

利用微卫星标记鉴定水稻的稻瘟病抗性

李仕贵^{1,2} 王玉平¹ 黎汉云¹ 周开达¹ 朱立煌^{2*}

¹(四川农业大学水稻研究所 温江 611130)

²(中国科学院遗传研究所 北京 100101)

摘 要 应用水稻稻瘟病抗性基因[*Pi-d(t)*]紧密连锁的微卫星标记 RM262 对含有该抗病基因的品种地谷与感病品种江南香糯和 8987 的杂交 F₂ 群体进行遗传分析和抗性鉴定,结果表明, RM262 的 PCR 扩增物在抗、感品种之间的多态性较好,在 2 个 F₂ 群体中, RM262 和抗病基因间的重组率分别为 5.74% 和 8.17%,应用该标记的抗性纯合和杂合带型选择抗性植株,其准确率可达 98% 以上。此外,还就分子标记辅助育种进行了讨论。

关键词 水稻 稻瘟病 微卫星 辅助育种

中图分类号 Q789 文献标识码 A 文章编号 1000-3061-(2000)0324-04

稻瘟病(*Pyricularia oryzae* Cav)是水稻的主要病害之一,近年来其危害面积正在逐年扩大,危害程度日趋严重,已成为水稻高产稳定的主要障碍因素之一。培育和种植抗病品种是控制这一病害的最经济有效的方法。传统的抗病育种依赖于抗性鉴定和植株表型选择,要求丰富的经验和长达数年甚至十几年的时间,并且受稻瘟病发病条件的限制,以及缺乏对抗病基因有效的追踪方法,很难选育出具有多个抗病基因的持久抗病品种,如何提高选择效率、减小育种进程中的盲目性,聚合多个抗性基因是将来抗病育种的关键。分子标记辅助选择是通过分析与抗病基因紧密连锁的分子标记的基因型来鉴别目标基因是否存在,这种间接的选择方法,因不受其它效应和环境因素的影响,可在早代进行选择,快速地将多个抗病基因聚合,培育出持久抗性品种。在水稻分子图谱上定位了许多抗稻瘟病基因(*Pi-zh*, *Pi-2*, *Pi-4*, *Pi-5*, *Pi-7*, *Pi-b*, *Pi-ta* 等)^[1-5],我们在新抗源的搜集整理基础上,已将一个新的抗稻瘟基因 *Pi-d(t)* 定位在第 2 染色体上,并筛选出与之紧密连锁的微卫星标记 RM262^[6]。本文在此基础上利用 RM262 对抗稻瘟基因 *Pi-d(t)* 进行鉴定和筛选。

1 材料和方法

1.1 植物材料

在 1996 年夏,以含有抗稻瘟病基因[*Pi-d(t)*]的

品种地谷为母本,感病品种江南香糯和 8987 为父本,配制杂交组合,翌年春季种植 F₁;1997 年正季,将亲本、F₁ 和 F₂ 群体种植于四川农业大学水稻研究所试验场。

1.2 供试菌系、菌液制备和接种鉴定

选用致病性比较稳定的广谱致病菌系 ZB₁₃ 为接种菌系,将感 ZB₁₃ 的水稻病穗颈分别用清水浸泡 24h 表面消毒后置于培养皿内的湿滤纸上,盖上皿盖置于 26℃~28℃ 的恒温箱内培养 48h,取出长有分生孢子的病穗颈,在显微镜下挑取单孢,移入琼脂淀粉培养基斜面上培养。2 星期后,在超净台上挑取斜面培养菌接种于三角烧瓶内灭过菌的高粱粒上,在恒温箱内培养 14d,当高粱粒表面长满菌丝时,倒出高粱粒,用清水洗去表面菌丝后,平铺于瓷盘上培养 2d,此时高粱粒表面长有许多分生孢子,用清水冲洗高粱粒上的分生孢子,配制成浓度为每毫升含 5×10⁴ 个分生孢子的悬浮液。

在水稻分蘖盛期,采用注射接种法,分别对亲本、F₁ 和 F₂ 接种致病菌系 ZB₁₃;距离稻颈顶端 10cm~12cm 处,将菌系的孢子悬浮液注入稻颈中央部位,直到多余孢子悬浮液从心叶冒出为止,每株注射 3~4 个分蘖。为了保证接种的可靠性,再辅以人工喷雾接种,接种后用薄膜覆盖保温 48h,7~9d 调查发病情况,并按凌忠专等介绍的方法进行抗病性定级和统计分析^[7]。

收稿日期:1999-06-30 修回日期:2000-01-24。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(39800102)。

* 联系作者。

1.3 植株 DNA 的提取和微卫星 (SSLR) 分析

在水稻分蘖期,分别取亲本、 F_1 和 F_2 群体各单株的新鲜叶片,参照 McCouch^[8]的方法提取单株 DNA。引物 RM262 以 Chen X 等提供的微卫星序列合成^[9]。PCR 反应体系按照 Panaud 等^[10]的方法进行,反应产物在 4% 琼脂糖凝胶中电泳,经溴化乙锭染色后在紫外灯下观察拍照。

表 1 地谷与江南香糯和 8987 的杂交后代群体对小种 ZB₁₃ 的抗性和微卫星分析

Table 1 Resistance segregation to blast strains and SSLP genotype in progeny populations of crosses between Digu and susceptible varieties

Parents and progeny populations	No. of R or S individuals		X^2	SSLP genotype			X^2	Recombination freq /%
	R	S		AA	Aa	aa		
Digu	20							
JNXN		20						
8987		20						
(Di × JNXN) F_1	20							
(Digu × 8987) F_1	20							
(Di × JNXN) F_2	94	29	0.0677	21	66	36	4.317	5.74
(Digu × 8987) F_2	79	17	2.3472	19	55	22	2.229	8.17

1) AA, genotype of the resistant line Digu; aa, genotype of susceptible parents; Aa, heterozygous

2) R, Resistance; S, Susceptible

抗感病植株比例符合 3:1 的分离比,表明地谷对 ZB₁₃ 小种的抗性受一对显性基因控制。

用微卫星 RM262 引物对感病品种江南香糯与 8987 和抗病品种地谷进行 PCR 扩增,结果表明,感病和抗病品种的扩增产物存在明显的多态(图 1)。其中感病品种江南香糯与 8987 的 PCR 产物片段大小约 160bp,抗病品种地谷的片段大小约 240bp。3 个亲本均扩增出 1 条带, F_1 有两条带,表明该微卫星为共显性标记。

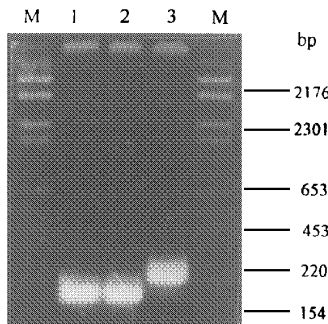


图 1 微卫星标记 RM262 在亲本间的多态性

Fig.1 The polymorphism of SSLP marker RM262

among three rice varieties

M. Marker; 1. JNXN; 2. 8987; 3. Digu

2 结果分析

2.1 抗稻瘟病基因 [Pi-d(t)] 与微卫星标记 RM262 的遗传

本实验测定了地谷与感病亲本江南香糯和 8987 及其杂交后代对致病小种 ZB₁₃ 的抗病表现(表 1)。 F_1 对小种 ZB₁₃ 均表现抗病反应, F_2 群体的

(地谷 × 8987) F_2 群体的微卫星分析结果如图 2,在该群体中出现 3 种带型,分别与感病品种 8987 (纯合基因型 aa) 和抗病品种地谷(纯合基因型 AA) 相同的带型以及同时出现双亲的 2 条带(杂合基因型 Aa);并且这 3 种带型(aa、Aa、AA) 的分离比例符合 1:2:1 的理论比(表 1)。在(地谷 × 江南香糯) F_2 群体中, RM262 的扩增产物带型和分离比同上述群体的结果一致。

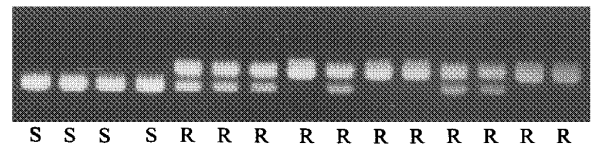


图 2 微卫星标记 RM262 在(地谷 × 8987) F_2 群体中的分离

Fig.2 Segregation of RM262 in F_2 population of Digu/8987

R, Resistance; S, Susceptible

2.2 微卫星标记 RM262 与抗病基因 [Pi-d(t)] 的共分离及其在育种中的应用

从(地谷 × 8987) F_2 群体分析可以看出,微卫星标记 RM262 和抗病基因 [Pi-d(t)] 之间的重组率为 8.17%。在(地谷 × 江南香糯) F_2 群体中,重组率为

5.74%。表明 2 个 F_2 群体中 90% 以上植株的 RM262 标记和植株的抗病性表现为共分离。以纯合带型 AA 选择,两个群体的入选植株均表现 100% 的抗病;以杂合带型 Aa 筛选(地谷×江南香糯) F_2 中入选植株 100% 的抗病(地谷×8987) F_2 群体 98.2% 的植株抗病(表 2)。在 2 个 F_2 群体中,均有部分 aa 纯合带型的植株表现抗病,是采用 RM262 筛选抗病植株与实际田间接种鉴定不一致

的主要原因,可能微卫星标记是在分子水平上对基因型进行分析,其结果不受环境条件和其他基因作用的影响。与感病亲本带型一致而表现抗病的植株,除因 RM262 与抗病基因之间可能产生的重组以外,稻瘟病接种鉴定的调查标准以及环境和人为因素也有一定的影响。从本研究结果表明, RM262 与抗病植株表现出很高的符合率,完全可以在抗病育种中应用。

表 2 用微卫星标记 RM262 鉴定稻瘟病抗性的符合率

Table 2 The consistency between the SSLP genotype and blast resistance in two F_2 populations

F_2 populations	Molecular diagnosis	RM262 genotype	No. of R plants	No. of S plants	Consistency/%
Digu/JNXN	R	AA	21	0	100
		Aa	66	0	100
	S	aa	7	29	80.5
	Total		94	29	94.3
Digu/8987	R	AA	19	0	100
		Aa	54	1	98.2
	S	aa	6	16	72.7
	Total		79	17	92.7

3 讨 论

利用目标性状紧密连锁的分子标记进行辅助选择是提高育种效率的有效途径。但是目标性状与标记间的重组率在不同的群体中是有一定的差异,且往往目标性状的定位群体不是育种群体,因此在实际应用中,要求用于辅助选择的分子标记与目标性状的重组率必须较低。Abenes ML(1994)对 3 个不同 F_2 群体在第 11 染色体上 10 个区间的重组率进行比较^[11]结果表明,紧密连锁的标记之间的重组率在不同群体间的差异不大。在本研究的 2 个 F_2 群体中, RM262 与抗病基因[Pi-d(t)]之间的重组率差异也较小,说明紧密连锁的分子标记在不同群体中的遗传距离有一定的稳定性。

水稻的许多重要性状如抗病性^[12]、抗虫性^[13]、糯性^[14]、株高^[15]、恢复^[16]、广亲和^[17]、香味基因^[18]等均已定位,且其中一些性状已筛选出紧密连锁的分子标记。应用这些分子标记进行间接选择,将得到事半功倍的作用。特别是抗性育种,直接选择需要创造特殊环境进行筛选鉴定,不仅育种时间长,而且受到许多条件限制;而分子标记辅助选择不受环境条件的影响,分析手段快速简便,可以大大地提高育种效率。在育种中,经常需要将多个性状或控制

某一性状的多个基因聚合于一个品种,需对逐个性状或基因进行筛选鉴定,不但费时,且常常达不到预期的目的。如在聚合杂交的历次杂交中应用目标性状紧密连锁的分子标记进行辅助选择,可以快速准确地多个目标基因聚合于一个重组体。Huang N. *et al.*(1997)用分子标记在杂交 F_4 代将 4 个抗白叶枯基因(Xa-4, Xa-5, Xa-13 和 Xa-21)聚于 IRBB60 品系中^[19]。本实验室正在用分子标记聚合 3 个抗稻瘟病基因[Pi-d(t), Pi-b 和 Pi-ta]培育持久抗性品种。

作物育种中可利用的分子标记有许多种,常用的有 RFLP 和 RAPD 等。RFLP 是共显性的标记,只要选择含有与目标基因紧密连锁标记的植株即可区分纯合和杂合型,但是 RFLP 分析需要的 DNA 量多,检测过程复杂,而且费用大,难以在育种实践中推广应用。RAPD 标记需要 DNA 量少,分析程序简单,但它是显性标记,不能区分纯合和杂合型,且重复性差,在实际应用中也存在一定的困难。所以在标记辅助选择中,需要将 RFLP 标记和 RAPD 扩增片段转换成以 PCR 为基础的共显性标记。本研究使用的微卫星标记兼具了 RFLP 和 RAPD 的优点,且多态性和重复性更好,是辅助育种中较理想的一种分子标记。

参 考 文 献

- [1] 朱立煌,徐吉臣,陈英等. 中国科学(B辑),1994,81:1047~1052
- [2] Yu Z. H, Mackill J, Bonman J M *et al.* *Theor Appl Genet*, 1991, 81:471~476
- [3] Rybka K, Miyamoto M, Ando I *et al.* *Mol Plant-Microbe Interact*, 1997, 10:517~524
- [4] Paroud O, Chen X, McCouch S R. *Mol Gen Genet*, 1996, 252:597~607
- [5] Wang G L, Mackill D J, Bonman J M *et al.* *Genetics*, 1994, 136:1421~1434
- [6] Li S G, Zhou K D, Zhu L H. Proceedings of 4th Asia-pacific Conference on Agricultural Biotechnology, Darwin, Australia, 13~16 July, 1998, p. 108~110
- [7] 凌忠专,潘庆华等. 主要农作物抗病性遗传研究进展,南京:江苏科技出版社,1990,pp. 105~109
- [8] McCouch S R, Kochert, Yu Z H. *Theor Appl Genet*, 1988, 76:148~159
- [9] Chen X, Themnykh S, Xu Y *et al.* *Theor Appl Genet*, 1997, 95:553~567
- [10] Paroud O, Chen X, McCouch S R. *Mol Gen Genet*, 1996, 252:597~607
- [11] Abens M L *et al.* *Euphytica*, 1994, 76:81~87
- [12] Ronald P C. *Plant molecular Biology*, 1997, 35:179~186
- [13] Ishii T, Brar D S *et al.* *Genome*, 1994, 37:217~229
- [14] Bligh H F J, Till R I, Jones C A. *Euphytica*, 1995, 86:83~85
- [15] Maeda H T, Ishii I *et al.* *Breeding Science*, 1995, 45:93
- [16] Zhang G, Bharaj T S *et al.* *Theor Appl Genet*, 1997, 94:27~33
- [17] Yanagihara S, McCouch S R *et al.* *Theor Appl Genet*, 1995, 90:182~188
- [18] Ahn S N, Tanksley S D *et al.* *Theor Appl Genet*, 1992, 84:825~828
- [19] Huang N *et al.* *Theor Appl Genet*, 1997, 95:313~320

Utilization of a Microsatellite Marker to Identify Rice Blast Resistance Gene in Two Segregating Populations

LI Shi-Gui^{1,2} WANG Yu-Ping¹ LI Han-Yun¹ ZHOU Kai-Da¹ ZHU Li-Huang²

¹(Rice Research Institute of Sichuan Agricultural University, Wenjiang 611130)

²(Institute of Genetics, The Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101)

Abstract The microsatellite (SSLP) marker RM262, which is tightly linked to the blast resistance gene Pi-d(t) in rice, provides means to conduct marker-aided selection in a rice breeding program. The objective of this study was to investigate the ability of this marker to select the blast resistance gene Pi-d(t) in two crosses for rice blast resistance breeding. The products with amplified the microsatellite primers were polymorphic between the three varieties examined. To examine the power of the identified microsatellite marker in predicting the Pi-d(t) locus, we determined the genotypes of the two F₂ populations at the Pi-d(t) locus by performing progeny testing for the disease responses. The results indicated an accuracy of more than 98% in identifying the resistant plants in both populations. Therefore the microsatellite marker can be utilized in marker-assisted selection and breeding for new varieties with blast resistance.

Key words Rice, blast resistance gene, microsatellite marker, marker-assisted selection