

玉米抗南方锈病性状遗传分析与连锁分子标记的筛选

王文浩, 周联东*, 张瑞平, 孙佩, 刘经纬, 王蕊 (河南省新乡市农业科学院, 河南新乡 453000)

摘要 [目的]对玉米南方锈病性状进行遗传分析,筛选南方锈病基因连锁的 SSR 引物标记,并进行初步定位。[方法]以抗南方锈病玉米自交系 K381 和感病自交系 LX9801 为材料,构建 6 个世代群体(P_1 、 P_2 、 F_1 、 F_2 、 B_1CF_1 、 B_2CF_1),对玉米南方锈病进行遗传分析,利用 SSR 标记对南方锈病连锁基因进行引物筛选,并利用筛选的分子标记对辅助抗南方锈病材料进行前景选择。[结果] F_2 代分离群体抗病株与感病株比例符合 3:1 分离比例, B_2CF_1 [(K381×LX9801)×LX9801] 群体抗感株接近 1:1 分离比例,推测其抗性基因为单一显性基因控制的,与 10.02 区域内的 2 对 SSR 引物 phi059 和 umc2018 紧密连锁,初步认为 K381 的抗南方锈病基因位于第 10 号染色体短臂上。[结论]引物 phi059 可以用于玉米抗南方锈病材料辅助选择。

关键词 玉米;南方锈病;SSR 分子标记;基因定位

中图分类号 S503.53 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2018)35-0100-03

Genetic Analysis and SSR Link Marker Screening of Gene Resistance to Southern Rust

WANG Wen-jie, ZHOU Lian-dong, ZHANG Rui-ping et al (Xinxiang Academy of Agricultural Sciences, Xinxiang, Henan 453000)

Abstract [Objective] To study the genetic analysis and SSR link marker screening of gene resistance to southern rust. [Method] Using K381 (immune inbred line), LX9801 (susceptible inbred line) and the derived population P_1 , P_2 , F_1 , F_2 , B_1CF_1 and B_2CF_1 as materials, we investigated the heredity of disease resistance gene and selected SSR marker to maize southern rust. SSR marker was used to assist foreground selection. [Result] The proportion of resistant and susceptible strains in F_2 population accorded with 3:1 isolation ratio. And the ratio of B_2CF_1 was 1:1. It was speculated that the resistance gene was controlled by a single dominant gene, closely linked with 2 pairs of SSR primers phi059 and umc2018 in region 10.02. It was preliminarily believed that the anti-rust gene of K381 located on the short side of chromosome 10. [Conclusion] The primer phi059 can be used to assist the selection of resistance to southern rust materials.

Key words Maize; Southern rust; SSR molecular marker; Gene location

2015 年玉米南方锈病在河南南阳、驻马店、周口、商丘等 15 个地(市)暴发流行,覆盖全省主要玉米种植区,全省共计发生 188.55 万 hm^2 ,占玉米种植面积的 56.1%^[1]。在流行年份,南方锈病能造成玉米大幅减产,严重时超过 45%^[2-3]。暴发流行时,除造成品质下降外,减产可达 80% 以上,甚至绝收^[4]。南方锈病是一种暴发性、毁灭性病害,防治非常困难,最有效的方法是选择抗病品种。由于该病害并非常年发生,因此常规育种过程中,在缺乏病害选择的情况下,很容易造成抗病基因的丢失。这是目前生产上应用的玉米自交系大多数感染南方玉米锈病的主要原因之一,目前生产上大部分品种不抗南方锈病。分子标记技术的应用不受环境、时间、地点和病害发生与否的影响。该技术对目标基因的转移可在早代进行准确、稳定地选择,从而加速育种进程,提高育种效率。与常规育种相比,该技术可提高育种效率 2~3 倍。

目前在分子标记辅助玉米抗南方锈病育种方面也做了大量研究。2003 年,陈翠霞等^[5]以齐 319×340 的 F_2 和 BC_1F_1 群体为材料,通过 SSR-BSA 分析,将齐 319 抗病基因 *RppQ* 定位在第 10 号染色体短臂上,与标记 phi041 和 phi118 连锁,遗传距离分别为 2.45、3.33 cM。2009 年,张斌^[6]也利用齐 319 为供体亲本,以南方玉米锈病感病自交系 L189、DH4866、502、5003、郑 58、昌 7-2、9801 等为受体亲本,通过回交育种,利用 phi041 和 phi118 这 2 个标记辅助选择,得到了抗南方玉米锈病良好的 BC_4F_1 代材料。李少博等^[7]用引物 phill8 和 P_2 辅助选择,对骨干自交系京 24 进行抗南方锈病改良。谭

华等^[8]通过研究发现,利用引物 phi048 对南方玉米锈病抗病材料进行早代选择是有效的,可淘汰大量感病家系,减轻田间工作量;利用分子标记辅助定向选择结合抗病接种鉴定,能有效改良温带种质的抗锈性。

该研究为了利用分子标记辅助玉米抗南方锈病育种,利用抗南方锈病玉米自交系 K381 和感病自交系 LX9801 构建 6 个世代群体,对玉米南方锈病基因的连锁标记进行进一步筛选。利用筛选的分子标记对辅助抗南方锈病材料进行前景选择,结合田间鉴定验证分子标记辅助选择玉米抗南方锈病基因的选择效果,以期分子标记辅助玉米抗南方锈病育种工作提供参考。

1 材料与方法

1.1 分离群体的构建 田间试验于 2016 年冬在河南省新乡市农业科学院海南三亚南滨基地进行,室内分析在新乡市农业科学院实验室进行。

以抗南方锈病玉米自交系 K381 和感病自交系 LX9801 构建 6 个世代群体,30 个 P_1 (K381)、30 个 P_2 (LX9801)、30 个 F_1 (K381×LX9801)、386 个 F_2 群体、284 个 B_2CF_1 [(K381×LX9801)×LX9801] 群体、198 个 B_1CF_1 [(LX9801×K381)×K381] 群体。

1.2 南方锈病接种方法 田间试验于 2016 年冬在河南省新乡市农业科学院海南三亚南滨基地进行,该地点为南方锈病高发区,在 3~5 片叶时人工接种 1 次,接种后 3~5 d 进行人工喷水,促使病原菌早发。

1.3 分子标记分析 采用 2×CTAB 法提取并纯化 DNA。参照已经发表的玉米分子标记连锁图,根据文献报道抗南方锈病基因位于第 10 号染色体上,从 Maize GDB (<http://www.maizegdb.org>) 上选取玉米第 10 号染色体连锁群上的 50 对标

基金项目 河南省科技攻关计划项目(172102110117)。

作者简介 王文浩(1973—),女,河南新乡人,副研究员,硕士,从事玉米育种研究。*通讯作者,研究员,硕士,从事玉米遗传育种研究。

收稿日期 2018-07-05

记,利用抗感池进行多态性筛选,对抗感池间有多态性的标记再进行分离群体的连锁分析。

PCR 扩增反应在 BIOER TC-96/G/H(b) 型 PCR 仪上进行。反应总体积为 20 μ L, 包括 0.2 mmol/L dNTPs、0.25 μ mol/L 引物和 20 ng 模板 DNA, 加灭菌纯水补足体积。PCR 扩增程序为 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 94 $^{\circ}$ C 40 s, 60 $^{\circ}$ C 35 s, 72 $^{\circ}$ C 45 s, 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。扩增产物用 6% 非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳, 染色过程在低速转动的水平摇床上进行, 方法为 ① 10% 乙醇 + 0.5% 冰醋酸固定 10~15 min; ② 0.2% 硝酸银渗透 10~15 min; ③ 用蒸馏水漂洗 2 次; ④ 1.5% 氢氧化钠 + 0.4% 甲醛显色, 直到显出清晰条带, 终止显色。结果照相分析。

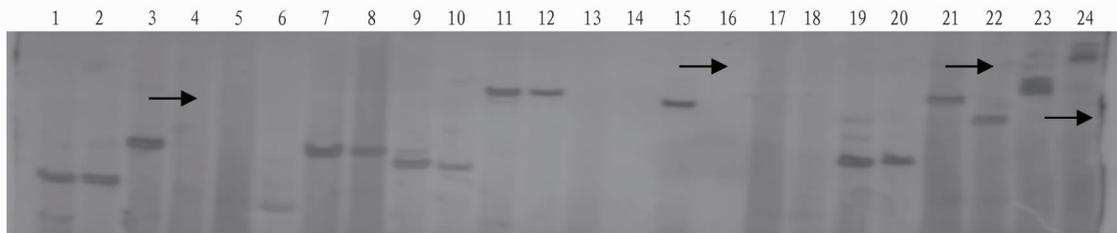
1.4 抗感池分析 在父母本各取 15 株高抗、高感的 DNA 等量混合, 组成 DNA 分析的抗、感基因池 (*Bulk R*, *Bulk S*)。

2 结果与分析

2.1 分离群体的表现型 抗病指数按玉米南方锈病抗性全国统一记载, 标准病级划分见表 1, 6 个世代群体抗性表现见表 2, 根据抗性表型鉴定结果发现 P_1 (K381)、 F_1 、 B_2CF_1 [(LX9801 \times K381) \times K381] 群体均表现高抗; F_1 代正反交抗性无明显差异, 说明该抗性性状受细胞质遗传影响小; F_2 分离群体 386 个, 扣除临界抗性无法分清等级的 12 个, 其抗感表现明显呈单峰偏态分布 (图 1), 抗、感株比例为 283:91, 经 χ^2 检验抗感株比例符合 3:1, B_1CF_1 [(K381 \times LX9801) \times LX9801] 群体 284 个, 抗、感株比例 (148:129) 接近 1:1, 符合孟德尔单一显性基因分离规律, 推测在该分离群体中南方锈病的抗性为单一显性基因控制。

2.2 分子标记连锁分析 选取均匀分布在玉米 10 号染色体短臂上的 50 对标记, 通过抗感反应池进行多态性筛选 (图 2), 其中有 5 对引物存在多态性差异。

利用抗感池间有差异的 5 对 SSR 标记对 F_2 分离群体、 B_2CF_1 [(K381 \times LX9801) \times LX9801] 群体再进行分离群体的标记连锁检测, 结果发现位于第 10 号染色体的 2 对 SSR 标记与抗病基因表现一定的连锁关系 (图 3、4), 其中位于 10.02 区域内的 1 对 SSR 标记 phi059 与抗病基因紧密连锁, 通过



注: 3 和 4 为引物 umc2018, 21 和 22 为引物 phi059

Note: 3 and 4 are primers umc2018, 21 and 22 are primers phi059

图 2 抗、感基因池引物筛选

Fig. 2 Primers screening of resistant and susceptible gene pools

3 小结

该研究通过对抗性材料 K381/LX9801 构建的 6 个世代群体遗传分析, F_2 代分离群体抗病株与感株比例符合 3:1, B_2CF_1 [(K381 \times LX9801) \times LX9801] 分离群体抗感株比例接近

表 1 叶片发病病级、症状与抗性

Table 1 Disease grade, symptoms and resistance of leaves

病级 Disease grade	叶片症状 Leaf symptoms	抗性 Resistance
0	叶片上无病斑、无任何过敏性反应	高抗 (HR)
1	叶片上无病斑, 仅有过敏性反应	高抗 (HR)
3	叶片上有少量孢子堆, 占叶面积不超过 25%	抗 (R)
5	叶片上有中量孢子堆, 占叶面积的 26%~50%	中抗 (MR)
7	叶片上有大量孢子堆, 占叶面积的 51%~75%	感 (S)
9	叶片上有大量孢子堆, 占叶面积的 76% 以上, 叶片枯死	高感 (HS)

表 2 6 个世代群体抗性表现

Table 2 Resistance performance of 6 generation groups

世代群体 Generation group	群体数量 Number of population	抗性株数量 Number of resistant plants	感染株数量 Number of infected plants
P_1 (K381)	30	30	0
P_2 (LX9801)	30	0	30
F_1	30	30	0
F_2	386	283	91
B_1CF_1	198	198	0
B_2CF_1	284	148	129

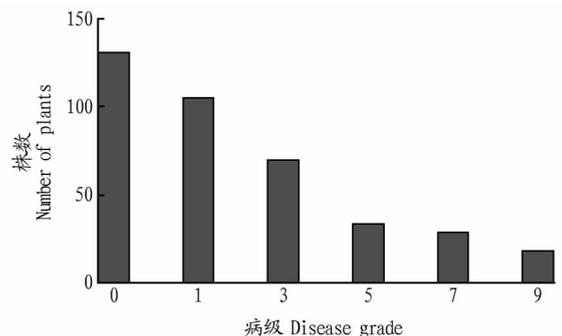
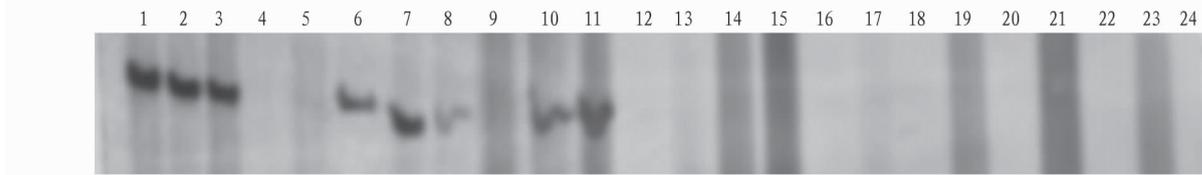


图 1 F_2 分离群体抗性分布

Fig. 1 Resistance distribution of F_2 isolated population

检测该标记在 F_2 分离群体分子标记带型 (K381 型、LX9801 型) 接近 3:1 的分离比例; B_1CF_1 [(K381 \times LX9801) \times LX9801] 群体标记带型 (K381 型、LX9801 型) 接近 1:1 的分离比例。

1:1, 推测其抗性基因为单一显性基因控制的, 利用 F_2 代分离群体进行 SSR 分子标记连锁分析, 初步认为材料 K381 的抗南方锈病基因与标记 umc2018 和 phi059 紧密连锁, 其中 phi059 标记与刘章雄等^[3] 以玉米南方型锈病免疫自交系 P_{25}

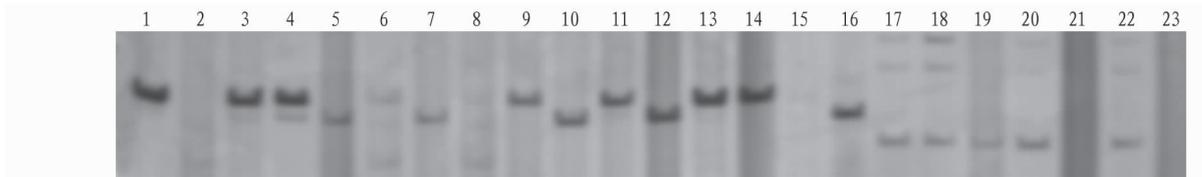


注:1~12为抗病材料,13~24为感病材料

Note:1-12 are disease-resistant materials;13-24 are susceptible materials

图3 用 umc2018 引物筛选抗、感材料

Fig. 3 Using umc2018 primers to screen the resistant and sensitive materials



注:1~16为抗病材料,17~23为感病材料

Note:1-16 are disease-resistant materials;17-23 are susceptible materials

图4 用 phi059 引物筛选抗、感材料

Fig. 4 Using phi059 primers to screen the resistant and sensitive materials

为材料获得的研究结果一致。2个引物均位于第10号染色体的10.02区,所以初步推断材料K381的抗南方锈病基因位于第10号染色体短臂上,这与陈翠霞等^[5]2003年研究结果一致。

参考文献

- [1] 徐永伟,于思勤,王江蓉,等.2015年河南省玉米南方锈病暴发流行原因分析及防治对策探讨[J].中国农技推广,2016,32(8):71-73.
- [2] RAID R N,PENNYPACKER S P,STEVENSON R E. Characterization of *Puccinia polysora* epidemics in Pennsylvania and Maryland[J]. Phytopathology,1988,78(5):579-585.

- [3] 刘章雄,王守才,戴景瑞,等.玉米P25自交系抗锈病基因的遗传分析及SSR分子标记定位[J].遗传学报,2003,30(8):706-710.
- [4] ZHANG Y,XU L,ZHANG D F,et al. Mapping of southern corn rust-resistant genes in the W2D inbred line of maize (*Zea mays* L.)[J]. Mol Breeding,2010,25:433-439.
- [5] 陈翠霞,邢全华,梁春阳,等.南方玉米锈病抗病基因的定位及不同遗传背景对基因标记的比较分析[J].遗传学报,2003,30(4):341-344.
- [6] 张斌.分子标记辅助选择玉米兼抗粗缩病和南方锈病的育种材料[D].泰安:山东农业大学,2012.
- [7] 李少博,宋伟,王风格,等.分子标记辅助玉米自交系京24抗南方锈病的改良[J].分子植物育种,2012,10(4):440-445.
- [8] 谭华,邹成林,郑德波,等.分子标记辅助选择抗南方玉米锈病材料[J].广东农业科学,2016,43(7):6-10.

(上接第27页)

短种子萌发的时间,比对照提前了1~2d,且随着处理浓度的增加,指标不断增加。当浓度为250mg/L时,发芽率、发芽势和发芽指数较高,对垂果亚麻种子的萌发具有明显的促进作用,因此可以用该浓度对种子进行处理。

不同浓度吲哚丁酸(IBA)和6-苄氨基嘌呤(6-BA)均对垂果亚麻萌发具有抑制作用。其中,吲哚丁酸IBA对胡麻种子具有较强抑制作用,50mg/L浓度也能完全抑制野生胡麻的萌发。5种浓度的6-BA降低了种子的发芽率,且随浓度的增加,抑制作用不断增强;浓度为60mg/L时完全抑制了种子萌发。该研究为胡麻野生种的繁育提供了一定的技术支撑。

参考文献

- [1] 李延邦,刘汝温,谢世君.胡麻[M].北京:学术期刊出版社,1989:38-53.

- [2] 米君.河北省胡麻生产调研报告[J].现代农村科技,2009(20):49-50.
- [3] 李爱荣.油用胡麻产业技术需求调研报告[J].现代农村科技,2009(20):57-58.
- [4] 张振宇.种子室内发芽试验注意事项及处理方法[J].中国种业,2010(10):46-47.
- [5] 王利英,乔军,石瑶,等.种衣剂与赤霉素对茄子种子发芽及幼苗生长的影响[J].中国瓜菜,2014,27(3):22-25.
- [6] 李琦.赤霉素对植物生长影响的研究进展[J].农家参谋,2018(5):86.
- [7] 荣冬青,樊英鑫,于晓敏,等.河北省亚麻科植物一新记录种——垂果亚麻[J].种子,2016,35(4):63-64.
- [8] 彭茂林,杜康兮,李立芹.3种植物生长调节剂对烟草种子萌发的影响[J].种子,2012,31(7):110-112,116.
- [9] 栾舒雅,王丽,佟凤琴.植物生长调节剂促进野生茄种子发芽的研究[J].辽宁大学学报(自然科学版),2007,34(2):181-183.
- [10] 邓天福,王霞.不同植物生长调节剂和温度处理对尚麻种子萌发的影响[J].河南科技学院学报,2015,43(1):20-24.
- [11] 陈玉燕,李立芹.3种植物生长调节剂对黑麦种子萌发的影响[J].种子,2011,30(7):91-93.
- [12] 张福平,李洁琼.植物生长调节剂对香豌豆种子发芽的影响[J].种子,2011,30(1):52-57.

科技论文写作规范——作者

论文署名一般不超过5个。中国人姓名的英文名采用汉语拼音拼写,姓氏字母与名字的首字母分别大写;外国人姓名、名字缩写可不加缩写点。