

黑龙江省主栽水稻品种抗稻瘟病 基因 $Pi-2(t)$ 的 SSR 检测分析

何琳¹, 王美国², 张亚玲³, 靳学慧³

(1. 黑龙江省农垦科研育种中心, 黑龙江 哈尔滨 150000; 2. 黑龙江省种子管理局, 黑龙江 哈尔滨 150000; 3. 黑龙江八一农垦大学 农学院, 黑龙江 大庆 163319)

摘要:为合理搭配种植水稻品种, 利用与抗稻瘟病基因 $Pi-2(t)$ 紧密连锁的 SSR 标记 AP22 和 SRM24 检测 49 份黑龙江省主栽水稻品种(系)抗瘟基因 $Pi-2(t)$ 的分布情况。结果表明: 用 2 个与抗稻瘟病基因 $Pi-2(t)$ 紧密连锁的 SSR 标记同时对抗瘟基因 $Pi-2(t)$ 的检测是非常有效的方法, 龙粳 8 号、绥粳 4 号、龙 D99-709 和垦 676 共 4 个水稻品种(系)检测出含有 $Pi-2(t)$ 抗稻瘟病基因, 并了解了该基因在黑龙江省水稻品种资源中的分布情况。

关键词:水稻品种; SSR 标记; 抗稻瘟病基因 $Pi-2(t)$

中图分类号: S511

文献标识码: A

文章编号: 1002-2767(2014)04-0011-03

黑龙江省是我国粳稻主产区之一, 水稻面积一直在不断增长, 现已达 397 万 hm^2 , 稻瘟病是黑龙江省水稻生产中危害严重的病害之一, 每年都有不同程度的发生, 轻则减产, 重则流行成灾或导致绝产, 2005 和 2006 年发病面积均超过 66.7 万 hm^2 , 给水稻生产造成巨大损失^[1], 长期的生产实践证明, 选育抗稻瘟病品种是防治稻瘟病最经济有效的方法, 但是黑龙江省的水稻开发研究工作起步较晚, 品种资源比较匮乏, 因此对黑龙江省主栽水稻品种(系)抗稻瘟病基因的快速鉴定和利用开展研究是十分重要的。

抗稻瘟病基因 $Pi-2(t)$ 是来自籼稻品种 5173 的一个控制广谱抗性、主效的显性抗病基因, 在水稻稻瘟病抗性上起重要作用。Chen 等^[2] 利用籼型近等基因系(near isogonics lines, NILs)对我国南方稻区水稻稻瘟病菌群体致病型的组成进行了分析, 各 NILs 被稻瘟病菌株侵染的结果表明, 带有 $Pi-2(t)$ 抗性基因的 C101A51 被侵染的频率最低, 仅占总菌数的 7.55%, C101A51 对我国南方

稻区单孢分离的菌株抗性达到 92.4%。到目前为止, 尚未报道关于抗稻瘟病基因 $Pi-2(t)$ 在黑龙江省主栽水稻品种(系)中的分布情况, 该试验利用 SSR 标记对黑龙江省水稻主栽品种(系)抗稻瘟病基因 $Pi-2(t)$ 进行检测分析, 了解 $Pi-2(t)$ 基因在黑龙江省水稻品种资源中的分布现状, 为育种家合理选用抗病资源, 配制杂交组合以及稻瘟病的防治等基础应用研究工作提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

供试的水稻品种包括阳性对照品种 5173, 含有抗稻瘟病基因 $Pi-2(t)$; 阴性对照品种珍汕 97B, 不含有抗瘟基因 $Pi-2(t)$; 受检的 49 份黑龙江省主栽水稻品种(系)见表 1。

1.2 方法

1.2.1 水稻基因组 DNA 的提取 在水稻 3~4 叶期取新鲜叶片, 采用 CTAB 法提取 DNA^[3-4]。

1.2.2 SSR 引物的选择 根据前人定位的结果^[5-8], 选择与抗稻瘟病基因 $Pi-2(t)$ 紧密连锁的 SSR 标记 AP22 和 SRM24, 由上海生物工程有限公司合成, 引物序列如下:

AP22 F 5'-GTGCATGAGTCCAGCTCAAA-3'
R5'-GTGTACTCCCATGGCTGCTC-3'
SRM24 F 5'-ACTCTCCAATGCCAACAGCTAT-3'
R5'-TGAACCTTTGCTTGCGTTCCTA-3'

收稿日期: 2013-12-05

基金项目: 黑龙江省科技计划资助项目(GB01B201, GB02B201)

第一作者简介: 何琳(1980-), 女, 黑龙江省爱辉县人, 硕士, 助理研究员, 从事大豆遗传育种工作。E-mail: hl801012@126.com。

通讯作者: 靳学慧(1962-), 男, 教授, 硕士研究生导师, 从事植物病理学的教学与科研工作。E-mail: jxhbyndzky@yahoo.com.cn。

表 1 供试水稻品种
Table 1 Rice varieties for test

受检水稻品种 Rice varieties				
空育 131	富士光	上育 418	东农 363	东农 424
东农 2009	松粳 3 号	松粳 6 号	松粳 7 号	松粳 8 号
松粳 9 号	松粳 10 号	龙粳 8 号	龙粳 12	龙粳 13
龙优 220	龙优 221	龙优 222	龙选 99-196	龙选 99-215
龙选 9707	龙交 00B-2862	龙丰 8811	龙 D99-709	龙品 02-1
龙糯 2 号	龙育 99-390	龙稻 5 号	合江 18	合江 19
五优 C	五优稻 1 号	垦鉴稻 6 号	垦鉴稻 7 号	垦鉴稻 8 号
垦稻 9 号	垦稻 10 号	垦 676	垦 00-915	绥粳 4 号
绥 01-5251	绥 01-6107	建 2009	普粘 7 号	哈 99-157
北 992	品鉴 2 号	九稻 19	沙沙尼	

1.2.3 PCR 扩增 PCR 反应体系为 20 μL , 其中 $10\times\text{Buffer}$ (含 Mg^{2+} 15 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$) 2 μL , dNTP(2.5 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$) 1 μL , 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 引物各 0.1 $\mu\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, 1 U 的 *rTaq* 酶, DNA 模板 1 μL , 加 ddH_2O 补足 20 μL 。

PCR 反应程序为 94℃ 预变性 5 min, 94℃ 变性 50 s, 55℃ 退火 50 s, 72℃ 延伸 1 min, 共 35 个循环, 最后 72℃ 延伸 10 min, 4℃ 保存。产物通过 3% 琼脂糖凝胶电泳, 用凝胶成像系统拍照。

2 结果与分析

利用 SSR 标记 AP22 和 SRM24 对 49 份黑龙江省水稻主栽品种(系)进行抗稻瘟病基因 *Pi-2(t)* 的检测, 结果表明, 经 SSR 标记 AP22 扩增后, 阳性对照品种 5173 在大约 130 bp 处有条带, 阴性对照品种珍汕 97B 在大约 170 bp 处有条带, 龙粳 8 号、绥粳 4 号、龙 D99-709 和垦 676 这 4 个水稻品种(系)也在大约 130 bp 处有条带, 与阳性对照品种 5173 一致, 说明含有 *Pi-2(t)* 抗瘟基因, 空育 131、沙沙尼、松粳 10 号和东农 2009 这 4 个品种(系)在大约 170 bp 处有条带, 与阴性对照品种珍汕 97B 一致, 说明不含 *Pi-2(t)* 抗瘟基因(见图 1); 经 SSR 标记 SRM24 扩增后, 阳性对照品种 5173 在大约 220 bp 处有条带, 阴性对照品种珍汕 97B 在大约 180 bp 处有条带, 龙粳 8 号、绥粳 4 号、龙 D99-709 和垦 676 四个水稻品种(系)也在大约 220 bp 处有条带, 与阳性对照品种 5173 一致, 说明含有 *Pi-2(t)* 抗瘟基因, 空育 131、沙沙尼、松粳 10 号和东农 2009 这 4 个品种(系)在大约 180 bp 处有条带, 与阴性对照品种一致, 说明不含有 *Pi-2(t)* 抗瘟基因(见图 2)。检测结果表

明, 在受检的 49 个水稻主栽品种(系)中, SSR 标记 AP22 和 SRM24 都检测到龙粳 8 号、绥粳 4 号、龙 D99-709 和垦 676 共 4 个水稻品种(系)含有 *Pi-2(t)* 抗瘟基因, 空育 131 等 45 个水稻品种(系)没有检测到 *Pi-2(t)* 抗瘟基因的存在。

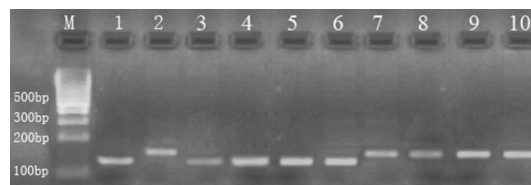


图 1 SSR 标记 AP22 扩增结果

1. 5173(阳性对照); 2. 珍汕 97B(阴性对照); 3. 龙粳 8 号; 4. 绥粳 4 号; 5. 龙 D99-709; 6. 垦 676; 7. 空育 131; 8. 沙沙尼; 9. 松粳 10 号; 10. 东农 2009。下同。

Fig. 1 Results of PCR by AP22

1. 5173(positive control); 2. Zhenxian 97B(negative control); 3. Longjing 8; 4. Suijing 4; 5. Long D99-709; 6. Ken 676; 7. Kongyu 131; 8. Shashani; 9. Songjing 10; 10. Dongnong 2009. The same below.

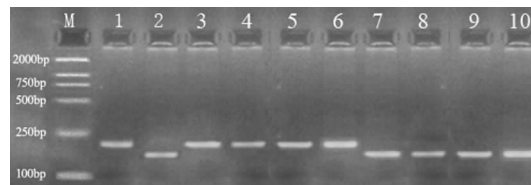


图 2 SSR 标记 SRM24 扩增结果

Fig. 2 Results of PCR by SRM24

3 结论与讨论

在供试的 49 份水稻品种(系)中, 龙粳 8 号、绥粳 4 号、龙 D99-709 和垦 676 共 4 个水稻品种(系)含有 *Pi-2(t)* 抗瘟基因, 占供试水稻品

种(系)的 8.16%,说明抗稻瘟病基因 *Pi-2(t)* 在黑龙江省主栽水稻品种(系)中分布较少,这可能是因为抗稻瘟病基因 *Pi-2(t)* 来自籼稻品种 5173 的抗稻瘟病基因,而黑龙江省种植的水稻都是粳稻品种,所以抗稻瘟病基因 *Pi-2(t)* 在黑龙江主栽水稻品种(系)中分布比较匮乏。抗稻瘟病基因 *Pi-2(t)* 是一个广谱、高抗的主效显性基因,根据张瑞萍^[9]对黑龙江省 39 个主栽水稻品种进行抗病性鉴定的结果表明,含有 *Pi-2(t)* 抗瘟基因的龙粳 8 号等 4 个品种(系)对稻瘟病具有较强的抗性。因此,黑龙江省各育种单位应该加强与外单位育种材料的交流,多引进抗源丰富的材料,以利于抗稻瘟病品种的选育和利用品种的遗传多样性控制稻瘟病。

利用分子标记辅助选择(Marker-assisted Selection,简称 MAS)是通过分析与抗病基因紧密连锁的分子标记的基因型来确定该基因是否存在。根据陈志伟等^[10]的研究结果表明,利用目标基因两侧紧密连锁的分子标记同时对目标基因进行选择准确率是非常高的^[11]。该研究利用与抗稻瘟病基因 *Pi-2(t)* 紧密连锁的 SSR 标记 AP22 和 SRM24 对黑龙江省主栽水稻品种(系)的抗稻瘟病基因 *Pi-2(t)* 进行检测非常可靠,以此明确了该基因在黑龙江省水稻资源中的分布情况,掌握了抗稻瘟基因 *Pi-2(t)* 的来源,在以后的抗病育种工作中,可利用该研究获得的含有抗瘟基因 *Pi-2(t)* 的品种(系)组配杂交组合,将抗病基

因转到水稻品种中,选育出抗病、高产和优质的水稻新品种。

参考文献:

- [1] 雷财林,张国民,程治军,等. 黑龙江省稻瘟病菌生理小种毒力基因分析与抗病育种策略[J]. 作物学报,2011,37(1): 18-27.
- [2] Chen H L, Chen B T, Zhang D P, et al. Pathotypes of *Pyricularia grisea* in rice field of central and southern China[J]. Plant Disease,2001(8):843-850.
- [3] 刘国权. 水稻抗瘟基因同源序列多态性分析[D]. 哈尔滨: 东北农业大学,2002.
- [4] McCouch S R, Chen X, Panaud O, et al. Microsatellite marker development, mapping and applications in rice genetics and breeding[J]. Plant Molecular Biology,1997,35:89-99.
- [5] Yu Z H, Mackill D J, Bommon J M, et al. Tagging genes for blast resistance in rice via linkage to RFLP Marker[J]. Theor Appl Genet,1991,81:471-476.
- [6] 傅彬英,杨代常,朱英国,等. 水稻抗稻瘟病基因 *Pi-2(t)* 物理图谱的构建[J]. 遗传学报,2000,27(9):787-791.
- [7] 吴金红,蒋江松,陈惠兰,等. 水稻稻瘟病抗性基因 *Pi-2(t)* 的精细定位[J]. 作物学报,2002,28(3):505-509.
- [8] 郑燕. 稻瘟病抗性基因 *Pi-2(t)* 紧密连锁的 SSR 标记的筛选及其应用[D]. 福州:福建农林科技大学,2004.
- [9] 张瑞萍. 黑龙江省稻瘟病菌生理小种地域性分布与品种抗瘟性研究[D]. 大庆:黑龙江八一农垦大学,2005.
- [10] 陈志伟,官华忠,吴为人,等. 稻瘟病抗性基因 *Pi-1* 连锁 SSR 标记的筛选和应用[J]. 福建农林大学学报:自然科学版,2005(34):74-77.
- [11] 何琳,靳学慧,张亚玲,等. SSR 对黑龙江省主栽水稻品种抗瘟基因 *Pi-1* 的检测分析[J]. 中国农学通报,2006,22(7):86-89.

Identification of Rice Blast Resistance Gene *Pi-2(t)* in Rice Varieties Commercially Grown in Heilongjiang Province with SSR Marker

HE Lin¹, WANG Xian-guo², ZHANG Ya-ling³, JIN Xue-hui³

(1. The Crop Research and Breeding Center of Land-reclamation, Harbin, Heilongjiang 150090; 2. The Seed Administration Bureau of Heilongjiang Province, Harbin, Heilongjiang 150009; 3. College of Agriculture, Heilongjiang Bayi Agricultural University, Daqing, Heilongjiang 163319)

Abstract: In order to reasonably collocat planting rice varieties, distribution of the blast resistance gene *Pi-2(t)* in 49 rice varieties commercially grown in Heilongjiang province was identified by the simple sequence repeat (SSR) marker AP22 and SRM24, which was tightly linked to blast resistance gene *Pi-2(t)* in rice. The results showed the indentification was very effective; Varieties of Longjing 8, Suijing 4, Long D99-709 and Ken676 were identified to have the *Pi-2(t)* gene; Distribution of the *Pi-2(t)* gene in rice resources was discussed.

Key words: rice varieties; SSR marker; rice blast resistance gene *Pi-2(t)*