

含白叶枯病抗性基因 *Xa23* 水稻恢复系的分子标记辅助选育

郑家团¹ 涂诗航¹ 张建福¹ 郑轶¹ 赵开军² 张水金¹ 谢华安^{1,*}

(¹福建省农业科学院 水稻研究所/农业部闽台农作物种质资源利用重点开放实验室/福州国家水稻改良分中心/福建省杂交水稻育种工程技术研究中心/福建省作物分子育种工程实验室, 福建 福州 350018; ²中国农业科学院 作物科学研究所, 北京 100081; * 通讯联系人, E-mail: huanxie@yahoo.com.cn)

Breeding of Restorer Lines of Hybrid Rice with Bacterial Blight Resistance Gene *Xa23* by Using Marker Assisted Selection

ZHENG Jia tuan¹, TU Shi hang¹, ZHANG Jian fu¹, ZHENG Yi¹, ZHAO Kai jun², ZHANG Shui jin¹, XIE Hua an^{1,*}

[¹ Rice Research Institute/Key Laboratory of Crop Germplasm Utilization between Fujian and Taiwan, Ministry of Agriculture/Chinese National Center for Rice Improvement (Fuzhou Branch)/Fujian Engineering and Technology Research Center of Hybrid Rice Breeding/Fujian Engineering Laboratory of Crop Molecular Breeding, Fujian Academy of Agricultural Sciences, Fuzhou 350018, China; ²Institute of Crop Sciences, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China; * Corresponding author, E-mail: huanxie@yahoo.com.cn]

Abstract: The bacterial blight resistance gene *Xa23* from a NIL CBB23 was introduced into a restorer line HK01, which is susceptible to bacterial blight, by crossing and marker assisted selection. Twelve homologous restorer lines with *Xa23* were obtained through testing the flanking marker C189. An elite restorer line (K10) with high resistance to bacterial blight and good restoring ability and high yield potential was selected.

Key words: hybrid rice; bacterial blight; marker-assisted selection; restorer line; resistance gene; breeding

摘要: 通过常规杂交育种技术和分子标记辅助选择技术,对携有白叶枯病抗性基因 *Xa23* 的亲本材料 CBB23 进行回交转育和农艺性状改良。通过分子标记辅助选择检测目的基因,快速获得了 12 份具有 *Xa23* 基因的恢复系稳定材料。采用白叶枯病菌株的专化强毒菌系 P6 对该 12 份材料进行室内接种鉴定,筛选出 1 份高抗白叶枯病的抗性新恢复系材料。应用 3 个不同的不育系对该恢复系进行测交,结果表明该恢复系具有良好的恢复性及产量潜力。

关键词: 杂交水稻; 白叶枯病; 分子标记辅助选择; 恢复系; 抗性基因; 育种

中图分类号: Q943; S511.035.1

文献标识码: A

文章编号: 1001-7216(2009)04-0437-03

水稻白叶枯病是由水稻黄单胞杆菌 (*Xanthomonas oryzae* pv. *oryza*, Xoo) 引起的一种全球性病害。一般病田损失 20% ~ 30%, 重病田损失 80%, 有的甚至颗粒无收^[1-3]。此病害在福建省每 3 ~ 5 年流行一次, 是福建省普遍发生且分布最广的一种细菌性病害。目前福建省大面积推广的水稻品种大多不抗白叶枯病, 用药防治效果差、成本高, 且严重污染环境。与发展新型高效、低毒的农药相比, 培育具有白叶枯病抗性基因的水稻新品种是控制水稻白叶枯病蔓延的一种更为经济、有效的途径。20 世纪 60 年代以来, 已鉴定出水稻白叶枯病抗性基因近 30 个^[4]。中国农业科学院作物科学研究所章琦等^[5] 鉴定出一个来自普通野生稻的白叶枯病抗性基因 *Xa23*, 其抗谱较广, 抗国内外 20 个白叶枯病鉴别菌株(抗菲律宾小种 1 ~ 10、中国致病型小种 1 ~ 7 和日本小种 1 ~ 3), 且完全显性, 全生育期抗病, 后又将 *Xa23* 转育到栽培稻中, 育成了近等基因系 CBB23。该基因在杂交稻白叶枯病抗性的改良上具有广阔的前景^[5-7]。本研究应用近等基因系 CBB23 对杂交水稻的骨干恢复系 HK01 进行遗传改良, 以期通过回交转育技术和分子标记辅助选择得到具有白叶枯病抗性基因 *Xa23* 的杂交水稻新恢复系。

1 材料与方 法

1.1 材 料

供体亲本 携有 *Xa23* 基因的近等基因系 CBB23(中国农

业科学院作物科学研究所提供); 受体亲本: 骨干恢复系 HK01。鉴定菌系: 专化强毒性菌系 P6(中国农业科学院作物科学研究所提供)。

1.2 试 验 方 法

1.2.1 田 间 试 验 与 技 术 路 线

以感白叶枯病恢复系 HK01 为受体亲本, 以 CBB23 为抗性基因供体亲本配制杂交组合, F₁ 自交, 以 HK01 为轮回亲本进行回交, 建立自交和回交分离群体。利用与抗性基因紧密连锁的 EST 分子标记 C189 对目的基因进行分子标记辅助选择, 获得含有目的基因的抗性单株。然后再分别进行自交、用恢复系 HK01 连续回交, 建立不同世代的分离群体。每个世代群体中均用选择标记进行选择, 最终获得含有目的基因 *Xa23* 的优良恢复系。

1.2.2 基 因 组 DNA 提 取 及 EST 标 记 引 物

基因组 DNA 的提取: 对于各世代材料, 均采用基因组

收稿日期: 2008-12-05; 修改稿收到日期: 2009-01-09。

基金项目: 国家科技支撑计划资助项目(2006BAD01A01); 国家 863 计划资助项目(2006AA100101); 福建省科技厅国家 863 计划项目配套经费资助项目(F2006AA100101); 福建省粮食作物育种重大专项资助项目(2008NZ0001); 福建省农业科学院科技创新团队建设基金资助项目(STIF-Y04)。

第一作者简介: 郑家团(1958-), 男, 研究员。

DNA 快速提取法提取叶片总 DNA^[8]。根据王春连等^[7]报道的标记序列 C189,由上海生工生物工程技术有限公司合成。EST 标记 C189 的正向引物序列为 5'-TAA GTT CTA CAT CGA CCC CA 3';反向引物序列为 5'-CAC ATG AAG AGC TGG AAA CG 3'。

1.2.3 PCR 反应体系及电泳

PCR 反应体积为 25 μ L,反应液组成如下:10 \times PCR 缓冲液 (100 mmol/L Tris HCl,pH 8.3,500 mmol/L KCl,0.1% Triton 100) 25 mmol/L MgCl₂,dNTP 2.5 mmol/L,每对引物 50 ng,50 ng 基因组 DNA,1 U Taq 酶。PCR 反应程序为:94 $^{\circ}$ C 下预变性 5 min,94 $^{\circ}$ C 下变性 1 min,58 $^{\circ}$ C 下退火 1 min,72 $^{\circ}$ C 下延伸 2 min,35 次循环;最后 72 $^{\circ}$ C 下延伸 10 min,4 $^{\circ}$ C 下保温。PCR 扩增产物在 1.0% 琼脂糖凝胶中电泳分离,并通过凝胶成像系统扫描记录结果。

1.2.4 接种与抗性分级标准

在水稻孕穗期采用剪叶法进行人工接种,具体操作方法为:用手术剪蘸取菌液剪去剑叶约 2 cm,按单株接种白叶枯病菌专化强毒菌系 P6,每株接种 5 张叶片。接种后 2~3 周,待对照发病充分后进行调查。根据方中达^[9]提出的抗性分级标准进行抗感划分和统计分析。

2 结果与分析

2.1 抗性基因连锁标记在抗感亲本间的多态性分析

利用与抗性基因 *Xa23* 紧密连锁的分子标记 C189,对基因的供体亲本 CBB23 与受体亲本 HK01 进行多态性分析。结果表明,CBB23 在约 750 bp 处出现扩增条带,而 HK01 则无扩增带出现(图 1),说明该标记可以有效地用于供体亲本和受体亲本的标记辅助选择。

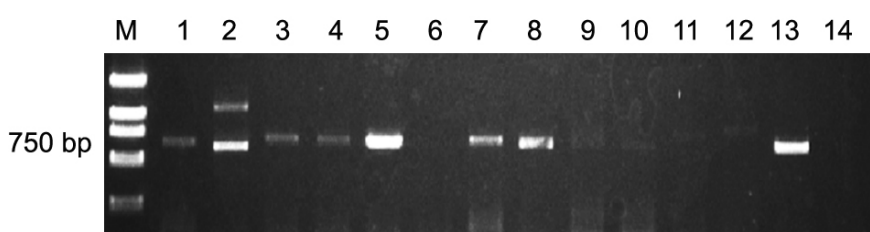


图 1 EST 标记 C189 对亲本及 F₂ 的扩增结果

Fig. 1 Amplification results of the parents and individuals of F₂ population by the EST marker C189.

M, DNA marker (DL2000); Lanes 1 to 12, F₂; Lane 13, CBB23; Lane 14, HK01.

表 1 杂交组合的产量构成因素

Table 1. Yield components of the crosses derived from the new restorer line K10.

组合 Cross	穗长 Panicle length /cm	每株穗数 Number of panicles per plant	结实率 Seed setting rate/%	千粒重 1000-grain weight/g
珍汕 97A/K10 Zhenshan 97A/K10	23.96 \pm 0.29	13.00 \pm 2.08	57.17 \pm 1.75	27.87 \pm 0.20**
-32A/K10	24.96 \pm 0.74**	15.09 \pm 0.77	71.23 \pm 0.32	27.47 \pm 0.29
福农 S/K10 Funong S/K10	25.79 \pm 0.37**	21.31 \pm 1.67**	72.44 \pm 1.06**	29.73 \pm 0.16**
汕优 63 Shanyou 63 (CK)	23.07 \pm 0.41	14.60 \pm 0.73	65.12 \pm 0.53	27.51 \pm 0.47

** 表示与对照 (汕优 63) 相比差异达 0.01 显著水平。

** Significant at 0.01 level, compared with CK.

2.2 目的基因的分子标记辅助选择

将 HK01 与 CBB23 杂交,收获 F₁ 单株,选择其中 3 个 F₁ 单株种子繁殖成 F₂ 分离群体。利用与抗性基因 *Xa23* 紧密连锁分子标记 C189 对 F₂ 植株 DNA 进行扩增(图 1),对在 750 bp 处出现扩增条带的单株进行挂牌标记。在 F₂ 群体选择农艺性状较好,且在 750 bp 处出现扩增条带的植株 150 株,种植成 F₃,再选择农艺性状一般但有扩增条带的植株与 HK01 回交。

2.3 植株抗病性检测

选择 12 份稳定地具有 *Xa23* 基因的高世代材料,在分蘖盛期用专化强毒菌系 P6 进行剪叶接种。结果筛选出 1 份编号为 K10 的高抗材料,其 35 株群体全部表现高抗。

2.4 杂交组合表现

用三系不育系珍汕 97A、-32A 和两系不育系福农 S 作母本,分别与 K10 配制杂交组合,于 2008 年 5 月将 F₁ 种于福建省沙县夏茂基地。实验按完全随机区组设计排列,3 次重复,每小区种植 5 行,每行 7 株。成熟时去除伪杂种,并随机抽取 3 株进行单株穗长、有效穗数、结实率、千粒重等 4 个性状的考查,结实率经反正弦平方根转换后进行统计分析。

从表 1 可以看出,K10 分别与珍汕 97A、-32A 及福农 S 测交,均表现出良好的恢复性能。组合福农 S/K10 在穗长、穗数、结实率和千粒重等性状上的表现,均优于对照汕优 63,达极显著水平;组合 -32A/K10 的穗长、每穗粒数和结实率也优于汕优 63,但穗数、结实率与对照相差不显著;与对照相比,组合珍汕 97A/K10 仅在千粒重上优于汕优 63,其他性状相差不显著。综上分析,K10 与两系不育系福农 S 具有较强的配合力,表明该恢复系在培育白叶枯病抗性杂交水稻组合上将有一定的应用价值。

3 讨论

分子标记辅助选择改良水稻白叶枯病的抗性,可以有目的地对杂交水稻恢复系进行改良,是一种有效的方法。中国水稻研究所利用回交和分子标记辅助选择相结合的方法,育成了两个携带广谱高抗白叶枯病基因 *Xa21* 的水稻恢复系 R8006 和 R1176,并配制出中优 6 号和中优 1176 等杂交组合^[10]。陈小荣等^[11]将 *Xa21* 基因成功导入水稻光(温)敏核不育系培矮 64S,获得抗性得到改良的转基因培矮 64S 不育系。安徽省农业科学院将 *Xa21* 导入明恢 63,育成了高抗白叶枯病的明恢 63^[12]。王春连等^[7]利用分子标记辅助选择

技术选育出 3 个携带 *Xa23* 基因的性状优良的恢复系。

分子标记辅助选择是一种利用与目的基因紧密连锁的分子标记,对目标性状进行间接选择的现代育种技术。该方法不仅可大大缩短育种年限,提高育种效率,而且还节约了大量的人力、物力和成本。因此,在实际育种工作中,利用分子标记辅助选择技术筛选具有抗病基因的单株显得非常重要。本研究利用分子标记辅助选择技术、表型选择与田间农艺性状选择相结合的方法,从 BC₂F₅ 获得了农艺性状相对较好,且高抗白叶枯病的改良恢复系 K10。该恢复系在培育白叶枯病抗性杂交水稻组合方面,将有一定的应用价值。

参考文献:

- [1] Lou S H . Rice Diseases . 2nd ed . Kew , England : Commonwealth Mycological Institute , 1985 .
- [2] Singh G P , Srivastava M K , Singh R V , et al . Variation and qualitative losses caused by bacterial blight in difference rice varieties . *Indian Phytopath* , 1997 , 30 : 180-185 .
- [3] 翟文学,朱立煌.水稻白叶枯病抗性基因的研究与分子育种.生物工程进展,1999,19(6):9-15.
- [4] 章琦.水稻白叶枯病抗性基因鉴定进展及其利用.中国水稻科学,2005,19(5):453-459.
- [5] 章琦,赵炳宇,赵开军,等.普通野生稻的抗水稻白叶枯病(*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*)基因 *Xa23*(t)的鉴定和分子标记定位.作物学报,2000,26(5):536-542.
- [6] Zhang Q , Wang C L , Zhao K J , et al . The effectiveness of advanced rice lines with new resistance gene *Xa23* to rice bacterial blight . *Rice Genet NewsL* , 2001 , 18 : 71-72 .
- [7] 王春连,戚华雄,潘海军,等.水稻抗白叶枯病基因 *Xa23* 的 EST 标记及其在分子育种上的利用.中国农业科学,2005,38(10):1996-2001.
- [8] 潘海军,王春连,赵开军,等.水稻抗白叶枯病基因 *Xa23* 的 PCR 分子标记定位及辅助选择.作物学报,2003,29(4):501-507.
- [9] 方中达.中国水稻白叶枯病菌致病类型的研究.植物病理学报,1990,20(2):81-87.
- [10] 曹立勇,庄杰云,占小登,等.抗白叶枯病杂交水稻的分子标记辅助育种.中国水稻科学,2003,17(2):184-186.
- [11] 陈小荣,钱海丰.转 *Xa21* 基因水稻培矮 64S 回交后代白叶枯病抗性与育性研究.中国水稻科学,2002,16(3):270-272.
- [12] 倪大虎,李莉,吴家道,等.利用分子标记改良水稻白叶枯病抗性的研究.安徽农业科学,2001,29(6):697-698.