

# 玉米烟嘧磺隆敏感基因的遗传分析及基因定位

洪翠萍 韩 帅 张彦军 王立静 魏海忠 钟世宜 刘保申

(山东农业大学 农学院 山东 泰安 271018)

**摘要:** 磺酰脲类除草剂烟嘧磺隆由于低用量、低毒、广谱及使用方便等特点而被广泛使用。对包括 Wny-1 和 yn-6 在内的 81 个玉米自交系进行烟嘧磺隆敏感性试验,并以 Wny-1 和 yn-6 为亲本进行烟嘧磺隆敏感性遗传研究。通过 Wny-1 和 yn-6 杂交、回交得到  $F_1$ 、 $BC_1$  群体,进而分析烟嘧磺隆敏感性遗传规律;利用  $BC_1$  群体中的烟嘧磺隆敏感单株对该敏感基因进行 SSR 标记定位。结果表明 81 个玉米自交系中有 8 个敏感,73 个耐烟嘧磺隆;yn-6 对烟嘧磺隆的敏感性由 1 对隐性核基因控制,该基因位于第 5 染色体短臂上 5S-96 和 5S-78 标记之间,物理距离约为 0.18 Mb,暂时将该基因命名为 *nsfy*。

**关键词:** 烟嘧磺隆; 敏感性; 遗传分析; 基因定位

中图分类号: S513.023 文献标识码: A 文章编号: 1000-7091(2012)04-0149-04

## Genetic Analysis and Gene Mapping of Sensitivity to Nicosulfuron in Corn

HONG Cui-ping, HAN Shuai, ZHANG Yan-jun, WANG Li-jing, WEI Hai-zhong,  
ZHONG Shi-yi, LIU Bao-shen

(Agronomy College, Shandong Agricultural University, Tai'an 271018, China)

**Abstract:** The sulfonylurea herbicide nicosulfuron has been used widely and rapidly for weed control because its advantages such as low application rates, low toxicity, broad-spectrum and flexible application. A total of 81 corn inbreds including Wny-1 and yn-6 were evaluated for tolerance to nicosulfuron.  $F_1$ ,  $BC_1$  populations were constructed on the basis of the hybridization between Wny-1 and yn-6 and were used for genetic analysis of nicosulfuron sensitivity. Sensitive plants in  $BC_1$  population were used for mapping this gene with SSR markers. Of 81 inbreds evaluated, 73 were resistant and 8 were susceptible. A single recessive nuclear gene which was located on the short arm of chromosome 5 determined sensitivity to nicosulfuron in yn-6. This gene was mapped between 5S-96 and 5S-78 with physical distance of 0.18 Mb and temporarily named *nsfy*.

**Key words:** Sulfonylurea; Sensitivity; Genetic analysis; Gene mapping

玉米是重要的粮食、饲料和工业原料作物,近年来玉米生产在世界范围越来越受到重视,应用化学除草剂防治玉米田杂草的方法越来越普遍。磺酰脲类除草剂是目前世界上使用量最大的一类除草剂<sup>[1-2]</sup>,烟嘧磺隆是广泛应用于玉米的磺酰脲类苗后选择性除草剂,深受广大农民的欢迎,但近年来不断出现烟嘧磺隆药害现象,对玉米的敏感性也日渐被研究。烟嘧磺隆是内吸性茎叶处理剂,它被杂草叶片或根部迅速吸收后,通过木质部和韧皮部在植物体内传导,抑制植物体内的乙酰乳酸合成酶(ALS)的活性,阻止支链氨基酸(缬氨酸、亮氨酸与异亮氨酸)合成<sup>[3-4]</sup>,进而阻止细胞分裂,使敏感植

物生长停滞、茎叶褪绿、逐渐枯死<sup>[5]</sup>,这一过程一般需要 7~15 d。在使用烟嘧磺隆除草剂的过程中发现,烟嘧磺隆可造成某些玉米自交系死亡,如 yn-6;而另一些自交系则能正常生长,如 Wny-1。本试验在对部分玉米品种进行烟嘧磺隆敏感性鉴定的同时,用 SSR 分子标记对玉米烟嘧磺隆敏感基因进行定位,以期为该除草剂的使用提供指导,为该基因的克隆及应用奠定基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 供试材料与药剂

供试玉米材料为 yn-6、Wny-1、YQ166、JM、

收稿日期: 2012-02-20

基金项目: 国家科技支撑计划项目(2011BAD35B01); 山东省农业良种产业化项目(鲁农良种字[2011]7号)

作者简介: 洪翠萍(1986-),女,山东滨州人,在读硕士,主要从事作物杂种优势与利用研究。

通讯作者: 刘保申(1966-),男,山东武城人,教授,博士生导师,主要从事作物杂种优势与利用研究。

YQ165、CPN050、2B42、YN-1-1、3841 等 81 个玉米自交系,由山东农业大学农学院提供。

供试药剂为 4% 烟嘧磺隆悬浮剂(山东先达化工有限公司)。

## 1.2 种植和调查方法

待玉米生长至有 3~5 片叶时用手动喷雾器进行烟嘧磺隆覆顶喷药处理,喷药浓度为 48 g/hm<sup>2</sup>,兑水 15 L,喷药 7~15 d 后进行田间调查。植株死亡判定为对烟嘧磺隆敏感,植株能恢复生长判定为耐烟嘧磺隆。自交系分行种植,每行 25 株左右。

## 1.3 遗传分析和定位群体的构建

对 Wny-1 和 yn-6 进行杂交和回交,分别得到其正反交 F<sub>1</sub> 和回交(Wny-1/yn-6//yn-6)BC<sub>1</sub>。田间种植 F<sub>1</sub>、BC<sub>1</sub> 群体,喷药后调查死亡植株和正常生长植株的数量。用 BC<sub>1</sub> 群体中的敏感植株构成烟嘧磺隆敏感基因的定位群体。

## 1.4 烟嘧磺隆敏感基因的定位

亲本及群体基因组 DNA 提取采用简化的 SDS 法;试验中所用微卫星标记序列引自 10 条染色体的 432 对 SSR 引物或根据从 www.maizesequence.org 所得序列用 Primer premier 5.0 自己开发,由华大基因公司合成。PCR 分析参照文献[6]的方法。PCR 反应产物在 6% 垂直平板聚丙烯酰胺凝胶上电泳,经 0.2% 硝酸银染色后观测。

对烟嘧磺隆敏感基因的定位采用 Michelmore 等<sup>[7]</sup>提出的近等基因池分析法。

表 1 Wny-1、yn-6 以及杂交和回交后代喷药后的反应

Tab. 1 Responses of Wny-1 yn-6 and their descendants after spraying

材料 Material	喷药后反应 Responses after spraying		理论比 Theoretical ratio	$\chi^2$
	正常 Normal	死亡 Doom		
Wny-1	26	0		
yn-6	0	26		
F <sub>1</sub>	48	0		
F <sub>1</sub> <sup>R</sup>	45	0		
BC <sub>1</sub>	335	329	1:1	0.038

注: F<sub>1</sub>: Wny-1/yn-6; F<sub>1</sub><sup>R</sup>: yn-6/Wny-1; BC<sub>1</sub>: Wny-1/yn-6//yn-6;  $\chi^2_{0.05}(1) = 3.84$ ,  $\chi^2_{0.01}(1) = 6.63$ 。

## 2.3 nsfy 基因定位

本次试验中所用 BC<sub>1</sub> 群体共有 664 个单株,烟嘧磺隆敏感植株数为 329,用敏感单株组成定位群体。经过 2 个亲本、烟嘧磺隆耐性池、烟嘧磺隆敏感池的筛选,发现有 2 对位于第 5 染色体短臂上的微卫星标记 *p-umc1523* 和 *p-umc2036* 一直表现出多态性,可能与烟嘧磺隆敏感基因连锁。用标记 *p-umc1523* 和 *p-umc2036* 进一步进行群体检测,结果证明,烟嘧磺隆敏感基因与这两个 SSR 分子标记存在连锁,图 1 是标记 *p-umc2036* 在定位群体单株中

## 1.5 连锁分析

根据 SSR 分析的结果,利用 MAPMAKER (EXP3.0b) 作图软件<sup>[8]</sup>计算标记与烟嘧磺隆敏感基因间的遗传距离(LOD = 3.0)。用 Mapdraw<sup>[9]</sup>软件绘制该基因的遗传连锁图谱。

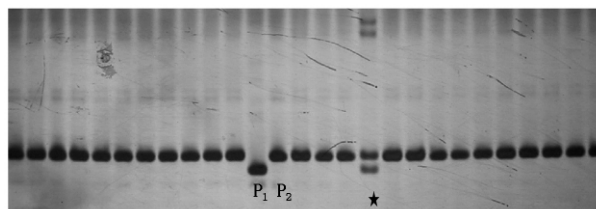
# 2 结果与分析

## 2.1 种质资源鉴定结果

喷药 7~15 d 后对 81 个自交系进行调查,发现 YQ166、yn-6、JM、YQ165、CPN050、2B42、YN-1-1、3841 等 8 个自交系植株死亡,因此,这 8 个自交系是烟嘧磺隆敏感自交系,包括 Wny-1 在内的其余 73 个自交系为烟嘧磺隆耐性自交系。敏感自交系中 3841 是普通玉米,其他是糯玉米,因此,烟嘧磺隆敏感现象不仅仅存在于糯玉米中。

## 2.2 烟嘧磺隆敏感性遗传分析

喷药 7~15 d 后进行田间调查:在 48 g/hm<sup>2</sup> 喷药浓度下,Wny-1 表现为耐烟嘧磺隆,yn-6 敏感;其正、反交 F<sub>1</sub> 代全都表现为耐烟嘧磺隆,且耐药性表现一致,均出现轻微药害现象但很快恢复正常生长,这表明烟嘧磺隆敏感性性状受细胞核隐性基因控制,与细胞质基因无关;(Wny-1/yn-6//yn-6)BC<sub>1</sub> 群体中出现性状分离,田间统计性状分离情况,结果如表 1 所示,卡方检验耐:敏分离比例符合 1:1,因此,敏感性性状受 1 对隐性核基因控制,暂时将该基因命名为 *nsfy*(*nsf-yn-6*)。



P<sub>1</sub>: Wny-1; P<sub>2</sub>: yn-6; ★: 交换单株。  
P<sub>1</sub>: Wny-1; P<sub>2</sub>: yn-6; ★: Crossing-over plant。

图 1 SSR 标记 *p-umc2036* 在

两亲本间的多态性及部分敏感单株中的扩增结果

Fig. 1 polymorphism and amplification of SSR marker *p-umc2036* in parents and some sensitivity plants

的扩增结果。经遗传分析发现,烟嘧磺隆敏感基因位于 *p-umc1523* 和 *p-umc2036* 之间,遗传距离分别为 13.13、3.06 cM。根据 *p-umc1523* 和 *p-umc2036* 之间的序列设计引物,找到 4 个与目标基因紧密连锁的 SSR 分子标记,分别将它们定名为 5S-88 (AC197912)、5S-96 (AC215857)、5S-78 (AC207421)

和 5S-80 (AC207421)。这几个标记在染色体上的顺序为近端体—*p-umc1523*—5S-88—5S-96—*nsfy*—5S-78—5S-80—*p-umc2036*—近着丝点(图 2),它们的序列见表 2。参考 <http://www.maizese-quence.org/blast> 的玉米序列数据,分析可知 5S-96 和 5S-78 的遗传距离为 13 cM,物理距离约为 0.18 Mb。

表 2 本试验中应用的部分 SSR 分子标记引物序列

Tab.2 Primer sequences of some SSR molecular markers applied in this experiment

标记名称 Marker name	登录号 Accession No. of BAC	前引物序列 Sequence of forward primer	后引物序列 Sequence of reverse primer
<i>p-umc1523</i>	b0067K19	TTTTAACTGTAAACCGGCCACATT	AGAGTTAGATGACTGCAGTGGCTG
5S-88	AC197912	GTTCGCAGTTTCGTTTCT	CGGACGGCAGCAAGAAGC
5S-96	AC215857	TGATAGCCGATAGGTCGTTGTG	GTCAGCTTTCATGTCCGTTGC
5S-78	AC207421	GCGAGACAGGAAGGAAGTGGAGG	TTTGCTCGGCTTCTTGGGATTTA
5S-80	AC207421	CGAAAGGCTGCGAAGGCTAGATG	TACTTACTCCGTGGCGGTGTTT
<i>p-umc2036</i>	b0025F05	TCAATCAAGCCTCTCGTAAGGAAC	CTCTTGATCTCAACCGAAATCCTG

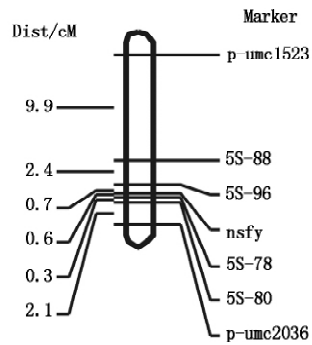


图 2 烟嘧磺隆敏感基因在玉米第 5 染色体上的分子标记定位

Fig.2 Molecular mapping of nicosulfuron sensitive gene on corn chromosome 5

3 讨论

磺酰脲类除草剂具有活性高、用量低、杀草谱广、选择性强等优点,非常符合人们对当代农药高效、低毒、低残留、低污染、低成本的追求。烟嘧磺隆是磺酰脲类玉米专用除草剂,是目前玉米田苗后除草剂的主打品种之一。玉米是我国的主要作物之一,其品种资源丰富,种类很多,生产中经常出现药害。1993 年 Kang<sup>[10]</sup>报道了玉米对烟嘧磺隆的敏感性,发现 Mp313E 对烟嘧磺隆的敏感性是由单隐性基因决定的,并把此敏感基因命名为 *nsf*。而 Bradshaw<sup>[11]</sup>、Barret 等<sup>[12]</sup>发现,烟嘧磺隆敏感自交系 GA209 对烟嘧磺隆的敏感性是由 1 个隐性基因 *ben1* 决定。1999 年 Moreno 等<sup>[13]</sup>用 B-A 染色体易位的方法将烟嘧磺隆敏感基因定位在第 7 条染色体上;2006 年 Williams 等<sup>[14]</sup>用图位克隆的方法将 *nsf1* 定位在第 5 染色体短臂上,并断定 *nsf1* 和 *ben1* 是同一

个基因。2008 年 Jonathan 等<sup>[15]</sup>将甜玉米自交系 Crl 对烟嘧磺隆敏感的基因定位到第 5 染色体短臂上,并在 5.01 处找到与其紧密连锁的标记,推定此基因是 *nsf1/ben1* 基因或与 *nsf1/ben1* 位点紧密连锁的基因。

本试验所用 81 个玉米自交系中 8 个为烟嘧磺隆敏感自交系,敏感自交系约占所测试自交系的 10%。敏感自交系中 3841 是普通玉米,其他是糯玉米,因此,烟嘧磺隆敏感现象普遍存在玉米各亚种中,研究不同玉米品种对该除草剂的敏感性差异,对玉米生产具有实际意义。目前,我国对这方面的研究大多停留在品种药害程度鉴定,对烟嘧磺隆敏感基因进行定位的较少,如陶波等<sup>[16]</sup>研究报道,玉米不同类型对烟嘧磺隆耐性不同,其耐性顺序为硬粒型>一般型>普甜型>爆裂型。本试验对多个玉米自交系进行烟嘧磺隆敏感性鉴定的同时,也对玉米烟嘧磺隆敏感性进行遗传分析和基因定位。通过对 *yn-6*、*Wny-1* 及 (*Wny-1/yn-6//yn-6*) *BC<sub>1</sub>* 群体的敏感性及遗传分析表明,*yn-6* 对烟嘧磺隆的敏感性是由 1 对隐性核基因控制的,暂时将该基因命名为 *nsfy*。通过 SSR 分子标记分析将该基因定位到第 5 染色体短臂 5.01 处,距 *nsfy* 基因最近的 2 个分子标记 5S-96 和 5S-78 之间的物理距离约为 0.18 Mb,为进行烟嘧磺隆敏感基因的分子标记辅助选择育种奠定基础。*nsfy* 与 *nsf1* 是否是同一基因或紧密连锁的基因,还有待于进一步验证。

参考文献:

[1] 甄英琴, 垢敬, 李葳, 等. 浅谈磺酰脲类除草剂的发展现状[J]. 天津农林科技, 2004, 181(5): 22-24.  
[2] 邓金保. 磺酰脲类除草剂综述[J]. 世界农药, 2003, 25

- (3): 24–32.
- [3] Gaston S, Ribas-Carbo M, Busquets S, *et al.* Changes in mitochondrial electron partitioning in response to herbicides inhibiting branched-chain amino acid biosynthesis in soybean [J]. *Plant Physiology*, 2003, 133: 1351–1359.
- [4] Chipman D, Barak Z, Schloss JV. Biosynthesis of 2-acetyl-2-hydroxy acids: acetolactate synthase and aceto-hydroxyacid synthase [J]. *Biophysica Acta*, 1998, 1385: 401–419.
- [5] Grandoni J A, Marta P T, Schloss J V. Inhibitors of branched-chain amino acid biosynthesis as potential anti-tuberculosis agents [J]. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 1998, 42(4): 475–482.
- [6] 王立静, 哈丽旦, 张素梅, 等. 新的玉米矮秆突变基因的鉴定与遗传分析 [J]. *华北农学报*, 2008, 23(5): 23–25.
- [7] Michelmore R W, Paran I, Kesseli R V. Identification of markers linked to disease-resistance genes by bulked segregant analysis: A rapid method to detect markers in specific genomic regions by using segregating populations [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1991, 88(21): 9828–9832.
- [8] Lander E S, Green P, Abrahamson J, *et al.* Mapmaker: An interactive computer package for constructing primary genetic linkage maps of experimental and natural populations [J]. *Genomics*, 1987, 1: 174–181.
- [9] 刘仁虎, 孟金陵. MapDraw 在 Excel 中绘制连锁图谱的宏 [J]. *遗传*, 2003, 25(3): 317–321.
- [10] Kang M S. Inheritance of susceptibility to nicosulfuron herbicide in maize [J]. *Hered*, 1993, 84: 216–217.
- [11] Bradshaw L D, Barrett M, C G Poncleit. Inheritance of bentazon susceptibility in a corn (*Zea mays*) line [J]. *Weed Sci*, 1994, 42: 641–647.
- [12] Barrett M, Polge N, R. Baerg, *et al.* Role of cytochrome P450 in herbicide metabolism and selectivity and multiple herbicide metabolizing cytochrome P450 activities in maize [M]//Hatzios K. Regulation of Enzymatic Systems Detoxifying Xenobiotics in Plants. Dordrecht: Kluwer Academic, 1997: 35–50.
- [13] Moreno O J, Kang M S, Wang G, *et al.* Chromosomal location of *nsfl* gene in maize by use of B-A translocations [J]. *Abstr Amer Soc Agron*, 1999, 91: 75.
- [14] Williams Sowinski M, S, Dam T, *et al.* Map-based cloning of the *nsfl* gene of maize [J]. *Maize Genetics Conference Abstracts*, 2006, 48: 26.
- [15] Jonathan N N, Martin M, Williams I I, *et al.* A common genetic basis in sweet corn inbred cr1 for cross sensitivity to multiple cytochrome P450-metabolized herbicides [J]. *Weed Science*, 2008, 56: 376–382.
- [16] 陶波, 苏少泉, 刘金宇. 农作物对磺酰脲类除草剂耐性的研究 [J]. *东北农业大学学报*, 1995(2): 105–106.