

辽宁地区水稻资源抗稻瘟病基因的检测分析

王丽丽¹, 赵家铭², 马作斌^{1,3}, 郑文静², 马殿荣¹

(¹沈阳农业大学水稻研究所, 沈阳 110161; ²辽宁省农业科学院创新中心, 沈阳 110161; ³辽宁省水稻研究所, 沈阳 110161)

摘要:为了明确辽宁地区水稻资源中抗稻瘟病基因的分布情况及抗病效应, 选取辽宁地区水稻资源 176 份, 鉴定了抗稻瘟病基因 *pi21*、*Pi36*、*Pi37*、*Pita*、*Pid2*、*Pid3*、*Pi5* 及 *Pib* 在这些材料中的分布情况, 并接种鉴定了这些材料对稻瘟病的抗性。结果表明: 176 份供试材料中, 83 份对稻瘟病表现抗病, 栽培稻、杂草稻及农家种中抗病品种所占的比率分别为 41.48%、1.14% 及 4.54%。抗稻瘟病基因 *pi21*、*Pi36* 和 *Pi37* 在所有参试材料中均未检测到, 且分别有 74 份、49 份、47 份、52 份及 89 份材料携带 *Pita*、*Pid2*、*Pid3*、*Pi5* 及 *Pib* 的抗病等位基因。抗病基因绝大部分分布在栽培种中, 农家种和杂草稻中分布较少。不含有抗稻瘟病基因和只携带单个抗病基因的材料对稻瘟病的抗性均较差, 而抗病基因聚合可不同程度提高材料的抗性。经检测, 不含有本试验鉴定的 *pi21* 等 8 个已克隆抗病基因的材料共 32 份, 其中表现抗病的占 21.87%; 只携带 1 个抗稻瘟病基因的材料为 52 份, 表现抗病的占 17.31%; 携带 2 个抗稻瘟病基因的材料为 39 份, 表现抗病的占 69.23%, 其中以携带 *Pita* + *Pi5* 的材料最多 (14 份), 且均表现抗病; 携带 3 个抗稻瘟病基因的材料为 31 份, 表现抗病的占 77.42%, 以携带 *Pita* + *Pid3* + *Pi5* 的材料抗性最强; 携带 4 个抗稻瘟病基因的水稻材料 22 份, 表现抗病的占 72.73%, 携带 5 个抗病基因的水稻材料未检测到。

关键词: 水稻品种; 稻瘟病; 表型鉴定; 基因型鉴定; 基因聚合

Identificating and Analyzing to Rice Blast Resistant Genes in Rice Germplasm Resources of Liaoning Province

WANG Li-li¹, ZHAO Jia-ming², MA Zuo-bing^{1,3}, ZHENG Wen-jing², MA Dian-rong¹

(¹Rice Research Institute Shenyang Agriculture University, Shenyang 110161; ²Liaoning Innovation Center of the Academy of Agriculture Sciences, Shenyang 110161; ³Rice Research Institute of Liaoning Province, Shenyang 110161)

Abstract: To understand the distribution of rice blast resistant genes and their contribution to rice blast disease in Liaoning Province, we selected 176 rice germplasm, and identified the distribution of rice blast resistance genes *pi21*, *Pi36*, *Pi37*, *Pita*, *Pid2*, *Pid3*, *Pi5* and *Pib* in these germplasm. Meanwhile, the phenotypes of rice blast resistance of these germplasm were studied by inoculating. The results showed that 83 germplasm were resistant to rice blast disease, among them, the rates of cultivars, weedy rice and landraces were 41.48%, 1.14% and 4.54%, respectively. Rice blast resistance genes *pi21*, *Pi36* and *Pi37* were not detected in all rice germplasm, and 74, 49, 47, 52 and 89 germplasm carried *Pita*, *Pid2*, *Pid3*, *Pi5* and *Pib*, respectively. Most of the genes were found in cultivars, but they were rare in landraces and weedy rice. Most of the germplasm that had no any rice blast resistant genes and carried only single rice blast resistant gene were susceptible to rice blast. Gene pyramiding could improve the resistant to some extent. In this test, about 32 germplasm did not carry any rice blast resistance genes that we identified, and only 21.87% of which were resistant to rice blast; about 52 germplasm carried single rice blast resistance gene, and only 17.31% of which were resistant to rice blast, too; about 39 germplasm carried two rice blast resistance genes, and 69.23% of which showed resistant to this disease. Within them, 14 germplasm that car-

收稿日期: 2016-07-06 修回日期: 2016-10-25 网络出版日期: 2017-02-17

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.4996.S.20170217.1107.006.html>

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31571993); 公益性行业 (农业) 科研专项课题 (201203026-3); 国家“863”计划项目 (2014AA10A603)

第一作者主要从事水稻分子遗传改良研究。E-mail: 13889316051@163.com; 赵家铭为共同第一作者

通信作者: 郑文静, 主要从事水稻分子遗传改良研究。E-mail: zwj27@126.com

马殿荣, 主要从事水稻种质资源、高产育种及水稻栽培生理研究。E-mail: madianrong@163.com

ried *Pita* and *Pi5* all showed resistant to rice blast; among 31 germplasm carried three rice blast resistance genes, the germplasm that were resistant to rice blast accounted for 77.42%, and the resistance of germplasm that carried *Pita*, *Pid3* and *Pi5* simultaneously were signally good; about 22 germplasm carried four rice blast resistance genes, with 72.73% of which were resistant to rice blast; the germplasm carried five rice blast resistance genes were not found.

Key words: rice varieties; rice blast; phenotype identification; genotype identification; gene pyramiding

水稻是世界上最重要的粮食作物之一,世界上超过一半的人口以稻米为食。水稻是中国粮食安全和农业可持续发展的重要战略资源^[1-3]。由稻瘟病菌(无性态: *Pyricularia grisea* Sacc.)引起的稻瘟病,是水稻生产上最具毁灭性的病害之一,也是世界性的真菌病害^[4]。该病既可造成水稻减产,也可降低水稻的品质,是限制水稻生产的重要因素。辽宁省作为优质东北大米的主产区,水稻生产也一直遭受稻瘟病的危害,每隔几年就有一次较大的流行^[5-7]。自2000年以来,辽宁省曾爆发4次稻瘟病大流行,累计发病面积达 1.2×10^6 hm²,造成 6.7×10^5 hm² 以上的稻田严重减产^[3,8]。而防控稻瘟病的危害,最经济有效的方法仍是选育及推广抗病水稻新品种。

目前育种家进行抗病品种选育,采取的主要方法是通过将主栽品种与抗病亲本杂交,再将后代于病害重发区进行自然鉴定,进而筛选抗病新品系来进行。但由于缺乏对抗源材料所携带抗稻瘟病基因的了解,在抗性亲本选择上目的性不强,对杂交后代的选择效率也较低。因此,鉴定水稻品种抗瘟基因型,根据检测结果制定育种策略,并利用分子标记辅助聚合主效抗病基因,拓宽水稻品种的抗谱,是育种人员急需开展的工作。目前已经报道了69个抗稻瘟病位点上共85个主效基因^[9-10],其中25个基因已被成功克隆,包括 *Pia*、*Pib*、*Pita*、*Pi2*、*Pi9*、*Piz-t*、*Pigm*、*Pid2*、*Pid3*、*Pi5*、*pi21*、*Pi25*、*Pi36*、*Pi37*、*Pit*、*Pish*、*Pik*、*Pik-h/Pi-54*、*Pik-m*、*Pik-p*、*pb1*、*Pi56*、*Pi63*、*Pi1* 和 *Pi50*。对于抗稻瘟病基因在品种中的分布,国内外学者也进行过大量的鉴定研究工作,并利用相关的分子标记进行抗病品种的辅助选择或聚合育种,如李进斌等^[11]利用 *Pita* 和 *Pib* 抗病基因序列建立的分子标记对材料进行了鉴定;时克等^[12]已将 *Pia*、*Pib* 及 *Pi9* 聚合到9311和明恢63等杂交稻亲本中,获得了携带不同抗性基因的近等基因系和2~3个抗性基因的聚合系;程芳艳等^[13]分析了广谱抗稻瘟病基因 *Pib*、*Pi5* 在东北三省水稻品种中的分布;刘华招等^[14]研究了抗病基因 *Pib* 和 *Pita* 在黑

龙江省主栽品种中的分布及利用价值。王妍等^[15]鉴定了 *Pita*、*Pid2*、*Pid3* 等基因在24份辽宁主栽水稻品种中的分布及等位基因的序列变异情况。但目前对品种的抗稻瘟病基因鉴定多数停留在单个基因的鉴定水平上,而利用多个基因的标记大规模开展水稻育种亲本抗稻瘟病基因型鉴定的工作仍较少,因此限制了多基因聚合效应的验证及多基因聚合品种的选育。本研究收集了辽宁省主栽水稻品种、农家种及杂草稻共176份,利用 *Pita*、*Pid2*、*Pid3*、*Pi5*、*pi21*、*Pi36*、*Pi37* 及 *Pib* 的功能标记及连锁标记鉴定了8个抗病基因在176个材料中的分布情况,同时结合这些材料的抗稻瘟病表型鉴定结果分析抗稻瘟病基因单个分布及不同基因聚合在辽宁地区的抗病效应,研究结果对于抗稻瘟病分子育种中的亲本选择、后代筛选及基因聚合等均具有重要的参考价值。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 水稻材料 本研究的试验材料包括辽宁省各地主栽水稻品种、杂草稻材料和农家种,共176份。其中134份栽培种来自沈阳农业大学水稻研究所、铁岭市农科院水稻研究所、丹东市农科院水稻研究所及辽宁盐碱地利用研究所,杂草稻材料12份由沈阳农业大学提供,农家种材料30份引自辽宁省种质资源库(辽宁省农业科学院作物基因资源储备中心)。

1.1.2 稻瘟病菌 用于人工接种鉴定的稻瘟病菌共8个生理小种,分别是ZA1、ZA9、ZB1、ZB13、ZC1、ZE1、ZF1和ZG1,为辽宁各地区流行的主要菌群,由沈阳农业大学植保学院刘志恒教授及魏松红教授提供。

1.2 抗稻瘟病表型鉴定方法

1.2.1 抗病鉴定圃田间自然鉴定 田间自然鉴定选在稻瘟病常年高发的辽宁省东港市大孤山镇抗病鉴定圃进行,由于该地区雾露时间长,日照时间相对较短,在水稻整个生育期日平均气温达到22~26℃,具有诱导稻瘟病发病的有利地理环境条件,历年稻

瘟病发病都非常严重。试验中每份材料设置 1 个小区,共 2 行,每行 10 丛,行株距为 30 cm × 16 cm,各品种随机排列,每隔 10 行加种 2 行诱发品种丽江新团黑谷,并将其作为感病品种对照。病圃四周也插植该诱发品种 3~6 行。在水稻全生育期保持适当水层,适当增施一些氮肥,根据病圃害虫、杂草发生种类和程度使用杀虫剂、除草剂,不喷施杀菌剂。

1.2.2 人工接种鉴定

1.2.2.1 稻瘟病菌产孢培养 将生长力旺盛的稻瘟病菌丝涂到番茄燕麦培养基上,25~27℃培养 3~4 d,稻瘟病菌丝长到培养皿的 1/4 且呈现灰白色时,用灭菌的棉签将菌丝轻轻刮掉,在培养皿上盖上一层纱布,始终使纱布保持湿润状态,继续培养 2~3 d,此时将产生大量稻瘟病孢子。

1.2.2.2 喷雾接种鉴定 将 8 个生理小种的病原菌孢子分别配成悬浮液(单位为 120 倍显微镜视野下有 20 个左右孢子),等量混合,均匀喷在 4 叶 1 心时期的幼苗上,接种后 24 h 用塑料膜覆盖保湿,并防止阳光直射。

1.2.3 致病反应型调查 田间诱发抗病表型的鉴定时期为分蘖末期(7 月上旬),人工接种鉴定抗病性调查于接种后 10 d 进行,致病反应型均参照统一标准进行评定^[16],发病级取两种鉴定方法中的感病

级别较高者,即如田间自然诱发鉴定表现为中抗(MR),人工接种鉴定表现为感病(S),则最终鉴定结果为 S。

1.3 抗稻瘟病基因型鉴定方法

取 176 份水稻材料 3~5 叶期的叶片,CTAB 法提取 DNA^[17],对于 *pi21*、*Pi36*、*Pi37*、*Pita*、*Pid2*、*Pid3*,根据其序列设计引物(表 1),扩增产物包含 6 个基因的功能性位点,PCR 产物纯化后测序,测序结果利用 seq-man 软件进行比对;对于 *Pi5* 及 *Pib*,用 2 个基因的连锁标记扩增^[18-19],从电泳结果判定基因的分布。

PCR 体系总体积 25 μL,其中 DNA 1 μL(20~100 ng/μL),上下游引物各 1 μL(10 μmol/L),5 U/μL 的 TAKARA LA *Taq*(由美国 Qiage 公司生产)0.25 μL,dNTP Mixture(2.5 mmol/L)2.5 μL,Buffer(5×)3 μL,蒸馏水 16.25 μL。PCR 反应程序如下:95℃预变性 5 min,95℃变性 30 s,55~61℃退火 30 s,72℃延伸 30~60 s(每对引物的退火温度及延伸时间见表 1),30 个循环,72℃总延伸 5 min,4℃保存。反应结束后取 6 μL PCR 产物并加入 2 μL Loading buffer,在 1% 琼脂糖凝胶(Goldenview 染色)中于 130 V 电压下电泳 0.25~0.5 h,利用凝胶成像系统观察电泳条带大小,并照相。将 25 μL 的 PCR 产物提交至中美泰和测序公司进行测序。

表 1 用于扩增抗稻瘟病基因的引物

Table 1 Primer pairs utilized for amplifying the rice blast resistant genes

抗病基因 Resistance genes	引物名称 Primer name		引物序列(5'-3') Sequence	退火温度(℃) Annealing temperature	延伸时间(s) Extension time	目的片段长度(bp) Fragment length
<i>Pita</i>	Primer1	F	ACTTCATGTTTGTCTGTACAGCA	55	30	467
		R	TCAAACAATCATCAAGTCAG			
	YL155/187	F	AGCAGGTTATAAGCTAGGCC	55	30	1042
		R	CTACCAACAAGTTCATCAA			
	YL183/187	F	AGCAGGTTATAAGCTAGCTAT	55	30	1042
		R	CTACCAACAAGTTCATCAA			
<i>Pid2</i>	Primer2	F	TCTTGCCTCCTGCGGCTAA	55	30	496
		R	CCAAAGCCTCCCTGACCAA			
<i>Pid3</i>	Primer3	F	CATGACAACCCCTCAGACAT	55	30	550
		R	ACAGAGCAGGAACCTCAGAT			
<i>Pi5</i>	Primer4	F	CCAAGTGCAACTAGAGGTATGGT	56	70	1105
		R	GTGCATCATCTTCAGATATCAGG			
<i>pi21</i>	Primer5	F	AGGTGGACTACGACGTGAAG	55	30	633
		R	GTACGGCACCAGCTTGCCT			
<i>Pi36</i>	Primer6	F	GTTTCATGATATGGTGCTCGATC	55	30	452
		R	TCCGGCAGCTCTTCTATTGTAC			
<i>Pi37</i>	Primer7	F	AATGAACTGAAGACCATGCTGGA	55	40	600
		R	TGGAAGTACATCTCGTCTAGAAG			
<i>Pib</i>	Lys145	F	TCGGTGCTCGGTAGTCACT	55	90	803
		R	GGGAAGCGGATCCTAGGTCT			
	Pibdom	F	GAACAATGCCAAACTTGAGA	55	90	365
		R	GGGTCCACATGTCAGTGAGC			

2 结果与分析

2.1 176份水稻资源的抗稻瘟病表型鉴定

抗病鉴定结果表明:感病对照(丽江新团黑谷)对稻瘟病表现高感,而各试验材料对该病敏感程度不同,综合田间诱发及人工接种的鉴定结果,176份材料中,对稻瘟病表现高抗(HR)的材料有3份,分别为沈农H10、铁粳9和盐粳456;表现抗

病(R)和中抗(MR)的材料分别有78份和2份,另有93份材料对稻瘟病表现感病,其中高感(HS)材料2份,感病(S)和中感(MS)材料分别为88份和3份。134份栽培稻品种中,有73份对稻瘟病表现抗病,占总数的41.48%;12份杂草稻材料中,有2份表现抗病,占总数的1.14%;30份农家种中,有8份表现抗病,占总数的4.55%(表2)。

表2 176份供试品种的表型和基因鉴定

Table 2 phenotype and gene identification of 176 tested varieties

编号 Number	品种名称 Name	所属类别 Category	来源 Source	穗颈瘟抗性 Panicle blast resistance	基因 Genes				
					<i>Pita</i>	<i>Pid2</i>	<i>Pid3</i>	<i>Pi5</i>	<i>Pib</i>
K1	沈农 1407	栽培稻	沈阳农业大学	R	-	+	+	+	+
K2	沈农 1405	栽培稻	沈阳农业大学	S	-	-	-	-	+
K3	沈农 1406	栽培稻	沈阳农业大学	R	-	+	+	+	+
K4	沈农 1401	栽培稻	沈阳农业大学	R	-	+	+	+	+
K5	沈农 1204	栽培稻	沈阳农业大学	R	+	-	-	+	+
K6	沈农 9816	栽培稻	沈阳农业大学	R	+	-	-	+	+
K7	千重浪 2	栽培稻	沈阳农业大学	R	+	-	-	+	+
K8	沈农 1402	栽培稻	沈阳农业大学	R	+	-	-	+	-
K9	沈农 016	栽培稻	沈阳农业大学	S	-	-	-	-	+
K10	沈农 Y2010	栽培稻	沈阳农业大学	S	-	+	+	-	+
K11	沈农糯稻	栽培稻	沈阳农业大学	R	-	+	+	-	+
K12	沈农 1004	栽培稻	沈阳农业大学	R	+	-	-	+	+
K13	沈农 1001	栽培稻	沈阳农业大学	R	+	+	+	-	+
K14	沈农 9903	栽培稻	沈阳农业大学	S	-	-	-	-	+
K15	沈农 054	栽培稻	沈阳农业大学	S	-	-	-	-	+
K16	沈农 Z68	栽培稻	沈阳农业大学	R	-	-	-	+	-
K17	沈农 808	栽培稻	沈阳农业大学	S	-	-	-	-	+
K18	沈农 09001	栽培稻	沈阳农业大学	S	-	-	-	-	+
K19	沈农 09543	栽培稻	沈阳农业大学	R	+	-	-	+	+
K20	沈农 Z73	栽培稻	沈阳农业大学	R	-	-	-	+	-
K21	沈农 1501	栽培稻	沈阳农业大学	R	+	-	-	+	-
K22	沈农 1502	栽培稻	沈阳农业大学	R	+	-	-	+	-
K23	沈农 H01	栽培稻	沈阳农业大学	R	-	-	-	+	+
K24	沈农 1504	栽培稻	沈阳农业大学	HS	-	+	+	-	+
K25	沈农 1505	栽培稻	沈阳农业大学	R	+	-	-	-	+
K26	沈农 1506	栽培稻	沈阳农业大学	S	+	-	-	-	-
K27	沈农 1507	栽培稻	沈阳农业大学	R	+	-	-	+	+
K28	沈农 1508	栽培稻	沈阳农业大学	S	-	-	-	-	+
K29	沈农 1509	栽培稻	沈阳农业大学	R	+	-	-	+	-
K30	沈农 1510	栽培稻	沈阳农业大学	R	+	-	-	+	-

表 2(续)

编号 Number	品种名称 Name	所属类别 Category	来源 Source	穗颈瘟抗性 Panicle blast resistance	基因 Genes				
					<i>Pita</i>	<i>Pid2</i>	<i>Pid3</i>	<i>Pi5</i>	<i>Pib</i>
K31	沈农 1511	栽培稻	沈阳农业大学	R	+	-	-	+	+
K32	沈农 1512	栽培稻	沈阳农业大学	S	-	-	-	-	+
K33	沈农 1513	栽培稻	沈阳农业大学	S	+	-	-	+	+
K34	沈农 1402	栽培稻	沈阳农业大学	R	+	-	-	+	-
K35	沈农 1403	栽培稻	沈阳农业大学	R	+	-	-	+	-
K36	沈农 1302	栽培稻	沈阳农业大学	S	-	-	-	+	+
K37	沈农 1404	栽培稻	沈阳农业大学	R	+	-	-	+	+
K38	沈农 1306	栽培稻	沈阳农业大学	S	-	-	-	-	-
K39	沈农 09407	栽培稻	沈阳农业大学	S	-	-	-	-	+
K40	沈农 1503	栽培稻	沈阳农业大学	R	+	-	-	+	-
K41	沈农 H02	栽培稻	沈阳农业大学	S	+	-	-	-	-
K42	沈农 H03	栽培稻	沈阳农业大学	S	+	-	-	-	-
K43	沈农 H04	栽培稻	沈阳农业大学	S	+	-	-	-	-
K44	沈农 H05	栽培稻	沈阳农业大学	S	+	-	-	-	-
K45	沈农 H06	栽培稻	沈阳农业大学	S	-	-	-	-	+
K46	沈农 H08	栽培稻	沈阳农业大学	S	+	-	-	-	-
K47	沈农 H09	栽培稻	沈阳农业大学	MR	-	-	-	+	+
K48	沈农 H10	栽培稻	沈阳农业大学	HR	+	+	+	+	-
K49	沈农 H11	栽培稻	沈阳农业大学	S	+	-	-	-	-
K50	沈农 H12	栽培稻	沈阳农业大学	S	+	-	-	-	-
K51	沈农 H22	栽培稻	沈阳农业大学	S	+	-	-	-	+
K52	沈农 H23	栽培稻	沈阳农业大学	S	+	-	-	-	+
K53	沈农 H24	栽培稻	沈阳农业大学	R	+	-	-	+	+
K54	沈农 H25	栽培稻	沈阳农业大学	R	+	-	-	+	-
K55	沈农 H27	栽培稻	沈阳农业大学	R	+	-	-	+	-
K56	沈农 14077	栽培稻	沈阳农业大学	R	+	-	-	+	-
K57	沈农 H29	栽培稻	沈阳农业大学	R	+	-	-	-	+
K58	沈农 H30	栽培稻	沈阳农业大学	S	+	-	-	-	+
K59	沈农 H31	栽培稻	沈阳农业大学	S	-	-	-	-	+
K60	沈农 H32	栽培稻	沈阳农业大学	R	+	-	-	+	-
K61	沈农 H50	栽培稻	沈阳农业大学	R	-	+	+	-	+
K62	沈农 H54	栽培稻	沈阳农业大学	S	-	-	-	-	+
K63	沈农 H60	栽培稻	沈阳农业大学	S	+	-	-	+	+
K64	沈农 H62	栽培稻	沈阳农业大学	R	-	-	-	+	+
K65	沈农 H63	栽培稻	沈阳农业大学	R	+	+	+	-	+
K66	铁粳 7	栽培稻	铁岭农科院水稻研究所	R	+	-	-	-	+
K67	铁粳 9	栽培稻	铁岭农科院水稻研究所	HR	+	+	+	+	-
K68	铁粳 11	栽培稻	铁岭农科院水稻研究所	R	-	-	-	-	+
K69	铁粳 12	栽培稻	铁岭农科院水稻研究所	MR	+	+	+	-	+

表 2 (续)

编号 Number	品种名称 Name	所属类别 Category	来源 Source	穗颈瘟抗性 Panicle blast resistance	基因 Genes				
					<i>Pita</i>	<i>Pid2</i>	<i>Pid3</i>	<i>Pi5</i>	<i>Pib</i>
K70	铁粳 13	栽培稻	铁岭农科院水稻研究所	S	-	+	+	-	+
K71	铁粳 14	栽培稻	铁岭农科院水稻研究所	R	+	+	+	-	-
K72	铁 09B161	栽培稻	铁岭农科院水稻研究所	S	+	-	-	-	-
K73	铁 12A18	栽培稻	铁岭农科院水稻研究所	MS	+	+	+	-	+
K74	铁 13A3	栽培稻	铁岭农科院水稻研究所	R	+	+	+	-	+
K75	铁 13A16	栽培稻	铁岭农科院水稻研究所	R	+	+	+	-	-
K76	铁 9936	栽培稻	铁岭农科院水稻研究所	R	-	-	-	-	-
K77	铁优 3	栽培稻	铁岭农科院水稻研究所	R	-	+	+	+	+
K78	铁优 4	栽培稻	铁岭农科院水稻研究所	R	+	+	+	-	+
K79	铁优 8	栽培稻	铁岭农科院水稻研究所	R	+	+	+	-	+
K80	铁优 9	栽培稻	铁岭农科院水稻研究所	S	+	+	+	-	+
K81	铁优 12	栽培稻	铁岭农科院水稻研究所	S	+	+	+	-	+
K82	铁优 13	栽培稻	铁岭农科院水稻研究所	R	+	+	+	-	+
K83	铁 14A1	栽培稻	铁岭农科院水稻研究所	S	+	-	+	-	-
K84	丹粳 1 号	栽培稻	丹东农科院水稻研究所	R	-	-	-	-	-
K85	丹粳 18	栽培稻	丹东农科院水稻研究所	S	-	-	-	-	+
K86	丹早稻 53	栽培稻	丹东农科院水稻研究所	R	-	+	+	-	-
K87	丹 426	栽培稻	丹东农科院水稻研究所	R	+	+	+	-	-
K88	丹 621	栽培稻	丹东农科院水稻研究所	R	+	+	+	-	-
K89	丹 103	栽培稻	丹东农科院水稻研究所	R	-	+	+	-	+
K90	丹 910	栽培稻	丹东农科院水稻研究所	R	-	+	+	-	+
K91	丹 578	栽培稻	丹东农科院水稻研究所	R	-	+	-	-	+
K92	丹 579	栽培稻	丹东农科院水稻研究所	R	-	-	-	-	+
K93	丹 99	栽培稻	丹东农科院水稻研究所	S	-	-	-	-	+
K94	丹粳 15	栽培稻	丹东农科院水稻研究所	S	-	-	-	-	+
K95	中丹 4 号	栽培稻	丹东农科院水稻研究所	S	-	-	-	-	+
K96	DR211	栽培稻	丹东农科院水稻研究所	S	-	-	-	-	-
K97	新 22-10	栽培稻	丹东农科院水稻研究所	R	+	-	-	+	-
K98	港丰 2 号	栽培稻	丹东农科院水稻研究所	S	-	-	-	-	+
K99	津原 88	栽培稻	丹东农科院水稻研究所	HS	-	-	+	-	-
K100	港育 7 号	栽培稻	丹东农科院水稻研究所	S	-	-	-	-	-
K101	金禾 2 号	栽培稻	丹东农科院水稻研究所	R	-	+	-	-	-
K102	盐粳 47-8	栽培稻	辽宁盐碱地利用研究所	S	-	-	-	-	+
K103	盐粳 47-8 东	栽培稻	辽宁盐碱地利用研究所	S	-	-	-	+	+
K104	盐粳 47-8 中	栽培稻	辽宁盐碱地利用研究所	R	-	-	+	+	+
K105	盐粳 456	栽培稻	辽宁盐碱地利用研究所	HR	+	-	+	-	-
K106	盐粳 933	栽培稻	辽宁盐碱地利用研究所	S	+	+	+	-	+
K107	盐 431	栽培稻	辽宁盐碱地利用研究所	R	+	+	-	-	+
K108	盐 1301	栽培稻	辽宁盐碱地利用研究所	R	+	+	-	-	+

表 2(续)

编号 Number	品种名称 Name	所属类别 Category	来源 Source	穗颈瘟抗性 Panicle blast resistance	基因 Genes				
					<i>Pita</i>	<i>Pid2</i>	<i>Pid3</i>	<i>Pi5</i>	<i>Pib</i>
K109	盐 1302	栽培稻	辽宁盐碱地利用研究所	R	+	-	+	-	-
K110	盐 1401	栽培稻	辽宁盐碱地利用研究所	S	-	-	-	-	+
K111	C103	栽培稻	辽宁盐碱地利用研究所	S	-	-	-	+	-
K112	C139	栽培稻	辽宁盐碱地利用研究所	S	-	-	-	-	+
K113	C310	栽培稻	辽宁盐碱地利用研究所	R	+	-	-	-	-
K114	C314	栽培稻	辽宁盐碱地利用研究所	S	+	-	+	-	-
K115	H107	栽培稻	辽宁盐碱地利用研究所	S	-	-	+	-	+
K116	H168	栽培稻	辽宁盐碱地利用研究所	R	+	+	-	-	+
K117	H172	栽培稻	辽宁盐碱地利用研究所	R	+	+	+	-	+
K118	337	栽培稻	辽宁盐碱地利用研究所	S	-	-	-	-	+
K119	L35	栽培稻	辽宁盐碱地利用研究所	S	-	+	+	-	+
K120	盐糯	栽培稻	辽宁盐碱地利用研究所	R	-	-	+	+	-
K121	J1	栽培稻	辽宁盐碱地利用研究所	S	+	+	-	-	+
K122	Q6	栽培稻	辽宁盐碱地利用研究所	MS	-	+	+	+	+
K123	Q19	栽培稻	辽宁盐碱地利用研究所	S	-	-	-	-	+
K124	Q25	栽培稻	辽宁盐碱地利用研究所	R	+	+	-	-	+
K125	Q26	栽培稻	辽宁盐碱地利用研究所	R	+	+	+	-	+
K126	花粳 8	栽培稻	辽宁盐碱地利用研究所	S	-	-	-	+	-
K127	花粳 15	栽培稻	辽宁盐碱地利用研究所	R	-	+	+	+	-
K128	花粳 22	栽培稻	辽宁盐碱地利用研究所	S	-	-	-	+	-
K129	花粳 1306	栽培稻	辽宁盐碱地利用研究所	R	+	-	-	+	-
K130	花粳 1404	栽培稻	辽宁盐碱地利用研究所	S	+	-	-	-	+
K131	花粳 1416	栽培稻	辽宁盐碱地利用研究所	S	-	-	+	-	+
K132	花粳 1417	栽培稻	辽宁盐碱地利用研究所	MS	-	+	+	-	-
K133	花粳 1418	栽培稻	辽宁盐碱地利用研究所	R	+	-	-	-	+
K134	花粳 1425	栽培稻	辽宁盐碱地利用研究所	R	-	-	-	-	+
K135	07—147(07-7)	杂草稻	取自宁夏	S	-	-	-	-	-
K136	07—149(07-9)	杂草稻	取自宁夏	S	-	-	-	+	-
K137	07—150(07-10)	杂草稻	取自宁夏	S	-	-	-	-	-
K138	07—151(07-11)	杂草稻	取自宁夏	R	-	-	-	-	-
K139	07—155(07-4)	杂草稻	取自连云港	S	-	+	-	-	-
K140	07—157(07-6)	杂草稻	取自连云港	S	-	+	-	-	-
K141	07—159(07-8)	杂草稻	取自连云港	R	-	+	+	-	-
K142	07—181(07-12)	杂草稻	取自上海	S	+	+	+	-	+
K143	03—1	杂草稻	取自上海	S	-	-	-	-	-
K144	03—3	杂草稻	取自上海	S	-	-	-	-	-
K145	03—14	杂草稻	取自上海	S	-	-	-	-	-
K146	03—16	杂草稻	取自上海	S	-	-	-	-	+
K147	华吹雪	农家种	辽宁省种质资源库	S	-	-	-	-	-
K148	一目惚	农家种	辽宁省种质资源库	S	-	-	-	+	-
K149	梦明	农家种	辽宁省种质资源库	R	-	-	-	-	-

表 2(续)

编号 Number	品种名称 Name	所属类别 Category	来源 Source	穗颈瘟抗性 Panicle blast resistance	基因 Genes				
					<i>Pita</i>	<i>Pid2</i>	<i>Pid3</i>	<i>Pi5</i>	<i>Pib</i>
K150	清锦	农家种	辽宁省种质资源库	S	-	-	-	-	-
K151	越实	农家种	辽宁省种质资源库	R	-	-	-	+	-
K152	二节稻	农家种	辽宁省种质资源库	S	-	-	-	-	-
K153	太南稻	农家种	辽宁省种质资源库	S	-	-	-	-	-
K154	芦苇稻	农家种	辽宁省种质资源库	R	-	-	-	+	-
K155	白大肚兴亚	农家种	辽宁省种质资源库	S	-	-	-	-	-
K156	红尖	农家种	辽宁省种质资源库	R	-	-	-	-	-
K157	永海稻	农家种	辽宁省种质资源库	R	+	+	-	-	+
K158	干拓稻	农家种	辽宁省种质资源库	R	+	+	+	-	+
K159	农安稻	农家种	辽宁省种质资源库	S	-	+	-	-	+
K160	太星稻	农家种	辽宁省种质资源库	R	-	-	-	-	-
K161	美山锦	农家种	辽宁省种质资源库	S	-	-	-	+	-
K162	津轻旭	农家种	辽宁省种质资源库	R	-	-	-	-	-
K163	心待	农家种	辽宁省种质资源库	S	-	-	-	-	-
K164	挂桥	农家种	辽宁省种质资源库	S	-	-	-	-	-
K165	隆化大红谷欠	农家种	辽宁省种质资源库	S	-	-	-	-	-
K166	白大肚	农家种	辽宁省种质资源库	S	-	-	-	-	-
K167	红毛子	农家种	辽宁省种质资源库	S	-	-	-	-	-
K168	红粘稻	农家种	辽宁省种质资源库	S	-	-	-	-	-
K169	大黄粳子	农家种	辽宁省种质资源库	S	-	-	-	+	-
K170	小白粳子	农家种	辽宁省种质资源库	S	-	-	-	-	-
K171	五常白毛	农家种	辽宁省种质资源库	S	-	-	-	-	-
K172	光头	农家种	辽宁省种质资源库	S	-	-	-	-	-
K173	红粘稻-1	农家种	辽宁省种质资源库	S	-	-	-	-	-
K174	猪毛稻	农家种	辽宁省种质资源库	S	-	-	-	+	-
K175	火稻子	农家种	辽宁省种质资源库	S	-	-	-	-	-
K176	白芒稻	农家种	辽宁省种质资源库	S	-	-	-	-	-

S:感病;MS:中感;HS:高感;R:抗病;MR:中抗;HR:高抗;+表示携带该基因;-表示不携带该基因

S:Susceptible,MS:Moderate susceptible,HS:High susceptible,R:Resistant,MR:Moderate resistant,HR:High resistant,“+” shows the variety carries the gene,“-” shows the variety does not carry the gene

2.2 8个抗稻瘟病基因在不同类型水稻资源中的分布及其抗病效应分析

2.2.1 *Pita* 在 176 份材料中的分布及其抗病效应分析

Pita 基因编码的蛋白由 928 个氨基酸组成,其抗、感等位基因的差异位于第 918 位氨基酸,抗病品种中的该位点为丙氨酸,而感病品种该位点是丝氨酸^[20]。以参试品种的 DNA 为模板,利用本研究设计的引物 Primer1,扩增产物约为 467 bp,其中,功能性位点位于 432 bp 处,如该位点显示为 G,则表明品种携带 *Pita* 的抗病等位基因,如该位点为 T,表明品种携带 *Pita* 的感病等位基因。如图 1 所示,

176 个材料中沈农 9816 等 74 份材料在功能性位点处的碱基序列为 GCT,其余 102 份材料均为 TCT。表明 74 份水稻材料携带 *Pita* 的抗病等位基因。这些材料绝大部分为栽培种,只有 1 份杂草稻材料和 2 份农家种携带该基因。74 份材料中对稻瘟病表现 MR~HR 的材料为 50 份,占 67.57% (图 2)。为了进一步确认鉴定结果,本研究还参考前人的鉴定方法^[21],利用显性分子标记 YL155/187 和 YL183/187 进行了重复性验证(图 3),结果表明利用两对引物扩增的鉴定结果与本研究利用测序技术进行功能性位点鉴定的结果一致。

		400 410 420 430 440
► Translate	► Consensus	AGCTTCTTTCTTTCTCTGCCGTGGCTTCTATCTTTACCTTCTATGCACTTTCA
Os12g0281300.seq(1>467)	→	AGCTTCTTTCTTTCTCTGCCGTGGCTTCTATCTTTACCTTCTATGCACTTTCA
► Shen Nong 9816.ab1(13>442)	→	AGCTTCTTTCTTTCTCTGCCGTGGCTTCTATCTTTACCTTCTATGCACTTTCA
► Shen Nong 1407.ab1(18>443)	→	AGCTTCTTTCTTTCTCTGCCGTGGCTTCTATCTTTACCTTCTATGCACTTTCA

沈农 9816 等 74 个品种在图中 432 ~434 碱基处为 GCT,编码丙氨酸;沈农 1407 等 102 个品种在相应位点碱基序列为 TCT,编码丝氨酸。加粗部分为品种间的多态性位点,下同
 The 432-434th bp of *Pita* allele in 74 varieties including Shennong 9816 is GCT, coding alanine; instead, in 102 varieties such as Shennong1407, the sequence is TCT, coding serine. The polymorphisms are shown in overstriking, the same as below

图 1 *Pita* 抗感等位基因序列比对

Fig. 1 Resistant and susceptible alleles of *Pita*

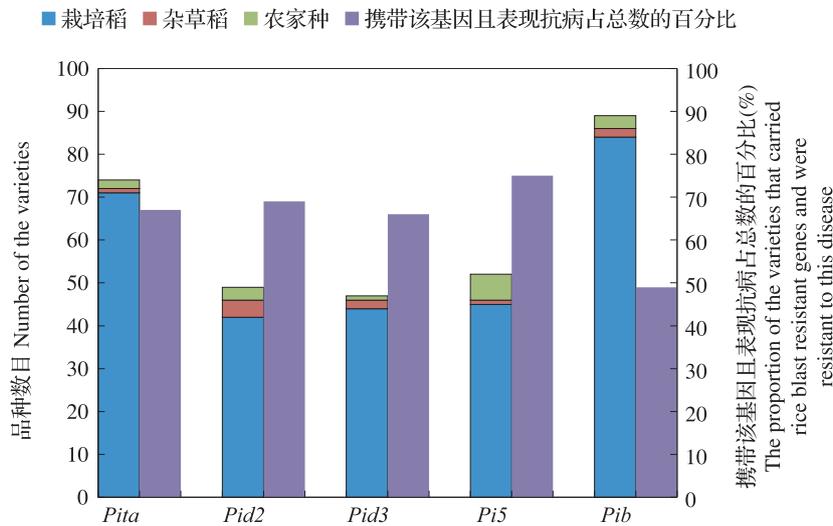
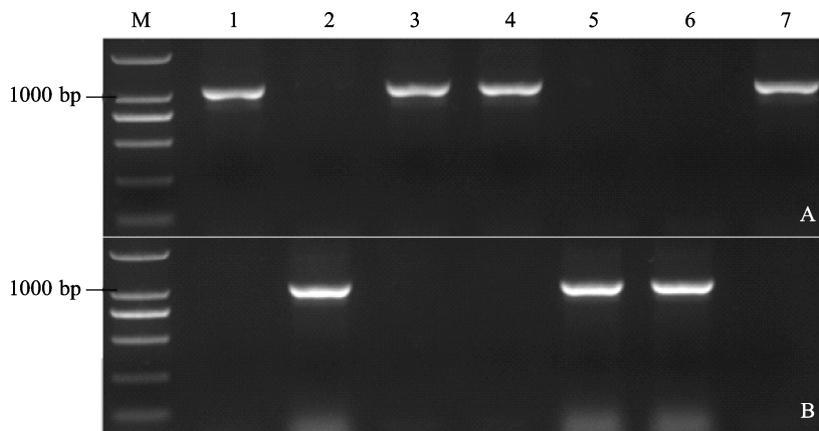


图 2 5 个基因在 176 份材料中的分布

Fig. 2 The distribution of 5 genes in 176 rice varieties



A 为抗病等位基因 *Pita* 显性分子标记 YL155/187 扩增产物;B 为感病等位基因 *Pita* 显性分子标记 YL183/187 扩增产物;M 为 DL2000 的分子量标记;泳道 1 为 *Pita* 单基因系;泳道 2 为丽江新团黑谷;泳道 3 ~7 分别为沈农 1204、沈农 9816、铁梗 12、丹 426 和永海稻
 A shows the amplification products of *Pita* allele by dominant molecular marker YL155/187, B shows the amplification products of *Pita* alleles by dominant molecular marker YL183/187, M is DL2000 molecular markers, Lane 1 is the monogenic line of *Pita*, lane 2 is Lijiangxintuanheigu, lane 3-7 are Shennong 1204, Shennong 9816, Tiejing12, Dan426 and Yonghaidao, respectively

图 3 部分水稻品种中 *Pita* 等位基因的扩增结果

Fig. 3 Amplification of *Pita* alleles in some rice varieties

2.2.2 *Pid2* 在 176 份材料中的分布及其抗病效应分析 *Pid2* 定位于水稻第 6 染色体上与着丝粒相邻处,该基因的抗感差异是由一个单碱基突变引起的,抗病等位基因第 441 位氨基酸为异亮氨酸,感病等位基因为甲硫氨酸^[22]。以 176 个品种的 DNA 为模板,利用 Primer2 进行扩增,电泳结果显示 176 个供试材料均可扩增出该特异性片段 (496 bp)。176 个材料中有 49 份 PCR 产物在第

266 碱基处为 A,即 *Pid2* 基因组 441 位氨基酸处的碱基序列为 ATA,表明这些材料携带 *Pid2* 的抗病等位基因。而其余 127 个材料在该位点为 G,表明其不携带该抗病基因(图 4)。49 份材料中有 42 份为栽培种(图 2),另有 4 份杂草稻材料和 3 份农家种材料也携带 *Pid2* 的抗病等位基因。49 份材料中对稻瘟病表现为 MR ~ HR 的材料为 34 份,占 69.39%。

	240	250	260	270	280	290
▶ Translate ▶ Consensus	AAGCACAATACCATTATTATTGTCATTATCTC					
Os06g0494100.seq(1>496) →	AAGCACAATACCATTATTATTGTCATTATCTC					
▶ Shen Nong 1407.ab1(11>426) →	AAGCACAATACCATTATTATTGTCATTATCTC					
▶ Shen Nong 1405.ab1(15>430) →	AAGCACAATACCATTATTATTGTCATTATGCTC					

沈农 1407 等 49 个材料在图中 264 ~ 266 碱基处为 ATA,编码异亮氨酸;沈农 1405 等 127 个品种在相应位点碱基序列为 ATG,编码甲硫氨酸
The 264-266th bp of *Pid2* allele in 49 germplasm including Shennong 1407 is ATA, coding isoleucine; instead, in 127 germplasm such as Shennong 1405, the sequence is ATG, coding methionine

图 4 *Pid2* 抗感等位基因序列比对

Fig. 4 Resistant and susceptible alleles of *Pid2*

2.2.3 *Pid3* 在 176 份材料中的分布及其抗病效应分析 与 *Pita* 和 *Pid2* 类似,*Pid3* 的抗感等位基因亦由单碱基突变引起。造成 *Pid3* 抗感差异的原因是该基因的起始转录位点处的第 2208 位碱基由 CAG 突变为 TAG,使 *Pid3* 基因成为假基因,丧失了抗性^[23]。本研究以参试材料 DNA 为模板,利用 Primer3 扩增,结果显示所有材料均可扩增出特异性条带,但测序结果表明只有

沈农 1001 等 47 份材料在 *Pid3* 功能性位点处碱基序列为 CAG,而其余均为为 TAG(图 5),表明只有这些材料携带 *Pid3* 的抗病等位基因,且在这 47 份材料中 44 份为栽培种,杂草稻和农家种中携带该基因的分别为 2 份和 1 份(图 2)。在携带 *Pid3* 抗病等位基因的 47 份材料中对稻瘟病表现为 MR ~ HR 的品种为 31 份,占 65.96%。

	150	160	170	180	190
▶ Translate ▶ Consensus	ATGATTTCATCTTACCCGCTCTGGGATCCAGGCAGACAGTAGTCAAGAAGTGTCT				
Os06g0330100.seq(1>550) →	ATGATTTCATCTTACCCGCTCTGGGATCCAGGCAGACAGTAGTCAAGAAGTGTCT				
▶ Shen Nong 1001.ab1(1>528) →	ATGATTTCATCTTACCCGCTCTGGGATCCAGGCAGACAGTAGTCAAGAAGTGTCT				
▶ Shen Nong 9903.ab1(1>523) →	ATGATTTCATCTTACCCGCTCTGGGATCTAGGCAGACAGTAGTCAAGAAGTGTCT				

沈农 1001 等 47 个材料在图中 173 ~ 175 碱基处为 CAG,编码谷氨酰胺;沈农 9903 等 129 个材料在相应位点碱基序列为 TAG,转录提前终止
The 173-175th bp of *Pid3* allele in 47 germplasm including Shennong 1001 is CAG, coding glutamine; instead, in 129 germplasm such as Shennong 9903, the sequence is TAG, which lead to terminate gene transcription

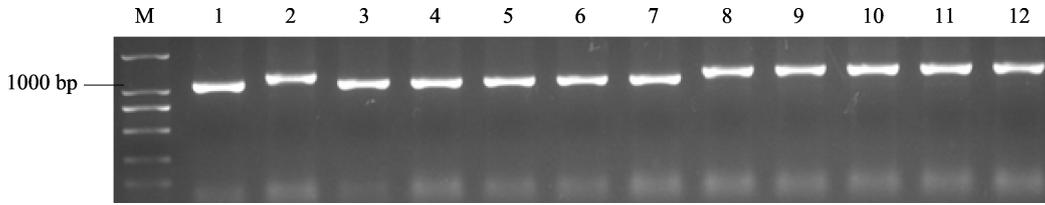
图 5 *Pid3* 抗感等位基因序列比对

Fig. 5 Resistant and susceptible alleles of *Pid3*

2.2.4 *Pi5* 在 176 份材料中的分布及其抗病效应分析 根据郑文静等^[18]的结果,利用 Primer4 扩增,从携带 *Pi5* 抗病基因的水稻材料可扩增出 1105 bp 的特异性片段。本研究中 176 个供试材料有 52 份可扩增出该特异性片段,而利用其余材料扩增后无 PCR 产物或产物片段长度与 1105 bp 差距较大(图 6)。52 份材料中 45 份为栽培种,只有 1 份杂草稻材料和 6 份农家种携带 *Pi5* 的抗病等位基因(图 2)。52 份材料中

对稻瘟病表现为 MR ~ HR 的材料为 39 份,占 75.00%。

2.2.5 *Pib* 在 176 份材料中的分布及其抗病效应分析 参照刘洋等^[19]的方法,利用 *Pib* 抗感病等位基因的显性标记 Lys145 和 Pibdom,以 176 个材料的 DNA 为模板扩增,电泳结果显示 176 个供试材料中有 89 个携带该基因(图 7),但其中只有 44 份材料对稻瘟病表现为 MR ~ HR,仅占 49.44%(图 2)。

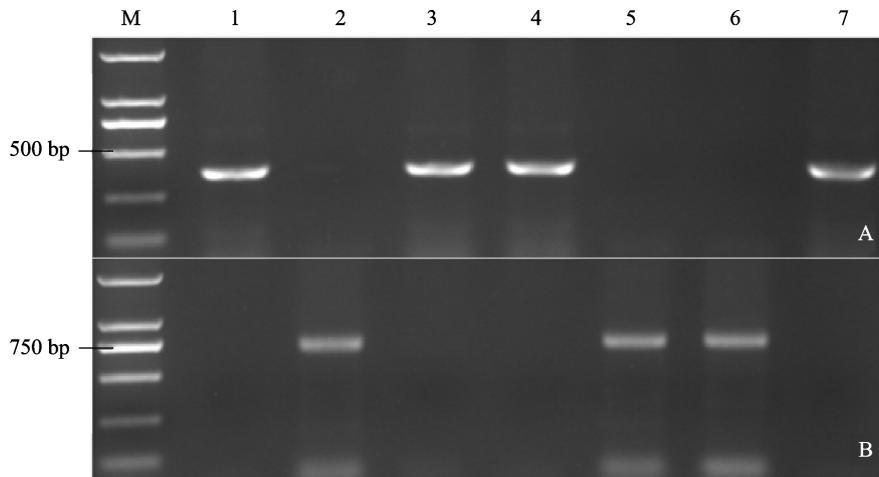


M 为 DL2000 分子量标记;泳道 1 为 *Pi5* 单基因系;2 为丽江新团黑谷;3~7 为携带 *Pi5* 抗病等位基因的材料,分别是沈农 1406、沈农 1401、千重浪 2、芦苇稻和越实;8~12 为不携带 *Pi5* 抗病等位基因的材料,分别是沈农 1405、沈农 Y2010、铁优 12、丹 579 和太星稻

M is DL2000 molecular marker, Lane 1 is the monogenic line of *Pi5*, lane 2 is Lijiangxintuanheigu, lane 3-7 are the germplasm that carried *Pi5* resistance allele, Shennong 1406, Shennong 1401, Qianchonglang2, Luweidao and Yueshi, lane 8-12 are the germplasm that didn't carry *Pi5*, Shennong 1405, Shennong Y2010, Tiewou12, Dan579 and Taixingdao

图 6 *Pi5* 连锁标记在不同水稻材料中的扩增结果

Fig. 6 Amplification results of *Pi5* linked marker in different rice germplasm



A 为抗病等位基因 *Pib* 显性分子标记 *Pibdom* 扩增产物;B 为感病等位基因 *Pib* 显性分子标记 *Lys145* 扩增产物;M 为 DL2000 分子量标记;泳道 1 为 *Pib* 单基因系;泳道 2 为丽江新团黑谷;泳道 3~7 分别为沈农 1407、沈农 1405、铁优 12、丹梗 18 和农安稻

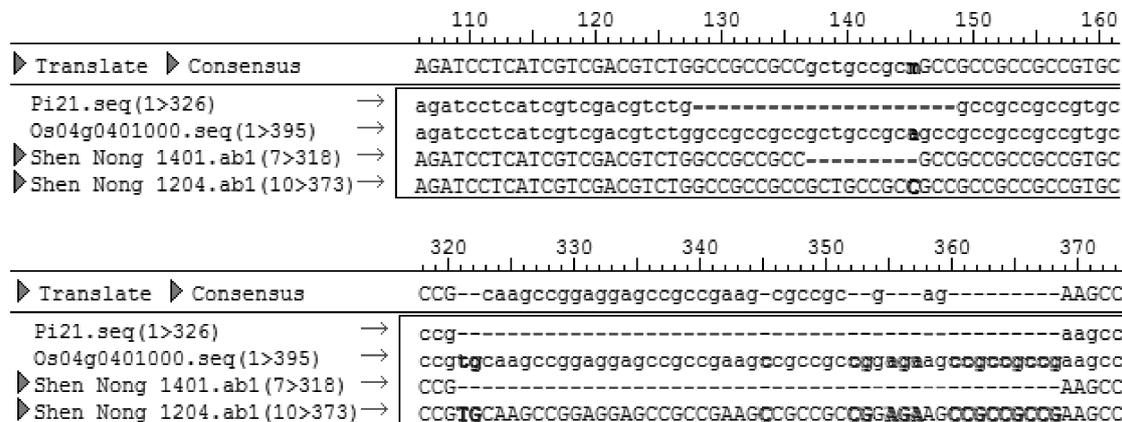
A is the amplification products of resistance allele of *Pib* by dominant molecular marker *Pibdom*, B is the amplification products of susceptible alleles of *Pib* by dominant molecular marker *Lys145*, M is DL2000 molecular marker, Lane 1 the monogenic line of *Pib*, lane 2 is Lijiangxintuanheigu, lane 3-7 are Shennong1407, Shennong1405, Tiewou12, Danjing18 and Nongandao, respectively

图 7 部分水稻材料中 *Pib* 等位基因的扩增结果

Fig. 7 The amplification results of *Pib* alleles in some rice germplasm

2.2.6 *pi21*, *Pi36*, *Pi37* 在 176 份材料中的分布及其抗病效应分析 S. Fukuoka 等^[24]的研究结果表明,抗病等位基因 *pi21* 是功能丧失型突变,与感病品种相比,抗病品种 Owarihatamochi 的 *pi21* 基因中分别有 21 bp 和 48 bp 的缺失,本试验中利用 Primer5 扩增,参试水稻材料均可扩增出 PCR 产物,测序结果表明,176 个材料的等位基因序列共分成 2 种类型,但 2 种类型与 *pi21* 的抗病等位基因相比均有差异(图 8),表明所有材料均不携带该基因。*Pi36* 编码的蛋白产物由 1056 个氨基酸组成,其抗性的产生是由于第 590 位氨基酸发生了置换(丝氨酸取代天冬氨酸)^[25]。利用 Primer6 扩增,测序结果表明本

试验中的 176 份材料的第 590 位氨基酸(图 9 中第 268~270th bp)均为天冬酰胺,即均不携带该抗病等位基因(图 9);*Pi37* 编码一个由 1290 个氨基酸组成的包含"NBS-LRR"结构的多肽产物,抗性的获得是因第 239 位(丙氨酸突变为缬氨酸)和第 247 位氨基酸(蛋氨酸突变为异亮氨酸)发生置换引起的^[24]。利用 Primer7 扩增,对 PCR 产物测序,结果显示所有材料的第 239 位氨基酸(图 10 中 295~297th bp)及 247 位氨基酸(图 10 中 319~312th bp)均分别为缬氨酸和异亮氨酸(图 10),即均非抗病等位基因。综上,参试的 176 份水稻材料均不携带 *pi21*、*Pi36* 及 *Pi37* 的抗病等位基因。

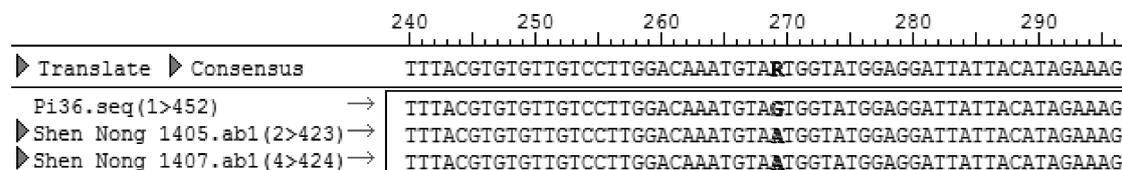


沈农 1401 等 6 个品种在图中第 136 和 321 碱基处有 9bp 和 48bp 的碱基缺失;沈农 1204 等 176 个品种在 145 碱基处检测到 1 个 SNP
Nine and forty-eight bp deletion were found in six varieties such as Shennong 1401 at 136th and 321th bp,

There was a SNP at 145th bp in 176 varieties such as Shennong 1204

图 8 *pi21* 两个不同片段的碱基缺失和突变

Fig. 8 Base deletion and mutation of *pi21* two different fragments

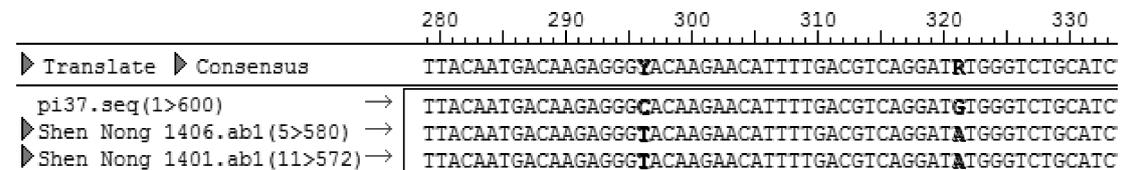


沈农 1405 等 176 个材料在图中 268 ~ 270 碱基处为 AAT, 编码天冬酰胺

The 268-270th bp of *Pi36* allele in 176 germplasm including Shennong 1405 is AAT coding asparagine

图 9 *Pi36* 抗感序列比对

Fig. 9 Resistant and susceptible allele of *Pi36*



沈农 1405 等 176 个材料在图中 295 ~ 297 碱基处为 GTA, 编码缬氨酸;在图中 319 ~ 321 碱基处为 ATA, 编码异亮氨酸

The 295-297th bp of *Pi37* allele in 176 varieties including Shennong 1405 is GTA, coding valine; instead, in the 319-321th bp of *Pi37* allele in 176 varieties is ATA, coding isoleucine

图 10 *Pi37* 抗感序列比对

Fig. 10 Resistant and susceptible allele of *Pi37*

2.2.7 单基因及多基因聚合的材料统计及其抗性分析 对各水稻材料进行抗稻瘟病基因型鉴定表明(表 3), 不含有所检测的 8 个抗稻瘟病基因的材料为 32 份, 其中 7 份表现抗病, 占 21.87%; 只携带 1 个抗病基因的材料共 52 份, 其中抗病材料占 17.31%; 由表 3 及图 11 可见, 当鉴定材料只携带某一抗病基因时其对稻瘟病的抗性均较弱, 尤其是 *Pita*, 10 份只含有该基因的材料中只有 1 份对稻瘟病表现是抗病的, 只携带 *Pid2* 的材料 3 份, 其中 1 份抗稻瘟病, 占

33.33%; 只携带 *Pid3*、*Pi5* 或 *Pib* 的水稻材料分别为 1、12 及 26 份, 其中抗病材料分别占 0%、33.33% 和 11.54%。携带 2 个抗稻瘟病基因的材料共有 39 份, 表现抗病的占 69.23%, 其中以携带 *Pita* + *Pi5* 的材料最多, 共有 14 份, 且均表现抗病; 携带 3 个抗稻瘟病基因的材料为 31 份, 表现抗病的占 77.42%, 以携带 *Pita* + *Pid3* + *Pi5* 的材料抗性最强; 携带 4 个抗稻瘟病基因的水稻材料 22 份, 表现抗病的占 72.73%, 携带 5 个抗病基因的水稻材料未检测到。

表 3 鉴定材料所携带的抗稻瘟病基因数目统计

Table 3 Numbers of rice blast resistant genes in 176 rice germplasm

水稻材料携带抗稻瘟病基因数目 Number of resistance genes carried in rice germplasm	携带抗病基因的材料数量 Number of germplasm that carried resistance gene	抗病材料个数 Number of disease- resistant germplasm	抗病比率(%) The proportion of resistant germplasm
0	32	7	21.87
1	52	9	17.31
2	39	27	69.23
3	31	24	77.42
4	22	16	72.73

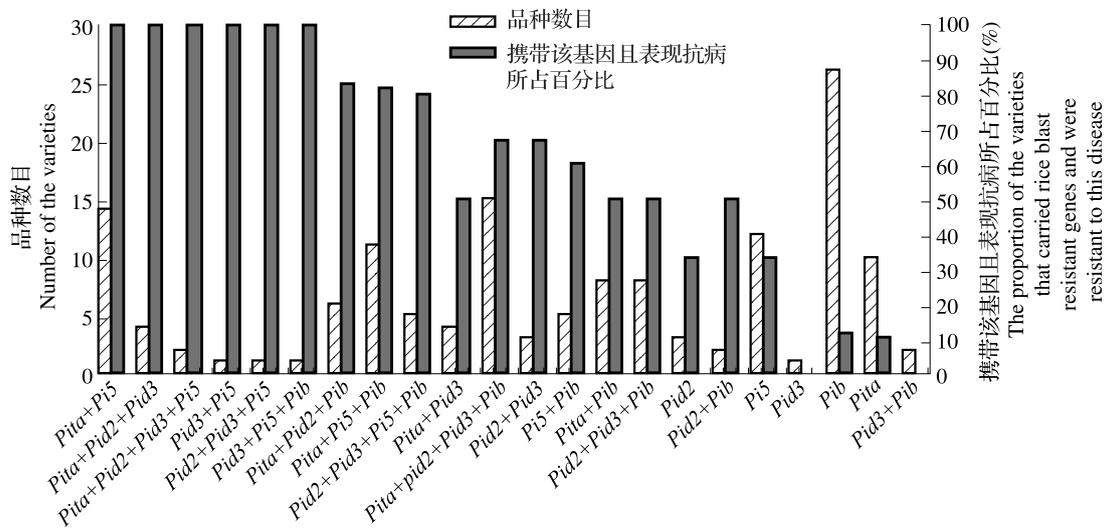


图 11 单基因及基因聚合的品种数目及不同基因的抗病效应

Fig. 11 Number of the varieties that carried one or more resistant genes and the contribution of single resistant gene or gene pyramiding

3 讨论

3.1 抗稻瘟病基因在水稻材料中的分布情况及其对抗病性的贡献

培育水稻抗病品种,筛选鉴定育种亲本中的抗稻瘟病基因是非常必要的,尤其是抗谱广且易于在育种中应用的基因。*pi21* 介导的是一种广谱持久的非小种专化性抗性,对于品种的抗性改良及保持抗性的持久性具有重要的应用价值,但遗憾的是本研究 176 份材料中未能筛到携带该基因的材料,同样,*Pi36* 和 *Pi37* 在所有材料中也未检测到,表明 3 个基因在北方稻种资源中分布较少。

Pita、*Pib*、*Pid2*、*Pid3* 和 *Pi5* 在各类材料中以不同频率出现,其中 *Pib* 的检出率最高,达所有材料的 50%,但该基因对辽宁地区稻瘟病抗性的贡献较小,26 份只携带该基因的材料中仅有 3 个表现为抗稻瘟病,且该基因与其他基因聚合后对提高品种抗性

的作用也不显著。李进斌等^[11]曾报道,云南地方稻种中携带 *Pib* 的品种占 18.8%,且这些品种均对稻瘟病表现抗病。程芳艳等^[13]鉴定了 52 份东北水稻品种抗瘟基因型,发现有 9 份材料携带 *Pib* 抗病基因,且其中有 2 份是感稻瘟病的^[21]。刘华招等^[14]对 36 份黑龙江省主栽品种鉴定表明 4 个品种携带 *Pib* 抗病基因,且对稻瘟病均表现抗病。综合以上结果,表明 *Pib* 在各地材料中分布可能较为广泛,但由于不同地区病原菌致病类型的不同,导致该基因在各地效应差异也较大。本研究中 *Pita* 的鉴定结果与 *Pib* 类似,176 份资源中约有 42.04% 的材料携带该基因,但该基因单独存在时水稻表现抗病的比率仅为 10% (图 11),而其与 *Pi5*、*Pid2* 和 *Pid3* 聚合后不同程度提高了水稻对稻瘟病的抗性。李进斌等^[11]的研究发现云南地方稻种中有 40.9% 携带 *Pita*,且绝大部分携带该基因的品种都对稻瘟病表现抗病;杨杰等^[26]研究表明 *Pita* 在我国浙江、福建、

广东、广西、贵州、四川、安徽、江西、河南、河北、吉林等地均有分布,但文中并未提及这些品种的抗性。刘华招等^[14]对36份黑龙江省主栽品种鉴定表明6个品种携带 *Pita* 抗病基因,且对稻瘟病均表现抗病。王世维等^[27]进行稻瘟病菌无毒基因监测时发现 *Avr-Pita* 在辽宁各地分布广泛,但突变类型较多,表明 *Pita* 对抵抗稻瘟病的危害具有一定的利用价值,但随着病原菌的不断进化,单一应用该基因仍有抗病丧失的风险。对水稻品种中 *Pi5* 的鉴定及其应用价值的研究,此前黑龙江省所做工作较多,程芳艳等^[13]鉴定了52份东北水稻品种抗瘟基因型,发现有8份材料携带 *Pi5* 抗病基因,但其中有5份是感稻瘟病的,表明该基因在黑龙江省应用价值不大。本研究176份参试材料中有52个携带该基因,且其中有75%表现抗稻瘟病(包括与其他基因聚合的),表明该基因在辽宁地区对品种的抗病性仍有一定贡献。*Pid2* 和 *Pid3* 均位于第6染色体,且两基因紧密连锁,本研究鉴定的176个材料中只发现3个 *Pid2* 和 *Pid3* 重组的个体,目前国内外对2个基因在水稻品种中分布及其抗病效应的研究较少。本研究鉴定发现分别有49和47份材料携带 *Pid2* 和 *Pid3* 抗稻瘟病基因,且两基因单独存在时抗病效应分别为33.33%及0,而与 *Pi5* 及 *Pita* 聚合后抗病效应大幅度提高。

3.2 不同抗稻瘟病基因的抗病效应

育种实践表明,聚合多个抗稻瘟病基因有利于拓宽品种的抗谱,提高品种对稻瘟病的抗性,本研究结果可见当水稻材料只携带 *Pita*、*Pib*、*Pid3*、*Pi5* 和 *Pid2* 时,抗病材料分别占总数的10%、11.54%、0、33.3%和33.33%,表明单基因存在时水稻抗性较差。尤其是 *Pita*,10个只携带该基因的材料仅有1份对稻瘟病表现抗病,而当与 *Pib*、*Pid3* 及 *Pi5* 聚合后,品种的抗病比率分别提高到50%、50%及100%,其中 *Pita + Pi5* 组合,14个同时携带这两个抗病基因的材料均对稻瘟病表现抗病。*Pita*、*Pib*、*Pid3*、*Pi5* 均属于NBS-LRR类基因,介导的是效应子激发免疫(ETI)。该免疫模式符合由H. H. Flor^[28]提出的经典基因对基因学说,即对应于寄主方面的每个主效的抗病基因,在病原菌方面也存在一个与之对应的无毒基因,病原菌基因的产物作为特定的效应子,被寄主中基因的产物作为受体通过受体配体模式或者警戒模式识别。因此抗病基因之间抗谱不同,即所识别的病原菌有差异,而基因聚合可扩大植物对病原菌识别的范围,拓宽抗谱,进而提高抗

性。但从本研究中单基因及多基因聚合的抗性比率来计算,基因聚合后的抗病效应远高于两基因分别存在时抗病效应的累加结果,因此,这种基因聚合后对抗病性的提高还不能简单归结于基因效应的叠加。不仅如此,品种所携带的抗病基因数目与其抗病性也非完全正相关,即并非抗病基因越多,品种抗病性越强。本研究中,31个品种携带3个抗病基因,其中24个表现抗病,占总数的77.42%;而携带4个抗稻瘟病基因的品种为22个,其中表现抗病的为16个,仅占总数的72.73%。对这些品种的基因组仔细调查发现,22个品种中有15个同时携带 *Pita + Pid2 + Pid3 + Pib*,而其中只有10个表现抗病,而在携带3个抗稻瘟病基因的品种中,4个拥有 *Pita + Pid2 + Pid3* 的品种均对稻瘟病表现抗病,从而表明 *Pib* 虽然在辽宁稻区水稻资源中广为分布,但其无论是单独存在还是与其他基因聚合均对抗性贡献不大。这也提示我们,在实际育种工作中不能盲目追求品种所携带抗病基因的数目,而应根据不同抗病基因在田间的效应及其与其他基因互作对抗性的贡献来选择性应用。

4 结论

基于本研究中176份材料的抗稻瘟病基因型及抗病表型的鉴定结果,我们可以得出以下结论,即 *pi21*、*Pi36* 及 *Pi37* 在北方稻种资源中分布极少, *Pita*、*Pib*、*Pid2*、*Pid3* 和 *Pi5* 在栽培稻中检出率较高,但在杂草稻和农家种的分布相对较少。针对辽宁地区,当品种不携带抗稻瘟病基因及只携带 *Pita*、*Pib*、*Pid2*、*Pid3* 或 *Pi5* 时对稻瘟病的抗性均较差,而基因聚合可在一定程度上提高品种对稻瘟病的抗性,其中以 *Pita* 和 *Pi5* 聚合对抗瘟性改良贡献最大。

参考文献

- [1] 赵自君. 黑龙江省水稻主产区稻瘟病流行情况气候区划及预测预报模型的研究[D]. 大庆:黑龙江八一农垦大学,2008:1-60
- [2] 王坤. 安徽省水稻主要病虫害预测及管理系统的研究[D]. 合肥:安徽农业大学,2008:1-50
- [3] 王见中. 辽宁省东港稻区稻瘟病综合防控技术研究[D]. 北京:中国农业科学院,2011:1-37
- [4] Qu S H. Rice diseases[M], 2edn. Kew Surrey: Common wealth Mycological Institute. CABI, 1985:109-201
- [5] 孙振东,刘志恒,徐成楠,等. 近年丹东地区稻瘟病发生动态分析[J]. 辽宁农业科学,2007(3):9-12
- [6] 王倩,李祥晓,王疏,等. 水稻分子育种亲本材料在东北地区的稻瘟病抗性评价[J]. 分子植物育种,2011,9(4):432-437
- [7] 陈德辉,傅金铭,赵晓宇,等. 东港地区稻瘟病流行原因分析与综合防治技术[J]. 辽宁农业科学,2005(2):57-58
- [8] 王倩,周永力,王疏,等. 我国东北稻区稻瘟病的研究进展

