

分子标记辅助选择技术在水稻抗稻瘟病育种中的应用

赵宏亮

(黑龙江省农业科学院耕作栽培研究所, 黑龙江哈尔滨 150086)

摘要: 介绍了分子标记辅助选择技术的原理及其在水稻抗稻瘟病育种上的应用现状, 主要从单个基因的转移、多个抗病基因的聚合两个方面对分子标记辅助选择技术在水稻抗稻瘟病育种中的应用进行了综述。

关键词: 分子标记辅助选择; 水稻; 稻瘟病; 育种

中图分类号: S511 文献标识码: A 文章编号: 1002-2767(2009)03-0008-03

Application of Molecular Marker-assisted Selection in Blast Resistance Breeding of Rice

ZHAO Hong-liang

(Crop Tillage and Cultivation Institute of Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Harbin, Heilongjiang 150086)

Abstract: The molecular marker-assistance selection technology principle and its current situation in blast resistance breeding of rice were introduced. It focused on the application of molecular marker-assistance selection technology in blast resistance breeding of rice from single gene shift and multiple gene pyramiding.

Key words: molecular marker-assistance selection; rice; blast; breeding

稻瘟病(*Pyricularia oryzae* Sacc)是世界范围内影响水稻产量最严重的真菌性病害^[1-2]。据估计, 从1975~1990年的16年间, 由稻瘟病引起的全球粮食损失高达1.57亿t, 平均每年接近1000万t^[3]。我国也是稻瘟病危害的重灾区, 20世纪90年代以来, 稻瘟病的年均发生面积在380万hm²以上, 稻谷年损失达数亿公斤^[4]。

实践证明, 培育和利用对稻瘟病具有持久抗性的水稻品种是最经济有效的措施。传统的抗病育种, 需要大量的田间工作, 周期长, 同时对育种目标的选择受到很多因素的干扰, 而新育成的品种在连续多代种植之后, 品种的抗性常因稻瘟病菌的生理小种变异而很快丧失, 抗瘟能力往往表现衰退, 因而培育具有持久抗性的水稻新品种已成为水稻科研的重要课题。而近年来迅速发展起来的分子标记辅助选择技术(Molecular Marker-assisted selection, MAS), 可弥补传统抗病育种选择技术准确率低的缺点, 从而加快育种进程。本文就分子标记辅助选择技术及其在抗稻瘟病育种中的应

用作一综述。

1 分子标记辅助选择技术的原理

分子标记始于20世纪80年代, 它是DNA水平上遗传多样性的直接反映。分子标记类型非常丰富, 主要包括: 限制性片断长度多态性(RFLP)、DNA扩增指纹(DAF)、随机引物PCR扩增(AP-PCR)、随机扩增多态性DNA(RAPD)、扩增子长度多态性(ALP)、序列特异性扩增区(SCAR)、酶切扩增多态性序列(CAPS)、序标位(STS)、扩增片段长度多态性(AFLP)、特异扩增子多态性(SAP)、简单串联重复序列(SSR)或简单序列长度多态性(SSLP)、单链构象多态性(SSCP)、抗性基因同源序列(RGA)和单核苷酸多态性(SNP)等^[5]。目前应用于植物遗传育种的分子标记主要有RFLP、RAPD、AFLP、SSR、SNPs等。

分子标记辅助选择是将分子标记应用于作物改良过程中进行选择的一种辅助手段^[6]。其基本原理是通过分析与目的基因紧密连锁的分子标记的基因型来进行育种, 从而达到提高育种效率的目的, 同时分子标记辅助选择还不受其它基因效应和环境因素的影响, 是对目标性状在分子水平上的一种选择, 选择结果十分可靠, 同时又可避免等位基因间显隐性关系的干扰^[7,8]。分子标记辅助选择技术的优越性主要体现在:

收稿日期: 2008-12-03
基金项目: 农业部 948 项目(2006-G1)
作者简介: 赵宏亮(1979-), 男, 内蒙古通辽市人, 硕士, 研究实习员, 从事水稻育种研究。E-mail: hongliang_1979@yahoo.cn.

(1) 分子标记可以方便、快速地完成品种之间的目的基因的转移, 或将近缘野生种的新基因导入; (2) 利用分子标记辅助选择可以不受时间和环境条件的限制, 在作物不同的发育阶段均可进行检测; (3) 可以实现优良基因的快速聚合, 使育种目标明确, 加快育种进程。

2 分子标记辅助选择在水稻抗稻瘟病育种中的应用

分子标记辅助选择在水稻抗稻瘟病育种中的应用主要体现在单个抗病基因的转移和多个抗病基因的聚合两方面。

2.1 单个抗病基因的转移

分子标记技术的快速发展带动了稻瘟病抗性基因的定位和精细定位的发展, 现在已鉴定的稻瘟病抗性基因达 30 多个^[9-11]。目前关于单个主抗基因的转移, 已有较多报道。如李仕贵等^[12]应用与稻瘟病抗性基因 *Pi-d(t)* 紧密连锁的微卫星标记 RM262 对含有该抗病基因的品种地谷与感病品种江南香糯和 8987 的 F_2 群体进行 MAS 选择, 结果发现应用该标记的抗性纯合和杂合带型选择抗性植株的准确率达 98% 以上。刘士平等^[13]通过 MAS 将带有广谱抗性基因 *Pi-1* 导入珍汕 97B 中, 获得了带有 *Pi-1* 基因的 17 个株系。陈志伟等^[14]将稻瘟病抗性基因 *Pi-2(t)* 从供体亲本材料 5173 导入到迄今广泛使用的雄性不育保持系珍汕 97B 中, 获得了一批携带 *Pi-2(t)* 的珍汕 97B 近等基因系。官华忠等^[15]利用 MAS 将 *Pi-9* 基因导入到保持系金山 B-1 以改良其对稻瘟病的抗性, 并对目标基因进行跟踪, 结果表明, 金山 B-1 的稻瘟病抗性得到了提高。金素娟等^[16]以含有广谱稻瘟病抗性基因 *Pi-1* 的籼稻材料 BL122 为供体, 优质感病温敏核不育系 GD-8S 为受体, 通过杂交、多次回交和自交结合分子标记辅助选择技术, 将 *Pi-1* 基因导入 GD-8S 中。综合目标基因的分子检测、育性镜检、田间农艺性状表现以及遗传背景的回交率, 筛选获得 5 个改良株系 RGD8S-1、RGD8S-2、RGD8S-3、RGD8S-4 和 RGD8S-5。Mackin 等^[17]培育出了一套以 CO39 为遗传背景的抗稻瘟病的近等基因系, C101LAC、C101A51、C104PKT 分别携带 *Pi-1*、*Pi-2* 和 *Pi-3*。凌忠专等^[18]利用我国一个高度感病粳稻品种, 丽江新团黑谷为轮回亲本, 以日本的抗稻瘟病鉴别品种为抗病基因供体, 培育出一套分别携带 6 个抗病基因的近等基因系: $F-80-1(Pik)$, $F-98-7(Pik^m)$, $F-124-1(Pi-ta)$, $F-128-1(Pi-ta^2)$, $F-129-1(Pik^n)$, $F-145-2(Pi-b)$ 。倪大虎^[9]以含广谱抗稻瘟病 *Pi9(t)* 基因的品种 75-1-127 为供体与 R18 杂交, 并对杂交后代回交和自交, 利用分子标记辅助选择 *Pi9(t)* 基因, 改良了 R18 对稻瘟病的抗性, 并对其后代进行了抗性鉴定, 表明抗谱与 *Pi9(t)* 的供体亲本 75-1-127 相仿, 抗谱与抗性都

明显优于 R18。王弋^[20]利用回交-自交的育种方法, 结合分子标记辅助选择和幼胚培养, 把稻瘟病抗性基因 *Pi-2* 导入不具有稻瘟病抗性的早粳恢复系 T1007 中, 获得了抗性基因 *Pi-2* 纯合的改良株 12 个系, 且抗性鉴定表明, 其抗性已达到中抗水平。

2.2 多个抗病基因的聚合

基因聚合是将不同优良性状的基因通过杂交、回交、复合杂交等手段转移到植株中, 以创造具有多种性状的优良种质材料。将多个不同抗性基因聚合到同一品种中被认为是获得持久抗性的途径之一^[21]。刘士平等^[21]认为多个稻瘟病基因的聚合可以拓宽抗谱, 增强抗性, 提高抗性水平, 是培育广谱、持久抗稻瘟病品种的重要措施之一。目前采用分子标记辅助技术将多个抗稻瘟病基因聚合到同一品种中也有一些报道。如 Zheng 等^[23]通过分子标记辅助育种技术将稻瘟病抗性基因 *Pi1*、*Pi2*、*Pi4* 聚合到同一品种中。Hittalmani 等^[24]利用分别含有单抗基因 *Pi-1*、*Pi-5*、*Pi-ta* 的 3 个近等基因系, 分别两两杂交, 选择同时含有 3 个基因的改良单株, 并用 RFLP 标记对它们进行精细定位, 结果表明其抗性和抗谱都得到了相应的提高。官华忠^[25]通过将含不同抗性基因的金山 S-2 近等基因系两两杂交, 获得了含杂合 *Pi-1* 和 *Pi-2* 抗性基因的单株 6 株和含杂合 *Pi-1* 和 *Pi-9* 抗性基因的单株 7 株。周元飞^[26]以携带抗白叶枯病基因 *Xa23* 的 CBB23 为受体亲本, 以携带抗稻瘟病基因 *Pi1*、*Pi2* 和 *Pi3* 的 BL123 为供体亲本, 两者进行杂交, 获得 F_1 再自交得 F_2 , 利用各个抗病基因的连锁标记进行分子标记辅助选择, 获得了多个多基因累加系, 其中 $(Xa23+Pi1+Pi2+Pi3)$ 5 个系, $(Xa23+Pi1+Pi2)$ 3 个系, $(Xa23+Pi2+Pi3)$ 3 个系, $(Xa23+Pi2)$ 3 个系, 且所选的这些系综合性状相对较好。邓棕交^[27]利用含有南方主要抗稻瘟病基因 *Pi1*、*Pi2* 的 105 号品种分别与具有优良性状的待改良材料 582 和 84 号杂交获得 F_1 , 自交获得 F_2 、 F_3 , 利用分子标记辅助选择技术在各分离群体中检测到同时含有两个抗病基因的基因聚合植株, 丰富了水稻抗稻瘟病材料。柳武革等^[28]以含广谱稻瘟病抗性基因 *Pi-1* 和 *Pi-2* 的 BL122 为供体, 温敏核不育系 GD-7S 为受体, 通过杂交、回交和自交并结合分子标记辅助选择, 将 *Pi-1*、*Pi-2* 基因导入温敏核不育系 GD-7S 中, 获得 5 个携带两个抗性基因的纯合改良不育株系。陈学伟等^[29]通过将地谷、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 F_2 代及 B_1C_1 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。陈红旗等^[30]以 C101LAC 和 C101A51 为稻瘟病抗性基因的供体亲本, 金 23B 为受体亲本, 通过杂交、复交及

一次回交,在分离世代,利用分子标记辅助选择技术结合特异稻瘟病菌株接种鉴定和农艺性状筛选,获得 6 个导入 *Pi-1*、*Pi-2* 和 *Pi-33* 基因的金 23B 导入系,且基因聚合后抗病频率提高,说明基因聚合是培育稻瘟病持久抗性的有效方法之一。

3 结语

分子标记辅助选择技术是现代生物技术在作物遗传改良领域中应用的一个重要方面。实践证明 分子标记辅助选择为传统的育种提供了一种有力的辅助手段^[31]。黑龙江省是东北地区粳稻主产区,近些年来,水稻面积持续增长,2007 年种植面积已攀升至 230 万 hm^2 ,但伴随着面积的增加 稻瘟病也随之而来且频繁发生。从 1964 年统计至今,每年都有稻瘟病的发生,发生较重的年份有 14 次,累计损失稻谷约 60 多亿 kg,严重影响农民的经济收入和国家粮食安全^[32]。如 2005 年稻瘟病发生面积 66.7 万 hm^2 ,其中穗颈瘟 29.9 万 hm^2 ,重发生县(市、区)15 个,中等发生县 10 个,发病严重地块减产 70%~80%^[33]。2006 年虽然经过全省努力防治,发病面积仍达到 73 万 hm^2 ^[34]。由此可见 稻瘟病的频繁发生严重制约着黑龙江省水稻的健康快速发展。目前黑龙江省水稻抗稻瘟病育种主要是依靠常规育种方法从后代材料中选育抗瘟新品种,而在利用分子标记辅助选择技术培育抗稻瘟病品种方面尚属起步阶段。因此,在今后的育种过程中应加强分子标记辅助选择技术的应用,加快育种进程,提高育种效率,满足黑龙江省水稻健康快速发展的需要。相信随着分子标记技术的迅速发展及检测技术的简化和试验成本的降低,分子标记辅助选择这一重要而有效的育种工具将会在水稻抗病育种研究中发挥越来越重要的作用。

参考文献:

[1] 闵绍楷,熊振民.水稻遗传和品种改良[M].杭州:浙江科学技术出版社,1983:167-176.

[2] 孙漱沅,金敏忠,张志明等.水稻稻瘟病及其防治[M].上海:上海科学出版社,1986:36-44.

[3] Baker B,Zambryski P,Staskiewicz B et al. Signaling in plant-microbe interactions[J]. Science, 1997, 276: 726-733.

[4] 董继新,董海涛,李德葆.水稻抗瘟性研究进展[J].农业生物技术学报,2000,8(1):99-103.

[5] Ribaut J M, Hoisington D. Marker assisted selection new tools and strategies[J]. Trends in Plant Sci., 1998, 3: 236-239.

[6] 白新盛,周开达,李梅芳等.生物技术在水稻育种中的应用研究[M].北京:中国农业出版社,1999.

[7] 郑康乐,黄宁.标记辅助选择在水稻改良中应用前景[J].遗传,1997,19(2):40-44.

[8] 方宣钧,吴为人,唐纪良.作物 DNA 标记辅助育种(“863”生物高技术丛书)[M].北京:科学出版社,2001.

[9] 陈夕军.水稻品种抗瘟遗传多样性及抗瘟基因分子标记研究[D].扬州:扬州大学硕士论文,2003.

[10] 郑燕.稻瘟病抗性基因 *Pi-2(t)* 紧密连锁的 SSR 标记的筛选及其应用[D].福州:福建农林大学硕士论文,2004.

[11] 邓一文.水稻广谱抗稻瘟病基因的遗传分析与定位[D].北京:中国农科院硕士论文,2004.

[12] 李仕贵,王玉平,黎汉云等.利用微卫星标记鉴定水稻的稻瘟病抗性[J].生物工程学报,2000,16(3):324-327.

[13] 刘士平,李信,汪朝阳等.利用分子标记辅助改良珍汕 97 的稻瘟病抗性[J].植物学报,2003,45(11):1346-1350.

[14] 陈志伟,郑燕,吴为人等.抗稻瘟病基因 *Pi-2(t)* 紧密连锁的 SSR 标记的筛选与应用[J].分子植物育种,2004,2(3):321-325.

[15] 官华忠,陈志伟,潘润森等.通过标记辅助回交育种改良优质水稻保持系金山 B 1 的稻瘟病抗性[J].分子植物育种,2006,4(1):49-53.

[16] 金素娟,柳武革,朱小源等.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[J].中国水稻科学,2007,21(6):599-604.

[17] Mackill D J, Bonman J M. Inheritance of blast resistance in near-isogenic lines of rice[J]. Phytopathology, 1992, 82: 746-749.

[18] 凌忠专,潘兴华,王久林.云南粳稻红镰刀谷的抗瘟性分析[C]//朱立宏.主要农作物抗病性遗传研究进展.南京:江苏科学技术出版社,1990:111-115.

[19] 倪大虎.利用分子标记辅助选择改良水稻对白叶枯病和稻瘟病抗性的研究[D].合肥:安徽农业大学,2006.

[20] 王弋.分子标记辅助选择改良 T1007 稻瘟病抗性和华 201S 的白叶枯病抗性研究[D].武汉:华中农业大学,2006.

[21] Hittalmani. Marker-assisted gene pyramiding and QTL mapping of blast resistance gene in rice[C]. Plant and Animal Genome V Conference, 1997.

[22] 刘士平.利用分子标记辅助选择改良珍汕 97 对稻瘟病的抗性[D].武汉:华中农业大学,2002.

[23] Zheng K, Huang N, Bennett J. PCR-based marker-assisted selection in rice breeding[C]//International Rice Institute. IRRI Discussion Paper Series No. 12. Philippine: IRRI, 1995.

[24] Hittalmani S, Parco A, Mew T V, et al. Fine mapping and DNA marker-assisted pyramiding of the three major genes for blast resistance in rice[J]. Theor Appl Genet, 2000, 100: 1121-1128.

[25] 官华忠.利用分子标记辅助选择改良水稻不育系稻瘟病抗性[D].福州:福建农林大学,2005.

[26] 周元飞.水稻白叶枯病和稻瘟病抗性分子标记辅助选择研究[D].武汉:华中农业大学,2003.

[27] 邓惊爻.水稻白叶枯病基因 *Xa23* 和抗稻瘟病基因 *Pi1*, *Pi2* 的分子标记辅助育种[D].南宁:广西大学,2006.

[28] 柳武革,王丰,金素娟等.利用分子标记辅助选择聚合 *Pi-1* 和 *Pi-2* 基因改良两系不育系稻瘟病抗性[J].作物学报,2008,34(7):1128-1136.

[29] 陈学伟,李仕贵,马玉清等.水稻抗稻瘟病基因 *Pid(t)1*、*Pib*、*Pita2* 的聚合及分子标记选择[J].生物工程学报,2004,24(5):708-714.

[30] 陈红旗,陈宗祥,倪深等.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[J].中国水稻科学,2008,22(1):23-27.

[31] 张文龙,陈志伟,杨文鹏等.分子标记辅助选择技术及其在作物育种上的应用研究[J].种子,2008,27(4):39-43.

[32] 马军韬,张国民,辛爱华等.黑龙江省水稻品种对稻瘟病的抗性分析及评价利用[J].植物保护科学,2008,24(2):332-334.

[33] 宋福金.黑龙江省水稻稻瘟病大发生的原因分析与对策[J].作物杂志,2006(1):69-70.

[34] 赵凤民.黑龙江省稻瘟病重发生引发的思考[J].北方水稻,2008,38(1):10-12.