

水稻抗白叶枯病基因 *Xa23* 的 PCR 分子标记定位及辅助选择

潘海军¹ 王春连¹ 赵开军^{1,*} 章琦¹ 樊颖伦¹ 周少川² 朱立煌^{3*}

(¹中国科学院作物育种栽培研究所,农业部作物遗传育种重点开放实验室,北京 100081; ²广东省农业科学院水稻研究所,广东广州 510640; ³中国科学院遗传研究所,北京 100101)

摘要 用 *Xa23* 的近等基因系 CBB23 及其感病轮回亲本 JG30 构建了包含 2562 个单株的 F₂ 作图群体。通过分析 571 个感病单株,找到 2 个新的与 *Xa23* 基因连锁的 SSR 标记 RMI87 和 RM206,它们与 *Xa23* 之间的遗传图距分别为 7.1 cM 和 1.9 cM。通过筛选 1200 个 RAPD 引物,获得 2 个与 *Xa23* 基因连锁的 RAPD 标记 RpdH5 和 RpdS1184,与 *Xa23* 之间的遗传图距分别为 7.0 cM 和 7.6 cM。利用丰富占/CBB23、绿油占/CBB23 两个实际育种 F₂ 群体,结合抗病性人工接种鉴定,测算了 RpdS1184、RM206 和 RpdH5 用于分子标记辅助选择(MAS)的可能性。结果表明,对于丰富 23 群体,RpdH5 和 RpdS1184 的 MAS 准确率分别为 91.0% 和 87.3%,如果同时使用这两个标记,可使 MAS 的准确率达 99%。对于绿油 23 群体,RpdH5、RpdS1184 和 RM206 的 MAS 准确率分别为 77.1%、81.1% 和 80.8%。同时使用 RpdH5、RpdS1184 标记的 MAS 准确率为 90.3%;同时使用 RpdH5、RM206 的准确率为 91.3%;同时使用 RpdH5、RM206、RpdS1184 标记的准确率为 90.8%。

关键词 *Xa23*; 水稻白叶枯病; SSR; RAPD; MAS

中图分类号: S511 文献标识码: A

Molecular Mapping by PCR-based Markers and Marker-assisted Selection of *Xa23*, a Bacterial Blight Resistance Gene in Rice

PAN Hai-Jun¹ WANG Chun-Lian¹ ZHAO Kai-Jun^{1,*} ZHANG Qi¹ FAN Yin-Lun¹ ZHOU Shao-Chuan²

ZHU Li-Huang³.

(¹ Key Laboratory of Crop Genetics & Breeding, Ministry of Agriculture, Institute of Crop Breeding and Cultivation, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing, 100081; ² Rice Research Institute, Guangdong Academy of Agricultural Sciences, Guangzhou, Guangdong 510640; ³ Institute of Genetics, Chinese Academy of Sciences, Beijing, 100101, China.)

Abstract A F₂ population, with 2562 individuals, of JG30/CBB23 was constructed for molecular mapping of the bacterial blight resistance gene *Xa23* in rice. After screening 1200 random amplified polymorphic DNA (RAPD) primers, we found RAPD markers, RpdH5 and RpdS1184, were linked to the *Xa23* gene, with genetic distance of 7.0 cM and 7.6 cM, respectively. Two simple sequence repeats (SSR) markers, RMI87 and RM206, were also found to be linked to the *Xa23* gene, the genetic distance were 7.1 cM and 1.9 cM, respectively. The marker-assisted selection (MAS) efficiency of RpdS1184, RM206 and RpdH5 was evaluated using two true breeding F₂ populations. The results showed that the MAS efficiency of RpdH5 and RpdS1184, in population Fengfu23, were 91.0% and 87.3%, respectively, but the MAS efficiency reached as high as 99% when these two markers were co-used. For population Luyou 23, the MAS efficiency of RpdH5, RpdS1184 and RM206 were 77.1%, 81.1% and 80.8%, respectively. When RpdH5 and RpdS1184 were co-used, the MAS efficiency was 90.3%; when RpdH5 and RM206 were co-used, the MAS efficiency was 91.3%; when RpdH5, RM206 and RpdS1184 were co-used, the MAS efficiency was 90.8%.

Key words *Xa23*; Rice bacterial blight; SSR; RAPD; MAS

基金项目:国家植物转基因及其产业化专项(J00-A-002);国家自然科学基金项目(39970452);国家“863”计划项目(2001AA222151)。

作者简介:潘海军(1976-),男,山东人,硕士生,研究方向:水稻抗病基因分子标记定位及应用。

*通讯作者:赵开军, Author for correspondence E-mail: zhaokj@mail.caas.net.cn

Received (收稿日期): 2002-06-26, Accepted (接受日期): 2002-10-15.

水稻白叶枯病是水稻生产中最严重的病害之一,世界各产稻区均有发生,一般减产 10%~30%,严重时甚至绝收^[1]。自 20 世纪 60 年代以来,国际上统一鉴定命名了 19 个水稻白叶枯病抗性基因^[2],其中能在育种上有效利用的并不多,除 *Xa3*、*Xa4* 已在育种上广泛利用外^[3],来自长药野生稻的 *Xa21* 由于具有广谱抗性并且已被分离克隆^[4],近年,人们正通过基因工程和杂交转育途径开发利用^[5,6]。近十年来不断有新的白叶枯病抗性基因被鉴定出来,新基因的序号已排至 *xa24*^[7]。其中由章琦等从我国普通野生稻中鉴定发掘的 *Xa23*,对国内外所有鉴别菌系都表现为高抗,而且为显性、全生育期抗病,对于杂交稻的改良具有广阔的应用前景^[8]。章琦等已将 *Xa23* 初步定位在水稻第 11 染色体的长臂上,与 SSR 标记 OSR6、RM224 和 RFLP 标记 G1465 之间的遗传图距分别为 5.3 cM、27.7 cM 和 16.7 cM^[8]。但是这 3 个标记均位于 *Xa23* 基因近端粒一侧,而且离 *Xa23* 基因较远,无法用于 *Xa23* 基因的分离克隆。另外,*Xa23* 基因的优异特性已引起育种家的重视,正被应用于水稻育种计划。由于可以鉴定 *Xa23* 基因的强致病菌系 P6 和 P10 引自 IRR1,在我国只能在限定的地点和严格隔离控制的条件下用于人工接种,所以在实际育种计划中,*Xa23* 基因的分子标记辅助选择显得非常重要。为此,我们近两年来采用 SSR、RAPD、AFLP 及 RFLP 等多种途径寻找与 *Xa23* 基因更紧密连锁的分子标记,以期用于 *Xa23* 基因的图位克隆和分子标记辅助选择(MAS)。本文报道 RAPD 标记和新的 SSR 标记的筛选及其用于 MAS 的可能性。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 植物材料

携有 *Xa23* 基因的近等基因系 CBB23、培育 CBB23 的轮回亲本 JG30(金刚 30)及它们的 F₂ 分离群体由本实验室制备。绿油 23(绿油占/CBB23)、丰富 23(丰富占/CBB23)两个 F₂ 育种群体由广东省农业科学院水稻所制备。所有提取 DNA 的植株种植在本所温室或网室,常规管理。

1.1.2 水稻白叶枯病菌系

水稻白叶枯病广致病菌系 P6 引自国际水稻研究所(IRRI),由本实验室保存。

1.1.3 RAPD 引物

购自 OPERON 公司的 10 碱基的 RAPD 引物 20 套共 400 个(编号:OPA、OPB、OPC、OPD、OPE、OPF、OPG、OPH、OPI、OPJ、OPK、OPL、OPM、OPN、OPO、OPU、OPV、OPW、OPX、OPY);购自上海生工生物工程技术服务有限公司(上海生工)的 10 碱基 RAPD 引物 800 个(编号:S181-S220、S321-S340、S461-S520、S1001-S1520、S2001-S2160)。

1.1.4 SSR 引物

根据 Temnykh *et al.*^[9]选用水稻第 11 染色体长臂上包括 RM206 和 RM187 的 SSR 标记 10 个。引物由上海生工合成。其中 RM206 和 RM187 的引物序列为:

RM206F:5'-CCCATGCGTTTAACTATTCT-3',

RM206R:5'-CGTTCATCGATCCGIATGG-3';

RM187F:5'-CCAAGGGAAAAGATGCCACAATTG-3',

RM187R:5'-GTGGACGCTTTATATTATGGG-3'。

1.2 方法

1.2.1 植株抗病接种鉴定

采用人工剪叶接种法^[8],用白叶枯病国际鉴别菌系 P6 对供试水稻植株于苗期进行抗性鉴定。

1.2.2 基因组 DNA 提取

对 JG30、CBB23 及它们的 F₂ 分离单株,参考 McCouch 等^[10]的方法提取叶片总 DNA。

对绿油 23、丰富 23 两个 F₂ 群体的分离单株,采用基因组 DNA 的快速提取法。具体步骤如下:取一小片嫩叶放入盛有 100 μL NaOH(0.5 mol/L)的 1.5 mL Eppendorf 管中,用磨砂玻璃棒研磨成匀浆,取 5 μL 上清液与 245 μL Tris-HCl(0.1 mol/L,pH 8.0)混合,4℃ 下保存,尽早用于 PCR。

1.2.3 PCR 反应及电泳

SSR 标记筛选及其用于 MAS 时:反应体积 25 μL,反应液组成为 1×PCR 缓冲液(10 mmol/L Tris-HCl,pH 8.3,50 mmol/L KCl,0.1% Triton-100),2.5 mmol/L MgCl₂,dNTP 0.25 mmol/L,每个引物 50 ng,100 ng 基因组 DNA,1U *Taq* 酶。反应程序为:94℃ 预变性 5 min,然后每个循环:94℃ 变性 1 min,55℃ 复性 1 min,72℃ 延伸 2 min,共循环 35 次,最后 72℃ 保温 10 min。

RAPD 标记筛选及其用于 MAS 时:反应体积 20 μL,反应液组成为 1×PCR 缓冲液(10 mmol/L Tris-HCl,pH 8.3,50 mmol/L KCl,0.1% Triton-100),2.0 mmol/L MgCl₂,dNTP 0.125 mmol/L,引物 30 ng,1 U

Taq 酶, 基因组 DNA 50 ng (标记筛选和定位) 或 3 μ L (MAS)。反应程序为: 95 预变性 5 min, 然后每个循环: 95 变性 30 s, 37 复性 45 s, 72 延伸 1 min, 共循环 45 次, 最后 72 保温 7 min。

PCR 扩增产物在 3.0% (SSR) 或 1.0% (RAPD) 琼脂糖凝胶中电泳分离, 经溴化乙锭 (EB) 染色后, 紫外灯下扫描照相。

1.2.4 分子标记与 *Xa23* 基因的连锁分析

根据分子标记多态性, 结合分离群体抗性表型参数, 用 Mapmaker/ EXP3.0 作图软件进行基因和分子标记位点的遗传连锁分析。LOD 3.0。重组值经 Kosambi 函数转换为遗传图距 (cM)。

2 结果与分析

2.1 F_2 作图群体构建

1999 年将 JG30 与 CBB23 杂交, 其 F_1 植株在海南岛繁殖加代, 单株收获。2000 年在北京种植 F_2 代分离群体, 共 2562 个单株。用 P6 进行白叶枯病抗性鉴定表明, 它严格符合 3 \diamond 1 的抗感分离 (表 1), 可以用于 *Xa23* 基因的分子标记定位。

表 1 JG30/CBB23 的 F_1 和 F_2 群体对 P6 的抗性反应

Table 1 Resistance reactions of F_1 and F_2 populations from cross JG30/CBB23 to P6

组合 Cross	F_1 植株 F_1 plant	F_2 群体 F_2 population		2 (Expected ratio)	P value
		抗病 R	感病 S		
JG30/CBB23	#1 \diamond R	1046	341	1387	0.106 (3 \diamond 1) 0.50 ~ 0.75
	#2 \diamond R	882	293	1175	0.000 (3 \diamond 1) > 0.90
总计 Total		1928	634	2562	0.075 (3 \diamond 1) 0.75 ~ 0.90

R: Resistant; S: Susceptible

2.2 *Xa23* 基因的 RAPD 标记定位

2.2.1 多态性 RAPD 引物的筛选

从 JG30/CBB23 的 F_2 分离群体中, 选择接种鉴定表现为典型的抗病和感病的单株各 10 株, 每株取等量 DNA 分别混合成抗病 DNA 池 (R-pool) 和感病 DNA 池 (S-pool)。用抗、感池 DNA 为模板, 从 1200 个 RAPD 引物中, 筛选到 2 个在抗、感池之间出现多态性条带的引物 H5 和 S1184, 它们在抗病 DNA 池中分别扩增出 0.65 kb 和 0.45 kb 特异片段, 分别记为 RpdH5 和 RpdS1184 (图 1)。

2.2.2 F_2 感病单株检测及遗传图距

鉴于 *Xa23* 为显性基因, JG30/CBB23 的 F_2 群体

中表型抗病的植株包含纯合和杂合两种基因型, 抗病表型存在因病原菌人工接种失误而造成误差的可能性, 相反, 感病植株为隐性纯合体, 感病表型理论上完全真实。在分子标记检测中, 感病植株的扩增带型可以真实地反映分子标记与 *Xa23* 基因间的遗传交换情况。因此, 我们用 RAPD 引物 H5 和 S1184, 对 F_2 群体的感病单株逐一检测 (图 1)。由于部分单株 DNA 量不足等原因, 最后获得 571 个感病单株的可分析数据。其中 H5 和 S1184 分别检测到 78 和 81 个单株在 *Xa23* 基因与分子标记之间发生了遗传交换。用 Mapmaker3.0 软件对上述结果进行连锁分析表明, RpdH5 和 RpdS1184 标记均与 *Xa23* 基因连锁, 其中 RpdH5 位于 *Xa23* 基因的靠着丝粒一侧, 遗传距离为 7.0 cM; RpdS1184 位于 *Xa23* 基因的靠端粒一侧, 遗传距离为 7.6 cM。这样就将 *Xa23* 基因框在特定的染色体区间内 (图 2)。

2.3 *Xa23* 基因的 SSR 标记定位

利用 JG30、CBB23、 F_2 抗病池、感病池 DNA 为模板, 筛选了水稻第 11 染色体长臂上的 10 个 SSR 标记。结果表明 RM206 和 RM187 在 JG30、CBB23 之间和抗、感 DNA 池之间扩增出多态性条带。所以用这两个标记检测了 F_2 群体的感病单株 (图 1), 在具可分析数据的 571 个感病株中, RM206 和 RM187 分别检测到 17 和 70 个单株在 *Xa23* 基因与分子标记之间发生了单交换、2 和 3 个单株发生了双交换。Mapmaker3.0 软件分析表明, RM206 和 RM187 标记均位于 *Xa23* 基因的靠端粒一侧, 与 *Xa23* 的遗传距离分别为 1.9 cM 和 7.1 cM (图 2)。

2.4 *Xa23* 基因的 PCR 分子标记辅助选择 (MAS)

由于可以鉴定 *Xa23* 基因的强致病菌系 P6 和 P10 引自 IRRI, 在我国只能在限定的地点和严格隔离控制的条件下用于人工接种, 所以在实际育种计划中, *Xa23* 基因的分子标记辅助选择很重要。丰富 23、绿油 23 两个 F_2 分离群体是广东省农科院水稻所的实际育种材料, 我们在用 P6 进行人工接种鉴定每个单株的抗病性的同时, 选用位于 *Xa23* 基因两侧的 RAPD 标记 RpdH5 和 RpdS1184 以及目前找到的离 *Xa23* 基因最近的 SSR 标记 RM206 对每个单株进行分子标记检测, 评估这 3 个 PCR 标记在辅助选择 *Xa23* 基因的效率。由于 RM206 在丰富 23、CBB23 之间没有多态性, 所以对丰富 23 群体只有 RpdH5 和 RpdS1184 标记选择的资料。

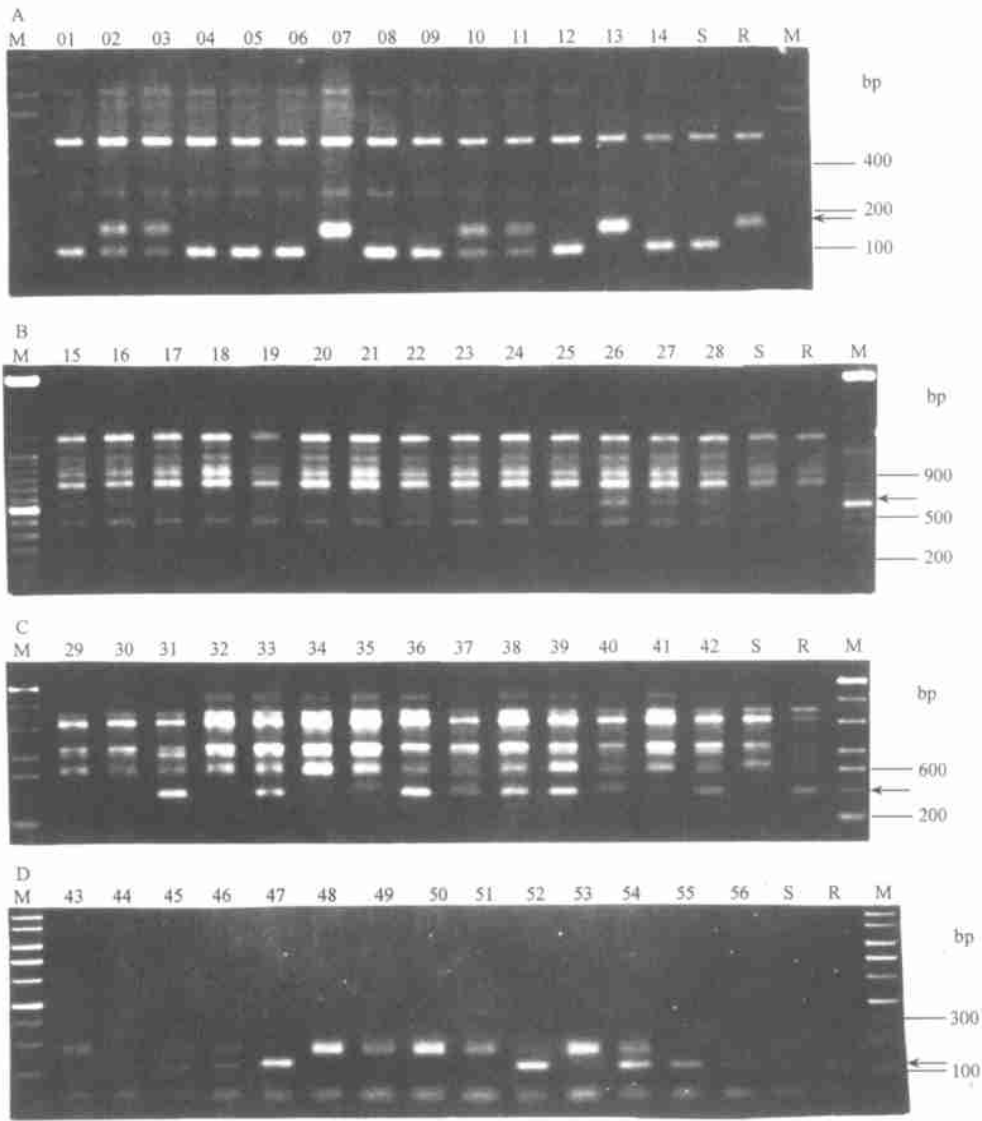


图1 分子标记在 F₂ 群体中与 Xa23 基因的连锁分析

M:分子量 R:抗病池 S:感病池 01 - 56:F₂ 感病植株

Fig. 1 Co-segregation between molecular markers and Xa23 in F₂ population

M:Molecular weight ; R:R-pool ; S:s-pool ;01-56:F₂ plants susceptible to P6 A:RM187 ; B:RpdH5 ;C:RpdS1184 ;D:RM206

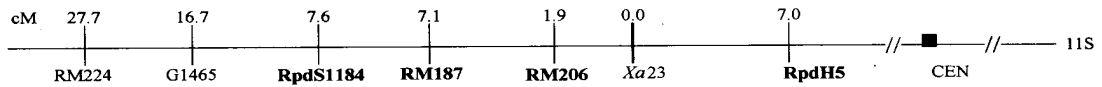


图2 水稻抗白叶枯病基因 Xa23 的连锁遗传图谱

Fig. 2 The genetic linkage map flanking rice bacterial blight resistance gene Xa23.

New markers identified in this study are shown in *boldface*. CEN: Centromere ; 11S: Short arm of chromosome 11

从表 2 可以看出,对于丰富 23 群体,RpdH5 标记检测的 328 个 F₂ 单株中,有 245 株在接种鉴定中表现为抗病,分子标记检测有 227 株表现为抗病带型,符合率为 92.7%;在接种鉴定中表现为感病的

83 个单株中,有 74 株在分子标记检测中表现为感病带型,符合率为 89.2%,所以平均符合率为 91.0%。同样可以算出 RpdS1184 标记对丰富 23 群体的 MAS 平均符合率为 87.3%。由于 RpdH5 标记

位于 *Xa23* 基因靠着丝粒一侧 7.0 cM 处, RpdS1184 标记位于 *Xa23* 基另一侧 7.6 cM 处(图 2), 说明对于 *Xa23* 基因, 利用相距 7.0 cM 左右的单个分子标记进行辅助选择, 其准确率在 90.0% 左右。由表 3 可知, 对于丰富 23 群体, 在 RpdH5 和 RpdS1184 标记检测中同时表现为抗病带型的 148 个单株中, 只有 1 株在接种鉴定中表现为感病, 表明同时使用位于 *Xa23* 基因两侧的 RpdH5、RpdS1184 标记, 可使 MAS 的准确率达到 99%。

对于绿油 23 群体, RpdH5、RpdS1184 标记的平均 MAS 符合率均有所降低, 分别为 77.1% 和 81.1%。距 *Xa23* 基因仅 1.9 cM 的 RM206 标记, 其平均 MAS 符合率也只有 80.8% (表 2)。但是抗病植株的 MAS 符合率并不低, 3 个标记分别为 89.1%、90.8% 和 94.9% (表 2), 之所以造成平均 MAS 符合率偏低的原因是感病植株的符合率低。我们查阅原始记录发现, 绿油 23 群体的部分单株在抗病接种鉴

定中的抗感反应不够清晰, 有 12 个单株的接种叶片之病斑面积在 15% ~ 20% 左右, 被归为感病植株(抗感分界标准为病斑面积 15%), 这可能有人为误差, 因为绿油 23 群体的感病株比例远多于 1/4, 例如 RpdH5 检测的 273 株中, 人工接种划分为 R 的为 193 株, 划分为 S 的为 80 株, 感病株比例为 1.7/4 (表 2), 这可能致使该群体中 MAS 符合率的估计偏低。由表 3 可知, 对于绿油 23 群体, 同时使用 RpdH5、RpdS1184 标记的 MAS 准确率为 90.3%; 同时使用 RpdH5、RM206 标记的 MAS 准确率为 91.3%; 同时使用 RpdH5、RM206、RpdS1184 标记的 MAS 准确率为 90.8%。可见, 同时使用位于 *Xa23* 基因两侧的 2 个或 3 个分子标记可提高 MAS 的准确率, 但使用 3 个分子标记的 MAS 符合率并不比使用 2 个分子标记的 MAS 符合率显著提高, 所以在实际应用中, 选择 2 个位于 *Xa23* 基因两侧的分子标记开展 MAS 就足够了。

表 2 绿油 23、丰富 23 两个 F₂ 群体分子标记检测与田间抗感表型的符合率

Table 2 Marker-assisted selection efficiency in two F₂ breeding populations

F ₂ 群体 [*] Populations	Marker	检测株数 Plants	人工接种 Inoculation		分子检测带型 Amplified pattern		分子检测符合率 MAS efficiency	
			表型 Phenotype	植株数 Plants	R	S	R S (%)	平均符合率 Mean (%)
			丰富 23 Fengfu 23	RpdH5	328	抗病 R	245	227
	RpdS1184	235	感病 S	83	9	74	(89.2)	
			抗病 R	175	151	24	86.3	87.3
			感病 S	60	7	53	(88.3)	
绿油 23 Luyou 23	RpdH5	273	抗病 R	193	172	21	89.1	77.1
			感病 S	80	28	52	(65.0)	
	RpdS1184	276	抗病 R	196	178	18	90.8	81.1
			感病 S	80	23	57	(71.3)	
	RM206	278	抗病 R	197	187	10	94.9	80.8
			感病 S	81	27	54	(66.7)	

*: 丰富 23: 丰富占/CBB23; 绿油 23: 绿油占/CBB23; Fengfu23: Fengfuzhan/CBB23; Luyou23: Luyouzhan/CBB23

表 3 同时使用 *Xa23* 基因两侧的分子标记的 MAS 符合度 (R%)

Table 3 MAS efficiency when 2 or 3 markers flanking *Xa23* were co-used

F ₂ 群体 [*] Population	RpdH5-RpdS1184				RpdH5-RM206				RpdH5-RM206-RpdS1184			
	Plants	R	S	R %	Plants	R	S	R %	Plants	R	S	R %
丰富 23 Fengfu23	148	147	1	99.3	/	/	/	/	/	/	/	/
绿油 23 Luyou23	175	159	17	90.3	184	168	16	91.3	174	158	16	90.8

*: 丰富 23: 丰富占/CBB23; 绿油 23: 绿油占/CBB23; Fengfu23: Fengfuzhan/CBB23; Luyou23: Luyouzhan/CBB23

3 讨论

3.1 分子标记定位

为使 *Xa23* 基因的分子标记定位足以精细到可以开展图位克隆,我们构建了包含 2562 个单株的 F_2 大群体。如果分子标记定位中检测每一个单株,则工作量非常大。所以我们参照王文明等^[11]的方法,主要用感病植株进行连锁分析。其理论基础是显性基因控制的抗病表型包含纯合和杂合两种基因型,且植株的抗病表型会因病原菌人工接种可能的失误而造成误差,相反,感病植株为隐性纯合体,无论出现纯合的抗性亲本带型还是杂合带型,都能清晰地揭示分子标记与抗病基因间的遗传交换情况。

本研究通过分析 571 个感病单株,找到 2 个新的与 *Xa23* 基因连锁的 SSR 标记 RM187 和 RM206,并测得它们与 *Xa23* 之间的遗传图距分别为 7.1 cM 和 1.9 cM,确证了 *Xa23* 在水稻第 11 染色体长臂上的相对位置(图 2)。实验中,我们也用前期找到的 SSR 标记 OSR6 检测该群体,发现其扩增带型总是与 RM187 的一致,通过比较引物碱基序列发现, RM187F 包含了 OSR6F 的全部 20 个碱基,只是在 3 端多了 TTG 碱基;RM187R 包含了 OSR6R 的全部 20 个碱基,只是在第 8 位多了 T 碱基^[9,12],所以 RM187 与 OSR6 在本群体中的扩增位点相同,所以测得 OSR6 与 *Xa23* 之间的遗传图距也为 7.1 cM。章琦等曾利用包含 160 个单株的 JG30/WBB1 (CBB23 培育中的 BC₅F₃ 代) F_2 群体测得 OSR6 与 *Xa23* 的遗传图距为 5.3 cM^[8],这可能由群体差异所致。

至此发现的与 *Xa23* 基因连锁的 SSR 标记 OSR6、RM224、RM187、RM206 及 RFLP 标记 G1465 均位于 *Xa23* 基因靠染色体端粒的同一侧(图 2),为了精细定位 *Xa23* 基因,有必要在 *Xa23* 的另一侧找到标记,从而首先将其框在特定的染色体区段内。本研究通过筛选 1200 个 RAPD 引物,获得 2 个与 *Xa23* 基因连锁的 RAPD 标记 RpdH5、RpdS1184,其中 RpdH5 位于 *Xa23* 基因靠着丝粒的一侧,这样 *Xa23* 就被框在了 RpdH5 与 RM206 之间 8.9 cM 的染色体区段内(图 2)。我们正集中力量寻找落入该染色体区段内的各种分子标记,包括 RFLP、AFLP、EST、YAC 亚克隆标记等。

3.2 分子标记辅助选择

从实验成本和技术可行性考虑,开展 MAS 首选基于 PCR 的分子标记。郑康乐等认为,用于 MAS 的分子标记与目标基因的遗传距离最好小于 5.0 cM^[13]。我们目前找到的位于 *Xa23* 基因两侧的最近的基于 PCR 的分子标记为 RM206 和 RpdH5,距 *Xa23* 分别为 1.9 cM 和 7.0 cM,因此我们利用丰富 23、绿油 23 两个实际育种 F_2 群体,结合抗病性的人工接种鉴定,测算 RM206 和 RpdH5 用于 MAS 的可靠性。由于 RM206 在丰富占、CBB23 之间没有多态性,所以又纳入 RpdS1184 进行测算。RpdS1184 与 RM206 位于 *Xa23* 基因的另一侧,但遗传图距为 7.6 cM(图 2)。

对于丰富 23 群体,RpdH5 和 RpdS1184 的 MAS 平均符合率分别为 91.0% 和 87.3%(表 2),如果同时使用这两个标记,可使 MAS 的准确率达 99%(表 3)。我们曾利用 JG30/WBB1 的 F_2 植株,JG30/WBB1、9520/WBB1、南京 11/WBB1、IR24/WBB1 的 14 个 F_3 家系,估算 OSR6 的 MAS 准确率为 92.2% [Zhao K J. *et al.*, Plant Genomics in China I (Abstracts). p104, Dalian, China, July 24-27, 2000]。从这些结果来看,我们的上述测算数据是可靠的。

对于绿油 23 群体,RpdH5、RpdS1184、RM206 的平均 MAS 符合率分别为 77.1%、81.1%、80.8%(表 2)。同时使用 RpdH5、RpdS1184 标记的 MAS 准确率为 90.3%;同时使用 RpdH5、RM206 标记的准确率为 91.3%;同时使用 RpdH5、RM206、RpdS1184 标记的为 90.8%(表 3)。我们认为这些测算数据比实际效率偏低,原因是在该群体的抗病接种鉴定中,有 12 个抗病单株由于抗感反应不够清晰而被归为感病植株,从而使群体中感病植株数远多于 1/4,感病植株的分子检测符合率仅为 65%~71.3%,从而拉低 MAS 的平均符合率。3 个标记对抗病植株的分子检测符合率较高(分别为 89.1%、90.8% 和 94.9%)也反证了这一点(表 2)。

由于使用 3 个分子标记的 MAS 符合率并不比使用 2 个分子标记的 MAS 符合率显著提高(表 3),所以在实际应用中,选择 2 个位于 *Xa23* 基因两侧的分子标记开展 MAS 就足够了。就目前情况看,选择 RpdH5 标记与 *Xa23* 基因另一侧的 RM206、OSR6、RM187 和 RpdS1184 标记之一联合使用,可使 *Xa23*

基因的 MAS 准确率达 90% ~ 99%。在实际应用中, 要根据亲本间的多态性, 选择位于 *Xa23* 基因两侧最近的 2 个标记开展 MAS, 这样不仅可以提高准确率, 而且可以增加中选个体与受体亲本的遗传背景同质性。

由于目前利用 MAS 对 *Xa23* 基因进行选择的准确率为 90% ~ 99%, 所以我们建议在育种利用的早期分离世代 ($F_2 \sim F_4$), 可以利用 MAS, 到后期基本稳定世代, 中选株系可取少量种子 (15 ~ 30 粒) 在控制的条件下进行人工接种鉴定抗病性, 既不影响育种进程, 又确保 *Xa23* 基因不被丢失。

References

- [1] Mew T W. Current status and future prospects of research on bacterial blight of rice. *Ann Rev Phytopatho*, 1987, 25: 359—382
- [2] Ogawa T. Methods and strategy for monitoring race distribution and identification of resistance genes to bacterial leaf blight (*Xanthomonas campestris* pv. *oryzae*) in rice. *JARQ*, 1993, 27: 71—80
- [3] Zhang Q (章琦). Genetic evaluation and utilization of resistance to rice bacterial blight in China. *Scientia Agricultura Sinica* (中国农业科学), 1991, 24(3): 26—36
- [4] Song W Y, Wang G L, Ronald P, et al. A receptor kinase-like protein encoded by the rice disease resistance gene, *Xa21*. *Science*, 1995, 270: 1084—1086
- [5] Zhai W-X(翟文学), Li X-B(李小兵), Tian W-Z(田文忠), et al. Introduction of a rice blight resistance gene, *Xa21*, into five Chinese rice varieties through an *Agrobacterium*-mediated system. *Science in China, Series C* (中国科学, C 辑), 2000, 30(2): 200—206
- [6] Chen S (陈升), Zhang Q-F (张启发). Improvement of bacterial blight resistance of hybrid rice by molecular marker-assisted selection. *Journal of Huazhong Agricultural University* (华中农业大学学报), 2000, 19(3): 183—189
- [7] Khush G S, Angeles E R. A new gene for resistance to race 6 of bacterial blight in rice, *Oryza sativa* L. *Rice Genetics Newsletter*, 1999, 16: 92—93
- [8] Zhang Q (章琦), Zhao B-Y (赵炳宇), Zhao K-J (赵开军), et al. Identifying and mapping a new gene *Xa23(t)* for resistance to bacterial blight (*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*) from *O. rufipogon*. *Acta Agronomica Sinica* (作物学报), 2000, 26(5): 536—542
- [9] Tenmykh S, Park W D, Ayres N, et al. Mapping and genome organization of microsatellite sequences in rice (*Oryza sativa* L.). *Theor Appl Genet*, 2000, 100: 697—712
- [10] McCouch S P, Kochert G, Yu Z H, et al. Molecular mapping of rice chromosome. *Theor Appl Genet*, 1988, 76: 815—829
- [11] Wang W-M(王文明), Zhou Y-L(周永力), Jiang G-H(江光怀) et al. Fine mapping of the rice bacterial blight resistance gene *Xa4* and its co-segregation maker. *Chinese Science Bulletin* (科学通报), 2000, 45(10): 1067—1070
- [12] Akagi H, Yokozeki Y, Inagaki A, et al. Microsatellite DNA markers for rice chromosomes. *Theor Appl Genet*, 1996, 93: 1071—1077
- [13] Zheng K-L(郑康乐), Huang N(黄宁). Outlook on the application of marker-assisted selection in rice improvement. *Hereditas* (遗传), 1997, 19(2): 40—44