

玉米抗矮花叶病基因 SSR 分子标记定位研究

李晓玉, 赵 靖, 文中仁, 周 建, 朱苏文*

(安徽农业大学生命科学学院, 安徽省作物生物学重点实验室, 合肥 230036)

摘 要: 通过矮花叶病抗性鉴定筛选出玉米高抗自交系黄野四-3 和高感自交系 8112。遗传分析显示矮花叶病抗性表现为显性遗传。利用 SSR 分子标记, 结合群体分离分析方法 (BSA), 对抗矮花叶病基因进行定位, 筛选获得了与玉米抗矮花叶病基因位点连锁的 SSR 标记, 并将该基因定位于第 3 连锁群, 与两侧的 Bnlg1035 和 Umc2266 分子标记遗传距离分别为 8.02 cM 和 3.04 cM。这一研究结果为快速筛选抗矮花叶病玉米新种质, 培育抗性新品种提供了理论依据, 为抗矮花叶病基因的分子标记辅助育种和抗病基因克隆奠定了基础。

关键词: 玉米矮花叶病; BSA; SSR 分子标记; 基因定位

中图分类号: S513

文献标识码: A

文章编号: 1672-352X (2013)02-0278-05

Location of maize dwarf mosaic virus-resistant genes with SSR makers

LI Xiao-yu, ZHAO Jing, WEN Zhong-ren, ZHOU Jian, ZHU Su-wen

(Key Laboratory of Crop Biology of Anhui Province, School of Life Science, Anhui Agricultural University, Hefei 230036)

Abstract: In this study, we screened out highly resistant Huangyesi-3 and Susceptible 8112 maize inbred lines by identification of resistance to maize dwarf mosaic virus (MDMV). Genetic analysis showed that the resistance to MDMV was autosomal dominant. The resistant genes were located by BSA (bulk segregate analysis) method using SSR molecular markers. SSR molecular markers that linked tightly to the resistant gene were screened and located accurately on chromosome 3. The linkage distance between Bnlg1035 and Umc2266 are 8.02 cM and 3.04 cM, respectively. These results provide a theoretical basis for screening the resistant germplasm quickly and cultivating new varieties, and lay a foundation for molecular marker-assisted breeding and cloning of resistance gene to maize dwarf mosaic virus.

Key words: Maize dwarf mosaic virus; BSA; SSR molecular markers; gene location

玉米是世界上主要的粮食作物之一。而矮花叶病是世界普遍流行的一种病毒性病害, 它是由玉米矮花叶病毒 (MDMV) 侵染引起的^[1-2], 首先在意大利发现。该病在玉米整个生长期均可感染, 以幼苗到抽雄前时期尤为严重。随着叶片的生长, 斑点沿叶脉逐渐扩展至整个叶片, 形成黄绿相间的条纹, 俗称条纹病, 病情严重时, 抽雄后叶片发黄或发紫而干枯, 植株矮小, 严重影响玉米的产量^[3]。国内外学者对于矮花叶病抗性的研究中, 由于受到研究材料的基因型、病毒株系、环境条件、抗病鉴定指标和遗传分析方法等不同的因素的影响, 使得玉米

矮花叶病的研究结果存在一定的分歧^[4-8]。为了精确选育和推广多种优良玉米品种, 提高育种效率, 分子标记辅助选择育种已成为一种重要的育种技术^[8-11], 因而首先必须寻找合适的分子标记。理想的分子标记必须具有高的多态性及共显性遗传, 能明确辨别等位基因, 具有检测手段简单、快速、成本低廉以及间重复性好等优点^[12]。目前开发的各种分子标记都有自身的优缺点, 微卫星 (microsatellite) 又称为简单重复序列 (simple sequence repeat, SSR), 是一种很方便的分子标记技术。SSR 广泛分布在真核生物基因组中, 因核心序列数目的变化而具有长

收稿日期: 2013-02-04

基金项目: 国家自然科学基金 (31201217), 安徽省科技攻关项目 (11000205) 和安徽省教育厅基金重点项目 (KJ2012A105) 共同资助。

作者简介: 李晓玉, 女, 博士, 讲师。E-mail: xiaoyuli512@hotmail.com

* 通信作者: 朱苏文, 女, 教授。E-mail: suwenzhu@126.com

度多态性,以共显性方式遗传,具有重复性好、特异性强、易用 PCR 和凝胶点泳检测等特点^[13],已广泛用于遗传图谱构建、基因和 QTL(quantitative trait loci)分析、标记辅助育种、家系分析、品种鉴定、种质保存以及进化分析等研究中^[14-16]。随着 SSR 分子标记的不断的开发,许多物种的 SSR 分子标记遗传图谱精密度越来越高,一些重要农作物如小麦、玉米、水稻、大豆、油菜等遗传图谱越来越趋于饱和。利用这些高密度的 SSR 遗传图谱就可以很方便地对一些重要的基因进行定位,如小麦白粉病新基因定位^[17],水稻芽鞘紫线反抑制基因定位^[18],以及大豆抗花叶病毒基因定位^[19]等。作者通过对玉米抗矮花叶病抗性基因位点进行 SSR 分子标记定位,从而获得与抗矮花叶病基因紧密连锁的分子标记,为矮花叶病抗病品种的选育和鉴定提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

从 20 份抗性材料(黄早四、黄野四-3、白 197、丹黄 19、齐 139、齐 138、京 7、吉 921、543、农大 178 及冀 288 等)和 10 份感病材料(B73、掖 478、Mo17、掖 107、旅 28 及 8112 等)选择出矮花叶病研究的抗病材料黄野四-3 和感病材料 8112 分别作为亲本,获得 F₁、F₂、F₃ 和 F₄ 群体。

1.2 方法

1.2.1 病毒的提取 实验用的毒源来自中国农业大学,并通过摩擦接种,接种于感病品系 Mo17 和 8112(3~5 叶期),在实验室病毒扩繁。称取一定重量的病叶去掉叶脉,剪碎,用少量的 0.02 mol·L⁻¹ 磷酸缓冲液(pH 8)研磨,磨碎后经双层纱布过滤,滤液以 8 000 r·min⁻¹ 离心 5 min,取上清汁液,最后用同样浓度的磷酸缓冲液稀释装入锥形瓶中备用。

1.2.2 病毒的接种 采用汁液摩擦接种法,用脱脂棉签蘸取一定量配置好的病毒稀释液,在涂有刚砂的 3~5 叶期的玉米叶片上轻轻摩擦 2 次,接种后 1 个星期再接种 1 次;玉米抽雄后 2 周左右调查病情。

1.2.3 基因组 DNA 的提取和检测 采用 CTAB 法提取玉米基因组 DNA^[14,20]。

1.2.4 PCR 反应及检测 根据玉米遗传数据库 <http://www.maizegdb.org/ssr.php> 公布的 SSR 引物,均匀随机选取玉米 10 条染色体上的 SSR 引物 135 对,引物由上海生工合成。PCR 扩增反应在 Biometra-96 梯度 PCR 仪上进行。

PCR 反应体系:每 50 反应体系中含有 ddH₂O, 10×buffer, 0.2 mmol·L⁻¹ 的 dNTPs, 1 U 的 Taq 酶,

0.4 μmol·L⁻¹ 的 SSR 引物,以及 100 ng 模板 DNA。

PCR 反应程序: 95℃ 预变性 5 min; 94℃ 变性 1 min; 65℃ 退火 30 s, 每个循环降 1℃; 72℃ 延伸 30 s; 从第 2 步开始 10 个循环; 95℃ 变性 1 min; 55℃ 退火 30 s; 72℃ 延伸 30 s; 从第 5 步开始 30 次循环; 最后 72℃ 延伸 10 min; 10℃ 保存。

1.2.5 聚丙烯酰胺凝胶电泳 采用 Sequi-Gen GT 电泳系统(Bio-Rad Laboratories)对 PCR 产物进行检测^[17]。

1.2.6 数据分析 利用 MAPMAKER/EXP3.0 对抗病基因紧密连锁的分子标记分析,确定标记和基因间的距离,绘出与抗病基因连锁遗传图^[18]。

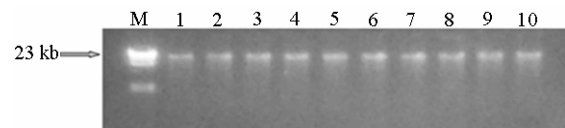
2 结果与分析

2.1 成株期抗性鉴定结果

自交系黄野四-3 和自交系 8112 的杂交 F₁ 代(共 130 个单株)在 3~5 叶期,接种病毒,1 周后再接种 1 次。1 周后观察,各单株都表现出条纹初期症状,表明幼苗都已经感染病毒,在抽穗 3 周后病情鉴定, F₁ 都表现出抗性,无明显的条纹症状,植株长势健壮,进一步对 F₂ 抗性以及 F₃、F₄ 代自交性状分离比观察分析表明玉米矮花叶病抗性在供试材料中表现为显性遗传。

2.2 玉米基因组提取

采用 CTAB 法分别提取亲本黄野四-3, 8112 以及 F₂ 玉米品种的基因组,该方法提取的基因组 DNA 分子量约在 23 kb,主带明显。样品经 0.8% 琼脂糖凝胶电泳与紫外检测和紫外分光光度计测定,其 A₂₆₀/A₂₈₀ 均在 1.8~2.0 之间,符合基因组 DNA 质量要求,可用作 PCR 反应模板。电泳检测结果如图 1。



1 代表黄野四-3 玉米基因组; 2 代表 8112 玉米基因组; 3~10 代表 F₂ 和 F₃ 的玉米基因组; M 代表 λ-Hind III

Lane 1: genome DNA of maize huangyesi-3; Lane 2: genome DNA of maize 8112; Lane 3-10: genome DNA of maize F₂ and F₃; Lane M: λ-Hind III

图 1 玉米叶片基因组 DNA 凝胶电泳

Figure 1 Gel electrophoresis analysis of maize genome DNA from leaf

2.3 多态性 SSR 引物在亲代与 F₂ 代群体中多态性分析

引物选择是根据 www.maizegdb.org 数据库中

公布的序列和所在区间,按照随机均匀选取的原则,选取了玉米 10 个连锁群上的 135 个 SSR 标记位点。选用的 135 对 SSR 引物分别在亲本黄野四-3 和 8112 基因组中进行 PCR 多态性筛选,结果有 51 对引物

表现多态性,选用这 51 对多态性引物在 F₂ 抗病池,感病池中筛选,通过聚丙烯酰胺凝胶电泳检测 PCR 扩增产物,3 对引物表现出多态性,分别是 Bnlgl601, Umc1644 和 Umc1528(表 1),都位于第 3 染色体上。

表 1 多态性引物及其序列
Table 1 SSR primers and their sequences

引物名称 Primer name	引物序列 (5'-3') Primer sequence(5'-3')	基序 Motifs	染色体位置 Chromosome location
Bnlgl601	Forward: CAGACCAGAGACCATCTGCA Reverse: ATCGTGCGCTAGTCCAGAGT	(AG)24	3.05
Umc1644	Forward: CCATAAACTGTTTCCTTTGGCACAC Reverse: CTTTCACGTGTTAAGGGAGACACC	(TTG)8	3.06
Ummc1528	Forward: AGTTCAACTGCTTAAGATCCGGTG Reverse: GTCTGTCGTTGTGTGCCAGTG	(TGCG)6	3.07
Bnlgl035	Forward: TGCTTGCACTGTCAGGAATC Reverse: CAGCTCTGACACACCACACA	(AG)13	3.05
Umc2266	Forward: ACGTTGGCCGTTAGTTCTTATCCT Reverse: GGACAGCTTGGCTTCGAGTG	(AAGGAG)4	3.06

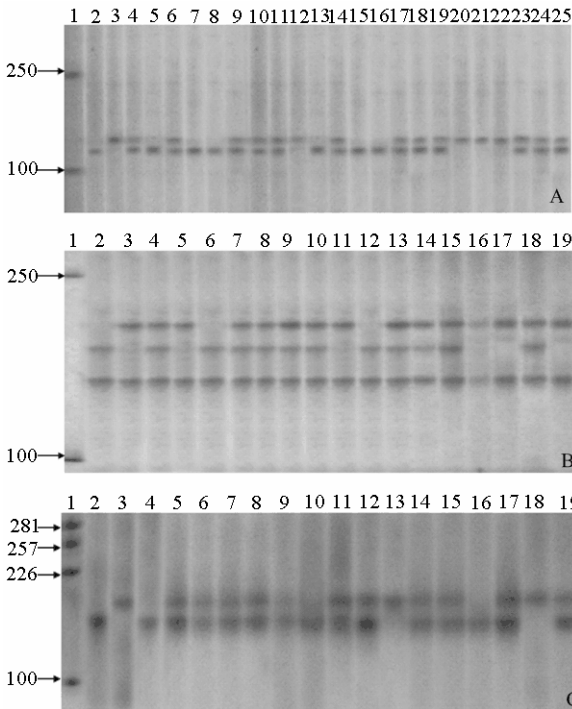


图 2 引物对 F₂ 分离群体基因型检测结果
Figure 2 Genotype analysis of F₂ individuals with SSR primer

A: 引物 umc1528, 1 代表 DNA Marker DL2000; 2 代表黄野四-3; 3 代表 8112; 4~25 代表部分 F₂ 单株。B: 引物 Umc1644, 1 代表 DNA Marker DL2000; 2 代表黄野四-3; 3 代表 8112; 4~19 代表部分 F₂ 单株。C: 引物 Bnlgl601, 1 代表 DNA Marker PBR322; 2 代表黄野四-3; 3 代表 8112; 4~19 代表部分 F₂ 单株

为了分析 3 对多态性引物 Umc1528、Umc1644 以及 Bnlgl061 与矮花叶病的抗性基因的连锁关系,再对 F₂ 群体单株的基因组进行扩增,结果如图 2 所示。

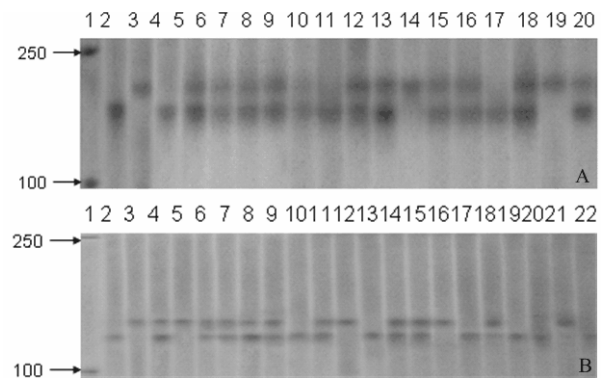


图 3 引物 Bnlgl035 和 Umc1644 对 F₂ 分离群体基因型检测结果
Figure 3 Genotype analysis of F₂ individuals with SSR primer Bnlgl035 and Umc1644

A: SSR primer Bnlgl035, Lane 1: DNA Marker DL2000; Lane 2: huangyesi-3; Lane 3 indicates 8112; Lane 4~20, some F₂ individuals. B: SSR primer Umc1644, Lane 1: DNA Marker DL2000; Lane 2: huangyesi-3; Lane 3: 8112; Lane 4-22: some F₂ individuals

根据图 2A、2B 和 2C,将 8112 带型记为 A,黄野四-3 带型记为 B,杂交带记为 H,同时调查 F₂ 群体单株的病情等级,为连锁分析提供表型和基因型

根据图 2A、2B 和 2C,将 8112 带型记为 A,黄野四-3 带型记为 B,杂交带记为 H,同时调查 F₂ 群体单株的病情等级,为连锁分析提供表型和基因型

根据图 2A、2B 和 2C,将 8112 带型记为 A,黄野四-3 带型记为 B,杂交带记为 H,同时调查 F₂ 群体单株的病情等级,为连锁分析提供表型和基因型

数据。

2.4 抗矮花叶病基因的初步定位

在亲本和抗感病池中筛选出的多态性引物 Umc1528、Umc1644 和 Bnlgl601, 分别对 F₂ 群体中 128 个单株做带型 (基因型) 分析。病情调查结果经过数据标准化处理后和 3 个标记的带型根据 MAPMAKER2.0 和 WinQTLCart2.5 软件对表现多态性的 3 个标记进行连锁分析。结果显示, Bnlgl601 和 Umc1644 之间存在一个主效的抗病基因, 其连锁距离分别为 20 cM 和 14 cM。为寻找更加紧密的连锁标记, 进一步加大筛选 Bnlgl601 和 Umc1644 之间 SSR 分子标记。

2.5 多态性引物的进一步筛选

在 Bnlgl601 和 Umc1644 初步定位区域内进一步选取 12 对 SSR 引物进行多态性筛选, 分别在亲本和抗病池之间筛选, 其中 Bnlgl1035、Umc2266 (表 1) 显示多态性。

2 对多态性引物在亲本黄野四-3, 8112 和 F₂ 群体的带型表现如图 3A 和 3B。

2.6 抗矮花叶病基因的定位

对在亲本和抗感病池 2 次筛选表现出的多态性的 5 对引物 Umc1528、Umc1644、Bnlgl1061、Bnlgl1035 和 Umc2266, 根据 MAPMAKER2.0 和 WinQTLCart2.5 软件对这 5 个标记进行连锁分析。结果显示, 这 5 个标记均表现出与抗病基因位点连锁。其中 Bnlgl1035 和 Umc2266 与抗病基因位点表现出更紧密连锁, 其遗传距离分别为 8.02 cM 和 3.04 cM, 并分别位于抗病基因的两侧, 如图 4。因此这 2 个标记可用于抗矮花叶病基因位点的辅助选择。

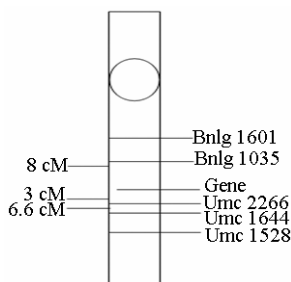


图 4 各标记与抗病基因间的连锁关系示意图

Figure 4 The sketch map indicates the relationship of the Markers and gene

3 讨论

玉米矮花叶病抗性遗传国内外有不少学者进行过研究, 利用抗性材料不同其遗传特点和抗性主效基因位点数量和定位结果也有所差异, 但多数结果

显示其抗性受 1~3 对主效基因控制, 主要位于第 3 和第 6 染色体上, 其杂交一代抗性趋向抗性强的亲本, 表现为显性和部分显性遗传。本研究利用实验室长期保存的自交系黄野四-3 作为矮花叶病抗源材料, 不仅高抗矮花叶病而且具有抗小斑病、红叶病、抗倒伏的、制种产量高优点。建立该自交系矮花叶病抗性基因位点紧密连锁的分子标记对利用该自交系作为抗源和综合性状转育的分子辅助育种创造多抗优良自交系具有重要应用。本研究定位获得的与矮花叶病抗性位点第 3 连锁群上, 较紧密连锁的分子标记为 Umc2266 和 Bnlgl1035, 其遗传距离分别为 3 cM 和 8 cM, 特别是 Umc2266 可用于该抗性位点的分子辅助选择, 然而, 为了提高选择效率或图位克隆该基因, 应进一步在此基础上寻找更加紧密连锁的分子标记。

本试验采用了 SDS 和 CTAB 2 种方法提取嫩叶 DNA, 发现所有引物用 CTAB 法提取的 DNA, 扩增条带清晰, 效果良好; 而 SDS 法提取的 DNA 均未扩增出条带, 可能是因为玉米叶子中含有的蛋白质对 PCR 扩增影响较大。CTAB 有去除蛋白质的作用, 经过 2 次沉淀和 RNA 酶处理, 所提的 DNA 纯度较高。所以用嫩叶作材料时, 宜用 CTAB 法来提取 DNA。另一方面, 由于 SSR 分子标记的扩增产物有较高的多态性, 条带从 1~5 个不等, 有时候可能会达到 8~10 条, 所以用一般的琼脂糖凝胶电泳很难判定条带的有无及多少, 且 SSR 引物的扩增产物大小从 90 到 300 左右, 所以从琼脂糖的电泳图上, 如果扩增产物浓度小, 就很难区分有的条带是二聚体还是真正的扩增产物, 所以本实验采用聚丙烯凝胶电泳进行多态性检测。

通过 BSA (分离群体分析法) 方法快速寻找与抗病基因连锁分子标记的技术路线是用母本性状的表現或基因型作为依据, 将分离群体中的植株分成 2 组进行比较。如果主效基因控制的性状在抗病亲本 (纯合) 和感病 (纯合) 的杂交后代中分离, 根据表现型选择抗病感病最强单株的 DNA 等量混合, 分别构成抗病池和感病池, 和亲本 DNA 分别构成了近等基因池, 检测分子标记在近等基因池的多态性, 从而快速寻找与目的基因紧密连锁的分子标记。BSA 法要求就是抗病池, 感病池必须是极端表现型的植株的基因组, 试验中在选择 F₂ 群体极端单株的时候, 应严格考察单株的叶片叶绿素破坏程度以及株高和产量等要素, 认真鉴定病情等级, 提高极端表型及表型类型的划分准确度, 从而增强遗传分析和基因定位的可靠性。

参考文献:

- [1] Williams L E, Alexander L J. Maize dwarf mosaic a new corn-disease[J]. *Phytopathology*, 1965, 55: 802-804.
- [2] 王富荣, 石秀清, 石银鹿. 山西省玉米病害的发生现状及防治对策[J]. *玉米科学*, 2000, 8(3): 79-80.
- [3] 扬满昌, 苗洪芹. 玉米病毒病发生情况及防治策略[J]. *植物保护*, 1995, 21(3): 38-39.
- [4] 吕香玲, 张宝石. 玉米矮花叶病研究进展[J]. *作物杂志*, 2007(3): 27-31.
- [5] 石秀清, 王富荣, 石荣鹿, 等. 玉米抗甘蔗花叶病毒资源的遗传多样性研究[J]. *作物学报*, 2003, 29(3): 391-396.
- [6] 吴建宇, 丁俊强, 杜彦修, 等. 两个玉米矮花叶病显性互补抗病基因的发现和定位[J]. *遗传学报*, 2002, 29(12): 1095-1099.
- [7] Weck E A, Beckman D, Mead D. Near isogenies line localization of maize dwarf mosaic virus resistance to chromosome 6s[J]. *Maize Genetic Cooperation Newsletter*, 1990, 64: 99-101.
- [8] 刘小红, 何道文, 张红伟. 玉米抗矮花叶病毒 B 株系的 QTL 定位[J]. *河北农业大学学报*, 2006, 29(6): 56-59.
- [9] Van Degenze A E, Gill K S. Molecular-genetic maps for group 1 chromosomes of Triticale species and their relation to chromosome 1R[J]. *Theoretical and Applied Genetics*, 1995, 84: 794-801.
- [10] Nelson J C, Deynze A E, Sorrells M E, et al. Molecular mapping of wheat. Homoeologous group 2[J]. *Genome*, 1995, 38: 516-524.
- [11] Devos K, Gale M D. The genetic maps of wheat and their potential in plant breeding[J]. *Outlook on Agriculture*, 1993, 22: 93-99.
- [12] XU Z, Zhou M P, Ren L J, et al. Molecular markers for *Fusarium* head blight resistance in Chinese wheat cultivar[J]. *Journal of applied genetics*, 2002, 15(8): 355-358.
- [13] Gupta P K, Balyan H S, Sharma P C, et al. Microsatellites in plants: a new class of molecular markers[J]. *Current Science*, 1996, 70(1): 45-54.
- [14] Tautz D, Renz M. Simple sequences are ubiquitous repetitive components of eukaryotic genomes[J]. *Nucleic Acids Research*, 1984, 12: 4127-4138.
- [15] Powell W, Macharay G C, Provan J. Polymorphism revealed by simple sequence repeats[J]. *Trends in Plant Science*, 1996, 1(7): 215-222.
- [16] Tankley S D, Ganai M W, Prince J P, et al. High density molecular linkage maps of the tomato and potato genomes[J]. *Genetics*, 1992, 132(4): 1141-1160.
- [17] Testolin R, Huang W G, Lain O, et al. A kiwifruit linkage map based on microsatellites and integrated with AFLP markers[J]. *Theoretical and Applied Genetics*, 2001, 103(1): 30-36.
- [18] Cipriani G, Lot G, Huang W G, et al. AC/GT and AG/CT microsatellite repeats in peach [*Prunus persica* (L) Batsch]: isolation, characterization, and cross-species amplification in *Prunus*[J]. *Theoretical and Applied Genetics*, 1999, 99(1/2): 65-72.
- [19] Gupta P K, Balyan H S, Sharma P C, et al. Microsatellites in plants: a new class of molecular markers[J]. *Current Science*, 1996, 70(1): 45-54.
- [20] Yu Y G, SaghaiMaroof M A, Buss G R, et al. RFLP and microsatellite mapping of a gene for soybean mosaic virus resistance[J]. *Phytopathology*, 1994, 84 (1): 60-64.