

赵传超, 丛森, 梁思怡, 等. 水稻抗稻瘟病基因 *Pi2* 的 KASP 标记开发与应用 [J]. 华南农业大学学报, 2023, 44(5): 725-734.
ZHAO Chuanchao, CONG Sen, LIANG Siyi, et al. Development and application of KASP marker for rice blast resistance gene *Pi2*[J]. Journal of South China Agricultural University, 2023, 44(5): 725-734.

水稻抗稻瘟病基因 *Pi2* 的 KASP 标记开发与应用

赵传超[†], 丛森[†], 梁思怡, 谢华斌, 陆文字,
肖武名, 黄明, 郭涛, 王加峰

(华南农业大学 国家植物航天育种工程技术研究中心/广东省植物分子
育种重点实验室, 广东 广州 510642)

摘要:【目的】水稻稻瘟病抗性基因 *Pi2* 对稻瘟病生理小种具有广谱抗性, 开发 *Pi2* 的 KASP 分子标记并对其评价, 为抗稻瘟病水稻品种分子育种提供简便、可靠的基因分型检测方法。【方法】利用 593 份自然群体中筛选出的不同抗性和亲缘关系的 2 份材料 H-74 和 H-78, 针对 *Pi2* 基因核心区域的 SNP 位点开发成 KASP 标记 Pi2-C3。【结果】利用标记 Pi2-C3 对自然群体中的 84 份材料进行 KASP 基因分型, 结果表明, 该标记可以准确地将不同水稻材料的 *Pi2* 位点分为抗病基因型、杂合基因型和感病基因型, 是一种高效鉴定抗稻瘟病基因 *Pi2* 的方法。利用标记 Pi2-C3 对阳江市病圃材料进行检测, 结合表型调查结果发现, 检测到含有 *Pi2* 基因的 46 份材料均表现出不同程度的稻瘟病抗性, 表明该标记可以用于检测材料在病圃的发病情况。【结论】本研究采用 KASP 技术, 开发了能准确检测 *Pi2* 基因的特异性分子标记 Pi2-C3, 并建立一套水稻 *Pi2* 基因的 KASP 基因分型体系, 对提高抗性育种效率, 改良抗稻瘟病水稻品种具有重要应用价值。

关键词: 水稻; 稻瘟病; *Pi2* 基因; KASP 标记; 分子标记; 抗性基因; 基因分型

中图分类号: S435.111.41;S511

文献标志码: A

文章编号: 1001-411X(2023)05-0725-10

Development and application of KASP marker for rice blast resistance gene *Pi2*

ZHAO Chuanchao[†], CONG Sen[†], LIANG Siyi, XIE Huabin, LU Wenyu,
XIAO Wuming, HUANG Ming, GUO Tao, WANG Jiafeng

(National Engineering Research Center of Plant Space Breeding, South China Agricultural University/ Guangdong
Provincial Key Laboratory of Plant Molecular Breeding, Guangzhou 510642, China)

Abstract: 【Objective】The rice blast resistance gene *Pi2* has broad spectrum resistance to physiological race of rice blast. Developing and evaluating KASP molecular markers for *Pi2* will provide a convenient and reliable gene typing method for molecular breeding of rice varieties with blast resistance. 【Method】Two materials H-74 and H-78 with different resistance and genetic relationships selected from 593 natural populations were used to develop KASP marker for the SNP sites in the core region of the *Pi2* gene, named Pi2-C3. 【Result】Using

收稿日期: 2023-04-17 网络首发时间: 2023-06-25 11:24:35

首发网址: <https://kns.cnki.net/kcms2/detail/44.1110.S.20230625.0846.002.html>

作者简介: 赵传超, 硕士研究生, 主要从事水稻遗传育种研究, E-mail: 411145013@qq.com; 丛森, 硕士, 主要从事抗稻瘟病分子标记研究, E-mail: congs@nfu.edu.cn; †表示同等贡献; 通信作者: 郭涛, 教授, 博士, 主要从事水稻育种技术创新及其应用, E-mail: guoguo@scau.edu.cn; 王加峰, 副研究员, 博士, 主要从事水稻抗病育种研究, E-mail: jfwang@scau.edu.cn

基金项目: 广东省自然科学基金 (2019A1515011825); 2021 年省级乡村振兴战略专项经费 (2021KJ382)

the marker Pi2-C3, 84 materials from the natural population were genotyped, and the results showed that the Pi2-C3 marker accurately distinguished the *Pi2* loci of different rice materials into resistant, heterozygous, and susceptible genotypes, which was an efficient method for identifying the blast-resistant gene *Pi2*. The marker Pi2-C3 was used to detect the materials in Yangjiang disease nursery. Combined with the phenotypic investigation, it was found that 46 materials containing *Pi2* gene showed different degrees of rice blast resistance, which indicated that the marker could be used to detect the incidence of materials in disease nursery.

【Conclusion】 This study develops a specific molecular marker Pi2-C3 for accurately detecting the *Pi2* gene using the KASP technology, and establishes a KASP genotyping system for rice *Pi2* gene. It has important application value for improving the efficiency of resistance breeding and improving blast-resistant rice varieties.

Key words: Rice; Rice blast; *Pi2* gene; KASP marker; Molecular marker; Resistance gene; Genotyping

水稻 *Oryza sativa* 是世界上重要的粮食作物，是全球主要的食物来源之一，其产量的高低直接影响粮食安全。每年由细菌、真菌和病毒侵染造成的水稻减产高达 30%~50%。其中稻瘟病对水稻生产造成的危害最为严重^[1]，培育具有稻瘟病抗性的水稻品种是防治该病害最经济有效的方法^[2]。然而，由于稻瘟病生理小种的迅速更替，许多抗病品种的抗病性在逐渐丧失^[3]。目前已经被鉴定并克隆的稻瘟病抗性 (*R*) 基因有 35 个^[4]，其中 *Pi2* 基因来自对稻瘟病具有高度抗性的哥伦比亚籼稻品种 5173^[5]，是一个广谱抗稻瘟病显性基因。该基因对 13 个国家的 36 个生理小种表现出高水平抗性^[6]。针对我国华南籼稻区的稻瘟病优势生理小种，*Pi2* 基因表现出良好的抗性^[7-8]，利用 *Pi2* 基因选育具有广谱抗性的水稻品种具有重要的应用价值。

随着生物技术的发展，利用分子标记进行分子标记辅助选择 (Maker-associated selection, MAS) 可以大大提高育种的效率和进程^[9]。目前针对 *Pi2* 基因开发并应用于育种的分子标记大多数属于第 2 代分子标记，包括简单重复序列标记 (Simple sequence repeats, SSR)、插入/缺失标记 (Insert/Deletion, InDel) 等，这类标记需要电泳技术进行检测，其操作过程较为繁琐，主要应用于基因定位和遗传图谱的绘制^[10]，无法实现大批量的准确检测，严重妨碍了该基因在水稻育种中的应用。

第 3 代分子标记——单核苷酸多态性 (Single nucleotide polymorphism, SNP) 标记^[11-13] 的出现为快速检测相关基因开辟了一条新的途径。SNP 是指分子水平上由单个核苷酸的改变即单个碱基的替换、插入或缺失，从而引起的 DNA 序列的多态性，被认为是水稻基因组中最丰富的标记类型^[14]。SNP

在生物基因组中数量多，分布广泛，遗传稳定性高，与性状表达密切相关，富有代表性。另外，SNP 标记检测技术易于实现自动化高通量基因分型，可以有效缩短检测时间^[15]。

近年来，竞争性等位基因聚合酶链式反应 (Kompetitive allele specific PCR, KASP) 技术已成为高效安全地检测 SNP 的新方法。KASP 技术是一种基于 SNP 标记的高通量基因分型技术，通过识别相应的荧光共振能量转移，利用基因探针对广泛的基因组 DNA 样品，以及对目标 SNPs 和 InDels 进行精准的双等位基因分型^[16]。该技术的检测过程无需电泳，可以有效地减少试验过程中有害物质的产生，现已广泛应用于各类作物的种质筛选工作^[17-18]。针对 *Pi2* 基因，利用 KASP 技术开发的分子标记相较于普遍使用 SSR 标记具有稳定性好、检测效率高等优点，可以更加高效准确地鉴定抗病基因，为聚合多个优质基因、培育高产抗病水稻品种提供技术支持。

本研究通过对大量水稻种质资源的基因组测序数据分析，挖掘 *Pi2* 基因核心区域 SNP 并开发为 KASP 分子标记，进一步通过室内接种、病圃鉴定验证标记的可靠性，最终构建一套适合于 *Pi2* 基因的分型体系。研究结果将为利用稻瘟病抗性基因 *Pi2* 进行品种选育提供技术支撑。

1 材料与方法

1.1 供试材料

本研究以华南农业大学国家植物航天育种工程技术研究中心收集的 593 份水稻自然种质作为供试材料，该群体分为 122 个粳稻材料和 471 个籼稻材料。通过该群体的基因组测序信息筛选 SNP 位点，并利用 H-74 和 H-78 开发 KASP 标

记。以该群体田间 2021 年早造和晚造材料以及阳江市 2020 年晚造病圃材料作为验证材料。以 R1179 作为抗病对照, ‘日本晴’作为感病对照。材料采用水培法^[19] 种植, 营养液参照国际水稻研究所 (International Rice Research Institute, IRRI) 的培养配方配制。

1.2 试验方法

1.2.1 DNA 提取方法 本研究采用改良的十六烷基三甲基溴化铵 (Cetyltrimethylammonium bromide, CTAB) 法提取 DNA。具体流程如下: 取少量幼嫩的叶片, 放入 2 mL 离心管中, 加入 2×CTAB 提取液 800 mL, 用高通量组织研磨仪 (Geno/Grinder) 以 1 500 r/min 充分研磨 3 min, 65 ℃ 水浴 30 min; 冷却后加入三氯甲烷: 异戊醇体积比为 24:1 的混合液至满管 (约 900 μL), 混合均匀, 8 000 r/min 离心 10 min, 放入-20 ℃ 的冰箱中 20 min, 使 DNA 充分沉淀; 10 000 r/min 离心 3 min, 去除上清液, 倒置 1 min, 加入 φ 为 70% 的乙醇溶液 800 μL, 10 000 r/min 离心 3 min, 去除上清液, 干燥后加入 ddH₂O 100 μL, 使 DNA 充分溶解, 置于-20 ℃ 保存。

1.2.2 KASP 标记开发 在美国国家生物技术信息中心 (National Center for Biotechnology Information, NCBI) 下载 *Pi2* 序列 (Genbank 登录号: DQ352453) 以及与 *Pi2* 互为等位基因的 *Pi9* (Genbank 登录号: DQ285630.1) 和 *Pigm* 序列 (Genbank 登录号: KU904633.2)。分别利用程序 VISTA tools(<https://genome.lbl.gov/vista/index.shtml>) 与 Softberry (<http://www.softberry.com/berry.phtml>) 在线分析, 获得序列组成和基因结构信息。对 H-74 和 H-78 材料进行单倍型分析, 获取 *Pi2* 抗性位点核心区域和重要 SNP 差异位点, 并根据样品材料的相似性判断目标基因是否存在。结合单倍型分析结果获得的 *Pi2* 基因抗性位点核心区域的物理区间, 利用程序 Primer-BLAST(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools>) 和软件 Premier5 设计普通 PCR 引物。H-74 和 H-78 这 2 个材料各设置 2 个重复, 对目标物理位置进行扩增并测序。对上述获得的测序结果进行比对, 分析差异 SNP, 优先选择单碱基突变、SNP 突变位点位于编码区且周边没有其他的差异 SNP 位点, 利用这些位点基于 KASP 技术设计成若干 KASP 分子标记。

1.2.3 KASP 基因分型 将待检测的 DNA 样品稀释至 50 mg/L, 加入 96 孔 PCR 板中。配制 KASP

扩增反应体系 20 μL (DNA 5 μL、引物 Mix 0.4 μL、2×KASP Master Mix 4.6 μL, 矿物油 10 μL)。KASP 扩增反应程序: 95 ℃ 预变性 180 s, 循环 1 次; 95 ℃ 变性 10 s, 63.4 ~ 56.2 ℃ 退火/延伸 30 s (-0.8 ℃/循环), 循环 9 次; 95 ℃ 变性 10 s, 55 ℃ 退火/延伸 30 s, 循环 29 次。待 PCR 扩增程序结束后, 用荧光检测仪 (FLUOstar Omega SNP) 进行荧光检测, 获得基因分型结果。

1.2.4 稻瘟病菌接种鉴定 使用开发的 KASP 标记进行基因分型后, 选择检测结果为阳性和阴性的材料各 3 份, 以及已知具有 *Pi2* 基因的材料 R1179 作为阳性对照和无 *Pi2* 基因的材料 ‘日本晴’ 作为阴性对照。将种子浸种催芽处理, 待种子浸种露白后, 以 8×8 的规格种植于 30 cm×20 cm 的盆中, 每个品种种植 4 株, 重复 2 次, 待水稻生长至 3~4 叶期, 参照韩美丽等^[20] 的方法离体单菌接种稻瘟病菌 GDYJ7, 6~7 d 后调查。

自然诱发病圃设置在广东省阳江市阳江农业科学研究所白沙试验场, 该病圃常年处于高温高湿的气候环境中, 具有发病的地理环境条件, 是广东省具有代表性的稻瘟病区。试验材料按单本种植, 每份材料种 5 行, 每行 6 株, 行距 23.3 cm, 株距 16.7 cm, 四周种植诱发品种 ‘Co39’。病圃全生育期防虫不防病。在成熟期, 以 ‘Co39’ 充分发病为准, 对供试材料进行穗颈瘟调查, 按 IRRI 0~9 级的分级标准进行记录 (0 级: 无病; 1 级: 抗; 3 级: 中抗; 5 级: 中感; 7 级: 感; 9 级: 高感)。

2 结果与分析

2.1 *Pi2* 基因核心 SNP 筛选

基于 593 份自然群体的全基因组重测序结果, 结合 *Pi2* 基因序列, 利用 MEGA X64 构建系统进化树, 根据进化树分布密度, 分为 7 个部分 (图 1A)。从中选择 2 个抗性不同且亲缘关系较远的材料 H-74 和 H-78, 其中 H-74 为抗病材料, 与 R1179 等抗病材料在 III 区; H-78 为感病材料, 与 ‘日本晴’、‘丽江新团黑谷’ 等感病材料在 II 区。*Pi2* 基因第 2 外显子上第 787~788 位密码子位置的核苷酸变异与稻瘟病抗性密切相关^[21-24]。因此对 H-74 和 H-78 这 2 个材料, 在 *Pi2* 基因区段以及基因上下游 100 kb 区域进行单倍型分析, 确定 *Pi2* 基因抗性位点核心区域的物理位置在 10 386 510~10 389 466 bp 的范围内。单倍型分析结果中发现该区域内含有

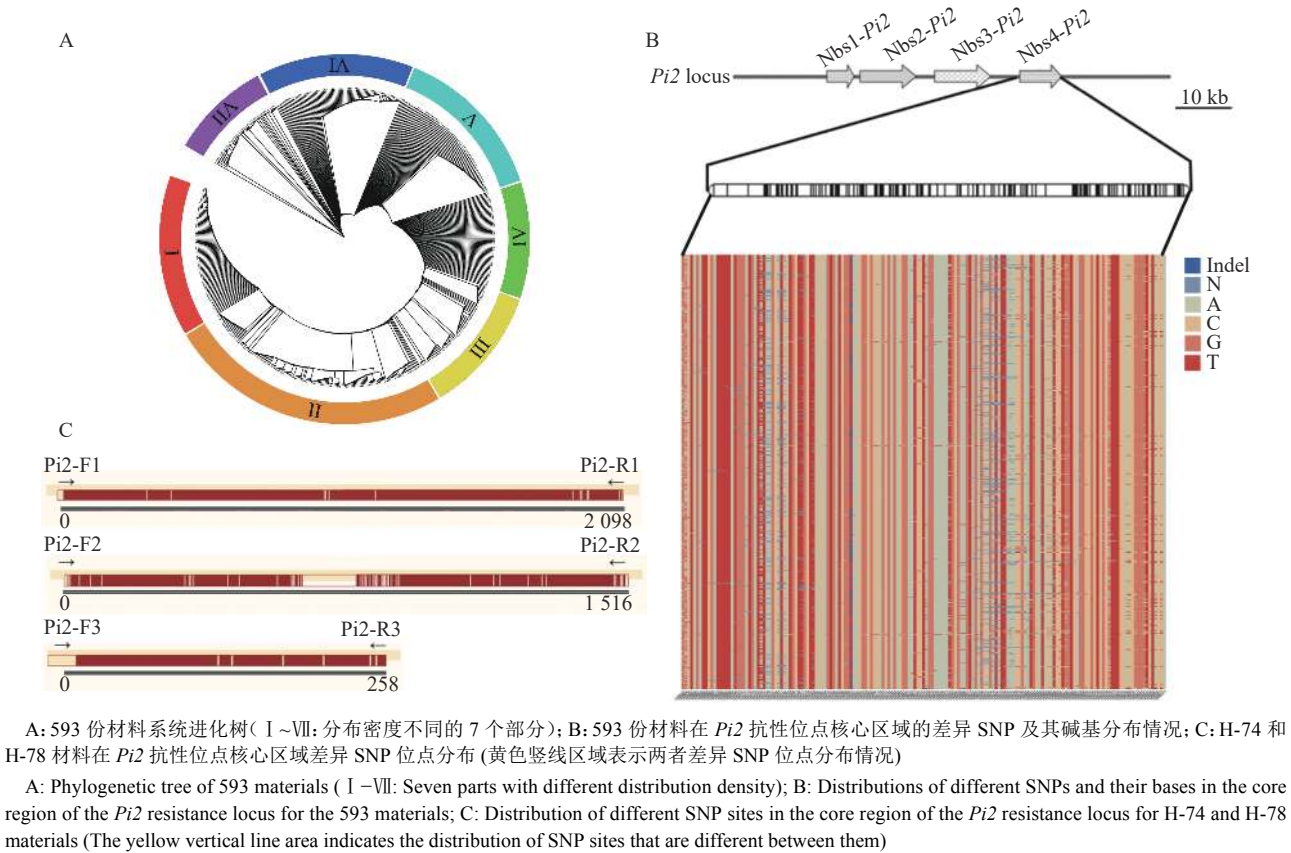


图 1 系统进化树及差异 SNP 位点分析

Fig. 1 Phylogenetic tree and analysis of different SNP sites

99 个重要的 SNP 突变位点。根据材料测序结果与分析结果中位点突变情况的相似性判断 H-74 材料含有 *Pi2* 基因, H-78 材料不含有 *Pi2* 基因。进一步利用 593 份自然群体的全基因组重测序结果, 分析区域范围内的所有差异 SNP 位点, 共筛选出 175 个 SNP 位点, 并获得这些位点的碱基分布情况 (图 1B)。

根据物理位置 10 386 510~10 389 466 bp, 利用软件 Primer5 设计引物 (表 1), 分别利用 3 对引物

表 1 测序引物

Table 1 Sequencing primers

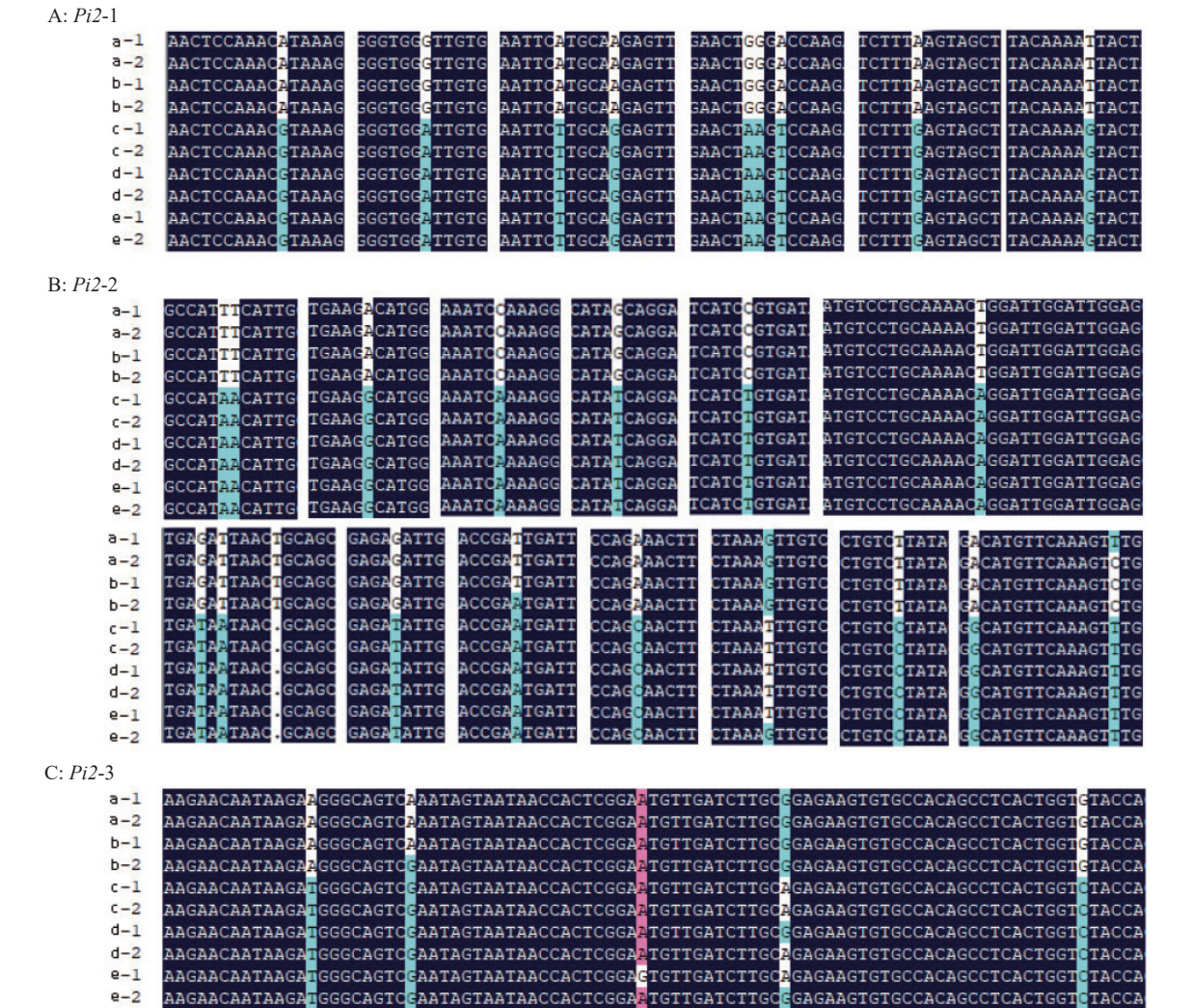
引物名称	序列(5'→3')	预期片段大小/bp
Primer name	Sequence	Expected fragment size
Pi2-F1	AAGCCTATGATTGGTTTCT	2 098
Pi2-R1	ACTGCCCTTCTTATTGTTC	
Pi2-F2	AACAATAAGAAGGGCAGTC	1 516
Pi2-R2	GAGGAGGAGATGAAATAGAAT	
Pi2-F3	AAGGTGGTGGTGCAAGTAC	258
Pi2-R3	CAATGTTATGGCATCGTTC	

对 H-74 和 H-78 材料的目标片段进行扩增和测序, 测序结果进行序列比对分析, 以获得更加精确的 SNP 位点及其分布和碱基突变情况 (图 1C, 图 2)。结合 593 份材料中发现的 175 个 SNP 位点与单倍型分析获得的 99 个 SNP 位点, 过滤数据, 在 10 386 510~10 389 466 bp 的区间内共筛选出 28 个关键 SNP 位点, 其中 9 个位于内含子, 19 个位于外显子。

2.2 KASP 标记开发

以不含有 *Pi2* 基因的‘日本晴’基因组作为参考序列, 将 H-74 材料与‘日本晴’基因组序列进行比对, 对上述的 28 个关键 SNP 位点进一步筛选, 剔除相同的突变 SNP 位点。最后获得 5 个关键的 SNP 位点, 分别在 10 388 566、10 388 841、10 389 007、10 389 256 和 10 389 341 bp 发生 SNP 变异, 利用这 5 个 SNP 位点设计 KASP 引物 (表 2)。

以含有 *Pi2* 基因的水稻材料 R1179 为阳性对照, 不含 *Pi2* 基因的‘日本晴’为阴性对照, ddH₂O 为空白对照, 在同一批 593 份自然群体材料中随机选取 84 份, 利用上述引物对其进行 KASP 基因分型检测。待测样品扩增产物的荧光信号显示为蓝色圆点, 且靠近 X 轴, 则表明该材料包含



a: H-74 材料, b: 包含 *Pi2* 基因的材料, c: H-78 材料, d、e: 确定没有 *Pi2* 基因的材料; 1 和 2 表示材料的 2 个重复
a: Material H-74, b: Material containing *Pi2* gene, c: Material H-78, d and e: Material without *Pi2* gene; 1 and 2 represent two repetitions of the material

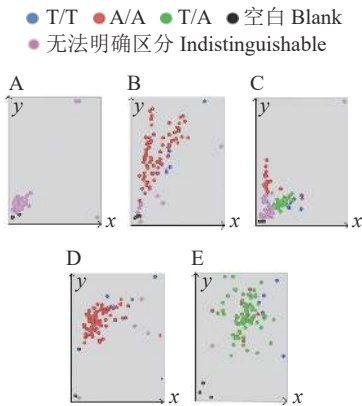
图 2 *Pi2* 基因差异位点序列比对

Fig. 2 Sequence alignment analysis of the different sites of *Pi2* gene

表 2 KASP 引物		
Table 2 KASP primers		
引物名称	检测位点	序列(5'→3')
Primer name	Detection site	Sequence
Pi2-C1-F1	A	GAAGGTGACCAAGTTCATGCTCAGGTGTCAGAATGGGAGAAATTCTATGAACAA
Pi2-C1-F2	C	GAAGGTCGGAGTCAACGGATTTCAGGTGTCAGAATGGGAGAAATTCTATGAACAC
Pi2-C1-R	A/C	TGTCCTTAGTAGGGGAGGAGG
Pi2-C2-F1	C	GAAGGTGACCAAGTTCATGCTGTATGATTCAACGATCAAGAGTGGGCAC
Pi2-C2-F2	T	GAAGGTCGGAGTCAACGGATTAGTTATGTATTTAAAACACAGCATGGT
Pi2-C2-R	C/T	CCTGTCTCGAGATTGAAACTGTG
Pi2-C3-F1	T	GAAGGTGACCAAGTTCATGCTCATGGGAGTATGTCCTGCAAAACT
Pi2-C3-F2	A	GAAGGTCGGAGTCAACGGATTTCATGGGAGTATGTCCTGCAAAAACA
Pi2-C3-R	T/A	CAAACGTCATGTGCTAGACTCTTGGGTC
Pi2-C4-F1	G	GAAGGTGACCAAGTTCATGCTCATTGGTAAACTACAGGGCCTACAG
Pi2-C4-F2	A	GAAGGTCGGAGTCAACGGATTTCATTGGTAAACTACAGGGCCTACAA
Pi2-C4-R	G/A	CACTTGGTAGTGTGCTGCAATGTATGTGCTC
Pi2-C5-F1	A	GAAGGTGACCAAGTTCATGCTCAATGTCTGCATACTCTTCGTTGTATAA
Pi2-C5-F2	G	GAAGGTCGGAGTCAACGGATTCAATGTCTGCATACTCTTCGTTGTATAG
Pi2-C5-R	A/G	AGGCATATTGTGTTAGTTATGCACTTCATTGGGTG

Pi2 基因, 即 T/T 基因型; 如果待测的扩增产物荧光信号显示为红色圆点, 且靠近 *Y* 轴, 则表明该材料不包含 *Pi2* 基因, 即 A/A 基因型。

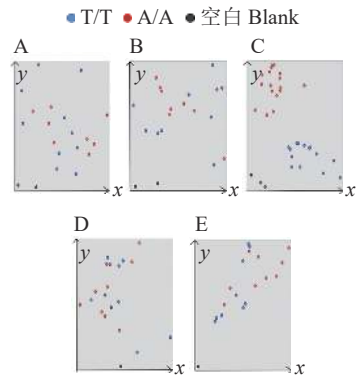
如图 3 所示, 引物 Pi2-C1、Pi2-C2 和 Pi2-C3 的基因分型中有着分群聚集的趋势, 引物 Pi2-C4 和 Pi2-C5 分型结果不够明确(图 3)。为进一步确认这 5 个引物的可行性, 利用 3 个已知包含 *Pi2* 基因的样品材料和 3 个已知不包含 *Pi2* 基因的样品材料作为阴、阳对照, 同样以 ddH₂O 作为空白对照, 对其进行 KASP 基因分型检测, 结果如图 4 所示。引物 Pi2-C3 可以成功将阴、阳对照及空白对照和检测样品材料分开。基因分型结果和预期结果相匹配, 初步判断引物 Pi2-C3 的可行性。然而利用引物 Pi2-C3 的分型结果较为分散, 为获得较为直观和清晰的图片, 在原有的检测 PCR 程序基础上加 4 个循环, 获得新的 KASP 基因分型结果(图 5)。



A-E 对应的引物分别为 Pi2-C1、Pi2-C2、Pi2-C3、Pi2-C4、Pi2-C5
Primers corresponding to A-E are Pi2-C1, Pi2-C2, Pi2-C3, Pi2-C4 and Pi2-C5 respectively

图 3 KASP 引物基因分型效果

Fig. 3 Genotyping effects of KASP primers



A-E 对应的引物分别为 Pi2-C1、Pi2-C2、Pi2-C3、Pi2-C4、Pi2-C5
Primers corresponding to A-E are Pi2-C1, Pi2-C2, Pi2-C3, Pi2-C4 and Pi2-C5 respectively

图 4 对照 KASP 基因分型结果

Fig. 4 KASP genotyping results for control samples

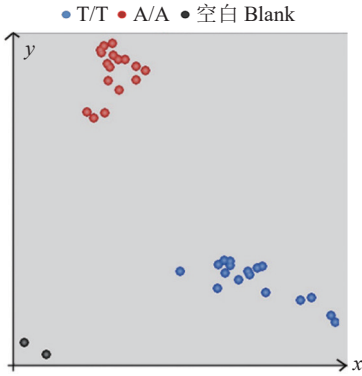


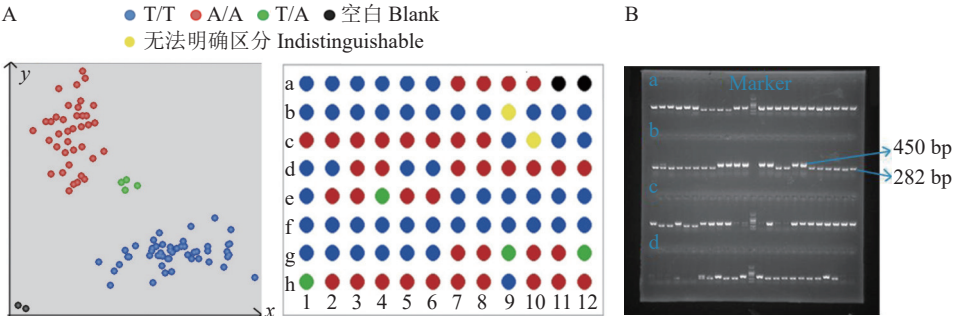
图 5 利用引物 Pi2-C3 增加 PCR 循环数后 KASP 基因分型结果

Fig. 5 KASP genotyping results after increasing PCR cycles by primer Pi2-C3

2.3 KASP 标记鉴定效果分析

为评估 KASP 标记 Pi2-C3 的检测效果, 本研究基于全基因组重测序结果选取了 6 个基因型为 T/T 的材料作为阳性对照、4 个基因型为 A/A 的材料作为阴性对照, ddH₂O 作为空白对照, 对 84 个田间水稻材料, 分别利用设计的 KASP 分子标记 Pi2-C3 和已报道的 SSR 标记 M-Pi2(Pi2-F: 5'-CAGCGATGGTATGAGCACAA-3', Pi2-R: 5'-CGTTCCTATACTGCCACATCG-3') 进行检测, 并对两者的检测结果进行比较。SSR 标记扩增后, 含有 *Pi2* 基因的片段大小为 450 bp, 不含 *Pi2* 基因的片段大小为 282 bp^[25]。结果如图 6A 所示, KASP 标记的基因分型结果中, 有 50 个材料的荧光信号点为蓝色, 38 个材料的荧光信号点为红色, 4 个材料的荧光信号点为绿色, 前后进行 2 次检测, 分型结果一致, 表明 KASP 标记 Pi2-C3 具有较好的重复性和稳定性。将上述结果与 SSR 标记的电泳结果(图 6B)相比较, 两者有 95% 的相似性, 并且在两者的结果中, 10 个对照材料的检测结果与前期测序结果一致。因此可初步判断, KASP 标记 Pi2-C3 可以成功区分纯合型 T/T、A/A 和杂合型 T/A 这 3 种基因型。

从 593 份材料中对该位点进行筛选, 挑选出基因型为 T/T 的 2 份材料 607-557 和 RT1031-69; 基因型为 A/T 的 22 份材料, 包括京农大 ‘W030’、‘早粳占’、CT15672-3-2-3-2-2-M、‘华粳粳 74’、白水糯、雪华新占、海南糯、1 641 选、远野 4 号、‘黄广华占 1 号’、黑糯 47、Getu、海南黑、本地糯(阳春三甲)、黑节早、广粳粳 165、观音稻、IRRI129、黄广软占、‘大丰糯’、‘鹏稻 2 号’、‘凤新丝苗-1’; 其余材料基因型为 A/A。从基因型为 A/A 的材料中随机挑选出 60 个材料, 再加上挑选出的基因型为 T/T 和 A/A 的 24 份材料, 对这



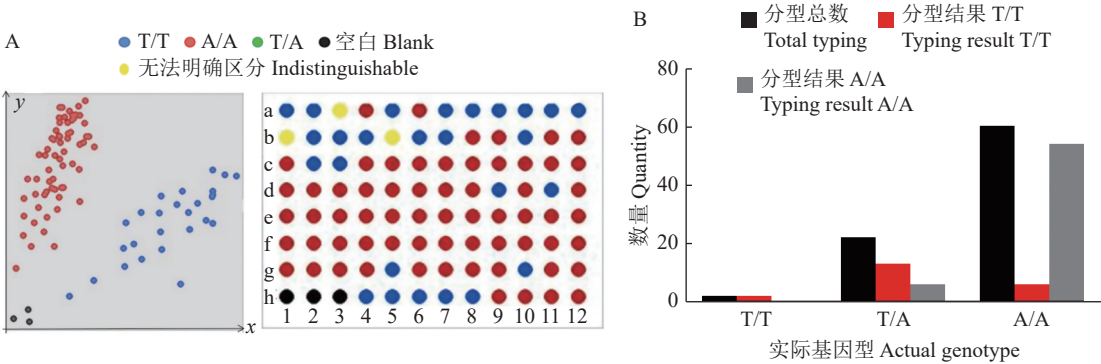
A: *Pi2* KASP 基因分型检测结果; B: SSR 标记检测结果 (Marker 位于胶图中央, 大小为 2 000 bp, a、c、d 区域中相应位置片段大小与 b 区域标示相同)
A: KASP genotype detection results for *Pi2*; B: SSR marker detection results (marker is located in the center of the rubber map, with the size of 2 000 bp, and the corresponding fragment sizes in areas a, c and d are the same as that in area b)

图 6 84 个田间材料 *Pi2*-C3 KASP 分子标记的验证

Fig. 6 Verification of *Pi2*-C3 KASP molecular marker for 84 field samples

84 个材料进行 KASP 基因分型检测, 进一步验证 KASP 标记的可靠性。如图 7A 所示, a-1 和 a-2 对应基因型为 T/T 的 2 个材料, 与检测结果保持一致。a-3 至 b-12 对应基因型为 A/T 的 22 个材料, 基

因型数量比 T/T:A/A=13:6, 初步判断这 22 个材料后代发生性状分离。c-1 至 g-12 对应基因型为 A/A 的 60 个材料, 54 个检测为 A/A, 6 个检测为 T/T, 准确率为 93%(图 7B)。



A: *Pi2* 基因 KASP 基因分型结果; B: *Pi2* 基因 KASP 基因分型与实际基因型比对分析
A: KASP genotyping results for *Pi2* gene; B: Comparison analysis between *Pi2* gene KASP genotyping and actual genotype

图 7 593 份材料中部分材料 KASP 基因分型结果

Fig. 7 KASP genotyping results of partial materials of the 593 materials

2.4 抗稻瘟病表型鉴定

为进一步验证基因分型结果的准确性, 以 R1179 与 ‘日本晴’ 分别作为阳性对照与阴性对照, 对基因分型中确定含有 *Pi2* 基因的种质 (H-11、H-12 和 H-94) 与基因分型中确定不含有 *Pi2* 基因的种质 (H-14、H-15 和 H-151) 进行稻瘟病离体打孔接种试验, 5~7 d 后调查接种表型, 根据叶片病斑大小分析材料的抗病性。结果 (图 8) 表明, H-11、H-12 和 H-94 对稻瘟病具有抗性而 H-14、H-15 和 H-151 对稻瘟病表现高感。表明抗性表型与基因分型结果一致, *Pi2* 基因 KASP 标记 *Pi2*-C3 具有较高的可靠性。

利用开发的 *Pi2*-C3 抗性标记对 2020 年晚造中阳江市病圃的 84 份材料进行 KASP 基因分型, 确定供试材料中 *Pi2* 基因的存在情况, 同时进行田间病圃抗性评价 (表 3)。从阳江市病圃材料中, 检

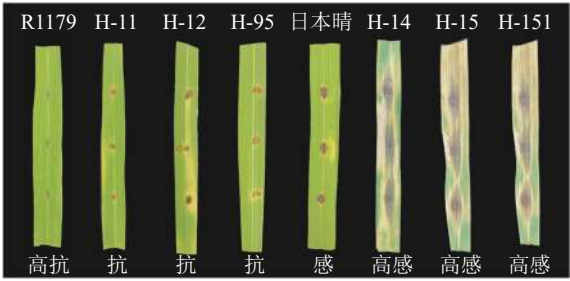


图 8 叶片接种表型
Fig. 8 Leaf inoculation phenotype

测到携带 *Pi2* 抗性基因的材料 46 份, 占 54.76%, 未携带 *Pi2* 抗性基因的材料 38 份, 占 45.24%。结合病圃表型观察, 抗性材料 68 份, 包括高抗材料 16 份、中抗材料 25 份; 感病材料 16 份, 包括高感材料 5 份、中感材料 5 份。在后续对病圃检测结果的验证中表明, 携带 *Pi2* 基因的材料对稻瘟病表现

表 3 广东阳江病圃材料 *Pi2* 基因检测结果及抗性评价

Table 3 *Pi2* gene detection results and resistance evaluation of materials from the Yangjiang disease nursery in Guangdong

编号 Number	<i>Pi2</i> 基因检测 <i>Pi2</i> gene detection	抗性评价 Resistance evaluation	编号 Number	<i>Pi2</i> 基因检测 <i>Pi2</i> gene detection	抗性评价 Resistance evaluation
J-201	—	中感	J-217	+	抗
J-202	+	抗	J-218	+	抗
J-203	+	抗	J-219	—	抗
J-204	+	抗	J-220	+	中抗
J-205	+	抗	J-221	—	中抗
J-206	—	抗	J-222	—	中抗
J-207	+	抗	J-223	—	中抗
J-208	+	抗	J-224	+	抗
J-209	+	高抗	J-225	+	抗
J-210	+	高抗	J-226	—	中抗
J-211	+	抗	J-227	—	中抗
J-212	—	中感	J-228	—	中感
J-213	+	抗	J-229	—	中抗
J-214	—	抗	J-230	—	中抗
J-215	+	抗	J-231	—	中抗
J-216	+	高抗	J-232	—	中感
J-233	+	抗	J-259	+	高抗
J-234	+	抗	J-260	+	高抗
J-235	—	抗	J-261	+	抗
J-236	+	高抗	J-262	+	高抗
J-237	+	高抗	J-263	—	中感
J-238	+	中抗	J-264	—	高感
J-239	—	中抗	J-265	+	高抗
J-240	+	抗	J-266	—	高感
J-241	+	高抗	J-267	—	高感
J-242	—	高感	J-268	+	抗
J-243	+	抗	J-269	+	抗
J-244	—	感病	J-270	+	抗
J-245	+	中抗	J-271	—	抗
J-246	+	抗	J-272	+	抗
J-247	—	高感	J-273	+	抗
J-248	—	中抗	J-274	+	高抗
J-249	+	抗	J-275	—	抗
J-250	+	中抗	J-276	—	中抗
J-251	—	抗	J-277	—	中抗
J-252	+	高抗	J-278	—	感病
J-253	+	高抗	J-279	—	感病
J-254	—	中抗	J-280	—	感病
J-255	+	高抗	J-281	—	中抗
J-256	+	高抗	J-282	—	感病
J-257	+	高抗	J-283	+	抗
J-258	—	抗	J-284	—	感病

为抗性,其中5份材料表现为高抗,7份表现为中抗。

3 讨论与结论

3.1 *Pi2* 基因分子标记的开发和应用

培育和种植抗稻瘟病水稻品种可以有效减少稻瘟病造成的损失,利用与抗稻瘟病基因连锁的分子标记进行辅助选择可以提高品种选育的效率。针对抗稻瘟病基因 *Pi2*,先后有不同的研究人员开发了不同类型的分子标记用于该基因的分型。Wu等^[26]利用 *Pi2* 基因的 SSR 标记 AP22,对277份优质中国水稻亲本材料进行了检测;高利军等^[25]基于 *Pi2* 基因与日本晴基因序列的差异开发共显性分子标记 M-*Pi2*;李潜龙^[27]基于 *Pi2* 基因1543~1545处3个碱基的缺失,开发 Indel 功能标记 Pi2-1,使用功能标记 Pi2-1 辅助选择育种改良文香1号的稻瘟病抗性,抗性表型的选择准确率在90%以上;李冰等^[28]利用 *Pi2* 位点 Nbs4-*Pi2* 及其复等位基因 *Pi9*、*Pigm* 位点 *Pigm*-R2 DNA 序列比对结果,开发了 Indel 标记 Pi2-CM1,该标记可有效区分 *Pi2* 与其等位基因 *Pi9* 和 *Pigm*。除了传统的二代标记,已有研究人员针对 *Pi2* 基因开发了一系列 SNP 标记。华丽霞等^[23]开发的 dCAPS 标记,在 PCR 扩增后需要通过酶切和电泳进行检测,操作复杂,而金名捺等^[24]开发的 HRM 标记,对 PCR 扩增体系要求较高,不适合进行大批量筛选。基于 KASP 的基因分型技术无需电泳,稳定性好,可以有效解决以上问题,杨义强等^[29]利用高抗稻瘟病品种‘黄广油占’与高感品种‘广陆矮4号’*Pi2* 基因第787和788密码子上的突变,开发了 *Pi2* 基因特异性 KASP 标记 W-*Pi2*,通过对40个品种和部分 F₂ 分离群体的检测发现该标记可以实现对 *Pi2* 基因的准确分型。邓钊等^[30]利用基于 KASP 技术开发的针对16个稻瘟病抗性基因的标记组合对隆两优和晶两优系列杂交稻品种及其亲本进行基因型检测,*Pia*、*Pita*、*Pi2*、*Pi5* 和 *Piz* 基因在品种中的检出频率相对较高,均达到50%以上,其中 *Pi2* 在父本中的检出率达到了71.2%。

本研究在593份自然群体材料中筛选出2个表型不同、亲缘关系较远的材料 H-74 和 H-78,进一步对这2个材料进行单倍型分析,获得 *Pi2* 基因抗性位点的核心区域和99个重要 SNP 位点。结合593份材料的全基因组重测序结果,筛选出关键 SNP 位点,最后成功开发出 KASP 特异性分子标记 Pi2-C3。该标记被应用于已知基因型的84个自然群体材料的检测中,显示出较高的准确度。同时,

从阳江市病圃材料中,选出84份材料进行 KASP 基因分型和抗性评价,发现46份材料携带 *Pi2* 抗性基因,占总体的54.76%,而38份材料未携带 *Pi2* 抗性基因,占45.24%。本研究开发的 KASP 标记专门针对 *Pi2* 基因进行检测。然而,在被检测的病圃材料中未携带 *Pi2* 抗性基因的材料可能由于携带 *Pi1*、*Pita* 及 *Piz-t* 等其他抗性基因而表现出稻瘟病抗性。与以往的研究相比,本研究开发的 KASP 标记 Pi2-C3 不需要进行电泳,准确度较高,并且易于实现高通量和自动化。另外,相较于其他 KASP 分子标记,本研究基于 *Pi2* 抗性位点的核心区域进行标记的开发,确保了标记的真实性和可靠性。

3.2 KASP 基因分型技术的应用前景

目前,SSR 标记鉴定体系已被广泛应用,显著提高了品种鉴定的效率和准确性。然而,在水稻基因组中,具有多个等位基因的位点增加了构建 DNA 指纹库的难度,需要频繁更新数据以避免转换错误。一些通量化的 SSR 标记检测技术缺乏稳定性。相比之下,SNP 标记仅有3个基因型,不受扩增片段大小的影响,可广泛用于 DNA 指纹图谱的构建,推动了检测技术的发展。基于 PCR 原理的 KASP 基因分型技术具有直观的检测结果,适用于高通量检测。与同为 SNP 检测技术的高分辨率熔解曲线(High resolution melting, HRM)相比,KASP 技术成本更低,操作更简便。本研究开发的 KASP 标记 Pi2-C3 和 SSR 标记 M-*Pi2* 分别对包含阴阳对照的96个材料进行检测,2种标记检测结果高达95%的一致性。由于 KASP 和 SSR 标记是基于不同的原理和标记位点设计的,SSR 不是基于基因的标记,其多态性不能完全反映基因的存在,而 KASP 是基于 SNP 差异开发的,具有更高的准确性。此外,*Pi2* 区域的某些位点可能在个别个体中呈现差异,这也可能导致 KASP 和 SSR 标记的检测结果不一致。另一方面,利用 KASP 标记进行基因分型可以减少电泳点样的步骤,从而降低试验误差。此外,KASP 标记的应用避免了使用有毒化学物质如核酸染料,减少了对人体和环境的潜在危害。KASP 的结果更加直观,可以通过颜色区分不同基因型,直接定位到相应的材料。

3.3 结论

本研究针对稻瘟病抗性基因 *Pi2* 的核心区域,开发了基于 KASP 基因分型技术的特异性分子标记 Pi2-C3,并建立了一套水稻 *Pi2* 基因的 KASP 基因分型体系。该标记能够准确检测水稻材料中 *Pi2* 基因,将不同水稻材料的 *Pi2* 位点分为 T/T、

T/A 和 A/A 基因型, 其中 T/T 为抗病基因型。相较于其他分子标记, 操作流程更加简便, 检测结果更加高效。KASP 基因分型检测技术为水稻抗稻瘟病种质资源的鉴定和抗性群体的高通量筛选提供了技术支持, 为水稻新时代抗性育种奠定了基础。

参考文献:

[1] 向聪, 雷东阳, 任西明, 等. 水稻抗稻瘟病遗传育种研究进展[J]. 作物研究, 2017, 31(5): 547-552.

[2] 权水清. 水稻稻瘟病菌无毒基因 AVR-Pik 的共显性标记开发与应用[D]. 武汉: 武汉大学, 2017.

[3] 温小红, 谢明杰, 姜健, 等. 水稻稻瘟病防治方法研究进展[J]. 中国农学通报, 2013, 29(3): 190-195.

[4] MENG X L, XIAO G, TELEBANCO-YANORIA M J, et al. The broad-spectrum rice blast resistance (*R*) gene *Pita2* encodes a novel *R* protein unique from *Pita*[J]. *Rice*, 2020, 13(1): 1-15.

[5] ZHOU B, QU S H, LIU G F, et al. The eight amino-acid differences within three leucine-rich repeats between *Pi2* and *Piz-t* resistance proteins determine the resistance specificity to *Magnaporthe grisea*[J]. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 2006, 19(11): 1216-1228.

[6] LIU G, LU G, ZENG L, et al. Two broad-spectrum blast resistance genes, *Pi9(t)* and *Pi2(t)*, are physically linked on rice chromosome 6[J]. *Molecular Genetics and Genomics*, 2002, 267(4): 472-480.

[7] 朱业宝, 方珊茹, 沈伟峰, 等. 国外引进水稻种质资源的稻瘟病抗性基因检测与评价[J]. 植物遗传资源学报, 2020, 21(2): 418-430.

[8] 陆展华, 付魏魏, 刘维, 等. 广东省主栽水稻品种稻瘟病主效抗性基因的鉴定及分析[J]. 植物病理学报, 2020, 50(6): 711-722.

[9] 沈新莲, 张天真. 作物分子标记辅助选择育种研究的进展与展望[J]. 高技术通讯, 2003, 13(2): 105-110.

[10] SHABIR G, ASLAM K, KHAN A R, et al. Rice molecular markers and genetic mapping: Current status and prospects[J]. *Journal of Integrative Agriculture*, 2017, 16(9): 1879-1891.

[11] 何元浩, 胡凤荣. 基于 AFLP 分子标记的 30 个风信子品种遗传多样性分析[J]. 分子植物育种, 2023, 21(9): 2955-2963.

[12] 李建武. 马铃薯 (*Solanum tuberosum* L.) 块茎淀粉含量及植株熟性性状的 QTL 定位与遗传分析[D]. 武汉: 华中农业大学, 2019.

[13] 刘传光, 张桂权. 水稻单核苷酸多态性及其应用[J]. 遗传, 2006, 28(6): 737-744.

[14] BEGUM H, SPINDEL J E, LALUSIN A, et al. Genome-wide association mapping for yield and other agronomic traits in an elite breeding population of tropical rice (*Oryza sativa*)[J]. *PLoS One*, 2015, 10(3): e0119873. doi: 10.1371/journal.pone.0119873.

[15] 王彦云. 基于 SNP 标记的黄河鲤鱼溯源研究与应

用[D]. 北京: 中国农业科学院, 2021.

[16] SEMAGN K, BABU R, HEARNE S, et al. Single nucleotide polymorphism genotyping using Kompetitive Allele Specific PCR (KASP): Overview of the technology and its application in crop improvement[J]. *Molecular Breeding*, 2014, 33(1): 1-14.

[17] 练云, 李海朝, 李金英, 等. 利用 KASP 标记筛选含 *rhg1* 和 *Rhg4* 位点的大豆抗病资源[J]. 植物遗传资源学报, 2021, 22(2): 399-406.

[18] 王蕊, 施龙建, 田红丽, 等. 玉米杂交种纯度鉴定 SNP 核心引物的确定及高通量检测方案的建立[J]. 作物学报, 2021, 47(4): 770-779.

[19] 张瑞, 王洋, HUSSAIN S, 等. 水培条件下水稻全生育期耐盐筛选鉴定[J]. 植物遗传资源学报, 2021, 22(6): 1567-1581.

[20] 韩美丽, 陆荣生, 霍秀娟, 等. 水稻离体叶抗稻瘟病鉴定方法研究[J]. 安徽农业科学, 2009, 37(13): 6037-6039.

[21] SU J, WANG W, HAN J, et al. Functional divergence of duplicated genes results in a novel blast resistance gene *Pi50* at the *Pi2/9* locus[J]. *Theoretical and Applied Genetics*, 2015, 128: 2213-2225.

[22] 汪文娟, 周继勇, 汪聪颖, 等. 八个抗稻瘟病基因在华南籼型杂交水稻中的分布[J]. 中国水稻科学, 2017, 31(3): 299-306.

[23] 华丽霞, 汪文娟, 陈深, 等. 抗稻瘟病 *Pi2/9/z-t* 基因特异性分子标记的开发[J]. 中国水稻科学, 2015, 29(3): 305-310.

[24] 金名捺, 陈竹锋, 丘式浚, 等. 基于 HRM 体系的稻瘟病抗性基因 *Pi2* 特异性分子标记的开发及应用[J]. 农业生物技术学报, 2018, 26(3): 365-373.

[25] 高利军, 高汉亮, 颜群, 等. 4 个抗稻瘟病基因分子标记的建立及在水稻亲本中的分布[J]. 杂交水稻, 2010, 25(S1): 294-298.

[26] WU Y, XIAO N, YU L, et al. Combination patterns of major *R* genes determine the level of resistance to the *M. oryzae* in Rice (*Oryza sativa* L.)[J]. *PLoS One*, 2015, 10(6): e0126130. doi: 10.1371/journal.pone.0126130.

[27] 李潜龙. 水稻抗稻瘟病基因 *Pi2* 功能标记的开发及育种应用[D]. 长沙: 湖南农业大学, 2018.

[28] 李冰, 李永聪, 刘芝好, 等. 水稻抗稻瘟病基因 *Pi2* 特异性分子标记的开发与应用[J]. 分子植物育种, 2021, 19(8): 2638-2643.

[29] 杨义强, 朱林峰, 李晓芳, 等. 抗稻瘟病基因 *Pi2* 的基因特异性 KASP 标记开发与應用[J]. 植物遗传资源学报, 2021, 22(5): 1314-1321.

[30] 邓钊, 江南, 符辰建, 等. 隆两优与晶两优系列杂交稻的稻瘟病抗性基因分析[J]. 作物学报, 2022, 48(5): 1071-1080.