

武陵山区稻瘟病菌生理小种分子鉴定体系的建立

刘松青, 郑洁, 王春台, 徐鑫*

(中南民族大学生命科学院, 武陵山区特色资源植物种质保护与利用湖北省重点实验室, 生物技术国家民委重点实验室, 湖北武汉 430074)

摘要 [目的]建立武陵山区稻瘟病菌生理小种分子鉴定体系。[方法]选用 RAPD、REMAP、Rep-PCR 3 种分子标记和无毒基因检测, 对武陵山区稻瘟病菌生理小种文库中 2013—2015 年分离的 220 个菌株进行指纹图谱的构建和聚类分析。[结果]共统计 26 对引物扩增得到的 3 年样本中稳定出现的 97 条具有多态性的条带。聚类分析结果显示, 在 0.75 的相似性水平上可将 220 个菌株分为 12 个遗传谱系, 谱系 10 为优势谱系, 不同年份的稻瘟病菌群体遗传结构存在一定差异, 但并未发生明显演化。[结论]建立了新的武陵山区稻瘟病菌生理小种分子鉴定体系, 为该地区抗稻瘟病菌品种的选育和布局提供参考。

关键词 稻瘟病菌; 遗传谱系; 鉴定体系; 武陵山区

中图分类号 S435.111.4⁺1 文献标识码 A

文章编号 0517-6611(2019)09-0144-07

doi: 10.3969/j.issn.0517-6611.2019.09.043



开放科学(资源服务)标识码(OSID):

Establishment of Molecular Identification System of *Magnaporthe oryzae* in the Wuling Mountain Area

LIU Song-qing, ZHENG Jie, WANG Chun-tai et al (Hubei Provincial Key Laboratory for Protection and Application of Special Plants in Wuling Area of China, Key Lab for Biotechnology of State Ethnic Affairs Commission, College of Life Science, South-Central University for Nationalities, Wuhan, Hubei 430074)

Abstract [Objective] To establish molecular identification system of *Magnaporthe oryzae* in the Wuling Mountain Area of China. [Method] Marker system including RAPD, REMAP, Rep-PCR and *Avr* genes was developed for fingerprint mapping and cluster analysis of 220 *M. oryzae* isolates collected from the Wuling Mountain Area during 2013–2015. [Result] A total of 97 polymorphic bands amplified by 26 pairs of primers were counted. The cluster analysis data showed that 220 strains could be divided into 12 genetic lineages at the 75% similarity level, and the lineage 10 was the dominant lineage. There were some differences in the genetic structure of *M. oryzae* populations in different years, but no significant evolution occurred. [Conclusion] The study established a new molecular identification system for *M. oryzae* in the Wuling Mountain Area, and provided a reference for the breeding and distribution of the *M. oryzae* resistant varieties in this area.

Key words *Magnaporthe oryzae*; Genetic lineage; Identification system; Wuling Mountain Area

稻瘟病是水稻重要的病害之一,可引起水稻大幅减产,严重时减产 40% ~ 50%^[1]。在防治稻瘟病的几种手段中,培育抗病品种仍是最经济有效的方法^[2]。然而,稻瘟病菌具有复杂的种群结构且变异频繁,可以在抗病品种田间应用的短短几年内克服其抗性^[3]。因此,分析稻瘟病菌的遗传结构和变异规律可为预测病害的发生及指导抗病品种的分布提供重要依据,可有效预防宿主抗性丧失引起的疾病流行^[4]。随着现代分子生物学技术的快速发展,分子标记技术已被大量运用到稻瘟病菌的群体遗传结构研究中,且取得了巨大进展^[5]。最常用的分子标记包括扩增片段长度多态性(AFLP)、限制性内切酶片段长度多态性(RFLP)、随机扩增多态性 DNA(RAPD)、反转录转座子-微卫星扩增多态性(REMAP)、Rep-PCR 技术、特异性扩增片段(SCAR)、简单重复序列(SSR)等^[6],其中 RAPD、REMAP、Rep-PCR 操作简单,成本低廉,仅需少量 DNA 和无需放射性等优点。此外, Huang 等^[7]、Imam 等^[8]、Selisand 等^[9]还开发了基于 *Avr* 基因的鉴定手段以确定稻瘟病种群的毒力谱。

武陵山区是稻瘟病重灾区,水稻种植面积超过 70 万 hm²,最严重时武平县稻瘟病病田率达 100%^[10]。该地区地形比较复杂,山峦呈高低起伏分布,各地方相对海拔差

距较大。水稻作为该地区的主要农作物,稻田主要分布在一些峡谷和沟渠中^[11]。由于该地区全年雨量充沛,雾露多,湿气重,水稻生长期的温度和湿度均很高,非常适合稻瘟病菌的繁殖,导致武陵山区稻瘟病菌的生理种类丰富,种群结构复杂,侵略性强。作为国家防治稻瘟病的重点区域,鄂西南地区是研究稻瘟病的理想地区。

在前期研究中,武陵山区特色资源植物种质保护与利用湖北省重点实验室从武陵山区采集了感染稻瘟病的水稻稻秆,构建了生理小种文库^[12],并对 2012—2014 年分离得到的稻瘟病菌生理小种进行了致病性分析^[13]与遗传多样性分析^[4]。笔者在沿用李泌等^[12]的分子标记鉴定体系的基础上,使用 RAPD、REMAP、Rep-PCR 及无毒基因 4 种鉴定手段,共 26 对引物,对 2013—2015 年分离的稻瘟病菌进行指纹图谱的构建,统计了指纹图谱中具有多态性的主带并建立新的分子鉴定体系,旨在为后续分子鉴定提供便利,并为该地区抗稻瘟病菌品种的选育和布局提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株。所用稻瘟病菌生理小种均由武汉中南民族大学武陵山区特色资源植物种质保护与利用湖北省重点实验室/生物技术国家民委重点实验室提供。

1.1.2 培养基。燕麦片培养基:取无糖燕麦片 30 g 置于锅内,然后加入清水 1 000 mL,煮沸约 5 min,过滤网过滤燕麦残渣。过滤液内加入蔗糖 15 g,琼脂 7 g,121 °C 灭菌 20 min。

液体培养基:10 g 葡萄糖,3 g 酵母提取物,加水定容至

基金项目 湖北省自然科学基金资助项目(2018CFB476);中央高校专项基金资助项目(CZD19001)。

作者简介 刘松青(1994—),女,安徽池州人,硕士研究生,研究方向:植物病理;郑洁(1996—),女,湖北荆州人,硕士研究生,研究方向:植物病理。刘松青和郑洁为共同第一作者。*通信作者,副教授,硕士生导师,从事遗传学研究。

收稿日期 2019-01-03

1 000 mL, 121 °C 灭菌 20 min。

1.2 方法

1.2.1 菌丝获取。从保存菌种的滤纸条^[14]上剪下一小片置于燕麦培养基中心, 26 °C 培养 7 d 左右。用接种针挑取菌块(1 mm×1 mm)于液体培养基中, 26 °C、150 r/min 摇床培养 3~4 d。镊子夹取菌丝体至 2 mL EP 管, 离心去上清后用真空冷冻干燥机干燥菌丝, 捣碎备用。

1.2.2 DNA 提取。用 10% SDS 和 2% CTAB 对约 50 mg 菌丝粉末进行基因组 DNA 的提取^[15], 将提取的基因组 DNA 直接电泳(0.8% 琼脂糖凝胶)检测质量及浓度, 条带清晰的 DNA 用于后续 PCR 的扩增。

1.2.3 PCR 扩增。选取 RAPD、REMAP、rep-pot2-PCR 3 种分子标记以及无毒基因对稻瘟病菌基因组 DNA 进行 PCR 扩增。扩增体系见表 1~4, 引物见表 5。扩增 RAPD 扩增程序: 94 °C, 5 min; 94 °C, 1 min, 35 °C, 40 s, 72 °C, 2 min, 40 个循环; 72 °C, 10 min; 4 °C, 保存。REMAP 扩增程序(T_m 统一代表不同引物的退火温度): 92 °C, 5 min; 92 °C, 45 s, T_m, 45 s, 72 °C, 1 min, 40 个循环; 72 °C, 10 min; 4 °C, 保存。

表 1 RAPD 扩增体系

Table 1 PCR reaction system for RAPD

编号 No.	体系成分 System components	用量 Dosage// μ L
1	ddH ₂ O	6.3
2	10×PCR Buffer	1.0
3	dNTP Mix(10 mmol/L)	0.8
4	Primer(10 μ mol/L)	0.4
5	MgCl ₂ (25 mmol/L)	0.4
6	rTaq 酶(5 U/ μ L)	0.1
7	DNA 模板(50 ng/ μ L)	1.0

表 5 试验所用引物

Table 5 PCR primers used in this study

分子标记类型 Molecular marker type	引物 Primer	引物序列(5'-3') Primer sequences	退火温度 Annealing temperature//°C	目的片段大小 Destination fragment size//bp
RAPD	S520	ACGGCAAGGA	35	多态性
	S1014	TGTGGCCGAA		
	S1032	GACGCGAACC		
	S1033	ACGCTGCGAC		
	S1076	CTGCGTGCTC		
	S1087	CCGTCCATCC		
	S1110	CAGACCGACC		
	S1125	GGTGCCAGTT		
	S1169	GTGGTCCAGA		
	S1189	AGTCCCCCTC		
	S1198	GGGAGCGAGT		
	S1219	CTGATCGCGG		
	S1243	GACTGGGAGG		
	S1261	GGGATGGAAC		
REMAP	LTR1	TGTCACAGACCTGAAGAACA	56	多态性
	ISSR1	AGAGAGAGAGAGAGAGC		
	ISSR4	ACACACACACACACACG		
Rep-PCR	ISSR6	CACACACACACACACARC	54	多态性
	Pot2-1	CGGAAGCCCTAAAGCTGTTT	62	多态性
	Pot2-2	CCCTCATTCTGACACAGTTC	62	多态性
无毒基因	Avr-pik F	ACTTGGGAACTGTGCTGTC	60	184
	Avr-pik R	AGCTGTAACAGTTCCAGCATC		
	Avr-pita F	CGACCCGTTTCCGCCTTTATT		
	Avr-pita R	TCCCTCCATTCCAACACTAACG		
	Avr1-CO39 F	AATTGCATAATCGCTGCGAT		
Avr1-CO39 R	GTCAAGCTCAGAACTTTGTT	54	918	

表 2 REMAP 扩增体系

Table 2 PCR reaction system for REMAP

编号 No.	体系成分 System components	用量 Dosage// μ L
1	ddH ₂ O	6.0
2	10×PCR Buffer	1.0
3	dNTP Mix(10 mmol/L)	0.5
4	LTR1(10 μ mol/L)	0.4
5	ISSR(10 μ mol/L)	0.6
6	MgCl ₂ (25 mmol/L)	0.4
7	rTaq 酶(5 U/ μ L)	0.1
8	DNA 模板(50 ng/ μ L)	1.0

表 3 Rep-PCR 扩增体系

Table 3 PCR reaction system for Rep-PCR

编号 No.	体系成分 System components	用量 Dosage// μ L
1	ddH ₂ O	6.75
2	10×Ex PCR Buffer	1.00
3	dNTP Mix(10 mmol/L)	0.80
4	Pot2-1(10 μ mol/L)	0.20
5	Pot2-2(10 μ mol/L)	0.20
6	ExTaq 酶(5 U/ μ L)	0.05
7	DNA 模板(50 ng/ μ L)	1.00

表 4 无毒基因扩增体系

Table 4 PCR reaction system for avirulence genes

编号 No.	体系成分 System components	用量 Dosage// μ L
1	ddH ₂ O	14.3
2	10×PCR buffer	2.0
3	dNTP Mix(10 mmol/L)	1.0
4	Primer F(10 μ mol/L)	0.3
5	Primer R(10 μ mol/L)	0.3
6	rTaq 酶(5 U/ μ L)	0.1
7	DNA 模板(50 ng/ μ L)	2.0

续表 1

分子标记类型 Molecular marker type	引物 Primer	引物序列(5'-3') Primer sequences	退火温度 Annealing temperature// $^{\circ}\text{C}$	目的片段大小 Destination fragment size//bp
	Avr-piz-t F	AAACCAGGGCAGCCAAAGA	58	153
	Avr-piz-t R	ATTCCAATCGAGCCAACG		
	Avr-ACE1 F	CCCAGAGTTGGCGATGATGC	62	661
	Avr-ACE1 R	ATGTGGCGGTGACAGAGGAC		
	Avr-pia F	TCTCGGGAAGCTGATRGAGT	59	265
	Avr-pia R	CTAACGGCCGGCTAACAAAC		

Rep-PCR 扩增程序:95 $^{\circ}\text{C}$, 2.5 min;94 $^{\circ}\text{C}$, 1 min,62 $^{\circ}\text{C}$, 1 min,65 $^{\circ}\text{C}$, 10 min,4 个循环;94 $^{\circ}\text{C}$, 30 s;62 $^{\circ}\text{C}$, 1 min,65 $^{\circ}\text{C}$, 10 min,26 个循环;65 $^{\circ}\text{C}$, 15 min;4 $^{\circ}\text{C}$, 保存。

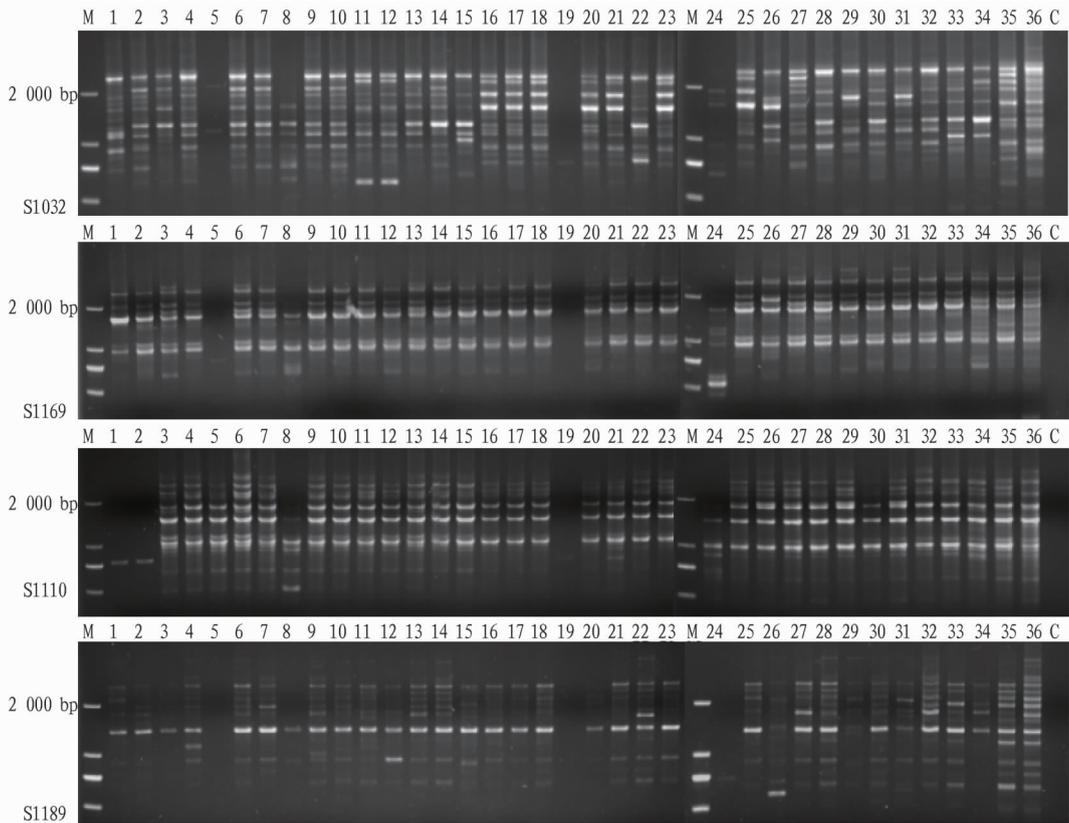
无毒基因扩增程序(T_m 统一代表不同引物的退火温度):94 $^{\circ}\text{C}$, 5 min;94 $^{\circ}\text{C}$, 45 s, T_m ,45 s,72 $^{\circ}\text{C}$, 90 s,35 个循环;72 $^{\circ}\text{C}$, 10 min;4 $^{\circ}\text{C}$, 保存。

RAPD 及 REMAP PCR 产物用 2% 琼脂糖凝胶进行电泳检测,Rep-PCR 和无毒基因 PCR 产物分别用 0.8% 和 1.0%

琼脂糖凝胶进行电泳检测,上样量为 5 μL 。

2 结果与分析

2.1 RAPD 电泳检测结果 使用 16 对 RAPD 引物对 2013—2015 年分离的 220 个稻瘟病菌基因组进行 PCR 扩增(2013 年部分结果见图 1),结果所有条带均大于 500 bp,对照无条带产生。对 3 年样本的扩增条带进行比较,选择明显、稳定、清晰的条带,统计了 73 个条带。



注:M. DL 2000;1~36. 2013 年稻瘟病菌生理小种 DNA;C. 空白对照

Note:M. DL 2000;1~36. DNA of *M. Oryzae* isolated in 2013;C. Blank control

图 1 2013 年稻瘟病菌生理小种 RAPD 指纹图谱

Fig. 1 DNA fingerprints patterns of *M. oryzae* isolated in 2013 by RAPD

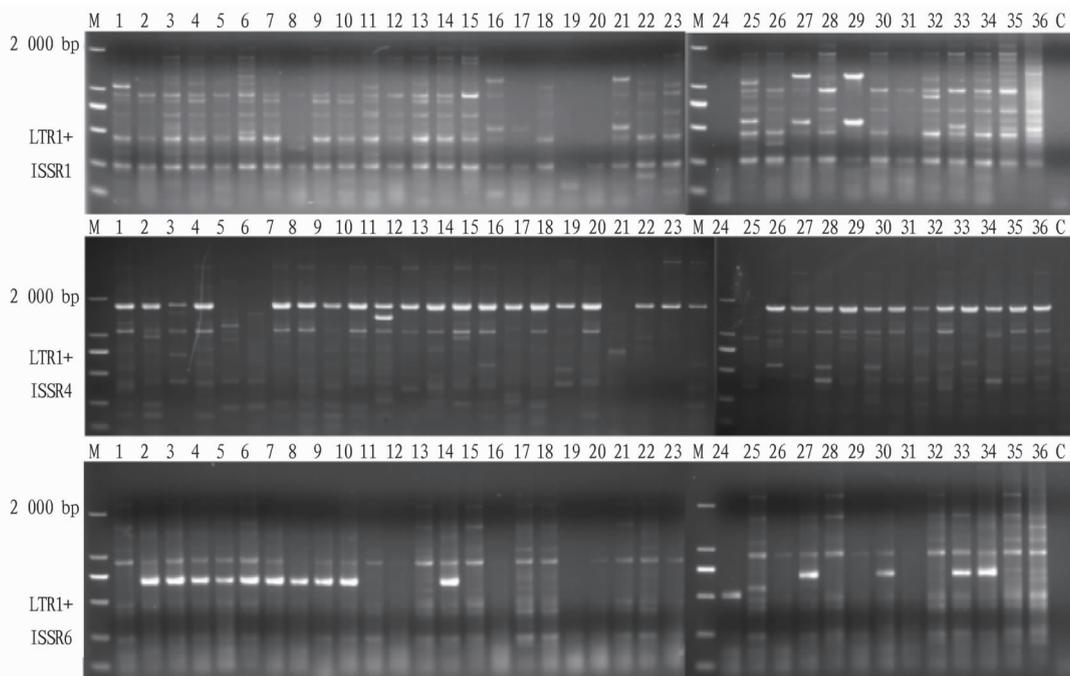
2.2 REMAP 电泳检测结果 使用 LTR1+ISSR1/4/6 这 3 对 REMAP 引物进行 PCR 扩增(2013 年扩增结果见图 2),由图 2 可知,大部分条带分布于 100~2 000 bp,少量条带大于 2 000 bp,对照无条带。对比 2013—2015 年样本扩增结果,得到了 11 个稳定且有多态性的带型。

2.3 Rep-PCR 电泳检测结果 用 pot2-1+pot2-2 对 2013—2015 年分离的稻瘟病菌进行 PCR 扩增(2013 年菌株

扩增结果见图 3),由图 3 可知,大部分条带分布于 1 000~10 000 bp,获得 5 个稳定带型。

2.4 无毒基因扩增电泳检测结果 对 220 个稻瘟病菌进行了包括 *Avr-pita*、*Avr-pizt*、*Avr-ACE1*、*Avr1-CO39*、*Avr-pit*、*Avr-pia* 的 6 个无毒基因的检测(2013 年扩增结果见图 4)。由图 4 可知,2013 年分离的稻瘟病菌都有无毒基因 *Avr-pizt*,在是否含有无毒基因 *Avr-pia*、*Avr-pita*、*Avr1-CO39* 上具有一定差

异,但总体上差异不显著。

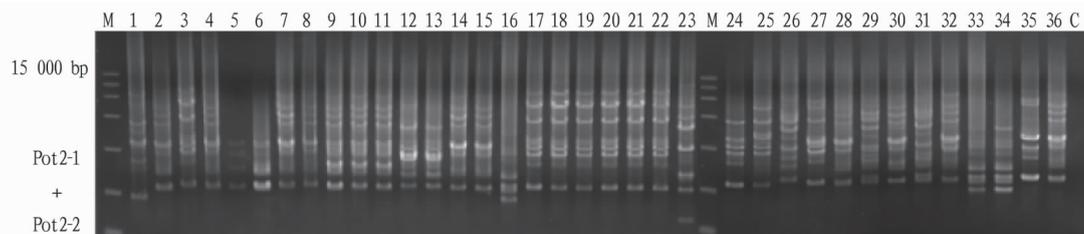


注: M. DL 2000; 1~36. 2013 年稻瘟病菌生理小种 DNA; C. 空白对照

Note: M. DL 2000; 1~36. DNA of *M. Oryzae* isolated in 2013; C. Blank control

图 2 2013 年稻瘟病菌生理小种 REMAP 指纹图谱

Fig. 2 DNA fingerprints patterns of *M. oryzae* isolated in 2013 by REMAP



注: M. DL 15000; 1~36. 2013 年稻瘟病菌生理小种 DNA; C. 空白对照

Note: M. DL 15000; 1~36. DNA of *M. Oryzae* isolated in 2013; C. Blank control

图 3 2013 年稻瘟病菌生理小种 Rep-PCR 指纹图谱

Fig. 3 DNA fingerprints patterns of *M. oryzae* isolated in 2013 by Rep-PCR

2.5 鉴定体系建立 根据 220 个稻瘟病菌生理小种的 PCR 扩增结果,由于 RAPD 具有重复性差的缺点,从分子标记 RAPD 扩增得到的超过 118 条带型中选择 73 条稳定出现、条带清晰、且 3 年间稳定存在的带型,加上 REMAP 和 Rep-PCR 中分别得到的 11 和 5 条带型以及对 6 对无毒基因的检测,共得到 97 条能有效区分不同生理小种的条带,将其命名为武陵山区稻瘟病菌生理小种分子鉴定体系(图 5)。

2.6 聚类分析 根据鉴定体系中对条带扩增的有无,有赋值为“1”,无则赋值为“0”,构建了“0-1”数据库,应用 PAST v 3. 16 对数据进行处理,使用未加权对组平均(UPGMA)算法和 Dice 相似性指数评估各菌株之间的相似性。聚类结果显示,在相似性系数为 0. 75 时,220 个菌株被分为 12 个遗传谱系,其中谱系 1、2、4、5、7、12 为 2015 年的单个菌株,谱系 3 谱系和 8 包含 2 个 2015 的菌株,谱系 6 和谱系 9 分别包含 4 个和 9 个 2015 年的菌株。谱系 10 为优势谱系,包括 33 个 2013

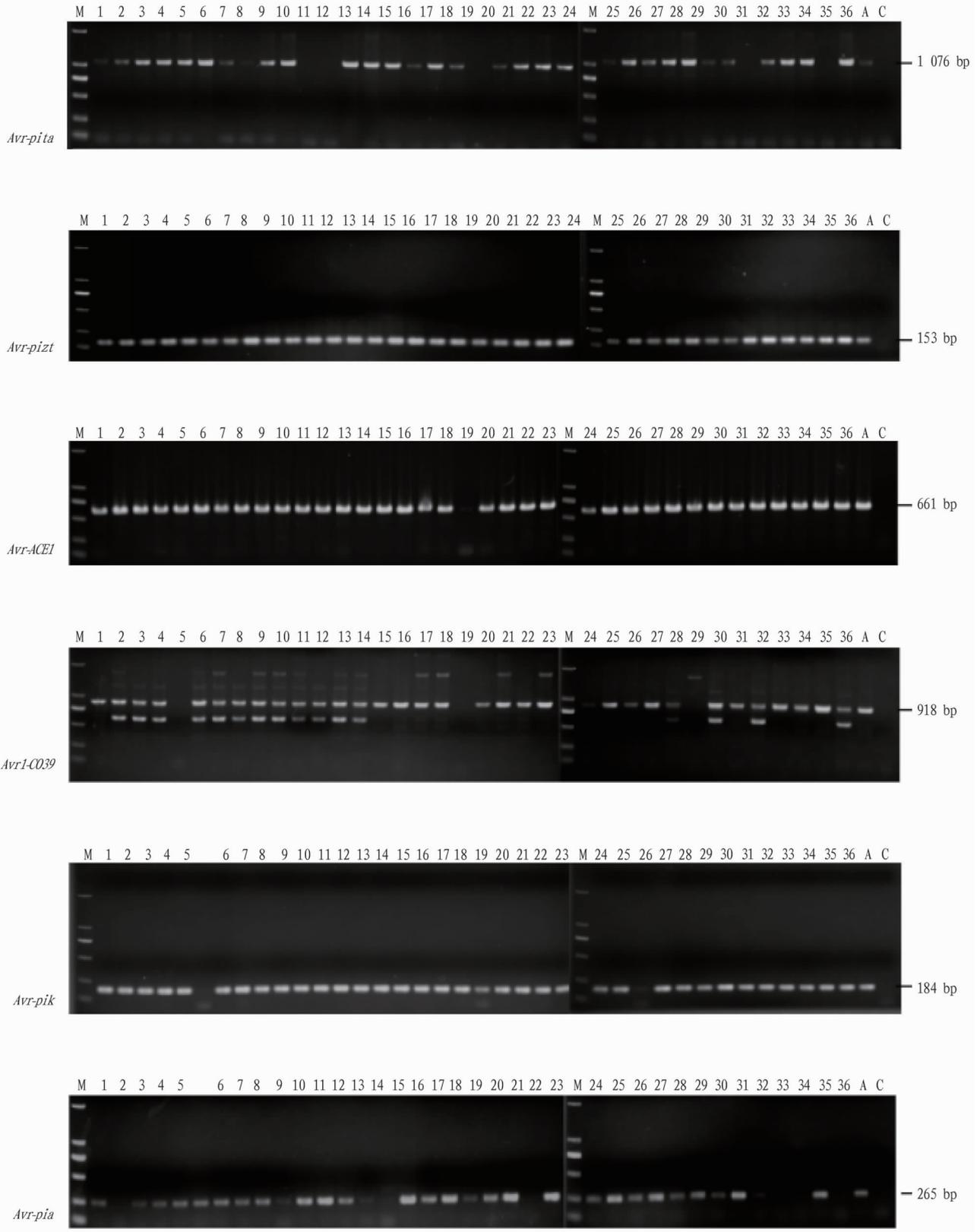
年菌株,26 个 2014 年菌株和 137 个 2015 年菌株(图 6)。

3 讨论

在 SSR、REMAP、RAPD 和 AFLP 等分子标记中的运用中,通常仅应用 1 种或 2 种类型的标记用于分析,得到的信息较少,特别是当群体数目庞大时不能有效地将其分离。该研究将 4 种鉴定手段(RAPD、REMAP、Rep-PCR 和 *Avr* 基因)组合起来形成一个鉴定系统,用于对该研究中使用的 220 个菌株进行分离,且这 4 种标记的检测仅需要通过常规的 PCR 扩增和琼脂糖凝胶电泳即可完成。因此,该研究建立了一种简单、低成本、有效的稻瘟病菌遗传多样性分析鉴定系统。基于此鉴定系统,该研究将 220 个菌株分成 12 个遗传谱系。结果显示,谱系 10 为优势谱系,包含 97% 的 2013 年菌株、100% 的 2014 年菌株和 84% 的 2015 年菌株。表明 3 年间,武陵山区稻瘟病菌的遗传结构并无显著变化,但随着时间的推移,菌群的遗传背景发生了一定程度的演化,与杨小

林等^[16]的研究结果一致。进一步证明了该研究所建立的武陵山区稻瘟病菌生理小种的分子鉴定体系的有效性,可为后

续武陵山区稻瘟病菌群体演化研究及抗病品种的选育提供极大的便利。

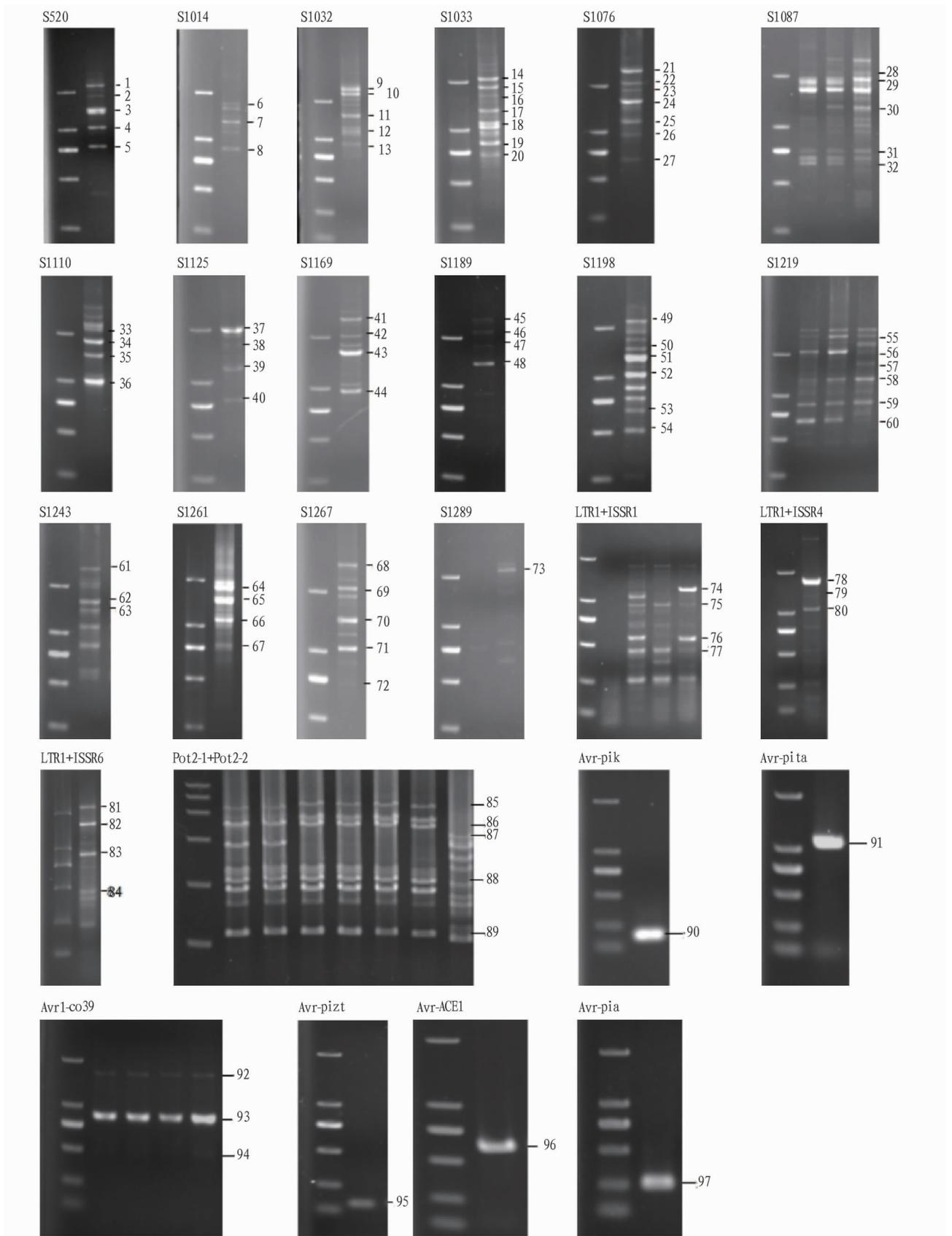


注: M. DL 2000; 1~36. 2013年稻瘟病菌生理小种 DNA; A. 阳性对照; C. 空白对照

Note: M. DL 2000; 1~36. DNA of *M. Oryzae* isolated in 2013; A. Active control; C. Blank control

图4 2013年稻瘟病菌生理小种无毒基因扩增图谱

Fig. 4 Amplification of the avirulence genes for the genome DNA of *M. oryzae* isolated in 2013



注:85~89 中 Marker 为 DL 15000,其余 Marker 均为 DL 2000

Note:Marker of 85~89 is DL 15000,others are DL2000

图 5 武陵山区稻瘟病菌生理小种分子鉴定体系

Fig. 5 Molecular identification system of *M. oryzae* in the Wuling Mountain Area

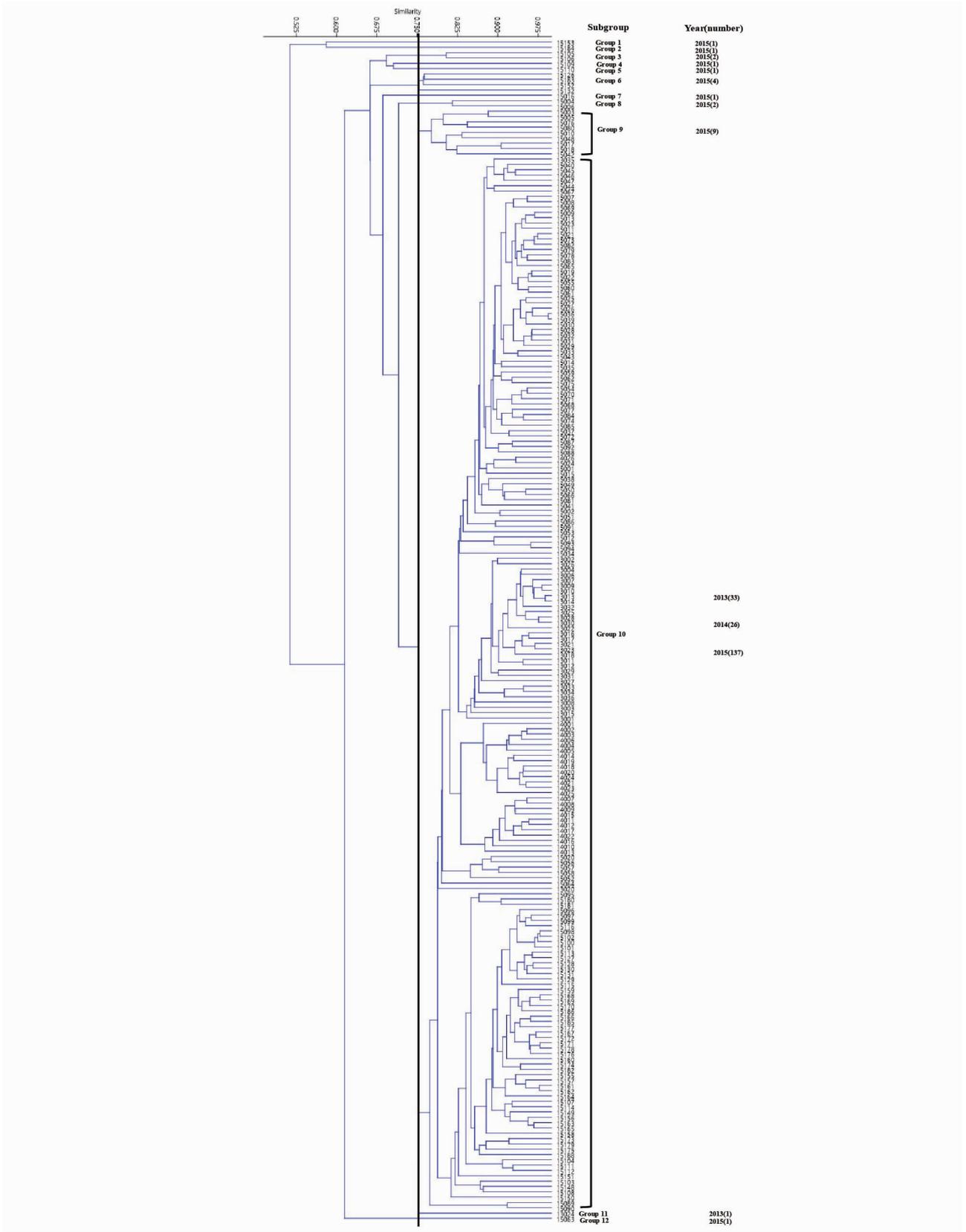


图6 2013—2015年武陵山区稻瘟病菌生理小种聚类分析结果

Fig. 6 Phylogenetic relationships of *M. oryzae* isolates collected in the Wuling Mountain Area from 2013 to 2015

参考文献

[1] 龙飞. 水稻常见病虫害防治技术[J]. 现代农村科技, 2018(12): 35.
 [2] HU K M, QIU D Y, SHEN X L, et al. Isolation and manipulation of quantitative trait loci for disease resistance in rice using a candidate gene ap-

proach[J]. Molecular plant, 2008, 1(5): 786-793.
 [3] KIYOSAWA S. Genetics and epidemiological modeling of breakdown of plant disease resistance[J]. Annual review of phytopathology, 1982, 20(1): 93-117.

富集,得到含量为 16.69%、得率为 5.28%的重楼茎叶总黄酮提

取物,该提取物中包含的单体黄酮类型有待进一步的研究。

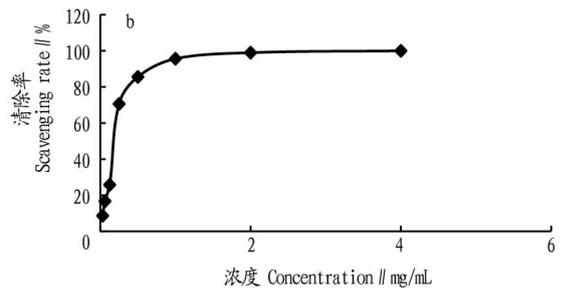
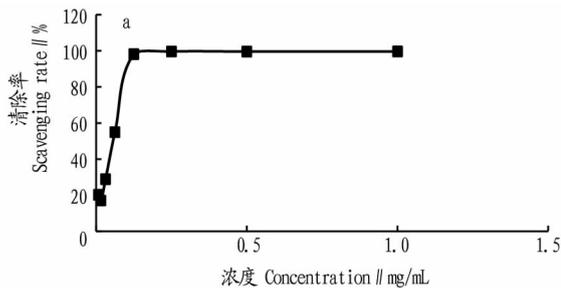


图 5 重楼茎叶总黄酮对维生素 C(a)和羟基自由基(b)的清除作用

Fig. 5 Scavenging effects of total flavonoids from stems and leaves of *Paris polyphylla* on vitamin C(a) and $\cdot\text{OH}$ (b)

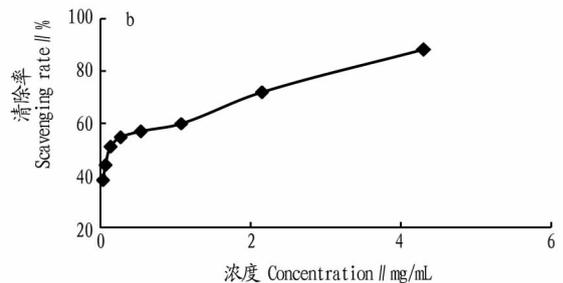
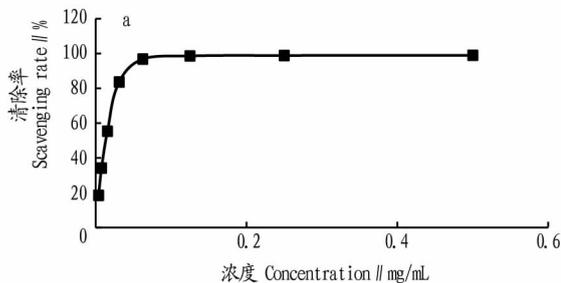


图 6 重楼茎叶总黄酮对维生素 C(a)和超氧阴离子(b)的清除作用

Fig. 6 Scavenging effects of total flavonoids from stems and leaves of *Paris polyphylla* on vitamin C(a) and $\text{O}_2^{\cdot-}$ (b)

重楼的药用部位为其干燥根茎,地上部位的茎叶通常被废弃掉,该研究通过对重楼茎叶的回收利用,并挖掘其药理活性,增大该植物的药用范围,用 DPPH 自由基清除率、羟基自由基清除率和超氧阴离子清除率对该部位的体外抗氧化活性进行评价,结果显示重楼茎叶总黄酮具有一定的抗氧化活性,这为重楼茎叶的应用开发提供了理论依据。

参考文献

- [1] 李晨,刘立敏,杨敏,等. 多叶重楼与云南重楼中 4 种重楼皂苷的积累差异[J]. 中成药,2017,39(7):1454-1459.
- [2] 张焯,赵倩,高科江,等. HPLC 测定不同生长年限滇重楼中薯蓣皂苷元含量[J]. 安徽农业科学,2011,39(6):3280-3281,3285.
- [3] 杨金霞,张慧,叶方,等. 武当山区不同采收期宽叶重楼地上部分总黄酮的累积规律[J]. 中国医药导报,2016,13(24):16-20.
- [4] 李晨,刘立敏,杨敏,等. 多叶重楼与云南重楼中 4 种重楼皂苷的积累差异[J]. 中成药,2017,39(7):1454-1459.
- [5] 杨金霞,朱敏,叶方,等. 武当山区不同品种重楼地上部分总黄酮含量比较研究[J]. 中国药业,2016,25(15):16-18.
- [6] 刘功成,王作伟,李亭亭,等. 重楼叶多糖改善 D-半乳糖衰老模型小鼠脾脏免疫功能 and 抗氧化能力[J]. 食品工业科技,2015,36(16):366-369,383.

- [7] 陈美红,梁梦园,闻晓东,等. 重楼地上部分化学成分和药理作用研究进展[J]. 中国野生植物资源,2018,37(1):44-50.
- [8] 陶笑,徐媛,江解增. 植物抗氧化性的主要活性成分研究[J]. 安徽农业科学,2017,45(25):8-10,58.
- [9] 薛梅,周卫平. 龙牙百合鳞茎总黄酮提取工艺及抗氧化性研究[J]. 安徽农业科学,2017,45(3):10-12,30.
- [10] YANG X M,JIANG Y M,YANG J L, et al. Prenylated flavonoids, promising nutraceuticals with impressive biological activities [J]. Trends in food science & technology,2015,44(1):93-104.
- [11] TAPAS A R,SAKARKAR D M,KAKDE R B. Flavonoids as nutraceuticals: A review [J]. Herba Polonica,2010,7(3):1089-1099.
- [12] SARANGARAJAN R,MEERA S,RUKKMANI R, et al. Antioxidants: Friend or foe? [J]. Asian pacific journal of tropical medicine,2017,10(12):1111-1116.
- [13] XU D P,LI Y,MENG X, et al. Natural antioxidants in foods and medicinal plants: Extraction, assessment and resources [J]. International journal of molecular sciences,2017,18(1):1-32.
- [14] 朱丹,杨菁,李林龙,等. 龙胆中黄酮化合物含量测定的方法学研究[J]. 安徽农业科学,2017,45(14):113-114.
- [15] 王策,李侠,邓少颖,等. 羟基自由基氧化对牛血清白蛋白结构及水合特性的影响[J]. 中国农业科学,2017,50(15):3013-3023.
- [16] 张雯,张娇,李平,等. 荧光/化学发光探针成像检测超氧阴离子自由基的研究进展[J]. 分析化学,2017,45(12):1838-1844.

(上接第 150 页)

- [4] XU X,YANG W,TIAN K, et al. Genetic diversity and pathogenicity dynamics of *Magnaporthe oryzae* in the Wuling Mountain area of China[J]. European journal of plant pathology,2019,153(3):731-742.
- [5] 杨小林. 湖北省稻瘟病重发区病菌群体致病性分化及水稻抗瘟基因的分析[D]. 武汉:华中农业大学,2012.
- [6] 周延清. DNA 分子标记技术在植物研究中的应用[J]. 生命科学,2005,17(3):15-17.
- [7] HUANG J,SI W N,DENG Q M, et al. Rapid evolution of *avirulence* genes in rice blast fungus *Magnaporthe oryzae* [J]. BMC Genetics,2014,15:1-10.
- [8] IMAM J,ALAM S,MANDAL N P, et al. Molecular identification and virulence analysis of AVR genes in rice blast pathogen, *Magnaporthe oryzae* from Eastern India[J]. Euphytica,2015,206(1):21-31.
- [9] SELISANA S M,YANORIA M J,QUIME B, et al. Avirulence (AVR) gene-based diagnosis complements existing pathogen surveillance tools for effective

- deployment of resistance (R) genes against rice blast disease[J]. Phytopathology,2017,107(6):711-720.
- [10] 徐世秀,秦大宗. 武陵山区稻瘟病发病流行特点与防治对策[J]. 南方农业,2009,3(4):45-46.
- [11] 李亮,李晓明. 武陵山区水稻的引种与推广[J]. 南方农业,2015,9(15):56-57.
- [12] 李泌,王春台,周杰,等. 2011 年鄂西地区水稻稻瘟病菌遗传多样性的分析[J]. 安徽农业科学,2014,42(14):4249-4251.
- [13] 田珂,杨武,李泌,等. 鄂西南地区 2012-2014 年稻瘟病菌致病性变化分析[J]. 华中农业大学学报,2017,36(5):10-14.
- [14] 龙子文,周杰,王春台,等. 鄂西地区稻瘟病菌生理小种文库的构建及初步鉴定[J]. 安徽农业科学,2012,40(24):12065-12067.
- [15] 杨水英,肖崇刚,杨静,等. 重庆稻瘟病菌遗传谱系与生理小种的关系研究[J]. 西南农业大学学报,2002,24(6):535-538.
- [16] 杨小林,施仕胜,张舒,等. 湖北省稻瘟病重发区病菌群体致病性分化的研究[J]. 湖北农业科学,2016,55(16):4169-4171.