

# 基于 QTL 定位和 RNA-seq 分析挖掘玉米茎粗候选基因

王新涛<sup>1</sup>, 魏 锋<sup>2</sup>, 代资举<sup>3</sup>, 李保叶<sup>1</sup>, 郝俊杰<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>河南省农业科学院植物保护研究所, 郑州 450002; <sup>2</sup>河南省新乡市农业科学院, 新乡 453002;

<sup>3</sup>河南省农业科学院河南省作物分子育种研究院, 郑州 450002)

**摘要:** 茎粗是影响玉米株型的一个重要性状, 为解析玉米茎粗的遗传基础, 本研究以茎粗存在显著差异的自交系郑 58 和 D863F 及其构建的 241 个 RILs 家系为材料, 在 2 个环境及最佳线性无偏预测值 (BLUP, best linear unbiased prediction) 下进行 QTL 定位。2 个环境及 BLUP 值下共检测到 6 个与玉米茎粗有关的 QTL, 分布于玉米的第 3、6 和 10 染色体上, 单个 QTL 解释的表型变异为 4.30%~10.73%。对 2 个亲本茎秆 RNA-Seq 结果进行分析, QTL 定位区间共检测到 106 个差异表达基因 (DEGs, differentially expressed genes), 其中 49 基因个上调, 57 个基因下调。GO 功能富集分析表明, 差异表达基因主要富集在分子功能中, 涉及催化活性、转移酶活性、苹果酸脱氢酶活性和离子结合等。KEGG 富集分析表明, 差异表达基因主要参与到次生代谢产物的生物合成, 丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸代谢, 类苯基丙酸合成代谢等过程。将 QTL 定位与转录组测序相结合, 筛选出 12 个可能调控茎粗发育的候选基因。这些 QTL 位点和候选基因可用于进一步的精细定位和功能分析, 为开展玉米理想株型分子育种奠定了基础。

**关键词:** 玉米; 茎粗; QTL; RNA-seq

## Identification of Candidate Genes Associating with Stem Diameter in Maize (*Zea mays* L.) Based on Integrating QTL Mapping and RNA-seq

WANG Xin-tao<sup>1</sup>, WEI Feng<sup>2</sup>, DAI Zi-ju<sup>3</sup>, LI Bao-ye<sup>1</sup>, HAO Jun-jie<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>Plant Protection Institute, Henan Academy of Agricultural Sciences, Zhengzhou 450002;

<sup>2</sup>Xinxiang Academy of Agricultural Sciences of Henan Province, Xinxiang 453002;

<sup>3</sup>Henan Academy of Crop Molecular Breeding, Henan Academy of Agricultural Sciences, Zhengzhou 450002)

**Abstract:** Stem diameter is an important trait that affects the plant architecture in maize (*Zea mays* L.). In order to study the genetic mechanism of stem diameter in maize, a recombinant inbred line (RIL) population (241 lines) derived from Zheng58 and D863F was used to determine the stem diameter at two environmental conditions, followed by QTL mapping using the best linear unbiased prediction values (BLUP). A total of 6 QTL for stem diameter were detected on chromosome 3, 6 and 10, each of which contributes to the phenotypic variance ranging from 4.30% to 10.73%. By transcriptome analysis, 106 (D863F/Zheng58) differentially expressed genes (DEGs) were identified in the physical intervals of the QTL. Forty-nine genes were up-regulated and 57 genes were down-regulated. GO functional enrichment analysis showed that most of the DEGs were enriched in molecular functions, including catalytic activity, transferase activity, malate dehydrogenase activity, ion binding and so on. KEGG enrichment analysis showed that the DEGs were mainly concentrated in biosynthesis of secondary metabolites, alanine, aspartate and glutamate metabolism, and phenylpropanoid biosynthesis. Twelve candidate genes were identified by integrating analysis of QTL mapping and RNA sequencing. These results enabled future fine mapping and functional analysis of these QTL and their candidate genes, which might provide

收稿日期: 2022-04-19 修回日期: 2022-06-02 网络出版日期: 2022-06-23

URL: <https://doi.org/10.13430/j.cnki.jpgr.20220419001>

第一作者研究方向为玉米遗传育种, E-mail: tao-450002@163.com; 魏锋为共同第一作者

通信作者: 郝俊杰, 研究方向为玉米病害和遗传育种, E-mail: haojjds@163.com

基金项目: 河南省科技攻关计划项目 (222102110433)

**Foundation project:** Science and Technology Project of Henan Province (222102110433)

a reference in marker-assisted maize breeding for ideal architecture.

**Key words:** maize; stem diameter; QTL; RNA-seq

近年来随着玉米 (*Zea mays* L.) 种植密度的提高, 对于玉米品种抗倒伏能力的要求也越来越高。茎粗作为玉米株型的一个重要性状, 是影响抗倒性并最终影响产量的重要因素<sup>[1]</sup>。研究表明, 茎粗与茎秆倒伏呈极显著负相关, 可作为衡量玉米倒伏的指标之一<sup>[2]</sup>。因此, 对玉米茎粗进行遗传分析并探讨其调控机制, 对于解析玉米茎秆发育的分子机制和开展 MAS 育种具有重要的意义。

QTL 定位和 GWAS 分析作为定位数量性状遗传位点的重要手段, 在玉米茎粗的遗传结构解析中被广泛应用。汤华等<sup>[3]</sup>利用 266 个 F<sub>2:3</sub> 家系定位到 8 个茎粗 QTL, 主要位于第 1、3、6 和 8 染色体上, 单个位点的贡献率为 6.46%~12.20%。徐德林等<sup>[4]</sup>以 186 个单株的 F<sub>2</sub> 群体, 在玉米第 2 染色体检测到 1 个茎粗 QTL, 且该位点作用方式为超显性。孙海艳等<sup>[5]</sup>以黄 C × 178 F<sub>2</sub> 群体为研究材料, 在玉米的第 2、3、4 和 9 染色体上定位到 4 个茎粗 QTL, 可以解释 6.8%~15.9% 的表型变异。贾波等<sup>[6]</sup>以苏玉 16 的 F<sub>2:3</sub> 家系为试验材料, 在玉米的第 1 和 3 染色体上共检测到 4 个茎粗 QTL, 可解释 5.84%~11.05% 的表型变异。Zhu 等<sup>[7]</sup>利用 162 个 DH 群体, 2 种密度条件下共定位到 2 个控制茎粗的主效 QTL 位点, 表型贡献率为 19.34%~20.21%。Hu 等<sup>[8]</sup>利用重组自交系群体在玉米第 5 染色体定位到同时控制宽和窄茎秆横截面直径的主效 QTL, 贡献率分别为 25.5% 和 22.1%。Mazaheri 等<sup>[9]</sup>则通过 942 份玉米自交系, 对茎秆相关性状进行全基因组关联分析, 在玉米的第 1、2、5、7、8 和 9 染色体上检测到 8 个与茎粗显著相关的 SNP 位点, 并在位点附近预测了 8 个候选基因。尽管以上研究为揭示玉米茎粗的遗传变异提供了位点参考, 但由于该数量性状的复杂性, 在不同遗传背景及环境条件下获得的 QTL 不尽一致, 对定位区间内相关性状候选基因的筛选和预测也较少。

随着高通量测序技术的进步, 研究人员在多种作物中利用转录组测序技术对目标性状进行候选基因分析。但由于获得的转录信息和差异基因比较广泛, 筛选出关键候选基因的难度较大。而基于 QTL 和 RNA-seq 的研究结果进行整合分析, 则可以极大缩小筛选基因的目标区域, 减少工作量和提高准确性, 进而挖掘出目标性状的候选基因。Lin 等<sup>[10]</sup>以玉米自交系 B73 × Mo17 构建的 RILs 和 F<sub>2:3</sub> 群体为

材料, 检测到 8 个与淀粉含量相关的 QTL, 其中位于第 9 染色体的 *Qsta9.1* 为主效 QTL; 通过 RNA-seq 分析筛选出 8 个差异表达基因, 预测其中的 2 个为 *Qsta9.1* 的候选基因。任蒙蒙等<sup>[11]</sup>以 3681-4 × X178 构建的 F<sub>2:3</sub> 群体为材料, 在玉米的第 10 染色体上定位到一个耐深播主效 QTL, 进一步构建近等基因系并进行 RNA-Seq 测序, 鉴定到 73 个差异表达基因, 并通过 GO 富集分析筛选了 4 个可能调控玉米中胚轴伸长的候选基因。而将 QTL 和 RNA-seq 分析相结合对玉米茎粗进行遗传解析的研究还未见报道。

发掘新的或稳定的控制茎粗的主效 QTL 位点, 并对其候选调控基因进行筛选和分析, 有利于进一步解析玉米茎粗性状的遗传和作用机制。本研究以玉米茎粗存在显著差异的玉米自交系郑 58 和 D863F 及其组建的 RILs 群体为试验材料, 在两个环境及 BLUP 值下对玉米茎粗进行 QTL 定位分析, 结合亲本的茎秆转录组数据, 筛选分布在 QTL 区间内的与茎秆发育相关的候选基因。为玉米茎粗主效 QTL 的精细定位、候选基因的功能验证及理想株型品种的培育提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

玉米 RIL 群体来源于亲本郑 58 × D863F 通过单籽粒传法构建成的 241 个 F<sub>7</sub> 家系, 郑 58 是玉米核心骨干自交系, 具有株型紧凑、穗位低和配合力高等优点; D863F 则具有抗倒伏、穗位适中和抗多种病害等特点。其中郑 58 和 D863F 分别来自于河南省农业科学院粮食作物研究所和中国农业科学院作物科学研究所。

### 1.2 田间试验及表型鉴定

2018 年和 2019 年夏季分别在河南西平 (33° 10' N, 113° 36' E) 和河南原阳 (35° 05' N, 113° 96' E) 试验基地进行田间试验。玉米授粉完成后 7~10 d, 每行从第 3 株开始随机选择 5 株, 利用电子游标卡尺测量植株地上茎基部第 3 节间中部的茎秆直径, 亲本及每个株系取其平均值为该株系的性状值。广义遗传力 ( $H^2$ ) 的计算公式为:  $H^2 = \sigma_g^2 / (\sigma_g^2 + \sigma_{gy}^2 / n + \sigma_e^2 / nr) \times 100\%$ , 其中  $\sigma_g^2$  表示基因型方差,  $\sigma_{gy}^2$  表示基因型与环境互作方差,  $\sigma_e^2$  表示误差项方

差,  $n$  和  $r$  分别代表环境数和重复次数。采用 SPSS 21.0 (<http://www.spss.com>) 对各环境下的表型数据进行统计分析。

郑 58、D863F 及 RIL 家系种植行长 2 m, 行距 0.6 m, 株距 0.25 m, 播种出苗后正常田间管理, 试验点田间试验均采用完全随机区组设计, 3 次重复。分别取大喇叭口期 2 个亲本的茎秆组织(茎基部第 3 节间中段), 经液氮速冻后于  $-80^{\circ}\text{C}$  超低温冰箱保存备用, 每个样品 3 个生物学重复。各样品经液氮研磨后利用 TRNzol 法提取总 RNA, 1% 琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 完整性。以不同玉米样品总 RNA 为模板, 用于 RNA-seq 及 qRT-PCR 分析。

### 1.3 茎粗 QTL 定位

前期利用 215 对多态性 SSR 标记对 RIL 群体进行基因型分析, 通过 JoinMap4.0 软件 ([www.biometris.wur.nl](http://www.biometris.wur.nl)) 构建遗传连锁图谱, 图谱全长 1832.35 cM, 标记间的平均遗传距离为 8.52 cM<sup>[12]</sup>。本研究结合 RIL 群体基因型, 采用 IciMapping v4.0 软件 (<https://isbreedingen.caas.cn/>) 的完备区间作图法进行 QTL 定位分析, 对两个环境及 BLUP 值下的茎粗进行 QTL 分析, 软件 LOD 阈值为 2.5, PIN 值设为 0.01, 模拟运算检测 1000 次。对检测到的 QTL 命名, 以  $q$  加上性状再加染色体位置表示。

### 1.4 转录组测序和差异表达基因筛选

对亲本(郑 58 和 D863F)在大喇叭口期的茎秆进行转录组测序, 茎秆 RNA-seq 测序和原始数据分析由北京诺禾致源科技股份有限公司提供, 基因表达量采用 FPKM (Fragments Per Kilobase of

exon model per Million mapped reads) 计算<sup>[13]</sup>, 利用 DESeq (<http://www.bioconductor.org/packages/release/bioc/html/DESeq2.>) 分析差异表达基因, 以  $|\log_2(\text{Fold change})| > 1$  且错误检出率 (FDR)  $< 0.05$  为标准筛选亲本茎秆间差异表达的基因。对筛选到的基因进行生物学过程、分子功能和细胞成分注释, 用 GOseq (<http://geneontology.org/>) 对差异表达基因进行了 GO 富集分析, 使用在线分析软件 KOBAS (<http://kobas.cbi.pku.edu.cn>) 进行 KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) 通路注释, 找出差异表达基因富集的功能或代谢路径。

基于 QTL 定位区间的标记信息, 参考玉米自交系 B73 基因组 (B73 RefGen\_V4, <https://www.maizgedb.org/genome/assembly/Zm-B73-REFERENCE-GRAMENE-4.0>) 上的物理位置, 筛选目标区段内的差异表达基因, 结合 GO 和 KEGG 分析, 进一步筛选与玉米茎秆发育相关的候选基因。

### 1.5 实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 分析

在候选区段内筛选与玉米茎秆发育相关的 12 个差异表达基因进行 qRT-PCR 验证 (表 1)。以不同玉米样品总 RNA 为模板, 通过反转录试剂盒 (PrimeScript RT-PCR Kit, TaKaRa), 获得 cDNA 第一链。以玉米的肌动蛋白基因 ( $\beta\text{-Actin}$ ) 作为内参基因, 以玉米不同材料的茎秆 cDNA 为模板进行 qRT-PCR。qRT-PCR 反应体系: cDNA 模板 1  $\mu\text{L}$ 、SYBR Premix Ex Taq (TaKaRa) 7.5  $\mu\text{L}$ 、上下游引物各 0.6  $\mu\text{L}$ 、ddH<sub>2</sub>O 5.3  $\mu\text{L}$ , 总体积 15  $\mu\text{L}$ 。采用相对定量  $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$  法<sup>[14]</sup> 分析候选基因表达量。

表 1 12 个候选差异表达基因 qRT-PCR 引物

Table 1 Primer sequences of twelve DEGs for qRT-PCR

引物名称 Primer name	正向引物 (5' -3') Forward primers (5' -3')	反向引物 (5' -3') Reverse primers (5' -3')
Zm00001d025316	TCTCCACTCGTCGTCC	GCCCTCCATTTCCTG
Zm00001d025345	TTTGCCGCCAATTCTG	GCACCACTGCCTGTCATAC
Zm00001d025490	CGGAGGACACCCAGCAACT	GGGACCAGCATCAGCATCG
Zm00001d025539	GTCTCACGCTCCTCTTGC	CATAGTCCGCTGCCACTC
Zm00001d025593	TGCTCCGACTTCTCTCCA	CGACCCTTTGAGTATCCC
Zm00001d025696	CAAACCTAATGTCTGT	TCAACAACCATCCCAC
Zm00001d036700	TCAGCACGCAGACGGAGACG	GCCGAGGTAGAGGCCTTGAGC
Zm00001d036703	CCAGGAGCGGAGTCGTT	GCGCCAAGGCTATGAG
Zm00001d036807	CAGCGTTGGTGCTAGATGAG	CCACTGTGAAGCCACTTGTT
Zm00001d036880	CGCTCCCTTACCCTGTG	AACCGCCTGTAGCTTGG
Zm00001d042727	CATACTAACCCATCCAGACAT	CACAAACTTGGCAACAGG
Zm00001d042752	TGGCGGAGGAGGAGGTGGAT	AGATGGCGGGCAGAAGAGGC
$\beta\text{-Actin}$	CCCTGAGGTTCTATTCCAGCC	CCAGGGAACATAGTGGAGCC

## 2 结果与分析

### 2.1 玉米 RIL 群体及双亲茎粗表型分析

RIL 群体和双亲在 2018 和 2019 年的茎粗表型分析结果见表 2。结果表明, 2 个环境下, 亲本 D863F 的茎粗平均值均显著高于郑 58 ( $P < 0.05$ )。RIL 群体中不同株系的茎粗均表现出较大的变异, 2 年的变异系数分别为 10.69% 和 12.64%。其中 2018 年茎粗为 14.83~26.75 mm, 平均值为 20.77 mm,

峰度为 0.24, 偏度为 -0.11; 2019 年茎粗为 11.98~24.72 mm, 平均值为 18.83 mm, 峰度为 -0.18, 偏度为 -0.14。RIL 群体茎粗的峰度和偏度的绝对值均小于 1, 符合连续的正态分布, 表现出典型的数量性状特征, 适合进行 QTL 定位研究(图 1、表 2)。方差分析结果表明, 茎粗在基因型、环境以及基因型 × 环境互动下的差异水平平均达到极显著水平 ( $P < 0.01$ ), BLUP 值的广义遗传力达到 71.13%, 表明茎粗性状的遗传力较高, 遗传相对稳定(表 3)。

表 2 不同环境下玉米茎粗的描述统计

Table 2 Phenotypic value statistics of stem diameter in maize under different environments (mm)

环境 Environment	亲本 Parents		RILs 群体 RILs population			偏度 Skewness	
	郑 58 Zheng 58	D863F	均值 ± 标准差 Mean ± SD	变幅 Range	变异系数(%) CV		峰度 Kurtosis
2018	19.00 ± 0.82	21.25 ± 0.87**	20.77 ± 2.22	14.83~26.75	10.69	0.24	-0.11
2019	17.45 ± 0.46	21.71 ± 0.64**	18.83 ± 2.38	11.98~24.72	12.64	-0.18	-0.14

± 前面数据表示平均值, 后面数据表示标准差; \*\* 表示在 0.01 水平上差异极显著, 下同

The data before ± represents the average, The data after ± represents represents the standard deviation; \*\* mean significant difference at 0.01 level, the same as below

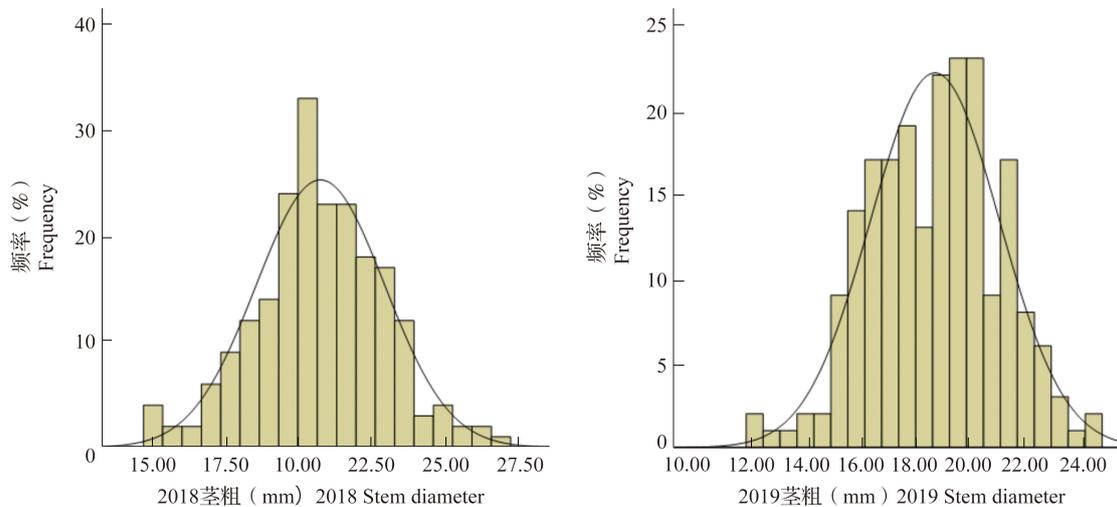


图 1 2018-2019 年 RILs 群体茎粗的频率分布

Fig.1 Frequency distributions of stem diameter in RILs population in 2018 and 2019

表 3 不同环境下玉米 RIL 群体茎粗的方差分析

Table 3 Variance analysis on stem diameter in maize RIL population under different environments

环境 Environment	变异来源 Variation	平方和 Sum of square	均方 Mean square	F	广义遗传力(%) $H^2$
2018	基因型	4631.72	21.64	8.34**	88.01
	误差	1590.56	2.59		
2019	基因型	4019.97	18.78	8.30**	87.95
	误差	1428.32	2.26		
BLUP	基因型	6315.37	29.51	12.20**	71.13
	环境	1597.91	1597.91	660.68**	
	基因型 × 环境	2353.21	11.00	4.55**	
	误差	1244.00	3008.71	2.42	

## 2.2 玉米 RIL 群体茎粗 QTL 定位

两个环境及 BLUP 值下共检测到 6 个与玉米茎粗有关的 QTL, 分别位于玉米的第 3、6 和 10 染色体上, 其中第 3 染色体上检测到的 QTL 增效等位基因来源于郑 58, 其余 QTL 的增效等位基因均来自于 D863F, 单个 QTL 解释可以解释 4.30%~10.73% 的表型变异 (表 4)。2018 年西平、2019 年原阳环境及 BLUP 值下各检测到 2 个 QTL, 其中位于玉米

第 10 染色体的 *qSD10* 在 2 个环境和 BLUP 值下均被检测到, 可解释的表型变异为 8.76%~10.73%, 表明该位点为稳定表达的调控玉米茎粗性状的主效 QTL。位于第 3 染色体 bnlg1350~umc2266 的 *qSD3* 在 2019 年原阳环境和 BLUP 值下均被定位到, 第 6 染色体 umc1979~bnlg2191 区间的 *qSD6* 仅在单一环境下被检测到, 这 2 个 QTL 解释的表型变异为 4.30%~7.00%。

表 4 玉米 RILs 群体茎粗的 QTL 定位结果

Table 4 QTL analysis for stem diameter in the RILs population of maize

环境 Environment	QTL	染色体 Chromosome	标记区间 Marker interval	物理位置 (M <sub>p</sub> ) Physical position	LOD	贡献率 (%) R <sup>2</sup>	加性效应 Additive effect
2018	<i>qSD6</i>	6	umc1979~bnlg2191	93.37~106.24	2.97	6.32	0.56
	<i>qSD10</i>	10	umc2350~umc1697	120.70~121.42	3.14	8.76	0.58
2019	<i>qSD3</i>	3	bnlg1350~umc2266	178.24~179.32	2.52	4.30	-0.50
	<i>qSD10</i>	10	umc2350~umc1697	120.70~121.42	4.12	10.73	0.71
BLUP	<i>qSD3</i>	3	bnlg1350~umc2266	178.24~179.32	3.61	7.00	-0.52
	<i>qSD10</i>	10	umc2350~umc1697	120.70~121.42	4.14	9.42	0.57

正值表示来自 D863F 的等位基因, 负值表示来自郑 58 的等位基因

Positive values indicate that the D863F allele, negative values indicate that the Zheng 58 alleles

## 2.3 茎粗 QTL 区间与差异表达基因联合分析

根据检测茎粗 QTL 所在的物理位置, 参考玉米 B73 基因组序列 (RefGen\_v4), 将 QTL 定位与转录组测序结果相结合, 对 2 个亲本大喇叭口期茎秆 RNA-Seq 表达谱中的基因表达量进行分析, 共检测到 106 个差异表达基因, 49 个上调, 57 个下调。其中分布在 *qSD3* 所在区间的差异表达基因有 13 个, 5 个上调, 8 个下调; 分布在 *qSD6* 所在区间的 DEGs 有 53 个, 26 个上调, 27 个下调; 分布在 *qSD10* 所在区间的差异表达基因有 40 个, 18 个上调, 22 个下调。

## 2.4 差异表达基因 GO 功能注释和 KEGG 富集分析

对定位区间内的差异表达基因进行 GO 功能注释, 106 个差异表达基因分别富集到 64 条 GO 显著条目中, 其中细胞组分 (Cellular component) 1 条, 与胞外基质相关, 占比 1.56%; 生物过程 (Biological process) 21 条, 主要参与蛋白磷酸化、氧化还原、生化代谢过程和基于微管的过程等, 占比 32.81%; 分子功能 (Molecular function) 42 条, 主要分为催化活性、转移酶活性、苹果酸脱氢酶活性和离子结合等, 占比 65.63%, 表明多数差异表达基因主要参与一些分子功能 (图 2)。将差异表达基因进一步进行 KEGG 富集通路分析, 共鉴定出 3 条 KEGG 富集通路, 分别是关于次生代谢产物的生物合成、丙氨酸、

天冬氨酸和谷氨酸代谢, 类苯基丙酸合成, 差异表达基因主要富集于次生代谢产物的生物合成途径。这表明在茎秆生长发育过程中, 不同茎粗的自交系亲本进行着复杂的新陈代谢, 涉及生物过程和分子功能方面的基因表达较为活跃。

## 2.5 候选基因挖掘及 qRT-PCR 验证

根据 GO 分析结果及其注释信息, 同时参考拟南芥、水稻等模式作物同源基因的生物功能, 在 3 个茎粗 QTL 中筛选出 12 个可能调控茎粗发育的候选基因, 其中分布在 *qSD3*、*qSD6* 和 *qSD10* 的候选基因分别为 2 个、4 个和 6 个 (表 5)。对筛选出的候选基因进行 GO 富集分析, 结果显示, 6 个候选基因 (*Zm00001d025490*、*Zm00001d025539*、*Zm00001d025593*、*Zm00001d025696*、*Zm00001d042752* 和 *Zm00001d042727*) 富集到 12 个条目, 生物过程和分子功能各占 6 个, 生物过程集中在代谢过程、氧化还原过程、单有机体过程等; 分子功能集中在氧化还原酶活性、水解酶活性和阳离子结合等功能条目。其余 6 个候选基因 (*Zm00001d025316*、*Zm00001d025345*、*Zm00001d036700*、*Zm00001d036703*、*Zm00001d036807* 和 *Zm00001d036880*) 在自交系 D863 (茎秆较粗) 中的表达量显著高于自交系郑 58 (茎秆较细), 依据基因的注释, 这 6 个候选基因可能通过生长素、转录因子等途径影响茎秆的发育。

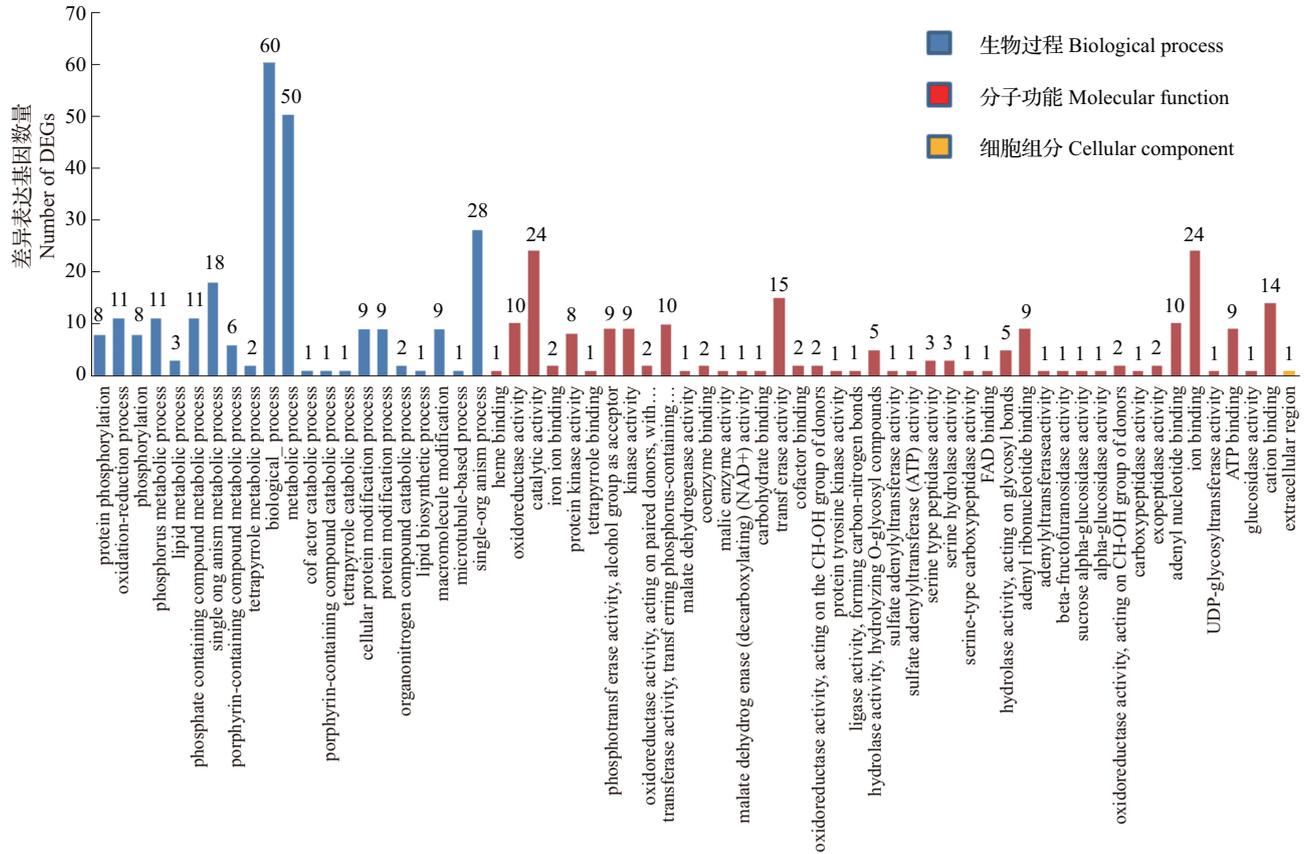


图 2 QTL 区间内的差异表达基因注释与分类  
Fig.2 GO annotation and classification of DEGs in QTL interval

表 5 QTL 区间筛选的候选基因

Table 5 Screening of candidate genes in QTL regions

候选基因 ID Candidategene ID	QTL 名称 QTL name	表达倍数 log <sub>2</sub> FCD	GO 信息 GO term	基因注释 Gene annotation
Zm00001d042727	qSD3	-1.96	BP: 生物过程、代谢过程	果糖 -1, 6- 二磷酸酶
Zm00001d042752	qSD3	5.29	BP: 生物过程、代谢过程	转录抑制因子 OFP6
Zm00001d036700	qSD6	1.94	无	CASP 蛋白 2C1
Zm00001d036703	qSD6	4.63	无	谷氨酰胺转储蛋白 4
Zm00001d036807	qSD6	2.46	无	转录因子 bHLH48
Zm00001d036880	qSD6	1.73	无	EIN3 结合 F-box 蛋白 1
Zm00001d025316	qSD10	1.50	无	F- 框 WD 重复域蛋白 10
Zm00001d025345	qSD10	2.78	无	小拉链蛋白 4
Zm00001d025490	qSD10	1.67	BP: 代谢过程、单生物过程; MF: 催化活性	生长素调节的器官大小基因 1
Zm00001d025539	qSD10	18.81	BP: 单有机体过程、蛋白质磷酸化; MF: 蛋白酪氨酸激酶活性	异胡豆苷合成酶蛋白 3
Zm00001d025593	qSD10	—	BP: 氧化还原过程; MF: 氧化还原酶活性、阳离子结合	3- 磷酸甘油醛脱氢酶 A
Zm00001d025696	qSD10	4.26	BP: 生物过程、代谢过程; MF: 水解酶活性、 水解酶活性作用于糖基键、催化活性	内切葡聚糖酶

—表示该基因在两样品间表达量的比值无法计算; BP、MF 分别代表生物过程和分子功能

Blank indicated that the ratio of the gene expression between the two samples could not be calculated; BP and MF represent biological process and molecular function respectively

为验证候选基因的转录组结果,本研究对 QTL 区段内筛选的 12 个差异表达基因进行 qRT-PCR 验证。结果显示,这些差异表达基因的 qRT-PCR 和转录组数据分析结果趋势相同(图 3、表 5),相关性分

析进一步显示 RNA-seq 和 qRT-PCR 之间存在显著相关性,相关系数为 0.889(图 4),表明 qRT-PCR 验证结果和转录组测序结果的一致性和实验结果准确可信。

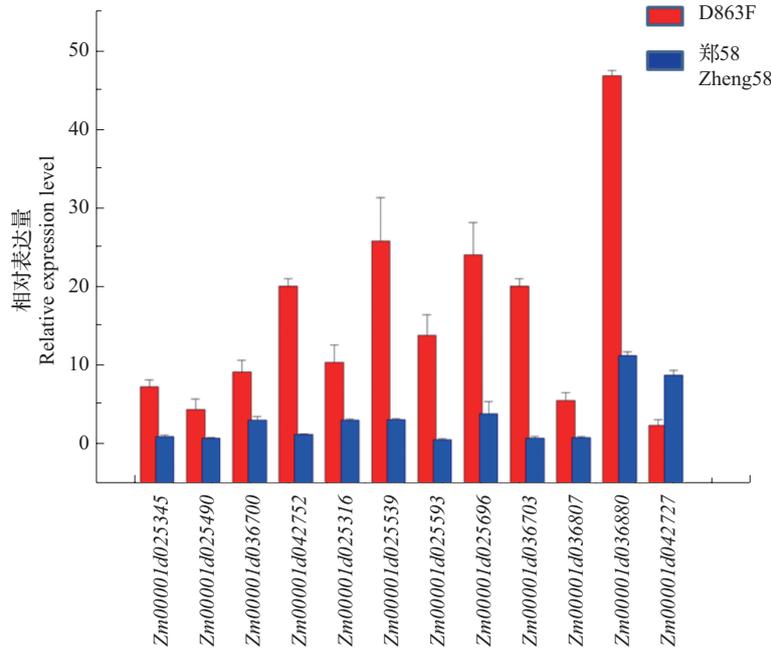


图 3 12 个差异表达基因的 qRT-PCR 分析  
Fig.3 qRT-PCR analysis of twelve DEGs

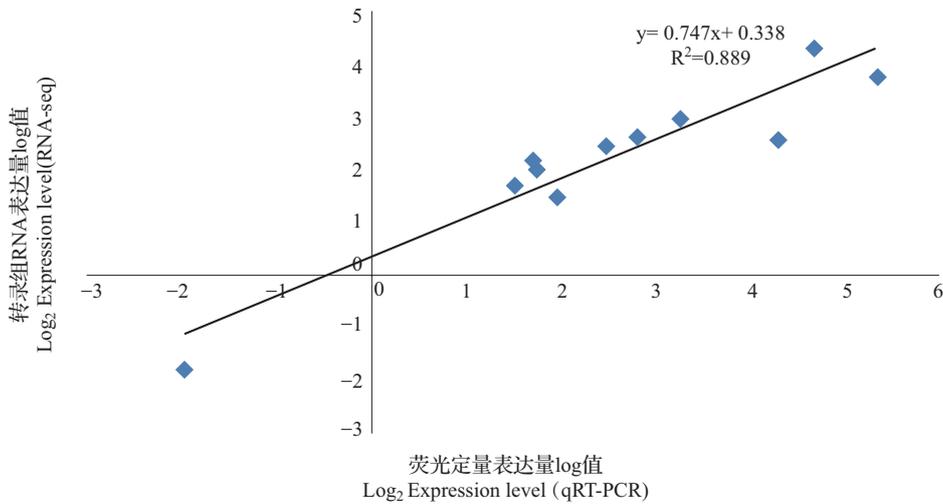


图 4 DEGs 基因的 RNA-Seq 和 qRT-PCR 表达相关性  
Fig.4 Relationship of expression level of DEGs between RNA-Seq and qRT-PCR

### 3 讨论

茎粗是影响茎秆强度的重要因素,同时也是青贮玉米培育、茎腐病病级评价和水分缺失的重要参考指标<sup>[15-18]</sup>。相比较于玉米其他株型性状,对茎粗的定位研究相对较少。易强等<sup>[19]</sup>和 Briggs 等<sup>[20]</sup>

研究认为玉米茎粗受环境的影响较大,定位到的 QTL 效应值较小,这与本研究的定位结果类似。因此,加强对玉米茎粗遗传基础的解析并挖掘其候选基因具有重要意义。

本研究利用重组自交系群体共定位到 6 个玉米茎粗相关的 QTL,分别位于玉米的第 3、6 和 10 染

染色体上。其中位于第3染色体 bnlg1350~umc2266 区间的 *qSD3* 与贾波等<sup>[6]</sup>定位的茎粗 QTL 区间基本一致,位于第6染色体 umc1979~bnlg2191 区间的 *qSD6* 与汤华等<sup>[3]</sup>和 Zhu 等<sup>[7]</sup>定位的茎粗 QTL 区间一致,说明以上2个 QTL 可靠性较高,是控制茎粗性状较为稳定的 QTL 位点。*qSD10* 在2个环境下均被检测到,特别是在2019年对茎粗表型的贡献率达到10.73%,为控制茎粗的主效 QTL,相关研究在第10染色体定位到控制茎粗的 QTL 与 *qSD10* 没有重叠,由此推测该位点为新发现的 QTL,为茎粗性状改良提供了新的位点参考和标记选择。

茎对于植物的直立和水分营养输送至关重要,其生长发育与相关生物过程、激素通路和转录因子调控息息相关,如影响拟南芥茎发育的次生细胞壁主要受木质素、木聚糖和纤维素等相关生物过程调控<sup>[21]</sup>;高粱茎中蔗糖的积累影响茎的伸长,参与茎秆发育的相关激素途径则直接或间接影响节间长度和细胞伸长<sup>[22]</sup>;玉米硬秆种质与非硬秆种质相比,其茎秆中参与水解酶活性、细胞骨架组织以及微管过程通路的相关基因显著上调<sup>[23]</sup>。本研究基于 QTL 定位和转录组差异表达基因分析结果,结合其他植物茎秆发育的生理途径等相关研究,初步发现12个可能参与玉米茎粗调控的候选基因主要集中于氧化还原酶活性、水解酶活性、基于微管的过程和激素的合成调控等通路。拟南芥 LITTLE ZIPPER 蛋白可以促进分生组织形成,该基因突变后影响叶片发育和主茎顶端分生组织形成<sup>[24]</sup>;水稻 LF1 在 LITTLE ZIPPER 家族基因 OsZPR4 和 OsHOX1 间形成负反馈环,通过影响 IAA 含量调控侧生器官发育<sup>[25]</sup>;因此候选基因 *Zm00001d025345* 作为拟南芥 LITTLE ZIPPER 4 的同源基因很可能参与调控了玉米茎秆发育。bHLH 转录因子是植物中重要的转录因子家族之一,广泛参与各种信号转导及合成代谢途径,拟南芥中 bHLH 家族成员 PIF7 作为中心调节因子通过激活相关基因表达促进茎的生长,同为 bHLH 家族成员的 bHLH48 正调控 PIF7 共同促进下胚轴的伸长<sup>[26-27]</sup>;位于 *qSD6* 位点区间内的候选基因 *Zm00001d036807* 是 bHLH48 的同源基因,推测作为转录因子可能通过相关代谢途径进而调控茎秆的发育进程。果糖-1,6-二磷酸酶(FBP)在植物蔗糖合成途径中起着关键的调控作用,抑制拟南芥 FBP 时,细胞中蔗糖含量降低,植株生长缓慢,且鲜重和干重降低<sup>[28-29]</sup>;将蓝藻的 FBP 在烟草中

过表达,促进了烟草中糖类的合成,进而加速其植株的生长<sup>[30]</sup>;位于 *qSD3* 位点区间内的候选基因 *Zm00001d042727* 作为果糖-1,6-二磷酸酶可能通过参与玉米的蔗糖合成进而影响植株茎秆的生长。其余候选基因对玉米茎粗的直接或间接影响还需要进一步的研究分析。综上所述,玉米茎粗受激素信号途径、转录因子及糖信号途径等一系列调控途径的影响,具有一定的复杂性。本研究获得的 QTL 位点和候选基因将为玉米株型的遗传改良提供重要的理论依据。

#### 参考文献

- [1] 王夏青,宋伟,张如养,陈怡凝,孙轩,赵久然. 玉米茎秆抗倒伏遗传的研究进展. 中国农业科学, 2021, 54(11): 2261-2272  
Wang X Q, Song W, Zhang R Y, Chen Y N, Sun X, Zhao J R. Genetic research advances on maize stalk lodging resistance. Scientia Agricultura Sinica, 2021, 54(11): 2261-2272
- [2] 丰光,景希强,李妍妍,王亮,黄长玲. 玉米茎秆性状与倒伏性的相关和通径分析. 华北农学报, 2010, 25(S1): 72-74  
Feng G, Jing X Q, Li Y Y, Wang L, Huang C L. Correlation and path analysis of lodging resistance with maize stem characters. Acta Agriculturae Boreali-Sinica, 2010, 25(S1): 72-74
- [3] 汤华,严建兵,黄益勤,郑用璠,李建生. 玉米5个农艺性状的 QTL 定位. 遗传学报, 2005, 32(2): 203-209  
Tang H, Yan J B, Huang Y Q, Zheng Y L, Li J S. QTL mapping of five agronomic traits in maize. Acta Genetica Sinica, 2005, 32(2): 203-209
- [4] 徐德林,蔡一林,吕学高,代国丽,王国强,王久光,孙海艳,覃鸿妮. 玉米株型性状的 QTL 定位. 玉米科学, 2009, 17(6): 27-31  
Xu D L, Cai Y L, Lv X G, Dai G L, Wang G Q, Wang J G, Sun H Y, Qin H N. QTL mapping for plant-type traits in maize. Journal of Maize Sciences, 2009, 17(6): 27-31
- [5] 孙海艳,蔡一林,王久光,王国强,徐德林,徐延军. 玉米株型性状的 QTL 定位. 西南大学学报, 2010(12): 14-18  
Sun H Y, Cai Y L, Wang J G, Wang G Q, Xu D L, Xu Y J. QTL mapping for plant traits in maize (*Zea mays* L.). Journal of Southwest University, 2010(12): 14-18
- [6] 贾波,蒋思霞,邓德祥,谢庆春,管飞翔,张玲. 玉米农艺性状 QTL 定位分析. 玉米科学, 2011, 19(3): 31-34  
Jia B, Jiang S X, Deng D X, Xie Q C, Guan F X, Zhang L. Mapping QTL of agronomic traits in maize. Journal of Maize Sciences, 2011, 19(3): 31-34
- [7] Zhu L Y, Chen J T, Li D, Zhang J H, Huang Y Q, Zhao Y F, Song Z Q, Liu Z Z. QTL mapping for stalk related traits in maize (*Zea mays* L.) under different densities. Journal of Integrative Agriculture, 2013(2): 218-228
- [8] Hu H X, Liu W X, Fu Z Y, Homann L D, Technow F, Wang H W, Song C L, Li S T, Melchinger A E, Chen S J. QTL mapping of stalk bending strength in a recombinant inbred line maize population. Theoretical and Applied Genetics, 2013, 126(9): 2257-2266

- [ 9 ] Mazaheri M, Heckwolf M, Vaillancourt B, Gage J L, Burdo B, Heckwolf S, Barry K, Lipzen A, Ribeiro C B, Kono T J, Kaeppler H F, Spalding E P, Hirsch C N, Buell R, Leon N D, Kaeppler S M. Genome-wide association analysis of stalk biomass and anatomical traits in maize. *BMC Plant Biology*, 2019, 19: 45
- [ 10 ] Lin F, Zhou L, He B, Zhang X, Dai H, Qian Y, Ruan L, Zhao H. QTL mapping for maize starch content and candidate gene prediction combined with co-expression network analysis. *Theoretical and Applied Genetics*, 2019, 132 ( 7 ): 1931-1941
- [ 11 ] 任蒙蒙, 张红伟, 王建华, 王国英, 郑军. 玉米耐深播主效 QTL qMES20-10 的精细定位及差异表达基因分析. *作物学报*, 2020, 46 ( 7 ): 1016-1024  
Ren M M, Zhang H W, Wang J H, Wang G Y, Zheng J. Fine mapping of a major QTL qMES20-10 associated with deep-seeding tolerance in maize and analysis of differentially expressed genes. *Acta Agronomica Sinica*, 2020, 46 ( 7 ): 1016-1024
- [ 12 ] Wang X T, Yang Q, Dai Z J, Wang Y, Zhang Y Y, Li B Q, Zhao W M, Hao J J. Identification of QTLs for resistance to maize rough dwarf disease using two connected RIL populations in maize. *PLoS ONE*, 2019, 14 ( 12 ): e0226700
- [ 13 ] Nagalakshmi U, Wang Z, Waern K, Shou C, Raha D, Gerstein M, Snyder M. The transcriptional landscape of the yeast genome defined by RNA sequencing. *Science*, 2008, 320 ( 5881 ): 1344-1349
- [ 14 ] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  method. *Methods*, 2001, 25 ( 4 ): 402-408
- [ 15 ] 尚纪纪, 张德贵, 王凯欣, 王国梁, 潘金豹, 李新海, 史利玉. 我国玉米自交系茎秆性状多样性分析. *植物遗传资源学报*, 2020, 21 ( 2 ): 321-329  
Shang Q Q, Zhang D G, Wang K X, Wang G L, Pan J B, Li X H, Shi L Y. Diversity analysis of stalk traits in maize inbred lines in China. *Journal of Plant Genetic Resources*, 2020, 21 ( 2 ): 321-329
- [ 16 ] 王聪, 马青美, 郭新梅, 赵美爱, 宋希云, 裴玉贺. 玉米茎秆抗倒伏相关性状的遗传效应分析. *玉米科学*, 2021, 29 ( 4 ): 9-17  
Wang C, Ma Q M, Guo X M, Zhao M A, Song X Y, Pei Y H. Genetic effects analysis of stem lodging resistance traits in maize. *Journal of Maize Sciences*, 2021, 29 ( 4 ): 9-17
- [ 17 ] 杨硕, 郑云霄, 黄亚群, 祝丽英, 赵永锋, 贾晓艳, 陈景堂, 郭晋杰. 不同玉米自交系茎秆上部维管束数目的差异分析. *植物遗传资源学报*, 2021, 22 ( 2 ): 466-475  
Yang S, Zheng Y X, Huang Y Q, Zhu L Y, Zhao Y F, Jia X Y, Chen J T, Guo J J. Analysis of the number of vascular bundles in the uppermost stem of different maize inbred lines. *Journal of Plant Genetic Resources*, 2021, 22 ( 2 ): 466-475
- [ 18 ] 刘福鹏, 曲文利, 房海悦, 李莉莉, 金峰学, 吴委林. 玉米茎粗 Meta-QTL 及候选基因分析. *东北农业科学*, 2019, 44 ( 5 ): 30-33  
Liu F P, Qu W L, Fang H Y, Li L L, Jin F X, Wu W L. Analysis of Meta-QTL and candidate genes related to stem diameter in maize. *Journal of Northeast Agricultural Sciences*, 2019, 44 ( 5 ): 30-33
- [ 19 ] 易强, 杨泽兵, 谭家颖, 侯宪斌, 刘应红, 柏光晓, 黄玉碧. 高低种植密度下玉米茎粗的 QTL 鉴定. *华北农学报*, 2021, 36 ( 5 ): 50-58  
Yi Q, Yang Z B, Tan J Y, Hou X B, Liu Y H, Bai G X, Huang Y B. QTL identification for stem diameter under low and high planting densities in maize. *Acta Agriculturae Boreali-Sinica*, 2021, 36 ( 5 ): 50-58
- [ 20 ] Briggs W H, McMullen M D, Gaut B S, Doebley J. Linkage mapping of domestication loci in a large maize-teosinte backcross resource. *Genetics*, 2007, 177: 1915-1928
- [ 21 ] Li W, Tian Z X, Yu D Q. WRKY13 acts in stem development in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Science*, 2015, 236: 205-213
- [ 22 ] Oliver J, Fan M Z, Mckinley B, Zemelis-Durfee S, Brandizzi F, Wilkerson C, Mullet J E. The AGCVIII kinase Dw2 modulates cell proliferation, endomembrane trafficking, and MLG/xylan cell wall localization in elongating stem internodes of sorghum bicolor. *The Plant Journal*, 2021, 105 ( 4 ): 1053-1071
- [ 23 ] Xie L Y, Wen D X, Wu C L, Zhang C Q. Transcriptome and QTL analyses reveal candidate genes for fiber quality in upland cotton. *The Crop Journal*, 2020, 8 ( 1 ): 98-106
- [ 24 ] Wenkel S, Emery J, Hou B H, Evans M, Barton M K. A feedback regulatory module formed by LITTLE ZIPPER and HD-ZIPIII genes. *The Plant Cell*, 2007, 19 ( 11 ): 3379-3390
- [ 25 ] Zhang T, You J, Zhang Y, Yao W Y, Chen W B, Duan Q N, Xiao W W, Ye L, Zhou Y, Sang X C, Ling Y H, He G H, Li Y F. LF1 regulates the lateral organs polarity development in rice. *New Phytologist*, 2021, 231 ( 3 ): 1265-1277
- [ 26 ] 于冰, 田焯, 李海英, 吕笑言, 王宇光, 端木慧子. 植物 bHLH 转录因子的研究进展. *中国农学通报*, 2019, 35 ( 9 ): 75-80  
Yu B, Tian Y, Li H Y, Lv X Y, Wang Y G, Duanmu H Z. Research progress of plant bHLH transcription factor. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2019, 35 ( 9 ): 75-80
- [ 27 ] Yang C W, Huang S, Zeng Y, Liu C, Ma Q Y, Pruneda-Paz J, Kay S A, Li L. Two bHLH transcription factors, bHLH48 and bHLH60, associate with phytochrome interacting factor 7 to regulate hypocotyl elongation in arabidopsis. *Cell Reports*, 2021, 35 ( 5 ): 109054
- [ 28 ] 何斌, 朱晋恒, 龙翔宇, 秦云霞, 唐朝荣. 巴西橡胶树叶绿体果糖-1, 6-二磷酸酶基因的全长 cDNA 克隆与表达分析. *热带作物学报*, 2015, 36 ( 3 ): 448-455  
He B, Zhu J H, Long X Y, Qin Y X, Tang C R. Cloning and expression analysis of a chloroplast Fructose-1, 6-Bisphosphatase gene in *hevea brasiliensis*. *Chinese Journal of Tropical Crops*, 2015, 36 ( 3 ): 448-455
- [ 29 ] 徐文亭, 王诚, 徐晓洋, 蔡彩平, 郭旺珍. 一个棉花果糖-1, 6-二磷酸酶基因的克隆与表达特征. *棉花学报*, 2013, 25 ( 6 ): 549-556  
Xu W T, Wang C, Xu X Y, Cai C P, Guo W Z. Cloning and expression analysis of a novel gene encoding Fructose-1, 6-bisphosphatase in cotton. *Cotton Science*, 2013, 25 ( 6 ): 549-556
- [ 30 ] Miyagawa Y, Tamoi M, Shigeoka S. Overexpression of a cyanobacterial fructose-1, 6-/sedoheptulose-1, 7-bisphosphatase in tobacco enhances photosynthesis and growth. *Nature Biotechnology*, 2001, 19 ( 10 ): 965-969