

517 份玉米种质容重与其他品质性状相关性 分析及候选基因挖掘

杨张钰¹, 陈小央², 李燕², 李欣泽¹, 白康杰¹, 骆遥³, 赵光武¹, 施俊生², 韩庆辉¹

(1. 浙江农林大学 现代农学院, 浙江 杭州 311300; 2. 浙江省农业厅 种子管理总站, 浙江 杭州 310000; 3. 义乌玉米科技小院, 浙江 义乌 322000)

摘要: 【目的】玉米 *Zea mays* 籽粒容重是国家玉米区试标准中品质性状的重要指标之一, 是一个复杂的数量性状, 目前其影响因素和调控机制尚未完全解析。淀粉、蛋白质、脂肪等品质性状是影响容重的重要因素, 但其与容重的关系仍存在争议。本研究旨在阐明容重与其他品质性状之间的相关性, 揭示容重的调控机制。【方法】测定以浙江省地方玉米种质资源为主要构成的 517 份玉米种质的容重, 粗淀粉、粗蛋白、粗脂肪、直链淀粉质量分数等性状, 并进行相关性分析。在此基础上, 选取 4 个高容重、高淀粉质量分数、低粗蛋白质量分数、低脂肪质量分数的玉米种质籽粒和 4 个低容重、低淀粉质量分数、高粗蛋白质量分数、高脂肪质量分数的玉米种质籽粒进行转录组测序 (RNA-Seq) 分析。【结果】容重与总淀粉质量分数呈显著正相关 ($P < 0.01$), 而容重与粗蛋白和粗脂肪质量分数呈显著负相关 ($P < 0.01$)。对极端种质进行 RNA-Seq 分析, 共筛选获得 159 个差异表达基因, 这些基因主要参与碳代谢、光合组织中的碳固定、氨基酸生物合成等过程。进一步实时荧光定量 PCR 对其中与碳代谢或氨基酸生物合成相关的 8 个候选基因表达量进行验证, 发现这些基因在不同种质中的表达变化规律与容重差异变化趋势一致。【结论】阐明了玉米籽粒容重与其他品质性状之间的相关性, 为高品质玉米新品种选育提供特异性种质及 8 个在碳还原、胚乳发育、淀粉代谢、细胞代谢和种子脂肪积累中起着重要作用的候选基因。图 4 表 2 参 40

关键词: 玉米; 籽粒容重; 品质性状; 调控机制

中图分类号: S330 文献标志码: A 文章编号: 2095-0756(2024)04-0669-10

Correlation analysis of test weight and other quality traits and candidate gene mining in 517 maize germplasms

YANG Zhangyu¹, CHEN Xiaoyang², LI Yan², LI Xinze¹, BAI Kangjie¹, LUO Yao³,
ZHAO Guangwu¹, SHI Junsheng², HAN Qinghui¹

(1. College of Advanced Agricultural Sciences, Zhejiang A&F University, Hangzhou 311300, Zhejiang, China; 2. Seed Management Station, Zhejiang Provincial Department of Agriculture and Rural Affairs, Hangzhou 310000, Zhejiang, China; 3. Yiwu Science and Technology Backyard of Maize, Yiwu 322000, Zhejiang, China)

Abstract: [Objective] As an important factor of quality traits in national maize standard regional tests, test weight is a complex quantitative trait, and its influencing factor and regulatory mechanism is still unclear. Quality traits such as starch, protein, and fat content are important factors affecting test weight, but the

收稿日期: 2024-01-28; 修回日期: 2024-04-12

基金项目: 浙江省玉米种质资源精准鉴定评价 (2022—2024); 杭州市科技发展计划项目 (202203A02); 国家自然科学基金资助项目 (32301833); 浙江省自然科学基金探索公益项目 (TGN24C130001); 浙江省鲜食玉米育繁推种业创新平台项目 (2022—2027); 浙江农林大学大学生创新创业项目 (S202210341085, 202210341001)

作者简介: 杨张钰 (ORCID: 0009-0006-5868-4945), 从事种子科学与技术研究。E-mail: 2021101012010@zafu.edu.cn。通信作者: 韩庆辉 (ORCID: 0009-0009-2505-4738), 讲师, 博士, 从事种子科学与技术研究。E-mail: qinghuihan@zafu.edu.cn

relationship between them is still unclear. [Method] This research determined the test weight, starch, crude protein, gross fat, and amylose content of 517 maize germplasms mainly composed of local maize germplasm resources in Zhejiang Province. On the basis of correlation analysis, the kernels of four germplasms with higher test weight, higher starch content, lower protein content, lower fat content, and four germplasms with opposite phenotypes were selected for RNA-Seq analysis. [Result] By correlation analysis, this research found there was a significant positive correlation between test weight and starch content, while a negative correlation was found between test weight and protein or fat content. RNA-Seq analysis was performed for the extreme germplasm, a total of 159 differentially expressed genes were screened between 2 groups, and 8 candidate genes related to carbon metabolism or amino acid biosynthesis were used for further analysis. The expression difference of these genes was consistent with the change of test weight in different inbred lines by RT-qPCR. [Conclusion] The correlation between test weight and other quality traits was preliminarily clarified, providing superior germplasms and 8 candidate genes that play important roles in carbon reduction, endosperm development, starch metabolism, cellular metabolism, and seed fat accumulation for the selection of new high-quality maize cultivars. [Ch, 4 fig. 2 tab. 40 ref.]

Key words: maize; kernel test weight; quality traits; regulation mechanism

玉米 *Zea mays* 是主要的食品、饲料和工业原料作物, 在粮食安全中发挥着至关重要的作用。容重作为玉米商品质量的重要指标, 已成为国际贸易中质量分级的重要因素^[1]。容重由单位容积内的粒数和重量决定, 在生长发育过程中, 受到多种因素的影响, 包括玉米整株的外形、吐丝期、抽雄期、灌浆期等^[1]。前人研究发现: 籽粒灌浆率是影响作物籽粒容重的关键因素^[2]。授粉 2~3 周后, 籽粒的灌浆速度较快, 内部物质在此期间迅速积累^[3]。由于玉米胚乳质量占籽粒质量的 85%, 玉米籽粒的饱满度主要受胚乳的影响^[3]。胚乳细胞的增殖和发育决定了籽粒的质量和品质, 玉米胚乳的发育包括籽粒库容建成和籽粒库充实^[4]。籽粒库容的建成主要是胚乳细胞的增殖和生长扩张, 以及胚乳细胞中淀粉颗粒的发育; 籽粒库的充实主要通过淀粉的持续合成和积累, 以及胚乳中淀粉颗粒的逐渐膨胀^[5]。胚乳淀粉质量分数为 70%~75%^[5], 由此可知, 玉米中淀粉质量分数与容重紧密相关, 容重可以反映籽粒的品质和成熟度^[6]。以往研究对玉米品质的研究主要集中在营养品质和加工品质方面, 对容重的研究较少。

籽粒容重与其他品质性状间有着密不可分的联系。在玉米中, 吴春胜等^[7]发现籽粒容重与蛋白质、脂肪含量负相关; 张丽等^[8]发现容重与蛋白质、淀粉含量正相关; 张静等^[9]发现容重与蛋白质含量负相关, 与脂肪、淀粉含量正相关; 而 DORSEY-REDDING 等^[10]则发现容重与淀粉含量负相关。综上所述, 玉米容重与其他品质性状之间的相关性存在争议。

前期通过数量性状基因座 (QTL) 或全基因组关联 (GWAS) 分析发现容重在小麦 *Triticum aestivum* 和玉米中具有高度遗传性, 并且筛选到一些关键 QTLs、单核苷酸多态性位点 (SNPs) 或基因^[11-16]。在玉米中, ZHANG 等^[11]对 B73 × Mo17 构建的 IBMSyn10 DH 群体对容重性状进行关联分析, 筛选到 17 个候选基因, 其中包括 *ATHB-4* (Zm00001d044081)。DING 等^[17]利用 Chang 7-2 × Zheng 58 构建的 225 个自交系群体通过混合模型 (MLM) 进行 QTL 分析, 鉴定到 5 个与容重相关的 QTLs。LIU 等^[18]利用 10 个重组自交系群体进行 QTL 分析, 在玉米中鉴定出 70 个 QTLs。由于容重是一个复杂的数量性状, 目前关于控制容重的关键基因鉴定进展缓慢。

本研究使用 517 份玉米种质对容重与粗淀粉、粗蛋白、粗脂肪、直链淀粉进行相关性分析, 并选取极端种质进行转录组测序 (RNA-Seq) 分析, 挖掘控制容重的关键基因, 为容重调控机制研究和高容重新品种选育提供候选基因和优异种质。

1 材料和方法

1.1 材料

以 517 份玉米种质资源为材料, 其中包括 368 份浙江地方玉米种质以及 149 份国内外骨干自交系。

对玉米种质进行自交授粉 4 代。2022 年 4 月种植于浙江省东阳市 (29.28°N, 120.33°E)、11 月种植于海南省乐东县 (18.52°N, 108.93°E) 和 7 月种植于浙江省杭州市临安区 (30.23°N, 119.72°E)。玉米种质在每个地点种植设 3 个随机区组重复。每个材料每行种植 20 株, 选取 9 个授粉良好的果穗进行测定。

B73 作为玉米重要的骨干自交系, 被广泛用于品种选育及各种基础研究的参考品种, 因此以 B73 作为参照, 以便监测和标准化不同批次样品的品质性状数据。

1.2 品质性状测定

1.2.1 容重测定 玉米果穗脱粒后去除杂质, 自然干燥后含水量降至 14% 以下。用 GHCS-1000AP KTW 测定仪 (浙江托普云农科技股份有限公司) 按照 SAC 方法 (GB 1353—2009《玉米》) 检测容重。从 9 个果穗的混合籽粒中随机采集约 50 g 种子, 用磨样机粉碎成粉末, 进行其他品质性状测定。

1.2.2 含水量测定 取 10 g 样本, 用电热鼓风干燥器 (DHG9030A, 浙江托普云农科技股份有限公司) 通过高温烘干法测定含水量。

1.2.3 粗蛋白测定 含氮量按照改进的凯氏定氮法^[19], 使用全自动凯氏定氮仪 (K9860, 海能仪器股份有限公司) 进行测定。取约 0.100 0 g 的样本, 籽粒中粗蛋白是检测含氮量的 6.25 倍。

1.2.4 粗脂肪测定 玉米籽粒粗脂肪的测定采用改良索氏抽提法^[20], 参考 GB 2906—1982《粮油作物种子粗脂肪测定方法》, 用索氏脂肪抽提仪 (SOX606, 海能仪器股份有限公司) 提取 2.000 0 g 籽粒中的粗脂肪, 然后用烘箱 (XMTD-8222, 上海精宏实验设备有限公司) 去除脂肪抽提剂石油醚。

1.2.5 粗淀粉测定 籽粒粗淀粉的测定参考 ISO 10520: 1997《本地淀粉 淀粉含量的测定 旋光法》和 GB 5006—1985《谷物籽粒粗淀粉测定法》。将 2.500 0 g 样本通过氯化钙-乙酸溶液水解, 然后使用硫酸锌和亚铁氰化钾溶液进行提取, 使用全自动旋光仪 (P850, 海能仪器股份有限公司) 进行测定。

1.2.6 直链淀粉测定 直链淀粉的测定参考 GB 7648—1987《水稻、玉米和谷子籽粒直链淀粉测定法》的改进方法^[21]。用 Synergy H1 多模式微孔板酶标仪 (BioTek 仪器公司) 测定直链淀粉-碘复合物在 720 nm 波长处的吸光度。

1.2.7 支链淀粉测定 支链淀粉质量分数的计算方法是从粗淀粉中减去直链淀粉质量分数。每个样品测定 2 个重复, 如果 2 次重复偏差超过 5%, 重复测定 1 次。直支比为直链淀粉质量分数与支链淀粉的比值。

1.3 RNA-Seq 分析

授粉 20~25 d 是玉米种子发育和灌浆的重要阶段^[22-23], 因此 RNA 提取自授粉 20 d 的籽粒。2023 年 8 月, 将 517 份玉米种质种植于浙江省杭州市临安区, 种植区域与 2022 年相同, 进行 3 个随机区组重复, 每个材料每行种植 20 株。根据 2022 年品质分析结果, 从具有极端表型的种质中分离籽粒, 筛选 4 个容重较高、粗淀粉质量分数较高、粗蛋白质量分数较低、粗脂肪质量分数较低的种质 (梅玉米、F1 白轴、CML324、975-12), 以及 4 个容重较低、粗淀粉质量分数较低、粗蛋白质量分数较高、粗脂肪质量分数较高的种质 (浙单 14、M270、孝丰白马玉米、金辉黑糯玉米), 上述 8 个极端种质的生育期均为 101 d。将 9 个果穗的籽粒混合作为 1 个重复。提取的 RNA 送至北京诺禾致源科技股份有限公司进行 RNA-Seq 测序和分析。

1.4 RNA 提取及实时荧光定量 PCR 检测

授粉 20 d 后, 采集籽粒并保存在 -80 °C 冰箱。使用 TransZol Up Plus RNA 试剂盒 (北京全式金生物科技股份有限公司) 提取总 RNA。使用 Hifair III 1st Strand cDNA Synthesis SuperMix 逆转录试剂盒 (上海翌圣生物技术有限公司) 将 RNA 反转录为 cDNA, 使用稀释的 cDNA 进行实时荧光定量 PCR (RT-qPCR) 鉴定。以玉米管家基因 *ZmGAPDH* 作为内参, 对样本进行 RT-qPCR 鉴定。引物组合: Zm00001d043468, 使用引物 1F 和 1R; Zm00001d028709, 使用引物 2F 和 2R; Zm00001d021653, 使用引物 3F 和 3R; Zm00001d004438, 使用引物 4F 和 4R; Zm00001d043511, 使用引物 5F 和 5R; Zm00001d041775 使用引物 6F 和 6R; Zm00001d032224 使用引物 7F 和 7R; Zm00001d035156 使用引物 8F 和 8R; *ZmGAPDH* 使用引物 9F 和 9R, 检测各基因表达。每个样品包含 3 个生物学重复, 3 个玉米的籽粒作为 1 个生物学重复。

1.5 统计分析

利用 Excel 和 SPSS 19.0 进行数据分析, 计算最大值、最小值、平均数、标准差、变异系数, 绘制群体频率分布图, 对玉米籽粒品质性状数据进行联合方差分析和相关性分析等。

2 结果与分析

2.1 517 份玉米籽粒容重和其他品质性状

从表 1 可见: 玉米籽粒容重最大值和最小值均在东阳, 分别为 904.00 和 254.55 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 。东阳容重的变异系数最大, 临安的变异系数最小。经过最佳线性无偏预测法 (BLUP) 分析后, 容重为 431.41~798.55 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, 变异系数降至 8.47%。粗蛋白质量分数最大值在乐东, 最小值在东阳。东阳粗蛋白质量分数的变异系数最大, 临安的变异系数最小。经 BLUP 分析, 粗蛋白质量分数为 6.17%~17.89%, 变异系数降至 10.09%。粗脂肪质量分数最大值和最小值均在东阳, 分别为 14.57% 和 2.01%。东阳的粗脂肪质量分数变异系数最大, 而临安最小。经 BLUP 分析, 粗脂肪质量分数为 2.64%~12.99%, 变异系数降至 29.01%。粗淀粉质量分数最大值在乐东, 最小值在东阳。东阳的变异系数最大, 临安的变异系数最小。经 BLUP 分析, 粗淀粉质量分数为 12.45%~71.25%, 变异系数降至 11.04%。直链淀粉质量分数最大值和最小值均在东阳, 分别为 36.44% 和 2.66%。东阳的直链淀粉质量分数变异系数最大, 而临安最小。经 BLUP 分析, 直链淀粉质量分数在 5.70%~32.68%, 变异系数降至 26.44%。支链淀粉质量分数最大值和最小值均在乐东, 分别为 65.94% 和 18.66%。经 BLUP 分析, 支链淀粉质量分数为 16.65%~61.79%, 变异系数降至 16.65%。直支比最大值在东阳, 最小值在乐东。东阳的变异系数最大, 而乐东的变异系数最小。经 BLUP 分析, 直支比为 0.16~2.30, 变异系数降至 33.08%。

表 1 玉米籽粒容重和其他品质性状统计及分析

Table 1 Descriptive statistics for maize test weight and other quality traits

项目	地点	容重/ $(\text{g}\cdot\text{L}^{-1})$	质量分数/%					直支比
			粗蛋白	粗脂肪	粗淀粉	直链淀粉	支链淀粉	
均值±标准差	东阳	606.84±101.03	12.48±2.08	4.98±2.00	62.73±9.64	21.87±8.94	40.83±10.64	0.60±0.32
	乐东	692.46±69.45	13.98±2.08	5.01±1.70	64.23±6.00	21.89±6.77	42.35±8.30	0.55±0.21
	临安	712.90±52.82	12.77±1.35	5.03±1.17	64.88±4.25	21.06±6.85	43.75±8.06	0.52±0.21
	BLUP	664.42±56.29	13.17±1.33	5.04±1.46	63.21±6.98	22.10±5.84	41.46±6.90	0.58±0.19
数值范围	东阳	254.55~904.00	7.66~20.30	2.01~14.57	19.95~72.46	2.66~36.44	4.98~65.13	0.07~3.00
	乐东	366.67~840.00	9.05~20.70	2.46~13.61	34.36~77.08	3.20~34.12	18.66~65.94	0.06~1.10
	临安	431.82~871.43	9.72~17.91	3.13~12.00	36.76~72.17	4.36~31.50	20.70~64.65	0.07~1.17
	BLUP	431.41~798.55	6.17~17.89	2.64~12.99	12.45~71.25	5.70~32.68	16.65~61.79	0.16~2.30
变异系数/%	东阳	16.65	16.66	40.13	15.37	40.88	26.07	53.39
	乐东	10.03	14.85	33.83	9.34	30.95	19.59	37.44
	临安	7.41	10.58	23.29	6.55	32.50	18.41	40.06
	BLUP	8.47	10.09	29.01	11.04	26.44	16.65	33.08

2.2 517 份玉米籽粒容重和其他品质性状群体结构分析

如图 1 所示: 容重主要分布在 650.00~700.00 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, 群体分布呈标准正态分布。粗蛋白、粗脂肪、粗淀粉、直链淀粉、支链淀粉质量分数和直支比分别主要分布在 12.00%~13.00%、4.00%~5.00%、64.00%~68.00%、24.00%~27.00%, 40.00%~46.00%, 0.60~0.80 内。粗蛋白、粗淀粉质量分数的群体分布呈正态分布, 粗脂肪、直链淀粉质量分数和直支比的群体分布呈偏态分布。

2.3 517 份玉米籽粒容重和其他品质性状联合分析

品质性状作为因变量, 品种和环境作为自变量进行分析 (表 2) 发现: 容重、粗脂肪和粗淀粉质量分数受品种、环境以及品种与环境交互作用的极显著影响 ($P<0.01$)。直链淀粉和支链淀粉的质量分数受品

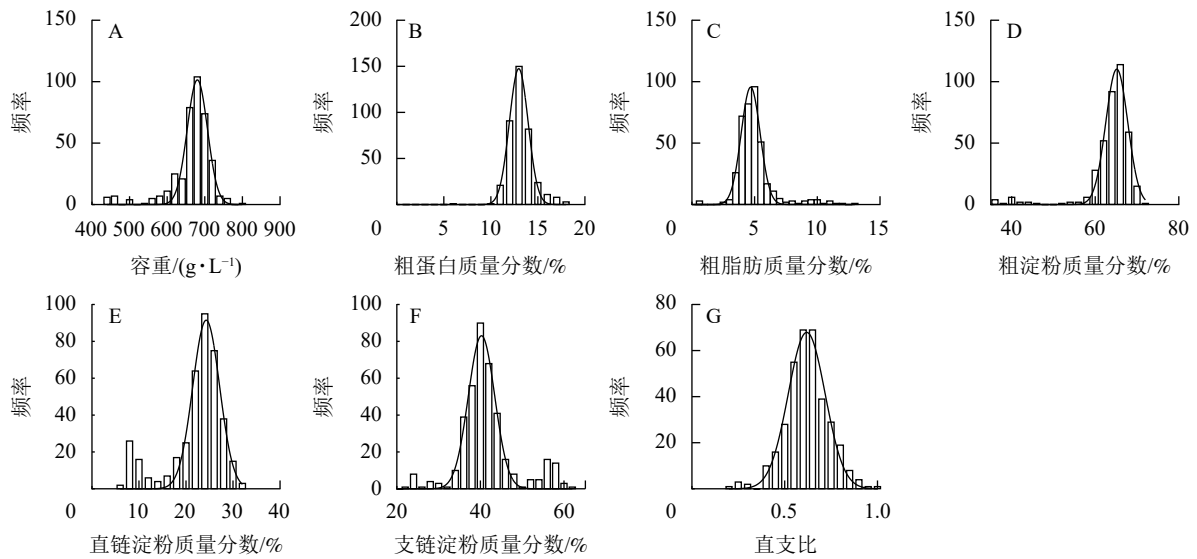


图 1 不同种质籽粒品质性状的群体分布图

Figure 1 Histogram of frequency distribution of kernel test weight and quality traits in different inbred lines

表 2 不同试验点玉米种质籽粒容重和其他品质性状的联合分析

Table 2 Joint analysis of kernel test weight and other quality traits of maize inbred lines in different experimental sites

性状	变异来源	平方和	F	P	性状	变异来源	平方和	F	P
容重	品种	415221.072	100.721	<0.001**	直链淀粉	品种	4869.787	135.622	<0.001**
	环境	159948.328	38.799	<0.001**		环境	91.143	2.538	0.112
	品种×环境	13620.659	3.304	0.003**		品种×环境	65.838	1.834	0.140
粗蛋白	品种	171.774	50.379	<0.001**	支链淀粉	品种	5845.288	86.835	<0.001**
	环境	94.612	27.749	<0.001**		环境	59.727	0.887	0.347
	品种×环境	4.487	1.316	0.268		品种×环境	80.387	1.194	0.311
粗脂肪	品种	317.333	171.032	<0.001**	直支比	品种	3.630	71.754	<0.001**
	环境	14.765	7.958	0.005**		环境	0.284	5.613	0.018*
	品种×环境	7.527	4.057	0.007**		品种×环境	0.038	0.758	0.518
粗淀粉	品种	6118.363	164.49	<0.001**					
	环境	330.135	8.876	0.003**					
	品种×环境	240.086	6.455	<0.001**					

说明：*表示 $P<0.05$ ；**表示 $P<0.01$ 。

种影响极显著 ($P<0.01$)，但不受环境以及品种与环境间交互作用的影响。粗蛋白质量分数、直支比受品种和环境的显著影响 ($P<0.01$ 或 $P<0.05$)，但不受品种和环境之间交互作用的影响。

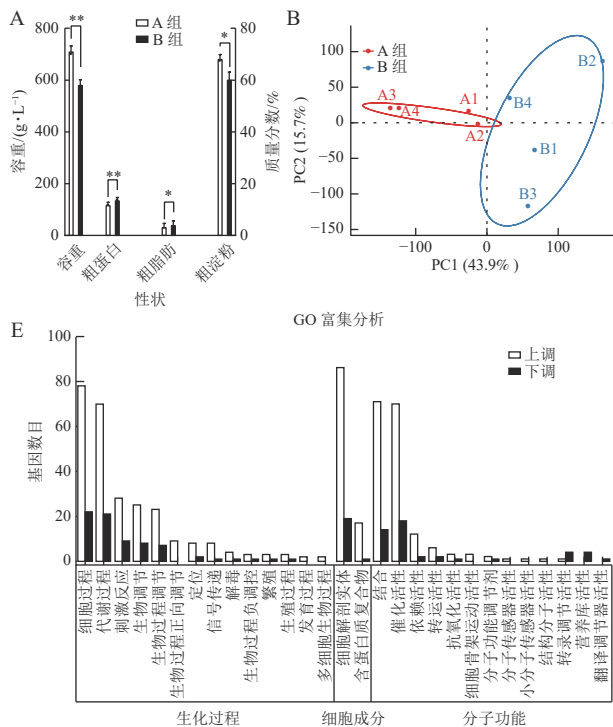
2.4 517 份玉米籽粒品质性状相关性分析

相关性分析 (图 2) 显示：容重与粗蛋白、粗脂肪质量分数呈极显著负相关 ($P<0.01$)，而与粗淀粉、直链淀粉和支链淀粉质量分数呈极显著正相关 ($P<0.01$)。容重与直支比之间无相关性。粗蛋白、粗脂肪质量分数与粗淀粉、直链淀粉和支链淀粉呈极显著负相关 ($P<0.01$)，而粗蛋白与粗脂肪质量分数呈极显著正相关 ($P<0.01$)。粗淀粉与直链淀粉、支链淀粉质量分数呈极显著正相关 ($P<0.01$)，而与直支比呈极显著负相关 ($P<0.01$)。直链淀粉与支链淀粉质量分数呈极显著负相关 ($P<0.01$)，而与直支比呈极显著正相关 ($P<0.01$)。支链淀粉质量分数与直支比呈极显著负相关 ($P<0.01$)。

2.5 玉米容重控制候选基因挖掘

通过主成分分析，容重较高、粗淀粉质量分数较高、粗蛋白质量分数较低的种质被划分为A组，而容重较低、粗淀粉质量分数较低、粗蛋白质量分数较高的种质被划分为B组(图3A)，说明A组和B组之间的基因表达量有显著性差异。在主成分分析中，PC1可解释43.9%的表型，PC2可解释15.7%的表型(图3B)。与A组相比，B1、B2、B3、B4中分别有1847、4729、2273、1918个基因上调，而B1、B2、B3、B4中分别有391、350、433、352个基因下调(图3C~D)。经过韦恩分析发现：其中140个基因在B组中共同上调，19个基因受到下调。对上述159个基因进行基因本体(GO)富集分析，发现分别有50和47个基因富集于细胞过程、生物过程的代谢，54个基因富集在细胞构造及组成中，46个基因分别具有结合和催化活性的分子功能(图3E)。通过京都基因与基因组百科全书(KEGG)富集分析，有7个基因富集于糖酵解/葡萄糖生成(ko00010)，5个基因富集于光合生物碳固定(ko00710)，8个基因富集于碳代谢(ko01200)，7个基因富集于氨基酸生物合成中的碳固定(ko01230)(图3F)。

为了进一步挖掘控制容重和品质性状的关键基因，从与碳代谢、光合组织中的碳固定以及氨基酸的生物合成相关途径中筛选出8个候选基因，通过RT-qPCR或RNA-Seq进行了验证分析。通过RT-qPCR分析，编码6-磷酸海藻糖合酶6的Zm00001d043468在B2中的表达量是A2的3.7倍。RNA-Seq数据



A. A组和B组的容重、粗蛋白、粗脂肪及粗淀粉质量分数; B. PCA评价A组和B组之间的差异, A1. 梅玉米, A2. F1白轴, A3. CML324, A4. 975-12, B1. 浙单14父本, B2. M270种质, B3. 孝丰白马玉米, B4. 金辉黑糯玉米; C. B组上调基因与A组比较的维恩图(Venn); D. B组下调基因与A组比较的韦恩图(Venn); E. 差异表达基因(DEGs)的GO富集分析; F. DEGs的KEGG富集分析。*表示 $P < 0.05$; **表示 $P < 0.01$ 。

图3 转录组分析筛选控制容重和品质性状的候选基因

Figure 3 Transcriptome screening of control genes for traits such as bulk density and quality

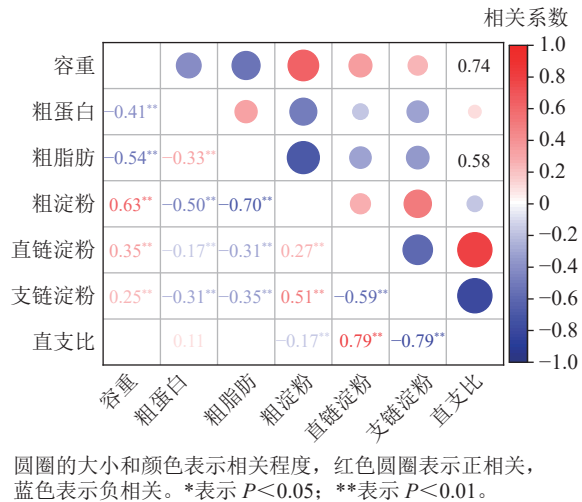


图2 籽粒容重与其他品质性状的相关性分析

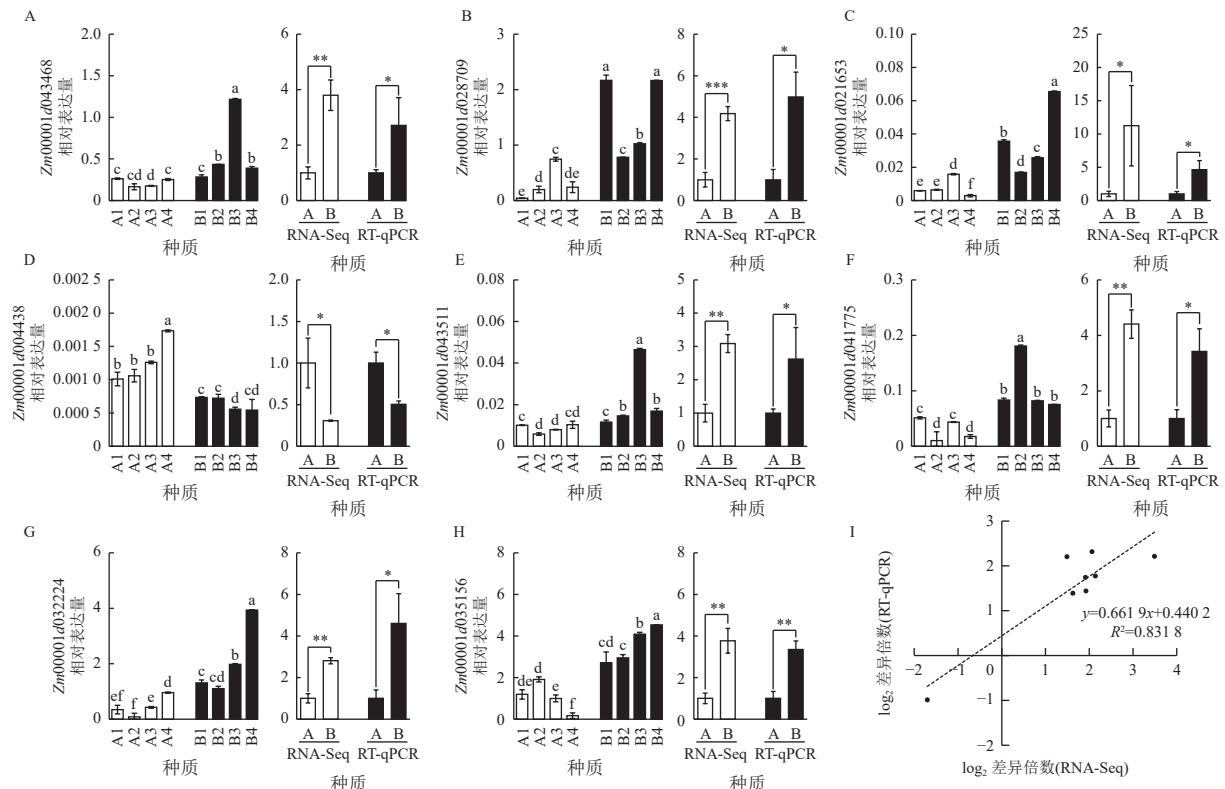
Figure 2 Correlation coefficients between kernel test weight and other quality traits

圆圈的大小和颜色表示相关程度，红色圆圈表示正相关，蓝色表示负相关。*表示 $P < 0.05$; **表示 $P < 0.01$ 。

图3 转录组分析筛选控制容重和品质性状的候选基因

Figure 3 Transcriptome screening of control genes for traits such as bulk density and quality

中, *Zm00001d043468* 的表达水平在 B 组中较 A 组升高 2.8 倍, 而通过 RT-qPCR 检测发现该基因在 B 组中的表达量是 A 组的 2.7 倍 (图 4A)。通过 RT-qPCR 分析, 编码抗坏血酸过氧化物酶同源基因-3 的 *Zm00001d028709* 在 B1 和 B4 组的表达量是 A1 组的 51 倍。通过 RNA-Seq 分析发现, *Zm00001d028709* 的表达水平在 B 组较 A 组升高 3.1 倍, 而 RT-qPCR 分析显示该基因在 B 组中表达量是 A 组的 4.9 倍 (图 4B)。通过 RT-qPCR 分析, 编码葡萄糖-6-磷酸/磷酸转运体-2 的 *Zm00001d021653* 在 B4 组的表达量是 A4 组的 21.4 倍。通过 RNA-Seq 分析发现 *Zm00001d021653* 的表达水平在 B 组较 A 组升高 10.2 倍, 而 RT-qPCR 实验验证发现该基因在 B 组表达量是 A 组的 4.6 倍 (图 4C)。通过 RT-qPCR 分析, 编码普鲁兰酶型淀粉脱支酶 1 的 *Zm00001d004438* 在 A4 组的表达量是 B3 组的 1.4 倍。通过 RNA-Seq 分析发现 *Zm00001d004438* 在 A 组的表达量较 B 组升高 2.3 倍, 而使用 RT-qPCR 验证发现该基因在 A 组的表达量是 B 组的 1.9 倍 (图 4D)。通过 RT-qPCR 分析, 编码己糖激酶-6 的 *Zm00001d043511* 在 B3 组的表达量是 A2 组的 6.9 倍。通过 RNA-Seq 分析发现 *Zm00001d043511* 在 B 组的表达量较 A 组升高 2.1 倍, 而 RT-qPCR 验证该基因在 B 组表达量是 A 组的 2.6 倍 (图 4E)。通过 RT-qPCR 分析, 编码 2-脱氢-3-脱氧磷酸辛酰缩酶的 *Zm00001d041775* 在 B2 中的表达量是 A2 的 17 倍。通过 RNA-Seq 分析发现 *Zm00001d041775* 在 B 组中的表达量较 A 组升高 3.4 倍, 而 RT-qPCR 检测该基因在 B 组的表达量是 A 组的 3.4 倍 (图 4F)。通过 RT-qPCR 分析, 编码丙酮酸脱氢酶复合体叶绿体二氢脂酰赖氨酸-残基乙酰转移酶组分-4 的 *Zm00001d032224* 在 B4 组的表达量是 A2 组的 46.9 倍。通过 RNA-Seq 分析发现 *Zm00001d032224* 在 B 组的表达量较 A 组升高 1.8 倍, 而 RT-qPCR 检测该基因在 B 组的表达量是 A 组的 4.6 倍 (图 4G)。通过 RT-qPCR 分析, 编码细胞膜甘油醛-3-磷酸脱氢酶 GAPC2 的 *Zm00001d035156* 在 B4 组的表达量是 A4 组的 25.6 倍。通过 RNA-Seq 分析发现: *Zm00001d035156* 在 B 组的表达量较 A 组升高 2.8 倍, 而 RT-qPCR 显示该基因在 B 组的表达量是 A 组的 3.4 倍 (图 4H)。从以上结果可以看出: RT-qPCR 和 RNA-Seq 检测基因表达的趋势是一致的。相关性分析发现: RT-qPCR 和 RNA-Seq 数据具有很高的相关性, R^2 为 0.831 8 (图 4I)。



A~H 左图为 RT-qPCR 检测不同种质的表达量, 右图为 A 组与 B 组的 RNA-Seq 和 RT-qPCR 监测基因表达量比较。I. RNA-Seq 与 RT-qPCR 结果的相关性分析。A1. 梅玉米, A2. F1 白轴, A3. CML324, A4. 975-12, B1. 浙单 14 父本, B2. M270 种质, B3. 孝丰白马玉米, B4. 金辉黑糯玉米。不同小写字母表示差异显著 ($P < 0.05$)。*表示 $P < 0.05$, **表示 $P < 0.01$ 。

图 4 通过 RNA-Seq 和 RT-qPCR 检测候选基因的相对表达量

Figure 4 Relative expression of candidate genes detected by RNA-Seq and RT-qPCR

3 讨论

容重是一个复杂的数量性状,受多因素影响,但与其他品质性状的关系仍有争议。在玉米中,张丽等^[8]研究表明:容重与蛋白质质量分数呈正相关,也有研究发现容重与蛋白质质量分数呈负相关^[7,9]。本研究发现玉米籽粒容重与粗蛋白质量分数呈负相关。向日葵 *Helianthus annuus* 中粗脂肪质量分数与容重呈正相关,但在燕麦 *Avena sativa* 中无显著关系,在大豆 *Glycine max* 中呈负相关^[24-26]。在玉米中,吴春胜等^[7]发现籽粒容重与脂肪质量分数呈负相关,张静等^[9]发现容重与脂肪质量分数呈正相关。本研究发现玉米容重与粗脂肪质量分数呈负相关。玉米籽粒主要由胚和胚乳组成,胚乳质量占了85%,且以淀粉为主,而胚的主要成分是蛋白质、脂肪和水。这可能有助于解释容重与粗脂肪和粗蛋白质量分数之间的负相关关系。张丽等^[8]利用29个山东省审定玉米品种研究发现玉米籽粒容重和淀粉呈正相关关系,但是DORSEY-REDDING等^[10]分别使用183和195个玉米杂交种发现玉米籽粒容重和淀粉呈负相关。本研究利用517个玉米种质发现淀粉质量分数和容重呈正相关。此外,容重与直链淀粉或支链淀粉的质量分数之间存在弱的正相关性,而容重与直支比之间没有相关性。这表明容重可能是由淀粉质量分数决定,而不是由淀粉类型决定。

容重是一个可遗传的数量性状,但它也受环境因素的影响。本研究表明:容重、粗脂肪和粗淀粉质量分数受品种、环境或品种和环境交互作用的影响,而直链淀粉和支链淀粉只受品种影响,不受环境影响。这些结果说明在不同环境下的容重可能受到粗蛋白、粗脂肪或粗淀粉质量分数的影响,而不受到直链淀粉和支链淀粉的影响。

在玉米中,ZHANG等^[11]利用B73×Mo17(IBM)Syn10 DH群体进行QTL关联分析,筛选到3个与容重相关的候选基因 *ZmSWEET4c*、*ZmYUC1* 和 *ZmTCRR*,这些基因均与胚乳发育及碳代谢有关^[11,27-28]。本研究通过RT-qPCR方法筛选并验证了8个与碳代谢和氨基酸代谢相关的基因。其中,与碳代谢相关的海藻糖-6-磷酸对胚发育、产量形成和非生物胁迫耐受性非常重要^[29-30]。在水稻 *Oryza sativa* 中, *OsTPS8* 在耐盐性和糖分积累方面起着重要作用^[31]。本研究发现编码6-磷酸海藻糖合酶6的 *Zm00001d043468* 与容重和品质性状有关。在拟南芥 *Arabidopsis thaliana* 中,基质抗坏血酸过氧化物酶(s-APX)已被证明可通过调节抗坏血酸的生物合成来控制碳水化合物供应^[32]。编码抗坏血酸过氧化物酶同源物3并与碳水化合物代谢(K00434)相关的 *Zm00001d028709* 在容重较低的种质中上调,该基因位于容重相关QTL位点 *PZE-103144282* 或 *qKTW3-2* 附近^[11]。在拟南芥中,葡萄糖-6-磷酸/磷酸转运体2(GPT2)可增加叶绿体内膜的碳还原,影响光合作用和植物生长^[33]。在玉米中,编码葡萄糖-6-磷酸/磷酸转运体2的 *Zm00001d021653* 可能是容重增加的原因。*Zm00001d004438* 编码普鲁兰酶型淀粉分支酶1(*Zpu1*),可能在胚乳发育过程中起重要作用^[34],在容重较高的种质中高表达,该基因位于已报道容重关联位点 *SYN18432*、*qKTW7* 和 *phi082-umc1799* 附近^[11,17]。*ZmHXK3a* 催化葡萄糖转化为葡萄糖-6-磷酸在淀粉代谢中发挥关键作用^[35]。本研究表明编码己糖激酶-6的 *Zm00001d043511* 在容重和粗淀粉质量分数较高的种质中高表达。在桑 *Morus alba* 叶中,编码2-脱氢-3-脱氧磷酸醛缩酶的 *KdsA* 在高盐和干旱胁迫下下调^[36]。本研究发现编码2-脱氢-3-脱氧磷酸醛缩酶的 *Zm00001d041775* 与容重和品质性状的形成有关,该基因位于容重关联位点 *PZE-10314428* 和 *qKTW3-2* 附近^[11]。在拟南芥中,细胞质甘油醛-3-磷酸脱氢酶GAPC2在细胞代谢和种子脂肪积累中起着重要作用^[37]。本研究发现编码细胞质甘油醛-3-磷酸脱氢酶GAPC2的 *Zm00001d035156* 在容重较高的种质中高表达。

4 结论

群体结构分析表明:玉米籽粒容重,粗蛋白、粗脂肪、粗淀粉、直链淀粉、支链淀粉质量分数和直支比的主要分布符合正态分布或近似正态分布。联合方差分析表明:容重、粗脂肪和粗淀粉质量分数受品种、环境以及品种与环境交互作用的显著影响;直链淀粉和支链淀粉的质量分数受品种影响较大,但不受环境以及品种与环境间交互作用的影响;粗蛋白质量分数、直支比受品种和环境的显著影响,但不受品种和环境之间交互作用的影响。品质性状之间相关性分析表明:容重与粗蛋白、粗脂肪质量分数呈显著负相关,而与粗淀粉、直链淀粉和支链淀粉质量分数呈显著正相关。容重与直支比之间无相关性。

进一步对极端玉米种质籽粒进行 RNA-Seq, 共鉴定到 8 个与碳代谢和氨基酸代谢途径相关的基因, 并利用 RT-qPCR 验证其在极端种质中的表达差异, 发现这些基因在不同种质中的表达变化规律与品质性状差异变化趋势一致, 其中 *Zm00001d021653*、*Zm00001d004438*、*Zm00001d043511*、*Zm00001d035156* 可能在碳还原、胚乳发育、淀粉代谢、细胞代谢和种子脂肪积累中起着重要作用。

本研究筛选获得了可能与品质性状相关的候选基因, 可以为高品质玉米新品种选育提供特异性种质资源及候选基因, 但是对于这些基因调控玉米籽粒品质性状的分子机制仍然不够清晰, 还需要进一步通过分子生物学实验来鉴定这些基因的功能, 以揭示玉米籽粒品质性状的分子调控机制。

5 参考文献

- [1] WANG Zhen, GUO Yanan, WANG Keru, *et al.* Effects of planting density on test weight and related indexes of maize [J]. *Crop Science*, 2023, **63**(6): 3470 – 3481.
- [2] PINHEIROBR N, COSTA R, ALMEIDA A, *et al.* Durum wheat breeding in Mediterranean environments-influence of climatic variables on quality traits [J]. *Journal of the Science of Food & Agriculture*, 2013, **25**(12): 962 – 973.
- [3] MARINCIU C M, ERBAN G, MANDEA V, *et al.* Nardi Fundulea, romania cultivar and crop management effects on test weight in winter wheat (*Triticum aestivum*) [J]. *Romanian Agricultural Research*, 2021, **38**: 1 – 7.
- [4] QI Xin, LI Shixue, ZHU Yaxi, *et al.* *ZmDof3*, a maize endosperm-specific Dof protein gene, regulates starch accumulation and aleurone development in maize endosperm [J]. *Plant Molecular Biology*, 2017, **93**(1): 7 – 20.
- [5] DAI Dawei, MA Zeyang, SONG Rentao. Maize endosperm development [J]. *Journal of Integrative Plant Biology*, 2021, **63**(4): 613 – 627.
- [6] MCNEECE B T, GILLENWATER J H, LI Z, *et al.* Assessment of soybean test weight among genotypes, environments, agronomic and seed composition traits [J]. *Agronomy Journal*, 2021, **113**(3): 2303 – 2313.
- [7] 吴春胜, 贾士芳, 王成己, 等. 高蛋白玉米、高油玉米与普通玉米品质的对比研究[J]. *玉米科学*, 2004, **12**(1): 57 – 60.
WU Chunsheng, JIA Shifang, WANG Chengji, *et al.* A comparison of quality among high-protein corn, high-oil corn and common corn [J]. *Journal of Maize Science*, 2004, **12**(1): 57 – 60.
- [8] 张丽, 董树亭, 刘存辉, 等. 玉米籽粒容重与产量和品质的相关分析[J]. *中国农业科学*, 2007, **40**(2): 405 – 411.
ZHANG Li, DONG Shuting, LIU Cunhui, *et al.* Correlation analysis on maize test weight, yield and quality [J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2007, **40**(2): 405 – 411.
- [9] 张静, 王彩红, 赵永锋, 等. 玉米种质资源子粒容重和品质性状差异性分析[J]. *植物遗传资源学报*, 2016, **17**(5): 832 – 839.
ZHANG Jing, WANG Caihong, ZHAO Yongfeng, *et al.* Difference analysis of kernel test weight and nutritional quality traits in maize (*Zea mays* L.) germplasm resources [J]. *Journal of Plant Genetic Resources*, 2016, **17**(5): 832 – 839.
- [10] DORSEY-REDDING C, HURBURGH C R, JOHNSON L A, *et al.* Relationships among maize quality factors [J]. *Cereal Chemistry*, 1991, **68**(6): 602 – 605.
- [11] ZHANG Xiaoxiang, GUAN Zhongrong, WANG Lei, *et al.* Combined GWAS and QTL analysis for dissecting the genetic architecture of kernel test weight in maize [J]. *Molecular Genetics and Genomics*, 2020, **295**(2): 409 – 420.
- [12] KRISTENSEN P S, AHMED J, ANDERSEN J R, *et al.* Genome-wide association studies and comparison of models and cross-validation strategies for genomic prediction of quality traits in advanced winter wheat breeding lines [J/OL]. *Frontiers in Plant Science*, 2018, **9**: 69 [2024-01-10]. doi: 10.3389/fpls.2018.00069.
- [13] CABRAL A L, JORDAN M C, LARSON G, *et al.* Relationship between QTL for grain shape, grain weight, test weight, milling yield, and plant height in the spring wheat cross RL4452/‘ACDomain’ [J/OL]. *PLoS One*, 2018, **13**(1): e0190681 [2024-01-10]. doi: 10.1371/journal.pone.0190681.
- [14] SUN Xianyin, WU Ke, ZHAO Yan, *et al.* QTL analysis of kernel shape and weight using recombinant inbred lines in wheat [J]. *Euphytica*, 2009, **165**(3): 615 – 624.
- [15] REIF J C, GOWDA M, MAURER H P, *et al.* Association mapping for quality traits in soft winter wheat [J]. *Theoretical and Applied Genetics*, 2011, **122**(5): 961 – 970.
- [16] SCHULTHESS A W, REIF J C, JIE L, *et al.* The roles of pleiotropy and close linkage as revealed by association mapping of yield and correlated traits of wheat (*Triticum aestivum* L.) [J]. *Journal of Experimental Botany*, 2017, **68**(15): 4089 – 4101.

- [17] DING Junqiang, MA Jinliang, ZHANG Chunrong, *et al.* QTL mapping for test weight by using F2: 3 population in maize [J]. *Journal of Genetics*, 2010, **90**(1): 75 – 80.
- [18] LIU Jie, HUANG Juan, GUO Huan, *et al.* The conserved and unique genetic architecture of kernel size and weight in maize and rice [J]. *Plant Physiology*, 2017, **175**(2): 774 – 785.
- [19] NOEL R J. Collaborative study of a semiautomated method for the determination of crude protein in animal feeds [J]. *Journal - Association of Official Analytical Chemists*, 1976, **59**(1): 134 – 140.
- [20] SUBRAMANIAN R, SUBBRAMANIYAN P, AMEEN J N, *et al.* Double bypasses soxhlet apparatus for extraction of piperine from *Piper nigrum* [J]. *Arabian Journal of Chemistry*, 2016, **9**(suppl 1): S537 – S540.
- [21] ZHU Tianming, JACKSON D S, WEHLING R L, *et al.* Comparison of amylose determination methods and the development of a dual wavelength iodine binding technique 1 [J]. *Cereal Chemistry*, 2008, **85**(1): 51 – 58.
- [22] DUVICK D N. Protein granules of maize endosperm cells [J]. *Cereal Chemistry*, 1961, **38**: 374 – 385.
- [23] CHEN Jian, ZENG Biao, ZHANG Mei, *et al.* Dynamic transcriptome landscape of maize embryo and endosperm development [J]. *Plant Physiology*, 2014, **166**(1): 252 – 264.
- [24] MIJIĆ A, LIOVIĆ I, ZDUNIĆ Z. Quantitative analysis of oil yield and its components in sunflower (*Helianthus annuus* L.) [J]. *Romanian Agricultural Research*, 2009, **26**(26): 41 – 46.
- [25] HOLLAND J B, FREY K J, HAMMOND E G. Correlated responses of fatty acid composition, grain quality and agronomic traits to nine cycles of recurrent selection for increased oil content in oat [J]. *Euphytica*, 2001, **122**(1): 69 – 79.
- [26] SHEA Z, SINGER W M, ROSSO L, *et al.* Determining genetic markers and seed compositions related to high test weight in *Glycine max* [J]. *Plants*, 2023, **12**(16): 1 – 12.
- [27] BERNARDI J, LANUBILE A, LI Qinbao, *et al.* Impaired auxin biosynthesis in the defective endosperm18 mutant is due to mutational loss of expression in the *ZmYuc1* gene encoding endosperm-specific YUCCA1 protein in maize [J]. *Plant Physiology*, 2012, **160**(3): 1318 – 1328.
- [28] MUÑIZ L M, ROYO J, GÓMEZ E, *et al.* The maize transfer cell-specific type-a response regulator *ZmTCRR-1* appears to be involved in intercellular signalling [J]. *The Plant Journal*, 2006, **48**(1): 17 – 27.
- [29] NUCCIO M L, WU J, MOWERS R, *et al.* Expression of trehalose-6-phosphate phosphatase in maize ears improves yield in well-watered and drought conditions [J]. *Nature Biotechnology*, 2015, **33**(8): 862 – 869.
- [30] LI Zhiyong, WEI Xiangjin, TONG Xiaohong, *et al.* The *OsNAC23-Tre6P-SnRK1a* feed-forward loop regulates sugar homeostasis and grain yield in rice [J]. *Molecular Plant*, 2022, **15**(4): 706 – 722.
- [31] VISHAL B, KRISHNAMURTHY P, RAMAMOORTHY R, *et al.* *OsTPS8* controls yield-related traits and confers salt stress tolerance in rice by enhancing suberin deposition [J]. *New Phytologist*, 2019, **221**(3): 1369 – 1386.
- [32] HEIBER I, CAI W, BAIER M. Linking chloroplast antioxidant defense to carbohydrate availability: the transcript abundance of stromal ascorbate peroxidase is sugar-controlled via ascorbate biosynthesis [J]. *Molecular Plant*, 2014, **7**(1): 58 – 70.
- [33] WEISE S E, LIU T, CHILDS K L, *et al.* Transcriptional regulation of the glucose-6-phosphate/phosphate translocator 2 is related to carbon exchange across the chloroplast envelope [J/OL]. *Frontiers in Plant Science*, 2019, **10**: 827[2024-01-10]. doi: 10.3389/fpls.2019.00827.
- [34] CHEN Erwang, YU Huiqin, HE Juan, *et al.* The transcription factors *ZmNAC128* and *ZmNAC130* coordinate with *Opaque2* to promote endosperm filling in maize [J]. *The Plant Cell*, 2023, **35**(11): 4066 – 4090.
- [35] XIAO Yingni, THATCHER S, WANG Min, *et al.* Transcriptome analysis of near-isogenic lines provides molecular insights into starch biosynthesis in maize kernel [J]. *Journal of Integrative Plant Biology*, 2016, **58**(8): 713 – 723.
- [36] YANG X B, WU S L, ZHU D P, *et al.* Expression of the 2-dehydro-3-deoxyphosphooc-tonate aldolase (*KdsA*) gene in mulberry leaves (*Morus alba* L.) is down-regulated under high salt and drought stress [J]. *Genetics and Molecular Research: GMR*, 2015, **14**(4): 11955 – 11964.
- [37] GUO Liang, MA Fangfang, WEI Fang, *et al.* Cytosolic phosphorylating glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenases affect arabidopsis cellular metabolism and promote seed oil accumulation [J]. *The Plant Cell*, 2014, **26**(7): 3023 – 3035.