

文章编号: 1005-0906(2004)02-0108-03

优质蛋白玉米的分子标记辅助选择

田清震,李新海,李明顺,姜伟,张世煌

(中国农科院作物育种栽培研究所 农业部作物遗传育种重点实验室 AMBIOENT-中国实验室,北京 100081)

摘要: 综述了应用于优质蛋白玉米种质辅助选择的分子标记,提出了优质蛋白玉米的分子标记辅助选择策略;通过对回交家系赖氨酸分析和 SSR 分子标记检测结果,对该技术的可靠性进行了验证;考虑到成本核算和可操作性,认为该分子标记辅助选择技术,应用于育种实践是非常经济有效的。

关键词: 优质蛋白玉米;分子标记辅助选择;SSR; AFLP

中图分类号: S513.035.3

文献标识码: A

Molecular Markers Assisted Selection to Quality Protein Maize

TIAN Qing-zhen, LI Xin-hai, LI Ming-shun, JIANG Wei, ZHANG Shi-huang

(Institute of Crop Breeding and Cultivation, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Key Lab of Crop Genetics and Breeding, Ministry of Agriculture, AMBIONET China-Lab, Beijing 100081, China)

Abstract: The molecular markers on quality protein maize (QPM) were reviewed in the article, and the strategy for marker-assisted selection in QPM breeding was proposed. The lysine content and the SSR profile of a back cross population was analyzed, and the reliability was proved. In view of the cost and practicability, the molecular marker selection technique was thought to be effective in breeding for QPM.

Key words: Quality protein maize (QPM); Marker assisted selection; Simple sequence repeat (SSR); AFLP (Amplified fragment length polymorphism)

玉米是畜禽饲料的主要能量来源。通常普通玉米中赖氨酸、蛋氨酸、色氨酸等必需氨基酸含量很低,其中赖氨酸是影响玉米营养价值的第一限制性氨基酸。单靠提高子粒蛋白质含量来提高玉米的营养价值是不够的,更重要的是改良蛋白质的质量,尤其是增加赖氨酸的含量。普通玉米子粒中赖氨酸含量只有 0.23%左右,而畜禽饲料需要 0.6%~0.8%。1964 年, Mertz 等发现 opaque-2(简称 o2)基因能够把胚乳中的赖氨酸和色氨酸含量提高近一倍,全子粒赖氨酸和色氨酸含量提高约 70%。o2 基因通过调节蛋白质的合成方向,减少胚乳中的醇溶蛋白,增加清蛋白、球蛋白、白蛋白和富含赖氨酸的谷蛋白,进而提高了胚乳中赖氨酸的含量。然而含 o2 基因的子粒为粉质、容重低、出苗力弱、容易感染穗腐病等不良性状。Paez 等(1969)证实胚乳修饰基因的存在,通

过轮回选择积累这些基因,可以把 o2 玉米的软质胚乳变成不同程度的硬质胚乳。此后,美国和国际玉米小麦改良中心(CIMMYT)的科学家做了大量努力,把许多玉米资源转育成硬质胚乳的高赖氨酸玉米,并正式称为优质蛋白玉米(QPM),从而提高了产量和抗病虫能力。优质蛋白玉米可以增强赖氨酸生产能力,用作畜禽饲料可大幅度提高动物生产性能,改善饲料转化效率,减少动物粪便中氮的排出,缓解养殖业对环境的污染。大力发展优质蛋白玉米生产,可以减少我国赖氨酸、豆粕和玉米的进口量,有利于调整农村产业结构,实现农业的可持续发展。

美国较早开始优质蛋白玉米研究,近年来,优质蛋白玉米研究重新得到重视,并作为美国玉米种质扩增计划(GEM)的重要目标之一。美国育种家把衣阿华坚秆综合种和伊利诺抗病高油等综合种变成了 o2 遗传背景。中美、南美和非洲的一些国家也积极开展 QPM 研究和利用,相继发放了多个 QPM 品种。CIMMYT 从 1965 年起就开始高赖氨酸玉米研究,并在 70 年代中期引入修饰基因,1992 年曾被迫中断,到 1997 年重新恢复并加强了 QPM 研究。到

收稿日期: 2003-07-04

作者简介: 田清震(1968-),男,博士,在中国农业科学院作物科学研究所从事玉米育种与生物技术研究。Tel:010-68918596

E-mail: qztian@caas.net.cn

注: 张世煌为本文通讯作者。

2002年,CIMMYT已经育成并发放了13个QPM Pools,10个QPM群体和2个高油QPM群体,以及55个QPM自交系。1973年以来,我国从CIMMYT引进了一批QPM Pools和群体,如Pool33、Pool34、Pob69和Pob70等。从这些资源中选育出一批配合力很高的QPM自交系,如齐205和CA375等,并培育了一批优质高产的新组合,如中单9409和中单3710,初步实现了优质高产的目标。但是QPM杂交种仍存在品种单一、抗病性差、生育期偏晚的问题,适应性满足不了我国玉米产区复杂多变的气候与自然条件,急待挖掘新的种质资源。

目前,QPM育种 o_2 和修饰基因的主要来源是CIMMYT种质,将这些材料与温带普通种质重组,培育新的QPM自交系,是克服QPM种质基础狭窄和提高抗病性的有效途径。在QPM转育过程中,除了保证准确地鉴定纯合的 o_2 基因型外,还必须转移修饰基因。尽管利用传统育种方法已经成功地转育了一些QPM自交系,但转育周期长、效率低、预见性差,已越来越不适应现代育种目标的需要。ELISA技术提供了一种快速测得赖氨酸含量的方法,但检测结果仅仅是赖氨酸含量相对比较值,而且方法复杂,很难适应现代育种的需要。近年来,生物技术的发展为优质蛋白玉米遗传育种研究提供了新途径。通过转座子标签法,已经克隆了 o_2 基因,以其序列为模板设计引物,开展分子标记辅助选择,已成为选育高赖氨酸材料的一种手段。借助与 o_2 基因紧密连锁的分子标记,可以鉴别后代高赖氨酸基因型,即前景选择;同时依靠标记对后代个体进行全基因组选择,加速轮回亲本基因组的恢复,即背景选择,从而提高选择效率,加速育种进程。

1 应用于优质蛋白玉米辅助选择的分子标记

建立分子标记辅助育种程序,监测赖氨酸含量,是QPM育种的关键技术环节。分子标记辅助选择被认为是作物育种的发展方向,但因技术及经济等方面原因,一直未能在育种实践中实施。为了克服目前 o_2 玉米存在的主要缺陷,实现玉米种质扩增,通常采用回交程序,选育 o_2 纯合材料。但 o_2 为隐性基因,并具有胚乳特异性,因此回交选择难度大。目前,应用于优质蛋白玉米辅助选择的分子标记主要有如下几种。

Kata等(1994)建立了 o_2 的cDNA探针和Hind III酶切相结合的RFLP分子标记辅助选择系统,在含有 o_2 基因的W64与普通玉米Mo17和TX5855

杂种之间表现出限制性长度多态性。该系统能较精确地鉴定 O_2/O_2 、 O_2/o_2 和 o_2/o_2 基因型个体,但需要Southern杂交,操作步骤繁琐,费用较高,因此在育种实践中难以应用。

基于PCR反应的分子标记的快速发展,为进一步发展分子标记辅助育种创造了条件。美国Pioneer公司和Missouri大学根据克隆的 o_2 基因序列分析,设计了三对SSR引物。用其中一对或两对,便可有效地检测单个植株是否为 o_2 基因隐性纯合。我们研究发现,phi057为共显性标记,能够区分杂合和纯合基因型,而phi112为显性标记;结合phi057和phi112对 o_2 基因进行检测,可提高检测的可靠性。SSR标记具有标记带型简单、只需少量的DNA样品、操作流程简单等优点。以其为基础,设计MAS程序,用于辅助育种,将提高QPM选择效率,降低成本。

扩增片段长度多态性(AFLP),可以一次性检测大量位点,从而可实现对后代个体的遗传背景进行选择,提高选择效率。目前,银染检测技术的普遍应用,在提高工作效率的同时,大大降低了检测成本,从而推进了分子标记辅助选择的实用化。

2 优质蛋白玉米的分子标记辅助选择策略

在开发 o_2 基因的分子标记和遗传多样性研究的基础上,我们针对不同育种目标要求,通过对回交后代苗期叶片进行基因型检测。同时,发挥分子标记不受环境条件影响的优越性,结合南繁加代种植,建立了QPM分子标记辅助育种的策略,正在将 o_2 基因分别转入不同遗传背景的后代自交系中。

对于改良已有QPM自交系的某些不良特性,可在同一杂种优势群内选择QPM自交系作为 o_2 基因供体,将QPM自交系与普通自交系杂交后,以QPM自交系回交,在回交群体中,采用 o_2 基因的连锁标记辅助筛选硬质胚乳的 o_2o_2 隐性纯合基因型;如果要使普通优良自交系与QPM自交系在后代遗传背景中占同样比重,即选育二环系,可直接在 F_2 代选择硬质胚乳的纯合 o_2 基因型;如果要使普通自交系转化为QPM自交系,可用普通系回交,在回交一代,采用 o_2 基因的连锁标记辅助筛选 O_2o_2 杂合基因型,同时按育种目标要求选择优良单株,再与普通系回交,筛选 O_2o_2 杂合基因型。通过控制普通亲本回交的代数,控制 o_2 基因在后代遗传背景中的比重,最后选择优良单株连续自交2~4代,便可获得性状稳定的普通骨干系的近等QPM系(图1)。在选育

过程中,通过灯箱进行子粒胚乳分级,可以准确选取硬质、半硬质子粒;通过营养钵育苗,利用 SSR 分子标记进行筛选后,移栽到田间。此外,在选育二环系

时,普通自交系与 QPM 自交系应来自同一杂种优势群,以方便杂种优势利用。

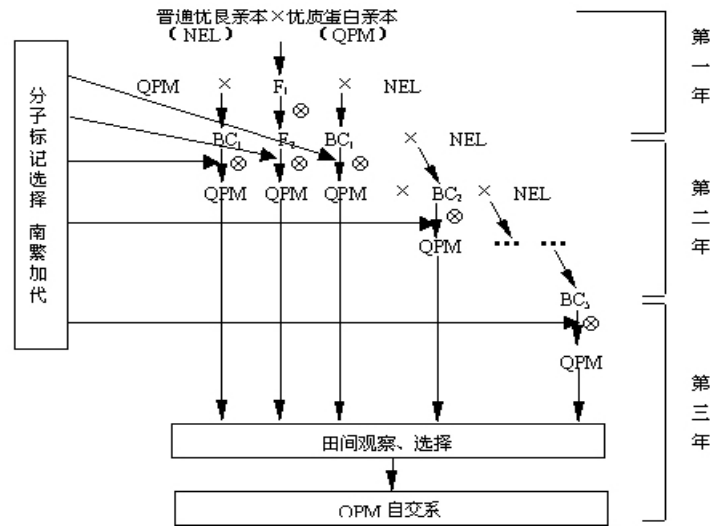


图1 优质蛋白玉米的分子标记辅助选择策略

通过回交培育 QPM 近等基因系是培育优质蛋白玉米的有效方法之一。培育过程中,在利用 SSR 标记监测 *o2* 的同时,用多态性高、检测位点多的 AFLP 标记,对回交群体内的单株及轮回亲本的遗传背景进行鉴定,选择与轮回亲本分子水平更相近的单株进行回交,可以缩短回交代数。一般培育一个近等基因系,需要回交 6 代以上,而通过分子标记进行前景选择和背景选择,仅需回交 3~4 代(Ribaut 等,1998)。

3 优质蛋白玉米分子标记辅助选择的可靠性验证

为了验证分子标记选择的可靠性,我们在(黄早四//CA335/CA335)回交群体中研究了 *o2* 基因的分离规律。通过 SSR 标记,分别选择 *o2* 纯合和杂合型个体,而后测定 *o2* 纯合、杂合及缺失个体子粒赖氨酸含量,评价 *o2* 基因选择效应。在 *o2o2*、*O2o2* 两种基因型中,各选 30 株,利用 Biochrom-20 氨基酸分析仪分析全子粒赖氨酸含量。

研究结果表明,在回交群体中,检测到 87 株为 *o2o2* 基因型,104 株为杂合 *O2o2* 基因型,经 χ^2 检验,基本符合 1:1 分离比例($\chi^2=2.46 < \chi^2_{0.05}=3.84$)。30 株 *O2o2* 基因型的赖氨酸含量在 0.27%~0.44%,平均值为 0.334%,而 30 株纯合 *o2o2* 基因型的赖氨酸含量在 0.38%~0.50%,平均值为 0.428%。这充分说明,利用分子标记 phi057 和 phi112 进行 *o2* 基因选择是有效的。

4 优质蛋白玉米分子标记辅助选择的成本核算

我们初步核算了 *o2* 基因标记辅助选择的成本费用。若采用单叶片提取和纯化 100 份 DNA,所需药品共计约 75 元(包括一些易耗品,如 1.5 mL Eppendorf 管、枪尖等未计算在内)。以 SSR 检测为例,若采用 10 μ L 反应体系,选用鼎国公司 Taq 酶,大约 96 个 PCR 管 1 次 PCR 反应需 8.8 元。制作一块规格为 30 cm \times 38 cm \times 0.4 mm 4.5% 的聚丙烯酰胺胶(丙烯酰胺和甲叉丙烯酰胺为 Sigma 生产) 约需 11.8 元,电泳、染色所需药品费用约为 18.6 元。这样通过变性聚丙烯酰胺凝胶电泳检测 48 份 DNA 样品的扩增带型共需费用计 39.2 元。如果两次点样,所需药品费用会更低。加上一些易耗品和仪器使用费,总成本也不过百元。相比之下,若采用化学分析法测定 96 份样品的赖氨酸含量则至少需要 4 000 元以上。若考虑到在选育二环系的 F₂ 代苗期采用标记辅助选择系统,可以减少四分之三的田间工作量,节省大量费用。如果通过 AFLP 进行背景选择,成本会有所增加,但可以通过减少回交代数和缩小回交群体,节约大量经费。

因此,本文建立的 *o2* 基因分子标记辅助选择技术,是非常经济有效的。

5 展望

目前,种质遗传基础狭窄已经成(下转第 113 页)

(上接第 110 页)为优质蛋白玉米育种发展的瓶颈。利用分子标记将普通自交系转化为 QPM 自交系,对拓展 QPM 种质的遗传基础无疑具有重要意义。

但在研究中也发现,利用 SSR 引物分析普通玉米和 QPM 自交系时,个别材料可能有交换现象发生。例如,QPM 自交系齐 205,在用 phi057 分析时,难以区分。因此,进一步发展新的分子标记是非常重要的。

应用以上技术体系,还可以创建多种优良性状的聚合体。例如,在选育高油玉米过程中,利用以上策略,将 *o2* 基因导入高油玉米自交系,可以创造高油、高赖氨酸的双高自交系。

总之,综合利用 SSR、AFLP 等分子标记,并与南繁加代技术、常规回交技术相结合,我们已经建立起一套经济实用的优质蛋白玉米分子标记辅助育种新体系,从而提高了选择效率和育种的科学性。目前,正在利用该分子育种体系,加速培育优质蛋白玉米自交系,组配新的 QPM 杂交种。

参考文献:

[1] 张世煌,白 丽,石德权. 优质蛋白玉米育种研究进展[A]. 2000 年玉米种质扩增、改良与杂种优势利用研究会议论文集 [C]. 2000.

[2] Dreher K, Morris M, Khairallah M, et al. 2002. Is marker-assisted selection cost-effective compared to conventional plant breeding methods? The case of quality protein maize. 203-236. In: R.E.Evenson, et al. Ed. Economic and Social Issues in Agricultural Biotechnology. CAB International 2002.

[3] Hartings H, Maddaloni M, Lazzaroni N, et al. The *O2* gene which regulates zein deposition in maize endosperm encodes a protein with structural homologies to transcriptional activators. The Embo Journal, 1989, 10: 2795-2801.

[4] Kata S R, Taylor B H, Bockholt A J, Smith J D. Identification of opaque-2 genotypes in segregating populations of Quality Protein Maize by analysis of restriction fragment length polymorphisms. Thero Appl Genet, 1994, 89: 407-412.

[5] Mertz E T, Bates L S, Nelson O E. Mutant gene that changes protein composition and increases lysine content of maize endosperm. Science, 1964, 145: 279-280.

[6] Paez A V, Helm J L, Zuber M S. Lysine content of opaque-2 maize kernels having different phenotypes. Crop Sci., 1969, 9: 251-252.

[7] Ribaut J M, Hoisington D. Marker-assisted selection: New tools and strategies. Trends in Plant Science, 1998, 3(6): 236-239.

[8] Schmidt R J, Burr F A, Burr, B. Transposon tagging and molecular analysis of the maize regulatory locus opaque-2. Science, 1987, 238: 960-963.

[9] Vasal S K. High quality protein corn. P85-111. In A.R. Hallauer (Ed), Specialty Corns. CRC Press, Boca Raton London, New York, Washington, D. C. 2001.