

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷
C12N 15/00
C12N 15/01
A01H 1/00
A01H 1/06
A01H 5/00



[12] 发 明 专 利 说 明 书

专利号 ZL 98808664.6

[45] 授权公告日 2005 年 9 月 7 日

[11] 授权公告号 CN 1218042C

[22] 申请日 1998.7.7 [21] 申请号 98808664.6
[30] 优先权
[32] 1997. 7. 7 [33] US [31] 60/051,854
[32] 1997. 7. 7 [33] US [31] 60/051,855
[86] 国际申请 PCT/US1998/013685 1998.7.7
[87] 国际公布 WO1999/002668 英 1999.1.21
[85] 进入国家阶段日期 2000.2.28
[71] 专利权人 埃克斯希德遗传有限公司
地址 美国衣阿华州
[72] 发明人 M·-T·张 彼得 L·基林
爱德华 P·韦尔赫姆
杰里 C·韦格尔
审查员 安玉苹

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司
代理人 谭明胜

权利要求书 1 页 说明书 29 页 附图 1 页

[54] 发明名称 用低植酸、富含油并且富含蛋白质的谷粒制造的动物饲料

[57] 摘要

本发明提供了谷粒、种子、由所述谷粒或种子制造的饲料、由所述谷粒制造的宠物食品以及由所述谷粒制造的食品。所述谷粒可以是具有下列特征的玉米谷粒：富含油、蛋白质含量增加并且植酸水平低。在谷粒中富含油、富含蛋白质和植酸降低的特征的组合，使得谷粒为饲喂家畜提供更多的卡路里、蛋白质和磷以及其它营养。由于所述谷粒成分的生物利用率提高，由本发明制造的宠物食品、动物饲料和玉米食品将提供更多营养。

I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

1. 一种含有下述物质的饲料:
 - a)玉米种子, 所述种子
 - 5 i)由玉米花粉诱变产生, 并且
 - ii)含有至少 5% 重量油、至少 11%重量蛋白质, 并且与所述物种的野生型种子相比, 植酸量降低至少三分之一,
 - 和
 - b)至少一种维生素或矿物质源;
- 10 所述饲料为消耗所述饲料的家畜提供营养平衡的饮食以及比用所述物种的野生型种子制造的同样饲料更大量的磷。
2. 依照权利要求 1 的饲料, 其中所述种子含有至少 13%重量蛋白质。
3. 依照权利要求 1 的饲料, 其中所述矿物质源包括钙、磷和盐。
- 15 4. 依照权利要求 1 的饲料, 其中所述维生素源包括维生素 A 和维生素 D 的至少其中之一。
5. 依照权利要求 1 的饲料, 其中所述维生素源包括由下列选出的维生素: 维生素 E、B₁₂、核黄素、泛酸、烟酸、生物素。
6. 依照权利要求 1 的饲料, 其中所述矿物质源包括由下列选出的
20 微量矿物质: 铁、铜、锰、锌、碘、硒。
7. 依照权利要求 1 的饲料, 所述饲料还包含由下列选出的饲料添加剂: 抗生素、砷化物、化疗药物、调味剂、抗氧化剂和植物提取物。
8. 依照权利要求 1 的饲料, 其中所述饲料补充了氨基酸赖氨酸。
9. 依照权利要求 1 的饲料, 其中所述饲料补充的氨基酸是甲硫氨
25 酸。
10. 依照权利要求 1 的饲料, 其中所述成分根据猪的饮食需要配制。
11. 依照权利要求 1 的饲料, 其中所述成分根据家禽的饮食需要
30 配制。

用低植酸、富含油并且富含蛋白质的谷粒制造的动物饲料

5 本发明基于 1997 年 7 月 7 日申请的美国临时申请第 60/051,854 号和 60/051,855 号并要求获得上述申请的权益，上述申请的全部内容通过引用结合到本文中。

发明领域

10 广义来说，本发明涉及油增加、蛋白质和氨基酸增加、总体磷生物利用率提高并且植酸减少的谷粒。这种谷粒可以用于动物饲料。更具体地说，本发明涉及提供改善的动物营养并降低畜牧生产的环境冲击的基于谷粒的饲料。

15 背景

 在过去五十年中，提供动物营养的方法已经改变。人们不再用任何可以得到的谷粒或草料饲喂家畜。取而代之的是，人们严密监控家畜饮食的总体营养价值和成本。人们监控用一定饮食饲喂的家畜的质量和性能特征，以及家畜的废物的环境冲击。收集的信息用于调整饲料，以增加饲料的营养价值和家畜的性能特征，同时降低成本和环境冲击。

 谷类和脂肪用于在非反刍动物，如猪和家禽的饲喂程序中提供卡路里的营养源。在过去几年中，谷类与补充物(如维生素、矿物质和脂肪)的比例已经改变，以尽力最大化家畜的饲喂效率。通过家畜遗传潜力的选配和供应给家畜的营养的组合，确定饲喂效率(饲料转化率)，或者说生产一磅家畜重量需要多少饲料。由于饲料转化率已经由于遗传增强(genetic enhancement)而提高，因此饲料中的矿物质营养需求已经提高，以保证完全和健康的饮食。

 由于家畜的摄食能力限制它所能消耗的营养和卡路里的量，因

此饲料业必须开发出制造含更多卡路里的饲料的方法。为提高饲料的卡路里密度, 生产者在饲料中加入脂肪。脂肪常常以液体形式加入饲料。脂肪具有为每一口饲料提供卡路里的益处。然而, 在饲料中加入脂肪有一些缺点, 如成本、劳动增加以及自动喂料系统的技术困难。此外, 脂肪常常是质量低劣的, 因此降低了饲料的总体质量。

为减少液态脂肪在饲料中的使用, 饲料业已经试图增加在饲料中使用的谷粒的油含量。Dupont 公司已经开发并商业化了高油玉米作为增加饲料中的油含量的方法。其他公司已经开发出含油量比 2 号黄马齿种玉米高(yellow dent corn)、但比 Dupont 的高油玉米低的玉米。高油和油增加的玉米在本文中可替换地称为富含油的玉米。在这些玉米中额外的油减少并有可能消除向饲料添加液态脂肪的需要。

传统上, 与 2 号黄马齿种玉米的植酸水平相比, 富含油的玉米被认为含有更高的植酸水平。然而, Raboy 等人(Journal of Heredity 1989: 80: 311-315)已经报道, 与以前预期的在浓度基础(即每 g 谷粒、胚芽或胚乳所含有 mg 成分)上明显的正关系相反, 在油的选择和 Illinois 高油系和低油系每谷粒、每胚芽和每胚乳所含的总体植酸、植酸磷和磷之间有明显的负关系。Raboy 解释: 每器官的总含量和每器官的浓度之间的差异源于在他的研究中使用的 Illinois 高油(IHO)和 Illinois 低油(ILO)种子之间显示的器官干重的巨大分歧; IHO 胚芽的干重是 ILO 胚芽的干重的约两倍, 而 ILO 胚乳的干重是 IHO 胚乳的干重的近三倍。与这种高油与低植酸相联系的趋势相比, Raboy 也报道了在对蛋白质增加的选择和植酸、植酸磷和磷的量增加之间有一致的正关系。因此, 在蛋白质的选择与 Illinois 高蛋白系和低蛋白系每谷粒、胚芽或胚乳的总体植酸、植酸磷和磷之间有明显的正关系。甚至当数据在浓度基础(即每 g 谷粒、胚芽或胚乳所含 mg 成分)上表达时, 这一点依然如此。因此, 对蛋白质的选择和对油的选择看起

来相异地影响种子中的植酸含量。

正如报道显示平均每增加 0.38%的蛋白质就伴随着油增加 1 % (Han Y.等人, 1987 Poultry Science 66: 103-111; Keshararz, Poultry Pointers, 第 6-7 页), 在技术上还不确定是否能产生含高油、高蛋白以及低植酸的谷粒(Brewer, “Optimum® 高油玉米改善家禽日粮” Poultry Digest, 1998 年 2 月/3 月第 30-31 页)。Brewer 陈述: 虽然可以象 1998 年一样得到高油玉米, 但还需要研制含高油、高蛋白和高可消化磷(即低植酸磷)的品种。

基于谷粒的饮食中的植酸浓度长久以来已经受到人类和动物营养学家的关注, 因为证据显示植酸与营养上重要的矿物质形成在肠中不被吸收的不可溶的盐。植酸(肌醇 1,2,3,4,5,6-(六磷酸二氢)酯)是种子中磷(P)的一种形式, 以植酸盐的形式贮存。植酸盐对家畜有负面营养影响, 因为结合到植酸的磷不能作为营养源被家畜利用。此外, 家畜并不存留如 Ca、Zn 等等的矿物质, 这些必需矿物质被排泄出来。最后, 含有植酸 P 的家畜废物会导致地表水和地下水污染。假如所述谷粒用于磨粉目的, 则包含植酸 P 的谷类加工副制品会导致地表水和地下水污染。

例如, 猪缺少将磷从植酸分子上切割下磷所需的消化酶(植酸酶), 因此不能利用植酸磷。通过去除结合磷的植酸盐来增加磷的可利用性, 这将使得能够减少饮食的总体磷含量而不会危害家畜的健康或生产性能。提高磷的生物利用率导致猪的废物中磷含量更低, 这正是环保所需要的。

在释放玉米粉和大豆饼粕中存在的部分植酸磷的努力中, 饲料业在动物饲料中加入了微生物植酸酶。这种在谷粒中处理植酸的方法看起来部分减少了被家畜排泄的磷。该项研究明显导致了其它降解饲料中的植酸的方法。一种方法包括在饲料中加入酶混合物和黑曲霉(*Aspergillus niger*)菌丝体。这些成分水解玉米-大豆饮食中存在的植酸。用酶混合物和真菌菌丝体饲喂的火鸡显示增强的性能并且存

留了 P 和 Ca。这些饲料研究都计划在饲料被家畜消耗之前将基于玉米和大豆的饲料去磷酸化，并因此减少排泄出的 P。这种处理谷粒中的植酸的方法具有明显的缺点，即增加饲料的劳动和成本。

5 在美国专利第 5,593,963 号中，Mogen 描述了通过遗传工程技术在玉米或大豆种子中产生来自曲霉属(*Aspergillus*)的对温度稳定的植酸酶。所述遗传产生的植酸酶设计用于通过降解从谷粒中释放出的植酸而降低动物饲料中的植酸含量，并因此降低家畜排泄出的磷的水平。

10 低植酸突变黄马齿种玉米种子已经由 Raboy 产生并在美国专利第 5,689,054 号中描述。这个专利描述了玉米中一个单基因、非致死 *lpa1* 突变体的发现，这种突变体导致谷粒中的植酸磷与野生型中的水平相比降低高达 95%。Raboy 注意到，虽然他的发明的突变体在表型上与野生型非常相似，但所述突变体需要引入一个育种程序，以将低植酸性状引入商业品系。此外，Raboy 解释：他的发明的低植酸
15 玉米突变体的特征在于谷粒的干重稍稍降低，这会导致生产力降低，而且纯合突变体可能减少或消除农学上重要的特征。由于 Raboy 等人(*Journal of Heredity* 1989)已经指出，对高蛋白的不同选择一致地产生植酸较高品系，因此还不清楚在 Raboy 的专利中所述的黄马齿种玉米中的 *lpa1-R* 和 *lpa2-R* 突变如何与导致高蛋白和富含油的玉米种子
20 的基因相互作用。因此无法确定地预测是否有可能保持带有低植酸突变的高蛋白并富含油的种子。

虽然饲料业已经提出了在饲料中含有更多能量和更少植酸磷的需要，但还未提出需要一种方法以有效利用成本的方式在饲料中同时提供高营养密度(即高蛋白和高油)和低植酸。有需要降低在饲料中
25 形成的植酸盐的量并增加饲料中能量的量，而不必向饲料添加植酸酶和液态油。虽然还未提出，但仍然需要具有蛋白增加、富含油并且植酸水平低的组合的谷粒。为降低畜牧生产中的饲料成本，需要有效利用成本并且不污染环境的营养密集的物质。此外，仍然需要

含有富含油、富含蛋白并且植酸水平低的玉米的饲料，其中所述玉米可以用于磨粉或饲料目的。

发明概述

5 本发明的一个目标是提供营养密集的谷粒，所述谷粒含有由于油而具有高能量水平和由于蛋白质改善的氨基酸含量，同时所述谷粒含有低植酸水平。

 本发明的另一个目标是降低消耗所述饲料的家畜的磷酸和/或磷的排泄，同时提高每日采食量的能量水平以及矿物质和其它营养的生物利用率。

10 本发明的一个目标是提供一种动物饲料，所述饲料含有由于油和蛋白而获得的高能量水平、同时含有低植酸水平。

 本发明的再一个目标是为家畜提供高度营养密集的饲料源，所述饲料源比使用常规商品玉米(即 2 号黄马齿种玉米)制造的同样饲料源含有更少的植酸。

15 本发明的再一个目标是为家畜提供含有任何限速氨基酸(rate limiting amino acid)的足量供应的高能量饲料源，所述饲料源比使用常规商品玉米(如 2 号黄马齿种玉米)制造的同样饲料源含有更少的植酸。

20 本发明的另一个目标是提供一种方法，减少家畜磷废物和/或污染以及由此引起的随后的藻类和微生物的大量繁殖，所述方法包括用本发明的动物饲料饲喂家畜，如猪和鸡。

 在一个实施方案中，本发明提供了谷类作物物种，如玉米(玉米)、稻、大麦和大豆的非致死突变种子或谷粒，所述种子或谷粒至少约 5% (干重)、最好至少约 6%或至少约 7%是油；至少约 11% (干重)、最好至少约 12%或至少约 13%是蛋白质；与所述物种的野生型种子相比，植酸的量(以总体磷、植酸或植酸磷中任何一种计)以干重计减少至少约三分之一(33%)，最好减少至少约一半(50%)或至少约 60-70%。当

本发明的种子是玉米时,所述减少的比较最好是针对标准2号(no.)黄马齿种玉米进行。

在另一个实施方案中,本发明提供了将磷利用率从黄马齿种玉米的28%提高到大于约70%,最好少于约90%,或者是约80%到84-85%。利用率是与种子中的总体磷相比,可利用的磷的量。本发明的杂种谷粒最好是有用的自交系与自交系ExSeed系U095-lpa1-E(或称为U095-E或U095py;按照布达佩斯条约于1998年7月7日以菌株名EX1965py保藏于美国典型培养物保藏中心,10801 University Blvd., Manassas, VA 20110-2209 USA, 保藏号203034。来源U095-py 1656-W97-Florida-100)的杂交体。本文使用的“E”或“py”命名表明由本发明人引入一个lpa1突变。可以使用许多其它杂交和自交系。例如,下列雌性自交系BD68py、TR306py、WD22py和TR329py与雄性自交系U095py、UU01py、UE95py、TR335py和TR386py杂交以产生高产杂交组合。特别优选与U095py的杂交,自交系U095py和由此产生的杂种是本发明的特定实施方案。本发明的杂种谷粒特征在于含有约6%油和12%蛋白质(或比黄马齿种玉米多3%油和3%蛋白质)并且植酸含量减少至少约33%。

在另一个实施方案中,本发明提供了包含如本文所述的种子以及至少一种维生素或矿物质源的饲料,所述维生素或矿物质源包括例如以下任一种或其中至少两种的混合物:钙或磷或它们的盐、维生素A、维生素D、维生素E、B₁₂、核黄素、泛酸、烟酸、生物素和微量矿物质,如铁、铜、锰、锌、碘和硒和/或其它饲料添加剂,如抗生素、砷化物、化疗药物、调味剂、抗氧化剂和植物提取物;所述饲料为消耗所述饲料的家畜提供营养平衡的饮食,以及比用所述物种的野生型种子制造的同等饲料更大量的生物可利用磷。本发明的饲料也可以包含氨基酸添加剂,如赖氨酸和甲硫氨酸。

在另一个实施方案中,本发明提供了一种改良的饲料,所述饲料在其它情况下针对猪或家禽配制,但包括本发明的种子,最好是

玉米种子。

在又一个实施方案中，本发明提供了一种增加包含物种野生型种子的制品的磷生物利用率的方法，所述方法包括为消费提供包含种子的制品(如本文所述的饲料)、以及将所述含有种子的制品饲喂会
5 从磷的生物利用率提高中受益的家畜的步骤，其中所述包含种子的制品含有本发明的种子。

在另一个实施方案中，本发明提供了会产生本发明的种子的种质。在一个最佳实施方案中，本发明提供了会产生本文所述的玉米种子的玉米种质。

10 在再一个实施方案中，本发明提供了从本发明的种子产生的植物。

在又一个实施方案中，本发明提供了完全成熟的本发明的种子。考虑下面的描述，其它目标和优点将会变得显而易见。

15 附图简述

图 1 显示了所筛选的 M2 种子的植酸含量的频率分布。

发明详述

本发明提供了谷粒、由所述谷粒制造的饲料、由所述谷粒制造的
20 的宠物食品以及由所述谷粒制造的食品。所述谷粒最好是具有以下特征的玉米谷粒：富含油、蛋白含量增加并且植酸水平低。优选的谷粒含有至少约 5%的油、至少 11%的蛋白质，并且与野生型谷物如标准黄马齿种玉米相比，植酸水平降低至少约 20%到约 70%，最好至少约 33%到约 60%。所述谷粒更优选含有至少 6%、更优选 7%的
25 油、至少 12%、更优选 13%的蛋白质，并且与其中谷粒是低植酸的标准黄马齿种玉米相比，植酸水平降低至少二分之一。除非另外说明，否则百分率以干重为基础表示为每谷粒中一种成分的量。谷粒中富含油、富含蛋白质、植酸减少的特征的组合使谷粒为所饲喂的

家畜提供更多卡路里、蛋白质和磷以及其它营养。由于所述谷粒的成分的生物利用率提高，本发明制造的宠物食品、动物饲料和玉米食品将提供更多营养。

换句话说，本发明包括针对特定家畜类型的动物饲料。在一个
5 实施方案中，本发明提供了一种饲料，与用 2 号黄马齿种玉米针对相似类型家畜配制的营养平衡饲料相比，所述饲料提供同样的总能量以及至少相同的性能限制性氨基酸与总能量的比例。所述饲料用包括油、蛋白质增加并且低植酸的玉米的能量源配制。此外，所述饲料可以包含至少一种蛋白质源以及至少一种维生素和矿物质源，
10 所述蛋白质源以与所述总能量一定比例包含潜在的性能限制性氨基酸成分，以使得所述氨基酸不再是性能限制性的；其中所述饲料为家畜提供与在营养平衡的饲料中的 2 号黄马齿种玉米相比，含有更高卡路里和更低植酸的谷粒。所述限制性氨基酸可以是根据动物物种需要的各种不同氨基酸，但最好包括赖氨酸、色氨酸、苏氨酸和甲硫氨酸。所述饲料的蛋白质源也可以包含大豆作为一种成分。本
15 发明的饲料也可以包含维生素以及矿物质源，如钙、磷和盐。在一个实施方案中，本发明的饲料含有维生素和矿物质源，包括维生素 A、E、D、B₁₂、核黄素、泛酸、烟酸、生物素中任何一种或它们的混合物；微量矿物质，如铁、铜、锰、锌、碘、硒中任何一种或它们的混合物；以及饲料添加剂，如本领域内已知的饲料添加剂并可以包括抗生素、砷化物、化疗药物、调味剂、抗氧化剂和植物提取物中的任何一种或它们的混合物。

本发明提供了提高含玉米制品中的磷的生物利用率的方法，包括下面步骤：为消费提供含玉米制品，其中所述含玉米制品是用本
25 发明的玉米谷粒制造，如那些特征在于含有至少 5%油、至少 11%蛋白质、并且与标准黄马齿种玉米相比植酸水平降低至少三分之一的玉米谷粒，其中本发明的谷粒的植酸浓度比标准黄马齿种玉米的植酸浓度低；并消费所述含玉米制品，所述含玉米制品与用黄马齿种

玉米制造的同样玉米制品相比，玉米材料中包含的植酸更少，其中所述玉米中的磷的生物利用率比用黄马齿种玉米制造的同样制品的高。

5 本发明还提供针对任何非反刍动物的饲料。本发明的饲料特别适于作为猪或家禽饮食中的成分。

在另一实施方案中，本发明提供了含有针对特定家畜类型的总能量含量的动物饲料，所述家畜需要在饲料中含有某一水平的一种氨基酸以从所述饲料中获得好的性能，所述饲料包含的玉米含有比 2 号黄马齿种玉米平均油水平更高的油量，比 2 号黄马齿种玉米的植酸水平相比更低的植酸水平；这种动物饲料包含蛋白质源，最好是基本由本发明的谷粒提供；与用 2 号黄马齿种玉米针对相似类型家畜配制的营养平衡饲料相比，这种动物饲料的性能限制性氨基酸与总能量的比例至少相同。

15 本发明提供了能量、蛋白质增加并且低植酸的谷粒。这种谷粒可以用作动物饲料，或者可以被研磨加工。本发明提供了富含油、富含蛋白质并且低植酸的新型玉米种子、植株和谷粒，以及这样的新型谷粒的用途。所述基于谷粒的饲料提供了改善的动物营养，并减少了畜牧生产的环境冲击。更特别的是，本发明提供了使用本发明的谷粒配制的动物饲料。

20 许多农作物用于人类或家畜消费的食物生产、生产人类消费制品的商业过程、工业制品的开发以及其它目的。传统上，农作物物种的改良涉及到通过遗传杂交引入所需性状。本发明同样可以通过使用标准作物(如玉米)育种和突变实践而重复完成。

25 玉米谷粒被认为是用于食物和饲料的高质量谷粒。高油玉米被认为比其它玉米能量更密集。高油玉米现在可以从 Dupont 作为商品得到。然而，高油玉米象所有玉米一样含有植酸。在本发明之前，还不存在低植酸并且富含油、富含蛋白质的玉米作物和谷粒。本发明还提供了由研磨本发明的种子得到的改良的面粉。因此，低植酸、

富含油、蛋白质增加的玉米谷粒应该表明了对能量、蛋白质密集的玉米以及提高谷类谷粒中的矿物质生物利用率的需要。

5 重复产生本发明的谷粒的方法如下所述。通常在玉米育种程序中，富含油、富含蛋白质的玉米作物与带有低植酸等位基因的玉米作物杂交。富含油的玉米作物可以通过轮回选择研制，如 University of Illinois 的高油玉米(可以作为商品从 Dupont 得到)所证实，或通过转化研制(转化玉米的方法是本领域的普通技术人员所熟知的)。这是完成本发明的起始材料的一部分。另一部分是一种低植酸作物。虽然这种作物不能作为商品得到，但试验材料是可以得到的。

10 高油谷粒可以作为 Top Cross 谷粒或高油杂种玉米(高油是指含有多于 3.5%油的任何玉米谷粒)从 Dupont 买到。富含油的玉米被定义为总油水平的百分率平均比标准黄马齿种玉米的平均油水平高的玉米。

15 下表显示了多种含油种子作物的各种油的总油重量%水平。在玉米下的数字是标准 2 号马齿种玉米中的水平。

表 1 商业作物的脂肪酸组成

	Sun (hiO)	Canol	lolinCan	甘蓝菜 (Crambe)	玉米	大豆
(C16:0) 棕榈酸	6	4	5	2	11	11
(C16:1) 棕榈油酸	0.3	0.3	0.4	0.3		
(18:0) 硬脂酸	5	1.5	1.5	1	2	4
(18:1) 油酸	20(81)	62	62	17	28	22
(18:2) 亚油酸	68(9)	20	27	8	58	53
(18:3) 亚麻酸	0.2	10	2	7	1	8

Sun (hiO) - 高油向日葵

Canol - canola

5 lolinCan - 低亚油酸 canola

甘蓝菜

玉米

大豆

10 因此，本发明包括富含油的谷粒，所述谷粒最好有上面所列比例的脂肪酸组成。本发明还包括脂肪酸组成增加的玉米，以便对饲喂所述改变的玉米的家畜来说，所述材料的有用物总体上不增加，但成效增加。本发明还包括富含油并且脂肪酸组成与上面所列的比例不同的谷粒。

15 由于遗传突变、选择育种、转化等等原因，谷粒谷类(grain cereal)中油的比例可能有所变化。用于饲料的主要谷粒可以通过产生杂种材料的标准方法产生，如将富含油、蛋白质增加的自交系与低植酸的自交系杂交，产生包括低脂肪酸和油增加的谷粒特征的杂种。

20 如上所述，Raboy 等人已经报道在玉米中蛋白质选择和植酸水平增加之间有正相关关系。下表列出了可以用于形成本发明的谷粒的一种营养密集玉米类型中存在的氨基酸值。玉米中的蛋白质由许

多不同的基因控制。优选的高蛋白玉米中，在玉米谷粒中存在的大多数氨基酸的百分率提高。高蛋白材料的一个例子是在 University of Illinois 中通过轮回选择研制的高蛋白玉米。许多可以得到的其它高蛋白玉米的赖氨酸增加，而大多数氨基酸在总体上不一定增加。这种
5 种高蛋白质类型也是有用的，因为这种增加的蛋白质是饲喂家畜的总体健康所需要的，并且这种蛋白质与本发明的其它性状组合起来时会更好地被利用。为方便杂种种子的育种，高蛋白质的性状是加性的或显性的。优质蛋白玉米(Quality protein maize)包括可以从 Wilson 种子、Crows、公共保藏机构和大学得到的高蛋白材料。或者，可以
10 通过轮回选择或使用玉米中的特定突变，如 o2:su2 产生高蛋白材料，其中所述 o2:su2 突变的赖氨酸比一般杂种多 49%，但蛋白质产量降低。在发展本发明时，使用了加性的并且大多数蛋白水平比一般黄马齿种玉米增加的高蛋白性状。富含蛋白质的玉米应该是指与黄马齿种玉米的平均氨基酸含量相比氨基酸含量增加和/或与黄马齿种玉米的平均氨基酸含量相比氨基酸含量的比例不同的玉米。高蛋白的
15 玉米应该是指与黄马齿种玉米的平均氨基酸含量相比，氨基酸含量增加的玉米。

表 2: 黄马齿种玉米对 EX404

(EX404 比标准黄马齿种玉米(平均 3-3.5% (重量)油和 7-9% (重量)蛋白质)多约 1% (重量)的油和约 2-3% (重量)的蛋白质。本文所用的 EX404 和 ES404 是相同的)

5 氨基酸组成:

	马齿种	ES404	变化%
色氨酸	.06	.06	100%
天冬氨酸	.57	.83	146%
苏氨酸	.29	.47	162%
丝氨酸	.41	.63	154%
谷氨酸	1.52	1.89	124%
脯氨酸	.74	1.04	141%
甘氨酸	.33	.41	124%
丙氨酸	.63	.87	138%
半胱氨酸	.18	.24	133%
缬氨酸	.38	.47	124%
甲硫氨酸	.17	.26	152%
异亮氨酸	.26	.36	138%
亮氨酸	1.01	1.48	146%
组氨酸	.24	.35	145%
赖氨酸	.24	.31	129%
精氨酸	.29	.42	107%

10 上表明显表明营养密集的玉米的大多数氨基酸值比黄凹材料的高。在植酸切实降低时, 多出的蛋白质看起来可以为家畜所用。由于遗传突变、选择育种、转化等等原因, 谷粒谷类中的蛋白比例可能会有变化。本发明提供了含有生物可利用蛋白的水平提高并且油

的水平提高、植酸水平降低的谷粒。

在 USDA 公布低植酸突变体 B73 lpa1-R、A632 lpa1-R 及它们的选择之前，只能使用传统育种方法在玉米种子中产生低植酸。通过标准育种研制的玉米种子中的低植酸看起来带有一些不希望有的农艺性状。由于植酸基因是隐性的，优选的方法要求这个基因固定存在于两种自交系中。根据下面方法可以研制含有低植酸的突变体。对植酸水平的选择必须非常小心地进行，因为植酸水平太低可能产生致死的种子。

通过下列步骤可以研制本发明的低植酸作物，这些步骤不需要进行过多的实验，并且可以由作物育种领域内的一般技术人员完成。产生低植酸玉米作物的最好方法使用了玉米花粉诱变。在单倍体花粉作物中诱导的突变会产生所述种子的杂合基因型。由于现在已知低植酸是一个隐性基因，因此必需将得到的突变体种子种植并自交，并分析得到的作物种子的突变表型。所述种子的分析应该在所述种子处于成熟期或收获期时进行。

用本领域内的常规方法，如辐射、化学处理和转座因子插入产生诱变。Neuffer 等人 Maize for Biological Research, W. F. Sheridan (编辑), Plant Molecular Biology Association (1982)教授了一种标准方法。这种方法将甲磺酸乙酯(EMS)应用于花粉。所述花粉用于授粉，种植得到的种子，并测试得自第二代的种子的植酸含量。测定 P 的方法是自 1990 年 Raboy 在 Maydica 35:383 (1990)公布 HVPE 方法后，本领域就已经知道了的。这种方法依赖于磷化合物的差别性迁移。在电泳分离所述化合物后，电泳图可以用于植酸相对于其它化合物的半定量评估。一种可替代的方法涉及筛选谷粒中高水平的无机磷。例如可以研磨谷粒样品(通过 Wiley 磨的 2mm 筛孔)，然后加入 15ml 0.4M HCl/0.7 Na₂SO₄ 中的 50mg 谷粒胚芽或 1g 胚乳。植酸作为铁盐沉淀下来。检测植酸铁沉淀中的磷以及总体 P。将植酸 P(mg)转化为植酸，转化因子为 3.5。这些结果导致包含所需等位基因的所需玉米

作物的选择。其它检测磷的方法是已知的并可用于选择作物。繁殖含有所需植酸的种子。本发明使用了这个过程，并选择在 *lpa1* 基因座带有新等位基因的自交系。这些包括将 EX404(低植酸)，EX404 与本发明的自交系之一杂交，以产生能生产本发明的谷粒的杂种。此外，本发明研制的自交系来自硬茎(stiff stalk)Lancaster 和另一种多用途杂种优势模式，以便当所述自交系与合适的杂种优势群体杂交时形成极好的杂种材料。还发现许多本发明研制的突变虽然植酸低，但等位测试表明，这些突变并不是与 *lpa1-R* 突变一样的突变体。

本发明所用的方法可以用于产生两个自交系，这两个自交系杂交时形成高产杂种。自交系可以作为商品从 University and Foundation 种子公司得到，并可以由培育玉米自交系领域内有经验的作物培育者培育出。固定带有低植酸性状的这两种自交系中的一种或两种可以与一种带有油增加性状的自交系杂交。如果高蛋白性状作为加性性状来选择，那么两种自交系中的任一种可以带有高蛋白性状。这样使得杂种组合同时带有隐性低植酸基因和显性或加性油基因的性状。将玉米作物反复育种，直到低植酸等位基因在两种相互间很好杂交的自交系中存在。同样，杂交组合中的至少一种自交系必须包含富含油的性状和/或富含蛋白质的玉米等位基因。

或者这种谷粒可以用 Dupont 专利申请 WO92/08341(US 615,839) 中教授的杂交育种方法产生。这种方法要求雄性授粉株带有富含油的性状。在 Dupont 的方法中富含油的传粉者(一种自交系)与雄性不育的杂种种子混合。然后雄性传粉者在茁壮的杂种植株上形成富含油的谷粒。

在本发明中所述雄性传粉者最好具有两个性状，一个固有的隐性植酸基因以及富含油、富含蛋白质的性状。此外，所述雄性不育杂种也具有低植酸性状。

本文描述了配制在一种谷粒源中含有增加的能量、蛋白质和低植酸的动物饲料的方法。优选的方法是通过用本发明的谷粒替代通

常使用的玉米谷粒以改良饲料或宠物食品。饲料中的其它成分可以是谷类加工副制品、蛋白质成分、大豆饼粕、微量矿物质和维生素、其它谷类、饲料添加剂和调味剂。这种饲料要求所产生的谷粒的特征在于油增加和蛋白质/氨基酸增加并且植酸低。惊人的是，低植酸与富含油以及蛋白质增加的组合看起来使得家畜能够更有效地利用在富含油的玉米中的额外蛋白以及新的可利用磷，这导致饲料转化率提高。从这种杂交组合得到的谷粒可以用于动物饲料中。这种饲料应该包含富含油、蛋白质增加和低植酸的组合，以及在猪或家禽的饮食中使用的其它饲料。

如果使用了其它谷粒，这些谷粒最好经过选择以含有与这种类型谷粒尽可能同样低的植酸含量。虽然作为总体饮食一部分的谷粒的百分率将会决定对植酸的选择要如何严格。

本发明对饲喂非反刍动物特别有用。下面提供了标准猪饮食的饲料成分。本发明的饲料混合物用本发明的谷粒取代了 2 号玉米。所述谷粒具有低植酸、高油和氨基酸增加的特征。当把这种谷粒提供给家畜时，将导致可利用的卡路里密度更高以及多种营养(如矿物质)的生物利用率更大。在饲料中使用这种谷粒减少了添加动物脂肪或植物油的需要。

猪主要饲喂强化玉米-大豆饼粕饮食。断奶前或早期断奶的仔猪常常需要在饮食中加入添加剂(如奶粉制品)以及其它高蛋白和脂肪源。完全的猪饮食提供了饲喂一种饮食的猪的全部营养需要。通过将平衡补充物与玉米:大豆饼粕以及维生素-矿物质预混料与玉米混合，可以制备这些饮食。传统的饲料常常添加了补充脂肪源，即植物种子油(提取)、动物油脂和牛脂、市售干脂(dry fat)、玉米油、大豆油或煮熟全脂大豆。在含 6%脂肪时，饮食在自动喂料器中的流动性受到损害。总体上 1%的脂肪产生效率约 2%的改善(消耗每单位重量的饲料获得的额外增重)。由使用本发明的饲料(使用油增加并且低植酸的玉米谷粒)增加的油增加了饮食的卡路里密度、金属的生物利

用率并减少了不希望的废物。本发明的饲料使用本发明的玉米谷粒替代了目前在针对家畜的饮食中使用的谷粒。下面两种新的饲料组合将使用这样的谷粒。这两种饲料的用途都针对家畜，最好是非反刍动物。这样的家畜包括猪、家禽、猫、狗、马、绵羊等等。

5 当增加饮食的营养密度时，会最大化家畜性能。这包括家畜如绵羊、猪、家禽、狗、猫和马。这种谷粒主要对大多数单胃动物有效。为配制包含本发明的谷粒的饮食，需要用本发明的谷粒替代所述饮食中的黄马齿种玉米(或甚至是富含油的玉米)的步骤，其中本发明的谷粒比标准玉米含有更高水平的油和氨基酸。然而，本发明随
10 后的步骤需要将蛋白质调整至根据家畜需要的饮食的能量水平。例如，如果饮食是针对猪的，那么应该增加赖氨酸的比例。如果饮食是针对家禽的，那么应该增加甲硫氨酸的比例，以此类推。

 当使用本发明的饲料时，按照能量增加的水平，增加蛋白质的氨基酸组成，特别是增加了作为猪的生长限制性氨基酸的赖氨酸，
15 以保持能量对蛋白质的良好平衡。本发明本身增加了赖氨酸。在表 2 给出的一个例子中，其中一种玉米谷粒含有的油和氨基酸含量增加，赖氨酸比常规玉米谷粒增加 29%。如果本发明的谷粒中的限速氨基酸的增加是足够的，那么饮食可以不需要额外增加这种氨基酸。然而，假如所述谷粒并不以足够的量包含所有的必需氨基酸以使得饮食平衡，必须在饮食中加入这些必需氨基酸。
20

 下表包括了针对猪的标准饲料中使用的成分。在本发明中这些成分可以同样使用，但标准玉米和用标准玉米制造的玉米制品应该用本发明的谷粒或由本发明的谷粒制造的制品替代。饲料中最好不需要添加脂肪。此外鼓励使用低植酸豆类和其它蛋白源。这些例子
25 同本文的其它例子一样，是本发明用途的说明，并非意图限制所公开的发明的范围。

猪饮食中使用的典型成分的能量、脂肪、蛋白质			
成分	可代谢的能量 千卡/磅	蛋白质%	脂肪%
动物脂肪	3585		100
苜蓿	775	17	3.0
大麦	1380	11	1.8
血粉	1060	86.0	1.0
黄玉米	1555	8.0	3.25
玉米黄浆(ml)	1760	60.0	1.0
棉籽粉	1160	41.0	2.0
蒸馏干燥谷粒 w/可溶物	1515	27.0	8
鱼粉	1500	60.0	6.0
赖氨酸盐酸盐、石灰 石、磷酸二钙	1100	48.0	5.0
买罗高粱	1490	9.0	2.0
糖蜜	910	3.0	
燕麦	1243	12	3.0
脱脂奶粉	1630	33	1.0
大豆饼粕	1535	47.5	1.0
大豆(煮熟全脂)	1650	37	18.0
大豆油	3300		100.0
向日葵	1000	28.0	2.0
小麦	1500	13	3.0
乳清	1405	14	.5

就象在如 Adams, K. L.和 Jensen A. H. “在动物饲料的猪和母猪的

饮食中使用高脂肪玉米”，Science and Technology, 17 (1987) 201-212等论文中所清楚表明的，就是饲喂使用了高油玉米(不是本发明的富含油、蛋白质增加和低植酸的玉米)的更高能量饮食的公猪比饲喂 2号玉米大豆饮食的同样类型猪显示更好的饲料转化率，其中所述高油玉米根据家畜类型(即怀孕母猪、仔猪(starter pig)、肥育猪(finish-5ing pig))调整过能量:赖氨酸比例。使用于这种类型猪上的本发明提供的饮食不仅是卡路里密集的以因此增加饲料转化率，而且是低植酸的以允许饲喂家畜从所述谷粒吸收增加效率和增重所需的微量矿物质、氨基酸和常量矿物质。然而，象以前用高油玉米作的测试一样，10饲喂包含本发明的谷粒的饮食的猪将要求(如果有必要)来自富含油、蛋白质增加和低植酸的谷粒的营养增加与赖氨酸水平的增加相平衡。

营养平衡的猪饮食应该含有蛋白质、氨基酸(如赖氨酸、苏氨酸、色氨酸)和主要矿物质(如钙、磷、盐，以及维生素如 A、D、E、B₁₂、15核黄素、泛酸、烟酸、生物素)和微量矿物质(如铁、铜、锰、锌、碘、硒)。此外，饲料饮食常常包括饲料添加剂如调味剂，并可以加入下面的化学制剂：阿泊拉霉素、杆菌肽、金霉素、巴波霉素、卡巴氧、林可霉素、青霉素、泰乐菌素、威里霉素等等。

本文所述的饲料的另一种潜在用途(除了用作宠物食品和猪饲料20以外)是用作家禽饲料。家禽包括大多数已经驯化的禽，包括鸭、鹅、雉、火鸡和鸡。家禽的营养素需要量与猪的营养素需要量不同，但它们的饮食的基本成分非常相似。家禽利用饮食中的谷类谷粒和谷物副制品、脂肪和碳水化合物。家禽饮食中的最大部分由谷类谷粒组成。这些至少包括玉米、小麦、燕麦、买罗高粱、大麦。然而，25按照本发明，优选的主要谷粒成分是富含油、富含蛋白质和低植酸的玉米。本发明设想，在本发明的饲料中几乎不使用至不使用不是本发明谷粒或本发明谷粒制品的其它玉米。此外，本发明的饲料包括可以来自花生饼粉、大豆饼粕、棉籽粉、鱼副制品、血粉和家禽

副制品等等的蛋白质。本发明的饲料还可以包含矿物质和维生素，特别是以石灰石或牡蛎壳形式的钙和维生素 D₃、胆碱、甲萘醌、A、E、B₁₂，以及饲料添加剂如抗氧化剂、抗生素。象猪一样，家禽看起来也有一种特定的氨基酸，在缺乏时会降低饲喂饲料的家畜性能。

5 对家禽来说，限制性氨基酸是甲硫氨酸，而对猪来说，限制性氨基酸是赖氨酸。因此，在配制本发明的饲料时，必须增加甲硫氨酸和总蛋白的量，以与用 2 号谷物玉米配制的饮食中同样比例相比保持饮食中的所需蛋白质总能量比例。此外，本发明不仅提供营养密集的饲料，而且由于螯合剂植酸的减少而增加了微量矿物质的生物利用
10 率，导致应用本发明的家禽的饲料转化率提高。

虽然上面的说明包含许多特征，但这些不应当被解释为限制本发明的范围，而应当解释为仅提供本发明的几个现有最佳实施方案的说明。在这个范围内，各种其它实施方案和分枝是可能的。

15 题目为“Life cycle Swine Nutrition,” PM489 的 Iowa State University 推广办公室出版物(1996 年修订本)第 12、15 和 20 页显示了标准生产条件下针对母猪和公猪的多种饮食。后面的信息显示针对不同家畜生长阶段的猪饲料和家禽饲料在现有技术中是已知的。下面是针对给定发育阶段的猪的一种饮食的一个例子。

20 实施例 1

将具有适度以及瘦肉生长潜能并且具有下列重量的猪根据下面的发育阶段号进行划分。6-8 磅=阶段 1，8-13 磅=阶段 2，13-18 磅=阶段 3，18-26 磅=阶段 4，26-37 磅=阶段 5，37-51 磅=阶段 6，51-69 磅=阶段 7，69-91 磅=阶段 8，91-118 磅=阶段 9，118-150 磅=阶段 10，
25 150-188 磅=阶段 11，188-233 磅=阶段 12，233-283 磅=阶段 13。

本文所开发的猪饮食是针对处于阶段 6 的猪配制的。一只处于阶段 6 的猪对每一千磅饲料需要：648.4 磅玉米、320.0 磅大豆饼粕、8.50 磅除壳的(dehulled)石灰石、15.25 磅磷酸二钙、4.10 磅盐、1.65

磅微量矿物质预混料、0.75 磅脂溶性维生素预混料、0.65 磅维生素 B 预混料、0.50 磅生物素和叶酸预混料、0.20 磅胆碱预混料以及任何经过 FDA 批准的饲料添加剂。这种饲料按照本发明制造，在饲料中用本发明的玉米替代了 2 号玉米，并增加赖氨酸的水平来匹配饮食中增加的能量，以避免赖氨酸的缺乏限制家畜生长。如果将所述饲料制成颗粒，那么维生素应该增加约 20%。

玉米是动物饲料中使用的基本粮谷。玉米含有家畜所需的多种必需营养素。现代家畜由于具有极大的沉积相对于脂肪的瘦肉组织的遗传能力，因此对营养有极大的需求。在这种对脂肪的需求对营养有极大需求以及这种对增加营养的需求的同时，我们也看到了采食量的下降。在动物遗传学已经并且继续通过减少总机体脂肪改善畜体质量的同时，环境学家已经指出，我们的浓缩动物饲料作业正在污染地面并随后污染地下水。由于知道玉米是畜牧生产中使用的主要饲喂成分，本发明就是含有浓缩营养的玉米，并且家畜对这些营养具有更高的生物利用率。这样的营养包括蛋白质、能量、氨基酸和矿物质。主要矿物质磷是生长、健康和生产所必需的。由于玉米中的植酸含量，玉米中的磷仅有约 30%可被家畜利用。然而，本发明的营养密集的玉米具有更大的磷可利用性。

实施例 2

本试验确定了商业化的肉用鸡对低植酸突变黄马齿种玉米与对黄马齿种玉米相比的反应。

试验在 13 天的饲喂研究中使用商业化肉用鸡。基本饮食是基于 NRC(国立推荐委员会)的玉米饮食。处理是用低植酸杂种谷粒取代传统的黄马齿种玉米，所述低植酸杂种谷粒由 B73 lpal-R 与一种 Exseed 自交系 UU01-lpal-E (或者本文称为 UU01-E 或 UU01-py)的杂交获得，后者是黄马齿种玉米的低植酸突变体。

所有试验都在 Good Laboratory Practices 的指导下控制并以动物

的福利为最先考虑。饲料和水无限制地供应,在整个试验中都测量体重和采食量,用本领域内已知的方法测定磷的利用率。报道了畜体评价、总增重、饲料转化率、死亡率、发病率和采食量。预期的结果是低植酸黄马齿种玉米的磷利用率相对于黄马齿种玉米改善。

5 据信饮食中的本发明的谷粒将导致排泄出的磷减少。这会导致更少的污染。

在这项研究中,用平均起始体重为 73.7g 的 8 天大的 New Hampshire × Columbian 雄性小鸡比较本发明的低植酸黄马齿种玉米与传统玉米(黄凹)相比的磷的利用率。这个试验是一个 CRD; 7T
10 × 4R × 5C, 试验时间 13 天(7 种处理,重复 4 次,每种处理 5 只小鸡)。

基本饮食如下: 玉米淀粉/葡萄糖(比例 2:1)到 100%; 大豆饼粕 47.4%; 大豆油 5%; 石灰石 1.2%; 盐 0.35%; 维生素混合物(A、D₃、E、K、scotin、核黄素、泛酸、烟酸、氯化胆碱、叶酸、硫胺素、B₆、B₁₂) 0.35%; 矿物质混合物(铜、碘、铁、锰、硒、锌) 0.15%; 胆碱 60,
15 0.1%; DL-Met 0.25%; 黄霉素 0.05%。基本饮食含有 0.1%可利用的磷、0.63% Ca 和 23% CP。所有百分率都以重量为基础。

为这个试验设计的处理如下: 1: 基本饮食; 2: 基本饮食加 0.06% 来自磷酸钾(KH₂PO₄)的磷(无机磷); 3: 基本饮食加 0.12%来自磷酸钾(KH₂PO₄)的磷(无机磷); 4: 基本饮食加 20%传统玉米; 5: 基本饮食
20 加 40%传统玉米; 6: 基本饮食加 20%低植酸玉米; 7: 基本饮食加 40%低植酸玉米。

增重 - 8-20 天(g)							
	1	2	3	4	5	6	7
R1	227.8	269.8	291.2	209.2	249.4	253.2	283.0
R2	216.8*	267.6	295.4	224.0	258.8	249.4	273.0*
R3	237.0	285.6	294.4	229.8	259.6	244.2	255.0
R4	224.6	258.4	300.2	232.8	236.8	241.6	269.6
平均值	226.5 ^d	270.3 ^b	295.3 ^a	223.9 ^d	251.1 ^c	247.1 ^c	270.1 ^b
g/c/d	17.4	20.7	22.7	17.2	19.3	19.0	20.7
合并 SEM=4.6; LSD=13.5; *小鸡被去掉或死亡; g/c/d=克/小鸡/天							

采食量 - 8-20 天(g)							
	1	2	3	4	5	6	7
R1	346.4	383.2	417.8	317.0	354.2	358.8	367.8
R2	325.9*	397.6	428.4	332.2	368.6	350.6	365.6*
R3	353.0	415.4	414.6	337.6	371.0	338.4	355.6
R4	348.6	387.0	435.6	343.8	349.8	344.6	367.6
平均值	343.4 ^d	395.8 ^b	424.1 ^a	332.6 ^c	360.9 ^{cd}	348.1 ^{de}	364.1 ^c
g/c/d	26.4	30.4	32.6	25.5	27.7	26.7	28.0
合并 SEM=5.3; LSD=15.6; *小鸡被去掉或死亡							

增重/采食量 - 8-20 天(g)							
	1	2	3	4	5	6	7
R1	0.658	0.704	0.697	0.660	0.704	0.706	0.769
R2	0.665*	0.673	0.690	0.674	0.702	0.711	0.747*
R3	0.671	0.688	0.710	0.681	0.700	0.722	0.717
R4	0.644	0.668	0.689	0.677	0.677	0.701	0.733
平均值	0.659 ^c	0.683 ^{cd}	0.696 ^{bc}	0.673 ^{de}	0.695 ^{bc}	0.710 ^b	0.741 ^a
合并 SEM=0.006; LSD=0.020; *小鸡被去掉或死亡							

胫骨灰(%)							
	1	2	3	4	5	6	7
R1	30.7	35.8	37.1	29.4	34.2	31.5	36.5
R2	30.2*	33.9	38.5	29.0	31.7	28.9	34.9*
R3	28.1	33.3	36.9	28.4	32.5	31.1	34.1
R4	30.2	33.7	36.6	29.1	31.0	29.7	35.0
平均值	29.8 ^d	34.1 ^b	37.2 ^b	28.9 ^d	32.3 ^c	30.3 ^d	35.1 ^b
合并 SEM=0.5; LSD=1.5; *小鸡被去掉或死亡							

胫骨灰(g)							
	1	2	3	4	5	6	7
R1	0.242	0.318	0.427	0.215	0.262	0.283	0.338
R2	0.230*	0.312	0.418	0.232	0.296	0.250	0.345*
R3	0.239	0.327	0.394	0.233	0.270	0.253	0.327
R4	0.241	0.300	0.390	0.248	0.254	0.261	0.339
平均值	0.238 ^c	0.314 ^c	0.407 ^a	0.232 ^c	0.270 ^d	0.261 ^d	0.337 ^b
合并 SEM=0.006; LSD=0.019; *小鸡被去掉或死亡							

从上面结果得到的斜率和标准曲线分析表明，低植酸玉米含有
5 比传统玉米中多三倍的可利用磷。

实施例 3

产生这些优良、农学上健康并且高产的突变体的方法是一种称为诱变的已知方法。这个方法在 Maize Genetic Newsletter 45:146
10 Neuffer 的论文中概述。应该注意到 EMS 是一个突变方法。象所有突变方法一样，突变行为可能不利地影响农艺性状，特别是作物的产量。然而，开始的种质优于先前形成植酸突变体的种质。因此本发明的作物的全部农艺性状比轮回选择或回交的工业方法更容易保存或选择。按照 Neuffer (1974)所述的程序，通过用石蜡油中的甲磺酸
15 乙酯处理花粉，在自交系中诱导突变。在来自谷类各种作物基因型的多种自交系上进行这种处理。本实施例将集中在通过这个方法研

制出玉米低植酸突变体。这种诱变方法已经用于产生多种谷类突变体。

本发明方法的一般步骤包括用甲磺酸乙酯(下文称为“EMS”)处理自交系花粉(在这种情况下是玉米)。将自交系花粉置于油中的 EMS 中 45 分钟。使用一支画笔,将花粉刷在受体玉米穗的穗丝上。这形成了突变体-1(M1)种子。种植这样的种子,并自体受粉以产生突变体-2(M2)谷粒。检测得到的 M2 谷粒的低植酸表型。

实施例 4

HVPE 方法是针对低植酸突变体的一般检测方法(Raboy, Mydica 35: 383 (1990))。这种方法依赖于磷化合物的差别性迁移。在电泳分离所述化合物后,电泳图可以用于植酸相对于其它化合物的半定量评估。一种可替代的方法是筛选谷粒中较高水平的无机磷。例如可以研磨谷粒样品(通过 Wiley 磨的 2mm 筛孔),然后加入 15ml 0.4M HCl/0.7 Na₂SO₄ 中的 50mg 谷粒胚芽或 1g 胚乳。植酸作为铁盐沉淀下来。检测植酸铁沉淀中的磷以及总体 P。将植酸 P (mg)转化为植酸,转化因子为 3.5。

已经知道测定植酸的原理。在本研究所使用的方法中,5-磺基水杨酸和 FeCl₃ (Wade 试剂)的溶液形成粉红色的发色团。在这种溶液中,植酸结合铁,降低了粉红色的水平。对这种颜色损失的测量可以用作植酸水平的指示。由于空白不含有植酸,因此所有包含植酸的样品的读数都将是负数。然而,假如有太多的植酸,那么铁-植酸络合物可能作为乳白色物质沉淀下来。在这种情况下将不存在粉红色,但乳白色物质会吸收光并导致错误的高读数。因此一些目视观察是必要的。如果玉米品种含有高植酸水平,这可能需要使用玉米提取物的更小量的等分物(少于 25 微升)。

可以使用快速筛选方法,如下文所述的方法对假定的低植酸种子评分。在这种方法中,用一片单边剃刀恰好在黑色层(black layer)

之后将谷粒根冠切下来。切割应该在胚尖处或接近胚根尖处横切盾片。通常从每个穗选择 8 个有代表性的谷粒。将谷粒的切口表面向上置于表面覆盖了玻璃纸带(粘面向上)的微量培养板上。解剖至少 100 个家系后, 完成染色程序。

- 5 用重复移液管将一滴 10 微升的 Wade 试剂(如下所述)加在每个谷粒切口表面上, 进行染色。几分钟后, 由于来自盾片的植酸结合 Wade 试剂中的铁, 颜色消失。观察那些因粉红色比其它家系消失更慢而分离的家系(可能占总体的 5%)。用本文所述的定量方法再次分析这些更慢的家系。

- 10 如下定量植酸。在 Carver 手动泵压榨机的钢板上压碎单个谷粒(每个家系 7 到 10 粒)(当钢板的孔镶有甘氨酸纸并且以约 5000 磅的压力压榨时获得最好结果), 然后将谷粒置于 1.5ml 微量离心管中。加入 1ml 0.65N 盐酸并静置过夜。第二天, 通过倒置混合上述混合物并静置 5 分钟。将 15 微升上清液等分物加入盛有 100 微升缓冲液 A (如本文所述)的微量离心管并混合。由于种子中高水平的磷, 低植酸突变体呈现很浓的蓝色。通常在下一天再次测试突变体。将 216ml 12.1N HCl 加入 3784ml 水中, 制成 0.65N HCl 提取液。每日新鲜配制试剂 A, 其中包括 2 份(体积比)去离子水、1 份(体积比)抗坏血酸溶液、1 份(体积比)钼酸铵溶液和 1 份(体积比) H_2SO_4 溶液。将 25g $(\text{NH}_4)_6\text{MO}_7\text{O}_{24} \times 4\text{H}_2\text{O}$ 用水溶解为 1 升, 制成钼酸铵溶液。将 167ml 36N 硫酸加入 833ml 水中, 制成 H_2SO_4 溶液。将 100g L-抗坏血酸用水溶解为 1 升, 制成抗坏血酸溶液。冷藏下抗坏血酸溶液可以稳定约七周, 但在未冷藏时仅稳定约两小时。

使用本领域内已知的方法制备植酸标准品。

- 25 可以如下目视筛选玉米谷粒(M2)的游离磷酸。选择谷粒、标出表型并置于多孔压榨板上。使用水力压榨机在多孔压榨板上压碎谷粒。将压碎的谷粒转移到 1.5ml 微量离心管中。加入 0.5ml 试剂 A。反应 2 小时后, 加入试剂 B。盖上离心管并倒置混合。一小时后目视

评价反应物的蓝色，如果需要可以使用灯光箱，选出含有最高水平磷酸，即最蓝的样品。通常选择来自每个家系(穗)的最蓝的样品并为最终选择作比较。由 50ml DMSO 和 50ml 试剂 B 制备这个分析中的试剂 A。试剂 B 每日新鲜配制，由以下物质制备：60ml 蒸馏水；30ml 10%抗坏血酸溶液(用水溶解 10g 抗坏血酸至 100ml 总体积；将抗坏血酸溶液冷藏，稳定 1 周)；30ml 3.5% 钼酸铵溶液(2.5g $(\text{NH}_4)_6\text{MO}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 加水溶解为 100ml 总体积)；30ml 6N 硫酸溶液(170ml 水加 25ml 浓硫酸，用水调整至 200ml 总体积)。

如下定量测试植酸(红色测试)。在 Carver 手动泵压榨机的压榨钢板上压碎约 12 个成熟种子。当钢板的孔镶有称量纸时获得最好结果。将谷粒在 5000 到 10000 磅压力下压榨并转移至微量离心管。将 1ml 0.65N HCl 加入样品，放置过夜并在第二天通过倒置离心管混合。为进行分析，在微量滴定板的每个孔中，将 200 μl Wade-A 试剂(下面描述)与 10 μl 上面获得的玉米/HCl 汁提取物混合。记录颜色的任何变化，将保持红色的样品记为低植酸，因为植酸结合铁并使溶液变白。用一台分光光度计在 490nm 处测量，完成定量测定。本文使用的试剂 A 是通过将 25.4g 5-磺基水杨酸与 350ml $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (如果需要，用研钵和研杵研磨)加入 1.5L 去离子水中而制备。用 NaOH 调节 pH 至 3.05，用蒸馏水调节体积至 2L。这种试剂可以在冰箱中稳定约 1 个月。将 216ml HCl (12.1N)加入 3784ml 蒸馏水中，制备 0.65N HCl。

这些分析使得能够选择带有所需等位基因的所需玉米作物。其它检测磷的方法是已知的，并且可以用于选择作物。

然后繁殖含有所需植酸水平的种子。本发明使用了这个方法并选择出带有低植酸突变的多种自交系。这些包括具有良好配合力的几个低植酸自交系，这些自交系一起杂交以形成产生本发明的谷粒的杂种。因此，本发明研制的自交系来自硬茎 Lancaster 和另一种多用途杂合模式，以便当所述自交系与合适的杂合模式杂交时形成极好的杂种材料。还发现许多本发明研制的突变虽然植酸低，但并不

是与 lpa1-R 突变一样的突变体。此外，在标准种子发芽测试中筛选种子的发芽力。发现一些低植酸的突变体不能发芽，而其它的能够正常发芽。仅维持具有良好萌芽特性的种子。

图 1 显示了从 3 个这样的针对植酸含量筛选出的自交系获得的一些数据的例子。如频率分布曲线所标绘出的，很明显有几个样品含有很低的植酸含量(少于 0.5 单位(重量比))，而大部分样品含有较高的植酸含量。选择名为 UO95 系的系作为起始材料，因为它含有比一般水平更高的蛋白质和油水平。这个系产生了富含油、蛋白质增加并且能正常发芽的种子。UO95py 保持了这些特性，并且具有如上所述的低植酸水平。当与某些其它自交系杂交时，得到的杂种产生富含油、蛋白质增加并含有低植酸水平的谷粒。

下表显示了与野生型种子相比的依照本发明的突变玉米的植酸水平(mg/g 种子)。

种子号	野生型系	植酸	突变系	植酸	减少%
24	UU01	1.16	UU01-py	0.17	85.3
12	UO95	1.85	UO95-py	0.14	92.4
12	WD22	1.45	WD22-py	0.05	96.6

下面提供了依照本发明的自交系的一个例子。

自交系	蛋白质	油	植酸	植酸减少%
野生型				
UO95	13.4	606	1.85	
UU01	12.7	2.9	1.16	
B73	11.3	4.4	---	
WD22	---	---	1.45	
突变体				
UO95py	14.4	5.3	0.14	85.3
UU01py	12.2	3.1	0.17	92.4
B73lpa1-R	13.2	3.2	---	---
Wd22py	---	---	0.05	96.6

5 在一台 Dickey-John 反射近红外分光光度计上，通过 NIR 分析测定蛋白质和油含量。

通过在配方中用本发明的谷粒取代并象正常一样烘烤或加工，本发明的谷粒也可以用作制造玉米粉圆饼、玉米粉和玉米花中使用的玉米谷粒或玉米粉的替代来源。

10 为增加磨粉效率和可回收的淀粉含量，通过用本发明的谷粒取代，本发明的谷粒也可以用于玉米湿磨工业中的替代品。同时切实降低了作为谷类加工过程副制品的动物饲料的植酸含量。

* * * * *

15 本文所提及的参考资料的全部内容都通过引用完整地结合到本文中。

