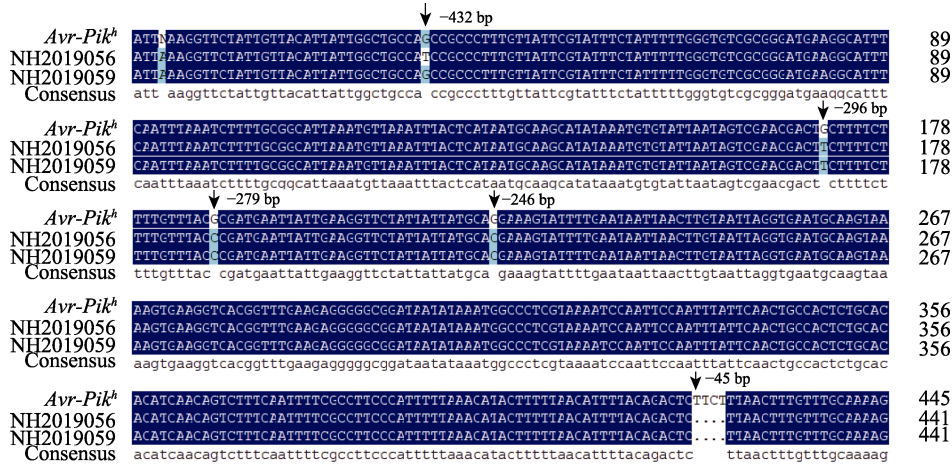


图 2 不同稻瘟菌株 *Avr-Pik^h* 序列比对结果

Fig. 2 Sequence alignment of *Avr-Pik^h* from different *M. oryzae* isolates

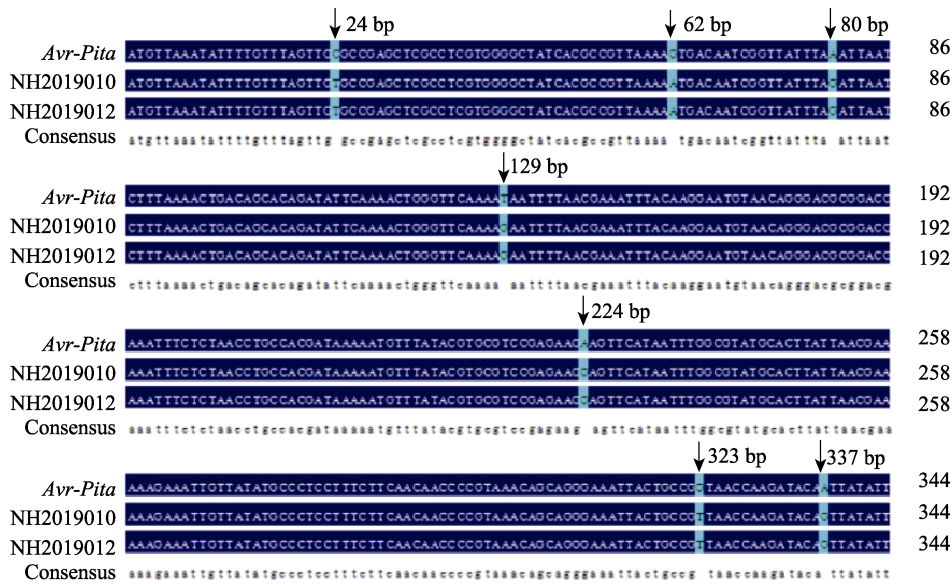


图 3 不同稻瘟菌株 *Avr-Pita* 序列比对结果

Fig. 3 Sequence alignment of *Avr-Pita* from different *M. oryzae* isolates

Avr-Pita 无毒功能的丧失。

(4) 无毒基因 *Avr-Pi9* 序列分析。测序比对结果表明，上杭稻瘟菌株 SH2019018 中 *Avr-Pi9* 的 ORF 333 bp 处插入一个鸟嘌呤 (G)，导致其最后 10 个氨基酸残基的移码突变 (图 4)，并可

能因此导致该菌株可以侵染 *Pi9* 水稻株系。

此外，本研究还检测到 3 个上杭稻瘟菌株 SH2019015、SH2019017 和 SH2019019 中 *Avr-Piz-t* 均在启动子上游缺失一个腺嘌呤 (A) (图 5)，并可能因此而改变基因的表达。

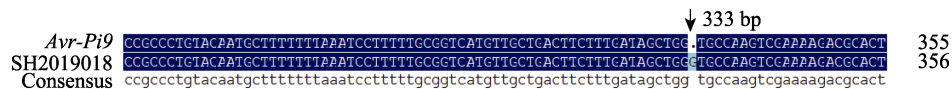


图 4 不同稻瘟菌株 *Avr-Pi9* 序列比对结果

Fig. 4 Sequence alignment of *Avr-Pi9* from different *M. oryzae* isolates

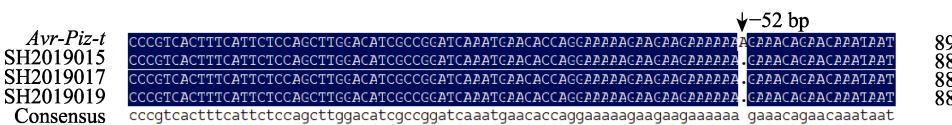


图 5 不同稻瘟菌株 *Avr-Piz-t* 序列比对结果

Fig. 5 Sequence alignment of *Avr-Piz-t* from different *M. oryzae* isolates

3 讨论

福建省不同区域稻瘟病菌田间群体致病频率和毒力频率存在较大差异。不同地区稻瘟病菌群体受水稻栽培品种和温度、湿度等气候条件的影响,可能产生较大的差异^[28]。本研究对福建省建阳、宁化和上杭的 113 个稻瘟单孢菌株进行致病性分析,总体而言,这 3 个地区的稻瘟病菌群体对所检测的 24 个抗病单基因系具有较强的致病性:强致病力菌株和较强致病力菌株分别占检测总菌株数的 48.67%和 30.09%。并且建阳和宁化稻瘟病菌群体的致病频率和毒力频率较为相近,而与上杭稻瘟病菌群体差异较大。其中,最明显的是建阳和宁化稻瘟菌株均未对任何检测的抗性基因表现出弱毒性,并对 6 个抗性基因 *Pik*、*Pik^p*、*Pik^h*、*Pi1*、*Pi9* 和 *Pik^m* 表现为中等毒性;相比之下,上杭稻瘟菌株对这 6 个抗性基因表现为弱毒力。

对 8 个无毒基因的检测结果显示,上杭稻瘟群体中 *Avr-Piz-t* 和建阳稻瘟群体 *Avr-Pita* 的检出频率极低,而 *Avr-Pib* 在建阳和上杭稻瘟群体中的检出频率也较低。表明这些基因不再适宜作为抗源在这些地区推广。此外,福建省这 3 个地区稻瘟群体中均不存在 *Avr-Co39*,这个结果与前人的研究结果^[29]一致,表明侵染水稻的稻瘟群体中很少携带该无毒基因。通过比较分析毒力频率和无毒基因存在频率,发现毒力频率明显高于无毒基因缺失的频率。其原因可能是这些无毒基因还发生除缺失之外的其他突变,如点突变、小片段缺失和 TE 插入等^[30]。本研究通过对部分菌株中 *Avr-Pib*、*Avr-Pik*、*Avr-Pita*、*Avr-Pi9* 和 *Avr-Piz-t* 的 PCR 产物进行测序比对,发现这些基因均发生了不同形式的突变。其中,*Avr-Pik* 和 *Avr-Pita* 主要是在编码区发生了非同义突变,而 *Avr-Pib* 则是在启动子靠近起始密码子的位置发生了碱基的缺失、替换和插入。

本研究与前人的研究结果均表明,利用鉴定品种进行致病性分析或者通过无毒基因检测分析的方法检测稻瘟菌群体无毒基因分布均存在一定的优缺点:利用鉴别品种可以直观地评价稻瘟菌株中是否携带对应的无毒基因,但是无法明确突变无毒基因的突变方式;通过检测已克隆无毒基因序列,可以体现无毒基因的变异方式,但是仅限于已克隆无毒基因,而且,对于受表观沉默的

无毒基因则束手无策^[31]。此外,菌株中还可能存在干扰无毒基因和 *R* 基因互作的因子^[32]。因此,结合 2 种方法是当前检测和分析无毒基因变异情况的最佳方案。

综上所述,本研究利用 24 个单基因水稻品种对福建省 3 个水稻栽培地区采集的 113 个稻瘟菌单孢菌株进行致病性分析,统计了 3 个地区菌株的致病频率、毒力频率、无毒基因的存在频率、无毒基因的组合频率。同时检测了 3 个地区稻瘟菌株中已克隆无毒基因的组成和变异情况。结果表明,携带 *Pik^s*、*Pib*、*Pi3* 和 *Pi12* 的水稻不适合在福建种植;携带 *Pia*、*Pii*、*Piz*、*Pita*、*Pit*、*Pis^h*、*Pi5*、*Pi7*、*Pi19*、*Pi20*、*Pita²* 和 *Pi11* 的水稻不适合在建阳和宁化种植。而携带 *Pi1*、*Piz^s*、*Pi9* 和 *Pik*、*Pik^h*、*Pik^m* 位点的水稻品种仍适合在福建种植。根据周江鸿等^[33]2003 年对福建省稻瘟病菌的毒力分析,未发现对抗性基因 *Piz* 有毒力的菌株,而目前福建这 3 个地区对 *Piz*、*Piz^t*、*Pib*、*Pi3*、*Pi9*、*Pi12*,以及建阳和宁化地区对 *Pi5*、*Pi7* 有毒力的菌株毒力频率呈上升趋势,而 3 个地区对 *Pis^h*、*Pik^m* 的毒力频率呈下降趋势。对比本实验室 2003 年的检测结果^[34],发现上杭地区稻瘟菌群体对 *Pi1* 的毒力频率呈下降趋势,而建阳和宁化地区的毒力频率却呈上升趋势。同样,通过与杨秀娟等^[13]2007 年检测的结果进行比较,发现福建这 3 个地区稻瘟菌群体菌株对 *Pik^p* 和 *Pik^m* 的毒力频率呈下降趋势,而建阳和宁化稻瘟菌株对 *Pik*、*Pik^m*、*Pik^h*、*Pi1* 和 *Piz^s* 的毒力频率均呈上升趋势。对比杜新宜等^[4]2016 年的结果发现,3 个地区稻瘟菌群体菌株对 *Pia*,以及宁化、上杭地区稻瘟菌株对 *Pis^h* 的毒力频率呈下降趋势,而对 *Pii*、*Piz^s*、*Piz^t*、*Pita*、*Pib*、*Pi7*、*Pi11* 的毒力频率均呈上升趋势。以上结果表明在过去的十几年间,福建稻瘟菌群体无毒基因组成存在一定的波动,并且不同地区的变化趋势也有差异。因此,对福建地区稻瘟菌群体无毒基因组成进行持续的检测仍具有重要的意义。

参考文献

- [1] FISHER M C, HENK D A, BRIGGS C J, BROWNSTEIN J S, MADOFF L C, MCCRAW S L, GURR S J. Emerging fungal threats to animal, plant and ecosystem health[J]. Nature, 2012, 484(7393): 186-194.
- [2] 曹妮, 陈渊, 季芝娟, 曾宇翔, 杨长登, 梁燕. 水稻抗稻瘟

- 病分子机制研究进展[J]. 中国水稻科学, 2019, 33(6): 489-498.
- CAO N, CHEN Y, JI Z J, ZENG Y X, YANG C D, LIANG Y. Recent progress in molecular mechanism of rice blast resistance[J]. Chinese Journal of Rice Science, 2019, 33(6): 489-498. (in Chinese)
- [3] 李杨, 王耀雯, 王育荣, 于洁. 水稻稻瘟病菌研究进展[J]. 广西农业科学, 2010, 41(8): 789-792.
- LI Y, WANG Y W, WANG Y R, YU J. Research progress on rice blast fungus[J]. Journal of Southern Agriculture, 2010, 41(8): 789-792. (in Chinese)
- [4] 杜宜新, 阮宏椿, 石妞妞, 甘林, 杨秀娟, 陈福如. 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[J]. 植物保护学报, 2016, 43(3): 442-451.
- DU Y X, RUAN H C, SHI N N, GAN L, YANG X J, CHEN F R. Pathogenicity analysis of *Magnaporthe grisea* against major *Pi*-genes and main rice varieties in Fujian province[J]. Acta Phytopylacica Sinica, 2016, 43(3): 442-451. (in Chinese)
- [5] FLOR H H. Current status of the gene-for-gene concept[J]. Annual Review of Phytopathology, 1971, 9(1): 275-296.
- [6] ORBACH M J, FARRALL L, SWEIGARD J A, CHUMLEY F G, VALENT B. A telomeric avirulence gene determines efficacy for the rice blast resistance gene *Pi-ta*[J]. The Plant Cell, 2000, 12(11): 2019-2032.
- [7] LI W, WANG B H, WU J, LU G D, HU Y J, ZHANG X, ZHANG Z G, ZHAO Q, FENG Q, ZHANG H Y, WANG Z Y, WANG G L, HAN B, WANG Z H, ZHOU B. 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*[J]. Molecular Plant-Microbe Interactions, 2009, 22(4): 411-420.
- [8] WANG B H, EBBOLE D J, WANG Z H. The arms race between *Magnaporthe oryzae* and rice: diversity and interaction of *Avr* and *R* genes[J]. Journal of Integrative Agriculture, 2017, 16(12): 2746-2760.
- [9] 李宏宇, 鲁国东, 王宗华. 稻瘟菌无毒基因研究进展[J]. 中国生物工程杂志, 2003, 23(6): 27-30, 35.
- LI H Y, LU G D, WANG Z H. Avirulence genes in *Magnaporthe grisea*[J]. Journal of Chinese Biotechnology, 2003, 23(6): 27-30, 35. (in Chinese)
- [10] ATKINS J G, ROBERTA L, ADAIR C R, GOTO K, KOZAKA T, YANAGIDA R, YAMADA M, MATSUMOT S. An international set of rice varieties for differentiating races of *Piricularia oryzae*[J]. Phytopathology, 1967, 57: 297-301.
- [11] 凌忠专, 潘庆华, 黄书钗, 王久林. 水稻抗稻瘟病育种[M]. 福州: 福建科学技术出版社, 1990.
- LING Z Z, PAN Q H, HUANG S Z, WANG J L. Rice blast resistance breeding[M]. Fuzhou: Fujian Science and Technology Press, 1990. (in Chinese)
- [12] LI J B, YANG J, LIU L, HE H M, HE X H, ZHU Y Y, LI C Y. Geographic distribution of avirulence genes in rice blast fungus in Yunnan province, China[J]. Journal of Resources and Ecology, 2011, 2(2): 181-185.
- [13] 杨秀娟, 阮宏椿, 杜宜新, 陈福如, 王茂明. 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.
- YANG X J, RUAN H C, DU Y X, CHEN F R, WANG M M. Pathogenicity and avirulence genes analysis of *Magnaporthe grisea* Barr. from rice in Fujian province of China[J]. Acta Phytopylacica Sinica, 2007 (4): 337-342. (in Chinese)
- [14] 朱名海, 赵美, 舒灿伟, 周而勋. 南繁区稻瘟病菌无毒基因的检测[J]. 华中农业大学学报, 2017, 36(4): 21-25.
- ZHU M H, ZHAO M, SHU S W, ZHOU E X. Detection of avirulence genes in *Magnaporthe oryzae* from South China crop breeding area[J]. Journal of Huazhong Agricultural University, 2017, 36(4): 21-25. (in Chinese)
- [15] 李祥晓, 王倩, 罗生香, 何云霞, 朱苓华, 周永力, 黎志康. 黑龙江省稻瘟病菌无毒基因分析及抗病种质资源筛选[J]. 作物学报, 2012, 38(12): 2192-2197.
- LI X X, WANG Q, LUO S X, HE Y X, ZHU L H, ZHOU Y L, LI Z K. Analyzing avirulence genes of *Magnaporthe oryzae* from Heilongjiang province and screening rice germplasm with resistance to blast fungus[J]. Acta Agronomica Sinica, 2012, 38(12): 2192-2197. (in Chinese)
- [16] 张崎峰, 靳学慧, 蔡鑫鑫, 李金良, 陈海军. 黑龙江省稻瘟病菌无毒基因的检测[J]. 黑龙江农业科学, 2014(12): 70-74.
- ZHANG Q F, JIN X H, CAI X X, LI J L, CHEN H J. Detection on avirulence gene of rice blast in Heilongjiang province[J]. Heilongjiang Agricultural Sciences, 2014(12): 70-74. (in Chinese)
- [17] 孟峰, 张亚玲, 靳学慧. 黑龙江省稻瘟病菌无毒基因 *AVR-Pita* 及其同源基因的检测与分析[J]. 中国水稻科学, 2020, 34(2): 143-149.
- MENG F, ZHANG Y L, JIN X H. Detection and analysis of *Magnaporthe oryzae* avirulent gene *AVR-Pita* and its homologous genes in Heilongjiang province[J]. Chinese Journal of Rice Science, 2020, 34(2): 143-149. (in Chinese)
- [18] 金晓春, 李志新, 张海生, 李晓方. 稻瘟病菌分离及保存方法研究[J]. 安徽农业科学, 2008, 36(17): 7308-7308, 7390.
- JIN X C, LI Z X, ZHANG H S, LI X F. The study on the isolation and preservation of rice blast fungus[J]. Journal of Anhui Agricultural Sciences, 2008, 36(17): 7308-7308, 7390.

- (in Chinese)
- [19] 龚国淑, 徐琴, 张敏, 杨继芝, 陈华保, 申世安, 唐太飞. 一种简便的病原真菌单孢分离方法研究[J]. 玉米科学, 2010(1): 126-127, 134.
GONG G S, XU Q, ZHANG M, YANG J Z, CHEN H B, SHEN S A, TANG T F. A simple method for single fungal spore isolation[J]. Journal of Maize Sciences, 2010(1): 126-127, 134. (in Chinese)
- [20] FANG W W, LIU C C, ZHANG H W, XU H, ZHOU S, FANG K X, PENG Y L, ZHAO W S. Selection of differential isolates of *Magnaporthe oryzae* for postulation of blast resistance genes[J]. Phytopathology, 2018, 108(7): 878-884.
- [21] 刘文德, 阮志平, 郑士琴, 赵长江, 郑武, 鲁国东, 王宗华. 水稻主要抗瘟基因对福建稻瘟菌群体的抗性分析[J]. 植物病理学报, 2005, 35(6): 526-531.
LIU W D, RUAN Z P, ZHENG S Q, ZHAO C J, ZHENG W, LU G D, WANG Z H. Resistance of rice major *Pi*-genes to the *Magnaporthe grisea* population in Fujian, China[J]. Acta Phytopathologica Sinica, 2005(6): 526-531. (in Chinese)
- [22] BONMAN J M, DE DIOS T I V, KHIN M M. Physiologic specialization of *Piricularia oryzae* in the Philippines[J]. Plant Disease, 1986, 70(8): 767-769.
- [23] VALENT B, FARRALL L, CHUMLEY F G. *Magnaporthe grisea* genes for pathogenicity and virulence identified through a series of backcrosses[J]. Genetics, 1991, 127(1): 87-101.
- [24] 孟庆林, 张匀华, 季宏平, 王芊, 孙毅民. 黑龙江省小麦白粉病菌毒性结构及毒力频率初步研究[J]. 黑龙江农业科学, 2005(5): 1-3.
MENG Q L, ZHANG Y H, JI H P, WANG Q, SUN Y M. Study on the virulent genes of *Erysiphe graminis* f. sp. Tritici in Heilongjiang province[J]. Heilongjiang Agricultural Science, 2005(5): 1-3. (in Chinese)
- [25] 王焕如, 赵兰波, 朱之培, 汪宜萱, 袁景顺, 赤国彤. 毒力频率在小麦抗叶锈性研究中的运用和发展[J]. 河北农业大学学报, 1984(2): 25-33.
WANG H R, ZHAO L B, ZHU Z Y, WANG Y X, YUAN J S, CHI G T. The application and improvement on the method of studying virulence frequency in the study of leaf rust of wheat[J]. Journal of Hebei Agricultural University, 1984(2): 25-33. (in Chinese)
- [26] 周维佳, 谢海呈, 曾令祥. 毒力频率在水稻抗稻瘟病性中的应用[J]. 西南农业学报, 1998, 11(1): 74-79.
ZHOU W J, XIE H C, ZENG L X. Pathogenetic frequencies of *Pyricularia oryzae* Cav. to rice varieties and hybrid combinations[J]. Southwest China Journal of Agricultural Sciences, 1998, 11(1): 74-79. (in Chinese)
- [27] SELISANA S M, YANORIA M J, QUIME B, CHAIPANYA C, LU G, OPULENCIA R, WANG G L, MITCHELL T, CORRELL J, TALBOT N J, LEUNG H, ZHOU B. Avirulence (*AVR*) gene-based diagnosis complements existing pathogen surveillance tools for effective deployment of resistance (*R*) genes against rice blast disease[J]. Phytopathology, 2017, 49(9): 711-720.
- [28] 张学博, 余菊生. 福建省稻瘟病菌生理小种的研究[J]. 福建农学院学报, 1981(1): 20-32.
ZHANG X B, YU J S. An investigation on the physiogocal race of rice blast fungus (*Pyricularia oryzae* cav.) in Fujian[J]. Journal of Fujian Agriculture College, 1981(1): 20-32. (in Chinese)
- [29] FARMAN M L, LEONG S A. Chromosome walking to the *AVR1-CO39* avirulence gene of *Magnaporthe grisea*: discrepancy between the physical and genetic maps[J]. Genetics, 1998, 150(3): 1049-1058.
- [30] HUANG J, SI W N, DENG Q M, LI P, YANG S H. Rapid evolution of avirulence genes in rice blast fungus *Magnaporthe oryzae*[J]. BMC Genetics, 2014, 15(1): 45.
- [31] WANG L Y, CHEN H, LI J J, SHU H D, ZHANG X X, WANG Y C, TYLER B M, DONG S M. Effector gene silencing mediated by histone methylation underpins host adaptation in an oomycete plant pathogen[J]. Nucleic Acids Research, 2020, 48(4): 1790-1799.
- [32] INOUE Y, VY T T P, TANI D, TOSA Y. Suppression of wheat blast resistance by an effector of *Pyricularia oryzae* is counteracted by a host specificity resistance gene in wheat[J]. New Phytologist, 2021, 229(1): 488-500.
- [33] 周江鸿, 王久林, 蒋琬如, 雷财林, 凌忠专. 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.
ZHOU J H, WANG J L, JIANG W R, LEI C L, LING Z Z. Virulence genes diversity and geographic distribution of *Pyricularia grisea* in China[J]. Acta Agronomica Sinica, 2003, 29(5): 646-651.
- [34] 鲁国东, 郑武, 阮志平, 陈在杰, 王宗华. 福建省稻瘟菌毒性类型组成及其对水稻几个 *Pi* 基因的毒性频率[J]. 植物病理学报, 2003, 33(3): 248-253.
LU G D, ZHENG W, RUAN Z P, CHEN Z J, WANG Z H. Pathotypes of *Magnaporthe grisea* Barr. and virulence to several rice *Pi*-genes in Fujian Province[J]. Acta Phytopathologica Sinica, 2003, 33(3): 248-253.