

抗稻瘟病基因 *Pib*、*Pita*、*Pi5*、*Pi25* 和 *Pi54* 在我国水稻微核心种质中的分布

邕长燕, 许兴涛, 马建, 王帅, 田鹏, 孟令志, 闫文秀, 赵志超, 王洁, 王久林, 雷财林

(中国农业科学院作物科学研究所 / 农作物基因资源与基因改良国家重大科学工程, 北京 100081)

摘要: 稻瘟病抗性基因 *Pib*、*Pita*、*Pi5*、*Pi25* 和 *Pi54* 等对我国不同稻区的稻瘟病菌表现广谱抗性, 在水稻育种中具有较高的利用价值。本研究利用各基因的功能性分子标记, 检测并分析了 *Pib*、*Pita*、*Pi5*、*Pi25* 和 *Pi54* 在我国水稻微核心种质中的分布情况。结果显示, 124 份种质携带 1~4 个目标基因, 其中黄丝桂占携带基因 *Pib*、*Pita*、*Pi5* 和 *Pi54*; 南雄早油占和乌嘴红谷分别携带 3 个基因 *Pita*、*Pi25* 和 *Pi54* 及 *Pita*、*Pi5* 和 *Pi54*; 叶里藏花和辽梗 287 等 35 份分别携带 *Pi5* 和 *Pi54*、*Pita* 和 *Pi54*、*Pib* 和 *Pi54*、*Pib* 和 *Pita*、*Pi25* 和 *Pi54*、*Pib* 和 *Pi5*、*Pita* 和 *Pi5*、*Pita* 和 *Pi25*、*Pi5* 和 *Pi25*; 抚宁紫皮梗子和隆化毛葫芦等 86 份分别携带单个目标基因。为了解我国水稻微核心种质的抗稻瘟病基因型, 以及有效利用优异种质改良水稻抗稻瘟病性提供了信息。

关键词: 水稻; 微核心种质; 稻瘟病; 抗性基因; 分子标记

Distribution of Blast Resistance Genes *Pib*, *Pita*, *Pi5*, *Pi25* and *Pi54* in Mini-core Collection of Chinese Rice Germplasm

QI Chang-yan, XU Xing-tao, MA Jian, WANG Shuai, TIAN Peng, MENG Ling-zhi,

YAN Wen-xiu, ZHAO Zhi-chao, WANG Jie, WANG Jiu-lin, LEI Cai-lin

(Institute of Crop Sciences, Chinese Academy of Agricultural Sciences/ National Key Facility for Crop Gene Resources and Genetic Improvement, Beijing 100081)

Abstract: Five blast resistance (*R*) genes, *Pib*, *Pita*, *Pi5*, *Pi25* and *Pi54*, which showed relative broad-spectrum resistance to Chinese *Magnaporthe oryzae* isolates, were surveyed in the mini-core collection of Chinese rice germplasm by using their functional markers. As a result, 124 accessions of germplasm were found to harbor 1-4 target genes, respectively. Among them, Huangsiguizhan contained four *R* genes including *Pib*, *Pita*, *Pi5* and *Pi54*; Nanxiongzaoyouzhuan and Wuzuihonggu each harbored three *R* genes *Pita*/*Pi25*/*Pi54* and *Pita*/*Pi5*/*Pi54*, respectively; 35 accessions including Yelicanghua and Liaojing 287, etc. each harbored two *R* genes with genotypic constitutions of *Pi5* and *Pi54*, *Pita* and *Pi54*, *Pib* and *Pi54*, *Pib* and *Pita*, *Pi25* and *Pi54*, *Pib* and *Pi5*, *Pita* and *Pi5*, *Pita* and *Pi25*, *Pi5* and *Pi25*, respectively. 86 accessions including Funingzipijingzi and Longhuamaohulou, etc. each harbored a single target gene. These results will provide references for grasping blast *R* genotypes of the mini-core collection of rice germplasm and improving cultivar resistance using the elite accessions of germplasm.

Key words: rice; mini-core collection of germplasm; rice blast; resistance gene; molecular marker

收稿日期: 2019-01-16 修回日期: 2019-01-24 网络出版日期: 2019-02-13

URL: <http://doi.org/10.13430/j.cnki.jpgr.20190116002>

第一作者研究方向为水稻抗稻瘟病分子育种, E-mail: qpan2018@163.com; 许兴涛为共同第一作者

通信作者: 雷财林, 研究方向为水稻稻瘟病与抗病分子育种, E-mail: leicailin@caas.cn

基金项目: 公益性行业 (农业) 科研专项 (201203014); 国家科技支撑计划项目 (2013BAD01B02); 转基因生物新品种培育重大专项 (2016ZX08001-002)

Foundation project: The Special Fund for Agro-scientific Research in the Public Interest Program of China (201203014), National Sci-tech Support Plan (2013BAD01B02), The Major Science and Technology Project to Create New Crop Cultivars using Gene Transfer Technology (2016ZX08001-002)

由 *Magnaporthe oryzae* 引起的稻瘟病是一种世界性水稻病害, 严重影响了水稻产量和品质^[1]。培育和利用抗病品种是控制稻瘟病最经济、有效和环境友好的措施。掌握水稻品种抗稻瘟病基因型, 对通过基因聚合手段培育广谱抗病品种, 合理布局抗稻瘟病基因型, 持续有效控制稻瘟病至关重要^[2]。

常规的水稻抗稻瘟病基因型分析, 涉及病原菌培养与接种、抗性遗传分析、基因等位性测定等复杂过程, 不仅工作量大、操作困难, 而且鉴定效率很低^[2]。近年来, 随着越来越多的抗稻瘟病基因被鉴定和克隆, 一些源于抗性基因 (如 *Pita*、*Pib*、*Pit*、*Pi5*、*Pi25*/*Pid3*、*Pik*、*Pik-m*、*Pik-p*、*Pil*、*Pi54*、*Pi64*、*Pi35* 等) 自身序列特异性的分子标记 (功能标记) 被相继开发出来, 为快速、准确、批量鉴定水稻抗稻瘟病基因型, 以及高效开展抗性基因聚合育种带来契机^[3-16]。

水稻微核心种质是我国近 6 万份栽培稻种质资源的浓缩, 具有广泛的遗传多样性^[17-18]。Zhai 等^[13]、Hua 等^[14]、Ma 等^[15]及马建等^[16]分别利用功能标记检测了 *Pik*、*Pik-p*、*Pik-m*、*Pil*、*Pi64* 和 *Pi35* 等在我国微核心种质中的分布, 确认品种肥东塘稻携带 *Pik*, 文香糯携带 *Pik-p*, 寸谷糯和郑稻 5 号携带 *Pik-m*, 抚宁紫皮粳子和细麻线携带 *Pi35*。本研究拟选择对我国稻瘟病菌表现广谱抗性的 *Pib*、*Pita*、*Pi5*、*Pi25*、*Pi54* 等作为目标基因^[2, 11-12, 19], 利用功能标记检测并分析其在我国水稻微核心种质中的分布, 为深入了解我国水稻微核心种质抗性基因型, 以及有效利用优异种质开展抗病育种提供信息。

表 1 用于鉴定目标基因的分子标记及其引物信息

Table 1 Molecular markers and their primer sequences used for identification of target genes

标记名称 Marker	目标基因 Target gene	引物序列 (5' - 3') Primer sequence (5' - 3')	片段大小 (bp) Fragment size	参考文献 Reference
Pibdom	<i>Pib</i>	F: GAACAATGCCCAAACCTTGAGA R: GGGTCCACATGTCAGTGAGC	365	[5-6]
Lys145	<i>pib</i>	F: TCGGTGCCTCGGTAGTCAGT R: GGGAAAGCGGATCCTAGGTCT	803	
YL155/87	<i>Pita</i>	F: AGCAGGTTATAAGCTAGGCC R: CTACCAACAAGTTCATCAAA	1042	[3-4]
YL183/87	<i>pita</i>	F: AGCAGGTTATAAGCTAGCTAT R: CTACCAACAAGTTCATCAAA	1042	
JJ80-T3	<i>Pi5</i>	F: TTATGAGATTAGGAGTGTAT R: ATGTAAAGGCAAAAGCTGAT	442	[8-9]
CAP1/Hinc II	<i>Pi25</i>	F: GCCACATCATAATTCCTTGA R: TGAAATGGGTGAAAGATGAG	406	[10]
Pi54 MAS	<i>Pi54</i>	F: CAATCTCCAAAGTTTTTCAGG R: GCTTCAATCACTGCTAGACC	359 p (<i>pi54</i>) / 216 P (<i>Pi54</i>)	[11]

1 材料与方法

1.1 水稻材料

水稻微核心种质 204 份, 其中粳稻 91 份、籼稻 113 份; 源自华北稻区 13 份 (11 粳, 2 籼)、东北稻区 9 份 (粳)、西北稻区 3 份 (粳)、长江中下游稻区 69 份 (26 粳, 43 籼)、西南稻区 68 份 (34 粳, 34 籼)、华南稻区 42 份 (8 粳, 34 籼), 204 份微核心种质及其抗稻瘟病基因组成详见附表 1 (<http://doi.org/10.13430/j.cnki.jpgr.20190116002> 附表 1), 由中国农业科学院作物科学研究所种质资源中期库及中国农业大学李自超教授提供。水稻品种特青 (携带 *Pib* 基因^[5])、Tetep (携带 *Pita*、*Pi5* 和 *Pi54* 基因^[4, 9, 11])、谷梅 2 号 (携带 *Pi25* 基因^[10])、丽江新团黑谷 (LTH, 不携带任何已知抗稻瘟病基因^[20]), 由本实验室保存, 分别用作阳性或阴性对照。

1.2 水稻基因组 DNA 的提取与 PCR 扩增

采用 CTAB 方法提取水稻幼苗的基因组 DNA^[2]。用于 PCR 扩增的引物名称、序列及预期片段长度列示于表 1。PCR 扩增反应体系为 10 μ L, 含 1.0 mL 10 \times 缓冲液 (无 Mg^{2+}), 0.2 mL dNTP (各 2.5 mmol/L), 0.6 mL $MgCl_2$ (25 mmol/L), 1 mL 引物 (2.5 mmol/L, F+R), 0.1 mL Taq 酶 (5 U/ μ L), 1 mL DNA (100 ng/ μ L) 和 6.1 mL ddH₂O。PCR 扩增程序: 94 $^{\circ}C$ 5 min; 94 $^{\circ}C$ 30 s, 57 $^{\circ}C$ 30 s, 72 $^{\circ}C$ 30 s, 35 个循环; 72 $^{\circ}C$ 7 min。扩增产物用 2% 琼脂糖凝胶电泳, 溴化乙锭染色, 在紫外灯下观察并用凝胶成像系统拍照。每个 DNA 样品重复扩增并电泳检测 3 次以上, 以确保扩增结果准确、可靠。

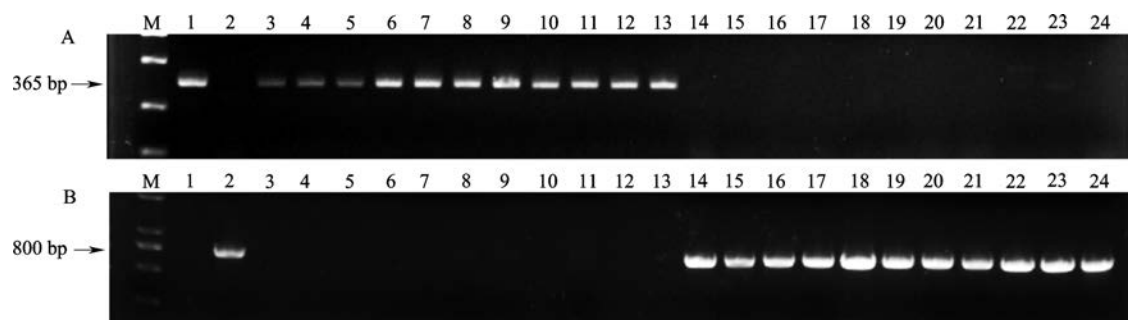
2 结果与分析

2.1 利用双标记鉴定 *Pib* 和 *Pita* 的抗、感病等位基因

利用 *Pib* 基因特异引物 *Pibdom* F/R 和 *pib* 基因特异引物 *Lys145* F/R 分别对供试水稻材料进行 PCR 扩增,发现阳性对照品种特青及台中籼选 220 号、闷加高 1 等 16 份微核心种质均能扩增出携带抗病等位基因 *Pib* 的特异性条带,而不能扩增出感病等位基因 *pib* 的特异性条带;反之,其他 188 份能扩增出感病等位基因 *pib* 而不能扩增出抗性等位基因 *Pib* 的特异性条带(附表 1、图 1)。据此,推断台中籼选 220 号、闷加高 1、青四矮 16B、滇瑞 409B、包协 123B、T80B、中 88B、古 154、IR661-1(早)、湘晚籼 1 号、

扬稻 2 号、泸科 3 号、黄丝桂占、金优 1 号、湘晚籼 3 号、成农水晶等 16 份微核心种质携带 *Pib* 基因。

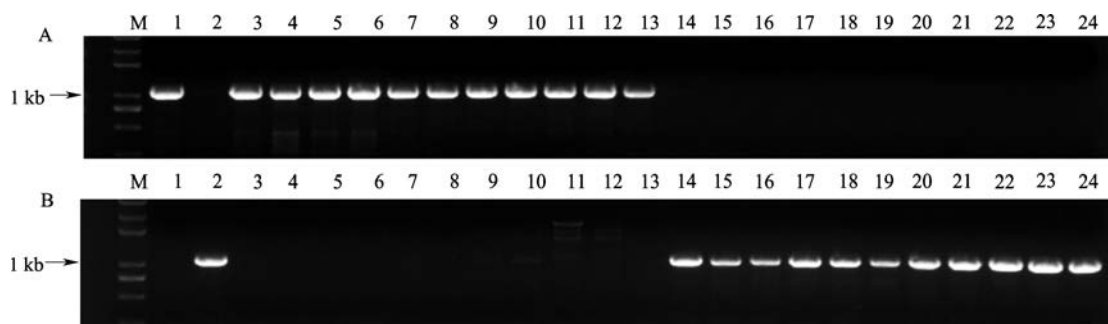
同样地,利用 *Pita* 基因特异引物 *YL155*/YL87 F/R 和 *pita* 基因特异引物 *YL183*/YL87 F/R 分别对供试水稻材料进行 PCR 扩增。结果表明,阳性对照品种 *Tetep* 及雷火占、金溪白、解放籼、一支香、鼠牙占、饿死牛、齐眉、南雄早油占、黑督 4、横县良春畚谷、矮仔占、七月粳、洞庭晚籼 1、柳叶粘、矮脚早、万利籼、梅花糯、文香糯、毫荒腊、秣五升、乌嘴红谷、泽谷、葡萄黄、闷加高 1、包二幅、青四矮 16B、特青选恢、桂朝 2 号、红晚 1 号、辽粳 287、黄丝桂占、墨米等 32 份微核心种质携带抗病等位基因 *Pita*,其他 172 份微核心种质携带感病等位基因 *pita*(附表 1、图 2)。



A: 引物 *Pibdom* 扩增抗病等位基因 *Pib* 的结果; B: 引物 *Lys145* 扩增感病等位基因 *pib* 的结果; M: 2K marker; 1: 特青(阳性对照); 2: 丽江新团黑谷(阴性对照); 3~24: 台中籼选 220 号、闷加高 1、青四矮 16B、滇瑞 409B、包协 123B、80B、中 88B、古 154、IR661-1(早)、黄丝桂占、金优 1 号、抚宁紫皮梗子、隆化毛葫芦、水原 300 粒、叶里藏花、中楼一号 1、卫国、丹东陆稻、兴国、老光头 83、白毛稻、木樨球
A: PCR amplification of the resistant allele of *Pib* using the primer pairs *Pibdom* F/R, B: PCR amplification of the susceptible allele of *Pib* using the primer pairs *Lys145* F/R, M: 2K markers, Lane 1: Teqing (positive control), Lane 2: Lijiangxintuanheigu (negative control), Lane 3-24: Taichungxianxuan No. 220, Menjiagao 1, Qingsi' ai 16B, Dianrui 409B, Baoxie 123B, 80B, Zhong 88B, Gu 154, IR661-1 (early), Huangsiguizhan, Jinyou No. 1, Funingzipijingzi, Longhuamaohulu, Shuiyuansanbaili, Yelicanghua, Zhonglouyihao 1, Weiguo, Dandongludao, Xingguo, Laoguangtou 83, Baimaodao, Muxiqiu

图 1 部分水稻品种中抗性基因 *Pib* 的 PCR 扩增结果

Fig. 1 PCR amplification of the *Pib* gene in a subset of rice varieties



A: 引物 *YL155*/87 扩增抗病等位基因 *Pita* 的结果; B: 引物 *YL183*/87 扩增感病等位基因 *pita* 的结果; M: 2K marker; 1: *Tetep* (阳性对照); 2: 丽江新团黑谷(阴性对照); 3~24: 一支香、鼠牙占、饿死牛、齐眉、南雄早油占、黑督 4、横县良春畚谷、矮仔占、七月粳、洞庭晚籼、柳叶粘、抚宁紫皮梗子、隆化毛葫芦、水原 300 粒、叶里藏花、中楼一号 1、卫国、丹东陆稻、兴国、老光头 83、白毛稻、木樨球

A: PCR amplification of the resistant allele of *Pita* using the primer pairs *YL155*/87 F/R, B: PCR amplification of the susceptible allele of *Pita* using the primer pairs *YL183*/87 F/R, M: 2K markers, Lane 1: *Tetep* (positive control), Lane 2: Lijiangxintuanheigu (negative control), Lane 3-24: Yizhixiang, Shuyazhan, Esiniu, Qimei, Nanxiongzaoyouzhuan, Heidu 4, Hengxianliangchunbeng, Aizhizhan, Qiyuexian, Dongtingwanxian, Liuyezhan, Funingzipijingzi, Longhuamaohulu, Shuiyuansanbaili, Yelicanghua, Zhonglouyihao 1, Weiguo, Dandongludao, Xingguo, Laoguangtou 83, Baimaodao, Muxiqiu

图 2 部分水稻品种中抗性基因 *Pita* 的 PCR 扩增结果

Fig. 2 PCR amplification of the *Pita* gene in a subset of rice varieties

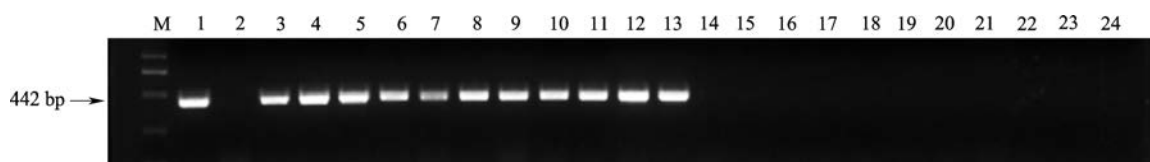
2.2 利用单标记鉴定 *Pi5*、*Pi25* 和 *Pi54* 基因

利用 *Pi5* 基因特异引物 JJ80-T3 F/R 对供试水稻材料进行 PCR 扩增, 发现阳性对照品种 Tetep 及叶里藏花、白毛稻、百歌稻、闽北晚籼、红矮糯、霸王鞭 1、毫补卡、紫米、香谷、清可、毫巴永 1、齐头谷、魔王谷内杂、南高谷、半节芒、八百粒、乌嘴红谷、马尾粘、红壳折糯(2)、小白米、闷加丁 2、金南特 B、中 88B、南京 11、桂朝 2 号、包选 21 号、湘矮早 10、矮沱谷 151 和黄丝桂占等 29 份微核心种质均能扩增出 *Pi5* 抗病位点的特异性条带(附表 1、图 3), 推断这 29 份微核心种质携带 *Pi5* 基因。

利用 SCAR 标记引物 CAP1 对供试水稻材料进行

PCR 扩增, 再经内切酶 *Hinc* II 酶切扩增产物, 发现阳性对照品种谷梅 2 号及铁秆乌、台山糯、矮禾迟、矮密、南雄早油占、闷加丁 2、红晚 1 号等 7 份微核心种质的扩增产物均能酶切出 *Pi25* 抗病位点特异性条带, 而其他 197 份微核心种质的扩增产物均不能被酶切(附表 1、图 4)。据此, 推断这 7 份微核心种质携带 *Pi25* 基因。

利用 InDel 标记引物 *Pi54* MAS 对供试水稻材料进行 PCR 扩增, 发现阳性对照品种 Tetep 及抚宁紫皮梗子、隆化毛葫芦、叶里藏花等 82 份种质能扩增出抗病等位基因 *Pi54* 的特异性条带, 而其他 122 份核心种质能扩增出感病等位基因 *pi54* 的特异性条带(附表 1、图 5)。据此, 推断这 82 份微核心种质均携带 *Pi54* 基因。

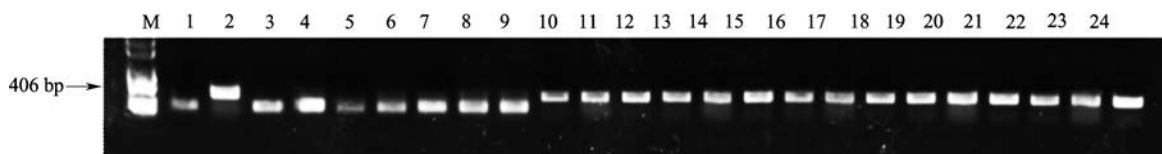


M: 2K marker; 1: Tetep (阳性对照); 2: 丽江新团黑谷 (阴性对照); 3~24: 百歌稻、闽北晚籼、霸王鞭 1、紫米、台中 65 号 / 台中 HR539、闷加丁 2、中 88B、南京 11 号、矮麻抗、红矮糯、三磅七十萝、抚宁紫皮梗子、隆化毛葫芦、水原 300 粒、卫国、丹东陆稻、兴国、老光头 83、木樨球、老虎种、有芒早梗、黄壳早甘日

M: 2K markers, Lane 1: Tetep (positive control), Lane 2: Lijiangxintuanheigu (negative control), Lane 3-24: Baigedao, Minbeiwaxian, Bawangbian 1, Zimi, Taichung No. 65/Taichung HR539, Menjiading 2, Zhong 88B, Nanjing No. 11, Aimakang, Hong'ainuo, Sanbangqishiluo, Funingzipijingzi, Longhuamaohulu, Shuiyuansanbaili, Weiguo, Dandongludao, Xingguo, Laoguangtou 83, Muxiqu, Laohuzhong, Youmangzaojing, Huangkezaonianri

图 3 部分水稻品种中抗性基因 *Pi5* 的 PCR 扩增结果

Fig. 3 PCR amplification of the *Pi5* gene in a subset of rice varieties

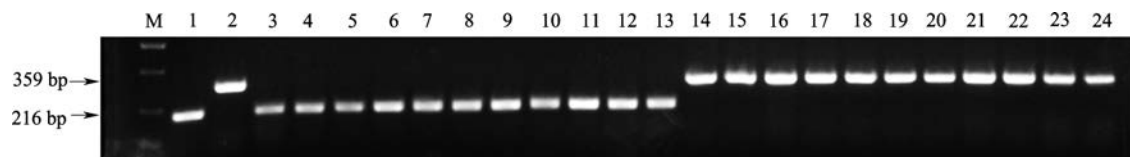


M: 2K marker; 1: 谷梅 2 号 (阳性对照); 2: 丽江新团黑谷 (阴性对照); 3~24: 铁秆乌、台山糯、矮禾迟、矮密、南雄早油占、闷加丁 2、红晚 1 号、湘恢 91269、抚宁紫皮梗子、隆化毛葫芦、水原 300 粒、叶里藏花、中楼一号 1、卫国、丹东陆稻、兴国、老光头 83、白毛稻、木樨球、老虎种、有芒早梗、壳早甘日

M: 2K markers, Lane 1: Gumei No. 2 (positive control), Lane 2: Lijiangxintuanheigu (negative control), Lane 3-24: Tiegianwu, Taishannuo, Aihechi, Aimi, Nanxiongzaoyouzhao, Menjiading 2, Hongwan No.1, Xianghui 91269, Funingzipijingzi, Longhuamaohulu, Shuiyuansanbaili, Yelicanghua, Zhonglouyihao 1, Weiguo, Dandongludao, Xingguo, Laoguangtou 83, Baimaodao, Muxiqu, Laohuzhong, Youmangzaojing, Huangkezaonianri

图 4 部分水稻品种中抗性基因 *Pi25* 的 PCR 扩增后酶切结果

Fig. 4 PCR amplification of the *Pi25* gene in a subset of rice varieties



M: 2K marker; 1: Tetep (阳性对照); 2: 丽江新团黑谷 (阴性对照); 3~24: 抚宁紫皮梗子、隆化毛葫芦、叶里藏花、老虎种、铁秆乌、六十早、雷火占、解放籼、南雄早油占、白壳花螺、白毛稻、水原 300 粒、中楼一号 1、丹东陆稻、兴国、老光头 83、有芒早梗、黄壳早甘日、百歌稻、木樨球、矮禾迟、珍汕 97B

M: 2K markers, Lane 1: Tetep (positive control), Lane 2: Lijiangxintuanheigu (negative control), Lane 3-24: Funingzipijingzi, Longhuamaohulu, Yelicanghua, Laohuzhong, Tiegianwu, Liushizao, Leihuozaan, Jiefangxian, Nanxiongzaoyouzhao, Baikeshualuo, Baimaodao, Shuiyuansanbaili, Zhonglouyihao 1, Dandongludao, Xingguo, Laoguangtou 83, Youmangzaojing, Huangkezaonianri, Baigedao, Muxiqu, Aihechi, Zhenshan97B

图 5 部分水稻品种中抗性基因 *Pi54* 的 PCR 扩增结果

Fig. 5 PCR amplification of the *Pi54* gene in a subset of rice varieties

2.3 *Pib*、*Pita*、*Pi5*、*Pi25* 和 *Pi54* 基因在微核心种质中的分布特点

在供试 204 份微核心种质中,有 124 份被检测到携带 1~4 个目标基因(附表 1)。*Pi54* 分布频率最高,为 40.20%;其次是 *Pita*、*Pi5* 和 *Pib*,其分布频率分别为 15.69%、14.22% 和 7.84%;*Pi25* 的分布频率最低,为 3.43%。*Pi5* 和 *Pi54* 在籼、粳两个亚种分布均较普遍且频率相近,而 *Pib*、*Pita* 和 *Pi25* 则明显倾向于籼亚种分布(附表 1、表 2)。

就稻区而言,*Pi54* 在西北、华北、东北、长江中下游和西南稻区分布较普遍(频率 33.33%~66.67%),在华南稻区也有分布(频率 19.05%);*Pita* 集中分布于华南稻区(频率 38.10%),在长江中下游、西南稻区、华北和东北稻区也有分布(频率 7.69%~11.59%);*Pi5* 在除西北外的 5 个稻区均有分布(频率

7.69%~22.06%);*Pib* 主要分布于长江中下游和华南稻区(频率 11.59%、11.90%),在西南稻区也有分布(频率 4.41%);*Pi25* 则集中分布于华南和长江中下游稻区(频率 7.14%、5.80%)(附表 1、表 2)。

在携带目标基因的 124 份微核心种质中,有 38 份携带 2~4 个目标抗性基因。其中,黄丝桂占携带 4 个基因 *Pib*、*Pita*、*Pi5* 和 *Pi54*;南雄早油占和乌嘴红谷携带 3 个基因,其基因组合分别为 *Pita*、*Pi25* 和 *Pi54* 及 *Pita*、*Pi5* 和 *Pi54*;叶里藏花和辽粳 287 等 35 份种质携带 2 个基因,其基因组合分别为 *Pi5* 和 *Pi54*(13 份)、*Pita* 和 *Pi54*(8 份)、*Pib* 和 *Pi54*(6 份)、*Pib* 和 *Pita*(2 份)、*Pi25* 和 *Pi54*(2 份)、*Pib* 和 *Pi5*(1 份)、*Pita* 和 *Pi25*(1 份)、*Pita* 和 *Pi5*(1 份)、*Pi5* 和 *Pi25*(1 份)。从总体上看,包含 2~4 个目标基因的种质几乎都分布于籼亚种或南方稻区(附表 1、表 3)。

表 2 各目标基因在不同亚种和稻区的分布

Table 2 Geographic distribution of target genes in different subspecies and rice-growing regions

目标基因 Target gene	基因在不同亚种分布频率(%) Frequency of target gene in different subspecies		基因在不同稻区分布频率(%) Frequency of target gene in different rice-growing regions						总频率 (%) Total frequency
	粳稻 <i>japonica</i> (91)	籼稻 <i>indica</i> (113)	华北 North China (13)	东北 Northeast China (9)	西北 Northwest China (3)	长江中下游 Middle and lower Yangtze River (69)	西南 Southwest China (68)	华南 South China (42)	
<i>Pib</i>	1.10	13.27	0	0	0	11.59	4.41	11.90	7.84
<i>Pita</i>	4.40	24.78	7.69	11.11	0	11.59	8.82	38.10	15.69
<i>Pi5</i>	13.19	15.04	7.69	11.11	0	8.70	22.06	14.29	14.22
<i>Pi25</i>	1.10	5.31	0	0	0	5.80	0	7.14	3.43
<i>Pi54</i>	45.05	36.28	61.54	33.33	66.67	40.58	48.53	19.05	40.20

括号内数字代表种质的份数,下同

The number in the parenthesis stands for number of varieties included, the same as below

表 3 各目标基因组合在不同亚种和稻区的分布

Table 3 Distribution of target gene combinations in different subspecies and rice-cropping regions

基因组合 Target gene combination	基因组合在不同亚种分布频率(%) Frequency of target gene combination in different subspecies		基因组合在不同稻区分布频率(%) Frequency of target gene combination in different rice-growing regions						总频率 (%) Total frequency
	粳稻 <i>japonica</i> (91)	籼稻 <i>indica</i> (113)	华北 North China (13)	东北 Northeast China (9)	西北 Northwest China (3)	长江中下游 Middle and lower Yangtze River (69)	西南 Southwest China (68)	华南 South China (42)	
<i>Pi5+Pi54</i>	6.59	6.19	7.69	0	0	4.35	11.76	2.38	6.37
<i>Pita+Pi54</i>	2.20	5.31	0	11.11	0	5.80	4.41	0	3.92
<i>Pib+Pi54</i>	0	5.31	0	0	0	4.35	2.94	2.38	2.94
<i>Pib+Pita</i>	1.10	0.88	0	0	0	0	0	4.76	0.98
<i>Pi25+Pi54</i>	1.10	0.88	0	0	0	2.90	0	0	0.98
<i>Pib+Pi5</i>	0	0.88	0	0	0	1.45	0	0	0.49
<i>Pita+Pi25</i>	0	0.88	0	0	0	0	0	2.38	0.49
<i>Pita+Pi5</i>	0	0.88	0	0	0	0	0	2.38	0.49
<i>Pi5+Pi25</i>	0	0.88	0	0	0	0	0	2.38	0.49
<i>Pita+Pi25+Pi54</i>	0	0.88	0	0	0	0	0	2.38	0.49
<i>Pita+Pi5+Pi54</i>	0	0.88	0	0	0	0	1.47	0	0.49
<i>Pib+Pita+Pi5+Pi54</i>	0	0.88	0	0	0	0	0	2.38	0.49

3 讨论

水稻品种对稻瘟病的抗性具有明显的致病型(小种)专化性,对不同稻区、不同年份的稻瘟病菌往往表现很大的抗性差异。掌握水稻品种抗性基因型及稻瘟病菌无毒基因型,是科学选育和合理布局抗病良种,进而持续有效防控稻瘟病的首要前提^[2,21]。日本在 20 世纪中后期广泛开展水稻品种抗稻瘟病基因分析,鉴定出 13 个抗性基因,基本明确了全国主要水稻品种抗性基因型^[22];并将主要抗性基因导入商业品种中,育成多个携带不同抗性基因的多系品种,为日本持续有效控制稻瘟病作出重要贡献^[23]。我国自 20 世纪 80 年代逐步开展了这方面工作,但当时的研究大多局限于个别抗源品种的抗性基因分析;近年来有关学者^[2,12,21,24]利用紧密连锁或功能分子标记检测了部分抗性基因在我国水稻品种中的分布,为当地水稻育种提供了借鉴。

我国的水稻微核心种质,是基于 6 万份中国栽培稻种资源(包括地方种、选育种、杂交稻保持系和恢复系)的分层取样结果,结合农艺性状调查和 SSR 位点检测等而构建的,能最大程度代表整个栽培稻种资源遗传多样性的一个子集,蕴藏着丰富的基因资源^[17-18]。近年来,有关学者利用水稻微核心种质开展抗病、抗旱、耐冷、育性恢复及广亲和性等多方面研究,筛选出一批优异种质资源和基因资源^[18,25-28]。在稻瘟病抗性方面,夏小东等^[18]通过聚类分析评价了 203 份微核心种质对当地稻瘟病菌的抗性,筛选出部分广谱抗性品种;Zhao 等^[13]、Hua 等^[14]、Ma 等^[15]和马建等^[16]开发并利用 *Pik*、*Pik-m*、*Pik-p*、*Pi1*、*Pi64* 和 *Pi35* 等的功能标记检测各基因在我国微核心种质中的分布,仅在 1、1、2、2 个地方品种中分别鉴定到 *Pik*(肥东塘稻)、*Pik-p*(文香糯)、*Pik-m*(寸谷糯和郑稻 5 号)和 *Pi35*(抚宁紫皮粳子和细麻线)。本研究以广谱抗性基因 *Pib*、*Pita*、*Pi5*、*Pi25*、*Pi54* 等为目标基因^[2,10,12,19],利用功能性分子标记(表 2)检测了各基因在 204 份水稻微核心种质中的分布,发现 *Pi54* 分布广泛,且无明显的粳、籼亚种间差异(表 3);另外, Ramkumar 等^[11]发现该基因广泛分布于印度水稻种质(频率 36.19%),这暗示着 *Pi54* 很可能与粳、籼驯化无关,而且已广泛应用于国内外水稻育种。Yi 等^[8]和 Lee 等^[9]报道 *Pi5* 与 *Pi3* 和 *Pii* 很可能是同一基因,而且功能性标记 JJ80-T3 无法区别这 3 个基因,故本研究鉴定的 *Pi5* 实质上应该包含 *Pi3* 或 *Pii*。*Pi5*/

Pi3/Pii 在我国微核心种质的分布相对广泛,且无明显的粳、籼亚种间差异,可能与 *Pi5* 和 *Pi3* 起源于粳稻^[8-9]而 *Pii* 起源于籼稻^[22]有关。*Pib* 和 *Pita* 在微核心种质中分布也相对广泛,但其分布明显倾向于粳亚种,可能与该二基因起源于粳稻^[22]有关。*Pi25* 在微核心种质中分布频率最低,仅为 3.43%,这与 Wang 等^[10]报道该基因在我国稻种资源中频率较低(1.2%)相一致。至于 *Pi25* 的起源,有待进一步探究。

本研究明确了 *Pib*、*Pita*、*Pi5*、*Pi25* 和 *Pi54* 在 204 份微核心种质中的分布,确认黄丝桂占携带 *Pib*、*Pita*、*Pi5* 和 *Pi54*;南雄早油占携带 *Pita*、*Pi25* 和 *Pi54*;乌嘴红谷携带 *Pita*、*Pi5* 和 *Pi54*;叶里藏花和辽粳 287 等 35 份分别携带 *Pi5* 和 *Pi54*、*Pita* 和 *Pi54*、*Pib* 和 *Pi54*、*Pib* 和 *Pita*、*Pi25* 和 *Pi54*、*Pib* 和 *Pi5*、*Pita* 和 *Pi25*、*Pita* 和 *Pi5*、*Pi5* 和 *Pi25*;86 份分别携带单个目标基因(附表 1),为有效利用优异核心种质开展抗病分子聚合育种提供了信息。目前国内外利用分子标记定位的抗稻瘟病基因超过 80 个,克隆的至少 26 个,而基于相应基因本身序列特异性建立起来的功能标记仍很有限^[13-16,21]。因此,有必要克隆更多的抗稻瘟病基因,尽可能开发各基因的功能标记,用以快速、批量鉴定我国水稻微核心种质乃至全国主要栽培品种(组合)的抗稻瘟病基因型,为高效选育抗病良种及合理布局抗病基因型,进而持续有效控制稻瘟病危害提供科学依据。

参考文献

- [1] Ou S. Rice Diseases, 2nd edition. London: Commonwealth Agricultural Bureaux, 1985: 380
- [2] 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 X, Wang J L, Wan J M. Distribution of two blast resistance genes *Pita* and *Pib* in major rice cultivars in China. Journal of Plant Genetic Resources, 2009, 10(1): 21-26
- [3] Jia Y, Wang Z, Singh P. Development of dominant rice blast *Pi-ta* resistance gene markers. Crop Science, 2002, 42(6): 2145-2149
- [4] Wang Z, Jia Y, Rutger J N, Xia Y. Rapid survey for presence of a blast resistance gene *Pi-ta* in rice cultivars using the dominant DNA markers derived from portions of the *Pi-ta* gene. Plant Breeding, 2007, 126(1): 36-42
- [5] 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 Science, 2004, 44(5): 1790-1798

- [6] 刘洋,徐培洲,张红宇,徐建第,吴发强,吴先军. 水稻抗稻瘟病 *Pib* 基因的分子标记辅助选择与应用. 中国农业科学, 2008, 41(1): 9-14
Liu Y, Xu P Z, Zhang H Y, Xu J D, Wu F Q, Wu X J. Marker-assisted selection and application of blast resistant gene *Pib* in rice. *Scientia Agricultura Sinica*, 2008, 41(1): 9-14
- [7] Hayashi K, Yasuda N, Fujita Y, Koizumi S, Yoshida H. Identification of the blast resistance gene *Pit* in rice cultivars using functional markers. *Theoretical and Applied Genetics*, 2010, 121(7): 1357-1367
- [8] Yi G, Lee S, Hong Y, Cho Y, Nam M, Kim S, Han S, Wang G, Hahn T R, Ronald P C, Jeon J. Use of *Pi5(t)* markers in marker-assisted selection to screen for cultivars with resistance to *Magnaporthe grisea*. *Theoretical and Applied Genetics*, 2004, 109(5): 978-985
- [9] Lee S, Song M, Seo Y, Kim H, Ko S, Cao P, Suh J, Yi G, Roh J, Lee S, An G, Hahn T R, Wang G, Ronald P C, Jeon J. Rice *Pi5*-mediated resistance to *Magnaporthe oryzae* requires the presence of two *CC-NB-LRR* genes. *Genetics*, 2009, 181(4): 1627-1638
- [10] Wang H, Chen J, Shi Y, Pan G, Shen H, Wu J. Development and validation of CAPS markers for marker-assisted selection of rice blast resistance gene *Pi25*. *Acta Agronomica Sinica*, 2012, 38(11): 1960-1968
- [11] Ramkumar G, Srinivasarao K, Mohan K M, Sudarshan I, Sivarajani K P, Gopalakrishna K, Neeraja C N, Balachandran S M, Sundaram R M, Prasad M S, Rani N S, Prasad A M R, Viraktamath B C, Madhav M S. Development and validation of functional marker targeting an InDel in the major rice blast disease resistance gene *Pi54 (Pik^h)*. *Molecular Breeding*, 2011, 27(1): 129-135
- [12] Wu Y, Xiao N, Yu L, Pan C, Li Y, Zhang X, Liu G, Dai Z, Pan X, Li A. Combination patterns of major *R* genes determine the level of resistance to the *M. oryzae* in rice (*Oryza sativa* L.). *PLoS One*, 2015, 10(6): e0126130. doi: 10.1371/journal.pone.0126130
- [13] 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 Phytologist*, 2011, 189(1): 321-334
- [14] Hua L, Wu J, Chen C, Wu W, He X, Lin F, Wang L, Ashikawa I, Matsumoto T, Wang L, Pan Q. The isolation of *Pi1*, an allele at the *Pik* locus which confers broad spectrum resistance to rice blast. *Theoretical and Applied Genetics*, 2012, 125(5): 1047-1055
- [15] Ma J, Lei C, Xu X, 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. *Molecular Plant Microbe Interactions*, 2015, 28(5): 558-568
- [16] 马建, 马小定, 赵志超, 王帅, 王久林, 王洁, 程治军, 雷财林. 水稻抗稻瘟病基因 *Pi35* 功能性分子标记的开发及其应用. 作物学报, 2015, 41(12): 1779-1790
Ma J, Ma X D, Zhao Z C, Wang S, Wang J L, Wang J, Cheng Z J, Lei C L. Development and application of a functional marker of the blast resistance gene *Pi35* in rice. *Acta Agronomica Sinica*, 2015, 41(12): 1779-1790
- [17] Zhang H, Zhang D, Wang M, Sun J, Qi Y, Li J, Wei X, Han L, Qiu Z, Tang S, Li Z. A core collection and mini core collection of *Oryza sativa* L. in China. *Theoretical and Applied Genetics*, 2011, 122(1): 49-61
- [18] 夏小东, 袁筱萍, 余汉勇, 王一平, 徐群, 魏兴华. 中国稻种资源初级核心种质对稻瘟病的抗性聚类分析. 华中农业大学学报, 2011, 32(2): 39-43
Xia X D, Yuan X P, Yu H Y, Wang Y P, Xu Q, Wei X H. Resistance to rice blast by clustering analysis of primary core collection of Chinese rice germplasm. *Journal of South China Agricultural University*, 2011, 32(2): 39-43
- [19] 周江鸿, 王久林, 蒋婉如, 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. 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. *Acta Agronomica Sinica*, 2003, 29(5): 646-651
- [20] Lei C, Hao K, Yang Y, Ma J, Wang S, Wang J, Cheng Z, Zhao S, Zhang X, Guo X, Wang C, Wan J. Identification and fine mapping of two blast resistance genes in rice cultivar 93-11. *The Crop Journal*, 2013, 1: 2-14
- [21] 汪文娟, 周继勇, 汪聪颖, 苏菁, 封金奇, 陈炳, 冯爱卿, 杨健源, 陈深, 朱小源. 八个抗稻瘟病基因在华南籼型杂交水稻中的分布. 中国水稻科学, 2017, 31(3): 299-306
Wang W J, Zhou J Y, Wang C Y, Su J, Feng J Q, Chen B, Feng A Q, Yang J Y, Chen S, Zhu X Y. Distribution of eight rice blast resistance genes in *indica* hybrid rice in China. *Chinese Journal of Rice Science*, 2017, 31(3): 299-306
- [22] 山崎義人, 高坂淳尔. 稻瘟病与抗病育种. 凌忠专, 孙昌其, 译. 北京: 农业出版社, 1990: 200-211
Yamasaki Y, Kozaka T. Translated by Ling Z Z and Sun C Q. *Rice Blast and Breeding for Disease Resistance*. Beijing: Agriculture Press, 1990: 200-211
- [23] Koizumi S, Ashizawa T, Zenbayashi K S. Durable control of rice blast disease with multilines // Kawasaki S. *Rice Blast: Interaction with Rice and Control*. London: Kluwer Academic Publishers, 2004: 191-199
- [24] 何重, 陈涛, 张亚东, 朱镇, 赵庆勇, 周丽慧, 于新, 王才林. 江苏部分梗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 Z, 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 Journal of Agricultural Sciences*, 2014, 30(5): 921-927
- [25] 杨有新, 吴锦文, 陈志雄, 王兰, 郭海滨, 李金泉, 刘向东, 卢永根. 基于功能性标记和测序发掘带有 *S₅⁺* 基因的水稻新种质. 科学通报, 2009, 54(15): 2212-2218
Yang Y X, Wu J W, Chen Z X, Wang L, Guo H B, Li J Q, Liu X D, Lu Y G. Mining rice new germplasm containing *S₅⁺* gene by functional molecular marker and sequencing. *Chinese Science Bulletin*, 2009, 54(15): 2212-2218
- [26] 金铭路, 杨春刚, 余滕琼, 郭桂珍, 汤翠凤, 张俊国, 阿新祥, 曹桂兰, 徐福荣, 刘宪虎, 戴陆园, 张三元, 韩龙植. 中国水稻微核心种质不同生育时期耐冷性鉴定及其相关分析. 植物遗传资源学报, 2009, 10(4): 540-546