

doi: 10.7668/hbxb.2014.06.021

利用 MAS 技术培育高抗稻瘟病的 杂交水稻恢复系航恢 1173

孙大元¹, 周丹华¹, 肖武名¹, 杨祁云², 王 慧¹, 张建国¹, 陈志强¹

(1. 国家植物航天育种工程技术研究中心, 华南农业大学, 广东 广州 510642; 2. 广东省农业科学院 植物保护研究所, 广东省植物保护新技术重点实验室, 广东 广州 510640)

摘要: 通过回交及自交, 并结合分子标记辅助选择, 将广谱抗源 H4 的一个主效抗稻瘟病基因 *Pi46* 导入到优良恢复系航恢 173 中, 并在 BC₂F₄ 群体中选育到一个株叶形态较好的株系, 暂命名为航恢 1173。分析结果表明, 航恢 1173 比航恢 173 的抗谱得以明显拓宽, 并无显著的农艺性状差异, 且所配杂交组合的抗性也得到显著的提高。

关键词: 稻瘟病; 恢复系; 分子标记辅助选择

中图分类号: Q78 文献标识码: A 文章编号: 1000-7091(2014)06-0121-05

MAS Breeding of Hanghui 1173 a Blast-resistant Rice Restoring Line of Hybrid Rice

SUN Da-yuan¹, ZHOU Dan-hua¹, XIAO Wu-ming¹, YANG Qi-yun², WANG Hui¹,
ZHANG Jian-guo¹, CHEN Zhi-qiang¹

(1. National Engineering Research Center of Plant Space Breeding, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China; 2. Plant Protection Research Institute, Guangdong Academy of Agricultural Sciences, Guangdong Provincial Key Laboratory of High Technology for Plant Protection, Guangzhou 510640, China)

Abstract: Cultivar Hanghui 173 is the restorer line, a parent for a number of hybrids in our research group. However, cultivar Hanghui 173 is highly susceptible to rice blast. In this study, a rice blast resistance gene *Pi46* was introgressed to improve the blast resistance and amylose content of Hanghui 173 and its derived hybrids, by marker-assisted selection (MAS). Our results showed that the improved Hanghui 1173 conferred a broad spectrum resistance and showed stable panicle blast resistance for five at natural blast nursery. The result of examining agronomic traits showed that the improved Hanghui 1173 and its hybrids were similar to controls.

Key words: Rice blast; Restorer; Marker-assisted selection

由稻瘟病菌 (*Magnaporthe oryzae*) 引起的稻瘟病是水稻的主要病害之一, 对水稻生产危害极大^[1]。在病害爆发年份里, 一般可造成产量损失 10% ~ 50%, 少数田块甚至绝收, 同时严重影响稻米品质^[2]。近几年, 西南、长江中游和东北等稻区持续大流行, 年发病面积达 330 ~ 570 万 hm², 损失稻谷数亿 kg, 给我国的粮食安全带来隐患^[3]。目前, 培育和种植抗病品种是防治该病害最有效和最安全的措施, 但由于稻瘟病菌生理小种遗传复杂性及易变性, 普通抗病品种往往种植 3 ~ 5 年后就易丧失抗

性^[4]。因此, 选用具有广谱、持久抗性的新抗源, 延长抗瘟品种的生命成为抗病育种的最经济有效的策略。

自 20 世纪 60 年代中期, 日本率先开展了水稻稻瘟病抗性遗传的系统性研究。目前, 已至少报道了 64 个抗稻瘟病位点共 78 个主效基因 (http://www.ricedata.cn/gene/gene_pi.htm)。

这些基因成簇地分布于除第 3 染色体外的所有水稻染色体上 (2 个隐性, 其他显性), 其中, *Pb1*、*Pia*、*Pib*、*Pid2*、*Pid3*、*Pik*、*Pik-h/Pi54*、*Pik-m*、*Pik-p*、*Pish*、*Pit*、*Pita*、*Piz-t*、*Pi1*、*Pi2*、*Pi5*、*Pi9*、*pi21*、*Pi25*、

收稿日期: 2014-09-06

基金项目: “十二五”国家“863”计划项目 (2012AA101201); 广东省农业科技研究团队项目 (20110203); 国家和广东省现代农业产业技术体系建设专项资金项目; 广东省自然科学基金重点项目 (S2011020001513)

作者简介: 孙大元 (1984-), 男, 河南信阳人, 博士, 主要从事水稻遗传育种研究。

通讯作者: 杨祁云 (1966-), 女, 广东揭阳人, 研究员, 主要从事水稻病害相关研究。

陈志强 (1956-), 男, 广东揭阳人, 教授, 硕士, 主要从事水稻遗传育种相关研究。

Pi36、*Pi37*、*Pi50*、*Pi56* 这 23 个基因已被成功克隆 (*Pi2*、*Pi9*、*Piz-t* 和 *Pi50* 同为 *Piz* 位点上的复等位基因; *Pi1*、*Pik-h*/*Pi54*、*Pik-m*、*Pik-p* 同为 *Pik* 位点上的复等位基因; *Pid3* 与 *Pi25* 等位), 这些抗病基因的鉴定与克隆为稻瘟病抗病分子育种奠定了基础。近年来, 水稻稻瘟病抗病分子育种取得了一定的进展。金素娟等^[5] 将 *Pi-1* 基因导入 GD-8S 中; 杨杰等^[6] 利用 *Pita* 和 *Pib* 基因的功能标记, 检测和分析了我国 115 份水稻地方品种的 *Pita* 和 *Pib* 基因型; 靳春鹏等^[7] 利用与 6 个抗病基因连锁的分子标记检测了吉林省水稻品种中抗性基因的分布情况; 王金明等^[8] 利用分子标记获得 *Pi40* 和 *Pib* 的聚合材料。与传统抗病育种相结合, 这些利用分子标记辅助选择技术育成的改良株系的稻瘟病抗性均有明显的提高。

在杂交育种中, 不育系和恢复系的选择是配置强优势杂交组合的关键环节, 相对于不育系的选育, 恢复系的选育具有周期短成效快的特点^[9]。因此, 以恢复系为着手点, 选育高抗稻瘟病的恢复系对于培育抗病优质杂交稻, 减少农药使用, 保护农业生态环境具有重要的意义^[9]。本研究选用一个对稻瘟病具有广谱抗性的籼型常规品系 H4 作为抗病基因的供体亲本, 以国家植物航天育种工程技术研究中心选育的感稻瘟病的优良三系恢复系航恢 173 为受体, 通过杂交、多次回交和自交, 及结合分子标记辅助选择, 拟将抗病基因 *Pi46* 导入航恢 173 中, 培育高抗稻瘟病的恢复系, 为进一步选育抗病优质的杂交稻新组合奠定良好的材料基础。

1 材料和方法

1.1 试验材料

稻瘟病抗病基因 *Pi46* 供体材料为空间诱变籼稻品系 H4; 水稻受体材料为本研究课题组培育的籼型三系恢复系航恢 173; 野败型籼稻三系不育系天丰 A 来自广东省农科院水稻所, 新质 Y 型籼稻三系不育系华农 A 来自华南农业大学农学院, 籼型光温敏两系核不育系培矮 64S 来自湖南杂交水稻研究中心。

1.2 分子标记

与稻瘟病抗病基因 *Pi46* 紧密连锁的 SSR 分子标记为 RM224^[10]; 与育性恢复基因 *Rf3* 紧密连锁的 SSR 标记为 RM1 和 RM10338, 与 *Rf4/Rf1* 紧密连锁的 SSR 标记为 RM3510、RM1108、RM258 和 RM304。

1.3 基因检测方法

水稻幼嫩叶片 DNA 的提取采用改良的简易 CTAB 抽提法。引物序列由上海生工生物工程技术有限公司合成。PCR 反应主要在 PE 公司 9700 型

热循环仪上进行; 20 μ L PCR 反应体系中含有 1.0 μ L 的 DNA 溶液, 20 μ L 的 10 \times PCR Buffer, 0.3 μ L 的 10 mol/L dNTPs, 10 μ mol/L 的正负引物各 0.8 μ L, 0.2 μ L *Taq* DNA 聚合酶 (5 U/ μ L), 其余由 ddH₂O 补足。反应程序: 94 $^{\circ}$ C 预变性 3 min; 94 $^{\circ}$ C 30 s, 55 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 45 s, 35 个循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min。扩增产物在 8% 的非变性聚丙烯酰胺凝胶中电泳, 快速银染法染色观察。

1.4 遗传背景分析

用于遗传背景分析的 408 对 SSR 引物由上海生工生物工程技术服务有限公司合成。首先对亲本 H4 和航恢 173 进行多态性分析, 然后利用亲本之间具有多态性的引物对改良株系进行遗传背景分析。回复率估算采用 Hospital 等^[11] 提出的方法:

$G_{(g)} = [L + X_{(g)}] / (2L)$, 其中 $G_{(g)}$ 为在 g 代的遗传背景回复率; $X_{(g)}$ 为在回交 g 代表现为轮回亲本带型的分子标记数量; L 为所分析的分子标记的数量。

理论上的遗传背景回复率计算: $G_{(g)} = 1 - (1/2)^{(g+1)}$, 其中 g 为回交世代。

1.5 稻瘟病抗性鉴定

人工接种鉴定: 催芽后将水稻种子播于秧盘中, 每个材料播 1 盘, 均设有抗、感对照, 播种 7 d 后接种菌株, 选用广东省有代表性的稻瘟病优势菌系 36 个用于接种, 接种 7 d 后调查抗性表现^[12]。

自然病圃鉴定: 选择广东省粤北稻作区的从化吕田稻瘟病鉴定圃, 叶瘟和穗颈瘟的调查按国际水稻研究所的分级标准^[13]。

2 结果与分析

2.1 目标基因的分子标记辅助选择

以航恢 173 作轮回亲本与供体亲本 H4 杂交,

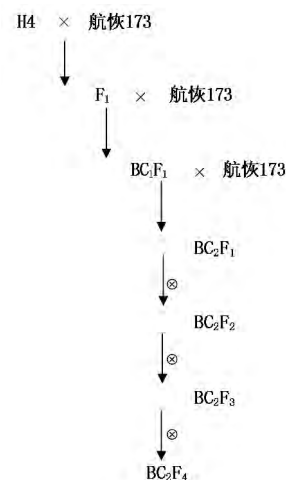


图 1 分子标记辅助选择改良航恢 173 稻瘟病抗性的育种程序
Fig.1 Scheme for MAS strategy to improve the rice blast

在 F_1 进行稻瘟病抗性鉴定, 确保无假杂种。随后在 BC_1F_1 同样进行抗病鉴定, 并利用与抗病基因 *Pi46* 紧密连锁的 SSR 分子标记 RM224 检测杂合单株, 选择农艺性状接近轮回亲本航恢 173 的杂合单株作父本继续回交, 随后连续自交 2 代, 整个分子改良过程的育种程序如图 1 所示。其间同时结合稻瘟病抗性鉴定及 *Pi46* 的分子标记辅助选择, 最终获得以航恢 173 为遗传背景的 10 个改良株系, 分别命名为 A1 ~ A10。

2.2 改良株系的恢复基因分析

航恢 173 作为本课题组选育的优良恢复系, 其恢复能力强, 对野败型不育系天丰 A 和 Y 型不育系华农 A 都有较好的恢复能力, 故而很有可能存在 2 对育性恢复基因 (*Rf3* 和 *Rf4/Rf1*) 位点。因此, 本研究利用与这 2 对恢复基因紧密连锁的分子标记进行恢复基因的选择 (表 1)。结果表明, 所有 10 个改良株系在育性恢复基因 *Rf3* 位点都与原航恢 173 一致, 而只有改良株系 A3 在 *Rf4/Rf1* 位点上表现与航恢 173 一致。

表 1 恢复基因分子标记检测结果

Tab.1 SSR-based fertility restorer (Rf) gene profiling of improved lines

品系 Lines	与 <i>Rf3</i> 紧密连锁的 SSR 标记 SSR markers linked to <i>Rf3</i>		与 <i>Rf4/Rf1</i> 紧密连锁的 SSR 标记 SSR markers linked to <i>Rf4/Rf1</i>			
	RM1	RM10338	RM258	RM304	RM3510	RM1108
H4	1	1	1	1	1	1
航恢 173 Hanghui 173	2	2	2	2	2	2
A1	2	2	2	1	3	3
A2	2	2	2	1	1	1
A3	2	2	2	2	2	2
A4	2	2	2	1	1	1
A5	2	2	2	1	1	1
A6	2	2	2	1	1	1
A7	2	2	2	1	1	1
A8	2	2	2	1	1	1
A9	2	2	2	1	1	1
A10	2	2	2	1	1	1

注: 1 和 2 代表亲本间不同的基因型; 3 为杂合状态下的基因型。

Note: 1 and 2 means different genotypes between the parents; 3 means the heterozygous genotype.

2.3 改良株系的遗传背景分析

共选用覆盖水稻全基因组的 408 对 SSR 引物对 H4 与航恢 173 进行多态性分析, 有效扩增为 399 对, 并在两亲本间筛选到 101 对多态性标记。随后, 利用这 101 对 SSR 标记分析所获得的 10 个改良株系的遗传背景 (表 2)。结果表明, 全部改良株系的

遗传背景的回率均明显高于其理论值, 说明在回交改良过程中, 结合对株叶形态等农艺性状的选择可以大大加快受体亲本遗传背景的回交。综合田间农艺性状表现和遗传背景回率, 从中筛选编号 A3 的株系作为进一步应用的株系, 并将其暂命名为航恢 1173。

表 2 遗传背景分析结果

Tab.2 Result of genetic background analysis

株系编号 Line code	位点数 No. of loci	差异位点数 No. of different loci	背景回率/% Recovery ratio of background	理论回率/% Theoretic recovery ratio
A1	101	25	87.6	87.5
A2	101	24	88.1	87.5
A3	101	8	96.0	87.5
A4	101	18	91.1	87.5
A5	101	18	91.1	87.5
A6	101	20	90.1	87.5
A7	101	18	91.1	87.5
A8	101	22	89.1	87.5
A9	101	23	88.6	87.5
A10	101	18	91.1	87.5

2.4 改良株系及其所配杂交组合的抗性表现

2010 年晚季至 2012 年晚季,共采用 128 个来自广东各稻作区的不同致病型稻瘟病代表菌株对改良系航恢 1173、H4 及其原种航恢 173 进行人工接种鉴定,结果如表 3 所示。改良株系 A3 的抗性频率几乎达到 100%,与其抗性基因供体亲本一致,而原航恢 173 的抗性频率只有 58.3%。另外,连续 2 年的田间自然诱发病圃颈瘟的抗性鉴定结果也表明,改良株系 A3 的抗性得到显著性的提高。同时,新恢复系航恢 1173 与 3 个不育系所配的杂交组合

也表现出较高的抗性水平。

2.5 改良恢复系航恢 1173 及其杂交组合的主要农艺性状分析

差异显著性分析(表 4)表明,新恢复系航恢 1173 的株高略高于原航恢 173,每穗粒数少于原航恢 173,而其他各主要农艺性状差异均未达到显著水平。而新恢复系所配的杂交组合与原对照组合相比,除了华优 1173 的有效穗数明显高于原对照组合华优 173,及结实率低于原华优 173,其他均无显著差异。

表 3 改良恢复系航恢 1173 及其杂交组合的稻瘟病抗性表现

Tab. 3 Disease evaluation of improved restored line A3 and its hybrids with three sterility

品系/组合 Lines/Hybrids	天优 1173 Tianyou 1173	华优 1173 Huayou 1173	培杂 1173 Peiza 1173	天优 173 Tianyou 173 (CK)	华优 173 Huayou 173 (CK)	培杂 173 Peiza 173 (CK)	天丰 A Tianfeng A	华农 A Huanong A	培矮 64S Peiai 64S	航恢 173 Hanghui 173 (CK)	航恢 1173 Hanghui 1173	H4
抗性频率/% R spectrum	-	-	-	-	-	-	-	-	-	58.3	100	100
发病级别 Grade	1	3	2	3	1	1	9	7	9	9	0	0
发病率 Rate/100%	3	10	5	10	5	5	30	50	25	30	0	0

注: - . 种子量不够,未测定。

Note: - . Means data was not tested for not enough seeds.

表 4 改良恢复系航恢 1173 及其杂交组合的主要农艺性状表现

Tab. 4 Performance of principal agronomic and grain quality traits of improved lines

品系/组合 Improved lines/ Hybrids	株高/cm Plant height	有效穗数 Panicle numbers	穗长/cm Panicle length	穗粒数/粒 Numbers of total grains	结实率/% Percent spikelet's fertility	千粒质量/g 1000 grains weight
航恢 1173 Hanghui 1173	111.0	10.0	25.2	214.2	90.5	17.3
航恢 173 Hanghui 173(CK)	105.3	11.0	25.7	258.1	86.3	16.5
H4	105.6	10.3	26.1	140.3	93.1	18.9
天优 1173 Tianyou 1173	100.9	6.0	23.9	219.2	92.4	21.2
天优 173 Tianyou 173(CK)	102.8	6.0	24.4	220.0	93.6	20.6
华优 1173 Huayou 1173	103.0	8.0*	23.2	212.0	80.7*	19.1
华优 173 Huayou 173 (CK)	104.0	6.6	24.2	225.8	90.0	19.8
培杂 1173 Peiza 1173	98.1	6.3	24.5	200.4	88.0	17.7
培杂 173 Peiza 173 (CK)	96.3	6.3	23.7	216.5	85.3	17.3

注: * . 差异显著。

Note: * . Significant difference at 5% (0.05) probability (D) levels.

3 讨论

近几年来,我国部分地区稻瘟病十分严重,广东稻区水稻生产季节正值高温高湿天气,稻瘟病时有发生^[14-16],水稻品种的稻瘟病抗性被列为品种审定的重要评价指标之一。因此,稻瘟病抗性育种显得尤为重要。而分子标记辅助选择作为一种新的作物改良辅助手段,在水稻抗性育种中起到显著的作用。本研究中,以携带抗病基因 *Pi46* 的高抗亲本 H4,通过分子标记辅助选择,抗性鉴定,恢复基因选择,遗传背景分析及杂交代组分析,最终获得一个高抗稻瘟病的新恢复系航恢 1173,从而证实分子标记辅助选择技术在作物育种实践中的实用性。

相对于常规育种,水稻恢复系的选育往往更为艰难,其主要原因是育性恢复基因的选择需要大批量的测交实验来鉴定,而分离世代中无法全部测交验证,易造成性状优良的品系缺乏恢复基因,且恢复力稳定较慢。而利用与育性恢复基因连锁的 DNA 分子标记,可以直接在各分离世代中对育性恢复基因进行选择,提高恢复系的选育工作效率。本研究中,在改良稻瘟病抗性的基础上,选取与育性恢复基因 *Rf3* 和 *Rf4/Rf1* 紧密连锁的分子标记对改良株系进行二次筛选,最终获得在 2 对恢复基因位点上和原种航恢 173 无差异的新恢复系航恢 1173。与不育系的测配结果也表明,新恢复系对不育系天丰 A 和华农 A 具有较强的恢复能力。

在分子标记辅助选择育种中,对目的基因选择的准确性是一个关键问题,而标记的准确与否直接影响到改良的成败。本研究中,在利用分子标记选择的同时,结合稻瘟病抗性鉴定,其准确性几乎是 100%。同时,也不能忽视背景选择的重要性,背景选择可加快遗传背景恢复,避免或减轻连锁累赘。本试验在选出带有目标基因的改良株系的基础上,选用覆盖了水稻 12 条染色体组的两亲本差异引物 101 对,对其进行背景筛选,结果表明,在 BC₂F₂ 中,就可以筛选遗传背景回复率达 96% 的单株。由此可见,目标基因的准确选择,再加上背景筛选的分子标记辅助选择对加快育种进程是非常有效的。

参考文献:

- [1] Zeigler R S, Leong S, Teng P S. Rice blast disease [M]. Wallingford, UK: CAB International, 1994: 267 - 292.
- [2] Baker B, Zambryski P, Staskawicz B, et al. Signaling in plant-microbe interactions [J]. Science, 1997, 276: 726 - 733.
- [3] 杨勤忠, 林菲, 冯淑杰, 等. 水稻稻瘟病抗性基因的定位及克隆研究进展 [J]. 中国农业科学, 2009, 42(5): 1601 - 1615.
- [4] Dean R A, Talbot N J, Ebbole D J, et al. The genome sequence of the rice blast fungus *Magnaporthe grisea* [J]. Nature, 2005, 434: 980 - 986.
- [5] 金素娟, 柳武革, 朱小源, 等. 利用分子标记辅助选择改良温敏核不育系 GD-8S 的稻瘟病抗性 [J]. 中国水稻科学, 2007, 21(6): 599 - 604.
- [6] 杨杰, 杨金欢, 王军, 等. 稻瘟病抗病基因 *Pita* 和 *Pib* 在中国水稻地方品种中的分布 [J]. 华北农学报, 2011, 26(3): 1 - 6.
- [7] 靳春鹏, 孙庚, 刘金亮, 等. 吉林省水稻品种对稻瘟病的抗性分析 [J]. 华北农学报, 2011, 26(3): 214 - 218.
- [8] 王金明, 林秀云, 刘晓梅, 等. 分子标记选择水稻抗稻瘟病基因 *Pi40* 和 *Pib* 聚合体 [J]. 华北农学报, 2012, 27(2): 218 - 221.
- [9] 王丰, 柳武革, 刘振荣, 等. 利用分子标记辅助选择聚合 *Pi-1* 和 *fgr* 基因改良水稻恢复系 [J]. 杂交水稻, 2010(S1): 237 - 244.
- [10] Xiao W M, Yang Q Y, Wang H, et al. Identification and fine mapping of a resistance gene to *Magnaporthe oryzae* in a space-induced rice mutant [J]. Molecular Breeding, 2011, 28(3): 303 - 312.
- [11] Hospital F, Chevalet C, Mulsant P. Using markers in gene introgression breeding programs [J]. Genetics, 1992, 132(4): 1199 - 1210.
- [12] 杨祁云, 朱小源, 雷财林, 等. 华南籼稻稻瘟病菌致病型单基因鉴别寄主筛选 [J]. 植物保护学报, 2004, 31(2): 113 - 120.
- [13] IRRI. The Twenty-ninth international rice blast nursery [M]. Manila: IRRI, 2004.
- [14] 刘水芳, 杨秀荣, 孙淑琴, 等. 水稻品种抗稻瘟病鉴定技术 [J]. 天津农业科学, 2007, 13(4): 55 - 58.
- [15] 王巧兰, 郭刚. 水稻稻瘟病生物防治研究进展 [J]. 河南农业科学, 2005(10): 10 - 13.
- [16] 朱小源, 杨健源, 陈玉托, 等. 引致天优 998 抗性丧失的稻瘟病菌小种鉴定及其致病性测定 [J]. 广东农业科学, 2008(12): 84 - 86.