

玉米籽粒氮含量遗传位点挖掘及候选基因预测

王利锋¹, 王 森^{1,2}, 蔡齐宗¹, 王 浩¹, 周 柯¹, 杨继伟¹, 李晶晶¹,
贾腾蛟¹, 张站壹¹, 王 景¹, 李会勇¹

(¹河南省农业科学院农作物种质资源研究所, 郑州 450002; ²河南大学生命科学学院, 开封 475001)

摘要: 玉米籽粒氮含量与品质紧密相关, 其遗传机制的解析对玉米品质育种具有重要意义。本研究以252份玉米自交系为关联群体, 利用贝叶斯信息与连锁不平衡迭代嵌套式模型(BLINK, bayesian-information and linkage-disequilibrium iteratively nested keyway)、固定随机循环概率模型(FarmCPU, fixed and random model circulating probability unification)、一般线性模型(GLM, general linear model)、混合线性模型(MLM, mixed linear model)、多位点混合线性模型(MLMM, multiple loci mixed model)和逐步排它性混合线性模型(SUPER, settlement of MLM under progressively exclusive relationship)等方法分别对其籽粒氮含量进行全基因组关联分析。共鉴定到13个与籽粒氮含量显著关联的SNP ($P < 3.64 \times 10^{-7}$)。BLINK、FarmCPU、GLM、MLM、MLMM和SUPER方法分别检测到6个、3个、7个、4个、2个和4个SNP位点。其中, S3_8879213在5种方法中均能检测到, S9_146173702在4种方法中均能检测到, S5_114774030和S7_182217338在3种方法中均能检测到, S1_10906326和S1_177528813在2种方法中均能检测到。共挖掘25个相关候选基因, 其中Zm00001eb275080和Zm00001eb330700可能是影响玉米籽粒氮含量的重要候选基因。

关键词: 玉米; 籽粒; 氮含量; 全基因组关联分析; 候选基因

Exploration of Elite Genetic Loci for Grain Nitrogen Content and Prediction of Candidate Genes in Maize

WANG Lifeng¹, WANG Sen^{1,2}, CAI Qizong¹, WANG Hao¹, ZHOU Ke¹, YANG Jiwei¹, LI Jingjing¹,
JIA Tengjiao¹, ZHANG Zhanyi¹, WANG Jing¹, LI Huiyong¹

(¹Crop Germplasm Research Institute, Henan Academy of Agricultural Sciences, Zhengzhou 450002;

²School of Life Sciences, Henan University, Kaifeng 475001)

Abstract: Nitrogen content in maize grains is closely related to maize quality, and the analysis of its genetic mechanism is great significance for maize quality breeding. In this study, we used 252 maize inbred lines as an association population, and used bayesian-information and linkage-disequilibrium iteratively nested keyway (BLINK), fixed and random model circulating probability unification (FarmCPU), general linear model (GLM), mixed linear model (MLM), multiple loci mixed model (MLMM), and settlement of MLMs under progressively exclusive relationship (SUPER) to conduct genome-wide association analysis for grain nitrogen content. A total of thirteen SNPs ($P < 3.64 \times 10^{-7}$) were identified. Six, three, seven, four, two and four SNPs were detected by BLINK, FarmCPU, GLM, MLM, MLMM and SUPER methods, respectively. S3_8879213 can be detected in five methods, S9_146173702 can be detected in four methods, S5_114774030 and S7_182217338 can be detected in three methods, S1_10906326, and S1_177528813 can be detected in two

收稿日期: 2023-12-27 网络出版日期: 2024-07-20

URL: <https://doi.org/10.13430/j.cnki.jpgr.20231227001>

第一作者研究方向为玉米种质资源和遗传育种, E-mail: wanglifeng625@126.com

通信作者: 李会勇, 研究方向为玉米种质资源, E-mail: lihuiyong1977@126.com

基金项目: 国家重点研发计划(2021YFD1200703); 河南省科技攻关计划(222102110471, 232102111103); 河南省农业科学院科技创新团队项目(2024TD19); 河南省农业科学院自主创新项目(2023ZC009)

Foundation projects: National Key Research and Development Program of China(2021YFD1200703); Henan Province Science and Technology Research Program Project(222102110471, 232102111103); Technology Innovation Team Project of Henan Academy of Agricultural Sciences(2024TD19); Independent Innovation Project of Henan Academy of Agricultural Sciences(2023ZC009)

methods. A total of twenty-five candidate genes were identified, among which *Zm00001eb275080* and *Zm00001eb330700* may be the important candidate genes affecting maize grain nitrogen content.

Key words: maize; grain; nitrogen content; genome-wide association analysis; candidate gene

玉米(*Zea mays* L.)作为我国第一大作物,在粮食、饲料和加工等行业发挥重要作用,有效保障国民经济和粮食安全^[1]。随着经济的发展和消费结构的改变,对玉米籽粒品质提出了更高的要求,育种目标也逐渐从高产向高产和优质协同方向发展^[2]。玉米籽粒氮含量是重要的品质性状之一。研究表明,在玉米商业化品种推广应用过程中,虽然产量不断提升,但籽粒氮含量显著下降,阻碍了高产和优质的协同^[3]。因此,在保障玉米品种高产基础上,如何更有效地提高其籽粒氮含量是今后重要的发展方向。

玉米籽粒氮含量是受多基因控制的数量性状,挖掘相关性状QTL是解析其遗传机制的重要基础。Hirel小组利用重组自交系群体,分别对玉米氮效率的相关酶、籽粒产量及氮含量(籽粒、秸秆、整株等)等性状进行遗传分析,发现许多生理性状及产量性状的QTL与氮含量相关基因存在共定位^[4-7]。Wassom等^[8]利用IHO×B73的回交群体定位到12个与玉米籽粒蛋白质含量相关的QTL位点,其中2个主效QTL位点位于第6号和第9号染色体上。Zhang等^[9]利用许178和P53构建的重组自交系群体,在6个不同环境下定位到25个玉米籽粒蛋白质含量相关QTL位点。Yang等^[10]利用B73和郑58的165个家系,共定位到10个蛋白质含量相关QTL位点。赵志鑫等^[11]利用许178和K12构建的重组自交系群体,共定位到9个玉米籽粒蛋白质含量显著相关QTL位点,其中位于第4号染色体umc1194~umc2384区间的QTL,在多种环境中均能检测到,被认为是主效QTL位点。李冉冉等^[12]利用KA105和KB020构建的RIL群体,在不同授粉方式进行玉米籽粒品质相关性状QTL检测,共检测到2个蛋白质含量相关QTL。

玉米种质资源是新品种选育的物质基础,不同基因型玉米种质资源的籽粒蛋白质含量间存在显著差异^[13-15]。本研究利用252份玉米自交系构建的关联群体,通过6种不同的方法对2个环境下的关联群体的籽粒氮含量进行全基因组关联分析,旨在挖掘显著关联位点,预测相关候选基因,并筛选籽粒氮含量高的优异种质,为玉米籽粒氮含量种质创新及遗传机理解析奠定基础,

并为进一步选育高产、优质玉米新品种提供参考。

1 材料与方法

1.1 试验材料

试验采用的关联群体来源于本课题组收集和自选材料,其中包括国内优异自交系107份,国外过保护期自交系132份,优异自选系13份,共252份。于2022年夏季分别种植在河南省农业科学院基地(河南新乡原阳)和周口郸城县农业科学研究所基地(河南周口郸城)。采用随机区组试验设计,2行区,双粒播,行距60 cm,株距25 cm,每行15株,3个重复。

1.2 籽粒氮含量测定及分析

于收获期连续收获每个小区每个穗行中部植株果穗3穗,自然晾干,脱取每个果穗的中部籽粒,混合均匀后粉碎。基于本课题组前期构建的近红外籽粒氮浓度预测模型,每份样品选取5 g,利用赛默飞傅立叶变换近红外光谱仪(Antaris II)测定关联群体材料2个环境3个重复的籽粒氮浓度,并乘以多重复单籽粒重的平均值,计算籽粒氮含量。利用Microsoft Excel 2010整理数据,IBM SPSS 20.0进行基本描述、方差等表型性状数据分析。

1.3 基因型鉴定和分析

采用GBS(Genotyping by sequencing)简化测序的方法对252份自交系进行基因型分型,测序仪为Illumina HiSeq PE150,双端测序。利用BWA软件比对到B73(RefGen V5)版参考基因组(https://ftp.ebi.ac.uk/ensemblgenomes/pub/release-57/plants/gff3/zea_mays/Zea_mays.Zm-B73-REFERENCE-NAM-5.0.57.chr.gff3.gz)。采用SAMTOOLS软件进行群体SNP的检测,以缺失率小于0.10、杂合率小于0.10、最小等位基因频率大于0.05为筛选标准,共获得137492个高质量SNP用于全基因组关联分析^[16-17]。

1.4 全基因组关联分析

利用GAPIT(Genome associated prediction integrated tool)软件包完成6种不同模型的2个环境下关联群体平均籽粒氮含量的全基因组关联分析,分别为贝叶斯信息与连锁不平衡迭代嵌套式模型(BLINK, bayesian-information and linkage-disequilibrium iteratively nested keyway)、固定随机循

环概率模型 (FarmCPU, fixed and random model circulating probability unification)、一般线性模型 (GLM, general linear model)、混合线性模型 (MLM, mixed linear model)、多位点混合线性模型 (MLMM, multiple loci mixed model) 和逐步排它性混合线性模型 (SUPER, settlement of MLM under progressively exclusive relationship), 显著临界值设置为 $P=0.05/137492=3.64E-07$ 。

采用玉米籽粒氮含量显著性 SNP 位点上下游各 50 kb 的区段用于该位点候选基因预测 (参照 B73 (RefGenV5) 基因组序列信息), 区段内候选基因筛选和功能注释通过 MaizeGDB 数据库 (<https://maizegdb.org/>) 完成, 并利用 DAVID 数据库 (<https://david.ncifcrf.gov/>) 在线进行 GO 和 KEGG 富集分析。

候选基因在缺氮和施氮处理下的基因表达谱分析数据引自 PRJNA587226 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/bioproject/PRJNA587226>), 并利用 R 语言 heatmap 包, K-means 聚类方式作图。

2 结果与分析

2.1 关联群体籽粒氮含量表型分析

2 个环境下关联群体籽粒氮含量结果表明, 其变异范围在 3.03~9.31 mg 之间, 不同自交系籽粒氮含量间存在广泛的遗传变异。从直方图的拟合曲线上来看, 在 2 个环境条件下, 关联群体籽粒氮含量均符合正态分布 (图 1)。单因素方差分析发现, 2 个环境的关联群体籽粒氮含量间无显著差异, 说明受环境影响较小。

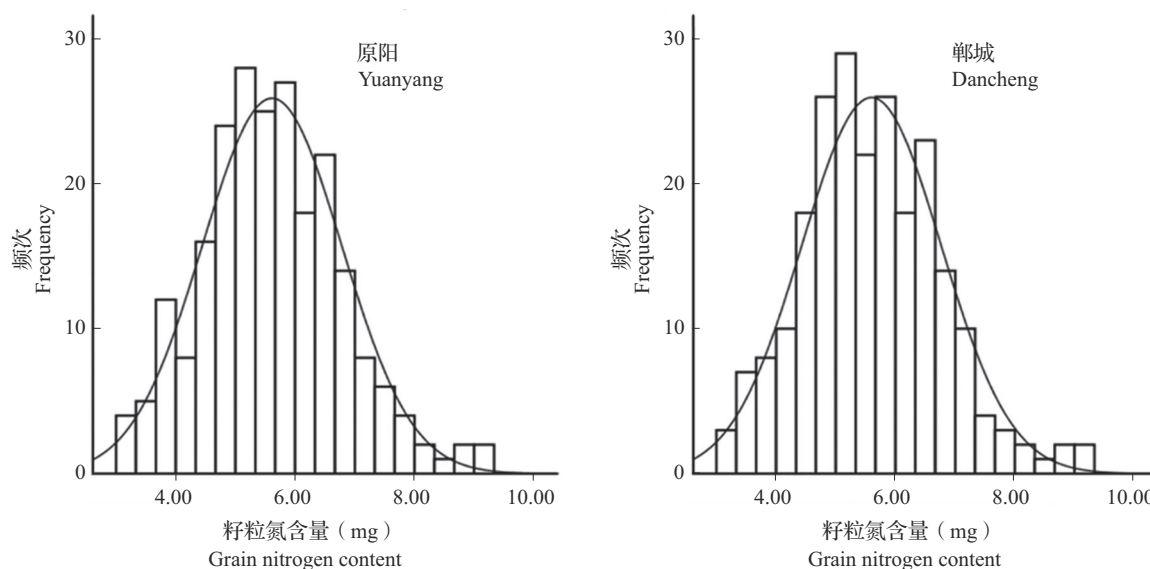


图 1 不同环境籽粒氮含量频次分布

Fig. 1 Frequency distribution of grain nitrogen content in different environments

2.2 籽粒氮含量全基因组关联分析

利用 6 种不同的全基因组关联分析方法, 对 2 个环境的玉米关联群体籽粒氮含量进行 SNP 显著位点挖掘, 共检测到 13 个与籽粒氮含量显著关联的 SNP 位点 (表 1)。其中, BLINK 方法检测到 6 个显著 SNP 位点, 分别位于第 1、2、3、5、7 和 9 号染色体 ($P=4.39E-14\sim5.87E-08$)。FarmCPU 方法检测到 3 个显著 SNP 位点, 分别位于第 1、8 和 9 号染色体 ($P=2.61E-15\sim1.86E-07$)。GLM 方法检测到 7 个显著 SNP 位点, 分别位于第 1、3、4、5、7 和 9 号染色体 ($P=4.50E-09\sim1.50E-07$)。MLM 方法检测到 4 个显著 SNP 位点, 分别位于第 3、5、7 和 9 号染色体 ($P=$

$4.13E-09\sim1.89E-07$)。MLMM 方法检测到 2 个显著 SNP 位点, 分别位于第 3 和 9 号染色体 ($P=7.52E-09\sim7.63E-09$)。SUPER 方法检测到 4 个显著 SNP 位点, 分别位于第 1、3、5 和 6 号染色体 ($P=4.82E-09\sim7.76E-08$)。

其中位于第 1 号染色体标记 S1_10906326 和 S1_177528813、第 3 号染色体的标记 S3_8879213、第 5 号染色体标记 S5_114774030、第 7 号染色体标记 S7_182217338 和第 9 号染色体标记 S9_146173702 在多种方法中均能检测到, 为主效 SNP 位点 (表 1, 图 2, 图 3)。

表 1 籽粒氮含量显著关联的 SNP 位点和候选基因
Table 1 Significant SNPs and candidate genes of grain nitrogen content

SNP 名称 SNP name	染色体 Chr.	位置(bp) Position	方法 Method	环境 Environment	P 值 P value	候选基因 Candidate gene
S1_10906326	1	10906326	BLINK	郸城	4.74E-09	<i>Zm00001eb003910, Zm00001eb003920, Zm00001eb003930</i>
			FarmCPU		2.61E-15	
S1_177528813	1	177528813	GLM	郸城	1.50E-07	<i>Zm00001eb031710, Zm00001eb031700, Zm00001eb031720</i>
			SUPER		1.88E-08	
S2_26621756	2	26621756	BLINK	原阳	1.62E-10	<i>Zm00001eb076310</i>
S3_8879213	3	8879213	BLINK	原阳	4.39E-14	<i>Zm00001eb121990, Zm00001eb122000, Zm00001eb121920</i>
			GLM		4.50E-09	
			MLM		4.13E-09	
			MLMM		7.52E-09	
			SUPER		7.76E-08	
S3_224090740	3	224090740	GLM	郸城	3.11E-08	<i>Zm00001eb159780</i>
S4_221605237	4	221605237	GLM	郸城	9.00E-08	<i>Zm00001eb202470</i>
S5_61436895	5	61436895	BLINK	原阳	2.13E-12	<i>Zm00001eb227670, Zm00001eb227680, Zm00001eb227690</i>
S5_114774030	5	114774030	GLM	原阳	5.93E-08	
			MLM		7.08E-08	<i>Zm00001eb235460</i>
			SUPER		1.79E-08	
S6_106080325	6	106080325	SUPER	原阳	4.82E-09	<i>Zm00001eb275080</i>
S7_182217338	7	182217338	BLINK	原阳	3.69E-11	<i>Zm00001eb330680, Zm00001eb330700, Zm00001eb330710, Zm00001eb330690, Zm00001eb330720</i>
			GLM		3.91E-08	
			MLM		4.16E-08	
S8_158491327	8	158491327	FarmCPU	郸城	8.29E-08	<i>Zm00001eb361270</i>
S9_70909760	9	70909760	BLINK	原阳	5.87E-08	<i>Zm00001eb383670</i>
S9_146173702	9	146173702	FarmCPU	郸城	1.86E-07	<i>Zm00001eb397820</i>
			GLM		7.65E-08	
			MLM		1.89E-07	
			MLMM		7.63E-09	

2.3 籽粒氮含量相关候选基因挖掘

根据检测到的 13 个显著 SNP 位点,共挖掘到 25 个籽粒氮含量相关候选基因(表 1)。利用 DAVID 数据库对 25 个候选基因进行富集分析。GO 分析显示,在生物进程方面,参与信号传导(Signaling)、发育和代谢(Developmental and metabolic process)、细胞定位(Localization)及生物调控(Biological regulation)等功能。在细胞组分层面,这些候选基因富集于细胞解剖结构(Cellular anatomical entity)、细胞内(Intracellular)、蛋白质复合物(Protein-containing complex)等。在分子功能方面,主要涉

及结合(Binding)、催化活性(Catalytic activity)、转录调控活性(Transcription regulator activity)等(图 4)。此外,KEGG 分析显示,主要参与二萜类化合物合成(Diterpenoid biosynthesis)、类黄酮合成(Flavonoid biosynthesis)、磷脂酰肌醇信号通路(Phosphatidylinositol signaling system)、泛素介导的蛋白质降解(Ubiquitin mediated proteolysis)、植物 MAPK 信号通路(MAPK signaling pathway-plant)以及植物激素信号转导(Plant hormone signal transduction)等代谢和信号传导过程(图 5)。

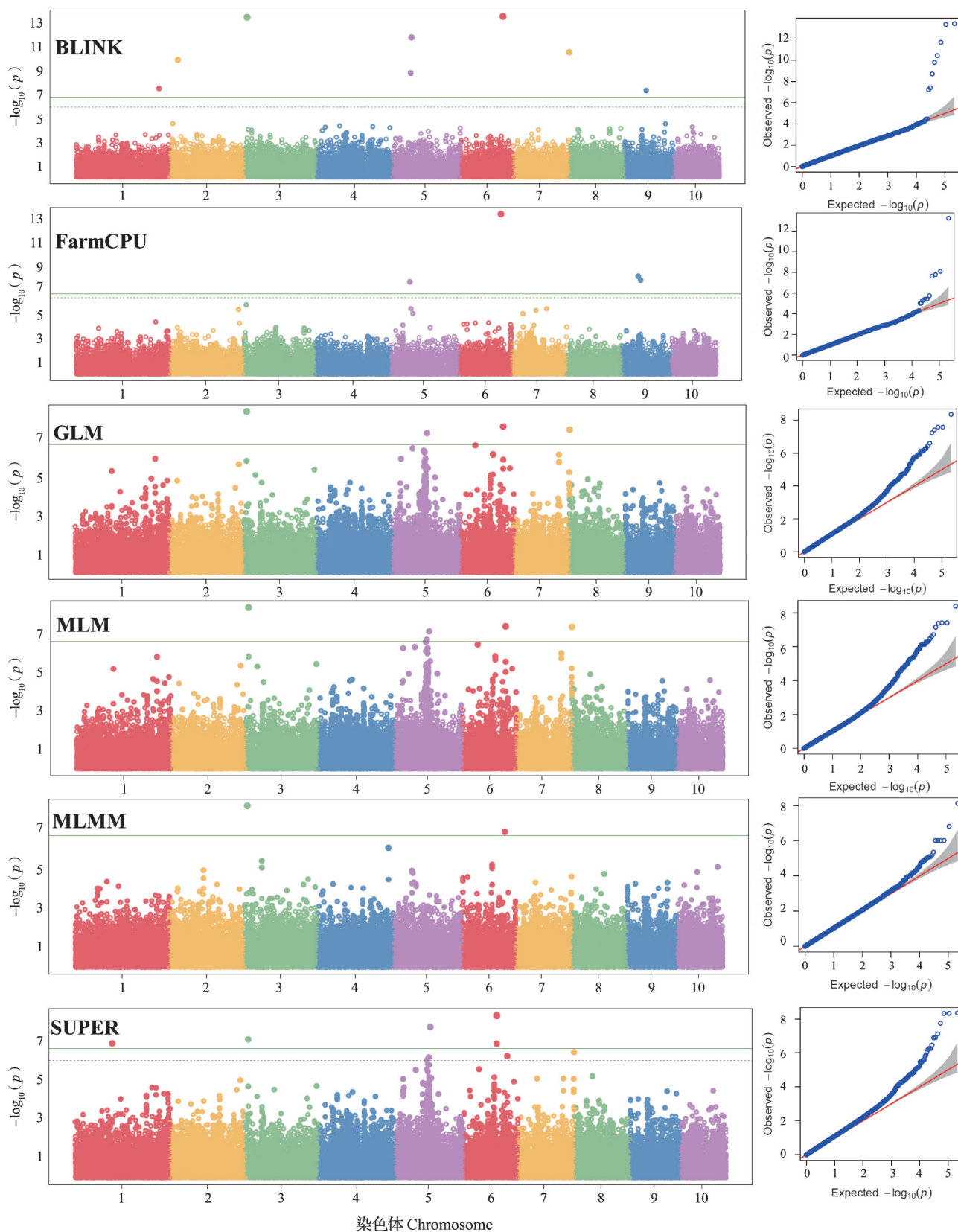


图2 原阳籽粒氮含量显著SNP的曼哈顿图和QQ图

Fig. 2 Manhattan plots and quantile-quantile plots for significant SNP for grain nitrogen content in Yuanyang

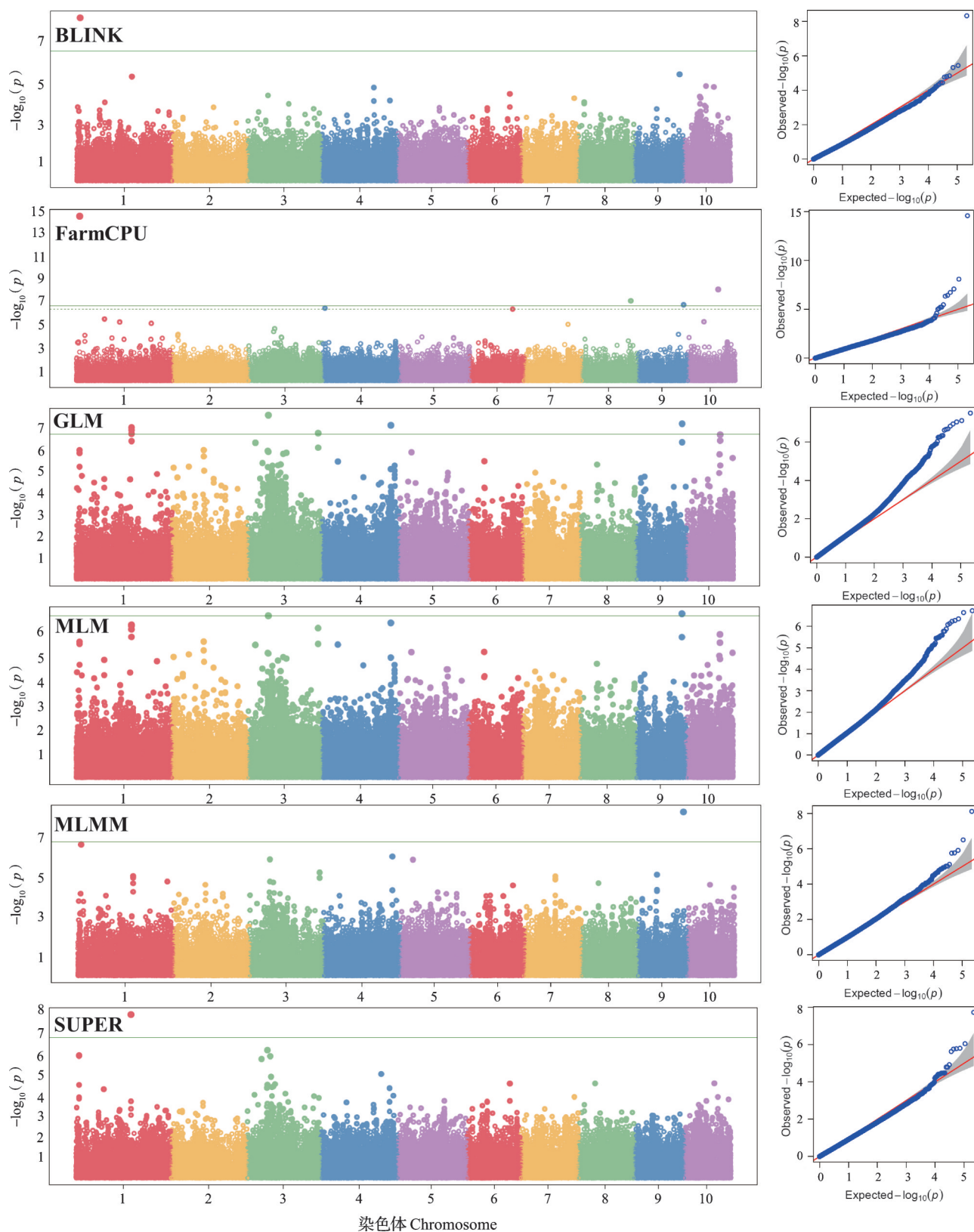


图3 郸城籽粒氮含量显著SNP的曼哈顿图和QQ图

Fig. 3 Manhattan plots and quantile-quantile plots for significant SNP for grain nitrogen content in Dancheng

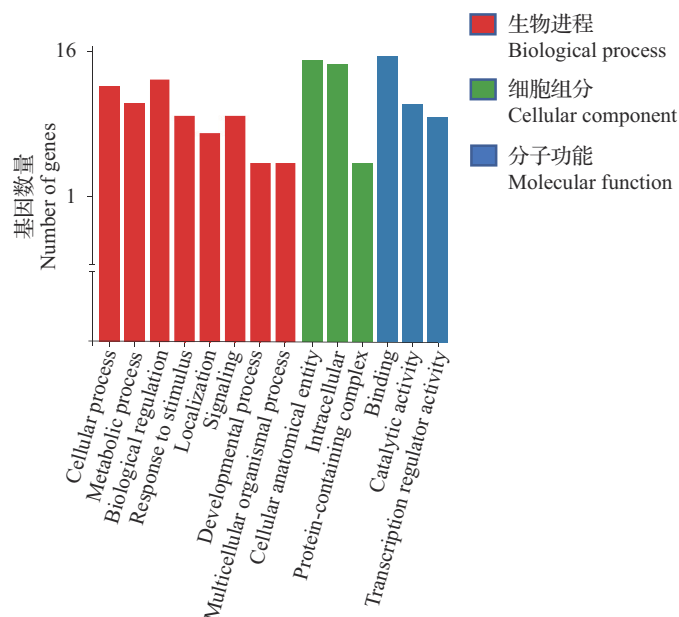


图4 GO通路富集分析

Fig. 4 GO enrichment analysis

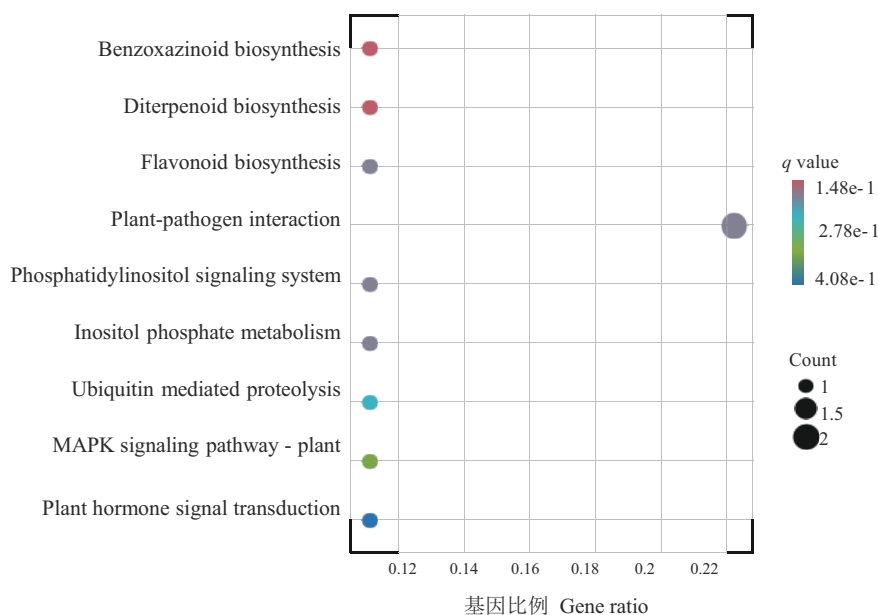


图5 KEGG通路富集分析

Fig. 5 KEGG enrichment analysis

其中,第1号染色体 Bin1.01 区域候选基因 *Zm00001eb003910 (lbd1)* 编码 LBD 转录因子 1; *Zm00001eb003920 (rtcs1)* 编码 RTCS LOB 结构域蛋白; *Zm00001eb003930 (pco140232)* 编码类 HR 病斑诱导蛋白。Bin1.05 区域候选基因 *Zm00001eb031700 (arftf34)* 编码 ARF 转录因子 34。第3号染色体 Bin3.03 区域候选基因 *Zm00001eb121990 (IDP7678)* 编码 1-氨基环丙烷-1-羧酸氧化酶; *Zm00001eb122000 (uaz277(201))* 编码 F-box 结构域蛋白; *Zm00001eb1*

21920 (*si946086a04*) 编码多核苷酸 5'-羟基激酶 NOL9。Bin3.09 区域 *Zm00001eb159780 (cenpc1)* 编码着丝粒蛋白 C1。第5号染色体 Bin5.09 区域候选基因 *Zm00001eb227670 (ppr288)* 编码五肽重复蛋白 288。第6号染色体 Bin6.02 区域候选基因 *Zm00001eb275080 (wrky114)* 编码 WRKY 转录因子 114。第7号染色体 Bin7.05 区域候选基因 *Zm00001eb330680 (bzip58)* 编码 bZIP 转录因子 58; *Zm00001eb330700* 编码液泡分选受体 1; *Zm00001eb*

330710(*wrky17*)编码 *WRKY* 转录因子 17; *Zm00001eb330690(abi32)* 编码休眠调节蛋白; *Zm00001eb330720* 编码 E3 泛素蛋白连接酶。第 9 号染色体 Bin9.06 区域候选基因 *Zm00001eb397820(kao2)* 编码异贝壳杉烯酸氧化酶 2。

基于氮响应转录组数据进行候选基因预测,发现 *Zm00001eb275080* 和 *Zm00001eb330700* 这 2 个候选基因对氮处理表现出极显著的表达水平差异^[18],因此认为这 2 个基因是影响玉米籽粒氮含量的重要候选基因(表 2,图 6)。

表 2 候选基因转录组学丰度 [$\log_2(\text{TPM}+1)$]^[18]

Table 2 Transcriptional abundance of candidate genes [$\log_2(\text{TPM}+1)$]^[18] in RNA-Seq analysis

候选基因 Candidate genes	缺氮 1 Nitrogen deficiency 1	缺氮 2 Nitrogen deficiency 2	缺氮 3 Nitrogen deficiency 3	施氮 1 Nitrogen application1	施氮 2 Nitrogen application2	施氮 3 Nitrogen application3	倍性变化 Fold change	P 值 <i>P</i> _value
<i>Zm00001eb003910</i>	4.39	4.45	4.62	2.61	2.64	2.53	0.58	0.00
<i>Zm00001eb003920</i>	2.36	1.87	2.06	1.57	1.02	1.75	0.69	0.03
<i>Zm00001eb031710</i>	2.49	1.22	2.63	2.28	2.18	0.99	0.86	0.37
<i>Zm00001eb031700</i>	0.97	1.19	0.00	0.00	0.47	1.45	0.89	0.46
<i>Zm00001eb031720</i>	0.97	0.55	1.08	1.58	1.65	1.71	1.90	0.02
<i>Zm00001eb121990</i>	4.02	3.55	4.18	5.42	5.51	5.46	1.39	0.01
<i>Zm00001eb122000</i>	4.35	3.89	4.54	4.30	4.20	4.25	1.00	0.48
<i>Zm00001eb121920</i>	4.33	3.69	4.41	4.21	3.83	3.96	0.97	0.25
<i>Zm00001eb159780</i>	2.18	1.61	2.37	2.38	2.19	2.14	1.09	0.26
<i>Zm00001eb202470</i>	1.91	1.08	1.71	1.95	2.07	1.96	1.27	0.14
<i>Zm00001eb227670</i>	0.88	0.26	0.89	0.09	0.61	0.64	0.66	0.28
<i>Zm00001eb227680</i>	1.53	1.16	1.71	1.97	1.58	1.56	1.16	0.17
<i>Zm00001eb227690</i>	4.31	4.83	4.72	4.46	4.09	4.32	0.93	0.17
<i>Zm00001eb235460</i>	4.55	4.50	4.66	4.01	4.23	4.02	0.89	0.03
<i>Zm00001eb275080</i>	1.17	0.73	0.87	5.02	5.25	5.09	5.53***	0.00
<i>Zm00001eb330680</i>	2.99	2.17	0.00	3.21	3.41	3.15	1.89	0.11
<i>Zm00001eb330700</i>	0.57	0.26	0.41	2.90	2.62	2.74	6.66***	0.00
<i>Zm00001eb330710</i>	3.48	3.00	3.57	3.91	4.02	3.95	1.18	0.05
<i>Zm00001eb330690</i>	3.61	2.04	3.47	4.09	4.12	4.09	1.35	0.09
<i>Zm00001eb330720</i>	1.64	0.64	2.53	3.00	3.20	3.05	1.93	0.06
<i>Zm00001eb383670</i>	5.70	6.33	5.96	5.26	5.21	5.16	0.87	0.03
<i>Zm00001eb397820</i>	4.42	3.74	4.46	5.66	5.66	5.67	1.35	0.01

倍性变化指不同处理间的差异倍数,*** 表示 $P<0.001$ 显著水平

Fold change refers to the multiple of differences between different treatments, *** indicates significant at the $P<0.001$ level

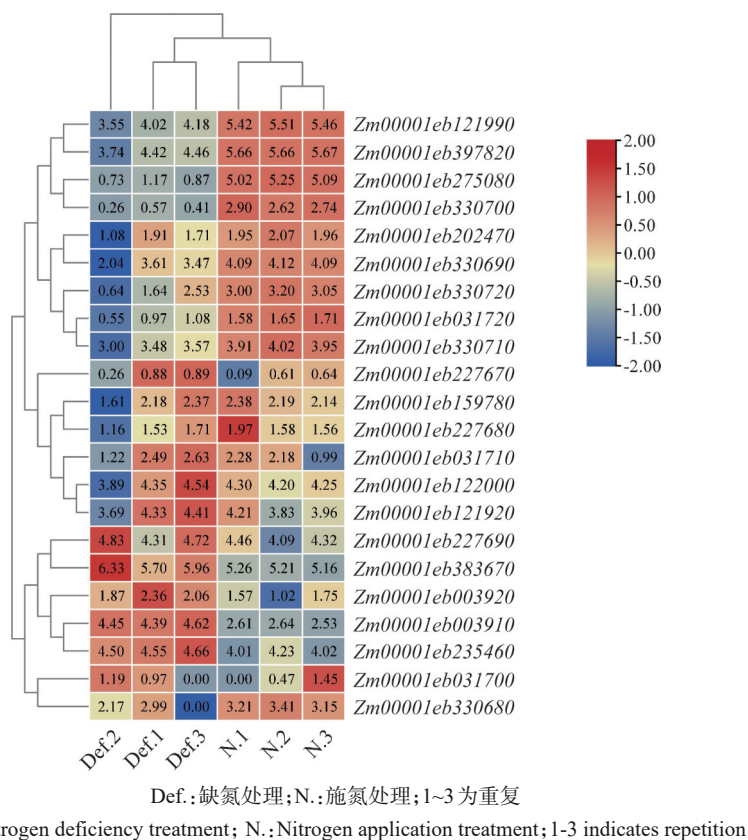


图6 候选基因在缺氮和施氮处理下的基因表达谱

Fig. 6 Gene expression profiles of candidate genes under nitrogen deficiency and nitrogen application treatments

3 讨论

籽粒氮含量(蛋白质含量)是影响玉米品质的重要性状之一,深入研究其遗传机制对于玉米品质育种具有重要意义。不同基因型玉米种质资源籽粒氮含量间存在显著差异^[13-15]。本研究利用遗传基础广泛的252份玉米自交系构建的关联群体进行籽粒氮含量相关表型与全基因组的关联分析,结果表明该群体在2个试验点的籽粒氮含量均符合正态分布,且无显著差异,可用于全基因组关联分析。同时,鉴定挖掘出郑Q216、4N506、齐318等一批2个试验点籽粒氮含量较高的玉米自交系,为后续高蛋白含量的玉米种质资源创新及新品种选育提供可靠的材料基础。

本研究利用BLINK、FarmCPU、GLM、MLM、MLMM和SUPER方法共发现13个与籽粒氮含量显著关联的SNP($P < 3.64E-07$),主要分别分布于染色体Bin1.01、Bin1.05、Bin3.03、Bin3.09、Bin4.09、Bin5.09、Bin6.02、Bin7.05和Bin9.06等区间。其中,Bin3.03区间内的位点S3_8879213在GLM、MLM、BLINK、SUPER和MLMM方法中均能检测到,

Bin9.03区间内位点S9_146173702在GLM、MLM、FarmCPU和MLMM方法中均能检测到,Bin5.09区间内位点S5_114774030在GLM、MLM和SUPER方法中均能检测到,Bin7.05区间内位点S7_182217338在GLM、MLM和BLINK方法中均能检测到,Bin1.01区间内位点S1_10906326在BLINK和FarmCPU方法中均能检测到,Bin1.05区间内位点S1_177528813在GLM和SUPER方法中均能检测到。推测这6个区间为重要的籽粒氮含量基因组区间,而区间内位点S3_8879213、S9_146173702、S5_114774030、S7_18221733、S1_10906326和S1_177528813可能是控制籽粒氮含量的重要位点。但是6种全基因组关联分析方法,在2个不同试验点间未定位到共同的SNP位点。

本研究共挖掘玉米籽粒氮含量相关候选基因25个,其中,Zm00001eb121990、Zm00001eb122000、Zm00001eb121920、Zm00001eb397820、Zm00001eb330680、Zm00001eb330700、Zm00001eb330710、Zm00001eb031720、Zm00001eb031730、Zm00001eb330690、Zm00001eb330720、Zm00001eb003910、Zm00001eb003920和Zm00001eb003930为不同方法共定位SNP

位点区间内发现的候选基因。候选基因 *Zm00001eb121990* 主要参与乙烯生物合成途径, Caicedo 等^[19] 发现其参与玉米衰老过程。候选基因 *Zm00001eb122000* 与植物生长发育相关, 并通过影响植物激素脱落酸、乙烯等植物激素信号传导和转录因子活性, 调控植物抗逆反应。候选基因 *Zm00001eb121920* 在核糖体 RNA(rRNA) 加工中发挥作用^[20]。候选基因 *Zm00001eb397820* 参与赤霉素生物合成, 对于植物生长具有重要性, 影响玉米生长速率、生物量和株高等性状^[21-23]。候选基因 *Zm00001eb330680* 是 *bZIP58* (Basic leucine zipper 58) 转录因子家族一员, 在植物中发挥着重要的调控作用, 参与了许多生长、发育和应激响应的过程, Wang 等^[24] 发现 *OsbZIP58* 是淀粉合成核心组件, 其突变体呈白垩状, 总淀粉含量和直链淀粉含量减低。且 *OsbZIP58* 参与调控植物花和种子的发育、生物和非生物胁迫应答等诸多生物学过程, 影响玉米铁锌元素生物强化^[25]。候选基因 *Zm00001eb330700* 介导可溶性蛋白在植物中液泡转运, 诱导脱落酸生物合成^[26], Lin 等^[27] 发现其可能参与玉米果穗夹角形态建成。候选基因 *Zm00001eb330710* 参与植物的生长发育、逆境胁迫等, 影响玉米耐寒性和苗期缺钾响应^[28-30]。候选基因 *Zm00001eb031720* 和 *Zm00001eb031730* 编码的蛋白是生长素响应因子, 在低氮条件下参与了表皮生长素信号通路, 从而刺激根毛伸长^[31]。候选基因 *Zm00001eb330690* 在调节植物生长发育和应对非生物胁迫中发挥重要作用^[32]。候选基因 *Zm00001eb330720* 通过染色质泛素化促进 DNA 修复或转录调控^[33]。候选基因 *Zm00001eb003910* 参与植物根、茎、叶、花的器官发育, 在植物的生长发育过程中起着至关重要的作用, 是玉米愈伤组织诱导的关键基因^[34-35]。位点 S1_10906326 上下游 50 kb 区间挖掘到的候选基因 *Zm00001eb003910*、*Zm00001eb003920* 和 *Zm00001eb003930*, 它们编码的蛋白质富含 LATERAL ORGAN BOUNDARIES DOMAIN (LOB) 结构域, 参与调控多种生物学过程, 包括侧向器官发育、病原菌反应以及无机氮元素的摄取。在玉米中 RTCS (Rootless concerning crown and seminal roots) 是富含 LOB 结构域的蛋白, 参与胚乳根和胚后叶生根系统的形成^[36-38]。在拟南芥中, 过表达 *MsLBD48* 会导致生长迟缓和生物量显著下降^[39]。

为了进一步筛选到与玉米氮代谢过程相关度较高的候选基因, 本研究通过比较 25 个候选基因在

经过硝酸盐补充处理后的表达水平, 发现候选基因 *Zm00001eb275080* 和 *Zm00001eb330700* 的表达水平存在显著变化。其中 *Zm00001eb275080* 编码 *wrky114* 转录因子, 有报道推测 *WRKY* 转录因子可能参与水稻氮源调节过程^[40]。*Zm00001eb330700* 编码液泡分选蛋白受体 1, 这 2 个候选基因在施加氮源后都显著上调^[41]。另外, *Zm00001eb330700* 下游基因 *Zm00001eb330710* 编码 *wrky17*, 施加氮源后表达谱也存在上调, 说明 *WRKY* 转录因子可能正向调控氮的转运。结果表明, 这 2 个候选基因为籽粒氮含量重要候选基因。本研究在玉米籽粒氮含量显著 SNP 位点挖掘的基础上, 对其相关候选基因进行了预测, 为进一步解析遗传机理提供基础。

参考文献

- [1] 戴景瑞, 鄂立柱. 百年玉米, 再铸辉煌-中国玉米产业百年回顾与展望. 农学报, 2018, 8 (1): 83-88
Dai J R, E L Z. From the past centennial progress to more brilliant achievements in the future: The history and prospects of maize industrialization in china. Journal of Agriculture, 2018, 8(1): 83-88
- [2] 李少昆, 赵久然, 董树亭, 赵明, 李潮海, 崔彦宏, 刘永红, 高聚林, 薛吉全, 王立春, 王璞, 陆卫平, 王俊河, 杨祁峰, 王子明. 中国玉米栽培研究进展与展望. 中国农业科学, 2017, 50(11): 1941-1959
Li S K, Zhao J R, Dong S T, Zhao M, Li C H, Cui Y H, Liu Y H, Gao J L, Xue J Q, Wang L C, Wang P, Lu W P, Wang J H, Yang Q F, Wang Z M. Advances and prospects of maize cultivation in China. Scientia Agricultura Sinica, 2017, 50 (11): 1941-1959
- [3] Duvick D N. The contribution of breeding to yield advances in maize (*Zea mays* L.). Advances in Agronomy, 2005, 86: 83-145
- [4] Hirel B, Bertin P, Quillere' I, Bourdoncle W, Attagnant C, Dellay C, Gouy A, Cadiou S, Retalliau C, Falque M, Gallais A. Towards a better understanding of the genetic and physiological basis for nitrogen use efficiency in maize. Plant Physiology, 2001, 125(3): 1258-1270
- [5] Gallais A, Hirel B. An approach to the genetics of nitrogen use efficiency in maize. Journal of Experimental Botany, 2004, 55 (396): 295-306
- [6] Hirel B, Le Gouis J, Ney B, Gallais A. The challenge of improving nitrogen use efficiency in crop plants: Towards a more central role for genetic variability and quantitative genetics within integrated approaches. Journal of Experimental Botany, 2007, 58(9): 2369-2387
- [7] Coque M, Martin A, Veyrieras J B, Hirel B, Gallais A. Genetic variation for N-remobilization and postsilking N-uptake in a set of maize recombinant inbred lines. 3. QTL

- detection and coincidences. Theoretical and Applied Genetics, 2008, 117(5): 729-747
- [8] Wassom J J, Wong J C, Martinez E, King J J, DeBaene J, Hotchkiss J R, Mikkilineni V, Bohn M O, Rocheford T R. QTL associated with maize kernel oil, protein, and starch concentrations; kernel mass; and grain yield in Illinois high Oil \times B73 backcross-derived lines. Crop Science, 2008, 48(1): 243-252
- [9] Zhang H D, Jin T T, Huang Y Q, Chen J T, Zhu L Y, Zhao Y F, Guo J J. Identification of quantitative trait loci underlying the protein, oil and starch contents of maize in multiple environments. Euphytica, 2015, 205: 169-183
- [10] Yang Z, Li X, Zhang N, Jiang H W, Gao J, Kuai B K, Ding Y L, Huang X Q. Detection of quantitative trait loci for kernel oil and protein concentration in a B73 and Zheng58 maize cross. Genetics and Molecular Research, 2016, 15(3): 1-10
- [11] 赵志鑫, 崔婷婷, 何坤辉, 兰天茹, 常立国, 刘建超. 多环境下玉米籽粒品质性状的 QTL 定位. 农业生物技术学报, 2018, 26(12): 2027-2035
- Zhao Z X, Cui T T, He K H, Lan T R, Chang L G, Liu J C. Mapping QTL for grain quality traits in maize (*Zea mays*) under multi-environments. Journal of Agricultural Biotechnology, 2018, 26(12): 2027-2035
- [12] 李冉冉, 张秀英, 李婷, 杨炳鹏, 于芮苏, 李冬梅, 李勤, 徐淑兔. 不同授粉方式下玉米籽粒品质性状的 QTL 定位. 西北农林科技大学学报, 2021, 49(11): 115-124
- Li R R, Zhang X Y, Li T, Yang B P, Yu R S, Li D M, Li Q, Xu S T. QTL mapping of maize grain quality under different pollination methods. Journal of Northwest A&F University, 2021, 49(11): 115-124
- [13] 张静, 王彩红, 赵永锋, 祝丽英, 黄亚群, 郭晋杰, 陈景堂. 玉米种质资源子粒容重和品质性状差异性分析. 植物遗传资源学报, 2016, 17(5): 832-839
- Zhang J, Wang C H, Zhao Y F, Zhu L Y, Huang Y Q, Guo J J, Chen J T. Difference analysis of kernel test weight and nutritional quality traits in maize (*Zea mays* L.) germplasm resources. Journal of Plant Genetic Resources, 2016, 17(5): 832-839
- [14] 杨露. 玉米籽粒品质性状的全基因组关联分析. 郑州: 河南农业大学, 2020
- Yang L. Genome-wide association analysis of quality traits in maize kernels. Zhengzhou: Henan Agricultural University, 2020
- [15] 赵海军, 史佳晴, 王彬, 郭益洋, 胡小丽, 韩赞平. 150 份玉米自交系籽粒及其品质性状的综合评价. 河南农业科学, 2023, 52(5): 33-39
- Zhao H J, Shi J Q, Wang B, Guo Y Y, Hu X L, Han Z P. Comprehensive evaluation of grain and its quality traits of 150 maize inbred lines. Journal of Henan Agricultural Sciences, 2023, 52(5): 33-39
- [16] 马娟, 王利锋, 曹言勇, 李会勇. 玉米出籽率全基因组关联分析. 植物遗传资源学报, 2021, 22(2): 448-454
- Ma J, Wang L F, Cao Y Y, Li H Y. Genome-wide association studies for kernel ratio in maize. Journal of Plant Genetic Resources, 2021, 22(2): 448-454
- [17] Jia T J, Wang L F, Li J J, Ma J, Cao Y Y, Lübberstedt T, Li H Y. Integrating a genome-wide association study with transcriptomic analysis to detect genes controlling grain drying rate in maize (*Zea mays* L.). Theoretical and Applied Genetics, 2020, 133: 623-634
- [18] Wang Y C, Xu J Y, Ge M, Ning L H, Hu M M, Zhao H. High-resolution profile of transcriptomes reveals a role of alternative splicing for modulating response to nitrogen in maize. BMC Genomics, 2020, 21(1): 353
- [19] Caicedo M, Munaiz E D, Malvar R A, Jiménez J C, Ordas B. Precision mapping of a maize MAGIC population identified a candidate gene for the senescence-associated physiological traits. Frontiers in Genetics, 2021, 12: 716821
- [20] Heindl K, Martinez J. Nol9 is a novel polynucleotide 5'-kinase involved in ribosomal RNA processing. The EMBO Journal, 2010, 29(24): 4161-4171
- [21] Hu S, Wang C, Sanchez D L, Lipka A E, Liu P, Yin Y, Blanco M, Lübberstedt T. Gibberellins promote brassinosteroids action and both increase heterosis for plant height in maize (*Zea mays* L.). Frontiers in Plant Science, 2017, 8: 1039
- [22] Nelissen H, Rymen B, Jikumaru Y, Demuyne K, Van Lijsebettens M, Kamiya Y, Inzé D, Beemster GT. A local maximum in gibberellin levels regulates maize leaf growth by spatial control of cell division. Current Biology, 2012, 22(13): 1183-1187
- [23] 崔荣秀, 张议文, 陈晓倩, 谷彩红, 张荃. 植物 bZIP 参与胁迫应答调控的最新研究进展. 生物技术通报, 2019, 35(2): 143-155
- Cui R X, Zhang Y W, Chen X Q, Gu C H, Zhang Q. The latest research progress on the stress responses of bZIP involved in plants. Biotechnology Bulletin, 2019, 35(2): 143-155
- [24] Wang J C, Xu H, Zhu Y, Liu Q Q, Cai X L. OsbZIP58, a basic leucine zipper transcription factor, regulates starch biosynthesis in rice endosperm. Journal of Experimental Botany, 2013, 64(11): 3453-3466
- [25] Basnet B, Khanal S. Quantitative trait loci and candidate genes for iron and zinc bio-fortification in genetically diverse germplasm of maize (*Zea mays* L.): A systematic review. Heliyon, 2022, 8(12): e12593
- [26] Wang Z Y, Gehring C, Zhu J H, Li F M, Zhu J K, Xiong L M. The Arabidopsis vacuolar sorting receptor1 is required for osmotic stress-induced abscisic acid biosynthesis. Plant Physiology, 2015, 167: 137-152
- [27] Lin J W, Li S K, Liang G Y, Liu M L, Jin T C, Qu Z W, Li H G, Chen S S, Li C, Zhang A, Ruan Y Y, Cui Z H. Genetic basis of maize ear angle revealed by high-density single nucleotide polymorphism markers in four recombinant inbred line populations. Euphytica, 2020, 216: 132

- [28] 黄幸, 丁峰, 彭宏祥, 潘介春, 何新华, 徐炯志, 李琳. 植物 WRKY 转录因子家族研究进展. 生物技术通报, 2019, 35(12):129-143
Huang X, Ding F, Peng H X, Pan J C, He X H, Xu J Z, Li L. Research progress on family of plant WRKY transcription factors. Biotechnology Bulletin 2019, 35(12):129-143
- [29] Xiong W D, Wang Y J, Guo Y Z, Tang W, Zhao Y R, Yang G F, Pei Y H, Chen J T, Song X Y, Sun J. Transcriptional and metabolic responses of maize shoots to long-term potassium deficiency. Frontiers in Plant Science, 2022, 13: 922581
- [30] Zeng R, Li Z Y, Shi Y T, Fu D Y, Yin P, Cheng J K, Jiang C F, Yang S H. Natural variation in a type-A response regulator confers maize chilling tolerance. Nature Communications, 2021, 12(1):4713
- [31] Jia Z T, Giehl R F H, Hartmann A, Estevez J M, Bennett M J, von Wirén N. A spatially concerted epidermal auxin signaling framework steers the root hair foraging response under low nitrogen. Current Biology, 2023, 33(18): 3926-3941
- [32] Wang S, Guo T, Wang Z, Kang J, Yang Q, Shen Y, Long R. Expression of three related to *ABI3/VP1* genes in *Medicago truncatula* caused increased stress resistance and branch increase in *Arabidopsis thaliana*. Frontiers in Plant Science, 2020, 11:611
- [33] Brühl J, Trautwein J, Schäfer A, Linne U, Bouazoune K. The DNA repair protein SHPRH is a nucleosome-stimulated ATPase and a nucleosome-E3 ubiquitin ligase. Epigenetics Chromatin, 2019, 12(1):52
- [34] Xu C, Luo F, Hochholdinger F. LOB domain proteins: Beyond lateral organ boundaries. Trends in Plant Science, 2016, 21(2):159-167
- [35] Du X M, Fang T, Liu Y, Wang M, Zang M S, Huang L Y, Zhen S H, Zhang J, Shi Z C, Wang G Y, Fu J J, Liu Y J. Global profiling of N⁶-methyladenosine methylation in maize callus induction. The Plant Genome, 2020, 13(2): e20018
- [36] Shuai B, Reynaga-Peña C G, Springer P S. The lateral organ boundaries gene defines a novel, plant-specific gene family. Plant Physiology, 2002, 129(2):747-761
- [37] Xu C Z, Tai H H, Saleem M, Ludwig Y, Majer C, Berendzen K W, Nagel K A, Wojciechowski T, Meeley R B, Taramino G, Hochholdinger F. Cooperative action of the paralogous maize lateral organ boundaries (LOB) domain proteins RTCS and RTCL in shoot-borne root formation. New Phytologist, 2015, 207(4):1123-1133
- [38] Taramino G, Sauer M, Stauffer J L, Multani D, Niu X, Sakai H, Hochholdinger F. The maize (*Zea mays* L.) *RTCS* gene encodes a LOB domain protein that is a key regulator of embryonic seminal and post-embryonic shoot-borne root initiation. The Plant Journal, 2007, 50(4): 649-659
- [39] Jiang X, Cui H T, Wang Z, Kang J M, Yang Q C, Guo C H. Genome-wide analysis of the LATERAL ORGAN BOUNDARIES Domain (LBD) members in alfalfa and the involvement of *MsLBD48* in nitrogen assimilation. International Journal of Molecular Science, 2023, 24(5):4644
- [40] Chen Q Y, Liu Z P, Wang B B, Wang X F, Lai J S, Tian F. Transcriptome sequencing reveals the roles of transcription factors in modulating genotype by nitrogen interaction in maize. Plant Cell Reports, 2015, 34(10):1761-1771
- [41] Yu C, Chen H M, Tian F, Bi Y M, Rothstein J S, Leach E J, He C Y. Identification of differentially-expressed genes of rice in overlapping responses to bacterial infection by *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* and nitrogen deficiency. Journal of Integrative Agriculture, 2015, 14(5): 888-899