

doi:10.7668/hbxb.2014.05.001

水稻对稻曲病致病菌株 Pi-1 抗病位点检测及效应分析

李余生, 杨娟, 黄胜东, 王才林

(江苏省农业科学院 粮食作物研究所, 江苏省优质水稻工程技术研究中心, 江苏 南京 210014)

摘要:为了鉴定水稻对稻曲病的抗病基因, 利用 157 个家系组成的大关稻 (Japonica)/IR28 (Indica) 重组自交系 (Recombinant inbred lines, RIL) 群体, 采用人工接种方法, 以发病病情指数作为表型值。2012 和 2013 年, 接种鉴定亲本及 RILs 对水稻稻曲病致病菌株 Pi-1 的抗性。利用 QTL Cartographer 分析软件, 对水稻抗 Pi-1 菌株基因进行检测分析。2 年共检测到 7 个 QTL, 分别为位于第 2、7、8、11 和 12 染色体上的 *qFsr2a*、*qFsr2b*、*qFsr7*、*qFsr8a*、*qFsr8b*、*qFsr11*、*qFsr12*, 单个位点的贡献率为 8.5% ~ 17.2%。其中, 2012 年检测到 *qFsr2a*、*qFsr2b*、*qFsr8a*、*qFsr11* 共 4 个位点; 2013 年检测到 *qFsr7*、*qFsr8b*、*qFsr11*、*qFsr12* 共 4 个位点。*qFsr11* 在 2 年中均被检测到, 对性状的解释率为 13.5% 和 17.2%, 作用效应使病情指数下降 9.9% 和 14.3%, 提高了抗病性。根据抗性位点加性效应方向, *qFsr2a*、*qFsr8a*、*qFsr8b*、*qFsr11* 和 *qFsr12* 等位点是来自于亲本 IR28 的增效等位基因, 而位点 *qFsr2b* 和 *qFsr7* 的抗性效应方向相反, 是来自于大关稻。稳定遗传的抗病位点 *qFsr11* 及其紧密连锁的分子标记可以在分子标记辅助选择育种中得以应用。

关键词: 水稻; 稻曲病; 致病菌株; 抗病性; 数量性状位点

中图分类号: Q78; S435 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-7091(2014)05-0001-04

Analysis of Quantitative Trait Loci for Pathogenic Strain Pi-1 of Resistance to Rice False Smut in Rice

LI Yu-sheng, YANG Juan, HUANG Sheng-dong, WANG Cai-lin

(Institute of Food Crops, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Jiangsu High Quality Rice Research and Development Center, Nanjing 210014, China)

Abstract: In order to identify the resistant gene of rice false smut in rice, a recombinant inbred line (RILs) population with 157 lines derived from an inter-subspecies cross of Daguandao/IR28 by the single seed descent method was used to detect quantitative trait loci (QTLs) conferring resistance to strain Pi-1 of rice false smut (caused by *Ustilaginoidea virens* (Cooke) Takahashi) in 2012 and 2013. The disease rate index of the two parents and 157 RILs caused by the strain Pi-1 of rice false smut were scored and the QTLs for rice false smut resistance were detected accordingly by QTL Cartographer software. Seven QTLs controlling false smut resistance were detected on chromosomes 2, 7, 8, 11 and 12, respectively, with the phenotypic variance of 8.5% - 17.2%. There were four QTLs detected in 2012 and 2013, respectively, and only one QTL was found in both two years, the phenotypic variation explained by this individual QTL was 13.5% and 17.2%, and the additive effects of this QTL contributed to the 9.9% and 14.3% decrease of disease index and therefore the disease resistance increased. The direction of the additive effects at five loci *qFsr2a*, *qFsr8a*, *qFsr8b*, *qFsr11* and *qFsr12* coincided with that predicted by phenotypes of the parents, and the IR28 alleles at these loci had positive effect against rice false smut while the negative effects were found in Daguandao alleles at *qFsr2b* and *qFsr7*. The *qFsr11* should be useful in rice breeding for resistance to rice false smut in marker-assisted selection (MAS) program.

Key words: Rice; Rice false smut; Pathogen strains; Disease resistance; Quantitative trait locus

稻曲病是水稻 (*Oryza sativa*) 常见的一种真菌性病害, 由绿核菌属绿核菌 (*Ustilaginoidea virens* (Cooke.) Takah) 引起穗部病害, 又称伪黑穗病、黑

球病等。稻曲病分布十分广泛, 世界各大稻区都有分布, 其中亚洲稻区为害最重, 亚洲稻区又以中国、日本、菲律宾发生最重^[1]。稻曲病在我国的粳稻生

收稿日期: 2014-07-06

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31071397); 国家高技术研究发展计划“863 计划”项目 (2011AA10A101); 江苏省农业科技自主创新基金项目 (CX[12]1003); 江苏省科技支撑计划项目 (BE2012307)

作者简介: 李余生 (1965-), 男, 江苏东台人, 副研究员, 博士, 主要从事水稻遗传育种研究。

长区每年都有发生,以往只是一种次要病害,近年来呈现出发病重、范围广、频率高、产量损失严重等特点,已从原先的次要病害上升为主要病害之一,成为继稻瘟病、条纹叶枯病之后的又一严重威胁水稻的重要病害。20 世纪 80 年代以来,随着杂交水稻品种的应用和高产品种的迅速推广以及氮肥用量不断加大,使得稻曲病的危害进一步加重,影响了水稻的产量和品质^[2-6]。另外,稻曲球中含有对人畜有害的毒素,长期食用对动物的微管蛋白有明显抑制作用^[7-9],前人用含稻曲病菌的稻谷喂养老鼠可导致肝脏、肾脏和膀胱等组织坏死^[2,10]。

稻曲病自发生以来,人们对稻曲病的发生规律和防治方法进行了深入研究,采用杀菌剂和调节播期来避开病害发生时期,从而控制稻曲病的发生和蔓延^[11-13]。但这种方法并不能从根本上解决该病的为害,并且大量杀菌剂的使用还会对环境造成污染。目前,国内外对稻曲病抗病机制及抗病性遗传研究尚处于初级阶段,还未能能在抗性育种和生产上得到应用。Li 等^[14]采用主基因+多基因混合遗传模型研究得出,水稻对稻曲病抗性遗传是由 2 对等效主基因+微效多基因控制;主效抗病基因在不同年份和不同环境下遗传稳定^[15-16]。徐建龙等^[17]利用图示基因型重叠方法检测到 2 个与抗病性相关的 QTL。

稻曲病抗病遗传机制和抗病基因方面研究的滞后严重制约了抗病育种的开展,通过定位新的抗病基因,尤其是对单一致病菌株的抗病基因,寻找与抗病基因紧密连锁的分子标记,采用分子标记辅助方法选育抗病品种,开辟水稻抗稻曲病育种新途径。

1 材料和方法

1.1 试验材料

大关稻为来自太湖稻区的粳稻地方品种,IR28 是来自菲律宾国际水稻所的籼稻品种,用于抗病性鉴定的试验材料为大关稻与 IR28 及其衍生的 157 个重组自交系群体。经人工接种鉴定,大关稻表现为感病,IR28 表现为抗病。用于分析的分子遗传图谱包含 167 个 SSR 分子标记,均匀分布于 12 条染色体上,分子图谱总长为 1 846.6 cM,标记间平均距离为 11.1 cM。

接种用病菌为稻曲病单一致病菌株 Pi-1 的菌丝-孢子混合液,孢子浓度为 100 倍显微镜下孢子数 100~150 个/视野。

1.2 试验方法

1.2.1 材料种植 2012 年和 2013 年夏季,将 157 个家系及 2 个亲本种植于南京病害鉴定专用秧池。

每个家系种 15 株,重复 2 次,株行距为 12 cm × 15 cm,单苗栽插,全生育期不使用杀菌剂,其他按常规栽培管理。

1.2.2 病菌接种 采用高效引发稻曲病人工接种方法^[18-19],在水稻孕穗破口前 7 d,下午 16:00 开始用注射器从穗苞侧面注入接种液,接种量 1~2 mL/穗,接 10 株,每株接 3 穗,另外 5 株作为对照,接种后根据气候变化适当进行喷雾保湿。

1.3 抗病性鉴定

接种 3 周后,不抗病的家系会出现发病症状,此时开始调查发病情况,调查每穗上的病粒数。以发病最重穗的病粒数为指标,参照唐春生等^[20]的标准分级,0 级,未发病;Ⅰ级,每穗 1 粒病粒;Ⅱ级,每穗 2 粒病粒;Ⅲ级,每穗 3~5 粒病粒;Ⅳ级,每穗 6~9 粒病粒;Ⅴ级,每穗 10 粒以上病粒。对亲本及各家系的发病株数和病级进行统计,采用病情指数公式计算病情指数,反正弦转化后作为表型值计算 QTL。

$$\text{病情指数} = \frac{\sum (\text{病级株数} \times \text{代表值})}{\text{总株数} \times \text{最高代表级}} \times 100\%$$

1.4 QTL 分析

利用 QTL Cartographer 2.5 分析软件,采用复合区间作图法进行 QTL 定位及遗传参数估算,统计检验阈值 LOD=2.5^[21]。QTL 命名按照 McCouch 等^[22]1997 年提出命名法。

2 结果与分析

2.1 两个亲本对稻曲病的抗性表现

亲本 IR28 在 2 年试验中均无发病症状或极轻微发病,病情指数分别为 0 和 0.002,根据抗级反应划分,属于高抗稻曲病;大关稻 2 年的病情指数分别为 76.3 和 79.4,属于高度感病(表 1)。

表 1 亲本穗期接种后对稻曲病的抗性表现

Tab. 1 Reaction of parents to rice false smut by artificial inoculation at booting stage

年份 Year	亲本 Parent	鉴定株数 No. of plants surveyed	病情指数 Disease index	抗性水平 Resistance level
2012	IR28	10	0.000	高抗 HR
	大关稻	10	76.300	高感 HS
2013	IR28	10	0.002	高抗 HR
	大关稻	10	79.400	高感 HS

2.2 RIL 群体对稻曲病的抗性表现

2 个年份中,157 个家系的抗病与感病呈连续分布,群体病情指数分别分布为 0.0~80.7 和 0.0~83.4(图 1)。群体病情指数分布显示高抗、中抗、中感、高感的家系呈连续性分布,说明该群体对稻曲病的抗性由主效基因和微效修饰基因控制。

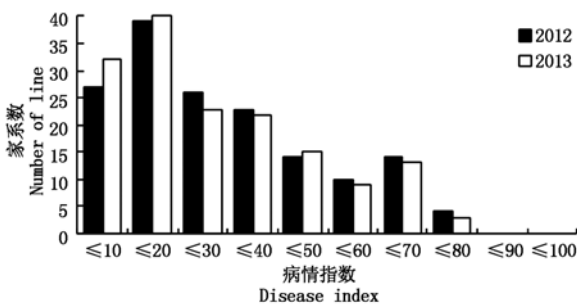


图 1 重组自交系群体稻曲病抗性病情指数分布图
Fig.1 Frequency distribution of resistance to rice false smut on the disease index in RIL population derived from Daguandao/IR28

2.3 抗稻曲病 QTL 检测及效应分析

2012 年,检测到 4 个抗稻曲病 Pi-1 菌株的 QTL (*qFsr2a*、*qFsr2b*、*qFsr8a*、*qFsr11*), LOD 值分别为 5.8,3.6,3.2,9.6,贡献率为 8.7%~16.9%,加性效应为 -9.9~7.6(表 2),分别位于第 2、8、11 染色体上(图 2)。*qFsr2a*、*qFsr8a* 和 *qFsr11* 是来源于抗病亲本 IR28 的等位基因,加性效应值分别为 -8.7,

-6.7, -9.9,作用效应均使群体病情指数降低,幅度在 -9.9~-6.7,增加了水稻对稻曲病的抗性;*qFsr2b* 加性效应值为正值,病情指数增加,作用效应使水稻对稻曲病的抗性降低,是来源于感病亲本大关稻的等位基因。

2013 年,检测到 4 个抗病 QTL (*qFsr7*、*qFsr8b*、*qFsr11*、*qFsr12*),分别位于第 7、8、11 和 12 染色体(图 2)。其中 *qFsr7* 的加性效应值为 7.1,与上年度检测到的 *qFsr2b* 作用效应相同,同为来源于大关稻的等位基因。其余 3 个位点 *qFsr8b*、*qFsr11*、*qFsr12* 均为来自抗病亲本 IR28 的等位基因,贡献率为 8.5%~17.2%,加性效应为 -14.3~-6.5(表 2)。

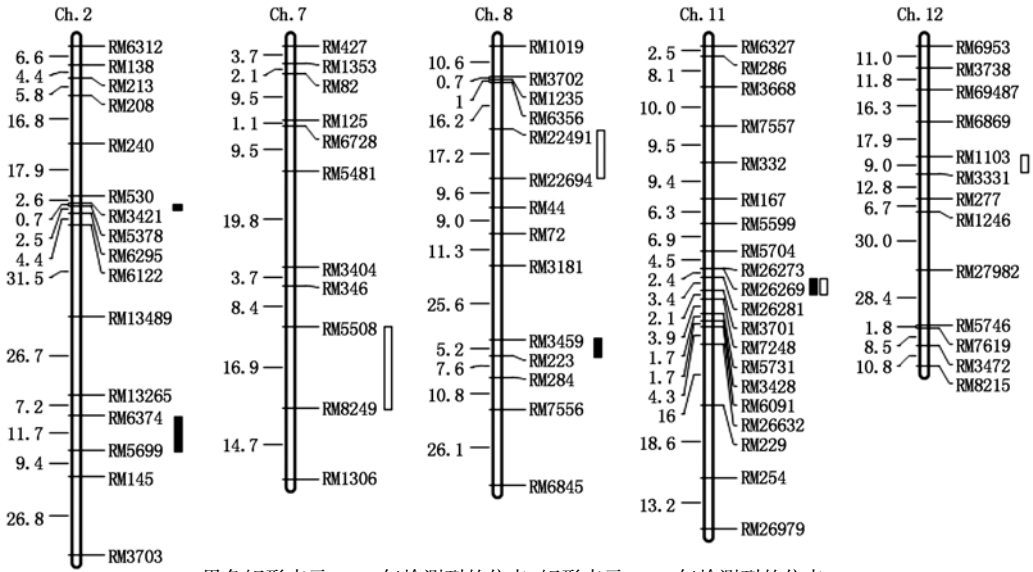
2 年共检测到 7 个抗稻曲病 QTL,其中 *qFsr11* 在 2 个年份中均被检测到,位于第 11 染色体 RM26281~RM3701 内,与分子标记 RM3701 的距离为 0.16 cM,该位点在 2 个年度间具有较好的遗传稳定性,2 年的加性效应分别为 -9.9 和 -14.3,贡献率为 13.5% 和 17.2%(表 2)。

表 2 抗稻曲病 QTL 的染色体定位及统计参数

Tab.2 Chromosome location and characteristics of QTLs for rice false smut resistance

年份 Year	QTL	标记区间 Marker interval	染色体 Chromosome	LOD 值 LOD score	贡献率/% Variance explained	加性效应 Additive effect
2012	<i>qFsr2a</i>	RM3421~RM5378 *	2	5.8	16.9	-8.7
	<i>qFsr2b</i>	RM6374 *~RM5699	2	3.6	11.1	7.6
	<i>qFsr8a</i>	RM3459~RM223 *	8	3.2	8.7	-6.7
	<i>qFsr11</i>	RM26281~RM3701 *	11	9.6	13.5	-9.9
2013	<i>qFsr7</i>	RM5508~RM8249 *	7	4.3	11.6	7.1
	<i>qFsr8b</i>	RM22491 *~RM22694	8	2.7	8.5	-6.5
	<i>qFsr11</i>	RM26281~RM3701 *	11	13.7	17.2	-14.3
	<i>qFsr12</i>	RM1103~RM3331 *	12	2.6	12.2	-9.3

注:*. 该标记距离 QTL 较近。
Note:*. Indicates the marker near a QTL.



黑色矩形表示 2012 年检测到的位点;矩形表示 2013 年检测到的位点。
Black rectangles denote QTLs detected in 2012;Rectangles denote QTLs detected in 2013.

图 2 稻曲病抗性 QTL 在染色体上的位置

Fig.2 Location of QTLs for resistance to rice false smut on chromosome

3 讨论

稻曲病的发生易受环境影响,尤其是温度和湿度的变化对稻曲病的侵染及扩散有很强的调控作用,成功地诱发稻曲病发生和选用科学的抗病性鉴定方法尤为重要。本研究采用了高效引发人工注射接种方法,接种液为菌丝-孢子混合液,保证了病菌与幼穗充分接触,确保充分侵染,张君成等^[18]研究表明,该方法诱发能力强、发病效果好,最高病穗发病率可达 100%,病情指数达 85.8%。比较得知,这种方法比单一分生孢子接种效果明显提高,单一分生孢子接种发病率为 11%~16%^[23];比喷雾^[24]、菌液涂抹^[12]、田间自然发病^[25]等接种方法更科学可靠。本试验中感病家系发病率达到 90.6%,未接种对照不发病,说明病害真正是由接种引发的。

抗病品种含有抗病基因是由品种本身遗传特性所决定的,而感病品种中检测到抗病基因的现象并不多见。Kunihiro 等^[26]发现京系 17 中带有抗纹枯病的基因;丁秀兰等^[27]检测到 Kinmaze 中含有抗条纹叶枯病基因。本研究中的大关稻为感病亲本,在衍生的后代中检测到来自于它的等位抗病基因 *qFsr2b*、*qFsr7*,分析这一现象推知在纯系品种由于基因间的相互作用,使得为数不多的抗病基因效应不能得以表达,在经过遗传重组后,基因组合形式产生变化,使得抗病基因抗性得到表达。这一抗病基因存在的方式,将是一个新的研究课题。

本研究在第 11 染色体上检测到的与稻曲病 Pi-1 致病菌株抗性相关的位点 *qFsr11*,该位点在 2 年的试验中被重复检测到,说明该位点具有很好的遗传稳定性,能够稳定提高水稻对病害的抗性。笔者对不同环境下和不同年份间稻曲病混合菌株抗性稳定性研究表明,在第 11 染色体长臂末端存在遗传稳定区域,含有多个抗病 QTL^[15-16]。从分析结果看,单一致病菌株侵染后的发病率和病情指数与混合菌株相比来得低,可能是混合菌株中各菌株的致病效应有累加作用,形成较强的选择压,从而加强了病害的发生效果。

参考文献:

- [1] Ou S H. Rice disease[Z]. UK: CAB/CM1, 1985: 307-311.
- [2] Nakamura K I, Izumiyama N. Lupiosis in rice caused by ustiloxin and crude extract of fungal culture of *Ustilaginoidea virens* [J]. Proc Jpn Assoc Mycotoxicol, 1992, 35: 41-43.
- [3] Dhindsa H S, Aulakh K S, Chahal S S. Incidence and assessment of losses due to false smut of rice in Punjab [J]. Indian Phytopathol, 1991, 44: 120-121.
- [4] Chib H S, Tikoo M L, Kalha C S. Effect of false smut on yield of rice [J]. Indian J Mycol Plant Pathol, 1992, 22: 278-280.
- [5] Sinha R K P, Sinha B B P, Singh A P. Assessment of yield loss due to false smut disease of rice [J]. J Appl Biol, 2003, 13: 35-37.
- [6] 季宏平. 水稻稻曲病产量损失及药剂防治的初步研究 [J]. 黑龙江农业科学, 2000(4): 18-19.
- [7] Iwasaki S. Chemistry and biological activity of the mycotoxins interfering with tubulin function [J]. Proc Jpn Assoc Mycotoxicol, 1992, 35: 1-6.
- [8] Koiso Y, Li Y, Iwasaki S, et al. Ustiloxins, antimitotic cyclic peptides from false smut balls on rice panicles caused by *Ustilaginoidea virens* [J]. The Journal of Antibiotics, 1994, 47(7): 765-773.
- [9] Li Y, Koiso Y, Kobayashi H, et al. Ustiloxins, new antimitotic cyclic peptides: interaction with porcine brain tubulin [J]. Biochemical Pharmacology, 1995, 49(10): 1367-1372.
- [10] Nakamura K, Izumiyama N, Ohtsubo K, et al. "Lupinosis"-like lesions in mice caused by ustiloxin, produced by *Ustilaginoidea virens*: a morphological study [J]. Natural Toxins, 1994, 2(1): 22-28.
- [11] 黄世文, 余柳青. 国内稻曲病的研究现状 [J]. 江西农业学报, 2002, 14(2): 45-51.
- [12] 李小湘, 黎用朝. 稻曲病研究进展 [J]. 湖南农学院学报, 1992, 10(S1): 230-233.
- [13] 刘永锋, 陈志谊, 陆凡, 等. 水稻稻曲病控制技术研究 [J]. 金陵科技学院学报, 2004, 20(3): 42-45.
- [14] Li Y S, Zhu Z, Zhang Y D, et al. Genetic analysis of rice false smut resistance using major gene plus polygene mixed genetic model [J]. Acta Agron Sin, 2008, 34(10): 1728-1733.
- [15] 李余生, 黄胜东, 杨娟, 等. 水稻抗稻曲病数量性状座位及效应分析 [J]. 作物学报, 2011, 37(5): 778-783.
- [16] 李余生, 杨娟, 黄胜东, 等. 不同环境下水稻稻曲病抗性位点检测 [J]. 农业科学与技术: 英文版, 2014, 28(3): 449-452, 473.
- [17] 徐建龙, 薛庆中, 罗利军, 等. 近等基因导入系定位水稻抗稻曲病数量性状位点的研究初报 [J]. 浙江农业学报, 2002, 14(1): 16-21.
- [18] 张君成, 张炳欣, 陈志谊, 等. 稻曲病的接种方法及其效果初探 [J]. 中国水稻科学, 2003, 17(4): 390-392.
- [19] 张君成, 陈志谊, 张炳欣, 等. 稻曲病的接种技术研究 [J]. 植物病理学报, 2004, 34(5): 463-467.
- [20] 唐春生, 高家樟, 曹国平, 等. 稻曲病病情分级标准的研究和应用 [J]. 湖南农业大学学报: 自然科学版, 2000, 26(2): 122-125.
- [21] Collard B, Jahufer M, Brouwer J B, et al. An introduction to markers, quantitative trait loci (QTL) mapping and marker-assisted selection for crop improvement: The basic concepts [J]. Euphytica, 2005, 142(1/2): 169-196.
- [22] McCouch S R, Cho Y G, Yano M, et al. Report on QTL nomenclature [J]. Rice Genet Newsl, 1997, 14: 11-13.
- [23] 缪巧明, 王永华. 水稻品种对稻曲病的抗病性鉴定技术研究 [J]. 西南农业学报, 1994, 7(2): 67-70.
- [24] 代光辉, 赵杰, 何润梅, 等. 稻曲病不同抗性水稻品种的组织化学及分生孢子侵染途径的初步观察 [J]. 植物病理学报, 2005, 35(1): 37-42.
- [25] Ansario M M, Ram T, Shama T. Yield loss assessment in promising rice cultures due to false smut [J]. Oryza, 1988, 25(2): 207-209.
- [26] Kunihiro Y, Qian Q, Sato H, et al. QTL analysis of sheath blight resistance in rice (*Oryza sativa* L.) [J]. Acta Genetica Sinica, 2002, 29(1): 50-55.
- [27] 丁秀兰, 江玲, 刘世家, 等. 利用重组自交系群体检测水稻条纹叶枯病抗性基因及 QTL 分析 [J]. 遗传学报, 2004, 31(3): 287-292.