

八个抗稻瘟病基因在华南籼型杂交水稻中的分布

汪文娟¹ 周继勇² 汪聪颖¹ 苏菁¹ 封金奇¹ 陈炳¹ 冯爱卿¹ 杨健源¹ 陈深¹ 朱小源^{1,*}
(¹广东省农业科学院 植物保护研究所/广东省植物保护新技术重点实验室, 广州 510640; ²广东省农业技术推广总站, 广州 510520; *通讯联系人, E-mail: zhuxy@gdppri.com)

Distribution of Eight Rice Blast Resistance Genes in *indica* Hybrid Rice in China

WANG Wenjuan¹, ZHOU Jiyong², WANG Congying¹, SU Jing¹, FENG Jinqi¹, CHEN Bing¹, FENG Aiqing¹, YANG Jianyuan¹, CHEN Shen¹, ZHU Xiaoyuan^{1,*}

(¹ Plant Protection Research Institute, Guangdong Academy of Agricultural Sciences/Guangdong Provincial Key Laboratory of High Technology for Plant Protection, Guangzhou 510640, China; ² Guangdong Agricultural Technology Extension Station, Guangzhou 510520, China; *Corresponding author, E-mail: zhuxy@gdppri.com)

Abstract: 【Objective】 The cloned rice blast resistant genes, *Pi1*, *Pik-p*, *Pik-h*, *Pi2*, *Pi9*, *Piz-t*, *Pita* and *Pii*, which showed broad-spectrum blast resistance in different rice growing regions, have been widely used in rice breeding for blast resistance. To clarify the distribution of these genes in hybrid rice in South China, 【Method】 the genotypes of resistance genes *Pi1*, *Pik-p*, *Pik-h*, *Pi2*, *Pi9*, *Piz-t*, *Pita* and *Pii* in 328 hybrid rice combinations were detected with functional markers. 【Result】 The distribution frequency of *Pita* and *Pii* was the highest, reaching 84.76% and 67.68% in the tested rice combinations, respectively; followed by *Pi2* and *Pik-p* with the proportion of 22.87% and 13.72%, respectively; *Pi1*, *Piz-t* and *Pik-h* had the lowest distribution frequency, accounting for 5.18%, 3.35% and 2.13% of total; all of these varieties didn't carry resistance gene *Pi9*. The number of blast resistance genes detected in hybrid rice combinations were at most four. The resistance evaluation showed that the frequency of resistant varieties rose with increasing number of resistance genes in hybrid combinations. In a hybrid combinations with four resistance genes, the distribution frequency of resistant varieties was 91.67%. Blast resistance contribution assay of the eight resistance genes revealed that *Pi2* and *Pi1* displayed the greatest resistance contribution in the local rice in South China, followed by *Pik-h*, *Pik-p*, *Pita*, *Pii* and *Piz-t*. 【Conclusion】 This study provided a scientific basis for the rational distribution of resistant varieties with different genotypes in South China.

Key words: hybrid rice combinations; resistance gene; rice blast; genotype analysis; molecular marker

摘要: 【目的】 已克隆的稻瘟病抗性基因 *Pi1*、*Pik-p*、*Pik-h*、*Pi2*、*Pi9*、*Piz-t*、*Pita*、*Pii* 对不同稻区的稻瘟病菌表现较广谱的抗性, 被广泛应用于水稻抗瘟性育种。为了明确上述抗性基因在华南稻区杂交稻组合中的分布及其组合的抗病有效性, 【方法】 利用上述 8 个抗病基因的功能标记, 对华南 328 个杂交稻组合进行了抗瘟基因型分子检测。【结果】 抗性基因 *Pita* 和 *Pii* 分布频率最高, 在测试组合中检出率分别为 84.76% 与 67.68%; 其次是 *Pi2* 与 *Pik-p*, 分别为 22.87% 与 13.72%; 检出频率较低的是 *Pi1*、*Piz-t* 和 *Pik-h*, 分别为 5.18%、3.35% 与 2.13%, 检测的品种都不携带抗性基因 *Pi9*。在单个杂交稻组合中, 检出的抗瘟基因数量最多是 4 个。抗病性评价结果表明, 杂交稻组合中检出的抗病基因数量越多, 其表现为抗病品种的频率就越高; 含 4 个抗病基因的杂交稻组合中, 抗病品种所占比率达 91.67%。含有不同抗瘟基因的组合表现出不同水平的抗瘟性, 其中 *Pi2* 与 *Pi1* 对华南稻区稻瘟病的抗病性贡献最大, 其他抗病基因的贡献大小依次是 *Pik-h*、*Pik-p*、*Pita*、*Pii* 与 *Piz-t*。【结论】 本研究为华南稻区杂交稻抗病品种基因型的合理布局以及抗瘟基因的应用提供了科学依据。

关键词: 杂交稻组合; 抗病基因; 稻瘟病; 基因型分析; 分子标记

中图分类号: S435.111.4¹; S511.034

文献标识码: A

文章编号: 1001-7216(2017)03-0299-08

水稻(*Oryza sativa*)是世界上重要的粮食作物, 全球半数以上的人口以稻米作为主食^[1]。由稻瘟

收稿日期: 2016-07-26; 修改稿收到日期: 2016-11-05。

基金项目: 国家重点研发计划项目(2016YFD0300700); 广东省科技计划资助项目(2015B020231003; 2016B090918116; 2016A050502030); 国家水稻产业技术体系资助项目(CARS-01-24)。

病菌(*Magnaporthe oryzae*)引起的稻瘟病是威胁水稻粮食生产的最具毁灭性的病害之一^[2],发病轻时导致减产,严重时局部田块甚至颗粒无收^[3]。稻瘟病也是华南水稻生产中最重要病害,近年来在华南发生日益严重,如华南稻区的天优 998、五优 308、天优 368 等主栽品种的抗性相继衰退或丧失,在部分稻区发生了稻瘟病大面积流行或暴发,对粮食的生产安全造成了严重影响^[4,5]。目前,选育和种植抗病水稻品种是防治稻瘟病最经济、环保及有效的措施^[6]。因此,摸清主栽品种与新选育的抗病品种的抗瘟基因型,是抗病品种科学应用的首要前提。

20 世纪 60 年代中期,日本率先对水稻稻瘟病的抗病基因开展了系统的研究。随后,源自不同水稻品种的 90 多个主效抗稻瘟病基因被鉴定^[7]。近年来,国内研究者对已鉴定的部分抗稻瘟病基因进行了抗性有效性评价。李进斌等^[8]分析了 22 个抗瘟基因在云南省 3 个稻区的抗性情况,发现 *Pi9* 和 *Piz⁵* 在云南稻区具有较好的抗性;杨健源等^[9]的研究表明,华南稻区目前有效的抗性基因主要为 *Pi1*、*Pi2*、*Pita* 等;并且发现目前华南籼稻区育种者利用的抗瘟基因多为 *Pi1* 与 *Pi2*^[10,11];张国民等^[12]分析了 24 个抗瘟基因在我国寒地稻区的抗性情况,发现 *Pi9* 对该稻区的稻瘟病菌表现出广谱抗性。然而,我国大部分稻区水稻品种的抗瘟基因型仍不清晰,有待分析与研究;该方面研究滞后的原因,主要是缺乏基因型快速有效的检测技术。迄今,已经成功克隆出 *Pib*、*Pi9*、*Pi2*、*Piz-t*、*Pik*、*Pik-p*、*Pik-h*、*Pi1*、*Pita*、*Pii*、*Pi50* 和 *Pi64* 等 26 个稻瘟病抗性基因^[13,14]。利用基因序列信息,发展特异性功能标记,可快速检测品种的抗稻瘟病基因型^[15,16],这对全面了解我国水稻抗稻瘟病的基因型及其合理布局与轮换有着重要意义。

我们利用 *Pi1*、*Pik-p*、*Pik-h*、*Pi2*、*Pi9*、*Piz-t*、*Pita*、*Pii* 等 8 个抗病基因功能性分子标记,对华南稻区 328 个杂交水稻组合进行了抗瘟基因型检测,旨在摸清该稻区杂交稻组合的基因型,为华南稻区抗病品种的合理布局及进一步选育新型的抗瘟杂交稻组合提供依据。

1 材料与amp;方法

1.1 植物材料

本研究所用材料包括 328 个近 5 年推广及新参试的华南籼型杂交稻组合,其种子由广东省省级水稻品种区域试验主持单位提供。

水稻种子经 0.5% 强氯精消毒 5 min, 25℃ 清水浸泡 24 h, 滤干种子, 置于 35℃ 培养箱中催芽 24 h。萌芽的种子以 4 行×6 列的间隔穴播于盛有栽培泥土的瓷盘里(规格 30 cm×20 cm×5 cm), 每天浇水 1~2 次。待秧苗长至 1 叶 1 心期, 每盆施 0.5 g 硫酸铵, 每间隔 3 d 施用一次, 共施 3 次。待植株长至 2.5~3.0 叶龄, 进行标样的采集。

1.2 病原菌材料、培养及接种调查

1.2.1 菌株来源

室内抗谱测定选用的 50~64 个菌株为单孢分离菌株, 均采自主栽品种。这些菌株来源于广东、广西、福建等地, 主要是根据当年或上一年稻瘟病菌生理小种的致病性测定情况挑选出的代表性菌株, 对稻瘟病单基因系的致病性上具有丰富的多样性; 所有菌株均保存于广东省农业科学院植物保护研究所。

1.2.2 菌株活化、繁殖及产孢

将保存的菌株转移至酵母固体培养基, 放于生化培养箱中, 活化培养 7 d 以上; 然后将菌丝体转移到高温高压湿热灭菌的玉米培养基上繁殖, 在生化培养箱中培养约 13 d。产孢: 先用灭菌过的无菌水洗去玉米粒表面的菌丝, 再将玉米粒置于已消毒的搪瓷盘中(25 cm×19 cm×2 cm) 铺开, 并在上面覆盖一层湿纱布, 然后在日光灯下光照培养 3~4 d 进行产孢。以上菌株的活化、繁殖及产孢均在 25℃ 下进行。

1.2.3 接种调查

用无菌水将附在玉米粒上的分生孢子洗下, 用 2 层塑料细纱网隔去玉米残渣, 在 100 倍显微镜下镜检, 选取浓度为 5×10^5 个/mL 的孢子悬浮液进行人工喷雾接种; 接种后的稻苗置于自制的相对湿度达 95% 以上的培养箱中暗培养 24 h, 温度控制在 25℃ 左右。之后转至玻璃温室中, 接种 7 d 后进行调查。病级调查按照国际水稻所稻瘟病圃苗瘟分级标准进行: 0~3 级为抗, 4~9 级为感。抗性频率(%)为无毒的菌株数目与总测定菌株数目之比。

1.2.4 抗病性综合评价

依据田间病圃鉴定与室内抗谱测定, 综合评价杂交稻组合的抗性。田间病圃分别设在广东稻区的曲江、从化、龙川、阳江、信宜等 5 个自然病区。室内抗谱测定选用的菌株来源于广东、广西、福建等地, 稻瘟病菌株均为单孢分离菌株, 接种菌株数为 50~64 个。依据杂交稻组合在病区的穗瘟病级以及室内抗谱测定的数据, 对组合做

出综合抗性评判，抗性级别由高至低排序为：高抗、抗、中抗、中感、感、高感等6个级别。调查与评价方法参照朱小源等^[17]和冯爱卿等^[18]的方法。

1.3 标样采集及DNA提取

每个品种采集2个单株的叶片，混合收集于2.0 mL的离心管中，经液氮速冻后，置于-80℃的冰箱内储藏备用。

首先将装有水稻叶片的离心管放在液氮中浸泡约5 min，随后用快速组织破碎仪磨碎叶片，再用百泰克生物技术(北京)有限公司的新型快速植物基因组DNA提取试剂盒，提取水稻叶片总DNA。

1.4 抗病基因*Pi2*、*Pi9*、*Pita*等8个基因特异性分子标记与检测

1.4.1 抗病基因*Pi2*、*Pi9*、*Pita*等8个基因特异性分子标记

本研究中*Pik-p*、*Pik-h*与*Pil*基因特异性分子标记是Zhai等^[19]与Hua等^[20]开发的*Pik*簇复等位基因间特异性分子标记。首先，基于日本晴参考序列与*Pik*簇等位基因序列间的较大差异，开发了K1标记，用于区分水稻品种含有的K型(Kusabue/K60)与N型(日本晴)两种基因型^[19, 21]；其次，通过对*Pik-m*/*Pik-p*/*Pik-l*/*Pil*及日本晴的感病等位基因编码区进行序列比对，找出各等位基因特异的SNP，利用dCAPS Finder 2.0软件(<http://helix.wustl.edu/dcaps/dcaps.html>)^[22]，针对包

含该SNP位点的序列，在其两翼设计引物，开发出能区分*Pik*簇复等位基因*Pik-p*、*Pik-h*与*Pil*的dCAPS标记。*Pii*特异性CAPS标记是Takagi等^[23]根据*Pii*供体品种Hitomeborn与日本晴中*pii*感病等位基因序列比对，发现在*Pvu* II酶切位点处存在SNP多态性而开发的*Pii*-CAPS标记。*Pi2*、*Pi9*与*Piz-t*特异性分子标记依据华丽霞等^[24]设计的标记。*Pita*基因特异性标记是通过将*Pita*全基因序列与日本晴的感病等位基因进行比对，找出特异的SNP，开发出能特异性地检测*Pita*基因的dCAPS标记(未发表资料)。各标记的具体信息见表1。

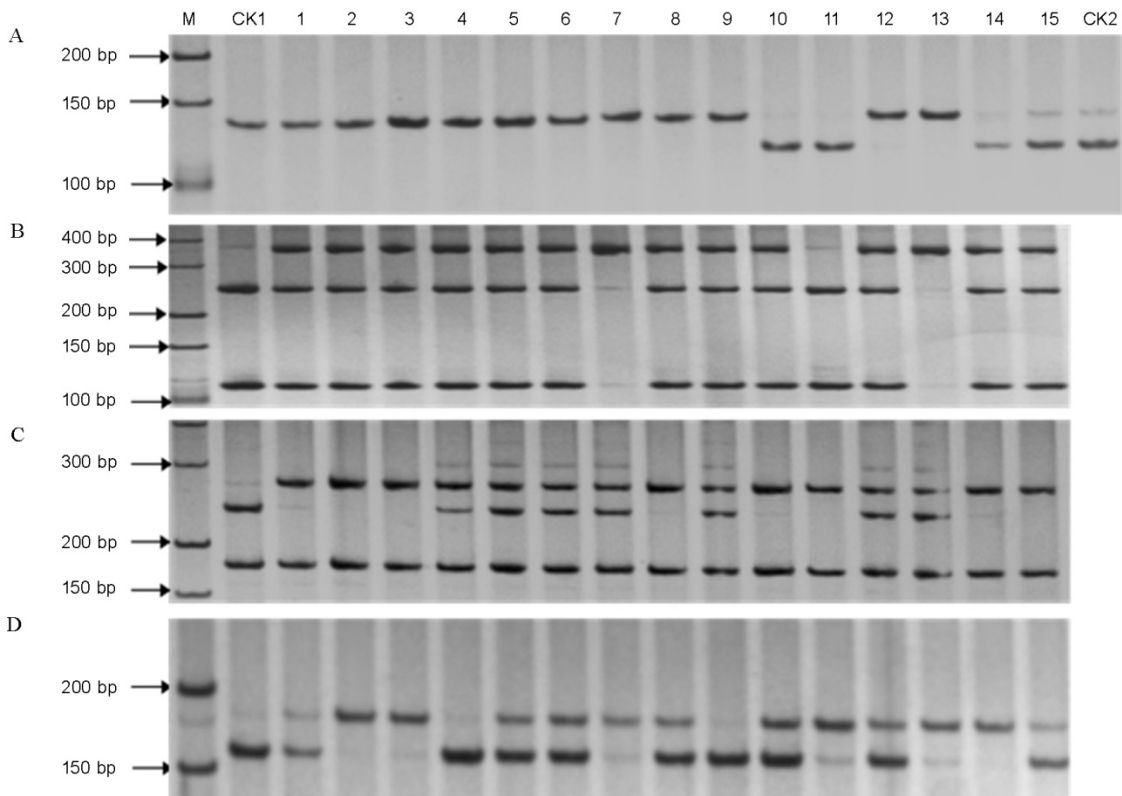
1.4.2 抗病基因*Pi2*、*Pi9*、*Pita*等8个基因特异性分子标记的检测

利用开发的*Pi2*、*Pi9*、*Pita*等8个基因特异性分子标记，对328个华南稻区杂交稻组合分别进行PCR扩增，并利用相应的限制性内切酶对PCR产物进行酶切，检测各杂交稻组合的基因型。分子标记PCR扩增：反应总体积为20 μL，其中包括水稻基因组DNA(20~30 ng/μL) 1 μL，10×PCR缓冲液10 μL，各1 μL正反向引物(10 μmol/L)，ddH₂O 7 μL。PCR程序如下：94℃下预变性3 min；94℃下变性30 s，55℃~60℃下退火30 s，72℃下延伸1 min，35个循环；72℃延伸5 min。PCR仪上扩增结束后，以各单管的PCR产物为模板，利用相应的限制性内切酶对PCR产物进行酶切，酶切体系为10 μL，其中，包括PCR产物10 μL，10×酶切缓冲液1 μL，限制性内切

表1 各基因特异标记检测引物

Table 1. Specific marker detecting primers for each gene.

引物名称 Primer name	引物序列(5'-3') Primer sequence (5'-3')	预期片段大小 Expected size/bp	标记类型 Marker type	内切酶 Enzyme	参考文献 Reference
Pi2-SNP	F: TACTCTTCGTTGTATAGGAC R: GGAGGAGGAGATGAAATAGAATC	462	CAPS	<i>Hinf</i> I	[24]
Pi9-SNP	F: CGCCGTTGATAAGTAAAAGCT R: CAAGAATAATATCTACCCATGG	126	dCAPS	<i>Hind</i> III	[24]
Piz-t P/A	F: ATGTGGATGCTGTGTTAT R: TAGTTTGCTGCTCAATAAGTA	176	Presence/Absence	—	[24]
K1	F: GCAAGATCAGTACCATCACGAGTAATAGCA R: GAGTAGCACTCAACGAAAAGGGCATCGGC	1600	Presence/Absence	—	[19]
Pik-p2/Pik-h2 SNP	F: CGTGGAAGTTCAACAAAAGG R: CAGCACCTGTATTATCCCAT	114	dCAPS	<i>Nde</i> I	[19]
Pik-h1/Pik-p1 SNP	F: TGCTGCAGGTCAGCCAAGCTTA R: CAACCGTTGTTTTGCCTCC	138	dCAPS	<i>Mse</i> I	[19]
Pi1-SNP	F: CAATAGTCCAGCTAAAACGG R: CATTGCGCCTTTACCTTGT	179	CAPS	<i>Rsa</i> I	[20]
Pita-SNP	F: GCCGTGGCTTCTATCTTCAGCT R: GTAAGTGTAAAATGACAAGAAAC	181	dCAPS	<i>Pvu</i> II	未发表 Unpublished
Pii-4SNP	F: TCCAATGCTTCTGAAAGGTAGC R: TGGAACATGAACCCATATCC	350(240/113)	CAPS	<i>Pvu</i> II	[23]



M—DL500。A—区分 *Pik-p* 和 *Pik-h* 的 SNP 标记对部分组合的分子检测, CK1—IRBLkp-K60 (*Pik-p*⁺), CK2—IRBLkh-K3 (*Pik-h*⁺); B—*Pii* 基因特异性分子标记对部分组合的分子检测, CK1—IRBLi-F5 (*Pii*⁺); C—*Pi2* 基因特异性分子标记对部分组合的分子检测, CK1—C101A51 (*Pi2*⁺); D—*Pita* 基因特异性分子标记对部分组合的分子检测, CK1—IRBLta-CP1 (*Pita*⁺)。泳道 1~15: 部分杂交稻组合, 依次是天优 613、泰丰优 806、元丰优 401、新优 1003、裕优 132、恒丰优华占、裕优 9822、泰丰优 2213、盛优华占、信两优 3 号、乐两优 1173、天优华占、恒丰优 9802、五丰优 1173 与 Y 两优 1173。

M, DL500. A, Identification of *Pik-p* and *Pik-h* with specific SNP marker; CK1, IRBLkp-K60(*Pik-p*⁺); CK2, IRBLkh-K3(*Pik-h*⁺). B, Identification of *Pii* with specific SNP marker; CK1, IRBLi-F5(*Pii*⁺). C, Identification of *Pi2* with specific SNP marker; CK1, C101A51(*Pi2*⁺). D, Identification of *Pita* with specific SNP marker; CK1, IRBLta-CP1 (*Pita*⁺). Lanes 1-15, Some of hybrid rice combinations, Tianyou 613, Taifengyou 806, Yuanfengyou 401, Xinyou 1003, Yuyou 132, Hengfengyouhuazhan, Yuyou 9822, Taifengyou 2213, Shengyouhuazhan, Xinliangyou 3, Leliangyou 1173, Tianyouhuazhan, Hengfengyou 9802, Wufengyou 1173, Y liangyou 1173.

图 1 基于特异性 SNP 分子标记的水稻品种抗瘟基因检测

Fig. 1. Detection of *R* genes in rice cultivars with specific SNP markers.

酶 0.3 μL, ddH₂O 3.7 μL。各单管酶切混合液, 在相应内切酶最适宜的酶切温度下(一般是 37°C)酶切 3 h, 产物加入载样缓冲液后, 在 6%~8%的聚丙烯酰胺凝胶上进行电泳检测, 电泳条件为 120 V, 2.5~3.0 h。

2 结果与分析

2.1 杂交稻组合的抗瘟基因型及其分布

本研究先利用能区别 *Pik* 位点 K 型/N 型结构的引物 K1, 对 328 个杂交稻组合进行了抗瘟基因检测, 结果在 211 个杂交稻组合中检测到含有 K 型的 *Pik* 等位基因簇; 再利用 *Pik* 等位基因簇的 *Pik-p*、*Pik-h* 与 *Pil* 的特异性 SNP 标记, 对这 211 个 K 型品种进行 *Pik-p*、*Pik-h* 与 *Pil* 基因型

分析。结果发现, 其中有 45 个品种含有 *Pik-p*, 有 17 个品种含有 *Pil*, 有 7 个品种含有 *Pik-h*。此外, 利用 *Pi2*、*Pi9*、*Piz-t*、*Pita* 及 *Pii* 基因特异性 SNP 标记, 分别对该 328 个杂交稻组合进行了抗瘟基因型检测。结果表明, 在这些杂交稻组合中绝大部分能检测到 *Pi2*、*Pi9*、*Piz-t*、*Pita* 及 *Pii* 等抗病基因及其感病等位基因, 部分基因特异性分子标记的检测结果如图 1 所示。

在检测的杂交稻组合中, 抗性基因 *Pita* 和 *Pii* 分布频率最高, 在测试组合中的检出率分别为 84.76%与 67.68%; 其次是抗性基因 *Pi2* 和 *Pik-p*, 分别为 22.87%与 13.72%。在这些杂交稻组合中, 检出频率较低的抗性基因是 *Pil*、*Piz-t* 与 *Pik-h*, 分别为 5.18%、3.35%与 2.13%。检测的 328 个杂

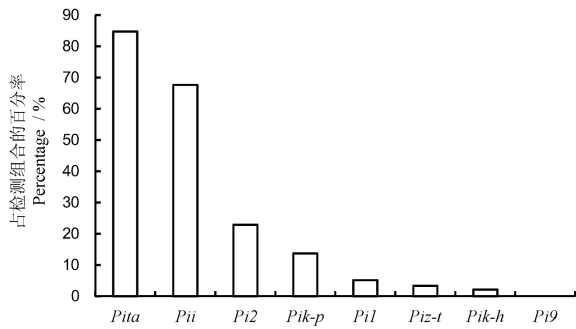


图2 抗稻瘟病基因在杂交稻组合中的分布
Fig. 2. Distribution of the blast resistance genes in the hybrid rice combinations.

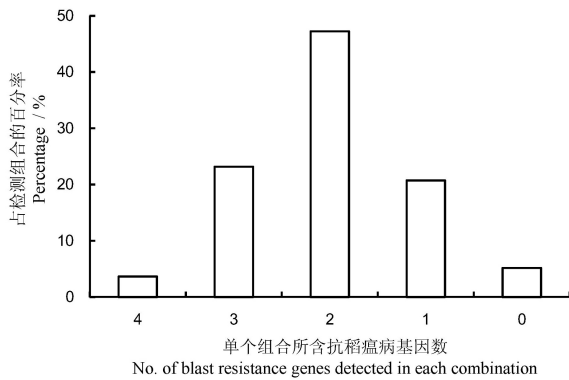
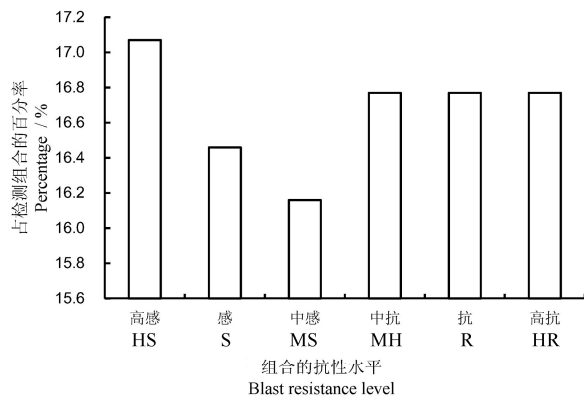


图3 单个杂交稻组合所含基因数及其所占比率
Fig. 3. Number of blast resistance genes detected in each hybrid rice combination and the percentage.



HS, Highly sensitive; S, Sensitive; MS, Moderately sensitive; MH, Moderately resistant; R, Resistant; HR, Highly resistant.

图4 328个华南稻区杂交稻组合抗性水平分布
Fig. 4. Percentage of resistance levels in the 328 hybrid rice combinations.

交稻组合都不携带抗性基因 *Pi9* (图 2)。

2.2 杂交稻组合聚合的抗瘟病基因数量分析

对 328 个杂交稻组合检出的抗瘟病基因数量进行分析, 裕优 132、恒丰优华占、吉丰优华占与金稻优 618 等 12 个杂交稻组合检出了 4 个抗瘟病基因, 是检出抗瘟病基因数量最多的杂交稻组合, 占总检测组合的比率是 3.66%。这 12 个组合中除都检出了 *Pi2*、*Pii*、*Pita* 基因外, 其中有 5 个组

合检出了 *Pil* 基因, 有 7 个组合检出了 *Pik-p* 基因。天优 613、天优 173、永丰优 9802 与荣优华占等 76 个杂交稻组合检出了 3 个抗瘟病基因, 占总检测组合的比率是 23.17%。在这 76 个杂交稻组合中, 绝大多数品种都检出了抗瘟病基因 *Pii* 与 *Pita*; 检出的另一个基因为 *Pi2*、*Piz-t*、*Pil*、*Pik-p*、*Pik-h* 之一。粤良优 778、华两优 78、珍丰优 9822 与美优 9802 等 155 个杂交稻组合检出了 2 个抗瘟病基因, 占总检测组合的比率为 47.25%; 其中, 大多数组合检出的抗瘟病基因是 *Pii* 与 *Pita*。另外, 部分杂交稻组合只检测出 1 个抗瘟病基因, 其比率为 20.73%, 还有 5.18% 的组合未检测到该 8 个抗瘟病基因中的任何一个 (图 3)。

2.3 检出的抗瘟病基因数量、类型与杂交稻组合的抗病相关性分析

为了探明杂交稻组合的抗瘟病基因类型或数量与品种抗病性间的相关性, 本研究对 328 个杂交稻组合进行了稻瘟病抗谱测定及田间病圃鉴定, 结合两组数据对这些组合进行了抗瘟性综合评价。在选取的 328 个杂交稻组合中, 高感、感、中感、中抗、抗、高抗的组合所占比例分别为 17.07%、16.46%、16.16%、16.77%、16.77%、16.77%, 各抗性水平的杂交稻分布较均衡 (图 4)。随着杂交稻组合检出的抗病基因数量的增多, 为抗病品种的比率也随之上升; 其中, 在含有 4 个抗病基因的杂交稻组合中, 抗病品种比率达 91.67%, 在含有 3 个、2 个与 1 个抗病基因的杂交稻组合中, 抗病品种比率分别为 76.32%、45.6% 与 35.29%。上述结果表明, 一个品种 (组合) 中含有的抗病基因数量越多, 其抗性品种的出现频率可以得到相应提升。

根据稻瘟病抗性综合评价的结果, 进一步分析含 *Pil*、*Pik-p*、*Pik-h*、*Pi2*、*Pi9*、*Piz-t*、*Pita*、*Pii* 等不同的抗性基因对提升水稻品种 (组合) 抗性频率的贡献。结果显示, 不同的抗性基因对提升水稻品种的抗病性贡献表现出显著差异; 其中, 携带了抗性基因 *Pi2* 的杂交稻组合, 表现为抗病品种的频率为 93.33%; 其次是 *Pil*、*Pik-h* 和 *Pik-p*, 分别为 88.24%、71.43% 和 60.0%; 在携带 *Pita*、*Pii* 与 *Piz-t* 基因的杂交稻组合中, 表现为抗病品种的频率分别为 55.03%、49.55% 与 27.27%。上述结果表明, *Pi2* 与 *Pil* 在华南籼稻区表现出良好的抗瘟性, 对该稻区稻瘟病的抗瘟性贡献最大, 其他抗瘟基因的抗病性贡献大小依次是 *Pik-h*、*Pik-p*、*Pita*、*Pii* 与 *Piz-t*。

3 讨论

了解病原菌的无毒基因以及品种抗病基因的构成是利用抗病品种控制稻瘟病的基础。单基因系的建立便于人们利用单基因鉴别系统鉴定稻瘟病菌无毒基因型,随着越来越多的抗稻瘟病基因被克隆,为利用特异性标记分析品种抗病基因型奠定了技术基础。国内学者利用抗稻瘟病单基因系对我国籼稻区稻瘟病菌的致病性进行了测定,研究表明华南稻瘟病菌与主效抗瘟基因的互作表现出丰富的多样性,但亦可把互作归类为几个主成份类型,即分别以 *Pi1*、*Pi2*、*Pita*²、*Pish*、*Piz*、*Pi9*、*Pik-h*、*Pik-p*、*Pii* 等 9 个基因与病原互作的 9 个互作类型^[9, 25]。本研究以上述基因为主要检测对象,试图探明上述基因在华南杂交稻的分布以及与抗病性间的相关性,为本地区抗病品种基因型的合理布局提供科学依据。

近年来,国内外学者对水稻品种的抗瘟基因型相继开展了研究。时克等^[26]利用基因自身的功能标记检测了 58 个水稻品种的 *Pita* 和 *Pib* 基因情况及其分布状况;何重等^[15]利用 *Pi-ta* 和 *Pi-b* 功能标记,对 40 个粳稻品种和 665 个粳稻新品系进行了基因型检测,明确了抗性基因 *Pi-ta* 和 *Pi-b* 在江苏粳稻品种中具有一定的分布,其中 *Pi-b* 的分布频率较高。马军韬等^[27]对 6 个主要水稻品种含有的抗瘟基因型进行了分析,共检测到 11 个抗瘟基因, *Pi1* 基因出现频率最高。本研究利用 *Pi1*、*Pik-p*、*Pik-h*、*Pi2*、*Pi9*、*Piz-t*、*Pita*、*Pii* 等 8 个基因功能性标记,对来自华南稻区不同遗传背景的 328 个杂交稻组合进行了基因筛查,发现在这些品种中分布频率最高的基因是 *Pita* 和 *Pii*, 这可能是华南稻区选用的育种材料中多含有 *Pita* 和 *Pii* 基因的缘故。检出率较低的抗病基因是 *Pi1*、*Piz-t* 和 *Pik-h*, 在这些品种中均未检测到 *Pi9* 基因,这一结果与 Tian 等^[28]的研究认为抗病基因 *Pi9* 尚未在中国籼稻品种中广泛应用相符;说明 *Pi9* 基因在华南稻区的抗病品种选育及生产上具有重要的应用潜力。本研究亦表明,一个杂交稻组合中检出的抗病基因数量最多是 4 个,检出 3 个或 4 个杂交稻组合的抗瘟性是否一定优于聚合了 2 个或单个抗性基因的组合,还有待扩大水稻的检测群体开展进一步的研究。

本研究分析了检测的 8 个抗病基因对杂交稻组合的抗病性贡献,发现 *Pi2* 与 *Pi1* 对华南稻作区稻瘟病的抗性贡献最大,这 2 个抗病基因也是

在华南稻区抗病育种工作中应用较多的广谱抗瘟基因。王丰等^[29]将稻瘟病广谱抗病基因 *Pi1* 和香味基因 *fgr* 聚合到恢复系 R290 中,显著提高了该恢复系的抗瘟性及稻米的香味品质;柳武革等^[30]将 *Pi1*、*Pi2* 基因导入到保持系荣丰 B 中,利用其配组的杂交稻组合表现出优良的稻瘟病抗性和丰产性。近年来,由于自然界中稻瘟病菌的快速变异,生产上已出现了含有广谱抗病基因 *Pi2* 与 *Pi1* 的品种抗病性衰退或丧失的事件^[4, 5, 31]。据报道,杂交稻天优 998 严重感病是由于广东省稻瘟病菌稀有小种 ZB3 上升为优势小种所致,该型小种可致使携带 *Pi1* 及其等位基因的水稻品种严重感病^[4];五优 308 在我国南方多个稻作区严重感病,侵染该组合的稻瘟病菌可侵染 *Pita* (*Pita2*)、*Pii*、*Pish* 等抗瘟基因^[5]。目前,与天优 998 及五优 308 抗瘟基因类型相近的杂交稻组合有湘丰优 827、双优 228、金昌优 3550、深优 9521、美优 116、五丰优 587、五丰优 165 等,这些组合在上述两个组合感病的稻区应避免种植;另外,与天优 998 及五优 308 不同类型的杂交稻组合有五丰优 9802、五优华占、五丰优 116、Y 两优 187、珍丰优 9822、美优 9802、天优华占等,这些组合在天优 998 和五优 308 感病的稻区可考虑因地制宜地轮换种植。

虽然,本研究分析的抗性基因是目前华南稻区重要的抗瘟基因型,但是,随着新的抗瘟基因不断鉴定、引入及应用,今后仍十分有必要拓展对不同类型的抗瘟基因开展深入分析与研究。

参考文献:

- [1] Liu J L, Wang X J, Mitchell T, Hu Y J, Liu X L, Dai L Y, Wang G L. Recent progress and understanding of the molecular mechanisms of the rice-*Magnaporthe oryzae* interaction. *Mol Plant Pathol*, 2010, 11(3): 419-427.
- [2] Ou S H. Rice Disease. 2nd edn. Kew: Commonwealth Mycological Institute, 1985: 109-201.
- [3] Miah G, Rafii M Y, Ismail M R, Puteh A B, Rahim H A, Asfaliza R, Latif M A. Blast resistance in rice: A review of conventional breeding to molecular approaches. *Mol Biol Rep*, 2013, 40(3): 2369-2388.
- [4] 朱小源, 杨健源, 陈玉托, 杨维新, 陈喜劳, 曾列先, 陈深. 引致天优 998 抗性丧失的稻瘟病菌小种鉴定及其致病性测定. *广东农业科学*, 2008(12): 84-86.
Zhu X Y, Yang J Y, Chen Y T, Yang W X, Chen X L, Zeng L X, Chen S. Race identification and pathogenicity test of the blast fungus causing the resistance breakdown

- of hybrid rice Tianyou 998. *Guangdong Agric Sci*, 2008(12): 84-86. (in Chinese with English abstract)
- [5] 汪文娟, 韦小燕, 陈凯玲, 陈尉芹, 陈珍, 杨健源, 朱小源. 源自杂交稻组合五优 308 稻瘟病菌致病性分析. *广东农业科学*, 2015, 14: 70-73.
Wang W J, Wei X Y, Chen K L, Chen W Q, Chen Z, Yang J Y, Zhu X Y. Pathogenicity analysis on *Magnaporthe grisea* of hybrid combination Wuyou 308. *Guangdong Agric Sci*, 2015, 14: 70-73. (in Chinese with English abstract)
- [6] Fjellstrom R, Conaway-Bormans C A, McClung A M, Marchetti M A, Shank A R, Park W D. Development of DNA markers suitable for marker assisted selection of three *Pi* genes conferring resistance to multiple *Pyricularia grisea* pathotypes. *Crop Sci*, 2004, 44: 1790-1798.
- [7] Liu W D, Liu J L, Triplett L, Leach J E, Wang G L. Novel insights into rice innate immunity against bacterial and fungal pathogens. *Annu Rev Phytopathol*, 2014, 52: 213-241.
- [8] 李进斌, 李成云, 陈艳, 雷财林, 凌忠专. 二十二个抗稻瘟病基因在云南的利用价值评价. *植物保护学报*, 2005, 32(2): 113-119.
Li J B, Li C Y, Chen Y, Lei C L, Ling Z Z. Evaluation of twenty-two blast resistance genes in Yunnan using monogenetic rice lines. *Acta Phytophyl Sin*, 2005, 32(2): 113-119. (in Chinese with English abstract)
- [9] 杨健源, 陈深, 曾列先, 李亦龙, 陈珍, 朱小源. 稻瘟病主效抗性基因对广东省籼稻稻瘟病菌的抗性评价. *中国水稻科学*, 2008, 22(2): 190-196.
Yang J Y, Chen S, Zeng L X, Li Y L, Chen Z, Zhu X Y. Evaluation on resistance of major rice blast resistance genes to *Magnaporthe grisea* isolates collected from *indica* rice in Guangdong Province, China. *Chin J Rice Sci*, 2008, 22(2): 190-196. (in Chinese with English abstract)
- [10] 柳武革, 王丰, 金素娟, 朱小源, 李金华, 刘振荣, 廖亦龙, 朱满山, 黄慧君, 符福鸿, 刘宜柏. 利用分子标记辅助选择聚合 *Pi-1* 和 *Pi-2* 基因改良两系不育系稻瘟病抗性. *作物学报*, 2008, 34(7): 1128-1136.
Liu W G, Wang F, Jin S J, Zhu X Y, Li J H, Liu Z R, Liao Y L, Zhu M S, Huang H J, Fu F H, Liu Y B. Improvement of rice blast resistance in TGMS Line by pyramiding of *Pi-1* and *Pi-2* through molecular marker-assisted selection. *Acta Agron Sin*, 2008, 34(7): 1128-1136. (in Chinese with English abstract)
- [11] 李进波, 夏明元, 戚华雄. 水稻抗稻瘟病基因 *Pi1* 和 *Pi2* 聚合系的获得及其抗性评价. *安徽农业科学*, 2015, 43(5): 12-14, 31.
Li J B, Xia M Y, Qi H X. Development and evaluation of disease resistance of pyramided lines with blast resistance genes *Pi1* and *Pi2* in rice. *J Anhui Agric Sci*, 2015, 43(5): 12-14, 31. (in Chinese with English abstract)
- [12] 张国民, 马军韬, 肖佳雷, 刘迎雪, 辛爱华, 任洋, 张丽艳, 刘东风. 已知抗瘟基因在黑龙江省寒地稻区的评价与利用. *植物病理学报*, 2011, 41(1): 72-79.
Zhang G M, Ma J T, Xiao J L, Liu Y X, Xin A H, Ren Y, Zhang L Y, Liu D F. Evaluation and utilization of value of twenty-four blast resistance genes in north cold region, Heilongjiang. *Acta Phytopathol Sin*, 2011, 41(1): 72-79. (in Chinese with English abstract)
- [13] Ma J, Lei C L, Xu X T, Hao K, Wang J, Cheng Z, Ma X, Ma J, Zhang X, Guo X, Wu F, Lin Q, Wang C, Zhai H, Wan J. *Pi64*, encoding a novel CC-NBS-LRR protein, confers resistance to leaf and neck blast in rice. *Mol Plant Microbe Interact*, 2015, 28(5): 558-568.
- [14] Su J, Wang W J, Han J L, Chen S, Wang C Y, Zeng L X, Feng A Q, Yang J Y, Zhou B, Zhu X Y. Functional divergence of duplicated genes results in a novel blast resistance gene *Pi50* at the *Pi2/9* locus. *Theor Appl Genet*, 2015, 128(11): 2213-2225.
- [15] 何重, 陈涛, 张亚东, 朱镇, 赵庆勇, 周丽慧, 于新, 王才林. 江苏部分粳稻品种和品系中稻瘟病抗性基因 *Pi-ta* 和 *Pi-b* 的基因型分析. *江苏农业学报*, 2014, 30(5): 921-927.
He C, Chen T, Zhang Y D, Zhu Z, Zhao Q Y, Zhou L H, Yu X, Wang C L. Genotypic analysis of blast resistance genes *Pi-ta* and *Pi-b* for *japonica* rice varieties and lines in Jiangsu Province. *Jiangsu Agric Sci*, 2014, 30(5): 921-927. (in Chinese with English abstract)
- [16] 程芳艳, 李春光, 刘永巍, 孙翊轩, 孟昭河, 徐正进. 水稻抗瘟基因 *Pi-b* 与 *Pi-5* 的分子检测及外引抗源的利用评价. *核农学报*, 2016, 30(1): 11-18.
Cheng F Y, Li C G, Liu Y W, Sun Y X, Meng Z H, Xu Z J. Molecular detection of blast resistance genes *Pi-b* and *Pi-5* in northeast rice varieties and utilization evaluation of introduced resistant donors. *J Nuclear Agric Sci*, 2016, 30(1): 11-18. (in Chinese with English abstract)
- [17] 朱小源, 杨健源, 刘景梅, 司徒志谋, 康金平, 胡学应, 朱敏记, 罗森辉, 杨祁云, 林佩珍, 曾列先, 姜先芽, 陈深. 广东水稻品种抗稻瘟病性分析与利用策略. *广东农业科学*, 2006(5): 34-37.
Zhu X Y, Yang J Y, Liu J M, Situ Z M, Kang J P, Hu X Y, Zhu M J, Luo S H, Yang Q Y, Lin P Z, Zeng L X, Jiang X Y, Chen S. Evaluation on resistance of rice varieties in Guangdong to rice blast and strategy for its utilization. *Guangdong Agric Sci*, 2006(5): 34-37. (in Chinese with English abstract)
- [18] 冯爱卿, 杨健源, 陈深, 曾列先, 杨祁云, 苏菁, 汪文娟, 朱小源. 水稻资源对稻瘟病质量抗性及其数量抗性评价. *广东农业科学*, 2015, 42(12): 27-32.
Feng A Q, Yang J Y, Chen S, Zeng L X, Yang Q Y, Su J, Wang W J, Zhu X Y. Evaluation on qualitative and quantitative resistance of rice germplasm to *Magnaporthe oryzae*. 2015. *Guangdong Agric Sci*, 2015, 42(12): 27-32. (in Chinese)

- [19] Zhai C, Lin F, Dong Z Q, He X, Yuan B, Zeng X, Wang L, Pan Q. The isolation and characterization of *Pik*, a rice blast resistance gene which emerged after rice domestication. *New Phytol*, 2011, 189(1): 321-334.
- [20] Hua L X, Wu J Z, Chen C X, Wu W H, He X Y, Lin F, Wang L, Ashikawa I, Matsumoto T, Wang L, Pan Q H. The isolation of *Pi1*, an allele at the *Pik* locus which confers broad spectrum resistance to rice blast. *Theor Appl Genet*, 2012, 125: 1047-1055.
- [21] Yuan B, Zhai C, Wang W J, Zeng X S, Xu X K, Hu H Q, Lin F, Wang L, Pan Q H. The *Pik-p* resistance to *Magnaporthe oryzae* in rice is mediated by a pair of closely linked CC-NBS-LRR genes. *Theor Appl Genet*, 2011, 122: 1017-2108.
- [22] Neff M M, Turk E, Kalishman M. Web-based primer design for single nucleotide polymorphism analysis. *Trends Genet*, 2002, 18(12): 613-615.
- [23] Takagi H, Uemura A, Yaegashi H, Tamiru M, Abe A, Mitsuoka C, Utsushi H, Natsume S, Kanzaki H, Matsumura H, Saitoh H, Yoshida K, Cano L M, Kamoun S O, Terauchi R. MutMap-Gap: Whole-genome sequencing of mutant F₂ progeny bulk combined with de novo assembly of gap regions identifies the rice blast resistance gene *Pii*. *New Phytol*, 2013, 200(1): 276-283.
- [24] 华丽霞, 汪文娟, 陈深, 汪聪颖, 曾烈先, 杨健源, 朱小源, 苏菁. 抗稻瘟病 *Pi2/9/z-t* 基因特异性分子标记的开发. *中国水稻科学*, 2015, 29(3): 305-310.
Hua L X, Wang W J, Shen C, Wang C Y, Zeng L X, Yang J Y, Zhu X Y, Su J. Development of specific DNA markers for detecting the rice blast resistance gene alleles *Pi2/9/z-t*. *Chin J Rice Sci*, 2015, 9(3): 305-310. (in Chinese with English abstract)
- [25] 朱小源, 杨祁云, 杨健源, 雷财林, 王久林, 凌忠专. 抗稻瘟病单基因系对籼稻稻瘟病菌小种鉴别力分析. *植物病理学报*, 2004, 34(4): 361-368.
Zhu X Y, Yang Q Y, Yang J Y, Lei C L, Wang J L, Ling Z Z. Differentiation ability of monogenic lines to *Magnaporthe grisea* in indica rice. *Acta Phytopathol Sin*, 2004, 34(4): 361-368. (in Chinese with English abstract)
- [26] 时克, 雷财林, 程治军, 许兴涛, 王久林, 万建民. 稻瘟病抗性基因 *Pita* 和 *Pib* 在我国水稻主栽品种中的分布. *植物遗传资源学报*, 2009, 10(1): 21-26.
Shi K, Lei C L, Cheng Z J, Xu X T, Wang J L, Wan J M. Distribution of two blast resistance genes *Pita* and *Pib* in major rice cultivars in China. *J Plant Genet Res*, 2009, 10(1): 21-26. (in Chinese with English abstract)
- [27] 马军韬, 张国民, 辛爱华, 张丽艳, 邓凌韦, 任洋. 水稻品种抗稻瘟病分析及基因聚合抗性改良. *植物保护学报*, 2016, 43(2): 177-183.
Ma J T, Zhang G M, Xin A H, Zhang L Y, Deng L W, Ren Y. Resistance analysis and improvement of rice varieties by gene pyramiding. *Acta Phytophyl Sin*, 2016, 43(2): 177-183. (in Chinese with English abstract)
- [28] Tian D G, Chen Z J, Chen Z Q, Zhou Y C, Wang Z H, Wang F, Chen S B. Allele-specific marker-based assessment revealed that the rice blast resistance genes *Pi2* and *Pi9* have not been widely deployed in Chinese indica rice cultivars. *Rice*, 2016, 9(1): 19. doi: 10.1186/s12284-016-0091-8.
- [29] 王丰, 柳武革, 刘振荣, 朱小源, 李金华, 廖亦龙, 朱满山, 黄慧君, 杨健源. 利用分子标记辅助选择聚合 *Pi-1* 和 *fgr* 基因改良水稻恢复系. *杂交水稻*, 2010(S1): 237-244.
Wang F, Liu W G, Liu Z R, Zhu X Y, Li J H, Liao Y L, Zhu M S, Huang H J, Yang J Y. Pyramiding *Pi1* and *fgr* genes to improve rice restorer lines by molecular marker-assisted selection. *Hybrid Rice*, 2010(S1): 237-244. (in Chinese with English abstract)
- [30] 柳武革, 王丰, 刘振荣, 朱小源, 李金华, 黄慧君, 廖亦龙, 朱满山, 付崇允, 陈建伟. 利用分子标记技术聚合 *Pi-1* 和 *Pi-2* 基因改良三系不育系荣丰A的稻瘟病抗性. *分子植物育种*, 2012, 10(5): 575-582.
Liu W G, Wang F, Liu Z R, Zhu X Y, Li J H, Huang H J, Liao Y L, Zhu M S, Fu C Y, Chen J W. Improvement of rice blast resistance in CMS line Rongfeng A by pyramiding *Pi-1* and *Pi-2* with molecular marker techniques. *Mol Plant Breeding*, 2012, 10(5): 575-582. (in Chinese with English abstract)
- [31] 汪文娟, 苏菁, 张杰, 李亦龙, 陈深, 曾列先, 杨健源, 朱小源. 源于粤晶丝苗 2 号穗瘟的稻瘟病菌致病性分析. *广东农业科学*, 2012, 23: 59-61.
Wang W J, Su J, Zhang J, Li Y L, Chen S, Zeng L X, Yang J Y, Zhu X Y. Pathogenicity analysis of the rice blast fungus isolated from the blast panicles of Yuejingsimiao 2. *Guangdong Agric Sci*, 2012, 23: 59-61. (in Chinese)