

水稻 Pi 基因分子标记的物理图谱锚定

刘华招², 陈温福¹, 刘 延²

(1 沈阳农业大学 水稻研究所, 辽宁省北方粳稻育种重点开放实验室 辽宁 沈阳 110161; 2 黑龙江省农垦科学院, 黑龙江 佳木斯 154007)

摘要: 整理国际注册或期刊报道的已定位 Pi 基因, 并在物理图谱上锚定, 为抗稻瘟病基因—Pi 基因的精细定位、图位克隆提供研究基础。利用 www.gramene.org 网站公布的 Pi 基因的分子标记, 在测序图谱 Gramene Annotated Nipponbare Sequence 2006 上进行物理图谱锚定。通过本研究把已定位的 89 个 Pi 基因的 42 个锚定到其物理图谱的 28 个位点上。这 42 个 Pi 基因, 除了已克隆的 11 个基因外, 其余的均可作为 Pi 克隆基因的候选基因作进一步的研究。

关键词: Pi 基因; 物理图谱; 锚定

中图分类号: Q78 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-7091(2009)增刊-0005-04

Rice Pi Genes Molecular Markers Anchored to the Physics Map of Rice Genome

LIU Hua-zhao², CHEN Wen-fu¹, LU Yan²

(1. Rice Research Institute, ShenYang Agricultural University, Key Laboratory of Northern Japonica Rice Breeding of Liaoning, ShenYang 110161, China; 2. Land Reclamation Academy of Heilongjiang Province, Jiamusi 154007, China)

Abstract Rice blast resistance genes Pi genes was reorganized based the international registration or the periodical reports and anchored to the rice genome physics map. The study was conducted to provide the foundation for the Pi gene's fine localization and chart position clone. Molecular markers of Pi genes was anchored from www.gramene.org website to the physics map of Gramene Annotated Nipponbare the Sequence 2006. 42 Pi genes of 89 has lit through this research anchored which locates to the physics map 28 units places. 42 Pi genes, besides already 11 genes which had been cloned other may do the further research as the Pi clone gene candidate gene.

Key words: Rice blast resistance genes Pi genes; Physics map; Anchor

水稻是世界上最重要的粮食作物之一, 约为一半以上人口的口粮, 然而目前水稻生产主要面临两大问题, 一方面是人口的不断增长和可耕种面积不断减少, 另一方面由于病原菌与害虫等生物胁迫引起的危害。稻瘟病是危害水稻生产的三大主要病害之一, 是由 (*Pyricularia grisea*) 真菌引起的最具毁灭性的水稻病害之一, 每年均有不同程度的发生, 稻瘟病流行年份重病区一般减产 10% ~ 20%, 严重的地方减产 40% ~ 50%, 甚至有的地方颗粒无收。目前选育和利用抗病品种是控制稻瘟病的有效手段, 但是稻瘟病菌小种具有高度变异性, 致使新审定抗病品种推广 3 ~ 5 年后, 即能产生侵染该品种的优势小

种, 从而引起品种抗性丧失。对水稻稻瘟病持久抗性的问题一直得到各国科学家的广泛关注, 20 世纪 60 年代开始发掘和利用稻瘟病抗性基因 (Pi 基因)。分子生物学技术加速了这一领域的发展, 优异抗性基因 Pi9、Pi33 等的发现, 掀起了发掘抗稻瘟病新基因的热潮, 本研究回顾 Pi 基因的鉴定、定位, 并在物理图谱锚定了相关基因, 筛选克隆广谱 Pi 基因的候选基因提供参考。

1 材料和方法

首先查询大量文献, 主要来源于 <http://www.ricedata.cn/>, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> 获得 Pi

收稿日期: 2009-09-18

作者简介: 刘华招 (1978-) 男, 黑龙江人, 助理研究员, 在读博士, 主要从事水稻抗病育种研究。

通讯作者: 陈温福 (1955-) 男, 辽宁法库人, 教授, 博士, 主要从事水稻遗传育种和高产栽培研究。

抗病基因的分子连锁标记。通过 www.gramene.org 网站查询 P 抗病基因连锁标记的物理位置, 进行 P i 基因物理图谱锚定。

水稻全基因组序列图谱已公布 www.gramene.org 并确定了大部分标记的物理位置, 这为 P 基因锚定到一个物理图谱中提供了条件。本研究以 GRAMENE网站公布的日本晴的测序图谱 Gramene Annotated Nipponbare Sequence2006为基础, 用与 P i 基因遗传距离较近分子标记构建新的 P 基因图谱。对于与 P 基因紧密连锁的还没有在物理图上锚定的分子标记, 利用引物序列在 NCBI网站通过 BLAST程序对粳稻基因组序列进行比对, 将其定位到合成的物理图上, 从而确定该分子标记在染色体上的物理顺序。

表 1 截至 2008 年 12 月已定位的主效稻瘟病抗性基因
Tab 1 Summary of identified Pi genes to rice blast up to December 2008

染色体 Chr	基因 Gene	连锁标记 Linked Marker	染色体 Chr	基因 Gene	连锁标记 Linked Marker
1	Pi5 (粳)	经典遗传与 Pi 连锁	11	Pi30 (粳)	
2	Pi19	RG520-RG446b	11	P34	C1172-C30038
2	Pi44 (粳)	同工酶基因 Amp1 连锁	11	P38	RM206 RM21
2	Pi46 (粳)	同工酶基因 Amp1 连锁	11	P44	AF349(3.3 cM)
4	Pi1 (粳)		11	P7	RG103-RG16间 5~10 cM
4	P21	G271(5.0) - G317(8.5 cM)	11	P12	
4	Pi5 (粳)	RG788	11	PiCG9 (粳)	S2712(1.0 cM)
4	Pish	经典遗传	11	Pii9	
4	Pit	经典遗传	11	Piht2	R4-RZ536
4	Pikuf	经典遗传, 加性作用, 田间抗性	11	PiY (粳)	RM202(3.8 cM)
5	Pi10	RRF6(3.8)-RRH18(2.9 cM)	11	Pia	经典遗传
6	Pi3 (粳)	同工酶基因 Amp3 和色素基因 C 连锁	11	Pif	经典遗传 与 Pik 连锁, 重组值 20%。
6	Pij		11	PiIs.I	经典遗传, 累加作用
6	Pi2		11	Pise1	经典遗传, 加性作用
6	Pi4		11	Pise3	经典遗传
6	P22	Pi2	11	Piku2	经典遗传
6	P8	Amp3(37.6±3%) -Pg12(27.3±2.7%)	12	P20	Pit4 连锁, XNPb402-XNPb88(1.0 cM)
7	Pi7 (粳)	同工酶基因 Es9 连锁	12	Pi57	
8	Pi29 (粳)		12	Pi2	
8	PiGD1 (粳)	XLRfr8(3.6 cM)	12	P21 (粳)	RG869
9	P3	属于 NBS-IRR 类基因	12	Pi31 (粳)	
9	P5	RG498(5 cM) -RG788 (10 cM)	12	Pi32 (粳)	
10	Pi28 (粳)		12	PiGD3 (粳)	RM179(4.9 cM)
10	PiGD2 (粳)	46(3.9 cM)	12	Pih1 (粳)	RG869(5.1 cM)
11	Pi2 (粳)		12	Pi6	RG869-RZ397
11	Pi8	ZR536(5.4 cM)	12	Pih Pi9	经典遗传

2.2 P 抗病基因在染色体上的分布

从表 1、图 1 可以看出, 目前有 7 个 P 基因定位在第 1 染色体上, 并分别被锚定在物理图谱上, 其中 3 个 P35 (粳) (33.0 Mb)、P37 (33.3 Mb)、Pish (33.7 Mb) 分布染色体长臂中部的 SSR 标记的 RM1216 和 RM1003 间, 其余的分散在 1 号的染色体各部, Pit (4.0 Mb) 位于染色体短臂末端 RFLP 标记

2 结果与分析

2.1 广谱 P 抗病基因的鉴定、定位总体情况

截至 2008 年 12 月, 经国际注册或期刊报道的已发现的 P 基因 97 个, 其中已定位的主效抗稻瘟病基因 88 个, 已克隆的 11 个, 还未标定的有 9 个 (定位情况如表 1, 可访问国家水稻数据中心的基因数据库 <http://www.ricedata.cn/gene.htm> 浏览最新整理结果)。已标定的 P 基因分布在除 3 号染色体各染色体, 其中 11 号 (25 个)、12 号 (17 个)、6 号 (15 个) 染色体居多, 7 号 (1 个)、10 号 (2 个)、9 号 (3 个) 染色体少, 通过本研究有 42 个 P 基因标定到物理图谱上的 28 个位点上。

R1613 附近, P24 (粳) (8.9 Mb) 位于染色体短臂中部 SSR 标记 RM259 附近与 K5 连锁^[1], Pi27 (粳) (13.4 Mb)、Pi4 (粳) (24.6 Mb) 位于着丝点附近。

第 2 染色体上定位 7 个 P 基因, 分布在染色体中部 3 个, 染色体长臂末端 4 个, 锚定在物理图谱上有 4 个。其中 Pid (粳) 位于染色体中部 (21.9 Mb) 与 G1314 连锁, Pi8 (粳) (34.7 Mb)、Pib (35.0 Mb)、Pih

25 (36.8 Mb) 位于染色体长臂末端, 其余的未锚定的 $Pi4(t)$ 、 $Pi6(t)$ 与同工酶标记 $Amp1$ 连锁, 位于染色体中部 RFLP 标记 $XNp1223$ 附近^[2,3], $Pi9$ 位于染色体长臂末端 RG520-RC446 b 之间, 在 $Pi-b$ 下端 20 cM 左右^[4]。

4 号染色体上报道的 P 基因有 3 个, $Pi(t)$ 、 $Pik1$ 与水稻稻瘟病抗性相关, $Pi1$ 位于染色体长臂中部 RFLP 标记 $Q271$ 附近, 隐性基因; 定位在 5 号染色体上的 $Pi0$ 位于长臂 $RRF6$ 和 $RRH8$ 之间^[5], $Pi26(t)$ 、 $Pi23$ 分别位于短臂 SSR 标记 $RM267$ 、 $RM516$ 附近。7 号染色体仅定位一个 $Pi7$ 基因, 与同工酶基因 $Es9$ 连锁^[6]。

锚定在 6 号染色体物理图谱 3 个位点 10 个基因, 其中 $Pi-z$ (10.4 Mb) 位点的密集 8 个基因, 成簇状分布, 其中 $Pi-z$ 、 $Pi9$ 、 $Pi-8m$ 、 $Pi-z$ 、 $Pi-z$ 等位, 另外 3 个 P 基因为 $Pi2$ 、 $Pi26$ 、 $Pi40(t)$ 其他 2 个位点着丝点两侧 $Pi25$ (12.1 Mb)、 $Pi-d$ (18.3 Mb)。定位在 6 号染色体 $Pi1$ 、 $Pi2$ 基因与水稻稻瘟病抗性相关, $Pi3(t)$ 、 $Pi8$ 与同工酶基因 $Amp3$ 连锁, $Pi9$ 位于长臂末端 C236 和 RC653 之间。

$Pi36$ 、 $Pi33$ 、 $Pi4$ 被锚定 8 号染色体的物理图 12.8 13.5 21.1 Mb 座位上, 另外两个 $PiGD1(t)$ 、 $Pi29(t)$ 与 P 抗病基因有关。定位在 9 号染色体 $Pi15$ 与 $Pi1$ 连锁, $Pi1$ 位于 RG498 和 RG788 之间, $Pi3$ 属于 NBS-LRR 类基因。10 号染色体仅定位 $PiGD2(t)$ 、 $Pi28(t)$ 两个与 P 抗病相关的基因。

11 号染色体定位的抗稻瘟病基因是最多的, 目前为止已定位了 25 个, 长臂末端 SSR 标记 $RM1233$ 和 $RM27369$ 间密集着 9 个 P 基因, 其中 Pik 、 $Pik8(t)$ 、 $Pik8$ 、 $Pikp$ 、 $Pikm$ 、 $Pikh$ 等位, 其他非等位 $Pih1(t)$ 、 Pil 、 $Pi1$, 其余 16 个基因在 11 号染色体各部位均有分布。在 12 号染色体上已定位的抗稻瘟病基因 (P) 有 17 个, 这些基因主要集中在染色体中部着丝点附近, 染色体短臂着丝点附近 SSR 标记 $RM27933$ 和 $RM27940$ 间密集 5 个基因, 其中 $Pi-ta$ 、 $Pi-ta$ 、 $Pi-ta$ 、 $Pi9$ 等位, $Pi20$ 与 $Pi-ta$ 连锁, 位于 $XNp402$ 和 $XNp188$ 之间, 其余的 $PiGD3(t)$ 、 $Pih1(t)$ 、 $Pi2(t)$ 、 $Pi31(t)$ 、 $Pi9$ 、 $Pi57$ 、 $Pi1(t)$ 、 $Pi2$ 等基因与品种抗病高度相关。

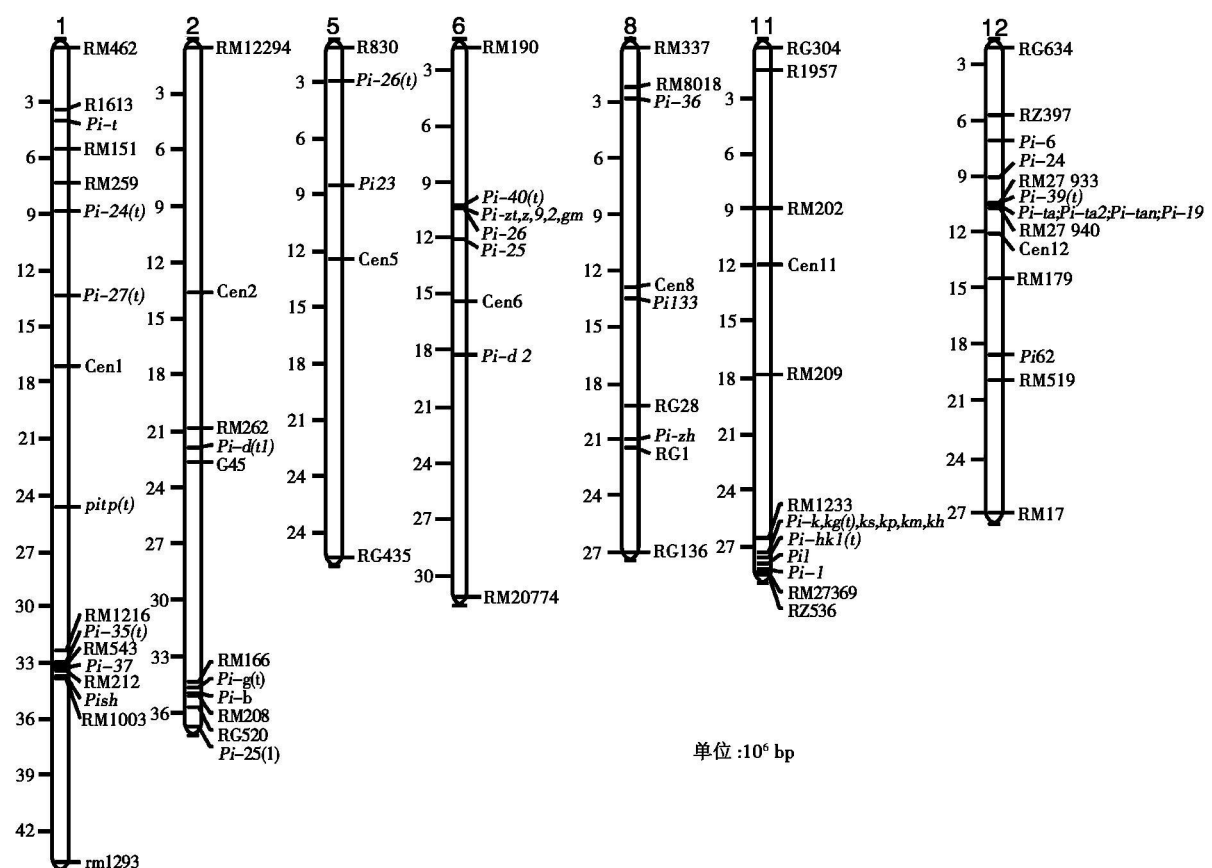


图 1 P 抗病基因在物理图谱上的锚定
Fig 1 Anchors of identified Pi Genes on Phytomaps

3 讨论

3.1 P抗病基因定位对 Maas实践指导意义

稻瘟病是严重制约水稻高产稳产的真菌性病害, 培育抗病品种是控制稻瘟病最经济、环保的办法, 而定位广谱抗性基因又是培育抗谱广、稳定的水稻品种的基础。通过 P 基因物理图谱锚定, 了解抗稻瘟病的遗传本质, 提供与抗病基因紧密连锁的锚定在物理图谱分子标记, 为该抗病基因克隆、分子标记辅助育种、基因聚合奠定基础。

3.2 P抗病基因的电子定位

基因定位是对基因在染色体上所在位置的测定。它对研究基因结构、功能和相互作用有着重要意义。常规基因定位方法是通过建立分离群体实现遗传作图, 电子定位是借助一定的生物信息数据库和生物信息软件, 实现基因的快速准确定位。通过此方法快速定位物理图上 28 个位点 42 个 P 基因。

3.3 稻瘟病抗性基因的克隆

抗病基因的克隆是揭示抗病分子机制的重要环节。克隆水稻抗瘟性基因, 解析其编码产物结构和功能, 是揭示寄主与病原菌互作、抗病基因进化及抗病性分子机制的基础。目前, 采用图位克隆方法已经克隆出 11 个抗瘟基因 (Pi-b Pi-ta Pi-f Pi-g, Pi-d, Pi-8n, Pi-kn, Pi-2, Pi-z Pi-37, Pi-36), 除 Pi-d 基因, 均属于 NBS-IRR 类基因。

参考文献:

- [1] Sallaud-C Lorieux M Roumen E et al Identification of five new blast resistance genes in the highly blast resistant rice variety IR64 using a QTL mapping strategy [J]. Theoretical and Applied Genetics 2003 106(5): 794—803
- [2] Pan Q-H Wang L Ikehashi H et al Identification of two new genes conferring resistance to rice blast in the Chinese native cultivar 'Maowangu' [J]. Plant Breeding 1998 117(1): 27—31
- [3] Pan Q-H Wang L Tanisaka T A new blast resistance identified in the Indian native rice cultivar Aus73 through allelism and linkage tests [J]. Plant Pathology 1999 48(2): 288—293
- [4] Tabien R-E Li Z Paterson A-H et al Mapping of four major rice blast resistance genes from 'Lemont' and 'Teqing' and evaluation of their combinatorial effect for field resistance [J]. Theoretical and Applied Genetics 2000 101(5): 1215—1225
- [5] Navin N, I Chao B-B Development of a sequence characterized amplified region (SCAR) based indirect selection method for a dominant blast resistance gene in rice [J]. Genome (National Research Council Canada), 1996 39(2): 26—30
- [6] Pan Q-H Tanisaka T Ikehashi H Studies on the genetics and breeding of blast resistance in rice VI Gene analysis for the blast resistance of two Yunnan native cultivars GA20 and GA25? [J]. Breeding Science 1996 46(1): 70—76