

## 三基因聚合改良恢复系福恢 673 的稻瘟病抗性

陈志伟<sup>1</sup>, 官华忠<sup>1</sup>, 王晓方<sup>2</sup>, 董瑞霞<sup>2</sup>, 卓成海<sup>1</sup>, 毛大梅<sup>1</sup>, 潘润森<sup>1</sup>, 周元昌<sup>1</sup>, 吴为人<sup>1</sup>

1 福建农林大学 福建省作物设计育种重点实验室, 福建 福州 350002

2 福建省农业科学院水稻研究所, 福建 福州 350003

陈志伟, 官华忠, 王晓方, 等. 三基因聚合改良恢复系福恢 673 的稻瘟病抗性. 生物工程学报, 2019, 35(5): 837–846.

Chen ZW, Guan HZ, Wang XF, et al. Pyramiding of 3-resistant-gene to improve rice blast resistance of a restorer line, Fuhui 673. Chin J Biotech, 2019, 35(5): 837–846.

**摘要:** 为了改良水稻优良恢复系福恢 673 的稻瘟病抗性, 以该恢复系为轮回亲本, 以携有 3 个稻瘟病抗性基因 ( $Pi-1$ 、 $Pi-9$  和  $Pi-k^h$ ) 的优质恢复系金恢 1059 为供体亲本, 通过回交育种结合分子标记辅助选择, 选育出 10 个导入了这 3 个抗稻瘟病基因的福恢 673 近等基因系, 其遗传背景恢复率为 92.96%–98.59%。抗性鉴定结果表明, 这些近等基因系及其与不育系宜香 A 配制的杂种一代均表现抗稻瘟病, 抗性明显强于对照福恢 673 和宜优 673, 且半数以上杂种一代基本保留了原组合的主要优点。用近等基因系 Line 9 配组的杂交稻新组合两优 7283 和金泰优 683 在区试中均表现出产量高、稻瘟病抗性强、生育期适中等特点, 表明该近等基因系具较好的应用前景。

**关键词:** 回交育种, 稻瘟病抗性, 遗传改良, 分子标记辅助选择, 基因聚合

## Pyramiding of 3-resistant-gene to improve rice blast resistance of a restorer line, Fuhui 673

Zhiwei Chen<sup>1</sup>, Huazhong Guan<sup>1</sup>, Xiaofang Wang<sup>2</sup>, Ruixia Dong<sup>2</sup>, Chenghai Zhuo<sup>1</sup>, Damei Mao<sup>1</sup>, Runsen Pan<sup>1</sup>, Yuanchang Zhou<sup>1</sup>, and Weiren Wu<sup>1</sup>

1 Fujian Provincial Key Laboratory of Crop Breeding by Design, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, Fujian, China

2 Rice Research Institute, Fujian Academy of Agricultural Sciences, Fuzhou 350003, Fujian, China

**Abstract:** To improve the blast resistance of elite rice restorer line Fuhui 673, 3 blast resistance genes  $Pi-1$ ,  $Pi-9$  and  $Pi-k^h$  were introduced into Fuhui 673 from a good-quality restorer line Jinhui 1059 through 3 successive backcrosses followed by one selfing using the technique of marker-assisted selection. Ten near-isogenic lines (NILs) of Fuhui 673 carrying the 3 introduced resistance genes were created. Genotype analysis using 68 SSR markers evenly distributed in the genome indicated that 92.96%–98.59% of the NILs' genetic background had been recovered to Fuhui 673. Both indoor and field resistance tests

**Received:** November 11, 2018; **Accepted:** February 2, 2019

**Supported by:** National Key R&D Program of China (No. 2007YFD0100100), Regional Development Project of Fujian (No. 2018N3011), Key Sci-Tech Project of Fujian (No. 2018N006).

**Corresponding author:** Zhiwei Chen. Tel: +86-591-83789331; Fax: +86-591-83789176; E-mail: czw9216@sina.com

国家重点研究计划 (No. 2007YFD0100100), 福建省科技厅区域发展项目 (No. 2018N3011), 福建省科技重点项目 (No. 2018N006) 资助。

indicated that the NILs and their hybrids with sterile line Yixiang A were all resistant to rice blast, with resistance levels significantly higher than those of controls Fuhui 673 and hybrid Yiyou 673 (Yixiang A  $\times$  Fuhui 673). In addition, among the 10 hybrids between the NILs and Yixiang A, 2 showed significantly higher yield than and 4 displayed similar yield to that of control Yiyou 673, suggesting that most of the NILs retained the elite characteristics of Fuhui 673. Two new hybrid rice cultivars Liangyou 7283 and Jintaiyou 683 from NIL Line 9 showed high yield, good resistance to blast and moderate growth period in regional trial, suggesting that the NIL Line 9 has a good prospect for application.

**Keywords:** backcross breeding, resistance to rice blast, genetic improvement, marker-assisted selection, gene pyramiding

水稻是世界上最重要的粮食作物之一, 世界上 50% 的人口以水稻为主食。稻瘟病是水稻的三大病害之一, 由稻瘟病菌 *Magnaporthe oryzae* 引起的, 全球每年因该病造成水稻产量损失 10%–15%, 给农民造成数十亿美元的经济损失<sup>[1]</sup>。稻瘟病在我国华南、西南、长江中游和东北地区等水稻主产区都会发生危害, 年发病面积达 330 万–570 万  $\text{hm}^2$ , 产量损失达数亿公斤, 给我国水稻生产带来了很大安全隐患<sup>[2]</sup>。而选育和推广抗稻瘟病品种是目前防治该病害最经济、最有效的方法之一<sup>[3]</sup>。目前, 已超过 100 个主效稻瘟病抗性基因被鉴定出来, 其中 30 个抗性基因已被成功克隆<sup>[4–5]</sup>。已有多个研究表明, 多个稻瘟病抗性基因的聚合可拓宽抗谱, 延长品种抗性年限<sup>[6–7]</sup>。来源于西非梗稻品种 LAC23 的 *Pi-1* 是一个广谱高抗稻瘟病基因<sup>[8]</sup>。来源于小粒野生稻的 *Pi-9* 基因也是一个抗性很强的稻瘟病抗性基因, 该基因对来自不同国家的 40 多个稻瘟病毒性菌株的抗性接近免疫水平<sup>[9]</sup>。水稻品种 Tetep 中携有的抗稻瘟病基因 *Pik<sup>h</sup>* 是一个主效基因, 该基因对印度的许多稻瘟病菌生理小种均具有抗性<sup>[10]</sup>。刘文德等利用从福建省水稻产区采集的 108 个稻瘟菌代表菌系, 对 30 个水稻抗稻瘟病近等基因系或单基因系品种进行抗病基因的抗谱分析, 发现抗稻瘟病基因 *Pik<sup>h</sup>*、*Pi-1* 和 *Pi-9(t)* 抗性较强, 抗性频率均达 80% 以上, 其中 *Pi-k<sup>h</sup>* 的抗性频率达 98.15%<sup>[11]</sup>。由于这 3 个抗病基因均为显性抗性基因, 因此, 针对这 3 个基因进行聚合育种有望育成稻瘟病抗性较好的水稻品种。

福恢 673 是福建省农业科学院水稻研究所育成的恢复力强、配合力好、综合性状稳定的恢复系<sup>[12]</sup>, 但其稻瘟病抗性一般。金恢 1059 是福建农林大学前期通过分子标记辅助育种技术育成的携有 *Pik<sup>h</sup>*、*Pi-1* 和 *Pi-9(t)* 抗性基因的抗稻瘟病恢复系, 该恢复系抗性好、米质优, 但配合力欠佳。本研究以携有 3 个抗病基因的抗源 R1059 为抗性供体亲本, 以福恢 673 为受体亲本, 通过传统的回交育种技术, 结合分子标记辅助选择技术, 将稻瘟病抗性基因 *Pi-1*、*Pi-9* 和 *Pi-k<sup>h</sup>* 导入福恢 673 中, 以期育成保留福恢 673 优良特性但稻瘟病抗性得到改良的新恢复系。

## 1 材料与方法

### 1.1 供试材料

抗性供体亲本: 金恢 1059, 是福建农林大学前期通过分子标记辅助选择技术育成的携有来源于 75-1-217 (*Pi-9*)、C101LAC (*Pi-1*) 和 IRBLkh-K3 (*Pi-K<sup>h</sup>*) 的 3 个抗病基因。

轮回亲本: 福恢 673, 系福建省农业科学院水稻研究所选育的强恢复系<sup>[12]</sup>, 利用该恢复系已配制出内 6 优 673、华两优 673、广 8 优 673、赣优 673、聚两优 673、广优 673、川优 673、宜优 673、天优 673、II 优 673 和京福 1 优 673 等 10 多个杂交稻新组合通过省级以上审定。

### 1.2 分子育种的主要技术路线

将携有 *Pi-1/Pi-9/Pi-K<sup>h</sup>* 的供体亲本金恢 1059 与福恢 673 杂交, 杂交  $F_1$  代再与轮回亲本福恢 673 回交。于下一生产季种植  $BC_1F_1$  代, 于抽穗期通

过株高、生育期、穗部性状等选择出一批株叶形态与轮回亲本最像的单株，再通过与目标抗性基因紧密连锁的分子标记 MRG4766<sup>[13]</sup>、FP1+FP2+RP<sup>[14]</sup>和 RM206<sup>[15]</sup>对 *Pi-1*、*Pi-k<sup>h</sup>* 和 *Pi-9* 进行跟踪选择，中选单株继续与福恢 673 回交；BC<sub>2</sub>F<sub>1</sub> 和 BC<sub>3</sub>F<sub>1</sub> 的处理方法参照 BC<sub>1</sub>F<sub>1</sub> 代；于 BC<sub>3</sub>F<sub>1</sub> 代，中选的单株自交收种获得 BC<sub>3</sub>F<sub>2</sub> 种子；在 BC<sub>3</sub>F<sub>2</sub> 代，通过株叶形态和标记选出 3 个抗病基因位点均为纯合抗病标记基因型的单株；这些单株收种后进行配合力测定、田间抗性鉴定等筛选，最终选出抗性、配合力、株叶形态等综合性状最好的株系。

主要技术路线如图 1 所示。

### 1.3 抗病近等基因系的鉴定

#### 1.3.1 近等基因系的分子鉴定

分别利用 MRG4766<sup>[13]</sup>、FP1+FP2+RP<sup>[14]</sup>和 RM206<sup>[15]</sup>分别对本研究前期选育出改良株系进行 *Pi-1*、*Pi-9* 和 *Pi-k<sup>h</sup>* 的标记基因型鉴定，同时在整

个基因组均匀挑选 68 对均匀分布的 SSR (Simple sequence repeats) 引物对育成的近等基因系进行标记基因型检测，并利用 NTSYS 2.0 软件进行聚类分析，并评估各近等基因系遗传背景恢复为轮回亲本的比例。

#### 1.3.2 近等基因系抗性表型鉴定

室内采用混合稻瘟病菌株对轮回亲本福恢 673 及改良株系、福恢 673 及改良株系与宜香 A 组配的 F<sub>1</sub> 进行鉴定，在水稻幼苗生长至 3 叶 1 心时进行喷雾接种，7–8 d 后记载各供试品种叶片病斑的发病等级，记载时以每一株叶片上最高发病级别的病斑为该株发病的级别。田间诱发鉴定在福建省上杭县茶地乡进行，将育成的改良株系以及其改良株系与宜香 A 配制的 F<sub>1</sub>、R1059(抗病对照)和感病对照品种(福恢 673 和宜优 673)，采用早圃直播的方法进行苗期田间诱发，每个品种播 30 粒种子，2 次重复，以发病高的小区为该测试品种的抗性定级标准。

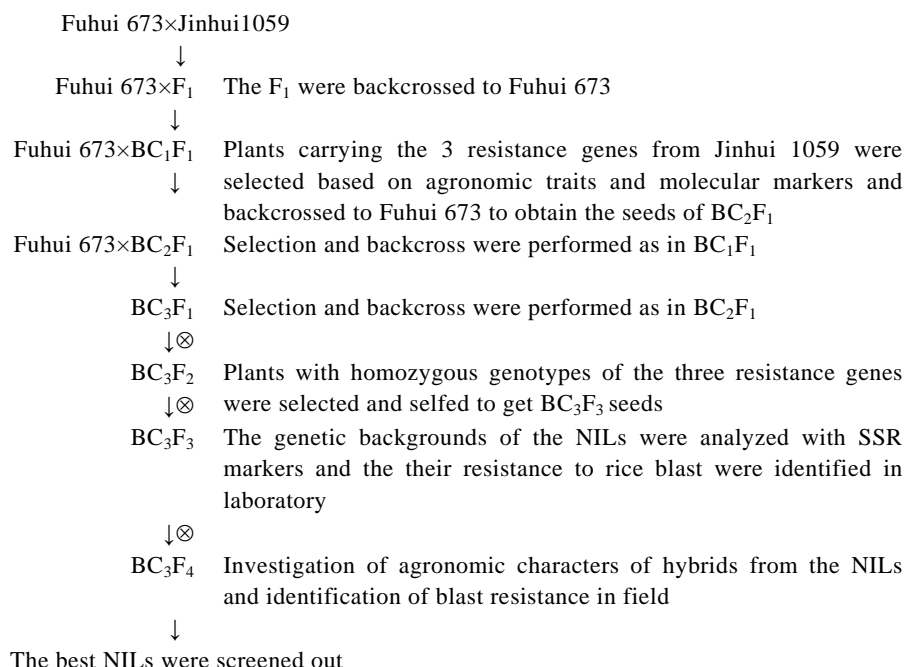


图 1 抗病近等基因系的选育过程

Fig. 1 Breeding procedure of the resistant Near-isogenic Lines.

## 1.4 杂种优势鉴定和应用前景分析

### 1.4.1 近等基因系的筛选

由于本研究的回交亲本福恢 673 配制的组合中, 与宜香 A 配制的宜优 673 为该亲本配制的杂交稻品种中应用面积最大的组合。因此本研究通过选育出的抗病近等基因系与优质不育系宜香 A 配制 F<sub>1</sub>, 在福建沙县通过三重复品种比较试验, 比较育成的抗病近等基因系配制的宜优组合与轮回亲本福恢 673 配制的宜优 673 的生育期、株高、每穗粒数、有效穗数、穗长、结实率、千粒重、产量等主要农艺性状, 分析这些株系是否保持福恢 673 的基本特性, 以期选出综合性状最好的株系, 进一步进行育种应用。

### 1.4.2 改良株系的育种应用评价

分析中选的抗病近等基因系配制的杂交稻组合在各级区试中的产量、抗性、生育期等综合表现, 初步评价新选育的抗病恢复系的应用前景。

## 2 结果与分析

### 2.1 近等基因系的选育过程

采用 1.2.1 所述的分子育种技术方案, 2010 年秋季在福建省泰宁县先用携有 3 个稻瘟病抗性基因 (*Pi-1*、*Pi-9* 和 *Pi-k<sup>h</sup>*) 的恢复系金恢 1059 与恢复系福恢 673 杂交, 获得 F<sub>1</sub> 种子; 2010 年冬季的海南省三亚市种植 F<sub>1</sub> 和福恢 673 (作为轮回亲本), 于 F<sub>1</sub> 抽穗期取穗与福恢 673 回交, 获得 BC<sub>1</sub>F<sub>1</sub> 种子 231 粒; 2011 年秋季在沙县种植 BC<sub>1</sub>F<sub>1</sub>, 抽穗时选生育期、株高、穗型、粒型等株叶形态选出株叶形态较像福恢 673 的单株 147 株, 利用 MRG4766 (与 *Pi-1* 紧密连锁)、FP1+FP2+RP (与 *Pi-9* 紧密连锁) 和 RM206 (与 *Pi-k<sup>h</sup>* 紧密连锁) 对通过株叶形态选出的单株进行标记鉴定, 从中获得在 3 个抗病基因位点均为杂合抗性标记基因型的单株 14 株, 从这 14 株杂合抗病标记基因型的单株中再选出 6 株与福恢 673 继续回交, 获得 BC<sub>2</sub>F<sub>1</sub> 种子 178 粒, 于 2011 年冬季在海南省种植 BC<sub>2</sub>F<sub>1</sub> 植

株 158 株, 通过株高、生育期、粒型等选出 72 株株叶形态与福恢 673 相近的单株, 通过标记进行前景选择获得 7 株在 3 个抗病基因位点均为杂合抗病标记基因型的单株, 利用这 7 个单株继续与福恢 673 进行回交获得 BC<sub>3</sub>F<sub>1</sub> 种子, 2012 年秋季在沙县种植 BC<sub>3</sub>F<sub>1</sub> 179 株, 通过株叶形态和分子标记选择选出 10 个株叶形态与福恢 673 高度相似且在 3 个抗病基因位点均为抗病标记基因型的单株, 这些单株套袋自交获得 BC<sub>3</sub>F<sub>2</sub> 种子; 2012 年冬季在海南省种植 BC<sub>3</sub>F<sub>2</sub> 株系群体, 最终通过株叶形态和标记辅助选择, 筛选出 10 个株高、生育期、穗型和粒型等均与轮回亲本高度相似且 3 个抗病基因位点均为抗病标记基因型的单株 (每个 BC<sub>3</sub>F<sub>2</sub> 选 1 株), 收套袋自交种, 获得 10 个改良后的近等基因系。2013–2014 年在福建省内和海南省进行加代、各近等基因系的抗性鉴定和杂种优势分析, 筛选出保留原亲本优良特性但稻瘟病抗性得到改良的新恢复系福恢 683。

### 2.2 近等基因系的分子鉴定

#### 2.2.1 目标基因的鉴定

利用 MRG4766 (与 *Pi-1* 紧密连锁)、FP1+FP2+RP (与 *Pi-9* 紧密连锁) 和 RM206 (与 *Pi-k<sup>h</sup>* 紧密连锁) 对 10 个福恢 673 的改良后代株系进行检测, 结果如图 2 所示。从图 2 可以看出,

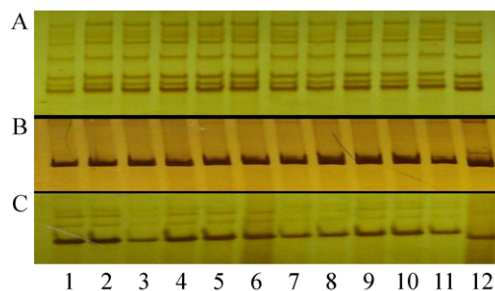


图 2 近等基因系中目标抗性基因的鉴定

Fig. 2 Identification of target genes in the NILs, amplified with primers RM206 (A), FP1+FP2+RP (B) and MRG4766 (C). Lanes 1–10, 11 and 12: amplification products of near-isogenic lines 1 to 10, R1059 and Fuhui 673.

10个改良株系在RM206、FP1+FP2+RP和MRG4766位点与受体亲本福恢 673 均存在多态性，且改良株系的扩增带型均与供体亲 R1059 一致，说明这 10 个抗病近等基因系在 *Pi-1*、*Pi-9* 和 *Pi-K<sup>h</sup>* 位点均为纯合抗病标记基因型，表明本研究前期通过分子标记对目标基因进行辅助选择是准确的。

### 2.2.2 遗传背景恢复比例评估

为了初步评估本研究选育出的 10 个改良株系的遗传背景恢复为轮回亲本福恢 673 的比例，本研究根据已公布的水稻 SSR 标记在水稻 12 条染色体的位置，从中均匀地选出 68 个 SSR 标记，利用这些标记对改良株系进行标记基因型检测，根据两亲本的扩增带型（分别记为 1 或 0），最后根据这 68 个标记的带型，对各改良株系及两亲本进行聚类分析，结果如图 3 所示。从图 3 可以发现，本研究选育出的 10 个改良株系与轮回亲本福恢 673 均被划分到同 1 个群，相似系数在 92.96%–98.59% 之间，其中一个株系（Line 7）与轮回亲本福恢 673 相似系数达 98.59%。该结果表明，本研究所选育的 10 个改良株系 90% 以上的遗传背景已恢复为轮回亲本福恢 673。

### 2.2.3 抗性表型鉴定

为了明确福恢 673 的改良株系对稻瘟病菌的

抗性反应，本研究在苗期进行了室内混合菌株抗性鉴定和田间自然诱发鉴定，结果如表 1 所示。室内混合接菌结果表明，各改良株系及其改良株系与宜香 A 组配的 F<sub>1</sub> 对混合稻瘟病菌的抗性表现均为抗病 (R)，除了改良株系 Line 7 和 Line 8 与宜香 A 组配的 F<sub>1</sub> 有少量病斑外 (病情指数分别为 0.37% 和 4.17%)，其他均无发病情况，抗性表现与抗病对照 R1059 的抗性结果一致 (无病斑)，而感病对照品种福恢 673 和宜优 673 病情指数分别为 60.00% 和 60.73%，远远高于改良系和改良系配制的杂种的抗性，两者的抗性综合评价为感病 (S) 和高感 (HS) (表 2)；田间自然诱发鉴定表明，10 个改良株系、改良株系与宜香 A 组配的

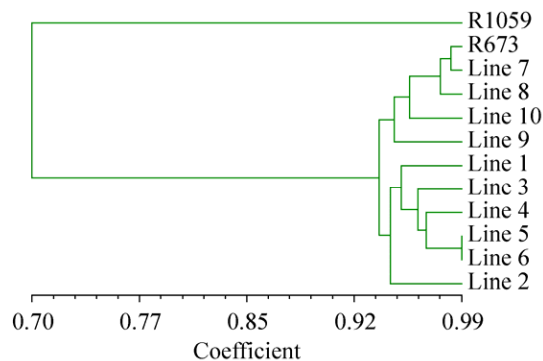


图 3 改良株系及其亲本的聚类分析图

Fig. 3 Dendrogram of cluster analysis of the NILs and their parent.

表 1 改良株系及其 F<sub>1</sub> 的抗性表现

Table 1 Resistance performance of the NILs and their hybrids

Code of lines	Indoor test		Field test		Code of F1	Indoor test		Field test	
	Disease index (%)	Resistance level	Disease index (%)	Resistance level		Disease index (%)	Resistance level	Disease index (%)	Resistance level
Line 1	0	R	0	R	Yixiang A/Line 1	0	R	0	R
Line 2	0	R	0	R	Yixiang A/Line 2	0	R	0	R
Line 3	0	R	0	R	Yixiang A/Line 3	0	R	0	R
Line 4	0	R	0	R	Yixiang A/Line 4	0	R	0	R
Line 5	0	R	0	R	Yixiang A/Line 5	0	R	0	R
Line 6	0	R	0	R	Yixiang A/Line 6	0	R	0	R
Line 7	0	R	0	R	Yixiang A/Line 7	0.37	R	0	R
Line 8	0	R	0	R	Yixiang A/Line 8	4.17	R	0	R
Line 9	0	R	0	R	Yixiang A/Line 9	0	R	0	R
Line 10	0	R	0	R	Yixiang A/Line 10	0	R	0	R
R1059	0	R	0	R	Yixiang A/R1059	0	R	0	R
Fuhui673	60.0	HS	48.0	S	Yiyou 673	60.73	HS	64.7	HS

Note: R: resistant to rice blast; S: susceptible to rice blast; HS: highly susceptible to rice blast.

表 2 近等基因系与宜香 A 配制的杂种表现

Table 2 Agronomic characters of hybrids between the NILs and Yixiang A

Hybrids	Full growing days		Plant height (cm)	Panicle length (cm)	No. of productive panicles (10 k)	No. of grains per panicle	Seed setting rate (%)	1 000-grain weight (g)	Yield (kg/667 m <sup>2</sup> )	Difference from CK	
	Days	Difference from CK								(kg)	(%)
Yixiang A/Line 9	130.3	-0.8	123.7	27.1	17.8	149.0	78.1	31.1	611.7**	21.5	3.64
Yixiang A/Line 1	129.7	-0.5	126.9	26.8	17.2	147.3	78.5	31.6	609.2**	19.0	3.21
Yixiang A/Line 8	129.9	-1.3	127.9	27.9	18.3	135.2	73.4	31.0	598.1*	7.9	1.34
Yixiang A/Line 7	131.7	+1.2	130.7	28.5	18.1	132.5	67.8	31.1	597.9*	7.7	1.20
Yiyou 673 (CK)	131.2	-	123.5	27.4	17.7	145.4	75.4	30.9	590.2	-	-
Yixiang A/Line 5	129.3	-1.9	122.2	24.6	17.9	143.0	74.8	31.3	589.8	-0.4	-0.07
Yixiang A/Line 2	129.5	-1.7	122.5	26.2	17.7	138.1	76.5	31.8	589.3	-0.9	-0.15
Yixiang A/Line 6	130.5	-0.7	125.4	26.5	17.9	142.2	75.7	30.8	581.2*	-9.0	-1.52
Yixiang A/Line 3	128.5	-2.7	124.4	25.9	18.0	130.5	76.0	31.0	552.2**	-38.0	-6.44
Yixiang A/Line 4	129.1	-2.1	126.5	25.9	18.8	138.4	69.7	31.2	540.8**	-49.4	-8.37
Yixiang A/Line 10	128.5	-2.7	122.9	26.3	17.3	128.1	79.1	31.2	538.9**	-51.3	-8.69

Note: \*\* and \* indicate significantly difference from CK at 0.01 and 0.05 level, respectively.

F<sub>1</sub>、抗病对照品种 R1059 均无病斑，表现抗病 (R)，而福恢 673 和宜优 673 均表现为感病 (图 4)。从室内混合菌株接菌鉴定和苗期自然诱发鉴定的综合结果来看，本研究获得改良株系及其配制的杂种的稻瘟病抗性均得到大大提高，表明本研究通过基因聚合技术改良福恢 673 的稻瘟病抗性是成功的。



图 4 代表性株系及其杂种的田间抗性表现

Fig. 4 The resistance performance of typical lines and their F<sub>1</sub> in the field. From left to right, Fuhui 673 (susceptible control line), Yiyou 673 (susceptible control hybrid), Line 9, Yixiang A/Line 9, R1059 (resistant control line) and Yixiang A/R1059 (resistant control hybrid).

#### 2.2.4 近等基因系的杂种优势分析

为了进一步明确福恢 673 的抗病近等基因系是否保留福恢 673 的主要优良特性，将福恢 673 和福恢 673 各抗病近等基因系与宜香 A 配置杂种 F<sub>1</sub>，通过三重复品种试验进行产量比较，结果见表 2。从表 2 可以看出，这些近等基因系与宜香 A 配制的杂种一代亩产在 538.9–611.7 kg 之间，2 个株系配制的杂种 (宜香 A/Line 9 和宜香 A/Line 1) 对照增产达极显著水平，增产幅度分别为 3.64% 和 3.21%，2 个株系配制的杂种 (宜香 A/Line 8 和宜香 A/Line 7) 对照增产达显著水平，增产幅度分别为 1.34% 和 1.20%，2 个株系配制的杂种产量比轮回亲本福恢 673 配制的杂种宜优 673 差异不显著 (宜香 A/Line 5 和宜香 A/Line 2)，减产幅度分别为 0.07% 和 0.15%，1 个株系配制的杂种 (宜香 A/Line 6) 比对照减产 1.52% 差异达显著水平，而有 3 个株系配制的杂种 (宜香 A/Line 3、宜香 A/Line 4 和宜香 A/Line 10)，其减产幅度在 -8.69%–6.44% 之间，与对照宜优 673 的差异达极显著水平。

在全生育期方面，近等系配制的宜香优组合全生育期在 128.5–131.7 d 之间，与对照宜优 673 相差在 -2.7–+0.5 d 之间；在株高方面，近等基因系的杂种一代株高在 122.2–127.9 cm 之间，与对



照宜优 673 株高差异在 $-1.3\sim+4.4$  cm 之间;在穗长方面,近等系配制的宜香优组合穗长在 $24.6\sim28.5$  cm 之间,与对照宜优 673 相差在 $-2.8\sim+1.1$  cm 之间;在有效穗方面,近等系配制的宜香优组合全有效穗在 $17.2\sim18.8$  万穗之间,与对照宜优 673 相差在 $-0.5\sim1.1$  万穗之间;在每穗粒数方面,近等系配制的宜香优组合穗粒数在 $128.1\sim149.0$  粒之间,与对照相差 $-7.6\sim3.6$  粒,在结实率方面,近等基因系配制的杂种结实率在 $67.8\%\sim79.1\%$  之间,与对照相差 $-7.6\%\sim3.7\%$ ;仅 3 个近等基因系配制的杂种结实率低于 70%。在千粒重方面,近等基因系的杂种在 $31.0\sim32.1$  g 之间,与对照相差 $-7.6\%\sim3.7\%$ 。因此,近等基因系配制的杂种与轮回亲本的主要农艺性状基本相似。

### 2.2.5 近等基因系的应用前景分析

#### 1) 福恢 673 与福恢 683 的 DNA 指纹比较

由于本研究 10 个近等基因系配制的杂种中,有 2 个株系 (Line 9 和 Line 1) 配制的杂种比对照明显增产且生育期比对照短,但 Line 1 配制的杂种株高比 Line 9 高了 3.2 cm,故本研究确定 Line 9 为首选的改良系,定名为福恢 683。但是,Line 1、

Line 2、Line 5、Line 7 和 Line 8 与宜香 A 配制的杂种产量均与福恢 673 与宜香 A 配制的杂种产量减产差异不显著或增产,因此,这些株系也有待进一步鉴定和利用。

为了比较新育成的抗病恢复系福恢 683 的 DNA 指纹与轮回亲本福恢 683 的 DNA 指纹差异,本研究根据目前现行的水稻品种 DNA 检测标准——水稻品种鉴定技术规程 SSR 标记法 (NY/T 1433-2014),分析了该标准规定的 48 个 SSR 标记在福恢 683 和轮回亲本福恢 683 的多态性,发现有 4 个标记 (RM190、RM224、RM481 和 RM119) 在两亲本间存在多态性(图 5),而根据现有的行业标准,福恢 683 和福恢 673 可被认定为不同的品种,因此,福恢 683 (Line 9) 可以作为新的抗病恢复系应用于生产。

#### 2) 福恢 673 的应用前景

杂种的产量表现:利用福恢 683 配制的杂交稻新组合两优 7283 (272S/福恢 683) 和金泰优 683 (金泰 A/福恢 683) 已于 2018 年分别通过福建省和湖北省审定。两优 7283 在 2016 年的福建省科研联合体晚稻区试中,平均亩产 553.48 kg,

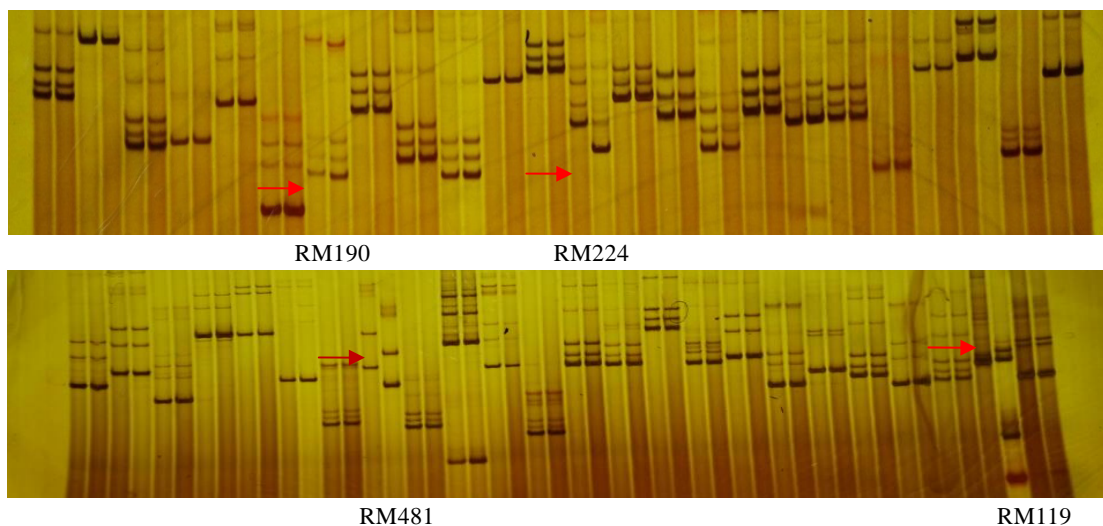


图 5 福恢 683 和福恢 673 的 DNA 指纹比较

Fig. 5 Comparison of DNA fingerprints between Fuhui 683 and Fuhui 673. The names of polymorphic markers were shown under the lanes.

比对照宜优 673 增产 9.32%，增产达极显著水平，产量居该组第 2 位，增产点率 85.7%；2017 年参加福建省科研联合体晚稻续试，平均亩产 530.25 kg，比对照宜优 673 增产 3.15%，增产达显著水平，居该组第 3 位，增产点率 80%。2017 参加福建省晚稻生产试验，平均亩产 550.04 kg，比对照宜优 673 增产 9.34%；金泰优 683 在 2015 年参加湖北恩施早中熟中稻品种组区域试验中，平均亩产 542.47 kg，比对照绵 5 优 142 增产 15.14%，增产达极显著水平，居第 1 位；6 个试验点种植，均比对照品种增产，增产点比率 100.0%。2016 年续试，平均亩产 618.50 kg，比对照绵 5 优 142 增产 15.28%，增产达极显著水平，居第 1 位；6 个试验点种植，均比对照品种增产，增产点比例 100.0%。2015–2016 年两年区试平均亩产 580.49 kg，比对照绵 5 优 142 增产 15.22%。两年的 12 个试验点均比对照品种增产，增产点比例 100.0%。2017 年生产试验平均亩产 557.82 kg，比对照增产 8.20%，居第 2 位。因此，金泰优 683 也是一个产量高、稳产性较好的杂交稻组合。由此可见，福恢 683 配制的组合产量高、丰产性和稳产性较好。

杂种抗性表现：根据金泰优 683 在湖北省恩施州两年的抗性表现，其稻瘟病综合抗性指数 2.4，穗瘟损失率最高级 3 级，综合评价为中抗稻瘟病，由于金泰优 683 的母本金泰 A 田间抗性表现为高感，故可推断金泰优 683 的抗性来自于父本；而根据两优 7283 在福建省两年的抗性表现，其两年的稻瘟病综合评价为中抗稻瘟病，而两优 7283 的母本 272 在福建省表现为高感，轮回亲本福恢 673 与宜香 A 配组的对照品种宜优 673 综合评价为高感稻瘟病。该结果也再次证实了改良株系的稻瘟病抗性得到了很大的提高。上述结果表明，本研究改良后的近等基因系配制的杂种稻瘟病抗性得到明显的提高，进一步证实了本研究中对目标基因进行聚合改良感病杂交稻亲本的抗性是有效的。

### 3 小结与讨论

随着越来越多水稻有利基因的发现及其相关分子标记的开发，我国育种家在水稻抗白叶枯病、抗稻瘟病、抗褐飞虱、抗稻瘿蚊、条纹叶枯病、抗稻瘿蚊等抗病虫、蜡质基因(*wx*)、香味基因 *fgr*、糊化温度等品质性状的分子标记辅助育种均取得了显著的进展<sup>[16-23]</sup>，但是，针对杂交稻亲本，同时对 3 个稻瘟病抗性基因进行标记辅助育种的研究鲜见报道。本研究通过一次杂交、三次回交和一次自交，同时通过与 *Pi1*、*Pi-k<sup>h</sup>* 和 *Pi9* 这 3 个目标抗性基因紧密连锁的分子标记对目标抗病基因进行选择，最终育成了 10 个遗传背景恢复比例为 92.96%–98.59% 的近等基因系，利用宜香 A 与这 10 个近等基因系配制的组合中，有 6 个株系与宜香 A 配制的 F<sub>1</sub> 代比原来亲本配制的 F<sub>1</sub> 代杂种优势强或相近，该结果表明，本研究选育的多数回交后代基本保留了轮回亲本的主要优点。从本研究初步筛选出的近等系所配组合在区试中的表现看，两优 7283 (272S/Line 9) 和金泰优 683 (金泰 A/Line 9) 均表现丰产性、稳产性好等特点，该结果也进一步说明本研究选育的新株系配制的组合产量性状好。

本研究中涉及的 *Pik<sup>h</sup>*、*Pi-1* 和 *Pi-9(t)* 为刘文德等<sup>[11]</sup>利用 30 个水稻抗稻瘟病近等基因系或单基因系品种，用收集自福建省水稻产区的 108 个稻瘟菌代表菌系进行抗谱分析而筛选出的 3 个抗谱最宽的抗性基因，但本实验室利用携有单个抗病基因的不育系金抗 1A (携 *Pi-1*)<sup>[21]</sup>、M76A (携 *Pi-1*)<sup>[12]</sup>、M20A<sup>[22]</sup> (携 *Pi-9*) 与抗性一般的父本配制的组合 (闽标优 1095<sup>[23]</sup>、M76 优 3301<sup>[24]</sup> 和 M 优 2155<sup>[25]</sup>) 在福建省的区试中的抗性均表现为中感稻瘟病，该结果表明，携单一抗性基因的品种的稻瘟病抗性难以达到中抗的水平。而本研究中聚合 *Pik<sup>h</sup>*、*Pi-1* 和 *Pi-9(t)* 的品种——两优 7283 和金泰优 683 在福建省区试和湖北省恩施州的区试



中均表现中抗 (福建省和湖北省恩施州均为稻瘟病高发区), 由于两优 7283 和金泰优 683 的母本 272S 和金泰 A 的抗性均表现为感病, 轮回亲本福恢 673 与宜香 A 配制的福建省晚稻迟熟组对照品种宜优 673 在区试中稻瘟病抗性表现为感病到高感, 因此, 可以判断两优 7283 和金泰优 683 的稻瘟病抗性是来自于父本福恢 683 (Line 9)。该结果表明, 聚合  $Pik^h$ 、 $Pi-1$  和  $Pi-9(t)$  稻瘟病抗性可以达到较高的抗性水平。

值得注意的是, 利用目前水稻 DNA 指纹鉴定的 48 对引物中对 Line 9 进行 DNA 指纹分析, 发现 RM119、RM190、RM224 和 RM481 共 4 个标记与轮回亲本有多态性, 因此, 福恢 683 (Line 9) 还无法直接代替原来的轮回亲本应用于生产。因此, 针对通过回交技术改良水稻轮回亲本的个别性状, 要实现用改良的后代直接替代原来的感病亲本应用于生产, 在回交过程中需利用水稻 DNA 指纹分析所采用的 48 对引物对中选的株系进行背景选择, 这样才有可能选出可以直接替代轮回亲本的近等基因系应用于生产。由于本研究中 Line 9 (福恢 683) 是通过选育的近等基因系与宜香 A 配制的组合的杂种优势最先筛选出来的, 其他近等基因系与其他不同的不育系配制组合的表现还未系统进行分析, 因此, 下一步将利用这些近等基因系与不同的不育系进行大范围的测配, 进行产量、米质、抗性、生育期等综合性状分析, 以期从中筛选出生产上有利利用价值的株系进一步应用, 研究结果也将为水稻分子标记辅助育种后代的筛选提供理论依据。

## REFERENCES

- [1] Zheng Z, Chen YQ, Zhang JF, et al. Mapping, cloning of rice blast resistance genes and their application. *Mol Plant Breeding*, 2009, 7(2): 385–392 (in Chinese).  
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. *分子植物育种*, 2009, 7(2): 385–392.
- [2] Li Y, Wang YW, Wang YR, et al. Research progress on rice blast fungus. *Guangxi Agric Sci*, 2010, 41(8): 789–792 (in Chinese).  
李杨, 王耀雯, 王育荣, 等. 水稻稻瘟病菌研究进展. *广西农业科学*, 2010, 41(8): 789–792.
- [3] Li T, Wang JL. Research progress on rice blast resistance gene. *Crop Res*, 2012, 26(6): 713–718 (in Chinese).  
李婷, 王建龙. 水稻稻瘟病抗性基因研究进展. *作物研究*, 2012, 26(6): 713–718.
- [4] Zhao HJ, Wang XY, Jia YL, et al. The rice blast resistance gene *Ptr* encodes an atypical protein required for broad-spectrum disease resistance. *Nat Commun*, 2018, 9: 2039.
- [5] Wang BH, Ebbolle DJ, Wang ZH. The arms race between *Magnaporthe oryzae* and rice: diversity and interaction of *Avr* and *R* genes. *J Integr Agric*, 2017, 16(2): 2746–2760.
- [6] Liu SP, Li X, Wang ZY, et al. Gene pyramiding to increase the blast resistance in rice. *Mol Plant Breeding*, 2003, 1(1): 22–26 (in Chinese).  
刘士平, 李信, 汪朝阳, 等. 基因聚合对水稻稻瘟病的抗性影响. *分子植物育种*, 2003, 1(1): 22–26.
- [7] Ma JT, Zhang GM, Xin AH, et al. Resistance analysis and improvement of rice varieties by gene pyramiding. *J Plant Protect*, 2016, 43(2): 177–183 (in Chinese).  
马军韬, 张国民, 辛爱华, 等. 水稻品种抗稻瘟病分析及基因聚合抗性改良. *植物保护学报*, 2016, 43(2): 177–183.
- [8] Mackill DJ, Bonman JM. Inheritance of blast resistance in near-isogenic lines of rice. *Phytopathology*, 1992, 82(7): 746–749.
- [9] 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. *Mol Genet Genomics*, 2002, 267(4): 472–480.
- [10] Sharma TR, Madhav MS, Singh BK, et al. High-resolution mapping, cloning and molecular characterization of the  $Pi-k^h$  gene of rice, which confers resistance to *Magnaporthe grisea*. *Mol Genet Genomics*, 2005, 274(6): 569–578.
- [11] Liu WD, Ruan ZP, Zheng SQ, et al. Resistance of rice major *Pi*-genes to the *Magnaporthe grisea* population in Fujian, China. *Acta Phytopathol Sin*, 2005, 35(6): 526–531 (in Chinese).  
刘文德, 阮志平, 郑士琴, 等. 水稻主要抗瘟基因对福建稻瘟菌群体的抗性分析. *植物病理学报*, 2005,

- 35(6): 526–531.
- [12] Huang TX, Wang WQ, Yang D, et al. Breeding of hybrid rice restorer line, Fuhui 673. *Fujian J Agric Sci*, 2012, 27(10): 1050–1055 (in Chinese).  
黄庭旭, 王乌齐, 杨东, 等. 杂交水稻恢复系福恢 673 的选育研究. *福建农业学报*, 2012, 27(10): 1050–1055.
- [13] Chen ZW, Guan HZ, Wu WR, et al. The screening of molecular markers closely linked to rice blast resistant gene *Pi-1* and their application. *J Fujian Agric Forest Univ: Nat Sci Ed*, 2005, 34(1): 74–77 (in Chinese).  
陈志伟, 官华忠, 吴为人, 等. 稻瘟病抗性基因 *Pi-1* 连锁 SSR 标记的筛选和应用. *福建农林大学学报: 自然科学版*, 2005, 34(1): 74–77.
- [14] Lin YQ, Peng JT, Guan HZ, et al. Establishment of double PCR detection system for rice blast resistance genes *Pi-1* and *Pi-9*. *J Fujian Agric Forest Univ: Nat Sci Ed*, 2015, 44(2): 169–173 (in Chinese).  
林艳秋, 彭江涛, 官华忠, 等. 水稻稻瘟病抗病基因 *Pi-1* 和 *Pi-9* 双重 PCR 检测体系的建立. *福建农林大学学报: 自然科学版*, 2015, 44(2): 169–173.
- [15] Mao DM, Guan HZ, Wang ZF, et al. Improvement of rice blast resistance of restorer line N175 by marker-assisted selection. *J Fujian Agric Forest Univ: Nat Sci Ed*, 2017, 46(3): 241–246 (in Chinese).  
毛大梅, 官华忠, 王志斌, 等. 利用分子标记辅助选择技术改良水稻恢复系 N175 的稻瘟病抗性. *福建农林大学学报: 自然科学版*, 2017, 46(3): 241–246.
- [16] Zhu YJ, Fan YY, Huang DR, et al. Application of marker-assisted selection in rice breeding. *Acta Agric Nucl Sin*, 2012, 26(5): 756–761 (in Chinese).  
朱玉君, 樊叶杨, 黄得润, 等. 分子标记辅助选择在水稻育种中的应用. *核农学报*, 2012, 26(5): 756–761.
- [17] Zhu YW, Lin YR, Chen L. Research progress of rice molecular breeding in China. *J Xiamen Univ: Nat Sci*, 2016, 55(5): 661–671 (in Chinese).  
朱义旺, 林雅容, 陈亮. 我国水稻分子育种研究进展. *厦门大学学报: 自然科学版*, 2016, 55(5): 661–671.
- [18] Peng YC, Li WH, Fan YY, et al. Breeding of indica hybrid rice Xieyou 218 with resistance to bacterial leaf blight by marker-assisted selection technique. *Hybrid Rice*, 2003, 18(5): 5–7 (in Chinese).  
彭应财, 李文宏, 樊叶扬, 等. 利用分子标记辅助选择技术育成抗白叶枯病杂交稻协优 218. *杂交水稻*, 2003, 18(5): 5–7.
- [19] Cao LY, Zhan XD, Zhuang JY, et al. Breeding of indica hybrid rice Guodao 1 with good quality, high yield and resistance to bacterial leaf blight by marker-assisted selection technique. *Hybrid Rice*, 2005, 20(3): 16–18 (in Chinese).  
曹立勇, 占小登, 庄杰云, 等. 利用分子标记辅助育种技术育成优质高产抗病杂交稻国稻 1 号. *杂交水稻*, 2005, 20(3): 16–18.
- [20] Liu WG, Wang F, Jin SJ, et al. Improvement of rice blast resistance in TGMS line by pyramiding of *Pi-1* and *Pi-2* through molecular marker-assisted selection. *Acta Agronom Sin*, 2008, 34(7): 1128–1136 (in Chinese).  
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. *作物学报*, 2008, 34(7): 1128–1136.
- [21] Guan HZ, Chen ZW, Wang ZH, et al. Molecule breeding of Jinkang 1A, a male sterile line of rice with good quality and blast resistance. *J Fujian Agric Forest Univ: Nat Sci Ed*, 2009, 38(5): 449–455 (in Chinese).  
官华忠, 陈志伟, 王宗华, 等. 优质抗稻瘟病三系不育系金抗 1A 的分子选育. *福建农林大学学报: 自然科学版*, 2009, 38(5): 449–455.
- [22] Chen ZW, Guan HZ, Pan M, et al. Breeding of CMS line M20A with good quality and blast resistance in rice. *Hybrid Rice*, 2016, 31(1): 10–12, 44 (in Chinese).  
陈志伟, 官华忠, 潘明, 等. 优质抗稻瘟病水稻三系不育系 M20A 的选育. *杂交水稻*, 2016, 31(1): 10–12, 44.
- [23] Zhou P, Tu SH, Zhang SJ, et al. Breeding a new early maturing hybrid rice variety, Minbiao You 1095. *Fujian J Agric Sci*, 2015, 30(9): 845–849 (in Chinese).  
周鹏, 涂诗航, 张水金, 等. 早熟杂交水稻闽标优 1095 的选育. *福建农业学报*, 2015, 30(9): 845–849.
- [24] Mao DM, Lin F, Wu MJ, et al. M76 You 3301, a new high-yielding medium hybrid rice combination. *Hybrid Rice*, 2018, 33(1): 84–85 (in Chinese).  
毛大梅, 林芳, 吴明基, 等. 高产杂交中稻新组合 M76 优 3301. *杂交水稻*, 2018, 33(1): 84–85.
- [25] Guan HZ, Mao DM, Xu XM, et al. M You 2155, a new early hybrid rice combination. *Hybrid Rice*, 2016, 31(6): 89–90 (in Chinese).  
官华忠, 毛大梅, 许旭明, 等. 杂交早稻新组合 M 优 2155. *杂交水稻*, 2016, 31(6): 89–90.

(本文责编 陈宏宇)