

玉米矮秆基因 *d15* 的克隆及表达分析赵长云^{1,2}, 白光庭^{1,3}, 何少勇¹, 余学杰^{1,2}, 李仁飞², 夏伟², 许秀兰², 柯永培^{1,2}(¹四川农业大学农学院, 成都 611130; ²四川正红生物技术有限责任公司, 成都 610213; ³甘肃亚盛农业研究院有限公司, 兰州 730000)

摘要: 发掘矮秆基因并解析其调控机制, 为玉米矮化育种提供基因资源和理论依据。利用形态观察和石蜡切片方法, 研究了玉米矮秆突变体 K15d 与野生型 K15 的矮化特征差异; 通过等位性鉴定并克隆了矮秆基因 *d15*, 分析了 3 个时期茎节间中 *d15* 的表达模式。与野生型 K15 比较, 突变体 K15d 的株高、穗位高和穗下节间数分别降低 39.22%、69.75% 和 38.83%, 差异均达显著或极显著水平; 茎秆细胞明显变小, 排列不规则。矮秆基因 *d15* 与 *br2* 等位, 第五外显子 5485bp-5685bp 区间缺失 200bp, 编码区全长 3983bp。 *d15* 编码蛋白的跨膜结构域只有 10 个, 缺失 2 个, 负责底物结合和转运功能的第二个保守功能域缺失。 *d15* 启动子较 *br2* 仅有 2 个 SNPs 差异。在拔节前、拔节期和拔节后 3 个时期, 突变体中 *d15* 基因的表达量与野生型间均无显著差异。由此可见, 矮秆基因 *d15* 的矮化特征及表达模式均与 *br2* 相似, 是一个新的 *br2* 等位基因, 丰富了玉米矮秆基因资源。

关键词: 玉米; 矮秆; *br2* 基因; 等位突变; 基因表达

Cloning and Expression Analysis of Dwarf Gene *d15* in MaizeZHAO Chang-yun^{1,2}, BAI Guang-ting^{1,3}, HE Shao-yong¹, YU Xue-jie^{1,2}, LI Ren-fei², XIA Wei², XU Xiu-lan², KE Yong-pei^{1,2}(¹College of Agronomy, Sichuan Agricultural University, Chengdu 611130; ²Sichuan Zhenghong Bio Co., Ltd. Chengdu 610213; ³Gansu Yasheng Agricultural Research Institute Co., Ltd. Lanzhou 730000)

Abstract: Exploring dwarf genes and deciphering their regulation mechanisms might provide germplasm resources and theoretical basis useful in maize dwarf breeding. The differences between maize dwarf mutant K15d and its wild type K15 were analyzed by morphological observation and paraffin section. Based on the result of allelism test, the functional gene in K15d mutant (designated *d15*) was cloned by PCR amplification, and the transcriptional pattern in stem internodes were analyzed at three stages. Compared with wild type K15, the plant height, ear height and the internodes number below ear position of mutant K15d significantly decreased by 39.22%, 69.75% and 38.83%, respectively. The stem cells in K15d were significantly smaller and irregularly arranged. The dwarf allele *d15* was allelic to *br2*, showing a 200bp deletion (5485' to 5685') at the fifth exon, and the coding region of 3983bp. The truncated protein encodes only 10 transmembrane domains, without the second conserved functional domain that is responsible for substrate binding and transport function. Compare to the allele *br2*, only had two SNPs were observed in the promoter sequence of *d15*. There were no significant differences in the expression levels of *d15* gene between the mutant and the wild type at the three stages of pre-elongation, elongation and post-elongation. Collectively, the novel allele *d15* is allelic and similar to *br2* on dwarf characteristic and expression pattern, which provided a new dwarf gene resource useful in maize breeding.

Key words: maize; dwarf; *br2* gene; allelic mutation; gene expression

株高是玉米理想株型建成的重要农艺性状之一, 直接影响玉米品种的高产潜力和抗倒性能^[1]。矮秆玉米具有抗倒伏、耐肥、株型紧凑等特点, 更能适应农业机械化的发展^[2], 也是开展作物矮化育种的关键种质资源。

收稿日期: 2022-11-15

修回日期:

网络出版日期:

URL:

第一作者: 研究方向为玉米遗传育种, E-mail: 651208212@qq.com; 白光庭为共同第一作者

通讯作者: 柯永培, 研究方向为玉米遗传育种, E-mail: keyp169@163.com

基金项目: 四川省重点研发项目(2021YFYZ0017); 四川省重大科技专项(2022ZDX0013); 成都市科技创新平台资助项目(2019-YF04-00022-JH); 成都市重点研发项目(2021-YF05-00527-SN)

Foundation projects : Key R&D Project of Sichuan Province (2021YFYZ0017);Major Science and Technology Project of Sichuan Province (2022ZDZX0013);Science and Technology Innovation Platform funded projects in Chengdu (2019-YF04-00022-JH);Key R&D Project in Chengdu (2021-YF05-00527-SN)

源^[3]。目前,玉米上最具商业价值的株高基因仍然是 *br2* (*brachytic2*),其能够抑制茎节间细胞的伸长,有效地降低株高,尤其对穗位以下节间更为显著^[4-6]。Pilu 等对 B73 中分离的矮秆材料 *br2-23* 进行研究,用 *br1*、*br2* 和 *br3* 与其进行等位杂交, F₁ 没有恢复野生型表现,推断它们为同源基因,并用 SSR 标记定位 F₂ 群体证实了这一推断^[7]。2003 年, Multani 等首次在玉米 B73 基因组中通过 Mu 转座子标签法克隆出 *br2* 基因,经研究表明其矮化机理是 *br2* 编码蛋白 PGP 的功能缺失导致 IAA 运输过程的受阻^[8]。近年来,通过突变体鉴定、QTL 定位及图位克隆等方法,多个玉米 *br2* 等位基因被克隆,如 *br2-23* 在第五外显子上发生一个 8bp 的自然缺失^[7]; *QTL-qph1* 第五外显子 5259bp 处发生一个 SNP (G/T) 改变^[9]; *d123* 第四外显子上编码的一个谷氨酸被替换为赖氨酸^[10]; *br2-NC238* 第四内含子上插入一个 572bp 微型反向重复转座元件 (MITE) ^[11]; *qpal* 第 5 外显子 6376bp 到 6617bp 间缺失 241bp^[5]。随着 *br2* 基因研究的不断深入,利用优良的 *br2* 等位变异,选育出一系列矮秆品种,在生产上得以大面积的推广,代表性品种有本雀比利亚 AN-360 (墨西哥)、矮 154 和矮 544 (河南新乡农科所)、矮单 268、南玉 8 号等^[12-14]。由于玉米 *br2* 基因连锁一些不良性状或一因多效,导致具有 *br2* 背景的材料也有一些不良性状,限制了 *br2* 矮秆材料的利用价值, *br2* 优良等位基因仍是育种家们寻找的目标^[15]。因此,发掘和利用新的矮秆基因或等位变异对玉米矮化育种具有重要意义。K15d 为本课题组发现的一个矮秆玉米突变体,前期研究表明 K15d 是较好的矮化育种亲本^[16]。本研究将对 K15d 的矮化特征进行鉴定,通过矮化基因的等位性鉴定,对 *d15* 基因进行克隆和表达分析,为进一步研究其矮化机制和应用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

玉米矮秆突变体 K15d 及同源高秆自交系 K15 (野生型)、R08d (*cr1*)、K125d (*br2*) 和 114F (*br2*); K15d 分别与 R08d、K125d 和 114F 杂交获得 3 个 F₁ 群体; K15d 分别与 R08d 和 K125d 构建 2 个 F₂ 群体。114F 来源于 MGCSC (Maize Genetics Cooperation Stock Centre), 其余材料均由四川正红生物技术有限责任公司 (以下简称公司) 提供。2×T5 Super PCR Mix、DH5α 感受态细胞购自成都擎科梓熙生物技术有限公司; TB Green™ Premix Ex Taq™ II、高保真酶 PrimeSTAR 购自 TAKARA 公司; 快捷型植物基因组 DNA 提取试剂盒、DNA 产物纯化试剂盒、RNA prep Pure Plant Kit 试剂盒购自 TIANGEN 公司; 反转录试剂盒 (ReverTra Ace® qPCR RT Master Mix with gDNA Remover) 购自 TOYOBO; 克隆载体 pEASY-T5 购自北京全式金生物技术有限公司; 引物由上海生工生物公司合成。

1.2 试验设计

2016年春季在公司双流基地顺序播种114F 、 R08d、 K125d、 K15d、 K15、 3个F₁群体和2个F₂群体， 6行区， 每行8窝， 每窝2株， 行距0.8m， 行长3.5m， 密度3350株/亩。 田间管理以大田生产为标准。

1.3 K15d与K15的矮化特征鉴定

1.3.1性状考察 散粉结束后， 测量K15和K15d的节间长、 节间粗和节间数并拍照。

1.3.2细胞学观察 在散粉结束后， 切取突变体K15d及K15的穗下节间中部约0.3cm×0.3cm×0.5cm大小块纵、 横切面， 采用石蜡切片法制作切片^[17]， 并在光学显微镜下对切片观察拍照， 比较同一放大倍数和视野下K15d与K15的细胞形状和数目。 计算各性状的平均值及标准误（SE）， 对突变体K15d与对应野生型K15的性状数据进行t-检验（Excel 2012和SPSS19）。

1.4 突变体致矮基因等位性鉴定

1.4.1 性状考察 散粉结束后， 测量 114F 、 R08d、 K125d、 K15d、 3 个 F₁ 群体和 2 个 F₂ 群体的株高和穗位高。

1.4.2 数据分析方法 计算 F₁ 株高和穗位高平均值和标准误（SE）， 与双亲株高和穗位高对比； 统计 F₂ 植株高矮分离情况， 并做株高分布图， 推测相应亲本间矮秆基因的等位关系。

1.5 同源克隆及序列分析

1.5.1 启动子的扩增 根据已报道的*br2*启动子序列设计引物pQPH1F（CGCGTACCGTATCTAACCAA）和pQPH1R（CGGGTCGCTGCTAGACATG）^[9]， 以K15和K15d基因组DNA为模版， 利用PCR方法扩增*d15*启动子序列。 PCR反应体系按照PrimeSTAR HS DNA Polymerase操作说明进行， 反应条件： 98℃预变性1min， 98℃变性10s， 60℃退火5s， 72℃延伸2min， 72℃再延伸7min， 35个循环。

1.5.2 编码区的扩增 参照*br2*基因组序列（Genebank登录号： AY366085）， 利用Premier5.0软件设计7对交叉覆盖整个*br2*基因组的特异性引物扩增K15和K15d， 所用引物序列见表1。 PCR扩增体系均为： 9.5μl ddH₂O， 1μl DNA， 前后引物各1μl， 12.5μl T5 Super PCR Mix。 PCR扩增程序： 98℃预变性3min， 98℃变性15sec， Tm（54~64℃）退火15sec， 72℃延伸15sec/kb， 扩增35个循环； 72℃延伸3min； 最后4℃保存。

对以上扩增出来的目标条带进行凝胶回收并纯化， 并与 *pEASY-T5* 载体连接转化到大肠杆菌 *DH5a* 感受态细胞中， 在 Amp 抗性的 LB 平板上筛选阳性克隆， 随机挑取单菌落进行 PCR 鉴定， 将阳性单菌落菌液分别送成都擎科梓熙生物技术有限公司和北京六合华大基因科技有限公司测序。 用 DNAMAN 软件对 K15d 和 K15 中 *d15* 基因测序结果进行拼接和比对。 采用 DNAMAN 软件预测编码氨基酸序列并比对。

表 1 同源克隆的引物序列

Table1 Primer sequences for homology-based cloning

引物名称	正向引物	反向引物	扩增长度（bp）
Name of primer	Forward primer sequence	Reverse primer sequence	Amplified length

H109	GCCGTCACCATCTAGTTTGC	CGACGACGAGGAAGTAGAAG	1105
H106	CGAGCAGCCGCCCAATG	TACCAGAGCAGGAGCCCGTAG	1007
H113	GGGCAACCTCATCCACTACAT	GGTTCTCCCTGATGCTCGTC	1595
H114	TTGGTCGTGGCTGTTTGTTG	GCATGGGTTTGACTGGCTCT	1743
H103	CCACCCCAGCTCTTGCTACTC	CCGCTTGGTCAGGTTCTC	1381
212F/233R	CGCCATCTTCGCCTACATC	CATCAATCTCTCGAGGAACCAAAC	1754
H211	GCGAGAACCTGACCAAGCG	CGCCCTTGATGAAGTCCG	663

1.6 生物信息学分析

利用在线工具TMHMM Server V.2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>) 预测蛋白跨膜结构域。SOPMA在线软件分析蛋白质二级结构类型。利用SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de>) 预测蛋白质功能结构域。

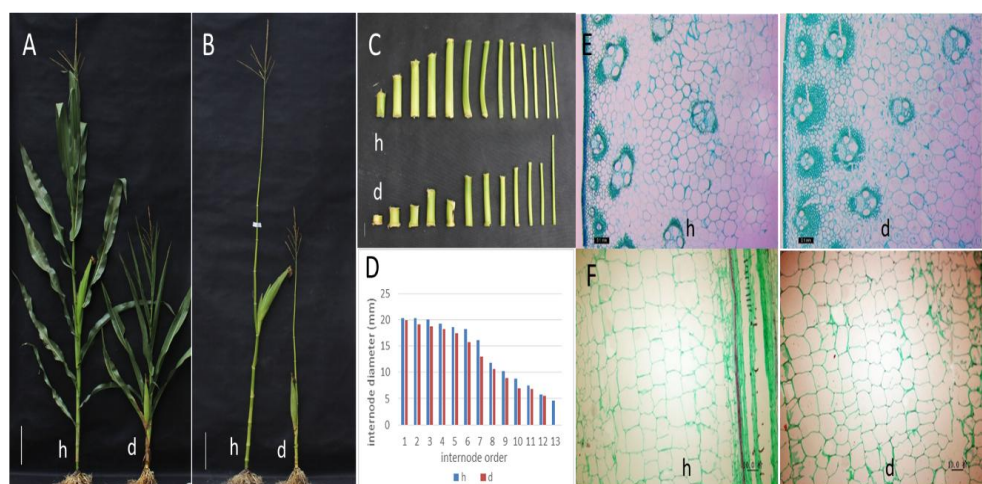
1.7 基因的表达

采用 RNA prep Pure Plant Kit 试剂盒分别提取 K15d 和 K15 材料拔节前期(8 片展开叶及 11 片可见叶)、中期(10 片展开叶及 13 片可见叶)和后期(12 片展开叶及 16 片可见叶)的茎秆第二节间的总 RNA，并通过反转录试剂盒将其反转录成 cDNA。田间取样应根据叶龄指数，每个时期每个材料选取展开叶片数与总叶片数均一致、株高及分化节数相同、发育程度最一致、无病虫害侵袭的植株，生物学重复 3 株，切取节间正中部区段，尽量保证切取的茎块含有同样比例的木质部与韧皮部及表皮组织。利用 Primer5.0 软件设计基因表达特异性引物 RT12 (上游引物 5'-CTGCTCATCGGCATGTCCTC-3'；下游引物：5'-GAACAAGGCGATCTCGTTGC-3')，*18s rRNA* 作为内参基因。按照 TB Green Premix Ex Taq II 说明书中配置定量反应体系，在 CFX96 Real-Time System 收集荧光，每个样品设置 3 次重复，基因相对表达量采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 方法计算^[18]。

2 结果与分析

2.1 K15和K15d的矮化特征比较

K15 与 K15d 的部分矮化性状比较见图 1。从图 1 中可以看出，矮秆突变体 K15d 与野生型 K15 相比株高、穗位高明显降低(图 1A，图 1B)；节间长特别是穗下节间明显变短(图 1C)；各节间直径变细(图 1D)。穗下节间细胞横切片(图 1E)和纵切片(图 1F)，同一放大倍数视野下 K15d 部分维管束变大，纵切面中细胞长度变短和排列不规则。



注：h：K15；d：K15d；A：植株 标尺=20cm；B：茎秆 标尺=20cm；C：节间 标尺=2.2cm；D：节间直径；E：穗下节间横切面（10×10）；F：穗下节间纵切面（10×10）

Note: h: K15; d: K15d; A: plants bar=20 cm; B: stems bar=20cm; C: internodes bar =2.2 cm; D: internode diameter; E: cross section of below ear internode (10x10); F: vertical section of below ear internode (10x10)

图 1 K15 与 K15d 部分矮化性状比较

Fig.1 Comparison of partial dwarfing characters between K15 and K15d

将 K15 与 K15d 的部分性状测量数据列于表 2。从表 2 中可以看出，矮秆突变体 K15d 与野生型 K15 相比株高降低 39.22%，穗位高降低 69.75%，差异均达到极显著水平；穗下节间数相对野生型缩短 38.83%，穗上节间数变化不明显，说明 K15d 的矮化与穗下部节间数的减少有关。在相同放大倍数和视野下 K15d 横切面细胞数减少 31.30%，纵切面细胞数增加 34.30%，分别达到极显著和显著水平。

表 2 K15 与 K15d 部分矮化性状比较

Table 2 Comparison of partial dwarfing characters between K15 and K15d

性状 Trait	K15	K15d	比 K15 增减 (%) Compared with K15(%)
株高 (cm) Plant height (cm)	234.60±2.19	142.60±1.70	-39.22**
穗位高 (cm) Ear height (cm)	72.73±2.15	22.00±1.20	-69.75**
节间数 (节) Internode No. (section)	13.00±0	11.33±0.67	-12.85
穗下节间数 (节) Internode no. below ear internode	6.00±0	3.67±0.33	-38.83*
穗上节间数 (节) internode no. above ear internode	7.00±0	7.67±0.33	+ 9.57
穗下节间横切面细胞数 (个) Transverse cell No. of below ear internode	57.50±0.50	39.5±0.50	-31.30**
穗下节间纵切面细胞数 (个) Longitudinal cell no. of below ear internode	10.67±0.67	14.33±0.67	+34.30*

注：±标准误；*表示在 P=0.05 水平差异显著，**表示在 P=0.01 水平差异显著

Note:± SE;*means significantly different at P=0.05,** means significantly different at P=0.01

2.2 突变体 K15d 致矮秆基因的等位性分析

2.2.1 F₁群体的株高和穗位高分析 3个F₁与双亲株高和穗位高比较结果（表3）。从表3中可以看出，组合

K15d×K125d和K15d×114F的株高和穗位高较矮。前期研究证明K125d和114F矮秆基因为单隐性细胞核基因

（*br2*）遗传^[19]，推测K15d矮秆基因亦为单隐性基因遗传，初步判断K15d、K125d和114F的矮秆突变基因相

互等位。而组合K15d×R08d (*cr1*) 株高和穗位高比双亲明显增高, 说明K15d矮秆基因与*cr1*不等位。

表 3 F₁ 代与双亲株高和穗位高比较

Table 3 Comparison of plant height, ear height between F₁ and it's Parents

组合	性状 (cm)	母本	父本	F ₁ 群体	等位性
Combination	Trait(cm)	Female parent	Male parent	F ₁ population	allelism
K15d×R08d	株高	142.60±1.70	115.33±1.14	254.60±2.39	不等位
	穗位高	22.00±1.20	34.13±0.95	78.05±2.80	
K15d×K125d	株高	142.60±1.70	106.27±1.17	189.10±3.68	等位
	穗位高	22.00±1.20	25.87±0.62	38.45±1.70	
K15d×114F	株高	120.79±0.97	120.00±1.45	154.96±2.42	等位
	穗位高	24.94±0.41	28.00±1.23	28.82±0.86	

2.2.2 F₂ 群体的株高分离 2 个组合 F₂ 群体株高分布图 (图 2)。从图 2 中可以看出, 组合 K15d×K125d F₂ 群体株高呈单峰分布, 而 K15d×R08d F₂ 群体株高呈双峰分布, 进一步证明 K15d 矮秆基因与 *br2* 等位, 与 *cr1* 不等位。

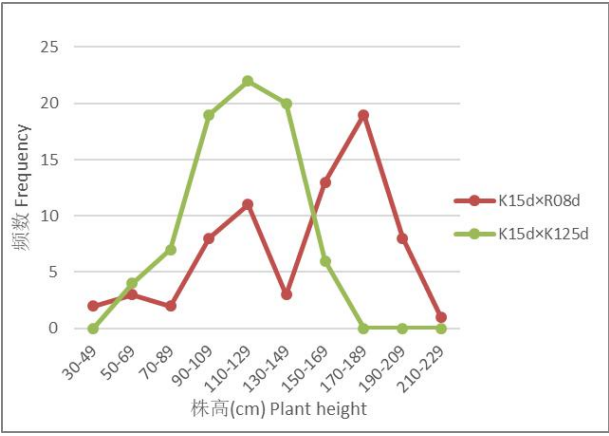


图 2 2 个组合 F₂ 群体株高分布图

Fig.2 The plant height distribution of F₂ population of 2 combinations

2.3 矮秆基因 *d15* 的克隆

2.3.1 *d15* 启动子 野生型 K15 和突变体 K15d 中 *d15* 启动子的 PCR 扩增产物长度与预期大小一致 (图 3)。测序结果分析, K15 和 K15d 中 *d15* 启动子的序列完全相同, 大小为 1100bp, 而与 GenBank 网站上参考基因组 B73 (RefGen_v4) 的 *br2* 区域比对则存在 2 个单核苷酸多态性 (SNPs), 同源性高达 99.94%。

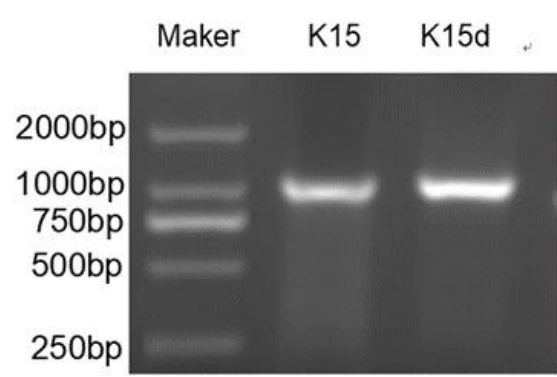
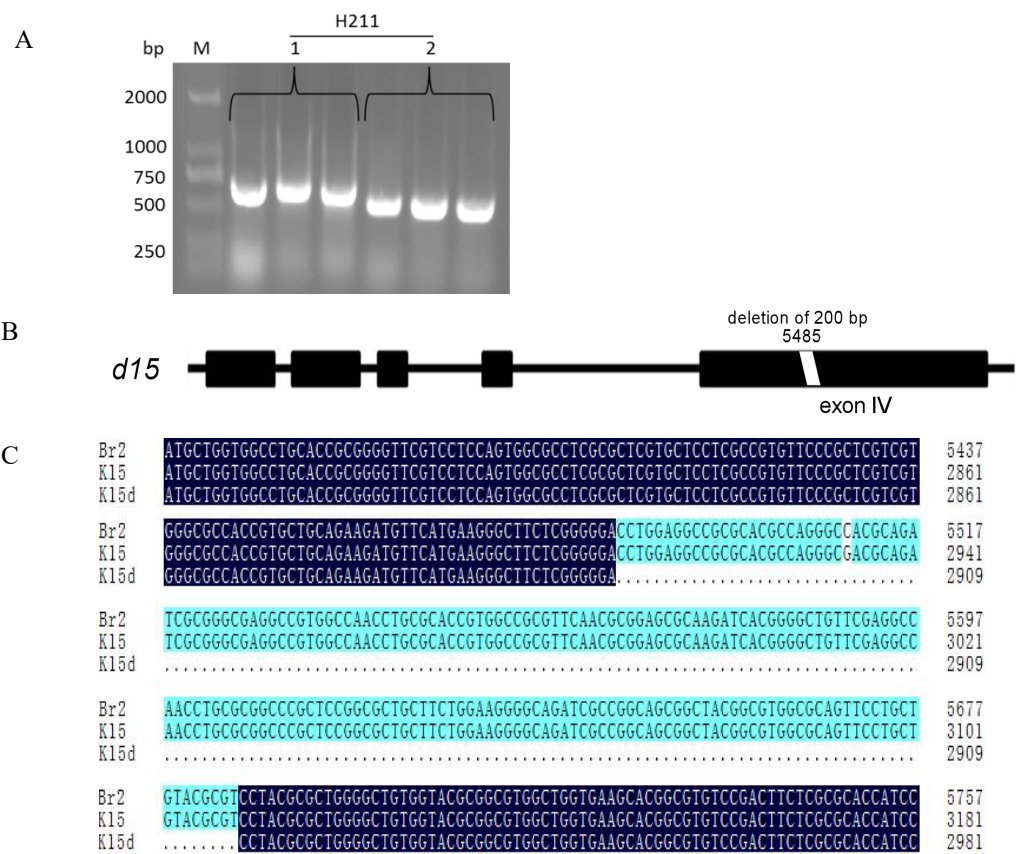


图 3 K15 和 K15d 中 *d15* 基因启动子的扩增结果

Fig.3 Amplification results of *d15* promoter in K15 and K15d

2.3.2 *d15* 编码区 利用 7 对特异性引物分别对 K15（WT）和 K15d 的基因组 DNA 进行扩增并进行琼脂糖凝胶电泳检测。从图 4A 可以看出，引物 H211 扩增 K15 和 K15d 后条带出现差异条带。对所有 PCR 扩增产物进行克隆及测序，并利用 DNAMAN 软件对编码序列进行拼接及比对。结果显示（图 4B,C）K15d 中 *d15* 基因编码区全长 3988bp，在第五外显子的 5485bp 到 5685bp 间缺失 200bp 的片段，是一个新的 *br2* 等位基因。



A 引物 H211 的扩增结果，1 和 2 分别表示野生型 K15 和突变体 K15d；B *d15* 基因结构及突变位点；C *d15* 基因缺失片段序列对比

A Amplification results of primer H211, 1 and 2 represent wild-type K15 and mutant K15d, respectively; B structure and mutation site of *d15* gene; C sequence comparison of fragment with deletion of *d15* gene

图 4 矮秆基因 *d15* 的克隆

Fig.4 The result of cloning of dwarf gene *d15*

2.3.3 *d15* 编码蛋白 利用 DNAMAN5.0 软件对 K15 和 K15d 中 *d15* 编码的氨基酸序列进行比对（图 5）。图 5 表明，K15 和 GenBank 中 *br2* 编码氨基酸序列的同源性为 95.91%，且差异区域不存在保守序列。K15d 中 *d15* 基因序列缺失导致编码氨基酸从第 972 处移码缺失，导致 *d15* 基因仅编码 1326 个氨基酸。

Br2 MSSSDPFEIIRARVVVLGSPHADGGDEWARPELEAFHLPSPAHQPPGFLAGQPEAAEQPTLPAPAGRSSSSSNPTTTSAGG 80
K15d MSSSDPFEIIRARVVVLGSPHADGGDEWARPELEAFHLPSPAHQPPGFLAGQPEAAEQPTLPAPAGRSSSSSNPTTTSAGG 80
Consensus MSSSDPFEIIRARVVVLGSPHADGGDEWARPELEAFHLPSPAHQPPGFLAGQPEAAEQPTLPAPAGRSSSSSNPTTTSAGG 80

Br2 GAAPPPSSPPPPPPASLETEQPPNARPASAGANDSKKPTTPAALRDLEFADGLDCALMLIGTLGALVHGCSLPVFLRFF 160
K15d GAAPPPSSPPPPPPASLETEQPPNARPASAGANDSKKPTTPAALRDLEFADGLDCALMLIGTLGALVHGCSLPVFLRFF 160
K15d GAAPPPSSPPPPPPASLETEQPPNARPASAGANDSKKPTTPAALRDLEFADGLDCALMLIGTLGALVHGCSLPVFLRFF 160
Consensus GAAPPPSSPPPPPPASLETEQPPNARPASAGANDSKKPTTPAALRDLEFADGLDCALMLIGTLGALVHGCSLPVFLRFF 160

Br2 ADLVDSFGSHADDDPDMVRLVVKYAFYFLVVGAAIWASSWAEISCWMWIGERQSTRMRIRYLDAAALRQDVSFDDIDVRAS 240
K15d ADLVDSFGSHADDDPDMVRLVVKYAFYFLVVGAAIWASSWAEISCWMWIGERQSTRMRIRYLDAAALRQDVSFDDIDVRAS 240
K15d ADLVDSFGSHADDDPDMVRLVVKYAFYFLVVGAAIWASSWAEISCWMWIGERQSTRMRIRYLDAAALRQDVSFDDIDVRAS 240
Consensus ADLVDSFGSHADDDPDMVRLVVKYAFYFLVVGAAIWASSWAEISCWMWIGERQSTRMRIRYLDAAALRQDVSFDDIDVRAS 240

Br2 DVIYAINADAVVYQDAIS KLGNI LHYMATEFVAGFVVGFTAAWQALVTLAVVPLIAYIGGLSAAALAKLSRSQSODALS 320
K15d DVIYAINADAVVYQDAIS KLGNI LHYMATEFVAGFVVGFTAAWQALVTLAVVPLIAYIGGLSAAALAKLSRSQSODALS 320
K15d DVIYAINADAVVYQDAIS KLGNI LHYMATEFVAGFVVGFTAAWQALVTLAVVPLIAYIGGLSAAALAKLSRSQSODALS 320
Consensus DVIYAINADAVVYQDAIS KLGNI LHYMATEFVAGFVVGFTAAWQALVTLAVVPLIAYIGGLSAAALAKLSRSQSODALS 320

Br2 ASGLAEQALAQIRIVQAFVGEEREMRAYSAALAVAQIRIGYRSGFAGKLGGLGTYIVFCYGLLLWYGGHLVRAQHTNGG 400
K15d ASGLAEQALAQIRIVQAFVGEEREMRAYSAALAVAQIRIGYRSGFAGKLGGLGTYIVFCYGLLLWYGGHLVRAQHTNGG 400
K15d ASGLAEQALAQIRIVQAFVGEEREMRAYSAALAVAQIRIGYRSGFAGKLGGLGTYIVFCYGLLLWYGGHLVRAQHTNGG 400
Consensus ASGLAEQALAQIRIVQAFVGEEREMRAYSAALAVAQIRIGYRSGFAGKLGGLGTYIVFCYGLLLWYGGHLVRAQHTNGG 400

Br2 LAIATMFVSMIGGL PR QSAPMAAFKARVAAKIFRIIDHRPGISSRDGAEPESVIGRVMRGVDFAYPSRPDPVILR 479
K15d LAIATMFVSMIGGL ALG QSAPMAAFKARVAAKIFRIIDHRPGISSRDGAEPESVIGRVMRGVDFAYPSRPDPVILR 480
K15d LAIATMFVSMIGGL ALG QSAPMAAFKARVAAKIFRIIDHRPGISSRDGAEPESVIGRVMRGVDFAYPSRPDPVILR 480
Consensus LAIATMFVSMIGGL PR QSAPMAAFKARVAAKIFRIIDHRPGISSRDGAEPESVIGRVMRGVDFAYPSRPDPVILR 479

Br2 GFSLVSPAGKTIALLVSSSGSGKSTIVSLIERFYDPSAGQILLDGHDLRSI LRWLRRRQIGLVSQEPALFATSIRENILLG 559
K15d GFSLVSPAGKTIALLVSSSGSGKSTIVSLIERFYDPSAGQILLDGHDLRSI LRWLRRRQIGLVSQEPALFATSIRENILLG 560
K15d GFSLVSPAGKTIALLVSSSGSGKSTIVSLIERFYDPSAGQILLDGHDLRSI LRWLRRRQIGLVSQEPALFATSIRENILLG 560
Consensus GFSLVSPAGKTIALLVSSSGSGKSTIVSLIERFYDPSAGQILLDGHDLRSI LRWLRRRQIGLVSQEPALFATSIRENILLG 559

Br2 RDSQSATLAEMEEAARVANAHSEFIKLDPGQYDTQVGGERGLQSGGQRIATARAMLKNPAIILLDEATSALDSSEKLV 639
K15d RDSQSATLAEMEEAARVANAHSEFIKLDPGQYDTQVGGERGLQSGGQRIATARAMLKNPAIILLDEATSALDSSEKLV 640
K15d RDSQSATLAEMEEAARVANAHSEFIKLDPGQYDTQVGGERGLQSGGQRIATARAMLKNPAIILLDEATSALDSSEKLV 640
Consensus RDSQSATLAEMEEAARVANAHSEFIKLDPGQYDTQVGGERGLQSGGQRIATARAMLKNPAIILLDEATSALDSSEKLV 639

Br2 QEALDRFMGRITTL GDR TGCPPSA KADVAVLQGGAVSEM AHDELMAKGNGTYAKLIRMQEQAEHAALVNARRSSAR 719
K15d QEALDRFMGRITTL VT AHRLSTIR KADVAVLQGGAVSEM AHDELMAKGNGTYAKLIRMQEQAEHAALVNARRSSAR 719
K15d QEALDRFMGRITTL VT AHRLSTIR KADVAVLQGGAVSEM AHDELMAKGNGTYAKLIRMQEQAEHAALVNARRSSAR 719
Consensus QEALDRFMGRITTL a KADVAVLQGGAVSEM AHDELMAKGNGTYAKLIRMQEQAEHAALVNARRSSAR 719

Br2 PSSARNVSSPIMTRNSSYGRSPYSRRLLSDFSTSDFTLSIHDPHHHHRTMADKQLAFRAGASSFLRLARMNSPEWAYALA 799
K15d PSSARNVSSPIMTRNSSYGRSPYSRRLLSDFSTSDFTLSIHDPHHHHRTMADKQLAFRAGASSFLRLARMNSPEWAYALA 799
K15d PSSARNVSSPIMTRNSSYGRSPYSRRLLSDFSTSDFTLSIHDPHHHHRTMADKQLAFRAGASSFLRLARMNSPEWAYALA 799
Consensus PSSARNVSSPIMTRNSSYGRSPYSRRLLSDFSTSDFTLSIHDPHHHHRTMADKQLAFRAGASSFLRLARMNSPEWAYALA 799

Br2 GSIGSMVCGSFAIFAYILSAVLSVYVAPDPRYMKREIAKYCYLLIGMSSAALLFNTVQHVFWDIVGENLTKRVREKMF 879
K15d GSIGSMVCGSFAIFAYILSAVLSVYVAPDPRYMKREIAKYCYLLIGMSSAALLFNTVQHVFWDIVGENLTKRVREKMF 879
K15d GSIGSMVCGSFAIFAYILSAVLSVYVAPDPRYMKREIAKYCYLLIGMSSAALLFNTVQHVFWDIVGENLTKRVREKMF 879
Consensus GSIGSMVCGSFAIFAYILSAVLSVYVAPDPRYMKREIAKYCYLLIGMSSAALLFNTVQHVFWDIVGENLTKRVREKMF 879

Br2 AVF RNEIAWFADENASARV ARLALDAQNVRSAIGDRISVIGNSALMLVACTAGFVLQWRALVLLAVEFLVVGATVL 959
K15d AVF RNEIAWFADENASARV ARLALDAQNVRSAIGDRISVIGNSALMLVACTAGFVLQWRALVLLAVEFLVVGATVL 959
K15d AVF RNEIAWFADENASARV ARLALDAQNVRSAIGDRISVIGNSALMLVACTAGFVLQWRALVLLAVEFLVVGATVL 959
Consensus AVF RNEIAWFADENASARV ARLALDAQNVRSAIGDRISVIGNSALMLVACTAGFVLQWRALVLLAVEFLVVGATVL 959

Br2 QKMFMKGSGDLLEAHARATQAGEAVAN RTVAAFNAERKITGLFEANLRGFLRRCFWKGQIAGSGYGVAAQFLLYASYA 1039
K15d QKMFMKGSGDLLEAHARATQAGEAVAN RTVAAFNAERKITGLFEANLRGFLRRCFWKGQIAGSGYGVAAQFLLYASYA 1039
K15d QKMFMKGSGDLLEAHARATQAGEAVAN RTVAAFNAERKITGLFEANLRGFLRRCFWKGQIAGSGYGVAAQFLLYASYA 1039
Consensus QKMFMKGSGDLLEAHARATQAGEAVAN RTVAAFNAERKITGLFEANLRGFLRRCFWKGQIAGSGYGVAAQFLLYASYA 1039

Br2 LGLWYAAWLKHKVSDFSRTIRVFV LMVSANGAAETLITL PDEFIKGRAMRSV FETIDRKTEVEPHDVAAPVPDPGGA 1119
K15d LGLWYAAWLKHKVSDFSRTIRVFV LMVSANGAAETLITL PDEFIKGRAMRSV FETIDRKTEVEPHDVAAPVPDPGGA 1119
K15d LGLWYAAWLKHKVSDFSRTIRVFV LMVSANGAAETLITL PDEFIKGRAMRSV FETIDRKTEVEPHDVAAPVPDPGGA 1119
Consensus LGLWYAAWLKHKVSDFSRTIRVFV LMVSANGAAETLITL PDEFIKGRAMRSV FETIDRKTEVEPHDVAAPVPDPGGA 1119

Br2 KVELKHXDFSLYSPRPDIQVFRDLSLRARAGKITALY PSESG KSSVSLALVQGFYKPTISGRVLLDGKDV KYNLRALRVV 1199
K15d KVELKHXDFSLYSPRPDIQVFRDLSLRARAGKITALY PSESG KSSVSLALVQGFYKPTISGRVLLDGKDV KYNLRALRVV 1199
K15d KVELKHXDFSLYSPRPDIQVFRDLSLRARAGKITALY PSESG KSSVSLALVQGFYKPTISGRVLLDGKDV KYNLRALRVV 1199
Consensus KVELKHXDFSLYSPRPDIQVFRDLSLRARAGKITALY PSESG KSSVSLALVQGFYKPTISGRVLLDGKDV KYNLRALRVV 1199

Br2 AVVPQEPFLF ASIHENIAYGREGATEAEV EAAQANAHRFIAALPEGYRTQV GENGVLQSGGQRIATIRALYKQAA 1279
K15d AVVPQEPFLF ASIHENIAYGREGATEAEV EAAQANAHRFIAALPEGYRTQV GENGVLQSGGQRIATIRALYKQAA 1279
K15d AVVPQEPFLF ASIHENIAYGREGATEAEV EAAQANAHRFIAALPEGYRTQV GENGVLQSGGQRIATIRALYKQAA 1279
Consensus AVVPQEPFLF ASIHENIAYGREGATEAEV EAAQANAHRFIAALPEGYRTQV GENGVLQSGGQRIATIRALYKQAA 1279

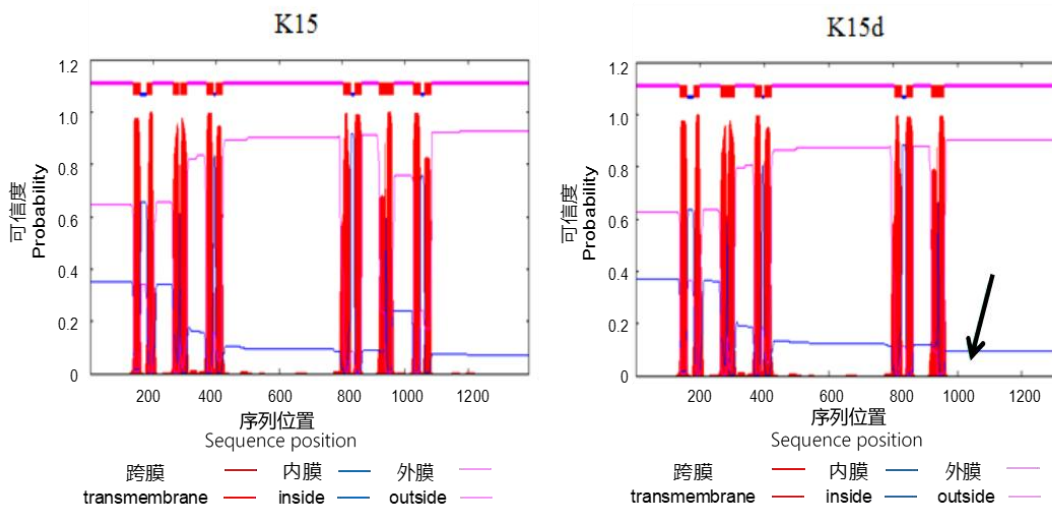
Br2 TVLLDEATSALLAESERCVEALERAGSGRTITIVVAHRLATVIRGAHTIAYIDDGKVAEQGSHSLHLKHHPDGGCYARMLQL 1359
K15d TVLLDEATSALLAESERCVEALERAGSGRTITIVVAHRLATVIRGAHTIAYIDDGKVAEQGSHSLHLKHHPDGGCYARMLQL 1360
K15d TVLLDEATSALLAESERCVEALERAGSGRTITIVVAHRLATVIRGAHTIAYIDDGKVAEQGSHSLHLKHHPDGGCYARMLQL 1360
Consensus TVLLDEATSALLAESERCVEALERAGSGRTITIVVAHRLATVIRGAHTIAYIDDGKVAEQGSHSLHLKHHPDGGCYARMLQL 1359

Br2 AAADGRGGRARAVVLVQRGRVGRNGWMDGFGSSRD 1394
K15d AAADGRGGRARAVVLVQRGRVGRNGWMDGFGSSRD 1393
K15d AAADGRGGRARAVVLVQRGRVGRNGWMDGFGSSRD 1393
Consensus AAADGRGGRARAVVLVQRGRVGRNGWMDGFGSSRD 1394

图 5 *d15* 基因编码蛋白的氨基酸序列比对
Fig.5 Alignment of *d15* amino acid sequences

2.4 生物信息学预测

2.4.1 *d15* 蛋白跨膜结构预测 通过 TMHMM2.0 工具对 *d15* 编码蛋白的跨膜结构预测。如图 6 所示，野生型 K15 中 *D15* 编码蛋白具有完整的 12 个跨膜结构域，而突变体 K15d 中 *d15* 编码蛋白只有 10 个跨膜结构域，在第 1050 个编码氨基酸处缺失 2 个跨膜结构域（黑色箭头）。



黑色箭头: *d15* 蛋白的跨膜结构域缺失位置

Black arrow: The location of missing transmembrane domain of *d15* protein

图 6 *d15* 蛋白的跨膜区预测

Fig.6 Prediction of transmembrane region of *d15* protein

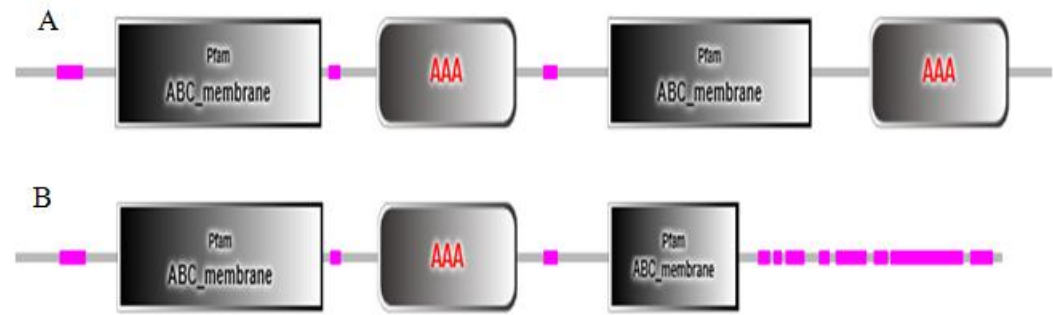
2.4.2 *d15* 蛋白二级结构预测 利用 SOPMA 对 *d15* 编码蛋白的二级结构预测发现（表 4），*d15* 编码蛋白的二级结构中 α -螺旋、扩展长链减少，而 β -转角和无规则卷曲结构增加，说明 *d15* 序列的缺失使蛋白二级结构组分发生改变，进而影响蛋白高级结构的形成。

表 4 *d15* 蛋白的二级结构预测

Table 4 Prediction of the secondary structure of *d15* protein

名称 Name	α -螺旋 Alpha helix	扩展长链 Extended strand	β -转角 Beta turn	无规则卷曲 Random coil
K15	47.31%	15.36%	5.10%	32.23%
K15d	42.38%	13.65%	8.07%	35.90%

2.4.3 *d15* 蛋白功能域预测 采用 SMART 预测 *d15* 编码蛋白的功能结构域，结合 NCBI CDD 数据库分析保守序列。结果发现，K15 中 *D15* 编码蛋白含有 ABC 转运蛋白典型的结构域，即含有两个核酸结合区（Nucleotide-binding Domain，NBD）和两个跨膜结构域（Transmembrane Domain，TMD），为全分子的 ABC 转运蛋白，具有“NBD-TMD”排列的结构域特点（图 7A）。而 K15d 中 *d15* 编码蛋白的第 2 个 TMD 不完整和第 2 个 NBD 缺失，此部分含有多个保守序列，如 Walker A（P 环）、Walker B、ABC signature motif（Walker C）、A 环、D 环、H 环和 Q 环等（图 7B）。由此判断，*d15* 编码蛋白功能结构域的缺失可能影响该蛋白的转运功能。



A: K15; B: K15d; AAA: ATP 结合域; ABC-membrane: 跨膜域

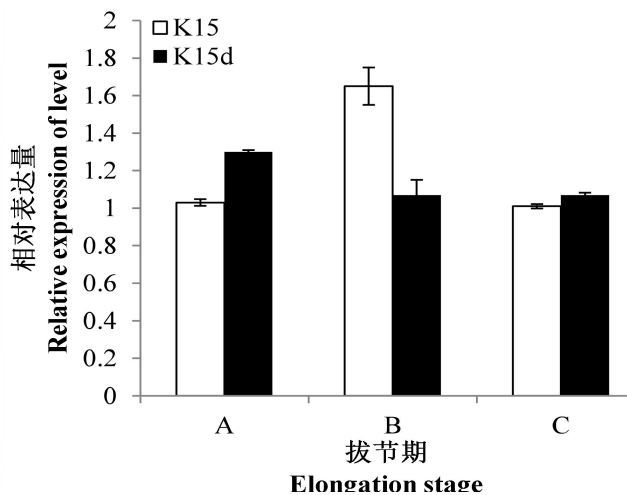
A:K15;B:K15d; AAA: ATP binding domain; ABC-membrane: the transmembrane domain

图 7 *d15* 蛋白的功能域预测

Fig.7 Prediction of functional conserved domain of *d15* protein

2.5 矮秆基因 *d15* 的表达分析

本研究对 K15d 和 K15 拔节期前、中、后 3 个发育时期 *d15* 基因在茎第二节间组织中进行表达分析（图 8）。结果显示，3 个时期内 *d15* 的表达量在 K15d 和 K15 间均无显著差异（ $P=0.316$ 、 0.144 及 0.166 ），表明株高的差异并非 *d15* 基因的表达所致。



A、B 和 C 表示拔节期前、中、后三个时间点。A 时期植株具 11 片可见叶、8 片展开叶；B 时期植株具 13 片可见叶、10 片展开叶；C 时期植株具 16 片可见叶、12 片展开叶

A, B and C are 3 developmental stages during stem elongation. A: Plants with 11 visible leave and 8 expanded leaves; B: Plants with 13 visible leave and 10 expanded leaves; C: Plants with 16 visible leave and 12 expanded leaves

图 8 *d15* 基因的表达

Fig.8 Expression of *d15* gene

3 讨论与结论

对玉米的矮化特征研究发现，不同的突变类型的农艺性状差异很大。研究表明，*br2* 突变体的株高是野生型的 1/4 到 1/2，主要是穗位以下节间缩短明显^[20]。本研究中矮秆突变体 K15d 较野生型株高降低 39.22%，穗位高降低 69.75%，且穗下节间严重缩短，节间数减少 38.83%。相对野生型，K15d 横切面细胞数减少 31.30%，维管束呈变大趋势；K15d 纵切面细胞数极显著增加，细胞变小，呈不规则排列。由此推测，矮秆材料 K15d 节间缩短的原因是细胞长度缩短、排列不规则引起的，与 *br2* 的矮化特征相似。与野生型相比，矮秆材料 K15d 株高、穗位高明显变矮，叶片变窄，抗倒耐密性增强，虽然单株产量降低，但生产应用过程中可以通过增加种植密度提高群体产量。本研究根据 K15d 与已知矮秆基因材料杂交 F₁ 株高和穗位高分析结果，结合 F₂ 群体株高分离表现，证明了 K15d 的矮化基因 *d15* 与 *br2* 等位。

Pilu 等^[7]通过同源克隆发现，*br2-23* 在第 5 外显子上缺失一个 8bp 的片段，导致移码使编码产物缺失 200 个氨基酸。石海春等^[19]参考玉米 *br2* 序列克隆到等位基因 *d125*，发现 *d125* 编码序列的第 1651bp 后插入 9bp 和第 6432bp 处缺失一个 232bp 的片段，导致编码 1318 个氨基酸。Lai Wei 等^[5]发现玉米 *br2* 等位基因 *qpai* 在第 5 外显子的 6376bp 到 6617bp 间缺失 241bp，导致其编码氨基酸移码缺失。本研究参考玉米 *br2* 基因序列扩增出等位基因 *d15*，其在第 5 外显子的 5485bp 到 5685bp 间缺失 200bp，这与现有的 *br2* 等位基因的突变区域结果不同。启动子序列分析表明，突变体和野生型中 *d15* 基因启动子相同，与参考基因组 B73 的 *br2* 启动子仅有 2 个 SNPs 差异，同源性和 99.94%，这与叶凌凤等克隆 *br2* 等位基因 *qph1* 的启动子结果相似^[21]。

跨膜结构域（TMD）形成的膜通道开口有利于底物的结合和转运，并且 TMD 上结合位点具有饱和点，调控着底物运输的速度^[22]。本研究预测发现 *d15* 蛋白跨膜区缺失，推测该缺失可能影响底物的结合及转运。

d15 编码蛋白的二级结构主要由 α -螺旋和无规则卷曲构成,其中 α -螺旋减少,与预测的跨膜结构域缺失有关,而主要形成酶活性部位和特异功能部位的无规则卷曲增加,表明二级结构的改变影响了蛋白功能。*d15* 编码蛋白的第二个功能域 NBD 缺失,此部分含有多个保守的二级结构,包括 Walker A (P 环)、Walker B、LSSG-motif、A 环、D 环、H 环和 Q 环。

研究表明,P 环、H 环、Walker B 和 Q 环形成 1 个腔隙用于 ATP 分子的容纳,D 环和 LSGGQ 序列则关闭腔隙,相互形成独有的“ATP sandwich”结构,该结构形式利于 ATP 自由能的有效释放,便于 PGP 蛋白构象的改变,从而促进其对底物的识别和转运^[23]。因此,该缺失导致 *d15* 编码蛋白不能有效捕获 ATP 分子,在跨膜转运过程中由于能量的供应不足导致其功能受到影响。启动子是基因转录表达的开始,克隆启动子序列并分析其顺式作用元件,对了解基因表达模式及其调控机制具有重要作用^[24]。*br2* 编码生长素极性运输蛋白 PGP,在玉米的多个组织中均有表达,尤其在伸长生长的茎秆节间表达量最高^[8]。Pilu 等^[7]对 *br2-23* 及其野生型 B73 近交系在 10 叶期时半定量分析认为,*br2-23* 的矮化并非表达差异而是由编码序列缺失而导致植株变矮。邢安琪等^[9]研究玉米 *br2* 等位基因 *qph1* 在生长的不同时期茎秆表达量发现,其表达量不是影响两亲本株高差异的因素。本研究发现,*d15* 启动子在野生型和突变体中无差异;在拔节期的前、中、后三个时期,*d15* 基因表达量在野生型 K15 和突变体 K15d 间均未达到显著差异。表明 *d15* 基因的功能并非启动子调控元件变异所致,且株高的差异与 *d15* 基因的表达量无关。推测 *d15* 基因的内部功能位点变化才是导致表型矮化的主要原因。

参考文献:

- [1] 稽怡, 缪曼珉, 陈学好. 植物矮生性状的分子遗传研究进展. 分子植物育种, 2006, 4(6): 753-771
Ji Y, Miu M M, Chen X H. Progresses on the molecular genetics of dwarf character in plants. Molecular Plant Breeding, 2006, 4(6): 753-771
- [2] 王文秀, 王磊. 玉米矮秆基因研究进展. 生物技术通报, 2018, 34(11): 28-32
Wang W X, Wang L. Research progress on maize dwarf genes, Biotechnology Bulletin, 2018, 34(11): 28-32
- [3] 于永红, 斯华敏. 水稻矮化相关基因的研究进展. 植物遗传资源学报, 2016, 6(03): 344-347
Yu Y H, Si H M. Research progress on the dwarf-related gene in Rice(*Oryza sativa L.*). Journal of Plant Genetic Resources, 2016, 6(03): 344-347
- [4] Anderson J C, Chow P N. Phenotypes and grain yield associated with *Brachytic2* gene in single cross hybrids of dent corn. Crop Science, 1963, 3(2): 111-113
- [5] Wei L, Zhang X, Zhang Z, Liu H H, Lin Z W. A new allele of the *Brachytic2* gene in maize can efficiently modify plant architecture. Heredity, 2018, 121(1): 75-86
- [6] Cassani E, Villa D, Durante M, Landoni M, Pilu R. The *brachytic 2* and *3* maize double mutant shows alterations in plant growth and embryo development. Plant Growth Regulation, 2011, 64(2):185-192
- [7] Pilu R, Cassani E, Villa D, Curiale S, Panzeri D, Badone F C, Landoni M. Isolation and characterization of a new mutant allele of *brachytic2* maize gene. Molecular Breeding, 2007, 20(2): 83-91
- [8] Multani D S, Briggs S P, Chamberlin M A, Blakeslee J J, Murphy A S, Johal G S. Loss of an MDR transporter in compact stalks of maize *br2* and sorghum *dw3* mutants. Science, 2003, 302(5642): 81-84

- [9] 邢安琪. 玉米株高主效 *QTL-qph1* 及 *ys* 基因及其修饰因子 *ys-modifier* 的克隆、功能验证及机理研究. 北京: 中国农业大学, 2014
- Xin A Q. Positional cloning and dissection a major plant height *QTL-qph1* and the *ys* mutant gene and its modifier in maize. Beijing: Zhongguo Agricultural University, 2014
- [10] 徐敏, 石海春, 余学杰, 谭义川, 柯永川, 赵长云, 柯永培. 一个玉米矮秆突变体 K123d 的遗传鉴定. 植物遗传资源学报, 2017, 18(1): 155-163
- Xu M, Shi H C, Yu X J, Tan Y Q, Ke Y C, Ke Y P. Genetic identification of a dwarf mutant K123d in maize (*Zea mays* L.). Journal of Plant Genetic Resources, 2017, 18(1): 155-163
- [11] Sara B, Nicola C, Salleres Belén, Cortivo I C D, Tuinstra M R, Johal G, Varotto S. Genetic and phenotypic characterization of a novel *brachytic2* allele of maize. Plant Growth Regulation, 2018, 86(1): 81-92
- [12] 阎淑琴. 矮生玉米的遗传与育种. 玉米科学, 2000, 8(2): 36-37
- Yan S Q. Genetics and breeding of dwarf corn. Journal of Maize Sciences, 2000, 8(2): 36-37
- [13] 崔绍平, 孙世珍, 徐有, 郑积德, 李洪杰. 玉米 *br-2* 矮生基因利用的研究. 华北农学报, 1990, 5(2): 7-12
- Cui S P, Sun S Z, Xu Y, Zheng J D, Li H J. A study on utilization of a dwarf gene *br-2* in maize breeding. Acta Agriculturae Boreali-Sinica, 1990, 5(2): 7-12
- [14] 何川, 郑祖平, 谢树果, 李钟, 刘代惠. 隐性单基因 *br-2* 玉米矮生系的选育. 中国农业科学, 2009, 42(8): 2978-2981
- He C, Zheng Z P, Xie S G, Li Z, Liu D H. Breeding of the maize monogenic *br-2* dwarf lines, Scientia Agricultura Sinica, 2009, 42(8): 2978-2981
- [15] 何川, 郑祖平. 玉米矮秆突变基因的鉴定与利用. 玉米科学, 2011, 19(02): 34-36
- He C, Zheng Z P. Identification and utilization of maize dwarf mutation gene. Journal of Maize Sciences, 2011, 19(02): 34-36
- [16] 余学杰, 王攀, 柯永培, 赵长云, 李仁飞, 石海春. 5 个玉米矮秆突变体的致矮效应及主要性状配合力研究. 种子, 2021, 40(07)
- Yu X J, Wang P, Ke Y P, Zhao C Y, Li R F, Shi H C. Study on dwarfing effect and combining ability of main traits of five maize dwarf mutants. Seed, 2021, 40(07)
- [17] 叶宝兴, 毕建杰, 孙印石. 植物细胞与组织研究方法. 1 版. 北京: 化学工业出版社, 2011: 54-63
- Ye B X, Bi J J, Sun Y S. Research methods of plant cell and tissue. 1st edn. Beijing: Chemical Industry Press, 2011: 54-63
- [18] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using Real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. Methods, 2001, 25(4): 402-408
- [19] 石海春, 陈立, 李开兵, 余学杰, 袁继超, 曲比伍合, 柯永培. 玉米矮秆突变体 K125d 的遗传鉴定. 华北农学报, 2020, 35(01): 65-72
- Shi H C, Chen L, Li K B, Yu X J, Yuan J C, QuBi W H, Ke Y P. Genetic analysis of maize dwarf mutant K125d. Acta agriculturae boreali-sinica, 2020, 35(01): 65-72
- [20] 樊景胜. 玉米矮生基因遗传及其利用. 黑龙江农业科学, 1999, (1): 29-30
- Fan J S. Genetics and utilization of maize dwarf gene. Heilongjiang Agricultural Science, 1999, (1): 29-30
- [21] 叶凌凤, 刘琳, 张志高, 徐启来, 王俊仁, 康定明. 玉米 *ZmPGPI* 基因启动子的克隆及结构功能分析. 中国农业大学学报, 2017, 22(3): 1-5
- Ye L F, Liu L, Zhang Z G, Xu Q L, Wang J R, Kang D M. Cloning and functional analysis of maize *ZmPGPI* promoter. Journal of China Agricultural University, 2017, 22(3): 1-5
- [22] 涂春华, 杨冬梓. P-糖蛋白结构及作用机制. 中国生物化学与分子生物学报, 2009, 25(1): 7-11
- Tu C H, Yang D Z. Molecular structure and functions of P-glycoprotein. Chinese Journal of Biochemistry and Molecular Biology, 2009, 25(1): 7-11
- [23] Ambudkar S V, Kim I W, Xia D, E Z. Sauna. The A loop, a novel conserved aromatic acid subdomain upstream of the Walker A motif in ABC transporters, is critical for ATP binding. Febs Letters, 2006, 580(4): 1049-1055
- [24] 聂丽娜, 夏兰琴, 徐兆师, 高东尧, 李琳, 于卓, 陈明, 李连城, 马有志. 植物基因启动子的克隆及其功能研究进展. 植物遗传资源学报, 2008, 9(3): 385-391

Nie L N, Xia L Q, Xu Z S, Gao D Y, Li L, Yu Z, Chen M, Li L C, Ma Y Z. Progress on cloning and functional study of plant gene promoters. Journal of Plant Genetic Resources, 2008, 9(3): 385-391