DOI：10.13718/j.cnki.xdzk.2014.10.008

基于混合分离分析策略发掘控制玉米分蘖性状位点①

王久光，　王　瑷，　丁晓雨，　刘朝显，
刘志斋，　王国强，　蔡一林

西南大学 农学与生物科技学院 玉米研究所，重庆 400715

摘要： 分蘖性状不仅与玉米的进化密切相关，对玉米育种也具有重要意义. 利用具有共同系谱来源的 8 个分蘖自交系与 3 个不分蘖自交系，提取 DNA 并分别等量混合，形成分蘖与不分蘖基因池；采用混合分离分析策略(bulked segregation analysis，BSA)，利用覆盖玉米全基因组的 1 013 个 SSR 标记对 2 个基因池进行多态性筛选，共获得了 16 个与玉米分蘖相关联的位点. 这 16 个位点分布在玉米 7 条染色体上，其中包括 2,4,5,6,7,8 和 9 号染色体. 参照 IBM2 2008 高密度整合遗传连锁图谱，这 16 个位点分别位于 11 个 Bin 区段中，基因功能注释显示这些片段中基因的数量在 7～37 个之间. 这些研究结果为克隆控制玉米分蘖基因奠定了良好的基础.

关　键　词： 玉米；分蘖；混合分离分析；基因发掘

中图分类号：S513　　**文献标志码：A**　　**文章编号：** 1673－9868(2014)10－0042－07

分蘖是禾本科植物的普遍特性，对水稻、小麦等作物产量的形成具有重要影响[1－2]. 玉米是禾本科玉米属一年生草本植物，其本身亦具有分蘖的特性，其分蘖主要是由侧生分生组织所决定，首先从主茎基部开始发育. 从植株的表现来看，玉米的野生近缘种大刍草即具有多分蘖的特性，并且与主茎一样，每一个分蘖都可以正常生长与结实. 然而，在长期的驯化与人工选择的进程中，玉米的这种分蘖特性在现代栽培种以及相应的育种资源中都受到抑制，或被选择剔除掉. 近年来，随着多元化育种目标的提出与实现，玉米的分蘖特性在特用玉米(如饲草玉米、甜玉米等)品种的培育中，逐渐受到育种家的重视.

为了揭示玉米分蘖性状的遗传特性，研究者广泛利用多分蘖的野生近缘种大刍草与玉米自交系进行杂交，构建分离群体进行目标基因的定位. 结果显示，在玉米的驯化过程中，分蘖性状主要有位于第 1 染色体长臂上的 *tb*1(*teosinte branched*1)基因控制[3]. 为了进一步明确该基因的功能，Doebley 等[4]利用转座子标签法，克隆了 *tb*1 基因. 序列分析发现，该基因不含内含子，序列中含有保守的 TCP 区和 R 区. 在大刍草和玉米中均有 *tb*1 基因的表达，但是他们的表达模式不同. 在大刍草中，*tb*1 在初级侧生分生组织中不表达，而在腋芽(次级侧生分生组织)中表达；在普通玉米中，*tb*1 在雌花序原基和原基下面未成熟节间以及包裹着这些原基的未成熟总苞中表达. 分析结果还显示，*tb*1 有 2 个方面的功能：① 抑制侧生分生组织的生长；② 促进雌穗的发育[4].

除 *tb*1 基因外，研究者陆续鉴定了其他与分蘖性状相关的基因，包括 *Cg*1，*D*10，*D*8-*N*2023，*Hsf*1-

① 收稿日期：2013－02－28
基金项目：重庆市重大攻关项目资助(CSTC2012ggC80003，CSTC2012ggC80004，CSTC2012ggC80007)；中央高校基本科研业务费专项基金资助(XDJK2011C005).
作者简介：王久光(1973－)，男，四川夹江人，讲师，主要从事植物遗传育种研究.
通信作者：蔡一林，教授.

*N*1603,*Nl*2-*N*1445,*Tlr* *,*Tlr*1-*N*1590,*Tp*1,*Tp*2,*Tp*3 以及 *ys* *-*N*326*A* 等(http://www.maizegdb.org).据报道,禾本科植物分蘖有两种类型,其一是分蘖发生在主茎基部不伸长的节上;其二则是发生在主茎已经伸长节的叶腋处[5].从上述基因所调控的表型来看,其相应突变体的表型基本都属于第二种,即这些基因所控制的分蘖基本都在主茎伸长节的叶腋部位形成,部分突变体同时在主茎基部能形成簇生状的分蘖,只是这些基部分蘖均比较弱小,难以正常生长、结实.在这些基因中,*Tlr*1-*N*1590,*Tp*1,*Tp*2 等在雌穗上会形成相应的苞叶状小叶片,而 *Hsf*1-*N*1603 突变体则在雄穗上形成苞叶状小叶片(http://www.maizegdb.org).

西南大学玉米研究所在利用成单9号(黄早四×成-7(33-757))选育二环系的过程中,于2001年发现1个分蘖株系.随后对该分蘖系逐年筛选、提纯,目前已经得到8个表型稳定的分蘖株系.多年的表型鉴定结果显示,这8个株系的分蘖数基本稳定在3个左右,并且所有分蘖均在主茎基部形成,均能正常生长、结实;这些分蘖茎秆只是稍弱于主茎,明显不同于已经报道的分蘖材料表型.在分蘖株系的提纯进程中,还从中得到了3个不分蘖的稳定株系,近5年的表型鉴定结果表明,这些不分蘖株系的分蘖数均为0.本研究分别以这些分蘖与不分蘖系构建相应的基因池,再选取覆盖玉米全基因组的SSR标记,通过混合分离分析(bulked segregation analysis,BSA)策略对构建的基因池进行筛选,发掘控制玉米分蘖特性的目标位点或候选基因,为后续的相关研究奠定了基础.

1 材料与方法

1.1 研究材料

实验材料一共包括8个分蘖株系与3个不分蘖株系,其中8个分蘖株系每一个都包含20~32个单株,而不分蘖株系每一个则包括15个单株.在这些株系生长到3展叶时,单株挂牌,并剪取每个单株的第3展叶,采用CTAB法提取DNA,保存备用.

1.2 混合基因池的构建

为了快速高效地检测控制目标性状的位点,本研究构建了研究材料的两套混合基因池(bulked gene pool,BGP).第一套基因池(BGP1)包括2组,一组(BGP1-1)由所有分蘖单株的等量DNA混合而成,为分蘖池;另一组(BGP1-2)由所有不分蘖单株的等量DNA混合而成,为不分蘖基因池.第二套基因池(BGP2)包括11组,其中8组分别由8个分蘖株系所包含单株的等量DNA混合而成,依次记为(BGP2-1-1~BGP2-1-8);而另3组则由3个不分蘖株系单株的等量DNA混合而成,依次记为(BGP2-2-1~BGP2-2-3).

1.3 基于混合基因池的位点发掘

选取覆盖玉米全基因组的1 013个SSR标记,其中包括60个用于中国玉米种质资源指纹图谱构建的核心SSR标记[6-8].利用这些标记对BGP1-1与BGP1-2进行多态性筛选,选取在这2个混合基因池之间表现为带型清晰、稳定的多态性标记,初步确定出控制目标性状的候选位点.然后利用这些筛选出的多态性标记,对3个不分蘖基因池进行鉴定,剔除这些多态性标记中在3个不分蘖基因池内有差异的标记,剩下的多态性标记(或者这些标记形成的标记区间)即为控制目标性状的候选位点.

1.4 位点图谱的构建

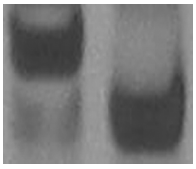
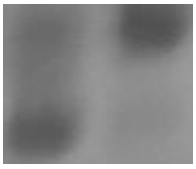
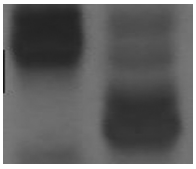
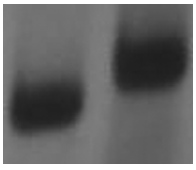
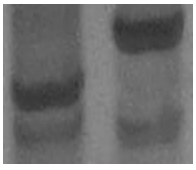
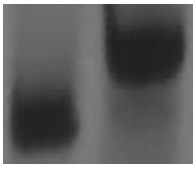
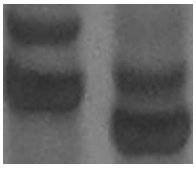
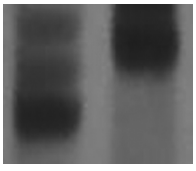
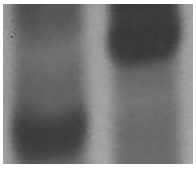
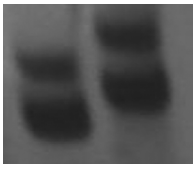
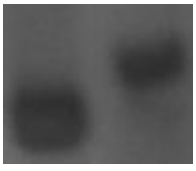
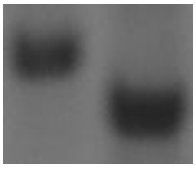
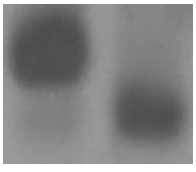
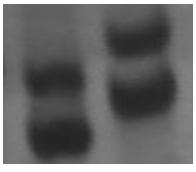
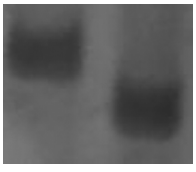
确定出与目标性状相关的位点后,基于玉米高密度参考图谱IBM2 2008 Neighbors Frame(http://www.maizegdb.org),利用MapChart软件(V2.1)构建出这些位点的图谱,以明确其在玉米染色体上的分布.

2 结果与分析

2.1 候选位点的确定

从1 013个覆盖玉米全基因组的SSR标记中,检测到16个在分蘖基因池与不分蘖基因池之间表现明显多样性的标记,其中有4个来源于核心SSR(表1).其中Chr.2上有2个,位于Bin2.02与Bin2.04;Chr.4上有3个,位于Bin4.08;Chr.5上有5个,位于Bin5.00(3个),Bin5.03与Bin5.06;Chr6与Chr7均只有1个,位于Bin6.07与Bin7.03;Chr8与Chr9上则均有2个,位于Bin8.08,Bin9.06与Bin9.07(表1).

表 1　在 2 个基因池之间表现多态性的 SSR 标记

标记名称	Bin	遗传距离	多态性	标记名称	Bin	遗传距离	多态性
umc1261k10	2.02	154.60		umc1429y7	5.03	286.60	
bnlg1018	2.04	294.20		umc1019	5.06	469.60	
umc1612	4.08	492.98		phi299852y2	6.07	450.70	
umc2285	4.08	514.90		umc1936k4	7.03	405.50	
umc1051	4.08	530.19		umc1384	8.08	527.34	
umc1308	5.00	6.30		umc1933	8.08	540.30	
umc2291	5.00	23.30		umc1733	9.06	492.30	
umc1097	5.00	40.80		umc1982	9.07	633.20	

注：表 1 中带后缀的标记来自构建玉米资源指纹图谱的核心 SSR 标记.

2.2　候选位点在玉米染色体上的分布

从 16 个筛选出的位点在 7 条染色体上的分布来看，除了位于 Chr. 6 与 Chr. 7 这 2 条染色体均只有 1 个位点外，Chr. 2，Chr. 8 与 Chr. 9 这 3 条染色体上则均有 2 个位点，另 2 条染色体 Chr. 4 与 Chr. 5 上则较多，分别有 3 个与 5 个位点.

在分布 2 个以上位点的染色体上，Chr. 8 上的 2 个位点位于同一个染色体区段 Bin8.08，在参考图谱 IBM2 2008 Neighbors Frame 上的遗传距离为 12.96 cM(图 1)；Chr. 2 与 Chr. 9 上的 2 个位点分别位于不

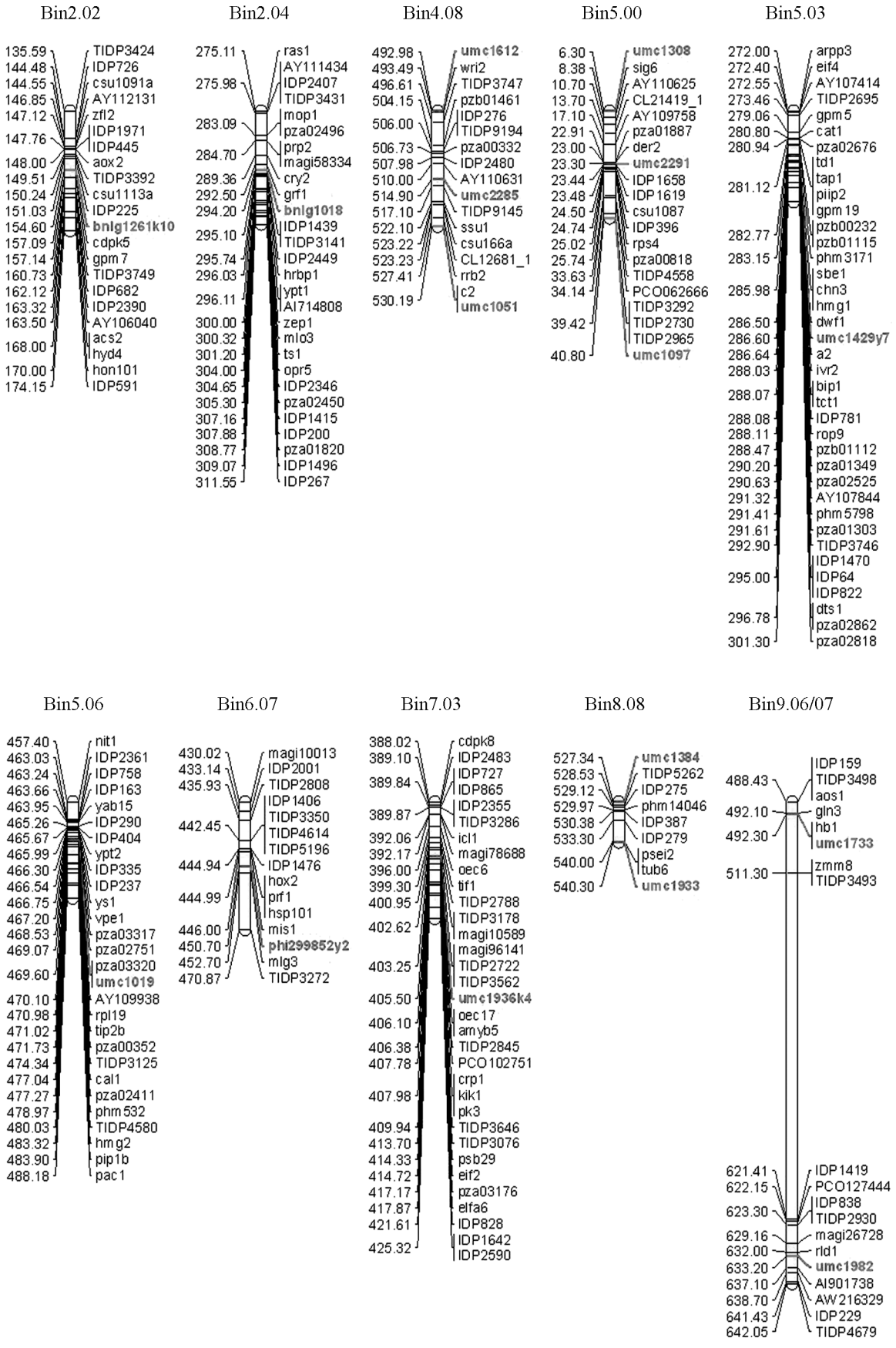


图 1　16 个候选位点在玉米基因组上的分布

同的染色体区段(Bin2.02,Bin2.04,Bin9.06 与 Bin9.07). 位于 Chr.4 上的 3 个位点也分布在同一个染色体区段 Bin4.08，这 3 个位点之间的遗传距离为 37.21 cM. 位于 Chr.5 上的 5 个位点中，有 2 个分布在 2 个独立的染色体区段 Bin5.03 与 Bin5.06，另 3 个则位于 Bin5.00 这个统一的区段，其遗传距离为 34.50 cM(图 1).

结合候选位点及其附近的基因分布，利用 MapChart 软件构建了这些候选位点的染色体图谱. 对于单个位点，检索了其上、下游 20 cM 区域内的基因；对于形成了相对固定区间的位点，则只检索了位于其区间内的基因信息. 这些候选位点在 7 条染色体上共计形成了 11 个区间(图 1).

红色加粗标记表示检测到的候选位点，其他位点表示在候选位点区间内或位点上、下游 20 cM 以内，在参考图谱 IBM2 2008 Neighbors Frame 上注释的基因.

2.3　候选位点附近的初步分析

为了进一步明确所确定候选位点的相关信息，对于构成了明确位点区间的候选位点，我们在参考图谱 IBM2 2008 Neighbors Frame 上检索了相应区间内已经注释的基因；而对于仅有单个位点的染色体区段，我们则在参考图谱检索了该位点上、下游 20 cM 以内已经注释的基因. 结果显示，在这些候选位点所确定的 11 个染色体区段内，在参考图谱上注释基因较多的有 Bin2.02(中心位点为 umc1261k10),Bin2.04(中心位点为 bnlg1018),Bin5.03(中心位点为 umc1429y7),Bin5.06(中心位点为 umc1019),Bin7.03(中心位点为 umc1936k4)；而 Bin8.08(位点区间 umc1384-umc1933),Bin9.06(中心位点为 umc1733)以及 Bin9.07(中心位点为 umc1982)内注释的基因则相对较少(表 2).

表 2　参考图谱上候选位点附近注释的基因检索

染色体区段(Bin)	候选位点	注释基因数	染色体区段(Bin)	候选位点	注释基因数
2.02	umc1261k10	21	5.03	umc1429y7	37
2.04	bnlg1018	27	5.06	umc1019	27
4.08	umc1612	15	6.07	phi299852y2	14
	umc2285		7.03	umc1936k4	32
	umc1051		8.08	umc1384	7
5.00	umc1308	17		umc1933	
	umc2291		9.06	umc1733	7
	umc1097		9.07	umc1982	10

3　讨　论

分蘖是玉米的一个重要特性，尽管在长期的进化与人工选择进程中，玉米的这种固有特性被极大程度地抑制或选择剔除了，但在目前的部分栽培品种中，仍然会出现分蘖，尤其是在特定的生长环境中，如肥水充足等，只是这些分蘖绝大部分都是无效分蘖，在玉米的生长后期都会自行消亡.

从育种的角度看，对于玉米的分蘖有两种不同的观点：其一认为分蘖是无益的，会影响到玉米的生长和产量. 从事普通饲料玉米栽培和育种的学者大多数持有这种观点，他们认为分蘖株生长所需要的养分，都是从主茎株的根争夺而来的. 分蘖株的生长量越大，主茎株的养分消耗就越多，因此会对玉米最终的产量形成明显的不利影响. 另一种观点则相反，认为玉米分蘖不会对产量形成不利影响，因为分蘖生长到一定阶段会自行消亡，其营养物质在分蘖死亡过程中可以回收利用，因而对产量没有影响，持这种观点的大多数为特用玉米栽培和育种者.

尽管研究者对于分蘖在玉米生产中的作用存在一定的争议，但是作为一个重要的进化性状，分蘖是玉米众多性状中研究相对较为深入的一个，并发掘了一系列控制该性状的目标基因. 然而从这些基因所调控的表型来看，其分蘖基本都是着生于主茎伸长节的叶腋部位，并且会不同程度地影响主茎、雌穗、雄穗等器官的发育(www.maizegdb.org). 相对于从主茎基部不伸长节上发生分蘖的相关研究则相对较少，并且也有部分研究结果显示，在甜玉米的种植中，分蘖是提高鲜质量产量和商品品质的有效措施[9-10]. 因此，利用相应的具有不伸长节分蘖特性的材料，开展分蘖性状的基因发掘，不仅会为玉米分蘖相关的基础研究提供新的参考，同时也可为目标基因在特用玉米中的应用奠定基础.

基于连锁分析的QTL(quantitative trait locus)定位是发掘控制数量性状基因位点的经典方法，利用该策略在玉米上发掘出大量的QTL位点[11-13]. 与这种策略不同，Bulked segregation analysis(BSA，混合分组分析法)是一种非连锁的定位方法，最早由Michlmore等提出，并成功应用于莴苣抗病位点/基因的发掘[14]. 因为该方法在进行位点/基因发掘的初期，并不是像传统的连锁分析那样，针对单株分别进行基因型鉴定，而只是鉴定极端表型单株所构建的基因池，因此可以极大地提高鉴定效率[15]，所以在不同作物的目标位点/基因的发掘中得到了广泛应用，包括玉米、水稻、油菜等作物育性相关基因的发掘[16-18]，棉花、大豆等作物抗病基因的发掘[19-20].

基于BSA策略，我们利用分蘖混合基因池与不分蘖基因池，在玉米的2,4,5,6,7,8,9等7条染色体上，初步检测到16个与玉米分蘖相关的位点，这些位点形成了11个相对独立的染色体区段，包括214个注释的基因(图1，表2). 从这些注释的基因来看，具有明确基因功能的有75个，其功能涉及病虫害抗性、碳水化合物合成、钙调相关蛋白、植株体内自由基清除、各种转录因子以及玉米的花器官(雄穗与雌穗)建成与株型构建等.

此外，从已经报道的与玉米分蘖相关的基因来看，13个具有明确染色体定位，其中第1染色体上有3个，包括*tb*1，第2染色体有2个，第3染色体有4个，第5染色体有2个，而第7与第10染色体则各有1个. 在13个基因中，有5个与本研究检测到的位点位于相同染色体，并且有3个位于相同的染色体区段，即位于Bin5.03区段内的*Nl*2-*N*1445，位于Bin5.06区段内的*Hsf*1-*N*1603，以及位于Bin7.03区段内的*Tp*1. 这3个基因与本研究检测到的候选位点的遗传距离(参考图谱IBM2 2008 Neighbors Frame)分别为40.7 cM(Bin5.03，umc1429y7),50.38 cM(Bin5.06，umc1019)与101.5 cM(Bin7.03，umc1936k4). 从其控制的表型来看，*Nl*2-*N*1445对应突变体的典型表型特征为叶片细、窄，并且伴有一定程度的植株畸形；*Hsf*1-*N*1603对应突变体表型表现为分蘖具有一定程度的畸形，叶鞘着生密集叶毛，叶片基部生长叶耳，并且雄穗上也附生苞叶状短叶；*Tp*1对应突变体的典型表型特征主要体现在雌穗上，即近穗柄的籽粒多被附生的苞叶单独包裹(www.maizegdb.org). 这些基因的表型特征明显不同于本研究材料.

尽管本研究利用BSA策略鉴定到16个与玉米分蘖相关的候选位点，但这些位点只是通过对混合基因池的检测所鉴定，对于各分蘖单株以及不分蘖单株的全基因组扫描，可能会为这些位点与目标表型的关联紧密程度提供更进一步的依据. 此外，通过不同遗传背景下的高回交世代以及相关的分离世代对这些位点加以验证，可以更确切地鉴定出这些位点对表型的贡献率.

参考文献：

[1] 李冬霞，隗 溟，廖学群. 水稻不同节位和数量分蘖对经济产量的作用[J]. 西南农业大学学报：自然科学版，2006，28(3)：366-368.

[2] 张建奎，宗学凤，李帮秀，等. 杂交小麦基本苗与产量结构关系的研究[J]. 西南农业大学学报：自然科学版，2005，27(1)：25-28.

[3] DOEBLEY J，STEC A，GUSTUS C. *Tosinte branchedl* and the Origin of Maize：Evidence for Epistasis and the Evolution of Dominance[J]. Genetics，1995，141(1)：333-346.

[4] DOEBLEY J，STEC A，HUBBARD L. The Evolution of Apical Dominance in Maize[J]. Nature，1997，386(3)：485-488.

[5] DUST A. Architectural Evolution and Its Implications form Domestication in Grasses[J]. Annals of Botany，2007，100(5)：941-950.

[6] 赵久然，王凤格，郭景伦，等. 中国玉米新品种DNA指纹库建立系列研究：II. 适于玉米自交系和杂交种指纹图谱绘制的SSR核心引物的确定[J]. 玉米科学，2003，11(2)：3-5，8.

[7] WANG F，ZHAO J，DAI J，et al. Selection and Development of Representative Simple Sequene Repeat Primers and Multiplex SSR Sets for High Throughput Automated Genotyping in Maize[J]. Chinese Science Bulletin，2007，52(2)：215-223.

[8] WANG F G，TIAN H L，ZHAO J R，et al. Development and Characterization of a Core Set of SSR Markers for Fingerprinting Analysis of Chinese Maize Farieties[J]. Maydica，2011，56：1693-1699.

[9] 史振声. 早熟甜玉米留蘖增产技术研究[J]. 玉米科学，1993，1(1)：20-22.

[10] 程新奇，邹 烁，赵丽君，等. 甜玉米分蘖与籽粒产量关系的初步研究[J]. 湖南文理学院学报：自然科学版，2005，

17(1)：71－73.
[11] MICHELMORE R W，PARAN I，KESSELI R V. Identification of Markers Linked to Disease-Resistance Genes by Bulked Segregant Regions by Using Segregating Populations [J]. Proceedings of the National Academy of Science，USA，1991，88(21)：9828－9832.
[12] 吕学高，蔡一林，陈天青，等. 玉米穗部性状 QTL 定位 [J]. 西南大学学报：自然科学版，2008，30(2)：64－70.
[13] 代国丽，蔡一林，徐德林，等. 玉米穗部性状的 QTL 定位 [J]. 西南师范大学学报：自然科学版，2009，34(5)：133－138.
[14] 晏　萌，覃鸿妮，周友建，等. 玉米种皮和穗轴中总酚含量的 QTL 分析 [J]. 西南师范大学学报：自然科学版，2012，37(8)：106－110.
[15] 吴为人，黄碧光. 利用混合分离分析法和 Mapmarker/Exp 软件定位互作基因的策略 [J]. 科学通报，2006，51(18)：2314－2318.
[16] WISE R P，GOBELMAN L，WERNER K，et al. Mitochondrial Transcript Processing and Restoration of Male Fertility in T-Cytoplasm Maize [J]. Journal of Heredity，1999，90(3)：380－385.
[17] DONG N V，SUBUDHI P K，LUONG P N，et al. Molecular Mapping of a Rice Gene Conditioning Thermosensitive Genic Male Sterility Using AFLP，RFLP and SSR Techniques [J]. Theoretical and Applied Genetics，2000，100(5)：727－734.
[18] 陆光远，杨光圣，傅廷栋. 甘蓝型油菜显性细胞核雄性不育基因的 AFLP 标记 [J]. 作物学报，2004，30(2)：104－107.
[19] 杜　威，杜雄明，马峙英. 棉花黄萎病抗性基因 SSR 标记研究 [J]. 西北农林科技大学学报：自然科学版，2004，32(3)：20－24.
[20] 张文惠，陈庆山，杨庆凯，等. 大豆灰斑病 1 号生理小种抗性基因的 SSR 标记分析 [J]. 大豆科学，2004，8(3)：169－173.

Mining of Loci Controlling Tillering Characters in Maize via Bulked Segregation Analysis (BSA)

WANG Jiu-guang，　WANG　Ai，　DING Xiao-yu，
LIU Chao-xian，　LIU Zhi-zhai，　WANG Guo-qiang，　CAI Yi-lin
Maize Research Institute，School of Agronomy and Biotechnology，Southwest University，Chongqing 400715，China

Abstract：Tillering is of great importance in maize (*Zea mays* L.) evolution and breeding. Genome DNA was extracted from 8 inbred lines with tillers and 3 with no tillers，all derived from the same hybrid Chengdan 7，and was bulked with equal amount to form bulked gene pools by the tillering lines and non-tillering lines，respectively. Through the polymorphism screening of 1 013 SSRs covering the entire maize genome，16 loci related to the traits of tillering in maize were identified via bulked segregation analysis (BSA) between the two bulked gene pools. These 16 loci were found to be located on 7 chromosomes，i. e. Chr. 2，Chr. 4，Chr. 5，Chr. 6，Chr. 7，Chr. 8，and Chr. 9. Referring to the high density linkage map of IBM2 2008 Neighbors Frame，these 16 loci were integrated into 11 separate chromosomal regions，within which 7 to 37 genes were annotated. Hopefully，these results may provide useful references for the researches in the fields of gene cloning，functional analysis and marker-assisted selection (MAS).

Key words：maize (*Zea mays* L.)；tillering；bulked segregation analysis；gene mining

责任编辑　夏　娟