

应用分子标记技术改良京作 1 号的稻瘟病抗性

向小娇¹, 张 建¹, 郑天清¹, 徐建龙^{1,2}

(¹中国农业科学院作物科学研究所, 北京 100081; ²中国农业科学院深圳农业基因组研究所, 广东深圳 518120)

摘要: 稻瘟病是危害水稻产量的重要生物胁迫之一。实践证明, 解决这一问题的最有效方法是培育具广谱、持久稻瘟病抗性的品种并推广种植。本研究以优质、高产、感稻瘟病的京作 1 号为轮回亲本, 与稻瘟病抗性基因 *Pi9*、*Pigm* 和 *pi21* 的供体材料进行杂交、回交和复交, 结合分子标记辅助选择和农艺性状筛选, 培育不同的单基因导入系和聚合系。苗期人工接种多个稻瘟病菌的结果显示, *Pi9* 抗性改良系的抗性频率达到 100%, *Pigm* 抗性改良系平均为 90%, 均极显著高于轮回亲本京作 1 号的抗性频率, 且农艺性状与京作 1 号基本一致。*pi21* 抗性改良系的抗性水平与京作 1 号没有明显差异, 单株产量极显著低于京作 1 号。与轮回亲本相比, *Pi9* 和 *pi21* 聚合系的抗性频率显著提高, 达到 93.33%, 但单株产量明显降低。研究结果证实了 *Pi9* 和 *Pigm* 基因在大幅度提高抗性的同时对主要农艺性状影响小, 都具有较大的育种利用价值。基因 *pi21* 抗谱较窄, 抗性不强, 且可能存在对产量的负效应, 不宜单独用来改良水稻品种的稻瘟病抗性, 需要与抗性强的主基因聚合, 通过多次回交和自交打破该基因与产量的不利连锁累赘。

关键词: 品种改良; 稻瘟病抗性; 分子标记辅助选择; 抗谱; 抗性水平

Improving Blast Resistance of Jingzuo1 Using Molecular Marker Technique

XIANG Xiao-jiao¹, ZHANG Jian¹, ZHENG Tian-qing¹, XU Jian-long^{1,2}

(¹Institute of Crop Science, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081;

²Agricultural Genomics Institute at Shenzhen, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Shenzhen 518120)

Abstract: Rice blast is one of the critical factors that reduce rice production. Breeding and cultivation of cultivars with durable blast resistance and broad-spectrum has been proved to be the most promising strategy to solve this problem. To improve blast resistance of Jingzuo1, the introgression and pyramiding of blast resistance genes *Pi9*, *Pigm*, and *pi21* were conducted through crossing, backcrossing, multiple crossing and self-crossing in combination with marker-assisted selection (MAS) and phenotypic selections. The results showed that resistance frequency of the resistance-improved line with *Pi9* reached 100%, and that of the resistance-improved lines with *Pigm* averagely reached 90%. Both of them were extremely significantly higher than that of recurrent parent Jingzuo1. And the agronomic traits of these lines were quite similar with that of Jingzuo1. The resistance-improved line with *pi21* had no significant difference of resistance frequency with Jingzuo1 but had significantly decreased grain yield per plant as compared with Jingzuo1. Comparing with Jingzuo1, the resistance frequency of pyramiding line of *Pi9* and *pi21* was significantly improved, reaching 93.33% with significant decrease in grain yield per plant. The results indicated that introgressions of *Pi9* and *Pigm* can greatly improve blast resistance and have less negative effects on agronomic traits, thus showing great potential application in rice breeding for blast resistance. Due to *pi21*'s relative poor resistance and narrow resistance-spectrum as well as possible negative effects on yield, it isn't recommended to separately

收稿日期: 2016-03-15 修回日期: 2016-04-19 网络出版日期: 2016-06-08

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.4996.S.20160608.1433.020.html>

基金项目: 国家“863”计划(2014AA10A601); 深圳孔雀团队计划(20130415095710361); 中国农业科学院科技创新工程

第一作者研究方向为水稻分子育种。E-mail: 1014113949@qq.com

通信作者: 徐建龙, 研究方向为遗传育种。E-mail: xujlcaas@126.com

use it for improvement of blast resistance. Combination of *pi2l* with other strong resistance genes could be proper for improvement of blast resistance by multiple backcross and selfing to break its unfavorable linkage drag with yield trait.

Key words: improvement of cultivar; blast resistance; marker-assisted selection; resistance spectrum; resistant level

水稻是全世界一半以上人口的主要粮食作物,尤其在中国、印度、日本等亚洲国家^[1]。到 2035 年,世界水稻产量必须增加 26% (与 2010 年相比) 才能满足因人口增长而增加的粮食需求^[2]。然而,现今的水稻生产却受到可耕地减少、土地贫瘠化、环境恶化及各种生物或非生物胁迫的威胁。在各种生物逆境中,由子囊菌引起的稻瘟病 (*Magnaporthe oryzae*) 是水稻生产中面临的最重要的生物胁迫之一,每年全球由稻瘟病导致的损失约占水稻总产量的 10% ~ 15%,相当于数十亿美元的经济损失^[3]。通过遗传育种手段提高水稻的抗病性,培育优良抗病品种是防治稻瘟病和解决粮食安全的最有效途径之一^[4]。

稻瘟病的遗传学研究始于日本。20 世纪 80 年代, S. Kiyosawa 等^[5-6] 组建了一套鉴别稻瘟病抗性基因的体系,并鉴定了 14 个位于 8 个位点上的稻瘟病抗性主效基因。随后,许多国家纷纷开展了稻瘟病的抗性遗传研究。截止到 2015 年 3 月,已至少有 84 个稻瘟病抗性主效基因被报道,它们分布于 69 个稻瘟病抗性位点上,其中 24 个基因已被成功克隆^[7]。在诸多抗瘟基因中, *Pi9* 和 *Pigm* 是同一复合抗瘟性基因座上的 2 个抗谱很广的等位或紧密连锁的基因。G. Liu 等^[8] 通过抗谱鉴定发现 *Pi9* 对 43 个来自 13 个国家的稻瘟病菌株都表现出高抗性。而 *Pigm* 对 30 个不同地区和国家的强致病菌株中的 29 个表现高抗或免疫,比公认的广谱抗性基因 *Pi1*、*Pi2* 等抗谱更广^[9],被认为具有较高的利用价值。*pi2l* 是被定位的第 1 个隐性抗瘟性主效 QTL,表现为部分田间抗性^[10]。QTL 控制的部分抗性具有更通用的遗传机制,使得抗性更持久^[11]。随着稻瘟病抗性基因的定位与克隆,相应的分子标记也被不断开发,为备受育种家青睐的分子标记辅助选择 (MAS) 育种提供了有利的辅助工具^[12]。利用 MAS 将广谱稻瘟病抗性基因导入感病品种中或者将多个不同的抗性基因聚合到同一品种中,是获得广谱高抗稻瘟病的有效途径^[13-15]。早在 1995 年, K. L. Zheng 等^[16] 就利用 MAS 成功将 *Pi1*、*Pi2*、*Pi4* 聚合于同一品种中。此后,许多育种家成功聚

合了不同稻瘟病抗性基因,促进了水稻稻瘟病抗性育种的发展。

京作 1 号是本课题以籼稻品种 93072 为供体,以吉粳 88 为轮回亲本,经过杂交和连续回交 2 次选育而成的北方粳稻新品系,2012 年在北方多点品种比较试验中产量比吉粳 88 增产 5.68%,米质优,但感稻瘟病。本研究利用带有稻瘟病抗性基因 *Pi9*、*Pigm* 和 *pi2l* 的水稻供体材料,通过回交、复交和分子标记辅助选择 (MAS) 将 *Pi9*、*Pigm* 和 *pi2l* 导入并聚合于京作 1 号中,鉴定不同抗瘟性基因对京作 1 号的稻瘟病抗性改良效果,以期培育出稻瘟病抗性强、抗谱广且综合性状好的优良品种,丰富我国北方粳稻的稻瘟病抗性基因。

1 材料与方法

1.1 供试材料

轮回亲本是本实验室育成的优良粳稻京作 1 号,抗源供体亲本是以小粒野生稻 (*Pi9*)、谷梅 4 号 (*Pigm*) 和 Owarihatamochi (*pi2l*) 为供体,分别与绥粳 10 号、龙粳 25 号和龙粳 26 号杂交和回交育成的抗病中间材料 HJ1 (*Pi9*)、HJ2 (*Pigm*) 和 HJ3 (*pi2l*)。

人工接种抗性评价的菌株由广东省农科院植保所和吉林省农科院水稻所提供的籼、粳菌株各 15 个,分别来自广东省和吉林省各地区,包括 14 个 B 群小种、2 个 C 群小种、1 个 E 群小种、5 个 F 群小种和 8 个 G 群小种 (表 2)。

1.2 多态性分子标记的筛选

根据基因精细定位、克隆及分子标记开发和 <http://www.gramene.org> 网站上的分子标记信息,对收集到的与这些抗性基因连锁的所有分子标记,采用 6% ~ 8% 的聚丙烯酰胺凝胶电泳和植物花青素染色筛选供体与受体间的多态性标记,最后筛选出序列标记位点 (STS) 标记 pB9-1^[17]、SSR 标记 SRF52 和 SRF5^[9]、RM5586 和 RM1359 作为抗瘟性基因 *Pi9*、*Pigm* 和 *pi2l* 在抗源供体与受体品种京作 1 号之间紧密连锁的多态性分子标记 (图 1 和表 1)。

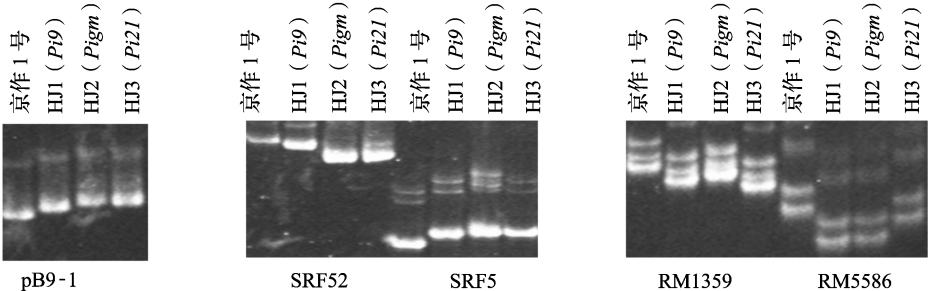


图 1 与 3 个抗性基因紧密连锁标记在抗源与受体亲本之间的产物扩增模式
Fig. 1 Amplification of tightly linkage markers of the three resistance genes between the donor parents and the recipient

表 1 与 3 个抗性基因紧密连锁标记信息

Table 1 Information of markers tightly linked with the three resistance genes

鉴定基因	分子标记	产物大小	F(5'-3')		退火温度(℃)
Target gene	Molecular marker	Product size(bp)	F(5'-3')	R(5'-3')	Anneal temperature
<i>Pi9</i>	pB9-1	174 ~ 179	TAGACTCCTTCCAAGTTTGACT	TGTGATTTTCAGAATTTTCGT	55
<i>Pigm</i>	SRF52	251	TTAGGATACGGCTTCTAGGC	CGTAATTGTTGCATATGGTG	56
	SRF5	139	ATGTGGGAATTTCTAGCCCC	CCCTAGTTTTCCAAATGGCC	56
<i>pi21</i>	RM1359	170	AACGAATTCTATTTTGCCTC	TTCTTCTCATTTCAATTCGC	55
	RM5586	134	CTCCATAATCAAGGAAGCTA	ATGAGTCTTTTCGTCAGTGT	55

1.3 抗瘟性改良的技术路线

抗性基因转育分单基因连续回交改良和不同抗性基因回交聚合改良 2 种方案(图 2)。单基因连续回交转育以京作 1 号为母本,分别与携带稻瘟病抗性基因 *Pi9*、*Pigm* 和 *pi21* 的中间材料 HJ1、HJ2 和 HJ3 杂交获得 F_1 ,选择真杂种 F_1 单株与京作 1 号回交得到 BC_1F_1 , BC_1F_1 选农艺性状与轮回亲本相近的单株取花粉混合授粉回交得到 BC_2F_1 。从 BC_2F_1 开始采用与抗性基因 *Pi9*、*Pigm* 和 *pi21* 紧密连锁的标记 pB9-1、SRF52/SRF5 和 RM5586/RM1359 鉴定基因型,选择标记带型为杂合且农艺性状与轮回亲本相近的单株继续回交,获得 BC_3F_1 种子,从 BC_3F_1 群体中选收标记基因型杂合、综合性状接近京作 1 号的单株种成 BC_3F_2 株系,从每个株系中选收标记基因型纯合、综合性状酷似京作 1 号的单株用于性状评价。与连续回交同步,从用于回交的 BC_2F_1 单株上收获 BC_2F_2 自交种子,逐代选收标记带型纯合且农艺性状与轮回亲本相近的单株,按系谱法加代直至 BC_2F_3 ,从每个 BC_2F_3 株系中选收标记带型纯合且农艺性状较优的单株用于性状评价。

在单基因回交转育的同时,从抗性基因 *Pi9*、*pi21* 导入京作 1 号的 2 个 BC_2F_1 群体中分别筛选 pB9-1 和 RM5586/RM1359 标记带型杂合且综合性

状较好的单株彼此杂交,获得双基因 *Pi9* 和 *pi21* 分离的复交 F_1 群体。在复交 F_1 群体中利用标记 pB9-1 和 RM5586/RM1359 辅助鉴定,选收 2 个基因位点均杂合且综合性状与京作 1 号相似的单株,种成 F_2 群体,从中选收 2 个抗性基因位点纯合且综合性状较优的单株,用于 F_3 性状评价。

1.4 稻瘟病抗性鉴定

将轮回亲本京作 1 号与各个单基因导入系和聚合系种子,委托广东省农业科学院植物保护研究所进行苗期稻瘟病接种鉴定。采用搪瓷盆育苗,将待鉴定种子与对照品种 Tetep(抗病对照)和丽江新团黑谷(感病对照)的种子消毒并催芽后挑选饱满露白的种子分区均匀播于盆中,每个材料 10 粒种子,2 次重复。水稻苗长至 3.5 ~ 4 叶龄时进行人工喷雾接种。稻瘟病菌分生孢子悬浮液浓度大约为 10 万个/mL,每盆 20 mL 的喷雾量。接种后的水稻苗在 24 ℃ 的接菌室中保湿培养 48 h 后移至温室,25 ~ 28 ℃ 下保湿培植,7 ~ 10 d(感病对照发病情况达到稳定)后,调查各个材料的发病情况。参照国际水稻研究所的稻瘟病抗性分级标准^[18],对每个菌株的抗性反应进行分级:0 ~ 3 级为抗(R),4 ~ 9 级为感(S),按以下公式计算抗性频率和抗谱重叠度:

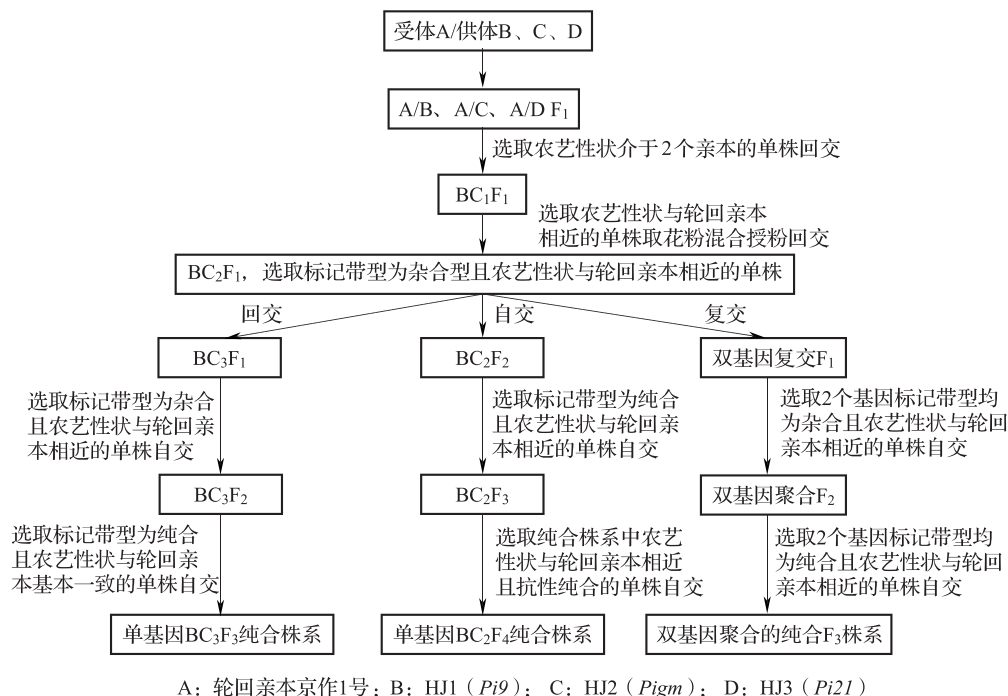


图2 京作1号稻瘟病抗性改良技术路线

Fig. 2 Strategy of improving blast resistance for Jingzuo1

抗性频率(%) = (接种后表现抗的菌株数/接种的总菌株数) × 100;

抗谱重叠度(%) = (具有相同抗性表现的菌株数/接种的总菌株数) × 100。

抗性分级标准为: 抗性频率 ≥ 90 为高抗(HR), 80 ≤ 抗性频率 < 90 为抗(R), 70 ≤ 抗性频率 < 80 为中抗(MR), 60 ≤ 抗性频率 < 70 为中感(MS), 50 ≤ 抗性频率 < 60 为感(S), 抗性频率 < 50 为高感(HS)。

1.5 农艺性状考查

对 BC₃F₃ 和 BC₂F₄ 单基因抗性改良系、F₃ 双基因抗性聚合系和轮回亲本京作1号, 设置田间农艺性状考查试验, 每株系种3行, 每行10株, 行株距 25 cm × 17 cm, 随机排列, 3次重复。取每重复中间1行的中间8株调查抽穗期、株高、有效穗数、每穗实粒数、结实率、千粒重, 测定单株产量。

1.6 数据分析

采用 *t* 测验比较各改良株系农艺性状均值与京作1号差异显著性。

2 结果与分析

2.1 抗性基因 *Pi9*、*Pigm* 和 *pi21* 的分子标记辅助导入与聚合

分子标记辅助抗性基因转育的过程如图2所

示。在京作1号与3个抗病供体 HJ1 (*Pi9*)、HJ2 (*Pigm*) 和 HJ3 (*pi21*) 杂交和回交的3个 BC₁F₁ 群体中, 按株系混合取花粉与京作1号回交, 获得 BC₂F₁ 群体。利用多态性分子标记 pB9-1、SRF52/SRF5 和 RM5586/RM1359 分别从3个 BC₂F₁ 群体(群体大小分别为63、74和81株)中检测出30、34和44株基因型杂合的单株, 再从每个群体入选的基因型杂合的单株中选择农艺性状与京作1号接近的3株继续回交, 并收获自交种子, 同时选择分别带有 *Pi9* 和 *pi21* 的抗性基因型杂合的单株配制复交组合。将每一抗性基因3个单株的回交种子混合, 种成 BC₃F₁ 群体, 3个 BC₃F₁ 群体大小分别为133、276和152株。从3个 BC₃F₁ 群体中经标记基因型鉴定, 筛选出基因杂合型的单株分别有59、123和60株, 再从中选择综合农艺性状与京作1号相近的单株各3株, 收获自交种子种成 BC₃F₂ 群体, 每个群体种植200株左右。分子标记跟踪检测 BC₃F₂ 群体的基因型, 结合综合农艺性状表现, 最终从每个群体中选择抗性标记基因型纯合、综合性状好的单株各1株收获自交种, 分别命名为 JZ-BC₃F₃-*Pi9*、JZ-BC₃F₃-*Pigm* 和 JZ-BC₃F₃-*pi21*。3个 BC₂F₁ 自交后代, 利用标记辅助选择抗性基因型结合农艺性状选择, 每代从300株群体中入选3株产生下一自交群体, 最后获得带有 *Pigm* 和 *pi21* 纯合基因型且性状较优的

BC₂F₃单株各 1 株收取自交种,分别命名为 JZ-BC₂F₄-*Pigm* 和 JZ-BC₂F₄-*pi2l*,没能选出携带 *Pi9* 基因的单株。上述入选的 5 份抗性改良系将用于后续抗性评价和农艺性状考察。

在京作 1 号/HJ (*Pi9*) BC₂F₁ 与京作 1 号/HJ (*pi2l*) BC₂F₁ 聚合的 95 株复交 F₁ 群体中,同时利用标记 pB9-1 和 RM5586/RM1359 检测到 12 株双基因 (*Pi9* + *pi2l*) 聚合体,从中选择农艺性状较好的 3 个单株种成 F₂ 群体,每群体 400 株。分子标记跟踪检测 F₂ 群体的基因型,结合综合农艺性状表现,最终选择抗性标记基因型纯合、综合性状接近京作 1 号的单株 1 株收自交种,命名为 JZ-F₃-*Pi9*-*pi2l*,用于后续抗性评价和农艺性状考察。

2.2 抗性改良株系的稻瘟病抗性表现

抗性改良株系和轮回亲本接种 30 个菌株的抗性表现如表 2 所示。轮回亲本京作 1 号本身对稻瘟病的抗性频率仅为 50%,属于感病品种。单基因导入系 JZ-BC₃F₃-*Pi9* 抗所有 30 个菌株,抗谱达 100%; JZ-BC₃F₃-*Pigm* 抗 28 个菌株,抗谱为 93.3%,这 2 个改良系均表现为高抗水平。JZ-BC₂F₄-*Pigm* 抗 26 个菌株,抗谱 86.7%,表现抗病。JZ-BC₃F₃-*pi2l* 和 JZ-BC₂F₄-*pi2l* 仅抗 30 个菌株中的 50% 菌株,抗谱为 50% 左右,为感病类型。双基因聚合系 JZ-F₃-*Pi9*-*pi2l* 抗 28 个菌株,抗谱与 JZ-BC₃F₃-*Pigm* 相当,为 93.3%,属高抗类型。不难看出,*pi2l* 不同导入方式的 2 个抗性改良株系 JZ-BC₃F₃-*pi2l* 和 JZ-BC₂F₄-*pi2l* 的抗瘟性与轮回亲本京作 1 号相当。不同改良系与轮回亲本的抗谱重叠度变幅为 50% ~ 90%,与轮回亲本的抗谱重叠度越高,对稻瘟病菌的抗性越差(表 2)。

2.3 抗性改良株系的农艺性状评价

考查抗性改良株系和聚合系的农艺性状表现(表 3,图 3)。结果表明,所有抗性改良株系的抽穗期与对照京作 1 号相当。JZ-BC₃F₃-*Pi9* 除结实率极显著低于对照外,其余性状与对照相仿;JZ-BC₃F₃-*Pigm* 每穗实粒数和结实率显著或极显著低于对照,千粒重极显著高于对照,单株产量高于对照但未及显著水平;JZ-BC₃F₃-*pi2l* 单株有效穗数和结实率均极显著低于对照,千粒重极显著高于对照,单株产量极显著低于对照;JZ-BC₂F₄-*Pigm* 的株高和每穗实粒数显著高于对照,结实率极显著低于对照,最终单株产量高于对照但未及显著水平;JZ-BC₂F₄-*pi2l* 单株有效数和结实率均极显著低于对照但千粒重极显著高于对照,单株产量极显著低于对照;JZ-F₃-*Pi9*-*pi2l*

株高显著高于对照,单株有效穗数和结实率显著和极显著低于对照,单株产量在所有改良系中最低,极显著低于对照。从株型和综合性状来看(图 3,表 3),*Pigm* 和 *Pi9* 抗性基因改良系表现最好,如 JZ-BC₃F₃-*Pi9*、JZ-BC₃F₃-*Pigm* 和 JZ-BC₂F₄-*Pigm* 3 个改良系除结实率显著下降外,没有其他明显的缺陷,单株产量均高于京作 1 号。而带有 *pi2l* 的抗性改良系的株型和综合性状相对较差,单株产量都极显著低于京作 1 号。

3 讨论

稻瘟病是制约水稻生产的重要病害之一,通过广谱稻瘟病抗性基因的导入和聚合培育抗性持久、稳定的品种是解决这一问题的最有效措施。京作 1 号是本课题组利用北方粳稻吉粳 88 与 93072 杂交和回交育成的高产优质粳稻品种,但不抗稻瘟病。本研究利用广谱抗瘟基因 *Pi9* 和 *Pigm* 及田间部分抗性 QTL *pi2l* 为供体改良京作 1 号的抗瘟病。*Pi9* 和 *Pigm* 是位于水稻第 6 条染色体短臂端靠近着丝粒处同一复合抗性基因座上的 2 个等位或紧密连锁基因。研究证明这 2 个基因都是广谱抗瘟性基因^[8-9]。在 *Pi9* 位点区域内,有 6 个 NBS-LRR 类基因以串联方式排列其中,而作为 *Pi9* 行使功能的是其中的 *Nbs2-Pi9*,它包含 2 个内含子,编码的蛋白产物由 1032 个氨基酸组成,其表达不受稻瘟病菌的影响,属于组成型基因,可能通过识别不同稻瘟病菌生理小种的不同分子或者保守分子实现广谱抗瘟性^[19]。*Pigm* 是谷梅 4 号中定位的广谱稻瘟病抗性基因,精细定位结果显示该基因与 *Pi9*、*Pi2* 等位或紧密连锁,但还未克隆^[9]。*pi2l* 是位于第 4 条染色体分子标记 G271-G317 之间的一个隐性主效 QTL,对稻瘟病具部分田间抗性^[10]。该基因激发的是一种低速诱导的抗病机制,与基础抗性有关,但小种专化性没有主基因强^[20]。本研究结果表明,*Pi9* 和 *Pigm* 基因对南方稻区收集的 15 个籼稻优势致病菌株和北方稻区收集的 15 个粳稻优势致病菌株的绝大多数表现抗病,抗谱在 93% 以上,进一步证实了其广谱抗瘟性。相反,*pi2l* 作为抗病 QTL,以单个基因存在时对多数稻瘟病菌不具抗性(如 JZ-BC₃F₃-*pi2l* 和 JZ-BC₂F₄-*pi2l*),抗谱仅 50% 左右。但 *pi2l* 与其他主基因结合在一起时,抗瘟性可以大大增强,如 JZ-F₃-*Pi9*-*pi2l* 抗 30 个菌株中 28 个,抗谱比导入 *pi2l* 单个基因改良系提高了 43.3%。与单基因抗性改良系 JZ-BC₃F₃-*Pi9* 相比,聚合系

表 2 抗性改良株系对 30 个稻瘟病菌株的抗性评价

Table 2 Evaluation of resistance improved lines on resistance to 30 isolates of *M. oryzae*

品系及携带的抗性基因	ZB13	ZB01	ZB13	ZB13	ZB13	ZB13	ZB13	ZB13	ZB13	ZB13	ZB13	ZB15	ZB15	ZB15	ZB29	ZC01	ZC13	ZE1	ZF1	ZF1	ZF1
Lines with resistance genes	13-710	11-121	00-193	11-1287	11-882	12-3057	12-3058	13-123	13-329	13-412	11-123	13-443	13-552	13-466	13-284	138-1	32-1	101-2	122-1	13-1-1	
JZ-BC ₃ F ₃ - <i>Pi9</i>	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	
JZ-BC ₃ F ₃ - <i>Pigm</i>	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	
JZ-BC ₃ F ₃ - <i>pi21</i>	S	R	R	R	S	R	S	S	R	S	R	R	S	S	R	S	S	R	S	R	
JZ-BC ₂ F ₄ - <i>Pigm</i>	R	R	R	R	S	R	R	S	R	S	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	
JZ-BC ₂ F ₄ - <i>pi21</i>	R	R	R	R	S	R	R	S	R	S	R	R	S	S	R	S	S	R	S	R	
JZ-F ₃ - <i>Pi9</i> - <i>pi21</i>	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	
京作 1 号	S	R	R	R	R	R	S	S	R	S	R	R	R	S	R	S	S	R	S	R	
Jingzuol (CK)																					

品系及携带的抗性基因	ZF1	ZF1	ZG1	ZG1	ZG1	ZG1	ZG1	ZG1	ZG1	ZG1	ZG1	浸染菌株数	抗性频率	与轮回亲本抗谱
Lines with resistance genes	13-586-D1-1	13-856-39	11-1	19-1	3-1	33-2	57-2	82-1	9-1	91-1	No. of infected strains	(%) Frequency of resistance	Overlap of resistance spectrum with the recurrent parent	
JZ-BC ₃ F ₃ - <i>Pi9</i>	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	0	100.0aA	50.0	
JZ-BC ₃ F ₃ - <i>Pigm</i>	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	2	93.3aA	56.7	
JZ-BC ₃ F ₃ - <i>pi21</i>	R	S	S	S	R	S	R	R	S	S	16	46.7bB	90.0	
JZ-BC ₂ F ₄ - <i>Pigm</i>	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	4	86.7aA	56.7	
JZ-BC ₂ F ₄ - <i>pi21</i>	R	S	S	S	R	S	R	S	S	S	15	50.0bB	86.7	
JZ-F ₃ - <i>Pi9</i> - <i>pi21</i>	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	2	93.3aA	56.7	
京作 1 号	R	S	S	S	R	S	R	S	S	S	15	50.0bB	—	
Jingzuol (CK)														

小写字母 a, b 和大写字母 A, B 分别代表在 0.05 和 0.01 水平上的差异显著性。表中 ZB、ZC、ZE、ZF 和 ZG 分别代表稻瘟病不同小种;13-710、11-121 等代表不同稻瘟病小种对应的接种用菌株

Lowercase letters a, b and capital letters A, B represent the significant differences at $P \leq 0.05$ and 0.01, respectively. ZB, ZC, ZE, ZF and ZG in the header stand for different races of *Magnaporthe oryzae*, and 13-710, 11-121, etc., for corresponding inoculating strains of different races

表 3 稻瘟病抗性改良系的农艺性状

Table 3 Agronomic traits of the blast resistance-improved lines

品系及携带基因	抽穗期 (d)	株高 (cm)	单株有效穗数	每穗实粒数	结实率 (%)	千粒重 (g)	单株产量 (g)
Lines with the resistance genes	Heading date	Plant height	No. of panicles per plant	No. of grains per panicle	Seed fertility	1000-grain weight	Grain yield per plant
JZ-BC ₃ F ₃ - <i>Pi9</i>	98.33 ± 1.22	112.40 ± 3.77	17.63 ± 2.39	157.11 ± 12.11	77.03 ± 9.56 **	21.04 ± 2.12	49.43 ± 8.55
JZ-BC ₃ F ₃ - <i>Pigm</i>	98.69 ± 1.89	113.38 ± 3.89	16.08 ± 2.02	146.80 ± 14.22 *	76.88 ± 8.26 **	22.59 ± 1.02 **	50.97 ± 6.79
JZ-BC ₃ F ₃ - <i>pi21</i>	97.00 ± 1.73	115.33 ± 2.69 *	11.00 ± 1.00 **	150.40 ± 11.30	80.53 ± 4.38 **	22.58 ± 0.38 **	32.99 ± 2.24 **
JZ-BC ₂ F ₄ - <i>Pigm</i>	99.33 ± 2.31	112.37 ± 7.77	17.67 ± 0.58	171.60 ± 9.90 *	76.7 ± 2.69 **	22.07 ± 1.53	50.76 ± 17.55
JZ-BC ₂ F ₄ - <i>pi21</i>	98.00 ± 1.43	114.54 ± 7.11	12.00 ± 1.10 **	155.45 ± 9.31	78.56 ± 3.21 **	23.22 ± 0.41 **	32.09 ± 3.25 **
JZ-F ₃ - <i>Pi9</i> - <i>pi21</i>	99.50 ± 1.73	117.55 ± 3.91 *	12.67 ± 3.21 *	152.05 ± 12.67	72.76 ± 5.29 **	21.03 ± 2.07	27.62 ± 3.93 **
京作 1 号	97.80 ± 0.45	111.00 ± 1.82	17.40 ± 1.14	158.32 ± 4.56	90.08 ± 1.08	21.06 ± 0.51	46.24 ± 2.38
Jingzuol (CK)							

* 和 ** 分别表示抗性改良系与京作 1 号性状在 0.05 和 0.01 的差异显著水平

* and ** represent significance levels at $P \leq 0.05$ and 0.01, respectively, for differences of traits between the improved lines and Jingzuol

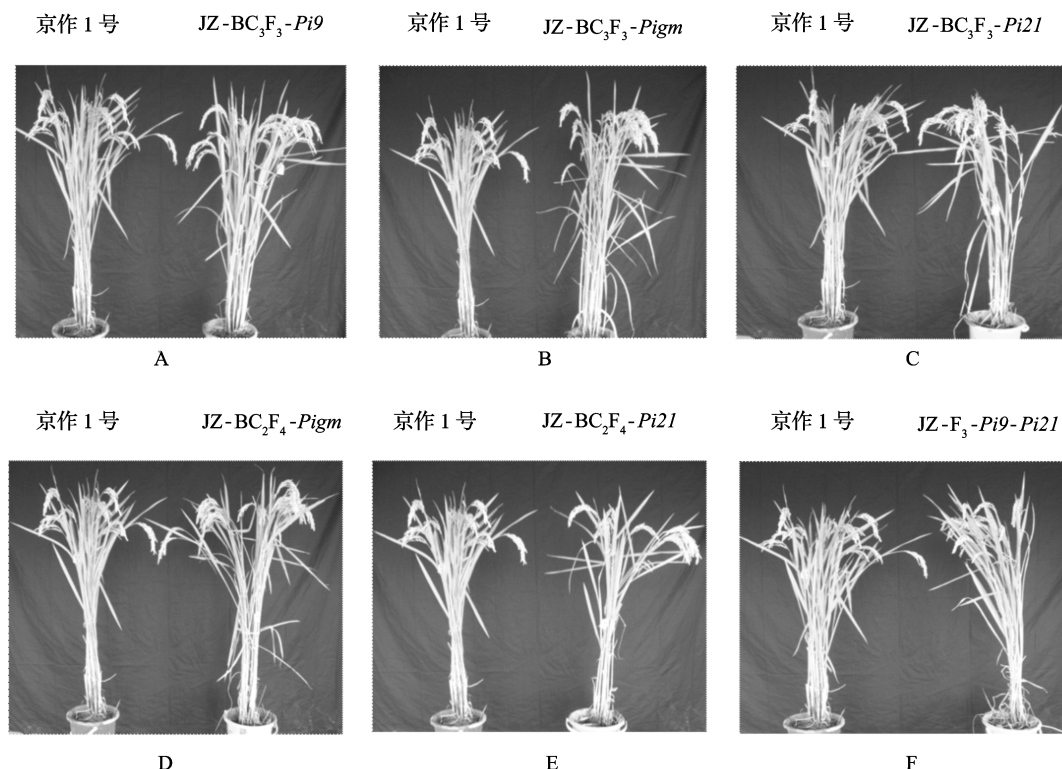


图 3 稻瘟病抗性改良系的农艺表现

Fig. 3 Agronomic performance of the blast resistance-improved lines

JZ-F₃-Pi9-pi21 的抗性似乎表现并不如预期那样理想,差异主要表现对 32-1 和 13-856-39 菌株的反应上,接种结果显示 JZ-F₃-Pi9-pi21 株系对这 2 个菌株的抗性均为 MS(中感),而 JZ-BC₃F₃-Pi9 则表现中抗(MR)。其实中抗和中感是 2 种比较接近的抗性,有时不易区分,但本研究在统计抗感时把中抗和中感分别归为抗(R)、感(S)2 种类型,因而可能造成 2 个改良系对这 2 个菌株的抗性差异。但即便如此,这 2 个株系的抗性频率差异不显著,没有达到统计学意义上的差异显著水平。JZ-F₃-Pi9-pi21 抗瘟性还有待进一步验证。

京作 1 号对接种的 30 个稻瘟病菌的抗谱为 50%,表明轮回亲本本身存在某些抗病基因。回交改良品种的抗性时,除导入目标抗性基因外,不同改良系导入供体基因组片段并不完全相同,存在一定的随机性,从而导致轮回亲本本身的背景抗性基因被供体等位基因替代的情况也不完全相同。由于导入供体的主效抗性基因与轮回亲本的背景抗性基因之间可能存在互作效应,不同改良系的这种互作效应可能不同,最终导致改良系之间对某些菌株抗性反应的不一致现象。比如, JZ-BC3F3-Pigm 与 JZ-BC2F4-Pigm 2 个抗性改良系都带有主效抗病基因 Pigm,但二者对稻瘟病菌 11-1287、13-123、13-412、

13-466、32-1 和 13-866-39 反应不尽相同,究其原因可能是 2 个改良系的主效抗病基因与京作 1 号本身的背景抗病基因之间互作效应的差异造成的。同样由于这种轮回亲本背景抗性基因与导入主效抗病基因之间的互作效应,有可能造成改良系对某些菌株的抗性不如轮回亲本,如 JZ-BC2F4-Pigm 对 11-882 的抗性还不如京作 1 号就属这种情况。

农艺性状考查和苗期接种鉴定结果显示,抗瘟性基因 Pi9 和 Pigm 能极显著地提高京作 1 号的稻瘟病抗性,除对结实率有影响外,对其他产量及其相关性状影响较小,因此对改良水稻稻瘟病抗性均具较大的利用价值。而导入基因 pi21 不仅对京作 1 号的抗性改良效果差,而且显著降低水稻单株产量,其降低产量的主要原因可能是显著减少单株有效穗数(表 3)。与轮回亲本相比,所有抗性改良系的结实率均显著降低,推测可能导入这些抗性基因的同时将降低结实率的不利连锁基因一同导入。S. Fukuoka 等^[20]发现基因 pi21 附近可能存在产量和品质相关的连锁累赘,建议与其他广谱抗瘟性基因或者多个抗瘟性基因聚合并经过多次回交和自交以打破产量、品质性状相关的连锁累赘进行应用。尽管 Pi9 和 Pigm 的抗谱很广,二者间没有明显差异,但殷得所等^[17]研究发现 Pi9 表现的抗性可能并

不持久,不能单独被长久利用。因此,将 *Pi9* 和 *Pigm* 与 *pi-21* 聚合,实现主基因抗性与微效基因抗性的累加,可能是延长抗性基因寿命的有力措施。

以往通过广谱基因的导入和聚合改良品种稻瘟病抗性的研究很多,抗瘟性基因 *Pi9*、*Pigm* 和 *pi21* 都曾被用来改良水稻稻瘟病抗性,但还没有在相同遗传背景下比较 *Pi9* 和 *Pigm* 的抗性水平的报道,也不曾有人将 *Pi9* 或 *Pigm* 与 *pi21* 聚合到同一优良品种中。本研究结果证明,*Pi9* 和 *Pigm* 在北方粳稻京作 1 号背景下抗性水平和抗谱相当,抗性改良系 JZ-BC₃F₃-*Pi9* 和 JZ-BC₃F₃-*Pigm* 不仅抗性强、抗谱广,而且综合农艺性状与京作 1 号接近,可以作为中间抗源用于粳稻品种的稻瘟病改良。相对于单个基因连续回交得到的抗性改良系而言,*Pi9* 和 *pi21* 的聚合系由于回交次数和自交次数都偏少,导致其农艺性状不够稳定,还需要利用标记辅助跟踪抗性基因自交 2~3 次,重组有利基因以改善产量等综合性状。

致谢

感谢广东省农业科学院植物保护研究所朱小源研究员提供苗期稻瘟病接种帮助。

参考文献

- [1] IRRI. Bring hope, improving lives: strategic plan 2007-2015 [M]. Manila, Philippines: IRRI, 2006
- [2] Seck P A, Diagne A, Mohanty S, et al. Crops that feed the world 7: rice [J]. Food Security, 2012, 4(1): 7-24
- [3] 郑钊, 陈由强, 张建福, 等. 水稻稻瘟病抗性基因定位, 克隆及应用 [J]. 分子植物育种, 2009, 7(2): 385-392
- [4] 韦新宇, 许旭明, 张锐, 等. 粳梗交新种质康丰 A 对稻瘟病抗性的遗传 [J]. 植物遗传资源学报, 2014, 15(5): 1133-1137
- [5] Kiyosawa S. Identification of blast-resistance genes in some rice varieties [J]. Jpn J Breed, 1978, 28(4): 287-296
- [6] Kiyosawa S. Inheritance of blast resistance transferred from some *Indica* varieties in rice [J]. Tokyo Nat Inst Agr Sci Bull Ser D, 1972, 23: 69-95
- [7] 国家水稻数据中心. 稻瘟病主效抗性基因列表 [DB/OL]. [2015-04-11]. http://www.ricedata.cn/gene/gene_pi.htm
- [8] Liu G, Lu G, Zeng L, et al. Two broad-spectrum blast resistance genes, *Pi9(t)* and *Pi2(t)*, are physically linked on rice chromosome 6 [J]. Mol. Genet. Genomics, 2002, 267(4): 472-480
- [9] Deng Y, Zhu X, Shen Y, et al. 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 [J]. Theor Appl Genet, 2006, 113(4): 705-713
- [10] Fukuoka S and Okuno K. QTL analysis and mapping of *pi21*, a recessive gene for field resistance to rice blast in Japanese upland rice [J]. Theor Appl Genet, 2001, 103(2-3): 185-190
- [11] Miah G, Rafii M Y, Ismail M R, et al. Blast resistance in rice: a review of conventional breeding to molecular approaches [J]. Mol Biol Rep, 2013, 40(3): 2369-2388
- [12] 王倩, 周永力, 王疏, 等. 我国东北稻区稻瘟病的研究进展 [J]. 植物遗传资源学报, 2012, 13(1): 143-147
- [13] Servin B, Martin O C, Mézard M. Toward a theory of marker-assisted gene pyramiding [J]. Genetics, 2004, 168(1): 513-523
- [14] 陈凯, 张强, 潘晓飏, 等. 3 个中籼稻骨干恢复系对稻瘟病和褐飞虱抗性改良效果的评价 [J]. 核农学报, 2013, 27(8): 1069-1080
- [15] 倪大虎, 易成新, 李莉, 等. 分子标记辅助培育水稻抗白叶枯病和稻瘟病三基因聚合系 [J]. 作物学报, 2008, 34(1): 100-105
- [16] Zheng K L, Huang N, Bennett J, et al. PCR-based marker-assisted selection in rice breeding [M]. IRRI Discussion Paper Series No. 12. Manila, Philippines: IRRI, 1995: 1-24
- [17] 殷得所, 夏明元, 李进波, 等. 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 [J]. 中国水稻科学, 2011, 25(1): 25-30
- [18] IRRI. Standard evaluation system for rice [M]. Manila, Philippines: IRRI, 2002
- [19] Qu S, Liu G, Zhou B, et al. The broad-spectrum blast resistance gene *Pi9* encodes a nucleotide-binding site-leucine-rich repeat protein and is a member of a multigene family in rice [J]. Genetics, 2006, 172(3): 1901-1914
- [20] Fukuoka S, Saka N, Koga H, et al. Loss of function of a proline-containing protein confers durable disease resistance in rice [J]. Science, 2009, 325(5943): 998-1001