

玉米穗部叶片相关性状的 GWAS 分析

李 昊, 刘瑞来, 许家伟, 张振弘, 李春翔, 张 林

(东北农业大学/寒地粮食作物种质创新与生理生态教育部重点实验室/黑龙江省寒地玉米种质资源创新工程技术研究中心, 哈尔滨 150030)

摘 要: 以 294 份自交系构成的玉米自然群体为试材, 调查穗部 3 片叶片的叶长、叶宽和叶面积等表型性状, 结合 5 850 982 个 SNPs 标记的基因型数据进行全基因组关联分析(GWAS)。结果表明, 参试材料的穗部叶片性状存在显著差异, 表现出典型的数量性状特点, 性状间表现为显著相关($P < 0.05$)。检测出极显著相关的 SNP 位点 439 个 ($P < 1E-05$), 基于 12 个与多个性状均显著相关的 SNP 位点预测到 29 个候选基因, 其中 18 个具有功能注释, 筛选出 5 个重要的候选基因, 包括 MYB 家族转录因子、NAC 家族转录因子、GLK 家族转录因子、E3 泛素蛋白连接酶、钙调蛋白结合核蛋白等, 可能通过相关信号转导、物质代谢合成及调控相关蛋白质稳定性来调节玉米穗部叶片性状。

关键词: 玉米; 穗部叶片; 关联分析; 候选基因

中图分类号: S513.035.3

文献标识码: A

Genome Wide Association Analysis of Ear Leaf Traits in Maize

LI Hao, LIU Rui-lai, XU Jia-wei, ZHANG Zhen-hong, LI Chun-xiang, ZHANG Lin

(Northeast Agricultural University/Key Laboratory of Germplasm Innovation and Physiological Ecology of Food Crops in Cold Region, Ministry of Education/Engineering Technology Research Center of Maize Germplasm Resources Innovation on Cold Land of Heilongjiang Province, Harbin 150030, China)

Abstract: Two hundred and ninety-four inbred lines were used to investigate phenotypic traits such as leaf length, leaf width and leaf area of three ear leaves. Then Genome wide association analysis(GWAS) was performed with genotypic data of 5 850 982 SNPs. The results showed that there were significant differences in panicle leaf traits among the inbred lines, showing typical quantitative traits, and significant correlations among the traits ($P < 0.05$). A total of 439 SNP loci were detected with highly significant correlations ($P < 1E-05$). Based on 12 SNP loci significantly associated with multiple traits, 29 candidate genes were predicted, 18 of which have functional annotations. Five important candidate genes were screened, including MYB family transcription factor, NAC family transcription factor, GLK family transcription factor, E3 ubiquitin ligase and calmodulin binding nuclear protein, which regulate ear leaf traits through related signal transduction, substance metabolism, and regulation of protein stability.

Key words: Maize; Ear leaf; GWAS; Candidate gene

玉米在全世界范围内广泛种植, 主要用作食物、饲料和生产燃料, 是我国粮食安全战略中的核心组成部分。我国玉米单产偏低, 2022 年为 6.43 t/hm², 仅为美国的 66%, 是目前制约产业发展的重要因素之一。叶片在子粒灌浆期可提供 80% ~ 90% 的干物质^[1], 叶长、叶宽、叶面积等重要的叶型相关性状, 尤其是穗部叶片, 通过影响玉米的光能利用效率、耐密

性以及抵御逆境的能力, 最终影响产量表现^[2-3], 开展相关遗传研究对于株型改良有重要作用。

玉米叶片相关性状是由多基因控制的数量性状, 主要以加性效应为主, 同时显性和上位性也起作用^[4]。目前, 研究多集中在采用 F₂、F_{2:3} 或 RIL 群体和 BC 等群体为试验材料, 定位相关 QTLs 及挖掘候选基因。Dai 等利用 DH 群体检测到 8 个和叶长相关的 QTLs, 可解释 3.46% ~ 10.02% 的表型变异, 其中 10 号染色体上的 *qfirstLL10* 为主效 QTL, 对叶长起负调控作用^[5]。Wang 等利用 RIL 群体定位了玉米叶宽相关的 4 个 QTLs, 其中 *qLW4* 为主效 QTL^[6]。利用自然群体采用全基因组关联分析(GWAS)方法挖掘叶片相关性状候选基因的相关报道较少。Wang 等在

录用日期: 2024-03-12

基金项目: 国家重点研发计划项目“东北春玉米区早熟高产抗逆宜机收新种质创制与应用”(2021YFD1201000)

作者简介: 李 昊(2005-), 男, 硕士, 现主要从事玉米遗传育种研究。

E-mail: lh_work@qq.com

张 林为本文通信作者。E-mail: neauzla@163.com

350个玉米自交系的自然群体中,在第2、5、9和10号染色体上检测到5个与叶夹角高度显著的SNP,从中鉴定出*ZmNAC16*和*ZmSBP18*基因^[7]。

本研究以294份玉米自交系构成的自然群体为试验材料,调查穗部叶片的叶长、叶宽、叶面积等表型数据,结合重测序获得的基因型数据进行全基因组关联分析,发掘显著关联的SNP位点并预测候选基因,为耐密植玉米分子育种提供技术支持。

1 材料与方法

1.1 试验材料

以294份不同血缘背景玉米自交系构成的自然群体为供试材料,该群体由东北农业大学玉米遗传育种团队提供。

1.2 试验方法

1.2.1 表型性状的田间采集和分析

2022年和2023年将参试自交系种植于黑龙江省哈尔滨市香坊区向阳镇东胜村东北农业大学向阳试验实习基地(45.7°N,126.9°E)。采用随机区组设计,3行区,2次重复,行长5 m,行距65 cm,株距25 cm。在授粉后10 d每个小区中间行随机选取3株长势一致的植株,测定穗上第1片叶、穗位叶和穗下第1片叶的叶长(Leaf length, LL)和叶宽(Leaf width, LW),计算叶面积(Leaf size, LS)=0.75×(叶长×叶宽)。利用Excel 2019整理田间测量数据,运用SPSS 23.0软件对各性状的表型值进行平均数、标准差、偏度、峰度等描述性统计和正态分布检验,运用R语言进行方差分析以及相关性分析。

1.2.2 全基因组关联分析(GWAS)

参试自交系的基因型数据由上海师范大学利用NovaSeq 6000测序平台检测,共检测到14 871 949个多态性SNP位点,以MAF>0.05、Miss<20%的标准进行过滤,获得5 850 982个高质量SNPs。为了剔除环境因素的影响,同时减少试验误差对结果造成的影响,本实验数据分析采用最佳线性无偏估计(Best Linear Unbiased Prediction, BLUP)值计算。使用R软件中的g3tools和lme4包计算自然群体2年1点试验各个性状的BLUP值。结合参试自交系的基因型数据和表型数据BLUP值,利用Linux环境下的GEMMA软件中的混合线性模型(LMM)模型对玉米穗部叶片相关性状进行关联分析,利用R软件绘制Manhattan图和Q-Q图。

1.2.3 候选基因的预测

对关联分析显著的SNP,基于LD衰减距离,映射到B73的RefGen_v4的基因组上,在SNP位点物理位置上、下游各50 kb范围内,利用MaizeGDB和NCBI数据库搜索候选基因并进行功能注释。

2 结果与分析

2.1 玉米穗部叶片相关性状的差异分析和相关分析

对294份玉米自交系穗上叶、穗位叶、穗下叶的叶长、叶宽以及叶面积共9个性状的表型数据进行统计分析。表1结果表明,各个性状的表型数据均存在丰富变异,变异系数在8.38%~13.43%。各性状的峰度和偏度都介于-1.0~1.0,呈现连续变异,表现出典型的数量遗传特性,说明该群体表型具有多样性,进行关联分析结果具有可信度。相关性分析结果表明(图1),穗部3片叶片的叶长之间、叶宽之

表1 玉米穗部叶片相关性状表型的统计分析

Table 1 Statistical analysis of the phenotypes of traits related to the ear leaves in maize

性 状 Trait	均值±标准误 Mean ± S.D.	变 幅 Range	标准差 SD	变异系数(%) CV	偏 度 Skewness	峰 度 Kurtosis
LL1	76.28±0.43	54.70 ~ 92.60	7.46	9.78	-0.39	-0.05
LL2	79.43±0.39	59.20 ~ 93.60	6.66	8.38	-0.33	-0.09
LL3	79.61±0.43	58.90 ~ 99.10	7.34	9.22	-0.25	-0.14
LW1	10.05±0.05	8.00 ~ 13.40	0.87	8.66	0.33	0.44
LW2	10.09±0.05	7.50 ~ 12.80	0.91	9.02	0.17	0.40
LW3	9.94±0.05	7.70 ~ 12.40	0.87	8.75	0.26	-0.05
LS1	575.60±4.48	380.20 ~ 882.90	76.89	13.36	0.31	0.57
LS2	601.08±4.38	406.50 ~ 855.20	75.13	12.50	0.23	0.10
LS3	594.28±4.43	362.40 ~ 822.30	79.83	13.43	0.17	-0.10

注:LL、LW和LS分别为叶长(cm)、叶宽(cm)和叶面积(cm²);1、2和3代表穗上叶、穗位叶和穗下叶。下图、下表同。

Note: LL, LW and LS mean leaf length, leaf width and leaf size; 1, 2 and 3 represents the first leaf above the first ear, the first ear leaf, and the first leaf below the first ear. The same below.

间和叶面积之间均呈现极显著正相关,相关系数分别为0.89、0.88和0.87;穗上叶的叶宽与穗位叶的叶宽之间相关性最强($R=0.91$),其次为穗位叶的叶宽与

穗下叶的叶宽($R=0.90$);穗部叶片的叶长和叶面积、叶宽与叶面积之间呈极显著正相关($R=0.54 \sim 0.76$)。

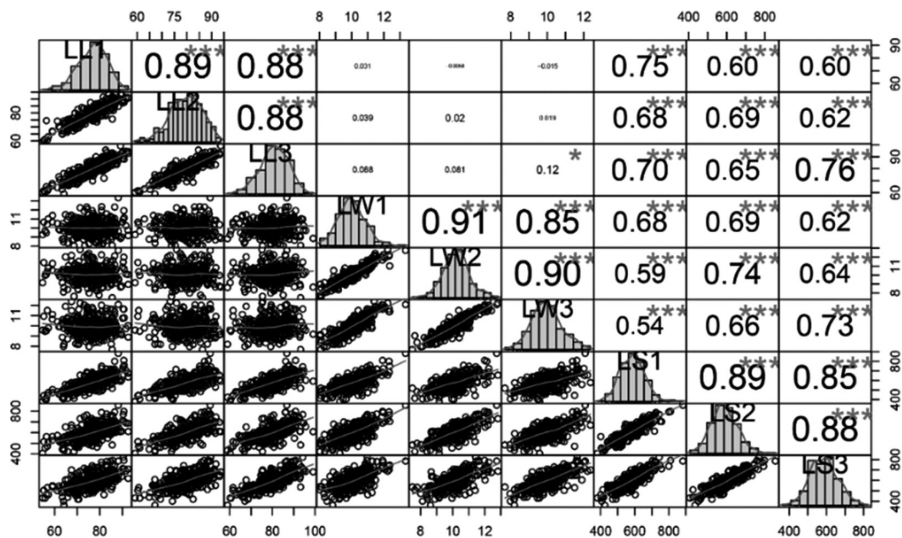


图1 玉米穗部叶片相关表型性状的相关性分析

Fig.1 Correlation analysis of phenotypes of traits related to the ear leaves in maize

2.2 玉米穗部叶片相关性状的全基因组关联分析

以294份玉米自交系穗部叶片相关各性状的BLUP值为表型数据,运用Linux环境下的GEMMA软件中的混合线性模型(LMM),以 $-\log_{10}P$ 值大于5,结合5 850 982个SNP标记对294份玉米自交系穗上叶、穗位叶、穗下叶的叶长、叶宽以及叶面积共9个性状进行全基因组关联分析。共检测到487个与穗部叶片相关性状显著关联的SNP标记,这些标记在10条染色体上均有分布(图2,图3)。显著关联的SNP标记中包括与叶长显著关联的89个SNP、与叶宽显著关联的287个SNP和与叶面积显著关联的111个SNP。与3个及以上性状均极显著关联的SNP位点有12个,分布在玉米1、3和5号染色体上($P=4.95E-08 \sim 9.91E-06$)。

2.3 玉米穗部叶片相关性状候选基因预测

以50 kb($R^2=0.1$)作为该关联群体的LD衰减距离,并在其LD范围内对与3个及以上性状显著关联的12个SNP位点进行候选基因的预测,共预测到29个基因,其中18个基因有注释功能(表2)。每个位点预测到1~7个候选基因,结合功能注释等筛选到5个可能与穗部叶片直接相关的候选基因。

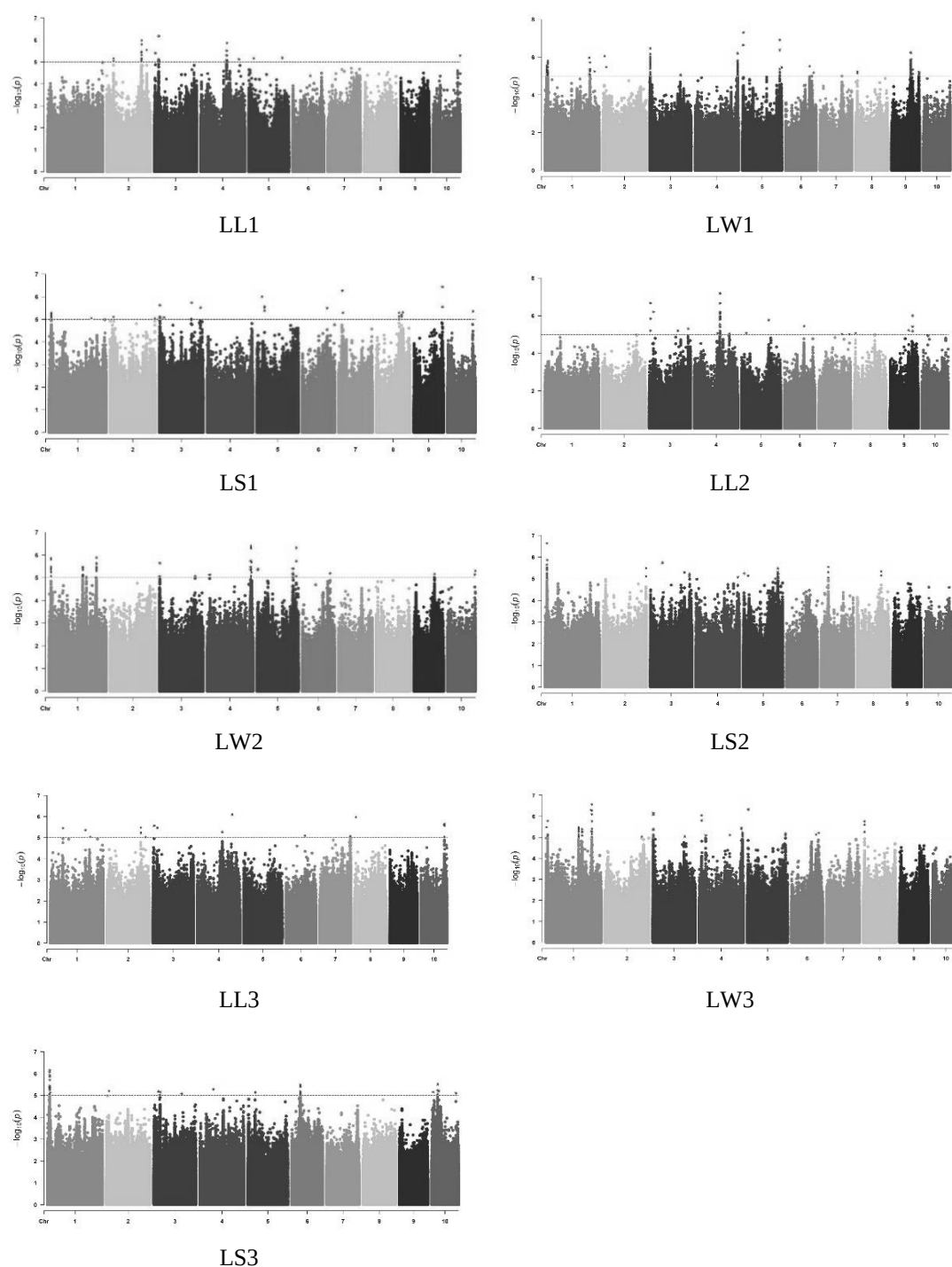
依据注释功能和前人报道,筛选出5个重要候选基因,其中,位点1_254283127、1_254286217、1_254292393和1_254324765共同预测到1个候选基因Zm00001d033211,编码钙调蛋白结合核蛋白;位

点1_9260272主要包含1个MYB转录因子基因Zm00001d027623;位点3_6100065主要包含1个NAC转录因子基因Zm00001d039506;位点1_254201430主要包含1个候选基因Zm00001d033208,其编码E3泛素连接酶蛋白;位点5_6095338主要包含1个GLK2转录因子基因Zm00001d013187。这些基因可能通过相关信号转导、物质代谢合成及调控相关蛋白质稳定性等途径参与玉米穗部叶片形状的调控。

3 结论与讨论

光合作用是产量形成的基础,叶片是其主要场所,叶面积大小直接影响光合效率。穗部叶片(棒3叶)距离雌穗最近,在所有叶片中拥有最大叶面积和最长的功能期,可以形成更多的光合产物,且优先将同化物运输到雌穗。Subedi等报道,去除玉米杂交种的穗下部叶片和穗位叶分别造成减产19%~26%和17%~25%^[8]。在本研究中,玉米穗部3片叶的叶长表现为穗下叶(79.61 cm)>穗位叶(79.43 cm)>穗上叶(76.28 cm),叶面积大小表现为穗位叶(601.08 cm²)>穗下叶(594.28 cm²)>穗上叶(575.60 cm²),但是总体差异不大^[9]。

通过全基因组关联分析挖掘到12个与玉米穗部叶片多个性状显著相关的SNP位点,部分位点与其他研究者报道的QTL区段有交叠。Zhao等通过



注:横轴表示玉米10条染色体,纵轴表示经过负的常数对数转换观察到的 P 值。

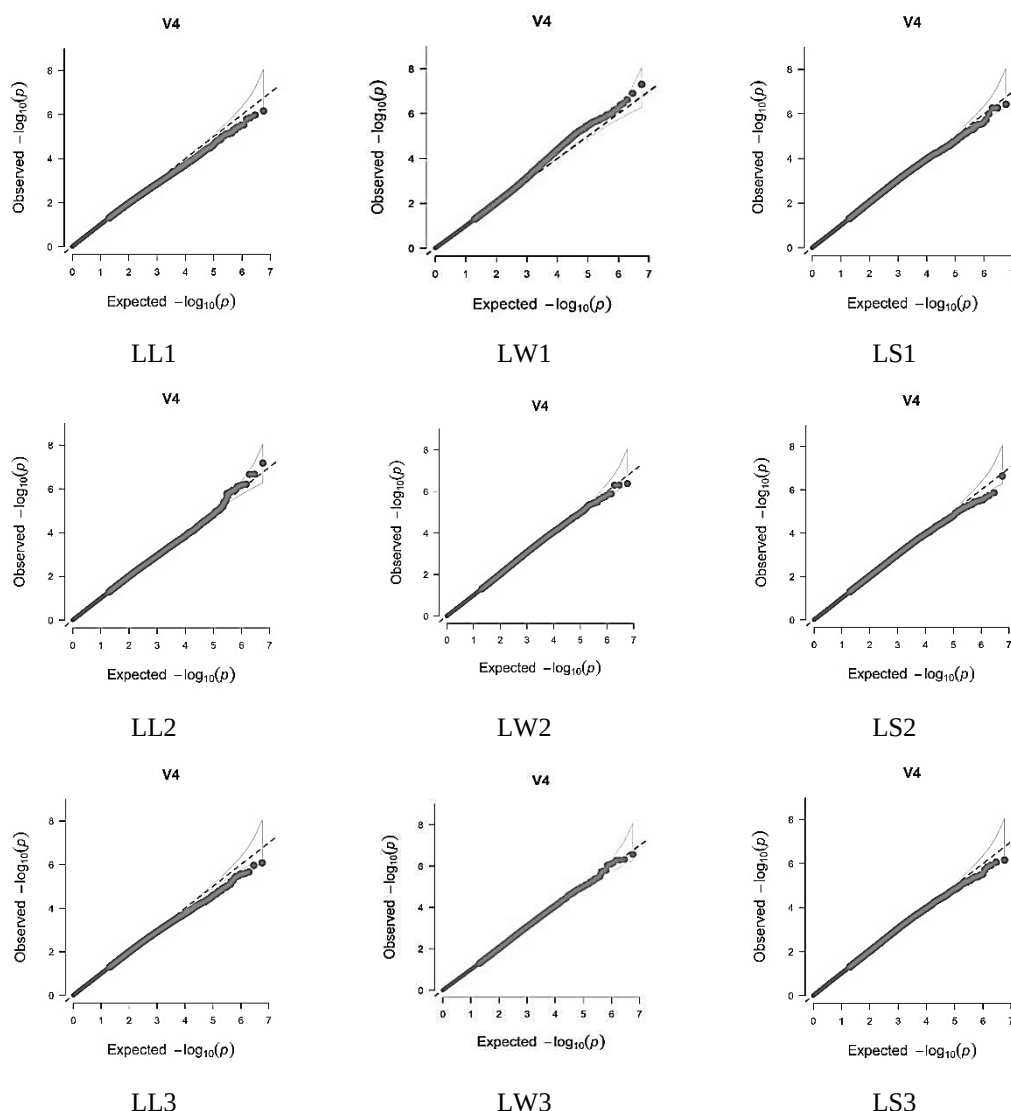
Note: The horizontal axis shows 10 chromosomes in maize, and the vertical axis shows $-\lg$ transformed observed P value.

图2 玉米穗部叶片相关性状的全基因组关联曼哈顿图

Fig.2 Manhattan plot of genome-wide association study for ear leaves related traits

整合分析挖掘出多个与玉米叶型结构相关的一致性mQTL区域^[10]。预测到5个调控玉米穗部叶片相关性状的重要候选基因,其中 *Zm00001d027623* 是MYB转录因子家族成员。水稻中 *OsMYB103L* 和 *OsMYB61* 通过参与赤霉素(GAs)途径参与次生壁的生

物合成,进而影响叶片形状和纤维素的合成^[11]。*Zm00001d039506* 是NAC转录因子家族成员,拟南芥中NAC家族成员 *CUC2* 和生长素之间形成了1个反馈作用环,Auxin-PIN1-CUC2分子模块通过调控叶缘和叶片局部生长从而影响叶片形状^[12]。



注:横轴表示经过负的常数对数转换的期望 P 值,纵轴表示经过负的常数对数转换观察到的 P 值。

Note: The horizontal axis shows $-\lg$ transformed expected P values, and the vertical axis shows $-\lg$ transformed observed P values.

图3 玉米穗部叶片相关性状的全基因组关联Q-Q图

Fig.3 Quantile-quantile plot of genome-wide association study for ear leaves related traits

*Zm00001d033208*编码E3泛素连接酶蛋白。水稻中的E3泛素连接酶WLG通过影响LARGE2的蛋白稳定性调控叶宽和粒宽的发育,进而影响穗粒数和单株产量^[13]。*Zm00001d033211*编码钙调蛋白结合核蛋白。拟南芥中的同源基因*AT3G22190*是细胞生长素和钙信号传导中的枢纽,调节植物的生长和发育^[14]。*Zm00001d013187*是GLK转录因子家族成员,拟南芥中的同源基因*AT4G17695*,参与*BOP1*和*BOP2*对叶片极性建成的调控^[15]。

本研究对玉米自然群体穗部3片叶片的叶长、叶宽和叶面积进行GWAS分析,检测出12个同时与多个性状显著相关的SNP位点,预测到29个候选基因,其中18个有功能注释,筛选出5个重要的候选基

因,包括MYB家族转录因子、NAC家族转录因子、GLK家族转录因子、E3泛素蛋白连接酶、钙调蛋白结合核蛋白等,可能通过相关信号转导、物质代谢合成及调控相关蛋白质稳定性来调节玉米穗部叶片性状。未来将开展这些候选基因的功能验证和作用机制解析,并开发分子标记,助力耐密植理想株型玉米分子育种。

参考文献:

- [1] 赵可夫. 玉米抽雄后不同叶位叶对子粒产量的影响及其光合性能[J]. 作物学报, 1981, 7(4): 259-266.
ZHAO K F. Effect of different leaf positions on grain yield and photosynthetic performance of maize after tasseling[J]. Acta Agronomica Sinica, 1981, 7(4): 259-266. (in Chinese)
- [2] KU L X, ZHANG J, GUO S L, et al. Integrated multiple population

表2 玉米穗部叶片相关性状相关的候选基因

Table 2 Candidate genes related to ear leaves related traits in maize

序 号 Number	SNP	物理位置 Position	等位基因 Allele	bin	性 状 Trait	P 值 P value	候选基因 Candidate gene	注释功能 Annotated function
1	1_9260272	9260272	T/C	bin1.01	LW1/LW2/LW3/LS2	2.76E-06	<i>Zm00001d027622</i>	—
						3.31E-06	<i>Zm00001d027623</i>	MYB转录因子
						1.65E-06		
2	1_250321833	250321833	A/G	bin1.09	LW1/LW2/LW3	1.08E-06	<i>Zm00001d033104</i>	—
						9.75E-06	<i>Zm00001d033105</i>	—
						5.07E-07	<i>Zm00001d033108</i>	赖氨酸-tRNA 连接酶
							<i>Zm00001d033109</i>	—
3	1_254201430	254201430	G/C	bin1.09	LW1/LW2/LW3	5.67E-06	<i>Zm00001d033204</i>	甲基结合结构域 115
						9.91E-06	<i>Zm00001d033205</i>	谷氧还蛋白家族蛋白
						5.11E-06	<i>Zm00001d033206</i>	—
							<i>Zm00001d033208</i>	E3 泛素连接酶
4	1_254283127	254283127	T/A	bin1.09	LW1/LW2/LW3		<i>Zm00001d033209</i>	—
						4.27E-06	<i>Zm00001d033211</i>	钙调蛋白结合蛋白 4
						3.47E-06		
5	1_254286217	254286217	T/C	bin1.09	LW1/LW2/LW3	5.28E-07		
						4.96E-06	<i>Zm00001d033211</i>	钙调蛋白结合蛋白 4
						2.51E-06		
6	1_254292393	254292393	C/T	bin1.09	LW1/LW2/LW3	2.71E-07		
						1.92E-06	<i>Zm00001d033211</i>	钙调蛋白结合蛋白 4
						4.06E-06		
7	1_254324765	254324765	T/G	bin1.09	LW1/LW2/LW3	1.71E-06		
						8.46E-06	<i>Zm00001d033211</i>	钙调蛋白结合蛋白 4
						2.38E-06		
8	3_6100065	6100065	A/T	bin3.02	LL1/LL2/LL3	7.98E-07		
						3.94E-06	<i>Zm00001d039503</i>	—
						2.11E-07	<i>Zm00001d039505</i>	线粒体加工肽酶亚基
						2.70 E-06	<i>Zm00001d039506</i>	NAC 转录因子
9	3_23815849	23815849	G/C	bin3.04	LL1/LL2/LL3/LS2		<i>Zm00001d039510</i>	钙调蛋白结合蛋白 7
							<i>Zm00001d040034</i>	多铜氧化酶 LPR2
						6.74E-07		
						6.20E-07		
10	5_6095338	6095338	A/G	bin5.01	LW1/LL2/LL3/LS2	3.43E-06		
						4.95E-08	<i>Zm00001d013181</i>	—
						4.72E-07	<i>Zm00001d013182</i>	—
						4.72E-07	<i>Zm00001d013184</i>	硫醇二硫交换蛋白 tx1A
							<i>Zm00001d013185</i>	氧化丙烯合成酶
							<i>Zm00001d013186</i>	蛋白酶体组装伴侣 2
							<i>Zm00001d013187</i>	GLK2 转录因子
11	5_211894653	211894653	T/G	bin5.08	LW1/LW2/LW3		<i>Zm00001d013188</i>	跨膜蛋白 147
						1.24E-07	<i>Zm00001d018006</i>	—
						4.89E-07	<i>Zm00001d018009</i>	驱动蛋白 KIN-4C
						6.53E-06		
12	5_212195971	212195971	A/G	bin5.08	LW1/LW2/LW3	4.22E-07	<i>Zm00001d018016</i>	RING-H2 手指蛋白 ATL46
						1.87E-06	<i>Zm00001d018017</i>	NHL 结构域蛋白
						7.87E-06	<i>Zm00001d018019</i>	—

- analysis of leaf architecture traits in maize(*Zea mays* L.)[J]. Journal of Experimental Botany, 2012, 63: 261–274.
- [3] ZHANG J, KU L X, HAN Z P, et al. The *ZmCLA4* gene in the *qlA4-1* QTL controls leaf angle in maize(*Zea mays* L.)[J]. Journal of Experimental Botany, 2014, 65: 5063–5076.
- [4] LIU R, MENG Q, ZHENG F, et al. Genetic mapping of QTL for maize leaf width combining RIL and IF2 populations[J]. PLoS One, 2017, 12(12): e0189441.
- [5] DAI W, YU H, LIU K, et al. Combined linkage mapping and association analysis uncovers candidate genes for 25 leaf-related traits across three environments in maize[J]. Theor Appl Genet., 2023, 136(1): 12.
- [6] WANG B, ZHU Y, ZHU J, et al. Identification and fine-mapping of a major maize leaf width QTL in a re-sequenced large recombinant inbred lines population[J]. Front Plant Sci., 2018, 9: 101.
- [7] WANG B B, LIN Z C, LI X, et al. Genome-wide selection and genetic improvement during modern maize breeding[J]. Nature Genetics, 2020, 52: 565–571.
- [8] SUBEDI K D, MA B. ID in conventional and leafy maize hybrids[J]. Crop Science, 2005, 45(6): 2246–2257.
- [9] 白永新,王早荣,钟改荣,等. 玉米高配合力亲本自交系、杂交种棒3叶的性状分析及叶面积的相关性研究[J]. 玉米科学, 1999, 7(2): 24–26.
- BAI Y X, WANG Z R, ZHONG G R, et al. Analysis of characteristics and correlation study of leaf area between high combining ability parent inbred lines and hybrid three leaves of corn[J]. Journal of Maize Sciences, 1999, 7(2): 24–26. (in Chinese)
- [10] ZHAO X, FANG P, ZHANG J, et al. QTL mapping for six ear leaf architecture traits under water-stressed and well-watered conditions in maize(*Zea mays* L.)[J]. Plant Breeding, 2018, 137: 60–72.
- [11] YANG C, LI D, LIU X, et al. *OsMYB103L*, an R2R3-MYB transcription factor, influences leaf rolling and mechanical strength in rice(*Oryza sativa* L.)[J]. BMC Plant Biology, 2014, 14(1): 158.
- [12] BÜRSTENBINDER K, MITRA D, QUEGWER J. Functions of IQD proteins as hubs in cellular calcium and auxin signaling: A toolbox for shape formation and tissue-specification in plants?[J]. Plant Signaling & Behavior, 2017, 12(6): e1331198.
- [13] KIERZKOWSKI D, RUNIONS A, VUOLO F, et al. A growth based framework for leaf shape development and diversity[J]. Cell, 2019, 177: 1405–1418.
- [14] YUE Z, WANG Z, YAO Y, et al. Variation in WIDTH OF LEAF AND GRAIN contributes to grain and leaf size by controlling LARGE2 stability in rice[J]. Plant Cell, 2024, 36(9): 3201–3218.
- [15] HA C, JUN J, NAM H, et al. BLADE-ON-PETIOLE 1 and 2 control Arabidopsis lateral organ fate through regulation of LOB domain and adaxial-abaxial polarity genes[J]. Plant Cell, 2007, 19(6): 1809–1825.

(责任编辑:朴红梅)

(上接第25页)

- CHEN Q S, JIANG H W, XIN D W, et al. Construction and application of backcross introgression lines[J]. Chinese Journal of Oil Crop Sciences, 2020, 42(1): 1–7. (in Chinese)
- [10] 鲁俊田,任丽丽,赵洪绪,等. Iodent 玉米种质改良旅大红骨选系配合力及杂种优势利用研究[J]. 玉米科学, 2020, 28(6): 18–24.
- LU J T, REN L L, ZHAO H X, et al. Study on the combination and hybrid utilization of Iodent corn germplasm improvement of the Lv-da red bone[J]. Journal of Maize Sciences, 2020, 28(6): 18–24. (in Chinese)
- [11] 高旭东,周旭梅,高洪敏,等. 欧洲玉米种质 BRC 选系主要农艺性状的配合力及杂种优势分析[J]. 玉米科学, 2015, 23(3): 28–33.
- GAO X D, ZHOU X M, GAO H M, et al. Combining ability of main agronomic traits and heterosis of european maize germplasm BRC [J]. Journal of Maize Sciences, 2015, 23(3): 28–33. (in Chinese)
- [12] 郭向阳,胡兴,祝云芳,等. 热带玉米 Suwan1 群体导入不同类型温带种质的遗传分析[J]. 玉米科学, 2019, 27(4): 9–13, 21.
- GUO X Y, HU X, ZHU Y F, et al. genetic analysis of different types of descendants derived from temperate germplasm crossed with suwan1 populations of tropical maize[J]. Journal of Maize Sciences, 2019, 27(4): 9–13, 21. (in Chinese)

(责任编辑:朴红梅)