

分子标记辅助选育抗水稻 条纹叶枯病的‘红血糯’种质

刘 艳¹, 付 强², 戎 洁², 朱 微², 秦德荣¹, 徐大勇^{1*}

(1 连云港市农业科学院, 江苏连云港 222006; 2 淮海工学院海洋学院, 江苏连云港 222005)

摘 要:为了改良水稻‘红血糯’品种对条纹叶枯病的抗性, 将‘秦稻 2 号’、‘香糯 Q33’、‘青香糯’作为抗性的供体亲本配制杂交组合; 同时选取了 ST10、H21 和 STS11-43 等 3 对显性分子标记用于亲本和 F₂ 群体田间抗病性的分子标记辅助检测。结果显示: (1) 不同分子标记在亲本中的多态性不同, 标记 H21 和 STS11-43 只有在‘红血糯’和‘香糯 Q33’之间具有多态性, 标记 ST10 在‘红血糯’与‘秦稻 2 号’、‘香糯 Q33’、‘青香糯’之间都有多态性。 (2) 各个分子标记在不同杂交组合 F₂ 群体的室内分子检测显示, 部分 F₂ 单株携带抗性基因条带, 也有个别单株含有杂合抗病基因条带。 (3) 田间发病抗性检测显示, 含有抗性基因的植株基本不发病, 携带抗性基因的单株与田间发病情况调查结果基本相符, 但对含有杂合抗病基因条带的抗病单株, 其还需 2~3 代田间观察, 纯化抗病基因。研究表明, 分子检测结果与田间抗病性检测结果相符, 3 种分子标记可以用于‘红血糯’杂交后代的分子标记辅助检测, 为改良‘红血糯’的条纹叶枯病抗性育种提供了可行的方法。

关键词: 红血糯; 水稻; 分子标记辅助选择; 条纹叶枯病

中图分类号: Q789

文献标志码: A

Molecular Marker-assisted Selection Method for Detecting Rice Strip Virus Resistance in ‘Hongxuenuo’ Hybrid Progenies

LIU Yan¹, FU Qiang², RONG Jie², ZHU Wei², QIN Derong¹, XU Dayong^{1*}

(1 Lianyungang Academy of Agricultural Sciences, Lianyungang, Jiangsu 222006, China; 2 Huaihai Institute of Technology College of Marine Science and Technology, Lianyungang, Jiangsu 222005, China)

Abstract: ‘Qindao 2’, ‘Xiangnuo Q33’ and ‘Qingxiangnuo’ as the donor parents of resistance gene, were selected to cross with ‘Hongxuenuo’ in order to improve the Hongxuenuos’ resistance to rice stripe virus; Meanwhile the polymorphism of three molecular markers consisted of ST10, H21 and STS11-43 were separately analyzed among the parents, and the polymorphic markers were detected in the different F₂ populations. The results showed that: (1) The polymorphism of molecular markers were different among the parents. The markers ST10 and STS11-43 were just detected between ‘Hongxuenuo’ and ‘Xiangnuo Q33’, and the marker H21 was detected between ‘Hongxuenuo’ and ‘Qindao 2’ or ‘Hongxuenuo’ and ‘Xiangnuo Q33’ or ‘Hongxuenuo’ and ‘Qingxiangnuo’. (2) From different kinds of molecular markers’ detection results to different hybrid combinations, it can be found that some individuals of F₂ generation have had the resistance gene, while few individuals had heterozygous resistance gene. (3) The performance of each plant in the field estimates that all of the individuals containing resistance gene are resistant to rice strip disease,

收稿日期: 2013-10-24; 修改稿收到日期: 2014-01-04

基金项目: 江苏省农业科技自主创新基金项目[CX(10)465]; 连云港市科技攻关计划(农业, CN1201); 国家水稻产业技术体系

作者简介: 刘 艳(1982—), 女, 博士, 助理研究员, 主要从事抗病育种研究。E-mail: ly516_bester@163.com

* 通信作者: 徐大勇, 博士, 研究员, 主要从事水稻遗传育种研究。E-mail: xudayong3030@sina.com

which is accordant to the expected result of molecular detection; but to those plants containing heterozygous resistance genes, it still needs further 2~3 generations' examination to get the pure resistance gene. In conclusion, this research demonstrated that the results of molecular assisted selection and the resistance of each plant in the field are consistent and those three different markers could be used to detect the resistance genes in the progenies of different hybrid combinations, which provided a viable method for modifying the Hongxuenuo's resistance to rice stripe virus.

Key words: Hongxuenuo; rice; molecular marker-assisted selection; rice strip disease

水稻条纹叶枯病(rice stripe disease, RSD)是由灰飞虱(*Laodelphax striatellus* Fallen)传播条纹叶枯病毒(rice stripe virus, RSV)引起的一种水稻病毒病。灰飞虱刺吸植株以持久方式传播,一旦获毒可终生经卵传毒,并在体内增殖^[1]。发病易受外界条件影响,抗性鉴定也比较困难,因此找到与抗条纹叶枯病基因紧密连锁的分子标记对该病的抗性育种具有非常重要的意义。如今大多数抗性粳稻品种均含有来自籼稻 Modan 和 Mudgo 的 *Stv-bⁱ* 抗性基因,许多研究学者在抗性基因附近设计不同类型的分子标记,对不同的粳稻品种和杂交群体的抗病性进行检测^[2-8],潘学彪等^[9]利用目标基因两侧的多态性 InDel 标记将水稻品种‘武育梗 3 号’的抗病性进行了成功改良,并选育出抗条纹叶枯病水稻新品种‘武陵梗 1 号’;张宏根等^[4]成功利用分子标记 STS 标记改良了‘武运梗 8 号’的条纹叶枯病的抗病性。这些实践应用实例充分说明利用与抗性基因 *Stv-bⁱ* 有关的分子标记进行水稻条纹叶枯病分子标记辅助育种的可行性。

抗性基因 *Stv-bⁱ* 的连锁标记在粳稻亲本之间具有多态性,但其在糯稻亲本之间的多样性研究还鲜见报道。本研究旨在利用 ST10 显性标记、共显性 SSR 标记和 STS 标记 3 种不同的分子标记对‘红血糯’与‘秦稻 2 号’、‘香糯 33’和‘青香糯’等糯稻品种之间的多态性进行了研究,并对杂交组合的 F₂ 代群体做了分子检测和田间发病鉴定,为将与抗性基因 *Stv-bⁱ* 连锁的标记应用于糯稻抗条纹叶枯病分子标记辅助育种的可行性提供依据。

1 材料和方法

1.1 材料与试剂

选取在田间表现有很强条纹叶枯病抗病性的‘秦稻 2 号’、‘香糯 Q33’、‘青香糯’品种作为抗性供体亲本;‘红血糯’作为抗性受体亲本。以这 3 个杂交组合的 F₂ 代群体作为分子标记检测群体。

CTAB 提取液、70%乙醇、氯仿/异戊醇(24:1)、TE 缓冲液、琼脂糖、TBE 电泳缓冲液、*Taq* 酶、dNTP、

MgCl₂、10×PCR Buffer 等试剂均从 TAKARA 公司购得。

1.2 方法

1.2.1 供试材料和田间种植 2010 年正季在连云港农科院试验基地,以‘红血糯’为母本,抗病品种为父本去雄杂交,配制抗条纹叶枯病改良杂交组合(‘红血糯’/‘秦稻 2 号’,‘红血糯’/‘香糯 Q33’,‘红血糯’/‘青香糯’),同年冬季在海南种植 F₁,2011 年正季种植 F₂ 群体。分蘖期田间选取表型接近‘红血糯’的单株进行挂牌编号,提取单株基因组 DNA,进行分子标记检测,成熟期收获各检测单株,根据农艺性状及室内考种淘汰部分单株。

1.2.2 水稻基因组 DNA 的提取 杂交组合后代按常规糯稻栽培管理,在分蘖盛期(移栽后约 25 d)取新展开叶,经液氮研磨后,利用 CTAB 法抽提水稻基因组 DNA^[8]。

1.2.3 分子标记检测 选取了 3 种不同的分子标记,详见表 1。H21 标记是根据 Hayano-Saito 等^[10-12]及 Wu^[13]等定位的结果设计的 SSR 共显性标记;ST10 是 Hayano-Saito 等^[10-12]研究定位的 RFLP 标记,而后又有 Hayano-Saito 等^[14]转化成基于 PCR 检测的 SCAR 标记;STS11-43 是基于 2 个抗性基因 qSTV-11b 和 qSTV-11c 的 QTL 定位结果而设计的 STS 标记。

PCR 基本反应体系为:25 μL 反应体积中含有 1.0 μL DNA 模板,2.0 μL 2.5 mmol/L MgCl₂,0.5 μL 2.5 mmol/L 的上下游引物,0.5 μL 10 mmol/L dNTPs,0.3 μL 5 U/μL *Taq* 酶,2.5 μL 10×Buffer (不含 Mg²⁺),17.7 μL ddH₂O。在基本反应体系基础上,不同的分子标记 PCR 体系略有调整。

PCR 反应条件为:94 ℃ 5 min;94 ℃ 1 min,63 ℃ 30 s,72 ℃ 1 min,35 个循环;72 ℃ 延伸 5 min(退火温度根据不同标记有所调整)。PCR 反应产物在 1%~3% 琼脂糖凝胶电泳,经 Goldview 染色,在凝胶成像系统下观察、采集图像。

1.2.4 条纹叶枯病田间抗性鉴定 对田间后代植株的条纹叶枯病的抗性鉴定采用田间自然接种法,

表 1 与条纹叶枯病抗性基因连锁的显性标记
Table 1 Markers linked with the resistance gene to rice strip virus

标记 Marker	正向引物 Forward primer	反向引物 Reverse primer	预计产物大小 The size of band/bp
H21 ^[3]	5'-GAGGTAGTATATTGGCAGG-3'	5'-AGGGATGTAAGTGTGGAG-3'	202
ST10 ^[2]	5'-CGAAAGATGGTTTCTCCACC-3'	5'-GACCAAGCAACTAATGACGC-3'	727
STS11-43 ^[4]	5'-TAAGAAGGGCGAACAAAC-3'	5'-AACCAACGCTACCAAGAC-3'	458

选择在灰飞虱虫源丰富的小麦田边育秧,每天驱虫 3 次,使秧苗均一受毒。在对照感病品种发病较重时,对田间材料进行条纹叶枯病发病情况调查。病级调查标准^[1]为:0 级,无症状;1 级,有轻微黄绿色斑驳症状,病叶不卷曲,植株生长正常;2 级,病叶上褪绿扩展相连成不规则的黄白色或黄绿色条斑,病叶不卷曲或略有卷曲,生长基本正常;3 级,病叶严重褪绿,病叶卷曲呈捻转状,少数病叶出现黄化枯萎症状;4 级,大部分病叶卷曲呈捻转状,叶片黄化枯死,植株呈假枯心状或整株枯死。记录数据,2~4 级直接记为发病;0、1 级记为不发病。

2 结果与分析

2.1 分子标记 H21 在亲本中的多态性与 F₂ 群体抗性检测结果

从分子标记 H21 引物扩增 4 个亲本的 DNA 片段结果来看,其多态性并不是很理想,仅在‘红血糯’与‘香糯 Q33’之间有差别,说明标记 H21 只适合用于‘红血糯’与‘香糯 Q33’作为杂交亲本的杂交后代的抗性辅助筛选(图 1,A)。

对‘红血糯’与‘香糯 Q33’杂交 F₂ 群体的检测结果(图 1,B)可以看出,有些单株已具有与供体亲本‘香糯 Q33’一致的电泳条带,由于 H21 标记是共显性标记,说明在 F₂ 群体中部分单株已含有纯合抗

病基因;但 3、6、12、14 泳道的单株有 2 条 DNA 条带,表明这部分单株携带抗性基因呈杂合型。对含有抗性基因和不含抗性基因的挂牌单株进行田间抗性鉴定,结果显示:含有抗性基因的植株抗性等级为 0 级,基本不发病;不含有抗性基因的材料表现为 3 级,个别单株发病严重为 4 级。田间检测检测结果与分子检测结果相符,但有些抗病单株含有杂合抗病基因,其还需 2~3 代田间观察,纯化抗病基因。

2.2 分子标记 ST10 在亲本中的多态性及 F₂ 群体抗性检测结果

从图 2,A 可看出,用标记 ST10 扩增了 4 个亲本的 DNA,在亲本‘红血糯’中没有扩增出电泳条带,但在其他 3 个亲本中均扩增出了条带,而‘香糯 Q33’扩增出的条带比文献报道的目的条带大。故采用 ST10 分子标记引物可以对‘红血糯’与‘秦稻 2 号’和‘青香糯’的杂交后代植株的抗性基因或者 *Stv-bⁱ* 基因进行鉴定。利用标记 ST10 对‘红血糯’/‘秦稻 2 号’和‘红血糯’/‘青香糯’的杂交后代进行了检测,从图 2,B、C 可看出,大部分单株已含有抗病基因,但携带抗病基因的单株仍需加代纯合。对田间挂牌单株的田间抗性观察发现,凡含有抗病基因条带的单株均表现出很强的抗病性(1 级),但个别单株虽然不含抗病基因也表现为不发病,这可能与介体昆虫侵染强度有关或是其他抗性基因发挥作用。

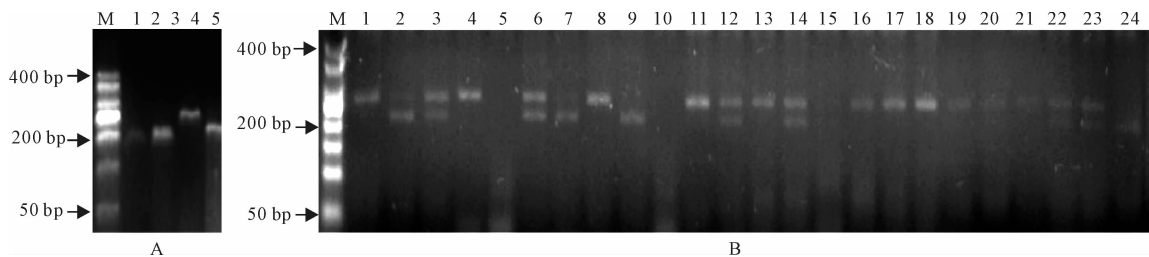


图 1 分子标记 H21 在 4 个糯稻亲本(A)以及‘红血糯’/‘香糯 Q33’杂交 F₂ 部分单株间(B)的多态性

M. 50 bp marker; A: 1. 红血糯; 2. 秦稻 2 号; 3. 香糯 Q33; 4. 青香糯;
B: 1. 香糯 Q33; 2. 红血糯; 3~24. 红血糯/香糯 Q33 杂交 F₂ 部分单株

Fig. 1 Polymorphism of marker H21 in 4 parents(A) and some individuals in the ‘Hongxuenuo’/‘Xiangnuo Q33’ F₂ population (B)

M. 50 bp marker; A: 1. Hongxuenuo; 2. Qindao 2; 3. Xinagnuo Q33; 4. Qingxiangnuo; B: 1. Xiangnuo Q33; 2. Hongxuenuo; 3~24. Some individuals in the Hongxuenuo/Xiangnuo Q33 F₂ population

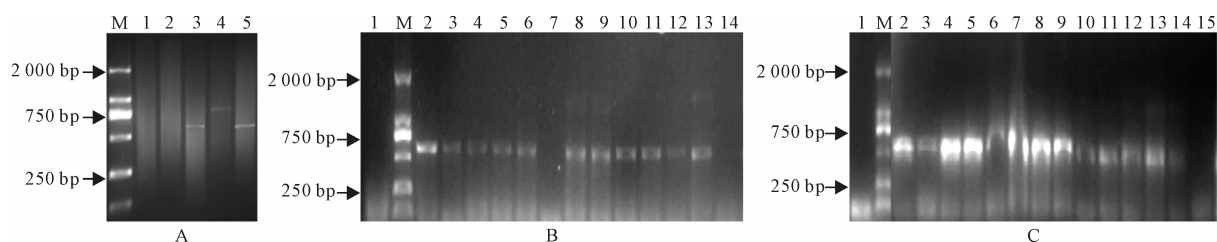


图2 分子标记 ST10 在 4 个糯稻亲本(A)以及‘红血糯’/‘秦稻 2 号’(B)和‘红血糯’/‘青香糯’杂交 F₂(C)部分单株间的多态性

M. DL2000; A: 1. 对照; 2. 红血糯; 3. 秦稻 2 号; 4. 香糯 Q33; 5. 青香糯; B: 1. ‘红血糯’; 2. 秦稻 2 号; 3~14. 红血糯/秦稻 2 号杂交 F₂ 部分单株; C: 1. 红血糯; 2. 青香糯; 3~15. 红血糯/青香糯杂交 F₂ 部分单株

Fig. 2 Polymorphism of marker ST10 in 4 parents(A) and some individuals in the ‘Hongxuenuo’/‘Qindao 2’ F₂ population(B) and some individuals in the ‘Hongxuenuo’/‘Qingxiangnuo’ F₂ population(C)

M. DL2000; A: 1. Control; 2. Hongxuenuo; 3. Qindao 2; 4. Xinagnuo Q33; 5. Qingxiangnuo; B: 1. Hongxuenuo; 2. Qindao 2; 3~14. Some individuals in the Hongxuenuo/Qindao 2 population of F₂; C: 1. Hongxuenuo; 2. Qingxiangnuo; 3~15. Some individuals in the Hongxuenuo/Qingxiangnuo F₂ population

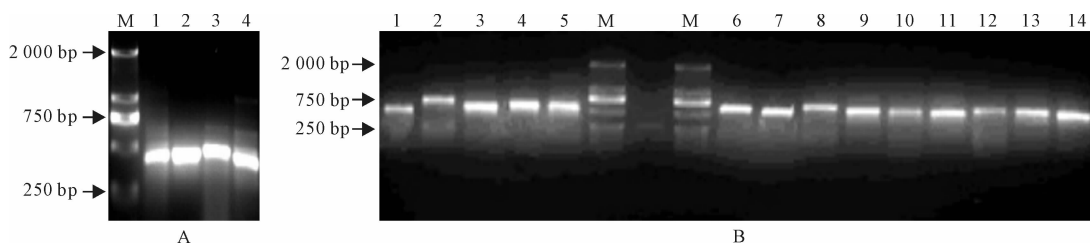


图3 分子标记 STS11-43 在 4 个糯稻亲本(A)以及‘红血糯’/‘香糯 Q33’杂交 F₂ 部分单株间(B)的多态性

M. DL2000; A: 1. 红血糯; 2. 秦稻 2 号; 3. 香糯 Q33; 4. 青香糯; B: 1. 红血糯; 2. 香糯 Q33; 3~14. 红血糯/香糯 Q33 杂交 F₂ 部分单株

Fig. 3 Polymorphism of the marker STS11-43 in 4 parents(A) and some individuals in the ‘Hongxuenuo’/‘Xiangnuo Q33’ F₂ population(B)

M. DL2000; A: 1. Hongxuenuo; 2. Qindao 2; 3. Xinagnuo Q33; 4. Qingxiangnuo; B: 1. Hongxuenuo; 2. Xiangnuo Q33; 3~14. Some individuals in the Hongxuenuo/Xiangnuo Q33 F₂ population

2.3 分子标记 STS11-43 在亲本中的多态性及 F₂ 群体抗性检测结果

使用标记 STS11-43 对亲本‘红血糯’和‘香糯 Q33’水稻基因组的扩增能呈现出多态性的条带,但品种‘秦稻 2 号’和‘青香糯’扩增出的条带均与‘红血糯’一致(图 3, A),无多态性。因此,利用标记 STS11-43 可检测鉴定‘红血糯’和‘香糯 Q33’杂交后代的抗性基因(*Stv-bⁱ*)。在对 F₂ 群体后代的检测中,从图 3, B 中可看出,泳道 4、5、8~14 电泳检测条带与‘香糯 Q33’基本一致。田间发病调查显示:携带抗性基因的单株数与田间抗病单株数基本一致,符合率 100%;不含有抗病基因目的条带的植株其发病率为 80%(数据未列出)。说明此标记能用于田间‘红血糯’/‘香糯 Q33’的分子标记辅助检测。

3 讨论

在水稻条纹叶枯病的自然抗性鉴定试验中,鉴定结果受环境因素影响较大,灰飞虱的虫口密度、带

毒率以及其传毒是否充分等因素影响着田间抗性鉴定结果的准确性,要想得到准确的结果还需多年多点的试验鉴定。随着抗水稻条纹叶枯病基因 *stv-bⁱ* 的定位研究和用于检测抗性基因的连锁标记的获得,为在抗病水稻新品种选育过程中的抗性检测提供了有效的参考依据。

不同的分子标记在不同水稻品种中具有多样性,现已有 14 对不同分子标记^[15]。李昕昱等^[15]分析比较了不同分子标记在不同抗条纹叶枯病粳稻品种中的多样性,研究发现虽然有些分子标记引物的扩增产物并不能很好地区分感病品种‘日本晴’和高抗品种‘Kasalath’,却能区分‘日本晴’与其他抗性品种。这说明不同分子标记在不同感抗品种间的多样性具有差异性。因此在本改良‘红血糯’的条纹叶枯病抗性研究中,采用了 ST10、STS11-43 和 H21 等 3 种显性标记,分析了其在‘红血糯’和其他糯稻亲本中的多态性,并对 3 个杂交组合 F₂ 群体进行了分子标记辅助和田间自然发病抗性检测。在

利用 PCR 方法进行分子标记鉴定目标基因的过程中,最重要的是能够在不同的水稻品种之间找到具有多态性的标记。3 种分子标记在不同糯稻亲本间表现出不同的多态性,共显性标记 H21 和 STS11-43 只在‘红血糯’和‘香糯 Q33’之间具有多态性,ST10 标记在‘红血糯’和‘秦稻 8 号’、‘红血糯’和‘香糯 Q33’、‘红血糯’和‘青香糯’之间均有多态性,均能够从 3 个抗性基因供体与受体中扩增出多样性片段,这说明分子标记 ST10 与抗性基因 *stvbⁱ* 是紧密连锁的,表现为共分离。这与王军等^[2]的研究结论一致。但对‘香糯 Q33’检测出的片段大于文献报道的目标条带,其原因还需做进一步研究。根据在不同水稻亲本的扩增片段的多样性,3 种分子标记

均可在‘红血糯’和‘香糯 Q33’这两个品种之间扩增出多态性条带,这说明在这两种水稻的基因组中,两者在这 3 个分子标记处的基因片段是有差异的。

由于不同标记与目的基因的距离不同,其区分感病品种和抗病品种的准确率也不同,但可以通过多种标记的同时使用来提高检测的准确性^[6]。本研究通过用 3 种分子标记来分析 4 种糯稻品种的抗性基因,成功找到了适合于不同杂交组合的分子标记,避免了使用单一标记可能出现的抗性单株的遗漏。这为采用分子标记辅助选择技术改良‘红血糯’对条纹叶枯病的抗性找到了一种有效、可行的方法,也为以这 4 种糯稻为亲本做分子标记辅助选育研究提供了重要的可行性和准确性保障。

参考文献:

- [1] YAO SH(姚 姝),CHEN T(陈 涛),ZHANG Y D(张亚东),*et al.* Resistance evaluation and molecular detection of rice stripe disease for twenty-eight Japonica rice varieties in Jiangsu Province[J]. *Jiangsu Journal of Agriculture Science* (江苏农业学报),2009,**25**(6):1 201—1 206(in Chinese).
- [2] WANG J(王 军),YANG J(杨 杰),CAO Q(曹 卿),*et al.* *Stvbⁱ* locus resistant to rice stripe disease validated by molecular marker ST10[J]. *Molecular Plant Breeding* (分子植物育种),2009,**5**(7):912—915(in Chinese).
- [3] CHEN F(陈 峰),ZHOU J H(周继华),ZHANG SH Y(张士永),*et al.* Marker assisted selection for *Stvbⁱ* gene controlling resistance to rice stripe disease[J]. *Acta Agronomica Sinica* (作物学报),2009,**35**(4):597—601(in Chinese).
- [4] ZHANG H G(张宏根),XU Z P(许作鹏),LI P(李 鹏),*et al.* Improving the resistance of Wuyunjing 8 to rice stripe virus via molecular marker-assisted selection[J]. *Acta Agronomica Sinica* (作物学报),2011,**37**(5):745—754(in Chinese).
- [5] HE CH X(何冲霄),DONG X M(董晓鸣),YAO L SH(姚立生),*et al.* Molecular marker assisted method for breeding new varieties against rice strip disease[J]. *Barley and Cereal Sciences* (大麦与谷类科学),2010,**1**:1—5(in Chinese).
- [6] LI Y SH(李余生),CHEN T(陈 涛),YU Q CH(虞秋成),*et al.* Identification and application of SSR markers linked to resistant gene *Stvbⁱ* for rice strip virus[J]. *Jiangsu Journal of Agriculture Science* (江苏农业学报),2009,**25**(3):459—463(in Chinese).
- [7] SUN L J(孙林静),MA ZH Y(马忠友),SU J P(苏京平),*et al.* Detection of the rice stripe disease resistance gene *Stvbⁱ* by molecular marker[J]. *Tianjin Agricultural Sciences* (天津农业科学),2007,**13**(3):9—11(in Chinese).
- [8] LIU Y(刘 艳),WANG Y CH(王逸超),FAN J W(樊继伟),*et al.* Application of marker-assisted selection of *Xa23* gene in enhancing bacterial leaf blight resistance in rice[J]. *Acta Agriculturae Zhengjiangensis* (浙江农业学报),2011,**23**(2):248—251(in Chinese).
- [9] PAN X B(潘学彪),CHEN Z X(陈宗祥),ZUO SH M(左示敏),*et al.* A new rice cultivar ‘Wulingjing 1’ with resistance to rice stripe virus bred by marker assisted selection[J]. *Acta Agronomica Sinica* (作物学报),2009,**35**(10):1 851—1 857(in Chinese).
- [10] HAYANO S Y,TSUJI T,FUJII K,*et al.* Localization of the rice stripe disease resistance gene, *Stvbⁱ* by graphical genotyping and linkage analyses with molecular markers[J]. *Theor. Appl. Genet.*,1998,**96**(8):1 044—1 049.
- [11] HAYANO S Y,SAITO K,FUJII K,*et al.* SCAR marker for selection of the rice stripe resistance gene *Stvbⁱ*[J]. *Japanese Society of Breeding*,2000a,**2**:67—72.
- [12] HAYANO S Y,SAITO K,NAKAMURA S,*et al.* Fine physical mapping of the rice stripe resistance gene locus, *Stvbⁱ*[J]. *Theor. Appl. Genet.*,2000,**101**(1—2):59—63.
- [13] WU SH J,ZHONG H,ZHOU Y,*et al.* Identification of QTLs for the resistance to rice stripe virus in the indica rice variety Dular[J]. *Euphytica*,2009,**165**:557—565.
- [14] HAYANO S Y,SAITO K,FUJII K,*et al.* SCAR marker for selection of the rice stripe resistance gene *Stvbⁱ*[J]. *Japan J. Breed. Res.*, 2000,**(2)**:67—72.
- [15] LI X Y(李昕翌),GUO L(郭 亮),LI J Y(李建粤),Comparison of amplified molecular markers in different rice varieties with stripe disease resistance[J]. *Journal of Shanghai Normal University* (Nat. Sci. Edi.) (上海师范大学学报·自然科学版),2012,**2**(41):165—170 (in Chinese).