

分子标记选择水稻抗稻瘟病基因 *Pi40* 和 *Pib* 聚合体

王金明¹ 林秀云¹ 刘晓梅² 孙 强¹ 李鹏志¹ 张三元¹

(1. 中国农业科技东北创新中心, 吉林 长春 130033; 2. 吉林省农业科学院 植保所, 吉林 公主岭 136100)

摘要: 培育多个抗病基因聚合的水稻品种是提高其抗病广谱性和持久性的有效途径之一。利用水稻抗稻瘟病基因 *Pi40*、*Pib* 的特异 PCR 标记, 对含有 *Pi40*、*Pib* 的水稻品系复合杂交 F_2 50 个植株进行检测, 从中选择到 *Pi40*、*Pib* 双基因聚合的抗病植株 28 个, 为持久、广谱抗病水稻育种奠定了基础。

关键词: 水稻稻瘟病; *Pi40*; *Pib*; 聚合; 标记辅助选择

中图分类号: Q78 文献标识码: A 文章编号: 1000-7091(2012)02-0218-04

Selecting the Pyramids of Blast Resistance Genes *Pi40* and *Pib* in Rice Assisted by Molecular Marker

WANG Jin-ming¹ LIN Xiu-yun¹ LIU Xiao-mei² SUN Qiang¹ LI Peng-zhi¹ ZHANG San-yuan¹

(1. Northeast Agricultural Research Center of China, Changchun 130033, China;

2. Plant Protection Institute, Jilin Academy of Agricultural Science, Gongzhuling 136100, China)

Abstract: Pyramiding resistance genes have been suggested as one of the most effective methods for preventing breakdown of major gene conferring resistance to blast within a very short period. The PCR markers of the blast resistance gene *Pi40* and *Pib* were used to identify the genes in F_2 plants of combination among the rice lines containing *Pi40* and *Pib* respectively. The results indicated that all the plants containing any one gene, two genes of *Pi40* and *Pib* showed resistance to blast, while the plants lacking the resistance gene were susceptible to blast. The tightly-linked markers of the resistance genes were powerful tools for the identification of *Pi40* and *Pib* in breeding program. 28 plants pyramiding two genes of *Pi40* and *Pib* were selected from 50 plants of the F_2 population. They can be used as parents to breed rice for blast resistance.

Key words: Rice blast; *Pi40*; *Pib*; Pyramiding; Marker assisted selection

稻瘟病是由子囊菌引起的广泛发生在世界各稻区的最重要的病害之一^[1], 每年都造成严重的粮食损失。据统计, 1975-1990 年的 16 年间, 由稻瘟病引起的全球粮食损失达 1.57 亿 t^[2]。我国的稻瘟病危害也相当严重, 自 20 世纪 90 年代以来, 年发病面积均在 380 万 km² 以上, 年损失产量达数亿公斤^[3]。因此, 稻瘟病的抗性问题成为育种工作者急需解决的重大课题。

培育和推广抗病品种被公认为是防治水稻稻瘟病最经济、安全、有效的途径。由于水稻稻瘟病菌具有群体大、适应范围广、生理小种变异快等特点, 具有单一抗病基因的品种容易丧失抗性。因此, 培育

多个抗稻瘟病基因聚合的水稻品种, 是提高其抗病广谱性、持久性的有效途径之一。传统的表型鉴定, 难以准确、快速地选择具有 2 个以上抗病基因的个体。应用 DNA 分子标记则可解决上述问题, 快速鉴定、选择出含 2 个以上抗病基因的聚合体。目前, 已建立 *Pi40*、*Pib* 的特异 PCR 标记^[4-6], 但利用分子标记选择水稻抗稻瘟病 *Pi40*、*Pib* 2 个基因聚合体的研究尚未见报道。

本研究将分别含有 *Pi40*、*Pib* 的抗病水稻品系进行复合杂交, 对其 F_2 50 个植株进行鉴定, 利用上述基因的分子标记选择含 2 个抗稻瘟病基因的植株。

收稿日期: 2011-12-27

基金项目: 吉林省人事厅博士后项目(00237); 吉林省农业科学院博士启动基金(00107); 吉林省科技支撑计划(20106023)

作者简介: 王金明(1978-), 男, 山西高平人, 副研究员, 博士, 主要从事水稻育种研究。

通讯作者: 张三元(1951-), 男, 上海人, 研究员, 主要从事水稻育种研究。

1 材料和方法

1.1 植物材料

含有 *Pi40* 抗性基因的 IR83260-1-1-1-5-1-1-1 和含有 *Pib* 的谷梅 2 号作为阳性对照 ,水稻品种吉粳 88 作为阴性对照。将 IR83260-1-1-1-5-1-1-1 /吉粳 88 杂种 F₂ 的抗病株与谷梅 2 号杂交 ,获复交 F₁ 材料 HS82 和 HS85 ,从 HS82 和 HS85 株系的 F₂ 中各随机取 25 株进行目标基因的分子标记检测和稻瘟病抗性鉴定。

其中 ,IR83260-1-1-1-5-1-1-1 由国际水稻所 Jena 博士惠赠 ,谷梅 2 号由中国水稻所提供 ,吉粳 88 由吉林省农科院水稻所选育、收集、保存。

1.2 方法

1.2.1 水稻稻瘟病抗性鉴定 在温室条件下 ,对吉林省农科院植保所提供的吉林省主要稻瘟病菌混合菌种进行人工接种鉴定。接种 10 d 后 ,当感病对照发病充分时记载发病情况

1.2.2 植物总 DNA 提取 采取卢扬江和郑康乐的方法^[7] ,取单株叶片进行 DNA 提取。

1.2.3 引物的合成 *Pi40* 的 STS 引物序列为: P1: 5'-CAACAAACGGGTCGACAAAGG-3'和 P2: 5'-CCCC CAGGTCGTGATACCTTC-3'; *Pib* 的 SSR 引物序列为: P3: 5'-GAACAATGCCCAAACCTTGAGA-3'和 P4: 5'-GGGTCCACATGTCAGTGAGC-3';

上述引物均由上海生工生物技术公司合成。

1.2.4 STS-PCR 扩增 PCR 扩增于 Applied Biosystems 9700 上进行。

反应体系 30 μL: 含有 10 ng 模板 DNA ,引物 P1、P2 各 10 pmole ,1.5 mmol/L MgCl₂ ,0.2 mmol/L dNTPs ,1 U *Taq* 聚合酶 ,ddH₂O 补至 30 μL。反应条件为 95℃ 变性 3 min; 95℃ 30 s ,65℃ 30 s ,72℃ 1 min ,循环 35 次 ,72℃ 延伸 10 min ,4℃ 保存。PCR 扩增产物经 2.5 U 的内切酶 TSP509I 酶切 2 h ,酶切后经 1.2% 琼脂糖凝胶电泳 ,溴化乙锭染色 ,紫外观察并照像。

表 1 分子标记检测和抗病鉴定复合杂交 F₂ 植株的结果

Tab.1 The results of F₂ plants identified by PCR markers and inoculation

株号 Plant No.	<i>Pi40</i> Marker	<i>Pib</i> Marker	抗病性 Resistance	株号 Plant No.	<i>Pi40</i> Marker	<i>Pib</i> Marker	抗病性 Resistance
HS82-1	+	-	R	HS85-1	-	+	R
HS82-2	+	-	R	HS85-2	+	+	R
HS82-3	-	+	R	HS85-3	-	+	R
HS82-4	+	+	R	HS85-4	+	+	R
HS82-5	+	-	R	HS85-5	+	+	R
HS82-6	+	+	R	HS85-6	+	+	R
HS82-7	+	+	R	HS85-7	+	+	R
HS82-8	-	+	R	HS85-8	-	-	S
HS82-9	-	+	R	HS85-9	+	+	R
HS82-10	+	-	R	HS85-10	+	+	R
HS82-11	+	+	R	HS85-11	+	+	R
HS82-12	+	-	R	HS85-12	+	+	R
HS82-13	-	+	R	HS85-13	+	+	R
HS82-14	+	+	R	HS85-14	-	-	S
HS82-15	+	-	R	HS85-15	+	+	R
HS82-16	-	+	R	HS85-16	+	+	R
HS82-17	+	+	R	HS85-17	+	+	R
HS82-18	-	+	R	HS85-18	+	+	R
HS82-19	-	+	R	HS85-19	+	+	R
HS82-20	+	-	R	HS85-20	+	+	R
HS82-21	+	+	R	HS85-21	+	+	R
HS82-22	+	+	R	HS85-22	-	+	R
HS82-23	+	-	R	HS85-23	+	+	R
HS82-24	+	-	R	HS85-24	-	-	S
HS82-25	+	+	R	HS85-25	+	+	R

注: +. 具有特异标记; -. 无特异标记。
Note: +. Indicates specific band; -. Indicates no band.

1.2.5 SSR-PCR 扩增 PCR 扩增于 Applied Biosystems 9700 上进行。

反应体系 30 μL: 含有 10 ng 模板 DNA ,引物

P1、P2 各 10 pmol ,1.5 mmol/L MgCl₂ ,0.2 mmol/L dNTPs ,1 U *Taq* 聚合酶 ,ddH₂O 补至 30 μL。反应条件为 95℃ 变性 3 min; 95℃ 45 s ,55℃ 45 s ,72℃ 1

有 DNA 用量少、操作简便、快速等优点,是分子标记辅助育种的首选。本研究利用特异 PCR 标记,在几天内从 F_2 50 个植株中检测出 2 个抗病基因聚合植株 47 株。再次说明分子标记特别是 PCR 标记辅助选择的高效率和优越性。目前,水稻多个抗稻瘟病基因已建立 SSR、RAPD、RDLP、STS 等标记,充分利用这些 PCR 标记,在水稻育种实践中开展标记辅助选择和抗病基因聚合,对于促进这些材料农艺性状的不断改进,实现抗病持久性和广谱性具有重要作用。

参考文献:

- [1] Zeigler R S, Leong S, Teng P S. Rice blast disease [M]. Wallingfor, UK: CAB International, 1994: 267 – 292.
- [2] Baker B, Zambryski P, Staskawicz B, *et al.* Signaling in plant-microbe interactions [J]. Science, 1997, 276: 726 – 733.
- [3] 董继新, 董海涛, 李德葆. 水稻抗瘟性研究进展 [J]. 农业生物技术学报, 2000, 8(1): 99 – 102.
- [4] Jeung J U, Kim B R, Cho Y C, *et al.* A novel gene, *Pi40(t)*, linked to the DNA markers derived from NBS-LRR motifs confers broad spectrum of blast resistance in rice [J]. Theor Appl Genet, 2007(115): 1163 – 1177.
- [5] 刘洋, 徐培洲, 张红宇, 等. 水稻抗稻瘟病 *Pib* 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.
- [6] 陈学伟, 李仕贵, 马玉清, 等. 水稻抗稻瘟病基因 *Pi-d(t)*¹、*Pi-b*、*Pi-ta*² 的聚合及分子标记选择 [J]. 生物工程学报, 2004, 20(5): 708 – 713.
- [7] 卢扬江, 郑康乐. 提取水稻 DNA 的一种简易方法 [J]. 中国水稻科学, 1992, 6(1): 47 – 48.
- [8] 张增艳, 陈孝, 张超, 等. 分子标记选择小麦抗白粉病基因 *Pm4b*、*Pm13* 和 *Pm21* 聚合体 [J]. 中国农业科学, 2002, 35(7): 789 – 793.