生物技术通报
· 研究报告 · BIOTECHNOLOGY BULLETIN 2026, 42(10):55-66

基于WGCNA的玉米雄穗耐热相关共表达模块鉴定和核心基因发掘

秦天元 吕玉平 阿不来提·阿布拉 韩登旭 董远 张雪 杨杰*
（新疆维吾尔自治区农业科学院作物研究所，乌鲁木齐 830091）

摘 要： 【目的】挖掘玉米中与热胁迫调控通路、抗逆指标紧密相关的核心基因，为解析玉米耐热机理提供新方向。【方法】选用耐热性较强的自交系PHBA6和热敏感自交系吉63为材料，分别在田间和温室条件下种植，于开花前期实施热胁迫处理。基于转录组测序分析，系统比较热胁迫条件下2种基因型雄穗的分子响应特征。【结果】在PHBA6中共鉴定1 288个差异表达基因，在吉63中共鉴定到912个差异表达基因。进一步通过加权基因共表达网络分析（weighted gene co-expression network analysis, WGCNA）构建与抗逆表型性状相关的基因共表达网络，共鉴定出15个与雄穗耐热性显著相关的基因模块。其中，4个与目标性状相关性最高的模块中进一步筛选出一批潜在关键基因，这些基因主要涉及转录调控、蛋白稳态维持、活性氧代谢及胁迫信号转导等生物学过程。【结论】系统揭示了玉米雄穗在热胁迫下的关键调控网络特征，明确了一批与耐热性密切相关的核心基因及其潜在调控通路。

关键词： 玉米；热胁迫；加权基因共表达网络；转录组学
DOI: 10.13560/j.cnki.biotech.bull.1985.2025-1424

Identification of Heat-responsive Co-expression Modules and Mining of Hub Genes in Maize Tassel Based on WGCNA

QIN Tian-yuan LYU Yu-ping ABULAITI Abula HAN Deng-Xu DONG Yuan ZHANG Xue YANG Jie*
(*Institute of Crop Research, Academy of Agricultural Sciences of Xinjiang Uyghur Autonomous Region, Urumqi* 830091)

Abstract: 【Objective】To identify hub genes closely associated with heat stress regulatory pathways and stress-resistance traits, and to provide new insights into the molecular mechanisms underlying heat tolerance in maize (*Zea mays*). 【Method】A heat-tolerant inbred line, PHBA6, and a heat-sensitive inbred line, Ji63, were used as experimental materials. Plants were grown under both field and greenhouse conditions, and heat stress was imposed at the early flowering stage. Based on transcriptome sequencing, the molecular response characteristics of tassels from the two genotypes under heat stress were systematically compared. 【Result】A total of 1 288 differentially expressed genes (DEGs) were identified in PHBA6, whereas 912 DEGs were detected in Ji63 under heat stress. Weighted gene co-expression network analysis (WGCNA) was further performed to construct gene co-expression networks associated with stress-resistance phenotypic traits, resulting in the identification of 15 gene modules significantly correlated with tassel heat tolerance. Among them, four modules showing the strongest correlations with target traits were selected, and a set of potential key genes was screened. These genes were mainly involved in biological processes such as transcriptional regulation, protein homeostasis maintenance, reactive oxygen species metabolism, and stress signal transduction. 【Conclusion】This study systematically reveals the key regulatory network characteristics of maize tassels under heat stress and identifies a group of hub genes closely associated with heat tolerance and their potential regulatory pathways.

Keywords: maize; heat stress; weighted gene co-expression network; transcriptome

收稿日期：2025-12-26
基金项目：新疆维吾尔自治区“天池英才”项目，新疆维吾尔自治区农业科学院稳定支持（xjnkywdzc-2024003-13，xjnkywdzczc-2025001-43），新疆维吾尔自治区重大科技专项（2024A02003-2），新疆维吾尔自治区重点研发计划（2024B02008-1），新疆维吾尔自治区“天山英才”项目
*通信作者：杨杰 155165876@qq.com

玉米（*Zea mays*）是我国种植面积最大的粮食作物之一，不仅是保障国家粮食安全的重要作物，同时也是重要的动物饲料来源、工业加工原料及生物质能源载体，在农业生产、畜牧养殖和能源开发等领域均具有不可替代的战略地位[1-2]。保证玉米正常生产，对于保障我国粮食安全、推动农业产业升级及支撑经济社会可持续发展具有重要的战略意义与实践价值[3]。

新疆地处我国西北边陲、欧亚大陆腹地，属典型的干旱半干旱大陆性气候区，光热资源丰富，且昼夜温差显著，为作物生长提供了独特的气候条件[4]。小麦、玉米与水稻作为新疆地区三大大宗粮食作物，其适种范围广泛，覆盖全疆绝大多数区域，三者播种面积合计占粮食作物总播种面积的90%以上[5]。受全球气候变化的影响，高温和热胁迫已成为限制玉米等作物生产的最严重自然灾害之一，对粮食安全构成重大威胁[6]。近年来，新疆地区降水稀少且蒸发量大，日最高气温≥35 ℃的酷热日数呈逐年递增趋势，对玉米生长发育构成显著威胁[7]。在田间，玉米花药经常不能露出颖壳，不能开裂散粉而形成“实药”，雄穗干枯产生“干梢”或“白灼”，严重时甚至完全干枯，玉米雄穗“干梢”现象频发，最终导致田间花粉量减少或不育，花粉活力降低，在此类高温干旱复合胁迫下，玉米在抽雄吐丝等关键生育期极易发生花粉活力下降、授粉受阻及结实率降低，严重时可导致大幅减产甚至绝收[7]。因此，深入剖析玉米耐热相关性状的遗传基础，挖掘耐热基因，培育耐热稳产玉米新品种，对于促进农业可持续发展，提升农户经济收益水平，筑牢国家粮食安全防线均具有重要的理论价值与实践意义[8]。

在响应热胁迫的过程中，玉米植株的正常生长及细胞内代谢过程受到干扰，引起产量和品质下降，严重的甚至导致死亡[9-11]。近年来，利用遗传学、分子生物学和多组学等手段，在玉米中相继克隆了一些与热胁迫响应相关的基因，如热激转录因子ZmHSF08通过结合并抑制*ZmUGT92A1*基因的表达，负调控玉米的耐热性。过表达*ZmHSF08*导致玉米耐热性降低，而过表达*ZmUGT92A1*则提高了玉米的耐热性[12]。ZmHSF20通过抑制*ZmHSF4*和纤维素合成酶基因*ZmCesA2*的表达，降低纤维素合成，削弱细胞壁稳定性，从而降低耐热性。在*Zmhsf20*突变体中，*ZmHSF4*和*ZmCesA2*表达上调，增强纤维素合成，提高细胞壁稳定性，增强耐热性[13]。bZIP60能激活关键热激转录因子基因*HSFTF13*的表达，进而上调热激蛋白HSP的转录水平，正向调控植物热激反应；相反，在高温胁迫条件下，*bzip60*突变体中*HSP*基因的正常上调表达受到显著抑制，导致植物对高温的热激反应明显钝化[14-15]。玉米热休克因子A2（ZmHSFA2）与热休克结合蛋白2（ZmHSBP2）可发生相互作用，二者拮抗调控半乳糖醇合成酶2（*ZmGOLS2*）基因的表达和棉子糖生物合成[16]。因此，解析玉米响应热胁迫的遗传与分子机制，改善植株生理生化指标，有利于保证玉米在热胁迫条件下的正常生产。

尽管目前玉米中已克隆鉴定出多个与耐热相关的基因，但多数研究仍停留在单基因功能验证或表型层面，对其调控网络、作用机制及生殖阶段特异性功能缺乏系统解析。特别是在雄穗发育等关键产量形成时期的耐热分子机制研究仍较为薄弱。同时，部分已报道基因在不同遗传背景中的稳定性和育种利用价值尚未充分验证，限制了其在生产实践中的推广应用。因此，有必要深入挖掘关键调控因子，解析其分子机制与调控网络，为玉米耐热分子设计育种提供理论依据和基因资源。

本研究以耐热差异明显的玉米自交系PHBA6和吉63为试验材料，进行田间和温室大棚的热胁迫处理，取其雄穗进行转录组测序，结合表型指标和产量数据，借助加权基因共表达网络分析（weighted gene co-expression network analysis, WGCNA）构建基因共表达网络，并将获得的基因模块与表型数据及产量数据开展关联分析，挖掘与热胁迫调控通路、抗逆指标紧密相关的核心基因，为玉米耐热机理的深入解析提供新方向。

1 材料与方法

1.1 材料

选择2个生育期相同、耐热差异明显的玉米自交系PHBA6（PHZ51×PHG47）和吉63［（127-32×铁84）（W24×W20）辐）］为材料（表1），PHBA6和吉63的种子由新疆维吾尔自治区农业科学院作物

表1　试验材料

Table 1　Experimental materials

自交系 Inbred line	母本 Maternal parent	父本 Paternal parent
PHBA6	PHZ51	PHG47
吉63	(127-32×铁84)	(W24×W20)辐

研究所玉米遗传育种与栽培创新团队提供。

1.2　*方法*

1.2.1　试验设计　试验地位于新疆维吾尔自治区农业科学院安宁渠综合试验场（43°58′53.38"N，87°30′17"E）。采用完全随机区组设计，因子为品系（PHBA6、吉63）与生长环境/处理（田间常温对照、温室高温胁迫），共2×2处理组合。高温处理通过温室控温方式施加，田间自然生长条件作为常温对照，除温度处理外，各处理在播种时间、出苗、间苗、施肥、灌溉及病虫害防治等农艺管理措施上保持一致，尽量降低非温度环境因素对试验结果的影响。每个处理设置3个生物学重复，每个重复由10株单株独立栽培。小区栽培密度为行距55 cm×株距20 cm，每小区至少栽培30株，以满足取样及后续表型测定需求。各处理内植株在小区随机分布，并进行随机取样。

在开花前期（雄穗可见膨大且尚未抽雄）施加热胁迫，以模拟热时段对雄穗发育的影响，温室设置为高温胁迫组，白天维持36-38 ℃（10-12 h），夜间维持26-28 ℃，胁迫持续10 d。田间自然生长温度为对照。热胁迫处理第5天时，于上午9：00-11：00统一采集雄穗组织，每个生物学重复从3-5株中各取1个完整雄穗，每个处理3个生物学重复，液氮速冻，-80 ℃保存备用。一部分用于转录组测序；一部分用于实时荧光定量PCR分析。穗长、穗粗和产量等农艺性状数据来源于同一处理和同一重复内未取样的其余植株，这些植株在相同处理条件下继续生长至成熟期，用于后期表型测定和关联分析。

1.2.2　转录组数据的获取与分析　在不同胁迫条件下，共采集12个样品［2个材料（PHBA6、吉63）×2个处理×3个重复］进行转录组测序。转录组数据分析采用玉米参考基因组B73（AGPv5）及其对应的基因注释文件作为参考序列，均从Ensembl Plants数据库下载（http://plants.ensembl.org/Zea_mays/Info/Index）。首先，使用Hisat2（版本2.2.10）将热处理与对照文库的测序数据分别与玉米参考基因组进行比对；随后，采用Samtools（版本0.1.19）将SAM格式文件转换为BAM格式文件，并对BAM文件进行重新排序；基于排序后的BAM文件，采用Cufflinks（版本1.2）进行转录本组装、丰度估计，同时完成样本间差异表达分析及可变剪切检测；最后，采用Python中用于高通量数据处理的HTSeq包计算各样本的基因表达量。根据基因长度和匹配到该基因的片段数目（read count值），计算每一个基因的FPKM（ragments per kilobase of exon per million fragments mapped），即每1百万个map上的reads中map到外显子的每1千个碱基上的reads的个数。一般情况下，当基因的FPKM绝对值大于1时认为其表达，否则认为其不表达。将表达的基因用DESeq2 R package（v3.5.2）软件和WGCNA进行多样本间差异表达分析，基于抗逆相关表型数据的模块划分及核心基因筛选。为了精确定位核心基因，利用$P<0.01$的差异表达基因进行后续筛选。采用AgriGo（http://systemsbiology.cau.edu.cn/agriGOv2/）[17-18]在线软件进行GO富集分析，其中，显著富集的GO类别P值应小于0.05。进一步基于R语言clusterProfiler软件包对差异表达基因进行KEGG通路富集分析，采用超几何检验评估通路显著性，$P<0.05$作为显著富集阈值。最后，利用利用Cytoscape[19]软件对基因调控网络进行可视化构建与分析。

1.2.3　候选基因的RT-qPCR验证　采用Trizol法提取玉米组织总RNA，经1%琼脂糖凝胶电泳检测RNA完整性，并利用NanoDrop 2000测定RNA浓度及纯度（$OD_{260/280}$=1.8-2.2）。RT-qPCR反应体系为2×SYBR Green Mix 10 μL、上下游引物各0.4 μL（10 μmol/L）、cDNA模板2 μL，用ddH_2O补足至20 μL。扩增程序为95 ℃ 3 min；95 ℃ 10 s，60 ℃ 30 s，共35个循环；每个样品设置3个生物学重复和3个技术重复。采用$2^{-\Delta\Delta Ct}$法计算相对表达量，并对RT-qPCR与RNA-seq表达趋势进行比较分析。

1.2.4　候选基因亚细胞定位　构建候选基因与绿色荧光蛋白（green fluorescent protein, GFP）的融合表达载体。根据候选基因CDS序列设计特异性引物，扩增目标片段并克隆至植物表达载体pBI121-GFP

中，使其与GFP融合表达。重组质粒经测序验证正确后，转化至农杆菌（*Agrobacterium tumefaciens*）GV3101感受态细胞。采用农杆菌介导瞬时表达法，将重组菌液注射4-6周龄烟草（*Nicotiana benthamiana*）叶片。培养48-72 h，取叶片表皮细胞，在激光共聚焦显微镜下观察GFP荧光信号。以空载体GFP作对照，根据荧光信号分布判断目标蛋白的亚细胞定位特征。

2 结果

2.1 差异基因的分析

通过二代转录组测序，12个样本共获得72.64 Gb原始测序片段，经过滤，得到240 563 102个Q30>95.64%的clean reads，其GC含量范围均为51.02%-55.99%。12个样本中，clean reads与基因组的匹配率皆大于96.21%，说明所有试验样品的采集及测序结果高度可信。基于每个转录本的read count值，利用DESeq2软件进行目的样本间的差异表达基因分析，以校正后的P<0.01为阈值，以差异倍数|log$_2$FC|>1为条件，筛选出差异极显著的转录本，用于后续分析。

通过对PHBA6和吉63在高温胁迫下的转录组数据与各自对照组进行比较，结果显示，在高温胁迫下，耐热型自交系PHBA6特异性表达的差异基因数量为1 288个，显著高于热敏感型自交系吉63的912个。表明PHBA6对高温胁迫具有更广泛的转录响应，可能具备更为复杂和丰富的热应激调控机制。进一步分析发现，2个自交系在高温胁迫下共同表达的差异基因有823个，构成高温胁迫下的核心共享基因，这些基因可能参与热休克蛋白、抗氧化酶等保守的热应激通路（图1）。综上所述，PHBA6在高温胁迫下展现出更为活跃的基因表达调控能力，同时与吉63共享一套核心的热应激响应机制，表明2个自交系在应对高温胁迫时，既存在共同的保守防御通路，也表现出品种特异性的调控网络差异，从分子水平解释了PHBA6相较于吉63具有更强高温耐受能力的潜在原因。

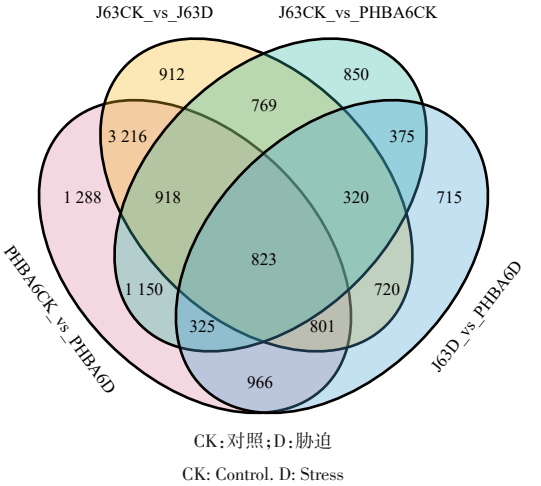


图1 不同处理下PHBA6与吉63雄穗中差异表达基因数

Fig. 1 Differentially expressed genes in tassels of PHBA6 and J63 under different treatment

2.2 双亲在热胁迫下差异基因的WGCNA分析

2.2.1 WGCNA分析中软阈值的确定 通过计算任意2个基因表达谱之间的皮尔逊相关系数，构建基因相似性矩阵，其计算公式为Smn=cor(xm, xn)，其中，Smn表示基因m和基因n之间的相关系数，S=[Smn]为基因相似性矩阵。为使所构建的网络符合无尺度网络（scale-free topology）特征，利用WGCNA包中的pickSoftThreshold函数对软阈值β进行评估与筛选（图2）。结果表明，在PHBA6和吉63 2个自交系中，当β=12时，网络较好地满足无尺度拓扑分布特征。因此，后续共表达网络分析采用β=12作为软阈值参数。

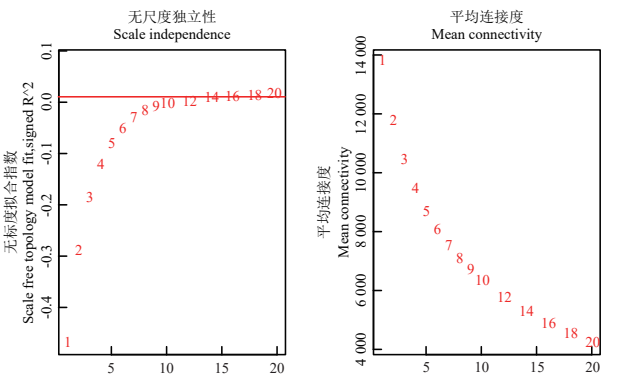
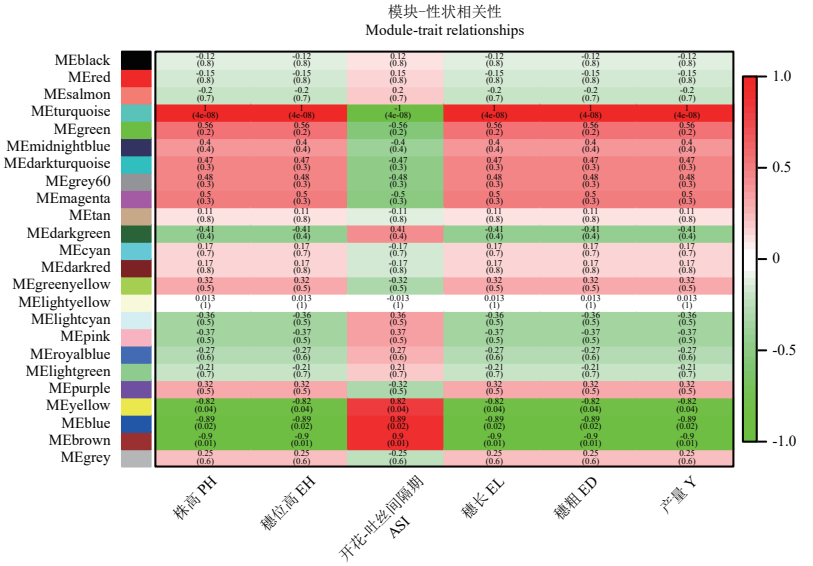


图2 基因共表达网络分析中软阈值的确定

Fig. 2 Determination of soft thresholds for gene co-expression networks

2.2.2 WGCNA分析中基因模块与表型性状之间的关联热图 将差异基因，结合样本株高（plant height, PH）、穗位高（ear height, EH）、开花吐丝间隔期

(anthesis-silking interval, ASI)、穗长（ear length, EL)、穗粗（ear diamete, ED）和产量（yield, Y）等性状矩阵，共得到24个与这些性状相关联的模块热图（图3)。其中，每个性状都有与其显著相关联的模块，turquoise模块与PH、EH、EL、ED和Y存在极显著正相关（均为r=1，P=4E-08)，与ASI存在极显著负相关（r=-1，P=4E-08)；brown模块与H、EH、EL、ED和Y存在极显著负相关（均为r=-0.9，P=0.01)，与ASI存在极显著正相关（r=0.9，P=0.01)。



横轴表示不同的性状，纵轴表示每一个模块的特征向量。红色的格子代表性状与模块具有正相关性，绿色的格子代表性状与模块具有负相关性。PH：株高；EH：穗位高；ASI：开花吐丝间隔期；EL：穗长；ED：穗粗；Y：产量

The horizontal axis indicates different traits, and the vertical axis indicates the eigenvector of each module. Red grids indicate a positive correlation between traits and modules, while green grids indicate a negative correlation between traits and modules. PH: Plant height. EH: Ear height. ASI: Anthesis-silking interval. EL: Ear length ED: Ear diameter. Y: Yield

图3　基因共表达网络模块与性状的关联热图

Fig. 3　Correlation heatmap of gene co-expression network modules and traits

为深入解析与目标性状高度关联的特异性模块的生物学功能，提取模块内具有代表性的特征向量基因（module eigengene, ME)，用ME代表模块中成千上万的基因进行相关性分析，利用这种方法可以进一步理清基因模块与模块之间的相互关系及与不同性状之间的相关性，从而筛选出目标基因模块。ME之间的相关性越高，其所在模块的相关性也就越高，通过两两之间的ME相关性分析发现，brown模块与turquoise模块中ME之间的相关性达到0.90，blue模块与green模块中ME之间的相关性达到0.88（图4)，tuqurise和green模块内基因与大部分表型指标呈正相关，blue和brown模块内基因与大部分表型指标呈负相关；因此，将这4个模块作为目标基因模块进行后续研究。

2.3　基因共表达网络中候选模块中基因的GO富集分析

为进一步挖掘候选模块中基因的功能，利用R包clusterProfile分别对筛选出的4个候选模块（brown、green、blue和turquoise）进行GO功能富集分析（图5)。结果表明，4个模块都可以显著富集到生物学过程（biological process, BP)、细胞组分（cellular component, CC）和分子功能（molecular function, MF)。其中，brown模块中主要显著富集在细胞壁组织、碳水化合物生物合成过程、细胞稳态、蛋白质在膜上的定位、细胞碳水化合物生物合成过程、蛋白质泛素化、蛋白质-DNA复合体、线粒体质子转运ATP合酶复合物、UDP-糖基转移酶活性、泛素-

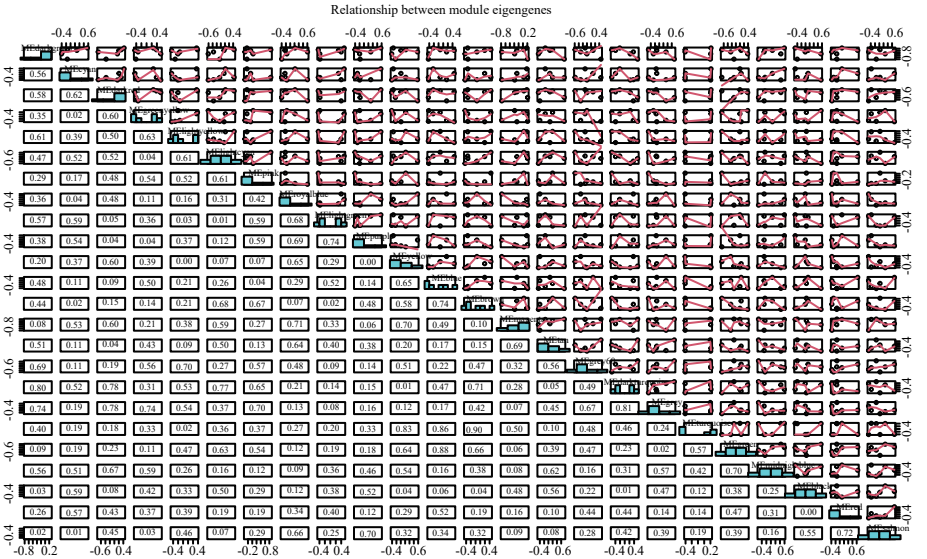
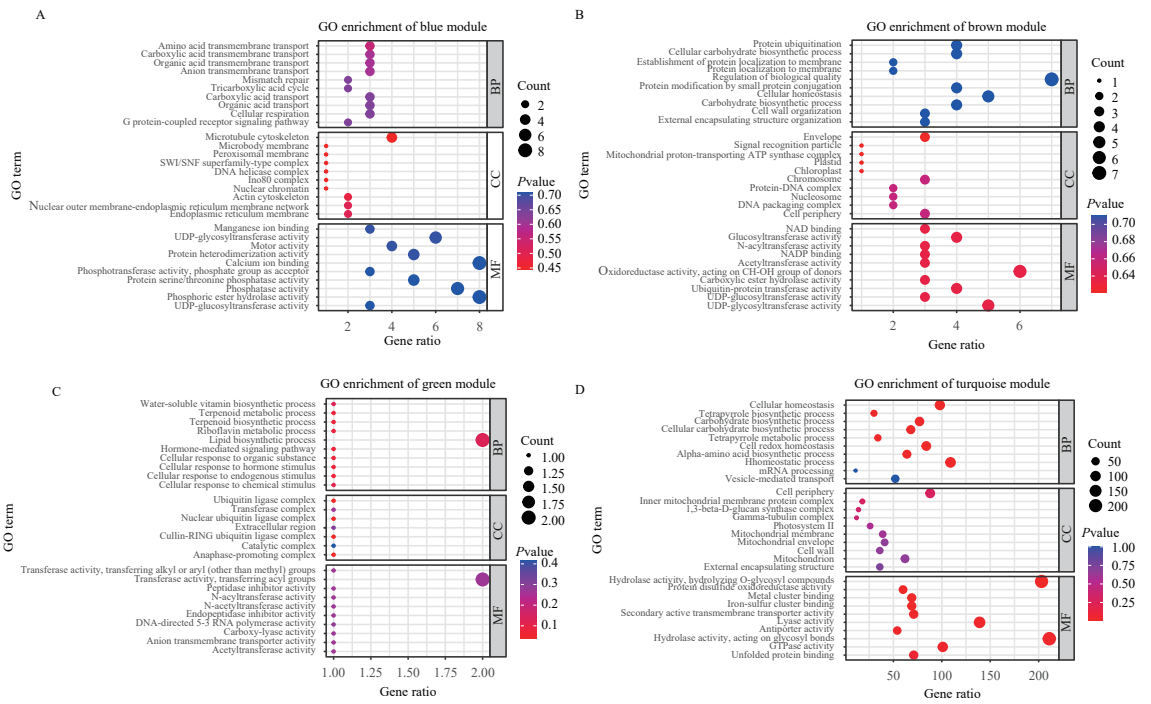


图4 基因共表达网络不同模块间ME的相关性

Fig. 4 Correlation of module eigengenes (ME) among different modules in the gene co-expression network



A、B、C和D分别表示blue、brown、green和turquoise模块内基因的GO富集分析结果。颜色深浅表示显著性水平，红色越深表示*P*值越小(显著性越高)，蓝色表示*P*值较大(显著性较低)，下同。圆点大小表示富集基因的数量，圆越大，富集基因数目越多

A, B, C, and D refers to the GO enrichment analysis results of genes in the blue, brown, green, and turquoise modules, respectively. The color intensity indicates the significance level: the darker the red, the smaller the *P*-value (higher significance), while blue indicates a larger *P*-value (lower significance), the same below. The sizes of the dots indicate the number of enriched genes; the larger the dot, the greater the number of enriched genes

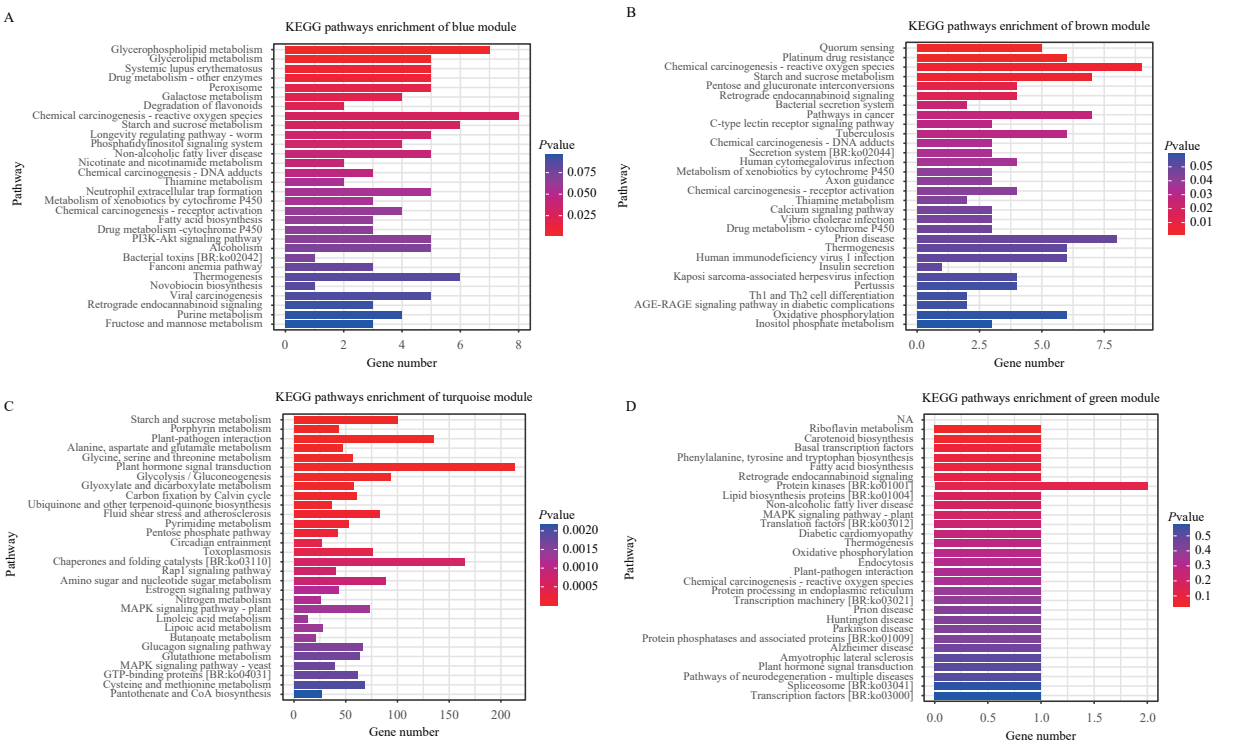
图5 候选模块中基因的GO富集

Fig. 5 GO enrichment of genes in candidate modules

蛋白转移酶活性、氧化还原酶活性、乙酰转移酶活性和N-酰基转移酶活性等GO term；green模块中主要显著富集在细胞对内源性刺激的反应、细胞对激素刺激的反应、细胞对有机物的反应、激素介导的信号通路、脂质生物合成过程、萜类生物合成过程、核泛素连接酶复合物、转移酶复合体、泛素连接酶复合物、阴离子跨膜转运蛋白活性、羧基裂合酶活性、DNA导向的5-3-RNA聚合酶活性、内肽酶抑制剂活性、N-乙酰转移酶活性和N-酰基转移酶活性等GO term；blue模块中主要显著富集在氨基酸跨膜转运、三羧酸循环、有机酸运输、细胞呼吸、肌动蛋白细胞骨架、核外膜–内质网膜网络、磷酸转移酶活性、钙离子结合、蛋白质异二聚化活性和UDP-糖基转移酶活性等GO term；turquoise模块中主要显著富集在碳水化合物生物合成过程、四吡咯代谢过程、细胞氧化还原稳态、α-氨基酸生物合成过程、mRNA加工、水解酶活性、GTP酶活动、水解酶活性、逆向转运蛋白活性、裂合酶活性、次级活性跨膜转运蛋白活性、光系统II、γ-微管蛋白复合体、1,3-β-D-葡聚糖合酶复合物和线粒体内膜蛋白复合物等GO term。

2.4　基因共表达网络中候选模块中基因的KEGG富集分析

为进一步探究候选模块中基因的功能，继续利用R包clusterProfile分别对筛选出的4个候选模块（brown、green、turquoise和blue）进行KEGG功能富集分析。结果显示（图6），在brown模块中主要显著富集在淀粉和蔗糖代谢、戊糖和葡萄糖醛酸相互转化、内源性大麻素逆向信号传导、细胞色素P450对外源性物质的代谢、钙信号通路、硫胺素代谢、肌醇磷酸盐代谢和氧化磷酸化等通路；green模块中主要显著富集在脂质生物合成蛋白、蛋白激酶、内源性大麻素逆向信号传导、脂肪酸生物合成、苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸生物合成、基础转录因子、类胡萝卜素生物合成、核黄素代谢、MAPK信号通



A、B、C和D分别表示blue、brown、turquoise和green模块内基因的KEGG富集分析结果

A, B, C, and D refers to the KEGG enrichment analysis results of genes in the blue, brown, turquoise, and green modules, respectively

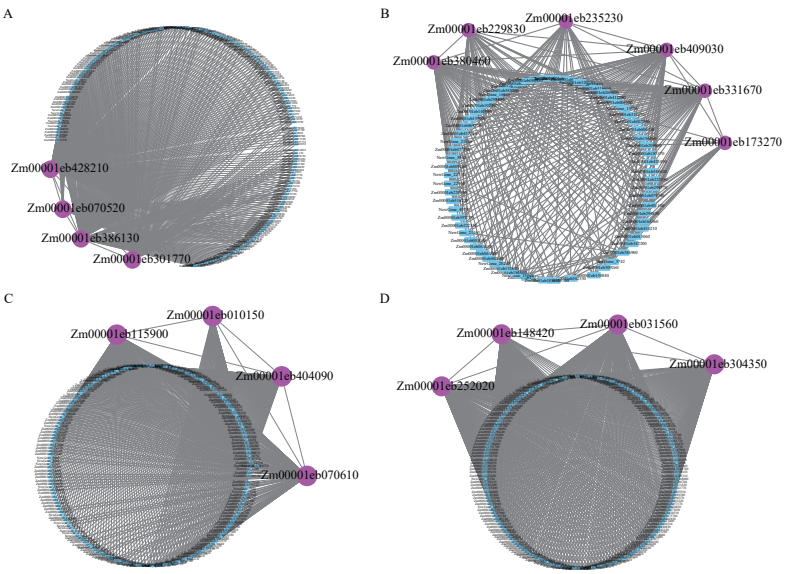
图6　候选模块中基因的KEGG富集

Fig. 6　KEGG enrichment of genes in candidate modules

路-植物、植物-病原体相互作用、内吞作用、氧化磷酸化、内质网中的蛋白质加工、蛋白磷酸酶和相关蛋白、植物激素信号转导和转录因子等通路；blue模块中主要显著富集在甘油磷脂代谢、黄酮类化合物的降解、半乳糖代谢、过氧化物酶体、烟酸和烟酰胺代谢、磷脂酰肌醇信号系统、淀粉和蔗糖代谢、细胞色素P450对外源性物质的代谢、脂肪酸生物合成、果糖和甘露糖代谢和嘌呤代谢等通路；turquoise模块中主要显著富集在卡尔文循环固碳乙醛酸盐和二羧酸盐代谢、糖酵解/葡萄糖生成、植物激素信号转导、甘氨酸、丝氨酸和苏氨酸代谢、丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸代谢、植物-病原体相互作用、卟啉代谢、淀粉和蔗糖代谢、戊糖磷酸途径、丁酸代谢、硫辛酸代谢、亚油酸、MAPK信号通路-植物、氮代谢、氨基糖和核苷酸糖代谢、泛酸和辅酶A生物合成、半胱氨酸和蛋氨酸代谢、GTP结合蛋白和谷胱甘肽代谢等通路。

2.5 基因共表达网络中候选模块中核心基因的可视化

为了探索上述4个候选模块中核心基因的功能，利用Cytoscape软件对模块内基因网络进行可视化处理，筛选出模块中高连通性的基因，首先计算各基因的模块成员关系（kME）和基因显著性（GS），将kME≥0.8且GS显著（$P<0.05$）的基因定义为模块核心基因（hub genes）。此外，基于拓扑重叠矩阵（topological overlap measure, TOM）评估基因间连通性，并将模块内连通度排名前5%的基因视为高度连通基因以进一步支持核心基因的筛选（图7），在该网络中，每一个节点代表一个基因，节点通过线相联系，处于连线两端的基因通常被认为具有相同的生物功能。在brown模块中挑选出4个核心基因，green模块中挑选出6个核心基因，turquoise模块中挑选出4个核心基因，blue模块中挑选出4个核心基因；为了探究这些核心基因的功能，利用玉米数据库（https://maizegdb.org/）和NCBI数据库（https://www.ncbi.nlm.nih.gov/）来查询这些核心基因的功能，并借助TAIR数据库（https://www.arabidopsis.org/）注释了拟南芥同源基因的功能（表2），通过已报道的文献，发现这些筛选出的核心基因大多数都与植株发育以及逆境胁迫相关，其中，在拟南芥中，Zm00001eb070520的同源基因*AT4G28815*属于碱性螺旋-环-螺旋（bHLH）转录因子超家族，酵母双杂交和体外结合试验证明，*AT4G28815*可以形成同源二聚体和异源二聚体，参与植物对温度的响应；



A、B、C和D分别为brown、green、turquoise和blue模块；“粉红色圆”代表核心基因

A, B, C, and D indicate the brown, green, turquoise, and blue modules respectively; the “pink circles” indicate the core genes

图7 候选模块中基因共表达网络及核心基因的挖掘

Fig. 7 Mining of gene co-expression networks and hub genes in candidate modules

表2　不同模块中核心基因的功能注释

Table 2　Functional annotation of hub genes in different modules

模块 Module	核心基因 Hub gene	拟南芥同源基因 Homologous gene in *A. thaliana*	基因功能 Gene function
blue	Zm00001eb428210	*AT5G47060*	假设蛋白(DUF581) Hypothetical protein (DUF581)
blue	Zm00001eb070520	*AT4G28815*	碱性螺旋–环–螺旋(bHLH)DNA结合超家族蛋白 Basic helix-loop-helix (bHLH) DNA-binding superfamily protein
blue	Zm00001eb386130	*AT5G64790*	O-糖基水解酶家族17蛋白 O-Glycosyl hydrolases family 17 protein
blue	Zm00001eb301770	X	未知功能 Unknown
brown	Zm00001eb115900	X	未知功能 Unknown
brown	Zm00001eb010150	*AT1G14710*	富含羟脯氨酸的糖蛋白家族蛋白 Hydroxyproline-rich glycoprotein family protein
brown	Zm00001eb404090	X	转导蛋白家族蛋白/WD-40重复序列家族蛋白 Transducin family protein/WD-40 repeat family protein
brown	Zm00001eb070610	X	未知功能 Unknown
green	Zm00001eb380460	*AT3G02380*	CONSTANS类似蛋白2 CONSTANS-like 2
green	Zm00001eb229830	*AT3G61350*	SKP1相互作用伙伴4 SKP1 interacting partner 4
green	Zm00001eb235230	*AT4G03030*	半乳糖氧化酶/kelch重复超家族蛋白 Galactose oxidase/kelch repeat superfamily protein
green	Zm00001eb409030	X	未知功能 Unknown
green	Zm00001eb331670	X	未知功能 Unknown
green	Zm00001eb173270	*AT1G32730*	(1 of 1) PTHR35696:SF1-F6N18.11
turquoise	Zm00001eb252020	*AT1G75330*	鸟氨酸氨甲酰转移酶 Ornithine carbamoyltransferase
turquoise	Zm00001eb148420	*AT1G56410*	热休克70 kD蛋白 Heat shock 70 kD protein-like
turquoise	Zm00001eb031560	*AT2G43010*	编码一个与活性PhyB蛋白相互作用的核定位bHLH蛋白 Encodes a nuclear localized bHLH protein that interacts with active PhyB protein
turquoise	Zm00001eb304350	X	未知功能 Unknown

注：X表示无拟南芥同源基因

Note: X indicates that no homologous gene was identified in *A. thaliana*

Zm00001eb386130在拟南芥中的同源基因*AT5G64790*参与细胞壁合成和重塑或细胞间信号传导，并且能够响应逆境胁迫及促进花粉萌发和花粉管生长；Zm00001eb010150在拟南芥中的同源基因*AT1G14710*是一种与光合作用相关的RNA结合蛋白，能够对周围环境和生理做出反应；Zm00001eb148420在拟南芥中的同源基因*AT1G56410*在开花和轻度热应激反应中发挥重要功能，*AT1G56410*是花朵开放和轻度热响应的必需基因。*AT1G56410*突变导致22 ℃时植株结实率显著降低，27 ℃时更为严重。*AT1G56410*的突变还导致2个侧萼片重叠顶端的后生融合，导致开花失败、花器官形成异常以及受精和结实受损；

Zm00001eb031560在拟南芥中的同源基因*AT2G43010*（*AtPIF4*）通过编码与活性PhyB蛋白相互作用的核定位蛋白bHLH来平衡植物的生长和高温防御等。

2.6 基因共表达网络候选模块中核心基因的RT-qPCR验证

从挑选的4个候选基因模块中筛选到18个可能与雄穗响应热胁迫相关的核心基因（表2），进一步根据基因功能，分析18个基因在不同样本中的表达变化，结果显示（图8），荧光定量PCR结果与转录组结果一致，进一步证明转录组测序数据结果的可靠性，并从中筛选表达量高且与热胁迫相关的基因Zm00001eb031560（*ZmPIF4*）进行后续的功能验证。

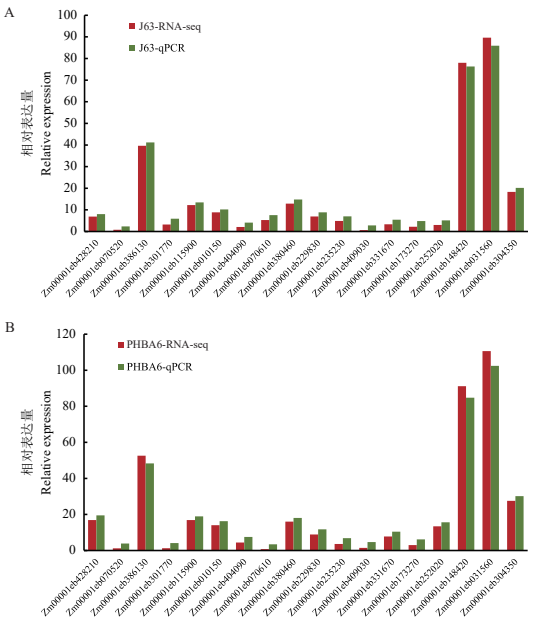


图8 核心基因的RT-qPCR与RNA-seq交互验证

Fig. 8 Cross-validation of hub genes by RT-qPCR and RNA-seq

2.7 ZmPIF4的亚细胞定位

亚细胞定位结果显示，阳性对照35S:GFP在烟草叶肉细胞的细胞核和细胞膜中均可检测到绿色荧光信号，表明游离GFP能够在细胞内自由扩散。而在35S:ZmPIF4:GFP转化的烟草叶片细胞核中观察到明显的绿色荧光信号（图9）。表明ZmPIF4主要定位于细胞核并可能在细胞核相关信号传导过程中发挥重要作用。

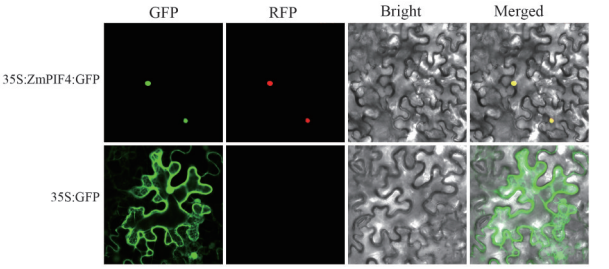


图9 玉米ZmPIF4蛋白的亚细胞定位

Fig. 9 Subcellular localization of the ZmPIF4 protein in *Z. mays*

3 讨论

玉米作为全球第一大作物，在粮食安全、饲料供应和工业加工等领域具有不可替代的重要地位[20]。然而，玉米虽为喜温作物，却对高温胁迫高度敏感，其生长发育易受到抑制。在全球气候变暖背景下，高温事件频发已成为威胁玉米生产稳定性的主要因素之一[21]。持续或极端高温可扰乱玉米正常生理代谢，延缓生长发育，导致花粉育性下降及籽粒灌浆受阻，最终造成显著减产[22-23]。因此，解析玉米耐热性的遗传基础、挖掘关键基因并培育耐热高产新品种，对保障新疆乃至全国玉米产业可持续发展具有重要意义。

雄穗发育期是玉米对高温最敏感的阶段之一，开花前遭遇高温会显著降低花粉活力并抑制散粉过程，进而影响授粉结实[24]，因此选用耐热性差异显著的材料是解析其分子机制的关键。本研究以耐热自交系PHBA6和热敏感自交系吉63为材料，在雄穗膨大但未抽雄阶段在温室进行高温胁迫，模拟自然条件下的热胁迫环境，为筛选耐热相关基因提供了可靠体系。基于转录组数据的加权基因共表达网络分析（WGCNA），本研究构建了玉米雄穗响应热胁迫的基因调控网络，并筛选出与耐热性显著相关的关键模块，这些模块通常参与特定生物学过程[25-26]。本研究共鉴定出多个相关模块，并筛选出与目标性状关系密切的核心模块，功能富集分析表明，这些模块主要涉及能量代谢、碳代谢、信号转导及激素调控等过程，其中，研究表明热激转录因子（HSFs）家族在植物热胁迫反应中扮演关键角色，在玉米应答高温胁迫过程中，通过调控下游基

因表达提高植物的耐热性[13]。此外，淀粉和蔗糖代谢、细胞色素P450介导的代谢过程、钙信号通路及氧化磷酸化等均被证实参与植物耐热调控[27-31]。本研究结果表明，上述通路在关键模块中均有不同程度富集，进一步验证了其在玉米耐热过程中的重要作用。同时，植物激素信号通路，尤其是脱落酸（ABA），在逆境响应中具有重要调节功能，可通过调控基因表达及生理过程增强植物抗逆性[32]。部分模块显著富集于激素信号转导通路，表明激素调控在玉米耐热过程中同样发挥重要作用，进一步分析表明，相关模块还涉及糖代谢及能量代谢途径，如糖酵解及碳同化等过程，这些途径有助于维持细胞能量供应，从而提高植株在高温胁迫下的适应能力。总体来看，玉米耐热性是多通路协同调控的复杂性状，涉及代谢调节、信号转导及转录调控等多个层面，本研究筛选的核心基因多与植物发育及逆境响应相关，可能在热胁迫应答过程中发挥重要作用。

尽管本研究取得了一定进展，但仍存在局限性。首先，仅选取2个玉米自交系，遗传背景较为单一，可能限制耐热相关基因的全面挖掘，未来可扩大材料范围，纳入不同遗传背景及耐热类型的种质资源，以提高研究结果的代表性；其次，本研究仅关注开花前期雄穗对热胁迫的响应，而玉米不同生育阶段对高温的响应机制可能存在差异，后续研究可从全生育期角度开展系统分析。此外，本研究主要基于转录组数据，缺乏蛋白质组和代谢组层面的验证，未来可结合多组学技术，系统解析蛋白表达调控及代谢变化，从而更全面揭示玉米耐热的分子机制。总体而言，本研究基于WGCNA方法初步解析了玉米雄穗响应高温胁迫的共表达网络及潜在调控途径，为耐热关键基因的挖掘提供了重要线索，随着多组学数据整合及功能验证的深入研究，有望进一步阐明玉米耐热的分子机制，为耐热玉米种质创新及新品种培育提供理论依据和技术支撑。

4　结论

基于12个转录组数据成功构建了基因共表达网络，鉴定出15个玉米雄穗耐热性密切相关的基因模块，挑选出4个与目标性状关联度最佳的基因模块，在brown、green、turquoise及blue模块中分别挑选出4、6、4、4个核心基因，这些基因可能通过热激转录因子介导的植物激素信号传导等途径，参与玉米热胁迫相关的调控通路。

参考文献

[1] Qu JZ, Xu ST, Gou XN, et al. Time-resolved multiomics analysis of the genetic regulation of maize kernel moisture [J]. Crop J, 2023, 11(1): 247-257.

[2] Yan YY, Duan FY, Li X, et al. Photosynthetic capacity and assimilate transport of the lower canopy influence maize yield under high planting density [J]. Plant Physiol, 2024, 195(4): 2652-2667.

[3] Ning Q, Jian YN, Du YF, et al. An ethylene biosynthesis enzyme controls quantitative variation in maize ear length and kernel yield [J]. Nat Commun, 2021, 12: 5832.

[4] 常晓春, 李建平, 郝晓燕, 等. 新疆玉米苗期耐旱性状全基因组关联分析 [J]. 现代农业科技, 2022(21): 24-27.
Chang XC, Li JP, Hao XY, et al. Genome-wide association analysis of drought tolerance traits at maize seedling stage in Xinjiang [J]. Mod Agric Sci Technol, 2022(21): 24-27.

[5] 窦婉毓, 颜双双, 孙仁华, 等. 基于21世纪以来我国作物产量、人口与政策分析未来秸秆还田的必然性 [J]. 中国农业大学学报, 2025, 30(12): 291-305.
Dou WY, Yan SS, Sun RH, et al. Inevitability of straw-returning to the field in the future: an analysis based on crop yield, population, and policy in China since the 21st century [J]. J China Agric Univ, 2025, 30(12): 291-305.

[6] Dong ZB, Xu ZN, Xu L, et al. *Necrotic upper tips1* mimics heat and drought stress and encodes a protoxylem-specific transcription factor in maize [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2020, 117(34): 20908-20919.

[7] Wang YY, Sheng DC, Zhang P, et al. High temperature sensitivity of kernel formation in different short periods around silking in maize [J]. Environ Exp Bot, 2021, 183: 104343.

[8] Zhou P, Enders TA, Myers ZA, et al. Prediction of conserved and variable heat and cold stress response in maize using *cis*-regulatory information [J]. Plant Cell, 2022, 34(1): 514-534.

[9] Li ZX, Howell SH. Heat stress responses and thermotolerance in maize [J]. Int J Mol Sci, 2021, 22(2): 948.

[10] Liang ZK, Myers ZA, Petrella D, et al. Mapping responsive genomic elements to heat stress in a maize diversity panel [J]. Genome Biol, 2022, 23: 234.

[11] Zhao XC, Wei JP, He L, et al. Identification of fatty acid desaturases in maize and their differential responses to low and high temperature [J]. Genes, 2019, 10(6): 445.

[12] Wang J, Chen L, Long Y, et al. A novel heat shock transcription factor (ZmHsf08) negatively regulates salt and drought stress

responses in maize [J]. Int J Mol Sci, 2021, 22(21): 11922.

[13] Li Z, Li ZR, Ji YL, et al. The heat shock factor 20-HSF4-cellulose synthase A2 module regulates heat stress tolerance in maize [J]. Plant Cell, 2024, 36(7): 2652-2667.

[14] Li ZX, Tang J, Srivastava R, et al. The transcription factor bZIP60 links the unfolded protein response to the heat stress response in maize [J]. Plant Cell, 2020, 32(11): 3559-3575.

[15] 武炳瑾. 热胁迫下调控小麦籽粒蛋白表达的因素 [D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2021.
Wu BJ. Factors regulating protein expression in wheat grains under heat stress [D]. Yangling: Northwest A & F University, 2021.

[16] Gu L, Jiang T, Zhang CX, et al. Maize HSFA2 and HSBP2 antagonistically modulate raffinose biosynthesis and heat tolerance in *Arabidopsis* [J]. Plant J, 2019, 100(1): 128-142.

[17] Du Z, Zhou X, Ling Y, et al. agriGO: a GO analysis toolkit for the agricultural community [J]. Nucleic Acids Res, 2010, 38(suppl_2): W64-W70.

[18] Tian T, Liu Y, Yan HY, et al. agriGO v2.0: a GO analysis toolkit for the agricultural community, 2017 update [J]. Nucleic Acids Res, 2017, 45(W1): W122-W129.

[19] Shannon P, Markiel A, Ozier O, et al. Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks [J]. Genome Res, 2003, 13(11): 2498-2504.

[20] Erenstein O, Jaleta M, Sonder K, et al. Global maize production, consumption and trade: trends and R&D implications [J]. Food Sec, 2022, 14(5): 1295-1319.

[21] Waqas MA, Wang XK, Zafar SA, et al. Thermal stresses in maize: effects and management strategies [J]. Plants, 2021, 10(2): 293.

[22] 闫恒宇, 李朝霞, 李玉斌. 高温对玉米生长的影响及中国耐高温玉米筛选研究进展 [J]. 植物学报, 2024, 59(6): 1007-1023.
Yan HY, Li ZX, Li YB. Research progress on heat stress impact on maize growth and heat-tolerant maize screening in China [J]. Bull Bot, 2024, 59(6): 1007-1023.

[23] 霍治国, 张海燕, 李春晖, 等. 中国玉米高温热害研究进展 [J]. 应用气象学报, 2023, 34(1): 1-14.
Huo ZG, Zhang HY, Li CH, et al. Review on high temperature heat damage of maize in China [J]. J Appl Meteor Sci, 2023, 34(1): 1-14.

[24] 闫振华, 刘东尧, 贾绪存, 等. 花期高温干旱对玉米雄穗发育、生理特性和产量影响 [J]. 中国农业科学, 2021, 54(17): 3592-3608.
Yan ZH, Liu DY, Jia XC, et al. Maize tassel development, physiological traits and yield under heat and drought stress during flowering stage [J]. Sci Agric Sin, 2021, 54(17): 3592-3608.

[25] Zhao W, Langfelder P, Fuller T, et al. Weighted gene coexpression network analysis: state of the art [J]. J Biopharm Stat, 2010, 20(2): 281-300.

[26] 秦天元, 孙超, 毕真真, 等. 基于WGCNA的马铃薯根系抗旱相关共表达模块鉴定和核心基因发掘 [J]. 作物学报, 2020, 46(7): 1033--1051.
Qin TY, Sun C, Bi ZZ, et al. Identification of drought-related co-expression modules and hub genes in potato roots based on WGCNA [J]. Acta Agron Sin, 2020, 46(7): 1033-1051.

[27] 郑晨璐, 王倩颖, 陆丹迎, 等. 高温胁迫下景宁木兰淀粉与蔗糖代谢途径转录分析 [J]. 浙江农林大学学报, 2023, 40(1): 55-63.
Zheng CL, Wang QY, Lu DY, et al. Transcriptional analysis of starch and sucrose metabolism pathways in *Magnolia sinostellata* under heat stress [J]. J Zhejiang A&F Univ, 2023, 40(1): 55-63.

[28] Magwanga RO, Lu P, Kirungu JN, et al. Knockdown of cytochrome P450 genes *Gh_D07G1197* and *Gh_A13G2057* on chromosomes D07 and A13 reveals their putative role in enhancing drought and salt stress tolerance in *Gossypium hirsutum* [J]. Genes, 2019, 10(3): 226.

[29] Kan Y, Mu XR, Zhang H, et al. TT2 controls rice thermotolerance through SCT1-dependent alteration of wax biosynthesis [J]. Nat Plants, 2022, 8(1): 53-67.

[30] Kim M, Schulz V, Brings L, et al. mTERF18 and ATAD3 are required for mitochondrial nucleoid structure and their disruption confers heat tolerance in *Arabidopsis thaliana* [J]. New Phytol, 2021, 232(5): 2026-2042.

[31] Sharma N, Chaudhary C, Khurana P. Wheat Myo-inositol phosphate synthase influences plant growth and stress responses via ethylene mediated signaling [J]. Sci Rep, 2020, 10: 10766.

[32] Kong GZ, Li H, Zheng JT, et al. PgMYB96 enhances *Physalis grisea* high temperature tolerance by activating trithorax-like factor WD REPEAT CONTAINING5b [J]. J Exp Bot, 2025, 76(12): 3527-3542.

（责任编辑 李楠）