

杂交水稻亲本明恢 63 对纹枯病 水平抗性的 QTL 定位

韩月澎^{1,3}, 邢永忠², 陈宗祥¹, 顾世梁¹, 潘学彪^{1,①}, 陈秀兰³, 张启发²

(1. 扬州大学, 扬州 225009; 2. 华中农业大学作物遗传改良国家重点实验室, 武汉 430070;

3. 江苏省里下河地区农业科学研究所, 扬州 225002)

摘要: 利用 240 份源于组合珍汕 97/明恢 63 的重组自交系群体(F_{11} 、 F_{12}), 连续两年进行 2 重复的随机区组田间试验, 运用改进的纹枯病人工接种鉴定方法, 调查其纹枯病病级, 结合该组合 F_9 群体构建的分子标记遗传连锁图谱, 运用区间作图法对抗纹枯病 QTLs 进行了定位。两年在第 5 染色体的相邻区间 C624 ~ C246(1999 年)和 C246 ~ RM26(2000 年)上各检测到一个抗纹枯病 QTL, 两者一个 LOD 值置信区间存在较大的重叠, 而且 LOD 峰值位点很接近, 推测它们可能是同一个 QTL。两年在第 9 染色体上均检测到一个 QTL, 分别位于 C472 ~ R2638(1999 年)和 RM257 ~ RM242(2000 年)区间上, 两区间相距 9.8 cM。两年检测到的所有抗纹枯病 QTLs 均来自明恢 63。

关键词: 水稻(*Oryza sativa* L.); 重组自交系; 纹枯病抗性; 数量性状基因座位

中图分类号: Q943 **文献标识码:** A **文章编号:** 0379-4172(2002)07-0622-05

Mapping QTLs for Horizontal Resistance to Sheath Blight in An Elite Rice Restorer Line, Minghui 63

HAN Yue-Peng^{1,3}, XING Yong-Zhong², CHEN Zong-Xiang¹, GU Shi-Liang¹,
PAN Xue-Biao^{1,①}, CHEN Xiu-Lan³, ZHANG Qi-Fa²

(1. Agricultural College of Yangzhou University, Yangzhou 225009, China; 2. National Key Laboratory of Crop Genetic Improvement, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China; 3. Lixiahe District Institute of Agricultural Sciences, Yangzhou 225002, China)

Abstract: This study was conducted with a recombinant inbred line (RILs) population consisting of 240 recombination lines, derived from an elite combination, Zhenshan 97B × Minghui 63. The RILs and their parents were grown in a randomized complete design with two replications in the years of 1999 and 2000. Sheath blight response ratings for the population and their parents were identified by an improved method of inoculation, which was carried out with short woody toothpicks incubated with a *Rhizoctonia solani* strain, RH-9, and inserted the third sheath in the late tillering/green ring stage of growth. A linkage map was constructed from the RILs. The QTL mapping of sheath blight resistance was carried out by the method of interval QTL mapping. Two QTLs for sheath blight resistance were detected in each year, and were located on chromosome 5 and chromosome 9, respectively. The QTL for sheath blight resistance on chromosome 5 was flanked by markers C624 and C246 on the basis of 1999 data, and by markers C246 and RM26 using 2000 data. The 1-LOD-confidence intervals of QTLs for sheath blight resistance on chromosome 5 detected in two years greatly overlapped with each other, and the peak of the 1-LOD-confidence intervals were approximately the same site. This suggested that the QTL for resistance on chromosome 5 detected in 1999 was probably the same as the QTL detected in 2000. The QTL for sheath blight resistance on chromosome 9 was located on the marker interval of

收稿日期: 2001-11-16; 修订日期: 2002-03-31

基金项目: 国家自然科学基金重大项目(No. 39893350)[Supported by National Science Foundation of China (No. 39893350)]

①联系人 E-mail: panxb@pub.yz.jinfo.net

C472 ~ R2638 in term of 1999 data, and on the interval of RM257 ~ RM242 based on 2000 data, and the two intervals were 9.7cM away from each other. Based on the effect analysis of QTLs for resistance, the genotype of MH63 had negative additive effects or reduced sheath blight rating.

Key words: Rice (*Oryza sativa* L.); recombinant inbred lines (RILs); sheath blight resistance; quantitative trait loci (QTL)

水稻纹枯病是水稻三大病害之一。自矮化育种以来,随着施肥水平的不断提高,危害有普遍加重的趋势^[1]。水稻纹枯病主要为害叶鞘、叶片,致叶片枯死,使结实率下降,千粒重减轻,一般造成产量损失可达到10%~30%,严重时引起植株倒伏或整丛枯死,产量损失达50%以上^[2]。目前生产上水稻纹枯病的防治主要依赖化学药剂^[3],抗纹枯病育种在多数水稻生产国至今还未能有效地开展起来。水稻纹枯病原菌是立枯丝核菌(*Rhizoctonia solani* Kühn),具有强腐生性和宽寄主范围。按照传统观念,对这样的病原菌,很难找到较高水平的抗源,或根本没有可以利用的抗源。再加上纹枯病的发生发展易受植株形态、生态气候的影响^[4~8],病害接种和鉴定难度较大。因此,水稻抗纹枯病研究一度进展缓慢。确定纹枯病抗性的重要位点,发展分子标记辅助选择技术在水稻抗纹枯病育种中的运用无疑具有重要意义。

到目前为止,从分子水平上研究水稻抗纹枯病遗传的报道较少。1995年,Li等^[9]报道了运用分子标记技术对抗纹枯病基因进行染色体定位的结果。潘学彪等^[10]和Zou等^[11]又于1999年和2000年分别发表了抗纹枯病相关QTL的定位研究。这些研究认为,水稻对纹枯病的抗性是由多基因控制、且存在主效抗病QTL的数量性状。

为了进一步深入了解水稻抗纹枯病遗传特性和寻找新的抗纹枯病QTLs,本实验利用由杂交组合珍汕97/明恢63衍生的重组自交系群体,运用改进的纹枯病接种方法——牙签嵌入接种法^[4],鉴定其纹枯病病级,并结合构建的分子标记图谱对抗纹枯病基因进行了分子标记定位,以便为推动抗纹枯病育种的发展提供新的信息。

1 材料和方法

1.1 重组自交系群体

由珍汕97B×明恢63组合经一粒传方法构建的含有240份重组自交系(RILs)群体及其亲本由华中农业大学作物遗传改良国家重点实验室提供^[12]。

RILs在1999年为F₁₁,2000年为F₁₂。

1.2 田间实验

1.2.1 实验设计 1999年和2000年连续两年在扬州大学农学院试验农场种植实验群体,包括亲本明恢63(MH63)、珍汕97(ZS97)、杂种一代汕优63(SY63)和RILs群体。实验按随机区组设计,重复两次,每小区栽3行,每行12株。株行距13.3cm×25cm。RILs群体进行分期播种,1999年早抽穗的家系于5月25日播种,晚抽穗家系于5月6日播种;2000年早抽穗的家系于5月30日播种,晚抽穗家系于5月6日播种。移栽期均为6月10日。

1.2.2 纹枯病菌系及接种方法 菌系为江苏农科院植保所提供的强致病菌株RH-9,采用嵌入法^[3]接种,每RIL小区接种中间行的中间8株,每株接种3个茎秆,接种时间为分蘖末期/拔节初期(7月17或20日)。

1.2.3 病情调查 每小区于抽穗后30d左右调查发病情况,每株以发病最重茎秆的病级为该植株的病级。纹枯病病级评级在Rush等人制定的0~9级标准^[13]的基础上进行了修改。0级为无病,9级为植株病死。

1.3 QTL分析

分子标记遗传连锁图谱由华中农业大学作物遗传改良国家重点实验室构建,含有221个标记,全长1796cM,标记间平均距离8.7cM^[12]。利用MAPMAKER/QTL1.1软件对抗纹枯病进行QTLs定位分析。用LOD值2.0作为阈值判断QTL的存在,若标记区间LOD>2.0,则认为该区间LOD值最高处对应的位点为该性状的一个QTL。

2 结果与分析

2.1 实验群体的纹枯病病级表现

从表1可知,父本(明恢63)和母本(珍汕97)的两年抗性鉴定结果相似,其中明恢63两年病级分别为4.80和4.74,达中抗水平,珍汕97的两年病级分

别为 7.35 和 7.25, 属感病类型。F₁ 代(汕优 63)两年病级为 5.72 和 6.75, 介于双亲之间, 属轻感类型。RILs 群体纹枯病抗性分离明显, 1999 年的病级变化范围为 2.12~8.87, 平均病级为 6.42; 2000 年的病级变化范围为 2.00~8.25, 平均病级为 6.22。两年的病级变化范围相似, 平均值相近。从图 1 可知, RILs 群体两年病级分布基本相似, 只是 1999 年分布曲线比 2000 年稍微右偏, 峰值也略高, 表明 1999 年群体比 2000 年群体发病略重。两年 RILs 群体病级分布均呈双峰曲线, 抗病 RILs 的病级多数为 4.5~

5.5, 感病系的病级多为 7~7.5, 高抗或高感的极端个体都较少, 这表明纹枯病抗性是由多基因控制的。

表 1 实验群体两年纹枯病平均病级表现

Table 1 The RIL means of sheath blight rating in a two-year field experiment

年份 Years	RILs		明恢 63 MH63	珍汕 97 ZS97	杂种 F ₁ SY63
	变异幅度	平均数±标准差			
	Range in RILs	Mean±SD			
1999	2.12~8.87	6.42±1.15	4.80	7.35	5.72
2000	2.00~8.25	6.22±1.23	4.74	7.25	6.75

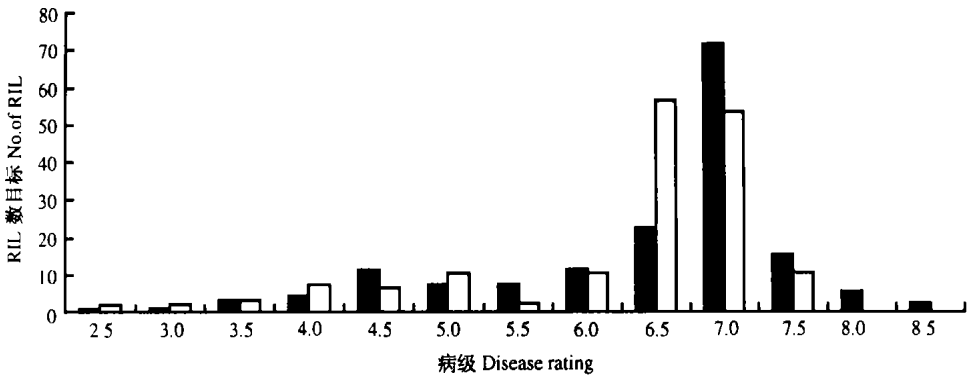


图 1 两年纹枯病病级在 RILs 中的分布

■ 1999 年分布; □ 2000 年分布

Fig. 1 Distributions of sheath blight rating in the RILs population in two years

■ Distribution in 1999; □ Distribution in 2000

2.2 抗纹枯病 QTL 分子标记定位

运用区间作图法, 对两年数据进行分析, 定位抗纹枯病 QTL, 结果见表 2。两年均检测到两个抗纹枯病 QTLs, 且都分别位于第 5 和第 9 两条染色体上。其中, 在第 5 染色体上, 1999 年检测到的一个抗纹枯病 QTL 位于 C624~C246 标记区间, 2000 年检测到的一个抗纹枯病 QTL 位于 C246~RM26 标记区间, 这两个区间紧紧相连(图 2), 且两年定位的抗纹枯病 QTL 的一个 LOD 值置信区间存在较大重叠, LOD 值的峰值也很接近, 两年解释的表型变异方差

大小相似, 均为 10%左右, 因此推测第 5 染色体上两年定位的抗纹枯病 QTL 可能是同一个 QTL。在第 9 染色体上, 1999 年检测到的一个抗纹枯病 QTL 所在标记区间为 C472~R2638, 2000 年检测到的一个抗纹枯病 QTL 所在标记区间为 RM257~RM242, 两区间相距 9.8cM。第 9 染色体上两年定位的抗纹枯病 QTL 分别能解释表型变异方差的 10.10% (1999 年)和 6.90% (2000 年)。此外, 两年检测到的所有抗纹枯病 QTLs, 明恢 63 基因型均表现为减效作用, 即定位的抗病基因都来自相对抗病亲本明恢 63。

表 2 RILs 群体两年用区间作图法定位的抗纹枯病 QTLs

Table 2 QTLs for resistance to sheath blight in RILs population based on MAPMAKER/QTL in two years

年份 Years	QTL ^{a)}	Chr.	标记区间 Marker interval	LOD 值 LOD score	贡献率 Variance explained(%)	加性效应 ^{b)} Additive effect
1999	qSB-5	5	C624~C246	3.66	10.50	-0.38
	qSB-9	9	C472~R2638	2.26	10.10	-0.36
2000	qSB-5	5	C246~RM26	3.40	9.50	-0.35
	qSB-9	9	RM257~RM242	2.50	6.90	-0.30

a) QTL 命名为性状英文缩写加所在染色体编号; b) 负值表示明恢 63 基因型为减效作用

a) Trait abbreviation plus chromosome number named QTL; b) Negative value indicated Minghui63 genotype at the locus with negative effect

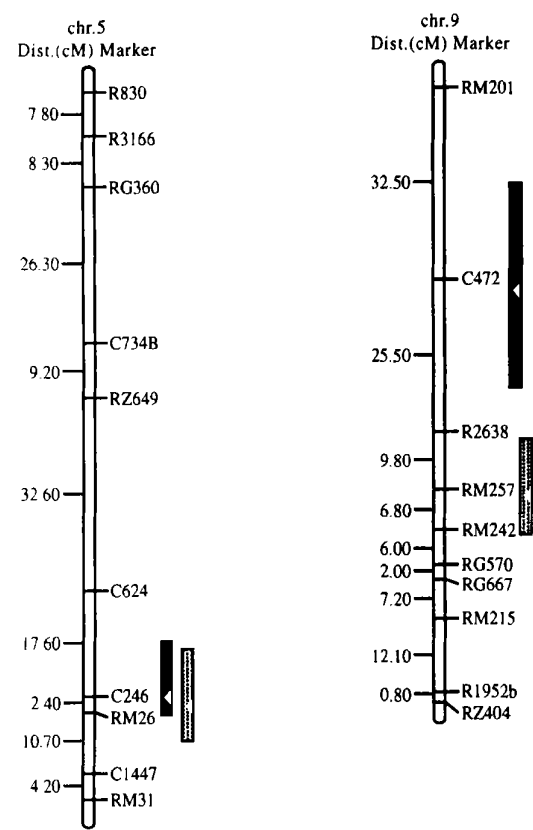


图 2 珍汕 97B/明恢 63 RILs 群体抗纹枯病 QTLs 图谱
短棒标明抗纹枯病 QTLs 所在的置信区间，
短棒内的三角形标明抗纹枯病 QTLs 最可能的位置
■：1999 年检测到的 qSB；▨：2000 年检测到的 qSB

Fig.2 The QTL map of resistance to sheath blight in the ZS97B/MH63 RILs population
The bars indicate the confidence intervals of QTL, the triangles inside the bars indicate the positions with QTLs peaks
■：qSB detected in 1999；▨：qSB detected in 2000

3 讨论

环境对于植物数量性状值的影响具有普遍性。Paterson 等^[14]和 Lu^[15]等研究发现一个群体在不同的环境下,检测到的 QTL 数量及其效应都有很大的差异;邢永忠等研究发现遗传力不同的数量性状,其 QTL 与环境互作程度不同^[16]。水稻纹枯病的发生和发展极易受田间小气候影响,因此降低环境误差,就显得更为重要。为此,本实验采取以下措施:(1)改进了接种方法,采用牙签嵌入接种法,在半天时间内完成全部接种工作,做到了不改变田间的自然生态气候和确保每株接种情况大体一致。(2)为了尽可能减小 RILs 因抽穗期不同而导致最适发病生育阶段所处农田小环境的差异,根据该群体在武汉的生育期表现,在扬州对 RILs 群体进行了分期播种,

使绝大部分重组自交系在相近的日期抽穗,减小了不同 RIL 发病高峰期——抽穗期时生长环境的差异。(3)利用 RILs 群体设置重复减小环境误差。年内重复间平均病级的相关性分析表明,1999 年两个重复间的相关系数为 0.79,2000 年两个重复间的相关系数为 0.85;年度间群体病级分布基本一致,相关系数为 0.80,均达到极显著水平。这表明采用的措施在相当程度上保证了实验的准确性。但是,即使采用了以上的措施,接种质量的好坏、田间土壤肥力的差异、不同 RIL 对病原菌敏感的生育阶段所处温度和湿度条件的差异等等,都可能影响发病程度。不同年份定位的主效抗病基因的位置和效应大小略有差异,可能与这些因素的影响有关。如何获得更准确的表型数据,仍然值得今后深入研究。

由于应用分子标记技术研究纹枯病抗性的报道很少,还有待更多较高水平研究资料的积累。Li 等^[9]用分子标记定位 Lemont/Teqing 组合 F₄ 混系群体中的纹枯病水平抗性基因,所用接种方法为接种物撒施法,病级评价方法为每个混系用目测估计法评级,评级时间第一年为各混系统一于接种后 30 天进行,第二年分别于各混系出穗后 30 天调查,共检测到 6 个抗纹枯病 QTL,分别位于第 2、3、4、8、9 和 12 染色体上。Zou 等^[11]用 Jasmine85/Lemont 组合的 F₂ 无性系群体,采用短牙签为接种物,于分蘖末期嵌入倒数第 3 叶鞘内侧,定位了 6 个抗纹枯病 QTL,分别位于第 2、3、7、9 和第 11 染色体上;其中,在第 11 染色体上两年在相同区间检测到一个抗纹枯病 QTL,贡献率高达 25%左右。本研究用珍汕 97/明恢 63 的 RIL 群体为研究对象,在第 5 和第 9 染色体上均检测到抗纹枯病 QTL,其中在第 5 染色体上检测到的抗纹枯病 QTL 为首次报道。

值得注意的是,本实验及前人的研究中,在第 9 染色体上均检测到抗纹枯病 QTL,但 QTL 的数量及所在位置均不相同。具体而言,Li 等在第 9 染色体上第一年未检测到抗纹枯病 QTL,第二年在 RG910b~RZ777 区间检测到一个抗纹枯病 QTL^[9]。Zou 等在第 9 染色体上第一年未检测抗纹枯病 QTL,第二年在 C397~G103 和 RG570~C356 区间分别检测到一个抗纹枯病 QTLs^[11]。本研究两年中分别在 C472~R2638 和 RM257~RM242 区间检测到一个抗纹枯病 QTL。将 3 个定位群体的图谱与日本水稻基因组及美国康乃尔大学的图谱进行比对可知,这些 QTL 所在位置均不相同。这可能与第 9 染色体上检测到的抗纹枯病 QTL 贡献率相对较小(可解释总变

异的 10% 以下), 因而和定位的准确性较低有关。同时, 我们利用本实验群体在第 9 染色体抗纹枯病 QTL 的附近区间, 检测到了一个与植株松紧度有关的主效 QTL, 其贡献率达到 15% 左右, 而植株松紧对纹枯病的发生、发展是有影响的(有关株形对纹枯病抗性的影响将另文报道), 因而可能会影响到抗纹枯病 QTL 定位的准确性。但是, 从 3 个研究的结果推测, 第 9 染色体上可能确实存在抗纹枯病 QTL。如何克服形态性状的影响, 较为准确地定位类似的 QTL, 是今后值得重视的课题。

致谢: 徐敬友教授和童蕴慧副教授等帮助收集和培养纹枯病菌系, 陈红旗、仲雪梅、杨雪峰、左示敏、胡茂龙、陈绍孜等同学先后参加部分研究工作, 在此一并表示感谢。

参考文献

- [1] Lee F M, Rush M C. Rice sheath blight: A major rice disease. *Plant Disease*, 1983, 67: 826 ~ 832.
- [2] Peng S Q, Zeng Z R, Zhang Z G. Sheath blight and its control in rice. Shanghai: Shanghai Technology Press, 1986.
彭绍裘, 曾昭瑞, 张志光. 水稻纹枯病及其防治. 上海: 上海科技出版社, 1986.
- [3] Xu W L, Cai W J, He Z X, He Y *et al.* Control of rice sheath blight by Jing gangmycin mixed with a growth regulator agent Yi-Sui-Su. *Journal of Zhejiang Agricultural University*, 1999, 25(2): 209 ~ 210.
- [4] Pan X B, Chen Z X, Xu J Y *et al.* The effects of different methods of inoculation and investigation on genetic research of resistance to rice sheath blight. *Journal of Jiangsu agricultural college*, 1997, 18(3): 27 ~ 32.
潘学彪, 陈宗祥, 徐敬友等. 不同接种调查方法对抗水稻纹枯病遗传研究的影响. *江苏农学院学报*, 1997, 18(3): 27 ~ 32.
- [5] Guo C J, Chen Z Y, Wang F M. Pathogenic variability of sheath blight of rice caused by *Thanatephorus acueneris* (Frank) Donk and identification techniques of varietal resistance. *Scientia Agricultura Sinica*, 1985, 5: 50 ~ 57.
过崇俭, 陈志谊, 王法明. 水稻纹枯病菌致病力分化及品种抗性鉴定技术的研究. *中国农业科学*, 1985 (5): 50 ~ 57.
- [6] Pan X B, Rush M C, Sha X Y. Major gene, nonallelic sheath blight resistance from the rice cultivars Jasmine 85 and Teqing. *Crop Science*, 1999, 39: 338 ~ 346.
- [7] Masajo T M, Hoff B J, Mellrath W O *et al.* Evaluating rice for resistance to sheath blight. *Proc Amer Phytopath Soc*, 1979, (3): 206.
- [8] Pan X B, Sha X Y, Xie Q J *et al.* Partial resistance to rice sheath blight may be controlled by single major genes. *Phytopathology* (USA), 1995, 85(4): 511.
- [9] Li Z K, Pinson S R M, Marchetti M A *et al.* Characterization of quantitative trait loci (QTLs) in cultivated rice contributing to field resistance to sheath blight (*Rhizoctonia solani*). *Theor. Appl. Genet.*, 1995, 91: 382 ~ 388.
- [10] Pan X B, Zou H J, Chen Z X *et al.* Tagging major quantitative trait loci for sheath blight resistance in a rice variety, Jasmine 85. *Chinese Science Bulletin*, 1999, 44(19): 1783 ~ 1789.
- [11] Zou J H, Pan X B, Chen Z X *et al.* Mapping Quantitative Trait Loci Controlling Sheath Blight Resistance in Two Rice Cultivars (*Oryza sativa* L.). *Theor. Appl. Genet.*, 2000, 101: 569 ~ 573.
- [12] Xing Y Z, Tan Y F, Xu C G *et al.* Mapping quantitative trait loci for grain appearance traits of rice using a recombinant inbred line population. *Acta Botanica Sinica*, 2001, 43(8): 840 ~ 845.
邢永忠, 谈移芳, 徐才国等. 利用水稻重组自交系群体定位谷粒外观性状的数量性状基因. *植物学报*, 2001, 43(8): 840 ~ 845.
- [13] Rush M C, Hoff B J, Mellrath W O *et al.* Disease nurseries. *Ann Prog Rept Rice Exp Sta. Crowley, IA* 1977, 69: 140 ~ 195.
- [14] Paterson A H, Damon S, Hewitt J D *et al.* Mendelian factors underlying quantitative traits in tomato: comparison across species, generations, and environments. *Genetics*, 1991, 127, 181 ~ 197.
- [15] Lu C, Shen L, Tan Z *et al.* Comparative mapping of QTLs for agronomic traits of rice across environments using a doubled haploid population. *Theor. Appl. Genet.*, 1996, 93: 1211 ~ 1217.
- [16] XING Y Z, XU C G, HUA J P *et al.* Analysis of QTL Environment Interaction for Rice Panicle Characteristics. *Acta Genetica Sinica*, 2001, 28(5): 439 ~ 446.
邢永忠, 徐才国, 华金平等. 水稻穗部性状的 QTL 与环境互作分析. *遗传学报*, 2001, 28(5): 439 ~ 445.

(责任编辑: 张艳)