

水稻品种抗瘟性表型与抗病基因同源序列相似性关系

刘二明^{1,3} 肖一龙^{2,3} 易有金¹ 庄杰云⁴ 郑康乐⁴ 罗峰³

(¹湖南农业大学生物安全科技学院, 湖南长沙 410128; E-mail: liuerming@hunau.net; ²湖南亚华种业股份有限公司, 湖南长沙 410011; ³湖南省攸县农业局, 湖南株州 412300; ⁴中国水稻研究所, 浙江杭州 310006)

Relationship Between Phenotype of Blast Resistance and Similarity of Resistance Gene Analog in Rice Varieties

LIU Er-ming^{1,3}, XIAO Yi-long^{2,3}, YI You-jin¹, ZHUANG Jie-yun⁴, ZHENG Kang-le⁴, LUO Feng³

(¹College of Bio-safety Science and Technology, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China; E-mail: liuerming@hunau.net; ²Hunan Yahua Seeds Co. Ltd, Changsha 410011, China; ³Agricultural Bureau of Youxian County, Hunan Province, Zhuzhou 412300, China; ⁴China National Rice Research Institute, Hangzhou 310006, China)

Abstract: Six pairs of primers, viz. RGA1(Resistance gene analog) (XLRR-for/ XLRR-rev), RGA2 (XLRR-inv1/XLRR-inv2), RGA3(NLRR-for/NLRR-rev), RGA4 (NLRR-inv1/NLRR-inv2), RGA5 (Pto-kin1/Pto-kin2) and RGA6 (Pto-kin3/Pto-kin4), were used to fingerprint 21 rice varieties based on RGA-PCR. Clustering analysis showed that the 21 varieties could be both classified into 5 groups at 0.72 similarity coefficient or using index of leaf blast severity at 0.84 level. Although there is no parallelism relationship between group and group in two different types of the clustering, the varieties, such as Xiangzi 3150, IR156, Zhuliangyou 02 and ZR02 with broad spectrum or durable resistance can be finely fallen into the same group. It was also suggested that 3 pairs among 6 primer pairs, viz. RGA1 and RGA2 designed from the LRR region of rice *Xa21* gene and RGA3 from the LRR region of tobacco *N* gene, were more suitable to evaluate rice germplasms for their genetic responses to rice blast by RGA-PCR.

Key words: rice blast; resistant phenotype; resistance gene analog; similarity

摘要: 用6对RGA引物,即RGA1(XLRR-for/XLRR-rev)、RGA2(XLRR-inv1/XLRR-inv2)、RGA3(NLRR-for/NLRR-rev)、RGA4(NLRR-inv1/NLRR-inv2)、RGA5(Pto-kin1/Pto-kin2)和RGA6(Pto-kin3/Pto-kin4)对21个品种进行RGA-PCR的DNA指纹分析。以相似系数0.72和田间叶瘟严重程度阈值0.84分别聚类,21个水稻品种均可以分成5类。尽管类与类之间没有一一对应关系,但抗谱广、抗性稳定或具持久抗性的品种,能较好地聚为一类,如湘资3150、IR156、株两优02、ZR02。在6对引物中,RGA1和RGA2来自于水稻抗白叶枯病基因*Xa21*含LRR结构,RGA3来自于烟草*N*基因含LRR结构,上述3对引物比较适宜用于水稻稻瘟病抗性基因遗传背景分析。

关键词: 稻瘟病; 抗性表型; 抗性基因同源序列; 相似性

中图分类号: Q943; S431.111.4⁺1; S511.034

文献标识码: A

文章编号: 1001-7216(2005)03-0209-08

水稻对稻瘟病的抗性通常以质量抗性为主,符合“基因对基因”假说^[1,2],即表现为品种的某一抗性基因与稻瘟病菌相对应的某一无毒基因之间的专化性互作。它的抗病性表型则是这两者在特定环境条件下互作的结果。

近十几年来在多种植物中已克隆到一系列的抗病毒、细菌、真菌和线虫基因^[3~7],如烟草原抗花叶病毒基因*N*、水稻抗白叶枯病基因*Xa21*、抗稻瘟病基因*Pitb*、亚麻抗锈病基因*L6*、甜菜抗包囊线虫基因*Hsl pro-1*等。迄今分离和测序的多数抗性基因及基因产物,它们有一些共同的结构,如富亮氨酸重复(leucine-rich repeats, LRRs)、核苷酸结合位点(nucleotide binding site, NBS)、丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶(serine/threonine protein kinase, STK)、跨膜结构域(transmembrane domain, TM)、亮氨酸拉链

(leucine zipper, LZ)、Toll白介素-1区域(Toll-interleukin-1 region, TIR)以及蛋白激酶(protein kinase, PK)等。这些结构与蛋白质之间的相互作用与细胞内的信号传递有关。既然植物绝大多数抗性基因享有共同的保守区域,那么极有可能在其他未被克隆的基因中也有类似的保守区。基于这一推理,可以以这些保守结构的序列为基础设计简并引物,在作物中应用PCR技术扩增和分离具有相似序列的DNA片段,即抗病基因同源序列(Resistance gene analogs, RGAs)。Maleki等^[3], Kanazin等^[4], Leister等^[5], Yu等^[6]应用这种方法在小

收稿日期: 2004-07-01; 修改稿收到日期: 2004-10-07。

基金项目: 2001-2003年中国农业科学院博士后流动站湖南亚华种业股份有限公司博士后工作站资助项目。

第一作者简介: 刘二明(1959-),男,博士,研究员。

麦、大豆、马铃薯抗性基因研究中已获得成功。Mago 等^[8]利用引物 S1、S2 及其组合对 Nipponbare × Kasalath 的 186 个 F₂ 株系的 RGAs 进行研究, 并认为利用已知抗性基因保守结构域同源序列扩增其他植物的候选抗性基因是可能的; Ilag 等^[9]利用抗病基因 RPS2 中拟南芥的 NBS-LRR 结构域分离了水稻品种 IR64 抗稻白叶枯病 (*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*) 的基因并对其特征进行了研究, 鉴定出了一个抗性基因。Zhuang 等^[10]利用 8 对 RGA 引物, 将谷梅 2 号一个兼抗叶瘟和穗瘟的基因定位于第 6 染色体上; 范静华等^[11]用 RGA 法进行了水稻抗瘟性评价分析。

本研究利用水稻品种在稻瘟病病圃自然诱导条件下的叶瘟病情严重度及抗病基因同源序列的相似性, 对部分水稻品种的抗性进行了遗传多样性和相互关系及抗性分类的比较研究。这对品种抗性评价和利用, 以及抗性基因的进一步发掘有一定的意义。

1 材料与方法

1.1 供试品种

所用品种包括湘矮早 7 号 (L1)、B40 (L2)、CO39 (L3)、南京 11 (L4)、Moroberecan (L5)、湘资 3150 (L6)、IR156 (L7)、株两优 02 (L8)、株 1S (L9)、ZR02 (L10)、C101A51 (*Pi-2*) (L11)、C101LAC (*Pi-1*) (L12)、C101PKT (*Pi-4*) (L13)、C104PKT (*Pi-3*) (L14)。国内 7 个鉴别品种 Tetep (L15)、珍龙 13 (L16)、四丰 43 (L17)、东农 363 (L18)、关东 51 (L19)、合江 18 (L20)、丽江新团黑谷 (L21)。

1.2 叶瘟鉴定方法及评价标准

田间试验按随机区组排列, 每品种 3 次重复, 自秧苗返青后, 当田间叶瘟危害稳定后进行调查, 以病叶面积分级, 计算叶瘟严重度^[12]。

1.3 水稻全基因组 DNA 的提取

将幼叶 (约 0.35 g) 剪成小段放入在 -70℃ 下预冷的研钵中, 加液氮研磨成粉末, 将粉末小心倒入加有 1000 μL 2% CTAB 提取液和 21 μL β-2-巯基乙醇的 1.5 mL 离心管中; 于 65℃ 下水浴保温 45 min; 从水浴锅中取出在 10 000 r/min 下离心 3 min, 取上清液 700 μL 于另一 1.5 mL 离心管中, 加入等体积氯仿: 异戊醇溶液 ($V_{\text{氯仿}} : V_{\text{异戊醇}} = 24 : 1$) 抽提 10 min (上下颠倒混匀), 12 000 r/min 下离心 3 min; 取上清液 600 μL, 加入等体积的异戊醇于 10 000 r/min 下离心 3 min; 取上清液 500 μL, 加入总体积 1/5 的 10 mmol/L NH₄Ac, 再加 2 倍体积无

水乙醇, 后于 -20℃ 下放置 2 h; 取出后于 12 000 r/min 下离心 3 min, 弃上清液, 加入 70% 乙醇 700 μL, 12 000 r/min 下离心 5 min; 去上清液, 在 4℃ 冰箱中干燥 1.5 h, 加 200 μL TE 缓冲液和 1 μL RNaseA 后于 37℃ 下放置 40 min; 然后加入等体积的异戊醇后于 10 000 r/min 下离心 5 min; 取上清液, 加入总体积 1/5 的 10 mmol/L NH₄Ac, 再加 2 倍体积无水乙醇, 后于 -20℃ 下放置 1 h; 12 000 r/min 下离心 10 min, 倒去上清液, 再加 70% 酒精 700 μL, 12 000 r/min 下离心 5 min, 倾去上清液, 于 4℃ 冰箱中干燥 1.5 h; 加入 30 μL TE 溶解, 置 -70℃ 冰箱中保存备用。

1.4 DNA 浓度检测^[13]

取 1×TE 溶解后的水稻 DNA 样品 1 μL, 在 0.5×TBE 中于 0.8% 琼脂糖凝胶上与标准浓度梯度 (15~300 ng) 的 λ-DNA (未经酶切) 电泳, 经溴化乙锭 (0.5 μg) 染色 15 min 后, 在自动凝胶成像分析系统 (Imagemaster[®] VDS, Pharmacia Biotech) 上观察和摄像。通过与 λ-DNA 浓度梯度和样品 DNA 的荧光强度比较确定样品 DNA 的浓度。

1.5 抗病基因同源序列 (RGA) 分析

选用 6 对引物, 参照 Chen 等^[14]、Zhuang 等^[10]的方法, 使用 MJ 研究所的 DTC-200 扩增仪, 从总 DNA 中扩增抗病基因同源序列, 扩增条件为: 94℃ 下先预变性 2 min, 然后 94℃ 下变性 2 s, 40℃ 下退火 45 s, 72℃ 下延伸 1.5 min, 共循环 40 次。扩增产物用聚丙烯酰胺凝胶电泳进行分离, 采用 Promega 公司的 DNA 银染系统显色。所有引物由国际水稻研究所 Leung 博士提供 (表 1)。

1.6 数据处理

1.6.1 读带

在荧光灯箱上读取 RGA-PCR 扩增产物的变性聚丙烯酰胺凝胶电泳图谱带。根据扩增谱带的有无记录, 有带的记为“1”, 无带的记为“0”。将数据制作成 Microsoft Excel 文件, 用于聚类分析和扩增谱带多态性比较。

1.6.2 遗传多样性数据处理

2002 年和 2003 年, 对叶瘟严重度采用 DPS 软件中的最长距离系统聚类法进行系统聚类。任意两个样品 *x* 和 *y* 间的 RGA 亲缘关系, 利用 NTSYSpc Version 2.11Q (Applied Biostatistics Inc.), USA 软件中的 UPGMA (Unweight pair-group method with arithmetic averages) 程序进行聚类分析, 构建遗传系统树型图。

表 1 用于 RGA 分析的引物对

Table 1. List of RGA primer pairs used in the study.

引物对代码	引物名称	序列 (5'-3')	保守结构域来源 ^[7]
Code	Primer name	Sequence (5'-3')	From conserved motifs ^[7]
RGA1	XLRR-for	TCCGTTGGACAGGAAGGAG	水稻抗白叶枯病基因 <i>Xa21</i> 含 LRRs 结构 LRR region of <i>Xa21</i> gene from rice
	XLRR-rev	TCCCATAGACCGGACTGTT	
RGA2	XLRR-inv1	TGTTCAGGCCAGATACCC	来自于烟草 <i>N</i> 含 LRRs 结构 LRR region of the tobacco <i>N</i> gene
	XLRR-inv2	GAGGAAGGACAGGTTGCC	
RGA3	NLRR-for	TAGGGCCTCTTGCATCGT	来自于番茄 <i>Pto</i> 的激酶结构 Kinase domain of <i>Pto</i> from tomato
	NLRR-rev	TATAAAAAGTGCCGGACT	
RGA4	NLRR-inv1	TGCTACGTTCTCCGGG	
	NLRR-inv2	TCAGGCCGTGAAAAATAT	
RGA5	Pto-kin1	GCATTGGAACAAGGTGAA	
	Pto-kin2	AGGGGGACCACCACGTAG	
RGA6	Pto-kin3	TAGTTCGGACGTTTACAT	
	Pto-kin4	AGTGTCTTGTAGGGTATC	

2 结果与分析

2.1 21 个品种的抗性遗传表型

2002 年和 2003 年待 21 个品种秧苗返青,田间叶瘟危害定局后进行调查,以病叶面积分级,计算叶瘟严重度,结果如表 2。

21 个品种两年的平均叶瘟严重度经系统聚类分析,结果如图 1。当阈值取 0.84 时,可将 21 个品种分成 5 类, I 类包括 L9、L8、L15、L7、L6、L10、L5 等 7 个品种,属抗到中等抗病,叶瘟严重度在 0.3%~23.3%,其中含 3 个持久抗瘟性品种 Moroberecan(L5)、湘资 3150(L6)和 Tetep(L15); II 类包括 L18、L16、L11 等 3 个品种,病叶严重度在 40.3%~

51.0%, 属感; III 类包括 L14、L3、L2、L1 共 4 个品种,叶瘟严重度在 68.0%~76.2%,属高感; IV 类包括 L20、L19、L13、L17、L4 等 5 个品种,叶瘟严重度 42.7%~75.0%,属高感; V 类包括 L21 和 L12 两个品种,叶瘟严重度 85.2%~94.0%,属高度感病。

2.2 品种 RGA 多态性

供试的 21 个品种,用 6 对 RGA 引物共扩增出可辨晰的谱带 3807 条,其中呈多态性的带共 2890 条,占总带数的 75.91%(表 3)。从谱带数目的多少看,RGA1、RGA2、RGA3 和 RGA4 都在 600 条以上,RGA5 和 RGA6 皆在 600 条以下;就单个品种而言,不同引物之间差异较大,谱带数在 10~55 条,且品种的抗瘟性与谱带数的多少没有相关性。多态

表 2 21 个供试品种的叶瘟严重度

Table 2. Leaf blast severity of the 21 tested varieties in 2002 and 2003. %

品种编号	2002	2003
Variety code		
L1	68.0	71.4
L2	71.9	67.8
L3	68.5	66.8
L4	61.1	64.5
L5	0.3	4.9
L6	0.7	2.7
L7	3.0	3.5
L8	3.6	10.1
L9	15.8	23.3
L10	1.2	4.5
L11	50.5	49.3
L12	89.9	85.2
L13	59.2	80.6
L14	76.2	75.3
L15	2.0	3.7
L16	40.3	45.5
L17	55.2	71.0
L18	41.2	51.0
L19	42.7	75.0
L20	45.3	75.0
L21	92.5	94.0

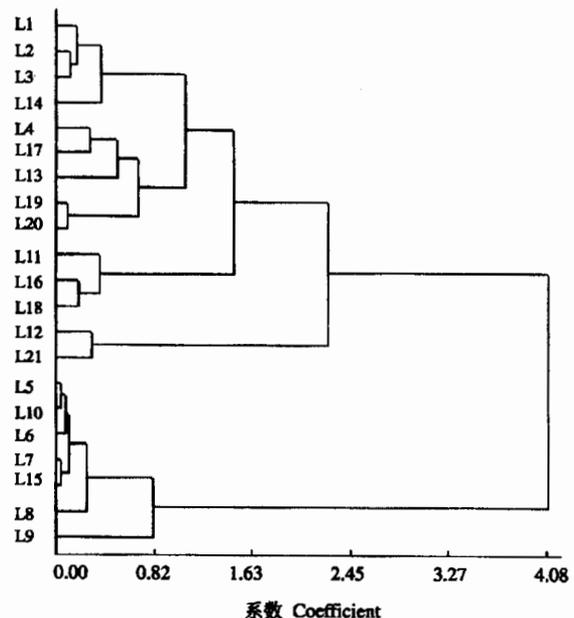


图 1 21 个品种系统聚类

Fig. 1. Dendrogram of the tested 21 rice varieties.

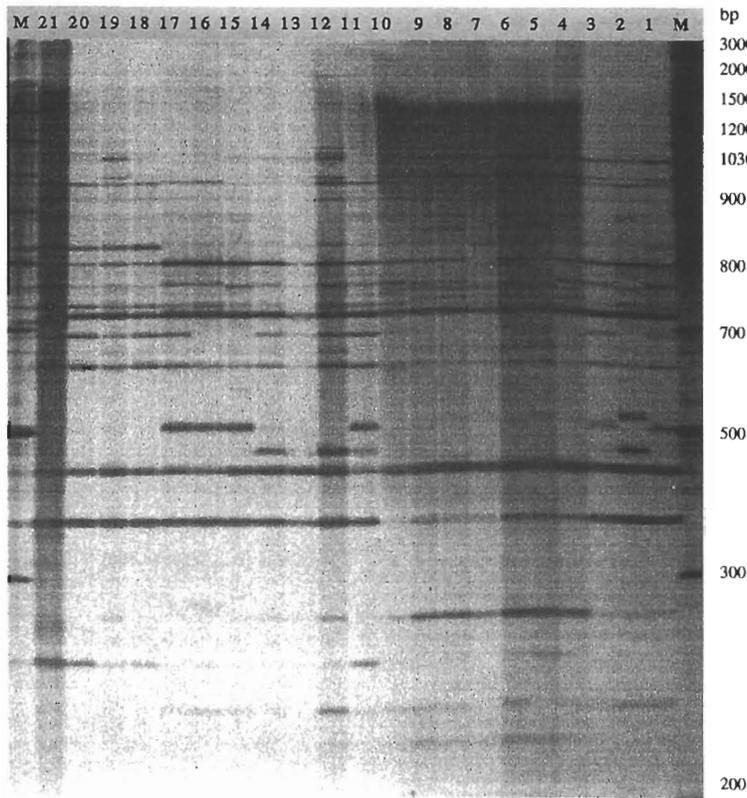


图2 21个品种基于RGA1(XLRR-for/XLRR-rev)-PCR扩增产物的电泳图谱
Fig.2. DNA fingerprinting of the 21 tested rice varieties based on RGA1-PCR.

性谱带数目和频率,除RGA5在60%以下外,其余都在73%以上,可见这些引物的多态性都较高。

6对RGA引物的多态性谱带分子量大小存在差异,RGA1在200~1500 bp,RGA2在190~2000 bp,RGA3在150~1200 bp,RGA4在160~2000 bp,RGA5在150~1250 bp,RGA6在200~1200 bp。一般以200~900 bp居多。

2.3 利用RGA相似性对品种进行聚类

根据6对RGA引物对21个品种扩增多态性谱带的相似系数,将6对引物扩增结果单独或组合,利用UPGMA程序进行聚类,结果如表4和图3~6。

依据系统聚类图谱以及2002年和2003年病圃中21个品种叶瘟严重度的系统分类,以相似系数0.66~0.86分类,6对RGA引物单独,或6对引物组合都可将21个品种分成5类(表4)。

2.4 品种抗瘟性表型与抗性基因同源序列相似性关系

品种的感病性是相对的,就本研究的21个品种而言,在2002年和2003年两年的病圃叶瘟和穗瘟

鉴定中,湘资3150(L6)、IR156(L7)、株两优02(L8)、ZR02(L10)、Tetep(L15)为抗病,株1S(L9)为中抗,其余15个品种均为感至高度感病。总体看,用RGA和叶瘟严重度聚类,类与类之间没有一一对应关系。若表型仅按抗感划分,用品种抗叶瘟表型(严重度)聚类为I类的品种抗稻瘟病(表4),相对应RGA1 I类中有8个品种,6个相吻合;

表3 6对RGA引物在21个品种中检测到的多态性

Table 3. Polymorphism of the 21 rice varieties based on 6 pairs of RGA primers.

代码 Code	总带数 No. of total bands	多态性带 No. of polymorphic bands	多态性带频率 Frequency of polymorphic bands/%
RGA1	689	563	81.71
RGA2	697	529	75.90
RGA3	667	394	59.07
RGA4	615	489	79.51
RGA5	565	418	73.98
RGA6	574	490	85.36
合计 Total	3807	2890	75.91

表 4 6 对 RGA 引物单独或组合及用叶瘟严重度对 21 个品种的分类

Table 4. Grouping of the 21 tested rice varieties with six pairs of RGA primers alone and all, and severity of leaf blast.

引物 Primer	相似系数 Coefficient	品种所属类别 Variety group				
		I	II	III	IV	V
RGA1	0.66	L7*、L9、L10*、 L8*、L5**、L6**、 L4、L3	L15**	L11	L21、L20、L18、L19、 L13、L17、L16、L4、 L12	L2、L1
RGA2	0.71	L20、L19、L13、L12、 L11、L10、L9、L8、 L7、L6、L5	L16、L15	L14、L3	L4、L2、L1	L21、L18、L17
RGA3	0.86	L7、L3、L6、L10、L4、 L8、L9、L1	L5	L17、L16、L15、L14、 L13	L12、L11、L2	L19、L21、L20、L18
RGA4	0.70	L21、L20、L19、L18、 L12、L6、L5、L10、 L9、L8、L4、L7、L1	L16、L1、L5、L3、L2	L11	L13	L11、L17、L14
RGA5	0.78	L5、L6	L19、L17、L10、L9、 L8、L15、L14、L4、 L3、L2、L1	L16、L12、L11、L20、 L18、L7	L13	L21
RGA6	0.73	L5、L7	L15、L14、L13、L6、 L9、L11、L8、L10、 L4、L3、L1	L2	L21、L20、L19、L18、 L17、L16	L12
6 对引物 All	0.72	L7、L6、L5、L10、L9、 L8、L4、L3	L17、L16、L15、L14、 L2、L1	L12、L11	L13	L19、L21、L20、L18
叶瘟严重度 Severity	0.84	L9、L8、L15、L7、L6、 L10、L5	L18、L16、L11	L20、L19、L13、L17、 L4	L14、L3、L2、L1	L21、L12

* 广谱抗瘟品种，** 持久抗瘟性品种。

* Represents the variety with a broad resistance spectrum to rice blast and ** with durable resistance.

RGA2 I 类中有 11 个品种，5 个相吻合；RGA3 I 类中有 8 个品种，6 个相吻合；RGA4 I 类中有 13 个品种，6 个相吻合；RGA5 I 类中具 2 个品种，2 个相吻合；RGA6 I 类中具 2 个品种，2 个相吻合；6 对引物

组合 I 类中有 8 个品种，6 个相吻合。基于这一结果并综合类与类相对应关系，前 3 对引物 RGA1、RGA2、RGA3(图 3~5)较适合稻瘟病抗性基因同源序列相似性分析，而尽可能用多对引物分析，则能

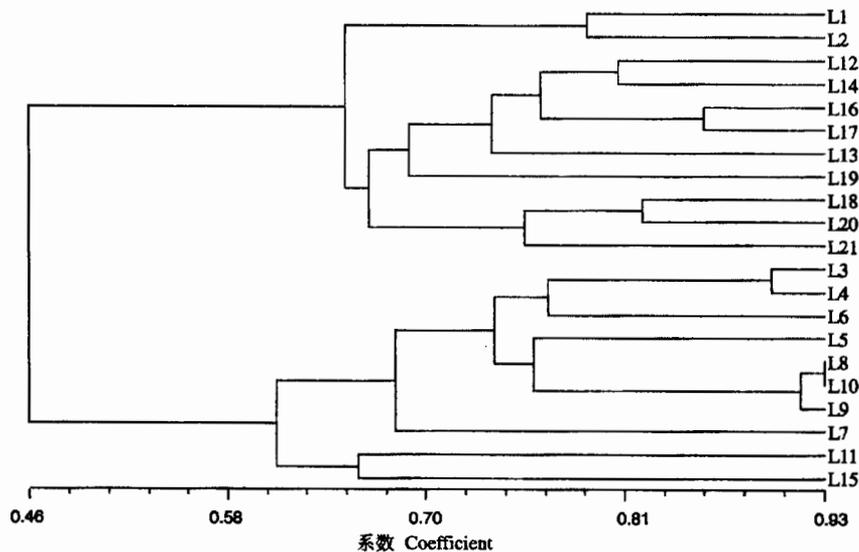


图 3 RGA1(XLRR-for/XLRR-rev)对 21 个品种的聚类

Fig. 3. Dendrogram of the 21 tested rice varieties based on RGA1-PCR.

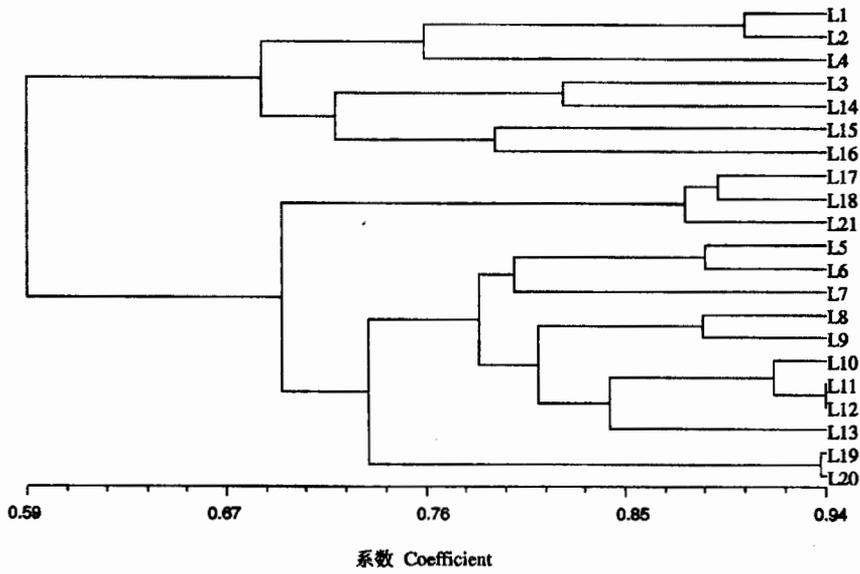


图 4 RGA2(XLRR-inv1/XLRR-inv2)对 21 个品种的聚类
 Fig. 4. Dendrogram of the 21 tested rice varieties based on RGA2-PCR.

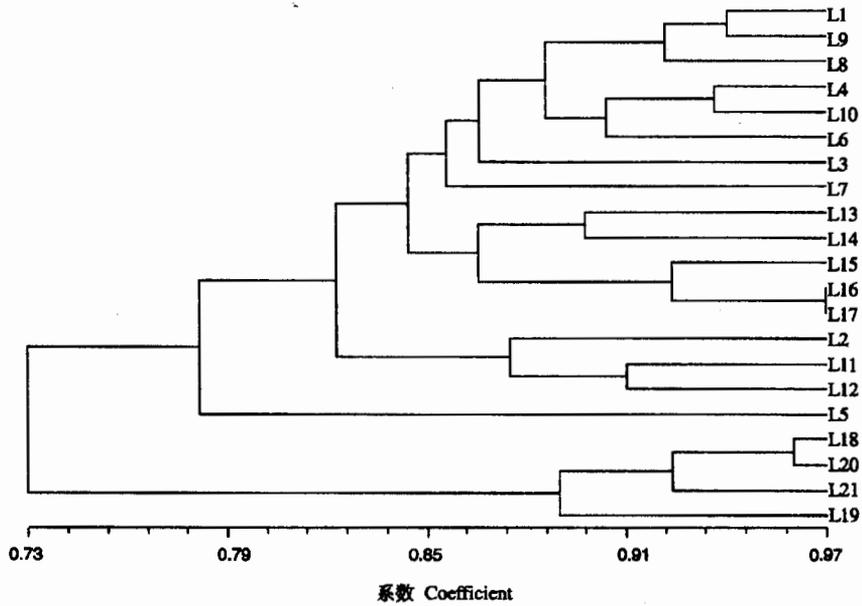


图 5 RGA3(NLRR-for/NLRR-rev)对 21 个品种的聚类
 Fig. 5. Dendrogram of the 21 tested rice varieties based on RGA3-PCR.

提高品种抗瘟性表型与抗性基因同源序列相似性关系吻合性。相对而言,抗谱广、抗性稳定或具持久抗瘟性的品种,用 RGA-PCR 法,能较好地聚在对应一类中,如 Moroberecan(L5)、湘资 3150(L6)、IR156(L7)、株两优 02(L8)、ZR02(L10)和 Tetep(L15)。

2.5 品种抗性遗传的多样性和宗亲关系

从表 3 和表 4 可以看出,品种 RGA-PCR 扩增的谱带十分丰富。同时,品种之间的带型没有完全相同的。说明这些供试品种在抗性遗传上互有一定程度的差异,表现出抗性遗传的多样性。从品种对

稻瘟病菌群体的抗性表型而言,可以表现出质的差异和量的差异;而就品种的抗性基因同源序列相似性而言,它在一定程度上反映了控制抗病性基因在结构和组成上的相似和差异。从品种 RGA 的 DNA 指纹多态性到抗性遗传表型的多样性,这种联系在群体遗传学上还未显示对应的关系。

6 对 RGA 引物聚类图(图 6)比较清楚地反映出,亲缘关系近的能较好地聚在一类或相似程度高,如株两优 02(L8)的亲本是株 1S(♀,L9)和 ZR02(♂,L10),C101A51(*Pi-2*)(L11)、C101LAC(*Pi-1*)(L12)、C101PKT(*Pi-4*)(L13)、C104PKT(*Pi-3*)(L14)为 CO39 遗传背景下的近等基因系。因此,用 RGA-PCR 进行聚类分析,除了反映出抗性基因同源序列相似性外,也在一定程度上体现出品种的亲缘关系。

3 讨论

3.1 RGA 引物的选择和数量

本研究结果表明,就水稻稻瘟病抗性基因同源序列相似性研究而言,引物 RGA1、RGA2 和 RGA3 较合适,其余引物较差(同一品种用不同评价方法,被分在不同类别)。这种不太适合的原因,一是可能不同物种的抗病基因同源序列的结构域存在差异;二是即使 LRR 结构域是大多数已知抗病基因编码的抗病蛋白中的特征结构域^[3~9],但在其他蛋白中同样存在 LRR 结构域,这些存在 LRR 结构域的其他蛋白可能并不与抗稻瘟病性有关;三是可能与品

种的抗菌谱差异有关。本研究显示,通过用尽可能多的且来自同一物种的抗性基因设计的引物进行扩增,可提高抗性分类的可靠性。由此看来,对于特定的作物病害抗性分类,应尽可能筛选来自同一作物抗性基因设计的 RGA 引物,且多态性条带数要多;引物的数量最好在 5 对以上,这样对靶标作物进行抗性评价或其他方面的研究较为合适。

3.2 RGA-PCR 与抗性表型

用 RGA-PCR 技术获得目标品种抗性基因同源序列相似性的信息,在品种抗性表型或 RGA 引物与某特定作物病害抗性关系不明确的情况下,是不知道品种属何种抗性类型的,由此而获得的信息没有实际应用价值。本研究把供试 21 个品种按抗瘟性表型(叶瘟严重度)和用 RGAs-PCR 的方法进行聚类分析,虽然没有显示出类与类之间的一一对应关系,但一些具持久抗性或广谱抗性的品种较好地聚集在一类。若利用已知持久抗瘟性品种作对照,选用适当的 RGA 引物,筛选优良持久或广谱抗瘟性资源,可能是一种快速的方法。

3.3 有待解决的问题

从抗病基因到抗性表型,这是一个十分复杂的过程,既涉及到品种抗性基因的本身,也触及到病原菌的无毒基因与环境因素的互作。因此,RGA-PCR 划分出的类别与遗传表型存在一定的差异。也许,在了解更多的稻瘟病抗性基因结构的情况下,通过设计新的引物,并与抗性表型分析的方法相结合,这个问题就能较好地解决。

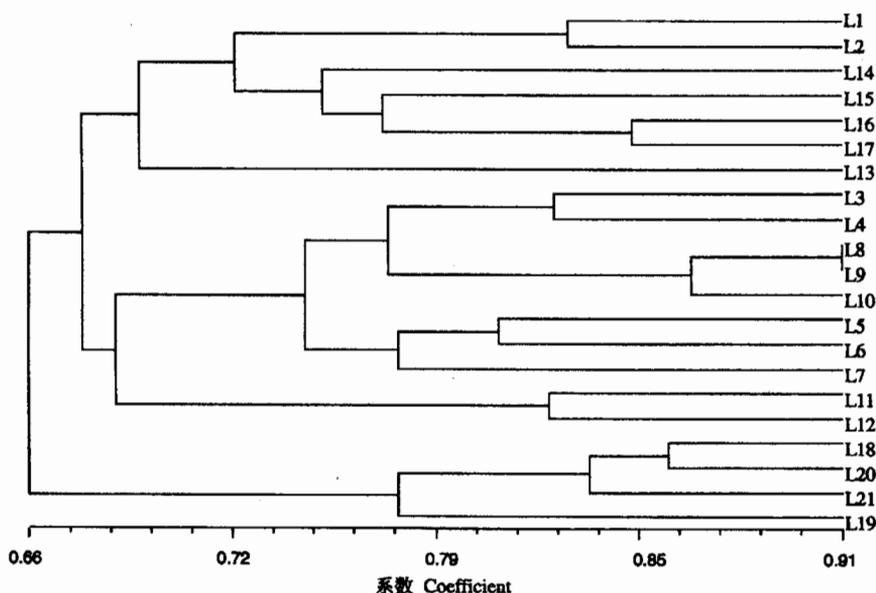


图 6 6 对 RGAs 对 21 个品种的聚类

Fig. 6. Dendrogram of the 21 tested rice varieties based on 6 pairs of RGAs-PCR.

参考文献:

- 1 Balhadere V P, Talbot N J. Fungal pathogenicity-establishing infection. In: Dickson M, Beynon J. *Molecular Plant Pathology*. Sheffield: Sheffield Academic Press, 2000. 1—25.
- 2 Valent B. Rice blast as a model system for plant pathology. *Phytopathology*, 1990, 80:33—36.
- 3 Maleki L, Faris J D, Bowden R L. Physical and genetic mapping of wheat kinase analogs and NBS-LRR resistance gene analogs. *Crop Sci*, 2003, 43: 660—670.
- 4 Kanazin V, Marek L F, Shoemaker R C. Resistance gene analogs are conserved and clustered in soybean. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, 93: 11746—11750.
- 5 Leister D, Ballvora A, Salamini F, *et al.* A PCR-based approach for isolating pathogen resistance genes from potato with potential for wide application in plants. *Nat Genet*, 1996, 14: 421—429.
- 6 Yu Y G, Buss G R, Saghai-Marooif M A. Isolation of a superfamily of candidate disease-resistance genes in soybean based on a conserved nucleotide-binding site. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, 93: 11751—11756.
- 7 Ramalingam J, Vera Cruz C M, Kukreja K, *et al.* Candidate resistance genes from rice, barley, and maize and their association with qualitative and quantitative resistance in rice. *MPMI*, 2003, 16 (1):14—24.
- 8 Mago R, Nair S, Mohan M. Resistance gene analogue from rice: cloning, sequencing and mapping. *Theor Appl Genet*, 1999, 99: 50—57.
- 9 Ilag L L, Yadav R C, Huang N, *et al.* Isolation and characterization of disease resistance gene homologues from rice cultivar IR64. *Gene*, 2000, 255:245—255.
- 10 Zhuang J Y, Ma W B, Wu J L, *et al.* Mapping of leaf and neck blast resistance genes with resistance gene analog, RAPD and RFLP in rice. *Euphytica*, 2002, 128:363—370.
- 11 范静华,汪安云,陈建斌,等. 水稻品种与稻瘟病分子指纹聚类分析初探. *中国农业大学学报*, 1998, 3(增刊):6—11.
- 12 农业部农作物病虫害测报站. GB/T 15790-1995 稻瘟病测报调查规范. 北京:中华人民共和国国家标准. 1996. 1—13.
- 13 刘二明,张志飞,罗峰. 湖南稻瘟病菌群体遗传多样性研究. *湖南农业大学学报(自然科学版)*, 2002, 28(5):391—394.
- 14 Chen D H, Zeigler R S, Leung H, *et al.* Population structure of *Pyricularia grisea* at two screening sites in the Philippines. *Phytopathology*, 1995, 85: 1011—1020.