



研究论文

Research Article

利用 MAS 技术改良水稻两用核不育系 C815S 的稻瘟病抗性

曹志[✉], 曾盖[✉], 郝明[✉], 盛浩闻[✉], 叶乃忠[✉], 肖应辉[✉]

湖南农业大学水稻科学研究所, 长沙, 410128

✉ 通讯作者: xiaoyh@hunau.edu.cn; ✉ 作者

分子植物育种, 2015 年, 第 13 卷, 第 3 篇 doi: 10.5376/mpb.cn.2015.13.0003

这是一篇采用 Creative Commons Attribution License 进行授权的开放取阅论文。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(中文):

曹志等, 2015, 利用 MAS 技术改良水稻两用核不育系 C815S 的稻瘟病抗性, 分子植物育种 (online), 13(3): 1015-1022 (doi: 10.5376/mpb.cn.2015.13.0003)

引用格式(英文):

Cao et al., 2015, Improving Blast Resistance of Dual-purpose Genic Sterile Line C815S by Using Molecular Marker-assisted Selection, Fenzi Zhiwu Yuzhong (online) (Molecular Plant Breeding), 13(3): 1015-1022 (doi: 10.5376/mpb.cn.2015.13.0003)

摘要 为了改良水稻两用核不育系 C815S 的稻瘟病抗性, 本研究以 75-1-127 (*Pi9*)、谷梅 2 号(*Pi25*)、谷梅 4 号(*Pigm*)、天津野生稻(*Pi2-1* 和 *Pi51(t)*)、湘资 3150 (*Pi47* 和 *Pi48*)和魔王谷(*Pi49*)共 6 个广谱抗稻瘟病水稻品种为供体亲本, 通过分子标记辅助选择育种技术, 将稻瘟病抗性基因回交导入 C815S。结果表明: 改良的 6 个 BC₃F₁ 群体除每穗粒数较轮回亲本极显著增加外, 其他性状均与轮回亲本保持一致。利用稻瘟病菌株 110-2 和 CHL506 对 BC₃F₂ 改良株系接种鉴定, 发现导入了抗病基因的单株抗性增强, 表明抗病基因已成功导入到受体亲本中并稳定表达, 证实本研究中分子标记辅助选择抗稻瘟病基因是有效的。改良的系列两用核不育系, 一方面可用于配制稻瘟病抗性增强的两系法杂交稻新组合, 另一方面为进一步培育聚合多个抗稻瘟病基因的不育系提供了材料基础。

关键词 水稻, 两用核不育系, 稻瘟病, 分子标记辅助选择

Improving Blast Resistance of Dual-purpose Genic Sterile Line C815S by Using Molecular Marker-assisted Selection

Cao Zhi[✉], Zeng Gai[✉], Hao Ming[✉], Sheng Haowen[✉], Ye Naizhong[✉], Xiao Yinghui[✉]

Rice Research Institute, Hunan Agricultural University, Changsha, 410128

✉ Corresponding author, xiaoyh@hunau.edu.cn; ✉ Authors

Abstract In order to improve the resistance to rice blast of the dual-purpose genic sterile rice cultivar, C815S, eight broad-spectrum resistance genes including *Pi9*, *Pi25*, *Pigm*, *Pi2-1*, *Pi51(t)*, *Pi47*, *Pi48* and *Pi49*, which were harbored in the six donor parents of 75-1-127, GuMei 2 (GM2), GuMei 4 (GM4), Tianjinyeshengdao (TY), XiangZi 3150 (XZ3150) and Mowanggu (MWG), respectively, were introgressed into C815S by successive backcross three times and molecular marker assisted selection technology. The major agronomical traits, which includes duration of seeding-heading (DSH), plant height (PH), panicle length (PL), flag leaf length (FLL), flag leaf width (FLW), productive panicles (PP) and grains per panicle (GPP), were investigated. The results showed that there were no significant difference between the BC₃F₁ plants and the recurrent parents for all the traits except that the GPP of six improved BC₃F₁ were significantly larger than that of C815S. The resistant ability of the BC₃F₂ population was identified by inoculating with the rice blast strains 110-2 and CHL506. The results showed that the plants, which the resistant gene linked marker genotype showed positive, exhibited enhanced resistance compared with the recurrent parent. It is validated that the DNA markers were effective in marker-assisted selection for improving rice blast resistance of the dual-purpose genic sterile rice. A series of improved dual purpose genic male sterile lines, on the one hand, could be used to develop two-line hybrid rice combinations with enhanced rice blast resistance, on the other hand, it provides the basic materials for further male sterile lines breeding of pyramiding multiple rice blast resistance genes.

Keywords Rice, Dual-purpose genic sterile line, Rice blast, Molecular marker-assisted selection



收稿日期: 2015 年 01 月 07 日

接受日期: 2015 年 02 月 08 日

发表日期: 2015 年 03 月 25 日

基金项目: 本研究由重庆市农业科学院“百名博士引进培养工程”项目(2013-2015)和重庆科技攻关项目(cstc2012ggC80002)共同资助。

研究背景

稻瘟病(*Pyricularia oryzae* Cav.)是目前水稻生产中最严重的一种真菌性病害之一,在世界范围内广泛分布并持续发生。实践表明,选育和推广抗病品种是防治稻瘟病最为有效、安全、环保的措施。截止至2013年8月,至少报道了68个抗稻瘟病位点共83个主效基因(http://www.ricedata.cn/gene/gene_pi.htm),其中已有23个稻瘟病抗性基因被克隆。在这些抗性基因中,对稻瘟病多数生理小种均表现抗性的广谱抗性基因在育种实践上倍受关注。*Pi9*是首次报道的广谱抗稻瘟病基因,该基因对来自14个国家43种以上稻瘟菌生理小种均表现出明显抗性(Liu et al., 2003)。近年,相继报道了*Pi25* (Wu et al., 2005)、*Pigm* (Deng et al., 2006)、*Pi2-1*和*Pi51(t)* (Wang et al., 2012)、*Pi47* (Huang et al., 2011; 史学涛, 2012)、*Pi48* (Huang et al., 2011; 刘杨, 2012)以及*Pi49* (Sun et al., 2013)等广谱抗性基因。这些基因均已被精细定位或克隆,其中*Pi9*、*Pi25*、*Pigm*和*Pi2-1*位于第6染色体相邻区域或互为复等位基因;*Pi51(t)*、*Pi47*和*Pi49*位于第11染色体相邻区域;*Pi48*定位于第12染色体,与*Pita*相邻或等位。这些研究为利用分子标记辅助选择技术开展稻瘟病抗性育种提供了技术支撑。

随着定位与克隆的水稻抗稻瘟病基因逐渐增多,这些抗性基因的育种应用也备受关注。王忠华等(2004)、金素娟等(2007)、刘洋等(2008)、周海鹏等(2008)和殷得所等(2011)相继采用分子标记技术,将*Pi9*、*Pi-ta*、*Pi-1*、*Pib*和*Pi25*等单个稻瘟病抗性基

因回交转育到栽培稻品种中。近年,采用分子标记辅助选择技术,将分散在不同品种中的抗性基因聚合到同一基因组中即基因聚合育种,在水稻不同病、虫害抗性新品种的选育方面得到大量应用。陈学伟等(2004)利用MAS技术获得含有三个抗稻瘟病基因*Pi-d(t)*¹、*Pi-b*和*Pi-ta2*的育种材料。庄杰云等(2010)采用分子标记辅助选择方法,育成聚合抗稻瘟病基因*Pib*和*Pita*、抗白叶枯病基因*Xa4*和*Xa13*、优质基因wx的恢复系中恢161,采用其配制的杂交稻新组合中优161于2009年通过国家农作物品种审定。柳武革等(2012)将*Pi-1*、*Pi-2*两个基因导入到荣丰B中,获得5个同时携带有两个目标基因的改良株系,而后进行不育系转育,筛选出不育性彻底、后期熟色好的三系不育系安丰A。Jiang等(2012)报道将*Pi1*、*Pi2*和*D12*三个抗稻瘟病基因导入到水稻三系保持系金23B中,显著增强了该不育系(保持系)及配制杂交组合的抗性。上述研究均表明,采用分子标记辅助选择聚合抗性基因,能极大地提高抗性育种的效率。

由湖南农业大学选育的水稻光温敏核不育系C815S (唐文邦等, 2007),具有不育起点温度在23℃以下,理想株型、配合力强、异交结实率高等特点;已成功选配出C两优396等一批优质、高产杂交组合。然而,生产实践表明C815S的稻瘟病抗性有待进一步改良。本研究以携带*Pi9*、*Pi25*、*Pigm*、*Pi2-1*、*Pi51(t)*、*Pi47*、*Pi48*和*Pi49*等抗病基因的6个抗源为供体亲本,采用回交育种技术和分子标记辅助选择技术将目标抗性基因导入受体亲本C815S中,旨在改良C815S的稻瘟病抗性。

1 结果与分析

1.1 不育系回交改良及分子标记辅助选择过程

整个改良过程,因回交转育过程相似,本研究仅以*Pi47*和*Pi48*基因的转育过程为例进行阐述(图1)。

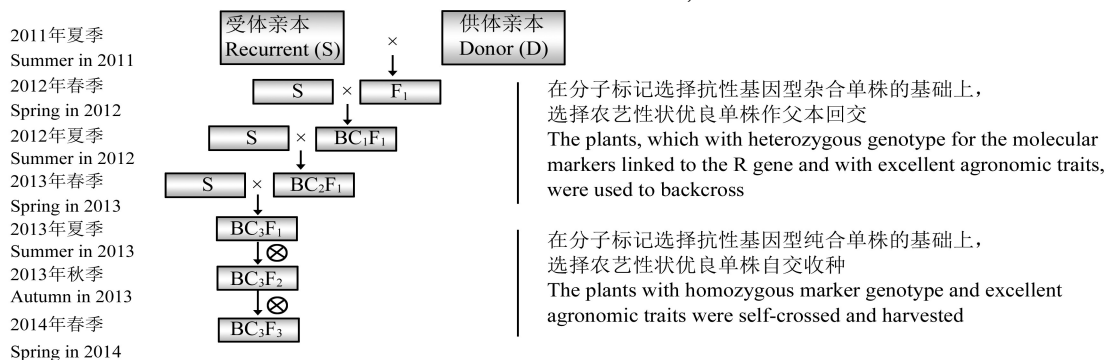


图1 分子标记辅助选择育种程序

Figure 1 Breeding procedure of molecular marker-assisted selection



2011年夏季, 采用C815S为受体亲本, 以携带*Pi47*和*Pi48*基因的供体亲本湘资3150为父本配制杂交组合, 并收获杂交种子。

2011年冬季, 在海南三亚种植F₁植株, 以之为父本对C815S授粉进行杂交, 获得BC₁F₁种子。

2012年夏季, 采用与*Pi47*基因连锁的标记RM224, 对BC₁F₁群体的63个植株进行基因型分析, 其中21个单株该标记表现为杂合基因型(表1); 再用与*Pi48*连锁的标记LY2进一步检测上述21个单株, 其中11株LY2基因型表现为杂合(表1); 在两目标基因连锁标记基因型均表现为杂合的上述11个单株中, 根据田间农艺性状选择其中部分单株为父本混合授粉或单株授粉, 继续与轮回亲本C815S回交获得BC₂F₁种子。

2012年冬季, 在温室内采用软盘育秧方式培育BC₂F₁植株, 采用RM224进行基因型分析从99个单

株中筛选获得39株基因型杂合单株, 在此基础上再用LY2进一步筛选得到两标记均为杂合基因型的单株15株。中选单株种植在海南三亚南繁基地, 从中选择农艺性状优良的单株继续与轮回亲本C815S回交获得BC₃F₁种子。

2013年夏季, 在长沙种植BC₃F₁植株110株, 其中RM224基因型为杂合的单株45株, 再用LY2筛选获得两标记均为杂合基因型的单株26株, 其中表现为不育的单株13株。当年秋季, 对不育单株采用割薹再生并用22℃冷水串灌处理诱导自交结实, 获得BC₃F₂种子。

2013年冬季, 将所有的BC₃F₂植株种植于海南三亚。用RM224对38个BC₃F₂植株进行检测(图2), 得到该标记为纯合抗病的单株11株, 杂合抗病单株21株。再用LY2对纯合抗病型单株进一步筛选(图3), 得到该标记为纯合抗病型的单株4株。

表 1 各世代基因型分析结果

Table 1 Genotype analysis for each generation

世代 Generation	基因型 Genotype	C815S/75-1-127		C815S/GM2		C815S/GM4		C815S/TY		C815S/XZ3150		C815S/MWG	
		<i>Pi9</i>		<i>Pi25</i>		<i>Pigm</i>		<i>Pi2-1</i>	<i>Pi51(t)</i>	<i>Pi47</i>	<i>Pi48</i>	<i>Pi49</i>	
		RM7311	RM7178	RM7311	RM7178	RM7311	RM7178	RM7311	RM7178	RM27990	RM224	LY2	RM224
BC ₁ F ₁	杂合型	37	-	14	-	24	-	37	-	17	21	11	16
	Heterozygous												
	感病型 Susceptibility	39	-	16	-	30	-	45	-	20	37	10	22
BC ₂ F ₁	杂合型	26	-	26	-	13	-	28	-	10	39	15	28
	Heterozygous												
	感病型 Susceptibility	27	-	32	-	11	-	25	-	18	56	24	34
BC ₃ F ₁	杂合型	54	50	37	35	27	26	25	25	11	45	26	35
	Heterozygous												
	感病型 Susceptibility	45	4	42	2	36	1	26	0	14	55	19	46
BC ₃ F ₂	纯合抗病型	11	11	5	5	6	6	11	11	1	11	4	8
	Homozygous resistant												
	杂合型	18	-	14	-	15	-	25	-	6	21	4	10
	Heterozygous 感病型 Susceptibility	8	-	8	-	5	-	10	-	4	6	3	15

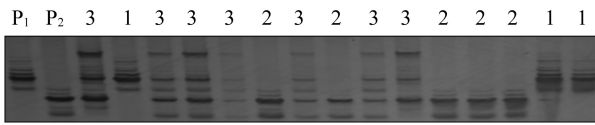


图2亲本品种和部分BC₃F₂植株的RM224标记基因型
 注: P1: C815S; P2: 湘资3150; 1: 纯合感病基因型; 2: 纯合抗病基因型; 3: 杂合基因型

Figure 2 Genotype of parents and part BC₃F₂ individuals for the marker of RM224

Notes: P1: C815S; P2: XZ3150; 1: Homozygous susceptible genotype; 2: Homozygous resistant genotype; 3: Heterozygous genotype

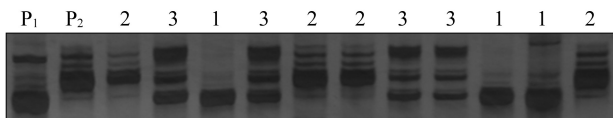


图3亲本品种和部分BC₃F₂植株的LY2标记基因型
 注: P1: C815S; P2: 湘资3150; 1: 纯合感病基因型; 2: 纯合抗病基因型; 3: 杂合基因型

Figure 3 Genotype of parents and part BC₃F₂ individuals for the marker of LY2

Notes: P1: C815S; P2: XZ3150; 1: Homozygous susceptible genotype; 2: Homozygous resistant genotype; 3: Heterozygous genotype

1.2改良BC₃F₁株系田间农艺性状考查

为了对改良的抗病不育系潜在的利用价值进行评价, 以受体不育系亲本C815S为对照, 对所有改良的BC₃F₁群体的播始历期、株高、穗长、有效

穗数、剑叶长、剑叶宽和每穗(主穗)粒数等主要农艺性状进行考查分析(表2)。结果显示, 与轮回亲本C815S相比, 不同抗源改良的BC₃F₁群体的每穗粒数大幅增加, 差异达0.01显著水平, 而其它5个性状与轮回亲本保持一致。

1.3改良BC₃F₂株系稻瘟病抗性分析

为了对改良株系的稻瘟病抗性进行准确评价, 根据前人(刘杨, 2012; Wang et al., 2012; 文婷, 2012; 史学涛, 2012)的研究结果, 选用有代表性的稻瘟病菌株110-2和CHL506采用苗期室内接种法对改良株系的抗病性进行了鉴定。采用各BC₃F₁株系自交收种获得的BC₃F₂群体鉴定结果表明, 只包含单个抗性基因的群体抗感单株分离比符合3:1的理论分离比, 而包含2个抗性基因的C815S/天野和C815S/湘资3150组合与15:1的理论分离比有一定偏离, 可能因群体偏小或者基因间存在互作所致(表3)。所有改良株系中的抗性单株较受体亲本对该2类稻瘟病菌株的抗性增强, 其中以谷梅4号、魔王谷为抗源的改良株系抗性最强, 其后依次是天津野生稻、谷梅2号、75-1-17和湘资3150 (表3)。为了检测室内接种鉴定表型与基因型的对应关系, 在每一抗源组合的BC₃F₂后代中随机选取16个单株进行基因型分析。结果表明接种鉴定后的抗感表型与基因型呈一一对应关系(图4), 表明抗病基因已成功导入到受体亲本中并稳定表达, 同时验证了选用的标记满足抗病分子标记辅助育种的要求。

表2 改良的 BC₃F₁ 群体与 C815S 农艺性状的比较

Table 2 Comparison of main agronomic traits between BC₃F₁ populations and C815S

株系 lines	播始历期(d) Duration of seedling-heading (d)	株高(cm) Plant height (cm)	穗长(cm) Panicle length (cm)	剑叶长(cm) Flag leaf length (cm)	剑叶宽(cm) Flag leaf width (cm)	有效穗数 Productive panicles	每穗粒数 Grains per panicle
C815S/75-1-127 BC ₃ F ₁	92	70.6±1.5	24.1±0.5	36.1±1.5	1.7±0.2	17.3±1.2	215.7±2.9**
C815S/GM2 BC ₃ F ₁	92	70.8±2.1	23.4±0.8	33.6±2.5	1.7±0.1	17.7±2.6	202.3±3.3**
C815S/GM4 BC ₃ F ₁	93	70.1±1.3	23.6±0.8	34.0±2.8	1.7±0.1	17.5±1.8	218.5±2.9**
C815S/TY BC ₃ F ₁	93	71.5±1.3	22.5±0.8	34.0±2.1	1.7±0.1	17.0±1.8	220.2±5.1**
C815S/XZ3150 BC ₃ F ₁	92	72.8±3.3	22.8±1.0	35.5±2.5	1.7±0.1	16.0±2.2	225.3±3.7**
C815S/MWG BC ₃ F ₁	91	72.3±2.8	23.5±0.8	36.2±2.2	1.7±0.2	16.7±1.2	198.5±2.2**
C815S	92	69.7±1.7	22.7±1.2	34.1±2.7	1.7±0.1	16.3±1.2	184.3±3.9

注: **: 表示与轮回亲本 C815S 相比在 0.01 水平存在显著差异, 多重比较采用 LSD 法

Notes: **: There is a significant difference at 0.01 level compared with the recurrent parent C815S, LSD method was used for multiple comparisons



表 3 BC₃F₂ 改良群体抗性鉴定

Table 3 Identification of resistance to rice blast in the improved BC₃F₂ lines

株系 Lines	菌株 110-2 Isolate 110-2					菌株 CHL506 Isolate CHL506				
	株数 Plants	抗病 Resistant	感病 Susceptible	χ^2	抗性等级 Resistant grade	株数 Plants	抗病 Resistant	感病 Susceptible	χ^2	抗性等级 Resistant grade
C815S	20	0	20		4.5	18	0	18		4
C815S/75-1-127	46	35	11	0	1.2	41	32	9	0.07	1
BC ₃ F ₂ C815S/GM2	33	25	8	0.01	0.8	41	31	10	0.01	0.5
BC ₃ F ₂ C815S/GM4	52	39	13	0.03	0	46	35	11	0	0
BC ₃ F ₂ C815S/TY BC ₃ F ₂	45	36	9	12.27	0.5	32	26	6	6.53	0
BC ₃ F ₂ C815S/XZ3150	49	41	8	6.86	2.5	43	36	7	5.76	2
BC ₃ F ₂ C815S/MWG	51	39	12	0.01	0	43	33	10	0.01	0

注: C815S/TY 和 C815S/XZ3150 组合的 χ^2 按 15:1 的理论分离比计算, 其他组合按 3:1 计算

Notes: The χ^2 values of cross of C815S/TY and C815S/XZ were calculated according to the expected ratio of 15:1, the others were according to 3:1

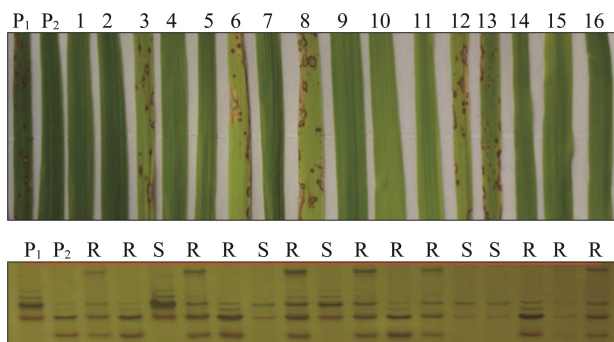


图4 C815S/魔王谷BC₃F₂群体部分单株抗感表型与基因型关系(RM224)

注: P1: C815S; P2: 魔王谷; 1~16: C815S/魔王谷BC₃F₂植株; R: 抗病; S: 感病

Figure 4 Relationship between genotype and phenotype of part BC₃F₂ individuals of C815S/MWG cross

Notes: P1: C815S; P2: MWG; 1~16: C815S/MWG BC₃F₂ individuals; R: Resistant; S: Susceptible

2 讨论

2.1 MAS是改良水稻两用不育系稻瘟病抗性的有效途径

本研究采用传统的回交育种技术与MAS技术相结合的方法, 通过一次杂交、三次回交以及一次自交即将抗病基因导入到受体亲本中并稳定表达。如采用传统的常规育种技术, 每一回交世代均需采用稻瘟病圃或者接种方式进行鉴定, 才能准确评价各分离世代中的单株抗性, 因此育种成本会大幅上升, 育种周期也会相应延长。特别对于两系不育系的抗稻瘟病改良, 除了要求目标单株具有抗性基因以外, 还要求中

选抗病单株能恢复可育以便于授粉或自交收种。采用分子标记辅助选择技术能尽早确定单株抗性和育性, 中选单株再采用人工设置的冷水处理系统使之恢复育性, 从而提高选择效率、缩短育种年限。

2.2 加强田间农艺性状背景选择是改良品种综合性状的关键

运用分子标记辅助选择技术进行抗病育种, 包括对抗病基因的前景选择和对轮回亲本遗传背景的选择。然而, 通过分子标记对回交群体进行遗传背景分析, 不仅耗时、费力而且成本高, 特别是在回交群体单株数量很大的情况下, 基因型分析工作量偏大, 很难在短期内完成。本研究借助于常规育种农艺性状选择的经验, 在抗性基因前景选择的基础上依据田间表型筛选合适的单株用于回交, 减少田间杂交的工作量, 加快了回交的进程, 同时也在一定程度上利用了新的变异。

研究发现, BC₃F₁改良株系主要农艺性状与轮回亲本基本保持一致, 部分株系每穗粒数较轮回亲本显著增加。这可能有两个方面的原因, 一是大多抗源材料是地方品种, 与不育系的遗传差异较大, 杂交后其蕴藏的优良基因得以释放; 二是在每一回交世代中, 均从中选择农艺性状优良的抗病单株与轮回亲本回交, 进而保持了部分来自抗源的优良基因, 使得改良株系在部分性状上较轮回亲本更优良。

2.3 开展多基因聚合育种是水稻稻瘟病抗性育种的重要方向



由于稻瘟病生理小种的多样性和复杂性, 含有单个抗病基因的品种推广3~5年以后就可能丧失抗性。而开展多基因聚合育种, 将来源于不同材料的抗病基因通过回交和MAS技术聚合到同一水稻材料中, 可以有效地拓宽其抗谱, 增强抗病能力。陈学伟等(2004)、陈红旗等(2008)和林琳(2010)利用MAS技术和回交育种技术对改良材料进行了抗稻瘟病基因的聚合, 发现聚合多个抗病基因的改良株系其抗菌谱拓宽, 抗病能力明显强于仅含单个抗病基因的株系。本研究所获得的包含单个或两个主基因的抗病改良系, 通过相互杂交可望在短期内聚合育成包含多个抗病基因的新型两系不育系。

3材料与方法

3.1试验材料

受体亲本为水稻光温敏两用核不育系C815S。6个抗性基因供体亲本包括: 75-1-127、谷梅2号(GM2)、谷梅4号(GM4)、天津野生稻(TY)、湘资3150(XZ3150)和魔王谷(MWG)。75-1-127、谷梅2号、谷梅4号和魔王谷分别为基因*Pi9*、*Pi25*、*Pigm*和*Pi49*的供体, 天津野生稻为*Pi2-1*和*Pi51(t)*的供体, 湘资3150中含有*Pi47*和*Pi48*基因。所有水稻品种种子由湖南农业大学水稻科学研究所提供。

供试菌种: 稻瘟病菌株110-2 (来自湖南)、CHL506 (来自福建), 均由湖南农业大学水稻基因组实验室保存、提供。

3.2 DNA分子标记

根据前人(刘杨, 2012; Wang et al., 2012; 文婷, 2012; 史学涛, 2012)的研究结果, 筛选获得在亲本间多态性较好的引物RM7311、RM7178、

RM27990、RM224和LY2, 分别用于不同目标基因的筛选(表4)。

3.3水稻总DNA提取及基因型鉴定

DNA样品的制备采用蔗糖提取法(曹志等, 2013), 蔗糖提取液的配制如下: 分别量取事先配制的0.5 mol/L Tris-HCl溶液(pH 7.5) 100 mL、3 mol/L NaCl溶液100 mL和0.75 mol/L蔗糖溶液400 mL, 用ddH₂O定容至1 000 mL并摇匀即为DNA提取液, 常温贮存备用。

PCR反应体系10 μL包括: 10× Buffer 1.0 μL, 5 mmol/L dNTPs 0.2 μL, 2 pmol/μL primer pair 1.0 μL, 5 U/μL *Taq*酶0.1 μL, DNA模板(约10 ng/μL) 1.0 μL, ddH₂O 6.7 μL。

扩增反应在ABI PCR system 2700上进行: 94℃预变性5 min; 94℃ 30 s; 52℃ 30 s, 72℃ 1 min, 共35个循环; 最后, 72℃延伸7 min。扩增产物用8%的非变性聚丙烯酰胺凝胶分离, 银染显色。

3.4不育植株的种子繁殖方法

根据历年气象资料以及受体亲本的生育期, 将BC₃F₁的育性敏感期安排在7月下旬-8月上旬, 在抽穗开花期根据花粉表现将可育株及农艺性状不良的单株拔除, 选留株型紧凑、分蘖能力较强、株高适中农艺性状优良的不育单株, 在离地面20~30 cm处割除植株上部, 加强肥水管理促其再生萌发。在再生穗花粉育性敏感始期(雌雄蕊形成期), 将稻桩放入20℃~22℃的冷水池中连续处理10~15 d, 诱导其育性转化和自交结实。

表 4 用于抗病基因筛选的分子标记信息

Table 4 The information of molecular markers used in screen for resistance genes

目标基因	标记	正向引物	反向引物	片段大小(bp)	退火温度(℃)
Genes	Markers	Forward Primer	Reverse Primer	Length (bp)	T _m (°C)
<i>Pi9</i> , <i>Pi25</i> , <i>Pi2-1</i> , <i>Pigm</i>	RM7311	agtggctgtgaactcggag	tcgtggcgccttaatctc	191	52
	RM7178	taaccttcacagcgaactgtg	ccgtgagatgggctacctac	151	52
<i>Pi51(t)</i>	RM27990	acttacactgatccgttcg	ccaggattattcgacaagc	130	52
<i>Pi47</i> , <i>Pi49</i>	RM224	atcgatcgatcttcacgagg	tgctataaaaggcattcggg	124	52
<i>Pi48</i>	LY2	attacgctcagatgtggc	ctagcgggaggttggag	203	52

3.5抗性鉴定方法

用于室内接种材料包括受体亲本C815S、6个抗



源供体亲本、改良的BC₃F₂群体及感病对照品种CO 39。将催芽后的水稻种子分别播种于32孔塑料育秧盘(544 mm×284 mm×52 mm), 用盆栽花卉培养基作为育苗基质。在人工气候室内育苗, 温度控制在26°C~28°C, 12 h光照、12 h黑暗交替培养至3~4叶期。采用约1×10⁵ /mL浓度的稻瘟菌孢子悬浮液活体喷雾接种后于26°C黑暗保湿24 h, 而后在光照高湿环境中培养5~7 d。稻瘟病抗性调查以Bonman等(1986)的0~5级标准调查病情。整理统计亲本、改良的BC₃F₂群体及对照的抗感情况, 并按照材料来源随机取样, 用于基因型分析。

作者贡献

曹志和曾盖是本研究的实验设计和实验研究的执行人; 曹志完成数据分析, 论文初稿的写作; 郝明、盛浩闻和叶乃忠参与实验设计, 田间试验, 试验结果分析; 肖应辉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

本研究由国家自然科学基金项目(31171834)、教育部创新团队发展计划(IRT1239)和湖南省高校科技创新团队项目共同资助。

参考文献

- Bonman J.M., De Dios T.I.V., and Khin M.M., 1986, Physiologic specialization of *Pyricularia oryzae* in the Philippines, *Plant Disease*, 70(8): 767-769
<http://dx.doi.org/10.1094/PD-70-767>
- Cao Z., Zeng G., Sheng H.W., and Xiao Y.H., 2013, A simple approach for rapid preparation of rice genomic DNA for PCR analysis, *Hunan Nongye Daxue Xuebao (Journal of Hunan Agricultural University)*, 39(1): 13-16 (曹志, 曾盖, 盛浩闻, 肖应辉, 2013, 一种适用于PCR的水稻基因组DNA简易制备方法, *湖南农业大学学报*, 39(1): 13-16)
- Chen H.Q., Chen Z.X., Ni S., Zuo S.M., Pan X.B., and Zhu X.D., 2008, Pyramiding three genes with resistance to blast by marker-assisted selection to improve rice blast resistance of jin23B, *Zhongguo Shuidao Kexue (Chinese Journal of Rice Science)*, 22(1): 23-27 (陈红旗, 陈宗祥, 倪深, 左示敏, 潘学彪, 朱旭东, 2008, 利用分子标记技术聚合3个稻瘟病基因改良金23B的稻瘟病抗性, *中国水稻科学*, 22(1): 23-27)
- Chen X.W., Li S.G., Ma Y.Q., Li H.Y., Zhou K.D., and Zhu L.H., 2004, Marker-assisted selection and

pyramiding for three blast resistance genes, *Pi-d(t)*¹, *Pi-b*, *Pi-ta*², in rice, *Shengwu Gongcheng Xuebao (Chinese Journal of Biotechnology)*, 20(5): 708-714 (陈学伟, 李仕贵, 马玉清, 黎汉云, 周开达, 朱立煌, 2004, 水稻抗稻瘟病基因*Pi-d(t)*¹、*Pi-b*、*Pi-ta*²的聚合及分子标记选择, *生物工程学报*, 20(5): 708-714)

- Deng Y.W., Zhu X.D., Shen Y., and He Z.H., 2006, Genetic characterization and fine mapping of the blast resistance locus *Pigm(t)* tightly linked to *Pi2* and *Pi9* in a broad-spectrum resistant Chinese variety, *Theor. Appl. Genet.*, 113(4): 705-713
<http://dx.doi.org/10.1007/s00122-006-0338-7>
- Huang L., Feng G.P., Wang S.H., Wang Y., Liu J.L., Jiang N., Yan W.T., Xu L.C., Sun P.Y., Li Z.Q., Pan S.J., Liu X.L., Xiao Y.H., Liu E.M., Dai L.Y., and Wang G.L., 2011, Molecular mapping of the new blast resistance genes *Pi47* and *Pi48* in the durably resistant local cultivar Xiangzi 3150, *Phytopathology*, 101(5): 620-626
<http://dx.doi.org/10.1094/PHTO-08-10-0209>
- Jiang H.C., Feng Y.T., Bao L., Li X., Gao G.J., Zhang Q.L., Xiao J.H., Xu C.G., and He Y.Q., 2012, Improving blast resistance of Jin 23B and its hybrid rice by marker-assisted gene pyramiding, *Mol. Breeding*, 30(4): 1679-1688
<http://dx.doi.org/10.1007/s11032-012-9751-6>
- Jin S.J., Liu W.G., Zhu X.Y., Wang F., Li J.H., Liu Z.R., Liao Y.L., Zhu M.S., Huang H.J., and Liu Y.B., 2007, Improving blast resistance of a thermo-sensitive genic male sterile line GD-8S by molecular marker-assisted selection, *Zhongguo Shuidao Kexue (Chinese Journal of Rice Science)*, 21(6): 599-604 (金素娟, 柳武革, 朱小源, 王丰, 李金华, 刘振荣, 廖亦龙, 朱满山, 黄慧君, 刘宜柏, 2007, 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, *中国水稻科学*, 21(6): 599-604)
- Lin L., 2010, The research on multi-gene pyramiding of rice blast resistance, Thesis for M.S., Sichuan Agricultural University, Supervisor: Li P., pp.10-48 (林琳, 2010, 稻瘟病抗性基因的多基因聚合研究, 硕士学位论文, 四川农业大学, 导师: 李平, pp.10-48)
- Liu S.P., L X., Wang C.Y., Li X.H., and He Y.Q., 2003, Improvement of resistance to rice blast in Zhenshan97 by molecular marker-aided selection, *Acta Botanica Sinica*, 45(11): 1346-1350
- Liu W.G., Wang F., Liu Z.R., Zhu X.Y., Li J.H., Huang



- H.J., Liao Y.L., Zhu M.S., Fu C.Y., and Chen J.W., 2012, Improvement of rice blast resistance in CMS line rongfeng A by pyramiding *Pi-1* and *Pi-2* with molecular marker techniques, *Fenzi Zhiwu Yuzhong (Molecular Plant Breeding)*, 10(5): 575-582 (柳武革, 王丰, 刘振荣, 朱小源, 李金华, 黄慧君, 廖亦龙, 朱满山, 付崇允, 陈建伟, 2012, 利用分子标记技术聚合*Pi-1*和*Pi-2*基因改良三系不育系荣丰A的稻瘟病抗性, 分子植物育种, 10(5): 575-582)
- Liu Y., 2012, Fine mapping of blast resistance gene *Pi48* in rice cultivar Xiangzi 3150, Thesis for M.S., Hunan Agricultural University, Supervisor: Wang G.L., Xiao Y.H., and Dai L.Y., pp.9-40 (刘杨, 2012, 水稻品种湘资3150中抗稻瘟病基因*Pi48*的精细定位, 硕士学位论文, 湖南农业大学, 导师: 王国梁, 肖应辉, 戴良英, pp.9-40)
- Liu Y., Xu P.Z., Zhang H.Y., Xu J.D., Wu F.Q., and Wu X.J., 2008, Marker-assisted selection and application of blast resistant gene *Pib* in rice, *Zhongguo Nongye Kexue (Scientia Agricultura Sinica)*, 2008, 41(1): 9-14 (刘洋, 徐培洲, 张红宇, 徐建第, 吴发强, 吴先军, 2008, 水稻抗稻瘟病*Pib*基因的分子标记辅助选择与应用, 中国农业科学, 41(1): 9-14)
- Shi X.T., 2012, Fine mapping of a blast resistance gene *Pi47* in rice cultivar Xiangzi 3150, Hunan Agricultural University, Supervisor, pp.9-32 (史学涛, 2012, 水稻品种湘资3150中抗稻瘟病基因*Pi47*的精细定位, 硕士学位论文, 湖南农业大学, 导师: 王国梁, 肖应辉, 戴良英, pp.9-32)
- Sun P.Y., Liu J.L., Wang Y., Jiang N., Wang S.H., Dai Y.S., Gao J., Li Z.Q., Pan S.J., Wang D., Li W., Liu X.L., Xiao Y.H., Liu E.M., Wang G.L., and Dai L.Y., 2013, Molecular mapping of the blast resistance gene *Pi49* in the durably resistant rice cultivar Mowangu, *Euphytica*, 192(1): 45-54
<http://dx.doi.org/10.1007/s10681-012-0829-3>
- Tang W.B., Chen L.Y., Xiao Y.H., Liu G.H., and Deng H.B., 2007, Breeding and utilization of dual-purpose genic male sterile rice C815S, *Hunan Nongye Daxue Xuebao (Journal of Hunan Agricultural University (Natural Sciences))*, 33: 26-31 (唐文邦, 陈立云, 肖应辉, 刘国华, 邓化冰, 2007, 水稻两用核不育系C815S的选育与利用, 湖南农业大学学报(自然科学版), 33: 26-31)
- Wang Y., Wang D., Deng X.J., Liu, J.L., Sun, P.Y., Liu Y., Huang H.M., Jiang N., Kang H.X., Ning Y.S., Wang Z.L., Xiao Y.H., Liu X.L., Liu E.M., Dai L.Y., and Wang G.L., 2012, Molecular mapping of the blast resistance genes *Pi2-1* and *Pi51(t)* in the durably resistant rice 'Tianjingyeshengdao', *Phytopathology*, 102(8): 779-786
<http://dx.doi.org/10.1094/PHYTO-03-12-0042-R>
- Wang Z.H., Jia Y.L., Wu D.X., and Xia Y.W., 2004, Molecular markers-assisted selection of the rice blast resistance gene *Pi-ta*, *Zuowu Xuebao (Acta Agronomica Sinica)*, 30(12): 1259-1265 (王忠华, 贾育林, 吴殿星, 夏英武, 2004, 水稻抗稻瘟病基因*Pi-ta*的分子标记辅助选择, 作物学报, 30(12): 1259-1265)
- Wen T., 2012, Improving the blast resistance of indica rice lines based on marker-assisted selection strategy using the *Pi9* gene sequence, Thesis for M.S., Hunan Agricultural University, Supervisor: Liu X.L., pp.10-38 (文婷, 2012, 利用*Pi9*基因序列标记辅助选择改良籼稻品种稻瘟病抗性, 硕士学位论文, 湖南农业大学, 导师: 刘雄伦, 王国梁, 戴良英, pp.10-38)
- Wu J.L., Fan Y.Y., Li D.B., Zheng K.L., Leung H., and Zhuang J.Y., 2005, Genetic control of rice blast resistance in the durably resistant cultivar Gumei 2 against multiple isolates, *Theor. Appl. Genet.*, 111(1): 50-56
<http://dx.doi.org/10.1007/s00122-005-1971-2>
- Yin D.S., Xia M.Y., Li J.B., Wan B.L., Zha Z.P., Du X.S., and Qi H.X., 2011, Development of STS marker linked to rice blast resistance gene *Pi9* in marker-assisted selection breeding, *Zhongguo Shuidao Kexue (Chinese Journal of Rice Science)*, 25(1): 25-30 (殷得所, 夏明元, 李进波, 万丙良, 查中萍, 杜雪树, 戚华雄, 2011, 抗稻瘟病基因*Pi9*的STS连锁标记开发及在分子标记辅助育种中的应用, 中国水稻科学, 25(1): 25-30)
- Zhou H.P., Zhan X.D., Chai R.Y., Cheng S.H., and Cao L.Y., 2008, Breeding of rice restorer lines carrying blast resistance gene *Pi25* by marker-assisted selection, *Zhongguo Shuidao Kexue (Chinese Journal of Rice Science)*, 22(6): 590-596 (周海鹏, 占小登, 柴荣耀, 程式华, 曹立勇, 2008, 具抗稻瘟病基因*Pi25*杂交恢恢复系的分子标记辅助选育, 中国水稻科学, 22(6): 590-596)
- Zhuang J.Y., Zhu Y.J., Tu G.Q., Ying J.Z., and Fan Y.Y., 2010, Gene pyramiding assisted breeding of new hybrid rice combination Zhongyou 161 with high yield and high grain quality, *Zajiao Shuidao (Hybrid Rice)*, 25(5): 12-14 (庄杰云, 朱玉君, 屠国庆, 应杰政, 樊叶杨, 2010, 多基因聚合育成优质高产杂交稻新组合中优161, 杂交水稻, 25(5): 12-14)