

# 水稻抗恶苗病微效 QTL 的定位

杨长登\* 郭龙彪 李西明 季芝娟 马良勇 钱 前

( 中国水稻研究所 水稻生物学国家重点实验室, 浙江 杭州 310006 ; \* 通讯联系人, E-mail : yangchangdeng@yahoo . com . cn)

## Analysis of QTLs for Resistance to Rice Bakanae Disease

YANG Chang deng\* , GUO Long biao , LI Xi ming , Ji Zhi juan , MA Liang yong , QIAN Qian

( State Key Laboratory of Rice Biology , China National Rice Research Institute , Hangzhou 310006 , China ; \* Corresponding author , E mail : yangchangdeng@yahoo . com . cn)

Abstract : A japonica/indica double haploid ( DH ) population , derived from Chunjiang 06 and TN1 , was used to analyze QTLs for resistance to rice bakanae disease by artificial inoculation at the budding stage . Both of the parents were susceptible to bakanae disease . Two QTLs ( *qB1* and *qB10* ) were detected for resistance to bakanae disease on chromosomes 1 and 10 , respectively , and both of the two QTLs showed additive effects .

Key words : rice ; bakanae disease ; quantitative trait locus ; double haploid population ; disease resistance

摘 要 : 对粳稻品种春江 06 和籼稻品种 TN1 以及由它们构建的加倍单倍体 ( DH ) 群体 , 采用芽期接菌方法接种恶苗病菌 , 进行抗恶苗病微效 QTL 的定位分析。共检测到 2 个 QTL : *qB1* 和 *qB10* , 分别位于第 1 和第 10 染色体上。2 个 QTL 的抗性基因都来自春江 06 , 贡献率相近。

关键词 : 水稻 ; 恶苗病 ; 数量性状座位 ; 加倍单倍体群体 ; 抗病性

中图分类号 : Q943 ; S435 . 111 4<sup>+</sup> 4

文献标识码 : A

文章编号 : 1001-7216(2006)06-0657-03

恶苗病是常见的水稻病害 , 对水稻生产威胁很大。一般可造成水稻减产 10% ~ 20% , 发病严重的可减产 50% 以上。近年来 , 随着粳稻面积的不断扩大和旱育秧技术的推广 , 恶苗病的发生日趋严重。因此 , 如何有效控制恶苗病的发生 , 日益受到育种家和农民的关注。

目前国内外有关恶苗病防治的研究多偏重筛选防治药剂方面 , 但如果长期使用单一药剂或采取低浓度长时间浸种消毒 , 容易形成耐性菌 , 产生抗药性<sup>[1]</sup> ; 而且化学药剂的使用会带来环境污染问题。生物防治方面的研究发现 , 木霉菌对 *Fusarium moniliforme* 有拮抗效果<sup>[2-3]</sup> , 但具体的拮抗机理、防治浓度等还有待进一步探索。

遗传育种学家致力于发掘和利用抗恶苗病的种质资源。黎定军<sup>[4]</sup> 鉴定了 411 个水稻品种对恶苗病的抗性 , 发现仅有 1 个高抗品种 , 12 个抗病品种 , 其余都为感病品种。郑镐燮等<sup>[5]</sup> 对 204 份水稻材料进行了研究 , 结果表明无一高抗材料 , 但材料间抗性差异明显。其他学者也鉴定了部分水稻恶苗病抗源材料 , 发现对恶苗病表现高抗的材料很少<sup>[6-9]</sup>。

迄今为止 , 国内外只对恶苗病菌的分类和赤霉酸的生物合成进行过分子生物学的研究 , 有关水稻对恶苗病的抗性遗传研究和分子定位未见报道。郑镐燮等<sup>[5]</sup> 通过对水稻恶苗病的抗性鉴定发现了部分抗到中抗恶苗病的材料 , 并对其中的部分 F<sub>2</sub> 进行了抗感分离比观察 , 发现抗/感组合的 F<sub>2</sub> 以抗病株数较多 , 但未对 F<sub>1</sub> 的抗病性进行观察 , 并且未对 F<sub>2</sub> 的抗感结果进行系统的总结 , 因此不能明确恶苗病抗性的遗传规律。

我们对粳稻品种春江 06 和籼稻品种 TN1 用恶苗病菌接种 , 发现幼苗都有一定的徒长 , 与对照相比 , 苗高增长显著 , 且在接种 6 d 后春江 06 和 TN1 的徒长长度差异较大。

因此 , 我们试着利用这两个亲本及在此基础上构建的 DH 群体 , 室内接种恶苗病菌 , 调查它们的徒长长度 , 通过 QTL 分析 , 研究恶苗病抗性微效基因的作用和分子遗传基础 , 以探讨其育种应用价值。

## 1 材料与方 法

### 1.1 水稻材料

采用粳稻品种春江 06 和籼稻品种 TN1 及其构建的加倍单倍体 ( DH ) 群体 120 个株系进行研究。

### 1.2 恶苗病菌接种与鉴定

#### 1.2.1 恶苗病菌的采集和分离

2004 年 7 月在中国水稻研究所富阳试验基地采集田间自然发生恶苗病的病苗。将发病苗带回实验室 , 从病苗基部分离获得恶苗病菌 , 以 PDA 培养基培养和低温保存。

在人工接种恶苗病菌前 5 d , 恶苗病菌用 PDA 培养基培养 , 用蒸馏水洗下恶苗病菌孢子 , 经无菌纱布过滤后 , 利用分光光度计 , 在 560 nm 波长下 , 稀释配成透光率  $T=40$  的溶液 , 即恶苗病菌孢子浓度约为 8000 个/μL。

#### 1.2.2 催芽和接种

试验于 2005 年 6 ~ 10 月进行。先将水稻种子放在玻璃瓶中 , 用一定浓度的浸种灵 ( 10% 二硫氰基甲烷乳油 ) 30 下浸种 48 h ; 洗去浸种灵 , 32 下催芽约 24 h , 芽长达到约 1

收稿日期 : 2006-01-05 ; 修改稿收到日期 : 2006-08-07。

基金项目 : 浙江省自然科学基金重点资助项目 ( Z304422 ) ; 浙江省水稻育种重大专项资助项目 ( 2004C12020-4 ) ; 浙江省农业科研一般资助项目 ( 2005C32002 )。

第一作者简介 : 杨长登 ( 1962 - ) , 男 , 研究员。

粒谷长;选择芽长整齐一致的芽谷,分成2份,每份10粒,分放2个玻璃瓶中,分别倒入10 mL的恶苗病菌孢子液和10 mL的蒸馏水,设3个重复,30℃下振荡培养24 h后倒出恶苗病菌孢子液和蒸馏水,保湿培养于30℃的培养箱中,5~7 d后于1叶1心时考查苗高。从苗基部至最长叶叶尖的距离为苗高。处理苗的苗高减去对照苗的苗高所得值即为徒长长度,得到重复的平均徒长长度,用于QTL分析。

## 1.2 QTL分析

采用区间作图法,用Mapmaker/QTL软件对接种恶苗病菌引起的徒长长度进行QTL定位分析。用LOD值2.0作为阈值来判断QTL的存在与否,若标记区间LOD>2.0,则认为该区间LOD值最高处所对应的位点即为该性状的1个QTL。同时计算每个QTL对各性状的贡献率和加性效应,QTL的命名原则遵循McCouch等<sup>[10]</sup>。

## 2 结果与分析

### 2.1 DH群体及双亲的抗病性表现

粳稻品种春江06和籼稻品种TN1用恶苗病菌接种后,幼苗都表现出徒长,与对照相比,苗高增长差异显著(表1,图1-A);且在接种后6 d,春江06和TN1的徒长长度差异较大(图1-B,C)。

粳稻春江06和籼稻TN1及其120个DH株系的抗病性分布如图2所示。春江06表现为感病,平均徒长长度为2.567 cm;TN1表现为高度感病,平均徒长长度为9.067 cm。DH群体的徒长长度表现为从0.367~11.467 cm的连续正态分布,平均值为4.967 cm,双向的超亲分离极其明显,并且分布区间广泛,表现出数量性状的遗传特点,符合QTL区间作图的需要。

### 2.2 QTL定位

利用该群体构建的200多个标记位点的SSR连锁图进行QTL定位分析。表2和图3列出了对120个DH群体株

系恶苗病抗性的QTL定位结果。在第1染色体和第10染色体上各检测到1个QTL,贡献率分别为13.4%和13.3%,两者贡献率相近。从表2可知,2个QTL的加性效应均为正,表明这2个位点都是来自春江06的等位基因,增强了抗性,能使徒长长度缩短1.5 cm。没有检测到来自TN1等位基因的QTL。

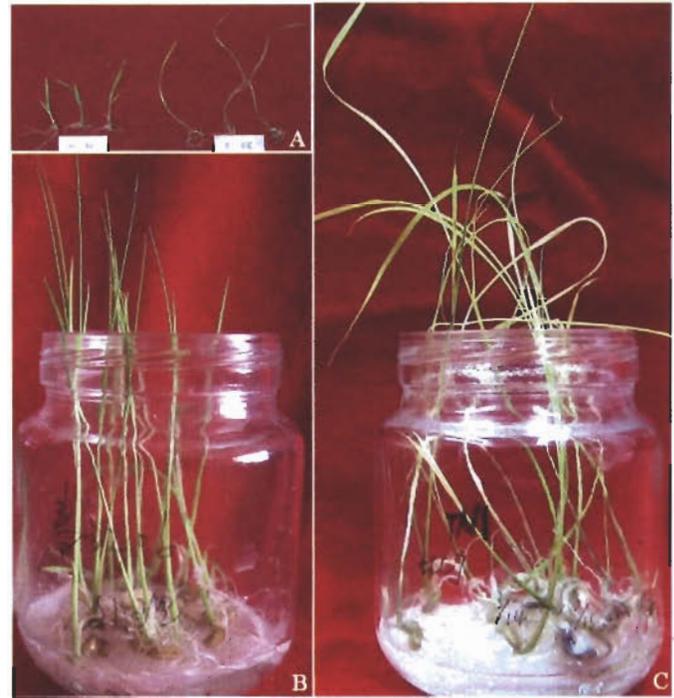


图1 亲本恶苗病菌接种后苗高差异

Fig. 1. Difference of seedling length between the two parents after inoculation *F. moniliforme*.

A—TN1接种恶苗病菌后苗高变化,左为对照,右为处理;B—春江06接种恶苗病菌6 d后幼苗;C—TN1接种恶苗病菌6 d后幼苗。

A, The difference of seedling length for TN1 between control and treatment, the left was control and the right was treatment; B, C, Seedlings of Chunjiang 06 and TN1 at 6 d after the inoculation.

表1 亲本接种恶苗病菌后苗高差异

Table 1. Seedling length of the two parents after inoculation of *F. moniliforme*.

品种 Variety	处理 Treatment	平均苗高 Average seedling length/cm
春江06 Chunjiang 06	处理 Treatment	7.598 aA
	CK	5.031 bB
TN1	处理 Treatment	14.967 aA
	CK	5.900 bB

不同字母表示在5%或1%水平差异显著。

Data followed by the different letters are significantly different at 5% or 1% levels.

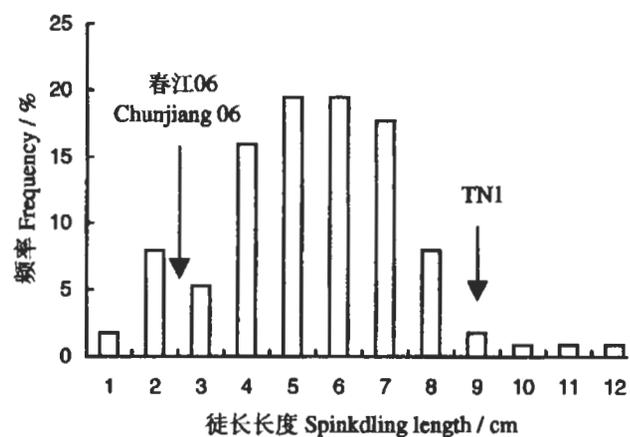


图2 春江06/TN1的DH群体及其双亲对恶苗病的抗性

Fig. 2. Reaction of resistance of Chunjiang 06/TN1 DH population and two parents to bakanae disease.

表2 水稻DH群体恶苗病的QTL定位

Table 2. Biometrical parameters of QTLs for rice bakanae disease in Chunjiang 06/TN1 DH population.

基因座 Locus	染色体 Chromosome	标记区间 Marker interval	LOD值 LOD score	贡献率 Variance explained/%	加性效应 Additive effect
<i>qB1</i>	1	RM7180—RM486	2.32	13.4	1.4771
<i>qB10</i>	10	RM1108—RM304	2.50	13.3	1.4505

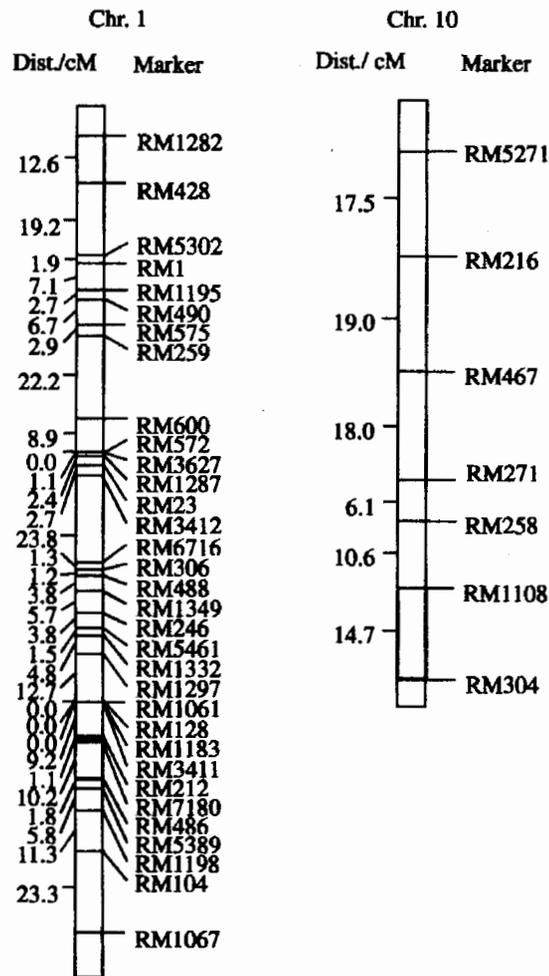


图3 春江06/TN1 DH群体恶苗病抗性的QTL图谱  
Fig. 3. QTL map of resistance to bakanae disease in the Chunjiang 06/TN1 DH population.

### 3 讨论

水稻恶苗病菌的无性态为半知菌串珠镰孢 (*Fusarium moniliforme* Sheld.)；有性态为子囊菌藤仓赤霉 [*Gibberella fujikuroi* (Saw.) Wollener]。恶苗病菌在 30~35℃ 时繁殖最快，20~25℃ 时虽能繁殖，但繁殖速率缓慢，到 40℃ 时病菌显然受到抑制。恶苗病菌侵害寄主以 35℃ 最为适宜，诱致徒长以 31℃ 时最为显著，在 25℃ 下病苗大为减少。Jeff<sup>[11]</sup> 的研究指出，低温阻止了病害的发生，而较高温度则有利于病害症状的出现。典型的症状一般发生在移栽后 25~30 d 内。因此，根据恶苗病菌的特性，需要探索一种适合恶苗病菌发病的接种方法，便于品种抗病性的研究和 QTL 的定位分析。

在现有抗恶苗病的研究中，已经发展了许多接种方法<sup>[8, 12]</sup>。根据接种时期不同，有芽期浸菌接种法、立针期接种法、芽期加立针期接种法、穗期接种法等；根据接种发生不同，有铺病节诱发法、自然诱发法、喷雾接种法等。Ahmed 等<sup>[13]</sup> 采用试管接种技术，在不同的恶苗病菌浓度下，根据芽伸长的长度不同，来鉴定品种的恶苗病抗性。吕彬<sup>[7]</sup> 初步把恶苗病抗性分为 0~9 级，其中高感 (HS) 级别苗期发病率为 30.1% 以上，成株期发病率为 50.1% 以上，而且苗期的抗性与成株期的抗性存在一定的相关性 ( $r=0.4321^{**}$ )<sup>[5-6]</sup>。本实验室研究发现 (未发表资料)，经恶苗病菌接种株高增长显著的秧苗移栽后死亡率均在 50% 以上。说明可以通过苗期接种恶苗病菌，进行秧苗徒生长度的显著性测验来鉴别水稻的抗恶苗病的水平。

水稻恶苗病菌 (赤霉菌) 在新陈代谢过程中产生赤霉素、镰刀菌酸、去氢镰刀菌酸、赤霉酸和脉镰刀菌素等物质，其中最主要的是环状醇类结构的赤霉素 GA<sub>3</sub>。GA<sub>3</sub> 是一种重要的植物生长物质 (植物激素)，它在植物生长的许多过程中具有不容忽视的作用<sup>[14]</sup>；但在恶苗病发病症状中，GA<sub>3</sub> 以及其他激素刺激了水稻的不正常生长，从而导致稻苗的徒长甚至死亡。因为稻苗在赤霉菌分泌的赤霉素刺激下，细胞快速伸长，细胞间隙增大，导致恶苗病菌分泌的其他毒性物质如镰刀菌酸和去氢镰刀菌酸<sup>[11, 15]</sup> 乘虚而入并产生毒害，抑制秧苗生长，最终导致秧苗移栽后死亡。恶苗病菌产生的 GA<sub>3</sub> 还可以诱导 α-淀粉酶重新合成<sup>[16]</sup>，这主要是由于 GA<sub>3</sub> 增加细胞的 α-淀粉酶 mRNA 数量，也即是增加特异性 α-淀粉酶基因的转录速率。在本研究中，我们利用恶苗病发病过程中 GA<sub>3</sub> 含量过多导致幼苗徒长的表型症状，进行 QTL 分析，探索挖掘抗恶苗病资源的可能性。共检测到 2 个抗恶苗病的 QTL，分别位于第 1 和第 10 染色体，2 个 QTL 都来自母本春江 06。

随着早育秧技术的推广，恶苗病作为水稻病害之一，正引起越来越多研究者的重视。本研究利用感恶苗病症状差异显著的 DH 群体，定位出 2 个 QTL，虽然贡献率都只有 13%，但对于恶苗病抗性遗传研究仍具有一定的意义。

### 参考文献：

- [1] 韩润亭, 刘洪涛. 45% 三福可湿性粉剂防治水稻恶苗病试验. 吉林农业科学, 1995(3): 46-50.
- [2] Rosales A M, Mew T W. Suppression of *Fusarium moniliforme* in rice by rice-associated antagonistic bacteria. *Plant Dis*, 1997, 81(1): 49-52.
- [3] 赵 蕾. 木霉菌的生物防治作用及其应用. 生态农业研究, 1999, 7(1): 66-68.
- [4] 黎定军. 水稻对恶苗病的抗性与病原菌致病性的研究. 植物病理学报, 1993, 23(4): 315-319.
- [5] 郑锦雯, 吕 彬, 吴润植. 水稻恶苗病抗病性筛选方法的初步研究. 植物保护学报, 1993, 20(4): 289-293.
- [6] 李 勇, 林佩力, 李 静, 等. 水稻品种抗恶苗病鉴定研究初报. 黑龙江农业科学, 1994(1): 29-31.
- [7] 吕 彬. 水稻种质资源对水稻恶苗病的抗性鉴定初报. 植物保护, 1994(3): 20-21.
- [8] 吕 彬. 水稻抗恶苗病的鉴定方法研究. 作物学报, 1996, 22(5): 629-633.
- [9] S urek H, G um ustekin H. Research activities on controlling rice bakanae and foot rot disease (*Fusarium moniliforme*) in Turkey. *Cahiers Options Méditerranéennes*, 1995, 8: 27-30.
- [10] McCouch S R, Cho Y G, Yano M, et al. Report on QTL nomenclature. *Rice Genet Newsl*, 1997, 14: 11-14.
- [11] Jeff O. New fungal threat: Foolish seedling disease pops up in California. *Rice J*, 2001, 104(4): 20-21.
- [12] 张淑平, 潘 勋, 张晓东. 河北省稻恶苗病菌及品种抗病性测定研究初报. 河北农业科学, 1994(1): 18-20.
- [13] Ahmed H U, Mia M A T, Miah S A, et al. Standardized test inoculation for bakanae disease (Bak). *IRRN*, 1986, 11(2): 21-22.
- [14] 余叔文, 汤章城. 植物生理与分子生物学. 2 版. 北京: 科学出版社, 1999.
- [15] 刘祖同, 徐海楼. 水稻恶苗病菌发酵赤霉素的研究. 清华大学学报: 自然科学版, 1992, 32(3): 60-65.
- [16] 李 玮, 朱广康. GA 调控 α-淀粉酶基因表达的分子生物学. 植物生理学通讯, 1994, 30(2): 147-153.