

544 份水稻种质稻瘟病抗性鉴定及抗性基因的分布研究

李刚¹ 袁彩勇^{1*} 曹奎荣² 孙祥良² 李军² 王健¹ 程保山¹
罗伯祥¹ 徐卫军¹ 唐九友³ 储成才³

(1. 江苏徐淮地区淮阴农业科学研究所/淮安市农业生物技术重点实验室, 江苏 淮安 223001;
2. 嘉兴市农业科学研究院(所), 浙江 嘉兴 314016;
3. 中国科学院遗传与发育生物学研究所/植物基因组学国家重点实验室, 北京 100101)

摘要 采用苗期喷雾接种鉴定方法并结合 10 个主效抗性基因的特异性分子标记检测, 分析 544 份水稻种质资源的稻瘟病抗性水平及其携带的抗性基因分布情况。结果表明: 稻瘟病抗性水平达高抗、抗、中抗、中感、感及高感的材料分别为 25、50、78、152、156 和 83 份; 10 个分子标记对应的抗病基因在供试材料中均被检测到, 含有 2 和 3 个抗性基因的材料分别为 4 和 17 份(占 0.7% 和 3.1%), 476 份材料含有 4~6 个抗性基因(占 87.5%), 47 份材料含有 7 个抗性基因(占 8.6%); 品种抗病反应与其抗病基因种类密切相关, *Pi5*、*Pita*、*Pi9*、*Pib* 等 4 个基因对 6 个强致病鉴定小种抗性表现较好。隆粳 968、秀水 134、嘉 58、津稻 263、淮稻 20 号、盐稻 10 号、谷梅 4 号等品种含有多个主效抗病基因, 连续多年达到高抗水平。利用分子标记辅助选择将不同来源的主效抗病基因聚合到同一品种中, 是控制该病害最经济有效的途径。

关键词 稻瘟病; 抗性基因; 分子标记; 基因聚合

中图分类号 S326 文章编号 1007-4333(2018)05-0022-07 文献标志码 A

Evaluation and distribution of the blast resistance genes of 544 rice materials

LI Gang¹, YUAN Caiyong^{1*}, CAO Kuirong², SUN Xiangliang², LI Jun², WANG Jian¹,
CHENG Baoshan¹, LUO Boxiang¹, XU Weijun¹, TANG Jiuyou³, CHU Chengcai³

(1. Huaiyin Institute of Agricultural Sciences in Xuhuai Region of Jiangsu/
Huai'an Key Laboratory of Agricultural Biotechnology, Huai'an 223001, China;
2. Jiaxing Academy of Agricultural Sciences, Jiaxing 314016, China;
3. Institute of Genetics and Developmental Biology/State Key Laboratory of Plant Genomics,
Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China)

Abstract A total of 544 rice materials were assessed for blast resistance and resistance genes distribution by inoculation and screening of molecular markers tightly linked to 10 major resistance genes. Among the 544 materials, 25, 50, 78, 152, 156 and 83 exhibited high resistance, resistance, moderate resistance, moderate susceptibility, susceptibility and high susceptibility, respectively. Ten resistance genes corresponding to markers were found in these materials; Two and three resistance genes were found in 4 and 17 materials (0.7% and 3.1%); Four to six resistance genes were found in 476 materials (87.5%); Seven resistance genes were found in 47 materials (8.6%). The resistance of all rice materials was significantly associated with resistance genes. *Pi5*, *Pita*, *Pi9* and *Pib* exhibited high resistance to 6 physiological races. The majority of resistance genes were found in Longjing 968, Xiushui 134, Jia 58, Jindao 263, Huaidao 20, Yandao 10 and Gumei 4. Pyramiding different resistance genes in rice by marker-assisted

收稿日期: 2017-08-12

基金项目: 国家重点研发计划“七大作物育种”重点专项(2017YFD0100400); 中国科学院战略性先导科技专项(XDA08010401);
淮安市应用研究与科技攻关(农业)计划(HAN2015008、HAN201613); 浙江省科技计划项目(2016C32104)

第一作者: 李刚, 助理研究员, 主要从事水稻遗传育种研究, E-mail: gansuligang@126.com

通讯作者: 袁彩勇, 研究员, 主要从事水稻遗传育种研究, E-mail: hysdygy@163.com

selection was suggested as the most economical, effective, and environment friendly measure for controlling rice blast disease in this study.

Keywords rice blast; resistance genes; molecular markers; gene pyramiding

水稻(*Oryza sativa*)是世界上最重要的粮食作物之一。由稻瘟病菌(*Magnaporthe grisea* Barr.)引起的稻瘟病分布广、破坏性强,是世界上一种最具毁灭性的水稻病害^[1]。1975—1990年以来,由稻瘟病引起的全球水稻产量损失高达1.57亿t^[2]。在我国稻瘟病损失达数亿公斤^[3]。生产实践证明,用化学农药防治稻瘟病,不仅破坏了农田生态环境,而且对人体健康造成危害。因此,利用抗病基因培育抗性品种是防治水稻稻瘟病最经济、有效、环保的手段^[4,5]。常规育种方法主要依赖于育种家的经验和表型数据分析,存在着育种周期长、选择效率低、准确性差等缺点^[6]。近年来,随着分子生物学技术的迅速发展,多个抗稻瘟病基因得到定位和克隆,开发出了一批与其紧密连锁的分子标记,为快速、准确地鉴定水稻资源抗稻瘟病基因型提供了极大的便利^[7]。

本课题组在多年的水稻育种工作中积累了一批优异种质资源,其中包括近年来审定的主推品种、农家品种及育种中间材料。然而,对这些材料的稻瘟病抗性水平和抗病基因分布状况尚不完全清楚。本研究拟采用温室人工喷雾接种法对这些种质资源进行稻瘟病抗性鉴定,并利用分子标记对其抗性基因分布状况和遗传背景进行分析,以期筛选出抗病性强的主导品种和优异抗源材料,为农技推广和抗病育种工作提供理论依据和重要抗病资源。

1 材料与方法

1.1 材料和菌株

材料为本课题组历年收集而来的544份水稻种质资源,包括:从江苏省农科院种质资源库引进24份;通过国家和各省审定的水稻品种85份,以及历年来参加区试的优秀品系和自家中间材料435份。利用在全省范围内采集并分离到的6个优势菌株(ZB₉、ZC₁₁、ZD₅、ZE₃、ZF、ZG₁)对供试材料进行人工接种鉴定,以丽江黑谷新团(LTH)为感病对照。

1.2 试验方法

1.2.1 稻瘟病抗性鉴定

将鉴定菌株分别移植于RCA(玉米粉40g、稻秆50g、琼脂20g)培养基上,在25~27℃条件下培养5~7d,待菌丝长满后,用灭菌的棉签擦掉气生菌

丝后保湿培养。待稻瘟病菌产生大量孢子后,用无菌水清洗、过滤至三角瓶中,配制孢子悬液(浓度为120倍显微镜视野下有20个左右孢子),并按相同浓度比例混合6个菌株悬液。

将供试材料用抗菌素402浸种3d后,用清水冲洗催芽1~2d,播种于育秧盘内,每品种播15~20粒。待秧苗长至3叶1心时,用稻瘟病菌孢子混合悬液对试验材料进行喷雾接种。接种后24h,用塑料薄膜覆于拱形支架上保湿,并用遮阳网防止阳光直射。接种后10d参照国际统一标准调查发病情况:0级为高抗(HR)、1级为抗病(R)、3级为中抗(MR)、5级为中感(MS)、7级为感病(S)、9级为高感(HS)。所有材料连续鉴定两年,根据两年的抗性表现进行综合评价。

1.2.2 水稻DNA提取及PCR检测

采用改良的CTAB法进行水稻基因组DNA提取^[8],并保存于-20℃备用。选用与10个抗病基因紧密连锁的引物进行PCR扩增反应,引物序列由上海生工生物工程有限公司合成(表1)。PCR反应体系总体积20μL,包括10μL 2×Taq PCR MasterMix,1μL模板DNA,正、反向引物各1μL,7μL ddH₂O。PCR反应程序为:94℃预变性5min;94℃变性45s,45~60℃(视不同引物而定)退火45s,72℃延伸1min,34个循环;72℃延伸8min,4℃保存。8μL扩增产物与1μL Loading buffer混合后,在3%琼脂糖凝胶上电泳,在凝胶成像系统中拍照。

1.3 数据分析

试验选用10对SSR引物检测抗感基因,依据标记对应抗性基因片段的大小,参照Marker对扩增条带赋值,判断每份材料中10个基因的有无,同时结合抗性反应进行相关性分析。

2 结果与分析

2.1 材料抗稻瘟病表型评价

对供试材料连续两年的抗性综合评价结果表明,高抗(HR)、抗(R)、中抗(MR)、中感(MS)、感(S)及高感(HS)材料分别为25、50、78、152、156和83份(表2)。供试材料的抗性水平在年际间表现基本一致,试验重复性较好。

表 1 抗性基因的分子标记信息

Table 1 List of the molecular markers of resistant genes

抗性基因 Resistant gene	对应标记 Corresponding marker	序列(5'-3') Sequence (5'-3')	扩增多态性 Amplified Fragment Polymorphism	基因片段/bp Fragment of gene	退火温度/℃ Annealing temperature	文献 Reference
<i>Pi2</i>	AP22F	gtgcatgagtccagctcaaa	2	143	55	[9]
	AP22R	gtgtactcccctggctgctc				
<i>Pi5</i>	M-Pi5F	atagatcatgcgccctettg	2	484	55	[10]
	M-Pi5R	tcatacccattcggtcatt				
<i>Pi9</i>	M-Pi9F	gctgtgctccaaatgaggat	2	291	55	[11]
	M-Pi9R	gcgatctcacatcctttgct				
<i>Pia</i>	Pi-aF	gcgactgacactttcaatagc	2	189	55	[12]
	Pi-aR	cggtagagcaatttagaagcag				
<i>Pib</i>	PibdomF	gaacaatgcccaacttgaga	2	350	60	[13]
	PibdomR	gggtccacatgtcagtgagc				
<i>Pita</i>	YL155F	agcaggttataagctaggcc	2	1 042	55	[14]
	YL155R	ctaccaacaagttcatcaaa				
<i>Pid2</i>	RM527F	ggctcgatctagaaaatccg	1	233	55	[15]
	RM527R	ttgcacaggttgcatagag				
<i>Pik</i>	RM1233F	ttcgtttctctggttagtg	2	176	55	[16]
	RM1233R	attggtcctgaagaagg				
<i>Pigm</i>	RB-2GF	atgctcgattcgttacattt	3	236	55	[17]
	RB-2GR	cgagtgcttttatagcgaat				
<i>Pish</i>	RM6648F	gatcgatcatggccagagag	3	207	55	[18]
	RM6648R	acagcaggttgatgaggacc				

表 2 供试材料稻瘟病抗性评价

Table 2 Blast resistance evaluation of the tested rice materials

病级 Disease scale	抗性评定 Resistance assessment	材料数目 No. of tested materials			合计 Total
		审定品种 Approved material	种质库保存资源 Germplasm conservation material	品系及中间材料 Strain and intermediate material	
0	高抗 HR	5	2	18	25
1	抗病 R	9	4	37	50
3	中抗 MR	13	0	65	78
5	中感 MS	25	9	118	152
7	感病 S	21	8	127	156
9	高感 HS	12	1	70	83
总计 Total		85	24	435	544

2.2 基于抗性标记的抗性基因分析

利用 10 个抗性基因的特异性分子标记对供试材料进行检测(表 3、图 1)。结果表明,544 份材料中包含了 10 个标记对应的全部抗性基因,其中 476 份材料含有 4~6 个抗性基因,占总数的 87.5%;含有 2 个

和 3 个抗性基因的材料分别为 4 和 17 份(占 0.7%和 3.1%);准稻 18 号、泗稻 785、盐粳 13 号、谷梅 4 号、宁 4722、HCF47 等 47 个品种(系)含有 7 个抗性基因(占 8.6%)。携带有 *Pi5*、*Pita*、*Pi9*、*Pik*、*Pib*、*Pi2*、*Pia*、*Pid2*、*Pish*、*Pigm* 基因的材料依次为 115 个

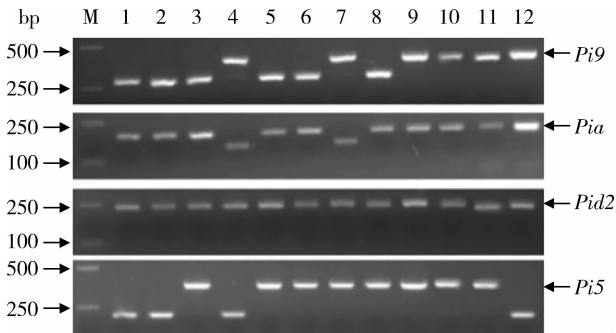
(21.1%)、200 个 (36.8%)、274 个 (50.4%)、447 个 (82.2%)、345 个 (63.4%)、442 个 (81.3%)、455 个 (83.6%)、532 个 (97.8%)、13 个 (2.4%)、1 个

(0.2%)。*Pid2* 基因在大部分粳稻品种(系)中被检测到,而大部分籼稻品种(系)携带 *Pish* 基因,近期被克隆的广谱抗病基因 *Pigm* 仅在谷梅 4 号中检测到。

表 3 供试材料抗性基因数与抗性反应的相关性

Table 3 Correlation between the number of resistant genes and disease reactions of the test materials

抗性基因数 No. of resistant gene	抗性表现 Resistant performance of the test materials						合计 Total
	HR	R	MR	MS	S	HS	
2		2				2	4
3	1	1	3	4	6	2	17
4	4	4	14	35	21	13	91
5	12	28	34	64	67	36	241
6	7	12	15	33	52	25	144
7	1	5	10	16	10	5	47



M:DL2000 DNA ladder marker, 1~12:徐稻 3 号,连梗 7 号,淮稻 5 号,盐稻 10 号,南梗 9108,宁梗 5 号,镇稻 14 号,武运梗 27,泗稻 785,扬梗 113

M,DL2000 DNA ladder marker; 1~12, Xudao 3, Lianjing 7, Huaidao 5, Yandao 10, Nanjing 9108, Ningjing 5, Zhendao 14, Wuyunjing 27, Sidao 785, Yangjing 113

图 1 部分材料抗病基因引物多态性

Fig. 1 Polymorphism of 12 materials by the molecular markers of resistant genes

2.3 抗性基因分布和抗性反应相关性分析

选择抗性达到抗病以上和高感的水稻品种,分析其抗病基因数量与抗性反应之间的相关性(表 4)。不同材料的抗性水平差异较大,隆梗 968、秀水 134、嘉 58、谷梅 4 号、津稻 263、红糯、贵州 R1、保丰 13296、盐稻 1076、镇 241 等 25 个品种(系)在年际间均达到高抗水平(HR);83 份材料表现为高感(HS),其中一些品种还入选国家、省市主推名录,

如新稻 22、南梗 44、南梗 46、连梗 9 号、华梗 5 号、淮稻 8 号、淮稻 11 号、淮稻 13 号、武运梗 23、武运梗 24、宁梗 5 号、常农梗 5 号、嘉花 1 号等,这些品种在稻瘟病重发区种植风险较大(表 4)。结果表明:水稻品种对稻瘟病的抗性水平与其所携带抗性基因数量并不完全相关;II-32B、IR24、润农 4 号三个品种仅含有 2~3 个抗性基因,但均达到抗病水平(R),推测这三个品种可能携带有其他主效抗病基因;*Pik*、*Pi2*、*Pia*、*Pid2* 等基因在抗、感群体中均匀分布,这些基因对鉴定小种的抗性反应并不显著;水稻品种含有 *Pi5*、*Pita*、*Pi9*、*Pib* 中的单个基因时,其多数品种抗性表现较差;当 2 个或多个基因组合出现时,其抗性水平较高(除南梗 44 和武运梗 24 外,其余为高抗和抗病)。

3 讨论与结论

稻瘟病又名稻热病,俗称火烧瘟、麻叶子、叩头瘟等,是目前水稻生产上的最主要病害之一。病菌以无性态的分生孢子和菌丝体在稻草和稻谷上越冬,翌年产生的分生孢子借风雨传播到稻株上,萌发后侵入寄主,向邻近细胞扩展发病,形成中心病株。病部形成的分生孢子,借风雨传播进行再侵染。稻瘟病可在水稻的各个生育期发生,按照发病部位的不同,可分为苗瘟、叶瘟、叶枕瘟、穗瘟、节瘟、谷粒瘟等类型,其中以叶瘟和穗瘟的危害最大^[19]。实践证

表4 供试抗/感病品种携带抗性基因的分布情况

Table 4 Distribution of resistance genes in resistant and sensitive rice materials

材料名称 Material	抗性水平 Resistance level	抗稻瘟病基因分布 Distribution of blast resistance genes										抗性基因数量 No. of resistance gene
		<i>Pi5</i>	<i>Pita</i>	<i>Pi9</i>	<i>Pib</i>	<i>Pik</i>	<i>Pi2</i>	<i>Pia</i>	<i>Pid2</i>	<i>Pish</i>	<i>Pigm</i>	
		隆粳 968	HR	—	—	+	+	+	—	+	+	
谷梅 4 号	HR	+	+	+	+	—	+	—	—	+	+	7
嘉 58	HR	—	—	+	+	+	—	—	+	—	—	4
秀水 134	HR	—	+	+	+	+	—	+	+	—	—	6
津稻 263	HR	+	+	—	—	+	+	+	+	—	—	6
红糯	HR	—	—	+	—	+	+	+	+	—	—	5
贵州 R1	HR	+	—	+	—	—	+	+	—	+	—	5
淮稻 5 号	R	—	+	—	+	—	+	+	+	—	—	5
淮稻 14 号	R	—	+	—	+	—	+	+	+	—	—	5
泗稻 12	R	—	+	—	+	—	+	+	+	—	—	5
南粳 5055	R	—	+	—	+	+	+	+	+	—	—	6
淮稻 20 号	R	+	+	—	+	+	—	+	+	—	—	6
扬粳 239	R	—	—	—	+	+	+	+	+	—	—	5
盐稻 10 号	R	+	—	+	+	—	+	—	+	—	—	5
润农 4 号	R	—	—	—	—	—	+	—	+	—	—	2
II—32B	R	—	—	+	—	—	—	—	—	+	—	2
IR24	R	—	—	+	—	+	+	—	—	+	—	3
贵州 R2	R	+	—	+	—	—	+	+	—	+	—	4
贵州 R3	R	+	—	+	—	—	+	+	—	+	—	4
贵州 R4	R	+	—	+	—	—	+	+	—	+	—	4
常农粳 5 号	HS	—	+	—	—	+	+	+	+	—	—	5
新稻 22	HS	—	+	—	—	+	+	+	+	—	—	5
南粳 46	HS	—	+	—	—	+	+	+	+	—	—	5
连粳 9 号	HS	+	—	—	—	+	+	+	+	—	—	5
华粳 5 号	HS	—	—	—	+	+	+	+	+	—	—	5
淮稻 8 号	HS	—	—	—	—	+	+	+	+	—	—	4
淮稻 11 号	HS	—	—	—	—	+	+	+	+	—	—	4
南粳 44	HS	—	+	+	+	—	+	+	+	—	—	6
武运粳 23	HS	—	—	—	+	—	+	+	+	—	—	4
宁粳 5 号	HS	—	+	—	—	+	+	+	+	—	—	5
淮稻 13 号	HS	—	—	—	—	+	+	+	+	—	—	4
武运粳 24	HS	—	—	+	+	—	+	+	+	—	—	5
燕子糯	HS	—	—	+	—	+	+	—	+	—	—	4

明,控制水稻稻瘟病最经济有效的手段就是选育和利用抗病品种^[20]。近年来,我国各级种子品审和管理部门对参试水稻品系的稻瘟病抗性严格把控,坚决淘汰感病品种(系),使得新审定品种均能达到中抗以上水平。但由于稻瘟病生理小种多、变化速度快、致病力差异大等原因,新品种在推广种植 3~5 年后,抗性就会逐渐丧失^[4]。本研究利用 6 个强致病鉴定小种对 85 个审定品种进行稻瘟病抗性鉴定,仅 5 个品种达到高抗水平(隆粳 968、秀水 134、嘉 58、谷梅 4 号、津稻 263),抗病品种 9 个(淮稻 5 号、淮稻 14 号、南粳 5055、泗稻 12 号、盐稻 10 号、淮稻 20 号、润农 4 号、扬粳 239、II-32B),感病品种 58 个(占 68.2%)。农技部门在遴选主导品种时,应结合最新的鉴定结果,重点推广农艺性状较好的中-高抗稻瘟病水稻品种。

水稻中存在着一类编码 NBS-LRR 蛋白(Nucleotide-binding site-leucine rich repeats)的主效抗稻瘟病基因,这类抗病基因介导的抗性表现强烈,传统意义上称之为垂直抗性^[21]。在育种应用上,抗性基因可操作性强、效果明显,因此开展主效抗性基因的鉴定及其应用研究较多^[22-27]。随着抗性基因数量的增加,供试材料的抗病性呈上升趋势^[5-7,21]。本研究发现,品种抗病性与其抗病基因种类密切相关,不同的抗病基因针对不同生理小种产生抗性反应。鉴定的 10 个主要抗病基因中,*Pi5*、*Pita*、*Pi9*、*Pib* 4 个基因对 6 个强致病鉴定小种抵抗力较强,其余基因在抗感材料中均匀分布。II-32B 和润农 4 号仅含有 2 个抗稻瘟病基因,抗性达到抗病(R)水平;南粳 46、淮稻 11 号、武运粳 24 等品种均含有多个抗性基因(4~7 个),却高感稻瘟病。因此,在选择抗病亲本时,须针对同一生态区域内的生理小种,鉴定对其抵抗力较强的基因类型,在育种过程中聚合其中 2 个或多个抗病基因,才能提高水稻品种的稻瘟病抗性水平。

本研究发现:隆粳 968、秀水 134、嘉 58、津稻 263、淮稻 20 号、盐稻 10 号等品种携带有多个主效抗性基因,且连续多年稻瘟病抗性鉴定表现好、农艺性状优良;谷梅 4 号携带有广谱抗性基因 *Pigm*,在连续多年的抗性鉴定均达到高抗水平。选择这些品种作为亲本进行配组,分子标记辅助技术与常规育种手段相结合,为育成多个主效基因聚合的水稻新品种对于控制病害具有重要意义。同时,应进一步发掘并精细定位新的主效抗稻瘟病基因,通过改良

使其快速成为水稻抗病育种的骨干亲本,为选育具有广谱高抗多抗的水稻新品种奠定基础。

参考文献 References

- [1] 黄富,刘成元,谢戎,叶华智. 水稻种质资源抗稻瘟病及其恢保持性评价[J]. 中国农业科学, 2005, 38(4): 831-836
Huang F, Liu C Y, Xie R, Ye H Z. Evaluation of blast resistance and restoring or remaining characteristics of rice germplasm resources[J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2005, 38(4): 831-836 (in Chinese)
- [2] Baker B, Zambryski P, Staskawicz B, Dinesh S P. Signaling in plant-microbe interactions[J]. *Science*, 1997, 276: 726-733
- [3] Zeigler R S, Leong S A, Teng P S. *Rice Blast Disease* [M]. Oxon: CAB International, 1994: 321-331
- [4] 沈瑛,朱培良,袁筱萍,Levy M,Decker M,Talbot N,Hamer J E. 中国稻瘟病菌的遗传多样性[J]. 植物病理学报, 1993, 23(4): 309-313
Shen Y, Zhu P L, Yuan X P, Levy M, Decker M, Talbot N, Hamer J E. Genetic diversity of rice blast fungus in China[J]. *Acta Phytopathologica Sinica*, 1993, 23(4): 309-313 (in Chinese)
- [5] 吴建利,庄杰云,李德薇,郑康乐. 水稻对稻瘟病抗性的分子生物学研究进展[J]. 中国水稻科学, 1999, 13(2): 123-128
Wu J L, Zhuang J Y, Li D B, Zheng K L. Progress on rice molecular biology of resistance to blast fungus[J]. *Chinese Journal of Rice Science*, 1999, 13(2): 123-128 (in Chinese)
- [6] 田大刚,苏军,陈建民,胡昌泉,陈在杰,王锋. 1092 份水稻材料稻瘟病抗性鉴定及抗性标记分析[J]. 分子植物育种, 2012, 10(2): 214-221
Tian D G, Su J, Chen J M, Hu C Q, Chen Z J, Wang F. Evaluation of blast resistance and analysis of resistance markers of 1 092 rice materials[J]. *Molecular Plant Breeding*, 2012, 10(2): 214-221 (in Chinese)
- [7] 谢倩凤,郭建夫,杨仕华,陈志雄,程本义,黄永相,李伟. 82 份水稻种质资源的稻瘟病抗性评价与抗性基因鉴定[J]. 广东农业科学, 2015, 14: 9
Xie Q F, Guo J F, Yang S H, Chen Z X, Cheng B Y, Huang Y X, Li W. Evaluation of blast resistance spectrum and identification of resistance genes in 82 rice germplasm resources[J]. *Guangdong Agricultural Sciences*, 2015, 14: 9 (in Chinese)
- [8] 邱福林,王和和,陈洁,庄杰云,Hei L,程式华,吴建利. 利用水稻突变体大量筛选的 DNA 微量快速提取法[J]. 中国水稻科学, 2006, 20(3): 329-332
Qiu F L, Wang H H, Chen J, Zhuang J Y, Hei L, Cheng S H, Wu J L. A rapid DNA mini-prep extraction method for large-scale rice mutant screening [J]. *Chinese Journal of Rice Science*, 2006, 20(3): 329-332 (in Chinese)
- [9] Jiang J S, Wang S P. Identification of a 118 kb DNA fragment containing the locus of blast resistance gene *Pi2(t)* in rice[J]. *Molecular Genetics and Genomics*, 2008, 268(2): 249-252

- [10] 王宁. *Pi5* 基因的分子标记辅助选育及转甘薯储藏蛋白基因的抗稻瘟病水稻新材料培育[D]. 杭州:浙江大学,2012
Wang N. Development of the blast-resistant rice by molecular marker-assisted selection of the *Pi5* gene and genetic transformation of the sporamin gene[D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2012 (in Chinese)
- [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 a member of a multigene family in rice[J]. *Genetics*, 2006, 172(3):1901-1914
- [12] 曾晓珊, 杨先锋, 赵正洪, 林菲, 王玲, 潘庆华. 稻瘟病抗病基因 *Pia* 的抗性分析及精细定位[J]. 中国科学: 生命科学, 2011, 41(1):70-77
Zeng X S, Yang X F, Zhao Z H, Lin F, Wang L, Pan Q H. Characterization and fine mapping of rice blast resistance gene *Pia*[J]. *Science China: Life Sciences*, 2011, 41(1):70-77 (in Chinese)
- [13] 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[J]. 植物遗传资源学报, 2009, 10(1):21-26
Shi K, Lei C L, Cheng Z J, Xu X T, Wang J L, Wan J M. Distribution of two blast resistance genes *Pita* and *Pib* in major rice cultivars in China [J]. *Journal of Plant Genetic Resources*, 2009, 10(1):21-26(in Chinese)
- [14] 王忠华, 贾育林, 吴殿星, 夏英武. 水稻抗稻瘟病基因 *Pita* 的分子标记辅助选择[J]. 作物学报, 2004, 30(12):1259-1265
Wang Z H, Jia Y L, Wu D X, Xia Y W. Molecular markers assisted selection of the rice blast resistance gene *Pita*[J]. *Acta Agronomica Sinica*, 2004, 3(12):1259-1265 (in Chinese)
- [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]. *Journal of Phytopathology*, 2004, 152(2):77-85
- [16] 杨小林. 湖北省稻瘟病重发区病菌群体致病性分化性及水稻抗稻瘟基因的分析[D]. 武汉:华中农业大学,2012
Yang X L. Population of *Magnaporthe grisea* (Hebert) barr in rice blast epidemic areas of Hubei Province and genetic analysis of resistance gene to rice blast [D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2012 (in Chinese)
- [17] 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[J]. *Theoretical and Applied Genetics*, 2006, 113(4):705-713
- [18] Akira T, Nagao H, Akio M, Hirohiko H. Unique features of the rice blast resistance *Pish* locus revealed by large scale retrotransposon tagging BMC[J]. *Plant Biology*, 2010, 10:175
- [19] 涂军明, 陈仕哲, 吕锐玲. 分子标记辅助选择技术在水稻稻瘟病抗性改良中的应用[J]. 江西农业学报, 2012, 24(10):55-58
Tu J M, Chen S Z, Lv R L. Application of molecular marker-assisted selection in rice blast resistance improvement[J]. *Acta Agriculturae Jiangxi*, 2012, 24(10):55-58 (in Chinese)
- [20] 朱金燕, 王军, 范方军, 李文奇, 王芳权, 仲维功, 杨杰. 水稻稻瘟病广谱抗病新等位基因 *pi21t* 的鉴定及其抗性应用[J]. 华北农学报, 2014, 29(6):11-15
Zhu J Y, Wang J, Fan F J, Li W Q, Wang F Q, Zhong W G, Yang J. Identification and application of one new rice blast broad-spectrum resistance allele *pi21t* [J]. *Acta Agriculturae Boreali-Sinica*, 2014, 29(6):11-15 (in Chinese)
- [21] 刘辉, 孟德龙, 查日扬, 徐大勇. 江苏水稻品种稻瘟病主效抗性基因鉴定及应用评价[J]. 福建农业学报, 2015, 30(5):452-458
Liu H, Meng D L, Zha R Y, Xu D Y. Identification and evaluation on blast resistance of rice varieties in Jiangsu[J]. *Fujian Journal of Agriculture Science*, 2015, 30(5):452-458 (in Chinese)
- [22] 陈能刚, 陈惠查, 阮仁超, 游俊梅. 水稻抗稻瘟病种质资源的研究进展[J]. 贵州农业科学, 2010, 38(12):7-10
Chen N G, Chen H C, Ruan R C, You J M. Research progress in blast resistant germplasm resources in rice [J]. *Guizhou Agricultural Sciences*, 2010, 38(12):7-10 (in Chinese)
- [23] 张磊, 张启军, 程兆榜, 杨豪, 周益军, 吕川根. 4套水稻稻瘟病鉴别品种对江苏地区主要稻瘟病菌株的抗性分析[J]. 江苏农业学报, 2010, 26(5):948-953
Zhang L, Zhang Q J, Cheng Z B, Yang H, Zhou Y J, Lv C G. Resistances of four sets of rice varieties to 19 strains of *Magnaporthe grisea* in Jiangsu area[J]. *Jiangsu Journal of Agriculture Science*, 2010, 26(5):948-953 (in Chinese)
- [24] 高汉亮, 颜群. 广西引种水稻抗稻瘟病鉴定[J]. 广西农学报, 2006, 21(4):17-19
Gao H L, Han Q. Identification of *anti-Magnaporthe grisea* in introduction of fine variety of rice in Guangxi[J]. *Journal of Guangxi Agriculture*, 2006, 21(4):17-19 (in Chinese)
- [25] 黄洪河, 郑家团, 郑常林. 近五年福建省省级审定水稻主要米质指标和稻瘟病抗性分析[J]. 中国稻米, 2004, (1):18-20
Huang H H, Zheng J T, Zheng C L. Analysis on the main quality index and the blast resistance of Fujian rice varieties nearly five years[J]. *China Rice*, 2004, (1):18-20 (in Chinese)
- [26] 张锦文, 谭亚玲, 洪汝科, 范静华, 罗琼, 曾千春. 高原梗稻子预44抗稻瘟病基因遗传分析和定位[J]. 中国水稻科学, 2009, 23(1):31-35
Zhang J W, Tan Y L, Hong R K, Fan J H, Luo Q, Zeng Q C. Genetic analysis and gene mapping of rice blast resistance in japonica variety Ziyu 44[J]. *Chinese Journal of Rice Science*, 2009, 23(1):31-35 (in Chinese)
- [27] 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[J]. *Euphytica*, 2002, 128(3):363-370