



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 112889664 B

(45) 授权公告日 2022. 06. 03

(21) 申请号 202110071094.1

(22) 申请日 2021.01.19

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 112889664 A

(43) 申请公布日 2021.06.04

(73) 专利权人 江苏里下河地区农业科学研究所
地址 225007 江苏省扬州市扬子江北路568号

专利权人 扬州播金源农业科技发展有限公司

(72) 发明人 李育红 李爱宏 肖宁 吴云雨
戴正元 刘广青 潘存红 周长海
余玲 黄年生 张小祥 季红娟
蔡跃 王闯 王志平 吴诗清
李响

(74) 专利代理机构 南京天华专利代理有限责任公司 32218

专利代理师 傅婷婷 夏平

(51) Int.Cl.
A01H 1/02 (2006.01)
A01H 1/04 (2006.01)
C12Q 1/6895 (2018.01)

审查员 李永超

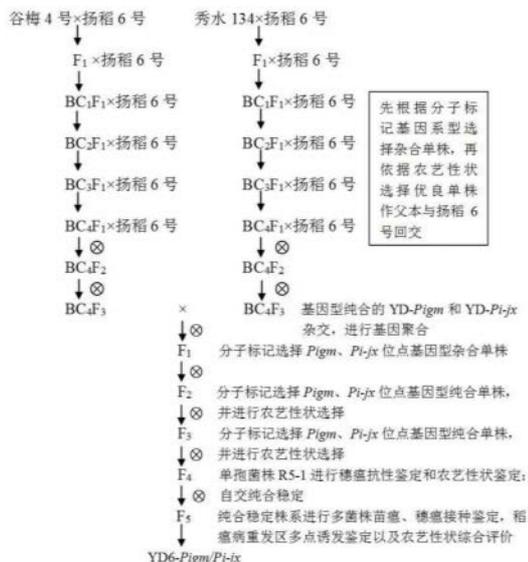
权利要求书2页 说明书7页
序列表1页 附图2页

(54) 发明名称

一种聚合互补抗稻瘟病基因培育广谱、持久抗性水稻育种材料的方法

(57) 摘要

本发明涉及了一种聚合互补抗稻瘟病基因培育广谱、持久抗性水稻育种材料的方法。本发明选用生产上推广面积较大且综合性状优良的常规稻或杂交稻亲本作轮回亲本,并开发设计鉴定抗稻瘟病基因Pi-jx的KASP标记用于标记辅助选择,通过连续回交、自交和聚合杂交,并结合分子标记辅助选择,实现了将两个抗性互补的广谱抗稻瘟病基因Pigm和Pi-jx在育种材料中的聚合。利用本发明方法选育的的育种材料种植后农艺性状与轮回亲本相近或一致,且对稻瘟病的广谱和持久抗性水平得到了显著提高。



1. 一种聚合互补抗稻瘟病基因培育广谱、持久抗性水稻育种材料的方法,其特征包含以下具体步骤:

(1) 选择含广谱、持久抗稻瘟病基因A的育种材料和含广谱、持久抗稻瘟病基因B的育种材料作基因供体亲本,分别与受体亲本杂交,获得 F_1 ,分别以 F_1-A 和 F_1-B 表示;所述的含广谱、持久抗稻瘟病基因B的育种材料与广谱、持久抗稻瘟病基因A的育种材料抗性互补;

(2) 种植 F_1-A 和 F_1-B 种子,开花期分别与轮回亲本回交,得到回交1代 BC_1F_1 群体,分别以 BC_1F_1-A 和 BC_1F_1-B 表示;

(3) 种植 BC_1F_1-A 和 BC_1F_1-B 群体,在苗期利用与目的抗性基因A和B紧密连锁的分子标记a和b进行分子检测,选择含有目的抗性基因且主要农艺性状和轮回亲本相似的杂合型单株,在开花期继续与轮回亲本回交,获得 BC_2F_1 群体,分别以 BC_2F_1-A 和 BC_2F_1-B 表示;

(4) 重复以上步骤(3),直至回交4代,获得 BC_4F_1 群体,分别以 BC_4F_1-A 和 BC_4F_1-B 表示;

(5) 种植各 BC_4F_1 群体,苗期依然利用上述连锁标记分别对目的抗性基因进行分子检测,在标记基因型纯合单株中,选择主要农艺性状选择与轮回亲本相似的单株自交收种,获得 BC_4F_2 株系,分别以 BC_4F_2-A 和 BC_4F_2-B 表示;

(6) 重复以上步骤(5),直至自交3代,获得 BC_4F_3 株系,分别以 BC_4F_3-A 和 BC_4F_3-B 表示。

(7) 种植 BC_4F_3-A 和 BC_4F_3-B 株系,苗期依然利用上述连锁标记分别对目的抗性基因进行分子检测,选择其中开花期取以基因型纯合和农艺性状似轮回亲本、且含抗稻瘟病基因A的单株YD-A作母本,选择其中基因型纯合和农艺性状似轮回亲本、且含抗稻瘟病基因B的单株YD-B作父本授粉杂交,获得杂交种 F_1 种子,以 F_1-A/B 表示;

(8) 种植 F_1-A/B 植株,成熟期混收,获得 F_2 群体,以 F_2-A/B 表示;

(9) 种植 F_2-A/B 群体,种植规模扩大到500株以上,苗期利用上述连锁标记分别对群体内单株进行目的抗性基因分子检测,选择双基因纯合、且农艺性状似轮回亲本的单株收种,获得 F_3 种子,以 F_3-A/B 表示;

(10) 种植 F_3-A/B 株系,重复步骤(9),获得 F_4 种子,以 F_4-A/B 表示;

(11) 种植 F_4-A/B 株系,苗期依然进行抗性基因分子检测;孕穗期,用对抗性基因*Pigm*致病的强毒力单孢菌株R5-1,对各株系进行穗瘟抗性鉴定;成熟期收获双基因纯合、抗菌株R5-1、且农艺性状似轮回亲本的单株,以 F_5-A/B 表示;其中,所述的强毒力单孢菌株R5-1在CN108456740A中公开;

(12) 对收获的 F_5-A/B 单株种子分成2份,1份苗期进行室内接种鉴定苗瘟抗性;另1份田间种植成株系,孕穗期通过注射法混合接种鉴定穗瘟抗性,成熟期开展农艺性状评价;选择抗苗瘟、穗瘟,且主要农艺性状似轮回亲本的株系,获得聚合双互补基因的的育种材料YD-A/B;

(13) 广谱、持久抗稻瘟病育种材料YD-A/B抗性验证,利用多菌株,对育成的广谱、持久抗稻瘟病育材料YD-A/B进行苗瘟、穗瘟抗性单菌系接种鉴定;同时,进行多地稻瘟病病圃鉴定,综合评价育成材料的综合抗性;

其中,所述的含广谱、持久抗稻瘟病基因A的育种材料为含广谱、持久抗稻瘟病基因*Pigm*的育种材料为谷梅4号,所述的含广谱、持久抗稻瘟病基因B的育种材料为含广谱、持久抗稻瘟病基因*Pi-jx*的育种材料秀水134;所述的受体亲本为扬稻6号;

步骤(3)中与目的抗性基因*Pigm*紧密连锁的分子标记为InDe1587,其引物序列如SEQ

ID NO.1和SEQ ID NO.2所示;与目的抗性基因*Pi-jx*紧密连锁的KASP分子标记为正向引物*Pi-jx-F-G*序列如SEQ ID NO.3所示,正向引物*Pi-jx-F-C*序列如SEQ ID NO.4所示,反向通用引物*Pi-jx-R*序列如SEQ ID NO.5所示;所述正向引物*Pi-jx-F-G*的5'端加上羧基荧光素FAM的荧光信号标签;正向引物*Pi-jx-F-C*的5'端加上5-六氯荧光素氨基磷酸酯HEX的荧光信号标签;

步骤(3)-步骤(6)、步骤(10)-步骤(11)中,皆扩大群体规模50株以上;步骤(9)群体规模500株以上。

2.根据权利要求1所述的一种聚合互补抗稻瘟病基因培育广谱、持久抗性水稻育种材料的方法,其特征在于:步骤(12)和步骤(13)中,通过苗期室内接种、孕穗期注射接种和病圃田间抗性鉴定,综合评价育成的广谱、持久抗稻瘟病育种材料YD6-*Pigm/Pi-jx*的稻瘟病抗性。

一种聚合互补抗稻瘟病基因培育广谱、持久抗性水稻育种材料的方法

技术领域

[0001] 本发明属于水稻分子育种技术领域,涉及一种聚合互补抗稻瘟病基因培育广谱、持久抗性水稻育种材料的方法。

背景技术

[0002] 水稻是我国最主要的粮食作物之一,年播种面积在3000万公顷左右,总收获量约占我国粮食总产量的40%,水稻生产是保证国家粮食安全的砥柱。由稻瘟病菌(*Magnaporthe oryzae*)引起的稻瘟病是威胁世界水稻安全生产的最主要真菌类病害之一,全球每年由稻瘟病引起的稻谷减产达10%-30%(Skamnioti and Gurr 2009)。近40年来,由于亲本遗传基础狭窄和高致病性稻瘟病菌的多样性,稻瘟病已成为杂交水稻生产面临的主要问题(Liu et al.2010),而近年来稻瘟病在西南、长江中下游和东北等稻作区持续大爆发,更是给水稻安全生产带来了巨大隐患(Wu et al.2016)。培育广谱、持久抗稻瘟病的水稻新品种,是控制稻瘟病最为经济有效的措施,而利用广谱、抗性持久的抗稻瘟病基因,结合分子标记辅助选择(MAS)技术则是培育抗稻瘟病水稻品种的有效手段,可实现水稻品种抗稻瘟病的持久性。

[0003] *Pigm*是从中国持久抗稻瘟病品种谷梅4号中鉴定的一个新的广谱稻瘟病抗性基因,比公认的广谱抗稻瘟病基因*Pi1*、*Pi2*、*Pi3*的抗谱更广,对不同国家和地区的30个强致病菌株中的29个表现高抗或免疫(Deng et al.,2006)。在籼稻扬稻6号和粳稻07GY31背景下研究*Piz*基因座不同复等位基因(*Pigm*、*Pi2*、*Pi9*、*Pizt*、*Piz*、*Pi40*)的抗性效应,也证实*Pigm*具有相对较好的苗瘟、穗瘟抗性效应(Wu et al,2016)。虽然抗稻瘟病基因*Pigm*在基础研究和生产实践中已被证实其应用价值,但是在实际生产应用中由于稻瘟病菌生理小种多,致病性分化、变异频繁,利用单一抗性基因培育的抗病品种往往在应用较短时间便会快速“丧失”抗性而成为感病品种,而抗性基因*Pigm*在多年应用后,抗性也呈逐渐下降趋势。因此,需要挖掘新的抗病基因以及通过基因聚合培育持久抗病品种是抗病育种急需解决的关键问题。

[0004] *Pi-jx*是利用自然品种作为定位群体,通过全基因组关联分析方法在水稻第12号染色体上定位到的一个新的抗稻瘟病基因。研究发现,从江苏、安徽、湖北、湖南、河南、浙江、广东、山东等8个省收集155份病菌接种,携带抗病基因型*Pi-jx*⁽⁺⁾品种在叶瘟和穗瘟抗性水平上都要显著优于感病基因型*Pi-jx*⁽⁻⁾品种,表现良好的抗病性。后续研究发现从稻瘟病常年重发的武陵山区分离到的强致病稻瘟病菌株R5-1,其对不同基因型材料的致病率高达95%以上,显著高于大面积生产分离的普通稻瘟病菌株,且对*Pigm*广谱抗性基因表现出致病性,而*Pi-jx*对R5-1表现抗病,理论上应该与*Pigm*具有互补效应,可以弥补*Pigm*抗性丧失的缺点。因此,聚合抗稻瘟病基因*Pigm*和*Pi-jx*将为持久稻瘟病抗病品种培育提供新的基因组合模式,也将培育更广谱、持久的抗性水稻育种材料,满足水稻生产上的需求。

[0005] 分子标记辅助选择(marker-assisted selection,MAS)是通过与目的基因紧密连

锁或共分离的分子标记,对目的基因进行筛选,因不受环境条件的影响,增加了选择的可靠性,减轻了育种工作量。在现代育种中,分子标记辅助选择(MAS)已经成为培育抗病品种的一种主要途径,特别是利用已经克隆的抗病基因,能增加选择的可靠性、减轻育种工作量和费用(Ishihara et al.2014;Jiang et al.2012;Narayanan et al.2002)。利用分子标记辅助选择(MAS)聚合几个/多个抗病基因,一直被认为是培育广谱、持久抗病品种的一个有效途径(Dai et al.2007;Fukuoka et al.2009;Jeung et al.2007)。

[0006] 本发明利用分子标记辅助选择(MAS)将广谱抗稻瘟病基因Pigm和Pi-jx聚合,这一新的基因组合模式,将培育更广谱、持久的抗性水稻育种材料,满足水稻生产上的需求。

发明内容

[0007] 发明目的:针对现有技术中存在的问题,提供一种聚合互补抗稻瘟病基因培育广谱、持久抗性水稻育种材料的方法,利用本发明方法培育的育种材料或品系具有更广谱、持久的稻瘟病抗性,对水稻稻瘟病的广谱和持久抗性水平获得显著提升。

[0008] 技术方案:一种聚合互补抗稻瘟病基因培育广谱、持久抗性水稻育种材料的方法,包括:

[0009] (1) 基因选择:聚合互补抗稻瘟病基因培育广谱、持久抗稻瘟病水稻育种材料,在基因选择上需遵循以下原则:

[0010] ①选择的基因需是已证实的,具有生产应用价值的广谱、持久抗稻瘟病基因,且具有全生育期抗性,特别是抗穗瘟;

[0011] ②聚合的两个基因抗性需具有互补性,才能保证培育的育种材料或品系具有更广谱、持久的稻瘟病抗性。

[0012] (2) 亲本选择:聚合互补抗稻瘟病基因培育广谱、持久抗稻瘟病水稻育种材料,在亲本上需遵循以下原则:

[0013] ①抗稻瘟病基因供体亲本选择:原则上应选择不利连锁累赘少的育种中间材料,最好是选择只含目的基因的单基因系;

[0014] ②抗稻瘟病基因受体亲本选择:原则上应选择在生产上大面积推广应用的、稻瘟病抗性较差的品种或杂交稻亲本,最好是选择依然具有生产潜力的品种或杂交稻亲本。

[0015] (3) 育种方法:聚合互补抗稻瘟病基因培育广谱、持久抗稻瘟病水稻育种材料,在育种方法上采用:分子标记辅助选择和常规育种(系谱选育、综合农艺性状选择)相结合的方法。

[0016] (4) 根据育种目标,对亲本材料进行聚合育种,获得广谱、持久抗稻瘟病水稻育种材料或品种;所述的育种目标至少包括综合农艺性状优异,聚合广谱、持久抗稻瘟病基因。

[0017] 本发明利用分子标记辅助选择结合系谱培育的方法,将含有两个稻瘟病抗性互补的广谱、持久抗稻瘟病基因,聚合到一个遗传背景的受体亲本,培育广谱、持久抗稻瘟病育种材料或品系,拓宽水稻的稻瘟病抗谱,使得抗性更持久,满足水稻生产需求。

[0018] 一种聚合互补抗稻瘟病基因培育广谱、持久抗性水稻育种材料的方法,包括以下步骤:

[0019] (1) 选择含广谱、持久抗稻瘟病基因A的育种材料作基因供体亲本,含与抗稻瘟病基因一的抗性互补的广谱、持久抗稻瘟病基因B的育种材料作基因供体亲本,分别与受体亲

本杂交,获得 F_1 ,分别以 F_1 -A和 F_1 -B表示。

[0020] (2) 种植 F_1 -A和 F_1 -B种子,开花期分别与轮回亲本回交,得到回交1代 BC_1F_1 群体,分别以 BC_1F_1 -A和 BC_1F_1 -B表示。

[0021] (3) 种植 BC_1F_1 -A和 BC_1F_1 -B群体,种植规模为每个回交世代种植50株(以下同),在苗期利用与目的抗性基因A和B紧密连锁的分子标记a和b进行分子检测,选择含有目的抗性基因且主要农艺性状和轮回亲本相似的杂合型单株,在开花期继续与轮回亲本回交,获得 BC_2F_1 群体,分别以 BC_2F_1 -A和 BC_2F_1 -B表示。

[0022] (4) 重复以上步骤(3),直至回交4代,获得 BC_4F_1 群体,分别以 BC_4F_1 -A和 BC_4F_1 -B表示。

[0023] (5) 种植各 BC_4F_1 群体,苗期依然利用上述连锁标记分别对目的抗性基因进行分子检测,在标记基因型纯合单株中,选择主要农艺性状选择与轮回亲本相似的单株自交收种,获得 BC_4F_2 株系,分别以 BC_4F_2 -A和 BC_4F_2 -B表示。

[0024] (6) 重复以下步骤(5),直至自交3代,获得 BC_4F_3 株系,分别以 BC_4F_3 -A和 BC_4F_3 -B表示。

[0025] (7) 种植 BC_4F_3 -A和 BC_4F_3 -B株系,苗期依然利用上述连锁标记分别对目的抗性基因进行分子检测,开花期取以基因型纯合和农艺性状似轮回亲本、且含抗稻瘟病基因A的单株YD-A作母本,以基因型纯合和农艺性状似轮回亲本、且含抗稻瘟病基因B的单株YD-B作父本授粉杂交,获得杂交种 F_1 种子,以 F_1 -A/B表示。

[0026] (8) 种植 F_1 -A/B植株,成熟期混收,获得 F_2 群体,以 F_2 -A/B表示。

[0027] (9) 种植 F_2 -A/B群体,种植规模扩大到500株以上,苗期利用上述连锁标记分别对群体内单株进行目的抗性基因分子检测,选择双基因纯合、且农艺性状似轮回亲本的单株收种,获得 F_3 种子,以 F_3 -A/B表示。

[0028] (10) 种植 F_3 -A/B株系,重复步骤(9),获得 F_4 种子,以 F_4 -A/B表示。

[0029] (11) 种植 F_4 -A/B株系,苗期依然进行抗性基因分子检测;孕穗期,用对抗性基因A致病的强毒力单孢菌株R,对各株系进行穗瘟抗性鉴定;成熟期收获双基因纯合、抗菌株R、且农艺性状似轮回亲本的单株,以 F_5 -A/B表示。

[0030] (12) 对收获的 F_5 -A/B单株种子分成2份,1份苗期进行室内接种鉴定苗瘟抗性;另1份田间种植成株系,孕穗期通过注射法混合接种鉴定穗瘟抗性,成熟期开展农艺性状评价;选择抗苗瘟、穗瘟,且主要农艺性状似轮回亲本的株系,获得聚合双互补基因的的育种材料YD-A/B。

[0031] (13) 广谱、持久抗稻瘟病育种材料YD-A/B抗性验证。利用多菌株(最好100个以上),对育成的广谱、持久抗稻瘟病育材料YD-A/B进行苗瘟、穗瘟抗性单菌系接种鉴定;同时,进行多地稻瘟病病圃鉴定,综合评价育成材料的综合抗性。

[0032] 其中,所述的广谱、持久抗稻瘟病基因A为广谱抗稻瘟病基因Pigm,广谱、持久抗稻瘟病基因B为广谱抗稻瘟病基因Pi-jx。

[0033] 与目标基因Pigm紧密连锁的分子标记优选InDe1587(一种用于检测谷梅4号抗稻瘟病基因Pigm(t)的分子标记InDe1587,发明专利号:ZL 2013 1 0428162.0),鉴定目标基因Pi-jx的分子标记优选KASP分子标记SN285。

[0034] 分子标记InDe1587引物:上游引物为5'-AACTTGCTGGGAGAAGGATTG-3'(SEQ ID

NO.1),下游引物为5'-GAGTTCGTACTTTTCAGGCTT-3'(SEQ ID NO.2)。

[0035] 分子标记SN285正向引物Pi-jx-F-G序列为:5'-GAAGGTGACCAAGTTCATGCTTCCATAGCAGGGACCTACAG-3'(SEQ ID NO.3),正向引物Pi-jx-F-C序列为:5'-GAAGGTGCGAGTCAACGGATTTTCCATAGCAGGGACCTATAA-3'(SEQ ID NO.4),反向通用引物Pi-jx-R序列为:5'-GCAGAGCACACCATACCCAC-3'(SEQ ID NO.5))所示。

[0036] 所述的轮回亲本为优良常规籼稻品种或两系杂交稻亲本扬稻6号。

[0037] 步骤(3)-步骤(6)、步骤(10)-步骤(11)中,皆扩大群体规模50株以上;步骤(9)群体种植规模500株以上,便于提高农艺性状似轮回亲本的候选单株概率。

[0038] 与现有技术相比,本发明的有益效果在于:

[0039] 1) 本发明聚合互补抗稻瘟病基因“Pigm+Pi-jx”,能更好地应对生产上稻瘟病菌生理小种复杂,致病性分化、变异频繁的现象,且能避免利用单一抗性基因培育的抗病品种应用较短时间便会快速“丧失”抗性的缺陷。广谱抗稻瘟病基因Pigm公认为具有广谱抗性,但在没有大规模应用前提下,已出现了新的致病菌株;Pi-jx是新发现的广谱抗稻瘟病基因,对具有Pigm抗性的新的致病菌株表现抗病,理论上应该与Pigm具有互补效应,可以弥补Pigm抗性丧失的缺点,聚合抗稻瘟病基因Pigm和Pi-jx将为持久稻瘟病抗病品种培育提供新的基因组合模式,也将对解决培育持久抗病品种的生产迫切需提供了新途径。

[0040] 2) 本发明利用不同来源的两个广谱抗稻瘟病基因,通过分子标记辅助选择回交转移到同一生产上广泛使用的两系杂交籼稻亲本扬稻6号,育成遗传背景相同携带不同目标基因的稻瘟病抗性单基因系,在此基础上再通过不同单基因系相互杂交育成聚合不同抗性基因的双基因系。上述育种程序,存在两方面应用优势:一、育成的遗传稳定抗病单基因系,可以尽早在生产上得以应用;二、以同一遗传背景的不同单基因系灵活组配杂交可实现不同基因聚合和后代性状快速稳定,避免连锁累赘,节省成本,缩短培育时间。

[0041] 3) 本发明在聚合互补抗稻瘟病基因培育广谱、持久抗性水稻育种材料的过程中,对于回交后代和杂交后代群体,都扩大种植规模,其优势在于,即为筛选含目的基因纯合的单株,也为提高筛选农艺性状优良单株单株的概率,减少成本和工作量,提高试验精度。

[0042] 4) 本发明对育成的互补广谱、持久抗稻瘟病基因的广谱、持久抗性水稻育种材料进行苗瘟、穗瘟和病圃重发区田间稻瘟病抗性鉴定,评级其综合抗性,优势在于,育成的抗稻瘟病材料或品系经得起生产检验,既避免了苗瘟抗而穗瘟不抗,也避免了苗瘟和穗瘟接种鉴定抗而生产上抗性减弱。

[0043] 5) 本发明开发设计的KASP分子标记SN285不仅能快速、准确的鉴定水稻种质资源或育种群体中的Pi-jx基因,且能同时实现对较多样本材料的高通量检测,提高选择效率,加快抗稻瘟病水稻品种的育种进程。

附图说明:

[0044] 图1聚合互补抗稻瘟病基因Pigm和Pi-jx培育目标改良系YD6-Pigm/Pi-jx的技术路线示意图。

[0045] 图2目标抗性基因Pigm的基因纯合体的选择示意图(泳道1为供体亲本谷梅4号,2为轮回亲本扬稻6号,3-11为选择群体的基因纯合单株)。

[0046] 图3KASP分子标记SN285近等基因系群体Pi-jx基因型的检测

[0047] (靠近Y轴的绿色圆点表示是携带G等位变异的含Pi-jx抗性基因的纯合体;靠近X轴的蓝色圆点表示是携带C等位变异的不含Pi-jx抗性基因的纯合体;X、Y轴中间的红色圆点表示是同时携带G/C等位变异的含Pi-jx抗性基因的杂合体;灰色圆点表示是以双蒸水代替样品模版DNA的阴性对照。)

具体实施方式

[0048] 下面结合具体实施例,进一步阐明本发明。

[0049] 实施例:

[0050] 1、抗稻瘟病基因供体亲本和受体亲本

[0051] (1) 广谱稻瘟病基因Pigm的供体亲本-谷梅4号(Deng Y W, et al. Genetic characterization and fine mapping of the blast resistance locus Pigm(t) tightly linked to Pi2 and Pi2 in a broad-spectrum resistant Chinese variety [J]. Theor Appl Genet, 2006, 113(4): 705-713), 广谱稻瘟病基因Pi-jx的供体亲本-秀水134(嘉兴市农业科学研究所和中国科学院遗传与发育生物学研究所联合培育的常规晚粳稻, 该品种已向农业部植物新品种保护办公室申请并授权, 品种权号: CNA20101026.2, 可购于嘉兴市农业科学研究所)。

[0052] (2) 受体亲本-扬稻6号(江苏里下河地区农业科学研究所选的常规中粳稻品种, 该品种已向农业部植物新品种保护办公室申请并授权, 品种权号: CNA20000091.8, 可购于江苏金土地种业股份有限公司)。

[0053] 2、聚合互补抗稻瘟病基因Pigm和Pi-jx培育广谱、持久抗性水稻育种材料YD-Pigm/Pi-jx的过程:

[0054] (1) 以携带抗稻瘟病基因Pigm的供体亲本-谷梅4号和携带抗稻瘟病基因Pi-jx的供体亲本-秀水134分别与轮回亲本扬稻6号杂交, 获得F₁, 分别以F₁-Pigm和F₁-Pi-jx表示。

[0055] (2) 种植F₁-Pigm和F₁-Pi-jx种子, 开花期分别与轮回亲本扬州6号回交, 得到回交1代BC₁F₁群体, 分别以BC₁F₁-Pigm和BC₁F₁-Pi-jx表示。

[0056] (3) 种植BC₁F₁-Pigm和BC₁F₁-Pi-jx群体, 种植规模为每个回交世代种植50株(以下同), 在苗期利用与目的抗性基因Pigm紧密连锁的分子标记InDel1587(引物如SEQ ID NO.1和SEQ ID NO.2所示)和鉴定抗性基因Pi-jx的KASP标记SN285(引物见表1)进行分子检测, 选择含有目的抗性基因且主要农艺性状和轮回亲本扬稻6号相似的杂合型单株, 在开花期继续与轮回亲本回交, 获得BC₂F₁群体, 分别以BC₂F₁-Pigm和BC₂F₁-Pi-jx表示。

[0057] 检测水稻稻瘟病抗性基因Pi-jx的KASP分子标记方法: 在合成Pi-jx基因KASP分子标记引物时, 所述正向引物Pi-jx-F-G的5'端加上羧基荧光素(FAM)的荧光信号标签; 正向引物Pi-jx-F-C的5'端加上5-六氯荧光素氨基磷酸酯(HEX)的荧光信号标签。

[0058] 所述的分子标记方法, 步骤如下:

[0059] ①水稻植株基因组DNA的提取;

[0060] ②将KASP标记SN285引物加入同一PCR反应体系, 并设置2个以双蒸水代替样品模版DNA的空白对照, 在荧光定量PCR仪上对水稻种质资源或育种群体植株的DNA进行扩增;

[0061] ③数据分析在Step One Software v2.2.2软件上进行。

[0062] 10uL反应体系包括样品模版DNA(10ng/uL) 1.0uL, 荧光引物mix 0.1uL, 2×KASP

反应混合液5.0uL,双蒸水3.9uL。

[0063] 条件包括94℃激活15min;94℃变性20sec,61~55℃退火60sec(每一个循环降低0.6℃),10个循环;94℃变性20sec,55℃退火60sec,26个循环。

[0064] 根据数据图的颜色和位置进行判别,其中靠近Y轴的绿色圆点表示是携带G等位变异的含Pi-jx抗性基因的纯合体;靠近X轴的蓝色圆点表示是携带C等位变异的不含Pi-jx抗性基因的纯合体;X、Y轴中间红色圆点表示是同时携带G/C等位变异的含Pi-jx抗性基因的杂合体;灰色圆点表示是以双蒸水代替样品模版DNA的阴性对照。

[0065] 表1分子标记辅助选择所用标记的序列信息

目标基因	染色体	标记名称	类型	引物序列 5'-3'	退火温度(℃)
[0066]				Fg: GAAGGTGACCAAGTTCATGCTTCCATAGCAGGGACCCTACAG	
Pi-jx	12	SN285	共显性	Fc: GAAGGTCGGAGTCAACGGATTTCCATAGCAGGGACCCTATAA R: GCAGAGCACACCATACCCAC	55

[0067] (4) 重复以上步骤(3),直至回交4代,获得BC₄F₁群体,分别以BC₄F₁-Pigm和BC₄F₁-Pi-jx表示。

[0068] (5) 种植各BC₄F₁群体,苗期依然利用上述连锁标记分别对目的抗性基因进行分子检测,在标记基因型纯合单株中,选择主要农艺性状选择与轮回亲本扬稻6号相似的单株自交收种,获得BC₄F₂株系,分别以BC₄F₂-Pigm和BC₄F₂-Pi-jx表示。

[0069] (6) 重复以下步骤(5),直至自交3代,获得BC₄F₃株系,分别以BC₄F₃-Pigm和BC₄F₃-Pi-jx表示。

[0070] (7) 种植BC₄F₃-Pigm和BC₄F₃-Pi-jx株系,苗期依然利用上述连锁标记分别对目的抗性基因进行分子检测,开花期取以基因型纯合、主要农艺性状优良,且含抗稻瘟病基因Pigm的单株YD-Pigm作母本,以基因型纯合、主要农艺性状优良,且含抗稻瘟病基因Pi-jx的YD-Pi-jx单株作父本授粉杂交,获得杂交种F₁种子,以F₁-Pigm/Pi-jx表示。

[0071] (8) 种植F₁-Pigm/Pi-jx植株,成熟期混收,获得F₂群体,以F₂-Pigm/Pi-jx表示。

[0072] (9) 种植F₂-Pigm/Pi-jx群体,种植规模扩大到500株以上,苗期利用上述连锁标记分别对群体内单株进行目的抗性基因分子检测,选择双基因纯合,且农艺性状似扬稻6号的单株收种,获得F₃种子,以F₃-Pigm/Pi-jx表示。

[0073] (10) 种植F₃-Pigm/Pi-jx株系,重复步骤(9),获得F₄种子,以F₄-Pigm/Pi-jx表示。

[0074] (11) 种植F₄-Pigm/Pi-jx株系,苗期依然进行抗性基因分子检测;孕穗期,用对抗性基因Pigm致病的强毒力单孢菌株R5-1(CN108456740A),对各株系进行穗瘟抗性鉴定,成熟期收获双基因纯合、抗菌株R5-1、且农艺性状似扬稻6号的单株10个以上,以F₅-Pigm/Pi-jx表示。

[0075] (12) 对收获的F₅-Pigm/Pi-jx单株种子分成2份,1份苗期利用从不同生态区收集并分离、且分属A、B、C、D、E、F、G群(针对中国稻瘟病鉴别品种)的7个代表性菌株,进行室内接种鉴定,其接种和鉴定方法参见于苗苗(2013)(于苗苗等,广谱稻瘟病抗性基因Pigm和Pi2的抗谱差异及与Pi1的互作效应.作物学报,2013,39(11):1927-1934)。另1份田间种植成株系,孕穗期利用上述菌株通过注射法进行混合接种,其接种和鉴定方法参见罗楚平(2009)(罗楚平等,水稻稻瘟病接种技术及2009年江苏省区试品种抗性鉴定.江苏农业科

学,2009,6:178-179);成熟期对每个株系进行主要农艺性状调查,包括株高、生育期及其产量构成性状。综合苗瘟和穗瘟抗性鉴定结果,选择抗性水平较扬稻6号显著改良(达到抗的水平)、主要农艺性状与扬稻6号相似(无显著差异)的株系,获得聚合互补抗稻瘟病基因Pigm和Pi-jx的育种材料YD6-Pigm/Pi-jx。

[0076] (13) 广谱、持久抗稻瘟病育种材料YD6-Pigm/Pi-jx抗性验证。利用四川、重庆、湖北、江西、安徽、湖南、广东、海南、福建、江苏等南方稻区收集、分离的120个单胞菌株,在苗期室内、孕穗期注射法对广谱、持久抗稻瘟病育种材料YD6-Pigm/Pi-jx和轮回亲本扬稻6号进行单菌系接种鉴定,结果显示其苗瘟抗性频率高达 $99 \pm 2.08\%$ 、穗瘟抗性频率达 $97 \pm 1.19\%$,而轮回亲本仅为 $12.58 \pm 1.95\%$ 和 $17.67 \pm 3.49\%$;在湖北恩施、江西井冈山、福建上杭和安徽金寨等稻瘟病重发区针对YD6-Pigm/Pi-jx和扬稻6号开展自然诱发鉴定,其抗性评价标准采用国际水稻所(2002) (IRRI.Standard Evaluation System for Rice (SES).2002, (4ed., pp.15-16). Los Banos. Philippines: International Rice Research Institute (IRRI)) 制定的0-9级分级标准执行,结果显示YD6-Pigm/Pi-jx的穗瘟病级在4个病圃均低于3级,达到抗的水平,而扬稻6号在4个病圃均高于7.5级,表现为感或高感。此外,在2017-2019年期间,每年从收集并保存的稻瘟病菌库中选择湖北、安徽、江苏3省共30个单胞菌株(每省10个),在孕穗期通过注射法对YD6-Pigm/Pi-jx和扬稻6号进行单菌系接种鉴定,结果显示YD6-Pigm/Pi-jx穗瘟抗性频率稳定在90%以上,而扬稻6号均低于30%。结果表明抗稻瘟病育种材料YD6-Pigm/Pi-jx具有广谱、持久的穗瘟抗性,也充分证明了本发明的有效性。

[0001]	序列表	
[0002]	<110> 江苏里下河地区农业科学研究所	
[0003]	扬州播金源农业科技发展有限公司	
[0004]	<120> 一种聚合互补抗稻瘟病基因培育广谱、持久抗性水稻育种材料的方法	
[0005]	<160> 5	
[0006]	<170> SIPOSequenceListing 1.0	
[0007]	<210> 1	
[0008]	<211> 21	
[0009]	<212> DNA	
[0010]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
[0011]	<400> 1	
[0012]	aacttgctgg gagaaggatt g	21
[0013]	<210> 2	
[0014]	<211> 21	
[0015]	<212> DNA	
[0016]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
[0017]	<400> 2	
[0018]	gagttcgtac ttttcaggct t	21
[0019]	<210> 3	
[0020]	<211> 42	
[0021]	<212> DNA	
[0022]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
[0023]	<400> 3	
[0024]	gaaggtgacc aagttcatgc ttccatagca gggaccctac ag	42
[0025]	<210> 4	
[0026]	<211> 43	
[0027]	<212> DNA	
[0028]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
[0029]	<400> 4	
[0030]	gaaggtcgga gtcaacggat tttccatagc agggacccta taa	43
[0031]	<210> 5	
[0032]	<211> 20	
[0033]	<212> DNA	
[0034]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
[0035]	<400> 5	
[0036]	gcagagcaca ccataccac	20

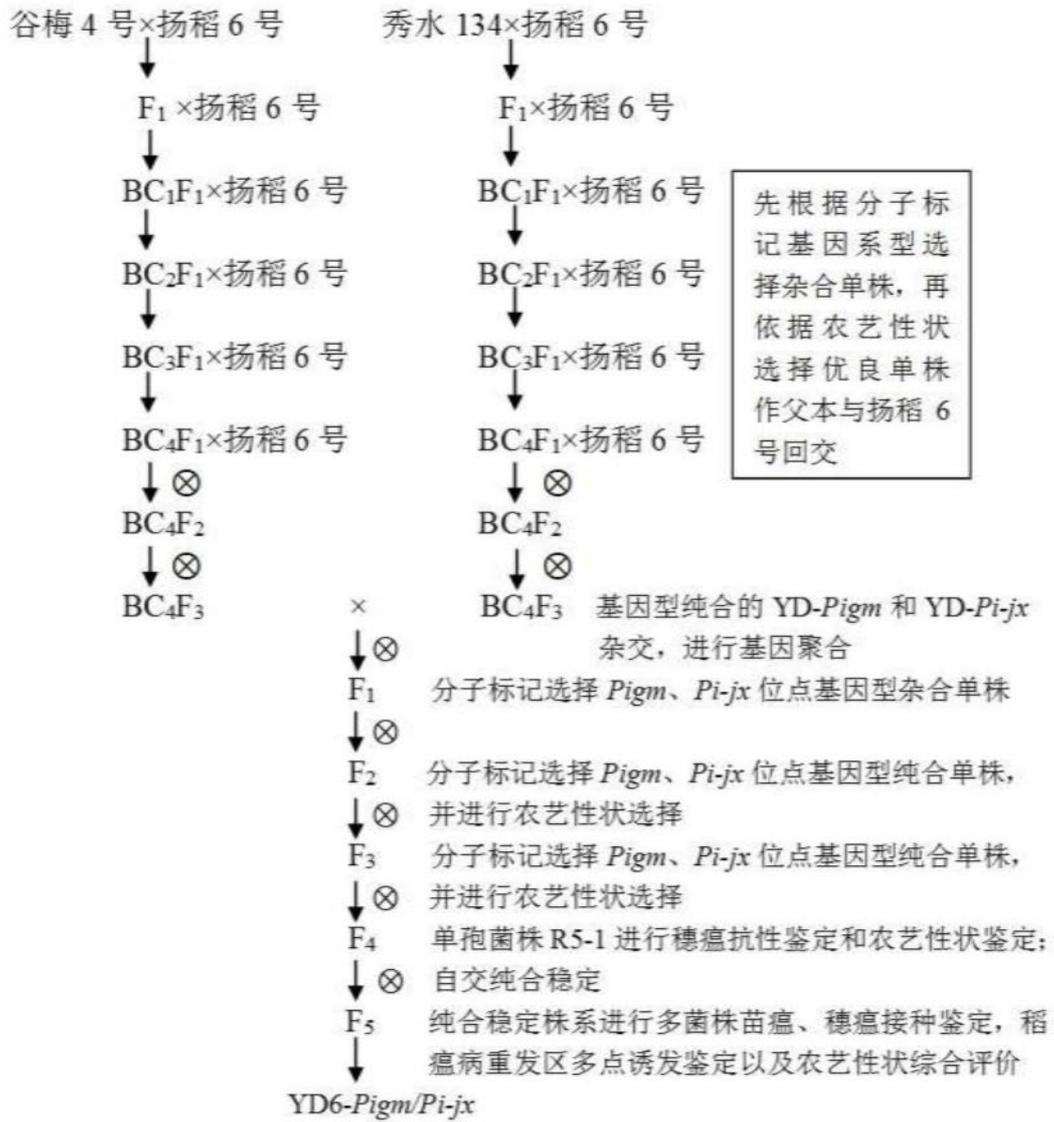


图1

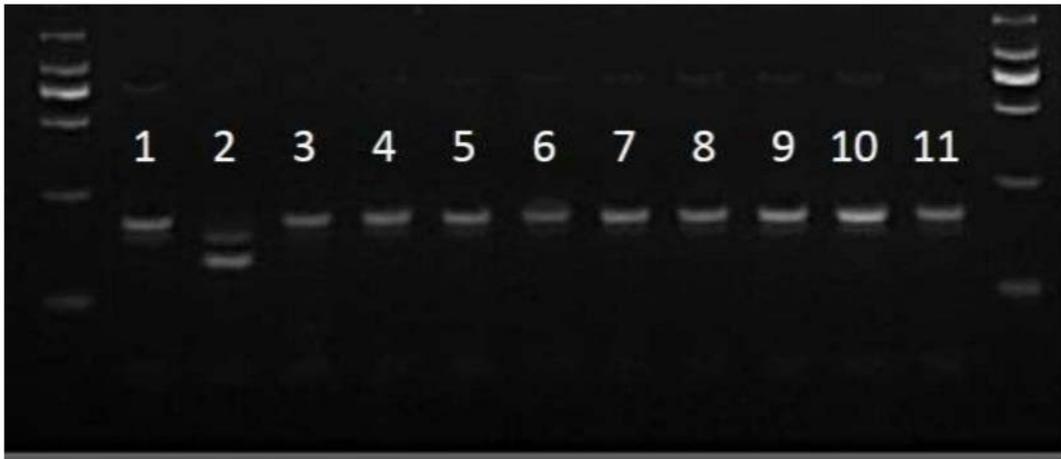


图2

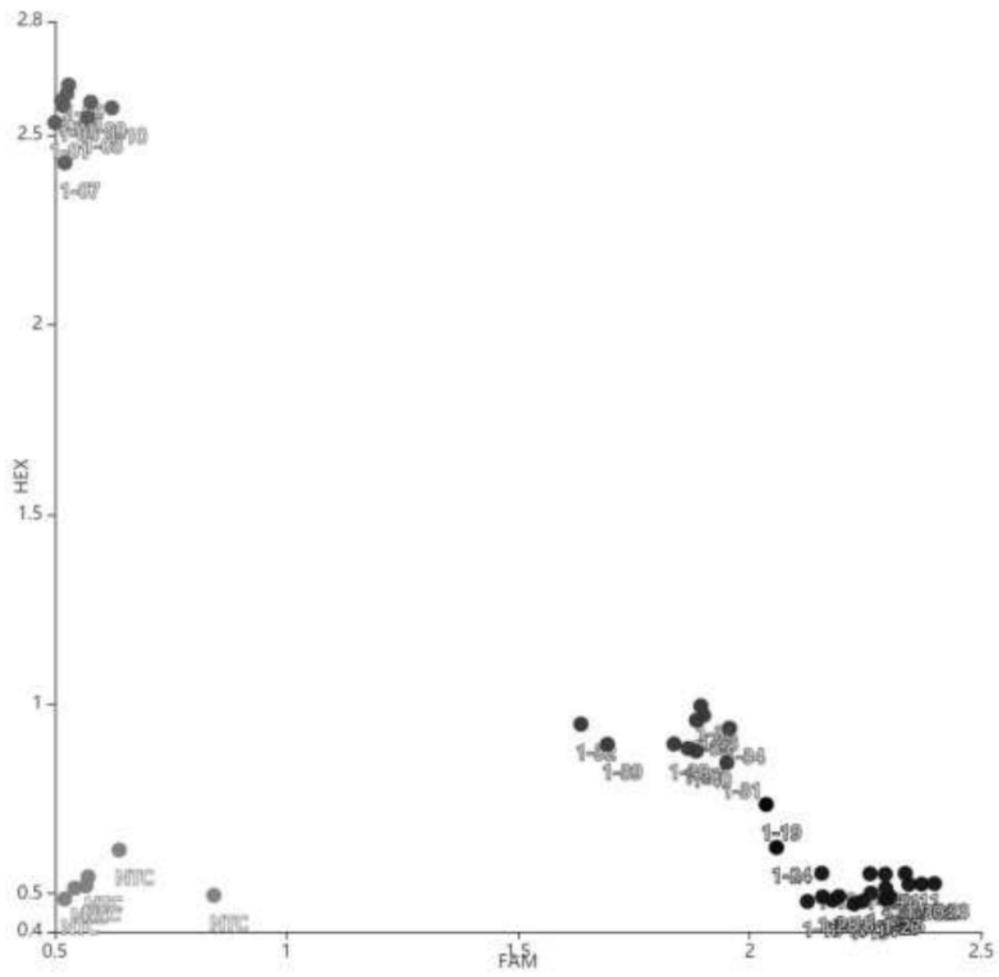


图3