

DOI: 10.3724/SP.J.1006.2010.01302

玉米 *o16* 基因回交渗入 *o2* 系的分子标记辅助选择

张文龙^{1,2,4} 杨文鹏^{2,3,*} 陈志伟^{1,2} 王明春² 杨留启² 蔡一林¹

¹ 西南大学农学与生物科技学院, 重庆 400716; ² 贵州省农业科学院旱粮研究所, 贵州贵阳 550006; ³ 贵州省农业科学院农业生物技术重点实验室, 贵州贵阳 550006; ⁴ 贵州省农业委员会种子管理站, 贵州贵阳 550001

摘 要: 在高赖氨酸玉米育种中, 主要是以玉米 *opaque-2(o2)* 突变体作供体回交转育培育亲本材料, 再行培育高赖氨酸杂交种。但是, 迄今培育的 *o2* 玉米系及其杂交种的籽粒赖氨酸含量约为 0.4%, 不能满足食用和饲用的需求。为了提高 *o2* 玉米的赖氨酸含量, 本研究利用一个新的高赖氨酸突变基因 *opaque-16(o16)* 的载体 QCL3021 作供体, *o2* 玉米系太系 19 为受体, 将 *o16* 基因回交渗入 *o2* 玉米系。在回交的每一世代及随后的自交世代, 用 *o2* 基因内的 SSR 标记 umc1066 和 *o16* 基因的连锁 SSR 标记 umc1141 进行前景选择, 再对中选单株进行全基因组 SSR 标记的背景选择, 最后用染料结合赖氨酸法测定籽粒赖氨酸含量, 以便保证筛选出遗传背景恢复率和赖氨酸含量均高的目标单株。在 BC₂F₄ 代, 获得携带 *o2* 和 *o16* 基因的家系 17 个, 其遗传背景与 *o2* 玉米系相当(恢复率为 92%~95%), 赖氨酸含量为 0.469%~0.599%。其赖氨酸含量比普通玉米平均提高约 122.63%; 比高值亲本太系 19(*o2o2*) 平均提高 22.33%, 增幅为 6.11%~35.52%; 比低值亲本 QCL3021(*o16o16*) 平均提高 65.86%, 增幅为 43.87%~83.74%。表明采用标记辅助选择技术将 *o16* 基因回交导入 *o2* 玉米, 能有效提高玉米籽粒的赖氨酸含量, 对高赖氨酸玉米的遗传改良和育种具有重要意义。

关键词: 分子标记辅助选择; 回交; 高赖氨酸突变体; *o16*; *o2*; 玉米

Molecular Marker-Assisted Selection for Corn *o2* Introgression Lines with *o16* Gene

ZHANG Wen-Long^{1,2,4}, YANG Wen-Peng^{2,3,*}, CHEN Zhi-Wei^{1,2}, WANG Ming-Chun², YANG Liu-Qi², and CAI Yi-Lin¹

¹ College of Agronomy and Biotechnology, Southwest University, Chongqing 400715, China; ² Institute of Upland Food Crops, Guizhou Academy of Agricultural Sciences, Guiyang 550006, China; ³ Key Laboratory of Agricultural Biotechnology, Guizhou Academy of Agricultural Sciences, Guiyang 550006, China; ⁴ Seed Administration Station, Guizhou Agricultural Committee, Guiyang 550001, China

Abstract: The *opaque-2 (o2)* mutant is commonly used as a donor to breed high lysine corn. But the highest lysine content of the *o2* line as well as the resultant hybrids is about 0.4%. It is necessary to increase lysine content for the staple food consumed by human and animals. QCL3021 line carrying *opaque-16 (o16)* gene is another high lysine mutant. This study was performed to transfer *o16* gene into *o2* line through hybridization between QCL3021 (donor) and *o2* line Taixi 19 (receiver) followed by multiple backcrossing. The foreground selection was performed using simple sequence repeats (SSR) marker umc1066 for *o2* gene and umc1141 for *o16* gene in every backcrossing and subsequent inbred generation. Selected plants were then screened for recovery of genetic background using SSR markers covering the whole genome. Grain lysine content was determined by dye-binding lysine (DBL) method. Plants with high lysine content and higher genetic background recovery ratio were eventually chosen. In BC₂F₄ generation, 17 family lines which carry both *o2* and *o16* genes were identified, with the genetic background recovery ratio of 92%–95%, indicating that the genome of these lines was highly identical with *o2* corn line. Lysine content of the selected plants was 0.469%–0.599%, which was an average increase of 122.63% for normal corn, 22.33% for the high parent line Taixi 19, and 65.86% for the low parent line QCL3021. This study demonstrated that molecular marker-assisted selection (MAS) for corn *o2* introgression lines that were infiltrated with *o16* gene was successful in improving grain lysine content. The established procedure

本研究由国家自然科学基金项目(30560079), 贵州省优秀科技教育人才省长资金项目[黔省专合字(2005)264 号]和国家重点基础研究发展计划(973 计划)项目(2006CB708206)资助。

* 通讯作者(Corresponding author): 杨文鹏, E-mail: ywpmaze@126.com

第一作者联系方式: E-mail: wlzhsst@yeah.net

Received(收稿日期): 2010-02-23; Accepted(接受日期): 2010-04-22.

can be applied in high lysine corn breeding and genetic improvement.

Keywords: Molecular marker-assisted selection; Backcross; High-lysine mutant; *o16*; *o2*; Corn

玉米是世界上重要的粮饲兼用作物,但其籽粒胚乳蛋白中缺少赖氨酸,因而营养价值较低。携带高赖氨酸突变基因的玉米,其籽粒胚乳的赖氨酸含量大约是普通玉米的两倍,具有较高的营养价值。提高玉米赖氨酸含量从而提高玉米营养价值是玉米品质育种的重要方面。玉米蛋白质品质遗传改良的突破性进展,主要依赖于 *opaque-2(o2)* 突变体的发现^[1],后来发现的高赖氨酸含量突变基因,如 *o6*、*o7*、*o15*、*o9*、*o11*、*o13*、*fl1*、*fl2*、*fl3*、*De^{*}-B30*、*Mc*、*Sh2*、*bt2* 等^[2-12],其突变体因幼苗致死或遗传方式复杂等原因难于在育种与生产中应用^[5,8-9]。可见,高赖氨酸玉米的种质资源缺乏,限制了其育种发展。

贵州省旱粮研究所从 Robertson 的玉米 Mutator 突变体库的分离群体中得到一个玉米高赖氨酸突变体,暂命名为 *opaque-16(o16)*,其赖氨酸含量达到 0.36%。突变基因 *o16* 已被定位在玉米第 8 染色体长臂上 *umc1141* 和 *umc1121* 两分子标记之间离 *umc1141* 分子标记 5 cM 以内的位置,而且与 *o2* 基因杂交聚合后获得的双隐性突变的籽粒赖氨酸含量总体上均分别高于双亲,比高值亲本平均约高 6%^[13]。表明玉米 *o16* 突变是可资利用的高赖氨酸玉米育种新材料。

一般而言,人摄入的每克蛋白质中应含有赖氨酸 51 mg^[14],也即要求玉米籽粒中的赖氨酸含量在 0.5% 以上;畜禽饲料中通常需要的赖氨酸为 0.6%~0.8%^[15]。目前应用的单突变体高赖玉米 *o2* 系的籽粒赖氨酸含量在 0.4% 左右,并不能满足食用和饲用的需求。如能将两个高赖氨酸突变基因 *o2* 和 *o16* 聚合起来应是一条提高赖氨酸含量的有效途径。但是,常规育种技术难以实现 *o2* 和 *o16* 基因的聚合。因为: (1)*o2*、*o16* 基因都是隐性遗传,其转育需要回交和自交并结合表型选择进行,世代数多; (2)两个基因具有相同的不透明胚乳表型,在将 *o16* 基因转育至 *o2* 玉米的过程中从表型上无法判别是 *o2* 或 *o16*,还是两者共同的作用; (3)胚乳表型的选择受胚乳异雄核授精的影响,如 *o2* 胚乳存在高达 5% 的异雄核授精^[16]。近年来,随着分子生物技术的发展,标记辅助选择(marker-assisted selection, MAS)技术得到长足发展,运用 MAS 技术便可缩短隐性基因的转育世代,从 DNA 水平上识别目的基因,去除异雄核授精的影响。

本研究的目的是将常规育种技术与 MAS 技术结合,将 *o16* 基因回交渗入 *o2* 玉米系,以期获得赖氨酸含量高于 *o2* 和 *o16* 玉米系的材料,提供高赖玉米的遗传改良和育种利用。

1 材料与方法

1.1 亲本材料和回交群体

太系 19 是引自山西的 *o2* 玉米自交系,具有不透明胚乳的表型,经染料结合赖氨酸(dye binding-lysine, DBL)法分析,其种子赖氨酸含量约为 0.43%。QCL3021 是贵州省旱粮研究所选育的 *o16* 玉米自交系,具有不透明胚乳表型,其种子赖氨酸含量约为 0.32%。

2005 年春,以太系 19 为受体亲本, QCL3021 为供体亲本配制 F₁ 杂交组合; 2005 年冬,种植 F₁ 杂种,用太系 19 回交获得 BC₁F₁ 种子。2007 年春,种植 BC₁F₁ 群体,经 MAS 选择,选出 *o2* 位点隐性纯合, *o16* 位点杂合的目标单株用太系 19 回交,获得 BC₂F₁ 种子,选择赖氨酸含量为 0.462% 的单株用于下一代播种。2007 年冬,种植 BC₂F₁ 群体,经 MAS 选择,选出 *o2* 位点隐性纯合, *o16* 位点杂合目标单株自交获得 BC₂F₂ 种子,选择赖氨酸含量为 0.491% 的单株用于下一代播种。2008 年春种植 BC₂F₂ 群体,经 MAS 选择,选出 *o2* 与 *o16* 位点均隐性纯合的目标单株进行自交,获得 BC₂F₃ 种子。2008 年冬种植 BC₂F₃ 家系种子,结合农艺性状观察,每个家系内选择雌雄协调、农艺性状与太系 19 相似的优良单株,再经分子标记检测,确证目标家系后进行自交获得 BC₂F₄ 家系种子。每年的田间试验,春季在贵州省旱粮研究所进行,冬季在海南省三亚市崖城镇进行。

1.2 DNA 提取、PCR 扩增、电泳检测和种子赖氨酸含量分析

于苗期选取幼嫩的叶片,采用适用于分子标记辅助选择的玉米微量 DNA 分离提取的 CTAB 法^[17],提取亲本和各世代单株基因组 DNA。参照 Yang 等^[13,18]的方法进行 DNA 样品的 PCR 扩增和扩增产物的电泳检测,PCR 扩增反应在 2720 Thermal Cycler (美国 Applied Biosystems)和 DNA Engine Peltier Thermal Cycler (美国 Bio-Rad)上完成,用 Sequi-Gen GT(美国 Bio-Rad)核酸电泳系统分离扩增产物。用 DBL 法^[18]测定种子赖氨酸含量,每样品重复 2 次,取平均值;

最终获得的 BC₂F₄ 家系种子, 重复测定 3 次, 取其平均值。

1.3 前景选择和背景选择

前景选择即对目标基因 *o2* 和 *o16* 进行选择。对 *o2* 基因, 选用 SSR 标记 *phil12*、*umc1066*、*phi057* 进行检测, 这 3 个标记位于 *o2* 基因内^[18]。对 *o16* 基因, 选用 SSR 标记 *umc1141* 和 *umc1121* 进行检测, *umc1141* 距离 *o16* 基因位点在 3 cM 以内, *umc1121* 距离 *o16* 位点在 8 cM 以内^[13]。

背景选择即对通过前景选择中选单株的遗传背景进行选择。在全基因组范围内筛选在亲本间具有多态性的 SSR 标记 243 个, 用于背景选择。

用于前景和背景选择的 SSR 标记的 PCR 扩增引物的序列来源于 Maizegdb 网站(<http://www.maizegdb.org/>), 由上海捷瑞生物工程公司合成。

1.4 统计分析方法

SSR 标记带型以 A、B、H、U 建立数据库, 在相同迁移位置上, 与轮回亲本一致的带型记为 A, 与供体亲本一致的带型记为 B, 杂合带型记为 H, 缺失记为 U。基于分子标记的遗传背景恢复率的统计分析, 采用公式 $G(g) = [L+X(g)]/(2L)$ 计算前景选择中选单株经背景选择的背景恢复率, 其中, $G(g)$ 指在回交 g 代的遗传背景恢复率; $X(g)$ 指在回交 g 代表现为受体亲本带型的分子标记数量; L 指所参与分析的分子标记数量^[19-21]。采用公式 $E[G(g)] = 1-(1/2)^{g+1}$ 进行遗传背景恢复率理论计算, g 指回交世代数。采用 χ^2 检验各分离世代 DNA 标记的分离是否符合孟德尔比例。用 SPSS13.0 计算偏相关系数和标准差。采用 GGT32 软件参照 IBM2 2008 Neighbors 图谱完成图示基因型分析。

2 结果与分析

2.1 SSR 标记的多态性分析

从图 1 可以看出, *o2* 基因内的 3 个标记, 其 PCR

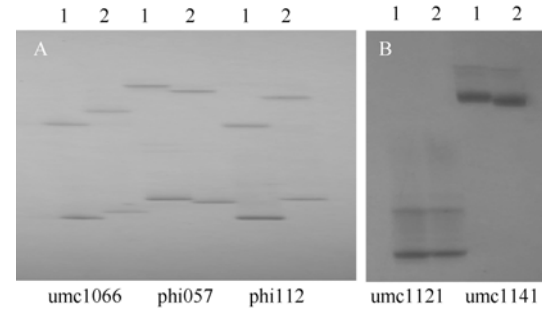


图 1 *o2* (A) 和 *o16* (B) 目标基因标记在亲本之间的多态性
Fig. 1 Polymorphism of the target genes markers in the parents for *o2* (A) and *o16* (B)
1: 太系 19; 2: QCL3021. 1: Taixi 19; 2: QCL3021.

扩增产物在两亲本间均具有多态性; 与 *o16* 基因连锁的 *umc1141* 标记的扩增片段呈现多态性, 而 *umc1121* 未检出多态性。进一步检测发现, *phi057*、*phil12*、*umc1066*、*umc1141* 均为共显性标记, 可以用于分子标记辅助选择。本项研究中, 选择 *umc1066*、*umc1141* 分别用于 *o2* 和 *o16* 基因的前景选择。

在全基因组范围内共选择了 243 对引物, 经过对双亲进行分子标记多态性筛选, 有 79 对引物在两亲本间表现多态性(表 1)。

2.2 各世代目标基因前景选择结果

利用 *umc1066* 和 *umc1141* 标记分别对不同世代的群体进行前景选择。由于 *umc1066* 是 *o2* 基因内的标记, 在每个分离世代都将 *o2* 基因作为第一轮选择对象, 获得含有 *o2* 的植株后再进行 *o16* 基因的选择。表 2 表明用 2 个标记对不同世代群体单株进行选择的结果接近理论值, 说明选择确实是有效的。BC₁F₁ 世代前景选择中选单株 63 株, 由于雌雄不协调及倒伏等原因, 实际收获 43 株。BC₂F₁、BC₂F₂ 世代前景选择中选单株分别为 41 和 21 株, 由于雌雄不协调, 实际分别收获 28 株和 17 株。选择 BC₂F₃ 世代每个家系内的优良单株进行 *o2* 和 *o16* 基因的分子标记检测验证, 检测单株在两基因位点均已纯合, 最终收获 BC₂F₄ 代优良家系材料 17 株(图 2 和图 3)。

表 1 全基因组 SSR 标记在亲本太系 19 和 QCL3021 间的多态性筛选结果
Table 1 Polymorphic markers screened between Taixi 19 and QCL3021 through the whole genome SSR markers in corn

染色体节段 Bin	筛选标记数 Number of screened markers	多态性标记数 Number of polymorphic markers	染色体节段 Bin	筛选标记数 Number of screened markers	多态性标记数 Number of polymorphic markers
1.00-1.12	31	8	6.00-6.08	23	10
2.00-2.10	22	5	7.00-7.06	23	12
3.00-3.10	24	3	8.01-8.09	25	9
4.00-4.11	24	8	9.00-9.07	25	9
5.00-5.09	23	6	10.00-10.0	23	9

表 2 各分离世代群体分子标记检测分析结果
Table 2 Results of the population segregation in each generation by SSR

世代 Generation	株数 Number of plants	umc1066(<i>o2</i>)		χ^2 (1:1)	umc1121(<i>o16</i>)			χ^2 (1:1)	χ^2 (1:2:1)
		<i>O2c</i>	<i>o2c</i>		<i>O16c6</i>	<i>O16c6</i>	<i>o16c5</i>		
BC ₁ F	283	14	13	0.51	15	13	—	1.71	—
BC ₂ F	97	—	95	—	5	41	—	1.5	—
BC ₂ F	106	—	10	—	2	5	21	—	0.88

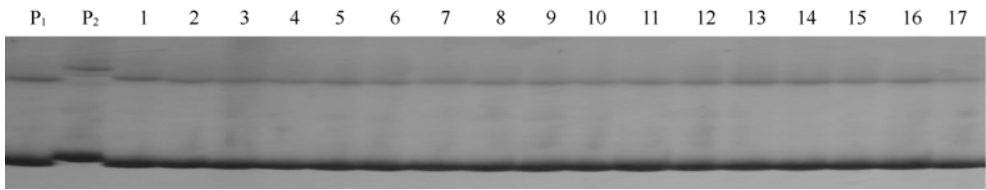


图 2 利用 umc1066 标记对 BC₂F₄ 代家系 17 株优选单株的 *o2* 基因检测结果
Fig. 2 Detection of *o2* gene for the 17 superior plants in the BC₂F₄ family lines by SSR marker umc1066
P₁: 太系 19; P₂: QCL3021; 1~17: 优选单株。P₁: Taixi 19; P₂: QCL3021; 1~17: superior plants.

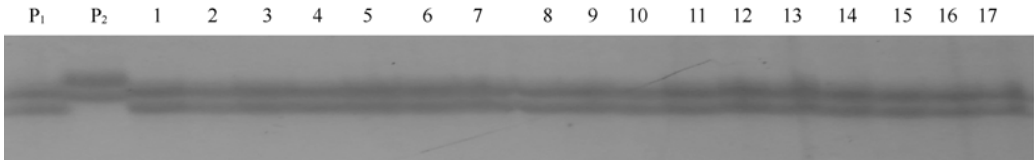


图 3 利用 umc1141 标记对 BC₂F₄ 代家系 17 株优选单株的 *o16* 基因检测结果
Fig. 3 Detection of *o16* gene for the 17 superior plants in the BC₂F₄ family lines by SSR marker umc1141
P₁: QCL3021; P₂: 太系 19; 1~17: 优选单株。P₁: QCL3021; P₂: Taixi 19; 1~17: superior plants.

2.3 各世代背景标记选择结果

利用具有多态性的 79 个 SSR 标记对 BC₁F₁、BC₂F₁ 及 BC₂F₃ 世代中选单株进行全基因组扫描, 计算中选单株的遗传背景恢复率以及各染色体的背景恢复率。在 BC₁F₁ 回交世代中, 中选单株遗传背景恢复率介于 72.8%~85.4% 之间, 平均遗传背景恢复率为 80.3%, 比理论值高 5.3%, 选择单株背景恢复率为 83.5% 的单株用于下一代继续回交。基因组各染色体的背景恢复率介于 67.2%~100.0% 之间, 其中, 第 10 染色体的背景恢复率最低, 第 3 染色体的背景恢复率最高。第 7 染色体的背景恢复率为 88.2%, 第 8 染色体的背景恢复率为 80.5%。同时, 对 BC₁F₁ 世代的相关性分析表明, 剔除第 3 染色体后(背景恢复率达 100%), 第 4、第 8 染色体与基因组的遗传背景恢复率的偏线性相关性没有达到显著水平($P>0.05$), 第 10 染色体与基因组的遗传背景恢复率的偏线性相关性达到了显著水平($0.01<P<0.05$), 其他染色体与基因组的遗传背景恢复率的偏线性相关性均达到了极显著水平($P<0.01$), 且表现为正相关。

在 BC₂F₁ 回交世代中, 中选单株的遗传背景恢

复率介于 86.7%~93.7%, 平均遗传背景恢复率 90.7%, 比理论值高 3.2%, 选择单株背景恢复率为 91.8% 的单株用于下一代自交。

在 BC₂F₃ 世代, 17 个中选单株的遗传背景恢复率介于 91.8%~94.9%, 供体亲本基因组在 17 个单株中所占比例介于 1.3%~6.3%, 供体亲本与受体亲本的杂合型所占比例为 1.3%~5.1%, 缺失数据比例为 0~1.2% (表 3)。在 17 个单株中, 遗传背景恢复率最高的为第 6 株和第 11 株, 最低的为第 10 株; 供体亲本所占比例最小的为第 6 株和第 14 株, 最大的为第 13 株; 双亲杂合型所占比例最小的为第 13 株, 最大的为第 1 株和第 2 株。

BC₂F₃ 世代 17 个中选单株在第 8 染色体的遗传背景恢复率介于 83.3%~88.9%, 供体亲本纯合片段的比率为 5.57%~16.70%, 双亲杂合片段的比例为 0~5.57% (图 4)。除第 6 单株导入供体亲本的两个片段外, 其他 16 个单株在第 8 染色体上均只导入供体亲本的一个片段。在导入供体亲本的所有片段中, 导入的最长供体亲本片段为 233.15 cM, 最短的供体亲本片段为 33.25 cM。在 17 个中选单株中, 导入片

表 3 BC₂F₃ 世代 17 个中选单株的标记带型比例
Table 3 The proportion of marker band of the 17 identified plants in the BC₂F₃ generation (%)

株系编号 No. of line	遗传背景恢复率 Recovery ratio of genetic background	供体亲本纯合片段比率 Proportion of the donor parent	杂合片段比率 Proportion of heterogeneous genotypes	缺失数据比率 Proportion of missing data
1	92.4	1.9	5.1	0.6
2	92.4	2.5	5.1	0
3	94.3	1.9	3.2	0.6
4	93.7	2.5	3.2	0.6
5	94.3	1.9	3.8	0
6	94.9	1.3	3.2	0.6
7	93.0	2.5	3.8	0.7
8	92.4	3.2	3.2	1.2
9	94.3	2.5	2.5	0.7
10	91.8	3.2	4.4	0.6
11	94.9	1.9	3.2	0
12	93.7	3.8	2.5	0
13	92.4	6.3	1.3	0
14	93.7	1.3	5.0	0
15	92.4	3.2	3.8	0.6
16	93.0	3.2	3.8	0
17	92.4	2.5	4.4	0.7

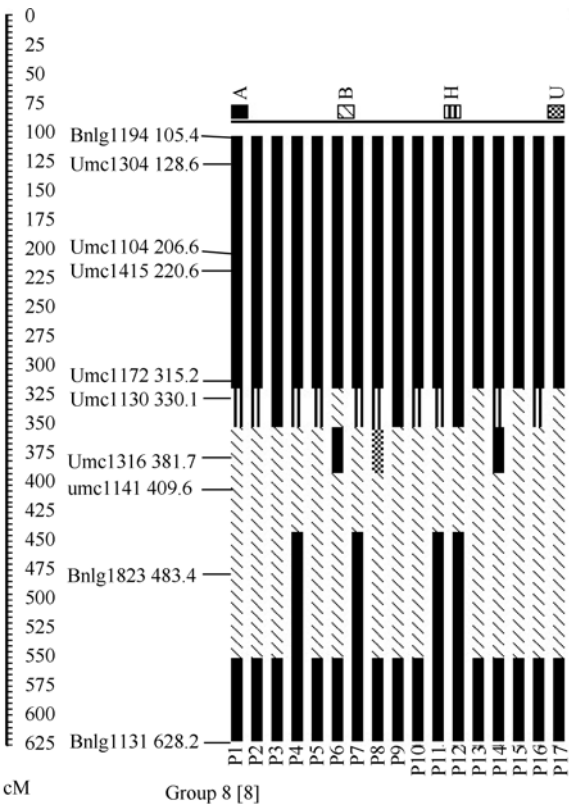


图 4 BC₂F₃ 世代 17 个中选单株在第 8 染色体上的图示基因型
Fig. 4 Genetic mapping on the chromosome 8 of the 17 identified plants in BC₂F₃ generation

段最短的为第 4、第 7、第 11 和第 12 单株，导入供体亲本的片段长度为 90.60 cM。这表明第 4、第 7、第 11 和第 12 单株，带有较小的连锁累赘。综合评定表明，第 11 株为其中最优选单株。

2.4 各世代赖氨酸含量测定结果

BC₂F₁ 中实际收获的 43 株果穗的籽粒赖氨酸含量为 0.383%~0.514%；实际收获的 28 株 BC₂F₂ 种子(已含有约 25%的 *ol6ol6* 基因型籽粒)赖氨酸含量为 0.398%~0.547%；BC₂F₃ 中实际收获 17 株的籽粒赖氨酸含量为 0.488%~0.587%；继续对 17 个家系里优选的 17 个单株收获的 BC₂F₄ 种子的籽粒赖氨酸含量进行测定验证，赖氨酸含量范围为 0.469%~0.599% (表 4)。17 个测定验证优株的籽粒赖氨酸含量见表 5。对高赖氨酸双隐性突变位点已经纯合的两个世代的 17 个单株籽粒赖氨酸含量差异显著性测验表明，不存在显著差异，赖氨酸含量趋于稳定。

从 BC₂F₁ 代单隐性突变系的赖氨酸平均含量高于亲本(太系 19) 5.23% 提高到 BC₂F₄ 代双隐性突变系赖氨酸平均含量高于亲本(太系 19) 22.33%。测定结果表明，在保证基因型的基础上，结合背景恢复率的选择与赖氨酸含量的测定，通过优中选优，能够逐代稳定提高赖氨酸含量。

表 4 各世代 *o2* 和 *o16* 基因聚合群体的赖氨酸含量
Table 4 Lysine content in the *o2* and *o16* gene pyramiding populations in each generation

世代 Generation	基因型 ^a Genotype ^a	株(系)数 Number of plants (lines)	赖氨酸含量的变幅 Range of lysine content (%)	平均赖氨酸含量 Average lysine content (%)	比“ <i>o2o2</i> ”增减 Changes compared to “ <i>o2o2</i> ” (%) ^b	比“ <i>o16o16</i> ”增减 ^c Changes compared to “ <i>o16o16</i> ” (%) ^c
BC ₁ F	<i>o2o2O16o16</i>	43	0.383–0.514	0.442	5.23	42.1
BC ₂ F	<i>o2o2O16o16</i>	28	0.398–0.547	0.465	12.59	44.9
BC ₂ F	<i>o2o2O16o16</i>	17	0.488–0.587	0.536	20.58	68.6
BC ₂ F	<i>o2o2O16o16</i>	17	0.469–0.599	0.541	22.33	65.9

^a: 基因型包含的 *o2* 位点和 *o16* 位点分别用 umc1066 和 umc1141 标记检测, “*o2o2*”代表亲本太系 19 的基因型, “*o16o16*”代表亲本 QCL3021 的基因型。^{b,c}: 比“*o2o2*”或“*o16o16*”增减(%)表示各世代家系测定的赖氨酸含量的平均值分别与每世代亲本测定值比较时, 增加或减少的百分数。

^a: the genotypes containing *o2* and *o16* loci were validated by umc1066 and umc1141 markers, “*o2o2*” is the genotype of Taixi 19 and “*o16o16*” is the genotype of QCL3021. ^{b,c}: changes compared to “*o2o2*” or “*o16o16*” (%) indicate the average lysine content in each generation family lines compared to the parent lines, the values are the percentage increased or reduced.

表 5 BC₂F₄ 世代 17 个双隐性纯合家系及对照的赖氨酸含量
Table 5 Lysine content of the 17 homozygous double recessive family lines in the BC₂F₄ generation and the control

株系编号 ^a No. of single plants in lines ^a	赖氨酸含量 Lys content (%)	标准差 Standard deviation (%)	比“ <i>o2o2</i> ”增减 ^b Changes compared to “ <i>o2o2</i> ” (%) ^b	比“ <i>o16o16</i> ”增减 ^c Changes compared to “ <i>o16o16</i> ” (%) ^c
1	0.544	1.4	23.07	66.87
2	0.577	3.9	30.54	76.99
3	0.537	2.2	21.49	64.72
4	0.469	1.2	6.11	43.87
5	0.549	4.4	24.20	68.40
6	0.546	3.7	23.53	67.48
7	0.487	1.4	10.18	49.39
8	0.569	2.5	28.73	74.54
9	0.554	4.1	25.34	69.94
10	0.555	2.2	25.57	70.25
11	0.499	2.6	12.89	53.07
12	0.506	5.3	14.47	55.21
13	0.582	5.1	31.67	78.53
14	0.599	2.8	35.52	83.74
15	0.523	2.3	18.32	60.43
16	0.564	4.0	27.60	73.01
17	0.532	2.7	20.36	63.19
18	0.243	2.6	45.02	–25.46
19	0.442	1.3	0	35.58
20	0.326	0.8	–26.24	0

^a: 18、19、20 分别为玉米自交系 106、轮回亲本太系 19、供体亲本 QCL3021。^{b,c}: 比“*o2o2*”或比“*o16o16*”增减(%)表示双突变系的赖氨酸含量与本代测定亲本的赖氨酸含量增加或减少的百分数。

^a: No.18 is corn inbred line 106; No.19 is receiver parent Taixi 19; No.20 is donor parent QCL3021. ^{b,c}: Changes compared to “*o2o2*” or “*o16o16*” (%) indicate percentage increased or decreased for lysine content in the double mutant lines compared to the parental line, Taixi 19 or QCL3021, in the same generation.

3 讨论

本研究利用 *o2* 玉米和 *o16* 玉米杂交, 再用 *o2* 玉米回交, 将 *o16* 基因渗入 *o2* 玉米系, 经 2 代回交和 3 代自交的 MAS 选择, 获得了 *o2* 和 *o16* 两

个位点隐性纯合而遗传背景与 *o2* 玉米系相当(92%~95%)的高赖氨酸玉米材料, 其赖氨酸含量分别比 *o2* 和 *o16* 玉米高, 且远高于普通玉米材料, 这对高赖氨酸玉米的遗传改良和育种具有重要意义。

本研究获得的 17 个双隐性纯合(*o2o2o16o16*)材料的赖氨酸含量比普通玉米平均提高 122.63%; 比高值亲本太系 19 (*o2o2*)平均提高 22.33%, 增幅为 6.11%~35.52%; 比低值亲本 QCL3021(*o16o16*)平均提高 65.86%, 增幅为 43.87%~83.74%, 这一结果与 Yang 等^[13]的研究结果一致, 进一步证明玉米 *o2* 位点与 *o16* 位点双隐性突变基因的聚合可以显著提高玉米籽粒赖氨酸含量。

研究表明, 用 umc1066、umc1141 分子标记进行前景选择是准确的。由于 umc1141 与 *o16* 基因有 3 cM 的遗传距离, 为了保证选择的准确性, 我们对中选个体的籽粒进行了赖氨酸含量的测定, 确认了 umc1141 标记的选择效率。

本研究在进行全基因组背景选择时, 对于已经恢复为轮回亲本的非靶标位点, 在下一世代不再进行背景选择, 这样便提高了背景选择的效率, 同时也减少了花费。在回交世代播种材料的选择方面, 综合背景恢复率和玉米籽粒的赖氨酸含量, 优先选择背景恢复率高的单株, 再考虑玉米籽粒的赖氨酸含量。这是由于染料结合赖氨酸(DBL)法是一种间接测定法, 尽管操作简单, 但其测定结果不很精确; 同时先通过背景选择实施了较大的选择压力, 不仅加快了遗传背景恢复进程, 而且在一定程度上可消除背景不同对赖氨酸含量的影响。 BC_1F_1 世代绝大多数染色体的遗传背景恢复率与全基因组遗传背景恢复率的偏相关达显著水平, 与夏军红等^[20]、段红梅等^[22]、刘志文等^[23]的研究结果相一致。这表明对有限数目的染色体或连锁群进行背景选择也可能达到对整个基因组选择的类似效果, 有利于进一步提高背景选择效率和降低试验成本。

回交导入法是基因聚合中较常使用的方法之一, 在水稻^[24-28]、小麦^[29]和大麦^[30]等作物的抗性基因聚合中被广泛采用, 获得了良好的效果。回交法与杂交后自交分离实现基因聚合的方法相比较, 各有优缺点。杂交后自交的方法较为简单和经济, F_2 代即可完成基因聚合。但是中选个体基因组杂合程度高, 不易稳定; 在培育成新的稳定二环系后, 需要进行配合力测定, 才便于育种应用。回交导入法难度相对较大, 花费较高, 一般要在 BC_2F_2 代才能实现基因聚合; 每一世代都必须进行前景选择, 并要配合背景选择。但是, 筛选出的基因聚合系, 可保留轮回亲本的优点, 不经配合力测定也可在育种中利用。此外, 从本研究结果来看, 回交渗入法也易于在较

小的群体中实现基因聚合。

4 结论

在 BC_2F_4 代, 获得携带 *o2* 和 *o16* 基因的家系 17 个, 其遗传背景与 *o2* 玉米系太系 19 相当(背景恢复率为 92%~95%), 赖氨酸含量为 0.469%~0.599%, 高于亲本太系 19 和 QCL3021, 且远高于普通玉米材料, 可作为高赖氨酸亲本在育种中应用。

References

- [1] 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
- [2] Mains E B. Heritable characters in maize: linkage of a factor for shrunken endosperm with the *al* factor for aleurone color. *J Hered*, 1949, 40: 21-24
- [3] Teas H J, Teas A N. Heritable characters in maize: Description and linkage of brittle endosperm-2. *J Hered*, 1953, 44: 156-158
- [4] Richardson D L. Shrunken-floury, a gene affecting protein synthesis. *Maize Genet Coop Newsl*, 1955, 29: 45
- [5] McWhirter K S. A floury endosperm, high lysine locus on chromosome 10. *Maize Genet Coop Newsl*, 1971, 45: 184
- [6] Soave C, Viotti A, Di Fonzo N, Salamini F. Recent evidence concerning the genetic regulation of zein synthesis. In: Leaver C J ed. *Genome Organization and Expression in Plants*. New York: Plenum Press, 1979. pp 219-226
- [7] Soave C, Tardani L, Di Fonzo N, Salamini F. Zein level in maize endosperm depends on a protein under control of the *opaque-2* and *opaque-6* loci. *Cell*, 1981, 27: 403-410
- [8] Nelson O E Jr. More precise linkage data on *fl3*. *Maize Genet Coop Newsl*, 1979, 53: 56
- [9] Nelson O E Jr. The mutations *opaque-9* through *opaque-13*. *Maize Genet Coop Newsl*, 1981, 55: 68
- [10] Salamini F, Di Fonzo N, Fornasari E, Gentinetta E, Reggiani R, Soave C. Mucronate, *Mc*, a dominant gene of maize which interacts with *opaque-2* to suppress zein synthesis. *Theor Appl Genet*, 1983, 65: 123-128
- [11] Motto M, Di Fonzo N, Hartings H, Maddaloni M, Salamini F, Soave C, Thompson R D. Regulatory genes affecting maize storage protein synthesis. *Oxf Surv Plant Mol Cell Biol*, 1989, 6: 87-114
- [12] Paulis J, Bietz J A, Bogoyo T P, Darrah L, Zuber M S. Expression of alcohol-soluble endosperm proteins in maize single and double mutants. *Theor Appl Genet*, 1990, 79: 314-320
- [13] Yang W P, Zheng Y L, Zheng W T, Feng R. Molecular genetic mapping of a high-lysine mutant gene (*opaque-16*) and the double recessive effect with *opaque-2* in maize. *Mol Breed*, 2005, 15: 257-269
- [14] Zhai F-L(翟凤林). Breeding for Crop Quality (作物品质育种). Beijing: Agriculture Press, 1991. pp 3-19 (in Chinese)

- [15] Tian Q-Z(田清震), Li X-H(李新海), Li M-S(李明顺), Jiang W(姜伟), Zhang S-H(张世煌). Molecular markers assisted selection to quality protein maize. *J Maize Sci* (玉米科学), 2004, 12 (2): 108–110 (in Chinese with English abstract)
- [16] Yang W P, Zheng Y L, Wu J. Heterofertilization of the opaque-2 endosperm in maize. *Hereditas*, 2008, 145: 225–230
- [17] Yang W-P(杨文鹏). Molecular Mapping of a High-Lysine Mutant Gene and Analyses of Heterofertilization of *o2* Endosperm and Allelic Variation at *o2* Locus in Maize. PhD Dissertation of Huazhong Agricultural University, 2005 (in Chinese with English abstract)
- [18] Yang W P, Zheng Y L, Ni S, Wu J. Recessive allelic variations of three microsatellite sites within the *o2* gene in maize. *Plant Mol Biol Rep*, 2004, 22: 361–374
- [19] Hospital F, Chevalet C, Mulsant P. Using markers in gene introgression breeding programs. *Genetics*, 1992, 132: 199–210
- [20] Xia J-H(夏军红), Zheng Y-L(郑用琰). Molecular marker-assisted backcross breeding of maize *Rf3* NIL and its efficient analysis. *Acta Agron Sin* (作物学报), 2002, 28(3): 339–344 (in Chinese with English abstract)
- [21] Fang M-J(方明镜), Ding D(丁冬), Yang W-P(杨文鹏), Xu S-Z(徐尚忠), Zheng Y-L(郑用琰). The linkage drag analysis of flanked *opaque2* by SSR marker in two maize BC₁F₁ population. *Acta Agron Sin* (作物学报), 2005, 31(10): 1359–1364 (in Chinese with English abstract)
- [22] Duan H-M(段红梅), Wang W-X(王文秀), Chang R-Z(常汝镇), Zhang M-C(张孟臣), Qiu L-J(邱丽娟). Efficient selection of genetic background using SSR markers in soybean. *J Plant Genet Resour* (植物遗传资源学报), 2003, 4(1): 36–42 (in Chinese with English abstract)
- [23] Liu Z-W(刘志文), Wang Y(王英), Liu X-P(刘雪平), Fu T-D(傅廷栋), Xue Y-C(薛永常), Tu J-X(涂金星), Ma C-Z(马朝芝). The effects analysis of molecular marker-assisted selection in yellow-seeded *Brassica napus*. *Acta Agric Boreali-Sin* (华北农学报), 2006, 21(2): 57–61 (in Chinese with English abstract)
- [24] Xu J-L(徐建龙), Lin Y-Z(林貽滋), Weng J-P(翁锦屏), Zhao X-L(赵新立). Convergence of resistance genes to bacterial blight in rice and its genetic effect. *Acta Agron Sin* (作物学报), 1996, 22(2): 129–134 (in Chinese with English abstract)
- [25] He G-M(何光明), Sun C-Q(孙传清), Fu Y-C(付永彩), Fu Q(付强), Zhao K-J(赵开军), Wang C-L(王春连), Zhang Q(章琦), Ling Z-Z(凌忠专), Wang X-K(王象坤). Pyramiding of senescence-inhibition *IPT* gene and *Xa23* for resistance to bacterial blight in rice (*Oryza sativa* L.). *Acta Genet Sin* (遗传学报), 2004, 31(8): 836–841 (in Chinese with English abstract)
- [26] Deng Q-M(邓其明), Zhou Y-J(周宇燊), Jiang Z-X(蒋昭雪), Wan Y-X(万映秀), Zhao B(赵斌), Yang L(杨莉), Li P(李平). Pyramiding bacterial blight (BB) resistance genes (*Xa21*, *Xa4* and *Xa23*) into rice and its effect analysis. *Acta Agron Sin* (作物学报), 2005, 31(9): 1241–1246 (in Chinese with English abstract)
- [27] Zhang J, Li X, Jiang G, Xu Y, He Y. Pyramiding of *Xa7* and *Xa21* for the improvement of disease resistance to bacterial blight in hybrid rice. *Plant Breed*, 2006, 125: 600–605
- [28] Liu W-G(柳武革), Wang F(王丰), Jin S-J(金素娟), Zhu X-Y(朱小源), Li J-H(李金华), Liu Z-R(刘振荣), Liao Y-L(廖亦龙), Zhu M-S(朱满山), Huang H-J(黄慧君), Fu F-H(符福鸿), Liu Y-B(刘宜柏). Improvement of rice blast resistance in TGMS line by pyramiding of *Pi-1* and *Pi-2* through molecular marker-assisted selection. *Acta Agron Sin* (作物学报), 2008, 34(7): 1128–1136 (in Chinese with English abstract)
- [29] Zeng X-Y(曾祥艳), Zhang Z-Y(张增艳), Du L-P(杜丽璞), Xin Z-Y(辛志勇), Chen X(陈孝). Development of wheat germplasms with multi-resistance to powdery mildew, stripe rust and yellow dwarf virus by molecular marker-assisted selection. *Sci Agric Sin* (中国农业科学), 2005, 38(12): 2380–2386 (in Chinese with English abstract)
- [30] Jefferies S P, King B J, Barr A R, Warner P, Logue S J, Langridge P. Marker-assisted backcross introgression of the *Yd2* gene conferring resistance to barley yellow dwarf virus in barley. *Plant Breed*, 2003, 122: 52–56