



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 107435068 A

(43)申请公布日 2017.12.05

(21)申请号 201710610688.9

(22)申请日 2017.07.25

(71)申请人 深圳市作物分子设计育种研究院
地址 518107 广东省深圳市光明新区凤新路新健兴科技工业园A6栋2楼西
申请人 深圳兴旺生物种业有限公司

(72)发明人 金名捺 丘式浚

(51)Int.Cl.

C12Q 1/68(2006.01)

C12N 15/11(2006.01)

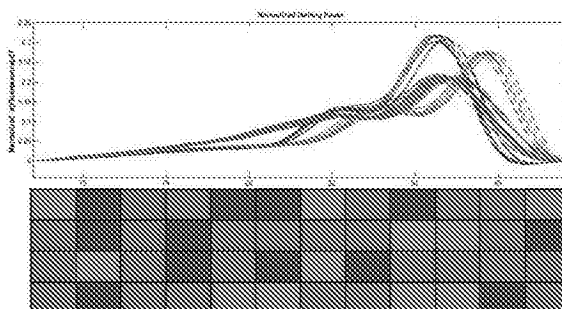
权利要求书1页 说明书9页
序列表2页 附图4页

(54)发明名称

抗稻瘟病Pi2基因特异性分子标记的开发与应用

(57)摘要

本发明涉及一种抗稻瘟病Pi2基因特异性分子标记的开发和应用,属于农业生物技术领域,具体涉及一种水稻抗稻瘟病基因Pi2的特异分子标记的高分辨率熔解曲线分析(High-Resolution Melting Curve Analysis,HRM)稻瘟病抗性基因Pi2的特异性分子标记引物,以及利用所述引物检测稻瘟病抗性基因Pi2的分子标记方法。本发明对原有标记进行扩增片段的缩小以及检测体系的优化,大大提高该基因在分子标记辅助选择育种、基因聚合育种,以及转基因育种中利用的效率。



1. 一种 *Pi2* 基因的检测引物, 其特征在于所述引物的正向引物是 5' - GCAGCCATTGAGAAGCTCTC -3', 反向引物是 5' - CCCCAAGTATCAGCATGGTT -3'。

2. 一种水稻抗稻瘟病基因 *Pi2* 的 HRM 检测方法, 其特征在于所述 HRM 检测体系包含一对检测引物, 所述检测引物的正向引物是 5' - GCAGCCATTGAGAAGCTCTC -3', 反向引物是 5' - CCCCAAGTATCAGCATGGTT -3'。

3. 根据权利要求 2 所述的 HRM 检测方法, 其特征在于所述方法包括以下步骤:

a) 提取待测样本 DNA;

b) 配制包含待测样品 DNA、检测引物、PCR 试剂盒和 EvaGreen 荧光染料的 PCR 反应体系进行 PCR 扩增; 和

c) 对 PCR 产物进行 HRM 分析扫描。

4. 根据权利要求 3 所述的 HRM 检测方法, 其中所述的提取待测样品 DNA 的方法是: 取样, 直接加提取液研磨, 沸水浴 10min 后, 静置分层取上清即为待测样品 DNA, 其中所述的提取液包含 10mM Tris-HCl、0.5mM EDTA 和 0.15M KCl。

5. 根据权利要求 3 所述的 HRM 检测方法, 其中所述的 PCR 反应体系包含 1 μ L PCR 模板, 0.5U rTaq DNA 聚合酶, 1 \times PCR 缓冲液, 250 μ M dNTP, 0.1 μ M 正向和反向引物和 0.1 μ L 20 \times EvaGreen 荧光染料。

6. 根据权利要求 3 所述的 HRM 检测方法, 其中所述的 PCR 扩增条件是: 94 $^{\circ}$ C 3 分钟; 94 $^{\circ}$ C 30 秒、58 $^{\circ}$ C 30 秒、72 $^{\circ}$ C 10 秒, 40 个循环; 72 $^{\circ}$ C 1 分钟; 紧接着 95 $^{\circ}$ C 变性 1 分钟; 25 $^{\circ}$ C 复性 1 分钟。

7. 一种基于 HRM 技术的水稻抗稻瘟病基因 *Pi2* 的检测试剂盒, 其特征在于所述检测试剂盒中包含一对检测引物, 所述检测引物的正向引物是 5' - GCAGCCATTGAGAAGCTCTC -3', 反向引物是 5' - CCCCAAGTATCAGCATGGTT -3'。

8. 根据权利要求 7 所述的检测试剂盒, 其中所述的试剂盒还包含 PCR 试剂和荧光染料。

9. 权利要求 7-8 之任一所述的检测试剂盒的使用方法, 其特征在于所述使用方法包括如下步骤:

a) 提取待测样本 DNA;

b) 配制包含待测样本 DNA、引物对、PCR 试剂盒和 EvaGreen 荧光染料的 PCR 反应体系进行 PCR 扩增; 和

c) 对 PCR 产物进行 HRM 分析扫描。

10. 权利要求 1 之所述的引物、权利要求 2-6 之任一所述的 HRM 检测方法、权利要求 7-9 之任一所述的试剂盒在检测水稻抗稻瘟病基因 *Pi2* 中的应用。

抗稻瘟病Pi2基因特异性分子标记的开发与应用

技术领域

[0001] 本发明属于农业生物技术领域,具体涉及一种稻瘟病抗性基因Pi2的特异分子标记的高分辨率熔解曲线分析(High-Resolution Melting Curve Analysis,HRM),以及利用所述引物检测稻瘟病抗性基因Pi2的方法。

背景技术

[0002] 水稻是世界上最重要的粮食作物之一,约有一半的世界人口以稻米为主食。由于囊菌(Magnapothe oryzae)引起的稻瘟病是广泛发生在世界各稻区影响水稻生产的重要病害之一,每年都会对水稻生产造成巨大损失。从环境保护和农业可持续发展来看,选育和种植抗病品种是防治稻瘟病最安全有效的方法。传统的水稻抗病育种严重依赖于抗性鉴定和植株表型的选择,受到育种者经验和病菌发病条件的限制,很容易造成抗病基因的丢失,选择效率往往较低。分子标记辅助选择通过与基因紧密连锁的分子标记的基因型来对目的基因进行选择,因为它不受环境因素的影响,选择基因可靠性极高。近年来,水稻抗稻瘟病基因的克隆取得了重要进展,稻瘟病抗性基因的分子标记的开发对于培育抗稻瘟病水稻品种具有重要意义。

[0003] 到目前为止,在水稻第6染色体短臂端的Pi2/9基因簇内至少有9个稻瘟病抗性基因(Pi2,Piz,Piz-t,Pi40,Pigm,Pi9,Pi26,Pi50,Pi2-2)已经被定位,这些基因都被认为在稻瘟病抗性育种方面具有重要的应用价值(Jiang et al.,2012),其中Pi9、Pi2、Piz-t以及Pigm已经被成功克隆(Qu et al.2006,Zhou et al.2006,Deng et al.2016)。Pi2基因源自哥伦比亚籼稻品种5173,是目前已克隆的一个重要稻瘟病显性广谱抗性基因(Liu et al.,2002),刘士平等(2003)利用收集到的不同地区来源的75个稻瘟病菌株进行接种,发现Pi2的抗谱可高达85.53%。携带Pi2的亲本C101A51对来自于13个国家的43个稻瘟病菌株中的36个表现抗性(Liu et al.,2002)。

[0004] Pi2编码一个NBS-LRR类蛋白,含有2个内含子,长度分别是3839bp和116bp,Pi2的cDNA全长为3332bp,包含117bp 5'UTR和116bp 3'UTR。Pi2蛋白包含1032个氨基酸,含有1个核苷酸结合位点(NBS)和3个富亮氨酸重复区(LRR)。Pi2所在的基因组区域存在9个抗性基因特征的候选基因,它们在序列上高度同源,核苷酸水平上的序列一致性达到95.6%;在氨基酸水平上,Pi2与Pi9的序列一致性高达96%,Pi2与Piz-t的编码产物仅在3个LRRs区域有8个氨基酸的差异;而在这8突变氨基酸中,仅有1个位于xxLxLxx基序中(Zhou et al.,2006)。

[0005] 高分辨率熔解曲线分析(High Resolution Melting,HRM)是近些年发展起来的一种单核苷酸多态性(Single Nucleotide Polymorphism,SNP)以及突变研究技术,是由犹他大学和爱德华科技公司合作开发的。它通过实时监测升温过程中双链DNA荧光染料与PCR扩增产物的结合情况,来判断是否存在SNP,而且不同SNP位点、是否是杂合子等都会影响熔解曲线的峰形,因此HRM分析能够有效区分不同SNP位点与不同基因型。这种检测方法不受突变碱基位点与类型的局限,在PCR结束后直接运行高分辨率熔解,即可完成对样品基因型的

分析。该检测方法因其操作简便、快速,成本低,无需设计探针,结果准确,并且实现了真正的闭管操作而受到普遍的关注。在植物育种上,HRM因为其操作与后期数据分析简单易懂,在突变扫描、基因分型、基于特定基因的种质资源鉴定以及功能标记开发等方面具有广阔的应用前景(罗文龙等,2011)。

[0006] 研究发现,Pi2与该位点处的Piz-t和Pi9是复等位基因,根据Pi2、Pi9和Piz-t的全基因组序列,通过序列分析寻找3个复等位基因存在差异的SNP位点,将其开发为基于HRM技术检测的基因特异性分子标记,并建立中高通量的辅助选择体系,能够进一步提高Pi2在水稻抗性育种中的选育效率。在我们以前的研究201410817042.4中,开发了一个检测Pi2的基因特异性分子标记,该标记引物扩增的PCR产物长度为495bp,但在实际的检测工作中,我们发现该引物的检测结果不是很稳定。有研究报道,扩增产物在200bp以内的HRM分型的效果最佳,大于200bp时,扩增产物发生错配的几率会增高(Liew et al.,2004),也就是随着扩增产物片段的增大,HRM检测的准确性和稳定性会逐渐降低。因此,为了增加Pi2基因的HRM检测的准确性和稳定性,我们很有必要在原有标记的基础上进行扩增片段的缩小以及检测体系的优化。

发明内容

[0007] 稻瘟病抗性基因Pi2与Pi9、Piz-t同为Piz位点上的复等位基因,它们都已经被成功克隆(<http://www.ricedata.cn/gene/list/87.htm>,国家水稻数据中心),其编码区序列可从NCBI的DNA序列数据库Genbank中下载得到,收录号分别为DQ352453、DQ285630、DQ352040。通过多序列比对软件DNAMAN对这些序列进行分析,发现6个抗稻瘟病基因Pi2的特异性SNP位点(如图1),他们分别位于Pi2的第787位、第788位、第789位和第792位密码子(GCA GGA ATC TCA GAT GGT,见图1中红色框内的序列,加粗表示Pi2基因特异性SNP),这些差异位点可以明显的将抗性基因Pi2与感性基因及复等位基因Pi9、Piz-t区分开来。

[0008] 为了开发出更加稳定的检测抗稻瘟病基因Pi2的HRM引物,我们用201410817042.4中的引物Pi2-HRM对12份待测水稻材料的基因组DNA(如表1)进行扩增,通过对这些扩增产物的测序结果进行比对后,在6个抗稻瘟病基因Pi2的特异性SNP位点两边的保守区域重新设计引物,图2红色框内的序列为Pi2的特异性序列,我们总共开发了1条左引物和6条右引物,引物序列如下:

[0009] Pi2-HRM2-1F:5'-GCAGCCATTGAGAAGCTCTC-3'(SEQ ID NO:1);

[0010] Pi2-HRM2-1R:5'-AGGGGAGGAGGAGATGAAAT-3'(SEQ ID NO:2);

[0011] Pi2-HRM2-2R:5'-GCTGCTCAATCCAGTTAGGC-3'(SEQ ID NO:3);

[0012] Pi2-HRM2-3R:5'-CCCCAAGTATCAGCATGGTT-3'(SEQ ID NO:4);

[0013] Pi2-HRM2-4R:5'-AGCTTCTCCCCAAGGTAAGC-3'(SEQ ID NO:5);

[0014] Pi2-HRM2-5R:5'-TGTTCTAAGATTTGGAATGCTC-3'(SEQ ID NO:6);

[0015] Pi2-HRM2-6R:5'-TCTTTTCCAACAGGGGTGAG-3'(SEQ ID NO:7);

[0016] 通过左引物分别与6条右引物配对对12份待测水稻材料的基因组DNA进行扩增和HRM检测,发现只有Pi2-HRM2-1F和Pi2-HRM2-3R引物对能很好地对12份待测水稻材料进行区分,即HRM的分型结果与扩增产物的测序结果完全一致(如图3和图4)。

[0017] 本发明提供一种利用分子标记快速、准确地鉴定和检测抗稻瘟病基因Pi2的方法,

同时提供一对结合HRM用于检测抗稻瘟病基因Pi2的分子标记引物,所述引物根据Pi2基因序列的特异性SNP设计,可以结合HRM用于抗稻瘟病基因Pi2的分子辅助选择育种,以提高分子标记辅助选择的效率以及抗病品种的鉴定和选育的效率。

[0018] 本发明提供如下解决方案:

[0019] 一对结合HRM用于鉴定和检测抗稻瘟病基因Pi2的分子标记引物,其上、下游序列分为:

[0020] Pi2-HRM2-1F:5'-GCAGCCATTGAGAAGCTCTC-3'(SEQ ID NO:1);

[0021] Pi2-HRM2-3R:5'-CCCCAAGTATCAGCATGGTT-3'(SEQ ID NO:4);

[0022] 上述引物是根据Pi2基因序列的特异性SNP设计的,其基因特异性SNP分别位于Pi2基因编码区的第787位、第788位、第789位和第792位密码子(GCA GGA ATC TCA GAT GGT,加粗表示Pi2基因特异性SNP)。

[0023] 上述引物的扩增产物的核苷酸序列如下(抗稻瘟病基因Pi2特异性SNP突出显示):

[0024] 5'-gcagccattgagaagctctctcttccctccaatctctccatgtggatgctgcAGGaAtctcagatGGtggaacacttgagtgcctagattctatttcatctcctcctccccactgaggacactcgtgttgatggaattcttggagatgcctaactggattgagcagctcactcactgaagaagatctacttattgaggagcaactaaaggaaggtaaaacctgctgatacttgggg-3'(SEQ ID NO:8)

[0025] 一种结合HRM鉴定和检测水稻抗稻瘟病基因Pi2的方法:利用上述引物扩增12份待测水稻材料的基因组DNA(如表1),取扩增产物用HRM仪器Light Scanner 96进行高分辨率熔解曲线采集分析,发现12个水稻品种的扩增产物被分成了6种类型(见图3),其中橙色的曲线是8号水稻材料“华占”和11号水稻材料“BL122”。以前的研究表明,它们都含有稻瘟病抗性基因Pi2。“华占”(已公开,申请公告号:CNA004577E),是以引自马来西亚的SC02-S6为基础材料,经过反复测交与系统选育而成的恢复系,本发明的阳性对照材料“华占”为广东省农业科学院朱小源研究员馈赠。接着,我们对这12份水稻材料的扩增产物进行测序发现,它们在序列上也被分为6种类型,且与HRM分型的分类结果完全一致(见图4),这些结果说明,用引物Pi2-HRM2扩增待测水稻材料DNA结合HRM的方法可以进行稻瘟病抗性基因Pi2的鉴定与检测。若待测材料的高分辨率熔解曲线与阳性对照——水稻抗稻瘟病品种“华占”的熔解曲线完全一致(如图3),则待测水稻抗稻瘟病材料含有抗稻瘟病基因Pi2;否则,待测材料中不含有抗稻瘟病基因Pi2。

[0026] 同时,我们对另外23个广泛使用的不育系和保持材料进行Pi2基因鉴定,发现它们都不含有该基因,其中橙色曲线为阳性对照材料“华占”(见图5)。因此,可以通过分子标记辅助选择的手段,用Pi2-HRM2引物结合HRM的方法,将Pi2基因跟踪导入到这些不育系和保持系中,从而提高以这些不育系和保持系为亲本的杂交稻组合对稻瘟病的抗性,为优质、多抗和高产的高效育种奠定基础。

[0027] 一种抗稻瘟病水稻材料分子标记辅助选择方法:以含有抗稻瘟病基因Pi2的水稻材料(本专利的供体亲本是华占)为亲本,与其他不含Pi2基因的水稻材料(本专利的受体亲本有五丰B、PA64S、黄华占、武运粳7号)进行杂交,分别提取各自杂交回交BC₁F₂分离后代的基因组DNA,以引物Pi2-HRM2对它们进行PCR扩增。每个群体的扩增产物的高分辨率熔解曲线都很好的分为了三种类型:与阳性对照“华占”的熔解曲线(橙色曲线)相一致的表示后代个体中含有Pi2基因;与阴性对照的熔解曲线(依次为五丰B——红色曲线、PA64S——绿色

曲线、黄华占——蓝色曲线、武运粳7号——青色曲线)相一致的表示后代个体中不含有Pi2基因;每个群体中含有杂合型Pi2的不同水稻材料个体,其高分辨率熔解曲线均为灰色(如图6、图7、图8、图9)。五丰B、PA64S、黄华占、武运粳7号分别代表了四种不含Pi2基因的单倍型,通过对它们的后代基因型分离进行分析发现,它们都满足1:2:1,结合前面对水稻材料中是否含有Pi2的鉴定结果,说明分子标记Pi2-HRM2的HRM检测可以用于目前在三系保持系、两系不育系、常规籼稻以及常规粳稻的Pi2基因的遗传改良过程。

[0028] 上述引物Pi2-HRM2可以优先对水稻苗期所提取的DNA进行分子标记鉴定,检测后代个体中是否携带“纯合型/杂合型”抗稻瘟病基因Pi2,从而将不含有抗稻瘟病基因Pi2的个体剔除,结合全基因组的背景扫描分析,可以更快的得到导入抗稻瘟病基因Pi2同时供体亲本背景导入最少的个体,从而提高水稻材料改良的效率。鉴于HRM检测对PCR要求较低,可以通过简单破碎“一管法”快速制备PCR模板,提高分子标记的检测效率。简单破碎“一管法”抽提水稻材料的总DNA优选过程如下:取2-4cm叶片,直接加提取液(10mM Tris-HCl、0.5mM EDTA、0.15M KCl)研磨,沸水浴10min后,静置分层取上清(1 μ L)即可用作DNA模板进行PCR扩增。

[0029] 本发明还提供了一种基于HRM技术的水稻Pi2基因检测的PCR试剂盒,它包含引物Pi2-HRM2-1F:5'-GCAGCCATTGAGAAGCTCTC-3'(SEQ ID NO:1)和Pi2-HRM2-3R:5'-CCCCAAGTATCAGCATGGTT-3'(SEQ ID NO:4);以及PCR试剂和荧光染料,用于检测水稻材料中是否含有Pi2基因。

[0030] 本发明还提供了一种试剂盒的使用方法,它的步骤如下:提取待测样本DNA;配制包含待测样本DNA、引物对、PCR试剂盒和EvaGreen荧光染料的PCR反应体系进行PCR扩增和对PCR产物进行HRM分析扫描。

[0031] 本发明相对于现有技术具有如下的优点及效果:

[0032] (1) 本发明提供的分子标记几乎不出现假阳性:传统的PCR扩增结合限制性内切酶的检测方法以电泳条带的“有无”来判读,往往假阳性较高。酶切之前,如果PCR产物不进行纯化则容易导致限制性内切酶活性降低而无法切开而造成假阳性;如果PCR产物进行纯化则容易导致回收扩增片段的量极低甚至消失,影响酶切后电泳结果的判读而造成假阳性。本发明提供的分子标记在检测上极具简便性和灵敏性,PCR产物直接进行高分辨率熔解曲线采集,达到“零损失”,其检测结果几乎不出现假阳性;

[0033] (2) 本发明提供的分子标记在实际应用中具有低成本、高通量的特点:目前,高分辨率熔解曲线分析方法是仅次于DNA芯片的中高通量SNP检测方法,10min内即可一次性采集96个PCR产物样品的高分辨率熔解,明显比传统的酶切电泳检测方法要简便快捷;并且该分子标记的PCR体系仅需10 μ l,是普通PCR体系的一半,因此即使需要0.04元/体系的饱和和荧光染料,其成本也并不高于普通PCR,特别适用于大规模分子辅助选择育种的生产实践中;

[0034] (3) 本发明提供的分子标记能够显著地减少PCR模板制备的人力成本和时间成本:在实际应用中,传统的普通PCR结合限制性内切酶的SNP检测方法对PCR模板纯度的要求很高,往往需要使用CTAB等费时费力的提取方法。本发明的分子标记对PCR模板要求不高,通过简单破碎“一管法”得到的提取液即可作为PCR模板,大大提高了分子检测的简便性。

[0035] (4) 该方法检测的是Indel或SNP类的变异,这类变异在个体中频率非常高,因此可以更容易找到适合作为跟踪基因分子标记,大大提高分子标记辅助选择育种的效率。

[0036] 因此,本发明所提供结合HRM用于检测抗稻瘟病基因Pi2的分子标记引物,以及利用所述引物检测抗稻瘟病基因Pi2的分子标记方法在生产实践中具有广阔的应用前景,利用此标记可以提高该基因在分子标记辅助选择育种中的利用效率。

附图说明

[0037] 图1、多序列比对软件DNAMAN分析抗性基因Pi2与复等位基因Piz-t、Pi9的基因序列一致性(红色框内代表抗性基因Pi2的特异性序列)。

[0038] 图2、多序列比对软件BioEdit分析12份待检测水稻材料中抗性基因Pi2的基因特异性位点两侧的保守性(红色框内代表抗性基因Pi2的特异性序列)。

[0039] 图3、引物Pi2-HRM2检测12个水稻品种的高分辨率熔解曲线(红色曲线代表1号“珍汕97B”和3号“常S”含有的Pi2基因的高分辨率熔解曲线,灰色曲线代表2号“天丰B”和4号“莱丰S”含有的Pi2基因的高分辨率熔解曲线,蓝色曲线代表5号“五丰B”、10号“谷梅四号”和12号“黄华占”含有的Pi2基因的高分辨率熔解曲线,绿色曲线代表6号“PA64S”和7号“P88S”含有的Pi2基因的高分辨率熔解曲线,橙色曲线代表8号“华占”和11号“BL122”含有的Pi2基因的高分辨率熔解曲线,青色曲线代表9号“武运粳7号”含有的Pi2基因的高分辨率熔解曲线,图上部代表熔解曲线,方格代表对应样品Pi2基因的检测情况)。

[0040] 图4、多序列比对软件BioEdit分析12份待检测水稻材料扩增产物的基因序列。

[0041] 图5、引物Pi2-HRM2检测23个水稻不育系和保持系材料的高分辨率熔解曲线(橙色曲线代表阳性对照材料“华占”的Pi2基因的高分辨率熔解曲线,灰色曲线和红色曲线均代表其它23个待测水稻材料中Pi2基因的高分辨率熔解曲线,图上部代表标准化的熔解曲线,方格代表对应样品Pi2基因的检测情况)。

[0042] 图6、引物Pi2-HRM2检测“五丰B”回交“华占”BC₁F₂分离群体的高分辨率熔解曲线(橙色曲线代表阳性对照“华占”和杂交F₂代分离群体中含有Pi2基因的个体的高分辨率熔解曲线,红色曲线代表阴性对照“五丰B”和杂交F₂代分离群体中不含有Pi2基因的个体的高分辨率熔解曲线,灰色曲线代表杂交F₂代分离群体中含有杂合型Pi2基因的个体的高分辨率熔解曲线,图上部代表标准化的熔解曲线,方格代表对应样品Pi2基因的检测情况)。

[0043] 图7、引物Pi2-HRM2检测“PA64S”回交“华占”BC₁F₂分离群体的高分辨率熔解曲线(橙色曲线代表阳性对照“华占”和杂交F₂代分离群体中含有Pi2基因的个体的高分辨率熔解曲线,绿色曲线代表阴性对照“PA64S”和杂交F₂代分离群体中不含有Pi2基因的个体的高分辨率熔解曲线,灰色曲线代表杂交F₂代分离群体中含有杂合型Pi2基因的个体的高分辨率熔解曲线,图上部代表标准化的熔解曲线,方格代表对应样品Pi2基因的检测情况)。

[0044] 图8、引物Pi2-HRM2检测“黄华占”回交“华占”BC₁F₂分离群体的高分辨率熔解曲线(橙色曲线代表阳性对照“华占”和杂交F₂代分离群体中含有Pi2基因的个体的高分辨率熔解曲线,蓝色曲线代表阴性对照“黄华占”和杂交F₂代分离群体中不含有Pi2基因的个体的高分辨率熔解曲线,灰色曲线代表杂交F₂代分离群体中含有杂合型Pi2基因的个体的高分辨率熔解曲线,图上部代表标准化的熔解曲线,方格代表对应样品Pi2基因的检测情况)。

[0045] 图9、引物Pi2-HRM2检测“武运粳7号”回交“华占”BC₁F₂分离群体的高分辨率熔解曲线(橙色曲线代表阳性对照“华占”和杂交F₂代分离群体中含有Pi2基因的个体的高分辨率熔解曲线,青色曲线代表阴性对照“武运粳7号”和杂交F₂代分离群体中不含有Pi2基因的个

体的高分辨率熔解曲线,灰色曲线代表杂交F₂代分离群体中含有杂合型Pi2基因的个体的高分辨率熔解曲线,图上部代表标准化的熔解曲线,方格代表对应样品Pi2基因的检测情况)。

[0046] 图10、引物Pi2-HRM检测“PA64S”回交“华占”BC₁F₂分离群体的高分辨率熔解曲线(橙色曲线代表阳性对照“华占”和杂交F₂代分离群体中含有Pi2基因的个体的高分辨率熔解曲线,绿色曲线代表PA64S和杂交F₂代分离群体中不含Pi2基因的个体的高分辨率熔解曲线)。

具体实施方式

[0047] 下面结合实施例及附图对本发明做进一步详细的描述,但本发明的实施方式不限于此。所用方法如无特别说明,均为常用分子生物学、组织培养技术和农学手册所记载的方法。具体步骤可参见:《Molecular Cloning:A Laboratory Manual(3rd edition)》(Sambrook,J.,Russell,David W.,2001,Cold Spring Harbor),《Plant Propagation by Tissue Culture》(Edwin F.George,Michael A.Hall,Geert-Jan De Klerk,2008, Springer)。

[0048] 实施例1:Pi2等位基因编码区序列的比对及特异性SNP分析

[0049] 稻瘟病抗性基因Pi2与Pi9、Piz-t同为Piz位点上的复等位基因,它们都已经被成功克隆(<http://www.ricedata.cn/gene/list/87.htm>,国家水稻数据中心),其编码区序列可从NCBI的DNA序列数据库Genbank中下载得到,收录号分别为DQ352453、DQ285630、DQ352040。通过多序列比对软件DNAMAN对这些序列进行分析,发现6个抗稻瘟病基因Pi2的特异性SNP位点(如图1),他们分别位于Pi2的第787位、第788位、第789位和第792位密码子(GCA GGA ATC TCA GAT GGT,见图1中红色框内的序列,加粗表示Pi2基因特异性SNP),这些差异位点可以明显的将Pi2抗性基因与感性基因及复等位基因Pi9、Piz-t区分开来。

[0050] 在我们以前的研究201410817042.4中,开发了一个检测Pi2的基因特异性分子标记,该标记引物扩增的PCR产物长度为495bp,但在实际的检测工作中,我们发现该引物的检测结果不是很稳定,且不能区分抗性纯合型和杂合型,结果见图10。有研究报道,扩增产物在200bp以内的HRM分型的效果最佳,大于200bp时,扩增产物发生错配的几率会增高(Liew et al.,2004),也就是随着扩增产物片段的增大,HRM检测的准确性和稳定性会逐渐降低。因此,为了增加Pi2基因的HRM检测的准确性和稳定性,我们很有必要在原有标记的基础上进行扩增片段的缩小以及检测体系的优化。

[0051] 实施例2:Pi2功能特异性分子标记引物设计与HRM检测

[0052] (1) 引物设计

[0053] 根据HRM引物的设计原则,在Pi2特异性SNP的上游和下游分别设计引物,我们总共开发了1条左引物和6条右引物,引物序列如下:

[0054] Pi2-HRM2-1F:5'-GCAGCCATTGAGAAGCTCTC-3'(SEQ ID NO:1);

[0055] Pi2-HRM2-1R:5'-AGGGGAGGAGGAGATGAAAT-3'(SEQ ID NO:2);

[0056] Pi2-HRM2-2R:5'-GCTGCTCAATCCAGTTAGGC-3'(SEQ ID NO:3);

[0057] Pi2-HRM2-3R:5'-CCCCAAGTATCAGCATGGTT-3'(SEQ ID NO:4);

[0058] Pi2-HRM2-4R:5'-AGCTTCTCCCCAAGGTAAGC-3'(SEQ ID NO:5);

- [0059] Pi2-HRM2-5R:5'-TGTTCTAAGATTTGGGAATGCTC-3' (SEQ ID NO:6);
- [0060] Pi2-HRM2-6R:5'-TCTTTTCCAACAGGGGTGAG-3' (SEQ ID NO:7);
- [0061] 利用上述6对引物扩增12份待测水稻材料的基因组DNA(如表1),PCR扩增反应体系如下:
- [0062] 10×PCR Buffer (Mg²⁺+plus):2μL
- [0063] dNTPs (2.5mM each):0.4μL
- [0064] Pi2-HRMF (10μM):0.4μL
- [0065] Pi2-HRMR (10μM):0.4μL
- [0066] TakaRa TaqTM (5U/μL):0.2μL
- [0067] DNA模板 (50-100ng/μL):1μL
- [0068] ddH₂O:补足至20μL。
- [0069] PCR温度循环条件如下:94℃3分钟;94℃30秒、58℃30秒、72℃30秒,35个循环;72℃2分钟。
- [0070] 测序结果分析(见图3和图4):6对引物的扩增产物中,只有分子标记引物对Pi2-HRM2-1F和Pi2-HRM2-3R的扩增产物测序结果与HRM分型结果完全一致,该引物对的上游引物在-50bp至-31bp处,下游引物在157bp至176bp处。
- [0071] 表1、用于Pi2基因多态性分析的品种名称

编号	1	2	3	4	5	6
[0072] 品种	珍汕 97B	天丰 B	常 S	莱丰 B	五丰 B	PA64S
编号	7	8	9	10	11	12
品种	P88S	华占	武运粳 7 号	谷梅四号	BL122	黄华占

- [0073] (2) HRM检测
- [0074] 通过Pi2功能特异性分子标记引物Pi2-HRM2对12份待测水稻材料的基因组DNA(如表1)进行扩增,PCR扩增反应体系如下:
- [0075] PCR扩增反应体系如下:
- [0076] 10×PCR Buffer (Mg²⁺+plus):1μL
- [0077] dNTPs (2.5mM each):0.1μL
- [0078] Pi2-HRMF (10μM):0.1μL
- [0079] Pi2-HRMR (10μM):0.1μL
- [0080] 20×EvaGreen:0.1μL
- [0081] TakaRa TaqTM (5U/μL):0.1μL
- [0082] DNA模板 (2-3ng/μL):1μL
- [0083] ddH₂O:补足至10μL。
- [0084] 为了防止体系蒸发,在PCR扩增前需滴加15μL-20μL矿物油覆盖。
- [0085] PCR温度循环条件如下:94℃3分钟;94℃30秒、58℃30秒、72℃10秒,40个循环;72℃1分钟;95℃1分钟;25℃1分钟后转移至4℃冰箱保存。
- [0086] PCR结束后,产物全部转移至白底黑框的96孔PCR板。为了方便后续校正96孔板的孔间温度差异,每个孔加入1μL温度内参(Internal Temperature Controls)并补加15μL-20μL矿物油覆盖后,即可进行高分辨率熔解曲线采集及分析。

[0087] 所述的温度内参碱基序列如下:

[0088] InTemF:5'-

[0089] ATCGTGATTTCTATAGTTATCTAAGTAGTTGGCATTAAATAATTTTCATTTT-3' (SEQ ID NO:9);

[0090] InTemR:5'-

[0091] AAAATGAAATTATTAATGCCAACTACTTAGATAACTATAGAAAATCACGAT-3' (SEQ ID NO:10);

[0092] 上述互补的寡聚核苷酸InTemF和InTemR合成后,10D的量用800 μ LddH₂O熔解,然后反应体系如下:

[0093] 饱和NaCl:1 μ L

[0094] InTemF:1 μ L

[0095] InTemR:1 μ L

[0096] ddH₂O:补足至10 μ L。

[0097] 在95 $^{\circ}$ C条件下变性3分钟后,自然冷却至室温复性,即可作为温度内参。

[0098] HRM分型结果分析(见图3):取扩增产物用HRM仪器Light Scanner 96进行高分辨率熔解曲线采集分析,发现12个水稻品种的扩增产物能被很好的分成6种类型(见图3),其中橙色的曲线是8号水稻材料“华占”和11号水稻材料“BL122”。以前的研究表明,它们都含有稻瘟病抗性基因Pi2。“华占”(已公开,申请公告号:CNA004577E),是以引自马来西亚的SC02-S6为基础材料,经过反复测交与系统选育而成的恢复系,本发明的阳性对照材料“华占”为广东省农业科学院朱小源研究员馈赠。12份待检测水稻材料的测序结果与HRM分型的分类结果完全一致(见图3和图4),说明用引物Pi2-HRM2扩增待测水稻材料DNA结合HRM的方法可以进行稻瘟病抗性基因Pi2的鉴定与检测。若待测材料的高分辨率熔解曲线与阳性对照——水稻抗稻瘟病品种“华占”的熔解曲线完全一致(如图3),则待测水稻抗稻瘟病材料含有抗稻瘟病基因Pi2;否则,待测材料中不含有抗稻瘟病基因Pi2。因此,水稻恢复系“华占”可作为纯合型抗稻瘟病Pi2基因的供体品种,而“华占”杂交后代材料可作为杂合型抗稻瘟病Pi2基因的阳性对照材料。

[0099] 实施例3:Pi2功能特异性分子标记在辅助育种中的应用分析

[0100] 对生产上广泛使用的不育系和保持材料进行Pi2基因鉴定,发现它们都不含有该基因,其中蓝色曲线为阳性对照材料“华占”(见图5),结合图3和图4的结果,可以通过分子标记辅助选择的手段,用Pi2-HRM2引物结合HRM检测的方法,将Pi2基因跟踪导入到不含有该基因的优质常规稻、不育系和保持系材料中,从而提高待改良优质常规稻以及以这些不育系和保持系为亲本的杂交稻组合对稻瘟病的抗性,为优质、多抗和高产的高效育种奠定基础。

[0101] 以含有抗稻瘟病基因Pi2的水稻材料(本发明的供体亲本是华占)为亲本,与其他不含Pi2基因的水稻材料(本专利的受体亲本有五丰B、PA64S、黄华占、武运粳7号)进行杂交,分别提取各自杂交回交BC₁F₂分离后代的基因组DNA,以引物Pi2-HRM2对它们进行PCR扩增。每个群体的扩增产物的高分辨率熔解曲线都很好的分为了三种类型:与阳性对照“华占”的熔解曲线相一致的表示后代个体中含有Pi2基因;与阴性对照的熔解曲线相一致的表示后代个体中不含有Pi2基因;每个群体中含有杂合型Pi2的不同水稻材料个体,其高分辨率熔解曲线均为灰色(如图6、图7、图8、图9)。而用我们以前的研究201410817042.4中开发的检测Pi2的基因特异性分子标记Pi2-HRM对图7中样品进行检测,发现其并不能很好地区

分抗性纯合型和杂合型,结果见图10。每个群体中含有杂合型Pi2的不同水稻材料个体,其高分辨率熔解曲线相一致。本专利中的四种待改良水稻材料分别代表了四种不含Pi2基因的单倍型,通过对它们的后代基因型分离进行分析发现,它们都满足1:2:1的分离比,结合前面对水稻材料中是否含有Pi2的鉴定结果,说明分子标记Pi2-HRM2的HRM检测可以用于目前在三系保持系、两系不育系、常规籼稻以及常规粳稻的Pi2基因的遗传改良过程。

SEQUENCE LISTING

<110> 深圳市作物分子设计育种研究院

深圳兴旺生物种业有限公司

<120> 抗稻瘟病Pi2基因特异性分子标记的开发与应用

<130>

<160> 10

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工合成

<400> 1

gcagccattg agaagctctc 20

<210> 2

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工合成

<400> 2

aggggaggag gatatgaaat 20

<210> 3

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工合成

<400> 3

gctgctcaat ccagttagc 20

<210> 4

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工合成

<400> 4

ccccaagtat cagcatggtt 20

<210> 5

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工合成

<400> 5

agtttctccc caaggtaagc 20

<210> 6

<211> 23
<212> DNA
<213> 人工合成
<400> 6
tgttctaaga tttgggaatg ctc 23

<210> 7
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工合成
<400> 7
tcttttccaa caggggtgag 20

<210> 8
<211> 241
<212> DNA
<213> *Oryza sativa*
<400> 8
gcagccattg agaagctctc ttcctccaa tctctccatg tggatgctgc aggaatctca 60
gatggtggaa cacttgagtg cctagattct atttcatctc ctctcccct actgaggaca 120
ctcgtgttgg atggaattct tgaggagatg cctaactgga ttgagcaget cactcacctg 180
aagaagatct acttattgag gagcaaacta aaggaaggta aaaccatgct gatacttggg 240
g 241

<210> 9
<211> 50
<212> DNA
<213> 人工合成
<400> 9
atcgtgattt ctatagttat ctaagtagtt ggcattaata atttcatttt 50

<210> 10
<211> 50
<212> DNA
<213> 人工合成
<400> 10
aaaatgaaat tattaatgcc aactacttag ataactatag aatcagat 50

```

P2 ATCTCTCCATGTGCAATGCTGATGCTGAGGATATCTCAGATGG...GCAACACTTGGAGTGCCTAG
P9 ATCTCTCCATGTGCAATGCTGATGCTGAGGATATCTCAGATGG...GCAACACTTGGAGTGCCTAG
P12 ATCTCTCCATGTGCAATGCTGATGCTGAGGATATCTCAGATGG...GCAACACTTGGAGTGCCTAG

```

图1

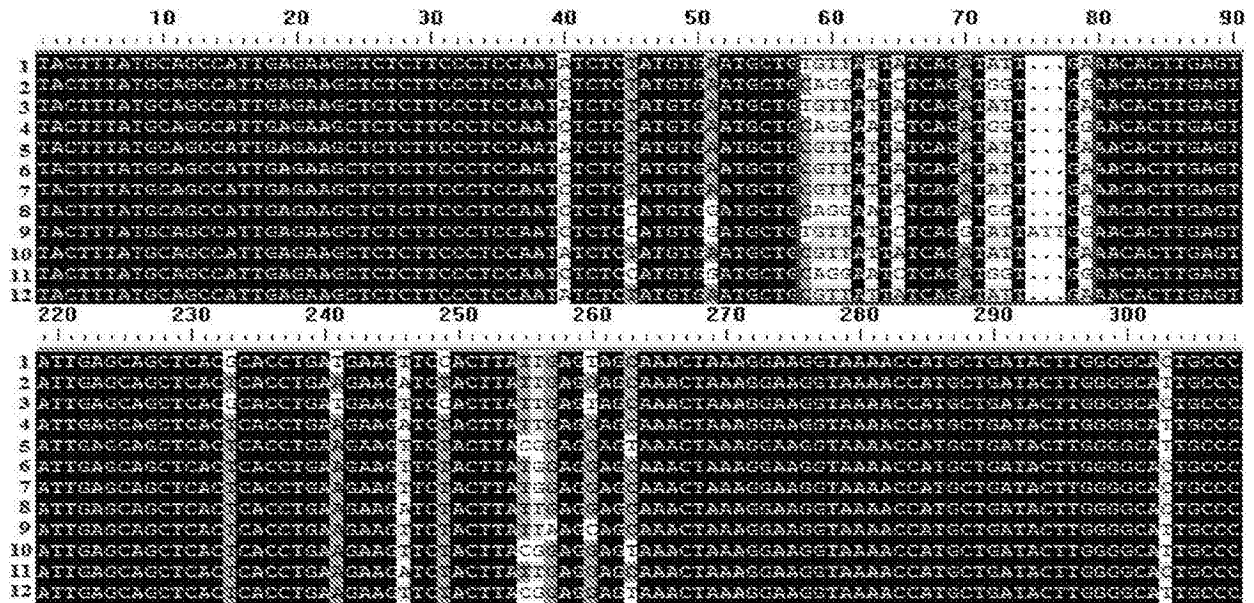


图2

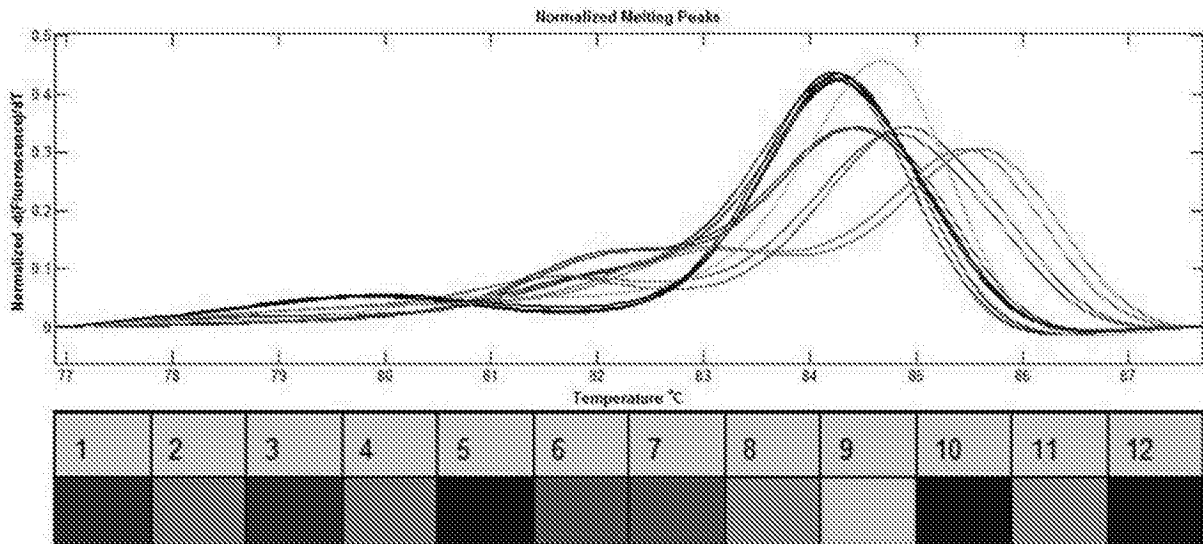


图3

```
1 ATCTC ATGTG ATGCTG GTTGA TCAG TATG CAAACACTTGAAGTGCCTAGATTCTATTTC TCTCCTCCCTCCCTACTAG  
3 ATCTC ATGTG ATGCTG GTTGA TCAG TATG CAAACACTTGAAGTGCCTAGATTCTATTTC TCTCCTCCCTCCCTACTAG  
5 ATCTC ATGTG ATGCTG GTTGA TCAG TATG CAAACACTTGAAGTGCCTAGATTCTATTTC TCTCCTCCCTCCCTACTAG  
10 ATCTC ATGTG ATGCTG GTTGA TCAG TATG CAAACACTTGAAGTGCCTAGATTCTATTTC TCTCCTCCCTCCCTACTAG  
12 ATCTC ATGTG ATGCTG GTTGA TCAG TATG CAAACACTTGAAGTGCCTAGATTCTATTTC TCTCCTCCCTCCCTACTAG  
6 ATCTC ATGTG ATGCTG GTTGA TCAG TATG CAAACACTTGAAGTGCCTAGATTCTATTTC TCTCCTCCCTCCCTACTAG  
7 ATCTC ATGTG ATGCTG GTTGA TCAG TATG CAAACACTTGAAGTGCCTAGATTCTATTTC TCTCCTCCCTCCCTACTAG  
2 ATCTC ATGTG ATGCTG GTTGA TCAG TATG CAAACACTTGAAGTGCCTAGATTCTATTTC TCTCCTCCCTCCCTACTAG  
4 ATCTC ATGTG ATGCTG GTTGA TCAG TATG CAAACACTTGAAGTGCCTAGATTCTATTTC TCTCCTCCCTCCCTACTAG  
8 ATCTC ATGTG ATGCTG GTTGA TCAG TATG CAAACACTTGAAGTGCCTAGATTCTATTTC TCTCCTCCCTCCCTACTAG  
11 ATCTC ATGTG ATGCTG GTTGA TCAG TATG CAAACACTTGAAGTGCCTAGATTCTATTTC TCTCCTCCCTCCCTACTAG  
9 ATCTC ATGTG ATGCTG GTTGA TCAG TATG CAAACACTTGAAGTGCCTAGATTCTATTTC TCTCCTCCCTCCCTACTAG
```

图4

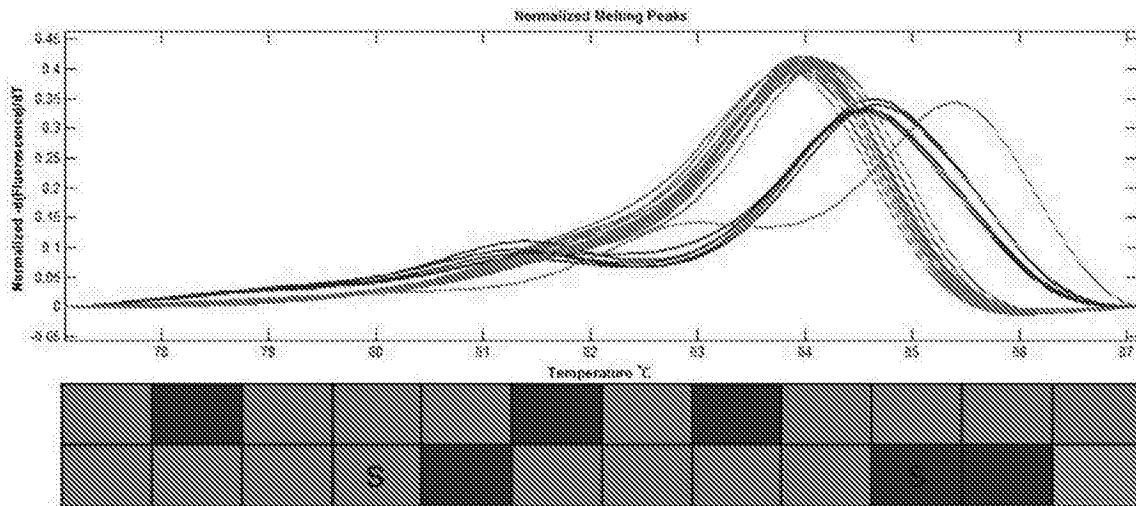


图5

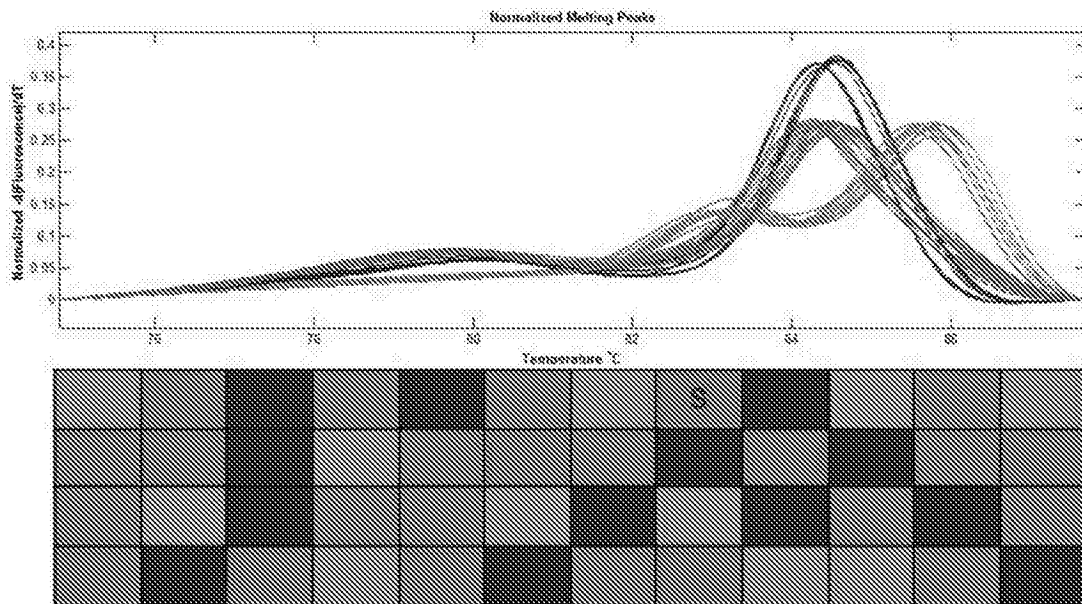


图6

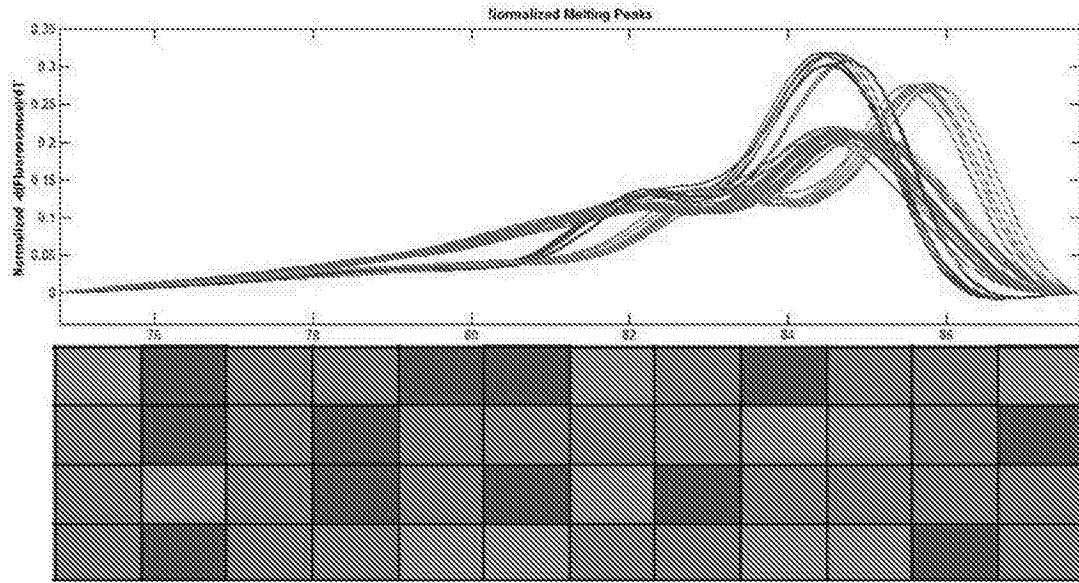


图7

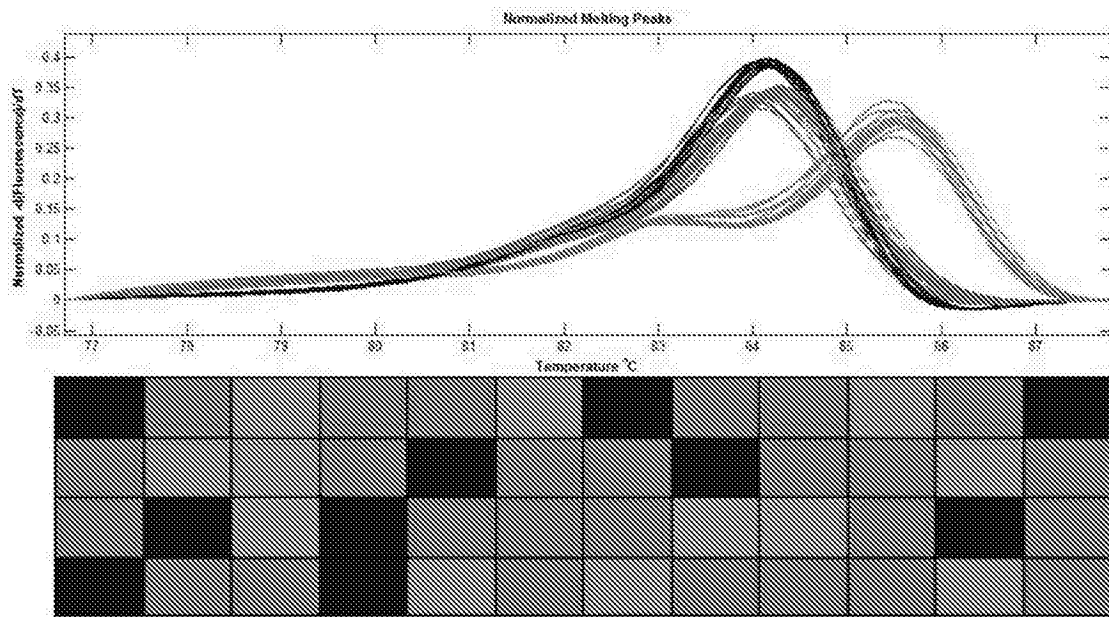


图8

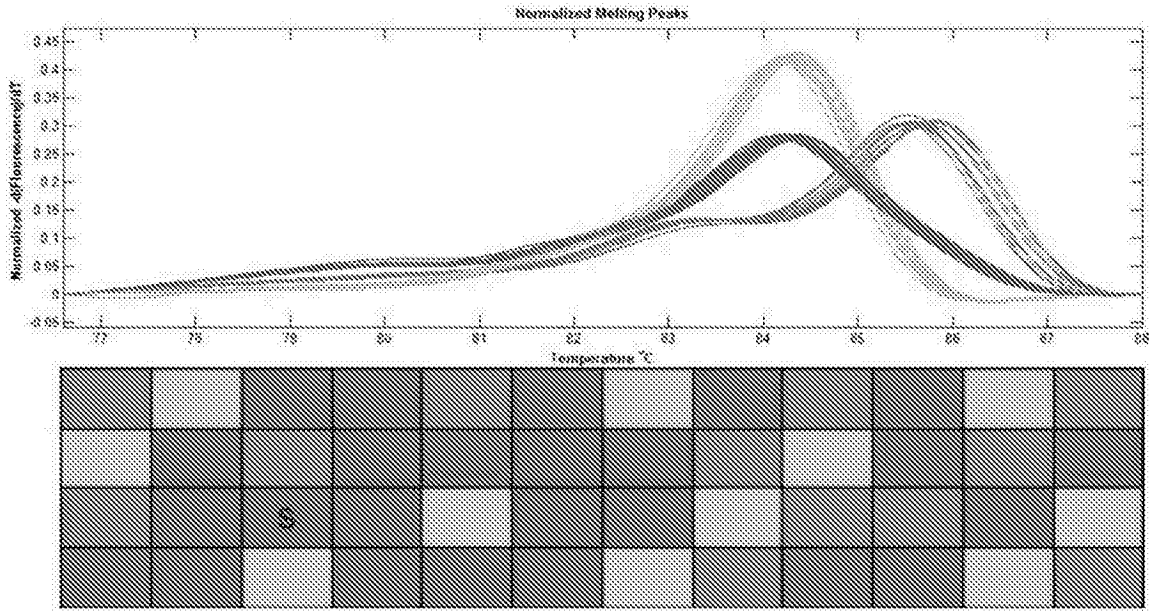


图9

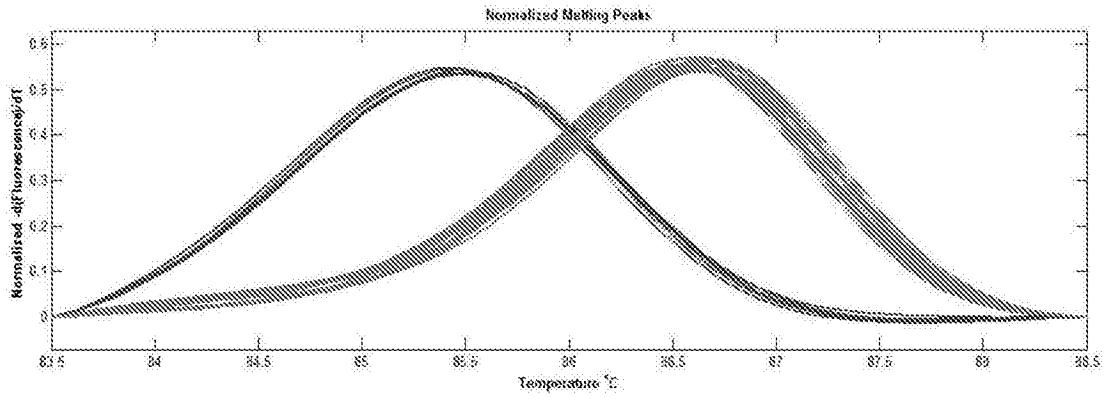


图10