

水稻抗稻瘟病鉴定中的几个相关问题的探讨*

何月秋¹, Hei Leung², Robert S. Zeigler², 唐文华³

(1. 云南农业大学植物保护学院, 云南 昆明 650201;

2. 国际水稻研究所昆虫与植病系, 菲律宾马尼拉市 7777;

3. 中国农业大学植物病理系, 北京 100094)

摘要: 利用 CO39 近等基因系及其累加系和 4 个稻瘟病菌的原始菌株及其突变体, 研究稻瘟病抗性鉴定中经常考虑的几个因子。结果表明, 接种孢子量与植株的病级、病斑数和发病叶面积呈正相关, 品种对混合菌株接种的抗病性主要取决于致病性强的菌株, 弱菌株的诱导抗性有限, 过量施用氮肥可使部分抗病品种感病, 被克服的主效基因没有明显的残效抗性。

关键词: 稻瘟病; 抗性鉴定; 近等基因系; 氮肥

中图分类号: S 435.111.41 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-390X(2003)03-0234-05

Some Issues on Identification of Rice Blast Resistance

HE Yue-qiu¹, Hei Leung², Robert S. Zeigler², TANG Wen-hua³

(1. Plant Protection College, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, China;

2. Entomology & Plant Pathology Division, International Rice

Research Institute, DAPO Box 7777, Metro Manila, Philippines;

3. Plant Pathology Department, China Agricultural University, Beijing 100094, China)

Abstract: Some issues on identification of rice blast resistance were studied by using CO39 near-isogenic and pyramid lines and 4 original isolates and their mutants of *Magnaporthe grisea*. The results were very useful to blast resistance breeding: that spore number for inoculation was significantly positive correlated to score, lesion number and diseased leaf area, resistance of a line to mixed spore suspension depended on the compatible isolate and induced resistance by incompatible isolate was very limited, much nitrogen application made resistant line susceptible and residual resistance did not appear among the defeated major resistance genes.

Key words: rice blast; resistance identification; near-isogenic line, nitrogen fertilizer

稻瘟病一直是困扰水稻生产的一个十分突出的问题。为了获得稳产和高产, 抗病育种总是作为首选的技术措施, 但抗病育种的成功与否取决于抗病基因资源的拥有、病原菌的群体组成, 抗病鉴定方法和抗病品种的使用方式等。在其他条件相同

的情况下, 抗病鉴定中的每一个细节均可能影响鉴定结果的正确性。本文就是针对鉴定中常遇到的几个要素进行研究, 以便更好地为抗病育种提供可靠的依据。

* 收稿日期: 2002-11-25

基金项目: 国际水稻所生物多样性控制稻瘟病项目; 国家 863 项目(2001AA211061; 2002AA241311); 云南省后备人才基金项目(99C10010R)。

作者简介: 何月秋(1956-), 男, 湖北武穴市人, 教授, 博士, 主要从事水稻稻瘟病的分子育种和防治研究。

1 材料和方法

1.1 品种和秧苗管理

所有品种均为具 CO39 遗传背景的抗稻瘟病近等基因系^[1]和累加系。其中 C101LAC 带有抗病基因 *Pi-1*, C101A51 带有抗病基因 *Pi-2*(或称 *Pi-Z5*), C101PKT 带有抗病基因 *Pi-4a*, 近等基因累加系 BL121 带有抗病基因 *Pi-1* 和 *Pi-2*, BL141 带有抗病基因 *Pi-1* 和 *Pi-4a*。每个品种 10~12 粒种子直播于直径为 10 cm 的塑料杯里。杯中的土壤为砂壤耕地土,以每 1 000 g 土壤中施硫酸铵 6 g 作为基肥,在播种时一次性施入,重复 3 次,随机排列。

1.2 菌株和接种

用于温室接种的 4 个原始菌株 P06-6, 9239-4 和 101-7-2-1-1, 9248-6, 以下简称菌株 1, 3, 4 和 5 以及 9239-4 的突变体 HCO(3)PKT(简称 20), 101-7-2-1-1 的突变株 R17, I73, LC141, LC57-4 和 LC122, 9248-6 突变株 LC142, I110 和 R6 等 12 个菌株。4 个原始菌株来自国际水稻所的稻瘟病圃, 突变株均来自该所的温室^[2]。菌株的培养按前报方法^[3], 孢子稀释至约 5×10^5 个/mL 用于接种。秧苗在国际水稻所的温室中长至 14 d(3.5~4.0 叶), 以电动高压喷雾器喷雾接种。接种后, 将秧苗置于 25 °C 恒温的结露室中保湿 18~24 h, 然后搬入 25 °C 的温室中保湿 5 d。为测定病菌混合后对品种抗病性的影响, 将 4 个原始菌株两两配对等量混合接种到秧苗上。

1.3 病情调查

在接种的第 6 d, 以 0~5 级标准^[4]调查上部两片发病叶的病级、逐个地数病斑数和估计病叶面积(发病面积占发病叶面积的百分率, DLA%)。病级 3 级以下的为抗病, 4 级以上的为感病, 品种的抗性以最高病级为依据。

2 结果与分析

2.1 常见的几个参数间的关系

在稻瘟病菌接种时, 研究者常考虑几个因子, 如多少接种量为好, 接种量与病情严重度有什么关系等。本研究以 12 个菌株接种到 CO39, C101LAC, C101A51, C101PKT, BL121 和 BL141 等 6 个近等基因系上, 每周播种一批秧苗, 重复 3 次, 共接种了 6 批秧苗, 即在长达两个月的时间内完成, 以尽可能地使接种时遇到不同的环境因子。孢子量从 4×10^5 个/mL 至 5×10^5 个/mL, 每盆接种量约 2 mL。但孢子量的计算都是以接种的总孢子量来计算的。病情调查后, 计算接种的孢子量、病级、发病面积和病斑数的相关系数(表 1)。结果表明, 病斑数与病斑面积之间呈极显著正相关, 除少数菌株如 I73 的病级—病斑数, 病级—病斑面积, 病级—孢子数之间, 菌株 LC57-4 的病级—孢子数, 病斑数—孢子数之间的相关系数未达到显著相关原因还有待进一步研究外, 其他菌株的各项相关系数均达显著或极显著相关。而菌株 I73 的致病性极强, 在 6 轮接种中均能使所有供试品种感病, 因而它的病级与其他因子相关不密切。

表 1 接种与病害调查中的几个因子间的相互关系

Tab. 1 Correlation coefficients among the factors during inoculation and disease scoring

菌株	病级— 病斑数	病级— 病斑面积	病级— 孢子数	病斑数— 病斑面积	病斑数— 孢子数	孢子数— 病斑面积
3	0.795 3**	0.675 8*	0.809 3**	0.800 8**	0.763 5**	0.883 6**
I20	0.803 6**	0.652 7*	0.586 4*	0.937 4**	0.833 3**	0.872 3**
4	0.722 7**	0.556 8*	0.468 0	0.919 4**	0.513 8*	0.581 4*
I73	0.477 3	0.450 0	0.418 3	0.978 8**	0.720 6**	0.700 3**
LC141	0.674 0*	0.560 7*	0.512 5*	0.882 0**	0.687 1*	0.760 6**
LC57-4	0.653 2*	0.584 6*	0.426 2	0.925 1**	0.458 2	0.610 4*
LC122	0.735 5**	0.664 5*	0.599 7*	0.888 0**	0.718 1**	0.670 7*
R17	0.712 7**	0.523 8*	0.544 4*	0.817 8**	0.555 6*	0.516 4*
5	0.723 9**	0.610 0*	0.510 3*	0.964 7**	0.726 1**	0.823 0**
LC142	0.537 7*	0.631 6*	0.635 2*	0.755 1**	0.523 0*	0.839 2**
I110	0.717 9**	0.635 0*	0.609 1*	0.949 2**	0.841 6**	0.831 6**
R6	0.727 9**	0.648 3*	0.672 4*	0.958 4**	0.919 5**	0.871 7**

注: * 和 ** 分别表示在 0.05 和 0.01 水平上差异显著。

2.2 混合接种对品种抗病性的影响

为了测定混合菌株间的影响,选用了 4 个致病性不相同的菌株,在接种前两两菌株混合接种。结果表明(表 2),当品种为抗病时,病斑数较少,将所有抗病类型的品种单株上的病斑数加起来平均也只有 5.52 个抗病型病斑,而感病型品种病斑数较多,且有的已连成片。品种的抗性主要取决于致病能力强的菌株,与致病能力弱的菌株无关。如菌株 3 能致 C101LAC 感病,另 3 个菌株则不能,凡与菌株 3 混合的组合均能使 C101LAC 感病;菌株 4 也同

菌株 3 相似,它能侵染 C101A51,另 3 个菌株则不能,凡是含有该菌株的混合接种,均使 C101A51 感病。从病斑数上来看,无毒菌株 1,4 和 5 减少了菌株 3 对 C101LAC 的病斑数,但减少的数量未达到统计学上显著水平;菌株 3 却对另 3 个菌株在 C101PKT 上没有任何作用,即没有表现出诱导抗性。由此看来,无毒菌株诱导水稻品种对有毒菌株的抗性似乎因菌株不同而异。并不是所有的致病力弱的菌株就可以引起发病减轻。同时,在混合接种鉴定品种的抗性时,也要特别注意挑选菌株。

表 2 3 个近等基因系对稻瘟病菌株及其混合菌株的抗性

Tab. 2 Resistance reactions of 3 near-isogenic lines (NILs) to blast pathogen isolates and their recombinations

近等 基因系		菌株及其组合									
		1	3	4	5	1+5	1+3	1+4	3+5	4+5	3+4
C101LAC	病斑数/个	0.91	36.57	0.92	1.89	0.05	30.50	0.30	29.46	2.21	32.94
	抗性反应	R	S	R	R	R	S	R	S	R	S
C101A51	病斑数/个	5.89	1.37	37.42	12.33	14.31	12.76	29.23	9.97	30.61	40.63
	抗性反应	R	R	S	R	R	R	S	R	S	S
C101PKT	病斑数/个	18.14	8.91	23.96	14.67	19.88	21.16	29.32	21.73	18.06	24.66
	抗性反应	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S

注: R 抗病; S 感病,下同

2.3 氮肥量的影响

为了测定施肥量对品种抗性的影响,设每 1 000 g 土壤中施硫酸铵 6 g 作为基肥的普通育苗和在此基础上于出苗后的第 1 周以同样数量的硫酸铵为追肥作为高肥育苗处理。接种后的结果表明(表 3),高肥育苗的处理,病情明显加重,特别是对有些品种而言,本不感病的品种反而感病。如 C101A51 对菌株 1 和菌株 5,它的病斑成为一种急性型的水渍状的病斑,有的叶片好像开水烫过了一样,极为严重。此外,还可以看出,几乎所有品种与菌株的组合,均是以高肥处理的菌株侵染效率较高(病斑数/10 000 个分生孢子),高肥处理时接种的孢子数只有普通施肥量育苗的 1/3 ~ 1/5,却在几个菌株与品种的组合上病斑数比后者的还要多,如菌株 5 接种的 4 个品种中,便有 3 个品种的病斑绝对数是高肥育苗的植株上多于普通施肥育苗的植株。由此可见,施肥量对水稻抗稻瘟病鉴定的影响非常大。

2.4 水稻抗病基因与病菌的无毒基因的关系分析

菌株 3 不能使抗病基因 $Pi-2$ 和 $Pi-4a$ 感病,也不能对这两个基因的组合(累加系)感病。菌株

4 不能感染带有抗病基因 $Pi-1$ 的品种和组合,菌株 5 不能感染抗病基因 $Pi-1$ 和 $Pi-2$ 。而菌株 3 的突变体 I20 是针对 $Pi-4a$ 发生的突变,即无毒基因 $Aur-Pi-4a$ 发生了突变,它在 C101PKT 上的病级由原始菌株的 3.0 级,增加到 4.9 级,发病面积也相应地由 0.17% 增加到 13.60%,同时,在近等基因累加系 BL141 上的病级和发病面积达 4.9 级和 13.31%;原始菌株 4 的 4 个针对抗病基因 $Pi-1$ 突变菌株 R17, I73, LC57-4, LC122, 均由原始菌株在 C101LAC 上的病级 0.61 级上升到 5 级,单株病斑数和病斑面积均增加,尤其是对原始菌株不能侵染的携带抗病基因 $Pi-1,2$ 的 BL121 的病级由原来的 0 级上升到 4.6 级以上,单株病斑数及病斑面积也相应的提高了,没有见到抗病基因 $Pi-2$ 的作用。同样的,菌株 5 及其突变菌株 LC142, I110 和 R6 与菌株 4 及其突变菌株相似,原始菌株不侵染 C101LAC,突变菌株都侵染该近等基因系,也能侵染由 $Pi-1,4$ 的两个基因的累加系 BL141, $Pi-1$ 抗病基因形同不存在一样(表 4)。这些结果表明,水稻病菌与品种的抗病基因间的关系从表型上看,的确为基因对基因关系,病菌的一个无毒基因位点的突

变,就可导致抗病基因功能的彻底丧失。

表3 施肥量与稻瘟病的严重度关系

Tab. 3 Blast severity of the near-isogenic lines (NILs) and fertilizer amount

菌株	近等基因	普通育苗			高肥育苗		
		孢子数/(个·盆 ⁻¹)	抗性	病斑数/个	孢子数/(个·盆 ⁻¹)	抗性	病斑数/个
1	CO39		S	75.5		S	74.3
	C101LAC	7.7 × 10 ⁶	R	0.7	1.7 × 10 ⁶	R	10.0
	C101A51		R	2.3		S	101.0
	C101PKT		S	65.0		S	102.5
CO39	S		223.2	S		55.5	
3	C101LAC	5.0 × 10 ⁶	S	265.0	1.5 × 10 ⁶	S	234.5
	C101A51		R	0.5		R	1.7
	C101PKT		S	72.4		S	33.5
	CO39		S	249.1		S	76.8
4	C101LAC	6.7 × 10 ⁶	R	17.0	1.3 × 10 ⁶	R	17.0
	C101A51		S	243.7		S	150.5
	C101PKT		S	123.5		S	152.2
	CO39		S	68.9		S	142.2
5	C101LAC	6.7 × 10 ⁶	R	55.0	1.5 × 10 ⁶	R	20.0
	C101A51		R	14.9		S	153.3
	C101PKT		S	26.9		S	72.7
	CO39		S	249.1		S	76.8

表4 近等基因系及累加系对原始菌株和突变菌株的抗病反应

Tab. 4 Reaction of the near-isogenic and pyramid lines to blast pathogen

近等 基因系		菌株										
		3	I20	4	R17	I73	LC57-4	LC122	5	LC142	I110	R6
C101;AC	病级	5.00*	4.95	0.61	5.00	5.00	4.95	5.00	0.45	5.00	5.00	5.00
	病斑数/个	29.71	47.65	7.17	47.38	31.56	45.20	48.14	0.20	37.75	32.08	30.91
	发病面积/%	22.14	24.45	0.01	32.81	23.28	34.60	36.86	0.00	35.00	35.14	25.91
C101A51	病级	0.00	0.00	4.64	5.00	4.71	4.71	5.00	0.00	2.93	1.85	2.00
	病斑数/个	0.00	0.00	49.33	55.75	32.40	22.31	37.22	0.00	16.57	13.26	3.44
	发病面积/%	0.00	0.00	28.75	29.29	17.15	19.67	27.78	0.00	0.06	0.08	0.01
C101PKT	病级	3.00	4.90	3.88	5.00	5.00	4.91	5.00	5.00	5.00	5.00	4.93
	病斑数/个	33.46	34.70	32.84	71.31	35.65	45.72	85.25	44.48	25.92	53.74	25.14
	发病面积/%	0.17	13.60	3.59	39.60	28.61	39.76	43.75	25.63	12.08	23.99	16.79
BL121	病级	0.00	0.00	0.00	5.00	4.96	4.61	5.00	0.00	2.50	2.62	2.10
	病斑数/个	0.00	0.00	0.00	95.44	68.14	36.46	106.21	0.00	13.79	6.90	4.50
	发病面积/%	0.00	0.00	0.00	21.46	28.64	16.86	33.93	0.00	0.03	0.02	0.02
BL141	病级	2.09	4.90	0.00	5.00	4.50	4.70	5.00	0.00	5.00	5.00	5.00
	病斑数/个	41.64	41.00	0.00	105.18	30.77	37.39	81.36	0.00	63.33	62.86	58.83
	发病面积/%	0.21	13.31	0.00	44.42	13.35	13.23	27.50	0.00	22.92	30.36	30.67

3 讨论

本研究用携带主效抗病基因的近等基因系来研究各因子的关系,明确病害严重程度与接种时所

用的孢子浓度呈极显著正相关,接种的孢子量越多,病斑越多,病斑面积越大。但当仅考虑主效抗病基因时,因病级较为稳定,故以病级为指标则可能较妥当。然而,在抗病鉴定时,特别是在大量地

鉴定育种亲本或早代材料时,用单一菌株逐一接种工作量太大,用混合菌株接种又可能因菌株之间的相互作用,如弱菌株能诱导植株对强致病力菌株产生抗性^[5]。在具体抗病鉴定的实践中,如何取舍所用菌株是一种艰难的抉择。利用抗病基因近等基因系的目的是希望尽可能地减少未知基因对研究结果的干扰,使结果更加直接地反映寄主抗病基因的作用,更能反映稻瘟病菌株的直接影响。结果表明,所用的 4 个菌株两两成对混合接种,品种的抗病反应主要取决于致病能力强的菌株(有毒菌株),与无毒菌株的关系不很密切。尽管 3 个菌株可减少菌株 3 对 C101LAC 的病斑数,但未达到统计学上的显著差异,且仍然不能主导植株的抗病性主体表现,因此,在抗病鉴定时,用混合菌株接种是可取的。不过,本研究是在两个菌株同时接种,未见到无毒菌株诱导的抗病性极显著的控病效果,是否在田间或者说无毒菌株先于有毒菌株侵入有类似的情况,以及无毒菌株的诱导抗性因菌株及水稻品种不同而异,有待今后进一步研究。过量施用氮肥或施肥不平衡易导致田间水稻感染稻瘟病是众所周知的,因而在抗病鉴定中,为了得到很好的发病结果,也常常多施速效氮肥。然而,本研究采用加倍施用速效氮肥硫酸铵的方法,证明有的品种对高用量的氮肥非常敏感,如 C101A51 在一般施肥时,对 3 个菌株表现抗病,但在高用量施肥后,它对其中 2 个菌株,表现出截然相反的结果,叶片上病情极为严重,好像开水烫过了一样,到接种后第 7 d,整个植株完全死亡。由此可见,在抗病性鉴定时,也不宜施肥量过多,否则,就可能导致较好的抗病品种或品系因感病而淘汰了。

水稻与稻瘟菌间的关系符合基因对基因关系^[6],但也有报道一个抗病基因的丧失有时是不完全的^[7],它在田间仍然发挥某种程度上的抗病作用,也就是存在抗病基因残效作用。抗病基因的残效作用在棉花抗角斑病中也有报道^[8]。然而,本研究利用一个主效基因的突变菌株来接种主效基因

的近等基因系和它们的累加系,均未见到这些被克服了的抗病基因存在任何残效作用(表 4),那些单个抗病基因的近等基因系和累加系对突变菌株的反应就如同抗病基因根本不存在一样。是否其它主效基因的抗性一旦被克服,也没有残效作用,还有待更多的菌株和更多的抗病基因进一步验证。

[参 考 文 献]

- [1] MACKILL D J, BONMAN J M. Inheritance of blast resistance in near-isogenic lines of rice [J]. *Phytopathology*, 1992, 82:746 - 749.
- [2] 何月秋,唐文华, HEI LEUNG, 等. 稻瘟病菌致病突变株的分离[J]. *云南农业大学学报*, 2000, 15(3):197 - 199, 211.
- [3] HE Y Q, TANG Y W, GEORGE M L, et al. Fitness test for *Magnaporthe grisea* using PCR - based markers[J]. *Acta Phytopathologica Sinica*, 1999, 29:227 - 234.
- [4] BONMAN J M, VERGEL DE DIOS T J, KHIM M M. Physiologic specialization of *Pyricularia* in the Philippines [J]. *Plant Disease*, 1986, 70:767 - 769.
- [5] 范静华,周惠萍,陈建斌,等. 非亲和稻瘟病菌对水稻的诱导抗性[A]. 喻盛甫等编. 云南省植物病理重点实验室论文集(第四卷)[C]. 昆明:云南科学技术出版社, 2002.
- [6] LEONG S A, FARMAN M L, NITTA N. Genetic and molecular analysis of a cultivar specificity locus from the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*[A]. In: KHUSH G S, ed. *Rice genetics III*, Proceedings of the Third International Rice Genetics Symposium[C]. Manila, Philippines: International Research Rice Institute. 1995, 847 - 852.
- [7] CHEN D. Population structure of *Pyricularia grisea* (Cooke) Sacc. at two screening sites in the Philippines and characterization of resistance genes[D]. Thesis (PH. D)-University of the Philippines at Los Baños, 1993.
- [8] JAYARAMAN J, GABRIEL O. The use of *Agrobacterium tumefaciens* in avirulence gene assays allows detection of weak resistance genes in cotton with residual effect against bacterial blight (DB/OL). <http://www.bspp.org.uk/icpp98/1.1/35.html>.