玉米大斑病抗性基因 *Ht2* 的精细定位

尹小燕^① 王庆华^① 杨继良^② 金德敏^② 王飞^① 王斌^② 张举仁^{①*}

(^①山东大学生命科学院, 济南 250100; ^②中国科学院遗传与发育生物学研究所, 北京 100101. *联系人,

E-mail: zjr@life.sdu.edu.cn)

摘要 精细定位玉米大斑病抗性基因 *Ht2* 对于图位克隆该基因和探讨玉米基因组中抗病基因的分布规律及分子标记辅助选择有重要意义. 以大斑病的感病自交系“获白”为母本, 抗病自交系“77*Ht2*”为父本, 构建了 F_2 作图群体. 通过 RFLP 分析知, *Ht2* 基因定位在第 8 染色体的 UMC89 和 BNL2.369 之间, 与 BNL2.369 相距 0.9 cM. 然后选用在该区域的 SSR 标记进行了连锁分析, 确定了 SSR 标记 UMC1202, BNLG1152, UMC1149 与 *Ht2* 基因紧密连锁, 其中 UMC1149 与 *Ht2* 基因的距离为 7.2 cM. 利用 BSA 法从 450 个 RAPD 引物的扩增产物中筛选出 7 个可能与 *Ht2* 基因连锁的标记, 并将其中单拷贝标记转换为 SCAR 标记. 连锁分析表明, 一个 SCAR 标记(定名为 SD-06₆₃₃)距 *Ht2* 基因 0.4 cM. 在此基础上, 构建了 *Ht2* 基因所在区域的分子标记连锁图.

关键词 玉米 大斑病抗性基因 *Ht2* 精细定位 遗传图谱 分子标记

玉米大斑病是危害玉米生产的主要病害, 是由玉米大斑突脐孢菌(*Helminthosporium turcicum* (Pass.))引起的. 大斑病抗性基因 *Ht1*, *Ht2*, *Ht3* 和 *HtN* 分别对特定的生理小种有抗性. 从育种角度看, 获得多基因抗性是培育高抗品种的关键. *Ht1*, *Ht2* 和 *HtN* 基因位于玉米不同染色体上, 若采用常规育种技术将它们集合于一个优良自交系中, 不仅周期长、效率低, 而且会不可避免地将一些不利性状的基因带入优良材料中. 另外, 由于携带 *Ht2* 基因的植株与带有 *Ht1* 和 *Ht2* 基因的植株对 2 号小种感染的反应相近, 故在田间很难进行有效选择. 开展分子标记辅助选择是解决这些难题的最佳途径, 因此, 寻找与 *Ht2* 基因紧密连锁的分子标记有重要意义. 抗病基因的克隆是深入了解植物抗病机制和采用基因工程方法提高植物抗病性的关键, 图位克隆是目前分离抗病基因的最常用技术. 精细定位 *Ht2* 基因, 不仅为该基因的克隆打下了必要的基础, 而且有助于深入分析玉米抗病基因在基因组中的分布、特点和演化.

1963 年, Hooker^[1]发现了玉米中存在单基因抗性, 并鉴定出 *Ht1* 基因. 1977 和 1981 年, Hooker^[2,3]又分别报道了 *Ht2* 和 *Ht3* 基因的存在. 1991 年, Bentolila 等人^[4]将 *Ht1* 基因定位在 RFLP 图谱上, 肯定了其存在于玉米 2 号染色体上. 随后, Zaitlin 等人^[5]将 *Ht2* 基因定位在玉米 8 号染色体的长臂上, 寻找出 8 个与 *Ht2* 基因连锁的分子标记, 其中 UMC48a 距 *Ht2* 基因约 4.9 cM. Simcox 等人^[6]用分子标记将 *Htn1*(即 *HtN*)

基因精细定位, 肯定了 *Ht2* 和 *Htn1* 基因均位于玉米 8 号染色体上, 二者之间的图距约为 10 cM. 近年来, Welz 等人^[7~10]用不同的群体进行了玉米大斑病 QTL 分析, 将主效基因 *Ht2* 和 *Htn1* 定位在 bin 8.05/8.06 区, 并报道主效基因和微效基因成簇分布于染色体上. 2001 年, van Staden 等人^[11]报道了 2 个与 *Ht2* 基因连锁的 SCAR 标记, 也将 *Ht2* 基因定位于 bin 8.05/8.06 区. 基因精细定位需要较大的作图群体和准确地鉴定抗、感性状, 但玉米植株高大, 获得庞大的 $F_{2,3}$ 家系工作量大. 到目前为止, *Ht2* 基因精细定位及其核苷酸序列和编码产物未见报道. 本文利用 RFLP (restriction fragment length polymorphism), SSR (simple sequence repeat), RAPD(random amplified polymorphic DNA)及 SCAR(sequence characterized amplified region)分子标记技术对 *Ht2* 基因进行了精细定位.

1 材料与方法

(i) 玉米材料. 玉米抗病亲本为带有 *Ht2* 基因的自交系“77*Ht2*”, 感病亲本为高感大斑病的自交系“获白”, 以“获白”植株为母本与“77*Ht2*”杂交. F_1 代自交后获 F_2 代, 以 F_2 群体为作图群体. 部分植株通过 $F_{2,3}$ 家系验证.

(ii) 单株接菌实验和抗病性遗传分析. 大斑病菌 2 号小种由河北农业大学董金皋教授提供, 用 PDA 培养基进行单病斑分离、纯化. 接种用的孢子溶液浓度范围为显微镜 10×10 倍视野内平均含有 10~15 个

孢子。植株长到4~5叶期时喷雾接种,并保湿 24 h,去保湿罩后在温室按常规管理,室温控制在 20 ~ 28℃,相对湿度为70%~90%。接种一周后出现病斑,14 d后观察统计植株发病情况。F₂分离群体抗病性鉴定中,以抗病、感病亲本和 F₁ 植株为对照。

(iii) 连锁标记筛选。植株发病情况调查结束后,分单株收获 F₂ 及亲本植株的叶片。按 Gardiner 等人^[12]的方法并稍作改进,提取 DNA,并用 *EcoR* I, *EcoR* V, *Hind* III, *Xba* I, *Bam* H I 和 *Dra* I 6 种限制性内切酶分别酶切玉米 DNA,电泳后真空转移。RFLP 探针的标记和分子杂交及检测采用 Roche 公司的 DIG 系统。RFLP 探针部分由墨西哥国际玉米小麦研究中心(CIMMYT)提供,其余部分来自美国 Incyte Genomics 公司。根据 Maize DB^[1]公布的序列,由 TaKaRa 公司合成 SSR 引物。PCR 按常规方法进行。部分 SSR 扩增产物用 3.0% 琼脂糖凝胶电泳分离,紫外检测;部分通过 6% 聚丙烯酰胺变性胶电泳,银染观察。

从 F₂ 分离群体中选取高抗植株和高感植株各 20 株,分别取等量 DNA 混合组成抗病池和感病池。用 450 个 10 碱基长的随机引物(Sangon 公司)进行 RAPD-BSA 分析。将 RAPD-BSA 分析中表现与抗病基因连锁的标记,进一步用 F₂ 群体单株进行验证,对确证为连锁的片段进行克隆,然后进行拷贝数测定。对其中单拷贝的紧密连锁的标记进行测序,转换成 SCAR 标记。

(iv) 连锁分析。根据分子标记检测结果,将有关资料输入计算机,用 Mapmaker Version 3.0 软件进行连锁分析,并用 Kosambi 函数将重组率转成遗传距离(cM)^[13]。

2 结果与分析

2.1 接种结果统计及遗传分析

F₂ 植株的接种试验分 3 批进行。第 1 批接种后观察统计为抗病 133 株,感病 41 株,合计 174 株,假设抗病性为一对基因控制的分离, χ^2 值为 $0.1916 < 3.841 = \chi^2_{0.05}$ 。第 2 批接种 322 株,其中 236 株表现抗病,86 株感病, χ^2 值为 0.5010。第 3 批接种 403 株,其中 297 株表现抗病,106 株感病, χ^2 值为 0.3648。

3 批接种结果均表明,在该群体中,抗感植株的分离符合孟德尔定律中单基因分离比(3:1)。在该群

体中,植株抗大斑病特性由一对基因控制,且抗性为完全显性。

2.2 RFLP 分析

参照对大斑病抗性基因定位结果^[5,6],选用在 8 号染色体上 bin 8.04 ~ 8.05 区的 15 个 RFLP 探针检测亲本植株,筛选出在双亲植株间产生多态性的“探针×酶”组合 28 个。然后用这些“探针×酶”组合检测由 246 株抗病植株和 72 株感病植株组成的 F₂ 群体,发现植株的抗、感性状与“*EcoR* V × UMC89”和“*Hind* III × BNL2.369”的带型表现出高度一致性,即存在紧密连锁的关系(图 1)。

2.3 SSR 分析

选用在 8 号染色体上距 *Ht2* 位点较近的 21 对 SSR 引物检测双亲及 F₁ 植株,其中 UMC1202, UMC1960, UMC1149, BNLG1152, BNLG2046 和 UMC1950 在双亲植株中产生了多态性。然后用上述引物分别检测 549 株 F₂ 植株。结果表明,UMC1202, UMC1149, BNLG1152 与 *Ht2* 基因存在着连锁关系。图 2 示出 SSR 标记 BNLG1152 的扩增图谱。

2.4 RAPD 分析

用 450 个随机引物进行了 RAPD-BSA 分析,发现有 7 个引物的扩增产物与抗性基因呈现连锁关系。经过 F₂ 群体验证,其中 5 个扩增产物确实与抗性基因连锁。对特异扩增产物进行回收、克隆和拷贝数测定后,将其中 3 个单拷贝的标记测序,并在原来的 RAPD 所用的 10 碱基引物上增加相邻的 14 个碱基,设计 PCR 引物,其中 1 个已成功地转换成了 SCAR 标记。此引物由 RAPD 引物 S2160 延伸而来,其序列为 5'-CACCGACATCGATCATTAGGGGAG-3'; 5'-CACCGACATCATGCTAGATAAACT-3',扩增片段为 633 bp,因此将该 SCAR 标记定名为 SD-06₆₃₃。在检测的 890 株 F₂ 植株中,出现了 4 个重组个体。图 3 所示为 SCAR 分析的部分结果。

用 Mapmaker Version 3.0 软件对 RFLP 标记(UMC89 和 BNL2.369)、SSR 标记(UMC1202, UMC1149 和 BNLG1152)及 SCAR 标记(SD-06₆₃₃) 在 F₂ 群体中的分离数据进行连锁分析,构建第 8 染色体的局部区域分子标记连锁图谱(图 4)。大斑病抗性基因 *Ht2* 定位在 RFLP 标记 BNL2.369 和 SCAR 标记 SD-06₆₃₃ 之间,与它们分别相距 0.9 cM 和 0.4 cM(图 4)。

1) Maize Data Base. Map bins 8; 2002. <http://www.agron.missouri.edu> 0.1360/csb2002-47-23-1811

图 1 RFLP 标记 UMC89(a)和 BNL2.369(b)在 F₂ 群体中的分离
P₁ 示感病亲本获白, P₂ 示抗病亲本 77Ht2, R 示 F₂ 抗病单株, S 示 F₂ 感病单株, * 示交换单株

图 2 SSR 标记 BNLG1152 在 F₂ 感病植株中的分离
P₁ 示感病亲本获白, P₂ 示抗病亲本 77Ht2, S 示 F₂ 感病单株, * 示交换单株, M 示标准分子量

图 3 SCAR 引物 SD-06₆₃₃ 和 RAPD 引物 S2160 分别对抗感病亲本及 F₂ 单株的扩增结果

1, 2 分别示抗病亲本 77Ht2 的 RAPD 和 SCAR 谱带; 3, 4 分别示感病亲本获白的 RAPD 和 SCAR 谱带; 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23 示 F₂ 抗病单株的 SCAR 谱带; 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22 示 F₂ 感病单株的 SCAR 谱带; M 示标准分子量

3 讨论

本研究结果(图 4(a))同已报道的结果^{[5,7~11]1)}有一定差异. 这些差异可能主要是由实验材料或研究方法不同造成的. Welz 等人^[7~10]以 3 个不同的群体为材料采用 QTL 分析方法进行主效基因定位, van Staden 等人^[11]用近等基因系材料寻找 SCAR 标记进行基因定位, 均将 *Ht2* 基因定位于 bin 8.05/8.06 区, 但他们未进行 *Ht2* 基因的精确定位. Zaitlin 等人^[5]用的自交系是 A619*Ht2* 和 W64A. Maize DB¹⁾的图谱是由多个实验室的资料汇总而来, 且处于不断的变更之中. 在后

二者的图谱中, *Ht2* 基因定位于 bin 8.04 ~ 8.05 区. 本研究使用的抗病自交系 77*Ht2* 是通过转育获得的, 77 系列材料来自(黄小 162/南 70) × (南 55/187-2). 感病自交系“获白”来自河南省获嘉县的一个农家品种. 我们的结果与 Zaitlin 等人^[5](图 4(b))和 Maize DB¹⁾的图谱(图 4(c))相近. 其次, 差异也许与作图群体大小有关. Zaitlin 等人^[5]用的作图群体是由 124 株 F₂ 植株组成, 相对偏小一些. Welz 等人^[7~10]所用的群体分别为 121 ~ 125 个 F₃ 家系, 194 ~ 256 个 F₃ 家系和 220 个 F₃ 家系, 而我们的群体要大得多.

1) 同 1812 页脚注 <https://engine.scichina.com/doi/10.1360/csb2002-47-23-1811>

图 4 *Ht2* 基因的连锁遗传图谱
(a) 本研究结果, (b) 参考文献[5], (c) Maize DB¹⁾, 仅示相对位置

在图 4 中, 尽管在 *Ht2* 基因两侧的分子标记及其顺序有差别, 但 *Ht2* 基因定位于玉米 8 号染色体上 bin 8.04 ~ 8.05 区是一致的, 且在图 4(a)和(c)中, *Ht2* 基因与核心探针 BNL2.369 不仅位置关系相同, 而且相距很近, 即从较大范围内看, *Ht2* 基因定位结果是一致的。

本研究找到了与 *Ht2* 基因紧密连锁的分子标记, 精细定位了 *Ht2* 基因, 这为图位克隆 *Ht2* 基因打下了基础, 也为采用分子标记辅助育种聚合大斑病抗性基因或将 *Ht2* 基因导入其他玉米自交系提供了高效的 SCAR 标记。

致谢 感谢墨西哥国际玉米小麦研究中心提供 RFLP 探针, 戴法超先生提供玉米自交系 77 *Ht2* 等, 董金皋教授提供大斑病菌 2 号小种, 石洁副研究员在大斑病的接种及抗性鉴定上给予热情帮助。本工作为国家“转基因植物研究与产业化”(批准号: J00-A-002)和国家科技攻关“种质资源创新利用”(批准号: 04-012)资助项目。

参 考 文 献

1 Hooker A L. Monogenic resistance in *Zea mays* L. to *Helminthosporium turcicum*. *Crop Sci*, 1963, 3: 381 ~ 383
2 Hooker A L. A second major gene locus in corn for chlorotic-lesion resistance to *Helminthosporium turcicum*. *Crop Sci*, 1977, 17: 132 ~ 135
3 Hooker A L. Resistance to *Helminthosporium turcicum* from *Tripsacum floridanum* incorporated into corn. *Maize Genetics Cooperation News Letter*, 1981, 55: 87 ~ 88

4 Bentolila S, Guitton C, Bouvet N, et al. Identification of an RFLP marker tightly linked to the *Ht1* gene in maize. *Theor Appl Genet*, 1991, 82: 393 ~ 398
5 Zaitlin D, Demars S J, Gupta M. Linkage of a second gene for NCLB resistance to molecular markers in maize. *Maize Genetics Cooperation News Letter*, 1992, 66: 69 ~ 70
6 Simcox K D, Bennetzen J L. The use of molecular markers to study *Setosphaeria turcica* resistance in maize. *Phytopathology*, 1993, 83: 1326 ~ 1330
7 Welz H G, Schechert A W, Geiger H H. Dynamic gene action at QTLs for resistance to *Setosphaeria turcica* in maize. *Theor Appl Genet*, 1999, 98: 1036 ~ 1045
8 Welz H G, Xia X C, Bassetti P, et al. QTLs for resistance to *Setosphaeria turcica* in an early maturing Dent × Flint maize population. *Theor Appl Genet*, 1999, 99: 649 ~ 655
9 Schechert A W, Welz H G, Geiger H H. QTL for resistance to *Setosphaeria turcica* in tropical African maize. *Crop Sci*, 1999, 39: 514 ~ 523
10 Welz H G, Geiger H H. Genes for resistance to northern corn leaf blight in diverse maize populations. *Plant Breeding*, 2000, 119: 1 ~ 14
11 van Staden D, Lambert C A, Lehmsiek A, et al. SCAR markers for the *Ht1*, *Ht2*, *Ht3* and *HtN1* resistance genes in maize. *Maize Genetics Conference Abstracts*, 2001, 43: 134
12 Gardiner J M, Coe E H, Melia-Hancock S, et al. Development of a core RFLP map in maize using an immortalized F₂ population. *Genetics*, 1993, 134: 917 ~ 930
13 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. *Genomics*, 1987, 1: 174 ~ 181

(2002-07-01 收稿, 2002-09-19 收修改稿)

<https://engine.scichina.com/doi/10.1360/csb2002-47-23-1811>