

云南不同来源四路糯玉米 *waxy* 和 *tb1* 基因分析

武晓阳, 隆文杰, 陈丹, 周国雁, 杜娟, 伍少云*, 蔡青* (云南省农业科学院生物技术与种质资源研究所/云南省农业生物技术重点实验室/农业部西南作物基因资源与种质创制重点实验室, 云南昆明 650223)

摘要 [目的]为四路糯资源的保护、研究与开发利用特异资源提供科学依据。[方法]对8份云南不同来源的四路糯资源材料进行糯性基因 *waxy*、分蘖基因 *tb1* 的测序及 SSR 分子标记分析, 探讨不同来源四路糯的形成规律。[结果]试验所用糯玉米具有共同的突变类型 *wx-D10*, 即 *waxy* 基因第10外显子15-bp的缺失; 检测控制分蘖的 *tb1* 基因发现, 在四路糯中保留了2类不同的等位基因, 并发现具有杂合基因型的植株存在; 进一步利用40对SSR标记检测不同来源的四路糯, 获得了27个多态性基因位点。[结论]试验所用四路糯有统一的起源, 在形成后基因组内依然保留了大量多等位基因位点, 由于四路糯在传播过程中发生不同等位基因的丢失, 形成不同类型的四路糯。

关键词 四路糯; *waxy* 基因; *tb1* 基因; 遗传分化

中图分类号 S513 **文献标识码** A

文章编号 0517-6611(2020)06-0025-05

doi: 10.3969/j.issn.0517-6611.2020.06.008

开放科学(资源服务)标识码(OSID): 

The Waxy and *tb1* Gene Analysis of Four-Row Wax Maizes with Different Sources of Yunnan

WU Xiao-yang, LONG Wen-jie, CHEN Dan et al (Biotechnology and Germplasm Resources Institute/Yunnan Provincial Key Lab of Agricultural Biotechnology/Key Lab of Southwestern Crop Gene Resource and Germplasm Innovation Ministry of Agriculture, Yunnan Academy of Agricultural Sciences, Kunming, Yunnan 650205)

Abstract [Objective] To provide scientific basis for special germplasm resources of the protection, development and utilization of four-row waxy maize resources. [Method] Sequencing of waxy gene *waxy*, tillering gene *tb1* and SSR molecular marker analysis were carried out for eight four-row wax maize resources of Yunnan. Their formation rules were also discussed. [Result] These four-row waxy maizes had the same mutation type *wx-D10*, which was 15-bp deletion in exon 10 of waxy gene; detection of *tb1* gene controlling tillering revealed that two different alleles were retained in four-row *waxy* maizes and plants with heterozygous genotype were found; 40 SSR markers were used to detect four-row waxy maizes from different sources, and 27 polymorphic loci were obtained. [Conclusion] These four-row *waxy* maizes had a unified origin; many different alleles were still retained in the genome after the formation of four-row waxy maizes; different types of four-way *waxy* were formed due to the loss of alleles during the process of material transmission.

Key words Four-row waxy maizes; Waxy gene; *tb1* gene; Genetic differentiation

糯性玉米(*Zea mays* L. var. *certain* Kulesh)是一类特殊的玉米栽培类型。中国拥有丰富的糯性玉米地方品种。以往研究发现中国西南地区,特别是云南及其周边地区是中国糯性玉米的起源中心^[1-3]。云南及其周边地区是中国少数民族的聚集地,他们自古以来就有食用糯性食物的习惯。很多特殊类型的糯性玉米就是在这一地区发现。四路糯(Four-row Wax)就是其中之一,它最早在云南勐海的傣族居民区发现,其果穗具有四路籽粒,形态具有许多玉米的原始特征^[4]。

目前,勐海四路玉米已有许多研究报道。通过对 *waxy* 基因的分析发现,勐海四路是 *wx-D10* 类型的突变^[5-6]。四路糯自交系 SICAU1212 通过与普通玉米自交系 B73 杂交构建 RIL(Recombinant Inbred Lines, 重组自交系)群体,进行果穗行数的 QTL 定位,结果发现3个主效 QTL,分布在 bin 2.02、bin 8.02 和 bin 8.04^[7];四路糯自交系 K10HEX206 和农 531 建立 F2:3 家系,进行果穗行数的 QTL 定位,结果发现5个主效 QTL,分布在 bin 2.04、bin 4.09、bin 5.04、bin 8.05 和 bin 9.03^[8]。勐海四路基因组重测序的完成为四路糯的研究

提供了基础数据^[9]。由此可见,四路糯已成为玉米遗传育种及相关基础学科的最佳特异研究材料,收集保护好这一珍贵的中国古老地方品种具有重要意义。

玉米糯质性受隐性的 *waxy* 单基因控制。普通玉米 *waxy* 基因能正常表达 *GBSS* I 蛋白,用于直链淀粉的合成。*waxy* 的突变造成 *GBSS* I 蛋白失去活性,直链淀粉的合成受阻,使玉米籽粒中的淀粉几乎全为支链淀粉,产生出糯质性籽粒^[10-11]。*tb1* 基因是控制玉米分蘖基因,该基因在大刍草基因组中被抑制表达,结果植株产生许多分蘖,而在玉米基因组中表达量提高使玉米植株无分蘖或少分蘖^[12-13]。*waxy* 和 *tb1* 基因均是在玉米驯化过程中受到人工选择压力的基因位点^[6,14-15]。

四路糯原产云南勐海、景洪、勐腊等县,是当地傣族、哈尼族、拉祜族和其他民族同胞自1890年以来种植的糯玉米品种^[4],至今仍有少量种植。云南省农业科学院作物种质资源库经过多年考察收集,保存了来自云南勐海、孟连、盈江及缅甸南坎的四路糯玉米资源,观察发现不同来源的材料虽均具有相同的四路果穗、白色籽粒和多雌穗等特征,但抽雄时间、叶鞘颜色、果穗形态等存在差异。为进一步探索分析四路糯资源的遗传变异与分化情况,笔者对不同来源的四路糯资源材料进行糯性基因 *waxy*、分蘖基因 *tb1* 的测序及 SSR 分子标记分析,旨在探讨不同来源四路糯的形成规律,为四路糯资源的保护、研究与开发利用特异资源提供科学依据。

基金项目 科技部、财政部国家科技基础条件平台国家农作物种质资源平台云南子平台(NICGR2018-030);云南省博士后定向资助(云人社通[2018]168号)。

作者简介 武晓阳(1982—),男,河北邢台人,助理研究员,博士,从事作物种质资源保护和利用研究。*通信作者:伍少云,研究员,博士,从事作物种质资源研究;蔡青,研究员,从事作物种质资源研究。

收稿日期 2019-08-28

1 材料与方法

1.1 试验材料 该研究选用 8 份云南不同来源的四路糯为试验材料,以玉米自交系 B73 为非糯玉米对照(表 1)。试验

材料均由国家农作物种质资源平台云南作物子平台提供,现保存于云南省农业科学院作物种质资源保存库。

表 1 试验所用不同四路糯玉米的比较
Table 1 Comparison of the four-row waxy maizes in the test

编号 Code	材料名称 Name	收集年份 Year of collection	材料来源 Origin	籽粒颜色 Seed color	果穗行数 Ear row number	雌穗数目 Number of female ears	分蘖 Tillering	雄花籽 Male flower seed
1	勐海四路 1	2007	勐海县	白	4	4~6	无	无
2	勐海四路 2	2015	勐海县	白	4	4~6	有	无
3	勐海四路 3	2015	勐海县	白	4	4~6	无	有
4	勐海四路 4	2016	勐海县	白	4	4~6	无	无
5	缅甸四路	21 世纪初	缅甸(南坎)	白	4	2~6	无	无
6	养派四路 1	2015	孟连县	白	4	4~6	无	无
7	养派四路 2	2015	孟连县	白	4	4~6	无	无
8	芒允四路	2015	盈江县	白	4	4~6	无	无

1.2 田间种植 将 8 份材料分别种植于嵩明实验基地。每份材料种植 20 个籽粒,行距 100 cm,株距 40 cm。成株时观察植株分蘖特征并调查每株雌穗数目;成熟期观察雄花籽特征,成熟果穗调查每穗穗行数;自交产生果穗的籽粒通过 I2/KI 染色的办法确定其糯性有无。

1.3 waxy 与 tb1 基因测序与序列分析 幼苗期从幼叶中提取基因组 DNA^[16]。通过穗行数和糯性特点每份材料选取 1 株具有典型四路特性的植株进行基因测序和分子标记检测。*waxy* 基因序列(GenBank 数据库编号 X03935.1)^[17]及 *tb1* 基因序列(B73,Chr1 265810820-265812615)用于引物设计,设计引物的软件是 Primer 3^[18]。PCR 采用 50 μL 体系:1×PCR buffer、1U *Taq* 酶,0.2 mmol/L 的各 dNTPs,0.4 μmol/L 的两端引物,50 ng 基因组 DNA。PCR 反应程序:94 ℃ 持续 1 min,35 个循环:94 ℃ 持续 30 s,50~65 ℃ 持续 30 s,72 ℃持续 90 s,最后 72 ℃持续 10 min。PCR 产物用于直接测序。基因结构图使用 GS-DS(Gene Structure Display Server,基因结构显示系统)绘制^[19]。采用软件 Clustal X (1.8)进行序列比对^[20]。

1.4 SSR 标记检测 该研究使用的 40 对 SSR 标记信息来自 MaizeGDB 网站(<https://archive.maizegdb.org/>)。PCR 产物使用 8%的聚丙烯酰胺凝胶电泳检测,银染后进行基因型统计。

2 结果与分析

2.1 田间表现 通过田间种植观察,不同来源四路糯均具有四路果穗和白色籽粒的特征,并在果穗的背部存在 1 个明显的凹槽(图 1)。

2.2 waxy 基因分析 玉米 *waxy* 基因具有 14 个外显子,通过 7 对引物可以覆盖整个 *waxy* 基因编码区(表 2、图 2),PCR 产物用于直接测序。*waxy* 基因的第二外显子区段的 GC 含量较高,该研究设计的巢式引物 *waxy*_25 和 *waxy*_27 可以对这一区段有效扩增。对 8 个典型单株进行测序,序列比对发现 8 个单株的 *waxy* 基因序列完全一致,其中引物 *waxy*_7 可以扩增第 9~10 外显子的区域,与对照序列比对发现 8 类材料具有一致的突变类型 *wx-D10*(图 3)。由图 3 可知,*waxy* 基因序列比对展示 *wx-D10* 突变位点,与野生型的 *waxy* 基因

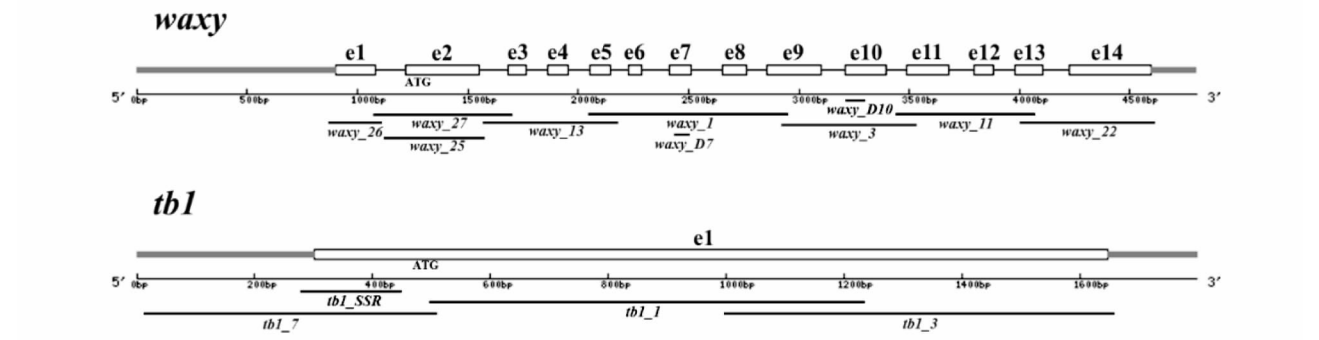


注:1~8 代表试验所用的 8 份四路糯;A.果穗的正面形态,B.果穗的背面形态
Note:1-8 were the 8 four-row waxy maizes ; A.The frontal shape; B. The back shape

图 1 8 份四路糯的穗部形态比较

Fig.1 Comparison of the ear shapes of 8 four-row wax maizes 相比存在 15-bp 的序列缺失;*tb1* 基因序列比对展示位于 5'-UTR 的 SSR 位点,这一位点可以检测出 8 份四路糯中存在 2 类等位基因,等位基因 1 较等位基因 2 缺少 5 个 AG 重复。利用 D10 位点两翼序列设计了 1 对特异标记 *waxy_D10* 用于 *wx-D10* 的检测(图 4)。

2.3 *tb1* 基因分析 *tb1* 基因具有单个外显子,通过 3 对引物可以覆盖整个 *tb1* 基因(表 2,图 2),PCR 产物用于直接测序。对 8 个典型单株进行测序,序列比对发现 *tb1* 基因编码区序列非常保守并不存在核苷酸多态性,在 *tb1* 基因的 5'-UTR (5'-untranslated region,5'-非翻译区域)存在 1 个 GA 重复的 SSR(Simple Sequence Repeats,简单序列重复)位点,并在这一位点存在差异(图 3)。利用这一微卫星位点设计了 1 对 SSR 标记 *tb1_SSR* 用于检测 8 个材料,这一差异位点可以将 8 份材料的 *tb1* 基因划分成为 2 个等位基因(图 4),4 号四路糯和 6 号四路植株依然保留了杂合基因型。



注:*waxy* 基因具有 14 个外显子 e1~e14;*tb1* 具有一个外显子 e1;基因结构图下方的线条表示设计引物扩增的基因区段
Note:The *waxy* gene had 14 exons e1-e14; the *tb1* gene had an exon e1; the lines below the structure map was the gene segment of primer amplification

图 2 *waxy* 和 *tb1* 基因结构
Fig.2 Structure map of *waxy* and *tb1* gene

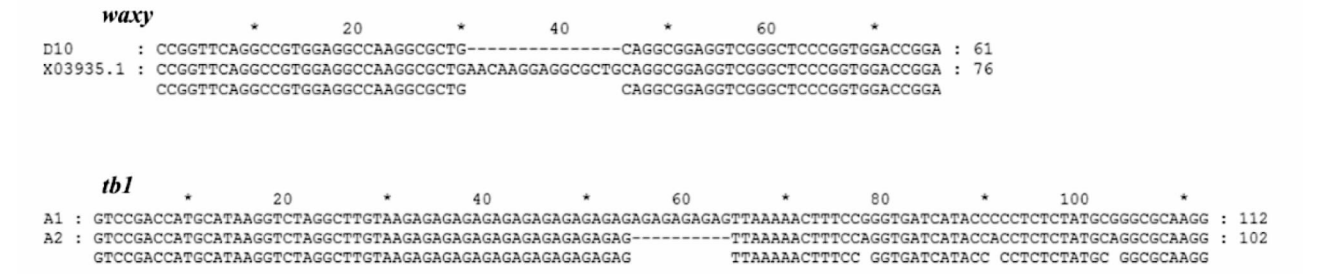


图 3 *waxy* 和 *tb1* 基因序列比对结果
Fig.3 Sequence alignment results of *waxy* and *tb1* gene

表 2 不同引物的比较
Table 2 Comparison of the primers

引物名称 Primer name	正向引物序列(5'-3') Forward primer sequence(5'-3')	反向引物序列(5'-3') Reverse primer sequence(5'-3')	扩增片段长度 Amplified fragment length//bp	退火温度 Annealing temperature//℃
<i>waxy</i> _1	GGAACGGACTACAGGGACAA	ATGAGCTCCTCGGCGTAGTA	866	57
<i>waxy</i> _3	TCACCGTCAGCCCCTACTAC	CTTGCTGGGAACCTCTCCT	624	57
<i>waxy</i> _11	GATCGTTCTGCTGTACGTGT	AGTTCCTACCATCTCCTCGT	698	57
<i>waxy</i> _13	ATGTGTTTCTCTCTGGCTTG	TCCGGAAGAATATGGTTTGT	658	57
<i>waxy</i> _22	TTCCCACTGTAACGTCGTGG	AACACCGAACAGCAGGATT	650	57
<i>waxy</i> _25	CGTGACACCTCTTTTCTCTC	TACACGAACACAAGCCAGGAG	468	57
<i>waxy</i> _26	AGAAATACCGAGGCTCGAC	GCCGATTAATCCACTGCGTA	365	57
<i>waxy</i> _27	CTGCGTGTGTTGATGATCCAG	GGCATCAGAGCAGAGAAAGG	694	57
<i>waxy</i> _D10	GTGGTGTGGTGTCCGGTT	TCTGCTCTTCCAGCTCG	115	57
<i>tb1</i> _1	GCCTTGGAGTCCCATCAGTA	TTATTGCCGATTCTTCTTGG	742	57
<i>tb1</i> _3	GGTACAGTGGCTCTCAACAC	AAGCGTGACTTCTGCTGAAAG	654	57
<i>tb1</i> _7	ATTCTCTCCCTCTCCCTCA	GGGCTTGAGAATCACAGAA	520	57
<i>tb1</i> _SSR	GAGTGGTATGATCACCTGGA	TCCTGGCACTAAGAGCAGTGT	186	57

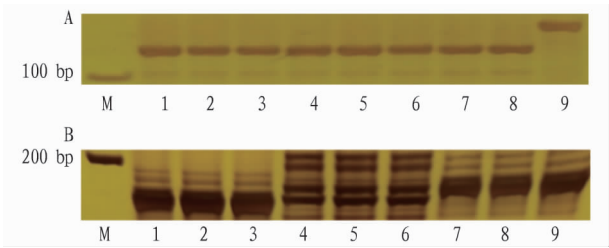
2.4 SSR 标记检测 进一步利用 40 对分布于玉米各染色体的 SSR 标记检测 8 份不同来源的四路糯,发现 27 个存在差异的基因位点。这 27 个差异位点可以划分出 2~4 个等位基因类型,并发现单个植株中依然保留了多处基因型杂合的位点。例如 *bnlg2305k4w* 位点位于 bin 5.07 的位置,在不同来源的 8 份四路糯中检测出 4 类等位基因,而 2 号和 7 号四路糯材料保留了杂合基因型(表 3)。

3 讨论

四路糯起源于中国的云南,通过多次资源收集发现四路糯在云南的勐海、养派、芒允和中缅边境地区均有分布。这些材料具有共同的果穗行数均是四路,相同的籽粒均是白色。最早的四路糯是在勐海地区发现,勐海四路属于 *wx-*

D10 突变。该研究进一步分析了不同来源的四路糯的 *waxy* 基因,发现四路糯均属于 *wx-D10* 类型突变,并且 *wx-D10* 之间并不存在序列差异。由此初步判断各地的四路糯最早具有同一来源。

四路糯具有多雌穗的特点,通常的玉米植株可以生长出 1~3 个雌穗。而四路糯通常可以生长出 3 个以上的雌穗。通常玉米不会像水稻和小麦一样长出分蘖,而来自勐海的四路糯可以生长出类似的分蘖,但是分蘖的育性很差,并不能产生种子。这些特征都属于玉米的原始特点,观察发现这些特点分布在不同来源的四路糯中,由此判断四路糯在传播的过程中发生分化。在以往的研究中,通过对不同居群的四路糯比较发现,在居群间存在遗传分化^[21]。



注:M 表示 Marker;1~8 泳道是来源不同的 8 份四路糯具有相同的 *wx-D10* 突变;9 泳道是非糯的玉米自交系 B73。B 为 *tb1_SSR* 的电泳结果,其中 M 表示 Marker,标记可以分辨出两类等位基因,1~3 泳道是等位基因 2,7~9 泳道是等位基因 1,4~6 泳道是杂合基因型

Note:M is marker;the lanes 1~8 are 8 four-row waxy maizes with the same *wx-D10* mutation; lane 9 is non-waxy maize inbred line B73.B is PAGE results of *tb1_SSR*,M is marker,*tb1_SSR* can distinguish two alleles,lanes 1~3 are allele 2, lanes 4~6 are allele 1,and lane 7~9 are heterozygous genotype

图 4 分子标记 *waxy_D10* 和 *tb1_SSR* 聚丙烯酰胺凝胶电泳结果
Fig.4 Polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) results of molecular markers *waxy_D10* and *tb1_SSR*

tb1 基因和 *waxy* 基因一样是在玉米形成的驯化选择中受到选择的基因位点,在四路糯的形成中,*waxy* 基因受到进一步的选择,仅保留了单一的 *wx-D10* 类型,而 *tb1* 基因位点并未受到类似的选择,保留了遗传多样性,在一些植株中还保留了杂合的基因型。玉米地方品种的形成是一个群体改良的过程,四路糯的形成也不例外。SSR 标记的分析发现,一些基因位点保留了 2 个以上的等位基因。如果所有的四路玉米来自 1 个突变植株的话,1 个基因位点就会最多保留两类等位基因。四路糯具有天然的防止混杂的特点。玉米地方品种通过开放式授粉的方式遗传,外源花粉的渗入都会造成一定程度的混杂。而四路糯具有果穗四路、白色籽粒和糯质性等特征,控制这些性状的基因位于不同的染色体上,通过这些性状的选择防止了来自外援花粉渗入造成的混杂。玉米地方品种通过姊妹交的方式遗传,这种近源的杂交的方式维持了每种地方品种各自的血统,并保证不与其他玉米出现混杂。

表 3 8 个四路糯品种在基因组不同位点的基因型比较
Table 3 Comparison of the genotypes at different genomic loci of 8 four-row waxy maizes

引物名称 Primer name	染色体位置 Chromosomal location	1	2	3	4	5	6	7	8	差异 Difference
<i>bnlg439w1</i>	1.03	11	12	11	11	11	11	12	12	有
<i>umc1335y5</i>	1.06	11	11	11	11	11	11	11	22	有
<i>umc1147y4</i>	1.07	11	11	11	11	11	11	11	11	无
<i>tb1_SSR</i>	1.09	11	11	11	12	22	12	11	11	有
<i>bnlg1671y17</i>	1.10	11	11	11	11	11	22	11	11	有
<i>phi96100y1</i>	2.00	—	—	11	11	11	11	11	11	有
<i>umc2007y4</i>	2.04	11	11	11	11	22	22	22	11	有
<i>umc1536k9</i>	2.07	—	11	11	12	11	11	11	11	有
<i>bnlg1940k7</i>	2.08	11	11	11	—	—	—	—	—	有
<i>bnlg1520K1</i>	2.09	11	11	11	11	11	11	11	22	有
<i>umc2105k3</i>	3.00	11	11	11	11	11	11	11	11	无
<i>phi053k2</i>	3.05	11	12	11	12	11	11	12	11	有
<i>umc1489y3</i>	3.07	11	11	11	11	11	22	22	22	有
<i>phi072k4</i>	4.01	11	11	11	11	11	11	—	—	有
<i>bnlg490y4</i>	4.04	—	—	—	—	11	11	—	—	有
<i>bnlg2291k4</i>	4.06	11	11	11	11	11	11	11	11	无
<i>umc1999y3</i>	4.09	11	11	11	11	11	11	11	11	无
<i>umc2115k3</i>	5.02	11	11	11	22	22	22	22	22	有
<i>umc1705w1</i>	5.03	11	11	11	11	11	11	11	11	无
<i>umc1429y7</i>	5.03	11	11	11	11	11	11	11	22	有
<i>bnlg2305k4</i>	5.07	11	12	11	11	33	33	34	11	有
<i>bnlg161k8</i>	6.00	11	11	11	22	11	13	11	11	有
<i>bnlg249k2</i>	6.01	11	11	11	11	11	11	11	11	无
<i>bnlg1702k1</i>	6.05	11	11	12	12	11	11	11	11	有
<i>phi299852y2</i>	6.07	11	11	11	12	11	11	11	11	有
<i>umc1545y2</i>	7.00	11	11	—	12	11	11	11	11	有
<i>umc2160k3</i>	7.01	11	12	12	11	22	11	11	11	有
<i>umc1936k4</i>	7.03	11	11	11	11	11	11	11	11	无
<i>umc1125y3</i>	7.04	11	11	11	11	11	11	11	11	无
<i>bnlg2235y5</i>	8.02	—	—	—	—	11	—	11	—	有
<i>bnlg240k1</i>	8.06	11	22	11	11	22	22	22	11	有
<i>phi080k15</i>	8.08	11	11	11	22	11	11	11	11	有
<i>phi233376y1</i>	8.09	11	11	11	12	11	11	11	11	有
<i>umc2084w2</i>	9.01	11	11	12	11	11	11	11	11	有
<i>phi065k9</i>	9.03	11	11	11	11	11	11	11	11	无
<i>waxy_D10</i>	9.03	11	11	11	11	11	11	11	11	无
<i>umc1492y13</i>	9.04	11	11	11	11	11	11	11	11	无
<i>umc1231k4</i>	9.05	11	11	11	11	11	11	11	11	无
<i>phi041y6</i>	10.00	11	11	11	11	11	11	11	11	有
<i>umc1432y6</i>	10.02	11	11	11	11	22	22	12	11	有
<i>umc2163w3</i>	10.04	11	11	11	11	11	11	11	11	无
<i>umc1506k12</i>	10.05	11	—	11	12	11	11	11	11	有

4 小结

该试验结果显示,试验所用四路糯有统一的起源,在形成后基因组内依然保留了大量多等位基因位点,由于四路糯在传播过程中发生不同等位基因的丢失,形成不同类型的四路糯。

参考文献

[1] LIU Y J, HANG Y B, RONG T Z, et al. Comparative analysis of genetic diversity in landraces of waxy maize from Yunnan and Guizhou using SSR markers[J]. *Agricultural sciences in China*, 2005(9): 648–653.

[2] 田孟良, 黄玉碧, 刘永建, 等. SSR 标记揭示的云南省、贵州省糯玉米与普通玉米种质资源的遗传差异[J]. *四川农业大学学报*, 2003, 21(3): 213–216.

[3] 杨太兴, 曾孟潜, 王璞. 我国南方糯玉米 (*Zea mays* Sinensis) 的过氧化物酶同工酶分析[J]. *植物学报*, 1981(2): 110–115.

[4] 曾孟潜, 杨太兴, 王璞. 勐海四路糯玉米品种的亲缘分析[J]. *遗传学报*, 1981(1): 91–96, 104.

[5] FAN L J, BAO J D, WANG Y, et al. Post-domestication selection in the maize starch pathway[J]. *PLoS One*, 2009, 4: 1–9.

[6] FAN L J, QUAN L Y, LENG X D, et al. Molecular evidence for post-domestication selection in the *Waxy* gene of Chinese waxy maize[J]. *Mol Breeding*, 2008, 22: 329–338.

[7] YANG C, TANG D G, ZHANG L, et al. Identification of QTL for ear row number and two-ranked versus many-ranked ear in maize across four environments[J]. *Euphytica*, 2015, 206: 33–47.

[8] 焦付超, 李永祥, 陈林, 等. 特异玉米种质四路糯的穗行数遗传解析[J]. *中国农业科学*, 2014, 47(7): 1256–1264.

[9] LIU H M, WANG X W, WEI B, et al. Characterization of genome-wide variation in four-row waxy, a waxy maize landrace with a reduced kernel row

phenotype[J]. *Frontiers in plant science*, 2016, 7: 1–12.

[10] DEMEREC M A. A case of pollen dimorphism in maize[J]. *American journal of botany*, 1924, 11: 461–464.

[11] WEATHERWAX P A. A rare carbohydrate in waxy maize[J]. *Genetics*, 1922, 7: 568–572.

[12] CLARK R M, WAGLER T N, QUIJADA P, et al. A distant upstream enhancer at the maize domestication gene *tb1* has pleiotropic effects on plant and inflorescent architecture[J]. *Nat Genet*, 2006, 38: 594–597.

[13] CUBAS P, LAUTER N, DOEBLEY J, et al. The TCP domain: A motif found in proteins regulating plant growth and development[J]. *The plant journal*, 1999 18: 215–222.

[14] CLARK R M, LINTON E, MESSING J, et al. Pattern of diversity in the genomic region near the maize domestication gene *tb1*[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, 101: 700–707.

[15] 田孟良, 黄玉碧, 谭功燮, 等. 西南糯玉米地方品种 *waxy* 基因序列多态性分析[J]. *作物学报*, 2008, 34(5): 729–736.

[16] DOYLE J J, DOYLE J L. Isolation of plant DNA from fresh tissue[J]. *Focus*, 1990, 12: 13–15.

[17] KLÖSGEN R B, GIERL A, SCHWARZ-SOMMER Z, et al. Molecular analysis of the waxy locus of *Zea mays*[J]. *Mol Gen Genet*, 1986, 203: 237–244.

[18] ROZEN S, SKALETSKY H. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers[J]. *Methods Mol Biol*, 2000, 132: 365–386.

[19] 郭安源, 朱其慧, 陈新, 等. GSDB: 基因结构显示系统[J]. *遗传*, 2007, 29(8): 1023–1026.

[20] THOMPSON J D, HIGGINS D G, GIBSON T J. CLUSTAL W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice[J]. *Nucleic acids research*, 1994, 22: 4673–4680.

[21] 张金渝, 张建华, 杨晓洪, 等. 西双版纳地区糯玉米品种四路糯、小黄糯的遗传多样性分析[J]. *中国农业科学*, 2007, 40(2): 234–243.

(上接第 24 页)

活性物质配合使用的治疗方式优于单一的治疗方式,避免长期使用单一治疗方式引起致病菌对其产生抗性。益生菌在机体消化代谢、免疫调节、疫病防治等方面的作用机制仍需深入研究。同时,使用益生菌防治禽病的方式还需结合生物安全防控、科学化饲养管理等综合措施,才能更好地促进家禽健康安全稳定生产。

参考文献

[1] 刘志林. 益生菌对猪肠道菌群的调控研究进展[J]. *山东畜牧兽医*, 2010, 31(3): 71–73.

[2] 刘帮兰, 沈联华, 陈秀梅, 等. 鸡柔嫩艾美耳球虫病检疫[J]. *中国畜禽种业*, 2017, 13(9): 147–148.

[3] 付春亮. 鸡球虫病的流行特点及防控措施[J]. *中国畜禽种业*, 2016, 12(6): 151–152.

[4] WALES A D, DAVIES R H A. A critical review of *Salmonella* Typhimurium infection in laying hens[J]. *Avian pathology*, 2011, 40(5): 429–436.

[5] 刘维, 励飞, 聂勇. 益生菌的作用机理及在养猪生产中的应用研究进展[J]. *饲料博览*, 2019(4): 23–26.

[6] VANDEPLAS S, DUBOIS D R, BECKERS Y, et al. *Salmonella* in chicken: Current and developing strategies to reduce contamination at farm level[J]. *Journal of food protection*, 2010, 73(4): 774–785.

[7] WOLFENDEN A D, VICENTE J L, HIGGINS J P, et al. Effect of organic acids and probiotics on *Salmonella enteritidis* infection in broiler chickens[J]. *International journal of poultry science*, 2007, 6(6): 403–405.

[8] BHANDARI S K, OPAPEJU F O, KRAUSE D O, et al. Dietary protein level and probiotic supplementation effects on piglet response to *Escherichia coli* K88 challenge: Performance and gut microbial population[J]. *Livest Sci*, 2010, 133(1/2/3): 185–188.

[9] 侯成立, 季海峰, 周雨霞, 等. 益生菌的作用机制及其在母猪生产中的应用[J]. *中国畜牧兽医*, 2011, 38(7): 20–22.

[10] 马云云, 王红妹, 杨玉华. 乳酸杆菌活菌制剂对大肠杆菌和鸡白痢沙门

氏菌体外拮抗试验[J]. *山东畜牧兽医*, 2006(3): 4–5.

[11] 范寰, 王建国, 孟繁瑞, 等. 不同发酵方法对预防鸡大肠杆菌病中药药效的影响[J]. *天津农业科学*, 2015, 21(9): 51–56.

[12] 蒋丹. *FimH* 基因重组乳酸菌对鸡致病性大肠杆菌的保护作用研究[D]. 长春: 吉林农业大学, 2014.

[13] 李朝辉, 孙龙, 王健, 等. 枯草芽孢杆菌和黄芪多糖对雏鸡免疫力的影响[J]. *吉林畜牧兽医*, 2019, 40(1): 5–8.

[14] 徐海燕, 曹斌, 辛国芹, 等. 一株芽孢杆菌的分离鉴定及其益生潜质分析[J]. *家畜生态学报*, 2012, 33(3): 48–54.

[15] 张涛. 复合乳酸菌制剂抗柔嫩艾美耳球虫效果研究[D]. 长春: 吉林农业大学, 2014.

[16] 王芬. 表达鸡柔嫩艾美耳球虫 *AMA1* 蛋白的乳酸乳球菌免疫保护作用[D]. 哈尔滨: 东北农业大学, 2016.

[17] 郭欣怡. 一起鸡球虫病的诊断及复合益生菌的治疗效果[J]. *黑龙江畜牧兽医*, 2017(4): 125–126.

[18] 张双龙. 混合乳酸菌抗鸡球虫感染作用效果的检测[D]. 长春: 吉林农业大学, 2012.

[19] 章薇. 枯草芽孢杆菌抑制鸡沙门氏菌的体外研究[C]//中国畜牧兽医学会 2013 年学术年会论文集. 北京: 中国畜牧兽医学会, 2013: 1.

[20] PENHA FILHO R A C, DÍAZ S J A, FERNANDO F S, et al. Immunomodulatory activity and control of *Salmonella* Enteritidis colonization in the intestinal tract of chickens by *Lactobacillus* based probiotic[J]. *Vet Immunol Immunopathol*, 2015, 167(1/2): 64–69.

[21] FEEN J C, WANG L H, ZHOU L X, et al. Using *in vitro* immunomodulatory properties of lactic acid bacteria for selection of probiotics against *Salmonella* infection in broiler chicks[J]. *PLoS One*, 2016, 11(1): 1–14.

[22] CHEN Q L, TONG C, MA S Y, et al. Involvement of microRNAs in probiotics-induced reduction of the cecal inflammation by *Salmonella* Typhimurium[J]. *Front Immunol*, 2017, 8: 1–13.

[23] WANG L H, LI L, LV Y, et al. *Lactobacillus plantarum* restores intestinal permeability disrupted by *Salmonella* infection in newly-hatched chicks[J]. *Sci Rep*, 2018, 8(1): 1–10.

[24] VILÀ B, FONTGIBELL A, BADIOLA I, et al. Reduction of *Salmonella enterica* var. Enteritidis colonization and invasion by *Bacillus cereus* var. *toyoi* inclusion in poultry feeds[J]. *Poultry science*, 2009, 88(5): 975–979.