

水稻白叶枯病抗性基因定位及其小种专化性*

罗利军 梅捍卫 赵新华 钟代彬 王一平 余新桥 应存山

(中国水稻研究所, 杭州 310006)

Zhikang Li A. H. Paterson Daolong Wang R. Tabien

L. Zhu J. W. Stansel

(Texas A&M University, College Station, TX77843, USA)

摘要 利用3个致病性不同的水稻白叶枯病菌小种,对由Lemont/特青培育的315个F₁₀重组自交系群体进行抗性基因(QTL)RFLP分析. 共发现1个主基因、10个QTL及9对互作位点与白叶枯病菌抗性有关. 其中,主基因Xa4定位于第11染色体上. Xa4对CR4和CX08表现显性主基因遗传,但对CR6则表现为一个主要的加性QTL的作用. 主基因小种专化性明显大于QTL. QTL之间以及QTL与主基因之间效应累加,共同提供抗病性的强度和稳定性. 在感病亲本中,亦存在抗性QTL. 因此,来源不同的中抗材料可能是水平抗性的良好基因源. 研究还表明,所定位的QTL与其他研究发现的抗不同病原菌的基因(QTL)处于相近的染色体位置,意味着它们可能是同一抗性基因族的成员.

关键词 白叶枯病 RFLP QTL 小种专化性

白叶枯病(*Xanthomonas oryzae* pv. *oryza*)是水稻的主要病害之一. 半个多世纪以来,对水稻白叶枯病的抗性遗传研究和抗性品种选育,一直是稻作科学研究的热点^[1,2]. 水稻品种的抗性表现为两种形式,即由主基因控制的质量(垂直)抗性和由微效多基因控制的数量(水平)抗性. 由于研究手段的限制,大多数研究集中于主基因抗性. 至目前为止,已发现20余个抗性主基因,培育了大批的抗性品种^[3]. 然而,由于病原菌小种专化性,新育成的抗性品种往往随着小种的变化而丧失抗性^[4],因此,在育种利用中,水平抗性愈来愈受到广泛的重视.

近年来发展的分子标记技术为鉴定和研究数量抗性基因提供了科学的方法^[5,6]. 本研究旨在利用水稻重组自交系群体和RFLP标记技术,对控制垂直和水平抗性的两类基因(主基因和QTL)进行染色体定位,基因互作和效应值估测,研究病原菌小种与抗性基因(QTL)相互关系,以及主基因和QTL的相互关系.

1 材料和方法

1.1 种植材料

美国梗稻品种“Lemont”,中国籼稻高产品种“特青”、Lemont×特青F₁代以及一套包括

315 个 F_{10} 株系的 Lemont $\times$ 特青重组自交系群体。每个亲本、 F_1 和重组自交系群体(RIL)种成 7 行区, 每行 6 株。

1.2 白叶枯病菌接种和评价

用于接种的白叶枯病菌包括 3 个遗传上稳定的小种, CR4, CR6 和 CX08, 由中国水稻研究所提供。供试菌种经扩大培育, 配制成 3×10^8 /mL 个细菌的悬浮液, 利用 Kaffman 氏剪叶法接种^[7]。每份材料接种 5 株, 每株 5 叶, 接种后田间保持 6~9 cm 深水层, 以保证湿度。移栽后 21 d 调查病斑长度。接种试验在杭州中国水稻研究所试验场进行。

1.3 分子标记和遗传作图

DNA 提取、酶解、Southern 转移、分子杂交和放射性自显影及图谱构建均按文献[8]方法进行。所用标记包括 186 个分子标记和 3 个形态标记: g1-1(光叶)、C(紫颖尖)和 Ph(酚反应), 分子标记试验在美国德州农工大学植物基因图谱实验室进行。

1.4 数据分析

用 SAS PROC GLM 分析对数转换的病斑长度数据, 以测验重组自交系间、病原菌小种间以及 RIL $\times$ 小种互作的差异显著性。用复合区间作图和多元回归模型鉴别抗病 QTL^[6], 这包括 2 个步骤: 第 1 步, 用 $p \leq 0.005$ 的阈值, 采用基于单个标记基因型的逐步回归分析, 筛选出对性状有显著影响的标记; 第 2 步, 将第 1 步筛选出的所有标记在模型中固定起来以控制背景遗传效应的影响。利用计算机软件 QTLMAPER V1.0¹⁾ 依次对所有标记区间进行复合区间作图。

2 结果

2.1 亲本和重组自交系群体的抗性表现

图 1 显示了亲本和 RIL 对 3 个菌株接种的反应。接种 CR4, CX08 和 CR6, 特青的平均病斑长度分别为 3.5, 2.1 和 14.7 cm, Lemont 为 22.9, 14.1 和 10.1 cm, F_1 代分别 5.9, 5.6 和 16.5 cm, 不分离世代病斑长度整齐一致, 说明特青带有抗 CR4 和 CX08 的显性抗病基因, 但对 CR6 感病。Lemont 对 3 个小种均感病。重组自交系接种 CR4 和 CX08, 群体病斑长度呈双峰分布, 表现一对主基因的分离, 但抗、感 RIL 均呈较大变异, 说明存在微效多基因的分离; 接种 CR6, 呈连续变异, 抗、感两方面均存在大幅度的超亲分离, 表现为典型的数量基因遗传。重组自交系中, 病斑长度短于双亲的株系占有相当的比例, 达 30% 左右。27 个重组自交系表现高抗, 病斑长度 ≤ 3 cm。重组自交系对 3 个小种的抗性高度相关, 其中, 接种 CR4 和 CX08 的病斑长度相关系数为 0.90, 接种 CR4 和 CR6 的为 0.83, 接种 CX08 和 CR6 的为 0.88。

2.2 抗性主基因、QTL 和互作位点的 RFLP 定位

根据高的 LOD 值(对 CR4 为 61.1, CX08 为 43.1, CR6 为 36.1)将 1 个对 3 个小种有较强抗性的主基因定位于第 11 染色体上的 RZ536 和 G2132b 之间(图 2)。根据前人研究^[3], 推断该基因为 Xa4。这一基因来自特青, 是在亚洲抗病品种中广泛分布的抗白叶枯病显性主基因。

1) Wang D L, Zhu J, Li Z K, et al. A mixed model approach mapping of QTL and epistasis loci and development of QTLMAPER V1.0a. A presentation at the General Meeting of International Rice Biotechnology, Rockefeller Foundation, Malaysia, 1997

Xa4 分别解释由 CR4, CX08 和 CR6 引起的病斑长度变异的 65.2%, 55.2% 和 52.1%. 分别具有减少病斑长度 9.0, 7.0 和 4.8 cm 的效应.

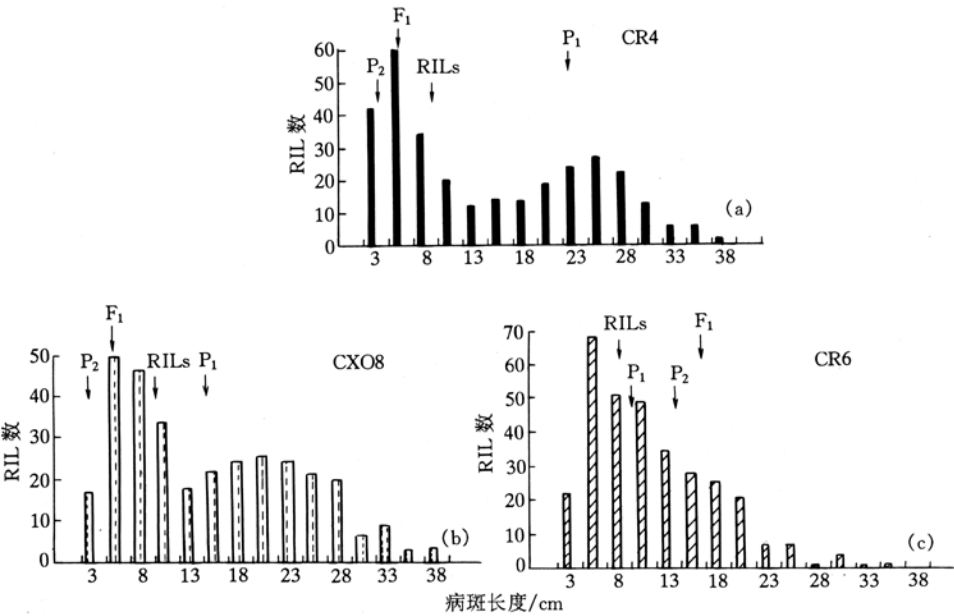


图 1 RIL 群体抗性表现
(a) CR4, (b) CX08, (c) CR6

除 Xa4 外, 还鉴别出 10 个 QTL(表 1)和 9 对互作位点(表 2)对白叶枯病表现显著抗性. 这些 QTL 被定位于水稻 12 条染色体中的 8 条染色体上(图 2). 这些 QTL 解释了除 Xa4 以外的剩余变异的 65% 以上. 10 个 QTL 中, 7 个来自特青(QBr2, QBr3b, QBr4a, QBr8, QBr9, QBr10 和 QBr11), 3 个来自 Lemont(QBr3a, QBr4b 和 QBr10).

表 1 抗性基因染色体定位及其加性效应^{a)}

基因(QTL)	标记区间	染色体	CR4		CX08		CR6	
			<i>a</i>	<i>P</i>	<i>a</i>	<i>P</i>	<i>a</i>	<i>P</i>
QBr2	RG520/RZ446b	2	—	—	—	—	−0.8	0.035 9
QBr3a	C515/RG348	3	2.2	0.000 9	2.1	0.001 0	1.6	0.003 5
QBr3b	RG482/CDO795	3	−0.8	0.000 6	−1.6	0.001 0	−1.2	0.002 0
QBr4a	RG214/Ph	4	−0.9	0.033 8	−1.8	0.007 4	−1.4	0.001 2
QBr4b	RZ69/RG190	4	1.9	0.006 0	1.8	0.000 5	2.1	0.000 8
QBr8	G104/G1314a	8	−1.6	0.002 2	−2.7	0.000 4	−2.0	0.000 1
QBr9	RG451/RZ404	9	−0.7	0.001 3	−2.4	0.000 8	−1.8	0.000 5
QBr10	RG1094f/C16	10	1.8	0.010 5	2.2	0.018 0	2.2	0.000 1
Xa4	RZ536/G2132b	11	−9.0	<0.000 1	−7.0	<0.000 1	−4.8	<0.000 1
QBr11	RG1022/RZ525	11	−2.8	<0.000 1	−2.6	<0.000 1	−1.7	0.000 4
QBr12	RG91Q/RG341	12	—	—	−1.7	0.000 4	−1.5	0.000 7

a) − 为标记对病原菌系的效应不显著. *P* 为包含所有显著 QTL 的多元回归模型中单个 QTL 偏回归方差显著性概率.
a 为特青位点的加性效应(正负数为增加、降低病斑长度, 单位: cm)

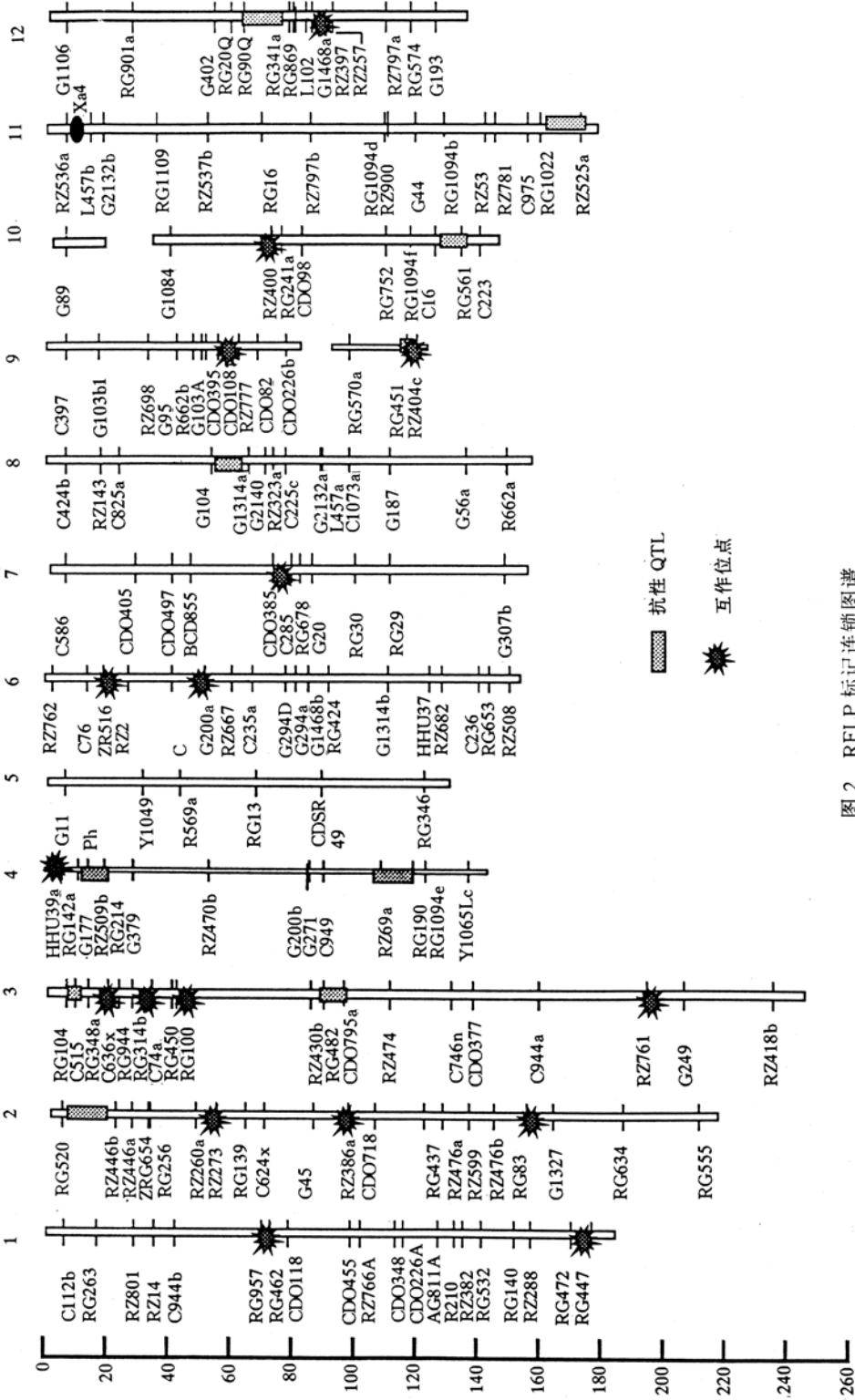


图 2 RFLP 标记连锁图谱

表 2 互作位点的染色体定位及其互作效应

染色体	标记 1	标记 2	染色体	白叶枯病	R ² /%	互作位点基因型				
						LL ^{a)}	LT	TL	TT	<i>p</i>
1	RG957	RZ386	2	CR4	19.7	1.9**	-4.0***	-3.5***	3.0***	<0.000 1
3	RG100	RZ761	3	CR4	14.9	-1.7**	2.1**	2.9**	-2.1**	0.000 5
1	RG472	HHU39	4	CR4	13.7	1.5*	-2.0**	-2.1**	2.0**	0.000 8
2	RZ273	C74a	3	CR4	14.5	-2.3**	2.3**	2.3**	-2.5**	0.000 2
				CX08	13.1	-2.3**	2.3**	2.3**	-2.5**	0.000 5
6	G200a	CDO1081	9	CX08	23.8	2.9**	-2.1**	-3.6***	3.0***	<0.000 1
2	RG83	CDO385	7	CX08	12.6	1.2*	-1.6*	-3.0***	2.4**	0.000 6
3	C636	RZ400	10	CX08	21.0	1.8**	-2.3*	-1.9*	1.9**	<0.000 1
				CR6	19.1	2.4**	-2.6**	-2.5**	1.9**	<0.000 1
10	RZ400	G1468a	12	CX08	8.7	-1.6*	2.3**	1.7*	-1.5*	0.006 0
				CR6	18.4	-1.9**	2.7**	2.0**	-1.9**	0.000 2
6	RZ516	RZ404	9	CR6	17.0	2.5**	-2.5**	-2.5**	3.0***	0.000 3

a) LL, LT, TL, TT 分别为互作位点的 Lemont 纯合基因型, 2 个重组型和特青的纯合基因型. *, ** 和 *** 分别表示 *t* 测验中 *p*<0.05, 0.01 和 0.001 的显著水平. R² 为多元回归模型中互作效应平方和占除 Xa4 变异外的剩余平方和的比例

2.3 抗性主基因及 QTL 的小种专化性

由表 1 可知, 抗性主基因及 QTL 存在小种专化性, 表现 3 个方面的特点: 一是大多数 QTL 对 3 个菌系的抗性方向一致, 二是少数 QTL(如 QBr2 和 QBr12)只抗 1 或 2 个小种, 三是抗所有 3 个小种的 QTL, 其抗性效应值存在差异. Xa4 对于 CR4 和 CR8, 表现主基因的抗性, 但对 CR6, 则表现为数量性状(QTL)的形式, 但其效应值最大.

3 讨论

虽然早就发现水稻对白叶枯病的水平抗性, 但过去对白叶枯病的遗传研究和抗性育种主要集中在主基因抗性^[2]. 一方面, 由于经典遗传学研究难以分解主基因及微效多基因的效应; 另一方面, 抗性主基因较易应用于育种计划之中. 本研究通过分子标记作图, 发现主基因和多个 QTL 共同控制水稻对白叶枯病的高水平抗性, 而且, 尽管大多数 QTL 具有相对小的遗传效应, 但即使在单个组合中(如 Lemont/特青), 抗性 QTL 的数目还是比较多的. 并且, 在感病品种中亦发现有抗性 QTL 的存在, 这些 QTL 以及主基因遗传效应可以累加, 不失为一类新型的抗病资源. 可以推测亲缘关系不同, 具有中等抗性的稻种资源, 可能是提供水平抗性的良好亲本.

本研究结果表明, 病原菌小种专化性包括质量和数量 2 个方面, 其主基因(如 Xa4)专化性是主要的. Xa4 广泛应用于水稻育种计划之中. 目前, 亚洲地区生产上利用的水稻品种大都带有 Xa4 基因. 由于白叶枯病小种的变化, 已有抗性品种丧失抗性的报道^[4]. 这种丧失抗性的遗传基础, 以前尚不清楚. 本研究中, 特青带有 Xa4 基因, 对 CR4 和 CX08 表现为主基因抗性, 但对两者抗性的水平不同, 反映出两小种对抗性基因致病力有差异; 对 CR6 则形态上表现感病, 即“抗性丧失”, 但遗传本质上, Xa4 还是起主要的抗性 QTL 的作用. 由于 QTL 的小种专化性没有主基因明显, 而且, 大量 QTL 的存在, 不易因小种变化完全“丧失抗性”, 因此, 大量 QTL 的累积效应, 不但可增加抗性水平, 而且可加强抗性的稳定性.

值得提出的是,在所定位的10个抗性QTL中,1个非常接近于第4染色体的Xa1(或Xa2)^[9],3个定位于第2,3染色体上的抗稻瘟病基因Pi-z, pi-11⁽¹⁾和Pi-q⁶附近^[9],4个位于第3,9,11,和12染色体的抗纹枯病和稻瘟病的相同区域^{[10][11]}。这些研究的抗性基因均来自于特青,这似乎说明本研究所发现的抗白叶枯病QTL与其他研究所发现的抗其他病害或同一病害不同小种的抗性基因(QTL)有某种必然的联系。“丧失抗性”的主基因似乎仍具有抗同一致病菌不同小种或不同致病菌的效应^[11]。最近的研究表明,在水稻和大豆中,抗性基因常常以基因簇的形式存在,其中包含紧密连锁的成员基因^[5,12,13]。因此,上述现象的另一种解释为,在抗性基因簇内,抗性成员基因(QTL)之间功能不同,对某一病菌或小种表现主基因的抗性,对另外的病原菌或小种则表现QTL的作用。

参 考 文 献

- 1 章 琦. 中国水稻白叶枯病抗性基因的利用及策略. 植物保护学报, 1995, 22: 241~246
- 2 IRRI Bacterial Blight of Rice. Proceedings of the International Workshop on Bacterial Blight of Rice. International Rice Research Institute, P. O. Box 933, Manila: Philippines, 1989
- 3 Kinoshita T. Report of the committee on gene symbolization, nomenclature and linkage groups. RGN, 1995, 12: 9~153
- 4 New T H, Cruz C M, Reyes R C. Changes in race frequency of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* in response to rice cultivars planted in the Philippines. Plant Dis, 1992, 76: 1 029~1 032
- 5 White F F, Chittoor J E, Leach J E, et al. Molecular analysis of the interaction between *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* and rice. Rice Genetics III, International Rice Research Institute, Manila: Philippines, 1996
- 6 Zeng Z B. Precision mapping of quantitative trait loci. Genetics, 1994, 136: 1 457~1 468
- 7 Kaffman H E, Reddy A P K, Hsieh S P Y, et al. An improved technique for evaluating resistance of rice varieties to *Xanthomonas oryzae*. Plant Dis Rep, 1973, 57: 537~541
- 8 Li Z K, Pinson S R, Stansel J W, et al. Identification of quantitative trait loci (QTLs) for heading date and plant height in cultivated rice (*Oryza sativa* L.). Theor Appl Genet, 1995, 91: 374~381
- 9 Causse M A, Fulton T M, Cho Y G, et al. Saturated molecular map of the rice genome based on an interspecific backcross population. Genetics, 1994, 138: 1 251~1 274
- 10 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
- 11 Martin T J, Ellingboe A H. Differences between compatible parasite/host genotypes involving the Pm4 locus of wheat and the corresponding genes in *Erysiphe graminis* f. sp. *Tritici*. Phytopathology, 1976, 66: 1 325~1 438
- 12 Kanazin V, Marek, L F, Shoemaker R C. Resistance gene analogs are conserved and clustered in soybean. Proc Natl Acad USA, 1996, 93: 11 745~11 750
- 13 Yu Y G, Buss G R, Saghai Maroof M A. Isolation of a superfamily of candidate disease-resistance genes in soybean based on a conserved nucleotide-binding site. Proc Nalt Acad USA, 1996, 93: 11 751~11 756

1) Tabien R E, Pinson S R M, Marchetti M A, et al. 1998 Mapping of four major blast resistance genes from “Lemont” and “Teqing” and evaluation of their combinational effect for resistance at the blast nursery. Theor Appl Genet (in Press)