

甜玉米果皮柔嫩度 QTL 定位

张士龙¹, 冯发强^{1,2}, 潘登¹, 黄君¹, 王国华¹, 杨瑞春¹, 李小琴^{1,2}

(1 华南农业大学农学院, 广东广州 510642;

2 华南农业大学, 亚热带农业生物资源保护与利用国家重点实验室, 广东广州 510642)

摘要:由组合 B15(不柔嫩) × B20(柔嫩)构建的 $F_{2,3}$ 家系群体(236 个家系)为作图群体, 构建了包含 89 个 SSR 标记的玉米遗传连锁图谱. 图谱的总长度为 1 317.2 cM, 相邻两标记间平均距离为 14.8 cM. 在 $F_{2,3}$ 家系群体中, 共检测到与甜玉米果皮嫩度性状相关的 QTL 4 个, 分别位于第 3、4、7 染色体上, 分别解释表型变异的 3.0%、1.1%、1.0% 和 6.0%, 且 4 个 QTL 加性效应均为负值, 表明均来自果皮柔嫩度较好的亲本, 具有降低果皮柔嫩度值, 改善果皮柔嫩度的作用.

关键词:甜玉米; 果皮柔嫩度; QTL 定位; SSR; 遗传图谱

中图分类号: S513

文献标志码: A

文章编号: 1001-411X(2012)04-0444-04

QTL Mapping for Pericarp Tenderness in Sweet Corn

ZHANG Shi-long¹, FENG Fa-qiang^{1,2}, PAN Den¹, HUANG Jun¹,
WANG Guo-hua¹, YANG Rui-chun¹, LI Xiao-qin^{1,2}

(1 College of Agriculture, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China;

2 State Key Laboratory for Conservation and Utilization of Subtropical Agro-bioresources,
South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

Abstract: The genetic linkage map was constructed with 89 SSR markers based on a maize population consisting of 236 F_2 individuals from B15 (not tender) × B20 (tender). The linkage map covering 1 317.2 cM on a total of ten chromosomes with an average interval length of 14.8 cM could be used to locate QTL. The population of 236 $F_{2,3}$ families were evaluated for pericarp tenderness. With the method of composite interval mapping, four QTLs associated with pericarp tenderness were identified on the 3rd, 4th, and 7th chromosomes, which explained 3.0%, 1.1%, 1.0% and 6.0% of phenotypic variance, respectively. The additive effects of 4 QTLs were all negative. The results revealed that all the QTLs had come from the parent with good pericarp tenderness, which could decrease pericarp tenderness and improve the tenderness of pericarp trait.

Key words: sweet maize; pericarp tenderness; QTL mapping; SSR; genetic linkage map

果皮柔嫩度是一个受多种因素影响的复合品质性状, 是衡量甜玉米品质的重要指标, 在品质育种中正被越来越多的育种家所重视^[1-3]. 然而, 甜玉米果皮柔嫩度的准确、快捷、客观的测定一直以来是一个悬而未决的难题, 因而有关该性状的遗传研究较少.

Huelsen^[4]认为, 果皮柔嫩度性状受多基因控制; Aza-nza 等^[5]用 88 个 RFLP 标记、3 个已克隆的基因和 2 个形态标记, 分别采用 Kramer Shear Test 装置和品尝法测定已煮熟的甜玉米鲜穗籽粒柔嫩度, 在 10 个连锁群上分别检测到 8 个与籽粒柔嫩度、4 个与感官柔

收稿日期: 2011-12-01

作者简介: 张士龙(1973—), 男, 博士, 现工作单位为湖北省农业科学院粮食作物研究所; 通信作者: 李小琴(1967—), 女, 教授, 博士, E-mail: xiaolinli2000@126.com

基金项目: 广东省科技计划项目(2009B020201006, 2007A020400002, 2006A20203003); 广东省农业厅育种攻关项目(粤农函[2008]25号)

嫩度相关的片断,但鲜见用 SSR 分子标记对甜玉米果皮柔嫩度性状进行 QTL 分析的报道.本研究以果实硬度计为测量果皮柔嫩度的工具,采用 SSR 标记对甜玉米果皮柔嫩度性状进行 QTL 分析,以期对甜玉米果皮柔嫩度的基因分离和克隆打下基础.

1 材料与方法

1.1 供试材料

以华南农业大学甜玉米课题组选育的二环系 B15 和 B20 普甜玉米自交系为试验材料.2 个材料均是经多代选择性状稳定的高代自交系. B15 果皮较不柔嫩、渣多、口感较差,而 B20 果皮较柔嫩、甜脆、渣少、口感较好.2007 年春在华南农业大学增城教学试验基地以 B15 为母本、B20 为父本,获得杂交组合 F_1 ;2007 年秋在华南农业大学增城教学试验基地种植 F_1 单株,自交获得 F_2 ;2008 年春在华南农业大学增城教学试验基地种植来自同一个果穗的 F_2 单株, F_2 单株自交最终获得 236 个 $F_{2,3}$ 家系.适时摘取分蘖盛期的父母本自交系、 F_1 、 F_2 植株的上部叶片保存于 $-80\text{ }^\circ\text{C}$ 超低温冰箱中.

2008 年秋在华南农业大学增城试验基地种植 B15、B20、 F_1 、 $F_{2,3}$ 家系共 239 个材料.8 月 26 日播种.采用完全随机区组设计,3 次重复,2 行区,行距 0.67 m,株距 0.33 m,每行种 10 株,施肥和田间管理与大田生产相同.在开花散粉期间,于每个小区中间随机选取 6~8 株长相一致的植株套袋自交授粉,记录授粉日期.

1.2 果皮柔嫩度的鉴定

在套袋自交授粉后第 18 天,用冰盒在田间取样.每个小区摘取 3 个大小一致的鲜苞,迅速作好标记放入取样冰盒带回实验室,立即用果实硬度计法测定果穗籽粒果皮柔嫩度.具体测定方法如下:取样后,剥开鲜穗苞叶,随机选取中部 12 个籽粒,用果实硬度计探头沿与籽粒顶部切线垂直的方向扎籽粒冠部,记录穿透果皮时果实硬度计的最大显示值,然后去掉 12 个显示值中的最大值、最小值,计算平均值即得所测材料的果皮柔嫩度值.柔嫩度值越大嫩度越差.每份材料测定 3 个鲜果穗(即 3 次重复).

1.3 QTL 作图及基因效应分析

采用 CTAB 法^[6]提取 F_2 单株的基因组 DNA,选用分布于玉米 10 个连锁群上的 300 对 SSR 引物进行 PCR 扩增^[7].SSR 引物序列来源于 Maize GDB (<http://www.agron.missouri.edu/query.html>),由 Sigma 公司合成,用 60 g/L 聚丙烯酰胺凝胶电泳检测 PCR 产物.使用 Mapmaker/EXP3.0b^[8] 和 QTLCartographer V2.0 软件^[9]进行连锁图谱构建和 QTL 位点扫描.参

照 Stuber 等^[10]的方法确定 QTL 的基因效应类型.

2 结果与分析

2.1 $F_{2,3}$ 家系果皮柔嫩度的方差分析

对 $F_{2,3}$ 家系群体就果皮柔嫩度进行单因素方差分析,结果列于表 1.表 1 结果显示,家系间的果皮柔嫩度差异达到极显著水平,这表明供试家系的果皮柔嫩度存在真实的遗传差异.

表 1 $F_{2,3}$ 家系果皮柔嫩度方差分析

Tab.1 Variance analysis of tenderness of pericarp of the $F_{2,3}$ families

差异源	SS	ν	MS	F	$F_{0.05}$	$F_{0.01}$
组间	303 462.00	235	1 291.33	13.36 **	1.22	1.322
组内	31 122.03	322	96.65			
总计	334 584.03	557				

2.2 $F_{2,3}$ 家系果皮柔嫩度性状的表现及其分离特征

亲本、 $F_{2,3}$ 家系果皮柔嫩度表型统计结果显示,两亲本间果皮柔嫩度差异较大,B15 亲本果皮柔嫩度值 188.75 g/mm^2 ,远高于 B20 亲本的 130.32 g/mm^2 . $F_{2,3}$ 家系在果皮柔嫩度性状上存在明显的双向超亲分离,变幅范围为 $90.49 \sim 216.59\text{ g/mm}^2$, $\bar{x} \pm SD$ 为 $151.90 \pm 23.45\text{ g/mm}$,变异系数为 15.44%,表明双亲均含有影响果皮柔嫩度性状的增效、减效基因.家系果皮柔嫩度性状次数分布(图 1)的偏度(0.17)和峰度(0.21)均小于 1,呈连续正态分布,表明果皮柔嫩度性状均是由微效多基因控制的数量性状.

2.3 F_2 群体遗传图谱的构建

去除 4 个严重偏分离的 SSR 标记,用 Mapmaker3.0b 对 F_2 的 95 个 SSR 分子标记进行连锁分析,有 6 个标记未被划入任何连锁群中,得到包含 89 个标记位点的遗传连锁图谱,覆盖 11 条连锁群,图谱的总长度为 1 317.2 cM,相邻两标记间的平均距离为 14.8 cM.除第 1 条染色体上的 2 个标记 umc2620、umc1797 单独成一个连锁群外,所有标记所属的染色体同已经发表的数据和 Maize GDB 中的结果基本一致^[11].图 2 列出了有 QTL 存在的第 3、4、7 染色体.

2.4 QTL 分析

以 $F_{2,3}$ 家系群体的果皮柔嫩度性状为指标在全基因组范围内共检测到 4 个 QTL,分别位于第 3、4、7、染色体上(图 2),分别位于 umc1495 ~ umc1683、umc1969 ~ umc2061、umc2635 ~ umc1407、bnlg1972 ~ umc1401 区间,与它们邻近的连锁标记分别为 umc1683、umc1969、umc1407 和 umc1401,可解释表型方差的 3.0%、1.1%、1.0% 和 6.0%,基因作用方

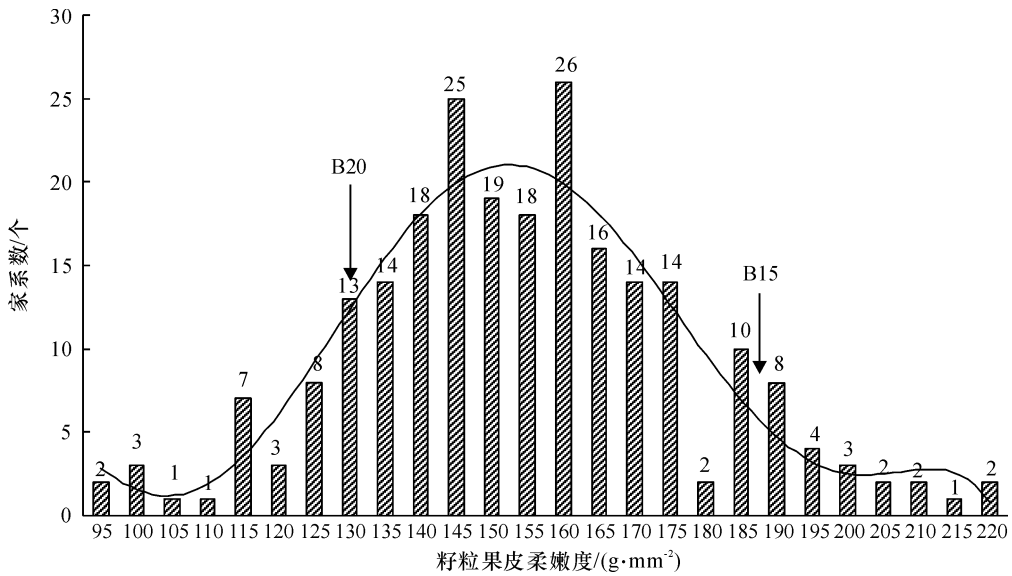


图1 F_{2,3}家系果皮柔嫩度性状频率分布图

Fig. 1 Frequency distribution of pericarp tenderness in the F_{2,3} families

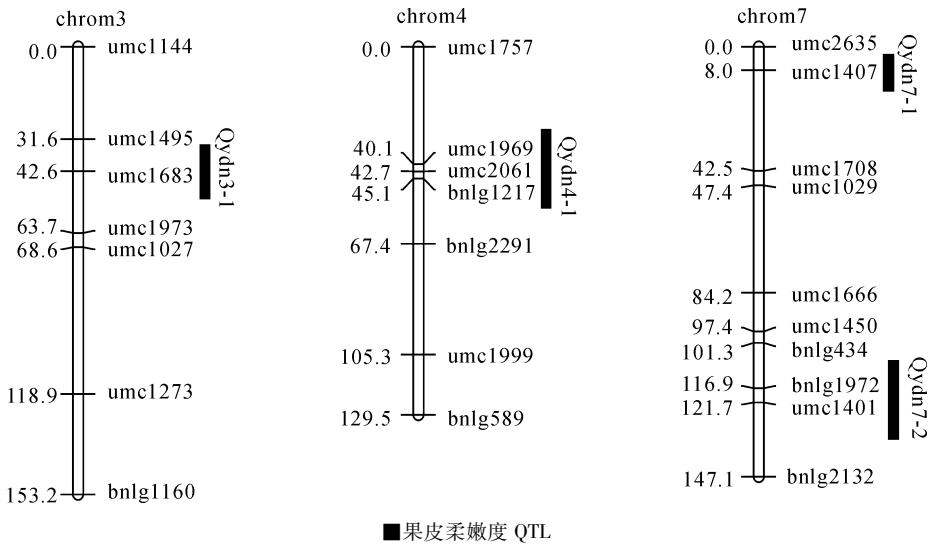


图2 利用来自 B15 × B20 的 236 个 F₂ 构建的第 3、4、7 染色体图

Fig. 2 The 3rd, 4th, 7th linkage groups constructed with 236 F₂ individuals from B15 × B20

式为加性和超显性(表2). 4 个 QTL 共解释表型变异的 11.1%. 由于所检测到的 4 个 QTL 的加性效应为负值,说明这 4 个 QTL 均来源于果皮柔嫩度较好的亲本 B20,具有改善果皮柔嫩度的作用.

表2 甜玉米果皮柔嫩度的 QTL 定位结果

Tab. 2 Mapping results of QTLs associated with pericarp tenderness of sweet corn

QTL	标记区间	位置/ cM	LOD	加性 效应	显性 效应	贡献率 (R ²)/%	作用 方式
Qydn3-1	umc1495 ~ umc1683	37.5	2.35	-7.25	1.11	3.0	加性
Qydn4-1	umc1969 ~ umc2061	40.1	3.44	-0.22	10.09	1.1	超显性
Qydn7-1	umc2635 ~ umc1407	7.8	2.13	-3.11	9.66	1.0	超显性
Qydn7-2	bnlg1972 ~ umc1401	121.7	3.45	-10.25	-0.51	6.0	加性

3 讨论与结论

3.1 减小误差,提高 QTL 定位的准确性

数量性状基因定位的准确性依赖于数量性状考察的准确性. 影响数量性状考察准确性的因素一般有 2 个:一是环境. 环境误差影响 QTL 定位的准确性是一个普遍现象, Paterson 等^[12] 和 Lu 等^[13] 研究表明,一个群体在不同的环境下,检测到的 QTL 数量及其效应都有很大差异;邢永忠等^[14] 研究发现,遗传力不同的数量性状,其 QTL 与环境互作程度不同. 甜玉米果皮柔嫩度易受地力、天气和收获时间的影响,因此降低环境误差是降低整个试验误差的开端步骤. 为此,本研究在试验过程中采取了以下措施:1) 选取地力均一的田块. 地力不均匀可导致甜玉米植株生

长发育程度不一致,各植株开花散粉期不集中,自交授粉时间相隔过长,果穗籽粒在相同的生长发育时间段内所经历的天气有较大变化,造成环境对不同植株果穗籽粒生长发育的影响不同而产生较大误差。因此最大限度地保证地力和田间环境的一致性,最大限度地保证家系自交授粉后籽粒在相同的生长发育时间段内环境的一致。

二是表型鉴定的方法。表型鉴定的准确性是影响 QTL 定位准确性的关键因素之一。甜玉米果皮柔嫩度是受多种因素影响的多套遗传体系的复合性状,目前还没有一种对其进行客观、准确、快捷鉴定的权威方法。为使表型鉴定结果准确可靠,本试验首先是在取样时注意选取该家系的典型果穗,确保材料具有代表性;其次采用果实硬度计对果皮柔嫩度进行鉴定,克服了品尝法结果因人而异的缺点,确保表型鉴定结果的客观性;最后在用果实硬度计测定果皮柔嫩度过程中严格按照果实硬度计的使用说明规范操作,并且整个表型鉴定过程均由固定的人测量和读数,确保表型鉴定结果的可靠性。上述措施能在最大程度上降低误差,确保表型鉴定结果的准确可靠。

3.2 遗传图谱的构建

本研究以 F_2 分离群体构建玉米遗传图谱,结果构建的图谱拟合了 89 个微卫星位点,标记间平均图距为 14.8 cM。但有些标记之间距离较大,如第 3 染色体上的 umc1027 ~ umc1273 区间、第 4 染色体上的 umc1757 ~ umc1969 区间等,对此可以通过增加其他标记解决问题。Yano 等^[15]研究发现,标记间隔在 5 ~ 21 cM 范围内对所检测 QTL 的位置与效应没有显著差异,增加标记数目对于新发现 QTL 的能力比较有限。另外,何小红等^[16]研究发现,只要标记距离不超过 50 cM,一旦 QTL 被检测到,其位置和效应的估计比较准确,而且适当大的标记间距(如 15 cM)有利于 QTL 的检测,过大或过小对 QTL 的检测均不利。因此本试验构建的图谱可用于 QTL 定位。

本研究利用果皮柔嫩度性状分离明显的 F_2 群体,采用果实硬度计作为鉴定表型的工具,共定位出了 4 个与果皮柔嫩度有关的 QTL。不过,本研究仅限于一年一点的探讨,以后还需继续进行不同年份、不同地点、不同组合、不同世代、不同群体的研究,以尽可能消除环境及遗传背景的影响,找出在不同环境和不同遗传背景下都存在的主效 QTL,为进一步的分子标记辅助选择创造条件。

参考文献:

[1] ITO G M, BREWBAKER J L. Genetic advance through

mass selection for tenderness in sweet corn[J]. Amer Soc Hort Sci, 1981, 106(4):496-499.

- [2] TRACY W F, GALINAT W C. Thickness and cell layer number of the pericarp of sweet corn and some of its relatives [J]. Hort Sci, 1987, 22(4):645-647.
- [3] TRACY W F, JUVIK J A. Pericarp thickness of a sh_2 population of maize selected for improved field emergence [J]. Crop Sci, 1989, 29(1):72-74.
- [4] HUELSEN W A. Sweet corn[M]. New York: Inter Sci Publishers Inc, 1954:83-86.
- [5] AZANZA F, TADMOR Y, KLEIN B P, et al. Quantitative trait loci influencing chemical and sensory characteristics of eating quality in sweet corn[J]. Genome, 1996, 39:40-50.
- [6] CIMMYT. Applied molecular genetics laboratory protocol [M]. Mexico: CIMMYT, 1998.
- [7] 魏昕, 荣廷昭, 潘光堂. 墨白 964 群体 5 轮混合选择遗传变异的分子生物学研究[J]. 中国农业科学, 2006, 39(2): 237-245.
- [8] LINCOLN S E, DALY M J, LANDER E S. Constructing genetics linkage maps with MAPMAKER/EXP Version3. 0b[EB/OL]. [2008-08-10]. http://www.umanitoba.ca/afs/plant_Science/psgendb/doc/mapmaker_tutorial.pdf.
- [9] WANG S, BASTEN C J, ZENG Z B. WindowsQTLCartographer2. 0. Raleigh [EB/OL]. [2008-08-10]. <http://statgen.ncsu.edu/qtlcart/WQTLCart.htm>.
- [10] STUBER C W, EDWARDS M D, WENDEL J F. Molecular marker-facilitated investigation of quantitative trait loci in maize: II: Factors influencing yield and its component traits[J]. Crop Sci, 1987, 27(4): 639-648.
- [11] SCHAEFFER M L, HARPER L C, GARDINER J M, et al. Maize Genetics and Genomics Database [EB/OL]. [2008-08-10]. <http://www.maizegdb.org/>.
- [12] PATERSON A H, DAMON S, HEWITT J D, et al. Mendelian factors underlying quantitative traits in tomato: Comparison across species, generations and environments[J]. Genetics, 1991, 127: 181-197.
- [13] LU Chao-fu, SHEN Li-shuang, HE Ping, et al. Comparative mapping of QTLs for agronomic traits of rice across environments using a doubled haploid population [J]. Thero Appl Genet, 1996, 93: 1211-1217.
- [14] 邢永忠, 徐才国, 华金平, 等. 水稻穗部性状的 QTL 定位与环境互作分析[J]. 遗传学报, 2001, 28(5): 439-446.
- [15] YANO M, HARUSHIMA Y, NAGAMURA Y, et al. Identification of quantitative trait loci controlling heading date in rice using a high-density linkage map[J]. Theor Appl Genet, 1997, 95:1025-1032.
- [16] 何小红, 徐辰武, 蒯剑敏, 等. 数量性状基因作图精度的主要影响因子[J]. 作物学报, 2001, 27(4): 469-475.

【责任编辑 周志红】