

抗稻瘟病基因 Pi-3 的定位*

许风华¹, 涂香明¹, 李顺德², 何月秋^{1**}

(1. 云南农业大学植物保护学院, 云南 昆明 650201; 2. 玉溪市农业局, 云南 玉溪 653100)

摘要: 利用 CO39 近等基因系中的 C104PKT 和 A57-119 及其杂交 F₂ 代为材料, 在水稻第 9 染色体上找到了 5 个与 Pi-3 基因紧密连锁的分子标记 R14, JJ113, JJ6782, JJ6242 和 G103, 它们与 Pi-3 间的遗传距离分别为 1.7 cM, 5.4 cM, 16.2 cM, 21.7 cM 和 6.9 cM。

关键词: Pi-3; 分子标记; 基因定位; 稻瘟病

中图分类号: S 435.111.41 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-390X(2007)01-0138-03

Localization of the Blast Resistance Gene Pi-3 on Rice Chromosome

XU Feng-hua¹, TU Xiang-ming¹, LI Shun-de², HE Yue-qiu¹

(1. Faculty of Plant Protection, Y A U, Kunming 650201, China; 2. Agricultural Bureau of Yuxi, Yuxi 653100, China)

Abstract: Five molecular makers R14, JJ113, JJ6782, JJ6242 and G103 linking with Pi-3, the blast resistance gene, with a distance of 1.7 cM, 5.4 cM, 16.2 cM, 21.7 cM and 6.9 cM on rice Chromosome 9 were found by using both parents C104PKT and A57, and their F₂ progenies with CO39 background in this study.

Key words: Pi-3; molecular marker; gene location; blast

水稻基因组测序的完成及分子标记种类和数量的大量涌现带动了稻瘟病抗性基因的定位和克隆。水稻抗稻瘟病基因 Pi-3 是一个具有广谱抗性的主效显性基因, 找出分子标记和定位该基因对克隆和聚合育种具有重要意义。

1 材料和方法

1.1 材料

水稻品种是水稻 CO39 近等基因系的品种 CO39, C104PKT(携带 Pi-3), A57-119(携带 Pi-1, Pi-2) 及杂交组合 C104PKT/A57-119 的 250 个 F₂ 代植株和 F₃ 家系。供试稻瘟病菌株 B97414 能侵染携带 Pi-1, Pi-2 和 Pi-4a 的品种, 但不能侵染携带 Pi-3 的品种。所有材料均种在国际水稻所温室, 当苗龄处在 3.5~4.0 叶时,

采用喷雾方法在人工气候箱中接种和保湿。

1.2 方法

水稻 DNA 的提取按常规方法进行。分子定位采用逐级推定法, 即在确定了一个标记在染色体上的位置后, 再依据该标记与 Pi-3 基因间的遗传距离和水稻基因组序列数据库, 设计引物扩增多态性条带, 进行基因定位。首先用 500 条随机引物和 270 对微卫星引物扩增及用 EcoR I, EcoRV, Xba I, BamH I, Bgl II, Hind III, DraI, Hae III 等 8 种内切酶完全酶切两个亲本 C104PKT, A57-119 和轮回亲本 CO39 的 DNA, 再以水稻和玉米上的抗病候选基因 R2, R4, R5, R6, R7, R8, R10, R13, R14, R15, R16, CG1, CG2, CG3, CG5, CG6, CG7, CG9, CG10, CG11, CG12, CG13, CG14, CG15, CG16, CG17, CG18, CG19, CG20, CG21, CG22, CG23,

收稿日期: 2006-06-07

* 基金项目: 国家 863 项目(2001AA211061); 云南省 863 配套项目(2003GP06); 国家转基因专项(J99-A-015); 云南省人才基金项目(99C10010R)。

** 通讯作者

作者简介: 许风华(1981-), 女, 山东临沂人, 在读硕士研究生, 主要从事抗稻瘟病基因定位工作。

CG24, CG26, CG27, CG30, CG32, CG33, CG34, CG35, CG36, CG38, CG41, CG43, CG44, CG46, CG47, CG49, CG51, CG52, CG64, CG78, CG89, CG95, CG97, CG98(美国堪萨斯州立大学植物病理系 JEAN L 博士惠赠)作为探针,以化学荧光标记法进行分子杂交,寻找与 Pi-3 基因连锁标记。再利用最初确定的标记序列信息,在日本的 RGP 网站或 NCBI 的 Genbank 中进行搜索,开展新一轮引物设计,寻找更多分子标记。

将 F₂ 代抗病性和所有分子标记均进行统计分析,表型或分子标记像 C104PKT 的记为 1,像 A57-119 的记为 0。所得数据先两点测验(卡方测验)进行孟德尔遗传分离比例的检验,后用 Mapmaker/EXP3.0 软件进行遗传分析,用 MapDraw V2.1 进行遗传作图。

2 结果与分析

2.1 第一个分子标记 R14 的确认

500 条随机引物和 270 对微卫星引物在双亲和轮回亲本 CO39 中未扩增到差异条带,表明这双亲是与 CO39 高度一致的近等基因系。而仅以 R14 为探针在 XbaI 酶切的尼龙膜上见到双亲差异条带,进一步对 F₂ 植株 DNA 进行分析,通过连锁的两点测验分析表明 R14 与 Pi-3 连锁,且二者间的遗传距离为 1.7 cM,由于 R14 是长 415 bp,位于第 9 染色体上的候选基因,因此开展了新一轮 PCR 标记的寻找工作。

2.2 第二个分子标记 G103 的确认

依据 R14 在第 9 染色体上,且与 Pi-3 紧密连锁,在同一染色体上找到另一个标记 G103,并设计 PCR 引物:(G103: 5-TACCCTCCGAAGTAGCTAGC-3 / 5-TTGCGCTTGCGC-ACGGTCAC-3),这对引物能在所有材料中可以扩增出一条 1.1 kb 的条带,当用 EcoRV 酶切这一片段时,抗病亲本片段被切成 0.65 kb 和 0.45 kb 两个片段,感病品种片段被切成 0.59 kb 和 0.51 kb 两个片段。用这一对引物扩增所有 F₂ 植株 DNA 和用 EcoRV 酶切,通过连锁的两点测验分析结果表明 G103 与 Pi-3 连锁,且二者间的遗传距离为 6.9 cM。将 R14 和 G103 数据同抗病性反应用 Mapmaker/EXP3.0 进行联合分析,Pi-3 基因位于两个分子标记之间。

2.3 JJ113, JJ6782 和 JJ6242 分子标记的确认

以 R14 序列为基础,在日本的 RGP 网站或

NCBI 的 Genbank 中进行搜索,结果发现克隆 AP005422 中包含 R14,位于水稻第 9 染色体 36.0 ~ 40.1 cM 处。同法以 G103 序列为基础,发现克隆 AP005700 中包含 G103,位于水稻第 9 染色体的 34.9cM 处。将 AP005700 (34.9cM 处)与 AP005422 (36.0 ~ 40.1 cM)之间的所有克隆 AP005700, AP005313, AP005400, AP005552, AP005685, AP005689, AP007202, AP006526, AP005836, AP005508, AP005572, AP005675, AP005422 用 DNASTar 中的 SeqMan 进行拼合,结果发现只有 AP007202 和 AP006526 之间不能拼合。据水稻的遗传距离和物理距离间的关系,Pi-3 基因应位于 AP006526 和 AP005836 之间,根据这两个大片段中可能基因序列的注释,筛选与抗病基因有关的序列,并将这些基因预测的产物与水稻中已克隆的抗病基因 Pi-b, Pi-ta, Xa21, Pi-9, Pi-d2 等的产物用 DNASTar 进行同源性比较,以同源性高的序列且在水稻基因组中无其他同源性的序列设计引物。共合成了数对引物,其中两对引物 JJ6242 和 JJ6782 直接在双亲间扩增出了差异性条带。

依据文献[1]报道位于第 9 染色体上的 Pi-5(t) 与 Pi-3(t) 等位或紧密连锁;而 Pi-3(t) 又与 Pi-i(t) 紧密连锁。YI 等在含 Pi-5(t) 的克隆中设计了 3 对引物 JJ80-T3, JJ81-T3, JJ113-T3 [2]。通过对 24 个单基因系品种的 PCR 分析知,这 3 个标记只出现在含 Pi-5(t), Pi-3(t) 或 Pi-i(t) 的品种中,即与 Pi-5(t), Pi-3(t) 或 Pi-i(t) 是连锁的。鉴于此在本试验中随意选取了 1 对引物 JJ113-T3,并在双亲间扩增出了差异性条带。

(1)引物 JJ6242[针对预测基因 6242(10606). t00012 设计]的扩增片段在预测基因的第 18 ~ 2285 之间,全长 2 268 bp,引物的序列:

6242-F:5-TGG CAC CAA CCG CTC
CTA CCA-3

6242-R:5-CAC AGG GGG TCC TGC
CTT CC-3

(2)引物 JJ6782[针对预测基因 6782(10355). t00012 设计]的扩增片段为预测基因的全长,共 1 089 bp,引物的序列:

6782-F:5-ATG GCA CTC TTC CTT
TTC CTC G-3

6782-R:5-ATA AAG GGA GAA AAT
GGA TAT CTC GT-3

(3)引物 JJ113 [JJ113 - T3] 的扩增片段全长 484 bp, 引物序列:

113 - F: 5 - CTC TTG GTG ATC TTT GTT AC - 3

113 - R: 5 - GGA TGA TGT GAT CTG CAG AG - 3

后用这 3 对引物扩增了 F_2 群体 DNA, 通过连锁的两点测验分析结果表明三者均与 Pi - 3 基因连锁。且与 Pi - 3 基因之间的遗传距离分别为 5.4 cM, 16.2 cM 和 21.7 cM。

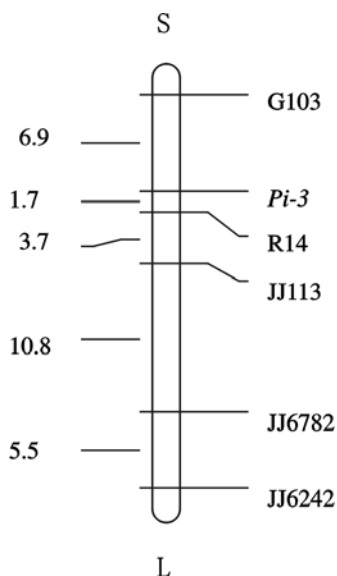


图 1 包含 Pi-3 的第 9 染色体的部分遗传图

Fig. 1 Part of genetic map of chromosome 9 including Pi-3 gene

2.4 连锁分析

连锁分析结果如图 1, 在 Clemson 大学与 Leister 公布的遗传图谱^[3,4]中, R14 与 G103 位于水稻的第 9 染色体上, 且其余 3 个标记 JJ113, JJ6782 和

JJ6242 通过前面所述可知也均位于第 9 染色体上。依据 MapDraw V2.1 作图, 也将 Pi - 3 基因作图于第 9 染色体上。

3 结论

本研究在第 9 染色体上找到了 5 个与 Pi - 3 基因紧密连锁的分析标记 R14, JJ113, JJ6782, JJ6242 和 G103, 与 Pi - 3 间的遗传距离分别为 1.7 cM, 5.4 cM, 16.2 cM, 21.7 cM 和 6.9 cM。前 4 个标记朝向第 9 染色体的长臂端, 而只有 G103 朝向短臂端。

致谢: 感谢国际水稻所昆虫与植物病理系 Hei Leung 博士在本工作前期提供有益的指导和先进的科研条件。

[参考文献]

- [1] INUKAI T, NELSON R J, ZEIGLER R S, et al. . Allelism of blast resistance genes in near-isogenic lines of rice [J]. *Phytopathology*, 1994, 84: 1278 - 1283.
- [2] INUKAI T, ZEIGLER R S, SARKARUNG S, et al. . Development of pre-isogenic lines for rice blast-resistance by marker-aided selection from a recombinant inbred population [J]. *Theor Appl Genet*, 1996, 93: 560 - 567.
- [3] <ftp://ftp.staff.or.jp/pub/geneticmap98/mapimage/chr09.gif>.
- [4] LEISTER D, KURTH J, LAURIE D A, et al. . RFLP - and physical mapping of resistance gene homologues in rice (*O. sativa*) and Barly (*H. vulgare*) [J]. *Theor Appl Genet*, 1999, 98: 509 - 520.