

## 云南地方稻种抗稻瘟病基因 *Pi-d3* 序列变异分析

杨奕 孙一丁 马继琼 王炎炎 许明辉\*

(云南省农业科学院 生物技术与种质资源研究所/ 云南省农业生物技术重点实验室/ 农业部西南作物基因资源与种质创制重点实验室, 昆明 650223; \* 通讯联系人, E-mail: xuminhui@sohu.com)

### Sequence Variation of *Pi-d3* for Rice Blast Resistance in Yunnan Rice Landrace

YANG Yi, SUN Yi-ding, MA Ji-qiong, WANG Yan-yan, XU Ming-hui\*

(Institute of Biotechnology and Genetic Resources/Key Laboratory of Biotechnology Research of Yunnan Province/Key Laboratory of Southwestern Crop Gene Resources and Germplasm Innovation of Ministry of Agriculture, Yunnan Academy of Agricultural Sciences, Kunming 650223, China; \* Corresponding author, E-mail: xuminhui@sohu.com)

YANG Yi, SUN Yiding, MA Jiqiong, et al. Sequence variation of *Pi-d3* for rice blast resistance in Yunnan rice landrace. *Chin J Rice Sci*, 2016, 30(1): 17-26.

**Abstract:** The sequence variations of *Pi-d3* for rice blast resistance in 80 Yunnan rice landraces were analyzed by resequencing open reading frame (ORF). Compared with *Pi-d3*<sup>Digw</sup> ORF, a total of 39 nucleotide variations were found in 2775-bp ORFs of 80 rice accessions with the average mutation rate of 1.41%. The WTBX*Pi-d3*ORF of 80 rice accessions was divided into 37 haplotypes based on the nucleotide variations. H8(28.8%), H4(11.3%) and H23(5.0%) are high-frequency types, while other types occurred at low frequency. The results showed that the WTBX*Pi-d3* in Yunnan rice landraces was rich in genetic variations and haplotypes, but low frequency. A total of 28 amino acids variations were found in 33 translation proteins of 37 haplotypes. 18 haplotypes with 32 rice landraces including 12 indica accessions possess the *Pi-d3* pseudogenes. The frequency of pseudogene was high. It was possible due to that the *Pi-d3* pseudogene permeated to indica. Terminators were newly founded at position 32 and 467 of protein except the published terminator at position 737. *Pi-d3* differed in both type and frequency of haplotypes between the subspecies of indica and japonica, the ecotypes of lowland and upland rice, no-waxy and waxy rice. It indicated that genetic differentiation occurred between subspecies or ecotypes. Geographical distribution showed that 37 haplotypes spread over a large area while concentrated in small areas. Puer, Banna and Lincang were the central area with abundant haplotypes, and based on this scale, the types of haplotypes decreased outward progressively.

**Key words:** Yunnan rice landraces; rice blast; *Pi-d3*; single nucleotide polymorphism

杨奕, 孙一丁, 马继琼, 等. 云南地方稻种抗稻瘟病基因 *Pi-d3* 序列变异分析. 中国水稻科学, 2016, 30(1): 17-26.

**摘要:** 对来自云南的 80 份地方稻种抗稻瘟病基因 *Pi-d3* 编码区序列进行了 PCR 扩增并测序分析。结果表明, 与地谷相比, 80 份云南地方稻种的 *Pi-d3* 编码区序列(全长 2775 bp)存在 39 个变异位点, 平均变异率为 1.41%。所有材料可以归为 37 种单倍型, 频率较高的单倍型是 H8(28.8%)、H4(11.3%)、H23(5.0%), 其他单倍型频率较低, 显示了云南地方稻种 *Pi-d3* 基因变异丰富, 单倍型类型多, 但频率较低。37 种单倍型中存在 28 个氨基酸差异位点, 共编码 33 种蛋白, 其中 18 种单倍型共计 32 份材料(包括 12 份籼稻品种)出现了假基因, 假基因化的频率较高, 可能是粳稻 *Pi-d3* 假基因化向籼稻渗透。除已发现的 737 位氨基酸假基因位点外, 新发现 32 和 467 两个假基因位点。*Pi-d3* 基因在籼稻、粳稻亚种, 水稻、陆稻, 黏稻、糯稻的单倍型类型及频率两方面均存在差异, 表明亚种间或生态型间发生了一定的遗传分化。37 种单倍型在云南的地理分布呈大分散、小聚居的特点, 普洱、版纳、临沧的单倍型种类最丰富, 并以之为中心向外扩展, 单倍型种类随之减少。

**关键词:** 云南地方稻种; 稻瘟病; *Pi-d3* 基因; 单核苷酸多态性

**中图分类号:** Q756; S435.111.4<sup>+1</sup>

**文献标识码:** A

**文章编号:** 1001-7216(2016)01-0017-10

水稻是世界上重要的粮食作物, 稻瘟病是由稻瘟病菌(*Magnaporthe oryzae*; 无性态: *Pyricularia oryzae*)引起的水稻真菌病害<sup>[1]</sup>, 在世界各水稻种植区均有发生, 可引起水稻大幅减产, 甚至绝收, 严重

阻碍了水稻生产的可持续发展。稻瘟病抗性可分为垂直抗性和水平抗性两种类型, 垂直抗性由单个主效抗性基因控制, 水平抗性则由微效多基因控制<sup>[2-4]</sup>。到目前为止, 通过广泛的遗传分析, 水稻中

收稿日期: 2015-06-13; 修改稿收到日期: 2015-07-30。

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(31360331); 科技部基础性工作专项(2012FY110200); 云南省自然科学基金资助项目(2013FZ146)。

至少已鉴定和定位了86个抗稻瘟病基因(国家水稻数据中心),这些基因大部分成簇地分布于水稻除第3染色体以外的其他11条染色体上<sup>[5]</sup>,其中,已有24个稻瘟病主效抗性基因被成功克隆<sup>[6-9]</sup>。

水稻抗稻瘟病基因 *Pi-d3* 由 Shang 等<sup>[10]</sup> 在比较籼粳稻全基因组 NBS-LRR 基因等位间假基因化差异时,利用假基因化标记在分离的感病小群体内克隆得到。*Pi-d3* 基因位于水稻第6染色体上,属于组成型表达基因,含有2775 bp的编码区,编码924个氨基酸,含有NBS-LRR结构域和MHD基序。由于 *Pi-d3* 抗性基因 LRR 序列中有一个碱基突变成终止子,所以存在等位的假基因。

云南高原地形气候复杂,位于中国与南亚两个稻种起源中心之间,云南境内海拔76~2700 m 区域均有亚洲栽培稻地方品种分布,是世界上最大的稻种遗传多样性中心之一,基因多样性大于中国其他地理群<sup>[11]</sup>。本研究对云南不同生态区的80份地方稻种 *Pi-d3* 基因编码区进行扩增并测序,通过分析 *Pi-d3* 基因在核苷酸水平上的多态性,明确云南稻种 *Pi-d3* 基因序列变异类型和地理分布特点,旨在为研究稻种传播过程中生态环境变化与基因变异的关系提供依据,为筛选抗稻瘟病地方品种提供材料。

## 1 材料与方法

### 1.1 供试材料

从保存于云南省农业科学院生物技术与种质资源研究所内的云南地方稻种资源核心种质库中随机抽取80份来源于云南省不同州市(县)的地方品种作为本研究的材料。按籼粳亚种分类,粳稻46份,籼稻34份;按水陆稻分类,水稻48份,陆稻32份;按黏糯稻分类,黏稻62份,糯稻18份。本研究以日本晴 *Pi-d3* 基因序列为测序对照。

### 1.2 水稻基因组 DNA 的提取

在水稻3~4叶期,取新鲜叶片,采用改进的CTAB法提取基因组DNA<sup>[12]</sup>。

### 1.3 *Pi-d3* 基因同源序列的获取及分析

根据已知的 *Pi-d3* 基因的保守序列设计引物对(*Pi-d3*-1F: 5'-GCGAGAAGGAAGTAACAC-CCA-3'; *Pi-d3*-1R: 5'-CGGAGGATATCGTG-CATTTGG-3'; *Pi-d3*-2F: 5'-GTACGACTCT-GGGTTGCTGAA-3'; *Pi-d3*-2R: 5'-AGAAT-GAATGTCCTGACTGAAACC-3'),由华大基因公

司合成后,对云南地方稻种抗稻瘟病基因 *Pi-d3* 进行扩增。

PCR反应体系总体积为40  $\mu$ L,包括10 $\times$ 缓冲液4  $\mu$ L,dNTPs 2  $\mu$ L,4 mol/L正向和反向引物2  $\mu$ L,Ex *Taq* 酶0.5  $\mu$ L,20 ng/ $\mu$ L DNA模板1  $\mu$ L,ddH<sub>2</sub>O 28.5  $\mu$ L。PCR反应程序如下:95 $^{\circ}$ C下预变性5 min;94 $^{\circ}$ C下变性40 s,57 $^{\circ}$ C下退火30 s,72 $^{\circ}$ C下延伸2 min,35个循环;72 $^{\circ}$ C下再延伸10 min。PCR扩增产物用0.5%的琼脂糖凝胶电泳。电泳后于紫外投射仪下检测条带合格后,送华大基因公司进行测序,每个材料重复测序两次。

用BioLign软件将同一材料的不同片段序列进行手工拼接后与地谷的 *Pi-d3* 基因进行对比分析,根据最大似然法,用软件MEGA V5.10构建系统进化树。多样性指数根据Fontaine<sup>[13]</sup>的方法采用单倍型在材料中的频率计算。多样性指数  $D_s = 1 - \sum_{i=1}^s P_i^2$  ( $P_i$  为单倍型在总数中的频率)。日本晴(GenBank Accession No.FJ773286.1)、地谷(GenBank Accession No.FJ773285.1)的 *Pi-d3* 编码序列从NCBI基因库(<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>)中获得。

## 2 结果与分析

### 2.1 云南地方稻种 *Pi-d3* 等位基因编码区序列的变异

在水稻中, *Pi-d3* 基因编码区的长度为2775 bp,实验获得的日本晴序列长度及碱基顺序与从GenBank获得的序列No. FJ773286.1一致,表明测序数据可靠。与地谷序列(GenBank Accession No. FJ773285.1)相比,80份云南地方稻种的 *Pi-d3* 编码序列中,共发现39个核苷酸变异位点,分别位于94,95,130,144,197,326,356,414,458,459,477,525,537,610,756,775,785,1014,1128,1197,1329,1399,1484,1544,1713,1729,1766,1842,1874,2005,2009,2209,2396,2444,2566,2671,2680,2687,2699位点(表1),平均变异率1.41%。39个不同位点的变异频率为1.25%~100.00%,值得注意的是,位点2566、2687处的变异率均达到100.00%,表明所检测的云南稻种在2566和2687位点与地谷完全不同。39个变异位点中17个发生颠换,占总突变位点的43.59%,其中G/T颠换7个(占17.95%),A/T颠换5个(占12.82%),C/G

表 1 云南地方稻种 *Pi-d3* 基因编码区序列的变异Table 1. Sequence variations of *Pi-d3* open reading frame in Yunnan rice landraces.

变异位点 Variation site	地谷碱基 Base in <i>Pi-d3</i> <sup>Digu</sup>	替代碱基 Substituted base	替换类型 Substitution type	测序材料数 Sequenced accession number	替代材料数 No. of substituted accessions	频率 Frequency /%
94	G	T	颠换 Transversion	80	3	3.8
95	A	T	颠换 Transversion	80	1	1.3
130	G	C	颠换 Transversion	80	77	96.3
144	T	G	颠换 Transversion	80	77	96.3
197	C	T	转换 Transition	80	7	8.8
326	A	T	颠换 Transversion	80	4	5.0
356	G	C	颠换 Transversion	80	3	3.8
414	G	T	颠换 Transversion	80	3	3.8
458	C	T	转换 Transition	80	22	27.5
459	A	G	转换 Transition	80	77	96.3
477	A	G	转换 Transition	80	46	57.5
525	T	C	转换 Transition	80	55	68.8
537	G	A	转换 Transition	80	48	60.0
610	G	A	转换 Transition	80	24	30.0
756	T	C	转换 Transition	80	7	8.8
775	G	A	转换 Transition	80	77	96.3
785	A	G	转换 Transition	80	75	93.8
1014	C	T	转换 Transition	80	22	27.5
1128	C	A	颠换 Transversion	80	8	10.0
1197	T	C	转换 Transition	80	79	98.8
1329	T	G	颠换 Transversion	80	5	6.3
1399	A	T	颠换 Transversion	80	8	10.0
1484	G	A	转换 Transition	80	5	6.3
1544	G	A	转换 Transition	80	24	30.0
1713	T	G	颠换 Transversion	80	71	88.8
1729	G	A	转换 Transition	80	72	90.0
1766	C	T	转换 Transition	80	8	10.0
1842	C	G	颠换 Transversion	80	9	11.3
1874	A	T	颠换 Transversion	80	69	86.3
2005	G	T	颠换 Transversion	80	23	28.8
2009	G	A	转换 Transition	80	23	28.8
2209	C	T	转换 Transition	80	23	28.8
2396	A	G	转换 Transition	80	8	10.0
2444	T	A	颠换 Transversion	80	71	88.8
2566	C	G	颠换 Transversion	80	80	100.0
2671	G	T	颠换 Transversion	80	10	12.5
2680	G	A	转换 Transition	80	72	90.0
2687	G	A	转换 Transition	80	80	100.0
2699	G	A	转换 Transition	80	7	8.8

颠换 4 个 (占 10.26%), A/G 颠换 1 个 (占 2.56%); 22 个位点发生转换, 占总突变位点的 56.41%, 其中 G/A 转换 14 个 (占 35.90%), C/T 转换 8 个 (占 20.51%)。经过 DNA 序列的比对, 可将 80 份云南地方稻种归为 37 种单倍型 (表 2), 日本晴归于 H4。每种单倍型的变异碱基数均在 10 个以上, 平均变异碱基数 17 个, 其中单倍型 H11 的

变异碱基数最多 (22 个), 单倍型 H31 的变异碱基数最少 (11 个)。从表 2 中还可以看出, 37 种单倍型中 H8 (28.8%), H4 (11.3%), H23 (5.0%) 所占比例较高, 是云南的主要类型, 而其他单倍型的频率较低, 每个单倍型仅有 1~2 个品种。可见, 云南地方稻种在 *Pi-d3* 位点上具有变异丰富、单倍型类型多、频率较低的特点。



### 2.2 抗稻瘟病基因 *Pi-d3* 蛋白的氨基酸分析

对比分析云南地方稻种 *Pi-d3* 基因的 37 种单倍型与地谷编码蛋白质情况,发现存在 28 个氨基酸的变异。37 种单倍型共编码 33 种蛋白质,单倍型 H2 与 H35、H4 与 H17、H8 与 H19、H14 与 H15 编码的蛋白质不存在差异(表 3)。这 33 种不同的蛋白质中,有 16 种提前出现终止子为非完整蛋白,其余的 17 种为完整蛋白。

结合表 2、表 3 可以看出 H1、H4、H17、H7、H9、H11、H14、H15、H18、H21、H24、H30、H36 共 13 种单倍型由于在核苷酸 2209 位处发生 C/T 颠换,使氨基酸 737 位出现终止子,导致 *Pi-d3* 基因成

为假基因,这是 Shang 等发现的假基因位点,由此可以推测这些单倍型的植株易感病<sup>[10]</sup>。此外,本研究中新发现单倍型 H33、H34 由于在核苷酸 94 位出现 G/T 颠换,致使氨基酸 32 位出现终止子;单倍型 H13、H16、H28、H34、H36 在核苷酸 1399 位发生 A/T 颠换,导致氨基酸 467 位出现终止子,这些是新发现的易感病假基因单倍型。

80 份云南地方材料中有 32 份出现假基因化现象,假基因出现频率高达 40%。这些假基因化材料包含粳稻 20 份,籼稻 12 份,虽然籼稻中出现假基因的频率(35.3%)明显低于粳稻(43.5%),但检测出了籼稻中存在假基因化现象。而Shang等在发现

表 3 不同单倍型中 *Pi-d3* 基因氨基酸序列变化

Table 3. Amino acid variation of *Pi-d3* in 37 haplotypes.

单倍型 Haplotype	氨基酸位点 Amino acid lous																											
	32	44	66	109	119	138	153	204	259	262	443	467	495	515	571	577	589	625	669	670	737	799	815	856	891	894	896	900
地谷 Digu	E	G	A	K	R	R	T	G	V	D	N	R	G	R	H	V	S	N	V	G	Q	N	F	H	V	V	R	R
H1	-	R	-	M	-	-	M	S	I	-	K	-	-	H	Q	M	-	I	F	D	*	-	Y	D	-	I	Q	-
H2、H35	-	R	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Q	M	-	I	-	-	-	-	Y	D	-	I	Q	-
H3	-	R	-	-	-	-	-	-	I	-	-	-	-	-	Q	M	-	I	-	-	-	-	Y	D	L	I	Q	-
H4、H17	-	R	-	-	-	-	M	S	I	-	-	-	-	H	Q	M	-	I	F	D	*	-	Y	D	-	I	Q	-
H5	-	R	-	M	P	S	-	-	I	-	-	-	E	-	-	-	L	-	-	-	-	S	-	D	L	-	Q	Q
H6	-	R	-	-	-	-	-	-	I	-	-	-	E	-	Q	M	-	I	-	-	-	-	Y	D	L	I	Q	-
H7	-	R	-	-	-	S	M	S	I	-	-	-	-	H	Q	M	-	I	F	D	*	-	Y	-	L	I	Q	-
H8、H19	-	R	-	-	-	-	-	-	I	-	-	-	-	-	Q	M	-	I	-	-	-	-	Y	D	-	I	Q	-
H9	-	-	-	-	-	-	M	S	I	-	-	-	-	H	Q	M	-	I	F	D	*	-	Y	D	-	I	Q	-
H10	-	R	-	-	-	-	-	-	I	G	-	-	-	-	Q	M	-	I	-	-	-	-	Y	D	L	I	Q	-
H11	-	R	-	M	P	S	M	S	I	-	-	-	-	H	Q	M	-	I	F	D	*	-	Y	D	-	I	Q	-
H12	-	R	-	-	-	-	-	-	I	-	-	-	-	-	Q	M	-	-	-	-	-	-	Y	D	-	I	Q	-
H13	-	R	-	-	-	-	-	-	I	-	-	*	-	-	Q	M	-	I	-	-	-	-	Y	D	L	I	Q	-
H14、H15	-	R	-	-	-	-	M	S	I	-	K	-	-	H	Q	M	-	I	F	D	*	-	Y	D	-	I	Q	-
H16	-	R	V	-	-	-	-	-	I	-	-	*	-	-	-	-	L	-	-	-	-	S	-	D	-	-	Q	Q
H18	-	R	-	-	-	-	M	S	I	-	-	-	-	H	Q	M	-	I	F	D	*	-	Y	D	L	I	Q	-
H20	-	R	V	-	-	-	-	-	I	-	-	-	-	-	-	-	L	-	-	-	-	S	-	D	-	-	Q	Q
H21	-	R	-	M	P	-	M	S	I	-	-	-	-	H	Q	M	-	I	F	D	*	-	Y	D	-	I	Q	-
H22	-	R	-	-	-	-	-	-	I	-	-	-	E	-	Q	M	-	I	-	-	-	-	Y	D	-	I	Q	-
H23	-	R	-	-	-	-	-	-	I	G	-	-	-	-	Q	M	-	I	-	-	-	-	Y	D	-	I	Q	-
H24	-	R	-	-	-	-	M	S	I	-	-	-	-	H	-	M	-	-	-	-	*	-	Y	D	-	I	Q	-
H25	-	R	V	-	-	-	-	-	I	-	-	-	-	-	-	-	L	-	-	-	-	S	-	D	-	-	Q	-
H26	-	R	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	E	-	Q	M	-	I	-	-	-	-	Y	D	-	I	Q	-
H27	-	R	V	-	-	-	-	-	I	-	-	-	-	-	-	-	L	-	-	-	-	S	-	D	L	-	Q	Q
H28	-	R	-	-	-	-	-	-	I	-	-	*	-	-	Q	M	-	I	-	-	-	-	Y	D	-	I	Q	-
H29	V	R	-	-	-	-	-	-	I	-	-	-	-	-	Q	M	-	I	-	-	-	-	Y	D	-	I	Q	-
H30	-	-	-	-	-	-	-	S	I	-	-	-	-	H	Q	M	-	I	F	D	*	-	Y	D	-	I	Q	-
H31	-	-	-	-	-	-	-	-	I	-	-	-	-	-	Q	M	-	I	-	-	-	-	Y	D	-	I	Q	-
H32	-	R	-	-	-	-	-	S	I	-	K	-	-	H	Q	M	-	I	F	D	-	-	Y	D	-	I	Q	-
H33	*	R	-	-	-	-	-	-	I	-	-	-	-	-	Q	M	-	I	-	-	-	-	Y	D	-	I	Q	-
H34	*	R	-	-	-	-	-	-	I	-	-	*	E	-	Q	M	-	I	-	-	-	-	Y	D	-	I	Q	-
H36	-	R	-	-	-	-	M	S	I	-	-	*	-	H	Q	M	-	I	F	D	*	-	Y	D	-	I	Q	-
H37	-	R	-	-	-	-	-	-	I	-	-	-	-	-	Q	M	-	I	-	-	-	-	D	-	I	Q	-	

“-”代表在此位点上与地谷相同;“\*”代表终止子。

“-”represents the same base as Digu; “\*”represents terminator.

*Pi-d3* 基因时认为, *Pi-d3* 假基因化只存在于粳稻和杂草稻中,而在检测过的野生稻和籼稻中都没有假基因化<sup>[10]</sup>。云南地方稻种 *Pi-d3* 假基因化在水稻和陆稻中出现的数量同为 16 份,但在水稻中出现频率(33.3%)低于陆稻(50.0%)。按黏糯稻分类,供试材料中有 23 份黏稻和 9 份糯稻材料出现 *Pi-d3* 假基因化,糯稻的出现频率(50.0%)高于黏稻(37.1%)。*Pi-d3* 假基因化在云南的 10 个州市均有分布,以普洱(8 份)、版纳(7 份)、临沧(6 份)为主,德宏出现 3 份,文山、昭通各出现 2 份,玉溪、红河、丽江、保山均出现 1 份。版纳出现 *Pi-d3* 假基因化的频率最高,达 87.5%。在普洱、版纳、临沧这些地区,籼稻和粳稻同时进行种植,天然杂交几率较高,云南籼稻品种中发现了假基因化现象,推测云南地方稻种中 *Pi-d3* 假基因化从粳稻向籼稻的渗透。

### 2.3 抗稻瘟病基因 *Pi-d3* 不同单倍型在云南各地区的分布

分析 *Pi-d3* 基因在云南省各州市的地理分布发现(表 4),主要单倍型中 H4 集中分布在普洱、临沧等地,在普洱的分布频率最高,达 44.4%,为普洱的优势单倍型。单倍型 H8 在云南省的分布范围较为广泛,主要分布在德宏、普洱、临沧、保山、玉溪、文山、昭通等地,其中在普洱和临沧的分布频率较高(17.4%),是普洱和临沧两地的优势单倍型。单倍型 H23 在普洱的分布频率同样较高(50.0%)。云南各地区的单倍型多样性指数表现为:普洱市(0.885) > 版纳州(0.875) > 临沧市(0.871) > 玉溪市(0.861) > 文山州(0.735) > 德宏州(0.722) > 保山市(0.720) > 丽江市(0.667) > 昭通市(0.560)。显而易见,普洱、版纳、临沧拥有较多类型的单倍型。这些结果进一步表明 *Pi-d3* 基因在云南各地不同的生态类型之间存在显著的遗传分化。

### 2.4 抗稻瘟病基因 *Pi-d3* 不同单倍型在水稻各类型中的分布

*Pi-d3* 基因在云南地方品种的粳稻、籼稻亚种间的分布存在差异,H1、H2、H3、H5、H6、H7、H9、H10、H11、H13、H14、H17、H18、H19、H20、H21、H22、H24、H25、H26、H27 等单倍型只在粳稻中出现;H28、H29、H30、H31、H32、H33、H34、H35、H36、H37 等单倍型只在籼稻中出现。在 *Pi-d3* 位点上,粳稻和籼稻的共享基因型有 H4、H8、H12、H15、H16、H23,根据共享基因型频率可以看出 H4 为粳稻的优势单倍型,H8 为籼稻的优势单倍型。

单倍型 H4 的序列与粳稻日本晴(GenBank Accession No. FJ773286.1)完全相同,单倍型 H8 的序列与籼稻 93-11(GenBank Accession No. FJ773285.1)的序列完全相同。可见,籼稻和粳稻均有优势单倍型,表明两个亚种在此位点上已发生明显的遗传分化,粳稻单倍型类型更为丰富。

*Pi-d3* 基因在水稻和陆稻间的分布同样存在差异,H1、H2、H3、H5、H6、H7、H11、H12、H13、H14、H17、H21、H26、H27、H32 等单倍型只在陆稻中出现;H9、H10、H19、H22、H24、H25、H28、H29、H30、H31、H33、H34、H35、H36、H37 等单倍型只在水稻中出现;H4、H8、H15、H16、H18、H20、H23 等单倍型在水陆稻种均有出现,其中 H4 为陆稻的优势单倍型、H8、H20、H23 为水稻的优势单倍型。

*Pi-d3* 基因在黏性稻和糯性稻间的分布存在差异,H1、H2、H5、H6、H7、H9、H13、H14、H15、H16、H17、H20、H22、H23、H26、H27、H29、H31、H32、H33、H34、H35、H36、H37 只在黏稻中分布;H10、H11、H19、H21、H24、H25、H30 只在糯稻中分布;H3、H4、H8、H12、H18、H28 等单倍型在黏稻和糯稻中均有分布,其中 H4、H8 为黏稻的优势单倍型,H28 为糯稻的优势单倍型。

### 2.5 进化树的构建

所有材料可分为两大枝(图 1),对应氨基酸 577、589、799、894 位点的变异,其中 I 枝包括 H20、H16、H27、H5、H25 和地谷,其余的 32 种单倍型归为第 II 枝。在第 I 枝中,地谷单独为一个分枝,H25、H5、H27、H16、H20 为一个群,它们与地谷的亲缘关系较近,特征是氨基酸 577、894 位点无变异,589 位点变异为 L(亮氨酸),799 位点变异为 S(丝氨酸)。在第 II 枝中,H37 单独为一个分枝,另外的 31 个单倍型聚为一个亚枝,这个亚枝中 H2、H35、H26、H6、H22、H34、H3、H13、H10、H23、H8、H19、H28、H29、H33、H31 聚为一个群,它们在氨基酸 669 和 670 位点均无变异。H24、H32、H9、H30、H7、H18、H17、H36、H4、H14、H15、H1、H11、H21 聚为一个群,它们的特征是在氨基酸 204 位点变异为 S(丝氨酸),515 位点变异为 H(组氨酸),H12 单独为一小枝。从进化关系看 H37、H12、H8、H19、H28、H29、H33 更为原始。

## 3 讨论

云南省地形气候复杂,位于中国与南亚两个稻

表 4. 不同单倍型在云南各地区的分布

Table 4. Distribution of *Pi-d3* haplotypes in Yunnan Province.

单倍型 Haplotype	材料数 No. of accessions	频率 Frequency /%	版纳州 Banna Prefecture	德宏州 Dehong Prefecture	普洱市 Pu'er City	临沧市 Lincang City	保山市 Baoshan City	怒江州 Nuijiang Prefecture	红河州 Honghe Prefecture	大理州 Dali Prefecture	玉溪市 Yuxi City	丽江市 Lijiang City	文山州 Wenshan Prefecture	昭通市 Zhaotong City	迪庆州 Diqing Prefecture	
H1	1	1.3			1											
H2	1	1.3			1											
H3	2	2.5			1		1									
H4	9	11.3	1		4	2						1	1			
H5	1	1.3			1											
H6	1	1.3			1											
H7	1	1.3			1											
H8	23	28.8	1	2	4	4	2				2	1	3	3		1
H9	1	1.3			1											
H10	1	1.3			1											
H11	1	1.3			1											
H12	2	2.5			1			1								
H13	1	1.3	1													
H14	1	1.3	1													
H15	2	2.5	1	1												
H16	2	2.5	1			1										
H17	1	1.3	1													
H18	2	2.5		2												
H19	1	1.3				1										
H20	3	3.8			1	1	1				1					
H21	1	1.3			1	1										
H22	1	1.3			1	1										
H23	4	5.0			2	1			1							
H24	1	1.3											1			
H25	1	1.3								1						
H26	1	1.3									1					
H27	1	1.3									1					
H28	3	3.8	1								1					
H29	1	1.3		1												
H30	1	1.3				1										
H31	1	1.3				1										
H32	1	1.3														
H33	2	2.5											1			
H34	1	1.3											1			
H35	1	1.3														
H36	1	1.3														
H37	1	1.3														
总数 Total	80	100.0	8	6	20	15	5	1	1	1	7	3	7	5	1	1
单倍型数量 No. of haplotypes			8	4	13	11	4	1	1	1	6	3	5	3	1	1
多样性指数 Index of diversity			0.875	0.722	0.885	0.871	0.720	0	0	0	0.816	0.687	0.735	0.560	0	0

表5 *Pi-d3* 不同单倍型在水稻各类型中的分布Table 5. Distribution of *Pi-d3* haplotype in different rice types.

单倍型 Haplotype	材料数 No. of accessions	粳稻		籼稻		陆稻		水稻		黏稻		糯稻	
		japonica		indica		Upland rice		Lowland rice		No-waxy rice		Waxy rice	
		数量 No.	频率 Frequency /%	数量 No.	频率 Frequency /%	数量 No.	频率 Frequency /%	数量 No.	频率 Frequency /%	数量 No.	频率 Frequency /%	数量 No.	频率 Frequency /%
H1	1	1	100.0	0	0	1	100.0	0	0	1	100.0	0	0
H2	1	1	100.0	0	0	1	100.0	0	0	1	100.0	0	0
H3	2	2	100.0	0	0	1	50.0	1	50.0	1	50.0	1	50.0
H4	9	7	77.8	2	22.2	6	66.7	3	33.3	7	77.8	2	22.2
H5	1	1	100.0	0	0	1	100.0	0	0	1	100.0	0	0
H6	1	1	100.0	0	0	1	100.0	0	0	1	100.0	0	0
H7	1	1	100.0	0	0	1	100.0	0	0	1	100.0	0	0
H8	23	9	39.1	14	60.9	5	21.7	18	78.3	19	82.6	4	17.4
H9	1	1	100.0	0	0	0	0	1	100.0	1	100.0	0	0
H10	1	1	100.0	0	0	0	0	1	100.0	0	0	1	100.0
H11	1	1	100.0	0	0	1	100.0	0	0	0	0	1	100.0
H12	2	1	50.0	1	50.0	2	100.0	0	0	1	50.0	1	50.0
H13	1	1	100.0	0	0	1	100.0	0	0	1	100.0	0	0
H14	1	1	100.0	0	0	1	100.0	0	0	1	100.0	0	0
H15	2	1	50.0	1	50.0	1	50.0	1	50.0	2	100.0	0	0
H16	2	1	50.0	1	50.0	1	50.0	1	50.0	2	100.0	0	0
H17	1	1	100.0	0	0	1	100.0	0	0	1	100.0	0	0
H18	2	2	100.0	0	0	1	50.0	1	50.0	1	50.0	1	50.0
H19	1	1	100.0	0	0	0	0	1	100.0	0	0	1	100.0
H20	3	3	100.0	0	0	1	33.3	2	66.7	3	100.0	0	0
H21	1	1	100.0	0	0	1	100.0	0	0	0	0	1	100.0
H22	1	1	100.0	0	0	0	0	1	100.0	1	100.0	0	0
H23	4	2	50.0	2	50.0	1	25.0	3	75.0	4	100.0	0	0
H24	1	1	100.0	0	0	0	0	1	100.0	0	0	1	100.0
H25	1	1	100.0	0	0	0	0	1	100.0	0	0	1	100.0
H26	1	1	100.0	0	0	1	100.0	0	0	1	100.0	0	0
H27	1	1	100.0	0	0	1	100.0	0	0	1	100.0	0	0
H28	3	0	0	3	100.0	0	0	3	100.0	1	33.3	2	66.7
H29	1	0	0	1	100.0	0	0	1	100.0	1	100.0	0	0
H30	1	0	0	1	100.0	0	0	1	100.0	0	0	1	100.0
H31	1	0	0	1	100.0	0	0	1	100.0	1	100.0	0	0
H32	1	0	0	1	100.0	1	100.0	0	0	1	100.0	0	0
H33	2	0	0	2	100.0	0	0	2	100.0	2	100.0	0	0
H34	1	0	0	1	100.0	0	0	1	100.0	1	100.0	0	0
H35	1	0	0	1	100.0	0	0	1	100.0	1	100.0	0	0
H36	1	0	0	1	100.0	0	0	1	100.0	1	100.0	0	0
H37	1	0	0	1	100.0	0	0	1	100.0	1	100.0	0	0
总数 Total	80	46	57.5	34	42.5	32	40.0	48	60.0	62	77.5	18	22.5

种起源中心之间,是世界上最大的稻种遗传多样性中心之一,基因多样性大于中国其他地理群<sup>[11]</sup>。本研究通过核苷酸序列分析将80份云南地方稻种的*Pi-d3*基因归为37种单倍型;单倍型分析表明云南地方稻种*Pi-d3*基因单倍型种类丰富,低频率的单倍型较多,籼稻和粳稻均有优势单倍型,两个亚种间已发生明显的遗传分化,出现这种现象也可能是籼稻和粳稻由不同的野生稻进化而来。

*Pi-d3*基因在云南的分布范围广泛,云南省13个州市的不同生态类型中都有分布,呈现出大分散、小聚居的特点。水稻与稻瘟病菌之间存在特异互作现象,且符合“基因对基因”的关系。云南稻瘟病菌群体遗传多样性水平较高<sup>[15-16]</sup>,不同海拔地区稻瘟

病菌生理小种和遗传多样性存在差异<sup>[17]</sup>。在“稻-稻瘟病菌”的长期协同进化中,复杂多样的稻瘟病菌群体参与了品种的自然选择,为云南稻种资源稻瘟病抗性提供了进化的动力<sup>[18]</sup>。因此,云南地方稻种*Pi-d3*基因的多样性及广泛分布与相关稻瘟病菌生理小种的遗传多样性密切相关。

Shang等在检测中发现,*Pi-d3*假基因化只存在于粳稻和杂草稻中,在大部分被测的粳稻品种中*Pi-d3*基因转录起始位点开始的第2208位核苷酸处的CAG突变成为终止子TAG,使之成为了假基因,而在检测过的非洲栽培稻、AA组型野生稻和籼稻中均未发现假基因,由此推测这种突变是籼粳稻分化后发生的<sup>[10]</sup>。本研究在检测的80份云南地方



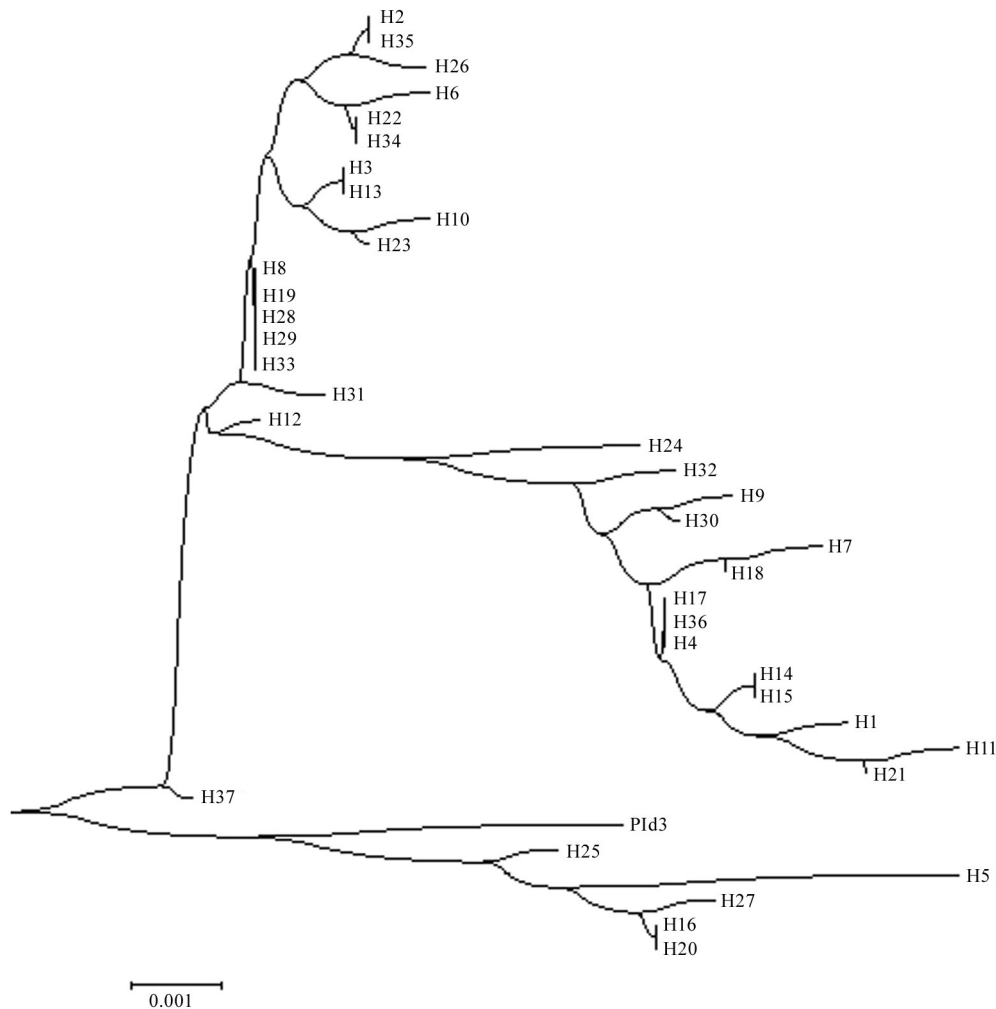


图 1 Neighbor-joining 法构建水稻抗稻瘟病基因 *Pi-d3* 系统进化树  
 Fig. 1. Neighbor-joining phylogenetic tree for 37 *Pi-d3* haplotypes.

稻种中发现 20 份粳稻和 12 份籼稻出现假基因化现象,假基因化频率较高,新发现核苷酸 94、1399 位两个假基因位点。*Pi-d3* 假基因出现频率较高的地区一般同时种植籼粳稻,天然杂交的几率高,籼稻中出现假基因化可能是粳稻与籼稻杂交,粳稻假基因向籼稻渗透的结果。

Shang 等<sup>[10]</sup>研究发现,抗稻瘟病基因 *Pi-d3* 在水稻品种地谷、93-11、TP309 以及日本晴中均被检测到,但只有籼稻品种地谷和 93-11 中该基因对稻瘟菌具有抗性,在粳稻品种 TP309 和日本晴中,由于基因内部一个 C/T 的颠换,导致终止子提前,仅编码一个带有 737 个氨基酸的多肽,破坏了该蛋白的 LRR 区域,进而导致该基因功能的丧失。本研究新发现 *Pi-d3* 基因在籼稻中出现假基因化现象,

这些假基因化的品种是否具有抗病性,需要进一步的抗病性研究。此外,除了出现 *Pi-d3* 假基因的单倍型,另外 19 种单倍型的 *Pi-d3* 氨基酸序列与地谷不同,它们的功能需要进一步研究。

参考文献:

[1] Couch B C, Hohn L M. A multilocus gene genealogy concordant with host preference indicates segregation of a new species, *Magnaporthe oryzae*, from *M. grisea*. *Mycologia*, 2002, 94: 683-693.  
 [2] Ezuka A. Field resistance of rice varieties to rice blast disease. *Rev Plant Prot Res*, 1972, 5: 1-21.  
 [3] Bonman J M, Mackill D J. Durable resistance to rice blast disease. *Oryza*, 1988, 25: 103-110.  
 [4] Wang G L, Mackill D J, Bonman M, et al. RFLP mapping of genes conferring complete and partial resistance to blast in a

- durably resistant rice cultivar. *Genetics*, 1994, 136: 1421-1434.
- [5] Chen M, Presting G, Barbazuk W B, et al. An integrated physical and genetic map of the rice genome. *Plant Cell*, 2002, 14: 537-545.
- [6] Hua L, Wu J, Chen C, et al. The isolation of *Pil*, an allele at the *pik* locus which confers broad spectrum resistance to rice blast. *Theor Appl Genet*, 2012, 125(5): 1047-1055.
- [7] Zhu X, Chen S, Yang J, et al. The identification of Pi50(T), a new member of the rice blast resistance Pi2/Pi9 mukigene family. *Theor Appl Genet*, 2012, 124(7): 1295-1304.
- [8] Lee S W, Han S W, Sririyanum M, et al. A type I-secreted, sulfated peptide triggers *Xa21*-mediated innate immunity. *Science*, 2009, 326(5954): 850-853.
- [9] 杨勤忠,林菲,冯淑杰,等. 水稻稻瘟病抗性基因的分子定位及克隆研究进展. 中国农业科学, 2009, 42(5): 1601-1615.  
Yang Q Z, Lin F, Feng S J, et al. Recent progress on molecular mapping and cloning of blast resistance genes in rice (*Oryza sativa* L.). *Sci Agric Sin*, 2009, 42(5): 1601-1615. (in Chinese with English abstract)
- [10] Shang J J, Tao Y, Chen X W, et al. Identification of a new rice blast resistance gene, *Pi-d3*, by genomewide comparison of paired nucleotide-binding site-leucine-rich repeat genes and their pseudogene alleles between the two sequenced rice genomes. *Genetics*, 2009, 182(4): 1303-1311.
- [11] 黄燕红,孙新立,王象坤. 中国栽培稻遗传多样性中心和起源研究. 植物遗传资源学报, 2005, 6(2): 125-129.  
Huang Y H, Sun X L, Wang X K. Study on the center of genetic diversity and its origin of cultivated rice in China. *J Plant Genet Res*, 2005, 6(2): 125-129. (in Chinese with English abstract)
- [12] 许明辉,郑明慧,刘彦中. 烟草品种 RAPD 分子标记多态性与品种鉴定. 种子, 1998(5): 23-25.  
Xu M H, Zheng M H, Liu Y Z. Genetic diversity and identification in varieties of *Nicotiana tabacum* L. by RAPD markers. *Seed*, 1998(5): 23-25. (in Chinese with English abstract)
- [13] Fontaine C, Lovett P, Sanou H, et al. Genetic diversity of the shea tree. *Vitellaria paradoxa* C. F. Gaertn, detected by RAPD and chloroplast microsatellite markers. *Heredity*, 2004, 93: 639-648.
- [14] Ballini E, Morel J B, Droc G, et al. A genome-wide meta-analysis of rice blast resistance genes and quantitative trait loci provides new insights into partial and complete resistance. *Plant Microbe Interact*, 2008, 21: 859-868.
- [15] 李进斌,李成云,张庆,等. 两套鉴别品种对云南稻瘟病菌株鉴别能力的比较. 中国农业科学, 2009, 42(2): 486-491.  
Li J B, Li C Y, Zhang Q, et al. Comparison of differentiating capacity of two sets of differential lines using isolates of *Magnaporthe grisea* collected from China's Yunnan Province. *Sci Agric Sin*, 2009, 42(2): 486-491. (in Chinese with English abstract)
- [16] Li J B, Yang J, Liu L, et al. Geographic distribution of avirulence genes in rice blast fungus in Yunnan Province. *China J Res Ecol*, 2011, 2(2): 181-185.
- [17] 林菁菁,李进斌,刘林,等. 云南元阳哈尼梯田稻瘟病菌遗传多样性分析. 植物病理学报, 2009, 39(1): 43-51.  
Lin J J, Li J B, Liu L, et al. Genetic diversity of *Magnaporthe grisea* of Hani terrace from Yuanyang County in Yunnan. *Acta Phyta Sin*, 2009, 39(1): 43-51. (in Chinese with English abstract)
- [18] 黄兴奇. 云南作物种质资源(稻作篇). 昆明: 云南科学技术出版社, 2005.  
Huang X Q. Yunnan crop germplasm resources (volume rice). Kunming: Yunnan Science and Technology Press, 2005.
- [19] 李进斌,王甜,许明辉. 云南地方稻种抗稻瘟病基因 *Pi-ta* 和 *Pi-b* 的鉴定. 中国水稻科学, 2012, 26(5): 593-599.  
Li J B, Wang T, Xu M H. Identification of *Pi-ta* and *Pi-b* genes for rice blast resistance of rice landraces from Yunnan Province. *Chin J Rice Sci*, 2012, 26(5): 593-599. (in Chinese with English abstract)
- [20] 赵国珍,蒋春苗,刘吉新,等. 云南野生稻抗稻瘟病 *Pi-ta* 基因的检测及分析. 中国水稻科学, 2014, 28(6): 675-680.  
Zhao G Z, Jiang C M, Liu J X, et al. Identification and analysis on the rice blast resistance gene *Pi-ta* in wild rice from Yunnan, China. *Chin J Rice Sci*, 2014, 28(6): 675-680. (in Chinese with English abstract)