

水稻臺農82號疊氮化鈉誘變系WM1370 之抗稻熱病基因座分析

陳珮潔^{1*}、廖大經^{2*}、吳永培²、沈偉強¹、陳繹年³、吳雅芳⁴、鄭安秀⁴、鍾嘉綾^{1,5}

¹ 國立臺灣大學植物病理與微生物學系。臺北市。

² 行政院農業委員會農業試驗所嘉義農業試驗分所農藝系。嘉義市。

³ 行政院農業委員會農業試驗所植物病理組。臺中市。

⁴ 行政院農業委員會臺南區農業改良場作物環境課。臺南市。

⁵ 聯絡作者，E-mail: clchung@ntu.edu.tw

* 同等貢獻

摘 要

陳珮潔^{1*}、廖大經^{2*}、吳永培²、沈偉強、陳繹年³、吳雅芳⁴、鄭安秀⁴、鍾嘉綾^{1,5}。2022。水稻臺農82號疊氮化鈉誘變系WM1370之抗稻熱病基因座分析。植物醫學64(3): 85-104。

水稻是重要糧食作物，由*Pyricularia oryzae*引起的稻熱病嚴重影響水稻生產，而使用抗病品種為最有效且環保的防治方法。水稻臺農82號為對稻熱病感病之梗稻，經過連續五代疊氮化鈉誘變及病圃篩選後，獲得44個抗稻熱病誘變系。本研究針對抗稻熱病及紋枯病的誘變系WM1370，進行9株本土稻熱病菌菌株之接種，發現其具有廣幅抗性；另一方面，透過PCR增幅定序臺農82號及誘變系WM1370之已知抗稻熱病基因座*Pi2/9*、*Pik*、*Pita*及*Ptr*後，發現臺農82號帶有*Pik-s*，但在*Pi2/9*、*Pita*及*Ptr*為感病等位基因，WM1370則帶有*Pik-s*及*Pita*抗病等位基因，而在*Pi2/9*及*Ptr*呈現不同變異。為探討WM1370之抗性遺傳，將其與感病籼稻CO39雜交後之636個F2子代，於2018年稻熱病旱田病圃分析抗病表現，並以84組簡單重複序列 (simple sequence repeat, SSR) 分子標誌進行集群分離分析 (bulk segregant analysis)，發現抗性與第12號染色體上3 Mb及17.8 Mb兩處分子標誌連鎖；再透過F_{2:3}至F_{2:5}子代於2019-2021年稻熱病旱田病圃進行抗性評估，同時使用5組SSR、8組競爭性等位基因特異性 (KBioscience competitive allele-specific PCR, KASP) 及10組插入/缺失 (insertion/deletion, Indel) 分子標誌進行基因型鑑定，連鎖分析之結果將WM1370之抗性區段縮小至約10.7-14.6 Mb區間，候選基因包括*Ptr* (與抗病品系Katy之等位蛋白具有一個胺基酸差異L763F)。WM1370於第12號染色體上橫跨*Pita* (10.6 Mb) 及10.7-14.6 Mb抗病基因座之區段，以及本研究新開發與抗病區段緊密連鎖之分子標誌，皆提供未來WM1370在育

種應用上的重要基礎，希望藉此擴充臺灣水稻抗稻熱病基因庫，促進抗病新品種育成。

關鍵詞：稻熱病菌、抗病基因、*Pik-s*、*Pita*、*Ptr*(=*Pita-2*)、疊氮化鈉誘變、精細定位、分子標誌

緒 言

水稻 (*Oryza sativa* L.) 是世界三大糧食作物，全球大約有一半人口仰賴稻米為主食⁽²⁵⁾。根據行政院農業委員會農業統計年報2011至2020年之資料，全臺水稻年平均栽培面積為266,553公頃，佔所有農作物栽培面積之21.86%，年平均產量為3,146,950公噸，平均產值達395.5億元，佔農產值15.8%，居各項作物之冠，顯示水稻在臺灣農業之重要性。由病原菌*Pyricularia oryzae* Cavara (syn. *Magnaporthe oryzae* B. C. Couch) 引起的稻熱病廣泛分佈於全球水稻栽培地區，其在水稻的各個生育時期皆可造成侵染，危害部位包含葉片、葉鞘、莖節、穗頸、枝梗與穀粒，嚴重時可造成整個植株枯死，每年造成全球稻米產量的損失高達10-30%⁽⁴⁰⁾。稻熱病菌需要葉表的水膜及幾近飽和之相對濕度才有助於侵染⁽³⁹⁾，而臺灣每年三月下旬至五月上旬是稻熱病的好發時期，尤其在清明節前後高濕度的環境下最為嚴重。根據早期臺灣省政府農林廳統計資料顯示，一期作稻熱病發生面積可達水稻總栽培面積10%以上，而大發生的年份更可高達栽培面積的25%以上⁽⁴⁾；2013年在臺中、彰化、雲林、嘉義、臺南及臺東爆發近十年來最嚴重的稻熱病災情，部分地區一期作葉稻熱病和穗稻熱病發病率分別高達77%和75%⁽³³⁾，據農糧署估計，當期穗稻熱病受害水稻面積約3萬公

頃，罹病田區產量減少約一至四成，影響甚鉅。

稻熱病可藉由肥培管理、病害偵測、化學藥劑等方式進行防治，近年來食品安全意識抬頭，農藥殘留成為臺灣社會大眾持續關注的議題，在維護生態環境的前提下，種植抗病品種被認為是最經濟、有效且對環境友善的防治措施⁽²⁴⁾，可同時滿足生產優質且安全農產品之需求。然而稻熱病菌族群在田間變異十分快速，使臺灣抗病品種在推廣栽植後的五年內（平均1.5年）失去對稻熱病的抗性^(4, 5)，因此持續選育出新的抗病且優質品種為植物病理學家與育種學家共同努力的目標。目前已被報導之水稻對稻熱病抗性基因/基因座 (resistance genes/loci, *R* genes/loci) 至少有118個，已被選殖的37個*R* genes包含 *Pish*、*Pi-35*、*Pi-37*、*Pit*、*Pi64* (Chr. 1)；*Pib* (Chr. 2)；*Pi68(t)* (Chr. 3)；*pi21*、*Pi63* (Chr. 4)；*Pi9*、*Pi2*、*Piz-t*、*Pi50*、*Pigm*、*Pid2*、*Pid3*、*Pid3-A4*、*Pi25* (Chr. 6)；*Pi36* (Chr. 8)；*Pi5*、*Pii*、*Pi56* (Chr. 9)；*Pil*、*Pik*、*Pik-m*、*Pik-p*、*Pik-h*、*Pik-s*、*Pik-e*、*Pi54of*、*Pi54rh*、*Pb1*、*Pia*、*PiCO39*、*NLS1* (Chr. 11)；*Pita*、*Ptr* (= *Pita-2*) (Chr. 12)^(13, 23, 36, 52)。其中近半數的*R* genes被定位在三個主要基因座上，分別為第6、11及第12號染色體的上的 *Pi2/9*、*Pik*、*Pita*及*Ptr* 基因座，而第5、7及10號染色體上目前並無抗稻熱病基因被選殖⁽²³⁾。

誘變育種是利用物理或化學方法誘導突變，由變異群體中選拔帶有特定性狀的個體，再進一步培育為新品種(系)的育種方法。在水稻育種上，過去有以 γ 射線、中子輻射及離子輻射等物理性方法造成變異，進而影響水稻代謝^(26, 29, 42)、營養價值^(16, 18)、提升對白葉枯病之抗性⁽⁹⁾及對鐵逆境之耐受性⁽⁴⁵⁾；化學誘變劑則是以烷化劑、秋水仙素及疊氮化鈉為主，烷化劑如 ethyl methane sulfonate (EMS)、N-methyl-N-nitrosourea (MNU) 和 diepoxybutane (DEP) 皆能造成鹼基甲基化及點突變，而秋水仙素可促進細胞分裂並誘使多倍體產生，疊氮化鈉則可透過抑制過氧化酵素 (peroxidase) 的活性，使DNA產生錯誤的修補作用，進而產生基因突變，而其突變方式主要為點突變，又以轉換突變 [transition mutation, 嘌呤 (A或G) 互相轉換或嘧啶 (C或T) 互相轉換] 較顛換突變 (transversion mutation, 嘌呤與嘧啶之間的轉換) 為多^(41, 48, 50)，亦有文獻發現其可造成單核苷酸缺失而造成移碼突變 (frameshift mutation)⁽¹⁾，且疊氮化鈉具有殘效少、處理濃度低、在土壤中分解效率高、致癌性低及高基因突變率的特性⁽⁴⁷⁾，在國際間已廣泛使用於改良水稻的性狀⁽⁵⁰⁾，例如：改良 Suweon 542的胚乳使其適用於米製品加工⁽³⁸⁾；誘變 IR64提高其鐵含量，用以改善開發中國家營養缺乏的問題⁽²⁰⁾；誘變臺農67號，改良其對鹽逆境的耐受性⁽³⁴⁾等。

臺農82號 (Tainung 82, TNG82) 為臺農67號以疊氮化鈉誘變改良之品種，植株具耐高氮肥、抗倒伏且適應性廣之特性，且其精米粗蛋白質含量低 (約4.5-5%)，食味及口感可媲美日本越光米，唯獨在抗病蟲害方面，臺農82號對葉稻熱病、褐飛虱、白葉枯病、紋枯病及白背飛虱等病蟲害皆不具抵抗力⁽¹⁰⁾。為改

善臺農82號對病蟲害的耐受性，嘉義農業試驗分所吳永培博士使用疊氮化鈉誘變臺農82號，並於2014-2015年於該分所水旱田病圃進行稻熱病及紋枯病的抗性選拔，最終由1,000株以上的子代中篩選出44個對稻熱病為抗病表現 (2至4.5級) 之品系 (親本臺農82號為8級)，其中誘變系WM1370除了對稻熱病呈現高度抗性 (2級)，對紋枯病亦有良好之抗病性 (2級，親本臺農82號為9級)。

為釐清臺農82號誘變系WM1370之抗稻熱病遺傳特性，本研究首先對WM1370進行本土稻熱病菌菌株之接種，確認其抗性幅度，並針對主要抗稻熱病基因座進行PCR增幅定序，釐清其抗性來源。另外，亦建立WM1370與感病秈稻CO39雜交族群，對其F₂子代進行集群分離分析 (bulked segregant analysis)，鎖定與稻熱病抗性相關的染色體區段，並藉由F_{2:3}、F_{2:4}、F_{2:5}子代進行精細定位 (fine-mapping)，希望能藉此找到新穎之抗病基因座，擴大臺灣抗稻熱病基因庫，並提供與抗病性緊密連鎖之分子標誌，促進水稻抗稻熱病品種之育成。

材料與方法

以疊氮化鈉誘變水稻

臺農82號之誘變參考Awan等人⁽²⁾的方式，共進行五次疊氮化鈉誘變劑處理。化學誘變對特定目標性狀的誘變率通常不高，連續五次誘變主要希望累積足夠變異，提高目標性狀出現的機率。疊氮化鈉每次處理濃度均為1.5 mM。第一次處理3,000粒臺農82號種子 (M₀)，並繁殖至M₁、M₂世代，於M₂世代種植2,000株，每株於成熟時收取一穗，每穗取3粒M₃世代種子混合，對其進行第二次誘變劑處理後，再依前述 M₀至M₃之流程進行，如此重複至第五次疊氮化鈉誘變處理後，於其M₃世代種植2,000株，每株成熟時收一穗，每穗取3粒混合，M₄種植2,000株，成熟時選拔1,000株收取種子，並於M₅世代放入嘉義農業試驗分所稻熱病旱田病圃進行抗性檢定，據此選拔抗病品系並進行自交繁殖，共自交五代使其趨於同質結合。

供試水稻及培養條件

本研究使用之水稻材料包括：秈稻臺農82號、臺農82號誘變系WM1370、秈稻CO39、CO39 x WM1370雜交族群及重組子代 (F₂至F_{2:5})，以及對稻熱病高度感病之秈稻品種Lomello及梗稻品種麗江新團黑穀 (Lijianxintuanheigu, LTH)，水稻之雜交與繁殖於嘉義農業試驗分所試驗田進行。人工接種評估誘變系WM1370抗性幅度之實驗於臺大植微系進行，稻種先以1%次氯酸鈉水浸泡15 min進行消毒，再以無菌水潤洗三次後，於無菌水中浸種24 hr，中間過程換水至少三次。浸種完之種子以夾鏈袋密封保濕，置於30℃黑暗環境下48 hr進行催芽，再播種於赤玉土及塑膠穴盤中 (每穴6顆稻種)，培養於16 hr光照、8 hr

黑暗，日溫28℃、夜溫26℃之生長箱，並於種植後七天與接種前一天以花寶5號 (Hypox Corporation, OH, USA) 稀釋500倍澆灌，在約二至三週大 (三葉齡) 時進行接種。

本研究以CO39與WM1370雜交之後代族群進行抗病基因座定位 (流程如圖一)，建立籼粳雜交族群進行分析，主要希望運用籼稻與粳稻親本間之高度遺傳變異，使後續多型性分子標誌篩選更容易。本研究於2018年一期作進行636個F₂子代之旱田稻熱病圃檢定，並挑選其中8株抗病、8株感病植株進行集群分離分析 (並未對所有F₂個體進行檢定)。2019年二期作進行636個F_{2,3}品系旱田稻熱病圃檢定，使用其中192個F_{2,3}品系進行連鎖分析，初步驗證抗性區間後，於其中挑選3個F_{2,3}品系建立F_{2,4}重組自交系，2020年一期作由417株F_{2,4}子代篩選11個F_{2,4}重組品系，2021年一期作針對來自11個F_{2,4}品系的359株F_{2,5}單株及來自4個F_{2,3}品系的203株F_{2,4}單株，於旱田稻熱病圃進行檢定。

人工接種評估WM1370之抗性幅度

為瞭解臺農82號誘變系WM1370之抗性幅度，以稻熱病菌株 *P. oryzae* 12YL-DL3-2、13TN-RK2-1、17HC-IR44-2-1、17TN-IR60-3-1、17PT-KD5-2-1、17TD-GS5-3-1、DAL1a1-1704、SY2a3-1803及ES1a1-1803接種WM1370及感病對照LTH，菌株由臺大植微系沈偉強老師及農業試驗所陳繹年先生提供，菌株採集資訊如表一。根據沈偉強老師及陳繹年先生實驗室之人工接種試驗，上述9菌株接種31個帶單一抗稻熱病基因的IRRI-bred blast-resistant lines (IRBLs)時，呈現不同的親和/不親和反應 (data not shown)，因此可歸類為不同生理小種。

稻熱病菌以濾紙法保存於-20℃⁽¹²⁾，每次試驗均撕取一小塊之濾紙片，將孢子沾於燕麥瓊脂培養基 (oatmeal agar, OMA) (50 g oatmeal、13.5 g agar、1 L ddH₂O)，於26℃、光照12 hr、黑暗12 hr下培養二週，接種四天前以無菌刀片輕劃菌落表面以

表一、接種試驗之稻熱病菌菌株採集資訊

TABLE 1. Collection information of *Pyricularia oryzae* isolates used in the inoculation experiment

Isolate ID ¹	Collection year	Location
12YL-DL3-2	2012	Douliu City, Yunlin County (雲林縣斗六市)
13TN-RK2-1	2013	Liujia Dist., Tainan City (臺南市六甲區)
17HC-IRRI44-2-1	2017	Emei Township, Hsinchu County (新竹縣峨眉鄉)
17TN-IRRI60-3-1	2017	Lucao Township, Chiayi County (嘉義縣鹿草鄉)
17PT-KD5-2-1	2017	Kanding Township, Pingtung County (屏東縣崁頂鄉)
17TD-GS5-3-1	2017	Guanshan Township, Taidong County (臺東縣關山鎮)
DAL1a1-1704	2017	Dali District, Taichung City (臺中市大里區)
SY2a3-1803	2018	Sanyi Township, Miaoli County (苗栗縣三義鄉)
ES1a1-1803	2018	Ershui Township, Zhonghua County (彰化縣二水鎮)

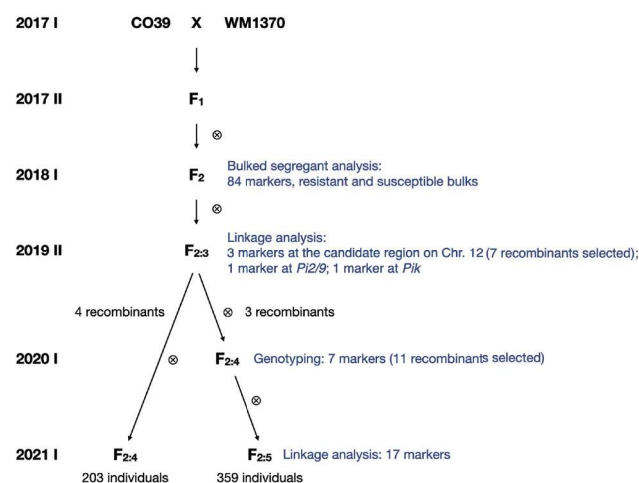
¹ *P. oryzae* 12YL-DL3-2, 13TN-RK2-1, 17HC-IRRI44-2-1, 17TN-IRRI60-3-1, 17PT-KD5-2-1, and 17TD-GS5-3-1 were provided by Dr. Wei-Chang Shen at Dept. of Plant Pathology and Microbiology of National Taiwan University. *P. oryzae* DAL1a1-1704, SY2a3-1803, ES1a1-1803 were provided by Yi-Nian Chen at Plant Pathology Division of Taiwan Agricultural Research Institute.

促進產孢。接種當天於培養皿中加入0.05% Tween 20，以載玻片輕刮菌落表面收集分生孢子，經雙層紗布過濾後，以血球計數器計算孢子量，並以0.05% Tween 20稀釋至 2×10^5 spores/ml使用。

稻熱病菌接種方式參考陳等⁽⁷⁾之方式，採取噴霧接種法，以空氣壓縮機及噴槍，在壓力10-15 psi下將孢子懸浮液均勻地噴灑於葉表 (每株接種約0.2 ml孢子懸浮液)，靜置風乾20分鐘，放入置物箱中加蓋保濕，並置入26℃黑暗且相對濕度100%條件下36小時，將蓋子開啟約0.5 cm縫隙，再置於28/26℃、16/8 hr light/dark且相對濕度80%之環境，於接種後七天評估抗性。上述實驗每個菌株各接種兩批植株，每批中每一品種 (系) 各4-6株，兩批放置於同個箱子的兩側。葉稻熱病之抗性檢定以國際稻米研究所 (International Rice Research Institute, IRRI) 訂定之0-9級罹病等級 (disease severity index, DSI)，對每個品種 (系) 之個體植株進行調查。0級 ≤ DSI ≤ 3級：抗病 (resistant, R)；3級 < DSI ≤ 5級：中等抗病 (moderately resistant, MR)；5級 < DSI ≤ 6級：中等感病 (moderately susceptible, MS)；6級 < DSI ≤ 9級：感病 (susceptible, S)⁽¹⁷⁾。

抗稻熱病基因座*Pi2/9*、*Pik*、*Pita*、*Ptr*之PCR增幅定序與分析

以調整後的cetyltrimethylammonium bromide (CTAB) 法萃取水稻genomic DNA⁽⁴⁶⁾。針對*Pi2/9*、*Pik*、*Pita*、*Ptr*之編碼序列 (coding sequence, CDS)，利用文獻上引子對^(8, 53)與新設計之引子對 (Pi9_e23F:GAATAGTAATAACCACTCGGAATGTTGA; Pi9_e23R: CAGGACATACTCCCATGGAATG)，對臺農82號及誘變系WM1370之DNA進行PCR增幅。PCR反應溶液總體積為20 μl，



圖一、以CO39 x WM1370雜交族群進行抗病基因座定位之流程圖。

Fig. 1. Scheme for mapping of resistance loci using CO39 x WM1370 population in this study.

I: 1st crop season. II: 2nd crop season.

包含0.1 μL *TaKaRa Ex Taq*TM (5 units/ μL) (Takara Bio, USA)、2 μL 10X *Ex Taq* Buffer (Takara Bio, USA)、1.6 μL dNTP Mixture (2.5 mM each) (Takara Bio, USA)、1 μL 10 μM forward primer、1 μL 10 μM reverse primer、1 μL 50 ng/ μL DNA及13.3 μL ddH₂O，PCR之反應條件為94°C變性5 min、每循環 94°C變性30 sec、55-65°C黏合30 sec及72°C聚合30-120 sec，共30個循環，最後以72°C聚合5 min完成增幅。PCR產物委託明欣生物科技有限公司進行Sanger sequencing，定序資料以SnapGene進行序列組裝及轉譯預測，並與已知抗性位點基因編碼序列（資料參考NCBI上EMBL/GenBank data libraries: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>）進行多重序列比對，並將比對後的檔案利用 Multalin (<http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/>)⁽¹¹⁾ 進行視覺化調整。

分子標誌設計與基因型分析

本研究使用之SSR分子標誌（表二及表三），係參考徐等 (2012) 針對5 個臺灣常見秈稈稻品種建立之多型性分子標誌平臺，其所篩選出的分子標誌來自Gramene (<https://archive.gramene.org/markers/>) 及RGP資料庫 (<http://rgp.dna.affrc.go.jp/E/publicdata/caps/index.html>)，並參考秈稻93-11及稈稻Nipponbare之indel序列自行開發。本研究使用其中橫跨12對染色體之84組SSR分子標誌進行集群分離分析（表二），PCR反應增幅同徐等 (2012) 所述，PCR產物使用6%的 1.5 mm non-SDS polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) 進行分析⁽¹⁵⁾。後續抗性區段之驗證使用5組於CO39及WM1370之間有多型性之分子標誌（表三），PCR反應溶液總體積為10 μL ，每管分別加入5 μL Taq DNA Polymerase 2X Master Mix RED (Ampliqon, Denmark)、1 μL 10 μM forward primer、1 μL 10 μM reverse primer、1 μL 20 ng/ μL DNA及2 μL ddH₂O，PCR反應條件為95°C變性 5 min、每循環95°C變性30 sec、50-60°C黏合30 sec、72°C聚合30 sec，共進行27次循環，最後以72°C聚合5 min完成增幅。RM27689及RM3103分子標誌分別以0.5X Tris-borate-EDTA (TBE) buffer所配置的2%及2.5 % agarose gel，於0.5X TBE buffer以電壓100V進行25分鐘電泳分析；RM144、RM28466及RM28404分子標誌於親本增幅的產物只相差18、25及27 bp，因此以高解析度之3% metaphor agarose gel，於0.5X TBE buffer以電壓50V進行75分鐘電泳分析。電泳後以溴化乙錠 (5 $\times$ 10⁻⁴ mg/mL) 染色10分鐘，再以ddH₂O褪染10分鐘後，於Gel Documentation-Videgel VGIS-4 (Top Bio Co., Taiwan) 觀察結果並拍照。

本研究開發之indel分子標誌（表四），則參考IRGC資料庫 (<https://snp-seek.irri.org/index.zul>) 中Nipponbare及秈稻93-11基因體序列進行相互比對，找尋介於100-300 bp 之indel區段以NCBI網站 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) 進行引子對之設計。各分子標誌適用之PCR黏合溫度如表四，而PCR增幅反應與電泳分析方法同上述。

本研究開發之KASP分子標誌（表五），則運用公開可取得之Nipponbare與CO39基因體序列相互比對，或以Nipponbare

為參考基因體，對WM1370與CO39進行特定基因之PCR增幅定序及比對，針對比對所獲得之單核苷酸多型性 (single-nucleotide polymorphism, SNP) 序列以Primer3 (<https://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/primer3/>) 進行引子對之設計，每組KASP分子標誌由兩組allele-specific primers及一組共用之reverse primer組成。KASP反應以StepOnePlusTM Real-Time PCR Systems (Thermo Fisher Scientific, USA) 或CFX Connect Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad, USA) 進行PCR增幅，反應溶液總體積為10 μL ，每管加入5 μL KAPA Probe fast qPCR kit (Roche, Switzerland)、0.3 μL 4 μM universal FAM probes、0.3 μL 4 μM universal VIC or HEX probes、0.14 μL 15 μM KASP assay (primer ratio如表五)、1 μL 50 ng/ μL DNA及3.26 μL ddH₂O，PCR反應條件為95°C變性3 min、每循環95°C變性20 sec、61°C黏合20 sec (-0.6°C/循環)、72°C 聚合1 sec，共進行10次循環，每循環95°C變性20 sec、55°C黏合及聚合40 sec，共進行38次循環⁽¹⁹⁾。

集群分離分析為自稻熱病旱田病圃中挑選8個抗病及8個感病之F₂個體，將其DNA分別混合後成為抗病群及感病群，連同兩親本DNA進行PCR反應增幅及電泳分析。有關F_{2,3}的基因型分析，為每品系20個單株混合之DNA進行基因型之測試。有關F_{2,4}及F_{2,5}的基因型分析，則先將其前一代品系所衍生之10-16個單株DNA混合測試，若為同型結合 (homozygous)，則各單株於該位點判定為該等位基因之同型合子 (homozygote)，若呈現異型結合 (heterozygous)，再分別測試每個單株之基因型。

CO39 x WM1370 F₂、F_{2,3}、F_{2,4}及F_{2,5}族群之病圃抗性檢定

CO39 x WM1370 F₂、F_{2,3}、F_{2,4}及F_{2,5}族群於嘉義農業試驗分所稻熱病旱田病圃進行抗性檢定。636個F₂品系及636個F_{2,3}品系之抗性檢定分別於2018年一期作、2019年二期作進行，種子採條播方式種植，行長25 cm，行距10 cm，每F_{2,3}品系播種一行，每行播種5 g，每隔10行栽植兩行感病品種Lomello，中間夾播一行臺農70號作為抗病對照，周圍邊行播種Lomello為接種源。肥料上，每公頃N、P₂O₅、K₂O分別為240 kg、36 kg及48 kg，整地時氮肥1/4量及磷、鉀肥全量做為基肥與土壤混合均勻，剩餘氮肥則分別在播種後15天、25天與天與35天做為追肥。稻種發芽後，每天8:00及16:00在葉面上噴水，每次2分鐘，以保持濕度促進發病。

來自11個F_{2,4}重組品系的359株 F_{2,5}子代及來自4個F_{2,3}重組品系的203株F_{2,4}子代 (每品系26-48株子代)，於2021年一期作進行抗性檢定，將單株種植於288孔之塑膠穴盤中，並於穴盤周圍種植感病品種Lomello做為自然接種源，肥料使用及噴水條件同上述。

統計分析

針對WM1370抗性幅度評估實驗，將人工接種9株菌株之結果合併進行單因子變異數分析 (One-way analysis of variance, One-way ANOVA)，確認各組別之間存在顯著差異 ($P < 0.05$)

表二、用於集群分離分析之simple sequence repeat (SSR) 分子標誌

TABLE 2. Simple sequence repeat (SSR) markers used for bulked segregant analysis

Chromosome	Marker name	Position (cM) ¹	Resistant bulk ²	Susceptible bulk	Forward primer sequence (5' to 3')	Reverse primer sequence (5' to 3')
1	RI01043	0.3	H	H	ATCATGGAGTTCCCTCATC	GAGCGTAGTCGTGGGAAG
1	STS389	10.9	H	H	AAATCCGAGAGCTAGTTCAGT	CAACCAAACACACCTTAGATT
1	RI01007	32.4-36.9	A	A	CTACTGCTGCTGCATGTCA	GGCGATGTTTCAGGTGGT
1	STS326	55.7	n/a	n/a	GCTCAGTATATTACGGTGGA	GGGAAGTAAATTGAATTGGTT
1	RM449	73.1	B	B	TTGGGAGGTGTTGATAAGGC	ACCACCAGCGTCTCTCTCTC
1	RM9	95.7-96.1	B	B	GGTGCCATTGTCGTCCTC	ACGGCCCTCATCACCTTC
1	CH0127	114.1-116.5	H	H	TATAGGGTGATGCCACTCTC	TTTCAGTCACATCGTACCAA
1	RI01017	134.7-135.8	H	H	AGGGCCAGTCGTGGTAT	TAAAGAAACGGTTGGTAGAA
1	STS420	157.6	H	H	ATTACCGACAGCAATAGTTCA	CACAGGTCATACACCATCTTT
1	RM6840	181.8	H	H	TACCAAGACTCCGCTATGGC	GAAGAAGGGATCATGGATCG
2	CH0214	0	A	A	GCATCTCGCTACCTAACCTA	GCAGTGCTAGCCTAGAAGAA
2	RM3188	15	H	H	TCACGAGTCGTTCTGTTCTG	CTTGCTGCTCAAGTGGTGAG
2	RM5459	36.3	H	H	AGTTGTTGTACCTCCTGCC	AATAAATAGGAGCCCGGGTC
2	CH0211	54.6	H	H	GCAGCAAAGTGCGGAGTA	CAGGTGAATTGCCAATTT
2	RM341	74.55	B	B	CAAGAAACCTCAATCCGAGC	CTCCTCCCGATCCCAATC
2	RM5651	93.5	A	A	AAGAGAACATTTGGAATCCT	TAACCTGTGCCTTGTTTG
2	RM525	118.1	H	H	GGCCCGTCCAAGAAATATTG	CGGTGAGACAGAATCCTTACG
2	RM14137	147.2	H	H	CACACGCTCTCCACCATTCC	AACGGCTATGCAATTGTTCCG
3	RM4853	6	B	B	CTATGGACGGTTGTTCGTAA	ATTTGATGCCAAGACAAATG
3	RM6038	24.4	H	H	CTTCGCCCCGATAAGTCTAG	GTAGTCCGACTCGATCTCCG
3	RI03056	46.6	H	H	TCGTTGGTTAATCACGCTTA	TGGATTTGACCAATGAGGAG
3	RM6959	65.4	A	A	TCCTATGGAGGATTGTTGCC	CGGAGGAGCAGAAACAAAAC
3	STS421	86	H	H	TAGATTCTTTATCCGCTCGT	AAGAACAGAAAGAGTCGCATT
3	RI03005	101.6	H	H	AGACTGGAACGGGATCATTG	ACGTGTTGCGGGCTCA
3	RI03006	120.4	H	H	TCTTTAGCGTGGGTTGGG	CGTATTCTCCTCTGTGATGC
3	RM8267	140.1	A	A	CATTGATAATGTCCAGTGACG	CTCCTGTTGTCACTCTTTGG
3	RM16211	164.4	A	A	AATGCTAATGGCGACTGACTTCG	ATGGGCTTGTTTGATTGCATCC
4	CH0458	7.1	A	A	CACTCATTGTTGAACGACAC	AAACATTTAGGGAAGCGAGT
4	SLS189	28.6	H	H	ATCAGAAATATTCGGGAAAAG	TTGTATACTCATTATGTAAATGGA
4	RI04042	48.3	H	H	AGGTGGGTCCAGGTATAATC	CACAGAGCTCTCTCTACCC
4	CH0411	75.9	H	H	CTTGAACCTGAGTGAGTGG	CGATGAAAATGATGTCTA
4	RI04014	94.4-96.0	A	A	AAGACGGGAGGATCTCA	CTAGCGTTAAACCACATAAA
4	RM1153	113.2	H	H	ACCAACGCCAAAAGCTACTG	TACTCGCCCTGCATGAGC
5	RM6300	6.5	A	A	CTTTGCTTTCGTGCCTTGTC	CGATGAATCCACTCCTCTC
5	RM7444	27.7	H	H	AATGGTACTACCGCCAGTGC	GGATTGTGATGTTCTGAGG
5	RI05018	49.4	H	H	TGAATCACGTTTATCAACCA	ATGAAACCGCTATTAAACCA
5	CH0507	54.6-55.4	H	H	CTCGCTGTTTACTGACTGG	TTTGATGTACTGCCTGCTCT
5	RM1386	77.4	A	A	TATTCAAGGTTGGCTGCCTC	CAATCACTCCATGGCTGATG
5	RI05013	86	H	H	TCCCAGTTACAGACCTATCG	GACGTTTGATCGTTCAGTTT
5	RM3476	101	H	H	GATTCTCGTCGTAATCAAGA	ATCCACGGTTAAGATAAATG
6	RM19255	3.25	H	H	TTAAGCTAGGGAATCAGCGTTAGC	GGAGTTGCAGTGTGGTGTGTGG
6	RI06052	18	H	H	CCATTGGTGCCATCTTC	TTGGTCCATTCCCCTCTC
6	RI06003	40.2	H	H	TCCAACGGGTATAAATGC	CACTAGACTCCCTCTTGAGAA
6	RI06083	58.7-61.6	H	H	TCGCTGCCTCGACAA	TCCACCTCCCAACAGC

Chromosome	Marker name	Position (cM) ¹	Resistant bulk ²	Susceptible bulk	Forward primer sequence (5' to 3')	Reverse primer sequence (5' to 3')
6	RI06027	74.1-76.5	H	H	AGGTAGGGACATGGGTTAGT	CTTCTTGGTCTTTGCGTTAG
6	R3879	99.2	H	H	CACTAATCAAGCCACTTCGG	CGAAACTTGTTTTCTTCCC
6	CH0626	107.6	A	A	GTGTGGCAATTTAACATCCT	TTTCATCAAATATCCCCATC
6	RM412	121.7	H	H	CACTTGAGAAAGTTAGTGCAGC	CCCAAACACACCCAAATAC
7	RM5055	11	H	H	CGTAGGTGATATATTGATCC	GTTCAAATTTTAACTAGCCA
7	RM1134	25.4	H	H	ACACCCAACCTTTTCTCACGC	AGCTAGGGTTTCGATCTCCC
7	RM21113	42.1	A	A	TGGTGTGCGTCGAAGTCTCTTCC	ACTATCGCGTCCCAGGTTCCG
7	RM6767	60.8	H	H	ACAAGCAACTTGCCTGTGG	CATCGCTGGGAGATCATAC
7	RI07044	81.1	H	H	GTAATCCACGGAGTGATTGT	TGCATTGTTCTCATGATACTG
7	RI07030	96.1	H	H	CATACGACTCCACAACACAC	CGATCTCTACGAGGGTTTTT
7	RM420	118.3	H	H	GGACAGAATGTGAAGACAGTCG	ACTAATCCACCAACGCATCC
8	CH0879	1.9	A	A	TAGTTGAAGGAGGAGAGATGG	A TTGTTTCTCCGCCA TTCC
8	RI08037	20.2	H	H	GTGTCGATATTGCATCCTTAG	ATAATTGGCGCTTCTGTTAG
8	RM72	45.4	H	H	CCGGCGATAAAACAATGAG	GCATCGGTCCTAACTAAGGG
8	RI08016	72.2	H	H	AAACCTGGAACCTCCCTCA	TTAGATGCCTCCCTATTGTC
8	SLS188	92.2	H	H	GGCATCAGTAAGACACAATA	AATGAATCTGTCTAGATTGG
8	RM4487	107.7	H	H	TGTTAATAAATCGAGTCACA	AATAATACTTCATCCGTTTC
8	RM6845	116.7	H	H	GTGACGGCAAGAGGAAGAAG	GTTTCGACAGGAACGCCAC
9	RM23911	12.5	A	A	TGCCTGCCTTATCTCTTGATGC	GATGAACCTAAAGGGCAGTTCC
9	CH0906	26.7-30.6	H	H	ACTGCTTTGATGGCTTGTTG	CTCCCCAACTGAATCC
9	RM3700	55.3	H	H	AAATGCCCCATGCACAAC	TTGTGAGATTGTCACCAGGG
9	SLS513	63.0-65.1	H	H	GGAATTAACCTTCCACTCGTT	TTGTTCCAATGAGCAATTAGT
9	RM6971	90.7	H	H	TTTGCGAACTAGACAAGGCC	GCGTCATTCTCGACGAGC
10	RI10013	1.9	n/a	n/a	TCAAAAGGTTGTGAGAAACA	GAGTATACAGGTGATGGATCG
10	CH1005	23.1	H	H	CTGATCCATTATCAACCCTAGC	GTTTCGTCCGGACTCTAGAAAA
10	RM6144	35.9	B	B	TGGAAGTCAACGGGAGTCTC	GAAGTAGTGGAATCGGCGAG
10	RI10026	57.5	H	H	ATGGTGAGAGAGTTCGAGTG	TTAGGCCATTATTGTACC
10	RI10030	73.7-83.0	H	H	AACCTCGATTGTATTTTCG	ATTCATCACAGGTGACTCC
11	RI11005	2.8-4.1	H	H	ACCTATTGTGACCGGTTTTA	GACAAAGACATCCACCAAGT
11	RI11008	20.3-27.8	H	H	ATAGTGAGGAGCTTGACACG	ATAGTGAGGAGCTTGACACG
11	CH1103	35.6-45.3	H	H	AATAGCTTATCAAGCTGTGT	TACGTTTACCTCGAGACCAT
11	RM287	64.5	A	A	TTCCCTGTTAAGAGAGAAATC	GTGTATTGGTGAAAGCAAC
11	SLS173	91.4	H	H	ACCCCTACCTCTACTAGTGC	CGGTTTGGGTGATAATATAG
11	RM224	106	A	A	ATCGATCGATCTTACGAGG	TGCTATAAAAGGCATTCCGGG
12	RMM27454	10.3	A	A	ACATTGCGGTATTATCTGCT	GAAACAGAGGCACATTTTCAT
12	CH1204	26	A	A	GATCACCATCCACATTAAC	ATAGCTAAATAAGGCTGATGGT
12	RM27789	42.7	H	H	AGCTCCGTCGAATCCATATTGC	CCAACCATTTCTCTCTACCATTCC
12	RM28179	61.7	A	A	GGTTCGAGGTGATCACTGCTTCC	GTGGTCACCGAGGTGGTTGAGG
12	RM28466	75.8	A	A	CCGACGAAGAAGACGAGGAGTAGCC	AGGCCGGAGAGCAATCATGTGC
12	RI12026	107.4	H	H	CTATAGCAGCCAGCTAATGC	TTCTGCCATAGATCTTCTC

¹ Marker positions based on the linkage map of Nipponbare x Kasalath (NK) (Hsu et al. 2018).² A: WM1370 homozygous; B: CO39 homozygous; H: Heterozygous; n/a: not available.

表三、對CO39及WM1370具多型性之simple sequence repeat (SSR) 分子標誌

TABLE 3. Polymorphic simple sequence repeat (SSR) markers between CO39 and WM1370

Marker	Chromosome	Marker position (bp) ¹	Primer sequences (5' to 3')	Anneal temp. (°C)	Electrophoresis gel	Product size (bp)	
						CO39	WM1370
RM144	11	28,281,693-28,281,937	F:TGCCCTGGCGCAAATTTGATCC R:GCTAGAGGAGATCAGATGGTAGTGCATG	58	3% metaphor agarose gel	219	237
RM27689	12	4,736,201-4,736,437	F:AACCTGCAATTACCATCCAAGC R:AATACACACCCACAGTTCCACACC	58	2% agarose gel	180	236
RM3103	12	7,461,468-7,461,772	F:CAGACAACCTTGAATGTACG R:ATGTCATGGGAGATAATTAA	50	2.5% agarose gel	122	218
RM28404	12	21,821,109-21,821,374	F:GTGGGAGTCGAGAGGCGATAAGG R:AAAGGACGGCTCATAGGTGATGG	58	3% metaphor agarose gel	238	265
RM28466	12	22,975,528-22,975,621	F:CCGACGAAGAAGACGAGGAGTAGCC R:AGGCCGGAGAGCAATCATGTCTG	60	3% metaphor agarose gel	70	94

¹ Genomic positions are based on the MSU7 Nipponbare reference genome.

表四、對CO39及WM1370具多型性insertion-deletion (InDel) 分子標誌

TABLE 4. Polymorphic insertion-deletion (InDel) markers between CO39 and WM1370

Marker ¹	Chromosome	Marker position (bp) ¹	Primer sequences (5' to 3')	Anneal temp. (°C)	Product size (bp)	
					CO39	WM1370
Indel_C6_102	6	10,269,770-10,270,294	F:GGGCGTAGCAGCAAACAAC R:TTCAGCCACCTGAATAGCCTG	60	283	525
Indel_C12_36	12	3,634,755-3,635,226	F:GAGAAGATTGGAGAGGAAAAGAGAAG R:AGCAAAAGCCGGTTCAAAAAC	60	366	472
Indel_C12_50	12	5,077,291-5,077,741	F:CGACGTTGGACAGTAGAGC R:ATTGAGTTCCGTTGCCGTGT	60	652	451
Indel_C12_71	12	7,132,754-7,133,432	F:TGATTTCGCGTGTCTGGTCT R:GTTAATGCCAATCTCGGGGC	60	413	679
Indel_C12_153	12	15,397,405-15,397,790	F:CGCGTGCAAATCCAAAACCC R:CATTACCTTGTGAAGTAGCAGCAC	60	296	386
Indel_C12_169	12	16,986,287-16,986,519	F:TCCTCTTGTAAACAAACACACAC R:GTTTAGGGCCTGATGGCCTG	60	360	233
Indel_C12_181	12	18,120,741-18,120,990	F:CACCGTGAGATACCACTACAACA R:GGTACGCGACRGTGCAAACG	60	167	250
Indel_C12_196	12	19,602,015-19,602,318	F:GTGAAGTTTCTCCCCCAACG R:TCCTGCATATTGTCTTAGARGG	58	371	304
Indel_C12_201	12	20,108,097-20,108,667	F:GGATGGAATGGAGATGAGC R:GCGCATGATWAAAATTAGCACAT	58	151	571
Indel_C12_217	12	21,701,080-21,701,708	F:GCATCTGGCTTTGGACAGTAG R:ACCTGTTTACCCATGTAGTTCA	60	241	629

¹ Genomic positions are based on the MSU7 Nipponbare reference genome.

表五、對CO39及WM1370具多型性之KBioscience competitive allele-specific PCR (KASP) 分子標誌

TABLE 5. Polymorphic KBioscience competitive allele-specific PCR (KASP) markers between CO39 and WM1370

Marker ¹	Type	SNP position (bp) ²	Concentration ratio	Primer sequences (5' to 3')
C12_104	SNP	10,388,051	1	F1:FAM- GAAGGTGACCAAGTTCATGCT ATTCTAGTTAGCTGGAT _g CTGG
			1	F2:HEX- GAAGGTCGGAGTCAACGGATT GCTATTCTAGTTAGCTGGAT _g CTGA
			5.2	R:GCTGCAACTAATGCTGTAGTACTATTTCAT
C12_Pita_R2	SNP	10,610,964	2	F1:FAM- GAAGGTGACCAAGTTCATGCT CGGGCTTTCGTGCtGACG
			0.4	F2:VIC- GAAGGTCGGAGTCAACGGATT CCGGGCTTTCGTGCtGACT
			5.2	R:CATCCGAAGACTGATGCTGATG
C12_Ptr_3	SNP	10,824,209	2	F1:FAM- GAAGGTGACCAAGTTCATGCT TACCTGTCGATGGTTGT _g ACC
			0.4	F2:HEX- GAAGGTCGGAGTCAACGGATT GTACCTGTCGATGGTTGT _g ACT
			5.2	R:CCTTGTGTGGATAGCATGGAGA
C12_118	SNP	11,875,086	1	F1:FAM- GAAGGTGACCAAGTTCATGCT GGATGGTAAGAAGATTC _g TGCG
			1	F2:HEX- GAAGGTCGGAGTCAACGGATT AGGATGGTAAGAAGATTC _g TGCA
			5.2	R:GGTGATTCAGGTGTGGCAAG
C12_140	SNP	14,015,888	1	F1:FAM- GAAGGTGACCAAGTTCATGCT ATATCCTGCTCATTGGTTT _{Ga} CCG
			1	F2:HEX- GAAGGTCGGAGTCAACGGATT CATATCCTGCTCATTGGTTT _{Gt} CCA
			5.2	R:CCATGTAAAGAAGCCCTCACA
C12_148_1	SNP	14,828,855	1	F1:FAM- GAAGGTGACCAAGTTCATGCT CTGACACTCTTCCTCAATTATGT _g AAT
			1	F2:HEX- GAAGGTCGGAGTCAACGGATT TGACACTCTTCCTCAATTATGT _g AAC
			5.2	R:CCTCTCCGTGTCGTAGTTCC
C12_158	SNP	15,895,666	1	F1:FAM- GAAGGTGACCAAGTTCATGCT TGCGGAATACCTCCACATiCAG
			1	F2:HEX- GAAGGTCGGAGTCAACGGATT TGCGGAATACCTCCACATiCAC
			5.2	R:AGGGAATCTGTTTTTGCCGAG
C12_161_2	SNP	16,197,212	2	F1:FAM- GAAGGTGACCAAGTTCATGCT GCACCTGGACTTGGGCAaCC
			0.4	F2:HEX- GAAGGTCGGAGTCAACGGATT GCACCTGGACTTGGGCAiGCT
			5.2	R:CTGCTAGGTTTCATCCCGTTC

¹ Markers were newly designed in this study, except that C12_104 was obtained from Sheng-Shan Wang at Tainan District Agricultural Research and Extension Station.

² Genomic positions are based on the MSU7 Nipponbare reference genome.

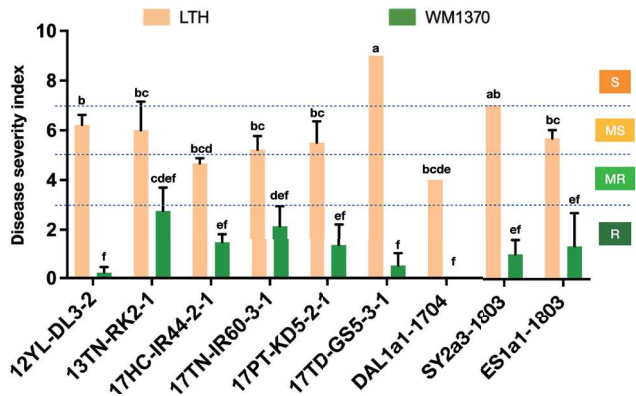
³ F1: forward primer with FAM-universal tail. F2: forward primer with HEX/VIC-universal tail. Universal tails are highlighted in bold. Lower case letters in the primer sequences stand for the mismatch of each allele-specific primers. R: reverse primer.

後，再以Tukey's honestly significant difference test (Tukey's HSD) 進行多重比較檢定 ($P < 0.05$)，釐清不同菌株造成之罹病等級差異。有關CO39 x WM1370 $F_{2,3}$ 、 $F_{2,4}$ 及 $F_{2,5}$ 子代之統計分析，先以皮爾森卡方檢定 (Pearson's Chi-square test) 分別針對來自不同品系之子代族群，檢測抗感病個體數量比率是否符合單一顯性基因分離率 (3:1) 或雙顯性基因分離率 (15:1)，而後將其罹病等級與基因型資料彙整後，首先將每一代來自不同親本之個體，分為不同族群進行One-way ANOVA，確認各分子標誌與抗感病性之相關性，而後再針對ANOVA結果具有顯著差異 ($P < 0.05$) 之分子標誌，以Tukey's HSD進行多重比較檢定 ($P < 0.05$)，確認不同基因型之抗感病表現差異，據此界定與稻熱病抗性相關之區段。所有統計分析均以R程式語言撰寫執行 (RStudio version 1.3.1056)⁽⁴⁴⁾。

結 果

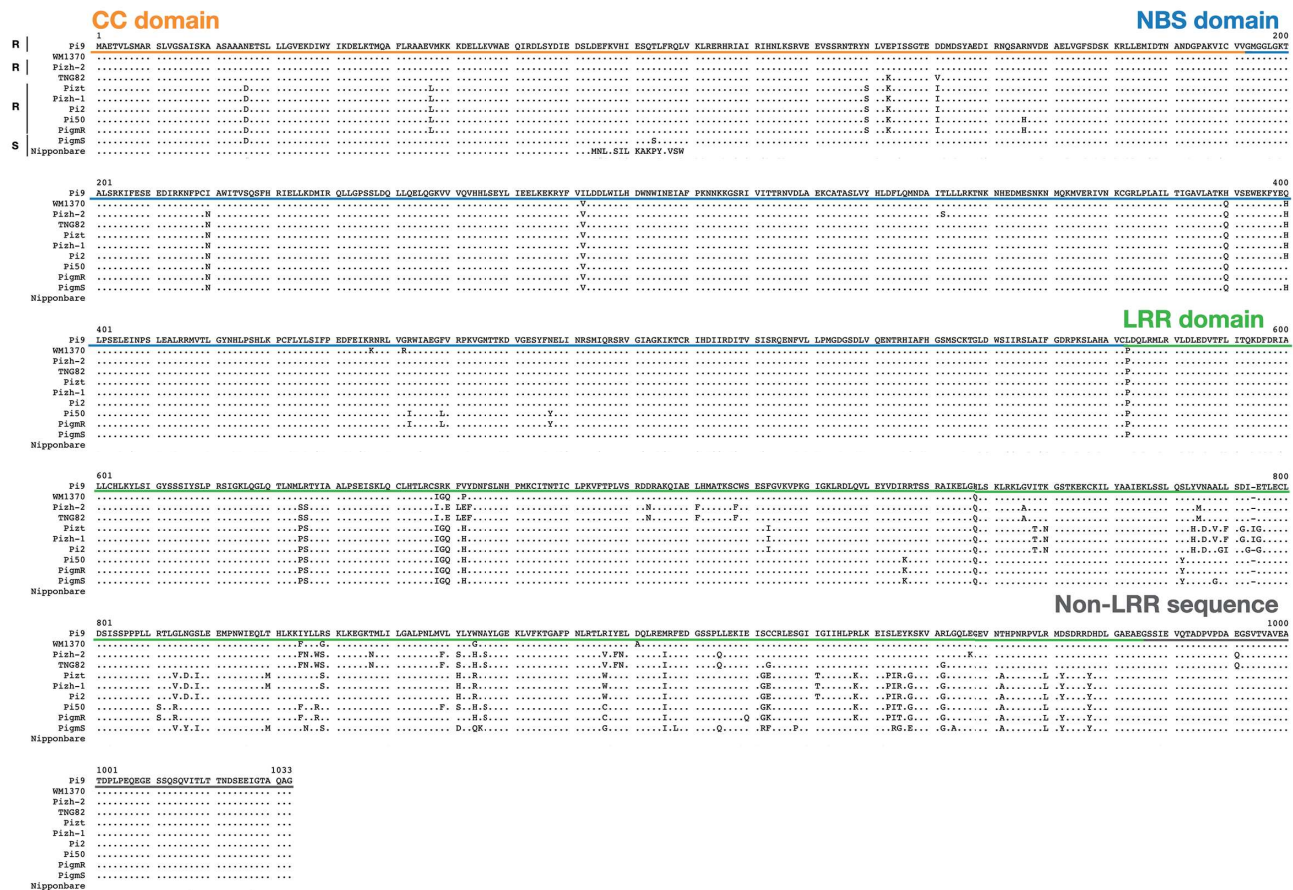
WM1370之抗性幅度評估

為了確認WM1370的抗性幅度，以2012-2018年收集自臺灣不同地區 (雲林縣斗六市、臺南市六甲區、新竹縣峨眉鄉、嘉義縣鹿草鄉、屏東縣崁頂鄉、臺東縣關山鎮、臺中市大里區、苗栗縣三義鄉及彰化縣二水鎮) 之9株不同生理小種稻熱病菌菌株接種感病對照LTH及WM1370，結果顯示，感病對照LTH平均罹病等級4-9級，為中抗至極感病之表現；WM1370平均罹病等級0-2.8級，為極抗至抗病表現，且除了菌株13TN-RK2-1 ($P = 0.072$) 之外，其餘8株菌株之接種結果WM1370與LTH平均罹病等級皆具顯著差異 ($P < 0.05$)，顯示WM1370具有廣幅抗性



圖二、LTH及臺農82號誘變系WM1370接種稻熱病菌株12YL-DL3-2、13TN-RK2-1、17HC-IR44-2-1、17TN-IR60-3-1、17PT-KD5-2-1、17TD-GS5-3-1、DAL1a1-1704、SY2a3-1803及ES1a1-1803之結果。

Fig. 2. Disease reactions of LTH and WM1370 upon inoculation with *P. oryzae* isolates 12YL-DL3-2, 13TN-RK2-1, 17HC-IR44-2-1, 17TN-IR60-3-1, 17PT-KD5-2-1, 17TD-GS5-3-1, DAL1a1-1704, SY2a3-1803 and ES1a1-1803. Data (mean $\pm$ standard error) with different letters are significantly different according to Tukey's HSD test at $P < 0.05$.



圖三、*Pi2/9*等位基因之胺基酸序列比對，誘變系WM1370之等位蛋白與Pi9具15處胺基酸差異。

Fig. 3. Alignment of the amino acid sequences of the alleles at *Pi2/9*. Fifteen amino acid differences were found between the allelic protein in the mutant line WM1370 and Pi9. TNG82: allelic protein in Tainung 82. WM1370: allelic proteins in Tainung 82 mutant line WM1370. R: resistance allelic protein; S: susceptibility allelic protein. The conserved coil-coiled (CC), nucleotide-binding site (NBS), and leucine-rich repeats (LRR) domains are based on the predicted protein structure of Pi9 (Qu et al. 2006).

(圖二)。

抗稻熱病基因座*Pi2/9*、*Pik*、*Pita*、*Ptr*之PCR增幅定序與分析

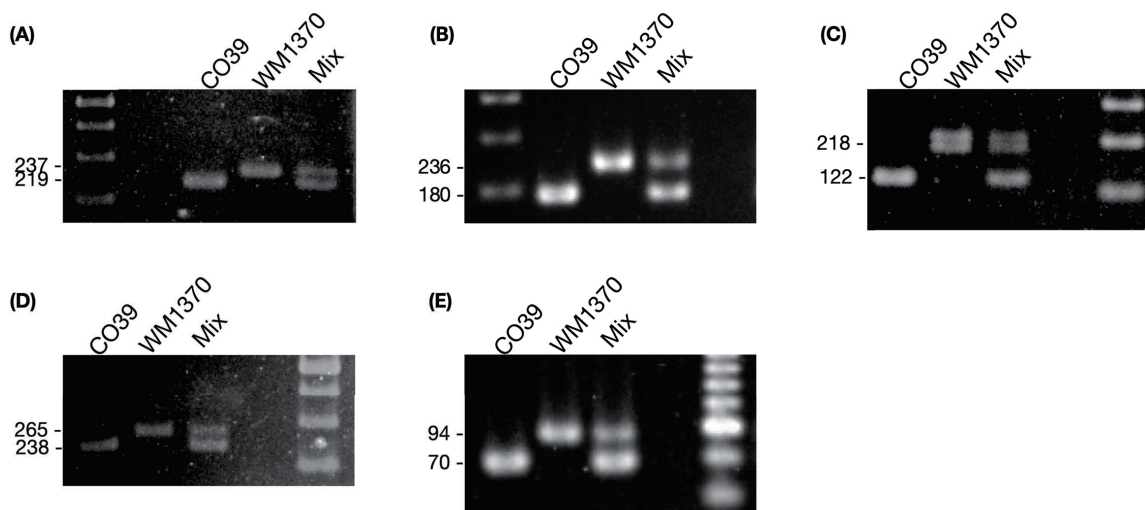
為了解WM1370的抗性來源，本研究針對已知主要抗稻熱病基因座*Pi2/9*、*Pik*、*Pita*及*Ptr*進行定序，並與基因座內目前已被選殖之抗感病等位基因進行序列比對。*Pi2/9*基因座之結果顯示，與親本臺農82號相比，WM1370有轉換及顛換突變，將胺基酸編碼與已被選殖之等位基因相比，發現WM1370及臺農82號雖具有完整的1032個胺基酸，但皆與Pi9、Pi2、Piz-t、PigmS、PigmR、Pizh-1、Pizh-2蛋白質不同，其中臺農82號與最近被選殖的Pizh-2最相似，但仍有6個胺基酸的差異，WM1370則與Pi9最相似，有15個胺基酸差異(圖三)。

*Pik*基因座由*Pik-1*及*Pik-2*組成，定序及比對結果顯示，WM1370與臺農82號於*Pik-1*及*Pik-2*之核苷酸序列完全相同，並無觀察到突變，且兩者胺基酸編碼與*Pik-s*相同。在*Pita*基因座，WM1370與臺農82號有7個核苷酸的差異，3處為轉換



圖四、*Ptr*等位基因之胺基酸序列比對，誘變系WM1370與抗病品系Katy之等位蛋白具有一個胺基酸差異 (L763F)。

Fig. 4. Alignment of the amino acid sequences of the alleles at *Ptr*. One amino acid difference (L763F) was found between the allelic proteins in the mutant line WM1370 and the resistant cultivar Katy. TNG82: allelic protein in Tainung 82. WM1370: allelic proteins in Tainung 82 mutant line WM1370. R: resistance allelic protein; S: susceptibility allelic protein. The conserved Armadillo (ARM) repeats domain (labelled with red lines) are based on the predicted protein structure of *Ptr* containing cultivar Katy. The deletion at amino acids 870-873 (nucleotides 2,608-2,619 bp) (pink shaded region) was associated with the resistance of *Ptr* in Katy (Zhao et al. 2018).



圖五、對CO39及WM1370具多型性之simple sequence repeat (SSR) 分子標誌。

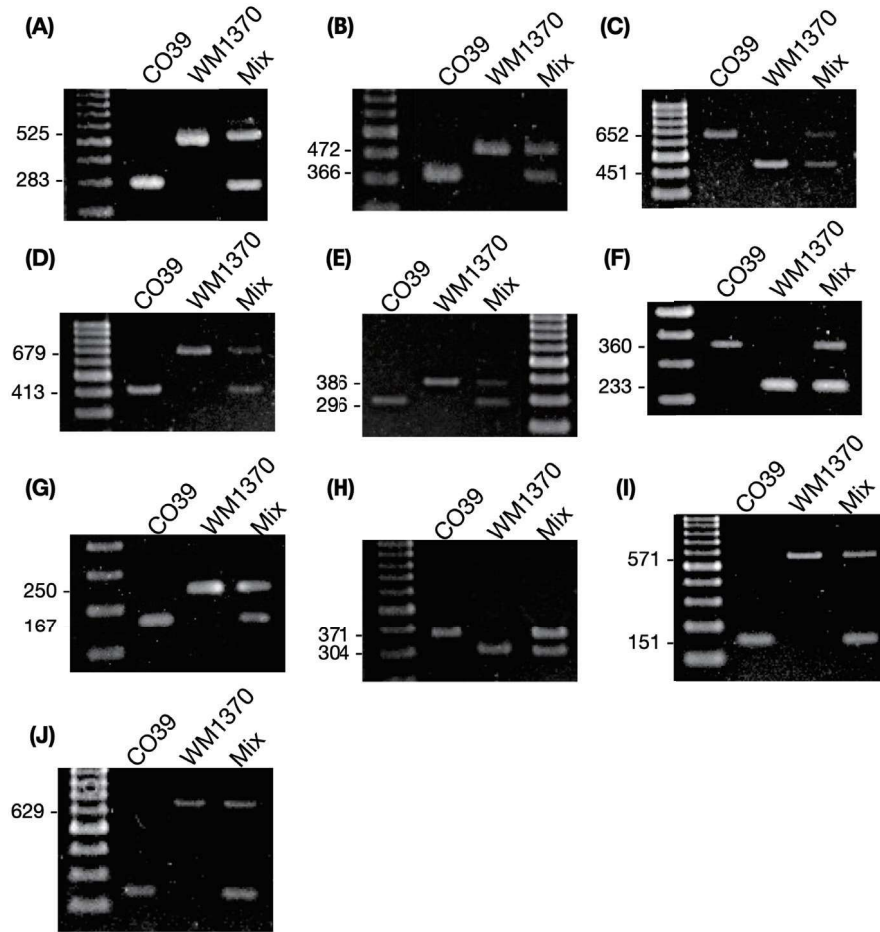
Fig. 5. Simple sequence repeat (SSR) markers polymorphic between CO39 and WM1370. (A) RM144; (B) RM27689; (C) RM3103; (D) RM28404; (E) RM28466. Mix: DNA mixture of CO39 and WM1370.

突變，4處為顛換突變，而於第2,752個核苷酸從T突變成G，致使影響*Pita*抗性的第918個胺基酸由感病的絲胺酸 (Serine, S) 轉為抗病的丙胺酸 (Alanine, A)，將胺基酸編碼與已被選殖之等位基因相比後，發現臺農82號之胺基酸編碼與感病品種 Nipponbare相同，屬感病的等位蛋白，而WM1370帶有與野生稻W1866相同的抗病等位蛋白。*Ptr*定序及比對結果顯示，與親本臺農82號相比，WM1370有轉換、顛換及缺失突變，其中於2,608-2,619處有12個核苷酸 (AAAAAACCAGAA) 之缺失，此處為影響*Ptr*抗性之區段，而將胺基酸編碼與已被選殖之等位基因比對後，發現WM1370與抗病品種Katy相比在Armadillo (ARM) repeat上第763個胺基酸為白胺酸 (Leucine, L) 轉苯丙胺

酸 (Phenylalanine, F) 之變異 (圖四)。

多型性分子標誌之篩選及開發

本研究使用之5組SSR分子標誌增幅結果如圖五，新開發之10組indel分子標誌如圖六，該等分子標誌皆可增幅出專一片段，且產物大小符合預期，並對CO39及WM1370具有多型性。本研究開發之8組多型性KASP分子標誌增幅結果如圖七，圖中的X軸與Y軸分別代表FAM及HEX/VIC的螢光強度，不同螢光代表來自兩親本的不同等位基因 (alleles) 及heterozygotes，理想中的增幅循環數為28-35之間，循環數過高會導致螢光probe產生假訊號，由於每組分子標誌增幅情形不同，在操作上會先以



圖六、對CO39及WM1370具多型性之Insertion-deletion (indel) 分子標誌。

Fig. 6. Insertion-deletion (indel) markers for polymorphic between CO39 and WM1370. (A) Indel_C6_102; (B) Indel_C12_36; (C) Indel_C12_50; (D) Indel_C12_71; (E) Indel_C12_153; (F) Indel_C12_169; (G) Indel_C12_181; (H) Indel_C12_196; (I) Indel_C12_201; (J) Indel_C12_217. Mix: DNA mixture of CO39 and WM1370.

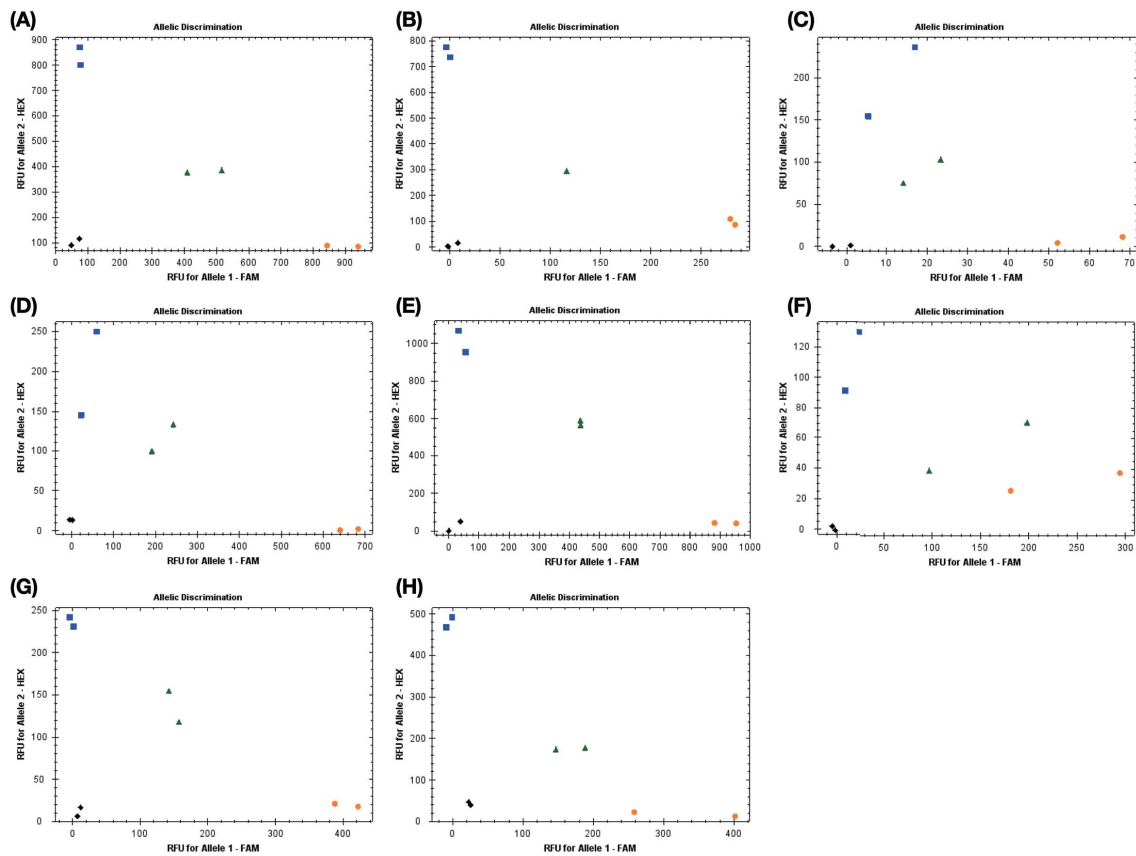
38循環進行增幅，再由分析軟體往前查看每循環的分群狀況，依據no template control (NTC；ddH₂O) 尚未出現假訊號且親本之DNA呈現可辨識的分群為主，而圖上不同螢光訊號均明確分群，顯示其對CO39及WM1370具有多型性。

WM1370之抗病基因座定位

依據表二之橫跨水稻十二對染色體的SSR分子標誌，針對CO39 x WM1370 F₂子代進行集群分離分析，發現抗病群、感病群基因型只有在CH1204 (chr.12: 3,017,759-3,017,848 bp) 及RM28179 (chr.12: 17,779,489-17,779,649 bp) 與抗感病親本之基因型相符。為了再次驗證抗性區段，於2019年二期作嘉義旱田病圃進行636個CO39 x WM1370 F_{2.3}品系之抗性檢定，其罹病等級介於0-9級之間，感病親本CO39罹病等級為5級（當季無抗病親本WM1370之檢定資料）。取其中192個F_{2.3}子代針對第12號染色體上三個分子標誌RM27689 (4.7 Mb)、C12_104 (10.4 Mb) 及C12_161_2 (16.1 Mb) 進行連鎖分析，初步驗證抗性與三個分子

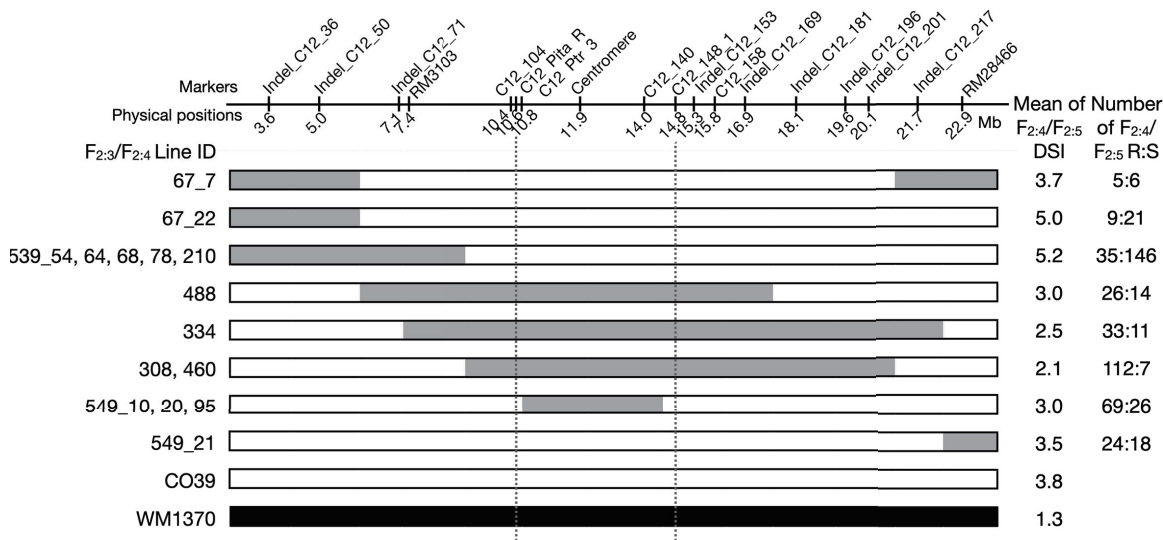
標誌皆有連鎖 ($P < 0.0001$) (data not shown)。針對基因型分析結果篩選出7個不同單倍型之F_{2.3}品系，進行後續基因座定位的試驗。因兩親本於*Pi2/9*及*Pik*基因座序列不同，針對此7個F_{2.3}品系測試Indel_C6_102 (Chr. 6: 10.2 Mb，與*Pi2/9*連鎖) 及RM144 (Chr. 11: 28.2 Mb，與*Pik*連鎖)，結果顯示7個F_{2.3}品系於此兩基因座皆為CO39同型合子，故可排除遺傳背景中*Pi2/9*及*Pik*之影響。針對來自前述7個F_{2.3}品系的417株F_{2.4}子代，利用RM27689 (4.7 Mb)、RM3103 (7.4 Mb)、C12_104 (10.4 Mb)、C12_118 (11.8 Mb)、C12_140 (14.0 Mb)、RM28404 (21.8 Mb) 及RM28466 (22.9 Mb) 共7組分子標誌進行基因型分析，並根據基因型分析之結果，挑選11個在目標區段重組之F_{2.4}個體 (5種單倍型，來自3個F_{2.3}品系)，進行F_{2.5}重組品系建構，然而因帶有*Pita*區段 (10.4-10.6 Mb) 之F_{2.4}品系未收穫種子，因此以其上一代之4個F_{2.3}品系一起進行抗性檢定 (Line 308、Line 334、Line 460及Line 488)，共同完成後續精細定位之連鎖分析。

來自前述11個F_{2.4}品系的359株F_{2.5}子代及來自4個F_{2.3}品系的



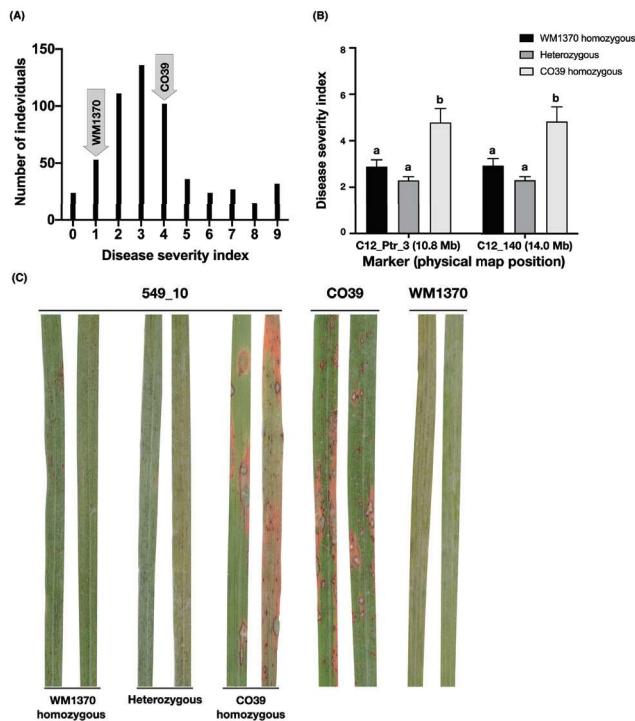
圖七、對CO39及WM1370具多型性之KBioscience competitive allele-specific PCR (KASP) 分子標誌。

Fig. 7. KBioscience competitive allele-specific PCR (KASP) markers polymorphic between CO39 and WM1370. (A) C12_104; (B) C12_Pita_R2; (C) C12_Ptr_3; (D) C12_118; (E) C12_140; (F) C12_148_1; (G) C12_158; (H) C12_161_2. Square: HEX/VIC-signal; triangle: heterozygous genotype; circle: FAM-signal; diamond: No template control (NTC).



圖八、WM1370在第12號染色體10.7-14.6 Mb之抗病基因座。

Fig. 8. The resistance locus at 10.7-14.6 Mb on chromosome 12 in WM1370. The figure shows the genotypes of CO39 x WM1370 F_{2:3} and F_{2:4} recombinants and the disease reactions of their F_{2:4} and F_{2:5} progenies. Disease evaluation was conducted in the upland blast nursery in Chiayi in the first crop season of 2021. 308, 334, 460, and 488 are F_{2:3} lines, and 67_7, 67_22, 549_21, 539_54, 539_64, 539_68, 539_78, 539_210, 549_10, 549_20, and 549_95 are F_{2:4} lines. Genomic positions are based on the MSU7 Nipponbare reference genome. White bar: CO39 homozygote; black bar: WM1370 homozygote; gray bar: heterozygous. DSI: disease severity index. R: resistant. S: susceptible.



圖九、(A) CO39 x WM1370 F_{2.4}及F_{2.5}族群於2021年一期作在嘉義旱田病圃之罹病度分布。測試品系包含來自11個F_{2.4}品系的359株F_{2.5}子代及來自4個F_{2.3}品系的203株F_{2.4}子代，箭頭處為抗感病親本WM1370及CO39之平均罹病度。(B) 來自F_{2.4}品系549_10、549_20及549_95的95株F_{2.5}子代連鎖分析之結果，不同字母代表依據Tukey's HSD test ($P < 0.05$) 分析具顯著差異。(C) 與抗性候選區段連鎖之分子標記C12_Ptr_3及C12_140處，帶不同基因型之549_10 F_{2.4}重組品系之F_{2.5}子代，以及親本CO39及WM1370於2021年一期作嘉義旱田病圃自然接種呈現之病徵。

Fig. 9. (A) Distribution of the disease severity index of the CO39 x WM1370 F_{2.4} and F_{2.5} populations in the upland blast nursery in Chiayi in the first crop season of 2021. The tested lines included 359 F_{2.5} individuals derived from 11 F_{2.4} lines and 203 F_{2.4} lines derived from 4 F_{2.3} lines. Arrows indicate the average disease severity index of the two parental rice varieties CO39 and WM1370. (B) Trait-marker linkage analyses of 95 F_{2.5} progenies derived from F_{2.4} lines 549_10, 549_20 and 549_95. Data (mean $\pm$ standard error) with different letters are significantly different according to Tukey's HSD test at $P < 0.05$. (C) The leaf blast symptoms of 549_10 F_{2.5} progenies carrying different genotypes at the candidate segment and the parental varieties CO39 and WM1370 under natural infection in the upland blast nursery in Chiayi in the first crop season of 2021.

203株F_{2.4}子代，於2021年一期作嘉義旱田病圃進行抗性檢定(各重組品系基因型及其子代之抗性檢定結果彙整如圖八)，其罹病等級介於0-9級之間，其中抗病親本WM1370罹病等級介於0-5級，平均罹病等級為1.3級，感病親本CO39介於2-6級，平均罹病等級為3.8級(圖九A)。檢視來自4個F_{2.3}重組品系之203株F_{2.4}子代，發現Line 334及Line 488之F_{2.4}子代抗感個體總和比分別為26:14及33:11，符合顯性單基因分離率3:1 ($\chi^2 = 2.13 < \chi^2_{0.05, 1} = 3.84$, $P = 0.14$; $\chi^2 = 0.00 < \chi^2_{0.05, 1} = 3.84$, $P = 1.00$)，

而Line 308及Line 460之F_{2.4}子代抗感個體總和比分別為73:4及39:3，符合雙顯性基因分離率15:1 ($\chi^2 = 0.15 < \chi^2_{0.05, 1} = 3.84$, $P = 0.70$; $\chi^2 = 0.06 < \chi^2_{0.05, 1} = 3.84$, $P = 0.81$)；檢視來自11個F_{2.4}品系的359株F_{2.5}子代，則僅由3個F_{2.4}重組品系549_10、549_20及549_95衍生之F_{2.5}族群，其抗感個體總和比為69:26，符合單一顯性基因分離率3:1 ($\chi^2 = 0.28 < \chi^2_{0.05, 1} = 3.84$, $P = 0.59$)，而其餘8個F_{2.4}重組品系67_7、67_22、539_54、539_64、539_68、539_78、539_210及549_21衍生之F_{2.5}族群，其抗感個體總和比均不符合單一顯性基因分離率3:1。

針對來自不同品系之子代族群分別進行連鎖分析，檢視來自F_{2.3}重組品系之不同F_{2.4}族群(表六)，可發現橫跨分子標記Indel_C12_71 (7.1 Mb) 至Indel_C12_181 (18.1 Mb) 之區間均與抗性呈現顯著相關。根據來自F_{2.4}重組品系67_7、67_22、539_54、539_64、539_68、539_78、539_210、549_21之F_{2.5}族群分析結果(表七)，抗性與Indel_C12_36 (3.6 Mb)、Indel_C12_50 (5.0 Mb)、Indel_C12_71 (7.1 Mb)、RM3103 (7.4 Mb)、Indel_C12_217 (21.7 Mb) 及RM28466 (22.8 Mb) 等區域均無顯著相關。而由3個F_{2.4}重組品系549_10、549_20及549_95衍生之F_{2.5}族群，其於C12_104 (10.4 Mb) 及C12_Pita_R2 (10.6 Mb)，座落於Pita處為CO39同型合子，且其抗性與C12_Ptr_3 (10.8 Mb) 及C12_140 (14.0 Mb) 顯著相關(圖九B)，因此針對14-15.3 Mb之間再設計1組KASP分子標記C12_148_1 (14.8 Mb)，測試結果顯示在C12_148_1 (14.8 Mb) 處皆為CO39同型合子，據此可將抗性區間縮小至約10.7-14.6 Mb；以其中549_10品系為例，其於此區間帶不同基因型之F_{2.5}子代，於病圃呈現明顯之抗感病差異(圖九C)，確認抗病基因位於此區間內。

討 論

WM1370為臺農82號誘變系中，對稻熱病菌具有廣幅及高度抗性之品系，該品系在連續誘變五次後，曾經過五代之自交純化，基因型已趨於同質結合，本研究在測試相關分子標記時，亦並未發現異質現象，因此可視為純系。本研究首先針對WM1370人工接種9株不同生理小種的本土稻熱病菌菌株，確認其具有廣幅抗性，亦透過對主要抗稻熱病基因座之PCR增幅定序得知，WM1370帶有Pik-s、Pita及可能帶Ptr(與已發表之Ptr抗性位點蛋白存在一個胺基酸差異L763F)。為了釐清抗病基因座，將WM1370與感病和稻CO39雜交，運用前人開發之2組SSR分子標記、及新開發之6組KASP及9組indel分子標記進行基因型分析，篩選重組子代並結合病圃抗性檢定資訊後，由CO39 x WM1370 F_{2.4}及F_{2.5}之連鎖分析結果中得知，稻熱病抗性與C12_Ptr_3 (10.8 Mb) 及C12_140 (14.0 Mb) 兩組分子標記連鎖，而Line 308及Line 460之F_{2.4}子代抗感病個體比率符合雙顯性基因分離率，顯示WM1370的遺傳背景中，應還有另外的抗

表六、2021年一期作CO39 x WM1370 F_{2:4} 族群連鎖分析結果**TABLE 6.** Trait-marker linkage analyses of the CO39 x WM1370 F_{2:4} population in the first crop season of 2021

F _{2:3} recombinant ID	Marker (Position) ¹	Degree of freedom	ANOVA sum square	Mean square	F value	Pr > F	Genotypes at the target locus	Number of F _{2:4} individuals	Disease severity index (mean ± SE) ²
488	Indel_C12_71 (7.1 Mb)	2	48.64	24.32	7.33	0.003	WM1370 homozygotes	9	1.89 ± 0.48 a
							Heterozygotes	13	2.62 ± 0.29 a
							CO39 homozygotes	11	4.82 ± 0.80 b
	RM3103 (7.4 Mb)	2	48.64	24.32	7.33	0.003	WM1370 homozygotes	9	1.89 ± 0.48 a
							Heterozygotes	13	2.62 ± 0.29 a
							CO39 homozygotes	11	4.82 ± 0.80 b
	C12_104 (10.4 Mb)	2	48.64	24.32	7.33	0.003	WM1370 homozygotes	9	1.89 ± 0.48 a
							Heterozygotes	13	2.62 ± 0.29 a
							CO39 homozygotes	11	4.82 ± 0.80 b
	C12_Ptr_3 (10.8 Mb)	2	46.57	23.29	7.62	0.002	WM1370 homozygotes	9	2.00 ± 0.50 a
							Heterozygotes	19	2.68 ± 0.24 a
							CO39 homozygotes	10	4.90 ± 0.87 b
	C12_140 (14.0 Mb)	2	45.74	22.87	6.69	0.004	WM1370 homozygotes	8	2.00 ± 0.60 a
							Heterozygotes	15	2.60 ± 0.25 a
							CO39 homozygotes	10	4.90 ± 0.87 b
334	C12_158 (15.8 Mb)	2	45.74	22.87	6.69	0.004	WM1370 homozygotes	8	2.00 ± 0.60 a
							Heterozygotes	15	2.60 ± 0.25 a
							CO39 homozygotes	10	4.90 ± 0.87 b
	Indel_C12_169 (16.9 Mb)	2	45.74	22.87	6.69	0.004	WM1370 homozygotes	8	2.00 ± 0.60 a
							Heterozygotes	15	2.60 ± 0.25 a
							CO39 homozygotes	10	4.90 ± 0.87 b
	RM3103 (7.4 Mb)	2	22.74	11.37	10.83	0.001	WM1370 homozygotes	10	2.00 ± 0.42 a
							Heterozygotes	22	2.09 ± 0.19 a
							CO39 homozygotes	11	3.73 ± 0.30 b
	C12_104 (10.4 Mb)	2	26.99	13.49	15.69	< 0.0001	WM1370 homozygotes	6	2.17 ± 0.54 a
							Heterozygotes	12	1.92 ± 0.26 a
							CO39 homozygotes	9	4.11 ± 0.20 b
	C12_Ptr_3 (10.8 Mb)	2	26.99	13.49	15.69	< 0.0001	WM1370 homozygotes	6	2.17 ± 0.54 a
							Heterozygotes	12	1.92 ± 0.26 a
							CO39 homozygotes	9	4.11 ± 0.20 b
	C12_140 (14.0 Mb)	2	26.99	13.49	15.69	< 0.0001	WM1370 homozygotes	6	2.17 ± 0.54 a
							Heterozygotes	12	1.92 ± 0.26 a
							CO39 homozygotes	9	4.11 ± 0.20 b
	C12_158 (15.8 Mb)	2	27.74	13.87	15.01	< 0.0001	WM1370 homozygotes	10	2.10 ± 0.41 a
							Heterozygotes	21	1.90 ± 0.17 a
							CO39 homozygotes	12	3.75 ± 0.28 b
	Indel_C12_169 (16.9 Mb)	2	16.78	8.389	6.45	0.006	WM1370 homozygotes	6	2.00 ± 0.58 a
							Heterozygotes	12	2.17 ± 0.30 a
							CO39 homozygotes	9	3.78 ± 0.36 b
	Indel_C12_181 (18.1 Mb)	2	6.94	3.47	2.62	0.087	WM1370 homozygotes	8	1.75 ± 0.41 a
							Heterozygotes	20	2.45 ± 0.26 a
							CO39 homozygotes	10	3.00 ± 0.37 a
	Indel_C12_217 (21.7 Mb)	2	4.94	2.47	1.78	0.183	WM1370 homozygotes	7	1.71 ± 0.47 a
							Heterozygotes	14	2.50 ± 0.33 a
							CO39 homozygotes	17	2.71 ± 0.27 a

F _{2:3} recombinant ID	Marker (Position) ¹	Degree of freedom	ANOVA sum square	Mean square	F value	Pr > F	Genotypes at the target locus	Number of F _{2:4} individuals	Disease severity index (mean ± SE) ²
308 460	C12_104 (10.4 Mb)	2	29.03	14.52	6.51	0.002	WM1370 homozygotes	39	1.54 ± 0.17 a
							Heterozygotes	55	2.22 ± 0.22 ab
							CO39 homozygotes	22	2.95 ± 0.38 b
	C12_Ptr_3 (10.8 Mb)	2	30.43	15.21	6.91	0.001	WM1370 homozygotes	40	1.55 ± 0.17 a
							Heterozygotes	53	2.21 ± 0.22 ab
							CO39 homozygotes	22	3.00 ± 0.38 b
	C12_140 (14.0 Mb)	2	30.43	15.21	6.91	0.001	WM1370 homozygotes	40	1.55 ± 0.17 a
							Heterozygotes	53	2.21 ± 0.22 ab
							CO39 homozygotes	22	3.00 ± 0.38 b
	C12_158 (15.8 Mb)	2	30.44	15.22	8.3	0.001	WM1370 homozygotes	37	1.49 ± 0.17 a
							Heterozygotes	43	2.19 ± 0.20 b
							CO39 homozygotes	20	3.00 ± 0.42 c
	Indel_C12_169 (16.9 Mb)	2	28.23	14.12	4.54	0.014	WM1370 homozygotes	28	1.46 ± 0.21 a
							Heterozygotes	24	2.17 ± 0.36 ab
							CO39 homozygotes	16	3.13 ± 0.63 b
	Indel_C12_181 (18.1 Mb)	2	33.63	16.82	7.34	0.001	WM1370 homozygotes	38	1.63 ± 0.19 a
							Heterozygotes	46	2.13 ± 0.21 a
							CO39 homozygotes	25	3.12 ± 0.42 b
	Indel_C12_196 (19.6 Mb)	2	6.65	3.33	0.82	0.448	WM1370 homozygotes	6	1.33 ± 0.61 a
							Heterozygotes	21	2.10 ± 0.43 a
							CO39 homozygotes	11	2.64 ± 0.69 a
	Indel_C12_201 (20.1 Mb)	2	4.82	2.41	0.99	0.373	WM1370 homozygotes	24	1.83 ± 0.21 a
							Heterozygotes	29	1.97 ± 0.17 a
							CO39 homozygotes	62	2.31 ± 0.24 a

¹ Genomic positions are based on the MSU7 Nipponbare reference genome.

² Data (mean ± standard error) with different letters are significantly different according to Tukey's HSD test at $P < 0.05$.

表七、2021年一期作CO39 x WM1370 F_{2.5} 族群連鎖分析結果**TABLE 7.** Trait-marker linkage analyses of the CO39 x WM1370 F_{2.5} population in the first crop season of 2021

F _{2.4} recombinant ID	Marker (Position) ¹	Degree of freedom	ANOVA sum square	Mean square	F value	Pr > F	Genotypes at the target locus	Number of F _{2.5} individuals	Disease severity index (mean ± SE) ²
67_7	Indel_C12_36 (3.6 Mb)	1	4.9	4.9	2.8	0.133	WM1370 homozygotes	2	2.50 ± 0.50 a
							Heterozygotes	8	4.25 ± 0.49 a
							CO39 homozygotes	-	-
	Indel_C12_50 (5.0 Mb)	1	1.52	1.52	0.66	0.438	WM1370 homozygotes	3	4.33 ± 0.88 a
							Heterozygotes	8	3.50 ± 0.53 a
							CO39 homozygotes	-	-
	Indel_C12_217 (21.7 Mb)	1	0	0	0	1	WM1370 homozygotes	-	-
							Heterozygotes	5	3.60 ± 0.75 a
							CO39 homozygotes	5	3.60 ± 0.68 a
	RM28466 (22.8 Mb)	1	4.15	4.15	2.07	0.184	WM1370 homozygotes	-	-
							Heterozygotes	6	3.17 ± 0.48 a
							CO39 homozygotes	5	4.40 ± 0.75 a
67_22	Indel_C12_36 (3.6 Mb)	2	5.04	2.52	0.72	0.498	WM1370 homozygotes	8	4.13 ± 0.72 a
							Heterozygotes	10	4.60 ± 0.48 a
							CO39 homozygotes	4	5.50 ± 1.19 a
	Indel_C12_50 (5.0 Mb)	2	1.81	0.9	0.19	0.832	WM1370 homozygotes	9	4.67 ± 0.85 a
							Heterozygotes	14	4.50 ± 0.53 a
							CO39 homozygotes	5	5.20 ± 0.97 a
539_54 539_64 539_68 539_78 539_210	Indel_C12_36 (3.6 Mb)	2	10.5	5.23	1.24	0.294	WM1370 homozygotes	30	4.67 ± 0.36 a
							Heterozygotes	60	5.42 ± 0.26 a
							CO39 homozygotes	34	4.82 ± 0.34 a
	Indel_C12_50 (5.0 Mb)	2	7.2	3.59	0.85	0.429	WM1370 homozygotes	30	4.63 ± 0.35 a
							Heterozygotes	67	5.21 ± 0.25 a
							CO39 homozygotes	41	4.93 ± 0.32 a
	Indel_C12_71 (7.1 Mb)	2	5.4	2.68	0.63	0.533	WM1370 homozygotes	29	4.69 ± 0.38 a
							Heterozygotes	64	5.33 ± 0.25 a
							CO39 homozygotes	35	5.03 ± 0.34 a
	RM3103 (7.4 Mb)	2	5.4	2.68	0.63	0.533	WM1370 homozygotes	29	4.69 ± 0.38 a
							Heterozygotes	61	5.25 ± 0.26 a
							CO39 homozygotes	36	5.08 ± 0.34 a
549_10 549_20 549_95	C12_Ptr_3 (10.8 Mb)	2	83.41	41.71	16.35	< 0.0001	WM1370 homozygotes	28	2.89 ± 0.29 a
							Heterozygotes	46	2.30 ± 0.15 a
							CO39 homozygotes	19	4.79 ± 0.60 b
	C12_140 (14.0 Mb)	2	82.9	41.45	15.99	< 0.0001	WM1370 homozygotes	27	2.93 ± 0.30 a
							Heterozygotes	46	2.30 ± 0.15 a
							CO39 homozygotes	18	4.83 ± 0.63 b
549_21	RM28466 (22.8 Mb)	2	4.79	2.4	0.92	0.408	WM1370 homozygotes	9	4.11 ± 0.26 a
							Heterozygotes	20	3.25 ± 0.28 a
							CO39 homozygotes	12	3.67 ± 0.70 a

¹ Genomic positions are based on the MSU7 Nipponbare reference genome.² Data (mean ± standard error) with different letters are significantly different according to Tukey's HSD test at $P < 0.05$.

稻熱病顯性基因座存在。綜合CO39 x WM1370 F_{2,4}及F_{2,5}之連鎖分析結果，以及重組品系549_10、549_20及549_95之基因型，推論WM1370在第12號染色體約10.7-14.6 Mb之間帶有抗稻熱病基因，過去曾有13個抗稻熱病基因座被定位於此區間，候選抗病基因可能為*Ptr*（與抗病品系Katy之等位蛋白具有一個胺基酸差異L763F）（10.8 Mb），及/或尚未被選殖、橫跨較大區間之抗病基因座如：*Pi6(t)*（4.0-18.9 Mb）、*Pi12(t)*（6.9-15.2 Mb）、*Pi58(t)*（7.4-11.2 Mb）、*Pi19(t)*（8.8-13.5 Mb）、*Pi42(t)*（9.3-12.2 Mb）、*Pi57*（10.7-10.8 Mb）、*Pi51(t)*（7.03-11.9 Mb）、*Pi48*（11.9-13.2 Mb）、*Pi67(t)*（10.6-12.6 Mb）、*Pi157*（8.8-18.1 Mb）、*Pih3*（3.5-14.4 Mb）及*Pi20*（10.1-14.1 Mb）^(6, 22, 27, 28, 30, 35, 37, 52, 54)，對於上述已定位但未被選殖的抗稻熱病基因座，後期的研究團隊會因為缺乏帶上述抗病基因的品種，或使用之鑑別性菌株不同，而難以判斷定位到的基因是否為同一個，因此以下針對已被選殖的候選基因*Ptr*做論述。

*Ptr*座落於水稻第12號染色體中心粒鄰近區域，其於2018年被選殖⁽⁵³⁾，並於2020年被驗證與更早定位出的*Pita-2*相同⁽³⁷⁾，其蛋白質結構中存在ARM repeat，屬於非典型的E3 ligase，由抗病品種Katy與感病品種Amene中發現，抗性蛋白質在第870至873具有4個胺基酸的缺失，依序為離胺酸（Lysine, K）、脯胺酸（Proline, P）、麩胺酸（Glutamate, E）及離胺酸，而誘變系WM1370與臺農82號相比，在第870至873發生胺基酸KPEK的缺失，推測疊氮化鈉的誘變使原先感病轉成抗病的*Ptr*。然而，WM1370所帶等位蛋白質與目前唯一被選殖出的抗病*Ptr*具有一個位點差異，其在第763個胺基酸為Phenylalanine（已知抗病*Ptr*為Leucine），此處位於推測為功能性區段的ARM repeat上，但對於抗病性的影響有待釐清。

WM1370帶有*Pik-s*、*Pita*及*Ptr*（L763F），根據2015至2018年農委會動植物防疫檢疫局「水稻主要病蟲害防疫體系之建立」計畫中，IRBLs在臺灣各地稻熱病監測田之抗感病表現，帶*Pik-s*者平均罹病度為39.61%為中等感病，帶*Pita*者平均罹病度為26.76%為中等抗病，而帶*Ptr*者平均罹病度僅有2.55%為抗病表現（鄭安秀及吳雅芳，pers. comm.）。另一方面，根據嘉義農業試驗分所旱田病圃之資料，於2011-2021年IRBLs之檢定資料中⁽³⁰⁾（廖大經，pers. comm.），帶有*Ptr*之IRBLs呈現1-4級的抗病反應，平均罹病等級為3.6級，而帶*Pita*之IRBLs抗病表現次之，平均罹病等級為4.6級，帶*Pik-s*之IRBLs為感病表現，平均罹病等級為7.7級。*Ptr*及*Pita*為緊密連鎖之抗病基因座，但*Ptr*在臺灣有較佳的應用潛力，其抗性較強且抗幅較廣⁽⁷⁾，在美國、印度、柬埔寨、菲律賓等地區亦發現*Ptr*之抗性幅度較*Pita*廣^(3, 14, 37, 49, 51)，例如人工接種18株美國分離菌株的結果，同時帶有*Pita*及*Ptr*之品種對88.9%測試菌株不親和，僅帶有*Ptr*者則抗性幅度略為減少（對77.8%測試菌株不親和），僅有*Pita*的抗性最差（對27.8至38.9%測試菌株不親和）⁽⁵³⁾。近年之研究顯示，*Pita*與*Ptr*共同主導由辨識*AVR-Pita*所誘發的防禦反應^(21, 53)，而

由於*Ptr*亦可對不帶有*AVR-Pita*的菌株呈現不親和反應，推測*Ptr*可以與*Pita*之外的其他抗病基因共同介導防禦反應⁽³⁷⁾。在3K genome database分析*Ptr*的多型性的研究中，發現僅有48個品種帶有與抗病品種Katy相同的等位基因，然而又僅有七個為梗稻種⁽⁵³⁾，顯示此抗病基因在梗稻中的稀有性。

未來可嘗試取得帶有不同候選基因座之水稻，與帶有約10.7-14.6 Mb抗病區段之重組品系549_10、549_20及549_95之F_{2,6}子代，進行不同生理小種稻熱病菌菌株之接種，以釐清WM1370於10.7-14.6 Mb區段所帶抗病基因之新穎性。此外，因第12號染色體之中心粒位於11.9 Mb，10.7-14.6 Mb的互換率極低，以目前子代的數量尚未篩到此區間發生重組之個體，因此未來需大幅增加定位族群之樣本數，方能進行更精細之定位。另一方面，在2016年誘變系WM1370與親本臺農82號之產量構成要素檢定資料中，WM1370在株高、穗數、穗長、稈實率略低於臺農82號，一穗粒數及千粒重略高於親本，其他農藝性狀及米質資料則有待調查⁽³²⁾。然而若以應用的角度切入，WM1370於第12號染色體上橫跨*Pita*（10.6 Mb）及10.7-14.6 Mb抗病基因座之區段，以及本研究新開發與抗病區段緊密連鎖、適用於高通量分析之KASP分子標誌，皆提供WM1370在育種應用上的重要基礎，未來可藉由WM1370作為抗性貢獻親，與具有良好農藝性狀及米質的臺灣栽培稻進行分子標誌輔助抗病育種，以促進抗稻熱病新品種育成，並藉此擴充臺灣抗稻熱病基因庫，以因應稻熱病菌之快速變異。

致 謝

本研究承行政院農業委員會動植物防疫檢疫局科技計畫 108農科-8.4.4-檢-B1(1)、109農科-8.4.2-檢-B3(1)、110農科-5.3.2-檢-B2(1) 及111農科-5.3.2-檢-B1(1) 經費挹注，試驗調查及資料整理承農試所嘉義農業試驗分所羅俊欽及賴佳鴻等同仁協助，特此誌謝。

引用文獻

1. Al-Qurainy, F., Al-Hemaid, F. M., Khan, S., Ali, M. A., Tarroum, M., and Ashraf, M. 2011. Detection of sodium azide-induced mutagenicity in the regenerated shoots of *Artemisia annua* using internal transcribed spacer (ITS) sequences of nrDNA. Pak. J. Bot. 43.4:2183-2186.
2. Awan, M. A., Konzak, C. F., Rutger, J. N., and Nilan, R. A. 1980. Mutagenic effects of sodium azide in rice. Crop Sci. 20:663-668.
3. Bryan, G. T., Wu, K. S., Farrall, L., Jia, Y., Hershey, H. P., McAdams, S. A., Faulk, K. N., Donaldson, G. K., Tarchini, R.,

- and 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.
4. Chen, L. C., Chen, Y. S., and Cheng, Y. H. 2004. Test of rice varieties and strains resistant to rice blast in blast nurseries during 1990-2002. *J. Agric. Res. China* 53:269-283. (In Chinese).
 5. Chen, L. C., Hua, S. H., and Cheng, C. H. 2009. Review of the screening tests for rice varietal resistance to major diseases and insect pests in Taiwan. Pages 83-103 in: *Proceedings of Symposium on Achievements and Perspectives of Rice Protection in Taiwan*, H. F. Ni and H. R. Yang eds. Chia-Yi Agricultural Experiment Station, Agricultural Research Institute, Council of Agriculture, Chia-yi, Taiwan. 161 pp. (In Chinese).
 6. Chen, S., Su, J., Han, J., Wang, W., Wang, C., Yang, J., Zeng, L., Wang, X., Zhu, X., and Yang, C. 2014. Resistance spectrum assay and fine mapping of the blast resistance gene from a rice experimental line, IRBLta2-Re. *Euphytica* 195:209-216.
 7. Chen, W. L., Shen, W. C., Chang, F. Y., Chang, W. B., Yu, T. H., Lai, M. H., Liao, J. Y., Wu, C. W., and Chung, C. L. 2015. Analysis of blast resistance genes and molecular markers development for the improvement of Taiwan high-quality rice varieties. *Plant Pathol. Bulletin* 24:225-240. (In Chinese).
 8. Chen, Y. C., Liao, D. J., Shih, Y. C., Chen, C. Y., Xiao, Y. T., Wu, Y. P., Shen, W. C., Chang, W. B., Cheng, A. H., and Chung, C. L. 2020. Identification of blast resistance gene *Pik-KU* in a rice cultivar Taikeng 8. *Journal of Plant Med.* 62:19-30. (In Chinese).
 9. Chern, M., Xu, Q., Bart, R. S., Bai, W., Ruan, D., Sze-To, W. H., Canlas, P. E., Jain, R., Chen, X., and Ronald, P. C. 2016. A genetic screen identifies a requirement for cysteine-rich – receptor-like kinases in rice NH1 (OsNPR1)-mediated immunity. *PLoS Genet.* 12:e1006049.
 10. Chou, S. Y., Liao, D. J., Chiu, C. H., and Wu, Y. P. 2019. Taiwan high-quality rice variety: "mei wei mi" Tainung 82. *J. Taiwan Agric. Res.* 118:5-9. (In Chinese).
 11. Corpet, F. 1988. Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. *Nucleic Acids Res.* 16:10881-10890.
 12. Couch, B. C., and Kohn, L. M. 2002. A multilocus gene genealogy concordant with host preference indicates segregation of a new species, *Magnaporthe oryzae*, from *M. grisea*. *Mycologia* 94:683-693.
 13. Devi, S. J. S. R., Singh, K., Umakanth, B., Vishalakshi, B., Rao, K. V. S., Suneel, B., Sharma, S. K., Kadambari, G. K. M., Prasad, M. S., Senguttavel, P., Syamaladevi, D. P., and Madhav, M. S. 2020. Identification and characterization of a large effect QTL from *Oryza glumaepatula* revealed *Pi68(t)* as putative candidate gene for rice blast resistance. *Rice* 13:17.
 14. Fukuta, Y., Koga, I., Ung, T., Sathya, K., Kawasaki-Tanaka, A., Koide, Y., Kobayashi, N., Obara, M., Yadana, H., and Hayashi, N. 2014. Pathogenicity of rice blast (*Pyricularia oryzae* Cava) isolates from Cambodia. *Jpn. Agric. Res. Q.* 48:155-166.
 15. Hsu, J. H., Lin, Y. R., Kuo, C. W., and Wu, Y. P. 2012. Establishing the platform of polymorphic markers for rice. *Crop Env. and Bioinform.* 9:137-159. (In Chinese).
 16. Hwang, J. E., Ahn, J. W., Kwon, S. J., Kim, J. B., Kim, S. H., Kang, S. Y., and Kim, D. S. 2014. Selection and molecular characterization of a high tocopherol accumulation rice mutant line induced by gamma irradiation. *Mol. Biol. Rep.* 41:7671-7681.
 17. IRRI. 2013. *Standard Evaluation System for Rice*. 5th ed. International Rice Research Institute, Manila, Philippines.
 18. Ishikawa, S., Ishimaru, Y., Igura, M., Kuramata, M., Abe, T., Senoura, T., Hase, Y., Arao, T., Nishizawa, N. K., and Nakanishi, H. 2012. Ion-beam irradiation, gene identification, and marker-assisted breeding in the development of low-cadmium rice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 109:19166.
 19. Jatayev, S., Kurishbayev, A., Zotova, L., Khasanova, G., Serikbay, D., Zhubatkanov, A., Botayeva, M., Zhumalin, A., Turbekova, A., Soole, K., Langridge, P., and Shavruk, Y. 2017. Advantages of Amplifluor-like SNP markers over KASP in plant genotyping. *BMC Plant Biol.* 17:254.
 20. Jeng, T. L., Lin, Y. W., Wang, C. S., and Sung, J. M. 2012. Comparisons and selection of rice mutants with high iron and zinc contents in their polished grains that were mutated from the *indica* type cultivar IR64. *J. Food Compos. Anal.* 28:149-154.
 21. Jia, Y., and Martin, R. 2008. Identification of a new locus, *Ptr(t)*, required for rice blast resistance gene *Pi-ta* – mediated resistance. *Mol. Plant Microbe Interact.* 21:396-403.
 22. Joshi, S., Dhatwalia, S., Kaachra, A., Sharma, K., and Rathour, R. 2019. Genetic and physical mapping of a new rice blast resistance specificity *Pi-67* from a broad spectrum resistant genotype Tetep. *Euphytica* 215:9.
 23. Kalia, S., and Rathour, R. 2019. Current status on mapping of genes for resistance to leaf- and neck-blast disease in rice. *Biotech.* 9:209.
 24. Khanna, A., Sharma, V., Ellur, R. K., Shikari, A. B., Gopala Krishnan, S., Singh, U. D., Prakash, G., Sharma, T. R., Rathour, R., Variar, M., Prashanthi, S. K., Nagarajan, M., Vinod, K. K., Bhowmick, P. K., Singh, N. K., Prabhu, K. V., Singh, B. D., and Singh, A. K. 2015. Development and evaluation of near-isogenic

- lines for major blast resistance gene(s) in Basmati rice. *Theor. Appl. Genet.* 128:1243-1259.
- 25 Khush, G. S. 2005. What it will take to feed 5.0 billion rice consumers in 2030. *Plant Mol. Biol.* 59:1-6.
 - 26 Kim, B., Woo, S., Kim, M. J., Kwon, S. W., Lee, J., Sung, S. H., and Koh, H. J. 2018. Identification and quantification of flavonoids in yellow grain mutant of rice (*Oryza sativa* L.). *Food Chem.* 241:154-162.
 - 27 Koide, Y., Telebanco-Yanoria, M. J., Fukuta, Y., and Kobayashi, N. 2013. Detection of novel blast resistance genes, *Pi58(t)* and *Pi59(t)*, in a Myanmar rice landrace based on a standard differential system. *Mol. Breed.* 32:241-252.
 - 28 Kumar, P., Pathania, S., Katoch, P., Sharma, T., Plaha, P., and Rathour, R. 2010. Genetic and physical mapping of blast resistance gene *Pi-42 (t)* on the short arm of rice chromosome 12. *Mol. Breed.* 25:217-228.
 - 29 Li, C., Liu, Y., Shen, W. H., Yu, Y., and Dong, A. 2018. Chromatin-remodeling factor OsINO80 is involved in regulation of gibberellin biosynthesis and is crucial for rice plant growth and development. *J. Integr. Plant Biol.* 60:144-159.
 - 30 Li, W., Lei, C., Cheng, Z., Jia, Y., Huang, D., Wang, J., Wang, J., Zhang, X., Su, N., and Guo, X. 2008. Identification of SSR markers for a broad-spectrum blast resistance gene *Pi20 (t)* for marker-assisted breeding. *Mol. Breed.* 22:141-149.
 - 31 Liao, D. J., Chen, L. C., Wu, C. W., and Chung, C. L. 2016. Response of rice varieties 'LTH' monogenic lines and 'CO 39' near-isogenic lines to rice blast. *Journal of Taiwan Agricultural Research* 65:8-17. (In Chinese).
 - 32 Liao, D. J. and Wu, Y. P. 2021. Study on the mixed-line cultivation model of rice variety 'Tainung 82' mutant lines for resistance of blast and grain yield. *J. Taiwan Agric. Res.* 70:170-181. (In Chinese).
 - 33 Lin, G. C. 2014. The epidemic of rice blast in Yulin, Chiayi, and Tainan and integrated disease management. *Tainan Dist. Agric. Newsl.* 87:22-25. (In Chinese).
 - 34 Lin, K. C., Jwo, W. S., Chandrika, N. N. P., Wu, T. M., Lai, M. H., Wang, C. S., and Hong, C. Y. 2016. A rice mutant defective in antioxidant-defense system and sodium homeostasis possesses increased sensitivity to salt stress. *Biol. Plant.* 60:86-94.
 - 35 Liu, X., Yang, Q., Lin, F., Hua, L., Wang, C., Wang, L., and Pan, Q. 2007. Identification and fine mapping of *Pi39(t)*, a major gene conferring the broad-spectrum resistance to *Magnaporthe oryzae*. *Mol. Genet. Genom.* 278:403-410.
 - 36 Liu, Y., Liu, B., Zhu, X., Yang, J., Bordeos, A., Wang, G., Leach, J. E., and 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.
 - 37 Meng, X., Xiao, G., Telebanco-Yanoria, M. J., Siazon, P. M., Padilla, J., Oplencia, R., Bigirimana, J., Habarugira, G., Wu, J., Li, M., Wang, B., Lu, G. D., and Zhou, B. 2020. The broad-spectrum rice blast resistance (*R*) gene *Pita2* encodes a novel *R* protein unique from *Pita*. *Rice* 13:19.
 - 38 Mo, Y. J., Jeung, J. U., Shin, Y. S., Park, C. S., Kang, K. H., and Kim, B. K. 2013. Agronomic and genetic analysis of Suweon 542, a rice floury mutant line suitable for dry milling. *Rice* 6:37.
 - 39 Muñoz, M. C. 2008. The effect of temperature and relative humidity on the airborne concentration of *Pyricularia oryzae* spores and the development of rice blast in southern Spain. *Span. J. Agric. Res.* 1:61-69.
 - 40 Nalley, L., Tsiboe, F., Durand-Morat, A., Shew, A., and Thoma, G. 2016. Economic and environmental impact of rice blast pathogen (*Magnaporthe oryzae*) alleviation in the United States. *PLoS ONE* 11:e0167295.
 - 41 Olsen, O., Wang, X., and von Wettstein, D. 1993. Sodium azide mutagenesis: preferential generation of A.T-->G.C transitions in the barley *Ant18* gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90:8043-8047.
 - 42 Phanchaisri, B., Samsang, N., Yu, L., Singkarat, S., and Anuntalabhochai, S. 2012. Expression of *OsSPY* and *14-3-3* genes involved in plant height variations of ion-beam-induced KDML 105 rice mutants. *Mutat. Res. Fund. Mol. Mech. Mutagen* 734:56-61.
 - 43 Qu, S., Liu, G., Zhou, B., Bellizzi, M., Zeng, L., Dai, L., Han, B., and Wang, G. L. 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.
 - 44 RStudio Team. 2020. RStudio: Integrated Development for R. PBC, Boston, MA.
 - 45 Ruengphayak, S., Ruanjaichon, V., Saensuk, C., Phromphan, S., Tragoonrung, S., Kongkachuichai, R., and Vanavichit, A. 2015. Forward screening for seedling tolerance to Fe toxicity reveals a polymorphic mutation in ferric chelate reductase in rice. *Rice* 8:3.
 - 46 Shih, Y. C., Liao, D. J., Wu, Y. P., Shen, W. C., Chang, W., B., C., C. Y., and Chung, C. L. 2017. Identification of blast resistance gene *Piz-t* in a rice cultivar Taikeng 14. *J. of Plant Med.* 59:23-32. (In Chinese).
 - 47 Singh, R. B., R. S. N. Pillai, and H. Kumar. 1981. Induced translocations in Safflower. *Corp Sci.* 21:811-815.

- 48 Till, B. J., J. Cooper, T. H. Tai, P. Colowit, E.A. Greene, S. Henikoff, and L. Comai. 2007. Discovery of chemically induced mutations in rice by TILLING. *BMC Plant Biol.* 7:19.
- 49 Variar, M., Cruz, C. M. V., Carrillo, M. G., Bhatt, J. C., and Sangar, R. B. S. 2009. Rice blast in India and strategies to develop durably resistant cultivars. Pages 359-373 in: G. L. Wang and B. Valent, eds., *Advances in Genetics, Genomics and Control of Rice Blast Disease*. Springer, Dordrecht, Netherlands.
- 50 Viana, V. E., Pegoraro, C., Busanello, C., and Costa de Oliveira, A. 2019. Mutagenesis in rice: The basis for breeding a new super plant. *Front. Plant Sci.* 10:1326-1326.
- 51 Wang, J. C., Correll, J. C., and Jia, Y. 2015. Characterization of rice blast resistance genes in rice germplasm with monogenic lines and pathogenicity assays. *J. Crop Prot.* 72:132-138.
- 52 Yoshida, K., and Miyashita, N. T. 2009. DNA polymorphism in the blast disease resistance gene *Pita* of the wild rice *Oryza rufipogon* and its related species. *Genes Genet. Syst.* 84:121-136.
- 53 Zhao, H., Wang, X., Jia, Y., Minkenberg, B., Wheatley, M., Fan, J., Jia, M. H., Famoso, A., Edwards, J. D., Wamische, Y., Valent, B., Wang, G. L., and Yang, Y. 2018. The rice blast resistance gene *Ptr* encodes an atypical protein required for broad-spectrum disease resistance. *Nat. Commun.* 9:2039.
- 54 Zhuang, J. Y., Ma, W. B., Wu, J. L., Chai, R. Y., Lu, J., Fan, Y. Y., Jin, M. Z., Leung, H., and Zheng, K. L. 2002. Mapping of leaf and neck blast resistance genes with resistance gene analog, RAPD and RFLP in rice. *Euphytica* 128:363-370.

ABSTRACT

Yue-Jie Chen^{1*}, Dah-Jing Liao^{2*}, Yong-Pei Wu², Wei-Chiang Shen¹, Yi-Nian Chen³, Ya-Fang Wu⁴, An-Hsiu Cheng⁴, Chia-Lin Chung^{1,5} 2022. Analysis of rice blast resistance loci in WM1370, a sodium azide induced mutant line derived from 'Tainung 82'. *J. Plant Med.* 64(3): 85-104.

*Corresponding author, E-mail: clchung@ntu.edu.tw

Rice is an important staple crop. Rice blast caused by *Pyricularia oryzae* can seriously affect rice production, and the use of genetic resistance is the most effective and eco-friendly method to control this disease. Tainung 82 (TNG82) is a *japonica* rice susceptible to rice blast. Forty-four rice blast resistance lines were generated after five generations of sodium azide mutagenesis and disease screening in the blast nursery. In this study, WM1370, the mutant line resistant to rice blast and sheath blight, was inoculated

with nine local *P. oryzae* isolates. WM1370 showed broad-spectrum resistance to all nine isolates. Additionally, TNG82 and WM1370 were sequenced for known rice blast resistance loci *Pi2/9*, *Pik*, *Pita*, and *Ptr*. TNG82 carries *Pik-s* and susceptibility alleles at *Pi2/9*, *Pita*, and *Ptr*. WM1370 carries resistance alleles at *Pik-s* and *Pita*, and have different mutations at *Pi2/9* and *Ptr*. To understand the genetics of resistance in WM1370, 636 F₂ progenies of WM1370 crossed with the susceptible *indica* cultivar CO39 were evaluated for disease severity in Chiayi upland blast nursery in 2018. Bulk segregant analysis using 84 simple sequence repeat (SSR) markers suggested that the resistance was associated with two markers located at 3 Mb and 17.8 Mb on chromosome 12. Linkage analysis was conducted using CO39 x WM1370 F_{2,3} to F_{2,5} progenies, by evaluating their resistance in Chiayi upland blast nursery in 2019-2021 and their genotypes at five SSR, eight KBioscience competitive allele-specific PCR (KASP), and ten insertion-deletion (Indel) markers. The resistance segment of WM1370 was fine-mapped to approximately 10.7 to 14.6 Mb, which contains *Ptr* [with predicted one amino acid difference (L763F) from the allelic protein in the resistance cultivar, Katy]. The resistance segment across *Pita* (10.6 Mb) and the resistance locus at 10.7-14.6 Mb on chromosome 12 in WM1370, and the newly developed markers tightly linked to the resistance segment, can serve as an important basis for the application of WM1370. It is expected to expand the pool of rice blast resistance genes in Taiwan, and promote the breeding of new resistant varieties in the future.

Keywords: *Pyricularia oryzae*, resistance genes, *Pik-s*, *Pita*, *Ptr* (=Pita-2), sodium azide mutagenesis, fine-mapping, molecular markers