

抗稻瘟病位点 LABR_64 的起源及其分布和序列多样性

邓雨飞^{1,2} 刘明浩² 王丹¹ 左示敏³ 康厚祥^{2,*} 王国梁^{2,4,*}

(¹湖南农业大学 农学院, 长沙 410128; ²中国农业科学院 植物保护研究所/植物病虫害生物学国家重点实验室, 北京 100193; ³扬州大学 植物功能基因组学教育部重点实验室/江苏省粮食作物现代产业技术协同创新中心, 江苏 扬州 225009; ⁴俄亥俄州立大学 植物病理学系, 美国 俄亥俄州 哥伦布 43210; *通讯联系人, E-mail: kanghouxiangcaas@163.com; wang.620@osu.edu)

Origin, Distribution and Sequence Diversity of Rice Blast Resistance Locus LABR_64 in Rice

DENG Yufei^{1,2}, LIU Minghao², WANG Dan¹, ZUO Shimin³, KANG Houxiang^{2,*}, WANG Guoliang^{2,*}

(¹Agricultural College, Hunan Agricultural University, Changsha 41028, China; ²State Key Laboratory for Biology of Plant Diseases and Insect Pest / Institute of Plant Protection, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193, China; ³Key Laboratory of Plant Functional Genomics, Ministry of Education / Co-Innovation Center for Modern Production Technology of Grain Crops, Yangzhou University, Yangzhou 225009, China; ⁴Department of Plant Pathology, Ohio State University, Columbus 43210, USA; *Corresponding author, E-mail: kanghouxiangcaas@163.com, wang.620@osu.edu)

Abstract: 【Objective】 A better understanding of the origin and distribution of disease resistance genes in rice germplasm is useful for breeding highly resistant varieties. 【Method】 We analyzed sequence diversity of the rice blast resistance locus LABR_64, which contains two homologous genes, *LABR_64-1* and *LABR_64-2*, is located in the allelic region of *Pi3/Pi5/Pii/Pi15* on rice chromosome 9. In addition, we analyzed the microsynteny of the LABR_64 orthologous region in different monocotyledons. 【Result】 The presence frequency (PF) of LABR_64 is 16%. All of the *japonica* rice cultivars carrying LABR_64 are highly resistant to rice blast and all of those without the locus are susceptible. In addition, the PF of LABR_64 in the *indica* subpopulation is lower than 5%. Although LABR_64 is correlated with the resistance to rice blast, many *indica* rice cultivars without LABR_64 are also resistant to rice blast. We also found that the *LABR_64-2* sequence is much conserved. Moreover, the microsynteny analysis of the LABR_64 orthologous region in different monocotyledons indicated that LABR_64 originates after the separation of the monocotyledonous and dicotyledonous species, and at the early differentiation stage of monocotyledons. 【Conclusion】 The rice blast resistance phenotypes are closely correlated with the presence of the LABR_64 locus in *japonica* subpopulation, but not in *indica*, indicating that there are many other resistance loci in the *indica* subpopulation. The *LABR_64-2* sequence can be used for developing molecular markers in marker-assisted rice blast resistance breeding. It also indicated that LABR_64 may play a role in disease resistance in different monocotyledons.

Key words: rice; rice blast resistance gene; sequence diversity; gene origin

摘要: 【目的】研究抗病基因在水稻种群中的分布特征是培育抗病品种的基础。【方法】以水稻第9染色体上与 *Pi3/Pi5/Pii/Pi15* 等位的抗病位点 LABR_64 为研究对象, 结合稻瘟病抗性鉴定, 对该位点中包含的两个抗病基因 *LABR_64-1* 和 *LABR_64-2* 在水稻群体中的分布特征进行了研究, 并对其在单子叶植物中对应的直系同源序列进行了共线性分析。【结果】LABR_64 位点在水稻中存在的频率约为 16%, 所有存在该位点的粳稻均表现高抗病性, 缺失该位点的粳稻品种均表现出高感病性, 而籼稻品种中 LABR_64 位点存在频率低于 5%, 虽然其存在情况下均表现出抗病性, 但大部分缺失该位点品种也表现出抗性; 存在 LABR_64 位点的品种中, *LABR_64-2* 基因编码序列高度保守; LABR_64 起源于单子叶与双子叶植物完全分离后及单子叶植物分化早期, 其在不同的单子叶植物的分化过程中一直保持着良好的共线性。【结论】粳稻抗稻瘟病表型与 *LABR_64-1* 和 *LABR_64-2* 存在与否紧密关联, 而籼稻的相关性不大, 表明籼稻中其他抗性基因在稻瘟病抗性过程中起主导作用; 鉴于 *LABR_64-2* 的高度保守性, 可根据其编码序列设计分子标记, 用于高效筛选抗稻瘟病粳稻品种; LABR_64 可能在不同单子叶植物抗病过程中均具有重要作用。

关键词: 水稻; 抗稻瘟病基因; 序列多样性; 基因起源

中图分类号: S435.111.4⁺1; S511.034

文献标识码: A

文章编号: 1001-7216(2019)01-0020-08

收稿日期: 2018-02-08; 修改稿收到日期: 2018-06-27。

基金项目: 国家自然科学基金国际合作重点项目(31461143019); 江苏省农业重大新品种创制项目(PZCZ201703)。

稻瘟病是由稻瘟病菌 (*Magnaporthe oryzae*) 引起的一种真菌病害, 主要通过气流传播, 是水稻的三大病害之一, 每年造成水稻减产高达 11%~13%, 给粮食产业造成巨大经济损失。因此, 有效防治稻瘟病是水稻安全生产的重要任务。目前, 选育优良抗病品种和化学防治是防治稻瘟病的两种主要方法, 其中, 前者是控制稻瘟病最经济、有效和环保的方法^[1]。同时, 稻瘟菌菌株多样性丰富且变异速度快, 导致水稻抗稻瘟病品种在大规模推广 2~3 年后容易丧失抗病性, 这对稻瘟病抗病育种和抗病品种田间布局带来极大困难, 也成为制约我国乃至世界水稻持续高产、稳产的主要因素之一^[2]。因此, 发掘自然群体中的抗稻瘟病新基因及建立抗病品种在不同地区的合理布局对水稻抗病育种具有重要意义。

根据植物抗性基因编码蛋白产物的类型, 可将抗病基因分为五大类, 包括 NBS-LRR、eLRR-TM、eLRR-TM-pkinase、STK 以及除这四类以外的其他类型^[3-4]。NBS-LRR 类基因编码具有核苷酸结合位点(NBS)和富亮氨酸重复(LRR)的胞内受体蛋白。根据 NBS 的 N 端结构不同, 又可分为 TIR-NBS-LRR 和 CC-NBS-LRR 两大类。其中, TIR-NBS-LRR 类型只存在于双子叶植物中, 单子叶植物抗病基因主要类型为 CC-NBS-LRR^[5-7]。目前, 共鉴定和报道了超过 100 个水稻抗稻瘟病基因位点, 已经克隆的水稻抗稻瘟病基因有 *Pib*、*Pi2*、*Pi9*、*Pigm*、*Piz-t*、*Pi5*、*pi21*、*Pi37*、*Pikm*、*Pish*、*Piks* 等 28 个^[8-18], 其中只有一个隐性基因, 为 *pi21*, 其余全部为显性抗稻瘟基因^[13]。在这 20 多个已被克隆的抗病基因中, 除 *Pi-d3* 编码 B-lectin 激酶^[10]和 *pi-21* 编码富含脯氨酸蛋白^[13]以外, 其余均为 NBS-LRR 类型基因。抗病基因呈串联重复分布于同一遗传座位在水稻 NBS-LRR 基因家族中为普遍现象。在已克隆的 20 多个抗稻瘟病基因中, *Pi2*、*Pigm*、*Pi9* 和 *Piz-t* 都位于第 6 染色体近着丝粒区域, 属于同一遗传座位。此外, *Pik*、*Pikm*、*Pikp* 和 *Pi1* 也呈串联重复分布于第 11 染色体同一遗传座位。*Pi5*、*Pi3*、*Pii* 和 *Pi15* 是位于第 9 染色体同一遗传座位的等位基因, 对 *Pi5* 序列和功能分析表明, 其中包含两个抗病基因 *Pi5-1* 和 *Pi5-2*, 需二者同时存在时才具有抗性^[19-21]。Kang 等^[22]利用 RDP1(rice diversity panel 1)群体接种 5 个不同的稻瘟菌菌株, 结合高通量测序获得的高密度 SNP 标记进行全基因组关联分析, 鉴定了 97 个与稻瘟病相关的位点 LABR(loci associated with blast resistance)。这些抗病位点中, 有且只有 64 号位点

LABR_64 对所有 5 个测试稻瘟菌的抗性均关联, 通过基因沉默方法对 LABR_64 位点中潜在的候选基因进行了功能分析, 鉴定到两个新的抗性位点基因 LABR_64-1 和 LABR_64-2。本研究系统分析了其在水稻群体中的分布情况, 并通过进一步序列比对分析, 发现此位点在单子叶植物中非常保守, 是一个古老的抗病位点。对该基因区域的进一步研究将有助于明确水稻抗稻瘟基因的起源与演化, 为挖掘新的抗稻瘟病基因以及充分利用抗病等位基因来提高水稻抗性提供新思路。

1 材料与方法

1.1 水稻材料、稻瘟菌材料以及试剂

本研究选用 227 份水稻核心材料, 其中籼稻 68 份, 粳稻 159 份, 日本晴为对照感病材料。所用稻瘟菌菌株为 RB22。聚合酶等分子试剂均购自全式金公司。

1.2 实验方法

1.2.1 水稻种植方法

将水稻种子去壳, 按照 Park 等^[23]的方法用酒精和次氯酸钠消毒后铺于 1/2MS 培养基上, 置于光照培养箱中(12 h 光照/12 h 黑暗)培养, 保证水稻起始状态一致。一周后, 将水稻幼苗移栽于中国农业科学院廊坊基地温室苗钵, 三周后进行接种。

1.2.2 稻瘟菌培养

参照 Wang 等^[24]的方法, 将稻瘟菌纸片转接到燕麦培养基上; 于 25℃ 黑暗培养箱中培养 5~7 d, 待菌丝扩散后, 转移至 24 h 光照培养箱中, 继续培养一周, 即可产生分生孢子。

1.2.3 稻瘟病接种方法

用 0.05% 的吐温水溶液刮洗孢子, 过滤至 50 mL 离心管中; 在光学显微镜下调节孢子浓度约为 1×10^5 个/mL; 用喷壶将孢子悬浮液均匀喷于 3 叶 1 心的水稻苗, 用封口膜轻轻封住接种箱, 置于 25℃、相对湿度 95% 条件下, 避光 24 h 后, 在光照 12 h/黑暗 12 h 条件下交替培养一周, 调查病情。

1.2.4 DNA 提取、PCR 和测序分析

采用 CTAB 法提取水稻叶片 DNA。使用 Primer Premier 5.0 设计引物(表 1), 长度约为 18~25 bp, GC 含量为 40%~60%, 退火温度为 55℃~60℃。DNA 测序等由北京华大基因研究中心有限公司完成。

1.3 数据分析

不同单子叶植物的参考基因组序列从 NCBI 网站(<ftp://ftp.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/>)下载, 利用

表 1 本研究所用的引物序列

Table 1. Sequences of the primers used in this study.

引物名称	目的基因	正向引物	反向引物
Primer name	Target gene	Forward sequence(5'-3')	Backward sequence(5'-3')
引物 1 Primer 1	<i>LABR64-1</i>	CGGAGAATAACTCCTTCGG	AAGGCTTGTCCTTTCCAAAA
引物 2 Primer 2	<i>LABR64-2</i>	CAAATGTTAGACACGGAAT	CAACTTGTATGGTGGAACTG
引物 3 Primer 3	<i>LABR_64</i>	CAGCCATGGCAGCCATATGACTG	CAGAGGAAGATCCTCCTCTCC
测序引物 1 Sequencing primer 1	<i>LABR64-1</i>	GCCTGTAGGTTTTTGAAAG	GAGGGAGTGCTGTAATAGATAAA
测序引物 2 Sequencing primer 2	<i>LABR64-2</i>	AGTTGAAGGAAATGTTGAGG	TTGTAATGAAATCCGGTAA

BLAST、ClustalW2 和 DNAMAN 等对序列进行比对和分析, Perl SVG 模块完成共线性作图。

2 结果与分析

2.1 LABR_64 位点稻瘟病抗性鉴定

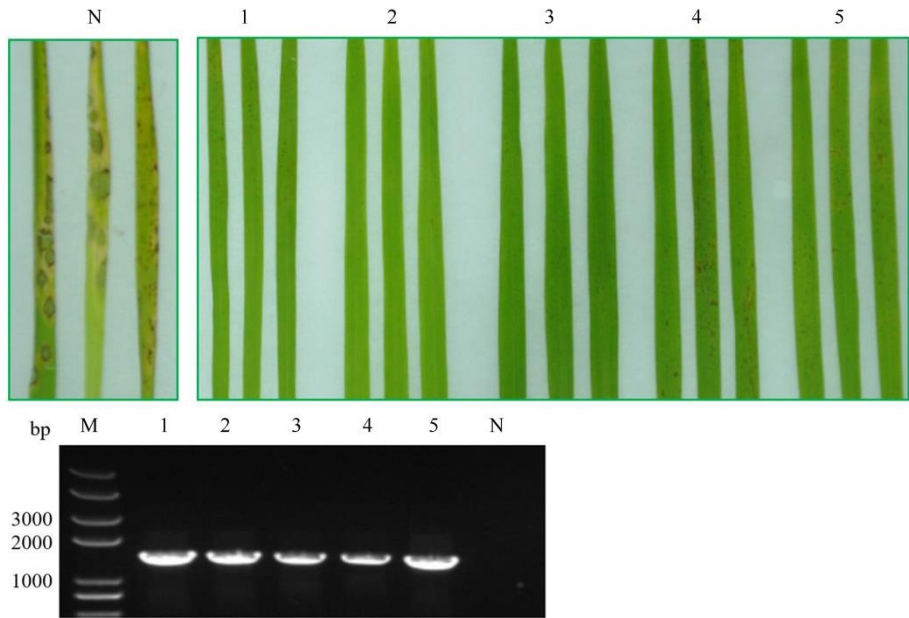
康厚祥等^[22]通过基因敲除技术敲除 LABR_64 位点中两个抗病基因中的任意一个后, 不同遗传背景的水稻品种均表现出感病性。本研究利用强致病稻瘟菌株 RB22 喷雾接种籼稻和粳稻材料后, 发现对照日本晴(缺失 LABR_64 区域两个抗病基因)叶片具有典型病斑, 表现为感病, 而携带 LABR_64 位点的材料叶片无典型病斑, 表现为抗病(图 1)。进一步表明 LABR_64 位点在供试水稻品种中与抗 RB22 紧密关联。

2.2 LABR_64 在籼粳稻中的分布

用 RB22 接种不同遗传背景的品种, 分别筛选出籼稻和粳稻的抗、感病品种。针对 LABR_64 位点包含的两个抗病功能基因 *LABR_64-1* 和 *LABR_64-2* 进行 PCR 检测。接种结果表明, 在感病粳稻品种中两个基因均缺失, 而在抗病品种中扩增条带清晰一致。在所测试粳稻品种中, LABR_64 的存在与否与抗/感 RB22 菌株高度关联; 籼稻抗性品种中, 只有部分品种包含 LABR_64 位点, 包含 LABR_64 的籼稻品种均对 RB22 菌株高抗, 同时, 籼稻抗病品种中还有很大一部分不包含 LABR_64, 表明这些籼稻品种中存在其他未知的抗病基因对 RB22 起抗性作用(图 2)。

2.3 LABR_64 位点的起源与演化

为了进一步明确抗稻瘟位点 LABR_64 的起源

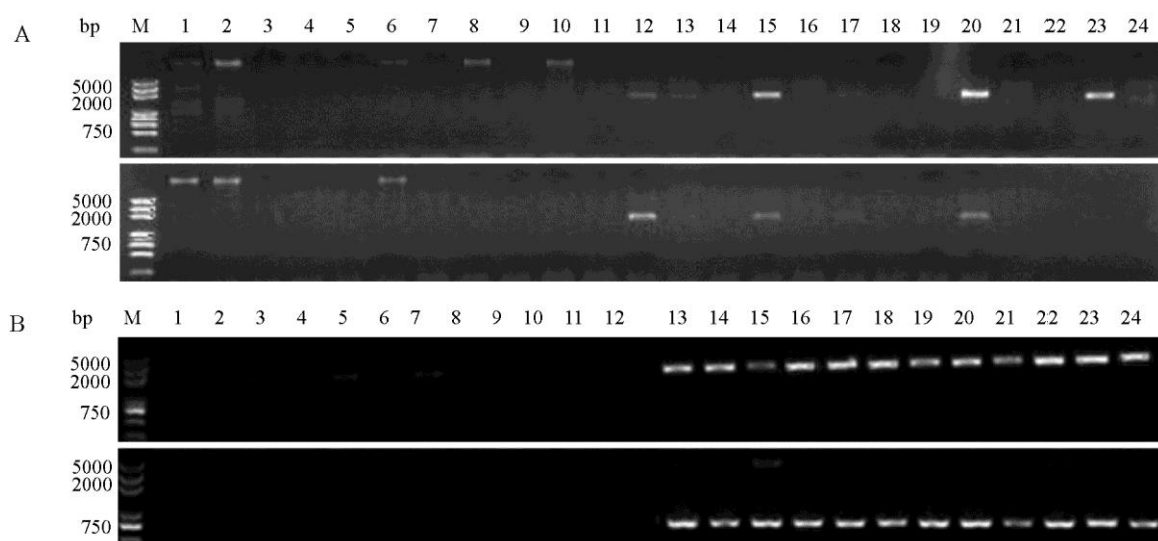


M—5000 bp 标记; 1—Binulawan; 2—IR36; 3—IR8; 4—Carolina Gold; 5—Iguape Cateto; N—日本晴。其中 Binulawan、IR36 和 IR8 为籼稻, 抗性级别为 0, Carolina Gold 和 Iguape Cateto 为粳稻, 抗性级别为 1。

M, 5000 bp marker; 1, Binulawan(*indica*, resistance level is 0); 2, IR36(*indica*, 0); 3, IR8(*indica*, 0); 4, Carolina Gold(*japonica*, 1); 5, Iguape Cateto(*japonica*, 1); N, Nipponbare.

图 1 包含 LABR_64 位点的部分水稻品种稻瘟病抗性鉴定

Fig. 1. Blast resistance evaluation of the rice varieties which contain LABR_64 locus.



A: *LABR_64-1*(上)、*LABR_64-2*(下)在籼稻感病和抗病品种中的分布, M—5000 bp 标记; 1~12 为感病品种; 13~24 为抗病品种。B: *LABR_64-1*(上)、*LABR_64-2*(下)在粳稻感病和抗病品种中的分布, M—5000 bp 标记; 1~12 为感病品种; 13~24 为抗病品种。

A, Distribution of *LABR_64-1*(above), *LABR_64-2*(below) in resistant and susceptible *indica* rice. M, 5000 bp marker; Lanes 1-12, Susceptible cultivars; Lanes 13-24, Resistant cultivars. B, Distribution of *LABR_64-1*(above), *LABR_64-2*(below) in resistant and susceptible *japonica* rice. M, 5000 bp Marker; Lanes 1-12, Susceptible cultivars; Lanes 13-24, Resistant cultivars.

图 2 LABR_64 在籼粳稻中的分布

Fig. 2. Distribution of LABR_64 in *indica* and *japonica* rice.

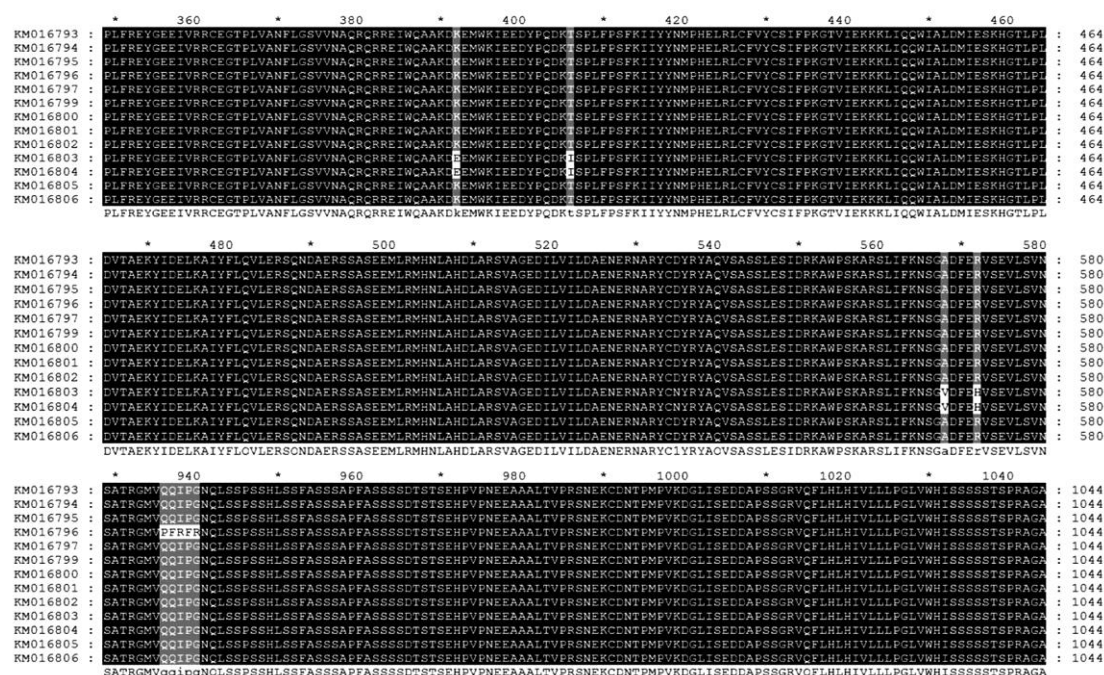
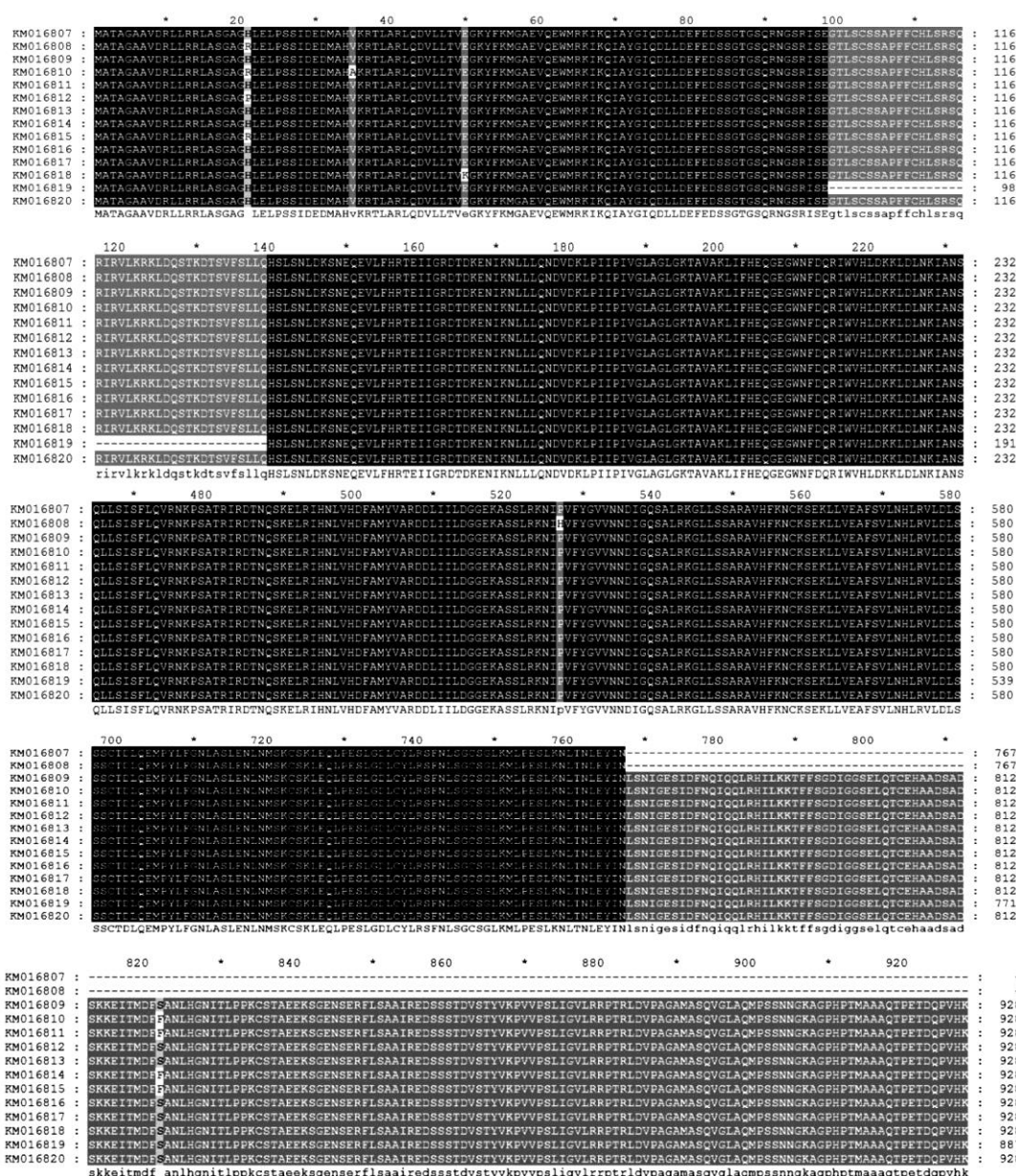


图 3 抗稻瘟病基因 *LABR_64-1* 序列多样性分析

Fig. 3. Sequences diversity of rice blast resistance alleles of *LABR_64-1*.

及在水稻不同亚群中的演化。选取 12 个包含 LABR_64 位点的抗病水稻品种进行 DNA 提取和 PCR 测序。通过对 *LABR_64-1* 和 *LABR_64-2* 基因序列比对发现, 两个基因序列在不同抗稻瘟病水稻品种中相对保守, 同时序列之间也具有多态性位

点, 这些多态性位点分布在第 175—458 位氨基酸 (NBS 结构域), 第 583—602 位和第 796—818 位氨基酸区域 (LRR 结构域) (图 3~4)。这些 NBS 和 LRR 结构区域的序列多样性可能对其抗稻瘟病功能的分化具有重要作用。

图4 抗稻瘟病基因 *LABR_64-2* 序列多样性分析Fig. 4. Sequences diversity of rice blast resistance alleles of *LABR_64-2*.

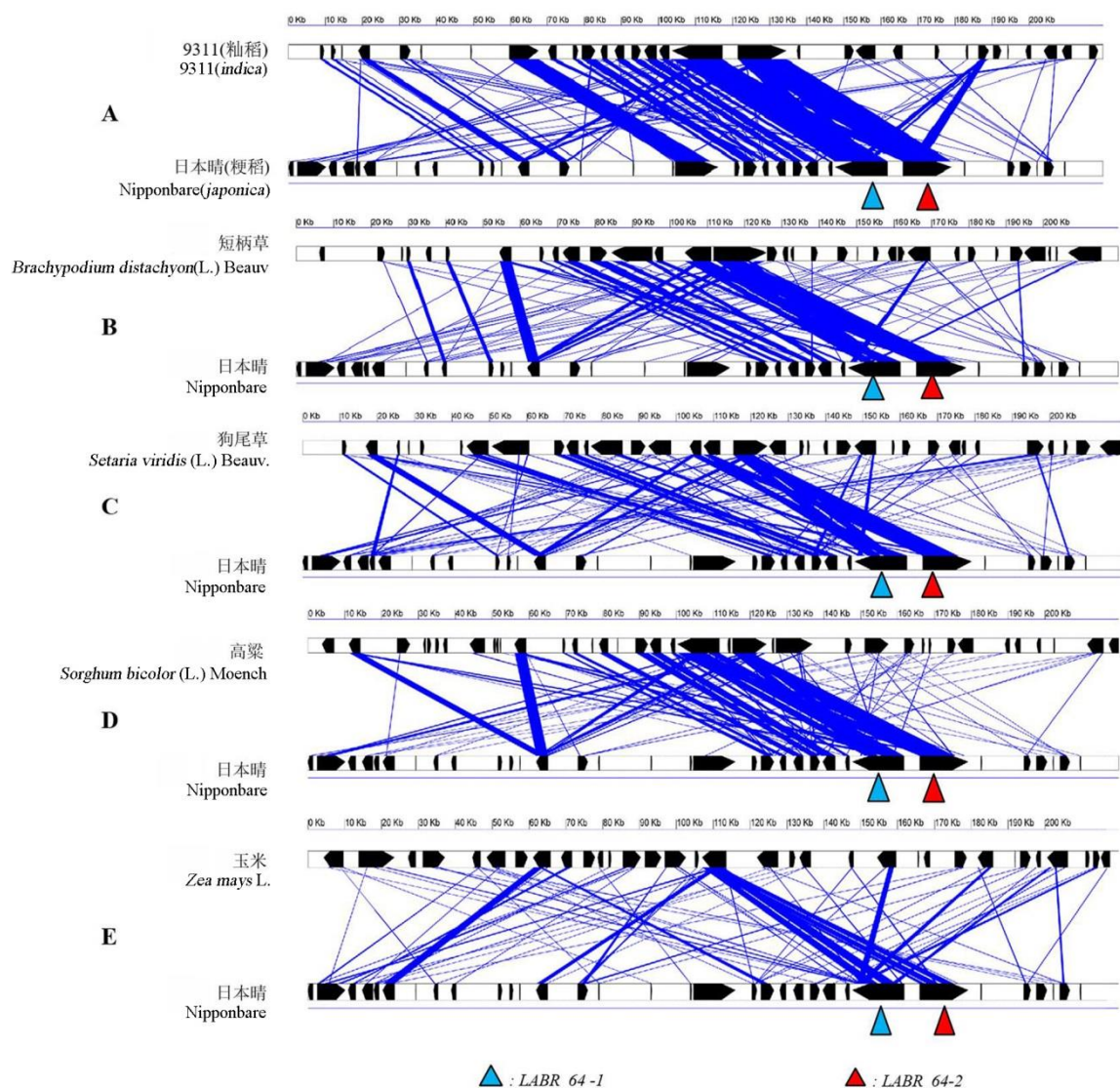
2.4 不同单子叶植物中 *LABR_64* 直系同源区段的序列共线性分析

在抗病粳稻和籼稻中, *LABR_64-1* 基因与 *LABR_64-2* 序列一致性高且所在区域共线性关系一致(图 5-A)。其中二穗短柄草 *LABR_64* 直系同源区域与水稻比较, 发现 *LABR_64-1* 直系同源基因差异相对于 *LABR_64-2* 的直系同源差异更大, 侧翼序列呈共线性排列。我们通过对 *LABR_64-1* 基因和 *LABR_64-2* 所在的 200 kb DNA 区段在几种单子叶植物(包括二穗短柄草、狗尾草、高粱、玉米)中的直系同源区段的分析, 发现均存在明显共线性关

系。表明在单子叶植物分化过程中 *LABR_64* 直系同源区域一直保持着共线性, 此区域在不同的单子叶植物中可能均起重要作用。此外, 序列比对分析发现双子叶植物(如拟南芥、大豆等)均不存在 *LABR_64* 直系同源区域, 表明 *LABR_64* 区域为单子叶植物所特有。

2.5 *LABR_64* 位点的起源

单双子叶植物分化的时间节点在 7300 万年前, 单子叶植物后续分化出不同的物种^[25-26](图 6)。其中, 玉米、高粱祖先大概在 4500 万~6000 万与其他单子叶植物(如小麦、二穗短柄草、水稻等)物种



A—日本晴和 9311(LABR_64 位点在不同粳稻品种中表现为存在或缺失两种主要类型, 而日本晴中缺失 LABR_64 位点, 为了便于共线性分析, 图中三角形区域表示来自抗病粳稻的 LABR_64 序列插入日本晴等位区域); B—二穗短柄草与水稻; C—粟米与水稻; D—高粱与水稻; E—玉米与水稻。

A, Nipponbare and 9311 (Nipponbare does not contain LABR_64, the triangles represent the LABR64-1 and LABR64-2 genes from the resistant japonica varieties). B, Nipponbare and *Brachypodium distachyon*; C, Nipponbare and *Setaria viridis*; D, Nipponbare and *Sorghum bicolor*; E, Nipponbare and *Zea mays*.

图 5 不同单子叶植物中 LABR_64 直系同源区域的序列共线性分析

Fig. 5. Microsynteny of the LABR_64 orthologous regions in different monocotyledons.

分离, 水稻在 4000 万~5400 万年前与小麦和二穗短柄草等物种分离。水稻和其他测试单子叶植物均存在一个与 LABR_64 直系同源的共线性区域(图 5), 因此, LABR_64 抗病位点的起源可追溯到单子叶植物分化早期, 即 5600 万~7300 万年, 是一个古老的抗病位点。

3 讨论

水稻是世界上最重要的粮食作物之一, 其品种

繁多且分布广泛, 同时水稻也是植物生物学研究的模式植物之一。相对水稻的起源与驯化、生长与发育、产量与品质等研究^[27-29]而言, 水稻抗病性研究相对滞后, 为水稻的分子设计育种带来了潜在风险。本研究关于抗稻瘟病基因的起源和演化研究可为分子设计育种提供理论基础, 同时可为其他非模式作物的相关研究提供重要参考价值。

在水稻抗稻瘟病研究中, 通过全基因组关联分析(Genome-wide association study, GWAS)挖掘出与抗稻瘟病相关的位点并进一步结合分子水平功能



图6 单子叶植物分化的时间节点(单位:百万年)

Fig. 6. Timeline of monocotyledon differentiation (Unit: million years).

验证已成为定位和克隆抗稻瘟病基因可靠的新方法。本研究对通过 GWAS 分析获得的 LABR_64 抗病位点,在 227 份核心水稻品种资源中进行抗性验证,发现 LABR_64 与抗稻瘟病具有高度相关性。稻瘟菌接种发现携带这个位点的水稻品种具有良好的抗性表型,进一步从群体水平说明了 LABR_64 位点与水稻抗性相关。

我国的地理环境复杂,南北气候差异大,栽培的水稻品种也不同,南方以籼稻为主,北方以粳稻为主^[30]。因而南北方稻瘟菌菌株也不尽相同^[31]。因此,挖掘并有效利用更多广谱抗稻瘟病基因是有效防治水稻稻瘟病的途径。*Pi5* 是已克隆的广谱抗稻瘟病基因之一^[21],LABR_64 位于水稻第 9 染色体 *Pi5* 等位区域^[32]。LABR_64 位点在不同粳稻抗病品种都存在,且不同品种间具有序列多样性,这些序列多样性可能对 LABR_64 的广谱抗病功能具有重要作用,LABR_64 区域序列多样性和其广谱抗病性之间的关系和机制还有待进一步研究。

植物中 NBS-LRR 类型基因家族是抗病基因中最大的家族,其旁系同源基因序列之间差异大、多样性丰富,通常认为其与病原菌的效应因子等存在协同演化关系^[9]。通常情况下,NBS-LRR 类型基因在基因组中存在非常高频率的缺失、加倍、异位插入、同源序列间彼此交换进而形成新基因^[11]。因此,对亲缘关系稍远的物种,随演化时间尺度的延长,NBS-LRR 基因及其侧翼序列的共线性极易被破坏。然而,本研究发现,抗稻瘟病位点 LABR_64 不仅古老,且其包含的基因 *LABR_64_1* 和 *LABR_64_2* 及其侧翼基因所在的 200 kb 区域在不同的单子叶植物中均保守且呈典型的共线性,虽然它在其他单子叶植物中的直系同源基因的功能尚不明确,但此研究结果表明,LABR_64 直系同源区段在不同的单子叶植物抗病过程中均可能扮演重要作用。

总之,对抗稻瘟病位点 LABR_64 的起源及演化的研究为水稻其他抗病基因的起源与演化分析奠定了基础,也为将来可能利用近缘物种的优良直

系同源基因进行作物抗病性改良提供了科学依据。

参考文献:

- [1] Jiang N, Liu X L, Dai L Y, Wang G L. Advances on the mapping and cloning of blast resistance gene in rice. *Chin Agric Sci Bull*, 2010, 26(10): 270-275.
- [2] He X Y, Wang L, Wu W H, Chen Z M, Lin F, Chen Y S, Liu W, Chen Y H, Liao Y P. The progress of mapping, isolation of the genes resistance to blast and their breeding application in rice. *Chin Agric Sci Bull*, 2014, 30(6): 1-12.
- [3] Dangi J L, Jones J D G. Plant pathogens and integrated defense responses to infection. *Nature*, 2001, 411(6839): 826-833.
- [4] Iyer A S, Mccouch S R. The rice bacterial blight resistance gene *xa5* encodes a novel form of disease resistance. *Mol Plant-Microbe Int*, 2004, 17(12): 1348-1354.
- [5] Kobe B, Deisenhofer J. A structural basis of the interactions between leucine-rich repeats and protein ligands. *Nature*, 1995, 374(6518): 183-186.
- [6] Tameling W I, Elzinga S D, Darmin P S, Vossen J H, Takken F L, Haring M A, Cornelissen B J. The tomato R gene products I-2 and MI-1 are functional ATP binding proteins with ATPase activity. *Plant Cell*, 2002, 14(11): 2929.
- [7] Zhang X, Yang S, Wang J, Jia Y, Huang J, Tan S, Zhong Y, Wang L, Gu L, Chen J Q, Pan Q, Bergelson J, Tian D. A genome-wide survey reveals abundant rice blast R genes in resistant cultivars. *Plant J*, 2015, 84(1): 20-28.
- [8] Wang Z X, Yano M, Yamanouchi U, Iwamoto M, Hayasaka H, Katayose Y, Sasaki T. The *Pib* gene for rice blast resistance belongs to the nucleotide binding and leucine-rich repeat class of plant disease resistance genes. *Plant J*, 1999, 19(1): 55-64.
- [9] Bryan G T, Wu K S, Farrall L, Jia Y, Hershey H P, McAdams S A, Faulk K N, Donaldson G K, Tarchini R, Valent B. A single amino acid difference distinguishes resistant and susceptible alleles of the rice blast resistance gene *Pi-ta*. *Plant Cell*, 2000, 12(11): 2033-2046.
- [10] 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 Int*, 2006, 19(11): 1216-1228.
- [11] Qu S H, Liu G F, Zhou B, Bellizzi M, Zeng L R, Dai L Y, Han B, Wang G L. The broad-spectrum blast resistance gene *Pi9* encodes a nucleotide-binding site-leucine-rich repeat protein and is a member of a multigene family in rice. *Genetics*, 2006, 172(3): 1901-1914.
- [12] 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.
- [13] Fukuoka S, Saka N, Koga H, Ono K, Shimizu T, Ebana K, Hayashi N, Takahashi A, Hirochika H, Okuno K, Masahiro Yano. Loss of function of a proline-containing protein confers durable disease resistance in rice. *Science*, 2009, 325(5943): 998-1001.
- [14] Lin F, Chen S, Que Z Q, Wang L, Liu X Q, Pan Q H. The blast resistance gene *Pi37* encodes a nucleotide binding site-leucine-rich repeat protein and is a member of a resistance gene cluster on rice chromosome 1. *Genetics*, 2007, 177(3): 1871-1880.
- [15] Ashikawa I, Hayashi N, Yamane H, Kanamori H, Wu J Z, Matsumoto T, Ono K, Yano M. Two adjacent nucleotide-binding site-leucine-rich repeat class genes are required to confer *Pikm*-specific rice blast resistance. *Genetics*, 2008, 180(4): 2267-2276.
- [16] Takahashi A, Hayashi N, Miyao A, Hirochika H. Unique features of the rice blast resistance *Pish* locus revealed by large scale retrotransposon-tagging. *Bmc Plant Biol*, 2010, 10(1): 175-186.
- [17] Zhai C, Lin F, Dong Z Q, He X Y, Yuan B, Zeng X S, Wang L, Pan Q H. The isolation and characterization of *Pik*, a rice blast resistance gene which emerged after rice domestication. *New Phytol*, 2011, 189(1): 321-334.
- [18] Deng Y, Zhai K, Xie Z, Yang D, Zhu X, Liu J, Wang X, Qin P, Yang Y, Zhang G, Li Q, Zhang J, Wu S, Millazzo J, Mao B, Wang E, Xie H, Tharreau D, He Z. Epigenetic regulation of antagonistic receptors confers rice blast resistance with yield balance. *Science*, 2017, 355(6328): 962-966.
- [19] Yi G, Lee S K, Hong Y K, Cho Y C, Nam M H, Kim S C, Han S S, Wang G L, Hahn T R, Ronald P C, Jeon J S. Use of *Pi5(t)* markers in marker-assisted selection to screen for cultivars with resistance to *Magnaporthe grisea*. *Theor Appl Genet*, 2004, 109(5): 978-985.
- [20] Jeon J S, Chen D, Yi G H, Wang G L, Ronald P C. Genetic and physical mapping of *Pi5(t)*, a locus associated with broad-spectrum resistance to rice blast. *Mol Genet Genom*, 2003, 269(2): 280-289.
- [21] Inukai T, Zeigler R S, Sarkarung S, Bronson M, Dung L V, Kinoshita T, Nelson R J. Development of pre-isogenic lines for rice blast-resistance by marker-aided selection from a recombinant inbred population. *Theor Appl Genet*, 1996, 93(4): 560-567.
- [22] Kang H X, Wang Y, Peng S S, Zhang Y L, Xiao Y H, Wang D, Qu S H, Li Z Q, Yan S Y, Wang Z L, Liu W D, Ning Y S, Korniliev P, Leung H, Mezey J, McCouch S R, Wang G L. Dissection of the genetic architecture of rice resistance to the blast fungus *Magnaporthe oryzae*. *Mol Plant Pathol*, 2015, 17(6): 959-972.
- [23] ParK C H, Wang G L. The *Magnaporthe oryzae* effector *AvrPiz-t* Targets the RING E3 ubiquitin ligase APIP6 to suppress pathogen-associated molecular pattern-triggered immunity in rice. *Plant Cell*, 2012, 24(11): 4748-4762.
- [24] Wang B H, Zhen W, Lu G D, Zhang X B, Wang Z H. Screening on the spore-producing media of *Pyricularia oryzae*. *Fujian Agric Sci Technol*, 2000(2): 1-2.
- [25] Huang X H, Yang S H, Gong J Y, Zhao Q, Feng Q, Zhan Q L, Zhao Y, Li W J, Cheng B Y, Xia J H, Chen N, Huang T, Zhang L, Fan D L, Chen J Y, Zhou C C, Lu Y Q, Weng Q J, Han B. Genomic architecture of heterosis for yield traits in rice. *Nature*, 2016, 537(7622): 629-633.
- [26] Vogel J P, Garvin D F, Mockler T C. Genome sequencing and analysis of the model grass *Brachypodium distachyon*. *Nature*, 2010, 463(7282): 763-768.
- [27] Zhang L, Yu H, Ma B, Liu G F, Wang J J, Wang J M, Gao R C, Li J J, Liu J Y, Xu J, Zhang Y Y, Li Q, Huang X H, Xu J L, Li J M, Qian Q, Han B, He Z H, Li J Y. A natural tandem array alleviates epigenetic repression of *IPA1* and leads to superior yielding rice. *Nat Commun*, 2017, 8(14789): 1-14.
- [28] Marschalek R, Silva M C, Santos S B D, Manke J R, Biegling C, Porto G, Wickert E, Andrade A D. Image-Rice Grain Scanner: A three-dimensional fully automated assessment of grain size and quality traits. *Crop Breed Appl Biotechnol*, 2017, 17: 89-97.
- [29] Luo C P, Ni L, Chen Z Y, Liu Y F, Liu Y Z, Nie Y F. Inoculation technology of rice blast and rice resistance to it in Jiangsu regional tests in 2009. *Jiangsu Agric Sci*, 2009(6): 178-179.
- [30] Zhu Y Y, Chen H, Wang Y Y, Li Z S, Li Y, Fan J H, Chen J B, Yang S S, Ma G L, Hu L P, Zou J Y, Mundt C C, Borromeo E, Leung H, Mew T W. Diversifying variety for the control of rice blast in China. *Biodiversity*, 2001, 2(1): 10-14.
- [31] Lei C L, Wang J L, Jiang W R, Ling Z Z, George M L. Population structure and genetic variation of rice blast fungus in some rice-growing regions in northern China. *Acta Phytopathol Sin*, 2002, 32(3): 219-226.
- [32] Wang G L, Mackill D J, Bonman J M, McCouch S, Champoux M C, Nelson R J. RFLP Mapping of genes conferring complete and partial resistance to blast in a durably resistant rice cultivar. *Genetics*, 1994, 136(4): 1421-1434.