

## 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

陈学伟<sup>1,2\*</sup> 李仕贵<sup>2\*</sup> 马玉清<sup>2</sup> 黎汉云<sup>2</sup> 周开达<sup>2</sup> 朱立煌<sup>1</sup>

<sup>1</sup>(中国科学院遗传与发育生物学研究所, 北京 100101)

<sup>2</sup>(四川农业大学水稻研究所, 成都 611130)

**摘 要** 冈 46B(G46B)是水稻生产应用中的一个农艺性状十分优良的保持系,其主要的缺陷是稻瘟病抗性较弱,通过对地谷, BL-1, Pi-4 号等三个分别含抗病基因  $Pi-d(t)^1$ 、 $Pi-b$ 、 $Pi-ta^2$  的稻瘟病抗性材料与 G46B 聚合杂交,并利用抗病基因连锁的分子标记对杂交后代进行辅助选择,在聚合杂交的 F2 代及 B1C1 代群体中共获得了 15 株含  $Pi-d(t)^1$ 、 $Pi-b$ 、 $Pi-ta^2$  等三个抗稻瘟病基因的材料,其可能的基因型分别为:三基因杂合体  $Pi-d(t)^1 pi-d(t)^1 / Pi-bpi-b / Pi-ta^2 pi-ta^2$  4 株,双基因杂合体 10 株,其中  $Pi-d(t)^1 Pi-d(t)^1 / Pi-bpi-b / Pi-ta^2 pi-ta^2$  6 株,  $Pi-d(t)^1 pi-d(t)^1 / Pi-bpi-b / Pi-ta^2 pi-ta^2$  3 株,  $Pi-d(t)^1 pi-d(t)^1 / Pi-bpi-b / Pi-ta^2 pi-ta^2$  1 株,双基因纯合体  $Pi-d(t)^1 Pi-d(t)^1 / Pi-bpi-b / Pi-ta^2 pi-ta^2$  仅 1 株,这一研究结果为进一步改良 G46B 的稻瘟病抗性奠定了基础,同时这一研究结果表明利用分子标记可快速、有效地实现多个抗病基因的聚合,大大提高水稻抗病育种的效率。

**关键词** 水稻, 稻瘟病, 抗病基因, 分子标记辅助选择

**中图分类号** Q754 **文献标识码** A **文章编号** 1000-3061(2004)05-0708-07

品种抗病性之所以丧失,关键在于品种或抗源的单一化,通过聚合杂交,累积多个抗病基因于同一材料,培育出多抗品种是避免或减缓品种抗性丧失的一种有效途径。分子标记辅助选择是通过基因型对植株进行选择,这种选择既不受环境和其他因素的影响,又能同时对多个基因作出准确的选择。因此,在对多个抗病基因的聚合过程中,利用分子标记辅助选择不仅能高效准确,而且还能克服传统方法不能同时对多种抗性作出鉴定的缺陷。

$Pi-b$ 、 $Pi-ta^2$  是分别来自日本抗性材料 BL-1、Pi-4 号的两个抗稻瘟病基因,已被克隆<sup>[1,2]</sup>。其中  $Pi-b$  位于第 2 染色体,与分子标记 G1234 相距仅 0.5cM<sup>[3]</sup>,并与分子标记 RM213、RM207 等紧密连锁; $Pi-ta^2$  位于第 12 染色体与分子标记 XNpb289、XNpb196 分别相距 0.3cM, 0.7cM<sup>[4]</sup>,与 RG124A、OSR20、OSR32 等紧密连锁; $Pi-d(t)^1$  是来自我国抗病材料地谷的一个抗稻瘟病基因,已初步定位于第 2 染色体(与  $Pi-b$  不同),与分子标记 G45、RM262、

RG124A 紧密连锁<sup>[5]</sup>。并且已得到 RFLP 标记 RG124A、G45 转换成的 STS 标记。冈 46B(G46B)是水稻生产应用上一个农艺性状十分优良的保持系,其主要的缺陷就是稻瘟病抗性较弱。本研究利用与抗病基因紧密连锁的分子标记,即用已转化成为的序标位 STS 及微卫星标记 RM213、RM207、OSR20、OSR32、RM262,采用 PCR 扩增方法跟踪筛选抗稻瘟病基因,将  $Pi-b$ 、 $Pi-ta^2$ 、 $Pi-d(t)^1$  聚合于 G46B 中,在相对较短的时间内培育出抗多个生理小种的相对持久抗病品系,用于生产;并对聚合后的各个抗病基因的抗性作出评价,同时对利用分子标记进行多个抗病基因的辅助选择的实用价值作出实证。

### 1 材料和方法

#### 1.1 植物材料

含抗稻瘟病基因  $Pi-d(t)^1$  的地谷、含抗稻瘟病基因  $Pi-b$  的 BL-1、含抗稻瘟病基因  $Pi-ta^2$  的 Pi-4 号、不含上述抗病基因的品种 G46B 和感病品种江

收稿日期:2004-03-02,修回日期:2004-06-22。

基金项目:国家 863 高技术发展与研究计划项目(No. 2004AA211132)和教育部优秀博士论文基金(No. 2000054)。

\* 通讯作者。 Tel: 86-10-64870491; Fax: 86-10-64873428; E-mail: xwchen@genetics.ac.cn;

Tel: 86-28-82722888; Fax: 86-28-82722918; E-mail: lishigui\_sc@263.net

南香糯(如表 1 所示)。

表 1 水稻亲本、F2 和回交分离群体  
Table 1 Rice varieties and their F2 & B1C1 populations

Parents & Populations	Varieties & Crosses	Resistance Genes	Plants
P1	JNXN	No	
P2	G46B	No	
P3	Digu	$Pi-d(t)^1$	
P4	BL-1	$Pi-b$	
P5	Pi-4	$Pi-ta^2$	
Population I	(Digu/JNXN)F2	$Pi-d(t)^1$	123
Population II	(Digu/G46B)F2	$Pi-d(t)^1$	96
Population III	(BL-1/Pi-4//Digu/G46B)F2	$Pi-d(t)^1$ / $Pi-b$ / $Pi-ta^2$	121
Population IV	(G46B//BL-1/Pi-4//Digu/G46B)F2	$Pi-d(t)^1$ / $Pi-b$ / $Pi-ta^2$	370

1.2 田间试验

在第一年夏,以含有抗稻瘟病基因  $Pi-d(t)^1$  的品种地谷为母本,感病品种江南香糯和冈 46B 为父本,配制杂交组合(如表 1 所示),同时配制 BL-1/ $Pi-4$  号 and 地谷/冈 46B 的单交组合;1997 年冬在海南种植上述 4 个杂交组合 F1 代,并将(BL-1/ $Pi-4$  号)F1 和(地谷/冈 46B)F1 进行聚合杂交。

第二年正季种植(地谷/江南香糯)F2(群体 I)和(地谷/冈 46B)F2(群体 II)进行稻瘟病苗瘟鉴定,同时在实验室进行分子标记选择,并计算两种方法鉴定结果的符合度。另一方面,以冈 46B 作轮回亲本与 BL-1/ $Pi-4$  号//地谷/冈 46B 的聚合杂交 F1 进一步杂交,将三个抗稻瘟病基因  $Pi-b$ 、 $Pi-ta^2$  和  $Pi-d(t)^1$  导入冈 46B 中,增加冈 46B 优良农艺性状基因的比例,同时收取聚合杂交的 F1 的种子形成两个辅助选择群体,即聚合杂交群体和回交群体。

第二年冬,在海南种植三个抗病材料与冈 46B 的回交后代。第三年,将上述三个抗病材料、聚合杂交 F2(群体 III)和回交 F2(群体 IV)群体种植于四川农业大学水稻研究所试验场(如表 1 所示),并进行稻瘟病接种鉴定和分子标记辅助选择。

1.3 供试菌系、菌液制备和接种鉴定

供试菌系为 ZB13, 菌系培养、菌液制备和接种鉴定按凌忠专介绍的方法<sup>[6]</sup>进行。

1.4 植株 DNA 的提取

在水稻分蘖期,分别取上述亲本、F1、F2 和三个抗病材料与冈 46B 回交 F2 群体各单株的新鲜叶片,按 McCouch<sup>[7]</sup>提供的方法提取 DNA。

1.5 分子标记辅助选择分析

根据  $Pi-d(t)^1$ 、 $Pi-b$  和  $Pi-ta^2$  的分子标记定位

结果和已建立的分子连锁图谱(如表 2 所示),寻找与抗病基因紧密连锁的分子标记;并按 Chen 等<sup>[8]</sup>和 Akagi 等<sup>[9]</sup>提供的微卫星序列以及 Inoue 等<sup>[10]</sup>

表 2 抗稻瘟病基因  $Pi-d(t)^1$ 、 $Pi-b$  和  $Pi-ta^2$  分子标记定位结果

Table 2 Blast resistance genes and their molecular markers				
Gene	Variety	Chromosome	Molecular marker	Distance/cm
$Pi-d(t)^1$		2	G45	10.6
			RM262	12.3
$Pi-b$	BL-1	2	RZ213	1.9
			RG520	2.5
$Pi-ta^2$	(Pi-4)	12	XNpb088	0.7
			XNpb124-1	7.5

Note: Molecular markers, RM207 and RM213, are located between the markers, RZ213 and RG520, respectively; Molecular markers, OSR20 and OSR32, are located between the markers, XNpb088 and XNpb124-1, respectively.

介绍的 STS 序位标序列合成下面分子标记(如表 3 所示),即与  $Pi-d(t)^1$  紧密连锁的标记 RM262 和 G45,与  $Pi-b$  连锁 RM207 和 RM213,与  $Pi-ta^2$  连锁的 OSR20 和 OSR32。

PCR 扩增反应总体积为 50L, 其中包括 50 mmol/L KCl, 10 mmol/L Tris-Cl (pH 8.3), 1.5 mmol/L  $MgCl_2$ , 0.01% 明胶, 200  $\mu$ mol/L dNTP, 50~100ng 的基因组 DNA, 1 个单位的 Tag 酶和每个引物 0.2  $\mu$ mol/L。PCR 扩增程序:在 94℃ 变性 5min;再进入 35 个循环(94℃ 变性 1 min, 55℃ 连接 1 min, 72℃ 延伸 2 min);最后在 72℃ 下保温 5 min。扩增产物用 4% 琼脂糖凝胶电泳,经溴化乙锭染色后,在紫外灯下观察并照相。

表 3 分子标记及其 PCR 引物序列

Table 3 Molecular markers and their PCR primers

Marker	Forward primer	Retard primer
G45	5'TGGGATCAAAGTTGGCTATG 3'	5'CGCAAAACAGGGAAGCCTTTC 3'
RM262	5'CATTCCGTCTCGGCTCAAAT 3'	5'CAGAGCAAGGTGGCTTGC 3'
RM207	5'CCATCGTGAGAAGATCTGA 3'	5'CACCTCATCTCTGTAACGCC 3'
RM213	5'ATCTGTTTGCAGGGGACAAAG 3'	5'AGCTCTAGACGATGTCGTGA 3'
OSR20	5'TGGTCAAGTGACTTAGGTGG 3'	5'AGAGCTCCAACCTTTTACAAG 3'
OSR32	5'CTCCAGCTTCGGCAACGTCA 3'	5'CTTCTTCATGCCCTCAATCGT 3'

## 2 结果

### 2.1 地谷抗稻瘟病基因分子标记鉴定

用微卫星 RM262 引物对感病品种江南香糯与冈 46B 和抗病品种地谷进行 PCR 扩增,结果表明,感病和抗病品种的扩增产物存在明显的多态(如图 1 所示)。其中感病品种江南香糯与冈 46B 的 PCR 产物片段大小约 160bp,抗病品种地谷的片段大小约 240bp。3 个亲本均扩增出 1 条带,F1 有两条带,表明该微卫星为共显性标记。

用微卫星 RM262 引物对(地谷 × 冈 46B)F2 群体分析,发现在该群体中出现了 3 种带型,分别与感病品种冈 46B(纯合基因型 aa)和抗病品种地谷(纯

合基因型 AA)相同的带型以及同时出现双亲的 2 条带(杂合基因型 Aa);并且这 3 种带型(aa、Aa、AA)的分离比例符合 1:2:1 的理论比(如表 4 所示)。在(地谷 × 江南香糯)F2 群体中,RM262 的扩增产物带型和分离比同上述群体的结果一致。同时,RM262 与抗病基因 *Pi-d(t)*<sup>1</sup> 的重组率在群体 I、群体 II 中分别为 5.14%,8.17%,二者差异不大。另外,对分子标记 RM262 用于对水稻植株抗病选择的可靠性进行了分析,结果表明在群体 I、群体 II 中 90% 以上的植株的 RM262 标记与植株的抗病性表现共分离(如表 5 所示),该分析结果与李仕贵所分析的结果<sup>[11]</sup>一致。表明 RM262 可用于对抗稻瘟病基因 *Pi-d(t)*<sup>1</sup> 的选择。

表 4 地谷与江南香糯和冈 46B 的 F1、F2 植株对小种 ZB13 的抗性和分子标记分析

Table 4 Analyses on the resistance of rice varieties, Digu, JNXN, and G46B, and their progenies of F1 and F2 to the blast isolate ZB13 via molecular markers

Varieties & progenies	No. of resistance & susceptibility		$\chi^2$	Molecular analyses			$\chi^2$	Ratios of recombinant/ %
	R	S		AA	Aa	aa		
Digu	20							
JNXN		20						
G46B		20						
(Digu/JNXN)F1	20							
(Digu/G46B)F1	20							
(Digu/JNXN)F2	94	29	0.0677	21	66	36	4.317	5.74
(Digu/G46B)F2	79	17	2.3472	19	55	22	2.229	8.17

Note: AA, aa, and Aa represent the PCR band-types of Digu, JNXN(G46B), and [Digu/JNXN(G46B)]F1, respectively; R and S represent the resistance and susceptibility respectively(also in other tables).

表 5 用分子标记 RM262 鉴定稻瘟病抗性的符合率

Table 5 The veracity of molecular assay by using RM262 on rice blast resistance

F2 population	Molecular marker assay	PCR band-type	No. of resistance	No. of susceptibility	Veracity/ %
(Digu/JNXN)F2	R	AA	21	0	100
		Aa	66	0	100
		aa	7	29	80.5
((Digu/G46B)F2)	R	AA	19	0	100
		Aa	54	1	98.2
		aa	6	16	72.7

2.2 应用分子标记辅助选择聚合水稻抗稻瘟病基因

2.2.1 抗稻瘟病基因  $Pi-d(t)^1$ 、 $Pi-b$  和  $Pi-ta^2$  紧密连锁的分子标记在亲本中的多态性分析:利用  $Pi-d(t)^1$  紧密连锁的标记 RM262 和 G45,与  $Pi-b$  连锁 RM207 和 RM213,与  $Pi-ta^2$  连锁的 OSR20 和 OSR32 的 PCR 引物分别扩增亲本地谷、BL-1、Pi-4 和冈 46B 的 DNA,仅有 RM262、RM213 和 OSR32 在亲本间出

现多态性(如图 1,2,3 所示),分别与  $Pi-d(t)^1$ 、 $Pi-b$  和  $Pi-ta^2$  紧密连锁,表明分子标记 RM262、RM213 和 OSR32 能用于对这三个抗稻瘟病基因的选择。

2.2.2 分子标记辅助选择聚合抗病基因:应用稻瘟病菌系 ZB13 接种聚合杂交 F2(群体Ⅲ)和回交 F2 群体(群体Ⅳ),分别获得 87 和 171 个抗稻瘟病单株,用于分子标记选择。

表 6 分子标记选择结果

Table 6 The results of MAS in population Ⅲ & Ⅳ

Population	Plants	Plants resistant to ZB13	Molecular marker	PCR band-type	Plants	Efficiency of selection(%)	Putative genotype
Population Ⅲ	121	87	RM262	Aa		98.85	$Pi-d(t)^1/pi-d(t)^1$
				AA			$Pi-d(t)^1/Pi-d(t)^1$
			RM213	Bb	24	18.39	$Pi-b/pi-b$
				BB	4		$Pi-b/Pi-b$
			OSR32	Cc	23	16.67	$Pi-ta^2/Pi-ta^2$
				CC	3		$Pi-ta^2/Pi-ta^2$
Population Ⅳ	370	171	RM262	Aa		98.83	$Pi-d(t)^1/pi-d(t)^1$
				AA			$Pi-d(t)^1/Pi-d(t)^1$
			RM213	Bb	52	19.30	$Pi-b/pi-b$
				BB	7		$Pi-b/Pi-b$
			OSR32	Cc	53	20.18	$Pi-ta^2/Pi-ta^2$
				CC	8		$Pi-ta^2/Pi-ta^2$

用 RM262 对群体Ⅲ和Ⅳ中抗菌系 ZB13 的 87 和 171 个单株进行 PCR 扩增分析,发现在群体Ⅲ的 87 株中只有 1 株未出现地谷的扩增带型(AA 或 Aa),接种鉴定和分子标记选择的符合度达 98.85%;在群体Ⅳ的 171 株中有两株未出现地谷的扩增带型,其符合度为 98.83%(如表 6 所示)。进一步用 RM213 对群体Ⅲ和群体Ⅳ选择,在群体Ⅲ的 87 株中含有 BL-1 特征带型(BB 或 Bb)共 28 株,其中杂合带型(Bb)24 株,纯合带型(BB)4 株;在群体Ⅳ的 171 株中含有 BL-1 特征带型共 59 株,其中杂合带型 52 株,纯合带型共 7 株(如表 6 所示)。用 OSR32 引物对群体Ⅲ和群体Ⅳ进行 PCR 扩增,在群体Ⅲ的 87 株中含有 Pi-4 号特征带型共 26 株(CC 或 Cc),其中杂合带型 23 株(Cc),纯合带型 3 株(CC);在群体Ⅳ的 171 株中含有 Pi-4 号特征带型共 61 株,其中杂合带型 53 株,纯合带型 8 株(如表 6,图 3 所示)。从基因频率分析,由于通过菌系 ZB13 接种鉴定选择,两个群体中  $Pi-d(t)^1$  基因的频率均显著

提高分别达到 98.85% 和 98.83%; $Pi-b$  基因的频率在群体Ⅲ和Ⅳ中分别为 18.39% 和 19.30%, $Pi-ta^2$  分别为 16.67% 和 20.18%,表明  $Pi-b$  和  $Pi-ta^2$  两个基因的频率在群体内和群体间没有显著差异。

用与三个抗病基因紧密连锁的分子标记结合分析群体Ⅲ和Ⅳ,发现群体Ⅲ和群体Ⅳ中同时含有地谷、BL-1 和 Pi-4 号三个品种特征带型的单株分别为 8 株和 7 株,其 PCR 扩增带型如图 1,2,3 所示。根据抗病基因与分子标记共分离的原则,推测这 15 株都含有  $Pi-d(t)^1$ 、 $Pi-b$ 、 $Pi-ta^2$  等三个抗稻瘟病基因(如表 7,图 1,2,3 所示),其可能的基因型分别为三基因杂合体  $Pi-d(t)^1 pi-d(t)^1/Pi-bpi-b/Pi-ta^2 pi-ta^2$  4 株,双基因杂合体 10 株,其中  $Pi-d(t)^1 Pi-d(t)^1/Pi-bpi-b/Pi-ta^2 pi-ta^2$  6 株,  $Pi-d(t)^1 pi-d(t)^1/Pi-bpi-b/Pi-ta^2 Pi-ta^2$  3 株,  $Pi-d(t)^1 pi-d(t)^1/Pi-bPi-b/Pi-ta^2 pi-ta^2$  1 株,双基因纯合体  $Pi-d(t)^1 Pi-d(t)^1/Pi-bpi-b/Pi-ta^2 Pi-ta^2$  仅 1 株。未出现三基因纯合体,这可能与选择的群体不够大有关。

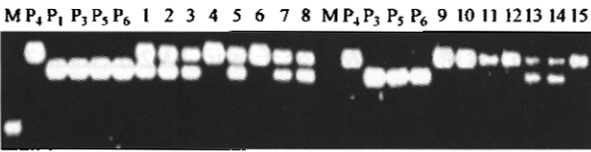


图 1 RM262 在亲本及选中单株中的特征分布

Fig.1 Analysis on the rice varieties and plants selected by using RM262

M representing DNA marker; P1, P3, P4, P5, and P6 representing JNXN, G46B, Digu, BL-1, and Pi-4 respectively; No. 1 ~ 8 representing the plants selected in population III; No. 9 ~ 15 representing the plants selected in population IV

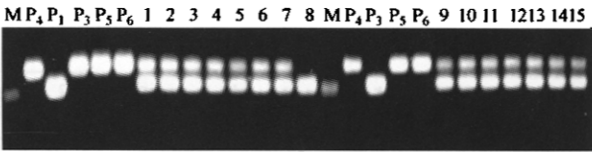


图 2 RM213 在亲本及选中单株中的特征分布

Fig.2 Analysis on the rice varieties and plants selected by using RM213

M representing DNA marker; P1, P3, P4, P5, and P6 representing JNXN, G46B, Digu, BL-1, and Pi-4 respectively; No. 1 ~ 8 representing the plants selected in population III; No. 9 ~ 15 representing the plants selected in population IV

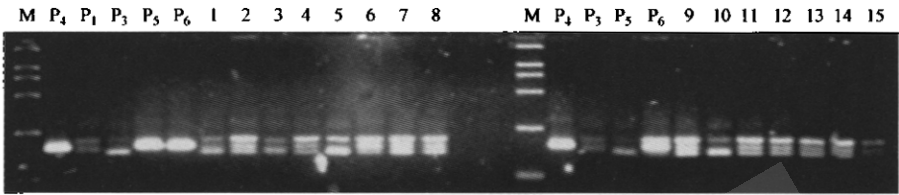


图 3 OSR32 在亲本及选中单株中的特征分布

Fig. 3 Analysis on the rice varieties and plants selected by using OSR32

M representing DNA marker; P1, P3, P4, P5, and P6 representing JNXN, G46B, Digu, BL-1, and Pi-4 respectively; No. 1 ~ 8 representing the plants selected in population III; No. 9 ~ 15 representing the plants selected in population IV

表 7 三个抗病基因聚合重组体的带型和可能的基因型表现

Table 7 Putative genotypes of 15 lines with three blast resistance genes, *Pi-d(t)*<sup>1</sup>, *Pi-b*, and *Pi-ta*<sup>2</sup>

Parent& Population	No. of plant	PCR band-type of RM262	PCR band-type of RM213	PCR band-type of OSR32	PCR band-type	Putative genotype
P1	JNXN	aa	bb	cc	aabbcc	$pi-d(t)^1 pi-d(t)^1 / pi-bpi-b / pi-ta^2 pi-ta^2$
P3	G46B	aa	bb	cc	aabbcc	$pi-d(t)^1 pi-d(t)^1 / pi-bpi-b / pi-ta^2 pi-ta^2$
P4	Digu	AA	bb	cc	AAbbcc	$Pi-d(t)^1 Pi-d(t)^1 / pi-bpi-b / pi-ta^2 pi-ta^2$
P5	BL-1	aa	BB	cc	aaBBcc	$pi-d(t)^1 pi-d(t)^1 / Pi-bPi-b / pi-ta^2 pi-ta^2$
P6	Pi-4	aa	bb	CC	aabbCC	$pi-d(t)^1 pi-d(t)^1 / pi-bpi-b / Pi-ta^2 Pi-ta^2$
Population III	1	Aa	Bb	CC	AaBbCC	$Pi-d(t)^1 pi-d(t)^1 / Pi-bpi-b / Pi-ta^2 Pi-ta^2$
	2	Aa	Bb	Cc	AaBbCc	$Pi-d(t)^1 pi-d(t)^1 / Pi-bpi-b / Pi-ta^2 pi-ta^2$
	3	Aa	Bb	CC	AaBbCC	$Pi-d(t)^1 pi-d(t)^1 / Pi-bpi-b / Pi-ta^2 Pi-ta^2$
	4	AA	Bb	Cc	AABbCc	$Pi-d(t)^1 Pi-d(t)^1 / Pi-bpi-b / Pi-ta^2 pi-ta^2$
	5	Aa	Bb	CC	AaBbCC	$Pi-d(t)^1 pi-d(t)^1 / Pi-bpi-b / Pi-ta^2 Pi-ta^2$
	6	AA	Bb	Cc	AABbCc	$Pi-d(t)^1 Pi-d(t)^1 / Pi-bpi-b / Pi-ta^2 pi-ta^2$
	7	Aa	Bb	Cc	AaBbCc	$Pi-d(t)^1 pi-d(t)^1 / Pi-bpi-b / Pi-ta^2 pi-ta^2$
	8	Aa	BB	Cc	AaBBCc	$Pi-d(t)^1 pi-d(t)^1 / Pi-bPi-b / Pi-ta^2 pi-ta^2$
Population IV	9	AA	Bb	Cc	AABbCc	$Pi-d(t)^1 Pi-d(t)^1 / Pi-bpi-b / Pi-ta^2 pi-ta^2$
	10	AA	Bb	CC	AABbCC	$Pi-d(t)^1 Pi-d(t)^1 / Pi-bpi-b / Pi-ta^2 Pi-ta^2$
	11	AA	Bb	Cc	AABbCc	$Pi-d(t)^1 Pi-d(t)^1 / Pi-bpi-b / Pi-ta^2 pi-ta^2$
	12	AA	Bb	Cc	AABbCc	$Pi-d(t)^1 Pi-d(t)^1 / Pi-bpi-b / Pi-ta^2 pi-ta^2$
	13	Aa	Bb	Cc	AaBbCc	$Pi-d(t)^1 pi-d(t)^1 / Pi-bpi-b / Pi-ta^2 pi-ta^2$
	14	Aa	Bb	Cc	AaBbCc	$Pi-d(t)^1 pi-d(t)^1 / Pi-bpi-b / Pi-ta^2 pi-ta^2$
	15	AA	Bb	Cc	AABbCc	$Pi-d(t)^1 Pi-d(t)^1 / Pi-bpi-b / Pi-ta^2 pi-ta^2$

入选的 15 株中,  $Pi-d(t)^1$  基因频率最高达 73.33%,  $Pi-ta^2$  基因频率次之, 为 63.33%,  $Pi-b$  基因频率最低为 53.33%; 这可能因稻瘟病菌系 ZB13 接种鉴定筛选导致  $Pi-d(t)^1$  基因频率上升; 另一方面  $Pi-d(t)^1$  和  $Pi-b$  基因对应的隐性等位点位于同一染色体是连锁基因不能自由组合引起  $Pi-b$  基因的频率降低, 从入选单株的基因型分析, 15 个单株也未发现  $Pi-d(t)^1 Pi-d(t)^1 / Pi-bPi-b / Pi-ta^2 Pi-ta^2$  型双基因纯合体; 因此在进行分子标记辅助选择中, 如两个目标基因连锁应适当扩大选择群体。

在传统抗病育种中, 往往应用多菌系混合接种或者在稻瘟病常发区种植分离群体进行筛选鉴定, 一般需要数年甚至十几年的时间, 才能育成一个抗病品种; 另一方面人工接种需要创造发病条件, 且多菌系混合接种, 菌系之间存在拮抗作用, 菌系的致病性可能下降, 影响接种鉴定选择效果; 自然接种发病条件的年度差异大, 并且受优势菌系的影响, 很难将多个抗病基因聚合于一个品种; 因此传统抗病育种时间长, 效率低。本研究采用分子标记筛选鉴定三个抗稻瘟病, 在 F2 代就获得三基因聚合的重组体, 为分子标记辅助育种在水稻育种的实际应用奠定了基础。目前分子标记辅助选择已成为植物育种研究的重要领域, 它将有助于突破常规育种的局限性, 育成高产、优质、多抗的新品种。

### 3 讨论

利用目标性状紧密连锁的分子标记进行辅助选择是提高育种效率的有效途径。但是目标性状与标记间的重组率在不同的群体中是有一定的差异, 且往往目标性状的定位群体不是育种群体, 因此在实际应用中, 要求用于辅助选择的分子标记与目标性状的重组率必须较低。Abenes 等<sup>[12]</sup> 对 3 个不同 F2 群体在第 11 染色体上 10 个区间的重组率进行比较, 结果表明, 紧密连锁的标记之间的重组率在不同群体间的差异不大。在本研究的 4 个分离群体中, RM262 与抗病基因  $Pi-d(t)^1$  之间的重组率差异也较小, 说明紧密连锁的分子标记在不同群体中的遗传距离有一定的稳定性。

水稻的许多重要性状如抗病性、抗虫性、糯性、株高、恢复、广亲和、香味基因等均已定位, 且其中一些性状已筛选出紧密连锁的分子标记。应用这些分子标记进行间接选择, 将得到事半功倍的作用。特别是抗性育种, 直接选择需要创造特殊环境进行筛

选鉴定, 不仅育种时间长, 而且受到许多条件限制; 而分子标记辅助选择不受环境条件的影响, 分析手段快速简便, 可以大大地提高育种效率。在育种中, 经常需要将多个性状或控制某一性状的多个基因聚合于一个品种, 需对逐个性状或基因进行筛选鉴定, 不但费时, 且常常达不到预期的目的。如在聚合杂交的历次杂交中应用目标性状紧密连锁的分子标记进行辅助选择, 可以快速准确地将多个目标基因聚合于一个重组体。Huang 等<sup>[13]</sup> 用分子标记在杂交 F4 代将 4 个抗白叶枯基因 ( $Xa-4$ ,  $Xa-5$ ,  $Xa-13$  和  $Xa-21$ ) 于 IRBB60 品系中。本研究应用微卫星标记辅助选择在聚合杂交 F2 和回交 BC2F2 代就将 3 个抗稻瘟病基因,  $Pi-d(t)^1$ ,  $Pi-b$  和  $Pi-ta^2$ , 聚合于一个重组体, 目前正在进一步自交结合微卫星标记选择获得具有三个抗病基因纯合稳定的单株, 并结合农艺性状选择培育持久抗性品种。作物育种中可利用的分子标记有许多种, 常用的有 RFLP 和 RAPD 等。RFLP 是共显性的标记, 只要选择含有与目标基因紧密连锁标记的植株即可区分纯合和杂合型, 但是 RFLP 分析需要的 DNA 量多, 检测过程复杂, 而且费用大, 难以在育种实践中推广应用。RAPD 标记需要 DNA 量少, 分析程序简单, 但它是显性标记, 不能区分纯合和杂合型, 且重复性差, 在实际应用中也存在一定的困难。所以在标记辅助选择中, 需要将 RFLP 标记和 RAPD 扩增片段转换成以 PCR 为基础的共显性标记。本研究使用的微卫星标记兼具了 RFLP 和 RAPD 的优点, 且多态性和重复性更好, 是辅助育种中较理想的一种分子标记。

### REFERENCES(参考文献)

- [1] Wang ZX, Yano M, Yamanouchi U *et al.* The *Pib* gene for rice blast resistance belongs to the nucleotide binding and leucine-rich repeat class of plant disease resistance genes. *Plant J*, 1999, 19: 55 - 64
- [2] Bryan GT, Wu KS, Farrall L *et al.* A single amino acid difference distinguishes resistant and susceptible alleles of the rice blast resistance gene *Pi-ta*. *Plant Cell*, 2000, 12(11):2033 - 2046
- [3] Masara M, Ikuo A, Krystyna R *et al.* High Resolution Mapping of the Indica-Derived Rice Blast Resistance Gene *Pi-b*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 1996, 9(1):6 - 13
- [4] Nakamura S, Asakawa S, Ohmido N *et al.* Construction of an 800-kb contig in the near-centromeric region of the rice blast resistance gene *Pi-ta^2* using a highly representative rice BAC library. *Mol Gen Genet*, 1997, 254(6):611 - 120
- [5] Li SG(李仕贵), Ma YQ(马玉清), Wang YP(王玉平) *et al.* Genetic analysis and mapping of a blast resistance gene in a indica rice variety, Digu. *The Process on Natural Science* (自然科学进展).

- 2000, 10(1):44-48
- [6] Ling ZZ, Pan QH, Wang JL. Gene analysis for blast resistance of Yunnan japonica type variety Mengwanggu-1. *Nanjing: Jiangsu Sciences Technology publishing House*. 1990, pp.105-109
- [7] McCouch SR, Kochert G, Yu ZH *et al.* Molecular mapping of rice chromosomes. *Theor Appl Genet*, 1988, 76:815-820
- [8] Chen X, Temnykh S, Xu Y *et al.* Development of microsatellite framework map providing genome-wide coverage in rice (*Oryza sativa* L.). *Theor Appl Genet*, 1997, 95:553-567
- [9] Akagi H, Yokozeki Y, Inagaki A *et al.* Microsatellite DNA markers for rice chromosomes. *Theor Appl Genet*, 1996, 94:61-67
- [10] Inoue T, HS Zhong A Miyao I *et al.* Sequence-tagged sites (STSs) as standard landmarks in the rice genome. *Theor Appl Genet*, 1994, 89:728-734
- [11] Li SG(李仕贵), Wang YP(王玉平), Li HY(黎汉云) *et al.* Analysis on rice blast resistance by using microsatellite molecular marker. *Chinese Journal of Biotechnology* (生物工程学报), 2000, 16(3): 324-327
- [12] Abenes ER, Angeles GS, Khush *et al.* Selection of bacterial blight resistant rice plants in the F2 generation via their linkage to molecular markers. *Rice Genet News*, 1993, 10:120-123
- [13] Huang N, Angeles ER, Domingo J *et al.* Pyramiding of bacterial blight resistance genes in rice.: marker-assisted selection using RFLP and PCR. *Theor Appl Genet*, 1997, 95(3):313-320

## Marker-assisted Selection and Pyramiding for Three Blast Resistance Genes, $Pi-d(t)^1$ 、 $Pi-b$ 、 $Pi-ta^2$ , in Rice

CHEN Xue-Wei<sup>1,2\*</sup> LI Shi-Gui<sup>2\*</sup> MA Yu-Qing<sup>2</sup> LI Han-Yun<sup>2</sup> ZHOU Kai-Da<sup>2</sup> ZHU Li-Huang<sup>1</sup>

<sup>1</sup> (Institute of Genetics and Developmental Biology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China)

<sup>2</sup> (Rice Research Institute, Sichuan Agricultural University, Chengdu 611130, China)

**Abstract** G46B is a promising holding line used for three-lines breeding strategy in hybrid rice, but it is susceptible to blast disease caused by *Pyricularia grisea*. To improve its blast resistance, three rice varieties, Digu, BL-1, and Pi-4, with blast resistance genes,  $Pi-d(t)^1$ ,  $Pi-b$ , and  $Pi-ta^2$ , respectively, were used to be crossed with G46B, and 15 plants with these three blast resistance genes,  $Pi-d(t)^1$ ,  $Pi-b$ , and  $Pi-ta^2$ , were selected from their F2 and B1C1 populations via a marker-aided crossing procedure. Among them, four plants were heterozygotes in the three resistance genes, with the genotype of  $Pi-d(t)^1 pi-d(t)^1 / Pi-bpi-b / Pi-ta^2 pi-ta^2$ ; ten plants were heterozygotes in two of the three resistance genes, of which six with the genotype of  $Pi-d(t)^1 Pi-d(t)^1 / Pi-bpi-b / Pi-ta^2 pi-ta^2$ , three with the genotype of  $Pi-d(t)^1 pi-d(t)^1 / Pi-bpi-b / Pi-ta^2 Pi-ta^2$ , and one with the genotype of  $Pi-d(t)^1 pi-d(t)^1 / Pi-bpi-b / Pi-ta^2 pi-ta^2$ ; and only one plant was homozygote in two of the three resistance genes with the genotype of  $Pi-d(t)^1 Pi-d(t)^1 / Pi-bpi-b / Pi-ta^2 Pi-ta^2$ . These results demonstrate the capacity of maker-assisted selection (MAS) in gene pyramiding for rice blast resistance and its enhancement for the efficiency in rice resistance breeding.

**Key words** rice (*Oryza sativa* L.), blast (*Pyricularia grisea*), resistance gene, maker-assisted selection (MAS)

Received: 03-02-2004

This work was supported by Grants from the National High Technology Research and Development Program of China (863 Program) (No. 2004AA211132) and the Ministry of Education in China (Excellent Doctoral Thesis Grant) (No. 200054).

\* Corresponding authors. Tel:86-10-64870491; Fax:86-10-64873428; E-mail: xwchen@genetics.ac.cn;

Tel:86-28-82722888; Fax:86-28-82722918; E-mail: lishigui-sc@263.net

### 本刊加入《中国学术期刊(光盘版)》声明

为适应我国信息化建设需要,扩大作者学术交流渠道,本刊已加入《中国学术期刊(光盘版)》和“中国期刊网”。如作者不同意将文章编入该数据库,请在来稿时声明,本刊将做适当处理。

《生物工程学报》编辑部