

分子标记辅助选择改良 C815S 的稻瘟病抗性

向聪^{1,2}, 任西明^{1,2}, 雷东阳^{1,2*}, 陈英¹

(1.湖南农业大学农学院, 湖南 长沙 410128; 2.水稻油菜抗病育种湖南省重点实验室, 湖南 长沙 410128)

摘要: 为提高水稻两系不育系 C815S 的稻瘟病抗性, 以含广谱抗稻瘟病基因 *Pigm* 的谷梅 4 号为供体, C815S 为受体, 通过杂交、回交并结合分子标记辅助选择, 将 *Pigm* 基因导入 C815S 中, 经抗性鉴定和综合农艺性状评价, 获得了 3 个携带纯合抗性基因的改良不育株系(7CS01、7CS02、7CS03)。抗性鉴定结果显示: 7CS01 病级为 1 级, 表现为抗; 7CS02 和 7CS03 病级为 3 级, 表现为中抗; 改良不育株系稻瘟病抗性综合指数平均较 C815S 提高 58.05%; 改良不育系穗数平均比 C815S 提高 26.45%。

关键词: 稻瘟病抗性; 水稻两系不育系 C815S; 分子标记辅助选择; 抗性鉴定

中图分类号: S511.035.4

文献标志码: A

文章编号: 1007-1032(2018)01-0062-04

Improvement of rice blast resistance of C815S through molecular marker-assisted selection

XIANG Cong^{1,2}, REN Ximing^{1,2}, LEI Dongyang^{1,2*}, CHEN Ying¹

(1.College of Agronomy, Hunan Agricultural University, Changsha, Hunan 410128, China; 2.Hunan Provincial Key Laboratory of Rice and Rapeseed Breeding for Disease Resistance, Changsha, Hunan 410128, China)

Abstract: To improve the blast resistance of C815S, a widely applicable two-line photo-thermal-sensitive male sterile in China, Gumei 4 contained rice blast resistance gene *Pigm* was used as gene donor to introduce *Pigm* into the genetic background of C815S by cross and then back cross breeding combined with molecular marker-assisted selection (MAS). Three improved sterile lines with *Pigm* homozygous genotype were developed through blast resistance identification and evaluation of comprehensive agronomic characters. 7CS01 showed 1st grade for blast, meant resistance; 7CS02 and 7CS03 showed 3rd grade for blast, meant middle resistance. Blast resistance comprehensive index of the improved sterile lines was raised by 58.05% and average spike number raised by 26.45%, compared to C815S.

Keywords: rice blast resistance; C815S; MAS; resistance identification

水稻稻瘟病抗性属于质量-数量性状^[1-3], 易受外界环境条件的影响, 利用常规育种手段进行表型选择难度较大, 效率低^[4], 采用分子标记辅助选择技术则对水稻稻瘟病抗性进行改良具有显著效果。已有超过 40 个抗稻瘟病基因被定位, 25 个稻瘟病基因被克隆^[5], 其中, *Pigm* 基因是具有广谱抗性的稻瘟病基因, 被精细定位于第 6 染色体的 *Pi2/9* 位点^[6]。王飞等^[7]利用分子标记辅助选择将 *Pigm* 基因导入高产易感稻瘟病品系‘武运粳 29196’中, 获

得了 82 个含有 *Pigm* 基因的纯合株系。向小娇等^[8]研究表明, *Pigm* 基因在提高水稻稻瘟病抗性的同时, 对水稻主要农艺性状的影响较小。曹志等^[9]以含 *Pigm*、*Pi9*、*Pi51*、*Pi47*、*Pi48*、*Pi2-1* 等 6 个广谱抗稻瘟病基因的品种为供体亲本, 通过分子标记辅助选择, 将这些抗病目的基因导入 C815S 中, 结果含 *Pigm* 基因的株系的稻瘟病抗性最强。

因亲本自身的稻瘟病抗性普遍表现较差, 目前生产上大面积推广应用的杂交稻大多数抗性不甚

理想^[10-11]。湖南农业大学水稻科学研究所选育的两系不育系 C815S 具有不育起点温度低、株型理想、配合力强和异交结实好的特点^[12]，生产应用面积大，但近年来稻瘟病生理小种不断变异，导致 C815S 对稻瘟病的抗性逐步衰退。笔者拟通过杂交、回交和分子标记辅助选择育种技术，将广谱抗稻瘟病基因 *Pigm* 导入 C815S 中，旨在获得具有持久稻瘟病抗性的改良水稻两系不育系，为选育安全高效的两系杂交稻提供优良亲本材料。

1 材料与方法

1.1 材料

供体亲本谷梅 4 号，受体亲本 C815S，感病对照 CO39，均由湖南农业大学水稻研究所提供。

1.2 方法

1.2.1 不育系改良进程

2014 年 12 月至 2015 年 4 月，在海南三亚，利用 C815S 与谷梅 4 号(含 *Pigm* 基因)杂交，获得杂种 F_1 ；2015 年 5—10 月，在湖南长沙，将 F_1 代与轮回亲本 C815S 回交，获得 BC_1F_1 ；2015 年 11 月至 2016 年 4 月，在海南三亚，选择含抗性目的基因的优良单株回交获得 BC_2F_1 ；2016 年 5—11 月在长沙，继续选择含抗性杂合基因、田间性状表现接近 C815S 的单株回交，获得 BC_3F_1 ；2016 年 12 月至 2017 年 4 月在海南三亚，自交获得 BC_3F_2 ，筛选含抗性纯合基因、田间农艺性状优良的目标单株。其间，每一回交世代均利用与目标基因紧密连锁的分子标记(RM7311)筛选基因杂合的单株， BC_3F_2 世代利用分子标记技术筛选携带纯合目的基因的单株，在利用分子技术选择的同时，筛选植株农艺性状接近 C815S 的优良株系，最后对 BC_3F_2 进行稻瘟病抗性鉴定。

1.2.2 引物筛选和分子检测

筛选到与稻瘟病抗性基因 *Pigm* 紧密连锁的多态性分子标记 RM7311，正向引物序列为 5'-AGTG GTCGTTGAACTCGGAG-3'，反向引物序列为 5'-TCGTGGCGCCTTTAATCTC-3'。

采用 CTAB 法提取水稻叶片 DNA。PCR 反应体系为 10 μ L，含 1 μ L DNA 模板、0.2 μ mol/L 正、反向引物各 0.2 μ L、5 μ L 2 \times EasyTaq SuperMix 以及

3.6 μ L ddH₂O。引物 RM7311 的 PCR 反应程序为：95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min 后，进行 35 个循环扩增，循环条件为 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s，58 $^{\circ}$ C 复性 30 s，72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min，最后在 72 $^{\circ}$ C 中延伸 5 min，于 4 $^{\circ}$ C 保存。PCR 扩增产物在 2% 的琼脂糖凝胶上电泳分离，EB 染色并记录结果。

1.2.3 改良不育系的稻瘟病抗性鉴定

不育系改良材料的稻瘟病抗性鉴定在湖南省浏阳市大围山抗性鉴定圃进行。每份材料插 6 行，每行 8 株，单本插，株行距 20 cm \times 25 cm，四周栽插感病对照 CO39，防虫不防病，增施氮肥。按照国家水稻区域试验稻瘟病抗性鉴定操作规程 (<http://pg.natesc.gov.cn>)，主要调查水稻叶瘟病级、穗瘟发病率、穗瘟损失率和穗瘟病级。抗性指数=苗叶瘟平均级数 \times 25%+穗瘟发病率病级 \times 25%+穗瘟损失指数病级 \times 50%。抗性综合指数 $<$ 0.1，0 级，高抗；抗性综合指数 0.1~2.0，1 级，抗；抗性综合指数 2.1~4.0，3 级，中抗；抗性综合指数 4.1~6.0，5 级，中感；抗性综合指数 6.1~7.5，7 级，感；抗性综合指数 7.5~9.0，9 级，高感。

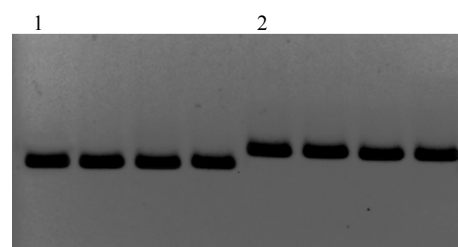
1.3 数据处理

采用 DPS 软件处理数据。

2 结果与分析

2.1 分离世代株系检测

引物多态性筛选结果表明，RM7311 在供体亲本谷梅 4 号中扩增出的产物较小，受体亲本 C815S 中扩增出的产物较大，如图 1 所示，供体和受体 PCR 扩增产物电泳带型间差异明显，表明 RM7311 在谷梅 4 号和 C815S 间具有较好的多态性。利用这个与 *Pigm* 基因紧密连锁的 SSR 引物能够筛选到抗性目的基因单株。



1 谷梅 4 号；2 C815S。

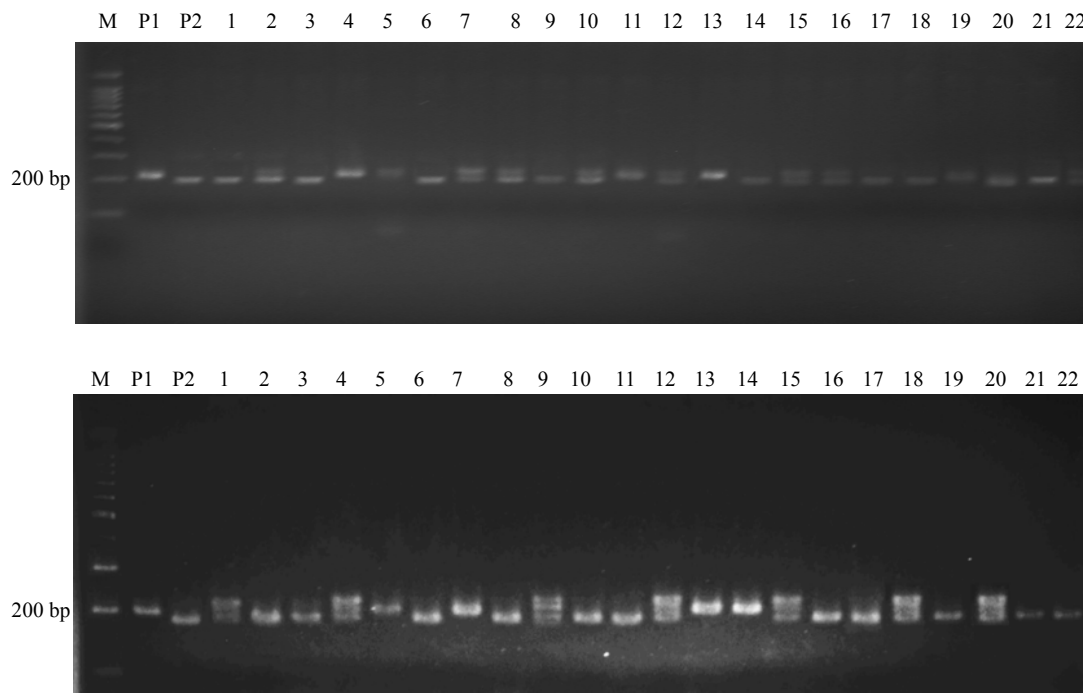
图 1 稻瘟病抗性基因 *Pigm* 引物筛选结果

Fig.1 Primer screening result for rice blast resistance gene *Pigm*

利用筛选到的多态性分子标记 RM7311 对不同

回交世代群体进行基因型选择,在 BC_1F_1 、 BC_2F_1 和 BC_3F_1 回交世代中,基因型表现为杂合带型和受体亲本纯合带型的分离比例基本符合 1:1 的比例。不育系改良过程中保留含 *Pigm* 抗性基因、农艺性状接近 C815S 的单株继续回交,同时保证足够规模的回交选择群体,以确保目的基因的存在并能够筛选到综合性状优良的不育系单株。

在 BC_3F_1 回交世代群体中,选择了 3 个农艺性状与受体亲本 C815S 基本一致且含抗性目的基因的优良单株,获得 BC_3F_2 世代不育系种子,加代自交继续种植,并利用分子标记 RM7311 进行检测,部分植株的基因型结果如图 2。结合农艺性状考察,筛选出 7CS01、7CS02 和 7CS03 这 3 个携带纯合抗病基因的优良不育系单株。



M DNA marker; P1 供体亲本谷梅 4 号; P2 受体亲本 C815S; 泳道 1~22 BC_3F_2 代单株。

图 2 BC_3F_2 代株系稻瘟病抗性 *Pigm* 的 PCR 分子检测结果

Fig.2 PCR analysis of SSR marker for rice blast resistance gene *Pigm*

2.2 改良不育系的稻瘟病抗性

2017 年夏季,将携带 *Pigm* 基因的 BC_3F_2 代株系种植于湖南省浏阳大围山稻瘟病病圃进行田间抗性鉴定。结果(表 1)表明:C815S 的叶瘟为 4 级,谷梅 4 号的叶瘟为 2 级,3 个改良株系中,2 个表现为 3 级,1 个 4 级;改良株系的稻瘟病发病率为 10%~20%,抗性级别 3~5 级,表现中抗至中感,

而 C815S 的稻瘟病发病率为 52%,表现高感,3 个改良株系的稻瘟病发病率平均较 C815S 降低了 73.1%;改良株系的稻瘟损失率均为 1 级,综合抗性指数 2.0~2.8, C815S 的稻瘟损失率为 20.1%,综合抗性指数 5.8,3 个改良株系的稻瘟损失率平均较 C815S 降低了 78.4%。所改良的 3 个株系的综合抗性指数略低于谷梅 4 号,但相比 C815S 显著提高(平均提高了 58.0%)。

表 1 BC_3F_2 株系的稻瘟病鉴定结果

Table 1 Rice blast resistance identification for improved line

BC ₃ F ₂ at Daweishan, Hunan				
株系	叶瘟病级	穗瘟病发病率/%	穗瘟病损失率/%	抗性综合指数
7CS01	4	12.0(5)	4.2(1)	2.8(MR)
7CS02	3	10.0(3)	4.0(1)	2.0(R)
7CS03	3	20.0(5)	4.8(1)	2.5(MR)
C815S	4	52.0(9)	20.1(5)	5.8(MS)
谷梅 4 号	2	10.0(3)	3.2(1)	1.8(R)

2.3 改良不育系的主要农艺性状

2017 年 9 月,随机选取 C815S 及 3 个改良不育系各 15 株,考察株高、穗数、剑叶长、剑叶宽、剑叶角度、穗长、每穗粒数、柱头外露率等性状,列于表 2。结果表明,改良不育系基本保留了亲本 C815S 的优良农艺性状,且个别株系的农艺性状优于 C815S。所改良不育系的穗数较 C815S 平均提高了 26.45%,达到显著水平;7CS02 的穗长提高了

15.56%，也达到显著水平。

表 2 改良不育系与亲本的农艺性状

Table 2 Comparison of agronomical traits of improved sterile lines with the parent

材料	株高/cm	单株穗数	剑叶长/cm	剑叶宽/cm	剑叶角度/(°)	穗长/cm	每穗总颖花数	柱头外露率/%
7CS01	87.6	14.7b	44.2	1.7	12.6	22.4ab	199.5	77.9
7CS02	83.5	16.7a	43.6	1.8	13.5	24.5a	188.7	75.9
7CS03	84.7	14.5b	47.4	1.7	13.6	21.6b	200.9	78.6
C815S	85.5	12.1c	43.1	1.8	13.4	21.2b	181.7	75.3

同列不同小写字母示在 0.05 水平差异显著。

3 讨论

传统育种主要通过杂交和回交方法改良水稻稻瘟病抗性，然后将分离群体种植于稻瘟病病圃区域，在发病后进行单株选择，再根据亲本类型及发病情况推测其抗性基因型^[13]，选择的的目的性不强且受环境条件影响大。利用分子辅助标记可以在每一改良世代都进行抗性基因筛选，在筛选含有抗性目的基因的基础上再进行表型选择，因此，较容易筛选到含有抗性基因且综合性状优良的目的单株，育种年限大大缩短，目的性更强，效果也更佳。

笔者采用分子标记辅助选择的方法，在 BC₃F₂ 世代便筛选到综合性状优良且含目的基因的单株，为后续育种提供了中间材料，但研究中也发现，含同一抗性基因的不同改良株系材料间的田间抗性表现略有差异，如株系 7CS02 含有 *Pigm* 基因，表现为抗稻瘟病，而 7CS01 和 7CS03 同样含有 *Pigm* 基因，却表现为中抗稻瘟病，究其原因，虽然 3 个改良不育系株系属于同一世代，但可能由于遗传背景上的差异，导致其抗性水平不同，也有可能是因为田间病菌分布不均匀影响了鉴定结果的准确性。此外，部分单株虽然室内分子检测中含有抗病目的基因，田间抗性鉴定也表现为高抗稻瘟病，但本身农艺性状却不太理想，并不能直接作为育种材料利用，因此，在采用分子标记辅助选择技术改良作物抗性时，有必要在改良的不同世代，种植较大规模群体，以达到筛选综合农艺性状与优良轮回亲本相似且拟改良的抗性性状效果好的目的。

本研究部分试验在杂交水稻国家重点实验室完成，得到该实验室研究人员的帮助，谨致谢意。

参考文献：

[1] 雷财林，凌忠专，王久林，等．水稻抗病育种研究进

展[J]．生物学通报，2004，39(11)：4-7．

- [2] 何秀英，廖耀平，陈钊明，等．水稻稻瘟病抗病育种研究进展与展望[J]．广东农业科学，2011(1)：30-33．
- [3] 段永嘉．稻瘟病抗性基因分析研究[J]．植物病理学报，1988，18(4)：234-238．
- [4] 杨丰宇，李永聪，刘雄伦，等．分子标记辅助选择改良早籼稻 1701 的稻瘟病抗性[J]．分子植物育种，2017，15(6)：2212-2217．
- [5] BALLINI E, MOREL J B, DROC G, et al．A genome-wide meta-analysis of rice blast resistance genes and quantitative trait loci provides new insights into partial and complete resistance[J]．Molecular Plant Microbe Interact, 2008, 180: 2257-2276．
- [6] DENG Y W, ZHU X D, SHEN Y, et al．Genetic characterization and fine mapping of the blast resistance locus *Pigm(t)* tightly linkd to *Pi2* and *Pi9* in a broad-spectrum resistant chinese variety[J]．Theoretical and Applied Genetics, 2006, 113(4)：705-713．
- [7] 王飞，王立广，潘梅瑶，等．水稻抗稻瘟病 *Pigm(t)* 基因的分子标记辅助选择与利用[J]．华北农学报，2016(1)：51-56．
- [8] 向小娇，张建，郑天清，等．应用分子标记技术改良京作 1 号的稻瘟病抗性[J]．植物遗传资源学报，2016，17(4)：773-780．
- [9] 曹志，曾盖，郝明，等．利用 MAS 技术改良水稻两用核不育系 C815S 的稻瘟病抗性[J]．分子植物育种，2015，13(6)：1193-1200．
- [10] 赵鹏，冯冉冉，肖巧珍，等．聚合抗褐飞虱基因 *Bph20(t)* 和 *Bph21(t)* 及抗稻瘟病基因 *Pi9* 水稻株系筛选[J]．南方农业学报，2013，44：885-892．
- [11] 胡巍，李艳芳，胡侃，等．分子标记辅助选择抗褐飞虱基因改良桂农占的 BPH 抗性[J]．分子植物育种，2015，13(5)：951-960．
- [12] 唐文邦，何强，肖应辉，等．水稻两用核不育系 C815S 所配组合杂种优势分析[J]．湖南农业大学学报(自然科学版)，2004，30(6)：499-502．
- [13] 肖伟军．分子标记辅助选择改良 R666 的稻瘟病抗性[D]．武汉：华中农业大学，2016．

责任编辑：罗慧敏

英文编辑：罗维