

刘艳艳,曹婷,刘兴华,等. 32 份粳稻骨干亲本抗稻瘟病基因的分子检测[J]. 江苏农业科学,2020,48(13):69-72.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2020.13.013

32 份粳稻骨干亲本抗稻瘟病基因的分子检测

刘艳艳,曹婷,刘兴华,严国红

(江苏沿海地区农业科学研究所,江苏盐城 224000)

摘要:为明确 $Pi-ta$ 和 $Pi9$ 稻瘟病抗性主效基因在 32 份粳稻骨干亲本中的分布状况,利用抗稻瘟病基因 $Pi-ta$ 和 $Pi9$ 的分子标记对 32 份粳稻骨干亲本进行检测。结果表明,在 32 份骨干亲本中, $Pi-ta$ 抗性基因检出率为 46.88%, $Pi9$ 抗性基因检出率为 12.50%,同时检测到 $Pi-ta$ 和 $Pi9$ 抗病基因,检出率为 3.12%,不含有 $Pi-ta$ 和 $Pi9$ 抗病基因的材料占比为 43.75%。在骨干亲本中, $Pi-ta$ 单个基因的检出率较高, $Pi9$ 单个基因的检出率较低,同时含有 $Pi-ta$ 和 $Pi9$ 抗病基因的材料较少,因此可见,多个抗稻瘟病基因的聚合育种是今后水稻抗病育种的重点。

关键词:水稻;稻瘟病; $Pi-ta$; $Pi9$;分子检测;抗性基因

中图分类号: S511.2⁺20.1;S435.111.4⁺1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2020)13-0069-03

水稻(*Oryza sativa*)作为世界上重要的粮食作物之一,为全球超过 1/2 的人口提供粮食来源^[1]。由稻瘟病菌(*Magnaporthe grisea*)引起的稻瘟病是水稻生产中最具有毁灭性的病害,在我国几乎所有水稻栽培地区都有稻瘟病害的发生,尤其是在南方稻区,曾多次出现稻瘟病大面积暴发事件,对我国的粮食生产造成了严重影响^[2-3]。病原菌的生理小种多、变异强,能够在短时间内适应水稻抗病品种(系)的遗传抗性,导致很多抗病水稻品种(系)无法持久抗病,推广种植数年后就导致抗性减弱或完全丧失。因此,利用抗病基因选育稻瘟病抗性品种是防治稻瘟病的有效手段^[4]。在传统水稻育种中,主要通过杂交系选结合抗病表型鉴定最终选育含有目标抗性的品种,依赖于育种者的育种经验,往往容易造成误差,导致抗性基因丢失,选择效率低且周期长^[5]。因此,利用分子生物学技术明确主栽品种和新选育品种的基因型,同时结合传统育种手段,是抗病品种科学应用的前提。

迄今,水稻所有染色体上至少有 69 个抗稻瘟病位点被报道,包含 84 个主效基因,其中 30 多个抗稻瘟病基因已经被克隆^[6]。许多与抗稻瘟病基因连锁的分子标记被开发, $Pi-ta$ 是最早被克隆出来的

抗稻瘟病基因之一,位于水稻第 12 号染色体靠近着丝点附近的区域,包含 2 个外显子和 1 个长度为 1 463 bp 的内含子,编码 1 个长度为 928 个氨基酸的细胞质膜受体蛋白,其分子标记也相继被开发并广泛应用于水稻抗稻瘟病分子育种中^[7]。水稻抗稻瘟病基因 $Pi9$ 来源于小粒野生稻,Qu 等克隆了 $Pi9$ 抗稻瘟病基因,并将该基因定位在水稻第 6 号染色体上,结果表明,接种多个稻瘟病病菌生理小种后表现出较高的抗性^[8]。华丽霞等利用 PCR 技术及电泳检测技术成功研发了稻瘟病抗性基因 $Pi2$ 、 $Pi9$ 及 $Piz-t$ 的分子标记^[9]。由此可见,利用水稻抗稻瘟病主效抗性基因 $Pi9$ 的分子标记,有助于改良水稻对稻瘟病的抗性^[10]。

本研究利用 $Pi-ta$ 和 $Pi9$ 抗病基因功能性分子标记,对 32 份粳稻育种骨干亲本进行抗稻瘟病基因型检测,旨在明确骨干亲本的抗病基因型,为下一步选育新的抗稻瘟病品种组合提供依据。

1 材料与方法

1.1 试验地点与材料

供试材料于 2017 年春季播种于江苏沿海地区农业科学研究所南洋试验农场(120°14'E, 33°25'N)。供试材料为 32 份粳稻育种骨干亲本,由江苏沿海地区农业科学研究所提供,详见表 1,其中已经审定的品种为科腾稻 2 号、泗稻 2333、云粳稻 1 号、盐稻 9 号、扬育粳 2 号、苏 10-100、盐稻 1333 和徐稻 3 号,其余材料为稳定的水稻品系。

收稿日期:2019-08-12

基金项目:江苏沿海地区农业科学研究所基金(编号:YHS201610)。

作者简介:刘艳艳(1990—),女,山东日照人,硕士,助理研究员,主要从事水稻育种及抗病性研究。E-mail:1052233980@qq.com。

通信作者:严国红,研究员,主要从事水稻遗传育种研究。E-mail:2376308693@qq.com。

表 1 32 份粳稻育种骨干亲本名称

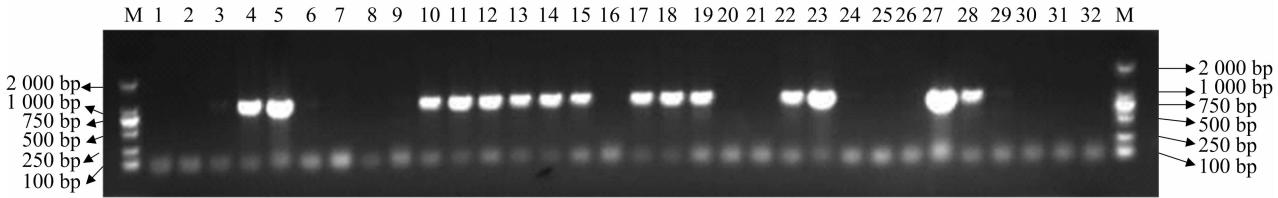
序号	品种(品系)名称	序号	品种(品系)名称
1	瑞友 16200	17	盐稻 13180
2	皖垦糯 084	18	扬育粳 2 号
3	江稻 159	19	苏 10-100
4	南粳 5840	20	丰粳 3264
5	镇稻 449	21	扬粳 3491
6	W034	22	宁 3817
7	连粳 15403	23	连粳 15214
8	金稻 68	24	盐稻 1333
9	盐稻 13124	25	金粳 227
10	科腾稻 2 号	26	徐稻 3 号
11	淮粳 1309	27	扬辐粳 5208
12	泗稻 2333	28	浙粳 20
13	淮 780	29	宁 1509
14	云粳稻 1 号	30	淮 775
15	皖垦粳 218	31	南粳 52002
16	盐稻 9 号	32	武 5257

1.2 稻瘟病抗性基因 *Pi-ta* 和 *Pi9* 的分子标记

稻瘟病抗性基因 *Pi-ta*、*Pi9* 引物序列参照高利军等的研究结果^[11],引物名称、序列及其目的扩增片段长度等信息见表 2,引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

表 2 稻瘟病抗性基因 *Pi-ta* 和 *Pi9* 的分子标记

目的基因	引物名称	引物序列 (5'→3')	目的片段长度 (bp)	退火温度 (℃)
<i>Pi-ta</i>	<i>Pi-ta</i> -F	AGCAGGTTATAAGCTAGGCC	1 042	55
	<i>Pi-ta</i> -R	CTACCAACAAGTTCATCAAA		
<i>Pi9</i>	<i>Pi9</i> -F	GCTGTGCTCCAAATGAGGAT	291/397	56
	<i>Pi9</i> -R	GCGATCTCACATCCTTTGCT		



编号 1~32 同表 1。图 2 同

图 1 功能标记 *Pi-ta* 的 PCR 扩增结果

2.2 抗性基因 *Pi9* 的分子检测

用抗稻瘟病基因 *Pi9* 特异性引物对 32 份供试粳稻材料进行 PCR 扩增,图 2 中的 M 为 TaKaRa 公司生产的 DL1000 DNA marker,1~32 对应表 1 中的品种(品系)。由图 2 可以看出,只有 4 个水稻品种(品系)扩增出大小为 291 bp 的特异性条带,分别是江稻 159、苏 10-100、盐稻 1333、徐稻 3 号。携带

1.3 稻瘟病抗性基因 *Pi-ta*、*Pi9* 的检测

采用十二烷基三甲基溴化铵(CTAB)方法提取水稻基因组 DNA。以基因组 DNA 为模板进行基因片段扩增,PCR 反应体系参照范方军等的方法^[12]。反应产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳分离后,用溴化乙锭染色,随后在紫外凝胶成像仪上观察并照相。

2 结果与分析

2.1 抗性基因 *Pi-ta* 的分子检测

用抗稻瘟病基因 *Pi-ta* 的特异性引物对 32 份供试粳稻材料进行 PCR 扩增。图 1 中的 M 为 TaKaRa 公司生产的 DL2000 DNA marker,1~32 对应表 1 中的品种(品系)。由图 1 可以看出,有 15 个水稻品种(品系)扩增出 1 条稍大于 1 000 bp 的特异性条带,分别是南粳 5840、镇稻 449、科腾稻 2 号、淮粳 1309、泗稻 2333、淮 780、云粳稻 1 号、皖垦粳 218、盐稻 13180、扬育粳 2 号、苏 10-100、宁 3817、连粳 15214、扬辐粳 5208、浙粳 20,表明所用水稻品种(品系)中含有抗稻瘟病基因 *Pi-ta*。携带 *Pi-ta* 抗性基因的水稻品种(品系)约占 32 份水稻品种(品系)的 46.88%,说明 *Pi-ta* 抗性基因已经在水稻骨干亲本中广泛存在。

Pi9 抗性基因的水稻品种(品系)占 32 份水稻品种(品系)的 12.50%,说明 *Pi9* 抗性基因在水稻骨干亲本中的应用较少,应该加大对抗性基因 *Pi9* 的利用。

2.3 抗性基因 *Pi-ta* 和 *Pi9* 的分布

由表 3 可以看出,在 32 份骨干亲本中,*Pi-ta* 抗性基因的检出率为 46.88%,*Pi9* 抗性基因的检出

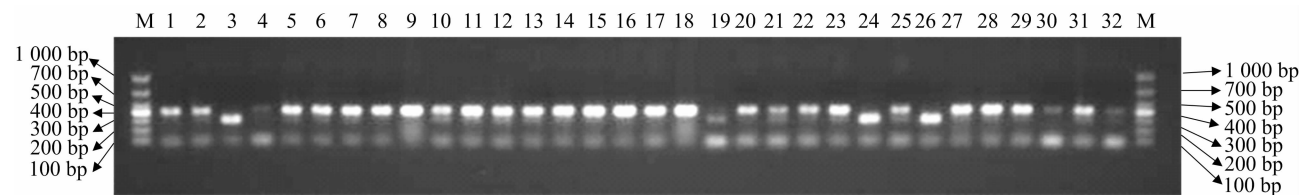


图2 功能标记 *Pi9* 的 PCR 扩增结果

表 3 抗性基因 *Pi-ta* 和 *Pi9* 的检出率及材料数

基因型	材料数 (份)	检出率 (%)
<i>Pi-ta</i>	15	46.88
<i>Pi9</i>	4	12.50
<i>Pi-ta + Pi9</i>	1	3.12
无抗性基因	14	43.75

率为 12.50%,同时检测到 *Pi-ta* 和 *Pi9* 抗病基因的比例为 3.12%,没有检测到 *Pi-ta* 和 *Pi9* 抗病基因的比例为 43.75%。在骨干亲本中,*Pi-ta* 单个基因的检出率较高,*Pi9* 单个基因的检出率较低,同时含有 *Pi-ta* 和 *Pi9* 抗病基因的材料较少。因此,在以后的水稻抗病育种中,应该加强多个抗稻瘟病基因的聚合利用。

3 讨论与结论

传统的水稻抗病育种主要依靠水稻品种在田间的发病程度进行筛选,这种育种方法耗时费力,而且容易受到环境的影响。稻瘟病菌具有多个生理小种,且变异速度较快,一些抗病水稻品种推广 2~3 年后表现出抗病性逐渐丧失的现象,因此,明确品种本身的抗性基因型对于品种的抗性改良尤为重要。随着抗稻瘟病基因的克隆及分子标记的开发,通过分子标记辅助选择检测水稻是否含有抗病基因,合理选择适宜在不同生态地区种植的抗性品种的方法,因具有准确、快速且不受环境影响等优点,已经被广泛应用于育种实践中。

近年来,国内外学者相继对水稻品种的抗瘟基因型开展了研究。张银霞等利用 *Pi-ta*、*Pi-b*、*Pi9* 对宁夏水稻种质资源进行了检测,为宁夏水稻分子标记辅助育种奠定了基础^[13]。王军等研究发现,*Pi-ta* 和 *Pi-b* 基因的联合效应与穗颈瘟抗性呈正相关,并且这种相关性比 2 个基因单独存在时与穗颈瘟抗性的相关性要紧密^[14]。王生轩等研究发现,在河南地区,水稻稻瘟病抗病基因 *Pi9* 和 *Piz-t* 在育种中利用得较为广泛,*Pi-ta* 利用得较少,今后河

南省在水稻育种工作中应加强广谱稻瘟病抗性基因的聚合育种和综合利用^[15]。马继琼等研究发现,贵州禾通过长期的人工和自然选择,*Pi5* 和 *Pi-kh* 基因频率相对较高,而 *Pi9* 和 *Pi2* 频率较低^[16]。范方军等研究发现,*Pi-ta*、*Pi-b*、*Pi54* 是水稻育种中重要的抗稻瘟病基因,表明抗稻瘟病基因 *Pi-ta* 和 *Pi-b* 与穗颈瘟抗性存在显著相关性^[12]。邹德堂等研究发现,在黑龙江地区水稻抗稻瘟病基因 *Pi9* 具有很高应用价值,含有 *Pi9* 基因的材料,苗期和分蘖期的平均发病级别均为 2.4 级,不含有 *Pi9* 基因的材料,苗期和分蘖期的平均发病级别分别为 5.1 级和 5.4 级^[17]。在本研究中,*Pi-ta* 检出率为 46.88%,*Pi9* 的检出率为 12.50%,因此在今后的育种中,可以适当加强对 *Pi9* 基因的利用。

本研究中,骨干亲本广谱抗病基因 *Pi9* 在供试材料中分布得较少,抗性资源没有得到充分利用。因此,在以后的育种实践中,可以利用遗传多样性的方法对稻瘟病进行防治,将不同类型的抗稻瘟病品种种植在同一地区,这样可以避免抗稻瘟病品种在种植 2~3 年后其抗性逐渐丧失的现象,从而延长抗性品种的使用年限。此外,在后续研究中,应聚合不同抗性基因来提高抗性,避免单一抗病基因丧失。

参考文献:

- [1]Liu J L, Wang X J, Mitchell T, et al. Recent progress and understanding of the molecular mechanisms of the rice - *Magnaporthe oryzae* interaction [J]. Molecular Plant Pathology, 2010, 11 (3): 419 - 427.
- [2]刘万才,刘振东,黄 冲,等. 近 10 年农作物主要病虫害发生危害情况的统计和分析[J]. 植物保护,2016,42(5):1-9,46.
- [3]何秀英,刘新琼,王 丽,等. 稻瘟病新隐性抗病基因 *pi55(t)* 的遗传及定位[J]. 中国科学(生命科学),2012,42(2):125-141.
- [4]李旭升,向小娇,申聪聪,等. 水稻重测序核心种质资源的稻瘟病抗性鉴定与评价[J]. 作物学报,2017,43(6):795-810.
- [5]王伟乾,于俊杰,聂亚锋,等. 2011—2014 年江苏省稻瘟病菌种群动态及毒力变化[J]. 江苏农业学报,2015,31(2):285-289.

梁 巩,张 强,郭旭川,等. 不同来源血清对体外培养驴巨噬细胞的影响[J]. 江苏农业科学,2020,48(13):72-75.

doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2020.13.014

不同来源血清对体外培养驴巨噬细胞的影响

梁 巩¹,张 强¹,郭旭川¹,陈慧斌¹,王艳萍^{1,2},曾维斌^{1,2}

(1. 石河子大学动物科技学院,新疆石河子 832000; 2. 塔里木大学动物科学学院,新疆阿拉尔 843300)

摘要:为比较驴血清和胎牛血清对体外培养驴巨噬细胞的影响,采用含 10% 驴血清或胎牛血清的培养液进行驴巨噬细胞培养的对比试验,分别在培养的 1、4、7、10 d 时观察细胞的生长状况,并用 MTT 法通过细胞吸光度检测细胞活力;培养后 4 d 采用流式细胞仪检测巨噬细胞的纯度。结果表明,含 10% 驴血清培养液培养的驴巨噬细胞的分化能力优于胎牛血清;培养后 1、4 d 时,2 种血清对巨噬细胞活力的影响没有显著差异,但培养后 7、10 d,驴血清组的细胞活力显著($P < 0.05$)或极显著($P < 0.01$)高于胎牛血清组;培养后 4 d,2 组试验中巨噬细胞的纯度分别为 $(92.72 \pm 0.45)\%$ 和 $(81.16 \pm 2.13)\%$ 。综上,驴血清组培养的巨噬细胞其分化能力、活力和纯度均优于胎牛血清组,故更适合用于驴巨噬细胞的体外培养。

关键词:驴;MTT 法;同源血清;异源血清;巨噬细胞;分化能力;活力;纯度;体外培养

中图分类号:S822.1 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2020)13-0072-04

血清支持细胞生长及繁殖的能力是在细胞培养过程中评价血清质量的重要指标之一,血清的选择对于细胞的培养有非常重要的意义^[1]。血清中由于含有多种促细胞生长的营养成分及细胞因子,

因此成为体外细胞培养液中的常用添加成分,其对细胞的培养意义重大。细胞培养液中,常用的血清主要来源于牛、猪、鸡等,其中胎牛血清因其获得量大、污染相对较小而得到广泛地应用,但不同来源的血清对不同的细胞培养效果各有差异^[2-3],来自同种动物的同源血清体外培养的细胞,其分化能力与贴壁能力均显著优于异源血清培养的细胞,另外同源血清的应用可减少向培养液中添加较为昂贵的细胞生长因子^[4-6]。

巨噬细胞作为重要的免疫细胞,是机体免疫反应的第 1 道防线^[7-8]。它也参与稳态调节,包括纤

收稿日期:2019-07-30

基金项目:国家自然科学基金(编号:31760643);石河子大学高层次人才科研启动项目(编号:RCZX201501);新疆生产建设兵团塔里木畜牧科技重点实验室开放课题(编号:HS201504)。

作者简介:梁 巩(1993—),男,新疆且末人,硕士研究生,研究方向为动物繁殖与生物技术。E-mail:2731327322@qq.com。

通信作者:曾维斌,副教授,研究方向为动物繁殖与生物技术。E-mail:zwbdky@126.com。

[6] 蔡金洋. 分子标记在水稻抗稻瘟病育种中的研究进展[J]. 农业科技通讯,2018(6):4-5,9.

[7] 王忠华,贾育林,吴殿星,等. 水稻抗稻瘟病基因 $Pi-ta$ 的分子标记辅助选择[J]. 作物学报,2004,30(12):1259-1265.

[8] Qu S H, Liu G F, Zhou B, et al. The broad-spectrum blast resistance gene $Pi9$ encodes a nucleotide-binding site-leucine-rich repeat protein and is a member of a multigene family in rice[J]. Genetics,2006,172(3):1901-1914.

[9] 华丽霞,汪文娟,陈 深,等. 抗稻瘟病 $Pi2/9/z-t$ 基因特异性分子标记的开发[J]. 中国水稻科学,2015,29(3):305-310.

[10] 周 鹏,涂诗航,董端霞,等. 水稻抗稻瘟病基因分子检测及抗性评价[J]. 福建农业学报,2016,31(9):962-965.

[11] 高利军,高汉亮,颜 群,等. 4 个抗稻瘟病基因分子标记的建立及在水稻亲本中的分布[C]//第 1 届中国杂交水稻水稻大会论文集,2010:294-298.

[12] 范方军,王芳权,刘永峰,等. $Pi-b$ 、 $Pi-ta$ 、 $Pikm$ 和 $Pi54$ 对水

稻穗颈瘟的抗性评价[J]. 华北农学报,2014,29(3):221-226.

[13] 张银霞,张 敏,田 蕾,等. 宁夏水稻品种抗稻瘟病基因 $Pi-ta$ 、 $Pi-b$ 和 $Pi9$ 的检测分析[J]. 江苏农业科学,2016,44(9):35-39.

[14] 王 军,杨 杰,杨金欢,等. $Pi-ta$ 、 $Pi-b$ 基因在江苏粳稻穗颈瘟抗性育种中的价值分析[J]. 华北农学报,2012,27(6):141-145.

[15] 王生轩,李俊周,谢 瑛,等. 河南粳稻抗稻瘟病基因 $Pi9$ 、 $Pi-ta$ 和 $Piz-t$ 的分子检测[J]. 分子植物育种,2017,15(3):177-181.

[16] 马继琼,孙一丁,杨 奕,等. $Pikh$ 、 $Pi2$ 、 $Pi9$ 、 $Pi5$ 4 个稻瘟病抗性基因在贵州禾中的分布[J]. 西南农业学报,2018,31(11):4-9.

[17] 邹德堂,姜思达,赵宏伟,等. 广谱抗性基因 $Pi9$ 在黑龙省水稻品种中的分布[J]. 东北农业大学学报,2016,47(7):1-8.