

水稻空间诱变稻瘟病抗性变异研究 及抗性变异基因的分子标记

洪彦彬^{1,2}, 杨祁云¹, 林佩珍¹, 王 慧², 陈志强²

(1 广东省农业科学院 植物保护研究所, 广东 广州 510640;

2 华南农业大学 农学院, 广东 广州 510642)

[摘要] 对空间诱变的丽江新团黑谷SP₁~SP₃代株系稻瘟病抗性变异进行了分析。结果表明, 经过空间诱变后, 510株SP₁代植株中有70株对接种的GD531菌株由感病变为抗病, 占总株数的13.7%; SP₂代多数抗病株系对接种菌株的抗感分离比例符合3:1或15:1的规律, 说明SP₂代多数抗病株系受1对或2对显性主效基因控制; SP₃代受1对抗病主效基因控制的抗病株系抗性继续分离, 而受2对抗病主效基因控制的抗病株系抗性基本稳定; 利用L_{R8}-SP₂群体对丽江新团黑谷经过空间诱变后产生的抗病基因进行分子标记, 结果发现该基因位于第9染色体上, 与微卫星标记RM409连锁。

[关键词] 水稻空间诱变; 稻瘟病; 抗性变异; 抗病基因; 微卫星标记

[中图分类号] S435.111.2

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2006)04-0096-05

由真菌*Magnaporthe grisea*引起的稻瘟病是一种全球性的毁灭性病害, 严重影响水稻的稳产、高产, 选育和推广抗病品种是防治该病最经济有效的措施。抗病与优质和丰产间的矛盾, 是当前广东省乃至华南籼稻区的稻瘟病抗病育种工作中存在的首要问题, 因此, 如何提高优质稻的产量和抗病水平是当务之急。

自开展空间诱变育种研究以来, 有关水稻空间诱变低代材料性状变异的研究已有不少报道, 但主要集中在重要农艺性状, 如株高、分蘖、有效穗、千粒重等方面^[1-4], 而对空间诱变抗病性变异的研究目前尚处于起步阶段。本研究利用返回式卫星搭载丽江新团黑谷种子, 对空间诱变后的丽江新团黑谷SP₁~SP₃代株系进行稻瘟病抗性变异分析, 探求其抗性变异遗传规律, 同时对突变后代的一个抗稻瘟病突变基因进行了SSR分子标记定位, 以期选育抗病、优质、丰产的水稻品种奠定基础。

1 材料与方法

1.1 供试水稻品种

1.1.1 空间诱变的水稻SP₁代供试材料 丽江新

团黑谷经过返回式卫星搭载空间诱变后获得的SP₁代种子, 以原种丽江新团黑谷作对照(CK)。

1.1.2 空间诱变的水稻SP₂代供试材料 经稻瘟病抗性接种鉴定, 从丽江新团黑谷SP₁代群体中选取11个抗病和1个感病植株的种子作为SP₂代供试材料, 编号为L_{R1}-SP₂, L_{R2}-SP₂, L_{R3}-SP₂, L_{R4}-SP₂, L_{R5}-SP₂, L_{R6}-SP₂, L_{R7}-SP₂, L_{R8}-SP₂, L_{R9}-SP₂, L_{R10}-SP₂, L_{R11}-SP₂和L_S-SP₂, 以原种丽江新团黑谷作对照(CK)。

1.1.3 空间诱变的水稻SP₃代供试材料 从L_{R11}-SP₂, L_{R7}-SP₂, L_{R9}-SP₂和L_{R3}-SP₂群体中各选取6个抗病植株的种子作为SP₃代供试材料, 以原种丽江新团黑谷作对照(CK)。

1.2 空间诱变方法

将丽江新团黑谷干种子于2003-11-03利用返回式卫星搭载空间运行18d后, 于11-21返回地面。1/3同源种子留作地面对照。

1.3 接种的稻瘟病菌株

接种菌株GD531, 经中国7个稻瘟病鉴别寄主鉴定为ZG1小种, 属于梗型致病小种。用35个单基

收稿日期] 2005-08-18

[基金项目] 国家“863”高技术发展计划与研究项目(2002AA241011); 广东省自然科学基金项目(031994); 广东省科技计划项目(2003C60404)

[作者简介] 洪彦彬(1979-), 男, 广东潮州人, 在读硕士, 主要从事水稻分子育种研究。E-mail: hongyanbin@tom.com

[通讯作者] 杨祁云(1966-), 女, 广东揭阳人, 研究员, 主要从事水稻稻瘟病菌研究。E-mail: yangqy@gdppri.com

陈志强(1956-), 男, 广东揭阳人, 教授, 主要从事水稻遗传育种研究。E-mail: chenlin@scau.edu.cn

因鉴别寄主(其中 F80-1、F98-7、F124-1、F128-1、F129-1 和 F145-2 为稻瘟病近等基因系, 其他为国际水稻研究所的单基因系)接种, 结果可侵染其中的 11 个, 其基因型分别为 *Pi-a*(1)、*Pi-ta*(2)、*Pi-b*、*Pi-t*、*Pi-km*、*Pi-ta*、*Pi-kP* (F129-1)、*Pi-3*、*Pi-5*、*Pi-12* 和 *Pi-19*。菌株的DNA 遗传宗谱型为广东的次优势宗谱 GDL 1, 其致病谱较窄, 能高感丽江新团黑谷。

1.4 对稻瘟病的抗性鉴定方法

将空间诱变材料与原种对照的种子采用常规方法浸种、催芽, 依次穴播(每穴 1 粒种子)于瓷盆中, 待秧苗长至 3~4 片叶时, 用筛选出的代表菌株接种, 接种液的分生孢子浓度为 5×10^4 /mL, 采用高压喷雾方法接种。接种苗于 25℃ 暗室中保湿 24 h 后, 放荫棚下继续保湿, 7 d 后调查发病情况。病级划分标准按中国统一的 0~9 级标准进行, 将病级为 0~3 级的定为抗病, 4~9 级的定为感病。

1.5 水稻总DNA 的提取

水稻总DNA 的提取采用Zheng 等^[5]的简易SDS 抽提法并稍加修改。取水稻苗期幼叶 2~3 片于研钵中, 加 400 μ L SDS 抽提液(200 mmol/L Tris-HCl, pH 7.5, 25 mmol/L NaCl, 0.5% SDS), 再加入少许石英砂, 研磨成绿色浆状。转移至 2 mL 离心管中, 用 400 μ L SDS 抽提液洗净研钵, 洗液一同倒入离心管中, 放置约 1 h。加入氯仿/异戊醇(体积比为 24:1) 约 1 mL, 振荡 45 min, 充分混匀后 14 000 r/min 离心 5 min, 上清液转移到另一 1.5 mL 离心管中, 加入等体积冰冻乙醇, -20℃ 下放置 15 min 析出DNA, 14 000 r/min 离心 3 min, 弃上清液, 用体积分数 75% 乙醇漂洗, 适当风干, 加 200~300 μ L TE (10 mmol/L Tris-HCl, pH 8.0, 1 mmol/L EDTA) 溶解。

1.6 微卫星分析

所用引物根据 Cornell 大学(网址: <http://ars-genome.cornell.edu/rice/microsat>) 公布的序列, 由上海生工公司合成, 共 222 对, 均匀分布于水稻的 12 条染色体上。PCR 反应在 PE9700 热循环仪上进行。按照 Panaud 等^[6]的方法并稍加修改。PCR 反应体系(20 μ L): 1 \times PCR Buffer (50 mmol/L KCl, 10 mmol/L Tris-HCl, pH 8.3, 1.5 mmol/L MgCl₂, 0.1% 明胶), 1 U *Taq* DNA 聚合酶, 50~100 ng 模板DNA, 0.15 μ mol/L 引物, 0.2 mmol/L dNTP。反应程序: 94℃ 预变性 5 min (94℃ 1 min, 55℃ 1 min, 72℃ 1 min), 35 个循环, 72℃ 再延伸 5 min。扩增产物在 6.0% 聚丙烯酰胺凝胶中电泳, 用 1 g/L AgNO₃ 染色观察。

2 结果与分析

2.1 空间诱变水稻的SP₁ 代抗性变异分析

从表 1 可以看出, 丽江新团黑谷经过空间诱变后 SP₁ 代的 510 株秧苗中有 70 株抗病(病级 0~3 级), 占总株数的 13.7%; 440 株感病秧苗中, 病级为 4~5 级的植株有 48 株, 占 9.4%; 病级为 6 级的有 60 株, 占 11.8%; 病级为 7~9 级的有 332 株, 占 65.1%; 98 株原种对照均严重感病, 病级为 8~9 级。丽江新团黑谷是国际上公认的、有准确可靠实验证据的不含任何主效抗性基因的普感稻瘟病的粳稻品种^[7]。以上结果表明, 经过空间诱变后, 丽江新团黑谷在 SP₁ 代株系中有一部分株系的抗性已产生显著变化, 由原来严重感病变成抗病, 另一部分感病程度减轻。说明空间诱变使丽江新团黑谷 SP₁ 代株系对稻瘟病的抗性发生了改变。

表 1 空间诱变丽江新团黑谷 SP₁ 代的苗期接种结果

Table 1 Leaf blast resistance of SP₁ lines derived from Lijiangxintuanheigu after space mutation

项目 Item	空间诱变丽江新团黑谷 SP ₁ 代株系病级 Leaf blast scale of SP ₁ lines of Lijiangxintuanheigu after space mutation										原种对照 病级 Leaf blast scale of CK
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	8~9
株数 No. of tilling	14	27	10	19	18	30	60	163	141	28	98
占总株数比例/% Percentage	2.7	5.3	2.0	3.7	3.5	5.9	11.8	32.0	27.6	5.5	100

注: 原种对照指丽江新团黑谷。

Note: CK referred as Lijiangxintuanheigu

2.2 空间诱变的水稻SP₂ 代抗性变异分析

由表 2 可知, 空间诱变丽江新团黑谷 SP₁ 代感病植株 L_s-SP₁ 在 SP₂ 代抗性未产生分离, 均为感病。从

SP₁ 代中选取的 11 个抗病植株在 SP₂ 代抗性全部产生分离, 且各株系之间抗感分离的比例也不一样。对 11 个抗病 SP₂ 代株系抗感分离比例进行 χ^2 分析, 统

计结果表明, L_{R1-SP_2} , L_{R5-SP_2} , L_{R7-SP_2} , L_{R8-SP_2} , L_{R10-SP_2} 和 L_{R11-SP_2} 符合 $3:1$ 的理论比值, L_{R3-SP_2} 和 L_{R6-SP_2} 和 L_{R9-SP_2} 符合 $15:1$ 的理论比值, 而 L_{R2-SP_2} 和 L_{R4-SP_2} 既不符合 $3:1$ 也不符合 $15:1$ 的理论比值。根据孟德尔遗传规律, 抗感分离比例符合 $3:1$ 的株系对菌株 GD 531 的抗性受 1 对抗病主效基因

控制, 而抗感分离比例符合 $15:1$ 的株系对菌株 GD 531 的抗性受 2 对抗病主效基因控制。说明 SP_2 代多数抗病株系受 1 对或 2 对显性主效基因控制, 而 L_{R2-SP_2} 和 L_{R4-SP_2} 既不符合 $3:1$ 也不符合 $15:1$ 的理论比值, 其抗性遗传基础可能较复杂, 有待进一步研究。

表2 空间诱变丽江新团黑谷 SP_2 代的苗期接种结果

Table 2 Leaf blast resistance of SP_2 lines derived from L ijiangxintuanheigu after space mutation

株系 Lines	抗感分离 Deviation of resistant plants to susceptible ones		期望值 Expectation	χ^2	P	
	R	S				R S
L_{R2-SP_2}	75	42	1.79	3.1	6.8438	0.005~0.01
L_{R5-SP_2}	71	35	2.03	3.1	3.2040	0.05~0.1
L_{R8-SP_2}	109	40	2.73	3.1	0.1815	0.5~0.75
L_{R11-SP_2}	79	26	3.03	3.1	0.0043	0.9~0.95
L_{R7-SP_2}	87	24	3.63	3.1	0.5150	0.25~0.5
L_{R10-SP_2}	109	24	4.65	3.1	3.4007	0.05~0.1
L_{R1-SP_2}	86	18	4.81	3.1	2.9714	0.05~0.1
L_{R4-SP_2}	54	9	6.01	3.1	4.1841	0.025~0.05
L_{R6-SP_2}	123	12	10.24	15.1	5.6391	0.01~0.025
L_{R9-SP_2}	106	9	11.82	15.1	1.1973	0.25~0.5
L_{R3-SP_2}	130	11	11.82	15.1	0.2441	0.5~0.75
L_S-SP_2	0	114			0.3439	0.5~0.75
原种(CK)	0	30				

注: R. 抗病; S. 感病; $\chi^2_{0.05} = 3.84 (df = 1)$; P. 理论频率。下表同。

Note: R. Resistant; S. Susceptible; $\chi^2_{0.05} = 3.84 (df = 1)$; P. Expected frequency. The following table is the same

2.3 空间诱变的水稻 SP_3 代抗性变异分析

从表3可以看出, L_{R11-SP_3} 的6个株系中有3个株系的抗性继续发生分离, 抗感比例符合 $3:1$ 的理论比值, 其余3个株系均表现为抗病; L_{R7-SP_3} 的6个株系中有4个抗性继续发生分离, 抗感比例符合 $3:1$ 的理论比值, 其余2个株系均表现为抗病; 而 L_{R9-SP_3} 和 L_{R3-SP_3} 的12个抗病株系全部表现为抗病。根据对丽江新团黑谷 SP_2 代抗性分析可知, L_{R11-SP_2} 和 L_{R7-SP_2} 对菌株 GD 531 的抗性受 1 对抗病主效基因

控制, 而 L_{R9-SP_2} 和 L_{R3-SP_2} 受 2 对抗病主效基因控制。根据孟德尔遗传规律, L_{R11-SP_2} 和 L_{R7-SP_2} 群体中有 50% 植株的抗病基因是杂合的, 到了 SP_3 代这些携带杂合抗病基因的植株抗性会继续产生分离, 而 L_{R9-SP_2} 和 L_{R3-SP_2} 由于受 2 对抗病主效基因控制, 到了 SP_3 代, 大部分植株至少含有 1 个抗病基因, 因此多数植株表现为抗病。以上的推论与空间诱变丽江新团黑谷 SP_3 代的抗性测定结果相吻合。

表3 空间诱变丽江新团黑谷 SP_3 代的苗期接种结果

Table 3 Leaf blast resistance of SP_3 lines derived from L ijiangxintuanheigu after space mutation

株系 Lines	抗感分离 Deviation of resistant plants to susceptible ones		期望值 Expectation	χ^2	P	
	R	S				R S
L_{R11-SP_3-1}	88	27	3.26	3.1	0.0724	0.75~0.9
L_{R11-SP_3-2}	91	30	3.03	3.1	0.003	0.9~0.95
L_{R11-SP_3-3}	154	0				
L_{R11-SP_3-4}	100	38	2.63	3.1	0.3478	0.5~0.75
L_{R11-SP_3-5}	144	0				
L_{R11-SP_3-6}	127	0				
L_{R7-SP_3-1}	161	0				
L_{R7-SP_3-2}	134	0				
L_{R7-SP_3-3}	94	28	3.36	3.1	0.1749	0.5~0.75

3 讨 论

本研究利用返回式卫星搭载空间诱变水稻品种丽江新团黑谷,对空间诱变后的SP₁~ SP₃代进行稻瘟病抗性的初步鉴定。结果表明,经过空间诱变后,部分植株对稻瘟病产生了明显的抗病性变异,13.7%的单株由感病变为抗病,说明空间诱变能够有效地作用于空间诱变个体,促使诱变个体产生抗性变异,从而改良品种的抗性。

SP₂~ SP₃代接种结果表明,经过诱变后,同一品种不同株系对同一接种菌株产生抗性突变的抗病基因数目不同,多数产生1~2个抗病主效基因的突变。由于目前对水稻空间诱变染色体变异的遗传机

理还不是很清楚,诱变除了导致基因的位点突变外,也可能导致染色体的缺失、重复、倒位、易位等畸变,这些畸变可能导致少数经空间诱变的丽江新团黑谷SP₂代株系抗感分离比例不符合3:1或15:1的理论比值。

利用L_{R8}-SP₂群体对丽江新团黑谷经过空间诱变产生的抗病基因进行分子标记,结果发现该基因与位于第9染色体SSR标记RM 409连锁,说明空间诱变丽江新团黑谷在低代就产生抗性基因的突变。由于丽江新团黑谷是国际公认的对稻瘟病不具抗病基因的粳稻品种,对其空间诱变后代的抗性基因进一步精细定位、克隆,将有助于进一步研究空间诱变抗性基因突变的机理。

[参考文献]

- [1] 王 慧,陈志强,杨祁云,等.水稻空间诱变突变品系主要农艺经济性状及稻瘟病抗性变异[J].华南农业大学学报:自然科学版,2004,25(4):1-5
- [2] 徐建龙,王俊敏,骆荣挺,等.空间诱变水稻大粒型突变体的遗传育种研究[J].遗传,2002,24(4):431-433
- [3] 李源祥,李金国,杨新喜,等.赣早粳47号亲本空间诱变的性状变异研究[J].航天医学与医学工程,2002,15(2):127-131
- [4] 周炳炎,许秀钧,黎毛毛,等.水稻空间诱变恢复系杂种优势测定试验初报[J].遗传,2001,23(3):234-236
- [5] Zheng K L, Huang N, Bennett J, et al. PCR-based marker-assisted selection in rice breeding [C]//RRIDiscussion Paper [S 1]: s n 1995, 12: 265-270
- [6] Panaud O, Chen X, McCouch S R. Development of microsatellite makers and characterization of simple sequence length polymorphism (SSLP) in rice (*Oryza sativa* L.) [J]. Mol Gen Genet, 1996, 252: 597-607.
- [7] 凌忠专,蒋琬如,王久林,等.水稻品种丽江新团黑谷普感特性的研究和利用[J].中国农业科学,2001,34(1):1-4

Study on resistance variation of space-induced lines to rice blast and molecular marker of the resistant mutant gene

HONG Yan-bin^{1,2}, YANG Qi-yun¹, LI Pei-zhen¹, WANG Hui², CHEN Zhi-qiang²

(1 Plant Protection Research Institute, Guangdong Academy of Agricultural Sciences, Guangzhou, Guangdong 510640, China;

2 College of Agriculture, South China Agriculture University, Guangzhou, Guangdong 510642, China)

Abstract: The research data on the variation of the resistance to rice blast in the SP₁ - SP₃ of lijiangxintuanheigu which was susceptible to blast after space-induction showed that 13.7% mutant plants in the SP₁ were resistant to rice blast. In the SP₂ rice space-induced lines, most of the resistant lines had a ratio of 3:1 or 15:1 of the deviation of resistance and susceptibility, implying the resistance was controlled by 1 pair or 2 pairs of major genes. In the SP₃ rice space-induced lines, a part of lines whose resistance were controlled by a pair of major genes continued to demonstrate deviation of resistance, but for the lines whose resistance were controlled by 2 pairs of major genes, the resistance generally became stable. By using the L_{R8}-SP₂ population for the molecular markers of the blast resistant genes induced through space mutation, it was found that the resistant gene was in the 9th chromosome and was linked with the SSR marker RM 409.

Key words: rice space-induced line; rice blast; resistance mutation; resistance gene; SSR marker