

· 专题论坛 ·

水稻稻瘟病抗性基因的克隆、育种利用及 稻瘟菌无毒基因研究进展

杨德卫^{1,2}, 王莫¹, 韩利波¹, 唐定中¹, 李生平^{1,3*}

¹福建农林大学植物免疫研究中心, 福州 350002; ²福建省农业科学院水稻研究所, 福州 350018

³福建农林大学, 福建省作物设计育种重点实验室, 福州 350002

摘要 稻瘟病是世界上影响水稻(*Oryza sativa*)粮食生产的主要病害之一, 抗病基因的发掘与利用是抗病育种的基础和核心。随着寄主水稻和病原菌稻瘟病菌(*Magnaporthe oryzae*)基因组测序和基因注释的完成, 水稻和稻瘟病菌的互作体系成为研究植物与真菌互作的模式系统。该文对稻瘟病抗病基因的遗传、定位、克隆及育种利用进行概述, 并通过生物信息学分析方法, 探讨了水稻全基因组中NBS-LRR类抗病基因在水稻12条染色体上的分布情况, 同时对稻瘟病菌无毒基因的鉴定及无毒蛋白与抗病蛋白的互作进行初步分析。最后对稻瘟病抗病基因研究存在的问题进行分析并展望了未来的研究方向, 以期水稻抗稻瘟病育种发展和抗病机制的深入理解提供参考。

关键词 稻瘟病, 基因定位, 分子克隆, 分子育种, 无毒基因

杨德卫, 王莫, 韩利波, 唐定中, 李生平 (2019). 水稻稻瘟病抗性基因的克隆、育种利用及稻瘟菌无毒基因研究进展. 植物学报 54, 265–276.

水稻(*Oryza sativa*)是世界上主要的粮食作物之一, 全球有50%以上的人口以水稻为主粮(张佩胜等, 2014)。预计到2030年, 水稻年产量需在现有基础上再增产40%才能满足世界人口的需求(Khush, 2005)。由稻瘟病菌(*Pyricularia oryzae*)引起的水稻稻瘟病是一种世界性病害(Zhang et al., 2016; 胡朝芹等, 2017; 张晓慧等, 2017), 在不同的水稻种植区和生产国均有不同程度的发生(Dean et al., 2005)。在中国不同的水稻产区几乎每年都有中等以上稻瘟病病害发生。过去20年中, 稻瘟病病害还呈现不断上升趋势(Roychowdhury et al., 2013)。稻瘟病可引起水稻大幅减产(40%–50%), 严重时甚至颗粒无收(Deng et al., 2017), 其不仅对水稻产量造成影响, 还会影响稻米品质。因此, 预防稻瘟病和降低稻瘟病发病率, 对世界粮食安全具有极其重要的意义。实践证明, 选育并推广具持久和广谱抗性的水稻新品种是防治稻瘟病最有效的方法之一。

水稻抵御稻瘟菌的免疫机制研究促进了水稻抗性的遗传改良和抗病机理的深入探讨。植物防御系统

可分为2个层次。第1层次是寄主植物通过细胞质膜上的模式识别受体(pattern recognition receptors, PRRs)识别病原菌的偶联分子模式(pathogen-associated molecular patterns, PAMPs), 即引发病原菌相关分子模式激发免疫反应(PAMPs-triggered immunity, PTI), 也称基础抗性。而一些致病力强的病原菌通过分泌毒性因子抑制植物的基础抗性, 产生效应因子引发感病反应(effector-triggered susceptibility, ETS)。此时, 植物通过第2层次的抗性系统, 绝大多数利用NBS-LRR (nucleotide binding site, Leucine-rich repeat)蛋白专一性识别特定的效应因子, 引发一系列防卫反应, 抑制病原菌的生长, 即效应因子激发的免疫反应(effector triggered immunity, ETI)。在长期进化过程中, 病原菌通过丢失或改变效应因子逃脱ETI的识别, 植物则进化出新的R基因识别新的效应因子, 再次引发ETI反应, 从而形成了十分复杂的植物免疫系统(Jones and Dangl, 2006)。

由于稻瘟病菌遗传的复杂性和易变性, 新培育的水稻品种在种植多年后就有可能成为感病品种

收稿日期: 2018-09-12; 接受日期: 2019-01-08

基金项目: 福建省公益项目(No.2017R1021-5, No.2017R1021-2)、福建省农业科学院青年创新团队(No.STIT2017-3-3)、福建省农业科学院一般项目(No.A2017-13)、福建省农业科学院科技创新项目(No.PC2018-2)和福建省农业科学院青年自由探索项目(No. AA2018-21)

* 通讯作者。E-mail: lishun1981@126.com

(Kiyosawa, 1989; Li et al., 2017)。因此, 延长水稻品种的抗病周期, 提高水稻品种的稻瘟病抗性水平, 是世界水稻育种和病理学家面临的难题。本文综述了水稻稻瘟病的遗传特性、抗性基因的定位及克隆的最新进展; 并利用生物信息学方法, 探明了水稻基因组中抗病基因在水稻12条染色体上的分布; 同时对稻瘟病抗病基因的研究和利用进行了分析与展望。

1 水稻稻瘟病抗性基因的遗传

经典遗传学表明, 抗感亲本杂交后F₁表现抗病, 则该抗性基因为显性基因控制, F₁表现感病则该抗性为隐性基因, F₁介于抗、感中间型则该抗性为不完全显性基因。水稻稻瘟病抗性基因的遗传较为复杂, 一般由1或2对显性主效基因控制, 个别由3对或者更多抗病基因控制(杨勤忠等, 2009; Zhang et al., 2015a)。这些抗性基因大部分由显性基因控制, 少数由隐性或者不完全显性基因控制, 有些抗性还存在直接或间接的相互关系(Fukuoka et al., 2009)。目前, 已鉴定和克隆的稻瘟病抗性相关基因绝大部分由显性基因控制。例如, *Piz*位点的抗性基因为显性基因。目前发现, 在*Piz*位点上至少存在*Piz-t*、*Pi-z*、*Pi2*、*Pi9*和*Pigm*五个抗性位点基因(Deng et al., 2017)。其中, *Pi9*对来自10多个国家的43个稻瘟病菌均表现抗性, 携带*Pi2*基因的亲本对来自10多个国家的36个稻瘟病菌表现抗性(Liu et al., 2002)。极少数为隐性基因控制, 如已克隆的*pi21*。携带隐性*pi21*等位基因的近等基因系AA-*pi21*对10种稻瘟病菌具有抗性, 但强度弱于专一抗病性的R基因(Fukuoka et al., 2009)。

2 水稻稻瘟病抗性基因的分类

稻瘟病抗性可分为完全抗性(又称为质量抗性或垂直抗性)和部分抗性(数量抗性或水平抗性)两种(Ezuka, 1972; 杨勤忠等, 2009)。完全抗性是指寄主与病原菌之间以一种不亲和的互作方式存在, 病原菌在寄主上

不能生长和繁殖, 且不能侵染寄主植物。这种抗性基因一般由1或数对主效基因控制, 并具有小种专化抗性。例如, 源自籼稻品种地谷的主效抗稻瘟病基因*Pi-d3*, 对我国稻瘟病生理小种Zhong-10-8-14表现较强的抗性(Shang et al., 2009)。部分抗性则是指水稻寄主与病原菌以一种亲和的方式互作, 且其能减弱病原菌的侵染程度。主要表现为田间发病轻, 一般由多个微效基因控制, 是数量遗传性状, 往往与病斑大小等有关, 小种专化抗性相对较弱(Wang et al., 1994)。例如, *pi21*为非专一性抗病基因, 其激发的是一种慢速抗病反应, 而此种反应可能是一种新的持久抗病反应机制, *pi21*等位基因不影响对其它真菌和细菌性病害的抗性(Fukuoka et al., 2009)。

完全抗性的主效基因易于操作, 在水稻育种和生产中得到广泛应用。然而, 稻瘟病菌的高度变异性和不稳定性导致新培育的水稻品种在种植多年后很可能成为感病品种。部分抗性的抗性水平虽然较完全抗性低, 但抗性相对稳定和持久。因此, 完全抗性 with 部分抗性的结合利用将是未来水稻抗稻瘟病育种的方向和趋势。

3 水稻稻瘟病抗性基因的鉴定和全基因组抗性基因的预测分析

近年来, 国内外研究者利用不同的群体和方法定位了大量水稻稻瘟病相关基因。根据<http://archive.gramene.org/>网站提供的数据, 截至2018年6月10日, 已鉴定183个水稻稻瘟病抗性相关基因(QTL)。它们分别位于水稻12条不同的染色体上, 其中位于第11号染色体的抗性基因最多(28个), 位于第3号染色体的抗性基因最少(表1)。在这些基因中, 有些是单基因控制的部分抗性基因, 如*Pi34* (Zenbayashi-Sawata et al., 2007)、*Pi35* (Nguyen et al., 2006)和*Pb1* (Fujii et al., 2000; Hayashi et al., 2010)等; 有些是主效抗性基因, 如*Pi1* (Yu et al., 1996; Li et al., 2012)、*Pi2*

表1 已鉴定的水稻稻瘟病抗性相关QTL和全基因组内含有结构域的蛋白

Table 1 Identified QTL of blast resistance and protein of NBS domain in rice

染色体	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	总计
QTLs数量	34	22	8	16	3	18	19	8	10	1	16	28	183
抗性蛋白数量	45	33	18	31	20	35	27	47	23	31	154	59	523

(Zhou et al., 2006; Jiang et al., 2012b)、*Pi9* (Qu et al., 2006)、*Piz* (Hayashi et al., 2006)、*Pi-d2* (Li et al., 2015)和*Pi-d3* (Chen et al., 2011)等。

目前, 鉴定的这些稻瘟病抗性基因主要属于NBS-LRR类, 如*Pi2*与*Piz-t*。二者的编码产物仅在3个LRRs区域有8个氨基酸的差异(Zhou et al., 2006)。进一步研究表明, bZIP类转录因子APIP5与*Piz-t*互作, 以防止坏死阶段发生坏死, APIP5对于*Piz-t*的稳定性至关重要(Wang et al., 2016)。还有一些NBS-LRR类抗瘟基因调控的抗病性由2个NBS-LRR结构基因共同控制, 且只有在二者同时存在时才表现出对稻瘟病的抗性。例如, *Pik-1*和*Pik-2*共同组成*Pik*, *Pikm-1*和*Pikm-2*共同组成*Pikm* (Ashikawa et al., 2008), *pia*由2个R基因(*RGA4*和*RGA5*)组成(Hutin et al., 2016)。*Pigm*是1个包含多个NBS-LRR类抗病基因的基因簇, 含有*PigmR*和*PigmS*两个基因。研究表明, *PigmR*表达可使水稻千粒重降低, 产量下降, 而*PigmS*由于受到表观遗传调控, 仅在水稻花粉中特异表达, 可提高水稻的结实率, 使产量增加, 最终*PigmR*和*PigmS*对水稻产量的影响相互抵消。进一步研究表明, *PigmS*与*PigmR*竞争形成异源二聚体, 由于*PigmS*表达水平较低, 可为病原菌提供“避难所”, 进而减缓了稻瘟菌对*PigmR*致病性的选择和进化, 最终导致*Pigm*介导的抗病具有持久性(Deng et al., 2017)。

为了解水稻全基因组抗病相关基因的分布情况, 我们利用生物信息学方法, 对水稻粳稻品种日本晴基因组中含有的NBS结构域(<http://pfam.xfam.org/>)进行分析, 发现了523个含NBS结构域的蛋白, 其中472个为典型NBS-LRR结构域蛋白, 分布于水稻不同的染色体上(表1)。其中, 第11条染色体上的抗病相关基因最多, 预测有154个, 许多抗病基因形成了基因簇。上述研究为我们今后鉴定和分离水稻抗病相关基因提供了有价值的信息。

4 水稻稻瘟病抗性基因的克隆

水稻稻瘟病抗性基因的克隆及遗传机理研究是当前植物免疫学和分子生物学领域的研究热点。开展稻瘟病抗病基因的克隆、功能解析和稻瘟菌效应蛋白的研究

将有助于探索水稻与稻瘟病菌之间互作的分子机理(Das et al., 2012)。植物基因的克隆主要通过正向和反向遗传学两种方法实现, 正向遗传学方法是从植物表型性状到对应基因的研究, 反向遗传学方法则是从对应基因到植物表型性状的研究(Takahashi et al., 1994)。

近年来, 通过图位克隆等方法已从水稻中成功克隆了*pi21*、*Pit*、*Pi2*、*Pi9*、*Piz-t*、*Pigm*、*Ptr*和*Pita*等37个稻瘟病抗性基因(表2)。在这些抗病基因中, *Piz-t*、*Pi9*、*Pi2*和*Pigm*互为*Piz*位点上的等位基因(Deng et al., 2017); *Pi-1*、*Pikh/Pi-54*、*Pikp*和*Pikm*互为*Pik*位点上的等位基因(Zhai et al., 2011); *Pi-25*与*Pid-3*互为等位基因(Lv et al., 2013); *PiCO39*与*Pia*互为等位基因(易怒安等, 2015)。

在部分抗性方面仅鉴定了个别相关基因。*pi21*是最早在水稻中被克隆的部分抗性基因。*Bsr-d1*是近期从广谱持久抗病材料地谷中克隆的部分抗性基因。研究表明, *Bsr-d1*基因的启动子区由于1个关键碱基变异, 使得上游MYB转录因子对*Bsr-d1*的启动子结合能力增强, 从而抑制其响应稻瘟病菌诱导的基因表达, 导致*BSR-D1*调控的H₂O₂降解酶相关基因表达下调, 使得水稻细胞内的H₂O₂富集, 最终增强了水稻的抗病性。同时研究发现, *BSR-D1*等位变异后, 不仅增强了水稻的抗病性, 而且对产量和稻米品质无明显影响。进一步对全球3 000份水稻资源进行分析, 发现仅有约10%含有该变异位点, 表明该位点在今后育种中将有更大的应用空间(Li et al., 2017)。

*Ptr*是最近被鉴定的1个结构新颖的广谱抗稻瘟病基因。研究发现, *Ptr*的广谱抗性不依赖*Pi-ta*, 但*Pi-ta*的广谱抗性需要*Ptr*。对含有*Pi-ta2*基因的材料进行测序, 发现它们的*Ptr*基因型一致, 且含有*Ptr*材料的抗谱与含有*Pi-ta2*材料的抗谱高度相似, 初步推断*Ptr*即为*Pi-ta2*。生物信息学分析发现, *Ptr*蛋白不包含抗病基因通常具有的NLR结构域, 而含有ARM (Armadillo)重复结构域。蛋白体外实验未发现*Ptr*具有与植物抗病性相关的E3泛素化功能。在IRRI 3 000份水稻基因组重测序材料中, 仅发现48份含有*Ptr*抗性基因型, 暗示*Ptr*在水稻抗病育种方面具有较大的应用前景(Zhao et al., 2018)。

表2 已克隆的稻瘟病抗性基因

Table 2 Cloned blast resistance genes in rice

基因	染色体	供体	编码蛋白	参考文献
<i>Pi37</i>	1	St. No. 1	NBS-LRR	Lin et al., 2007
<i>Pish</i>	1	日本晴	NBS-LRR	Takahashi et al., 2010b
<i>Pit</i>	1	K59	NBS-LRR	Hayashi et al., 2010
<i>Pi35</i>	1	Hokkai 188	NBS-LRR	Fukuoka et al., 2014
<i>Pi64</i>	1		NBS-LRR	Ma et al., 2015
<i>Pib</i>	2	IR24, BL1	NBS-LRR	Wang et al., 1999
<i>Bsrd-1</i>	3	地谷	MYB转录因子	Li et al., 2017
<i>pi-21</i>	4	Owarihatamochi	富含脯氨酸蛋白	Fukuoka et al., 2009
<i>Pi-63</i>	4	Kahei	NBS-LRR	Xu et al., 2014
<i>Pi2</i>	6	Jefferson	NBS-LRR	Zhou et al., 2006
<i>Pi9</i>	6	75-1-127	NBS-LRR	Qu et al., 2006
<i>Piz-t</i>	6	Zenith	NBS-LRR	Zhou et al., 2006
<i>Pid-2</i>	6	地谷	类受体激酶蛋白	Chen et al., 2006
<i>Pid-3</i>	6	地谷	NBS-LRR	Shang et al., 2009
<i>Pi-25</i>	6	谷梅2号	NBS-LRR	Chen et al., 2011
<i>Pid3-A4</i>	6	A4 (普通野生稻)	NBS-LRR	Lv et al., 2013
<i>Pi50</i>	6	Er-Ba-zhan (EBZ)	NBS-LRR	Zhu et al., 2012
<i>Pigm</i>	6	谷梅4号	NBS-LRR	Deng et al., 2017
<i>Pi-36</i>	8	Q61	NBS-LRR	Liu et al., 2007
<i>Pi-5/Pi-3/Pii</i>	9	Tetep	NBS-LRR	Lee et al., 2009
<i>Pii</i>	9	Hitomebore	NBS-LRR	Takagi et al., 2013
<i>Pi56</i>	9	三黄占2号	NBS-LRR	Liu et al., 2013
<i>Pikh/Pi-54</i>	11	K3	NBS-LRR	Sharma et al., 2005
<i>Pik-m</i>	11	Tsuyuake	NBS-LRR	Ashikawa et al., 2008
<i>Pb1</i>	11	Modan	NBS-LRR	Hayashi et al., 2010
<i>Pik</i>	11	Kusabue	NBS-LRR	Zhai et al., 2011
<i>Pik-p</i>	11	K60	NBS-LRR	Yuan et al., 2011
<i>Pia</i>	11	Aichi Asahi	NBS-LRR	Hutin et al., 2016
<i>Pi-1</i>	11	LAC (根茎稻)	NBS-LRR	Hua et al., 2012
<i>Pi54rh</i>	11	nrcpb 002	NBS-LRR	Das et al., 2012
<i>Pi-CO39</i>	11	CO39 (药用野生稻)	NBS-LRR	Chauhan et al., 2002
<i>Pi54of</i>	11	nrcpb004	NBS-LRR	Devanna et al., 2014
<i>PiK-h</i>	11	K3	NBS-LRR	Zhai et al., 2014
<i>Pike</i>	11	籼早143	NBS-LRR	Chen et al., 2015
<i>Piks</i>	11	未知	NBS-LRR	GenBank: AET36547.1
<i>Pita</i>	12	Yashiro-mochi	NBS-LRR	Bryan et al., 2000
<i>Ptr</i>	12	M2353	膜蛋白	Zhao et al., 2018

5 稻瘟病抗性基因在水稻遗传育种中的应用

在水稻抗稻瘟病育种方面, 世界水稻育种专家开展了大量工作。我国抗稻瘟病育种主要经历了常规育种和分子育种两个阶段。常规育种是将抗性基因通过杂交技术转入目标株系, 进而育成新的抗病品种(邓其明等, 2009)。目前, 常规育种仍是水稻抗病育种普遍采用的技术。近年来, 通过该方法已培育出一系列水稻新品种, 如黄华占、粤晶丝苗2号、玉香油占、合美占和特粳占25等(何秀英等, 2011)。然而, 常规育种主要通过田间抗性表现进行选择, 存在选育效率低和工作量大的缺陷(文绍山和高必军, 2012)。

随着分子生物学的发展, 利用分子标记技术开展分子育种逐渐成为植物育种发展的重要方向(柏斌等, 2012)。倪大虎等(2008)利用分子标记技术将抗稻瘟病基因*Pi9*和抗白叶枯病基因*Xa21*和*Xa23*同时聚合到水稻中。Jiang等(2012a)应用分子标记辅助选择育成同时携带*Pi1*和*Pi2*的不育系金23A。柳武革等(2012)借助分子标记辅助育种技术, 育成了同时携带*Pi1*与*Pi2*抗病基因的两个不育系吉丰A和安丰A。分子标记辅助育种已成为多基因抗病聚合育种的重要手段, 将在培育抗稻瘟病水稻新品种中发挥重要作用。

虽然稻瘟病抗性基因在水稻遗传改良中取得了一些进展, 抗病性强的水稻品种可以有效抵御病害, 但是却经常以“牺牲”产量为代价(Brown, 2003; Nelson et al., 2018)。原因是当水稻受到病原菌侵害时, 为达到生存的目的, 其会优先将物质能量代谢用于抵御病害, 结果造成了水稻的发育受阻。然而, 最近Deng等(2017)分离的稻瘟病抗性基因*Pigm*却有不同的作用机制, 它含有2个典型的R基因, 其中*PigmR*可导致水稻千粒重的降低, 产量下降, *PigmS*则可提高水稻的结实率, 从而抵消*PigmR*对水稻产量的影响。

此外, Wang等(2018)研究表明, *IPA1*不仅能够提高水稻的产量, 还可以增强水稻对稻瘟病的抗性。进一步研究发现, *IPA1*的磷酸化修饰是平衡产量与抗性的关键调节枢纽。*IPA1*受稻瘟病菌诱导磷酸化, 该磷酸化能改变*IPA1*与DNA序列的结合特性。通常情况下, *IPA1*结合*DEP1*等穗发育相关基因的启动子,

促进其表达, 从而调控水稻的产量; 而受稻瘟病菌诱导磷酸化后, *IPA1*更倾向于结合抗病相关基因*WRKY45*的启动子, 促进其表达, 以增强免疫反应, 进而提高抗病性。*IPA1*在正常条件下促进生长发育, 在稻瘟病菌感染时则受诱导磷酸化增强免疫反应, 这一机制使得水稻在增产的同时又增强了对稻瘟病的抗性, 为水稻高产和高抗育种奠定了重要理论基础。

6 稻瘟菌无毒基因的克隆

随着生物技术(尤其是二代、三代测序技术)的快速发展, 稻瘟菌无毒(avirulent, Avr)基因的鉴定和克隆也取得很大进展。目前, 已鉴定出40多个稻瘟病菌无毒基因, 但仅有19个被成功克隆(表3)。无毒基因所编码的蛋白在大小和结构上存在差异, 但除了无毒基因*ACE1*外, 其余均编码分泌蛋白, 这与目前认为病原菌的效应子多为分泌蛋白的观点一致。

7 抗病蛋白与无毒蛋白的互作模式

一般情况下, 水稻稻瘟病抗性基因(resistance, R)与对应的无毒基因(Avr)间遵循“基因对基因”的互作模式(Yasuda et al., 2015; Wang et al., 2017)。研究表明, 稻瘟病抗病蛋白与对应的无毒蛋白的识别机制极为复杂。直接互作被称为“受体-配体模式”。Pita是第1个被证实的与病原菌无毒蛋白直接互作的稻瘟病抗病蛋白, 其LRR结构域能与无毒蛋白Avr-Pita在酵母细胞内直接互作(Jia et al., 2000)。

植物抗病蛋白与病原菌效应子间的识别也非常复杂。随着克隆的抗病蛋白和无毒蛋白越来越多, 研究者对抗病蛋白与无毒蛋白互作遗传机制的了解越来越全面。相继提出了受体-配体模式(Keen, 1990; Dodds and Rathjen, 2010)、警戒模式(van der Hoorn and Kamoun, 2008; Mukhtar et al., 2011)、诱饵-陷阱模式(Zhou and Chai, 2008; Collier and Moffett, 2009; Khan et al., 2016)以及综合诱饵模式(Cesari, 2018)。

近年来, 多数研究认为, 2个相互独立的NLR类抗病蛋白共同介导抗性机制可能是植物先天免疫系统的一个特点(Wang et al., 2013; Césari et al., 2014)。正常情况下, 1对Pik-h抗病蛋白处于非激活状

表3 已克隆的稻瘟病无毒基因

Table 3 Cloned avirulence genes of *Magnaporthe oryzae*

无毒基因	供体菌株	对应R基因	功能	编码分泌蛋白	参考文献
<i>PWL1</i>	WGG-FA40	未知	富含甘氨酸的带有信号肽的疏水蛋白	是	Kang et al., 1995
<i>PWL2</i>	Guy11	未知	富含甘氨酸的带有信号肽的疏水蛋白	是	Sweigard et al., 1995
<i>PWL3</i>	WGG-FA40	未知	富含甘氨酸的带有信号肽的疏水蛋白	是	Kang et al., 1995
<i>PWL4</i>	WGG-FA40	未知	富含甘氨酸的带有信号肽的疏水蛋白	是	Kang et al., 1995
<i>Avr-CO39</i>	K76-79	<i>C039</i>	功能未知, 仅在宿主细胞质中转录	是	Farman and Leong, 1998 Farman et al., 2002
<i>Avr-Pita</i>	O-137	<i>Pi-ta</i>	含金属蛋白酶结构域, 作用于宿主细胞质	是	Orbach et al., 2000
<i>ACE1</i>	Guy11	<i>Pi-33</i>	编码一个非核糖体多聚乙酰合酶, 该酶参与代谢的产物能够被Pi-33识别并激活免疫反应	未知	Fudal et al., 2005
<i>Avr-Pia</i>	Ina168	<i>Pia</i>	功能未知, 作用于宿主细胞质	是	Yoshida et al., 2009
<i>Avr-Pii</i>	Ina168	<i>Pii</i>	功能未知, 作用于宿主细胞质	是	Yasuda et al., 2006
<i>Avr-Pik/km/kp</i>	Ina168	<i>Pik/km/kp</i>	功能未知, 作用于宿主细胞质	是	Yoshida et al., 2009
<i>Avr-Piz-t</i>	81278ZB15	<i>Piz-t</i>	功能未知蛋白, 对基础抗性具有抑制作用	是	Li et al., 2009
<i>Avr-Pi9</i>	R01-1	<i>Pi9</i>	在水稻受到侵染时, 被转运到宿主细胞, 并且在侵染初期高表达	是	Wu et al., 2015
<i>Avr-Pib</i>	CHL42	<i>Pib</i>	编码75个残基蛋白, 包括信号肽	是	Zhang et al., 2015b
<i>Avr-Pita1</i>	O-137	<i>Pita1</i>	产生16个功能蛋白	是	Takahashi et al., 2010a
<i>AVR-Pi54</i>	MG-79	<i>Pi54</i>	功能未知, 作用于宿主细胞质	是	Ray et al., 2016
<i>BAS1, BAS2, BAS3, BAS4</i>	O-137	未知	它们以不同的模式分泌到寄主细胞中, 但以相容方式互作	是	Mosquera et al., 2009

态, 病原菌入侵后, 寄主植物的基础性防御系统被打破, 这时识别效应子Avr-Pik-h的抗性蛋白Pikh-1通过改变其构象激活抗病蛋白Pikh-2, 从而由Pikh-2传递相关信号并触发防御反应(Zhai et al., 2014)。Césari等(2013)研究表明, Pia1和Pia2分别为识别稻瘟病菌效应子Avr-Pia和AVR1-CO39所必需。进一步研究表明, Pia2的功能是诱导细胞死亡(受到Pia1抑制)和激活HR反应; Pia1能通过其HMA结构域识别Avr-Pia, 并转换无毒蛋白信号解除对Pia2的抑制, 从而由Pia2传递相关信号并触发防御反应。

水稻中抗病蛋白pia由2个R蛋白(RGA4和RGA5)组成, 其在寄主体内形成同源和异源复合体。当RGA4单独存在时, 自主诱发寄主产生效应子依赖的细胞坏死反应, 该激活反应受到RGA5的抑制。进一步研究发现, RGA5的C末端存在1个与Pikh-1 HMA结构域类似, 直接参与识别2个序列的效应子Avr-CO39和Avr-Pia (Hutin et al., 2016)。RGA5是参与病原菌识别的必须结构域(Ortiz et al., 2017), 通过与Avr-CO39和Avr-Pia直接结合, 解除对RGA4的抑制, 进

而引发抗病反应(Césari et al., 2014)

8 问题与展望

近年来, 抗稻瘟病相关基因的鉴定和分离为水稻抗病分子育种研究奠定了良好的基础, 利用分子标记育种技术培育的水稻抗病新品种开始应用于农业生产。然而, 随着外界环境的持续变化和单一性稻瘟病抗性品种的大面积推广种植, 病原菌新生小种不断出现, 因此必须不断培育出稻瘟病抗病水稻新品种。鉴于抗稻瘟病新基因的挖掘是水稻抗稻瘟病分子育种的重要前提和基础, 基于稻瘟病遗传育种和抗性基因的研究现状, 笔者认为还存在以下几方面问题需要探讨。

(1) 传统的抗病育种存在一定的局限性。虽然近年来, 育种家们运用传统的育种方法培育了大量适应世界不同稻作区的水稻抗性栽培品种, 但由于稻瘟病菌的易变性和复杂性, 以及稻瘟病基因表达的上位效应, 使得水稻种植仍面临稻瘟病害的威胁。(2) 目前水稻分子育种中存在的主要问题是缺乏可在不同地

区有效抵御多种稻瘟病菌生理小种的R基因。虽然已有大量的R基因被鉴定和克隆,但是不同R基因对田间哪些稻瘟病致病性菌株起作用难以预测,导致育种家在育种过程中难以选用相应的R基因。(3)长期使用单一类型的稻瘟病抗性基因,会促进稻瘟病新优势生理小种形成,使得当前推广的水稻品种的抗性逐渐降低。因此,持久和广谱稻瘟病抗性基因的短缺严重影响了抗病分子育种进程。(4)通常携带抗病基因供体的其它农艺性状不理想(如分蘖少、产量低、品质差和株高不合理等)。当以这些材料为抗原进行杂交或者回交时,容易出现不良性状“连锁累赘”现象;而当导入该抗性基因时,其它不利性状也会一并导入受体亲本中。(5)虽然目前已经分离多个稻瘟病抗性相关基因,但由于作图群体的遗传背景和鉴定菌株不同,导致相关基因之间的等位关系不很明确,“同功异名”的等位基因很多。(6)通过基因组进行基因图位克隆也存在一些问题。例如,在分离稻瘟病抗性基因过程中,以已测序的水稻品种(93-11和日本晴等)为参考基因组,如果该基因组缺失对应的抗病基因序列,则利用PCR图位克隆技术很难得到候选基因。(7)虽然已经克隆到一些稻瘟病抗性基因和病原菌无毒基因,但是它们之间互作的分子机理还不清楚。针对当前稻瘟病研究存在的一些问题,笔者认为应该从以下几方面开展相关研究。

(1) 深入开展稻瘟病抗性新基因的挖掘和利用。从野生稻、地方品种、引进品种、农家种和各种栽培品种中鉴定并利用图位克隆技术分离新的稻瘟病抗病相关基因;同时,进一步开发功能性标记和进行抗谱分析,阐明基因簇内各基因之间的相互关系,从而加速水稻抗病分子育种进程。

(2) 稻瘟病抗性基因新位点和新材料的创制。随着外界环境和生态条件的改变,稻瘟病菌会进化出不同类型甚至致病力更强的生理小种。因此,稻瘟病抗性新材料的创制和新位点的鉴定显得尤为重要。笔者建议从两方面着手:一是创制新的抗病突变体。利用诱变的方法,从目前的感病品种中,针对生产上高致病力的菌株,筛选和鉴定抗病突变体。这些突变体的农艺性状尽管可能不理想,但可通过对其抗性相关基因进行鉴定和分析,以抵抗目前生产上流行的生理小种,进一步改良水稻稻瘟病抗性。其次是创制大量的抗病等位突变体。我们知道,水稻不同等位基因的变

化会对抗病和其它性状产生重要影响。例如,在*Piz*位点上,目前已至少鉴定了*Pi2*、*Pi9*、*Pi50*、*Pigm*和*Piz-t*五个等位基因(<http://www.ricedata.cn/gene/list/87.htm>),这些等位基因在生产中都具有广阔的应用前景。此外,我们还通过生物信息学方法,发现了水稻全基因组有500多个与抗病相关的NBS结构域蛋白。可利用这些信息,对相关R基因进行编辑或者诱变处理,创制大量等位性突变体。然后从这些突变体中筛选抗病突变体,进行测序、分析及进一步克隆抗病基因。继而通过分子标记遗传改良水稻的稻瘟病抗性,并应用于农业生产。

(3) 筛选能在不同地区有效抵御稻瘟病菌的R基因。虽然目前已经分离近40个稻瘟病抗性R基因,但不同R基因能够抵御哪些稻瘟病菌还不清楚。因此,可以通过构建含有单个R基因的近等基因系,鉴定来自不同地区、不同类型的稻瘟病菌,以便筛选出能抵御不同类型、不同地区稻瘟病菌的R基因。

(4) 深入开展抗病基因与病原菌无毒基因之间互作的分子机理研究。近年来,随着生物技术尤其是测序技术的快速发展,基因组测序成本大大降低,这必将加速植物抗病和病原菌无毒基因的鉴定与分离以及它们之间互作的分子机制研究(Xu et al., 2005; Ebbole, 2007; Wang et al., 2017)。这方面研究的不断深入,将促进人们进一步认识水稻抗病与病原菌无毒基因间“基因对基因”互作的本质,并可为防治稻瘟病提供新的理论与技术支持。

参考文献

- 柏斌, 吴俊, 周波, 邓启云 (2012). 稻瘟病抗性分子育种研究综述. 杂交水稻 27, 5-9.
- 邓其明, 周鹏, 林琳, 王世全, 李双成, 李平 (2009). 水稻稻瘟病抗性基因研究进展及其在育种上的应用. 安徽农业科学 37, 1489-1492, 1508.
- 何秀英, 廖耀平, 陈钊明, 程永盛, 陈粤汉 (2011). 水稻稻瘟病抗病育种研究进展与展望. 广东农业科学 38, 30-33.
- 胡朝芹, 刘剑宇, 王韵茜, 杨睿, 汪秉琨, 何月秋, 曾千春, 罗琼 (2017). 粳稻子预44抗LP11稻瘟病菌基因*Pizy6(t)*的定位. 植物学报 52, 61-69.
- 柳武革, 王丰, 刘振荣, 朱小源, 李金华, 黄慧君, 廖亦龙, 朱满山, 付崇允, 陈建伟 (2012). 利用分子标记技术聚合*Pi-1*和*Pi-2*基因改良三系不育系荣丰A的稻瘟病抗性. 分子植物

- 育种 10, 575–582.
- 倪大虎, 易成新, 李莉, 汪秀峰, 张毅, 赵开军, 王春连, 章琦, 王文相, 杨剑波 (2008). 分子标记辅助培育水稻抗白叶枯病和稻瘟病三基因聚合系. 作物学报 34, 100–105.
- 文绍山, 高必军 (2012). 利用分子标记辅助选择将抗稻瘟病基因 *Pi-9(t)* 渗入水稻恢复系沪恢17. 分子植物育种 10, 42–47.
- 杨勤忠, 林菲, 冯淑杰, 王玲, 潘庆华 (2009). 水稻稻瘟病抗性基因的分子定位及克隆研究进展. 中国农业科学 42, 1601–1615.
- 易怒安, 李魏, 戴良英 (2015). 水稻抗稻瘟病基因的克隆及其分子育种研究进展. 分子植物育种 13, 1653–1659.
- 张佩胜, 赵春德, 余宁, 张迎信, 刘群恩 (2014). 稻瘟病抗性基因的克隆及应用研究进展. 中国稻米 20(5), 1–7.
- 张晓慧, 冯晓敏, 林少扬 (2017). 水稻主栽品种空育131抗稻瘟病位点的扫描及其基因组重建. 植物学报 52, 30–42.
- Roychowdhury M, 贾育林, Cartwright RD (2013). 水稻抗稻瘟病基因的结构、功能和共同进化. 作物学报 38, 381–393.
- Ashikawa I, Hayashi N, Yamane H, Kanamori H, Wu JZ, Matsumoto T, Ono K, Yano M (2008). Two adjacent nucleotide-binding site-leucine-rich repeat class genes are required to confer *Pikm*-specific rice blast resistance. *Genetics* 180, 2267–2276.
- Brown JKM (2003). A cost of disease resistance: paradigm or peculiarity? *Trends Genet* 19, 667–671.
- Bryan GT, Wu KS, Farrall L, Jia Y, Hershey HP, McAdams SA, Faulk KN, Donaldson GK, Tarchini R, Valent B (2000). A single amino acid difference distinguishes resistant and susceptible alleles of the rice blast resistance gene *Pi-ta*. *Plant Cell* 12, 2033–2046.
- Cesari S (2018). Multiple strategies for pathogen perception by plant immune receptors. *New Phytol* 219, 17–24.
- Césari S, Kanzaki H, Fujiwara T, Bernoux M, Chalvon V, Kawano Y, Shimamoto K, Dodds P, Terauchi R, Kroj T (2014). The NB-LRR proteins RGA4 and RGA5 interact functionally and physically to confer disease resistance. *EMBO J* 33, 1941–1959.
- Césari S, Thilliez G, Ribot C, Chalvon V, Michel C, Jauneau A, Rivas S, Alaux L, Kanzaki H, Okuyama Y, Morel JB, Fournier E, Tharreau D, Terauchi R, Kroj T (2013). The rice resistance protein pair RGA4/RGA5 recognizes the *Magnaporthe oryzae* effectors AVR-Pia and AVR1-CO39 by direct binding. *Plant Cell* 25, 1643–1681.
- Chauhan RS, Farman ML, Zhang HB, Leong SA (2002). Genetic and physical mapping of a rice blast resistance locus, *Pi-CO39(t)*, that corresponds to the avirulence gene AVR1-CO39 of *Magnaporthe grisea*. *Mol Genet Genomics* 267, 603–612.
- Chen J, Peng P, Tian JS, He YG, Zhang LP, Liu ZX, Yin DD, Zhang ZH (2015). *Pike*, a rice blast resistance allele consisting of two adjacent NBS-LRR genes, was identified as a novel allele at the *Pik* locus. *Mol Breed* 35, 117.
- Chen J, Shi YF, Liu WZ, Chai RY, Fu YP, Zhuang JY, Wu JL (2011). A *Pid3* allele from rice cultivar Gumei2 confers resistance to *Magnaporthe oryzae*. *J Genet Genomics* 38, 209–216.
- Chen XW, Shang JJ, Chen DX, Lei CL, Zou Y, Zhai WX, Liu GZ, Xu JC, Ling ZZ, Cao G, Ma BT, Wang YP, Zhao XF, Li SG, Zhu LH (2006). A B-lectin receptor kinase gene conferring rice blast resistance. *Plant J* 46, 794–804.
- Collier SM, Moffett P (2009). NB-LRRs work a “bait and switch” on pathogens. *Trends Plant Sci* 14, 521–529.
- Das A, Soubam D, Singh PK, Thakur S, Singh NK, Sharma TR (2012). A novel blast resistance gene, *Pi54rh* cloned from wild species of rice, *Oryza rhizomatis* confers broad spectrum resistance to *Magnaporthe oryzae*. *Funct Integr Genomics* 12, 215–228.
- Dean RA, Talbot NJ, Ebbole DJ, Farman ML, Mitchell TK, Orbach MJ, Thon M, Kulkarni R, Xu JR, Pan H, Read ND, Lee YH, Carbone I, Brown D, Oh YY, Donofrio N, Jeong JS, Soanes DM, Djonovic S, Kolomiets E, Rehmeier C, Li W, Harding M, Kim S, Lebrun MH, Bohnert H, Coughlan S, Butler J, Calvo S, Ma LJ, Nicol R, Purcell S, Nusbaum C, Galagan JE, Birren BW (2005). The genome sequence of the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. *Nature* 434, 980–986.
- Deng YW, Zhai KR, Xie Z, Yang DY, Zhu XD, Liu JZ, Wang X, Qin P, Yang YZ, Zhang GM, Li Q, Zhang JF, Wu SQ, Milazzo J, Mao BZ, Wang ET, Xie HA, Tharreau D, He ZH (2017). Epigenetic regulation of antagonistic receptors confers rice blast resistance with yield balance. *Science* 355, 962–965.
- Devanna NB, Vijayan J, Sharma TR (2014). The blast resistance gene *Pi54of* cloned from *Oryza officinalis* interacts with *Avr-Pi54* through its novel non-LRR domains. *PLoS One* 9, e104840.
- Dodds PN, Rathjen JP (2010). Plant immunity: towards an integrated view of plant-pathogen interactions. *Nat Rev Genet* 11, 539–548.
- Ebbole DJ (2007). *Magnaporthe* as a model for understanding host-pathogen interactions. *Annu Rev Phytopathol* 45, 437–456.

- Ezuka A** (1972). Field resistance of rice varieties to blast disease. *Rev Plant Prot Res* **5**, 1–21.
- Farman ML, Eto Y, Nakao T, Tosa Y, Nakayashiki H, Mayama S, Leong SA** (2002). Analysis of the structure of the *AVR1-CO39* avirulence locus in virulent rice-infecting isolates of *Magnaporthe grisea*. *Mol Plant Microbe Interact* **15**, 6–16.
- Farman ML, Leong SA** (1998). Chromosome walking to the *AVR1-CO39* avirulence gene of *Magnaporthe grisea*: discrepancy between the physical and genetic maps. *Genetics* **150**, 1049–1058.
- Fudal I, Böhnert HU, Tharreau D, Lebrun MH** (2005). Transposition of MINE, a composite retrotransposon, in the avirulence gene *ACE1* of the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. *Fungal Genet Biol* **42**, 761–772.
- Fujii K, Hayano-Saito Y, Saito K, Sugiura N, Hayashi N, Tsuji T, Izawa T, Iwasaki M** (2000). Identification of a RFLP marker tightly linked to the panicle blast resistance gene, *Pb1*, in rice. *Breed Sci* **50**, 183–188.
- Fukuoka S, Saka N, Koga H, Ono K, Shimizu T, Ebana K, Hayashi N, Takahashi A, Hirochika H, Okuno K, Yano M** (2009). Loss of function of a proline-containing protein confers durable disease resistance in rice. *Science* **325**, 998–1001.
- Fukuoka S, Yamamoto SI, Mizobuchi R, Yamanouchi U, Ono K, Kitazawa N, Yasuda N, Fujita Y, Nguyen TTT, Koizumi S, Sugimoto K, Matsumoto T, Yano M** (2014). Multiple functional polymorphisms in a single disease resistance gene in rice enhance durable resistance to blast. *Sci Rep* **4**, 4550.
- Hayashi K, Yoshida H, Ashikawa I** (2006). Development of PCR-based allele-specific and InDel marker sets for nine rice blast resistance genes. *Theor Appl Genet* **113**, 251–260.
- Hayashi N, Inoue H, Kato T, Funao T, Shiota M, Shimizu T, Kanamori H, Yamane H, Hayano-Saito Y, Matsumoto T, Yano M, Takatsuji H** (2010). Durable panicle blast-resistance gene *Pb1* encodes an atypical CC-NBS-LRR protein and was generated by acquiring a promoter through local genome duplication. *Plant J* **64**, 498–510.
- Hua LX, Wu JZ, Chen CX, Wu WH, He XY, Lin F, Wang L, Ashikawa I, Matsumoto T, Wang L, Pan QH** (2012). The isolation of *Pi1*, an allele at the *Pik* locus which confers broad spectrum resistance to rice blast. *Theor Appl Genet* **125**, 1047–1055.
- Hutin M, Césari S, Chalvon V, Michel C, Tran TT, Boch J, Koebnik R, Szurek B, Kroj T** (2016). Ectopic activation of the rice NLR heteropair RGA4/RGA5 confers resistance to bacterial blight and bacterial leaf streak diseases. *Plant J* **88**, 43–55.
- Jia YL, McAdams SA, Bryan GT, Hershey HP, Valent B** (2000). Direct interaction of resistance gene and avirulence gene products confers rice blast resistance. *EMBO J* **19**, 4004–4014.
- Jiang HC, Feng YT, Bao L, Li X, Gao GJ, Zhang QL, Xiao JH, Xu CG, He YQ** (2012a). Improving blast resistance of Jin 23B and its hybrid rice by marker-assisted gene pyramiding. *Mol Breed* **30**, 1679–1688.
- Jiang N, Li ZQ, Wu J, Wang Y, Wu LQ, Wang SH, Wang D, Wen T, Liang Y, Sun PY, Liu JL, Dai LY, Wang ZL, Wang C, Luo MZ, Liu XL, Wang GL** (2012b). Molecular mapping of the *Pi2/9* allelic gene *Pi2-2* conferring broad-spectrum resistance to *Magnaporthe oryzae* in the rice cultivar Jefferson. *Rice* **5**, 29.
- Jones JDG, Dangl JL** (2006). The plant immune system. *Nature* **444**, 323–329.
- Kang S, Sweigard JA, Valent B** (1995). The *PWL* host specificity gene family in the blast fungus *Magnaporthe grisea*. *Mol Plant Microbe Interact* **8**, 939–948.
- Keen NT** (1990). Gene-for-gene complementarity in plant-pathogen interaction. *Annu Rev Genet* **24**, 447–463.
- Khan M, Subramaniam R, Desveaux D** (2016). Of guards, decoys, baits and traps: pathogen perception in plants by type III effector sensors. *Curr Opin Microbiol* **29**, 49–55.
- Khush GS** (2005). What it will take to feed 5.0 billion rice consumers in 2030. *Plant Mol Biol* **59**, 1–6.
- Kiyosawa S** (1989). Breakdown of blast resistance in rice in relation to general strategies of resistance gene deployment to prolong effectiveness of disease resistance in plants. In: Leonard KJ, Fry WE, eds. *Plant Disease Epidemiology*. New York: McGraw-Hill. pp. 251–283.
- Lee SK, Song MY, Seo YS, Kim HK, Ko S, Cao PJ, Suh JP, Yi G, Roh JH, Lee S, An G, Hahn TR, Wang GL, Ronald P, Jeon JS** (2009). Rice *Pi5*-mediated resistance to *Magnaporthe oryzae* requires the presence of two Coiled-Coil-Nucleotide-Binding-Leucine-Rich repeat genes. *Genetics* **181**, 1627–1638.
- Li JB, Li D, Sun YD, Xu MH** (2012). Rice blast resistance gene *Pi1* identified by MRG4766 marker in 173 Yunnan rice landraces. *Rice Genom Genet* **3**, 13–18.
- Li JB, Sun YD, Liu H, Wang YY, Jia YL, Xu MH** (2015). Natural variation of rice blast resistance gene *Pi-d2*. *Genet Mol Res* **14**, 1235–1249.
- Li W, Wang BH, Wu J, Lu GD, Hu YJ, Zhang X, Zhang ZG, Zhao Q, Feng Q, Zhang HY, Wang ZY, Wang GL, Han B,**

- Wang ZH, Zhou B (2009). The *Magnaporthe oryzae* avirulence gene *AvrPiz-t* encodes a predicted secreted protein that triggers the immunity in rice mediated by the blast resistance gene *Piz-t*. *Mol Plant Microbe Interact* **22**, 411–420.
- Li WT, Zhu ZW, Chern M, Yin JJ, Yang C, Ran L, Cheng MP, He M, Wang K, Wang J, Zhou XG, Zhu XB, Chen ZX, Wang JC, Zhao W, Ma BT, Qin P, Chen WL, Wang YP, Liu JL, Wang WM, Wu XJ, Li P, Wang JR, Zhu LH, Li SG, Chen XW (2017). A natural allele of a transcription factor in rice confers broad-spectrum blast resistance. *Cell* **170**, 114–126.
- Lin F, Chen S, Que ZQ, Wang L, Liu XQ, Pan QH (2007). 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. *Genetics* **177**, 1871–1880.
- Liu XQ, Lin F, Wang L, Pan Q (2007). 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. *Genetics* **176**, 2541–2549.
- Liu Y, Liu B, Zhu XY, Yang JY, Bordeos A, Wang GL, Leach JE, Leung H (2013). Fine-mapping and molecular marker development for *Pi56(t)*, a NBS-LRR gene conferring broad-spectrum resistance to *Magnaporthe oryzae* in rice. *Theor Appl Genet* **126**, 985–998.
- Liu YL, Schiff M, Serino G, Deng XW, Dinesh-Kumar SP (2002). Role of SCF ubiquitin-ligase and the COP9 signalosome in the *N* gene-mediated resistance response to Tobacco mosaic virus. *Plant Cell* **14**, 1483–1496.
- Lv QM, Xu X, Shang JJ, Jiang GH, Pang ZQ, Zhou ZZ, Wang J, Liu Y, Li T, Li XB, Xu JC, Cheng ZK, Zhao XF, Li SG, Zhu LH (2013). Functional analysis of *Pid3-A4*, an ortholog of rice blast resistance gene *Pid3* revealed by allele mining in common wild rice. *Phytopathology* **103**, 594–599.
- Ma J, Lei CL, Xu XT, Hao K, Wang JL, Cheng ZJ, Ma XD, Ma J, Zhou KN, Zhang X, Guo XP, Wu FQ, Lin QB, Wang CM, Zhai HQ, Wang HY, Wan JM (2015). *Pi64*, encoding a novel CC-NBS-LRR protein, confers resistance to leaf and neck blast in rice. *Mol Plant Microbe Interact* **28**, 558–568.
- Mosquera G, Giraldo MC, Hyun Khang C, Coughlan S, Valent B (2009). Interaction transcriptome analysis identifies *Magnaporthe oryzae* BAS1–4 as Biotrophy-Associated secreted proteins in rice blast disease. *Plant Cell* **21**, 1273–1290.
- Mukhtar MS, Carvunis AR, Dreze M, Eppele P, Steinbrenner J, Moore J, Tasan M, Galli M, Hao T, Nishimura MT, Pevzner SJ, Donovan SE, Ghamsari L, Santhanam B, Romero V, Poulin MM, Gebreab F, Gutierrez BJ, Tam S, Monachello D, Boxem M, Harbort CJ, McDonald N, Gai LT, Chen HM, He YJ, European Union Effectoromics Consortium, Vandenhaute J, Roth FP, Hill DE, Ecker R, Vidal M, Beynon J, Braun P, Dangl JL (2011). Independently evolved virulence effectors converge onto hubs in a plant immune system network. *Science* **333**, 596–601.
- Nelson R, Wiesner-Hanks T, Wissner R, Balint-Kurti P (2018). Navigating complexity to breed disease-resistant crops. *Nat Rev Genet* **19**, 21–33.
- Nguyen TTT, Koizumi S, La TN, Zenbayashi KS, Ashizawa T, Yasuda N, Imazaki I, Miyasaka A (2006). *Pi35(t)*, a new gene conferring partial resistance to leaf blast in the rice cultivar Hokkai 188. *Theor Appl Genet* **113**, 697–704.
- Orbach MJ, Farrall L, Sweigard JA, Chumley FG, Valent B (2000). A telomeric avirulence gene determines efficacy for the rice blast resistance gene *Pi-ta*. *Plant Cell* **12**, 2019–2032.
- Ortiz D, de Guillen K, Cesari S, Chalvon V, Gracy J, Padilla A, Kroj T (2017). Recognition of the *Magnaporthe oryzae* effector AVR-Pia by the decoy domain of the rice NLR immune receptor RGA5. *Plant Cell* **29**, 156–168.
- Qu SH, Liu GF, Zhou B, Bellizzi M, Zeng LR, Dai LY, Han B, Wang GL (2006). 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. *Genetics* **172**, 1901–1914.
- Ray S, Singh PK, Gupta DK, Mahato AK, Sarkar C, Rathour R, Singh NK, Sharma TR (2016). Analysis of *Magnaporthe oryzae* genome reveals a fungal effector, which is able to induce resistance response in transgenic rice line containing resistance gene, *Pi54*. *Front Plant Sci* **7**, 1140.
- Shang JJ, Tao Y, Chen XW, Zou Y, Lei CL, Wang J, Li XB, Zhao XF, Zhang MJ, Lu ZK, Xu JC, Cheng ZK, Wan JM, Zhu LH (2009). Identification of a new rice blast resistance gene, *Pid3*, by genomewide comparison of paired nucleotide-binding site-leucine-rich repeat genes and their pseudogene alleles between the two sequenced rice genomes. *Genetics* **182**, 1303–1311.
- Sharma TR, Madhav MS, Singh BK, Shanker P, Jana TK, Dalal V, Pandit A, Singh A, Gaikwad K, Upreti HC, Singh NK (2005). High-resolution mapping, cloning and

- molecular characterization of the *Pi-k^h* gene of rice, which confers resistance to *Magnaporthe grisea*. *Mol Genet Genomics* **274**, 569–578.
- Sweigard JA, Carroll AM, Kang S, Farrall L, Chumley FG, Valent B** (1995). Identification, cloning, and characterization of *PWL2*, a gene for host species specificity in the rice blast fungus. *Plant Cell* **7**, 1221–1233.
- Takagi H, Uemura A, Yaegashi H, Tamiru M, Abe A, Mit-suoka C, Utsushi H, Natsume S, Kanzaki H, Matsumura H, Saitoh H, Yoshida K, Cano LM, Kamoun S, Terauchi R** (2013). MutMap-Gap: whole-genome resequencing of mutant F₂ progeny bulk combined with *de novo* assembly of gap regions identifies the rice blast resistance gene *Pii*. *New Phytol* **200**, 276–283.
- Takahashi M, Ashizawa T, Hirayae K, Moriwaki J, Sone T, Sonoda R, Noguchi MT, Nagashima S, Ishikawa K, Arai M** (2010a). One of two major paralogs of *AVR-Pita1* is functional in Japanese rice blast isolates. *Phytopathology* **100**, 612–618.
- Takahashi A, Hayashi N, Miyao A, Hirochika H** (2010b). Unique features of the rice blast resistance *Pish* locus revealed by large scale retrotransposon-tagging. *BMC Plant Biol* **10**, 175.
- Takahashi JS, Pinto LH, Vitaterna MH** (1994). Forward and reverse genetic approaches to behavior in the mouse. *Science* **264**, 1724–1733.
- Van der Hoorn RA, Kamoun S** (2008). From guard to decoy: a new model for perception of plant pathogen effectors. *Plant Cell* **20**, 2009–2017.
- Wang BH, Ebbole DJ, Wang ZH** (2017). The arms race between *Magnaporthe oryzae* and rice: diversity and interaction of *Avr* and *R* genes. *J Integr Agric* **16**, 2746–2760.
- Wang GL, Mackill DJ, Bonman JM, McCouch SR, Champoux MC, Nelson RJ** (1994). RFLP mapping of genes conferring complete and partial resistance to blast in a durably resistant rice cultivar. *Genetics* **136**, 1421–1434.
- Wang J, Zhou LA, Shi H, Chern M, Yu H, Yi H, He M, Yin JJ, Zhu XB, Li Y, Li WT, Liu JL, Wang JC, Chen XQ, Qing H, Wang YP, Liu GF, Wang WM, Li P, Wu XJ, Zhu LH, Zhou JM, Ronald PC, Li SG, Li JY, Chen XW** (2018). A single transcription factor promotes both yield and immunity in rice. *Science* **361**, 1026–1028.
- Wang RY, Ning YS, Shi XT, He F, Zhang CY, Fan JB, Jiang N, Zhang Y, Zhang T, Hu YJ, Bellizzi M, Wang GL** (2016). Immunity to rice blast disease by suppression of effector-triggered necrosis. *Curr Biol* **26**, 2399–2411.
- Wang X, Richards J, Gross T, Druka A, Kleinhofs A, Steffenson B, Acevedo M, Brueggeman R** (2013). The *rpg4*-mediated resistance to wheat stem rust (*Puccinia graminis*) in barley (*Hordeum vulgare*) requires *Rpg5*, a second NBS-LRR gene, and an actin depolymerization factor. *Mol Plant Microbe Interact* **26**, 407–418.
- Wang ZX, Yano M, Yamanouchi U, Iwamoto M, Monna L, Hayasaka H, Katayose Y, Sasaki T** (1999). The *Pib* gene for rice blast resistance belongs to the nucleotide binding and leucine-rich repeat class of plant disease resistance genes. *Plant J* **19**, 55–64.
- Wu J, Kou YJ, Bao JD, Li Y, Tang MZ, Zhu XL, Ponaya A, Xiao G, Li JB, Li CY, Song MY, Cumagun CJR, Deng QY, Lu GD, Jeon JS, Naqvi NI, Zhou B** (2015). Comparative genomics identifies the *Magnaporthe oryzae* avirulence effector *AvrPi9* that triggers *Pi9*-mediated blast resistance in rice. *New Phytol* **206**, 1463–1475.
- Xu X, Hayashi N, Wang CT, Fukuoka S, Kawasaki S, Takatsuji H, Jiang CJ** (2014). Rice blast resistance gene *Pikahei-1(t)*, a member of a resistance gene cluster on chromosome 4, encodes a nucleotide-binding site and leucine-rich repeat protein. *Mol Breed* **34**, 691–700.
- Xu YB, McCouch SR, Zhang QF** (2005). How can we use genomics to improve cereals with rice as a reference genome? *Plant Mol Biol* **59**, 7–26.
- Yasuda N, Mitsunaga T, Hayashi K, Koizumi S, Fujita Y** (2015). Effects of pyramiding quantitative resistance genes *pi21*, *Pi34*, and *Pi35* on rice leaf blast disease. *Plant Dis* **99**, 904–909.
- Yasuda N, Noguchi MT, Fujita Y** (2006). Partial mapping of avirulence genes *AVR-Pii* and *AVR-Pia* in the rice blast fungus *Magnaporthe oryzae*. *Can J Plant Pathol* **28**, 494–498.
- Yoshida K, Saitoh H, Fujisawa S, Kanzaki H, Matsumura H, Yoshida K, Tosa Y, Chuma I, Takano Y, Win J, Kamoun S, Terauchi R** (2009). Association genetics reveals three novel avirulence genes from the rice blast fungal pathogen *Magnaporthe oryzae*. *Plant Cell* **21**, 1573–1591.
- Yu ZH, Mackill DJ, Bonman JM, McCouch SR, Guiderdoni E, Notteghem JL, Tanksley SD** (1996). Molecular mapping of genes for resistance to rice blast (*Pyricularia grisea* Sacc.). *Theor Appl Genet* **93**, 859–863.
- Yuan B, Zhai C, Wang WJ, Zeng XS, Xu XK, Hu HQ, Lin F, Wang L, Pan QH** (2011). The *Pik-p* resistance to *Magnaporthe oryzae* in rice is mediated by a pair of closely linked CC-NBS-LRR genes. *Theor Appl Genet* **122**, 1017–1028.
- Zenbayashi-Sawata K, Fukuoka S, Katagiri S, Fujisawa M, Matsumoto T, Ashizawa T, Koizumi S** (2007). Genetic

- and physical mapping of the partial resistance gene, *Pi34*, to blast in rice. *Phytopathology* **97**, 598–602.
- Zhai C, Lin F, Dong ZQ, He XY, Yuan B, Zeng XS, Wang L, Pan QH (2011). The isolation and characterization of *Pik*, a rice blast resistance gene which emerged after rice domestication. *New Phytol* **189**, 321–334.
- Zhai C, Zhang Y, Yao N, Lin F, Liu Z, Dong ZQ, Wang L, Pan QH (2014). Function and interaction of the coupled genes responsible for *Pik-h* encoded rice blast resistance. *PLoS One* **9**, e98067.
- Zhang N, Luo J, Rossman AY, Aoki T, Chuma I, Crous PW, Dean R, de Vries RP, Donofrio N, Hyde KD, Lebrun MH, Talbot NJ, Tharreau D, Tosa Y, Valent B, Wang ZH, Xu JR (2016). Generic names in *Magnaportheales*. *IMA Fungus* **7**, 155–159.
- Zhang XH, Yang SH, Wang J, Jia YX, Huang J, Tan SJ, Zhong Y, Wang L, Gu LJ, Chen JQ, Pan QH, Bergelson J, Tian DC (2015a). A genome-wide survey reveals abundant rice blast *R* genes in resistant cultivars. *Plant J* **84**, 20–28.
- Zhang SL, Wang L, Wu WH, He LY, Yang XF, Pan QH (2015b). Function and evolution of *Magnaporthe oryzae* avirulence gene *AvrPib* responding to the rice blast resistance gene *Pib*. *Sci Rep* **5**, 11642.
- Zhao HJ, Wang XY, Jia YL, Minkenberg B, Wheatley M, Fan JB, Jia MH, Famoso A, Edwards JD, Wamish Y, Valent B, Wang GL, Yang YN (2018). The rice blast resistance gene *Ptr* encodes an atypical protein required for broad-spectrum disease resistance. *Nat Commun* **9**, 2039.
- Zhou B, Qu SH, Liu GF, Dolan M, Sakai H, Lu GD, Bellizzi M, Wang GL (2006). The eight amino-acid differences within three leucine-rich repeats between Pi2 and Piz-t resistance proteins determine the resistance specificity to *Magnaporthe grisea*. *Mol Plant Microbe Interact* **19**, 1216–1228.
- Zhou JM, Chai JJ (2008). Plant pathogenic bacterial type III effectors subdue host responses. *Curr Opin Microbiol* **11**, 179–185.
- Zhu XY, Chen S, Yang JY, Zhou SC, Zeng LX, Han JL, Su J, Wang L, Pan QH (2012). The identification of *Pi50(t)*, a new member of the rice blast resistance *Pi2/Pi9* multigene family. *Theor Appl Genet* **124**, 1295–1304.

Progress of Cloning and Breeding Application of Blast Resistance Genes in Rice and Avirulence Genes in Blast Fungi

Dewei Yang^{1,2}, Mo Wang¹, Libo Han¹, Dingzhong Tang¹, Shengping Li^{1,3*}

¹Plant Immunity Center, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China; ²Institute of Rice, Fujian Academy of Agricultural Sciences, Fuzhou 350018, China; ³Fujian Provincial Key Laboratory of Crop Breeding by Design, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China

Abstract Rice blast, caused by *Magnaporthe oryzae*, is one of the most destructive diseases of rice worldwide. The identification and utilization of resistance genes are the basis and key factors for breeding resistance rice cultivars. With the availability of genomic sequences of both *Oryza sativa* and *M. oryzae*, rice has become one of the model systems for dissecting the molecular interactions between plants and pathogens. In this paper, we summarize the current status of genetics, mapping, cloning and breeding application of the genes resistant to blast. Using bioinformatics analysis, we analyzed the distribution of all NBS-LRR type of disease resistance genes on the 12 chromosomes of the rice genome and also preliminarily summarized the identified avirulence genes as well as interactions between the resistance proteins and the avirulence proteins. Finally, we analyzed and discussed the problems in rice breeding and prospects for research. This review will provide useful suggestions for further research on rice blast resistance breeding and disease resistance mechanisms.

Key words rice blast, mapping, cloning, breeding application, avirulence genes

Yang DW, Wang M, Han LB, Tang DZ, Li SP (2019). Progress of cloning and breeding application of blast resistance genes in rice and avirulence genes in blast fungi. *Chin Bull Bot* **54**, 265–276.

* Author for correspondence. E-mail: lishun1981@126.com