

玉米 SSR 连锁图谱构建和抗弯孢菌叶斑病的 QTL 分析

刘兰浩¹, 裴玉贺¹, 穆平¹, 张恩盈¹, 郭新梅¹, 鄢洪海², 宋希云¹

(1. 青岛农业大学 生命科学学院, 山东 青岛 266109; 2. 青岛农业大学 农学与植物保护学院, 山东 青岛 266109)

摘要: 利用 SSR 分子标记技术以及软件 Mapmaker3.0, Mapdraw2.0 和 QILMaper1.6 对齐 319 和掖 478 及其 F_{2:3} 家系进行了初步的遗传分析, 构建了分子遗传连锁图谱。该连锁图总长度 1 638.7 cM, 包含 114 个标记, 平均两个标记间的距离为 14.37 cM。在所做标记的附近得到 5 个 QTLs, 分别位于第 2, 3, 5, 6, 9 条染色体上, 能解释表型变异的 36.21%, 21.6%, 39.41%, 20.67%, 30.54%, 而且均检测出加性效应。另外, 还发现 QTLs 之间表现出上位性互作。

关键词: 玉米; 弯孢菌叶斑病; SSR; 上位性互作; 加性效应

中图分类号: Q78 文献标识码: A 文章编号: 1000-7091(2009)02-0027-05

SSR Linkage Map Construction and QTL Analysis for *Curvularia* Leaf Spot Disease in Maize

LIU Lan-hao¹, PEI Yu-he¹, MU Ping¹, ZHANG En-ying¹, GUO Xin-mei¹,
YAN Hong-hai², SONG Xi-yun¹

(1. College of Life Science, Qingdao Agricultural University, Qingdao 266109, China; 2. College of Agriculture and Plant Protection, Qingdao Agricultural University, Qingdao 266109, China)

Abstract: In this study, SSR molecular marker technology and software Mapmaker3.0, Mapdraw2.0 and alignment QILMaper1.6 were applied for preliminary genetic analysis of Ye 478, Qi319 and population of F_{2:3} lines, and molecular genetic linkage map was constructed. The total length of the linkage map was 1 638.7 cM, containing 114 markers, and the average distance between two markers was 14.37 cM. Five QTLs were found near the SSR markers set, which were localized on chromosome 2, 3, 5, 6, 9, which could explain 36.21%, 21.6%, 39.41%, 20.67%, 30.54% of the phenotypic variation. They all demonstrated additive effects. Digenic epistasis interactions existed between some detected QTLs related to resistance to *Curvularia lunata*.

Key words: Maize; *Curvularia lunata*; SSR; Epistasis interaction; Additive effects

玉米弯孢菌叶斑病 (*Curvularia lunata* (Wakker) Boed.) 原主要发生在热带及亚热带地区, 但自 1956 年 Nelson 报道该病害在印度发生以来, 目前全世界主要玉米产区多数都已发生^[1-3]。近几年, 在我国一些玉米产区相继较大面积地发生玉米弯孢菌叶斑病。该病害发展蔓延快, 已在相当一部分地区和省份造成严重危害^[4-12]。因此研究弯孢菌叶斑病的遗传机制, 确定抗病 QTL 位点, 发展分子标记辅助选择育种具有重要意义。

本研究在利用 SSR 标记构建玉米连锁图谱的

基础上, 对玉米抗弯孢菌叶斑病进行 QTL 初步分析, 以明确抗病基因数目、位置及效应, 深入了解玉米抗弯孢菌叶斑病的遗传机制, 为抗病育种提供理论依据, 从而推动抗弯孢菌叶斑病育种的发展。

1 材料和方法

1.1 试验材料

齐 319 和掖 478 均为高配合力的玉米自交系, 其中, 齐 319 对玉米弯孢菌叶斑病表现抗性, 掖 478 感病^[13]。用齐 319 × 掖 478 获得 F_{2:3} 家系 (78 个); 本试验

收稿日期: 2009-01-07

基金项目: “十一五” 科技支撑计划“粮食丰产科技工程”(2006BAD02A09-JS03); 山东省农业良种工程; 青岛市自然科学基金(05-2-JC-55)

作者简介: 刘兰浩 (1978-), 男, 山东潍坊人, 硕士, 主要从事玉米分子育种研究。

通讯作者: 宋希云 (1961-), 男, 山东潍坊人, 教授, 博士, 主要从事作物育种研究。

菌种 (*C. lunata*) 由青岛农业大学植物保护学院提供。

1.2 田间试验及抗病性鉴定

分别于 2006 和 2007 年将 F₂ 和 F_{2:3} 家系种植于青岛农业大学试验田。选取地势平坦、肥力均匀的田块播种, 小区面积 3.0 m × 0.7 m, 每小区 15 穴, 3 次重复, 随机排列, 8 叶左右接种。用手持喷雾器喷雾接种, 接种后捆扎保湿 48 h, 以后逐日观察记载潜育期, 待病情稳定后, 逐株记载病斑反应型、病斑数、病斑大小和严重度。严重度的鉴定: 待田间病情稳定后, 取果穗叶以上 3 叶逐株调查严重度。分级标准参照王宏等^[14]的方法。

1.3 玉米基因组 DNA 的提取

采用 CTAB (Cetyl triethylammonium bromide) 法提取玉米总 DNA, 参考 Saghai - Maroof^[15] 的方法。待 DNA 完全干燥后, 加入 100 μL 灭菌 TE, 溶解 DNA。每管加入 1 μL RNA 酶 (10 mg/mL), 37 °C 保温 30 min, 降解其中的 RNA。0.8% 琼脂糖凝胶电泳检验 DNA 质量, -20 °C 保存, 以备后用。

1.4 SSR 分析

按下列组成进行 PCR 反应 (总反应体积 20 μL) ddH₂O 8 μL, Primer F (10 μmol/L) 0.5 μL, Primer R (10 μmol/L) 0.5 μL, 2 × Taq Supermix 10 μL, 50 ng DNA。用 PCR (PTC200) 扩增仪进行扩增, 扩增条件如下: 95 °C 5 min, 65 °C 40 s, 72 °C 40 s, 一个循环; 然后 95 °C 30 s, 55 °C 40 s, 72 °C 40 s, 共 20 个循环; 95 °C 30 s, 15 个循环; 72 °C 6 min。样品取出后放在 4 °C 下备用, 或马上在扩增样品中加入点样缓冲液, 1:1 混合, 95 °C 下变性 5 min 后立即转移到冰浴中冷却待用。制备 8% PA 胶, 加入 10 μL 样品, 恒压 350 V 电泳 3 h。用银染法显带, 记录下亲本及各家系的带型情况。

1.5 数据处理及 QIL 分析软件

试验结果记录: 与齐 319 相同的位点记为 1, 与掖 478 相同的位点记为 2, 杂合的位点记为 3, 二者皆无的记为 0。利用 Mapmaker3.0 软件进行分子标记连锁分析, 利用遗传连锁图绘制软件 MapDraw2.0 绘制玉米分子遗传连锁图。利用 QILMapper1.6 软件进行 QIL 分析。

2 结果与分析

2.1 SSR 标记遗传连锁图谱的构建

选取 45 对 SSR 引物, 在亲本齐 319 和掖 478 间进行多态性筛选, 共选出 17 对带型清晰、重复性好的多态性引物用于连锁图谱的构建。用 MAPMAKER/EXP 3.0 软件进行分子标记连锁分析, 共 114 个标记纳入了该连锁图中。根据标记间的距离和标记顺序, 用软件 Mapdraw2.0 作图, 结果如图 1 所示。该连锁图总长度 1 638.7 cM, 平均两个标记间的距离为 14.37 cM。

2.2 严重度正态分布检验

F_{2:3} 家系植株发病的严重度分布如图 2 所示, 其中, 没有严重度为 0, 4, 5 级材料, 严重度为 0.5, 1, 2 和 3 级的材料分别有 6, 5, 24, 43 个, 分别占群体的 7.7%, 6.4%, 30.8%, 55.1%。可见在其 F_{2:3} 家系中中感的材料占了大多数, 但出现了超出其亲本抗性的材料。对其进行正态分布检验, 结果表明: 变异系数达 36.74%, 标准差为 0.84, 偏度为 -0.86, 概率 P=0.001 55, 峰度为 -0.36, 概率 P=0.504 15, 基本呈正态分布, 抗病性状表现出数量性状遗传的特点, 符合 QIL 定位要求。

2.3 抗病 QIL 分析

根据遗传连锁图谱, 利用 QILMapper1.6 软件对玉米弯孢菌叶斑病抗性进行 QIL 分析, 结果如表 1 和表 2 所示。

表 1 根据显著性水平检测到的 QILs

Tab. 1 QILs detected through the significant level

| 染色体 Chrom | 标记区间 Interval | 距左边界距离/M Site1 | 距左标记距离/M Site2 | 似然比 LR | LOD 值 LOD | 加性 效应 A | 概率值 Prob | 贡献率/ H ² (Δi) % |
|--------------|---------------------|-------------------|-------------------|-----------|--------------|------------|-------------|-------------------------------|
| 2 | bnlg121 - hrg1 | 0.020 | 0.020 | 16.04 | 3.48 | -0.508 5 | 0.000 1 | 36.21 |
| 3 | BE639846 - umc2266 | 0.754 | 0.000 | 13.78 | 2.99 | -0.392 7 | 0.000 2 | 21.60 |
| 5 | bnlg1306 - ucsd106e | 0.224 | 0.060 | 13.37 | 2.90 | -0.530 5 | 0.000 2 | 39.41 |
| 6 | bnlg2151 - end1 | 0.191 | 0.060 | 22.40 | 4.86 | -0.382 3 | 0.000 0 | 20.67 |
| 9 | gpm604b - sus1 | 0.229 | 0.000 | 32.26 | 7.00 | -0.464 7 | 0.000 0 | 30.54 |

通过分析 (表 1), 找到了 5 个 QILs: bnlg121 - hrg1, BE639846 - umc2266, bnlg1306 - ucsd106e, bnlg2151 - end1, gpm604b - sus1, 分别位于第 2, 3, 5, 6, 9 条染色体上, 能解释表型变异的 36.21%, 21.6%, 39.41%, 20.67%, 30.54%。而且有 4 个 QILs 的基因效应表现为负向的加性效应, 1 个表现为

正向的加性效应 (表 1), 也就是说在抗病和感病亲本中都可能含有抗病基因。这 5 个 QILs 虽未包含本试验所做的 17 个标记, 但是却距所做标记很近, bnlg121 - hrg1 与所做标记 bnlg161 紧密连锁, 距离为 9.7 cM; BE639846 - umc2266 与所做标记 bnlg1063 连锁, 距离为 22.7 cM; bnlg1306 - ucsd106e 与所做标记 bnlg1346 连锁,

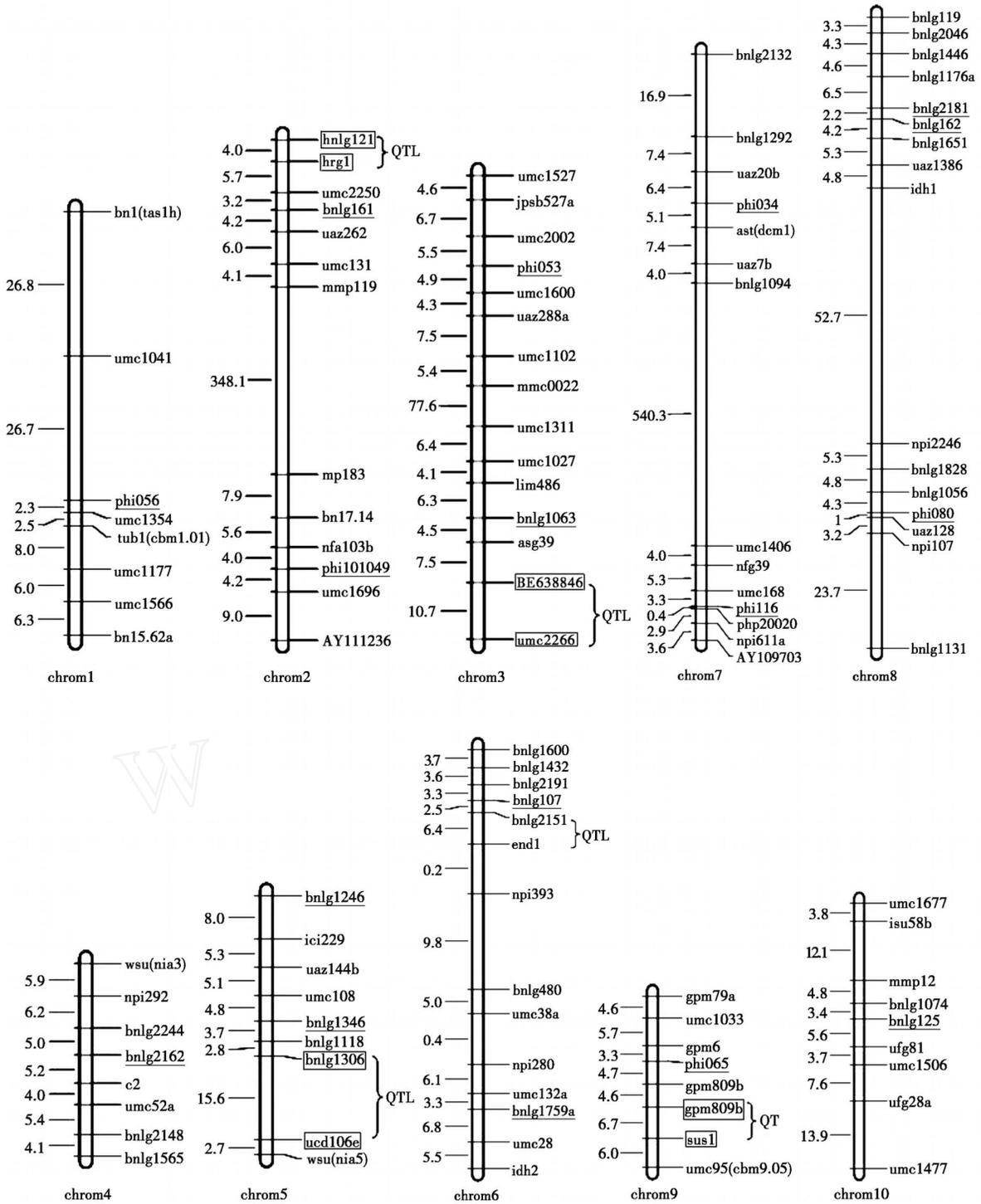


图 1 根据 SSR 标记产生的连锁图谱

Fig. 1 Linkage map according to the SSR markers

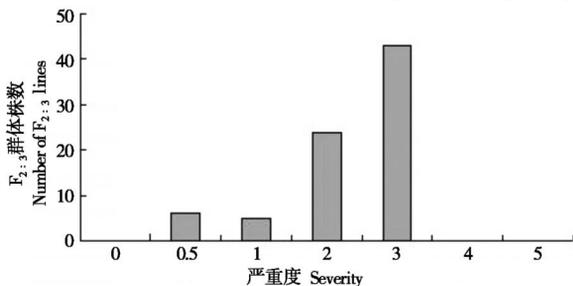


图 2 F_{2.3} 群体感病严重度的分布

Fig. 2 Distribution of disease severity in F_{2.3} population

距离为 8.5 cM; bnlgl2151 - end1 与所做标记 bnlgl107 紧密连锁, 距离为 2.5 cM; gpm604b - sus1 与所做标记 phi065 紧密连锁, 距离为 9.3 cM (如图 1, 加框标记为 QILs, 带下划线标记为所做标记)。另外, 在不同的 QILs 之间出现了上位性互作, 本试验检测到 3 对 QILs 发生上位性互作 (表 2), 其中 umc1566 - bn15.62a 对 C2 - umc52a 和 bnlgl1446 - bnlgl1176a 对 gpm79a - umc1033 表现出增强抗性的效应, bnlgl1306 - ucd106e 对 bnlgl2181 - bnlgl162 表现出减弱抗性的效应。

表2 不同的 QILs 之间的上位性效应

Tab.2 Digenic epistasis interactions existed between different QILs

| 染色体 Ch - Ini | 标记区间 Int. Namei | 染色体 Ch - Inj | 标记区间 Int. Namej | 似然比 LR | LOD 值 LOD | 上位性 互作 AAij | 概率值 Probij |
|-----------------|----------------------|-----------------|--------------------|-----------|--------------|----------------|---------------|
| 1 - 7 | umc1566 - bnl5.62a | 2 - 4 | C2 - umc52a | 22.93 | 4.98 | 0.189 7 | 0.000 0 |
| 5 - 7 | bnlg1306 - ucsd106e | 6 - 4 | bnlg2181 - bnlgl62 | 14.83 | 3.22 | - 0.152 0 | 0.000 2 |
| 8 - 4 | bnlg1446 - bnlgl176a | 7 - 1 | gpm79a - umc1033 | 36.88 | 8.00 | 0.215 9 | 0.000 0 |

3 讨论

本研究得到了 5 个 QILs,分别位于第 2,3,5,6,9 条染色体上,黎裕等^[16]也连续 2 年在第 6 条染色体检测到了 QIL。检测到的 5 个 QILs,其加性效应相对大小也不同,这与黎裕和赵君得到的结果也相似。说明在第 6 条染色体上很可能存在着抗病基因,而且加性效应是其遗传的主效应。另外,在分析中还发现 QILs 之间存在上位性互作,黎裕和赵君同样也检测到了控制玉米弯孢菌叶斑病抗性的 QILs 之间存在上位性互作^[16,17]。这说明上位性互作也是影响该病抗性的遗传基础。所以要把分子标记用在针对该病的抗病育种中必须做更深入更全面的考虑,因为上位性效应会影响育种中基因型的选择。

由于在生产上,玉米弯孢菌叶斑病主要在成株期发生,因此在幼苗期或反季节条件下用分子标记辅助选择来进行抗病育种非常有意义。近年来,由于 PCR 标记的广泛使用,基因型鉴定的成本大幅度降低,使分子标记辅助选择在实际应用中成为可能。黎裕提出辅助选择方案,我们可以借鉴,在考虑到杂种优势群的情况下把期望的基因组区域聚合起来,培育出优良的自交系^[18]。从本试验以及前人的工作来看,QIL 检测效率取决于以下因素: QIL 分析的数学方法; 作图群体的类型; 标记密度; 群体大小; 目标性状的遗传力^[19]。

本试验所用的软件是基于混合线性模型的复合区间作图软件 QILMapper1.6,该方法把群体均值、QIL 的各项遗传主效应(包括加性效应、显性效应和上位性效应)作为固定效应,而把环境效应、QIL 与环境互作、分子标记效应及其与环境互作效应作为随机效应,将效应估计与定位分析结合起来,进行多环境下的联合 QIL 定位分析,提高了作图的精度和效率^[20]。与基于多元回归的复合区间作图法相比,用混合线性模型方法进行 QIL 定位可避免所选标记对 QIL 效应分析的影响,还能无偏地分析 QIL 与环境的互作效应,把标记效应作为随机效应,克服了把标记效应作为固定效应时用回归方法进行标记筛选可能出现的问题,而且大大缩短了分析的时间。用模拟数据进行的研究发现,DH 群体和 RIL 群体是 QIL 分析最好的群体^[21]。姜丽丽等^[22]利用 RIL₆

群体对干旱和灌溉两种处理条件下玉米株高、产量进行了 QIL 分析。但对玉米而言,DH 群体的构建相当困难,而 RIL 群体的构建耗时长,在我国目前 QIL 分析起步时间较短的情况下,用 F₃ 群体来进行 QIL 作图是可以接受的。但李玉玲等^[23]利用相同来源的 F_{2:3}家系群体和 BC₂S₁ 家系群体进行玉米生育期的 QIL 分析,结果证明两类群体检测出 QIL 的数目、位置、效应和贡献率均存在较大差异,认为主要原因在于 BC₂S₁ 群体抽样选择所引起的群体结构差异,F_{2:3}群体显示出较高的 QIL 检测能力,但回交育种过程中应慎重依据 F_{2:3}群体 QIL 定位结果进行标记辅助选择(MAS)。随着时间的推移,RIL 群体和测交群体成熟的条件下,可以用更好的群体来进行更准确的 QIL 定位。同时,还需要扩大群体内样本数量,增加标记数目,以提高 QIL 分析的准确性。

参考文献:

- [1] Mandokhot, A M. Survival of *Curvularia clavata*, incitant of leaf spot of maize [J]. *Indian Phytopathology*, 1980, 33 (3) : 396 - 398.
- [2] Macri F. Isolation and characterization of phytotoxins from *Curvularia lunata* (Waks) Boed [J]. *Physiological Plant Pathology*, 1976, 8(3) :325 - 331.
- [3] Ito M F. Maize leaf spots caused *Curvularia lunata* Boed[J]. *Dumma Phytopathologica*, 1979(3) :181 - 184.
- [4] 段双科. 玉米自交系黄早 4“黄斑病”的调查研究[J]. *植物保护*, 1984, 10(6) :12.
- [5] 甘贤友,周国顺,袁桂荣,等. 玉米弯孢霉叶斑病初步研究[J]. *植物保护*, 1995, 21(5) :24 - 25.
- [6] 徐德坤,王琪,殷秀东,等. 玉米弯孢菌叶斑病调查初报[J]. *山东农业科学*, 1995(6) :38, 50.
- [7] 戴法超,高卫东,王晓鸣. 玉米弯孢菌叶斑病的初步研究简报[J]. *植物保护*, 1996, 22(4) :36 - 37.
- [8] 吕国忠,陈捷,白金恺,等. 我国玉米病害发生现状及防治措施[J]. *植物保护*, 1997, 23(4) :20 - 21.
- [9] 吕国忠,刘志恒,何刚副,等. 辽宁省爆发一种新病害——玉米弯孢菌叶斑病[J]. *沈阳农业大学学报*, 1997, 28(1) : 75 - 76.
- [10] 戴法超,王晓鸣,朱振东,等. 玉米弯孢菌叶斑病研究[J]. *植物病理学报*, 1998, 28(2) :123 - 129.
- [11] 石洁,刘玉瑛,刘爱国,等. 河北省玉米弯孢霉菌叶斑病发生调查[J]. *河北农业大学学报*, 1998, 21(2) :

- 94.
- [12] 刘玉瑛,石洁,邵艳军.玉米弯孢菌叶斑病接种技术研究[J].华北农学报,1999,14(增刊):96-100.
- [13] 刘兰浩,孙阳,穆平,等.部分玉米种质资源对弯孢菌叶斑病的抗性评价[J].玉米科学,2008,16(3):126-129.
- [14] 王宏,吕国忠,纪明山,等.玉米杂交种对弯孢菌叶斑病抗性鉴定[J].沈阳农业大学学报,2000,31(5):476-478.
- [15] Saghai - Maroof M A ,Biyashey R M ,Yang G P ,*et al.* Ribosomal DNA spacer length polymorphisms in barley: Mendelian inheritance ,chromosomal location and population dynamics[A]. Proceeing of the National Academy of Science USA ,1984 ,81 :8014 - 8018.
- [16] 黎裕,戴法超,景蕊莲,等.玉米弯孢菌叶斑病抗性的 QTL 分析[J].中国农业科学,2002,35(10):1221-1227.
- [17] 赵君.玉米弯孢菌叶斑病抗性遗传分析及在亲本 PI38 和 5003 间筛选具有 RFLP 多态性酶和探针组合 [D]. 北京:中国农业大学,2000.
- [18] 黎裕,王天宇,贾继增.玉米抗病虫性的分子标记研究进展[J].生物工程进展,2001,21(3):42-49.
- [19] Melchinger A E. Advances in the analysis of data on quantitative trait loci [C]// International Crop Science II. Oxford IBH Publishing Co ,New Delhi ,1997:773-791.
- [20] 朱军.复杂数量性状基因定位的混合模型方法 [C]// 王连铮,戴景瑞.全国作物育种学术讨论会论文集.北京:中国农业科技出版社,1998:19-20.
- [21] Moreno - Gonzalez J. Efficiency of generations for estimating marker - associated QTL effects by multiple regression [J]. Genetics ,1993 ,135 :223 - 231.
- [22] 姜丽丽,樊明寿,郭九峰.干旱和灌溉两种处理条件下玉米株高、产量的 QTL 分析[J].华北农学报,2007,22(4):86-90.
- [23] 李玉玲,李学慧,董永彬,等.利用相同来源 F_{2:3} 和 BC₂S₁ 群体定位玉米生育期 QTL [J].华北农学报,2007,22(6):38-43.

