

玉米种质资源抗两种镰孢穗腐病的大规模鉴定

韩宇琛¹, 韦翊君¹, 张震¹, 王天宇², 番兴明³, 苏爱国⁴, 吴建宇¹, 陈甲法¹

(¹河南农业大学生命科学学院, 郑州 450002; ²中国农业科学院作物科学研究所, 北京 100081; ³云南省农业科学院粮食作物研究所, 昆明 650221; ⁴北京市农林科学院玉米研究中心, 北京 100097)

摘要: 玉米穗腐病是一种主要由拟轮枝镰孢和禾谷镰孢引起的真菌性病害, 严重威胁国家粮食安全。随着气候和耕作制度的变化, 穗腐病已成为玉米生产上发生最普遍、危害最重的病害之一, 大规模的抗病种质资源鉴定有利于解决因优良抗病种质资源缺乏而导致的抗病品种培育困难的问题。本研究在建立了玉米穗腐病高通量抗性鉴定平台的基础上, 采用滚动式抗性鉴定策略, 在初级鉴定阶段采用单环境、单重复的策略对大量种质进行初步筛选, 随后对初级鉴定中的高抗种质进行多重复、多环境、多年份的次级鉴定, 逐步淘汰感病种质。2018-2020年间对10524份玉米种质资源进行了抗镰孢穗腐病的初级鉴定, 共筛选到191份高抗种质, 进一步对高抗种质进行滚动式次级鉴定, 最终筛选出18XDHNAM11-20、H5084、MC303等59份具有稳定抗性的种质, 其中24份种质在5年的鉴定中均表现为抗病。从59份抗病种质的杂种优势类群看, 抗病种质可分为5个类群: 温热互导群、国内Reid群、NSS群、SS群及黄改群, 基本涵盖国内最主要的杂种优势类群, 其中来自温热互导群的抗病材料有24份, 占抗病材料总数的41%。本研究抗病种质资源的发掘为玉米抗穗腐病育种提供了重要资源。

关键词: 玉米; 穗腐病; 抗性鉴定; 遗传多样性

Large-scale Identification of Maize Germplasm Resources for Resistance to Ear Rot Caused by Two *Fusarium* Species

HAN Yuchen¹, WEI Yijun¹, ZHANG Zhen¹, WANG Tianyu², FAN Xingming³,
SU Aiguo⁴, WU Jianyu¹, CHEN Jiafa¹

(¹College of Life Sciences, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002; ²Institute of Crop Sciences, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081; ³Institute of Food Crops, Yunnan Academy of Agricultural Sciences, Kunming 650221; ⁴Maize Research Center, Beijing Academy of Agriculture and Forestry Sciences, Beijing 100097)

Abstract: Maize ear rot is a fungal disease mainly caused by *Fusarium verticillioides* and *Fusarium graminearum*, which seriously threatens national food security. With the change of climate and farming system, ear rot has become one of the most common and most harmful diseases in maize production. Large-scale identification of disease-resistant germplasm resources is conducive to solving the difficulty of breeding resistant varieties due to the lack of good disease-resistant germplasm. In this study, based on the establishment of a high-throughput resistance identification platform for maize ear rot, a rolling resistance identification strategy was adopted, that is, in the primary identification stage, a large number of germplasm resources were initially screened using a single repeat and single environment strategy, and then in secondary identification stage the highly resistant germplasm from the primary identification stage was accurately evaluated under multiple environments and years, and the susceptible germplasm was gradually eliminated. During the year 2018 to 2020, a total of 191 highly resistant germplasm was identified from 10524 maize germplasm in the primary

收稿日期: 2024-01-13 网络出版日期: 2024-08-13

URL: <https://doi.org/10.13430/j.cnki.jpgr.20240113002>

第一作者研究方向为植物分子遗传, E-mail: 2571314029@qq.com

通信作者: 陈甲法, 研究方向为植物分子遗传, E-mail: chenjiufa2005@163.com

基金项目: 河南创新人才项目(22HASTIT040, 212300410046); 国家玉米良种重大科研联合攻关项目(19190496)

Foundation projects: Henan Innovative Talent Project (22HASTIT040, 212300410046); Major Scientific Joint Research on National Maize Varieties (19190496)

identification stage, and a total of 59 stable resistant germplasm, including 18XDHNAM11-20, H5084 and MC303, was finally identified through the secondary identification stage. Among them, 24 germplasm showed resistance to *Fusarium* ear rot in the five years. In terms of heterosis groups of disease-resistant germplasm, the disease-resistant germplasm was divided into 5 groups, namely, tropical-temperate introduced heterosis group, Reid group, NSS group, SS group and Huangai group, which basically covered the most important heterosis groups in China. Among them, there are 24 resistant materials came from tropical-temperate introduced heterosis group germplasm, accounting for 41% of the total materials. These resistant germplasm resources identified in this study provide important resources for ear rot resistant breeding in maize.

Key words: maize; ear rot; resistance identification; genetic diversity

玉米(*Zea mays* L.)是我国主要的粮食作物、饲料来源和工业原料,在国民生产生活中占有重要地位,据国家统计局数据(<https://data.stats.gov.cn/easyquery.htm?cn=C01>)显示,2012年玉米产量超过水稻成为我国第一大粮食作物,并呈现逐年增长的趋势。2023年,我国玉米播种面积达4421.9万公顷,占三大主要粮食作物(稻、小麦、玉米)的44.25%,总产量为28884.2万吨,占三大主要粮食作物的45.03%(https://www.stats.gov.cn/sj/zxfb/202312/t20231211_1945417.html)。因此保障玉米的产量和品质对于确保国家粮食安全具有重要意义。

玉米穗腐病是由病原菌侵染引起果穗或籽粒病变的一种真菌性病害,在世界玉米种植区域普遍发生^[1]。玉米穗腐病的一般发生年份可造成农作物产量损失10%~20%,严重时造成产量损失30%~40%^[2],且病原菌产生的有毒次生代谢物严重影响食品和饲料安全^[3-4]。由于危害的严重性,穗腐病被列入玉米新品种审定中“高感一票否决”病害。近年来随着气候和耕作制度的变化,我国玉米穗腐病的发生越来越重,成为玉米生产上亟待解决的主要病害之一。玉米穗腐病可由镰孢菌(*Fusarium*)、青霉菌(*Penicillium spp.*)、曲霉菌(*Aspergillus*)、枝孢菌(*Cladosporium*)等70多种病原菌引起,生产上最主要的病原菌是禾谷镰孢(*Fusarium graminearum*)和拟轮枝镰孢(*Fusarium verticillioides*),也叫串珠镰孢(*Fusarium moniliforme*)^[5]。拟轮枝镰孢产生的伏马菌素(Fumonisin)是一种慢性促癌剂,能够引起灵长类动物的动脉粥样硬化样改变^[3,4,6]。禾谷镰孢主要产生脱氧雪腐镰刀菌烯醇(DON, deoxynivalenol)等毒素,摄入被DON污染的粮食会影响动物的生长、繁殖率和子代的存活率,甚至可使生长停滞,并对心、肝、肾等器官造成伤害,严重时造成动物死亡^[7-9]。目前,生产上防治玉米穗腐病

主要以化学防治为主,如授粉后喷施杀菌剂和杀虫剂^[10],但由于玉米穗腐病原菌种类的多样性和发病环境的复杂性,化学防治效果往往不理想,另外化学防治可能会污染水源、土壤,对环境和人类健康可能产生负面影响。因此,推广抗病品种是防治穗腐病最经济有效的方法,然而目前审定和推广的品种中高抗品种相对较少^[11],优良抗病种质资源的缺乏成为抗病品种培育的限制因素之一。大规模的进行抗病种质资源鉴定,发掘和利用抗病种质资源,可为培育优良抗病新品种提供资源基础。

目前,国内外已经报道了一些抗玉米穗腐病的种质资源。2006-2012年,段灿星等^[12]对1647份玉米种质进行抗拟轮枝镰孢穗腐病鉴定,筛选出了BGC1、粤C0-M2、粤14-1等27份高抗种质。Chen等^[13]利用包含940份自交系的关联分析群体对玉米穗腐病的抗性在3个环境下进行鉴定,从中鉴定出63份高抗拟轮枝镰孢穗腐病的自交系。加拿大农业部筛选出3个抗禾谷镰孢穗腐病玉米自交系CO387、CO388和CO441,美国北卡罗莱那州立大学鉴定出GE440、NC300两个抗拟轮枝镰孢穗腐病的自交系^[14]。苏爱国等^[15]综合2个试验点的抗性评价结果,鉴定出OQ603、百黄混、PI539921等9份对禾谷镰孢穗腐病表现高抗的自交系。何玥等^[16]对998份玉米地方种质进行穗腐病鉴定,得到铁心早、红爆花和乌炸包谷共3份对禾谷镰孢表现高抗的种质。这些抗病资源的发掘对丰富抗病种质资源、选育抗病品种起到了重要作用。然而,现有的抗病种质资源仍然远远不足,尤其是兼抗两种穗腐病原菌的种质资源更是匮乏,而能够应用于品种改良、生产生活的种质更是少之又少。

近年来,兼抗拟轮枝镰孢和禾谷镰孢混合菌的玉米种质开始引起国内外学者的关注。董华芳等^[17]采用花丝通道法接种拟轮枝镰孢和禾谷镰孢,在37份骨干自交系中鉴定到了兼抗拟轮枝镰孢和

禾谷镰孢玉米穗腐病的自交系 BT-1。夏玉生等^[18]利用花丝通道注射法对 346 份玉米自交系接种拟轮枝镰孢和禾谷镰孢,鉴定到了 45 份对两种穗腐病均表现为中抗以上的种质。段灿星等^[19]在 6 个环境下对 690 份代表性玉米种质接种拟轮枝镰孢和禾谷镰孢,鉴定出 H446、吉资 1055 和铁 97085 共 3 份稳定抗两种穗腐病的玉米种质。我国玉米种质资源丰富,但目前鉴定到的兼抗两种病原菌的抗性种质相对较少,为解决穗腐病抗病种质资源匮乏问题,需要广泛的交流合作,尽可能地扩大种质资源的搜集范围和多样性。本研究在国家良种重大科研联合攻关项目的支持下,采用滚动式鉴定方法,先在较大范围内初步鉴定获得兼抗两种穗腐病的高抗种质,再对高抗种质进行多重复、多点、多年的精准鉴定,任何一个环境出现感病则淘汰该种质,该方法有利于大范围鉴定抗病种质。通过滚动式鉴定方法期望快速鉴定出一批兼抗拟轮枝镰孢和禾谷镰孢穗腐病的玉米新种质,为玉米穗腐病抗性研究提供材料基础。

1 材料与方 法

1.1 试验材料

2018-2020 年间,在国家良种重大科研联合攻关项目的支持下,共集结了 10524 份种质资源(表 1),其中中国农业科学院提供 5842 份材料,云南省农业科学院提供 2939 份材料,河南农业大学提供 806 份材料,北京市农林科学院提供 937 份材料。本研究使用的禾谷镰孢(*Fusarium graminearum*)和拟轮枝镰孢(*Fusarium verticillioides*)均由本课题组采集、分离纯化和培养。

表 1 2018-2020 年抗穗腐病种质资源鉴定供试材料来源
Table 1 Source of germplasm for evaluating resistance to ear rot in maize from 2018 to 2020

材料来源 Source	2018	2019	2020
中国农业科学院 CAAS	3210	1076	1556
云南省农业科学院 YAAS	1449	1140	350
北京市农林科学院 BAAFS	600	-	337
河南农业大学 HAU	532	274	-
总计 Total	5791	2490	2243

—:无数据

—: No data; CAAS: Chinese Academy of Agricultural Sciences; YAAS: Yunnan Academy of Agricultural Sciences; BAAFS: Beijing Academy of Agriculture and Forestry Sciences; HAU: Henan Agricultural University

1.2 滚动式抗源鉴定方法

传统的抗性鉴定方法是对每一份种质资源进行多环境、多重复的表型鉴定,再对种质资源进行抗性评价。这种方法的工作量较大,效率相对较低,极大地增加了大范围筛选抗病种质的成本。为了解决这一问题,本课题组采用了“滚动式抗源鉴定方法”(图 1),该方法分为初级鉴定和次级鉴定两个阶段。在初级鉴定阶段,采用单重复、单环境的策略对初次集结的大量种质资源进行初次筛选,随后,将在初级鉴定中表现出高抗的种质资源进行多重复、多年、多点的次级鉴定,在次级鉴定的任何一个环境出现感病情况,则淘汰该种质。每年的次级鉴定包括来自初级鉴定的高抗种质和前一年次级鉴定的抗和高抗种质。这种滚动式的抗源鉴定方法,既可以在大范围内进行抗病种质的筛选,又能确保精准的抗性鉴定要求。

2018 年,在焦作市修武县对 5791 份种质进行单环境初步鉴定。2019 年,在焦作市对集结到的 2490 份种质进行单环境初级鉴定的同时,在焦作市修武县和郑州市惠济区河南农业大学科教园区对 2018 年筛选到的高抗种质分别进行 2 个和 1 个重复的滚动式次级鉴定,淘汰中抗与感病种质。2020 年,在焦作市对 2243 份种质进行单环境初级鉴定,同时在焦作市和郑州市对 2019 年初级鉴定筛选到的高抗种质和次级鉴定筛选到的高抗和抗的种质分别进行 2 个重复的滚动式次级鉴定,继续淘汰中抗与感病种质。按照滚动式抗源鉴定模式(图 1),2021 年和 2022 年,在焦作市和郑州市继续对上一年所有筛选到的抗病级别以上的抗性种质分别进行 2 个重复的次级鉴定,最终得到多年稳定抗穗腐病的种质。

1.3 病原菌的培养

1.3.1 拟轮枝镰孢的培养 将本课题组保存的拟轮枝镰孢菌种转接于 PDA 固体培养基,28℃ 恒温培养 7~10 d 进行扩繁。把扩繁完成的菌种切块,接种于玉米固体培养基中,28℃ 恒温培养 10~14 d(图 2)。将无菌水倒入玉米培养基内冲洗、搅拌。用双层纱布过滤掉菌丝、培养基等杂质制成孢子悬浮液并镜检。用无菌水将孢子浓度稀释到 5×10^6 个/mL,用于大田接种。

1.3.2 禾谷镰孢的培养 将 100 根牙签捆为一捆,加蒸馏水浸泡 10 min,大火烧开后,用小火慢煮 1 h,期间分 3 次加入蔗糖(每升蒸馏水每次加入 1~2 g)。将水煮过的牙签装瓶,牙签尖部统一朝上,装满瓶子。向瓶中倒入 PDA 培养基,淹没牙签一半,

封口,121℃高压蒸汽灭菌30 min。待培养基冷却凝固后,把前期在培养皿上扩繁的菌种切块,接种于

牙签培养基中,28℃恒温培养15 d左右(图2),用于大田接种。

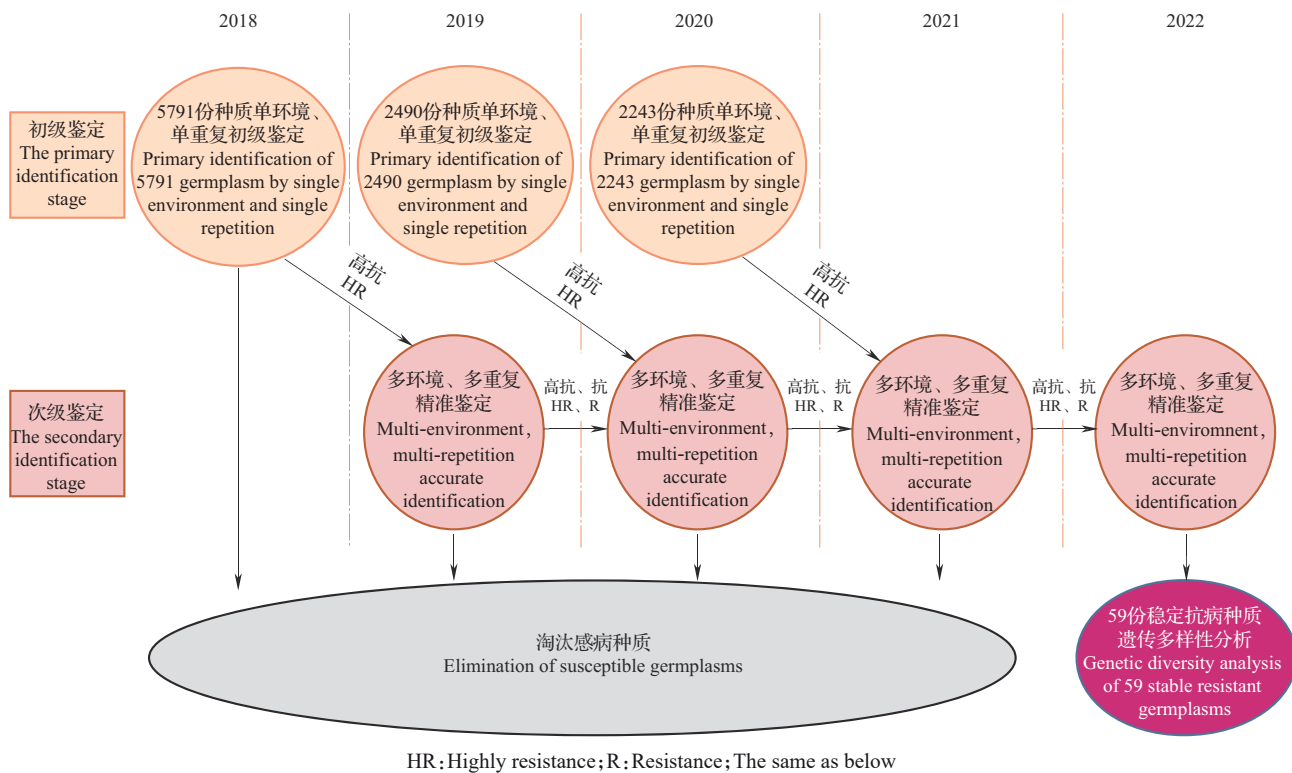


图1 滚动式抗源鉴定流程

Fig.1 The flow chart of the rolling resistant germplasm identification method



A: 拟轮枝镰孢菌种; B: 转接菌种于玉米培养基的过程; C: 拟轮枝镰孢在玉米培养基中培养过程; D: 拟轮枝镰孢培养完成(15 d)的状态; E: 禾谷镰孢菌种; F: 转接菌种于牙签培养基的过程; G: 禾谷镰孢在牙签培养基中培养过程; H: 禾谷镰孢培养完成(15 d)的状态

A: *Fusarium verticillioides*; B: The process of transferring bacteria to maize medium; C: The culture process of *Fusarium verticillioides* in corn medium; D: The state in which the culture of *Fusarium verticillioides* was completed (15 d); E: *Fusarium graminearum*; F: The process of transferring bacteria to the toothpick medium; G: The culture process of *Fusarium graminearum* in toothpick medium; H: State in which the culture of *Fusarium graminearum* has been completed (15 d)

图2 两种病原菌的培养

Fig.2 The culture of two kinds of pathogenic bacteria

1.4 穗腐病的大田接种与抗性评价

田间实验在河南省焦作市修武县和河南省郑州市惠济区河南农业大学科教园区试验基地进行。每份材料种植1行,行长4 m,行距0.6 m,株距0.22 m。每50份材料为一组,在每组的开始处设置抗病对照BT-1和感病对照N6。供试材料生育期有差异,因此在吐丝后7~10 d进行分批次接种。每批接种

完成后在行头喷漆作为标记。每株玉米同时接种两种病菌,拟轮枝镰孢采用针刺果穗法接种于穗子中下部,禾谷镰孢菌采用牙签法接种于穗子顶端。接种过程如图3所示。接种前向孢子悬浮液中加入1%的吐温80增加病原菌孢子的溶解度和粘性。接种30 d后,统计小区内所有穗的发病面积。



A: 牙签通道法接种禾谷镰孢; B: 改良针刺果穗法接种拟轮枝镰孢; C: 2021年焦作试验基地玉米穗腐病大田发病情况;

D: 穗腐病抗性鉴定工作使用工具

A: *Fusarium graminearum* inoculation by silk channel injection method; B: *Fusarium verticillioides* inoculation by improved nail inoculation method; C: Typical field situation of *Fusarium* ear rot in maize; D: Tools for evaluation *Fusarium* ear rot

图3 玉米穗腐病的大田接种和鉴定

Fig.3 Field inoculation and evaluation of *Fusarium* ear rot in maize

参照农业行业标准《NY/T 1248.8-2016 玉米抗病虫性鉴定技术规范》(<https://hbba.sacinfo.org.cn/attachment/onlineRead/95e138b5f17c1a958a26ca7ee87c9f0c24ee8eba69abd4117574239fe713aa15>), 对小区内的全部果穗进行穗腐病发病面积的调查(图4),

依据发病面积以及发病等级划分标准对每行所有果穗进行发病等级划分(表2), 然后利用 $\bar{x} = (x_1 + x_2 + \dots + x_n) / n$ 计算每行内所有果穗的平均发病等级, 将平均发病等级作为材料的发病等级, 并根据每个材料的发病等级进行抗性评价(表3)。

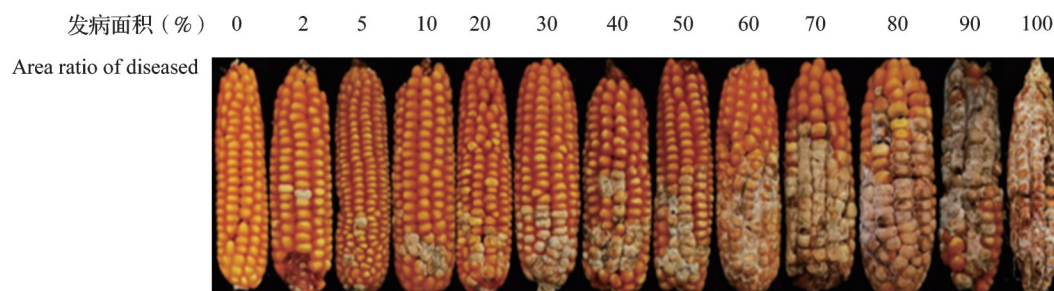


图4 穗腐病发病面积表型评定标准

Fig.4 The phenotypic evaluation criteria for disease area to ear rot

表2 穗腐病发病等级划分标准

Table 2 The classification criteria for disease scale to ear rot

发病等级 Disease scale	发病面积(%) Area ratio of diseased
1	0~5
3	5~20
5	20~40
7	40~60
9	>60

表3 穗腐病抗性评价标准

Table 3 The evaluation criteria for resistance to ear rot

抗性评价 Resistant evaluation	平均发病等级 Mean disease scale
高抗HR	<1.5
抗R	1.5~3.5
中抗MR	3.5~5.5
感S	5.5~7.5
高感HS	7.5~9.0

MR: Moderately resistant; S: Susceptible; HS: Highly susceptible; The same as below

1.5 核心种质血缘划分

利用博瑞迪公司的1K单核苷酸多态性位点(SNP, single nucleotide polymorphism)芯片技术对抗病种质进行基因型测定^[20]。利用TASSEL5.0、Admixture和Curlywhirly分别对基因型结果进行群体结构分析、杂种优势类群分析和主成分分析(PCA, principal component analysis)。通过3种分析结果的互相印证,明确核心种质的杂种优势类群。

2 结果与分析

2.1 种质的初级抗性鉴定分析

2018-2020年初级鉴定的结果表明,每年鉴定

的不同抗性的材料数量和比例均呈正态分布(图5)。其中对禾谷镰孢和拟轮枝镰孢混合菌引起的穗腐病表现为中抗的材料最多,平均占比45.0%,而高抗材料在2018-2020年分别鉴定到125份、24份和42份,分别占当年供试材料的2.16%、0.82%和1.38%,占比较少;抗病和感病材料占比平均均在20%左右;高感材料的占比稍高于高抗材料,3年分别占比6.16%、8.17%和8.54%。

从供试材料的来源来看,2018-2020年来源于云南省农业科学院的材料每年平均发病等级均低于当年供试材料平均等级,表现出较好的玉米穗腐病抗性。中国农业科学院和河南农业大学的供试材料的平均发病等级在3年间变化不大(图6)。

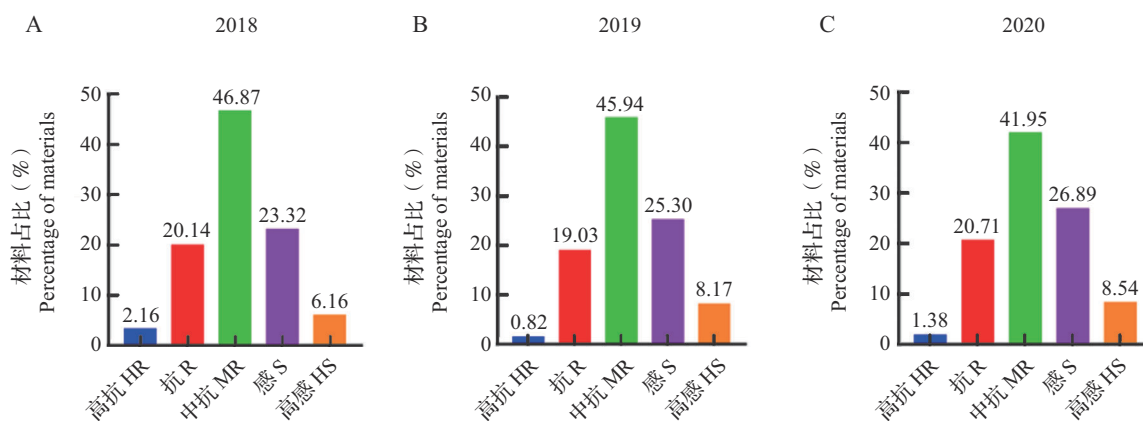


图5 2018-2020年供试种质穗腐病抗性分布

Fig.5 Distribution of resistance to ear rot in experimental germplasm from 2018 to 2020

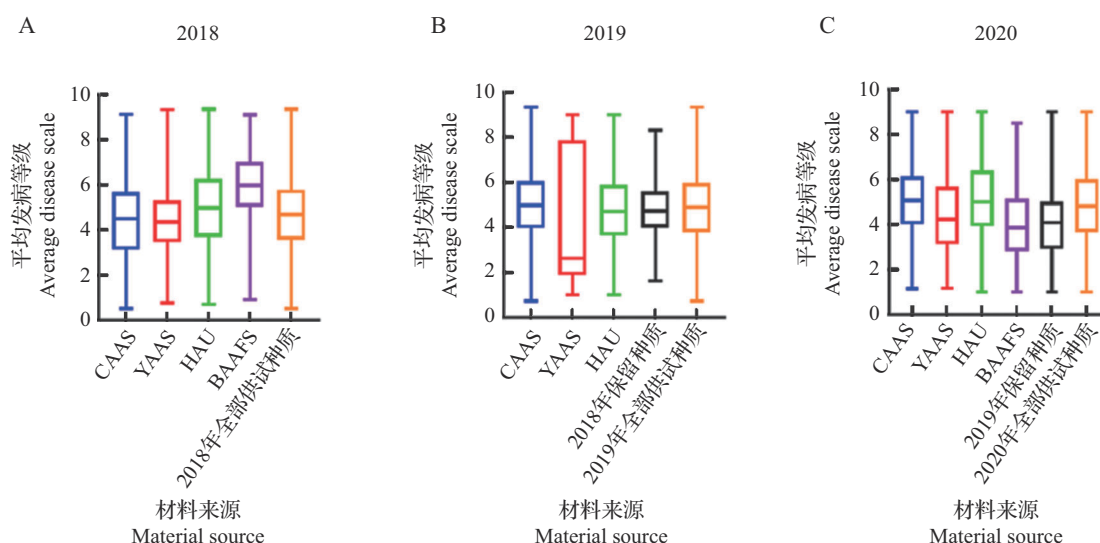


图6 2018-2020年不同来源供试种质对穗腐病的抗性

Fig.6 Comparison of resistance to ear rot disease among germplasm in different sources from 2018 to 2020

2.2 次级抗性鉴定分析

2019-2022年,针对上一年初级抗性鉴定表现为高抗的种质和次级鉴定中的高抗及抗病种质进行滚动式次级鉴定,同时也对部分种子量较大的高感及感病种质进行重复鉴定。通过对每个重复的描述性统计分析发现,各年重复间的平均值和标准误差等描述统计参数差异不大,表明次级鉴定重复性较好,鉴定结果比较可靠(表4)。对上一年鉴定出的抗病和感病种质,利用本年度次级鉴定结果进行箱线图分析(图7),发现上一年鉴定的抗病种质(上一年初级鉴定为高抗和次级鉴定为高抗和抗病的种质),在第二年次级鉴定中有64.7%仍表现为抗病(抗病和高抗等级),另外37.3%的种质转为中抗及更感病类型;上一年鉴定的感病种质(上一年初级鉴定为高感和次级鉴定中表现为高感和感病的

部分种子量较大的种质)在第二年鉴定中77.8%仍表现为感病或高感等级。如在2020年鉴定出的109份抗病种质(初级鉴定中表现为高抗、次级鉴定中表现为高抗和抗病)中,在2021年的鉴定中有64份仍表现为高抗或抗病,有45份转为中抗、感病或高感。2020年鉴定出的感病种质(初级鉴定中表现为高感、次级鉴定中表现为高感和感病)中,选取种子量较大的77份种质,在2021年的次级鉴定中有61份仍表现为高感或感病,有16份转变为中抗或抗病。根据5年滚动式鉴定结果,共筛选到59份多年多点稳定抗病种质(详见<https://doi.org/10.13430/j.cnki.jpgr.20240113002>,附表1),其中24份种质在2018-2022年对穗腐病均表现为高抗或抗病等级(图8),2份种质4年均表现高抗或抗病等级,30份种质3年均表现高抗或抗病等级。

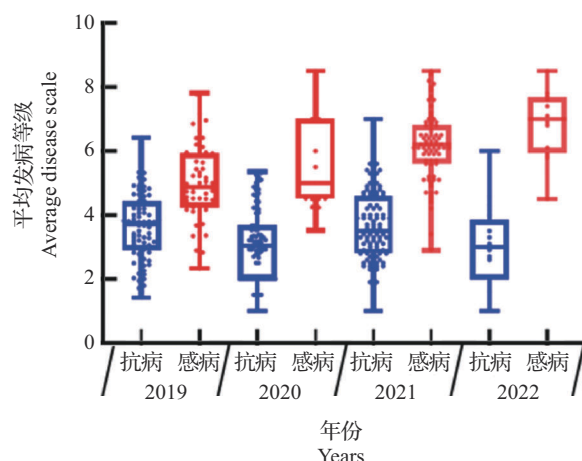
表4 2019-2022年穗腐病抗性滚动鉴定描述性统计

Table 4 Descriptive statistics of the rolling resistant germplasm identification for ear rot resistance from 2019 to 2022

指标 Index	2019			2020				2021				2022			
	重复一 Rep1	重复二 Rep2	重复三 Rep3	重复一 Rep1	重复二 Rep2	重复三 Rep3	重复四 Rep4	重复一 Rep1	重复二 Rep2	重复三 Rep3	重复四 Rep4	重复一 Rep1	重复二 Rep2	重复三 Rep3	重复四 Rep4
平均值 Mean	4.01	4.51	3.93	3.65	3.65	3.77	3.58	4.54	5.04	4.51	4.63	4.75	4.46	2.97	3.22
标准误差 SE	0.22	0.16	0.16	0.17	0.18	0.16	0.17	0.14	0.18	0.17	0.13	0.29	0.24	0.22	0.30
中位数 Median	3.67	4.67	3.71	3.47	3.37	3.70	3.21	4.33	4.75	4.15	4.59	5.00	4.50	2.82	2.40
众数 Mode	1.00	5.00	3.00	1.00	1.00	3.00	2.50	3.00	3.00	3.00	5.00	5.00	3.00	2.00	1.00
标准差 SD	2.34	1.72	1.81	1.89	2.00	1.70	1.76	1.47	1.79	1.71	1.19	2.15	1.96	1.53	2.15
方差 Variance	5.47	2.96	3.27	3.56	4.01	2.91	3.09	2.15	3.21	2.92	1.42	4.63	3.84	2.35	4.61
峰度 Kurtosis	-0.54	-0.43	0.26	-0.07	-0.64	0	0.44	1.46	-0.94	-0.40	-0.34	-0.68	-0.27	1.74	0.14
偏度 Skewness	0.66	-0.07	0.71	0.54	0.45	0.54	0.81	1.17	0.45	0.41	0.16	-0.23	0.37	1.23	1.09
区域 Area	8.00	7.67	8.00	8.00	8.00	8.00	8.00	7.00	6.44	7.50	5.44	8.00	8.00	6.67	8.00
最小值 Min.	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	2.00	2.56	1.00	2.00	1.00	1.00	1.00	1.00
最大值 Max.	9.00	8.67	9.00	9.00	9.00	9.00	9.00	9.00	9.00	8.50	7.44	9.00	9.00	7.67	9.00
求和 Sum	461.20	536.45	475.16	444.96	431.27	407.39	386.20	472.41	478.75	469.00	417.05	270.97	290.03	139.69	164.04
观测数 Observation	115.00	119.00	121.00	122.00	118.00	108.00	108.00	104.00	95.00	104.00	90.00	77.00	75.00	77.00	71.00
置信度(95.0%) Confidence level	0.43	0.31	0.33	0.34	0.37	0.33	0.34	0.29	0.37	0.33	0.25	0.57	0.49	0.45	0.60

重复一和重复二种植于河南省焦作市修武县;重复三和重复四种植于河南省郑州市惠济区

Repetition 1 and repetition 2 were planted in Xiuwu county, Jiaozuo city, Henan province; Repetition 3 and repetition 4 were planted in Huiji district, Zhengzhou city, Henan province; Rep: Repetition



箱线图显示出次级鉴定中抗病和感病种质平均发病等级的最大值、最小值、中位数及上下四分位数;抗病:指上一年初级鉴定的高抗种质和次级鉴定的高抗和抗病种质;感病:指部分种子量较大的上一年抗性评价为感病和高感的种质

The boxplot shows the maximum, minimum, median and upper and lower quartiles of the average disease scale of disease resistant and susceptible germplasm in secondary identification; R: Refers to the germplasm that were highly resistant in the primary identification stage, and highly resistant and resistant in the secondary identification stage in the previous year; S: Refers to the germplasm that were highly susceptible in the primary identification stage, and susceptible and highly susceptible in the secondary identification stage in the previous year

图7 2019-2022年穗腐病抗性滚动鉴定情况

Fig.7 The result of rolling resistant germplasm identification for ear rot resistance from 2019 to 2022

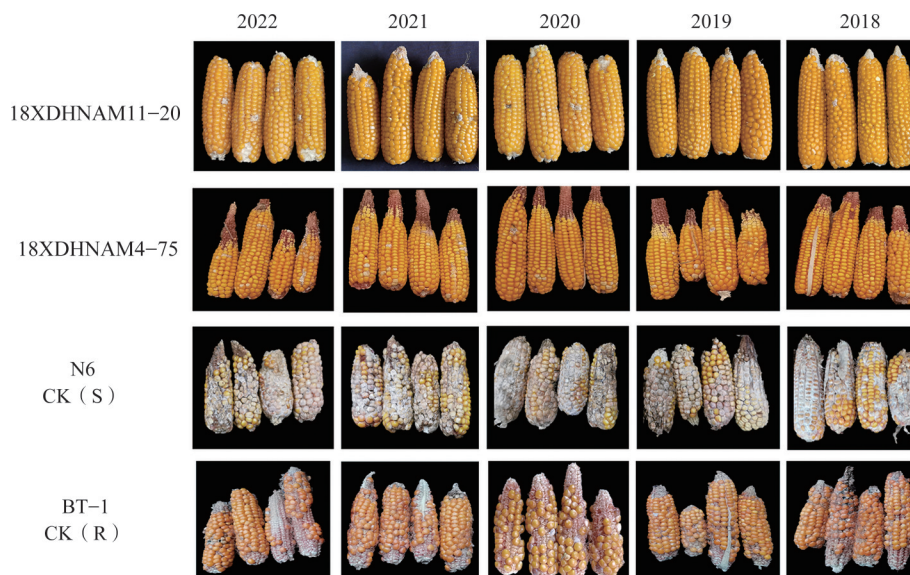


图8 多年抗病种质18XDHNAM11-20、18XDHNAM4-75、感病对照N6和抗病对照BT-1表型鉴定结果

Fig.8 Phenotypic of disease-resistant germplasm 18XDHNAM11-20, 18XDHNAM4-75, susceptible control N6 and resistant control BT-1

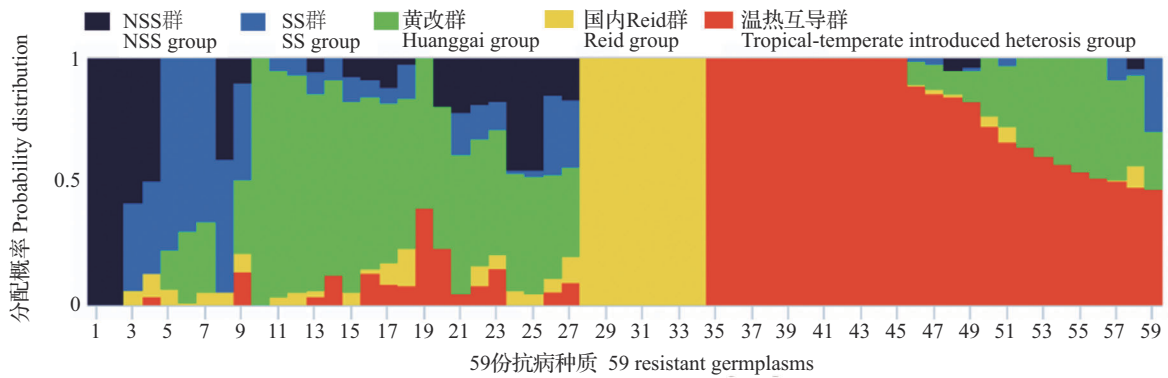
2.3 高抗种质的遗传多样性分析

利用4589个SNP位点将59份多年鉴定的玉米穗腐病抗病种质进行分类,共分为黄改群、NSS群、温热互导群、SS群和国内Reid群5大类群。群体结构分析结果(图9A)与进化树分析结果(图9B)基本一致,说明供试种质来源广泛。主成分分析表明,NSS群与SS群和温热互导群的距离都比较远(图9C),这3个

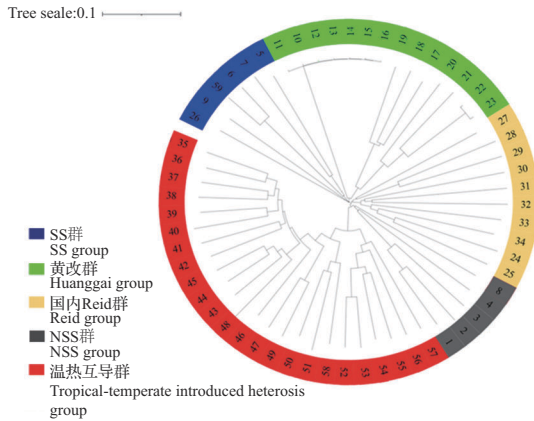
类群之间有较强的杂种优势。

从59份抗病种质在5大类群中的占比来看(图10),温热互导群种质对禾谷镰孢和拟轮枝镰孢混合感染导致的玉米穗腐病有较强的抗性。抗病种质中41%的种质都属于温热互导群,黄改群和国内Reid群次之,占比分别为24%和17%,SS群占比为10%,NSS群占比最少,为8%。

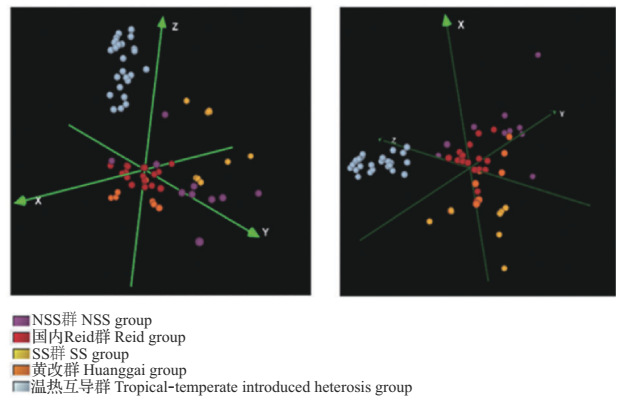
A



B



C



A: 群体结构分析结果; B: 进化树分析; C: 主成分分析, x、y、z轴分别代表3个主成分PC1、PC2和PC3

A: Results of population structure analysis; B: Phylogenetic tree analysis results; C: Principal component analysis results, the x, y and z axes represent the three principal components PC1, PC2 and PC3, respectively

图9 59份抗病种质的遗传多样性分析

Fig.9 Genetic diversity analysis for 59 resistance germplasms

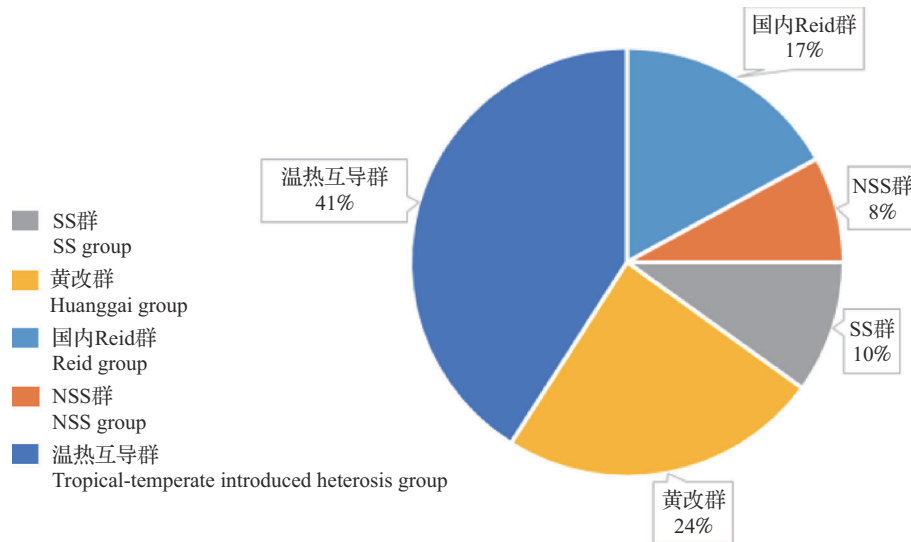


图10 抗病种质在不同杂种优势类群中的比例

Fig.10 The proportion of resistant germplasms in different heterosis groups

3 讨论

玉米穗腐病是一种在全世界各玉米主产区均会出现的普遍性病害,其产生的毒素对人畜健康有

极大的威胁,因此,玉米穗腐病的防控效果在一定程度上影响我国的粮食安全。目前,已发现的穗腐病原菌高达70余种,大多数抗病种质对不同种病原菌引起的穗腐病的抗性有着较大的差异^[18-19],此

外,玉米花丝、苞叶、穗轴等都影响玉米穗腐病抗性,表明玉米穗腐病有着复杂的致病机理。本研究对玉米种质进行多年多点抗性鉴定发现,部分高抗种质在不同年份、不同地点表现中抗或感病,表明温度、湿度等环境因素对玉米抗性也有较大影响^[19]。总体来说,穗腐病具有危害大、病原菌种类复杂多样、抗性遗传机理复杂、受环境影响大的特点,使得育种上可用的优良抗病种质资源比较匮乏。因此,发掘能够稳定遗传的兼抗多种病原菌穗腐病的优良种质资源有助于培育绿色抗性玉米新品种,为进一步保障玉米生产的质量和产量提供重要的材料基础。

玉米穗腐病的发生受环境影响较大,且抗性机理复杂,大范围的抗源筛选有利于获得优良稳定的抗病种质。传统的多年多点多重复抗源筛选方法工作量大、效率低,很难兼顾大范围抗源筛选和精准抗源鉴定。本研究采用“滚动式抗源鉴定”方法:先对大规模的种质资源进行单环境单重复的初次鉴定,再对初次鉴定得到的高抗种质进行多环境、多重复、多年份的次级鉴定,每年淘汰感病种质,最终筛选到一批多年间表现稳定的优良抗病种质。本研究通过3年对10524份供试种质进行单环境、单重复穗腐病初级鉴定,筛选到191份高抗玉米穗腐病的种质;再针对初次鉴定到的高抗种质进行多环境、多重复、多年份的滚动式次级鉴定,最终筛选到24份5年均表现抗病的种质、2份4年均表现抗病的种质,实现了高通量大范围和精准鉴定的统一,并获得了良好的结果。

目前,国内外开展玉米穗腐病抗性鉴定主要采用花丝通道法和创伤接种法,花丝通道法分为使用雾化器将孢子悬浮液喷洒在玉米花丝上或使用注射器将孢子悬浮液注射到靠近穗轴尖端的花丝通道中两种,创伤接种法一般将孢子悬浮液直接注射到伤口部位或将病原菌定殖的牙签/海绵贴在伤口部位^[18-19,21-24]。本研究运用注射孢子的创伤接种法和病原菌定殖牙签的花丝通道法分别对同一果穗进行拟轮枝镰孢和禾谷镰孢的接种鉴定,分别模拟了拟轮枝镰孢由于昆虫取食、鸟类啄食等造成籽粒创伤而被感染和禾谷镰孢孢子由花丝通道侵染的过程。采用两种病原菌结合两种不同接种方法的方式进行玉米穗腐病抗性接种鉴定,更真实的模拟了玉米植株在田间的侵染模式,更准确的反映了玉米种质对两种镰孢穗腐病的抗性情况。

来源广泛的抗病种质是改良和培育玉米穗腐

病抗病品种的基础,本研究筛选到59份穗腐病稳定抗病种质,来自于国内Reid群、NSS群、SS群、黄改群和温热互导群,涵盖国内主要的杂种优势类群,可实现优先同群改良的玉米育种原则。黄改群和SS群种质在已知的报道中抗源较少,本研究分别鉴定到14份黄改群以及6份SS群抗源,这些抗病种质资源的发掘为玉米抗穗腐病育种提供了重要资源。另外,感病种质在挖掘穗腐病抗病基因、解析玉米穗腐病发病机理等方面也是不可或缺的,本研究在筛选出59份高抗种质的同时,也筛选出了14份环境间稳定、农艺性状优良的高感种质(数据未展示),这为玉米穗腐病分子机理的深入研究提供了材料基础。

参考文献

- [1] 李辉,向葵,张志明,袁广胜,潘光堂.玉米穗腐病抗性机制及抗病育种研究进展.玉米科学,2019,27(4):167-174
Li H, Xiang K, Zhang Z M, Yuan G S, Pan G T. Research progress of resistance mechanism and breeding for ear rot in maize. Journal of Maize Sciences, 2019,27(4):167-174
- [2] 肖淑芹,李国福,路媛媛,马昌广,薛春生,陈捷.玉米镰孢穗腐病发生条件及化学防治效果研究.玉米科学,2017,25(3):144-147
Xiao S Q, Li G F, Lu Y Y, Ma C G, Xue C S, Chen J. Study on occurrence condition and chemical control effect of *Fusarium* ear rot in maize. Journal of Maize Sciences, 2017,25(3):144-147
- [3] Goswami R S, Kistler H C. Heading for disaster: *Fusarium graminearum* on cereal crops. Molecular Plant Pathology, 2004,5(6):515-525
- [4] Santiago R, Reid L M, Arnason J T, Zhu X Y, Martinez N, Malvar R A. Phenolics in maize genotypes differing in susceptibility to *Gibberella* stalk rot (*Fusarium graminearum* Schwabe). Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2007, 55(13):5186-5193
- [5] Atlin G N, Enerson P M, Mcgirr L G, Hunter R B. *Gibberella* ear rot development and zearalenone and vomitoxin production as affected by maize genotype and *Gibberella zeae* strain. Canadian Journal of Plant Science, 1983,63(4):847-853
- [6] 程璐,陈家斌,张艺璇,杨丹丹,谭静.两种优势病原菌玉米穗腐病的研究比较.云南大学学报:自然科学版,2022,44(3):647-654
Cheng L, Chen J B, Zhang Y X, Yang D D, Tan J. Comparison of two dominant pathogens on ear rot of maize. Journal of Yunnan University: Natural Science Edition, 2022, 44(3):647-654
- [7] Gelderblom W, Cawood M, Snyman S, Marasas W. Fumonisin B1 dosimetry in relation to cancer initiation in rat liver. Carcinogenesis, 1994,15(2):209

- [8] Krska R, Baumgartner S, Josephs R. The state-of-the-art in the analysis of type-A and -B trichothecene mycotoxins in cereals. *Fresenius Journal of Analytical Chemistry*, 2001, 371(3):285
- [9] Dong W M, Azconaolivera J I, Brooks K H, Linz J E, Pestka J J. Elevated gene expression and production of interleukins 2, 4, 5, and 6 during exposure to vomitoxin (deoxynivalenol) and cycloheximide in the EL-4 thymoma. *Toxicology & Applied Pharmacology*, 1994, 127(2):282
- [10] 商鸿生. 玉米高粱谷子病虫害诊断与防治原色图谱. 北京:北京金盾出版社, 2005:93-96
- Shang H S. Primary color map for diagnosis and control of diseases and insect pests of maize and *Sorghum*. Beijing: Beijing Jindun Publishers, 2005:93-96
- [11] 凡卓, 庄训宇, 刘焱昆, 刘庆强, 施艳, 李宇, 袁虹霞, 李洪连. 玉米新品种对3种主要病害的抗性鉴定与评价. *河南科学*, 2023, 41(9):1292-1299
- Fan Z, Zhuang X Y, Liu Y K, Liu Q Q, Shi Y, Li Y, Yuan H X, Li H L. Identification and evaluation of resistance of new maize varieties to three major diseases. *Henan Science*, 2023, 41(9):1292-1299
- [12] 段灿星, 王晓鸣, 武小菲, 杨知还, 宋凤景, 赵立萍, 孙素丽, 朱振东. 玉米种质和新品种对腐霉茎腐病和镰孢穗腐病的抗性分析. *植物遗传资源学报*, 2015, 16(5):947-954
- Duan C X, Wang X M, Wu X F, Yang Z H, Song F J, Zhao L P, Sun S L, Zhu Z D. Analysis of maize accessions resistance to *Pythium* stalk rot and *Fusarium* ear rot. *Journal of Plant Genetic Resources*, 2015, 16(5):947-954
- [13] Chen J, Shrestha R, Ding J, Zheng H, Mu C, Wu J, Mahuku G. Genome-wide association study and QTL mapping reveal genomic loci associated with *Fusarium* ear rot resistance in tropical maize germplasm. *G3: Genes|Genomes|Genetics*, 2016, 6(12):3803-3815
- [14] Santiago R, Reid L M, Zhu X, Butrón A, Malvar R A. *Gibberella* stalk rot (*Fusarium graminearum*) resistance of maize inbreds and their F₁ hybrids and their potential for use in resistance breeding programs. *Plant Breeding*, 2010, 129(4):454-456
- [15] 苏爱国, 王帅帅, 段赛茹, 张如养, 邢锦丰, 杨扬, 宋伟, 赵久然. 玉米抗禾谷镰孢菌穗粒腐病种质资源鉴定. *植物遗传资源学报*, 2021, 22(4):971-978
- Su A G, Wang S S, Duan S R, Zhang R Y, Xing J F, Yang Y, Song W, Zhao J R. Identification for ear rot resistance against *Fusarium graminearum* in maize germplasm. *Journal of Plant Genetic Resources*, 2021, 22(4):971-978
- [16] 何玥, 郭爽, 王栋, 聂蕾, 涂亮, 刘鹏飞, 郭向阳, 王安贵, 祝云芳, 吴迅, 陈泽辉. 玉米地方种质资源对禾谷镰孢菌穗腐病的抗性评价. *耕作与栽培*, 2023, 43(5):1-5
- He Y, Guo S, Wang D, Nie L, Tu L, Liu P F, Guo X Y, Wang A G, Zhu Y F, Wu X, Chen Z H. Identification for ear rot resistance against *Fusarium graminearum* in maize landrace germplasm. *Tillage and Cultivation*, 2023, 43(5):1-5
- [17] 董华芳, 宋伟彬, 代小冬, 李晶晶, 刘春元, 吴建宇. 玉米穗部不同组织对串珠镰刀菌和禾谷镰刀菌的抗性研究. *玉米科学*, 2006, 14(4):141-144
- Dong H F, Song W B, Dai X D, Li J J, Liu C Y, Wu J Y. Resistance of different tissues of maize ear to *Fusarium moniliforme* and *Fusarium graminearum*. *Journal of Maize Sciences*, 2006, 14(4):141-144
- [18] 夏玉生, 郭成, 温胜慧, 孙素丽, 朱振东, 段灿星. 玉米种质抗拟轮枝镰孢与禾谷镰孢穗腐病鉴定及抗性多样性分析. *植物遗传资源学报*, 2022, 23(1):61-71
- Xia Y S, Guo C, Wen S H, Sun S L, Zhu Z D, Duan C X. Identification of maize germplasm resistant to *Fusarium* ear rot and *Gibberella* ear rot and genetic diversity analysis of resistant lines. *Journal of Plant Genetic Resources*, 2022, 23(1):61-71
- [19] 段灿星, 崔丽娜, 夏玉生, 董怀玉, 杨知还, 胡清玉, 孙素丽, 李晓, 朱振东, 王晓鸣. 玉米种质资源对拟轮枝镰孢与禾谷镰孢穗腐病的抗性精准鉴定与分析. *作物学报*, 2022, 48(9):2155-2167
- Duan C X, Cui L N, Xia Y S, Dong H Y, Yang Z H, Hu Q Y, Sun S L, Li X, Zhu Z D, Wang X M. Precise characterization and analysis of maize germplasm resources for resistance to *Fusarium* ear rot and *Gibberella* ear rot. *Acta Agronomica Sinica*, 2022, 48(9):2155-2167
- [20] 张鹏, 管俊娇, 黄清梅, 杨晓洪, 康祝科. 基于SNP芯片的云南玉米自交系遗传多样性和群体遗传结构分析. *南方农业学报*, 2020, 51(9):2082-2089
- Zhang P, Guan J J, Huang Q M, Yang X H, Kang Z K. Genetic diversity and population genetic structure analysis of maize inbred lines in Yunnan province based on SNP chip. *Journal of Southern Agriculture*, 2020, 51(9):2082-2089
- [21] Xu Y F, Zhang Z R, Lu P, Li R Q, Ma P P, Wu J Y, Li T. Increasing *Fusarium verticillioides* resistance in maize by genomics-assisted breeding: Methods, progress, and prospects. *The Crop Journal*, 2023, 11(6):1626-1641
- [22] Tahat M, Aldakil H, Alananbeh K, Salem N. First report of *Fusarium verticillioides* causing *Fusarium* ear rot of corn in Jordan. *Plant Disease*, 2023, 107:1632
- [23] Giomi G, Kreff E, Iglesias J, Fauguel C, Fernandez M, Oviedo M, Presello D. Quantitative trait loci for *Fusarium* and *Gibberella* ear rot resistance in Argentinian maize germplasm. *Euphytica*, 2016, 211:287-294
- [24] Guo Z, Zou C, Liu X, Wang S H, Xu Y B. Complex genetic system involved in *Fusarium* ear rot resistance in maize as revealed by GWAS, bulked sample analysis, and genomic prediction. *Plant Disease*, 2020, 104(6):1725-1735

附表 1 滚动式抗源鉴定筛选到的穗腐病抗病种质

TableS1 The resistant germplasm of ear rot identified using the rolling resistant germplasm identification method

编号	材料名称	2022 年		2021 年		2020 年		2019 年		2018 年	
No.	Germplasm name	2022 year		2021 year		2020 year		2019 year		2018 year	
		发病等级	抗性评价	发病等级	抗性评价	发病等级	抗性评价	发病等级	抗性评价	发病等级	抗性评价
		Rating scale	Resistant evaluation	Rating scale	Resistant evaluation	Rating scale	Resistant evaluation	Rating scale	Resistant evaluation	Rating scale	Resistant evaluation
1	MC098	3.2	R	2.9	R	1.8	R	-	-	-	-
2	MC149	2.4	R	3.2	R	2.2	R	-	-	-	-
3	MC131	3.2	R	3.4	R	2	R	-	-	-	-
4	18XDHNAM11-177	3.1	R	3.4	R	2.7	R	1.8	R	1.8	R
5	18XDHNAM11-105	3.5	R	2.3	R	1.6	R	2.6	R	1.5	R
6	19J1956-3	3.3	R	3.1	R	2.5	R	-	-	-	-
7	K20HNGER0469	3.5	R	2.9	R	1.8	R	-	-	-	-
8	YN-71	3.5	R	3.1	R	1.4	HR	-	-	-	-
9	K20HNGER1413	1	HR	2.4	R	1.8	R	-	-	-	-
10	MC321	3.3	R	3	R	1	HR	-	-	-	-
11	MC310	2.3	R	3.3	R	1.7	R	-	-	-	-
12	MC298	-	-	2.9	R	1.7	R	-	-	-	-
13	MC301	-	-	3.5	R	1.7	R	-	-	-	-
14	MC316	3	R	3.4	R	1.9	R	-	-	-	-
15	MC303	1	HR	2.6	R	2.4	R	-	-	-	-
16	MC193	-	-	1	HR	2	R	-	-	-	-
17	MC064	2.8	R	3.2	R	2.6	R	-	-	-	-

18	MC049	2	R	3.2	R	1.8	R	-	-	-	-
19	MC050	3	R	3.1	R	1.7	R	-	-	-	-
20	H5040	1.1	HR	2.4	R	2	R	-	-	-	-
21	H5041	1	HR	2.3	R	1.6	R	-	-	-	-
22	H5003	1.9	R	1.8	R	1.6	R	-	-	-	-
23	BT-1	2.5	R	2.2	R	2.9	R	1.4	HR	1.2	HR
24	YN-3	3.2	R	3.3	R	1.4	HR	-	-	-	-
25	YN-208	3.4	R	1.4	HR	1.9	R	-	-	-	-
26	K20HNGER1543	3.2	R	3.2	R	2.3	R	-	-	-	-
27	H4933	1	HR	2.6	R	2.1	R	-	-	-	-
28	H5097	2	R	2.8	R	2	R	-	-	-	-
29	H5084	2	R	2.1	R	2.1	R	-	-	-	-
30	K20HNGER1503	1.5	R	2.6	R	1.8	R	-	-	-	-
31	YN-295	3.1	R	3.4	R	1.9	R	-	-	-	-
32	H4842	2.9	R	1.9	R	1.2	HR	-	-	-	-
33	YN-81	3.1	R	2.8	R	2.4	R	-	-	-	-
34	YN-143	3.1	R	3.3	R	2.8	R	-	-	-	-
35	18XDHNAM11-48	2.1	R	3.4	R	2.4	R	2.3	R	2.3	R
36	18XDHNAM11-80	1.4	HR	3.3	R	1	HR	2.2	R	1.5	R
37	18XDHNAM11-66	3.2	R	2.5	R	1.7	R	1.5	R	1.8	R
38	18XDHNAM11-69	1	HR	2.5	R	2.2	R	1.5	R	1.3	HR
39	18XDHNAM11-138	2.7	R	2.5	R	1.8	R	2	R	2.4	R

40	18XDHNAM11-27	3.1	R	2.9	R	2.1	R	2.5	R	1	HR
41	18XDHNAM11-149	3.4	R	3.4	R	2.4	R	2.8	R	2.8	R
42	18XDHNAM11-162	1.4	HR	3.4	R	1.3	HR	1.6	R	1.6	R
43	18XDHNAM11-20	2.3	R	1.7	R	2.8	R	2	R	1	HR
44	18XDHNAM11-153	2.5	R	2.8	R	2.6	R	2.2	R	2.2	R
45	18XDHNAM11-112	1	HR	3.4	R	2.8	R	1	HR	-	-
46	18XDHNAM11-168	2.3	R	3.1	R	2.2	R	1.4	HR	1.4	HR
47	18XDHNAM11-131	2.5	R	2.2	R	1.7	R	1	HR	2.8	R
48	H4845	1.8	R	3.2	R	1.8	R	-	-	-	-
49	18XDHNAM11-129	2.4	R	2.5	R	2.5	R	1	HR	2.6	R
50	18XDHNAM21-39	2.4	R	3.5	R	2.2	R	2	R	2.3	R
51	18XDHNAM21-33	1.2	HR	1	HR	2.5	R	3	R	2	R
52	18XDHNAM4-137	2.4	R	1.9	R	1.9	R	2	R	2.3	R
53	18XDHNAM4-8	3.4	R	3.3	R	1.9	R	1.3	HR	1	HR
54	18XDHNAM4-75	2.1	R	2	R	2.6	R	2	R	1.6	R
55	18XDHNAM4-15	2.2	R	2.4	R	3.4	R	1.7	R	1	HR
56	18XDHNAM4-141	1.4	HR	1.6	R	2.6	R	2.5	R	1.4	HR
57	18XDHNAM13-29	1.4	HR	2.7	R	1.8	R	2	R	2	R
58	18XDHNAM21-62	3.2	R	2.8	R	2.4	R	1.3	HR	-	-
59	19J1956-2	2.9	R	3.3	R	2.4	R	-	-	-	-

HR 代表高抗;R 代表抗病;-代表缺失

HR stands for highly resistant; R stands for resistant;- stands for absence