

空间诱变水稻 DH104 的稻瘟病抗性分析及抗病基因定位

孙大元^{1,2†}, 肖武名^{1†}, 杨祁云², 王 慧¹, 郭 涛¹, 刘永柱¹, 张建国¹, 朱小源², 陈志强¹

(1 华南农业大学, 国家植物航天育种工程技术研究中心, 广东 广州 510642;

2 广东省农业科学院 植物保护研究所, 广东 广州 510640)

摘要: 采用来自广东各稻作区的 39 个不同致病型稻瘟病代表菌株, 对由沪早 B 经空间突变而来的优质籼稻抗源 DH104 进行抗谱分析. 结果发现, DH104 的抗谱达到 100%, 而 8 个单基因品系的抗谱均在 80% 以下. 为了挖掘和定位 DH104 含有的稻瘟病抗性基因, 选用广致病谱病菌 GD0193 对 DH104 进行遗传分析. 用 GD0193 接种 DH104 和高感稻瘟病籼稻材料 L101 杂交获得的 F₂ 群体, 结果发现, F₂ 群体抗病与感病植株的比例符合 3:1 的理论比值 (313R:97S, $\chi^2 = 0.8961$), 表明 DH104 对 GD0193 的抗性由一个显性主效基因控制, 暂命名为 Pixt(t) 基因. 利用 SSR 标记将其初步定位在第 6 染色体短臂 RM136 和 RM7213 之间, 遗传距离分别为 4.9 和 1.5 cM.

关键词: 水稻; 稻瘟病; 抗性分析; 基因定位

中图分类号: S435.111.41

文献标志码: A

文章编号: 1001-411X(2011)03-0018-04

Analysis of Resistance to Blast and Mapping of Rice Blast Resistance Gene in DH104

SUN Da-yuan^{1,2†}, XIAO Wu-ming^{1†}, YANG Qi-yun², WANG Hui¹,

GUO Tao¹, LIU Yong-zhu¹, ZHANG Jian-guo¹, ZHU Xiao-yuan², CHEN Zhi-qiang¹

(1 National Engineering Research Center of Plant Space Breeding, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China;

2 Plant Protection Research Institute, Guangdong Academy of Agricultural Sciences, Guangzhou 510640, China)

Abstract: The DH104, an *indica* rice mutant from Huhuan B, and eight monogenic lines were subjected to resistance spectrum with 39 isolates collected from Guangdong Province, China. The results showed that DH104 conferred broader resistance spectrum than the eight monogenic lines. To identify and map the blast resistance gene in DH104, a representative isolate GD0193 was used to identify and map R gene from DH104. Isolate GD0193 was used for inoculating a population of F₂ derived from the cross between DH104 and highly susceptible variety L101 (*indica*). The results showed that the segregation of resistant (R) and susceptible (S) progenies fitted a 3:1 ratio in the F₂ population (313R:97S, $\chi^2 = 0.8961$), indicating the R gene was controlled by a single dominant gene, temporarily designed as Pixt(t) gene. The R gene was located between RM136 and RM7213 on chromosome 6 using SSR markers, with genetic distances 4.9 and 1.5 cM respectively.

Key words: *Oryza sativa*; rice blast; resistance analysis; gene mapping

收稿日期: 2010-12-01

作者简介: 孙大元(1984—), 男, 硕士研究生; 肖武名(1982—), 男, 博士; † 对本文贡献相同; 通信作者: 陈志强(1956—), 男, 教授, E-mail: chenlin@scau.edu.cn

基金项目: 863 计划项目(2007AA100101); 国家科技支撑计划项目(2008BAD97B02); 广东省自然科学基金(815106400100002); 国家和广东省现代农业产业技术体系资助

由病原真菌小种 *Mangrospora grisea* (Hebert) *barr* 引起的稻瘟病是全球水稻生产上最具毁灭性的病害之一^[1]。据估计,全球每年因稻瘟病危害造成约 50 亿美元的损失^[2]。在我国,稻瘟病每年都不同程度地发生和流行,近几年,在西南、长江中游和东北等稻区持续大流行,年发病面积达 330 万 ~ 570 万 hm^2 , 给我国的粮食安全带来隐患^[3]。目前,对稻瘟病的控制,一般采用季节调整、化学防治和种植抗性品种。季节调整常受不同作物茬口的影响而不易操作;化学防治既增加成本又没有长期有效的杀菌剂,而且污染环境,还会增加稻谷中的农药残留量,尤其在病害大流行的年份,感病品种即便多次施药也效果甚微;抗病新品种往往由于病原菌小种致病性的演变与遗传的易变性,常常在推广几年后丧失抗性^[4]。即便如此,长期的生产实践证明,利用遗传抗性、选育和利用抗病品种是最有效、最经济、对环境最友好的防治策略,也符合人类对绿色食物的要求,而培育抗性品种关键在于掌握较好的抗性基因来源^[5]。

迄今,通过广泛的遗传分析,已至少报道了 64 个抗稻瘟病位点共 75 个主效基因。这些基因成簇地分布于除第 3 染色体外的所有水稻染色体上(1 个隐性,其他显性),其中, *Pib*、*Pita*、*Pi2*、*Piz-t*、*Pi9*、*Pid2*、*Pi21*、*Pi36*、*Pi37*、*Pikm*、*Pi5*、*Pid3*、*Pit*、*Pish*、*Pib1* 等 15 个基因已被成功克隆,*Pi2*、*Piz-t* 和 *Pi9* 同为 *Piz* 基因位点上的复等位基因(国家水稻数据中心, <http://www.ricedata.cn/>)。分离和克隆优异的抗稻瘟病基因,利用分子标记辅助选择(Marker-assisted selection, MAS)技术将多个具有不同抗谱的稻瘟病抗性基因聚合到同一水稻品种中,有利于培育具有持久抗性的水稻品种^[6]。航天育种在创造优异新种质、诱导新的基因资源突变和培育农作物新品种上已发挥其独特的优势和作用,是农作物遗传改良的新途径,是未来作物育种新技术的重要组成部分^[7]。实践证明,空间诱变手段可对水稻品种的稻瘟病抗性进行有效改良,且已育成多个抗稻瘟病优良品种^[8-11]。但空间诱变稻瘟病抗性变异的机制很复杂,需要更为系统地研究。

国家植物航天育种工程技术研究中心在对水稻保持系沪早 B 的空间诱变后代进行稻瘟病抗性初筛时,发现 1 份编号为 DH104 的早熟矮秆材料表现出广谱抗性(数据未发表)。因此,有必要将其抗病基因挖掘出来,用于抗病育种。本研究通过对 DH104 的稻瘟病抗谱测定和抗性遗传分析,利用分离群体分析法(Bulked-segregant analysis, BSA)和隐性群体分析

法(Recessive-class analysis, RCA)^[12]结合 SSR 等分子标记技术快速定位了 DH104 的 1 个抗性基因,并构建出该基因的分子遗传连锁图。

1 材料与方法

1.1 材料

高抗稻瘟病材料 DH104、高感稻瘟病籼稻材料 L101,均由国家植物航天育种工程技术研究中心提供;IBBL1-CL(含 *Pi1* 基因)、IRBL9-W(含 *Pi9* 基因)、F128-1(含 *Pita*² 基因)、IRBLz5-CA(含 *Pi-z5* 基因)、IRBLkh-k3(含 *Pikp* 基因)、IRBLsh-S(含 *Pish* 基因)、IRBLz-Fu(含 *Piz* 基因)和 IRBLi-F5(含 *Pii* 基因)等 8 个单基因品系,由 IRRI 和中国农业科学院作物研究所提供。

1.2 方法

1.2.1 抗性鉴定和抗谱分析 人工接种鉴定:采用 39 个来自广东各稻作区的不同致病型稻瘟病代表菌株对 DH104、感病亲本 L101 及 8 个单基因品系进行抗谱测定,接种 7 d 后调查抗性表现^[13]。菌株 GD0193 被选作抗性遗传分析菌株,被中国 7 个鉴别寄主鉴定为 ZB13 小种,属于籼型致病小种;采用 14 个对广东稻瘟病菌具有较好鉴别能力的单基因鉴别寄主进行鉴定,致病型为 I-01-04, GD0193 可侵染 *Pik*、*Pikp*、*Pi7(t)* 基因等 8 个单基因鉴别寄主,其致病谱较广,具有较好的代表性^[14]。所有材料的种子催芽后单粒穴播于塑料育秧盘中。稻苗采取早育栽培,长至一叶一心期,用硫酸铵施肥,每盆施用 0.5 g,接种前共施 3 次。待稻苗长至 3.5 ~ 4.0 叶龄,进行人工喷雾接种。

1.2.2 水稻 DNA 提取 参照 Murray 和 Thompson^[15]的 CTAB 方法,从冷冻的水稻叶片中提取各个植株的基因组 DNA。DH104 与 L101 杂交的 F_2 代群体经 GD0193 接种鉴定后,分别选取 10 个高度抗病和 10 个高度感病个体等量混合其 DNA 组成抗病池(显性池)和感病池(隐性池)。

1.2.3 SSR 分析 所用引物序列均来自 <http://www.gramene.org/db/cmap>,由上海生工生物工程技术服务有限公司合成,共 408 对,均匀分布于水稻 12 条染色体上。PCR 反应主要在 PTC-100 型 PCR 扩增仪(MJ 公司)上进行;25 μL PCR 反应体系中含有:0.2 $\mu\text{mol/L}$ 引物,0.1 mmol/L dNTPs,1 \times PCR Buffer,20 ~ 50 ng 模板 DNA,1U *Taq* DNA 聚合酶。反应程序:94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 3 min;94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 55 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 45 s, 35 个循环;72 $^{\circ}\text{C}$ 再延伸 5 min。扩增产物在

w 为 8% 的聚丙烯酰胺凝胶中电泳,快速银染法染色观察^[16].

1.2.4 遗传图谱的构建 DH104 与 L101 杂交的 F_2 代群体经 GD0193 接种鉴定后,收集感病的 F_2 个体,构建隐性作图群体,采用隐性群体进行连锁分析,重组率按 Kosambi^[17] 作图函数转换成遗传距离^[18].

2 结果与分析

2.1 DH104 的抗性评价

39 个代表性菌株的测定结果表明,DH104 抗谱为 100%, IRBLkh-k3、IBBL1-CL、IRBL9-W、F128-1、IRBLz5-CA、IRBLsh-S、IRBLz-Fu 和 IRBLi-F5 等 8 个单基因品系的抗谱均低于 80%,分别为 27.8%、69.4%、72.2%、52.8%、77.8%、27.8%、36.1% 和 19.4%.感病亲本 L101 的抗谱为 30.5%,远窄于 DH104 的 100%.

2.2 定位群体的抗感分离结果

DH104 与 L101 杂交的 F_1 代全部高抗 GD0193,表明其对该菌株的抗性为显性.接种结果表明其 F_2 代群体包含 313 个抗病个体和 97 个感病个体,抗感比例为 3.226:1,符合 3:1 的理论比例($\chi^2 = 0.8961$),说明 DH104 对 GD0193 的抗性由 1 个显性主效基因控制,暂命名为 $Pixt(t)$ 基因.

2.3 抗性基因分子定位

选取 408 个均匀分布在水稻 12 条染色体的 SSR 标记,对 DH104 和 L101 进行多态性分析,其中 98 个 SSR 标记在两亲本间有多态性.进一步利用在两亲本间表现出多态性的 98 对引物扩增抗病基因池和感病基因池,结果发现第 6 染色体短臂上的 3 个 SSR 标记 RM136、RM197 和 RM541 在两池间表现出多态性.

为了界定 $Pixt(t)$ 基因位点所在的区域,我们以 SSR 标记 RM136 作为起点,在 GRAMENE 数据库 (<http://www.gramene.org/>) 中向其两侧各 20 cM 区域搜索公共 SSR 标记各 10 个.然后用这 20 个 SSR 标记对两亲本进行分析,结果表明只有 3 个 SSR 标记 RM549、RM7213 和 RM3 在抗感亲本间检测到多态性.

利用上述多态性标记对 F_2 群体中获得的总共 71 个极端感病个体(其中有 10 多株因感病严重而枯死,无法提取 DNA)进行连锁分析,结果表明 RM136、RM549、RM7213 和 RM3 都与抗病基因连锁,其中 RM549 和 RM136 位于该基因的左侧,各检测出 13 和 5 个重组体,转换成遗传距离分别为 9.6

和 4.9 cM,而 RM7213 和 RM3 位于该基因的右侧,各检测出 2 和 26 个重组体,转换成遗传距离分别为 1.5 和 18.6 cM.根据这 4 个 SSR 标记与目的基因的连锁关系,构建了覆盖抗性基因 $Pixt(t)$ 的遗传连锁图(图 1).通过图 1 可知目的基因被界定到 SSR 标记 RM136 与 RM7213 之间约 6.4 cM 的遗传区域.

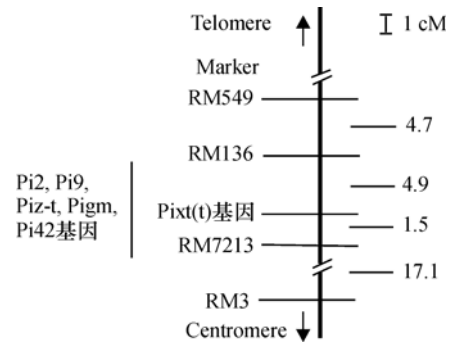


图 1 $Pixt(t)$ 基因的遗传连锁图

Fig. 1 Genetic map of $Pixt(t)$ gene

3 讨论

抗病基因常常在特定染色体区域成簇存在^[19].在已定位的 84 个稻瘟病抗性基因中,超过半数的基因以基因簇的形式分布于水稻的不同染色体区域^[3].其中,最大的 3 个基因簇分别位于水稻的第 6、11 和 12 染色体上.迄今,至少发现有 9 个抗性基因 $Pi2$ ^[20]、 $Pi9$ ^[21]、 $Pi22$ ^[22]、 $Pi25$ ^[23]、 $Pi26$ ^[24]、 $Pi40$ ^[25]、 $Pigm$ ^[26]、 Piz 和 $Piz-t$ ^[20] 成簇分布于第 6 染色体短臂近着丝粒附近.在该基因簇中, $Pi2$ 、 $Pi9$ 和 $Piz-t$ 已被克隆. Deng 等^[26] 将谷梅 4 号的抗性基因 $Pigm$ 定位到与上述 3 个已克隆的基因相同的 BAC 克隆 AP005659 上.在该基因簇中,其他基因定位的区域比较大,但均覆盖了 $Pi2$ 、 $Pi9$ 、 $Piz-t/Piz$ 、 $Pigm$ 和 $Pi40$ 基因所在的区域,表明它们之间紧密连锁或者是等位基因.我们鉴定的 $Pixt(t)$ 基因也被定位在这个大基因簇中.然而 $Pixt(t)$ 基因定位的区域比较大,也覆盖了这些基因所在的区域, $Pixt(t)$ 是它们的等位基因还是一个新的基因有待进一步的研究.

本研究通过抗谱测定发现 DH104 抗谱为 100%,而同在一个区域的单基因系 $Pi2(Pi-z5)$ 、 $Pi9$ 、 Piz 的抗谱分别为 77.8%、72.2% 和 36.1%.很显然,它们之间有很大的区别,但这也不足以说明它们是完全不同的.因此,想要弄清它们之间的关系,我们需要开展进一步的相关研究:一方面,可通过构建更大的定位群体,展开对该基因的精细定位和克隆;另一方面,可以开展等位性分析工作,来确定它们是否

等位;再次,可以构建 $Pix(t)$ 的单基因系,进行单基因系间的抗性测定,来明确它们之间的关系.另外,具有广谱抗性的 DH104 可以作为一个优异的稻瘟病抗源,结合分子标记辅助育种,发挥其独特的育种价值.

参考文献:

- [1] OU S H. Rice diseases[M]. 2nd ed. Kew:Common Wealth Mycological Institute,1985:109-201.
- [2] JEON J S, CHEN D, YI G H, et al. Genetic and physical mapping of $Pi5(t)$, a locus associated with broad-spectrum resistance to rice blast [J]. Molecular Genetics and Genomics, 2003, 269:280-289.
- [3] 杨勤忠,林菲,冯淑杰,等.水稻稻瘟病抗性基因的分子定位及克隆研究进展[J].中国农业科学,2009,42(5):1601-1615.
- [4] WANG Guo-liang, MACKILL D J, BONMAN J M, et al. RFLP mapping of genes conferring complete and partial resistance to blast in a durably resistant rice cultivar[J]. Genetics, 1994, 136:1421-1434.
- [5] JIA Yu-lin, WANG Zhong-hua, SINGH P. Development of dominant rice blast Pi -ta resistance gene markers[J]. Crop Science, 2002, 42(6):2145-2149.
- [6] HITITALMANI S, PARCO A, MEW T V, et al. Fine mapping and DNA marker-assisted pyramiding of the three major genes for blast resistance in rice [J]. Theoretical and Applied Genetics, 2000, 100(7):1121-1128.
- [7] 陈志强,郭涛,刘永柱.水稻航天育种研究进展与展望[J].华南农业大学学报,2009,30(1):1-5.
- [8] 张国民,孙野青,李明贤,等.航天诱变水稻对叶瘟和穗瘟的抗性鉴定[J].植物保护,2003,29(2):36-39.
- [9] 杨祁云,王慧,林佩珍,等.水稻空间诱变第一代材料抗稻瘟病研究初报[C]//彭友良.中国植物病理学会2004年学术年会论文集.北京:中国农业科技出版社,2004:332-334.
- [10] 杨祁云,王慧,林佩珍,等.水稻空间诱变育种抗稻瘟病研究[J].植物保护学报,2005,32(3):251-255.
- [11] 肖武名,杨祁云,陈志强,等.空间诱变水稻品系抗稻瘟病遗传及微卫星多态性分析[J].中国农业科学,2008,41(12):3952-3958.
- [12] ZHANG Q, SHEN B Z, DAI X K, et al. Using bulked extremes and recessive class to map genes for photoperiod-sensitive genic male sterility in rice [J]. Proc Natl Acad Sci, 1994, 91:8675-8679.
- [13] 朱小源,杨祁云,杨健源,等.抗稻瘟病单基因系对籼稻稻瘟病菌小种鉴别力分析[J].植物病理学报,2004,34(4):361-368.
- [14] 杨祁云,伍尚忠,朱小源,等.广东稻瘟病菌的遗传宗谱与致病性的关系研究[J].植物保护学报,2000,27(4):289-294.
- [15] MURRAY M G, THOMPSON W K. Rapid isolation of high-molecular-weight plant DNA [J]. Nucleic Acids Res, 1980, 8:4321-4325.
- [16] 杨祁云,洪彦彬,陈志强,等.空间诱变品系稻瘟病抗性变异及分子标记研究[J].植物病理学报,2008,38(6):592-598.
- [17] KOSAMBI D D. The estimation of map distances from recombination values [J]. Ann Eugen, 1944, 12:172-175.
- [18] PAN Q H, HU Z D, TAKATOSHI T, et al. Fine mapping of the blast resistance gene $Pi15$, linked to Pii , on rice chromosome 9 [J]. Acta Botanica Sinica, 2003, 45:871-877.
- [19] SUDUPAK M A, BENNETZEN J L, HULBERT S H. Unequal exchange and meiotic instability of disease-resistance genes in the RP1 region of maize [J]. Genetics, 1994, 133:119-125.
- [20] ZHOU B, QU S, LIU G, 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, 19:1216-1228.
- [21] QU Shao-hong, LIU Gui-fu, ZHOU Bo, et al. The broad-spectrum blast resistance gene $Pi9$ encodes a nucleotide-binding site-leucine-rich repeat protein and is a member of a multigene family in rice [J]. Genetics, 2006, 172:1901-1914.
- [22] AHN S N, KIM Y K, HONG H C, et al. Molecular mapping of a new gene for resistance to rice blast (*Pyricularia grisea* Sacc.) [J]. Euphytica, 2000, 116:17-22.
- [23] ZHUANG Jie-yun, MA Wen-bin, WU Jian-li, et al. Mapping of leaf and neck blast resistance genes with resistance gene analog, RAPD and RFLP in rice [J]. Euphytica, 2002, 128:363-370.
- [24] WU J L, FAN Y Y, LI D B, et al. Genetic control of rice blast resistance in the durably resistant cultivar Gumei2 against multiple isolates [J]. Theoretical and Applied Genetics, 2005, 111(1):50-56.
- [25] 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]. Theoretical and Applied Genetics, 2007, 115(8):1163-1177.
- [26] DENG Yi-wen, ZHU Xu-dong, SHEN Ying, et al. Genetic characterization and fine mapping of the blast resistance locus $Pigm(t)$ tightly linked to $Pi2$ and $Pi9$ in a broad-spectrum resistant Chinese variety [J]. Theoretical and Applied Genetics, 2006, 113(4):705-713.

【责任编辑 周志红】