

水稻抗白叶枯病基因 Xa23 群体的 MAS 育种研究

于洁¹, 王耀雯¹, 马文清¹, 王建岭¹, 王育荣¹, 赵开军², 王春连², 刘丕庆¹

(1 广西大学农学院, 广西南宁 530004; 2 中国农业科学院作物科学研究所, 农业部作物遗传育种重点实验室, 北京 100081)

摘要:将野生稻中发现的抗白叶枯病基因 Xa23 转入 3 个优良恢复系中, 为培育新的抗白叶枯病品种奠定基础. 采用分子标记辅助育种(MAS)和人工剪叶接种方法快速选育抗白叶枯病新品系. 选取前期所得的材料进行 P6 菌接种鉴定, 利用 Xa23 基因连锁的 EST 标记 C189 对接种所得的 272 份接种鉴定表现有抗性的材料进行标记检测, 共得到含有 Xa23 基因的材料 254 份, 研究发现所得到的材料已经基本稳定, 可选取最优品系参加新品种的区试.

关键词:水稻; 水稻白叶枯病; EST 标记; Xa23 基因; MAS

中图分类号: S511

文献标识码: A

文章编号: 1001-411X(2010)04-0001-05

The MAS Research in the Population of Bacterial Blight Resistance Gene Xa23 in Rice

YU Jie¹, WANG Yao-wen¹, MA Wen-qing¹, WANG Jian-ling¹, WANG Yu-rong¹,
ZHAO Kai-jun², WANG Chun-lian², LIU Pi-qing¹

(1 College of Agronomy, Guangxi University, Nanning 530004, China; 2 Key Laboratory of Crop Genetics and Breeding, Ministry of Agriculture, Institute of Crop Sciences, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China)

Abstract: The bacterial blight resistance gene Xa23 newly found in the wild rice was introgressed into the three elite restorer lines to lay a solid foundation for the development of the bacterial blight resistance varieties. The marker-assisted selection (MAS) and leaf-cutting inoculation method were used to assay new lines. The early generation breeding materials were assayed with the inoculation of P6, and the progenies of these resistant materials were verified by the marker C189, which was closely linked with gene Xa23. Of the 272 resistant accessions revealed by the inoculation method, only 254 accessions were verified to be resistant by the marker C189 test. The late generation breeding materials were stable in phenotype, and the elite lines could be selected for the variety trial.

Key words: rice; bacterial blight; EST mark; Xa23 gene; MAS

水稻白叶枯病 *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (Xoo) 是由水稻黄单胞杆菌引起的细菌性病害. 自 1884 年该病首先在日本福岗地区发现以来, 其发病范围不断扩大. 目前, 水稻白叶枯病的发生范围已遍及世界各水稻产区^[1-2], 尤以南亚和东南亚稻米生产国危害严重^[1], 目前已成为世界水稻三大病害之一.

近 30 年来我国选育优良抗病恢复系大都采用显性抗病基因 Xa4^[3-4] 这一单一抗源, 已造成白叶枯病菌小种的变迁, 新的小种已经出现并呈上升趋势^[5], 从而使我国大面积种植的一些抗病杂交稻“丧失”抗性, 因而挖掘、鉴定和利用新抗源就成为水稻白叶枯病研究的新热点. 其中由章琦等^[6] 从我国普通野生

收稿日期: 2009-12-10

作者简介: 于洁(1981—), 女, 博士研究生; 通信作者: 刘丕庆(1964—), 男, 教授, 博士, E-mail: liupq@gxu.edu.cn

基金项目: “863”计划项目(2006AA10Z1B7); 广西科学基金“培育含抗白叶枯病基因 Xa23 分子标记抗病的水稻新恢复系”(桂科回 0448005); 广西亚热带生物资源保护利用重点实验室、省部共建国家重点实验室培育基地开放课题(SB0502)

稻中鉴定发掘的 Xa23 基因,对国内外所有鉴别菌系都表现为高抗,而且为显性、全生育期抗病,对于杂交稻的改良具有广阔的应用前景.王春连等^[7]已将 Xa23 定位在水稻第 11 染色体短臂,与 SSR 标记 RM206 和 EST 标记 C189 之间的遗传图距分别为 1.9 和 0.8 cM.本文主要报道利用 C189 标记进行分子标记选育抗白叶枯病新品系,并对所得品系进行产量和稻米品质评价,以期得到更适宜广西地区种植的新品种.

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 植物材料 用于分子标记定位 384 × 386、385 × 386、387 × 386 等 3 个杂交组合的自交 F₄ 和回交后代 BC₃F₁ 植株,以及亲本 384、385、386、387,供体亲本 386 为 Xa23 基因的近等位基因系 CBB23 (CBB23 由中国农业科学院作物育种栽培研究所,农业部作物遗传育种重点开放实验室赵开军研究员提供).

1.1.2 水稻白叶枯病菌系 水稻白叶枯病广致病菌系 P6 引自国际水稻研究所(IRRI),真空保存于 -70 ℃ 冰箱.接种前用肋本哲氏培养基复壮菌株,于 28 ℃ 培养 48 h,以无菌水配制接种菌液,浓度调至 1 × 10⁹ CFU/mL.由中国农业科学院作物育种栽培研究所赵开军研究员提供.

1.1.3 引物 根据前期定位 Xa23 基因的区域^[8-9]和中国农业科学院研究的结果^[7],选择距目标基因 0.8 cM 的 EST 标记 C189 和 1.9 cM 的 SSR 标记 RM206 为 MAS 标记(由赵开军研究员提供).其序列为: C189F:5′ - TAAGTTCTACATCGACCCCA - 3′; C189R: 5′ - CACATGAAGAGCTGGAACG - 3′; RM206F:5′ - CCCATGCGTTTAACTATTCT - 3′; RM206R:5′ - CGT-TCCATCGATCCGTATGG - 3′.

1.2 方法

1.2.1 植株抗病接种鉴定 采用人工剪叶接种法^[5],用白叶枯病国际鉴别菌系 P6 对供试水稻植株于苗期进行抗性鉴定.接种后 14 ~ 20 d,待感病对照品种病情趋于稳定时调查,用病斑面积占叶片面积的百分率(*R*)作为抗感反应参数.本研究所用分离群体单株抗感分明,*R* 为 20% 作为抗感界限:1% < *R* < 3% 为高抗,3% < *R* < 5% 为中抗,5% < *R* < 10% 为抗病,10% < *R* < 15% 为感病,15% < *R* < 20% 为中感,*R* > 20% 为高感^[10].

1.2.2 基因组 DNA 提取 采用简易的 CTAB 法提

取叶片总 DNA.取 20 mg 嫩叶片,加 400 μL 1.5 × CTAB (1.5% CTAB, 75 mmol/L Tris-HCl, 15 mmol/L EDTA, 1.05 mol/L NaCl, pH = 8) 在研钵中研磨至均匀液体,再加 400 μL 1.5 × CTAB 洗涤,吸取绿色研磨液至 1.5 mL 离心管中,加 550 μL 氯仿 + 异戊醇 [*V*(氯仿):*V*(异戊醇) = 24:1],摇匀,12 000 r/min 离心 6 min,取上清至另一离心管,用预冷的同样体积异丙醇沉淀,摇匀,12 000 r/min 离心 8 min.去上清,φ = 75% 乙醇洗涤 2 ~ 3 次,干燥沉淀物,溶于 600 μL ddH₂O 中,取溶液作 PCR 模板.

1.2.3 PCR 反应及电泳 EST 标记筛选时,反应体积 25 μL,反应液组成为:10 × PCR 缓冲液 2.5 μL, 25 mmol/L MgCl₂ 2.5 μL, 20 mmol/L dNTP 0.6 μL, 10 mmol/L 引物各 0.8 μL, 5 U/μL *Taq* 酶 0.2 μL, 15 ~ 25 μg/mL 模板 DNA 2.0 μL.

反应条件为:94 ℃ 预变性 5 min; 94 ℃ 变性 1 min, 58 ℃ 复性 1 min, 72 ℃ 延伸 2 min, 共循环 35 次;最后 72 ℃ 保温 10 min, 8 ℃ 保存.

PCR 扩增产物在 10 g/L 琼脂糖凝胶中电泳分离,经 0.5 μg/mL 溴化乙锭(EB)染色后,利用凝胶成像系统扫描拍照.

2 结果与分析

2.1 接种鉴定结果

随机选取前人所得的 351 份材料,送至中国农业科学院用 P6 进行白叶枯病的田间接种鉴定,其中 384 后代送检 1 份,387 后代送检 11 份,385 后代送检 338 份,共得到抗性材料 74 份,其中高抗材料 54 份,为以下的标记鉴定提供依据.具体鉴定结果见表 1.

表 1 384/386,385/386,387/386 的 BC₃F₁ 群体对 P6 的抗性反应结果

Tab. 1 Resistance reactions of BC₃F₁ populations from cross 384/386, 385/386 and 387/386 to P6

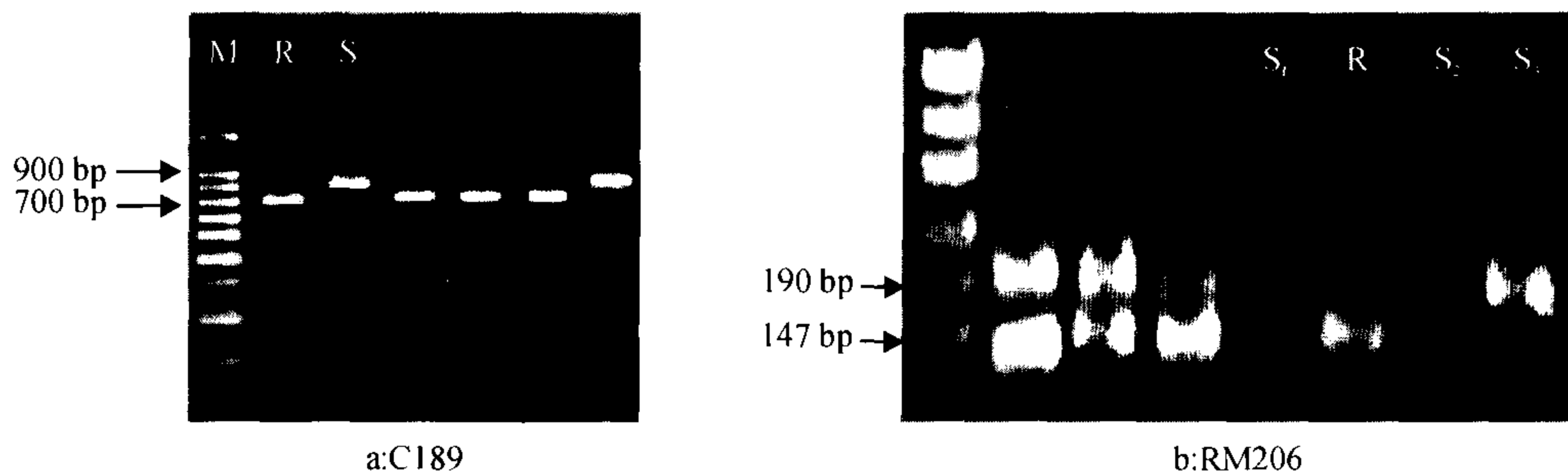
品系	<i>R</i> ¹⁾	材料数目	占比/%
385/386 群体	1%	39	11.54
	1% ~ 3%	6	1.77
	3% ~ 5%	16	4.73
	5% ~ 10%	6	1.77
	≥20%	271	80.17
384/386 群体	1%	1	100
387/386 群体	1%	4	36.36
	1% ~ 3%	2	18.18
	≥20%	5	45.45

1) *R* 为病斑面积占叶片面积的百分率.

2.2 C189 标记与 RM206 在亲本间的多态性验证

利用 Xa23 基因连锁标记 C189 对抗感亲本进行 PCR 扩增. 结果表明, 抗感亲本之间表现出良好的多态性(图 1a). 供体亲本 386 在 700 bp 处仅扩增出 1 条片段, 基因型为 AA; 受体亲本 384、385、387 均在 800 bp 附近仅扩增出 1 条片段, 基因型为 aa; 有些材料则同时在 800 和 700 bp 处各扩增出 1 条片段, 基

因型为杂合型 Aa, 表明 C189 为共显性标记. 图 1b 的结果表明, 抗感亲本之间同样表现出良好的多态性. 供体亲本 386 在 147 bp 处仅扩增出 1 条片段, 基因型为 AA; 受体亲本 384、385、387 均在 190 bp 附近仅扩增出 1 条片段, 基因型为 aa; 有些材料则同时在 147 和 190 bp 处各扩增出 1 条片段, 基因型为杂合型 Aa.



M: Molecular mass ladder, 100 bp ladder, 最大片段为 1 000 bp; R: 386; S: 387; S₁: 384; S₂: 385; S₃: 387.

图 1 C189 标记与 RM206 标记亲本间的多态性

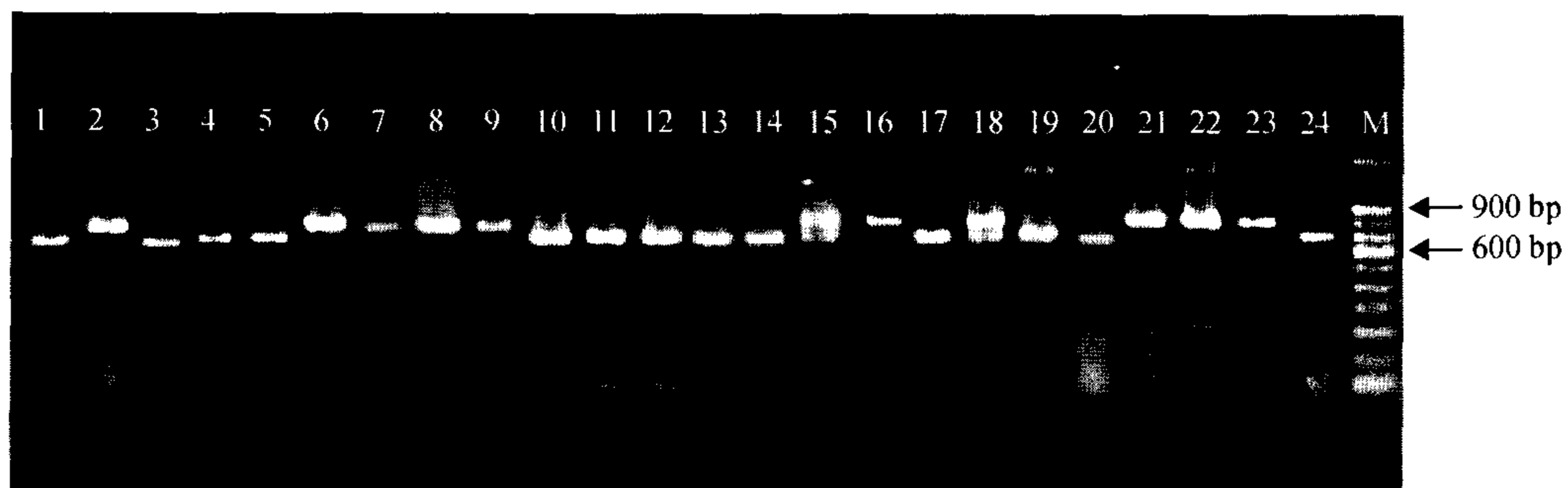
Fig. 1 Polymorphism of C189 and RM206

2.3 C189 与 RM206 符合率检测

本课题组前人采用引物为 RM206 标记进行辅助选择, 因此首先对所选的 C189 标记和 RM206 标记的符合性进行了验证, 所得的符合率达到 95.67%, 说明所选的 C189 标记可以用来继续进行本试验材料的辅助选择.

2.4 C189 标记鉴定结果

从鉴定所得的 74 份抗性材料中选取 68 份进行田间种植, 每小区每个材料 20 株, 随机抽取 4 株的叶片, 共 272 株. 利用 C189 标记进行分子标记的检测, 出现了 3 种带型, 与抗性亲本 386 符合的有 254 株, 达到总植株数的 93.38%; 与轮回亲本 387 符合的有 17 株, 出现双亲带型的有 4 株(图 2).



M: Molecular mass ladder, 100 bp ladder, 最大片段为 1 000 bp; 1: 386; 2: 387; 3~24: 待检植株.

图 2 C189 标记的 DNA 扩增带型

Fig. 2 PCR products amplified from DNAs extracted by primers for C189

2.5 田间农艺性状的调查及分析

以已推广品种博优 253 为对照品种, 对已知有抗性的部分材料进行田间随机区组种植. 每个材料种植 28 株, 成熟后收取中间 10 株, 考察株高、分蘖数、穗长、剑叶长、千粒质量等 9 个农艺性状. 由表 2 可看出, 各品系株高与对照接近, 无明显差异; 有效分蘖除 1909 为 8.5 个外, 其他品系均与对照差异不显著; 穗长、剑叶长、剑叶宽、以及每穗实粒数均差异

不大, 只是其中 1932 的结实率达到 79.09%, 明显超过对照的 71.35%; 千粒质量除 1937 为 19.97 g 外, 其余均接近或超过对照品种, 其中 1911 更是达到 22.75 g. 说明我们所得到的材料除能抗病外, 其农艺性状也已经趋于稳定. 多重比较分析结果表明, 各品系除水稻剑叶长有极显著差异外, 株高、分蘖数、穗长、剑叶宽、每穗实粒数以及千粒质量无显著差异.

表 2 参试组合和对照组合的产量性状表现及多重比较¹⁾

Tab.2 Main yield traits of tested combination and check combination and multiple comparison									
品系	株高/ cm	有效 分蘖数	穗长/ cm	剑叶长/ cm	剑叶宽/ cm	每穗实 粒数	每穗总 粒数	结实 率/%	千粒 质量/g
1934	92.11ab	10.00ab	23.33c	24.93a	1.37a	136.88b	174.62ab	78.39a	21.326ab
1925	94.26ab	10.07ab	25.85c	26.83c	1.58a	138.55b	177.59b	78.01ab	21.248ab
1909	91.42ab	8.50a	23.95a	26.46a	1.48b	125.07b	186.99ab	67.63d	21.693ab
1918	91.75ab	9.57ab	23.93c	26.71c	1.47a	126.46b	182.89b	74.85abc	20.380a
1936	94.23b	10.13ab	24.17c	27.42c	1.49a	136.85b	187.16b	76.49a	20.447ab
1911	93.13ab	10.67ab	23.74b	26.54c	1.40a	143.15b	174.70b	75.72abc	22.753b
1932	93.2ab	11.33ab	24.44c	26.27c	1.50a	132.29b	188.16b	79.09a	21.517ab
1916	89.08a	9.63ab	24.03c	24.57a	1.45a	148.82a	166.89a	74.12abc	20.857ab
1937	95.28ab	10.13ab	24.51c	28.70b	1.60a	123.69b	199.05b	72.15bcd	19.970a
对照	92.67ab	10.83b	23.15c	26.66c	1.45a	143.64b	175.29b	71.35cd	21.433ab

1) 同列数据后凡是有一个相同小写字母者,表示差异不显著(LSD法, $P=0.05$).

2.6 稻米品质性状分析

博优 253 是广西的推广品种,其审定时米质指标为整精米率 66.4%、长宽比 2.6、垩白米率 40%、垩白度 5.9%、胶稠度 43 mm、直链淀粉质量分数 19.3%. 以博优 253 为对照,对上述考种的各品系进行了品质分析,结果见表 3. 由表 3 可见,1932 的长宽比略大于对照品种,精米率和整精米率也接近对照;并且所得品系的垩白米率和垩白度也低于对照;

直链淀粉质量分数也均低于对照. 多重比较结果表明,垩白度与直链淀粉质量分数在各品系间无差异;1911 与 1918 精米率有显著差异;1925 与 1936 整精米率有显著差异,其他均无明显差异;垩白米率中 1918 与对照差异显著,其他区组差异不大. 上述结果表明,在蒸煮食味品质方面,各待测品系与对照的差异均不明显,说明各待测品系基本稳定(表 3).

表 3 各品系的稻米品质分析及多重比较结果¹⁾
Tab.3 Analysis of rice quality and multiple comparison

品系	精米率/%	整精米率/%	长/宽	垩白米率/%	垩白度/%	胶稠度/mm	w(直链淀粉)/%
1909	69.11ab	61.76ab	2.49a	33.3abc	3.15a	47.17ab	14.47a
1911	71.01a	62.29ab	2.53a	42.67ab	4.39a	46.67ab	14.12a
1916	69.02ab	62.02ab	2.42ab	34.00abc	3.16a	33.00cd	14.42a
1918	66.03b	66.83ab	1.83b	45.67a	4.04a	48.83ab	13.03a
1925	68.14ab	64.85b	2.51a	30.00abc	2.18a	35.67bcd	13.57a
1932	69.02ab	64.80ab	2.67a	33.00abc	4.22a	43.00abc	13.61a
1934	69.03ab	63.27ab	2.57a	26.33bc	3.63a	49.33a	13.35a
1936	69.12ab	60.09a	2.58a	34.66abc	5.21a	50.33a	13.98a
1937	67.02ab	64.93ab	2.55a	34.33abc	2.84a	49.00a	12.78a
对照	68.02ab	62.20ab	2.61a	40.00c	5.92a	41.00d	17.00a

1) 同列数据后凡是有一个相同小写字母者,表示差异不显著(LSD法, $P=0.05$).

2.7 利用 C189 标记对 Xa23 基因的分子标记选择

Xa23 基因是近年来发现的高抗、显性、全生育期抗病的优异特性基因. 由于这些优异特性,正更广泛地被应用于实际育种中. 本文利用 C189 标记,对笔者前期所得的育种材料进行了进一步鉴定,以期能培育出高产、优质、高抗性的水稻恢复系. 由于 C189

离 Xa23 基因很近(0.8 cM),仅利用 C189 单个分子标记辅助选择 Xa23 基因的正确率接近 100%^[7],这足以达到利用分子标记辅助选择 Xa23 基因的目的. 2007 年 P6 接种的 83 份有抗性材料中,2007 年早造分子检测有抗性的占总材料的 93.38%,无抗性的占 0.63%,抗感分离的仅占 0.15%,说明分子检测和田

间接种的结果基本一致,符合预期的结果,所得的新的抗病育种材料已经基本稳定.

3 讨论

由于可用于田间鉴定白叶枯病的强致病菌系 P6 和 P10 引自国际水稻所 (IRRI), 在中国只能在限定的地点和严格隔离控制的条件下进行人工接种, 所以在实际育种中, Xa23 基因的分子标记辅助选择显得尤为重要. 郑康乐等^[11]认为, 用于 MAS 的分子标记与目标基因的遗传距离最好小于 5.0 cM. 而前人对白叶枯病基因的 MAS 选育集中利用的 SSR 标记 RM206, 与目标基因的距离为 1.9 cM, 利用 RM206 的 MAS 准确率在 77% ~ 95% 之间^[8]. C189 标记是近年来新兴的标记, 王春连等^[7]用 C189 标记对 Xa23 基因的近等基因系 CBB23 与其感病轮回亲本 JG30 杂交所得的 F2 群体中的 571 个感病单株进行分子检测和连锁分析, 结果表明 C189 靠着丝粒一侧, 与 Xa23 的遗传距离为 0.8 cM. 将 C189 标记成功用于水稻分子育种实践, 标记辅助选择的正确率接近 100%, 已培育出 3 个将 Xa23 基因与高产、优质、抗褐飞虱等性状聚合的水稻恢复系. 本研究将 C189 标记用于前人所得的各种育种材料的 MAS, 结果表明, 分子标记检测的符合率达到 93.4%. 如此高的准确率为今后能更快更准确地获得稳定的高产优质恢复系提供了新的方法和途径.

参考文献:

- [1] MEW T W. Current status and future prospects of research on bacterial blight of rice[J]. Ann Rev Phytopath, 1987, 25:359-382.
- [2] SWING J M. Reclassification of the causal agents of bacterial blight (Xoo) and bacterial leaf streak of rice[J]. Nova Rev J Bacteriol, 1990, 40:309-311.
- [3] 章琦. 水稻白叶枯病的抗性和遗传研究进展[M]//朱立宏. 主要农作物抗病性遗传研究进展. 南京: 江苏科学技术出版社, 1990:1-13.
- [4] 孙恢鸿, 农秀美, 黄福新, 等. 广西常规稻区试品种抗白叶枯病鉴定与分析[J]. 广西植保, 1997, 10(4): 1-4.
- [5] 翟文学, 朱立煌. 水稻白叶枯病抗性基因的研究与分子育种[J]. 生物工程进展, 1999, 19(6): 9-15.
- [6] 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* 新基因 Xa-23⁽¹⁾ 的鉴定和分子标记定位[J]. 作物学报, 2000, 26(5): 536-542.
- [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[J]. 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[J]. 作物学报, 2003, 29(4): 501-507.
- [9] WU J Z, MAEHARA T, SHIMOKAWA T, et al. A comprehensive rice transcript map containing 6591 expressed sequence tag sites[J]. The Plant Cell, 2002, 14: 525-535.
- [10] 金旭炜, 王春连, 杨清, 等. 水稻抗白叶枯病近等基因系 CBB30 的培育及 Xa30(t) 的初步定位[J]. 中国农业科学, 2007, 40(6): 1094-1100.
- [11] 郑康乐, 黄宇. 标记辅助选择在水稻改良中的应用前景[J]. 遗传, 1997, 19(2): 40-44.

【责任编辑 周志红】