

蜀恢527抗水稻白叶枯病改良系的遗传背景和农艺性状分析

黄廷友 李仕贵^{*} 王玉平 马玉清 王玲霞^{*}

(四川农业大学水稻研究所, 四川温江 611130)

摘要 利用336个SSR标记和100个RAPD引物, 对分子标记辅助选择获得的10个蜀恢527抗水稻白叶枯病改良系的遗传背景、白叶枯病的抗性和抗谱及农艺性状进行了研究。结果表明, 10个改良株系在Xa21和Xa4位点纯合, 抗我国7个病原型代表菌系C₁~C₇和菲律宾小种1和6(P1和P6)。在遗传背景分析检测的位点中, 改良系与蜀恢527表现差异的SSR位点仅为1~5个, RAPD位点的相似率在92.1%~97.5%之间。在考察的改良系及其与D62A和G46A所配制的杂交组合的8个农艺性状中, 除与G46A所配杂交组合在千粒重、每穗颖花数和产量性状方面与对照差异显著外, 其余均无显著差异, 但是所得改良系的抗性得到了提高, 其余性状与轮回亲本相似, 其中以Line 9和Line 10的遗传背景和农艺性状与蜀恢527最为相似。表明分子标记改良蜀恢527对白叶枯病的抗性是成功的, 是一种有效的育种方法。

关键词 Xa21和Xa4; 遗传背景分析; 抗白叶枯病; 农艺性状分析

中图分类号: S511

Analysis of Genetic Background and Agronomic Traits in Improved Restoring Lines Shuhui 527 with Resistance to Bacterial Blight

HUANG Ting-You, LI Shi-Gui^{*}, WANG Yu-Ping, MA Yu-Qing, WANG Ling-Xia

(Rice Research Institute of Sichuan Agricultural University, Wenjiang 611130, Sichuan, China)

Abstract The genetic background, resistance spectrum to bacterial blight and agronomic traits were evaluated in 10 'Shuhui 527' improved restoring lines with resistance to Bacterial blight, which were bred by Molecular Marker assisted Selection(MAS). Results showed that these lines were homozygous in loci Xa21 and Xa4 and resistant to the representative strains of 7 Chinese pathotypes C₁~C₇ in China, and Philippine race 1 and 6, P1 and P6. Comparison of genetic background showed that there were only 1~5 differential SSR loci, the similarity of RAPD bands was 92.1%~97.5%. The variation of the 8 agronomic traits observed between the improved restoring lines and combinations released from the each lines crossed with D62A was not significant. The agronomic traits investigated between the restoring line and the combinations of these lines crossed with G46A, respectively, had no significant difference except the 1 000 grain weight, spikelets per panicle and yield. But the resistance to Bacterial blight of these lines was improved and the other traits were similar to the recurrent parent. The genetic background and agronomic traits of line 9 and line 10 were more similar to Shuhui 527, it indicated that improvement of resistance to Bacterial blight of Shuhui 527 by using MAS was successful, and the MAS method used in rice breeding was an effective approach.

Key words Xa21 and Xa4; Genetic-background analysis; Bacterial blight resistance; Agronomic traits evaluation

水稻白叶枯病(*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*, Xoo)是全球性的病害, 给我国杂交稻生产带来严重的危害^[1]。控制这种病害最经济有效的方法是培育和种植抗病品种^[2]。杂交稻占我国稻谷总产量的60%, 但是大多数亲本及组合对白叶枯病的抗性较

差^[1], 改良其抗性迫切而重要。提高杂交稻抗性最好的方法是在恢复系中导入显性广谱抗性基因。单一基因的长期使用会使品种的抗性很快丧失, 在品种中聚合多个抗病基因可培育广谱抗性品种、延长品种抗性的寿命^[3]。近年发展的以PCR为基础的

*基金项目:国家863计划项目(2001AA211081)和教育部优秀博士论文资金(200054)。

作者简介:黄廷友(1969-),男,四川资中人,在读博士,主要从事水稻遗传育种与分子生物学研究。E-mail: htysca@mail.china.com, Tel: 028-82710888。*通讯作者:李仕贵(1965-),男,四川阆中人,教授,博士生导师,主要从事水稻遗传育种与分子生物学的教学与科研工作。Tel: 028-82722661; Fax: 028-82726875; E-mail: lishigui-sc@263.net

Received(收稿日期): 2003-01-21, Accepted(接受日期): 2003-06-27.

分子标记辅助选择(Molecular Marker—Assisted Selection, MAS)对改良水稻白叶枯病抗性是一种快速有效的方法^[1~4]。*Xa21*是来源于长药野生稻(*Oryza longistaminata*)的显性广谱抗性基因,对目前水稻生产上常见的生理小种具有较强的抗性^[5];*Xa4*是一个不完全显性抗性基因,但能抵御我国大部分菌系^[1]。这两个基因已由国际水稻所聚合在 IRBB60 中,并已获得了它们的 PCR 标记^[5,6],这使用分子标记辅助选择成为可能。

蜀恢 527 是四川农业大学水稻研究所新育成的强恢复系。具有配合力高、米质优和抗稻瘟病等特点,已组配出系列高产优质组合,但由于不抗白叶枯病,限制了它的推广应用。我们以 IRBB60 为供体亲本,蜀恢 527 为轮回亲本,采用分子标记辅助与农艺性状选择相结合,将 *Xa21* 和 *Xa4* 聚合于蜀恢 527,并从 BC₃F₂ 世代中选出了 10 个抗稻白叶枯病的蜀恢 527 改良系^[7]。本研究对这 10 个蜀恢 527 改良系的遗传背景、稻白叶枯病的抗性和抗谱及田间农艺性状表现进行分析研究,以期进一步完善分子标记辅助育种方法,为选出最佳抗白叶枯病蜀恢 527 改良系提供依据。

1 材料与方法

1.1 植物材料和农艺性状调查

蜀恢 527、IRBB60、IR24(作为感病对照)、通过分子标记辅助选择获得的 10 个抗稻白叶枯病蜀恢 527 改良系^[7](以下简称改良恢复系)及其与不育系 G46A、D62A 分别配制的杂交组合(表 4、表 5 和表 6)。

2002 年春,10 个改良系和蜀恢 527 及其与不育系 G46A、D62A 所配制的杂交组合,按随机区组,3 次重复,每小区 5 行,每行 12 株,行距 27 cm,株距 17 cm,种植于四川农业大学水稻所温江实验场。土壤肥力均匀,田间管理相同于大田。成熟时,每小区去边行,取中间 5 株进行性状调查和室内考种,考察性状有:播抽期(d)、株高(cm)、千粒重(g)、每穗颖花数(朵)、每穗粒数(粒)、结实率(%)和产量(t/hm²)。所得数据在 SPSS 10.0 上进行方差分析,达显著水平者再进行 LSD 比较。

1.2 分子标记检测

1.2.1 抗性位点检测 用与 *Xa21* 和 *Xa4* 连锁的 PCR 引物对改良系的抗性位点进行检测。引物为

pTA248(与 *Xa21* 连锁),序列为 5'-GACCGGAGAAGGGTGGTCCCGAG3', 5'-GACCGGGTAATCGAAAGA TGAAA-3';MP12(与 *Xa4* 连锁),序列为 5'-ATCGATCGATCTTCACGAGG3', 5'-TGCTATAAAAGCATTCGGG3'。DNA 的提取,PCR 反应及产物检测根据文献[4]所述。

1.2.2 遗传背景分析 根据 Cornell 大学 SSR 图谱,选择 336 对 SSR 引物(每条染色体 28 对,覆盖水稻染色体 1691.7 cM)和 100 个 RAPD 引物进行背景分析。微卫星扩增方法参照文献[4]所述,RAPD 反应按 Operon Technologies. Inc 产品说明书进行。

1.3 抗病接种鉴定

蜀恢 527、IRBB60、IR24 和 10 个改良系于 2002 年春播种于四川农业大学水稻所温江的隔离田中,每个品种(或系)种植 1 行(10 株),随机区组,3 次重复。抗谱鉴定采用同株分蘖分组法(同一植株的不同分蘖上分别接种不同菌系小种)。所用菌系为菲律宾小种 P6、P1 和中国的 7 个病原型代表菌系 C ~ C'。菌液的准备按文献[8]所述。在分蘖盛期用人工剪叶法进行接种。接种后 20 d,当感病对照品种 IR24 的病情发展趋于稳定时,测量病斑占叶长度的百分率,并按病斑长度百分率分为 5 种水平:5%,高抗(HR);5%~10%,抗(R);10%~15%,中抗(MR);15%~30%,中感(MS);30%感病(S)。

2 结果与分析

2.1 改良系的抗性位点检测

用与 *Xa21* 和 *Xa4* 连锁的 PCR 引物 pTA248 和 MP12 对 10 个改良系的 PCR 分析表明,10 个株系在 *Xa21* 和 *Xa4* 位点均表现纯合(图 1)。在它们各自的后代中随机取 30 株进行 PCR 分析,也得到了相同的结果。另外,用与 *Xa21* 和 *Xa4* 对应的稻白叶枯菌系 P6 和 P1 接种鉴定 10 个改良恢复系的后代单株,均表现抗病(表 2)。表明改良系在 *Xa21* 和 *Xa4* 的标记位点和抗病基因位点纯合。

2.2 遗传背景分析

以 336 对 SSR 引物所检测的 DNA 位点结果表明,改良系与蜀恢 527 的位点相似率在 98.5% 以上,其中有 6 个株系只有 1~2 差异位点。从有差异的微卫星标记分析,第 1 染色体上的 RM9 和 RM302 在 8 个改良系中与蜀恢 527 出现差异。两个目标基因所在的 11 染色体上仅检测到 2 个株系在 RM202 位

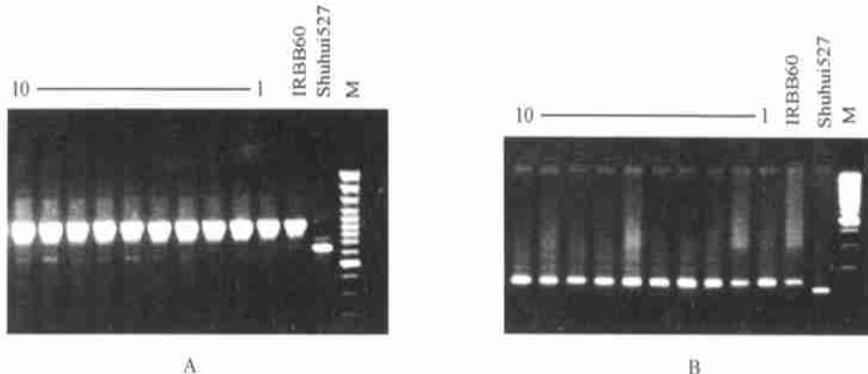


图1 亲本及10株改良系的PCR分析结果

Fig.1 PCR analysis of 10 improved restorative lines and their parents (Shuhui527 and IRBB60) with pTA248 (A) and MP12 (B)

A、B分别为pTA248和MP12扩增结果;1~10为10个改良系;M:100 bp ladder

M: 100 bp ladder; 1 - 10: 10 improved restorative lines

点有差异。RAPD检测结果的相似率为92.1%~97.5%。Line 1和Line 2的SSR和RAPD位点与蜀恢527差异较大,Line 4与蜀恢527仅有2个SSR位点差异,而RAPD位点差异较大。Line 3、Line 9和Line 10的遗传背景最接近蜀恢527,表明所获得的改良系除在抗病基因 $Xa21$ 和 $Xa4$ 位点不同外,其余位点基本与蜀恢527相同。

2.3 抗性及抗谱分析

改良系对稻白叶枯病的抗性及抗谱分析结果表明(表2),各个改良系和供体亲本IRBB60,均能抗本研究所用的9个菌系。用与 $Xa21$ 和 $Xa4$ 对应的菌系P6和P1接种鉴定,10个改良系均表现抗,而蜀恢527和IR24表现感,表明应用分子标记辅助选择已将 $Xa21$ 和 $Xa4$ 累加于蜀恢527中,且抗性强,抗谱较广。

2.4 改良抗病恢复系及其杂交稻组合的农艺性状表现

用SPSS 10.0对所得数据进行方差分析表明,考察的抗稻白叶枯病改良恢复系和蜀恢527以及与D62A所配制的相应组合的8个农艺性状均无显著差异(表3、表4),与冈46A所配组合,播抽期、株高、有效穗、每穗粒数和结实率5个性状的方差分析不显著,但是每穗颖花数和产量在区组间达0.05显著水平,千粒重则达0.01显著水平(表5)。进一步的LSD分析表明:G46A/Line 1、G46A/Line 2、G46A/Line 8的上述性状与冈优527(G46A/蜀恢527)相比差异达0.05显著水平。这与遗传背景分析中Line 1和Line 2与蜀恢527的DNA差异位点较多的结果吻合。因此,所得到的改良系除了抗性水平提高外,其余的优良性状与轮回亲本相比无显著差异,印证了上述

表1 遗传背景分析结果

Table 1 The results of genetic background analyzed using SSR and RAPD

品系 Line	SSR 分析 SSR analysis		RAPD 分析 RAPD analysis	
	不同位点/ 染色体 Differential loci/ Chromosomes	不同位点数 No. of differential locus	相同带数 No. of similar band	相似率 % of similarity
Line 1	RM9/1, RM180/7, RM281/8, RM302/1	4	432	92.1
Line 2	RM9/1, RM297/1, RM180/7, RM281/8, RM302/1	5	444	93.3
Line 3	RM302/1	1	460	96.0
Line 4	RM9/1, RM302/1	2	444	93.5
Line 5	RM9/1, RM297/1	2	455	96.4
Line 6	RM9/1, RM297/1, RM302/1	3	461	96.2
Line 7	RM9/1, RM202/11, RM302/1	3	452	94.4
Line 8	RM9/1, RM302/1	2	461	96.7
Line 9	RM202/11, RM302/1	2	463	97.5
Line 10	RM9/1, RM302/1	2	472	97.5

表2 改良恢复系和对照对供试菌系的反应

Table 2 The reactions and resistance spectrum to the 9 strains tested in the improved restoring lines and controls

品种/品系 Cultivar/line	抗性反应 Reactions of resistance to 9 strains of <i>Xoo</i>								
	P1	P6	C	C	C	C	C	C	C
IR24	S	S	S	S	S	S	S	S	S
527R	S	S	S	S	S	S	S	S	S
IRBB60	HR	HR	HR	HR	HR	HR	HR	HR	HR
Line 1	R	R	R	R	R	R	R	R	R
Line 2	R	R	R	R	R	R	R	R	R
Line 3	R	R	R	R	R	R	R	R	R
Line 4	R	R	R	R	R	R	R	R	R
Line 5	R	R	R	R	R	R	R	R	R
Line 6	R	R	R	R	R	R	R	R	R
Line 7	R	R	R	R	R	R	R	R	R
Line 8	R	R	R	R	R	R	R	R	R
Line 9	R	R	R	R	R	R	R	R	R
Line 10	R	R	R	R	R	R	R	R	R

Notes: R: Resistant; HR: High Resistant; S: Susceptible; MS: Middle Susceptible.

表3 改良恢复系及其对照的田间农艺性状表现

Table 3 Performance of agronomic traits of improved restoring lines and controls

改良系 Improved line	播抽期 Days to heading (d)	千粒重 1 000-grain weight (g)	株高 Plant height (cm)	有效穗 Panicles per plant	每穗颖花数 Spikelets per panicle	每穗粒数 Grains per panicle	结实率 Setting percentage (%)	产量 Yield (t/hm ²)
Shuhui 527(CK)	103	33.83	124.17	10.17	132.73	104.10	78.41	7.15
Line 1	101	33.22	127.30	9.00	119.56	102.00	85.23	8.06
Line 2	101	32.50	126.13	8.67	141.71	108.54	76.85	6.87
Line 3	101	32.89	124.60	9.73	132.62	100.76	76.49	7.16
Line 4	102	32.72	127.03	9.13	149.35	127.38	85.30	7.31
Line 5	101	32.67	126.57	8.47	148.38	115.39	77.44	7.28
Line 6	102	33.05	123.40	9.23	139.40	110.17	78.72	7.34
Line 7	101	33.45	121.37	8.47	92.62	74.71	80.66	7.62
Line 8	102	33.83	125.33	8.63	137.84	107.95	78.24	7.18
Line 9	102	33.89	124.13	9.40	144.49	121.21	83.70	6.99
Line 10	101	33.39	126.00	9.20	152.08	126.23	83.05	7.03

表4 改良恢复系与D62A所配组合及对照的农艺性状表现

Table 4 The agronomic traits of hybrid rice combinations of improved restoring lines crossed with D62A and controls

组合 Combination	播抽期 Days to heading (d)	千粒重 1 000-grain weight (g)	株高 Plant height (cm)	有效穗 Panicles per plant	每穗颖花数 Spikelets per panicle	每穗粒数 Grains per panicle	结实率 Setting percentage (%)	产量 Yield (t/hm ²)
D62A/ Shuhui 527(CK)	125	30.28	127.43	8.90	186.28	138.48	74.32	8.04
D62A/ Line 1	124	29.50	124.93	9.57	173.05	134.44	77.68	8.82
D62A/ Line 2	124	28.42	123.95	9.15	191.03	142.01	74.11	8.33
D62A/ Line 3	125	29.02	125.32	8.79	190.02	141.50	74.40	8.42
D62A/ Line 4	123	29.45	124.37	9.77	185.83	145.03	78.12	8.73
D62A/ Line 5	124	28.67	124.77	8.87	200.70	152.27	75.81	7.98
D62A/ Line 6	124	29.67	125.50	9.63	175.04	127.67	72.95	8.19
D62A/ Line 7	125	29.06	126.53	9.63	148.67	111.46	75.47	8.16
D62A/ Line 8	123	29.56	126.70	9.07	171.96	137.49	80.04	8.91
D62A/ Line 9	124	30.06	125.87	9.87	178.25	138.56	77.74	8.07
D62A/ Line 10	125	29.92	125.30	9.25	175.95	132.36	75.24	8.51

表5 改良系与G46A所配组合及对照的农艺性状表现

Table 5 The agronomic traits of hybrid rice combinations of improved restoring lines crossed with G46A and controls

组合 Combination	播抽期 Days to heading (d)	千粒重 ^{b)} 1 000-grain weight ^{b)} (g)	株高 Plant height (cm)	有效穗 Panicles per plant	每穗颖花数 ^{a)} Spikelets per panicle ^{a)}	每穗粒数 Grains per panicle	结实率 Setting percentage (%)	产量 ^{a)} Yield ^{a)} (t/hm ²)
G46A/ Shuhui 527(CK)	121	29.55	129.00	7.83	221.95	166.96	75.25	8.31
G46A/ Line 1	119	28.28 [*]	129.13	9.13	187.81 [*]	143.14	76.31	7.68
G46A/ Line 2	120	30.17	127.30	8.65	189.51 [*]	145.68	76.85	9.68 [*]
G46A/ Line 3	121	28.92	128.20	8.30	213.64	162.90	76.31	8.28
G46A/ Line 4	119	29.17	128.00	8.10	230.23	166.01	72.11	8.11
G46A/ Line 5	119	28.84	127.75	8.10	223.23	173.80	77.73	8.42
G46A/ Line 6	120	29.00	127.73	8.43	220.08	161.34	73.18	8.60
G46A/ Line 7	121	29.84	129.75	8.35	211.26	162.66	77.14	7.65
G46A/ Line 8	119	29.61	127.17	7.97	171.84 [*]	134.90	78.49	8.42
G46A/ Line 9	120	30.17	128.00	7.90	215.62	163.65	75.90	8.10
G46A/ Line 10	120	28.89	127.97	8.40	211.71	159.41	75.20	8.46

注:a), b) 分别表示0.05和0.01显著水平; *与对照的差异达0.05显著水平。

Notes:a), b) Significant at the level of 0.05 and 0.01, respectively; * Significant at the level of 0.05 compared to CK.

从分子水平上进行背景分析的结果。

3 讨论

在分子标记辅助育种过程中,许多研究者希望导入目的基因的DNA片段小,遗传背景更接近受体亲本,降低连锁累赘。本研究在用SSR进行背景分析时,与Xa21和Xa4位于同一染色体(第11染色体)的28个SSR标记,只有RM202位点在Line 7和Line 9与蜀恢527存在差异,其余标记及RM202在其他的抗性改良系均无差异。根据Cornell大学SSR图谱(<http://www.gramene.org>),与Xa21和Xa4相近的标记是RM21、RM254和RM139,它们在10个改良系中均无差异,表明Xa21和Xa4基因导入的片段可能性较小。另一方面,SSR和RAPD两种分析的结果均显示,改良系的遗传背景与蜀恢527的相似率较高,其中Line 9和Line 10最接近蜀恢527,农艺性状表现也与此吻合。但两种分析结果在单株上有一些差异。如SSR分析Line 3时,只检测到一个位点与蜀恢527有差异,在10个改良系中与蜀恢527的差异是最小的;但在RAPD分析时,Line 3与蜀恢527的相似率为96%,并不是差异最小的。其原因可能是所用方法不同,而导致检测的位点不同。此外,就检测的位点与水稻基因组相比,毕竟是很小的一部分,且控制许多农艺性状的基因大多为数量性状位点(QTLs),如果背景选择只仅仅根据实验室而不与田间选择结合,则应寻找与这些QTLs紧密连锁的标记,才能收到预期结果。

利用SSR分析背景时,第一染色体上的RM9和RM302位点在各改良系中几乎均与蜀恢527存在差异(表1)。从GenBank内调出它们所在的contigs,发现与RM302在同一个contig上共有20多个各种预测基因,另外与RM9有联系的contig有两个,它们与40多个基因有关。在上述基因中均没有发现与本研究所考察的农艺性状有直接关系的基因,或许这两个位点在基因组中是不表达的部分,或与所考察的农艺性状无多大的联系,或这两个位点与稻白叶枯病的抗性表达有关,均有待进一步探讨。

分子标记辅助选择改良水稻白叶枯病的抗病性,是一种有效的方法^[3,4,6,9],尤其是目标基因中的一个基因对另一个的效应有掩盖作用时,分子标记辅助选择显得更为有效^[3,4]。本研究在BC₃F₂得到了Xa21和Xa4累加系的纯合系(改良系),对改良

系的遗传背景、抗性和田间农艺性状及所配组合等方面的研究结果表明,抗病改良系除了抗性水平提高外,其余相同于轮回亲本的优良性状不变。用分子标记辅助选择获得的品系不存在生物的安全性,快速准确,便于推广。本实验所得的蜀恢527的抗白叶枯病改良系所配组合的产量有些甚至比对照还有所提高。可从中选出最优组合进行品比试验,以加速产业化。在此基础上,改良系配组杂交稻的多点试验、抗性水平及抗谱、在发病条件下的产量及米质变化和更大范围的配合力测定等研究均在进行中。

致 谢:中国科学院遗传和发育研究所赵显峰在接种鉴定时给予了帮助。

References

- Zhang Q(章琦). Utilization and strategy of resistance to rice bacterial blight in China. *Acta Phytophylacia Sinica* (植物保护学报), 1995, 22 (3): 241 - 246
- Khush G S, Mackill D J, Sidhu G S. Breeding rice for resistance to bacterial blight. IRRI Bacterial Blight of Rice. IRRI, Manila, Philippines, 1989. 207 - 217
- Singh S, Sidhu J S, Huang N, Vikal Y, Li Z, Brar D S, Dhaliwal H S, Khush G S. Pyramiding three bacterial blight resistance genes (xa5, xa13 and Xa21) using marker-assisted selection into indica rice cultivar PR106. *Theor Appl Genet*, 2001, 102: 1 011 - 1 015
- Kangle Zheng, Ning Huang, John Bennett, Gurdev S Khush. PCR-based marker-assisted selection in rice breeding, IRRI Discussion Paper Series No. 12. 1995. 1 - 24
- Khush G S, Bacalangco E Ogawa. A new gene for resistance to bacterial blight from *O. longistaminata*. *Rice Genet News*, 1990, 7:121 - 122
- Ma B-J (马伯军), Wang W-M (王文明), Zhao B (赵彬), Zhou Y-L (周永力), Zhu L-H (朱立煌), Zhai W-X (翟文学). Studies of PCR marker for rice bacterial blight resistance gene Xa4. *Hereditas (Beijing)* (遗传), 1999, 21 (3) : 9 - 12
- Huang T-Y(黄廷友), Li S-G(李仕贵), Wang Y-P(王玉平), Li H-Y(黎汉云). Accelerated improvement of bacterial blight resistance of 'Shuhui 527' using molecular marker-assisted selection. *Chinese Journal of Biotechnology*(生物工程学报), 2003, 19(2) :153 - 157
- Zhao X-F(赵显峰), Zhai W-X(翟文学), Li P(李平), Wang C-L(王春莲), Pan X-B(潘学彪), Qian Q(钱前), Li S-G(李仕贵), Zhu L-H(朱立煌). Field test and analyses of different Xa21-transgenic hybrid rice combinations. *Acta Agronomica Sinica*(作物学报), 2002, 28(4) : 521 - 529
- Chen Sheng, Lin X H, Xu C G, Zhang Qi Fa. Improvement of bacterial blight resistance to Minghui 63, an elite restorer line of hybrid rice, by molecular marker-assisted selection. *Crop Science*, 2000, 140: 239 - 244