

利用非近交亲本间杂交 F₁ 群体 对木薯褐斑病田间抗性的 QTL 分析

王萍^{ab}, 李杰^a, 付瑜华^c, 王惠君^c, 李开绵^{b*}, 王文泉^{c*}

(中国热带农业科学院, a. 椰子研究所, 海南文昌 571339; b. 热带作物品种资源研究所, 海南儋州 5717372;

c. 热带生物技术研究所暨热带作物生物技术国家重点实验室, 海口 571101)

摘要: 对非近交亲本抗褐斑病的文昌红心和中感亲本华南 6 号杂交获得分离群体 184 个株系, 采用简单重复序列 (Simple Sequence Repeat, SSR) 分析, 检测了木薯 (*Manihot esculenta* Crantz) 对褐斑病田间抗性的数量性状基因位点 (Quantitative Trait Locus, QTL)。采用田间自然发病和辅助人工接菌的方法, 分别在 2004 年苗期、2005 年苗期和成株期 3 次调查和鉴定了群体的抗病性反应。结果表明, 这 3 个时期群体褐斑病病情指数 (DI) 分布范围较一致, 均呈连续性偏峰态分布。从 400 对 SSR 引物中筛选出在抗、感基因池和两个亲本间均具有多态性的引物 17 对, 群体检测获得 50 个等位基因位点, 构建了包含 34 个位点的 8 个连锁群, 覆盖木薯基因组 695.7 cM, 2 个位点间平均图距为 20.5 cM。采用复合区间作图法进行 QTL 分析, 共检测到 15 个与木薯褐斑病抗性相关的 QTL, 贡献率在 9.61%–64.81%, 主要分布在第 1、2、4 连锁群的特定区域。其中, 第 1、2 连锁群上的 6 个 QTL 是重要的 QTL。

关键词: 木薯; 褐斑病; SSR; QTL; 遗传图谱

中图分类号: Q348

文献标识码: A

文章编号: 1005-3395(2007)03-0191-07

QTL Analysis of Field Resistance to Brown Leaf Spot in F₁ Population of Non-inbred Parents in Cassava

WANG Ping^{a,b}, LI Jie^a, FU Yu-hua^c, WANG Hui-jun^c,
LI Kai-mian^{b*}, WANG Wen-quan^{c*}

(a. Coconut Research Institute, Wenchang 571339, China; b. Tropical Crops Genetic Resources Institute, Danzhou 571737, China;

c. Institute of Tropical Bioscience and Biotechnology, the State Key Laboratory of Tropical Crop Biotechnology,
the Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, Haikou 571101, China)

Abstract: One hundred and eighty-four lines of F₁ hybrid between non-inbred parent Wenchang red resistant to brown leaf spot and moderately susceptible South China 6 were used to detect quantitative trait loci (QTLs) for field resistance to brown leaf spot (*Cercosporidium henningsii*) of cassava (*Manihot esculenta* Crantz) by simple sequence repeat (SSR) markers. Disease response was investigated under field conditions assisted with artificial inoculation during 2004–2005 seedling stages and 2005 grown-up stage of cassava. Disease index showed a skewed distribution, indicating that major effective genes existed. Seventeen out of 400 SSR primers were screened based on DNA amplification of resistance and susceptible gene pools and two parents. Fifty alleles were found using the 17 SSR primers. Eight linkage groups associated with 30 alleles were constructed covering a length of 695.7 cM with an average marker distance of 20.5 cM. A total of fifteen QTLs for resistance were identified, located

收稿日期: 2006-06-08

接受日期: 2006-12-11

基金项目: 国家自然科学基金项目(30571004)资助

* 通讯作者 Corresponding author

on groups 1, 2, 3 and 4, accounting for 9.61%–64.81% of phenotypic variance. Six of them on groups 1 and 2 were important QTLs.

Key words: *Manihot esculenta*; Brown leaf spot; SSR; QTL; Genetic map

木薯褐斑病(Brown leaf spot)是由尾孢状叶斑病菌(*Cercosporidium henningsii*)侵染导致的木薯叶部病害,是世界木薯种植区广泛发生的病害。最早在非洲东部出现,随后在印度、菲律宾、加纳等木薯主产区流行。多雨潮湿条件下易发生,造成叶片迅速脱落而导致减产^[1-3]。

木薯褐斑病导致块根产量下降 10%–30%^[4],目前尚未见关于木薯褐斑病抗性育种的报道。对复杂遗传性状进行 QTL 标记,运用于分子标记辅助育种是国际作物育种研究的发展趋势。有关木薯遗传图谱和分子标记的研究已有不少报道^[5-7],木薯对细菌性叶斑病(BBD)和非洲花叶病毒(FCMV)抗性的 QTL 标记获得满意的结果,有关 FCMV 的 MAS (Marker assisted selection, MAS) 选择已经在育种中得到运用^[8-9],但是尚未见有关木薯褐斑病抗性分子标记的研究报道。

本研究旨在利用抗病亲本文昌红心与中感亲本华南 6 号杂交,建立实验群体,在对分离群体的抗病性鉴定和分子遗传多样性进行分析的基础上,解析木薯对褐斑病抗性的 QTL,寻找与抗病性紧密连锁的分子标记,为抗病品种的分子标记辅助选择、抗病基因分离和综合育种奠定基础。

1 材料和方法

1.1 供试材料

本试验采用非近交的木薯(*Manihot esculenta* Crantz)抗褐斑病亲本文昌红心(Wenchang red)和中感亲本华南 6 号(South China 6)杂交,获得实验 F₁ 代群体,为遗传分离的理论 F₂ 代群体,184 个株系,种植于中国热带农业科学院热带作物品种资源研究所试验基地。

1.2 木薯褐斑病抗性鉴定

木薯褐斑病田间抗性鉴定采用自然发病结合人工接菌的方法。病原菌采自海南田间病株叶片分离的混合菌株,在温室用感病寄主繁殖后,取病叶收集孢子,进行田间喷雾接种。分别在苗期和成株期 2 个发病高峰期调查群体株系的叶片病斑数。病害严重度有 0–5 级分级标准:0: 叶片无病斑, 1: 有

1–3 个病斑, 2: 有 3–6 个病斑, 3: 有 6–9 个病斑, 4: 有 9–12 个病斑, 5: 12 个以上病斑。根据加权法计算病情指数: $DI = \sum (F \times n) / (N \times 5) \times 100$

F: 每个严重度的株数(权重), *n*: 严重度分级, *N*: 调查总株数。分别在 2004 年成株期和 2005 年的苗期和成株期 3 个环境下调查获得病情指数数据,并进行数据分布的统计学检测。

1.3 群体的分子标记检测

DNA 提取 采用 CTAB 法^[10]提取群体每个株系的初展叶片的基因组 DNA,最终稀释浓度为 50 ng L⁻¹。

SSR 引物合成 根据已公布的木薯 SSR 标记,由北京赛百盛基因技术有限公司合成 400 对引物,用于群体多态性检测。

PCR 扩增 采用 20 μl 反应体系: 10 倍扩增缓冲液 2.0 μl, MgCl₂ (25 mmol/L) 1.5 μl, dNTPs (25 mmol/L) 0.3 μl, *Taq* 酶 (5 U μl⁻¹) 0.2 μl, 引物 (5 μmol/L) 2 μl, 模板 DNA (50 ng L⁻¹) 1.0 μl, 双蒸水 13 μl。PCR 反应程序为: 预变性 94℃ 4 min 后; 94℃ 1 min, 退火 1 min, 72℃ 1 min, 35 个循环; 72℃ 延伸 10 min。退火温度根据不同 SSR 引物的解链温度在 42–55℃ 之间。

1.4 连锁图构建及 QTL 分析

利用 Mapmaker/EXP Version 3.0 软件,在 LOD 值 3.0 条件下构建连锁群,再用 WinQTL Cart 2.5 软件进行 QTL 区间作图。

2 结果和分析

2.1 群体株系对褐斑病的抗性反应

文昌红心×华南 6 号杂交实验群体及其亲本在 2004 年成株期、2005 年苗期和成株期褐斑病病情指数的鉴定结果表明,亲本文昌红心病情指数平均为 25,具有中度抗性,亲本华南 6 号病情指数平均为 55,属于中感类型。群体株系的病情指数在 10–100 之间,具有明显的多样性分离,且具有超亲遗传现象。群体病情指数的分布见图 1。3 个时期的鉴定结果均呈偏峰态分布,但是其分布范围和趋势具有

一致性,表明可能存在主效抗性基因,且适合于 QTL 分析。

2.2 具有群体多态性 SSR 标记的筛选

根据群体株系在 2004-2005 年褐斑病抗性鉴定结果,根据集群分离方法(BSA)^[11],分别采用 9 个高感和 9 个高抗的极端株系构建了抗、感基因池。利用抗、感基因池,双亲本和部分典型抗、感株系为模板,对 400 对 SSR 引物进行扩增,筛选结果表明,有 66 对 SSR 引物在所有模板中具有多态性等位基因,多态性比率为 16.5%。其中 17 对 SSR 引物在抗、感基因池之间具有多态性条带差异,多态性比率为 4.25%,适用于完全群体分析和 QTL 标记。图 2 为引物 SSRY178 在抗感池、池中个体和杂交亲本上的 PCR 图谱。

2.3 群体多态性的 SSR 检测与连锁图谱构建

用 17 对多态性 SSR 引物对群体株系进行 PCR

扩增,结果获得 50 个多态性位点。用 MapMakerNT 软件进行连锁分析,在 LOD 值为 3.0 的条件下,将其 34 个等位基因位点定位到 8 个连锁群(图 3)。该图谱覆盖 695.7 cM,位点间平均图距为 20.5 cM,每个连锁群的平均位点数为 4.3,其中第 3 连锁群最长,长度为 211.7 cM,第 7、8 连锁群最短,只有 2 个位点。这是一个用抗病关联标记构建的不完全连锁群,可用于进一步对抗病基因标记的区间作图。

2.4 木薯对褐斑病抗性的 QTL 分析

将用于构建抗叶斑病相关标记连锁图谱的群体 SSR 等位基因数据和分别在苗期、成株期群体株系的病情指数数据,导入 WINcartQTL2.0 软件,用复合区间作图原理,进行了木薯抗褐斑病的 QTL 分析。在置信概率 LOD>2.5 条件下,将与抗病性相关 QTL 定位于不同的连锁群上。结果表明:总计检测到 29 个与抗病或者感病相关的 QTLs,所能解释

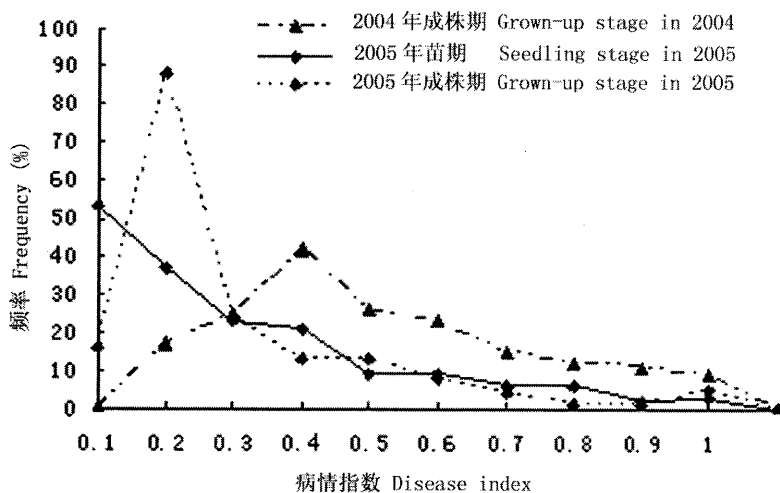


图1 文昌红心×华南6号群体褐斑病病情指数分布图
Fig. 1 Frequency distribution of disease index of brown leaf spot in a Wenchang red × South China 6 population

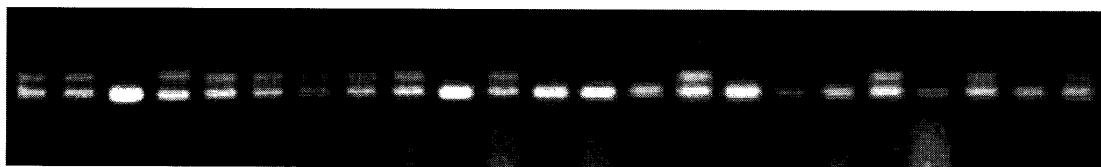


图2 引物 SSRY178 在抗、感池、池中个体和杂交亲本上的 PCR 图谱
Fig. 2 Pattern of PCR amplification of resistant and susceptible bulk DNA, individuals in pools and cross parents by the SSRY178 primer

1-9: 感株 Susceptible lines; 10-18: 抗株 Resistant lines; 19: 感亲 Susceptible parent South China 66; 20: 抗亲文昌红心 Resistant parent Wenchang red; 21: 感池 Susceptible pool; 22: 抗池 Resistant pool; 23: 抗、感混池 Resistant and susceptible bulk DNA

的表型方差(又称贡献率)在 16.47%–57.67%, 置信区间 LOD 在 2.57–15.82。其中具有负向加性效应的抗病相关 QTL 15 个。

2004 年成株期未检测到与抗病性相关的, 能够降低病情指数的 QTL。

2005 年苗期抗病性相关 QTL 有 7 个, 分别位

于第 2、4、5、6、7 连锁群上(表 1、图 3)。其中第 2 连锁群 2 个, qD1b2-1, qD1b2-2 的贡献率分别为 37.37%和 51.48%, 位于相邻位点, 其中 qD1b2-1 距离左标记 NS22 (2) 2.01 cM, 右标记 SSRY68 (2) 27.59 cM, qD1b2-2 左图距 6.01cM, 右图距 23.59 cM。该 QTL 具有紧密连锁标记, 且具有较大

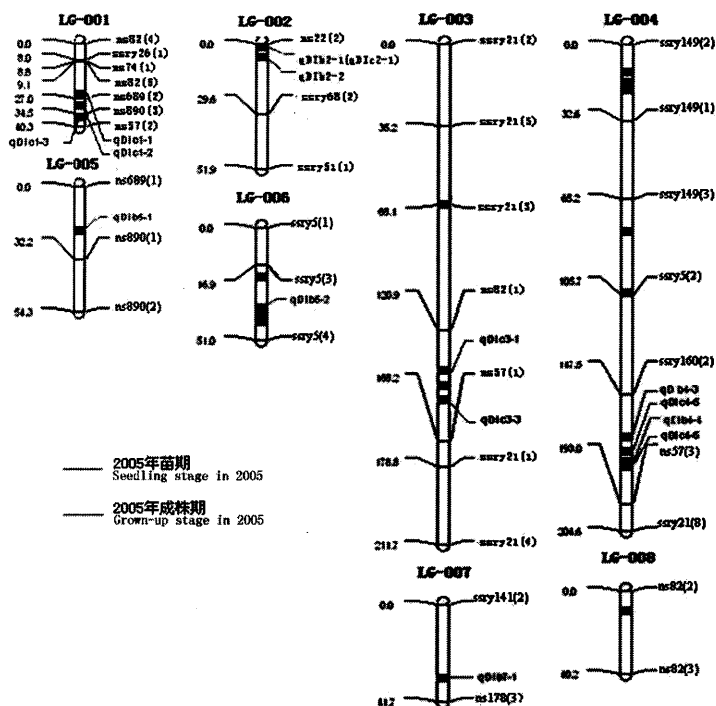


图 3 利用群体文昌红心×华南 6 号构建的抗棕色叶斑病相关标记木薯不完全连锁图谱

Fig. 3 Incomplete linkage groups constructed by markers related to resistance to brown leaf spot in a Wenchang red × South China 6 population

表 1 木薯苗期对褐斑病抗性的 QTL 效应(2005 年)

Table 1 QTL for resistance to brown leaf spot at seedling stage of cassava in 2005

QTL	连锁群 Linkage group	图距(cM) Map distance	标记区间 Marker interval	临近标记 Adjacent marker	LOD	加性效应 Additive effect	显性效应 Dominant effect	贡献率 Variance explained (%)
qD1b2-1	2	2.01	NS22(2)-SSRY68(2)	NS22	7.8091	-0.2744	-0.3097	0.3737
qD1b2-2	2	6.01	NS22(2)-SSRY68(2)	NS22	10.5138	-0.2498	-0.2725	0.5148
qD1b4-3	4	165.51	SSRY160(2)-NS57(3)	SSRY160	15.8282	-0.0806	-0.8988	0.0986
qD1b4-4	4	175.51	SSRY160(2)-NS57(3)	NS57	14.5642	-0.1032	1.6344	0.1759
qD1b5-1	5	20.01	NS689(1)-NS890(1)	NS890	2.9596	-0.0981	1.5752	0.1228
qD1b6-2	6	36.91	SSRY5(3)-SSRY5(4)	SSRY5	4.2964	-0.1149	1.7320	0.1861
qD1b7-1	7	32.01	SSRY141(2)-NS178(3)	NS178	3.2088	-0.1252	-0.7993	0.2465

的负向加性和负向显性效应值, 置信区间值也较高。第4连锁群上2个, 位于相邻位点区间, qDib4-3 贡献率 9.86%, 距离左标记 SSRY160(2) 18.01 cM, 右标记 NS57(3) 27.49 cM; qDib4-4 贡献率 17.59%, 距离左标记 SSRY160(2) 28.01 cM, 右标记 NS57(3) 17.49 cM; 第5连锁群上1个, qDib5-1 贡献率 12.28%, 距离左标记 NS689(1) 20.01 cM, 右标记 NS890(2) 12.19 cM; 第6连锁群上1个, qDib6-2 贡献率 18.61%, 距离左标记 SSRY5(3) 20.01 cM, 右标记 SSRY5(4) 14.09 cM; 第7连锁群上1个, qDib7-1 贡献率 24.65%, 距离左标记 SSRY141(2) 32.01 cM, 右标记 NS178(3) 9.69 cM(图3)。

2005年成株期褐斑病抗性相关的 QTL 8个, 分别位于第1、2、3和第4连锁群上(表2)。其中第1连锁群上3个, qDlc1-1 贡献率 47.32%, 位于 NS82(5)与 NS689(2)之间, 左图距 16.01 cM, 右图距 1.89 cM; qDlc1-2 贡献率 42.2%, 位于 NS689(2)与 NS890(3)之间, 左图距 4.01 cM, 右图距 3.49 cM; qDlc1-3 贡献率为 41.06%, 距离左标记 NS890(3) 2.01 cM, 右标记 NS57(2) 3.79 cM。第2连锁群上1个, qDlc2-1 贡献率 53.13%, 距离左标记 NS22(2) 2.01 cM, 右标记 SSRY68(2) 27.59 cM, 与 qDib2-1 重合在相同位置; 第3连锁群上2个, qDlc3-1、qDlc3-3 位于相邻标记之间, 贡献率分别为 64.81%

和 65.3%, qDlc3-1 距离左标记 NS82(1) 18.01 cM, 右标记 NS57(1) 29.29 cM; qDlc3-3 距离左标记 NS82(1) 30.01 cM, 右标记 17.29 cM。第4连锁群上2个, 位于相邻标记之间, qDlc4-5 贡献率 9.61%, 距离左标记 SSRY160(2) 24.01 cM, 右标记 NS57(3) 21.49 cM。qDlc4-6 贡献率 13.31%, 距离左标记 SSRY160(2) 30.01 cM, 右标记 NS57(3) 15.49 cM(图3)。

比较 2005 年苗期与成株期抗褐斑病相关 QTL, 以第2、4连锁群的 QTL 具有可重复性, 且分布区域十分接近。但是以第2群的 qDib2-1、qDib2-2 和 qDlc2-1, 第1群的 qDlc1-1、qDlc1-2 和 qDlc1-3 具有紧密连锁标记, 较高的加性效应值和大的置信区间, 优先考虑运用于分子标记辅助育种。

3 讨论

3.1 关于木薯褐斑病病原菌与抗性鉴定方法

木薯褐斑病菌是尾孢菌属的专性寄生菌^[2], 不能够进行纯培养, 病原菌的繁殖只能在活体寄主上进行。但 Borborua^[12-13]曾报道用马铃薯葡萄糖琼脂培养基和豆荚琼脂培养基可以分离和培养木薯尾孢菌。本实验采集海南岛田间自然发病株上的病原孢子, 试图进行单孢子分离, 但是没有成功。遂采用混合孢子接种, 在木薯感病材料上繁殖病菌, 通

表2 木薯成株期对褐斑病抗性的 QTL 效应(2005年)

Table 2 QTL for resistance to brown leaf spot at grown-up stage of cassava in 2005

QTL	连锁群 Linkage group	图距(cM) Map distance	标记区间 Marker interval	临近标记 Adjacent marker	LOD	加性效应 Additive effect	显性效应 Dominant effect	贡献率 Variance explained (%)
qDlc1-1	1	25.11	NS82(5)-NS689(2)	NS689	11.9685	-0.3007	-0.4420	0.4732
qDlc1-2	1	31.01	NS689(2)-NS890(3)	NS689	10.4905	-0.3380	-0.4515	0.4220
qDlc1-3	1	36.51	NS890(3)-NS57(2)	NS890	8.8179	-0.3507	-0.4510	0.4106
qDlc2-1	2	2.01	NS22(2)-SSRY68(2)	NS22	13.5682	-0.2741	-0.2197	0.5313
qDlc3-1	3	138.91	NS82(1)-NS57(1)	NS82	14.7523	-0.0282	0.4376	0.6481
qDlc3-3	3	150.91	NS82(1)-NS57(1)	NS57	15.3712	-0.0364	0.4459	0.6530
qDlc4-5	4	171.51	SSRY160(2)-NS57(3)	NS57	17.2017	-0.0685	-0.7379	0.0961
qDlc4-6	4	177.51	SSRY160(2)-NS57(3)	NS57	12.4096	-0.0747	-0.7419	0.1331

过孢子喷雾结合田间自然发病,达到适合于抗病性鉴定的病原条件。关于木薯褐斑病鉴定的严重度分级标准,国际上尚未统一标准,本研究中参照有关叶部病害的严重度分级标准,将木薯对叶斑病的反应分为 0、1、2、3、4、5 六个等级,较好地解决了鉴定问题。然后计算了病情指数,其作为抗病与感病反应的依据,具有可靠性。

3.2 苗期与成株期抗病性

木薯褐斑病在海南和广西主产区有两个明显的发病高峰期,即苗期和成株生长后期。这与当地气候条件有密切的关系。在每年的 5 月初至 6 月上旬,雨季开始,此时木薯株高 1 m 左右,正值封行,病原孢子通过气流传播,开始第 1 次发病高峰期;在当年 9 月左右,木薯下部叶片已经脱落,在多雨高湿度年份,叶斑病流行导致上部叶片脱落,造成减产,这与 Ciferri 和 Manuel^[14,15]的报道的结果相似。本研究正是根据木薯叶斑病发病规律,选择了苗期和成株后期两个抗性鉴定时期,以期抗病性鉴定结果具有代表性。在病害最流行时期和植株最易感病时期进行褐斑病情况调查,能较真实地反映材料的抗性水平。

3.3 木薯抗褐斑病性相关标记连锁图谱与 QTL 分析

本研究仅采用了与抗褐斑病关联的 17 对 SSR 引物对群体进行了扩增,获得 50 个多态性位点,其中 34 个标记定位于 8 个连锁群。由于连锁群的标记数量有限,图谱饱和度不足,对 QTL 参数的估计会有偏差,一般置信区间和贡献率会偏高一些。但是利用集群分离法获得的标记与抗病性关系密切,便于我们在较短时间内找到相关 QTL 位点。该方法在作物重要性状的 QTL 分析中经常运用,并获得良好的结果^[16]。实验中获得的部分结果在 2005 年苗期和成株期抗病 QTL 具有可重复性,如第 2、4 连锁群上的 QTL,也是本实验结果可靠性的一个佐证。

3.4 木薯抗褐斑病相关 QTL 的运用

本研究首次报道了木薯抗褐斑病相关的 QTL。特别是位于第 1、第 2 连锁群上的 6 个 QTL 分别具有紧密连锁的 SSR 分子标记,较高的贡献率,较大的病情指数负向加性效应和较大的置信区间值,预

示着他们代表着较为重要的抗病基因,有希望运用于木薯抗褐斑病的分子标记辅助育种。但是尚需要在增加分子遗传图谱饱和度基础上,进一步验证 QTL 的可靠性,并对现有标记的多态性、准确性进行检验。在大量工作基础上,这些标记将为抗褐斑病基因的精细定位、抗病聚合育种,乃至基因克隆奠定基础。

参考文献

- [1] Hrishy H, Hair R G. Cassava Production Technology [M]. Trivandrum: Central Tuber Crops Research Institute, 1978: 73-74.
- [2] Ayesu-Offei E N, Antwi-Boasiako C. Production of microconidia by *Cercospora henningsii* Allesch, cause of brown leaf spot of Cassava (*Manihot esculenta* Crantz) and tree cassava (*Manihot glaziovii* Muell.-Arg.) [J]. Ann Bot, 1996, 78: 653-657.
- [3] Lozano J C, Booth R H. Disease of cassava (*Manihot esculenta* Crantz) [J]. PANS, 1974, 20: 30-54.
- [4] Teri J M, Mtakwa P W, Mshana D. Cassava yield losses from brown leaf spot induced by *Cercosporidium henningsii* [M] // Tropical Root Crops: Production and Uses in Africa. Ottawa (Canada): IDRC, 1984: 79-81.
- [5] Fregene M A, Angel F, Gómez R, et al. A molecular genetic map of cassava (*Manihot esculenta* Crantz) [J]. Theor Appl Genet, 1997, 95: 431-441.
- [6] Mba R E C, Stephenson P, Edwards K, et al. Simple sequence repeat (SSR) markers survey of the cassava (*Manihot esculenta* Crantz) genome: Towards an SSR-based molecular genetic map of cassava [J]. Theor Appl Genet, 2001, 101: 21-31.
- [7] Okogbenin E, Marin J, Fregene M. An SSR-based molecular genetic map of cassava [J]. Euphytia, 2006, 147: 433-440.
- [8] Akano A O, Dixon A G O, Mba C, et al. Genetic mapping of a dominant gene conferring resistance to cassava mosaic disease [J]. Theor Appl Genet, 2002, 105: 521-525.
- [9] Jorge V, Fregene M A, Dugue M C, et al. Genetic mapping of resistance to bacterial blight disease in cassava (*Manihot esculenta* Crantz) [J]. Theor Appl Genet, 2000, 101: 865-872.
- [10] Zhang L R (张立荣), Xu D Q (徐大庆), Liu D Q (刘大群). SSR marker, ISSR marker and their application to plant genetics and breeding [J]. J Agri Univ Hebei (河北农业大学学报), 2002, 25 (1): 90-94. (in Chinese)
- [11] Colombo C, Second G, Charrier A. Diversity within American cassava germplasm based on RAPD markers [J]. Genet Mol Biol, 2000, 23 (1): 189-199.
- [12] Borborua A. Two new leaf spot diseases of tuber crop in Assam [J]. Phytopathol Not, 1982, 12(3): 341.
- [13] Kasirivu J B K, Esuruoso O F, Terry E R. Field screening of cassava clones for resistance to *Cercospora henningsii* [M] // Tropical Root Crops: Research Strategies for the 1980s. Ottawa (Canada): IDRC, 1981-1982: 49-57.

- [14] Ciferri I. A disease of cassava, *Manihot esculenta* Crantz in Sto. Domingo II. The circular leaf spot disease, (*Helminthosporium hispaniolae* Cif.) [J]. *Bouentino della stazione de patologia vegetale di Roma*, 1933, 13: 261-307.
- [15] Manuel K P, Mario A M. Reaction of cassava plants to brown leaf spot infection [J]. *Ann Trop Res*, 1988, 10(1): 1-8.
- [16] Paran I, Zamir D. Quantitative traits in plants: beyond the QTL [J]. *Trent Genet*, 2003, 19(6): 303-306.