

抗稻瘟病基因 *pi5* 检测标签的设计及验证^①

郑文静^{1,2}, 丛 玲², 王 妍³,

赵家铭¹, 张丽霞¹, 陈温福¹

1. 辽宁省农业科学院, 沈阳 110161; 2. 沈阳农业大学 水稻研究所, 沈阳 110161;

3. 沈阳农业大学 植物保护学院, 沈阳 110161

摘要: 稻瘟病是在世界范围内广泛分布的水稻真菌病害, 控制该病的为害必须有效利用抗稻瘟病基因. 抗病基因 *pi5* 包含 2 个独立遗传的 NBS-LRR 类基因 *Pi5-1* 和 *Pi5-2*, 为了解该基因的抗谱并使其在抗病育种中得以有效利用, 本研究利用辽宁地区分离出的 6 群 15 个生理小种对携带该基因的单基因系接种, 结果表明单基因系对其中 12 个生理小种表现中抗或抗病, 只对其中 3 个小种表现中感或感病, 这说明 *pi5* 抗病基因抗谱较宽, 是一个可在辽宁地区广为使用的广谱抗稻瘟病基因. 为了提高该基因的选择效率, 使其在抗病品种选育中发挥更大的作用, 本研究根据 *pi5-1* 和 *pi5-2* 的 CDS 序列设计特异性引物, 并通过基因扩增和测序比对, 获得了 6 对用于育种亲本材料或杂交后代抗稻瘟病基因型检测的标记, 为携带 *pi5* 抗病基因育种材料的分子标记辅助育种提供了参考.

关 键 词: 稻瘟病; 抗病基因; *pi5*; 检测标签

中图分类号: S435.111.4⁺1

文献标志码: A

文章编号: 1673-9868(2014)9-0015-08

稻瘟病 *Pyricularia grisea* cav. 是由稻瘟病菌 (*Magnaporthe oryzae*, 无性态: *Pyricularia*) 引起的水稻病害^[1], 其分布范围十分广泛, 据统计, 全世界 80 余个国家均有发生, 一般流行年份可造成 10%~20% 的减产, 严重发生时可达到 40%~50%^[2]. 20 世纪 90 年代以来, 我国稻瘟病的年发生面积均在 380 万 hm^2 以上, 每年损失稻谷达数亿千克^[3]. 近年来, 随着品种应用的单一化、集中化以及气候的影响, 稻瘟病的为害也越来越重. 尽管人们在病害防治上耗费了巨大的精力和物质投入, 但限于诸多方面因素的影响, 防病效果一直不尽人意, 尤其在病害严重发生年份, 常常给生产、育种造成重大损失. 以辽宁省为例, 自 20 世纪 90 年代起, 分别发生了因辽粳 287、辽盐 241、辽粳 454 和辽星 1 号几个主栽品种抗病性退化导致的穗颈瘟大面积发生, 严重影响了北方粳稻的生产. 产生这种现象的根本原因就是主栽品种对稻瘟病菌的抗谱狭窄, 且单一化、集中化种植现象普遍, 这样一旦稻瘟菌流行小种发生变化, 品种对稻瘟病的抗性便迅速下降^[4]. 因此, 选育聚合多基因或具广谱抗性的水稻品种尤为必要.

目前, 在抗稻瘟病品种选育的过程中, 育种家主要选用系谱法或结合分子标记辅助选择抗病个体. 传统的系谱法通过两亲本组配, 从分离后代中择优选育品种, 抗瘟表型依赖于田间自然鉴定或人工接种鉴定, 鉴别难度大, 准确率低.

由于不了解亲本的抗瘟基因型, 育种者在亲本选择上非常盲目, 通常是海量配组, 海量选择后代, 工作量大, 育种效率低. 在利用分子标记辅助选择进行抗病育种时, 所选用的多是与抗病基因连锁的 SSR 标

① 收稿日期: 2013-03-13

基金项目: 辽宁省博士启动基金资助项目(20121143); 辽宁省科技攻关资助项目“主要农作物生物育种技术研究”(2011208001).

作者简介: 郑文静(1974-), 女, 吉林公主岭人, 博士, 研究员, 主要从事水稻分子遗传改良研究.

通信作者: 陈温福, 中国工程院院士, 博士生导师.

记^[5-7],易造成假阳性的判断,如能根据抗感等位基因本身的 CDS 序列差异来设计不同基因的共分离标记,不仅可首先检测亲本所携带的抗瘟基因,也能在后代辅助选择时大大提高抗性品种选择的准确性.

本试验首先用辽宁地区流行的 6 群 15 个稻瘟病生理小种接种,鉴定 *pi5* 单基因系的抗谱,再根据该抗病基因的 6 段外显子序列设计引物,对 24 个主栽水稻品种扩增,并测定 PCR 产物的序列,比较不同品种间等位基因序列的差异,从而筛选出与 *pi5* 抗病基因共分离的显性标记和共显性标记,以用于其他水稻材料中该基因的鉴定及后代材料的分子标记辅助选择.

1 材料和方法

1.1 供试水稻材料

供试水稻材料由辽宁省农业科学院水稻研究所提供(表 1).

表 1 供试水稻品种

序 号	品 种 名	序 号	品 种 名
1	秋田小町 Qiutianxiaoding	13	辽农 979 Liaonong 979
2	丽江新团黑谷 LTH	14	盐丰 456 Yanfeng 456
3	辽粳 454 Liaojing 454	15	辽粳 371 Liaojing 371
4	辽盐 241 Liaoyan 241	16	千重浪 2 号 Qianchonglang 2
5	秋光 Qiuguang	17	沈稻 7 Sehndao 7
6	辽粳 294 Liaojing 294	18	沈农 265 Shennong 265
7	盐丰 47 Yanfeng 47	19	铁粳 4 Tiejing 4
8	C418	20	辽盐 2 Liaoyan 2
9	辽星 1 Liaoxing 1	21	越光 Yueguang
10	辽粳 9 Liaojing 9	22	港源 8 号 Gangyuan 8
11	辽粳 101 Liaojing 101	23	港育 129 Gangyu 129
12	辽开 79 Liaokai 79	24	<i>Pi5</i> 单基因系 Single-gene line <i>pi5</i>

1.2 供试稻瘟病菌株

稻瘟病菌株为田间分离纯化的利用中国 7 个鉴别小种鉴别的 6 群 15 个生理小种,均为辽宁地区流行小种,由沈阳农业大学植物保护学院刘志恒教授提供.

2 试验方法

2.1 人工接种鉴定单基因系抗谱

2.1.1 稻瘟病菌产孢培养

将稻瘟病菌分别移植于燕麦片番茄汁琼脂培养基上,25~27 ℃条件下培养 5~7 d,待菌丝长满,用灭菌的棉签擦掉气生菌丝后保湿培养,稻瘟病菌会大量产孢.

2.1.2 喷雾接种鉴定

待鉴别品种稻苗长至 4 叶 1 心时,将上述扩繁培养的各菌株分生孢子分别用 120 mL 无菌水清洗,用双层纱布过滤装入三角瓶中,配制孢子悬液(单位为 120 倍显微镜视野下有 20 个左右孢子),分别隔离喷雾接种.接种后 24 h,用塑料膜覆于塑料盘上方的铁架上保湿,在塑料膜上覆盖遮阳网防止阳光直射.

2.1.3 致病反应型调查

于接种后 10 d 调查,致病反应型参照统一标准进行评定^[8].

2.2 抗病鉴定圃田间自然鉴定稻瘟病抗性

于病害重发区辽宁省东港市大孤山镇抗病鉴定圃进行田间自然鉴定,该地区雾露时间长,日照时间短,水稻整个生育期的日平均气温达到 22~26 ℃,具有利于发病的地理环境条件,历年稻瘟病发生均非常严重.每个供试品种设 1 个小区,5 行,每行 10 丛,行株距为 30 cm×16 cm,各品种随机排列,2 次重复.

病圃四周插植诱发品种 3~6 行。在水稻全生育期保持适当水层，适当增施一些氮肥，根据病圃害虫、杂草发生种类和程度使用杀虫剂、除草剂，不喷施杀菌剂。

2.3 水稻基因组提取

采用改良的 CTAB-氯仿-异戊醇法进行水稻基因组 DNA 提取^[9]，取 3 叶期水稻嫩叶约 0.1 g 于液氮中研磨，加入 CTAB 裂解缓冲液(10% CTAB、5 mol/L NaCl、1 mol/L、pH 值 8.0 Tris-HCl、0.5 mol/L EDTA)，氯仿/异戊醇(24：1)抽提 2 次，用异丙醇沉淀、乙醇洗涤，干燥后加入 1×TE 缓冲液溶解 DNA，保存于-20 ℃备用。

2.4 引物设计

利用 DNAMAN 软件，遵循引物设计原则，根据两基因的 CDS 序列设计 8 对引物，详见表 2。

表 2 用于 *pi5* 抗病基因检测的引物

引物名称	引 物 序 列	目的片段长度/bp
<i>Pi5</i> -1-1	F: ATGGTTGGCGCCGAGATGCT R: ATCGAACTGC TCCTTGGAAG	294
<i>Pi5</i> -1-2	F: CGCTATCCAATCCAATGCTTCTG R: ACATCAAGTGGCAAGGTTCCATG	1 066
<i>Pi5</i> -1-3	F: TTCGCATGCATAAATTGGCTCAT R: CTCAGTGACAATTTCAGGCTCCT	1 280
<i>Pi5</i> -1-4	F: CCAAGTGCAACTAGAGGTATGGT R: GTGCATCATCTTCAGATATCAGG	1 105
<i>Pi5</i> -2-1	F: AGCATAGACGAGGACATGGC R: GAACTTCTTGCTCATTGGAT	642
<i>Pi5</i> -2-2	F: TCCAATGAG CAAGAAGTTC TG R: TGCTATCCACTGTTCAATAAG	885
<i>Pi5</i> -2-3	F: CACCAGAATCAGAGACACCAATC R: TCACTCCCTCCAATATCTCCAG	960
<i>Pi5</i> -2-4	F: ACGATTCTTATCAGCTGCAGT R: GACCAGACATCTTCTCTTCGG	741

2.5 PCR 扩增

根据两基因 CDS 设计的引物，委托北京奥科生物科技有限公司合成，PCR 反应程序为：94 ℃预变性 5 min，94 ℃变性 30 s，55~61 ℃退火 30 s，72 ℃延伸 30~60 s，30 个循环，72 ℃延伸 10 min。

2.6 电泳检测基因扩增结果

取 4 μL PCR 产物，在 1%琼脂糖凝胶中电泳，经 goldview 染色，在凝胶成像系统下拍照。

2.7 PCR 产物测序比对

PCR 产物利用双脱氧终止法测序，所用仪器为 ABI3730XL(委托中美泰和生物技术有限公司完成)，序列读出后用 DNAMAN 软件比对分析。

3 结果分析

3.1 *Pi5* 单基因系的抗谱鉴定结果

pi5 单基因系的抗谱利用 6 群 15 个生理小种接种鉴定，结果表明(图 1)：利用 ZB5 和 ZD7 对 *pi5* 单基因系接种，叶片上病斑典型，长 1~2 cm，为害面积 2%以下，表现为中感(MS)；利用 ZE3 接种，*pi5* 单基因系叶片上出现典型病斑，为害面积 3%~10%，表现为 MS；而其余 12 个小种对该单基因系接种时，叶片上均只有小于 2 mm 的褐点，表现中抗或抗病。表明 *pi5* 为抗谱较宽的抗稻瘟病基因，可用于

品种的抗瘟性改良.

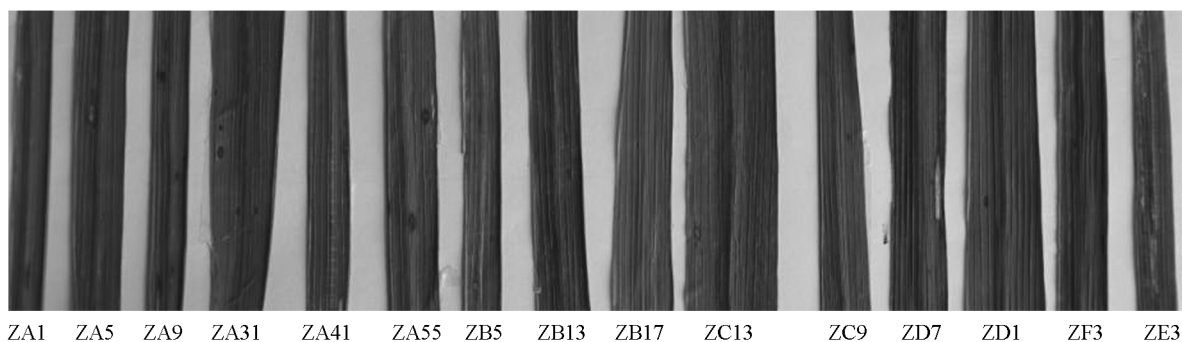


图 1 *Pi5* 单基因系抗谱鉴定结果

3.2 *Pi5* 单基因系田间自然鉴定结果

由图 2 可见,对照品种丽江新团黑谷叶片上出现典型梭形病斑,为害面积达 50%以上,对稻瘟病表现为高感(HS);而 *pi5* 单基因系叶片上只有针尖大小的褐点,对稻瘟病表现为抗病(R).说明该基因可对当地田间流行的混合小种具主效抗性.

3.3 主栽水稻品种 CDS 序列的扩增结果及序列分析

3.3.1 *pi5*-1

图 3 为根据 *pi5*-14 段外显子序列设计的引物以 24 个品种 DNA 为模板扩增的结果.由图 3 可见,第 1 段外显子,所有品种均可扩增出特异性条带(294 bp),但序列分析结果表明(图 4),24 个品种的碱基序列分成 2 种类型,其中 1(秋田小町),13(辽农 979)和单基因系序列一致,另外 21 个品种中检测到 13 个单核苷酸突变(SNP).但由图 5 可见,翻译后的

氨基酸序列结果显示其中 12 个 SNP 为同义突变,只有一个错义突变发生在 CDS 62 处,感病等位基因由 A 突变成 G,造成翻译后第 21 位氨基酸由天冬酰胺(D)突变成甘氨酸(G).

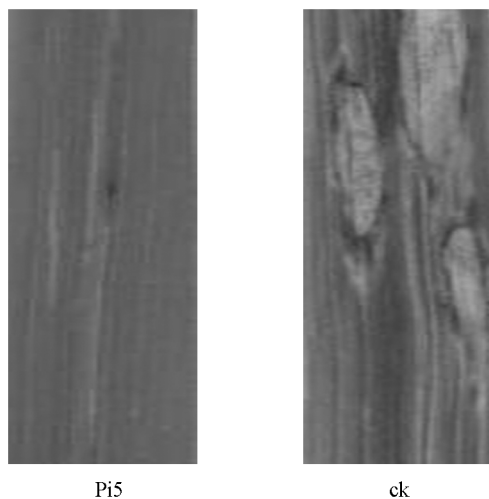


图 2 *Pi5* 单基因系田间自然鉴定结果

第二段外显子,只有 1,13 和单基因系可扩增出特异性条带(图 3),测序结果表明两品种此段外显子的序列与单基因系和基因组完全一致;

第三段外显子与第一段的扩增结果类似,所有品种均可扩增出特异性条带(图 3),但测序结果表明各品种间的碱基序列仍有较大差异(图 6).其中 1,13 与基因组序列更接近,但仍有一些微小差异,翻译后的氨基酸序列与基因组相比有 3 处突变(图 6 中列出 2 处).而感病等位基因则在 75,102,247 和 621 bp 处共发生 4 处 C/T 突变,另外在 103 bp 等处还检测到 8 个 SNP.从翻译后的氨基酸序列比对结果看,1,13 号品种的 3 个 SNP 均造成氨基酸序列的改变,而另外 21 个品种中,14 个 SNP 中只有 6 个是错义突变,其余 8 个均为同义突变(图 7).

将 *pi5*-1-3 的氨基酸序列在 <http://pfam.sanger.ac.uk/search> 上查询,发现该区域包含 3 个 LRR 结构域,与图 7 对比发现,1,13 发生基因突变的区域(34,67,70)均不包含在几个结构域中,预计对小种专化性抗性影响不大,而感病等位基因有 3 处氨基酸突变发生在第 3 个结构域内(图 8).

第 4,5 段外显子的扩增结果在品种间有多态性,1,13 和单基因系扩增出的片段较其他品种稍短(图 3),测序结果显示,21 个品种在 *pi5*-1 基因组 9 985 bp 处插入了 161 bp(图 9 的灰色部分),由于该区域位于第 4 和 5 段外显子间的内含子区域,因此对翻译后的氨基酸序列没有影响,但这种插入突变和 *pi5*-1 基因是共分离的.

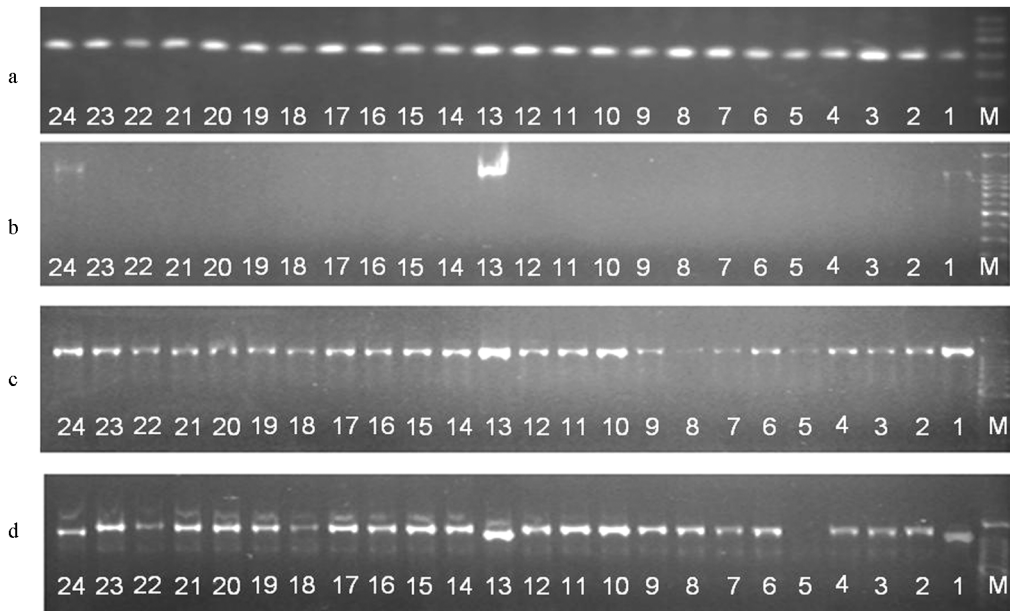


图 3 中 a-d 分别表示第 1 至第 4 段外显子.
图 3 *pi5*-1 基因 4 段外显子的扩增结果

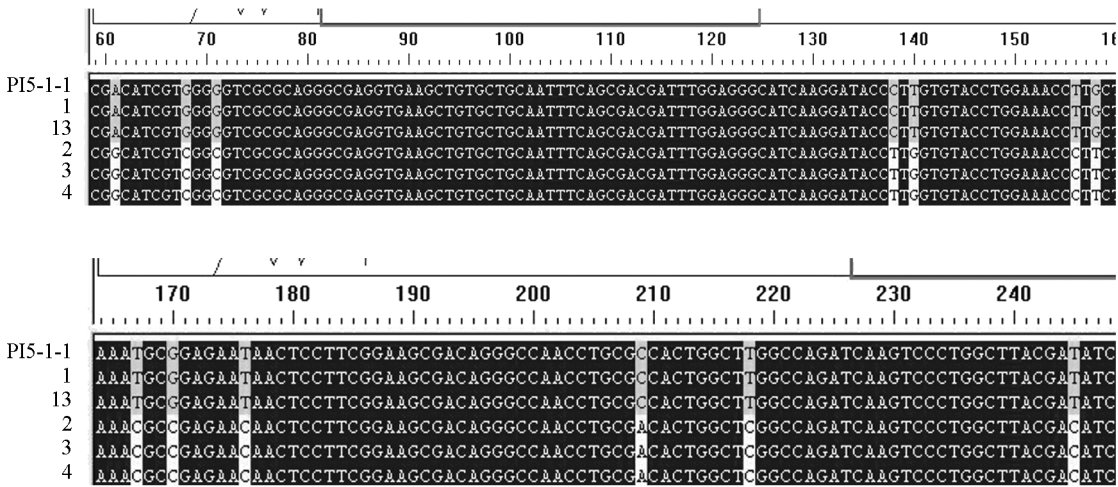


图 4 *pi5*-1-1 的 DNA 序列比对结果

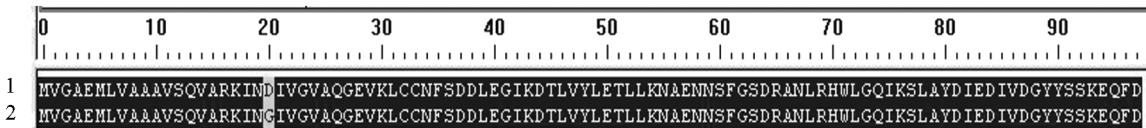


图 5 中“1”为 1,13 号品种及 *pi5* 基因组翻译的氨基酸序列,“2”为其余 21 个品种翻译的氨基酸序列.

图 5 *pi5*-1-1 的氨基酸序列比对结果

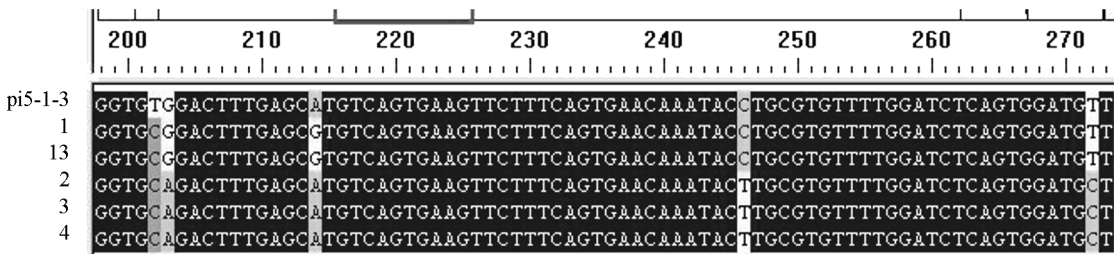


图 6 *pi5*-1-3 的 DNA 序列比对结果

3.3.2 *pi5-2*

图 10 为 *pi5-2* CDS 序列的扩增结果,可以看出 4 段外显子扩增结果一致,均只有 1,13 和单基因系可扩增出特异性条带.经比较,1,13 两品种的序列与单基因系和基因组完全一致.

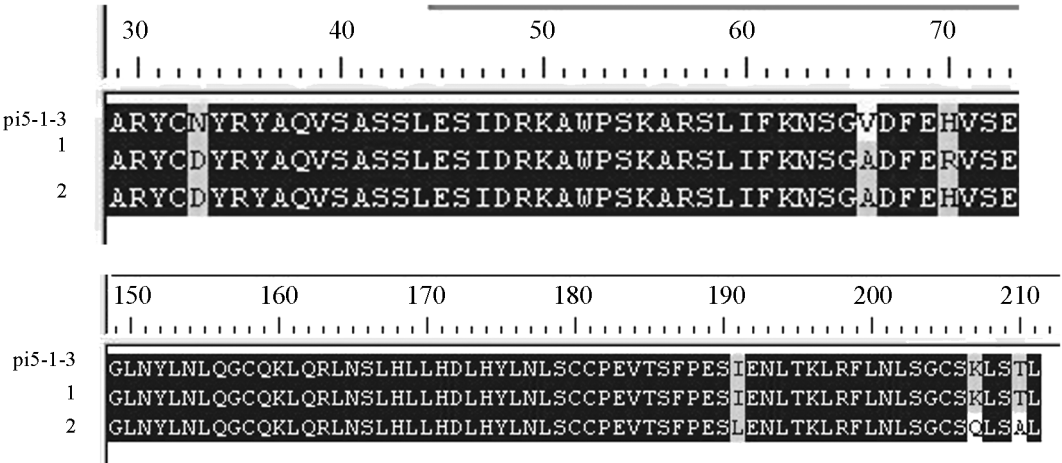


图 7 *pi5-1-3* 的氨基酸序列比对结果

Family	Description	Entry type	Clan	Envelope		Alignment		HMM	
				Start	End	Start	End	From	To
LRR_4	Leucine Rich repeats (2 copies)	Family	CL0022	80	125	81	116	2	37
LRR_4	Leucine Rich repeats (2 copies)	Family	CL0022	126	171	127	168	2	42
LRR_4	Leucine Rich repeats (2 copies)	Family	CL0022	173	212	174	210	3	37

图 8 *pi5-1-3* 区域所包含的结构域

```
9901 ataccattat aaggaaatag atcatgcgcc ctcttggtta aaggaatttg atgtttttttt
9961 atattcgctc tctttgagat atac
TCCCTCCGTTTCAATGTAAGTCATTCTAGCATTTCC CACATTTCATATTGATATTAATAAATCAAGACATATATATC
TATCTAGATTTTATTAAGATGAGGTTACATCAATATGAATATAGAAAATGCTAGAAATGACTTACATTGTGAAACGG
AGGAAGTAC ctgtca tccagcagtg gtaaaaagga tagtatatag
```

图 9 第 4 及第 5 段外显子间的插入片段

4 结论与讨论

结合 *pi5-1* 和 *pi5-2* 的电泳及测序分析结果,可见在参试的 24 个品种中,*pi5-1* 和 *pi5-2* 两个基因是连锁的,而 *pi5-1-2*,*pi5-1-4*,*pi5-2-1*,*pi5-2-2*,*pi5-2-3* 和 *pi5-2-4* 这 6 个标记与两个基因共分离,利用其中任意一对引物均可鉴定该基因,*pi5-1-4* 为共显性标记,可用于分离后代的选择,其余 5 个标记为显性标记,可在亲本基因型鉴定中选择应用.

追溯稻瘟病抗病基因的来源,发现已克隆的 22 个抗瘟基因中只有 *pi9* 来自野生稻,而已经鉴定的其他 41 个抗病基因也只有 *pi40* 是从澳洲野生稻中分离出来的^[10],这说明目前生产上利用的抗病基因绝大部分来自于栽培稻,而这些品种在长期的育种及栽培过程中不断发生着遗传重组.另外,环境因素也会导致一些基因突变,因此鉴定品种是否携带已知抗病基因及在分离后代中筛选携带抗病基因的个体,仅根据与该基因连锁的标记肯定不够,必须找到与基因共分离程度非常高的标记才行,即便是利用基因本身的序列来筛选,也必须找到与抗病等位基因本身连锁的标记,且应与感病等位基因易于显著区别开,否则分子标记辅助选择的作用将无从谈起.以本研究中 *pi5-1-1* 为例,该标记取自基因序列本身,但其扩增产物的序列在抗病基因和感病等位基因间的差距非常大,而仅凭电泳又无法区分,必须通过测序才能鉴定出二者的差

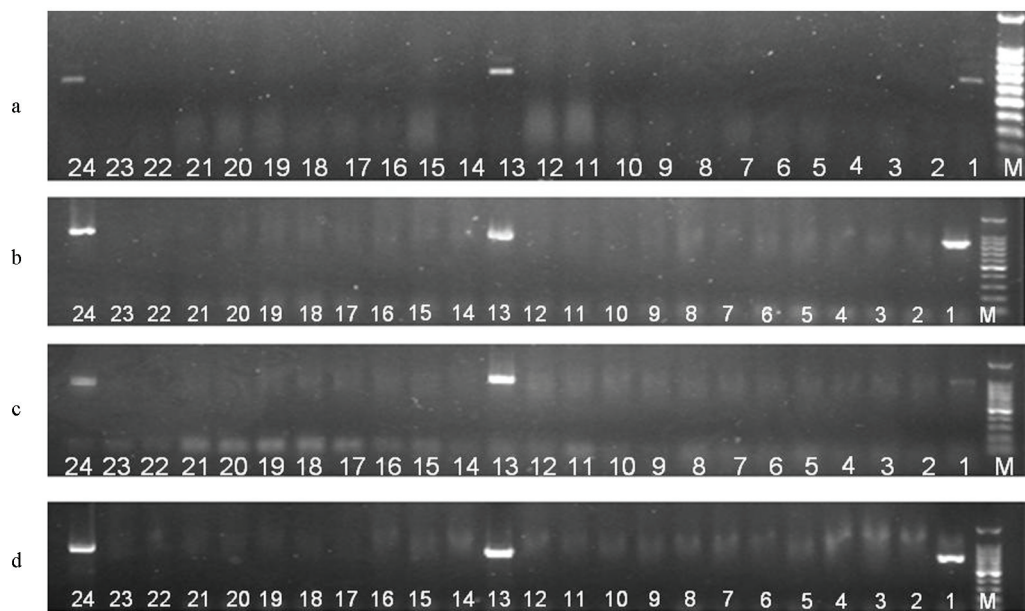


图 10 中 a-d 分别表示第 1 至第 4 段外显子。
图 10 *pi5-2* 基因 4 段外显子的扩增结果

异. 因此, 这类标记在育种中并不方便应用.

另外, *pi5* 单基因抗性鉴定结果表明, 虽然该单基因系在田间自然鉴定时对混合小种表现为 R, 但利用 15 个生理小种单独接种时, 仍有 3 个小种对 *pi5* 单基因系致病, 其中 ZB5 属近年来辽宁省稻瘟病菌优势种群, ZD1 和 ZF3 为非优势种群^[11], 若推广种植的水稻材料中只携带 *pi5* 一个抗病基因, 当推广面积扩大, 尤其是单一品种大面积种植时, 就会对致病小种起到定向选择的作用^[12], 从而导致该品种丧失抗病性. 因此, 将一些与 *pi5* 抗谱互补的其他抗病基因通过杂交及分子标记辅助选择的手段与之聚合, 可提高品种对稻瘟病抗性的稳定性和持久性^[13-14]. 对此, 本课题组也正在开展其他单基因系的抗谱鉴定及抗瘟基因的检测方法研究等工作, 争取创制抗谱广、抗性稳定及持久的多基因聚合材料, 作为育种亲本或品种推广应用.

参考文献:

[1] LIU J L, WANG X J, THOMAS M, et al. Recent Progress and Understanding of the Molecular Mechanisms of the Rice-Magnaporthe Oryzae Interaction [J]. Mol Plant Pathol, 2010, 11(3): 419-427.

[2] DEAN R A, VAN J A, PRETORIUS Z A, et al. The top 10 Fungal Pathogens in Molecular Plant Pathology [J]. Molecular Plant Pathology, 2010, 13(4): 414-430.

[3] BAKER B, ZAMBRYSKI P, STASKAWICZ B, et al. Signaling in Plant-Microbe Interactions [J]. Science, 1997, 276: 726-733.

[4] 宗宪春, 郑险峰, 孔秀英. 杭稻瘟病育种的历史回顾 [J]. 牡丹江师范学院学报: 自然科学版, 1998, 19(9): 8.

[5] 何琳, 靳学慧, 张亚玲, 等. 用 SSR 标记对部分粳稻品种抗瘟基因 Pi-1 的检测 [J]. 黑龙江八一农垦大学学报, 2006, 18(2): 13-15.

[6] 李鼎, 许明辉, 姚春馨, 等. 云南地方核心稻种抗稻瘟病基因 Pid(t) 的 SSR 检测及鉴定 [J]. 西南农业学报, 2008, 21(6): 1583-1586.

[7] 李仕贵, 王玉平, 黎汉云, 等. 利用微卫星标记鉴定水稻的稻瘟病抗性 [J]. 生物工程学报, 2000, 16(3): 324-327.

[8] 全国稻瘟病生理小种联合试验组. 我国稻瘟病生理小种研究 [J]. 植物病理学报, 1980, 10(2): 71-82.

[9] 邱福林, 王和和, 陈洁, 等. 用于水稻突变体大量筛选的 DNA 微量快速提取法 [J]. 中国水稻科学, 2006, 20(3): 329-332.

- [10] 国家水稻数据中心. 稻瘟病主效抗性基因列表 [EB/OL]. (2012-06-20) [2013-03-10] http://www.ricedata.cn/gene/gene_pi.htm.
- [11] 刘志恒, 刘雯雯, 杨红, 等. 2008~2010 年辽宁省稻瘟病菌种群动态分析 [J]. 沈阳农业大学学报: 自然科学版, 2012, 43(2): 159-162.
- [12] 凌忠专, 雷财林, 王久林. 稻瘟病菌生理小种研究的回顾与展望 [J]. 中国农业科学, 2004, 37: 1879-1859.
- [13] 陈学伟, 李仕贵, 马玉清, 等. 水稻抗稻瘟病基因 Pi-d(t)、Pib、Pita 的聚合及分子标记选择 [J]. 生物工程学报, 2004, 20(5): 708-713.
- [14] 陈红旗, 陈宗祥, 倪深, 等. 利用分子标记技术聚合 3 个稻瘟病基因改良金 23B 的稻瘟病抗性 [J]. 中国水稻科学, 2008, 22(1): 23-27.

Design of Detecting Markers to Rice Blast Resistance Gene *pi5* and Their Validation

ZHENG Wen-Jing^{1,2}, CONG Ling², WANG Yan³,
ZHAO Jia-ming¹, ZHANG Li-xia¹, CHEN Wen-fu¹

1. Liaoning Academy of Agricultural Sciences, Shenyang 110161, China;

2. Rice Research Institute of Shenyang Agricultural University, Shenyang 110161, China;

3. Plant Protection College of Shenyang Agricultural University, Shenyang 110161, China

Abstract: Blast is one of the most devastating rice fungal diseases in the world. , and efficient use of the resistance genes is essential. To control the disease fundamentally, using resistance genes efficiently is essential. The resistance gene *pi5* contains the NBS-LRR (nucleotide binding site-leucine-rich repeats) type genes *Pi5-1* and *Pi5-2*, which are of independent inheritance. To ascertain the resistance spectrum of *pi5* and promote its utilization efficiency in resistance breeding, the single-gene line of *pi5* was inoculated with 15 physiological races of rice blast which were separated from Liaoning province and, which belonged to 6 taxa, respectively. The results of the inoculation test showed that the single-gene line of *pi5* was resistant or moderately resistant to 12 physiological races of the was the middle level and stable resistance pathogen, and susceptible or moderately susceptible to only 3 physiological races were pathogenic to single gene line of *pi5*, which indicated that *pi5* is a broad- resistance spectrum resistant gene and is, therefore, well-suited to be used in Liaoning province. To promote the utilization efficiency of *pi5* and applied value in blast resistance breeding of *pi5*, we designed specific primers according to the CDS (coding sequence) of *pi5-1* and *pi5-2*, and by gene amplification and sequence contrasting, 6 pairs of the testing primers were validated shown to be suitable to be used for selection of hybrids and parent germplasm as parents, which maybe contribute to promoting the efficiency and accuracy of resistance breeding.

Key words: rice blast; resistance gene; *pi5*; testing marker

