

玉米抗纹枯病 QTL 分子标记定位

杨华 杨俊品* 荣廷昭 谭君 邱正高

(四川农业大学玉研究所[†], 雅安 625014; 四川省农业科学院作物研究所[†], 成都 610066; 重庆市农业科学研究所, 重庆 400055. † 同等贡献. * 联系人, E-mail: yjunpin@263.net)

摘要 用抗玉米纹枯病自交系CML270和感病自交系478的(CML270×478)×CML270 BC₁ 2群体共322个株系为作图和定位群体, 构建了125个SSR标记位点的遗传连锁图谱, 覆盖玉米基因组1939.0 cM, 平均图距15.5 cM. 采用复合区间定位分析, 检测到玉米纹枯病抗病指数主效QTL位点3个, 2个位于第1染色体, 1个位于第7染色体上, 它们分别能解释表型变异的18%~20%; 控制株高的QTL位点7个, 分别位于第3~6染色体上, 控制“穗位高”的QTL位点5个, 分别位于第3, 4, 6染色体上. 自交系CML270玉米纹枯病抗性主效QTL真实存在, 抗性与植株高度遗传上不存在连锁关系, 为玉米纹枯病分子标记辅助选择(MAS)和抗性基因分离与克隆提供了技术和材料支撑.

关键词 纹枯病 SSR QTL 定位 遗传图谱 玉米

玉米纹枯病(*Rhizoctonia solani*)是世界玉米生产中的重要病害之一. 在我国, 玉米纹枯病最早发生的记载于1966年^[1]. 20世纪70年代后, 随着玉米种植面积的扩大, 杂交种的推广应用, 施肥量及种植密度的提高, 玉米纹枯病的发生、发展和蔓延日趋严重, 已成为我国玉米产区的主要病害之一. 迄今, 国内外尚未有玉米纹枯病抗源研究的报道, 相关研究集中于对其症状、病原学、病害发生、发展与危害以及病害防治等方面^[2~15]. 玉米品种间存在纹枯病抗性差异^[7,16], 但一般认为纹枯病抗性仅仅是控制株高或生育期等性状的基因多效性^[17]. 事实上, 在水稻和小麦中, 国内外已有纹枯病抗源和抗性遗传研究报道^[12,17~19], 抗性表现为受主效基因、微效基因或主效和微效基因共同控制.

为此, 我们于1996年从国际小麦玉米改良中心(CIMMYT)引进玉米纹枯病抗源, 通过1997~2000年抗性鉴定实验, 获得高抗玉米纹枯病且抗性稳定的抗性材料CML270, 于2000年7月通过四川省科学技术厅技术鉴定和由中国农业大学组织的“九五”国家重点玉米科技攻关项目验收. 为了从遗传上证实CML270抗性的存在, 我们构建了抗感杂交组合, 采用多生态接种鉴定, 应用SSR分子标记技术, 检测是否存在主效QTL, 从而为进一步开展分子标记辅助选择、抗性基因分离与克隆、抗性转育及抗病育种奠定基础.

1 材料与方 法

() 群体. 1999年, 以CML270(抗)为母本(四

川省农业科学院作物研究所提供), 478(感)为父本杂交, 2000年获得(CML270×478)×CML270 BC₁ 2种子322份, 加亲本共324份, 2001年在雅安、重庆、成都3地区试点, 采用 α -格子方设计(18×18), 3次重复, 春播, 行长4 m, 行距0.8 m, 株距0.25 m, 16窝/行, 定苗1株/窝, 单行区, 常规大田管理. 玉米纹枯病致病菌株采自四川省和海南省15个地(市)县, 经四川省农业科学院植物保护研究所分离、纯化和鉴定, 属玉米纹枯病强致病菌丝融合群AG-1-IA, 4冰箱保存备用. 在成都和重庆试点, 于10~12叶期, 等量接种分离纯化扩繁培养物(带菌玉米粉粒)于叶鞘内, 接种后2~3 d连续喷水, 以提高田间湿度利于发病.

() 田间观测记载. BC₁ 2, 父本, 母本和F₁基于小区进行调查. 株高为植株基部至雄穗顶端之间的长度, 取15株的平均值(cm); 穗位高为植株基部至主穗穗节之间的长度, 取15株平均值(cm); 抗病指数指在玉米乳熟期, 按玉米纹枯病抗性全国统一记载标准(表1)分单株记载病级^[20], 抗病指数=1-病情指数.

表1 玉米纹枯病记载标准^{a)}

反应类型	抗病类型	发病率(%)	发病症状
0	HR	0	无病斑
1	HR	0.1~20	病斑在穗下第4叶鞘以下
3	R	20.1~40	病斑在穗下第3叶鞘以下
5	MR	40.1~60	病斑在穗下第2叶鞘以下
7	S	60.1~80	病斑在穗下第1叶鞘以下
9	HS	80.1~100	病斑在穗鞘的上方

a) HR: 高抗病, R: 抗病, MR: 中度抗病 t; S: 感病, HS: 高度感病

() 田间性状统计分析. 方差分析、 χ^2 检验按荣廷昭等人^[21]的方法进行; 正态分布检验按范福仁^[22]介绍的配合正态曲线 χ^2 检验方法.

() DNA 的提取和纯化. 按株系取心叶 30 株等量混合, 取 15 g, 采用 CTAB 法(CIMMYT 实验手册, 1998)抽提和纯化总 DNA.

() SSR 分析. 选用分布于玉米 10 个连锁群上的 399 对 SSR 引物序列, 由 SBS 公司合成. PCR 反应体系和反应程序按 <http://www.burr.bio.bnl.gov/acemaz.html> 提供的方法进行. PCR 产物用 3.5% 琼脂糖或 6.0% 聚丙烯酰胺凝胶检测, 聚丙烯酰胺凝胶电泳、银染程序参照 Clark 等人^[23]方法进行, Gel Doc1000 凝胶成像系统 (Bio-Rod 公司) 成像, Quantity 软件分析电泳结果.

() 数据分析. 根据电泳谱带结果, 建立作图群体的 SSR 标记数据库: 与亲本 CML270 相同带型记为 A, 杂合 (F_1) 带型记为 H, 缺失或模糊记为“-”. 对所有引物带型按孟德尔分离比 1:1 进行 χ^2 检验. 根据带型转换数据文件, 启动 MAPMAKER/EXP 3.0b, 调入数据文件, 先进行 2 点分析, 选用“Kosambi”函数将重组值转换成图距 (cM). 采用“GROUP”命令 (LOD 值 ≥ 3.0 , 重组率 < 0.50), 推测可能的连锁群, 然后, 参照 <http://www.agron.missouri.edu/ssr.html> 获得的 SSR 标记所在染色体位置, 利用 3 点和多点分析构建 10 个连锁群框架, 通过“COMPARE”和“TRY”命令最终确定连锁遗传图谱^[24].

() QTL 定位. 运用 WinQtlcart v2.0 软件, 采用复合区间作图法对抗病指数、株高、穗位高进行分析. 运行参数为: 步行速度为 2 cM; 窗口大小为 10.00 cM; 模式 6; 背景标记为 5; LOD 值取 2.5 作为阈值判断 QTL 的存在, 同时计算每个 QTL 对表型变

异的贡献率.

2 实验结果

2.1 田间统计分析

自交系 CML270 抗病指数为 91.1%, 表现高抗; 自交系 478 抗病指数为 39.5%, 表现高感; CML270 株高、穗位高分别为 148.0 和 56.8 cm, 478 株高、穗位高分别为 109.4 和 29.0 cm, 存在较大差异. 两亲本自交系间纹枯病抗性、株高、穗位高等性状有较大差异; 正态曲线 χ^2 检验结果表明, $BC_{1:2}$ 群体抗病指数、株高、穗位高 3 性状正态曲线 χ^2 值均不显著, 符合正态分布, 表明 $BC_{1:2}$ 群体抗病指数、株高、穗位高适合于 QTL 定位研究.

对作图群体田间实验结果进行联合方差分析, 3 地点误差归入区组间差异, 分析结果见表 2. 从表中可以看出, 相对抗病指数、株高、穗位高 3 性状株系间均存在极显著差异, 可进一步进行标记定位分析.

2.2 构建连锁遗传图谱

399 对 SSR 引物中, 128 对引物双亲间差异明显, 多态性频率 31.56%. 用表现双亲多态性的 128 个 SSR 标记对 $BC_{1:2}$ 群体进行分析 (图 1 为 phi116 在 $BC_{1:2}$ 群体的分离), 共检测到 129 个位点 (umc1294 检测到 2 个位点), 利用 χ^2 检验检测 128 个 SSR 标记 129 个标记位点在 $BC_{1:2}$ 群体的分离, 125 个 SSR 标记位点符合孟德尔单位点分离比 (1:1), 4 个标记表现偏分离, 偏分离比例 3.10%. 剔除上述表现偏分离的 4 个标记, 根据转换数据建立 124 个 SSR 标记 125 个标记位点的数据文件, 启动 MAPMAKER/EXP3.0b, 调入数据文件, 先进行 2 点分析, 采用“GROUP”命令 (LOD 值 ≥ 3.0 , 重组率 < 0.50), 推测可能的连锁群,

表 2 性状 F 检验结果^{a)}

项目	株系平均	最小值	最大值	区组间	株系间	误差	F 值
抗病指数	54.09	27.14	75.41	86081.42	508.70	237.25	2.14**
株高	162.77	136.25	190.38	103314.99	622.64	162.80	3.82**
穗位高	90.17	85.29	98.02	35503.84	230.63	60.35	3.82**

a) **示极显著水平 ($F_{(0.01, \infty)} = 1.25$)

P₁ P₂ 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29

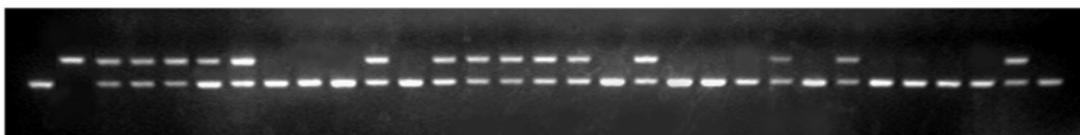


图 1 引物 phi116 对分离群体基因型检测的部分结果
P₁: CML270 带型; P₂: 478 带型; 1~28 代表 $BC_{1:2}$ 群体各株系带型

根据 <http://www.agron.missouri.edu/ssr.html> 获得的 SSR 标记所在染色体位置, 利用 3 点和多点分析, 通过“COMPARE”和“TRY”命令最终确定 125 个 SSR 标记位点在连锁遗传图谱中的位置。

利用上述 124 个 SSR 标记, 构建了 125 个 SSR 标记位点的玉米分子标记遗传图谱, 该分子遗传图谱覆盖整个玉米基因组 1939 cM, 平均间距 15.5 cm, 最大图距 47.5 cM(图 2)。

2.3 抗性 QTL 定位分析

用构建的 SSR 遗传连锁图谱, 采用复合区间作图法对抗病指数进行 QTL 定位分析。检测到 3 个主效 QTL, 分别位于第 1 和第 7 染色体上(表 3, 图 2)。邻近的连锁标记为 bnlgl671, umc1044 和 phi116, 其区间标记, 在第 1 染色体上分别位于 bnlgl597~bnlgl671 和 bnlgl421~umc1044 之间, 其贡献率为 18.38%和 18.20%。前一 QTL 加性效应为负值, 表明亲本 CML270 起负向的作用; 亲本 478 起正向的作用, 增加抗性。后一 QTL 加性效应为正, 表明亲本 CML270 起正向作用, 增加抗性; 在第 7 染色体上 phi116~umc1428 之间, 贡献率 20.86%, 方向为正, 表明亲本 CML270 起正向作用, 增加抗性。

2.4 株高和穗位高 QTL 定位分析

共检测到控制株高主效 QTL 位点 7 个(表 4), 分别位于 3~6 连锁群上, 邻近连锁标记为 dupssr23, nc005, bnlgl755, umc1294, umc1008, bnlgl118 和 bnlgl759, 距离在-0.44~6.01 cM 之间。各 QTL 的贡献率在 15.92%~32.63%。其中第 5 连锁群上的 QTL 加性效应为正值, 表明亲本 CML270 在该位点上的作用是正向的, 增加株高。其余 QTL 加性效应均为负值, 表明亲本 CML270 在这些位点作用方向是降低植株高度。

穗位高 QTL 定位分析共检测到 5 个 QTL 位点(表 4), 分别位于第 3, 4, 6 连锁群上, 邻近连锁标记为 dupssr23, mmc0321, bnlgl292, umc1294, umc1002, 距离为-11.11~-1.11 cM, QTL 对表型的贡献率为 11.46%~25.08%。其中前 4 个 QTL 加性效应为负值, 表明亲本 CML270 作用方向是降低穗位高; 后一 QTL 加性效应为正, 表明其作用方向是增加穗位高度。

综上所述, 相对抗病指数检测出的 QTL 在第 1, 7 连锁群上, 株高和穗位高检测出的 QTL 在第 3~6 连锁群上, 说明亲本 CML270 对玉米纹枯病的抗性与株高

和穗位高在遗传上没有连锁关系, 表现独立遗传。

3 讨论

玉米纹枯病是一个喜温喜湿的病害^[1-11], 气候因素对纹枯病的发生有重要影响。本研究在纹枯病常发区 3 种大田气候环境下进行, 同时人工接种加强了优势种群的病菌数量, 从病原上保证各株系发病的一致性和严重性, 增加了田间抗性鉴定的可靠性。实验设计采用大样本可以降低抽样误差, 易于检测紧密连锁基因位点的交换, 有利于提高定位的准确性。Tanksley^[12]报道能够说明表型变异的 10%以上的 QTL 为主效基因。本研究检测到抗病指数的贡献率在 10%以上的主效 QTL 有 3 个, 与株高和穗位高独立遗传, 表明自交系 CML270 存在纹枯病主效抗性基因, 玉米纹枯病抗源真实存在。与连续多年(1997~2000 年)人工接种鉴定, CML270 表现高抗且抗性稳定, 结果一致(通讯资料)。

根据前人研究^[14,19,26-28], 定位的 QTL 与邻近分子标记距离较近, 且利用分子标记定位群体进行分子标记辅助选择(MAS), 有利于提高选择效率。本研究发现了纹枯病抗性 3 个位点, 邻近标记距离均 4 cM 以内, 为玉米纹枯病抗性分子标记辅助选择提供了可能, 为简便、快速转育玉米纹枯病抗性奠定了基础。目前, 我们已利用 phi116, umc1044 对 (478×CML270)×CML270 的 BCF₆ 群体进行抗性分子标记辅助选择, 标记抗性与田间抗性极显著相关, 从中获得多个高抗玉米纹枯病自交系, 如抗玉米纹枯病自交系 478C₄, 一般配合力相对平均值为 2.03, 与多个自交系表现了较高的特殊配合力, 其中 478C₄×8701 已进入重庆市玉米区域实验(另文发表)。此外, 自交系 CML270 来源于热带种质, 与国内玉米种质遗传距离较远, 在玉米常规育种具较大利用价值, 已利用 CML270 与国内骨干自交系 330, Mo17, 48-2 及成 687, 3732 等进行杂交、回交, 开展抗性转育, 获得了一批抗玉米纹枯病自交系。因此, 我们认为, 自交系 CML270 是一个优良的玉米纹枯病抗病种质资源, 它的发现和利用必将为我国、特别是西南玉米纹枯病抗病育种奠定良好的种质基础。

目前, 正利用 mRNA 差别显示法和抗病基因同源序列分离玉米纹枯病抗性基因同源序列; 拟利用 (478×CML270)×478 回交群体建立抗玉米纹枯病近等基因系, 对抗性基因进行精细定位, 采用图位克隆实

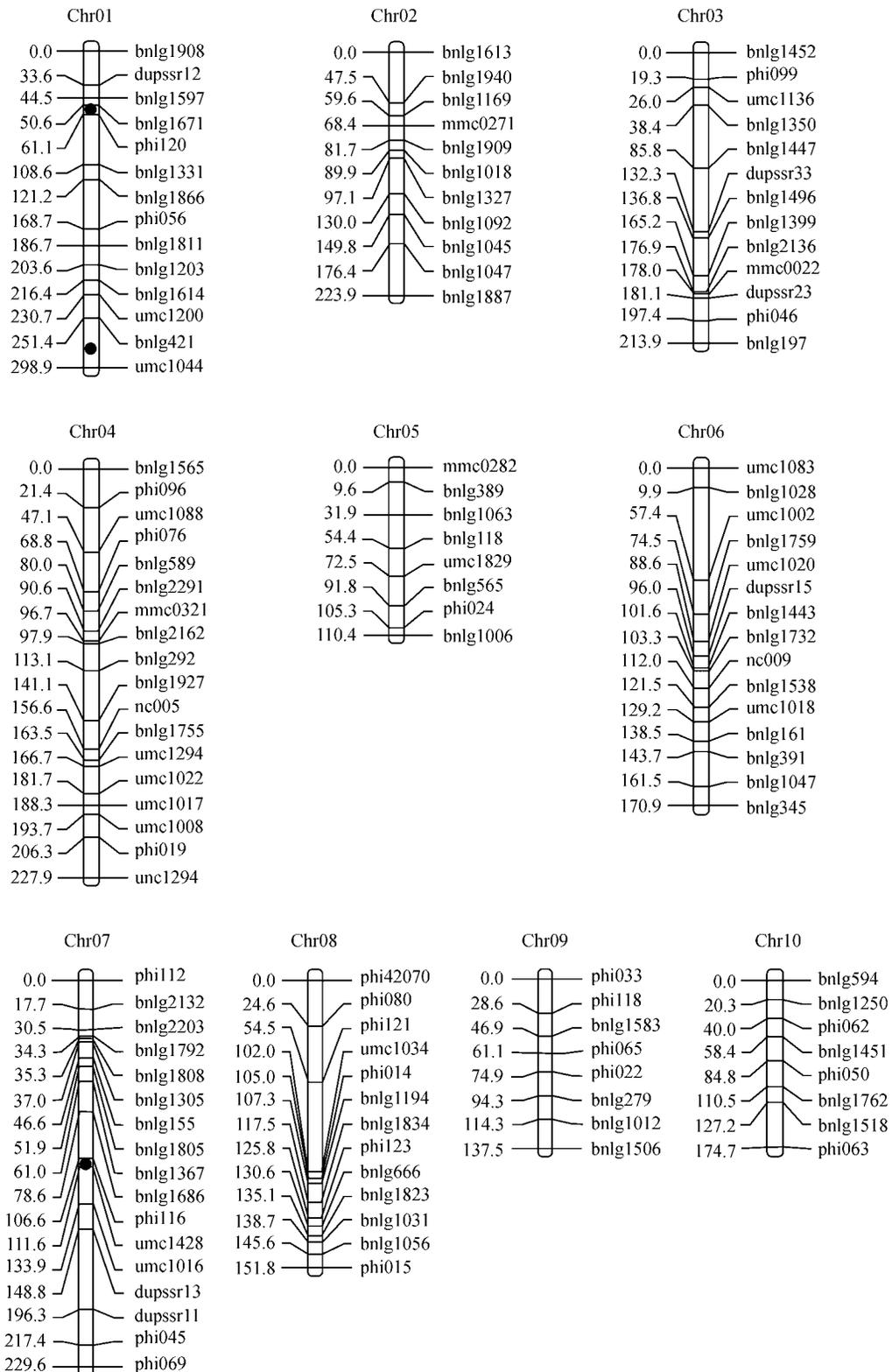


图 2 玉米 SSR 遗传连锁图谱及纹枯病抗性的 QTL 定位图

● 示相对抗病指数 QTL

表3 抗病指数 SSR 定位分析结果

性状	序号	染色体	位置	区间标记	LOD 值	邻近标记	与邻近标记的距离	加性基因效应	贡献率(%)
抗病指数	1	1	48.51	bnlg1597~bnlg1671	2.5794	bnlg1671	-2.115	-3.3209	18.38
	2	1	295.39	bnlg421~umc1044	3.8193	umc1044	-3.485	4.1258	18.20
	3	7	108.59	phi116~umc1428	6.2419	phi116	2.015	5.376	20.86

表4 株高和穗位高 SSR 定位分析结果

性状	序号	染色体	位置	区间标记	LOD 值	邻近标记	与邻近标记的距离	加性基因效应	贡献率(%)
株高	1	3	180.01	mmc0022~dupssr23	4.8257	dupssr23	-1.04	-4.4653	22.77
	2	4	153.09	bnlg1972~nc005	3.9909	nc005	-3.46	-4.706	24.56
	3	4	162.56	nc005~bnlg1755	11.3178	bnlg1755	-0.965	-7.0277	32.17
	4	4	172.66	umc1294~umc1022	13.3169	umc1294	6.01	-9.3123	15.92
	5	4	195.71	umc1008~phi019	2.7164	umc1008	2.01	-3.4667	32.63
	6	5	53.96	bnlg1063~bnlg118	5.6797	bnlg118	-0.44	4.6663	27.70
	7	6	78.49	bnlg1759~umc1020	2.9121	bnlg1759	4.015	-3.7199	26.04
穗位高	1	3	183.06	dupssr23~phi046	2.7356	dupssr23	2.01	-2.2171	23.33
	2	4	94.59	bnlg2291~mmc0321	7.3876	mmc0321	-2.135	-3.7973	25.08
	3	4	101.94	bnlg2162~bnlg292	3.4581	bnlg292	-11.11	-2.7613	20.27
	4	4	165.54	bnlg1755~umc1294	2.8914	umc1294	-1.11	-2.249	23.14
	5	6	51.9	bnlg1028~umc1002	2.6394	umc1002	-5.5	2.3929	11.46

施对抗性基因的分离、克隆,进而开展遗传转化,为最终解决玉米纹枯病危害提供材料和技术支撑。

致谢 本工作为“948”项目“玉米纹枯病抗源及分子标记辅助转育技术”(批准号: 971004)、四川省农业生物技术育种攻关项目、国家高技术研究发展计划(批准号: 2003AA207070)、四川省玉米育种及种质资源研究项目资助及四川省农业科学院博士后基金资助项目。

参 考 文 献

- 戚佩坤. 吉林省栽培植物真菌病害志. 北京: 科学出版社, 1966. 33
- 高卫东. 华北区玉米、高粱、谷子纹枯病病原学初步研究. 植物病理学报, 1987, 17(4): 247-251
- 谭复顺. 鄂西山区玉米纹枯病损失调查. 植物保护, 1988, 14(2): 54
- 谭方河, 陶家凤. 西南地区立枯丝核菌优势融合群致病性的初步研究. 四川农业大学报, 1991, 9(1): 149-155
- 宋佐衡, 陈捷, 刘伟成. 玉米纹枯病研究进展概述. 辽宁农业科学, 1993, 4: 45-47
- 卿九龄. 摘除病叶防治玉米纹枯病的研究. 植物保护, 1994, 20(1): 4-6
- 吴大椿, 万明刚. 玉米对纹枯病抗性的初步研究. 湖北农业科学, 1995, 6: 39-41
- 吴大椿, 方守国, 余知和. 玉米纹枯病病原及生物学特性研究. 湖北农学院学报, 1997, 3: 15-19
- 陈捷. 玉米纹枯病病原菌浸染过程研究. 沈阳农业大学学报, 2000, 31(5): 503-506
- 唐朝荣, 陈捷, 纪明山, 等. 辽宁省玉米纹枯病病原学研究. 辽宁农业科学, 2000, 30(4): 319-326
- 肖炎农, 李捷生, 郑用铨, 等. 湖北省玉米纹枯病病原丝核菌的种类和致病性. 菌物系统, 2002, 21(3): 419-422
- 张怀琼, 任正隆. 小麦纹枯病抗性及其遗传的初步研究. 植物病理学报, 1999, 29(3): 199-202
- Hirrel M C. First report of sheath blight (*Rhizoctonia solani*) on field corn in Arkansas. Plant Disease, 1988, 72(7): 644

- Lande R, Thompson R. Efficiency of marker-assisted selection in the improvement of quantitative traits. Genetics, 1990, 124: 743-756
- Summer D R, Minton N A. Crop losses in corn induced by *Rhizoctonia solani* AG-2-2 and nematodes. Phytopathology, 1989, 79: 934-941
- Vimla B, Mukherjee B K, Ahuja V P. Combining ability analysis for resistance to banded leaf and sheath blight of maize. Indian J Genet, 1988, 48(1): 75-79
- 潘学彪, 邹军煌, 陈宗祥, 等. 水稻品种 Jasmine85 抗纹枯病主效 QTL 的分子标记定位. 科学通报, 1999, 44(15): 1629-1635
- Li Z K, Pinson S R M, Marshetti M A, et al. Characterization of quantitative trait loci(QTLs) in cultivated rice contributing to field resistance to sheath blight (*Rhizoctonia solani*). Theor Apple Genet, 1995, 91: 374-381
- Zou J H, Pan X B, Chen Z X, et al. Mapping quantitative trait loci controlling sheath blight resistance in two rice cultivars (*Oryza sativa* L). Theor Apple Genet, 2000, 101: 569-573 [DOI]
- 王晓鸣, 戴法超. 玉米病虫害田间手册. 北京: 中国农业科技出版社, 2001
- 荣廷昭, 朱孝达, 唐富玉. 农业实验与统计分析. 成都: 四川科学技术出版社, 1993
- 范福仁. 生物统计学. 南京: 江苏科学技术出版社, 1980. 74-78; 442-443
- Clark M S, 编. 顾红雅, 译. 植物分子生物学实验手册. 北京: 高等教育出版社, 1998
- Lander E S, Green P, Abrahamson J, et al. MAPMAKER: An interactive computer package for constructing primary genetic linkage maps of experimental and natural populations. Genomics, 1987, 1: 174-181 [DOI]
- Tanksly S D. Annu Rev Mapping polygenes. Genet, 1993, 27: 205-233
- 方宣钧, 吴为人, 唐纪良. 作物 DNA 标记辅助育种. 北京: 科学出版社, 2001
- Young N D. A cautiously optimistic vision for marker-assisted breeding. Mol Breeding, 1999, 5: 505-510 [DOI]
- Zent Z B. Precision mapping of quantitative trait loci. Genetics, 1994, 136: 1457-1468

(2004-11-18 收稿, 2005-03-14 收修改稿)