

天津野生稻稻瘟病抗性的遗传分析与抗瘟基因 *Pi2-1* 的初步定位

王悦^{1a,2}, 邓晓娟^{1a,2}, 江南^{1a,2}, 黄红梅^{1b}, 王丹^{1a,2}, 何峰^{1a,2}, 孙平勇^{1a,2}, 王国梁^{1a,2*}

(1.湖南农业大学 a.农学院;b.生物科学技术学院,湖南长沙 410128;2.作物基因工程湖南省重点实验室,湖南长沙 410128)

摘要:为了更好地揭示天津野生稻对稻瘟病抗性的遗传机理,以天津野生稻与感病品种 CO39 杂交构建的 F₂ 群体为研究对象,利用稻瘟病菌株 CHL1743、110-2 和 318-2 进行室内接种鉴定,F₂ 群体的抗感单株分离比符合 3:1,表明其对 3 个稻瘟病菌株的抗性均由 1 个主效基因控制,命名为 *Pi2-1*。利用群体分离分析法和隐性群体分离法进行初步定位分析,将 *Pi2-1* 基因定位在水稻第 6 号染色体着丝粒附近的 SSR 标记 AP5659-5 到 RM7213 之间,与 2 个标记的遗传距离分别为 0.9 cM 和 1.4 cM。

关键词:水稻;稻瘟病菌;抗性遗传;基因定位

中图分类号:S432.2+3 文献标志码:A 文章编号:1007-1032(2013)01-0040-06

Genetic analysis of the blast resistance in the wild rice species

Tianjinyeshengdao and preliminary mapping of the resistance gene *Pi2-1*

WANG Yue^{1a,2}, DENG Xiao-juan^{1a,2}, JIANG Nan^{1a,2}, HUANG Hong-mei^{1b}, WANG Dan^{1a,2}, HE Feng^{1a,2},
SUN Ping-yong^{1a,2}, WANG Guo-liang^{1a,2*}

(1.a. College of Agronomy; b. College of Bioscience and Biotechnology, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China; 2. Crop Gene Engineering Key Laboratory of Hunan Province, Changsha 410128, China)

Abstract: To better understand the genetic basis of blast resistance in the wild rice species Tianjinyeshengdao (TY), F₂ population from the cross between TY and the rice cultivar CO39 which is highly susceptible to blast was constructed and respectively inoculated with isolates CHL1743, 110-2 and 318-2 in the growth chamber. The results showed that the resistant and susceptible plants in F₂ population following inoculation fitted the ratio of 3:1, indicating the resistance to isolates CHL1743, 110-2 and 318-2 in TY was controlled by a single dominant gene which was named as *Pi2-1*. To preliminary determine the chromosomal location of blast resistance gene, bulked segregant analysis (BSA) and recessive-class analysis (RCA) were conducted. The results indicated that *Pi2-1* was located near the centromeric region of rice chromosome 6 and linked to the markers AP5659-5 and RM7213, with a distance of 0.9 cM and 1.4 cM, respectively.

Key words: rice; *Magnaporthe oryzae*; resistance inheritance; gene mapping

由稻瘟病菌(*Magnaporthe oryzae*)引起的稻瘟病是最严重的水稻病害之一^[1]。目前,主要采用化学防治和种植抗病品种相结合的方法防治稻瘟病,但化学药剂的使用不仅造成了环境的大面积污染,

也不断提高了水稻的生产成本,2000年,仅在日本,抗稻瘟病杀菌剂的销售额就达26亿日元(约2亿元人民币)^[2]。由于稻瘟病菌群体结构复杂、易变,含单个抗性基因的水稻新品种往往在种植3~5年后便

收稿日期:2012-10-12

基金项目:国家转基因重大专项(2011ZX08001-002);教育部创新团队发展计划项目(IRT1239);湖南省高校科技创新团队支持计划项目

作者简介:王悦(1985—),男,湖南岳阳人,博士研究生,主要从事作物分子育种研究, wangyue515@163.com; *通信作者, wang.620@osu.edu

容易丧失抗性,因此,发掘和定位更多新的抗性基因(QTLs),利用分子标记技术,将多个稻瘟病抗性基因(QTLs)聚合到高产的水稻品种中,培育出具有广谱持久抗性的水稻新品种,是防治稻瘟病最有效的措施。

稻瘟病抗性基因的遗传分析开始于 1922 年, Sasaki 等最早报道不同水稻品种对稻瘟病原菌的侵染存在差异,且其杂交后代对稻瘟病的抗感分离比率遵从孟德尔定律。随后, Kiyosawa 和 Ling 等^[3-5]也在稻瘟病抗性机制研究中做出了重要贡献。据统计,至少有 85 个主效抗瘟基因被鉴定和定位,其中,大多数抗性基因都集中在第 2、6、8、9、11、12 染色体上,特别是在第 6、11、12 号染色体上分布的基因最多,并且都有基因聚集现象^[6]。目前, *Pit*^[7]、*Pi37*^[8]、*Pish*^[9]、*Pib*^[10]、*pi21*^[11]、*Pi9*^[12]、*Pi2*^[13]、*Pizt*^[13]、*Pid2*^[14]、*Pid3*^[15]、*Pi25*^[16]、*Pi36*^[17]、*Pi5*^[18]、*Pikm*^[19]、*Pik*^[20]、*Pikp*^[21]、*Pbl*^[22]、*Pikh/Pi54*^[23]、*Pia*^[24]、*Pil*^[25]和 *Pita*^[26]等 21 个稻瘟病抗性基因被克隆,除了 *pi21* 是隐性基因,其余都是显性抗瘟基因^[27]。从已克隆的这些抗病基因特征来看,除了 *Pid2* 编码一种跨膜的丝氨酸/苏氨酸激酶和 *pi21* 编码一种与重金属结合的蛋白和富含脯氨酸的结构域以外,其余基因均编码有 NBS-LRR 蛋白结构^[11,14]。近年来,随着分子标记技术的快速发展,分子标记辅助育种的效率不断提高。Hayashi 等^[28]针对 *Pik*、*Piz*、*Pit*、*Pikm*、*Pita*、*Pizt* 和 *Pib* 等抗病基因开发了 InDel 和 SNP 等特异性标记,这些功能标记的开发,为分子标记辅助育种提供了更直接有效的工具。文婷等^[29]用分子标记 *Pi9-1* 对新育成的天龙香 103、香丰 187、明恢 63 等 8 个高代材料进行抗瘟基因 *Pi9* 检测,标记 *Pi9-1* 对抗稻瘟病表型选择的效率均为 100%。柳武革等^[30]利用分子标记技术,成功将不同的稻瘟病抗性基因 *Pil* 和 *Pi2* 聚合到水稻温敏核不育系 GD-7S 中,其后代品种均表现出抗谱增宽、抗性加强。天津野生稻(TY)是在对 38 000 份国内外不同的稻种资源进行稻瘟病抗性鉴定过程中,筛选出的具有广谱持久抗性的抗源材料^[31-32]。通过 SSR 等分子标记,鉴定 TY 的广谱抗瘟基因,对抗病育种十分必要。笔者利用 TY 与感病品种 CO39 杂交,构建 F₂ 群体,采用群体分离分析法和

隐性群体分离法,结合 SSR 标记初步定位了主效抗瘟基因 *Pi2-1*,并构建了该基因的遗传连锁图谱,以期为进一步定位、克隆和分子标记辅助育种打下基础。

1 材料与方法

1.1 材料

天津野生稻(TY),由湖南农业大学植物疾病控制研究所提供;高感稻瘟病粳稻品种 CO39 和稻瘟病菌株 CHL1743、110-2 和 318-2 由湖南农业大学水稻基因组学实验室提供。

1.2 方法

1.2.1 F₂ 定位群体的构建

以 CO39 为母本, TY 为父本,杂交得到 F₁ 代种子, F₁ 植株套袋自交得到 F₂ 代种子。

1.2.2 接种鉴定

将 TY、CO39 及其 F₂ 代种子于 37 °C 浸种(两干两湿),露白后间隔播种于育秧盘中,温室育苗。当幼苗在接种前 1 周(二叶期)时,施少量氮肥(每盘 2 g)。每个菌株设置 3 个重复。

将已纯化的稻瘟病菌株 CHL1743、318-2 和 110-2 分别接种于燕麦-西红柿平板培养基上,26 °C 恒温箱中黑暗培养 7~10 d,至菌丝覆盖整个平板培养基时,加入 3~5 mL 无菌蒸馏水,用棉签将菌丝轻轻刮掉,放置在智能光照培养箱中 24 h 光照培养,温度控制在 26~28 °C,4~7 d 后产孢充分,每个平板培养基用 20 mL 含有 0.02% Tween 20 的无菌水洗下孢子,过滤到盛有灭菌水的烧杯中,经搅拌制成接种悬浮液,其浓度为每毫升 20~30 万个孢子。用血小球计数板观察稻瘟病菌孢子的数量,接种浓度为在 100 倍显微镜下平均每个视野 20~30 个孢子。

当幼苗生长至三叶一心时,将育秧盘放入塑料保湿箱中,保湿箱移至专用接种室内进行接种。接种悬浮液以气雾的形式均匀喷洒在秧苗上,使每个叶片都布满均匀的雾点。接种后将保湿箱放置在专用接种室内,黑暗保湿 24 h 后移出室外,正常光照周期培养,并注意保温和保湿,确保病斑的正常扩

展。接种 7 d 后即进行病情鉴定, 或当感病对照品种达到高度发病时调查。以国际水稻所 0~9 级评判标准为依据, 逐株鉴定和记载, 分级标准: 0 级, 无病斑; 1 级, 仅有小的针尖大小的褐点; 2 级, 较大褐点; 3 级, 直径 1~2 mm 圆形稍大灰色病斑, 边缘褐色; 4 级, 1~2 mm 灰色纺锤形病斑, 通常局限于 2 条叶脉之间; 5 级, 灰色梭形病斑, 受害面积为叶面积的 4%~10%; 6 级, 灰色梭形病斑, 受害面积为叶面积的 11%~25%; 7 级, 灰色梭形病斑, 受害面积为叶面积的 26%~50%; 8 级, 灰色梭形病斑, 受害面积为叶面积的 51%~75%; 9 级, 灰色梭形病斑, 受害面积大于叶面积的 75% 或叶片全部枯死。统计分析时, 0~3 级为抗病类型(R), 4~9 级为感病类型(S) [33]。

1.2.3 SSR 分析

选择均匀覆盖整个水稻基因组染色体上的 1 286 对 SSR 标记, 对 TY 和 CO39 之间的多态性进行检测, SSR 标记及其序列信息均参照 McCouch、国际水稻基因组测序计划等发表的文献和 Gramene 数据库(<http://www.gramene.org/>) [34-35]。所有 SSR 标记由上海英韦创津和南京金斯特生物公司合成, 保存于湖南农业大学水稻基因组学实验室。PCR 扩增参照文婷等 [29] 的方法并略作修改。扩增产物用 8% 的非变性聚丙烯酰胺凝胶(PAGE)电泳分离, 银染步骤根据 Sanguinetti 等 [36] 的方法改进而成。

1.2.4 遗传和连锁分析

接种表型鉴定后, F₂ 群体的抗感单株分离比通过 χ^2 检验进行分析确认。利用群体分离分析法, 随机选取抗病单株和感病单株各 10 株, 在 12 条染色体上每隔 10 cM 选取 1 个多态性明显的标记, 分析与抗瘟基因可能存在的连锁关系, 得到连锁标记。再利用隐性群体分离法, 用连锁标记对 F₂ 群体中所有感病单株进行基因型分析, 构建局部遗传连锁图, 将抗瘟基因初步定位到特定的染色体区段上。

将 F₂ 群体中电泳条带与亲本 TY 一致的记为“ A”, 与亲本 CO39 一致的记为“ B”, 杂合带型记为“ H”, 未扩增出产物或者条带不清楚的记为“-”, 并整理为“ raw” 文件。运用 MAPMAKER/EXP 3.0 软件进行遗传连锁分析, 计算分子标记间的遗传距

离, 取 3.0 为 LOD 阈值, 最大遗传距离为 50 cM, 并用 MapDraw2.1 绘制分子标记遗传连锁图谱。

2 结果与分析

2.1 TY 的抗性遗传分析

利用稻瘟病菌株 CHL1743、318-2 和 110-2 对 F₂ 群体进行接种鉴定, 采用国际水稻所 0~9 级的判级标准, 在 F₂ 群体中分别得到 47、52 和 29 株感病单株, 经 χ^2 检验表明, F₂ 群体的抗感单株分离比均接近 3:1 (表 1), 即 TY 对稻瘟病菌株 CHL1743、110-2 和 318-2 的抗性由 1 个主效抗瘟基因控制。

表 1 F₂ 群体对稻瘟病菌株 CHL1743、318-2 和 110-2 的抗性反应

| 群体 | 小种 | 抗病单株 | 感病单株 | 群体大小 | $\chi^2(\chi^2_{0.05}=3.84)$ |
|------------------------|---------|------|------|------|------------------------------|
| TY/CO39 F ₂ | CHL1743 | 152 | 47 | 199 | 0.20 |
| TY/CO39 F ₂ | 318-2 | 164 | 52 | 216 | 0.10 |
| TY/CO39 F ₂ | 110-2 | 94 | 29 | 123 | 0.13 |

2.2 TY 主效抗瘟基因的初步定位

为了初步确定主效抗瘟基因的位置, 从稻瘟病菌株 318-2 接种鉴定的 F₂ 群体抗、感单株中, 各选取 10 株极抗和极感的单株。以 TY 和 CO39 为对照, 用多态性明显的 136 个标记分别对 22 个单株的 DNA 进行 PCR 扩增。结果表明, RM19814 和 AP4007 多态性标记在 10 株极感的单株中各发现 1 个重组子, 并且这 2 个重组子来自于不同的感病单株; AP5659-5 多态性标记没有发现重组子, 即第 6 号染色体上的 3 个标记 RM19814、AP5659-5 和 AP4007 可能与抗瘟基因存在连锁关系(图 1)。

为了进一步确定结果, 将感病群体继续扩大, 并在目标区段加大分子标记密度, 选用 5 个标记 RM19814、AP4791、AP5659-5、RM7213 和 AP4007 对 460 个感病单株进行基因型分析。结果表明, RM19814 和 AP4007 分别发现 11 和 16 个重组子, 这 27 个重组子均来自于不同的感病单株, 基本确定了主效抗瘟基因在第 6 号染色体上所在的区段, 而 AP4791、AP5659-5 和 RM7213 分别发现 9、8 和 12 个重组子, 参照稻瘟病抗性基因命名原则, 将这个主效抗瘟基因命名为 *Pi2-1*。

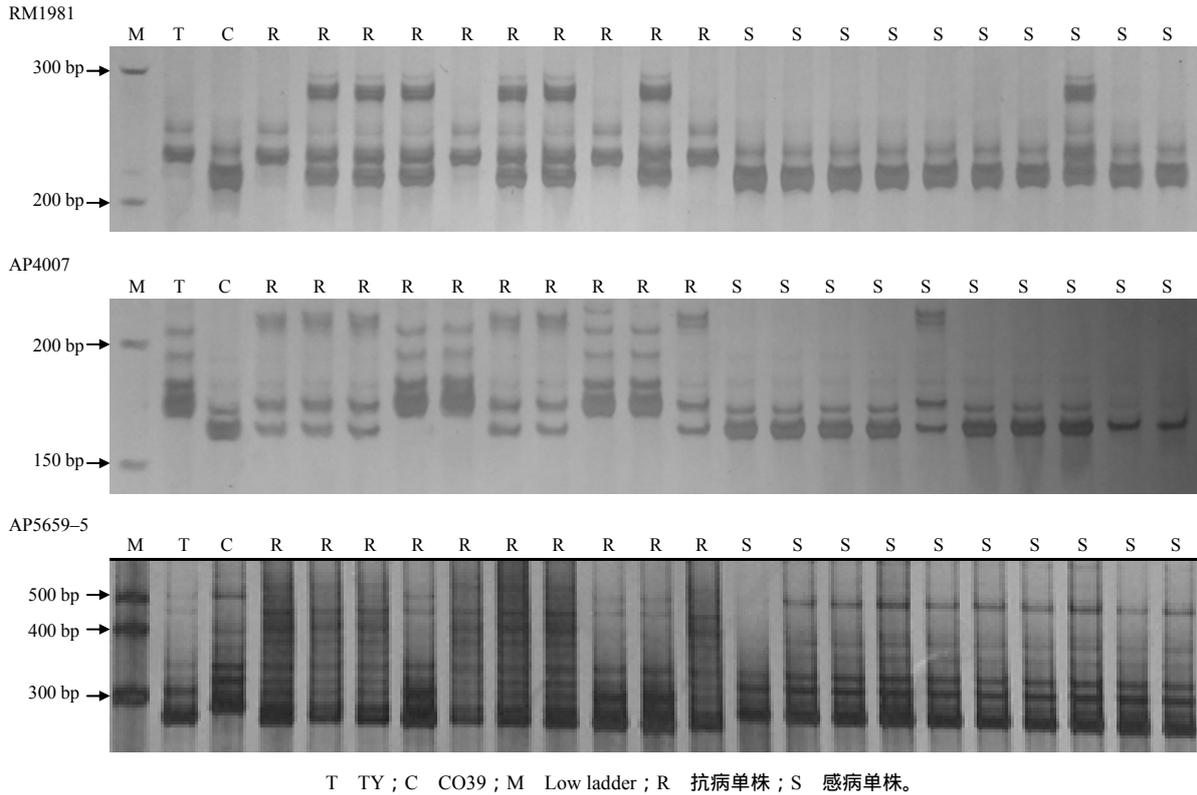


图 1 SSR 标记 RM19814、AP4007 和 AP5659-5 的连锁分析

Fig.1 Linkage analysis of the SSR marker RM19814, AP4007 and AP5659-5

2.3 *Pi2-1* 基因的遗传连锁图谱

根据上述5个与*Pi2-1*基因连锁的分子标记在感病群体中的重组情况，通过MAPMAKER/EXP 3.0软件分析可知，RM19814、AP4791、AP5659-5、RM7213和AP4007与*Pi2-1*基因的遗传距离分别为3、1.3、0.9、1.4和2 cM，*Pi2-1*基因被定位在AP5659-5到RM7213的2.3 cM区间范围内(图2)。

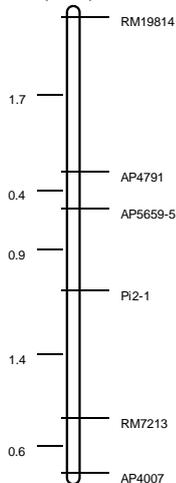


图2 *Pi2-1*基因遗传连锁图谱

Fig. 2 The genetic linkage map of *Pi2-1* gene

3 讨论

目前，稻瘟病威胁着几乎所有水稻种植地区的生产安全，每年由于这种真菌性病害而造成水稻产量损失，约占全球水稻总产量的10%~30%^[37]。由于稻瘟病生理小种的多变性和环境的复杂性，含单个抗性基因的水稻品种往往只能保持几年的田间抗性；因此，利用分子标记辅助选择等育种方法，将一些广谱持久抗性基因高效聚合到高产水稻品种中，是培育水稻新品种的技术关键。TY连续13年在20个稻瘟病抗性鉴定病圃中，表现出稳定、高水平的田间抗性，并对吉林、浙江、湖南、福建、广东、海南等地不同纬度的155个菌株表现的抗性频率达92.9%^[31-32]，这充分说明TY作为一个抗源材料，不仅在湖南本省，在其他地区也具有抗谱广、抗性稳定的特点。

本研究结果表明，TY对稻瘟病菌株 CHL1743、110-2 和 318-2 产生的抗性由 1 个主效抗瘟基因 *Pi2-1* 控制，该基因被定位在 SSR 标记 AP5659-5 到 RM7213 之间，与 2 个标记的遗传距离分别为 0.9

cM 和 1.4 cM, 位于第 6 号染色体 *Pi2/9* 位点, 此区域是稻瘟病抗性基因密集区, 这个位点有 10 个基因被定位, 分别是 *Pi9*^[12]、*Pi2*^[13]、*Piz-t*^[13]、*Piz*^[38]、*Pigm*^[39]、*Pi26*^[40]、*Pi40*^[41]、*Pi50*^[42]、*qBR6*^[43]、*Pi2-2*^[27], 这种聚集现象可能是 DNA 半保留复制或 DNA 非对称性复制所造成的, 这也可能是稻瘟病抗性基因进化的重要途径^[44]; 因此, 对这些等位基因进行图位克隆, 不仅能够揭示稻瘟病抗性位点的进化关系, 而且对剖析稻瘟病抗性机理有重要意义。为了精细定位主效抗瘟基因 *Pi2-1*, 后续工作将在目的基因区域设计更多的分子标记, 如 InDel、CAPS 等标记, 并构建相应抗性基因的近等基因系, 为克隆及分子标记辅助选择奠定基础。

参考文献:

- [1] Skamnioti P, Gurr S J. Against the grain: Safeguarding rice from rice blast disease[J]. Trends in Biotechnology, 2009, 27(3): 141–150.
- [2] Ballini E, Morel J B, Droc G, et al. A genome-wide meta-analysis of rice blast resistance genes and quantitative trait loci provides new insights into partial and complete resistance[J]. Molecular Plant–Microbe Interactions, 2008, 21(7): 859–868.
- [3] Sasaki R. Existence of strains in rice blast fungus[J]. Japanese Journal of Plant Protection, 1922, 9: 631–644.
- [4] Kiyosawa S. Establishment of differential varieties for pathogenicity test of rice blast fungus[J]. Rice Genet Newsl, 1984(1): 95–97.
- [5] Ling Z. Blast resistance classification of some rice varieties in China[J]. Scientia Agricultura Sinica, 1984(2): 19–28.
- [6] 杨勤忠, 林菲, 冯淑杰, 等. 水稻稻瘟病抗性基因的分子定位及克隆研究进展[J]. 中国农业科学, 2009, 42(5): 1601–1615.
- [7] Hayashi K, Yoshida H. Refunctionalization of the ancient rice blast disease resistance gene *Pit* by the recruitment of a retrotransposon as a promoter[J]. The Plant Journal, 2008, 57(3): 413–425.
- [8] Lin F, Chen S, Que Z, et al. 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[J]. Genetics, 2007, 177(3): 1871–1880.
- [9] Takahashi A, Hayashi N, Miyao A, et al. Unique features of the rice blast resistance *Pish* locus revealed by large scale retrotransposon-tagging[J]. BMC Plant Biology, 2010, 10: 175.
- [10] Wang Z X, Yano M, Yamanouchi U, et al. The *Pib* gene for rice blast resistance belongs to the nucleotide binding and leucine-rich repeat class of plant disease resistance genes[J]. The Plant Journal, 2002, 19(1): 55–64.
- [11] Fukuoka S, Saka N, Koga H, et al. Loss of function of a proline-containing protein confers durable disease resistance in rice[J]. Science, 2009, 325: 998–1001.
- [12] Qu S, Liu G, Zhou B, et al. 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[J]. Genetics, 2006, 172(3): 1901–1914.
- [13] Zhou B, Qu S, Liu G, et al. The eight amino-acid differences within three leucine-rich repeats between *Pi2* and *Piz-t* resistance proteins determine the resistance specificity to *Magnaporthe grisea*[J]. Mol Plant Microbe Interact, 2006, 19(11): 1216–1228.
- [14] Chen X, Shang J, Chen D, et al. A B-lectin receptor kinase gene conferring rice blast resistance[J]. The Plant Journal, 2006, 46(5): 794–804.
- [15] Shang J, Tao Y, Chen X, et al. 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[J]. Genetics, 2009, 182(4): 1303–1311.
- [16] Chen J, Shi Y, Liu W, et al. A *Pid3* allele from rice cultivar Gumei2 confers resistance to *Magnaporthe oryzae*[J]. Journal of Genetics and Genomics, 2011, 38(5): 209–216.
- [17] Liu X, Lin F, Wang L, et al. The in silico map-based cloning of *Pi36*, a rice coiled-coil nucleotide-binding site leucine-rich repeat gene that confers race-specific resistance to the blast fungus[J]. Genetics, 2007, 176(4): 2541–2549.
- [18] Lee S K, Song M Y, Seo Y S, et al. Rice *Pi5*-mediated resistance to *Magnaporthe oryzae* requires the presence of two coiled-coil-nucleotide-binding-leucine-rich repeat genes[J]. Genetics, 2009, 181(4): 1627–1638.
- [19] Ashikawa I, Hayashi N, Yamane H, et al. Two adjacent nucleotide-binding site-leucine-rich repeat class genes are required to confer *pikm*-specific rice blast resistance[J]. Genetics, 2008, 180(4): 2267–2276.
- [20] Zhai C, Lin F, Dong Z, et al. The isolation and characterization of *Pik*, a rice blast resistance gene which emerged after rice domestication[J]. New Phytologist,

- 2011, 189(1): 321–334.
- [21] Yuan B, Zhai C, Wang W, et al. The *Pik-p* resistance to *Magnaporthe oryzae* in rice is mediated by a pair of closely linked CC-NBS-LRR genes[J]. TAG Theoretical and Applied Genetics, 2011, 122(5): 1017–1028.
- [22] Hayashi N, Inoue H, Kato T, et al. Durable panicle blast-resistance gene *Pbl* encodes an atypical CC-NBS-LRR protein and was generated by acquiring a promoter through local genome duplication[J]. The Plant Journal, 2010, 64(3): 498–510.
- [23] Rai A K, Kumar S P, Gupta S K, et al. Functional complementation of rice blast resistance gene *Pi-kh(Pi54)* conferring resistance to diverse strains of *Magnaporthe oryzae*[J]. Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology, 2011, 20(1): 55–65.
- [24] Okuyama Y, Kanzaki H, Abe A, et al. A multifaceted genomics approach allows the isolation of the rice *Pia*-blast resistance gene consisting of two adjacent NBS-LRR protein genes[J]. The Plant Journal, 2011, 66(3): 467–479.
- [25] Hua L, Wu J, Chen C, et al. The isolation of *Pi1* an allele at the *Pik* locus which confers broad spectrum resistance to rice blast[J]. TAG Theoretical and Applied Genetics, 2012, 125(5): 1047–1055.
- [26] Bryan G T, Wu K S, Farrall L, et al. A single amino acid difference distinguishes resistant and susceptible alleles of the rice blast resistance gene *Pi-ta*[J]. The Plant Cell Online, 2000, 12(11): 2033–2045.
- [27] Jiang N, Li Z, Wu J, et al. Molecular mapping of the *Pi2/9* allelic gene *Pi2-2* conferring broad-spectrum resistance to *Magnaporthe oryzae* in the rice cultivar Jefferson[J]. Rice, 2012, 5: 29.
- [28] Hayashi K, Yoshida H, Ashikawa I. Development of PCR-based allele-specific and InDel marker sets for nine rice blast resistance genes[J]. TAG Theoretical and Applied Genetics, 2006, 113(2): 251–260.
- [29] 文婷, 梁毅, 江南, 等. 利用 *Pi9* 基因序列标记辅助选择改良籼稻稻瘟病抗性[J]. 湖南农业大学学报: 自然科学版, 2012, 38(3): 262–266.
- [30] 柳武革, 王丰, 金素娟, 等. 利用分子标记辅助选择聚合 *Pi-1* 和 *Pi-2* 基因改良两系不育系稻瘟病抗性[J]. 作物学报, 2008, 34(7): 1128–1136.
- [31] 彭绍裘, 黄费元, 孙国昌, 等. 水稻品种在不同纬度下持久抗瘟性的研究[J]. 中国农业科学, 1996, 29(2): 52–58.
- [32] 彭绍裘, 刘二明, 黄费元, 等. 水稻持久抗瘟性研究[J]. 植物保护学报, 1996, 23(4): 293–299.
- [33] 黄红梅, 肖应辉, 黄玲, 等. 湘资 3150 微效抗瘟性基因鉴定[J]. 植物病理学报, 2011, 41(5): 509–515.
- [34] Mccouch S R, Teytelman L, Xu Y, et al. Development and mapping of 2240 new SSR markers for rice (*Oryza sativa* L.) [J]. DNA Research, 2002, 9(6): 199–207.
- [35] Khurana P, Gaikwad K. The map-based sequence of the rice genome[J]. Nature, 2005, 436: 793–800.
- [36] Sanguinetti C, Dias N E, Simpson A. Rapid silver staining and recovery of PCR products separated on polyacrylamide gels[J]. Biotechniques, 1994, 17(5): 914.
- [37] Liu J, Wang X, Mitchell T, et al. Recent progress and understanding of the molecular mechanisms of the rice-*Magnaporthe oryzae* interaction[J]. Molecular Plant Pathology, 2010, 11(3): 419–427.
- [38] Yu Z, Mackill D, Bonman J, et al. Tagging genes for blast resistance in rice via linkage to RFLP markers[J]. Theoretical and Applied Genetics, 1991, 81(4): 471–476.
- [39] Deng Y, Zhu X, Shen Y, et al. 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.
- [40] Wu J L, Fan Y Y, Li D B, et al. Genetic control of rice blast resistance in the durably resistant cultivar Gumei 2 against multiple isolates[J]. Theoretical and Applied Genetics, 2005, 111(1): 50–56.
- [41] Jeung J, Kim B R, Cho Y C, et al. A novel gene, *Pi40(t)*, linked to the DNA markers derived from NBS-LRR motifs confers broad spectrum of blast resistance in rice[J]. Theoretical and Applied Genetics, 2007, 115(8): 1163–1177.
- [42] Zhu X, Chen S, Yang J, et al. The identification of *Pi50(t)*, a new member of the rice blast resistance *Pi2/Pi9* multigene family[J]. Theoretical and Applied Genetics, 2012, 124(7): 1295–1304.
- [43] Liu Y, Zhu X Y, Zhang S, et al. Dissecting quantitative resistance against blast disease using heterogeneous inbred family lines in rice[J]. Theoretical and Applied Genetics, 2011, 122(2): 341–353.
- [44] Michelmore R W, Meyers B C. Clusters of resistance genes in plants evolve by divergent selection and a birth-and-death process[J]. Genome Research, 1998, 8(11): 1113–1130.

责任编辑: 罗慧敏

英文编辑: 罗维