

文章编号:1000-8551(2020)11-2386-11

玉米抗玉米蚜种质的鉴定与抗性位点的定位分析

宋 炜 李兴华 王江浩 张动敏 张全国 王立伟 魏剑锋 李荣改*

(河北省农林科学院粮油作物研究所/河北省作物遗传育种实验室, 河北 石家庄 050035)

摘要:玉米蚜是世界性的玉米害虫,利用玉米自身的抗性是控制玉米蚜虫危害的重要途径。为培育抗蚜新品种,提高玉米的抗性,首先需要鉴定筛选抗性种质,明确其抗性遗传模式,发掘抗性基因。本研究首先对新收集的国内外玉米种质资源进行抗玉米蚜鉴定,然后采用分离群体分组分析与高通量测序技术相结合的方法,对鉴定出的高抗蚜玉米自交系携带的抗性位点进行了定位分析。结果表明,在98份玉米种质资源中有5份表现高抗玉米蚜,其中高抗蚜自交系32t33的抗蚜性受多基因控制,表现数量遗传特征,测序分析在第3、第5染色体上获得了2个与抗蚜性状关联的区域,其大小分别为19.66和6.34 Mb,并在关联区域初步筛选出5个抗蚜候选基因。本研究结果丰富了玉米的抗蚜基因资源,为最终分离出抗性基因、明确抗蚜的遗传机制和培育抗蚜品种奠定了基础。

关键词:玉米;玉米蚜;种质资源;抗蚜性;基因定位

DOI:10.11869/j.issn.100-8551.2020.11.2386

玉米(*Zea mays* L., $2n=20$)是世界上主要的粮食作物之一。我国是世界第二大玉米生产大国,产量占世界总产量的20%,因此玉米生产在保障我国粮食安全和国民经济发展方面发挥着重要作用^[1];而且随着全球气候变暖,玉米作为一种适应性广、抗逆性强的粮食作物越来越受到重视^[2]。玉米蚜(*Rhopalosiphum maidis* Fitch)对玉米生产的危害是一个全球性问题^[3]。玉米蚜直接从植株体内吸食汁液对玉米造成危害,并且还作为病毒的载体传播,如玉米矮花叶病毒等多种病毒,引起病害,严重危害玉米生产^[4]。近年来,随着我国玉米生产由单一的籽粒生产向鲜食、粮饲兼用或青贮专用生产的方向发展,受种植密度增加及夏季天气干旱少雨等因素的影响,玉米蚜的发生更趋严重,严重年份可造成玉米减产50%^[2]。而且玉米蚜有着极高的繁殖率,单头蚜虫可在6个星期内生产5.9万个后代^[5],并能产生有翅迁移蚜,给化学防治带来困难。因此,选育抗蚜虫品种是防治虫害和保护生态环境最有效的方法;筛选抗蚜玉米新种质、对其抗蚜性进行遗传分析、定位和克隆抗性基因,对开展玉米抗蚜育种具有重要的理论和现实意义。

国外从上世纪20年代就已经开始了玉米对蚜虫的抗性研究,Gernert^[6]在1917年首次报道了利用一年生蜀黍(*Euchlaena mexicana*)与黄色马齿型玉米杂交,其杂种F₁从玉米的野生近缘种中获得了玉米蚜的抗性。我国开展玉米抗蚜研究起步晚,多集中于生产上不同玉米品种(系)的抗蚜鉴定,很少涉及对种质资源进行系统性的抗性鉴定和遗传研究^[7-8]。国内外研究显示,虽然鉴定出少数抗性种质资源,但在玉米中未发现对玉米蚜免疫的材料,且对少数抗性资源进行了遗传研究^[9-13]。对来自热带甜玉米自交系AA8sh2的抗蚜性遗传研究发现,其抗性是隐性的,连锁分析发现了2个抗性位点 aph 和 $aph2$,分别被定位在第10和第2染色体^[10, 14-16]。而对温带玉米抗蚜性遗传研究发现抗性受多个基因控制,加性效应大于非加性效应^[11, 17-19]。近年来,随着玉米基因组序列的获得和全基因组关联分析的应用,分别在玉米第1、第4、第5、第6、第7和第10染色体上发现了对玉米蚜的抗性位点,能够解释15%~27%的抗性表型变异^[4, 11, 20]。以上研究结果表明,玉米对玉米蚜的抗性遗传机制比较复杂,抗性遗传一般受多基因与环境共同控制。为了

收稿日期:2019-04-15 接受日期:2019-07-18

基金项目:河北省自然科学基金(C2016301089),河北省科技支撑项目(16226323D),国家玉米产业技术体系专项(CARS-02-58)

作者简介:宋炜,男,副研究员,主要从事玉米遗传育种研究。E-mail:sw1717@126.com

* 通讯作者:李荣改,女,研究员,主要从事玉米分子遗传育种研究。E-mail:lironggai@hotmail.com

挖掘玉米抗蚜基因和改良品种的抗性,本研究在筛选玉米抗蚜种质的基础上,对玉米抗蚜性状进行遗传分析,并采用分离群体分组分析法(bulk segregation analysis,BSA)与特异位点扩增片段测序(specific-locus amplified fragment sequencing,SLAF-seq)相结合的方法对抗性位点进行定位分析,以期对抗蚜基因的克隆和分子标记辅助育种奠定基础。

1 材料与方法

1.1 供试材料与田间试验设计

试验在河北省石家庄市藁城区河北省农林科学院粮油作物研究所堤上试验站进行。国内外收集的 98 份玉米种质资源(表 1)分别于 2014 年和 2015 年的 5 月 20 日、6 月 15 日分两期播种,进行两年共 4 个处理(环境)的田间抗蚜性鉴定。每份材料单行区种植,行长 5 m,行距 0.6 m,每穴双粒点播,每行播种 18 穴,出苗后每穴定苗留 1 株。生长期肥水管理同一般大田。

1.2 试验材料的抗蚜鉴定

每小区定点 5 株,分别在玉米生长发育的苗期、小喇叭口期、大喇叭口期、抽雄期,田间调查蚜虫数量 2 次,2 次间隔 3 d,从授粉期至收获,每间隔 5 d 调查 1 次;抽雄期以前每株调查心叶、展开叶叶片和叶鞘上的玉米蚜数量,抽雄期后调查叶片、叶鞘、雄穗、雌穗上的玉米蚜数量。计数精度视虫口密度而定,当每株虫量在 50 头以下逐头实数,50 头以上时,分别以 10 头或 20 头为单位目测估计。参考董怀玉等^[21]抗蚜性等级确定方法和蚜情指数进行抗蚜性鉴定和评价。

蚜情指数=某份玉米材料的平均蚜量/全部观测玉米材料的平均蚜量。即根据每份玉米材料上的蚜情指数,将其抗蚜性划分为免疫(immune,IMMU)、高抗(high resistance,HR)、抗(resistance,R)、感(sense,S)、中感(medium sense,MS)、高感(high sense,HS)6 级,其蚜情指数分别为 0、0~0.25、0.26~0.50、0.51~0.75、0.76~1.25 和大于 1.25。

1.3 F₂ 群体的抗蚜鉴定

2015 年夏天,以高抗蚜虫玉米自交系 32t33 为父本,高感蚜虫玉米自交系 335HX 为母本配制杂交组合,秋天收获的 F₁ 种子在 2015 年冬季种植于海南省三亚市河北省农林科学院粮油作物研究所试验站,自交获得 F₂ 种子。2016 年 6 月 15 日将收获的 762 粒 F₂ 遗传分离群体与双亲及 F₁ 一起,采取单粒播种的方法种植于堤上试验站玉米试验田进行抗蚜性鉴定。

在田间 F₂ 群体种植圃,对 762 个单株授粉后,采用田间蚜虫自然繁殖和人工接虫相结合的方法进行抗蚜性鉴定。在授粉后第 10 天开始根据上述蚜虫调查方法进行第一次调查后,在每株果穗以下第一片叶的叶腋处接虫约 10~20 头,接虫后 7 d 进行第二次蚜虫数量调查,继而进行第 2 次接虫,再过 7 d 进行第三次蚜虫数量调查,收获前进行最后一次调查。根据 4 次的结果计算 F₂ 群体各单株的蚜情指数。

1.4 DNA 提取和混池的构建

在苗期采集 335HX×32t33 杂交组合的双亲、F₁ 和 F₂ 群体单株的新鲜嫩叶,采用改良的 CTAB 法提取 DNA^[22],用 1% 琼脂糖凝胶,电压 120 V,电泳 50 min 检测 DNA 质量,并利用 NannoDrop 2000 分光光度计(Thermo Scientific,美国)测定 DNA 浓度。DNA 样品的 OD_{260/280} 值在 1.8~2.0 之间,浓度≥50 ng·μL⁻¹,总量≥2 μg,无降解的 DNA 用于混池的构建。

根据 F₂ 群体 762 个单株抗蚜鉴定结果,分别选取高抗蚜、高感蚜单株各 40 株的 DNA 等量混合,分别构建最终浓度为 30 ng·μL⁻¹ 的抗、感混池,与双亲的 DNA 样品一起用于特异位点扩增片段测序(SLAF-seq)。

1.5 SLAF 文库构建及高通量测序

以玉米基因组(ftp://ftp.ensemblgenomes.org/pub/plants/release-24/fasta/zea_mays/)为参考基因组进行电子酶切预测后,选用 Hae III 和 Hpy166III 双酶对双亲以及 2 个混池的基因组 DNA 样品进行酶切,酶切片段长度在 414~464 bp 的序列定义为 SLAF 标签,回收得到的酶切片段进行 3' 端加 A 处理、连接 Dual-index 测序接头^[23]、PCR 扩增、纯化、混样、切胶选取目的片段,文库质检合格后,利用 IlluminaHiSeqTM 2500 高通量测序平台进行测序。

1.6 SLAF 标签的开发和 SNP 检测

对 SLAF-seq 测序获得的序列进行比对并根据序列相似度进行聚类,获得在不同样品间序列有差异的多态性 SLAF 标签(这种序列多态性主要包括 SNP 和 Indel 标记),利用 BWA 软件^[24]将 SLAF 标签与玉米参考基因组比对,确定在基因组的位置。使用 GATK 软件工具包的局部重比对(local realignment)对 SLAF 标签中的 SNP 进行变异检测,从而获得多态性 SNP 标记。

1.7 BSA 关联分析

采用 ED(euclidean distance)算法^[25]计算与目的基因连锁的区域。利用两混池间差异 SNP 的频率的差异,计算两混池间 SNP 的 ED 值,ED 值越大表明该 SNP 在两混池间的差异越大。根据连锁的原理,真实

表 1 参试玉米种质资源来源及抗蚜性表现

Table 1 The origin of maize germplasm resources and their aphid-resistance evaluation

编号 No.	品种名称 Variety name	来源 Origins	抗性等级 Resistance grade	类群 Groups	抗性等级 Resistance grade	编号 No.	品种名称 Variety name	来源 Origins	类群 Groups	抗性等级 Resistance grade
1	PHJ70	(AC26/B73H) X9312121X	MS	SS	MS	50	IRF315	(PA91/LH98A)-6-420-64-2-1-3-4-1-1	NSS	S
2	PHC86	PH211/PH323	HS	SS	HS	51	IRF314	(PA91/LH98A)-6-420-64-2-1-3-1-1-1	NSS	S
3	PHC83	PH814/PH207	HS	NSS	HS	52	IRF313	Oh43Syn. ERGII-1-DH2-12904-152-4-1-1-1-1	NSS	MS
4	PHC72	PH369/PH207	MS	NSS	MS	53	IRF312	(LH98/VA22)GA-5-1349-134-2-1-3-1	NSS	HR
5	PHG71	PH369/PH207	HS	SS	HS	54	B123	BSKRL2	B	HR
6	PHG47	PH041×MKSJDTE	HS	NSS	HS	55	B116	B97×B99	B	S
7	PHC39	B37/PHBD5×B14/PHWK9	HS	SS	HS	56	B113	BS11(FR)C9	B	HS
8	PHC35	lodent line×PH595	MS	NSS	MS	57	B112	BSCB1(R)C11	B	HR
9	PHC29	(PH207×PH806)×PH207	S	NSS	S	58	B111	BSSS(R)C9	A	S
10	MDF-13D	H4101(OH43×C103)×800M	MS	NSS	MS	59	B110	BS13(S)C5	A	MS
11	LH85	Pioneer 3978	R	未知	R	60	B109	Recovered B73	A	MS
12	LH82	610×LH7	R	NSS	R	61	B108	Pool 41	C	HS
13	LH74	A632×B73	S	SS	S	62	B107	Pool 41	C	MS
14	LH61	[(Mo17×ASA) Mo17(2)]	S	NSS	S	63	B98	BS11(FR)C5-2803	B	MS
15	LH52	Mo17(3)×610 (W153R type)	S	NSS	S	64	B97	BSCB1(R)C9-2	B	MS
16	LH51	Lancaster× Mo17 backcross 5	MS	NSS	MS	65	B89	BSSS(R)C7	A	S
17	LH39	Oh43×L120	S	NSS	S	66	B91	BSCB1(R)C8	B	S
18	LH38	A619×L120	MS	NSS	MS	67	SPop1	未知	未知	S
19	LH146Ht	[(B73×CM105) CM105]	S	SS	S	68	SPop2	未知	未知	S
20	LH143	A632 NRC	S	SS	S	69	SPop3	未知	未知	S
21	LH132	B73(2)×H93	HS	SS	HS	70	SPop4	未知	未知	S
22	LH119	B73(2)×H93	MS	SS	MS	71	SPop5	未知	未知	S
23	LH123HT	Pioneer 3535	MS	NSS	MS	72	SPop6	未知	未知	S
24	HBA1	PH Hybrids 3195×3199	MS	未知	MS	73	SPop7	未知	未知	S

注:SS; 茎秆种群; NSS; 非茎秆种群。

Note: SS; Stiff stalk (SS) heterotic pattern. NSS; Non-stiff stalk (NSS) heterotic pattern.

表 1 (续)

编号 No.	品种名称 Variety name	来源 Origins	抗性等级 Resistance grade	类群 Groups	抗性等级 Resistance grade	编号 No.	品种名称 Variety name	来源 Origins	类群 Groups	抗性等级 Resistance grade
25	HCL645	NL9607/BE8066	HS	SS	HS	74	SPop8	未知	未知	HS
26	D1798Z	MNL947/ML6Q01-1//MNL232	MS	NSS	MS	75	SPop9	未知	未知	S
27	G80	Funks	MS	未知	MS	76	SPop10	未知	未知	MS
28	DJ7	(B73×BS16)/B73 BC3	MS	SS	MS	77	SPop11	未知	未知	S
29	78 002A	B73×A634(Mi42×B14 BC3)	MS	SS	MS	78	SPop12	未知	未知	S
30	78010	B73×A634(Mi42×B14 BC3)	MS	SS	MS	79	SPop13	未知	未知	MS
31	5707	C123Hi×Va59	MS	NSS	MS	80	SPop14	未知	未知	R
32	807	W117×B37 Ht	HS	SS	HS	81	SPop15	未知	未知	S
33	LH1	[(B37×644) B37]	HS	SS	HS	82	SPop16	未知	未知	MS
34	794	235×B73	R	SS	R	83	SPop17	未知	未知	MS
35	792	未知	MS	未知	MS	84	SPop18	未知	未知	MS
36	778	W117×B37 Ht	MS	SS	MS	85	SPop19	未知	未知	MS
37	764	235×B73	R	SS	R	86	SPop20	未知	未知	MS
38	PH207	G3BD2×C3RZ1	R	NSS	R	87	SPop21	未知	未知	MS
39	IRF252	LH7 × LH38	HS	NSS	HS	88	SPop22	未知	未知	MS
40	LH104	A619 × L120	HS	NSS	HS	89	SPop23	未知	未知	MS
41	LH39	Oh43 × L120	MS	NSS	MS	90	SPop24	未知	未知	MS
42	LH38	A619 × L120	MS	NSS	MS	91	SPop25	未知	未知	S
43	IRF321	Oh43Syn. ERGII-1-DH2-12904-136-1-1-1-1	MS	NSS	MS	92	PH6WC	PH01N×PH09B	SS	MS
44	IRF320	H40(VA22) D4-4-2928-86-1-1-2-1	MS	未知	MS	93	PH4CV	PH7V0×PHBE2	NSS	S
45	LH39	Oh43 × L120	MS	NSS	MS	94	郑 58	掖 478 变异株	SS	MS
46	IRF319	(PA91/LH98) GA-6-420-64-2-1-1-5-2	HS	NSS	HS	95	昌 72	黄早四×潍 95	NSS	S
47	IRF318	(PA91/LH98A)-6-420-64-2-1-3-3-1-1	HS	NSS	HS	96	32133	32124 杂交种	NSS	HR
48	IRF317	(PA91/LH98A)-6-420-64-2-1-1-2-2-1	S	NSS	S	97	DM3/335F	DM3/PH4CV	SS	HR
49	IRF316	(PA91/LH98A)-6-420-64-2-1-1-5-1-1	MS	NSS	MS	98	335HX	PH6WC 变异株	SS	HS

的关联区域附近的 SNP 位点会倾向于在两混池间表现出差异,因此目标区域内的 ED 值越大。根据 ED 值作图,在目标性状关联区域的附近会出现较明显的峰。为消除背景噪音,对每个位点原始 ED 值进行 2 次方

$$ED = \sqrt{(A_{mut} - A_{wt})^2 + (C_{mut} - C_{wt})^2} + \sqrt{(GT_{mut} - G_{wt})^2 + (T_{mut} - T_{wt})^2}$$

式中, A_{mut} 表示在 SNP 位点上 A 碱基在隐性(抗蚜)混池中的深度; A_{wt} 表示 A 碱基在显性(感蚜)混池中的深度。依次类推。

2 结果与分析

2.1 玉米不同发育时期玉米蚜种群的数量动态

由图 1 可知,玉米蚜种群数量在抽雄期前极少,之后随着大量有翅蚜的迁入并大量繁殖,使得成熟期单株蚜虫量平均达到 1 200 头以上,表明玉米蚜的发生盛期出现在玉米抽雄期至成熟期。因此,应在玉米抽雄后对其进行抗蚜性鉴定和筛选。

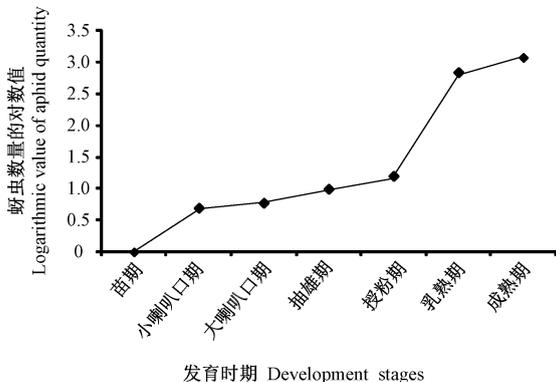


图 1 蚜虫种群在玉米不同发育时期的数量动态

Fig.1 Dynamics of aphid population at different maize developmental stages

2.2 不同玉米种质对玉米蚜抗性水平的影响

根据蚜情指数对 98 份参试玉米种质资源进行抗蚜性鉴定和评价。比较每份参试玉米种质资源在 2 个不同播期玉米蚜的种群数量发现,5 月中旬播种(春播)的所有玉米种质资源材料在整个发育时期玉米蚜数量均明显低于 6 月播种(夏播)的玉米蚜数量(数据未列出)。每份材料单株的玉米蚜虫数量和蚜情指数分析结果显示,没有对玉米蚜表现免疫的种质资源;5 份表现为高抗,分别是 IRF312、B123、B112、32t33 和 DM3/335F;包括 335HX 在内的 17 份表现高感(表 1、表 2)。从参试种质资源的总体表现看,88.78%的玉米种质资源表现感玉米蚜,表明现有的玉米种质资源中缺乏玉米蚜的抗源,尤其缺少对蚜虫侵染表现免疫的材料。

处理,然后对每个位点进行 SNPNUM 拟合,取所有位点拟合值的中位数与 3 倍的标准差之和 ($median + 3SD$) 作为分析的关联阈值,根据关联阈值确定最终关联区域。公式如下:

表 2 98 份玉米种质资源的抗蚜性鉴定结果

Table 2 Aphid-resistance evaluation of ninety-eight maize germplasm resources

抗性等级 Resistant grades	蚜情指数 Aphid index	品种数 Variety numbers	品种占比 Percentage of varieties/%
免疫 IMMU	0	0	0
高抗 HR	0~0.25	5	5.10
抗 R	0.26~0.50	6	6.12
感 S	0.51~0.75	28	28.57
中感 MS	0.76~1.25	42	42.86
高感 HS	>1.25	17	17.35

2.3 32t33 自交系的抗蚜性遗传

为了明确筛选出的高抗玉米蚜 32t33 自交系的抗蚜遗传特性,利用其与高感蚜自交系 335HX 配制杂交组合,对组合的双亲及其杂交后代 F_1 、 F_2 群体单株的蚜虫群口数量和抗蚜等级进行统计分析(图 2、图 3)。结果显示,杂交种 F_1 和感蚜亲本的蚜情指数分别为 0.908、0.904,在感蚜表现上一致, F_2 群体表现抗、感蚜分离且呈正态分布,表明 32t33 自交系的抗蚜性遗传为隐性且表现数量性状特征。

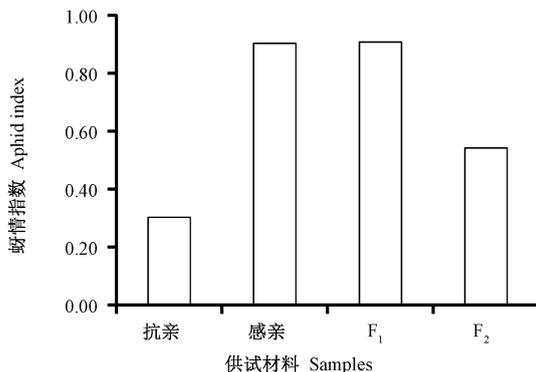


图 2 供试材料的蚜情指数

Fig.2 Aphid index of plant materials

2.4 SLAF 标签开发及其在玉米染色体上的分布

对利用玉米 32t33 与 335HX 杂交后代 F_2 群体单株构建的抗、感蚜 2 个混池的 DNA 和双亲的 DNA 样品,经 $Hae\text{ III} + Hpy166\text{ III}$ 双酶切所产生的 414~464 bp 片段进行测序。利用 BWA 软件将测序结果与玉米参

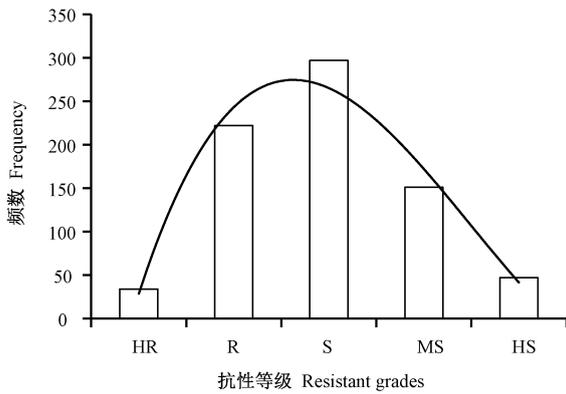


图 3 F_2 群体抗蚜等级频数分布图

Fig.3 Frequency distribution of aphid resistance in the F_2 population

考基因组比对,发现 4 个样品的序列与参考基因组序列重叠率在 98.84% 以上,表明测序结果能真实反映双亲及 2 个混池基因组信息,共获得 364 147 个 SLAF 标签,抗蚜混池平均测序深度为 70.45 \times ,感蚜混池平均测序深度为 65.68 \times ,两混池平均测序深度为 68.07 \times ,总测序深度为 136.13 \times (表 3)。由表 4 可知,有 357 778 个 SLAF 标签定位到玉米染色体上,开发的标记有效率为 98.25%。在每条染色体上的标记数量在 23 870~52 668 之间,开发的 SLAF 标签在不同染色体上均匀分布,覆盖了整个基因组(图 4),可以用于进一步分子标记的开发。

表 3 抗、感蚜混池开发的 SLAF 标记统计表

Table 3 The statistics of developed SLAF markers for resistant and susceptible bulks

样品编号 Sample ID	SLAF 标签数目 SLAF number	总测序深度 Total sequencing depth	平均测序深度(\times) Average sequencing depth (\times)
抗蚜混池 Resistant bulk	363 831	25 631 420	70.45
感蚜混池 Susceptible bulk	362 033	23 844 918	65.68

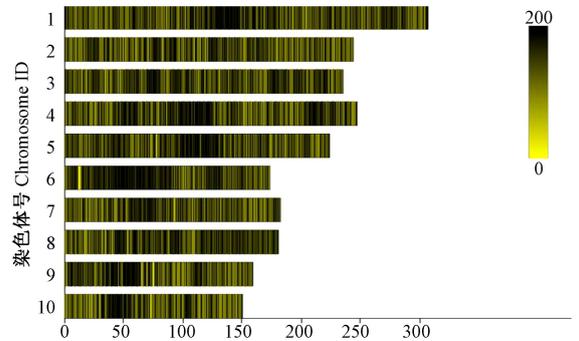
2.5 多态性 SNP 标记分析

根据定位到染色体上的多态性 SLAF 标签序列信息,利用 GATK 软件的序列局部重比对功能对 SLAF 标签中存在的序列变异的 SNP 进行检测,一共检测到 11 052 576 个 SNP 标记(表 5)。滤掉可信度低的标记后,最终得到高质量的可靠 SNP 位点 46 553 个。这些 SNP 在父本 32i33、母本 335HX、抗蚜混池、感蚜混池样本中的杂合度分别为 28.81%、24.42%、81.62% 和

表 4 SLAF 标记在每条染色体分布统计表

Table 4 The distribution of SLAF markers on each chromosome

染色体号 Chromosome ID	SLAF 数目 SLAF number
1	52 668
2	39 064
3	40 320
4	42 730
5	38 711
6	32 037
7	29 774
8	31 719
9	26 885
10	23 870
其他 Others	6 369
总和 Total	364 147



注:横坐标为染色体物理长度(Mb),每一个黄色条带代表一条染色体,色条代表 SLAF 密度;颜色的深浅表示 SLAF 标记在这些区域的数量。

Note: The x-axis indicates the physical position in megabases (Mb). Each yellow band represents a chromosome. The color bar shows the SLAF density. Dark and light colors denote the SLAF marker numbers at these loci.

图 4 SLAF 标记在每条玉米染色体上的分布

Fig.4 The distribution of SLAF markers on each maize chromosome

75.61%,两混池的杂合度高于双亲,杂合度的分布符合亲本及混池的特征,表明开发的 SNP 标记可用于进一步的关联分析。

2.6 抗蚜性候选区域的筛选

利用获得的 46 553 个可信多态性 SNP 位点,计算每个 SNP 位点的 ED 值,并对 ED 值进行拟合得到关联值分布(图 5)。以所有位点拟合值的中位数与 3 倍标准差之和(0.12)为阈值进行关联分析,将抗蚜性关联到 2 个区段,分别位于第 3、第 5 染色体上

(图 5)。位于第 3 染色体的区域在 70 453 782 ~ 108 289 839 bp 之间的 19.66 Mb 范围内,第 5 染色

体的区域在 177 885 175 ~ 184 229 926 bp 之间 6.34 Mb 范围内(表 6)。

表 5 样品中检测到的 SNP 统计表

Table 5 The statistics of detected SNPs in the used samples

样品名称 Sample name	检测到的 SNP 总数 Total detected SNP number	样品中检测到的 SNP 数目 Detected SNP number in each sample	样品中 SNP 的杂合率 Heter SNP ratio/%
32i33	9 135 238	5 783 811	28.81
335HX	9 135 238	7 042 418	24.42
抗蚜混池 Resistant bulk	1 917 338	1 564 982	81.62
感蚜混池 Susceptible bulk	1 917 338	1 449 850	75.61

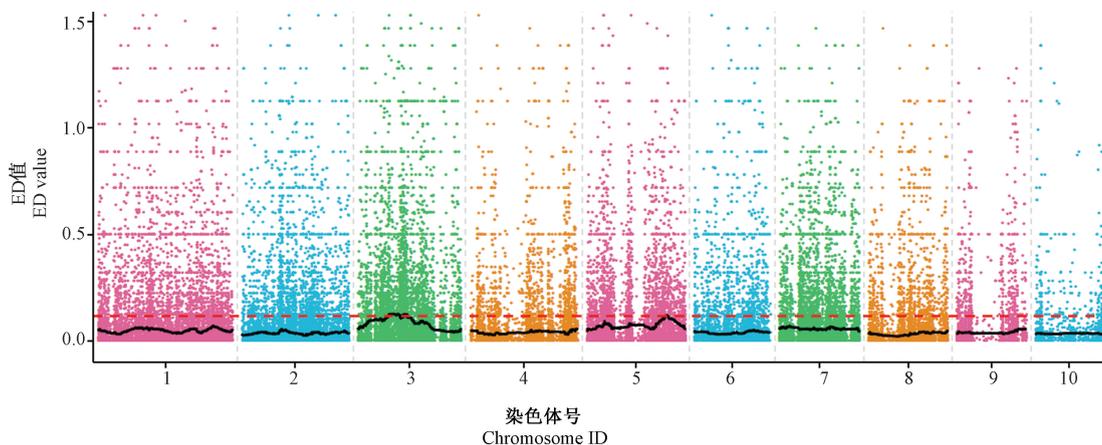


图 5 混池 ED 关联分析结果图

Fig.5 The results from bulk ED association analysis

2.7 抗蚜候选基因的筛选

针对关联区域内的基因,分析其外显子区域在 2 个亲本之间差异的 SNP 信息,对 SNP 进行变异的注释,共发现存在非同义突变的 SNP 有 85 个,对应到 43 个基因上,这些基因可能是与抗蚜性状直接相关的功能基因。将存在非同义突变的基因分别与 NR、Swiss-Prot、GO、KEGG、COG 等数据库比对进行深度注释,并结合与模式植物拟南芥中同源基因的功能注释,进一步筛选与植物免疫、抗性有关的基因,缩小候选基因的范围。根据抗性基因编码的抗性蛋白具有的保守区域序列,在关联区域发现 3 个具有抗性蛋白结构域的基因,分别是 *Zm00001d041215*、*Zm00001d041298*、*Zm00001d016953*(表 7)。前 2 个基因位于第 3 染色体,编码具有 LRR-RLK(leucine rich repeat receptor-like kinases)功能域的激酶,后 1 个基因位于第 5 染色体关联区域,编码典型的受体蛋白,其含有 NB-ARC 结构域(nucleotide-binding adaptor shared by APAF-1, certain R gene products and CED-4)。除 3 个抗性基因外,还

发现 2 个位于第 3 染色体关联区域的基因 *Zm00001d041220* 和 *Zm00001d040936*,其同源基因在拟南芥中具有防御病害、逆境的功能^[26-27]。在关联区域内的 5 个与免疫、抗性相关的基因可作为抗蚜候选基因做进一步研究。

3 讨论

研究玉米蚜在玉米整个生育期的发生规律是蚜虫综合防治的基础,对玉米生产上选择适宜的防治时期具有指导意义。本研究结果表明,玉米蚜在不同玉米品种上发生高峰表现比较一致,均在玉米抽雄后的灌浆期,也是蚜虫对玉米危害最严重的时期(图 1)。这与以往一些研究结果一致,玉米蚜繁殖高峰期也正是玉米产生和积累营养的最佳时期^[8-9, 28]。玉米蚜的繁殖同时还受环境因素的影响,如光照、温度、湿度等,既可以直接影响玉米的抗性,又可以通过影响蚜虫繁殖间接影响玉米的抗性^[7]。因此,在田间应选择

表 6 关联区域信息统计表

Table 6 The statistic of associated regions

染色体号 Chromosome ID	开始位置 Start/bp	结束位置 End/bp	区间大小 Size/Mb
5	177 885 175	184 229 926	6.34
小计 Total			6.34
3	70 453 782	70 572 823	0.12
3	70 578 767	70 633 452	0.05
3	70 767 630	84 634 961	13.87
3	89 762 963	93 280 008	3.52
3	93 284 846	93 316 789	0.03
3	104 685 424	104 699 900	0.01
3	104 788 465	106 354 815	1.57
3	106 541 357	106 583 102	0.04
3	106 621 345	106 623 109	0.00
3	107 251 386	107 268 328	0.02
3	107 381 020	107 561 550	0.18
3	107 870 860	108 052 217	0.18
3	108 052 546	108 072 926	0.02
3	108 136 700	108 188 914	0.05
3	108 189 526	108 189 582	0.00
3	108 289 532	108 289 839	0.00
小计 Total			19.66

灌浆期对玉米品种进行抗蚜鉴定和评价,确保鉴定结果的准确性。

玉米为异花授粉作物,遗传多样性丰富,对蚜虫的抗性也表现出很大的差异^[29-30]。本研究在 2 年 2 个播期共 4 个不同环境下对近百份玉米种质资源的抗蚜性状进行鉴定,未发现对蚜虫免疫的材料,仅筛选出包括 32t33 在内的 5 份高抗蚜材料(表 2)。这与其他国内外研究者认为已应用的玉米种质资源缺乏抗玉米蚜的玉米种质,抗蚜遗传基础狭窄的观点一致^[8-9]。少数表现高抗蚜的玉米种质资源,如 Minnesota 13、Oh43、Oh45、L317、Mo17、A632、Ky21、Mo18w 等,也是非常重要的遗传育种基础材料^[9, 12]。本研究鉴定筛选出的抗蚜性种质材料丰富了抗蚜遗传育种资源,特别是玉米自交系 32t33 不仅对玉米蚜表现高抗,还表现出很高的一般配合力,是一个非常优良的亲本,已利用其配出多个强优势杂交组合参加玉米区域试验。

SLAF-seq 技术是利用高通量测序发展而来的一套简化基因组测序技术。与 BSA 分析相结合,在分子标记开发上具有通量高、准确性高的优势,近年来在水稻、小麦、大豆等作物中已得到广泛应用^[31-33]。但是,在玉米中的应用比较晚。杜龙岗等^[34]、吴向远^[35]利用此方法分别对玉米果皮纤维素含量、玉米早衰性状进行了分析,获得了与两性

表 7 关联区段的候选基因

Table 7 The identification of candidate genes in associated regions

拟南芥基因 <i>Arabidopsis</i> gene	玉米基因 Maize gene	染色体位置 Chromosome position/bp	基因注释 Gene annotation
AT5G62710	Zm00001d041215	3:105 825 613~105 830 802	富含亮氨酸重复序列类受体蛋白激酶基因家族蛋白 Leucine-rich repeat receptor-like protein kinase family protein
AT4G36830	Zm00001d041220	3:106 078 570~106 079 511	GNS1/SUR4 膜蛋白 GNS1/SUR4 membrane protein
AT5G45190	Zm00001d040936	3:80 811 933~80 814 817	Cyclin-T1-2
	Zm00001d041298	3:110 788 361~110 796 970	LRR 类受体丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶 LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase
	Zm00001d016953	5:181 069 679~181 070 242	NBS-ARC 结构域,抗病蛋白 NBS-ARC domain, disease resistance protein

状相关联的基因组区域,进一步证实了此方法用于基因定位的可行性。本研究采用此方法对来自玉米自交系 32t33 的抗蚜性进行分析,获得了 11 052 576 个 SNP 位点(表 5),并将 2 个与抗蚜性关联的区域分别定位在第 3、第 5 染色体上。尽管前人分别利用抗蚜的 Mo17、Ky21 与不同的感蚜品种构建的纯系(RIL、NILs)在第 1、第 4、第 5、第 6、第 7、第 10 染色体上定位

了一些与玉米抗蚜性相关的位点(QTLs)^[11-12],但本研究定位的抗性位点与其位置不同,本研究发现的新位点丰富了玉米抗蚜遗传的基础,新开发的 SNP 标记可用于进一步基因精细定位和分子标记辅助育种。

本研究在 2 个与抗蚜性关联的染色体区域,筛选出 5 个与植物免疫、抗性有关的基因(表 7)^[36-37]。3 个为编码核苷酸结合结构域(nucleotide binding site,

NBS)和富亮氨酸重复序列保守结构域(leucine-rich repeat conserved domain, LRR)的受体蛋白(nucleotide-binding adaptor shared by APAF-1, R proteins and CED-4, NB-ARC)或激酶(leucine rich repeat receptor-like kinases, LRR-RLK)基因,这2种基因在植物的防御系统中起着非常重要的作用^[36-38]。虽然鲜见玉米抗性蛋白和激酶的基因对玉米蚜具有抗性的报道,但在番茄、甜瓜上分别克隆的 *Mi-1*、*Vat* 基因属于 *R* 基因具有抗蚜功能^[39-41]。此外,还有多个与抗蚜相关的位点也已被定位在 NBS-LRR 簇序列区域内^[42-44]。Song 等^[45]在玉米全基因组中鉴定出 151 个具有 NBS-LRR 结构的基因和 226 个含有 LRR-RLK 结构的基因,这对在抗蚜关联区域筛选候选基因具有指导意义。除 3 个 *R* 基因外,还鉴定出 2 个与在拟南芥上参与植物免疫、抗逆性有关基因的同源基因(表 7)。但这些候选基因对蚜虫危害的应答反应有待进一步研究。

4 结论

通过对从国内外收集的玉米种质资源的抗玉米蚜鉴定,筛选出高抗的玉米自交系 32t33,其抗蚜性由隐性基因控制且表现数量性状特征,采用 SLAF 测序技术与 BSA 分析相结合的方法开发出 11 052 576 个 SNP 标记,获得了 2 个与抗蚜性关联的区域,并确定了 5 个候选基因。本研究结果丰富了玉米的抗蚜基因资源,开发的分子标记可用于后续的基因精细定位,为最终分离出抗性基因,明确玉米的抗蚜的遗传机制和应用用于玉米抗蚜品种选育奠定了基础。

参考文献:

- [1] 石耀辉,周广胜,王秋玲,麻雪艳,冯晓钰.夏玉米对土壤水分持续减少的响应及其转折点阈值分析[J].生态学报,2018,38(8):2896-2905
- [2] 武德功,方文浩,杜军利,余海兵,王长进,李金鹏,储丽娜,汤丽.不同蚜虫密度胁迫对抗感玉米幼苗生理物质的影响[J].浙江农业学报,2018,30(4):528-536
- [3] Butron A, Samayoa L F, Santiago R, Ordás B, Malvar R A. Genomics of Insect Resistance [M]. Switzerland: Springer Nature Switzerland Press, 2018: 163-183
- [4] Tzin V, Fernandez-Pozo N, Richter A, Schmelz E A, Schoettner M, Schäfer M, Ahern K R, Meihls L N, Kaur H, Huffaker A. Dynamic maize responses to aphid feeding are revealed by a time series of transcriptomic and metabolomic assays [J]. Plant Physiology, 2015, 169(3): 1727-1743
- [5] Stadler B, Dixon A F. Ecology and evolution of aphid-ant interactions [J]. Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics, 2005, 36: 345-372
- [6] Gemert W B. Aphis immunity of teosinte-corn hybrids [J]. Science, 1917, 46(1190): 390-392
- [7] 徐雪,吕晓坤,何力,孙跃先,陈国华,李强.玉米不同品种对玉米蚜的抗性鉴定[J].云南农业大学学报,2013,28(4):307-312
- [8] 李远,赵曼,郭线茹,席章营,罗梅浩,闫凤鸣.不同玉米品种(系)田间抗蚜性的初步鉴定[J].河南农业大学学报,2012,46(3):598-601
- [9] Carena M, Glogoza P. Resistance of maize to the corn leaf aphid: A review [J]. Maydica, 2004, 49(4): 241-254
- [10] So Y S, Ji H C, Brewbaker J L. Resistance to corn leaf aphid (*Rhopalosiphum maidis* Fitch) in tropical corn (*Zea mays* L.) [J]. Euphytica, 2010, 172(3): 373-381
- [11] Betsiashvili M, Ahern K R, Jander G. Additive effects of two quantitative trait loci that confer *Rhopalosiphum maidis* (corn leaf aphid) resistance in maize inbred line Mo17 [J]. Journal of Experimental Botany, 2014, 66(2): 571-578
- [12] Tzin V, Lindsay P L, Christensen S A, Meihls L N, Blue L B, Jander G. Genetic mapping shows intraspecific variation and transgressive segregation for caterpillar-induced aphid resistance in maize [J]. Molecular Ecology, 2015, 24(22): 5739-5750
- [13] Song J, Hui L, Zhuang H F, Zhao C X, Xu Y X, Wu S B, Qi J F, Li J, Hettenhausen C, Wu J Q. Transcriptomics and alternative splicing analyses reveal large differences between maize lines B73 and Mo17 in response to aphid *Rhopalosiphum padi* infestation [J]. Frontiers in Plant Science, 2017, 8: 1738
- [14] Chang S H, Brewbaker J. The genetics of resistance to the corn leaf aphid, *Rhopalosiphum maidis* (Fitch). [J]. Maize Genetics Cooperation Newsletter, 1974, 48: 37-38
- [15] Lu X, Brewbaker J. Genetics of resistance in maize to the corn leaf aphid (Homoptera: Aphididae) [J]. Maize Genetics Cooperation Newsletter, 1999, 73: 36-37
- [16] So Y S. Corn Leaf Aphid and Polysora Rust Resistance in Tropical Maize [D]. Manoa: University of Hawaii at Manoa, 2003
- [17] Bing J W, Guthrie W D. Generation mean analysis for resistance in maize to the corn leaf aphid (Homoptera: Aphididae) [J]. Journal of Economic Entomology, 1991, 84(3): 1080-1082
- [18] Chang S H. The Genetics of Resistance to the Corn Leaf Aphid, *Rhopalosiphum maidis* (Fitch), in Corn [D]. Manoa: University of Hawaii at Manoa, 1976
- [19] Bing J W, Guthrie W D, Dicke F F. Genetics of resistance in maize to the corn leaf aphid (Homoptera: Aphididae) [J]. Journal of Economic Entomology, 1992, 85(4): 1476-1479
- [20] Yan J, Lipka A E, Schmelz E A, Buckler E S, Jander G. Accumulation of 5-hydroxynorvaline in maize (*Zea mays*) leaves is induced by insect feeding and abiotic stress [J]. Journal of Experimental Botany, 2015, 66(2): 593-602
- [21] 董怀玉,徐秀德,刘彦军,孙娜.高粱种质资源抗高粱蚜鉴定与评价研究[J].杂粮作物,2000,20(2):43-45
- [22] 刘东军,张宏纪,张举梅,孙德全,孙岩,马延华,郭怡璠,刘文林,杨淑萍,闫文义.91份俄罗斯玉米自交系的遗传多样性

- 分析 [J]. 核农学报, 2016, 30(11): 2112-2118
- [23] Kozich J J, Westcott S L, Baxter N T, Highlander S K, Schloss P D. Development of a dual-index sequencing strategy and curation pipeline for analyzing amplicon sequence data on the MiSeq Illumina sequencing platform [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2013, 79(17): 5112-5120
- [24] Li H, Durbin R. Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform [J]. Bioinformatics, 2009, 25(14): 1754-1760
- [25] Hill J T, Demarest B L, Bisgrove B W, Gorski B, Su Y C, Yost H J. MMAPP: Mutation mapping analysis pipeline for pooled RNA-seq [J]. Genome Research, 2013, 23(4): 687-697
- [26] Quist T M, Sokolchik I, Shi H, Joly R J, Bressan R A, Maggio A, Narsimhan M, Li X. HOS₃, an ELO-like gene, inhibits effects of ABA and implicates a S-1-P/ceramide control system for abiotic stress responses in *Arabidopsis thaliana* [J]. Molecular Plant, 2009, 2(1): 138-151
- [27] Cui X F, Fan B F, Scholz J E, Chen Z X. Roles of Arabidopsis cyclin-dependent kinase C complexes in cauliflower mosaic virus infection, plant growth, and development [J]. Plant Cell, 2007, 19(4): 1388-1402
- [28] 王永宏, 作均祥, 苏丽. 玉米蚜的发生动态研究 [J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2003, 31(S1): 25-28
- [29] McMullen M D, Frey M, Degenhardt J. Genetics and Biochemistry of Insect Resistance in Maize, Handbook of Maize: Its Biology [M]. New York: Springer Press, 2009: 271-289
- [30] Meihls L, Kaur H, Jander G. Natural Variation in Maize Defense Against Insect Herbivores. In Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology [M]. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2012, 77: 269-283
- [31] Hu M J, Zhang H P, Liu K, Cao J J, Wang S X, Jiang H, Wu Z Y, Lu J, Zhu X F, Xia X C. Cloning and characterization of *TaTGW-7A* gene associated with grain weight in wheat via SLAF-seq-BSA [J]. Frontiers in Plant Science, 2016, 7: 1902
- [32] Zheng W J, Wang Y, Wang L L, Ma Z B, Zhao J M, Wang P, Zhang L X, Liu Z H, Lu X C. Genetic mapping and molecular marker development for *Pi65 (t)*, a novel broad-spectrum resistance gene to rice blast using next-generation sequencing [J]. Theoretical and Applied Genetics, 2016, 129(5): 1035-1044
- [33] Zhang D, Li H Y, Wang J S, Zhang H Y, Hu Z B, Chu S S, Lv H Y, Yu D Y. High-density genetic mapping identifies new major loci for tolerance to low-phosphorus stress in soybean [J]. Frontiers in Plant Science, 2016, 7: 372
- [34] 杜龙岗, 王美兴. 玉米 SLAF 标记的开发及其在玉米果皮纤维素含量 BSA 分析中的应用 [J]. 中国农业科学, 2018, 51(8): 6-15
- [35] 吴向远. 玉米叶片衰老的转录组及 miRNA 调控机制解析 [D]. 郑州: 河南农业大学, 2016
- [36] Li Q, Xie Q G, Smithbecker J, Navarre D A, Kaloshian I. *Mi-1*-mediated aphid resistance involves salicylic acid and mitogen-activated protein kinase signaling cascades [J]. Molecular Plant-Microbe Interactions, 2006, 19(6): 655-664
- [37] Gao L, Anderson J P, Klingler J P, Nair R M, Edwards O R, Singh K B. Involvement of the octadecanoid pathway in bluegreen aphid resistance in *Medicago truncatula* [J]. Molecular Plant-Microbe Interactions, 2007, 20(1): 82-93
- [38] Urbach J M, Ausubel F M. The NBS-LRR architectures of plant R-proteins and metazoan NLRs evolved in independent events [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2017, 114(5): 1063
- [39] Milligan S B, Bodeau J, Yaghoobi J, Kaloshian I, Zabel P, Williamson V M. The root knot nematode resistance gene *Mi* from tomato is a member of the leucine zipper, nucleotide binding, leucine-rich repeat family of plant genes [J]. Plant Cell, 1998, 10(8): 1307-1319
- [40] Rossi M, Goggin F L, Milligan S B, Kaloshian I, Ullman D E, Williamson V M. The nematode resistance gene *Mi* of tomato confers resistance against the potato aphid [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1998, 95(17): 9750-9754
- [41] Pauquet J, Burget E, Hagen L, Chovelon V, Menn A L, Valot N, Desloire S, Caboche M, Rousselle P, Pitrat M. Map-based cloning of the *Vat* gene from melon conferring resistance to both aphid colonization and aphid transmission of several viruses [C]//Meeting on Progress in Cucurbit Genetics & Breeding Research Cucurbitaceae. Olomouc: Palacky University Press, 2004: 325-329
- [42] Klingler J, Creasy R, Gao L, Nair R M, Calix A S, Jacob H S, Edwards O R, Singh K B. Aphid resistance in *Medicago truncatula* involves antixenosis and phloem-specific, inducible antibiosis, and maps to a single locus flanked by NBS-LRR resistance gene analogs [J]. Plant Physiology, 2005, 137(4): 1445-1455
- [43] Wroblewski T, Piskurewicz U, Tomczak A, Ochoa O, Michelmore R W. Silencing of the major family of NBS-LRR-encoding genes in lettuce results in the loss of multiple resistance specificities [J]. The Plant Journal, 2007, 51(5): 803-818
- [44] Kim K S, Hill C B, Hartman G L, Hyten D L, Hudson M E, Diers B W. Fine mapping of the soybean aphid-resistance gene *Rag2* in soybean PI 200538 [J]. Theoretical and Applied Genetics, 2010, 121(3): 599-610
- [45] Song W, Wang B Q, Li X H, Wei J F, Chen L, Zhang D M, Zhang W Y, Li R G. Identification of immune related LRR-containing genes in maize (*Zea mays* L.) by genome-wide sequence analysis [J]. International Journal of Genomics, 2015, 2015: 231358

Identification of Corn Leaf Aphid (*Rhopalosiphum maidis* Fitch) Resistance Germplasms and Mapping of Resistance Loci in Maize

SONG Wei LI Xinghua WANG Jianghao ZHANG Dongmin ZHANG Quanguo
WANG Liwei WEI Jiangfeng LI Ronggai*

(Institute of Cereal and Oil Crops, Hebei Academy of Agriculture and Forestry Sciences/Key Laboratory of Crop Genetics and Breeding of Hebei Province, Shijiazhuang, Hebei 050035)

Abstract: Corn leaf aphid (*Rhopalosiphum maidis* Fitch) is one of the most predominant insect pests in maize fields and causes significant loss of the crop worldwide. The use of insect-resistant germplasms is a very effective and economical way to control this insect pest. In order to develop resistant hybrids for aphid control, it is necessary to identify and screen resistant germplasms, determine genetic pattern of resistance, and explore resistant genes. In the present study, newly collected maize germplasms for corn leaf aphid resistance have been evaluated; the aphid-resistance loci from maize inbred line 32t33 have been identified by employing a combination of bulked segregant analysis and high-throughput sequencing technology. The results showed that 5 out of 98 maize germplasms were highly resistant to corn leaf aphid. The resistance from the inbred line 32t33 is subject to polygenic control and exhibited quantitative genetic characteristics. Two genomic regions on chromosomes 3 and 5 were identified to be associated with corn leaf aphid resistance, with sizes of 19.66 Mb and 6.34 Mb, respectively. Furtherly, five candidate genes associated with the aphid resistance have been initially predicted. The results of this study could help to enrich aphid-resistance maize resources, better understand the maize aphid-resistance mechanism and develop new hybrids with corn leaf aphid resistance.

Keywords: *Zea mays*, corn leaf aphid, germplasm resources, corn leaf aphid resistance, gene mapping