

文章编号: 1005-0906(2006)06-0028-04

在构建 QPM 近等基因系过程中对回交群体的 SSR 标记选择

雷开荣^{1,2}, 石春焱^{1,3}, 李明顺¹, 张世煌¹, 李新海¹,
肖木楫¹, 张德贵¹, 郝转芳¹

(1. 中国农业科学院作物科学研究所, 农业部作物遗传育种重点开放实验室, 北京 100081;

2. 重庆市农业科学研究所, 重庆市农作物生物工程中心, 重庆 400055; 3. 内蒙古通辽市农业科学院, 内蒙古 通辽 028000)

摘要: 优质蛋白玉米(QPM)遗传基础狭窄, 以普通玉米自交系为遗传背景培育 *opaque-2* 近等基因系是 QPM 种质改良的重要途径。本文利用 SSR 标记技术, 以 *opaque-2* 基因序列为背景开发的特异 SSR 引物 phi057 和 umc1066 作为标记, 对构建中的 95 个 QPM 近等基因系回交群体 BC₁F₁ 和 BC₂F₁ 进行目标基因选择。结果表明, SSR 标记 phi057 对大多数回交群体中的 *opaque-2* 基因的选择是有效的; 在少数回交群体, 如(多黄 29 × CA335) × 多黄 29, SSR 标记 phi057 和 umc1066 不能区分单株间的基因型变异, 针对这些材料, 需要进行更深入的研究或开发新的 SSR。

关键词: 优质蛋白玉米; SSR; 近等基因系; 分子标记辅助选择

中图分类号: S513.024

文献标识码: A

SSR Marker Assisted Selection for *opaque-2* Gene in Early Generations of NILs Development in QPM

LEI Kai-rong^{1,2}, SHI Chun-yan^{1,3}, LI Ming-shun¹, ZHANG Shi-huang¹, et al.

(1. Institute of Crop Sciences, CAAS, Key Lab of Crop Genetics and Breeding, Ministry of Agriculture, Beijing 100081; 2. Chongqing Institute of Agricultural Sciences, Chongqing Center of Bio-Engineering for Crop, Chongqing 400055; 3. Tongliao Academy of Agricultural Sciences, Tongliao, Inner Mongolia 028000, China)

Abstract: The germplasm base of quality protein maize (QPM) is narrower. The available approach to enhance QPM germplasm is to convert normal maize inbred lines to *opaque-2* NILs (near isogenic lines) assisted with molecular markers. The procedures of marker assisted selection for *opaque-2* in early generations of backcrossing (BC₁F₁ and BC₂F₁) by SSR markers phi057 and umc1066 were developed. The results showed that the *opaque-2* gene could be genotyped in most backcrossing populations by SSR marker phi057. Using this method, *opaque-2* gene can be identified in most NILs populations. But the SSR markers phi057 and umc1066 can't distinguish homozygotes and heterozygotes in the BC₁F₁ of (Duohuang29 × CA335) × Duohuang29. So, new SSR of the *opaque-2* gene is needed to be developed for MAS.

Key words: Quality protein maize; SSR; NILs; Molecular marker assisted selection

针对玉米子粒中赖氨酸和色氨酸等必需氨基酸含量较少等问题, 在提高玉米产量的同时改良玉米

的营养品质越来越迫切。1914 年, Osborne 等发现玉米胚乳蛋白质的氨基酸组成不完全, 缺少赖氨酸和色氨酸, 造成营养缺陷。直到 50 年后, Mertz 等发现在隐性基因 *opaque-2* (简称 *o2*) 纯合体的玉米胚乳中赖氨酸含量比普通玉米高 1 倍, 全子粒中赖氨酸和色氨酸含量提高约 70%。但由于 *o2* 基因纯合体的玉米胚乳表现为软质不透明, 子粒含水量较高、易破碎、容易感染穗腐病、外观品质较差和产量较低等

收稿日期: 2006-02-17

基金项目: 国家自然科学基金项目(30571169)、948 重大专项(2003-Q03-3)

作者简介: 雷开荣(1965-), 男, 副研究员, 主要从事作物遗传改良与生物技术研究。Email: leikairong@126.com
石春焱为并列第一作者。李明顺为本文通讯作者。

问题,高赖氨酸玉米在生产中的利用非常困难,发展缓慢。

Paez 等发现胚乳修饰基因可以把高赖氨酸玉米子粒的软质胚乳修饰成不同程度的硬质胚乳,赖氨酸含量几乎不降低,为解决高赖氨酸玉米的软质胚乳缺陷提供了遗传基础。Vasal 等利用该遗传系统把软质胚乳的高赖氨酸玉米转变为硬质胚乳的优质蛋白玉米(QPM),培育了 20 多个 QPM 群体和一系列自交系,推进了 QPM 在热带、亚热带地区的种植和利用。

为了克服目前 *o2* 玉米存在的主要缺陷,扩大种质遗传基础,通常采用回交的方法培育 QPM 新种质。但 *o2* 为隐性基因,回交选择过程中鉴定难度大。采用常规方法测定赖氨酸含量需要对子粒进行破坏性检测,测试程序复杂、费用高,不能在早世代实现 *o2* 基因的前景选择,大大增加了 QPM 育种的难度。近年来,SSR 标记技术的发展为 QPM 种质创新提供了新的技术手段。Schmidt 等利用转座子方法克隆了 *o2* 基因;Maddaloni 等测定了 *opaque-2* 基因的 cDNA 全序列;根据 *opaque-2* 基因的微卫星序列,Pioneer 公司和 Missouri 大学开发了 3 对用于 *o2* 位点多态性检测的 SSR 标记 phi057、phi112 和 umc1066,并将其定位在第七染色体上。姜伟等和 R. Babu 等研究表明,Phi057 和 umc1066 为共显性标记,能够区分杂合与纯合基因型。姜伟等利用 phi057 分析普通自交系与 QPM 回交群体 *O2o2* 杂合基因型和 *o2o2* 纯合基因型子粒赖氨酸含量的差异,认为利用 phi057 标记辅助选择 *o2o2* 基因型可以提高优质蛋白玉米选育效率。

本研究利用 *o2* 基因序列内的微卫星标记 phi057 和 umc1066 对 QPM 育种早代回交群体进行目标基因 *o2* 的前景选择,在构建 QPM 近等基因系的过程中,应用 SSR 标记辅助选择技术加快 QPM 新种质的培育进程。

1 材料与方法

1.1 材料

以 CAL58、掖 107 和综 31 等 95 个综合性状优良的普通玉米自交系为受体(表 1、表 2),与含 *o2* 基因的 QPM 自交系 CA339、CA335 杂交;种植 F_1 群体,分别用受体自交系回交,收获回交一代种子;每个 BC_1F_1 群体种植成穗行,按单株提取苗期叶片基因组 DNA,用 SSR 标记分析基因型,选标记为 *O2o2* 杂合基因型的单株与相应的受体亲本回交,产生

BC_2F_1 群体;继续用 SSR 标记对 BC_2F_1 群体进行分析,并构建下一个回交世代群体。

1.2 方法

1.2.1 DNA 提取

将幼苗叶片剪成块,每个 1.5 mL Eppendorf 管中放入 100 mg 左右;加 5N 异硫氰酸胍提取液 500 μ L,在植物组织研磨机(Qiagen TissueLyser)上以 1/30 s 频率研磨 1.5 min;加入 4N $NaClO_4$ 700 μ L;混匀,室温放置 10 min;12 000 rpm 离心 5 min;取上清,加入等体积无水乙醇,沉淀 DNA;12 000 rpm 离心 5 min;弃上清;加 1 mL 70%乙醇,洗涤沉淀;12 000 rpm 离心 3 min,弃上清;晾干沉淀,加 50 μ L ddH₂O;完全溶解后,4℃保存备用。

1.2.2 SSR 标记分析

(1)试剂来源:SSR 标记 Phi057、umc1066 的序列来自 Maize GDB(2002),由上海生物工程公司合成。Tag DNA 聚合酶、d'NTP 等购自北京鼎国生物技术有限公司。

Phi057 由 Pioneer 公司开发,重复序列为(GCC)_n,序列为:

Phi057-F:5'-CTCATCAGTGCCGTCGTCCAT-3'

Phi057-R:5'-CAGTCGCAAGAAACCGTTGCC-3'

Umc1066 由 Missouri 大学开发,重复序列为(GCCAGA),序列为:

Umc1066-F:5'-ATGGAGCACGTCATCTCAATG G-3'

Umc1066-R:5'-AGCAGCAGCAACGTCTATGA CACT-3'

(2)反应体系:反应总体积 10 μ L,包括 10×Buffer (含 20 mmol/L Mg^{2+}) 1 μ L、d'NTP (25 mM each) 0.1 μ L、引物 (20 μ M each) 0.13 μ L、Tag DNA 聚合酶(2 U/ μ L) 0.25 μ L、DNA 模板 2.5 μ L、ddH₂O 6.02 μ L。

(3)扩增程序:94℃变性 2 min,60℃退火 30 s,72℃延伸 50 s,1 个循环;94℃变性 50 s,60℃退火 30 s,72℃延伸 50 s,35 个循环;再 72℃延伸 5 min。

(4)聚丙烯酰胺凝胶电泳及银染程序:参照 CIM-MYT-ABC 操作手册。

2 结果与分析

2.1 BC_1F_1 代群体中 *opaque-2* 基因的前景选择

用 *o2* 位点的特异性标记引物 phi057 对 42 个回交群体 BC_1F_1 代进行标记分析,各群体分别检测 5~13 株,共计检测 313 株。其中 38 个 BC_1F_1 群体检测出 *O2O2*、*O2o2* 基因型分离,考虑到各群体检测样

本较少,根据质量性状遗传特征,将各群体检测结果合并分析,38 个 BC₁F₁ 群体检测出 *O2o2* 杂合基因型 141 株、*O2O2* 纯合基因型 126 株, $\chi^2_{(1)}=0.187<\chi^2_{0.05(1)}=3.84$,符合 1:1 分离比率,与文献记载结果相符(表 1、表 3)。在另外 4 个群体中,(吉 853 × CA339) × 吉 853 全部为 *O2O2* 显性纯合基因型,疑为假杂种或检测群体较小所致;(多黄 29 × CA335) × 多黄 29、(丹 3130 × CA339) × 丹 3130、(9046 × CA335) ×

9046 群体全部为 *o2o2* 隐性纯合基因型,用引物 umc1066 重复检测,结果相同,这可能是因为所用的 SSR 引物在 *o2* 位点对多黄 29、丹 3130、9046 与 CA335 和 CA339 没有多态性(表 2)。因此, phi057 和 umc1066 这两个标记不能对这 3 个群体的后代进行基因型鉴别。对这 3 个群体有必要通过专门试验作进一步研究才能确定这两对引物的作用。

表 1 部分回交 BC₁F₁ 群体 SSR 分子标记辅助选择结果
Table 1 Results of MAS for 38 BC₁F₁ populations by SSR marker phi057

材料名称 NILs population	回交 BC ₁ F ₁ 代基因型分布 Distribution of genotype in BC ₁ F ₁ generations				材料名称 NILs population	回交 BC ₁ F ₁ 代基因型分布 Distribution of genotype in BC ₁ F ₁ generations			
	检测株数	<i>O2O2</i>	<i>O2o2</i>	<i>o2o2</i>		检测株数	<i>O2O2</i>	<i>O2o2</i>	<i>o2o2</i>
1 (CAL58 × CA339) × CAL58	6	1	5	0	21 (196 × CA335) × 196	12	4	8	0
2 (掖 107 × CA339) × 掖 107	6	5	1	0	22 (5213 × CA335) × 5213	6	1	5	0
3 (综 31 × CA335) × 综 31	13	5	8	0	23 (Mo17 × CA335) × Mo17	6	3	3	0
4 (汶黄 × CA335) × 汶黄	6	2	4	0	24 (吉 846 × CA335) × 吉 846	6	2	4	0
5 (莫群 17 × CA339) × 莫群 17	13	9	4	0	25 (8001 × CA335) × 8001	6	3	3	0
6 (中黄 204 × CA335) × 中黄 204	6	3	3	0	26 (832 × CA335) × 832	6	4	2	0
7 (B73 × CA335) × B73	6	4	2	0	27 (311-2 × CA335) × 311-2	6	1	5	0
8 (CN962 × CA335) × CN962	6	3	3	0	28 (313 × CA335) × 313	6	5	1	0
9 (丹 340 × CA335) × 丹 340	6	2	4	0	29 (吉 495 × CA335) × 吉 495	6	3	3	0
10 (中黄 68 × 黄 C) × 中黄 68	6	2	4	0	30 (辽 138 × CA335) × 辽 138	6	5	1	0
11 (川黄 321 × CA335) × 川黄 321	6	1	5	0	31 (4866 × CA335) × 4866	6	2	4	0
12 (自 330 × CA339) × 自 330	6	3	3	0	32 (698-4 × CA335) × 698-4	6	5	1	0
13 (吉 465 × CA335) × 吉 465	13	5	8	0	33 (W20 × CA335) × W20	12	0	12	0
14 (吉 477 × CA335) × 吉 477	5	4	1	0	34 (郑 22 × CA335) × 郑 22	6	5	1	0
15 (吉 63 × CA335) × 吉 63	6	3	3	0	35 (临系 11 × CA335) × 临系 11	6	4	2	0
16 (辽 2345 × CA339) × 辽 2345	6	4	2	0	36 (旱 23 × CA335) × 旱 23	6	3	3	0
17 (辽白 371 × CA339) × 辽白 371	6	1	5	0	37 (91041-2 × CA335) × 91041-2	6	3	3	0
18 (吉 477 × CA335) × 吉 477	6	2	4	0	38 (武 314 × CA339) × 武 314	6	3	3	0
19 (Q1261 × CA339) × Q1261	6	2	4	0	合计 Total	267	126	141	0
20 (3189 × CA335) × 3189	13	9	4	0					

表 2 部分亲本自交系的 phi057 扩增产物多态性表现
Table 2 The polymorphism among some maize inbred lines amplified with SSR primer phi 057

	CA335	CA339	多黄 29	9046	丹 3130	吉 853	掖 107
Phi057-1	1	1	1	1	1	0	0
Phi057-2	0	0	0	0	0	0	0
Phi057-3	0	0	0	0	0	0	0
Phi057-4	0	0	0	0	0	1	1



M: 分子质量标准,1~51:来自 8 个 BC₁F₁ 代的不同单株,52:QPM 自交系 CA335
M: molecular standard, 1-51: individuals from 8 BC₁F₁ populations, 52: QPM inbred-CA335

图 1 部分 BC₁F₁ 群体植株的 phi057 标记基因型差异
Fig.1 Profiles of individuals sampled from BC₁F₁ population by SSR marker phi057

2.2 BC₂F₁ 群体中 *opaque-2* 基因的前景选择

用轮回亲本对 BC₁F₁ 的 53 个杂合基因型单株进行回交, 每个 BC₂F₁ 种植穗行。各群体分别检测 3~10 株, 其中 52 个 BC₂F₁ 群体检测出 *O2O2*、*O2o2* 基因型分离, [(掖 107×CA339)×掖 107]×掖 107 群体未检测出 *O2o2* 杂合基因型。共计对 431 个 BC₂F₁ 单株进行了 SSR 标记分析, 检测出 *O2O2* 纯合基因型 231 株, *O2o2* 杂合基因型 200 株, $\chi^2=1.044<\chi^2_{0.05(1)}=3.84$, 符合 1:1 的分离比率(表 3)。进一步验证了在 BC₁F₁ 对 *O2o2* 杂合基因型的 SSR 标记辅助选择是有效的。

表 3 优质蛋白玉米回交世代 SSR 标记基因型分离规律适合性检验

Table 3 The fitness examination for segregated proportions of genotypes in BC₁F₁ and BC₂F₁ populations

回交世代 Backcrossing populations	SSR 标记 phi057 SSR marker phi057			χ^2
	检测样本数	<i>O2O2</i>	<i>O2o2</i>	
BC ₁ F ₁	267	126	141	0.187
BC ₂ F ₁	431	231	200	1.044

注:BC₂F₁ 为 BC₁F₁ 代杂合基因型单株与轮回亲本回交产生。

Note: BC₂F₁ populations were that heterozygous of BC₁F₁ backcrossed with the normal recurrent parents.

3 讨 论

种质基础狭窄和胚乳缺陷是优质蛋白玉米育种必须解决的两大关键问题。借助普通玉米种质, 将优良的普通玉米自交系转育成 QPM 是扩增优质蛋白玉米的遗传基础、克服胚乳缺陷、加快新品种选育进程的有效途径。通过常规育种方法将普通自交系培育成 QPM 近等基因系, 因 *o2* 是隐性基因, 每回交 1 代需自交一次, 测定赖氨酸含量, 然后再回交, 一般需要回交-自交 5 代以上, 育种周期长、费用高和效率低。利用 SSR 标记辅助选择技术培育 QPM 自交系, 可以选择 *O2o2* 基因型单株回交, 同时结合背景选择, 最后自交选择 *o2o2* 基因型, 可以把培育 QPM 近等基因系所需的时间至少缩短一半, 从而加快 QPM 育种进程, 提高效率。

国内外研究结果表明, 以 *o2* 基因序列为基础开发的 3 对微卫星标记中, phi057 和 umc1066 为共显性标记, 在 QPM 与普通玉米自交系间表现多态性, 能够准确地区分 *O2O2*、*O2o2* 和 *o2o2* 这 3 种基因型。

因此, 利用微卫星标记 phi057 和 umc1066 在 QPM 与普通自交系杂交、回交世代中进行 *o2* 基因的前景选择是有效的。本实验在构建 QPM 近等基因系的早期群体进行 SSR 标记辅助选择时发现, phi057 和 umc1066 在部分普通玉米自交系与 QPM 自交系 CA335 或 CA339 间不能检测出多态性, 无法区分分离群体单株间的基因型变异, 不能完成对 *o2* 基因的前景选择, 对于产生这种现象的原因及背景还有待进一步研究。

参考文献:

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

[2] 田清震, 李新海, 李明顺, 等. 优质蛋白玉米的分子标记辅助选择[J]. 玉米科学, 2004, 12(2): 108-110.

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

[4] Vasal S K. High quality protein corn[J]. Specialty corns, 2001.

[5] 丁占生, 康继伟, 张世煌, 等. 辅助选择优质蛋白玉米种质的 ELISA 方法[J]. 玉米科学, 2002, 10(2): 22-23.

[6] Kassahun Bantte, Prasanna B M. Simple sequence repeat polymorphism in Quality Protein Maize(QPM) lines[J]. Euphytica, 2003, 129: 337-344.

[7] 番兴明, 张世煌, 谭 静, 等. 根据 SSR 标记划分优质蛋白玉米自交系的杂种优势群[J]. 作物学报, 2003, 29 (1): 105-110.

[8] Stuber C W, Polacco M, Senior M L. Synergy of empirical breeding, marker-assisted selection, and genomics to increase crop yield potential[J]. Crop Sci., 1999, 39: 1571-1583.

[9] Schmidt R J, Burr F A, Aukerman M J, et al. Maize regulatory gene *opaque-2* encodes a protein with a "eucinezipper" motif that binds to zein DNA[J]. Proc Natl Acad Sci., 1990, 87: 46-50.

[10] Maddaloni M, Di Fonzo N, Hartings H, et al. The sequence of the zein regulatory gene *opaque-2* of *Zea mays*[J]. Nucleic Acids Research, 1989, 17(18): 7532.

[11] Chin E, Senior L, Shu H, et al. Maize simple repetitive DNA sequence: Abundance and allele variation[J]. Genesome, 1996, 39: 866-873.

[12] Senior L. Polymorphism rate and utility of SSRs using agarose gel[J]. Maize Genetics Abstracts, 1997.

[13] 姜 伟, 李新海, 李明顺, 等. *opaque-2* 基因微卫星标记与玉米赖氨酸含量的关系[J]. 作物学报, 2004, 30(8): 739-744.

[14] 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.

[15] 李新海, 袁力行, 李晓辉, 等. 利用 SSR 标记划分 70 份我国玉米自交系的杂种优势群[J]. 中国农业科学, 2003, 36(6): 622-627.

(责任编辑: 朴红梅)