

## 利用 *Pi9* 基因序列标记辅助选择改良籼稻稻瘟病抗性

文婷<sup>1a,2</sup>, 梁毅<sup>1a,2</sup>, 江南<sup>1a,2</sup>, 李智强<sup>1a,2</sup>, 刘金灵<sup>1a,2</sup>, 杨婷婷<sup>1a,2</sup>, 戴良英<sup>1b,2</sup>, 王国梁<sup>1a,2</sup>, 刘雄伦<sup>1a,2\*</sup>

(1. 湖南农业大学 a. 农学院; b. 生物安全科学技术学院, 湖南 长沙 410128; 2. 作物基因工程湖南省重点实验室, 湖南 长沙 410128)

**摘 要:** 利用广谱抗稻瘟病基因 *Pi9* 基因序列设计的特异分子标记 Pi9-a, 通过回交育种和分子标记辅助选择技术, 改良 8 份受体水稻材料(丰源 B、II 32B、天龙香 103、香丰 187、明恢 63、轮回 422、R747、25H003)的稻瘟病抗性。结果表明: 分子标记 Pi9-a 对 8 份受体亲本与 *Pi9* 供体亲本 75-1-127 间进行的多态性检测中, 除香丰 187 外, 其余 7 个组合间均存在稳定明显的多态; 对 4 个 BC<sub>1</sub>F<sub>1</sub> 群体进行随机取样的基因型和表型鉴定中, Pi9-a 对抗稻瘟病表型选择的效率均为 100%。

**关 键 词:** 水稻; 稻瘟病; *Pi9* 基因; 标记辅助选择; 分子育种

中图分类号: Q78 文献标志码: A 文章编号: 1007-1032(2012)03-0262-05

## Improving blast resistance of *indica* rice lines by *Pi9* gene marker-assisted selection

WEN Ting<sup>1a,2</sup>, LIANG Yi<sup>1a,2</sup>, JIANG Nan<sup>1a,2</sup>, LI Zhi-qiang<sup>1a,2</sup>, LIU Jin-ling<sup>1a,2</sup>, YANG Ting-ting<sup>1a,2</sup>,

DAI Liang-ying<sup>1b,2</sup>, WANG Guo-liang<sup>1a,2</sup>, LIU Xiong-lun<sup>1a,2\*</sup>

(1.a. College of Agronomy; b. College of Bio-Safety Science and Technology, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China; 2. Crop Gene Engineering Key Laboratory of Hunan Province, Changsha 410128, China)

**Abstract:** In this study, a specific inner genic molecular marker Pi9-a was developed based on the sequence of the *Pi9* gene, and was employed for improving the blast resistance of 8 receptor *indica* rice lines (FengyuanB, II 32B, Tianlongxiang103, Xiangfeng187, Minghui63, Lunhui422, R747 and 25H003) through marker-assisted selection (MAS) and back-cross breeding. Pi9-a showed obvious and stable polymorphisms between the donor line of *Pi9*, 75-1-127 and 8 receptor lines except Xiangfeng187. The individuals from 4 BC<sub>1</sub>F<sub>1</sub> populations were genotyped and phenotyped, and the result showed that the selection efficiency using Pi9-a was 100%.

**Key words:** rice; rice blast; *Pi9* gene; marker-assisted selection; molecular breeding

超级杂交稻种植面积快速增加, 由于其相对较窄的遗传基础和大量使用氮肥, 使得稻瘟病在种植区域广泛流行。长期的实践表明, 选育和利用抗病品种(组合)是控制稻瘟病害最安全、经济、环保的方法<sup>[1-2]</sup>。

近年来, 越来越多的抗稻瘟病基因或 QTL 被定位和克隆。*Pi9* 是已克隆的 21 个抗稻瘟病主效基

因之一<sup>[3-29]</sup>, 位于水稻第 6 号染色体短臂近着丝粒区域的 *Pi2* 位点, 该基因对来自多个国家的多数稻瘟病菌生理小种表现出较高水平的抗性。笔者拟利用已克隆的 *Pi9* 基因序列设计基因内特异分子标记 Pi9-a, 分析该分子标记在 8 份水稻受体材料与 *Pi9* 基因供体亲本 75-1-127 之间的多态性, 利用多态标记在各回交群体中进行基因型鉴定和选择, 结合

收稿日期: 2012-02-04

基金项目: 国家自然科学基金项目(31171526); 国家转基因生物新品种培育重大专项(2011ZX08001-002)

作者简介: 文婷(1987—), 女, 湖南岳阳人, 硕士研究生, 主要从事作物遗传育种研究, wenting871013@126.com; \*通信作者, xionglun@yahoo.com

室内接种表型验证,分析分子标记辅助选择效率,以期定向改良这些受体亲本对稻瘟病的抗性。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

*Pi9* 基因受体水稻亲本:丰源 B、II 32B、天龙香 103、香丰 187、明恢 63、轮回 422、R747、25H003,共 8 份。

*Pi9* 基因供体水稻亲本 75-1-127。稻瘟病菌室内喷雾接种感病对照 CO39。稻瘟病菌生理小种共 18 份:CHL440、CHL446、CHL471、CHL473、CHL506、CHL1743、X2007A-1、318-2、RB14、87-4、110-2、193-1-1、195-2-2、E2007O46A<sub>2</sub>、ROR1、KJ201、KOH、chnos60-2-3。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 分子标记的建立

*Pi9* 属于 NBS-LRR 类基因,含有 2 个内含子,长度分别为 5 362 bp 和 128 bp,*Pi9* cDNA 全长 4 009 bp,包含 3 099 bp 的编码区和 910-bp 3' UTR。通过设计基因内特异功能标记 *Pi9*-a(待发表),分析 *Pi9*-a 在 8 份水稻受体材料与 *Pi9* 基因供体亲本 75-1-127 之间的多态性,并进一步对各亲本组合的回交后代进行分子标记辅助选择。

#### 1.2.2 模板 DNA 的提取

对受体、供体亲本及各组合的杂交、回交后代单株,各取约 0.2 g 新鲜叶片置于 2.0 μL 离心管中,液氮研磨,CTAB 法<sup>[32]</sup>提取总 DNA。

#### 1.2.3 标记分析与鉴定

利用标记分别 PCR 扩增所有 DNA 样品材料,分析其在受体亲本和供体亲本间的多态性,鉴定含目标基因的后代单株。

PCR 反应体系(10 μL)为:10×Buffer 1.0 μL,2.5 mmol/L dNTPs 0.2 μL,2 pmol/μL primer pair 1 μL,5 U/μL *Taq* 酶 0.1 μL,DNA 模板(约 10 ng/μL)1.0 μL,ddH<sub>2</sub>O 6.7 μL。PCR 反应程序为:94 °C 预变性 4 min,94 °C 变性 30 s,50 °C 退火 30 s,72 °C 延伸 1 min,35 个循环,72 °C 延伸 7 min。

扩增产物用 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳,观察标记电泳表型,分析对应基因型。

#### 1.2.4 改良回交群体构建与分子标记辅助选择

经分子标记 *Pi9*-a 检验亲本多态性后,用 8 份水稻材料中与 75-1-127 具有多态的亲本作受体及轮回亲本,分别与 75-1-127 杂交及逐代回交。每个组合每代田间种植 15 株并编号,苗期单株取样,提取总 DNA,用特异多态分子标记 PCR 扩增,鉴定各单株基因型,并结合田间综合农艺性状的背景筛选,选 3~5 株含 *Pi9* 基因的阳性植株与轮回亲本回交,构建各组合各代回交混合群体。通过 2009、2010、2011 年在长沙和三亚两地的穿梭试验,获得各组合的 BC<sub>3</sub>F<sub>1</sub> 代群体。

#### 1.2.5 室内接种表型鉴定

接种材料包括供体亲本、受体亲本、BC<sub>1</sub>F<sub>1</sub> 及感病对照水稻品种 CO39。供试水稻材料分批播种于透明塑料盆(20 cm×15 cm×30 cm)中,育苗基质是不添加腐殖质的花卉营养土,幼苗在 26~28 °C 的人工气候箱里 12 h 光照、12 h 黑暗培养,四叶期采用单个生理小种约 1×10<sup>5</sup>/mL 的稻瘟菌孢子悬浮液室内喷雾活体接种后,26 °C 黑暗保湿 24 h,再在 26~28 °C 正常光照条件下高湿培养 5~7 d,参照 Bonman 的 0~5 级标准调查病情(0~2 级划为抗病类型,3~5 级划为感病类型)<sup>[30]</sup>。

## 2 结果与分析

### 2.1 亲本材料的稻瘟病抗谱

利用 18 个稻瘟病菌生理小种,对供体与受体亲本进行抗性鉴定及抗谱分析,并筛选对受体亲本致病性较强的小种,用于鉴定分子标记辅助选择的效率。结果(表 1)表明,各供试材料对 18 个生理小种的抗性表现及抗谱差异明显。轮回 422 抗性较差,抗谱较窄,对 13 个小种表现感病;明恢 63 和 II 32B 相对抗性较好,只对 3 个小种表现感病;*Pi9* 基因供体 75-1-127 对 16 个小种表现抗性,但对韩国小种 ROR1 和日本小种 KOH 表现感病;感病对照品种 CO39 对全部供试小种表现感病。各受体材料均可找到至少 1 个区别于 *Pi9* 基因抗谱的特性感病小

种,用于分子标记辅助选择育种中的表型验证。另外,丰源 B、天龙香 103、香丰 187、明恢 63 和 R747 均对 *Pi9* 基因致病小种 ROR1 和 KOH 表现抗病,有望获得比 *Pi9* 基因抗谱更广的水稻新材料。

表 1 亲本材料的稻瘟病抗谱  
Table 1 Resistance spectrum comparison among parents to different *M.oryzae* isolates

稻瘟病菌生理小种	抗 性									
	丰源 B	II 32B	天龙香 103	香丰 187	明恢 63	轮回 422	R747	25H003	75-1-127	CO39
CHL471	R	R	S	R	R	S	R	R	R	S
CHL473	R	R	S	S	R	R	R	R	R	S
CHL440	R	R	S	S	R	S	S	S	R	S
CHL1743	R	R	S	S	R	S	R	R	R	S
CHL446	R	R	S	R	R	R	R	R	R	S
E2007O46A <sub>2</sub>	S	R	R	R	S	S	R	R	R	S
X2007A-1	S	S	R	S	R	S	S	R	R	S
318-2	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S
RB14	R	R	R	S	R	S	S	R	R	S
87-4	R	R	R	S	S	R	S	R	R	S
ROR1	R	S	R	R	R	S	R	R	S	S
KJ201	S	R	R	R	R	S	S	S	R	S
110-2	R	R	R	S	S	S	R	S	R	S
193-1-1	R	R	R	R	R	R	S	S	R	S
195-2-2	R	R	S	S	R	S	R	S	R	S
KOH	R	S	R	R	R	S	R	S	S	S
chnos60-2-3	R	R	S	R	R	S	R	S	R	S
CHL506	S	R	S	R	R	S	R	R	R	S

“S”表示感病;“R”表示抗病。

2.2 分子标记 Pi9-a 在亲本间的多态性

为验证 *Pi9* 基因内特异分子标记 Pi9-a 在基因型辅助选择育种中的实用性,利用这套标记对 8 份受体水稻亲本和 *Pi9* 基因供体亲本 75-1-127 进行 PCR 扩增,结果 Pi9-a 在 75-1-127 和香丰 187 基因组中扩增出 1 条 513 bp 的清晰稳定特异片段,而在另外 7 个受体亲本中没有扩增产物,即该分子标记在丰源 B、II 32B、天龙香 103、明恢 63、轮回 422、R747、25H003 与 75-1-127 之间表现出稳定易辨的多态性;因此, Pi9-a 可以用在这 7 份受体材料的回交育种中进行分子标记辅助选择,改良其稻瘟病抗性。

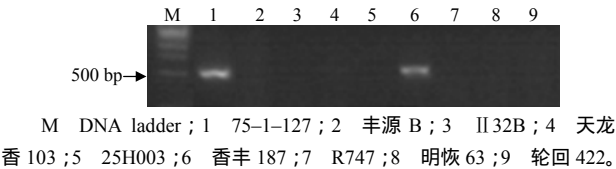
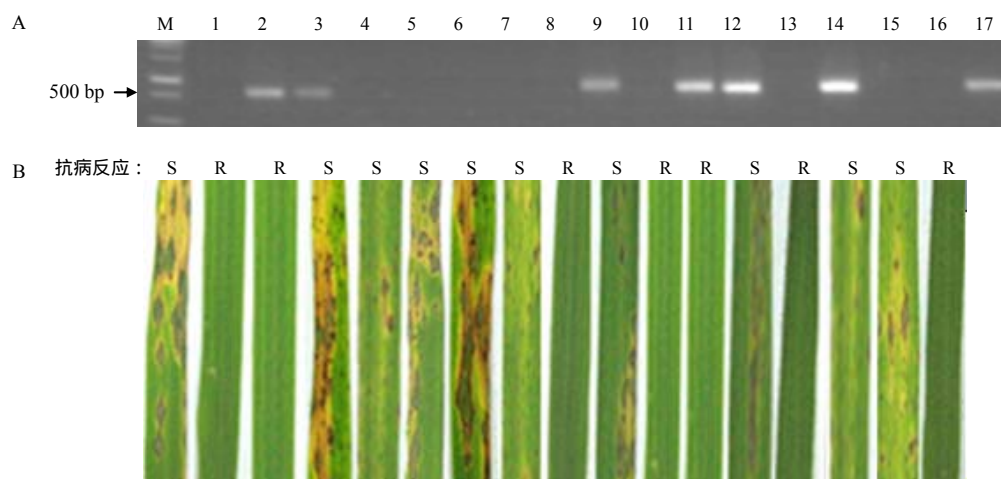


图 1 Pi9-a 对受体水稻基因组的 PCR 扩增结果  
Fig. 1 PCR amplification of molecular marker Pi9-a to tested receptor rice lines

2.3 Pi9-a 选择目标单株的效率

根据多态性筛选结果,利用 Pi9-a 对丰源 B、II 32B、天龙香 103、明恢 63、轮回 422、R747 和 25H003 等 7 份受体水稻材料开展了分子标记辅助选择育种研究。2009—2011 年,用 7 个受体亲本分别与 75-1-127 杂交及连续回交,并在每个回交世代进行基因型选择,经过长沙和三亚两地的穿梭试验,获得了 7 个组合的 BC<sub>3</sub>F<sub>1</sub> 代群体。

选用天龙香 103、25H003、轮回 422 和 R747 与 75-1-127 的 4 个 BC<sub>1</sub>F<sub>1</sub> 群体,验证 Pi9-a 对稻瘟病抗性表型选择的效率。结果表明,在每个组合的 BC<sub>1</sub>F<sub>1</sub> 群体中随机选择的 15 株样本中, Pi9-a 与 *Pi9* 基因共分离,且基因型对表现型选择的效率均达 100%,说明 Pi9-a 是一个非常有效的分子标记。图 2 是天龙香 103/75-1-127 的 BC<sub>1</sub>F<sub>1</sub> 代的验证结果。图示琼脂糖电泳分析结果稳定易辨,用于分子标记辅助育种实践效果很好;室内喷雾接种结果抗感界限分明,感病叶片出现约 1~2 mm 椭圆形、中央灰白色、边缘褐色的典型病斑,或典型病斑相互连接成片,甚至叶片局部枯死。



A *Pi9-a* 的基因型鉴定结果; 1 天龙香 103; 2 75-1-127; 3~17 15 个  $BC_1F_1$  样本单株; B 稻瘟菌小种 CHL440 室内接种表型鉴定结果; 1 天龙香 103; 2 75-1-127; 3~17 15 个  $BC_1F_1$  对应样本单株。

图2 *Pi9-a* 对天龙香 103/75-1-127  $BC_1F_1$  群体的表型选择效率

Fig. 2 Phenotypic selection efficiency of *Pi9-a* in the  $BC_1F_1$  population of Tianlongxiang103/75-1-127

### 3 讨论

传统抗病育种通过表型鉴定和选择获得目标基因及目标性状,但抗病表型的出现受环境和生育时期的制约,从而影响选择的准确性。分子标记特别是 DNA 标记的出现,使水稻抗病育种从基于表型选择的传统育种阶段发展到基于基因型选择的分子育种。分子标记辅助选择可以有效地提高选择的准确性,并且可以在作物生长早期进行选择,大大提高了育种效率,加快了育种进程:只要找到与目标基因紧密连锁的分子标记,就可以通过基因型分析在育种群体中快速而准确地找到含有目标基因的个体。而最准确、高效莫过于利用抗病基因本身序列信息设计出的高效分子标记。此类标记几乎没有重组之忧,多态性广,分析手段节本省时,带型简单、稳定、易辨。本研究基于 *Pi9* 基因序列开发了基因内特异分子标记 *Pi9-a*,用于分子标记辅助育种实践,效果好。

由于稻瘟病菌生理小种的多样性及快速变异性,限制了稻瘟病抗性基因和抗性品种的推广应用,而聚合育种是解决这个问题的有效途径。目前,关于水稻抗病聚合育种研究已不鲜见于各研究单位,但结合基因内序列标记辅助选择的聚合育种有待深入研究与实践。可以充分利用已经克隆或精细定位的抗稻瘟病基因尤其是广谱抗性基因,如 *Pi9*、

*Pi2*、*Pi-zt*、*Pi-ta*、*Pi-z*、*Pigm* 等,通过分子育种方法,将多个基因聚合到同一个水稻品种中,育成具有广谱持久稻瘟病抗性的水稻新品种。

### 参考文献:

- [1] 赵振梅. 不同氮肥水平下水稻品种与稻瘟病菌小种互作模型的研制[J]. 植物病理学报, 2001, 31(4): 375-380.
- [2] 吴俊, 刘雄伦, 戴良英, 等. 水稻广谱抗稻瘟病基因研究进展[J]. 生命科学, 2007, 19(2): 233-238.
- [3] Zhou B, Qu S, Liu G, et al. The eight amino acid differences within three leucine-rich repeats between *Pi2* and *Pi-zt* resistance proteins determine the resistance specificity to *Magnaporthe grisea*[J]. MPMI, 2006, 19(11): 1216-1228.
- [4] Bryan G T, Wu K S, Farrall L, et al. A single amino acid difference distinguishes resistant and susceptible alleles of the rice blast resistance gene *Pi-ta* [J]. Plant Cell, 2000, 12: 2033-2046.
- [5] Lee Sang-Kyu, Song Min-Young, Seo Young-Su, et al. Rice *Pi5*-mediated resistance to *Magnaporthe oryzae* requires the presence of two CC-NB-LRR genes[J]. Genetics, 2009, 181(4): 1627-1638.
- [6] Qu S, Liu G, Zhou B, 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.
- [7] Fukuoka S, Okuno K. QTL analysis and mapping of *pi21*, a recessive gene for field resistance to rice blast in Japanese upland rice[J]. Theor Appl Genet, 2001, 103: 185-190.

- [8] Chen J , Shi Y F , Liu W Z , et al . A *Pid3* allele from rice cultivar Gumei 2 confers resistance to *Magnaporthe oryzae*[J] . JGG , 2011 , 38(5) : 209–216 .
- [9] 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] . Theor Appl Genet , 2003 , 106 : 794–803 .
- [10] Chen D H , M dela Vina , T Inukai , et al . Molecular mapping of the blast resistance gene , *Pi44(t)* , in a line derived from a durably resistant rice cultivar[J] . Theor Appl Genet , 1999 , 98 : 1046–1053 .
- [11] Sharma T R , Madhav M S , Singh B K , et al . High-resolution mapping , cloning and molecular characterization of the *Pi-kh* gene of rice , which confers resistance to *Magnaporthe grisea*[J] . MGG , 2005 , 274(6) : 569–578 .
- [12] Yudai Okuyama , Hiroyuki Kanzaki , Akira Abe , et al . A multifaceted genomics approach allows the isolation of the rice *Pia*-blast resistance gene consisting of two adjacent NBS-LRR protein genes[J] . Plant J , 2011 , 66(3) : 467–479 .
- [13] Wang Z X , Masahiro Yano , Utako Yamanouchi , et al . The *Pib* gene for rice blast resistance belongs to the nucleotide binding and leucine-rich repeat class of plant disease resistance genes[J] . Plant J , 1999 , 19 : 55–64 .
- [14] Chen X , Shang J , Chen D , et al . A B-lectin receptor kinase gene conferring rice blast resistance[J] . Plant J , 2006 , 46 : 794–804 .
- [15] Shang J J , Tao Y , Chen X W , et al . Identification of a new rice blast resistance gene , *Pid3* , by genome wide comparison of paired Nucleotide-Binding Site-Leucine-Rich Repeat genes and their pseudo gene alleles between the two sequenced rice genomes[J] . Genetics , 2009 , 182(4) : 1303–1311 .
- [16] Deng Y , Zhu Xu , Shen Y , 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] . Theor Appl Genet , 2006 , 113 : 705–713 .
- [17] Ikuo Ashikawa , Nagao Hayashi , Hiroko Yamane , et al . Two adjacent nucleotide-binding site Leucine-rich repeat class genes are required to confer *Pikm*-specific rice blast resistance[J] . Genetics , 2008 , 180 : 2267–2276 .
- [18] Yuan B , Zhai Ch , Wang W J , et al . The *Pik-p* resistance to *Magnaporthe oryzae* in rice is mediated by a pair of closely linked CC-NBS-LRR genes[J] . Theoretical and Applied Genetics , 2011 , 122(5) : 1017–1028 .
- [19] Zhai Ch , Lin F , Dong Zh Q , et al . The isolation and characterization of *Pik* , a rice blast resistance gene which emerged after rice domestication[J] . New Phytologist , 2011 , 189(1) : 321–334 .
- [20] Liu X Q , Lin F , Wang L , et al . The in silico map-based cloning of *Pi36* , a rice coiled-coil nucleotide-binding site leucine-rich repeat gene that confers race-specific resistance to the blast fungus[J] . Genetics , 2007 , 176 : 2541–2549 .
- [21] Lin F , Chen S , Que Z , et al . The blast resistance gene *Pi37* encodes a nucleotide binding site leucine-rich repeat protein and is a member of a resistance gene cluster on rice chromosome 1[J] . Genetics , 2007 , 177 : 1871–1880 .
- [22] 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(8) : 1163–1177 .
- [23] 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] . MPMI , 2006 , 19(11) : 1216–1228 .
- [24] 杨红 , 储昭晖 , 傅晶 , 等 . 抗稻瘟病主效 QTL *rbr2* 是 *Pib* 的等位基因[J] . 分子植物育种 , 2008 , 6(2) : 213–219 .
- [25] Nagao Hayashi , Haruhiko Inoue , Takahiro Kato , et al . Durable panicle blast-resistance gene *Pb1* encodes an atypical CC-NBS-LRR protein and was generated by acquiring a promoter through local genome duplication[J] . Plant J , 2010 , 64(3) : 498–510 .
- [26] Hayashi K , Yasuda N , Fujita Y , et al . Identification of the blast resistance gene *Pit* in rice cultivars using functional markers[J] . Theor Appl Genet , 2010 , 121(7) : 1357–1367 .
- [27] Akira Takahashi , Nagao Hayashi , Akio Miyao , et al . Unique features of the rice blast resistance *Pish* locus revealed by large scale retrotransposon-tagging[J] . BMC Plant Biology , 2010 , 10 : 175 .
- [28] Hayashi K , Hashimoto N , Daigen M , et al . Development of PCR-based SNP markers for rice blast resistance genes at the *Piz* locus[J] . Theor Appl Genet , 2004 , 108 : 1212–1220 .
- [29] Qu S , Liu G , Zhou B , 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 .
- [30] Bonman J M , Vergel D , Dios T I , et al . Physiologic specialization of *Pyricularia oryzae* in the philippines[J] . Plant Dis , 1986 , 70 : 767–769 .

责任编辑: 罗慧敏