



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 110468229 B

(45)授权公告日 2020.05.08

(21)申请号 201910825603.8

(22)申请日 2019.09.03

(65)同一申请的已公布的文献号  
申请公布号 CN 110468229 A

(43)申请公布日 2019.11.19

(73)专利权人 云南省农业科学院生物技术与种  
质资源研究所

地址 650205 云南省昆明市盘龙区北京路  
2238号

(72)发明人 陈玲 王波 程在全 王玲仙  
肖素勤 张敦宇 陈越 付坚  
余腾琼 钟巧芳 柯学 殷富有  
蒋聪

(74)专利代理机构 云南凌云律师事务所 53207  
代理人 康珉

(51)Int.Cl.

C12Q 1/6895(2018.01)

C12N 15/11(2006.01)

(56)对比文件

CN 101892244 A,2010.11.24,

CN 110066883 A,2019.07.30,

CN 101880669 A,2010.11.10,

CN 108103237 A,2018.06.01,

Kim SM et al..A novel resistance gene  
for bacterial blight in rice, Xa43(t)  
identified by GWAS, confirmed by QTL  
mapping using a bi-parental population.  
《PLoS One》.2019,第14卷(第2期),e0211775.

Suk-Man Kim.Identification of novel  
recessive gene xa44(t) conferring  
resistance to bacterial blight races in  
rice by QTL linkage analysis using an SNP  
chip.《Theoretical and Applied Genetics》  
.2018,第131卷(第12期),2733-2743.

审查员 侯玮婷

权利要求书1页 说明书7页

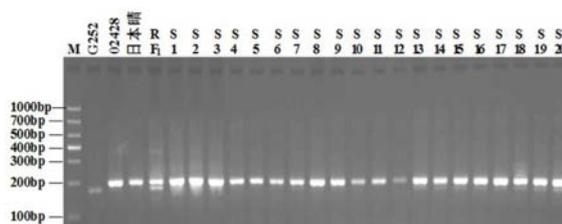
序列表2页 附图1页

(54)发明名称

水稻广谱高抗白叶枯病基因Xa45(t)的共分离分子标记Hxjy-1

(57)摘要

本发明公开一种水稻广谱高抗白叶枯病基因Xa45(t)的共分离分子标记Hxjy-1,其核苷酸序列如SEQ ID NO:1和SEQ ID NO:2所示。该共分离分子标记Hxjy-1能够准确筛选出含广谱高抗白叶枯病基因Xa45(t)的材料,能有效预测水稻植株对白叶枯病的抗性与否,可大大加快抗白叶枯病的水稻材料筛选进度。



1. 一种水稻广谱高抗白叶枯病基因Xa45(t)的共分离分子标记Hxjy-1,其特征在于,所述共分离分子标记Hxjy-1为Hxjy-1-F引物和Hxjy-1-R引物扩增的片段,目标片段长度167bp,所述Hxjy-1-F引物的核苷酸序列如SEQ ID NO:1所示,Hxjy-1-R引物的核苷酸序列如SEQ ID NO:2所示。

2. 根据权利要求1所述的共分离分子标记Hxjy-1,其特征在于,所述共分离分子标记Hxjy-1在水稻染色体上的物理距离为27.978Mb。

3. 权利要求1或2所述的共分离分子标记Hxjy-1在水稻抗白叶枯病分子标记辅助选择育种中的应用。

4. 根据权利要求3所述的应用,其特征在于,所述共分离分子标记Hxjy-1通过Hxjy-1-F引物和Hxjy-1-R引物在目标水稻材料中扩增出167bp的片段,则目标水稻材料含有抗白叶枯病基因Xa45(t)位点。

5. 根据权利要求4所述的应用,其特征在于,所述的扩增采用15 $\mu$ L PCR反应体系:5U/ $\mu$ L Taq酶0.1 $\mu$ L,含Mg<sup>2+</sup>的10 $\times$ PCR Buffer 1.5 $\mu$ L,2.5mmol/L dNTP 1.2 $\mu$ L,10 $\mu$ mol/L上、下游引物各0.4 $\mu$ L,20ng/ $\mu$ L模板DNA 2 $\mu$ L,ddH<sub>2</sub>O 9.4 $\mu$ L;PCR反应条件为:94 $^{\circ}$ C预变性5min;94 $^{\circ}$ C变性30sec,55 $^{\circ}$ C复性30sec,72 $^{\circ}$ C延伸1min,共35个循环;72 $^{\circ}$ C延伸10min;取5 $\mu$ L PCR扩增产物在4%琼脂糖凝胶上5V/cm恒压电泳,然后通过凝胶成像系统成像并保存。

6. 根据权利要求5所述的应用,其特征在于,在15 $\mu$ L PCR反应体系中加入1滴石蜡油。

## 水稻广谱高抗白叶枯病基因Xa45(t)的共分离分子标记Hxjy

-1

### 技术领域

[0001] 本发明属于作物分子遗传学研究技术领域,具体涉及水稻广谱高抗白叶枯病基因Xa45(t)的共分离分子标记Hxjy-1,适用于利用Hxjy-1对基因Xa45(t)进行辅助选择育种。

### 背景技术

[0002] 水稻是世界最重要的粮食作物之一,全球有一半以上的人口以稻米为主食,保障粮食安全是全球面临的重大挑战,然而,病虫害是威胁水稻生产的主要因素,控制各种水稻病虫害是亟待解决的严峻问题。由稻黄单胞杆菌(*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*, Xoo)引起的水稻白叶枯病是一种主要的细菌病害,该病在我国南方以及东南亚稻区经常暴发成灾,是水稻高产、稳产的主要限制因素之一。最经济有效且环保可持续的病害控制方法是培育对白叶枯病具有广泛抗性的水稻品种并加以推广。然而,由于在部分稻区大面积推广携带单一抗病基因的水稻品种,水稻与白叶枯病菌之间存在协同进化的关系,我国以及东南亚部分稻区已相继出现对国内外主推的抗病基因Xa4和Xa21有毒力的菌株,因此,不断鉴定白叶枯病抗性新基因,通过新基因聚合对培育具有广谱持久抗性的水稻品种具有重要意义。

[0003] 目前,将优异种质资源中的遗传变异导入到主栽品种中,结合后代相关性状进行新基因发掘利用,不仅可以培育不同轮回亲本的目标性状渗入系群,且可以有效发掘有利基因,此种策略对于从野生稻中发掘有利基因相对有效。

[0004] 元江普通野生稻(*Yuanjiang Oryza rufipogon* Griff.)是我国迄今发现分布海拔最高(750m)的普通野生稻,因气候生态环境独特,其生境周围均无栽培稻种植,被认为是原始性最好的普通野生稻(史冬燕等.元江普通野生稻叶片cDNA文库的构建及部分基因片段分析.遗传HEREDITAS(Beijing)2008年6月,30(6):776~780)。本申请人课题组培育了以合系35(合系35,我国选育的高产优质粳稻品种)为轮回亲本,元江普通野生稻为供体亲本的BC<sub>2</sub>F<sub>16</sub>渗入系群体,用收集自日本、菲律宾、中国的PX099、T7147、YN18、YN1、GD414、HEN11、ScYc-b、YN7、FuJ、YN24和Y8共11个强致病菌在植株孕穗期进行人工接种,鉴定各渗入系及双亲的白叶枯病抗性。申请人课题组发现株系G252和供体亲本元江普通野生稻高抗上述11个菌株,受体亲本合系35号高感上述11个菌株,表明G252对白叶枯病具有与元江普通野生稻相同的抗性反应。进一步说明G252携带的抗性基因可能来自元江普通野生稻。将G252与感白叶枯病的粳稻02428杂交,构建F<sub>2</sub>定位群体,对F<sub>2</sub>植株接种上述11个菌株。遗传分析发现,F<sub>2</sub>植株对每个菌株的抗病植株数目与感病植株数目符合3:1分离比,表明G252对白叶枯病的抗性由显性基因控制。申请人课题组通过基因定位获得1个对上述11个菌株都具有抗性的广谱高抗基因,暂命名为Xa45(t)。

[0005] 由于Xa45(t)是一个广谱高抗白叶枯病显性基因,该基因在培育抗性新品种具有广阔的应用前景。因此,有必要寻找Xa45(t)的共分离标记,将其锚定在染色体上,有利于通过共分离标记研究基因Xa45(t)在染色体上的功能,同时为克隆和利用基因Xa45(t)培育新

的抗白叶枯病水稻品种具有重要意义。

### 发明内容

[0006] 针对上述研究背景,本发明的目的是提供水稻广谱高抗白叶枯病基因Xa45(t)的共分离分子标记Hxjy-1,可将基因Xa45(t)精确地锚定在染色体上。通过检测与Xa45(t)共分离的分子标记Hxjy-1,可以检测水稻Xa45(t)单基因系后代材料的白叶枯病抗性,不仅操作简单,且准确率达100%,进而能加快抗白叶枯病水稻品种的选育进度。

[0007] 为实现上述目的,本发明提供的水稻广谱高抗白叶枯病基因Xa45(t)的共分离分子标记Hxjy-1由Hxjy-1-F引物和Hxjy-1-R引物组成,目标片段长度167bp,所述Hxjy-1-F引物的核苷酸序列如SEQ ID NO:1所示,Hxjy-1-R引物的核苷酸序列如SEQ ID NO:2所示。

[0008] 本发明提供的水稻广谱高抗白叶枯病基因Xa45(t)的共分离分子标记Hxjy-1在水稻染色体上的物理距离为27.978Mb,可将基因Xa45(t)标定在水稻11号染色体长臂末端上,也可用于筛选含有该目的基因的单株。

[0009] 本发明还提供了上述水稻广谱高抗白叶枯病基因Xa45(t)的共分离分子标记Hxjy-1在水稻抗白叶枯病分子标记辅助选择育种中的应用。

[0010] 在所述的应用中共分离分子标记Hxjy-1能够扩增出167bp的扩增片段,则目标水稻材料含有抗白叶枯病基因Xa45(t)位点。

[0011] 所述的扩增采用15 $\mu$ L PCR反应体系进行PCR扩增;15 $\mu$ L PCR反应体系为:5U/ $\mu$ L Taq酶0.1 $\mu$ L,含Mg<sup>2+</sup>的10 $\times$ PCR Buffer 1.5 $\mu$ L,2.5mmol/L dNTP1.2 $\mu$ L,10 $\mu$ mol/L上、下游引物各0.4 $\mu$ L,20ng/ $\mu$ L模板DNA 2 $\mu$ L,ddH<sub>2</sub>O 9.4 $\mu$ L;PCR反应条件为:94 $^{\circ}$ C预变性5min;94 $^{\circ}$ C变性30sec,55 $^{\circ}$ C复性30sec,72 $^{\circ}$ C延伸1min,共35个循环;72 $^{\circ}$ C延伸10min;取5 $\mu$ L PCR扩增产物在4%琼脂糖凝胶上5V/cm恒压电泳,然后通过凝胶成像系统成像并保存。

[0012] 为防止所述的15 $\mu$ L PCR反应体系液体蒸发,最后在所述的15 $\mu$ L PCR反应体系中加1滴石蜡油。

[0013] 本发明还提供了上述水稻广谱高抗白叶枯病基因Xa45(t)的共分离分子标记Hxjy-1在分子标记辅助选择中的应用。

[0014] 与现有技术相比,本发明的有益效果是:

[0015] (1) 本发明首次利用元江普通野生稻和分子标记方法发掘出一个广谱高抗白叶枯病基因Xa45(t)。

[0016] (2) 本发明开发的基因Xa45(t)的共分离分子标记Hxjy-1是在坚实的遗传实验结果上验证的,且标记特异性高,双亲之间差异明显,可操作性强,扩增出的目标片段单一,容易检测,只要通过简单的PCR扩增技术和琼脂糖凝胶电泳检测技术,就可以准确定位到目的基因,无需繁琐、毒性大、耗时长的聚丙烯酰胺凝胶电泳检测,检测环保、方便、快捷、高效。

[0017] (3) 本发明将Xa45(t)基因精细锚定在水稻11号染色体长臂末端上,利用本发明提供的共分离分子标记Hxjy-1,可准确且有效地筛选出Xa45(t)的候选基因,提高了候选基因筛选的效率,为后续克隆、利用Xa45(t)基因以及研究其功能奠定了很好的理论基础。

[0018] (4) 辅助选育目标明确,有效提高了常规育种的辅助选育效率。常规育种往往通过表型选择单株用于后续的杂交或回交转育。但水稻的白叶枯病抗性鉴定程序复杂,周期长,同时易受环境因素和人为因素影响。如,水稻白叶枯病鉴定一般要待植株长到孕穗期进行

接菌,所以在抗性鉴定之前,植株的培养周期长,且费事费力;此外培养菌株,人工接种,田间调查等都需花费大量的人力物力,还需避开梅雨天气。因此利用常规手段进行抗性育种难度较大、效率低、成本高。然而通过本发明分子标记检测目标植株中的白叶枯病抗性基因位点,仅在苗期就能快速鉴定出高抗纯合基因型的单株,及时淘汰感病单株或杂合基因型单株,不仅节约生产成本,而且大大提高抗性材料的选择效率,极大地缩短水稻品种的育种周期。

[0019] 序列表中SEQ ID NO:1所示的是Hxjy-1-F引物的核苷酸序列。

[0020] 序列表中SEQ ID NO:2所示的是Hxjy-1-R引物的核苷酸序列。

[0021] 序列表中SEQ ID NO:3所示的是R13I14-F引物的核苷酸序列。

[0022] 序列表中SEQ ID NO:4所示的是R13I14-R引物的核苷酸序列。

[0023] 序列表中SEQ ID NO:5所示的是Hxjy-14-F引物的核苷酸序列。

[0024] 序列表中SEQ ID NO:6所示的是Hxjy-14-R引物的核苷酸序列。

[0025] 序列表中SEQ ID NO:7所示的是RM224-F引物的核苷酸序列。

[0026] 序列表中SEQ ID NO:8所示的是RM224-R引物的核苷酸序列。

[0027] 序列表中SEQ ID NO:9所示的是RM27322-F引物的核苷酸序列。

[0028] 序列表中SEQ ID NO:10所示的是RM27322-R引物的核苷酸序列。

#### 附图说明

[0029] 图1:利用共分离分子标记Hxjy-1鉴定20份G252/02428的F<sub>2</sub>群体感病后代基因Xa45(t)的分离情况电泳图。M代表标准分子量标记(DL1000 Marker),G252为抗病亲本,02428为感病亲本,日本晴为感病栽培稻,F<sub>1</sub>为抗病亲本G252和感病亲本02428杂交所产生的第一代,编号1-20的数字代表从G252/02428群体中随机抽取的20个F<sub>2</sub>感病单株。各单株对应的病级标注在各单株编号上方,S表示感病(病斑长度大于6cm),R表示抗病(病斑长度小于或等于6cm)。

[0030] 图2:利用共分离分子标记Hxjy-1鉴定22份G252/02428的F<sub>2</sub>群体抗病后代基因Xa45(t)的分离情况电泳图。M代表标准分子量标记(DL1000 Marker),G252为抗病亲本,02428为感病亲本,编号1-22的数字代表从G252/02428群体中随机抽取的22个F<sub>2</sub>抗病单株。各单株对应的病级标注在各单株编号上方,R表示抗病(病斑长度小于或等于6cm)。

#### 具体实施方式

[0031] 下面将结合实施例对本发明实施方式进行了描述,实施例中无特殊说明的为常规方法。所用试剂或仪器均为市售。

[0032] 实施例1本发明水稻广谱高抗白叶枯病基因Xa45(t)的共分离分子标记Hxjy-1的获得,包括如下步骤:

[0033] (一)F<sub>2</sub>群体构建及表型鉴定

[0034] (1)从元江普通野生稻(采自云南省元江县)的转育后代进行白叶枯病抗性鉴定,所述元江普通野生稻的转育后代是将元江普通野生稻与合系35杂交,并用合系35为轮回亲本,育成以合系35为遗传背景并携带抗白叶枯病基因的渗入系BC<sub>2</sub>F<sub>16</sub>材料。

[0035] 用下述11个收集自菲律宾、日本、中国的白叶枯病强致病菌对渗入系BC<sub>2</sub>F<sub>16</sub>材料接

种进行白叶枯病抗性鉴定,在渗入系BC<sub>2</sub>F<sub>16</sub>材料植株孕穗期进行人工接种,鉴定各渗入系及双亲的白叶枯病抗性。发现株系G252(即元江普通野生稻渗入系G252)和供体亲本元江普通野生稻高抗该11个菌株,受体亲本合系35号高感该11种菌株,表明G252对白叶枯病具有与元江普通野生稻相同的抗性反应,说明G252携带的白叶枯病抗性基因可能来自元江普通野生稻,即筛选出对该11个白叶枯病强致病菌均具有广谱、高抗性的抗源G252。

[0036] G252作为抗病亲本,粳稻02428作为感病亲本,待G252和02428开花时,将G252与02428进行常规杂交,套袋处理及单株收集,得到F<sub>1</sub>代种子,F<sub>1</sub>种子发芽成苗后,分别提取DNA(用CTAB法),利用SSR标记检测F<sub>1</sub>植株的真实性将真实的F<sub>1</sub>植株自交,套袋处理及单株收集,得到F<sub>2</sub>代种子,F<sub>2</sub>代种子发芽成苗后构成F<sub>2</sub>分离群体,将F<sub>2</sub>分离群体作为基因定位群体材料,均种植于云南省元江县基地,单株栽插,每行种植10株,株行距为12cm×24cm,常规水肥管理,周围设保护行。

[0037] 所述11个白叶枯病强致病菌是PX099、T7147、YN18、YN1、GD414、HEN11、ScYc-b、YN7、FuJ、YN24和Y8。

[0038] 上述各菌株及相关材料在如下非专利文献公开,申请人有保存,自本专利申请日起20年内可提供。

[0039] PX099,菲律宾标准菌株6,采集自菲律宾、公布于文献“郑伟等.中国、日本和菲律宾水稻白叶枯病菌遗传多样性比较分析.微生物学报,2008,35(4):519~523”。

[0040] T7147,日本标准菌株2号,采集自日本,公布于文献“郑伟等.中国、日本和菲律宾水稻白叶枯病菌遗传多样性比较分析.微生物学报,2008,35(4):519~523”。

[0041] YN18(中国标准菌株1号)、YN1(中国标准菌株2号)、GD414(中国标准菌株3号)、HEN11(中国标准菌株4号)、ScYc-b(中国标准菌株5号)、YN7(中国标准菌株6号)、FuJ(中国标准菌株8号)和YN24(中国标准菌株9号)采集自中国东北稻区、公布于文献“吴宪等.东北水稻白叶枯病菌株遗传多样性分析及品种对白叶枯病抗性评价.吉林农业大学学报,2015,37(3):290~295”。

[0042] Y8,云南强致病型生理小种,采集自中国云南,公布于文献“殷富有等.普通野生稻栽培稻杂交后代白叶枯病抗性评价.江西农业学报,2010,22(8):81~84”。

[0043] 合系35(市售),栽培稻,我国选育的高产优质粳稻品种,公布于文献“殷富有等.普通野生稻栽培稻杂交后代白叶枯病抗性评价.江西农业学报,2010,22(8):81~84”。

[0044] 粳稻02428,是我国选育的矮秆广亲和粳稻(栽培稻),公布于文献“谢勇武等.粳稻02428突变体重组自交系糙米功能成分含量及其与农艺性状的相关分析.西南农业学报,2011年24卷5期:1620~1624”。

[0045] (2)用上述11个白叶枯病强致病菌在植株孕穗期接菌处理对亲本、F<sub>2</sub>家系进行抗病性鉴定。接种前,将菌株接种于NA培养基上(NA培养基配方:牛肉浸膏3g,酵母提取物1g,蛋白胨5g,蔗糖10g,琼脂17g,加水定容至1000ml,调pH至6.8~7.0。),置于28℃±2℃培养48h~72h。接种时用无菌蒸馏水洗脱菌株,悬浮均匀,配制成3×10<sup>8</sup>cfu/mL(OD<sub>600</sub>=0.5)。于植株孕穗期(插秧后约40天),手术剪灭菌后,蘸取制备好的病菌悬浮液,选取剑叶,剪刀平置,刀尖向上,剪去叶尖1~3cm,每个菌株接种1株植株,每接种1个菌株换一把剪刀,做好标记,接种后自然条件下观察记载。

[0046] 接种15天左右当参试材料的病情发展趋于稳定时,每株选取病斑最长的3片无损

害叶(无虫害、除白叶枯病外无其它病害及机械损伤),测量病斑长度。以6cm作为抗感分界,即病斑长度小于或等于6cm为抗病,大于6cm为感病。

#### [0047] (二) 抗性模式分析

[0048] F<sub>2</sub>植株的抗性鉴定可判断抗病亲本含有的基因类型,即:若F<sub>2</sub>植株理论抗感分离比为3:1,则为1个显性基因控制;1:3则为1个隐性基因控制;15:1则为2个显性基因控制;1:15则为2个隐性基因控制,依次类推,可以了解抗病亲本的抗病特性为多少显隐性基因控制。理论抗感分离比可通过卡方检验进行分析,即:统计样本的实际观测值与理论推断值之间的偏离程度按 $[X^2 = \sum (\text{实际观察值} - \text{理论推断值})^2 / \text{理论推断值}]$ 公式计算卡方值,将卡方值通过CHIDIST函数计算P值,若P值大于0.05,差异不显著,接受假设,若P值小于0.05,差异显著,不接受假设。

#### [0049] (三) 基因组DNA提取及PCR反应

[0050] (1) 用CTAB法分别提取亲本及F<sub>2</sub>群体各单株叶片的DNA,DNA纯化后用0.8%琼脂糖凝胶检测,以确定其质量。利用紫外分光光度计将DNA浓度调整为20ng/μL,分别存于-20℃冰箱备用。

#### [0051] (2) PCR扩增及电泳

[0052] PCR反应在PCR扩增仪上进行。PCR反应体系(15μL)为:5U/μL Taq酶0.1μL,含Mg<sup>2+</sup>的10×PCR Buffer 1.5μL,2.5mmol/L dNTP 1.2μL,10μmol/L上、下游引物各0.4μL,20ng/μL模板DNA 2μL,ddH<sub>2</sub>O 9.4μL,最后加1滴石蜡油防止蒸发;PCR反应条件为:94℃预变性5min;94℃变性30sec,55℃复性30sec,72℃延伸1min,共35个循环;72℃延伸10min;取5μL PCR扩增产物在4%琼脂糖凝胶上5V/cm恒压电泳,然后通过凝胶成像系统成像并保存。

[0053] 所述上游引物是指位于整个扩增子(就是被扩增的目的序列)的5'端的引物。下游引物是指位于整个扩增子(就是被扩增的目的序列)的3'端的引物。

#### [0054] (四) 基因定位

##### [0055] (1) 多态性标记筛选

[0056] 根据Gramene网站(<http://www.gramene.org/>)公布的SSR分子标记按照比较均匀的物理距离选择309个标记,对双亲(G252和02428)按上述实施例1步骤(三)PCR反应体系及PCR反应条件进行PCR扩增和4%琼脂糖凝胶电泳检测,从中筛选出多态性好,带型容易判定的SSR标记。

##### [0057] (2) 基因初定位

[0058] 在上述实施例1步骤(一)中所述的基因定位群体材料(F<sub>2</sub>分离群体)中选取极端抗病植株10株和极端感病植株10株,采用CTAB法分别提取核基因组DNA,抗病植株和感病植株分别等量混合,分别构成抗、感DNA池,用上述实施例1步骤(四)(1)筛选到的多态性SSR标记对定位群体的抗、感DNA池分别进行分子检测,G252和02428两亲本作为对照,初步筛选与抗白叶枯病基因连锁的标记,然后用部分感病单株对连锁标记进行验证。当在两亲本和抗、感DNA池之间检测到多态性,说明目的基因就位于这两标记之间。将这两标记对定位群体感病单株进行PCR扩增,根据PCR分析结果(按实施例1步骤(三)基因组DNA提取及PCR反应进行PCR),将抗病亲本的带型记为“A”,感病亲本的带型记为“B”,杂合带型记为“H”,将每个SSR标记扩增的PCR带型结合双亲、F<sub>2</sub>感病单株的表型,检测两标记是否与目的基因连锁,从而将基因初步定位在染色体上。所述极端抗病是指在所有的F<sub>2</sub>家系中,病斑最短,抗病最强的

植株;所述极端感病是指在所有的F<sub>2</sub>家系中,病斑最长,抗病最弱植株。

### [0059] (3) 基因精细定位

[0060] 根据初定位结果,参照日本晴基因组,将与目的基因连锁的标记之间的水稻日本晴基因组序列下载,上传这些序列到NCBI数据库(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)中,搜索简单重复序列,利用Primer premier 5.0设计SSR标记。在NCBI数据库中,通过Blast程序,将下载的序列与水稻9311基因组序列进行比对,查找插入缺失区域,设计InDel标记。将设计好的SSR标记和InDel标记进行多态性筛选,筛选得到的多态性标记在定位群体各感病单株间进行连锁分析,最终将目的基因精细定位在染色体上。

### [0061] (五) 结果与分析

#### [0062] (1) 元江普通野生稻渗入系G252抗性遗传分析

[0063] 将F<sub>2</sub>植株分成11个小群体(G1~G11),每个小群体接种上述实施例1步骤(一)中所述的11个菌株中的1个菌株,同时G252作为阳性对照和粳稻02428作为阴性对照,当G252和粳稻02428病斑稳定时,调查统计F<sub>2</sub>发病情况,结果显示,每个小群体对相应菌株的抗感差异都较明显。根据接菌鉴定情况,统计出每个小群体抗病植株和感病植株份数,初步分析发现每个小群体对相应菌株的理论推断值都呈3抗:1感的分离,推测G252可能携带1个广谱显性的抗白叶枯病基因或多个抗性基因互作促使G252对白叶枯病具有广谱抗性。

#### [0064] (2) 基因Xa45(t) 初定位

[0065] 从每个小群体中,选取极端抗病植株10株和极端感病植株10株,采用CTAB法分别提取DNA,抗感植株分别等量混合,分别构成抗、感DNA池,用筛选到的86对SSR多态性标记对每个小群体的抗感池进行分子检测,G252和粳稻02428两亲本作为对照,结果11号染色体的SSR标记能够在两亲本和每个小群体的抗感池之间检测到多态性,说明目的基因可能位于该染色体上。选取每个小群体的F<sub>2</sub>感病单株进行连锁分析,发现每个小群体的目的基因都位于RM224和RM27322之间,表明G252携带了1个对每个参试菌株的遗传效应都一致的抗性基因,将该基因暂命名为Xa45(t),进一步表明基因Xa45(t) 广谱高抗白叶枯病,也表明了构建的11个小群体分别对每个参试菌株的抗性反应无区别,故可将11个小群体合并为1个大群体,后续试验都以大群体进行研究。

[0066] 连锁标记RM224由RM224-F引物和RM224-R引物组成,所述RM224-F引物的核苷酸序列如SEQ ID NO:7所示,RM224-R引物的核苷酸序列如SEQ ID NO:8所示。

[0067] 连锁标记RM27322由RM27322-F引物和RM27322-R引物组成,所述RM27322-F引物的核苷酸序列如SEQ ID NO:9所示,RM27322-R引物的的核苷酸序列如SEQ ID NO:10所示。

#### [0068] (3) 基因Xa45(t) 精细定位

[0069] 为了进一步定位Xa45(t) 基因,开发新的131对SSR和136对InDel标记,从中筛选出5对SSR和9对InDel多态性标记,将获得的多态性标记在定位群体各感病单株间进行高精度的连锁分析,最终把基因Xa45(t) 精细定位在水稻11号染色体长臂末端R13I14和Hxjy-14两标记之间26kb的物理距离范围内,且发现InDel标记Hxjy-1在各感病单株之间扩增的基因型都与感病亲本02428基因型一致,表明Hxjy-1与基因Xa45(t) 共分离(见表1)。

[0070] 表1水稻广谱高抗白叶枯病基因Xa45(t) 的连锁标记

标记名称	正向引物 (5'~3')	反向引物 (5'~3')	基因组位置 <sup>a</sup> /bp	预期片段大小/bp
[0071] Hxjy-1	Hxjy-1-F 引物核苷酸序列如 SEQ ID NO: 1 所示	Hxjy-1-R 引物核苷酸序列如 SEQ ID NO: 2 所示	27978440~27978634	167
R13I14	R13I14-F 核苷酸序列如 SEQ ID NO: 3 所示	R13I14-R 核苷酸序列如 SEQ ID NO: 4 所示	27957132~27957343	198
Hxjy-14	Hxjy-14-F 核苷酸序列如 SEQ ID NO: 5 所示	Hxjy-14-R 核苷酸序列如 SEQ ID NO: 6 所示	27983253~27983436	170

[0072] <sup>a</sup>:为在日本晴基因组上的物理距离。

[0073] 实施例2

[0074] 共分离分子标记Hxjy-1的验证

[0075] (一) 材料和方法

[0076] (1) 材料

[0077] 阴性品种:感白叶枯病品种02428 (作为阴性对照)、日本晴及G252/02428杂交后代的不抗病材料296份,共299份。

[0078] 阳性品种:G252 (作为阳性对照) 及G252/02428杂交后代的抗病材料63份,共64份。

[0079] 共分离分子标记:Hxjy-1

[0080] 日本晴,日本选育的粳型常规水稻,公布于文献“潘孝武等.CBF调节子在水稻品种日本晴和93-11低温驯化过程中的差异调控机制.中国水稻科学,2012,26 (5) :521~528”。

[0081] (2) 方法

[0082] 各水稻基因组DNA提取和利用共分离分子标记Hxjy-1对各基因组DNA进行PCR扩增的方法同实施例1。

[0083] (二) 结果

[0084] 分别对上述水稻材料02428等363份阴性和阳性样本的DNA进行PCR扩增。结果表明:本发明共分离分子标记Hxjy-1在阳性样本中均能扩增出相应的目的片段(目标片段长度167bp),在阴性样品中未扩增出大小相同的片段,检测率为100% (363/363)。结果说明,本发明提供的共分离分子标记Hxjy-1及其检测方法能够准确筛选出含有基因Xa45 (t) 的材料,能有效预测水稻植株对白叶枯病的抗性与否,可大大加快抗白叶枯病的水稻材料筛选进度。

- [0001] 序列表
- [0002] <110> 云南省农业科学院生物技术与种质资源研究所
- [0003] <120> 水稻广谱高抗白叶枯病基因Xa45 (t) 的共分离分子标记Hxjy-1
- [0004] <160> 10
- [0005] <170> SIPOSequenceListing 1.0
- [0006] <210> 1
- [0007] <211> 20
- [0008] <212> DNA
- [0009] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
- [0010] <400> 1
- [0011] gactgttccc tcttgatac 20
- [0012] <210> 2
- [0013] <211> 20
- [0014] <212> DNA
- [0015] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
- [0016] <400> 2
- [0017] gtcgtgaaga aagaagcaag 20
- [0018] <210> 3
- [0019] <211> 20
- [0020] <212> DNA
- [0021] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
- [0022] <400> 3
- [0023] agctgagagc cagagatcag 20
- [0024] <210> 4
- [0025] <211> 20
- [0026] <212> DNA
- [0027] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
- [0028] <400> 4
- [0029] gtccatcaaa caccaagatc 20
- [0030] <210> 5
- [0031] <211> 20
- [0032] <212> DNA
- [0033] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
- [0034] <400> 5
- [0035] ggagacatcc tcaactcttg 20
- [0036] <210> 6
- [0037] <211> 20
- [0038] <212> DNA

- [0039] <213> 人工序列(Artificial Sequence)  
[0040] <400> 6  
[0041] gattagttgg ggaatgacgg 20  
[0042] <210> 7  
[0043] <211> 20  
[0044] <212> DNA  
[0045] <213> 人工序列(Artificial Sequence)  
[0046] <400> 7  
[0047] atcgatcgat cttcacgagg 20  
[0048] <210> 8  
[0049] <211> 20  
[0050] <212> DNA  
[0051] <213> 人工序列(Artificial Sequence)  
[0052] <400> 8  
[0053] tgctataaaa ggcattcggg 20  
[0054] <210> 9  
[0055] <211> 24  
[0056] <212> DNA  
[0057] <213> 人工序列(Artificial Sequence)  
[0058] <400> 9  
[0059] agagcccatg tagctacgcc ttcg 24  
[0060] <210> 10  
[0061] <211> 24  
[0062] <212> DNA  
[0063] <213> 人工序列(Artificial Sequence)  
[0064] <400> 10  
[0065] aatcatgccg gctgaaattg tacc 24

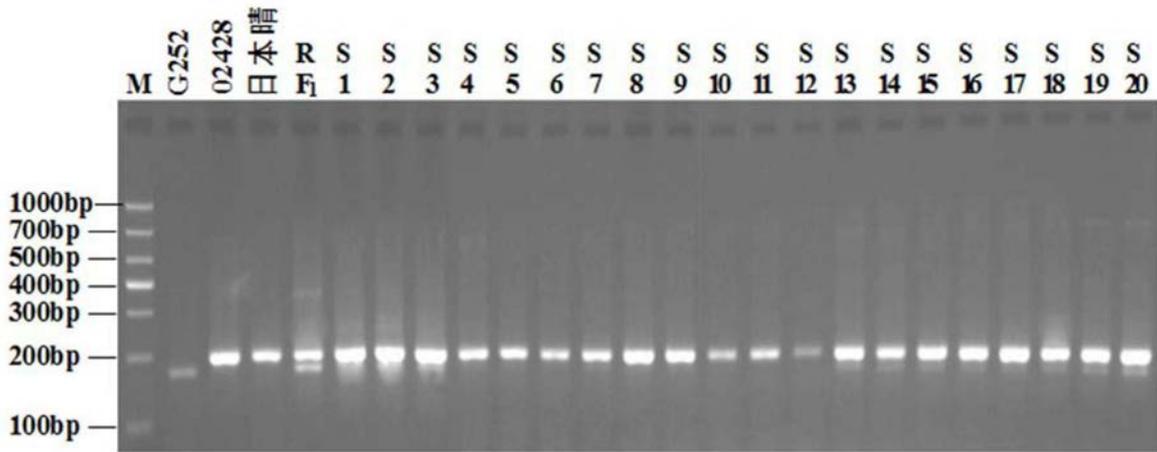


图1

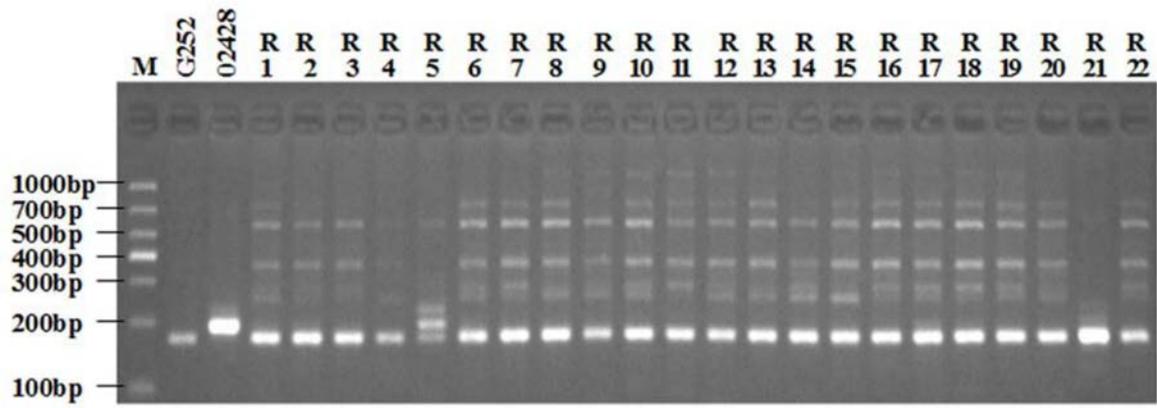


图2