

谭 静, 罗 吉, 王文瑞, 等. 玉米尾孢菌灰斑病抗性种质鉴定及其抗性基因分析[J]. 江苏农业学报, 2020, 36(6): 1373-1381.
doi: 10.3969/j.issn.1000-4440.2020.06.004

玉米尾孢菌灰斑病抗性种质鉴定及其抗性基因分析

谭 静, 罗 吉, 王文瑞, 王 琨, 高佳琪

(云南大学农学院, 云南 昆明 650500)

摘要: 灰斑病是全球玉米的重要病害, 特别对中国西南地区玉米的生产造成了严重影响, 玉米尾孢菌是中国西南地区玉米灰斑病的主要致病菌种。本研究采用来源广泛的 241 份玉米自交系构建关联群体, 在云南玉米灰斑病重病区进行灰斑病的田间自然发病抗性鉴定; 利用覆盖玉米全基因组的单核苷酸多态性(SNP) 标记对由 241 份玉米自交系构建的关联群体进行基因型分析, 在此基础上通过全基因组关联分析进行玉米灰斑病抗性基因的定位及其候选基因的预测, 为玉米灰斑病抗性育种提供技术支持。2017-2018 年的玉米灰斑病抗性鉴定结果显示, 2 年共有 109 份热带/亚热带玉米自交系之间和 109 份温带玉米自交系材料之间以及材料与年份互作间的差异均达极显著水平; 在 2017-2018 年的抗性鉴定结果中均表现为抗病的材料有 44 份, 均表现为高抗的材料仅有 5 份。用 20 586 个高质量 SNP 标记、2 年玉米灰斑病表型数据进行全基因组关联分析, 结果显示, 在 $P \leq 0.001$ ($-\lg P \geq 3$) 条件下, 共检测到 44 个与玉米灰斑病抗性显著关联的 SNP 位点, 其中 34 个 SNP 位点对应 31 个基因, 分布在除 10 号染色体外的其他染色体上。结合已有的连锁定位研究结果可知, 在以上 31 个基因中, 除了 4 个基因外, 其余 27 个基因均分布在已知数量性状座位(QTL) 区间内, 将这 27 个基因在生物信息数据库中与已有信息进行比对, 共获得 8 个与抗病相关的候选基因。研究结果可为由玉米尾孢菌引起的玉米灰斑病的抗性育种及其抗性基因的克隆、抗病机制的研究奠定基础。

关键词: 玉米; 玉米尾孢菌; 灰斑病; 抗性种质; 抗病基因; 关联分析

中图分类号: S435.131.4⁺9 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4440(2020)06-1373-09

Identification of resistant germplasm and analysis on resistant genes of gray leaf spot caused by *Cercospora zeina* in maize

TAN Jing, LUO Ji, WANG Wen-ru, WANG Kun, GAO Jia-qi

(School of Agriculture, Yunnan University, Kunming 650500, China)

Abstract: Gray leaf spot (GLS) is an important disease of maize in the globe, which brings about severe impact on maize production especially in Southwestern China. *Cercospora zeina* is the main pathogen of GLS in Southwestern China. In this study, 241 maize inbred lines with wide sources were used to construct association population, and the resistance phenotype to GLS under natural condition in the severe disease area of Yunnan was evaluated. Genotypes of the association population constructed by 241 maize inbred lines were analyzed by single nucleotide polymorphism (SNP) markers covering the whole genome. Then the loci of GLS-resistant genes and the candidate genes were predicted to provide technical support for the GLS-resistant breeding of maize by genome-wide association analysis. The two-year (2017 to 2018) identification results of GLS-resistance indicated that there were significant differences among 109 tropical/subtropical maize inbred lines, 109 temperate maize inbred lines and the interaction between materials and years. There were 44 inbred lines with disease resistance and five inbred lines with high resistance in two years of resistant evaluation. The results of genome-wide association analysis

by using 20 586 high-quality SNP markers and two-year phenotypic data of GLS indicated that, under the condition of $P \leq 0.001$ ($-\lg P \geq 3$), a total of 44 SNP loci significantly associated with GLS-resistance were detected, among which 34 SNP loci corresponding to 31 genes were

收稿日期: 2020-05-16

基金项目: 国家自然科学基金项目(31560395)

作者简介: 谭 静(1975-), 女, 山东乳山人, 硕士, 研究员, 主要研究方向为玉米遗传改良。(Tel) 0871-65031539; (E-mail) tanjingli@sina.com

distributed on chromosomes except for chromosome 10. Compared with existing research results on linkage location, it could be seen that except for four genes, the remaining 27 genes of the 31 genes were located in the quantitative trait locus (QTL). Eight candidate genes related to disease resistance were obtained by comparing the 27 genes in bioinformatics database. The results will lay a foundation for the resistance breeding, the cloning of resistant genes and the resistance mechanism research on maize GLS (*Cercospora zeina*).

Key words: maize; *Cercospora zeina*; gray leaf spot; resistant germplasm; resistant gene; correlation analysis

玉米(*Zea Mays* L.)是全球第一大粮食作物,灰斑病是玉米叶部的主要病害,在世界各玉米产区均有发生,一般会造成玉米产量损失达5%~30%,严重时可达60%以上,甚至造成绝收^[1-4]。在中国西南高海拔玉米种植区,灰斑病已经成为玉米生产中最重要病害,在云南地区已经超过玉米大斑病成为玉米生产中的第一大病害^[2, 5-6]。长期以来,国内研究者一致认为,玉蜀黍尾孢菌是中国玉米灰斑病的致病菌种^[7],直到2013年才有报道指出,玉米尾孢菌是中国西南地区玉米灰斑病的主要致病菌种^[8-9]。

培育和种植抗病品种是控制植物病害最经济有效的途径,而抗病育种的成效取决于对获得抗原、抗病遗传机制的认识。目前,国内外研究者已经开展了大量玉米灰斑病的抗源筛选工作,虽然有研究结果表明,玉米自交系、杂交种对灰斑病的抗性差异明显,但均未发现对灰斑病免疫的玉米种质,大多数玉米种质对灰斑病表现为感病^[3, 10-12]。多数研究发现,玉米对灰斑病的抗性主要表现为加性遗传效应,属于数量性状遗传效应^[13-14]。研究者已经用不同群体定位了多个抗玉米灰斑病QTL,这些QTL在玉米的10条染色体上均有分布^[15-24]。但是这些研究大多是针对玉蜀黍尾孢菌玉米灰斑病的抗性,加上受连锁分析自身的局限,不能全面挖掘玉米灰斑病抗性基因,且多数定位精度不高,难以在玉米灰斑病的抗性育种中得以应用。

关联分析是一种以连锁不平衡为基础,鉴定与表型变异紧密联系的功能性等位基因/基因型的分析方法。具有研究周期短、分辨率高、可同时检测数十个基因等优点,是复杂数量性状基因挖掘和验证的首选方法^[25-27]。Mammadov等^[28]结合连锁和关联分析法,在玉米第1、6、7、8号染色体上获得了抗玉米灰斑病QTL;Kuki等^[29]通过全基因组关联分析检测到7个单核苷酸多态性(SNP)位点与玉米灰斑病抗性显著相关,并发现3个抗玉米灰斑病的候选基因。本研究利用自然发病原理对241份来源广泛的玉米自交系

进行玉米尾孢菌灰斑病抗性鉴定,为西南地区玉米灰斑病育种提供材料支撑。同时,本研究利用覆盖全基因组的SNP标记,通过全基因组关联分析全面挖掘抗玉米尾孢菌灰斑病的基因及其位点,并对检测到的显著性位点与前人研究得到的QTL区间进行比较,结合生物信息学分析方法,从一致性位点中预测候选基因,为玉米尾孢菌灰斑病抗性基因的克隆和抗病机制的研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

参考已有表型数据和系谱关系,从来源广泛的630份玉米自交系中优先选择没有直接亲缘关系、抗灰斑病差异大的241份玉米自交系构建关联群体,其中111份来自CIMMYT(国际玉米小麦改良中心),30份来自美国,6份来自泰国,其余94份来自国内不同玉米生态区,其中包括在中国玉米产业中大面积推广使用的一些重要杂交种的亲本。

1.2 田间试验与抗性鉴定

利用重病区自然发病原理进行玉米灰斑病的抗性鉴定,于2017-2018年在云南保山市郊进行。根据系谱将研究材料分为热带/亚热带、温带2组,组内采用随机区组设计,设2次重复,同时选取4个典型材料(抗病自交系Y32、感病自交系Ye478、抗病杂交种海禾2号、感病杂交种会单四号)作为对照,每40行设置1组对照(含2个抗病对照材料、2个感病对照材料),在试验地外围种植2行感病材料作为保护行。种植规格参照当地习惯,加强田间水肥管理,试验期间防虫但不防病,在开花后第2周参照王晓鸣等^[30]的玉米灰斑病分级标准对植株的抗病性进行鉴定,按照抗病性由强到弱分为1级、3级、5级、7级、9级(其中1级为高抗,9级为高感),以后每隔1周调查1次,共调查3次,取病级最符合正态分布的1次调查结果。每次调查均由2人进行独立评价,每个小区最终的病害级别为2人评价值

的平均值。

1.3 基因型鉴定

用 Affymetrix SNP 56K 芯片(包含 56 110 个 SNP 标记)对上述自交系进行基因型分析,对芯片检测结果进行严格的质量控制,最终选取 20 586 个高质量 SNP 标记用于后续的数据分析。

1.4 数据分析

用 SPSS 25.0 软件对表型数据进行描述性统计和方差分析,用 Structure (V 2.3.4) 软件进行群体结构分析,再利用 TASSEL 5.0 软件中的混合线性模型(Mixed-linear model, MLM),在考虑群体结构和亲缘关系的条件下进行 SNP 标记与玉米灰斑病表型之间的关联分析,参照 $P \leq 0.001$ ($-\lg P \geq 3$) 的标准进行显著性位点检测,并对检测到的显著性位点与前人研究得到的 QTL 区间进行比较,结合生物信息学方法,预测与前人研究得到的 QTL 一致性位点中的候选基因。

2 结果与分析

2.1 抗性鉴定

由于田间出苗、生长等因素而使部分材料缺失,2017 年获得了 232 份玉米自交系的灰斑病抗性鉴定结果,2018 年获得了 225 份玉米自交系的灰斑病抗性鉴定结果。2017 年的玉米灰斑病抗性鉴定结果显示,抗病自交系 Y32 的平均病级为 1.50,抗病杂交种海禾 2 号的平均病级为 2.19;感病自交系 Ye478 的平均病级为 6.88,感病杂交种会单四号的平均病级为 6.31。2018 年的玉米灰斑病抗性鉴定结果显示,抗病自交系 Y32 的平均病级为 1.00,抗病杂交种海禾 2 号的平均病级为 3.25;感病自交系 Ye478 的平均病级为 7.63,感病杂交种会单四号的平均病级为 7.94。由此可见,在鉴定试验中抗病对照、感病对照的发病病级适宜且二者间差异明显,说明在本试验条件下得出的玉米灰斑病发病程度和鉴定效果可以用来区分不同玉米材料的抗性差异。

对 2017-2018 年共有的 218 份玉米自交系的灰斑病抗性鉴定结果进行方差分析,由表 1 可见,材料间以及年份与材料间互作的差异均达极显著水平,说明玉米灰斑病表型与环境之间存在极显著互作,109 份热带/亚热带玉米自交系和 109 份温带玉米自交系对玉米灰斑病的抗性均存在极显著差异。正态分布检验结果表明,2017-2018 年玉米灰斑病表型的偏度、峰度绝对值均小于 1,符合正态分布,2017-2018

年玉米灰斑病病级的频率分布直方图见图 1。

表 1 关联群体玉米自交系灰斑病病级的方差分析

Table 1 Variance analysis on gray leaf spot (GLS) rate of maize inbred lines in association population

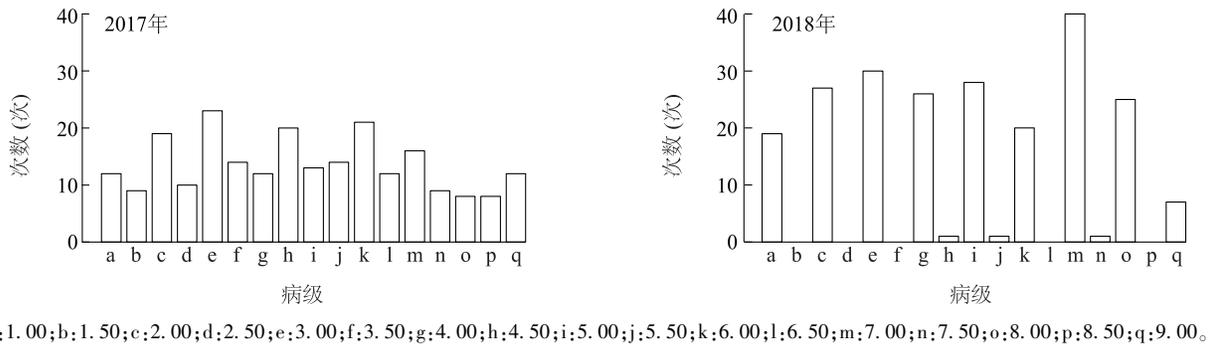
材料类型	变异来源	自由度	平方和 (SS)	均方 (MS)	F 值
热带/亚热带	年份	1	1.689	1.689	0.652
	重复	1	11.284	11.284	18.589**
	材料	108	1 480.011	13.704	5.286**
	年份×材料	108	279.994	2.593	4.271**
温带	误差	217	131.726	0.607	
	年份	1	6.565	6.565	1.826
	重复	1	0.917	0.917	1.444
	材料	108	948.453	8.782	2.442**
	年份×材料	108	388.373	3.596	5.662**
	误差	217	137.833	0.635	

**表示在 0.01 水平差异显著 ($P < 0.01$)。

在 2017 年,232 份玉米自交系的灰斑病病级在 1.00~9.00 级均有分布,平均病级为 4.79 级,其中高感材料(病级 > 7.00) 37 份,感病材料 ($5.00 < \text{病级} \leq 7.00$) 63 份,中抗材料 ($3.00 < \text{病级} \leq 5.00$) 59 份,抗病材料 ($1.00 < \text{病级} \leq 3.00$) 61 份,高抗材料 ($\text{病级} \leq 1.00$) 12 份。在 2018 年,225 份玉米自交系的灰斑病病级在 1.00~9.00 级均有分布,平均病级为 4.96 级,其中高感材料 33 份,感病材料 61 份,中抗材料 55 份,抗病材料 57 份,高抗材料 19 份。综合 2017-2018 年的玉米灰斑病抗性鉴定结果可知,2 年都表现为抗病的材料有 44 份,2 年都表现为高抗的材料有 5 份(分别为 DTMA25、CIMBL32、CIMBL70、GEMS19、PS61-20),可以在玉米灰斑病抗病育种中应用这 5 份高抗材料。

2.2 全基因组分析

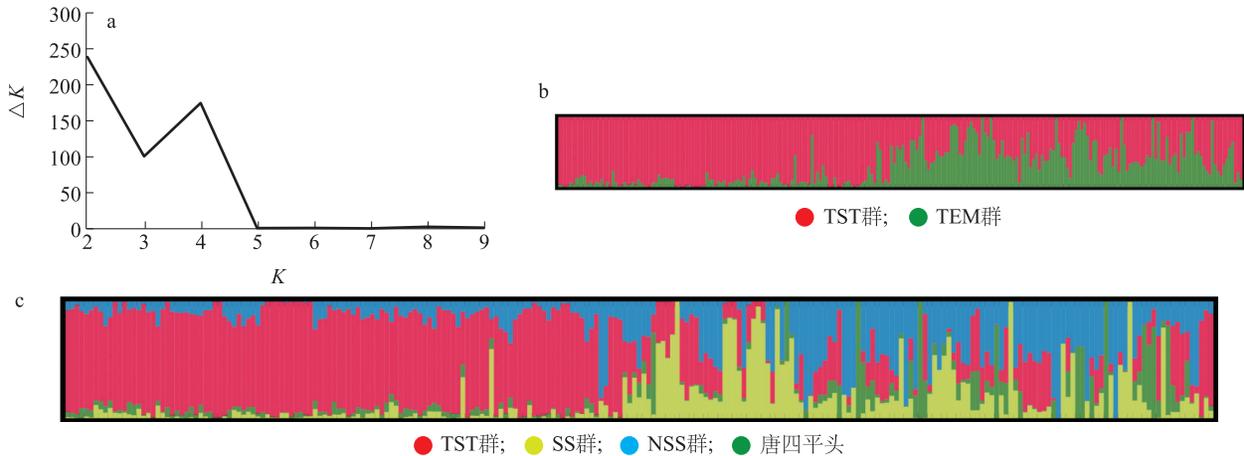
对 241 份玉米自交系的群体结构分析可知, ΔK 在 $K=2$ 时出现第 1 个峰值(图 2a、图 2b),将 241 份玉米自交系划分成 2 个亚群,与系谱信息进行比对后发现,第 1 个亚群对应育种实践中的热带/亚热带(Tropical and subtropical, TST)种质,第 2 个亚群对应育种实践中的温带(Temperate, TEM)种质; ΔK 在 $K=4$ 时出现第 2 个峰值(图 2a、图 2c),说明该群体能进一步被划分为 4 个亚群,对应系谱中这 4 个亚群分别为 TST 群、温带坚秆(Stiff stalk)群、温带非坚秆(Non-stiff stalk)群和温带唐四平头群。



a; 1.00; b; 1.50; c; 2.00; d; 2.50; e; 3.00; f; 3.50; g; 4.00; h; 4.50; i; 5.00; j; 5.50; k; 6.00; l; 6.50; m; 7.00; n; 7.50; o; 8.00; p; 8.50; q; 9.00。

图1 玉米灰斑病病级的频率分布直方图

Fig.1 Frequency distribution histogram of GLS rate in maize



a: ΔK 值图, 横坐标为 K 值, 纵坐标为 ΔK 值。b: $K=2$ 时的群体结构图。c: $K=4$ 时的群体结构图。TST 群: 热带/亚热带群, TEM 群: 温带群, SS 群: 温带竖秆群, NSS: 温带非竖秆群。

图2 241份玉米自交系的群体结构

Fig.2 Population structure in the 241 maize inbred lines

分析结果表明,在 $P \leq 0.001$ ($-\lg P \geq 3$)条件下,2017年检测到22个与抗性显著关联的SNP位点,2018年检测到23个与抗性显著关联的SNP位点,2年均检测到的SNP位点仅有1个,对应标记为AX86259524(表2)。通过查阅注释文件发现,在2年内检测到的与玉米灰斑病抗性关联的44个SNP位点中,有10个位点的注释信息位于基因间区域,其余34个有注释信息的SNP位点共对应31个基因,这31个基因分布在除10号染色体外的其他染色体上,其中分布在6号染色体上的基因数最多,有6个,分布在4号染色体上的基因数最少,仅有1个,分布在其余染色体上的基因数为2~4个。

2.3 抗性基因与已知抗性QTL比较

将本研究检测到的31个基因与前人研究确定的玉米灰斑病抗性QTL区间进行比较,发现除了位于bin 1.11的2个基因(登录号:GRMZM2G163912、GRMZM2G156543)和位于bin 2.04的1个基因(登

录号:GRMZM2G161932)、位于bin 5.02的1个基因(登录号:GRMZM2G057129)外,其余27个基因均分布在前人研究的QTL区间内(表3)。虽然以上4个基因不位于前人研究的QTL区间内,但都与已定位的QTL相距不远,它们是否属于新的QTL还有待进一步研究确定。其中1号染色体上登录号为GRMZM2G163912的基因与Zhang等^[20]定位的QTL区间的右标记*umc1500*在遗传图谱上只相距54.20 cM,与闫伟等^[31]通过QTL元分析定位的QTL区间右标记*ias13a*的距离更近,为47.12 cM,登录号为GRMZM2G156543的基因与闫伟等^[31]通过QTL元分析定位的QTL区间右标记*ias13a*相距99.52 cM;2号染色体上登录号为GRMZM2G161932的基因与Balint-Kurti等^[18]定位的*mmp167~umc2249* QTL区间的物理距离最近,为432 kb;5号染色体上登录号为GRMZM2G057129的基因与Benson等^[32]定位的QTL区间右边界的物理距离只有14 kb。

表 2 玉米灰斑病抗性关联显著性位点

Table 2 Significant single nucleotide polymorphism (SNP) loci associated with GLS resistance in maize

年份	单核苷酸多态性 (SNP) 标记	玉米 B73 V3 版上注释的基因登录号	bin	碱基位置	P 值	-lgP	R ²	
2017	AX116873072	GRMZM5G889999	7.04	156 182 273	9.59×10 ⁻⁵	4.018 335	0.070 787	
	AX95678619	GRMZM2G080044	9.01	7 620 704	9.68×10 ⁻⁵	4.014 079	0.065 982	
	AX86263934	GRMZM2G057129	5.02	8 134 415	9.99×10 ⁻⁵	4.000 516	0.065 717	
	AX86286595	GRMZM2G477314	1.10	281 321 400	1.12×10 ⁻⁴	3.949 725	0.064 708	
	AX86280968	GRMZM2G161932	2.04	48 590 009	1.66×10 ⁻⁴	3.780 012	0.061 437	
	AX86291016	intergenic		126 878 832	2.41×10 ⁻⁴	3.617 143	0.058 636	
	AX86243556	intergenic		218 638 586	2.84×10 ⁻⁴	3.546 267	0.056 923	
	AX116871676	intergenic		150 275 895	2.99×10 ⁻⁴	3.524 871	0.059 795	
	AX86320824	intergenic		31 281 627	3.15×10 ⁻⁴	3.501 298	0.056 089	
	AX86280339	GRMZM2G130278	2.07	195 912 702	3.44×10 ⁻⁴	3.463 295	0.055 553	
	AX86242039	GRMZM2G389789	2.04	35 358 494	3.53×10 ⁻⁴	3.452 403	0.055 223	
	AX86261917	GRMZM5G887716	9.01	8 039 868	3.56×10 ⁻⁴	3.449 003	0.056 530	
	AX86282273	GRMZM2G156543	1.11	295 490 136	5.08×10 ⁻⁴	3.294 202	0.052 673	
	AX86282358	GRMZM2G110141	6.05	150 592 637	5.33×10 ⁻⁴	3.272 916	0.051 797	
	AX86259524	GRMZM2G130278	2.07	195 912 740	5.62×10 ⁻⁴	3.250 467	0.051 526	
	AX86280726	GRMZM2G080174	7.04	154 277 825	6.06×10 ⁻⁴	3.217 527	0.051 246	
	AX86300931	GRMZM2G106427	6.03	102 399 426	7.91×10 ⁻⁴	3.101 886	0.048 492	
	AX86290220	intergenic		10 795 858	8.12×10 ⁻⁴	3.090 328	0.050 122	
	AX86281826	GRMZM2G163912	1.11	288 742 212	8.82×10 ⁻⁴	3.054 763	0.047 938	
	AX116875774	GRMZM2G100146	8.05	136 129 975	9.23×10 ⁻⁴	3.034 715	0.047 189	
	AX86263146	GRMZM2G374309	7.03	154 747 848	9.75×10 ⁻⁴	3.011 086	0.047 627	
	AX86278800	GRMZM2G160887	9.01	8 414 792	9.82×10 ⁻⁴	3.008 041	0.048 508	
	2018	AX86275790	GRMZM2G150217	8.04	110 372 621	1.48×10 ⁻⁵	4.828 950	0.084 621
		AX86309888	GRMZM2G163426	2.06	177 440 328	1.17×10 ⁻⁴	3.932 340	0.065 220
		AX86244929	GRMZM2G068665	3.05	150 268 973	2.51×10 ⁻⁴	3.600 070	0.058 699
		AX86305255	GRMZM2G022820	6.01	44 009 333	2.66×10 ⁻⁴	3.575 385	0.058 780
		AX86327709	GRMZM2G069177	3.04	13 312 272	3.79×10 ⁻⁴	3.421 914	0.055 237
		AX86316600	GRMZM2G043995	6.01	43 975 532	4.13×10 ⁻⁴	3.384 486	0.055 635
		AX86259524	GRMZM2G130278	2.07	195 912 740	4.39×10 ⁻⁴	3.357 901	0.053 998
		AX86245857	GRMZM2G030463	4.03	12 606 643	4.70×10 ⁻⁴	3.327 902	0.054 094
AX86267581		intergenic		164 271 629	4.99×10 ⁻⁴	3.301 620	0.055 022	
AX86293781		GRMZM2G025214	6.01	43 624 775	5.16×10 ⁻⁴	3.287 237	0.053 089	
AX86272545		intergenic		177 233 169	5.22×10 ⁻⁴	3.282 381	0.052 553	
AX86290238		GRMZM2G030463	4.03	12 584 481	5.59×10 ⁻⁴	3.252 564	0.052 564	
AX86308994		intergenic		67 935 376	5.70×10 ⁻⁴	3.244 257	0.052 422	
AX86259536		GRMZM2G419111	3.04	40 064 069	5.72×10 ⁻⁴	3.242 952	0.053 002	
AX86258187		GRMZM2G007372	5.04	84 843 099	6.52×10 ⁻⁴	3.185 943	0.051 440	
AX86248649		GRMZM2G074634	5.04	84 103 739	7.45×10 ⁻⁴	3.128 056	0.050 946	
AX86279436		GRMZM2G131024	3.04	43 869 157	7.78×10 ⁻⁴	3.109 261	0.050 001	
AX86299851		GRMZM2G026117	5.04	84 248 322	7.87×10 ⁻⁴	3.103 914	0.049 957	
AX86264035		GRMZM2G022820	6.01	44 008 563	8.49×10 ⁻⁴	3.070 896	0.049 483	
AX86273118		intergenic		43 468 429	8.59×10 ⁻⁴	3.066 092	0.049 383	
AX86249990	intergenic		43 973 360	8.81×10 ⁻⁴	3.054 926	0.049 165		
AX86316602	GRMZM2G022726	6.01	44 006 176	8.81×10 ⁻⁴	3.054 926	0.049 165		
AX86281684	GRMZM2G401664	7.03	143 821 472	9.34×10 ⁻⁴	3.029 628	0.049 795		

bin 表示染色体区域,当 bin=7.04 时,表明该标记位于第 7 号染色体 0.04 区域,其他依此类推;intergenic 表示基因间区域。

表3 关联基因与已确定的抗玉米灰斑病 QTL 的比较

Table 3 Comparison between associated genes with QTL identified in previous studies

bin	玉米 B73 V3 版上注释的基因登录号	QTL 区间		参考文献	
		左标记/位置	右标记/位置		
1.10	GRMZM2G477314	<i>lim99a</i>	<i>ias13a</i>	[31]	
		<i>bnlg1720</i>	<i>umc1500</i>	[20]	
2.04	GRMZM2G389789	<i>umc34</i>	<i>umc1541</i>	[18]	
2.06	GRMZM2G163426	<i>umc2253</i>	<i>umc1551</i>	[20]	
		<i>agrr267b</i>	<i>mc1</i>	[31]	
		<i>umc2194</i>	<i>umc2019</i>	[23]	
		<i>umc139</i>	<i>umc137</i>	[16]	
2.07	GRMZM2G130278	<i>umc139</i>	<i>umc137</i>	[16]	
3.04	GRMZM2G069177	<i>PZA00508.2</i>	<i>PZA02474.1</i>	[33]	
		<i>GRMZM2G419111</i>	<i>PZA00508.2</i>	<i>PZA02474.1</i>	[33]
		<i>GRMZM2G131024</i>	<i>PZA00508.2</i>	<i>PZA02474.1</i>	[33]
3.05	GRMZM2G068665	<i>umc102a</i>	<i>bnl5.14</i>	[16]	
		<i>umc102a</i>	<i>bnl5.14</i>	[15]	
		143 898 953 bp	180 504 690 bp	[32]	
		<i>umc1773</i>	<i>umc2127</i>	[23]	
4.03	GRMZM2G030463	<i>umc2082</i>	<i>umc1117</i>	[34]	
		<i>umc31a</i>	<i>php20597a</i>	[15]	
		<i>bnlg1046</i>	<i>umc1171</i>	[20]	
5.04	GRMZM2G074634	<i>bnlg557</i>	<i>bnlg150</i>	[17]	
		<i>GRMZM2G026117</i>	<i>umc43</i>	<i>umc40</i>	[16]
		<i>GRMZM2G007372</i>	<i>umc43</i>	<i>php10014</i>	[15]
		<i>umc1784</i>	<i>umc1171</i>	[21]	
6.01	GRMZM2G022726	<i>php20599</i>	<i>umc85a</i>	[15]	
		<i>GRMZM2G022820</i>	<i>php20599</i>	<i>umc85a</i>	[15]
		<i>GRMZM2G025214</i>	<i>php20599</i>	<i>umc85a</i>	[15]
		<i>GRMZM2G043995</i>	<i>php20599</i>	<i>umc85a</i>	[15]
6.03	GRMZM2G106427	<i>php20599</i>	<i>umc85a</i>	[15]	
		86 257 528 bp	113 885 960 bp	[32]	
		<i>npi373</i>	<i>umc46</i>	[16]	
6.05	GRMZM2G110141	<i>php20599</i>	<i>umc85a</i>	[15]	
7.03	GRMZM2G401664	<i>umc111</i>	<i>129 865 901</i>	[16]	
		<i>GRMZM2G080174</i>	<i>asg32</i>	<i>156 132 738</i>	[19]
		<i>GRMZM2G374309</i>	<i>asg32</i>	<i>156 132 738</i>	[19]
7.04	GRMZM5G889999	<i>umc111</i>	<i>asg32</i>	[16]	
8.04	GRMZM2G150217	<i>bnl13.05a</i>	<i>bnl12.30a</i>	[15]	
8.05	GRMZM2G100146	<i>ufg80</i>	<i>bnlg666</i>	[18]	
		<i>umc89</i>	<i>csu31</i>	[16]	
		135 091 499 bp	156 907 035 bp	[32]	
		<i>bnl12.36b</i>	<i>gpm511</i>	[31]	
9.01	GRMZM2G080044	<i>bnl13.05a</i>	<i>bnl12.30a</i>	[15]	
		<i>POI100005</i>	<i>umc113</i>	[15]	
		<i>GRMZM2G160887</i>	<i>POI100005</i>	<i>umc113</i>	[15]
	<i>GRMZM5G887716</i>	<i>POI100005</i>	<i>umc113</i>	[15]	

bin 表示染色体区域, QTL 表示数量性状座位。

3 讨论

3.1 玉米灰斑病抗性鉴定与抗性种质培育

准确的抗性鉴定是抗病育种及抗病基因定位的根本前提。人工培养玉米灰斑病的病原菌较难,发病要求的环境较难控制,而利用重病区的自然发病原理是玉米灰斑病抗性鉴定的有效途径^[35]。本试验地点位于云南省保山市市郊(海拔1 600 m,地理坐标为25°08'N,99°10'E),属于玉米灰斑病的重灾区,当地气候温暖潮湿,田间相对湿度较高,并且土壤属微酸性红壤,有利于病原菌的存活、侵染和在田间发病流行。目前,许多有关玉米灰斑病的研究都将试验地点设在云南省保山市市郊^[20-21,23],而且已有研究发现,该地区的玉米灰斑病病原菌为玉米尾孢菌^[2,8-9]。由此可见,本研究所选试验地点可以从环境、气候、病原菌等方面为玉米尾孢菌灰斑病的发生与流行提供条件,从而为本研究得到真实、可靠的表型数据提供重要保障。

为了准确评估研究材料的抗病情况,本研究在田间试验设计的基础上采用严格的措施控制试验误差,一是将关联群体按照热带/亚热带、温带种质分为2组,组内采用随机区组设计,2次重复;二是设置大量对照,每40行放1组对照(2个抗病对照材料,2个感病对照材料),以提高试验数据的准确性。从试验结果看,对照材料抗病自交系Y32在2017年、2018年这2年的抗性鉴定结果中表现为一致抗病,感病自交系Ye478表现为一致感病;2017年232份玉米自交系的平均病级为4.79级,2018年225份玉米自交系的平均病级为4.96级。方差分析结果显示,玉米灰斑病表型不仅在玉米材料间表现出极显著差异,在年份与材料互作间也表现出极显著差异。分析其原因,一方面由于玉米灰斑病抗性是由许多微效基因控制的数量性状,易受环境影响^[13-14];另一方面,也与玉米灰斑病抗性评价标准有关。在本研究中,评价玉米灰斑病抗性采用的是中国病害鉴定通用的叶斑病病级划分标准,即根据发病叶片部位及发病面积进行分级,目前大多数玉米灰斑病研究都采用这个方法进行抗性评价^[20-21,23],该方法易于掌握和在田间实施,但是通过目测叶片发病面积进行分级可能会存在一定的主观性,要求调查者能准确识别玉米灰斑病并正确评价其病级。本研究在调查过程中采用2人独立评价的方法,再取2人评价值的平均值代表该材料的病级,

以尽量避免因个人主观因素带来的表型误差。

尽管目前国内外在玉米灰斑病抗性种质鉴定方面进行了大量研究,但是大多数都是针对玉蜀黍尾孢菌灰斑病抗性种质鉴定,而且目前在世界范围内缺少抗玉米尾孢菌灰斑病的种质资源。本研究通过2年的玉米尾孢菌灰斑病抗性鉴定,筛选出44份抗病材料和5份高抗材料,可以在玉米尾孢菌灰斑病的抗性遗传改良中加以利用。对这些材料的来源进行分析发现,这些抗病材料大都来源于CIMMYT(82%)。进一步查看241份玉米自交系中所有来源于CIMMYT的材料发现,中抗及以上的材料占比达到了66.7%以上,而CIMMYT种质基本上属于热带/亚热带种质,表明来源于热带/亚热带的玉米种质对于玉米尾孢菌灰斑病普遍具有较好的抗性。吴纪昌等^[10]对来源广泛的915份玉米自交系进行灰斑病抗性鉴定,发现其中的高抗材料多数是从国外引进的具有热带/亚热带血缘的材料。Shi等^[36-37]通过对玉米种质进行抗性鉴定发现,在中国主要的玉米种质中,具有热带/亚热带血缘的PB种质对灰斑病的抗性表现较好。综上,今后应加强热带/亚热带玉米种质的研究和应用,培育优良的抗灰斑病玉米品种。

3.2 玉米灰斑病抗性位点与候选基因预测

虽然本研究检测到的与玉米灰斑病抗性显著关联的44个SNP位点中只有1个位点在2年内均被检测到,但与他人的研究结果进行比较可以发现,本研究检测到的44个SNP位点中有34个SNP位点对应31个基因,分布在除10号染色体外的其余染色体上。由此可以推测,本研究通过关联分析得到的玉米灰斑病抗性位点是真实有效的,同时也进一步证明,玉米灰斑病抗性是由许多微效基因控制的数量性状^[13-14]。本研究检测到的44个与玉米灰斑病抗性显著关联的SNP位点的表型贡献率都较低(4.72%~8.46%),其中2017年、2018年重复检测到的SNP标记AX86259524的表型贡献率分别仅为5.15%、5.40%。正是因为这些位点的表型贡献率较小、极易受外界环境的影响,因此它们被重复检验的难度较大,说明表型鉴定对于受微效基因控制的数量性状研究极为重要。

将本研究检测到的位于已知玉米灰斑病QTL区间内的27个基因在生物信息数据库中进行比对,共找到8个与植物抗病相关的基因。其中登录号为GRMZM2G163426基因(*TRAM/LAG/CRN8* 5基因,简称*TLC5*)、登录号为GRMZM2G130278基因(内腔

蛋白保留受体家族蛋白编码基因)和登录号为 GRMZM2G069177 基因(自噬相关蛋白 18 编码基因)都可以通过调控细胞程序性死亡来参与植物免疫反应^[38-39]。Pei 等^[40]研究发现,自噬相关蛋白编码基因在应对小麦白粉病的免疫反应中起着积极作用。登录号为 GRMZM5G889999 基因(激酶-相互作用激酶 1 编码基因)和登录号为 GRMZM2G374309 基因(富半胱氨酸受体样蛋白激酶 10 编码基因)都包含丝氨酸/苏氨酸激酶结构域(STK),在植物免疫系统中充当细胞表面受体并转导信号,以触发植物的先天性免疫反应^[41-42]。此外,许多研究都发现,丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶在植物抗病方面有着重要作用^[43-44]。已有的研究结果也多次将丝氨酸/苏氨酸激酶基因作为玉米灰斑病抗性的候选基因^[36, 45-46]。登录号为 GRMZM2G068665 基因(吡咯啉-5-羧酸还原酶基因)参与植物脯氨酸合成代谢途径,而游离脯氨酸可能在胁迫耐受和渗透调节中起作用^[47-48]。郭红莲等^[49]研究发现,游离脯氨酸含量与玉米品种对灰斑病的抗性间呈正相关。登录号为 GRMZM2G007372 基因(五肽重复序列蛋白编码基因)和登录号为 GRMZM2G100146 基因(组蛋白脱乙酰酶 *HDT2* 基因)都通过调控基因表达进而参与到植物免疫防御过程中^[50-51],在拟南芥、水稻中都有这 2 个基因与抗病性相关的报道^[52-53]。虽然有报道表明,以上 8 个基因在植物中都有抗病防御的功能,但是它们是否对玉米灰斑病具有抗性还需进行相关基因的功能验证。这 8 个候选基因不仅分别位于不同染色体及其区段上,其抗病机制也各不相同,并且其基因功能涉及信号转导、转录调控、物质代谢和结构蛋白功能,暗示玉米灰斑病的抗病反应是一个非常复杂的过程,可能涉及多种调控途径的相互作用,因此在研究抗玉米灰斑病的过程中,还需要挖掘更多抗性基因和抗性机制。

参考文献:

- [1] 卢宗志,李艳君,李海春,等. 玉米灰斑病对玉米产量及产量特性的影响研究[J]. 玉米科学, 2008, 16(6): 126-129.
- [2] 赵立萍,王晓鸣,段灿星,等. 中国玉米灰斑病发生现状与未来扩散趋势分析[J]. 中国农业科学, 2015, 48(18): 3612-3626.
- [3] HILTY J W, HADDEN C H, GARDEN F T. Response of maize hybrids and inbred lines to gray leaf spot disease and the effects on yield in Tennessee[J]. Plant Disease Reporter, 1979, 63(6): 515-518.
- [4] KINYUA Z M, SMITH J J, KIBATA G N, et al. Status of grey leaf spot disease in Kenyan maize production ecosystems[J]. African Crop Science Journal, 2010, 18(4): 183-194.
- [5] 李 晓,张小飞,崔丽娜,等. 警惕四川玉米灰斑病的发生危害[J]. 四川农业科技, 2011(12): 37.
- [6] 周惠萍,吴景芝,李月秋,等. 云南省玉米灰斑病发生规律研究[J]. 西南农业学报, 2011, 24(6): 2207-2212.
- [7] 张益先,吕国忠,梁景颐,等. 玉米灰斑病菌生物学特性研究[J]. 植物病理学报, 2003, 33(4): 292-295.
- [8] 刘庆奎,秦子惠,张小利,等. 中国玉米灰斑病原菌的鉴定及其基本特征研究[J]. 中国农业科学, 2013, 46(19): 4044-4057.
- [9] LIU K J, XU X D. First report of gray leaf spot of maize caused by *Cercospora zeina* in China[J]. Plant Disease, 2013, 97(12): 1656.
- [10] 吴纪昌,马丽君,王作英. 玉米抗尾孢菌叶斑病鉴定与抗病材料利用[J]. 辽宁农业科学, 1997(5): 25-28.
- [11] 董怀玉,姜 钰,王丽娟,等. 玉米种质资源抗灰斑病鉴定与评价[J]. 植物遗传资源学报, 2005, 6(4): 441-443.
- [12] 吕香玲,李新海,陈 阳,等. 玉米种质抗灰斑病鉴定与评价[J]. 玉米科学, 2011, 19(6): 125-128.
- [13] 李世强,陈 威,谭 静,等. 玉米灰斑病的抗性机理研究进展[J]. 生物技术进展, 2011, 1(2): 112-115.
- [14] ABEBE M, MARIA A. Genetic analysis of resistance to gray leaf spot of maize inbred lines[J]. Crop Science, 2005, 45(1): 163-170.
- [15] BUBECK D M, GOODMAN M M, BEAVIS W D, et al. Quantitative trait loci controlling resistance to gray leaf spot in maize[J]. Crop Science, 1993, 33: 838-847.
- [16] CLEMENTS M J, DUDLEY J W, WHITE D G. Quantitative trait loci associated with resistance to gray leaf spot of corn[J]. Phytopathology, 2000, 90(9): 1018-1025.
- [17] LEHMENSIEK A, ESTERHUIZEN A M, VAN-STADEN D, et al. Genetic mapping of gray leaf spot (GLS) resistance genes in maize[J]. Theoretical and Applied Genetics, 2001, 103: 797-803.
- [18] BALINT-KURTI P J, WISSER R, ZWONITZER J C. Use of the IBM population for precise mapping of quantitative trait loci for gray leaf spot resistance in maize[J]. Crop Science, 2008, 48(5): 1696-1704.
- [19] POZAR G, BUTRUILLE D, SILVA H D, et al. Mapping and validation of quantitative trait loci for resistance to *Cercospora zeamays* infection in tropical maize (*Zea mays* L.)[J]. Theoretical and Applied Genetics, 2009, 118(3): 533-564.
- [20] ZHANG Y, XU L, FAN X M, et al. QTL mapping of resistance to gray leaf spot in maize[J]. Theoretical and Applied Genetics, 2012, 125(8): 1797-1808.
- [21] XU L, ZHANG Y, SHAO S Q, et al. High-resolution mapping and characterization of *qRgl2*, a major quantitative trait locus involved in maize resistance to gray leaf spot[J]. BMC Plant Biology, 2014, 14: 230-240.
- [22] BERGER D K, CARSTENS M, KORSMAN J N, et al. Mapping QTL conferring resistance in maize to gray leaf spot disease caused by *Cercospora zeina*[J]. BMC Genetics, 2014, 15: 60.
- [23] LIU L, TAN J, ZHANG Y D, et al. QTL mapping for gray leaf

- spot resistance in a tropical maize population[J]. *Plant Disease*, 2016, 100(2): 304-312.
- [24] HE W Z, YANG L, LENG Y F, et al. QTL mapping for resistance of maize to grey leaf spot[J]. *Journal of Phytopathology*, 2018, 166(3): 167-176.
- [25] WANG W Y, BARRATT B J, CLAYTON D G, et al. Genome-wide association studies: theoretical and practical concerns[J]. *Nature Review Genetics*, 2005, 6: 109-118.
- [26] WITTE J S. Genome-wide association studies and beyond[J]. *Annual Review of Public Health*, 2010, 31(1): 9-20.
- [27] ZHU C S, GORE M, BUCKLER E S, et al. Status and prospects of association mapping in plants[J]. *The Plant Genome*, 2008, 1(1): 5-20.
- [28] MAMMADOV J A, SUN X C, GAO Y X, et al. Combining powers of linkage and association mapping for precise dissection of QTL controlling resistance to gray leaf spot disease in maize (*Zea mays* L.)[J]. *BMC Genomics*, 2015, 16(1): 916-931.
- [29] KUKI M C, SCAPIM C A, ROSSI E S, et al. Genome wide association study for gray leaf spot resistance in tropical maize core[J]. *PLoS One*, 2018, 13(6): e0199539.
- [30] 王晓鸣,石 洁,晋齐鸣,等. 玉米病虫害田间手册——病虫害鉴别与抗性鉴定[M]. 北京: 中国农业科学技术出版社, 2010: 8.
- [31] 闫 伟,李 元,宋茂兴,等. 玉米抗灰斑病 QTL 元分析及其验证[J]. *作物学报*, 2016, 42(5): 758-767.
- [32] BENSON J M, POLAND J A, BENSON B M, et al. Resistance to gray leaf spot of maize: genetic architecture and mechanisms elucidated through nested association mapping and near-isogenic line analysis[J]. *PLoS Genetics*, 2015, 11(3): e1005045.
- [33] ZWONITZER J C, COLES N D, KRAKOWSKY M D, et al. Mapping resistance quantitative trait loci for three foliar diseases in a maize recombinant inbred line population-evidence for multiple disease resistance? [J]. *Phytopathology*, 2010, 100(1): 72-79.
- [34] JINES M P. Identification of quantitative trait loci (QTL) for gray leaf spot resistance, maturity, and grain yield in a semi-tropical recombinant inbred population of maize [D]. North Carolina, USA: North Carolina State University, 2004:55-69.
- [35] 谭 静,罗 吉,孙彩梅,等. 玉米灰斑病抗性种质与基因位点的研究进展[J]. *种子*, 2019, 38(8): 57-60,64.
- [36] SHI L Y, LV X L, WENG J F, et al. Genetic characterization and linkage disequilibrium mapping of resistance to gray leaf spot in maize (*Zea mays* L.) [J]. *The Crop Journal*, 2014 (Z1): 132-143.
- [37] 刘可杰,董怀玉,姜 钰,等. 300 份玉米种质对两种灰斑病菌的抗性评价[J]. *玉米科学*, 2018, 26(4): 162-165.
- [38] TAKAHASHI Y, BERBERICH T, KANZAKI H, et al. Serine palmitoyltransferase, the first step enzyme in sphingolipid biosynthesis, is involved in non-host resistance[J]. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 2009, 22(1): 31-38.
- [39] XU G Y, LI S Z, XIE K, et al. Plant ERD2 - like proteins function as endoplasmic reticulum luminal protein receptors and participate in programmed cell death during innate immunity [J]. *The Plant Journal*, 2012, 72(1): 57-69.
- [40] PEI D, ZHANG W, SUN H, et al. Identification of autophagy-related genes *ATG4* and *ATG8* from wheat (*Triticum aestivum* L.) and profiling of their expression patterns responding to biotic and abiotic stresses[J]. *Plant Cell Reports*, 2014, 33(10): 1697-1710.
- [41] AFZAL A J, WOOD A J, LIGHTFOOT D A. Plant receptor-like serine threonine kinases: roles in signaling and plant defense[J]. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 2008, 21(5): 507-517.
- [42] SEKHVAL M K, LI P C, LAM I, et al. Disease resistance gene analogs (RGAs) in plants[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2015, 16(8): 19248-19290.
- [43] ZHOU T, FAN M X, IRFAN M, et al. Phylogenetic analysis of *STK* gene family and Usp domain in maize[J]. *Molecular Biology Reports*, 2014, 41(12): 8273-8284.
- [44] KRISHNAN A, MAHADEVAN C, MANI T, et al. Virus-induced gene silencing (VIGS) for elucidation of pathogen defense role of serine/threonine protein kinase in the non-model plant *Piper colubrinum* Link.[J]. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 2015, 122(2): 269-283.
- [45] 宋军锋,陈 华,田志强,等. 玉米灰斑病抗病 QTL 鉴定和效应分析[J]. *河南农业大学学报*, 2019, 53(5): 677-682.
- [46] YU Y, SHI J Y, LI X Y, et al. Transcriptome analysis reveals the molecular mechanisms of the defense response to gray leaf spot disease in maize[J]. *BMC Genomics*, 2018, 19(1): 742-758.
- [47] SZABADOS L, SAVOURÉ A. Proline: a multifunctional amino acid[J]. *Trends in Plant Science*, 2010, 15(2): 89-97.
- [48] VERSLUES P E, SHARMA S. Proline metabolism and its implications for plant-environment interaction[J]. *The Arabidopsis Book*, 2010, 2010(8): e0140.
- [49] 郭红莲,陈 捷,高增贵. 游离脯氨酸在玉米灰斑病抗性机制中作用的研究[J]. *玉米科学*, 2003, 11(1): 83-85.
- [50] CHEN Z J, TIAN L. Roles of dynamic and reversible histone acetylation in plant development and polyploidy[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2007, 1769(5/6): 295-307.
- [51] SEKHVAL M K, LI P, LAM I, et al. Disease resistance gene analogs (RGAs) in plants [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2015, 16(8): 19248-19290.
- [52] SONG D H, LI G J, SONG F M, et al. Molecular characterization and expression analysis of *OsBISERK1*, a gene encoding a leucine-rich repeat receptor-like kinase, during disease resistance responses in rice[J]. *Molecular Biology Reports*, 2008, 35(2): 275-283.
- [53] PARK Y J, LEE H J, KWAK K J, et al. MicroRNA400-guided cleavage of pentatricopeptide repeat protein mRNAs renders *Arabidopsis thaliana* more susceptible to pathogenic bacteria and fungi [J]. *Plant and Cell Physiology*, 2014, 55(9): 1660-1668.

(责任编辑:徐 艳)