

文章编号: 1005-0906(2010)06-0011-04

几个供体对优质蛋白玉米(QPM)近等基因系构建效果的比较

赵 刚^{1,2}, 吴子恺¹, 陈 亮^{2,3}, 张德贵², 张世煌²,
卢振宇², 白 丽², 李明顺²

(1. 广西大学农学院, 南宁 530005; 2. 中国农业科学院作物科学研究所, 北京 100081;
3. 沈阳农业大学特种玉米研究所, 沈阳 110161)

摘 要: 对 CA335、CA339、山东 2548 和齐 205 这 4 个国内常用优质蛋白玉米自交系的赖氨酸含量、子粒表型、醇溶蛋白积累及 *opaque-2* 基因的序列进行分析, 对不同自交系作为 *opaque-2* 突变基因(*o2*)基因供体的分子标记选择效果进行比较。结果表明, 4 个自交系属于两类不同的 *o2* 突变体类型, CA335 和 CA339 为一类, 山东 2548 和齐 205 为一类。两类突变体作为 *o2* 供体选择效果有较大差异, CA335 和 CA339 是优良供体, 齐 205 和山东 2548 则不是理想供体。对于优质蛋白玉米育种, 供体的选择非常重要, 好的 QPM 自交系不一定是好的供体。

关键词: 优质蛋白玉米; *opaque-2* 基因; 供体; 分子标记; 基因系构建

中图分类号: S513.035

文献标识码: A

Comparison of Several Donor Inbred Lines on Development of Quality Protein Maize (QPM) Near-isogenic Lines

ZHAO Gang^{1,2}, WU Zi-kai¹, CHEN Liang^{2,3}, LI Ming-shun², et al.

(1. Agronomy College, Guangxi University, Nanning 530005;

2. Chinese Academy of Agricultural Sciences, Department of Crop Genetics and Breeding, Beijing 100081;

3. Special Corn Institute of Shenyang Agricultural University, Shenyang 110161, China)

Abstract: Lysine content, kernel phenotype, zein accumulation and *opaque-2* gene sequence of four maize inbred lines (CA335, CA339, Lu2548 and Qi205) were investigated in this study. These QPM inbred lines as the donor of *opaque-2* mutant gene (*o2*) respectively, were backcrossed to introgression *o2* into elite maize inbred lines based on marker-assisted. The results showed that these four QPM inbred lines belonged to two different types of *o2* mutant, CA335 and CA339 were the first type, and Lu2548 and Qi205 were another type. There was large difference of different donor inbred lines on development of near-isogenic lines. CA335 and CA339 were good donors, Lu2548 and Qi205 were poor. The choice of a QPM donor was important for QPM breeding. Although some elite inbred have good high lysine content, it may not be the best choice as a donor.

Key words: Quality protein maize (QPM); *opaque-2*; Donor parent; Marker assisted selection; Construction of isogenic lines

收稿日期: 2010-03-09

基金项目: 国家自然科学基金(30571169)、国家玉米产业技术体系遗传育种研究项目、国家科技支撑计划(2007BAD31B03、2006BAD01A03)

作者简介: 赵 刚(1981-), 男, 河南驻马店人, 博士, 从事玉米遗传育种研究。E-mail: zhaogang166@126.com
李明顺为本文通讯作者。E-mail: mshunli@yahoo.com.cn

优质蛋白玉米富含赖氨酸。与普通玉米相比, 优质蛋白玉米子粒赖氨酸含量大幅提高。优质蛋白玉米用作畜禽饲料可提高玉米利用效率, 大幅度提高动物生产性能, 节约粮食和蛋白饲料, 缓解养殖业对环境的污染^[1]。*opaque-2* 突变基因(*o2*)能够提高玉米子粒的赖氨酸含量, 且 *o2* 突变体是通过引起醇溶蛋白(Zein)和非醇溶蛋白(Non-Zein)的变化进而提高赖氨酸含量, 目前利用 *o2* 突变体改良玉米品种是行之

有效的方法。*Opaque-2* 基因(*O2*)已经克隆,分子标记辅助选择 *o2* 已成功应用于优质蛋白玉米育种^[2-5]。在优质蛋白玉米分子标记回交育种过程中,*o2* 供体的选择直接影响到选择的效率。目前国内未见相关研究报道。本试验选择 4 个国内常用的优质蛋白玉米自交系,比较分析了其赖氨酸含量、子粒表型、醇溶蛋白的积累及 *o2* 基因序列,对其作为 *o2* 供体的选择效果进行了初步比较,为优质蛋白玉米的种质扩增提供参考。

1 材料与方法

1.1 实验材料

选用 4 个国内常用的优质蛋白玉米自交系(CA335、CA339、山东 2548 和齐 205)作为 *o2* 供体,88 份国内骨干自交系作为受体。选用美国自交系 W64A 和 W64o2 作对照,W64o2 为软质高赖氨酸玉米。

1.2 实验方法

1.2.1 *o2* 近等基因系构建

采用分子标记辅助选择同时结合表型选择将 *o2* 导入到普通玉米自交系,构建 *o2* 基因近等基因系。连续回交 3~6 代,然后自交 2~4 代。试验采用 phi057、uumc1066 和 phi112 共 3 个标记,具体方法见雷开荣和卢振宇等^[6-7]。试验于 2004~2009 年在北京和三亚进行。每个自交系构建过程中每代种植 1~2 行,构建完成后种植 6 行繁种,行距 60 cm,株距 25 cm,行长 4 m。考察其农艺性状并测定赖氨酸含量。

1.2.2 赖氨酸和粗蛋白的测定

赖氨酸用氨基酸自动分析仪测定,前处理参照国家标准 GB7649-87;粗蛋白含量测定分别参照国家标准 GB2905-82(半微量凯氏法)。由农业部谷物品质监督检验测试中心测定,2 次重复。

1.2.3 醇溶蛋白(Zein)分析

将成熟子粒的胚和种皮去掉用于醇溶蛋白的提取。醇溶蛋白的提取参考 Wallace 等方法^[8]。取等量的醇溶蛋白样品,变性后用于 SDS-PAGE 电泳分析,浓缩胶浓度为 4%,分离胶为 12%,用考马斯亮蓝 R250 染色。

1.2.4 基因序列分析

用 3 对引物(O2-711、O2-649、O2-746)扩增 *o2* 基因,获得 *o2* 基因的全部 6 个外显子和部分内含子序列^[9,10],扩增产物用 1% 的琼脂糖检测并回收纯化。回收产物用 pMD18-T 载体试剂盒连接 (TaKaLa 公司),具体操作方法参考文献[11],转化后用于测序,测序由中国农业科学院农作物转基因资源与遗传改良重大科学工程开放实验室完成。测序结果用 DNAMAN 进行比对,并用 Mega 4.1 软件建立系统发育树。

2 结果与分析

2.1 赖氨酸含量及子粒表型

表 1 结果表明,4 个优质蛋白玉米自交系的赖氨酸含量都在 0.4% 以上,其中最高的是齐 205,为 0.465%;最低的是 CA335,为 0.405%。除 CA335 为不透明子粒类型外,其他 3 个自交系均为半透明子粒类型。普通玉米对照材料 W64A 的赖氨酸含量仅为 0.304%。

表 1 自交系赖氨酸含量及子粒表型分析

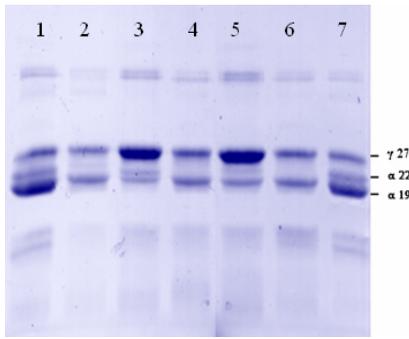
Table 1 Lysine content and kernel phenotype of maize inbred lines

自交系 Inbred lines	粗蛋白(%) ± 标准差 Crude protein($\bar{X} \pm SD$)	赖氨酸(%) ± 标准差 Lysine($\bar{X} \pm SD$)	子粒表型 Kernel phenotype
CA335	9.703 ± 0.018	0.405 ± 0.015	不透明
CA339	11.097 ± 0.106	0.450 ± 0.006	半透明
齐 205	11.011 ± 0.016	0.465 ± 0.013	半透明
山东 2548	10.051 ± 0.069	0.431 ± 0.008	半透明
W64Ao2	12.641 ± 0.047	0.585 ± 0.004	不透明
W64A	11.861 ± 0.057	0.304 ± 0.006	透明

2.2 醇溶蛋白分析结果

醇溶蛋白分析结果表明,与普通玉米 W64A 相比,供试材料的醇溶蛋白积累发生了较大变化(图 1)。W64Ao2 和 4 个优质蛋白玉米自交系的 19 kD α -zein 显著降低;而 22 kD α -zein 的合成受到强烈

抑制,几乎没有合成,仅 CA339 有很少量的积累;27 kD γ -zein 的变化则不一致,CA335 的积累量较少,基本没有变化,齐 205 的积累有少量增加,而 CA339 和山东 2548 的 27 kD γ -zein 则显著增加。



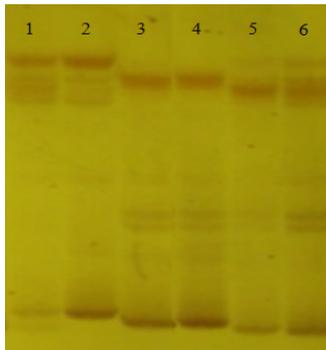
注:1为 W64A;2为 CA335;3为 CA339;4为齐 205;
5为山东 2548;6为 W64Ao2;7为 W64A。

图 1 胚乳醇溶蛋白的 SDS-PAGE 电泳

Fig.1 Electrophoresis on SDS-PAGE of zein from the mature endosperms

2.3 供体等位基因类群分析

对 phi057 位点的多样性分析表明,CA335 和 CA339 带型一致,齐 205 和山东 2548 一致,且都不同于普通玉米(图 2)。



注:1为 CA335;2为 CA339;3为齐 205;4为山东 2548;
5为 W64Ao2;6为 W64A。

图 2 自交系在 SSR(Phi057)位点的多样性分析

Fig.2 Polymorphism analysis on SSR (phi057) site in maize inbred lines

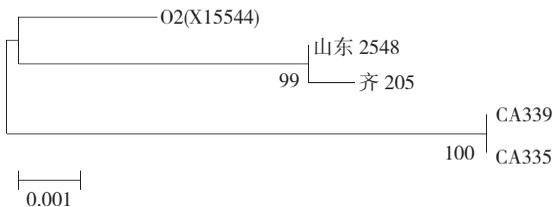


图 3 4个优质蛋白玉米自交系及 O2(GenBank 注册号为 X15544)的系统发育树

Fig.3 Neighbor-joining tree resulting from the analysis of coding sequence alignment including the four o2 donors alleles and O2(GenBank Accession No.X15544)

以 4 个玉米自交系和 X15544 的 O2 基因编码序列为数据,用邻近法(Mega 4.1 软件)建立了系统发育树(图 3)。结果表明,CA335 和 CA339 具有完全相同的编码区序列,山东 2548 和齐 205 具有较高的同源性,与 CA335 和 CA339 同源性较低,4 个自交系被分成了两类。

2.4 近等基因系的构建

由于 umc1066 在较多亲本间没有多态性,phi112 为显性标记无法区分杂合基因型,采用 phi057 进行标记辅助选择。利用 CA335、CA339 及其后代中选育的二环系为 o2 供体,77 份普通玉米自交系为受体,成功构建了 45 份近等基因系。结果表明,o2 基因导入后赖氨酸含量明显提高,子粒表型发生了很大变化,多数为半透明和不透明子粒类型,也有少数近等基因系的赖氨酸含量没有提高或提高较少。由于在构建过程中 o2 分子标记的多态性丢失造成导入失败,还有一些材料繁育困难造成近等基因系的构建失败。用山东 2548 和齐 205 作为供体,11 份普通玉米自交系为受体,未能成功构建近等基因系。有些材料在构建过程中 o2 分子标记的多态性丢失,有些材料在回交完成后自交时又发生分离,多态性丢失。

3 结论与讨论

CA335、CA339、山东 2548 和齐 205 材料的赖氨酸含量都在 0.4%以上。o2 基因的隐性突变可以引起 19 kD α-zein 和 22 kD α-zein 的积累减少,而胚乳修饰基因可以增加 27 kD γ-zein 的积累^[12,13]。试验结果表明,这 4 个自交系的 19 kD α-zein 和 22 kD α-zein 积累大幅降低,说明这 4 个自交系应该属于隐性突变体;CA339、山东 2548 和齐 205 的 27 kD γ-zein 的合成有不同程度的增加,说明这 3 个自交系含有不同程度的胚乳修饰基因,而 CA335 则较少或不含胚乳修饰基因。

o2 基因的等位突变有很多类型,4 个自交系被分成两类,与他们的血缘关系一致。CA335 和 CA339 来自同一优质蛋白玉米群体 Pool33,齐 205 来源于潍矮 141 × 中系 017,山东 2548 则来源于齐 205 × 掖 478。

采用 Phi057 单标记辅助选择 o2 近等基因系(o2-NILs),CA335 和 CA339 作为 o2 供体是可行的,而山东 2548 和齐 205 不是理想供体。这说明供体的选择是 o2 近等基因系构建的一个重要方面,好的自交系不一定是好的供体。供体选择不当不仅浪费时

间,还浪费人力物力,造成不必要的损失。

本实验发现,umc1066受体和供体间的多态性不好。以前的研究也表明,umc1066在有些材料和供体间无多态性,phi112为显性标记,不便于区分和选择。因此,在育种实践中应该首选phi057标记。另外,少数受体和CA335、CA339的Phi057引物扩增结果也无多态性,表明phi057在一些普通玉米材料和CA335、CA339间均无多态性。这样有两种方式进行构建o2-NILs:一是利用山东2548和齐205为供体进行构建;二是用其他两个引物进行扩增,而这两种方式都不理想。为保证构建效果,需要两种方式结合起来共同构建相应的o2-NILs。

本实验所得到的o2近等基因系胚乳硬度度较低,不透明类型较多。因此,应尽量选择含有较多胚乳修饰基因的供体,并且修饰基因容易导入到受体的供体材料中,以便能够选出硬度度较高的优质蛋白玉米材料,为此还需利用更多材料进行深入研究。

参考文献:

- [1] 高俊,齐广海. 优质蛋白玉米对猪的生物学价值及氮代谢研究[J]. 中国饲料, 2002, 12(4): 5-7.
- [2] Bante K, Prasanna B M. Simple sequence repeat polymorphism in Quality Protein Maize (QPM) lines[J]. Euphytica, 2003, 129: 337-344.
- [3] Babu R, Nair S K, Kumar A, et al. Two-generation marker-aided

backcrossing for rapid conversion of normal maize lines to quality protein maize (QPM)[J]. Theor. Appl. Genet., 2005, 111: 888-897.

- [4] 姜伟,李新海,李明顺,等. opaque-2基因微卫星标记与玉米子粒赖氨酸含量的关系[J]. 作物学报, 2004, 30(8): 739-744.
- [5] 宋敏,田清震,李新海,等. 分子标记在优质蛋白玉米(QPM)育种中的应用[J]. 中国农业科学, 2005, 38(9): 1748-1754.
- [6] 雷开荣,石春焱,李明顺,等. 在构建QPM近等基因系过程中对回交群体的SSR标记选择[J]. 玉米科学, 2006, 14(6): 28-31.
- [7] 卢振宇,李明顺,谢传晓,等. 玉米叶片DNA快速提取方法改进研究[J]. 玉米科学, 2008, 16(2): 50-53, 55.
- [8] Wallace J C, Lopes M A, Paiva E, et al. New methods for extraction and quantitation of zeins reveal a high content of gamma-zein in modified opaque-2 maize[J]. Plant Physiology, 1990, 92: 191-196.
- [9] Henry A M, Damerval C. High rates of polymorphism and recombination at the opaque-2 locus in cultivated maize[J]. Mol. Gen. Genet., 1997, 256: 147-157.
- [10] Henry A M, Manicacci D, Falque M, et al. Molecular evolution of the opaque-2 gene in *Zea mays* L.[J]. J. Mol. Evol., 2005, 61: 551-558.
- [11] Sambrook J, Russell D W. Molecular cloning: a laboratory manual[C]. Cold Spring Harbor Laboratory, New York. 2001.
- [12] Geetha K B, Lending C R, Lopes M A, et al. opaque-2 modifiers increase γ -zein synthesis and alter its spatial distribution in maize endosperm[J]. The Plant Cell, 1991, 3: 1207-1219.
- [13] Gibbon, B C, Larkins, B A. Molecular genetic approaches to developing quality protein maize[J]. Trends Genet., 2005, 21, 227-233.

(责任编辑:姜媛媛)