

抗茎腐病分子标记在 159 份玉米自交系 中的验证及实用性评价

王金萍^{1,2}, 刘永伟², 孙果忠², 王海波²

(¹河北农业大学农学院, 保定 071001; ²河北省农林科学院遗传生理研究所/河北省植物转基因中心, 石家庄 050051)

摘要:为了评价抗茎腐病基因分子标记在辅助育种中的实用性,本研究对 159 份玉米自交系进行了茎腐病田间抗性鉴定,并检测了与 4 个茎腐病抗性 QTL(*qRfg1*、*qRfg2*、*RpiQI319-1* 和 *RpiQI319-2*) 紧密连锁的 11 个分子标记在上述材料中的扩增情况。结果表明:供试玉米自交系的平均发病率为 26.30%, 发病率低于 30.0% 的材料占 67.92%, 抗病资源丰富。来源于国外、东北、西南和黄淮海地区的材料平均发病率分别为 27.67%、17.92%、15.12% 和 36.80%, 与东北和西南地区种质相比, 黄淮海地区抗性种质相对缺乏。通过比较分子标记扩增带型与田间茎腐病表型, 发现与同一 QTL 连锁的不同分子标记的检测结果存在较大差异, 其中分子标记 STS01(*qRfg1*)、STS479(*qRfg2*)、bnlg1866(*RpiQI319-1*) 和 bnlg1716(*RpiQI319-2*) 的阳性检测结果与田间表型符合度较高, 分别为 76.79%、78.95%、91.67%、73.33%, 具有上述特异扩增多态性的材料平均发病率分别为 22.06%、19.01%、10.65%、19.63%, 可作为抗茎腐病分子检测的有效标记。本研究为开展玉米抗茎腐病分子育种提供了重要参考。

关键词: 玉米; 茎腐病; 分子标记

Evaluation and Validation of Molecular Markers Associated with Stalk Rot Resistance in 159 Maize Inbred Lines

WANG Jin-ping^{1,2}, LIU Yong-wei², SUN Guo-zhong², WANG Hai-bo²

(¹College of Agriculture, Agricultural University of Hebei, Baoding 071001; ²Institute of Genetics and Physiology, Hebei Academy of Agriculture and Forestry Sciences/Plant Genetic Engineering Center of Hebei Province, Shijiazhuang 050051)

Abstract: Stalk rot in maize, a soil-born disease around the world, could cause severe yield and quality loss. In order to evaluate the practicability of molecular markers linked to stalk rot resistance genes in maize assisted breeding, 159 maize inbred lines were used to screen resistance to stalk rot in the fields, and the characteristics of amplified bands of eleven molecular markers (STS01, STS378, STS414, STSZ514, STSZ479, bnlg1203, bnlg1866, SSRZ33, SSRZ47, umc2069 and bnlg1716) linked to four resistant QTLs, *qRfg1*, *qRfg2*, *RpiQI319-1* and *RpiQI319-2* were analyzed in the above-mentioned inbred lines. The results showed that the disease-resistant germplasms were plentiful in the tested materials. There were 55 inbred lines with a zero incidence rate accounting for 34.59% of the total, 42 inbred lines with an incidence between 0.1% to 20.0% accounting for 26.42%, 19 between 20.1% to 40.0% accounting for 12.58%, 13 between 40.1% to 60.0% accounting for 8.18%, 14 between 60.1% to 80.0% accounting for 8.81%, and 15 between 80.1% to 100% accounting for 9.43%. The average incidence of the total materials was 26.30%, and the incidence of 108 inbred lines accounting for 67.92% were less than 30.0%. The resistance of tested materials from different regions showed big difference. The average incidence of the inbred lines from abroad, Northeast, Southwest and Huanghuaihai region were 27.67%, 17.92%, 15.12% and

收稿日期: 2016-10-18 修回日期: 2016-11-22 网络出版日期: 2017-03-30

URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.4996.S.20170330.1448.002.html>

基金项目: 河北省财政专项(2009055001、F15R25)

第一作者主要从事玉米遗传育种研究。E-mail: 15226506557@163.com

通信作者: 孙果忠, 主要从事作物遗传育种研究。E-mail: 13933023804@163.com

王海波, 主要从事作物遗传育种研究。E-mail: nkywanghb@163.com

36.80% with a proportion of the resistant inbred lines of 62.69%, 82.36%, 88.24% and 53.66%, respectively. It was obvious that the proportion of resistant germplasms in Huanghuaihai region was lower than that in Northeast or Southwest region. Besides the genetic factor, the stalk rot phenotype of materials was also influenced by locations, years and researchers. The degree of stalk rot disease was obviously associated with the field conditions for plant growth and development, and most of the resistant materials were late-maturing. It was therefore an urgent problem to be solved about how to breed the early-maturing and resistant inbred lines in Huanghuaihai region. There were significant differences among the PCR results of several markers linked to the same QTL. Practicability of molecular markers was evaluated by checking the conformity between genotype tested by molecular markers and phenotype identified in the fields. Four molecular markers, STS01, STSZ479, bnlgl866 and bnlgl716, linked to *qRfg1*, *qRfg2*, *RpiQI319-1* and *RpiQI319-2* respectively, had a high conformity rate of 76.79%, 78.95%, 91.67% and 73.33%. The average incidence rates of positive materials detected by the above four markers were 22.06%, 19.01%, 10.65% and 19.63%, respectively. Thus, STS01, STSZ479, bnlgl866 and bnlgl716 can be used as effective markers for molecular assisted selection on stalk rot resistance in maize breeding. By comparing the conformity between phenotype and genotype tested by molecular markers linked to *Pythium* stalk rot resistant QTL (*RpiQI319-1* and *RpiQI319-2*) or *Fusarium* stalk rot resistant QTL (*qRfg1* and *qRfg2*), it was found that the *Fusarium* resistant QTL (*qRfg1* and *qRfg2*) was useful to the *Pythium* stalk rot. Some highly resistant inbred lines, such as F19 and SW113, were not found in any tested QTL, which needs to be further studied for new resistant QTLs. This study provided important information for molecular breeding of stalk rot in maize.

Key words: maize; stalk rot; molecular marker

玉米茎腐病 (Maize stalk rot) 是一种危害极大的土传病害, 在世界各玉米种植区均有发生^[1-4]。受玉米播种密度提高、氮肥使用量增加以及秸秆还田等因素的影响, 玉米茎腐病在我国的发生程度呈逐年加重的趋势^[5-7]。玉米茎腐病由一种或多种致病病菌侵染所致, 病原菌组成较为复杂, 且年度间和地区间存在差异。目前已知的致病菌种类有 20 余种, 我国以肿囊腐霉 (*Pythium inflatum* Matthews) 和禾谷镰孢 (*Fusarium graminearum* Schwabe) 为主^[5,8-9]。

种植抗病品种是防治玉米茎腐病最经济有效的措施, 而对玉米自交系茎腐病抗性的有效鉴定是培育抗病品种的前提^[10-11]。国内外研究表明, 玉米茎腐病抗性是由多个基因位点控制的数量性状, 以加性效应为主。M. E. Pe 等^[12]发现了 5 个抗玉米赤霉菌茎腐病的位点, 分别在 1、3、4、5、10 号染色体上。Q. Yang 等^[13]利用茎腐病高抗自交系 1145 和高感自交系 Y331 组配的回交群体, 定位了 2 个禾谷镰孢茎腐病抗性 QTL 位点 *qRfg1* 和 *qRfg2*, 分别位于 bin10.03/4、bin1.09/10 区域, 并将 *qRfg1* 精确定位在标记 SSR334 和 SSR58 之间。此后, D. Zhang 等^[14]将 *qRfg2* 精确定位在标记 SSRZ319 和 CAPSZ459 间。F. J. Song 等^[15]报道齐 319 对肿囊腐霉茎腐病的抗性由 2 对独立遗传的显性基因 *RpiQI319-1* 和 *RpiQI319-2* 控制, 前者位于 1 号染色体的 SSRZ33 和 SSRZ47 标记

之间, 后者位于 10 号染色体的 umc2069 和 bnlgl716 标记之间。上述结果为玉米抗茎腐病育种的分子标记辅助选择 (MAS, marker-assisted selection) 奠定了基础。

尽管在玉米上已经报道了很多控制数量性状的分子标记, 但真正应用于育种实践的还不多。这是因为受基因与环境互作影响, QTL 的位置和效应估计易存在误差; 且基于双亲定位的分子标记受遗传背景的影响, 具有群体局限性。随着 MAS 技术在育种上的应用, 分子标记的实用性逐渐受到育种家的重视^[16-18]。马丽等^[19]利用 Pearson 相关分析模型研究了 7 个已报道的小麦穗发芽抗性相关分子标记检测结果与表型的相关性, 从中筛选出 3 个实用性好的分子标记。宋茂兴等^[20]通过分析 100 份玉米自交系的分子标记检测结果与田间抗病表型的符合度, 验证了 2 个玉米抗矮花叶病分子标记的有效性。

本研究在 2015 年和 2016 年连续对国内外 159 份自交系进行了田间茎腐病抗性鉴定, 并检测了与 4 个抗茎腐病 QTL *qRfg1*、*qRfg2*、*RpiQI319-1* 和 *RpiQI319-2* 紧密连锁的 11 个分子标记在上述自交系中的扩增情况, 旨在探讨上述分子标记用于茎腐病抗性鉴定的实用性, 为利用 MAS 技术培育抗茎腐病玉米品种提供参考。

1 材料与方法

1.1 试验材料

以本实验室保存的 159 份自交系为试材(表 1),

包括 67 份国外种质和 92 份国内种质,国内种质中来源于东北区 17 份,黄淮海区 41 份,西南区 34 份。供试材料具有广泛的地理分布和丰富的遗传多样性。肿囊腐霉由中国农科院作科所王晓鸣研究员馈赠。

表 1 159 份供试玉米自交系及其来源

Table 1 159 maize inbred lines and their origin in this study

自交系 Inbred line	来源 Origin	自交系 Inbred line	来源 Origin	自交系 Inbred line	来源 Origin	自交系 Inbred line	来源 Origin
丹 340	东北	U8112	黄淮海	F06	西南	o7157	国外
丹 3130	东北	W3141	黄淮海	F19	西南	pac	国外
丹 360	东北	WK858	黄淮海	GEMS53	西南	POB69	国外
合 344	东北	X178	黄淮海	M2R7C4AMH32	西南	S000001	国外
吉 412	东北	矮 68	黄淮海	si273	西南	S000007	国外
吉 465	东北	昌 7-2	黄淮海	STL5	西南	S000019	国外
吉 63	东北	黄早四	黄淮海	SW113	西南	S01	国外
吉 853	东北	获唐黄	黄淮海	SW28	西南	S02	国外
辽 3053	东北	冀 35	黄淮海	SW50	西南	S23	国外
沈 136	东北	鲁 9801	黄淮海	SW98	西南	S24	国外
沈 137	东北	鲁原 92	黄淮海	T14	西南	S25	国外
沈 5003	东北	齐 318	黄淮海	zheng32	西南	S331	国外
铁 7922	东北	齐 319	黄淮海	301-304	国外	S332	国外
自海 9-21	东北	郑 58	黄淮海	502	国外	S333	国外
C8605-2	东北	中 17	黄淮海	581	国外	S334	国外
PH4CV	东北	中群 13QPMC14	黄淮海	582	国外	S889	国外
PH6WC	东北	中群 13QPMC4	黄淮海	583	国外	SOD	国外
488	黄淮海	中自 01	黄淮海	584	国外	SOPV	国外
872	黄淮海	chuan48-2	西南	585	国外	WZ421	国外
1145	黄淮海	CIMBL121	西南	586	国外	WZ425	国外
3189	黄淮海	CIMBL122	西南	587	国外	WZ426	国外
9058	黄淮海	CIMBL154	西南	867	国外	WZ428	国外
Feb-29	黄淮海	CIMBL24	西南	868	国外	WZ431	国外
32124	黄淮海	CIMBL286	西南	1241	国外	WZ433	国外
CA339	黄淮海	CIMBL324	西南	1602	国外	WZ434	国外
D1798Z	黄淮海	CML161	西南	2941	国外	WZ435	国外
D4-673	黄淮海	CML28	西南	2956	国外	W169	国外
D 黄 212	黄淮海	CML290	西南	3882	国外	W182	国外
H21	黄淮海	CML298	西南	3914	国外	W200	国外
H58	黄淮海	CML30	西南	3915	国外	W264	国外
HCL645	黄淮海	CML328	西南	3916	国外	WC867	国外
K22	黄淮海	CML33	西南	8052	国外	Z001	国外
K29	黄淮海	CML423	西南	8053	国外	俄-1	国外
K53	黄淮海	CML428	西南	8054	国外	俄-2	国外
K8	黄淮海	CML451	西南	8055	国外	俄-3	国外
L98-1	黄淮海	CML50	西南	B73	国外	俄-4	国外
N14	黄淮海	CML93	西南	C103	国外	自 330	国外
R105	黄淮海	CTL20	西南	Mo17	国外	早 599	国外
R1520	黄淮海	CTL26	西南	L010004	国外	莫群 17	国外
SX1132-2	黄淮海	DM9	西南	L010006	国外		

1.2 茎腐病抗性鉴定

供试材料在 2015 年和 2016 年连续鉴定 2 年。其中,2015 年按春播和夏播种植 2 批。2015 年春播材料于 4 月中旬种植在本研究中心网室,试验地为沙性土壤、地力瘠薄、亩施磷酸二铵 25 kg。2013—2015 年连续 3 年在该网室按王晓鸣等^[5]的方法在玉米大喇叭口期土壤接种种囊腐霉菌,年际间发病情况稳定。2015 年和 2016 年夏播材料于 6 月中旬种植在河北省农林科学院大河实验站,试验地为粘性土壤、地力中等、亩施复合肥 30 kg,自然发病。每个材料种植 1 行,行长 8.4 m,行距 60 cm,株距 20 cm;每隔 10 行设置齐 319 和郑 58 为抗、感对照。灌溉、化学除草等同常规实验田管理。

按照王晓鸣等^[5]的方法,以茎基部变褐、茎节变软为标准,在玉米乳熟末期逐株调查参试自交系的茎腐病发生情况,分别记载总株数和发病株数,计算发病株率 = (发病株数/总株数) × 100%。不同播期的晚熟材料发病率以发病重的播期鉴定结果为

准。按照王晓鸣等^[5]的抗病级别评价标准,茎腐发病率小于等于 30.0% 为抗病。

1.3 分子标记检测

每份材料取 3~5 株幼苗叶片,利用植物基因组 DNA 提取试剂盒(Tiagen DP305)提取 DNA。根据文献[13-15]报道合成抗茎腐病 *qRfg1*、*qRfg2*、*RpiQI319-1* 和 *RpiQI319-2* 的连锁标记引物(表 2)。供试材料检测的 PCR 反应体系为 20 μL,包括 2 × Taq PCR MasterMix 10 μL, ddH₂O 8 μL,模板 DNA 1 μL,上下游引物各 0.5 μL。PCR 反应程序为 94 °C 预变性 5 min;94 °C 变性 30 s,55~60 °C 退火 30~45 s,72 °C 延伸 30~60 s,共 35 个循环;72 °C 终延伸 10 min。PCR 反应结束后,取 5 μL PCR 产物采用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳或 8% 非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳检测。凝胶成像、拍照,每个样品重复检测 3 次。比较 PCR 扩增产物在凝胶上的迁移率和带型,与抗病对照扩增多态性一致的基因型记作阳性,视为含有目标 QTL。

表 2 本研究所用的玉米抗茎腐病 QTL 分子标记

Table 2 Molecular markers for detecting QTLs conferring resistance to maize stalk rot in the study

目标 QTL Target QTL	标记 Marker	引物序列 Primer sequences	标记类型 Marker type	参考文献 References	
<i>qRfg1</i>	STS01	F:5'-CCTCCGGTACGCACCTTACT-3' R:5'-CCAAGGTCAACTTCAGCCAT-3'	STS	[13]	
	STS378	F:5'-TGCAGCAGGTTTCATGTTTAT-3' R:5'-TTCCAACCTTATCAGCGACGA-3'	STS		
	STS414	F:5'-CCATAGACCAGTCGCACATT-3' R:5'-GCCTGACATCAGTACCACT-3'	STS		
	<i>qRfg2</i>	STSZ514	F:5'-ACGGGACAGAGGACACAC-3' R:5'-GACCGTTTCATGCGTATGTG-3'	STS	[14]
		STSZ479	F:5'-TAATTGATGAATCGCCACGA-3' R:5'-GGAGATAGGAGGGCTGCATT-3'	STS	
	<i>RpiQI319-1</i>	bnlg1203	F:5'-GACCCGTCTCTTTCAGTGC-3' R:5'-GTCTGTCTGCACCCGTTTTT-3'	SSR	[15]
bnlg1866		F:5'-CCCAGCGCATGTCAACTCT-3' R:5'-CCCCGGTAATTCAGTGGATA-3'	SSR		
SSRZ33		F:5'-TATFCAATTCATGTTTCC-3' R:5'-GATGCCAAAGCTCATACT-3'	SSR		
SSRZ47		F:5'-GAGTATGTTAGGGTTTCGG-3' R:5'-GACGGTGTGGACTTGTG-3'	SSR		
<i>RpiQI319-2</i>		umc2069	F:5'-ACAACCTCCTCCACGACCAAC-3' R:5'-GTAGAGGTCCCACTGTTCCTCAAT-3'	SSR	
	bnlg1716	F:5'-AAATAACCAGAACATGCCGC-3' R:5'-CGCAACTTTCATCGAGTTGA-3'	SSR		

1.4 分子标记检测结果分析

以田间茎腐病发病率小于等于 30% 作为抗病标准^[5], 通过比较 159 份自交系的分子标记检测结果和田间茎腐病抗性水平, 分析分子标记在自然群体中的检测符合度。分子标记检测符合度 = 分子标记检测呈阳性且田间发病率小于等于 30.0% 的自交系数/分子标记检测呈阳性的自交系总数 × 100%。

2 结果与分析

2.1 玉米自交系茎腐病田间抗性鉴定结果

表 3 159 份玉米自交系田间茎腐病抗性鉴定

Table 3 Resistance types of 159 maize inbred lines to stalk rot

发病率 (%)	自交系数数量	占总体比例 (%)	玉米自交系
Ratio of infected plants	Number of inbred line	Proportion in total	Maize inbred lines
0	55	34.59	丹 340、丹 360、合 344、吉 412、沈 137、铁 7922、自海 9-21、K8、R1520、SX1132-2、32i24、R105、9058、齐 318、581、582、583、584、585、587、867、1241、1602、2941、3882、3915、3916、8052、8054、8055、pac、S01、S02、S331、S332、S334、SOPV、W169、W200、Z001、俄-2、莫群 17、黄早四、早 599、CIMBL24、CML28、CML33、CTL20、CTL26、F19、GEMSS3、si273、SW28、SW113、SW50
0.1 ~ 20.0	42	26.42	吉 465、沈 136、沈 5003、L98-1、POB69、CIMBL122、301-304、S889、CML161、CML451、丹 3130、S333、868、俄-1、1145、U8112、齐 319、PH6WC、中自 01、Zheng32、CML30、CML328、CML428、CML50、PH4CV、872、CIMBL286、S25、自 330、CA339、N14、T14、吉 853、SW98、获唐黄、CML93、DM9、STL5、SOD、WZ325、F06、M2R7C4AMH32
20.1 ~ 40.0	20	12.58	o7157 *、CIMBL121 *、CML423 *、586 *、矮 68 *、CML298 *、S23 *、D4-673 *、冀 35 *、昌 7-2 *、W3141 *、W264、H58、WZ425、K22、WK858、CIMBL324、B73、K53、Mo17
40.1 ~ 60.0	13	8.18	CML290、3914、8053、S24、WZ421、WZ433、WZ434、X178、中群 13QPMC14、中群 13QPMC4、俄-3、488、5829-2
60.1 ~ 80.0	14	8.81	502、2956、CIMBL154、郑 58、S000001、L010006、WZ426、俄-4、K29、WC867、吉 63、辽 3053、3189、鲁原 92
80.1 ~ 100	15	9.43	C8605-2、鲁 9801、中 17、S000007、S000019、W182、Chuan48-2、D 黄 212、C103、L010004、WZ428、WZ431、D1798Z、H21、HCL645

* 自交系的发病率为 20.1% ~ 30.0%

The incidence rate of inbred lines with * mark is from 20.1% - 30.0%

2.2 地理来源与玉米自交系茎腐病抗性

不同地理来源的自交系的茎腐病抗性存在显著差异(图 1)。国外、东北、西南和黄淮海地区种质的平均发病率分别为 27.67%、17.92%、15.12% 和 36.80%。国外种质中, 发病率低于 30.0% 的抗病材料 42 份, 占 62.69%, 其中发病率低于 20.0% 的材料 39 份, 占 58.21%, 发病率为 0 的材料 29 份, 占 43.28%。东北地区种质中, 发病率低于 30.0% 的

研究表明 159 份玉米自交系的茎腐病抗性存在明显差异。其中, 发病率为 0 的自交系 55 份, 占总材料的 34.59%; 发病率介于 0.1% ~ 20.0% 之间的自交系 42 份, 占 26.42%; 发病率介于 20.1% ~ 40.0% 之间的自交系 20 份, 占 12.58%; 发病率介于 40.1% ~ 60.0% 之间的自交系 13 份, 占 8.18%; 发病率介于 60.1% ~ 80.0% 之间的自交系 14 份, 占 8.81%; 发病率介于 80.1% ~ 100% 之间的自交系 15 份, 占 9.43%。供试材料的平均发病率为 26.30%; 其中, 发病率低于 30.0% 的抗病材料 108 份, 占 67.92% (表 3)。

抗病材料 14 份, 占 82.36%, 且这 14 份材料发病率均低于 20.0%, 发病率为 0 的材料 7 份, 占 41.18%。西南地区种质中, 发病率低于 30.0% 的抗病材料 30 份, 占 88.24%, 其中发病率低于 20.0% 的材料 27 份, 占 79.41%, 发病率为 0 的材料 11 份, 占 32.35%。黄淮海区种质中, 发病率低于 30.0% 的抗病材料 22 份, 占 53.66%, 其中发病率低于 20.0% 的材料 17 份, 占 41.46%, 发病率为 0

的材料 8 份,占 19.51%。如何培育既早熟又抗茎腐病的玉米自交系将是黄淮海夏玉米育种亟待解决的问题。

2.3 玉米自交系标记基因型分型

11 个分子标记在供试自交系中的扩增结果表明:除了 SSRZ33 扩增条带差异较小不易观察外,其他 10 个标记的扩增条带差异明显。比较凝胶上的迁移率和带型,与抗病对照一致的基因型视为阳性,即含有目标 QTL。以 bnlg1866 和 STS01 的扩增结

果为例, bnlg1866 在对照材料齐 319 扩增出 100 bp 左右的目标片段,沈 137、自海 9-21 等扩增出相同目标片段的材料为阳性;丹 340、SW113 等未扩增出相同目标片段的材料为阴性。STS01 在对照材料 1145 中扩增出 500 bp 目的片段,沈 137、自海 9-21 等扩增出相同目标片段的材料为阳性;丹 340、583 等未扩增出相同目标片段的材料为阴性(图 2)。

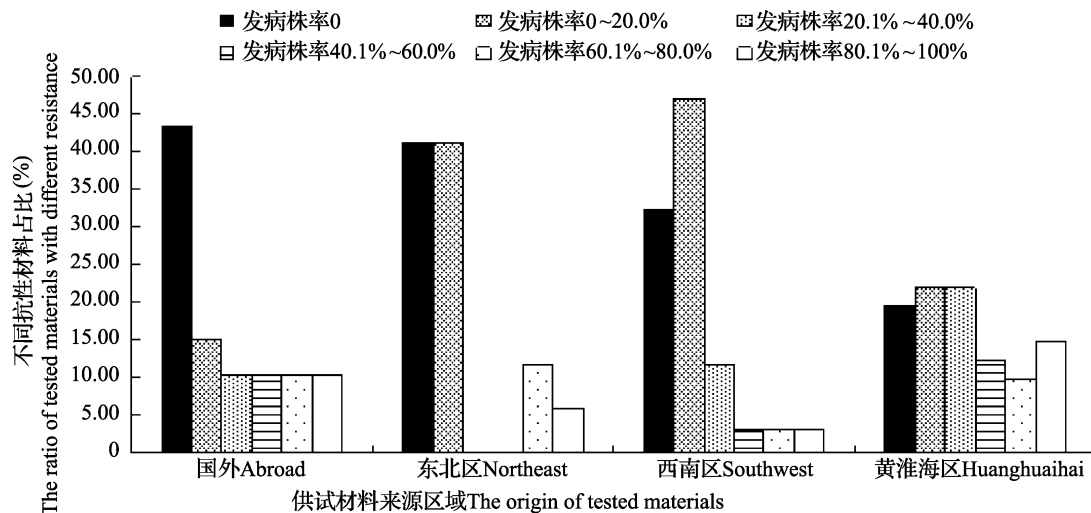
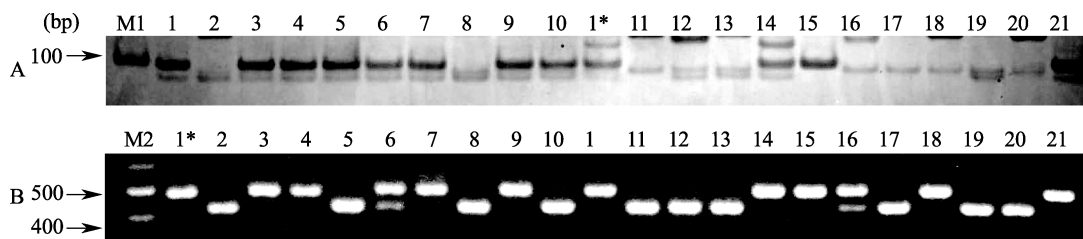


图 1 不同地理来源自交系茎腐病抗性特征

Fig. 1 The stalk rot incidence of inbred lines from different regions



M1: 50 bp Ladder; M2: 100 bp Ladder; 1: 齐 319; 2: 丹 340; 3: 沈 137; 4: 自海 9-21; 5: 583; 6: 黄早四; 7: CML28; 8: SW113; 9: SW28; 10: 丹 3130; 11: PH4CV; 12: 自 330; 13: 昌 7-2; 14: CML50; 15: M2R7C4AMH32; 16: B73; 17: Mo17; 18: D1798Z; 19: D 黄 212; 20: 中 17; 21: CIMBL154; 1*: 1145

M1: 50 bp Ladder, M2: 100 bp Ladder, 1: Qi319, 2: Dan3130, 3: Shen137, 4: Zihai9-21, 5: 583, 6: Huangzaosi, 7: CML28, 8: SW113, 9: SW28, 10: Dan3130, 11: PH4CV, 12: Zi330, 13: Chang7-2, 14: CML50, 15: M2R7C4AMH32, 16: B73, 17: Mo17, 18: D1798Z, 19: Dhaung212, 20: Zhong17, 21: CIMBL154, 1*: 1145

图 2 标记 bnlg1866 (A) 和 STS01 (B) 的 PCR 扩增结果

Fig. 2 PCR fragments amplified with the markers bnlg1866 (A) and STS01 (B)

将发病率低于 30% 定义为抗病级别,根据分子标记检测与田间抗性鉴定结果可将供试自交系分为 4 种类型(表 4): I. 分子标记检测为阳性,表型鉴定为抗病材料,推测此类自交系中可能含有目标基因,且分子标记与目标基因紧密连锁; II. 分子标记

检测为阴性,但表型鉴定为抗病材料,推测此类自交系可能存在其他抗病基因; III. 分子标记检测为阳性,但表型鉴定为感病材料,推测此类自交系分子标记检测到的特异扩增带型可能与目标基因无关; IV. 分子标记检测为阴性,表型鉴定为感病材料,推测此

类自交系不含目标基因。如 bnlgl866 共检测出 12 份阳性自交系,其中沈 137、齐 319 等 11 份自交系田间表现抗茎腐病,为 I 型;CIMBL154 感病材料,为 III 型。bnlg1866 检测表现阴性的 147 份自交系中,丹 340、SW113 和 PH4CV 等 97 份自交系田间表

现抗茎腐病,为 II 型;B73、Mo17 和中 17 等 50 份自交系田间表现感茎腐病,为 IV 型自交系。因而,用 bnlgl866 进行 III 型后代材料的标记辅助选择可能是无效的。

表 4 10 个与玉米茎腐病抗性 QTL 连锁的分子标记有效性评价

Table 4 Evaluation of 10 molecular markers linked to stalk rot resistant QTLs in maize

QTL	标记 Marker	阳性自交系 Positive inbred line		各种类型自交系的数量 Number of inbred lines in each type			
		数量 Number	平均发病率(%) The average incidence	I	II	III	IV
<i>qRfg1</i>	STS01	56	22.06	43	65	13	38
	STS378	63	27.16	44	64	19	32
	STS414	142	25.81	97	11	45	6
<i>qRfg2</i>	STS479	38	19.01	30	78	8	43
	STS514	149	26.48	101	7	48	3
<i>RpiQI319-1</i>	bnlg1866	12	10.65	11	97	1	50
	bnlg1203	106	24.01	77	31	29	22
	SSRZ47	122	25.74	82	26	40	11
<i>RpiQI319-2</i>	bnlg1716	15	19.63	11	97	4	47
	umc2069	90	28.27	60	48	30	21

通过比较 159 份自交系的分子标记检测和田间茎腐病抗性水平的符合度可以初步判断不同标记用于 MAS 的有效性。结果表明,与不同 QTL 连锁的标记实用性存在很大差异。与 *qRfg1* 连锁的 3 个标记 STS01、STS378 和 STS414 检测出阳性自交系数目分别为 56、63 和 142,其中发病率低于 30% 的抗病自交系所占比例分别为 76.79%、69.84% 和 68.31%。与 *qRfg2* 连锁的 2 个标记 STS479 和 STS514 检测出阳性自交系数分别为 38 和 149,其中抗病自交系所占比例分别为 78.95% 和 67.79%。与 *RpiQI319-1* 连锁的 3 个标记 bnlgl866、bnlg1203 和 SSRZ47 检测出的阳性自交系数分别为 12、106 和 122,其中抗病自交系所占比例分别为 91.67%、72.64% 和 67.21%。与 *RpiQI319-2* 连锁的 2 个标记 bnlgl716 和 umc2069 检测出阳性自交系数目分别为 15 和 90,其中抗病自交系所占比例分别为 73.33% 和 66.67% (表 5)。上述结果表明,分子标记 STS01 (*qRfg1*)、STS479 (*qRfg2*)、bnlg1866 (*RpiQI319-1*)

和 bnlgl716 (*RpiQI319-2*) 的标记检测结果与田间表型符合度较高,分别为 76.79%、78.95%、91.67%、73.33%,具有上述特异扩增多态性的材料平均发病率分别为 22.06%、19.01%、10.65% 和 19.63%,可作为抗茎腐病分子检测的有效标记。

通过比较肿囊腐霉茎腐病抗性 QTL (*RpiQI319-1*、*RpiQI319-2*) 和镰孢茎腐病抗性 QTL (*qRfg1*、*qRfg2*) 的分子标记检测与田间抗性符合度,可以看出镰孢茎腐病抗性 QTL (*qRfg1*、*qRfg2*) 对腐霉菌引起的茎腐病也有一定的抗性。与同一 QTL 连锁的分子标记获得的检测效率也存在较大差异。与 *RpiQI319-1* 连锁分子标记 bnlgl866 检测出的 12 个阳性自交系平均发病为 10.65%,其中 11 个发病率低于 30%,检测结果符合度为 91.67%,高于另 2 个连锁标记 bnlgl203、SSRZ47 的检测符合度,可作为该基因的有效标记。

表 5 阳性自交系在不同发病率区间的分布情况

Table 5 The distribution of positive inbred lines in different interval of incidence

QTL	标记 Marker	阳性株数 Positive number	发病率区间 Interval of incidence						符合度(%) Conformity
			0	0.1% ~ 20.0%	20.1% ~ 40.0%	40.1% ~ 60.0%	60.1% ~ 80.0%	80.1% ~ 100%	
<i>qRfg1</i>	STS01	56	22	21	1	3	3	6	76.79
	STS378	63	19	20	7	5	6	6	69.84
	STS414	142	49	39	18	11	12	13	68.31
<i>qRfg2</i>	STSZ479	38	15	14	2	3	1	3	78.95
	STSZ514	149	51	39	19	13	12	15	67.79
<i>RpiQI319-1</i>	bnlg1866	12	6	5	0	0	1	0	91.67
	bnlg1203	106	40	30	10	9	9	8	72.64
	SSRZ47	122	46	27	18	9	10	12	67.21
<i>RpiQI319-2</i>	bnlg1716	15	5	5	3	0	2	0	73.33
	umc2069	90	26	27	13	5	9	10	66.67

3 讨论

3.1 茎腐病的抗性鉴定

田间条件下,茎腐病的发病程度除了受遗传因素影响外,还与不同地域间和年际间的环境条件变化有关^[21-23]。在玉米生长后期遇上雨后放晴的高温、高湿天气容易诱发茎腐病,若发病条件不利则可能发病轻或不发病,这是导致不同玉米种质对茎腐病的抗病性在年度间存在显著差异的主要原因^[24]。其次,土壤中致病菌数量、土壤肥力等也会影响发病程度,肥水条件充足、玉米植株生长健壮,则不利于发病。本研究中,春播材料在连续 3 年接种肿囊腐霉的病菌中进行鉴定,地力中等偏下、前期控制水肥,利于热带或亚热带晚熟材料的发病。夏播材料在玉米生长后期遇上雨后高温,田间茎腐病发生严重,调查结果能够充分反映自交系的茎腐病抗性水平。

玉米材料的茎腐病抗性水平(特别是中间型)鉴定还受各种主客观因素影响,导致同一材料在不同地点、不同年份乃至不同研究者之间存在较大差异。本研究中昌 7-2 的肿囊腐霉茎腐发病率 26.3%,按照王晓鸣等^[5]划分的抗病性等级,与李辉等^[25]的鉴定结果较为一致,他们报道昌 7-2 的镰孢茎腐病为中抗水平,即发病率介于 10%~30%,而宋燕春等^[26]鉴定结果为昌 7-2 的肿囊腐霉茎腐病为高抗水平,即发病率低于 5%。此外,同一名称

的材料经过不同研究人员扩繁,材料自身的性状也可能有所差异。

田间鉴定中发现茎腐病的发病程度与植株的生长发育状态有关,抗病材料大多表现晚熟。含有 *qRfg1*、*qRfg2* 位点的自交系 Y1145 在夏播条件下较郑 58 晚熟 5~6 d,一些来自国外和西南区的热带和亚热带材料,如 CML28、CML33 等,即使在田间春播的条件下仍表现晚熟、植株高大,在 10 月初其他材料收获时,这些材料正处于灌浆期,可能因植株生长活力旺盛而表现出较好的抗病性。

3.2 抗茎腐病基因分子标记的实用性

玉米对茎腐病的抗性受多个基因位点控制的数量性状,以加性效应为主;因而抗性较高的材料往往聚合更多抗性基因等位变异,对不同致病菌的抗病性变幅不大。该结果与王富荣等^[27]报道相符,他们采用自然发病和土壤接种的方法对 1550 份玉米品种茎腐病抗性进行鉴定,研究表明人工接种鉴定与田间自然发病鉴定结果差异不大,且不同抗性品种用腐霉菌和镰刀菌单独或混合接种,抗性反应基本一致。本研究分子标记检测的结果也表明镰孢茎腐病抗性 QTL(*qRfg1*、*qRfg2*)对腐霉菌引起的茎腐病也有一定的抗性。因而,本研究所筛选出的分子标记 STS01(*qRfg1*)、STSZ479(*qRfg2*)、bnlg1866(*RpiQI319-1*)和 bnlg1716(*RpiQI319-2*)可用于玉米抗茎腐病 QTL 聚合的分子标记辅助选择育种。本研究中一些高抗茎腐病的自交系(如 F19、SW113)

中未检测到任何抗性位点,这些材料是否存在新的抗性位点有待进一步研究。

参考文献

- [1] Francis R G, Burgess L W. Surveys of Fusaria and other fungi associated with stalk rot of maize in Eastern Australia[J]. Crop Pasture Sci, 1975, 26(5):801-807
- [2] Cook R J. The incidence of stalk rot (*Fusarium* spp.) on maize hybrids and its effect on yield of maize in Britain[J]. Ann Appl Biol, 2008, 88(1):23-30
- [3] Lal S, Singh I S. Breeding for resistance to downy mildews and stalk rots in maize[J]. Theor Appl Genet, 1984, 69(2):111-119
- [4] Khokhar M k, Hooda K S, Sharma S S, et al. *Fusarium* stalk rot: a major threat to maize production in India[J]. Maize J, 2013, 1(2):1-6
- [5] 王晓鸣,石洁,晋齐鸣,等.玉米病虫害田间手册[M].北京:中国农业科学技术出版社,2010:72-76,246,259
- [6] 吴海燕,孙淑荣,范作伟,等.玉米茎腐病研究现状与防治对策[J].玉米科学,2007,15(4):129-132
- [7] 王晓鸣,晋齐鸣,石洁,等.玉米病害发生现状与推广品种抗性对未来病害发展的影响[J].植物病理学报,2006,36(1):1-11
- [8] 王晓鸣,吴全安,刘晓娟,等.寄生玉米的6种腐霉及其致病性研究[J].植物病理学报,1994,24(4):343-346
- [9] 吴全安,金加同.北京和浙江地区玉米青枯病原菌的分离与鉴定[J].中国农业科学,1989,22(5):71-75
- [10] 苏前富,晋齐鸣,孟玲敏,等.吉林省玉米审定品种抗性分析及抗逆育种方向选择[J].玉米科学,2012,30(3):139-141
- [11] 王晓鸣,戴法超,朱振东,等.玉米自交系和杂交种的抗病特性研究[J].中国农业科学,2000,33(S):132-140
- [12] Pè M E, Gianfranceschi L, Taramino G, et al. Mapping quantitative trait loci (QTLs) for resistance to *Gibberella zeae* infection in maize[J]. Mol Genet Genomics, 1993, 241(1):11-16
- [13] Yang Q, Yin G M, Guo Y L, et al. A major QTL for resistance to *Gibberella* stalk rot in maize[J]. Theor Appl Genet, 2010, 121(4):673-687
- [14] Zhang D, Liu Y, Guo Y, et al. Fine-mapping of *qRfg2*, a QTL for resistance to *Gibberella* stalk rot in maize[J]. Theor Appl Genet, 2012, 124(3):585-596
- [15] Song F J, Xiao M G, Duan C X, et al. Two genes conferring resistance to *Pythium* stalk rot in maize inbred line Qi319[J]. Mol Genet Genomics, 2015, 290(4):1543-1549
- [16] Bernardo R. Molecular markers and selection for complex traits in plants: learning from the last 20 years[J]. Crop Sci, 2008, 48(5):1649-1664
- [17] Caffagni A, Albertazzi G, Gavina G, et al. Characterization of an Italian rice germplasm collection with genetic markers useful for breeding to improve eating and cooking quality[J]. Euphytica, 2013, 194(3):383-399
- [18] Xu Y B, Crouch J H. Marker-assisted selection in plant breeding: from publication to practice[J]. Crop Sci, 2008, 48(2):391-407
- [19] 马丽,李治,任天恒,等.普通小麦穗发芽抗性相关分子标记在RIL群体中的验证与评价[J].麦类作物学报,2014,34(4):435-442
- [20] 宋茂兴,瞿会,闫伟,等.2个玉米抗矮花叶病分子标记的有效性评价[J].植物遗传资源学报,2016,17(3):555-561
- [21] Wang X M, Zhang Y H, Xu X D, et al. Evaluation of maize inbred lines currently used in Chinese breeding programs for resistance to six foliar diseases[J]. Crop J, 2014, 2(4):213-222
- [22] 段灿星,朱振东,武小菲,等.玉米种质资源对六种重要病虫害的抗性鉴定与评价[J].植物遗传资源学报,2012,13(2):169-174
- [23] 段灿星,王晓鸣,武小菲,等.玉米种质和新品种对腐霉茎腐病和镰孢穗腐病的抗性分析[J].植物遗传资源学报,2015,16(5):947-954
- [24] 吴全安,朱小阳,林宏旭,等.玉米青枯病原菌的分离及其致病性测定技术的研究[J].植物病理学报,1997,27(1):29-35
- [25] 李辉,马昌广,王国栋,等.28种自交系对5种玉米主要病害的抗性鉴定结果[J].玉米科学,2014,22(2):155-158
- [26] 宋燕春,裴二芹,石素云,等.玉米重要自交系的肿瘤腐霉茎腐病抗性鉴定与评价[J].植物遗传资源学报,2012,13(5):798-802
- [27] 王富荣,石秀清.玉米品种抗茎腐病鉴定[J].植物保护学报,2000,27(1):59-62