

分子标记辅助选择改良蜀恢 527 对白叶枯病的抗性

黄廷友 李仕贵* 王玉平 黎汉云

(四川农业大学水稻研究所,成都 611130)

摘 要 以含抗性基因 *Xa21* 和 *Xa4* 的抗白叶枯病近等基因系 IRBB60 为供体亲本,以不抗白叶枯病强恢复系蜀恢 527 为轮回受体亲本,连续回交 3 代,自交 1 代,在分离世代用分别与 *Xa21* 和 *Xa4* 紧密连锁的标记 pTA248 和 MP12 对目标基因 *Xa21* 和 *Xa4* 进行辅助选择,直至 BC₃F₂。在 BC₃F₂ 中选出株型、粒型、播抽期等农艺性状与蜀恢 527 相似且 pTA248 和 MP12 的扩增带型纯合的 10 个单株,用 100 个 RAPD 和 120 对 SSR 引物进行背景选择,决选出 5 个单株,作为改良的蜀恢 527。抗性分析表明,这些改良的蜀恢 527 株系对我国菌系 C I -C VII 和来自菲律宾的 P₁ 和 P₆ 均表现抗性,说明抗性基因已成功导入蜀恢 527 中并表达。同时对 pTA248 和 MP12 在亲本间的多态性和选择的准确性也进行了分析,结果显示这两个标记在亲本间的多态性明显,共显性,选择的准确率分别在 97% 和 83% 以上,可以用其进行标记辅助选择。

关键词 *Xa21*, *Xa4*, 抗白叶枯病, 分子标记辅助选择, 抗性鉴定

中图分类号 Q78 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2003)02-0153-05

白叶枯病 (*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*, *Xoo*) 是水稻的重要病害之一,它导致水稻大幅度减产和产量不稳定,同时也影响稻米品质。防治白叶枯病最经济有效的措施是选育和种植抗病品种^[1-2]。分子标记辅助选择 (Molecular marker - assisted selection, MAS) 是直接利用与目标基因紧密连锁的分子标记对其进行选择,是一种高效的抗病育种方法^[2-6]。目前在水稻分子图谱上定位了 20 多个抗白叶枯病基因^[7-9],其中与 *Xa21* 和 *Xa4* 紧密连锁的 PCR 标记已经找到^[2,10]。这使得用分子标记辅助选择改良水稻白叶枯病的抗性成为可能。

本研究以抗白叶枯病水稻材料 IRBB60 为供体亲本,四川农业大学水稻研究所新育成的优质、高配合力、强恢复系蜀恢 527 为受体亲本,利用分子标记

辅助选择,将 *Xa21* 和 *Xa4* 导入蜀恢 527,达到改良其抗白叶枯病的目的。

1 材料与方 法

1.1 植物材料

蜀恢 527,四川农业大学水稻所新育成的优质、高配合力强恢复系,不抗白叶枯病;IRBB60,国际水稻所以 IR24 为背景育成的抗白叶枯病近等基因系 (NILs) (含 *Xa21*、*Xa4*、*xa5* 和 *xa13*) 及另外两个近等基因系 IRBB21 (含 *Xa21*) 和 IRBB4 (含 *Xa4*);IR24, 作为感病对照。

1.2 PCR 分析

1.2.1 *Xa21* 和 *Xa4* 特异性扩增引物 (表 1)

表 1 用于分子标记辅助选择的引物序列

Table 1 Sequence of markers for marker-assisted selection of resistance genes to *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (*Xoo*)

Marker	Chromosome	Primer sequence	Linked gene	Distance	Reference
pTA248	11	5' gacgcggaagggtggttcccagag3'	<i>Xa21</i>	0.0cM	Ronald <i>et al</i> 1992
		5' gacgcggtaatcgaaagatgaaa3'			
MP12	11	5' atcgcgatcttcacgagg3'	<i>Xa4</i>	—	MA B J <i>et al</i> 1999
		5' tgctataaaaggcaltcggg3'			

Note: cM, centimorgan

收稿日期: 2002-10-09, 修回日期: 2002-12-22。

基金项目: 国家 863 高技术发展与研究计划项目 (No. 2001AA211081) 和教育部优秀博士论文基金 (No. 2000054)。

* 通讯作者。 Tel: 86-28-82722661, Fax: 86-28-82726875, E-mail: lishig@263.net

1.2.2 遗传背景选择 根据 Cornell 大学 SSR 图谱, 从每条染色体上选 10 对 SSR 引物(覆盖水稻染色体 1691.7cM)和 100 个 RAPD 引物(OPG、OPJ、OPL、OPR 和 OPT 序列)进行背景分析。

1.2.3 DNA 的提取,PCR 扩增: DNA 的提取,SSR 反应及产物的检测按文献[2]所述。RAPD 反应按 Operon Technologies, Inc 产品说明书进行。

1.3 分子标记辅助选择程序

1.3.1 pTA248 和 MP12 选择的准确性分析: 为了确定分别与 *Xa21* 和 *Xa4* 紧密连锁的 PCR 引物 pTA248 和 MP12 选择的准确性,分别配制组合(蜀恢 527 × IRBB21)和(蜀恢 527 × IRBB4)。在 F_2 群体中,用上述标记分析其单株的基因型,然后套袋自交。在 F_3 代株系中,分别用相应的鉴别菌系 P_6 和 P_1 进行鉴定,根据抗感分离,推断 F_2 的基因型,确定标记选择的准确性。

1.3.2 选择程序: 用 IRBB60 与蜀恢 527 配制杂交组合,以蜀恢 527 作轮回亲本,连续回交。在回交分离世代进行分子标记辅助选择。选择的步骤:首先,按株型、叶色和播抽期选择与蜀恢 527 相似的单株;再用 MP12 和 pTA248 扩增入选单株,选择含 IRBB60 带型的单株,最后,从株高、播抽期和粒型等农艺性状上,决选与蜀恢 527 相似的单株,继续与蜀恢 527 回交,直至 BC_3F_2 。在 BC_3F_2 中,用 100 个随机引物和 120 对 SSR 引物对 MP12 和 pTA248 扩增带型纯合且农艺性状与蜀恢 527 相似的单株进行背景分析。进一步对决选株系作抗谱和抗性分析。

1.4 白叶枯菌系接种及抗性分析

用我国的 7 个代表菌系 C I -C VII 和来自菲律宾的 P_1 和 P_6 , 分析决选株系的抗谱和抗性水平。接种前将保存的菌种在 PSA 培养基上复壮,并于鉴别品

种上测试毒力。将毒力稳定的菌种在 PSA 上于 28℃ 培养 48h,用灭菌蒸馏水配制成 1×10^9 cell/mL 的菌悬液用以接种。采用人工剪叶法在分蘖盛期接种,每株接种 5~6 张叶片。抗谱分析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)进行。接种在四川农业大学实验场隔离的田块中进行。接种后 20d 左右,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: $\leq 5\%$ 高抗(HR); 5%~10%, 抗(R); 10%~15%, 中抗(MR); 15%~30%, 中感(MS); $\geq 30\%$ 感病(S)。

2 结果与分析

2.1 pTA248 和 MP12 在亲本和群体间的多态性及选择的准确性

pTA248 和 MP12 的扩增带型在蜀恢 527、IRBB60、IRBB21 和 IRBB4 之间均存在明显的多态性(图 1 2),其中 pTA248 在 IRBB60 和 IRBB21 中扩增带相同,约 1000bp,在蜀恢 527 的扩增片段约 700bp。MP12 在 IRBB60 和 IRBB4 中扩增带相同,且与蜀恢 527 存在明显差异。这两个标记分别在(蜀恢 527 × IRBB21)和(蜀恢 527 × IRBB4)的 F_2 群体中均出现 3 种带型:抗病亲本带(AA 或 BB),杂合带型(Aa 或 Bb)及和蜀恢 527 相同的带型(aa 或 bb),在检测的 96 个单株中,AA:Aa:aa 为 22:54:20($\chi^2 = 1.58$),BB:Bb:bb 为 30:38:28($\chi^2 = 8.91$)。经卡方检测,均符合 1:2:1 的理论比。表明这两个标记为共显性。

pTA248 对 *Xa21* 选择的准确性在 97% 以上,而 MP12 对 *Xa4* 的准确性在 83.3% 以上(表 2)。影响选择的准确率,除了标记与基因存在一定的交换外,接种鉴定的误差也是一个重要原因。

表 2 pTA248 和 MP12 选择的准确性

Table 2 Accuracy of marker-assisted selection for the resistance gene, *Xa21* and *Xa4*, based on marker genotypes (pTA248 for *Xa21* and MP12 for *Xa4*) verified by F_3 progeny testing

F ₂ plants		No. of F ₃ families with each resistant phenotype*				Recombinant value
Marker genotype	No.	RR	Rr	rr	Accuracy/%	
<i>Xa21</i>	AA	25	25	0	0	100
	Aa	70	2	68	0	97.1
	aa	35	0	0	35	100
<i>Xa4</i>	BB	24	20	4	0	83.3
	Bb	56	5	51	0	94.4
	bb	50	0	6	44	88.0

AA, Genotype of the resistant line IRBB21; Aa, Heterozygous; aa, Genotype of Shuhui527; BB, Genotype of the resistant line IRBB4; Bb, heterozygous; bb,

Genotype of Shuhui527; * RR, Homozygous resistant; Rr, Heterozygous; rr, Homozygous susceptible

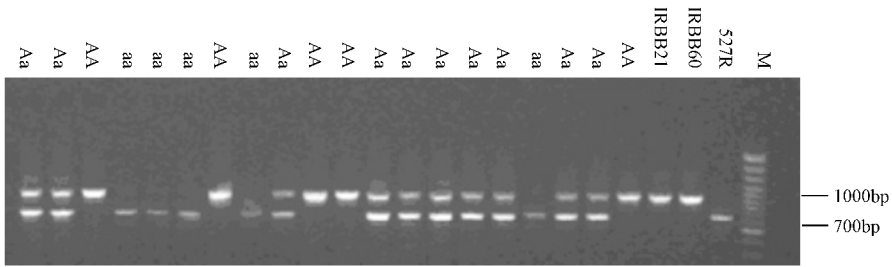


图 1 pTA248 在蜀恢 527、IRBB60、IRBB21 间的多态性和在(蜀恢 527 × IRBB21)的 F₂ 群体中的分离

Fig.1 Polymorphism of pTA248 in Shuhui527, IRBB60, IRBB21 and Segregation in F₂ population from the cross of (Shuhui527 × IRBB21)

AA. The genotype of resistant parent ; Aa. Heterozygenotype ; aa. The genotype of Shuhui527 ; M. 100bp ladder

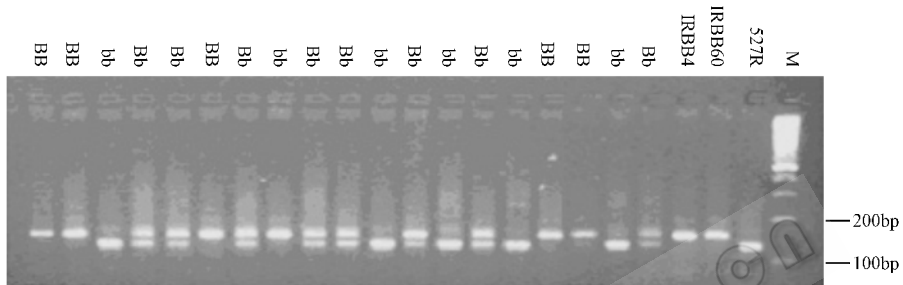


图 2 MP12 在蜀恢 527、IRBB60、IRBB4 间多态性和在(蜀恢 527 × IRBB4)的 F₂ 群体中的分离

Fig.2 Polymorphism of MP12 in Shuhui527, IRBB60, IRBB4 and Segregation in F₂ population from the cross of (Shuhui527 × IRBB4)

BB. The genotype of resistant parent ; Bb. Heterozygenotype ; bb. The genotype of Shuhui527 ; M. 100bp ladder

2.2 选择结果分析

2.2.1 目的基因的选择:在(蜀恢 527 × IRBB60)的 BC₁F₁ 中,从田间选 300 株,经 PCR 扩增,选得 40 株含 Aa 和 Bb 带型的单株。从株高、叶型、粒型和播抽期等农艺性状选择与蜀恢 527 最相似的单株作为回交亲本与蜀恢 527 进行回交得 BC₂F₁。对 BC₂F₁、BC₃F₁ 也按同样的方法进行选择,得到含 Aa 和 Bb 带型的单株均为 40 株。在入选的 BC₃F₁ 中,选与蜀恢 527 最相似的单株自交,得 BC₃F₂。从 500 株 BC₃F₂ 中,经分子标记和田间农艺性状的选择,得到 20 株 AA 和 BB 带型的单株。

2.2.2 遗传背景筛选:在 BC₃F₂ 选出的 20 株 AA 和 BB 带型的植株中,从株高、叶型、粒型和播抽期决选与蜀恢 527 相似的 10 个单株,用 100 个随机引物和 120 对 SSR 引物进行背景分析表明,决选的 10 株与蜀恢 527 的遗传背景相同率分别在 92.1% ~ 97.5% 和 96.7% ~ 99.2%(表 3)。其中 5、6、8、9、10 单株在遗传背景和农艺性状与蜀恢 527 更相似,作为改良的蜀恢 527,暂命名为改良蜀恢 527R-5、527R-6、527R-8、527R-9 和 527R-10。

2.3 抗性水平和抗性分析

白叶枯病接种鉴定表明(结果见表 4),感病对照 IR24 及蜀恢 527R 对本实验所用的 9 个菌系的病

斑长度百分比大于 15%,表现中感或感。IRBB4 对 P₀ 和 C IV 菌系表现感,这与 Xa4 的抗谱是一致的^[9]。IRBB60、IRBB21 及所选的 5 个株系对本实验所用的 9 个菌系均表现抗性。说明抗性基因已被导入到感病的蜀恢 527 中,且在其遗传背景下保留了对白叶枯病的广谱抗性。

表 3 背景选择的结果

Table 3 The results of background selection

Plant	Background selection by SSR		Background selection by RAPD	
	No. of similar loci	Percent of similarity/%	No. of similar band	Percent of similarity/%
1	117	97.5	432	92.1
2	116	96.7	444	93.3
3	118	98.3	460	96.0
4	117	97.5	444	93.5
5	118	98.3	455	96.4
6	118	98.3	461	96.2
7	116	96.7	452	94.4
8	118	98.3	461	96.7
9	119	99.2	463	97.5
10	118	98.3	472	97.5

表 4 改良蜀恢 527 及亲本和对照的抗性表现

Table 4 Resistance spectrum of parental and lines marker-assisted selected and controls to Xoo races C I -C VII from China and P1 and P6 from Philippines

Varieties and lines	Resistant level to 9 Xoo races or pathotypes								
	P ₁	P ₆	C I	C II	C III	C IV	C V	C VI	C VII
IR24	S	S	S	S	S	S	S	S	S
527R	MS	S	S	S	S	S	S	S	S
IRBB60	HR	HR	HR	HR	HR	HR	HR	HR	HR
IRBB21	HR	HR	HR	HR	HR	HR	HR	HR	HR
IRBB4	R	S	R	R	R	S	R	R	R
527R - 5	R	R	R	R	R	R	R	R	R
527R - 6	R	R	R	R	R	R	R	R	R
527R - 8	R	R	R	R	R	R	R	R	R
527R - 9	R	R	R	R	R	R	R	R	R
527R - 10	R	R	R	R	R	R	R	R	R

R. Resistant ; HR. High resistant ; S. Susceptible ; MS. Middle susceptible

3 讨 论

由 *Xanthomonas oryzae* pv. *Oryzae* 引起的稻白叶枯病是水稻最严重的病害之一,在我国稻区,每年均有不同程度的发生,给水稻生产带来严重的损失。培育和种植抗病品种是最经济有效的方法^[1,2]。传统的抗病育种,在每一代经过田间抗性鉴定,不仅费时、费力,而且还存在发病条件、基因的上位性和表达时间许多限制因素,影响育种的效率。分子标记辅助选择,一方面,可对目标基因进行有效追踪;另一方面,可选出在遗传背景上与轮回亲本相似的单株,减少盲目性,加速育种进程。本研究用分子标记辅助选择,经一次杂交、三次回交和一次自交及一次田间接种鉴定,就选出了携带 *Xa21* 和 *Xa4* 且遗传背景与蜀恢 527 相似的改良恢复系。与传统育种方法相比,提高了育种效率。在聚合多个基因的育种中,尤其是当一个基因对另一个基因的遗传效应具有掩盖作用时,要达到将它们累加的目的,是相当困难的。分子标记辅助选择则可快速将多个基因累加在一个品系中,达到改良其抗性的目的^[3,4,6]。本实验用分子标记辅助选择,将具有掩盖效应的抗性基因 *Xa21* 和 *Xa4* 导入蜀恢 527 中(*Xa21* 对 *Xa4* 的遗传效应具有掩盖作用^[1]) ,达到了改良其抗白叶枯病的目的,获得改良系的遗传背景与蜀恢 527 相似且已纯合,如用传统方法则十分困难。

标记选择的准确性是 MAS 的一个重要方面。一般而言,各标记与目标基因间均有一定的交换值,甚至在不同的背景下其值也不一样^[10-12]。在本研究中,各标记与目标基因间存在的交换值是影响选择准确性的一个重要原因之一,其中 pTA248 对 *Xa21* 和 MP12 对 *Xa4* 选择的准确率分别为 97.1%

~ 100% 和 83.3% ~ 94.4%。MAS 是辅助手段,在低世代中要选择大量的单株和株系,随着世代的增加逐渐淘汰非目标材料,且经 MAS 选得的材料,最终要经过田间的鉴定,这样在多世代的选择中,可以逐步剔除由于 MAS 的不准确性而混进的非目标材料,同时也不至于丢失目标基因,所以,对选择准确性可允许的范围较大。育种中,可利用的分子标记较多。对目标基因进行选择,PCR 标记最佳;背景分析,SSR 标记可以确定差异的位点,但多态性较低,RAPD 多态性较高,但不能确定差异位点。还有其它方法如 RFLP、AFLP 等,应根据情况灵活选用。

将多个抗性基因聚合在一个品系中,由于基因间的相互作用,其抗性增强、抗谱拓宽,从而延长品种(系)的持久抗性^[1,3,4,7,13,14]。本研究将 *Xa21* 和 *Xa4* 导入蜀恢 527 中,所得改良株系对 9 个白叶枯菌系表现抗性,其抗性的持久性和抗性水平在进一步的研究之中。

致谢:对本所王宁霞老师和中国科学院遗传研究所赵显峰在白叶枯菌的接种方面给予的帮助表示谢意!

REFERENCES (参考文献)

- [1] Sanchez A C, Bar D S, Huang N *et al.* Sequence tagged site marker-assisted selection for three bacterial blight resistance genes in rice. *Crop Science*, 2000, **40**: 792 - 797
- [2] Zheng Kangle, Huang Ning, Bennett John *et al.* PCR-based marker-assisted selection in rice breeding. IRRI Dissision Paper, Series No. 12. 1995
- [3] Hittalmani S, Parco A, Mew T V *et al.* Fine mapping and DNA marker-assisted pyramiding of the three major genes for blast resistance in rice. *Theor Appl Genet*, 2000, **100**: 1121 - 1128

- resistance gene in rice :marker-assisted selection using RFLP and PCR. *TAG* ,1997 ,**95** 313 – 320
- [5] Chen Sheng ,Lin X H ,Xu C G *et al.* Improvement of Bacterial Blight Resistance of “ Minghui63 ” ,an Elite Restorer Line of Hybrid Rice ,By Molecular Marker-Assisted Selection. *Crop Science* ,2000 ,**40** :239 – 244
- [6] Singh J ,Sidhu S ,Huang N *et al.* Pyramiding three bacterial blight resistance genes(*Xa5* ,*Xa13* and *Xa21*)using marker-assisted selection into indica rice cultivar PR106. *TAG* 2001 (102) :1011 – 1015
- [7] ZHANG Q(章琦) ,ZHAO B Y(赵炳宇) ,ZHAO K J(赵开军) *et al.* Identification and mapping a new gene *Xa23* for resistance to bacterial blight from *O. rufipogon* . *Acta Agronomica Sinica*(作物学报) ,2000 ,**26**(5) 536 – 542
- [8] GAO D Y(高东迎) ,XIANG Y H(向阳海) ,SUN L H(孙立华) *et al.* RAPD analysis of a new resistance gene *Xa25* (1) to rice bacterial blight. *Chinese J Rice Sci*(中国水稻科学) ,2002 ,**16**(2) :179 – 181
- [9] Inoshita T Report of the committee on gene symbolization ,nomenclature and linkage groups. *Rice Geneti Newslett* ,1995 ,**12** 9 – 153
- [10] MA B J(马伯军) ,WANG W M(王文明) ,ZHAO B(赵彬) *et al.* Studies of PCR Marker for the Rice Bacterial blight Resistance Gene *Xa4* . *Hereditas*(遗传) ,1999 ,**21**(3) 9 – 12
- [11] WAN B L(万丙良) ,YANG G C(杨国才) ,CHEN Z J(陈志军) *et al.* Breeding rice resistance to Bacterial Blight with PCR marker *Xa21* gene. *Journal of Huazhong Agricultural University*(华中农业大学学报) 2001 ,**20**(4) 310 – 313
- [12] 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**(30) 26 – 36
- [13] ZHENG K I(郑康乐) ,ZHUANG J Y(庄杰云) ,WANG H R(王红容) .Performance of resistance gene pyramids to races of rice bacterial blight in Zhejiang Province. *Hereditas*(遗传) ,1998 ,**20**(4) :4 – 6
- [14] XU J L(徐建龙) ,LIN Y Z(林贻滋) ,WENG J P(翁锦屏) *et al.* Covergence of resistance genes to bacterial blight in rice and its genetic effect. *Acta Agronomica Sinica*(作物学报) ,1996 ,**22**(2) :129 – 134

Accelerated Improvement of Bacterial Blight Resistance of ‘ Shuhui527 ’ Using Molecular Marker-assisted Selection

HUANG Ting-You LI Shi-Gui* WANG Yu-Ping LI Han-Yun

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

Abstract ‘ Shuhui527 ’ is a promising restorer line bred by Rice Research Institute of Sichuan Agricultural University in recent years. However, this line is susceptible to Bacterial Blight (BB) ,which limits its use. The IRBB60 from the International Rice Research Institute (IRRI) , contains dominant genes *Xa21* and *Xa4* conferring resistance to BB. The objective of this study is to improve the BB resistance of ‘ Shuhui527 ’ by introgressing *Xa21* and *Xa4* , the two broad-spectrum BB resistance genes , into ‘ Shuhui527 ’ with IRBB60 as the donor , pTA248 and MP12 , linking tightly with *Xa21* and *Xa4* respectively as DNA markers. BC₁F₁ progenies of (Shuhui527 × IRBB60) , containing *Xa21* and *Xa4* identified using PCR screening and with agronomic traits including plant type ,grain type and days to heading etc similar to those of ‘ Shuhui527 ’ , were subsequently backcrossed to ‘ Shuhui527 ’ and self-pollinated to generate BC₂F₁ and BC₁F₂ . The BC₃F₁ and BC₃F₂ were subsequently developed using the same approach. Among the 20 BC₃F₂ plants , homozygous *Xa21* and *Xa4* , 10 plants were the most similar to ‘ Shuhui527 ’ in the agronomic traits , and were screened using 120 pairs SSR and 100 pairs RAPD markers. Based on the results of the background screening and the performance of the agronomic traits 5 plants were identified as improved- ‘ Shuhui527 ’ and designated as 527R-5 , 527R-6 , 527R-8 , 527R-9 and 527R-10. The improved- ‘ Shuhui527 ’ lines expressed high resistance to *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (*Xoo*) stains C I – C VII , P₁ and P₆ . The evaluation of the polymorphisms and selection accuracies of pTA248 and MP12 demonstrated that the polymorphisms of the two markers were obvious and co-dominant and the accuracies were more than 97% and 83% respectively , indicating the two markers are good for *Xa21* and *Xa4* in Molecular Marker-assisted Selection.

Key words *Xa21* , *Xa4* , bacterial blight resistance , molecular marker-assisted selection (MAS) , resistance evaluation

Received : 10-09-2002

This work was supported by a Grant from State “ 863 ” Project and Foundation of Excellent Doctorial Dissertation ,Educational Administration ,PRC.

* Corresponding author. Tel : 86-28-82722661 ; Fax : 86-28-82726875 ; E-mail : lishigui-sc@263.net

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>