DOI: 10.3724/SP.J.1006.2012.00275

玉米籽粒中花色苷和黑色素含量的 QTL 分析

覃鸿妮 晏 萌 王召辉 郭 莹 王 辉 孙海燕 刘志斋 蔡一林*

西南大学玉米研究所 / 农业部生物技术与作物品质改良重点实验室, 重庆 400716

摘 要: 花色苷和黑色素是黑玉米籽粒中重要而有益的化学成分, 深入开展其 QTL 定位研究, 对于色素相关基因的克隆与转化和分子标记辅助育种, 具有重要的理论意义和应用价值。本文利用 1 个黑玉米自交系 SDM 为共同父本, 分别与白玉米自交系木 6 和黄玉米自交系 Mo17 杂交, 构建 2 个相关 $F_{2:3}$ 群体(分别缩写为 WD 和 YD), 对玉米籽粒中花色苷含量和黑色素含量进行 QTL 分析。结果表明, 黑玉米 SDM 籽粒中的花色苷和黑色素含量均极显著高于木 6 和 Mo17, 2 种色素含量间呈极显著正相关。2 个群体中共检测到 17 个色素相关的 QTL, 其中与花色苷含量相关的 QTL 在 2 个群体中各 4 个, 分布在第 4、第 6、第 7 和第 10 染色体上, 与黑色素含量相关的 QTL 在 WD 和 YD 群体中分别为 4 个和 5 个, 分布在第 1、第 2、第 6、第 7 和第 10 染色体上。2 个群体检测到 QTL 的数量、分布和对表型的贡献率均高度一致, 而且解释花色苷含量和黑色素含量变异大的 QTL 在 2 个群体中均有成簇分布的现象, 主要表现在 bin 6.04 处的标记区间 umc1796–mmc2006 内和 bin 10.04 处的标记区间 umc2043–bnlg1028 内, 分别解释表型变异的 12.7%~21.3% 和 8.6%~21.3%。它们可能是一因多效的同一 QTL 或者是在该区段内紧密连锁的不同 QTL。上位性分析表明, 2 个群体中检测到的上位性 QTL 的数量、位置和对表型的贡献率差别均较大, WD 群体的上位性效应明显大于 YD 群体, 说明上位性效应对遗传背景更加敏感, 需要进一步深入研究贡献率大的上位性 QTL 及其利用。

关键词: 玉米籽粒; 花色苷; 黑色素; QTL 分析

QTL Mapping for Anthocyanin and Melanin Contents in Maize Kernel

QIN Hong-Ni, YAN Meng, WANG Zhao-Hui, GUO Ying, WANG Hui, SUN Hai-Yan, LIU Zhi-Zhai, and CAI Yi-Lin*

Maize Research Institute, Southwest University / Key Laboratory of Biotechnology and Crop Quality Improvement, Ministry of Agriculture, Chongqing 400716, China

Abstract: Anthocyanin and melanin are important and beneficial chemical components in black maize kernel. It is important to comprehensively study the QTL mapping for anthocyanin and melanin, cloning and transfer of pigmentation-related genes and marker assisted breeding. In this study, two related $F_{2:3}$ populations derived from crosses of Mu6×SDM (WD) and Mo17×SDM (YD) were used to identify QTLs for anthocyanin and melanin contents in maize kernels. The results showed that the phenotype and QTL identification of two populations were highly consistent. The anthocyanin and melanin contents of SDM were significantly higher than those of Mu 6 and Mo17. The positive correlation between the two pigment contents in kernel was highly significant. A total of seventeen QTLs were identified, including eight QTLs for ACK and nine QTLs for MCK. For ACK, four QTLs were both detected in two populations, which were distributed on chromosomes 4, 6, 7, and 10. For MCK, four and five QTLs were identified in WD and YD populations, respectively, which were distributed on chromosomes 1, 2, 6, 7, and 10. The number, distribution and effects of QTLs in two populations were highly consistent, and the major QTLs of ACK and MCK in two populations were both clustered, which were detected in the intervals of umc1796–mmc2006 (bin 6.04) and umc2043–bnlg1028 (bins

本研究由重庆市重大科技专项(CSTC2010AA1022), 中央高校基本科研业务费专项(XDJK2009C122), 国家大学生创新性实验计划项目(091063510)和重庆市主要农作物种质资源共享平台建设项目(CSTC2010AA1033)资助。

* 通讯作者(Corresponding author): 蔡一林, E-mail: caiyilin1789@yahoo.com.cn, Tel: 023-68250447

第一作者联系方式: E-mail: qhn224@126.com, Tel: 13594180038

Received(收稿日期): 2011-04-14; Accepted(接受日期): 2011-09-10; Published online(网络出版日期): 2011-11-07.

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.1809.S.20111107.1048.012.html>

10.04) and explained 12.7–21.3% and 8.6–21.3% of phenotype variation, respectively. These QTLs which were stable in different genetic backgrounds might be closely linked to each other, or a same pleiotropic QTL which could be used in fine mapping and cloning of pigmentation-related genes in maize. The result of epistatic analysis indicated that the number, position and effects of epistatic QTLs between two populations were much different, and epistatic effects were more obvious for WD than for YD. Some epistatic QTL pairs explaining more than 10% variation of phenotype play an important role in pigment production and should be further studied.

Keywords: Maize kernel; Anthocyanin; Melanin; QTL mapping

玉米籽粒中色素的成分和含量与玉米营养品质密切相关。不同颜色的玉米中所含的色素成分不同^[1], 普通黄玉米主要是类胡萝卜素, 而黑玉米主要是花色苷和黑色素。花色苷属于酚类色素, 赋予植物鲜艳的颜色以利于授粉和种子传播、抵抗植物虫害等^[2]。植物中所含的黑色素主要为异黑色素, 呈棕色或黑色, 是花色苷等酚类物质经过氧化和多聚化生成的不溶于酸、微溶于水、溶于碱的高分子量色素^[3-4]。黑色素作为一种保护性色素, 强化了生物机体对环境胁迫的耐受力^[5], 更为重要的是花色苷和黑色素对人体具有许多生理保健功能^[4, 6]。因此, 黑玉米中的主要色素既可作为天然食用色素, 又可作为抗氧化剂用于医药、保健品和化妆品, 具有广阔的应用前景。

早期有关玉米色素的研究与易于观察的色泽变异紧密结合, 早在 1900 年以前, 玉米红色和蓝色籽粒的分离现象就引起植物学家的重视, 随后通过大量杂交试验, 研究了玉米的色泽变异与基因位点^[7-12]。Emerson^[7]选择几种彩色玉米对其遗传进行了研究, 基于完全连锁理论, 认为玉米籽粒不同色泽之间并非独立遗传。Hayes^[8]认为玉米种皮的颜色受一系列复等位基因控制, 而非 2 个或者更多的紧密连锁基因控制。Anderson^[9]研究发现, 某些有关玉米种皮颜色的基因在遗传上是等位基因或紧密连锁, 有大量的基因参与性状的表达。Rhoades^[12]研究基因剂量效应对玉米糊粉层颜色的影响, 指出影响玉米糊粉层颜色的 4 个基因 *A1*、*C*、*R* 和 *A2* 必须至少各有一个显性基因, 才能使糊粉层显颜色。崔丽娜等^[1]通过徒手切片和分光光度法, 研究玉米籽粒色泽的组成、分布和积累规律表明, 不同颜色的玉米其色素组成和分布均不同; 其中 2 个黑玉米材料紫糯香和西星黑糯 1 号的籽粒色素成分主要是花色苷, 且主要存在于糊粉层中。随着分子标记技术的应用, 玉米色素相关基因的定位也取得了进展。Sourdille 等^[13]对含 392 单株的 F_2 群体的叶缘、主茎、颖片和花丝等颜色基因的 QTL 定位, 检测到 8 个位点, 分别位于第 2、第 3、第 4、第 5、第 7、第 9、第 10

染色体, 其中第 2 和第 10 染色体上的 QTL 对表型的贡献率最大。Brown 等^[14]利用 IL731AW×6786W 的 $F_{2:3}$ 群体, 通过 RFLP 标记, 对控制玉米叶片、果皮、茎秆等颜色的基因进行 QTL 定位, 通过 2 年的表型鉴定, 检测到 2 个与花色苷含量相关的 QTL, 位于第 10 和第 5 染色体, 分别解释表型变异的 18.8% 和 7.1%。孙玲凌等^[15]利用自交系 K12 和琼 68 的 F_2 和 BC_1 群体对玉米红花丝进行遗传分析, 发现 K12 的红花丝由 1 对显性基因控制, 利用数量性状和质量性状结合的基因定位方法, 将该基因定位在第 10 染色体上, 与 SSR 标记 umc1576 之间的遗传距离为 3.0 cM。Lee 等^[16]用 2 个白玉米自交系(其中一个自交系籽粒上有紫色条纹)构建了 $F_{2:3}$ 群体, 采用 58 个 SSR 标记, 2 年重复检测到 1 个控制白玉米籽粒上紫色条纹的 QTL, 位于第 6 染色体, 其最近标记为 umc1979, 从而推测控制 PKS 的基因就是与这个位点紧密相连的 *pl1* 基因。

到目前为止, 前人对玉米色泽相关性状的 QTL 研究较零散, 找到的 QTL 较少, 且定位区间大。前人所有的色泽相关 QTL 研究, 其表型的鉴定均是通过颜色深浅分等级评估色素含量, 颜色越深代表花色苷含量越多, 没有针对某种色素测定其具体含量, 而黑(紫)玉米中色素相关性状是非常复杂的, 肉眼观察到的颜色深浅并不能代表某种色素含量的多少。因此有关黑玉米中色素含量的 QTL 还需进一步深入研究。本试验组配 2 个 $F_{2:3}$ 群体, 相关色素的含量经实验室定量测定, 对控制黑玉米籽粒中花色苷和黑色素含量的基因进行 QTL 定位, 为玉米中色素相关基础研究提供参考, 为玉米中色素的分子标记辅助育种及玉米色素相关基因的克隆与转化提供了依据。

1 材料与方法

1.1 材料

以西南大学玉米研究所新培育的全黑玉米自交系 SDM 为共同父本, 分别与白玉米自交系木 6 和黄玉米自交系 Mo17 杂交, 构建 2 个各含 189 个家系的

$F_{2:3}$ 群体, 作为目标性状定位的基础群体, 分别以缩写“WD”和“YD”代表“木 6×SDM”和“Mo17×SDM”的 $F_{2:3}$ 群体。SDM 全籽粒墨黑, 穗轴为深紫色(图 1)。Mo17 是玉米育种的骨干亲本, 籽粒颜色为黄色。木 6 是中国西南地区广泛应用的一个玉米自交系, 其籽粒为白色。

图 1 SDM 的果穗、籽粒和穗轴

Fig. 1 Ear, kernel, and cob of SDM inbred line

A、B、C 分别为 SDM 的果穗、籽粒和穗轴。

A, B, C is the ear, kernel, and cob of SDM, respectively.

1.2 方法

1.2.1 田间试验 2008 年春在重庆北碚获得 F_1 种子, 2008 年冬在海南利用 F_1 套袋自交产生 F_2 种子, 2009 年春在重庆北碚利用 F_2 套袋自交产生 $F_{2:3}$ 种子。2010 年春在重庆北碚种植 $F_{2:3}$ 家系, 采用田间完全随机区组设计, 重复 2 次, 每小区种 20 株, 种植密度为 45 000 株 hm^{-2} , 套袋自交, 成熟收获晒干后脱粒, 测定全部 20 株果穗籽粒的花色苷和黑色素含量, 取其 2 个重复的平均值供 QTL 分析。

1.2.2 花色苷含量的测定 用蒸馏水浸泡干籽粒 24 h, 剥离白色/黄色胚乳, 将剩下的紫黑色部分 55℃ 恒温烘干即为待测样品。采用 pH 示差法测定样品中的花色苷含量^[17-18]。称取 0.1 g 样品, 加 5 mL 5% 盐酸甲醇溶液, 于 50℃ 恒温水浴 1 h, 10 000×g 离心 5 min, 对残渣重复提取 2 次, 合并 3 次上清液, 定容至 15 mL, 将该色素溶液在 200~800 nm 扫描, 确定花色苷的最大吸收波长, 于花色苷最大波长处 (507 nm) 测定吸光度。吸取 2 mL 样品液, 分别用 pH 1.0 [0.2 mol L^{-1} KCl : 0.2 mol L^{-1} HCl = 25 : 67, V/V]

和 pH 4.5 [0.2 mol L^{-1} NaAc·3H₂O : 0.2 mol L^{-1} HAc = 1 : 1, V/V] 的缓冲液稀释至 10 mL 并混匀, 以 2 mL 溶剂加 8 mL 相应缓冲液作空白, 分别在 507 nm 和 700 nm 测吸光值。

$$\text{MF} = \frac{A \times V \times N \times M}{\varepsilon \times m}$$

式中, MF 为花色苷质量分数 (mg g^{-1}); $A = (A_{\text{max}} - A_{700})_{\text{pH}1.0} - 0.1(A_{\text{max}} - A_{700})_{\text{pH}4.5}$; V 为定容体积 (mL); N 为稀释倍数; M 和 ε 分别为 Cyanidin-3-glucoside 的分子量 (449) 和消光系数 (29 600); m 为样品质量 (g)。

1.2.3 黑色素含量的测定 参照曲存民等^[19]的方法将提取过花色苷的残渣加入 5 mL 2% NaOH, 置 70℃ 水浴加热提取 1 h, 于 10 000×g 离心 5 min, 收集上清液于 25 mL 离心管中。取残渣按上述方法再提取 2 次, 合并 3 次上清液, 然后用 2% NaOH 溶液定容至 25 mL, 再吸取 2 mL 上清液用 2% NaOH 溶液稀释至 10 mL。在 290 nm 处测定吸光值, 以 $A_{290 \text{ nm}} \text{ g}^{-1}$ 干重表示黑色素含量。

1.2.4 遗传连锁图谱的构建 在植株长至 5 片叶左右时, 取 F_2 单株及亲本的嫩叶, 用 CTAB 法^[20]提取 DNA。参照 <http://www.maizegdb.org/> 上的相关信息, 选取覆盖玉米全基因组的 SSR 标记进行多态性引物的筛选, 分别利用筛选出的 SSR 标记并采用 JoinMap Version 3.0 软件^[21]构建“WD”和“YD”的遗传连锁图谱。

1.2.5 QTL 分析 基于完备区间作图方法 (inclusive composite interval mapping, ICIM) 的 QTL Ici-mapping 3.0 软件^[22]进行 QTL 定位和上位性分析。对 QTL 检测, 选用 1 cM 的步长 (walking speed), 选取参数 1 000 次回归, 显著水平 0.05, 丢失数据以删除处理。对上位性效应的检测, 采用 ICIM-EPI 的方法进行全基因组上位性扫描, 步长为 5 cM, 作 1 000 次回归, LOD 阈值采用手动设定为 5.0, 丢失数据也以删除处理。使用 Map Chart Vision 2.2 绘图。按 Stuber 等^[23]标准判定基因作用方式, 当显性效应值与加性效应值比值的绝对值为 0~0.20 时认为是加性 (additive, A), 0.21~0.80 为部分显性 (partial dominance, PD), 0.81~1.20 为显性 (dominance, D), 大于 1.20 为超显性 (over dominance, OD)。QTL 命名方法: 以 MCK-1a 为例, MCK 表示玉米籽粒中黑色素含量, 短线后的数字 1 表示第 1 染色体, a 表示在该染色体上定位的黑色素含量 QTL 的序号。

2 结果与分析

2.1 亲本及 F_{2:3} 家系籽粒中 2 种色素含量的表型分析

表 1 表明, 黑玉米 SDM 籽粒中的花色苷和黑色素含量均极显著高于木 6 和 Mo17 ($P < 0.01$)。F_{2:3} 群体籽粒中的花色苷和黑色素含量表现为连续分布

(图 2), 说明 2 种色素含量是数量性状, 适合作 QTL 检测。花色苷含量的峰度和偏度系数均较大, 黑色素含量峰度较大(表 1), 表明这 2 种色素含量不是典型的正态分布, 存在控制 2 种色素含量的主效基因。相关分析结果表明, 玉米籽粒中花色苷含量和黑色素含量在 2 个群体中均呈极显著正相关, 在 WD 和 YD 群体中的相关系数分别为 0.616 和 0.427。

表 1 亲本及 2 个 F_{2:3} 群体的表型分析
Table 1 Analysis of phenotypic values of the parents and F_{2:3} families in two populations

性状 Trait	群体 Population	亲本 Parental lines				F _{2:3} 群体 F _{2:3} population				
		SDM	木 6 Mu 6	Mo17	<i>t</i> 值 <i>t</i> -value	平均值 Mean	范围 Range	标准差 Standard deviation	偏度 Skewness	峰度 Kurtosis
ACK (mg g ⁻¹)	WD	5.20	0.24	—	42.7**	1.94	0–9.76	1.92	1.37	1.99
	YD	5.20	—	0.14	43.7**	3.16	0–9.85	3.36	1.26	1.47
MCK (A _{290nm} g ⁻¹)	WD	7.90	2.19	—	38.2**	4.49	1.85–7.69	1.38	0.13	–0.70
	YD	7.90	—	2.44	41.9**	4.25	0.30–7.83	1.42	0.52	0.87

** 表示在 0.01 水平差异显著; ACK: 籽粒中花色苷含量; MCK: 籽粒中黑色素含量; WD: 木 6 和 SDM 杂交获得的 F_{2:3} 群体; YD: Mo17 和 SDM 杂交获得的 F_{2:3} 群体。
** indicates significance at $P < 0.01$, ACK: anthocyanin content of kernel; MCK: melanin content of kernel; WD: F_{2:3} population derived from cross of Mu6×SDM (WD); YD: F_{2:3} population derived from cross of Mo17×SDM.

图 2 2 个 F_{2:3} 群体籽粒中花色苷和黑色素含量的频率分布
Fig. 2 Frequency distribution of anthocyanin and melanin contents in kernel of F_{2:3} families

2.2 遗传连锁图谱的构建

对于 WD 群体, 从 1 000 对覆盖玉米全基因组的 SSR 引物中筛选出 150 对多态性引物进行连锁分析, 构建了含 124 个标记位点的玉米基因组的 10 个连锁群(图 3), 总的遗传距离为 1 085.8 cM, 标记间的平均距离为 8.7 cM。每个连锁群含有 7~18 个 SSR 标记, 平均为 12.4 个。大部分标记与标准图谱 IBM2 2008 Neighbors Frame6 上的位置较一致, 极少数标记的位置不一致, 其中标准图谱上位于第 6、第 8 和第 9 染色体上的 3 个标记 umc1833、mmc0001 和 bnlg1131 在本连锁图谱上分别位于第 1、第 3 和第 8 染色体。

对于 YD 群体, 从 1 000 对覆盖玉米全基因组的 SSR 引物中筛选出 182 对 SSR 多态性引物进行连锁分析, 构建了含 145 个标记位点的玉米基因组的 11 个连锁群, 其中第 7 染色体被分成了 2 个连锁群(图 4)。连锁群全长 1 023.4 cM, 标记间平均距离为 7.1 cM。每个连锁群包括 8~22 个 SSR 标记, 平均为 13.2 个。与标准图谱比较, 标记 umc1386a 和 bnlg1191 在标准图谱上分别位于第 3 和第 9 染色体, 而在本连锁图谱上分别位于第 1 和第 8 染色体。

2.3 色素相关性状的 QTL 检测

2.3.1 玉米籽粒中花色苷含量的 QTL 检测 WD 群体和 YD 群体中各检测到 4 个控制玉米籽粒中花

色苷含量的 QTL，增效基因均来自父本 SDM。从 WD 中检测到的 QTL 位于第 6、第 7 和第 10 染色体上(图 3 和表 2)，其中位于第 6 和第 10 染色体上的 2 个 QTL ACK-6a 和 ACK-10b 的贡献率最大，分别解释表型变异的 21.3%和 12.5%，基因作用方式分别为加性和部分显性，分别位于标记区间 umc1857–umc1979 和 umc1477–umc2043，2 标记间的距离分别为 1.7 cM 和 8.9 cM。从 YD 中检测到的 QTL 位于第 4、第 6 和第 10 染色体上(图 4 和表 3)，其中位于第

6 和第 10 染色体上的 2 个 QTL ACK-6b 和 ACK-10c 贡献率最大，分别解释表型变异的 20.0%和 16.9%，基因作用方式分别为部分显性和加性，分别位于标记区间 mmc0523–umc2006 和 bnlg1028–IDP7852，2 个标记间的距离分别为 3.9 cM 和 8.8 cM。

2.3.2 玉米籽粒中黑色素含量的 QTL 检测 2 个群体中共检测到 9 个控制玉米籽粒中黑色素含量的 QTL，增效基因均来自父本 SDM。从 WD 群体中检测到 4 个 QTL，位于第 1、第 6 和第 10 染色体上(图

表 2 WD 群体中检测到的 QTL
Table 2 QTLs identified in the WD population

QTL	位点 Bins	位置 Position	标记区间 Marker interval	LOD	加性效应 A	显性效应 D	基因作用方式 Gene action	贡献率 Phenotypic variance explained (%)
籽粒中花色苷含量 Anthocyanin content of kernel								
ACK-6a	6.04	76	umc1857–umc1979	13.16	−1.22	0.23	A	21.30
ACK-7a	7.02	31	umc1409–bnlg2259	3.26	−0.53	−0.80	OD	8.13
ACK-10a	10.07	9	umc2021–umc1196a	4.18	−0.66	−0.12	A	6.45
ACK-10b	10.04	47	umc1477–umc2043	7.98	−0.82	0.55	PD	12.56
籽粒中黑色素含量 Melanin content of kernel								
MCK-1a	1.02	0	umc1166–bnlg1007	3.17	−0.39	0.10	PD	4.00
MCK-1b	1.04	58	bnlg1429–umc2217	9.29	−0.62	−0.01	A	12.97
MCK-6a	6.04	78	umc1979–umc1796	12.48	−0.82	0.20	PD	18.68
MCK-10a	10.04	40	umc1477–umc2043	12.28	−0.84	0.20	PD	21.28

加性效应：负值表示增效等位基因来源于 SDM，正值表示增效等位基因来源于木 6。ACK：籽粒中花色苷含量；MCK：籽粒中黑色素含量。

A: additive effect of the QTL. negative values indicate that the alleles for increasing trait values are contributed by SDM; positive values indicate that the alleles for increasing trait values are contributed by another parent Mu 6. D: dominant effect of the QTL. ACK: Anthocyanin content of kernel; MCK: Melanin content of kernel.

表 3 YD 群体中检测到的 QTL
Table 3 QTLs identified in the YD population

QTL	位点 Bins	位置 Position	标记区间 Markers interval	LOD	加性效应 A	显性效应 D	基因作用方式 Gene action	贡献率 Phenotypic variance explained (%)
籽粒中花色苷含量 Anthocyanin content of kernel								
ACK-4a	4.06	58	bnlg2291–umc1945	3.12	−0.94	−0.74	PD	4.89
ACK-6b	6.04	7	mmc0523–umc2006	11.28	−2.04	0.78	PD	20.03
ACK-10c	10.04	46	bnlg1028–IDP7852	11.55	−2.06	0.08	A	16.88
ACK-10d	10.03	82	phi084–umc1272	3.51	−0.19	1.54	OD	5.48
籽粒中黑色素含量 Melanin content of kernel								
MCK-1c	1.07	2	umc2550–umc2217	7.36	−0.69	0.05	A	13.82
MCK-2a	2.07	43	umc1497–mmc0271	2.71	−0.50	−0.04	A	5.06
MCK-6b	6.04	5	umc1014–mmc0523	6.52	−0.73	0.09	A	12.70
MCK-7a	7.02	54	umc1393–phi112	3.42	−0.55	0.31	PD	6.31
MCK-10b	10.04	47	bnlg1028–IDP7852	5.12	−0.47	0.48	D	8.56

加性效应：负值表示增效等位基因来源于 SDM，正值表示增效等位基因来源于 Mo17。ACK：籽粒中花色苷含量；MCK：籽粒中黑色素含量。

A: additive effect of the QTL. negative values indicate that the alleles for increasing trait values are contributed by SDM; positive values indicate that the alleles for increasing trait values are contributed by another parent Mo17. ACK: Anthocyanin content of kernel; MCK: Melanin content of kernel.

3和表2), 其中位于第6和第10染色体上的2个QTL MCK-6a 和 MCK-10a 的贡献率最大, 分别解释表型

变异的18.6%和21.2%, 基因作用方式均为部分显性, 分别位于标记区间 umc1979–umc1796 和 umc1477–

图3 WD群体中检测出的色素相关QTL在连锁群上的分布

Fig. 3 Distribution of QTLs for pigmentation-related traits on linkage map in the WD population

umc2043, 2 标记间的距离分别为 3.1 cM 和 8.9 cM。从 YD 中检测到 5 个 QTL, 位于第 1、第 2、第 6、第 8 和第 10 染色体上(图 4 和表 3), 其中位于第 1、第 6 和第 10 染色体上的 3 个 QTL MCK-1c、MCK-6b 和

MCK-10b 贡献率最大, 分别解释表型变异的 13.8%、12.7%和 8.6%, 基因作用方式分别为加性、加性和显性, 分别位于标记区间 umc2550–umc2217、umc1014–mmc0523 和 bnlgl028–IDP7852, 2 个标记间的距离分

图 4 YD 群体中检测出的色素相关 QTL 在连锁群上的分布

Fig. 4 Distribution of QTLs for pigmentation-related traits on linkage map in the YD population

别为 9.3、2.4 和 8.8 cM。

2.4 色素相关性状的 QTL 上位性分析

2 个群体的上位性分析结果见表 4。WD 群体中检测到 9 对花色苷含量的双基因互作和 4 对黑色素含量的双基因互作。其中与花色苷含量相关的上位性 QTL 有 5 对属于一个有显著效应的座位与一个没有显著性效应的座位间的互作, 位于第 10 染色体与第 2、第 6 和第 7 染色体之间, 即当 QTL ACK-10b (位于 bin 10.04, 标记区间 umc1477-umc2043 内) 单独存在时对表型的贡献率仅为 12.5%, 而当与另一个 QTL 发生互作后对表型的贡献率可达到 17.3%~24.0%, 以显显互作方式为主。而且从单座位 QTL 的加性效应与双座位间的上位性效应可以看出, QTL 的加性效应与加性×加性互作的作用方式和效应大小各不相同。另外 4 对花色苷含量相关的上位

性 QTL 为没有显著效应的座位间的互作, 即单独存在时对表型的贡献率非常小, 几乎检测不到, 但 2 个 QTL 同时存在时, 发生上位性互作, 以显显互作和显加互作方式为主, 互作后对表型的贡献率最大为 20.4%, 最小为 8.8%。与黑色素含量相关的 4 对上位性 QTL 全部为没有显著效应的座位间的互作, 其中 3 对位于第 2 染色体与第 8 染色体之间, 以显显互作方式为主, 对表型的贡献率为 6.2%~12.2%。1 对位于第 1 染色体和第 5 染色体之间, 以加显互作方式为主, 对表型的贡献率为 13.0%。YD 群体中共检测到 9 对双基因互作, 其中 4 对与花色苷含量相关, 5 对与黑色素含量相关, 这 9 对上位性 QTL 全部为没有显著效应的座位间的互作, 以显显互作和显加互作为主, 互作后对表型的贡献率不大, 均小于 10%。总体来看, 2 个群体中检测到的上位性 QTL 的

表 4 WD 和 YD 群体中上位性效应
Table 4 Epistasis effects of QTL pair for the two traits in populations WD and YD

群体	染色体	染色体 1 标记区间	染色体 2 标记区间	加加互作	加显互作	显加互作	显显互作	贡献率
Population	Chr.1×Chr.2	Marker interval-1	Marker interval-2	AA	AD	DA	DD	R ² (%)
籽粒中花色苷含量 Anthocyanin content of kernel								
WD	2×6	umc1230-umc1464	umc1520-bnlg1732	0.49	0.59	1.17	1.92	12.55
	2×10	mmc0271-umc1536	umc1477-umc2043	0.13	0.67	-1.60	-2.35	23.44
	6×10	bnlg1732-umc2319	umc1477-umc2043	1.46	0.51	0.68	1.41	17.39
	6×10	mmc0523-umc1857	umc1477-umc2043	1.21	0.21	0.76	2.04	20.62
	6×10	umc1796-bnlg1867	umc1477-umc2043	1.22	0.45	0.93	2.71	24.06
	7×10	umc1409-bnlg2259	umc1477-umc2043	1.00	-0.36	1.42	0.92	17.49
	7×8	umc1001-umc1408	umc1872-umc1415	-0.36	0.75	-1.27	-1.02	8.83
	8×9	mmc0001-bnlg240	umc1519-bnlg1129	-0.45	1.23	-1.92	-1.88	20.49
	9×10	bnlg1724-bnlg244	umc2021-umc1196a	0.94	0.88	0.74	1.82	17.14
YD	1×7	umc1534-bnlg1598	umc1585-umc1001	-0.47	-0.06	-0.74	-0.71	1.85
	1×9	umc1383-umc1797	bnlg1626-umc1277	-0.45	-0.03	0.77	0.68	0.95
	2×2	umc1776-bnlg125	phi96100-phi402893	0.06	0.33	0.95	-1.24	2.26
	3×9	bnlg197-bnlg1350a	umc1277-umc1957	0.24	-0.06	0.36	-2.09	1.41
籽粒中黑色素含量 Melanin content of kernel								
WD	1×5	umc1991-umc1534	umc1587-umc1260	0.63	-1.02	-0.71	-0.21	13.06
	2×8	bnlg1662-umc2205	umc1075-umc1483	0.15	0.63	0.51	-0.64	6.24
	2×8	mmc0271-umc1536	umc1075-umc1483	0.19	0.78	0.65	-0.99	12.21
	2×8	mmc0271-umc1536	umc1483-phi119	0.05	0.16	0.82	-1.12	8.23
YD	1×8	umc1386a-umc1395	bnlg669-umc1415	-0.22	0.12	-0.75	-0.61	5.40
	3×3	bnlg197-bnlg1350a	bnlg1108-bnlg1257	0.82	0.23	0.48	-1.11	9.69
	6×10	umc1105-umc1014	bnlg1028-IDP7852	0.34	-0.62	-0.05	-0.52	4.60
	6×10	umc2006-umc1114	umc1272-bnlg2336	0.11	-0.62	-0.84	-0.43	6.81
	6×10	umc1114-bnlg1732	umc1319-umc2034	0.67	-0.04	0.21	-0.16	4.87

WD: 木 6 和 SDM 杂交获得的 F_{2:3} 群体; YD: Mo17 和 SDM 杂交获得的 F_{2:3} 群体。

WD: F_{2:3} population derived from the cross of Mu6×SDM (WD); YD: F_{2:3} population derived from the cross of Mo17×SDM. AA: additive by additive; AD: additive by dominant; DA: dominant by additive; DD: dominant by dominant.

数量、位置和对表型的贡献率差别均较大,说明不同遗传背景对上位性的影响较大。

3 讨论

3.1 黑玉米中色素相关性状的 QTL 定位

关于玉米色泽,早期的研究者是将基因位点与易于观察的色泽变异相联系,通过基础杂交研究玉米色泽的遗传规律。迄今为止,黑玉米(紫玉米)相关色素的 QTL 研究报道还较少,近 10 年来,国内外研究者对黑玉米籽粒、穗轴的颜色以及某些农艺性状如紫色叶脉、叶鞘、花丝等通过颜色的深浅来分等级衡量色素(主要是花色苷)含量,定位了玉米基因组中一些色素相关的 QTL^[13-16]。本研究在 2 个相关 $F_{2:3}$ 群体中检测到了多个控制黑玉米籽粒中色素含量的 QTL,其中某些 QTL 与前人报道的 QTL 处于同一染色体的相同区域内^[13,15-16]。例如,在 bin 6.04 处 2 个群体共同定位到的多个 QTL 的重叠区域,与 Lee 等^[16]检测到的 1 个与白色玉米上紫色条纹 (PKS) 相关的 QTL 处于同一区域,而且二者具有共同的多态性 SSR 标记 umc1979。该区段内存在一个花色苷的调节基因 *pl1* (*purple plant 1*),其最近标记为 umc1014 (<http://www.maizegdb.org/>); Sourdille 等^[13]和孙凌玲等^[15]在 bin 10.04 处分别检测到了 1 个与花丝颜色相关的主效 QTL,其探针和最近标记分别为 umc57 和 umc1576,与本研究定位到的另外 1 个与籽粒中花色苷和黑色素含量均相关的 QTL 区域一致。该区段附近包括 3 个花色苷的调节基因 *r1* (*colored 1*), *Sn1* (*scutellar node color1*), *Lc1* (*red leaf color 1*) (<http://www.maizegdb.org/>)。这 2 个区域内存在的 4 个与花色苷相关的基因是否与黑玉米中色素的合成有关还需要进一步研究,但该信息为黑玉米籽粒中相关色素基因的进一步精细定位和克隆提供参考。同时, Sourdille 等^[13]检测到位于第 2 染色体上和 Brown 等^[14]检测到位于第 5 染色体上控制多个紫色植株性状的主效 QTL 在本研究中均未发现,其最主要的原因可能是控制玉米不同部位颜色的基因不同,某些控制色素合成的基因只在植株的特定部位表达^[24],也可能是试验材料不同,群体种类和大小不同。不同群体、不同方法定位出的玉米色素相关性状的 QTL 不同,说明黑玉米果穗和植株色素的合成是受多个基因控制的复杂数量性状,其表达受到材料、植株部位以及植株发育的不同时期等多种因素共同影响^[1]。

3.2 2 个群体间色素相关性状 QTL 的比较

本研究中,3 个亲本的籽粒颜色以及相关色素含量差异大,因此用其组配的 2 个相关 $F_{2:3}$ 群体作为定位的基础群体,容易找到对色素含量贡献大的 QTL。从定位结果来看,虽然 2 个群体的共同标记只有 48 个,但是检测到的控制玉米籽粒中花色苷和黑色素含量的 QTL 在 10 条染色体上的分布、效应及对表型的贡献率都较一致。以 IBM2 2008 Neighbors Frame6 作为参考图谱,对 2 个群体定位结果一致性比较。表明玉米籽粒中花色苷和黑色素含量是由主效基因和微效基因共同控制的,主效 QTL 的存在导致 $F_{2:3}$ 家系表型分布频率的峰度和偏度系数均较大,偏离了正态分布,而且贡献率较大的 QTL 在 2 个群体中高度一致。bin 6.04 处 umc1857 和 umc1014 附近的 QTL 同时与籽粒中花色苷和黑色素含量相关,增效基因均来自父本 SDM,贡献率为 11.8%~21.3%; bin 10.04 处 IDP7852-umc1477 区间内的 QTL 同时与籽粒中花色苷和黑色素含量相关,2 个群体的重叠区间为 361.6~366.3 cM,增效基因均来自父本 SDM,贡献率为 9.3%~21.2%; bin 1.04 处 umc2217 附近的 2 个 QTL 与黑色素含量相关,重叠位点为 341.75,增效基因均来自父本 SDM,2 个群体中贡献率分别为 12.7%和 13.8%。2 个群体所检测到的上位性 QTL 存在较大差异,再次证实了上位性对遗传背景更敏感的结论^[25]。但是在特定的遗传背景下,上位性对色素含量的影响有着非常重要的作用,对这些 QTL 的利用需要进一步深入研究。

3.3 色素相关性状的成簇分布

表型相关分析表明,玉米籽粒中花色苷和黑色素含量呈中度正相关。QTL 定位结果显示,2 个群体中检测到的对花色苷和黑色素含量贡献率较大的 QTL 有成簇分布的现象,主要表现在第 6 和第 10 染色体。在第 6 染色体上,从 2 个群体中检测到的 4 个 QTL 分布在 bin 6.04 处的 umc1796-mmc2006 标记区间内。第 10 染色体上,2 个群体中检测到的 4 个 QTL 分布在 bin 10.04-10.06 的 umc2043-bnlg-1028 标记区间内。因此认为第 6 和第 10 染色体的 2 个区域内的 QTL 是控制玉米籽粒中花色苷和黑色素含量的一因多效的位点或者是在相邻的位点紧密连锁,这与表型的相关性分析结果一致。

4 结论

色素含量受一些主效和微效 QTL 共同控制,从

2个群体检测到QTL的数量、分布和对表型的贡献率均高度一致,而且贡献率较大的QTL在2个群体中均有成簇分布的现象,同时控制2个性状,主要表现在bin 6.04处的标记区间umc1796–mmc2006内和bin 10.04–10.06处的标记区间umc2043–bnlg1028内。这些QTL可能是一因多效的同一QTL或者是在该区段内紧密连锁的不同QTL,可为玉米中色素形成遗传机制的深入研究提供重要的参考。从2个群体检测到的上位性QTL的数量、位置和对表型的贡献率差别均较大,说明上位性效应对遗传背景更加敏感,需要进一步深入研究贡献率大的上位性QTL及其利用。

References

- [1] Cui L-N(崔丽娜), Gao R-Q(高荣岐), Sun A-Q(孙爱清), Dong S-T(董树亭), Zhang H-R(张华荣). Regularity of carotenoids and anthocyanins accumulation in various genotypes of maize kernel. *Acta Agron Sin* (作物学报), 2010, 36(5): 818–825 (in Chinese with English abstract)
- [2] Holton T A, Cornish E C. Genetics and biochemistry of anthocyanin biosynthesis. *Plant Cell*, 1995, 7: 1071–1083
- [3] Zhao S-Q(赵肃清), Sun Y-M(孙远明), Cai Y-F(蔡燕飞), Zhang H-R(张厚瑞). Advances on research of natural melanin. *Guangzhou Food Sci Technol* (广州食品工业科技), 17(3): 54–59 (in Chinese with English abstract)
- [4] Jones K. The potential health benefits of purple corn. *Herbal Gram*, 2005, 65: 46–49
- [5] Prota G D, Ischia M, Napolitano A. The Chemistry of melanins and Related Metabolites. The Pigmentary System. Oxford: Oxford University Press, 1998. pp 307–332
- [6] Wang J-T(王金亭), Sun C-F(孙长峰), Wu G-Q(吴广庆). Advances on research and application of natural phenols pigment. *Prog Mod Biomed* (现代生物医学进展), 2008, 8(2): 376–379 (in Chinese with English abstract)
- [7] Emerson R A. Genetic correlation and spurious allelomorphism in maize. *Annu Rep Nebraska Agric Exp Stn*, 1911, 24: 59–90
- [8] Hayes H K. Inheritance of a mosaic pericarp pattern color of maize. *Genetics*, 1917, 2: 261–281
- [9] Anderson E G. Pericarp studies in maize: II. The allelomorphism of a series of factors for pericarp color. *Genetics*, 1924, 9: 442–453
- [10] Anderson E G, Eyester W H. Pericarp studies in maize: III. The frequency of mutation in variegated maize pericarp. *Genetics*, 1927, 13: 111–120
- [11] Emerson R A, Anderson E G. The a series of allelomorphs in relation to pigmentation in maize. *Genetics*, 1932, 17: 503–509
- [12] Rhoades M M. The effect of varying gene dosage on aleurone color in maize. *Genetics*, 1936, 23: 347–354
- [13] Sourdille P, Baud S, Leroy P. RFLP markers and genes affecting anthocyanin pigmentation in maize (*Zea mays* L.). *Euphytica*, 1996, 91: 21–30
- [14] Brown A F, Juvik J A, Pataky J K. Quantitative trait loci in sweet corn associated with partial resistance to Stewart's wilt, northern corn leaf blight, and common rust. *Phytopathology*, 2001, 91: 293–300
- [15] Sun L-L(孙玲玲), Lin X-E(林兴娥), Xie H-L(谢慧玲), Fu Z-Y(付志远), Tang J-H(汤继华). The tagging molecular markers for red silk gene in maize inbred line K12. *J Henan Agric Univ* (河南农业大学学报), 2007, 41(5): 480–482 (in Chinese with English abstract)
- [16] Lee E A, Young J A, Azizi F, Jay S, Schaafsma A W. Phenotypic and genotypic characterization of purple kernel streak in white food corn. *Crop Sci*, 2009, 49: 1235–1241
- [17] Zhang J-X(张建霞), Zhang Y(张燕), Sun Z-J(孙志健), Hu X-S(胡小松), Wu J-H(吴继红), Liao X-J(廖小军). Summary of resource distribution and qualitative and quantitative analysis methods of anthocyanin. *Food Sci* (食品科学), 2009, 30(5): 263–268 (in Chinese with English abstract)
- [18] Xu J-R(徐金瑞), Zhang M-W(张名位), Liu X-H(刘兴华), Liu Z-X(刘章雄), Zhang R-F(张瑞芬), Sun L(孙玲), Qiu L-J(邱丽娟). Correlation between antioxidation, and content of total phenolics and anthocyanin in black soybean accessions. *Sci Agric Sin* (中国农业科学), 2006, 39(8): 1545–1552 (in Chinese with English abstract)
- [19] Qu C-M(曲存民), Fu F-Y(付福友), Liu L-Z(刘列钊), Wang J-F(王家丰), Mao L-J(毛丽佳), Yuan X-Y(原小燕), Chen L(谌利), Li J-N(李加纳). QTL mapping of embryonic pigment components in *Brassica napus*. *Acta Agron Sin* (作物学报), 2009, 35(2): 286–294 (in Chinese with English abstract)
- [20] Chen D H, Ronald P C. A rapid DNA miniprep method suitable for AFLP and other PCR applications. *Plant Mol Biol Rep*, 1999, 17: 53–57
- [21] Stam P. Construction of integrated genetic linkage maps by means of a new computer package: JoinMap. *Plant J*, 1993, 3: 739–744
- [22] Wang J-K(王建康). Inclusive composite interval mapping of quantitative trait genes. *Acta Agron Sin* (作物学报), 2009, 35(2): 1–7 (in Chinese with English abstract)
- [23] Stuber C W, Edwards M D, Wendel J F. Molecular marker-facilitated investigations of quantitative traits loci in maize: II. Factors influencing yield and its component traits. *Crop Sci*, 1987, 27: 639–648
- [24] Goodman C D, Casati P, Walbot V. A multidrug resistance-associated protein involved in anthocyanin transport in *Zea mays*. *Plant Cell*, 2004, 16: 1812–1826
- [25] Liao C Y, Wu P, Hu B, Yi K K. Effects of genetic background and environment on QTL and epistasis for rice (*Oryza sativa* L.) panicle number. *Theor Appl Genet*, 2001, 103: 104–111