

玉米耐旱功能标记辅助选择初探

柳思思^{1,2}, 刘玲玲², 许侃², 石庆华¹, 张世煌², 郝转芳²

(¹ 新疆农业大学农学院, 乌鲁木齐 830052; ² 中国农业科学院作物科学研究所/作物分子育种国家工程实验室, 北京 100081)

摘要:干旱是影响玉米生产的主要因素之一, 培育耐旱品种可以有效地保持其在干旱环境下的产量稳定性。随着生物信息学数据库的不断完善及基因组学技术的发展, 耐旱通用 QTL (Quantitative trait locus) 的发掘为分子育种提供了新的机遇和方法。本研究在已发掘的耐旱通用 QTL 基础上, 选取相关的 18 个连锁标记进行开发并且验证在不同种质背景下 24 份玉米自交系的耐旱性。结果表明, 共检测出 42 个多态性位点, 平均多态性信息量为 0.4245; 通过 GGT32 (Graphical GenoTypes) 图示基因型软件分析 SSR 位点, 得出 umc2217、umc2029、phi099、umc1213 和 phi022 这 5 个连锁标记可用来初步鉴定玉米耐旱性; 利用卡方检验, 得出 phi022 和 umc2217 均达到显著水平, 其与耐旱密切相关。因此, 这几个连锁标记不仅可被用于相应群体的耐旱分子标记辅助选择, 而且为以后的标记辅助选择及抗旱性基因克隆的研究打下基础。

关键词: 玉米; 耐旱; SSR 标记; 分子标记辅助选择

An Initial Analysis of Functional Marker-Assisted Selection with Drought Tolerance in Maize

LIU Si-si^{1,2}, LIU Ling-ling², XU Kan², SHI Qing-hua¹, ZHANG Shi-huang², HAO Zhuan-fang²

(¹ College of Agronomy, Xinjiang Agricultural University, Urumqi 830052; ² Institute of Crop Sciences/National Engineer Laboratory of Crop Molecular Breeding, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081)

Abstract: Drought is one of the main factors affecting maize production and development of new cultivars with high yield stability under water stress is a major breeding objective. With the enrichment of bioinformatics databases and development of genomic technology, progress on identification of the consensus drought-tolerant QTLs provides new approaches and prospects for molecular breeding of drought tolerance in maize. According to our previous study, some important constitutive and adaptive QTLs using meta-analysis were identified to find specific genes and their families for speculating on drought tolerance networks. The objective of this study was on the basis of excavated drought-tolerant universal QTLs, selecting 18 linked markers to develop and verify the drought tolerance in 24 different germplasms. The results were as follows: (1) 42 polymorphism sites and a mean polymorphism information content of 0.4245 were detected, with a range of 0.0799 to 0.7170. (2) By GGT32 analysis, 5 linked markers including umc2217, umc2029, phi099, umc1213, and phi022 showed significant variations among different germplasms, which might be initially used to identify different drought-tolerant materials. (3) Using the analysis of chi-square test, linked markers phi022 and umc2217 had reached significant levels, which might be closely related to sites of drought tolerance. Therefore, these linked markers can not only be for the corresponding groups of drought-resistant marker-assisted selection, but also lay the foundation for future marker-assisted selection and drought resistance gene cloning

Key words: *Zea mays* L.; drought tolerance; simple sequence repeats; molecular marker assisted selection

收稿日期: 2012-03-13 修回日期: 2012-05-16 网络出版日期: 2013-01-30

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.4996.S.20130130.1616.004.html>

基金项目: 国家高技术研究发展计划 (863 计划) 项目 (2011AA100501)

作者简介: 柳思思, 硕士研究生。研究方向: 玉米耐旱分子生物学。E-mail: liusisi.5945@163.com

通信作者: 石庆华, 副教授。E-mail: ADA5233@163.com; 郝转芳, 副研究员。E-mail: haozhuanfang@yahoo.com.cn

玉米是世界第一大粮食作物^[1]。随着全球畜牧业迅速发展和应用玉米加工液体燃料乙醇的需求迅速攀升,玉米的需求量大幅度增加。然而,全球气候变化引发干旱发生周期越来越短,程度越来越重,对粮食生产构成严重威胁。据统计,每年因干旱造成玉米减产约 20% ~ 30%,干旱已成为限制玉米生产的首要非生物胁迫因素^[2]。尽管传统育种技术在作物遗传改良方面取得了显著成就,但由于其易受环境影响,致使选择效率较低、周期较长,已不能满足当前玉米生产对优良品种的需求。利用基因组学和生物信息学的最新研究成果,开展玉米分子标记育种研究,构建实用、经济、高效的分子育种技术体系,选育高产优质多抗玉米新品种,已经成为玉米育种的重要研究方向^[3]。

分子数量遗传学的发展促进了分子标记的更新和高密度遗传连锁图谱的构建,发掘出大量与数量性状相关的 QTL,同时也促进了 MAS (Marker-assisted selection) 在数量性状选择上的应用。MAS 是通过利用与目标性状紧密连锁的 DNA 分子标记对目标性状进行间接选择的现代育种技术,可以使育种家无需测定表型就能够追踪调控抗旱性状的遗传位点,可免去多年多点的大量田间测试工作,提高选择效率。J. Bernier 等^[4]指出,QTL 效应在不同的群体和环境缺乏重复性是限制了 QTL 在 MAS 上应用的两个重要因素;此外,验证耐旱基因和在基因内开发有效的标记十分困难。因此,利用一致性 QTL 和其潜在的基因是解决辅助育种的一种有效途径。现在,从 QTL 作图到分子标记辅助选择 (MAS) 的成功应用的例子都有报道,如大豆孢囊

线虫上 SSR 标记 sat309 的应用和 *Fhb1* 基因连锁的分子标记用于提高小麦对赤霉病的抗性^[5-7];最近,J. Bernier 等^[4]报道,通过分子标记辅助选择对 9 个胁迫试验的评估,得出数量性状位点 qtl12.1 对培育抗旱早稻栽培种有较大潜力。

本研究根据 Z. F. Hao 等^[8]元分析结果,设计与耐旱紧密连锁的 SSR 标记,并结合田间抗逆性鉴定,验证在不同种质背景下材料的耐旱性,为推动玉米耐旱分子标记辅助选择育种发展提供基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

选用 24 份自交系,为来源不同、前期研究证明耐旱能力明显差异的玉米常用自交系(表 1)。其中,自交系齐 319、旱 21、X178、7922、辽 3053 和 52106 等被鉴定为抗旱自交系;自交系东 91、东 46 和红玉米等被鉴定为旱敏感自交系^[9]。根据本实验室已有研究基础,选取 18 对与耐旱相关的 SSR 引物(表 2)^[8],用于 PCR 扩增。引物由北京奥科鼎盛生物科技有限公司合成。

1.2 SSR 标记分析

采用 M. A. Saghai-Maroo 等^[10]提出的 CTAB 方法提取 DNA。用改良 CTAB 法抽提并纯化总 DNA,用 Thermo NANO DROP 2000 型分光光度计检测 DNA 浓度和质量,并把浓度统一调至 50 ng/μL 备用。

PCR 扩增反应总体积为 20 μL,其中包括:1 × *Taq* buffer、0.2 mmol/L dNTP mixture、0.25 μmol/L SSR 引物、0.5 U *Taq* DNA 酶和 100 ng DNA 模板。反应试剂购自天根生化科技(北京)有限公司。

表 1 24 份玉米自交系及系谱来源

Table 1 Maize inbred lines and their pedigrees used in the study

编号 Code	自交系 Inbred line	系谱来源 Origin/pedigree	编号 Code	自交系 Inbred line	系谱来源 Origin/pedigree
1	齐 319	先锋杂交种 78599 选系	13	丹 598	(丹 340 × 丹黄 11) × (丹黄 02 × 599)
2	旱 21	美国杂交种 78599	14	CA339	Pool 33 QPM
3	X178	美国杂交种 78599	15	早 49	合 344 × 太系 138 低温诱变
4	B73	BSSSC5	16	吉 842	吉 63 × Mo17
5	豫 12	Mo17 改良系	17	东 46	大黄 46、塔 22C、牛 11 等综合种
6	吉 477	外国杂交种 HC777	18	冀 53	冀群 2C ₀ - 2
7	辽 3053	(沈 5003 × B68)/铁 7922	19	东 91	大黄
8	5213	Mo17 改良系	20	吉 81162	525 × 掖 107
9	52106	矮金 525 × 掖 107/106	21	塔 5	地方品种
10	吉 495	Mo17 × L105/Mo17	22	БІР44	БІР44
11	7922	从美国杂交种 3382 中分离	23	红玉米	红玉米
12	中 17	中 17	24	郑 30	郑 20 × 掖 478

1 ~ 12:抗旱自交系;13 ~ 24:旱敏感自交系

1 - 12 is drought-resistant inbred lines;13 - 24 is drought-sensitive inbred lines

表 2 18 对引物在 24 份玉米自交系中检测的多态性位点、*PIC* 值及可能的耐旱候选基因分析

Table 2 Polymorphism sites and *PIC* values for SSR loci found in 24 maize inbred lines and possible co-locating candidate for drought tolerance using 18 pairs of primers

引物编号 Primer code	SSR primer	重复序列 Repeat sequence	图谱位置 Bin No.	多态性位点 No. of polymorphism sites	多态性 信息量 <i>PIC</i> value	一致性 QTL Consensus QTL	基因名称 Gene name	解释 Definition
1	phi022	GTGC	9.03	3	0.6215	DCQ34	<i>Wx1</i>	Granule bound starch synthase/Wax1
2	phi027	GCGCT	9.03	3	0.3299	DCQ34	<i>Wx1</i>	Granule bound starch synthase/Wax1
3	phi034	CCT	7.02	2	0.3297	DCQ26	<i>cyp6</i>	Cytochrome P450
4	phi036	AG	3.04	2	0.4688			
5	phi099	AC	3.04	2	0.4764			
6	phi109275	AGCT	1.03	3	0.6616	DCQ1	<i>Hsp26</i>	Heat shock protein26
7	phi339017	AGG	1.03	2	0.1653			
8	umc1289	(TCG)5	8.03	2	0.3750	WCQ26	<i>SOD3c</i>	Superoxide dismutase3c
9	umc1388	(CGC)4	6.05	2	0.4444	DCQ26	<i>esp1</i>	Embryo specific protein1
10	umc1415	(GAC)10	8.03	2	0.4959	WCQ26	<i>SOD3c</i>	Superoxide dismutase3c
11	umc1865	(GAG)6	7.03	2	0.4688	WCQ24	<i>psy3</i>	Phytoene synthase
12	umc2029	(AGA)5	1.08	2	0.4965	DCQ4;WCQ4	<i>cpn2</i>	Chaperonin2
13	umc2040	(CGC)4	6.05	2	0.0799	DCQ26	<i>esp1</i>	Embryo specific protein1
14	umc2213	(AT)6	9.02	2	0.4965	DCQ34	<i>baf1</i>	Barren stalk fastigate1
15	umc2217	(TG)6	1.04	3	0.6424	WCQ2	<i>SOD4</i>	Superoxide dismutase4
16	umc2368	(GCT)4	7.05	2	0.2188	DCQ28;WCQ25	<i>SOD2</i>	Superoxide dismutase2
17	umc2400	(AGA)4	5.03	2	0.1528	WCQ18	<i>bip1</i>	Binding protein homolog1
18	bnlg1094	AG(21)	7.02	4	0.7170	DCQ26	<i>cyp6</i>	Cytochrome P450

PCR 反应程序为: 94 ℃ 模板 DNA 预变性 5 min, 1 个循环; 94 ℃ 模板 DNA 变性 30 s, 55 ~ 60 ℃ (视引物而定) 与模板靶位点结合 30 s, 72 ℃ 引物沿模板延伸 30 s, 共 35 个循环; 最后 72 ℃ 延伸 10 min, 降至 4 ℃ 取出。全部 PCR 反应在 C1000™ thermal cycler (Bio-RAD, USA) 上进行。以 PBR322 片段为分子量 Marker, 采用 DYCZ-30 型电泳仪(北京六一仪器, 北京) 进行 8% 的聚丙烯酰胺凝胶电泳, 在恒定功率 30 w 电泳 60 min。按照 CIMMYT (International Maize and Wheat Improvement Center) 应用生物技术中心的银染程序染色^[11]。

1.3 数据分析

统计 SSR 引物扩增谱带, 根据扩增产物的电泳结果, 凝胶上在相同迁移率位置有带记为 1, 无带记为 0, 缺失记为 9。以简单配对参数 (simple matching coefficient) 计算遗传相似系数 $GS = m / (m + n)$, 其中 m 为基因型间共有带数目, n 为差异带数目^[12]。按 UPGMA 方法 (Unweight Pair Group Method Using Arithetic Average), 采用 NTSYS-pc 2.1 软件对 24 个自交系进行聚类分析^[13]。每一个 SSR 位点的多态性信息量 (polymorphism information content, *PIC*) 按公式 $PIC = 1 - \sum f_i^2$ 计算^[14], 其中 f_i 为 i 位点基因

频率。

利用 GGT32 (Graphical GenoTypes) 图示基因型软件分析 SSR 位点的情况^[15]。利用获得的基因数据等位基因频率与预期值 (1:1) 的偏离情况进行差异显著性检测, 以卡方测验做近似的显著性检测, 显著水平为 0.05。

2 结果与分析

2.1 SSR 标记分析

利用 18 对 SSR 引物对 24 份自交系进行同源位点扩增, 带型稳定。这 18 对 SSR 引物分布在玉米 1、5、6、7 和 9 染色体上, 在 24 份自交系间共检测出 42 个多态性位点, 每对引物检测到 2 ~ 4 个多态性位点, 平均每对引物检测到 2.28 个多态性位点。每个 SSR 位点的多态性信息量 (*PIC*) 在 0.0799 ~ 0.7170 之间, 平均 0.4245, 其中引物 bnlg1094 位点的 *PIC* 最大为 0.7170, umc2040 位点的 *PIC* 最小为 0.0799 (表 2)。

2.2 遗传变异分析

利用 42 个多态性标记计算 24 个自交系之间的遗传相似性系数 (GS)。范围为 0.02 ~ 0.85, 平均为 0.5738。中 17 和 5213 之间的遗传相似性最大 ($GS = 0.85$), 塔 5 和东 46 之间的遗传相似性最小

($GS = 0.32$)。

2.3 卡方检测及基因型分析

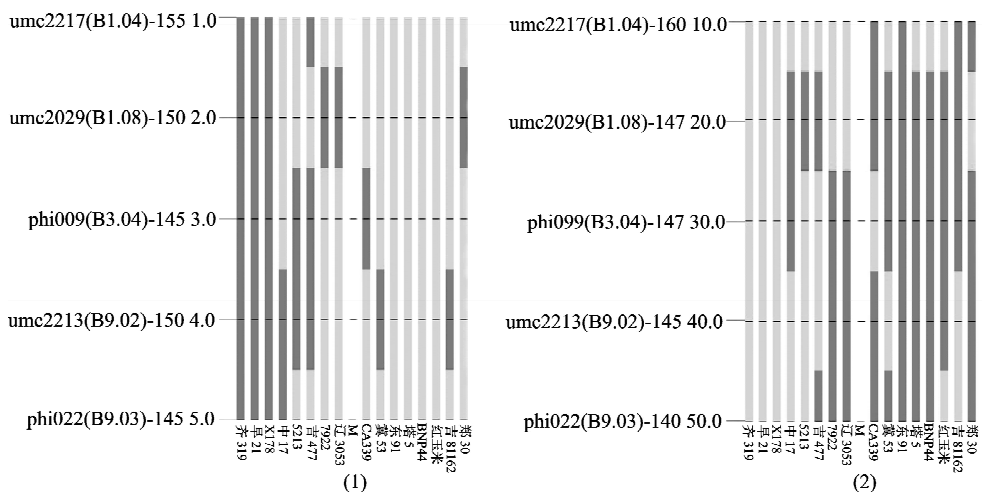
结合基因型分析,利用卡方检测做近似检验,根据等位基因频率的总体表现,设置阈值为 0.05。表 3 为 16 份自交系的卡方测验情况,从表中可明显看出,SSR 标记 phi022 和 umc2217 位点达到显著水

平,说明其位点与耐旱密切相关。通过 GGT32 (Graphical GenoTypes) 图示基因型软件分析 SSR 位点,由图 1 可以看出,umc2217、umc2029、phi099、umc2213 和 phi022 这 5 对引物在抗旱和旱敏感自交系间差异显著,可以用作初步鉴定玉米耐旱性,故可能用于分子标记辅助选择。

表 3 SSR 标记等位基因情况及卡方测验

Table 3 The situation of SSR marker allele and chi-square test

引物编号	SSR 引物	图谱位置	χ^2	引物编号	SSR 引物	图谱位置	χ^2
Priwer code	SSR primer	Bin No.	χ^2 test	Priwer code	SSR primer	Bin No.	χ^2 test
1	phi022	9.03	5.333	10	umc1415	8.03	0.547
2	phi027	9.03	0.333	11	umc1865	7.03	0.267
3	phi034	7.02	0.333	12	umc2029	1.08	2.400
4	phi036	3.04	0.267	13	umc2040	6.05	0.005
5	phi099	3.04	1.886	14	umc2213	9.02	2.250
6	phi109275	1.03	0.268	15	umc2217	1.04	8.000
7	phi339017	1.03	0.435	16	umc2368	7.05	0.571
8	umc1289	8.03	0.333	17	umc2400	5.03	0.571
9	umc1388	6.05	0.267	18	bnlg1094	7.02	0.510



M 左侧为 8 份耐旱自交系,M 右侧为 8 份旱敏感自交系。其中,红色条形框表示对应自交所具有的该 SSR 标记的导入片段。
At the left and right of M are 8 drought-tolerant and 8 drought-sensitive inbred lines, respectively. Among them, the introgression segments are marked with red bars for each line, which represent the corresponding inbred line with SSR markers showed on the left.

图 1 玉米自交系的图示基因型分析

Fig.1 Analysis of graphical genotypes for maize inbred line

2.4 候选基因分析

Z. F. Hao 等^[8]已通过元分析方法发现了一些重要的一致性 QTL 位点并找到了一些与耐旱相关的候选基因。表 2 中,一些重要的耐旱基因已经被证明与这些一致性 QTL 相关。如 Wx 基因,位于玉米 9 号染色体(9.03),该位置映射一致性 QTL 为 DCQ34,与其相关的连锁标记为 phi022 和 phi027。 Wx 基因编码颗粒结合型淀粉合成酶 (GBSSI, granule bound starch synthase),主要控制玉米胚乳和花

粉的直链淀粉合成,以及通过叶片上的蜡质,降低叶片蒸腾作用,进而产生抗旱作用^[16]。近年来,应用分子标记研究玉米 Wx 基因越来越多^[17-18]。SOD (Superoxide dismutase) 为超氧化物歧化酶,是与生物机体抗性有关的重要保护酶之一。玉米是抗旱性很强的植物,因此,了解玉米 SOD 及同工酶对选育玉米优良抗旱品种有重要意义。玉米 SOD 酶包含 4 种同工酶,分别有 2 种存在于细胞质 (SOD2 和 SOD4) 中,1 种存在叶绿体中 (SOD1),1 种存在于线

粒体中(SOD3)^[19]。表2中有3种SOD4、SOD2和SOD3c同工酶基因分别位于1、7和8号染色体,该位置映射的一致性QTL为WCQ2、DCQ28\WCQ25和WCQ26,与其相关的连锁标记为umc2217、umc2368和umc1289。

3 讨论

到目前为止,已经发现多个与耐旱性有关的QTL,且一些连锁标记已经成功地应用于选择回交育种中^[20]。毫无疑问,连锁QTL定位技术促进了对一般抗旱性机制的理解。然而,由于耐旱相关性状的遗传力较低、基因型与环境之间的互作较强以及作图群体背景不同等诸多因素的影响,即使对控制同一性状的QTL进行定位,结果也不尽相同,使得一些QTL定位的结果只能用于同一个作图遗传背景和同一种环境条件。因此,如何找到切实有效的标记,并将这些定位的QTL用于育种实践已经成为分子生物学的重点研究课题。近年来,随着生物信息学和比较基因组学的快速发展,作物重要性状基因的比较定位不仅有助于发掘一致性主效QTL位点及其连锁标记,而且为基因或QTL的克隆和利用提供了信息。F. Chardon等^[21]收集313个玉米花期相关性状的QTLs,采用元分析方法,发现了62个一致性的QTLs。李雪华等^[22]对玉米干旱条件下农艺性状和生理性状相关的181个QTLs进行整合后,在玉米的10条染色体上发掘出15个耐旱通用QTL。Z. F. Hao等^[8]采用元分析方法分析了收集到的239个水分胁迫相关的QTLs,结果发现了39个一致性QTLs,集中在1、2、3、5、6和9号染色体上。

尽管文献报道的QTL数目在逐年增多,但是分子标记辅助选择(MAS)在改良品种上的应用仍是很少,特别是耐旱上更是少之又少^[23]。目前玉米上仅在一些效应比较大的QTL,主要是抗病基因方面有成功例子。如杨华等^[24]利用第7和第1染色体上与抗病QTL紧密连锁的2个标记phi116和umc1044对(CML270×478)×CML270回交后代13份BCF_{6,7}选系进行了抗性分子标记辅助选择,成功地选育出了抗病自交系。在玉米上利用3个SSR标记umc1066、phi057和phi112对优质蛋白玉米o2基因进行辅助选择,研究o2基因与其互作修饰氨基酸的相互关系^[25]。在玉米耐旱研究上,报道的只有J. M. Ribaut等^[20]利用标记辅助回交育种,通过导入5个ASI(Anthesis and silking interval)QTLs改良了一个优良的热带不耐旱自交系CML247,对具有

与亲本相同背景的后代进行逐代检测,选择出比对照耐旱的优良品系。在已有研究基础上,通过元分析方法发现了与耐旱相关的一致性QTL与某些分子标记紧密连锁(表2),本研究通过开发这些SSR标记,验证了不同种质背景的玉米自交系耐旱性,将有助于对不同品种耐旱性进行初步鉴定和筛选。

综上所述,随着基因组学技术和生物信息学的不断推进与完善,遗传连锁图谱和物理图谱的日趋饱和,以及单靠常规育种选育含优良性状的新品种难度日益加大,目标基因的分子标记定位及分子标记辅助选择育种将有更为广阔的应用前景;因此,利用分子标记和分子标记辅助选择育种技术可进一步促进玉米耐旱候选基因的精细定位和克隆,加快耐旱玉米品种的选育进程。

参考文献

- [1] Edmeades G O. Drought tolerance in maize: an emerging reality [M]. Ithaca:LSAAA, 2008
- [2] 苏治军,郝转芳,谢传晓,等. 玉米 *dbf1* 基因与耐旱相关性状的关联分析[J]. 植物遗传资源学报, 2010, 11 (4):474-478
- [3] 李建生. 玉米分子育种研究进展[J]. 中国农业科技导报, 2007, 9 (2):10-13
- [4] Bernier J, Kumar A, Venuprasad R, et al. Characterization of the effect of a QTL for drought tolerance in rice, qtl2.1, over a range of environments in the Philippines and eastern India [J]. Euphytica, 2009, 166:207-217
- [5] Concibido V C, Diers B W, Arelli P R, et al. A decade of QTL mapping for cyst nematode resistance in soybean [J]. Crop Sci, 2004, 44:1121-1131
- [6] Anderson J A, Chao S, Liu S. Molecular breeding using a major QTL for *Fusarium* head blight resistance in wheat [J]. Crop Sci, 2008, 47: 112-119
- [7] Bernardo R. Molecular markers and selection for complex traits in plants: learning from the last 20 years [J]. Crop Sci, 2008, 48: 1649-1664
- [8] Hao Z F, Li X H, Liu X L, et al. Meta-analysis of constitutive and adaptive QTL for drought tolerance in maize [J]. Euphytica, 2010, 174:165-177
- [9] Hao Z F, Li X H, Su Z J, et al. A proposed selection criterion for drought resistance across multiple environments in maize [J]. Breed Sci, 2011, 61 (2):101-108
- [10] Saghai-Maroo M A, Soliman K M, Jorgenson R, et al. Ribosomal DNA spacer length polymorphisms in barley: mendelian inheritance, chromosomal location and population dynamics [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1984, 8:8014-8018
- [11] Hoisington D, Khairallah M, Gonzalez-de-Leon D. Laboratory protocols: CIMMYT applied molecular genetics laboratory [M]. Mexico:CIMMYT,1994
- [12] Sneath P H A, Sokal R R. Numerical taxonomy: the principles and practice of numerical classification [M]. San Francisco: Freeman, 1973
- [13] Rohlf F F J. NTSYS-pc numerical taxonomy and multivariate analysis system, version 2.1 [M]. New York:Exeter Publications,2000