

高抗玉米丝黑穗病种质创新及 相关分子标记的筛选和验证

张建国

(黑龙江省农业科学院 玉米研究所, 黑龙江 哈尔滨 150086)

摘要:以黑龙江省农业科学院玉米研究所创造的龙早群为试材,研究了高抗玉米丝黑穗病种质创新及相关的分子标记筛选和验证。结果表明:对龙早群按 S1 和半同胞综合选择法进行轮回选择选育出 15 份田间接种发病达到高抗水平的材料;利用复合杂交技术在接种鉴定条件下,通过自交、回交等方法选育出 6 份高抗丝黑穗病、高配合力、优质、农艺性状优良的玉米自交系;通过试验筛选出 3 个可以用于对玉米种质进行抗丝黑穗病种质鉴定的分子标记引物,即 umc1386、umc1525 和 umc2077。

关键词:玉米;丝黑穗病;种质创新;分子标记

中图分类号:S513.034

文献标识码:A

文章编号:1002-2767(2011)07-0007-03

玉米丝黑穗病遍布世界玉米生产国。我国北方春玉米区、西南山区、西北玉米区发生较重。黑龙江省是玉米丝黑穗病高发区,据调查一般年份主栽玉米品种丝黑穗病发病率在 2%~5%,重发生年在 5%~10%。个别地区的个别品种感病率在 50%~70%。玉米丝黑穗病每发病一株即减产一株,因此对玉米丝黑穗病抗性的高低直接关系到玉米品种能否高产、稳产。晋齐鸣等统计 1996~1998 年在松辽平原玉米丝黑穗病爆发性流行,发病率为 7%~35%,严重者达到 62%,损失惨重。王晓鸣等调查 2002 年全国有 1 067 万 hm^2 发生玉米丝黑穗病,占春玉米播种面积的 19.5%,感病和高感品种分别占 10%~14% 和 50% 以上。总之,玉米丝黑穗病已经成为我国玉米生产的重要病害。因此,高抗丝黑穗病、优良玉米种质资源的创新与选育为最终选育高抗丝黑穗病玉米新品种,奠定了物质基础。选育和利用抗病品种是控制玉米丝黑穗病最经济、最有效的措施,因此,玉米种质资源丝黑穗病抗性鉴定是抗病育种的一项重要工作^[1-3]。常规的田间鉴定方法存在用地量大,时间长,需要同时在多个环境鉴定的问题,耗费大量人力和物力。所以开展玉米对种质资源抗性的快速鉴定和提高选择效率的研究变得十分重要和紧迫起来^[4]。玉米遗传学和分子生物学的发展使人们对玉米抗丝黑穗病的分子鉴定成为可能。利用抗病基因的分子标记不仅可以对主基因进行辅助选择,而且可以对单个 QTL

进行操作,这使对 QTLs 所控制的抗病性状选择成为可能。该研究根据目前国内外陆续发表的有关玉米抗丝黑穗病基因定位的 QTL 信息,采用元分析方法估算“一致性”QTL 存在的位置和置信区间,优化玉米抗病 QTL。筛选出与玉米抗丝黑穗病相关的分子标记,并对这些标记进行验证。同时基于“一致性”QTL 区间发掘玉米抗丝黑穗病候选基因,为玉米种质抗丝黑穗病分子鉴定和抗丝黑穗病分子标记辅助选择奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

选用黑龙江省农业科学院玉米研究所创造的龙早群为试材;课题组搜集的 8 个田间接种抗感玉米丝黑穗病明确的自交系分别是龙系 53(抗)、K10(感)、444(感)、Mo17(抗)、齐 319(抗)、文黄 314(感)、合 344(抗)、黄早 4(感)。

1.2 方法

1.2.1 幼苗准备 供试种子播种于直径 20 cm 花盆内,每盆播种 5 粒,培养于温室内,温度范围 20~33℃,待苗长至 3~5 片叶期,每盆留苗 3 株,用于接种。

1.2.2 DNA 提取 苗期 3~5 片叶提取单株 DNA,提取方法参照闫苗苗等报道的 CTAB 提取法^[5],稍加改动。

1.2.3 DNA 质量纯度检测 取 1 μL DNA 溶液,用 2% 的琼脂糖凝胶电泳检测。 $\lambda/\text{Hind III}$ 为分子量 Marker,加入 5 μL GoldView(荧光染料)于琼脂糖凝胶中,电泳电压 5~8 $\text{V} \cdot \text{cm}^{-1}$,时间为 30~40 min,当指示剂迁移到适当距离时停止电泳。紫外光下观察,在点样孔附近呈现一致明亮带。若无带出现或成弥散状,则表明 DNA 已降解,不能采用^[6-8]。

1.2.4 引物 在玉米遗传学与基因组学数据库

收稿日期:2011-05-17

基金项目:国家“863”计划资助项目(2009AA101103);黑龙江省自然科学基金资助项目(C200819);黑龙江省农科院科技创新工程资助项目(2010-01-02)

作者简介:张建国(1972-),男,黑龙江省绥化市人,硕士,副研究员,从事玉米遗传育种工作。E-mail:zhangjg_663@sohu.com。

(www.maizegdb.org/)上查找 SSR 分子标记引物序列,选取玉米染色体上的 3 个“热点”区段内

2.09、3.04、3.05 的共 55 个 SSR 分子标记(见表 1),由上海生工生物技术公司合成^[9-11]。

表 1 玉米第 2、3 染色体 3 个位点上的 SSR 分子标记引物

引物	染色体	引物	染色体	引物	染色体	引物	染色体
umc1230	2.09	umc1425	3.04	umc1908	3.04	umc2002	3.04
umc1551	2.09	umc2000	3.04	umc1900	3.04	bnlg1022b	3.04
umc1256	2.09	umc1495	3.04	umc1223	3.04	phi029	3.04
umc1252	2.09	umc1392	3.04	umc1504	3.04	umc1158	3.05
umc1207	2.09	umc1742	3.04	umc1920	3.04	umc1174	3.05
umc1525	2.09	umc1717	3.04	umc2264	3.04	phi053	3.05
umc1736	2.09	bnlg1638	3.04	umc1683	3.04	bnlg1601	3.05
bnlg1893	2.09	mmc0132	3.04	umc1386	3.04	umc1102	3.05
bnlg469b	2.09	bnlg1452	3.04	umc1773	3.04	bnlg1456	3.05
umc1704	2.09	bnlg2136	3.04	umc1030	3.04	bnlg1246b	3.05
umc2184	2.09	umc1012	3.04	umc1347	3.04	bnlg420	3.05
umc2077	2.09	umc1449	3.04	umc1965	3.04	bnlg1035	3.05
bnlg1520	2.09	umc1729	3.04	bnlg1957	3.04	umc1616	3.05
umc1772	3.04	mmc0312	3.04	umc1527	3.04		

1.2.5 PCR 扩增 PCR 反应在 ALS1296 型 PCR 扩增仪中进行。dNTPs、Buffer 和 Taq 酶均购自北京全式金公司(Trans Gen)。反应体系(25 μ L):10 \times buffer 2.5 μ L;2.5 mmol \cdot L⁻¹ MgCl₂ 2 μ L;2 mmol \cdot L⁻¹ each 的 dNTPs 2.5 μ L;5 U \cdot μ L⁻¹ Taq 酶 0.2 μ L;10 μ mol \cdot L⁻¹ Primer I 和 Primer II 各 2 μ L;模板 DNA 4 μ L;超纯水 9.8 μ L。

反应程序:95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min;95 $^{\circ}$ C 模板变性 30 s,58 $^{\circ}$ C 退火 30 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 45 s 共 35 个循环;72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min;4 $^{\circ}$ C 保存待测。

1.2.6 聚丙烯酰胺凝胶电泳及银染程序

电泳仪为北京六一仪器厂生产的 DYY-12C 型,电泳槽为北京六一仪器厂生产的 DYC-20C 型,8%聚丙烯酰胺凝胶检测扩增产物,电压 1 000 V,电泳 1 h。电泳完成后银染观察结果。银染程序参照王风格等报道的方法^[12]。

1.2.7 试验设计流程 试验流程见图 1。

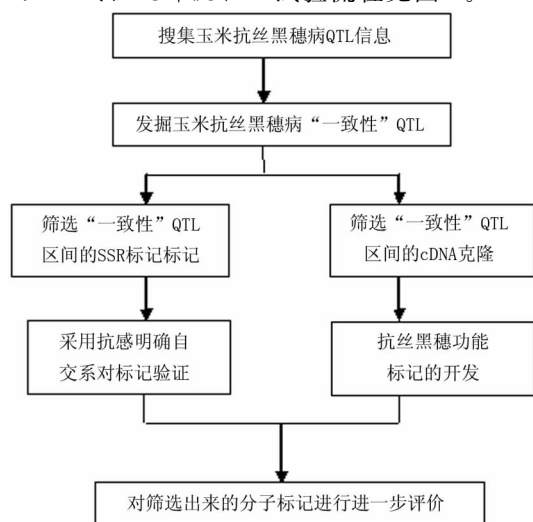


图 1 试验设计流程

2 结果与分析

2.1 高抗丝黑穗病种质创新情况

利用 S1 及半同胞轮回选择技术对龙早群进行一轮高压抗病筛选选育出 15 份田间接种发病达到高抗水平的材料,利用复合杂交技术在接种鉴定条件下,通过自交、回交等方法选育出 6 份高抗丝黑穗病、高配合力、优质、农艺性状优良的玉米自交系。这些种质材料通过分子标记验证在相应位点均发现抗性基因存在。

2.2 杂交试验结果

对 8 个田间接种抗感玉米丝黑穗病明确的自交系进行了抗病材料与感病材料杂交,组成了抗 \times 抗、抗 \times 感、感 \times 感 3 种类型,杂交后代通过田间测试与实验室工作结合表明田间抗感病情况与实验室分子标记验证能够完全相符合,同时构建了 BC₂F₂ 群体,为进一步候选基因挖掘提供了素材。

2.3 SSR 标记分析

利用 55 对 SSR 引物对 15 份龙早群种质以及 8 份抗感明确的自交系进行分析,结果表明,23 份引物 PCR 扩增结果稳定,重复性好。其中检测到 umc1386、umc1525 和 umc2077 这 3 对引物能有效标记抗性基因,初步认为这些引物与玉米抗病基因是连锁的。并因此构建了一个玉米抗丝黑穗病 QTL 一致性图谱,确定“一致性”QTL 区间。建立起一套适合实验室的分子标记技术体系,提高检测筛选效率。通过试验筛选出 3 个可以用于对玉米种质进行抗丝黑穗病种质鉴定标记,节省大量的人力和物力,提高玉米抗丝黑穗病育种水平。

2.4 分子标记与田间育种的结合情况

对筛选出来的“一致性”QTL 区间界定的标记进行验证分析,寻找出与主效 QTL 连锁的分子标记,采用抗感明确的种质进行 PCR 扩增,将扩增结果与抗病性进行相关分析,筛选出与抗病性紧密相关的分子标记;利用寻找到的抗病候选基因,开发新的标记,采用抗感明确的种质进行验

证。构建一个玉米抗丝黑穗病 QTL 一致性图谱,确定“一致性”QTL 区间为 2.09~3.04;建立起一套适合实验室的分子标记技术体系^[13-14]。

该试验成功地筛选出用于玉米抗丝黑穗病种质鉴定的标记,能够直接用于玉米育种实践,对在田间接种发病率低于 6% 的品种龙单 38 进行检测,发现其杂交种及母本在 2.09 位点有抗性基因存在,达到了提高玉米抗丝黑穗病鉴定水平,为以后构建及选育的育种群体在丝黑穗抗性水平上可以进行快速检测,能够节省土地、人力和物力,提高玉米抗病育种水平,大大提高玉米育种效率。

3 结论与讨论

该试验利用抗感明确的材料标记筛选位于抗病基因位点区域的有效 SSR 标记,通过对不同试验材料的反复测试,筛选出 umc1386、umc1525 和 umc2077 这 3 对引物能有效标记抗性基因。玉米丝黑穗病在表现型上有抗病和感病两种类型,目前认为其抗病性是多基因控制的数量性状,这可以从不同品种 F₂ 家系以及 F₃ 家系的抗病性连续分布得到证明。Manninger 利用 N6 自交系(15 年表现对丝黑穗病完整的抗性)和不同感病亲本杂交, F₁ 的抗病性因感病系感病程度不同而不同,并且出现丝黑穗病比感病亲本感病还重的情况,说明存在感病显性效应。在我国主要是根据不同抗病类型结合不同的杂优模式组配的杂交种或后代抗病性表现,有针对性地研究了不同材料玉米抗丝黑穗病遗传特点。赵晋锋等研究表明玉米杂交种后代丝黑穗病的抗性多介于双亲之间。梅振邦等报道玉米对丝黑穗病的抗性属于细胞核遗传,正反交抗性差异不显著,抗丝黑穗病对感病呈不完全显性^[15-17]。由于不同研究者所用材料、环境条件以及研究方法不同,研究结果不完全一致。但目前多数研究者基本可以认定玉米对丝黑穗病的抗性属数量性状遗传;同时受加性和上位性、显性效应控制,其中基因加性效应占主导作用,非加性效应作用较小,抗病性能够稳定遗传^[18]。

目前,有关玉米抗丝黑穗病 QTL 的信息逐步被公布出来,研究者期望整合这些信息,公认的通过分析比对加以利用。生物信息学的产生与发展提供了利用 QTL 的信息手段。通过发掘一致性的 QTL 区间,可以开展对主效 QTL 控

制的性状的选择,以及基于一致性的 QTL 区间的抗病候选基因的发掘。该试验通过田间测试与实验室分子测试相结合验证了部分抗性基因位点,同时累积了丰富的抗感明确材料的 F₂ 群体,为进一步深入研究做了储备。

参考文献:

- [1] 晋齐鸣,李建平,张秀文,等. 松辽平原玉米主要病虫害综合治理体系的研究[J]. 玉米科学,2000,8(2):84-88.
- [2] 王燕,石秀清,王建军,等. 玉米自交系抗丝黑穗病鉴定与评价[J]. 山西农业科学,2009,37(7):17-19,25.
- [3] 梁素明,王爱萍,董琦,等. 长根茎玉米自交系及群体材料抗丝黑穗病鉴定与评价[J]. 山西农业科学,2009,37(10):55-57.
- [4] 张建国,赵伟,李树军,等. 高抗丝黑穗病、优良玉米种质资源的创新与改良[J]. 黑龙江农业科学,2005(2):24-25.
- [5] 闫苗苗,魏光成,潘效红,等. 一种适用于动物与植物总 DNA 提取的方法——改良 CTAB 法[J]. 安徽农业科学,2008,36(20):8488,8558.
- [6] 华致蒲,白宝璋,赵晓军. 玉米丝黑穗病生理分化的研究[J]. 吉林农业大学学报,1995,17(2):32-37.
- [7] 李新海,袁力行,李晓辉,等. 利用 SSR 标记划分 70 份我国玉米自交系的杂种优势群[J]. 中国农业科学,2003,36(6):622-627.
- [8] 宋树云,孙秀华,郭文广,等. 玉米种质资源抗丝黑穗病鉴定[J]. 吉林农业科学,2000,25(3):32-33.
- [9] 王振华,姜艳喜,王立丰,等. 玉米丝黑穗病的研究进展[J]. 玉米科学,2002,10(4):61-64.
- [10] Stromberg E L, Stienstra W C, Kommedahl T, et al. Smut expression and resistance of corn to *Sphacelotheca reiliana*[J]. Minnnesota Plant Dis, 1984,68:880-884.
- [11] Lu X W, Brewbaker J L. Molecular mapping of QTLs conferring resistance to *Sphacelotheca reiliana* (Kühn) Clint[J]. Maize Genetics Cooperation Newsletter, 1999, 73:36.
- [12] 王凤格,赵久然,郭景伦,等. 一种改进的玉米 SSR 标记的 PAGE/快速银染检测新方法[J]. 农业生物技术学报,2004,12(5):606-607.
- [13] Kantety R V, Zeng X, Bennetzen J L, et al. Detection of high levels of polymorphism among dent and popcorn inbred lines using Inter-Simple Sequence Repeat (ISSR) amplification technique[J]. Maize Newsletter, 1995, 69:132-34.
- [14] 李新海,傅骏骅,张世煌,等. 利用 SSR 标记研究玉米自交系的遗传变异[J]. 中国农业科学,2000,33(2):1-9.
- [15] 梅振邦,徐国英,王河成,等. 玉米对丝黑穗病的抗性遗传规律[J]. 山西农业科学,1982(11):10-13.
- [16] Lübberstedt T, Xia X C, Tan G, et al. QTL mapping of resistance to *Sphacelotheca reiliana* in maize[J]. Theor Appl Genet, 1999, 99:593-598.
- [17] 石红良,姜艳喜,王振华,等. 玉米抗丝黑穗病 QTL 分析[J]. 作物学报,2005,31:1449-1454.
- [18] 杜建中,孙毅,郝曜山,等. 抗玉米丝黑穗病转基因株系的分子检测及抗病株系选育[J]. 华北农学报,2006,21(5):9-14.

Germplasm Innovation on High Resistance of Head Smut in Maize and the Screening and Verification of Their Molecular Marker

ZHANG Jian-Guo

(Maize Research Institute of Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Harbin, Heilongjiang 150086)

Abstract: Developing new germplasm on head smut of maize and testing the correlative markers were studied using Longzao population that created by Maize Research Institute of Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences. The result showed that 15 materials high resistance on head smut germplasm were created through the recurrent selection by S1 and half-sib selection, and 6 new inbred lines were created by complex cross, and their characters were high resistance on head smut, high combining ability, good quality. In the same time 3 new molecular markers were created, in order to test the high resistance on head smut germplasm.

Key words: maize(*Zea mays* L.); head smut; germplasm innovation; molecular marker