

利用关键性状分子标记辅助选育食用木薯新品系

许丰收^{1,2}, 赵 笑^{2,3}, 孙粉杏^{2,4}, 严华兵⁵, 陈 新^{2*}, 王文泉¹

1. 海南大学热带作物学院, 海南海口 570228; 2. 中国热带农业科学院热带生物技术研究所/海南热带农业资源研究院海南省热带农业生物资源保护与利用重点实验室, 海南海口 571101; 3. 华中农业大学植物科学技术学院, 湖北武汉 430070; 4. 南京农业大学生命科学院, 江苏南京 210095; 5. 广西农业科学院经济作物研究所, 广西南宁 530007

摘要: 木薯是世界热区重要的粮食作物, 培育高 β -胡萝卜素、低生氰糖苷和口感软糯的食用品系是木薯重要的育种目标之一。为了高效地从育种材料中筛选出优良食用木薯品系, 本研究基于生氰糖苷转运基因 *MATE* 编码区 G→A 突变导致氨基酸变化进而影响其跨膜结构稳定的前人研究成果, 开发了 *MATE*-SNAP 标记, 并联合使用 β -胡萝卜素 *PSY2*-SNAP 和糯质 *GBSS I*-SNAP 标记从 50 份种质资源中筛选出携带 1~2 个目的等位基因的亲本材料 12 份, 根据花期在不同年份共配制杂交组合 10 个。通过对杂交种子进行育苗、移栽和初步考种, 依据实生苗分枝特点, 选择直立不分枝或中高位分枝的株系 134 个, 利用 *MATE/PSY2/GBSS I*-SNAP 分子标记进行基因型鉴定, 从中筛选出 13 个聚合了 2~3 个目的基因型的候选食用木薯品系。采用分光光度法对 13 个品系块根薯肉的氰化物含量进行测定, 发现对照 SC9 的氰化物含量为 49.24 $\mu\text{g/g}$, 新品系氰化物含量为 38.82~76.51 $\mu\text{g/g}$; 利用丙酮比色法对块根薯肉的 β -胡萝卜素含量进行测定, 发现对照 SC9 的 β -胡萝卜素含量为 184.75 $\mu\text{g/hg}$, 6 个黄色薯肉新品系 β -胡萝卜素含量为 101.58~154.10 $\mu\text{g/hg}$; 利用双波长分光光度法对 2 个 *GBSS I*-SNAP 标记基因型为纯合糯质 GG 的品系块根进行支链淀粉含量测定, 发现 P13-1 和 V7-14 的支链淀粉含量分别为 82.46% 和 83.79%。对 13 个品系的块根薯肉进行食味评分, 发现 A5-138、A2-213、P7-6、P9-6、V4-8 和 V4-19 等 5 个品系的评分较高, 是潜在的食用木薯新品种。综上, 利用分子标记辅助选择可以快速和准确地从育种材料中筛选出目的品系, 提高木薯品种改良效率。

关键词: 木薯; β -胡萝卜素; 生氰糖苷; 分子标记

中图分类号: S533 文献标识码: A

Screen New Edible Cassava Lines Assisted by Molecular Markers of Key Traits

XU Fengshou^{1,2}, ZHAO Xiao^{2,3}, SUN Fenxing^{2,4}, YAN Huabing⁵, CHEN Xin^{2*}, WANG Wenquan¹

1. College of Tropical Crops, Hainan University, Haikou, Hainan 570228, China; 2. Institute of Tropical Bioscience and Biotechnology, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences / Key Laboratory for Biology and Genetic Resources of Tropical Crops of Hainan Province, Hainan Institute of Tropical Agricultural Resources, Haikou, Hainan 571101, China; 3. College of Plant Science & Technology, Huazhong Agricultural University, Wuhan, Hubei 430070, China; 4. College of Life Science, Nanjing Agricultural University, Nanjing, Jiangsu 210095, China; 5. Cash Crops Research Institute, Guangxi Academy of Agricultural Sciences, Nanning, Guangxi 530007, China

Abstract: Cassava is an important food crop in tropical regions, and one of the main breeding goals is to cultivate new lines with high β -carotene, low cyanogenic glucoside and waxy taste. In order to screen promising edible lines from breeding materials, the study developed a *MATE*-SNAP marker based on a mutation of G→A in the coding region of cyanogenic glucoside transporter gene *MATE* which resulted to amino acid change and affected its transmembrane structure stability. Combining with the β -carotene *PSY2*-SNAP and waxy quality *GBSS I*-SNAP markers, 12 parent

收稿日期 2022-06-14; 修回日期 2022-09-19

基金项目 国家重点研发计划专项 (No. 2019YFD10010); 海南省重点研发计划项目 (No. ZDKJ2021012)。

作者简介 许丰收 (1994—), 男, 硕士研究生, 研究方向: 食用木薯品种选育。*通信作者 (Corresponding author): 陈 新 (CHEN Xin), E-mail: chenxin@itbb.org.cn。

lines, carrying 1–2 target alleles, were selected from 50 cassava germplasms, and totally hybridized 10 cross-combinations according to flowering period among different years. Firstly, 134 erect or middle branched candidate lines were screened out through seedling, transplanting and preliminary field trial. Secondly, 13 edible promising lines which aggregated 2–3 target alleles, were chosen by using *MATE/PSY2/GBSS I*-SNAP markers together. The content of cyanogenic glucoside in root flesh was determined by spectrophotometry, the value of SC9 was 49.24 $\mu\text{g/g}$, and those of 13 promising lines were in the range of 38.82–76.51 $\mu\text{g/g}$; the content of β -carotene in root flesh was determined by acetone colorimetry, the value of SC9 was 184.75 $\mu\text{g/hg}$, and those of the six yellow-root lines were within the limits of 101.58–154.10 $\mu\text{g/hg}$; the content of amylopectin in root flesh was determined by dual wavelength spectrophotometry, the values of P13-1 and V7-14, whose alleles were GG that genotyped by *GBSS I*-SNAP marker, was 82.46% and 83.79%, respectively. Based on this, 5 lines, A5-138, A2-213, P7-6, V4-8 and V4-19, were found to be the potential new edible cassava varieties by taste grading. In conclusion, marker-assisted selection can quickly and accurately screen out the target lines from breeding materials and improve the efficiency of cassava genetic improvement.

Keywords: cassava; β -carotene; cyanogenic glucoside; molecular marker

DOI: 10.3969/j.issn.1000-2561.2023.12.005

木薯是重要的热带块根作物，是全球第六大粮食作物。我国木薯种植主要集中在广西、海南和广东等热带省（区），作为变性淀粉和燃料乙醇的主要原料。木薯块根淀粉含量一般在 25% 左右，是一种高能食物来源^[1]。木薯自 19 世纪 20 年代传入我国，至今已有 200 年的栽培历史，由于其粗生、易植、高产和四季皆可收获食用等特性，一直是贫困地区居民保障温饱的粮食作物。为了改善口感方便食用，人们开发出了各种各样的木薯食品和小吃，中国热带农业科学院木薯研究团队通过归纳整理和创新，编撰了中英文双语《中国木薯食谱》^[2]。

近年来，我国木薯种植面积和产量持续下降，而需求却持续增长，每年木薯进口量持续增加，2019 年进口原淀粉和干片达到 1700 万 t（折合干片），是国内产量的 6 倍左右（据中国淀粉工业协会统计数据）。国际木薯淀粉和工业酒精市场维持低价位，导致木薯原料收购价持续走低，农户种植积极性缺乏。木薯块根营养丰富，除富含淀粉外，钾、钙、镁、铁等矿质元素较丰富，还含有 β -胡萝卜素和维生素等，其营养价值比肩甘薯和马铃薯^[3]。随着大健康时代的到来，人们对膳食均衡需求不断增强，加强木薯食用价值的开发和利用，培育食用木薯新品种，推动木薯食用化发展，将促进我国木薯产业高效益发展。

木薯因其块根中生氰糖苷含量的不同分为苦木薯和甜木薯，食用苦木薯会出现恶心、腹泻等症状，严重时会对运动神经产生伤害，引起 konzo 病。热带不发达地区人们以木薯块根及其制品为主食，导致维生素 A 缺乏并产生相应疾病，如夜

盲症等^[4]。常规木薯品种多为白色薯肉， β -胡萝卜素含量低且生氰糖苷含量高于 50 $\mu\text{g/g}$ ，因此，为了改善木薯的食用品质，降低块根中生氰糖苷含量，提高块根中的 β -胡萝卜素含量并改良薯肉的外观色泽，木薯科研工作者做了大量工作，取得一些重要进展。生氰糖苷主要在木薯叶片中合成，再通过韧皮部转运到块根中。木薯叶片受到害虫或动物吸/啃食后，位于液泡中的生氰糖苷与细胞壁或乳管中的 β -葡萄糖苷酶互作，释放出氰化氢（HCN）使害虫和动物中毒，故生氰糖苷在木薯植株内具有一定的防御功能^[5]。多家科研机构联合测定了 3354 个巴西木薯品系，以及部分非洲种质多年多点的块根生氰糖苷含量，通过关联分析，发现 2 个主效位点，其中第 16 号染色体上的多种药物和外运（MATE）蛋白可贡献块根中 30% 的生氰糖苷含量的变异。MATE 蛋白编码基因第 4 个外显子 G→A 突变，使该位点编码的氨基酸由丙氨酸变为苏氨酸，进而导致蛋白跨膜结构不稳定或构象发生改变，生氰糖苷跨膜转运效率明显下降或丧失^[6]。在木薯块根 β -胡萝卜素合成途径中，八氢番茄红素合成酶是参与 β -胡萝卜素合成的关键酶，木薯基因组中有 3 个编码八氢番茄红素合成酶的基因，分别命名为 *PSY1*~*3*，其中 *PSY2* 基因编码序列第 572 个碱基 C→A 的突变，导致编码氨基酸由丙氨酸变成天冬氨酸，氨基酸的改变使 *PSY2* 的活性增至 3 倍以上，从而提高了块根 β -胡萝卜素的含量，且该突变位点为木薯特有，在 JGI 数据库的其他物种中尚未发现^[7-8]。国际热带农业研究中心（CIAT）通过自交在木薯品系 AM206-5 的 S₁ 代中发现 1 个糯性淀粉突变

体, 泰国木薯发展研究所 (TTDI) 进一步研究发现糯木薯品系的 *GBSS I* 基因在第 6 个外显子上有 1 个碱基 C 缺失, 产生移码突变导致酶活丧失^[9]。低氰苷、高 β -胡萝卜素和糯性等性状的形成机理的解析奠定了木薯食用品种选育的理论基础。

利用前期根据 β -胡萝卜素合成基因 *PSY2*、*GBSS I* 的单碱基变异开发的单核苷酸扩增多态性 (SNAP) 标记^[9-10], 与本研究开发的 *MATE*-SNAP 标记 (生氰糖苷转运蛋白编码基因) 对国内主栽品种和引进优良品种进行基因型鉴定, 筛选一批亲本配制不同杂交组合, 并对杂交实生苗及其繁殖后代株系进行基因型和品质指标鉴定, 选育聚合了高 β -胡萝卜素、低生氰糖苷或糯质性状的食用木薯新品种/系。

1 材料与方法

1.1 材料

木薯杂交亲本种植于中国热带农业科学院热带生物技术研究所文昌试验基地, 采用分期播种 (每个品系间隔 30 d, 共种植 3 次) 的方法增加花期相遇的几率。常规管理, 氮肥减半, 适当打顶以促进开花。亲本信息见表 1。

表 1 本研究的木薯亲本及 *PSY2/MATE/GBSS I*-SNAP 标记基因型

Tab. 1 Parents and genotypes based on *PSY2/MATE/GBSS I*-SNAP markers in this study

序号 Code	亲本 Parent	<i>PSY2</i> 基因型 genotype	<i>MATE</i> 基因型 genotype	<i>GBSS I</i> 基因型 genotype	特性 Characteristic
1	SC205	CC	AG	CC	国内主栽品种
2	SC124	CC	AG	CC	耐寒品种
3	SC8	CC	AG	CG	国内主推品种
4	SC9	AC	AA	CC	主栽食用品种
5	HB60	CC	AG	CC	泰国高产品种
6	ZMH588	AC	AG	CG	高 β -胡萝卜素
7	CH12	AC	AA	CG	高 β -胡萝卜素
8	CH16	CC	AA	CG	携带糯质基因
9	CH20	CC	AA	CG	携带糯质基因
10	18R	AC	AG	CG	高 β -胡萝卜素
11	GR3	CC	AG	CC	广西高产品种
12	GR6	CC	AA	CC	广西耐寒品种
13	XX048 [#]	AC	AG	CC	广西高产品种

注: XX048[#]是自交系亲本, 通过一轮自交获得 28 个自交 S_1 株系。

Note: XX048[#] is a self crossing parent, which obtained 28 self crossing S_1 lines through one round of self crossing.

采用人工授粉套袋隔离的方式配制杂交组合, 收获杂交种子后利用育苗盆育苗, 于出苗 60 d 左右移栽大田。次年初收获单株, 淘汰长势差和块根产量偏低的个体, 根据种茎状况每个单株栽种 1~2 行株系, 年底考种测定产量和食用品质相关性状。

新选 048 (XX048) 及其 28 个自交 S_1 代株系 (XXS1-1~28) 种植于广西农业科学研究院科研基地, 常规管理。

1.2 方法

1.2.1 DNA 抽提 采集木薯植株顶部幼嫩叶片, 低温研磨成粉状, 参照植物基因组 DNA 提取试剂盒 (成都福际生物技术有限公司) 的流程提取 DNA, 通过琼脂糖凝胶电泳检测质量, 并用 NanoDrop 紫外分光光度计 (Thermo, USA) 检测 DNA 浓度, 稀释至 50 ng/ μ L, 于 -20 $^{\circ}$ C 冰箱保存, 备用。

1.2.2 SNAP 引物设计 从美国能源部生物信息网站 (www.phytozome.com) 下载 *MATE* 基因的完整序列, 找到 G \rightarrow A 突变位点, 根据 SNAP 技术引物设计原则, 利用 NCBI 网站 (www.ncbi.nlm.nih.gov/) 中的 Primer BLAST 程序进行引物设计, 并将反向引物 3 端倒数第 3 个碱基依据 SNAP 引物设计的原则将 A 错配为 T, 以保证引物对能够特异地区分 2 个不同的等位基因。本研究用到的引物序列见表 2。

表 2 本研究中 *MATE*-SNAP 引物序列

Tab. 2 Sequences of *MATE*-SNAP primer set used in this study

引物 Primer	序列 (5'-3') Sequence (5'-3')	等位基因 Allele	产物长度 Product size/bp
MATE-R1	CGGAGACTGCTTTG GAAACTGT	A	355
MATE-R2	CGGAGACTGCTTTG GAAACTGC	G	
MATE-F	GCATGACGATTTCC GGATGG		

1.2.3 PCR 扩增和产物多态性检测 通过对基因组 DNA 用量和 PCR 扩增退火温度、延伸时间及循环数的调整和优化, 确定 *MATE*-SNAP 引物组合的 PCR 扩增体系参数: 100 ng DNA, 2 \times PCR master mixture (Vazyme, CHN) 10 μ L, 每条引物 0.5 μ L, 加双蒸水至总体积 20 μ L; PCR 反应条件为: 94 $^{\circ}$ C 3 min; 94 $^{\circ}$ C 30 s, 60.5 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C

1 min, 32 个循环; 72 °C 5 min。 *PSY2/GBSS I*-SNAP 引物组合的 PCR 扩增体系参数参照文献 [9-10]。所有 PCR 产物在 1.5% 琼脂糖凝胶上进行电泳, 并用 Tanon 4000 凝胶成像系统 (上海天能科技有限公司) 进行拍照。每个 PCR 反应至少重复 2 次, 以确保试验结果的一致性和准确性。

1.2.4 块根薯肉颜色评估、类胡萝卜素、氰化物含量和支链淀粉比率测定 薯肉颜色评估: 田间收获块根时, 每个株系选取 3 个来自不同单株的块根, 横切后记录块根颜色并留存蒸煮前后的照片。

β -胡萝卜素含量采用丙酮提取比色法测定^[11]。木薯块根氰化物采用苦味酸显色法测定^[12] (海南省苦味酸属于管制药品, 现阶段无法购买, 因此后期采用分光光度法); 木薯块根氰化物采用分光光度法测定^[13-14]。木薯块根淀粉支链淀粉含量采用双波长分光光度法测定^[15]。所有样品设 3 次试验重复, 计算平均值和标准差。

1.2.5 块根蒸煮后食味评分 参照《热带作物品种区域试验技术规程 木薯》(NY/T 2446—2013)^[16] 进行食味评价, 略有改动。木薯块根收获当天, 洗净并去掉薯皮, 选择 2~3 条中段薯块, 切成 0.5 cm 厚度的薯片 20 片左右, 蒸煮 30 min。安排 10 名人员品尝, 并对蒸熟薯片从香度、苦度、甜度、粉度、粘度和纤维感分别进行打分, 最后计算每个株系的综合评分。

2 结果与分析

2.1 *MATE*-SMAP 标记的引物设计及其准确性分析

根据 *MATE* 蛋白编码基因第 4 个外显子的 G→A 突变, 参考 *PSY2*-SNAP 标记引物的设计原理, 本研究也设计了一组 SNAP 引物 (表 2)。

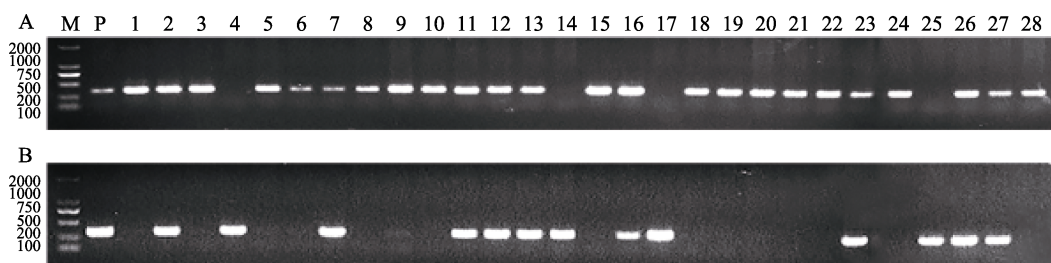
在优化 PCR 反应体系后, 对新选 048 及其 28 个自交 F_1 代株系进行 *MATE* 基因 G→A 突变位点的基因型鉴定, 通过电泳图 (图 1) 可以发现, 新选 048 在该位点是杂合 AG, 28 个自交 S_1 代株系在该位点存在分离, 其中 AA 型 16 个、AG 型 9 个和 GG 型 3 个, 群体的偏分离趋向 AA 型 (可能是群体太小的缘故)。采用苦味酸显色法对新选 048 和 28 个自交 S_1 代植株块根薯肉氰化物含量进行检测, 发现氰化物含量在自交 S_1 代群体中存在变异, 且 AA 型株系的薯肉氰化物含量均小于 50 $\mu\text{g/g}$, GG 型和 AG 型株系薯肉偏向于高氰化物含量 (表 3)。

2.2 亲本选择、杂交组合配制和实生苗子代选优

为了配制杂交组合, 选育薯肉高 β -胡萝卜素、低生氰糖苷或糯性淀粉的食用木薯新品系, 本研究利用 3 组 *MATE/PSY2/GBSS I*-SNAP 标记对近 50 个候选亲本的基因型进行鉴定, 并从中筛选出 12 个亲本品系 (表 1)。利用这 12 个亲本于 2016—2018 年分别进行人工授粉杂交, 其中 2016 年 V 系列, 2017 年 P 系列, 2018 年 A 系列, 总计 10 个组合。通过对杂交种子进行育苗、移栽和初步考种, 根据实生苗分枝特点, 选择直立不分枝或中高位分枝 (1 次分枝部位一般高于 1.5 m) 的子代株系进行基因型筛选。每个组合选择 4~44 个候选株系, 总计 134 个株系 (表 4)。

2.3 育种株系的基因型鉴定和优良品系筛选

为了对育种株系食用品质相关基因的基因型进行鉴定, 选择聚合块根高 β -胡萝卜素、低生氰糖苷和糯质等位基因的优良株系, 同样利用 3 组 *MATE/PSY2/GBSS I*-SNAP 标记对 134 个株系进行基因型鉴定, 从中筛选出 13 个目的品系 (图 2, 表 5), 其中高 β -胡萝卜素 AC 基因型品系 6 个,



A: 引物组合 *MATE*-R1/*MATE*-F 的 PCR 产物, A 等位基因; B: 引物组合 *MATE*-R2/*MATE*-F 的 PCR 产物, G 等位基因。

M: DL2000 marker; P: 新选 048; 1~28 是新选 048 自交 S_1 代株系。

A: PCR products with *MATE*-R1/*MATE*-F, A allele; B: PCR products with *MATE*-R2/*MATE*-F, G allele; M: DL2000 marker; P: XX048; 1~28 are self-cross S_1 lines of XX048.

图 1 基于 *MATE*-SNAP 标记的新选 048 及其自交 S_1 代群体的基因型

Fig. 1 Genotypes of XX048 and its self-cross S_1 lines based on *MATE*-SNAP markers

表 3 新选 048 亲本及其自交 S₁ 代株系的 MATE-SNAP 基因型和薯肉氰化物含量

Tab. 3 Genotypes based on MATE-SNAP and root flesh cyanide content of XX048 and its self-cross S₁ lines

株系 Line	基因型 Genotype	氰化物含量 HCN content/($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)	株系 Line	基因型 Genotype	氰化物含量 HCN content/($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)	株系 Line	基因型 Genotype	氰化物含量 HCN content/($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)
XX048	AG	50~100	XXS1-10	AA	<10	XXS1-20	AA	30~50
XXS1-1	AA	30~50	XXS1-11	AA	30~50	XXS1-21	AA	<10
XXS1-2	AG	50~100	XXS1-12	AG	30~50	XXS1-22	AA	20~30
XXS1-3	AA	20~30	XXS1-13	AG	100~200	XXS1-23	AG	100~200
XXS1-4	GG	100~200	XXS1-14	AG	50~100	XXS1-24	AA	20~30
XXS1-5	AA	10~20	XXS1-15	AA	20~30	XXS1-25	GG	50~100
XXS1-6	AA	<10	XXS1-16	AA	10~20	XXS1-26	AG	100~200
XXS1-7	AG	100~200	XXS1-17	GG	30~50	XXS1-27	AG	50~100
XXS1-8	AA	10~20	XXS1-18	AG	30~50	XXS1-28	AA	20~30
XXS1-9	AA	10~20	XXS1-19	AA	10~20			

注：氰化物含量采用苦味酸显色法测定。

Note: Cyanide content is determined by the picric acid colorimetric method.

表 4 杂交组合、株系和优良品系

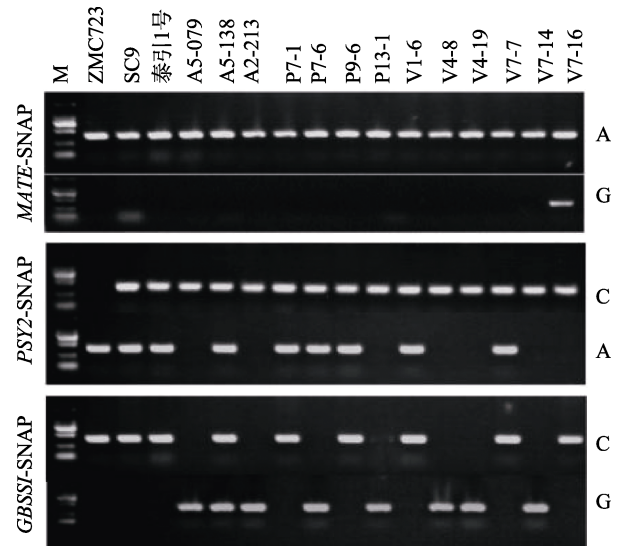
Tab. 4 Cross combinations, candidate lines and promising lines

年份 Year	系列 Line	组合 Combination	候选株系 Candidate line	优良品系 Promising line
2016	V1	CH12×HB60	7	1
	V2	SC9×SC124	9	0
	V4	SC9×SC8	22	2
	V7	18R×SC205	4	3
2017	P7	CH12×GR3	9	2
	P9	CH12×GR6	7	2
	P13	CH20×ZMH588	12	1
2018	A1	SC205×18R	12	0
	A2	SC205×HB60	8	1
	A5	SC205×CH16	44	2
总计		10	134	13

低生氰糖苷纯合 AA 基因型品系 12 个，糯质 GG 基因型品系 7 个；聚合高 β -胡萝卜素 AC 基因型和低生氰糖苷 AA 基因型品系 6 个；聚合低生氰糖苷 AA 基因型和糯质 GG 基因型品系 6 个；聚合高 β -胡萝卜素 AC 基因型、低生氰糖苷 AA 基因型和糯质 GG 基因型品系 1 个 (P7-6)。

2.4 优良品系块根氰化物、 β -胡萝卜素、支链淀粉含量测定和食味评分

在确定 13 个优良品系和 3 个对照品系基因型的基础上，于 2021 年底收获木薯块根，去掉薯皮后对薯肉进行氰化物和 β -胡萝卜素含量测定 (表 5)。15 个低生氰糖苷 AA 基因型品系块根的氰化物含量为 (38.82±0.57)~(77.37±2.14) $\mu\text{g}/\text{g}$ ，平均氰



M: DL2000 marker.

图 2 基于 MATE/PSY2/GBSSI-SNAP 标记的优良品系基因型

Fig. 2 Genotypes of promising lines based on MATE/PSY2/GBSSI-SNAP markers

化物含量为 59.86 $\mu\text{g}/\text{g}$ ，其中 A5-079 和 V1-6 的氰化物含量低于食用木薯主栽品种 SC9。 β -胡萝卜素含量为 (45.72±6.67)~(198.15±15.64) $\mu\text{g}/\text{hg}$ ，其中基因型为 AA 的 ZMC723 含量最高，为 (198.15±15.64) $\mu\text{g}/\text{hg}$ ；基因型为 AC 的品系中 SC9 含量最高，泰引 1 号和 A5-138 次之，平均含量为 145.93 $\mu\text{g}/\text{hg}$ ；基因型为 CC 的品系中 A5-079 含量最高，为 (118.63±4.70) $\mu\text{g}/\text{hg}$ ，平均含量为 79.94 $\mu\text{g}/\text{hg}$ 。除 A5-079 外，块根 β -胡萝卜素含量大于 100.0 $\mu\text{g}/\text{hg}$ 的其他品系薯肉颜色基本为淡黄色和黄色。

表 5 优良株系的 *MATE/PSY2/GBSS I-SNAP* 基因型鉴定以及块根氰化物和 β -胡萝卜素含量
 Tab. 5 Genotypes of promising lines based on *MATE/PSY2/GBSS I-SNAP* and determination of β -carotene and cyanide content in storage root

序号 Code	品系 Line	株型 Plant type	<i>MATE</i> 基 因型 <i>MATE</i> genotype	氰化物含量 Cyanide content ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)	<i>PSY2</i> 基 因型 <i>PSY2</i> genotype	β -胡萝卜素含量 β -carotene content ($\mu\text{g}\cdot\text{hg}^{-1}$)	薯肉颜色 Root color	<i>GBSS I</i> 基 因型 <i>GBSS I</i> genotype	食味评分 Score
1	ZMC723	高位分枝	AA	51.94±0.99	AA	198.15±15.64	黄色	CC	80.4
2	SC9	低位分枝	AA	49.24±1.42	AC	184.75±20.53	淡黄	CC	94.3
3	泰引 1 号	中位分枝	AA	70.17±1.77	AC	179.45±5.63	淡黄	CC	81.2
4	A5-138	直立型	AA	59.41±0.64	AC	154.10±12.53	淡黄	CG	93.8
5	P7-1	直立型	AA	76.51±3.49	AC	119.60±8.75	淡黄	CC	81.2
6	P7-6	中位分枝	AA	77.37±2.14	AC	116.30±12.28	淡黄	GG	91.7
7	P9-6	直立型	AA	62.59±0.66	AC	134.10±3.35	淡黄	CC	90.3
8	V1-6	直立型	AA	44.41±1.51	AC	125.30±4.23	淡黄	CC	82.2
9	V7-7	顶端分枝	AA	53.73±1.13	AC	101.58±2.80	淡黄	CC	83.6
10	A5-079	高位分枝	AA	38.82±0.57	CC	118.63±4.70	白色	GG	81.6
11	A2-213	高位分枝	AA	70.10±0.93	CC	81.35±7.03	白色	GG	91.0
12	P13-1	高位分枝	AA	71.61±0.95	CC	89.63±6.88	白色	GG	80.4
13	V4-8	直立型	AA	56.06±2.65	CC	45.72±6.67	白色	GG	92.5
14	V4-19	高位分枝	AA	66.16±2.36	CC	80.00±3.85	白色	GG	92.7
15	V7-14	直立型	AA	49.86±0.91	CC	68.63±2.60	白色	GG	89.2
16	V7-16	直立型	AG	64.81±3.16	CC	75.65±1.70	白色	CC	82.5

注：氰化物含量采用分光光度法测定。

Note: Cyanide content is determined by spectrophotometry.

从糯质基因型为 GG 的品系中选取 P13-1 和 V7-14 进行支链淀粉含量测定, 发现其支链淀粉含量分别为 $82.46\%\pm 0.42\%$ 和 $83.79\%\pm 1.40\%$, 高于木薯淀粉支链淀粉平均含量 $75.55\%\pm 1.81\%$ ^[17]。

进而, 以食用木薯主推品种 SC9、引进食用品种泰引 1 号和高 β -胡萝卜素品系 ZMC723 为对照, 对 13 个优良品系的薯肉食味进行评分(表 5, 图 3)。综合来看, 13 个参试品系/种的综合评分均超过 80.0, 其中 A5-138 的评分最高, 为 93.8, 略低于对照 SC9 (94.3); 品系/种 A2-213、P7-6、P9-6、V4-8 和 V4-19 的评分均超过 90.0, 是潜在的食用木薯新品系。

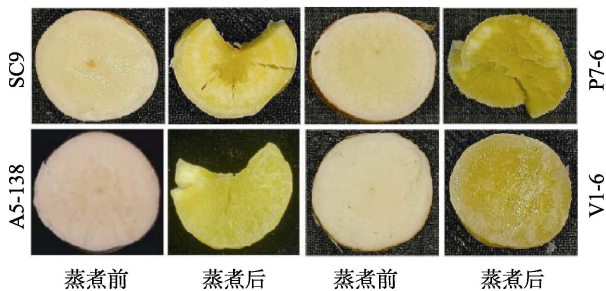


图 3 SC9 和 3 个优良品系薯肉蒸煮前后的形态

Fig. 3 Root flesh morphology of SC9 and three promising lines before and after cooking

3 讨论

3.1 *MATE-SNAP* 标记是一个具有育种价值的分子标记

本研究根据前人发现的生氰糖苷转运蛋白 *MATE* 基因的关键突变位点开发了 SNAP 分子标记^[6], 并利用一个小规模的自交群体验证其可靠性, 发现突变位点为 AA 基因型的木薯品系块根生氰糖苷含量低。随后, 利用 *MATE-SNAP* 标记对育种材料进行筛选, 发现 *MATE-SNAP* 基因型为 AA 的品种/系块根平均生氰糖苷含量为 $59.86\ \mu\text{g/g}$, 略高于食用木薯主栽品种 SC9 ($49.24\ \mu\text{g/g}$), 其中 A05-079 和 V1-6 品系低于 SC9。因此, *MATE-SNAP* 标记有助于育种工作者从中间材料中筛选出低生氰糖苷品系, 缩小检测范围, 提高选育效率。

3.2 木薯生氰糖苷合成和转运机制复杂, 亟需深入研究发掘更多关键基因

木薯中的生氰糖苷主要有亚麻苦苷和百脉根苷, 主要分布在叶片、茎秆和块根中, 特定条件下被分解生成氢氰酸, 具有一定的毒性, 长期食用生氰糖苷含量高的木薯薯肉, 会引起氰中毒^[18]。木薯块根生氰糖苷主要来源于叶片合成转运和块根的自身合成^[19]。本研究开发的 *MATE-SNAP* 标记

是基于生氰糖苷转运蛋白基因 *MATE* 编码区的单碱基变异,在一定程度上有助于筛选出生氰糖苷从叶片向块根转运能力弱的木薯种质,但如果涉及其他生氰糖苷转运蛋白或块根自身的生氰糖苷合成,则无法企及。本研究中的 12 个优良食用木薯品系虽然均为低生氰糖苷 AA 基因型,但其块根氰化物含量却存在差异,而且 V7-16 (AG 基因型)的块根生氰糖苷含量与 AA 基因型相差不大,预示还有其他基因可以影响和调控木薯块根生氰糖苷的转运和合成。利用基因编辑技术敲除木薯生氰糖苷合成起始的关键基因 *MeCYP7D1* 和 *MeCYP79D2*,发现单独敲除 *MeCYP79D2* 可以显著减少氰化物的含量^[20],而且转录因子 *MebHLH72/114* 可以同时调控木薯叶片中 *MeCYP7D1/D2* 和 *MeCYP71E* 的转录活性^[21]。另外,在杏树和百脉根中的研究发现, *bHLH* 类转录因子可以通过调控 *PdCYP79D16*、*PdCYP71AN24* 和 *LjCYP79D3* 的转录活性来影响生氰糖苷在特定组织器官内的合成效率^[22-23]。因此,加强木薯生氰糖苷合成和转运调控机制研究,发掘更多关键基因和突变位点,为培育地上部生氰糖苷合成正常但生氰糖苷向木薯块根转运,且块根自身生氰糖苷合成效率低的木薯新品系,提供理论指导和基因资源。

3.3 关键性状调控分子标记的使用可以加速木薯新品种的选育

我国的木薯产业发展正处于瓶颈期,大力推动木薯食用化发展,培育食用木薯新品种,是维持木薯产业可持续发展的重要举措之一。本研究利用低生氰糖苷 *MATE*、高 β -胡萝卜素 *PSY2*^[10] 和糯质 *GBSS I-SNAP*^[9] 标记对木薯种质资源进行基因型筛选,选择合适亲本材料进行杂交组合配制,并利用分子标记选择聚合 2~3 个目的等位基因的实生苗株系或品系,再结合相关品质指标的测定和食味评分快速从 134 个候选株系中筛选出 13 个优良品系,其中 5 个品系食味评分较高,是潜在的食用木薯新品种。此外,由于这些优良品系的食用品质基因型已知,可以据此制定杂交计划或通过自交进一步定向改良,选育块根生氰糖苷含量更低、 β -胡萝卜素含量增加和口感更加软糯的新品系,从而提高木薯品种改良效率。

参考文献

[1] 单荣芝,黄洁. 我国食用木薯的历史、现状与发展对策

[J]. 农业科技管理, 2013(5): 73-75.

SHAN R Z, HUANG J. The history, current situation and development countermeasures of edible cassava in China[J]. Management of Agricultural Science and Technology, 2013(5): 73-75. (in Chinese)

[2] 单荣芝,黄洁. 中国木薯食谱[M]. 海口: 海南出版社, 2011. SHAN R Z, HUANG J. Chinese cassava recipes[M]. Hainan Publishing House, 2011. (in Chinese)

[3] JI F J, WANG D F, HOU G Y. Nutrition value analysis of cassava residue[J]. China Feed, 2016(6): 37-40.

[4] CARVALHO L J, AGUSTINI M A, ANDERSON J V, VIEIRA E A, SOUZA C R D, CHEN S B, SCHAAL B A, SILVA J P. Natural variation in expression of genes associated with carotenoid biosynthesis and accumulation in cassava (*Manihot esculenta* Crantz) storage root[J]. BMC Plant Biology, 2016, 16(1): 133.

[5] 邹良平,起登凤,孙建波,彭明. 木薯生氰糖苷研究进展[J]. 热带农业科学, 2013, 33(10): 43-46.

ZOU L P, QI D F, SUN J B, PENG M. Research advances on cyanogenic glycoside in cassava[J]. Chinese Journal of Tropical Agriculture, 2013, 33(10): 43-46. (in Chinese)

[6] OGBONNA A C, ANDRADE L R B D, RABBI I Y, MUELLER L A, OLIVEIRA E J D, BAUCHET G J. Large-scale genome-wide association study, using historical data, identifies conserved genetic architecture of cyanogenic glucoside content in cassava (*Manihot esculenta* Crantz) root[J]. Plant Journal, 2021, 105(3): 754-770.

[7] WELSCH R, ARANGO J, BAR C, SALAZAR B, AL-BABILI S, BELTRAN J, CHAVARRIAGA P, CEBALLOS H, TOHME J, BEYER P. Provitamin A accumulation in cassava (*Manihot esculenta* Crantz) roots driven by a single nucleotide polymorphism in a phytoene synthase gene[J]. Plant Cell, 2010, 22(10): 3348-3356.

[8] UDOH L I, GEDIL M, PARKES E Y, KULAKOW P, ADESOYE A, NWUBA C, RABBI I Y. Candidate gene sequencing and validation of SNP markers linked to carotenoid content in cassava (*Manihot esculenta* Crantz)[J]. Molecular Breeding, 2017, 37(123): 1-12.

[9] AIEMNAKA P, WONGKAEW A, CHANYHAWORN J, NAGASHIMA S K, BOONMA S, AUTHAPUN J, JENWEERAWAT S, KONGSILA P, KITTIPADAKUL P, NAKASAYHIEN S, SREEWONGCHAI T, WANNARAT W, VICHUKIT V, LOPEZ-LAVALLE L A B, CEBALLOS H, ROJANARIDPICHED C, PHUMICHAI C. Molecular characterization of a spontaneous waxy starch mutation in cassava[J]. Crop Science, 2012, 52(5): 2121-2130.

[10] 朴朴森,尚小红,许丰收,廖明馨,王明,严华兵,陈新,王文泉. 基于 *PSY2* 基因单碱基突变的薯肉颜色分子标

- 记开发与利用[J]. 核农学报, 2022, 36(1): 34-41.
- PHYU P T, SHANG X H, XU F S, LIAO M X, WANG M, YAN H B, CHEN X, WANG W Q. Development and utilization of cassava root color marker basing on a single nucleotide mutation in *PSY2* gene[J]. Journal of Nuclear Agricultural Sciences, 2022, 36(1): 34-41. (in Chinese)
- [11] 徐娟, 黄洁, 徐瑞丽, 宋付平, 甘学德, 苏明. 28份甘薯种质的产量和营养及食味评价[J]. 湖南农业大学学报, 2012, 38(1): 8-15.
- XU J, HUANG J, XU R L, SONG F P, GAN X D, SU M. Evaluation of the yield, nutritive content and eating quality in sweet potato germplasm containing 28 cultivars[J]. Journal of Hunan Agricultural University, 2012, 38(1): 8-15. (in Chinese)
- [12] MAZIYA-DIXON B, DIXON A G O, ADEBOWALE A R A. Targeting different end uses of cassava: genotypic variations for cyanogenic potentials and pasting properties[J]. International Journal of Food Science & Technology, 2007, 42(8): 969-976.
- [13] 梁五生, 潘娟. 应用分光光度法测定植物组织中的氰化物含量[J]. 浙江大学学报, 2004, 30(2): 226-228.
- LIANG W S, PAN J. Measurement of cyanide content in plant tissues by spectrophotometric method[J]. Journal of Zhejiang University, 2004, 30(2): 226-228. (in Chinese)
- [14] 范明霞. 木薯再生体系的建立和 *HNL24b* 基因的克隆及辐照诱变育种[D]. 武汉: 华中农业大学, 2010.
- FAN M X. Establishment of regeneration system, molecular cloning of *HNL24b* and induced mutation breeding of cassava[D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2010. (in Chinese)
- [15] 黄慧芳, 罗燕春, 田益农, 付海天, 苏文潘, 彭靖茹, 黎萍, 黄强, 侯学文. 双波长分光光度法测定木薯块根淀粉含量的动态变化[J]. 中国粮油学报, 2012, 27(10): 113-117.
- HUANG H F, LUO Y C, TIAN Y N, FU H T, SU W P, PENG J R, LI P, HUANG Q, HOU X W. Time course of starch content in cassava root tuber determined by dual-wavelength spectrophotometry[J]. Journal of the Chinese Cereals and Oils, 2012, 27(10): 113-117. (in Chinese)
- [16] 中国国家标准化管理委员会. 热带作物品种区域试验技术规范 木薯: NY/T 2446—2013[S]. 北京: 中国农业出版社, 2014.
- Standardization Administration of China. Technical specification for regional test of tropical crop varieties – cassava: NY/T 2446—2013[S]. Beijing: China Agriculture Press, 2014.
- [17] 叶剑秋. 木薯种质资源遗传多样性评价和创新利用[D]. 海口: 海南大学, 2014.
- YE J Q. Genetic diversity evaluation, innovation and utilization of cassava germplasms[D]. Haikou: Hainan University, 2014. (in Chinese)
- [18] 王琴飞, 林立铭, 张振文, 余厚美, 徐缓, 羊贤月. 食用木薯块根及其制品中生氰糖苷检测方法的建立与应用[J]. 食品工业科技, 2022, 43(2): 271-278.
- WANG Q F, LIN L M, ZHANG Z W, YU H M, XU H, YANG X Y. Establishment and application of a method for detecting the cyanogenic glycoside in sweet cassava root and its products[J]. Science and Technology of Food Industry, 2022, 43(2): 271-278. (in Chinese)
- [19] DU L, BOKANGA M. The biosynthesis of cyanogenic glucosides in roots of cassava[J]. Phytochemistry, 1995, 39(2): 323-326.
- [20] GOMEZ M A, BERKOFF K C, GILL B K, LAVARONE A T, LIEBERMAN S E, MA J M, SCHULTINK A, WYMAN S K, CHAUHAN R D, TAYLOR N J, STASKAWICZ B J, CHO M J, ROKHSAR D S, LYONS J B. CRISPR-Cas9-mediated knockout of *CYP79D1* and *CYP79D2* in cassava attenuates toxic cyanogen production[J/OL]. BioRxiv, [2022-05-25]. <http://doi.org/10.1101/2021.10.08.462827>.
- [21] AN F F, XIAO X H, CHEN T, XUE J J, LUO X Q, OU W J, LI K M, CAI J, CHEN S B. Systematic analysis of bHLH transcription factors in cassava uncovers their roles in postharvest physiological deterioration and cyanogenic glycosides biosynthesis[J]. Frontiers in Plant Science, 2022, 13: 901128.
- [22] SANCHEZ-PEREZ R, PAVAN S, MAZZEO R, MOLDOVAN C, CIGLIANO R A, CUETO J D, RICCI ARDI F, LOTTI C, RICCIARDI F, DICENTA F, LOPEZ-MARQUES R L, MOLLER B L. Mutation of a bHLH transcription factor allowed almond domestication[J]. Nature, 2019, 364(6445): 1095-1098.
- [23] CHEN C, LIU F, ZHANG K X, NIU X L, ZHAO H, LIU Q X, GEORGIEV M I, XU X H, ZHANG X Q, ZHOU M L. MeJA-responsive bHLH transcription factor LjbHLH7 regulates cyanogenic glucoside biosynthesis in lotus japonicus[J]. Journal of Experimental Botany, 2022, 73(8): 2650-2665.