

玉米 *sk-A7110* 突变体的鉴定与基因定位

李清林, 徐长利, 董鲁朋, 赵燕, 戚秀山, 刘保申

(山东农业大学农学院/作物生物学国家重点实验室, 泰安 271018)

摘要: 柱头是玉米的主要性器官, 其正常发育与形态建成对种子的繁殖和产量具有决定作用。本实验室发现一个雌穗发育异常的自然突变体 *sk-A7110*, 该突变体雌穗的柱头完全缺失, 无法授粉结实。遗传分析表明, *sk-A7110* 突变体的柱头缺失性状属于隐性性状, 受 1 对隐性核基因控制。利用集团分离分析法将控制对应野生型性状的 *SKA7110* 基因定位在 2 号染色体短臂上, 位于物理距离约 255kb 的 *SAG21* 与 *IDP1453* 标记之间, 研究工作为 *SKA7110* 基因的克隆与功能分析奠定了基础。

关键词: 玉米; 花丝缺失; 基因定位

Analysis and Gene Mapping of a Maize Mutant Termed *sk-A7110*

LI Qing-lin, XU Chang-li, DONG Lu-peng, ZHAO Yan, QI Xiu-shan, LIU Bao-shen

(College of Agronomy, Shandong Agricultural University/State Key Laboratory of Crop Biology, Tai'an 271018)

Abstract: Silk is the main sexual organs of maize, and the normal development and morphogenesis of silk is crucial for the reproduction and yield of seed. We found a natural mutant *sk-A7110* that showed an exhaustive deletion of silk, which made itself suffer the abortion of seed on account of no pollination. Genetic analysis indicated that the mutation was controlled by a single recessive nucleus gene *SKA7110*. The *SKA7110* was localized in a 255 kb physical distance between the markers *SAG21* and *IDP1453* on chromosome 2 according to the gene mapping result by using bulked segregation analysis. The work of this study would provide a basis for cloning and functional analysis of *SKA7110*.

Key words: maize; silk deletion; gene mapping

玉米 (*Zea mays*) 的柱头是指由雌穗小花心皮原基分化形成的丝状器官, 俗称花丝。花丝是玉米雌穗的重要器官, 具有接受和运输花粉的作用, 其正常发育对种子的繁殖和产量具有决定作用, 花丝缺失时玉米无法完成受精和结实。研究玉米花丝发育形成的遗传与分子机制, 可为深入开展玉米花器官性别分化的基因控制途径、激素的功能及作用机理等基础研究提供参考。D. F. Jones^[1] 对花丝缺失突变体 *silkless* (*sk1*) 进行研究分析, 发现其雄穗发育正常, 雌穗小花的雌蕊发生败育, 且突变性状受隐性单基因控制, 推断野生型花丝发育的控制基因 *SKI* 是雌小穗上位花雌蕊原基正常发育的必需基因^[2]。

20 世纪初, 前人即开始了对玉米雌穗及花丝突

变体的收集和研究^[3]。R. A. Emerson^[4] 报道了雄穗雌性化且雌小穗双花丝的隐性突变体 *ts1* 和 *ts2*, 对应野生型基因 *TS1* 与 *TS2* 分别位于 2 号与 1 号染色体上^[5-6]。J. H. Kempton^[7] 研究了雌穗发生分枝且小花及花丝缺失的 *branched silkless1* (*bd1*) 突变体, 证明突变性状受 1 对隐性核基因控制, 对应野生型基因 *BDI* 被定位在 7 号染色体长臂末端, 调控小穗分生组织向小花的分化^[8]。A. C. Fraser^[9] 研究发现单隐性突变体 *silky-1* (*si1*) 的雌小穗有 4 条花丝, 且果穗熟后花丝不脱落, B. A. Ambrose 等^[10] 将野生型基因 *SII* 定位在 6 号染色体上, 且观察证实雌小穗多余的花丝来自上位花内未正常败育的雄蕊。B. E. Thompson 等^[11] 发现一个小花及花器官异常多

收稿日期: 2015-04-13 修回日期: 2015-05-10 网络出版日期: 2016-01-28

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.4996.S.20160128.1526.018.html>

基金项目: “十二五”农村领域国家科技计划课题(2011BAD35B01); 国家“863”项目(2012AA101104); 山东省农业生物资源创新利用项目

第一作者研究方向为玉米分子遗传与育种。E-mail: zhiyinzi@163.com

通信作者: 刘保申, 研究方向为玉米遗传育种。E-mail: liubs@sdau.edu.cn

生的 *bearded-ear* (*bde*) 突变体,其小穗内有多个小花,胚珠生出多条育性较低的花丝,遗传研究证实该突变性状受隐性基因 *bde* 控制,野生型雌小穗发育的控制基因 *BDE* 位于 5 号染色体上。D. F. Jones^[12] 后来发现一些雌穗顶端长有花药的花丝缺失突变体,将之与 *sk1* 一起称为 *sk* 突变体。分析前人对上述 5 个突变体的研究可知,只有 *sk1* 表现花丝缺失单一性状,其他突变体表现花丝发育异常的同时均伴随有雄穗变异性状,可以推断,*TS1*、*TS2*、*BD1*、*SII* 与 *BDE* 基因在表达上均与 *SK1* 存在直接或间接关系。至今未见 *SK1* 基因被克隆的报道,关于它与其他基因的关系以及在花丝发育中的作用仍处于推测阶段^[2]。

本实验室在自交系 A7110 中发现花丝缺失的突变株系,花丝缺失性状可以通过花粉传递,依据表型特征和来源将该突变株系命名为 *silkless-A7110* (*sk-A7110*),野生型花丝发育的控制基因命名为 *SKA7110*。*sk* 突变体的表型特殊且易于观察鉴定,被认为是有望揭示玉米性器官分化调控机制的关键材料,但前人仅对其进行了初步的表型观察与遗传分析,没有对花丝发育控制基因进行深入研究。因此,本研究以 *sk-A7110* 突变体为材料,对其表型进行了初步鉴定和遗传分析,并对引起该突变性状的基因进行了精细定位,以期对 *SKA7110* 基因的克隆及作用机理的研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

遗传分析选用 B73、80044(来源于 Reid 群体的选系)、 P_2 自交系作母本分别与 *sk-A7110* 突变体杂交,再以 *sk-A7110* 为回交父本与 3 个杂交组合的后代 F_1 回交得到 BC_1 ,并对 BC_1 进行单穗播种。基因定位用花丝缺失性状遗传稳定的 *sk-A7110* 突变体作父本给玉米自交系 B73、 P_2 、80044 授粉,获得对应杂交组合 F_1 ,并分别以各组合的 F_1 为回交母本,*sk-A7110* 为回交父本进行回交,获得各组合 BC_1 ,以 BC_1 分离群体为作图群体。

1.2 方法

1.2.1 表型鉴定 吐丝期在 A7110 变异株系的后代中选择正常吐丝和不吐丝植株各 30 株进行标记,分别在吐丝期、乳熟中期、成熟期对正常吐丝与不吐丝植株各选 10 株进行扒苞叶检查,记录果穗花丝的发育状况。吐丝期至成熟期不能正常吐丝且经扒苞叶验证果穗花丝数为零的植株记为突变体株,正常

吐丝并能完成授粉结实的植株记为野生型。在鉴定突变体与野生型花丝发育性状的同时,观察记录果穗穗轴及子粒的发育情况。

1.2.2 PCR 扩增及产物检测 试验材料的基因组 DNA 统一采用改良的 SDS 法提取。初步定位使用的 SSR 引物序列信息来源于 Maize GDB (<http://www.maizegdb.org>),精细定位使用的 SSR 及基因特异性标记的引物序列是参考 Gramene (<http://www.gramene.org>) 网站上下下载的 B73 基因组序列,利用 Primer5.0 软件设计完成,并由 Sangon Biotech 公司合成。扩增体系包括有 1.0 μ L 10 μ mol/L 引物,1.0 μ L 模板 DNA,3.0 μ L ddH₂O,5.0 μ L 2 \times Power Taq PCR Master Mix (BioTeke Corporation 提供)。扩增程序为 95 $^{\circ}$ C 预变性 5min;95 $^{\circ}$ C 变性 45 s,55 $^{\circ}$ C 退火 30 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 50 s,34 个循环,最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。扩增产物经 120 V 恒压非变性 PAGE 凝胶电泳,凝胶浓度 6% ~ 8%,电泳缓冲液为 1 \times TBE,电泳产物经快速银染法染色后观察分析。

1.2.3 基因定位 用 *sk-A7110* 与 P_2 检验均匀分布于玉米 10 条染色体上的 208 对 SSR 标记的多态性,找出两亲本间的多态性标记,从 BC_1 植株中选取突变体与野生型的 DNA 样品各 10 个分别构建近等基因池,检验在亲本间具有多态性的标记,利用池间多态性标记检验 134 株突变株的基因型,筛选与目的基因紧密连锁的标记,根据连锁标记在染色体上的分布信息确定目的基因所在区域。在目标区域内合成新的 SSR 与 SSP 引物,利用各杂交组合的 BC_1 进行基因定位,通过染色体步移不断缩小目标遗传区域。

多态性标记带型统计分析时,与 *sk-A7110* 突变体带型一致的单株记为 B,野生型亲本带型的单株记为 A;各组合 F_1 带型的植株记为 H。利用 D. D. Kosambi 函数^[13] 将重组率转化为遗传距离,并用 Mapchart 2.0 软件辅助进行连锁分析,根据连锁分析结果构建 *SKA7110* 基因所在区域的遗传图谱。

2 结果与分析

2.1 突变体的表型特征

经表型鉴定,*sk-A7110* 突变体的营养生长正常,株高、穗位与野生型均无明显差异。与野生型相比(图 1-A),突变体的主要特征是雌穗的花丝完全缺失,吐丝至成熟期均没有花丝发育迹象。鉴定发现,突变体因花丝缺失无法进行授粉,其穗轴呈典型圆

锥状,较野生型穗轴小,子房仅由表皮构成且乳熟期表现一定程度膨大后又变瘦瘪,检查成熟期果穗,无种子产生(图 1-B)。田间调查结果显示,突变体雄穗一次分枝与二次分枝的数量较野生型明显减少(表 1)。

2.2 花丝缺失性状的遗传分析

对 P₂、B73、80044 与 *sk-A7110* 杂交的组合 F₁ 和 BC₁ 群体进行表型性状统计。结果显示,各杂交组合 F₁ 的所有个体均长出花丝,3 个杂交组合的 BC₁ 群体出现性状分离,经卡方适合度检测 ($\chi^2_{0.05,1} = 3.84$),3 个杂交组合 BC₁ 的分离均符合花丝缺失突变体:野生型 = 1:1 的分离比例(表 2)。说明 *sk-A7110* 的花丝缺失性状受隐性单基因控制。

表 1 两个分离群体中野生型与突变体型雄穗分枝数比较

Table 1 Tassel branch number of wild type and mutant in segregation population of two combinations

杂交组合(群体)	分枝类型	野生型数量	突变体型数量
Hybridized group	Branch type	Wild type number	Mutant number
80044/ <i>sk-A7110</i>	一级分枝 Primary branch	8.89	6.24 **
(BC ₁)	二级分枝 Secondary branch	2.11	0.83 **
B73/ <i>sk-A7110</i>	一级分枝 Primary branch	11.65	9.58 **
(BC ₁)	二级分枝 Secondary branch	3.72	1.65 **

** 表示在 $P < 0.01$ 水平上差异显著 ** indicates the different significance at $P < 0.01$ level

表 2 *sk-A7110* 突变体的遗传分析

Table 2 Genetic analysis of *sk-A7110* mutant

杂交组合(群体)	BC ₁ 群体总株数	野生型株数	突变体株数	理论比值	($\chi^2_{0.05} \leq 3.84$)
Hybridized group	Total BC ₁ number	Wild type number	Mutant number	Theory value	
B73/ <i>sk-A7110</i>	231	117	114	1:1	0.04
80044/ <i>sk-A7110</i>	938	465	473	1:1	0.68
P2/ <i>sk-A7110</i>	2785	1422	1363	1:1	1.25

2.3 SKA7110 基因的初步定位

208 对 SSR 引物的多态性检验结果显示,有 37 个标记在 P₂ 与 *sk-A7110* 之间存在多态性,利用这 37 个多态性标记对 *sk-A7110*/P₂ 组合 BC₁ 分离群体的近等基因池进行扩增,发现位于 2 号染色体上的 5 对标记表现多态性,利用 134 个突变株进行连锁性检验,结果表明 2 号染色体短臂上的标记 *umc1555* 和 *umc1448* 与 *SKA7110* 基因紧密连锁,与 *SKA7110* 基因的遗传距离分别为 2.24 cM 和 6.72 cM(图 2-A)。在 *umc1555* 与 *umc1448* 之间合成 255 对引物,通过对 P₂ 与 *sk-A7110* 的多态性检验获得 7 对多态性标记,利用 2785 株 BC₁ 单株将 *SKA7110* 基因定位在标记 *TIDP2900* 左侧,遗传距离为 1.65 cM(图 2-A)。

2.4 SKA7110 基因的精确定位

标记 *TpA7133* 和 *IDP1453* 在 80044 与 *sk-A7110*



A: 去除苞叶的野生型玉米雌穗; B: 去除苞叶的 *sk-A7110* 突变体雌穗
A: Wild-type ear without husk leaves, B: *sk-A7110* ear without husk leaves

图 1 野生型与 *sk-A7110* 突变体吐丝期的雌穗

Fig. 1 The ear of the wild-type (WT) and *sk-A7110* mutant at silking stage

间表现多态性,且均位于标记 *umc1555* 与 *TIDP2900* 之间。用 938 株 80044/*sk-A7110* 组合 BC₁ 单株将 *SKA7110* 基因定位在标记 *TpA7133* 与 *IDP1453* 之间,与两标记的遗传距离分别为 0.64 cM 与 0.43 cM(图 2-B)。根据 *TpA7133* 与 *IDP1453* 之间的注释基因序列设计 86 对特异性引物,经多态性检验,发现标记 *SAG16*、*SAG21*、*SAG35* 在 *sk-A7110* 与 80044 之间表现多态性,*SAG21* 位于 *SAG16* 和 *SAG35* 的右侧,与 *IDP1453* 的物理距离最小。最终利用组合 BC₁ 中 *TpA7133* 标记的交换单株将 *SKA7110* 基因定位在标记 *SAG21* 的右侧,*SAG21* 距 *SKA7110* 基因的遗传距离为 0.53 cM。标记 *SAG21* 位于注释基因 GRMZM2G02419 上,与标记 *IDP1453* 的遗传距离为 0.96 cM,物理距离约 255 kb,之间包含 5 个基因组注释基因(图 2-C)。

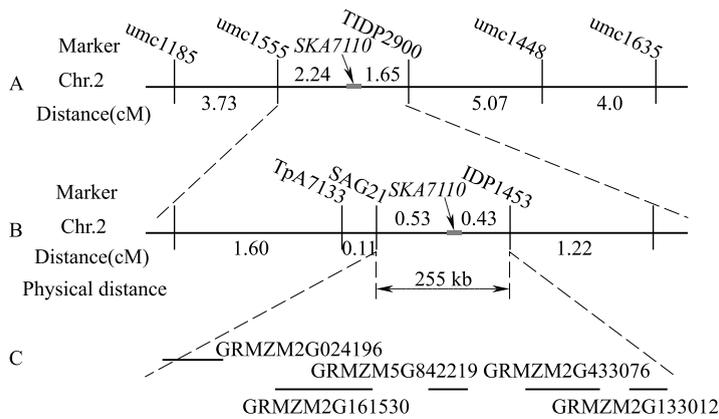


图 2 *SKA7110* 在 2 号染色体上的基因定位

Fig. 2 Gene mapping of *SKA7110* on maize chromosome 2

3 讨论

sk-A7110 属于自然突变体,具有 *sk* 家族突变体的表型特征,花丝缺失性状与 *sk1* 一致,由于 D. F. Jones^[1] 之后没有关于 *sk1* 性状突变基因的进一步研究报告,目前无法确定引起 *sk-A7110* 与 *sk1* 花丝缺失性状的突变基因的关系。*sk-A7110* 与 P2、B73、80044 三个杂交组合的 F₁ 均全部正常吐丝且 BC₁ 均出现花丝缺失突变体与野生型的 1:1 性状分离,说明 *sk-A7110* 的花丝缺失性状受 1 对隐性核基因控制。通过基因定位,本研究将 *SKA7110* 基因定位在位于 2 号染色体短臂上的标记 *SAG21* 与 *IDP1453* 之间,查询结果显示,定位区域内的 5 个注释基因全部编码表达蛋白,且均没有关联位点的注释信息,因此,推测 *SKA7110* 可能是该区域内一个控制玉米雌穗小花发育的新基因。

近年,针对玉米花器官突变体的分子生物学研究表明,性别决定基因通过调节激素合成控制小花分生组织分化来对玉米性器官的分化发育进行调控^[14-18],其中,内源赤霉素(GA, gibberellin)是雌蕊发育的关键激素,可以促进雌小穗上位花雌蕊的分化起始并保障其正常形成^[19-20],*sk-A7110* 突变体表型的产生有可能与 GA 的合成异常有关。本研究对 *SKA7110* 基因的定位结果为其进一步的精细定位与克隆提供了参考依据。

参考文献

[1] Jones D F. Heritable characters in maize. XXIII-*Silkless* [J]. J Hered, 1925, 16: 339-341
 [2] 杨同文,李潮海. 玉米性别决定的激素调控[J]. 植物学报, 2012, 47(1): 65-73
 [3] Veit B, Schmidt R J, Hake S, et al. Maize floral development: new genes and old mutants [J]. Plant Cell, 1993, 5: 1205-1215
 [4] Emerson R A. Heritable characters of maize. II. Pistillate flowered

maize plants [J]. J Hered, 1920, 11: 65-76
 [5] Irish E E, Langdale J A, Nelson T M. Interactions between *tassel seed* genes and other sex determining genes in maize [J]. Dev Genet, 1994, 15(2): 155-171
 [6] Acosta I F, Laparra H, Romero S P, et al. *tasselseed1* is a lipoxygenase affecting jasmonic acid signaling in sex determination of maize [J]. Science, 2009, 323(5911): 262-265
 [7] Kempton J H. Heritable characters in maize. XLVII-*Branched Silkless* [J]. J Hered, 1934, 25(1): 29-32
 [8] Chuck G, Muszynski M, Kellogg E, et al. The control of spikelet meristem identity by the *branched silkless1* gene in maize [J]. Science, 2002, 298(5596): 1238-1241
 [9] Fraser A C. Heritable characters of maize. XLIV-*silky ears* [J]. J Hered, 1933, 24: 41-46
 [10] Ambrose B A, Lerner D R, Ciceri P, et al. Molecular and genetic analyses of the *silky1* gene reveal conservation in floral organ specification between eudicots and monocots [J]. Mol Cell, 2000, 5: 569-579
 [11] Thompson B E, Bartling L, Whipple C, et al. *bearded-ear* encodes a MADS box transcription factor critical for maize floral development [J]. Plant Cell, 2009, 21: 2578-2590
 [12] Jones D F. Unisexual maize plants and their bearing on sex differentiation in other plants and in animals [J]. Genet, 1934, 19: 552-567
 [13] Kosambi D D. The estimation of map distances from recombination values [J]. Ann Human Genet, 1943, 12(1): 172-175
 [14] Colombo L, Marziani G, Masiero S, et al. *BRANCHED SILKLESS* mediates the transition from spikelet to floral meristem during *Zea mays* ear development [J]. Plant J, 1998, 16(3): 355-363
 [15] Chuck G, Meeley R, Irish E, et al. The maize *tasselseed4* microRNA controls sex determination and meristem cell fate by targeting *Tasselseed6/indeterminate spikelet1* [J]. Nat Genet, 2007, 39(12): 1517-1521
 [16] Chuck G. Molecular mechanisms of sex determination in monoecious and dioecious plants [J]. Adv Bot Res, 2010, 54: 53-83
 [17] Tanaka W, Pautler M, Jackson D, et al. Grass meristems II: inflorescence architecture, flower development and meristem fate [J]. Plant Cell Physiol, 2013, 54(3): 313-324
 [18] Young T E, Giesler-Lee J, Gallie D R. Senescence-induced expression of cytokinin reverses pistil abortion during maize flower development [J]. Plant J, 2004, 38(6): 910-922
 [19] Calderon-Urrea A, Dellaporta S L. Cell death and cell protection genes determine the fate of pistils in maize [J]. Development, 1999, 126: 435-441
 [20] Yamasaki S, Fujii N, Takahashi H. Hormonal regulation of sex expression in plants [J]. Vitam Horm, 2005, 72: 79-110