

高粱抗蚜 QTL 定位

王 成, 罗 峰, 高建明, 裴忠有, 傅 扬, 孙守钧*

(天津农学院, 天津 300384)

摘要: 发掘国内高粱蚜抗性基因及其紧密连锁的分子标记, 以期为培育抗蚜高粱品种奠定基础。利用 SSR 标记, 分析抗蚜与感蚜组合 TAM428×Tx622B 的 220 个 F_2 代单株, 采用区间作图法进行高粱抗蚜的 QTL 分析。结果显示, 试材 TAM428 的抗蚜性符合数量性状遗传的特点, 构建了由 4 个标记组成的遗传连锁图, 在高粱 B 连锁群上覆盖 13.4 cM, 检测到 1 个抗蚜 QTL, 位于标记 Xcup29 与 Sam61581 之间, 解释的变异百分比为 24.7%。由此可见, 研究发现了 1 个主效 QTL 控制高粱抗蚜性, 其表现为显性和负向加性遗传。

关键词: 高粱; 蚜虫; 抗性基因; SSR 标记; QTL 定位

中图分类号: S435.14 **文献标志码:** A **文章编号:** 1004-3268(2014)07-0080-05

QTL Mapping of Aphid Resistance Genes in Sorghum

WANG Cheng, LUO Feng, GAO Jian-ming, PEI Zhong-you, FU Yang, SUN Shou-jun*

(Tianjin Agricultural University, Tianjin 300384, China)

Abstract: Identification of aphid resistance genes and their closely linked molecular markers is very important for developing aphid resistant sorghum cultivars. An F_2 population with 220 lines derived from cross between TAM428 and Tx622B was analyzed using SSR markers. And interval mapping method was adopted for the analysis of aphid resistance QTL in sorghum. The aphid-resisting trait of TAM428 fit into the inheritance law of quantitative traits. A genetic linkage map was constructed, which was composed of four markers and covered 13.4 cM in linkage group B. One QTL responsible for sorghum resistance to aphid was detected in this study, and mapped to the region between the molecular markers Xcup29 and Sam61581. This QTL could explain 24.7% of the total variation. In this study, a major QTL controlling sorghum resistance to aphid was identified, and inheritance of this QTL met the genetic models of dominance and negative addition.

Key words: sorghum; aphid; resistance gene; SSR marker; QTL mapping

高粱蚜(*Melanaphis sacchari* Zehntner)是我国高粱上的一种主要害虫, 尤以甜高粱上危害最为严重。害虫除直接从植株体内吸食营养外, 还可分泌大量蜜露污染作物, 影响植株光合作用, 严重影响高粱产量及品质^[1-2]。高粱蚜危害一般引起减产 15% 左右, 大发生年份防治不及时减产可达 30% 以上, 甚至可造成高达 50% 的损失^[3]。目前对高粱蚜的防治主要采用化学药剂, 虽然效果良好, 但防治时正逢高温季节, 由于高粱种植密度大, 防治很困难^[4]。防治高粱蚜最

经济有效的方法是培育抗虫品种, 长期以来, 育种工作者也选育了一些抗蚜品种(系), 但抗蚜效果有很大差异, 生产上大面积推广的不多, 因此, 目前抗蚜育种成为高粱抗虫育种的主要内容之一。

利用分子生物学理论和技术, 对高粱蚜抗性基因进行深入研究, 完成基因定位, 对于明晰高粱抗蚜机制和进行分子标记辅助选择(MAS)育种具有重要意义。前人对于高粱抗蚜性相关基因的分子标记、QTL 定位等做过一些研究, 但因蚜虫种类和发

收稿日期: 2013-11-15

基金项目: 国家科技支撑计划项目(2007BAD42B03); 天津市科技支撑计划项目(12ZCZDNC00100)

作者简介: 王 成(1988-), 男, 天津人, 在读硕士研究生, 研究方向: 高粱遗传育种。E-mail: 492025861@qq.com

* 通讯作者: 孙守钧(1961-), 男, 山东文登人, 教授, 博士, 主要从事饲用作物遗传改良研究。E-mail: sunshoujun@tjau.edu.cn

生规律不同,所得结论存在诸多分歧和不足。如在美国危害高粱的是麦二叉蚜(*Schizaphids graminum* Rondani),而危害我国高粱的是高粱蚜。对高粱抗麦二叉蚜 QTL 的定位已有报道,Katsar 等^[5]发现至少 10 个 QTL,分别位于 A、D、E、F、G、H、I、J 连锁群上;Agrama 等^[6]发现有 9 个分别位于连锁群 A、B、C、D、F、H、J 上的 QTL 与蚜虫生理型 I、K 的抗性有关。我国也进行了高粱抗蚜分子标记研究。李玥莹等^[7]以高粱组合 TAM428×ICS-12B 杂交后代建立的抗感群体为试材,应用 RAPD 技术对抗高粱蚜基因进行分析,最终得到了 10 个具有稳定多态性标记的引物。常金华等^[8]发现抗虫基因位于第 9 连锁群上,与标记 Xtxp6 间存在连锁关系。国内对高粱抗蚜 QTL 定位尚未见报道。

高粱抗蚜性鉴定受蚜虫种类和环境影响较大,且其属非单基因遗传性状,针对我国的高粱蚜,用 QTL 定位方法进行分析,可在育种过程中作为辅助选择手段促进抗虫育种的发展。为此,应用 250 对 SSR 引物对高粱抗蚜基因进行 QTL 分析,完成 QTL 在染色体上的定位,以期对高粱分子标记辅助选择育种提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 试验材料

试验材料来自天津农学院作物遗传育种重点实验室,母本 TAM428(P₁)是抗蚜纯系,父本 Tx622B(P₂)为感蚜纯系。TAM428×Tx622B 杂交得到 F₁ 代,进一步自交获得 F₂ 代。

1.2 蚜虫的接种鉴定与抗蚜性验证

2012 年将双亲、F₁ 以及 F₂ 代种植在天津农学院东校区试验田。采用随机区组设计,单行区,共 49 行,其中母本 2 行、父本 16 行、F₁ 代 1 行、F₂ 代 30 行。每行长 4 m,行距 0.2 m,株距 0.15 m。每隔 2 行种植 1 行亲本 Tx622B 作诱发行,以保证充分接种。常规水肥管理。

采用田间自然感蚜与人工接蚜相结合的鉴定方法,对 P₁、P₂、F₁ 及 F₂ 单株进行抗蚜性鉴定。每小区随机选 20 株,在蚜虫盛发期(高粱灌浆期)从感蚜亲本上摘取布满蚜虫的叶片,去掉天敌后接种于每一植株倒数第 3 或 4 片叶的叶腋处,每株接虫 200 头左右,1 周后进行蚜量调查。隔 7 d 调查一次,共 3 次。调查部位为植株倒数第 3 或 4 片可见叶,用相机拍照并记录蚜虫数。依据蚜量划分抗性等级,抗蚜性分级标准为:高抗(HR),0≤蚜量≤40;抗蚜(R),41≤蚜量≤200;中抗(MR),201≤蚜量≤400;

感蚜(S),401≤蚜量≤700;高感(HS),蚜量≥701。根据田间蚜虫数考察结果,采用 SPSS 17.0 对 F₂ 代各单株的蚜虫分布频率进行分析。

根据 F₂ 代的田间鉴定结果,分别从抗蚜、中抗、感蚜 3 个等级的 F₂ 代中各选出 10 个单穗,于 2013 年 5 月种植在天津农学院东校区试验田蚜虫盛发地块,常规水肥管理,并于蚜虫盛发期调查每一株 F_{2:3} 的蚜虫发生情况,记录并整理数据,以验证 F₂ 代抗蚜性考察的准确性。

1.3 基因组 DNA 提取和 SSR 分析

从亲本、F₁ 和 F₂ 群体单株上取叶片,每一单株采集一小片嫩叶,冷冻处理后,采用改良的 CTAB 法提取基因组 DNA^[9],然后使用 0.8% 琼脂糖凝胶电泳检测,并将 DNA 质量浓度均调整为 10 ng/μL。PCR 反应体系为 15 μL:1.5 μL 的 10×PCR 反应缓冲液,0.3 μL 的 10 mmol/L dNTPs,0.12 μL 的 Taq DNA 聚合酶,0.9 μL 的 10 μmol/L 引物,1.5 μL 的 10 ng/μL 模板 DNA,10.68 μL 的去离子水。扩增程序为:94℃预变性 4 min;94℃变性 1 min,55~60℃退火 30 s(或 1 min),72℃延伸 1 min,35 个循环;72℃充分延伸 6 min。扩增完成后,取 5 μL 产物,于 2.5% 琼脂糖凝胶上进行电泳以检测结果(100 V 电泳 60 min)。对于未表现出多态性的引物,用 8% 非变性聚丙烯酰胺凝胶以 90 W 恒功率电泳分离扩增产物,银染显色后在观察灯箱上进行数据分析。

1.4 SSR 标记筛选、数据统计及连锁图构建

首先用 250 对 SSR 引物^[10]对抗、感亲本 TAM428、Tx622B 进行筛选,获得表现出多态性的引物。根据 F₂ 代抗蚜性鉴定结果,选取高抗、高感的单株各 11 株。利用亲本间表现出多态性的引物对抗、感组单株再次进行筛选,记录带型,并将抗、感 2 组间条带数目进行 χ^2 检测,表现出显著差异的引物用于 F₂ 群体分析。条带统计方法如下:(1)对于共显性标记,与母本 TAM428 一致的带型记为 a,与父本 Tx622B 一致的带型记为 b,杂合的带型记为 h,未扩增出或模糊不清的记为 u;(2)对于显性标记,若母本带型为显性,无父本带型,则记为(b,d),d 表示分离群体中和母本带型一致的单株,b 表示和父本一致的带型;(3)反之,若父本带型为显性,无母本带型,则记为(a,c),c 表示分离群体中和父本带型一致的单株,a 表示和母本一致的带型。

利用 Join Map 3.0 软件^[11],先用 Calculate 命令计算相关参数,在 Groupings(tree)命令下,在 LOD≥3.0 的状态下进行连锁群分组,然后用 Create

Groups for Mapping 命令作图,用 Map 命令构建框架图,并进行图距的计算。最后进行优化,得到准确的图谱框架。

1.5 抗蚜性基因的 QTL 定位

应用 Join Map 3.0^[11]和 Map QTL 4.0^[12]分析高粱抗蚜虫相关 QTL。采用区间作图法(interval mapping,IM),取 LOD 值 3.0 为 QTL 存在的阈值。

2 结果与分析

2.1 高粱抗蚜性鉴定结果及遗传分析

调查结果表明,TAM428 的蚜量平均值为 33.580 头,表现为高抗;Tx622B 的蚜量平均值为 659.360 头,表现为感蚜; F_1 的蚜量平均值为 130.475 头,介于 2 个亲本之间,趋于抗蚜。以上数据表明,TAM428 的抗蚜性是由显性基因控制的。利用 P_1 、 P_2 、 F_1 和 F_2 抗蚜性鉴定所得的蚜量绘制频数分布图(图 1),结果显示,本研究用群体的蚜量调查结果符合正态分布,这是数量性状遗传的表现,此群体可以用于 QTL 分析。

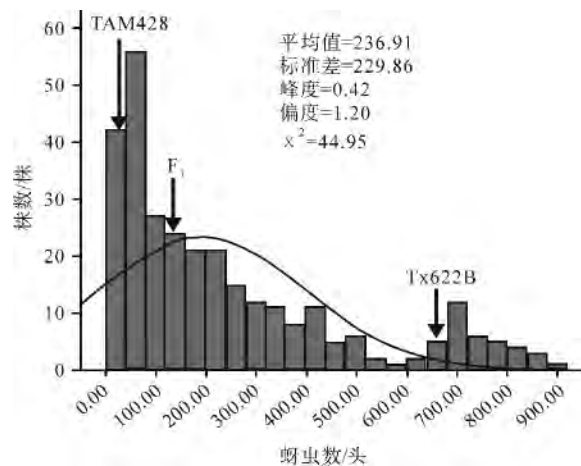


图 1 亲本、 F_1 、 F_2 蚜量的频数分布及 F_2 群体的遗传参数

2.2 SSR 标记连锁群构建

通过亲本 TAM428 和 Tx622B 对 250 对 SSR 引物的筛选,选出在双亲间产生多态性的 63 对引物组合,分布于 10 个连锁群上,多态率为 25.2%。利用这 63 对 SSR 引物对抗蚜组和感蚜组的各 11 个 F_2 单株进行检验,并对结果进行 χ^2 检测,最终获得了 5 对具有多态性的引物,多态率为 7.9%,它们分别位于高粱的 A、B、J 染色体上(表 1)。采用标记 Xcup29 检测的抗组上条带数为 11,感组上条带缺失数是 4(图 2), χ^2 检测结果显示,其 χ^2 值最小,说明其扩增条带数目与差异显著的理论条带数目最为接近,在进行群体扩增后,最可能表现出显著的差异。用筛选出的 5 对多态性引物对 F_2

群体的 220 个单株 DNA 进行扩增,与预期相同,引物 Xcup29 扩增结果在 F_2 群体中表现出明显差异,其余 4 对引物差异均不显著。围绕着 Xcup29 这个标记在 ± 10 cM 的范围内,又筛选出 3 个与其连锁的标记,通过软件分析将 4 个标记定位在构建的图谱上。最终获得了高粱 SSR 分子标记遗传连锁图谱,包含 1 个连锁群(LG),总长度为 13.4 cM,平均图距为 3.2 cM(图 3)。

表 1 多态性引物筛选结果

引物名称	染色体	R+	S-	χ^2
Sam54775	A	9	5	0.67
Xcup29	B	11	4	0.25
Sam50778	J	10	4	0.67
Sam38392	J	9	4	1.26
Sam73363	J	10	4	0.67

注:R+为抗组上条带数;S-为感组上条带缺失数。

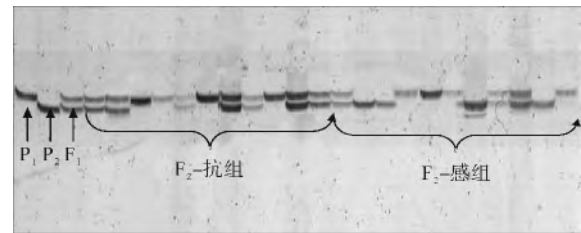


图 2 引物 Xcup29 扩增结果

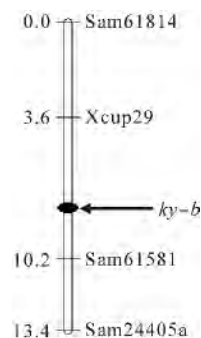


图 3 高粱抗蚜性 QTL 的定位

2.3 高粱抗蚜基因的 QTL 定位

根据抗蚜性鉴定结果,共检测到 1 个主效 QTL ($ky-b$),其位于 B 连锁群(Chr. 2)上的标记 Xcup29 与 Sam61581 之间,距离为 6.6 cM,距离上下两侧标记的遗传距离分别为 5.0 cM 和 1.6 cM,连锁距离为 13.4 cM,其中包括 4 个标记,它们的平均距离为 4.5 cM。LOD 值为 12.66,其解释的变异百分比为 24.7%。加性效应为 -138.775,显性效应为 -41.838,显性势为 0.30,QTL 作用方式为负向加性和部分显性。

3 结论与讨论

3.1 关于抗蚜性鉴定引物的筛选

SSR 标记多态性非常丰富,并具有操作简便、稳定可靠和费用较低等优点,称作 RFLP 之后的第 2 代分子标记,广泛应用于构建遗传图谱^[13-19]、基因定位^[20-22]和种质鉴定等研究工作。本试验 2 个亲本的 DNA 分析结果表明,亲本之间的基因组相似性极高,这直接给标记筛选带来了一些困难。通过对 250 对 SSR 引物的筛选,选出了 63 对表现出多态性的引物,多态率为 25.2%。将这 63 对引物分别与抗虫+感虫共 22 个 F₂ 单株 DNA 进行反应,对带型数目进行 χ^2 检测,数值越小说明越接近理论的比例,同时也说明该多态性片段与目标性状基因连锁,然后再用筛选出的有连锁关系的 5 对引物对 F₂ 群体的单株 DNA 进行扩增,这样做的优点在于,能够较为准确地筛选出与目的性状连锁的引物,既节省了时间又降低了试验成本。最后构建了一张具 4 个 SSR 标记、1 个连锁群的遗传图谱,达到了定位标准的要求,为高粱抗蚜性分子鉴定提供了参考。此外,本试验发现抗蚜性变异较少,一方面可能在其他染色体上还存在着变异未被发现;另一方面可能是 F₂ 群体易受环境影响所致。

3.2 关于高粱抗蚜基因的 QTL 定位

鉴于高粱蚜人工和田间鉴定易受环境条件影响,比较费时费力,一些学者试图利用 MAS 育种的手段开展抗蚜品种的选育,以提高抗虫育种效率。而受到群体大小、亲本差异、基因型和环境互作的差异以及遗传图谱的差异等因素影响,不同的分离群体检测到的 QTL 差异较明显^[23]。

李玥莹等^[7]以 TAM428×ICS-12B 杂交后代建立的抗感群体为试材,应用 BSA 法对抗高粱蚜基因进行分析,筛选了 500 个 RAPD 随机引物,共扩增出 1 614 条谱带,得到了 10 个具有稳定多态性标记的引物,其中 OPN-07 和 OPN-08 这 2 个引物的多态性扩增图谱抗感之间差异明显。其试验虽然采用了与本试验相同的母本材料,但未实现标记的定位。常金华等^[8]利用与感虫表现连锁的 3 对 SSR 引物进一步对 F₂ 分离群体的 298 个单株进行 PCR 分析,结果显示,抗虫基因与标记 Xtxp6 间存在连锁关系,连锁距离为 8.7 cM,因 Xtxp6 位于第 9 连锁群,初步将该抗虫基因定位于第 9 连锁群上。而本试验结果表明,与抗蚜有关的等位基因存在于第 2 连锁群上。两试验结果不一致,究其原因可能是所用亲本不同,其试验所用的高粱组合为河农 16×千

三。Katsar 等^[5]发现至少 10 个高粱对麦二叉蚜抗性位点位于 8 个连锁群上,与蚜虫生理型 C、E、I 和 K 抗性相关。它们分别位于染色体 A、D、E、F、G、H、I、J 上,解释总表型变异的 2.94%~49.38%。位于染色体 E 上的 2 个 QTL 和 G 上的 1 个 QTL,有着最大的抗性效应。其未在连锁群 B 上发现与抗麦二叉蚜有关的 QTL,与本试验结果出现差异,可能是由于亲本差异,但最主要的原因可能是高粱蚜种类不同所致,而高粱对不同高粱蚜的抗性由不同的 QTL 控制。值得注意的是,美国抗蚜高粱品种引入我国后均未表现出抗性。

Agrama 等^[6]发现有 9 个分别位于连锁群 A、B、C、D、F、H、J 上的高粱抗麦二叉蚜 QTL 与麦二叉蚜生理型 I、K 的抗性有关,其中,效应最大的抗蚜 QTL 位于连锁群 B 上,Xtxp7 和 Xtxp13 分别位于本试验中发现的 Xcup29 与 Sam61581 的两侧,距离分别为 4.5 cM 和 7.4 cM。这表明 2 项研究在 B 连锁群相近位置上检测到了一个效应较大的 QTL,推测在该位置上确实存在着高粱抗蚜主效 QTL。Almeida 等^[24]针对 QTL 表达是否受环境的影响,提出了 2 种 QTL 类型,分别为在不同环境下能够反复检测到的 QTL,即基础性 QTL 和在特定环境下检测到的 QTL,即适应性 QTL。综合国内外的研究,除 Agrama 等^[6]的研究结果与本试验有相同之处外,其余研究均与本试验结果不同,由此推测,与标记 Xcup29 紧密连锁的 QTL 可能为基础性 QTL。本研究结果可作为进一步进行抗蚜 QTL 分子标记辅助选择、精细作图和抗蚜基因图位克隆的基础。

本研究证实,试材 TAM428 所含有的抗蚜基因符合数量性状遗传的特点。通过对 TAM428×Tx622B 所构建的 F₂ 群体进行 QTL 分析,检测到 1 个与高粱抗蚜性相关的 QTL,位于标记 Xcup29 与 Sam61581 之间。

参考文献:

- [1] 董怀玉,徐秀德,刘彦军,等.高粱种质资源抗高粱蚜鉴定与评价研究[J].杂粮作物,2000,20(2):43-45.
- [2] 杜兰花,梁涛.山西省晋中区域高粱蚜虫种群演变消长原因探析[J].山西农业科学,2009,37(2):64-66.
- [3] 檀文清,李三棉,郭黄萍,等.高粱抗蚜性遗传的研究[J].山西农业科学,1985(8):12-14.
- [4] 何富刚,颜范悦,辛万民,等.国内外高粱种质抗高粱蚜鉴定与评价研究[J].辽宁农业科学,1996(5):14-17.
- [5] Katsar C S, Paterson A H, Teetes G L, et al. Molecular

- analysis of sorghum resistance to the greenbug (Homoptera: Aphididae) [J]. Plant Resistance, 2002, 95: 448-457.
- [6] Agrama H A, Widle G E, Reese J C, *et al.* Genetic mapping of QTLs associated with greenbug resistance and tolerance in *Sorghum bicolor* [J]. Theor Appl Genet, 2002, 104: 1373-1378.
- [7] 李玥莹, 赵姝华, 杨立国, 等. 高粱抗蚜基因的 RAPD 分析[J]. 生物技术, 2002, 12(4): 6-8.
- [8] 常金华, 夏雪岩, 张丽, 等. 高粱抗蚜基因的遗传分析和 SSR 标记定位[J]. 草业学报, 2006, 15(2): 113-118.
- [9] Gao J M, Xia B X, Luo F, *et al.* Marker-assisted breeding for *rfl*, a nuclear gene controlling A1 CMS in sorghum (*Sorghum bicolor* L. Moench) [J]. Euphytica, 2013, 193: 383-390.
- [10] Li M, Yuyama N, Luo L, *et al.* *In silico* mapping of 1 758 new SSR markers developed from public genomic sequences for sorghum [J]. Mol Breeding, 2009, 24: 41-47.
- [11] van Ooijen J W, Voorrips R E. Software for the calculation of genetic linkage maps [M]. Wageningen: Plant Research International, 2001.
- [12] van Ooijen J W. Software for the calculation of QTL positions on genetic maps [M]. Wageningen: Plant Research International, 2002.
- [13] Menz M A, Klein R R, Mullet J E, *et al.* A high-density genetic map of *Sorghum bicolor* (L.) Moench based on 2926 AFLP, RFLP and SSR markers [J]. Plant Mol Biol, 2002, 48(5/6): 483-499.
- [14] Han O K, Kaga A, Isemura T, *et al.* A genetic linkage map for azuki bean [J]. Theor Appl Genet, 2005, 111: 1278-1287.
- [15] Roder M S, Korzun V, Wendehake K, *et al.* A microsatellite map of wheat [J]. Genetics, 1998, 149: 2007-2023.
- [16] Jones E S, Dupal M P, Dumsday J L, *et al.* An SSR-based genetic linkage map for perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.) [J]. Theor Appl Genet, 2002, 105: 577-584.
- [17] Haussmann B I G, Hess D E, Seetharama N, *et al.* Construction of a combined sorghum linkage map from two recombinant inbred populations using AFLP, SSR, RFLP, and RAPD markers, and comparison with other sorghum maps [J]. Theor Appl Genet, 2002, 105: 629-637.
- [18] Sharopova N, McMullen M D, Schultz L, *et al.* Development and mapping of SSR markers for maize [J]. Plant Molecular Biology, 2002, 48: 463-481.
- [19] Gonzalo M J, Oliver M, Garcia-Mas J, *et al.* Simple-sequence repeat markers used in merging linkage maps of melon (*Cucumis melo* L.) [J]. Theor Appl Genet, 2005, 110: 802-811.
- [20] Liu X M, Smith C M, Gill B S. Identification of microsatellite markers linked to Russian wheat aphid resistance genes *Dn4* and *Dn6* [J]. Theor Appl Genet, 2002, 104: 1042-1048.
- [21] Chu C G, Paris J D, Friesen T L, *et al.* Molecular mapping of hybrid necrosis genes *Ne1* and *Ne2* in hexaploid wheat using microsatellite markers [J]. Theor Appl Genet, 2006, 112(7): 1374-1381.
- [22] Guo R X, Sun D F, Tan Z B, *et al.* Two recessive genes controlling thermophotoperiod-sensitive male sterility in wheat [J]. Theor Appl Genet, 2006, 112(7): 1271-1276.
- [23] Beavis W B. QTL analyses: power, precision, and accuracy [M] // Patterson A H. Molecular dissection of complex traits. Boca Raton: CRC Press, 1998.
- [24] Almeida G D, Makumbi D, Magorokosho C, *et al.* QTL mapping in three tropical maize populations reveals a set of constitutive and adaptive genomic regions for drought tolerance [J]. Theor Appl Genet, 2013, 126: 583-600.