



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109628628 A

(43)申请公布日 2019.04.16

(21)申请号 201811513661.9

(22)申请日 2018.12.11

(71)申请人 华智水稻生物技术有限公司

地址 410125 湖南省长沙市远大二路长沙  
高新技术产业开发区隆平科技园内  
国家杂交水稻研究中心院内

(72)发明人 彭佩 石彦龙 江南 李为国  
肖金华

(74)专利代理机构 北京市中联创和知识产权代  
理有限公司 11364

代理人 王铮 康秀敏

(51)Int.Cl.

C12Q 1/6895(2018.01)

C12N 15/11(2006.01)

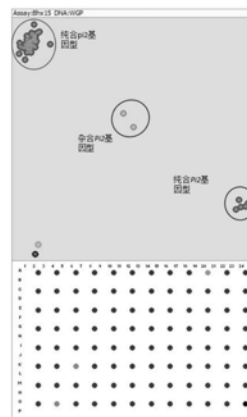
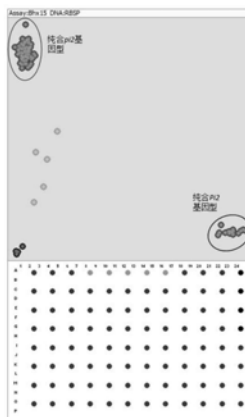
权利要求书1页 说明书7页  
序列表1页 附图1页

(54)发明名称

水稻抗稻瘟病基因Pi2的SNP标记的开发和应用

(57)摘要

本发明提供了一种与广谱抗稻瘟病基因Pi2紧密连锁的SNP分子标记K\_060502,该SNP标记检测水稻第6号染色体第10432612位点处碱基为G或T,基于KASP技术开发的该SNP标记的引物组合为Primer X、Primer Y和Primer C。本发明利用KASP技术对与广谱抗稻瘟病基因Pi2紧密连锁的SNP标记进行基因快速分型,可以高、中、低通量的应用在商业化分子育种中;同时开发SNP标记表型的选择效率达到100%,可在籼稻、粳稻等不同种质资源中快速、精准的检测广谱抗稻瘟基因Pi2;并且在检测过程中不需要酶切、电泳及测序等繁琐的程序,减少了气溶胶的污染以及溴化乙锭EB(ethidium bromide)等有毒物的使用,可在育种早期进行前景的分子标记辅助选择,减小育种群体的大田种植规模,降低育种成本,加快育种进程。



1. 一种与抗稻瘟病基因Pi2紧密连锁的SNP分子标记,其特征在于,所述分子标记是与抗稻瘟病基因Pi2共分离的SNP标记K\_060502,该SNP标记检测水稻第6号染色体第10432612位点处碱基为G或T。

2. 一种用于检测权利要求1所述分子标记的引物组合包括:

(1) 两条特异性引物:Primer X:5'-GAGCTTCAGCAAGCCATC-3';Primer Y:5'-TGAGCTTCAGCAAGCCATA-3';

(2) 一条通用引物:Primer C:5'-GATATTGTTTCTCTGCCATGC-3'。

3. 权利要求1所述分子标记在检测抗稻瘟病基因Pi2中的应用。

4. 权利要求1所述分子标记在抗稻瘟病基因Pi2辅助育种中的应用。

5. 权利要求1所述分子标记在选育抗稻瘟病的水稻资源中的应用。

6. 根据权利要求6所述的选育抗稻瘟病的水稻资源中的应用,其特征在于,所述应用为利用KASP进行Pi2分型或是将Pi2锚定在基因芯片中。

7. 根据权利要求3所述的应用,其特征在于,包括如下步骤:

S1、提取水稻样品基因组DNA;

S2、以水稻基因组DNA为模板,利用权利要求2所述引物组合进行KASP反应检测;其中,两条特异性引物分别连接不同的荧光序列;

S3、若只检测到引物Primer X所连荧光序列对应的荧光信号,则检测位点为碱基G,判断水稻样品为携带抗稻瘟病基因Pi2的纯和型;若只检测到引物Primer Y所连荧光序列对应的荧光信号,则检测位点为碱基T,判断水稻样品为不含抗稻瘟病基因Pi2的纯和型;若同时检测到两种荧光,则判断水稻样品为抗稻瘟病基因Pi2的杂合型。

8. 根据权利要求7所述的应用,其特征在于,引物Primer X、Primer Y的5'段连接FAM或HEX荧光接头序列。

9. 权利要求4所述分子标记在水稻抗病性辅助育种中的应用,其特征在于,包括如下步骤:

S1、提取水稻样品基因组DNA;

S2、以水稻基因组DNA为模板,利用权利要求2所述引物组合进行KASP反应检测;其中,两条特异性引物分别连接不同的荧光序列;

S3、选择检测到引物Primer X所连荧光序列对应的荧光信号的水稻样品进行育种。

10. 一种检测抗稻瘟病基因Pi2的SNP分子标记的试剂盒,所述试剂盒包括如权利要求2所述的引物组合。

## 水稻抗稻瘟病基因Pi2的SNP标记的开发和应用

### 技术领域

[0001] 本发明涉及分子标记及作物育种领域,具体的,涉及一种水稻抗稻瘟病基因Pi2的SNP标记的开发和应用。

### 背景技术

[0002] 水稻是中国乃至世界上最重要的粮食作物之一,世界上有一半以上的人口以稻米为主食。稻瘟病被称为水稻的癌症,是对水稻生产危害最严重的病害之一。中国大面积推广的杂交稻,由于缺少远源优质抗病资源的导入,亲本遗传多样性不高,抗病改良是一大瓶颈;在水稻主要种植国家,经常有稻瘟病流行和爆发的报道,每年可造成20-100%的产量损失。

[0003] 实践证明,选育抗病品种是解决上述问题最为经济、安全、环保、高效的方法。但由于稻瘟菌生理小种致病性变异频繁、群体结构复杂,导致单一抗性品种在种植3~5年后即丧失抗性,因此利用广谱抗病基因培育持久、广谱抗病品种是应对稻瘟病危害的重要途径。

[0004] 至今,水稻中有25个已克隆的稻瘟病抗性基因,其中大多数抗谱很窄。而来自哥伦比亚籼稻品种5173的Pi2,是一个显性广谱抗稻瘟病基因。Chen等以来源于中国中部和南部稻区的792个生理小种接种携带Pi2基因的水稻近等基因系C101A51,发现C101A51对超过92%的生理小种表现抗性;Liu等研究表明,C101A51对来自13个国家的43个稻瘟菌生理小种中的36个表现抗性;刘士平用不同地区来源的75个稻瘟菌菌株接种发现,Pi2抗谱高达85.53%。因此,Pi2在水稻抗稻瘟病育种中具有重要应用价值,自2006年克隆以来,得到了广泛应用。

[0005] 与传统育种方法相比,分子标记辅助选择提高了选择的可靠性,加快了育种进度,且不受环境和人员经验影响,近年来越来越多的应用到育种实践中。但Pi2所在的基因簇内,至少存在10个抗病基因(Piz,Piz-t,Pi2,Pi2,Pi9,Pi25,Pi26,Pi40,Pi50,Pi2-2),它们在序列上高度相似,核苷酸水平上的序列一致性达95.6%;在氨基酸水平上,Pi2与Pi9序列一致性高达96%,Pi2与Piz-t只有8个氨基酸的差异。因此,需要开发一种稳定、可靠、分辨率高的分子标记。

[0006] 目前已开发的分子标记,一般都需要进行琼脂糖凝胶电泳(邓国富等,CN 105462971 B;张明永等,CN106636358 A),甚至需要更复杂的聚丙烯酰胺凝胶电泳(陈庆全等,CN 102312000 A;陈松彪等,CN 104073487 B;纪剑辉等,CN 104450932 B;圣中华等,CN 106636395 A),有的还需要酶切后进行聚丙烯酰胺凝胶电泳(华丽霞等,CN 103320437 B),操作繁琐,费时耗物,不便于规模化鉴定;金名捺等(CN 107435068A)通过高分辨率熔解曲线分析(High Resolution Melting Curve Analysis,HRM)的方法检测SNP(Single Nucleotide Polymorphism)位点,虽然避免了电泳或酶切过程,但随着扩增产物片段增大,检测的准确性和稳定性会逐渐降低。因此,需要开发的标记除了稳定可靠、分辨率高,还要操作简便、高效快速、可直接对碱基进行检测。

## 发明内容

[0007] 本发明公开了一种稻瘟病抗性基因Pi2的分子标记和应用,所述分子标记是与广谱抗稻瘟病基因Pi2连锁的SNP标记。该标记基于KASP技术开发,能精确的将Pi2与其它紧密连锁或等位的抗稻瘟病基因进行区分,具有操作简便、成本低廉、检测周期短、标记稳定性好等优点,且能在低世代群体中准确检测Pi2,提高育种效率,缩短育种年限,对水稻稻瘟病抗性育种具有重要意义。

[0008] 具体的,本发明所述的一种稻瘟病广谱抗性基因Pi2的分子标记的开发流程见图1。根据文献资料将水稻Pi2基因定位于水稻6号染色体的10387509-10390465区间,对此基因区间及其附近两侧的SNP位点进行挖掘。挑选出的SNP位点,提取其侧翼序列,并利用在线引物设计网站BatchPrimer3对其进行引物设计。利用候选SNP标记,对含有Pi2基因的供体材料C101A51和其它不含Pi2基因的22个水稻品种进行KASP反应验证,挑选出与Pi2供体材料共分离及扩增效果好的的SNP标记K\_060502。利用K\_060502标记对190份材料进行检测,证实本发明所检测的Pi2基因位点为高特异性的抗性位点。利用标记K\_060502对Pi2供体亲本C101A51和黄华占杂交产生的F2遗传分离群体进行检测,结合抗性鉴定数据,再次验证了本发明的可行性和准确性。

[0009] 为了解决现有技术中存在的问题,本发明的目的是提供与稻瘟病抗性基因Pi2紧密连锁的SNP (single nucleotide polymorphism) 分子标记K\_060502及其应用。

[0010] 为了实现本发明目的,本发明的技术方案如下:

[0011] 一种与抗稻瘟病基因Pi2紧密连锁的SNP分子标记,所述分子标记是与抗稻瘟病基因Pi2共分离的SNP标记K\_060502,该SNP标记检测水稻第6号染色体第10432612位点处碱基为G或T;

[0012] 一种用于检测权利要求1所述分子标记的引物组合包括:(1) 两条特异性引物:Primer X:5'-GAGCTTCAGCAAGCCATC-3';Primer Y:5'-TGAGCTTCAGCAAGCCATA-3';(2) 一条通用引物:Primer C:5'-GATATTGTTTCTCTGCCATGC-3',具体见表1。

[0013] 表1标记序列表

[0014]

标记名称	Allele X	Allele Y	Position	Primer Seq Allele X	Primer Seq Allele Y	Primer Seq Common
K_060502	G	T	chr6.10432612	GAGCTTCAGCAAGCCATC	TGAGCTTCAGCAAGCCATA	GATATTGTTTCTCTGCCATGC

[0015] 一种检测抗稻瘟病基因Pi2的SNP分子标记的试剂盒,所述试剂盒包括上述的引物组合。

[0016] 所述分子标记、所述的引物组合或所述试剂盒在检测抗稻瘟病基因Pi2、在抗稻瘟病基因Pi2辅助育种以及在选育抗稻瘟病的水稻资源中的应用。

[0017] 进一步的,所述应用包括利用KASP进行Pi2分型或是将Pi2锚定在基因芯片中。

[0018] 更进一步的,包括如下步骤:

[0019] S1、提取水稻样品基因组DNA;

[0020] S2、以水稻基因组DNA为模板,利用上述引物组合进行KASP反应检测;其中,两条特异性引物分别连接不同的荧光序列;

[0021] S3、若只检测到引物Primer X所连荧光序列对应的荧光信号,则检测位点为碱基G,判断水稻样品为携带抗稻瘟病基因Pi2的纯和型;若只检测到引物Primer Y所连荧光序列对应的荧光信号,则检测位点为碱基T,判断水稻样品为不含抗稻瘟病基因Pi2的纯和型;

若同时检测到两种荧光,则判断水稻样品为抗稻瘟病基因Pi2的杂合型。

[0022] 进一步的,特异性引物5' 段连接FAM或HEX荧光接头序列。

[0023] 再进一步的,所述分子标记在水稻抗病性辅助育种中的应用,包括如下步骤:

[0024] S1、提取水稻样品基因组DNA;

[0025] S2、以水稻基因组DNA为模板,利用上述引物组合进行KASP反应检测;其中,两条特异性引物分别连接不同的荧光序列;

[0026] S3、选择检测到引物Primer X所连荧光序列对应的荧光信号的水稻样品进行育种。

[0027] 本发明的有益效果:

[0028] (1) 本发明开发的SNP标记与Pi2基因紧密连锁,经过分离群体稻瘟病表型鉴定后,验证开发的SNP标记表型选择效率达到100%,可在籼稻、粳稻等不同种质资源中快速、精准的检测广谱抗稻瘟基因Pi2。

[0029] (2) 本发明开发的SNP标记结合KASP基因分型技术,可以高、中、低通量的应用在商业化分子育种中,且在检测过程中不需要酶切、电泳及测序等繁琐的程序,减少了气溶胶的污染以及EB等有毒物的使用,直接对碱基进行检测,准确性不受扩增片段长度影响,而且简便、快速、精确,自动化程度高,大大提高了基因选育效率,降低了成本。

[0030] (3) 本发明所述的SNP标记可在苗期即可进行前景选择和背景选择,减小育种群体的大田种植规模,缩短育种年限,加快育种进程。

## 附图说明

[0031] 图1为本发抗稻瘟病基因Pi2分子标记的开发流程图。

[0032] 图2为利用分子标记K\_060502检测自然群体分型图。

## 具体实施方式

[0033] 下面将参考附图并结合实施例来详细说明本发明。实施例中所使用的实验方法如无特殊说明,均为常规方法;所用的材料、试剂等,如无特殊说明,均可从商业途径得到。

[0034] 在本发明使用的术语是仅仅出于描述特定实施例的目的,而非旨在限制本发明。在本发明和所附权利要求书中所使用的单数形式的“一种”、“所述”和“该”也旨在包括多数形式,除非上下文清楚地表示其他含义。还应当理解,本文中使用的术语“和/或”是指并包含一个或多个相关联的列出项目的任何或所有可能组合。

[0035] 实施例1抗稻瘟病基因Pi2分子标记的制备

[0036] 1、引物设计

[0037] Pi2基因位于水稻6号染色体的10387509-10390465区间,以基因区间为中心向两侧各延伸50kb,根据国际水稻所3000份水稻重测序数据进行SNP位点提取,挑选出的SNP位点,提取侧翼序列,并利用在线引物设计网站BatchPrimer ([http://probes.pw.usda.gov/batch\\_primer3/](http://probes.pw.usda.gov/batch_primer3/)) 对其进行引物设计。该SNP标记有三条引物,见表1,在其中两条特异性引物5' 端分别连接FAM和HEX荧光序列。引物委托Invitrogen公司合成。

[0038] 如果样品PCR产物只检测到引物Primer X对应荧光信号,则检测位点为碱基G,判定测试的水稻样品含纯合的Pi2基因;若只检测到引物Primer Y对应荧光信号,则检测位点

为碱基T,判定测试的水稻样品不含有纯合的pi2基因;若同时检测到两种荧光信号则检测位点为G:T,判断待测水稻含有杂合的Pi2基因。

[0039] 2、DNA提取:从水稻叶片中提取基因组DNA,采用简化CTAB法。

[0040] 3、KASP反应测试

[0041] KASP反应测试在LGC SNPline基因分型平台上进行。在微孔反应板中加入20ng DNA样品,烘干后加入KASP反应混合液,反应体系见表2。PCR扩增在水浴热循环仪中完成,Touchdown PCR反应条件为:94℃预变性15分钟;第一步扩增反应,94℃变性20秒,65℃~57℃退火并延伸60秒,10个循环,每个循环退火及延伸的温度降低0.8℃;第二步扩增反应,94℃变性20秒,57℃退火并延伸60秒,26个循环。反应完成后利用扫描仪Pherastar对KASP反应产物进行荧光数据读取,荧光扫描的结果会自动转化成图形。本发明中使用的LGC SNPline基因分型平台与其配套试剂耗材均购于英国LGC公司。

[0042] 表2 KASP检测的反应体系

[0043]

	终浓度	体积(μL)
100UM Primer C	0.42μM	0.0125
100UM Primer X	0.17μM	0.0050
100UM Primer Y	0.17μM	0.0050
2x KASP Master Mix	1x	1.4792
超纯水		1.4983
总体积		3

[0044] 4、标记分型数据

[0045] 利用标记K\_060502对Pi2基因供体材料C101A51与其它22个水稻品种进行KASP初筛反应验证,结果如表3。Pi2基因供体材料C101A51在K\_060502测试位点检测结果为碱基G,20份不含Pi2基因水稻品种在测试位点检测出碱基T,Pi50的供体材料二八占也检测出碱基G,可能是Pi50为Pi2的等位基因,基因序列同源性高,在检测位点序列一致。

[0046] 表3标记K\_060502初筛分型数据

[0047]

材料名称	材料说明	检测结果
C101A51	Pi2供体	G
75-1-127	Pi9供体	T
二八占	Pi50供体	G
Fukunishiki	Pi-z供体	T
谷梅4号	Pigm供体	T
福锦	Pi-z+Pi-sh供体	T
Asominori	感病材料	T
Cpslo17	感病材料	T
湘早粳13号	感病材料	T
原丰早	感病材料	T
丽江新团黑谷	感病材料	T

C039	感病材料	T
湘矮早7号	感病材料	T
Kasalath	感病材料	T
密阳46	感病材料	T
明恢63	感病材料	T
II-23B	感病材料	T
中9B	感病材料	T
Y58S	感病材料	T
黄华占	感病材料	T
金23B	感病材料	T
日本晴	感病材料	T

[0048] 实施例2抗稻瘟病基因Pi2分子标记的群体及标记表型验证

[0049] 1、自然群体验证

[0050] 为检测本发明所述SNP标记的实用性,利用187份材料对SNP标记K\_060502进行自然群体验证。187份材料中包括已知含纯合Pi2基因的品种、含有其他稻瘟病抗性基因的供体、普感材料、常见杂交稻和核心水稻育种材料。标记在自然群体分型结果如图2所示,21份材料检测为具有稻瘟病抗性的纯合Pi2基因型,2份杂交稻中检测出杂合Pi2基因型,6份材料无扩增信号,其余含有其他抗稻瘟病基因供体、普感材料、常见杂交稻和核心水稻育种材料均检测为无稻瘟病抗性纯合Pi2基因型。

[0051] 可见,Pi2基因已在水稻育种中应用,标记K\_060502可便捷高效检测水稻品种中是否含有Pi2基因。

[0052] 2、标记表型验证

[0053] 利用标记K\_060502对Pi2基因供体C101A51和感病亲本黄华占构建的F2:3家系进行检测。同时,在水稻苗期,对20个F2:3家系及2个亲本接种Pi2基因非亲和稻瘟病菌株CHL1743,调查病情,表型与基因型对应一致,再次验证了本发明的可行性和准确性(见表4)。

[0054] 表4遗传分离群体表型与基因型鉴定

[0055]

编号	材料名称	基因型	表型
16CA 0884-59	黄华占/C101A51 F3	R	R
16CA 0884-35	黄华占/C101A51 F3	R	R
16CA 0884-6	黄华占/C101A51 F3	R	R
16CA 0884-8	黄华占/C101A51 F3	R	R
16CA 0884-11	黄华占/C101A51 F3	R	R
16CA 0884-17	黄华占/C101A51 F3	R	R
16CA 0884-20	黄华占/C101A51 F3	S	R
16CA 0884-23	黄华占/C101A51 F3	R	R
16CA 0884-25	黄华占/C101A51 F3	R	R
16CA 0884-27	黄华占/C101A51 F3	R	R
16CA 0884-29	黄华占/C101A51 F3	R	R
16CA 0884-31	黄华占/C101A51 F3	S	S
16CA 0884-34	黄华占/C101A51 F3	S	S

[0056]

16CA 0884-47	黄华占/C101A51 F3	S	S
16CA 0884-51	黄华占/C101A51 F3	S	S
16CA 0884-54	黄华占/C101A51 F3	S	S
16CA 0884-58	黄华占/C101A51 F3	S	S
16CA 0884-60	黄华占/C101A51 F3	S	S
16CA 0884-64	黄华占/C101A51 F3	S	S
16CA 0884-67	黄华占/C101A51 F3	S	S
KF00001404	黄华占	S	S
KF00003401	C101A51	R	R

[0057] 虽然,上文中已经用一般性说明及具体实施方案对本发明作了详尽的描述,但以上所述仅为本发明的较佳实施例而已,并不用以限制本发明,凡在本发明的精神和原则之内,所作的任何修改、等同替换、改进等,均应包含在本发明的保护范围之内。



## 序列表

	<110> 华智水稻生物技术有限公司	
	<120> 水稻抗稻瘟病基因 Pi2 的 SNP 标记的开发和应用	
	<160> 3	
	<170> PatentIn version 3.3	
	<210> 1	
	<211> 18	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<400> 1	
	gagcttcagc aagccatc	18
[0058]	<210> 2	
	<211> 19	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<400> 2	
	tgagcttcag caagccata	19
	<210> 3	
	<211> 21	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<400> 3	
	gatattgttt ctctgccatg c	21

## 序列表

<110> 华智水稻生物技术有限公司

<120> 水稻抗稻瘟病基因Pi2的SNP标记的开发和应用

<160> 3

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 18

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 1

gagcttcagc aagccatc 18

<210> 2

<211> 19

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 2

tgagcttcag caagccata 19

<210> 3

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 3

gatattgttt ctctgcatg c 21

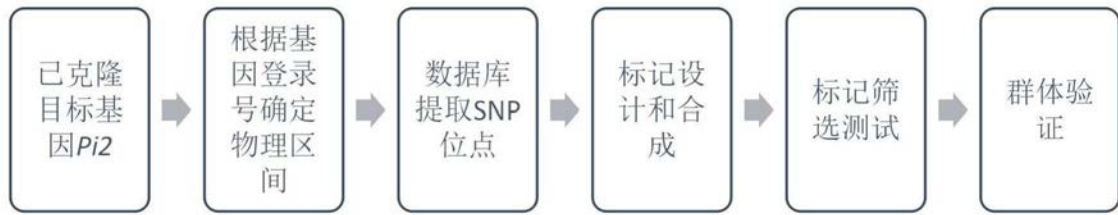


图1

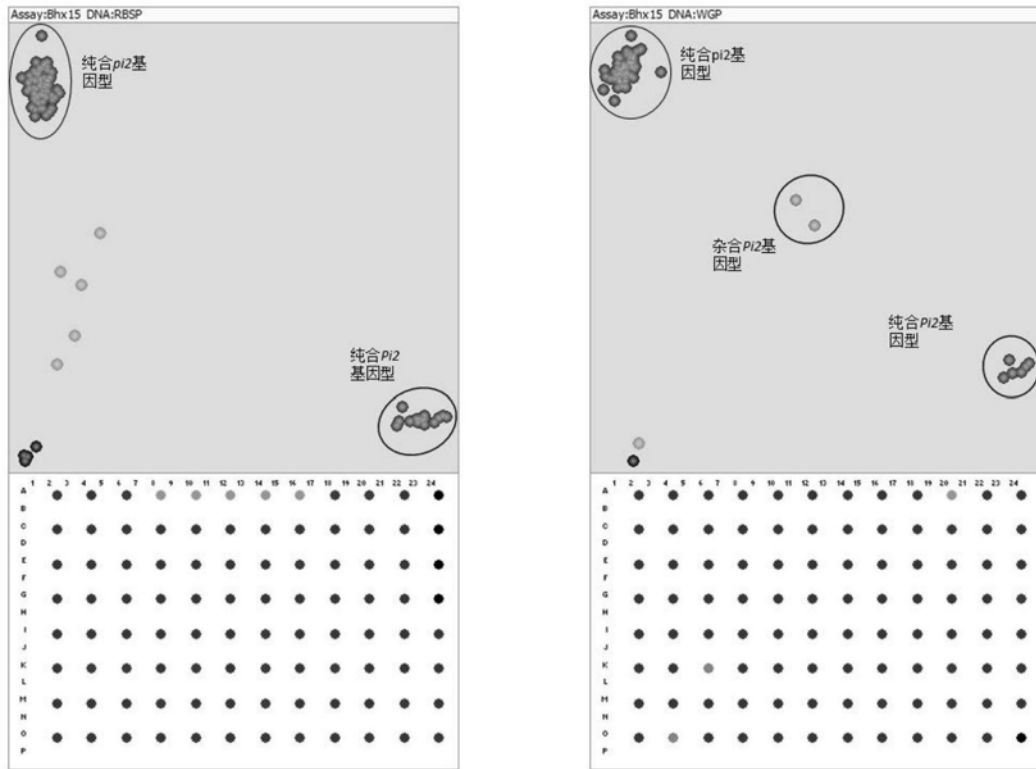


图2