

抗病基因 *Pi-ta* 在骨干亲本及其衍生品种的传递

刘华招

(黑龙江省农垦科学院水稻研究所,佳木斯 154007)

摘要:利用 *Pi-ta* 的显性分子标记对寒地稻区水稻骨干亲本合江 20 号及其衍生品种进行 *Pi-ta* 抗性基因传递分析。结果表明,抗病基因 *Pi-ta* 在亲本合江 20 号衍生子 1 代出现的频率为 50%,子 2 代出现的频率为 33.3%、子 3 代出现的频率为 7.7%,抗病基因 *Pi-ta* 的传递与合江 20 号衍生系谱一致。抗谱分析表明,*Pi-ta* 抗病基因在子代中出现与衍生品种的抗谱正相关,这可能与后代选择过种中抗病基因的丢失有关,这也可能是决定不同水稻品种的稻瘟病发生程度的主要原因之一。

关键词:*Pi-ta* 基因;骨干亲本;合江 20 号;基因传递

Transmission of Resistance Gene *Pi-ta* in Rice Backbone Parent and It's Derivatives

LIU Hua-zhao

(Rice Research Institute, Heilongjiang Academy of Land Reclamation Sciences, Jiamusi 154007)

Abstract: Hejiang 20 is one of the most important backbone parents in cold region. In this paper, the rice blast resistance gene *Pi-ta* genetic transmission between Hejiang 20 and its 27 derivatives were analyzed by using the dominant rice *Pi-ta* gene markers. The results showed that frequency of resistance gene *Pi-ta* was 50% in the first generations of Hejiang 20 derivatives, and the frequency of occurrence in the second-generation derivative varieties was 33.3%, and the frequency of occurrence in the third-generation of derivative varieties was 7.7%. Disease transmission of the resistant gent *Pi-ta* just liked as Hejiang 20 derivative map. The spectral analysis of *Pi-ta* results indicated that it was a positive correlation for resistance gene between offspring and derived varieties. These results could be caused by the loss of resistance genes in the species, which was also might be one of the main reasons to determine the levels of rice blast for the different rice varieties.

Key words: *Pi-ta* gene; backbone parents; Hejiang 20; gene transmission

近年来,研究骨干亲本形成的过程、分析骨干亲本重要性状基因的遗传传递已成为新的研究热点^[1-2]。国内外科学家利用分子标记技术对小麦、玉米的一些骨干亲本重要基因在衍生品种中的遗传传递规律进行了分析。李小军等^[3]用 SSR 标记对小麦骨干亲本欧柔及其衍生的 23 份后代品种中重要农艺性状遗传传递进行了分析,结果表明欧柔等位变异类型在后代具有高的分布频率以及较高的穗粒数和产量。袁园园等^[4]用 33 个特异标记对 76 份碧蚂 4 号衍生材料进行分析,表明碧蚂 4 号含有一些特殊的与重要农艺性状相关的基因组位点/区段,可能是其成为骨干亲本的遗传基础。刘化龙等^[5]

用 SSR 标记分析了寒地水稻品种骨干亲本,结果表明寒地水稻品种遗传改良是围绕少数骨干亲本进行的,骨干亲本将大部分优良基因传递到了衍生品种中。于海霞等^[6]利用 330 个特异标记分析小麦骨干亲本矮孟牛 41 份后代材料的遗传频率和遗传贡献率,发现亲本矮孟牛的遗传物质对后代影响的覆盖涉及面最广,遗传贡献率最大,对后代衍生品种不同染色体的贡献率范围为 5.4% ~ 21.5%。综上分析,解析作物骨干亲本的重要基因遗传特点,对于骨干亲本的深入研究和利用、新型骨干亲本的创制、杂交育种中亲本选配等都具有重要意义。分子标记为筛选、鉴定、跟踪这些基因提供了有效的技术手段。

收稿日期:2012-11-06 修回日期:2012-12-03 网络出版日期:2013-06-19

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.4996.S.20130619.1518.002.html>

基金项目:黑龙江省青年基金项目(C130401)

第一作者主要从事水稻抗逆育种及遗传改良。E-mail: huazhaoliu@126.com

合江 20 号品种具有矮秆、耐寒、后熟快、分蘖力强、抗病性较强、耐旱、耐盐碱等优良基因,是寒地稻区育成品种重要骨干亲本之一^[7],对稻瘟病具有较高的抗性,遗传配合力高,由其衍生的有 3 代 27 个品种,作为骨干亲本为寒地水稻育种和生产作出了重要贡献。

Pi-ta 是来自 Tetep 的最早被克隆的抗稻瘟病基因之一,位于水稻第 12 条染色体上,王忠华等^[8]、刘华招等^[9]利用自身序列设计特异性引物建立了 DNA 显性分子标记。本研究对骨干亲本合江 20 号及其衍生品种中抗病基因 *Pi-ta* 的传递进行分析,对水稻骨干亲本优良基因的有效应用及提高育种的效率都具有推进作用。

1 材料与方法

1.1 供试材料

1.1.1 供试品种 骨干亲本合江 20 号及其衍生品种 27 个,其系谱见表 1。阳性对照 Tetep,阴性对照丽江新团黑谷,其种子由中国农业科学院作物科学研究所提供。

表 1 合江 20 号衍生品种及其系谱

Table 1 The varieties derived from Hejiang 20 and their respective pedigrees

序号 No.	品种 Variety	子代 Generation	系谱 Pedigree
1	牡丹江 17 号	子 1 代	合江 20 号/(南京籼稻/公交 17 号)清杂 16 号
2	合江 21 号	子 1 代	合江 20 号/普选 10 号
3	合江 23 号	子 1 代	合江 20 号/松前
4	黑粳 5 号	子 1 代	黑粳 2 号//黑交 71-72-1/合江 20 号
5	东农 424	子 1 代	山大 7-11/合江 20 号//东农 363
6	松粳 3 号	子 1 代	辽粳 5 号/合江 20 号
7	松粳 6 号	子 1 代	辽粳 5 号/合江 20 号
8	松粳 10 号	子 1 代	辽粳 5 号/合江 20 号
9	松粳 4 号	子 2 代	松 7331/牡丹江 17//双 152
10	龙粳 11 号	子 2 代	沙 29/合江 21 号
11	绥粳 1 号	子 2 代	合江 21 号系选
12	东农糯 418	子 2 代	合江 23/秋光//吉粘 2 号
13	垦稻 9 号	子 2 代	牡 871894/黑粳 5 号
14	五优稻 1 号	子 2 代	松粳 3 号系选
15	五优稻 3 号	子 3 代	五优稻 1 号系选

表 1(续)

序号 No.	品种 Variety	子代 Generation	系谱 Pedigree
16	五优稻 4 号	子 3 代	五优稻 1 号系选
17	五工稻 1 号	子 3 代	五优稻 1 号空载
18	松粳 9 号	子 3 代	五优稻 1 号/通 306
19	龙盾 106	子 3 代	五优稻 1 号/龙盾 103
20	东农 425	子 3 代	五优稻 1 号/东农 423
21	东农 427	子 3 代	五优稻 1 号/东农 423
22	东农 428	子 3 代	五优稻 1 号/东农 423
23	东农 429	子 3 代	五优稻 1 号/东农 423
24	东农 430	子 3 代	五优稻 1 号/东农 423
25	龙稻 7 号	子 3 代	五优稻 1 号系选
26	垦稻 17 号	子 3 代	垦稻 9 号/屨锦
27	垦稻 19 号	子 3 代	垦 96-614/垦 96-730// 垦 96-249/垦 96-754

1.1.2 供试菌株 菌株为黑龙江省农垦科学院水稻研究所分离的稻瘟病生理小种 ZA1、ZA17、ZA33、ZA49、ZA53、ZA57、ZB1、ZB3、ZB5、ZB11、ZB15、ZB25、ZC5、ZD1、ZD3、ZD5、ZD7、ZE1、ZF1、ZG1 等 20 个单孢菌株。为繁殖大量病原孢子,将试管中病原菌转移到大麦粒培养基上进行 2 级培养扩大繁殖。其方法是將大麦粒加水后煮到半熟状态或用水浸泡 24 h,然后倒去多余的水分,装入三角瓶中,高压灭菌后立即将麦粒摇散防止结块。然后在无菌条件下接种病菌,于 28 ℃恒温箱内培养,至第 4、5 天时摇动三角瓶内的大麦粒,使菌丝生长均匀。待灰色菌丝长满大麦粒并开始变黑时,大约 12 ~ 14 d,用自来水冲洗大麦粒上的菌丝,随后摊放薄层于搪瓷盘中,盘上覆盖 1 ~ 2 层纱布以保温,并置于 25 ~ 28 ℃温度条件下培养 2 d 左右,即可见到麦粒上产生大量灰色的分生孢子,就可供接种使用。

1.2 育苗与移栽

每份材料各取 100 粒饱满、健康的种子置于浸润滤纸培养皿内,将培养皿放置在 30 ℃恒温箱中进行浸种催芽。3 d 后取出,播种到温室内的钵盒内,每钵 4 穴,每穴 4 ~ 5 粒,每份材料 20 钵,盆钵中的营养土须先消毒。长至 3 叶 1 心后移到室外。5 叶 1 心时进行稻瘟病人工接种试验。

1.3 水稻 DNA 提取及 PCR 扩增

在水稻 5 叶期取新鲜叶片,采用 CTAB 法提取水稻基因组 DNA,用于 PCR 扩增反应的引物

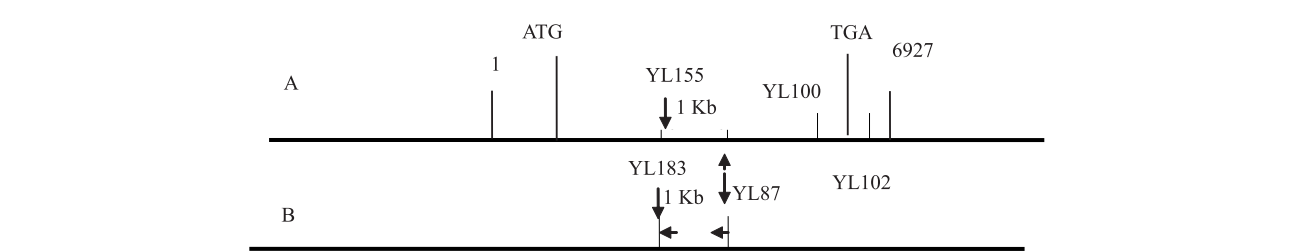
名称^[8]、序列、预期扩增片段见表 2,图 1。引物由上海生物工程股份有限公司合成。PCR 反应体系为 20 μL,各成分的含量为 20 ng 模板 DNA 2 μL、150 μmol/L dNTP 1 μL、0.2 μmol/L 正反向引物为 2 μL、*Taq* DNA 聚合酶 (5 U/μL) 0.2 μL、2.5 mmol/L MgCl₂ 1.2 μL、10 × *Taq* buffer 2 μL、超纯水 11.6 μL。PCR 反应程序:95 ℃ 预变性 3 min;94 ℃ 变性 45 s;50 ~ 55 ℃ 退火 45 s;72 ℃

延伸1 ~ 1.5 min;共 36 个循环;72 ℃ 延伸 7 min;然后 4 ℃ 保存。*Pi-ta* 引物的扩增产物在 1.5% 琼脂糖凝胶中检测,SYBR Green I (上海雅吉生物科技有限公司) 染色,紫外灯下观察拍照。YL155/YL87 特异性扩增抗病等位基因 *Pi-ta* 的相应序列;YL183 /YL87 特异扩增感病等位基因 *Pi-ta* 的相应序列。在相同条件下,每个 DNA 样品重复扩增并电泳检测 3 次。

表 2 用于 PCR 反应的引物名称、序列、片段预期大小及其在 *Pi-ta* 基因的位置

Table 2 Name,sequence,expected fragment size,and theirs position in <i>Pi-ta</i> gene of specific primers used for PCR					
编号 Code	引物 Primer	目标基因 Gene	序列(5'-3') Sequence	位置 Location	预期片段 (bp) Expected size
Y12	YL155	<i>Pi-ta</i>	AGCAGGTTATAAGCTAGGCC	4409-4428 *	1042
	YL87		CTACCAACAAGTTCATCAAA	5450-5431	
Y14	YL183	<i>pi-ta</i>	AGCAGGTTATAAGCTAGCTAT	4409-4429 *	1042
	YL87		CTACCAACAAGTTCATCAAA	5450-5431	

*:特异性引物序列在抗病基因 *Pi-ta* 的相应位置详见 GenBank accession No. AF207842
*:Location of the special primers sequence of the *Pi-ta* gene was based on GenBank accession No. AF207842



A:抗病基因 *Pi-ta* 全序列;B:感病基因 *pi-ta* 全序列;ATG:翻译起始位点;TGA:终止位点
A:All sequence of the resistant *Pi-ta* gene,B:All sequence of the recessive *pi-ta* gene,ATG: Translation start site,TGA:Termination site

图 1 水稻抗稻瘟病基因 *Pi-ta* 全序列示意图^[10]
Fig. 1 A schematic representation of the doubles trends of the 10322 bp of the *Pi-ta* gene

2 结果与分析

2.1 *Pi-ta* 基因在骨干亲本合江 20 号及衍生品种中检测

利用显性标记引物 YL155/YL87 和 YLI83/YL87 对阳性对照 Tetep、阴性对照丽江新团黑谷、骨干亲本合江 20 号及衍生的 27 个品种进行 PCR 反应。YL155/YL87 能特异性扩增出抗病等位基因 *Pi-ta* 的相应序列 1 kb 片段,表明含有 *Pi-ta* 抗病基因,没有扩增出则表明不含有 *Pi-ta* 抗病基因;YLI83/YL87 能特异性扩增出感病等位基因 *pi-ta* 的相应序列 1 kb 片段,表明含有 *pi-ta* 感病基因,没有

扩增则表明不含有 *pi-ta* 感病基因。
由图 2 可见,引物 YL155/YL87 在 Tetep 和合江 20 号中扩增出 1 kb 大小左右的特异性条带,引物 YLI83/YL87 则没有扩增出该特异性条带。丽江新团黑谷恰恰相反。这证明了合江 20 号含有 *Pi-ta* 抗病基因。
由图 2 和表 2 看出,骨干亲本合江 20 号衍生品种子 1 代有 4 个品种含有抗病基因 *Pi-ta*,*Pi-ta* 抗病基因出现的频率为 50%;子 2 代有 2 个品种含有抗病基因 *Pi-ta*,频率为 33.3%;子 3 代有 1 个品种含有抗病基因 *Pi-ta*,频率为 7.7%。随着衍生代数的增加,*Pi-ta* 抗病基因出现的频率在减少。

的梦想。在现在的产量水平下,能够通过育种和栽培的手段控制住稻瘟病大面积经常性发生,在几十年前看这就是一场技术革命。把现在的品种放到几十年前去种植,其抗性表现一定远远强于它的祖先。把对现有品种的产量预期每 hm^2 降低 1000 kg,它的抗性表现绝不是目前的水平。新审定品种抗性的迅速丧失,不是抗稻瘟病育种出了多大的问题,而是生产者的栽培技术和利益驱动出了大问题。面对这种局面,更应该重视品种抗性的保持,育种者和生产者都应该客观看待抗性,尊重品种种性。今后在稻瘟病育种上的突破,一定首先是在品种种性取得突破的前提下获得的^[12]。抗稻瘟病的种性如何突破?答案是引进新抗源、创制新种质^[13]。

寒地早粳稻抗性基因的利用是从日引品种骨干亲本石狩白毛^[14] (*Pi-i*) 利用开始的,20 世纪 60 年代育成的 14 个早粳品种中有 9 个具有石狩白毛亲缘,占 64.3%,种植面积占 72.9%。进入 20 世纪 70 年代育成的 20 个品种中,具有石狩白毛 (*Pi-i*) 亲缘的品种占 30%,种植面积占 54.2%。这是新抗源的加入,如坊主 (*Pi-a*)、农林 11、下北 (*Pi-a*、*Pi-ta*)、新雪 (*Pi-a*、*Pi-i*)、手稻 (*Pi-a*、*Pi-k*)、虾夷 (*Pi-a*、*Pi-k*) 等,衍生出骨干亲本合江 20 号,使得 20 世纪 80 年代育成品种的抗性寿命得以延长。而后由合江 20 号又衍生出 3 代 27 个品种,并表现出较好的抗瘟性,是 *Pi-i*、*Pi-a*、*Pi-ta* 基因聚合的结果。

本研究利用 *Pi-ta* 抗病基因显性分子标记对骨干亲本合江 20 号及衍生品种进行了分析,结果显示分子标记检测结果同合江 20 号衍生系谱一致,显性分子标记可以研究抗病基因的遗传传递。在合江 20 号中发现了抗病基因 *Pi-ta*,在衍生子 1 代出现的频率为 50%、子 2 代出现的频率为 33.3%、子 3 代出现的频率为 7.7%,表明随着衍生代数的增加,*Pi-ta* 抗病基因出现的频率在减少,相应抗性也在下降。后代选择过程中抗病基因的丢失,是稻瘟病发生主要原因之一。

对水稻骨干亲本抗病等重要农艺性状基因的遗传传递规律的研究有明显的价值,分子标记为筛选、鉴定、跟踪这些基因提供了有效的技术手段^[15]。目

前水稻重要农艺性状基因遗传传递的研究还较少,本研究也只是对合江 20 号的 *Pi-ta* 抗病基因的遗传传递进行了初步分析,而对水稻抗病基因等重要基因的遗传需要进行更深入的研究。

参考文献

[1] 赵峰,孟祥兵,李卫华,等. 玉米骨干亲本黄早四抗病基因遗传传递规律的初步研究[J]. 玉米科学,2008,16(6):15-18

[2] 汤圣祥,王秀东,刘旭. 中国常规水稻品种的更替趋势和核心骨干亲本研究[J]. 中国农业科学,2012,45(8):1455-1464

[3] 李小军,徐鑫,刘伟华,等. 利用 SSR 标记探讨骨干亲本欧柔在衍生品种的遗传[J]. 中国农业科学,2009,42(10):3397-3404

[4] 袁园园,王庆专,崔法,等. 小麦骨干亲本碧蚂 4 号的基因组特异位点及其在衍生后代中的传递[J]. 作物学报,2010,36(1):9-16

[5] 刘化龙,王敬国,刘华招,等. 基于 SSR 标记的寒地水稻品种骨干亲本分析[J]. 植物遗传资源学报,2011,12(6):865-871

[6] 于海霞,肖静,田纪春. 小麦骨干亲本矮孟牛及其衍生后代遗传解析[J]. 中国农业科学,2012,45(2):199-207

[7] 丛万彪. 寒地水稻骨干亲本合江 20 的育成和利用[J]. 黑龙江农业科学,1999(3):65-66

[8] 王忠华,Redus M A R C,贾育林. 水稻抗稻瘟病基因 *Pi-ta* 共显性分子标记的建立[J]. 中国水稻科学,2005,19(6):483-488

[9] 刘华招,刘延,刘化龙,等. 黑龙江省种植品种中稻瘟病抗性基因 *Pib* 和 *Pi-ta* 的分布[J]. 东北农业大学学报,2011,42(4):27-31

[10] 刘华招,陈温福,刘延. 水稻 *Pi* 基因分子标记的物理图谱锚定[J]. 华北农学报,2009,24(S):5-8

[11] Liu H Z, Liu Y, Liu H L, et al. Identification and analysis of physiological races of magnaporthe oryzae in Heilongjiang province [J]. Journal of Northeast Agricultural University, 2012, 19(1): 15-20

[12] 黎毛毛,黄永兰,余丽琴,等. 利用 SSR 标记构建江西稻种资源核心种质库的研究[J]. 植物遗传资源学报,2012,13(6):952-957

[13] 王富有. 中国作物种质资源引进与流出研究[J]. 植物遗传资源学报,2012,13(2):335-342

[14] 刘华招,刘延,陈温福. 寒地水稻骨干亲本石狩白毛衍生品种的育成、推广及启示[J]. 黑龙江八一农垦大学学报,2011,23(2):8-12

[15] 雷昊,张悦,林志珊,等. 利用分子标记将 2Ai-2 染色体转移到小麦 ph1b 遗传背景的研究[J]. 植物遗传资源学报,2012,13(5):838-842