

黑龙江省水稻种质资源抗稻瘟病 基因 *Pi-ta* 的分子标记检测

黄晓群, 郭震华, 王瑞英, 张兰民, 王 翠, 周雪松, 赵海新
(黑龙江省农业科学院 佳木斯水稻研究所, 黑龙江 佳木斯 154026)

摘要:为了明确水稻抗稻瘟病基因 *Pi-ta* 在黑龙江省种质资源中的分布状况, 利用已建立的水稻抗稻瘟病基因 *Pi-ta* 显性分子标记对 72 个黑龙江省主栽品种和优异种质资源进行了分子鉴定。结果表明: 合江 21、龙粳 4 号、龙粳 10 号、龙盾 D904、龙花 00-485、佳禾早占、龙粳 29、龙粳 31、龙盾 105、龙粳 39、垦 99639、松粳 5 号、龙盾 306、东农 428、东农 430、芦苇稻、莲育 7-91、龙香稻 2 号和绥香 08-5080 共 19 个品种(系)含有 *Pi-ta* 基因。

关键词: 水稻; 稻瘟病; *Pi-ta* 基因; 显性分子标记

中图分类号: S511.024

文献标识码: A

文章编号: 1002-2767(2013)10-0001-04

稻瘟病是由子囊菌 *Magnaprthe grisea* (Hebert) Barr. [无性世代为 *Pyricularia grisea* (Cooke) Sacc.] 引起的广泛发生于世界各稻区的主要病害之一, 是限制水稻高产稳产的主要因素。黑龙江省的稻瘟病危害也非常严重, 每年均有不同程度的发生, 流行年份一般减产 10%~15%, 个别年份超过 20%, 局部田块甚至颗粒无收^[1]。

对于稻瘟病的防治, 目前在大面积的栽培中, 一般采用种植抗病品种和化学防治来控制病害。长期的实践证明, 选育和推广抗病品种是防治稻瘟病最经济有效的途径, 而抗病品种选育的最大挑战在于抗源的正确选择。抗源是抗病育种的物质基础, 收集优良抗源是抗病育种的关键, 抗病育种能否开创育种新局面, 提高抗性水平, 有充足的抗源亲本以及能否合理地利用抗源亲本是重要的环节。

近年来, 随着分子标记的大量开发, 国内外对具有广谱、抗性强而持久的抗稻瘟病种质资源的发掘、定位、克隆非常重视。截至 2012 年 6 月, 至少报道了 63 个抗稻瘟病位点, 共 77 个主效基因。这些基因成簇地分布于除第 3 染色体外的所有水稻染色体上(2 个隐性, 其它显性), 其中, *Pb1*、*Pia*、*Pib*、*Pid2*、*Pid3*、*Pik*、*Pik-h*/*Pi54*、*Pik-m*、

Pik-p、*Pish*、*Pit*、*Pi-ta*、*Piz-t*、*Pi1*、*Pi2*、*Pi5*、*Pi9*、*pi21*、*Pi25*、*Pi36*、*Pi37* 和 *Pi50* 共 22 个基因已被成功克隆(国家水稻数据中心: http://www.ricedata.cn/gene/gene_pi.htm), 为快速、准确、系统地筛选抗源, 鉴定抗病基因型以及高效开展抗稻瘟病基因聚合育种带来了新的契机。

Pi-ta 基因位于水稻第 12 染色体靠近着丝点的区域, 编码由 928 个氨基酸残基组成的富含亮氨酸重复序列的细胞质膜受体蛋白。王忠华等利用籼稻抗病等位基因 *Pi-ta* 和粳稻感病等位基因 *pi-ta* 在 DNA 序列上的多态性建立起以抗病基因本身序列为引物的 DNA 显性分子标记, 可以快速准确地从水稻资源中鉴定出 *Pi-ta* 基因^[2-5]。

时克等研究表明 *Pi-ta* 基因目前我国很多稻区仍表现广谱的稻瘟病菌抗性^[6], 该研究拟利用 *Pi-ta* 的功能标记对黑龙江省水稻种质资源的抗稻瘟病基因进行检测和分析, 以期了解 *Pi-ta* 基因在黑龙江省水稻种质资源中的分布现状, 为抗稻瘟病品种的选育及合理利用、稻瘟病预测及防治等方面研究提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

供试水稻材料为含抗稻瘟病基因 *Pi-ta* 的阳性对照 Tetep, 不含 *Pi-ta* 的阴性对照丽江新团黑谷, 以及黑龙江省大面积种植的主栽品种和一些优良种质资源(见表 1), 共 74 份。其中阳性对照和阴性对照均由黑龙江省农业科学院佳木斯水稻研究所植物保护实验室提供。

收稿日期: 2013-06-03

基金项目: 黑龙江省省长基金资助项目(2009HSJ-C-6); 国家水稻产业体系资助项目(CARS-01-14); 黑龙江省农业科技创新工程资助项目

第一作者简介: 黄晓群(1980-), 女, 内蒙古自治区赤峰市人, 硕士, 助理研究员, 从事水稻常规与分子标记辅助育种研究。E-mail: xiaqunhuang2003@163.com。

表 1 品种及其来源
Table 1 Cultivars and sources

| 编号 No. | 品种(系) Cultivars | 来源 Source | 编号 No. | 品种(系) Cultivars | 来源 Source |
|-----------|--------------------|----------------------|-----------|--------------------|--------------------------|
| 1 | 合江 19 | 黑龙江省农业科学院佳木斯水稻研究所 | 37 | 绥粳 7 号 | 黑龙江省农业科学院绥化分院 |
| 2 | 合江 21 | 黑龙江省农业科学院佳木斯水稻研究所 | 38 | 东农 415 | 东北农业大学 |
| 3 | 龙粳 3 号 | 黑龙江省农业科学院佳木斯水稻研究所 | 39 | 绥粳 9 号 | 黑龙江省农业科学院绥化分院 |
| 4 | 龙粳 4 号 | 黑龙江省农业科学院佳木斯水稻研究所 | 40 | 垦稻 10 号 | 黑龙江省农垦科学院水稻研究所 |
| 5 | 龙粳 7 号 | 黑龙江省农业科学院佳木斯水稻研究所 | 41 | 龙稻 5 号 | 黑龙江省农业科学院耕作栽培研究所 |
| 6 | 龙粳 8 号 | 黑龙江省农业科学院佳木斯水稻研究所 | 45 | 牡丹江 28 | 黑龙江省农业科学院牡丹江分院 |
| 7 | 龙花 00-835 | 黑龙江省农业科学院佳木斯水稻研究所 | 43 | 龙盾 104 | 黑龙江省监狱管理局农业科学研究所 |
| 8 | 龙粳 10 号 | 黑龙江省农业科学院佳木斯水稻研究所 | 44 | 龙盾 105 | 黑龙江省监狱管理局农业科学研究所 |
| 9 | 龙粳 14 | 黑龙江省农业科学院佳木斯水稻研究所 | 45 | 龙粳 39 | 黑龙江省农业科学院佳木斯水稻研究所 |
| 10 | 龙粳 20 | 黑龙江省农业科学院佳木斯水稻研究所 | 46 | 龙粳 41 | 黑龙江省农业科学院佳木斯水稻研究所 |
| 11 | 龙粳 21 | 黑龙江省农业科学院佳木斯水稻研究所 | 47 | 龙粳 40 | 黑龙江省农业科学院佳木斯水稻研究所 |
| 12 | 龙粳 25 | 黑龙江省农业科学院佳木斯水稻研究所 | 48 | 松粳 6 号 | 黑龙江省农业科学院五常水稻研究所 |
| 13 | 龙粳 26 | 黑龙江省农业科学院佳木斯水稻研究所 | 49 | 五优稻 | 黑龙江省农业科学院五常种子公司 |
| 14 | 龙粳 27 | 黑龙江省农业科学院佳木斯水稻研究所 | 50 | 垦 99639 | 黑龙江省农垦科学院水稻研究所 |
| 15 | 龙粳 28 | 黑龙江省农业科学院佳木斯水稻研究所 | 51 | 普优 9 号 | 穆棱市水稻育种研究所 |
| 16 | 空育 131 | 日本 | 52 | 垦 02-605 | 黑龙江省农垦科学院水稻研究所 |
| 17 | 垦稻 12 | 黑龙江省农垦科学院水稻研究所 | 53 | 北 02-20 | 北方水稻所 |
| 18 | 龙稻 3 号 | 黑龙江省农业科学院耕作栽培研究所 | 54 | 绥粳 7 号 | 黑龙江省农业科学院绥化分院 |
| 19 | 垦 94437 | 黑龙江省农垦科学院水稻研究所 | 55 | 松粳 5 号 | 黑龙江省农业科学院五常水稻研究所 |
| 20 | M926 | 黑龙江省农业科学院牡丹江分院 | 56 | 垦 07-2258 | 黑龙江省农垦科学院水稻研究所 |
| 21 | 绥粳 3 号 | 黑龙江省农业科学院绥化分院 | 57 | 垦 07-1304 | 黑龙江省农垦科学院水稻研究所 |
| 22 | 绥 936165 | 黑龙江省农业科学院绥化分院 | 58 | 龙盾 306 | 黑龙江省监狱管理局农业科学研究所 |
| 23 | 龙盾 D904 | 黑龙江省监狱管理局农业科学研究所 | 59 | 松粘 1 号 | 黑龙江省农业科学院五常水稻研究所 |
| 24 | 龙花 00-485 | 黑龙江省农业科学院佳木斯水稻研究所 | 60 | 东农 428 | 东北农业大学 |
| 25 | 佳禾早占 | 厦门大学 | 61 | 东农 430 | 东北农业大学 |
| 26 | 绥 02-7105 | 黑龙江省农业科学院绥化分院 | 62 | 建三江香稻 | 黑龙江省农垦总局建三江分局农业科学研究所 |
| 27 | 绥 02-6222 | 黑龙江省农业科学院绥化分院 | 63 | 金育 07-2 | 金宏伟种业 |
| 28 | 三江 1 号 | 黑龙江省农垦总局建三江分局农业科学研究所 | 64 | 芦苇稻 | 不详 |
| 29 | 龙糯 98-325 | 黑龙江省农业科学院佳木斯水稻研究所 | 65 | 牡 02-1319 | 黑龙江省农业科学院牡丹江分院 |
| 30 | 东农 416 | 东北农业大学 | 66 | 莲育 7-91 | 佳木斯莲江口种子公司 |
| 31 | 龙粳 29 | 黑龙江省农业科学院佳木斯水稻研究所 | 67 | 哈 05-203 | 黑龙江省农业科学院耕作栽培研究所 |
| 32 | 稻稗 | 不详 | 68 | 龙粳香 1 号 | 黑龙江省农业科学院佳木斯水稻研究所 |
| 33 | 沙沙尼 | 日本 | 69 | 中龙香粳 1 号 | 中国农业科学院与黑龙江省农业科学院耕作栽培研究所 |
| 34 | 空育 139 | 日本 | 70 | 龙香稻 2 号 | 黑龙江省农业科学院耕作栽培研究所 |
| 35 | 龙粳 31 | 黑龙江省农业科学院佳木斯水稻研究所 | 71 | 龙香稻 1 号 | 黑龙江省农业科学院耕作栽培研究所 |
| 36 | 垦鉴稻 6 号 | 黑龙江省农垦科学院水稻研究所 | 72 | 绥香 08-5080 | 黑龙江省农业科学院绥化分院 |

1.2 方法

在水稻 3 叶期取新鲜叶片,按照 McCouch 提供的方法提取 DNA^[7]。用于 PCR 扩增反应的引物名称、序列及预期扩增序列片段见表 2,引物序列由英俊生物技术有限公司合成。YL155/YL87 能特异性扩增出抗病等位基因 *Pi-ta*,YL183/YL87 能特异性扩增出感病等位基因 *pi-ta*。PCR 反应总体积 15 μ L,含 1.5 μ L 10 \times PCR buffer(with Mg^{2+}),0.5 μ L 2.5 mmol \cdot L⁻¹ dNTP,2.0 μ L 5 mol \cdot L⁻¹ 上游和下游引物,0.25 μ L 5 U $\cdot\mu$ L⁻¹ Taq 酶,2.5 μ L 模板

DNA,8.25 μ L dd H₂O。PCR 反应程序为 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min,35 个循环的 94 $^{\circ}$ C 变性 1 min,56 $^{\circ}$ C 退火 0.5 min,72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min,最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。扩增产物加入 2.5 μ L loading buffer(0.25% 溴酚兰,40% 蔗糖)混匀,用 1.0% 琼脂糖凝胶(加 EB)于 0.5 \times TBE 缓冲液中恒压 120~140 V 电泳 0.5 h 左右,在紫外灯下直接观察或者用凝胶扫描成像系统扫描记录电泳结果。每个样品 PCR 扩增及电泳重复 2 次。

表 2 用于 PCR 反应的引物
Table 2 The primers used for PCR

| 引物名称 Primers | 目标基因 Gene | 序列(5'-3') Sequence(5'-3') | 位置 Location | 片段预期大小/bp Expected size |
|-----------------|--------------|------------------------------|----------------|----------------------------|
| YL155 | <i>Pi-ta</i> | AGCAGGTTATAAGCTAGGCC | 4409-4428 | 1042 |
| YL87 | | CTACCAACAAGTTCATCAAA | 5450-5431 | |
| YL183 | <i>pi-ta</i> | AGCAGGTTATAAGCTAGCTAT | 4409-4429 | 1042 |
| YL87 | | CTACCAACAAGTTCATCAAA | 5450-5431 | |

2 结果与分析

利用显性分子标记 YL155/YL87 和 YL183/YL87 对黑龙江省的优异种质资源进行 PCR 扩增,其中 Tetep 作为阳性对照,丽江新团黑谷作为阴性对照,分别能特异性扩增出抗、感稻瘟病等位基因 *Pi-ta* 的相应片段序列。YL155/YL87 能特异性扩增出 1 042 bp 片段,而 YL183/YL87 则不能扩增出片段,说明该品种含有 *Pi-ta* 基因,YL183/YL87 能扩增出 1 042 bp 片段,而 YL155/YL87 则不能扩增出片段,说明该品种含有其感病等位基因 *pi-ta*(见图 1)。在 72 个被检种质资源中,有 19 个品种(系)含有抗稻瘟病基因 *Pi-ta*,分别为合江 21、龙粳 4 号、龙粳 10 号、龙盾 D904、龙花 00-485、佳禾早占、龙粳 29、龙粳 31、龙盾 105、龙粳 39、垦 99639、松粳 5 号、龙盾 306、东农 428、东农 430、芦苇稻、莲育 7-91、龙香稻 2 号和绥香 08-5080,而其它 53 个品种(系)则不含 *Pi-ta* 基因。

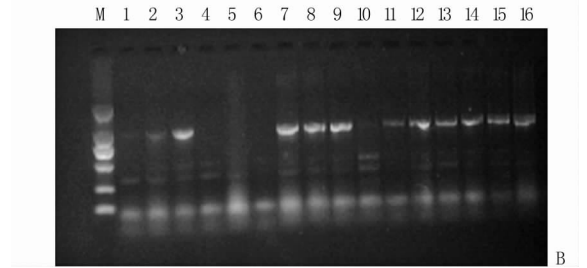


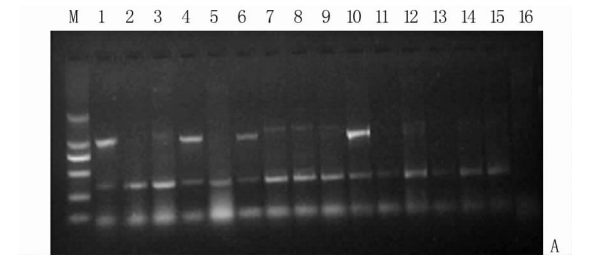
图 1 部分不同水稻品种中抗病基因 *Pi-ta* 的 PCR 扩增结果
Fig.1 PCR amplification of *Pi-ta* gene for different rice cultivars

A 为抗病等位基因 *Pi-ta* 显性分子标记 YL155/YL87; B 为感病等位基因 *pi-ta* 显性分子标记 YL183/YL87;(1~16 泳道分别为水稻品种 Tetep、丽江新团黑谷、合江 19、合江 21、龙粳 3 号、龙粳 4 号、龙粳 7 号、龙粳 8 号、龙花 00-835、龙粳 10 号、龙粳 14、龙粳 20、龙粳 21、龙粳 25、龙粳 26、龙粳 27)

A. The resistant *Pi-ta* dominant marker YL155/YL87; B. The recessive *pi-ta* dominant marker YL183/YL87; (Lane 1~16 were rice cultivars Tetep, Lijiangxintuanheigu, Hejiang 19, Hejiang 21, Longjing 3, Longjing 4, Longjing 7, Longjing 8, Longhua 00-835, Longjing 10, Longjing 14, Longjing 20, Longjing 21, Longjing 25, Longjing 26, Longjing 27)

3 结论与讨论

20 世纪 60 年代中期,日本率先开展了水稻品种抗稻瘟病基因分析的研究工作,鉴定了最初的 8 个抗性位点上的 14 个基因,并建立了一套抗



稻瘟病基因分析用的鉴别体系(JDCs, Japanese differential cultivars)(国家水稻数据中心: http://www.ricedata.cn/gene/gene_pi.htm)。近年来,随着分子标记技术的快速发展,开发并应用与抗性基因紧密连锁的分子标记,特别是利用抗性基因本身的序列建立的分子标记,也称之为功能基因,使得基因鉴定工作简便而准确。利用此类基因进行分子标记辅助选择育种,大大提高了育种效率。

Pi-ta 在一些稻区仍具有重要的育种价值。为了明确该基因在黑龙江省稻区的分布状况,该研究利用王忠华等开发研究的 YL155/YL87 和 YL183/YL87 标记,分别特异性扩增出抗稻瘟病等位基因 *Pi-ta* 和感稻瘟病等位基因 *pi-ta* 的相应片段序列,可以鉴别水稻品种中是否含有抗稻瘟病基因的显性分子标记。结果表明,合江 21、龙粳 4 号、龙粳 10 号、龙盾 D904、龙花 00-485、佳禾早占、龙粳 29、龙粳 31、龙盾 105、龙粳 39、垦 99639、松粳 5 号、龙盾 306、东农 428、东农 430、芦苇稻、莲育 7-91、龙香稻 2 号和绥香 08-5080 共 19 个品种(系)含有 *Pi-ta* 基因,说明该基因在黑

龙江稻区分布较广。该研究为合理布局含有 *Pi-ta* 基因的品种(系),以及合理利用含有该基因的种质资源进行杂交配组、聚合育种等奠定了基础,具有重要的参考价值。

参考文献:

- [1] 宋成艳,王桂玲,刘乃生,等. 部分黑龙江省水稻品种的抗瘟性分析[J]. 中国农学通报,2009,25(16):201-205.
- [2] Bryan G T, Wu K, Farrall L, et al. A single amino acid difference distinguishes resistant and susceptible alleles of the rice blast resistance gene *Pi-ta* [J]. Plant cell, 2000, 12: 2033-2045.
- [3] Jia Y, Wang Z, Sing P. Development of dominant rice blast *Pi-ta* resistance gene markers[J]. Crop Science, 2002, 42: 2145-2149.
- [4] Jia Y, Wang Z, Fjellstrom R G, et al. Rice *Pi-ta* gene confers resistance to the major pathotypes of the rice blast fungus in the US[J]. Phytopathology, 2004, 96: 296-301.
- [5] 王忠华,贾育林,吴殿星,等. 水稻抗稻瘟病基因 *Pi-ta* 的分子标记辅助选择[J]. 作物学报, 2004, 30(12): 1259-1265.
- [6] 时克,雷财林,程治军,等. 稻瘟病抗性基因 *Pi-ta* 和 *Pib* 在我国水稻主栽品种中的分布[J]. 植物遗传资源学报, 2009, 10(1): 21-26.
- [7] McCouch S R, Kochert G, Yu Z H, et al. Molecular mapping of rice chromoosomes[J]. Theoretical and Applied Genetics, 1998, 76: 815-820.

Molecular Marker Detection of Rice Blast Resistance Gene *Pi-ta* in Heilongjiang Rice Germplasm Resources

HUANG Xiao-qun, GUO Zhen-hua, WANG Rui-ying, ZHANG Lan-min, WANG Cui, ZHOU Xue-song, ZHAO Hai-xin

(Institute of Jiamusi Rice Sciences, Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Jiamusi, Heilongjiang 154026)

Abstract: In order to confirm the distribution of rice blast resistance gene *Pi-ta* in Heilongjiang rice germplasm resources, Molecular marker detection of rice blast resistance gene *Pi-ta* was operated for 72 rice local cultivars commercially grown and germplasm in Heilongjiang province. The results showed that 19 rice local cultivars were identified to contain *Pi-ta* gene, including Hejiang 21, Longjing 4, Longjing 10, Longdun D904, Longhua 00-485, Jiahezaozhan, Longjing 29, Longjing 31, Longdun 105, Longjing 39, Ken 99639, Songjing 5, Longdun 306, Dongnong 428, Dongnong 430, Luweidao, Lianyu 7-91, Longxiangdao 2, Suixiang 08-5080.

Key words: rice; rice blast resistance; *Pi-ta* gene; dominant DNA marker

欢迎投稿 欢迎订阅