

孙大元,周丹华,张景欣,等. 广谱抗源 H4 中 2 个主效抗病基因的单基因系构建及评价[J].江苏农业学报,2017,33(1):1-5.
doi:10.3969/j.issn.1000-4440.2017.01.001

广谱抗源 H4 中 2 个主效抗病基因的单基因系构建及评价

孙大元¹, 周丹华², 张景欣¹, 王 慧², 朱小源¹, 杨祁云¹, 陈志强²

(1. 广东省农业科学院植物保护研究所/广东省植物保护新技术重点实验室,广东 广州 510640; 2. 华南农业大学国家植物航天育种工程技术研究中心,广东 广州 510642)

摘要: 近等基因系是准确鉴定病原菌无毒基因型,监测病原菌群体无毒基因结构动态变化以及开展寄主抗病性遗传研究与抗病育种应用的重要材料。为了明确广谱抗源 H4 中 2 个主效抗病基因 *Pik-H4* 和 *Pita-H4* 与已知等位基因之间的抗性差异,以丽江新团黑谷(LTH)为背景,采用分子标记辅助选择技术和抗性评价等方法,构建广谱抗源 H4 的 2 个主效抗病基因 *Pik-H4* 和 *Pita-H4* 的近等基因系。结果表明:携带 *Pik-H4* 的近等基因系的抗性明显好于携带 *Pita-H4* 的近等基因系。

关键词: 稻瘟病抗性基因; 分子标记辅助选择; 近等基因系

中图分类号: S332.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4440(2017)01-0001-05

Development of near-isogenic lines for two blast resistance genes in an indicarice H4

SUN Da-yuan¹, ZHOU Dan-hua², ZHANG Jing-xin¹, WANG Hui², ZHU Xiao-yuan¹, YANG Qi-yun¹, CHEN Zhi-qiang²

(1. Plant Protection Research Institute Guangdong Academy of Agricultural Sciences/Guangdong Provincial Key Laboratory of High Technology for Plant Protection, Guangzhou 510640, China; 2. National Engineering Research Center of Plant Space Breeding, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

Abstract: Near-isogenic lines (NIL) are expected to be a valuable genetic resource for blast resistance, monitoring blast races and revealing their pathogenicities. To understand resistance difference between *Pik-H4*, *Pita-H4* and their allelic gene, we constructed two near-isogenic lines with LTH as background by combining marker-assisted selection with resistance evaluation in this study. It was found that the resistance of NIL carrying *Pik-H4* was better than that carrying *Pita-H4*.

Key words: blast resistance gene; marker-assisted selection; near-isogenic lines

收稿日期:2016-04-18

基金项目:广东省自然科学基金重点项目(2016A030311017);

“十二五”国家“863”计划项目(2012AA101201);国家自然科学基金项目(31401722)

作者简介:孙大元(1984-),男,河南信阳人,博士,助理研究员,主要从事水稻抗病育种研究。(Tel) 13533422395; (E-mail) 307321118@qq.com。周丹华为共同第一作者。

通讯作者:杨祁云, (Tel) 020-87544321; (E-mail) 839034017@qq.com。陈志强, (Tel) 020-85285772; (E-mail) chenlin@scau.edu.cn

稻瘟病是具有毁灭性的世界性水稻病害,每年造成全球高达 11%~30% 的稻谷产量损失,损失的粮食足以养活 6×10^7 人^[1-2]。近年来,稻瘟病在中国各主要稻区均有发生,其中华南、西南东部、江南、长江中下游、东北等部分稻区流行偏重,年发生面积约 5×10^6 hm²,严重威胁国家粮食安全^[3-4]。长期的生产实践证明,选育和利用抗病品种是防治稻瘟病最经济、有效和安全的措施^[5-8]。但因稻瘟病在水稻生长全生育期内均可发生,且稻瘟病菌致病小种具有

高度的异质性,新选育的抗病品种常常在推广 3~5 年后便失去利用价值^[9-10]。因此,挖掘新的抗病资源、鉴定新的抗病基因,培育具有持久抗病性的水稻品种,是当前稻瘟病抗病育种的当务之急。

迄今为止,至少有 80 多个抗稻瘟病基因被鉴定,并有 25 个基因被克隆,这些基因多成簇分布在除第 3 染色体外的其他 11 条水稻染色体上,其中在第 6、第 11 和第 12 号染色体上存在 3 个较大基因簇,分别为 *Piz* 位点(含 *Piz-t*、*Pi9*、*Pi2*、*Pigm* 和 *Pi50* 等), *Pita* 位点(*Pita*、*Pita*² 和 *Pi39* 等)和 *Pik* 位点(含 *Pik*、*Pik-s*、*Pik-p*、*Pik-m*、*Pik-h*、*Pi7* 和 *Pi1* 等)^[11-12]。这些基因簇上的基因多为等位或紧密连锁的关系,并且它们在抗性表现上具有明显的差异,致使多数抗性基因未能充分在育种上利用起来^[13-14]。因此,只有明确这些基因簇位点上基因的抗性差异,才能有针对性地开展分子标记辅助育种。此外,基于“基因对基因”假说,每 1 个抗病基因都对应 1 个稻瘟病菌无毒基因,而无毒基因易发生突变,所以可以通过对基因簇位点上抗病基因等位分析来监测病原菌群体无毒基因结构变化^[15-16]。目前,以丽江新团黑谷(LTH)和 CO39 为背景的抗稻瘟病基因近等基因系和近等基因累加系已广泛应用于各国稻瘟病研究工作中,作为重要的水稻抗稻瘟病单基因鉴别体系,不仅可以有效鉴别稻瘟病菌致病型,也可用于评价主要抗性基因的育种价值^[17-21]。

本课题组在长期的稻瘟病抗病育种研究中挖掘到多个抗病种质资源,如 DH104、H4、H11、D69 和 T2 等,并在其中鉴定到 *Pixt(t)*、*Pi46(t)*、*Pik-H4*、*Pita-H4*、*Pi51(t)*、*Pi-h3(t)* 和 *PiTH* 等抗病基因^[22-27]。为了进一步明确这些抗病基因与已报道等位基因的关系和充分利用这些抗病基因资源,本研究以丽江新团黑谷(LTH)为背景,采用分子标记辅助选择技术,结合抗性评价,构建广谱抗源 H4 2 个主效抗病基因 *Pik-H4* 和 *Pita-H4* 的近等基因系。

1 材料与方法

1.1 试验材料

丽江新团黑谷(LTH)、广谱抗源 H4,以及特普、珍龙 13、四丰 43、东农 363、关东 51 和合江 18 等中国早期的稻瘟病菌小种鉴别品种。

用于苗期叶瘟抗谱测定的 35 个稻瘟病菌菌株

均由广东省农业科学院植物保护研究所提供,其中菌株 GD0193 和 GD08T13 分别为抗病基因 *Pik-H4* 和 *Pita-H4* 的遗传分析菌株。此外 GD0193 可侵染 *Pik*、*Pikp*、*Pi7(t)* 基因等多个单基因鉴别寄主,其致病谱较广,具有较好的代表性,GD08T13 属于致病专化性较强的菌株^[28-29]。

1.2 分子标记

SSR 分子标记 *RM224* 和 *RM179* 分别为抗病基因 *Pik-H4* 和 *Pita-H4* 的紧密连锁标记。用于遗传背景分析的 414 对 SSR 引物由上海生工生物工程技术服务有限公司合成。参考 Hospital 等^[30]提出的方法计算背景回复率: $G_g = [L + X_g] / (2L)$, 其中 G_g 为在 g 代的遗传背景回复率; X_g 为在回交 g 代表现为轮回亲本带型的分子标记数量; L 为检测分子标记的数量。理论上的遗传背景回复率计算方法为 $G_g = 1 - (1/2)^{(g+1)}$, 其中 g 为回交世代。

1.3 基因检测方法

参照 Murray 等^[31]的 CTAB 抽提法提取水稻幼嫩叶片 DNA, 20.0 μ l PCR 反应体系, 包括 1.0 μ l 的 DNA 溶液, 2.0 μ l 的 10 \times PCR MIX buffer, 10 μ mol/L 的正负引物各 0.8 μ l, 其余由双蒸灭菌水(ddH₂O)补足。反应程序: 94 $^{\circ}$ C 预变性 3 min; 94 $^{\circ}$ C 30 s, 55 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 45 s, 30 个循环, 72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min。扩增产物在 8% 的非变性聚丙烯酰胺凝胶中电泳, 快速银染法染色观察。

1.4 稻瘟病抗性鉴定

水稻干种子催芽后播种在育秧盘中, 每个品系播 1 穴(每穴 15 粒), 均设有抗病、感病对照, 待秧苗长至 3~4 片叶时, 采用筛选出的 35 个代表菌株分别接种, 采用高压喷雾接种法接种, 接种 7 d 后调查抗性表现。

2 结果与分析

2.1 基于分子标记辅助选择的近等基因系构建

以 LTH 为母本与 H4 杂交, F_1 进行稻瘟病抗性鉴定, 确保无假杂种。随后以 LTH 为轮回亲本回交。在 BC_1F_1 代, 分别利用与抗病基因 *Pik-H4* 和 *Pita-H4* 紧密连锁的分子标记 *RM224* 和 *RM179* 进行单株检测, 将具有分子标记 *RM224* 和 *RM179* 的单株分开, 分别接种稻瘟病菌株 GD0193 和 GD08T13, 确定抗性。以分别含有抗病基因 *Pik-H4* 和 *Pita-H4* 的抗病单株为父本, 与轮回亲本 LTH 继续回交, 此

后每个回交世代都进行分子标记检测,同时分别接种稻瘟病菌株 GD0193 和 GD08T13,直至获得 BC_4F_2 。整个选育过程见图 1。

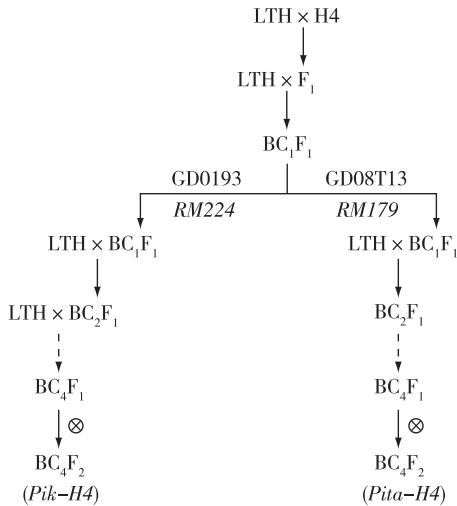


图 1 分子辅助选择程序

Fig.1 Program of marker-assisted selection

2.2 近等基因系遗传背景分析

在种植 BC_4F_2 后,选择株型接近 LTH,且分别含有抗病基因 *Pik-H4* 和 *Pita-H4* 的 2 个单株收种,并进一步形成株系,命名为 Pik-H4-1、Pik-H4-2、Pita-H4-1 和 Pita-H4-2。在背景分析之前,选用覆盖水稻全基因组的 414 对 SSR 引物(表 1),对亲本 H4 和 LTH 进行多态性分析,有效多态数为 253,多态率为 61.2%,覆盖全部 12 条染色体。

表 1 亲本 H4 和 LTH 之间多态性 SSR 标记的筛选

Table 1 Screening of SSR markers with polymorphisms between H4 and LTH

染色体	筛选标记数	多态性标记数	多态性频率(%)
染色体 1	60	36	60.0
染色体 2	53	38	71.7
染色体 3	58	32	55.2
染色体 4	25	16	64.0
染色体 5	23	15	65.2
染色体 6	43	24	55.8
染色体 7	26	17	65.4
染色体 8	21	13	61.9
染色体 9	26	9	34.6
染色体 10	19	12	63.2
染色体 11	26	19	73.1
染色体 12	34	22	64.7

随后利用这 253 对 SSR 标记的引物对所选的含有 *Pik-H4* 的 2 个株系以及含有 *Pita-H4* 的 2 个株系进行遗传背景分析。结果(表 2)表明,所选择的 4 个株系中,除了编号为 Pik-H4-2 的株系的背景回复率为 96.0%外,其他株系遗传背景的背景回复率均明显高于其理论值(96.9%),表明利用分子标记辅助选择技术结合抗病性鉴定,可以缩短时间,迅速构建抗病基因近等基因系。

表 2 目标株系的遗传背景分析

Table 2 Analysis on genetic background of target lines

染色体	背景回复率(%)			
	Pik-H4-1 株系	Pik-H4-2 株系	Pita-H4-1 株系	Pita-H4-2 株系
染色体 1	97.2	97.2	100.0	94.4
染色体 2	100.0	100.0	100.0	97.4
染色体 3	100.0	93.8	96.9	100.0
染色体 4	100.0	100.0	100.0	100.0
染色体 5	100.0	93.3	100.0	100.0
染色体 6	95.8	83.3	100.0	100.0
染色体 7	100.0	100.0	100.0	100.0
染色体 8	100.0	100.0	100.0	100.0
染色体 9	100.0	100.0	88.9	100.0
染色体 10	91.7	100.0	100.0	100.0
染色体 11	94.7	89.5	94.7	84.2
染色体 12	95.5	95.5	100.0	95.5

2.3 近等基因系抗性评价

抗性评价是抗病基因近等基因系构建过程中的一个重要环节。综合田间农艺性状的表现和遗传背景的背景回复情况,选择株系 Pik-H4-1 和 Pita-H4-1 作为下一步抗病性鉴定材料。

分别将中国的 7 个稻瘟病鉴别寄主特特普、珍龙 13、四丰 43、东农 363、关东 51、合江 18 和 LTH 以及抗病基因供体亲本 H4,同株系 Pik-H4-1 和 Pita-H4-1 播于塑料育秧盘中,每个品系播种 2 行,共 20 个单株,待到苗期,分别接种广致病谱代表菌株 GD0193 和 GD08T13。结果(表 3)表明,Pik-H4-1 株系对菌株 GD0193 表现出高抗水平,和抗性亲本 H4 没有差异,此外特特普、东农 363 和关东 51 也对菌株 GD0193 表现出高抗水平,而 Pita-H4-1 株系和 LTH 则表现出感病;Pita-H4-1 株系对菌株 GD08T13 表现出高抗水平,和抗性亲本 H4 及特特普无差异,而 Pik-H4-1 株系、LTH 及其他几个鉴别寄主则表现

出感病。

35 个代表性菌株的抗谱测定结果(表 3)表明, *Pik*-H4-1 株系的抗性频率为 62.86%, 高于珍龙 13 及四丰 43, 低于其供体亲本和特特普、东农 363 及

关东 51; *Pita*-H4-1 株系的抗谱只有 11.43%, 与合江 18 一样; 而 LTH 抗性频率则为 0, 表明其对 35 个菌株均无抗性。综合来看, 携带 *Pik*-H4 的近等基因系的抗性明显好于携带 *Pita*-H4 的近等基因系。

表 3 近等基因系对稻瘟病的抗性反应

Table 3 Resistant reaction of near-isogenic lines to rice blast

项 目	特特普	珍龙 13	四丰 43	东农 363	关东 51	合江 18	LTH	H4	<i>Pita</i> -H4-1	<i>Pik</i> -H4-1
含有的抗病基因	<i>Pi1</i> 、 <i>Pi5</i> 、 <i>Pi54</i>	—	<i>Pia</i> 、 <i>Pib</i>	<i>Pik</i> 、 <i>Pia</i>	<i>Pik</i>	<i>Pia</i>	<i>Pik-l</i>	<i>Pik-H4</i> 、 <i>Pita-H4</i>	<i>Pita-H4</i>	<i>Pik-H4</i>
抗性频率(%)	88.57%	25.71%	8.57%	80.00%	80.00%	11.43%	0	100.00%	11.43%	62.86%
菌株 GD0193	R	S	S	R	R	S	S	R	S	R
菌株 GD08T13	R	S	S	S	S	S	S	R	R	S

R:抗病表现;S:感病表现。—:没检测到相关抗病基因。

3 讨 论

植物中抗性基因往往在特定染色体区域成簇存在^[12]。目前在水稻第 11 染色体上定位到 22 个抗病基因,多数成簇分布于 *Pik* 位点附近,且在 *Pik* 位点克隆到了 *Pi1*^[32]、*Pik*^[33]、*Pikh*^[34]、*Pikm*^[35]、*Pikp*^[36]、*Piks*、*Pi7* 和 *Pik-l*^[37] 等 8 个等位基因,均由 2 个紧密连锁且具有完全独立功能的 *NBS-LRR* 类基因组成。*Pik* 位点的等位基因序列高度保守,其中 *Pik-l* 位点存在多个 SNP。本研究中 *Pik*-H4 是本课题组近期克隆到的 1 个 *Pik* 位点的新的等位基因,其供体亲本 H4 与已知的 *Pik* 位点的近等基因系(包括 *IRBL6*、*IRBL7*、*IRBL8*、*IRBL18*、*IRBL21* 及 *F98-7* 等)存在明显的抗谱差异,并且 GD0193 可侵染 *Pi1*、*Pik*、*Pi7*、*Pikm* 和 *Pikp* 等 *Pik* 位点的等位基因^[23]。而本研究中构建的 *Pik*-H4 的近等基因系 *Pik*-H4-1 株系对 GD0193 表现为抗病,再次验证 *Pik*-H4 是 *Pik* 位点的 1 个新的等位基因。此外,本研究中发现特特普、东农 363 及关东 51 也对 GD0193 表现为抗病,并且都含有 *Pik* 位点的等位基因,是否就说明 *Pi1* 和 *Pik* 应该是对 GD0193 表现为抗病的? 其实不然,特特普还含有 *Pi5*、*Pi54*, 东农 363 含有 *Pia*, 关东 51 也可能含有其他抗病基因,且稻瘟病菌株 GD0193 中可能还含有除 *Avr-Pik* 以外的其他的无毒基因。另外,也有研究者发现含有 *Pi2* 位点的等位基因的 *Pi51(t)* 也对 GD0193 表现为抗病,而根据“基因对基因”假说, GD0193 中应含有与之对应的无毒基因^[27]。同时近期也有研究结果表明,与 *Pik* 位点抗病基因相对应的稻瘟病菌无毒基因 *AvrPik* 也存在多个等位基因(*Avr-Pik-A*、*Avr-Pik-B*、*Avr-Pik-C*、*Avr-Pik-D* 及 *Avr-Pik-E*),致使 *Pik* 位点等

位基因存在着抗谱差异和小种特异性^[38]。因此, *Pik*-H4 的近等基因系的构建有利于开展稻瘟病菌无毒基因变异监测。

Pita 位于水稻第 12 染色体靠近着丝点附近的区域,而 *Pita*²则实际上是 *Pita* 至少加上 1 个紧密连锁的其他抗性基因^[7]。*Pita* 在中国很多稻区表现广谱持久的稻瘟病抗性,被广泛应用于中国的水稻育种和生产,但其近等基因系 *IRBLta-CP1* 和 *IRBLta-CT2* 在华南地区抗性较低^[39]。虽然本研究中构建 *Pita*-H4 的近等基因系 *Pita*-H4-1 株系的抗谱同样并不理想,但其对致病专化性较强的菌株 GD08T13 表现出较好的抗性,表明其具有一定的育种利用价值。

本研究通过构建广谱抗源 H4 中 2 个主效抗病基因 *Pik*-H4 和 *Pita*-H4 的近等基因系,不仅可以明确 *Pik*-H4 和 *Pita*-H4 与已知等位基因的抗性差异,还可进一步对广谱抗源 H4 的抗病机制进行阐述,同时为利用它们开展抗病育种奠定了基础。

参考文献:

- [1] MOFFAT A S. Plant genetics. Mapping the sequence of disease resistance[J]. Science, 1994, 265(5180): 1804-1805.
- [2] WANG G, VALENT B, VARIAR M, et al. Rice blast in India and strategies to develop durably resistant cultivars[M]. New York: Springer Netherlands, 2009: 359-373.
- [3] 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.
- [4] 朱 凤, 田子华, 邵德良, 等. 从 2014 年稻瘟病重发谈今后防控对策的改进[J]. 江苏农业科学, 2016, 44(8): 155-158.
- [5] 徐小金, 董 波, 陶跃之, 等. 粳稻品种 Oochikara 稻瘟病抗性基因挖掘[J]. 江苏农业学报, 2016, 32(5): 961-967.
- [6] KIYOSAWA S, LING Z. Genetic studies on rice blast relationships[M]. New York: Springer Netherlands, 2001: 145-162.

- [7] 张银霞,张 敏,田 蕾,等. 宁夏水稻品种抗稻瘟病基因 *Pi-ta*、*Pi-b* 和 *Pi9* 的检测分析[J]. 江苏农业科学,2016,44(9): 35-39.
- [8] 姜少芸,郑 露,朱 昶,等. 湖北省主栽水稻品种对稻瘟病的田间抗性鉴定[J]. 南方农业学报,2016,47(8): 1303-1312.
- [9] KIYOSAWA S. Genetics and epidemiological modeling of breakdown of plant disease resistance[J]. Annual Review of Phytopathology, 1982, 20(1): 93-117.
- [10] 徐建第,张全芳,姜明松,等. 2013 年山东省部分稻区稻瘟病菌生理小种的鉴定及分析[J]. 山东农业科学,2015,47(4): 110-111,116.
- [11] MA J, LEI C, XU X, et al. *Pi64*, encoding a novel CC-NBS-LRR Protein, confers resistance to leaf and neck blast in rice[J]. Molecular Plant-Microbe Interactions, 2015, 28(5): 558-568.
- [12] 国家水稻数据中心. 稻瘟病主效抗性基因列表[DB/OL]. [2012-6-20]. http://www.ricedata.cn/gene/gene_pi.htm.
- [13] 杨祁云,朱小源,雷财林,等. 华南籼稻稻瘟病菌致病型单基因鉴别寄主筛选[J]. 植物保护学报,2004,31(2): 113-120.
- [14] 朱小源,杨祁云,杨健源,等. 抗稻瘟病单基因系对籼稻稻瘟病菌小种鉴别力分析[J]. 植物病理学报,2004,34(4): 361-368.
- [15] 凌忠专,MEWT,王久林,等. 中国水稻近等基因系的育成及其稻瘟病菌生理小种鉴别能力[J]. 中国农业科学,2000,33(4): 1-8.
- [16] VALENT B, KHANG C H. Recent advances in rice blast effector research[J]. Curr Opin Plant Biol, 2010, 13(4): 434-441.
- [17] KOIDE Y, EBRON L A, KATO H, et al. A set of near-isogenic lines for blast resistance genes with an Indica-type rainfed lowland elite rice (*Oryza sativa* L.) genetic background[J]. Field Crops Research, 2011, 123(1): 19-27.
- [18] TELEBANCO-YANORIA M J, KOIDE Y, FUKUTA Y, et al. Development of near-isogenic lines of Japonica-type rice variety Lijiangxintuanheigu as differentials for blast resistance[J]. Breeding Science, 2010, 60(5): 629-638.
- [19] MARYJEANIE T Y, YOHEI K, YOSHIMICHI F, et al. A set of near-isogenic lines of Indica-type rice variety CO 39 as differential varieties for blast resistance[J]. Molecular Breeding, 2011, 27(3): 357-373.
- [20] WANG J C, CORRELL J C, JIA Y. Characterization of rice blast resistance genes in rice germplasm with monogenic lines and pathogenicity assays[J]. Crop Protection, 2015, 72: 132-138.
- [21] WANG J C, JIA Y, WEN J W, et al. Identification of rice blast resistance genes using international monogenic differentials[J]. Crop Protection, 2013, 45(3): 109-116.
- [22] 孙大元. 广谱抗源 H4 抗稻瘟病的分子机制研究[D]. 广州:华南农业大学, 2014.
- [23] 孙大元,肖武名,杨祁云,等. 空间诱变水稻 DH104 的稻瘟病抗性分析及抗病基因定位[J]. 华南农业大学学报, 2011, 32(3): 18-21.
- [24] 孙大元,周丹华,肖武名,等. 利用 MAS 技术培育高抗稻瘟病的杂交水稻恢系航恢 1173[J]. 华北农学报, 2014, 29(6): 121-125.
- [25] XIAO W, YANG Q, SUN D, et al. Identification of three major *R* genes responsible for broad-spectrum blast resistance in an indica rice accession[J]. Molecular Breeding, 2015, 35(1): 1-11.
- [26] XIAO W, YANG Q, WANG H, et al. Identification and fine mapping of a resistance gene to Magnaportheorae in a space-induced rice mutant[J]. Molecular Breeding, 2011, 28(3): 303-312.
- [27] XIAO W M, YANG Q, WANG H. Identification and fine mapping of a major *R* gene to Magnaportheorae in a broad-spectrum resistant germplasm in rice[J]. Molecular Breeding, 2012, 30(4): 1715-1726.
- [28] 朱小源,杨健源,陈玉托,等. 引致天优 998 抗性丧失的稻瘟病菌小种鉴定及其致病性测定[J]. 广东农业科学, 2008(12): 84-86.
- [29] 杨祁云,伍尚忠,朱小源,等. 广东稻瘟病菌的遗传宗谱与致病性的关系[J]. 植物保护学报, 2000, 27(4): 289-294.
- [30] HOSPITAL F, CHEVALET C, MULSANT P. Using markers in gene introgression breeding programs[J]. Genetics, 1992, 132: 1199-1210.
- [31] MURRAY M G, THOMPSON W F. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA[J]. Nucleic Acids Res, 1980, 8(19): 4321-4325.
- [32] 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]. Theor Appl Genet, 2012, 125(5): 1047-1055.
- [33] 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 Phytol, 2011, 189(1): 321-334.
- [34] ZHAI C, ZHANG Y, YAO N, et al. Function and interaction of the coupled genes responsible for *Pik-h* encoded rice blast resistance[J]. PLoS One, 2014, 9(6): e98067.
- [35] LI L, WANG L, JING J, et al. The *Pik m* gene, conferring stable resistance to isolates of Magnaportheorae, was finely mapped in a crossover-cold region on rice chromosome 11[J]. Molecular Breeding, 2007, 20(2): 179-188.
- [36] WANG L, XU X, LIN F, et al. Characterization of rice blast resistance genes in the *Pik* cluster and fine mapping of the *Pik-p* locus[J]. Phytopathology, 2009, 99(8): 900-905.
- [37] SINGH W H, KAPILA R K, SHARMA T R, et al. Genetic and physical mapping of a new allele of *Pik* locus from japonica rice 'Liziangxintuanheigu'[J]. Euphytica, 2015, 205(3): 889-901.
- [38] WU W, WANG L, ZHANG S, et al. Stepwise arms race between *AvrPik* and *Pik* alleles in the rice blast pathosystem[J]. Mol Plant Microbe Interact, 2014, 27(8): 759-769.
- [39] 杨健源,陈 深,曾列先,等. 稻瘟病主效抗性基因对广东省籼稻稻瘟病菌的抗性评价[J]. 中国水稻科学, 2008, 22(2): 190-196.

(责任编辑:陈海霞)