

## 水稻品种‘沈农606’抗稻瘟病基因定位和连锁的SRAP片段分析

姜树坤<sup>1,2</sup>, 张喜娟<sup>2</sup>, 张丽<sup>1,\*</sup>

沈阳农业大学<sup>1</sup>辽宁省农业生物技术重点实验室,<sup>2</sup>辽宁省北方粳稻育种重点实验室, 沈阳110161

**摘要:** 选用抗稻瘟病水稻品种‘沈农606’为抗病亲本与感病品种‘丽江新团黑谷’配制杂交组合。鉴定亲本、F<sub>1</sub>正反交及其F<sub>2</sub>群体的抗病性的结果表明,‘沈农606’的抗性受一对显性基因控制。采用相关序列扩增多态性(SRAP)和简单序列重复(SSR)标记,以及分离体分组混合分析法(BSA)将该基因定位于8号染色体上,其与SRAP标记m5e1-500的遗传距离为2.8 cM,与SSR标记RM25的遗传距离为9.8 cM,暂命名为*Pi-SN606*。m5e1-500序列位于8号染色体上,它能编码大于40个氨基酸的阅读框有2个,在NCBI网站上没有比对到同源性序列。

**关键词:** 水稻; 稻瘟病; 基因定位; SRAP; SSR

## Blast Resistance Gene Mapping and Linked SRAP Fragment Analysis of Rice (*Oryza sativa* L.) ‘Shennong606’

JIANG Shu-Kun<sup>1,2</sup>, ZHANG Xi-Juan<sup>2</sup>, ZHANG Li<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>Key Laboratory of Agricultural Biotechnology of Liaoning Province, <sup>2</sup>Key Laboratory of Northern Japonica Rice Breeding of Liaoning Province, Shenyang Agricultural University, Shenyang 110161, China

**Abstract:** The rice (*Oryza sativa*) blast resistance cultivar ‘Shennong 606’ was crossed to a susceptible cultivar ‘Lijiangxintuanheigu’. Based on the segregation ratios of resistant and susceptible plant in F<sub>2</sub> populations, it was deduced that the rice blast resistance gene was encoded by dominant gene. We report here the use of bulked segregate SRAP (sequence-related amplified polymorphism) and SSR (simple sequence repeat) analysis for rapid identification of DNA markers linked to the resistance gene. Two SRAP markers and one SSR marker were identified linking to the resistance gene locus. The linkage analysis with three markers using Mapmaker 3.0 software showed that the resistance gene locus was mapped to m5e1-500 (2.8 cM) tightly and RM25 (9.8 cM). Sequenced the m5e1-500 fragment linked to the resistance gene and compared with the NCBI databases, the result proved the gene mapped on chromosome 8. Two ORFs (open reading frame) which was larger than 40 amino acids were coded by the m5e1-500 sequence. This region does not align with the other plants in NCBI website.

**Key words:** rice; blast; gene mapping; SRAP; SSR

稻瘟病是水稻重要病害之一,自1918年日本左左木最早分析水稻品种抗稻瘟病能力以来(孙漱沅等1986),人们已用多种分子标记方法定位了50多个抗病基因。而且每年都有新的基因发现和定位(Wang等1999; Bryan等2000; Liu等2002; 吴金红等2002; Jiang和Wang 2002; 陈志伟等2004; Jia等2000; Jeoh等2003; Chanhan等2002; Liu等2005; Chen等2005; 张建福等2006)。*‘沈农606’*是我校稻作室培育的超级稻品种,田间表现出较强的稻瘟病抗性,本文对其中所含的稻瘟病抗性基因进行了遗传分析和定位,以期能为今后该基因的克隆以及分子标记辅助育种

建立基础性材料。

### 材料与方法

材料为抗稻瘟病的超级稻(*Oryza sativa* L.)品种‘沈农606’(本校徐正进先生惠赠)和感病品种‘丽江新团黑谷’(本校刘志恒先生惠赠)。2004年,以两品种为亲本配制杂交组合,获得F<sub>1</sub>、F<sub>2</sub>

收稿 2007-07-19 修定 2007-09-14

资助 辽宁省重点实验室专项资金计划和沈阳农业大学青年教师基金。

\* 通讯作者(E-mail: ququlili2000@yahoo.com.cn; Tel: 024-88487164)。

代种子。

选用ZA41菌系,挑取斜面培养的菌接种于灭菌的高粱粒上,室温(26℃)培养10~14 d,洗去表面菌丝,平铺于瓷盘上培养2 d,配成孢子悬浮液(在100倍的视野下30个孢子)。亲本(对照)、F<sub>1</sub>(正、反交)、F<sub>2</sub>浸种催芽后分别点播于60 cm×40 cm×8 cm的育苗盘内,育苗盘内铺有1.5 cm厚的岩棉为基质,播后覆盖1 cm厚细沙,常规管理。四叶期时定量喷雾接种,接种后立即在26~28℃条件下黑暗保湿(相对湿度95%)24 h,然后将育苗盘移至25~30℃、相对湿度>95%的高温环境下,8~10 d后调查病斑,进行抗病性评定及统计分析(王久林等2000)。

基因组DNA的提取采用姜树坤等的方法(2006);相关序列扩增多态性(sequence-related amplified polymorphism, SRAP)引物采用Li和Quiros(2001)已发表的引物组合:m1~m10/e1~e11,共计110对;反应体系参照Li和Quiros(2001)。简单序列重复(simple sequence repeat, SSR)引物按染色体均匀选取共计84个,扩增程序参照姜树坤等(2007)文中的方法。扩增产物用6%的变性聚丙烯酰胺凝胶分离,电泳缓冲液为0.5×TBE。电泳后采用银染法染色(Panaud等1996)。

生物统计时参照吴建利等(2000)关于稻瘟病抗

性基因遗传分析的适合性 $\chi^2$ 测验方法,计算遗传距离采用Mapmaker 3.0软件(Lander等1987)。将与抗病基因紧密连锁的SRAP片段m5e1-500用大连宝生物Agarose Gel DNA Purification Kit Ver.2.0试剂盒回收测序。用DNAMAN 5.0软件及NCBI网站上的相关功能分析序列。

## 实验结果

### 1 水稻品种‘沈农606’抗稻瘟病性的遗传分析

‘沈农606’×‘丽江新团黑谷’的F<sub>1</sub>正反交各单株均表现抗病,表明其抗性受核基因控制。F<sub>2</sub>代群体的抗感分离情况为632株抗病,196株感病。 $\chi^2$ 测验表明抗、感单株分离符合3:1分离比(表1),表明‘沈农606’的稻瘟病抗性受一对主效基因控制。

### 2 ‘沈农606’抗稻瘟病基因的定位

将亲本间有多态性的35对SRAP引物和16对SSR引物在抗、感池间进行扩增后,其中有2对SRAP引物和1对SSR引物呈现出多态性,表明它们与该抗性基因存在连锁关系。采用这3对引物对112个F<sub>2</sub>感病单株利用Mapmaker 3.0软件计算遗传距离。结果表明,‘沈农606’抗稻瘟病基因位于8号染色体上,与SRAP标记m5e1-500(图1)的遗传距离为2.8 cM(图2),与SSR标记

表1 F<sub>2</sub>群体接种稻瘟病菌ZA41后的鉴定

Table 1 Identification results of F<sub>2</sub> population with ZA41 race

亲本及后代群体	鉴别小种	鉴定株数	抗病株数	感病株数	期望比	$\chi^2$	$P_{0.05, 0.01}$
‘沈农606’	ZA41	20	20				
‘丽江新团黑谷’	ZA41			20			
F <sub>1</sub>	ZA41	15	15				
F <sub>2</sub>	ZA41	828	632	196	3:1	0.71	3.84~6.63

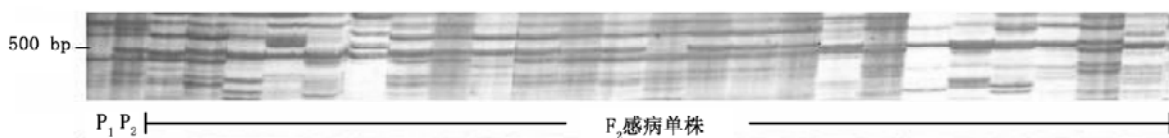


图1 SRAP引物m5e1扩增片段在F<sub>2</sub>群体中的分离

Fig.1 Segregation of m5e1 amplification fragments in F<sub>2</sub> population

P<sub>1</sub>: ‘沈农606’; P<sub>2</sub>: ‘丽江新团黑谷’; 其他为F<sub>2</sub>感病单株。

RM25 (图3)的遗传距离为9.8 cM (图2)。

### 3 连锁的SRAP片段分析

用DNAMAN 5.0软件对测序后的序列进行开放阅读框架(open reading frame, ORF)检测的结果(图4)显示, m5e1-500序列能够编码大于40个氨基酸的阅读框有2个, 即84个氨基酸和40个氨基酸。由于序列太短, 无法用NCBI上的BLAST软件对这两个氨基酸序列进行相似性比对。我们

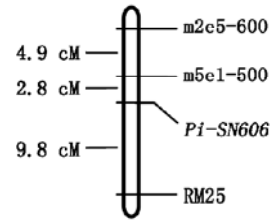


图2 ZA41 菌系抗性基因在水稻染色体上的定位  
Fig.2 Mapping of blast-resistance gene to ZA41 race on rice chromosome

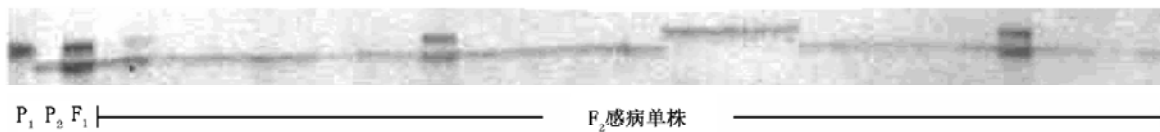


图3 SSR引物RM25扩增片段在F<sub>2</sub>群体中的分离

Fig.3 Segregation of RM25 amplification fragments in F<sub>2</sub> population  
P<sub>1</sub>: '沈农606'; P<sub>2</sub>: '丽江新团黑谷'; F<sub>1</sub>: 杂种1代; 其他为F<sub>2</sub>感病单株。

a	1 1 61 20 121 40 181 60 241 80 301 100 361 120 421 140 481 160	TGATGACGGCCAGTGCAGCTTGCATGCCTGCAGGTCGACGATTTGAGTCCAAACCGGATA M T A S A A C M P A G R R F E S K P D GAAGGCAAGATATAACATTACCATGTCACCTTTTGTCAATAGATATAAAGTTCTACATAT R R Q D I T L P C H F L S I D I K F Y I TTTGGATTTGGATTTCGAACCTCCTACCAACATCAATTTCAAACGAAAGCTAGACGTTAATT F W I W I R T S Y O H O F O T K L D V N TAGAAGGAATATCAGAGCTCATGAGTATTTGTTGGAAGTTTGTGGAATCTACTTTTCAGA L E G I S E L M S I C W K V C G I Y F Q GTTTTGGTCCAAAGTAAAAATACCTACAAGCTACCGGGAATCTATAAAACAATCCACGTA S F G H K * ACCCAATCTGAGTCTAATCTGGATCTTAGACCTTGTAATTGTTTCGTGGACTAAACCCAA 100 361 TGGGGTGGTGCCTTAGGACTAACTCTAGGACTTCCCTAATCATATTTATTTCAGTAGCCAT 120 421 TATAGTTTAGTGTGTCAGGTTTCACTTAAATAATTTTACAATTGCAGTTTCATCGCTATCC 140 481 GGTTTGGACTCAA 160
b	1 1 61 21 121 41 181 61 241 81 301 101 361 121 421 141 481 161	TGATGACGGCCAGTGCAGCTTGCATGCCTGCAGGTCGACGATTTGAGTCCAAACCGGATA 1 GAAGGCAAGATATAACATTACCATGTCACCTTTTGTCAATAGATATAAAGTTCTACATAT M S L F V N R Y K V L H I 121 TTTGGATTTGGATTTCGAACCTCCTACCAACATCAATTTCAAACGAAAGCTAGACGTTAATT L D L D S N L L P T S I S N E A R R * 181 TAGAAGGAATATCAGAGCTCATGAGTATTTGTTGGAAGTTTGTGGAATCTACTTTTCAGA 61 241 GTTTTGGTCCAAAGTAAAAATACCTACAAGCTACCGGGAATCTATAAAACAATCCACGTA 81 301 ACCCAATCTGAGTCTAATCTGGATCTTAGACCTTGTAATTGTTTCGTGGACTAAACCCAA 101 361 TGGGGTGGTGCCTTAGGACTAACTCTAGGACTTCCCTAATCATATTTATTTCAGTAGCCAT 121 421 TATAGTTTAGTGTGTCAGGTTTCACTTAAATAATTTTACAATTGCAGTTTCATCGCTATCC 141 481 GGTTTGGACTCAA 161

图4 m5e1-500的核苷酸序列及推导的氨基酸序列

Fig.4 Nucleotide and deduced amino acid sequence of m5e1-500  
a: 84个氨基酸的阅读框; b: 40个氨基酸的阅读框。

对该片段的核酸序列进行比对的结果表明, 片段与粳型水稻8号染色体上的AP008224.2序列同源性为100%, 这与SSR定位的结果一致, 说明可以用SRAP片段测序进行水稻的基因定位。

## 讨 论

SRAP是一种新型的基于PCR技术的分子标记, 可对内含子区域和启动子区域进行特异性扩增, 近年来, 已广泛应用于基因定位、基因克隆、生物多样性、遗传图谱构建、预测杂种优势、比较基因组学等诸多研究领域(Li和Quiros 2001; 林忠旭 2003; Ferriol等 2003)。与其他的几种分子标记相比, 它的引物设计简单且合成费用低, 扩增产物多态性高, 在基因组上分布均匀, 这些特点都可大大降低实验成本和劳动强度; 此外, SRAP标记扩增区域包括开放阅读框且扩增产物和扩增引物都较长, 这就使其扩增产物更容易克隆测序, 也更有利于在网上数据库中进行比对分析。现在, 随着水稻基因组测序的完成, 大量的水稻基因信息都可以通过网络进行查询和分析, 这就使得SRAP标记在水稻基因定位和克隆中具有较高的应用价值。

‘沈农606’是北方重点推广的超级稻品种, 在田间表现出较强的稻瘟病抗性。本文结果表明, ‘沈农606’对ZA41小种的抗性受一对显性核基因控制, 并将其定位于8号染色体上。此种基因的鉴定和定位为克隆该基因及分子标记辅助育种奠定了基础。另外, 目前定位在8号染色体上的抗稻瘟病基因有*Pi-11(t)*、*Pi-36(t)*和*Pi-33(t)*, 本文所鉴定的抗病基因与这3个基因之间的关系尚待进一步研究。‘沈农606’系谱中有多个亲本具有较强的稻瘟病抗性, 如‘藤坂5号’、‘塔杜康’、‘福锦’等, 这一抗性基因的具体来源仍需进一步验证。

本文中的测序比对结果虽然不很理想, 但我们正进一步筛选较长的连锁片段进行测序。同时, 根据抗病基因保守区设计固定引物, 结合SRAP标记选择扩增外显子区域的引物, 并拟采用类似靶位区域扩增多态性(target region amplified

polymorphism, TRAP)标记的策略(Hu和Vick 2003)进行连锁引物的筛选。

## 参考文献

- 陈志伟, 郑燕, 吴为人, 赵长江(2004). 抗稻瘟病基因*Pi-2(t)*紧密连锁的SSR标记的筛选及应用. 分子植物育种, 2(3): 321~325
- 姜树坤, 王政海, 钟鸣, 张丽, 刘少霞(2007). 辽宁省近十五年部分主栽水稻品种的SSR多态性分析. 植物生理学通讯, 43(1): 69~72
- 姜树坤, 钟鸣, 徐正进, 张丽, 马慧, 刘少霞(2006). RAPD标记进行水稻籼粳分类的研究. 沈阳农业大学学报, 37(4): 639~641
- 林忠旭, 张献龙, 聂以春, 贺道华, 吴茂清(2003). 棉花SRAP遗传连锁图构建. 科学通报, 48(15): 1676~1679
- 孙漱沅(1986). 稻瘟病及其防治. 上海: 上海科学技术出版社, 1
- 王久林, 雷财林, 蒋琬如, 凌忠专(2000). 籼稻品种浙辐802抗瘟性遗传研究. 遗传学报, 27(3): 235~239
- 吴建利, 庄杰云, 柴荣耀, 樊叶扬, 金敏忠, 李德葆, 郑康乐(2000). 水稻抗穗瘟基因的分子定位. 植物病理学报, 30(2): 111~115
- 吴金红, 蒋江松, 陈惠兰, 王石平(2002). 水稻稻瘟病抗性基因*Pi-2(t)*的精细定位. 作物学报, 28(4): 505~509
- 张建福, 凌忠专, 王国英, 谢华安(2006). 粳型恢复系云恢290稻瘟病抗性遗传学分析. 分子植物育种, 4(4): 540~544
- Bryan GT, Wu KS, Farrall L, Jia Y, Hershey HP, McAdams SA, Faulk KN, Donaldson GK, Tarchini R, Valent B (2000). A single amino acid difference distinguishes resistant and susceptible alleles of the rice blast resistance gene *Pi-ta*. Plant Cell, 12(11): 2033~2046
- Chanhan RS, Farman ML, Zhang HB, Leong SA (2002). Genetic and physical mapping of a rice blast resistance locus, *Pi-CO39(t)*, that corresponds to the avirulence gene *AVR1-CO39* of *Magnaporthe grisea*. Mol Genet Genomics, 267: 603~612
- Chen S, Wang L, Que Z, Pan R, Pan Q (2005). Genetic and physical mapping of *Pi37(t)*, a new gene conferring resistance to rice blast in the famous cultivar St. No.1. Theor Appl Genet, 111: 1563~1570
- Ferriol M, Pico B, Nuez F (2003). Genetic diversity of a germplasm collection of *Cucurbita pepo* using SRAP and AFLP marker. Theor Appl Genet, 107(2): 271~282
- Hu J, Vick BA (2003). TRAP target region amplification polymorphism: a novel marker technique for plant genotyping. Plant Mol Biol Rep, 21: 289~294
- Jeoh JS, Chen D, Yi GH, Wang GL, Ronald PC (2003). Genetic and physical mapping of *Pi5(t)*, a locus associated with broad-

- spectrum resistance to rice blast. *Mol Genet Genomics*, 269: 280~289
- Jia YL, Mcadams SA, Bryan GT, Hershey HP, Valent B (2000). Direct interaction of resistance gene and avirulence products confers rice blast resistance. *EMBO J*, 19: 4004~4014
- Jiang J, Wang S (2002). Identification of a 118-kb DNA fragment containing the locus of blast resistance gene *Pi-2(t)* in rice. *Mol Gene Genomics*, 268: 249~252
- Lander ES, Green P, Abrahamson J, Barlow A, Daly MJ, Lincoln SE, Newberg L (1987). MAPMAKER: an interactive computer package for constructing primary genetic linkage maps of experimental and natural populations. *Genomics*, 1: 174~181
- Li G, Quiros CF (2001). Sequence related amplified polymorphism (SRAP), a new marker system based on a simple PCR reaction: its application to mapping and gene tagging in *Brassica*. *Theor Appl Genet*, 103: 455~461
- Liu G, Lu G, Zeng L, Wang GL (2002). Two broad-spectrum blast resistance genes, *Pi9(t)* and *Pi2(t)*, are physically linked on rice chromosome 6. *Mol Genet Genomics*, 267: 472~480
- Liu XQ, Wang L, Chen S, Lin F, Pan QH (2005). Genetic and physical mapping of *Pi36(t)*, a novel rice blast resistance gene located on rice chromosome 8. *Mol Genet Genomics*, 274 (4): 394~401
- Panaud O, Chen X, McCouch SR (1996). Development of microsatellite marker and characterization of simple sequence length polymorphism (SSLP) in rice (*Oryza sativa* L.). *Mol Gen Genet*, 252: 597~607
- Wang ZX, Yano M, Yomanouchi U, Iwamoto M, Monna L, Hayasaka H, Katayose Y, Sasaki T (1999). The *Pib* gene for rice blast resistance belongs to nucleotide binding and leucine rich repeat class of plant disease resistance gene. *Plant J*, 19 (1): 55~64