

玉米 *ELM1* 基因的序列变异及与株型和穗部相关性状的关联分析

杨泽峰, 张恩盈, 徐暑晖, 毛蓓丽, 潘亮, 陈庆, 徐辰武

扬州大学农学院; 教育部植物功能基因组学重点实验室; 江苏省作物遗传生理重点实验室, 扬州 225009

摘要 玉米 *elm1* 突变体使得光敏色素载体合成受阻并导致光敏色素活性下降, 从而使得突变体植株表现出对光的不敏感性。为研究玉米 *ELM1* 基因序列的多态性及其与主要农艺性状之间的关联, 本研究对玉米 *ELM1* 基因在 80 个自交系中进行了目标序列重测序, 并与株高和穗位高 2 个株型性状以及穗长、穗粗、轴粗、穗重、行粒数、穗行数和穗粒数 7 个穗部性状进行关联分析。*ELM1* 基因在供试玉米自交系中共有 85 个变异, 包括 73 个 SNP 和 12 个 Indel。尽管该基因的编码区不含 Indel, 但 15 个 SNP 变异位点依然可以将编码区划分成 7 种单倍型, 并编码 6 种 *ELM1* 蛋白质。关联分析发现, 玉米 *ELM1* 基因中 1 个非同义突变位点与穗位高存在显著关联, 另有 2 个非同义突变位点与行粒数存在显著关联。

关键词 玉米; *ELM1* 基因; 序列变异; 株型和穗部性状; 关联分析

中图分类号 Q943.2

文献标志码 A

doi 10.3981/j.issn.1000-7857.2014.35.009

Sequence Variations of the Maize *ELM1* Gene and Their Association with Plant Types and Ear Traits

YANG Zefeng, ZHANG Enying, XU Shuhui, MAO Beili, PAN Liang, CHEN Qing, XU Chenwu

Key Laboratory of the Ministry of Education for Plant Functional Genomics; Jiangsu Key Laboratory of Crop Genetics and Physiology; Agricultural College, Yangzhou University, Yangzhou 225009, China

Abstract With the deficiency of the synthesis for the phytochrome chromophore in the maize *elm1* mutant, the phytochrome activity might be reduced and the mutant plant might show characteristics of light insensitivity. In order to reveal the nucleotide polymorphisms in the maize *ELM1* gene and their associations with important agronomic traits, the sequences of the maize *ELM1* gene are captured in 80 inbred lines in the present study, and the associations between the sequence variations of this gene and 2 plant types (including plant height and ear height) and 7 ear traits (ear length, ear diameter, cob diameter, ear weight, kernels per row, rows per ear and kernels per ear) are determined. A total of 85 variants, including 73 SNPs and 12 indels, are detected from the full sequences of this gene in the tested inbred lines. Although in the coding regions, the indel is not included, with the SNPs of CDS sequences, the maize *ELM1* gene can be classified into 7 haplotypes, which encode 6 different *ELM1* proteins. There are significant differences among inbred lines for all 9 plant types and ear traits. According to the results of the association analysis, one nonsynonymous SNP is found to be associated with the ear height, while two other nonsynonymous SNPs are associated with the kernels per row.

Keywords maize; *ELM1* gene; sequence variations; plant type and ear traits; association analysis

收稿日期: 2014-10-15; 修回日期: 2014-11-03

基金项目: 高等学校博士学科点专项科研基金项目(20123250110001); 江苏省自然科学基金项目(BK2012261); 江苏省高校自然科学研究重大项目(14KJA210005); 江苏省“青蓝工程”科技创新团队项目

作者简介: 杨泽峰, 副教授, 研究方向为植物功能基因组学与生物信息学, 电子邮箱: zfyang@yzu.edu.cn; 徐辰武(通信作者), 教授, 研究方向为数量遗传学与生物信息学, 电子邮箱: qtls@yzu.edu.cn

引用格式: 杨泽峰, 张恩盈, 徐暑晖, 等. 玉米 *ELM1* 基因的序列变异及与株型和穗部相关性状的关联分析[J]. 科技导报, 2014, 32(35): 78-84.

光是调控植物生长发育生存最重要的环境影响因子之一。首先,植物通过光合作用将光能转化成化学能贮存起来,通过改善作物的生长和光合作用条件,提高光合作用效率和光能利用率,可以增加农作物的产量^[1]。其次,光也是调控植物生长发育的重要信号来源。植物生长发育的全过程均会受到光信号的调控,包括种子萌发、幼苗去黄化、向地性、向光性、避荫性、叶片张开、茎秆伸长、叶绿体运动、气孔张开和开花期等^[2,3]。此外,光照的长短、强度、方向和质量还影响作物的产量和品质等^[4]。因此,对农作物光信号转导相关基因的研究将为进一步筛选出目的基因的优异等位变异,并在分子设计育种中加以应用奠定基础。

植物接收光信号主要由不同于光合作用捕光色素的光受体(photoreceptor)完成,光敏色素(phytochrome, phy)是感受红光和远红光区域光的一类受体,在植物中以多基因家族的形式存在^[5,6]。光敏色素的生理作用非常广泛,能影响植物一生的形态建成;而缺失光敏色素生色团的叶色突变体是研究植物光形态建成的理想材料^[7]。玉米(*Zea mays* L.)中的*elm1*突变体使得光敏色素载体合成受阻导致光敏色素活性下降,从而使得突变体植株表现出对光的不敏感性^[8,9]。玉米*ELM1*基因又被称为*ZmHY2*,是拟南芥*HY2*基因的同源基因,它们编码的蛋白质具有50%的相似性。玉米*ELM1*基因位于8号染色体,编码一个297aa的铁氧还蛋白依赖性比还原酶(ferredoxin-dependent bilin reductase)。序列分析发现玉米*elm1*突变体在该基因的第3内含子的3'剪切点有一G至A的转换而导致蛋白质翻译的提前终止,并产生了对光的不敏感性^[10]。

玉米是世界三大作物之一,也是产量最大的农作物,是世界上主要的食品和饲料来源。玉米在粮食生产中的作用举足轻重,预计到2030年,在小麦、玉米和水稻三大作物中,玉米的需求增幅最大。为满足日益增长的需求,利用丰富变异的优异种质资源育成高产优质的品种势在必行。株型和穗部性状是玉米产量重要的影响因子,挖掘与玉米株型和穗部性状相关联的优异等位变异位点,不仅为揭示相关性状的遗传基础奠定基础,还能为育种实践中进行目的性状的改良提供分子遗传学依据。尽管玉米*elm1*突变体是玉米中第一个被发现的光敏色素缺陷型突变体,在揭示玉米生长发育过程中光敏色素信号途径具有重要的理论价值,但*ELM1*基因在常用玉米自交系中的序列变异尚不明确,尤其是其序列变异对株型和穗部性状等产量影响因子的作用尚不得而知。本研究在中国常用玉米自交系中经基因序列定点捕获*ELM1*基因的全长序列,并通过基于候选基因的关联分析方法阐释该基因序列变异与株型和穗部性状等产量影响因子的关联。

1 材料和方法

1.1 试验材料和表型鉴定

选取具有广泛代表性的玉米自交系80份,包括中国温带玉米的5个杂种优势群的代表性种质、热带/亚热带种质和来源于国外的种质材料。供试材料于2013年冬季种植在海南

省,田间试验采用完全随机设计,每个材料种植2行,每行15株,株距0.3 m,行距0.6 m。常规田间水肥管理,并对主要农艺性状进行调查。在授粉后15 d选取位于每行中间位置的10株,分别测量株高和穗位高。这些单株的果穗收获后晾干,并在实验室中考察相应的穗部性状,包括穗长、穗粗、轴粗、穗重、行粒数、穗行数 and 穗粒数。

1.2 DNA提取和*ELM1*基因测序

在实验室水培种植供试玉米材料,至出苗15 d左右剪取嫩叶,采用改良的CTAB法提取基因组DNA。用分光光度计检测DNA浓度;利用琼脂糖凝胶电泳方法检测DNA质量。采用B73的*ELM1*基因(GRMZM5G861678)序列为模板,在供试玉米材料中采用NimbleGen平台对该基因进行目标序列定点捕获并测序。基因的目标序列定点捕获和测序均由深圳华大基因科技有限公司完成。

1.3 数据分析

玉米*ELM1*基因序列通过Clustal X软件^[11]进行比对并手工校对。序列分析采用DNAsp软件^[12]进行:利用 π 和 θ 估计基因全长和各个区段的核苷酸多态性;采用Tajima's D ^[13]、Fu与Li的 D^* 和 F^* 参数^[14]对*ELM1*基因序列进行中性测验。玉米*ELM1*基因多态性位点的连锁不平衡(LD)值采用Tassel软件^[15]计算,并采用连锁不平衡参数 r^2 值表征LD。LD随距离的衰减曲线参照Remington等^[16]定义的非线性回归方程,并用SAS软件中的NLIN过程拟合该线性回归方程。采用Tassel软件^[15]的混合线性模型对最小频率在0.05以上的变异位点与表型数据进行关联分析。

2 结果与分析

2.1 *ELM1*基因的序列变异

采用玉米自交系B73的*ELM1*基因(GRMZM5G861678)的全长序列为模板,在80个常用玉米自交系中经定点捕获该基因位点的核苷酸序列。所测序列为该基因的起始密码子至终止密码子之间的区段,不仅涵盖该基因所有的外显子区段,还包括该基因的内含子区段。经多序列比对,共获得了3780 bp的核苷酸序列。进一步分析发现,该基因位点中共包含85个变异,涵盖238个核苷酸位点(表1)。在该基因中共发现SNP变异位点73个,平均每51.78 bp有1个SNP。共发现12个Indel变异,平均每315 bp有1个Indel。

该基因共包含8个外显子区段和7个内含子区段,每一内含子中至少含有1个变异位点,而8个外显子中有4个没有序列变异。内含子区具有较高的变异频率,平均每41.2 bp就有1个变异(包括SNP和Indel),而编码区平均每59.6 bp有1个变异。此外,本研究还发现所有的Indel变异均出现在内含子区。

核苷酸多态性通常用参数 π 和 θ 作为衡量的指标,其中 π 是衡量同一位点不同序列两两之间差异的参数;而 θ 则是衡量群体突变率的参数指标,与核苷酸变异占序列位点数的比率有关。在本研究的试验群体中,*ELM1*基因全长序列(含启

表1 玉米 *ELM1* 基因的多态性位点
Table 1 Polymorphic sites in maize *ELM1* gene

位点	位置	多态性类型	频率/%	位点	位置	多态性类型	频率/%
SNP_14	Exon01	C/A	86/14	SNP_1962	Intron02	G/A	99/1
SNP_56	Exon01	C/A	86/14	SNP_2297	Intron02	C/T	98/2
SNP_98	Exon01	C/T	94/6	SNP_2299	Intron02	T/C	65/35
Indel_156	Intron01	CTGACAGC/-----	65/35	SNP_2302	Intron02	G/A	55/45
SNP_181	Intron01	G/T	79/21	SNP_2333	Intron02	C/A	96/4
Indel_202	Intron01	A/-	89/11	Indel_2344	Intron02	-/G	96/4
SNP_209	Intron01	C/T	86/14	SNP_2348	Intron02	G/T/A	85/11/4
SNP_237	Intron01	A/G	98/2	Indel_2349	Intron02	G/-	80/20
SNP_259	Intron01	C/T	86/14	SNP_2446	Intron02	G/A	65/35
SNP_266	Intron01	C/T	99/1	SNP_2455	Intron02	C/T	89/11
SNP_294	Intron01	C/T	94/6	SNP_2491	Intron02	T/C	65/35
SNP_336	Intron01	C/A	85/15	SNP_2520	Intron02	G/A	96/4
SNP_421	Intron01	A/T	98/2	SNP_2637	Intron03	G/A	98/2
SNP_422	Intron01	T/C	86/14	SNP_2671	Intron03	C/G	65/35
SNP_451	Intron01	T/C	94/6	Indel_2684	Intron03	AC/--	96/4
SNP_452	Intron01	C/T	99/1	SNP_2757	Exon04	A/G	98/2
SNP_559	Intron01	T/A	65/35	SNP_2876	Intron04	T/G	65/35
Indel_581	Intron01	T/-	68/32	SNP_2910	Exon05	C/A	98/2
SNP_595	Intron01	C/T	94/6	SNP_2939	Exon05	T/C	65/35
SNP_621	Intron01	T/A	55/45	SNP_2993	Exon05	C/A	65/35
SNP_1042	Intron01	C/T	86/14	SNP_2998	Exon05	C/T	80/20
Indel_1068	Intron01	-----/TACAGGA	94/6	SNP_3005	Exon05	C/A	65/35
Indel_1133	Intron01	G/-	86/14	SNP_3020	Exon05	G/A	80/20
Indel_1143	Intron01	-----/TCTAGTCT	94/6	SNP_3027	Exon05	G/A	96/4
SNP_1152	Intron01	C/T	98/2	SNP_3035	Exon05	C/T	99/1
SNP_1155	Intron01	G/T	99/1	Indel_3051	Intron05	-/G/C	69/11/2
SNP_1156	Intron01	A/G	99/1	Indel_3052	Intron05	-----/ATTTT	89/11
SNP_1159	Intron01	C/T	99/1	Indel_3065	Intron05	-/T	81/19
SNP_1185	Intron01	A/C	99/1	SNP_3238	Intron06	C/T	86/14
SNP_1186	Intron01	T/C	99/1	SNP_3305	Intron06	A/G	98/2
SNP_1195	Intron01	T/C	65/35	SNP_3311	Intron06	G/A	98/2
SNP_1359	Intron01	A/T	96/4	SNP_3338	Intron06	G/T	99/1
SNP_1390	Intron01	A/G	65/35	SNP_3359	Intron06	G/T	98/2
SNP_1391	Intron01	G/A	89/11	SNP_3379	Intron06	C/A	89/11
SNP_1401	Intron01	G/A	89/11	SNP_3493	Intron07	C/T	65/35
SNP_1424	Intron01	G/A	99/1	SNP_3494	Intron07	A/G	65/35
SNP_1445	Intron01	C/T	98/2	SNP_3499	Intron07	C/T	86/14
SNP_1486	Intron01	C/T	69/31	SNP_3536	Intron07	T/C	65/35
SNP_1507	Intron01	G/A	65/35	SNP_3560	Intron07	TC/	65/35
SNP_1749	Intron02	T/A	99/1	SNP_3596	Exon08	G/A	86/14
SNP_1837	Intron02	C/T	99/1	SNP_3635	Exon08	A/G	85/15
SNP_1867	Intron02	A/G	96/4	SNP_3686	Exon08	G/A	94/6
SNP_1880	Intron02	T/C	98/2				

动子区)的 π 值为0.0043, θ 值为0.0041(表2)。在中性进化的条件下,核苷酸多样性的两个参数 π 和 θ 的值应该近似相等。而Tajima's D测验可以通过比较群体突变率的2个估计值 π 和 θ 的差异来检验选择效应^[13]。利用玉米ELM1基因序列中的SNP位点进行Tajima's D测验,全长序列的Tajima's D值为0.1083,未达到显著水平。Fu与Li的D*和F*的测验只分别为0.3153和0.2783,也未达到显著水平。此外,本研究对该基因的编码区和内含子区分别进行了Tajima's D测验,结果都未达到显著水平。研究结果表明该基因位点并没有受到明显的人工选择。

表2 玉米ELM1基因的序列变异参数
Table 2 Parameters for the sequence variants of maize ELM1 gene

参数	编码区	内含子区	全长
序列长度/bp	894	2886	3780
变异位点(SNP+InDel)	15	70	85
变异频率	59.6	41.2	44.5
SNP数目	15	58	73
SNP频率	59.6	49.8	51.8
InDel数目	0	12	12
InDel平均长度/bp	0	3.1	3.1
InDel频率	0	240.5	315
π	0.0038	0.0044	0.0043
θ	0.0034	0.0043	0.0041
Tajima's D	0.3909	0.0198	0.1083
Fu and Li's D*	1.0680	0.0113	0.3153
Fu and Li's F*	0.9827	0.0176	0.2783

2.2 ELM1基因的单倍型分析

根据所测玉米ELM1基因的全长序列,将80份玉米自交系划分成14个单倍型,分别定义为H01~H14(表3)。携带单倍型H02的自交系数目最多,为35个,占有所有自交系的比率为43.75%。有8种单倍型仅仅包含1个供试自交系。ELM1基因的编码区具有15个SNP变异位点,不含有InDel变异位点。根据这15个SNP变异位点可以将供试材料划分成7种单倍型,分别定义为HC01~HC07。编码区单倍型HC01含有50个自交系,占有所有供试材料的比率超过了62.5%;除此之外,另外一个含有10个以上自交系材料的单倍型为HC03。在所有的基于编码区的单倍型中,只有HC04包括1个自交系,其余均包括2个及以上自交系。

表3 供试玉米自交系中ELM1基因的单倍型分布
Table 3 Distribution of haplotypes of maize ELM1 gene among tested inbred lines

基于全长单倍型	自交系数目	基于编码区单倍型	自交系
H01	1	HC01	BEM
H02	35	HC01	BJ- 4, 10168, K8112, 3189, 沈137, JB, M1, WT26, OH43, M1132, 齐319, 319B, QF03, RBS11, 郑58, JND-2, 478 选, KWS456, 杂107, 4866, Mo17, 8605-2, 6819, 丹黄25, 丹988, Q52, 齐318, WT262, QDM01, 8112, QF02, 综3, s80, 齐232, 铁9206
H03	13	HC01	7922, QF01, JND- 1, suwan, 11099, 11200, 鲁原92, BJ-5, Y53, 丹340, 107, 本育15, 昌7-2
H04	2	HC02	H21, RCML15
H05	1	HC01	纯2433
H06	10	HC03	武314, LX9801, 412, QH19612, k12, 340 改, 502, 黄早四, QS7M, QZ01
H07	1	HC03	吉853
H08	1	HC04	黄518
H09	4	HC05	丹598, JH3372, 178, P138
H10	8	HC06	4CV, S122, Ex 韩, 10533-1, QF-11, nx335, xy35, BJ-2
H11	1	HC06	丹99
H12	1	HC07	E28
H13	1	HC07	11118
H14	1	HC05	FLB01

在ELM1基因编码区的15个SNP变异位点中,8个为同义突变位点,不能引起编码蛋白质序列的改变;其余7个为非同义突变位点,能引起编码氨基酸序列的改变。将7种编码区单倍型的核苷酸序列转为氨基酸序列发现,供试的玉米自交系材料中ELM1基因共编码6种ELM1蛋白质,氨基酸长度为297aa(图1)。在7种编码区单倍型中,HC03和HC05共同编码一种ELM1蛋白质,而其余各编码区单倍型分别编码一种蛋白质。玉米ELM1蛋白质中包含一段铁氧还蛋白色素还原酶结构域(ferredoxin-dependent bilin reductase domain),本研究中发现的氨基酸变异位点均位于该结构域中。

```

*      20      *      40      *      60      *      80      *      100
HC01 : MSGGGGLSGGCSYQKRVHVALEQTRHRSTLVPHPSQEKFRFIKANEDTNVNLNLSFSTSKIRLLRSLTIEQKNSVQVLDFAAFSRPEYDLPIFCANAFSS : 100
HC02 : MSGGGGLSGGCSYQKRVHVALEQTRHRSTLVPHPSQEKFRFIKANEDTNVNLNLSFSTSKIRLLRSLTIEQKNSVQVLDFAAFSRPEYDLPIFCANAFSS : 100
HC03/05 : MSGGGGLSGGCSYQKRVHVALEQTRHRSTLVPHPSQEKFRFIKANEDTNVNLNLSFSTSKIRLLRSLTIEQKNSVQVLDFAAFSRPEYDLPIFCANAFSS : 100
HC04 : MSGGGGLSGGCSYQKRVHVALEQTRHRSTLVPHPSQEKFRFIKANEDTNVNLNLSFSTSKIRLLRSLTIEQKNSVQVLDFAAFSRPEYDLPIFCANAFSS : 100
HC06 : MSGGGGLSGGCSYQKRVHVALEQTRHRSTLVPHPSQEKFRFIKANEDTNVNLNLSFSTSKIRLLRSLTIEQKNSVQVLDFAAFSRPEYDLPIFCANAFSS : 100
HC07 : MSGGGGLSGGCSYQKRVHVALEQTRHRSTLVPHPSQEKFRFIKANEDTNVNLNLSFSTSKIRLLRSLTIEQKNSVQVLDFAAFSRPEYDLPIFCANAFSS : 100
      Ferredoxin-dependent bilin reductase domain
*      120     *      140     *      160     *      180     *      200
HC01 : PARSIVLDDLNPLYDTTEHKDYREKYRALMPLVHKYSELLPWGKITSLSLRFSPVIVITVFEPRANQALYSAFMDYYMWLEFMDGAVRESSKER : 200
HC02 : PARSIVLDDLNPLYDTTEHKDYREKYRALMPLVHKYSELLPWGKITSLSLRFSPVIVITVFEPRANQALYSAFMDYYMWLEFMDGAVRESSKER : 200
HC03/05 : PARSIVLDDLNPLYDTTEHKDYREKYRALMPLVHKYSELLPWGKITSLSLRFSPVIVITVFEPRANQALYSAFMDYYMWLEFMDGAVRESSKER : 200
HC04 : PARSIVLDDLNPLYDTTEHKDYREKYRALMPLVHKYSELLPWGKITSLSLRFSPVIVITVFEPRANQALYSAFMDYYMWLEFMDGAVRESSKER : 200
HC06 : PARSIVLDDLNPLYDTTEHKDYREKYRALMPLVHKYSELLPWGKITSLSLRFSPVIVITVFEPRANQALYSAFMDYYMWLEFMDGAVRESSKER : 200
HC07 : PARSIVLDDLNPLYDTTEHKDYREKYRALMPLVHKYSELLPWGKITSLSLRFSPVIVITVFEPRANQALYSAFMDYYMWLEFMDGAVRESSKER : 200

*      220     *      240     *      260     *      280     *
HC01 : IDRNREAQHKYLTWRAEKDPGYPLKLLIGESGAKDLVREFFLFEVGSGLGTSFLEYFAEYAQEDGTVNKKRSMAGKSFGRPWAHGLFVGDVAVDG : 297
HC02 : IDRNREAQHKYLTWRAEKDPGYPLKLLIGESGAKDLVREFFLFEVGSGLGTSFLEYFAEYAQEDGTVNKKRSMAGKSFGRPWAHGLFVGDVAVDG : 297
HC03/05 : IDRNREAQHKYLTWRAEKDPGYPLKLLIGESGAKDLVREFFLFEVGSGLGTSFLEYFAEYAQEDGTVNKKRSMAGKSFGRPWAHGLFVGDVAVDG : 297
HC04 : IDRNREAQHKYLTWRAEKDPGYPLKLLIGESGAKDLVREFFLFEVGSGLGTSFLEYFAEYAQEDGTVNKKRSMAGKSFGRPWAHGLFVGDVAVDG : 297
HC06 : IDRNREAQHKYLTWRAEKDPGYPLKLLIGESGAKDLVREFFLFEVGSGLGTSFLEYFAEYAQEDGTVNKKRSMAGKSFGRPWAHGLFVGDVAVDG : 297
HC07 : IDRNREAQHKYLTWRAEKDPGYPLKLLIGESGAKDLVREFFLFEVGSGLGTSFLEYFAEYAQEDGTVNKKRSMAGKSFGRPWAHGLFVGDVAVDG : 297
    
```

图1 玉米 *ELM1* 基因编码的蛋白质序列比对

Fig. 1 Alignment of protein sequences encoded by maize *ELM1* gene

2.3 *ELM1* 基因的连锁不平衡和遗传重组

连锁不平衡(LD)指的是不同位点间的等位基因的非随机关联^[7]。LD是多态性(如SNP)之间的相关,是进化过程中的突变和重组共同起作用的结果。本研究对最低变异频率0.05以上的玉米 *ELM1* 基因的SNP位点进行连锁不平衡分析,并以位点距离和连锁不平衡参数 r^2 作散点图(图2)。连锁不平衡的衰减根据非线性方程进行描述。一般认为,若 r^2 值小于0.1,则位点间不存在连锁不平衡。这主要是因为当 r^2 值小于0.1时,要检测到足够的关联就需要非常大的群体样本,使得关联分析难以操作。本研究通过拟合的非线性方程发现,玉米 *ELM1* 基因的连锁不平衡随距离的增加而快速衰减,并且在大约3110 bp处即可衰减至0.1水平(图2)。

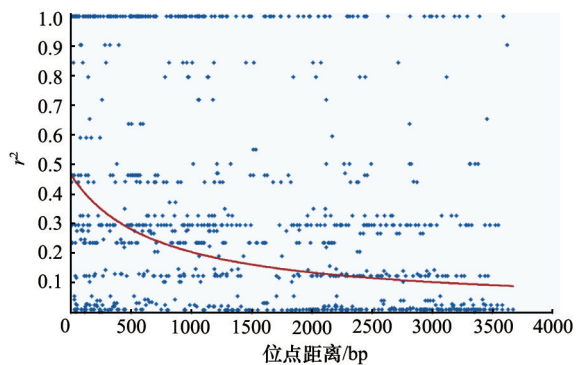


图2 玉米 *ELM1* 基因的变异位点之间连锁不平衡示意图
Fig. 2 Diagram of the LD between polymorphic sites of the maize *ELM1* gene

玉米基因内变异位点的连锁不平衡有快速衰退的特征,一般在几百bp便可衰退至0.1的水平^[7],研究发现,*ELM1* 基因虽然也具有连锁不平衡衰退的规律,但较其他基因明显衰退速率慢。影响连锁不平衡衰退的一个重要因素为遗传重

组,一般认为较多的重组将导致连锁不平衡的快速衰退。为分析重组事件对连锁不平衡的影响,本研究利用 *ELM1* 基因序列中的多态位点分析了其重组事件。发现在供试材料中至少有7次重组事件,其相应的核苷酸位点分别是(295, 337)、(337, 452)、(1196, 1360)、(1360, 1391)、(1881, 2298)、(2298, 2334)、(3028, 3239)。该基因的重组事件可以通过比较不同单倍型之间的序列变化得到证实。如单倍型H02和H03是 *ELM1* 基因中出现频率最高的2种单倍型,分别包含35和13个自交系。这2种单倍型的Exon01和Exon08区段序列完全一致,但在Intron01至Intron07的区段内至少有2个变异位点,说明这2种单倍型之间在Intron01至Intron07的区段内至少存在2次重组事件才导致了这2种单倍型的分化。

2.4 *ELM1* 基因与表型的关联分析

分别对株高、穗位高、穗长、穗粗、轴粗、穗重、行粒数、穗行数和穗粒数共9个玉米产量相关性状进行测定,方差分析表明这9个农艺性状均在供试玉米自交系间存在极显著差异(表4)。利用变异系数表示每一性状的绝对变异度,发现每一性状均具有较高的变异度,但不同性状的变异系数也存在较大差异。变异系数最高的性状为穗重,达到31.65%;最低的为穗粗,仅为9.51%。9个玉米产量性状中有8个性状的广义遗传力超过50%,表明这些性状主要受到遗传因素的控制。株高的遗传力最高,为83.7%,而行粒数的遗传力最低,为44.3%。

关联分析采用Tassel软件的混合线性模型。在编码区内共检测到2个SNP变异与玉米穗位高存在显著关联(表5),这2个变异位点处于完全连锁不平衡状态,对穗位高表型的贡献率为5.66%。在这2个SNP变异位点中,SNP_2998为非同义突变位点,能引起编码蛋白质序列的改变。6个SNP变异位点与行粒数存在显著的关联。其中,SNP_56和SNP_2993为非同义突变位点,能引起编码蛋白质序列的改变。此外,SNP_56与SNP_14处于完全连锁不平衡状态,对行粒数的表型贡献

率为7.29%;SNP_2993和SNP_2939及SNP_3005也处于完全连锁不平衡状态,对行粒数表型的贡献率为10.87%。除穗位

高和行粒数之外,本研究中所鉴定的其他农艺性状均不与ELM1基因的序列变异存在显著关联。

表4 供试玉米自交系株型和穗部性状的描述性统计数、单因素方差分析和遗传力

Table 4 Descriptive statistics, one-way ANOVA, and heredity capacity of plant type and ear traits of the tested maize inbred lines

参数	株高/cm	穗位高/cm	穗长/cm	穗粗/cm	轴粗/cm	穗重/g	行粒数	穗行数	穗粒数
平均数	185.309	65.394	12.401	4.267	3.030	74.716	19.040	14.674	280.854
标准差	30.199	14.879	1.690	0.406	0.341	23.651	3.931	1.977	72.493
最小值	99.667	37.500	8.294	3.273	2.200	28.200	9.000	10.333	117.000
最大值	256.050	110.100	16.240	5.400	4.029	144.763	28.632	19.714	484.842
变异系数	16.30%	22.75%	13.63%	9.51%	11.52%	31.65%	20.65%	13.47%	25.81%
方差分析F值	98.347**	56.372**	21.880**	25.315**	22.246**	26.680**	11.342**	18.088**	14.468**
遗传力	0.837	0.755	0.613	0.649	0.617	0.660	0.443	0.567	0.508

注:**表示在1%水平上的差异显著性。

表5 玉米ELM1基因序列变异与表型性状的关联

Table 5 Association between the sequence polymorphisms of maize ELM1 gene and phenotypic variations

性状	变异	F值	P值	r ²
穗位高	SNP_2998	4.3220	0.0412	0.0566
	SNP_3020	4.3220	0.0412	0.0566
行粒数	SNP_14	5.8228	0.0184	0.0729
	SNP_56	5.8228	0.0184	0.0729
	SNP_2939	8.6743	0.0043	0.1087
	SNP_2993	8.6743	0.0043	0.1087
	SNP_3005	8.6743	0.0043	0.1087
	SNP_3635	4.3437	0.0407	0.0544

3 讨论

丰富的变异是作物遗传改良的基础。而作物种质材料的变异包括两个方面,一方面是表型特征的变异,另一方面是遗传基础的变异。此外,丰富的表型变异和核苷酸多样性也是通过连锁和关联分析进行遗传作图的重要基础^[18]。本研究采用中国常用的玉米自交系,发现这些玉米种质在表型性状上存在明显的差异,而遗传力的研究也表明这些性状大部分是有遗传基础起到主要作用。此外,本研究分析了玉米ELM1基因在供试群体中的遗传变异,遗传多样性参数 π 值为0.0043,该值较对278个自交系通过全基因组重测序方法^[19]得到的 π 值(0.006)稍低。这些研究结果表明,该供试群体在表型变异和遗传基础变异方面均具有较好的代表性。

SNP和Indel变异是基因组中最常见的变异,其中SNP是

基因组中发生频率最高、数量最多而且密度最大的变异。不论SNP还是Indel都可以引起基因的突变并对表达产物产生影响,而且部分变异能够引起作物表型的显著变化。Ching等^[20]对36个玉米自交系的18个基因进行了研究,发现在编码区平均130.5 bp有1个SNP,而非编码区平均47.7 bp有1个SNP。本研究发现,玉米ELM1基因位点的非编码区与他们的研究结果相近,而编码区的变异则远远高于他们的研究结果。这一方面可能是由于本研究所用群体较他们所研究的群体大,另一方面可能是由于本研究群体中大部分变异均为频率较低的变异,有很多变异仅仅出现在1~3个自交系中。尽管ELM1基因的编码区与内含子区具有相近的SNP变异频率,但编码区并不具有Indel变异,12个Indel均出现在内含子区,但该基因编码区的7个非同义突变能够引起氨基酸序列的改变,并最终导致80个玉米自交系编码6种不同的ELM1蛋白。

光信号转导途径紧密地联系着植物的生理和发育进程,进而影响农作物的产量^[2]。对光信号转导相关基因的研究,将有助于探索出一条通过修饰作物的光信号途径改良农作物产量和品质的新策略。已有研究表明,光信号转导相关基因能显著影响开花期、株高等产量相关性状。如高粱中编码光敏色素PHYB的基因,认为是6个控制开花时期的基因之一^[21]。对光敏色素PHYA和PHYB的研究表明,转基因作物表现出节间缩短、株高和避阴性降低而促使株型紧凑、光合效率高等特征^[22,23]。本研究在对玉米ELM1基因进行序列变异分析的基础上,进一步对其变异位点与株高、穗位高、穗长等9个产量相关性状进行了关联分析,并筛选到1个非同义突变与穗位高存在显著关联,另2个非同义突变与行粒数存在显著关联。由于穗位高和行粒数一直被认为是影响玉米产量的重要响应因子,因此本研究的结果可为进一步通过分

子标记辅助选择提高玉米的产量提供借鉴。值得注意的是,本研究中涉及的所有性状均为典型的数量性状,受多基因的调控和环境条件的共同作用。由于本研究在关联分析时仅采用了一个候选基因 *ELM1*,得出的结论需要进一步验证。

4 结论

玉米 *ELM1* 基因的全长序列在 80 个常用玉米自交系中共发现 73 个 SNP 和 12 个 Indel。该基因的编码区含有 15 个 SNP,其中 7 个为非同义突变位点,可以将 80 个自交系划分成 7 种单倍型,并编码 6 种 *ELM1* 蛋白质。玉米 *ELM1* 基因符合中性进化模型假设,没有发生纯化选择。基于候选基因的关联分析方法发现,该基因的 1 个非同义突变与穗位高存在显著关联;另有 2 个非同义突变与行粒数存在显著关联。研究结果表明玉米 *ELM1* 基因的变异位点可用于分子标记辅助选择改良现有种质,对中国玉米株型和穗部性状改良的分子设计育种具有一定指导意义。

参考文献 (References)

- [1] Yin Z, Zhang Z, Deng D, et al. Characterization of Rubisco activase genes in maize: An alpha-isoform gene functions alongside a beta-isoform gene [J]. *Plant Physiology*, 2014, 164(4): 2096-2106.
- [2] 詹克慧, 李志勇, 侯佩, 等. 利用修饰光敏色素信号途径进行作物改良的可行性[J]. *中国农业科学*, 2012, 45(16): 3249-3255.
Zhan Kehui, Li Zhiyong, Hou Pei, et al. A new strategy from crop improvement through modification of phytochrome signalling pathways[J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2012, 45(16): 3249-3255.
- [3] Quail P H. Phytochrome photosensory signalling networks[J]. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2002, 3(2): 85-93.
- [4] Ballaré C L, Casal J J. Light signals perceived by crop and weed plants[J]. *Field Crops Research*, 2000, 67(2): 149-160.
- [5] Wu F Q, Fan C M, Zhang X M, et al. The phytochrome gene family in soybean and a dominant negative effect of a soybean PHYA transgene on endogenous Arabidopsis PHYA[J]. *Plant Cell Reports*, 2013, 32(12): 1879-1890.
- [6] Abdurakhmonov I Y, Buriev Z T, Logan-Young C J, et al. Duplication, divergence and persistence in the phytochrome photoreceptor gene family of cottons (*Gossypium* spp.)[J]. *BMC Plant Biology*, 2010, 10: 119.
- [7] 何冰, 刘玲珑, 张文伟, 等. 植物叶色突变体[J]. *植物生理学通讯*, 2006, 42(1): 1-9.
He Bing, Liu Linglong, Zhang Wenwei, et al. Plant leaf color mutants[J]. *Plant Physiology Communications*, 2006, 42(1): 1-9.
- [8] Sawers R J, Linley P J, Farmer P R, et al. Elongated mesocotyl1, a phytochrome-deficient mutant of maize[J]. *Plant Physiology*, 2002, 130(1): 155-163.
- [9] Markelz N H, Costich D E, Brutnell T P. Photomorphogenic responses in maize seedling development[J]. *Plant Physiology*, 2003, 133(4): 1578-1591.
- [10] Sawers R J, Linley P J, Gutierrez-Marcos J F, et al. The *ELM1* (*ZmHy2*) gene of maize encodes a phytochromobilin synthase[J]. *Plant Physiology*, 2004, 136(1): 2771-2781.
- [11] Larkin M A, Blackshields G, Brown N P, et al. Clustal W and Clustal X version 2.0[J]. *Bioinformatics*, 2007, 23(21): 2947-2948.
- [12] Librado P, Rozas J. DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data[J]. *Bioinformatics*, 2009, 25(11): 1451-1452.
- [13] Tajima F. Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism[J]. *Genetics*, 1989, 123(3): 585-595.
- [14] Fu Y X, Li W H. Statistical tests of neutrality of mutations[J]. *Genetics*, 1993, 133(3): 693-709.
- [15] Bradbury P J, Zhang Z, Kroon D E, et al. TASSEL: Software for association mapping of complex traits in diverse samples[J]. *Bioinformatics*, 2007, 23(19): 2633-2635.
- [16] Remington D L, Thornsberry J M, Matsuoka Y, et al. Structure of linkage disequilibrium and phenotypic associations in the maize genome[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2001, 98(20): 11479-11484.
- [17] Yan J, Warburton M, Crouch J. Association mapping for enhancing maize (L.) genetic improvement[J]. *Crop Science*, 2011, 51(2): 433-449.
- [18] Xu S, Yang Z, Zhang E, et al. Nucleotide diversity of maize *ZmBT1* gene and association with starch physicochemical properties[J]. *PloS One*, 2014, 9(8): e103627.
- [19] Jiao Y, Zhao H, Ren L, et al. Genome-wide genetic changes during modern breeding of maize[J]. *Nature Genetics*, 2012, 44(7): 812-815.
- [20] Ching A, Caldwell K S, Jung M, et al. SNP frequency, haplotype structure and linkage disequilibrium in elite maize inbred lines[J]. *BMC Genetics*, 2002, 3: 19.
- [21] Childs K L, Miller F R, Cordonnier-Pratt M M, et al. The sorghum photoperiod sensitivity gene, Ma3, encodes a phytochrome B[J]. *Plant Physiology*, 1997, 113(2): 611-619.
- [22] Boylan M T, Quail P H. Oat phytochrome is biologically active in transgenic tomatoes[J]. *The Plant Cell*, 1989, 1(8): 765-773.
- [23] Thiele A, Herold M, Lenk I, et al. Heterologous expression of arabidopsis phytochrome B in transgenic potato influences photosynthetic performance and tuber development[J]. *Plant Physiology*, 1999, 120(1): 73-82.

(责任编辑 吴晓丽)

《科技导报》“研究论文”栏目征稿

“研究论文”栏目专门发表自然科学、工程技术领域具有创新性的研究论文,要求学术价值显著、实验数据完整、具有原始性和创造性,同时应重点突出、文字精炼、引证及数据准确、图表清晰,并附中、英文摘要以及作者姓名、所在单位、通信地址、关键词等信息。在线投稿:www.kjdb.org。