

抗稻瘟病基因 *Pi2* 的基因特异性 KASP 标记开发与应用

杨义强¹, 朱林峰^{1,2}, 李晓芳¹, 付杰¹, 黄道强¹, 邱先进², 周少川¹, 王重荣¹

(¹广东省农业科学院水稻研究所/广东省水稻新技术研究重点实验室, 广州 510640; ²长江大学农学院, 湖北荆州 434023)

摘要: 水稻稻瘟病抗性基因 *Pi2* 是一个对稻瘟病生理小种具有广谱抗性的基因, 对于水稻的稻瘟病抗性育种具有非常重要的应用价值。为提高 *Pi2* 的选择效率, 本研究根据高抗稻瘟病品种黄广油占与高感稻瘟病品种广陆矮 4 号在 *Pi2* 基因的第 787 位、第 788 位密码子上的变异 GCA GGA/GTG TTA, 基于竞争性等位基因 PCR (KASP, kompetitive allele specific PCR) 标记技术原理, 开发 *Pi2* 的基因特异性 KASP 标记。对 40 个水稻品种的检测结果表明, 所开发的基因特异性 KASP 标记可准确区分 *Pi2* 基因的抗性等位基因型、感病等位基因型和杂合基因型, 并且与抗病表型高度关联, 是一种鉴定 *Pi2* 基因的抗性等位基因的有效方法。F₂ 分离群体的应用结果表明, 该标记可在苗期检测育种材料的稻瘟病抗性基因 *Pi2* 的等位基因型, 不需要将育种材料种到病圃鉴定, 可用于预测育种材料的稻瘟病抗性, 提高育种效率。本研究鉴定出了 28 个携带 *Pi2* 抗稻瘟病基因的广东水稻品种, 并提供了可快速鉴定的分子标记, 对提高品种培育效率, 促进抗稻瘟病水稻品种的遗传改良, 具有重要应用价值。

关键词: 水稻; 抗稻瘟病基因; 基因特异性标记; KASP 标记; 标记辅助选择

Development and Application of KASP Marker Specific for Rice Blast Resistance *Pi2* Gene

YANG Yi-qiang¹, ZHU Lin-feng^{1,2}, LI Xiao-fang¹, FU Jie¹, HUANG Dao-qiang¹,
QIU Xian-jin², ZHOU Shao-chuan¹, WANG Chong-rong¹

(¹Rice Research Institute, Guangdong Academy of Agricultural Sciences/Guangdong Key Laboratory for New Technology
Research of Rice, Guangzhou 510640; ²College of Agriculture, Yangtze University, Hubei Jingzhou 434023)

Abstract: *Pi2* is a rice gene for broad-spectrum resistance to blast pathogens, which has an important application value for rice blast resistance breeding in South China. In order to improve the selection efficiency, a KASP marker specific for *Pi2* gene was developed based on the variation GCA GGA/GTG TTA at codon 787 and 788 of *Pi2* gene between the highly resistant variety Huangguang Youzhan and the highly susceptible variety Guanglu Ai 4. The developed allele specific marker could accurately distinguish the resistance allele, susceptible allele and heterozygous genotype at *Pi2* in 40 rice varieties, which was highly correlated with their resistance/susceptible phenotypes. Further more, this marker was applied in a large F₂ segregation population from a cross of Wushan Youzhan and Yujing 91 to select the target genotypes of the individuals or lines that carried the blast resistance *Pi2* alleles through marker-assisted selection exhibited intermediate or high resistance to blast in disease nursery. In conclusion, using the developed allele specific marker, 28 Guangdong rice varieties that carry blast resistance gene *Pi2* were identified, which has an important application value in improving selection efficiency in the development of blast resistant rice varieties.

Key words: rice; blast resistance gene; allele specific marker; KASP marker; marker-assisted selection

收稿日期: 2021-03-27 修回日期: 2021-05-06 网络出版日期: 2021-06-18

URL: <http://doi.org/10.13430/j.cnki.jpgr.20210327001>

第一作者研究方向为水稻分子育种, E-mail: yangxianchuan@foxmail.com

通信作者: 王重荣, 研究方向为水稻基因组学与分子育种, E-mail: wanger1980@163.com

基金项目: 广东省农业科学院农业优势产业学科团队建设项目 (202111TD); 广东省应用型科技研发专项 (2015B020231001)

Foundation projects: Agricultural Competitive Industry Discipline Team Building Project of Guangdong Academy of Agricultural Sciences (202111TD), Guangdong Province Applied Science and Technology Research and Development Program (2015B020231001)

由稻瘟病菌引起的稻瘟病是危害水稻生产最严重的病害之一, 每年可造成 10%~30% 减产, 严重时会造成水稻产量 40%~50% 的减产。从环境保护与农业可持续发展考虑, 选育与种植抗稻瘟病品种是防治稻瘟病最安全有效的方法^[1-2]。依靠表型鉴定的传统抗性品种选育方法往往因为环境和人为因素的影响对表型鉴定不准, 需要加大群体规模以及增加表型鉴定的批次, 这极大地增加了抗性育种的工作量与成本。利用已克隆的稻瘟病抗性基因的连锁标记或功能基因标记, 从遗传上跟踪目标基因, 选择含有目标抗性基因的单株进行杂交(回交), 育种家不但能准确的进行目标性状的定向改良, 而且能减小杂交(回交)群体的大小, 节省成本。

Pi2 是一个对稻瘟病菌具有广谱、持久抗性的重要基因, 特别是对华南籼稻区的稻瘟病的优势生理小种具有很好的抗性, 因此, 它在稻瘟病抗性育种中具有非常重要的应用价值^[3-6]。前期, 有研究者开发出该基因的分子标记, 并用于分子标记辅助选择(MAS, marker-assisted selection)育种^[4-8], 但这些分子标记的检测多数基于凝胶电泳技术, 操作繁杂, 难以实现自动化, 导致进行该基因的 MAS 育种过程效率较低。另外, 这些标记检测使用的溴化乙锭或者聚丙烯酰胺易对环境造成污染, 对人体产生危害。开发抗稻瘟病基因 *Pi2* 的基因特异性标记, 并建立高效、环境友好的检测体系, 对促进该基因的商业化育种应用具有重要意义。

单核苷酸多态性(SNP, single nucleotide polymorphism), 主要是指在基因组上由单个核苷酸变异所引起的 DNA 序列多态性。它是生物可遗传的变异中最常见的一种。SNP 数量多, 分布广泛, 适于快速、规模化筛查, 易于基因分型, 在分子育种领域有着广泛的应用。现阶段适用于 SNP 检测的方法主要有凝胶电泳、荧光定量 PCR、基因芯片和竞争性等位基因 PCR(KASP, kompetitive allele specific PCR)^[9]。KASP 的基因分型方法是通过计算 PCR 过程中产生的荧光信号, 实现对变异位点的检测, 且检测过程无需电泳, 减少了实验操作过程对环境的污染和人体的伤害^[9-12]。该方法已开始用于分子标记辅助选择、基因定位、种子纯度及真实性鉴定等工作, 具有成本低、通量高、实验操作安全和基因型数据采集准确的优势^[11-16]。本研究表明所开发的 *Pi2* 抗稻瘟病基因的 KASP 特异性分子标记 W-*Pi2* 可在早期(种子或苗期)检测育种材料的 *Pi2* 的等位基因, 极大地提高育种材料在病圃鉴定的效率和准确

性; 鉴定筛选出的 27 份抗稻瘟病种质资源, 对促进抗稻瘟病水稻品种的遗传改良具有重要的应用价值。

1 材料与方法

1.1 试验材料

以本单位选育的 35 个常规稻品种和收集自广东省、湖南省、江西省、广西壮族自治区的 7 个优质品种为试验材料, 其中, 黄广油占(HGYZ, Huangguang Youzhan)是生产上大面积种植的高抗稻瘟病品种, 作为抗病对照; 广陆矮 4 号(GLA 4, Guanglu Ai 4)是广东地区稻瘟病自然诱发病圃普遍应用的感病对照。42 份水稻品种(系)由广东省农业科学院水稻研究所收集保存, 并在广东省农业科学院水稻研究所广州市大丰试验田进行播种、移栽, 按常规栽培方式进行田间管理。

1.2 稻瘟病抗性鉴定

抗性鉴定采用自然病圃鉴定的方法^[6]。自然诱发病圃设置在广州市从化区吕田镇莲麻村, 其常年处于高温高湿的气候环境中, 具有发病的地理环境条件, 是广东省具有代表性的稻瘟病区。试验材料按单本种植, 每份材料种 2 行, 每行 4 株, 行距 23.3 cm, 株距 16.7 cm, 四周种植诱发品种广陆矮 4 号。病圃全生育期防虫不防病。在成熟期, 以广陆矮 4 号充分发病为准, 对供试材料进行穗颈瘟调查, 按国际水稻所(IRRI)0~9 级的分级标准进行记录, 0 级无病, 1 级抗, 3 级中抗, 5 级中感, 7 级感, 9 级高感。

1.3 W-*Pi2* 标记设计方法

采用华丽霞等^[7]方法中的引物 *Pi2*SNP 对黄广油占和广陆矮 4 号进行 PCR 克隆和测序, 将测序结果与金名捺等^[8]中的 *Pi9*、*Pi2*、*Piz-t*、*Pigm* 同一位置的多态性片段基因序列进行比对。*Pi9*、*Pi2*、*Piz-t*、*Pigm*、*Pi50* 的基因组序列来自 GenBank 数据库, 对应的登录号分别为 DQ285630、DQ352453、DQ352049、KU904633、KP985761, 利用 NCBI 网站的在线 BLAST 分析工具进行比对(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>), 日本晴参考基因组序列采用 *LOC_Os06g17900* 的序列, 比对结果发现两个品种在第 787 位、第 788 位密码子上存在差异, 黄广油占为与 *Pi2* 等位的 GCA GGA 基因型, 广陆矮 4 号为 GTG TTA 基因型。根据测序获得的序列利用软件 Primer Premier 5.0 按 Awais 等^[11]方法对此差异位点设计 KASP 标记引物, 然后将引物序列交由生工生物工程(上海)股份有限公司进行引物合成, 引物的序列信息详见表 1。

表1 W-Pi2 标记引物序列

Table 1 W-Pi2 primer sequences

检测位点 Detected allele	引物名称 Primer name	序列 (5'-3') Sequence
Allele-CAG	W-Pi2-fam-F	gaaggtgaccaagttcatgctTCTCCATGTGGATGCTGCAG
Allele-TGT	W-Pi2-hex-F	gaaggtcggagtcaacggattTCTCTATGTGAATGCTGTGT
Allele-CAG/TGT	W-Pi2-R	TGTCCTTAGTAGGGGAGGAGG

引物 W-Pi2-fam-F 中小写字母部分为 FAM 通用荧光标签序列,引物 W-Pi2-hex-F 中小写字母部分为 HEX 通用荧光标签序列

The lowercase letter part of primer W-Pi2-fam-F is the FAM universal fluorescent label sequence, and the lowercase letter part of primer W-Pi2-hex-F is the HEX universal fluorescent label sequence

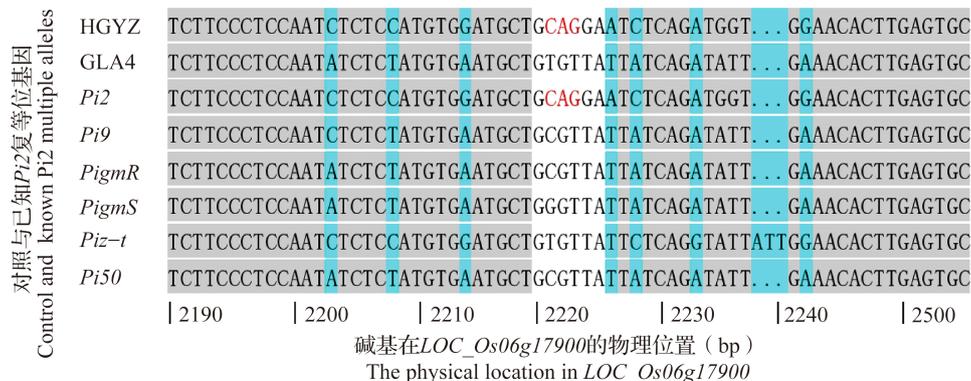
1.4 W-Pi2 标记基因分型的方法步骤

以 CTAB 法抽提的水稻叶片基因组 DNA 为模板,采用上述 KASP 分子标记的引物进行 PCR,将扩增产物放置 Bio-Rad CFX Connect 实时荧光定量 PCR 仪上获取对应的产物荧光信号值(RFU, relative fluorescence units),完成基因分型。反应的体系 10 μ L 包括 20~30 ng/ μ L 的 DNA 2 μ L,所述的分子标记引物共 0.28 μ L,其中两条 F 引物各 0.07 μ L, R 引物 0.14 μ L,以及 5 μ L 的 2 \times KASP Master mixture,补水至 10 μ L。KASP Master mixture 由广州固德生物技术有限公司提供。反应的条件为:94 $^{\circ}$ C 15 min; 94 $^{\circ}$ C 20 s, 63~55 $^{\circ}$ C 1 min,每个循环降 0.8 $^{\circ}$ C,共 10 个循环; 94 $^{\circ}$ C 20 s, 55 $^{\circ}$ C 1 min,共 26 个循环。荧光信号值的读取条件为 16 $^{\circ}$ C, 20 s。根据荧光信号结果,判断待检测水稻样品的 *Pi2* 等位基因型:若只检测到 FAM 荧光信号,则待测水稻品种为 *Pi2* 抗性等位基因型 CAG;若只检测到 HEX 荧光信号,则待测水稻样品为 *Pi2* 感病等位基因型 TGT;若同时检测到两种荧光信号,则待测水稻样品为 *Pi2* 杂合基因型。

2 结果与分析

2.1 分子标记 W-Pi2 的引物开发

根据已有文献报道,在 *Pi2* 基因第 2 外显子上第 787 位和第 788 位密码子位置存在核苷酸变异,此处变异与水稻的稻瘟病抗性密切相关^[3-4,7-8],并且包含此处变异的一段 66 bp 的序列能够区分 *Pi2* 基因的复等位基因^[7-8]。本研究通过 PCR 克隆和测序,将测序结果与已报道的 *Pi9*、*Pi2*、*Piz-t*、*Pigm*、*Pi50* 同一位置的多态性片段基因序列进行比对,发现在高抗稻瘟病品种黄广油占(HGYZ)与感稻瘟病品种广陆矮 4 号(GLA 4)在该位点存在多态性差异,黄广油占为 *Pi2* 等位的 GCA GGA 基因型,广陆矮 4 号为 GTG TTA 基因型(图 1)。因此,以核苷酸差异 CAG/TGT 为标记引物的 3' 末端开发标记 W-Pi2。标记引物序列如表 1 所示,标记引物 Allele-CAG 能跟 KASP master mix 中的 FAM 荧光标签匹配,而标记引物 Allele-TGT 跟 KASP master mix 中的 HEX 荧光标签匹配。经过 PCR 后,可以根据不同的荧光信号获得不同的基因型。如图 2 所

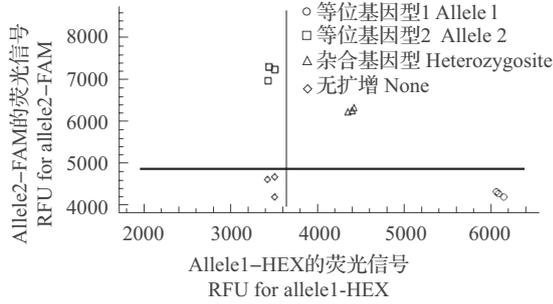


蓝色突出显示为 SNP 变异位点,白色突出显示为 GCA GGA/GTG TTA 变异位点,红色字母为 *Pi2* 特异性差异位点

SNP mutation sites were highlighted in blue, GCA GGA/GTG TTA mutation sites were highlighted in white, and *Pi2* specific difference sites were highlighted in red letters

图1 *Pi2* 复等位基因差异位点分析Fig.1 Sequence alignment analysis of multiple alleles of *Pi2*

示, 标记 W-*Pi2* 能够很好的检测出不同的等位基因型, 可以用于大规模的育种材料检测。



□: 抗性等位基因型 Allele 2 (黄广油占, CAG 变异) 分布点;
 ○: 为感病等位基因型 Allele 1 (广陆矮 4 号, TGT 变异) 分布点;
 △: 杂合基因型对照发布点; ◇: 阴性对照分布点; 下同
 □: Resistance allele 2 (HGYZ, CAG variant),
 ○: Susceptible alleles 1 (GLA 4, TGT variant),
 △: Heterozygote control, ◇: Negative control, the same as below

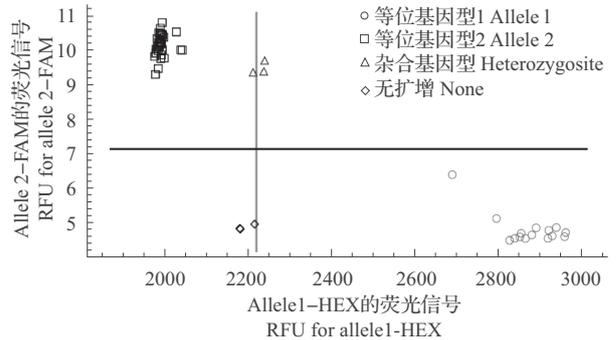
图 2 标记 W-*Pi2* 分型图

Fig.2 Schematic diagram of W-*Pi2* genotyping

2.2 KASP 标记 W-*Pi2* 检测 *Pi2* 等位基因在品种中的分布

应用 W-*Pi2* 标记对 40 个待测水稻品种及对照品种黄广油占和广陆矮 4 号进行 KASP 检测, 检测结果见图 3、表 2。其中, 28 个品种标记基因型为

CAG, 即抗病等位基因, 田间稻瘟病抗性鉴定表明除 1 个 (齐华占) 中感外, 其余品种表现为中抗到高抗; 12 个品种标记基因型为 TGT, 即感病等位基因型, 抗性鉴定表现除 1 个为高抗外, 其余都是感病, 说明该标记与抗性表型高度关联, W-*Pi2* 能够用于品种抗病基因 *Pi2* 的抗 / 感等位基因鉴定。借助该标记的应用, 育种家能够从种质资源中筛选出抗源品种。



□: 序号 1~28; ○: 序号 29~40
 (详细品种名称见表 2)
 □: No.1-28, ○: No.29-40 (detailed variety names showed at table 2)

图 3 标记 W-*Pi2* 在 42 个水稻品种中的分型结果
 Fig.3 W-*Pi2* detection results of 42 rice varieties

表 2 42 个水稻品种的 W-*Pi2* 标记的基因型与稻瘟病抗性

Table 2 W-*Pi2* marker genotypes and blast resistance in 42 rice varieties

序号 Number	品种名称 Variety name	W- <i>Pi2</i> 标记基因型 W- <i>Pi2</i> marker genotype	稻瘟病抗性鉴定结果 Results of rice blast resistance identification	品种特性 (选育品种 / 地方品种) Variety characteristics (cultivar/landrace)	来源地 Source
1	五山油占	Allele 2	高抗	选育品种 (粤审稻 2006004)	广东省
2	美雅占	Allele 2	抗	选育品种 (粤审稻 2009030)	广东省
3	28 占	Allele 2	中抗	选育品种	广东省
4	黄软秀占	Allele 2	中抗	选育品种 (粤审稻 2013023)	广东省
5	黄秀占	Allele 2	高抗	选育品种 (粤审稻 2010023)	广东省
6	黄丰占	Allele 2	中抗	选育品种 (粤审稻 2012002)	广东省
7	新黄占	Allele 2	高抗	选育品种 (粤审稻 2011026)	广东省
8	丰太丝苗	Allele 2	抗	选育品种 (粤审稻 2013003)	广东省
9	丰粤华占	Allele 2	中抗	选育品种 (粤审稻 2013027)	广东省
10	矮华丝苗	Allele 2	中抗	选育品种 (粤审稻 2013024)	广东省
11	齐华占	Allele 2	中感	选育品种 (粤审稻 2011021)	广东省
12	五山美占	Allele 2	中抗	选育品种 (粤审稻 2014005)	广东省
13	五山丰占	Allele 2	抗	选育品种 (粤审稻 2014004)	广东省
14	黄秀丝苗	Allele 2	抗	选育品种 (粤审稻 2014023)	广东省
15	黄广莉占	Allele 2	高抗	选育品种 (粤审稻 2015006)	广东省
16	美丝占	Allele 2	抗	选育品种 (粤审稻 2006046)	广东省

表 2(续)

序号 Number	品种名称 Variety name	W-Pi2 标记基因型 W-Pi2 marker genotype	稻瘟病抗性鉴定结果 Results of rice blast resistance identification	品种特性(选育品种/地方品种) Variety characteristics (cultivar/landrace)	来源地 Source
17	黄广华占 1 号	Allele 2	高抗	选育品种(粤审稻 2016031)	广东省
18	五山软占	Allele 2	抗	选育品种(粤审稻 20170050)	广东省
19	五山丝苗	Allele 2	高抗	选育品种(粤审稻 2009031)	广东省
20	黄银占	Allele 2	抗	选育品种(粤审稻 2013002)	广东省
21	黄丝莉占	Allele 2	抗	选育品种(粤审稻 2015001)	广东省
22	黄广华占 2 号	Allele 2	抗	选育品种(粤审稻 20180001)	广东省
23	黄广农占	Allele 2	中抗	选育品种(粤审稻 20190014)	广东省
24	五山丝占	Allele 2	高抗	选育品种(粤审稻 20170051)	广东省
25	黄软占	Allele 2	抗	选育品种(粤审稻 2011001)	广东省
26	五广占	Allele 2	抗	选育品种(粤审稻 2011025)	广东省
27	黄莉占	Allele 2	高抗	选育品种(粤审稻 2008001)	广东省
28	黄粤丝苗	Allele 2	中抗	选育品种(粤审稻 2012025)	广东省
29	美香占 2 号	Allele 1	感	选育品种(粤审稻 2006009)	广东省
30	农香 21	Allele 1	感	选育品种(CNA20080249.6)	湖南省
31	马坝油占	Allele 1	高感	地方品种	广东省
32	丰矮占 1 号	Allele 1	感	选育品种(粤审稻 1997002)	广东省
33	茉莉新占	Allele 1	中感	选育品种(粤审稻 200105)	广东省
34	黄软丝苗	Allele 1	高抗	选育品种(粤审稻 2015009)	广东省
35	黄粤占	Allele 1	感	选育品种(粤审稻 2008037)	广东省
36	农香 32	Allele 1	感	选育品种(湘审稻 2015009)	湖南省
37	玉晶 91	Allele 1	感	选育品种(湘审稻 2015034)	湖南省
38	湘早籼 17 号	Allele 1	高感	选育品种(湘品审第 152 号)	湖南省
39	玉清香	Allele 1	感	地方品种	江西省
40	百香优	Allele 1	感	地方品种	广西壮族自治区
CK1	黄广油占	Allele 2	高抗	选育品种(粤审稻 2013001)	广东省
CK2	广陆矮 4 号	Allele 1	高感	选育品种	广东省

Allele 2 为抗性等位基因型(黄广油占); Allele 1 为感病等位基因型(广陆矮 4 号); 下同

Allele 2 is the resistance allele (HGYZ); Allele 1 is the susceptible allele (GLA 4), the same as below

2.3 应用 KASP 标记 W-Pi2 辅助选择抗稻瘟病育种材料

以高抗稻瘟病的品种五山油占作为母本,与不携带 *Pi2* 抗性等位基因的感病品种玉晶 91 杂交获得 F_2 群体,利用设计的 KASP 标记 W-Pi2 对 4600 多个 F_2 单株进行基因型检测,从中筛选出纯合的抗病 *Pi2* 基因型约 1000 多株,并种植到大田,同时挑选纯合感病基因型 100 株作为对照。通

过 F_3 家系的田间农艺性状表现,从中筛选出 18 株纯合抗病基因型和 6 株纯合感病基因型自交获得 F_4 ,将 24 份 F_4 种植到广州市从化区吕田镇稻瘟病鉴定圃进行稻瘟病自然诱发鉴定。鉴定结果表明,携带抗性 *Pi2* (Allele 2) 的株系对稻瘟病表现为抗或高抗,携带感病 *Pi2* (Allele 1) 的株系表现为感,株系的抗性表现与 W-Pi2 标记基因型相符(表 3)。

表 3 五山油占与玉晶 91 杂交后代株系的 W-Pi2 标记的基因型及其稻瘟病抗性

Table 3 W-Pi2 genotypes and blast resistance in F₄ lines derived from the cross of Wushan Youzhan/Yujing 91

区号 Number	W-Pi2 标记基因型 W-Pi2 marker genotype	稻瘟病抗性鉴定结果 Results of rice blast resistance identification	区号 Number	W-Pi2 标记基因型 W-Pi2 marker genotype	稻瘟病抗性鉴定结果 Result of rice blast resistance identification
X2011	Allele 1	感	X2023	Allele 2	高抗
X2012	Allele 1	感	X2024	Allele 2	高抗
X2013	Allele 1	感	X2025	Allele 2	高抗
X2014	Allele 1	感	X2026	Allele 2	高抗
X2015	Allele 1	感	X2027	Allele 2	抗
X2016	Allele 1	感	X2028	Allele 2	抗
X2017	Allele 2	高抗	X2029	Allele 2	高抗
X2018	Allele 2	抗	X2030	Allele 2	抗
X2019	Allele 2	抗	X2031	Allele 2	抗
X2020	Allele 2	高抗	X2032	Allele 2	高抗
X2021	Allele 2	高抗	X2033	Allele 2	高抗
X2022	Allele 2	高抗	X2034	Allele 2	高抗

3 讨论

目前已有 27 个水稻抗稻瘟病主效基因被克隆^[17-18], 利用与目标基因连锁的分子标记、基因特异性分子标记或基因功能标记辅助选育携带抗病基因的水稻品种、提高品种的抗性, 已经是育种家常用的方法。柳武革等^[19]利用与抗病基因 *Pi1* 和 *Pi2* 紧密连锁的分子标记辅助改良了三系不育系荣丰 A 的稻瘟病抗性。向小姣等^[20]利用与抗病基因 *Pi9* 和 *Pigm* 连锁的标记辅助回交改良优质、高产、感稻瘟病的京作 1 号, 获得了较好的效果。聂元元等^[21]借助分子标记辅助选择方法, 利用抗稻瘟病基因 *Pi1*、*Pi2*、*Pi9* 改良三系杂交稻恢复系 R225, 创制了一批中抗水平以上的抗病株系。董瑞霞等^[22]利用抗稻瘟病基因 *Pi25* 改良水稻不育系臻达 A 及其杂交种的稻瘟病抗性。针对 *Pi2* 基因及其复等位基因, 已有研究者开发了相关的标记。华丽霞等^[7]开发的 dCAPS 标记, PCR 扩增之后需要酶切, 再进行凝胶电泳检测, 操作繁杂, 难以实现自动化。而金名捺等^[8]开发的 HRM 标记, 对 PCR 扩增体系比较敏感, 并且试剂成本较高, 进行大批量筛选性价比不高。基于 KASP 的基因分型方法是一种对 SNP、Indel 位点进行双等位基因分型的技术。相比前人的研究, 本研究开发的 KASP 标记 W-Pi2 具有无需电泳、稳定性好、准确度高、容易实现自动化和高通量、样本检测费用较低的特点。实验过程表明, 在普通的实验室设备条件下, 1 名实验员 1 天可以轻松地完成 5000 份左右的样本检测, 单个数据点费用低

至 0.9 元左右。

本研究开发的 KASP 标记 W-Pi2 利用 *Pi2* 外显子区域上的核苷酸突变, 能够特异性甄别 *Pi2* 抗性等位基因 (图 1), 试验结果表明, 该标记不仅适合种质资源进行初筛, 寻找抗源品种, 而且适合在杂交后代群体中进行规模化筛选, 从而提高育种选择的准确率。近年来, 随着我国水稻产业“提质增效”的转向, 优质化是水稻产业提升的核心目标。目前大面积推广的优质稻品种, 如美香占 2 号、马坝油占、农香 21、农香 32、玉清香、百香优等食味品质优异的品种, 由于不含有抗稻瘟病基因, 其稻瘟病抗性较差, 这极大地限制了优质稻品种的生产 and 推广。优质稻品种优质不抗病, 缺乏抗病优质品种, 成为制约水稻产业优质化发展的一个重要瓶颈。广东省保存有丰富的水稻种质资源, 稻瘟病抗源品种丰富, 因此, 许多品种被广泛应用于我国育种单位和种业公司的育种体系中。本研究表明, 除去 2 个对照品种, 源于广东省的 33 个品种有 28 个携带 *Pi2* 抗性基因, 其中 27 个品种对稻瘟病表现为中抗、抗或高抗, 因此, 这些品种可以作为稻瘟病抗性育种计划的抗源亲本。利用本研究鉴定的抗源品种, 借助开发的 *Pi2* 特异性标记, 对培育抗病优质水稻新品种具有较大的应用价值, 将给水稻产业的“提质增效”提供有力的支撑。

了解不同水稻品种的抗性基因可以减少抗性育种工作的盲目性, 提高抗性育种效率。因此, 创制已知抗病基因的功能标记或特异性标记, 并对水稻品种资源进行抗性基因筛查, 显得十分重要。本研究

发现,品种黄软丝苗虽然没有携带 *Pi2* 抗性基因,但高抗稻瘟病,很明显该品种肯定存在其他抗性基因,可以作为挖掘新的抗性基因的研究材料。与之相反,品种齐华占虽然携带有 *Pi2* 抗性基因,但中感稻瘟病。其原因可能是存在 *Pi2* 的抑制基因。

综上所述,本研究针对抗稻瘟病基因 *Pi2* 的特异性位点,开发了一个 KASP 标记 W-*Pi2*,并成功应用于水稻抗源品种的筛选与分子标记辅助选育抗病株系。W-*Pi2* 标记能够很好地鉴定水稻材料中 *Pi2* 的不同等位基因,相比其他 *Pi2* 的分子标记的检测效果,其操作更加简便。结合高通量的 DNA 提取和自动化高通量基因型分型技术的发展,KASP 特异性标记的开发和利用对推进稻瘟病抗性品种的育种具有重要应用价值。

参考文献

- [1] 何秀英,王玲,吴伟怀,陈钊明,林菲,程永盛,刘维,陈粤汉,廖耀平. 水稻稻瘟病抗性基因的定位、克隆及育种应用研究进展. 中国农学通报, 2014, 30(6): 1-12
He X Y, Wang L, Wu W H, Chen Z M, Lin F, Cheng Y S, Liu W, Chen Y H, Liao Y P. The progress of mapping isolation of the genes resisting to blast and their breeding application in rice. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2014, 30(6): 1-12
- [2] 袁熹,李大勇,宋凤鸣. 水稻对稻瘟病的广谱抗性: 分子机制及其育种应用. 植物生理学报, 2017, 53(8): 1348-1358
Yuan X, Li D Y, Song F M. Broad spectrum resistance of rice to *Magnaporthe grisea*: molecular mechanism and breeding application. Plant Physiology Journal, 2017, 53(8): 1348-1358
- [3] Su J, Wang W J, Han J L, Chen S, Wang C Y, Zeng L X, Feng A Q, Yang J Y, Zhou B, Zhu X Y. Functional divergence of duplicated genes results in a novel blast resistance gene *Pi50* at the *Pi2/9* locus. Theoretical and Applied Genetics, 2015, 128(11): 2213-2225
- [4] 汪文娟,周继勇,汪聪颖,苏菁,封金奇,陈炳,冯爱卿,杨健源,陈深,朱小源. 八个抗稻瘟病基因在华南籼型杂交水稻中的分布. 中国水稻科学, 2017, 31(3): 299-306
Wang W J, Zhou J Y, Wang C Y, Su J, Feng J Q, Chen B, Feng Ai Q, Yang J Y, Chen S, Zhu X Y. Distribution of eight rice blast resistance genes in indica hybrid rice in China. Chinese Journal of Rice Science, 2017, 31(3): 299-306
- [5] 朱业宝,方珊茹,沈伟峰,陈立喆,江川,王金英. 国外引进水稻种质资源的稻瘟病抗性基因检测与评价. 植物遗传资源学报, 2020, 21(2): 418-430
Zhu Y B, Fang S R, Shen W F, Chen L Z, Jiang C, Wang J Y. Detection and evaluation of blast resistance genes in exotic rice germplasm resources. Journal of Plant Genetic Resources, 2020, 21(2): 418-430
- [6] 陆展华,付魏魏,刘维,卢东柏,王晓飞,王石光,何秀英. 广东省主栽水稻品种稻瘟病主效抗性基因的鉴定及分析. 植物病理学报, 2020, 50(6): 711-722
Lu Z H, Fu W W, Liu W, Lu D B, Wang X F, Wang S G, He X Y. Identification and analysis of major resistance genes to *Magnaporthe oryzae* in main rice varieties in Guangdong province. Acta Phytopathologica Sinica, 2020, 50(6): 711-722
- [7] 华丽霞,汪文娟,陈深,汪聪颖,曾烈先,杨健源,朱小源,苏菁. 抗稻瘟病 *Pi2/9/z-t* 基因特异性分子标记的开发. 中国水稻科学, 2015, 29(3): 305-310
Hua L X, Wang W J, Chen S, Wang C Y, Zeng L X, Yang J Y, Zhu X Y, Su J. Development of specific DNA markers for detecting the rice blast resistance gene alleles *Pi2/9/z-t*. Chinese Journal of Rice Science, 2015, 29(3): 305-310
- [8] 金名捺,陈竹锋,丘式浚,陈慧,谢刚,李早霞,唐晓艳. 基于 HRM 体系的稻瘟病抗性基因 *Pi2* 特异性分子标记的开发及应用. 农业生物技术学报, 2018, 26(3): 365-373
Jin M N, Chen Z F, Qiu S J, Chen H, Xie G, Li Z X, Tang X Y. Development and application of HRM-based molecular marker specific for the *Pi2* gene for rice blast resistance. Journal of Agricultural Biotechnology, 2018, 26(3): 365-373
- [9] 王富强,樊秀彩,张颖,刘崇怀,姜建福. SNP 分子标记在作物品种鉴定中的应用和展望. 植物遗传资源学报, 2020, 21(5): 1308-1320
Wang F Q, Fan X C, Zhang Y, Liu C H, Jiang J F. Application and prospect of SNP molecular markers in crop variety identification. Journal of Plant Genetic Resources, 2020, 21(5): 1308-1320
- [10] Semagn K, Babu R, Hearne S, Olsen M. Single nucleotide polymorphism genotyping using kompetitive allele specific PCR (KASP): overview of the technology and its application in crop improvement. Molecular Breeding, 2014, 33(1): 1-14
- [11] Awais R, Wen W E, Gao F M, Zhai S N, Jin H, Liu J D, Guo Q, Zhang Y J, Dreisigacker S, Xia X C, He Z H. Development and validation of KASP assays for genes underpinning key economic traits in bread wheat. Theoretical and Applied Genetics, 2016, 129(10): 1843-1860
- [12] Pariasca-Tanaka J, Lorieux M, He C, McCouch S, Thomson M J, Wissuwa M. Development of a SNP genotyping panel for detecting polymorphisms in *Oryza glaberrima/O.sativa* interspecific crosses. Euphytica, 2015, 201(1): 67-78
- [13] 刘丽华,庞斌双,刘阳娜,李宏博,王娜,王拯,赵昌平. 基于 SNP 标记的小麦高通量身份鉴定模式. 麦类作物学报, 2018, 38(5): 529-534
Liu L H, Pang B S, Liu Y N, Li H B, Wang N, Wang Z, Zhao C P. High-throughput identification mode for wheat varieties based on SNP markers. Journal of Triticeae Crops, 2018, 38(5): 529-534
- [14] 魏中艳,李慧慧,李骏, Yasir A. Gamar, 马岩松,邱丽娟. 应用 SNP 精准鉴定大豆种质及构建可扫描身份证. 作物学报, 2018, 44(3): 315-323
Wei Z Y, Li H H, Li J, Gamar Y A, Ma Y S, Qiu L J. Accurate identification of varieties by nucleotide polymorphisms and establishment of scannable variety IDs for soybean germplasm. Acta Agronomica Sinica, 2018, 44(3): 315-323
- [15] 练云,李海朝,李金英,周扬,王仕伟,张辉,雷晨芳,武永康,张晶鹏,王金社,卢为国. 利用 KASP 标记筛选含 *rhg1* 和 *Rhg4* 位点的大豆抗病资源. 植物遗传资源学报, 2021, 22(2): 399-406
Lian Y, Li H C, Li J Y, Zhou Y, Wang S W, Zhang H, Lei C F, Wu Y K, Zhang J P, Wang J S, Lu W G. Marker-assisted screening of soybean cyst nematode germplasms harboring resistance loci *rhg1* and *Rhg4*. Journal of Plant Genetic Resources, 2021, 22(2): 399-406
- [16] 王蕊,施龙建,田红丽,易红梅,杨扬,葛建镨,范亚明,任洁,

- 王璐, 陆大雷, 赵久然, 王凤格. 玉米杂交种纯度鉴定 SNP 核心引物的确定及高通量检测方案的建立. 作物学报, 2021, 47(4): 770-779
- Wang R, Shi L J, Tian H L, Yi H M, Yang Y, Ge J R, Fan Y M, Ren J, Wang L, Lu D L, Zhao J R, Wang F G. Identification of SNP core primer and establishment of high throughput detection scheme for purity identification in maize hybrids. Acta Agronomica Sinica, 2021, 47(4): 770-779
- [17] 华丽霞, 何炼, 蒋秋平, 叶鹏盛, 代顺冬, 韦树谷, 刘朝辉, 曾华兰. 稻瘟病抗性基因特异性分子标记的开发及应用进展. 分子植物育种, 2016, 14(10): 2739-2748
- Hua L X, He L, Jiang Q P, Ye P S, Dai S D, Wei S G, Liu Z H, Zeng H L. The process of gene-specific DNA markers development and application for rice blast resistance genes. Molecular Plant Breeding, 2016, 14(10): 2739-2748
- [18] Deng Y W, Zhai K R, Xie Z, Yang D Y, Zhu X D, Liu J Z, Wang X, Qin P, Yang Y Z, Zhang G M, Li Q, Zhang J F, Wu S Q, Milazzo J, Mao B Z, Wang E, Xie H A, Tharreau D, He Z H. Epigenetic regulation of antagonistic receptors confers rice blast resistance with yield balance. Science, 2017, 355(6328): 962-965
- [19] 柳武革, 王丰, 刘振荣, 朱小源, 李金华, 黄慧君, 廖亦龙, 朱满山, 付崇允, 陈建伟. 利用分子标记技术聚合 *Pi-1* 和 *Pi-2* 基因改良三系不育系荣丰 A 的稻瘟病抗性. 分子植物育种, 2012, 10(5): 575-582
- Liu W G, Wang F, Liu Z R, Zhu X Y, Li J H, Huang H J, Liao Y L, Zhu M S, Fu C Y, Chen J W. Improvement of rice blast resistance in CMS line Rongfeng A by pyramiding *Pi-1* and *Pi-2* with molecular marker techniques. Molecular Plant Breeding, 2012, 10(5): 575-582
- [20] 向小姣, 张建, 郑天清, 徐建龙. 应用分子标记技术改良京作 1 号的稻瘟病抗性. 植物遗传资源学报, 2016, 17(4): 773-780
- Xiang X J, Zhang J, Zheng T Q, Xu J L. Improving blast resistance of Jingzuo 1 using molecular marker technique. Journal of Plant Genetic Resources, 2016, 17(4): 773-780
- [21] 聂元元, 李霞, 毛凌华, 颜满莲, 颜龙安, 蔡耀辉. 分子标记辅助选择改良三系杂交稻恢复系 R225 稻瘟病抗性. 中国稻米, 2016, 22(3): 60-63
- Nie Y Y, Li Xia, Mao L H, Yan M L, Yan L A, Cai Y H. Improving blast resistance of parental restorer lines R225 by marker-assisted selection. China Rice, 2016, 22(3): 60-63
- [22] 董瑞霞, 王洪飞, 董练飞, 周鹏, 涂诗航, 游晴如, 廖发炼, 黄庭旭. 分子标记辅助选择改良水稻不育系臻达 A 及其杂交种的稻瘟病抗性. 植物遗传资源学报, 2017, 18(3): 573-586
- Dong R X, Wang H F, Dong L F, Zhou P, Tu S H, You Q R, Liao F L, Huang T X. Improving the rice blast resistance for a CMS line of rice Zhenda A and its hybrids using molecular marker-assisted selection. Journal of Plant Genetic Resources, 2017, 18(3): 573-586

欢迎订阅 2022 年《植物资源与环境学报》

《植物资源与环境学报》为江苏省中国科学院植物研究所和江苏省植物学会联合主办的学术刊物, 国内外公开发行人。本刊为全国中文核心期刊(北大核心)、中国科技核心期刊和中国科学引文数据库核心期刊(CSCD 核心), 并为 BA(预评)、CAB、BCI、JST、中国生物学文摘、中国环境科学文摘、中国科学引文数据库、万方数据——数字化期刊群、中国学术期刊(光盘版)、超星期刊域出版平台和中文科技期刊数据库等国内外著名刊库收录。2013 年荣获“首届江苏省新闻出版政府奖·期刊奖”及江苏省精品科技期刊项目; 2015 年荣获“第六届江苏省科技期刊金马奖·精品期刊奖”; 2015 年至 2021 年均荣获江苏省精品科技期刊项目。

本刊围绕植物资源与环境两个中心命题, 报道我国植物资源的考察、开发利用和植物物种多样性保护, 自然保护区与植物园的建设和管理, 植物在保护和美化环境中的作用, 环境对植物的影响以及与植物资源和植物环境有关学科领域的原始研究论文、研究简报和综述等。凡从事植物学、生态学、自然地理学以及农、林、园艺、医药、食品、轻化工和环境保护等领域的科研、教学、技术人员及决策者均可以从本刊获得相关学科领域的研究进展和信息。

本刊为双月刊, 大 16 开本, 2022 年起每期 100 页。全国各地邮局均可订阅, 邮发代号 28-213, 每期定价 26 元, 全年定价 156 元。国内统一连续出版物号 CN 32-1339/S, 国际标准连续出版物号 ISSN 1674-7895。

地址: 江苏省南京市中山门外 江苏省中国科学院植物研究所内

邮编: 210014

电话: 025-84347014

QQ: 2219161478

E-mail: zwzybjb@163.com

网址: <http://zwzy.cnbg.net>

微信公众号:

