

Pigm 特异性选择标记的开发及其在粳稻穗颈瘟抗性育种中的利用

曾生元 李闯 杜灿灿 孙立亭 景德道 林添资 余波 钱华飞 姚维成 周义文
龚红兵*

(江苏丘陵地区镇江农业科学研究所, 江苏 句容 212400; *通讯联系人, E-mail: 1179809265@qq.com)

Development of Specific Markers for *Pigm* in Marker-Assisted Breeding of Panicle Blast Resistant *japonica* Rice

ZENG Shengyuan, LI Chuang, DU Cancan, SUN Liting, JING Dedao, LIN Tianzi, YU Bo, QIAN Huafei, YAO Weicheng, ZHOU Yiwen, GONG Hongbing*

(Zhenjiang Institute of Agricultural Sciences of the Ning-Zhen Hilly District, Jurong 212400, China; *Corresponding author, E-mail: 1179809265@qq.com)

Abstract: 【Objective】 *Pigm* is a broad-spectrum resistance gene to rice blast, which is isolated from Gumei 4, a variety with durable resistance. *Pigm* is allelic to *Piz*, *Piz-t*, *Pi2*, *Pi9*, *Pi40* and so on, but shows different resistance spectrum. To breed resistance variety carrying *Pigm* with molecular marker-assisted selection, discovering *Pigm*-tightly-linked markers is important. 【Method】 We identified a unique DNA sequence of Gumei 4 by genomic sequencing, and developed a set of specific markers tagged to *Pigm* base on the sequence divergence. Then, by means of molecular-assisted selection and background gene screening, *Pigm* was pyramided to three representative *japonica* varieties belonging to different ecotypes from Yangtze-Huai River Area. 【Result】 An InDel marker *Pigm-4* which is closely linked to the functional unit of *Pigm* was developed. *Pigm-4* showed distinct specificity by genotype screening of various rice varieties, and can distinguish the genotype of *Pigm* from its alleles *Piz*, *Piz-t*, *Pi2*, *Pi9* and *Pi40*. Although receptors carry with resistant genes such as *Pib+Pi54* (Wuyun 2674), *Pib+Pita* (Wuyunjing 27), *Pib+Pi54+Pb1* (Zhendao 18), respectively, but none of them can defense high virulence blast pathogen. Relevant introgression lines were established and inoculations of introgression lines indicate that *Pigm* can promote resistance level to rice panicle blast significantly in different *japonica* backgrounds. 【Conclusion】 *Pigm* can be used as a beneficial gene source in the breeding of blast resistant *japonica* rice, and *Pigm-4* is an excellent marker for the molecular marker-assisted selection of *Pigm*.

Key words: *Pigm*; specific-marker; *japonica* rice; panicle blast; resistance

摘要: 【目的】 *Pigm* 是一个广谱的稻瘟病抗性基因, 源自持久抗性品种谷梅 4 号, 与 *Piz*、*Piz-t*、*Pi2*、*Pi9* 和 *Pi40* 等互为复等位基因但抗谱存在差异。为了更好地在分子辅助选择育种中利用 *Pigm* 基因, 开发与 *Pigm* 特异性标记具有重要意义。【方法】在已有文献报道定位结果的基础上, 通过随机测序获得了一段谷梅 4 号基因组的特异序列, 并据此开发了一组用于筛选 *Pigm* 基因的分子标记, 进一步选取江淮稻区 3 个不同生态型代表性粳稻品种作为受体, 利用分子标记辅助选择结合对抗性基因的背景检测将 *Pigm* 基因导入受体品种。【结果】*Pigm-4* 标记位于 *Pigm* 基因簇内部, 与抗病功能元件 *PigmR* 紧密连锁, 对不同类型的品种检测发现该标记特异性强, 且利用该标记可将 *Pigm* 与 *Piz*、*Piz-t*、*Pi2*、*Pi9* 以及 *Pi40* 区分开来。对受体亲本稻瘟病抗性基因的检测和接种结果分析发现江淮稻区粳稻品种虽然携带了 *Pib*、*Pi54*、*Pita*、*Pb1* 中的 2~3 个基因, 但是对强毒力的稻瘟病小种抗性普遍不强, 而 3 种代表性粳稻背景下导入 *Pigm* 基因均可显著提高其对穗颈瘟的抗性水平。【结论】*Pigm* 可以作为抗稻瘟病粳稻育种的有利基因资源加以利用, 而 *Pigm-4* 是分子标记辅助筛选 *Pigm* 的优异标记。

关键词: *Pigm*; 特异分子标记; 粳稻; 穗颈瘟; 抗性

中图分类号: Q755; S511.034; S435.111.4⁺1 文献标志码: A

文章编号: 1001-7216(2018)05-0453-09

水稻的全生育期均有可能受稻瘟病为害, 但是穗(颈)瘟直接导致水稻减产且无法补救, 对水稻的

为害更为严重^[1-2]。大多广谱稻瘟病抗性资源来自籼稻或者野生稻, 而粳稻中普遍缺乏抗稻瘟病优异种

收稿日期: 2017-11-09; 修改稿收到日期: 2018-01-30。

基金项目: 国家重点研发计划资助项目(2017YFD0100400); 镇江市科技支撑计划资助项目(NY2015018); 江苏省重点研发计划资助项目(BE2015363); 江苏省农业科技自主创新资金资助项目[CX(16)1029]。

质(国家水稻数据中心, http://www.ricedata.cn/gene/gene_pi.htm)。气候条件适宜时, 粳稻极易暴发稻瘟病。例如, 2014年和2015年江淮稻区的大多数粳稻品种均受不同程度穗颈瘟为害^[3]。

培育抗病品种是防治稻瘟病最经济有效的手段。传统的水稻稻瘟病抗性育种是通过抗性鉴定(一般采用接种或发病区鉴定等方式)对植株进行表型选择, 工作量大, 耗费时间长, 且易受环境条件的限制, 鉴定结果的误差较大, 选择效率较低。通过分子标记辅助选择抗病基因则可有效减少上述不利因素, 是培育抗病品种的有效途径之一^[4]。但是, 由于稻瘟病菌具有高度多样性、变异性的特点, 一些抗谱窄的抗性基因则易在较短时间内丧失抗性。因此, 聚合抗谱广、抗性持久的抗病基因选育抗病品种, 是抗稻瘟病育种的关键策略^[5]。

*Pigm*是从持久抗稻瘟病品种谷梅4号中鉴定到的一个广谱抗稻瘟病基因(簇), 与*Pi2*、*Pi9*、*Piz-t*、*Pi26*、*Pi40*和*Pi50*等基因位于同一基因家族或互为复等位基因, 但不同基因间的抗谱差异明显^[6-11]。江苏、安徽、湖北、广东、海南等不同地区稻瘟病代表性小种接种鉴定结果表明, *Pigm*基因对以上稻瘟病生理小种的抗性频率最高可达91.9%, 抗谱在75%左右, *Pigm*的抗谱较*Pi2*、*Pi9*、*Piz-t*更广, 且粳稻中几乎不存在*Pigm*基因^[12-13]。由于*Pigm*与*Piz-t*等基因(*Piz-t*在粳稻中有一定比例的分布)位于同一基因簇, 要实现*Pigm*的利用就需要将*Pigm*与*Piz-t*等其他不同复等位基因区分开来, 从而将*Pigm*特异地导入至受体品种之中。目前用于检测*Pigm*基因的常用标记包括功能标记M26205、M80362以及InDel标记S29742等^[10, 14-17]。但是, M26205是显性标记, 不能区分纯合与杂合。

本研究通过短序列测定, 获得了谷梅4号基因组的一段特异序列, 并据此成功开发了谷梅4号基因组特异的分子标记, 进一步通过对背景抗性基因的筛选、分子标记辅助选择结合田间选育, 将*Pigm*导入携带不同抗稻瘟病基因的不同类型粳稻品种之中, 探讨了*Pigm*在培育抗稻穗颈瘟粳稻新品系中的利用价值。

1 材料与方法

1.1 水稻材料

本研究所用的水稻材料包括*Pi9*、*Pi2*、*Piz*、*Piz-t*、*Pi40*及*Pigm*的供体品种75-1-127、C101A51、Toride 1、Fukunishiki、IR65482及谷梅4号; 受体品种武运

2674(迟熟中粳稻)、武运粳27(中熟中粳稻)、镇稻18(早熟晚粳稻)和粳、粳、粳中间型及其他类型代表性品种271份。其中, *Pi9*、*Pi2*、*Piz*、*Piz-t*、*Pi40*的供体品种由江苏省里下河地区扬州农业科学研究所提供, 谷梅4号引自中国水稻研究所; 用于特异性检测的271份品种材料由扬州大学严长杰教授课题组提供。

1.2 引物设计与序列测定

根据Deng等^[6]的定位结果, 在<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>网站上获取水稻品种日本晴第6染色体10 360 000—10 440 000 bp序列, 利用软件Primer 5.0软件, 设计10对预计产物在500~1200 bp的扩增标记(表2), 这些标记均匀分布, 间隔10 kb左右。分别以谷梅4号和日本晴、9311为模板扩增, 产物测序, 再根据序列比对结果开发特异性分子标记。

1.3 DNA提取、PCR扩增及电泳分析

用设计开发的*Pigm*-4标记对271份水稻代表性品种进行多态性检测, 采用SDS法提取水稻叶片的DNA。

参照龚红兵等^[18]的方法进行PCR, 反应总体积为10 μ L, 包括DNA 1.5 μ L, 2 mmol/L上下游引物各0.5 μ L, 10 \times Taq缓冲液(GENERAY) 1.2 μ L, 12 mmol/L dNTP 0.3 μ L, 1000 U Taq DNA聚合酶(GENERAY) 0.1 μ L, 加ddH₂O补足至10 μ L。PCR扩增条件为94 $^{\circ}$ C下预变性5 min; 94 $^{\circ}$ C下变性30 s, 55 $^{\circ}$ C~60 $^{\circ}$ C退火30 s(温度因引物不同而异), 72 $^{\circ}$ C下延伸30 s左右(根据预期产物长度, 按1 kb/min调整延伸时间), 扩增32个循环; 72 $^{\circ}$ C下延伸5 min, 4 $^{\circ}$ C下保温。产物经8%垂直平板聚丙烯酰胺凝胶电泳, 0.1%硝酸银染色后观测。

1.4 水稻穗颈瘟抗性鉴定与评价

水稻穗颈瘟抗性鉴定试验于镇江市农业科学研究所行香基地进行。5月20日播种, 于6月20日移栽, 单本栽插, 每区5行, 每行12株, 株行距13.3 cm \times 25.0 cm。2次重复, 常规水肥管理。

于水稻孕穗期, 选用分别来自广东省、湖北省、海南省、浙江省和江苏省的致病频率较高的5个代表性菌株GD18-3(B1, 致病频率65.6%)、ES9-5-1(B15, 致病频率75.0%)和HN1.1(C1, 致病频率59.4%)、ZJ13-4(A15, 致病频率63.3%)和XH8.4.4(G1, 致病频率37.5%)接种。这5个菌株均引自扬州市农业科学研究所。扩大培养后等比例混合这5个菌株的孢子液。分别选择每个株系的第2行, 用注射器将接种液缓缓注入稻苞内, 每穗注射1 mL, 每重复接种10穗, 并对接种的稻穗作好标

表1 代表性品种在Pigm-4座位的带型

Table 1. Typical varieties and their genotype in Pigm-4 locus.

| 品种 Variety | S | T | 品种 Variety | S | T | 品种 Variety | S | T | 品种 Variety | S | T |
|----------------------|----------|---|------------------------|----------|---|--------------------------|----------|---|-------------------------|----------|---|
| 谷梅 4 号 Gumei 4 | <i>i</i> | 1 | TGMS 29 | <i>i</i> | 3 | II-32B | <i>i</i> | 2 | 徐稻 8 号 Xudao 8 | <i>j</i> | 3 |
| 9311 | <i>i</i> | 2 | Swarna | <i>i</i> | 2 | 中 9B Zhong 9B | <i>i</i> | 2 | 华粳 3 号 Huajing 3 | <i>j</i> | 3 |
| 培矮 64 Peiai 64 | <i>i</i> | 2 | Phalguna | <i>i</i> | 2 | 闽标 1B Minbiao 1B | <i>i</i> | 2 | 华粳 5 号 Huajing 5 | <i>j</i> | 3 |
| 南京 16 Nanjing 16 | <i>i</i> | 2 | Ajaya | <i>i</i> | 2 | 镇轴 1B Zhenxian 1B | <i>i</i> | 2 | 淮稻 5 号 Huaidao 5 | <i>j</i> | 3 |
| 南京 11 Nanjing 11 | <i>i</i> | 2 | Budda | <i>i</i> | 3 | 镇轴 2B Zhenxian 2B | <i>i</i> | 2 | 淮稻 9 号 Huaidao 9 | <i>j</i> | 3 |
| 桂朝 2 号 Guichao 2 | <i>i</i> | 2 | Palung 2 | <i>i</i> | 2 | 镇轴 3B Zhenxian 3B | <i>i</i> | 2 | 盐稻 6 号 Yandao 6 | <i>j</i> | 3 |
| 巨丰占 Jufengzhan | <i>i</i> | 3 | RUSTYLATE | <i>i</i> | 2 | 内香 2B Neixiang 2B | <i>i</i> | 2 | 盐稻 11 Yandao 11 | <i>j</i> | 3 |
| IR8 | <i>i</i> | 3 | TeR Si Chut | <i>i</i> | 2 | 内香 5B Neixiang 5B | <i>i</i> | 2 | 盐粳 9 号 Yanjing 9 | <i>j</i> | 3 |
| IR30 | <i>i</i> | 3 | 广陆矮 4 号 Guangluai 4 | <i>i</i> | 2 | 广占 63S Guangzhan 63S | <i>i</i> | 2 | 扬育粳 2 号 Yangyujing 2 | <i>j</i> | 3 |
| IR52 | <i>i</i> | 3 | LA 110 | <i>i</i> | 2 | Y58S | <i>i</i> | 2 | 扬粳 4038 Yangjing 4038 | <i>j</i> | 3 |
| IR64 | <i>i</i> | 2 | 云恢 72 Yunhui 72 | <i>i</i> | 2 | 培矮 64S Peiai 64S | <i>i</i> | 2 | 宁粳 1 号 Ningjing 1 | <i>j</i> | 3 |
| IR72 | <i>i</i> | 2 | IR65600-27-1-2-2 | <i>i</i> | 2 | 日本晴 Nipponbare | <i>j</i> | 3 | 宁粳 3 号 Ningjing 3 | <i>j</i> | 3 |
| 茉莉香占 Molixiangzhan | <i>i</i> | 2 | 爷驼虱 Yetuozai | <i>i</i> | 2 | 轮回 422 Lunhui 422 | <i>j</i> | 2 | 宁粳 5 号 Ningjing 5 | <i>j</i> | 3 |
| 马尾粘 Maweizhan | <i>i</i> | 2 | 广 122 Guang 122 | <i>i</i> | 2 | Balilla | <i>j</i> | 3 | 南粳 46 Nanjing 46 | <i>j</i> | 3 |
| 扬辐轴 2 号 Yangfuxian 2 | <i>i</i> | 2 | 台中轴 10 Taizhongxian 10 | <i>i</i> | 2 | 隔湖香糯 Gehuxiangnuo | <i>j</i> | 3 | 南粳 5055 Nanjing 5055 | <i>j</i> | 3 |
| 武香粳 Wuxiangxian | <i>i</i> | 2 | 鱼鳊谷 Yujiugu | <i>i</i> | 2 | Lemont | <i>j</i> | 3 | 南粳 9108 Nanjing 9108 | <i>j</i> | 3 |
| 协青早 Xieqingzao | <i>i</i> | 3 | IR71466-75-3-B-1 | <i>i</i> | 2 | 农垦 57 Nongken 57 | <i>j</i> | 3 | 苏沪香粳 Suhuxiangjing | <i>j</i> | 3 |
| 七丝软占 Qisirananzhan | <i>i</i> | 2 | Caozhao-2 | <i>i</i> | 2 | 越光 Koshihikari | <i>j</i> | 3 | 通粳 981 Tongjing 981 | <i>j</i> | 3 |
| 扬稻 4 号 Yangdao 4 | <i>i</i> | 2 | IRBB60 | <i>i</i> | 2 | 桂花黄 Guihuahuang | <i>j</i> | 3 | 武粳 15 Wujing 15 | <i>j</i> | 3 |
| 3037 | <i>i</i> | 2 | IR24 | <i>i</i> | 2 | 02428 | <i>j</i> | 3 | 武育粳 3 号 Wuyujing 3 | <i>j</i> | 3 |
| 超丰占 Chaofengzhan | <i>i</i> | 2 | GaJale | <i>i</i> | 2 | 江洲香糯 Jiangzhouxiangnuo | <i>j</i> | 3 | 武运粳 7 号 Wuyunjing 7 | <i>j</i> | 3 |
| 中香 1 号 Zhongxiang 1 | <i>i</i> | 2 | ZALE | <i>i</i> | 2 | 扬辐粳 4901 Yangfujing 4901 | <i>j</i> | 3 | 武运粳 19 Wuyunjing 19 | <i>j</i> | 3 |
| 9308 | <i>i</i> | 2 | 珍汕 97 Zhenshan 97 | <i>i</i> | 2 | 小钱优 Xiaoqianyou | <i>j</i> | 3 | 武运粳 21 Wuyunjing 21 | <i>j</i> | 3 |
| 龙特甫 Longtefu | <i>i</i> | 2 | IRBB7 | <i>i</i> | 2 | 豫粳 6 号 Yujing 6 | <i>j</i> | 3 | 武运粳 23 Wuyunjing 23 | <i>j</i> | 3 |
| 南特号 Nantehao | <i>i</i> | 2 | 毫安农 Haoannong | <i>i</i> | 3 | Woaiga | <i>j</i> | 3 | 武运粳 27 Wuyunjing 27 | <i>j</i> | 3 |
| 盐恢 559 Yanhui 559 | <i>i</i> | 2 | Basmati 370 | <i>i</i> | 2 | 香粳 49 Xiangjing 49 | <i>j</i> | 3 | 武运粳 29 Wuyunjing 29 | <i>j</i> | 3 |
| 密阳 46 Milyang 46 | <i>i</i> | 2 | TKM 6 | <i>i</i> | 2 | 笠锦 Saisanishiki | <i>j</i> | 3 | 常农粳 3 号 Changnongjing 3 | <i>j</i> | 3 |
| 特青 Teqing | <i>i</i> | 2 | ChiPda | <i>i</i> | 3 | 珍珠矮 Zhenzhuai | <i>j</i> | 2 | 常农粳 7 号 Changnongjing 7 | <i>j</i> | 3 |
| E32 | <i>i</i> | 2 | Calcag | <i>i</i> | 3 | 苏御糯 Suyunuo | <i>j</i> | 3 | 武陵粳 1 号 Wulingjing 1 | <i>j</i> | 3 |
| 奇妙香 Qimiaoixiang | <i>i</i> | 2 | Padi siam kuning | <i>i</i> | 2 | 靖稻 7 号 Jingdao 7 | <i>j</i> | 3 | 镇稻 88 Zhendao 88 | <i>j</i> | 3 |
| 粤香占 Yueixiangzhan | <i>i</i> | 2 | Y134 | <i>i</i> | 2 | 黄金晴 Huangjingqing | <i>j</i> | 3 | 镇稻 99 Zhendao 99 | <i>j</i> | 3 |
| Newrex | <i>i</i> | 2 | Hta 7204 | <i>i</i> | 2 | 辽粳 294 Liaojing 294 | <i>j</i> | 3 | 镇稻 11 Zhendao 11 | <i>j</i> | 3 |
| Cpslo 17 | <i>i</i> | 3 | Co 43 | <i>i</i> | 2 | 沈农 1033 Shennong 1033 | <i>j</i> | 3 | 镇稻 14 Zhendao 14 | <i>j</i> | 3 |
| Habataki | <i>i</i> | 2 | Seberang | <i>i</i> | 2 | 台北 167 Taipei 167 | <i>j</i> | 3 | 镇稻 18 Zhendao 18 | <i>j</i> | 3 |
| 滇屯 502 Diantun 502 | <i>i</i> | 2 | Sri Roja | <i>i</i> | 2 | 水晶 3 号 Shuijing 3 | <i>j</i> | 3 | 镇稻 19 Zhennuo 19 | <i>j</i> | 3 |
| 巴西早稻 Baxihandao | <i>i</i> | 2 | Chorofa | <i>i</i> | 2 | 早丰 9 号 Zaofeng 9 | <i>j</i> | 3 | 盐粳 11 Yanjing11 | <i>j</i> | 3 |
| 台中本地 1 号 TN1 | <i>i</i> | 2 | Cisadane | <i>i</i> | 3 | 农育 1898 Nongyu 1898 | <i>j</i> | 3 | 镇稻 15 Zhendao 15 | <i>j</i> | 3 |
| 丽小糯 Lixiaomuo | <i>i</i> | 2 | IRGC 40275 | <i>i</i> | 3 | IT111 | <i>j</i> | 3 | 镇稻 17 Zhendao 17 | <i>j</i> | 3 |
| 轴糯 201 Xianmuo 201 | <i>i</i> | 2 | IRGC 23364 | <i>i</i> | 1 | 宁粳 1 号 Ningjing 1 | <i>j</i> | 3 | 镇稻 16 Zhendao 16 | <i>j</i> | 3 |
| 寸谷糯 Cungunuo | <i>i</i> | 2 | IRGC 5075 | <i>i</i> | 2 | 863B | <i>j</i> | 3 | 镇糯 817 Zhennuo 817 | <i>j</i> | 3 |
| 丰矮占 Fengaizhan | <i>i</i> | 2 | IRGC 43675 | <i>i</i> | 2 | 昆农 8 号 Kunong 8 | <i>j</i> | 3 | 镇稻 21 Zhendao 21 | <i>j</i> | 3 |
| BG 90-2 | <i>i</i> | 2 | 蜀恢 527 Shuhui 527 | <i>i</i> | 2 | 寒丰 Hanfeng | <i>j</i> | 3 | 圣稻 18 Shengdao 18 | <i>j</i> | 3 |
| TKM9 | <i>i</i> | 2 | 安选 6 号 Anxuan 6 | <i>i</i> | 2 | 秀水 11 Xiushui 11 | <i>j</i> | 3 | 豫粳 6 号 Yujing 6 | <i>j</i> | 3 |
| Cisanggarung | <i>i</i> | 2 | 中恢 8006 Zhonghui 8006 | <i>i</i> | 2 | 盐粳 2 号 Yanjing 2 | <i>j</i> | 3 | 9469 | <i>j</i> | 3 |
| Khazar | <i>i</i> | 2 | R9308 | <i>i</i> | 2 | 圣稻 13 Shengdao 13 | <i>j</i> | 3 | C418 | I | 3 |
| Hnankar | <i>i</i> | 2 | 盐恢 559 Yanhui 559 | <i>i</i> | 2 | 春江 06 Chunjiang 06 | <i>j</i> | 3 | Amo3(Sana) | I | 2 |
| Maoathukha | <i>i</i> | 2 | 明恢 63 Minghui 63 | <i>i</i> | 2 | 辽粳 5 号 Liaojing 5 | <i>j</i> | 3 | MR185 | I | 2 |
| Bs BRC 28 | <i>i</i> | 2 | R6547 | <i>i</i> | 2 | 鄂宜 105 Eyi 105 | <i>j</i> | 3 | Shwe Thwe Yin Hvyv | I | 2 |
| PS BRC 66 | <i>i</i> | 2 | 明恢 86 Minghui 86 | <i>i</i> | 2 | Kairyo Mochi | <i>j</i> | 3 | Bg 300 | I | 2 |
| 八宝米 Babaomi | <i>i</i> | 2 | 绵恢 577 Mianhui 577 | <i>i</i> | 2 | 密阳 23 Milyang 23 | <i>j</i> | 2 | Bg 94-1 | I | 2 |
| SLG1 | <i>i</i> | 3 | 成恢 177 Chenghui 177 | <i>i</i> | 2 | 滇粳 Dianjing | <i>j</i> | 2 | CR 203 | I | 2 |
| BaSmat | <i>i</i> | 2 | 远恢 2 号 Yuanhui 2 | <i>i</i> | 2 | Binam | <i>j</i> | 3 | Dhan 4 | I | 2 |
| Bhavani | <i>i</i> | 2 | 成恢 727 Chenghui 727 | <i>i</i> | 2 | Azucena | <i>j</i> | 2 | Pusa (Basmatil) | I | 2 |
| IRAT 352 | <i>i</i> | 3 | 浙恢 7954 Zhehui 7954 | <i>i</i> | 2 | SAL-BVT-BAO | <i>j</i> | 2 | 中超 123 Zhongchao 123 | I | 2 |
| Tal 0MMoloi | <i>i</i> | 2 | 扬恢 818 Yanghui 818 | <i>i</i> | 2 | Dacca 6 | <i>j</i> | 3 | MiLagrosa zawa Banday | I | 2 |
| MR77(Seberang) | <i>i</i> | 3 | 华占 Huazhan | <i>i</i> | 2 | Giza 14 | <i>j</i> | 3 | Jhona 349 | I | 3 |
| IR6 | <i>i</i> | 3 | 镇恢 084 Zhenhui 084 | <i>i</i> | 2 | Biniapan | <i>j</i> | 2 | Basmati 385 | I | 3 |
| At354 | <i>i</i> | 3 | 镇恢 62 Zhenhui 62 | <i>i</i> | 2 | Asominori | <i>j</i> | 2 | JP-5 | I | 2 |
| BG304 | <i>i</i> | 2 | 镇恢 46 Zhenhui 46 | <i>i</i> | 2 | 五大稻种 Wudadaozhong | <i>j</i> | 2 | M202 | I | 2 |
| X 21 | <i>i</i> | 2 | 镇恢 832 Zhenhui 832 | <i>i</i> | 2 | AP423 | <i>j</i> | 2 | Razza 77 | I | 3 |
| X 22 | <i>i</i> | 2 | 蜀恢 498 Shuhui 62 | <i>i</i> | 2 | Ai Yeh Lu | <i>j</i> | 2 | EiRo | I | 3 |
| X 23 | <i>i</i> | 2 | D3745 | <i>i</i> | 2 | 秀水 519 Xiushui 519 | <i>j</i> | 3 | Rubio | I | 3 |
| C 71 | <i>i</i> | 2 | 镇恢 82 Zhenhui 82 | <i>i</i> | 2 | 苏秀 867 Suixu 867 | <i>j</i> | 3 | serendah Kynin | I | 3 |
| C 70 | <i>i</i> | 2 | 镇恢 100 Zhenhui 100 | <i>i</i> | 2 | 龙梗 31 Longjing 31 | <i>j</i> | 3 | Dular | A | 3 |
| Q 5 | <i>i</i> | 2 | CBB23 | <i>i</i> | 2 | 龙梗 41 Longjing 41 | <i>j</i> | 3 | OM 997 | A | 2 |
| 缓阳占 Suiyangzhan | <i>i</i> | 2 | IR72 | <i>i</i> | 2 | 连梗 6 号 Lianjing 6 | <i>j</i> | 3 | Ziri | A | 3 |
| Govind | <i>i</i> | 2 | 黄华占 Huanghuazhan | <i>i</i> | 2 | 连梗 7 号 Lianjing 7 | <i>j</i> | 3 | Kentan Nangka | J | 2 |
| UPR 191-66 | <i>i</i> | 3 | 天丰 B Tianfeng B | <i>i</i> | 2 | 徐稻 3 号 Xudao 3 | <i>j</i> | 3 | Ginga | F | 3 |

S—亚种属性；*i*—籼稻；*j*—粳稻；I—籼梗中间类型；A—秋稻；J—爪哇岛；F—香稻。T—Pigm-4带型；1—82 bp带型；2—126 bp带型；3—155 bp带型。

S, Property; *i*, indica; *j*, japonica; I, indica-japonica intermediate type; A, Aus; J, Java; F, Aromatic. T, Pigm-4 genotype; 1, 82 bp; 2, 126 bp; 3, 155 bp.

表2 本研究用于测序和检测*Pigm*基因的相关标记

Table 2. Sequencing and selecting markers for *Pigm* in this study.

| 标记名称 Name | 正向引物(5'-3') Forward primer (5'-3') | 反向引物(5'-3') Reverse primer (5'-3') | 染色体位置 Physical location / bp | 用途 Purpose |
|--------------|---------------------------------------|---------------------------------------|---------------------------------|---------------|
| Sepigm-4 | TCGCAGCCATCCAAAGTGAGTC | TACACCTGCGAATCAAATCACT | 10 435 917—10 436 503 | 测序 Sequencing |
| Pigm-2 | TCTGAATTATTGTGGTCGTG | CCGTTACATCAGTTTTTCT | 10 366 681—10 366 821 | 检测标记 MAS |
| Pigm-4 | ATGCTCGATTCTGTTACATT | CGTCCCACACTTCTTTTT | 10 436 075—10 436 229 | 检测标记 MAS |

表3 检测抗稻瘟病基因的引物信息

Table 3. Information of molecular markers for screening rice blast resistance genes.

| 目标基因 Target gene | 标记名称 Marker name | 正向引物(5'-3') Forward primer(5'-3') | 反向引物(5'-3') Reverse primer(5'-3') | 预计片段大小 Expected fragment / bp | 参考文献 Reference |
|---------------------------|---------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|-------------------------------------|-------------------|
| <i>Pib</i> | Pibdom | GAACAATGCCCAAACCTTGAGA | GGGTCCACATGTCAGTGAGC | 365 | [12] |
| <i>Pi9</i> | PB9-1 | TAGACTCCTTCCAAGT TTGACT | TGTGATTTTCAGAATTT TCGT | 180 | [12] |
| <i>Pi2</i> | AP22 | GTGCATGAGTCCAGCTCAAA | GTGTACTCCCATGGCTGCTC | 143 | [12] |
| <i>Piz1</i> | <i>Piz1</i> -PA | ATGTGGATGCTGTGTTAT | TAGTTTGCTGCTCAATAAGTA | 176 | [20] |
| <i>Pi5</i> | JJ817 | GATATGGTTGAAAAGCTAATCTCA | ATCATTTGCTCTTCATATTCAGAGT | 1450 | [12] |
| <i>Pi54</i> | Pikh-1 | CAATCTCCAAAGTTTTCAGG | GCTTCAATCACTGCTAGACC | 216 | [12] |
| <i>Pikm</i> | Pikm1 | TGAGCTCAAGGCAAGAGTTGAGGA | TGTTCCAGCAACTCGATGAG | 174 | [5] |
| | Pikm2 | CAGTAGCTGTGTCTCAGAACTATG | AAGGTACCTCTTTTCGGCCAG | 290 | |
| <i>Pita</i> / <i>pita</i> | YL155/YL87 | AGCAGGTTATAAGCTAGGCC | CTACCAACAAGTTCATCAAA | 1042 | [12] |
| | | AGCAGGTTATAAGCTAGCTAT | CTACCAACAAGTTCATCAAA | 1042 | |
| <i>Pb1</i> | Pb1-1 | ATCAACGCTACCTTCCC | GTGCCATCACAATTTCTTC | 159 | [21] |

记。参照国际水稻研究所分级标准(IRRI, 2002)调查穗颈瘟抗性级别^[19]。

1.5 受体亲本稻瘟病抗性背景分析

对武运2674、武运粳27、镇稻18等3个受体亲本进行稻瘟病抗性基因的检测，检测的基因包括 *Pita*、*Pib*、*Pi54*、*Pikm*、*Pb1*、*Piz-t*、*Pi9*、*Pi5*、*Pi2*，其中，*Pita*、*Pib*、*Pi54*、*Pi9*、*Pi5*、*Pi2*的特异性检测标记引自Wu等^[12]，*Piz-t*的特异性标记引自华丽霞等^[20]，*Pikm*的特异性标记引自Costanzo等^[5]，*Pb1*的特异性标记引自孙立亨等^[21]。这些标记的具体信息列于表3。

1.6 导入系材料的构建与*Pigm*基因的效应分析

从2014年正季开始，以武运2674与谷梅4号杂交、回交；2014年冬季以武运粳27、镇稻18为母本，与谷梅4号杂交，之后连续回交，回交后代均利用 *Pigm*-4标记配合使用*Pigm*-2标记检测，至2017年正季，分别回交至BC₅F₁、BC₄F₁代，对部分目标单株、株系进行接种和病圃鉴定。

2 结果与分析

2.1 特异连锁标记的获得与验证

对10对随机引物的测序结果分析表明在第4对产物中谷梅4号的DNA序列与粳稻日本晴相比，谷

梅4号缺失73 bp，而与9311相比缺失了44 bp(图1)。根据此差异，我们设计了InDel标记*Pigm*-4(表2)。

根据测序结果比对差异，我们在*Pigm*上游获得了一段籼粳特异序列差异，并据此设计了InDel标记 *Pigm*-2(表1)。

进一步利用 Sepigm-4 标记分别对携带 *Pi9*、*Pi2*、*Piz*、*Piz-t*、*Pi40* 的供体品种 75-1-127、C101A51、Toride1、Fukunishiki、IR65482 进行扩增，测序比对发现各亲本序列均与谷梅 4 号不同(图 1)。通过 *Pigm*-4 标记检测不同类型的 271 份代表性品种，其中仅一份未知来源的籼稻材料可扩增出与谷梅 4 号一致的带型，从而说明 *Pigm*-4 具有很强的特异性(表 1、图 2)。

2.2 受体亲本的稻瘟病抗性基因

利用特异性标记对武运2674、武运粳27、镇稻18等3个受体进行检测。发现武运2674含*Pib*、*Pi54*这两个抗性基因；武运粳27含*Pita*、*Pib*两个抗性基因，镇稻18含*Pib*、*Pi54*、*Pb1*等3个抗性基因(表4)。

对3个受体亲本进行穗颈瘟接种鉴定，武运2674、武运粳27及镇稻18的抗性等级分别为9级(高感)、7级(高感)和5级(中感)，暗示*Pi54*+*Pib*基因型组合对南方强毒力(高致病频率)的稻瘟病小种几乎不存在抗性，*Pita*+*Pib*的基因型组合仅减轻部分伤害，尽管*Pb1*提高了水稻的穗颈瘟抗性，但仍难以

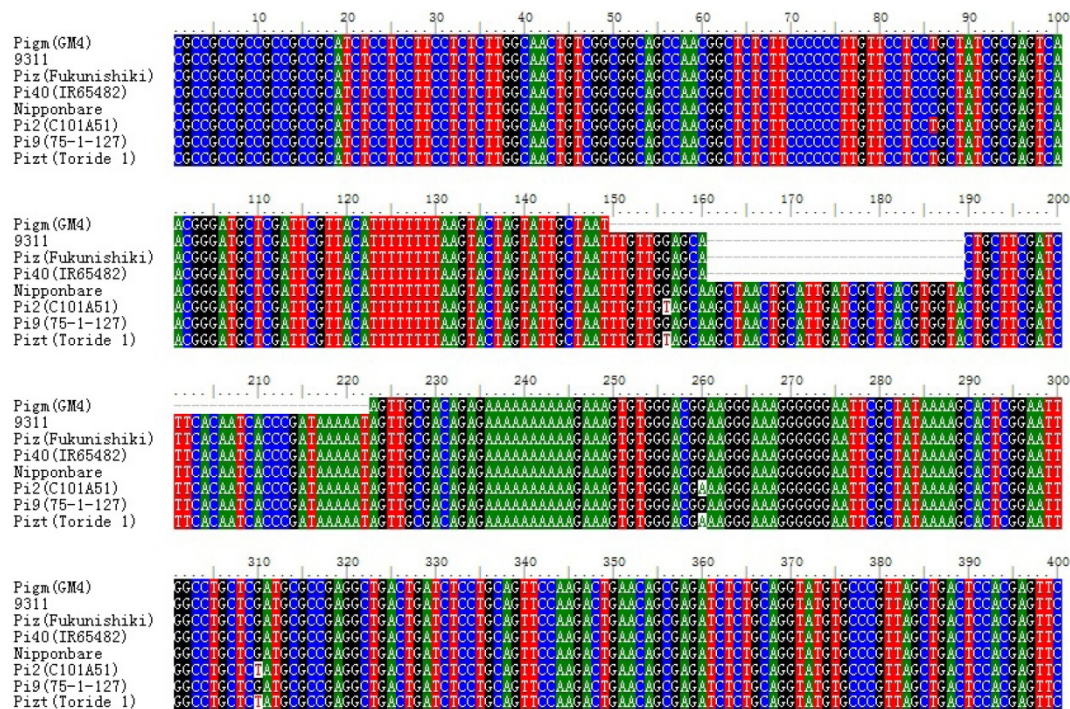
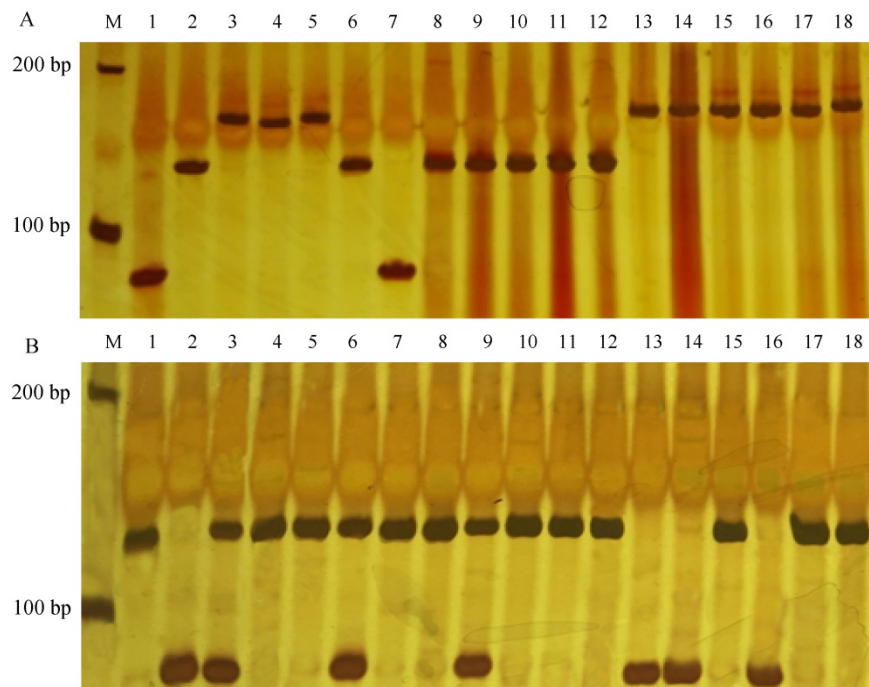


图 1 谷梅 4 号序列与相关亲本的部分序列比对结果
Fig. 1. Sequence alignment of different *Piz* alleles amplified with Sepigm-4.



A 图 1~18 泳道分别为亲本谷梅 4 号、IR65482、C101A51、75-1-127、Toride 1、Fukunishiki、武运 2674/谷梅 4 号 BC₃F₃ 纯系、9311、镇恢 82、镇恢 832、成恢 177、成恢 727、秀水 519、武运 2674、武运梗 27、镇稻 88、镇稻 18 及镇糯 19；B 图 1、2 泳道分别为武运 2674、谷梅 4 号，3~18 泳道为武运 2674/谷梅 4 号部分 BC₃F₂ 单株。

In Fig. A, Lanes 1 to 18 represent Gumei 4, IR65482, C101A51, 75-1-127, Toride 1, Fukunishiki, BC₃F₃ homozygous lines of Wuyun 2674/Gumei 4, 9311, Zhenhui 82, Zhenhui 832, Chenghui 177, Chenghui 727, Xiushui 519, Wuyun 2674, Wuyunjing 27, Zhendao 88, Zhendao 18, and Zhennuo 19, respectively.

In Fig. B, 1, Wuyun 2674; 2, Gumei 4; Lanes 3 to 18 represent some BC₃F₂ individuals derived from Wuyun 2674/ Gumei 4.

图2 *Pigm-4*在部分亲本间(A)及分离群体(B)的检测结果
Fig. 2. Diversity detection of *Pigm-4* marker in relevant parents and segregation population.

表4 3个受体亲本所包含的抗稻瘟病基因型及抗性等级

Table 4. Distribution of R genes and resistance level of the three receptors.

| 受体亲本名称 Variety | 亲本生态型 Ecotype | <i>Pi54</i> | <i>Pb1</i> | <i>Pib</i> | <i>Pita</i> | 抗性等级 Resistance level |
|--------------------|---|-------------|------------|------------|-------------|--------------------------|
| 武运2674 Wuyun 2674 | 迟熟中粳 Late maturing mid-season japonica rice | + | - | + | - | 9(HS) |
| 武运粳27 Wuyunjing 27 | 中熟中粳 Medium maturing mid-season japonica rice | - | - | + | + | 7(HS) |
| 镇稻18 Zhendao 18 | 早熟晚粳 Early maturing late japonica rice | + | + | + | - | 5(MS) |

+: 表示携带目标基因; -: 不携带目标基因; HS—高感; S—中感。
+, With target gene; -, Without target gene; HS, High sensibility; MS, Medium sensibility.

表5 Pigm-2及Pigm-4检测不同回交群体的基因型情况

Table 5. Genotype distribution in different backcross population detected by Pigm-2 and Pigm-4.

| 群体 Population | 标记 Marker | 各基因型单株数 Individuals with different genotype | |
|---|--------------|--|-----------------|
| | | <i>Pigmpigm</i> | <i>pigmpigm</i> |
| | | | |
| 武运2674/谷梅4号 BC ₅ F ₁ Wuyun 2674/Gumei 4 BC ₅ F ₁ | Pigm-2 | 89 | 62 |
| | Pigm-4 | 92 | 59 |
| 武运粳27/谷梅4号 BC ₄ F ₁ Wuyunjing 27/Gumei 4 BC ₄ F ₁ | Pigm-2 | 43 | 50 |
| | Pigm-4 | 41 | 54 |
| 镇稻18/谷梅4号 BC ₄ F ₁ Zhendao 18/Gumei 4 BC ₄ F ₁ | Pigm-2 | 35 | 32 |
| | Pigm-4 | 35 | 32 |

有效抵抗南方强毒力稻瘟病菌小种(表4)。

2.3 Pigm基因改良粳稻穗颈瘟的效果

分别以武运2674、武运粳27、镇稻18为母本，与谷梅4号杂交、回交，利用两翼标记Pigm-4及Pigm-2检测，三个亲本分别回交到BC₅F₁、BC₄F₁及BC₄F₁，对武运2674/谷梅4号衍生的BC₅F₁共计151个单株进行检测，发现利用Pigm-2标记检测到的基因型为*Pigmpigm*、*pigmpigm*的个体分别是89、62株，而Pigm-4标记检测到的基因型为*Pigmpigm*、*pigmpigm*的个体分别是92、59株，有5个交换单株(即两个标记基因型不一致的单株)，对武运粳27/谷梅4号BC₄F₁代93个单株进行检测，发现Pigm-2标记检测到的基因型为*Pigmpigm*、*pigmpigm*的个体分别是43、50株，而Pigm-4标记有*Pigmpigm*、*pigmpigm*的个体分别是41、52株，也有5个交换单株；对镇稻18/谷梅4号衍生的BC₄F₁代共计67个单株进行检测，发现Pigm-2、Pigm-4标记检测到的基因型为*Pigmpigm*、*pigmpigm*的个体均为35及32株，但有4个交换单株(表5、图3)。

之后对两个标记均为杂合带型的160个目标单株(3个群体分别是88、39、33株)的*Pib*、*Pi54*、*Pita*、*Pb1*等4个基因进行检测，88个武运2674/谷梅4号衍生的BC₅F₁单株均携带了纯合的*Pib*、*Pi54*基因；武运粳27/谷梅4号BC₄F₁单株中携带*Pigmpigm*、*PibPib*、*Pi54Pi54*、*PitaPita*的有37个，有2个单株未检测到*Pi54*，镇稻18/谷梅4号BC₄F₁单株中基因型为*Pigmpigm*、*PibPib*、*Pi54Pi54*、

*Pb1Pb1*的单株有31个，也有2个单株未检测到*Pb1*。所以除*Pigm*杂合外，其余抗性基因与受体亲本一致的单株共有156个。

分别对携带*Pigm*杂合体的160个目标单株及*Pigm*区段内发生交换，但是其余抗性基因与受体亲本一致的14个单株接种鉴定(其中有2个单株因青枯病无法调查抗性等级)。结果显示导入*Pigm*基因的不同受体亲本的品系均能显著提高其对南方强毒

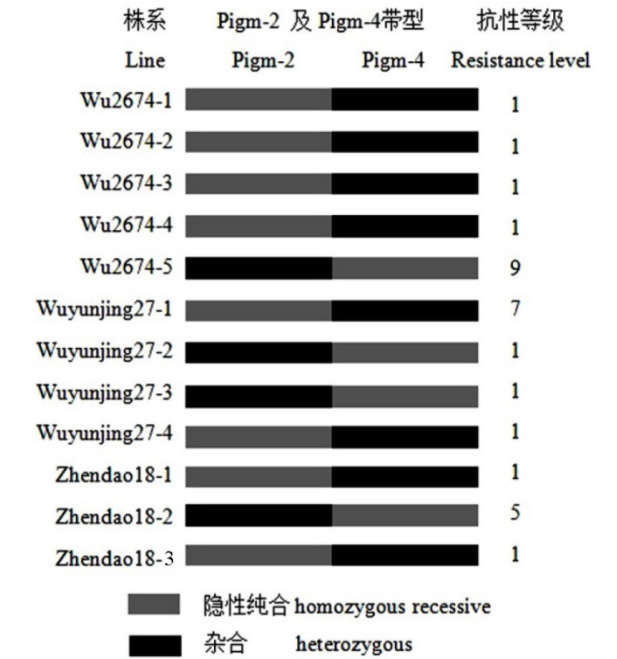
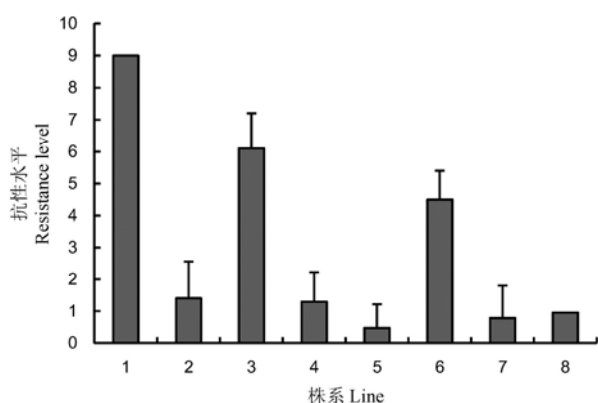


图3 导入系内不同类型交换单株的抗性
Fig. 3. Resistant level of the recombination individuals between Pigm-2 with Pigm-4 of introgression lines.



1—武运2674; 2—武运2674(*Pib*+*Pi54*+*Pigm*); 3—武运粳27; 4—武运粳27(*Pi54*+*Pita*+*Pigm*); 5—武运粳27(*Pita*+*Pigm*); 6—镇稻18; 7—镇稻18(*Pib*+*Pi54*+*Pib1*+*Pigm*); 8—镇稻18(*Pib*+*Pi54*+*Pigm*)。

1, Wuyun 2674; 2, Wuyun 2674(*Pib*+*Pi54*+*Pigm*); 3, Wuyunjing 27; 4, Wuyunjing 27 (*Pi54*+*Pita*+*Pigm*); 5, Wuyunjing 27(*Pita*+*Pigm*); 6, Zhendao 18; 7, Zhendao 18(*Pib*+*Pi54*+*Pib1*+*Pigm*); 8, Zhendao 18(*Pib*+*Pi54*+*Pigm*)。

图4 不同抗稻瘟病基因组合的抗性等级

Fig. 4. Resistance level of different combination patterns of R genes.

力小种的穗颈瘟抗性(图3)。但在*Pigm*两个侧翼标记存在交换的12个单株中, 8个*Pigm*-2位点纯隐性而*Pigm*-4位点杂合单株的抗病比例达到87.5%, 而另外4株相反基因型单株的抗性频率为50%(图4), 表明2个标记距目标基因还有一定的距离, 但是*Pigm*-4离目标基因更近。

3 讨论

Piz 座位是一个含有 9 个 NBS-LRR 元件的基因簇, 迄今至少已发现了 *Piz*、*Pi2*、*Pi9*、*Piz-t*、*Pi26*、*Pi40*、*Pi50*、*Pigm* 等 8 个复等位基因, 其中 *Pi2*、*Piz-t* 被认为是 *R4* 起主要作用, *Pi9* 是 *R2*, 而 *Pi50* 则在 *R4* 位置上产生了 4 次复制。Deng 等^[22]成功实现了对 *Pigm* 的克隆, 研究表明 *Pigm* 包含 13 个元件的基因簇, 这可能也是 *Pigm* 较 *Piz-t* 等其他等位基因抗谱更广的主要原因, 且 *Pigm* 受 *PigmR*(*R6*) 与 *PigmS*(*R8*) 共同作用, 维持水稻抗性与产量的平衡, 其中, *PigmS* 表现出表观遗传的特征, 在不同部位表达量有显著差异。通过比对发现本研究标记 *Pigm*-4 位于 *R12* 启动子区, 谷梅 4 号 *Pigm*-4 标记所在区段的序列与 *Piz*、*Pi2*、*Pi9*、*Piz-t*、*Pi40* 的供体亲本及绝大多数水稻品种均不相同, 表现出谷梅 4 号基因组特异的现象, 对于谷梅 4 号是如何进化得到这些特异序列, 以及它与其抗性的维持是否存在一定的相关性, 还有待深入研究。

参照日本晴基因组, *Pigm* 基因位于水稻第 6 染色体 10 036 773—10 042 226 bp 内。在第 6 染色体短臂上鉴定和分离了多个重要农艺性状相关基因, 如品质基因 *Wx*^[23]、*ALK*^[24], 生育期基因 *Hd1*^[25]、*Hd3*^[26], 广亲和基因 *S₅*^[27] 及其他基因, 它们之间存在一定的互相连锁关系, 如控制抽穗期的主效基因 *Hd1* 就位于 9 336 376—9 338 569 bp 处, 与 *Pigm* 连锁。所以, 要在导入广谱抗稻瘟病 *Pigm* 基因的同时保留受体亲本优良性状, 就需要经过多次的回交筛选, 而用于筛选的标记与目标基因越为紧密, 目标基因不丢失及导入不良连锁片段的可能性就越小。本研究利用的两个标记与目标基因紧密连锁, 且其中 *Pigm*-4 具有基因组特异性, *Pigm*-2 位于 *Pigm* 上游 2 kb 处, 二者配合可以确保将 *Pigm* 基因簇同时导入受体。

不同课题组对 *Pigm* 的抗谱测定均证明该基因具有广谱抗性, 但是本研究进一步证明目前江淮稻区推广的粳稻品种中并不存在 *Pigm* 基因型。因此, 将 *Pigm* 导入到粳稻品种, 可能有助于显著改良粳稻的稻瘟病抗性。研究表明有些稻瘟病基因的抗性也会因背景不同而存在差异, 如 *Pib1*^[28-29]。本研究利用分别携带不同抗性基因的长江中下游三种不同生态型的粳稻品种(中熟中粳、迟熟中粳、早熟晚粳)为受体, 重点考查了不同粳稻背景下 *Pigm* 对提升粳稻穗颈瘟抗性的效应, 结果表明, 江淮稻区粳稻品种虽然携带了部分稻瘟病抗性基因, 但是对强毒力的南方小种抗性水平普遍较低, 所以一旦本地稻瘟病小种发生变化, 极有可能引起当地稻瘟病灾害的暴发, 而 *Pigm* 在不同的粳稻背景中均可有效提升其对水稻穗颈瘟的抗性等级, 达到高抗水平, 进一步证明 *Pigm* 可以与其他抗稻瘟病基因“兼容”, 在改良粳稻稻瘟病抗性育种中加以利用。

需要指出的是, Deng 等^[22]研究表明 *Pigm* 基因本身对水稻的产量性状也存在一定影响, 即在降低千粒重同时增加结实率从而保证水稻不减产, 不过该研究的粳稻受体品种为日本晴和意大利的原始品种 Maratelli, 从生产的角度出发, 它们的农艺性状较当前粳稻主栽品种存在明显差距。例如目前主推常规粳稻的结实率一般达 90% 以上(如本研究 3 个受体品种的结实率均在 93% 左右), 所以 *Pigm* 是否可维持主推常规粳稻品种的产量平衡还需进一步验证。本研究到目前为止只回交了 4~5 代, 要准确评价 *Pigm* 在粳稻育种中的利用价值, 还需要继续回交自交以纯化背景, 并进一步考查该基因对其他农艺性状的影响。

参考文献:

- [1] Liu Q, Yang J Y, Zhang S H, Zhao J L, Feng A Q, Yang T F, Wang X F, Mao X X, Dong J F, Zhu X Y, Leung H, Leach J E, Liu B. *OsGF14b* positively regulates panicle blast resistance but negatively regulates leaf blast resistance in rice. *Mol Plant Microbe In*, 2016, 29(1): 46-56.
- [2] Zhuang J Y, Ma W B, Wu J L, Chai R Y, Lu J, Fan Y Y, Jin M Z, Leung H, Zheng K L. Mapping of leaf and neck blast resistance genes with resistance gene analog, RAPD and RFLP in rice. *Euphytica*, 2002, 128(3): 363-370.
- [3] 朱凤, 田子华, 邵德良, 刘永锋. 从2014年稻瘟病重发谈今后防控对策的改进. *江苏农业科学*, 2016, 44(8): 155-158.
Zhu F, Tian Z H, Tan D L, Liu Y F. How to improve the countermeasures-Based on the rice blast outburst in 2014. *Jiangsu Agric Sci*, 2016, 44(8): 155-158. (in Chinese)
- [4] Gouda P K, Saikumar S, Varma C M K, Nagesh K, Thippeswamy S, Shenoy V, Ramesha M S, Shashidhar H E. Marker-assisted breeding of *Pi-1* and *Piz-5* genes imparting resistance to rice blast in PRR78, restorer line of Pusa RH-10 Basmati rice hybrid. *Plant Breeding*, 2013, 132(1): 61-69.
- [5] Costanzo S, Jia Y L. Sequence variation at the rice blast resistance gene *Pi-km* locus: Implications for the development of allele specific markers. *Plant Sci*, 2010, 178(6): 523-530.
- [6] Deng Y W, Zhu X D, Shen Y, He Z H. Genetic characterization and fine mapping of the blast resistance locus *Pigm(t)* tightly linked to *Pi2* and *Pi9* in a broad-spectrum resistant Chinese variety. *Theor Appl Genet*, 2006, 113(4): 705-713.
- [7] Jiang N, Li Z Q, Wu J, Wang Y, Wu L Q, Wang S H, Wang D J, Wen T J, Liang Y, Sun P Y. Molecular mapping of the *Pi2/9* allelic gene *Pi2-2* conferring broad-spectrum resistance to *Magnaporthe oryzae* in the rice cultivar Jefferson. *Rice*, 2012, 5(21): 1-7.
- [8] Turnbull L A, Levine J M, Fergus A J F, Petermann J S. The *Pi40* gene for durable resistance to rice blast and molecular analysis of *Pi40*-advanced backcross breeding lines. *Phytopathology*, 2009, 99(3): 243-250.
- [9] Zhu X Y, Shen C, Yang J Y, Zhou S C, Zeng L X, Han J L, Jing S, Ling W, Pan Q H. The identification of *Pi50(t)*, a new member of the rice blast resistance *Pi2/Pi9* multigene family. *Theor Appl Genet*, 2012, 124(7): 1295-1304.
- [10] Su J, Wang W J, Han J H, 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): 1-13.
- [11] Zhou B, Qu S, Liu G, Dolan M, Sakai H, Lu G, Bellizzi M, Wang G L. The eight amino-acid differences within three leucine-rich repeats between *Pi2* and *Piz-t* resistance proteins determine the resistance specificity to *Magnaporthe grisea*. *Mol Plant Microbe In*, 2006, 19(11): 1216-1228.
- [12] Wu Y Y, Xiao N, Yu L, Pan C H, Li Y H, Zhang X X, Liu G Q, Dai Z Y, Pan X B, Li A H. Combination patterns of major *R* genes determine the level of resistance to the *M. oryzae* in rice (*Oryza sativa* L.). *PLoS ONE*, 2014, 10(6): e0126130.
- [13] 于苗苗, 戴正元, 潘存红, 陈夕军, 余玲, 张晓祥, 李育红, 肖宁, 龚红兵, 盛生兰. 广谱稻瘟病抗性基因 *Pigm* 和 *Pi2* 的抗谱差异及与 *Pi1* 的互作效应. *作物学报*, 2013, 39(11): 1927-1934.
Yu M M, Dai Z Y, Pan C H, Chen X J, Yu L, Zhang X X, Li Y H, Xiao N, Gong H B, Sheng S L, Pan X B, Zhang H X, Li A H. Resistance spectrum difference between two broad-spectrum blast resistance genes, *Pigm* and *Pi2*, and their interaction effect on *Pi1*. *Acta Agron Sin*, 2013, 39(11): 1927-1934. (in Chinese with English abstract)
- [14] 田红刚, 陈红旗, 胡江, 雷财林, 朱旭东, 钱前. 抗稻瘟病基因 *Pigm* 导入对寒地粳稻抗病性和产量性状的影响. *沈阳农业大学学报*, 2016, 47(5): 520-526.
Tian H G, Cheng H Q, Hu J, Lei C L, Zhu X D, Qian Q. Effect of introgressed *Pigm* gene on rice blast resistance and yield traits of *Japonica* rice in cold area. *J Shenyang Agric Univ*, 2016, 47(5): 520-526. (in Chinese with English abstract)
- [15] 王飞, 王立广, 潘梅瑶, 钮中一, 周勇, 梁国华. 水稻抗稻瘟病 *Pigm(t)* 基因的分子标记辅助选择与利用. *华北农学报*, 2016, 31(1): 51-56.
Wang F, Wang L G, Pan M Y, Niu Z Y, Zhou Y, Liang G H. Marker-assisted selection and application of blast resistant gene *Pigm(t)* in rice. *Acta Agric Boreali-Sin*, 2016, 31(1): 51-56 (in Chinese with English abstract).
- [16] 杨平, 邹国兴, 陈春莲, 黄永萍, 兰波, 熊运华, 尹建华. 利用分子标记辅助选择改良春恢 350 稻瘟病抗性. *分子植物育种*, 2015, 13(4): 741-747.
Yang P, Zou G X, Chen C L, Huang Y P, Lan B, Xiong Y H, Yin J H. Improvement of rice blast resistance of Chunhui350 by using molecular-marker assisted selection. *Mol Plant Breeding*, 2015, 13(4): 741-747. (in Chinese with English abstract)
- [17] 张礼霞, 王林友, 范宏环, 王建军. 利用 *Pigm* 基因改良粳稻保持系的稻瘟病抗性研究. *核农学报*, 2017, 31(3): 424-431.
Zhang L X, Wang L Y, Fan H H, Wang J J. Study on improving rice blast resistance of *Japonica* maintainer line by introducing *Pigm* gene. *J Nucl Agric Sci*, 2017,

- 31(3): 424-431. (in Chinese with English abstract).
- [18] Cho Y C, Kwon S W, Choi I S, Lee S K, Jeon J S, Oh M K, Roh J H, Hwang H G, Yang S J, Kim Y G. Identification of major blast resistance genes in Korean rice varieties (*Oryza sativa* L.) using molecular markers. *J Crop Sci Biotechnol*, 2007, 10(4): 265-276.
- [19] IRRI. Standard evaluation system for rice (SES). Los Banos: International Rice Research Institute, 2002.
- [20] 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, Chen S, 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, 29(3): 305-310. (in Chinese with English abstract)
- [21] 孙立亭, 林添资, 龚红兵, 景德道, 余波, 钱华飞, 曾生元, 李闯, 姚维成, 盛生兰. 稻瘟病抗性基因 *Pb1* 功能特异性分子标记及其专用引物、检测方法和应用: 201610305124X. 2016-08-24.
- Sun L T, Lin T Z, Gong H B, Jing D D, Yu B, Qian H F, Zeng S Y, Li C, Yao W, C, Sheng S L. Specific marker for *Pb1* and its primer, detection method and application: 201610305124X. 2016-08-24. (in Chinese)
- [22] Deng Y W, Zhai K R, Xie Z, Yang D Y, Zhu X D, Liu J Z, Wang X, Qin P, Yang Y Z, Zhang G M, Li Q, Zhang J F, Wu S H, Milazzo J, Mao B Z, Wang E T, Xie H A, Tharreau D, He Z H. Epigenetic regulation of antagonistic receptors confers rice blast resistance with yield balance. *Science*, 2017, 355(6328): 962-965.
- [23] Wang Z Y, Wu Z L, Xing Y Y, Zheng F G, Guo X L, Zhang W G, Hong M M. Nucleotide sequence of rice *waxy* gene. *Nucleic Acids Res*, 1990, 18(19): 5898-5898.
- [24] Gao Z Y, Zeng D L, Cui X, Zhou Y H, Yan M X, Huang D N, Li J Y, Qian Q. Map-based cloning of the *ALK* gene, which controls the gelatinization temperature of rice. *Sci China: Ser C*, 2003, 46(6): 661-668.
- [25] Yano M, Katayose Y, Ashikari M, Yamanouchi U, Monna L, Fuse T, Baba T, Yamamoto K, Umehara Y, Nagamura Y. *Hd1*, a major photoperiod sensitivity quantitative trait locus in rice, is closely related to the *Arabidopsis* flowering time gene *CONSTANS*. *Plant Cell*, 2000, 12(12): 2473-2483.
- [26] Tamaki S, Matsuo S, Wong H L, Yokoi S, Shimamoto K. *Hd3a* protein is a mobile flowering signal in rice. *Science*, 2007, 316(5827): 1033-1036.
- [27] Chen J, Ding J, Ouyang Y, Du H, Yang J, Cheng K, Zhao J, Qiu S, Zhang X, Yao J, Liu K, Wang L, Xu C, Li X, Xue Y, Xia M, Ji Q, Lu J, Xu M, Zhang Q. A triallelic system of *S5* is a major regulator of the reproductive barrier and compatibility of *indica-japonica* hybrids in rice. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105(32): 11436-11441.
- [28] Inoue H, Hayashi N, Matsushita A, Liu X Q, Nakayama A, Sugano S, Jiang C J, Takatsuji H. Blast resistance of CC-NB-LRR protein *Pb1* is mediated by *WRKY45* through protein-protein interaction. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2013, 110(23): 9577-9582.
- [29] Lee S K, Song M Y, Seo Y S, Kim H K, Ko S, Cao P J, Suh J P, Yi G, Roh J H, Lee S, An G, Hahn T R, Wang G L, Ronald P, Jeon J S. Rice *Pi5*-mediated resistance to *magnaporthe oryzae* requires the presence of two coiled-coil-nucleotide-binding-leucine-rich repeat genes. *Genetics*, 2009, 181(4): 1627-1638.