

玉米穗粗性状的全基因组关联分析及QTL元分析

邵晓宇¹, 宋希云^{2,3}, 潘顺祥¹, 赵美爱^{1,3,*}

¹青岛农业大学生命科学学院, 山东省高校植物生物技术重点实验室, 山东青岛266109; ²青岛农业大学农学院, 山东青岛266109; ³青岛市主要农作物种质资源创新与应用重点实验室, 山东青岛266109

摘要: 玉米(*Zea mays*)是全世界总产量最高的粮食作物, 穗粗是玉米单株产量的重要指标。利用FarmCPU软件对292份玉米自交系进行全基因组关联分析(GWAS), 筛选到28个显著性单核苷酸多态性(SNP)位点。借助IBM2 2008 Neighbors高密度图谱整合了2007~2015年文献发表的105个玉米穗粗性状的数量性状基因座(QTL), 采用元分析的方法, 确定了10个与穗粗相关的“一致性”QTL (Meta-QTL)。通过查询各年各点最显著的SNP位点, 以及位于Meta-QTL内的显著性SNP位点, 获得了9个玉米穗粗的候选基因, 分别位于玉米染色体区段bin 1.10、3.09、4.08、5.05、6.07、8.03、9.05、10.04。全基因组关联分析和Meta-QTL筛选的穗粗候选基因可以为玉米分子标记辅助育种和基因克隆提供有用的信息。本研究对玉米穗粗性状的遗传改良及高产稳产育种提供参考。

关键词: 玉米; 穗粗; 全基因组关联分析; 元分析

玉米(*Zea mays*)的产量性状一直是人们最重视的农艺性状之一。玉米产量相关性状分为四大类: 干物质及淀粉性状、籽粒相关性状、粒重相关性状和穗部相关性状。穗部相关性状包括穗长、穗粗、穗行数、粒长、粒宽等(张耿等2008)。穗粗作为玉米穗部的一个重要性状, 与玉米产量有着密切的关系, 是单株产量高低的重要指标(宋伟2011)。

梁晓玲和高慧慧(2001)利用17个玉米杂交种材料, 对11个农艺性状进行途径分析和相关分析, 结果表明, 对产量影响最大的为千粒重, 相关系数达到显著水平; 穗粗、出籽率和穗长与产量成正相关关系。宋伟(2011)检测到控制一个玉米穗粗性状的主效数量性状基因座(quantitative trait locus, QTL)——yED-4, 位于8号染色体上。Zhang等(2017)联合连锁和关联图谱, 确定了与穗部性状相关的26个稳定的QTL以及6个单核苷酸多态性(single-nucleotide polymorphism, SNP)位点。虽然已有很多QTL被报道, 但是这些结果之间由于作图群体、分析方法以及环境条件的差异造成了QTL定位区间过大的问题。利用元分析软件BioMercator v4.2, 将QTL信息整合到IBM2 2008 Neighbors图谱上, 可提取相对有效且可靠的QTL标记信息。

关联分析是根据基因组连锁不平衡程度来推断控制数量性状的基因与分子标记之间的关联, 具有研究周期短、定位精度好、投入产出比高等特点, 只要构建了合适的关联分析平台, 就可以同时对多种性状开展研究, 是一种高效的研究手段

(白光红2014)。然而导致群体中连锁不平衡程度的变化因素很多, 应用传统的关联分析方法, 复杂的群体结构会显著增加假阳性; 当分子标记的多态性分布和群体结构分布一致时, 又会造成很多假阴性。FarmCPU (fixed and random model circulating probability unification)通过交替使用一个固定效应模型和一个随机效应模型来解决模型中的混杂问题(Liu 2016)。

本实验旨在利用MaizeSNP50 BeadChip芯片及两年四点的穗粗表型数据, 对292份玉米自交系组成的关联作图群体进行全基因组关联分析, 以得到与穗粗性状关联的SNP位点, 并整合多年穗粗性状的QTL, 采用元分析方法, 确定与玉米穗粗相关的“一致性”QTL (Meta-QTL), 找寻候选基因, 以期为玉米穗粗重要基因的精细定位和克隆提供依据。

材料与方法

1 试验材料

本研究所用材料包括我国生产上推广的玉米(*Zea mays* L.)杂交种亲本、杂交育种上常用的骨干自交系以及本课题组选育的共292份自交系组成的自然群体, 具体材料名称详见表1。2015年,

收稿 2017-04-24 修定 2017-09-21

资助 国家自然科学基金(31371636)、山东省现代农业产业技术体系玉米产业创新团队项目(SDAIT-01-022-01)、山东省良种工程项目、山东省重点研发项目(2016GNC110018)和青岛市应用基础研究计划项目(14-2-4-13-jch)。

* 通讯作者(E-mail: meiai@qau.edu.cn)。

表1 292份玉米自交系材料名称
Table 1 Names of 292 inbred lines in maize

序号	名称	序号	名称	序号	名称	序号	名称
1	掖478	51	LY010	101	K6H9103	151	zm5538
2	早49	52	LY013	102	K8112	152	zm5539
3	E28	53	LY014	103	LY059	153	zm5540
4	B73	54	LY016	104	LY060	154	zm5541
5	444	55	LY017	105	LY061	155	zm5542
6	P138	56	LY018	106	LY062	156	zm5543
7	P170	57	LY019	107	LY064	157	奥20-3
8	853	58	LY020	108	LY065	158	奥894-2
9	7922	59	LY021	109	LY066	159	奥甜8210
10	81162	60	JH271	110	LY068	160	白515
11	K12	61	K12B	111	LY069	161	爆-1
12	1/6海南	62	H901	112	LY070	162	本育15
13	吉846	63	ML-3	113	LY071	163	昌7-2
14	齐319	64	MLBJ	114	LY073	164	超6X
15	青农105父本	65	MQ-3	115	LY074	165	朝白-1
16	青农105母本	66	MY-4	116	LY11-11	166	冲17-2
17	京D24	67	MY6-8	117	LYM1	167	冲17-2
18	良玉88母	68	NF-35	118	LYM2	168	丹340
19	13甜-3(海南)	69	LY022	119	LYM3	169	丹638
20	319B	70	LY023	120	LYM4	170	丹638
21	335选	71	LY024	121	K ₁₂ -146	171	丹998
22	340G	72	LY025	122	K ₁₂ -148	172	丹sy3-1
23	414系	73	LY026	123	K ₁₂ -160	173	丹黄25
24	496WP	74	LY028	124	K ₁₂ -176	174	都6607
25	78599选	75	LY029	125	K ₁₂ -272	175	菲律宾-1
26	LY055	76	LY030	126	K ₁₂ -386	176	TW263
27	LY056	77	LY031	127	HO-3-4	177	TW623
28	LY057	78	LY032	128	NF358	178	WYH-2
29	87-20	79	LY033	129	NLEBM-4	179	WYH-3
30	K12-452	80	LY034	130	OA1207	180	X178
31	K12-512	81	LY035	131	P1211-6	181	XD28
32	K12-526	82	LY036	132	488	182	Y53
33	K12-76	83	LY037	133	785	183	YM-8
34	K12HF184	84	LY038	134	S122	184	YWH67
35	CML13	85	LY039	135	T123	185	zm5535
36	CML84	86	LY042	136	T29803	186	菲律宾-3
37	CML99	87	LY044	137	K910改	187	峰273
38	CML199	88	LY045	138	KHL88	188	抚96
39	CML255	89	LY046	139	L01125	189	海Y18
40	CML299	90	LY047	140	L0167	190	海南-2
41	CML306	91	LY049	141	L219	191	华160
42	CML385	92	LY050	142	L502-196	192	华玉W13
43	D811	93	LY054	143	LD3162	193	黄5
44	DH7823	94	K12HF304	144	LX9801	194	黄515
45	Ex	95	K12HF76	145	M01	195	基础1
46	LY001	96	K36	146	M4	196	107-8
47	LY002	97	K6H4057	147	MJ02	197	吉M67
48	LY006	98	K6H6079	148	ML-1	198	吉早48
49	LY007	99	K6H6179	149	zm5536	199	极早白
50	LY009	100	K6H6784	150	zm5537	200	金海5选

表1 (续)

序号	名称	序号	名称	序号	名称	序号	名称
201	13H-342	224	仁白	247	菲律宾-2	270	早10
202	13H-375新父	225	三团	248	农华101母	271	早10
203	辽3162	226	山农206a	249	农糯-2	272	招835
204	辽3180	227	山农206b	250	糯-3	273	郑0510
205	聊玉20母本	228	陕814	251	糯-4	274	郑58G
206	鹿65	229	沈137	252	糯-5	275	H231
207	美24242	230	沈单16父	253	彭甜11-A	276	H90
208	美338	231	沈玉88母	254	W42-2	277	189
209	美抗-1	232	舜尧7号	255	WL	278	BC2433
210	美抗-2	233	孙1	256	系1-4	279	BM
211	美抗-3	234	孙2	257	夏514	280	230
212	美抗-4	235	孙3	258	夏844	281	D729
213	美选	236	甜06-261	259	夏987	282	244
214	甜-4(德)	237	甜16	260	夏996	283	FC521
215	KN-1	238	甜-2(德)	261	先96	284	FR218
216	KN-1m	239	中102	262	先锋选	285	ML-2
217	彭甜33-A	240	中单909选	263	先玉698选	286	铁9010
218	齐205	241	中系09	264	新1391	287	铁98042
219	齐318	242	诸糯-7	265	新DH	288	铁X98042
220	107X	243	紫药515	266	岩103	289	铁单9010
221	11N597	244	92黄40	267	岩172	290	威海白
222	129-2405	245	A632	268	254	291	魏1122
223	热BS11	246	AMD43X	269	遗67	292	西星糯-6

将292份玉米自交系材料种植在山东青州和河南洛阳, 2016年种植在山东青州和山东胶州, 均采用随机区组设计, 3次重复, 小区行长3 m, 行距0.6 m, 株距0.2 m, 每行15株, 田间管理同大田。

2 表型数据

每个自交系均选择发育正常、结实饱满的果穗9穗, 用游标卡尺垂直于果穗测定果穗中间宽度3次, 得到穗粗值, 单位为毫米。

采用SPSS 20.0对玉米穗粗性状的表型值进行统计分析和正态分布检验。采用SAS 9.4计算各方差, 按照Knapp等(1985)提出的公式 $h^2=\sigma_g^2/(\sigma_g^2+\sigma_{gl}^2/n+\sigma_e^2/nr)$ 估算玉米穗粗的广义遗传力(h^2), 其中 σ_g^2 为遗传方差, σ_{gl}^2 为基因型与环境互作的方差, σ_e^2 为误差方差, n 为地点数, r 为重复数。

3 基因型数据测定

将292份玉米材料播种至田间, 待材料长至六叶期, 每行用打孔器取8片大小一致的圆片, 置于96孔板离心管中, 冷冻干燥后-20℃保存。由杜邦先锋公司提取DNA, 采用Illumina公司开发的Maize-SNP50 BeadChip芯片进行基因型检测。该芯片包

括55 126个SNP标记, 均匀覆盖玉米自交系B73全基因组。SNP基因型检测参照Illumina公司提供的操作指南, 采用Illumina BeadStation 500 G SNP分型系统完成, 剔除缺失率大于20%、杂合率大于10%、最小等位基因频率(minor allele frequency, MAF) <0.05的SNP后, 采用25 331个高质量的SNP标记进行关联分析。

4 玉米穗粗的全基因组关联分析

本研究利用25 331个SNP基因型数据和292份玉米自交系材料的穗粗表现型数据, 采用FarmCPU软件将群体结构——主成分分析(principal component analysis, PCA)作为固定效应(fixed effect), 亲缘关系矩阵(kinship)作为随机效应(random effect model, REM)加在混合线性模型中, 进行SNP标记与玉米穗粗性状的关联分析。在 $P<0.000 1$ 水平上, 判定SNP标记与穗行数关联的显著性(陈广凤等2015; Ueda等2015; 张焕欣等2014)。

5 元分析

5.1 QTL信息收集

于中国知网(<http://www.cnki.net/>)、NCBI

PubMed (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>)、百度学术(<http://xueshu.baidu.com/>)等网站搜索主要刊物2007~2015年发表的文献中穗粗QTL信息,包括作图群体大小、群体类型、作图函数、染色体位置、LOD值、贡献率、置信区间、遗传图谱标记、遗传距离等。在QTL定位中, QTL位置(最大可能性位置及其置信区间)和贡献率(解释表型变异的比率)是QTL的两个重要参数(Li等2007)。如果某一QTL的置信区间未知, 则根据Darvasi和Soller (1995)的公式推断其95%的置信区间。

$$CI=530/(N\times R^2) \tag{1}$$

$$CI=163/(N\times R^2) \tag{2}$$

式中, CI指QTL的置信区间(confidence interval, CI), N 代表作图群体的大小, R^2 代表该QTL的贡献率; 公式(1)适用于回交和 F_2 作图群体, 公式(2)适用于重组自交系群体。

5.2 元分析方法

利用BioMercator v4.2软件的映射功能, 将独立试验构建的遗传图谱和QTL信息映射到高密度分子标记连锁图谱IBM2 2008 Neighbors上, 获得整合图谱。通过模拟运算给出QTL的5个模型, 分别表示该区域含有1、2、3、4和 N 个“真实” QTL; 根据最小的最小信息准则(Akaike-type criteria, AIC)值, 判断最优模型(Goffinet和Gerber 2000); 再利用该软件的元分析功能, 以初始QTL不少于3个QTL的标准, 确定入选的与穗粗相关的Meta- QTL的位置及置信区间。

实验结果

本研究综合了两年四点的表型数据, 利用Maize-SNP50 BeadChip芯片数据中剔除MAF<0.05后的25 331个SNP, 采用FarmCPU软件对玉米穗粗性状

做了全基因组关联分析及元分析, 并筛选了与穗粗性状相关的候选基因。

1 自然群体穗部性状表型值及其变异

对两年四个地点的自然群体穗粗性状的表型值进行统计分析和正态分布检验(表2)。2015、2016两年的玉米穗粗总变异范围为24.32~52.22 mm, 平均值范围为37.16~40.16 mm, 说明不同自交系间穗粗差异较大。2016年青州及胶州穗粗平均值明显小于2015年洛阳和青州的平均值, 这可能是由于2016年夏季阴雨天过多、玉米光合作用时间少造成的。各年各点的偏度和峰度均介于-1~1之间, 说明穗粗在群体中符合正态分布(表2)。各年各点的正态分布直方图见图1, 横坐标为穗粗, 纵坐标为频率。由图1可见, 四个地点的穗粗值都在40 mm左右频率较高。

2 玉米穗粗的全基因组关联分析结果

根据FarmCPU的复合线性模型对玉米穗粗的全基因组关联分析结果, 挑选 $-\log_{10}p$ 大于4的SNP位点(p 值为数量性状观测值), 穗粗性状的全基因组关联分析结果如图2所示。图2-A、C、E、G为曼哈顿图(Manhattan plot, 表示每条染色体上的每个SNP标记的观测 $-\log_{10}p$ 值), 从左至右不同颜色表示玉米1~10号染色体, 纵坐标为观测 $-\log_{10}p$ 值, 图中黑色横线以上表示与穗粗相关性显著的位点; 图2-B、D、F、H为QQ图(quantile-quantile plot, 用来估计数量性状观测值与预测值之间的差异), 横坐标为预测 $-\log_{10}p$ 值, 纵坐标为观测 $-\log_{10}p$ 值, 图中红色直线为预测值等于观测值的参考线, 位于红色参考线以上的点即为显著性超出预测值的位点。由于2016年青州的QQ图趋势不理想, 因此舍弃了该点的显著性SNP。与穗粗显著相关的SNP位点共有28个($p<10^{-4}$), 其中2015年洛阳包含10个

表2 2015和2016年各地点玉米穗粗数据

Table 2 The data of ear diameters in maize grown in different places in 2015 and 2016

年份	极小值/mm	极大值/mm	均值/mm	标准差	偏度	峰度	环境	广义遗传力
2015	24.32	51.89	39.54	4.16	-0.029	0.979	洛阳	85.88%
2015	25.10	52.22	40.16	4.13	-0.330	0.594	青州	
2016	26.93	49.78	37.16	3.50	0.096	0.386	胶州	
2016	26.95	52.13	38.16	3.71	-0.326	-0.124	青州	

偏度(skewness)是描述某变量取值分布对称性的统计量, 峰度(kurtosis)是描述某变量所有取值分布形态陡缓程度的统计量, 广义遗传力(broad-sense heritability)指遗传方差占表现型方差的百分数, 表中数据代表两年四点总的广义遗传力。

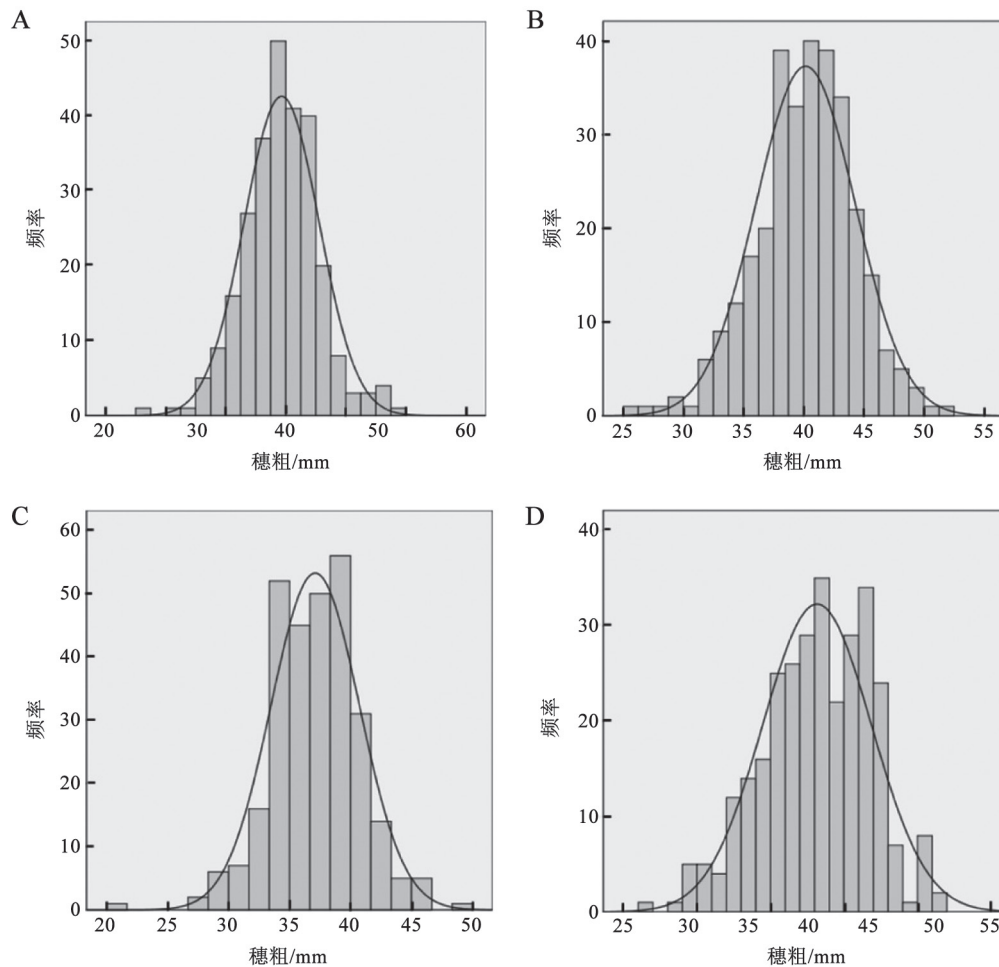


图1 2015和2016年各地点玉米穗粗的直方图

Fig.1 Histograms for maize ear diameters from different places in 2015 and 2016

A: 2015年洛阳; B: 2015年青州; C: 2016年胶州; D: 2016年青州。

显著性SNP, 2015年青州包含13个显著性SNP, 2016年胶州包含5个显著性SNP, 如表3所示。28个SNP覆盖了1号、3号、4号、5号、6号、7号、8号、9号、10号九条染色体, 分别位于染色体框1.03、1.05、1.07、1.09、1.10、3.09、4.05、4.08、5.00、5.03、5.05、6.01、6.03、6.04、6.07、7.03、8.03、8.07、9.03、10.03和10.04 (表3)。

3 玉米穗粗的元分析结果

3.1 玉米穗粗QTL文献及整理

收集了2007~2015年11篇文献中与穗粗相关的105个QTL信息(表4), 包括作图群体大小、群体类型、作图函数、染色体位置、LOD值、贡献率、置信区间、遗传图谱标记和遗传距离等。将每个原始图谱整合至玉米参考图谱IBM2 2008 Neighbors上, 构建了一致性图谱。由于胡利宗等(2010)和

Mendes-Moreira等(2015)的7号染色体原始图谱的分子标记不能映射到参考图谱上, 因此在构建7号染色体一致性图谱时, 舍弃了两个原始图谱, 7号染色体Meta-QTL整合时也未加入两个图谱的QTL。

3.2 玉米穗粗Meta-QTL的整合

整合搜集的105个玉米穗粗的QTL至一致性图谱上(图3), 结果表明, 玉米穗粗QTL覆盖了1号、2号、3号、4号、5号、6号、7号、8号和10号共九条染色体, 主要集中在1号、2号、3号、4号、5号和10号染色体上。对105个QTL进行元分析, 选择AIC值最小的模型为最优QTL模型, 根据初始QTL不少于3个的选取标准, 共得到10个Meta-QTL。这些Meta-QTL分布在1号、2号、3号、4号、5号、7号和10号染色体上, 置信区间大小由4.2~15.13 cM不等(表5)。根据MQTL两侧标记的物理

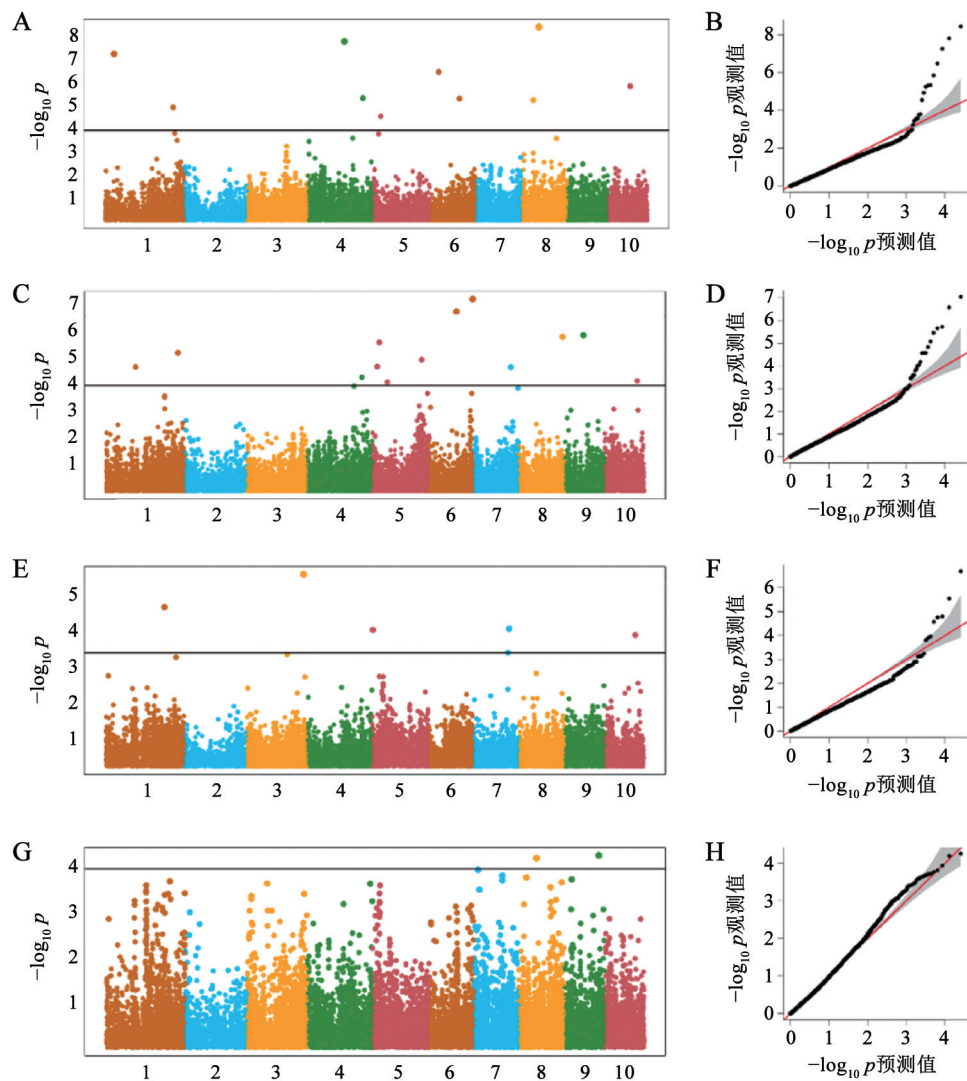


图2 2015和2016年玉米穗粗全基因组关联分析曼哈顿图及QQ图

Fig.2 Manhattan plot and quantile-quantile plot of genome-wide association analysis for ear diameter in maize in 2015 and 2016
A和B: 2015年洛阳; C和D: 2015年青州; E和F: 2016年胶州; G和H: 2016年青州。A、C、E和G: 曼哈顿图(表示每条染色体上的每个SNP标记的 $-\log_{10}p$ 观测值); B、D、F和H: QQ图(表示数量性状观测值与预测值之间差异)。p: 数量性状观测值。

距离和SNP标记的物理距离, 本研究的显著性SNP标记PZE_101048890位于MQTL2区间内, PZE_103171163位于MQTL6区间内, SYNGENTA6857位于MQTL8区间内, PZE_110067406和PZE_110061773位于MQTL10区间内。

4 玉米穗粗候选基因功能注释

通过查询Maize GDB (<http://www.maizegdb.org/>)、NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)分子标记和基因数据库, 将各年份地点的SNP标记进行了基因的功能注释。其中各年各点最显著的4个SNP所在的候选基因分别被注释为泛素结合酶E2、

DUF1645家族蛋白、P环三磷酸水解酶和磷酸核糖转移酶。在28个与穗粗显著关联的SNP中, 我们发现3个候选基因与泛素相关, 分别为泛素结合酶E2、泛素连接酶E3和泛素末端水解酶。已有拟南芥和水稻 (*Oryza sativa*)的研究发现, 表达泛素相关酶的基因与种子大小有关。位于Meta-QTL内的SNP标记PZE_103171163、SYNGENTA6857、PZE_110067406和PZE_110061773分别被注释为含P环三磷酸核苷水解酶超家族蛋白、E2F相关磷蛋白、聚腺苷酸特异性核糖核酸酶、假定MRS2-D镁转运蛋白(表6)。

表3 2015和2016年与玉米穗粗显著相关的28个SNP位点

Table 3 Twenty-eight SNPs which were significantly correlated with maize ear diameter in 2015 and 2016

SNP标记	等位基因	染色体号	物理位置/bp	染色体位置/bin	-log ₁₀ P值	地点	年份
PZE_108042082	A/G	8	68 445 014	8.03	8.426 0	洛阳	2015
PZE_104069344	A/C/G/T	4	138 009 042	4.05	7.794 1	洛阳	2015
PZE_101048890	A/G/T	1	33 677 004	1.03	7.247 5	洛阳	2015
PZE_106015303	A/G/T	6	36 836 724	6.01	6.463 4	洛阳	2015
PZE_110044605	G/T	10	85 027 699	10.03	5.844 2	洛阳	2015
PZE_104124003	A/C/G	4	201 426 529	4.08	5.331 0	洛阳	2015
PZE_106056547	A/C/G/T	6	110 465 686	6.04	5.314 6	洛阳	2015
PZE_108035132	A/G	8	49 110 637	8.03	5.245 9	洛阳	2015
PZE_101208406	C/T	1	258 034 687	1.09	4.932 8	洛阳	2015
PZE_105041346	A/C/G/T	5	27 663 265	5.03	4.543 0	洛阳	2015
SYN4311	A/C/T	6	165 447 568	6.07	7.043 8	青州	2015
PZE_106052904	C/T	6	103 570 219	6.03	6.583 4	青州	2015
PZE_109044289	A/C/G/T	9	76 109 248	9.03	5.720 4	青州	2015
PZE_108119984	A/C	8	167 554 776	8.07	5.663 2	青州	2015
PZE_105040885	C/T	5	26 890 327	5.03	5.461 0	青州	2015
PZE_101223864	A/C	1	275 012 730	1.10	5.077 5	青州	2015
SYNGENTA6857	A/G	5	188 509 313	5.05	4.824 5	青州	2015
SYN32845	C/T	5	19 076 912	5.03	4.571 5	青州	2015
PZE_101108171	A/C/G	1	114 182 209	1.05	4.561 8	青州	2015
SYNGENTA11834	A/T	7	146 534 090	7.03	4.557 0	青州	2015
SYN28068	A/C/G	4	202 250 929	4.08	4.183 6	青州	2015
PZE_110067406	A/C/G	10	123 976 464	10.04	4.048 7	青州	2015
PZE_105059330	A/G/T	5	58 165 601	5.03	4.001 3	青州	2015
PZE_103171163	A/G	3	218 272 659	3.09	6.683 9	胶州	2016
SYN16352	A/C/G/T	1	223 385 856	1.07	5.545 9	胶州	2016
PZE_107084584	A/C/G/T	7	140 288 830	7.03	4.795 7	胶州	2016
SYN15172	A/C	5	2 745 843	5.00	4.753 8	胶州	2016
PZE_110061773	A/G	10	116 913 027	10.04	4.577 9	胶州	2016

等位基因(allele): 该位点单个碱基变化。

表4 2007~2015年玉米穗粗QTL信息整合

Table 4 Summary of the QTLs of ear diameters in maize from 2007 to 2015

亲本	群体大小/株	群体类型	方法	QTL数	参考文献
Dan232×N04	258	F ₉	CIM	19	Li等2011
Dan232×N04	220	BC ₂ F ₂	CIM	26	Li等2007
PB260×PB266	149	F _{2:3}	CIM	10	Mendes-Moreira等2015
四287×四144	187	F ₃	CIM	5	孙婷婷2013
农系928	161	导入系	ICIM	5	祝丽英2012
L26×095	186	F ₂	CIM	2	代国丽等2009
092×交51	400	F ₂	IM	7	吕学高等2008
‘农单5号’	79	DH	CIM	3	张建华等2009
农系110×农系53	95	BC ₂ F ₂	CIM	2	胡利宗等2010
掖478×丹340	397	F _{2:3}	CIM	26	杨晓军2008

BC₂F₂: F₁与轮回亲本回交两代, 再自交一代得到的群体; DH: 双单倍体, 单倍体染色体加倍后得到的群体; F₂: 指F₁自交后代组成的群体; F_{2:3}: 每个F₂代植株自交叉产生的各自对应的F₃群体组成的群体, 不混合; F₃: 指F₂自交后代组成的群体; F₉: 连续自交9代得到的群体; 导入系: 染色体片段代换系, 通常通过系统回交和自交, 并借助于分子标记辅助选择使供体亲本的片段导入到轮回亲本中而得来。CIM: composite interval mapping, 复合区间作图法; ICIM: inclusive composite interval mapping, 完备区间作图法; IM: interval mapping, 区间作图法。

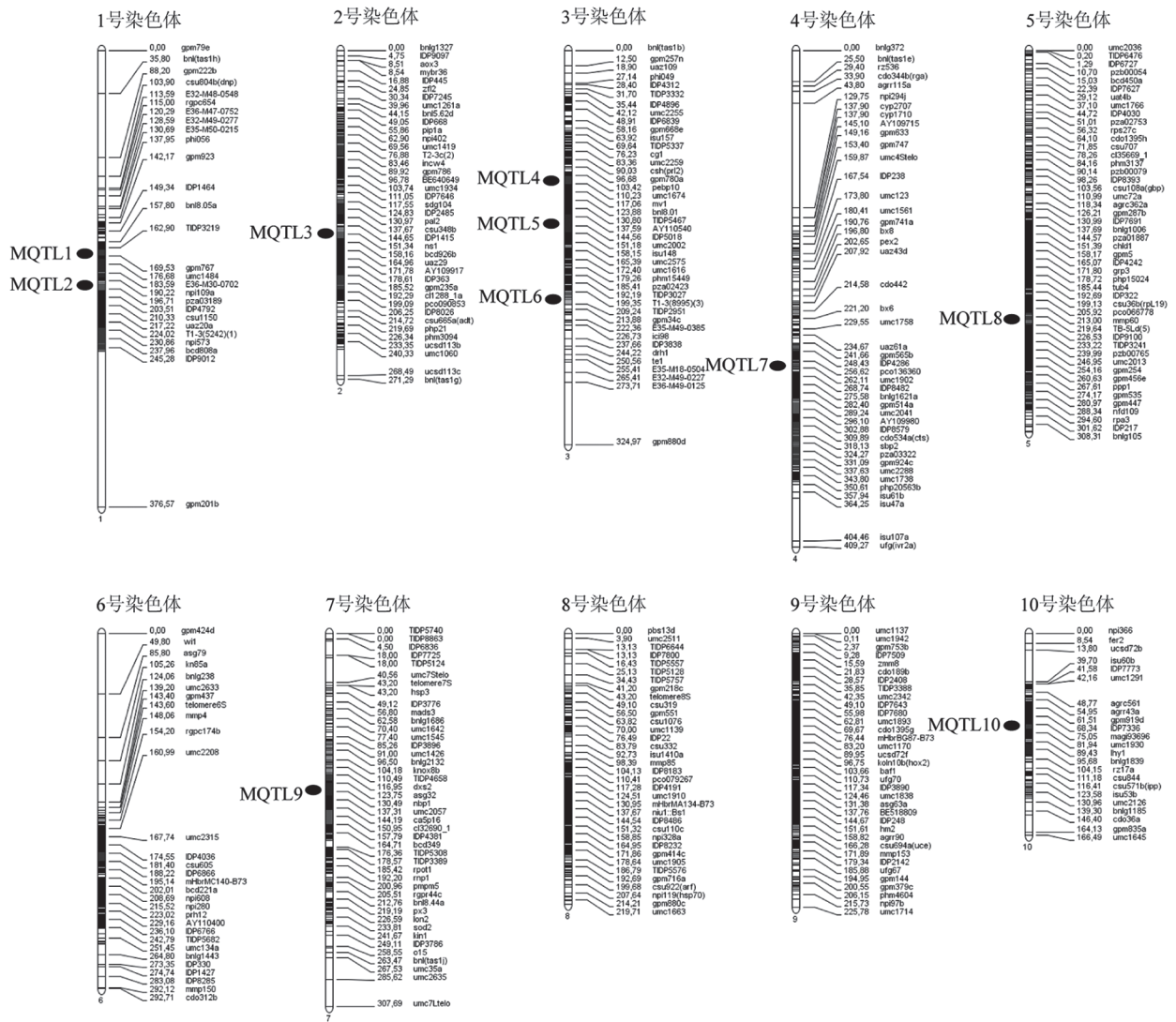


图3 玉米穗粗性状的元分析Meta-QTL图谱

Fig.3 Meta-QTL map integrated for ear diameter in maize

MQTL1~10为Meta-QTL, 表5和6同。

表5 玉米穗粗元分析Meta-QTL的位置信息

Table 5 Information of Meta-QTL positions by meta-analysis for ear diameter in maize

Meta-QTL	染色体号	位置/cM	置信区间/cM	左标记	左标记位置/cM	右标记	右标记位置/cM
MQTL1	1	167.36	164.58~170.13	cdo1081a	164.58	AY108650	170.06
MQTL2	1	195.34	192.00~198.62	npi423	192.49	agrr92a	198.62
MQTL3	2	151.09	146.20~155.97	les10	147.07	umc1003	155.92
MQTL4	3	107.31	103.77~110.84	bnlg1957	103.84	uaz37	110.83
MQTL5	3	143.05	135.49~150.62	IDP4818	135.71	IDP7565	150.56
MQTL6	3	204.96	199.26~210.66	T1-39(8995) (3)	199.35	IDP9094	210.19
MQTL7	4	260.33	255.41~265.24	pco136360	256.62	umc49j	265.23
MQTL8	5	221.53	216.54~226.52	pza03049	216.57	umc2527	226.32
MQTL9	7	129.39	123.89~134.88	agrc261	124.05	npi47b	134.82
MQTL10	10	77.44	75.34~79.54	cdo482	75.36	bnl17.08	79.49

表6 玉米穗粗候选基因功能注释

Table 6 The annotated functions of candidate genes for ear diameter in maize

标记	位置/bin	候选基因	功能分类	Meta-QTL
PZE_101223864	1.10	GRMZM2G018798	泛素连接酶E3	—
PZE_103171163	3.09	GRMZM2G156158	三磷酸核苷水解酶类	MQTL6
PZE_104124003	4.08	LOC100381748	泛素末端水解酶	—
SYNGENTA6857	5.05	GRMZM2G178595	E2F转录因子相关磷蛋白	MQTL8
SYN4311	6.07	GRMZM2G348890	DUF1645家族蛋白	—
PZE_108042082	8.03	GRMZM2G015287	泛素结合酶E2	—
SYN9773	9.05	GRMZM2G060842	假定蛋白	—
PZE_110067406	10.04	GRMZM2G301246	poly(A)特异核糖核酸酶	MQTL10
PZE_110061773	10.04	GRMZM2G054632	假定镁转运蛋白	MQTL10

加粗的分子标记为各年份地点最显著的SNP。

讨 论

本研究采用FarmCPU软件, 利用25 331个SNP标记对292份玉米自交系进行穗粗全基因组关联分析, 发现28个与穗粗显著关联($P<0.0001$)的SNP。利用BioMercator v4.2对2007~2015年间的穗粗QTL做了元分析, 得到了10个Meta-QTL, 分布在1号、2号、3号、4号、5号、7号和10号染色体上。根据每年每点最显著的SNP和与元分析有一致性的SNP等, 发掘了9个候选基因分别位于bin 1.10、3.09、4.08、5.05、6.07、8.03、9.05和10.04。

FarmCPU是通过交替使用一个固定效应模型和一个随机效应模型来解决模型中混杂问题的新算法。与其他模型会因为数据量过大内存溢出而导致无法运算相比, FarmCPU只需要几个小时来完成数据分析, 在大数据计算中占有优势。其编程语言为R, 因此可以广泛地运用到多个操作系统中, 包括Windows、Linux和Mac OS系统(Liu 2016)。本研究采用FarmCPU软件, 对292份玉米自交系进行了穗粗性状的全基因组关联分析。

本研究在28个与穗粗显著关联的SNP中, 发现有3个SNP所在基因的功能注释与泛素相关。泛素广泛存在于动物、植物及酵母等真核生物中并高度保守(Avram和Aaron 1998)。泛素有两种结构——多聚泛素和单体泛素。多聚泛素-靶蛋白质复合物中的蛋白质主要被降解, 通过降解细胞中非正常、多余以及变性蛋白质, 消除它们对细胞可能造成的危害, 也可为合成新的蛋白质提供氨

基酸; 降解部分酶原、激素前体, 活化蛋白; 降解某些代谢过程中的关键酶及调节蛋白, 控制蛋白质在细胞中的水平, 调节细胞代谢及生物的生长发育。多聚泛素与靶蛋白的结合需要3个酶: E1 (泛素活化酶)、E2 (泛素结合酶)和E3 (靶蛋白复合物)。在E1的催化下, 泛素首先和ATP反应形成泛素-AMP, 然后泛素再和E1以硫酯键的方式结合成E1-S-泛素复合物。接着泛素与E2的巯基相连接, 在E3的作用下, 泛素转移给靶蛋白, 形成E3-靶蛋白复合物。E3将靶蛋白激活形成E3-靶蛋白复合物同时识别E2泛素复合物, 并将E2-泛素复合物中的泛素连接到靶蛋白上。E3对E2具有较高的专一性。本研究结果中的3个与泛素相关的候选基因分别编码泛素结合酶E2、泛素连接酶E3和泛素末端水解酶。前人研究发现, E3作为泛素化过程中重要的特异性识别因子, 对种子大小起到重要调控作用(Avram和Aaron 1998)。在拟南芥中DA1基因编码一种泛素受体蛋白, DA2和EOD1蛋白由DA1蛋白调控, DA2基因和EOD1基因对种子大小有负调控作用(Xia等2013)。蒋春苗等(蒋春苗等2012)分离克隆到一个疣粒野生稻泛素结合酶基因OmE2; OmE2蛋白与其他物种的泛素结合酶具有高度一致性和相似性, 含有泛素结合酶活性位点的保守序列和半胱氨酸残基, 且具有3个跨膜结构域, 推测OmE2是一类泛素结合蛋白兼跨膜蛋白。此外, 前人通过分析62份玉米在不同的干旱条件下[4℃、20% 聚乙二醇(PEG-6000)和200 mmol·L⁻¹ NaCl] OmE2s的表达量, 发现其表达模式不同, 说明OmE2s可能在植物抗旱反应中起到关键作用

(Jue等2015)。在玉米中,籽粒作为穗部的一部分,其大小很有可能影响穗粗的大小。

在9个候选基因中, DUF1645家族蛋白和E2F相关磷蛋白与细胞周期的调控有关。在拟南芥中DUF1645蛋白参与miRNA介导的气孔发育调控(胡志勇等2013)。水稻中DUF1645蛋白由*OsSGL*编码, Wang等(2016)对水稻做了*OsSGL*过表达实验,发现*OsSGL*能显著改变转基因水稻植株性状,包括增加粒长、粒重和穗粒数,使产量显著增长。显微镜分析表明,增强*OsSGL*表达将促进细胞分裂和灌浆。基因芯片和实时定量PCR (quantitative real-time PCR, qPCR)分析表明,大量的基因参与应激反应,细胞周期和细胞分裂素信号转导过程诱导或抑制*OsSGL*过表达植株。其最终结果表明*OsSGL*可以通过细胞分裂素信号转导通路调节细胞生长和抗逆性。转录因子E2F与细胞增殖、凋亡及癌变密切相关。为研究水稻胚乳细胞周期的调控机制,国静等(2007)根据拟南芥基因组提供的信息,从水稻基因组中得到90个细胞周期相关基因的序列,其中包含9个基因编码E2F蛋白。候选基因通过控制植物细胞周期,调节细胞生长,也可能影响玉米穗粗的大小。

本研究通过全基因组关联分析和元分析的方法,发掘了9个与穗粗相关的候选基因,为玉米穗粗的重要基因的精细定位和克隆提供依据,对玉米产量的分子育种提供参考。

参考文献

- Bai G (2014). Methods of kernel traits measurement and QTL mapping and analysis of association (PhD thesis). Urumqi: Xinjiang Agricultural University (in Chinese with English abstract) [白光红(2014). 玉米籽粒性状测定方法及QTL定位与关联分析(博士论文). 乌鲁木齐: 新疆农业大学]
- Chen GF, Chen JS, Tian JC (2015). Genome-wide association analysis between SNP markers and plant height related traits in wheat. *Acta Agron Sin*, 41 (10): 1500–1509 (in Chinese with English abstract) [陈广凤, 陈建省, 田纪春(2015). 小麦株高相关性状与SNP标记全基因组关联分析. 作物学报, 41 (10): 1500–1509]
- Dai G, Cai Y, Xu D, Lü X, Wang G, Wang J, Sun H (2009). QTL mapping of ear traits in maize (*Zea mays* L.). *J Southwest China Norm Univ-Nat Sci*, 34 (5): 133–138 (in Chinese) [代国丽, 蔡一林, 徐德林, 吕学高, 王国强, 王久光, 孙海艳(2009). 玉米穗部性状的QTL定位. 西南师范大学学报(自然科学版), 34 (5): 133–138]
- Darvasi A, Soller M (1995). Advanced intercross lines, an experimental population for fine genetic mapping. *Genetics*, 141 (3): 1199–1207
- Goffinet B, Gerber S (2000). Quantitative trait loci: a meta-analysis. *Genetics*, 155: 463–473
- Guo J, Song J, Wang F, Zhang X (2007). Identification and expression analysis of cell cycle related genes in rice. *Jinhua: Abstracts of the 2007 Symposium on Plant Genetics and Genomics in China (in Chinese)* [国静, 宋建, 王芳, 张宪省(2007). 水稻细胞周期相关基因的鉴定及表达分析. 金华: 中国遗传学会植物遗传和基因组学专业委员会2007年学术研讨会摘要集]
- Hu LZ, Liu JG, Guo JJ, Zhao YY, Zhu LY, Song ZQ, Chen JT (2010). QTL analysis of ear traits based on BC₂F₂ Population in maize (*Zea mays* L.). *Acta Agr Boreali-Sin*, 25 (4): 73–77 (in Chinese with English abstract) [胡利宗, 刘均革, 郭晋杰, 赵永锋, 祝丽英, 宋占权, 陈景堂(2010). 基于玉米BC₂F₂群体的穗部性状QTL分析. 华北农学报, 25 (4): 73–77]
- Hu Z, Hua W, Liu J, Zhan G, Zhang L, Deng B, Yang H, Wang H (2013). The interaction between DUF1645 protein and D1 participated in regulation of stomatal development which was mediated by miRNA in *Arabidopsis*. *Wuhan: Proceedings of the Second Symposium on Plant Biotechnology and Modern Agriculture (in Chinese)* [胡志勇, 华玮, 刘静, 詹高淼, 张亮, 邓彬彬, 杨红丽, 王汉中(2013). 拟南芥DUF1645蛋白与D1互作参与miRNA介导的气孔发育调控. 武汉: 第2届植物生物技术与现代农业论坛论文集]
- Jiang CM, Huang XQ, Fu J, Yu TQ, Zhong QF, Li DQ, Yin FY, Zhang DY, Wang LX, Cheng ZQ (2012). Cloning and analysis on full-length cDNA sequence of ubiquitin-conjugating enzyme gene from *Oryza meyeriana* Baill. *Acta Agron Sin*, 38 (5): 808–813 (in Chinese with English abstract) [蒋春苗, 黄兴奇, 付坚, 余腾琼, 钟巧芳, 李定琴, 殷富有, 张敦宇, 王玲仙, 程在全(2012). 疣粒野生稻泛素结合酶基因的全长cDNA序列克隆与分析. 作物学报, 38 (5): 808–813]
- Jue D, Sang X, Lu S, Dong C, Zhao Q, Chen H, Jia L (2015). Genome-wide identification, phylogenetic and expression analyses of the ubiquitin-conjugating enzyme gene family in maize. *PLoS ONE*, 10 (11): e0143488
- Knapp SJ, Stroup WW, Ross WM (1985). Exact confidence intervals for heritability on a progeny mean basis. *Crop Sci*, 25: 192–194
- Li JZ, Zhang ZW, Li YL, Wang QL, Zhou YG (2011). QTL consistency and meta-analysis for grain yield components in three generations in maize. *Theor Appl Genet*, 122 (4): 771–782
- Li YL, Niu SZ, Dong YB, Cui DQ, Wang YZ, Liu YY, Wei MG (2007). Identification of trait-improving quantitative trait loci for grain yield components from a dent corn inbred line in an advanced backcross BC₂F₂ population and comparison with its F_{2:3} population in popcorn. *Theor Appl Genet*, 115 (1): 129–140
- Liang XL, Abu LT, Feng GJ, Li J, Li MD, Li WD, Gao HH (2001). Yield performance of maize hybrids and analysis of correlation between yield and agronomic characteristics. *J Maize Sci* 9 (1): 16–20 (in Chinese with English abstract) [梁晓玲, 阿布来提, 冯国俊, 李进, 李铭东, 李维鼎, 高慧慧(2001). 玉米杂交种的产量比较及主要农艺性状的相关和通径分析. 玉米科学, 9 (1): 16–20]
- Liu X, Huang M, Fan B, Buckler ES, Zhang Z (2016). Iterative usage

- of fixed and random effect models for powerful and efficient genome-wide association studies. *PLoS Genet*, 12 (2): e1005767
- Lü X, Cai Y, Chen T, Xu D, Wang W, Liu Z, Wang J (2008). QTL mapping of ear traits in maize (*Zea mays* L.). *J Southwest Univ Nat Sci*, 30 (2): 64–70 (in Chinese) [吕学高, 蔡一林, 陈天青, 徐德林, 王伟林, 刘志斋, 王久光(2008). 玉米穗部性状QTL定位. 西南大学学报(自然科学版), 30 (2): 64–70]
- Mendes-Moreira P, Alves ML, Satovic Z, dos Santos JP, Santos J, Souza JC, Pêgo SE, Hallauer AR, Patto MCV (2015). Genetic architecture of ear fasciation in maize (*Zea mays*) under QTL scrutiny. *PLoS ONE*, 10 (4): e0124543
- Shi LY, Li XH, Hao ZF, Xie CX, Ji HL, Lue XL, Zhang SH, Pan GT (2007). Comparative QTL mapping of resistance to gray leaf spot in maize based on bioinformatics. *J Integr Agr*, 6 (12): 1411–1419
- Song W (2011). Quantitative genetic analysis of ear diameter in maize (Master's thesis). Chengdu: Sichuan Agricultural University (in Chinese with English abstract) [宋伟(2011). 玉米穗粗的数量遗传分析(硕士论文). 成都: 四川农业大学]
- Sun T (2013). Construction of genetic linkage map and identification of QTLs for important agronomic trait in maize (*Zea Mays* L.) (Master's thesis). Yanji: Yanbian University (in Chinese with English abstract) [孙婷婷(2013). 玉米遗传图谱构建及重要农艺性状QTL定位(硕士论文). 延吉: 延边大学]
- Ueda Y, Frimpong F, Qi Y, Matthus E, Wu L, Höller S, Kraska T, Michael F (2015). Genetic dissection of ozone tolerance in rice (*Oryza sativa* L.) by a genome-wide association study. *J Exp Bot*, 66 (1): 293–306
- Wang M, Lu X, Xu G, Yin X, Cui Y, Huang L, Rocha PSCF, Xia X (2016). *OsSGL*, a novel pleiotropic stress-related gene enhances grain length and yield in rice. *Sci Rep*, 6: 38157
- Xia T, Li N, Dumenil J, Li J, Kamenski A, Bevan MW, Gao F, Li Y (2013). The ubiquitin receptor DA1 interacts with the E3 ubiquitin ligase *DA2* to regulate seed and organ size in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 25 (9): 3347–3359
- Yang X (2008). QTL mapping and genetic effect analysis of important trait in maize (Master's thesis). Urumqi: Xinjiang Agricultural University (in Chinese with English abstract) [杨晓军(2008). 玉米重要性状QTL定位与遗传效应分析(硕士论文). 乌鲁木齐: 新疆农业大学]
- Zhang C, Zhou Z, Yong H, Zhang X, Hao Z, Zhang F, Li M, Zhang D, Li X, Wang Z, et al (2017). Analysis of the genetic architecture of maize ear and grain morphological traits by combined linkage and association mapping. *Theor Appl Genet*, 130 (5): 1011–1029
- Zhang G, Zhu LY, Chen JT (2008). Consensus map of the QTLs relevant to yield traits of maize and the development of functional candidate gene. *Acta Agr Boreali-Sin*, 23 (6): 20–27 (in Chinese with English abstract) [张耿, 祝丽英, 陈景堂(2008). 玉米产量相关性状QTL通用图谱的构建及功能候选基因的开发. 华北农学报, 23 (6): 20–27]
- Zhang HX, Weng JF, Zhang XC, Liu CL, Yong HJ, Hao ZF, Li XH (2014). Genome-wide association analysis of kernel row number in maize. *Acta Agron Sin*, 40 (1): 1–6 (in Chinese with English abstract) [张焕欣, 翁建锋, 张晓聪, 刘昌林, 雍洪军, 郝转芳, 李新海(2014). 玉米穗行数全基因组关联分析. 作物学报, 40 (1): 1–6]
- Zhang JH, Liu ZZ, Zhu LY, Huang YQ, Chen JT, Gao H, Zhao YF (2009). QTL mapping for ear traits under different densities using DH population of maize. *J Agric Univ Hebei*, 32 (5): 1–6, 17 (in Chinese with English abstract) [张建华, 刘志增, 祝丽英, 黄亚群, 陈景堂, 高慧, 赵永锋(2009). 不同密度下玉米DH群体果穗性状的QTL定位分析. 河北农业大学学报, 32 (5): 1–6, 17]
- Zhu L (2012). QTL mapping for plant type, ear traits and genetic analysis of a male sterile line in maize (*Zea Mays* L.) (PhD thesis). Baoding: Hebei Agricultural University (in Chinese with English abstract) [祝丽英(2012). 玉米株型、穗部性状QTL鉴定和不育系遗传分析(博士论文). 保定: 河北农业大学]

Genome-wide association study and Meta-QTL analysis of ear diameter trait in maize

SHAO Xiao-Yu¹, SONG Xi-Yun^{2,3}, PAN Shun-Xiang¹, ZHAO Mei-Ai^{1,3,*}

¹College of Life Science, Key Lab of Plant Biotechnology in Universities of Shandong Province, Qingdao Agricultural University, Qingdao, Shandong 266109, China; ²College of Agronomy, Qingdao Agricultural University, Qingdao, Shandong 266109, China;

³Qingdao Key Lab of Germplasm Innovation and Application of Major Crops, Qingdao, Shandong 266109, China

Abstract: Maize (*Zea mays* L.) is a kind of food crop with the highest total yield in the world, and ear diameter is an important index of yield in maize. In this study, genome-wide association study (GWAS) of ear diameters in 292 inbred lines was carried out with FarmCPU software, and 28 significant SNP (single-nucleotide polymorphism) loci were identified in maize. With the help of IBM2 2008 Neighbors high density map, 105 QTLs (quantitative trait loci) of maize ear diameter characters, which were published from 2007 to 2015, were integrated with the method of meta-analysis. Results show that the ear diameter was related to 10 Meta-QTL. By searching the most significant SNP sites, and the significant SNPs which were located in Meta-QTL, 9 candidate genes related to ear diameter of maize were obtained, and these genes are located in maize chromosome bins 1.10, 3.09, 4.08, 5.05, 6.07, 8.03, 9.05, 10.04, respectively. Candidate genes identified by genome-wide association analysis and Meta-QTL can provide useful information for molecular marker-assisted breeding and gene cloning in maize. This study has guiding significances for the genetic improvement of ear diameter and breeding of high and table yield in maize.

Key words: *Zea mays*; ear diameter; genome-wide association study; Meta-QTL

Received 2017-04-24 Accepted 2017-09-21

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No. 31371636), “the Innovation Team in Maize” Modern Agricultural System of Shandong Province (Grant No. SDAIT-01-022-01), Improved Seed Engineering in Shandong Province, Key R&D Project in Shandong Province (Grant No. 2016GNC110018), and Applied Basic Research Project of Qingdao (Grant No. 14-2-4-13-jch).

*Corresponding author (E-mail: meiai@qau.edu.cn)