

籼稻品种地谷抗稻瘟病基因的遗传分析和定位*

李仕贵^{①②} 马玉清^① 王玉平^① 王文明^②

周开达^① 朱立煌^{②**}

(^①四川农业大学水稻研究所, 四川温江 611130; ^②中国科学院遗传研究所, 北京 100101)

摘要 利用我国稻区的稻瘟病生理小种 ZB₁₃和 ZB₁₅对地谷与感病品种江南香糯的杂交 F₁, F₂ 和 B₁F₁ 群体进行接种鉴定, 确认地谷对 ZB₁₃和 ZB₁₅的抗性受一对显性基因控制. 应用 ZB₁₃接种的(地谷 × 江南香糯)F₂ 群体构建抗病池和感病池, 通过 RFLP 和微卫星标记对两池 DNA 多态性的检测, 发现两个可能与相应抗病基因紧密连锁的分子标记. 进一步用 F₂ 分离群体, 将该基因定位于第 2 染色体, 暂定名为 Pi-d(t).

关键词 稻瘟病 限制性片段长度多态性(RFLP) 微卫星标记 基因定位

稻瘟病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, 已成为水稻高产稳产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, 而抗源的发掘和利用、抗病基因的遗传分析和定位则是抗病育种的基础. 自 60 年代日本系统地开展水稻抗稻瘟病基因遗传分析以来, 迄今已鉴定并定名了 30 多个抗病基因^[1], 其中 20 多个已经定位^[2]. 但是稻瘟病菌生理小种的致病性变异较大, 迄今在不同生态环境中已鉴定了几百个生理小种^[3]. 而大多数品种抗源单一, 隐含着抗性丧失的危险. 因此, 迫切需要拓宽新的抗病基因, 寻找与抗病基因紧密连锁的分子标记, 并利用分子标记对抗病基因进行选择, 提高育种效率; 同时为抗病基因的克隆奠定基础^[4].

地谷是广西地方品种谷龙 13 与珍汕 97 杂交育成的一个抗病保持系, 对南方籼稻区分离的多个稻瘟病菌系表现高度抗性¹⁾. 本研究利用 RFLP 和微卫星标记, 结合群分法对来源于地谷的抗稻瘟病基因进行遗传分析和定位, 并寻找与该基因紧密连锁的分子标记.

1 材料与方法

1.1 植物材料

1995 年夏, 以籼稻地谷为母本, 感病品种粳稻江南香糯为父本, 配制杂交组合, 翌年春季种植 F₁; 1996 年正季, 将亲本, F₁, F₂ 和 B₁F₁ 群体种植于四川农业大学水稻研究所试验场.

1998-09-16 收稿, 1999-04-05 收修改稿

* 国家自然科学基金资助项目(批准号: 39800102)

** 联系人

1) 四川省水稻稻瘟病抗性鉴定资料

1.2 供试菌系、菌液制备和接种鉴定

选用本地区致病性比较稳定的广谱致病菌系 ZB₁₃和 ZB₁₅为接种菌系, 将感 ZB₁₃和 ZB₁₅的水稻病穗颈分别用清水浸泡 24 h, 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 48 h, 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. 两周后, 挑取斜面培养菌接种于灭过菌的高粱粒上, 培养 14 d, 当高粱粒表面长满菌丝时, 用清水洗去表面菌丝, 平铺于瓷盘上培养 2 d, 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 5×10^4 个分生孢子/mL 的悬浮液.

在水稻分蘖盛期, 用医用注射器(针头型号 4.5)分别对双亲, F₁, F₂ 和 B₁F₁ 接种致病菌系 ZB₁₃和 ZB₁₅; 并在距离稻茎顶端 10 ~ 12 cm 处, 将菌系的孢子悬浮液注入稻茎中央部位, 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 48 h, 7 ~ 9 d 后调查发病情况, 并按凌忠专、潘庆华等介绍的方法进行叶瘟抗病性定级和统计分析^[5].

病斑型分为 4 种: b 型, 褐点型病斑; bg 型, 病斑长径不超过 2 mm, 周围褐色, 中央灰白色; bG 型, 病斑长径超过 2 mm, 周围褐色, 中央白色; PG 型, 病斑长径超过 2 mm, 周围无色或紫色, 中央灰白色.

抗性分级标准:

(1) 无病斑……R^h

(2) 有病斑: 1) $b > bg + bG + PG$ 时, a $bG + pG = 0$ ……R

b $bG + PG > = 1$ ……MR

2) $b < bg + bG + PG$ 时, a $b + bg > bG + PG$ ……MR

b $b + bg < bG + PG$ ……S

c $PG > (b + bg + bG)/2$ ……S

统计分析时, 将 R^h, R 和 MR 反应的植株归入抗病(R)类型, 其余为感病.

根据抗性鉴定结果, 以 ZB₁₃接种的(地谷 × 江南香糯)F₂ 群体为基础, 提取单株总 DNA, 用于 RFLP 和微卫星标记分析.

1.3 RFLP 分析

WTBZ^[2]对 148 个 F₂ 单株 DNA 进行 RFLP 分析. DNA 提取、限制性酶切、Southern 转移和分子杂交参照 McCouch^[6]的方法进行. 采用 8 种限制性内切酶: *EcoRI*, *BamHI*, *HindIII*, *ScaI*, *EcoRV*, *BglII*, *DraI*和 *XbaI*. 探针由美国 Cornell 大学 Tanksley 实验室和日本 RGP 馈赠.

1.4 微卫星 DNA 标记分析

按照 Chen 等^[7]提供的微卫星序列合成引物. PCR 反应参照 Panaud 等^[8]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.

1.5 遗传作图

用 MAPMAKER 软件^[9]对分离群体的抗性和标记的分离数据进行连锁分析. 利用 Kosambi 函数将重组率转化为遗传图距(Centimorgan, CM).

2 结果

2.1 地谷抗稻瘟病基因遗传分析

本实验测定了地谷和江南香糯两个亲本及其杂交后代对致病小种 ZB₁₃和 ZB₁₅的抗病表现

(表 1). 其 F_1 对两个小种均表现抗病反应, F_2 群体的抗感病植株比例符合 3:1 的分离比, B_1F_1 群体出现 1:1 的分离比例, 表明地谷对 ZB_{13} 和 ZB_{15} 小种的抗病性受一对显性基因控制.

表 1 地谷 × 江南香糯的 F_2 和 B_1F_1 群体对小种 ZB_{13} 和 ZB_{15} 的抗性分离

亲本和 后代群体	生理小种	抗感反应个体数		期望比	X^2	$P_{0.05, 0.01}$
		R	S			
地谷	ZB_{13} 和 ZB_{15}	20				
江南香糯	ZB_{13} 和 ZB_{15}		20			
F_1	ZB_{13} 和 ZB_{15}	20				
F_2	ZB_{13}	102	46	3:1	2.9189	3.84 ~ 6.63
F_2	ZB_{15}	84	37	3:1	2.0083	3.84 ~ 6.63
B_1F_1	ZB_{13}	15	23	1:1	1.6842	3.84 ~ 6.63
B_1F_1	ZB_{15}	21	16	1:1	0.5319	3.84 ~ 6.63

2.2 抗病池和感病池的建立

在抗性分析的基础上, 选择 ZB_{13} 作为鉴别小种对 F_2 群体进行抗感分群, 从抗病和感病的 F_2 群体中, 分别随机选取 10 个单株, 每个单株各取等量叶片, 再将抗病和感病单株的叶片分别混合提取, 形成抗病和感病 DNA 池.

2.3 抗病池和感病池的 RFLP 和微卫星标记分析

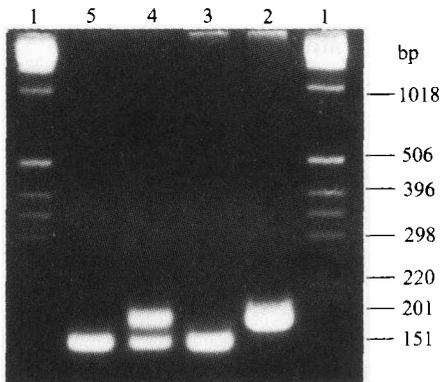


图 1 微卫星标记 RM262 在亲本和抗、感病池中的多态性

1. 分子量标记, 2. 地谷, 3. 江南香糯, 4. 抗病池, 5. 感病池

用 8 种酶切配合 126 个 RFLP 探针和 40 个微卫星标记检测亲本 DNA, 能揭示多态性的探针和标记共 102 个, 多态性表现频率为 61.45%; 应用上述 102 个亲本多态性探针和标记检测抗病和感病池, 发现位于第 2 染色体的 DNA 探针 G1314A 和微卫星标记 RM262 能揭示两池的多态性(图 1), 显示该抗病基因与第 2 染色体上的 G1314A, RM262 位点连锁.

2.4 地谷稻瘟病抗性基因的定位

为了进一步确定地谷对 ZB_{13} 小种的抗病基因在染色体上的准确位点, 用 G1314A 和 RM262 及其附近的 C601, C424, G45, G243 探针以及 RM263, RM29 微卫星标记检测 148 个 F_2 植株, 结果表明, 该抗稻瘟病基因与上述探针和标记有明显的连锁关系, 并与 G1314A 和 RM262 表现共分离(图 2). 利用 MAPMAKER 软件进行

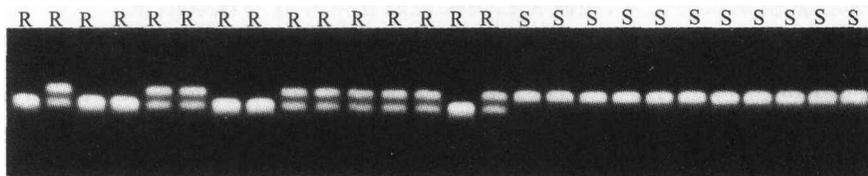


图 2 RM262 在(地谷 × 江南香糯) F_2 群体中的分离
R 为抗病单株, S 为感病单株

作图分析, 构建了第 2 染色体的部分遗传连锁图. 图 3 显示了地谷的稻瘟病抗性基因在第 2 染色体的相对位置, 与 G1314A 的图距仅 1.2 cm, 该基因暂定名为 Pi-d(t). 为了证明该基因是尚未定位的基因, 应用第 2 染色体已定位的抗稻瘟病基因 Pi-b 共分离的分子标记 G 1234 检测上述 F₂ 群体, 结果显示 G 1234 与该抗病基因无连锁.

3 讨论

地谷是 90 年代初福建农业科学院利用广西地方品种谷龙 13 为抗源育成的一个抗稻瘟病保持系, 目前是杂交水稻育种中主要应用的抗源之一. 本研究结果表明地谷对 ZB₁₃ 和 ZB₁₅ 小种的抗性受一对显性基因控制. 用 ZB₁₃ 接种 (地谷 × 江南香糯) F₂ 群体为基础, 采用 RFLP 和微卫星标记结合群分法, 找到与抗 ZB₁₃ 的稻瘟病抗性基因紧密连锁的分子标记, 并进一步将该基因 (Pi-d(t)) 定位到第 2 染色体, 它的识别和定位将有助于该基因的克隆和分子标记辅助育种.

Wang 等^[10]利用重组自交系群体和 QTL 区间作图法定位了 10 个抗稻瘟病 QTL 位点, 但第 2 染色体未发现抗稻瘟病 QTL 座位. Yu 等^[11]曾利用近等基因系和 RFLP 标记将 Pi-2(t) 和 Pi-4(t) 分别定位于第 6 和第 12 染色体, Rybka 等^[12]和郑康乐等^[13]用类似方法分别将 Pi-ta², Pi-ta 和 Pi-h-1 定位在第 12 染色体上. 朱立煌等^[14]用 RAPD 和 RFLP 标记结合群分法, 在第 8 染色体定位了一个未知的抗病基因 Pi-zh. Miyamoto 等^[15]用分子标记, 将 Pi-b 定位于第 2 染色体短臂的端部, 并构建了 Pi-b 的高密度连锁群, 然而, 具有该抗病基因的日本品系 (例如 BL-1) 对中国菌系 ZB₁₃ 感病¹⁾. 本研究定位的抗稻瘟病基因 Pi-d(t) 位于第 2 染色体短臂的近着丝点区, 它与 Pi-b 共分离的分子标记 G1234 无连锁关系, 表明该基因与 Pi-b 不等位. 此外, Pan 等^[16]报道 Pi-14(t) 和 Pi-16(t) 与第 2 染色体的同工酶标记 Ampl 连锁, 但未能确定这两个基因在第 2 染色体上的准确位点; 本研究定位的抗稻瘟病基因 Pi-d(t) 是否与它们等位有待于进一步研究.

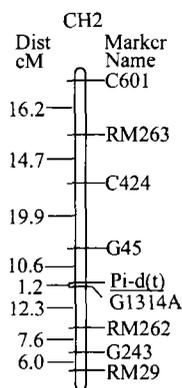


图 3 抗病基因 Pi-d(t) 在第 2 染色体上的定位

参 考 文 献

- McCouch S, Nelson R, Tohme J, et al. Mapping blast resistance genes in rice. In: Zeigler R, Leong S, Teng P, eds. Rice Blast Disease. 1994. 167 ~ 186
- Ronald P C. The molecular basis of disease resistance in rice. Plant Molecular Biology, 1997, 35: 179 ~ 186
- Bonman J M, Vergel de Dios T I, Khin M M. Physiologic specialization of *Pyricularia oryzae* in the Philippines. Plant Dis, 1986, 70: 767 ~ 769
- Hittammani S, Foolad M R, New T, et al. Development of a PCR-based marker to identify rice blast resistance gene, Pi-2(t), in a segregating population. Theor Appl Genet, 1995, 91: 9 ~ 14
- 凌忠专, 潘庆华, 王久林, 等. 云南粳型品种勐旺谷-1 的抗稻瘟病基因分析. 见: 主要农作物抗病性遗传研究进展, 南京: 江苏科学出版社, 1990. 105 ~ 109
- McCouch S R, Kochert G, Yu Z H, et al. Molecular mapping of rice chromosomes. Theor Appl Genet, 1988, 76: 148 ~ 159

1) 本实验室未发表的研究结果

- 7 Chen X, Themnykh S, Xu Y, et al. Development of microsatellite framework providing genome-wide coverage in rice (*Oryza sativa* L.). *Theor, Appl Genet*, 1997, 95: 553 ~ 567
- 8 Panaud O, Chen X, McCouch S R. Development of microsatellite markers and characterization of simple sequence length polymorphisms (SSLPs) in rice (*Oryza sativa* L.). *Mol Gen Genet*, 1996, 252: 597 ~ 607
- 9 Lander E S, Green P, Abrahamson J, et al. MAPMAKER: an interactive computer for constructing primary genetic linkage maps of experimental and natural populations. *Genomics*, 1987, 1: 174 ~ 182
- 10 Wang G L, 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. *Genetics*, 1994, 136: 1 421 ~ 1 434
- 11 Yu Z H, Mackill J, Bonman J M, et al. Tagging genes for blast resistance in rice via linkago to RFLP marker. *Theor Appl Genet*, 1991, 81: 471 ~ 476
- 12 Rybka K, Miyamoto M, Ando I, et al. High resolution mapping of the *indica*-derived rice blast resistance genes II . *Pi-ta*² and *Pi-ta* and a consideration of their origin. *Mol Plant-Microbe Interact*, 1997, 10: 517 ~ 524
- 13 郑康乐, 庄杰云, 钱惠荣, 等. 应用标记定位水稻的抗稻瘟病基因. *植物病理学报*, 1995, 25: 307 ~ 313
- 14 朱立煌, 徐吉臣, 陈 英, 等. 用分子标记定位一个未知的稻瘟病抗性基因. *中国科学, B辑*, 1994, 81: 1 048 ~ 1 052
- 15 Miyamoto M, Ando I, Rybka K, et al. High resolution mapping of the *indica*-derived rice blast resistance genes I. *Pi-b*. *Mol Plant-Microbe Interact*, 1996, 9: 6—13.
- 16 Pan Q, Tanisaka T, Okumoto Y, et al. Studies on the genetics and breeding of blast resistance in rice V. Identification of two blast resistance genes in a Yunnan native variety, Maowangu. *Breeding Science*, 1995, 46 (Suppl. 1): 79.