

水稻黑条矮缩病抗性 QTL 分析

潘存红^{1,2} 李爱宏^{2,**} 陈宗祥¹ 吴林波¹ 戴正元² 张洪熙² 黄年生²
陈夕军¹ 张亚芳¹ 左示敏¹ 潘学彪^{1,*}

¹ 扬州大学江苏省作物遗传生理重点实验室 / 植物功能基因组学教育部重点实验室, 江苏扬州 225009; ² 江苏里下河地区农业科学研究所 / 国家水稻改良中心南京分中心, 江苏扬州 225007

摘要: 利用珍汕 97B/明恢 63 的重组自交系群体, 采用自然发病鉴定的方法, 以穴发病率为表型值, 对各株系进行黑条矮缩病抗性鉴定。群体的穴发病率偏向于抗病亲本, 且呈连续性分布, 表明水稻黑条矮缩病抗性受数量性状基因控制。利用 WinQTLcart 2.5 软件对黑条矮缩病抗性 QTL 进行分析, 共检测到 6 个 QTL, 其中第 6、11 染色体上各有 2 个, 第 7、9 染色体各有 1 个。第 6、7、9 染色体上的 4 个 QTL 在两个地点都能检测到, 是稳定表达的 QTL, 尤其是第 6 染色体上的 2 个 QTL, LOD 值分别为 12.09 和 9.77, 贡献率分别为 20.20% 和 18.68%, 是主效 QTL, 能在分子标记辅助选择育种中加以利用。
关键词: 水稻黑条矮缩病; 重组自交系群体; QTL 分析

Detection of QTL for Resistance to Rice Black-Streaked Dwarf Viral Disease

PAN Cun-Hong^{1,2}, LI Ai-Hong^{2,**}, CHEN Zong-Xiang¹, WU Lin-Bo¹, DAI Zheng-Yuan², ZHANG Hong-Xi², HUANG Nian-Sheng², CHEN Xi-Jun¹, ZHANG Ya-Fang¹, ZUO Shi-Min¹, and PAN Xue-Biao^{1,*}

¹ Key Laboratory of Plant Functional Genomics of Ministry of Education / Key Laboratory of Crop Genetics and Physiology of Jiangsu Province, Yangzhou University, Yangzhou 225009, China; ² Lixiahe Agricultural Research Institute of Jiangsu Province / Nanjing Subcenter of National Rice Improvement Center, Yangzhou 225007, China

Abstract: The rice black-streaked dwarf viral disease (RBSDV), transmitted by the planthopper *Laodelphax striatellus* Fallèn, was one of the most serious diseases in rice in south China. Breeding of RBSDV resistance variety using marker-assisted selection was effective measure to reduce the disease damage. For achieving this aim, QTL mapping of resistance to RBSDV was studied using a recombinant inbred line (RIL) population from the cross between Zhenshan 97B and Minghui 63. Reactions of 242 RILs to RBSDV were investigated by natural infection method in Agricultural College of Yangzhou University and Lixiahe Agricultural Research Institute, and scored by the incidence of RBSDV. The trait of RBSDV incidence was normally distributed and marked bias towards the resistant parent, which implied that they were controlled by quantitative trait loci. Six QTLs for resistance to RBSDV were detected by WinQTLcart 2.5 software. Two adjacent QTLs were mapped on chromosome 6, two on chromosome 11, one on chromosomes 7 and 9, respectively. Four QTLs on chromosomes 6, 7, and 9 could be detected in two locations, and were stably expressed across the two environments. There had not been any reports about location of QTL for resistance of rice stripe virus and planthopper, which suggested that six QTLs in this study were really resistant to RBSDV. Two QTLs on chromosome 6 were with main effect, and their contributions to the total variation were 20.20% and 18.68% with LOD scores of 12.09 and 9.77 respectively, moreover, they had high value for study on genetics of RBSDV and should be useful in marker-assisted selection for resistance to RBSDV.

Keywords: Rice black-streaked dwarf viral disease; Recombinant inbred line population; QTL analysis

水稻黑条矮缩病(rice black-streaked dwarf viral disease, RBSDV)是一种以灰飞虱为主要传播介体的病毒病^[1-2]。随着耕作制度和栽培方式的变化、冬季气候变暖、以及感病品种的大面积推广,黑条矮缩病在江苏、浙江大规模发生,危害逐年加重^[3-6]。目前,对黑条矮缩病的防治主要使用农药灭杀毒源寄主灰飞虱,但由于介体昆虫种群数量大、耐药性高、传毒持久,导致防治效果不佳。

本研究由江苏省自然科学基金项目(BK2008202)和江苏里下河地区农业科学研究所基金项目(200801)资助。

* 通讯作者(Corresponding author): 潘学彪, E-mail: shuidao@yzu.edu.cn; Tel: 0514-87972136

第一作者联系方式: E-mail: pancunhong@163.com **共同第一作者

Received(收稿日期): 2009-03-11; Accepted(接受日期): 2009-06-25.

培育抗病品种是防治各类病害最为经济、有效的手段。筛选、发掘和创新抗病种质是开展抗病育种的前提和基础,而抗性基因定位(尤其是精细定位)和克隆,则为利用标记辅助选择等分子育种手段,高效培育抗病品种提供了全新和有利工具。但迄今,对水稻黑条矮缩病抗性种质的筛选和抗性遗传基本特性还鲜有研究,更没有关于水稻黑条矮缩病抗性基因/QTL定位的报道。本研究组对 175 份水稻种质进行自然诱发鉴定,结果发现珍汕 97A 等三系早籼稻不育系基本为感或高感型,明恢 63 等中籼稻恢复系为相对抗病型^[7]。本研究旨在调查各株系对黑条矮缩病的抗性表现,进行水稻黑条矮缩病抗性QTL检测和遗传效应分析,以促进水稻黑条矮缩病的抗性遗传育种应用研究。

1 材料与方法

1.1 供试材料

珍汕 97B/明恢 63 的重组自交系群体共 242 个株系,分子连锁图谱由华中农业大学邢永忠^[8]教授提供,含 221 个分子标记,覆盖水稻基因组的 1 796 cM,标记间的平均距离为 8.7 cM,符合QTL定位的要求。

1.2 试验方法

1.2.1 试验材料田间种植 将材料分别种植于江苏里下河地区农科所万福基地试验田(以下简称农科所)和扬州大学农学院试验田(以下简称农院),各两次重复。5 月 10 日播种,6 月 5 日至 6 日移栽,每株系栽插 100 穴,单苗栽插,行株距为 13.3 cm × 25.0 cm,常规肥水管理,移栽前不施农药。

1.2.2 黑条矮缩病诱发 用盘拍法调查灰飞虱虫口密度,将 33 cm×45 cm涂有肥皂液的白瓷盘,对准秧苗基部,轻拍植株使灰飞虱拍落于盘中。分别于 2008 年 5 月 15 日和 22 日 9:00 左右在农学院和农科所试验田进行调查,每一材料类型田块对角线定 5 点取样,每点拍 0.22 m²,记载灰飞虱数量。结果显示试验田块秧苗期的灰飞虱分别达到 2.71×10⁷和 3.01×10⁷头 hm⁻²,虫口基数巨大。参照吕永平等^[9]方法随机对 233 头灰飞虱进行水稻黑条矮缩病毒的RT-PCR检测,黑条矮缩病毒的携毒率平均分别达到 17.8%和 19.5%,具备了足量毒源。移栽前不施农药。

1.2.3 数据统计与分析 齐穗后,参照李爱宏等^[7]方法对各株系进行黑条矮缩病穴发病率调查。利用 WinQTLcart 2.5 软件^[10],采用复合区间作图法(composite interval mapping, CM)定位QTL,将LOD值 2.5 作为阈值,若标记区间LOD>2.5,则认为区间内LOD最大处对应的位点存在一个抗黑条矮缩病QTL。

2 结果与分析

2.1 重组自交系群体对黑条矮缩病的抗性表现

用黑条矮缩病的穴发病率来表示发病情况。亲本明恢 63 和珍汕 97B 的穴发病率分别为 6.2%、39.5%,F₁的穴发病率为 11.9%,偏向于抗病亲本。珍汕 97B/明恢 63 重组自交系群体在两个地点(分别为农科所和农学院)的黑条矮缩病抗性分布频率见图 1,群体的穴发病率在 2.0%~49.6%的范围内,呈连续性分布,偏向于抗病亲本。两个地点各小区的发病率分别用该地点两个重复穴发病率的平均数表示,农科所种植群体穴发病率高于 15%的株系数比农学院多,说明在这个地点的黑条矮缩病发病更严重。穴发病率连续性分布说明群体对黑条矮缩病的抗性由多基因控制。方差分析表明,重组自交系在两个地点的发病情况存在显著差异,家系与地点存在极显著的交互,这可能是两地点灰飞虱数量差异引起的(表 1)。

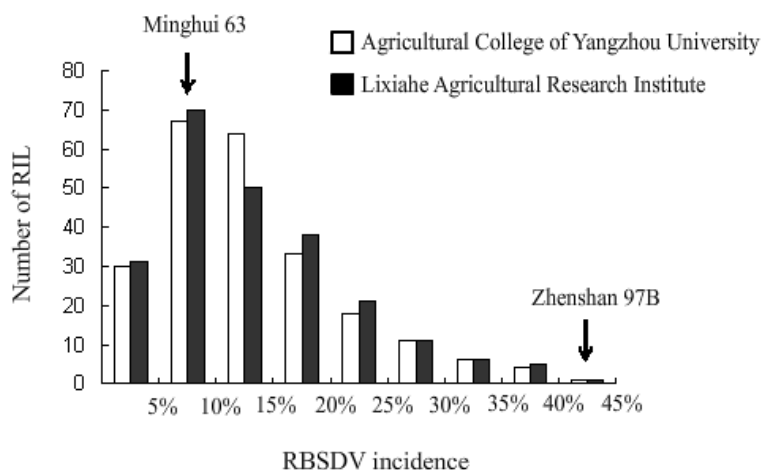


图 1 珍汕 97B/明恢 63 重组自交系群体穴发病率次数分布图

Fig. 1 Frequency distribution of the RBSDV incidence in Zhenshan 97B/Minghui 63 RIL population

表 1 重组自交系群体在两个地点发病情况的方差分析

Table 1 ANOVA Analysis of RBSDV resistance of RIL population in two locations

变异来源 Source of variation	自由度 <i>df</i>	平方和 <i>SS</i>	均方 <i>MS</i>	<i>F</i> 值 <i>F</i> -value	<i>P</i> 值 <i>P</i> -value
家系 Line	241	61697.08	256.00	8.61	<0.001
地点 Location	1	142.50	142.50	4.79	0.029
家系×地点 Line×location	241	13602.84	56.44	1.90	<0.001
误差 Error	484	14397.51	29.75		
总变异 Total	967	89839.93			

2.2 黑条矮缩病抗性 QTL 检测

用 WinQTLcart 2.5 软件分析抗黑条矮缩病的 QTL。农学院地点在第 6、7、9 染色体上共检测到 4 个 QTL (图 2)，其中第 6 染色体上有 2 个相邻的 QTL，各 QTL 的 LOD 值分别为 12.09、9.77、5.51 和 2.93，贡献率分别为 20.20%、18.68%、10.25% 和 4.02%，这些位点的抗性等位基因来自明恢 63 (表 1)；农科所地点在第 6、7、9、11 染色体上共检测到 6 个 QTL，其中在第 6 和 11 染色体上都有 2 个 QTL (图 2)，其 LOD 值分别为 9.33、8.68、4.53、10.94、3.14 和 4.65，贡献率分别为 10.04%、10.10%、4.58%、13.26%、3.28% 和 5.22%，其抗性等位基因来自明恢 63 (表 2)。

两个地点在第 6、7、9 染色体上检测到的 4 个 QTL 的位置相同，其中第 6 染色体上 2 个 QTL 的 LOD 值和贡献率较大，为稳定表达的主效 QTL。农科所地点在第 9 染色体上 QTL 的 LOD 值和贡献率比农学院地点大，但定位区间略大一些；在农科所地点还检测到位于第 11 染色体上的抗性 QTL，如将 LOD 阈值降至 2.0，在农学院地点同样也可检测到该位点。

表 2 两个地点检测到的黑条矮缩病的抗性 QTL 及统计特征

Table 2 Chromosome locations and characteristics of QTLs for RBSDV resistance in two locations

试验地点 Location	标记区间 Marker interval	QTL 位置 QTL position (cM)	置信区间 C.I. (cM)	染色体 Chromosome	LOD 值 LOD value	加性效应 Additive effect	贡献率 Variance explained (%)
扬州大学农学院 Agricultural College of Yangzhou University	R2869–R3139	2.01	0–6.2	6	12.09	3.65	20.20
	R3139–Waxy	10.41	6.2–12.9	6	9.77	3.51	18.68
	RG128–RG678	34.31	4.3–52.1	7	5.51	2.6	10.25
	RM242–RG667	80.61	74.6–82.6	9	2.93	1.63	4.02
里下河地区农科所 Lixiahe Agricultural Research Institute	R2869–R3139	2.21	0–6.2	6	9.33	3.01	10.04
	R3139–Waxy	10.41	6.2–12.9	6	8.68	3.02	10.10
	RG128–C1023	38.21	4.3–40.2	7	4.53	2.03	4.58
	RM257–RM215	80.61	67.8–89.8	9	10.94	3.46	13.26
	Clone1–Y6854L	12.61	9.9–13.6	11	3.14	1.72	3.28
	L1044–Clone2	24.31	17.9–27.7	11	4.65	2.17	5.22

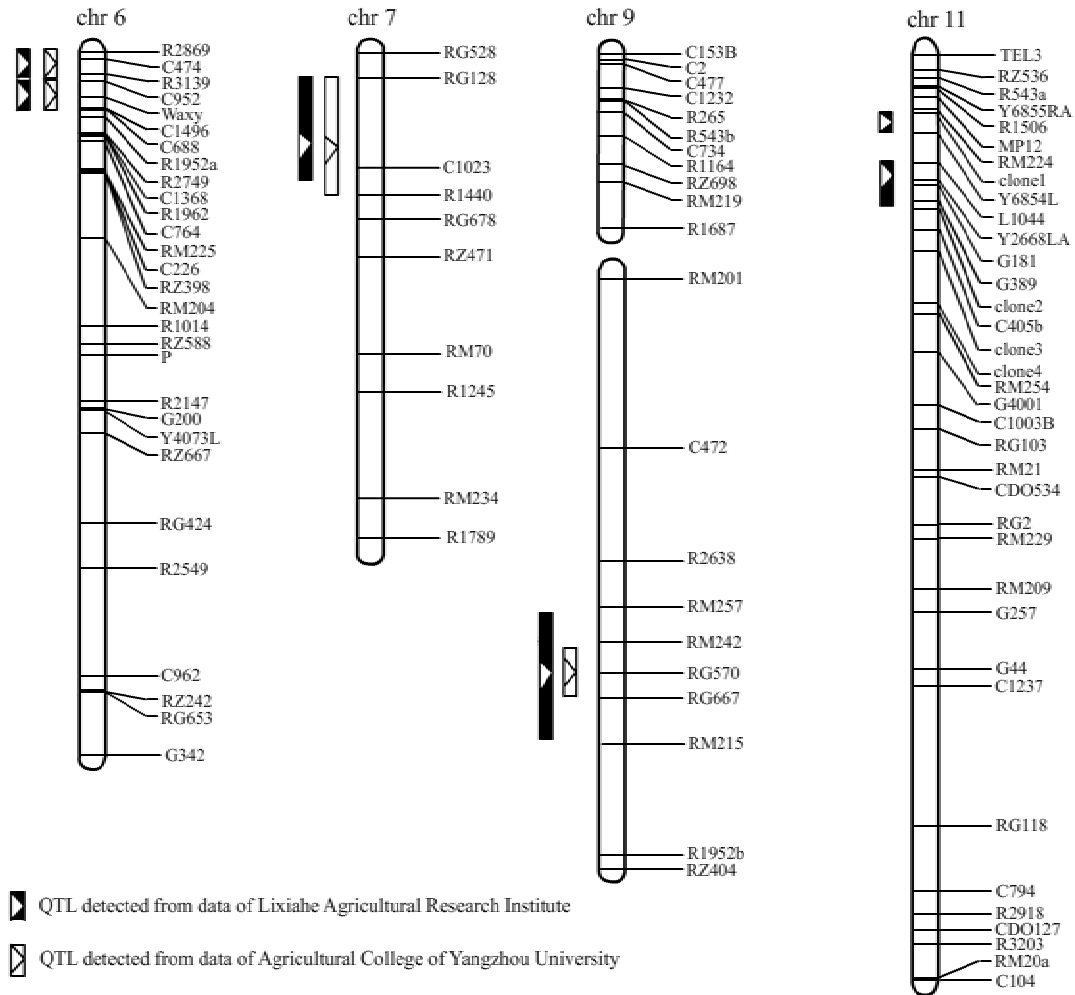


图 2 珍汕 97B/明恢 63 重组自交系群体抗黑条矮缩病 QTL 在染色体上的分布

Fig. 2 Linkage maps showing the location of QTL for resistance to RBSDV in Zhenshan 97B/Minghui 63 RIL population

第 9 染色体分子标记连锁图由两个连锁群构成。

Molecular marker linkage map was made up of two linkage groups in chromosome 9.

3 讨论

本研究两个地点检测出的 QTL 中,有 4 个位点的区间一致,说明抗性 QTL 检测结果的可靠性。其中,在第 6 染色体两个相邻的区间定位到 2 个 QTL, LOD 值和贡献率都较高,表明这 2 个 QTL 的效应较大,

但由于是相邻区间,还需要构建定位区间的次级分离群体来进一步证实是 2 个 QTL,还是一个效应较大的 QTL 在起作用。农学院点在第 9 染色体上定位 QTL 的 LOD 值和贡献率分别为 2.93 和 4.02%,而在农科所点分别为 10.94 和 13.26%,这可能是由于农科所点黑条矮缩病发病更加严重,两个地点定位 QTL 区间的一致性也说明这个 QTL 是稳定表达的。只在农科所点定位到的第 11 染色体两个相邻的 QTL,可能也是因此地点发病严重所致。

水稻黑条矮缩病是以刺吸类昆虫灰飞虱作为媒介传播的,最近,对这类昆虫的抗性基因/QTL 的定位已取得了一些进展。孙黛珍等^[11]用重组自交系群体 Nipponbare/Kasalath//Nipponbare 在第 3 染色体上 R1618~C595 和 R2170~C1135 标记区间内各定位到 1 个灰飞虱抗性 QTL,另有其他研究者在此区间定位到黑尾叶蝉和白背飞虱的抗性 QTL^[12-14],说明此区段存在刺吸类害虫的抗性基因簇;Rahman 等^[15]在第 4 染色体的短臂 STS 标记 B4 和 S4019 间定位到抗褐飞虱基因 *BPH20(t)*;Kawaguchi 等^[16]在第 6 染色体短臂定位到抗褐飞虱基因 *bph4*, McCouch 等^[17]在第 6 染色体的长臂 RFLP 标记 RG146 和 RG445 之间定位到抗白背飞虱基因 *Wbph1*;另外在第 11 染色体的长臂标记 C1172 附近也存在对二点黑尾叶蝉、褐飞虱等刺吸类害虫的抗性基因簇^[14,18]。本研究定位到的 6 个黑条矮缩病抗性 QTL 的标记区间内没有刺吸类害虫抗性 QTL 定位的报道,表明这 6 个 QTL 可能均是品种本身的抗病性 QTL,而非抗虫性(如灰飞虱)QTL。

水稻条纹叶枯病与黑条矮缩病均为病毒病,其传毒介体昆虫均是灰飞虱,关于抗条纹叶枯病的 QTL 已有较多报道, Hayano 等^[19]将条纹叶枯病抗性基因 *Stb-bi* 定位在第 11 染色体两个重叠克隆 220B5 和 123A6 之间 286 kb 的区间内;丁秀兰等^[20]用 kinmaze/DV85 重组自交系群体定位到 3 个抗性 QTL,分别位于第 1、7、11 染色体;Maeda 等^[21]在陆稻 Kanto72 中检测到两个抗性 QTL,位于第 2 和 11 染色体;孙黛珍等^[22]用窄叶青 8 号/武育粳 3 号 F₂ 群体,在第 1、5、7 染色体上定位 3 个抗性 QTL。丁秀兰等^[20]和孙黛珍等^[22]在第 7 染色体定位的条纹叶枯病抗性 QTL 位于长臂上,而本研究定位的黑条矮缩病抗性 QTL 位于短臂上;以上不同研究者在第 11 染色体定位的条纹叶枯病抗性 QTL 都与基因 *Stb-bi* 的定位区间一致,与本研究在第 11 染色体定位的黑条矮缩病抗性 QTL 区间不一致,这说明水稻条纹叶枯病与黑条矮缩病是独立遗传的,本研究定位的 6 个抗性 QTL 是黑条矮缩病抗性 QTL。

迄今为止,还没有水稻黑条矮缩病抗性基因/QTL 定位的报道,本研究结果为首次报道。为进一步验证和精细定位本研究检测到的抗黑条矮缩病 QTL,并进一步分析单个 QTL 的遗传效应,本研究组构建了各个 QTL 区间的次级分离群体。同时,由于珍汕 97B 和明恢 63 均为籼稻,其亲缘关系相对较近,可能不易进一步发展分子标记用于精细定位,本研究组还以一个高度感病的常规粳稻品种“淮稻 5 号”,与明恢 63 构建了回交导入系群体,根据定位区间来做下一步的回交工作,为目标基因的精细定位和克隆做准备。

4 结论

定位到 6 个 QTL,分布于第 6、7、9、11 染色体,抗性等位基因都来自抗性亲本明恢 63,其中在第 6、7、9 染色体上的 4 个 QTL 在两个地点都能检测到。在第 6 染色体的 2 个 QTL 效应较大,为稳定表达的主效 QTL。

致谢: 本研究所用的珍汕 97B/明恢 63 重组自交系群体和分子标记连锁图由华中农业大学张启发院士和邢永忠教授提供,在此表示感谢。

References

- [1] Milne R G, Lovisolo O. Maize rough dwarf and related viruses. *Adv Virus Res*, 1977, 21: 267-341
- [2] Azuhata F, Uyeda I, Kimura I, Shikata E. Close similarity between genome structures of rice black-streaked dwarf and maize rough dwarf viruses. *J General Virology*, 1993, 74: 1227-1232
- [3] Ding X-T(丁新天), Xu J-H(徐加湖), Li D-X(黎东兴), Ding L-L(丁丽玲), Chen Y-T(陈宇腾), Zhang J-Y(章锦杨), Qiu C-H(邱财富). The prevalent reason of rice black-streaked dwarf viral disease and controlling approach in the south mountain of Zhejiang. *Chin Agric Sci Bull* (中国农学通报), 2003, 19(4): 113-116 (in Chinese)

- [4] Chen S-X(陈声祥), Wu H-L(吴惠玲), Liao X-G(廖璇刚), Lü Y-P(吕永平), Shen S-F(沈升法), Wang O-F(王藕芳), Jin M-S(金梅松). The prevalent reason of rice black-streaked dwarf viral disease in the middle of Zhejiang. *Zhejiang Agric Sci* (浙江农业科学), 2000, (6): 287–289 (in Chinese)
- [5] Qiu G-C(仇广灿), Cheng X-S(成晓松), Hu J(胡键), Wu C-Q(吴彩全), Cao X-L(曹晓利). Epidemics characteristic of rice black-streaked dwarf viral disease and its controlling method. *Barley & Cereal Sci* (大麦与谷类科学), 2008, 3(2): 51–53 (in Chinese)
- [6] Wang H-D(王华弟), Zhu Z-R(祝增荣), Chen J-P(陈剑平), Wang E-G(汪恩国), Li B-F(李宝福). Epidemics, monitoring and key control techniques of the rice black-streaked dwarf viral disease. *Acta Agric Zhejiangensis* (浙江农业学报), 2007, 19(3): 141–146 (in Chinese with English abstract)
- [7] Li A-H(李爱宏), Dai Z-Y(戴正元), Ji H-J(季红娟), Zhang X-X(张小祥), Li Y-H(李育红), Pan C-H(潘存红), Zhang H-X(张洪熙), Pan X-B(潘学彪). Preliminary analysis on resistance of rice black-streaked dwarf viral disease for germplasm with different gene-types. *J Yangzhou Univ* (Agric & Life Sci Edn)(扬州大学学报·农业与生命科学版), 2008, 29(3): 18–22(in Chinese with English abstract)
- [8] Xing Y-Z(邢永忠), Tan Y-F(谈移芳), Xu G-C(徐才国), Hua J-P(华金平), Sun X-L(孙新立). Mapping quantitative trait loci for grain appearance traits of rice using a recombinant inbred line population. *Acta Bot Sin* (植物学报), 2001, 43(8): 840–845 (in Chinese with English abstract)
- [9] Lü Y-P(吕永平), Lei J-L(雷娟利), Jin D-D(金登迪), Chen S-X(陈声祥). Detect RBSDV with RT-PCR. *Acta Agric Zhejiangensis* (浙江农业学报), 2002, 14(2): 117–119 (in Chinese)
- [10] Wang S C, Zeng Z B. Windows QTL Cartographer 2.0 Department of Statistics. North Carolina State University, Raleigh, NC, 2001–2004. <http://statgen.ncsu.edu/qtlcart/WQTLCart.html>
- [11] Sun D Z, Jiang L, Liu S J, Zhang Y X, Huang P H, Cheng X N, Zhai H Q, Wan J M. Detection of QTLs for resistance to rice stripe virus and small brown planthopper in rice (*Oryza sativa* L.). *Acta Agron Sin* (作物学报), 2006, 32(6): 805–810
- [12] Yamasaki M, Tsunenmatu H, Yoshimura A, Iwata N, Yasui H. Quantitative trait locus mapping of ovicidal response in rice (*Oryza sativa* L.) against whitebacked planthopper (*Sogatella furcifera* Horvath). *Crop Sci*, 1999, 39: 1178–1183
- [13] Wang C M, Yasui H, Yoshimura A, Zhai H Q, Wan J M. Inheritance and QTL mapping of antibiosis to green leafhopper in rice. *Crop Sci*, 2004, 44: 389–393
- [14] Yasui H, Yoshimura A. QTL mapping of antibiosis to green leafhopper, *Nephotettix virescens* distant and green rice leafhopper, *Nephotettix cincticeps* Uhler in rice, *Oryza sativa* L. *Rice Genet Newsl*, 1999, 16: 96–98
- [15] Rahman M L, Chu S H, Qiao Y L, Jiang W Z, Khanam M S, Jena K K, Koh H J. Genetic analysis and high-resolution mapping of two rice brown planthopper resistant genes, *BPH20(t)* and *BPH21(t)* from *Oryza Minuta*. In: Plant & Animal Genomes XVI Conference, San Diego, CA: Scherago International, Inc., 2008. 237
- [16] Kawaguchi M, Murata K, Ishii T, Takumi S, Mori N, Nakamura C. Assignment of a brown planthopper (*Nilaparvata lugens* Stal) resistance gene *bph4* to the rice chromosome 6. *Breed Sci*, 2001, 51: 13–18
- [17] McCouch S R, Khush G S, Tanksley S D. Tagging genes for disease and insect resistance via linkage to RFLP markers. In: Rice Genetics II. Proc 2nd Int Rice Genet Symp. Manila: IRRI, 1991. pp 443–449
- [18] Su C-C(苏昌潮). Analysis of Germplasm Resistant to Brown Planthopper (*Nilaparvata lugens* Stal) and Molecular Mapping of BPH Resistant Gene in Rice (*Oryza sativa* L.). PhD Dissertation of Nanjing Agricultural University, 2003. pp 48–53 (in Chinese with English abstract)
- [19] Hayano-Saito Y, Saito K, Nakamura S, Kawasaki S, Iwasaki M. Fine physical mapping of the rice stripe resistance gene locus, *Stvb-i*. *Theor Appl Genet*, 2000, 101: 69–63
- [20] Ding X-L(丁秀兰), Jiang L(江玲), Liu S-J(刘世家), Wang C-M(王春明), Chen L-M(陈黎明), Cheng Z-B(程兆榜), Fan Y-J(范永坚), Zhou Y-J(周益军), Wan J-M(万建民). Using recombinant inbred lines (RILs) derived from crossing of Kinmaze and DV 85. *Acta Genet Sin* (遗传学报), 2004, 31(3): 287–292 (in Chinese with English abstract)
- [21] Maeda H, Nemoto H, Yagi T. QTL analysis for stripe disease resistance using recombinant inbred lines derived from crossing between Milyang and Akihikare. In: Prospects of Rice Genetics and Breeding for the 21st Century-Paper Collection of International Rice Genetics and Breeding Symposium. Beijing: China Agricultural Science and Technology Press, 1999. pp 53–57
- [22] Sun D-Z(孙黛珍), Jiang L(江玲), Zhang Y-X(张迎信), Cheng X-N(程遐年), Zhai H-Q(翟虎渠), Wan J-M(万建民). Analysis of quantitative trait loci for resistance to stripe disease in rice. *Chin J Rice Sci* (中国水稻科学), 2007, 21(1): 95–98 (in Chinese with English abstract)