

# 基于 SLAF-seq 玉米高密度遗传连锁图谱构建与株型性状 QTL 定位

薛春雷<sup>1,2</sup>, 吴慧<sup>3</sup>, 逯晓萍<sup>1\*</sup>, 韩平安<sup>2</sup>, 孙峰成<sup>2</sup>, 张来厚<sup>2</sup>

1. 内蒙古农业大学农学院, 呼和浩特 010018

2. 内蒙古自治区农牧业科学院玉米研究所, 呼和浩特 010031

3. 和林格尔县农业综合开发技术研究评审中心, 呼和浩特 011500

**摘要** 株型直接决定生物产量、种植密度与籽粒产量, 利用玉米高密度遗传连锁图谱解析株型相关性状的遗传机制, 对选育理想株型玉米新品种具有重要意义。本研究利用 SLAF-seq 技术, 依据玉米黄早四参考基因组信息, 对昌7-2与PHB1M及其138个F<sub>2:3</sub>家系高通量测序, 开发高密度SNP的遗传图谱, 并进行株型相关性状QTL定位。研究结果构建了一张总图距为1354.81 cM, 标记间的平均距离为0.32 cM, 标记数为4220个SLAF标签(7876个SNP)的高密度遗传图谱。在E1与E2两种密度下, 对株高、穗位、叶片数、节间数、平均节间长进行QTL定位, 共检测到10个QTL位点, 其中, 有7个PVE超过了10%。叶片数、穗位、节间数为主效QTL, ADD为负值, 叶片数与节间数的减效等位基因来源于PHB1M, 穗位的减效等位基因来源于昌7-2。叶片数与节间数在2个密度下均定位在8号染色体上, 说明二者之间有着共同的遗传机制。与QTL关联的SLAF标记共有61个, 其中, SLFA7305498和SLFA6717271为qLC-2-LG8与qIC-2-LG8共有标记。该研究将为玉米株型相关性状的标记辅助选择提供支撑。

**关键词** 玉米; SLAF-seq 技术; 高通量测序; 高密度遗传连锁图谱; 株型

高密度遗传连锁图谱在遗传学与基因组学研究中, 特别是在基因的精细定位、基于图谱的基因克隆与目标数量性状基因座(QTL)的标记辅助选择方面非常重要。现在虽然进行基因快速定位的

方法很多, 如QTL-seq、BSA-seq、BSR-seq等, 但是普遍存在研究性状单一, 解释表型变异(PVE)缺乏或不准确等情况<sup>[1]</sup>, 且在设计研究方案时也需要了解目标性状的PVE等基本遗传信息。因此, 高质

收稿日期: 2020-11-06; 修回日期: 2021-04-19

基金项目: 内蒙古自治区科技计划项目(20131410, 2020GG0136); 内蒙古农牧业科学院青年创新基金项目(2020QNJJN06); 内蒙古农牧业创新基金项目(2020CXJJN01)

作者简介: 薛春雷, 博士研究生, 研究方向为玉米遗传育种, 电子信箱: xcl13474717283@163.com; 逯晓萍(通信作者), 教授, 研究方向为种质资源研究与创新, 电子信箱: lxp1960@163.com

引用格式: 薛春雷, 吴慧, 逯晓萍, 等. 基于SLAF-seq玉米高密度遗传连锁图谱构建与株型性状QTL定位[J]. 科技导报, 2021, 39(14): 144-154; doi: 10.3981/j.issn.1000-7857.2021.14.014

量、高密度遗传图谱的构建是目标性状遗传解析的基础。构建高密度连锁图谱的关键是大量的可用遗传标记,而下一代测序(next-generation sequencing, NGS)技术可以开发大量的标记<sup>[2]</sup>。简化基因组测序(reduced representation genome sequencing, RRGs)对于单核苷酸多态性(SNP)的大规模开发与基因型分型具有快速与低成本的优势<sup>[3-4]</sup>,随着NGS技术的发展,开发出了各种RRGS方法<sup>[5-6]</sup>,特异位点扩增片段测序(specific-locus amplified fragment sequencing, SLAF-seq)是一种最近发展起来的基于RRGS和高通量测序的方法,已应用于许多物种的遗传图谱构建。利用双条码测序,SLAF-seq可同时对于具有大量基因座的大种群进行基因分型,电子酶切预测可以优化标记开发效率,严格的基因分型程序可以保证基因型的准确性<sup>[7]</sup>。

玉米株型直接决定生物产量、种植密度与籽粒产量<sup>[8]</sup>。株高、穗位、节间数、叶片数与平均节间长是玉米株型的重要组成部分,研究人员对此开展了大量研究<sup>[8-13]</sup>。这5个性状与抗倒性、耐密性、冠层通风透光有着密切关系<sup>[8,13-14]</sup>。改善株型结构不仅可以提高玉米产量,还可以平衡不同性状在群体与单株之间的矛盾,提高育种效率<sup>[15]</sup>。因此,在培育新种质时,优化株型相关的5个性状可避免产量损失。目前,已经鉴定出大量株型相关性状的QTLs。Peiffer等<sup>[16]</sup>通过对玉米嵌套联合作图(NAM)群体中玉米株高遗传基础的剖析,揭示了玉米株高有很强的遗传力,且受多基因控制。Li等<sup>[17]</sup>以大刍草渐渗群体,对叶片数量及其与开花时间的遗传关系进行了全面的遗传解剖,表明二者具有独立的遗传控制。李丹<sup>[13]</sup>研究表明,穗上叶片数与穗下叶片数可能受到相对独立的遗传调控。郭海平等<sup>[18]</sup>研究表明,第7、8、9节间长与穗位高有着共同的遗传基础,节间长也是穗位高的重要构成因子,决定着玉米的株高和穗位高。但是,前人大多集中于单一或少数株型性状的遗传研究,缺乏对株型性状整体的遗传解析。

玉米自交系黄早四的衍生系昌7-2是中国地方种质资源唐四平头的重要改良系之一<sup>[19]</sup>,其组配的郑单958,成为中国第6次玉米杂交种更换的标

志性品种<sup>[20]</sup>,对玉米种子产业产生重要影响<sup>[21]</sup>。昌7-2(图1(a))的雄穗分支多,株高较矮,穗位比高,节间数多,节间短,叶片稠密,一般配合力(general combining ability, GCA)高,组配出杂交种具有果穗均匀,封顶性好,耐密性、综合抗性与适应性突出<sup>[22-23]</sup>等优点,主要缺点为穗位比高,茎秆质量较差,后期容易倒伏<sup>[24]</sup>,籽粒脱水慢等问题<sup>[25]</sup>。PHB1M(图1(b))<sup>[26]</sup>是先玉696父本,是当前应用较多的先锋自交系之一,雄穗分支较少,株高、穗位较高,茎秆坚硬,节间数少,节间较长,叶片稀疏,主要通过自身节间长影响杂交种株高与穗位高的。

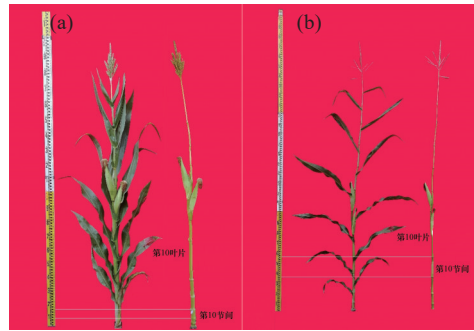


图1 昌7-2(a)、PHB1M(b)的整株图

缩短节间长与减少节间数可以降低株高、穗位高,降低重心,提高抗倒伏能力<sup>[18]</sup>。本研究选取杂种优势方向基本一致,共同优点多,株型相关性状互补的昌7-2与PHB1M双亲 $F_{2:3}$ 群体,利用SLAF-seq技术,以黄早四为参考基因组<sup>[27]</sup>,绘制高密度遗传图谱,对5个株型相关性状进行QTL定位,为双亲株型相关性状的改良与分子标记辅助选择(MAS)育种提供理论支撑。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

试验材料包括父本昌7-2(郑单958父本)、母本PHB1M(先玉696父本)及138份 $F_{2:3}$ 群体。

### 1.2 试验设计

试验在内蒙古呼和浩特市和林格尔县盛乐镇和林格尔县农业综合开发技术研究中心进行。年平均气温为9.5~10.9℃,降雨量约为350 mm,无霜期约135 d。2017年以昌7-2为父本,PHB1M为母

本, 杂交获得  $F_1$  种子。2018 年, 种植  $F_1$ , 经自交后得到  $F_2$ 。2019 年, 将随机选取的  $F_{2,3}$  家系与双亲及  $F_1$  种子按株行种植, 种植密度为 4000 株/亩 (E1) 与 8000 株/亩 (E2), 随机区组设置, 各 2 次重复, 每重复 1 行, 行长 4 m, 行距 50 cm。田间灌溉采取膜下滴灌方式, 全生育期间滴水 6 次, 分别为播种后 1 d、苗期、拔节期、抽雄期、灌浆期、乳熟期。E1、E2 用于表型性状调查, E2 的家系分单行混合取样。

### 1.3 试验方法

#### 1.3.1 性状调查

在  $F_{2,3}$  家系苗期, 对 E2 的家系分单行混合取样, 并迅速投入液氮中, 然后存放在  $-80^{\circ}\text{C}$  超低温冰箱保存。用油漆标记每行所有单株的第 5 片与第 10 片叶, 在测数据时统计叶片数、成株节间数、株高、穗位高等相关性状。

#### 1.3.2 CTAB 法提取叶片组织总 DNA

DNA 参照高风云方法<sup>[28]</sup>。

#### 1.3.3 SLAF 文库构建和高通量测序

根据玉米基因组<sup>[27]</sup>大小以及 GC 含量等信息, 最终选取黄早四基因组作为参考基因组进行酶切预测。所用参考基因组下载地址: <https://bigd.big.ac.cn/search?dbId=gwh&q=HuangZaoSi&page=1>。

选择 HaeIII 酶切组合, 酶切片段长度在 314 ~ 364 bp 的序列定义为 SLAF 标签, 对检测合格的各样品基因组 DNA 分别进行酶切实验<sup>[7]</sup>。

#### 1.3.4 SLAF-seq 数据分析和绘制高密度遗传图谱

利用 Dual-index 对测序得到的原始数据进行识别, 得到各个样品的 reads。对过滤完接头的测序 reads 进行测序质量和数据量的评估。通过 Control 数据的比对效率评估酶的酶切效率, 判断实验

过程的准确性和有效性。通过 reads 比对基因组的方法, 在亲本和子代中开发 SLAF 标签, 寻找多态性的 SLAF 标签<sup>[7]</sup>。对多态性的 SLAF 标签进行基因型编码后, 通过 HighMap 作图软件<sup>[29]</sup>, 构建遗传图谱, 进行图谱评估。

#### 1.3.5 数据分析与 QTL 定位

利用 SPSS 19.0 对所调查株高、穗位高、叶片数、节间数与平均节间长进行描述性统计分析。利用已经构建好的玉米  $F_{2,3}$  SLAF 标记遗传连锁图谱, 采用 R/QTL 定位软件检测表型变量与图谱标记间的关联关系, 运用复合区间作图法 (CIM) 进行 QTL 定位。每一个性状的 QTL 定位, 采用重复抽样 1000 次的排列测验来决定 LOD 值的临界值, 从总体数据来确定 LOD 值的取舍<sup>[30]</sup>。则参照前人提出的命名原则进行<sup>[31]</sup>。在本研究中以 qPH1-1-1 为例, q 表示 QTL, PH 表示定位的株高性状, 1 表示环境 1 (E1), 2 表示环境 2 (E2), 短线后的数字 1 表示染色体, 再短线后 1 数字表示该 QTL 的序号。

## 2 结果与分析

### 2.1 SLAF-seq 数据分析

经 SLAF 文库构建和高通量测序, 共获得 1100759016 个 reads 数据, 其中, 来自昌 7-2 的 reads 数量为 31294372 个, 来自 PHB1M 的 reads 数量为 25496455 个,  $F_{2,3}$  群体的 138 个子代的平均 reads 数值为 7564986 (表 1)。昌 7-2 测序质量值 (Q30) 为 96.65%, GC 含量为 48.66%; PHB1M 测序 Q30 为 96.64%, GC 含量为 48.78%; 子代测序平均 Q30 为 96.06%, GC 含量为 48.84%; 总体测序平均 Q30 为 96.07%, GC 含量为 49.53% (表 1)。

表 1 亲本和子代的测序数据统计

样品	总 Reads	总 Bases	Q30 百分比/%	GC 百分比/%
昌 7-2	31294372	6944620842	96.65	48.66
PHB1M	25496455	5841369636	96.64	48.78
子代*	7564986	1717075786	96.06	48.84
总计	1100759016	249742449042	96.07	49.53

注: \* 表示子代测序数据的平均值。

昌7-2的SLAF标签数为421226,对应的reads数为17678520,平均测序深度为41.97×;PHB1M的SLAF标签数为298819,对应的reads数为11240750,平均测序深度为37.62×;SLAF标签亲本平均测序深度为39.80×。子代的平均SLAF标签数为341019,对应的平均reads数为3663469,平均测序深度为10.74×(表2)。

表2 亲本和子代的SLAF标签数及其测序深度

样品	SLAF数	Reads数	平均深度
昌7-2	421226	17678520	41.97×
PHB1M	298819	11240750	37.62×
子代*	341019	3663469	10.74×

注: \*表示子代测序数据的平均值。

### 2.2 SLAF 标签分析

根据等位基因数和基因序列之间的差异进行多态性分析,SLAF标签可分为Polymorphic型、Non-Polymorphic型和Repetitive型3类。本研究共开发554687个SLAF标签,其中多态性SLAF标签有108843个,占比19.62%;Non-Polymorphic SLAF标签有445322个,占比80.29%;Repetitive SLAF标签522个,占比0.09%(表3)。根据遗传学通用的2等位编码规则对多态性SLAF标签进行编码基因型(图2),有77644个标签成功编码,其中符合F<sub>2:3</sub>群体特征的有效标签(aa×bb基因分离类型)为68557个,亲本的有效多态性为12.36%。为保证遗传图谱质量,选择测序深度10×以上的亲本纯合的有效标签,筛选出7149个SLAF标签用于制作图谱。

表3 SLAF标签类型统计分析

类型	数量	百分比/%
多态性SLAF	108843	19.62
非多态性SLAF	445322	80.29
重复性SLAF	522	0.09
总SLAF	554687	100

注: \*表示子代测序数据的平均值。

### 2.3 高密度遗传图谱的构建

通过与参考基因组的定位,将SLAF标签分为10个连锁群,通过两两标签之间计算MLOD值<sup>[32]</sup>,将筛选出的7149个SLAF标签,过滤掉与其他

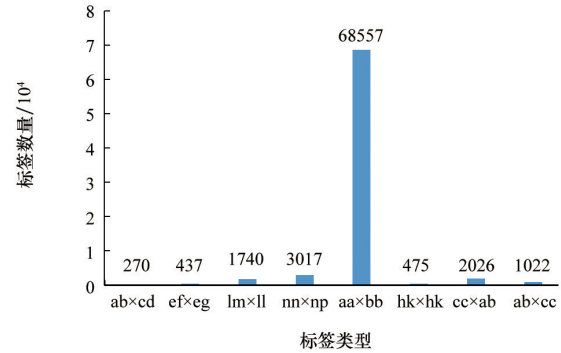


图2 8种基因分离方式的SLAF标签数量

SLAF标签的MLOD值均低于3的标签,共上图4220个,定义为上图标记(marker)。昌7-2和PHB1M上图marker都是4220个,标记总深度和分别为159255和133045,标记平均深度分别为37.74×和31.53×;每个子代上图marker的平均数为3933个,标记平均深度为7.89×(表4)。

表4 上图标记深度

样品	标记数量	总深度	平均深度/×
昌7-2	4220	159255	37.74
PHB1M	4220	133054	31.53
子代*	3933	31020	7.89

注: \*表示子代测序数据的平均值。

本研究构建的遗传图谱包含4220个marker,覆盖10个连锁群(10条染色体),总图距为1354.81 cM,标记间的平均图距为0.32 cM。经序列分析发现,4220个上图标记中包含了7876个SNP(表5)。从表5和图3可知,chr9连锁图图距最长(169.55 cM),上图marker最多(384个),标记间平均距离为0.44 cM;chr8连锁图图距最短(95.60 cM),上图marker 382个,标记间平均距离为0.25 cM;标记间最大距离为13.01 cM,位于Chr1。本研究中,10个连锁群的Spearman相关系数均达0.99以上,表明10个连锁群的图谱与物理图共线性都很好(表5)。

### 2.4 株型相关性状表型分析

在E1与E2 2个密度下,分别对昌7-2、PHB1M与其F<sub>2:3</sub>群体的株高、穗位高、叶片数、节间数与平均节间长等性状进行测定。通过比较2个亲本与F<sub>2:3</sub>群体表型发现,除穗位没有差异,其他4个性状均存在极显著差异。其中,昌7-2的总叶片数与总

表5 10个连锁群基本信息统计

连锁图谱编号	标记数	距离/cM	平均距离/cM	最大间距/cM	间距小于5 cM/%	SNP数	Spearman系数
LG1	469	163.32	0.35	13.01	99.57	875	1
LG2	342	168.52	0.49	2.72	100.00	876	1
LG3	461	150.84	0.33	5.22	99.78	813	0.999
LG4	503	108.27	0.22	11.25	99.60	940	0.999
LG5	428	150.79	0.35	4.78	100.00	723	1
LG6	430	117.83	0.27	12.41	99.77	786	0.998
LG7	354	123.43	0.35	6.13	99.72	662	0.995
LG8	382	95.6	0.25	4.78	100.00	672	0.999
LG9	384	169.55	0.44	3.49	100.00	717	1
LG10	467	106.66	0.23	5.22	99.79	812	0.999
总计	4,220	1,354.81	0.32	13.01	99.82	7,876	



图3 玉米高密度连锁图

节间数极显著高于PHB1M,株高与平均节间长极显著低于PHB1M。在E1中,总叶片数均比E2中多,株高、穗位、平均节间长均比E2中少,总节间数双亲比E2中多,F<sub>2:3</sub>比E2中少(表6)。

F<sub>2:3</sub>群体中,E1与E2中峰度与偏度绝对值均小

于1,说明F<sub>2:3</sub>群体在2个密度下均呈正态分布,适合相关性状的QTL定位。E1中变异系数在4.96%~15.03%,E2中变异系数在4.82%~13.61%。E1中的株高、穗位、平均节间长的最大值与最小值均小于E2中值(表6)。

表6 F<sub>2,3</sub>群体表型性状描述统计分析

样品	总叶片数/个		株高/cm		穗位/cm		平均节间长/cm		总节间数/个		
	E1	E2	E1	E2	E1	E2	E1	E2	E1	E2	
亲本	昌7-2	21.86±	21.41±	210.67±	221.50±	115.83±	132.06±	13.88±	14.87±	15.18±	14.91±
		0.35A	0.13A	9.34C	12.98C	6.27A	19.74a	0.71C	0.90C	0.59A	0.61A
	PHB1M	18.17±	18.11±	289.53±	307.66±	118.06±	133.00±	23.79±	25.42±	12.17±	12.11±
		0.62C	0.27C	16.44A	9.26A	9.07A	7.08a	0.49A	1.11A	0.62C	0.27C
	均值	20.16±	20.11±	257.32±	274.53±	114.89±	132.69±	18.87±	19.69±	13.69±	13.98±
标准差	1.00	0.97	18.69	18.33	17.26	18.06	1.38	1.43	1.00	0.94	
F <sub>2,3</sub> 群体	最小值	18.17	17.33	204.42	205.33	74.42	81.17	14.90	15.85	11.17	11.33
	最大值	22.83	22.33	300.67	312.89	162.33	175.67	22.47	22.96	16.33	16.33
	偏度	0.20	-0.17	-0.12	-0.43	0.19	-0.01	-0.27	0.05	0.18	-0.11
	峰度	-0.51	-0.15	-0.09	0.69	-0.11	-0.27	0.09	-0.27	-0.32	0.01
	变异系数/%	4.96	4.82	7.26	6.68	15.03	13.61	7.33	7.26	7.28	6.69

注:相同性状不同大写字母表示相互之间存在极显著差异(P<0.01)。

### 2.5 QTL定位分析

在E1与E2 2个密度下,5个性状共检测到10个QTL,每个性状均检测到2个QTL,贡献率的变幅为5.792%~24.052%,其中贡献率超过10%的QTL有7个,表明株型相关性状受多个主效QTL控制(表7)。与QTL关联的SLAF标记共有61个(表

8)。QTL位点对应的SNP标记数都超过2个,有的甚至达到13个(如qMIL-2-LG8)。在E2密度中,qLC-2-LG8与qIC-2-LG8均定位在第8染色体的59.271~59.636 cM,为主效QTL,减效等位基因来源于PHB1M,共有标记为SLFA7305498和SLFA6717271。

表7 农艺性状、连锁群、QTL定位、基因效应及贡献率

性状	LG	QTL	基因组区域/cM		MaxLOD	加性效应	贡献率
			起始	终止		ADD	PEV/%
总叶片数	8	qLC-1-LG8	54.848	55.213	7.176	-0.423	16.964
LC	8	qLC-2-LG8	59.271	59.636	8.96	-0.473	23.075
株高	5	qPH-1-LG5	45.949	45.949	4.234	5.72	9.105
PH	5	qPH-2-LG5	40.324	40.689	3.561	5.538	8.868
穗位	3	qEH-1-LG3	101.998	102.728	7.319	-8.021	19.799
EH	3	qEH-2-LG3	102.728	103.093	5.04	-7.638	16.69
平均节间长	5	qMIL-1-LG5	27.281	27.646	2.841	0.34	5.792
MIL	8	qMIL-2-LG8	62.202	62.932	6.508	0.589	15.318
总节间数	8	qIC-1-LG8	37.968	38.698	6.789	-0.48	20.21
IC	8	qIC-2-LG8	59.271	59.636	9.471	-0.493	24.052

表8 农艺性状QTL及其对应的连锁群和SLAF标记

性状	LG	QTL	SLAF数目	SLAF编号(Marker NO.)
总叶片数	8	qLC-1-LG8	7	6743254;7765636;7873782;7828880;7793896;8079367;8042850
LC	8	qLC-2-LG8	5	7305498;6717271;7103179;7285143;7945333
株高	5	qPH-1-LG5	3	2254449;1446513;2661963
PH	5	qPH-2-LG5	2	2801721;2115362

表8 农艺性状QTL及其对应的连锁群和SLAF标记(续)

性状	LG	QTL	SLAF数目	SLAF编号(Marker NO.)
穗位	3	qEH-1-LG3	7	13174428;12967171;14019594;13793231;13934970;12973115;12552388
EH	3	qEH-2-LG3	2	12552388;12465648
平均节间长	5	qMIL-1-LG5	6	1683188;1802877;2185417;1834983;2343078;2628644
MIL	8	qMIL-2-LG8	13	7613601;7866309;7923731;6970374;8109232;7031541;8202938;7121501;7056437;6729919;8068745;7500509;7813213
总节间数	8	qIC-1-LG8	11	7671860;6827920;7955811;7929317;7570171;8237130;7768956;6961389;7678547;7001467;6727067
IC	8	qIC-2-LG8	5	7103179;7305498;6717271;7285143;7945333

总叶片数QTL定位在第8染色体上,分别为qLC-1-LG8、qLC-2-LG8,均为负加性效应,为主效QTL,其减效等位基因来源于PHB1M;株高QTL定位在第5染色体上,分别为qPH-1-LG5、qPH-2-LG5,均为正加性效应,为微效QTL,其增效等位基因来源于PHB1M。穗位QTL定位在第3染色体上,分别为qEH-1-LG3、qEH-2-LG3,均为负加性效应,为主效QTL,其减效等位基因来源于昌7-2。总节间数QTL均分布在第8染色体上,分别为qIC-1-LG8、qIC-2-LG8,均为负加性效应,为主效QTL,其减效等位基因来源于PHB1M。平均节间长QTL分别分布在第5、8染色体上,分别为qMIL-1-LG5、qMIL-2-LG8,均为正加性效应,第8染色体上为主效QTL,其增效等位基因来源于PHB1M。

### 3 讨论

#### 3.1 高质量、高密度遗传图谱构建

高密度遗传连锁图谱在遗传学与基因组学研究中非常重要,特别是对于基因的精细定位、基于图谱的基因克隆与目标QTL的标记辅助选择。现在虽然可以进行快速定位方法很多,如QTL-seq、BSA-seq、BSR-seq等,普遍存在研究性状单一, PVE缺乏或不准确等情况<sup>[1]</sup>,且在设计研究方案时也需要了解目标性状的PVE等基本遗传信息。因此,高质量、高密度遗传图谱的构建是目标性状遗传解析的基础。Liu等<sup>[33]</sup>利用SLAF-seq,以abe2与B73的300个F<sub>2</sub>群体为材料,构建了总长度为2123 cM,标记间平均距离为0.46 cM的高密度遗传图

谱。与BSR-seq结合快速定位到稳定表达的穗行数QTL qKRN8-1。两种方法结合可以用于目标性状的精细定位与MAS。Wu等<sup>[34]</sup>利用以M03和M08甜玉米自交系的148个BC<sub>4</sub>F<sub>3</sub>群体构建了全长2413.25 cM、包含3876个SNP标记、标记间平均距离0.62 cM的高密度遗传图谱,结合2个生长季的数据定位到一个稳定的QTL,结合功能注释筛选到4个可能与人工老化后种子活力有关的候选基因。王天宇课题组利用GBS测序完成了以黄早四为共同亲本的中国玉米NAM群体<sup>[35]</sup>的基因型鉴定,并构建了包含4932个标记的高密度遗传图谱,标记间平均距离为0.34 cM<sup>[36]</sup>,以此为基础,定位到5个雄穗QTL一致性区间在3个群体中可稳定表达<sup>[35]</sup>,分别定位到在多环境下稳定表达的5个株高、4个穗位高“环境钝感QTL”。此外,进一步鉴定出5个重要的株高和穗位高QTL富集区段<sup>[37]</sup>,鉴定出了近1000个与开花时间相关的SNPs<sup>[38]</sup>,鉴定到365个与干旱相关性状相关的SNPs<sup>[39]</sup>,定位到11个来自黄早四的具有较低遗传重组率等位变异,且表现为增产的重要产量相关基因组区段<sup>[40]</sup>,这些结果为相关性状分子标记辅助选择、精细定位及基因克隆提供了基本依据。

本研究以中国唐四平头地方种质资源的骨干系黄早四为参考基因组,开发了4220个多态性SLAF标签作为上图标记,以昌7-2与PHB1M及其138个F<sub>2,3</sub>群体为材料,构建了一张总图距为1354.81 cM,标记间的平均距离为0.32 cM的高密度遗传图谱。该图谱将为双亲株型相关性状的QTL定位与MAS育种提供理论支撑。

### 3.2 构建遗传连锁图谱群体的材料选择

构建遗传连锁图谱的材料选择与研究目标有着密切关系<sup>[41]</sup>。不同材料的选择对于构建图谱精度、QTL定位、标记辅助选择以及其他遗传学研究与应用有着显著影响。在玉米育种中,将构建连锁图谱的群体与当前玉米育种利用的骨干自交系的选系基础相结合,可以加快连锁图谱试验结果在育种工作中的应用。

中国玉米种质资源相对狭窄,外国杂交种在中国的审定推广为中国提供了获得优良玉米种质资源的途径<sup>[26]</sup>,利用国外引进资源与国内种质资源改良,可以快速实现有利基因的融合,然而,温带种质连锁不平衡(linkage disequilibrium, LD)衰退速度慢<sup>[42]</sup>,通过常规育种实现目标性状的重组困难较大。同时,在玉米育种中,育种材料的前景选择与背景选择同等重要,很多时候背景选择更重要<sup>[43]</sup>。黄早四是中国重要地方种质资源唐四平头的骨干系,黄早四及其衍生系配制的杂交种玉米种植面积占到中国总面积的2/3。其衍生系扎461、吉853、K12、Lx9801、京92、昌7-2在中国玉米生产中发挥了重要的作用。其中,昌7-2组配的郑单958,累计推广面积8.68亿亩,横亘20年依然占居市场主要位置<sup>[44]</sup>,对中国玉米种子产业产生重要影响<sup>[21]</sup>。昌7-2的雄穗分支多,株高较矮,穗位系数高,节间数多,节间短<sup>[45]</sup>,叶片稠密,产量GCA高,组配出杂交种具有果穗均匀,封顶性好,耐密性、综合抗性与适应性突出<sup>[22-23]</sup>等优点,在玉米育种中,作为轮回亲本可以持续改良其他性状,不断巩固国内杂优模式;作为短节间性状的供体亲本,可以将唐四平头种质的适应性等优点一起导入外来种质资源中,改善外来资源的株型结构与适应性。PHB1M<sup>[26]</sup>是先玉696父本,是当前应用较多的先锋自交系之一,雄穗分支较少,株高、穗位较高,茎秆坚硬,节间数少,节间较长,叶片稀疏,对杂交种株高与穗位高主要通过自身节间长影响的。二者在株型相关性状之间具有显著的差异,为目标性状的QTL定位提供了充分的表型变异。育种实践表明,PHB1M与昌7-2的改良中,前者降株高、穗位高,后者降穗位高、降重心成功率很低。因此,以昌7-2×PHB1M的

F<sub>2:3</sub>群体构建高密度遗传连锁图谱,对株型相关性状研究,将遗传研究与育种工作同步进行,可以加快遗传研究对育种工作的指导。

### 3.3 利用高密度遗传连锁图谱定位株型相关性状

株高、穗位、节间数、叶片数与平均节间长是玉米株型的重要组成部分,具有高遗传力<sup>[7-14]</sup>。Pan等<sup>[8]</sup>利用10个多遗传背景的RIL群体对玉米株型进行了全面的遗传解剖,鉴定到的株高、穗位高QTL在玉米10条染色体均有分布,穗上叶片数与穗下叶片数QTL主要在第1、2、6、8、9染色体上分布。Zhou等<sup>[9]</sup>利用RIL群体及其与昌7-2、MO17分别配制的杂交群体解析株高、穗位、节间数的配合力遗传基础。在RIL群体检测到的16个QTL中,有7个影响GCA,说明GCA和性状是由不同的基因座控制。在35个对杂交种影响的QTL中,有57.1%的加性/GCA效应QTL重叠,28.5%的非加性/SCA效应QTL重叠,表明在该设计中,由SCA效应引起的杂交种变异占比较小。这些QTL分布在10条玉米染色体上,其中5号染色体和10号染色体上有2个QTL热点。李丹<sup>[13]</sup>对玉米与大刍草的BC<sub>2</sub>S<sub>3</sub>RIL群体研究,总叶片数广义遗传力较高,并由多个微效QTL控制,其中,qTLN8-1的PVE最大,为9.8%。因此,株型相关性状在不同遗传群体存在着较大的遗传差异。本研究检测到10个与株型相关的QTL中,有7个PVE贡献率超过了10%;除了平均节间长,其他4个性状在两个密度下均定位在同一染色体的相邻位置;总叶片数与总节间数在两个密度下均定位在8号染色体上,说明二者之间有着共同的遗传机制。株高与平均节间长的增效等位基因来自PHB1M,总叶片数与总节间数的减效等位基因来自PHB1M,穗位高的减效等位基因来自昌7-2。因此,依据各性状的加性效应值与PVE贡献率,有机会选育出具有PHB1M的总叶片数、总节间数,具有昌7-2的株高与穗位高、平均节间长较短的自交系。

以骨干自交系的选系群体为基础,研究目标性状的遗传特性,找到与株型相关性状紧密连锁标记,可为精准株型育种提供支撑。本研究找到5个性状的10个QTL关联的61个SLAF标记,QTL位点

对应的 SNP 标记数都超过 2 个。在 E2 密度中, qLC-2-LG8 与 qIC-2-LG8 均定位在第 8 染色体的 59.271 ~ 59.636 cM, 为主效 QTL, 减效等位基因来源于 PHB1M, 共有标记为 SLFA7305498 和 SLFA6717271, 可为叶片数与节间数性状的 MAS 提供理论支撑。

## 4 结论

利用 SLAF-seq 技术, 依据玉米黄早四参考基因组信息, 对昌 7-2 与 PHB1M 及其 138 个  $F_{2:3}$  群体高通量测序, 以 4220 个高质量 SLAF 标签 (7876 个 SNP) 作为上图标记, 共构建 10 个连锁群, 总图距为 1,354.81 cM, 标记间的平均距离为 0.32 cM。利用该图谱, 对株高、穗位、叶片数、节间数、平均节间长进行 QTL 定位, 共检测到 10 个 QTL 位点, 其中, 有 7 个 PVE 超过了 10%。叶片数、穗位、节间数为主效 QTL, 叶片数与节间数的减效等位基因来源于 PHB1M, 叶片数与节间数在两个密度下均定位在 8 号染色体上, 说明二者之间有着共同的遗传机制。与 QTL 关联的 SLAF 标记共有 61 个, 其中, SLFA7305498 和 SLFA6717271 为 qLC-2-LG8 与 qIC-2-LG8 共有标记。该图谱为自交系昌 7-2 与 PHB1M 之间差异性状的 QTL 定位与基本遗传信息的获得提供了支撑。以此为基础, 与 BSA-seq、RNA-seq 技术相结合, 为相关性状主效 QTL 的精细定位、候选基因的图位克隆、微效 QTL 的 SNP 位点开发以及 MAS 提供理论支撑。

### 参考文献 (References)

- [1] Zou C, Wang P, Xu Y. Bulk sample analysis in genetics, genomics and crop improvement[J]. *Plant Biotechnology Journal*, 2016, 14(10): 1941-1955.
- [2] Zhang J, Zhang Q, Cheng T, et al. High-density genetic map construction and identification of a locus controlling weeping trait in an ornamental woody plant (*Prunus mume* Sieb. et Zucc)[J]. *DNA Research*, 2015, 22(3): 183-91.
- [3] Lucito R, Nakimura M, West J A, et al. Genetic analysis using genomic representations[J]. *PNAS*, 1998, 95(8): 4487-92.
- [4] van Tassel C P, Smith T P, Matukumalli L K, et al. SNP discovery and allele frequency estimation by deep sequencing of reduced representation libraries[J]. *Nat Methods*, 2008, 5(3): 247-52.
- [5] Baxter S W, Davey J W, Johnston J S, et al. Linkage mapping and comparative genomics using next-generation RAD sequencing of a non-model organism[J]. *PLoS One*, 2011, 6(4): e19315.
- [6] Poland J A, Brown P J, Sorrells M E, et al. Development of high-density genetic maps for barley and wheat using a novel two-enzyme genotyping-by-sequencing approach [J]. *PLoS One*, 2012, 7(2): e32253.
- [7] Sun X, Liu D, Zhang X, et al. SLAF-seq: An efficient method of large-scale de novo SNP discovery and genotyping using high-throughput sequencing[J]. *PLoS One*, 2013, 8(3): e58700.
- [8] Pan Q, Xu Y, Li K, et al. The genetic basis of plant architecture in 10 maize recombinant inbred line populations [J]. *Plant Physiology*, 2017, 175(2): 858-873.
- [9] Zhou Z, Zhang C, Lu X, et al. Dissecting the genetic basis underlying combining ability of plant height related traits in maize[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2018, 9: 1117.
- [10] Li Z Q, Zhang H M, Wu X P, et al. Quantitative trait locus analysis for ear height in maize based on a recombinant inbred line population[J]. *Genetics and Molecular Research*, 2014, 13(1): 450-456.
- [11] Zheng Z P, Liu X H. Genetic analysis of agronomic traits associated with plant architecture by QTL mapping in maize[J]. *Genetics and Molecular Research*, 2013, 12(2): 1243-53.
- [12] Ku L X, Zhang L K, Tian Z Q, et al. Dissection of the genetic architecture underlying the plant density response by mapping plant height-related traits in maize (*Zea mays* L.)[J]. *Molecular Genetics & Genomic Medicine*, 2015, 290(4): 1223-1233.
- [13] 李丹. 玉米叶片数遗传结构的解析及目标 QTL 的克隆 [D]. 北京: 中国农业大学, 2015.
- [14] Zhou Z, Zhang C, Zhou Y, et al. Genetic dissection of maize plant architecture with an ultra-high density bin map based on recombinant inbred lines[J]. *BMC Genomics*, 2016, 17: 178.
- [15] 张世煌. 两个杂种优势列[J]. *种子科技*, 2015, 33(8): 6-7.
- [16] Peiffer J A, Romay M C, Gore M A, et al. The genetic architecture of maize height[J]. *Genetics*, 2014, 196(4): 4487-92.

- 1337-1356.
- [17] Li D, Wang X, Zhang X, et al. The genetic architecture of leaf number and its genetic relationship to flowering time in maize[J]. *New Phytologist*, 2016, 210(1): 256-268.
- [18] 郭海平, 孙高阳, 张晓祥, 等. 基于SSSL群体的玉米穗下节间长 QTL 分析[J]. *作物学报*, 2018, 44(4): 522-532.
- [19] 崔俊明, 赵博, 孙本栋, 等. YW-S 血缘玉米自交系昌 7-2 的选育及应用[J]. *杂粮作物*, 2003(4): 187-191.
- [20] 堵纯信, 曹春景, 曹青, 等. 玉米杂交种郑单 958 的选育与应用[J]. *玉米科学*, 2006(6): 43-45, 49.
- [21] 张世煌. 郑单 958 带给我们的创新思路和发展机遇[J]. *玉米科学*, 2006(6): 4-6.
- [22] 李潮海, 赵亚丽, 王小星, 等. 玉米昌 7-2 近缘系遗传多样性及其配合力分析[J]. *河南农业大学学报*, 2008(2): 150-154.
- [23] 孙贵星, 任雪娇, 杨巍, 等. 玉米“昌 7-2”遗传改良系及其组配杂交种的耐密性分析[J]. *吉林农业大学学报*, 2015, 37(2): 141-147, 165.
- [24] 王元东, 赵久然, 张华生, 等. “黄欧”系列玉米自交系宜机械粒收特征特性研究[J]. *植物遗传资源学报*, 2019, 20(6): 1554-1565.
- [25] 李璐璐, 明博, 谢瑞芝, 等. 玉米品种穗部性状差异及其对籽粒脱水的影响[J]. *中国农业科学*, 2018, 51(10): 1855-1867.
- [26] 王楠, 李穆, 路明, 等. 美国先锋公司玉米品种在我国的应用分析[J]. *作物杂志*, 2019(4): 24-29.
- [27] Li C, Song W, Luo Y, et al. The HuangZaoSi maize genome provides insights into genomic variation and improvement history of maize[J]. *Molecular Plant*, 2019, 12(3): 402-409.
- [28] 高凤云, 斯钦巴特尔, 张辉, 等. 基于 SLAF-seq 技术构建亚麻高密度遗传图谱[J]. *中国油料作物学报*, 2017, 39(3): 334-341.
- [29] Li R, Li Y, Kristiansen K, et al. SOAP: Short oligonucleotide alignment program[J]. *Bioinformatics*, 2008, 24(5): 713-714.
- [30] Churchill G A, Doerge R W. Empirical threshold values for quantitative trait mapping[J]. *Genetics*, 1994, 138(3): 963-971.
- [31] 席先梅. 基于导入系群体玉米遗传图谱构建及重要农艺性状 QTL 定位[D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2018.
- [32] Davey J W, Hohenlohe P A, Etter P D, et al. Genome-wide genetic marker discovery and genotyping using next-generation sequencing[J]. *Nature Reviews Genetics*, 2011, 12: 499-510.
- [33] Liu C, Zhou Q, Dong L, et al. Genetic architecture of the maize kernel row number revealed by combining QTL mapping using a high-density genetic map and bulked segregant RNA sequencing[J]. *BMC Genomics*, 2016, 17(1): 915.
- [34] Wu X, Feng F, Zhu Y, et al. Construction of high-density genetic map and identification of QTLs associated with seed vigor after exposure to artificial aging conditions in sweet corn using SLAF-seq[J]. *Genes (Basel)*, 2019, 11(1): 37.
- [35] 杨钊钊, 李永祥, 刘成, 等. 基于多个相关群体的玉米雄穗相关性状 QTL 分析[J]. *作物学报*, 2012, 38(8): 1435-1442.
- [36] Li C, Li Y, Bradbury P J, et al. Construction of high-quality recombination maps with low-coverage genomic sequencing for joint linkage analysis in maize[J]. *BMC Biology*, 2015, 13: 78.
- [37] 李清超, 李永祥, 杨钊钊, 等. 基于多重相关 RIL 群体的玉米株高和穗位高 QTL 定位[J]. *作物学报*, 2013, 39(9): 1521-1529.
- [38] Li Y X, Li C, Bradbury P J, et al. Identification of genetic variants associated with maize flowering time using an extremely large multi-genetic background population [J]. *Plant Journal*, 2016, 86(5): 391-402.
- [39] Li C, Sun B, Li Y, et al. Numerous genetic loci identified for drought tolerance in the maize nested association mapping populations[J]. *BMC Genomics*, 2016, 17(1): 894.
- [40] 李永祥, 李春辉, 杨俊品, 等. 中国玉米骨干亲本黄早四杂种优势形成的遗传基础解析[J]. *中国农业科学*, 2020, 53(20): 4113-4126.
- [41] 阮成江, 何祯祥, 钦佩. 中国植物遗传连锁图谱构建研究进展[J]. *西北植物学报*, 2002(6): 246-256.
- [42] Lu Y, Shah T, Hao Z, et al. Comparative SNP and haplotype analysis reveals a higher genetic diversity and rapider LD decay in tropical than temperate germplasm in maize[J]. *PLoS One*, 2011, 6(9): e24861.
- [43] 徐云碧. 分子植物育种[M]. 北京: 科学出版社, 2014: 292-293.
- [44] 佟屏亚. 横亘 20 年郑单 958 依然市场唱主角[J]. *种子科技*, 2020, 38(21): 1-2.
- [45] 尚圻圻, 张德贵, 王凯欣, 等. 我国玉米自交系茎秆性状多样性分析[J]. *植物遗传资源学报*, 2020, 21(2): 321-329.

## Construction of high-density genetic linkage map of maize based on SLAF-seq and QTL mapping of plant architecture traits

XUE Chunlei<sup>1,2</sup>, WU Hui<sup>3</sup>, LU Xiaoping<sup>1\*</sup>, HAN Pingan<sup>2</sup>, SUN Fengcheng<sup>2</sup>, ZHANG Laihou<sup>2</sup>

1. Agricultural College, Inner Mongolia Agricultural University, Hohhot 010018, China
2. Maize Research Institute, Inner Mongolia Academy of Agricultural & Animal Husbandry Sciences, Hohhot 010031, China
3. Agricultural Comprehensive Development Technical Research and Evaluation Center of Hellingeer County, Hohhot 011500, China

**Abstract** The plant architecture directly determines the biological yield, the planting density and the grain yield. The genetic mechanisms of the plant architecture related traits are analyzed in this paper by using the high-density genetic linkage map of the maize. This map is of great significance for breeding new maize varieties of ideal plant type. To develop high-throughput SNP markers for the high quality map from Chang 7-2 × PHB1M, and the map QTL of the plant type related traits, 2 parents and 138 individuals of their  $F_{2:3}$  population are detected by the SLAF-seq technology. The results are used to construct a high-density genetic map with a total distance of 1354.81 cM, an average distance of 0.32 cM between markers, and with 4220 SLAF (7876 SNPS) as markers. With the densities of E1 and E2, QTL is mapped for the plant height, the ear height, the leaf count, the internode count and the average internode length. A total of 10 QTLs are detected, and the PVE of 7 QTLs exceeds 10%. The leaf count, the ear height and the internode number are the major QTLs and the ADD is negative. The decreasing effect alleles of the leaf count and the internode count are from PHB1M, and the ear height is from Chang 7-2. The leaf count and the internode count are located on the chromosome 8 at both densities, showing that they have a common genetic mechanism. There are a total of 61 SLAF markers associated with the QTL, among which SLFA7305498 and SLFA6717271 are the common markers of qLC-2-LG8 and qIC-2-LG8. This study provides a support for the marker-assisted selection of the plant architecture traits.

**Keywords** maize; SLAF-seq technology; high-throughput sequencing; high-density genetic linkage map; plant architecture ●



(责任编辑 徐丽娇)