

网络出版日期:2020-06-02 doi: 10.7606/j.issn.1004-1389.2020.06.006 网络出版地址:http://kns.cnki.net/kcms/detail/61.1220.S.20200601.1204.002.html

# 玉米轴色突变体 698-3R 的遗传鉴定

余学杰<sup>1,2</sup>,李开兵<sup>1,3</sup>,张 玉<sup>1,4</sup>,

柯永培1,2,蔡 林2,石海春1,2

(1.四川农业大学农学院,成都 611130;2.四川农大正红生物技术有限责任公司,成都 610213;3.贵州毕节市农业农村局,贵州毕节 551700;4.山东鑫丰种业有限公司,山东聊城 252400)

**摘 要** 以辐射诱变获得的玉米红轴突变体 698-3R 为材料,通过遗传交配设计分析轴色的遗传规律,利用 SSR-BSA 法初步定位轴色基因,并对候选基因进行克隆和表达分析。结果表明:(1)突变体 698-3R 的红轴对 白轴性状表现为显性遗传,受一对核基因控制,初步定位在第一染色体上的 SSR 标记 phi095 与 umc1452 之 间,与 phi095 相距 3.9 cM,与 umc1452 相距 7.1 cM,将该基因暂定名为 C(t);(2)以轴色基因 P1 的 cDNA 为 模板克隆 C(t),发现 698-3R 有 3 个 C(t)转录本,而野生型 698-3 中至少有 2 个;预测氨基酸序列比对发现, 698-3R 中 3 个 C(t)蛋白的氨基酸序列与已知 P1-wr 蛋白一致,突变使其获得完整的 MYB 结构域和酸性激 活域,而野生型 698-3 中 698-3-P-1 蛋白由于编码序列缺失导致移码突变,不具有该功能结构域;(3)对 C(t) 基因 qRT-PCR 分析发现,除 25DAP 外,其余 4 个时期在 698-3R 中表达水平均显著或极显著高于 698-3;以 A1 和 C2 基因表达验证分析发现,C(t) 与验证基因表达模式一致,说明 C(t)可能具有 P1 激活调控 A1 和 C2 基因表达的功能。推测该红轴基因 C(t)可能为一个P1-wr 基因。 **关键词** 玉米;辐射诱变;698-3R;轴色;遗传鉴定;基因定位;基因克隆

**中图分类号** S513 文献标志码 A 文章编号 1004-1389(2020)06-0860-10

种质资源是玉米育种的物质基础,玉米种质 资源的研究工作一直被高度重视<sup>[1-4]</sup>。广泛应用 辐射诱变创制新的玉米种质资源,直至选育新品 种,是突破玉米育种实践中资源遗传基础狭窄瓶 颈的可能技术之一<sup>[5-7]</sup>。玉米自交系 698-3 自身 综合性状优良,已组配出 10 多个杂交种,在生产 应用上取得了显著的社会经济效益<sup>[8]</sup>,用它作为 基础材料进行改良,创制新的优良玉米种质资源 的可能性较大。本试验以用<sup>60</sup>Co-γ射线辐射诱变 处理玉米自交系 698-3 获得的一份红轴突变体 698-3R 为材料,研究其轴色遗传规律,定位控制 该轴色基因,并对其候选基因进行克隆和表达分 析,为该突变体的进一步应用研究提供参考。

- 1 材料与方法
- 1.1 供试材料

玉米自交系 698-3(P<sub>1</sub>),以及用<sup>60</sup>Co-γ射线

辐射该自交系而获得的一份遗传稳定的红轴突变体,暂命名为 698-3R( $P_2$ ),正、反交  $F_1$ 、 $B_1$ 、 $B_2$ 和  $F_2$ 群体,均由四川正红生物技术有限责任公司提供。其中,经多年田间种植鉴定,亲本 698-3和 698-3R 除轴色有明显差异外,其余主要农艺经济性状无显著差异。

#### 1.2 试验方法

1.2.1 田间试验 在四川和海南构建正交  $F_1$ ( $P_1 \times P_2$ )、反交  $F_1(P_2 \times P_1)$ 、 $B_1$  正交[( $P_1 \times P_2$ ) × $P_1$ ]、 $B_1$  反交[( $P_2 \times P_1$ )× $P_1$ ]、 $B_2$  正交[( $P_1 \times P_2$ ) × $P_2$ ]、 $B_2$  反交[( $P_2 \times P_1$ )× $P_2$ ]和  $F_2$  群体。 在公司双流育种基地种植亲本  $P_1$ 、 $P_2$ ,  $F_1$  正反交 群体, B1、 $B_2$  正反交群体和  $F_2$  群体。其中亲本和 正反交  $F_1$ 代, 6 行区, 每行 7 穴, 每穴 2 株定苗, 种植密度 50 000 株/hm<sup>2</sup>, 每个分离群体种植1个 果穗的全部种子,每穴播种 3 粒,不间苗。田间考 察所有群体果穗的轴色。

收稿日期:2019-09-12 修回日期:2019-10-28

基金项目:四川省科技支撑计划项目(2016NYZ0006, 2011FZ0119);四川省重点研发项目(2019YFN0012)。

第一作者:余学杰,男,学士,实验师. 主要从事玉米遗传育种研究。E-mail: yuxj305@163.com

通信作者:石海春,男,博士,教授,博士生导师,主要从事玉米遗传育种研究。E-mail: haichun169@163.com

1.2.2 红轴基因定位 定位群体为 F2 代正反交 群体,在5~6片叶时,田间取亲本 P<sub>1</sub>、P<sub>2</sub>10 株幼 嫩叶片混合,F2 正反交群体同时单株取样,DNA 提取采用 2×CTAB 法,15 µL PCR 反应体系,用 6%变性聚丙烯酰胺凝胶电泳扩增产物,银染法检 测<sup>[9]</sup>。根据 F<sub>2</sub> 群体穗轴颜色,参照 Michelmore 等<sup>[10]</sup>提出的分离群体分组分析法(Bulked segregant analysis, BSA), 在 F2 群体中随机选取红 轴和白轴各 10 个单株,分别取等量 DNA 混合, 建成红轴基因池和白轴基因池。根据在红、白池 间筛选的 SSR 引物情况,对在两池间多态性表现 稳定的 SSR 标记,用 F<sub>2</sub> 代正反交群体中全部白 轴单株进行 PCR 扩增,统计白轴单株对应的 SSR 多态性结果,用红轴单株做验证。将具有白轴 698-3 带型的单株记为 A,具有红轴 698-3R 带型 的单株记为 B,具有双亲本杂合带型的单株记为 H,用 MAPMARKER 3.0 软件对 F<sub>2</sub> 分离群体的 轴色性状和分子标记的分离数据进行连锁分析, 利用 Kosambi 函数将重组率转化为遗传距离  $(cM)^{[11]}$ 

1.2.3 候选基因克隆 根据遗传分析与基因定 位结果,在 MaizeGDB上搜索定位区段附近轴色 相关基因,根据结果基因模型为模版使用 Oligo 7 设计引物,Trizol 法提取穗轴颖片总 RNA,PCR 扩增目的基因片段,将目的片段连入 T5 载体 (pEASY<sup>®</sup>-T5 Zero Cloning Kit,购自 TRANS), 挑单克隆重复测序,使用 DNAMAN 对测序结果 比对,IBS 1.0 序列图绘制软件比对结果作图。 1.2.4 表达分析 取 698-3R 和 698-3 自然授粉 后 5、10、15、20 和 25 d(DAP)的穗轴颖片;Trizol 法提取总 RNA, TaKaRa 试剂盒 PrimeScript<sup>TM</sup> RT reagent Kit with gDNA Eraser (Perfect Real Time)去除基因组 DNA 与反转录,SYBR 荧光染 料法(UltraSYBR Mixture 试剂盒,康为世纪生物 科技有限公司),基因相对表达量计算采用 Livak 等<sup>[12]</sup>方法,利用 Excel 2007 进行相对表达量作 图;PCR 反应在 C1000<sup>TM</sup> Thermal Cycler PCR 仪 上进行,CFX96 Real-Time System 进行荧光收 集;内参为β-Actin;每个时期各材料均取 3 株样, 做 3 次技术重复。

2 结果与分析

#### 2.1 突变体 698-3R 轴色的遗传规律

对各群体果穗轴色分离情况进行统计分析 (表 1)表明:所有 698-3 果穗均为白轴,698-3R、 正反交  $F_1$  果穗和以 698-3R 为轮回亲本的 2 个回 交 B2 群体的果穗均表现为红轴,说明 698-3R 红 轴性状受细胞核显性基因控制;2 个正反交  $F_2$  群 体的果穗出现分离,经  $\chi^2$  检验,红轴与白轴符合 3:1 分离比例,2 个回交 B1 群体则符合 1:1 分 离比例,所有正反交组合轴色分离比例一致,不受 细胞质效应影响,表明该突变体穗轴颜色是受 1 对核基因控制,将该基因暂定名为 C(t)。

Table 1 Segregation of cob color in each population							
群体 Population	总株数 Total numbers of plants	红轴株数 Plant number of red cob	白轴株数 Plant number of white cob	红轴:白轴 Ratio of red cob to white cob	理论比例 Theoretical ratio	卡方值 χ <sup>2</sup>	
P <sub>1</sub> (698-3)	84	0	84	—	_	_	
$P_2(698-3R)$	84	84	0	—	—	_	
$F_{1E}$ (698-3 × 698-3R)	84	84	0	—	—	_	
$F_{1ar{ m c}}$ (698-3 $ m R  imes$ 698-3)	84	84	0	—	—	_	
$F_{2E}$ (698-3 × 698-3R)	276	205	71	2.89 : 1	3 <b>:</b> 1	0.043 5	
$F_{2ar{ m pc}}$ (698-3 $ m R  imes$ 698-3)	207	156	51	3.06 : 1	3 <b>:</b> 1	0.001 6	
${\rm B}_{1{\mathbb E}}$ (698-3×698-3R) × 698-3	308	157	151	1.04 : 1	1:1	0.081 2	
${\rm B}_{2{\mathbb E}}$ (698-3 $ imes$ 698-3R) $ imes$ 698-3R	316	315	1	—	—	_	
$\mathrm{B}_{1ar{ m K}}$ (698-3 $\mathrm{R} imes$ 698-3) $ imes$ 698-3	393	187	206	1:1.1	1:1	0.824 4	
${\rm B}_{2ar{ m E}}$ (698-3R $ imes$ 698-3) $ imes$ 698-3R	259	259	0	_	_	—	

表 1 各群体轴色表现 Table 1 Semi-referred as herein and semi-referred

### 2.2 突变体 698-3R 轴色基因的分子标记定位

2.2.1 多态性引物筛选 首先选用均匀分布于

玉米 10 条染色体上的 475 对 SSR 引物,检测 698-3R 与 698-3 的基因组 DNA 扩增差异,共筛

选出 18 对在亲本间表现多态性稳定且重复性好 行的 SSR 引物(表 2),用它们在红、白轴基因池间进 两

行多态性筛选,结果显示,只有引物 umc2225 在 两基因池间表现多态性。

表 2 两亲本间表现多态性 SSR 引物

Table 2 Polymorphism of SSR primers in two parents

引物 Primer	位置(Bins) Site(Bins)	引物 Primer	位置(Bins) Site(Bins)	引物 Primer	位置(Bins) Site(Bins)
umc2225	1.01~1.02	bnlg1721	2.08	bnlg1443	6.05
bnlg2238	1.04	umc2202	2.08	bnlg2132	7
umc1080	2.06~2.07	phi453121	3.01	bnlg1805	7.03
bnlg1633	2.07	phi104127	3.01	umc1149	8.05~8.06
umc1798	2.08	umc1965	3.04	bnlg240	8.06
bnlg1662	2.08	phi031	6.04	phi233376	8.09

2.2.2 C(t)基因的分子标记初步定位 用位于 引物 umc2225 附近的 29 对 SSR 引物,以及与控 制玉米轴色基因 P1 相连锁的 10 对引物,进行亲 本和两池间的多态性筛选,结果进一步筛选出3 对 SSR 引物具有多态性,它们是 umc2224、 umc1452 和 phi095(图 1,表 3)。然后用这 4 对候 选标记对 F2 正反交群体中共计 122 个白轴单株 进行 PCR 扩增,其检测结果为,phi095 表现为 116个698-3带型,5个698-3R带型,1个双亲本 杂合带型:umc1452 表现为 95 个 698-3 带型,0 个 698-3R 带型,17 个双亲本杂合带型,10 个空 白;umc2225 表现为 57 个 698-3 带型,13 个 698-3R带型,49个双亲本杂合带型,3个空白; umc2224 在 122 个白轴 DNA 中扩增条带表现为 83个698-3带型,5个698-3R带型,22个双亲本 杂合带型,12个空白。用引物 phi095 对其随机 选取的 20 个 F<sub>2</sub> 红轴单株 DNA 进行验证,其扩 增条带均表现为 698-3R 带型。利用 MAPMAK-ER 3.0 作图软件对筛选出的在双亲和两池间表 现多态性的 SSR 引物进行连锁分析,利用 Kosambi 函数将重组率转化为遗传距离(cM)。根 据  $F_2$  定位群体的轴色和微卫星标记的分离数据 构建局部分子连锁图(图 2),结果表明轴色突变 基因 C(t)位于第一染色体短臂上 phi095 与 umc1452 之间,与 phi095 相距 3.9 cM,与 umc1452 相距 7.1 cM,与 umc2225 相距 23.5 cM,与 umc2224 相距 70.1 cM。

#### 2.3 红轴基因 C(t)的候选基因克隆

2.3.1 C(t) 侯选基因的选择 根据定位结果, 在数据库 MaizeGDB 上搜索关于穗轴颜色相关基 因, 仅 有 Pericarp color 1 (P1), ID: GRMZM2G084799。P1 基因控制玉米种皮和穗 轴的着色,由两个后缀字母表示其在种皮和穗轴 颖上的表达,例如P1-rw 和P1-wr 分别表示红色 种皮白色穗轴和白色种皮红色穗轴。标记 phi095 与P1 基因紧密连锁,本研究定位结果显示 C(t) 与该标记也存在连锁关系,且在染色体上 与P1 基因位于该标记同侧,遗传模式分析显示



P1、P2、W1、R1分别为698-3、698-3R、白池、红池;W、R分别为F2群体白轴单株、红轴单株;\*为交换单株

P1,P2,W1,R1 were 698-3,698-3R, white pool and red pool respectively; W, R the  $F_2$  individual plants with white and red cob respectively; \* was exchange plant

图 1 phi095 在两池和部分 F<sub>2</sub> 群体单株间的扩增图谱

Fig. 1 Map of amplification with phi095 between two pools and F2 individual plants

类型	引物	位置(Bins)	
Туре	Primer	Site(Bins)	Primer sequence
定位引物	umc2224	1.01	CGGGCTATAAGTAAACTGAAACGG//AGCTGGCTAGCTGTTAGCGTTTT
Locating primer	umc2225	1.02	TCGGCTGACATAATAAAAACCATAGC//ATGCGAATTTTACCGGGTTTTT
	umc1452	1.03	GATCCTAGCCTTGAAGGGGAACT//AAGAGGAACCATTCTGCTATCGTG
	phi095	1.03	CCGATCGGCTTTATCACTGTTTAGC//ATGCACCATTCTAGCACTATAG-CAACACT
克隆引物	Pc4F/Pc4R	_	AGCCAGCACAGCACACA//GCCAAAACGCCGCCGT
Cloning primer	EP5-8/EP3-10	—	ACGCGCGACCAGCTGCTAACCGTG//CTGTCGGCCTCCCCCAGACTAGG
	qP4F/qP4-1R	—	GACCGATCAGACAGACCAAC//ACCTTTACAATGCCATACGAC
	qP4F/qP4-2R	_	GACCGATCAGACAGACCAAC//CTATTCTACATGCCATACACGAA
表达引物 Expressing prim- er	qP4F/qP4-3R	_	GACCGATCAGACAGACCAAC//AAAACTGTACACACGAGCAAC
	qP5F/qP4-2R	_	TTGGCTCCTGTCCGACT// CTATTCTACATGCCATACACGAA
	qP4F/qP4-3R	_	GACCGATCAGACAGACCAAC//AAAACTGTACACACGAGCAAC
	qA11F/qA11R	—	GGCGCATCGTCTTCACTTCC// GTCGGTCCAGCTTTCCTCGTC
	qC21-1F/qC21R	—	CACCGCCTGATTCATCGATT// ACTACACACGACAATTATAGCAG
	β-Actin		TGGCATTGTCAACAACTGG// CCCACTAGCGTACAACGAA

表 3 引物名称和序列

Table 3 Name and sequence of primers







*C*(*t*)为红轴对白轴为显性遗传,与*P1*基因一致,因此以*P1*作为候选基因开展研究(NCBI登录号:NM 001291678)。

2.3.2 *C*(*t*)基因的 cDNA 克隆 从 698-3R 的 15DAP 时期的 穗轴颖片转录物中,引物 Pc4F/Pc4R(序列见表 3)扩增并克隆测序后获得 3 个转录本,分别是 698-3R-cDNA1、698-3R-cD-NA2 和 698-3R-cDNA3,序列比对见图 3。从图 3 可知,3 个 cDNA 在不同位置上有差异,但均具有 完整的起始密码子和终止密码子。从 698-3 的 15DAP 时期的穗轴颖片转录物中,引物 Pc4F/

Pc4R 无法获得产物,而引物 EP5-8/EP3-10(序列 见表 3)扩增并克隆测序获得 1 个 382 bp 的片段 698-3-cDNA1(图 3),与 698-3R-cDNA1 相比, 698-3-cDNA1 在第 415 个碱基开始有一个 521 bp 片段的缺失,这直接导致移码突变(如图 4 中 的 698-3-P-1)。而引物 qP4F/qP4-3R(序列见表 3)对 698-3 的 15DAP 时期的穗轴转录物扩增并 克隆测序,结果如图 3,698-3 中至少存在 2 个 *c* (*t*)转录本,698-3-cDNA2 和 698-3-cDNA3,且仅 在 1403 碱基处有不同,与 698-3R 的 3 个转录本 在此处碱基差异一致。从 698-3 中克隆出来的 *c* (*t*)转录本均不完整,除了 698-3-cDNA1 包含翻 译起始密码子外,698-3-cDNA2 和 698-3-cDNA3 均位于第三外显子上,位于模板的 1 341~1 420 的位置,且 3 个转录本均不包含终止密码子。

2.3.3 c(t) 基因缺失位点鉴定 使用 4 对引物 (qP5F/qP4-2R、qP4F/qP4-3R、qP4F/qP4-2R 和 qP4F/qP4-1R,位置如图 4 所示,序列见表 3)对 698-3R 和 698-3 穗轴颖片的转录物进行扩增,这 4 对引物在 698-3R 中均能扩增,而 698-3 中则只 有 qP4F/qP4-3R 能扩增,根据这些引物位置,推 测 c(t)的转录本在引物 qP4-1R 到 qP4-2R 所对 应的位置可能有突变,位于模板 1 461-1 513 处 (图 4 中虚线区段所示)。对 qP4F/qP4-3R 扩增 片段连入克隆载体进行测序,序列差异结果如上 述中的 698-3-cDNA2 和 698-3-cDNA3。



NM-001291678 是 NCBI 上P1-rr 等位的 cDNA;698-3R-cDNA1、698-3R-cDNA2 和 698-3R-cDNA3 是 C(t)在 698-3R 中的 3 个转录 本;698-3-cDNA1,698-3-cDNA2 和 698-3-cDNA3 是 c(t)在 698-3 中的 3 个转录本

NM-001291678 was cDNA of P1-rr Allele in NCBL 698-3R-cDNA1, 698-3R-cDNA2 and 698-3R-cDNA3 were three transcripts of C (t) in 698-3R. 698-3-cDNA1, 698-3-cDNA2 and 698-3-cDNA3 were three transcripts of c(t) in 698-3



M. DL 2000 DNA marker;1 和 2 分别表示红轴突变体 698-3R 和白轴自交系 698-3;引物 qP5F/qP4-2R、qP4F/qP4-3R、qP4F/qP4-2R、qP4F/qP4-1R 和 β-Actin 扩增的产物的目的长度分别为 182、80、142、173 和 217 bp。

M. DL 2000 DNA marker; 1 and 2 indicate red cob mutant 698-3R and white cob inbred 698-3, respectively; the predicted lengths of the amplified products of the primers qP5F/qP4-2R, qP4F/qP4-3R, qP4F/qP4-2R and qP4F/qP4-1R were 182, 80, 142, and 173 bp, respectively.



2.3.4 C(t)蛋白氨基酸序列分析 使用 DNA-MAN 预测 698-3R-cDNA1、698-3R-cDNA2、698-3R-cDNA3 和 698-3-cDNA1 编码蛋白的氨基酸 序列并比对,结果如图 5 所示。在 698-3R 中,仅 有 698-3R-cDNA3 编码的蛋白 698-3R-P-3 在 C 末端有1个丙氨酸(A)插入,另外2个转录本预

测的氨基酸序列与已知的 P1-wr 蛋白的氨基酸 序列完全一致,且预测的3个蛋白均具有完整的 MYB结构域(第12~115个残基,如图5虚线所 示)和酸性激活域(第201~244个残基,如图5实 线所示)的氨基酸序列。而 698-3 的转录本 698-3-cDNA1 预测的 698-3-P-1 蛋白由于缺失导致移

图 3 C(t)的 cDNA 序列比对 Fig. 3 Sequence alignment of cDNA of C(t) 码突变,该突变区域刚好位于上述 2 个功能结构 区段(如图 5 的 698-3-P-1 所示)。说明,698-3R 的 3 个转录本预测的蛋白可能与 P1-wr 蛋白功能 一致,而与 698-3 的转录本预测的蛋白的功能不 一样。



NP-001278607、AAU09456 和 ACS44752 分别是 NCBI 上 P1-rr、P1-rw 和 P1-wr 蛋白氨基酸序列;698-3R-P-1、698-3R-P-2、698-3R-P-3 和 698-3-P-1 分别由 698-3R-cDNA-1、698-3R-cDNA-2、698-3R-cDNA-3 和 698-3-cDNA1 通过 DNAMAN 软件预测的氨基酸序列;虚线所指示区域为 MYB 结构域,实线所指示区域为酸性激活域

NP-001278607, AAU09456 and ACS44752 are amino acid sequences of P1-rr, P1-rw and P1-wr proteins on NCBI, respectively;698-3R-P-1, 698-3R-P-2, 698-3R-P-3 and 698-3-P-1 are predicted amino acid sequences from 698-3R-cDNA1, 698-3R-cDNA2, 698-3R-cD-NA3, and 698-3-cDNA1 by DNAMAN, respectively; the area of dotted line is MYB domain, and the area of solid line is acidic activation domain

#### 图 5 C(t)蛋白氨基酸列比对

#### Fig. 5 Sequence alignment of amino acid of predicted C(t) protein

2.3.5 *C*(*t*)的 qRT-PCR 结果分析 根据 C(t) 基因克隆结果,4 对引物中只有 qP4F/qP4-3R 在 698-3R和 698-3 的转录物中均能进行扩增(图 4),因此选择这对引物进行 C(t)基因的相对表达 量分析。结果如图 6,各时期 C(t) 基因在 698-3R 中的表达量均高于 698-3,除 25DAP 外,其余 4 个 时期表达水平均呈现显著或极显著差异(P= 0.004、0.001、0.001 和 0.036)。P1 基因是一个 MYB转录调控因子,根据其在糅红色素合成过 程中调控对 A1 和 C2 基因具有激活调控表达的 功能,本研究选 A1 和 C2 基因进行表达验证,引 物分别为 qA11F/qA11R 和 qC21-1F/qC21R(序 列见表 3),结果如图 6 所示。A1 和 C2 基因的表 达模式与C(t)基因一致,说明C(t)可能具有P1 激活调控 A1 和 C2 基因的功能。

3 讨论与结论

#### 3.1 突变体 698-3R 轴色的遗传规律

育种实践中多认为玉米轴色为质量性状,即 由一对基因控制,如曹冰等<sup>[13]</sup>研究表明玉米轴色 受一对基因控制,其中红轴对白轴为显性;而丰 光等<sup>[14]</sup>研究认为,玉米轴色性状遗传为少数主基 因控制,符合加性一显性一上位性两对主基因遗 传模型。本研究表明,突变体 698-3R 的轴色性状 受一对核基因控制,且红轴对白轴为显性遗传,其 结果与曹冰等<sup>[13]</sup>研究一致,将该基因暂定名为 C(t)。

# 3.2 突变体 698-3R 轴色基因 C(t)的初步定位 结果

Frascaroli等<sup>[15]</sup>研究表明玉米穗轴颜色是由



\*表示在 0.05 水平差异显著,\*\*表示在 0.01 水平差异显著

\* means significantly different at 0.05 level, \* \* means significantly different at 0.01 level





位于染色体 1.03 位置的*P1* 基因所控制,到现在 已发现的玉米轴色突变基因有 *P1-vv*<sup>[16]</sup>、*c1*<sup>[17]</sup>、*P1-wrb*<sup>[18]</sup>、*P1-www*<sup>[19]</sup>、*P1-ovov*<sup>[20-21]</sup>、*P1-mm*<sup>[22]</sup>、*P1-pr*<sup>[23-24]</sup>、*ufo1*<sup>[25]</sup>、*r1*等。本研究将 突变体 698-3R 轴色突变基因 *C(t)*,初步定位于 玉米第一染色体上 phi095 与 umc1452 之间,与 phi095 相距 3.9 cM,与 umc1452 相距 7.1 cM。 Veldboom 等<sup>[26]</sup>研究表明,phi095 与 *P1* 基因紧 密连锁,而红轴突变基因 *C(t)*与 phi095 相距较 近,推测该基因与控制种皮色和轴色的主要基因 *P1* 之间存在紧密连锁。

#### 3.3 突变体 698-3R 轴色基因 C(t)的克隆结果

P1 编码一个 MYB 转录调控因子,调控玉米 的种皮、穗轴及其他花器官的着色。P1 不同等位 间的转录本数量有较大差异, P1-rr 被认为只有 一个转录本,而P1-wr存在多个拷贝[27-28],这些拷 贝并非可变剪切所致,而是由P1 基因的复制形成 了串联重复<sup>[18]</sup>。本试验结果显示,在 698-3R 转 录物中检测到了3个C(t)转录本,而白轴的698-3至少2个,这与P1 基因存在多转录本的结果一 致。698-3R的3个转录本虽然在5'UTR和 3'UTR存在差异,但预测编码氨基酸序列基本一 致;698-3 的转录本中,一个 521 bp 片段的缺失以 及在1461~1513可能的缺失,直接影响预测编 码蛋白的氨基酸序列以及蛋白功能。Zhang 等<sup>[28]</sup>和 Chopra 等<sup>[29]</sup>认为 P1 等位的表达模式不 同,与编码蛋白质的C末端结构差异有关。预测 C(t)蛋白氨基酸序列与已知 P1-rr 与 P1-wr 蛋白 比对也发现,C(t)蛋白与 P1-rr 蛋白在 C 末端存 在较大差异,与 P1-wr 蛋白一致。因此推测 C(t) 可能为一个P1-wr 基因,根据P1 基因控制种皮、 穗轴颜色命名规则,C(t)则为一个 P1-ww 基因。 P1 基因研究中未提及过 P1-ww 的 cDNA 克隆, 多为对基因组中的基因结构分析,本研究在 698-3 转录物中未能成功获得 C(t)转录本全长,可能 与其结构和表达有关<sup>[28,30]</sup>。

#### 3.4 突变体 698-3R 轴色基因 C(t)的表达功能

只要存在适当的调节剂,几乎在每个植物器 官中都可以发现 3-羟基黄酮及其衍生色素花青 素[31],相比之下,玉米中的 3-脱氧类黄酮仅在种 皮、穗轴及雄穗颖片等部分花器官中发现,在成熟 的种皮和穗轴中,3-脱氧黄酮聚合形成红色糅红 色素[32]。玉米 P1 基因是生物合成 3-脱氧黄酮和 糅红色素所必需,但不能用于 3-羟基类黄酮和花 青素的合成[33]。糅红色素的生物合成开始于三 个丙二酰辅酶 A 与一个对香豆酰辅酶 A 经 Colorless2(C2)<sup>[34]</sup>基因编码的查尔酮合酶(CHS) 缩合形成柚皮素查耳酮,随后由 Chalcone flavanone isomerase1( Chi1)<sup>[35]</sup>基因编码的查耳酮异 构酶(CHI)将柚皮素查耳酮转化为柚皮素,在此 产生关键的分支步骤。玉米中的糅红色素是由柚 皮素或圣草酚通过由玉米 Anthocyaninless1 (A1)<sup>[36]</sup>基因编码的二氢黄酮醇还原酶(DFR)产 生的 4-黄烷醇或黄酮醇的聚合物,在此过程中, C2 和 A1 受P1 基因激活与表达量的调控<sup>[37]</sup>,本 研究结果显示, A1 和 C2 基因的表达模式与 C(t)基因一致,这与 Grotewold 等<sup>[37-38]</sup>的研究结 果相符,表明 C(t)具有 MYB 调控功能,这也更 说明了 C(t) 蛋白具有激活调控的功能。不同的 P1 等位基因有着不同的着色模式, P1 等位间的 糅红色素的发生和表达强度存在着很大差异,其 转录本的积累时间与可见色素的形成相关<sup>[30]</sup>, P1-rr 转录物的积累始于雌穗发育的早期阶段, 6DAP、9DAP 和 15DAP 表达强烈<sup>[39]</sup>, C(t)的转 录水平规律与之基本相符, 但P1-rr 在穗轴 6DAP 表达量最高, 而 C(t)则在 10DAP 时表达量最高, Zhang 等<sup>[30]</sup>也有相同结果, 可能是由于 P1 等位 间表达模式存在差异导致。

#### 参考文献 Reference:

- [1] 王懿波,王振华,王永普,等.中国玉米主要种质杂交优势利 用模式研究[J].中国农业科学,1997,30(4):16-24.
  WANG Y B, WANG ZH H, WANG Y P, et al. Studies on the heterosis utilizing models of main maize germplasms in China[J]. Scientia Agricultura Sinica,1997,30(4):16-24.
- [2] 滕文涛,曹靖生,陈彦惠,等.十年来中国玉米杂种优势群及 其模式变化的分析[J].中国农业科学,2004,37(12):1804-1811.

TENG W T, CAO J SH, CHEN Y H, et al. Analysis of maize heterotic groups and patterns during past ecade in China[J]. Scientia Agricultura Sinica, 2004, 37(12):1804-1811.

- [3] 吴 迅,杨克相,郭向阳,等.基于热带玉米种质的高效诱导 自交系筛选[J].玉米科学,2018,26(3):17-21.
  WU X,YANG K X,GUO X Y,et al. Screening of inbred lines with higher induced rate by using tropical maize germplasm to be acceptor parent[J]. Journal of Maize Sciences,2018,26(3):17-21.
- [4] 王晓娟,何海军,刘忠祥,等.一个玉米叶夹角突变体的表型 鉴定及遗传分析[J].西北农业学报,2019,28(8):1226-1231.

WANG X J, HE H J, LIU ZH X, et al. Phenotyping and genetic analysis of leaf angle mutant in maize(Zea mays L.) [J]. Acta Agriculturae Boreali-occidentalis Sinica, 2019, 28(8):1226-1231.

- [5] 秦家友,石海春,柯永培,等.玉米辐射诱变系表型及 SSR 遗传差异研究[J].玉米科学,2012,20(2):41-47.
  QIN J Y, SHI H CH, KE Y P, et al. Research on genetic difference of maize mutants by irradiation based on phenotypic and SSR[J]. Journal of Maize Sciences, 2012, 20(2): 41-47.
- [6] 陈华伟,石海春,余学杰,等.1份<sup>60</sup>Co-γ射线诱变玉米雄性 不育突变体的遗传分析[J].核农学报,2016,30(5):829-834.

CHEN H W,SHI H CH,YU X J,*et al.* Genetic analysis of a maize male sterile mutant induced by  $^{60}$ Co- $\gamma$ irradiation [J]. *Journal of Nuclear Agricultural Sciences*, 2016, 30(5):829-834.

- [7] 赵林姝,刘录祥.农作物辐射诱变育种研究进展[J].激光生物学报,2017,26(6):481-489.
   ZHAOLSH,LIULX. Research progresses in irradiationinduced mutation breeding in crops[J]. Acta Laser Biology Sinica, 2017,26(6):481-489.
- [8] 唐海涛,张 彪,杨俊品,等.优良玉米自交系 698-3 的选育 与应用[J].中国农学通报,2008,24(11):189-193. TANG H T,ZHANG B,YANG J P,et al. Breeding and application of excellent maize inbred line 698-3[J]. Chinese Agricultural Science Bulletin,2008,24(11):189-193.
- [9] CIMMYT. Applied Molecular Genetics Laboratory Protoco 1[M]. Mexico: CIMMYT, 1998.
- [10] MICHELMORE R W, PARAN I, KESSEL I R V. Identification of markers linked to disease resistance genes by bulked segregant analysis: a rapid method to detect markers in specific genomic regions by using segregating populations [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of USA, 1991, 88: 9823-9832.
- [11] LANDER E S, GREEN P, ABRAHAMSON J, et al. MAPMAKER: an interactive computer for construction primary genetics linkage maps of experimental and natural populations[J]. Genomics, 1987, 1:174-182.
- [12] LIVAK K J, SCHMITTGEN T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2  $-\Delta\Delta C_T$  method[J]. *Methods*, 2001, 25(4): 402-408.
- [13] 曹 冰,李现奎,李临江,等. 玉米株型和轴色性状的遗传 分析[J]. 山东农业科学,2007(2):8-9.
  CAO B, LI X K, LI L J, *et al.* Genetic analysis of maize plant type and ear color[J]. *Shandong Agricultural Sciences*,2007(2):8-9.
- [14] 丰 光,于 兵,李妍妍,等.玉米穗轴颜色性状的遗传研究[J]. 华北农学报,2012,27 (增刊):65-68.
  FENG G,YU B,LI Y Y,*et al.* Genetic study on ear axis color traits of maize[J]. *Acta Agriculturae Boreali-Sinica*,2012,27 (Supplement):65-68.
- [15] FRASCAROLI E, LANDI P. Allelic frequency change of P<sub>1</sub> gene in a maize population after recurrent selection for grain yield[J]. Crop Science, 1988, 38: 1391-1394.
- [16] CHEN J. Molecular analysis of Ac transposition and DNA replication[J]. Genetics, 1992, 130(3):665-676.
- [17] BYME P F. Maize silk maysin concentration and corn earworm antibiosis: QTLs and genetic mechanisms [J]. Crop Science, 1998, 38(2): 461-471.
- [18] GOETTEL W, MESSING J. Change of gene structure and function by non-homologous end-joining, homologous recombination, and transposition of DNA[J]. PLoS Genetics, 2009,5(6):98-111.
- [19] ATHMA P.PETERSON. Ac induces homologous recombination at the maize P locus[J]. Genetics, 1991, 128:163-173.
- [20] CHOPRA S, ATHMA P, LI X G, et al. A maize myb homolog is encoded by a multicopy gene complex[J]. Mo-

lecular and General Genetics Mgg, 1998, 260: 372-380.

- [21] ZHANG F, PETERSON T. Comparisons of maize pericarp color 1 alleles reveal paralogous gene recombination and an organ-specific enhancer region [J]. *Plant Cell*, 2005,17,903-914.
- [22] BRINK R A, STYLES E D. A collection of pericarp factors [J]. MNL, 1966, 40:149-160.
- [23] GOETTEL W, MESSING J. Paramutagenicity of a P<sub>1</sub> epiallele in maize [J]. Theoretical and Applied Genetics, 2013,126(1):77-159.
- [24] GOETTEL W, MESSING J. Epiallele biogenesis in maize [J]. Gene, 2012, 12:34.
- [25] SEKHON R S, WANG P, SIDORENKO L V, et al. Maize unstable factor for orangel is required for maintaining silencing associated with paramutation at the pericarp coloR<sub>1</sub> and booster 1 loci [J]. PLoS Genetics, 2012, 8: e1002980.
- [26] VELDBOOM L R .LEE M. Genetic mapping of quantitative trait loci in maize in stress and nonstress environments: Grain yield and yield components [J]. Crop Science, 1996, 36:1310-1319.
- [27] CHOPRA S, ATHMA P, LI X, et al. A maize myb homolog is encoded by a multicopy gene complex[J]. Molecular & General Genetics Mgg, 1998, 260(4):372-380.
- [28] ZHANG P, CHOPRA S, PETERSON T. A segmental gene duplication generated differentially expressed mybhomologous genes in maize[J]. *Plant Cell*, 2000, 12(12): 2311-2322.
- [29] CHOPRA S, ATHMA P, PETERSON T. Alleles of the maize P gene with distinct tissue specificities encode mybhomologous proteins with C-terminal replacements [J]. *Plant Cell*, 1996, 8(7): 1149-1158.
- [30] ZHANG F, PETERSON T. Comparisons of maize pericarp color 1 alleles reveal paralogous gene recombination and an organ-specific enhancer region [J]. *Plant Cell*, 2005, 17(3):903-914.

- [31] DOONER H K, ROBBINS T P, JORGENSEN R A. Genetic and developmental control of anthocyanin biosynthesis[J]. Annual Review of Genetics, 1991, 25(1):173-199.
- [32] STYLES E D, CESKA O. Genetic control of 3-hydroxyand 3-deoxy- flavonoids in Zea mays[J]. Phytochemistry, 1975,14(2):413-415.
- [33] STYLES E D,CESKA O. The genetic control of flavonoid synthesis in maize[J]. Canadian Journal of Genetics & Cytology, 1977, 19(2):289-302.
- [34] WIENAND U, WEYDEMANN U, NIESBACH-KLSGEN U, et al. Molecular cloning of the C2 locus of Zea mays, the gene coding for chalcone synthase[J]. Molecular & General Genetics Mgg, 1986, 203(2): 202-207.
- [35] GROTEWOLD E, PETERSON T. Isolation and characterization of a maize gene encoding chalcone flavonone isomerase[J]. Molecular & General Genetics Mgg, 1994, 242(1):1-8.
- [36] SCHWARZ-SOMMER Z, SHEPHERD N, TACKE E, et al. Influence of transposable elements on the structure and function of the A1 gene of Zea mays[J]. Embo Journal, 1987,6(2):287-294.
- [37] GROTEWOLD E, PETERSON T. Alternatively spliced products of the maize *P* gene encode proteins with homology to the DNA-binding domain of myb-like transcription factors[J]. *Proceedings of the National Academy of Science*, 1991, 88(11): 4587-4591.
- [38] GROTEWOLD E, DRUMMOND B J, BOWEN B, et al. The my b-homologous P gene controls phlobaphene pigmentation in maize floral organs by directly activating a flavonoid biosynthetic gene subset[J]. Cell, 1994, 76(3): 543-553.
- [39] SIDORENKO L V,LI X,COCCIOLONE S M,et al. Complex structure of a maize myb gene promoter: functional analysis in transgenic plants[J]. Plant Journal for Cell & Molecular Biology, 2000,22(6):471-482.

## Genetic Identification of Color Mutant 698-3R in Maize Cob

YU Xuejie<sup>1,2</sup>, LI Kaibing<sup>1,3</sup>, ZHANG Yu<sup>1,4</sup>, KE Yongpei<sup>1,2</sup>, CAI Lin<sup>2</sup> and SHI Haichun<sup>1,2</sup>

 College of Agronomy, Sichuan Agricultural University, Chengdu 611130, China; 2. Sichuan Zhenghong Biology Co., Ltd., Chengdu 610213, China; 3. Bijie Bureau of Agriculture and Rural Affairs, Bijie

Guizhou 551700, China; 4. Shandong Xinfeng Seed Co., Ltd., Liaocheng Shandong 252400, China)

Abstract In this study, 698-3R mutant with red cob color derived from inbred line 698-3 by irradiation was selected for investigate the hereditary character of cob color by genetic analysis and the candidate gene mapping by SSR-BSA, candidate gene cloning and expression were also studied. The results showed: (1) the trait of red cob color was controlled by one single dominant gene, and the red cob gene, temporally named as C(t), was mapped on the chromosome 1S between two SSR markers of phi095 and umc1452 with genetic distance of 3.9 cM and 7.1 cM, respectively; (2) C(t) was cloned by the template of cDNA of P1 gene, and three transcripts of C(t) were identified in 698-3R while at least two in the wild type 698-3. Alignment of predicted amino acid sequences revealed that the amino acid sequence of three C(t) proteins in 698-3R were consistent with that in P1-wr protein. The complete MYB domain and acid-activating domain were obtained by mutation, while C(t) protein, 698-3-P-1 protein from 698-3 were verified for lack of MYB domain; (3) The qRT-PCR analysis indicated that C(t) gene expression in 698-3R was significantly or extremely significantly up-regulated in four sampling periods except for 25 DAP compared with the wild type of 698-3. Gene expression patterns of A1 and C2 were consistent with that of C(t) gene, this suggests that C(t) would activate and regulate gene expression of A1 and C2 via P1 gene. Accordingly, we proposed that the red cob gene C(t)was a P1-wr allele.

**Key words** Maize; Irradiation mutagenesis; 698-3R; Cob color; Genetic identification; Gene location; Gene cloning

**Received** 2019-09-12 **Returned** 2019-10-28

Foundation item Science and Technology Support Project in Sichuan Province(No. 2016NYZ0006, No. 2011FZ0119); Key Research and Development Projects in Sichuan Province(No. 2019YFN0012).
First author YU Xuejie, male, bachelor, experimentalist. Research area: maize breeding. E-mail: yuxj305@163.com

**Corresponding author** SHI Haichun, male, Ph. D, professor, doctoral supervisor. Research area: maize breeding. E-mail: haichun169@163.com

(责任编辑:成 敏 Responsible editor: CHENG Min)