

研究报告

A Letter

利用分子标记鉴定超级稻恢复系 R9308 的白叶枯病抗性基因

陈深广¹, 杨杨^{1,2}, 吴建利¹, 程式华¹

1. 水稻生物学国家重点实验室, 国家水稻改良中心, 中国水稻研究所, 杭州, 310006

2. 杭州师范大学生命与环境科学学院, 杭州, 310036

✉ 通讯作者: shcheng@mail.hz.zj.cn ✉ 作者

分子植物育种, 2011年, 第9卷, 第15篇 doi: 10.5376/mpb.cn.2011.09.0015

收稿日期: 2010年11月15日

接受日期: 2010年12月28日

发表日期: 2011年02月22日

这是一篇采用 Creative Commons Attribution License 进行授权的开放获取论文。只要对本原作有恰当的引用, 版权所有人允许并同意第三方无条件的使用与传播。

引用格式:

陈深广等, 2011, 利用分子标记鉴定超级稻恢复系 R9308 的白叶枯病抗性基因, 分子植物育种 Vol.9 No.15 (doi: 10.5376/mpb.cn.2011.09.0015)

摘要 协优 9308 是我国第一代超级杂交稻品种, 具有 12t/ha 的产量潜力, 其恢复系 R9308 源于籼粳交后代。本研究利用分子标记分析了 R9308 的白叶枯病抗性基因, 结果表明, R9308 中至少含最常见的 *Xa4* 基因, 来源于其亲本之一的 IR26。但 R9308 的抗性谱较单基因系 IRBB4 更广, 表明该恢复系可能含有其他未知基因。本研究为 R9308 的利用和改良提供了基础。

关键词 水稻; 白叶枯病抗性基因; 标记辅助选择; 恢复系

Identification of Bacterial Blight Resistance Genes in Super Rice Restorer Line R9308 Using Molecular Markers

Chen Shenguang¹, Yang Yang^{1,2}, Wu Jianli¹, Cheng Shihua¹

1. State Key Laboratory of Rice Biology, Chinese National Center for Rice Improvement, China National Rice Research Institute, Hangzhou, 310006, P.R. China

2. College of Life and Environmental Sciences, Hangzhou Normal University, Hangzhou, 310036, P.R. China

✉ Corresponding author, shcheng@mail.hz.zj.cn; ✉ Authors

Abstract Xieyou9308, the first generation of super hybrid in China, possesses the high-yielding potential of 12t/ha. Its restorer line was derived from the offsprings of an indica/japonica cross. In the present study, detection of bacterial blight resistance genes in the super rice restorer line, R9308, was carried out using functional molecular markers. The results indicated that R9308 possessed at least one bacterial blight resistance gene *Xa4* which came from one of the parents IR26. The resistant spectrum of R9308 was broader than that of monogenic line IRBB4, indicating R9308 might possess unknown bacterial resistance gene (s). This work provides clues for the utilization and improvement of R9308.

Keywords *Oryza sativa* L.; Bacterial blight resistance gene; Marker assisted-selection; Restorer line

研究背景

由黄单孢菌(*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*, Xoo)引起的白叶枯病是水稻最严重的细菌性病害之一。稻作生产中防治该病害最经济有效的方法是选育推广抗病的新品种, 包括抗性更强的多基因聚合的品种(Huang et al., 1997), 这就要求水稻研究人员充分发掘、鉴定和评价有育种利用价值的稻种资源(王春莲等, 2004; 夏志辉等, 2009; 郑崇珂等, 2009)。迄今为止, 已经在全球稻种资源中鉴定了32个白叶枯病抗性基因(郑崇珂等, 2009; 章琦, 2005; 金旭炜等, 2007), 其中19个基因通过经典遗传和分子标记方法进行了定位, 有7个基因通过图位法得到克隆

分离, 包括*Xa1*、*Xa21*、*Xa23*、*Xa26(Xa3)*和*Xa27*等5个显性基因以及*xa5*和*xa13*两个隐性基因(Yoshimura et al., 1998; Xiang et al., 2006; Song et al., 2005; 张小红等, 2008; Sun et al., 2004; Gu et al., 2005; Iyer et al., 2004; Chu et al., 2006)。通过基因克隆, 不仅为抗病基因的作用机制的探明奠定基础, 同时也发掘了相应的分子标记, 为利用标记辅助选择等现代生物学技术培育白叶枯病抗性水稻新品种提供了有利的技术支撑(章琦, 2009)。

近年来, 我国十分重视高产、优质与抗病的超级稻的选育和推广。R9308是超级稻协优9308的恢复系, 用其配组的协优9308是中国水稻研究所培育

的首个超级杂交水稻, 米质优、对白叶枯病表现中抗, 曾经被农业部列为重点推广的超级稻之一。亲本之一的协青早A/B对白叶枯病抗性不佳(姬广海等, 2000), 因此协优9308的抗病性主要来源于恢复系R9308, 但R9308的白叶枯病抗性基因一直未有深入研究。实际上, 缺少对绝大多数新品种及其亲本的抗性组份的研究现象在我国非常普遍, 这也限制了这些新品种与亲本在育种中的进一步有目的利用, 造成盲目配组选育现象。另外, 在新品种的各級区试中一般采用混合菌株进行抗性评价, 也无法知道新品种中的抗性基因。本文试图利用DNA分子标记结合田间抗性评价对协优9308、协青早B、恢复系R9308及其亲本可能含有的白叶枯病抗性基因进行鉴定, 探讨R9308的抗性基础, 为恢复系R9308进一步育种利用与改良提供依据。

1 结果与分析

1.1 分子标记验证

利用检测5个白叶枯病抗性基因的5对分子标记对上述材料进行分析。结果表明, 所有5对引物均能扩增出PCR产物。其中, 检测Xa4基因的引物Xa4在Xa4单基因系IRBB4、R9308、IR26、协A/R9308以及协B/R9308中检测到一条约150 bp的带, 此外, 该引物还在IRBB10中检测到相同的带, 这是因为IRBB10中的Xa10与Xa4之间的重组值为10% (图1)。

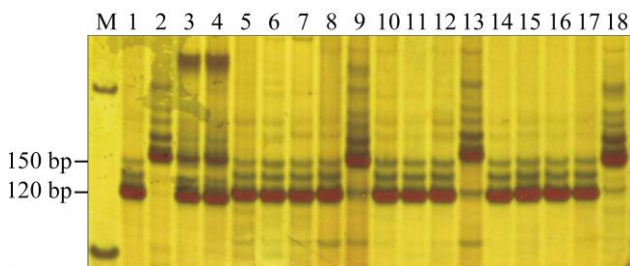


图1 白叶枯病抗性基因Xa4的标记分析

注: M: DNA ladder; 1: 协B; 2: R9308; 3: 协B/R9308; 4: 协A/R9308; 5: IR24; 6: 300号; 7: C57; 8: IRBB3; 9: IRBB4; 10: IRBB5; 11: IRBB7; 12: IRBB8; 13: IRBB10; 14: IRBB11; 15: IRBB13; 16: IRBB14; 17: IRBB21; 18: IR26

Figure 1 Marker detection on bacterial blight resistance gene Xa4
Note: M: DNA ladder; 1: Xie B; 2: R9308; 3: Xie B/R9308; 4: A/R9308; 5: IR24; 6: No.300; 7: C57; 8: IRBB3; 9: IRBB4; 10: IRBB5; 11: IRBB7; 12: IRBB8; 13: IRBB10; 14: IRBB11; 15: IRBB13; 16: IRBB14; 17: IRBB21; 18: IR26

相反, 在协B、300号、C57以及感病对照IR24中没有检测到该带, 而检测到一条约120 bp的带。由于300号、C57和IR26均为R9308的亲本, 因此上述结果说明, 恢复系R9308中可能存在白叶枯病抗性基因Xa4, 而且该基因来源于其亲本之一的IR26, 另外两个亲本300号和C57不含Xa4基因。检测xa5基因的引物xa5在xa5单基因系IRBB5以及R9308、协B、300号、协A/R9308和协B/R9308中检测到一条约287 bp的带, 而在IR26和对照IR24中检测到一条略小的带, C57扩增不出任何带。这一结果说明R9308、协B和300号中可能存在xa5基因。对于另外3个基因Xa7、xa13和Xa21, 仅分别在其单基因系IRBB7、IRBB13、IRBB21中检测到相应的带, 而在R9308、协B、300号、C57、IR26、协A/R9308和协B/R9308中没有检测到相应的带。这一结果说明, R9308中不存在上述三个基因。此外, 我们还对Xa23、Xa27和Xa32(t)也分别进行了检测, 但也未发现有任何相关性(未发表数据)。

1.2 白叶枯病抗性表现

为了验证R9308中是否存在Xa4和xa5两个抗性基因, 我们利用一套菲律宾白叶枯病抗性小种对其抗性进行了鉴定。结果表明, 协B、300号和感病对照IR24对所有小种均表现感病(表1)。与单基因系

表1 白叶枯病抗性鉴定结果

Table 1 Evaluation of bacterial blight resistance

水稻 Rice	小种 Race									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
IRBB4	R	R	S	M	S	S	S	R	S	R
IRBB5	R	R	R	S	M	S	R	R	S	M
协 B	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Xie B										
R9308	MR	MR	S	R	M	S	S	M	R	R
300 号 No. 300	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
C57	S	R	S	S	S	S	S	MR	S	M
IR26	R	R	S	R	R	S	S	R	R	R
协 A/9308	R	R	S	R	MS	S	R	-	R	MR
XieA/9308										
协 B/9308	MR	-	-	R	MS	S	M	-	R	R
XieB/9308										
IR24 (CK)	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S

注: M: 表示 MR 和 MS 共存; -: 无数据

Note: M: co-existence of MR and MS; -: missing data

IRBB5相比, R9308也在5个小种上(PXO71, 112, 340, 145, 280)有抗性差异, 这一结果说明, 在R9308、协B和300号中检测到的与IRBB5相同的带可能仅仅是 $xa5$ 的等位基因, 不具有抗性功能, 或者说R9308中不存在 $xa5$ 基因。虽然与单基因系IRBB4的抗谱不尽相同, 但R9308和IR26的抗谱最为接近, 此外两个杂种协A/R9308和协B/R9308与R9308一致, 而且也与IRBB4相似。结合分子标记检测结果, 说明恢复系R9308的主要白叶枯病抗源基因为 $Xa4$ 。另外, R9308与IRBB4最主要的抗性差异表现在小种9上, R9308为抗, 而IRBB4为感病, 说明R9308可能存在未知的抗病基因。

2讨论

我国具有丰富的稻种资源, 发掘稻种资源中的抗性基因甚至远源抗性基因是改良水稻抗性的重要途径(章琦, 2005; 沈玮玮等, 2010)。与其他病害一样, 培育抗白叶枯病的水稻新品种是防治该病害的最有效途径。迄今为止, 科学家已经在全球稻种资源中鉴定了32个白叶枯病抗性基因。其中 $Xa7$ 、 $xa5$ 、 $Xa21$ 和 $Xa23$ 等基因具有广谱抗性, 是白叶枯病抗性改良的首选基因, 可以通过标记辅助选择进行聚合的方法加以利用。这一方法在白叶枯病抗性改良种已经证明是行之有效的方法(Huang et al., 1997; Cao et al., 2003)。

在杂交水稻选育中, 通常利用的是显性白叶枯病抗性基因, 除非不育系和恢复系中都含有相同的隐性基因。虽然已经鉴定了30余个白叶抗病基因, 但在生产实践中应用的往往是少数几个基因。在我国, 利用频率最高的是 $Xa4$ 基因, 抗源狭窄, 潜藏白叶枯病大爆发的危险。因此, 有目的的利用多基因抗性是解决这一问题的有效途径。为此, 需要在品种选育过程中对亲本材料的抗性基础具有充分的了解。中国水稻研究所培育的杂交水稻恢复系R9308具有许多优异的农艺性状, 分别来源于C57、300号和IR26。对国内白叶枯病小种的混合接种表现中抗, 但抗性基因以及其来源不清楚。本文采用单小种鉴定方法, 对杂交稻协优9308及其亲本协B和恢复系R9308, R9308的三个亲本300号、C57和IR26分别进行了鉴定。与预期的一致, R9308的抗性基因来源于IR26的 $Xa4$, 但R9308的抗谱较 $Xa4$ 为广, 因此可能还存在其他抗性基因, 需要进一步研

究。从本研究结果看, R9308中不含 $Xa7$ 、 $xa13$ 和 $Xa21$, 也未检测到与 $Xa23$ 、 $Xa27$ 和 $Xa32(t)$ 的相关, 但包括这些基因在内, 许多白叶枯病抗性基因还缺少相应的单基因系。因此, 需要加强这方面的研究, 为新基因的快速鉴定、等位性的研究等提供了基础。

3材料与方法

3.1水稻材料

R9308为本课题组选育的籼型杂交稻恢复系, 亲本为C57、300号和IR26。2009年R9308与协青早B共同种植于中国水稻研究所海南繁育基地。以协青早A和B为母本, R9308为父本分别配置组合。2010年两个 F_1 、协青早B、R9308及其3个亲本以及白叶枯病抗性单基因系IRBB3、IRBB4、IRBB5、IRBB7、IRBB8、IRBB10、IRBB11、IRBB13、IRBB14和IRBB21作为单季稻种植于中国水稻所富阳实验基地网室内。

3.2白叶枯病小种与接种

采用10个菲律宾白叶枯病小种进行抗性鉴定, 分别为小种1(PXO61)、小种2(PXO86)、小种3(PXO79)、小种4(PXO71)、小种5(PXO112)、小种6(PXO99)、小种7(PXO145)、小种8(PXO280)、小种9(PXO339)和小种10(PXO341)。所有菌系于甘油中保存在 -80°C 冰箱, 接种前用Wakimoto培养基复壮菌株, 置于 28°C 培养48 h, 以无菌水配制接种菌液, 浓度调至 1×10^9 CFU mL, 在成株期采用剪叶法接种, 每个材料接种三片叶。接种后15天量取病斑长度和叶片总长, 以病斑长度占20%为抗感标准, 小于10%为抗病(R), 10~20%为中抗(MR), 20~30%为中感(MS), 大于30%为感病(S)。

3.3引物设计与PCR扩增

采用简易法提取水稻DNA(卢扬江和郑康乐, 1992)。利用文献报道合成了检测5个白叶枯病抗性基因的PCR引物(表2)。50 μL PCR扩增体系中含: 5 μL $10 \times$ PCR缓冲液(Invitrogen), 10 $\mu\text{mol/L}$ dNTP(鼎国), 2 μL 50 mmol/L MgSO_4 , 1 μL 10 $\mu\text{mol/L}$ 前引物, 1 μL 10 $\mu\text{mol/L}$ 后引物, 1单位Taq DNA聚合酶(Invitrogen), 2 μL 模板DNA。反应条件: 94°C 预变性2分钟; 94°C 30秒、 60°C 30秒、 72°C 60秒, 共35个循环; 最后 72°C 延伸5分钟。PCR产物在1%琼脂糖凝胶上电泳检测。

表 2 用于抗性基因检测的分子标记

Table 2 Molecular markers used for assay of bacterial blight resistance genes

标记 Marker	前引物(5'-3') Forward primer (5'-3')	后引物(5'-3') Reverse primer (5'-3')	参考文献 Reference
<i>Xa4</i>	ATCGATCGATCTTCACGAGG	TGCTATAAAAAGGCATTCGGG	Huang et al., 1997
<i>xa5</i>	TAGCTGCTGCCGTGCTGTGC	AATATTTTCAGTGTGCATCTC	Iyer et al., 2004
<i>Xa7</i>	CGATCTTACTGGCTCTGCAACTCTGT	GCATGTCTGTGTCGATTCGTCGGTACGA	Porter et al., 2003
<i>xa13</i>	AGCTCCAGCTCTCCAAATG	GGCCATGGCTCAGTGTTTAT	Chu et al., 2003
<i>Xa21</i>	ATAGCAACTGATTGCTTGG	CGATCGGTATAACAGCAA AAC	Yoshimura et al., 1998

作者贡献

陈深广和杨杨是本研究的实验设计和实验研究的执行人,也是数据分析,论文初稿的完成人;吴建利和程式华是项目的构思者及负责人,指导实验设计,数据分析,论文写作与修改。全体作者都阅读并同意最终的文本。

致谢

本研究由国家863计划专项(2009AA101101)和农业部超级稻专项(2006-9)资助。感谢国际水稻研究所VeraCruz博士提供白叶枯病菌小种。

参考文献

Cao L.Y., Zhuang J.Y., Yuan S.J., Zhan X.D., Zheng K.L., and Cheng S.H., 2003, Hybrid rice resistant to bacterial leaf blight developed by marker assisted selection, *Rice Sci.*, 11: 68-70

Chu Z.H., Yuan M., Yao J.L., Ge X.J., Yuan B., Xu C.G., Li X.H., Fu B.Y., Li Z.K., Bennetzen J.L., Zhang Q.F., and Wang S.P., 2006, Promoter mutations of an essential gene for pollen development result in disease resistance in rice, *Genes Dev.*, 20: 1-5

Gu K.Y., Yang B., Tian D., Wu L., Wang D., Sreekala C., Yang F., Chu Z., Wang G.L., White F.F., and Yin Z., 2005, R gene expression induced by a type-III effector triggers disease resistance in rice, *Nature*, 435: 1122-1125

Huang N., Angels E.R., Domingo J., Mangpantay G., Singh S., Zhang G., Kumar N., Vadivel B.J., and Khush G.S., 1997, Pyramiding of bacterial blight resistance genes in rice: marker-assisted selection using RFLP and PCR, *Theor Appl Genet*, 95: 313-320

Iyer A.S., and McCouch S.R., 2004, The rice bacterial blight resistance gene *xa5* encodes a novel form of disease resistance, *Mol. Plant Microbe Int.*, 17: 1348-1354

Ji G.H., Zhang S.G., and Xu Z.G., 2000, Evaluation on resistance of rice cultivars to bacterial blight, *Yunnan Nongye Daxue Xuebao (Journal of Yunnan Agricultural University)*, 15(4): 321-323 (姬广海, 张世光, 许志刚,

2000, 水稻品种对白叶枯病抗性鉴定的研究, *云南农业大学学报*, 15(4): 321-323)

Jin X.W., Wang C.L., Yang Q., Jiang Q.X., Fan Y.L., Liu G.C., and Zhao K.J., 2007, Breeding of near-isogenic line CBB30 and molecular mapping of *Xa30(t)*, a new resistance gene to bacterial blight in rice, *Zhongguo Nongye Kexue (Sci. Agric. Sin.)*, 40(6): 1094-1100 (金旭炜, 王春莲, 杨清, 江祺祥, 樊颖伦, 刘古春, 赵开军, 2007, 水稻抗白叶枯病近等基因系CBB30的培育及*Xa30(t)*的初步定位, *中国农业科学*, 40(6): 1094-1100)

Lu Y.J., and Zheng K.L., 1992, A simple method to extract rice DNA, *Zhongguo Shuidao Kexue (Chin. J. Rice Sci.)*, 6(1): 47-48 (卢扬江, 郑康乐, 1992, 提取水稻DNA的一种简易方法, *中国水稻科学*, 6(1): 47-48)

Porter B.W., Chittoor J.M., Yano M., Sasaki T., and White F.F., 2003, Development and mapping linked to the rice bacterial blight resistance gene *Xa7*, *Crop Sci.*, 43: 1484-1492

Shen W.W., Song C.L., Chen J., Fu Y.P., Wu J.L., and Jiang S.M., 2010, Transgenic rice plants harboring genomic DNA from *Zizania latifolia* (Griseb.) confer bacterial blight resistance, *Zhongguo Shuidao Kexue (Chin. J. Rice Sci.)*, 24(5): 447-452 (沈玮玮, 宋成丽, 陈洁, 付亚萍, 吴建利, 江绍玫, 2010, 转蕈候选基因克隆获得抗白叶枯病水稻植株, *中国水稻科学*, 24(5): 447-452)

Song W.Y., Wang G.L., Chen L.L., Kim H.S., Pi L.Y., Holsten T., Gardner J., Wang B., Zhai W.X., Zhu L.H., Fauquet C., and Ronald P., 1995, A receptor kinase-like protein encoded by the rice disease resistance gene, *Xa21*, *Science*, 270: 1804-1806

Sun X.L., Cao Y.L., Yang Z.F., Xu C.G., Li X.H., Wang X.P., and Zhang Q.F., 2004, *Xa26*, a gene conferring resistance to *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* in rice, encoding an LRR receptor kinase-like protein, *Plant J.*, 37: 517-527

Wang C.L., Zhao B.Y., Zhang Q., Zhao K.J., and Xing Q.D., 2004, Identification of a new rice germplasm with resistance to bacterial blight and the breeding of a near-isogenic line, *Zhiwu Yichuan Ziyuan Xuebao (Journal of Plant Genetic*

- Resource), 5(1): 26-30 (王春连, 赵炳宇, 章琦, 赵开军, 邢全党, 2004, 水稻白叶枯病新抗源Y238的鉴定及其近等基因系培育, 植物遗传资源学报, 5 (1): 26-30)
- Xia Z.H., Han F., Gao L.F., Yuan Q.H., Zhai W.X., Liu D., and Ruo Y.H., 2009, Application of functional marker to identify genes for bacterial blight resistance in *Oryza rufipogon*, *Zhongguo Shuidao Kexue* (Chin. J. Rice Sci.), 23(6): 653-656 (夏志辉, 韩飞, 高利芬, 袁潜华, 翟文学, 刘迪, 罗越华, 2009, 利用功能标记鉴定普通野生稻中的白叶枯病抗性基因, 中国水稻科学, 23(6): 653-656)
- Xiang Y., Cao Y.L., Xu C.G., Li X.H., and Wang S.P., 2006, *Xa3*, conferring resistance for rice bacterial blight and encoding a receptor kinase-like protein, is the same as *Xa26*, *Theor. Appl. Genet.*, 113: 1347-1355
- Yoshimura S., Yamanouchi U., Katayose Y., Toki S., Wang Z.X., Kono I., Kurata N., Yano M., Iwata N., and Sasaki T., 1998, Expression of *Xa1*, a bacterial blight-resistance gene in rice, is induced by bacterial inoculation, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95: 1663-1668
- Zhang Q., 2005, High lights in identification and application of resistance genes to bacterial blight, *Zhongguo Shuidao Kexue* (Chin. J. Rice Sci.), 19(5): 453-459 (章琦, 2005, 水稻白叶枯病抗性基因鉴定进展及其利用, 中国水稻科学, 19(5): 453-459)
- Zhang Q., 2009, Genetics and improvement of resistance to bacterial blight in hybrid rice in China, *Zhongguo Shuidao Kexue* (Chin. J. Rice Sci.), 23(2): 111-119 (章琦, 2009, 中国杂交水稻白叶枯病抗性的遗传改良, 中国水稻科学, 23(2): 111-119)
- Zhang X.H., Wang C.L., Li G.F., Zhang X.K., Liang Y.T., Sun L.Q., and Zhao K.J., 2008, Genetic analysis on bacterial blight resistance of *Xa23*-transgenic rice, *Zuowu Xuebao* (*Acta Agronomica Sinica*), 34(10): 1679-1687 (张小红, 王春连, 李桂芬, 张晓科, 梁云涛, 孙亮庆, 赵开军, 2008, 转*Xa23*基因水稻的白叶枯病抗性及其遗传分析, 作物学报, 34(10): 1679-1687)
- Zheng C.K., Wang C.L., Yu Y.J., Liang Y.T., and Zhao K.J., 2009, Identification and molecular mapping of *Xa32(t)*, a novel resistance gene for bacterial blight (*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*) in rice, *Zuowu Xuebao* (*Acta Agronomica Sinica*), 35(7): 1173-1180 (郑崇珂, 王春莲, 于元杰, 梁云涛, 赵开军, 2009, 水稻抗白叶枯病新基因*Xa32(t)*的鉴定和初步定位, 作物学报, 35(7): 1173-1180)



BioPublisher是一个致力于发表生物科学研究论文、开放取阅的出版平台

在BioPublisher上发表论文, 任何人都可以免费在线取阅您的论文

- ※同行评审, 论文接受严格的高质量的评审
- ※在线发表, 论文一经接受, 即刻在线发表
- ※开放取阅, 任何人都可免费取阅无限使用
- ※快捷搜索, 涵盖谷歌学术搜索与知名数据库
- ※论文版权, 作者拥有版权读者自动授权使用

在线投稿: <http://chinese.sophiapublisher.com>