

DOI: 10.3724/SP.J.1006.2010.00428

利用核心种质发掘及评价花生抗黄曲霉资源

姜慧芳¹ 任小平¹ 王圣玉¹ 张晓杰¹ 黄家权¹ 廖伯寿¹
Corley C HOLBROOKA² Hari D UPADHYAYA³¹ 中国农业科学院油料作物研究所 / 农业部油料作物生物学重点开放实验室, 湖北武汉 430062; ² USDA-ARS, P O Box 748, Tifton, Georgia 31793, USA; ³ International Crops Research Institute for the Semi-Arid Tropics, Patancheru, AP 502 324, India

摘要: 黄曲霉菌极大地限制全世界的花生生产和产业发展, 且生产上抗性品种较少, 我国花生育种和生产中的抗性资源缺乏, 迫切需要发掘抗黄曲霉种质。本研究以中国花生核心种质 561 份和 ICRISAT 微核心种质 155 份为材料, 鉴定了黄曲霉侵染和产毒抗性, 发掘出抗黄曲霉侵染和产毒种质各 8 份, 包括具优良农艺性状的抗黄曲霉产毒种质 51002-6。鉴定结果表明, ICRISAT 花生微核心种质中抗黄曲霉侵染和产毒种质的频率高于中国花生核心种质; 普通型花生资源中抗黄曲霉侵染种质的频率较高, 龙生型资源中抗黄曲霉产毒种质的频率较高。根据 SSR 分析, 鉴定出与生产上推广应用的优良品种中花 5 号、中花 6 号、中花 12 和远杂 9102 遗传距离较远的抗黄曲霉产毒种质 ICG12625 和抗侵染种质 ICG4750, 拓宽了我国花生品种改良的遗传基础。根据抗病基因产物的 NBS 类型保守域设计简并引物对抗黄曲霉种质的 DNA 进行 PCR 扩增、克隆、测序和分析, 获得了 1 条 RGA 片段。

关键词: 花生核心种质; 抗黄曲霉资源; 农艺性状; SSR 遗传多样性; RGA

Development and Evaluation of Peanut Germplasm with Resistance to *Aspergillus flavus* from Core Collection

JIANG Hui-Fang¹, REN Xiao-Ping¹, WANG Sheng-Yu¹, ZHANG Xiao-Jie¹, HUANG Jia-Quan¹, LIAO Bo-Shou¹, Corley C HOLBROOKA², and Hari D UPADHYAYA³¹ Oil Crops Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences / Key Laboratory of Oil Crop Biology of the Ministry of Agriculture, Wuhan 430062, China; ² USDA-ARS, PO Box 748, Tifton, Georgia 31793, USA; ³ International Crops Research Institute for the Semi-Arid Tropics, Patancheru, AP 502 324, India

Abstract: Peanut (*Arachis hypogaea* L.), one of the main oil and cash crops in the world, is easily susceptible to *Aspergillus flavus*, resulting huge loss in its quality, so *Aspergillus flavus* infection greatly limits peanut production and industry in China. Therefore, it is imperative to develop new peanut germplasm with resistance to *Aspergillus flavus* in breeding program. The core collection is well accepted as a useful way to improve the efficiency of crop germplasm evaluation and utilization, which contains a subset of accessions from the entire collection that covers the most of available genetic information. In the present study, a total of 561 accessions of Chinese peanut core collection and 155 accessions of ICRISAT mini core collection were identified. Eight varieties with resistance to *Aspergillus flavus* invasion and aflatoxin production each were developed, including one (51002-6) with elite agronomic traits. The peanut germplasm with resistance to *Aspergillus flavus* invasion and aflatoxin production in ICRISAT mini core were more than those in Chinese peanut core collection. In addition, the percentages of accessions with resistance to *Aspergillus flavus* invasion in var. *hypogaea*, and accessions resistant to aflatoxin production in var. *hirsuta* were relatively high in comparison with others. Genetic diversity in the resistant peanut selections was evaluated based on morphological traits and SSR approach. ICG12625 with resistance to aflatoxin production and ICG4750 with resistance to aflatoxin invasion were evaluated by SSR, the genetic distance of them with high-yielding cultivars such as Zhonghua 5, Zhonghua 6, Zhonghua 12, and Yuanza 9102 was larger. The primers were designed based on the conserved NBS-LRR domains of the disease resistance genes sequence, one RGA (resistance gene analog) from genomic DNA of six different peanuts with resistance to *Aspergillus flavus* was obtained through PCR.

Keywords: Peanut core collection; Varieties with resistance to *Aspergillus flavus*; Agronomic traits; SSR genetic diversity; RGA

本研究由国家科技支撑计划项目(2006BAD13B05-2), 国家自然科学基金项目(30571132), 国家科技基础条件平台项目(2005DKA21002-13)和农作物种质资源保护项目(NB07-2130135-35)资助。

第一作者联系方式: E-mail: peanutlab@oilcrops.cn

Received(收稿日期): 2009-07-09; Accepted(接受日期): 2009-10-02.

花生黄曲霉毒素是黄曲霉菌(*Aspergillus flavus*)及寄生曲霉菌(*Aspergillus parasiticus*)的产毒菌株侵染花生后产生的毒性物质,对人和动物危害极大。花生是最容易受黄曲霉菌侵染的农作物之一,我国花生生产规模较大,干燥和贮藏条件难于保证,是世界上花生黄曲霉毒素污染较为严重的国家^[1-2]。培育和应用抗病品种是防治花生病害最为经济有效的途径。近30年来,国际上广泛开展了花生黄曲霉抗性的研究,发现花生对黄曲霉毒素污染的抗性存在两种类型,一种是对黄曲霉菌侵染的抗性(抗侵染),即以种皮的特殊生化成分抵御黄曲霉菌的侵染和定殖;另一种是对黄曲霉菌产毒的抗性(抗产毒),即在黄曲霉菌侵染后抑制其毒素产生^[3-6]。目前世界范围内发掘出的抗黄曲霉毒素污染的种质较少^[3-12],应用于生产的抗病品种更少,严重影响了抗病育种的进展。

从收集的基础花生资源中筛选所需要的抗黄曲霉材料,费时费力。核心种质是用科学的方法建立的并且能以最小的资源数量最大程度地代表整个遗传资源的多样性群体,从而为种质资源的评价和鉴定带来方便。国内外研究表明,通过核心种质发掘优异基因资源是有效的。Holbrook等^[13-14]通过对美国花生核心种质的叶斑病和根结线虫抗性鉴定,获得了一批抗病资源并明确了抗根结线虫资源的地理分布,将鉴定效率提高了一倍。Anderson等^[15]和Iseib等^[16]通过美国花生核心种质的番茄斑萎病抗性鉴定,发掘出55份抗病资源,并认为花生核心种质为快速有效进行抗病资源发掘提供了一个合理的种质范围。但目前国内外很少有关于通过花生核心种质发掘出抗黄曲霉资源的研究报道。

我国构建了以576份资源组成的中国花生核心种质,并从ICRISAT引进了全套微核心种质184份^[17],本研究以这两套核心种质为材料,对其进行黄曲霉接种鉴定,旨在发掘抗病资源,为花生抗黄曲霉育种取得突破及资源有效利用提供基础。

1 材料与方 法

1.1 试验材料

中国花生核心种质561份和ICRISAT微核心种质155份(由于种子数量的限制未用全部的核心种质),以“J11”为抗病对照,“中花5号”为感病对照。

1.2 黄曲霉抗性鉴定及调查方法

连续3年(2006—2008年)选取成熟饱满、种皮

完整的种子(未经其他任何杀菌剂、种衣剂等处理),参考姜慧芳等^[8-9]描述的方法接种黄曲霉菌。接种物为本实验室筛选出的强产毒菌株AF2202,浓度为每毫升 4×10^6 孢子,每品种接种40粒,重复3次。置25℃生长箱中培养7d。用甲醇提取黄曲霉毒素,用荧光分光光度计检测毒素含量。按《花生种质资源描述规范和数据标准》的方法和标准调查侵染和产毒抗性^[18]。

1.3 抗病种质植物学性状的调查

2007—2008年连续两年将鉴定出的抗黄曲霉材料种植于中国农业科学院油料作物所试验农场,按《花生种质资源描述规范和数据标准》^[18]对主要农艺性状进行调查。

1.4 抗病种质的SSR分析

选取花生健壮幼叶,采用CTAB法提取基因组DNA^[19]。用国际半干旱研究所(ICRISAT)生物技术实验室提供的SSR引物序列由上海生工公司或北京奥科公司合成引物,按本实验室建立的优化体系进行PCR扩增。用6%变性聚丙烯酰胺凝胶电泳分离扩增产物,银染显色,电脑扫描。

1.5 抗病种质的RGA分析

根据NB-LRR型抗病基因的NBS保守区的氨基酸序列设计4对简并引物(表1)扩增基因组DNA,扩增产物经1.0%琼脂糖凝胶(含核酸染色剂)电泳,用OMEGA公司GEL EXTRACTION KIT柱式DNA凝胶回收试剂盒回收差异DNA片段与pGM-T载体的连接,将连接产物转化到大肠杆菌,并进行菌落PCR检测、测序及分析。

2 结果与分析

2.1 核心种质对黄曲霉菌侵染的反应及抗侵染种质的发掘

通过对716份花生材料包括中国花生核心种质561份和ICRISAT微核心种质155份的鉴定,获得资源的感染指数0.19~1.00。其中,感染指数小于0.30的资源材料8份,占1.12%;感染指数在0.31~0.40之间的33份,占4.61%;感染指数在0.41~0.55之间的66份,占9.22%,其余资源的感染指数均在0.55以上,占85.06%。可见,花生资源中抗黄曲霉侵染种质的频率很低。

中国花生核心种质与ICRISAT微核心种质比较(表2),中国资源的感染指数在0.30以下的资源4份,占其0.71%。ICRISAT花生核心种质的感染指数在

表1 花生抗病基因同源序列扩增引物
Table 1 Primer sequences used for the amplification of peanut resistance gene analogs (RGA)

引物编号 Primer ID	模体 Motif	模体序列 Motif sequence	引物序列 Primer sequence (5'-3')
PLTR-fwd	P-loop	GMGGVVGKTT	GGNATGGGNGTNGGNAARACNACN
PLTR-rev	GLPL	GLPLALKVLG	NCANCARAANGGNTGNGGNGGGTANGG
PNTR-fwd	P-loop	GGVVGKTT	GGNGGNGTNGGNAANACNAC
PNTR-rev	RNBS-D	CFLYCALFP	CGRAANARNSHRCARTANVNRAARC
PCRE-fwd	Kinase-2	LILDDVW	TGATACTGGATGATGTCTGG
PCRE-rev	EGF	EGFIRNT	GTGCTTCTTATGAACCCTTC
PRGA-fwd	P-loop	GVGKTT	GGNGGNGTNGGNAANACNAC
PRGA-rev	GLPL	GLPLAL	ARNGCTARNGGNARNCC

表2 不同花生种质对黄曲霉菌感染反应
Table 2 Response to infection by *Aspergillus flavus* in different peanut varieties

种质类别 Type of germplasm	具不同感染指数的品种(抗性品种)数量 No. of varieties (resistant varieties %) with different infection indexes						总数 Total
	0.30	0.31-0.40	0.41-0.55	0.56-0.70	0.71-0.85	>0.85	
中国花生核心种质 Chinese core collection	4(0.71%)	16(2.85%)	35(6.24%)	97(17.29%)	210(37.43%)	199(35.47%)	561
ICRISAT 花生微核心种质 ICRISAT mini core collection	4(2.58%)	17(10.97%)	31(20%)	53(34.19%)	33(21.29%)	17(10.97%)	155
多粒型 var. <i>fastigiata</i>	0	6(7.32%)	8(9.76%)	22(26.83%)	22(26.83%)	24(29.27%)	82
赤道型 var. <i>aequatoriana</i>	0	0	0	1(100)	0	0	1
秘鲁型 var. <i>peruviana</i>	0	0	0	1(50)	1(50)	0	2
珍珠豆型 var. <i>vulgaris</i>	1(0.34%)	17(5.76%)	22(7.46%)	43(14.58%)	108(36.61%)	104(35.25%)	295
龙生型 var. <i>hirsuta</i>	0	1(2.86%)	3(8.57%)	9(25.71%)	15(42.86%)	7(20.00%)	35
普通型 var. <i>hypogaea</i>	7(2.63%)	14(5.26%)	32(12.03%)	70(26.32%)	79(29.70%)	64(24.06%)	266
中间型 Intermediate type	0	0	1(2.86%)	2(5.71%)	17(48.57%)	15(42.86%)	35

括号内的值为抗性品种的百分数。

The values in brackets mean percentage of resistant varieties.

0.30 以下的材料也是 4 份, 占其 2.58%。可见, ICRISAT 花生微核心品中抗黄曲霉感染种质的频率高于中国花生核心种质的对应值。

不同植物学类型材料对黄曲霉菌感染的反应(表 2)表明, 多粒型、龙生型和中间型花生中均没有感染指数在 0.30 以下的种质。赤道型和秘鲁型资源较少, 仅 3 份, 均表现不抗黄曲霉菌感染, 感染指数均在 0.56 以上。珍珠豆型花生中感染指数在 0.30 以下的材料 1 份, 占该类型的 0.34%。普通型花生中感染指数在 0.30 以下的材料 7 份, 占该类型的 2.63%。由此可见, 普通型花生中, 抗黄曲霉感染种质的频率最高。

综上所述, 在中国花生核心种质和 ICRISAT 花生微核心种质中发掘出抗黄曲霉感染种质 8 份(表 4), 包括珍珠豆型 1 份和普通型 7 份。其中, 中国和

ICRISAT 花生种质各 4 份。

2.2 核心种质对黄曲霉菌产毒的反应及抗产毒种质的发掘

与抗黄曲霉菌感染鉴定相似, 对 716 份核心种质的接种鉴定表明, 黄曲霉毒素含量小于 6 000 $\mu\text{g kg}^{-1}$ 的材料 8 份, 占鉴定资源总数的 1.12%; 毒素含量在 6 000.1~15 000.0 $\mu\text{g kg}^{-1}$ 之间的 44 份, 占 6.15%; 毒素含量在 15 000.1~30 000.0 $\mu\text{g kg}^{-1}$ 之间的 105 份, 占 14.66%, 其余材料的毒素含量均在 30 000.0 $\mu\text{g kg}^{-1}$ 以上, 占 78.07%。可见, 花生种质资源中, 抗黄曲霉菌产毒种质的频率与抗感染种质的频率相似。

表 3 表明, 中国花生核心种质中, 毒素含量小于 6 000 $\mu\text{g kg}^{-1}$ 的材料 5 份, 占 0.89%, 毒素含量在 6 000.1~15 000.0 $\mu\text{g kg}^{-1}$ 之间的 31 份, 占 5.70%, 毒素含量在 15 000.1~30 000.0 $\mu\text{g kg}^{-1}$ 之间的 81 份, 占

14.44%。ICRISAT 花生微核心种质中, 毒素含量小于 6 000 $\mu\text{g kg}^{-1}$ 的材料 3 份, 占 1.94%, 毒素含量在 6 000.1~15 000.0 $\mu\text{g kg}^{-1}$ 之间的 13 份, 占 8.39%, 毒素含量在 15 000.1~30 000.0 $\mu\text{g kg}^{-1}$ 之间的 24 份, 占 15.48%。可见, ICRISAT 花生微核心种质中抗黄曲霉产毒资源的频率高于中国花生核心种质的对应值。

综合分析不同植物学类型材料对黄曲霉产毒的反应(表 3)表明, 龙生型和普通型花生中毒素含量小于 6 000 $\mu\text{g kg}^{-1}$ 的材料各 2 份, 分别占各类型的

5.71%和 0.75%。珍珠豆型花生中毒素含量小于 6 000 $\mu\text{g kg}^{-1}$ 的材料 3 份, 占该类型的 1.02%。涉及赤道型材料 1 份, 表现抗黄曲霉菌产毒, 接种条件下毒素含量为 4 257 $\mu\text{g kg}^{-1}$ 。多粒型和秘鲁型材料均表现不抗黄曲霉菌产毒。

通过上述分析, 在中国花生核心种质和 ICRISAT 花生微核心种质中发掘出抗黄曲霉产毒种质 8 份(表 4), 包括赤道型 1 份, 珍珠豆型 3 份, 龙生型 2 份和普通型 2 份。

表 3 中国花生核心种质和 ICRISAT 花生微核心种质对黄曲霉产毒反应

Table 3 Response to aflatoxin production in Chinese core collection and ICRISAT mini core collection ($\mu\text{g kg}^{-1}$)

种质类型 Type of germplasm	具不同毒素含量的品种(抗性品种)数量 No. of varieties (resistant varieties %) with different aflatoxin contents					总数 Total
	6000	6000.1-15000.0	15000.1-30000.0	30000.1-50000.0	>50000.0	
中国花生核心种质 Chinese core collection	5(0.89%)	31(5.53%)	81(14.44%)	147(26.20%)	297(52.94%)	561
ICRISAT 花生微核心种质 ICRISAT mini core collection	3(1.94%)	13(8.39%)	24(15.48%)	44(28.39%)	71(45.81%)	155
多粒型 var. <i>fastigiata</i>	0	5(6.10%)	10(12.20%)	18(21.95%)	49(59.76%)	82
赤道型 var. <i>aequatoriana</i>	1(100%)	0	0	0	0	1
秘鲁型 var. <i>peruviana</i>	0	0	1(50%)	1(50%)	0	2
珍珠豆型 var. <i>vulgaris</i>	3(1.02%)	22(7.46%)	46(15.59%)	82(27.80%)	142(48.14%)	295
龙生型 var. <i>hirsuta</i>	2(5.71%)	4(11.43%)	5(14.29%)	9(25.71%)	15(42.86%)	35
普通型 var. <i>hypogaea</i>	2(0.75%)	13(4.89%)	40(15.04%)	79(29.70%)	132(49.62%)	266
中间型 Intermediate	0	1(2.86%)	2(5.71%)	2(5.71%)	30(85.71%)	35

括号内的值为抗性品种的百分数。

The values in bracket mean percentage of resistant varieties.

表 4 通过核心种质发掘出的抗黄曲霉材料

Table 4 Peanut varieties with resistance to *Aspergillus flavus* in core collections

种质名称 Genotype	植物学类型 Botanical type	来源 Origin	感染指数 Infection index	种质名称 Genotype	植物学类型 Botanical type	来源 Origin	毒素含量 Toxin content ($\mu\text{g kg}^{-1}$)
铺地毡 Pudizhan	普通 var. <i>hypogaea</i>	中国 China	0.23	51002-6	珍珠豆 var. <i>vulgaris</i>	中国 China	3495
百色大花生 Baisedahuasheng	普通 var. <i>hypogaea</i>	中国 China	0.25	沙岗立大 Shaganglida	普通 var. <i>hypogaea</i>	中国 China	5703
老番豆 Laofandou	普通 var. <i>hypogaea</i>	中国 China	0.27	揭农 Jienong	珍珠豆 var. <i>vulgaris</i>	中国 China	5959
新沂大麻花 Xinyidamahua	普通 var. <i>hypogaea</i>	中国 China	0.30	巨野小花生 Juyexiaohuasheng	龙生 var. <i>hirsuta</i>	中国 China	5592
ICG6813	普通 var. <i>hypogaea</i>	ICRISAT	0.25	岷县小红毛 Shengxianxiaohongmao	龙生 var. <i>hirsuta</i>	中国 China	5224
ICG12370	普通 var. <i>hypogaea</i>	ICRISAT	0.19	赤道 var. <i>aequatoriana</i>	赤道 var. <i>aequatoriana</i>	ICRISAT	4257
ICG4750	珍珠豆 var. <i>vulgaris</i>	ICRISAT	0.30	珍珠豆 var. <i>vulgaris</i>	珍珠豆 var. <i>vulgaris</i>	ICRISAT	5019
ICG4156	普通 var. <i>hypogaea</i>	ICRISAT	0.22	普通 var. <i>hypogaea</i>	普通 var. <i>hypogaea</i>	ICRISAT	5159

2.3 抗病种质的主要植物学性状和产量性状

对 16 份抗侵染和产毒材料的主要植物学性状和产量性状比较表明, ICG12697 的主茎最高(115.5 cm), 51002-6 的主茎最矮(44.5 cm)。ICG12697 的侧枝最长(123.2 cm), 51002-6 的侧枝最短(53.6 cm)。ICG6813 的总分支数最多(21.8 个), ICG12697 的总分支数最少(4.9 个)。揭农的单株结果数最多(19.9 个), ICG12370 的单株结果数最少(5.3 个)。沙岗立大和 51002-6 的荚果和种子均较大, 荚果长宽分别为 3.9 cm×1.6 cm 和 3.5 cm×1.5 cm, 种子长宽分别为 2.0 cm×0.9 cm 和 1.8 cm×1.0 cm, 百果重分别为 206.5 g 和 202.2 g, 百仁重分别为 82.8 g 和 78.0 g, 出仁率分别为 70.2%和 72.5%。嵊县小红毛的出仁率最高(79.8%), 51002-6 的单株生产力最大(22.5 g)。

2.4 抗病种质的 SSR 遗传多样性

以获得的抗病种质和生产上应用的优良品种中花 5 号、中花 6 号、远杂 9102、中花 12 为材料, 用 206 对 SSR 引物进行扩增, 筛选获得 26 对具多态性且扩增效果较好的引物。26 对 SSR 引物扩增获得的条带数为 2~8 条, 其中 1B9 和 8D9 的条带最多, 均

为 8 条, 而大部分引物在大多数种质基因组 DNA 中只扩增出 2~4 条带。

26 对引物在对黄曲霉菌不同抗性种质中扩增出的 DNA 片段及遗传距离表明, 所涉及的抗黄曲霉种质间遗传差异较大, 遗传距离变幅较宽, 其范围在 0.11~0.86 之间, 平均为 0.42。在 20 份材料中, 两两之间遗传距离最大的出现在 2 份抗产毒种质, 即赤道型的 ICG12625 与普通型的沙岗立大之间, 为 0.86; 遗传距离最小的出现在 2 份普通型的抗侵染种质, 即铺地毡和百色大花生之间, 为 0.11。两两品种之间遗传距离达 0.42 以上的有 89 个组合。与中花 5 号、中花 6 号、远杂 9102 和中花 12 平均遗传距离最远的种质是 ICG12625, 遗传距离在 0.71~0.85 之间, 其次是 ICG4750, 遗传距离在 0.59~0.67 之间。

应用相关软件, 对 20 份材料的 SSR 扩增结果进行聚类分析(图 1), 在遗传距离 0.65 处被分为 2 组(A 组和 B 组)。A 组由来源于 ICRISAT 的 ICG4750(抗侵染)和 ICG12625(抗产毒)组成。B 组的 18 份材料在遗传距离 0.42 处进一步分为 3 个亚组。B1 亚组由密枝亚种的普通型和龙生型共 11 份资源组成, 包括

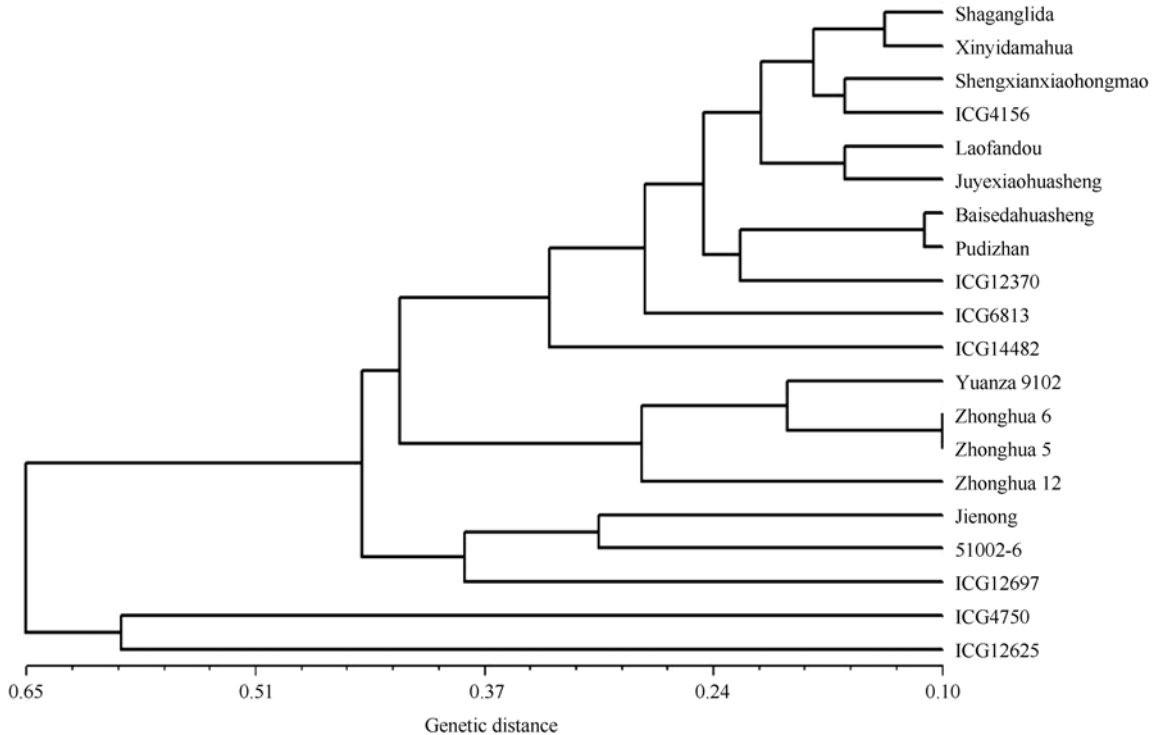


图 1 抗黄曲霉资源聚类图
Fig. 1 Dendrogram of genotypes with aflatoxin resistance based on SSR profiles

Shaganglida: 沙岗立大; Xinyidamahua: 新沂大麻花; Shengxianxiaohongmao: 嵊县小红毛; Laofandou: 老番豆; Juyexiaohuasheng: 巨野小花生; Baisedahuasheng: 百色大花生; Pudizhan: 铺地毡; Yuanza 9102: 远杂 9102; Zhonghua 6: 中花 6 号; Zhonghua 5: 中花 5 号; Zhonghua 12: 中花 12; Jienong: 揭农。

7 份抗侵染材料和 4 份抗产毒材料; B2 亚组由生产上应用的 4 份优良品种组成; B3 亚组由 3 份抗产毒的珍珠豆型资源组成。

2.5 抗病种质的 RGA 分析

利用设计的 4 对简并引物, 对 6 份不同抗、感黄曲霉的花生(沙岗立大、巨野小花生、揭农、崂县小红毛、51002-6 和中花 12)基因组 DNA 进行 PCR 扩增, 获得特异 DNA 条带的引物有 3 对, 包括 PLTR、PNTR 及 PCRE, 其中 PCRE 在所有材料中均扩增出约 500 bp 的特异条带(图 2)。

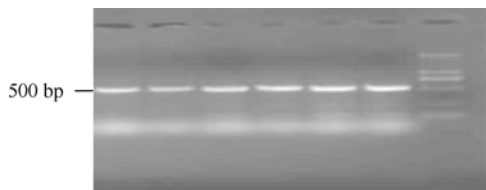


图 2 简并引物 PCRE 对 6 份抗黄曲霉种质的扩增结果
Fig. 2 PCR amplifications using degenerated primer PCRE among six varieties genotypes with different resistance to aflatoxin

将回收的目的片段连接到 pGM-T 载体上, 转化至大肠杆菌感受态细胞中, 重组质粒经蓝白斑筛选后, 随机挑选 3~5 个白色菌落进行 PCR 鉴定。挑选的 6 个克隆均扩增出略大于 500 bp 的条带, 说明目的 DNA 片段已连接到 pGM-T 载体上。序列分析结果显示, 6 个重组质粒均含插入片段, 序列测定表明插入片段中含引物序列。将重组质粒去除 pGM-T 载体后进行序列比对, 表明这 6 条序列对应于 1 条 RGA 序列。该 RGA 编码 166 个氨基酸。将获得的 DNA 序列输入 NCBI 网站的 GenBank 数据库, 利用 Blast 进行同源性搜索, 发现该序列与已公布的植物抗病基因类似物(RGA, 登录号为 AY747324.1)具有一定的同源性, 编码蛋白与该基因编码的 CRE 蛋白同源性达到 100%。

用 CLUSTAL X 软件分析 5 份抗病和 1 份感病品种的同源序列, 发现其核苷酸序列完全相同, 而在感病品种中花 12 中, 在第 14 位和第 444 位两处存在单核苷酸的多态性(SNP)位点变化(表 5)。

表 5 不同抗黄曲霉种质的核苷酸序列差异比较

Table 5 Comparison of nucleotide sequences in peanut varieties with various resistance to *Aspergillus flavus*

	沙岗立大 Shaganglida	巨野小花生 Juyexiaohuasheng	揭农 Jienong	崂县小红毛 Shengxianxiaohongmao	51002-6	中花 12 Zhonghua 12
第 14 位碱基 14th Nt	A	A	A	A	A	G
第 444 位碱基 444th Nt	A	A	A	A	A	C

3 讨论

本研究表明, 利用花生核心种质发掘抗黄曲霉资源是有效的。通过对 2 个核心种质人工接种黄曲霉菌鉴定其抗性, 获得抗黄曲霉侵染材料 8 份, 抗黄曲霉产毒种质 8 份。抗病材料存在广泛的遗传多样性, 感染指数和毒素含量变异范围均较宽。接种强产毒黄曲霉菌株后中国花生核心种质的感染指数为 0.23~1.00, 毒素含量为 3 495~175 947 $\mu\text{g kg}^{-1}$, ICRISAT 花生微核心种质相应为 0.19~1.00 和 4 257~207 970 $\mu\text{g kg}^{-1}$ 。ICRISAT 花生微核心种质中抗黄曲霉侵染和产毒材料频率均较高, 普通型花生资源中抗黄曲霉侵染种质的频率较高, 龙生型资源中抗黄曲霉产毒种质的频率较高。这些结果为制定我国花生种质资源的收集、引进和保护计划具有参考价值。

系统了解作物种质资源的主要特性和遗传多样性是资源有效利用和保护的基础^[20], 鉴定和发掘与高产品种遗传差异较大的抗病种质, 对于改良高产优良品种的抗性具有重要意义。本研究发掘出的 16

份抗病种质在形态性状方面存在较大差异, 其中 51002-6 的植株较矮, 高产潜力较大, 荚果和种子均较大, 单株生产力高。SSR 分析结果与植物学分类吻合, 珍珠豆型、普通型、龙生型分别聚在一起, 中国花生资源与 ICRISAT 资源也基本上能区分开, 表明中国花生种质与 ICRISAT 花生种质存在一定差异。鉴定出与生产上推广应用的优良品种中花 5 号、中花 6 号、中花 12 和远杂 9102 遗传距离较远的种质 ICG12625、ICG4750、ICG12697、ICG14482 和老番豆。因此, 在对这些优良品种进行遗传改良时, 可以选择这些亲缘关系较远、遗传距离较大的种质, 扩大我国花生品种改良的遗传基础。

根据抗病基因产物的 NBS 类型保守域设计 4 对简并引物对抗黄曲霉种质的 DNA 进行 PCR 扩增, 通过克隆测序和同源性分析, 获得 1 条与已公布的植物抗病基因类似物具有一定同源性的 RGA 片段, 该片段在感病品种中花 12 与其他 5 个抗病品种之间有两处存在碱基差异, 此片段是否与花生黄曲霉抗性相关, 有待进一步研究。这些结果为揭示花生抗黄曲霉的分子机制和花生的分子育种奠定了基础。

4 结论

发掘出抗黄曲霉侵染和产毒种质 16 份, 证明利用花生核心种质发掘抗黄曲霉资源是有效的。通过对抗感材料的分析, 获得 1 条 RGA 片段。

References

- [1] Liang X-Q(梁炫强), Pan R-Z(潘瑞炽), Bin J-H(宾金华). Progress on mechanism of resistance to *Aspergillus* infection in peanut. *Chin Oil Crops Sci* (中国油料作物学报), 2000, 22(3): 77–80 (in Chinese with English abstract)
- [2] Liang X-Q(梁炫强), Pan R-Z(潘瑞炽), Bin J-H(宾金华). Factors related to preharvest resistance to *Aspergillus* infection in peanut. *Chin Oil Crops Sci* (中国油料作物学报), 2000, 22(4): 67–70 (in Chinese with an English abstract)
- [3] Xiao D-R(肖达人), Wang S-Y(王圣玉), Qu Z(瞿桢). Progress on aflatoxin contamination of peanut. *Peanut Sci Tech* (花生科技), 1999, 28(suppl): 124–129 (in Chinese)
- [4] Xiao D-R(肖达人), Wang S-Y(王圣玉), Zhang H-L(张洪玲). Rapid identifying method for resistance to aflatoxin production in peanut. *Chin Oil Crops Sci* (中国油料作物学报), 1999, 21(3): 72–76 (in Chinese with English abstract)
- [5] Mehan V K, McDonald D. Research on the aflatoxin problem in groundnut at ICRISAT. *Plant Soil*, 1984, 79: 255–260
- [6] Mehan V K, McDonald D, Rasagopalan K. Resistance of peanut genotypes to seed infection by *Aspergillus flavus* in field trials in India. *Peanut Sci*, 1987, 14: 17–21
- [7] Mehan V K, McDonald D, Haravu L J, Jayanthi S. The groundnut aflatoxin problem: Review and literature database. ICRISAT Press, 1991
- [8] Jiang H-F(姜慧芳), Wang S-Y(王圣玉), Ren X-P(任小平). Reaction of groundnut germplasm to *Aspergillus flavus* invasion. *Chin Oil Crops Sci* (中国油料作物学报), 2002, 24(1): 23–25 (in Chinese with English abstract)
- [9] Jiang H-F(姜慧芳), Ren X-P(任小平), Wang S-Y(王圣玉). Evaluation for resistance to invasion and aflatoxin contamination caused by *Aspergillus flavus* in groundnut. *Chin Oil Crops Sci* (中国油料作物学报), 2005, 27(3): 21–25 (in Chinese with English abstract)
- [10] Jiang H-F(姜慧芳), Ren X-P(任小平), Wang S-Y(王圣玉), Liao B-S(廖伯寿). Durability of resistance to *Aspergillus flavus* infection and effect of intact testa without injury on Aflatoxin production in peanut. *Acta Agron Sin* (作物学报), 2006, 32(6): 851–855 (in Chinese with English abstract)
- [11] Mixon A C. Peanut accessions resistance to seed infection by *Aspergillus flavus*. *Agron J*, 1973, 65: 560–562
- [12] Mixon A C. Reducing *Aspergillus* species infection of peanut seed using resistant genotypes. *J Environ Qual*, 1986, 15: 101–103
- [13] Holbrook C C, Anderson W F. Evaluation of a core collection to identify resistance to late leaf spot in peanut. *Crop Sci*, 1995, 35: 1700–1702
- [14] Holbrook C C, Timper P, Xue H Q. Evaluation of the core collection approach for identifying resistance to *Meloidogyne arenaria* in peanut. *Crop Sci*, 2000, 40: 1172–1175
- [15] Anderson W F, Holbrook C C, Culbreath A K. Screening the core collection for resistance to tomato spotted wilt virus. *Peanut Sci*, 1996, 23: 57–61
- [16] Isleib T G, Beute M K, Rice P W, Hollowell J E. Screening the peanut core collection for resistance to *Cylindrocladium* black rot and early leaf spot. *Proc Am Peanut Res Edu Soc*, 1995, 27: 25
- [17] Jiang H-F(姜慧芳), Ren X-P(任小平), Liao B-S(廖伯寿), Huang J-Q(黄家权), Lei Y(雷永), Chen B-Y(陈本银), Guo B Z, Holbrook C C, Upadhyaya H D. Peanut core collection established in China and compared with ICRISAT mini core collection. *Acta Agron Sin* (作物学报), 2008, 34(1): 25–30 (in Chinese with English abstract)
- [18] Jiang H-F(姜慧芳), Duan N-X(段乃雄). Descriptors and data standard for peanut (*Arachis* spp.). Beijing: China Agriculture Press, 2006. pp 11–36 (in Chinese)
- [19] Lei Y(雷永), Liao B-S(廖伯寿), Wang S-Y(王圣玉), Li D(李栋), Jiang H-F(姜慧芳). Identification of AFLP markers for resistance to seed infection by *Aspergillus flavus* in peanut (*Arachis hypogaea* L.). *Acta Agron Sin* (作物学报), 2005, 31(10): 1349–1353 (in Chinese with English abstract)
- [20] Mace E S, Phong D T. SSR analysis of cultivated groundnut (*Arachis hypogaea* L.) germplasm resistant to rust and late leaf spot diseases. *Euphytica*, 2006, 152: 317–330