

玉米自交系 P178 的大斑病抗性 QTL 定位和效应分析

田志强¹,艾堂顺¹,邓 策¹,尤诗婷²,史 芹³,马亚龙¹,李志敏¹,丁俊强^{1*}

(1. 河南农业大学 农学院,河南 郑州 450002; 2. 天津农学院,天津 300380; 3. 郑州农林科学研究所,河南 郑州 450005)

摘要: 为了进一步鉴定玉米大斑病的主效抗病位点,以玉米优良抗病自交系 P178 为供体亲本,感病自交系 G41 为轮回亲本,发展了包含 150 个家系的 BC₂F₅ 群体,用于玉米大斑病抗性遗传分析。2017 年在吉林榆树和黑龙江双城 2 个环境条件下,对群体大斑病抗性进行了鉴定,结合 KASP 分子标记遗传连锁图谱的构建,对抗病 QTL 进行检测。结果表明,玉米大斑病抗性在群体家系间表现出广泛的变异。在玉米第 1、2、8、9 染色体上共检测到 6 个抗病 QTL,分别可以解释 4%~23% 的表型遗传变异。2 个稳定的抗病 QTL 分别位于第 2 染色体和第 8 染色体上,其在 2 个环境条件下都能检测到,而其他的 QTL 位点仅在 1 个环境条件下检测到。

关键词: 玉米; 大斑病; 自交系 P178; QTL 定位; 分子育种

中图分类号: S435.131 **文献标志码:** A **文章编号:** 1004-3268(2018)02-0073-05

QTL Mapping of Resistance to Northern Corn Leaf Blight in
Maize Inbred Line P178 and Effect Analysis

TIAN Zhiqiang¹, AI Tangshun¹, DENG Ce¹, YOU Shiting², SHI Qin³, MA Yalong¹, LI Zhimin¹, DING Junqiang^{1*}

(1. College of Agronomy, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, China; 2. Tianjin Agricultural University, Tianjin 300380, China; 3. Zhengzhou Institute of Agriculture and Forestry Science, Zhengzhou 450005, China)

Abstract: For identification of the major quantitative trait loci (QTL) resistant to northern corn leaf blight(NCLB) in maize, an advanced backcross population (BC₂F₅) including 150 family lines was developed using P178 as resistant donor parent and G41 as susceptible recurrent parent, respectively. The population as well as the parental lines was planted in Lishu, Jilin province and Shuangcheng, Heilongjiang province in 2017 for the evaluation of resistance to NCLB. Significant phenotypic variation in NCLB resistance was observed in both locations. Combined with the construction of genetic map with KASP markers, QTLs of resistance to NCLB were analyzed. In total, six QTLs were identified on chromosomes 1, 2, 8 and 9, which could explain 4%—23% phenotypic variation. Two stable QTLs were identified on chromosomes 2 and 8, which could be detected in the two environments, while the remaining QTLs conferred resistance to NCLB at a single location.

Key words: Maize; Northern corn leaf blight; Inbred line P178; QTL mapping; Molecular breeding

玉米大斑病由大斑刚毛球腔菌 (*Setosphaeria turcica*, 无性型 *Exserohilum turcicum*) 引起,是世界上普遍发生、危害严重的一种真菌性病害。玉米植株发病后,叶片先出现水渍状或灰绿色小斑点,随后沿叶脉方向迅速扩大,形成黄褐色或灰褐色梭形大斑,

影响植株光合作用,造成籽粒灌浆不足,导致产量降低^[1]。在我国玉米主产区,大斑病的常年发生面积约在 600 万 hm²,近年来其在局部地区暴发成灾,对玉米生产造成了严重危害^[2-3]。

解决玉米大斑病问题最有效的途径是选育和推

收稿日期:2017-11-02
基金项目:河南省自然科学基金(162300410140);河南省高校重点科研项目(17B210002)
作者简介:田志强(1976-),男,河南安阳人,助理研究员,硕士,主要从事玉米抗病机制研究。E-mail:tt973@126.com
* 通讯作者:丁俊强(1977-),男,河南唐河人,副教授,博士,主要从事玉米分子育种研究。E-mail:dingjunqiang1203@163.com

广抗病品种,而解析玉米大斑病的抗病遗传机制对抗病育种具有重要的指导作用。自 20 世纪 60 年代以来,已经有多个抗大斑病基因(*Ht* 基因)被鉴定,并在玉米生产上得到广泛应用。Hooker^[4]最先在美国玉米自交系 GE440 和秘鲁爆裂玉米品种 Ladyfinger 中鉴定出抗病基因 *Ht1*。该基因位于玉米第 2 染色体长臂上,对大斑病病原菌 1 号生理小种表现毒性,而对其他生理小种表现出质量性状抗性的特性^[5]。相继被鉴定的抗病基因还包括第 8 染色体长臂上的 *Ht2*^[6] 和 *Htn1*^[7],以及第 7 染色体长臂上的 *Ht3*^[8]。在 20 世纪 80 年代,这些 *Ht* 基因通过回交转育的方式被导入到玉米骨干自交系(如 A619、B37、B73、Oh43 等)中,在玉米生产上发挥了重要的作用^[9]。

随着玉米大斑病病原菌生理小种的分化变异,*Ht* 基因在玉米生产上的抗病效应逐渐降低,因此,更多的研究集中到数量性状抗性上^[10-11]。采用 Tx303 × B73 组配的连锁群体,Chung 等^[12]在第 1 染色体上鉴定到 2 个主效 QTL(*qNLB1.02* 和 *qNLB1.06*);采用 S11 × DK888 组配连锁群体,Chung 等^[13]进一步在第 8 染色体上鉴定出 1 个主效 QTL(*qNLB8.06*),从物理位置分析,该 QTL 和 *Ht2* 比较接近;Poland 等^[14]利用巢式关联作图群体(包含 25 个重组自交系群体)对大斑病抗性遗传结构进行了解析,共鉴定出 29 个 QTL,该群体中的大斑病抗性表型变异主要由多个微效 QTL 的加性效应控制,没有检测到主效抗病位点。

含有热带亚热带血缘的材料在拓宽我国玉米种质基础方面有重要的作用,尤其是良好的抗病性日益受到育种工作者的重视。本研究选用 1 份含有热带亚热带血缘的优良玉米自交系 P178,对其抗玉米大斑病的遗传机制进行分析,鉴定抗病基因位点,为分子标记辅助选择育种和抗病基因分离奠定基础。

1 材料和方法

1.1 供试材料

作图群体是以优良玉米杂交品种农大 108 的亲本 P178 为供体亲本,自交系 G41 为轮回亲本,经过 2 次回交,4 次自交,构建的包含 150 个家系的 BC₂F₃ 群体。其中,P178 高抗玉米大斑病,G41 高感玉米大斑病。

1.2 田间试验设计和抗病性鉴定

2017 年夏季分别在大斑病发生和流行的吉林梨树和黑龙江双城种植试验群体,包括 150 个 BC₂F₃ 群体家系和亲本。田间试验采用随机区组设

计,单行区,行长 4 m,行距 0.66 m,株距 0.25 m,2 次重复。玉米乳熟后期在田间调查玉米大斑病发病情况,根据植株叶片的发病面积采用 1~9 级的标准进行抗性级别划分^[15],其中 1 级为抗病,9 级为感病。对收集的亲本和群体家系表型数据,采用 SPSS 软件计算平均值和标准差;大斑病抗性在所有环境下总变异按变异来源可分为环境变异和家系间变异,按 $H^2 = \sigma_g^2 / (\sigma_g^2 + \sigma_{gl}^2 / n + \sigma_e^2 / nr)$ 计算广义遗传力,其中, σ_g^2 为遗传方差, σ_e^2 为误差方差, σ_{gl}^2 为基因型与环境互作的方差, r 为每个地点的重复数, n 为地点数。

1.3 分子标记连锁图谱的构建和 QTL 作图

以苗期新鲜叶片为材料,采用 CTAB 法提取亲本和群体家系总 DNA。采用均匀分布于玉米基因组上的 852 个 KASP (Kompetitive allele specific PCR,竞争性等位基因特异性 PCR) 标记^[16]进行群体及亲本间的标记多态性筛选。分子标记连锁图谱构建采用完备区间作图 IciMapping 软件^[17],操作步骤如下:用“0”表示抗病亲本 P178 的纯合带型,“2”表示感病亲本 G41 的纯合带型,“1”表示杂合带型;对每个标记的带型在群体中的分布进行卡方测验,然后用“group”命令(LOD=3.0)对所有的标记进行分组,之后分别对每组标记用“order”命令进行自动排序,最后用“ripple”命令确定每一条染色体上所有标记的最佳排列顺序。采用完备区间作图软件 IciMapping 中的加性效应模型(ICIM-ADD)对群体的加性效应进行评估,采用上位性效应模型(ICIM-EPI)鉴定上位性效应并判定其显著性。

2 结果与分析

2.1 玉米遗传连锁图谱的构建

在 852 个 KASP 标记中,有 349 个标记在亲本间表现出多态性。利用多态性标记对群体家系基因型进行了检测,并利用完备区间作图 IciMapping 软件进行遗传连锁图谱构建。采用 LOD>3.0 标准,将 349 个标记分成 10 个连锁群,覆盖玉米 10 条染色体,图谱总长度 2 336.2 cM,平均间距为 6.89 cM。其中,第 4 染色体上含有的标记数目最多,有 53 个;第 10 染色体上包括的标记数目最少,有 14 个;第 7 染色体上标记间的遗传距离最小,为 5.52 cM;而第 10 染色体上标记间的遗传距离最大,为 10.45 cM。分子标记遗传连锁图谱的构建为下一步的抗病基因定位奠定了基础。

2.2 玉米亲本和作图群体的大斑病抗性表型分析

在玉米乳熟后期,调查玉米大斑病发病情况,对

亲本和作图群体家系的大斑病抗性进行评估。在吉林梨树和黑龙江双城,玉米大斑病抗性在 2 个亲本和群体家系间呈现广泛的变异(表 1)。P178 表现为高抗玉米大斑病;G41 表现为高感玉米大斑病。在吉林梨树和黑龙江双城,P178 的抗性级别分别为 2.5 和 2.8,而 G41 的抗性级别分别是 7.1 和 7.5,亲本间高度差异化的抗性表现为研究抗病基因的分离遗传规律奠定了基础。

表 1 玉米亲本和作图群体大斑病抗性级别和遗传力

地点	亲本 P178 抗性级别	亲本 G41 抗性级别	群体				
			抗性级别	σ_e^2	σ_{gl}^2	σ_c^2	H^2
梨树	2.5 ± 0.2	7.1 ± 0.1	4.6 ± 1.2	6.4 **	—	0.52	0.96
双城	2.8 ± 0.2	7.5 ± 0.2	4.9 ± 1.5	5.9 **	—	0.40	0.97
两点综合	2.6 ± 0.2	7.2 ± 0.2	4.8 ± 1.3	9.2 **	0.91 **	0.64	0.94

注:** 表示在 $P < 0.01$ 水平显著。

2.3 玉米大斑病抗性 QTL 定位及基因效应分析

根据吉林梨树和黑龙江双城的玉米大斑病抗性鉴定结果,利用完备区间作图软件对抗病 QTL 的位置和效应分别进行了分析(图 1、表 2)。在梨树点,共检测到 4 个 QTL 与玉米大斑病抗性显著相关,分别位于第 1 (bin1.04)、2 (bin2.09)、8 (bin8.06)、9 (bin9.03)染色体上。在检测到的 4 个 QTL 中,位于第 9 染色体上的 QTL 有最大的效应值,其加性效应为 0.62,可解释抗性 23% 的表型遗传变异;另一个效应较大的 QTL 位于第 2 染色体上,其加性效应为 0.55,可解释抗性 20% 的表型遗传变异;其余 2 个抗性 QTL 对大斑病抗性变异的贡献率较小,第 8 染色体上的 QTL 可以解释 13% 的表型遗传变异,而

与 2 个亲本的抗性表现相比,作图群体家系在吉林梨树和黑龙江双城的平均抗性级别分别为 4.6 和 4.9。方差分析结果表明,吉林梨树和黑龙江双城玉米大斑病抗性的遗传力分别为 0.96 和 0.97,综合两点分析,遗传力为 0.94。作图群体家系间广泛的抗性遗传变异源自 2 个亲本的抗性差异,其较高的遗传力也表明大多数的抗性遗传变异由抗性因子控制。

位于第 1 染色体上的 QTL 解释 8% 的表型遗传变异。所有的抗性位点都来自于抗病亲本 P178,没有检测到来自亲本 G41 的抗性位点。在双城点,也检测到 4 个 QTL 与玉米大斑病抗性显著相关,分别位于第 1 (bin1.04)、2 (bin2.09)、8 (bin8.01)、8.06)染色体上,在第 8 染色体上检测到的 2 个 QTL 中,其中一个 QTL 有较大的效应值,其加性效应为 0.93,可解释 10% 的抗性表型遗传变异;位于第 1 和第 2 染色体上的 QTL,均可以解释 9% 的表型遗传变异;而位于第 8 染色体上的另一个 QTL 解释 4% 的表型遗传变异。所有的 QTL 抗性位点都来自于抗病亲本 P178,没有检测到来自亲本 G41 的抗性位点。

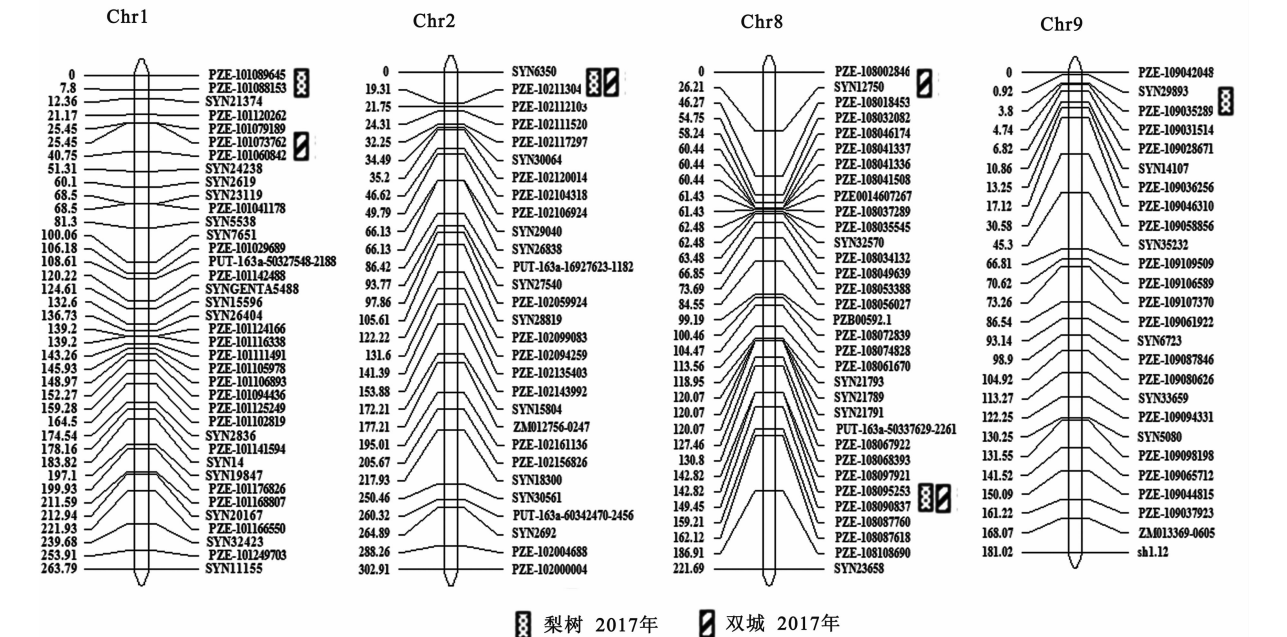


图 1 玉米自交系 P178 × G41 构建的 BC₂F₃ 群体中检测到的大斑病抗性 QTL

表 2 利用完备区间作图软件鉴定的玉米大斑病抗性 QTL

染色体位点	标记区间	梨树			双城		
		LOD	R ²	Add	LOD	R ²	Add
1.04	PZE - 101088153→ PZE - 101089645	3.12	0.08	0.51			
1.04	PZE - 101060842→ PZE - 101073762				2.61	0.09	0.96
2.09	SYN6350→PZE - 102113046	6.11	0.20	0.55	5.11	0.09	1.00
8.01	PZE - 108002846→SYN12750				3.10	0.10	0.93
8.06	PZE - 108095253→PZE - 108090837	5.10	0.13	0.46	2.64	0.04	0.30
9.03	PZE - 109035289→SYN29893	9.06	0.23	0.62			

注：QTL 区间为双侧标记；R² 表示 QTL 解释的遗传变异；Add 正值表示抗病位点来自 P178。

3 结论与讨论

本研究采用 QTL 作图策略,对玉米自交系 P178 的大斑病抗性进行了 QTL 定位。在玉米第 1、2、8、9 染色体上共检测到 6 个抗病 QTL,分别可以解释 4% ~ 23% 的表型遗传变异,其中在第 2 和第 8 染色体上检测到 2 个稳定的抗病 QTL。

玉米大斑病是一种复杂的真菌性病害,选择合适的作图群体进行抗病性鉴定,是进行 QTL 定位的基础。本研究在作图群体选择上,选用感病亲本作为轮回亲本,抗病亲本为供体亲本,通过 1 次杂交、2 次回交和 4 次自交发展的 BC₂F₅ 群体作为定位群体。与传统的作图群体(如重组自交系群体)比较,本研究采用的群体在抗病性鉴定方面有明显的优点,主要表现在群体的开花期变异小,尽量减少了开花期性状对病原菌侵染和表型鉴定的干扰,保证了表型数据采集的可靠性和一致性,为后续的 QTL 定位奠定了良好的基础。

在玉米基因组中,已经有多个抗大斑病位点被报道。分析这些抗病位点在基因组上的分布,发现存在抗病热点区域。在这些热点区域中,部分抗病位点已经被精细定位,或者分离出了抗病基因。如在第 1 染色体上,存在 2 个抗病热点区域(*qNLB1.02* 和 *qNLB1.06*),进一步分析表明,编码植物抗病相关蛋白 remorin 的基因(*ZmREM6.3*)^[18] 和一个编码类受体激酶的基因(*pan1*)^[19],分别是 *qNLB1.02* 和 *qNLB1.06* 的候选基因。在玉米第 8 染色体(bin 8.06)上,Hurni 等^[20]克隆了大斑病抗病基因 *Htn1*,该基因编码一个与细胞壁受体相关的蛋白激酶,可以感受玉米大斑病病原菌或者寄主产生的激发子,从而激发下游的抗病信号产生免疫应答反应。本研究鉴定了 6 个抗大斑病 QTL 位点,与前人的研究相比较,除发现了一致的抗病位点,同时也鉴定出了新的抗病位点。在梨树和双城 2 个地点,在玉米第 8 染色体(bin8.06)上检测到一个稳定的 QTL 位点,位于标记 PZE - 108095253 和 PZE - 108090837 之

间,该区间与 *Htn1* 所在的区间相重叠。此外,本研究还在第 2 染色体上检测到稳定的抗病位点。在单个环境下,玉米第 1 染色体(bin1.04)、第 8 染色体(bin 8.01)、第 9 染色体(bin9.03)上也检测到抗病位点。这些抗病位点与已经报道的抗病热点区域不同,可以认为是新的抗大斑病位点。

分子标记辅助选择育种是玉米性状改良的重要手段,和常规育种技术相结合,可以大大加快玉米新品种选育的进程。为了使抗病位点尽快地运用到抗病实践中,基因定位时可使用与育种直接有关的材料,以缩短基因定位研究与育种应用的距离。本研究在抗病材料选择上,抗源来自生产上大面积应用的杂交种农大 108 的亲本 P178。P178 含有热带种质血缘,具有配合力高、综合农艺性状优良、抗逆性好的特点,在玉米育种实践中也被广泛用作抗病性改良的供体材料^[21]。本研究鉴定了与抗病位点连锁的分子标记,为大斑病抗病分子标记辅助选择育种和选育综合农艺性状优良的抗病种质奠定了基础。

参考文献：

[1] Balint-Kurti P J, Johal G. Maize disease resistance[M]//Bennetzen J L, Hake S C. Handbook of maize: Its biology. New York: Springer, 2009: 229-250.

[2] 苏前富, 贾娇, 李红, 等. 玉米大斑病暴发流行对玉米产量和性状表征的影响[J]. 玉米科学, 2013, 21(6): 145-147.

[3] 全国农业技术推广服务中心. 2015 年全国三大谷类作物重大病虫害发生趋势预报[J]. 植物保护, 2015, 41(2): 1-4.

[4] Hooker A L. Inheritance of chlorotic-lesion resistance to *Helminthosporium turcicum* in seedling corn[J]. Phytopathology, 1963, 53: 660-662.

[5] Coe E H, Neuffer M G, Hoisington D A. The genetics of corn[M]//Sprague G F, Dudley J W. Corn and corn improvement. Madison: ASA-CSSA-SSSA Publ., 1988: 81-258.

(下转第 97 页)

- ses of genetic diversities within tomato and pepper collections detected by retrotransposon-based SSAP, AFLP and SSR[J]. Theor Appl Genet, 2005, 110(5): 819-831.
- [3] 李晴, 张学时, 张广臣, 等. 辣椒种质遗传多样性的 RAPD 分析[J]. 北方园艺, 2010(22): 118-122.
- [4] 周晶, 沈火林, 杨文才, 等. 辣椒遗传多样性的 SSR 分析[J]. 华北农学报, 2009, 24(S1): 62-67.
- [5] 贾豪, 魏小春, 姚秋菊, 等. 辣椒 SSR 标记种质资源遗传多样性的分析[J]. 分子植物育种, 2017(1): 353-363.
- [6] Zhebentyayeva T N, Reighard G L, Gorina V M, *et al.* Simple sequence repeat (SSR) analysis for assessment of genetic variability in apricot germplasm[J]. Theor Appl Genet, 2003, 106(3): 435-444.
- [7] Kim S, Park M, Yeom S, *et al.* Genome sequence of the hot pepper provides insights into the evolution of pungency in *Capsicum* species[J]. Nat Genet, 2014, 46(3): 270-278.
- [8] Qin C, Yu C S, Shen Y, *et al.* Whole-genome sequencing of cultivated and wild peppers provides insights into *Capsicum* domestication and specialization[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2014, 11(14): 5135-5140.
- [9] Lu J, Qi J J, Shi Q X, *et al.* Genetic diversity and population structure of cucumber (*Cucumis sativus* L.) [J]. PLoS One, 2012, 7(10): e46919.
- [10] Ren Y, Zhang Z H, Liu J H, *et al.* An integrated genetic and cytogenetic map of the cucumber genome[J]. PLoS One, 2009, 4(6): e5795.
- [11] Kumar S, Tamura K, Nei M. MEGA3: Integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment[J]. Brief Bioinform, 2004, 5(2): 150-163.
- [12] Nei M. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals[J]. Genetics, 1978, 89(3): 583-590.
- [13] Powell W, Machray G C, Provan J. Polymorphism revealed by simple sequence repeats[J]. Trends Plant Sci, 1996, 1(7): 215-222.
- [14] 罗玉娣, 李建国, 李明芳. 用 SSR 标记分析辣椒属种质资源的遗传多样性[J]. 生物技术通报, 2006(S1): 337-341.
- [15] 陈文超, 张竹青, 邹学校. 辣椒种质遗传多样性的 EST-SSR 分析[J]. 植物遗传资源学报, 2013, 14(6): 1137-1141.
- (上接第 76 页)
- [6] Zaitlin D, Demars S J, Gupta M. Linkage of a second gene for NCLB resistance to molecular markers in maize[J]. Maize Genet Coop Newsl, 1992, 66: 69-70.
- [7] Simcox K D, Bennetzen J L. The use of molecular markers to study *Setosphaeria turcica* resistance in maize[J]. Phytopathology, 1993, 83: 1326-1330.
- [8] Van S D. SCAR markers for the *Ht1*, *Ht2*, *Ht3* and *HtN1* resistance genes in maize[J]. Maize Genetics Conference Abstracts, 2001, 43: 134.
- [9] Welz H G, Geiger H H. Genes for resistance to northern-corn leaf blight in diverse maize populations[J]. Plant Breed, 2000, 119: 1-14.
- [10] Pratt R C, Gordon S G. Breeding for resistance to maize foliar pathogens[J]. Plant Breed Rev, 2006, 26: 119-173.
- [11] Ali F, Pan Q C, Chen G S, *et al.* Evidence of multiple disease resistance (MDR) and implication of meta-analysis in marker assisted selection[J]. PLoS One, 2013, 8(7): e68150.
- [12] Chung C L, Longfellow J, Walsh E K, *et al.* Resistance loci affecting distinct stages of fungal pathogenesis: Use of introgression lines for QTL mapping and characterization in the maize-*Setosphaeria turcica* pathosystem[J]. BMC Plant Biol, 2010, 10: 103.
- [13] Chung C L, Jamann T, Longfellow J, *et al.* Characterization and fine-mapping of a resistance locus for northern leaf blight in maize bin 8.06[J]. Theor Appl Genet, 2010, 121: 205-227.
- [14] Poland J A, Bradbury P J, Buckler E S, *et al.* Genome-wide nested association mapping of quantitative resistance to northern leaf blight in maize[J]. Proc Natl Acad Sci, 2011, 108: 6893-6898.
- [15] Chen G, Wang X, Long S, *et al.* Mapping of QTL conferring resistance to northern corn leaf blight using high-density SNPs in maize[J]. Molecular Breeding, 2016, 36: 4.
- [16] Semagn K, Babu R, Hearne S, *et al.* Single nucleotide polymorphism genotyping using kompetitive allele specific PCR (KASP): Overview of the technology and its application in crop improvement[J]. Mol Breed, 2014, 33: 1-14.
- [17] Meng L, Li H, Zhang L, *et al.* QTL IciMapping: Integrated software for genetic linkage map construction and quantitative trait locus mapping in bi-parental populations[J]. The Crop Journal, 2015, 3: 169-173.
- [18] Jamann T M, Luo X, Morales L, *et al.* A remorin gene is implicated in quantitative disease resistance in maize[J]. Theor Appl Genet, 2016, 129: 591-602.
- [19] Jamann T M, Poland J A, Kolkman J M, *et al.* Unraveling genomic complexity at a quantitative disease resistance locus in maize[J]. Genetics, 2014, 198: 333-344.
- [20] Hurmi S, Scheuermann D, Krattinger S G, *et al.* The maize disease resistance gene *Htn1* against northern corn leaf blight encodes a wall-associated receptor-like kinase[J]. Proc Natl Acad Sci, 2015, 112: 8781-8785.
- [21] 许其凤. 优质、高产玉米新品种农大 108 的选育与推广[J]. 中国农业大学学报, 2003, 8(1): 25-26.