

DOI: 10.3724/SP.J.1006.2026.53058

## 玉米苞叶数目转录组分析及候选基因鉴定

马 亮<sup>1</sup> 马 璐<sup>1</sup> 张舒钰<sup>1</sup> 章慧敏<sup>1</sup> 王仁明<sup>3</sup> 宋旭东<sup>1</sup> 张振良<sup>1</sup>  
冒宇翔<sup>1</sup> 陆虎华<sup>1</sup> 陈国清<sup>1,2</sup> 郝德荣<sup>1</sup> 周广飞<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup> 江苏沿江地区农业科学研究所, 江苏南通 226012; <sup>2</sup> 江苏省现代作物生产协同创新中心, 江苏南京 210095; <sup>3</sup> 青岛联合利农进出口有限公司, 山东青岛 266100

**摘 要:** 苞叶数目是衡量玉米品种是否适宜机械直收籽粒的重要性状之一。为研究玉米苞叶数目形态建成的代谢途径及调控基因, 本研究以多苞叶数目自交系 YD97 和少苞叶数目自交系 YD132 为材料, 对 7 叶期和吐丝期的苞叶组织进行转录组测序。以 YD97 为对照, YD132 为样品, 共检测到 4089 个差异表达基因, 其中 1979 个基因上调表达, 2150 个基因下调表达。K-means 分析将差异表达基因分为 8 个聚类。GO 富集分析表明, 差异表达基因主要与刺激响应、氨基酸转运、生长素响应、分枝形态建成、氮化合物代谢过程和细胞周期等相关。KEGG 富集分析发现, 差异表达基因主要富集于光合作用、植物激素信号转导、淀粉与蔗糖代谢和马达蛋白等途径。其中, 植物激素信号转导途径, 尤其是生长素信号转导途径, 在玉米苞叶数目形态建成中发挥重要作用。此外, 将转录组结果与 QTL 定位结果联合, 结合候选基因关联分析和 25 个玉米自交系苞叶组织的实时荧光定量 PCR 分析, 鉴定到 2 个玉米苞叶数目候选基因, *Zm00001eb156610* 和 *Zm00001eb275220*, 分别编码谷氨酸合成酶 2 和蛋白质 S-酰基转移酶。研究结果有助于玉米苞叶数目的分子机制解析和遗传改良。

**关键词:** 玉米; 苞叶数目; 转录组测序; 植物激素; 候选基因

## Transcriptome analysis and identification of candidate genes associated with husk number in maize

Ma Liang<sup>1</sup>, Ma Lu<sup>1</sup>, Zhang Shu-Yu<sup>1</sup>, Zhang Hui-Min<sup>1</sup>, Wang Ren-Ming<sup>3</sup>, Song Xu-Dong<sup>1</sup>, Zhang Zhen-Liang<sup>1</sup>, Mao Yu-Xiang<sup>1</sup>, Lu Hu-Hua<sup>1</sup>, Chen Guo-Qing<sup>1,2</sup>, Hao De-Rong<sup>1</sup>, and Zhou Guang-Fei<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup> Jiangsu Yanjiang Institute of Agricultural Sciences, Nantong 226012, Jiangsu, China; <sup>2</sup> Jiangsu Collaborative Innovation Center for Modern Crop Production, Nanjing 210095, Jiangsu, China; <sup>3</sup> Qingdao Agro-Unitek Import & Export Co., Ltd., Qingdao 266100, Shandong, China

**Abstract:** Husk number is a key trait influencing the suitability of maize varieties for mechanical grain harvesting. To investigate the molecular mechanisms and candidate genes associated with husk number, the multi-husk inbred line YD97 and the few-husk inbred line YD132 were used as experimental materials. Transcriptome sequencing was conducted on husk tissues collected at the seven-leaf stage and the silking stage. Using YD97 as the control and YD132 as the sample, a total of 4089 differentially expressed genes (DEGs) were identified, including 1979 upregulated and 2150 downregulated genes. K-means clustering grouped these DEGs into eight distinct clusters. Gene ontology (GO) enrichment analysis showed that the DEGs were primarily involved in responses to stimuli, amino acid transport, auxin response, branch morphogenesis, nitrogen compound metabolism, and cell

本研究由江苏省科协青年科技人才托举工程项目(TJ-2023-052), 江苏省自然科学基金项目(BK20241833), 江苏省重点研发计划项目(BE2022343), 江苏省种业振兴揭榜挂帅项目(JBGS [2021] 054)和江苏沿江地区农业科学研究所青年博士基金项目(YJBS (2023) 004)资助。

This study was supported by the Youth Talent Support Program of Jiangsu Association for Science and Technology (TJ-2023-052), the Natural Science Foundation of Jiangsu Province, China (BK20241833), the Key Research and Development Program of Jiangsu Province (BE2022343), the Seed Industry Revitalization Announcement and Leading Project of Jiangsu Province (JBGS [2021] 054), and the Youth Doctoral Foundation of Jiangsu Yanjiang Institute of Agricultural Science (YJBS (2023) 004).

\* 通信作者(Corresponding author): 周广飞, E-mail: gfzhou88@jaas.ac.cn

第一作者联系方式: E-mail: 20230098@jaas.ac.cn

Received (收稿日期): 2025-07-30; Accepted (接受日期): 2025-11-18; Published online (网络出版日期): 2025-11-21.

URL: <https://link.cnki.net/urlid/11.1809.S.20251121.1008.002>

This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

cycle processes. Kyoto encyclopedia of genes and genomes (KEGG) pathway analysis revealed that the DEGs were significantly enriched in pathways related to photosynthesis, plant hormone signal transduction, starch and sucrose metabolism, and motor proteins. Notably, the plant hormone signal transduction pathway—particularly the auxin signaling pathway—appears to play a critical role in the morphogenesis of maize husk number. Furthermore, two candidate genes, *Zm00001eb156610* (encoding glutamate synthase 2) and *Zm00001eb275220* (encoding a protein S-acyltransferase), were identified by integrating transcriptome sequencing, QTL mapping, candidate gene association analysis, and quantitative real-time PCR validation across husk tissues from 25 maize inbred lines. These findings contribute to a better understanding of the molecular mechanisms regulating husk number in maize and provide valuable insights for its genetic improvement.

**Keywords:** maize; husk number; transcriptome sequencing; plant hormone; candidate gene

玉米是我国第一大粮食作物,对保障我国粮食安全发挥重要作用。在我国农业现代化进程中,小麦、水稻等生产基本实现了全程机械化,玉米生产先后实现了机械播种、机械管理、机械摘穗收获,但机械粒收发展缓慢,严重制约我国玉米产业的发展。究其原因,主要是当前我国玉米主推品种生理成熟后籽粒脱水慢,致使收获时籽粒含水量高,达不到机械粒收和安全储藏的要求<sup>[1-3]</sup>。

玉米苞叶由侧生分生组织发育而来,轮生于穗柄的节部,不仅可为果穗的生长发育提供良好环境,也可提供营养物质<sup>[4-5]</sup>。苞叶数目是玉米苞叶的重要性状,直接影响收获时籽粒的含水量和苞叶的脱皮,进而影响籽粒的剥净率和破损度<sup>[1,3,6]</sup>。在干燥脱水期,玉米籽粒水分可透过苞叶,经蒸腾作用,蒸发到空气中<sup>[6]</sup>,但我国多数主推玉米品种苞叶数目较多,不利于玉米籽粒的快速脱水,导致收获时籽粒含水量较高,在机收籽粒过程中,苞叶不易脱皮、籽粒不易脱落且破碎率较高<sup>[1,3]</sup>。收获期籽粒含水量与苞叶数目呈极显著正相关<sup>[6-7]</sup>,通过适当减少苞叶数目,不仅利于籽粒脱水,而且不影响籽粒产量<sup>[8]</sup>。因此,选育苞叶数目适宜的品种有助于推动我国玉米机械粒收的发展。

玉米苞叶数目表现为数量性状特征<sup>[9-11]</sup>,研究者利用正向遗传学手段鉴定到大量控制玉米苞叶数目的数量性状位点(quantitative trait loci, QTL)<sup>[7,12-14]</sup>,其中主效 QTL *qHN7*<sup>[12]</sup>、*qHN1-1-1*<sup>[13]</sup>和 *qHN4*<sup>[14]</sup>分别可解释 19.6%、19.4%和 11.1%的表型变异,但其候选基因仍不清楚。Wang 等<sup>[15]</sup>利用全基因组关联分析,鉴定到一个调控玉米苞叶数目的基因 *ZMET2*,编码 DNA 甲基转移酶,通过影响 DNA 甲基化水平调控玉米苞叶数目。

转录组测序技术可以检测到全基因组所有基因的转录信息,也可获得特定时期某一生物学过程显著富集的基因,是筛选作物重要性状候选基因的有效手段。但转录组分析通常会获得大量差异表达基

因,很难筛选出关键候选基因。为找出目标性状关键候选基因及代谢通路,部分研究利用转录组分析和基因定位相结合的手段。任蒙蒙等<sup>[16]</sup>利用  $F_{2,3}$  群体,在玉米 10 号染色体上检测到一个玉米耐深播主效 QTL *qMES20-10*,进一步通过精细定位和转录组测序技术,筛选出 73 个差异表达基因作为 *qMES20-10* 候选基因,主要富集于化学性应激反应、氧化还原反应和对氧化胁迫的应激反应。王新涛等<sup>[17]</sup>将 QTL 定位与转录组分析相结合,筛选出 12 个可能调控玉米茎粗发育的候选基因,主要富集于氧化还原酶活性、水解酶活性、基于微管的过程和激素的合成调控等通路。叶靓等<sup>[18]</sup>联合全基因组关联分析和转录组分析,预测了 6 个玉米抗穗腐病候选基因。

本研究从衍生于多苞叶数目自交系 DH4866 和少苞叶数目自交系 T877 的重组自交系群体中<sup>[12]</sup>,选择一个多苞叶数目家系 YD97 和一个少苞叶数目家系 YD132 作为研究对象,进行转录组测序,以期在转录水平上探索玉米苞叶数目形态建成机制,进一步联合 QTL 定位和候选基因关联分析,挖掘调控玉米苞叶数目的候选基因,旨在为玉米苞叶数目的遗传改良提供理论参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

多苞叶数目材料 YD97 和少苞叶数目材料 YD132 作为试验材料,用于转录组测序,其中 YD132 携带苞叶数目 QTL *qHN3*、*qHN6* 和 *qHN7* 的优异等位基因, YD97 携带这 3 个 QTL 的非优异等位基因, YD97 和 YD132 背景相似率为 71.88%<sup>[12]</sup>。在 251 份玉米自交系中随机选取 25 份自交系<sup>[19]</sup>,用于候选基因实时荧光定量 PCR 分析(附表 1)。

2023 年 YD97、YD132 和 25 份玉米自交系种植于江苏沿江地区农业科学研究所薛窑试验基地,参考前期研究<sup>[20]</sup>, YD97 和 YD132 在 7 叶期(V7)和吐丝期(R1)取苞叶原基用于转录组测序, 25 份玉米自交

系在 V7 期取苞叶原基用于实时荧光定量 PCR。样品液氮速冻,  $-80^{\circ}\text{C}$  保存。每个样品为 3 株混合取样, 每个材料 3 次生物学重复, 按照 TRIzol 试剂盒 (Invitrogen 公司, 美国) 说明书提取样品总 RNA。采用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 质量, 并使用 NanoDrop 2000 分光光度计测量 RNA 浓度。

### 1.2 转录组测序及数据分析

由江苏三泰生物科技有限公司完成文库构建和转录组测序。利用 Illumina Novaseq 6000 平台进行双末端测序。使用 fastp 软件(v0.11.5)对原始序列进行接头去除, 过滤掉片段长度小于 50 bp、N 碱基比例大于 5% 等质量较低的序列, 过滤后获得的高质量 reads 用于后续分析。

利用 Hisat2 软件, 将高质量的过滤序列比对到 Zm-B73-REFERENCE-NAM-5.0 上。使用 Samtools 软件(v2.1.0)和 Stringtie 软件(v1.3.5)进行比对结果转录本组装, 并输出基因比对读取数。使用每千碱基外显子百万片段数 (fragments per kilobase per million mapped fragments, FPKM) 值衡量基因的表达水平, FPKM 值的计算公式为  $\text{FPKM} = (\text{比对到基因上的总 reads 数} \times 10^9) / (\text{测序总 reads 数} \times \text{基因长度})$ 。采用 DESeq2 (v1.26.0) 进行差异表达分析, 以矫正后的  $P$  值  $P_{\text{adjust}} < 0.05$  和表达差异倍数  $|\log_2(\text{Fold Change})| \geq 1$  为标准, 判定差异表达基因 (differentially expressed genes, DEGs)。过滤掉在 80% 样本中均不表达的 DEGs ( $\text{FPKM} < 1$ ), 采用 R 包 ClusterGVis (v0.1.4) 对符合条件的 DEGs 进行 K-means 聚类分析。使用 R 包 clusterProfiler (v4.10.0) 对 DEGs 进行 GO (gene ontology) 和 KEGG (kyoto encyclopedia of genes and genomes) 富集分析, 通过 Fisher 检验进行显著富集的筛选。

### 1.3 候选基因关联分析

将 QTL *qHN3*、*qHN6* 和 *qHN7* 区间内的 DEGs 作为潜在候选基因。利用 212 份玉米自交系 20× 重测序数据 (湖北省农业科学院贾海涛博士惠赠), 筛选位于潜在候选基因内及其上下游 2000 bp 的 SNP 标记, 结合该群体的群体结构 (Q)、亲缘关系 (K) 和表型数据<sup>[7]</sup>, 利用 TASSEL 5.0 软件<sup>[21]</sup> 的混合线性模型 (mixed linear model, MLM) 进行关联分析, 设置阈值  $P \leq 1/N$  ( $N$  为区间内所使用总标记的数目)。将显著性标记定位到的基因作为候选基因。

### 1.4 实时荧光定量 PCR

利用 OligoAnalyzer (<https://sg.idtdna.com/calc/>

analyzer) 设计引物 (附表 2), 由北京擎科生物科技股份有限公司合成。按照 HiScript III RT SuperMix for qPCR + gDNA wiper (Vazyme, R233-01) 说明书对 RNA 样品进行反转录。利用 AceQ qPCR SYBR Green Master Mix (Vazyme, Q111-02/03) 试剂, Applied Biosystems 7000 荧光定量 PCR 仪进行实时定量 PCR, 3 次技术重复。以玉米  *$\beta$ -tublin* 为内参基因, 采用  $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$  法计算各个基因的相对表达量。

## 2 结果与分析

### 2.1 玉米苞叶数目差异表达基因鉴定

玉米自交系 YD97 的苞叶数目显著多于 YD132 的苞叶数目 (图 1-A, B)。取 2 个自交系 V7 和 R1 期的苞叶组织, 进行转录组测序。各样品的 Reads 与参考基因组的比对率均大于 88%, 单一比对率均大于 80%, 表明测序质量良好, 可用于后续分析 (表 1)。

YD97 作为对照, YD132 作为样品, 通过 DESeq2 分析, V7 期鉴定出 2362 个 DEGs, 其中 1120 个基因上调表达, 1242 个基因下调表达; R1 期鉴定出 2932 个 DEGs, 其中 1512 个基因上调表达, 1420 个基因下调表达; 2 个时期共鉴定出 4089 个 DEGs, 其中 1979 个基因上调表达, 2150 个基因下调表达; 2 个时期共有 1208 个 DEGs, 其中共同上调表达基因 653 个, 共同下调表达基因 512 个, 表明这些基因可能同时参与玉米苞叶起始分化和后期发育 (图 1-C 和 D)。随机选择 8 个 DEGs 进行实时荧光定量 PCR 验证, 8 个 DEGs 实时荧光定量 PCR 结果与转录组测序结果表达变化趋势一致, 相关系数  $R^2 = 0.77$  ( $P = 0.0007$ ) (附图 1), 表明转录组测序结果可靠。

### 2.2 玉米苞叶数目差异表达基因富集分析

为解析苞叶数目相关基因的动态变化模式, 对 DEGs 进行标准化处理, 剔除在 80% 样本中  $\text{FPKM} < 1$  的基因, 最终筛选出 3675 个 DEGs。基于 3675 个 DEGs 的表达模式, 将其划分为 8 个聚类 (C1~C8) (图 2)。各聚类呈现不同的表达趋势: C1、C2、C3 和 C4 的 DEGs 在 YD132 中上调表达, 在 YD97 中下调表达; C5、C7 和 C8 的 DEGs 在 YD132 中下调表达, 在 YD97 中上调表达; C6 的 DEGs 在 YD97 和 YD132 中的表达模式相似, 无明显差异。

对各聚类 DEGs 进行 GO 富集分析, 发现 YD97 和 YD132 中的上调表达基因具有显著的功能分化 (图 2)。YD132 上调表达基因主要富集于环境响应与代谢调控相关功能, 例如, C1 的 DEGs 富集于外界

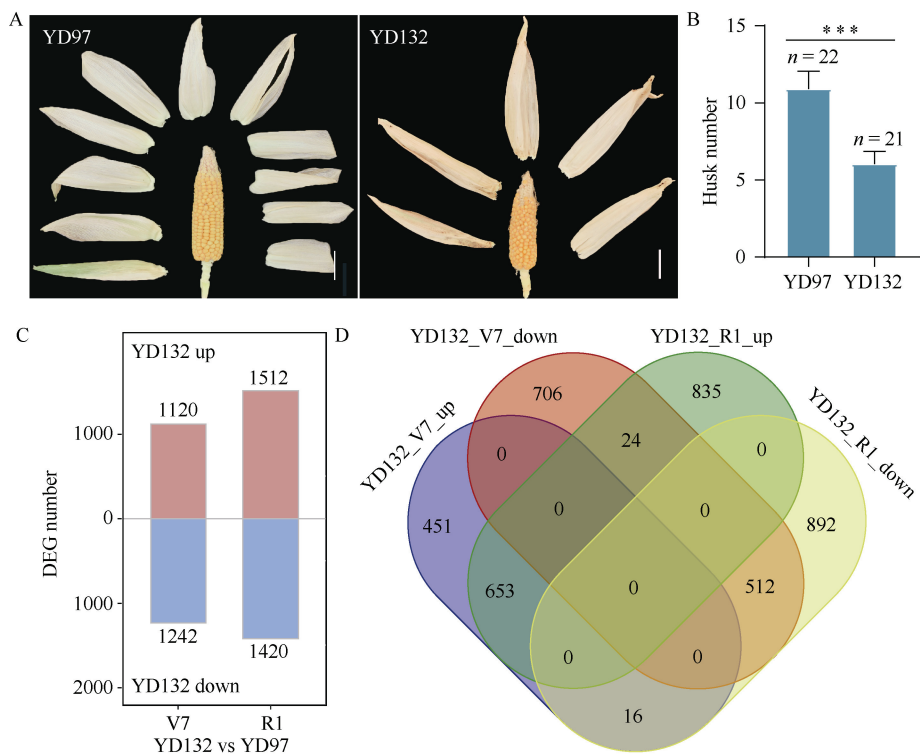


图 1 YD97 和 YD132 苞叶数目比较及差异表达基因的鉴定

**Fig. 1 Comparison of husk number and identification of DEGs between YD97 and YD132**

A: YD97 和 YD132 苞叶照片。标尺为 5 cm。B: YD97 和 YD132 苞叶数目统计分析。数据代表平均值±标准差。显著性分析利用 Student's *t*-test 计算。\*\*\*表示  $P < 0.001$ 。n 表示单株数。C: YD97 和 YD132 之间差异表达基因数目。D: 维恩图显示 YD97 和 YD132 之间差异表达基因数目。V7: 7 叶期; R1: 吐丝期。

A: husk phenotype of YD97 and YD132. Scale bar = 5 cm. B: statistical analysis of husk number in YD97 and YD132. Data are presented as mean ± standard deviation (SD). Significance was assessed using Student's *t*-test. \*\*\* indicates  $P < 0.001$ . n represents the number of individual plants. C: number of differentially expressed genes (DEGs) between YD97 and YD132. D: Venn diagram showing the overlap of DEGs between YD97 and YD132. V7: seven-leaf stage; R1: silking stage.

表 1 样品测序质量分析

**Table 1 Quality analysis of the sequencing data**

| 样品<br>Samples | 原始序列<br>Raw reads | 过滤后序列<br>Clean reads | 高质量序列<br>High quality rate (%) | 总比对率<br>Overall alignment rate (%) | 单一比对率<br>Unique alignment rate (%) |
|---------------|-------------------|----------------------|--------------------------------|------------------------------------|------------------------------------|
| YD97_V7-1     | 48,138,904        | 45,355,162           | 94.22                          | 88.47                              | 82.56                              |
| YD97_V7-2     | 54,751,468        | 52,583,682           | 96.04                          | 88.70                              | 84.31                              |
| YD97_V7-3     | 45,804,592        | 44,474,340           | 97.10                          | 90.77                              | 86.38                              |
| YD132_V7-1    | 46,922,316        | 44,898,478           | 95.69                          | 88.65                              | 82.77                              |
| YD132_V7-2    | 46,922,414        | 45,055,192           | 96.02                          | 89.35                              | 84.68                              |
| YD132_V7-3    | 44,494,410        | 42,917,810           | 96.46                          | 89.16                              | 84.48                              |
| YD97_R1-1     | 53,148,972        | 51,146,790           | 96.23                          | 89.54                              | 84.95                              |
| YD97_R1-2     | 58,479,998        | 56,783,176           | 97.10                          | 90.20                              | 85.87                              |
| YD97_R1-3     | 53,024,428        | 51,199,102           | 96.56                          | 89.46                              | 84.78                              |
| YD132_R1-1    | 43,873,188        | 42,166,088           | 96.11                          | 88.85                              | 84.78                              |
| YD132_R1-2    | 47,811,968        | 46,586,542           | 97.44                          | 89.19                              | 85.27                              |
| YD132_R1-3    | 55,492,932        | 53,894,340           | 97.12                          | 88.66                              | 84.25                              |

V7: 7 叶期; R1: 吐丝期。V7: seven-leaf stage; R1: silking stage.

生物刺激响应(GO:0043207)、小分子分解代谢 (GO:0009416), C4 的 DEGs 富集于氨基酸转运 (GO:0044282)等, C3 的 DEGs 富集于光刺激响应 (GO:0006865)。YD97 上调表达基因主要富集于生长发

育相关功能,例如, C5 的 DEGs 富集于内源刺激响应(GO:0009719)、生长素响应(GO:0009733)、细胞壁组织或生物合成(GO:0071554)等, C7 的 DEGs 富集于催化活性调控(GO:0050790)、分枝形态建成(GO:0001763)、氮化合物代谢的负调控(GO:0051172)等, C8 的 DEGs 富集于细胞周期(GO:0022402)等。上

述结果表明, YD132 的苞叶发育倾向于环境适应和代谢调控, 而 YD97 的苞叶发育主要依赖内源激素和细胞生长调控。在分子层面反应了苞叶对果穗生长发育的保护作用, YD97 苞叶数目多, 苞叶为果穗提供了更有利的保护, 病虫害不易入侵; 而 YD132 苞叶数目少, 病虫害较易入侵, 需响应环境变化, 保障生长发育。

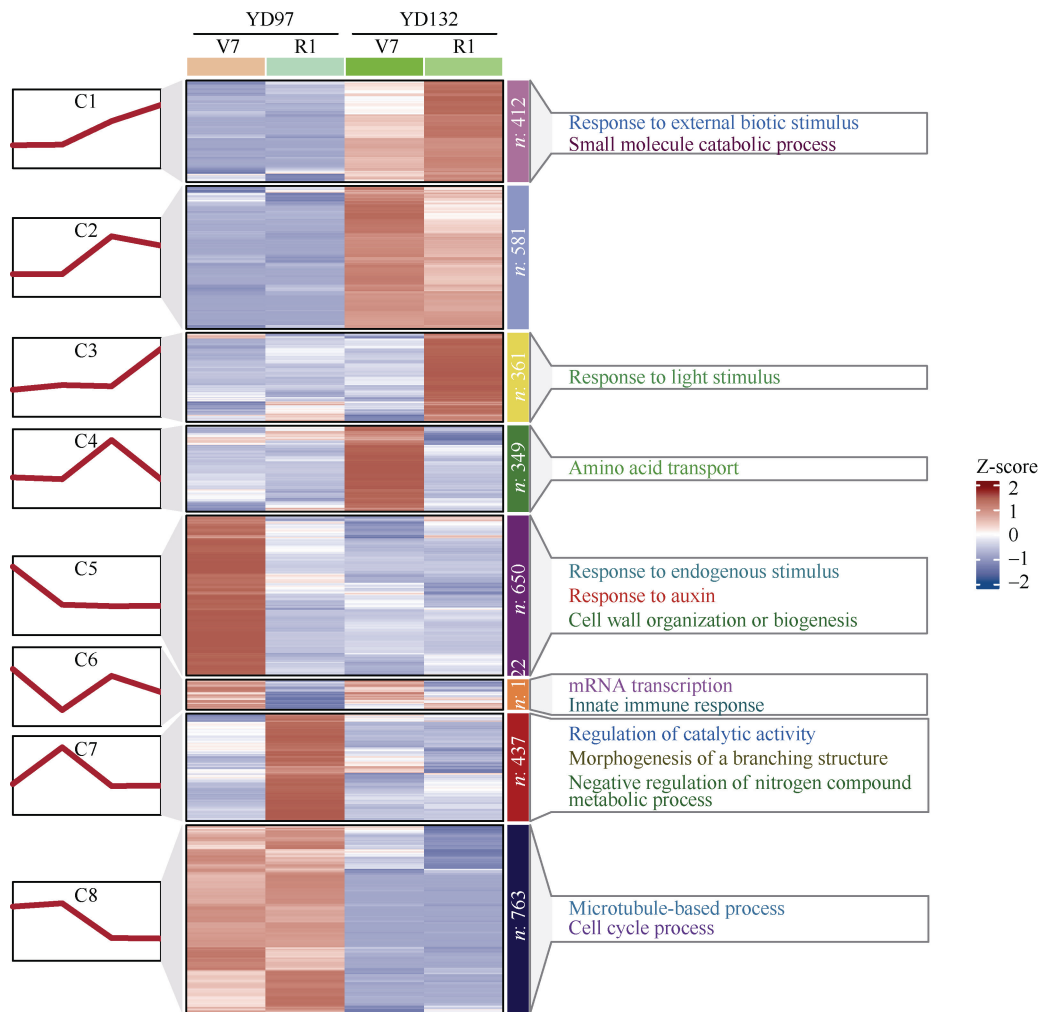


图 2 差异表达基因的 K-means 和 GO 富集分析

Fig. 2 K-means clustering and GO enrichment analysis of DEGs

左侧折线图表示通过 K-means 分析的 8 个聚类群。中间热图表示差异表达基因归一化 FPKM 值(Z-score);  $n$  表示基因数目。右侧文字表示 GO 富集的注释。V7: 7 叶期; R1: 吐丝期。

The line chart on the left shows eight gene clusters identified by K-means analysis. The central heatmap displays the normalized FPKM values (Z-score) of DEGs;  $n$  indicates the number of genes in each cluster. Annotations for gene ontology (GO) enrichment are shown on the right. V7: seven-leaf stage; R1: silking stage.

KEGG 分析发现, DEGs 主要富集于光合作用(zma00195)、植物激素信号转导(zma04075)、淀粉与蔗糖代谢(zma00500)、马达蛋白(zma04814)等途径。其中, C4 和 C5 聚类中的 DEGs 均显著富集于植物激素信号转导途径(zma04075)(图 3), 表明玉米 V7 期苞叶的发育与植物内源激素密切相关。进一步对 C4 和

C5 中富集于植物激素信号转导途径的 DEGs 进行鉴定, 结果显示, C4 聚类中鉴定到多个关键激素响应基因, 在 YD132 中上调表达, 包括生长素响应蛋白编码基因 *Zm00001eb067420*、乙烯不敏感蛋白编码基因 *Zm00001eb331080*、脱落酸不敏感蛋白 5 编码基因 *Zm00001eb331250* 和茉莉酸阻遏因子 TIFY 蛋白编码

基因 *Zm00001eb179390* 等(图 4-A)。C5 聚类中的 DEGs 主要富集于生长素响应因子, 在 YD132 中下调

表达(图 4-B)。结果表明, 植物激素信号转导代谢通路在玉米苞叶数目形态建成中发挥重要作用。

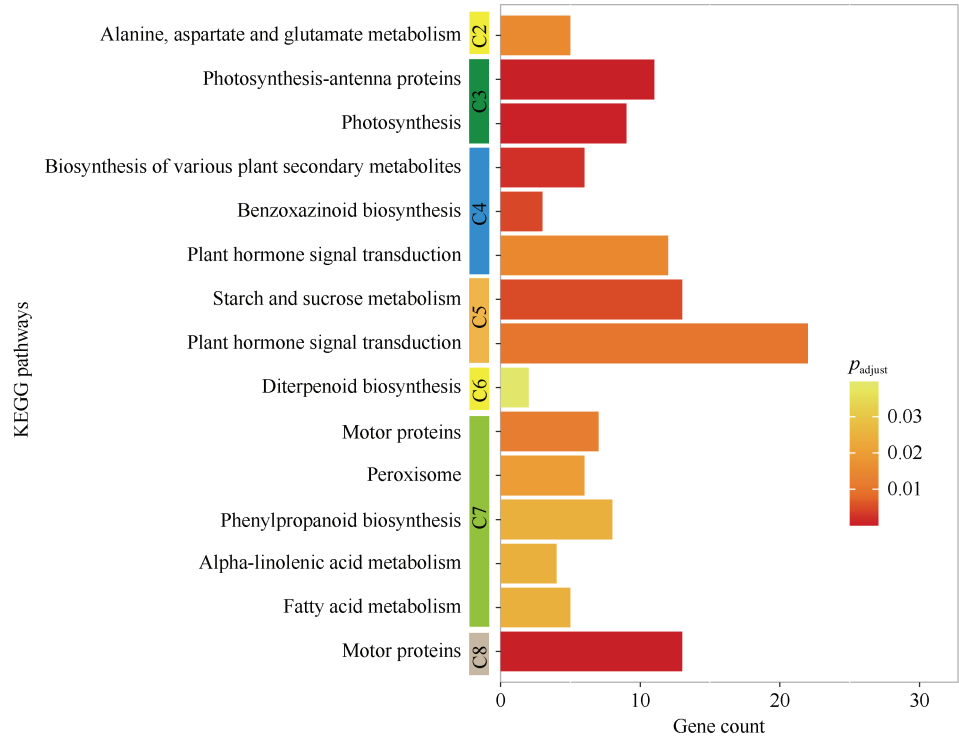


图 3 差异表达基因的 KEGG 富集分析  
Fig. 3 KEGG enrichment analysis of DEGs

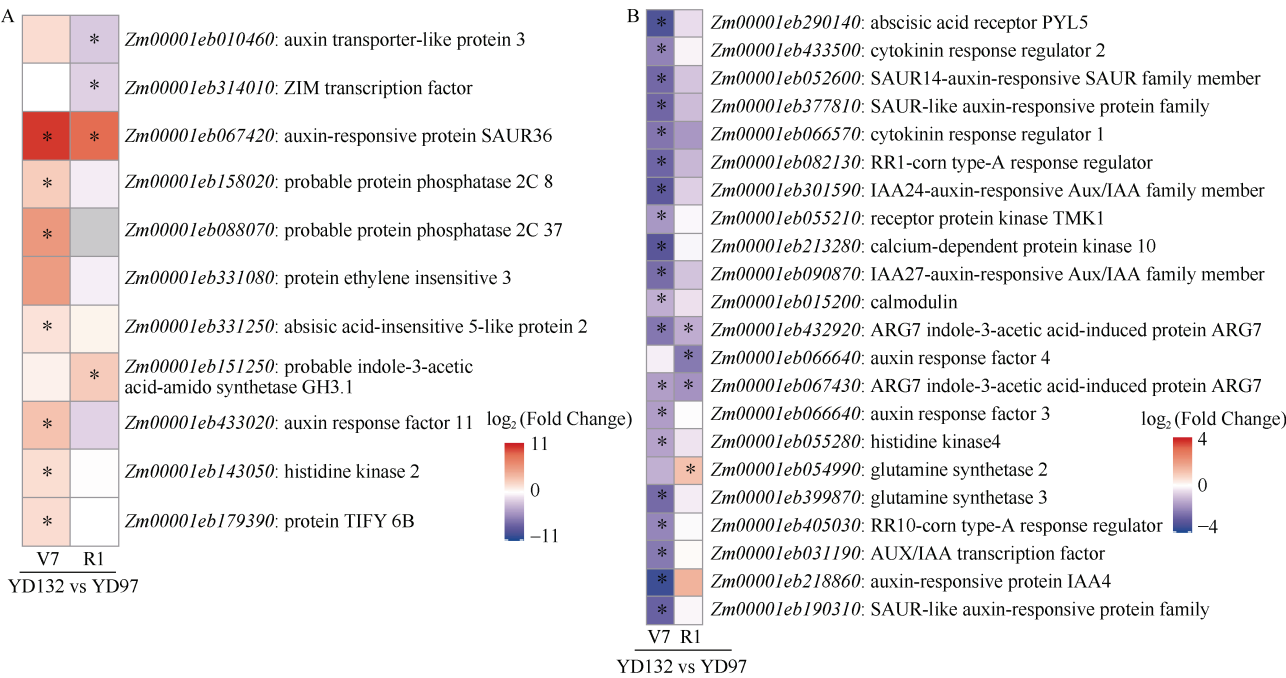


图 4 C4 (A)和 C5 (B)中植物激素信号途径相关基因表达热图  
Fig. 4 Heatmap analysis of plant hormone signal transduction genes in clusters C4 (A) and C5 (B)  
\*表示  $P < 0.05$ . V7: 7 叶期; R1: 吐丝期。  
\* indicates significance at  $P < 0.05$ . V7: seven-leaf stage; R1: silking stage.

### 2.3 玉米苞叶数目候选基因鉴定

前期研究,课题组利用衍生于 DH4866 × T877 的重组自交系群体,检测到 3 个苞叶数目 QTL, *qHN3*、*qHN6*、*qHN7*, 分别位于玉米第 3、6、7 染色体上,可解释 8.2%、7.9%、19.6%的表型变异<sup>[12]</sup>。本研究将转录组测序和 QTL 定位结果整合,共 37 个 DEGs 位于 *qHN3*、*qHN6* 和 *qHN7* 等 3 个 QTL 区间内,作为潜在候选基因。其中, *qHN3* 区间包含 18 个 DEGs, *qHN6* 区间包含 13 个 DEGs, *qHN7* 区间包含 6 个 DEGs (图 5)。利用 212 份玉米自交系 20× 重测序数据, *qHN3* 区间筛选出 1925 个 SNP 标记,通过关联分析,在  $P < 5.19 \times 10^{-4}$  (1/1925) 水平下,鉴

定到 3 个显著的 SNP 位点(图 6-A, B); 3 个显著 SNP 位点均位于基因 *Zm00001eb156610* 内, 其中 1 个 SNP 位于基因第 23 外显子, G/A 突变属于非同义突变, 导致甘氨酸(GGA)变为谷氨酸(GAA), 1 个 SNP 位于基因第 24 外显子, G/A (GGG/GGA) 突变属于同义突变, 1 个 SNP 位于基因 3'UTR (图 6-C); 3 个显著 SNP 可将 212 份玉米自交系分为 2 种单倍型(Hap1 和 Hap2), Hap1 的苞叶数目(8.21 张)显著多于 Hap2 的苞叶数目(7.41 张) (图 6-D)。 *qHN6* 区间筛选出 1011 个 SNP 标记, 通过关联分析, 在  $P < 9.89 \times 10^{-4}$  (1/1011) 水平下, 鉴定到 6 个显著的 SNP 位点(图 6-A, E)。6 个显著 SNP 位点均位于基因 *Zm00001eb275220*

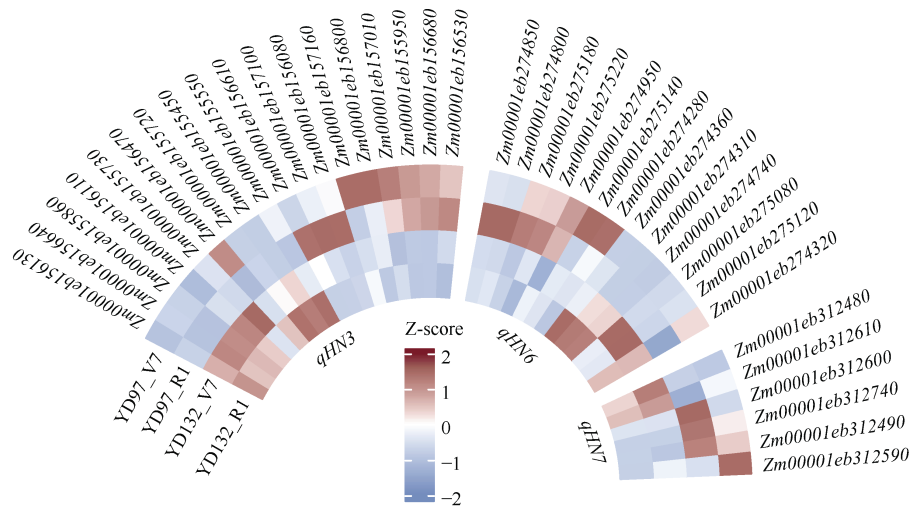
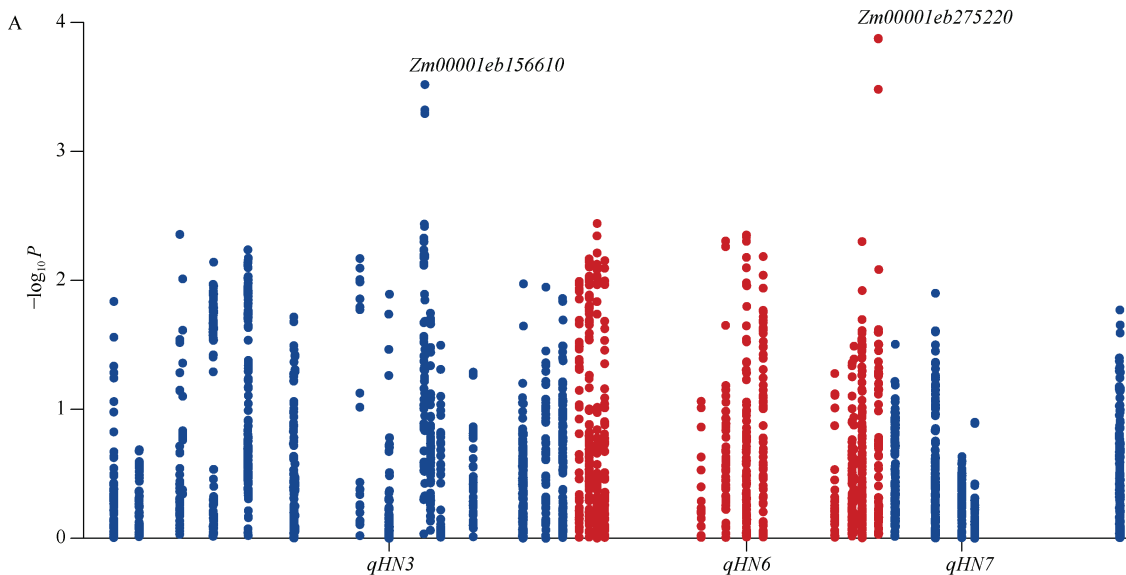


图 5 玉米苞叶数目 QTL 区间内潜在候选基因

Fig. 5 Putative candidate genes located within QTL regions for husk number in maize

V7: 7 叶期; R1: 吐丝期。V7: seven-leaf stage; R1: silking stage.



(图 6)

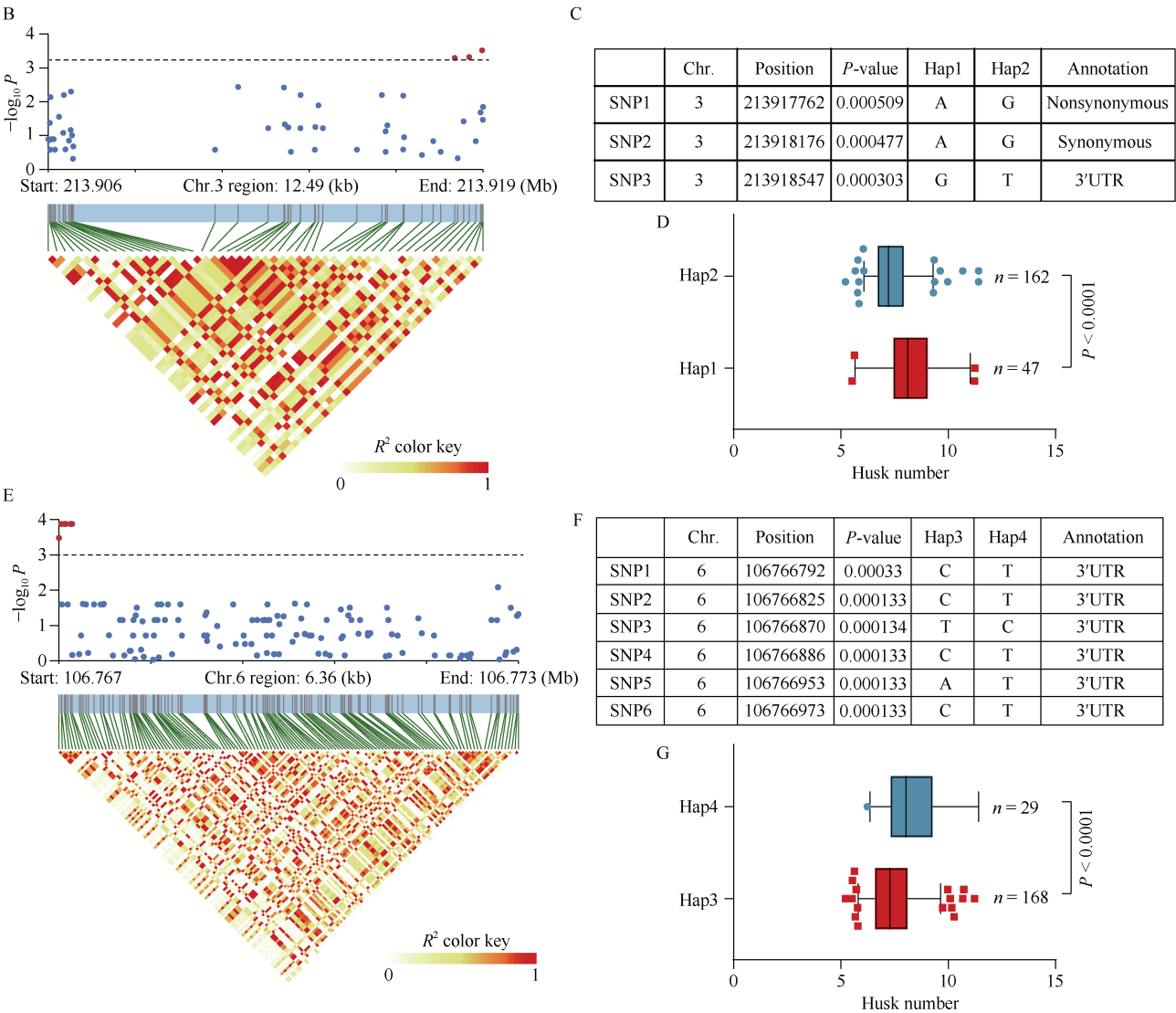


图 6 玉米苞叶数目候选基因的单倍型分析  
**Fig. 6 Haplotype analysis of candidate genes for husk number in maize**  
A: *qHN3*、*qHN6* 和 *qHN7* QTL 区间关联分析。B: *Zm00001eb156610* 内 SNP 连锁区块可视化分析。C: *Zm00001eb156610* 的单倍型。D: *Zm00001eb156610* 两种单倍型苞叶数目比较。E: *Zm00001eb275220* 内 SNP 连锁区块可视化分析。F: *Zm00001eb275220* 的单倍型。G: *Zm00001eb275220* 两种单倍型苞叶数目比较。  
A: association analysis within QTL regions *qHN3*, *qHN6*, and *qHN7*. B: visualization of SNP linkage blocks in *Zm00001eb156610*. C: identified haplotypes of *Zm00001eb156610*. D: comparison of husk number between two haplotypes of *Zm00001eb156610*. E: visualization of SNP linkage blocks in *Zm00001eb275220*. F: identified haplotypes of *Zm00001eb275220*. G: comparison of husk number between two haplotypes of *Zm00001eb275220*.

3'UTR 区, 可将 212 份玉米自交系分为 2 种单倍型 (Hap3 和 Hap4), Hap3 的苞叶数目(7.45 张)显著少于 Hap4 的苞叶数目(8.35 张) (图 6-F, G)。*qHN7* 区间筛选出 926 个 SNP 标记, 通过关联分析, 在  $P < 1.08 \times 10^{-3}$  ( $1/926$ )水平下, 没有鉴定到显著的 SNP 位点(图 6-A)。

*Zm00001eb156610* 和 *Zm00001eb275220* 是转录组数据中的 DEGs, 实时荧光定量 PCR 结果与转录

组测序结果表达变化趋势一致。相对于少苞叶数目材料 YD132, 2 个基因在多苞叶数目材料 YD97 中高表达(图 7-A), 说明 2 个基因的表达量与玉米苞叶数目相关。为验证这一结果, 随机选取了 25 个苞叶数目存在显著差异的自交系, 进行 qRT-PCR 分析, 回归分析结果表明, 2 个基因的表达量与苞叶数目呈显著正相关(图 7-B, C)。综上结果, 将 *Zm00001eb156610* 和 *Zm00001eb275220* 作为玉米苞叶数目的候选基因。

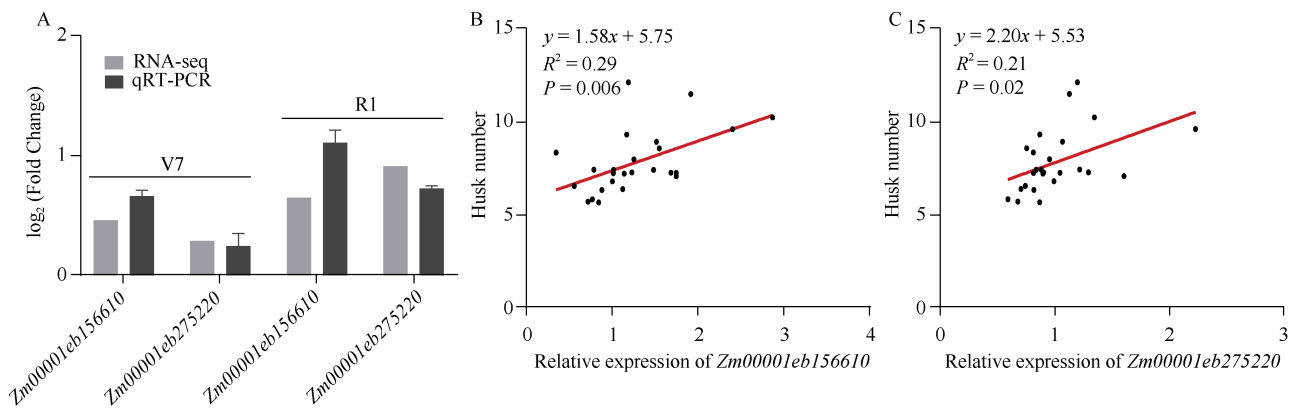


图 7 *Zm00001eb156610* 和 *Zm00001eb275220* 基因表达分析

Fig. 7 Expression analysis of *Zm00001eb156610* and *Zm00001eb275220*

A: *Zm00001eb156610* 和 *Zm00001eb275220* 基因转录组和 qRT-PCR 结果比较, 以 YD132 中的表达量作为对照。B: *Zm00001eb156610* 基因表达量与苞叶数目回归分析, 基因在 B73 中的表达量作为 1。C: *Zm00001eb275220* 基因表达量与苞叶数目回归分析, 基因在 B73 中的表达量作为 1。V7: 7 叶期; R1: 吐丝期。

A: comparison of expression levels obtained from RNA-seq and qRT-PCR for *Zm00001eb156610* and *Zm00001eb275220*, with YD132 used as the control. B: regression analysis between expression level of *Zm00001eb156610* and husk number; expression in B73 was set as 1. C: regression analysis between expression level of *Zm00001eb275220* and husk number; expression in B73 was set as 1. V7: seven-leaf stage; R1: silking stage.

### 3 讨论

苞叶是玉米变态叶, 由侧生分生组织发育而来, 轮生于穗柄的节部, 包裹在果穗周围, 伴随着果穗生长<sup>[4]</sup>。前期研究表明, 激素在玉米叶片形态建成和果穗发育过程中具有关键调控作用。例如, 玉米 KNOX 蛋白可调控生长素、赤霉素和油菜素内酯等激素影响叶鞘、叶长和叶宽的形成<sup>[22]</sup>。玉米 *KRN5b* 基因可影响生长素和茉莉酸合成和应答相关基因的表达, 调控穗分生组织发育和穗行数<sup>[23]</sup>。敲除玉米乙烯合成酶编码基因 *ZmACO2*, 可导致幼穗中乙烯含量减少, 生长素和茉莉酸含量增加, 进而促进分生组织和花的发育, 增加穗长和穗粒数<sup>[24]</sup>。此外, 在玉米的营养生长和生殖生长期, 分枝事件多数是通过生长素极性运输转运蛋白的活动形成生长素反应峰值来调控的<sup>[25]</sup>。本研究对苞叶数目存在显著差异的 2 个自交系 YD97 和 YD132 的苞叶组织进行转录组测序, 共鉴定到 4089 个 DEGs, 富集于多条代谢途径, 其中植物激素信号转导途径显著富集。玉米 V7 期是苞叶数目形态建成的关键时期<sup>[7]</sup>, 本研究在 V7 期鉴定到的上调 DEGs 涉及多个激素响应基因, 包括生长素、脱落酸、乙烯和茉莉酸等, 下调 DEGs 中涉及多个生长素响应因子。表明不同激素信号通路可能协同互作调控侧生分生组织发育, 影响玉米苞叶数目, 其中生长素信号通路发挥重要作用。

本研究联合转录组测序、QTL 定位和候选基因关联分析, 鉴定到 2 个玉米苞叶数目候选基因:

*Zm00001eb156610* 和 *Zm00001eb275220*, 分别是苞叶数目 QTL *qHN3* 和 *qHN6* 的候选基因。*qHN7* 内没有检测到显著位点, 可能是由于 *qHN7* 的优异等位基因是稀有基因, 本研究利用的候选基因关联分析群体相对较小, 导致该优异位点丢失<sup>[26]</sup>。*Zm00001eb156610* 和 *Zm00001eb275220* 在 V7 期苞叶原基中的表达量与苞叶数目呈显著正相关, 在 R1 期苞叶组织中高表达, 说明 2 个基因在玉米苞叶生长发育中发挥重要作用。

*Zm00001eb156610* 编码谷氨酸合成酶 2 (glutamate synthase2, GOGAT2)。GOGAT 是植物氮代谢中的关键酶, 催化酰胺酸从谷氨酰胺转移到 2-氧戊二酸合成谷氨酸<sup>[27]</sup>。谷氨酸是  $\gamma$ -氨基丁酸的前体, 在平衡碳/氮代谢和各种细胞过程中发挥着重要作用; 可以与生长素吲哚 3-乙酸结合, 并被氧化降解; 也可作为信号分子调节植物生长、发育和防御反应<sup>[28]</sup>。*Zm00001eb156610* 拟南芥同源基因 *GLT2* 参与根响应铵的供应<sup>[29]</sup>, 硝酸盐转运蛋白编码基因 *ZmNRT2.5* 调控玉米苞叶宽度<sup>[30]</sup>, 本研究 DEGs 也富集于氮代谢调控途径, 暗示氮的转运、信号转导及利用基因参与玉米苞叶形态建成。高等植物中, GOGAT 存在 2 种形式: NADH-GOGAT 和 Fd-GOGAT, GOGAT2 属 NADH-GOGAT 型<sup>[27]</sup>。水稻 *OsNADH-GOGAT1* 和 *OsNADH-GOGAT2* 基因分别具有调控有效分蘖数和每穗小花数的功能<sup>[31-32]</sup>, 表明 NADH-GOGAT 影响植物腋生和花序分生组织的发育。玉米

苞叶是由侧生分生组织发育而来, *Zm00001eb156610* 也有可能通过影响分生组织的发育调控玉米苞叶数目。

*Zm00001eb275220* 编码蛋白质 S-酰基转移酶 (protein S-acyl transferases, PAT)。PAT 主要参与蛋白质的棕榈酰化修饰, 可将长链饱和脂肪酸(通常是棕榈酸)连接到靶蛋白的半胱氨酸残基上, 进而调控蛋白质的活性、运输、稳定性及亚细胞定位<sup>[33]</sup>。*Zm00001eb275220* 玉米同源基因 *ZmTIP1* 可增加玉米根毛长度, 提高耐旱性<sup>[34]</sup>。拟南芥同源基因 *TIP1* 功能缺失突变体表现出典型的自身免疫特征, 包括植株矮小、出现病斑、防御基因表达量增加等<sup>[35]</sup>。PAT 编码基因 *UvPfa3* 和 *UvPfa4* 可以调控稻曲菌的致病力<sup>[36]</sup>, *GhPAT2* 参与调控陆地棉黄萎病抗性<sup>[37]</sup>, 表明 PAT 参与免疫防御反应。玉米苞叶与穗腐病抗性存在 2 个相互对立的方面, 苞叶数目少且包裹松, 一方面有利于病原菌的入侵, 抗病性下降, 另一方面有利于籽粒的快速脱水, 降低籽粒含水量, 不利于病原菌的繁殖, 抗病性提高<sup>[38-39]</sup>。本研究中, 多苞叶数目自交系 YD97 对穗腐病的抗性显著低于少苞叶数目自交系 YD132 对穗腐病的抗性<sup>[40]</sup>。然而, 2 个自交系的亲本, 多苞叶数目亲本 DH4866 的穗腐病抗性显著高于少苞叶数目亲本 T877 的穗腐病抗性<sup>[40]</sup>。有趣的是, *qHN6* 与玉米穗腐病抗性 meta-QTL *ZmMQTL6.1* 重叠<sup>[41]</sup>。利用基因编辑、过表达等技术验证 *Zm00001eb275220* 是否具有调控玉米苞叶数目和穗腐病抗性的双重功能值得尝试, 这也将有助于在分子水平上说明玉米苞叶和穗腐病抗性的关系。

## 4 结论

通过转录组分析明确了激素信号转导途径, 尤其是生长素信号通路, 在玉米苞叶数目形态建成中发挥重要作用; 联合转录组分析、QTL 定位、候选基因关联分析和实时荧光定量 PCR 分析, 鉴定到 2 个玉米苞叶数目候选基因 *Zm00001eb156610* 和 *Zm00001eb275220*, 分别编码谷氨酸合成酶 2 和蛋白质 S-酰基转移酶。

## References

- 王克如, 李少昆. 玉米籽粒脱水速率影响因素分析. 中国农业科学, 2017, 50: 2027–2035.  
Wang K R, Li S K. Analysis of influencing factors on kernel dehydration rate of maize hybrids. Sci Agric Sin, 2017, 50: 2027–2035 (in Chinese with English abstract).
- 李璐璐, 雷晓鹏, 谢瑞芝, 等. 夏玉米机械粒收质量影响因素分析. 中国农业科学, 2017, 50: 2044–2051.  
Li L L, Lei X P, Xie R Z, et al. Analysis of influential factors on mechanical grain harvest quality of summer maize. Sci Agric Sin, 2017, 50: 2044–2051 (in Chinese with English abstract).
- 李少昆. 我国玉米机械粒收质量影响因素及粒收技术的发展方向. 石河子大学学报(自然科学版), 2017, 35: 265–272.  
Li S K. Factors affecting the quality of maize grain mechanical harvest and the development trend of grain harvest technology. J Shihezi Univ (Nat Sci), 2017, 35: 265–272 (in Chinese with English abstract).
- Wang P, Kelly S, Fouracre J P, et al. Genome-wide transcript analysis of early maize leaf development reveals gene cohorts associated with the differentiation of C<sub>4</sub> Kranz anatomy. Plant J, 2013, 75: 656–670.
- Abadassi J. Maize agronomic traits needed in tropical zone. Int J Environ Sci Technol, 2015, 4: 371–392.
- Zhou G F, Hao D R, Xue L, et al. Genome-wide association study of kernel moisture content at harvest stage in maize. Breed Sci, 2018, 68: 622–628.
- 周广飞, 马亮, 马璐, 等. 玉米苞叶性状全基因组关联分析. 中国农业科学, 2025, 58: 431–442.  
Zhou G F, Ma L, Ma L, et al. Genome-wide association study of husk traits in maize. Sci Agric Sin, 2025, 58: 431–442 (in Chinese with English abstract).
- 李璐璐, 谢瑞芝, 王克如, 等. 去苞叶对玉米籽粒脱水过程的影响. 作物杂志, 2018(2): 114–117.  
Li L L, Xie R Z, Wang K R, et al. Effects of peeling husk on grain dehydration of maize. Crops, 2018(2): 114–117 (in Chinese with English abstract).
- Brewbaker J L, Kim S K. Inheritance of husk numbers and ear insect damage in maize. Crop Sci, 1979, 19: 32–36.
- Zhou G F, Hao D R, Chen G Q, et al. Genome-wide association study of the husk number and weight in maize (*Zea mays* L.). Euphytica, 2016, 210: 195–205.
- Cui Z H, Luo J H, Qi C Y, et al. Genome-wide association study (GWAS) reveals the genetic architecture of four husk traits in maize. BMC Genomics, 2016, 17: 946.
- Zhou G F, Mao Y X, Xue L, et al. Genetic dissection of husk number and length across multiple environments and fine-mapping of a major-effect QTL for husk number in maize (*Zea mays* L.). Crop J, 2020, 8: 1071–1080.
- Cui Z H, Xia A A, Zhang A, et al. Linkage mapping combined with association analysis reveals QTL and candidate genes for three husk traits in maize. Theor Appl Genet, 2018, 131: 2131–2144.
- Zhang J, Zhang F Q, Tian L, et al. Molecular mapping of quantitative trait loci for 3 husk traits using genotyping by sequencing in maize (*Zea mays* L.). G3: Gene Genom Genet, 2022, 12: jkac198.
- Wang Z, Xia A A, Wang Q, et al. Natural polymorphisms in *ZMET2* encoding a DNA methyltransferase modulate the number of husk layers in maize. Plant Physiol, 2024, 195: 2129–2142.
- 任蒙蒙, 张红伟, 王建华, 等. 玉米耐深播主效 QTL *qMES20-10* 的精细定位及差异表达基因分析. 作物学报, 2020, 46: 1016–1024.  
Ren M M, Zhang H W, Wang J H, et al. Fine mapping of a major QTL *qMES20-10* associated with deep-seeding tolerance in maize and analysis of differentially expressed genes. Acta Agron

Sin, 2020, 46: 1016–1024 (in Chinese with English abstract).

[17] 王新涛, 魏锋, 代资举, 等. 基于 QTL 定位和 RNA-seq 分析挖掘玉米茎秆候选基因. 植物遗传资源学报, 2022, 23: 1737–1745.

Wang X T, Wei F, Dai Z J, et al. Identification of candidate genes associating with stem diameter in maize (*Zea mays* L.) based on integrating QTL mapping and RNA-seq. J Plant Genet Resour, 2022, 23: 1737–1745 (in Chinese with English abstract).

[18] 叶靓, 朱叶琳, 裴琳婧, 等. 联合全基因组关联和转录组分析筛选玉米拟轮枝镰孢穗腐病的抗性候选基因. 作物学报, 2024, 50: 2279–2296.

Ye L, Zhu Y L, Pei L J, et al. Screening candidate resistance genes to ear rot caused by *Fusarium verticillioides* in maize by combined GWAS and transcriptome analysis. Acta Agron Sin, 2024, 50: 2279–2296 (in Chinese with English abstract).

[19] Zhou G F, Zhu Q L, Mao Y X, et al. Multi-locus genome-wide association study and genomic selection of kernel moisture content at the harvest stage in maize. Front Plant Sci, 2021, 12: 697688.

[20] Xia A A, Zheng L M, Wang Z, et al. The *RHW1-ZCN4* regulatory pathway confers natural variation of husk leaf width in maize. New Phytol, 2023, 239: 2367–2381.

[21] Bradbury P J, Zhang Z W, Kroon D E, et al. TASSEL: software for association mapping of complex traits in diverse samples. Bioinformatics, 2007, 23: 2633–2635.

[22] Strable J, Nelissen H. The dynamics of maize leaf development: patterned to grow while growing a pattern. Curr Opin Plant Biol, 2021, 63: 102038.

[23] Shen X M, Liu L, Tran T, et al. *KRN5b* regulates maize kernel row number through mediating phosphoinositol signalling. Plant Biotechnol J, 2024, 22: 3427–3441.

[24] Ning Q, Jian Y N, Du Y F, et al. An ethylene biosynthesis enzyme controls quantitative variation in maize ear length and kernel yield. Nat Commun, 2021, 12: 5832.

[25] Gallavotti A, Yang Y, Schmidt R J, et al. The Relationship between auxin transport and maize branching. Plant Physiol, 2008, 147: 1913–1923.

[26] Yan J B, Warburton M, Crouch J. Association mapping for enhancing maize (*Zea mays* L.) genetic improvement. Crop Sci, 2011, 51: 433–449.

[27] Liu X J, Hu B, Chu C C. Nitrogen assimilation in plants: current status and future prospects. J Genet Genom, 2022, 49: 394–404.

[28] Liao H S, Chung Y H, Hsieh M H. Glutamate: a multifunctional amino acid in plants. Plant Sci, 2022, 318: 111238.

[29] Kojima S, Minagawa H, Yoshida C, et al. Coregulation of *glutamine synthetase1;2* (*GLN1;2*) and *NADH-dependent glutamate synthase* (*GLT1*) gene expression in *Arabidopsis* roots in response to ammonium supply. Front Plant Sci, 2023, 14: 1127006.

[30] Wang Q, Wang M, Xia A A, et al. Natural variation in *ZmNRT2.5* modulates husk leaf width and promotes seed protein content in maize. Plant Biotechnol J, 2025, 23: 1039–1052.

[31] Tamura W, Hidaka Y, Tabuchi M, et al. Reverse genetics approach to characterize a function of NADH-glutamate synthase1 in rice plants. Amino Acids, 2010, 39: 1003–1012.

[32] Tamura W, Kojima S, Toyokawa A, et al. Disruption of a novel NADH-glutamate Synthase2 gene caused marked reduction in spikelet number of rice. Front Plant Sci, 2011, 2: 57.

[33] Liu F, Lu J Y, Li S, et al. Protein S-acylation, a new *Panacea* for plant fitness. J Integr Plant Biol, 2024, 66: 2102–2108.

[34] Zhang X M, Mi Y, Mao H D, et al. Genetic variation in *ZmTIP1* contributes to root hair elongation and drought tolerance in maize. Plant Biotechnol J, 2020, 18: 1271–1283.

[35] Cheng Y T, Thireault C A, Zhang L, et al. Roles of microbiota in autoimmunity in *Arabidopsis* leaves. Nat Plants, 2024, 10: 1363–1376.

[36] Duan Y H, Li P P, Zhang D Y, et al. S-palmitoylation of MAP kinase is essential for fungal virulence. mBio, 2024, 15: e02704–e02724.

[37] Deng Y H, Chen Q J, Qu Y Y. Protein S-acyl transferase GhPAT27 was associated with *Verticillium wilt* resistance in cotton. Plants, 2022, 11: 2758.

[38] 朱秋丽, 张舒钰, 章慧敏, 等. 玉米果穗苞叶包裹度的 QTL 分析. 农业生物技术学报, 2023, 31: 2231–2238.

Zhu Q L, Zhang S Y, Zhang H M, et al. QTL analysis of husk coverage on maize (*Zea mays*) ear. J Agric Biotechnol, 2023, 31: 2231–2238 (in Chinese with English abstract).

[39] 段灿星, 王晓鸣, 宋凤景, 等. 玉米抗穗腐病研究进展. 中国农业科学, 2015, 48: 2152–2164.

Duan C X, Wang X M, Song F J, et al. Advances in research on maize resistance to ear rot. Sci Agric Sin, 2015, 48: 2152–2164 (in Chinese with English abstract).

[40] Zhou G F, Li S F, Ma L, et al. Mapping and validation of a stable quantitative trait locus conferring maize resistance to *Gibberella* ear rot. Plant Dis, 2021, 105: 1984–1991.

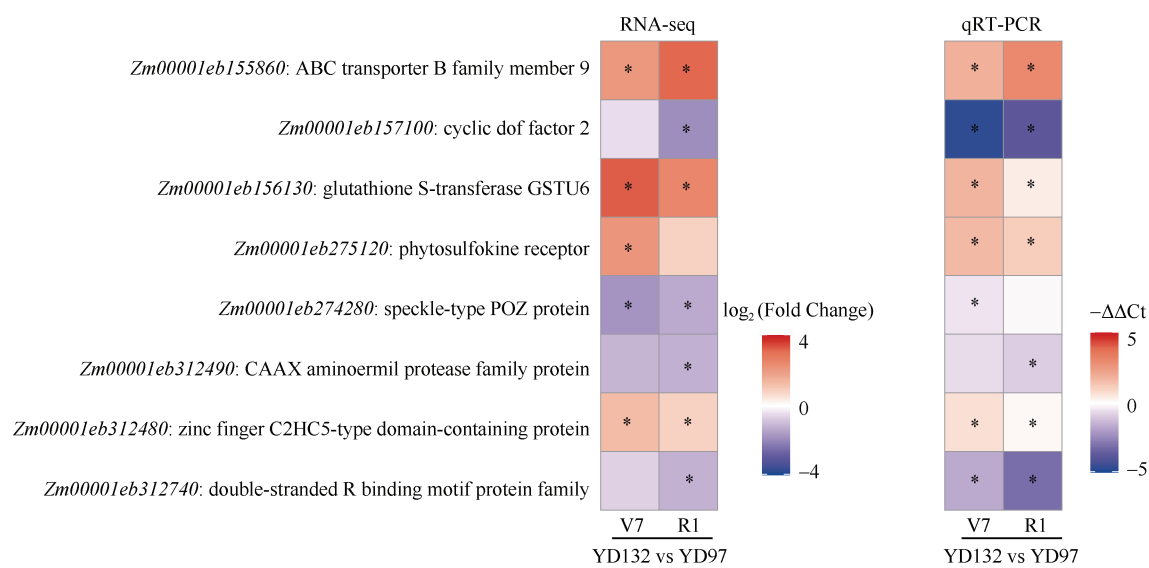
[41] Akohoue F, Miedaner T. Meta-analysis and co-expression analysis revealed stable QTL and candidate genes conferring resistances to *Fusarium* and *Gibberella* ear rots while reducing mycotoxin contamination in maize. Front Plant Sci, 2022, 13: 1050891.

附表 1 25 个玉米自交系的苞叶数目  
Table S1 Husk number of twenty-five maize inbred lines

| 自交系<br>Inbred line | 苞叶数目<br>Husk number | 自交系<br>Inbred line | 苞叶数目<br>Husk number | 自交系<br>Inbred line | 苞叶数目<br>Husk number | 自交系<br>Inbred line | 苞叶数目<br>Husk number |
|--------------------|---------------------|--------------------|---------------------|--------------------|---------------------|--------------------|---------------------|
| T877               | 7.93                | N11                | 8.30                | 12HTJ              | 7.21                | HX3M               | 6.30                |
| 齐 319 Qi 319       | 7.03                | 吉 853 Ji 853       | 10.17               | B73                | 6.75                | Q248               | 6.34                |
| 郑 58 Zheng 58      | 6.50                | PH814/PH848        | 5.63                | HA0213             | 7.19                | DH382              | 7.36                |
| 掖 478 Ye 478       | 7.23                | BSKRL2             | 7.22                | 武 9086 Wu 9086     | 5.67                | CS01               | 11.42               |
| CCM                | 7.38                | XL21               | 8.52                | CT3566             | 9.26                | YL2333             | 7.17                |
| ZGF                | 8.87                | 12HT113            | 5.80                | 9F592              | 7.37                | YL2338             | 12.04               |
| DH4866             | 9.54                |                    |                     |                    |                     |                    |                     |

附表 2 实时荧光定量 PCR 引物信息  
Table S2 Information of primers used for quantitative real-time PCR

| 基因<br>Gene             | 正向引物<br>Forward primer (5'-3') | 反向引物<br>Reverse primer (5'-3') |
|------------------------|--------------------------------|--------------------------------|
| <i>Zm00001eb155860</i> | GCGAGACCAGAACAGCTAAT           | GAATCTCTCCACGAGGCTTATC         |
| <i>Zm00001eb157100</i> | CTGTTCGGCAAGGTCATCC            | GAGGAAGGGCCGTCTGT              |
| <i>Zm00001eb156130</i> | AACCCGGTGCACAAGAAG             | AGGTACTGCAGGATCACGA            |
| <i>Zm00001eb275120</i> | TGCGTCTACAAGGCAGTTT            | CCAGCTCATTCTCGAATTCCT          |
| <i>Zm00001eb274280</i> | TGACAGGTATGGGCTGAACAG          | TTTGAGCAGCGAGCAGTT             |
| <i>Zm00001eb312490</i> | CAGCTGAGTGTGACAGTAGTAG         | CGAAACACATCATCTGGGAATG         |
| <i>Zm00001eb312480</i> | GGGTCACATTGGTTCCTCAA           | GCGTGCGTGTGTTGTTTCTT           |
| <i>Zm00001eb312740</i> | ACAAAGTGCCTGATGGTCTC           | CTTTCGCTTGACCAAAGTTCTG         |
| <i>Zm00001eb156610</i> | GGTTCATGGGAAACGATACA           | GGTCAATCGGAGGGTTTGTA           |
| <i>Zm00001eb275220</i> | CTGTGGATCACACTGGACAAA          | CAGCATCCATCTTAGCTCCTTC         |
| <i>β-tublin</i>        | CTACCTCACGGCATCTGCTATGT        | GTCACACACACTCGACTTCACG         |



附图 1 8 个差异表达基因的实时荧光定量 PCR 验证

Fig. S1 Quantitative real-time PCR (qRT-PCR) verification of 8 differently expression genes

热图直观展示 10 个验证基因在转录组测序(左图)和实时荧光定量 PCR 结果(右图)的表达模式。以 YD97 7 叶期和吐丝期样本的表达量为对照, 数据采用 3 次生物学重复的均值。显著性分析利用 Student's *t*-test 计算, \*表示  $P < 0.05$ 。V7: 7 叶期; R1: 吐丝期。  
The heatmap visually displays the expression patterns of 8 validated genes in RNA-seq (left panel) and qRT-PCR (right panel). Using expression levels from YD97 samples at the seven-leaf stage and silking stage as controls, the data represent means from three biological replicates. Statistical significance was determined by Student's *t*-test, \* indicates  $P < 0.05$ . V7: seven-leaf stage; R1: silking stage.