

# 黑龙江省水稻种质资源抗稻瘟病基因 *Pi-b* 的分子标记检测

黄晓群,潘国君,张兰民,王瑞英,郭震华,赵海新,周 通  
(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-b* 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-b* 显性分子标记对 72 个黑龙江省主栽品种和优异的种质资源进行了分子鉴定。结果表明:合江 21、龙粳 3 号、龙粳 4 号、龙粳 7 号、龙粳 14、龙粳 25、佳禾早占、空育 139、芦苇稻、哈 05-203 和中龙香粳 1 号共 11 个品种(系)含有 *Pi-b* 基因。

**关键词:**水稻;稻瘟病;*Pi-b* 基因;显性分子标记

**中图分类号:**S511 **文献标识码:**A **文章编号:**1002-2767(2014)05-0026-04

稻瘟病是由子囊菌(*Magnaprthe grisea*)引发的一种水稻重要病害,为黑龙江省寒地稻作区的主要病害之一,每年都有不同程度的发生。特别是近几年来,随着黑龙江省水稻种植面积不断扩大,发病更为严重。2005 年黑龙江省稻瘟病发生面积达 66.7 万  $\text{hm}^2$ ,严重地块减产 70%~80%。截至 2006 年,发生面积达到 73 万  $\text{hm}^2$ <sup>[1]</sup>,有加重趋势。2007 年,黑龙江省发生稻瘟病的面积为 17.4 万  $\text{hm}^2$ ,绝产面积 1.6 万  $\text{hm}^2$ ,分别占当年水稻种植总面积的 7.4%和 0.67%<sup>[2]</sup>。为了减少稻瘟病带来的损失,需合理地布局含有不同抗稻瘟病基因的品种,通过基因聚合育种等手段培育具有广谱抗性的新品种。

早在 20 世纪 60 年代中期,日本利用经典遗传学方法对水稻品种的抗稻瘟病基因进行了分析研究,鉴定了 8 个抗性位点上的 14 个抗稻瘟病基因。近年来,随着分子标记的大量开发与应用,截至 2013 年 8 月,已至少报道了 68 个抗稻瘟病位点共 83 个主效基因,其中 24 个主效基因已被克隆<sup>[3]</sup>。随着抗稻瘟病基因的成功克隆,以及与抗病基因紧密连锁的分子标记,特别是利用抗稻瘟病基因自身序列建立起的分子标记(功能基因标记)的开发,使得抗稻瘟病基因的鉴定、选择变得

更加简便而准确<sup>[4-5]</sup>。

*Pi-b* 基因定位于水稻第 2 染色体长臂近末端区域,属于 NBS-LRR 类抗病基因,编码一个由 1 251 个氨基酸组成的蛋白产物<sup>[6-8]</sup>。其功能基因标记已被开发,显性标记 Pibdom 能检测出抗病等位基因 *Pi-b*,显性标记 Lys145 能检测出感病等位基因 *Pi-b*,这两个显性标记组成一套水稻抗稻瘟病基因 *Pi-b* 显性分子标记,可以快速准确地从水稻资源中鉴定出 *Pi-b* 基因<sup>[4]</sup>。该研究拟利用 *Pi-b* 的功能标记 Pibdom 和 Lys145 对黑龙江省水稻种质资源进行检测和分析,可以了解 *Pi-b* 基因在黑龙江省水稻种质资源中的分布现状,为抗稻瘟病品种的合理布局及基因聚合育种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-b* 的阳性对照 BL-1、不含 *Pi-b* 的阴性对照丽江新团黑谷(LTH)以及黑龙江省大面积种植的主栽品种和一些优良的种质资源(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。

### 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<sup>[9]</sup>。用于 PCR 扩增反应的引物名称、序列、位置及片段大小等详细信息见表 2,Pibdom 能特异性扩增出抗稻瘟病等位基因 *Pi-b* 的 365 bp 片段, Lys145 能特异性扩增出感

收稿日期:2014-01-05

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 its sources

编号 No.	品种(系) Cultivars(line)	来源 Sources	编号 No.	品种(系) Cultivars(line)	来源 Sources
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分公司
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	佳木斯莲江口种子分公司
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

稻瘟病等位基因 *Pi-b* 的 803 bp 片段。引物由英俊生物技术有限公司合成。PCR 反应体系为 15  $\mu$ L, 含 1.5  $\mu$ L 10 $\times$ PCR buffer(with  $Mg^{2+}$ ), 0.5  $\mu$ L 2.5 mmol $\cdot$ L $^{-1}$  dNTP, 2.0  $\mu$ L 5 mol $\cdot$ L $^{-1}$  正向和反向引物, 0.25  $\mu$ L 5 U $\cdot$  $\mu$ L $^{-1}$  *Taq* 酶, 2.5  $\mu$ L 模板 DNA, 8.25  $\mu$ L dd H $_2$ O。PCR 反应程序为: 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min, 94 $^{\circ}$ C 变性 1 min, 56 $^{\circ}$ C 退火 0.5 min, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min, 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min, 共 35

个循环。PCR 扩增产物加入 2.5  $\mu$ L loading buffer(0.25%溴酚兰, 40%蔗糖)作为指示剂, 在 1.0%琼脂糖凝胶(加溴化乙锭染色)上进行电泳, 缓冲液为 0.5 $\times$ TBE, 恒压 120~140 V 电泳 0.5 h 左右, 最后用凝胶扫描成像系统扫描记录电泳结果。为确保结果的准确性, 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 Primers	靶基因 Target gene	序列(5'~3') Sequence	位置 Location	预期片段/bp Expected size
PibdomF	<i>Pi-b</i>	GAACAATGCCCAAACCTTGAGA	8699-8720	365
PibdomR		GGGTCCACATGTCAGTGAGC	9016-8996	
Lys145F	<i>Pi-b</i>	TCGGTGCCTCGGTAGTCAGT	37285710-37285729	803
Lys145R		GGGAAGCGGATCCTAGGTCT	37286477-37286458	

## 2 结果与分析

利用显性分子标记 Pibdom 和 Lys145 对黑

龙江省的优异种质资源进行 PCR 扩增, 其中 BL-1 作为阳性对照, 丽江新团黑谷作为阴性对照。

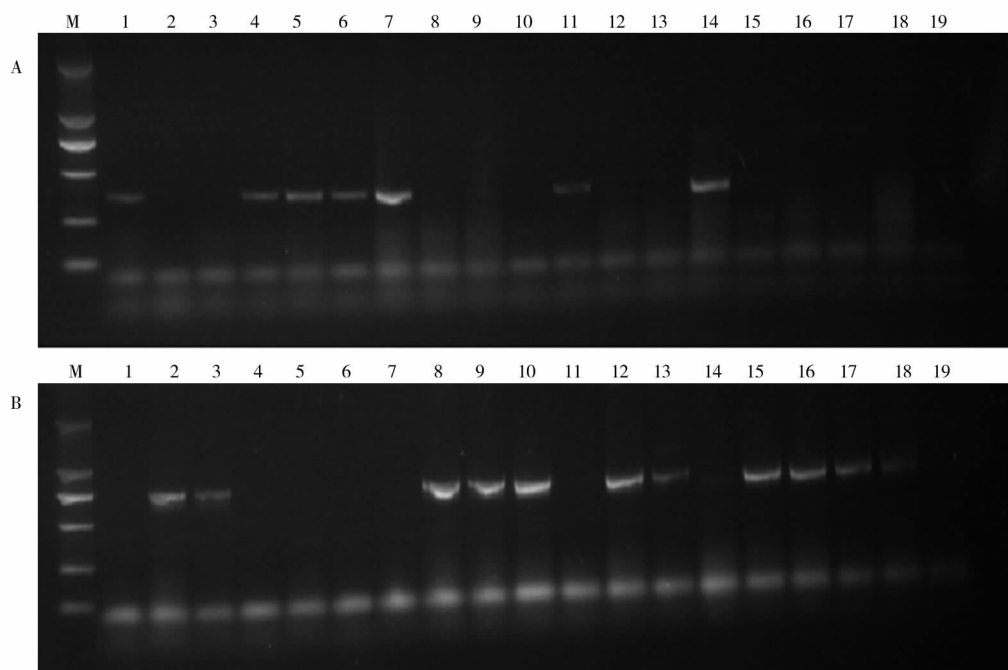


图 1 不同水稻品种中抗病基因 *Pi-b* 的 PCR 扩增结果

A 为抗病等位基因 *Pi-b* 显性分子标记 Pibdom; B 为感病等位基因 *pi-b* 显性分子标记 Lys145; 1~19 泳道分别为水稻品种 BL-1、丽江新团黑谷、合江 19、合江 21、龙梗 3 号、龙梗 4 号、龙梗 7 号、龙梗 8 号、龙花 00-835、龙梗 10 号、龙梗 14、龙梗 20、龙梗 21、龙梗 25、龙梗 26、龙梗 27、龙梗 28、空育 131、垦稻 12

Fig. 1 PCR amplification of *Pi-b* gene for different rice cultivars

A. The Dominant marker Pibdom of resistant *Pi-b*; B. The Dominant marker Lys145 of recessive *Pi-b*; Lane 1~19 were rice cultivars BL-1, LTH, 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, Longjing 28, Kongyu 131, Kendao 12

结果表明 *Pibdom* 能特异性扩增出 365 bp 的片段,而 *Lys145* 不能,说明该品种含有 *Pi-b* 基因, *Lys145* 能扩增出 803 bp 片段,而 *Pibdom* 不能,则说明该品种含有其感病等位基因 *pi-b* (见图 1)。在 72 个被检种质资源中,有 11 个品种(品系)含有抗稻瘟病基因 *Pi-b*,分别为合江 21、龙粳 3 号、龙粳 4 号、龙粳 7 号、龙粳 14、龙粳 25、佳禾早占、空育 139、芦苇稻、哈 05-203 和中龙香粳 1 号,其中编号为 19 的垦稻 12 重复扩增 2 次都没有出现带型,有可能由于 DNA 的质量问题或者对引物不能扩增出带型,有待进一步研究。研究中其余 60 个品种(品系)不含 *Pi-b* 基因。

### 3 结论与讨论

一些主效抗稻瘟病基因在我国很多稻区表现为具有广谱抗病性,例如 *Pi-9*、*Pi-ta*、*Pi-b*、*pi-1* 等,但是由于对这些抗稻瘟病基因的检测不够系统和详细,在育种的杂交配组应用上存在很大的盲目性。利用与抗稻瘟病基因紧密连锁的分子标记对其进行辅助选择,可加速抗病基因的鉴定,进而提高了抗病育种进程。

多数研究表明抗病基因 *Pi-b* 仍具有较重要的利用价值。为了明确该基因在寒地稻区的分布概况,该研究利用功能基因标记 *Pibdom* 和 *Lys145*,分别特异性扩增出抗、感稻瘟病等位基因 *Pi-b* 和 *pi-b* 的相应片段序列,可以准确、快速地鉴定出水稻品种中是否含有抗稻瘟病基因 *Pi-b*。研究结果表明,合江 21、龙粳 3 号、龙粳 4 号、龙粳 7 号、龙粳 14、龙粳 25、佳禾早占、空育 139、芦苇稻、哈 05-203 和中龙香粳 1 号共 11 个品

种(品系)含有 *Pi-b* 基因,该基因在黑龙江稻区分布较广。该研究为合理利用与布局含有 *Pi-b* 基因的品种(品系),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] 乔金玲,张景龙,徐巍. 寒地水稻稻瘟病的发生规律与防治措施[J]. 黑龙江农业科学,2009(1):62.
- [2] 支庚银,张国民,雷财林,等. 黑龙江省 2007 年水稻稻瘟病生产调研及建议[J]. 黑龙江农业科学,2010(4):68-70.
- [3] 国家水稻数据中心[EB/OL]. [2013-12-05]. [http://www.ricedata.cn/gene/gene\\_pi.htm](http://www.ricedata.cn/gene/gene_pi.htm).
- [4] 刘洋,徐培洲,张红宇,等. 水稻抗稻瘟病 *Pi-b* 基因的分子标记辅助选择与应用[J]. 中国农业科学,2008,41(1):9-14.
- [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] Monna L, Miyao A, Zhong H S, et al. Saturation mapping with subclones of YACs: DNA marker production targeting the rice blast disease resistance gene, *Pi-b* [J]. Theoretical and Applied Genetics, 1997, 94(2): 170-176.
- [7] Masaru Miyamoto, Ikuo Ando, Krystyna Rybka, et al. High resolution mapping of the *indica*-derived rice blast resistance genes. I. *Pi-b* [J]. Molecular Plant-Microbe Interactions, 1996, 9(1): 6-13.
- [8] Zi-Xuan Wang, Masahiro Yano, Utako Yamanouchi, et al. The *Pib* gene for rice blast resistance belongs to the nucleotide binding and leucine-rich repeat class of plant disease resistance genes[J]. The Plant Journal, 1999, 19(1): 55-64.
- [9] Couch 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-b* in Heilongjiang Rice Germplasm Resources

HUANG Xiao-qun, PAN Guo-jun, ZHANG Lan-min, WANG Rui-ying, GUO Zhen-hua, ZHAO Hai-xin, ZHOU Tong

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

**Abstract:** In order to confirm the distribution of rice blast resistance gene *Pi-b* in Heilongjiang rice germplasm resources, Molecular marker detection of rice blast resistance gene *Pi-b* was operated for 72 rice local cultivars commercially grown and germplasm in Heilongjiang province. The results showed that eleven rice local cultivars were identified which contain *Pi-b* gene, including Hejiang 21, Longjing 3, Longjing 4, Longjing 7, Longjing 14, Longjing 25, Jiahezaozhan, Kongyu 139, Luweidao, Ha 05-203 and Zhonglongxiangjing 1.

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