

# 高赖氨酸玉米近等基因系创建及胚乳质地变异研究

齐建双<sup>1,2</sup>, 李建军<sup>1,3</sup>, 铁双贵<sup>2</sup>, 孙建军<sup>2</sup>, 卢彩霞<sup>2</sup>, 朱卫红<sup>2</sup>, 周珂<sup>2</sup>, 陈彦惠<sup>1</sup>

(1. 河南农业大学 农学院, 河南 郑州 450002;

2. 河南省农业科学院粮食作物研究所, 河南 郑州 450002; 3. 河南师范大学 生命科学院, 河南 新乡 453007)

**摘要:**采用回交转育与分子标记相结合的手段, 对育种上广泛运用的 3 个骨干自交系郑 58、478 和昌 72 进行改良, 成功创建了高赖氨酸近等基因系。对回交转育成的高赖氨酸近等基因系 QZ58、Q478 和 QC72 进行表型分析和研究, 结果表明, 马齿型的郑 58、478 和硬粒型的昌 72 经过相同的转育手段转育成含有  $o_2o_2$  纯合基因型的近等基因系胚乳硬度度发生了很大的变异。从表型来看, QZ58 和 Q478 家系仅有少数几种表现型, 而 QC72 家系却出现了一系列的连续变异。3 个骨干系转化前后容重差均值相差很少(郑 58 与 QZ58 差均值为 107 g/L; 478 与 Q478 差均值为 105 g/L; 昌 72 与 QC72 差均值为 102 g/L), 但降低幅度有很大差异(郑 58 容重降低幅度为 94 ~ 147 g/L; 478 为 92 ~ 119 g/L; 昌 72 为 68 ~ 125 g/L), 其中昌 72 的变幅最大。转化后近等基因系胚乳硬度度总体趋势为 QC72 > Q478 > QZ58, 与转化前一致。这说明  $o_2$  基因对不同种质玉米胚乳硬度度降低的总体趋势一致, 但效果具有明显差异。

**关键词:**近等基因系; SSR 标记; 胚乳质地

**中图分类号:** S513.03 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-7091(2006)02-0042-04

## Study How to Establish the Isogenic Lines and the Variations of Their Endosperm

QI Jian-shuang<sup>1,2</sup>, LI Jian-jun<sup>1,3</sup>, TIE Shuang-gui<sup>2</sup>,

SUN Jian-jun<sup>2</sup>, LU Cai-xia<sup>2</sup>, ZHU Wei-hong<sup>2</sup>, ZHOU Ke<sup>2</sup>, CHEN Yan-hui<sup>1</sup>

(1. College of Agronomy, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, China;

2. The Cereal Crops Institute of Henan Academy of Agricultural Sciences, Zhengzhou 450002, China;

3. College of Life Science, Henan Normal University, Xinxing 453007, China)

**Abstract:** This paper established QZ58 and Q478 and QC72 isogenic lines; which were from normal corn lines Zheng 58 and 478 and Chang 72. And analyzed the hardness of different endosperm types among QZ58 and Q478 and QC72. The results showed that there were 6 different endosperm types among QC72 isogenic line and only 3 endosperm types among QZ58 and 478 isogenic lines. The hardness QC72 appears a series of continuous variations. The current of the remainder of litter weight is QC72 > Q478 > QZ58. The higher is litter weight of recurrent parent, the higher is it of its genealogical line. So it is important to chose a hard endosperm line as recurrent parent when corn breeding in Quality Protein Maize (QPM).

**Key words:** Isogenic line; SSR marker; Endosperm quality

运用回交的手段, 对一些优良自交系的个别缺点进行改良是选育自交系十分有效的措施<sup>[1,2-4]</sup>。自从 1964 年 Mertz 等人发现 *opaque-2* 基因能够显著提高玉米子粒中的赖氨酸和色氨酸含量以来<sup>[2,3,5]</sup>,

各国的育种家都相继投入到优质蛋白玉米育种中, 但是, 多年来并未出现理想的优质蛋白玉米品种。这是因为优质蛋白玉米种质资源相对贫乏, 很难直接组配单交种, 育种家们大多是运用高赖氨酸的种

收稿日期: 2005-09-20

基金项目: 河南省杰出人才创新基金资助 (0221001000); 国家 863 分子育种重大专项课题 (2003AA207070)

作者简介: 齐建双 (1979-), 女, 河南安阳人, 在读硕士, 主要从事玉米遗传育种研究; 陈彦惠、铁双贵为通讯作者。

质,通过回交转育的手段将普通玉米自交系转化成高赖氨酸的近等基因系。实践证明,由普通玉米转化而来的这些近等基因系发生了一系列的变化,如出现了容重降低,胚乳粉质程度增加<sup>[1,3]</sup>,出苗速度慢,容易感染病虫害等。近年来,育种家们对转育成的高赖氨酸玉米自交系与普通玉米自交系的差异以及田间性状和配合力均有研究,但是,还未见到有关高赖氨酸玉米近等基因系的创建及胚乳质地变异的详细报道。本研究对目前育种上广泛运用的3个骨干自交系郑58、478和昌72进行了成功的转育,并对其高赖氨酸近等基因系进行研究,揭示回交转育成的近等基因系胚乳的变异特点,以期为提高优质蛋白玉米的育种效率提供理论依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

普通玉米自交系郑58、478和昌72及高赖氨酸供体亲本CAO42各4个穗行;高赖氨酸近等基因系(经过7代回交转育)QZ58家系55个穗行,Q478家系30个穗行和QC72家系60个穗行。

### 1.2 方法

1.2.1 SSR分子标记回交育种创建近等基因系 第1季:以普通玉米自交系为母本与高赖氨酸供体亲本CAO42杂交,得到 $F_1$ ;第2季:以普通玉米做轮回亲本回交,得到 $BC_1F_1$ ;第3季:按穗行种下 $BC_1F_1$ ,挑选农艺性状、抗性较好的单株挂牌取样,提DNA,电泳,得到已经成功转入了 $o_2$ 基因的单株,继续回交得到 $BC_2F_2$ ;如此循环到 $BC_7F_7$ (理论上回交3代即可)。再自交3~4代。

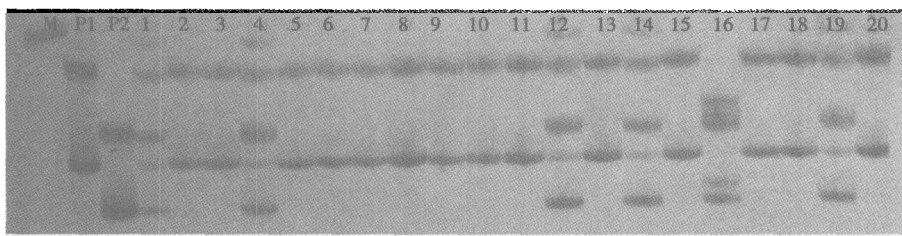


图1 轮回亲本昌72、高赖供体亲本CAO42和其回交群体 $o_2$ 基因内umc1066标记电泳图

Fig.1 The profiles of normal C72 and CAO42 and their recurrent populations by umc1066

### 2.2 转化后材料田间农艺性状及基因型SSR分子标记鉴定

在图2中,M,P1,P2同图1;编号1~29代表29个QC72家系单株样品(其中9,22,25是杂株,考种

1.2.2 田间试验 从2000年开始在河南省农科院试验农场进行,并且每年在海南加繁1代。采用随机区组设计,单行小区,每小区行长3.5 m,行距0.6 m,株距0.2 m,每行18株。从苗期开始进行田间综合农艺性状观察,着重记载每代回交材料的抽雄期、吐丝期和散粉期。

1.2.3 *opaque-2* 基因SSR分子标记鉴定 SSR标记选用 $o_2$ 基因内3个标记,它们是Phi057、Phi112, umc1066;引物序列来自MAIZEDATABASE;引物由上海生工公司合成。DNA提取、PCR扩增等方法采用MAIZEDATABASE操作书。

1.2.4 容重测定 用tm型高精度粮食水分容重测定仪测量容重。

1.2.5 表型分析 直接观察玉米胚乳外部形态、统计各种结构类型。

## 2 结果与分析

### 2.1 SSR分子标记回交育种创建近等基因系选择效率

在图1中,M为Marker(Del3000);P1为轮回亲本普通昌72;P2为高赖氨酸供体亲本CAO42;编号1~20代表回交1代群体的20个单株样品。结果显示:有25%左右的单株为杂和带型,说明这些单株中已经成功转入了 $o_2$ 基因,基因型为 $O_2o_2$ 。去除没有转入 $o_2$ 基因的单株,对转入了 $o_2$ 基因的这些单株继续回交。如此反复,经过7代回交,再连续自交4代,得到高赖氨酸近等基因系,运用SSR分子标记回交育种创建近等基因系选择效率达到了100%。

时已经去除)。由图2可以清楚的看到,经过7代回交,再连续自交4代,得到材料基因型与高赖氨酸亲本一样,是双隐性纯合体。说明经过7代的回交基因已经在 $o_2$ 位点纯合。这与表现型相一致。

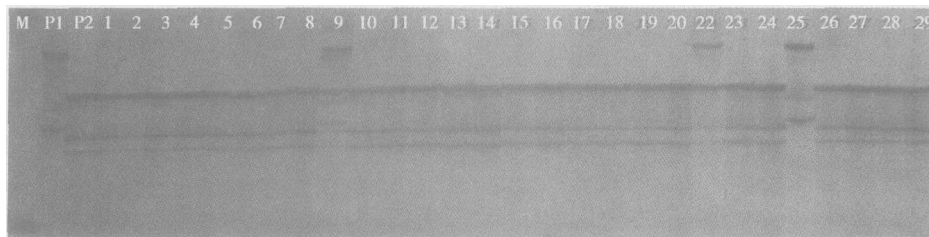


图2 普通昌72及其高赖氨酸近等基因QC72家系opaque-2基因内umc1066标记电泳图

Fig.2 The profiles of normal C72 and QC72 isogenic line by umc1066

从田间观察来看,这些在 $o_2$ 位点基因型纯合的材料其株型、株高、雄穗等农艺性状都与普通自交系郑58、478和昌72非常接近。这样我们采用回交转育与分子标记相结合的手段,成功创建了高赖氨酸近等基因系QZ58、Q478和QC72。

### 2.3 近等基因系胚乳类型和质地变化

由普通玉米自交系转化成的高赖氨酸近等基因系子粒胚乳结构发生了很大的变化,但不同玉米种质的胚乳类型和质地又各不相同。马齿型的郑58和478,其近等基因系家系胚乳类型都只有3种,粉质程度比较高,但从表型和容重测量结果来看,Q478家系的硬质程度比QZ58家系的要高,而硬粒型的昌72,转化后却发现了一系列不同程度的硬质

胚乳连续性变异,有完全软质不透明的,也有规则的顶部胚乳是硬质的(硬质的比例不同),还有斑块状硬质胚乳。

### 2.4 容重变化范围及分布密度

测量了普通自交系郑58、478和昌72及其高赖氨酸近等基因家系共157个穗行的容重。结果表明:普通昌72容重最大,达到814 g/L;普通478的容重为775 g/L;普通Z58容重最小,值为763 g/L;QZ58家系容重介于616~669 g/L之间,容重均值为656 g/L;Q478家系容重介于656~683 g/L之间,容重均值为670 g/L;QC72家系容重范围在689~746 g/L之间,容重均值为712 g/L。QZ58、Q478和QC72 3个家系容重分布密度见表1。

表1 QZ58、Q478和QC72 3个家系容重分布密度比较

Tab.1 The density of liter weight of QZ58 and O478 and QC72 genealogical line

%

材料名称 Material name	750g/L以上 More than 750 g/L	(715 ~ 750) g/L	(680 ~ 715) g/L	(645 ~ 680) g/L	645 g/L以下 Less than 645 g/L	容重均值(g/L) Average of liter weight
QZ58	0	0	0	67.5	32.5	656
Q478	0	0	27.3	72.7	0	670
QC72	0	40	60	0	0	712

注:普通郑58容重为763 g/L;普通478的容重为775 g/L;普通昌72容重为814 g/L

Note: The liter weight of the three normal lines: Zheng 58, 763 g/L; 478, 775 g/L; Chang72, 814 g/L

### 2.5 QZ58、Q478和QC72 3个家系容重大小比较

图3、4中数据是选用了每个群体的前20个穗行的容重值。由图3可以看到:马齿型的郑58、478和硬粒型的昌72经过相同的转育手段其高赖氨酸近等基因系QZ58、Q478和QC72容重有很大差异。同是马齿型的郑58和478其近等基因系家系的容重也有差异,但差异较小,近等基因系家系的容重总体趋势是QC72 > Q478 > QZ58。分析原因可能与转化前普通玉米自交系Z58、478和C72的基础容重有关,由表1知,普通玉米自交系的基础容重为C72 > 478 > Z58,所以基础容重较大的自交系转化后其相应近等基因系的容重也较大。

### 2.6 3个骨干系回交转育前后容重之差比较

普通郑58、478和昌72的容重结果见表1。转化后3个骨干系容重降低幅度分别为,郑58容重降

低幅度为94~147 g/L; 478容重降低幅度为92~119 g/L; 昌72容重降低幅度为68~125 g/L(图4)。所以普通郑58、478和昌72与3个家系容重的差均值分别为:普通郑58与QZ58家系容重差均值107 g/L,普通478与Q478家系容重差均值105 g/L,普通昌72与QC72家系容重差均值102 g/L。由此可见,3个骨干系回交转育前后容重的差均值非常接近,容重降低幅度都比较大。但是,昌72容重降低最少的只有68 g/L,最多的则达到了125 g/L,前文也有描述QC72家系胚乳硬质度表现型也出现了从软到硬的连续变异。所以,我们认为opaque-2基因对普通郑58、478和昌72这3个遗传背景的子粒胚乳硬质度降低的总体趋势一致,但效果具有明显差异。

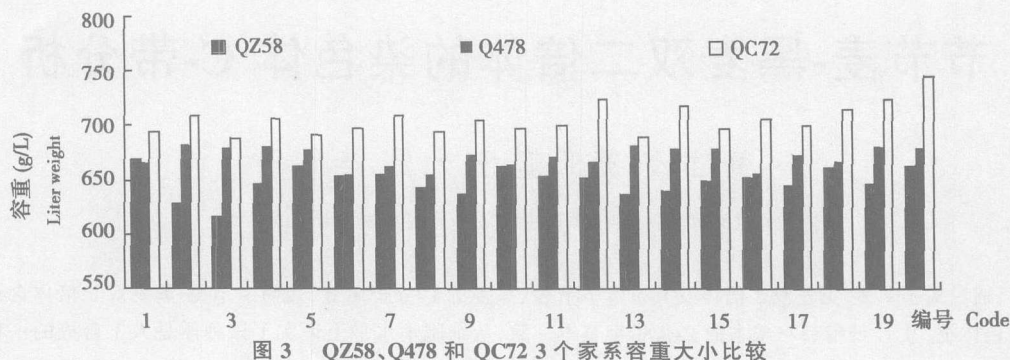


图3 QZ58、Q478 和 QC72 3 个家系容重大小比较

Fig.3 Comparison of liter weight of QZ58 , Q478 and QC72

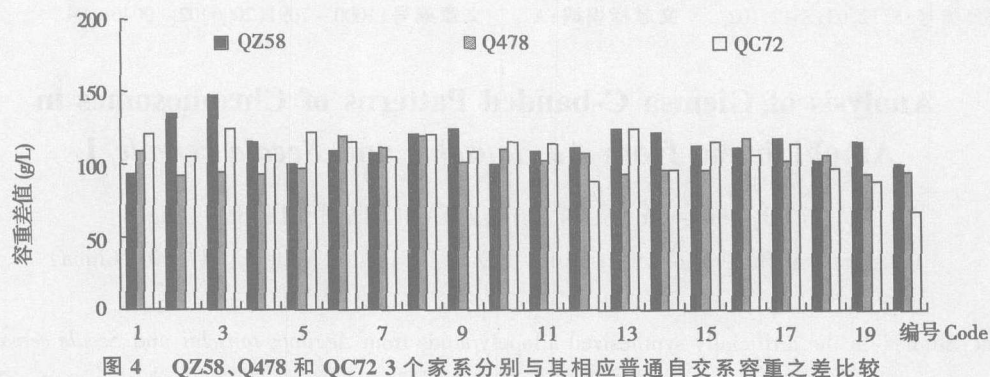


图4 QZ58、Q478 和 QC72 3 个家系分别与其相应普通自交系容重之差比较

Fig.4 Comparison of liter weight between the normal corn lines and their isogenic lines

### 3 讨论

本研究用回交转育与分子标记相结合的手段,快速成功地创建了骨干系郑 58、478 和昌 72 的高赖氨酸近等基因系 QZ58、Q478 和 QC72。这种方法比常规回交方法选育自交系的时间缩短了 1/3,大大加快了育种进程,而且不会导致硬质  $o_2o_2$  基因型材料丢失。

对转育成的高赖氨酸近等基因系的研究表明:转化前后同一种质材料的容重之差的大小可以说明转化后的近等基因系与其转化前普通自交系的胚乳硬质度的接近程度,差值越小说明其与转化前相应的普通自交系的胚乳硬质度越接近。本研究在 QC72 家系中就发现了最小差值只有 68 g/L,而在 QZ58 家系中却有最大差值达到了 147 g/L, Q478 家系差值均在 92 ~ 119 g/L。并且从表现型来看, QC72 家系胚乳硬质度表现型也出现了从软到硬的连续变异,所以我们认为硬粒型昌 72 的转化效果最理想,最容易得到硬质胚乳的  $o_2o_2$  纯合基因型材料。

QZ58、Q478 和 QC72 3 个家系容重有很大差异,总体趋势是 QC72 > Q478 > QZ58,与转化前相应普通

自交系容重大小趋势是一致的。3 个家系与其相应普通玉米自交系相比较容重降低幅度都较大,均值超过了 100 g/L,但 3 个均值相差很小。这说明近等基因系的容重与转化前普通玉米自交系 Z58、478 和 C72 的基础容重有关,普通玉米自交系的基础容重为昌 72 > 478 > 郑 58,所以基础容重较大的自交系转化后其相应近等基因系的容重也较大。这就告诉我们在以后的优质蛋白育种过程中选择硬质程度较高的自交系作为轮回亲本进行回交转育十分关键。我们认为 *opaque-2* 基因对不同种质玉米胚乳硬质度降低的总体趋势一致,但效果具有明显差异。

### 参考文献:

- [1] 曹靖生. *02* 基因的转入对玉米性状的影响[J]. 国外农学——杂粮作物, 1999, 19(3): 9 - 11.
- [2] 周洪生. 玉米种子大全[M]. 北京: 中国农业出版社, 2000. 260 - 289.
- [3] 史桂荣. *02* 基因的转入对玉米形态性状的影响[J]. 玉米科学, 2002, 10(3): 27 - 28.
- [4] 杨引福, 胡必德, 师公贤. CIMMYT 玉米基因圃 Pool33QPM 温带驯化种群轮回选择的效果[J]. 西北农业大学学报, 1995, 23(增刊): 6 - 8.
- [5] 齐建双, 铁双贵, 孙建军, 等. *Opaque - 2* 基因对不同玉米种质胚乳质地的影响[J]. 河南农业科学, 2005, (11): 30 - 32.