

分子标记(SSR)技术在水稻稻瘟病研究中的应用及展望

孟 英, 许显滨, 李 炜, 谭 贺, 卞景阳, 肖佳雷
(黑龙江省农科院耕作栽培所, 哈尔滨 150086)

摘要: 稻瘟病是北方水稻的主要病害, 选育抗病品种是防治稻瘟病最经济有效的措施。微卫星 DNA 分子标记为辅助选育抗稻瘟病水稻新品种和抗性鉴定提供了新的方法和手段。阐述 SSR 对水稻抗稻瘟病研究的作用, 介绍 SSR 的机理和方法, 为今后抗稻瘟病的分子遗传机理奠定了基础。

关键词: SSR; 稻瘟病

中图分类号: S 522.035.3 文献标识码: A 文章编号: 1002-2767(2007)02-0075-04

Application and Prospect of Molecular Mark Technology on Rice Blast

MENG Ying, XU Xian bin, LI Wei, TAN He, BIAN Jing yang XIAO Jia lei
(Crop Tillage and Cultivation Institute, Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Harbin 150086)

Abstract: Rice blast disease, caused by *Pyricularia grisea* Sacc., is the most destructive diseases in northeast. Breeding resistant cultivars is the most effective and economical way to control this disease. Micro satellites DNA (SSR) marker is a new method to select new resistant varieties to rice blast. Principles and the method of SSR marker were introduced, and the development of resistance to rice blast by SSR marker method was also discussed. It provided the basis for molecular hereditary mechanism of rice blast.

Key words: SSR; rice blast disease;

0 前言

水稻是全世界最重要的粮食作物之一。我国是世界上年产量最多的国家。水稻也是我国最重要的粮食作物, 我国水稻面积约占粮食作物总面积的 30%, 产量占粮食总产的 40%, 我国 50% 以上的人口是以稻米为主食, 在某种程度上可以说水稻单产的高低是维系着我国的人口增长和社会稳定的关键。但是, 随着水稻和高产栽培措施的推广, 稻瘟病等病害呈不断加重的趋势, 已成为水稻生产的主要障碍, 尤其在我国北方, 是水稻生产中发生最严重的病害, 每年都造成严重的经济损失。由真菌 *Magnaporthe grisea* (Hebert) Barr. [无性世代: *Pyricularia grisea* (Cooke) Sacc.] 引起的稻瘟病是一种最具毁灭性的水稻病害^[1]。选育抗病品种, 利用品种抗性是最经济有效的防治措施。

水稻对稻瘟病持久抗性的问题早已引起人们的

重视, 但是, 由于技术方法上的局限性, 这方面的研究及实践一直未取得突破性的进展。传统选育方法依赖于抗性鉴定和表型选择, 不仅周期长而且受许多条件的限制。

自从 20 世纪 80 年代后期以来, 建立在以 DNA 多态性为基础的分子标记技术的发展和运用, 为稻瘟病持久抗性的研究提供了一种非常有用的工具。国内外在应用这一技术对稻瘟病病原菌群体结构分析及抗病品种抗性遗传分析等方面已有不少研究。现已鉴定出的 40 多个抗稻瘟病基因中有 20 多个主效基因, 10 多个数量抗性位点水稻抗稻瘟病基因。*Pil* 源于籼稻品种 AC23 中, 是一个具广谱抗性的显性抗病基因。

利用中南稻区的 715 个菌株接种结果表明, *Pil* 的亲本 C101LAC 的侵染率仅为 10.35%, 故可抵抗中国大多数病原菌生理小种。传统选育方法依

收稿日期: 2006-09-19

作者简介: 孟英(1970-), 女, 山东省兖州人, 在读博士, 助理研究员, 主要从事水稻栽培及生理研究。E-mail: mengying1209@163.com.

赖于抗性鉴定和表型选择, 不仅周期长而且受许多条件的限制。利用与抗病基因紧密连锁的分子标记进行辅助选择, 可加速抗原筛选和抗病基因的鉴定, 从而大大提高育种选择效率。

SSR 标记是近年来发展起来的建立在 PCR 基础上的 DNA 分子标记, 由于其具有多态性高、易于检测及结果稳定可靠等优点, 在水稻抗稻瘟病育种方面得到了广泛的应用。本研究对 SSR 标记的原理和方法及其对水稻抗稻瘟病研究的作用进行了综述, 以期选育出抗稻瘟病的水稻新品种提供科学依据。

1 SSR 标记的原理

简单重复序列(Simple Sequence Repeat, SSR) 又称微卫星 DNA (Micro satellites DNA) [1,2], 是由 1~6 个核苷酸为基本重复单位组成的长达几十个核苷酸的重复序列。SSR 分布于整个基因组中, 而且其两端的序列一般为相对保守的单拷贝序列, 据此可以设计特异引物进行 SSR-PCR, 以扩增串联重复序列, 根据串联重复数的不同, 就可以揭示微卫星 DNA 的多态性。因此, 它是一种基于 DNA 长度多态性的分子标记。

SSR 与其他分子标记相比具有以下特点: ① 丰富性; ② 多态性高; ③ 通用性与保守性; ④ 共显性遗传; ⑤ 以 PCR 为基础, 反应速度快, 易于检测; ⑥ 结果稳定可靠, 重复性好, 便于实现自动化。

2 SSR 标记技术的流程

2.1 SSR 引物的开发

使用 SSR 标记的前提是要知道重复序列两侧的 DNA 序列, 这就需要开发 SSR 引物, 而且一旦开发, 就可以在实验室间互相交流。目前, SSR 标记的获得主要有两种方法: 一种是传统的构建基因组文库法, 另一种是通过检索 GenBank, EM BL 和 DDBJ 等 DNA 数据库获得 SSR 引物。第一种方法需要构建小片段基因组文库, 再用含有特定 SSR 序列的探针针对每个克隆进行筛选, 然后对其测序。此方法工作量极大, 需花费大量的人力和财力, 而且效率较低, 植物中获得的阳性克隆比率约为 2%~3%, 获得成功引物的几率则更低^[3]。第二种方法, 即检索核酸数据库是随着生物信息学发展起来的一种方便快捷的开发方法。此方法简单易行, 成本较低。表 1 为刘士平等人用 ZS97× BL5 的杂种一代 F₁ 与 ZS97 回交得 BC₁F₁ 群体共 102 个单株, 将 BC₁F₃ 的种子分 3 次重复进行接种, 按接种的抗感反应构建 Pi 区段的连锁图谱, 整合 SSR 标记。

表 1 SSR 标记的引物序列

标 记	序列(5' - 3')
RM 144, Forward	TGCCCTGGCGCAAATTTGATCC
Reverse	GCTAGAGGAGATCAGATCGTAGTGC
RM 224, Forward	ATGATCGATCGATCTTCACGAGG
Reverse	TGCTATAAAAGGCATTCCGGG

随着水稻籼粳亚种基因组序列草图的完成, 水稻物理图谱也已经建立^[4,5], 使其已经完全取代了传统的开发方法。目前, 已开发的水稻 SSR 标记有 8 000 余个, 其中定位的 SSR 标记已达 2 000 余个^[6,7], 并公布于 <http://www.gramene.org> 上, 可供研究人员直接利用。

2.2 SSR 的扩增

SSR 扩增在 DNA 热循环仪上进行, 反应条件基本与一般 PCR 相同, 2 条引物分别为 18~20 个碱基。由于引物的特异性, 其退火温度一般为 50℃~60℃。因不同引物、不同物种 DNA 的差异, 需要对其退火温度、反应体系中各组分的浓度进行调整和优化。其反应程序一般为: 94℃ 5 min→35 次循环(94℃变性 45 s→50℃~60℃退火 45 s→72℃延伸 1 min→72℃延伸 10 min→4℃保存备用。对于少数 SSR 引物, 若 2 个单引物的退火温度相差较大, 则可以采用 Touchdown 反应程序^[8]。

2.3 SSR 的检测

SSR-PCR 扩增后的产物可以采用聚丙烯酰胺凝胶电泳经银染后进行检测。这种方法不仅可避免使用同位素, 而且分辨率很高, 即使扩增产物有 1 bp 的长度差异也可以检测到。聚丙烯酰胺凝胶电泳又可分为变性和非变性 2 种, 但非变性的聚丙烯酰胺凝胶中杂带较多, 对结果的准确性影响较大。变性的聚丙烯酰胺凝胶则条带较为清晰, 便于分析, 结果更加准确可靠^[9]。此外, 还可以用荧光标记物结合毛细管测序仪进行自动化检测, 但其价格比较昂贵, 在一定程度上限制了该方法的广泛使用性。

3 分子标记在水稻抗稻瘟病研究中的应用

3.1 抗稻瘟病基因 SSR 标记的方法

寻找与抗稻瘟病基因紧密连锁的 SSR 标记主要有两种方法, 一种是分离群体分组分析法(Bulked Segregant Analysis, BSA) 或近等基因池法(Near-isogenic Pools), 即选取抗感双亲本杂交获得的 F₂ 代抗感个体, 组成 2 个抗感分离群体, 或 2 个抗感近等基因池, 分析其 SSR 标记的多态性, 然后用

F₂ 代抗感分离个体进行 SSR 标记, 之后与抗感基因进行连锁分析, 从而确定抗感基因与 SSR 标记的相关性。另一种方法是利用近等基因系分析法 (Near-isogenic Lines), 即利用 2 个近等基因系筛选 SSR 标记, 然后用其后代进行连锁分析。李仕贵等^[14] 利用 BSA 法筛选出与抗稻瘟病基因 *Pi-d(t)* 紧密连锁的 SSR 标记 RM 262, 在此基础上, 又利用 RM 262 对含有该抗病基因的品种“地谷”与感病品种“江南香糯”和“8987”的 F₂ 群体进行了遗传分析和抗性鉴定, 结果发现, 应用该标记的抗性纯合和杂合带型选择抗性植株的准确率可达 98% 以上; 刘士平等^[15] 利用回交群体 BC₁F₂, 筛选出与抗稻瘟病基因 *Pi1* 连锁的 SSR 标记 RM 144 和 RM 224, 并将其定位在 RZ 536 和 RM 144 之间, 图距分别为 9.7, 8.6 cM; 经连锁分析后将 *Pi1* 定位于水稻第 11 连锁群的长臂末端区, 基本验证了前人的定位区间。

目前, 已鉴定出 40 多个稻瘟病抗性主效基因位点^[10, 13], 并分别被定位到水稻除第 3 条染色体外的 11 条染色体上, 而以 SSR 标记为基础的水稻遗传连锁图基本上已经覆盖了水稻基因组的所有区域, 因此, 利用 SSR 标记筛选和定位抗稻瘟病基因, 具有其独特的优势。福建农林大学作物科学学院的陈志伟等^[12] 在广谱的抗稻瘟病基因 *Pi-2(t)* 的附近筛选到了 1 个新的 SSR 标记 SRM 24, 估计了其 *Pi-2(t)* 间的距离大约只有 0.5 cM。并利用该标记成功地将 *Pi-2(t)* 从供体材料“5173”, 导入到迄今为止广泛使用的雄性不育保持系“珍汕 97B”中, 获得了 *Pi-2(t)* 的“珍汕 97B”近等基因系。并利用这种方法获得了一个与 *Pi21* 紧密连锁的标记 4766。

3.2 稻瘟病菌基因组中 SSR 的系统研究

李成云等人在对稻瘟病菌基因组中 SSR 分布进行了系统分析的基础上, 对由 1~6 个碱基为重复单元的 SSR 在基因的蛋白质编码区中的分布进行了分析。结果表明, 该病原菌的 2 378 个基因的编码区中共分布有 3 240 个 SSR 序列 (标准是 15 bp 以上, 匹配值为 80%)。在已经有注释的 4 732 个基因中, 861 个基因的编码区中有 SSR。编码区中的 SSR 以 3 碱基重复和 6 碱基重复为主, 其他类型的 SSR 则很少在编码区中出现。SSR 在这些基因中很少有保守性, 表明这些基因的高度变异, 或者起源是较晚的。含有 SSR 的基因多为转录蛋白、信号传导的细胞调节基因这一现象表明, SSR 在物种形成过程中有重要作用。利用基因编码区中丰富的

SSR 序列信息及其变化带来功能变化的信息, 将可以在该菌功能基因组的研究中发挥十分重要的作用 (见表 2)。

表 2 SSR 在稻瘟病菌基因中的数量分布

一个基因中含有 SSR 的数量	基因数量
1	1817
2	402
3	115
4	30
5	8
6	6
7	2
8	3
9	1
10	2
11	1

3.3 分子标记在抗稻瘟病研究的作用

稻瘟病是植物-病原物相互作用的模式系统, 其抗病性不单与水稻品种本身的基因型有关, 亦与病原菌的基因型相关。稻瘟病菌的易变性和群体结构的复杂性是水稻品种稻瘟病抗性易丧失的根本原因之一, 因此全面准确地掌握育种地区稻瘟病病原菌的结构及其演化变异规律, 是开展水稻稻瘟病持久抗性育种必不可少的工作内容。已有的初步研究结果表明, 病原真菌中的 SSR 一般都有 2~5 个等位位点, 不但可用于种群遗传多样性、近缘种的比较及系谱研究^[12], 而且还可用于不同寄主分离物之间的比较^[15], 或是菌株、小种之间的比较^[16]。因此, 利用稻瘟病菌基因组中数量丰富、分布广泛的 SSR 标记, 能够为群体研究提供大量遗传信息。而且还可通过基因组中位置已知的 SSR 标记, 很快筛选到与无毒基因 (*Avr*) 等重要功能基因连锁的标记, 为进一步对无毒基因进行精细定位、克隆, 明确其与相应抗性基因互作的规律奠定了基础。

水稻品种的抗病性之所以容易丧失, 关键在于品种或抗源的单一化。通过聚合杂交, 累积多个抗病基因于同一材料, 培育出多抗品种, 是避免或减缓水稻品种抗性丧失的一种有效途径。如在聚合杂交的历次杂交中, 应用目标性状紧密连锁的分子标记进行辅助选择, 可以快速准确地将多个目标基因聚合于 1 个重组体。SSR 标记对抗稻瘟病研究起到十分重要的作用, 为抗病基因的聚合提供了一种有效的工具。陈学伟等^[17] 利用与抗病基因紧密连锁

的序标位 STS 及 SSR 标记 OSR20、OSR32、RM 213、RM 207、RM 262, 跟踪筛选了抗稻瘟病基因, 将 $Pi-d(t)1$ 、 $Pi-b$ 、 $Pi-ta2$ 聚合于 G46B 中, 在相对较短的时间内, 培育出了抗多个生理小种的相对持久的抗病品系, 对利用分子标记进行多个抗病基因的辅助选择提供了有实用价值的实证。

4 分子标记技术应用展望

稻瘟病菌的 SSR 分析, 已经有一些研究者做过探索^[10, 11, 14, 17], 但都不是就基因组规模进行的。目前该病原菌基因测序已经完成, 必将极大地促进在基因组水平研究该菌的遗传与变异, 为寄主病原物相互关系的研究, 利用寄主抗性管理植物病害提供更透彻的信息。尽管在植物病原真菌中, 稻瘟病菌是研究比较多的真菌, 但就整个基因组来说, 我们目前知道的仍然非常有限。利用物理、化学、生物方法寻找各类突变体, 是功能基因组研究中非常重要的手段。而如此丰富的 SSR 可谓天然存在的突变库。利用基因编码区中丰富的 SSR 序列信息及其变化带来的功能变化的信息, 将可以在该菌功能基因组的研究中发挥十分重要的作用。如通过编码区内 SSR 与近旁 SSR 的连锁关系, 来证明基因位置是否发生了变化; 利用编码区内重复次数差异较大的 SSR, 也可通过 RT-PCR、定量 PCR 来比较其所在基因表达水平的差异, 从而深入研究 PCR 对基因表达的影响及基因表达水平变化以后对稻瘟病菌生物学特性的影响。目前, SSR 具有诸多优点而成为第 2 代较理想的分子标记。SSR 与 QTL 检测方法相结合将有更广泛的应用前景。

参考文献:

[1] Stephen A draft sequence of the rice genome (*Oryza sativa* L. ssp. japonica) [J]. *Science* 2002, 296: 92-100.
 [2] Tautz D, Trick M, Dover G. Cryptic simplicity in DNA is a major source of genetic variation [J]. *Nature* 1986, 322: 652-656.

[3] McCouch SR, Teytelma L, Xu Y, et al. Development and mapping of 2240 new SSR marker for rice (*Oryza sativa* L.) [J]. *DnaRes* 2002, 9: 199-207.
 [4] SH. Rice disease [M]. Farnham Royal, UK: Commonwealth Agricultural Bureaux, 1995.
 [5] Li W, Li L, Han YJ, et al. A draft sequence of the rice genome (*Oryza sativa* L. ssp. indica) [J]. *Science* 2001, 296: 79-92.
 [6] 朱宏波, 方宜钧, 杨仁崔. 利用水稻基因组序列数据开发 SSR 标记的方法 [J]. *分子植物育种*, 2003, 1(2): 273-276.
 [7] 张增翠, 侯喜林. SSR 分子标记开发策略及评价 [J]. *遗传*, 2004, 26(5): 763-778.
 [8] 郑景生, 吕蓓. PCR 技术及实用方法 [J]. *分子植物育种*, 2003, 1(3): 381-394.
 [9] 曲鲁江, 李显耀, 杜志强, 等. 微卫星 PCR 产物变性与非变性 PAGE 2 银染检测方法的比较 [J]. *遗传*, 2004, 26(4): 522-524.
 [10] McCouch SR, Kochert G, Yu ZH, et al. Molecular mapping of rice chromosomes [J]. *Theory Appl Genet* 1988, 76: 815-820.
 [11] Wang G L, Mackill D J, Bonman J M, et al. RFLP mapping of genes conferring complete and partial resistance to blast in a durably resistant rice cultivar [J]. *Genetics* 1994, 136: 1421-1433.
 [12] McCouch S R, Nelson R J, Tohme J, et al. Mapping of blast resistance gene in rice [A]. *Rice Blast Disease [C]*. Manila, Philippines: IRRI, 1994. 167-186.
 [13] Prashanth G B, Hittalmani S, Srinivasachary, et al. Genetic markers associated with field resistance to leaf and neck blast across locations in rice (*Oryza sativa* L.) [J]. *Rice Genetics Newsletter*, 1998, 15: 128-131.
 [14] 李仕贵, 王玉平, 黎汉云, 等. 利用微卫星标记鉴定水稻的稻瘟病抗性 [J]. *生物工程学报*, 2000, 16(3): 324-327.
 [15] 刘士平, 薛艳红. 利用 DNA 微卫星标记定位水稻的抗稻瘟病基因 [J]. *三峡大学学报*, 2003, 25(6): 574-576.
 [16] 陈志伟, 郑燕, 吴为人, 等. 抗稻瘟病基因 Pi22(t) 紧密连锁的 SSR 标记的筛选与应用 [J]. *分子植物育种*, 2004, 2(3): 321-325.
 [17] 陈学伟, 李仕贵, 马玉清, 等. 水稻抗稻瘟病基因 Pi2d(t)1, Pi2b, Pi2ta2 的聚合及分子标记选择 [J]. *生物工程学报*, 2004, 20(5): 708-714.

2007 年 1 号文件的几个“新”

文件起草者之一、国家发改委宏观经济研究院副院长马晓河研究员指出 2007 年一号文件传递的最新政策信息主要有如下七个方面:

首先, 最大的“新”是把积极发展现代农业作为新农村建设的首要任务和重要内容。其次, 2007 年, 在增加“三农”投入方面, 提出“三个继续高于”和一个“主要用于”, 即 2007 年财政支农投入的增量要继续高于上年, 国家固定资产投资用于农村的增量要继续高于上年, 土地出让收入用于农村建设的增量要继续高于上年, 建设用地税费提高后新增收入主要用于“三农”。第三, 2007 年在全国范围内农村

义务教育实施“两免一补”, 相对于 2006 年只在西部地区实施是一个突破。第四, 继续扩大新型农村合作医疗试点范围, 今年要实现让 80% 的农村人口享受到, 明年将在农村地区全部实现。第五, 在建立农业风险防范机制方面, 提出扩大农业政策性保险试点范围, 各级财政对农户参加农业保险给予保费补贴。第六, 在深化农村综合改革方面, 提出中央和省级财政要安排一定资金, 对地方推进农村综合改革给予奖励补助。第七, 提出要开发农业多种功能, 健全发展现代农业的产业体系, 包括专门提到的推进生物质产业发展。