

水稻抗白叶枯病恢复系的分子育种

易懋升, 丁效华, 张泽民, 曾瑞珍, 李文涛, 张桂权

(华南农业大学农学院, 广东省植物分子育种重点实验室, 广东广州 510642)

摘要: 利用4类粳型亲粳系与携带有2个恢复基因Rf3、Rf4和4个抗白叶枯病基因Xa4、xa5、xa3和淞1的品系构建回交群体, 应用与目标基因紧密连锁的以PcR为基础的分子标记进行辅助选择(MAS)。在Bc1F1选择到2个恢复基因和4个抗白叶枯病基因全杂合的植株19个。在BC1F2对19个当选株系进行MAS, 共选择到28株至少含有4个纯合目标基因的单株, 其中3个单株在6个目标基因座位上均带有纯合目标基因型、测交结果表明, 选取的2个具6个纯合目标基因的单株对野败型细胞质雄性不育系有良好的恢复力。

关键词: 水稻; 恢复基因; 抗白叶枯病基因; 分子标记辅助选择

中图分类号: S332.2 文献标识码: A 文章编号: 1001-411X(2006)02-0001-04

Molecular Marker-Assisted Breeding of Restorer Lines with

Bacterial Blight Resistance in *Oryza sativa*

YI Mao-sheng, DING Xiao-hua, ZHANG Ze-min, ZENG Rui-zhen, LI Wen-tao, ZHANG Gui-quan

(College of Agriculture, South China Agric. Univ., Guangdong Provincial Key Lab of Plant Molecular Breeding, Guangzhou, 510642 China)

Abstract: Backcross populations were constructed using four kinds of Ind/ca-compatible Japonica lines (ICJLs) and lines with two restorer genes, Rf3, Rf4 and four bacterial blight (BB) resistance genes, Xa4, xa5, xa3 and Xa21. Molecular marker-assisted selection (MAS) was conducted using polymorphic PCR markers tightly linked with six genes mentioned above. Nineteen plants with all six heterozygous target genotypes were selected in BC1F1 and developed to BC1F2 lines. These lines were detected further. Twenty-eight plants with at least four homozygous target genotypes were obtained. Among them three plants were found to contain six homozygous genotypes, thus indicated successful pyramiding of restorer and BB genes. The test showed that 2 selected plants with six homozygous loci were good restorative to wild abortive type cytoplasmic male sterility (CMS) lines.

Key words: *Oryza sativa*; restorer gene; bacterial blight resistance gene; molecular marker-assisted selection

我国1973年在世界上首次成功地实现了杂交水稻“三系”配套,并在生产上得到了广泛应用,为我国乃至世界的粮食增产作出了巨大贡献。野败型细胞质雄性不育系是目前生产上应用面积最大的不育系,因此对其相应恢复基因的研究也较为深入。野败型不育恢复性主要受2对相互独立的恢复基因控

收稿日期:2005-06-15

作者简介:易懋升(1976-),男,硕士,现在广州市花卉研究所工作;通讯作者:张桂权(1957-),男,教授,E-mail: gqzhang@scau.edu.cn

基金项目:教育部“长江学者和创新团队发展计划(IRT0448);广东省自然科学基金团队项目(2003023);广东省科技计划项目(2004B20101003);广东省教育厅自然科学研究项目(Z03010)

制,其中 *Rf3* 位于第1染色体上,*Rf4* 位于第10染色体^[1-2]. 白叶枯病是由革兰氏阴性菌黄单胞水稻变种 *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* 引起的全球性的水稻主要病害之一. 目前已鉴定的白叶枯病抗性基因有29个^[3-7]. 在抗白叶枯病基因聚合育种中,常用的抗性基因主要有 *Xa4*、*xa5*、*xa13* 和 *Xa21*,这4个抗白叶枯病基因分别位于第11、5、8和11染色体上^[8]. Abenes等^[9]通过分子标记辅助选择(molecular marker-assisted selection, MAS)对抗白叶枯病基因进行了辅助选择;Huang等^[10]利用 RFLP 和 PCR 标记成功构建了含4个抗白叶枯病基因 *Xa4*、*xa5*、*xa13* 和 *Xa21* 的多基因聚合系;Basharat^[11]在多个杂交、回交组合中通过 MAS 也成功实现了 *Xa4*、*xa5*、*xa13* 和 *Xa21* 基因的转移,获得了大量携带有多个抗性基因的材料. 本研究根据已有的抗白叶枯病基因 *Xa4*^[12-14]、*xa5*^[15-16]、*xa13*^[17-18]、*Xa21*^[19] 和野败型雄性不育恢复基因 *Rf3*、*Rf4*^[3-6] 的分子标记定位结果,通过 MAS 将这些基因聚合在一起,培育抗白叶枯病的恢复系,进而提高杂交水稻的抗病性.

1 材料与方法

1.1 供试材料

轮回亲本共有4类粳型亲粳系:IC31、IC32、IC33和IC34,它们分别是以粳型亲粳系 G2416-3、G2417-2-1、G2605 和 G3004-4 为基因供体,以台中65为受体杂交构建分离群体,通过 MAS 获得的在 *S-b*、*S-c* 和 *S-d* 3个基因座位上分别与上述供体基因型相同的粳型亲粳系. 供体亲本是携带有 *Xa4*、*xa5*、*xa13*、*Xa21* 等4个纯合抗白叶枯病基因和2个纯合恢复基

因 *Rf3*、*Rf4* 的材料(以下称4R品系,由广东省植物分子育种重点实验室培育).

1.2 分子标记辅助选择

以4类粳型亲粳系为母本,以4R品系为父本配制杂交组合. 在 F_1 代以同类型粳型亲粳系为父本进行回交得到 BC_1F_1 . 利用与目标基因紧密连锁的分子标记对 BC_1F_1 单株进行检测,选择6个目标基因连锁标记带型均杂合的个体. 将 BC_1F_1 当选单株种植成 BC_1F_2 株系,各株系分单株取样进行分子标记辅助选择(MAS). 标记分析方法按照 Li等^[20]介绍的方法进行.

1.3 育性检测

用博A、特A、梅A3个野败型细胞质雄性不育系为测验种与当选单株进行测交,抽穗灌浆期从测交 F_1 群体随机抽取3个单株,统计小穗育性,测定当选单株的恢复性.

2 结果与分析

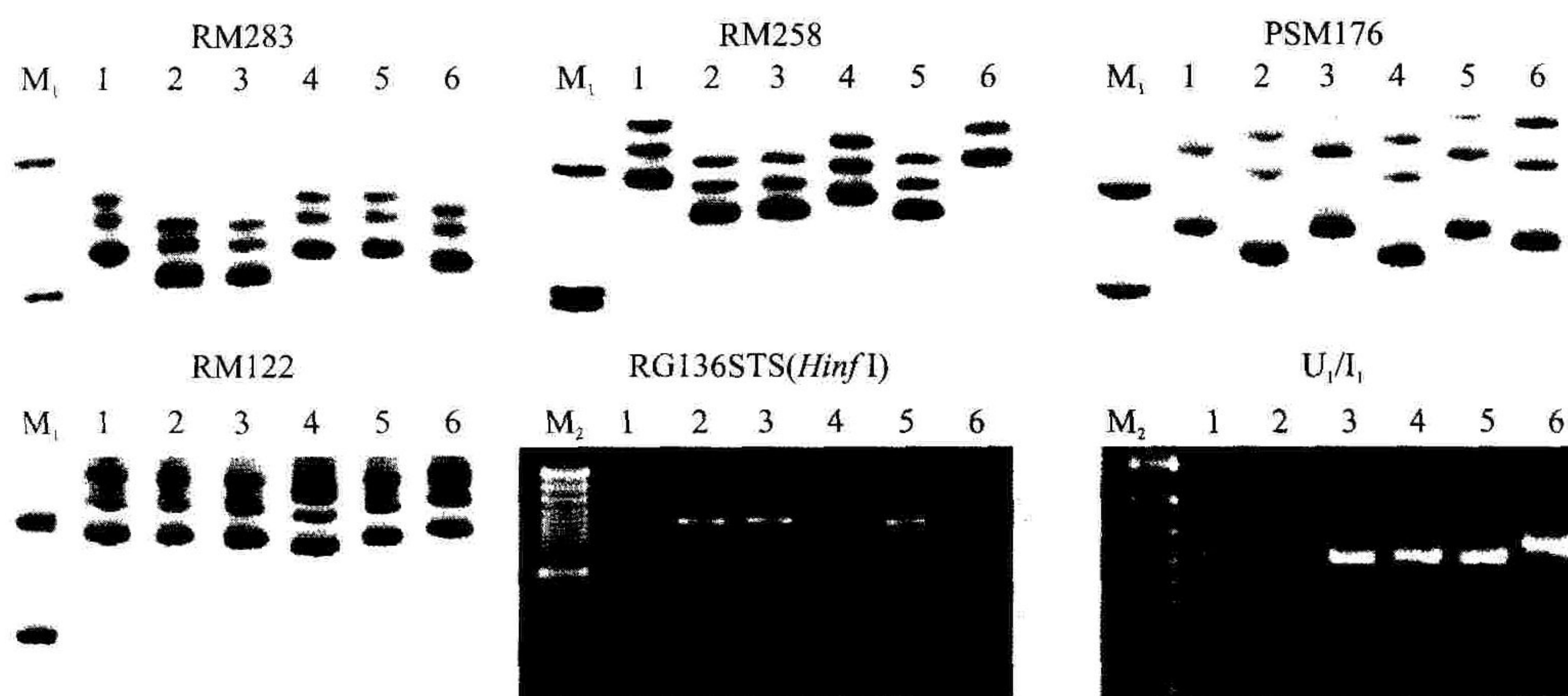
2.1 亲本间基因连锁标记的多态性

在前人对各个基因定位的基础上,参照黄朝锋^[21]对分子标记遗传图谱的整合结果,对6个目标基因分子标记连锁图进行了整理. 根据目标基因分子标记连锁图谱的整理结果,对与目标基因区域紧密连锁的 PCR 标记在亲本间的多态性进行了筛选(表1). IC32与4R品系在6个基因座位区连锁标记多态性最高,有较多分子标记可以利用;而IC34与4R品系之间可供利用的有多态性的标记较少. 图1为部分与恢复基因 *Rf3*、*Rf4* 和抗白叶枯病基因 *Xa4*、*xa5*、*xa13*、*Xa21* 连锁的 PCR 标记扩增带型.

表1 与目标基因紧密连锁的多态性 PCR 标记

Tab. 1 Polymorphic PCR markers linked with target genes

基因 genes	亲本 parents			
	IC31/4R	IC32/4R	IC33/4R	IC34/4R
<i>Rf3</i>	RM283, RM151, RM522, PSM354	RM283, RM151, PSM354, RM522, RG532STS(<i>Alu</i> I)	RM283, RM151, RM522, PSM354	RM283
<i>Rf4</i>	RM258, PSM168	RM258, PSM167, PSM344	RM258, PSM168, PSM344	RM258
<i>Xa4</i>	RM206, PSM176, RM224	RM144, RM206, RM224, PSM176	RM206, RM224 PSM176	RM206, PSM176
<i>xa5</i>	RM122, RM153	RM122, RM153	RM122, RM153	RM122, RM153
<i>xa13</i>	RM264, RM281, RG136STS(<i>Hinf</i> I)	RM264, RM281, RG136STS(<i>Hinf</i> I), PSM352	RM264, RM281, RG136STS(<i>Hinf</i> I)	RM264, RM281, RG136STS(<i>Hinf</i> I)
<i>Xa21</i>	pTA248, U_1/I_1	pTA248, U_1/I_1	pTA248, U_1/I_1	pTA248, U_1/I_1



M₁: 相对分子质量标记 pUC19/Msp I, M₂: 相对分子质量标记 100 bp DNA ladder, 1~6: 分别为 IC31、IC32、IC33、IC34、台中 65 和 4R 品系
M₁: pUC19/Msp I DNA ladder; M₂: 100bp DNA ladder; 1-6: IC31, IC32, IC33, IC34, Taizhong 65 and 4R line, respectively.

图1 恢复基因和抗白叶枯病基因连锁标记扩增带型

Fig. 1 Band patterns of markers linked with restorer genes and bacterial blight resistance genes

2.2 入选单株的基因型

利用与恢复基因和抗白叶枯病基因紧密连锁的 PCR 标记,对 BC₁F₁ 群体进行 MAS,以 *Rf3*, *Rf4*, *Xa4*, *xa5*, *xa13*, *Xa21* 等 6 个基因座位连锁标记带型都杂合的单株为目标单株. 经过分子检测,从总共 1 749 个单株中共选择到符合上述标准的目标单株 19 株.

将 BC₁F₁ 当选单株种植成株系,各株系分单株取样,共取样 3 793 株. 利用表 1 中列出的所有多态性分子标记进行检测. 对分子标记检测结果,以与目标基因遗传距离最近的有多态性的双边连锁标记带型为准(没有双边标记的以单边标记为准)进行统计. 结果表明,6 个目标基因均纯合的单株有 3 株;携带有 5 个纯合目标基因的单株(*Rf3* *Rf3*/*Rf4* *Rf4*/*Xa4* *Xa4*/*Xa21* *Xa21*/*xa5* *xa5*, *Rf3* *Rf3*/*Rf4* *Rf4*/*Xa4* *Xa4*/*Xa21* *Xa21*/*xa13* *xa13*, *Rf3* *Rf3*/*Rf4* *Rf4*/*Xa21* *Xa21*/*xa5* *xa5*/*xa13* *xa13* 各 3 株)共 9 株;携带有 4 个纯合目标基因的单株(*Rf3* *Rf3*/*Rf4* *Rf4*/*Xa4* *Xa4*/*Xa21* *Xa21* 有 10 株, *Rf3* *Rf3*/*Rf4* *Rf4*/*Xa21* *Xa21*/*xa13* *xa13* 有 4 株, *Rf3* *Rf3*/*Xa4* *Xa4*/*Xa21* *Xa21*/*xa13* *xa13* 有 2 株)共 16 株.

2.3 目标单株的恢复性

用 3 个野败型细胞质雄性不育系与当选的 2 个携带 6 个纯合目标基因的单株进行测交,统计各个测交组合 F₁ 的平均小穗育性. 结果显示, M13Rf90 与博 A、特 A、梅 A 3 个不育系测交 F₁ 平均小穗育性分别为 80.2% ± 4.31%、76.3% ± 3.45% 和 82.2% ± 6.20%,均达到了正常水平; M13Rf22 与特 A 的小穗育性也比较高,为 88.3% ± 5.45%,表明这 2 个单株携带有 *Rf3* 和 *Rf4* 基因,具有野败型雄性不育恢复

性. 又由于 3 个不育系均为典型的籼稻,因此测交结果也初步表明这 2 个单株具有良好的亲籼性.

3 讨论

本研究中共涉及到 6 个基因,前人对各个基因的定位做了大量的工作. 但由于涉及到的材料非常丰富,遗传背景复杂,现有的定位结果仍不能完全满足本研究 MAS 准确性的需要. 本研究在对前人定位结果综合的基础上,对仍然不能满足 MAS 要求的目标基因区域,利用网上公布的序列资料设计了新的 SSR 引物^[21]. 多态性筛选的结果表明,本研究中部分群体的多态性 PCR 标记已经能满足对目标基因进行 MAS 的要求,特别是 IC32 与 4R 品系在目标基因区域连锁标记多态性很高,可用于 MAS 的 PCR 标记较多.

本研究在 BC₁F₂ 共选择到 6 个目标基因连锁标记带型全纯合的单株 3 株,并对其中的 2 株进行了测交验证,确认了 MAS 的准确性. 对于传统的选择育种来说,在 3 个世代甚至更长时间内是不可能实现这么多个基因同时聚合的. 本试验及一些前人的研究结果^[11,22] 均表明, MAS 在多基因聚合育种中具有巨大的优越性.

如何克服水稻亚种间杂种不育性是把籼粳杂种强大的生物学优势转化为产量优势的关键. 特异亲和性的学术观点^[23-24] 提出了利用特异亲和基因培育粳型亲籼系,从而达到克服籼粳杂种不育性的设想. 按照粳型亲籼系的设计标准,丁效华等^[22,25] 鉴定出了几个粳型亲籼系. 现有的粳型亲籼系具有粳稻遗传背景,对籼稻有较强的亲和性,能直接用于亚种间“两系”杂交稻配组,但由于其对野败型细胞质雄性

不育性不具有恢复性,故不能用于配制亚种间“三系”杂交稻组合.本研究通过MAS筛选到几个携带6个目标基因的材料,它们具有较好的恢复性和亲粳性,又由于这些材料来自用粳型亲粳系作轮回亲本的回交群体,因此也可能具有较强的粳型性.用这些材料与粳型野败型细胞质雄性不育系配组,就有可能实现亚种间“三系”杂种优势的利用.本研究今后的工作重点将是对当选材料的粳型性、抗病性、恢复性和亲粳性进行系统的鉴定.

参考文献:

- [1] BHARAJ T S, VIRMANI S S, KHUSH G S. Chromosomal location of fertility restoring genes for 'wild abortive' cytoplasmic male sterility using primary trisomics in rice[J]. Euphytica, 1995, 83: 169-173.
- [2] ZHANG Gui-quan, LU Yong-gen, HUANG Nin. Molecular analysis of introgressed chromosomal segments in a set of near-isogenic lines of rice for fertility-restoring genes[J]. Rice Genetics Newsletter, 1994, 11: 147-149.
- [3] KINOSHITA T. Report of the committee on gene symbolization nomenclature and linkage groups[J]. Rice Genet Newsletter, 1995, 12: 24-93.
- [4] LIN Xin-hua, ZHANG Diuan-pin, XIE Yue-feng, et al. Identifying and mapping a new gene for bacterial blight resistance in rice based on RFLP markers[J]. Phytopathology, 1996, 86: 156-159.
- [5] GAO He-ping, LIN Xing-hua, YU Gong-xing, et al. Inheritance of resistance to bacterial blight of four Yunnan rice varieties[J]. Rice Genet Newsletter, 1999, 12: 233-234.
- [6] LEE K S, RASABANDITH S, ANGELES E R, et al. Inheritance of resistance to bacterial blight in 21 cultivars of rice[J]. Phytopathology, 2003, 93: 147-152.
- [7] 谭光轩, 任翔, 翁清妹, 等. 药用野生稻转育后代一个抗白叶枯病新基因的定位[J]. 遗传学报, 2004, 31(7): 724-729.
- [8] KAMESWARA R K, LAKSHMINARASU M, JENA K K. DNA markers and marker-assisted breeding for durable resistance to bacterial blight disease in rice[J]. Biotechnology Advances, 2002, 20: 33-47.
- [9] ABENES M L P, ANGELES E R, KHUSH G S, et al. Selection of bacterial blight resistant rice plant in the F₂ generation via their linkage to molecular markers[J]. Rice Genet Newsletter 1993, 10: 120-123.
- [10] HUANG N, ANGELES E R, DOMINGO J, et al. Pyramiding of bacterial blight resistance gene in rice, marker-assisted selection using RFLP and PCR[J]. Theor Appl Genet, 1997, 95: 313-320.
- [11] BASHARAT H S. Pyramiding breeding of bacterial blight resistance genes in rice (*Oryza sativa* L)[D]. 广州: 华南农业大学农学院, 2001.
- [12] YOSHIMURA S, YOSHIMURA A, SAITO A, et al. RFLP analysis of introgressed chromosomal segments in three near-isogene lines of rice bacterial blight resistance genes, *Xa-1*, *Xa-3* and *Xa-4*[J]. Jpn J Genet, 1992, 67: 27-29.
- [13] 马伯军, 王文明, 赵彬, 等. 水稻抗白叶枯病基因 *Xa4* 的PCR标记研究[J]. 遗传, 1999, 21(3): 9-12.
- [14] 王文明, 周永力, 江光怀, 等. 水稻抗白叶枯病基因 *Xa-4* 的精细定位及其共分离分子标记[J]. 科学通报, 2000, 45(10): 1067-1071.
- [15] MCCOUNCH S R, ABENES M L, ANGELES R, et al. Molecular tagging of a recessive gene *xa5*, for resistance to bacterial blight of rice[J]. Rice Genetics Newsletter, 1991, 8: 143-145.
- [16] BLAIR M W, MCCOUNCH S R. Microsatellite and sequence-tagged site markers diagnostic for the rice bacterial leaf blight resistance gene *xa5*[J]. Theor Appl Genet, 1997, 95: 174-184.
- [17] ZHANG Gui-quan, ANGELES E R, ABENES M L P, et al. RAPD and RFLP mapping of the bacterial blight resistance gene *xa-13* in rice[J]. Theor Appl Genet, 1996, 93: 65-70.
- [18] SANCHEZ A C, HOG L L, YANG D, et al. Genetic and physical mapping of *Xa-13*, a recessive bacterial blight resistance gene in rice[J]. Theor Appl Genet, 1999, 98: 621-632.
- [19] RONALD P C, ALBANO B, TABIEN R, et al. Genetic and physical analysis of the rice bacterial blight resistance locus, *Xa21*[J]. Mol Gen Genet, 1992, 236: 113-120.
- [20] LI Wen-tao, ZENG Rui-zhen, ZHANG Ze-min, et al. Mapping of *S-b* locus for F₁ pollen sterility in cultivated rice using PCR based markers[J]. Acta Botanica Sinica, 2002, 44(4): 463-467.
- [21] 黄朝锋. 水稻微卫星图谱的发展及抗虫基因的分子定位[D]. 广州: 华南农业大学农学院, 2003.
- [22] 丁效华, 陈跃进, 杨长寿, 等. 水稻粳型亲粳系粳型性的判别[J]. 中国水稻科学, 2003, 17(1): 21-24.
- [23] 张桂权, 卢永根. 栽培稻杂种不育性的遗传基础[J]. 华南农业大学学报, 1987, 8(3): 53-62.
- [24] 张桂权, 卢永根. 粳型亲粳系的选育及其在杂交水稻超高产育种上的利用[J]. 杂交水稻, 1999, 14(6): 3-5.
- [25] 丁效华, 陈跃进, 杨长寿, 等. 水稻粳型亲粳系亲和性的测定[J]. 中国水稻科学, 2002, 16(4): 366-368.

【责任编辑 周志红】