

玉米籽粒相关性状遗传解析及主效位点 *qKW2.04* 精细定位

穆志生¹, 汤彬^{1,2}, 陈林¹, 张登峰¹, 李春辉¹, 王天宇¹, 黎裕¹, 石云素¹, 李永祥¹

(¹作物基因资源与育种全国重点实验室/中国农业科学院作物科学研究所, 北京 100081; ²湖南省作物研究所, 长沙 410125)

摘要: 籽粒相关性状包含粒长、粒宽和百粒重, 是决定玉米产量的重要因素。本研究以玉米自交系 B73 与 CML277 构建的重组自交系群体为试验材料, 应用基于测序的基因分型技术构建高精度遗传图谱, 利用完备区间作图法鉴定到 9 个 QTL (quantitative trait loci), 其中第 2 染色体上的 *qKW2.04* 位点分别解释粒宽和百粒重表型变异的 20.34% 和 15.84%。在此基础上, 利用轮回亲本 B73 及其近等基因导入系材料 NIL-1041A 构建 F₂ 分离群体, 将 *qKW2.04* 位点进一步分解为 2 个紧密连锁的粒宽 QTL: *qKW2.04-1* 和 *qKW2.04-2*, 分别位于标记区间 InDel23.32~umc1555 和 InDel47.09~InDel57.06, 表型贡献率分别为 22.45% 和 12.22%, 增效等位变异均来自 CML277; 其中, 通过筛选目标区段重组单株将 *qKW2.04-1* 精细定位在分子标记 InDel26.76 和 InDel27.86 间 1.1 Mb 区间之内。本研究为阐明玉米籽粒相关性状遗传基础提供了新的线索, 为玉米高产分子设计育种提供了基因资源。

关键词: 玉米; 粒宽; 百粒重; 遗传解析; 精细定位

The Genetic Analysis of Kernel-Related Traits and Fine Mapping of a Major QTL *qKW2.04* in Maize

MU Zhisheng¹, TANG Bin^{1,2}, CHEN Lin¹, ZHANG Dengfeng¹, LI Chunhui¹, WANG Tianyu¹, LI Yu¹,
SHI Yunsu¹, LI Yongxiang¹

(¹ State Key Lab of Crop Gene Resource and Breeding/Institute of Crop Sciences, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081; ²Hunan Crop Research Institute, Changsha 410125)

Abstract: Kernel-related traits, including kernel length, kernel width, and hundred kernel weight, are pivotal factors in determining maize yield. In this study, a recombinant inbred line (RIL) population derived from the maize inbred lines B73 and CML277 was utilized as the experimental material. Utilizing the high-precision genetic maps constructed through

收稿日期: 2024-02-23 网络出版日期:

URL:

第一作者研究方向为玉米种质资源, E-mail: 2402482400@qq.com; 汤彬为共同第一作者

通信作者: 石云素, 研究方向为玉米种质资源, E-mail: shiyunsu@caas.cn

李永祥, 研究方向为玉米种质资源, E-mail: liyongxiang@caas.cn

基金项目: 国家重点研发计划 (2021YFD1200705, 2020YFE0202300); 中国农业科学院作物科学研究所中央级公益性科研院所基本科研业务费专项 (Y2020YJ09, CAAS-ZDRW202109); 中国农业科学院科技创新工程

Foundation projects: National Key R&D Program of China (2021YFD1200705, 2020YFE0202300); Fundamental Research Funds for Central Non-Profit of Institute of Crop Sciences, Chinese Academy of Agricultural Sciences (Y2020YJ09, CAAS-ZDRW202109); Innovation Program of CAAS

genotyping-by-sequencing (GBS) technology, nine kernel-related quantitative trait loci (QTLs) were identified, and *qKW2.04* was precisely located on chromosome 2 using the inclusive composite interval mapping (ICIM) method, explaining 20.34% and 15.84% of the phenotypic variation, respectively. Building upon this, an F₂ segregating population was developed using the recurrent parent B73 and its introgression line (NIL-1041A). This facilitated the further decomposition of major locus *qKW2.04* into two tightly linked kernel width major QTL, designated as *qKW2.04-1* and *qKW2.04-2*, which were located in the marker intervals InDel23.32~umc1555 and InDel47.09~InDel57.06, explaining 22.45% and 12.22% of the phenotypic variation, respectively. The favorable allelic variations for both QTLs were contributed by CML277. Through the selection of recombinant individuals within the target region, *qKW2.04-1* was finely positioned between molecular markers InDel26.76~InDel27.86 within a 1.1 Mb interval. This study provides new clues for elucidating the genetic basis of kernel-related traits and gene resources for high-yield molecular breeding in maize.

Key words: maize; kernel width; hundred kernel weight; genetic dissection; fine mapping

玉米 (*Zea mays* L.) 是重要粮经饲兼用作物, 在保障粮食安全、改善人民生活水平等方面中起着至关重要的作用^[1-2]。已有研究表明, 现代栽培玉米起源于小颖大刍草亚种和墨西哥高原大刍草亚种^[3], 从大刍草到玉米的驯化过程中, 籽粒形态和大小变化明显^[4-5]。高产是玉米育种最重要的目标之一, 而产量是由多基因控制的复杂数量性状, 其遗传力较低、易受环境影响^[6]。粒长、粒宽和百粒重等籽粒相关性状也是决定玉米单产水平的关键因子和品种改良的重要目标性状, 遗传力较高^[7-8]。因此, 解析玉米籽粒相关性状遗传基础, 对高产种质资源创新和新品种培育具有理论指导意义。

随着玉米基因组测序的完成和高通量分子标记技术的应用^[9], 玉米籽粒性状遗传基础解析方面取得了显著进展, 定位了大量与籽粒大小相关的位点和候选基因^[10-11], 并在玉米全基因组范围内鉴定到多个控制籽粒大小的热点区域^[12-15], 为相关基因精细定位和图位克隆提供了重要的候选区域。同时, 一些玉米籽粒大小相关的主效 QTL 被精细定位和图位克隆, 如粒宽主效 QTL *qKW7* 被精细定位在第 7 染色体上的一个 647 kb 区间^[16], 粒宽主效 QTL *qKW9.2* 精细定位在第 9 染色体的一个 630 kb 区间^[14], 控制玉米粒型的主效 QTL *qKM4.08* 编码 retromer 蛋白, 通过增加早期发育籽粒中生长素生物合成和转运影响粒型^[17], 控制籽粒大小和粒重的主效 QTL *qHKW1* 编码 CLV1/BAM 相关的类受体激酶蛋白, 是影响热带玉米产量的关键基因^[18], 爆裂玉米中控制粒重和粒型的关键基因 *ZmKW1* 编码 1 个含有 seven in absentia 结构域的 E3 泛素连接酶可以负调控胚乳细胞数量和大小^[19]。

玉米自然群体中籽粒大小具有丰富的遗传变异, 其优良基因/等位基因有待深入挖掘和利用。本研究以玉米自交系 B73 和 CML277 为亲本构建的重组自交系 (RIL, recombinant inbred line) 群体为试验材料, 借助高密度遗传图谱开展籽粒大小相关性状 QTL 遗传定位, 并以定位到的粒宽和百粒重主效位点 *qKW2.04* 为目标, 利用 B73 及其近等基因导入系材料 NIL-1041A 为亲本构建 F₂ 分离群体, 用于验证 RIL 群体的定位结果, 最后通过目标 QTL 区间跨叠系, 明确主效位点的染色体物理位置和遗传效应, 为玉米籽粒性状主效 QTL

精细定位和候选基因的挖掘奠定基础，也为玉米产量相关性状的分子标记辅助选择提供参考和科学依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

以玉米自交系 B73（温带）和 CML277（热带）为亲本构建的 182 个 RIL 家系为籽粒相关性状初定位群体，该群体来源于美国康奈尔大学的巢式关联作图（NAM, nested association mapping）群体^[20]。

以轮回亲本 B73 及其近等基因导入系 NIL-1041A 杂交构建的 564 个 F₂ 次级分离群体及其衍生家系为材料，用于籽粒相关性状主效 QTL 验证和精细定位。其中，导入系 NIL-1041A 选自于国际玉米小麦改良中心（CIMMYT, centro internacional de mejoramiento de maizy trigo）的以 CML277 为供体亲本、B73 为受体亲本构建的导入系（ILs, introgression lines）群体。经多环境下的表型精准鉴定，导入系 NIL-1041A 的粒宽、百粒重等籽粒相关性状与受体亲本 B73 存在极显著差异（ $P<0.01$ ）。

1.2 田间试验与表型鉴定

B73×CML277 组合 RIL 群体分别于 2010 年海南三亚南滨农场（18.39°N, 109.19°E）、2011 年重庆潼南（30.03°N, 106.22°E）、2011 年河南新乡（35.19°N, 113.53°E）、2011 年天津（39.40°N, 117.05°E）、2011 年北京顺义（39.48°N, 116.28°E）共 5 个环境进行种植。各环境下的 RIL 群体均采用随机区组设计，单行区，2 次重复，行长 3 m，行距 0.6 m，株距 0.25 m，每行定苗 12 株。

为了验证 RIL 群体的定位结果，2015 年春在北京昌平试验基地（40.17°N, 116.23°E），种植 B73 和 NIL-1041A 杂交组合的 F₂ 分离群体（包含 564 个单株），分离群体全部单株自交后进行基因型和表型鉴定。根据 F₂ 群体的定位结果，2015 年冬在海南三亚南滨农场利用籽粒大小目标主效 QTL 两侧的分子标记和 MaizeSNP50 芯片覆盖玉米全基因组的 SNP 标记挑选出目标区段为杂合基因型，而其余区段为纯合 B73 基因型的单株并自交用于后续精细定位。2016 年在北京昌平和海南三亚南滨农场种植目标 QTL 的分离群体，利用 QTL 两侧的分子标记筛选重组单株并自交，2017 年在北京昌平扩繁重组单株衍生的纯合重组家系（HR, homozygous recombinant）及其纯合非重组家系（HNR, homozygous non-recombinant）。为了进一步缩小目标主效 QTL 的定位区间，2017 年在海南三亚南滨农场和梅山（18.37°N, 109.06°E）种植所有重组单株衍生的纯合重组家系和对应的纯合非重组家系。田间试验采用随机区组设计，单行区，3 次重复，每个家系种 1 行，行长 3 m，行距 0.6 m，株距 0.25 m，每行定苗 12 株。

试验材料生长期内的施肥、灌溉和病虫害防治等所有田间管理措施均遵循当地大田生产管理。待完全成熟后，每行收获中间 5 株的果穗用于考察粒长、粒宽和百粒重。粒长和粒宽为每个果穗中部随机挑选 10 个籽粒测量 10 粒长和 10 粒宽，每个果穗重复测量 3 次取平均值，单位为 cm。百粒重为每个果穗随机选取 100 个籽粒的重量，每个果穗重复测量 3 次取平均值，单位为 g。

1.3 DNA 提取与基因型鉴定

当玉米植株长至 6 叶时，按单株取幼嫩叶片（纯合家系为所有单株叶片的混合），采用 CTAB 法^[21]提取叶片的基因组 DNA。利用基于测序的基因分型技术（GBS, genotyping-by-sequencing）^[22]鉴定 RIL 群体家系的基因型。

用于 QTL 验证和精细定位的分子标记，主要参考 MaizeGDB 网站（<http://www.maizegdb.org/>）公布的简单重复序列（SSR, simple sequence repeats）标记，其他来源于 B73 和 CML277 参考基因组序列信息比对分析获得的插入缺失（InDel, insertion deletion）标记，使用 Primer5.0 软件设计亲本间多态性分子标记^[23]。反应体系 10 μ l（模板 DNA 2 μ l，引物 1.5 μ l，Supermix 5 μ l，ddH₂O 1.5 μ l）。反应程序：预变性 95℃ 300 s；变性 95℃ 30 s；退火 55~58℃ 30 s；延伸 72℃ 25 s；循环 34 次；最后延伸 72℃ 300s；4℃ 保存 120 s。PCR 扩增产物通过 8.0% 非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳和银染法显色，鉴定定位群体的基因型。

1.4 遗传连锁图谱的构建

对于 RIL 群体，选择测序质量好、最小等位基因频率高于 0.05 的多态性 SNP 标记，利用重组最大简约法（MPR, maximum parsimony of recombination）推测 RIL 群体的双亲基因型，根据双亲 SNP 基因型对 RIL 群体的基因型进行赋值，将具有相同基因型的 SNP 区域集约化为一个区块（bin），利用全基因组的所有区块构建 RIL 群体的重组区块图谱（Recombination bin map）^[24]。最后，将每个重组区块当成基因组的一个标记，利用 Mapchart V2.2 软件构建 RIL 群体的高密度遗传连锁图谱^[25]。

对于 B73 和 NIL-1041A 组配的 F₂ 分离群体，选择符合正常分离的 InDel 和 SSR 标记，利用 QTL IciMapping V4.1 软件中的 MAP 模块构建导入片段的局部遗传连锁图^[26]。

1.5 表型数据分析及 QTL 作图

使用 Microsoft Excel 2010 与 SAS V9.2 软件对表型数据进行统计分析。利用 QTL IciMapping V4.1 软件中的完备区间作图法（ICIM, inclusive composite interval mapping）对籽粒相关性状进行 QTL 定位，其中缺失表型数据用“-100”表示，LOD 阈值设置为 2.50^[27-28]。利用 Mapchart V2.2 软件对 RIL 群体籽粒相关 QTL 在遗传连锁图谱上的分布进行绘制。使用 SAS V9.2 软件中基于单因子的成组法 t 检验判断纯合重组型及其纯合非重组型家系之间的表型差异是否显著^[29]，验证精细定位区间交换片段的遗传效应。

2 结果与分析

2.1 高密度遗传图谱的构建

利用 GBS 技术，对以 B73 和 CML277 为亲本构建的 RIL 群体进行基因型检测，过滤掉等位基因频率小于 0.05 的 SNP 后获得 372,534 个高质量 SNP 位点。利用高质量 SNP 位点构建 RIL 群体的重组区块图谱，

共包含 2141 个 bin 标记。再利用 2141 个 bin 标记构建遗传连锁图谱,结果表明,遗传连锁图谱总长度为 1264.26 cM, 标记间最大距离为 15.02 cM, 最小距离为 0.29 cM, 标记间平均遗传距离为 0.59 cM (图 1)。

白色矩形代表粒长 QTL, 交叉线矩形代表粒宽 QTL, 黑色矩形代表百粒重 QTL

图 1 籽粒相关性状 QTL 在遗传图谱上的分布

2.2 基于 RIL 群体的玉米籽粒相关性状 QTL 定位

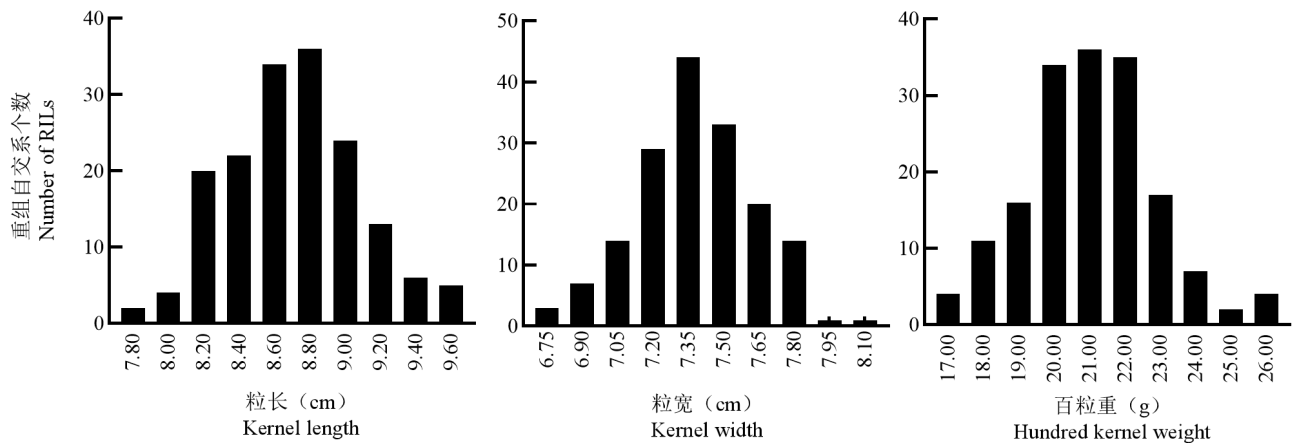


图 2 粒长、粒宽和百粒重在 RILs 群体中的分布

Fig.2 The distribution of kernel length, kernel width and hundred kernel weight in RILs

利用 RIL 群体 5 个环境下籽粒性状的表型均值进行 QTL 定位,共检测到 9 个 QTL,分别在第 1、2、3、5、9、10 染色体上,单个 QTL 可以解释的表型变异在 5.12%~20.34%之间(表 1)。其中,在第 10 染色体上共检测到 2 个粒长 QTL,命名为 *qKL10-1* 和 *qKL10-2*,表型贡献率分别为 7.98%和 7.54%,增效等位基因分别来源于 CML277 和 B73;在第 2、3 和 9 染色体检测到 3 个粒宽 QTL,表型贡献率分别为 20.34%、8.42%和 5.12%,增效等位基因都来源于 CML277;在第 1、2、5、9 染色体检测到 4 个百粒重 QTL,单个 QTL 可以解释的表型变异在 5.51%~15.84%之间,除 *qHKW5* 增效等位基因来源于 B73 外,其余 QTL 增效等位基因都来源于 CML277,表明热带亲本 CML277 在更多基因位点上拥有大籽粒等位变异。

其中,*qKW2* 和 *qHKW2* 是控制粒宽和百粒重的主效 QTL,可解释的表型贡献率分别为 20.34%和 15.84%,增效等位基因都来源于 CML277; *qKW2* 和 *qHKW2* 共定位于第 2 染色体 bin2.04 同一区间内(标记 m1403-m1420),且粒宽的 LOD 值和贡献率都大于百粒重。因此, m1403~m1420 位点可能存在同时控制粒宽和百粒重的主效 QTL(一因多效),或者是 2 个紧密连锁的主效 QTL,将其命名为 *qKW2.04* 用于后续进一步研究。

表 1 多环境下基于 RIL 群体的籽粒相关性状 QTL 定位结果

Table 1 QTL analysis of kernel related traits under multi-environments in RILs

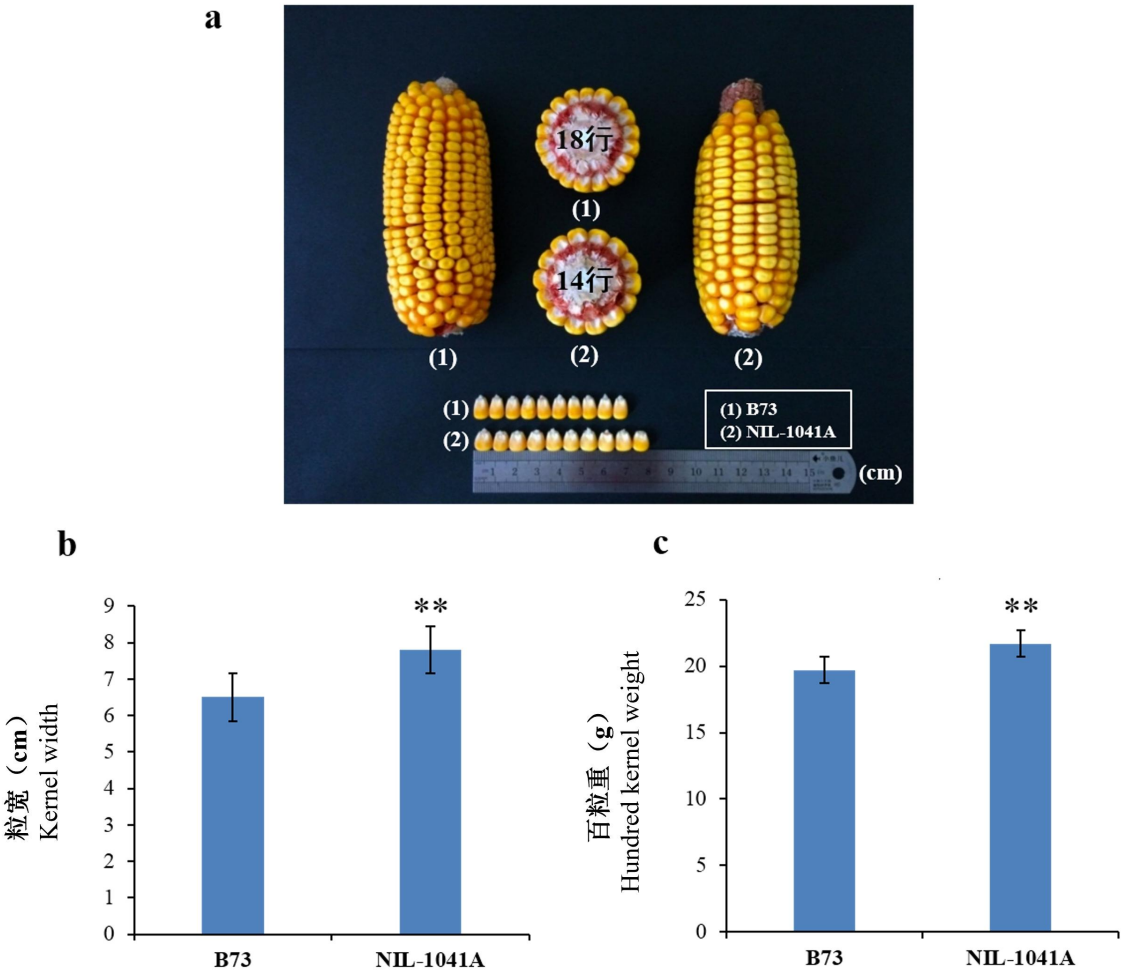
籽粒性状	染色体	QTL 名称	标记区间	LOD 值	贡献率 (%)	加性效应
Kernel trait	Chr.	QTL name	Marker interval	LOD score	PVE	Additive effect
粒长 Kernel length	10	<i>qKL10-1</i>	m6839~m6859	3.01	7.98	0.111
	10	<i>qKL10-2</i>	m7117~m7130	3.10	7.54	-0.107
粒宽 Kernel width	2	<i>qKW2</i>	m1403~m1420	9.65	20.34	0.122
	3	<i>qKW3</i>	m1869~m1896	3.94	8.42	0.079
	9	<i>qKW9</i>	m6598~m6608	2.63	5.12	0.061
百粒重 Hundred kernel weight	1	<i>qHKW1</i>	m855~m857	3.24	6.36	0.497

2	<i>qHKW2</i>	m1403~m1420	7.59	15.84	0.781
5	<i>qHKW5</i>	m3463~m3503	3.65	7.44	-0.535
9	<i>qHKW9</i>	m6641~m6650	2.79	5.51	0.460

PVE: Phenotypic variations explained; The same as below

2.3 近等基因导入系 NIL-1041A 表型和导入片段分析

对 B73 和导入系 NIL-1041A 的籽粒相关性状进行了精准评价（图 3），发现两者在籽粒形态表型方面存在明显差异：B73 籽粒属于马齿形籽粒，籽粒扁长；NIL-1041A 籽粒也属于马齿形籽粒，但籽粒扁宽；在粒宽方面，NIL-1041A 表型值（7.80 cm）极显著高于 B73（6.50 cm），但籽粒长度无显著变化；在百粒重方面，NIL-1041A（21.70 g）也极显著高于 B73（19.70 g）。



a: 亲本间粒宽的表型差异; **: 在 $P < 0.01$ 水平达到显著差异

a: Phenotypic difference in kernels between parents; **:Significantly different at $P < 0.01$

图 3 B73 及其导入系 NIL-1041A 的粒宽、百粒重表型差异分析

Fig.3 Phenotypic difference between B73 and its introgression line NIL-1041A in kernel width and hundred kernel weight

利用 MaizeSNP50 高密度基因芯片对 NIL-1041A 的导入片段进行分析，结果表明 NIL-1041A 及其轮回亲本 B73 之间的全基因组相似性为 86.2%。进一步分析发现，在 B73 遗传背景下，NIL-1041A 中主要导入 2 个来源于 CML277 的染色体片段，分别位于第 2 和第 3 染色体，导入片段大小分别为 182.63 Mb、133.97 Mb（表 2）。根据 RIL 群体籽粒相关性状 QTL 定位结果，NIL-1041A 的导入片段包含 2 个粒宽 QTL（*qKW2*、*qKW3*）和 1 个百粒重 QTL（*qHKW2*），其中包含粒宽和百粒重主效 QTL *qKW2.04* 所在的染色体区段，因此 NIL-1041A 可作为 *qKW2.04* 深入遗传解析的遗传材料。

表 2 导入系 NIL-1041A 染色片导入片段分析
Table 2 Analysis of chromosome introgression segments in NIL-1041A

染色体	标记区间	物理位置 (Mb)	片段大小 (Mb)
Chr.	Marker interval	Physical position	Size
2	PZE-102045397~PZE-102159564	23.32-205.95	182.63
3	SYN682~SYN15478	28.33-162.30	133.97

物理位置参考 B73_RefGen_v2
Physical location reference B73_RefGen_v2

2.4 基于 B73 及其导入系组合 F₂ 分离群体的籽粒相关性状 QTL 定位

根据 MaizeSNP50 基因芯片对 NIL-1041A 的染色体导入片段的分析结果，针对第 2、3 染色体上的导入片段，一方面在 MazieGDB 公共数据库中筛选亲本间具有多态性的 SSR 标记，另一方面参考亲本 CML277 和 B73 的参考基因组序列设计 InDel 标记，筛选亲本间具有差异的多态性 InDel 标记（表 3）。利用这些多态性标记鉴定 B73 和 NIL-1041A 组合 F₂ 群体（包含 564 个单株）的 F₂ 群体基因型，并构建导入片段的局部遗传连锁图。

表 3 多态性标记的引物序列
Table 3 The primer sequences of polymorphic markers

标记名	上游引物	下游引物
Marker name	Forward primer (5'→3')	Reverse primer (5'→3')
phi053	CTGCCTCTCAGATTCAGAGATTGAC	AACCCAACGTACTCCGGCAG
phi083	CAAACATCAGCCAGAGACAAGGAC	ATTCATCGACGCGTCACAGTCTACT
umc1223	TTCAACAGATTCAGAGAAAGCACA	TTGATAATTAATCCGCAGCTCTCTC
umc1448	ATCCTCTCATCTTTAGGTCCACCG	CATATACAGTCTCTTCTGGCTGCTCA
umc1501	CCACATTGGCTGAATTTGTTGTA	CTTGTTGGCTAGAAATTTGCCTTG
umc1535	GGCAGAGAGATGAAAAAGAATGGA	CAAGGCACCCACACACATACATA
umc1555	ATAAAACGAACGACTCTCTCACCG	ATATGTCTGACGAGCTTCGACACC
umc1908	CGTACACTCAATCACGATCCAAAC	AACTTTGGGTACAAGTCAAGAGGC
umc2002	TGACCTCAACTCAGAATGCTGTTG	CACAAAATCCTCGAGTTCTTGATTG
umc2254	GCACAAAGCATCGTACTTGGATAG	CCTTTGTCCTCGATCTCTCAGTTC
umc2625	GTGTGGTTGGATCTCTATGAGCCT	CGCTGACCATGTAGCGTCATTAT
bnlg108	GCACTCACGCGCACAGGTCA	CGCCTGCCAAGGTACATCAC

bnlg2077	GACCAGAGGATGGGGAAATT	GTAGGCACATGCACATGAGG
InDel23.11	GAAACCGAGATGAGGGAATA	GATGTGATGACGACCAGTAAG
InDel23.32	ACAGGGGCAGACCCAAAAGG	TTTCGGGGACGAGGATGGAG
InDel23.73	GCCAGTTTGGACCAGGGACG	CTACGAGCAACACCTTTATCTTTA
InDel26.76	GGAGCAGGCAGAAAAGAAAC	AGGGAGGGAAACGCTATACTA
InDel27.86	CTAATGGGCTCTAAGATGGT	CAATAGCTTTGGTTGGACGT
InDel28.31	GAGTTCACGCTCAAGTCGG	CAAACAGTGGCGGCAGATA
InDel28.64	GTTGGTCGGTCAGTTTGCT	CTCGTCCTCTGGTTCGTTTC
InDel29.12	TTTCTGTTCAGGCACAAAGTA	TCGTGACAGGATGTGGCTAT
InDel31.06	TCCGACAAGTACAACGAGAT	ACACGAGCGTCACTCCCTAT
InDel32.58	AGGAGGATGAAGATACGAGTG	CAAGAAGCAACCAGGACAGC
InDel47.09	GGGCTGGACCAGGCACTAT	CGGAAGCAGAGGCATGAGA
InDel57.06	CTGGGCTGCTCACGAAGTCA	ACTCAACCACCTCGCCATT

应用 QTL IciMapping V4.1 的 ICIM-ADD 模型分析法，对 B73 和 NIL-1041A 组合 F₂ 群体的粒宽和百粒重进行 QTL 分析，检测到 3 个粒宽 QTL，其中在第 2 染色体导入片段内检测到 2 个紧密连锁的粒宽 QTL，分别位于标记区间 InDel23.32~umc1555 和 InDel47.09~InDel57.06，表型贡献率分别为 22.45%和 12.22%，增效等位变异均来自 CML277。与 RIL 群体定位结果类似，在第 3 染色体上同样检测到 1 个粒宽 QTL，标记区间为 umc1908~umc1223，遗传效应较小，表型贡献率为 6.90%。同时，还检测到 2 个百粒重 QTL，分别 在第 2 染色体标记区间 umc1555~umc1448 和第 3 染色体标记区间 phi053~umc1501，表型贡献率分别为 13.97%和 8.21%，增效等位变异均来自 CML277（表 4）。

结合 RIL 群体和导入系衍生 F₂ 群体的定位结果可知，RIL 群体定位的粒宽和百粒重主效 QTL *qKW2.04* 可进一步分解为 2 个紧密连锁的相引相 QTL，第 1 个位点记作 *qKW2.04-1*，第 2 个位点记作 *qKW2.04-2*（表 4）。由于 *qKW2.04-1* 的 LOD 值和贡献率均高于 *qKW2.04-2*，因此选择 *qKW2.04-1* 作为精细定位的目标位点。

表 4 轮回亲本 B73 与 NIL-1041A 组合的 F₂ 群体的籽粒性状 QTL 定位

Table 4 The identification of QTL for kernel traits in a F₂ population derived from B73 and NIL-1041A

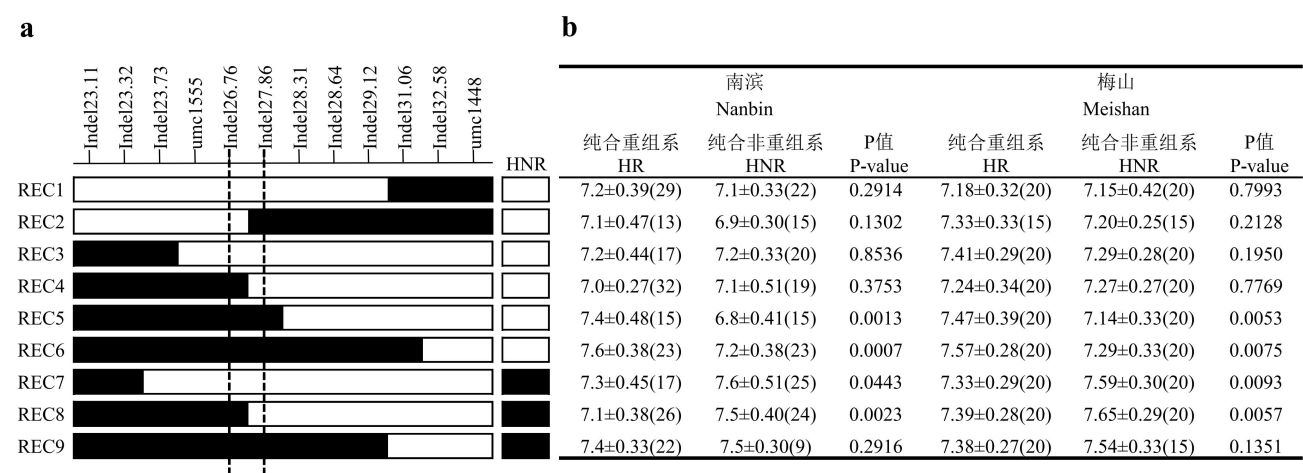
籽粒性状	染色体	QTL 名称	标记区间	LOD 值	贡献率 (%)	加性效应	显性效应
Kernel trait	Chr.	QTL name	Marker interval	LOD score	PVE	Additive effect	Dominance effect
粒宽 Kernel width	2	<i>qKW2.04-1</i>	InDel23.32-umc1555	16.18	22.45	0.266	0.101
	2	<i>qKW2.04-2</i>	InDel47.09-InDel57.06	9.41	12.22	0.195	0.069
	3	<i>qKW3</i>	umc1908-umc1223	3.51	6.90	0.139	0.087
百粒重 Hundred kernel weight	2	<i>qHKW2</i>	umc1555-umc1448	12.04	13.97	1.588	0.706
	3	<i>qHKW3</i>	phi053-umc1501	7.22	8.21	1.254	0.706

2.5 粒宽主效 QTL *qKW2.04-1* 的精细定位

选择 *qKW2.04-1* 区段（InDel23.32 和 umc1448）为杂合基因型，而其余区段为 B73 纯合基因型的单株自交，用于筛选目标 QTL 区间内的重组单株，为避免非目标 QTL 导入片段对精细定位结果的影响，将所有重组单株都自交 2 代，利用交换断点的分子标记筛选出纯合重组家系和纯合非重组家系，经多代背景选择

后筛选出 *qKW2.04-1* 区段发生交换的 101 个纯合家系，2017 年在海南三亚南滨和梅山试验基地进行后代测验和粒宽表型比较。由图 4 可知，12 个分子标记可以将 *qKW2.04-1* 鉴定的重组单株分为 9 种重组类型，编号为 REC1~REC9。

重组单株后代测验结果表明，在南滨和梅山 2 个试验点，REC5、REC6、REC7、REC8 的纯合重组家系和纯合非重组家系间均存在显著的粒宽差异，可以将 *qKW2.04-1* 定位在标记 InDel26.76 和 InDel28.31 间约 1.55 Mb 的范围内。而在南滨和梅山 2 个试验点，REC1、REC2、REC3、REC4、REC9 的纯合重组家系和纯合非重组家系间粒宽差异均不显著，可以将 *qKW2.04-1* 定位在标记 InDel26.76 和 InDel27.86 间约 1.1 Mb 的范围内。因此，利用目标 QTL 区间内的跨叠系群体，将 *qKW2.04-1* 定位在标记 InDel26.76 的下游和 InDel27.86 的上游，在 B73 RefGenV2 参考基因组第 2 染色体的 26.76~27.86 Mb 区间之内，区间大小约 1.1 Mb。



a. 纯合重组家系及其对应的纯合非重组家系的基因型；白色为 B73 基因型，黑色为 CML277 基因型，REC1~REC9 为重组单株的 9 种重组类型；b. 不同环境下纯合重组家系和对应的纯合非重组家系间的表型差异，括号内数值为样本量大小

a. The genotype of the homozygous recombinant (HR) families and homozygous non-recombinant (HNR) families; White and black indicated introgressed segments from B73 and CML277, respectively; REC1-REC9 represent nine recombinant types of recombinant individual; b. Phenotypic difference between HR and homologous HNR families. Numbers in brackets is the sample size

图 4 粒宽主效位点 *qKW2.04-1* 的精细定位
Fig.4 Fine mapping of kernel width related QTL *qKW2.04-1*

3 讨论

玉米是全球种植范围最广、产量最高的粮食作物，其显著的高产潜能对于保障国家粮食安全意义重大^[30]。玉米产量与籽粒大小相关性状显著相关，因此籽粒相关性状的遗传基础解析对于提高玉米产量具有重要意义^[7]。热带玉米自交系具有许多温带自交系所缺失的优良等位基因，如热带/亚热带玉米种质 CIMBL55，在干旱胁迫条件下，与 B73 和 Mo17 相比，CIMBL55 的苗期存活率高，而基因组分析表明，在 108 个前期鉴定的抗旱基因中，CIMBL55 中至少携带了 65 个优异等位变异，推测其是构成 CIMBL55 优良抗旱性的遗传基础^[31]。本研究以温带自交系 B73 和热带自交系 CML277 为亲本构建的 RIL 群体在玉米第 2 染色体上定

位到控制粒宽和百粒重的主效 QTL *qKW2.04*，且增效等位基因都来源于 CML277，为挖掘热带玉米种质中籽粒大小相关的优异等位基因，阐明玉米籽粒大小形成的遗传基础积累了有益资料。

本研究所鉴定到的 *qKW2.04* 可以分别解释 20.34% 的粒宽和 15.84% 的百粒重表型变异，为主效位点。另外，*qKW2.04* 定位区域与之前很多籽粒产量相关性状 QTL 定位的区段重叠，例如，以 B73 和 A7 为亲本构建的 F₃ 群体将 1 个粒重主效 QTL 定位至第 2 染色体 bin2.04，可解释表型变异的 26.5%^[32]；以普通玉米自交系丹 232 和爆裂玉米自交系 N04 为亲本构建的 RIL 群体同样将 1 个粒重主效 QTL 定位至第 2 染色体 umc1776~umc1448 之间^[33]；以黄 C 与许 178 构建的 RIL 群体和永久 F₂ 群体在第 2 染色体标记区间 umc1185~umc1579 定位到 1 个控制粒宽的主效 QTL^[34]。Wang 等^[35]根据文献利用 QTL 元分析将产量相关的 2 个 meta-QTLs 区段，即 *MQTL22* 与 *MQTL23* 定位至第 2 染色体 bin2.04 的区域。Chen 等^[36]根据文献利用 QTL 元分析将粒宽、粒重相关的 3 个 meta-QTLs 区段，即 *MQTL-8*、*MQTL-9* 与 *MQTL-10* 定位至第 2 染色体 bin2.04 的区域。由此可见，玉米第 2 染色体 bin2.04 区域是籽粒大小等产量相关性状 QTL 定位的重要热点区域，在不同的遗传群体和不同的环境中均可检测到粒宽和粒重相关的主效 QTL，值得进一步开展主效 QTL 的精细定位和图位克隆。

同一个 QTL 内可能存在多个影响表型的基因，由于群体大小、标记数目和表型鉴定准确性等原因，在初级 QTL 群体中定位的数量性状主效位点可能包含多个紧密连锁的基因位点，需要构建遗传背景较为简单的高代回交群体、鉴定更多的重组交换单株，才能更好地估计单个 QTL 的遗传效应。水稻中 2 个粒宽基因 *GS5* 和 *GW5* 在第 5 染色体上的物理距离不到 2 Mb，在 *GS5* 的图位克隆过程中由于 *GW5* 的影响使得 *GS5* 的部分交换单株基因型和表型发生矛盾，最后通过构建固定 *GW5* 基因而 *GS5* 基因分离的定位群体才最终完成 *GS5* 的图位克隆^[37]。控制玉米粒宽的主效 QTL *qKW7* 在高代回交群体中被分解为 2 个加性效应相反的 QTL，分别命名为 *qKW7a* 和 *qKW7b*，增效等位基因分别来源于黄早四和掖 478，通过构建 *qKW7a* 为黄早四纯合基因型，而 *qKW7b* 分离的粒宽近等基因系 *qKW7b^{YE478}*，采用重组单株后代测验的方法最终将 *qKW7b* 精细定位在 59 kb 的物理区间^[38]。本研究以 RIL 群体定位的粒宽和百粒重主效 QTL *qKW2.04* 为靶标，进一步将 *qKW2.04* 分解为紧密连锁、加性效应方向相同的 2 个主效位点：*qKW2.04-1* 与 *qKW2.04-2*，并将 *qKW2.04-1* 精细定位在 1.1 Mb 的物理区间，为玉米籽粒大小基因的精细定位和图位克隆提供了很好的示例。

4 结论

利用玉米自交系 B73 与 CML277 构建的 RIL 群体，在第 2 染色体 bin2.04 区间内鉴定到可分别解释 20.34% 的粒宽和 15.84% 的百粒重表型变异的主效 QTL，增效等位基因源于 CML277，将其命名为 *qKW2.04*。以 B73 及其近等导入系材料 NIL-1041A 为亲本构建 F₂ 分离群体，以 *qKW2.04* 为靶标，构建目标 QTL 区间的跨叠系，将 *qKW2.04* 分解为 2 个紧密连锁的相引相粒宽 QTL *qKW2.04-1* 与 *qKW2.04-2*，并将 *qKW2.04-1* 精细定

位到第 2 染色体的 26.76~27.86 Mb 区间之内, 为进一步开展 *qKW2.04* 位点的功能基因克隆和遗传资源的创制提供了重要的研究基础。

参考文献

- [1] Hubert B, Rosengrant M, Boekel M, Ortiz R. The future of food: Scenarios for 2050. *Crop Science*, 2010, 50 (S1): 33-50
- [2] Ray D K, Mueller N D, West P C, Foley J A. Yield trends are insufficient to double global crop production by 2050. *PLoS ONE*, 2013, 8 (6): e66428
- [3] Yang N, Wang Y B, Liu X G, Jin M L, Vallebuena-Estrada M, Calfee E, Chen L, Dilkes B P, Gui S T, Fan X M, Harper T K, Kennett D J, Li W Q, Lu Y L, Ding J Q, Chen Z Q, Luo J Y, Mambakkam S, Menon M, Snodgrass S, Veller C, Wu S S, Wu S Y, Zhuo L, Xiao Y J, Yang X H, Stitzer M C, Runcie D, Yan J B, Ross-Ibarra J. Two teosintes made modern maize. *Science*, 2023, 382 (6674): eadg8940
- [4] Doebley J. The genetics of maize evolution. *Annual Review of Genetics*, 2004, 38: 37-59
- [5] Sosso D, Luo D P, Li Q B, Sasse J, Yang J L, Gendrot G, Suzuki M, Koch K E, Mccarty D R, Chourey P S, Rogowsky P M, Ross-Ibarra J, Yang B, Frommer W B. Seed filling in domesticated maize and rice depends on SWEET-mediated hexose transport. *Nature Genetics*, 2015, 47 (12):1489-1493
- [6] Doebley J F, Gaut B S, Smith B D. The molecular genetics of crop domestication. *Cell*, 2006, 127 (7): 1309-1321
- [7] Li C H, Li Y X, Sun B C, Peng B, Liu C, Liu Z Z, Yang Z Z, Li Q C, Tan W W, Zhang Y, Wang D, Shi Y S, Song Y C, Wang T Y, Li Y. Quantitative trait loci mapping for yield components and kernel-related traits in multiple connected RIL populations in maize. *Euphytica*, 2013, 193 (3): 303-316
- [8] Li Y, Ma X L, Wang T Y, Li Y X, Liu C, Liu Z Z, Sun B C, Shi Y S, Song Y C, Carlone M, Bubeck D, Bhardwaj H, Whitaker D, Wilson W, Jones E, Wright K, Sun S K, Niebur W, Smith S. Increasing maize productivity in China by planting hybrids with germplasm that responds favorably to higher planting densities. *Crop Science*, 2011, 51 (6): 2391-2400
- [9] Schnable P S, Ware D, Fulton R S, Stein J C, Wei F S, Pasternak S, Liang C Z, Zhang J W, Fulton L, Graves T A, Minx P, Reily A D, Courtney L, Kruchowski S S, Tomlinson C, Strong C, Delehaunty K, Fronick C, Courtney B, Rock S M, Belter E, Du F Y, Kim K, Abbott R M, Cotton M, Levy A, Marchetto P, Ochoa K, Jackson S M, Gillam B, Chen W Z, Yan L, Higginbotham J, Cardenas M, Waligorski J, Applebaum E, Phelps L, Falcone J, Kanchi K, Thane T, Scimone A, Thane N, Henke J, Wang T, Ruppert J, Shah N, Rotter K, Hodges J, Ingenthron E, Cordes M, Kohlberg S, Sgro J, Delgado B, Mead K, Chinwalla A, Leonard S, Crouse K, Collura K, Kudrna D, Currie J, He R F, Angelova A, Rajasekar S, Mueller T, Lomeli R, Scara G, Ko A, Delaney K, Wissotski M, Lopez G, Campos D, Braidotti M, Ashley E, Golser W, Kim H, Lee S, Lin J K, Dujmic Z, Kim W, Talag J, Zuccolo A, Fan C Z, Sebastian A, Kramer M, Spiegel L, Nascimento L, Zutavern T, Miller B, Ambrose C, Muller S, Spooner W, Narechania A, Ren L, Wei S, Kumari S, Faga B, Levy M J, McMahan L, Van Buren P, Vaughn M W, Ying K, Yeh C T, Emrich S J, Jia Y, Kalyanaraman A, Hsia A P, Barbazuk W B, Baucom R S, Brutnell T P, Carpita N C, Chaparro C, Chia J M, Deragon J M, Estill J C, Fu Y, Jeddeloh J A, Han Y J, Lee H, Li P H, Lisch D R, Liu S S, Liu Z J, Nagel D H, McCann M C, SanMiguel P, Myers A M, Nettleton D, Nguyen J, Penning B W, Ponnala L, Schneider K L, Schwartz D C, Sharma A, Soderlund C, Springer N M, Sun Q, Wang H, Waterman M, Westerman R, Wolfgruber T K, Yang L X, Yu Y, Zhang L F, Zhou S G, Zhu Q H, Bennetzen J L, Dawe R K, Jiang J M, Jiang N, Presting G G, Wessler S R, Aluru S, Martienssen R A, Clifton S W, McCombie W R, Wing R A, Wilson R K. The B73 maize genome: Complexity, diversity, and dynamics. *Science*, 2009, 326 (5956): 1112-1115
- [10] Liu J, Huang J, Guo H, Lan L, Wang H Z, Xu Y C, Yang X H, Li W Q, Tong H, Xiao Y J, Pan Q C, Qiao F, Raihan M S, Liu H J, Zhang X H, Yang N, Wang X Q, Deng M, Jin M L, Zhao L J, Luo X, Zhou Y, Li X, Zhan W, Liu N N, Wang H, Chen G S, Li Q, Yan J B. The conserved and unique genetic architecture of kernel size and weight in maize and rice. *Plant Physiology*, 2017, 175 (2): 774-785
- [11] Li X W, Wang M, Zhang R Y, Fang H, Fu X Y, Yang X H, Li J S. Genetic architecture of embryo size and related traits in maize. *The Crop Journal*, 2022, 10 (1): 204-215
- [12] Chen L, An Y X, Li Y X, Li C H, Shi Y S, Song Y C, Zhang D F, Wang T Y, Li Y. Candidate loci for yield-related traits in maize revealed by a combination of metaQTL analysis and regional association mapping. *Frontiers in Plant Science*, 2017, 8: 2190
- [13] Chen L, Li C H, Li Y X, Song Y C, Zhang D F, Wang T Y, Li Y, Shi Y S. Quantitative trait loci mapping of yield and related traits using a high-density genetic map of maize. *Molecular Breeding*, 2016, 36 (9):134
- [14] Raihan M S, Liu J, Huang J, Guo H, Pan Q C, Yan J B. Multi-environment QTL analysis of grain morphology traits and fine mapping of a kernel-width

QTL in Zheng58 × SK maize population. *Theoretical and Applied Genetics*, 2016, 129 (8): 1465-1477

- [15] Li L, Li X H, Li L L, Schnable J, Gu R L, Wang J H. QTL identification and epistatic effect analysis of seed size- and weight-related traits in *Zea mays* L. *Molecular Breeding*, 2019, 39 (5): 67
- [16] Li X, Li Y X, Chen L, Wu X, Qin W W, Song Y C, Zhang D F, Wang T Y, Li Y, Shi Y S. Fine mapping of *qKW7*, a major QTL for kernel weight and kernel width in maize, confirmed by the combined analytic approaches of linkage and association analysis. *Euphytica*, 2016, 210 (2): 221-232
- [17] Chen L, Li Y X, Li C H, Shi Y S, Song Y C, Zhang D F, Wang H Y, Li Y, Wang T Y. The retromer protein *ZmVPS29* regulates maize kernel morphology likely through an auxin-dependent process(es). *Plant Biotechnology Journal*, 2020, 18 (4): 1004-1014
- [18] Yang N, Liu J, Gao Q, Gui S T, Chen L, Yang L F, Huang J, Deng T Q, Luo J Y, He L J, Wang Y B, Xu P W, Peng Y, Shi Z X, Lan L, Ma Z Y, Yang X, Zhang Q Q, Bai M Z, Li S, Li W Q, Liu L, Jackson D, Yan J B. Genome assembly of a tropical maize inbred line provides insights into structural variation and crop improvement. *Nature Genetics*, 2019, 51 (6): 1052-1059
- [19] Zhang L, Fu M M, Li W Y, Dong Y B, Zhou Q, Wang Q L, Li X Y, Gao J, Wang Y, Wang H, Li Y Y, Wang J C, Wu Y R, Li Y L. Genetic variation in *ZmKW1* contributes to kernel weight and size in dent corn and popcorn. *Plant Biotechnology Journal*, 2024, DOI: 10.1111/pbi.14279
- [20] Buckler E S, Holland J B, Bradbury P J, Acharya C B, Brown P J, Browne C, Ersoz E, Flint-Garcia S, Garcia A, Glaubitz J C, Goodman M M, Harjes C, Guill K, Kroon D E, Larsson S, Lepak N K, Li H H, Mitchell S E, Pressoir G, Peiffer J A, Rosas M O, Rocheford T R, Romay M C, Romero S, Salvo S, Sanchez Villeda H, Silva H S, Sun Q, Tian F, Upadaya N, Ware D, Yates H, Yu J M, Zhang Z W, Kresovich S, McMullen M D. The genetic architecture of maize flowering time. *Science*, 2009, 325 (5941): 714-718
- [21] Porebski S, Bailey L G, Baum B R. Modification of a CTAB DNA extraction protocol for plants containing high polysaccharide and polyphenol components. *Plant Molecular Biology Reporter*, 1997, 15 (1): 8-15
- [22] Elshire R J, Glaubitz J C, Sun Q, Poland J A, Kawamoto K, Buckler E S, Mitchell S E. A robust, simple genotyping-by-sequencing (GBS) approach for high diversity species. *PLoS ONE*, 2011, 6 (5): e19379
- [23] Zhai Z H, Chen X N, Wang J. Primer design with primer Premier 5.0. *Northwest Medical Education*, 2008, 16 (4): 695-698
- [24] Li C H, Li Y X, Shi Y S, Song Y C, Zhang D F, Buckler E S, Zhang Z W, Wang T Y, Li Y. Genetic control of the leaf angle and leaf orientation value as revealed by ultra-high density maps in three connected maize populations. *PLoS ONE*, 2015, 10 (3): e0121624
- [25] Voorrips R E. MapChart: Software for the graphical presentation of linkage maps and QTLs. *Journal of Heredity*, 2002, 93 (1): 77-78
- [26] Meng L, Li H H, Zhang L Y, Wang J K. QTL IciMapping: Integrated software for genetic linkage map construction and quantitative trait locus mapping in biparental populations. *Crop Journal*, 2015, 3 (3): 269-283
- [27] Li H, Hearne S, Bänziger M, Li Z, Wang J. Statistical properties of QTL linkage mapping in biparental genetic populations. *Heredity*, 2010, 105 (3): 257-267
- [28] Wang J K, Wan X Y, Crossa J, Crouch J, Weng J F, Zhai H Q, Wan J M. QTL mapping of grain length in rice (*Oryza sativa* L.) using chromosome segment substitution lines. *Genetic Research*, 2006, 88 (2): 93-104
- [29] Marasinghe M G, Kennedy W J. SAS for data analysis: Intermediate statistical methods. New York: Springer-Verlag, 2008
- [30] Yan J B, Tan B C. Maize biology: From functional genomics to breeding application. *Journal of Integrative Plant Biology*, 2019, 61 (6): 654-657
- [31] Tian T, Wang S H, Yang S P, Yang Z R, Liu S X, Wang Y J, Gao H J, Zhang S S, Yang X H, Jiang C F, Qin F. Genome assembly and genetic dissection of a prominent drought-resistant maize germplasm. *Nature Genetics*, 2023, 55 (3): 496-506
- [32] Ajnone-Marsan P, Monfredini G, Ludwig W F, Melchinger A E, Franceschini P, Pagnotto G, Motto M. In an elite cross of maize a major quantitative trait locus controls one-fourth of the genetic variation for grain yield. *Theoretical and Applied Genetics*, 1995, 90 (3-4): 415-24
- [33] Li J Z, Zhang Z W, Li Y L, Wang Q L, Zhou Y G. QTL consistency and meta-analysis for grain yield components in three generations in maize. *Theoretical and Applied Genetics*, 2010, 122 (4): 771-82
- [34] Zhang Z H, Liu Z H, Hu Y M, Li W H, Fu Z Y, Ding D, Li H C, Qiao M M, Tang J H. QTL analysis of kernel-related traits in maize using an immortalized F₂ population. *PLoS ONE*, 2014, 9 (2): e89645
- [35] Wang Y J, Huang Z J, Deng D X, Ding H D, Zhang R, Wang S X, Bian Y L, Yin Z T, Xu X M. Meta-analysis combined with syntenic metaQTL mining dissects candidate loci for maize yield. *Molecular Breeding*, 2013, 31 (3): 601-614

- [36] Chen L, An Y X, Li Y X, Li C H, Shi Y S, Song Y C, Zhang D F, Wang T Y, Li Y. Candidate loci for yield-related traits in maize revealed by a combination of metaQTL analysis and regional association mapping. *Frontier in Plant Science*, 2017, 8: 2190
- [37] Li Y B, Fan C C, Xing Y Z, Jiang Y H, Luo L J, Sun L, Shao D, Xu C J, Li X H, Xiao J H, He Y Q, Zhang Q F. Natural variation in *GS5* plays an important role in regulating grain size and yield in rice. *Nature Genetics*, 2011, 43 (12): 1266-1269
- [38] Tang B, Li Y X, Mu Z S, Chen L, Guo H L, Chen Z H, Li C H, Liu X Y, Zhang D F, Shi Y S, Li Y, Wang T Y. Fine mapping and candidate gene analysis of *qKW7b*, a major QTL for kernel width in maize. *Molecular Breeding*, 2020, 40 (67)