

三黄占2号稻瘟病抗性与稻米直链淀粉含量的关系研究

张少红¹ 刘斌¹ 朱小源² 杨健源² 伍尚忠² Hei Leung³

(¹广东省农业科学院水稻研究所, 广东广州 510640; ²广东省农业科学院植物保护研究所, 广东广州 510640; ³菲律宾国际水稻研究所, 菲律宾马尼拉 DAPO Box 7777)

摘要: 以高抗稻瘟病、直链淀粉含量(AC)较高的三黄占2号和高感稻瘟病、AC较低的丽江新团黑谷衍生的重组自交系群体为研究材料, 从性状的相关性和控制两性状的基因在染色体上的位置关系剖析稻瘟病抗性和稻米AC的内在关系。结果表明, 两性状间没有显著的相关性。3个与AC相关的QTL分别被定位在第5、6和7染色体上, 其加性效应均来自丽江新团黑谷, 起降低AC的作用。比较这些QTL与先前对同一群体鉴定的稻瘟病抗性基因(主效基因和QTL)在染色体上的位置, 表明控制这两性状的基因没有紧密连锁关系, 亦没有显著的基因间互作。据此认为, 通过亲本的合理选择和分子标记辅助选择, 可以把三黄占2号稻瘟病持久抗性与理想AC整合到同一品系中, 育成优质、抗病的优良品种。

关键词: 稻瘟病抗性; 直链淀粉含量; 基因定位; 相关性; 水稻
中图分类号: S511

Relationship between Blast Resistance and Amylose Content in a RIL Population Derived from Rice Crossed SHZ-2 × LTH

ZHANG Shao-Hong¹, LIU Bin¹, ZHU Xiao-Yuan², YANG Jian-Yuan², WU Shang-Zhong² and Hei Leung³

(¹Rice Research Institute, Guangdong Academy of Agricultural Sciences, Guangzhou 510640, China; ²Plant Protection Research Institute, Guangdong Academy of Agricultural Sciences, Guangzhou 510640, China; ³International Rice Research Institute, DAPO Box 7777, Manila, the Philippines)

Abstract: Sanhuangzhan 2 (SHZ-2) has been considered as a promising blast resistance source in rice breeding in South China because of its durable blast resistance and good agronomic traits. Three major genes responsible for qualitative resistance and five defense genes significantly associated with quantitative resistance to blast in SHZ-2 have been identified and mapped using the candidate resistance gene approach in our previous study. However, its edible quality of kernel is relatively poor because of high amylose content (AC), and most derived resistant cultivars have the similar shortcoming. To have an insight into the relationship between strong blast resistance and high AC in SHZ-2, a RIL population derived from a cross between SHZ-2 and Lijiangxintuanheigu (LTH) was used to identify the blast resistance genes in SHZ-2 and QTL for AC in the study. Results revealed no significant ($P < 0.05$) correlation between blast resistance and AC in the RIL population (Table 2). *t*-test also indicated that there was no significant difference for average AC between highly blast-resistant RI lines and blast-susceptible RI lines (Table 3). Three QTLs for AC were identified when single-factor analysis of variance and interval mapping were performed. They were mapped on chromosome 5, 6 and 7, respectively. All the three QTL were from LTH and contributed to the reduction of AC. Comparing the locations of QTL for AC identified in this study with the locations of previously identified genes (major genes and QTL) conferring blast resistance in SHZ-2, there was no close linkage among these genes for the two traits (Fig. 2). These results suggested that the strong blast resistance are not linked with the higher AC in SHZ-2 and it is possible to combine the two traits and develop an elite cultivar with durable blast resistance and ideal AC by proper selection of parents and marker-assisted selection.

Key words: Blast resistance; Amylose content; Gene mapping; Correlation; *Oryza sativa* L.

三黄占2号(SHZ-2)是广东省农业科学院于 1985年育成的籼稻品种。近20年来,应用国内外不

同的稻瘟病菌株接种及多点田间抗性评价表明, SHZ-2对稻瘟病具有广谱的质量抗性和高水平的数量抗性^[1,2];国际稻瘟病圃(International Rice Blast Nursery, IRBN)评价结果亦显示,其各项抗瘟指标接近或部分超过国际公认的持久抗瘟性品种 Moroberekan、OS6及 IR36^[2]。因此,它是目前国际上少有的稻瘟病优异抗源。此外,它还具有优良的农艺性状。以它为抗源已育成了三芦占7号、绿黄占、七袋占等10多个抗瘟品种。遗憾的是,SHZ-2稻米直链淀粉含量(AC)较高,致使饭质较硬,口感较差。以它为抗源育成的绝大部分抗性品种,存在同样缺点。这一问题影响了SHZ-2在优质稻抗瘟育种中的应用。究竟SHZ-2稻瘟病抗性与其较高的稻米AC是否存在紧密连锁关系,一直没有加以研究。

在笔者前期的研究中,应用候选抗性基因方法,已鉴定、标记定位了与SHZ-2稻瘟病质量抗性相关的3个主效基因和与其数量抗性相关的5个防卫基因,并通过人工接种和多点田间试验证明了3个主效基因具有较强的抗性互补性,是SHZ-2获得广谱质量抗性的基础,5个防卫基因对SHZ-2获得稳定、高水平的数量抗性起重要的作用^[1,3]。在此基础上,本研究以SHZ-2稻瘟病抗性基因鉴定所用的同一重组自交系群体为材料,分别测定其AC及标记定位与AC相关的QTL,从两性状的相关性和控制两性状的基因在染色体上的位置关系剖析SHZ-2稻瘟病抗性与其稻米AC的内在关系,为应用SHZ-2作为抗源进行优质稻瘟病抗性的分子育种奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料

以持久抗瘟性籼稻品种SHZ-2和高感稻瘟病的粳稻品种丽江新团黑谷(LTH)为亲本进行杂交。从F₂代起到F₇代以单粒传(single seed descent, SSD)方法,构建重组自交系(RIL)群体,共获得215个株系。每世代在植株开花前,均严格套袋处理。套袋的F₆种子用于基因型分析。2002年晚造在广东省农业科学院白云基地种植繁殖。取种子量足够的170个株系用于直链淀粉含量(AC)测定。

1.2 直链淀粉含量测定

按农业部部颁标准NY147-1988米质测定方法^[4]进行。碘比色分析用FOSS公司FIAstar流动注射分析仪的直链淀粉分析模块完成^[5]。

1.3 稻瘟病抗性评价

质量抗性以病级为指标,记载标准参照Bonman等^[6]的方法;数量抗性以病叶面积(diseased leaf area, DLA)作为指标,调查方法参照Notteghem^[7]的方法。

田间抗性评价按国际水稻研究所标准评价、鉴定方法^[8]在田间病圃进行。

1.4 数据处理

1.4.1 QTL分析 应用SAS软件^[9]的一般线性模型(GLM)确定与AC显著相关($P < 0.01$)的分子标记及标记间的互作。利用由SHZ-2与LTH杂交衍生的RIL群体,构建含167个分子标记的连锁图谱^[1],采用区间作图(interval mapping)法(Mapmaker/QTL 1.1软件^[10])进行QTL染色体定位。当 $LOD \geq 2.0$ 时,认为该位置QTL存在,并计算出各QTL对AC的贡献率及其加性效应值。标记间的遗传距离用Kosambi函数进行换算。

1.4.2 相关性分析及t-检验 应用SAS软件^[9]的CORR程序及t-检验程序分别进行RIL群体稻瘟病抗性与稻米AC的相关性分析及高抗稻瘟病和高感稻瘟病两组RI系AC平均值的差异显著性检验。

2 结果与分析

2.1 亲本及其重组自交系的稻米直链淀粉含量

图1是SHZ-2和LTH及其衍生的RIL群体稻米AC的分布情况。从图可见,RIL群体的稻米AC表现出数量性状遗传特征。群体中AC的平均值为20.3%,与两亲本(SHZ-2 24.4%, LTH 15.8%)的平均值(20.1%)相近。大部分RI系(90%)的AC在两亲本之间,少部分RI系(10%)的AC超过亲本(高于SHZ-2或低于LTH)。具有籼稻理想AC(根据国家优质稻谷标准GB/T 17891-1999,为17%~22%)的RI系有95个(56%),占群体的一半。可见,RIL群体的

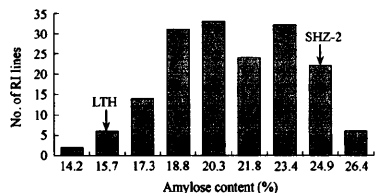


图1 三黄占2号 and 丽江新团黑谷衍生的重组自交系群体直链淀粉含量的分布
Fig.1 Distribution of amylose content in RIL population derived from SHZ-2 and LTH

AC 有较大的变异, 亦不乏理想类型。

2.2 控制直链淀粉含量 QTL 的标记定位

单因子方差分析及区间作图结果表明, 3 个 QTL 与 AC 相关, 分别定位在水稻的第 5、6 和 7 染色体上(表 1、图 2)。这 3 个 QTL 的加性效应均来自

LTH, 起到降低 AC 的作用, 它们可解释 6.0% ~ 65.5% 的 AC 变异(表 1)。1 个主效 QTL(qAC-6)在第 6 染色体上, 其 LOD 值为 18.4, 对表型的贡献为 65.5%, 对降低 AC 有较大的作用。其他 2 个 QTL 的贡献较小, 可看成微效 QTL。

表 1 与直链淀粉含量相关的 QTL

Table 1 Putative QTL for amylose content in RIL population derived from SHZ-2 and LTH

QTL	染色体 Chromosome	区间 Interval	LOD 值 LOD value	加性效应 Additive effect	对表型贡献 Variance explained (%)
qAC-5	5	PK1K2-11-Rp1-A	2.3	-1.54	6.0
qAC-6	6	RM204-PK1K2-18	18.4	-4.66	65.5
qAC-7	7	RG511-NLRInv-6	2.2	-2.33	14.7

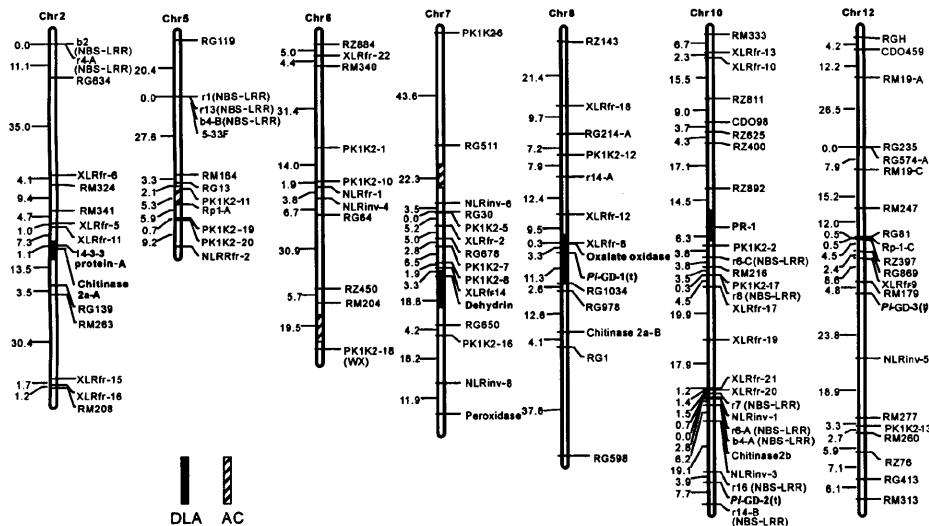


图 2 与稻瘟病抗性和稻米直链淀粉含量相关的基因座在染色体上的定位

Fig. 2 Linkage map showing locations of gene associated with blast resistance and amylose content

3 个稻瘟病主效抗性基因 *Pi-GD-1(t)*、*Pi-GD-2(t)* 和 *Pi-GD-3(t)* 分别定位在第 8、10 和 12 染色体上, 染色体上的黑色填充区域代表与稻瘟病数量抗性(diseased leaf area, DLA)相关的 QTL, 斜线填充区域代表与直链淀粉含量相关的 QTL。

Three major genes controlling resistance to blast, *Pi-GD-1(t)*, *Pi-GD-2(t)* and *Pi-GD-3(t)* are located on chromosomes 8, 10 and 12, respectively. Solid-filled areas on chromosomes represent the intervals of putative QTL for DLA (diseased leaf area), and diagonal-filled areas represent the intervals of putative QTL for AC.

2.3 稻瘟病抗性与稻米直链淀粉含量的关系

2.3.1 稻瘟病抗性与稻米 AC 表型的相关性

以具有不同致病性的广东及菲律宾菌株对 RIL 群体中 170 个 RI 系接种进行稻瘟病抗性评价, 并测定其稻米 AC。对群体两性状的相关性分析结果(表 2)表明, 无论是稻瘟病质量抗性或数量抗性, 与稻米 AC 的相关性均不显著($P < 0.05$)。

进一步比较分析含有多个和不含有或只有个别 SHZ-2 稻瘟病抗性基因(主效基因和 QTL)、在广东和菲律宾国际水稻研究所田间试验均表现高抗和高感的 RI 系的 AC(表 3), 其平均值接近, 分别为 19.2%(高抗稻瘟病组)和 18.6%(高感稻瘟病组), 差异不显著(表 3, $P = 0.6141$)。

2.3.2 控制相关性状的基因座在水稻染色体上

的位置及互作关系 本研究组以往已鉴定了控制 SHZ-2 稻瘟病质量抗性的 3 个主效抗性基因 *Pi-GD-1(t)*、*Pi-GD-2(t)* 和 *Pi-GD-3(t)*，以及与稻瘟病数量抗性显著相关的 5 个防卫基因及与之共定位的 QTL。这些稻瘟病抗性基因被定位在第 2、7、8、10 和 12 染色体上^[1](图 2)。而本研究中与稻米 AC 相关的 3 个 QTL 分别定位在第 5、6 和 7 染色体上。比较这些基因在水稻染色体上的位置可知，与 SHZ-2 稻瘟病抗性相关的 3 个主效基因和 5 个防卫基因，仅有与稻瘟病数量抗性相关的防卫基因 (Dehydrin) 和一个稻米 AC 的微效 QTL (qAC-7) 同在第 7 染色体上，但其间的遗传距离为 30 cM，不存在紧密连锁。双向方差分析表明，所有这些基因座位间的互作不

显著 ($P < 0.05$)。

表 2 RIL 群体稻瘟病抗性与其直链淀粉含量的相关性
Table 2 Correlation coefficients between blast resistance and amylose content in RIL population

	稻瘟病质量抗性 Qualitative resistance			稻瘟病数量抗性 Quantitative resistance	
	RFDW-I	POG-6	RFDW-IV	DLA (GD)	DLA (IRRI)
直链淀粉含量 Amylose content	-0.0986	0.0074	0.0621	-0.0825	-0.0378

注：RFDW-I、POG-6 和 RFDW-IV 分别为鉴定 SHZ-2 主效抗性基因 *Pi-GD-1(t)*、*Pi-GD-2(t)* 和 *Pi-GD-3(t)* 的接种菌株，DLA (GD) 和 DLA (IRRI) 分别为广东和非律宾国际水稻研究所温室接种的病叶面积。
Notes: RFDW-I, POG-6 and RFDW-IV: Blast isolates used for the identification of three major genes in SHZ-2. *Pi-GD-1(t)*, *Pi-GD-2(t)* and *Pi-GD-3(t)*, respectively. DLA (GD) and DLA (IRRI): Diseased leaf area assessed in the greenhouses of Guangdong, China and IRRI, the Philippines, respectively.

表 3 高抗和高感稻瘟病的两组 RIL 系直链淀粉含量及其平均值差异显著性 t -检验
Table 3 t -test on the difference of average amylose content between the highly blast-resistant RIL lines and the blast susceptible RIL lines

RI 系 RI line	主效基因 ⁽¹⁾ Major gene			防卫基因 ⁽²⁾ Defense gene					病叶面积 ⁽⁴⁾ DLA (%)		AC 平均 AC Ave. AC (%)	t -检验 ⁽⁵⁾ t P		
	MG1	MG2	MG3	DC1	DC2	DC3	DC4	DC5	GD	IRRI		t	P	
RI-104	+	+	+	+	+	-	+	+	1	0	17.1	19.2	0.52	0.6141
RI-114	+	+	+	+	-	+	+	+	1	0	23.6			
RI-177	+	+	+	+	+	+	+	+	1.5	0	21.1			
RI-178	+	+	+	+	+	+	+	+	1	0	21.2			
RI-217	+	+	+	+	+	+	+	+	3	0	20.5			
RI-286	+	+	+	+	+	+	+	+	1	0	17.6			
RI-289	+	+	+	+	-	+	+	+	8	0	18.4			
RI-53	+	+	+	+	+	+	+	+	1.5	0	14.2			
RI-24	+	-	+	+	+	+	+	+	1.5	6.8	18.9			
RI-58	-	-	-	-	-	-	+	+	57	20.3	19.1			
RI-86	-	-	-	+	-	-	-	-	64	45.6	20.2			
RI-154	-	-	-	-	-	-	-	-	73	32	15.7			
RI-251	-	-	-	+	-	-	-	-	73	35.2	17.5			
RI-274	-	-	-	-	+	-	-	-	82	29	19.5			
RI-283	-	-	+	-	-	-	-	-	73	45	18.2			
RI-176	+	-	-	+	-	+	-	-	40	48.8	19.8			

注：(1) MG1、MG2 和 MG3：稻瘟病主效抗性基因 *Pi-GD-1(t)*、*Pi-GD-2(t)* 和 *Pi-GD-3(t)*；(2) DC1、DC2、DC3、DC4 和 DC5：与稻瘟病数量抗性相关的防卫基因草酸氧化酶、脱水素、病程相关蛋白、几丁质酶和 14-3-3 蛋白；(3) + 表示含有该基因，- 表示不含有该基因；(4) GD 和 IRRI：广东从化和非律宾国际水稻研究所稻瘟病圃试验；(5) t -检验： $P = 0.6141 > 0.05$ ，两组 RIL 系直链淀粉含量平均值差异不显著。
Notes: (1) MG1, MG2 and MG3: Blast resistant genes *Pi-GD-1(t)*, *Pi-GD-2(t)* and *Pi-GD-3(t)*; (2) DC1, DC2, DC3, DC4 and DC5: Defense genes associated with quantitative resistance to blast, oxalate oxidase, dehydrin, PR-1, chitinase 2a and 14-3-3 protein; (3) Gene presence (+), gene absence (-); (4) GD and IRRI: Blast nurseries at Conghua of Guangdong, China and IRRI, the Philippines; (5) t -test $P = 0.6141 > 0.05$, no significant difference for the average amylose content between the two groups of RIL lines.

3 讨论

本研究表明，SHZ-2 稻瘟病持久抗性与其较高的稻米 AC 并没有紧密连锁关系。但为何在过去的育种实践中，以 SHZ-2 为抗源却难以选育到具有理想 AC 的抗病材料？究其原因，一方面与选育目标的确立和亲本的选择有关。从笔者的研究结果来看，AC 在分离群体中呈正态分布，杂交后代的 AC 大部分处于两亲本之间，中间值范围的株系占有最

大的比例(图 1)。因此，要获得理想 AC 的株系，应该选择合适 AC 的亲本。以 SHZ-2 为抗源进行优质、抗病育种时，如果能选用比 SHZ-2 有较低 AC 亲本间 AC 的平均值处于理想范围的亲本进行杂交，在其后代获得理想 AC 的株系的概率将增大。然而，过去在亲本材料选择和品种选育上多只侧重于高产，在一定程度上忽略了 AC。另一方面，从笔者以及他人对稻瘟病抗性和稻米 AC 的分子遗传分析结果来看，具有稻瘟病持久抗性或高抗稻瘟病的水

稻品种其稻瘟病抗性往往是由多个基因(主效基因和 QTL)控制的^[3,11-13],稻米 AC 亦是由主效和微效多基因控制的^[14-15]。这些由微效多基因控制的性状,容易受到环境条件变化的影响。因此,应用常规遗传育种的方法难以在杂交后代中同时对这些性状进行准确的选择。分子标记技术为基因鉴定和选择提供了一种有效的工具,可通过分析分离群体性状与 DNA 标记的分离关系,对控制性状的基因进行鉴定、标记。特别是对多基因控制的数量性状,亦可通过建立性状与标记之间的共分离关系,对控制数量性状的座位(QTL)进行标记,并准确地确定 QTL 的数目、在染色体上的位置以及计算其对表型的贡献。在育种中应用分子标记辅助选择,把过去的表型选择改进为对基因型的选择,从而大大提高选择的准确性和效率。相信随着对 SHZ-2 等重要稻瘟病抗源的抗性基因的鉴定、标记,以及对影响稻米 AC 的基因的鉴定、标记,通过亲本的合理选择和分子标记辅助选择,将有望把水稻这两个重要性状有效地结合起来,促进优质稻的稻瘟病持久抗性育种。

References

- [1] Liu B. Identification of candidate genes associated with durable resistance to blast in rice (*Oryza sativa* L.) and marker-assisted selection. Ph. D Dissertation of South China Agricultural University, 2001
- [2] Zhu X-Y(朱小源), Yang Q-Y(杨祁云), Liu B(刘斌), Zhang S-H(张少红), Wu S-Z(伍尚忠). Study on characters of blast resistance in Sanhuangzhan 2 and its derived varieties. *Guangdong Agric Sci* (广东农业科学), 2003, (2):37-40(in Chinese)
- [3] Liu B, Zhang S H, Zhu X Y, Yang Q Y, Wu S Z, Mei M T, Mauleon R, Leach J, Mew T, Leung H. Candidate defense genes as predictors of quantitative blast resistance in rice. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 2004, 17(10):1146-1152
- [4] Standard of Ministry of Agriculture, P. R. China NY147-88 - Method for Rice Quality Measurement(中华人民共和国农业部颁标准 NY147-88——米质测定方法), Beijing: Chinese Standard Press, 1988. pp 4-6(in Chinese)
- [5] FOSS TECATOR AB. FIAstar 5000 Analyzer User Manual. Hongsan, Sweden: FOSS TECATOR AB, 2000
- [6] Bonman J M, Vergel De Dios T I, Khin M M. Physiologic specialization of *Pyricularia oryzae* in the Philippines. *Plant Dis*, 1986, 70(8):767-769
- [7] Notteghem J L, Chatel M, Dechanet R. In: Symposium sur la resistance du riz a la pyriculariose. Montpellier, France: IRAT-GERDAT, 1981. pp 313-330
- [8] International Network for Genetic Evaluation of Rice (INGER). Standard Evaluation System for Rice, 4th ed. International Rice Research Institute, Manila, the Philippines, 1996
- [9] SAS Institute. SAS/STAT User's Guide Version 6.4. SAS Institute, Inc, Raleigh, NC, 1989
- [10] Lincoln S E, Daly M J, Lander E S. Mapmaker/Exp. 3.0 and Mapmaker/QTL 1.1. Whitehead Institute, Cambridge, MA, 1993
- [11] Chen D H, Nelson R J, Wang G L, Inukai T, Mackill D J, Ronald P C. Characterization of blast resistance in the durable resistant rice cultivar Moroberekan. In: *Advance in Rice Blast Research*. Dordrecht: Kluwer Academic Publisher, 2000, pp 17-27
- [12] Wang G L, Mackill D J, Bonman J M, McCouch S R, Champoux M C, Nelson R J. RFLP mapping of genes conferring complete and partial resistance to blast in a durably resistant rice cultivar. *Genetics*, 1994, 136(4):1421-1434
- [13] Zhuang J Y, Ma W B, Wu J L, Chai R Y, Lu J, Fan Y Y, Jin M Z, Leung H, Zheng K L. Mapping of leaf and neck blast resistance genes with resistance gene analog, RAPD and RFLP in rice. *Euphytica*, 2002, 128(3): 363-370
- [14] Huang Z-L(黄祖六), Tan X-L(谭学林), Traogornung S, Vanavichit A. Mapping QTLs for amylose content of grain with molecular markers in rice (*Oryza sativa* L.). *Acta Agron Sin* (作物学报), 2000, 26(6):777-782(in Chinese with English abstract)
- [15] Bao J-S(包劲松), He P(何平), Li S-G(李仕贵), Xia Y-W(夏英武), Chen Y(陈英), Zhu L-H(朱立煌). Comparative mapping quantitative trait loci controlling the cooking and eating quality of rice (*Oryza sativa* L.). *Sci Agric Sin* (中国农业科学), 2000, 33(5): 8-13(in Chinese with English abstract)