

利用 BSA 法检测水稻条纹叶枯病高效抗性位点

张云辉,张所兵,林 静,汪迎节,方先文

(江苏省农业科学院 粮食作物研究所,江苏 南京 210014)

摘要:通过前期对江苏水稻地方品种抗条纹叶枯病资源的筛选获得的一份高抗条纹叶枯病水稻品种旱稻,配制其与条纹叶枯病感病品种武育梗 3 号杂交组合,采用田间自然接种鉴定方法,以病情指数为表型值,对 141 个 F_2 单株的 $F_{2,3}$ 株系进行了条纹叶枯病抗性鉴定。同时利用群体分离分析法(Bulked segregant analysis,BSA 法)对抗/感 DNA 池分析发现第 11 染色体 SSR 标记 RM209、RM21 与条纹叶枯病抗性有明显的连锁关系。利用基于完备复合区间作图方法的 QTL 检测软件(QTL IciMapping V3.2)在第 11 染色体上检测到一个条纹叶枯病抗性相关 QTL,位于 SSR 标记 RM209 和 RM21 之间,LOD 值为 13.25,可解释表型变异 38.39%,加性效应为负值,表明该数量性状基因座对水稻条纹叶枯病的抗性来自抗病亲本旱稻。

关键词:水稻;条纹叶枯病;群体分离分析法;QTL 定位

中图分类号:S435.111.4+2 **文献标识码:**A **文章编号:**1000-7091(2014)02-0085-04

Detection of High Effect Site for Resistance to Rice Stripe Virus by BSA

ZHANG Yun-hui,ZHANG Suo-bing,LIN Jing,WANG Ying-jie,FANG Xian-wen

(Institute of Food Crops,Jiangsu Academy of Agricultural Sciences,Nanjing 210014,China)

Abstract:The Jiangsu landrace rice variety Handao was previously identified as high resistance to rice stripe disease (RSV). A total of 141 $F_{2,3}$ lines derived from the cross of Handao and Wuyujing 3, a variety high sensitive to RSV, were investigated by natural infection method in field, and the disease rating index was scored. Analysis of the resistant/sensitive pools by bulked segregant analysis indicated that the SSR markers RM209 and RM21 on rice chromosome 11 obviously linked to RSV resistance. A QTL for RSV was detected on rice chromosome 11 between RM209 and RM21 by the software QTL IciMapping V3.2 based on the principle of inclusive composite interval mapping (ICIM) with the maximum LOD score 13.25, which explained 38.39% of the trait variance. Additive effects of $qSTV11^{HD}$ was negative, indicating that the resistance allele was inherited from Handao.

Key words:Rice;Rice stripe virus;Bulked segregant analysis;QTL mapping

水稻条纹叶枯病(Rice stripe disease)是由水稻条纹病毒(Rice stripe virus,RSV)引起的病毒病,该病毒由灰飞虱(*Laodelphax striatellus fallen*)传播。病株心叶首先呈现断续的黄白色条斑,随后逐渐扩大,造成心叶枯萎,穗小畸形不实,严重影响水稻产量。2000 年以来该病在江苏省发生逐年加重,2004 年江苏将近 80% 的稻田遭受条纹叶枯病的危害^[1-2]。早期对该病害的防治主要通过改进栽培技术和化学防治为主,但是防治效果并不明显,因为灰飞虱传毒效率非常高,具有瞬时性和持久性的特点,一旦获毒可终身带毒并经卵传毒,而且化学药剂的

过度使用对稻米的食用安全 and 环境造成负面影响。因此,选育优良的抗病品种是最为经济有效、环境友好的防治措施。

近年来随着分子标记技术的快速发展,越来越多的抗水稻条纹叶枯病基因/QTL 得到鉴定和定位。基于此建立起来的分子标记辅助选择技术对水稻条纹叶枯病抗性品种的选育发挥了积极作用。孙黛珍等^[3]通过对窄叶青 8 号/武育梗 3 号 F_2 群体构建分子图谱,对每个 F_2 单株衍生的 $F_{2,3}$ 家系进行抗条纹叶枯病鉴定,人工接种条件下在第 7 染色体上检测到抗性位点 $qSTV7$,而在田间自然接种条件下分别

收稿日期:2013-12-23

基金项目:江苏省农业科技自主创新基金项目[CX(12)2024]

作者简介:张云辉(1987-),男,江苏高淳人,助理研究员,博士,主要从事水稻品种资源研究。

通讯作者:方先文(1967-),男,江苏高邮人,研究员,博士,主要从事水稻品种资源研究。

在第 1 和第 5 染色体检测到 2 个抗性位点 $qSTV1$ 和 $qSTV5$ 。丁秀兰等^[4]利用 Nipponbare/Kasalath//Nipponbare 回交重组自交系(BIL)群体,对水稻条纹叶枯病抗性基因进行了 QTL 检测分析,苗期强迫饲毒鉴定检测到 2 个 QTL,分别位于第 7 和第 11 染色体;田间自然接种在第 11 染色体的相同位置也检测到抗病 QTL。Zhang 等^[5]利用 Koshihikari/Kasalath 置换系与背景亲本 Koshihikari 杂交后代将第 11 染色体上的抗性基因 $qSTV11^{KAS}$ 定位到 39 kb 的区间内。Zhang 等^[6]利用 Sasanishiki/Habataki//Sasanishiki 回交重组自交系群体在第 3 染色体检测到 1 个、第 11 染色体检测到 2 个 QTL,而且位于第 11 染色体的 2 个 QTL($qSTV11^{HAB-1}$ 和 $qSTV11^{HAB-2}$)紧密连锁。这 2 个位点在由原回交重组自交系衍生下来的染色体片段置换系(CSSLs)中得到验证,并分别将这 2 个位点定位到 333 kb 和 204 kb 区间范围内。

群体分离分析法(BSA 法)最早是 Michelmore 在莴苣抗病性研究中提出的^[7]。该方法将作图群体中研究的目的性状,根据其表型差异(如抗病和感病)分为 2 组,分别提取 2 组单株的 DNA,2 组 DNA 等量混合构成 DNA 池用作模板进行标记分析。如果某一(些)标记在 2 个池之间表现出多态性,则表明该标记与目标性状基因连锁。因为这 2 个 DNA 池之间除了目标基因座所在染色体区域的 DNA 组成上存在差异外,基因组中其他 DNA 组成是该作图群体基因库的一个随机样本,是完全相同的。因此两 DNA 池之间的差异相当于两近等基因系之间的差异^[8]。BSA 法省去了近等基因系费时费工的选育过程,同时也能成为定位效应较大的数量性状位点的一种有效手段^[9],具有广泛的应用前景。利用 BSA 法已在植物中定位了许多基因^[10-13]。

本研究利用早年江苏省农业种质资源保护与利用平台筛选到的抗条纹叶枯病江苏省地方品种旱稻与高感品种武育梗 3 号的 F_2 群体,通过 BSA 法在水稻全基因组筛选条纹叶枯病高效抗性位点,并对相关 QTL 进行了分析,以期水稻抗条纹叶枯病基因的定位、分子标记辅助选择提供参考依据。

1 材料和方法

1.1 材料

抗病品种旱稻(母本)、感病品种武育梗 3 号(父本)、141 个 F_2 单株收获的 $F_{2,3}$ 家系种子、抗病对照品种 IR 36 及感病对照品种越光。

1.2 田间自发鉴定

江苏省农业科学院试验田为条纹叶枯病重发

区,当地的灰飞虱带毒率为 27%(江苏省植保站)。为保证充足的虫源,选用四周为麦地的田块种植。2007 年 5 月 10 日(小麦收割前 2 周)将待测材料每个 $F_{2,3}$ 家系播种 50 粒,均匀播种在长 50 cm × 宽 40 cm 的小区内,株距 6 cm。随机设计,重复 2 次。播种后 10 d 间苗至 30 株;播种 50 d 后查发病情况,在此期间不喷洒任何杀虫剂,水肥管理如大田。

1.3 抗性鉴定标准

参照 Washio 等^[14]。按照病害发生的严重程度,将各植株分成 A、B、Bt、Cr、C 和 D 这 6 个抗性级别:

A:长势很差,病叶整片或部分萎蔫,叶片卷曲、枯心、枯死;

B:长势很差,病叶不萎蔫,下部叶片有连续或随机的黄色病斑,上部叶片有褪绿症状;

Bt:症状与 B 相似,但长势较差;

Cr:长势较弱,病叶略卷曲,病部略黄,呈零星点状或条纹状,病健交界明显;

C:长势略弱,病斑略黄零星分散;

D:长势好,病斑随苗的生长而消失。

统计各家系中不同抗性级别的植株数,按下列公式计算病情指数:

病情指数 = $(100 \times A + 80 \times B + 60 \times Bt + 40 \times Cr + 20 \times C + 5 \times D) / (\text{被测总苗数} \times 100) \times 100\%$

抗性评价标准为:病情指数 0 ~ 29 为高抗(HR)、30 ~ 39 为中抗(MR)、40 ~ 69 为中感(S)、70 以上为高感(HS)。

1.4 抗/感 DNA 池分析与 QTL 检测

按照病情指数计算结果,分别选取 10 个极端抗病家系和 10 个极端感病家系的上代 F_2 单株叶片等量混合提取 DNA,构成 DNA 抗/感池。以均匀分布于水稻 12 条染色体上的 102 个两亲本间呈现多态性的 SSR 标记对抗/感池进行分析。以病情指数表示每个 $F_{2,3}$ 株系的抗病性,取 2 次重复的平均值作为各 F_2 单株的表型值,采用 Wang 等^[15]开发的 QTL IciMapping V3.2 软件进行 QTL 分析,以 LOD 值 2.5 为阈值。QTL 命名遵循 McCouch 等^[16]的原则。

2 结果与分析

2.1 亲本及 $F_{2,3}$ 家系条纹叶枯病抗性表现

同期种植的抗病对照 IR 36 病情指数为 1,表现高抗;感病对照越光病情指数为 81.2,表现高感,表明田间自发鉴定是可靠的。亲本旱稻和武育梗 3 号病情指数分别为 10.4 和 78.4,整个群体的病情指数为 0 ~ 55.3,偏向于抗性亲本(图 1)。

抗/感 DNA 池分析,利用本实验室水稻 12 条染

染色体上的 525 对 SSR 标记对两亲本进行多态筛选, 共有 102 对在亲本间呈现多态性。利用 102 对 SSR 标记对抗病和感病 DNA 池分析, 发现在第 11 染色体上的 SSR 标记 RM209 和 RM21 在两池间表现出明显的多态性, 据此推断该标记附近存在一个效应较大的水稻抗条纹叶枯病 QTL。

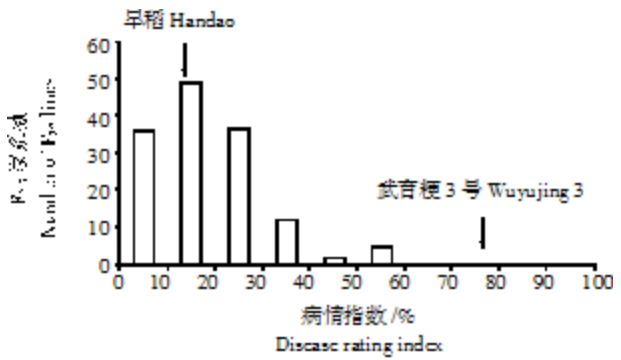


图 1 早稻/武育梗 3 号 $F_{2,3}$ 群体病情指数分布
Fig. 1 Frequency distribution of disease rating index of rice stripe in Handao/Wuyujing 3 $F_{2,3}$ population

2.2 抗条纹叶枯病 QTL 检测

利用 QTL IciMapping v3.2 软件, 将第 11 染色体分子标记在 F_2 群体中的基因型与病情指数相结合, 在第 11 染色体上检测到 1 个抗条纹叶枯病相关 QTL, 命名为 $qSTV11^{hd}$, 位于标记 RM209 和 RM21 之

间, 离 RM209 最近(图 2), LOD 值为 13.25, 可解释表型变异 38.39%, 加性效应为负值(表 1), 表明该数量性状基因座对条纹叶枯病的抗性来自抗病亲本早稻。

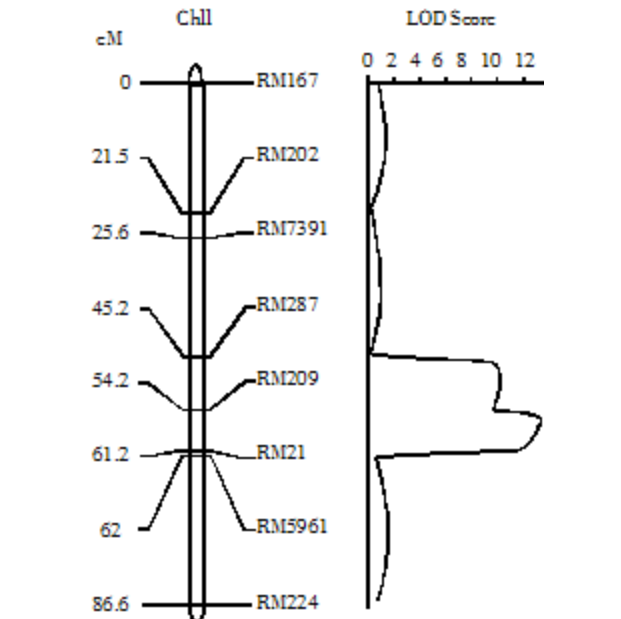


图 2 以早稻/武育梗 3 号 F_2 群体构建的第 11 染色体 SSR 连锁标记图谱及抗条纹叶枯病 QTL 检测
Fig. 2 Molecular linkage map constructed with SSR markers based on Handao/Wuyujing 3 F_2 population and detection of QTL for rice stripe virus resistance

表 1 水稻条纹叶枯病抗性 QTL 检测

Tab. 1 Detection of QTL of rice stripe virus resistance

QTL	染色体 Chromosome	遗传位置/cM Genetic location	标记区间 Marker interval	LOD 值 LOD score	可解释的表型变异/% PVE	加性效应 Additive effect
$qSTV11^{hd}$	11	56	RM209 ~ RM21	13.25	38.39	-10.58

3 讨论

使用群体分离分析法(BSA)能够快速筛选出效应较大的数量性状位点连锁标记, 省时省工, 只需针对目标区域构建连锁图谱, 结合表型即可检测相应 QTL, 可较快获得主效 QTL 的分子标记, 用于分子标记辅助育种。本研究利用 BSA 法在水稻第 11 染色体上筛选到与条纹叶枯病抗性存在明显连锁关系的 SSR 标记, 构建第 11 染色体连锁图谱, 利用 QTL 检测软件(QTL IciMapping V3.2)检测到一个条纹叶枯病 QTL $qSTV11^{hd}$, 其 LOD 值达到 13.25, 可解释的表型变异达到 38.39%, 是一个效应值较大的 QTL, 与 SSR 标记 RM209 连锁紧密, 该标记可用于水稻抗条纹叶枯病的分子标记辅助选择育种。

众多研究表明, 水稻第 11 染色体长臂存在主效的条纹叶枯病抗性基因/QTL。如来自巴基斯坦籼稻品种 Modan 的抗性基因 *Stvb-i*^[17], 日本已利用该

抗性基因培育了许多抗条纹叶枯病粳稻新品种。Zhang 等^[6]在第 11 染色体上精细定位了 2 个条纹叶枯病抗性 QTL, $qSTV11^{HAB-1}$ 和 $qSTV11^{HAB-2}$, 前者与 *Stvb-i* 紧密连锁, 但不是同一位点, 后者距离 *Stvb-i* 稍远。Zhang 等^[5]定位了高抗条纹叶枯病品种 Kasalath 第 11 染色体的抗病 QTL $qSTV11^{KAS}$, Wang 等^[18]定位了抗病 QTL $qSTV11-i$, 其来源于籼稻品种 IR 24, Wu 等^[19]定位了来源于抗病品种特青的抗性 QTL $qSTV11^{TQ}$ 。通过整合比较染色体图谱和分子标记的相对位置, $qSTV11^{HAB-1}$ 位点包含 $qSTV11^{KAS}$, 部分包含 $qSTV11-i$, 与 $qSTV11^{TQ}$ 相邻。这些研究表明, 在水稻第 11 染色体上很可能存在条纹叶枯病的抗性基因簇。本研究在水稻地方品种早稻中检测到的 QTL $qSTV11^{hd}$ 位于 SSR 标记 RM209 附近, 该处集中了 $qSTV11^{HAB-1}$ 、 $qSTV11-i$ 和 $qSTV11^{TQ}$ 这 3 个位点, 与它们的关系有待进一步研究。

参考文献:

- [1] 潘学彪,梁国华,陈宗祥,等. 江苏抗水稻条纹叶枯病育种策略[J]. 江苏农业科学,2005(5):22-23.
- [2] 王才林. 江苏省水稻条纹叶枯病抗性育种研究进展[J]. 江苏农业科学,2006(3):1-5.
- [3] 孙黛珍,江玲,张迎信,等. 水稻抗条纹叶枯病数量性状座位分析[J]. 中国水稻科学,2007,21(1):95-98.
- [4] 丁秀兰,江玲,张迎信,等. 利用回交重组自交群体检测水稻条纹叶枯病抗性位点[J]. 作物学报,2005,31(8):1041-1046.
- [5] Zhang Y X, Wang Q, Jiang L, *et al.* Fine mapping of *qSTV11^{KAS}*, a major QTL for rice stripe disease resistance [J]. Theor Appl Genet, 2011, 122(8):1591-1604.
- [6] Zhang Y X, Wang Q, Jiang L, *et al.* Detection and fine mapping of two quantitative trait loci for partial resistance to stripe virus in rice (*Oryza sativa* L.) [J]. Mol Breed, 2012, 30(3):1379-1391.
- [7] Michelmore R W, Paran I, Kesseli R V. Identification of markers linked to disease-resistance genes by bulks segregant analysis: a rapid method to detect markers in specific genomic regions by using segregating populations [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1991, 88(21):9828-9832.
- [8] 方宣钧,吴为人,唐纪良. 作物 DNA 标记辅助育种[M]. 北京:科学出版社,2001:60-61.
- [9] Korol A, Frenkel Z, Cohen L, *et al.* Fractioned DNA pooling: a new cost-effective strategy for fine mapping of quantitative trait loci [J]. Genetics, 2007, 176(4):2611-2623.
- [10] Zhang Q, Shen B Z, Dai X K, *et al.* Using bulked extremes and recessive class to map genes for photoperiod-sensitive genic male sterility in rice [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1994, 91(18):8675-8679.
- [11] Wang G L, Paterson A H. Assessment of DNA pooling strategies for mapping of QTLs [J]. Theor Appl Genet, 1994, 88(3-4):355-361.
- [12] Zhang J, Stewart J M D. Identification of molecular markers linked to the fertility restorer genes for CMS-D8 in cotton [J]. Crop Science, 2004, 44(4):1209-1217.
- [13] Ji H S, Chu S H, Jiang W Z, *et al.* Characterization and mapping of a shattering mutant in rice that corresponds to a block of domestication genes [J]. Genetics, 2006, 173(2):955-1005.
- [14] Washio O, Ezuka A, Toriyama K, *et al.* Testing method for genetic of and breeding for resistance to rice stripe disease [J]. Bull Chugoku Agric Exp Sta Ser, 1968, 16:39-197.
- [15] Wang J K, Wan X Y, Li H H, *et al.* Application of identified QTL-maker associations in rice quality improvement through a design-breeding approach [J]. Theor Appl Genet, 2007, 115(1):87-100.
- [16] McCouch S R, Cho Y G, Yano M, *et al.* Report on QTL nomenclature [J]. Rice Genet Newsl, 1997(14):11-13.
- [17] Hayano-Saito Y, Saito K, Nakamura S, *et al.* Fine physical mapping of the rice stripe resistance gene locus, Stv-bi [J]. Theor Appl Genet, 2000, 101(1-2):59-63.
- [18] Wang B X, Jiang L, Zhang Y X, *et al.* Genetic dissection of the resistance to Rice stripe virus present in the indica rice cultivar 'IR 24' [J]. Genome, 2011, 54(8):611-619.
- [19] Wu X J, Zuo S M, Chen Z X, *et al.* Fine mapping of *qSTV11^{TQ}*, a major gene conferring resistance to rice stripe disease [J]. Theor Appl Genet, 2011, 122(5):915-923.