中国水稻科学(*Chin J Rice Sci*), 2017, 31(4): 441－446
http://www.ricesci.cn
DOI: 10.16819/j.1001-7216.2017.6131

超级早稻中早 39 稻瘟病抗性的系谱分析

梁燕[1] 季芝娟[1] 曾宇翔[1] 张翠真[2] 吴晗霖[1] 杨长登[1,*]
([1]中国水稻研究所/水稻生物学国家重点实验室，杭州 310006；[2]长江大学 生命科学学院， 湖北 荆州 434023；[*]通讯联系人，E-mail：yangchangdeng@126.com)

Genealogical Analysis on Resistance to *Magnaporthe oryzae* of Super Early Rice Zhongzao 39

LIANG Yan[1], JI Zhijuan[1], ZENG Yuxiang[1], ZHANG Cuizhen[2], WU Hanlin[1], YANG Changdeng[1,*]
([1]*State Key Laboratory of Rice Biology, China National Rice Research Institute, Hangzhou 310006, China;* [2]*College of Life Science, Yangtze University, Jingzhou 434023, China;* [*]*Corresponding author, E-mail: yangchangdeng@126.com*)

Abstract: 【Objective】 To clarify the genetic basis of the durable resistance to *Magnaporthe oryzae* of the super early rice Zhongzao 39,【Method】blast resistance assessment, molecular marker screening and gene sequencing were conducted.【Result】Zhongzao 39, Jinzao 47 and Zhongzu 3 showed positive bands to all the molecular markers for 7 resistant genes *Piz*, *Pi9*, *Pib*, *Pi36*, *Pi64*, *Pi-d2* and *Pi-d3*; The resistance performance of Zhongzao 39, were fully consistent with Jinzao 47 and Zhongzu 3 to the 5 isolates collected from Zhejiang and Jiangxi Province, China; Molecular sequencing results showed that all the test materials contain *Pi-d2* resistant alleles. 【Conclusion】These results showed that the genetic basis of durable resistance to *Magnaporthe oryzae* of Zhongzao 39 was contributed by Jinzao 47 and Zhongzu 3.
Key words: molecular marker; resistant gene; gene sequencing; genealogical analysis

摘 要：【目的】研究常规超级早籼稻品种中早 39 持久高抗稻瘟病的遗传基础，【方法】利用田间抗性鉴定、稻瘟病抗性基因分子标记检测和基因测序的方法，分析中早 39 稻瘟病持久抗性的遗传基础。【结果】中早 39、金早 47 和中组 3 号对 7 个稻瘟病抗性基因 *Piz*、*Pi9*、*Pib*、*Pi36*、*Pi64*、*Pi-d2* 和 *Pi-d3* 的分子标记均呈阳性条带；且中早 39 与金早 47、中组 3 号对 5 个稻瘟病生理小种的抗性表现完全相同。中早 39 与金早 47、中组 3 号无论是表型还是基因型都完全一致；序列分析结果表明中早 39 系谱中的供试材料均含有 *Pi-d2* 抗病等位基因。【结论】中早 39 的抗稻瘟病特性经中组 3 号，来源于金早 47。含有 *Pi-d2* 的地谷与中早 39、金早 47 和中组 3 号对 5 个稻瘟病生理小种的表型相同。
关键词：分子标记；抗性基因；基因测序；系谱分析
中图分类号：S435.111.4[+]1; S511.034 **文献标识码：**A **文章编号：**1001-7216(2017)04-0441-06

近年来，随着社会发展，农业种植结构的进一步调整，我国的粮食安全隐忧突出[1]。常规早籼稻因其耐储存、用途广泛、商品性好等特点，特别是作为工业用粮的作用大大增加，是我国粮食安全的重要支撑。2013 年中早 39 被农业部确定为超级稻品种，因其具有高产优质和持久抗稻瘟病的特点，连续 6 年(2011－2016)被农业部推荐为超级稻示范推广品种[2]，最近几年一直作为浙江省早稻区试的对照材料。2008－2009 年浙江省早稻区域试验中，中早 39 的稻瘟病抗性为抗或高抗。2013 年中早 39 连创两项浙江农业水稻高产纪录，成为浙江省早稻种植面积最大的品种[3]。中早 39 作为恢复系广泛应用于早稻育种中，由中早 39 配制的两系杂交籼稻组合株两优 39 也于 2014 年通过了国家审定。

前期研究中我们采用来自全国 12 个省市的 146 个菌株对中早 39 进行了稻瘟病抗谱测定，结果表明中早 39 对籼型小种的平均抗谱为 82.9%，对粳型小种的平均抗谱为 71.2%。中早 39 对不同省市的稻瘟病菌株的抗谱不一致，对浙江、贵州和广西的菌株抗谱分别为 92.9%、93.1%和 100%，说明中早 39 在这 3 个省份可以作为稻瘟病抗性育种的抗源使

收稿日期：2016-09-21; **修改稿收到日期：**2017-03-23。
基金项目：中央级公益性科研院所基本科研业务费资助项目(2014RG001-3)。

用[4, 5]。中早 39 是由中组 3 号和嘉育 253 杂交选育而成[6]，中组 3 号由金早 47 经无性系变异选育而成；早籼稻品种金早 47 是金华市农业科学研究所用中 87-425/陆青早 1 号作亲本选育而成[6](图 1)，田间表现高抗稻瘟病。追溯中早 39 的系谱并结合各品种的田间抗性表现，推测中早 39 对稻瘟病的抗性是经由中组 3 号来自金早 47，但是缺乏理论依据。

聚集抗病基因是抗性育种的主要方法。鉴定、定位和克隆广谱抗稻瘟病基因，对深入理解水稻广谱抗病的分子机制，培育广谱和持久抗病品种，持续有效控制稻瘟病具有重要意义[7]。前期研究结果表明，中早 39 广谱持久抗性的基础是含有抗性等位基因 *Piz*、*Pi9*、*Pib*、*Pi36*、*Pi64*、*Pi-d2* 和 *Pi-d3*。*Piz* 和 *Pi9* 是水稻叶瘟抗性位点 *Piz* 上的 5 个抗性等位基因中的两个，其中 *Pi9* 来自小粒野生稻，抗谱广；*Pib* 来自水稻品种 BL1，对日本大多数稻瘟病菌小种有抗性，对中国的菌株 ZB13 和 ZC15 也表现抗病反应。源自 Q61 的稻瘟病抗性基因 *Pi36*，对中国菌株 CHL39 有较强的叶瘟抗性，Pi36 的第 590 个氨基酸由丝氨酸取代天冬氨酸；*Pi64* 来源于粳稻羊毛谷，对籼稻小种表现广谱高抗；源自籼稻品种地谷的主效抗稻瘟病基因 *Pi-d2*，对我国稻瘟病生理小种 ZB15 表现较高的叶瘟抗性[6]。*Pi-d2* 是单拷贝基因，编码长度为 825 个氨基酸的跨膜受体蛋白激酶(RLK)，该激酶氨基端含有疏水性信号肽、β-lectin 结构域、PAN 域和 TM 域，羧基端是个典型的丝氨酸/苏氨酸激酶结构域(STK)。*Pi-d2* 因含有膜外 β-lectin 结构属于新的抗病基因类型，其抗感差异是抗病蛋白的第 441 氨基酸由异亮氨酸(I)突变为感病蛋白的甲硫氨酸(M)造成的[6,8]；同样源自籼稻地谷的主效抗稻瘟病基因 *Pi-d3*，对我国稻瘟病生理小种 Zhong-10-8-14 表现较高的抗性水平[6,9]。因此，我们利用这 7 个抗性基因，研究中早 39 的系谱。

本研究利用田间接种鉴定、分子标记鉴定、抗性基因测序、生物信息学分析等方法，明确中早 39 中的抗稻瘟病的基因及其来源。

1 材料与方法

1.1 实验材料

中早 39、嘉育 253、中组 3 号、金早 47、丽江新团黑谷、原丰早、CO39、地谷和稻瘟病鉴别品种(特特普、珍龙 13、四丰 43、东农 363、关东 51、合江 18 和丽江新团黑谷)，以及研究中用到的稻瘟病菌株均由中国水稻研究所水稻生物学国家重点实验室育种新技术课题组提供。浙辐 802、嘉育 293、湘早籼 1 号、青谷矮 3 号和陆青早 1 号为中国水稻研究所水稻种质资源库魏兴华研究员提供，系谱见图 1。其中丽江新团黑谷、原丰早和 CO39 作为稻瘟病鉴定的感病对照品种。

1.2 分子检测

参照 Warude 等[10]的方法提取水稻全基因组 DNA，1%琼脂糖胶电泳和超微量分光光度计(Thermo Scientific NanoDrop 2000c, 美国)检测其产量和质量。25 μL PCR 体系和反应条件参照 Liang 等[7]，每对引物的退火温度参照表 1。用 3%琼脂糖凝胶(含 GelRed)电泳分离后，于 BIORAD 凝胶成像

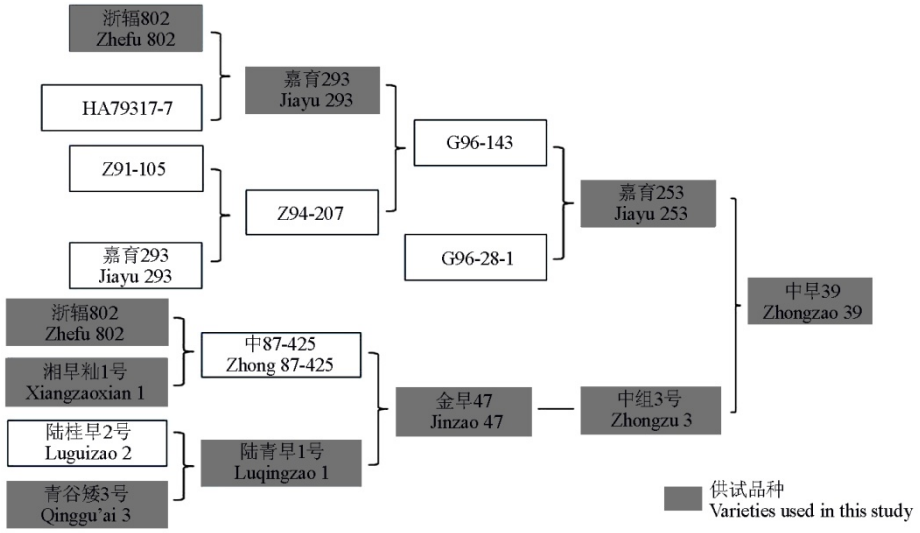

图 1 超级早稻中早 39 系谱

Fig. 1. The genealogy of super early rice Zhongzao 39.

仪下拍照。PCR 产物送铂尚生物技术(上海)有限公司测序，每个 PCR 独立扩增，重复测序至少 3 次。

DNA 序列经 BioEdit 软件人工校对和序列拼接。利用在线软件“GeneScan (http://genes.mit.187edu/genscan.html)和 Fegenesh (http://linux1. softberry. com/berry. phtml? 188 Topic = fgenesh&group = programs & subgroup = gfind)”进行编码区预测。利用在线软件 MultAli(http: //multalin.toulouse.inra.fr/multalin)进行序列比对[11]。

1.3 接种鉴定

抗病表型鉴定所用的稻瘟病菌株分别采自浙江省(14-754、10-105、12-157、16-754)和江西省(16-161)早籼稻主产区重发病区的稻瘟病病穗。在稻瘟病鉴别品种特特普、珍龙 13、四丰 43、东农 363、关东 51、合江 18 和丽江新团黑谷上鉴定上述 5 个稻瘟病生理小种的致病类型，除了来自江西省的 16-161 属于 ZG 类群外，其他 4 个菌株均属于 ZA 和 ZB 类群(表 2)。在中国水稻研究所实验基地进行分生孢子分离、培养和接种。分生孢子接种浓度为 2×10^5~5×10^5 个/mL，添加 0.2% 吐温-20，在水稻分蘖盛期注射接种。一周后调查发病情况，依据国家农业行业标准(水稻稻瘟病鉴定技术规范)记载病情，以发病最重的稻株作为该品种的抗性级别，每个重复中只要有 2 株以上感病即记为感(S)，低于 2 株记为抗(R)。

2 结果与分析

2.1 表型鉴定

中早 39 由中组 3 号和嘉育 253 杂交选育而来，而中组 3 号是金早 47 经无性系变异选育而成，田间表现具有与金早 47 一致的稻瘟病抗谱。供试材

表 1 稻瘟病抗性基因检测和序列分析所用到的引物

Table 1. Primer used for molecular marker screening and gene sequencing analysis.

名称 Name	引物序列 Primer sequence (5′-3′)	目的片段大小 Product/bp	目的基因 Target gene	退火温度 Annealing temperature /℃	参考文献 Reference
pid2-F	TTGGCTATCATAGGCGTCC	1057	*Pi-d2*	55	[13]
pid2-R	ATTTGAAGGCGTTTGCGTAGA				
pid3-F	GAATGAGTGGAATCGGCAAG	775	*Pi-d3*	55	[13]
pid3-R	AATCCTTCAGCAACCCAGAG				
pi36-F	CAATGTGTGACTTGTGCGGACT	1036	*Pi36*	55	[13]
pi36-R	TCTTCCATCTCGGATTTCGTGT				
Piz-F	GGACCCGCGTTTTCCACGTGTAA	292	*Piz*	60	[14]
Piz-R	AGGAATCTATTGCTAAGCATGAC				
Pib-F	ATGGAGGATACCGAGTTGACTG	1089	*Pib*	55	[13]
Pib-R	CCGTTGACTTTGAGATGGCGAT				
YRT6-F	TCCTGTGTTTCCTACCGAGTCCAGC	1016	*Pi64*	55	[15]
YRT6-R	AGAGGAGTGCAAGGTTACCAGAGCC				
P9-F	CGGTTATAGATGAATATAGTTC	803	*Pi9*	50	[16]
P9-R	GTTCGACTCTCCCTTCAAGC				
Pid2-2F*	TTGGGTCTAGACCAAACAGAGCTTCTAACAATC	2720	*Pi-d2*	55	[8]
Pid2-2R*	TTTGCGTCGACCTAGTTACAGATCACTGTGCCAT				

“*”用于基因测序的引物。

“*” indicates the primers for gene sequencing.

表 2 鉴别品种对供试稻瘟病菌株的抗性表现

Table 2. The resistance of the seven varieties to the tested *Magnaporthe oryzae* isolates.

菌株名称 Isolate name	抗性 Resistance							种群 Group
	特特普 Tetep	珍龙 13 Zhenlong 13	四丰 43 Sifeng 43	东农 363 Dongnong 363	关东 51 Guandong 51	合江 18 Hejiang 18	丽江新团黑谷 Lijiangxintuanheigu	
14-754	抗 R	感 S	抗 R	抗 R	抗 R	抗 R	感 S	ZB_{31}
10-105	感 S	抗 R	抗 R	感 S	感 S	感 S	感 S	ZA_{49}
12-157	抗 R	感 S	感 S	抗 R	抗 R	感 S	感 S	ZB_{13}
16-754	抗 R	感 S	抗 R	抗 R	抗 R	感 S	感 S	ZB_{29}
16-161	抗 R	抗 R	抗 R	抗 R	抗 R	抗 R	感 S	ZG_1

表 3 供试材料的稻瘟病田间抗性表现

Table 3. Blast resistance of the materials tested.

材料 Material	14-754	10-105	12-157	16-754	16-161
浙辐 802 Zhefu 802	抗 R	抗 R	感 S	感 S	抗 R
嘉育 293 Jiayu 293	抗 R	抗 R	感 S	感 S	抗 R
湘早籼 1 号 Xiangzaoxian 1	抗 R	抗 R	抗 R	抗 R	抗 R
青谷矮 3 号 Qinggu'ai 3	抗 R	抗 R	抗 R	抗 R	抗 R
陆青早 1 号 Luqingzao 1	抗 R	抗 R	抗 R	抗 R	抗 R
金早 47 Jinzao 47	感 S	抗 R	抗 R	抗 R	抗 R
中组 3 号 Zhongzu 3	感 S	抗 R	抗 R	抗 R	抗 R
嘉育 253 Jiayu 253	感 S	抗 R	抗 R	感 S	抗 R
中早 39 Zhongzao 39	感 S	抗 R	抗 R	抗 R	抗 R
地谷 Digu	感 S	抗 R	抗 R	抗 R	抗 R

料接种于 2016 年 8 月 3 日，一周后的田间接种鉴定结果显示(表 3)，稻瘟病生理小种 14-754 侵染金早 47、中组 3 号和中早 39，而其他 4 个小种 10-105、12-157、16-754 和 16-161 则不能侵染这 3 个品种。金早 47、中组 3 号和中早 39 对实验中的 5 个生理小种的抗谱一致。系谱分析结果表明，稻瘟病生理小种 14-754 对系谱上游的浙辐 802、嘉育 293、湘早籼 1 号、青谷矮 3 号和陆青早 1 号表现免疫，从金早 47 开始致病，在中组 3 号和中早 39 发病。作为中早 39 亲本之一的嘉育 253 除了对 14-754 表现感病外，对 16-754 也表现感病，说明中早 39 的抗稻瘟病特性源于中组 3 号和金早 47。地谷对这 5 个菌株的抗病反应与金早 47、中组 3 号和中早 39 完全一致(表 3)。

2.2 分子标记检测

如图 2 所示，稻瘟病抗性基因 *Pi9* 的分子标记在浙辐 802、青谷矮 3 号、陆青早 1 号、金早 47、中组 3 号和中早 39 中检测到阳性条带，而在其他三个供试材料中没有检测到目的条带。*Pi-d2*、*Pi-d3*、*Piz* 和 *Pib* 四个抗性基因的特异性分子标记在 9 个供试材料中都检测到阳性条带。*Pi36* 在嘉育 293 和嘉育 253 中未检测到阳性条带。*Pi64* 在嘉育 293 和陆青早 1 号中未检测到阳性条带。值得注意的是，金早 47、中组 3 号和中早 39 的基因型完全一致，本

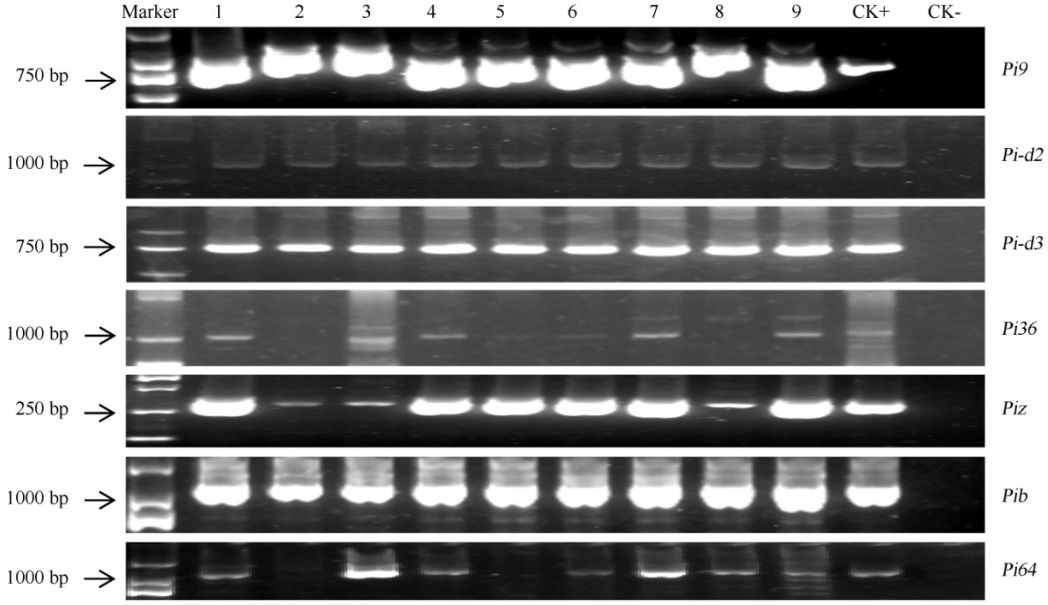

图 2 稻瘟病抗性基因分子标记检测

Fig. 2. Molecular detection of the blast resistant genes.

Marker－DL2000。1~9 分别代表浙辐 802、嘉育 293、湘早籼 1 号、青谷矮 3 号、陆早青 1 号、金早 47、中组 3 号、嘉育 253 和中早 39。CK+自上而下分别为 *Pi9*-IRBL9-W、*Pi-d2*-地谷、*Pi-d3*-地谷、*Pi36*-Kasalath、*Piz*-IRBLz-Fu、*Pib*-IRBLb-B 和 *Pi64*-羊毛谷。CK-均为 H_2O。

Marker, DL2000. 1, Zhefu 802; 2, Jiayu 293; 3, Xiangzaoxian 1; 4, Qinggu'ai 3; 5, Luqingzao 1; 6, Jinzao 47; 7, Zhongzu 3; 8, Jiayu 253; 9, Zhongzao 39. From top to bottom, CK+ represent *Pi9*-IRBL9-W, *Pi-d2*-Digu, *Pi-d3*-Digu, *Pi36*-Kasalath, *Piz*-IRBLz-Fu, *Pib*-IRBLb-B and *Pi64*-Yangmaogu, respectively. CK-, H_2O.

图 3　氨基酸序列比对分析

Fig. 3.　Alignment analysis of amino acid sequences.

研究的抗性基因分子标记均能检测到阳性条带。

2.3　抗性基因 *Pi-d2* 序列分析

中早 39 和春江糯遗传群体定位结果表明，中早 39 在 *Pi-d2* 所在的分子标记区间含有一个主效抗稻瘟病基因[5]。结合本研究的表型鉴定结果，中早 39 对 5 个稻瘟病生理小种的抗性表现与地谷一致，将 *Pi-d2* 的序列作为研究重点。将供试材料中 *Pi-d2* 等位基因的序列与其参考序列(*Pi-d2*：FJ915121)比较[8]，供试材料中共检测到 5 个多态性位点，氨基酸多态性频率为 0.00062；检测到 3 个单倍型，单倍型多态性频率为 0.556。将 DNA 序列转换为氨基酸系列，与参考氨基酸序列(PID2：ACR15163.1)相比，供试材料中共检测到两个非同义突变 D95N 和 H686R。其中，D95N 由天冬氨酸突变为天冬酰胺，仅在金早 47 中检测到；而 H686R 出现在所有的供试材料中，由组氨酸突变为精氨酸。

3　讨论

在水稻抗病育种实践中，明确抗病亲本中抗性基因型可以更有效地应用于育种实践[12-14]。对中早 39 的抗稻瘟病的遗传背景研究，有助于从分子水平了解抗性基因在中早 39 中的来源与分布情况，为水稻稻瘟病抗性育种提供理论支持。

分子标记检测结果表明中早 39 中含有本研究中用到的所有抗性基因位点 *Piz*、*Pi9*、*Pib*、*Pi36*、*Pi64*、*Pi-d2* 和 *Pi-d3*，从一个方面解释了中早 39 具有持久和广谱的稻瘟病抗性的原因。金早 47 和中组 3 号具有与中早 39 完全一致的基因型。田间接种鉴定的结果表明金早 47、中组 3 号和中早 39 具有相同的抗谱。田间接种鉴定结果含有 *Pi-d2* 和 *Pi-d3* 的地谷具有与中组 3 号、金早 47 和中早 39 完全一致的抗谱，对稻瘟病生理小种 14-754 表现感病，对其他 4 个生理小种表现抗病，说明 14-754 可以侵染携 *Pi-d2* 和 *Pi-d3* 抗性基因的水稻品种。

前期的研究我们在中早 39 中 *Pi-d2* 所在的分子标记区间检测到一个主效抗性基因位点 *Pi-zc* (t) [5]，*Pi-d2* 定位于水稻第 6 染色体上近着丝粒区域，与 RM527 和 RM3 连锁，遗传距离分别为 3.2 cM 和 3.4 cM[15]。序列分析表明，中早 39 中的 *Pi-d2* 等位基因与参考序列相比具有一个非同义突变 H686R，且这个突变普遍存在于所有的供试材料中。Li 等[16]在 35 个亚洲栽培稻和 6 个野生稻中检测到三个非同义突变 S321L、I441M 和 H686R，其中 H686R 在所有的供试材料中均被检测到，说明非同义突变 H686R 是普遍存在的。本研究中，所有的供试材料在第 441 个氨基酸均为异亮氨酸(I)，所以均为抗病 *Pi-d2* 等位基因。稻瘟病菌 14-754 使供试材料包括中早 39、中组 3 号、金早 47 和地谷的抗病 *Pi-d2*

等位基因失去抗性，而浙辐 802、嘉育 293、湘早籼 1 号、青谷矮 3 号、陆青早 1 号中可能存在其他的抗性基因，对 14-754 表现抗病。后续实验可利用稻瘟病生理小种 14-754，将这 5 个材料中对 14-754 的抗性基因导入到中早 39 中，以提高其抗谱。

本研究从田间稻瘟病接种鉴定、稻瘟病抗性基因分子标记检测和抗性基因测序分析 3 个方面证明，中早 39 的稻瘟病抗病特性经中组 3 号，来源于金早 47。通过分析稻瘟病抗性基因 *Pi-d2* 的序列，确定中早 39 系谱中的供试材料均含有 *Pi-d2* 等位基因。

参考文献：

[1] 周博. 基于农业可持续发展的我国粮食安全影响因素研究. 沈阳: 沈阳农业大学, 2015.
Zhou B. Distribution of resistance genes in rice and avirulence genes in rice blast fungus and molecule detection of *Magnaporthe oryzae*. Shenyang: Shenyang Agricultural University, 2015. (in Chinese with English abstract)

[2] 寿建尧, 杨长登, 戚航英, 吴森贤. 中早39攻关田单产超 700 kg/667 m^2 栽培技术. 中国稻米, 2015(6): 51-52.
Shou J R, Yang C D, Ji H Y, Wu S X. Cultivation techniques and application of Zhongzao 39 with yield exceed 700 kg/667 m^2. *China Rice*, 2015(6): 51-52. (in Chinese)

[3] 吴敏芳, 吴河元, 张伟, 孙方良. 早稻中早39的特征特性及栽培要点. 浙江农业科学, 2015, 56(5): 648-649.
Wu M F, Wu H Y, Zhang W, Sun F L. The characteristics and cultivation of the early Zhongzao 39. *J Zhejiang Agric Sci*, 2015, 56(5): 648-649. (in Chinese)

[4] 夏令治, 季芝娟, 曾宇翔, 梁燕, 杨长登. 超级稻品种中早 39 的稻瘟病抗谱测定. 中国稻米, 2015 (3): 69-72.
Xia L Z, Ji Z J, Zeng Y X, Liang Y, Yang C D. Analysis of blast resistance spectrum in super rice variety Zhongzao 39. *China Rice*, 2015(3): 69-72. (in Chinese)

[5] 夏令治. 超级早稻中早 39 的抗稻瘟病遗传机理研究. 北京: 中国农业科学院, 2015.
Xia L Z. The Genetic mechanism research of resistance to *Magnaporthe oryzae* in the super early rice Zhongzao 39[D]. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2015. (in Chinese with English abstract)

[6] 中国水稻品种及其系谱数据库.[2015-03-01] http://www.ricedata.cn/variety/ index.htm
China Rice Varieties and Their Pedigree Database. [2015-03-01]. http://www.ricedata.cn/variety/index. htm

[7] Liang Y, Yan B Y, Peng Y L, Ji Z J, Zeng Y X, Wu H L, Yang C D. Molecular screening for identification of resistant genes in a germplasm (*Oryza sativa* L.) collection resistant to *Magnaporthe oryzae*. *Rice Sci*, 2017, 24(1): 41-47.

[8] Chen X W, Shang J J, Chen D X, Lei C L, Zou Y, Zhai W X, Liu G Z, Xu J C, Ling Z Z, Cao G, Ma B T, Wang Y P, Zhao X F, Li S G, Zhu L H. A B-lectin receptor kinase gene conferring rice blast resistance. *Plant J*, 2006, 46: 794-804.

[9] Shang J J, Tao Y, Chen X W, Zou Y, Lei C L, Wang J, Li X B, Zhao X F, Zhang M J, Lu Z K, Xu J C, Cheng Z K, Wan J M, Zhu L H. Identification of a new rice blast resistance gene, *Pid3*, by genome wide comparison of paired nucleotide-binding site-leucine-rich repeat genes and their pseudogene alleles between the two sequenced rice genomes. *Genetics*, 2009, 182: 1303-1311.

[10] Warude D, Chavan P, Joshi K, Patwardhan B. DNA isolation from fresh and dry plant samples with highly acidic tissue extracts. *Plant Mol Biol Rep*, 2003, 21: 467a-467f.

[11] Corpet F. Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. *Nucl Acids Res*, 1988, 16 (22): 10881-10890.

[12] 林世成, 闵绍楷. 中国水稻品种及其系谱. 上海: 上海科学技术出版社, 1991: 47.
Lin S C, Min S K. Chinese rice varieties and their pedigree. Shanghai: Shanghai Science and Technology Press, 1991: 47. (in Chinese)

[13] 万建民. 中国水稻遗传育种与品种系谱(1986-2005). 北京: 中国农业出版社, 2010.
Wan J M. Chinese Rice Genetic Breeding and Pedigree (1986-2005). Beijing: China Agriculture Press, 2010.

[14] Shi J, Li D Q, Li Y, Li X Y, Guo X Y, Luo Y W, Lu Y G, Zhang Q, Xu Y J, Fan J, Huang F, Wang W M. Identification of rice blast resistance genes in the elite hybrid rice restorer line Yahui 2115. *Genome*, 2015, 58: 91-97.

[15] Chen X W, Li S G, Xu J C, Zhai W X, Ling Z Z, Ma B T, Wang Y P, Wang W M, Cao G, Ma Y Q, Shang J J, Zhao X F, Zhou K D, Zhu L H. Identification of two blast resistance genes in a rice variety, Digu. *J Phytopathol*, 2004, 152(2): 77-85.

[16] Li J B, Sun Y D, Liu H, Wang Y Y, Jia Y L, Xu M H. Natural variation of rice blast resistance gene *Pi-d2*. *Genet Mol Res*, 2015, 14 (1): 1235-1249.