

玉米自交系 CML470 抗南方锈病基因的定位

姚国旗, 单娟, 曹冰, 崔良国, 都森烈, 韩志景, 刘铁山, 李翠兰, 汪黎明

(山东省农业科学院玉米研究所, 济南 250100)

摘要: 南方锈病是我国玉米产区的主要病害, 玉米抗病品种的利用是控制其为害的一条最为安全和经济的途径。但是, 在我国当前的玉米育种中, 所利用的玉米南方锈病基因多来自美国杂交种 78599 等。为寻找新的南方锈病抗病基因, 本研究对 CIMMYT 自交系 CML470 的抗性进行了遗传分析。结果发现 CML470 的抗性由一个显性抗病基因(定名为 *RppC*)控制, 该抗病基因被定位于 10 号染色体短臂端部, 位于 SSR 标记 umc1380 和 umc1291 之间, 分别与两标记相距 3.5 cM 和 8.8 cM。通过回交, 并利用分子标记辅助选择, *RppC* 被转移到了优良自交系昌 7-2 中。

关键词: 玉米; 南方锈病; 抗病基因; 基因定位; 标记辅助选择

Mapping the Maize Southern Rust Resistance Gene of Inbred Line CML470

YAO Guo-qi, SHAN Juan, CAO Bing, CUI Liang-guo, DU Sen-lie,

HAN Zhi-jing, LIU Tie-shan, LI Cui-lan, WANG Li-ming

(Maize Research Institute, Shandong Academy of Agricultural Sciences, Jinan 250100)

Abstract: Southern rust is one of the major diseases for maize in China. Deployment of resistant varieties is one of the most environment-friendly and cost-saving methods. However, resistance genes used in current breeding programs mainly originated from the hybrid 78599. CML470 was a inbred line developed in CIMMYT and its inheritance of resistance to southern rust was studied to identify novel resistance genes. Genetic analysis showed that the resistance of CML470 was controlled by a dominant gene (named as *RppC*), which was mapped to an interval on the terminal of chromosome 10 short arm flanked by closest SSR markers umc1380 and umc1291 with a distance of 3.5 cM and 8.8 cM, respectively. The resistance gene *RppC* was transferred into the elite line Chang 7-2 by back-cross with the aid of molecular marker-assisted selection.

Key words: Maize; southern rust; resistance gene; molecular mapping; marker assisted selection

锈病是玉米的主要病害之一, 包括普通锈病、南方锈病和热带锈病 3 种类型。我国主要有玉米普通锈病和南方锈病发生^[1], 其中南方锈病为害最为严重^[2]。南方锈病是由多堆柄锈菌 (*Puccinia polysora* Underw) 侵染引起的, 流行时能造成玉米大幅减产, 严重时减产甚至超过 45%, 是包括我国玉米产区在内的很多玉米产区的主要病害^[3-5]。该病的发生需要略高的温度和高湿环境, 过去主要发生在我国南方一些地区。近年来由于气候的变化, 南方锈病在

我国的北方玉米产区也大面积发生, 现已成为黄淮海玉米产区的主要病害^[2,6]。

培育和利用抗病品种是一条控制玉米南方锈病为害最安全、经济、有效的方法。但是, 目前我国多数玉米品种和自交系对南方锈病抗性差, 黄淮海主推的两大品种郑单 958 与浚单 20 均不抗南方锈病^[2]。在我国当前玉米育种中, 所利用的抗源大多源自美国杂交种 78599^[6]。由于生理小种的变化, 抗病基因会丧失抗性。长期大面积使用同一抗源存在遗传脆弱性,

收稿日期: 2012-07-29 修回日期: 2012-10-29 网络出版日期: 2013-04-02

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.4996.S.20130402.1737.021.html>

基金项目: 国家转基因生物新品种培育重大专项(2011ZX08003); 山东省自然科学基金项目(ZR2009DM007); 山东省良种工程“玉米抗病、专用种质创新利用研究”项目; 山东省农业科学院博士基金项目(2007YBS006)

作者简介: 姚国旗, 博士, 助理研究员, 研究方向为玉米遗传育种。E-mail: yaoguqi927@sohu.com

通信作者: 汪黎明, 博士, 研究员, 研究方向为玉米遗传育种。E-mail: lmwang@saas.ac.cn

会给生产带来潜在威胁。因此,寻找新的抗源和抗病基因是持久控制该病发生为害的重要保证。

不同玉米品种对南方锈病的抗性存在差异。在遗传上,玉米对南方锈病抗性呈现主基因控制的质量抗性和多基因控制的数量抗性形式不同,有报道称玉米对南方锈病抗性还存在显性遗传与隐性遗传 2 种不同的方式^[7]。已经报道的玉米抗南方锈病的质量抗性基因不少于 3 个^[8-10]。在玉米南方锈病抗性基因定位方面,研究者利用不同的种质,在 10 号染色体短臂上发现了抗病主基因或者主效 QTL^[5,9-13]。此外,有研究者报道在玉米第 3、4、8、9 等染色体上也存在抗南方锈病的 QTL^[12-13]。

玉米起源于热带,热带、亚热带玉米种质比温带种质具有更多的遗传多样性,因而是寻找新的玉米抗病基因的重要种质资源^[10,12-14]。但是,由于适应性的问题,在育种中直接利用这些种质存在一定的困难^[15]。此外,在抗病品种的培育中,田间抗性鉴定对于环境的温度、湿度、菌源有一定的要求,增加了抗病品种选育难度。因此,利用分子标记技术从热带、亚热带种质中发现新的抗病基因并应用于育种研究具有重要的现实意义。本研究对抗病的 CIMMYT 自交系 CML470 进行了抗性遗传分析和抗病基因遗传定位,并通过回交,将抗病基因转移到了优良自交系昌 7-2 中。

1 材料与方法

1.1 试验材料

本研究中,抗病亲本 CML470 引自 CIMMYT,该自交系适应亚热带低地生态条件。黄淮海玉米产区骨干自交系昌 7-2 用作感病亲本和回交转育的轮回亲本。用昌 7-2 与 CML470 杂交,产生 F_1 。由 1 个 F_1 单株与亲本昌 7-2 回交获得 124 个 BC_1 植株,124 株 BC_1 自交获得 124 个家系。从 124 个 BC_1 自交家系中,选择抗病 BC_1 植株的自交家系,后代种子混合种植,用昌 7-2 回交 3 代,然后自交 1 代后由分子标记选择,获得 25 个 BC_4F_2 单株,再自交获得相应家系。

以上材料用于抗性遗传分析和抗病基因定位。此外,除亲本自交系外,感病自交系鲁系 9311 在部分试验中也用作感病对照。

1.2 田间抗病性评价

所有抗性评价试验均在海南省三亚市及山东省农业科学院玉米研究所试验基地完成。田间采用行长 4 m,行距 60 cm,株距 20 cm 的种植方式。

2007 年 11 月至 2008 年 3 月,在试验地进行亲本自交系南方锈病抗性鉴定。2008 年 11 月至 2009

年 3 月,对 BC_1 分离群体进行鉴定。2009 年 11 月至 2010 年 3 月,对 F_1 、 BC_1F_2 家系进行鉴定。在后面的 2 个鉴定时期,设置感病亲本昌 7-2 作为感病对照,抗病亲本 CML470 作抗病对照。

2011 年 11 月至 2012 年 3 月对 24 个选择的 BC_4F_2 单株的自交家系进行鉴定。鉴定中,每份材料种植 2 个重复,每个重复种植 1 个穗行,约 20 株植株,重复内随机排列。同时在试验中每 10 行插入 2 个感病对照(鲁系 9311 和昌 7-2)。此外,每个重复中各安排 1 行抗病对照 CML470。

除依赖自然接种外,在 2008 年 11 月至 2009 年 3 月、2009 年 11 月至 2010 年 3 月及 2011 年 11 月至 2012 年 3 月的鉴定试验中,还在小喇叭口期进行了人工接种。方法是采用田间采集的南方锈病感染叶片,用自来水冲洗叶片配置孢子悬浮液,然后用喷雾器喷洒于需要鉴定的材料上。

在约 80% 的植株进入散粉后 20 d 进行抗性评价。分 6 级记载发病情况,0 级为植株不发病;1 级为植株有孢子堆,最严重发病叶片有极少孢子堆分布、病斑面积占该叶面积比例 < 5%;2 级为植株部分叶片发病,最严重发病叶片孢子堆呈零星散布、叶片的病斑面积占该叶面积比例 5% ~ 10%;3 级为植株部分叶片发病,最严重发病叶片有明显孢子堆呈聚集片状分布、病斑面积占该叶面积约 10% ~ 20%;4 级为植株部分叶片严重发病,最严重发病叶片有明显孢子堆呈聚集片状分布、病斑达到该叶面积的 20% 以上;5 级为全部叶片病斑面积达到该叶面积的 20% 以上。发病程度为 0 ~ 2 级的植株划分为抗病类型,发病程度为 3 级或 3 级以上的植株划分为感病类型。

1.3 分子标记分析

3 叶期至 5 叶期取幼苗叶片,液氮中研磨成粉末。用 CTAB (cetyl trimethyl ammonium bromide) 方法提取 DNA^[16]。抗感池配置法为:从 BC_1 群体中,分别选择极端抗病与感病植株各 8 株,取等量叶片混合后研磨,分别提取 DNA,用作抗感池 DNA。从玉米遗传学与基因组学数据库中 (<http://www.maizegdb.org>),选择均匀分布于玉米 10 条染色体上 SSR 标记,以及报道的与抗南方锈病基因连锁的 SSR 标记。对这 200 多对 SSR 标记,在亲本 CML470 和昌 7-2 间进行多态分析。多态标记用于抗感池多态性分析及标记辅助选择。

PCR 反应在 Applied biosystem Thermal Cycler 2720 上进行。反应体系 10 μ L,内含模板 10 ~ 20 ng,引物各 2 pmol、 $MgCl_2$ 15 nmol、0.25 U *Taq* DNA

聚合酶与 $1 \times$ PCR 缓冲液。反应循环程序如下: 94°C 预变性 3 min, 然后按 94°C 变性 30 s、 $50 \sim 60^{\circ}\text{C}$ (根据引物而定) 退火 30 s、 72°C 延伸 30 s 进行 35 个循环, 最后 72°C 延伸 5 min。PCR 产物在 8% 19:1 或者 25:1 acrylamide/bis-acrylamide 非变性聚丙烯酰胺凝胶上电泳分离, 然后银染。

连锁分析采用软件 MAPMAKER EXP/3.0b^[17]。作图函数选择 Kosambi, 连锁判断标准设为 LOD 值 3.0。连锁图绘制采用软件 Mapchart^[18]。

BC_4F_2 单株的标记基因型图示中, phi118 设为起点。对于 2 个相邻标记基因型所跨染色体区域的基因型, 当其两侧标记基因型 (杂合、纯合 CML470 或昌 7-2 型) 不同时, 以两标记的中点, 把目标染色体区域分为 2 个部分, 两部分各以与其相邻的标记位点的基因型为参考。

标记辅助选择中, 前阶段在 10 号染色体的长臂和其他染色体上各选择 2~3 个多态性分子标记; 连同目标基因区域共用了 33 个标记, 用于供体基因组回复检测。后阶段进一步选择覆盖全基因组的 119 个多态性标记位点进行分析 and 选择。回复率的估算依据以下公式。

回复率 = 携带供体亲本等位基因位点数 / 全部检测到的多态位点数 $\times 100\%$ 。

2 结果与分析

2.1 CML470 对南方锈病的抗性遗传分析

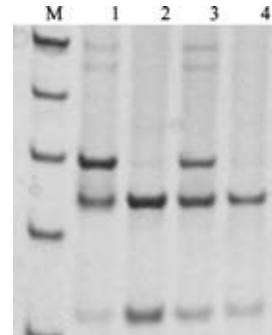
2007-2008 年在海南对亲本自交系的鉴定中, 昌 7-2 表现为感南方锈病 (发病程度为 4 级), CML470 表现为抗病 (发病程度为 1 级)。

2008-2009 年的鉴定中, 亲本表现与上一年度一致。在由感病亲本回交得到的 BC_1 中, 抗病植株为 64 株, 发病程度为 1 级或 2 级。感病植株为 60 株, 发病程度为 3 级或 3 级以上。同时, F_1 在鉴定中也表现为抗病型 (1 级)。这一结果符合在回交群体中的单个显性基因控制的 1:1 抗感分离比例 ($\chi^2 = 0.13, P = 0.72$)。在 2009-2010 年, 对上述 124 株 BC_1 的自交后代进行了抗性鉴定。在这些家系中, 所有来自抗病植株的家系均表现为抗病性分离, 来自感病植株的家系均表现为一致感病。表明回交群体中抗病株均为杂合型, 感病株均为纯合感病型。以上结果表明 CML470 对玉米南方锈病的抗性是由一个显性抗病基因决定的 (暂命名为 *RppC*)。

2.2 *RppC* 的遗传定位

为了定位 CML470 中抗病基因 *RppC*, 首先在亲

本 CML470 与昌 7-2 间进行了多态性标记筛选。在全部筛选的 200 多个 SSR 标记中, 有 128 个在亲本间检测到多态, 多态率为 67%。利用亲本间呈多态性的标记, 进行抗感池分析, 结果发现标记 umc1380 在抗感池间扩增出多态性差异片段 (图 1)。对组成抗感池的单株进行进一步分析, 所有抗病株的 umc1380 位点均为杂合型, 感病株中只有 1 株的 umc1380 位点为杂合型, 其他均为纯合昌 7-2 型。利用 BC_1 群体进行连锁分析, 表明 umc1380 与抗病基因连锁, 两者相距 3.5 cM (图 2)。



泳道 M、1、2、3、4 分别为分子量标记、亲本 CML470、亲本昌 7-2、抗池和感池

Lane M, 1, 2, 3, and 4 were molecular weight marker, CML470, chang 7-2, bulked resistant plants, and susceptible plants, respectively

图 1 SSR 标记 umc1380 对 CML470 南方锈病抗性抗感池分析

Fig. 1 Bulk segregant analysis of CML470 southern rust resistance with SSR marker umc1380

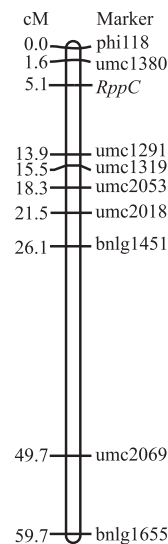


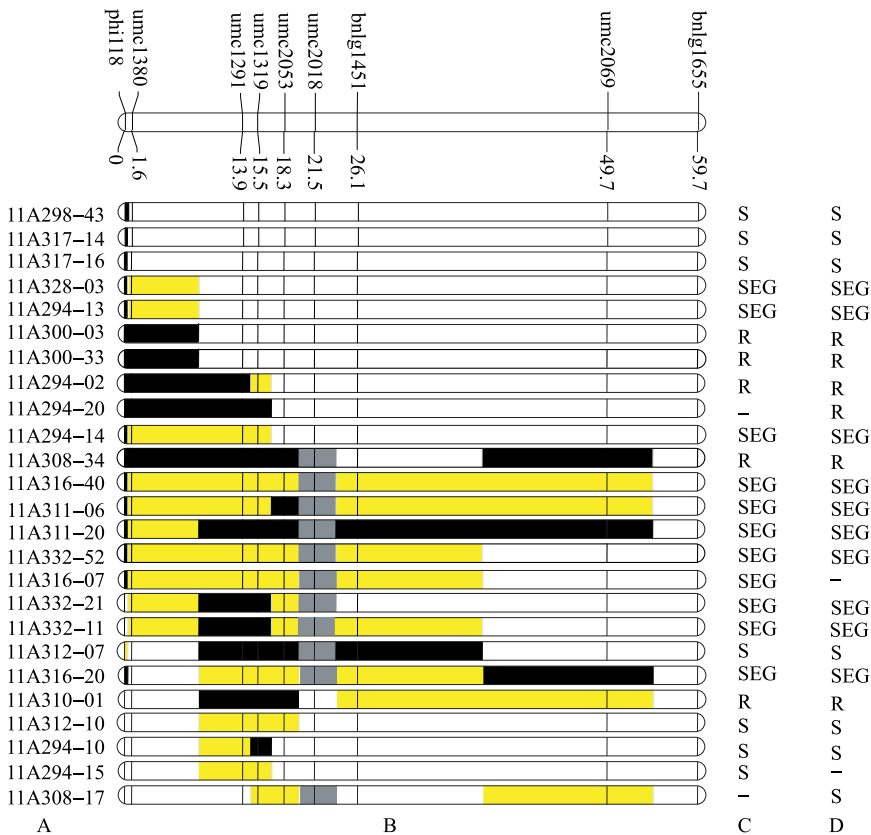
图 2 自交系 CML470 抗病基因 *RppC* 的遗传定位
Fig. 2 Genetic mapping of the rust resistance gene *RppC* of inbred line CML470

umc1380 位于 10 号染色体短臂的 bin10.00 上, 为进一步确认抗病基因在染色体上的位置, 对 10 号

染色体上 *umc1380* 位点附近并能在亲本间检测到多态的 SSR 标记,利用 BC₁ 群体进行连锁分析,构建抗病基因附近的局部连锁图。结果表明 *RppC* 位于 SSR 标记 *umc1380* 与 *umc1291* 之间,与这 2 个标记的遗传距离分别为 3.5 cM 与 8.8 cM (图 2)。*umc1291* 位于 10 号染色体的 bin10.01 上,这一结果进一步确认 *RppC* 位于 10 号染色体的短臂末端。

为确认抗病基因定位结果,通过标记选择出昌 7-2 背景下的 CML470 染色体 10 短臂端部导入片段相互重叠的 25 个 BC₄F₂ 单株,对当选植株进一步自交 1 代,进行后代抗病性鉴定(图 3)。在 2011-2012 年鉴定中,感病对照均表现为感病,抗病对照均表现为抗病。除缺失小区外,所有家系在 2 个重复中的表现均一致。鉴定结果显示:1) *umc1380-umc1291* 基因型为纯合 CML470 型的单株,其自交后代一致表现为抗病;2) *umc1380-umc1291* 基因型为杂合型的单株,其自交后代抗病性表现为分离;3) *umc1380-umc1291* 基

因型为纯合昌 7-2 型的单株,其自交后代一致表现为感病;4) *umc1291* 位点为纯合昌 7-2 基因型的单株中,*umc1380* 位点为纯合 CML470 基因型的,其自交后代一致抗病,*umc1380* 位点为杂合型的,其自交后代抗性分离;5) *umc1380* 位点为纯合昌 7-2 基因型的单株中,*umc1291* 位点为纯合 CML470 型或者杂合型的,多数单株自交后代抗病性表现为一致感病;但是单株 11A316-20 的 *umc1291* 基因型为杂合,其自交后代抗性分离,单株 11A310-01 的 *umc1291* 为纯合抗病亲本型,其自交后代表现为完全抗病。由此可见,在这些植株中,*umc1380-umc1291* 基因型为抗病亲本型时,植株表现为抗病;*umc1380-umc1291* 基因型为感病亲本型时,植株表现为感病;*umc1380-umc1291* 基因型为重组型的植株,多数植株的抗病性与 *umc1380* 位点基因型一致。这一结果与前述的定位结论一致,即抗病基因 *RppC* 位于 *umc1380-umc1291* 区间,并且与 *umc1380* 的连锁更为紧密。



A: 植株号; B: 标记基因型 (黑色区域为纯合 CML470 型, 黄色为杂合型, 灰色为纯合 CML470 或者杂合型, 白色为纯合昌 7-2 型);

C、D 分别为自交后代在重复 1 与 2 中抗病性分离情况, R、S、SEG 和 - 分别表示完全抗病、完全感病、抗性分离、数据缺失

A: Plant names, B: Genotypes. Black bars indicate markers homozygous for the CML470 allele, yellow indicate markers heterozygous, grey indicate markers homozygous for CML470 or heterozygous, and white indicate markers homozygous for the chang 7-2 allele. C and D shows southern rust resistance of the plants progeny in repeat 1 and 2, respectively. R, S, and SEG are abbreviations for resistant, susceptible, segregating, respectively. - means missing data

图 3 携带 CML470 基因组片段的 BC₄F₂ 单株的 *RppC* 所在区域标记基因型及其自交后代南方锈病抗性

Fig. 3 Graphical marker genotypes of chromosome regions across *RppC* of BC₄F₂ plants carrying CML470 genome fragments and southern rust resistance of their progenies

2.3 抗病基因的回交转移

为了在育种中利用抗病基因,将抗病基因 *RppC* 向昌 7-2 进行了回交转移。选择 umc1380 和 umc1291 分子标记位点均携带抗病亲本等位型的 3 个抗病 BC₁ 单株。对当选 3 个单株的自交穗行,用昌 7-2 回交后分别混收。种植混收后代,通过自然鉴定选择抗病植株后,再用昌 7-2 回交 2 代,分单株收获。随机挑选收获 30 个单株种植成穗行,选择表型与轮回亲本最为相近的 10 个穗行,每穗行选 3~5 个单株检测 umc1380、umc1291 及其他分布于各染色体的 31 个多态性标记位点的基因型。选择出 umc1380 和 umc1291 位点为抗病亲本等位型,其他背景位点尽可能为纯合昌 7-2 型的 2 个单株 (10AN294 和 10AN300),然后自交。

对来源于单株 10AN294 和 10AN300 的各包含 60 个植株的自交家系,再用前述 33 个标记位点进行标记分析,选择出 umc1380 位点为纯合抗病亲本型及 umc1380 与 umc1291 2 个位点均为纯合抗病亲本型,背景尽可能回复到轮回亲本昌 7-2 型的单株各 1 株,分别是 10AN300-3 和 10AN294-2。进一步用覆盖全基因组的 119 个多态性位点对 10AN300-3 和 10AN294-2 进行了检测,结果表明轮回亲本的回复率分别达到 90.0% 和 90.8%。2011 年冬,对 10AN300-3 和 10AN294-2 自交家系鉴定表明两材料均抗病。

对当选株 10AN300-3 和 10AN294-2,用昌 7-2 进一步回交 1 代后再自交 1 代。对两分离家系的各 300 株单株,用 119 个多态性标记进行分析、选择,获得了 umc1380 位点为纯合抗病亲本型及 umc1380 与 umc1291 2 个位点均为纯合的抗病亲本型,其他背景标记位点均为昌 7-2 基因型的植株各 1 株。

3 讨论

本研究对外引种质进行抗性鉴定,发现了 1 份抗南方锈病的新抗源 CML470。通过遗传分析,明确了其抗性由显性单基因 *RppC* 控制,并将 *RppC* 定位于 10 号染色体上,根据标记与公共数据库 (<http://www.maizegdb.org>) 的信息对比,推断其位于短臂上的 bin10.00~10.01 上。已经报道的抗南方锈病基因 *RppP25*、*RppQ*、*RppD* 也定位于这一区域^[9-10],*Rpp9* 也定位于染色体 10 的短臂上^[19]。此外,也有研究者报道了抗南方锈病的主效 QTL 位于这一区域^[11-13]。由于缺乏等位性分析、抗谱分析以及抗病基因的直接序列信息,本研究中所发现的抗病基因与上述抗病基因是否相同,以及它们之间的等位性关系,还需要进一步研究。

抗病基因在染色体上常常成簇分布^[20],包括本研究在内,多个研究都在玉米染色体 10 的 bin10.00~10.01 区域发现抗锈病的基因位点存在,这与抗病基因分布的规律是一致的。继续对玉米染色体 bin10.00~10.01 附近的抗病基因序列进行研究,分析其在种质资源中的遗传多样性,对发掘玉米南方锈病抗性新基因具有一定的意义。

参考文献

- [1] 梁克恭,武小菲.我国玉米锈病的发生与为害情况[J].植物保护,1993,19(5):34
- [2] 刘骏,马青,于凯,等.我国玉米南方锈病发生区域和玉米品种田间抗性的研究[J].作物杂志,2009(3):71-74
- [3] Raid R N, Pennypacker S P, Stevenson R E. Characterization of *Puccinia polysora* epidemics in Pennsylvania and Maryland[J]. Phytopathology, 1988, 78: 579-585
- [4] Agarwal P C, Khetarpal R K, Payak M M. *Polysora* rust of maize caused by *Puccinia polysora*[J]. Indian J Agr Sci, 2001, 71: 275-276
- [5] 刘章雄,王守才,戴景瑞,等. 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
- [6] 叶金才. 育成我国首例对玉米南方锈病免疫系齐 319[J]. 中国农业科学, 2000, 33(4): 110
- [7] Chávez-Medina J A, Leyva-López N. Resistance to *Puccinia polysora* in maize accessions[J]. Plant dis, 2007, 91: 1489-1495
- [8] Storey H H, Howland A K. Resistance in maize to the tropical American rust fungus, *Puccinia polysora* Underw, I. Genes *Rpp1* and *Rpp2*[J]. Heredity, 1957, 11: 289-301
- [9] Zhang Y, Xu L, Zhang D, et al. Mapping of southern corn rust-resistant genes in the W2D inbred line of maize (*Zea mays* L.) [J]. Mol Breeding, 2009, 25: 433-439
- [10] Chen C X, Wang Z L, Yang D E, et al. Molecular tagging and genetic mapping of the disease resistance gene *RppQ* to southern corn rust[J]. Theor Appl Genet, 2004, 108: 945-950
- [11] Scott G E, King S B, Armour J W J. Inheritance of resistance to southern corn rust in maize *Zea mays* populations[J]. Crop Sci, 1984, 24: 265-267
- [12] Holland J B, Uhr D V, Je Vers D, et al. Inheritance of resistance to southern corn rust in tropical-by-corn-belt maize populations [J]. Theor Appl Genet, 1998, 96: 232-241
- [13] Jines M P, Balint-Kurti P, Robertson-Hoyt L A, et al. Mapping resistance to southern rust in a tropical by temperate maize recombinant inbred topcross population [J]. Theor Appl Genet, 2007, 114: 659-667
- [14] 林红,潘丽艳,文景芝.吉林省部分玉米种质资源抗玉米弯孢菌叶斑病鉴定研究[J].植物遗传资源学报,2006,7(3):292-296
- [15] Tallury S P, Goodman M M. Experimental evaluation of the potential of tropical germplasm for temperate maize improvement[J]. Theor Appl Genet, 1998, 98: 54-61
- [16] CIMMYT. Laboratory protocols: CIMMYT applied molecular genetics laboratory [M]. Third Edition. Mexico: CIMMYT, 2005: 9-10
- [17] Lander E S, Green P, Abrahamson J, et al. MAPMAKER: an interactive computer package for constructing primary genetic linkage maps of experimental and natural populations [J]. Genomics, 1987, 1: 174-181
- [18] Voorrips R E. MapChart: Software for the graphical presentation of linkage maps and QTLs[J]. J Hered, 2002, 93: 77-78
- [19] Ullstrup A J. Inheritance and linkage of a gene determining resistance in maize to an American race of *Puccinia polysora*[J]. Phytopathology, 1965, 58: 605-608
- [20] Michelmore R W, Meyers B C. Clusters of resistance genes in plants evolve by divergent selection and a birth-and-death process [J]. Genome Res, 1998, 8: 1113-1130