

许洛,王绍新,冯健英,等. 基于SSR遗传标记的玉米骨干亲本黄早四传递到衍生系的重要基因组区段分析[J]. 江苏农业科学,2017,45(19):132-138.

doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2017.19.029

基于SSR遗传标记的玉米骨干亲本黄早四传递到衍生系的重要基因组区段分析

许洛,王绍新,冯健英,史峰,张娟,于广军

(石家庄市农林科学研究院,河北石家庄050041)

摘要:研究玉米骨干亲本黄早四传递到衍生系中的重要基因组区段及其分布,对系统了解黄早四成为中国玉米育种骨干亲本的遗传机制有重要意义,并且能为进一步发掘黄早四及其衍生系中控制重要性状的基因提供理论依据和参考。以我国玉米骨干亲本黄早四及其主要衍生系共计35份自交系为试验材料,利用覆盖玉米全基因组的255个SSR标记进行遗传分析,结果表明:黄早四衍生系中存在着丰富的遗传变异,即使是不同来源的同一名称材料也存在一定遗传差异。在黄早四的遗传改良过程中,选择发挥了重要作用。在DNA水平上,检测到黄早四传递到衍生系中频率较高的48个基因组区段及一些优势等位变异,其中部分区段与前人研究报道的控制黄早四抗病性、产量和株高等性状的基因或QTL相一致。所检测到的在黄早四及其衍生系中传递频率较高的区段可能是决定骨干亲本黄早四优良特性的重要基因组区段,可作为今后进一步深入研究的重要候选区段。

关键词:玉米;骨干亲本;黄早四;衍生系;传递片段

中图分类号: S513.032 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2017)19-0132-06

骨干亲本是育种工作中应用最广泛且用于选育重要育种材料的基础种质。近几十年来,我国玉米育种界公认的玉米骨干亲本有5个,即黄早四、丹340、掖478、自330和Mo17^[1],其中由北京市农林科学院与中国农业科学院作物科学研究所于20世纪70年代共同选育的优良玉米自交系黄早四是我国玉米育种工作中应用最广泛的骨干亲本。在我国玉米骨干亲本中,黄早四衍生系的数量最多(近百个),且含有该血缘的杂交种在生产中的推广应用面积也最大。目前,黄早四及其衍生系,以及由其组配的杂交种仍在我国玉米育种和生产中发挥着举足轻重的作用。研究骨干亲本黄早四基因组区段在其衍生系中的传递,发掘黄早四基因中发挥重要作用的关键基因组区段,对系统了解黄早四能够成为我国玉米育种骨干亲本的重要原因,以及创制未来骨干亲本具有重要意义。骨干亲本的概念已在世界范围内被广泛认可和接受,并且已成为作物育种理论研究的重要课题之一。近年来,国内外正致力于玉米^[2]、小麦^[3-6]、大麦^[7]、大豆^[8]等作物骨干亲本的深入研究,并已有部分骨干亲本遗传传递规律的相关报道。我国玉米骨干亲本黄早四配合力高,株型紧凑,高抗玉米大小斑病和矮花叶病,综合穗部性状优良^[9-10],但却存在自身产量低、抗倒性差、黄斑病严重、早衰、籽粒白顶等不良性状^[11]。自20世纪80年代起,国内多家玉米育种单位开始致

力于黄早四的改良研究,并成功选育出了一批综合性状优良的黄早四衍生系^[12-14]。研究表明,黄早四衍生系在自身产量和抗性等方面均较黄早四有了大幅提高^[15-17]。在抗病性方面,黄早四及其衍生系对玉米矮花叶病B株系具有良好的抗性^[18-19]。在目前已定位的7个玉米矮花叶病抗病基因/QTL即*Scm2*、*Rscmw2*、*Scm3*、*Mdm1*、*Scm1*、*Rscmw1*和*mdm1(t)*中,仅*mdm1(t)*来自黄早四^[20-22],且黄早四及其衍生系和杂交种中均存在矮花叶病抗性基因*mdm1(t)*和玉米茎腐病抗性基因*Rfg1*,但不存在茎腐病抗性基因*Rpi1*^[2]。目前,已有大量对黄早四及其衍生系进行农艺性状、配合力和抗病性鉴定的研究报道,并有黄早四抗病基因在衍生系及杂交种中遗传传递规律的初步研究,但在全基因组水平上关于黄早四重要基因组区段在其衍生系中传递的研究还没有报道。本研究以我国玉米骨干亲本黄早四及其主要衍生系共计35份自交系为试验材料,利用覆盖玉米全基因组的255个SSR标记对其进行DNA水平上的分析,以发掘黄早四传递到衍生系中决定其优良特性的重要基因组区段,初步了解黄早四成为骨干亲本的遗传机制。

1 材料与方法

1.1 试验材料

本研究共搜集到我国玉米育种和生产中应用广泛的玉米骨干亲本黄早四及其衍生系共计35份供试材料。其中,黄早四、昌7-2和京7分别有不同来源的2份种质[分别以(1)、(2)标示];吉853、吉853改、吉854和吉856为骨干亲本黄早四与自330的F₂群体选系,同时含有黄早四和自330的血缘,而其余自交系均为黄早四的衍生系。供试材料的种子大部分由中国农业科学院国家作物种质库提供,部分由石家庄市农林科学研究院提供。35份自交系的名称及系谱/来源见表1。

收稿日期:2017-02-20

基金项目:河北省科技支撑计划(编号:16226323D)。

作者简介:许洛(1968—),女,河北饶阳人,硕士,副研究员,主要从事玉米遗传育种及栽培研究。E-mail:sjzxluo@163.com。

通信作者:于广军,副研究员,主要从事玉米育种及技术推广研究。

E-mail:zxns@126.com。

表1 35份自交系的名称及系谱/来源

编号	材料名称	系谱/来源
1	黄早四(1)	塘四平头
2	双105	不详
3	双741	矮金525×维尔44/黄早四×三团
4	⑦-61	金525×5344/三团×黄早四
5	H21	黄早四×H84
6	I331	不详
7	文黄31413	黄早四×文青1331
8	齐310	黄早四×金02
9	齐401	黄早四×衡白502
10	原辐黄	黄早四辐
11	白野四	黄早四×海东013/黄早四
12	黄野四3	黄早四×野鸡红
13	D黄212	黄早四改良系
14	冀35	冀多142×黄早四/黄早四
15	京7(1)	黄早四×罗系3
16	京7黄	京7×黄早四
17	昌7-2(1)	黄早四×淮95
18	黄早四-15	黄早四分离系
19	K12	黄早四×维春
20	天涯4	武109×黄早四
21	黄428	黄早四×E28
22	吉444	A619×黄早四
23	吉853	黄早四×自330
24	吉854	黄早四×自330
25	吉856	黄早四×自330
26	吉853改	黄早四×自330
27	京404	黄早四×墨群体/黄早四
28	鲁9801	西502×H21
29	抗黄四	黄早四改良系
30	石3526	冀3505×H21
31	京7(2)	黄早四×罗系3
32	黄早四(2)	塘四平头
33	昌7-2(2)	黄早四×淮95
34	鲁原133	原齐721×黄早四(辐)
35	多黄27	黄早四改良系

1.2 SSR基因型鉴定

基因组DNA的提取采用CTAB法^[23]。选取255对覆盖玉米全基因组的SSR引物对35份自交系进行基因型鉴定。其中,34个SSR为基因内SSR,其余均为基因组SSR。大部分SSR引物的重复单元和引物序列来自MaizeGDB(<http://www.maizegdb.org>),部分由北京市农林科学院玉米研究中心提供。SSR位点的图谱位置(coordinate)基于IBM2 2008 Neighbors Frame获取,从该图谱查不到位点的图谱位置则根据其临近位点并结合IBM2 2008 Neighbors的图谱信息获得。

本研究采用TP-M13荧光标定方法对供试材料进行SSR基因型鉴定^[24]。所有SSR位点反向引物的5'端均加上了一段M13序列(5'-CACGACGTTGTAACGAC-3'),正向引物为该SSR位点的正常引物序列。所有SSR引物由上海生工生物工程技术有限公司合成。另外,再合成一条5'端带有荧光标记的M13引物序列。本研究所用荧光标记共有FAM、VIC、PET、NED 4种。荧光引物由美国ABI公司合成。PCR产物在ABI 3700 DNA测序仪上进行自动荧光检测,检测结果用GeneTyper 2.1软件进行数据分析和提取。

1.3 遗传多样性分析

运用PowerMarker V3.25软件^[25]进行等位变异数目、等位变异频率、多态性信息含量(PIC)的统计分析。多样性衡量参数多态性信息含量(PIC)值的计算公式为^[26]:

$$PIC_i = 1 - \sum_{u=1}^k \tilde{p}_{iu}^2 - \sum_{v=1}^k \sum_{u=u+1}^k 2 \tilde{p}_{iu} \tilde{p}_{iv}^2$$

式中: \tilde{p}_{iu} 是 u th等位变异的频率, \tilde{p}_{iv} 则是 v th等位变异的频率。

1.4 遗传相似系数及聚类分析

将骨干亲本黄早四及其衍生系的SSR基因型鉴定数据按照有带赋值“1”,无带赋值“0”,缺失则赋值“9”进行转换,整理为0、1数据格式。利用NTSYSpc V2.10t软件计算不同材料间的遗传相似性系数,并利用UPGMA(unweighted pair group method with arithmetic mean)法进行聚类分析。遗传相似系数的计算方法为: $GS_{Dicc} = 2a/(2a+b+c)$ 。其中, a 为任意2份材料的共有条带数目, b 、 c 则为2份材料间的差异条带数目。而对于黄早四及其衍生系间的遗传相似性,即可作为黄早四对其衍生系的遗传贡献率。

1.5 黄早四重要基因组区段分析

将与骨干亲本黄早四SSR标记遗传变异一致的衍生系记为“1”,不一致的记为“0”,缺失数据记为“9”。利用GGT软件分析不同染色体上黄早四及其衍生系不同SSR位点的遗传变异是否相同,统计与黄早四SSR位点等位变异相同的衍生系数目及其占衍生系总数的比例,并将其作为黄早四SSR位点等位变异在衍生系中的传递频率。本研究将黄早四在其衍生系中传递频率为60%以上的区域作为黄早四的重要基因组区段。

2 结果与分析

2.1 黄早四及其衍生系的遗传多样性分析

利用覆盖玉米全基因组、扩增带型清晰稳定的255个SSR标记对玉米骨干亲本黄早四及其衍生系进行遗传多样性分析。结果表明,黄早四与其衍生系间存在丰富的遗传变异。255个SSR标记在35份供试材料中共检测到1831个等位变异,平均每个位点7.18个,变幅为1~24。其中,umc1284和umc1408在所有材料中均未检测到遗传变异,而bnlg169的遗传变异最为丰富,共检测到24个等位变异。所有标记平均PIC为0.60,变幅为0~0.93。34个基因内SSR位点所揭示的遗传变异略低于基因组SSR位点。

基于SSR基因型鉴定结果对黄早四及其衍生系进行聚类分析,结果表明35份材料可被划分为两大类群(图1)。从图1可以看出,遗传相似性较高的材料聚为一类,尤其是2份不同来源的黄早四、京7和昌7-2更是紧密聚在一起,而来自黄早四和自330 F₂群体选系的吉853、吉853改、吉854和吉856间存在较大差异。其中,吉854和吉856与黄早四血缘的遗传差异较大,二者与D黄212单独聚成一个类群。相比之下,吉853与吉853改的遗传成分更多地偏向于黄早四血缘。而在另一大类群中,K12和I331与黄早四及其他衍生系的遗传差异相对较大。35份材料的聚类结果与其系谱来源基本一致。

2.2 黄早四及其衍生系的遗传相似性分析

利用255个SSR位点对不同来源同一种质的相似性,以及黄早四及其衍生系的遗传相似性即遗传贡献率进行分析,

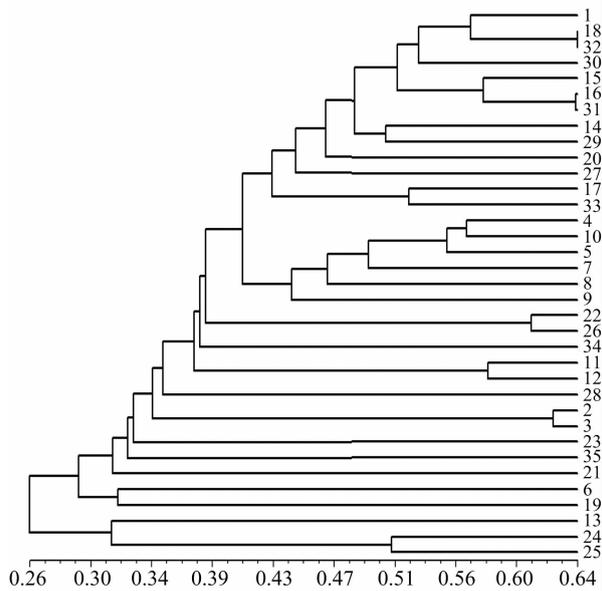


图1 黄早四及其衍生系的聚类分析

表2 黄早四对其衍生系的遗传相似性/贡献率

材料	指标	遗传相似性/遗传贡献率(%)										
		基因组水平	Chr1	Chr2	Chr3	Chr4	Chr5	Chr6	Chr7	Chr8	Chr9	Chr10
黄早四与其衍生系	最大值	56.6	55.4	65.3	71.7	66.7	58.5	67.7	74.3	54.2	51.9	73.1
	最小值	23.6	20.6	20.0	7.5	20.3	19.5	25.4	21.1	12.5	10.5	29.8
	平均	41.1	35.3	43.1	41.9	42.7	35.9	44.0	48.8	37.2	32.0	53.2
黄早四(1)与黄早四(2)		57.0	47.8	50.6	60.0	67.8	57.9	57.6	57.1	45.5	57.7	62.7

2.3 黄早四传递到衍生系中的重要遗传区段分析

虽然从不同供试材料间,尤其是黄早四对其衍生系的遗传贡献率分析表明骨干亲本与其衍生系间存在较大遗传差异,但在黄早四的遗传改良过程中,决定其优良性状的重要基因组区段却传递到衍生系中。为明确黄早四传递到其衍生系中的重要基因组区段,本研究利用GGT软件对黄早四及其衍生系在全基因组不同SSR标记间的等位变异进行了分析。本研究设定当黄早四中某位点的等位变异在衍生系中的传递频率 $\geq 60\%$ 时,即认为该位点为黄早四的重要遗传传递区段。结果表明,黄早四衍生系在不同染色体上均存在黄早四的重要基因组区段。

在黄早四传递到衍生系的基因组区段中,传递频率达60%以上的区域共计48个。其中,部分区域位于或临近已经定位的与黄早四抗性、株型、ASI和产量等性状相关的基因或QTL区域(表3、表4)。在黄早四中也存在一些在衍生系中传递频率较高,但目前并未检测出与黄早四重要农艺性状相关联的基因组区域。如第4染色体上的umc1284和第7染色体上的umc1408位点在黄早四及其所有衍生系中均未检测到等位变异,虽然衍生系中第7染色体上phi116位点存在其他等位变异,但黄早四中176bp的等位变异均传递至其衍生系中。这些高频传递位点的作用还有待进一步明确。

3 讨论

近几十年来,黄早四及其衍生系在我国玉米育种和生产中均发挥了极其重要的作用。为弥补骨干亲本黄早四的部分缺陷,育种工作者通过各种手段选育出了一系列综合性状优

结果表明,2份不同来源的同一材料以及黄早四与其衍生系间均存在较大的遗传差异。在全基因组水平上,2份不同来源的黄早四、京7和昌7-2的遗传相似性分别为57.0%、53.5%和52.5%。黄早四与其衍生系的遗传相似性即对其衍生系的遗传贡献率平均为41.1%,变幅为23.6%~56.6%(表2)。衍生系中,与黄早四遗传组成相差最小且相似性达50%以上的仅有黄早四-15、冀35、原辐黄共3份材料,遗传相似性分别为56.6%、52.7%和50.7%。而与黄早四遗传差异最大的为吉856和吉854,遗传相似性分别为25.5%和23.6%。其余衍生系与黄早四的遗传相似性介于30%~40%之间。

染色体水平上,黄早四对其衍生系的遗传贡献率在不同染色体间也存在一定差异。其中,第10染色体上黄早四对其衍生系的平均遗传贡献率最高,为53.2%;而在第9染色体的平均遗传贡献率最低,仅为32.0%。2份不同来源的黄早四不同染色体间第4染色体的遗传相似性最高,为67.8%;而第8染色体的遗传相似性最低,仅为45.5%。

良的黄早四衍生系。这些衍生系不仅保留了黄早四综合性状好、配合力高、适应性广等优异特点,而且还分别对黄早四的个别不利性状进行了有针对性的改良,为选育综合性状优良的品种奠定了良好的遗传基础。对育种工作者而言,了解骨干亲本及其衍生系的遗传组成将不仅有助于弄清为什么黄早四成为了我国玉米育种的骨干亲本,而且还有助于创制未来新的骨干亲本。

本研究表明,在分子水平上黄早四衍生系的遗传组成与黄早四相比均发生了不同程度的改变。在全基因组水平上,黄早四与其衍生系的遗传相似性介于23.6%~56.6%之间。在育种材料的遗传改良过程中,选择发挥了重要作用。如吉853、吉853改、吉854和吉856均为黄早四和自330的F₂群体选系,但吉856和吉854却与黄早四遗传差异较大,二者与黄早四的遗传相似性仅为25.5%和23.6%;而吉853和吉853改的遗传成分则更多地偏向于黄早四血缘,与黄早四的遗传相似性分别为35.7%和44.9%。笔者曾对我国五大玉米骨干亲本及其主要衍生系进行了群体结构分析,结果同样表明吉854和吉856与自330的遗传相似性较高,而吉853和吉853改则与黄早四的遗传相似性较高(未发表)。这充分表明了黄早四衍生系的遗传改良过程中,黄早四因经历了与其他育种材料的反复杂交及多向选育,从而造成了人工选择及遗传漂变对其种质基础的改变,进而形成了兼具黄早四优良特性的优异新种质。此外,从本研究结果还可看出,即使是2份不同来源的同一种质,其遗传相似性也存在一定程度的差异,并且不同染色体间的遗传相似性也存在较大差异。

表3 黄早四向衍生自交系传递频率较高(>60%)的位点

染色体	标记	染色体位置	与黄早四相同谱带材料		谱带缺失材料		等位变异	PIC
			总数	比例(%)	总数	比例(%)		
1	phi056	-11.7	24	70.59			4	0.380 8
	phi339017	275.0	21	61.76			5	0.453 2
	umc1076	440.0	33	97.06			2	0.054 0
	umc1147 - phi002	714.4 - 722.4	28	82.35			6	0.319 3
			30	90.91	1	2.94	2	0.148 0
	umc2047 - bnlgl671	842.3 - 913.4	27	79.41			4	0.320 8
2			29	85.29			6	0.478 5
	umc1542 - bnlgl297	57.6 - 59.9	26	78.79	1	2.94	6	0.305 9
			23	67.65			9	0.499 6
	phi109642 - umc2248	244.0 - 267.8	26	76.47			4	0.343 9
			23	69.70	1	2.94	6	0.446 2
	nc133	343.0	27	79.41			3	0.305 9
3	umc1079 - phi127	369.3 - 451.1	25	73.53			4	0.398 0
			25	73.53			7	0.470 1
	umc1516 - bnlgl520	584.3 - 599.1	28	82.35			4	0.278 6
			30	88.24			4	0.202 9
	umc1746	7.1	20	62.50			6	0.531 1
	umc2257	30.5	21	63.64	1	2.94	6	0.517 1
4	umc1655	191.1	25	73.53			6	0.618 7
	bnlg602	270.3	19	63.33	4	11.76	4	0.451 5
	bnlg1160	491.4	21	61.76			6	0.521 5
	umc2050 - umc1399 - mmc0251	538.2 - 544.6 - 611.4	25	73.53			3	0.336 5
			28	84.85	1	2.94	4	0.277 9
			28	82.35			6	0.297 9
5	umc1294	114.0	24	70.59			8	0.460 0
	phi096 - bnlgl490	232.2 - 237.8	32	94.12			2	0.101 9
			25	73.53			6	0.4154
	bnlg1784	393.7	24	70.59			7	0.522 1
	phi092	522.1	32	94.12			3	0.198 7
	umc1559	544.7	22	64.71			3	0.382 4
6	umc1284	643.3	34	100			1	0.000 0
	phi109188	285.7	27	81.82	1	2.94	5	0.353 6
	phi331888	317.6	22	64.71			3	0.445 1
	umc1171 - umc1966	376.4 - 377.9	22	73.33	4	11.76	4	0.383 7
			25	73.53			4	0.391 1
	phi077 - umc1186 - umc1517 - umc1656 - umc1818	121.1 - 127.1 - 129.8 - 133.4 - 135.7	21	61.76			10	0.577 5
7			27	84.38	2	5.88	4	0.259 9
			25	75.76	1	2.94	3	0.321 3
			27	79.41			2	0.2688
			24	75.00	2	5.88	5	0.370 7
	bnlg1154	253.0	26	76.47			9	0.655 8
	mmc0241 - umc2170	312.7 - 435.1	25	73.53			5	0.393 1
8			26	76.47			3	0.352 4
	phi123	564.2	31	91.18			2	0.144 5
	phi034	179.9	22	64.71			5	0.503 6
	umc1408	365.4	34	100			1	0.000 0
	umc2197	587.9	26	76.47			2	0.290 5
	phi116	611.5	34	100			3	0.081 0
9	umc1139	26.8	33	97.06			3	0.130 5
	phi115	269.2	24	70.59			6	0.477 9
	umc1121 - umc2212	383.4 - 422.7	33	97.06			2	0.054 0
			25	73.53			5	0.478 6
	phi080 - phi233376	571.5 - 609.1	28	82.35			8	0.687 7
			24	80.00	4	11.76	6	0.514 3

续表 3

染色体	标记	染色体位置	与黄早四相同谱带材料		谱带缺失材料		等位变异	PIC
			总数	比例(%)	总数	比例(%)		
9	umc1492	308.0	32	94.12			4	0.132 7
	umc1231	342.0	23	67.65			8	0.527 8
	phi448880	536.8	28	82.35			5	0.290 2
10	umc2399	-34.4	23	85.19	7	20.59	4	0.246 4
	phi041	30.9	24	70.59			6	0.456 0
	umc1432	107.9	25	73.53			8	0.425 8
	phi96342 - umc1367 - umc2016 - phi050	112.0 - 183.8 - 195.4 - 226.1	30	96.77	3	8.82	2	0.085 4
			31	91.18			3	0.153 2
			21	61.76			4	0.554 3
			31	91.18			4	0.157 5
	umc1336	228.3	20	62.50	2	5.88	7	0.534 7
	bnlg137 - phi071	287.5 - 291.6	22	64.71			4	0.484 9
			29	85.29			4	0.314 3
	bnlg1028	380.5	26	78.79	1	2.94	6	0.568 6
	umc1196 - bnlg1677 - bnlg1450	444.8 - 449.3 - 483.7	23	67.65			5	0.475 0
			25	73.53			7	0.418 8
		26	76.47			8	0.387 0	

表 4 黄早四中已检测到的抗病性及其他性状基因/QTL

染色体	染色体位置		连锁标记	已定位的基因/QTL
	Bin	Coordinate		
1	1.01	-11.7	phi056	株高 QTL ^[27]
	1.07	711.5	umc128	产量 QTL ^[28]
2	2.07	450.9 - 509.2	umc22 - umc122	<i>Ht1</i> ^[29]
	2.02	65.7	bnlg1017	ASI QTL ^[28]
3	3.01	2.0 - 21.8	umc1394 - umc2103	穗位叶面积 QTL ^[30]
	3.04	159.0 - 131.1	phi036 - bnlg1035	
4	4.04	237.8	bnlg490	产量 QTL ^[28]
6	6.00 - 6.01	98.4 - 121.1	bnlg391 - phi077	<i>mdm1(t)</i> ^[21-22]
		121.1	phi077	抗矮花叶病 QTL ^[31]
	75.8 - 121.1	bnlg1600 - phi077	<i>Qscm6</i> ^[32]	
6.05	312.7	mme0241	<i>Rfg1</i> ^[2] 、穗位高 QTL ^[27]	
8	8.06	439.1, 425.2	umc84, umc30	<i>Htm1</i> ^[33]
	8.03	295.3		<i>rip</i> ^[34]
10	10.03	226.1	phi050	穗位高 QTL ^[27]

本研究通过利用 SSR 标记对黄早四及其衍生系进行遗传分析,共找到 48 个从黄早四传递到其衍生系中的重要基因组区域,这些高频率区域分布于黄早四每条染色体的不同区段。其中,部分位于或临近目前已定位的决定黄早四优良性状的基因或 QTL 区段内,并且部分优势等位变异被传递到衍生系中。

吴建宇等利用黄早四(抗) × Mo17(感)的 F₂ 分离群体将黄早四的矮花叶病抗性基因 *mdm1(t)* 定位在 phi077 - bnlg391 区段^[21-22]。此外,在黄早四不同研究群体中也在该区段定位了大量矮花叶病的抗性 QTL。如王风格等利用黄早四(抗) × 掖 107(感)的 F₂ 分离群体在第 6 染色体上检测到了与 phi077 连锁的提高对矮花叶病抗性的主效 QTL^[31]; Liu 等利用黄早四(抗) × Mo17(感)的 F₉ RIL 群体在第 6 染色体的 bnlg1600 - phi077 区段检测到 1 个可解释表型变异高达 50% 的抗矮花叶病的主效 QTL 即 *Qscm6*^[32]。本研究结果表明,黄早四第 6 染色体的 phi077 - umc1186 - umc1517 -

umc1656 - umc1818 区段在衍生系中有较高的遗传频率。该区段的 phi077 位点在 35 份黄早四及其衍生系中具有丰富的遗传变异(共 10 个等位变异),其中在多数衍生系(21 份)中均检测到了来自黄早四的 167 bp 特异带。这说明在黄早四的遗传改良过程中该优势等位变异被保留了下来,其传递频率为 61.76%,黄早四抗矮花叶病基因传递到了大部分衍生系中。位于第 6 染色体与玉米抗茎腐病基因 *Rfg1* 连锁的 SSR 标记 mme0241 在 35 份供试材料中共检测到 5 个等位变异,其中 255 bp 的黄早四特异带在 25 份衍生系中检测到,说明该衍生系中均具有 *Rfg1* 基因,均抗禾谷镰刀菌引起的茎腐病,其传递频率为 73.53%。此外,也有研究表明该位点与穗位高 QTL 连锁^[27]。

李立家等利用 RFLP 标记 umc22 和 umc122 在黄早四中玉米大斑病抗性基因 *Ht1* 定位到第 2 染色体上^[29]。本研究位于该区域且传递频率较高的是遗传变异非常丰富的

phi127 位点。该位点在 35 份材料中共检测到 7 个等位变异, 其中 130 bp 的等位变异为黄早四的特异带, 且在 25 份衍生系中均检测到该变异, 传递频率为 73.53%。此外, 李立家等研究表明第 8 染色体的 RFLP 标记 umc84(439.1) 或 umc30(425.2) 所在区段应为另一个玉米大斑病显性抗病单基因 *Htn1* 的所在位置^[33]。本研究发现黄早四在衍生系中遗传频率较高的 umc121 - umc2212 区段即位于该区域, 临近位点 umc2212(422.7) 的传递频率达 73.53%, 传递的是 116 bp 的优异等位变异, 这说明黄早四中的玉米大斑病抗性基因被选择并传递到大多数衍生系中。玉米中的一个广谱抗病基因 *rip* 被定位在第 8 染色体的 295.30 位置^[34], 本研究中的 phi115 位点(269.2) 与其临近, 衍生系中有 24 份材料均检测到该位点在黄早四中的 320 bp 特异带, 传递频率为 70.59%。另一个广谱抗病基因 *pall* 之前被定位在 5.05 位置, 本研究中虽然大部分黄早四衍生系中位于 5.03 - 5.04 的 phi109188、phi331888 和 umc1171 - umc1966 区域与黄早四遗传组成相同, 但因 5.05 区段没有标记数据, 因此还有待增加标记密度进行深入研究。

本研究还检测到一些在黄早四及其衍生系中遗传一致性较高且与之前定位的株高、穗位高、穗位叶面积、产量、ASI 等性状 QTL 位于同一区段的区域, 这说明决定上述性状的遗传区域在黄早四遗传改良过程中也得以选择。当然, 对于这些区段所携带的基因及其功能还需进一步深入研究。需要说明的是, 一些位点如 umc2212、phi115 等在骨干亲本黄早四中均检测到 2 个等位变异, 这说明黄早四基因组中的个别位点还存在部分剩余变异, 但在对黄早四进行遗传改良的过程中, 仅是其中的 1 个优势等位变异被选择并在衍生系中保留了下来。此外, 本研究还检测到了在黄早四及其衍生系中高度一致的遗传位点, 这些区段可能决定了黄早四及其衍生系的某些共有性状。关于这些区段是否包含有决定重要性状的优异基因, 今后还需要开展进一步深入研究。

4 结论

尽管黄早四及其衍生系具有丰富的遗传多样性, 但在黄早四的遗传改良过程中决定黄早四重要性状的基因组区段却被保留了下来, 并以较高的频率传递到衍生系中。本研究利用 SSR 标记对黄早四及其衍生系进行了遗传分析, 在一定程度上对黄早四成为骨干亲本的遗传机制有所了解, 并且所发掘的高频率传递区段可作为今后骨干亲本黄早四研究中的重要候选区段。

参考文献:

[1] 王懿波, 王振华, 王永普, 等. 中国玉米主要种质的改良与杂优模式的利用[J]. 玉米科学, 1999, 7(1): 1-8.
 [2] 赵峰, 孟祥兵, 李卫华, 等. 玉米骨干亲本黄早四抗病基因遗传传递规律的初步研究[J]. 玉米科学, 2008, 16(6): 15-18.
 [3] 司清林, 刘新伦, 刘智奎, 等. 阿夫及其衍生小麦品种(系)的 SSR 分析[J]. 作物学报, 2009, 35(4): 615-619.
 [4] 李小军, 徐鑫, 刘伟华, 等. 利用 SSR 标记探讨骨干亲本欧柔在衍生品种的遗传[J]. 中国农业科学, 2009, 42(10): 3397-3404.
 [5] 李小军, 徐鑫, 刘伟华, 等. 应用 SSR 分子标记分析国外种质对我国小麦品种的遗传贡献[J]. 作物学报, 2009, 35(5): 778-785.

[6] 韩俊, 张连松, 李静婷, 等. 小麦骨干亲本“胜利麦/燕大 1817”杂交组合后代衍生品种遗传构成解析[J]. 作物学报, 2009, 35(8): 1395-1404.
 [7] Russell J R, Ellis R P, Thomas W T B, et al. A retrospective analysis of spring barley germplasm development from ‘foundation genotypes’ to currently successful cultivars [J]. Molecular Breeding, 2000, 6(6): 553-568.
 [8] Lorenzen L L, Boutin S, Young N, et al. Soybean pedigree analysis using map-based molecular markers: I. Tracking RFLP markers in cultivars [J]. Crop Science, 1995, 35(5): 1326-1336.
 [9] 曾三省, 任蕤, 刘新芝. 黄早四在我国玉米育种和生产中的重要地位[J]. 玉米科学, 1996, 4(1): 1-6.
 [10] 李遂升. 玉米“黄早四”的选育过程及其应用[J]. 北京农业科学, 1997, 15(1): 19-21.
 [11] 梁同生, 付金宁, 马建军. 黄早四系群的应用和发展[J]. 内蒙古农业科技, 1996(3): 9-10.
 [12] 师公贤, 张仁和, 刘仲山, 等. 玉米自交系 K12 的创造与应用[J]. 中国农学通报, 2004, 20(3): 78-79.
 [13] 刘兴斌, 孙发明, 焦仁海, 等. 玉米自交系吉 853 的应用和改良[J]. 吉林农业科学, 2005, 30(5): 13-16.
 [14] 李凤华, 董海合, 杨兆顺, 等. 黄早四类群玉米自交系吉 853 的改良研究[J]. 天津农业科学, 2006, 12(2): 24-25.
 [15] 高荣耀, 王米贵, 赵殿轩. 黄早 4 及其部分衍生系农艺性状鉴定与配合力分析[J]. 河北农业科学, 1994(3): 9-13.
 [16] 王懿波, 任和平, 刘学汉. 玉米黄早四改良系及其改良单交种应用的初步研究[J]. 华北农学报, 1989, 4(1): 23-28.
 [17] 张成和, 刘爱国, 石洁, 等. 玉米自交系黄早 4 改良系 3 个主要性状的鉴定和筛选[J]. 河北农业大学学报, 1996, 19(3): 33-37.
 [18] 姜华, 白元俊, 赵延明, 等. 东北地区部分玉米品种资源抗玉米矮花叶病鉴定研究[J]. 玉米科学, 2002, 10(1): 84-87.
 [19] Wang Z H, Li X H, Yuan L X, et al. Genetic diversity of elite maize germplasm of resistant to SCMV [J]. Acta Agronomica Sinica, 2003, 29(3): 391-396.
 [20] 席章营, 张书红, 李新海, 等. 一个新的抗玉米矮花叶病基因的发现及初步定位[J]. 作物学报, 2008, 34(9): 1494-1499.
 [21] 吴建宇, 夏宗良, 汤继华, 等. 一个抗玉米矮花叶病新基因位点的发现和细胞学定位[J]. 植物病理学报, 2002, 32(1): 55-58.
 [22] Wu J Y, Tang J H, Xia Z L, et al. Molecular tagging of a new resistance gene to maize dwarf mosaic virus using microsatellite markers [J]. Acta Botanica Sinica, 2002, 44(2): 177-180.
 [23] Saghai - Maroof M A, Soliman K M, Jorgensen R A, et al. Ribosomal DNA spacer - length polymorphisms in barley: Mendelian inheritance, chromosomal location and population dynamics [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences USA, 1984, 81(24): 8014-8018.
 [24] Schuelke M. An economic method for the fluorescent labeling of PCR fragments [J]. Nature Biotechnology, 2000, 18(2): 233-234.
 [25] Liu K J, Muse S V. PowerMarker: an integrated analysis environment for genetic marker data [J]. Bioinformatics, 2005, 21(9): 2128-2129.
 [26] Botstein D, White R L, Skolnick M, et al. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms [J]. The American Journal of Human Genetics, 1980, 32(3): 314-331.
 [27] 兰进好, 褚栋. 玉米株高和穗位高遗传基础的 QTL 剖析[J].

牟云,汪文伦,许万云,等. 人乳铁蛋白的沙漠小球藻表达系统的构建与鉴定[J]. 江苏农业科学,2017,45(19):138-142.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2017.19.030

人乳铁蛋白的沙漠小球藻表达系统的构建与鉴定

牟云,汪文伦,许万云,胡梦薇,王丹,严国,王会敏,高剑峰

(石河子大学生命科学学院,新疆石河子 83200)

摘要:为获得人乳铁蛋白的沙漠小球藻(*Chlorella* sp. GTD8A1)的表达系统和稳定的小球藻 GTD8A1-hLF 工程藻种,将人乳铁蛋白基因导入小球藻细胞中进行表达鉴定。以人血 cDNA 为模板,RT-PCR 扩增得到人乳铁蛋白基因(GenBank 登录号 NM-002343.4),经 *Kpn* I 和 *Xba* I 双酶切后,连接到植物表达载体 pCAMBIA2300-35S-OCS 中,获得重组质粒载体 pCAMBIA2300-35S-hLF-OCS,将重组质粒电击转入 GTD8A1 中,通过菌落 PCR 鉴定后扩大培养,在 DNA 和 RNA 水平分析人乳铁蛋白基因的整合和转录,SDS-PAGE 和 Western Blot 分析获得 70 ku 的目的蛋白;将转基因藻种(GTD8A1-hLF)在 BBM 培养基中进行培养周期优化。结果表明,重组人乳铁蛋白在沙漠小球藻细胞中表达成功;通过 Elisa 测其人乳铁蛋白表达量在 20 d 时达到最大,浓度为 13.28 mg/L。

关键词:小球藻;人乳铁蛋白;表达系统;SDS-PAGE;Western Blot;构建;鉴定

中图分类号: S188 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2017)19-0138-05

新疆古尔班通古特沙漠位于准噶尔盆地的中央,是我国第二大沙漠和面积最大的固定、半固定沙漠。年降水量 70~150 mm,冬季有积雪,春季和初夏降水略多,冬季最低地表温度可达 -25℃,夏季最高地表温度可达 30℃^[1]。生长在此的小球藻及其他藻类与高等植物经过百万年的进化,已经完全适应了沙漠的极端环境。从 20 世纪 80 年代末开始,对沙漠微藻的研究与开发受到国内外研究者的重视^[2]。研究表明,在新疆沙漠中生长着百余种藻类,小球藻是其中重要的组成部分^[3]。小球藻为球形或椭圆形绿色单细胞藻类植物,也是真核微生物的一种。其细胞直径 3~8 μm,是地球上最早的生命之一,出现在 20 多亿年前,遗传相对保守,其广泛分布于土壤、湖泊、海洋、南北极生态系统和荒漠,是生物量丰富、生产力较高的单细胞生物^[4]。作为广泛分布的单细胞藻类植物,小球藻是在单细胞水平上研究和建立转基因表达系统及其相关条件优化和其他具有药用价值的副产品开发和研究

的绝佳材料。目前,由于四代生物燃料崛起,国内外关于小球藻基因组学、基因工程^[5]的研究与开发日趋活跃。近几年,随着小球藻基因组测序^[6]的完成,以及对其外源蛋白基因排斥与免疫^[7-8]的深入研究,使得小球藻这种单细胞微生物成为最佳生物反应器的研究焦点,也是研究外源基因表达的最佳材料。

乳铁蛋白(lactoferrin,LF)是乳汁中一种重要的非血红素铁结合糖蛋白,是一种糖基化蛋白,分子量为 70~80 ku、约 700 个氨基酸,基因的大小在 2 112~2 530 bp 之间;广泛分布在初乳、牛奶及其相应的分泌物如眼泪、唾液,是一种多功能性糖蛋白,在各种动物之间的同源性较高^[9]。它能螯合生物体液中的铁(Fe²⁺或 Fe³⁺)或者破坏微生物的细胞膜,使其减少微生物(细菌、病毒和寄生虫)的增殖、黏附或者将其杀死,从而表现出抗菌的作用^[10]。人乳铁蛋白(human lactoferrin,hLF)是一条多肽链折叠形成 2 个对称的环状结构(N and C lobes),包含部分 α-螺旋链接域^[11]。人乳铁蛋白对免疫、细菌、病毒、微生物、抗寄生虫和真菌都有相应的保护和抗性的作用,从而被开发成食品添加剂和保健品等。同时,科学界也将乳铁蛋白列为新型抗生素的候选者^[12]。目前,人乳铁蛋白也被加工成婴幼儿奶粉的食品添加剂,受到广大消费者的青睐。但是,人乳铁蛋白主要由初乳和血液来提取获

收稿日期:2016-05-06

基金项目:国家自然科学基金(编号:31460276)。

作者简介:牟云(1992—),女,四川华蓥人,硕士研究生,从事可再生能源的开发与利用相关研究。E-mail:1171534413@qq.com。

通信作者:高剑峰,教授。E-mail:jianfeng@shzu.edu.cn。

遗传,2005,27(6):925-934。

[28] Li X H, Liu X D, Li M S, et al. Identification of quantitative trait loci for anthesis-silking interval and yield components under drought stress in maize[J]. Acta Botanica Sinica, 2003, 45(7): 852-857.

[29] 李立家,宋运淳,鄢慧民,等. 染色体定位两个与玉米大斑病抗性基因 *Htn1* 连锁的 RFLP 标记[J]. 植物学报,1998,40(12): 1093-1097.

[30] 郑祖平,黄玉碧,田孟良,等. 不同供氮水平下玉米株型相关性状的 QTLs 定位和上位性效应分析[J]. 玉米科学,2007,15(2): 14-18.

[31] 王凤格,刘贤德,王振华,等. 玉米抗甘蔗花叶病毒 QTL 的初步研究[J]. 作物学报,2003,29(1):69-74.

[32] Liu X H, Tan Z B, Rong T Z. Molecular mapping of a major QTL conferring resistance to SCMV based on immortal RIL population in maize[J]. Euphytica, 2009, 167(2): 229-235.

[33] 李立家,宋运淳,鄢慧民. 两个与玉米大斑病抗性基因 *Htn1* 连锁的 RFLP 标记的原位杂交定位[J]. 植物病理学报,1998,28(2):117-121.

[34] 王玲,宋运淳,宁顺斌,等. 玉米(*Zea mays* L.)两个广谱抗病基因 *rip* 和 *pall* 的原位杂交定位[J]. 作物学报,1999,25(5): 639-642.