

玉米K718d矮秆基因的定位及候选基因分析

王琴娣¹, 石海春^{1,2}, 余学杰^{1,2}, 赵长云², 曲比伍合², 夏伟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)

摘要: 为发掘玉米矮秆基因, 解析矮化机理, 以玉米矮秆突变体K718d、野生型K718及其F₂分离群体为材料, 结合BSA全基因组重测序(BSA-reseq)和转录组测序(RNA-seq)定位矮秆基因。在1号染色体上检测到3个候选区域, 总长度为21.03 Mb, 包含基因438个。共鉴定出差异表达基因2374个, 其中上调基因1452个, 下调基因922个。KEGG分析显示, 差异表达基因主要涉及苯丙烷代谢、脂肪酸链延长和半乳糖代谢等通路。基因功能注释显示, 差异表达基因参与细胞生长发育、细胞壁组成和植物激素合成代谢等过程。BSA-reseq与RNA-seq联合分析, 共筛选出基因26个, 其中非同义突变基因19个。结合同源基因功能注释、基因表达量和生物信息学分析, 初步获得与植物激素代谢相关的Zm00001d032035和Zm00001d032422候选基因2个。PCR扩增和qRT-PCR分析显示, 与K718相比, K718d中2个基因编码区碱基和氨基酸序列均有不同程度突变, 基因表达量均极显著降低。研究结果为进一步克隆矮秆基因和育种应用提供参考。

关键词: 玉米; 矮秆; BSA全基因组重测序; 转录组; 候选基因

Localization and Candidate Gene Analysis of a Maize Dwarf Mutant K718d

WANG Qin-di¹, SHI Hai-chun^{1,2}, YU Xue-jie^{1,2}, ZHAO Chang-yun², QUBI Wu-he², XIA Wei², KE Yong-pei^{1,2}

(¹College of Agronomy, Sichuan Agricultural University, Chengdu 611130; ²Sichuan Zhenghong Bio Co., Ltd., Chengdu 610213)

Abstract: In order to explore the dwarf gene and analyze the dwarfing mechanism in maize, the maize dwarf mutant K718d, wild-type K718 and their F₂ segregation population were used for gene mapping by BSA whole genome resequencing (BSA-reseq) and transcriptome sequencing (RNA-seq). Three candidate regions with a total length of 21.03 Mb hosting 438 annotated genes were detected on chromosome 1. A total of 2374 differentially expressed genes (DEGs) were identified, including 1452 up-regulated genes and 922 down-regulated genes. KEGG analysis showed that DEGs were mainly involved in metabolic pathways including phenylpropane metabolism, fatty acid chain elongation and galactose metabolism. Gene function annotations showed that DEGs were involved in cell growth, cell wall composition, and plant hormone anabolism. BSA-reseq and RNA-seq suggested 26 candidate genes, of which 19 were found with non-synonymous mutations. Two candidate genes Zm00001d032035 and Zm00001d032422, which are annotated with plant hormone metabolism, were obtained based on the homologous gene function annotation, gene expression level and bioinformatics analysis. PCR amplification and qRT-PCR analysis showed that, both genes contained the amino acid substitutions in the coding region in K718d if compared to K718, and both showed decreased transcripts. These results provide reference for further dwarfing gene cloning and application in maize breeding.

Key words: maize; dwarf; BSA-reseq; transcriptome; candidate genes

收稿日期: 2022-09-25 修回日期: 2022-10-19 网络出版日期: 2022-11-24

URL: <https://doi.org/10.13430/j.cnki.jpgr.20220925002>

第一作者研究方向为玉米遗传育种, E-mail: 1305324798@qq.com

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

基金项目: 四川省重大科技专项(2022ZDZX0013); 四川省重点研发项目(2021YFZ0017)

Foundation projects: Major Science and Technology Project of Sichuan Province (2022ZDZX0013); Key R&D Project of Sichuan Province (2021YFYZ0017)

矮秆玉米株型紧凑,上疏下密利于通风透光,光能利用率高,适合密植,通过选育优良矮化玉米杂交种可有效减少玉米倒伏,稳定和提高玉米产量^[1]。植株矮化多与赤霉素、生长素和油菜素内酯等激素相关。水稻 *sdl*^[2]、小麦 *Rht*^[3]和拟南芥 *gal*^[4]等矮化均与赤霉素代谢异常相关,玉米 *br2*和高粱 *dw3*由于生长素转运异常导致矮化^[5]。截至2022年,在 Maize GDB (<https://www.maizegdb.org/>) 公布的已定位的玉米矮化基因有60多个,大部分都是隐性基因,只有 *D9*^[6]、*Dt*^[7]、*D11*^[8]等为显性。已公布的控制玉米株高的QTL有300多个。矮化育种是玉米育种实践中重要的内容之一,然而玉米矮化育种上应用较多的仍然是 *br2*,大多基因与不良性状连锁^[9],能够被应用到玉米生产上的矮秆资源有限,遗传多样性低,不利于玉米产业的可持续发展。因此,发掘新的玉米矮秆基因,对于玉米育种及生产均具有重要意义。

随着高通量测序的不断发展,通过BSA-reseq能够高效准确地对目标基因进行定位,然而不足之处是无法确保能够精确定位基因的位置,往往还需结合分子标记或转录组和蛋白组数据等方法,来达到获取候选基因的目的^[10]。RNA-seq能够深入揭示组织发育的分子机理,并为候选基因的筛选提供可靠的依据。目前,将BSA-reseq和RNA-seq结合鉴定候选基因的报道很多。Gao等^[11]利用该方式鉴定了调控水稻叶的隐性基因 *Plr4*,为阐明花青素合成途径的分子机制奠定了基础;Sunggil等^[12]将BSA-reseq和RNA-seq联合分析,确定了洋葱育性恢复的候选基因 *AcPMS1*。

董丽等^[13]用SSR标记将K718d的矮秆基因定位于1号染色体 *umc1278*与*umc1128*之间,遗传距离分别为1.0cM和2.5cM,是1个新的 *br1* 等位基因。本研究以玉米矮秆突变体K718d、野生型K718及其F₂分离群体为材料,采用BSA全基因组重测序技术定位矮秆基因;利用RNA-seq技术,明确K718d与K718差异表达基因及关键代谢途径,结合BSA测序数据进行联合分析,以期获得候选基因,并对其编码区进行克隆和表达分析,为进一步解析其矮化机制和应用提供依据。

1 材料与amp;方法

1.1 试验材料

玉米高秆自交系K718(野生型),经自然突变获得的矮秆突变体K718d,及其组配的F₁和F₂群体,均

由四川正红生物技术有限公司提供。

2020年冬,在海南种植矮秆突变体K718d和野生型K718,共168株,构建F₁。2021年3月,在成都双流种植F₁群体,共42株,构建F₂。同年8月于广西南宁种植F₂群体,共571株。田间管理同一般大田生产。

将K718d及K718饱满、大小一致的种子,表面进行短暂的消毒,用无菌水清洗,然后在带土的发芽盒中发芽,温度28℃,光照16h,黑暗8h培养,用于转录组测序分析。

1.2 试验方法

1.2.1 BSA重测序定位 统计K718d×K718 F₁及F₂群体植株的株高分离比例,并进行卡方检验。玉米抽雄吐丝期,在K718d×K718 F₂群体中随机选取高株和矮株各30株,提取DNA分别等量混合,构建高秆池和矮秆池,同时选取双亲各1株提取DNA。利用Illumina HiSeq X Ten平台对2个混池和双亲分别展开30×和10×全基因组重测序。通过BWA软件^[14]比对到玉米参考基因组B73_RefGen_v4(ftp://ftp.ensemblgenomes.org/pub/release-32/plants/fasta/zea_mays/dna)。采用GATK3.3软件工具包模块进行SNPs的检测^[15]。过滤测序数据得到高质量SNPs位点,采用ΔSNP-index进行关联分析^[16]。

1.2.2 转录组分析 取3叶期K718d与K718幼茎组织,利用TRIzol Kit提取RNA,送至北京百迈客生物技术股份有限公司,构建cDNA文库,并利用Illumina HiSeq™2000测序平台进行测序。Raw reads数据去除接头序列和低质量序列,获得Clean reads,利用HISAT2将Clean reads与玉米参考基因组B73_RefGen_v4进行比对,获取基因组位置信息^[17];根据FPKM定量结果,对表达量进行标准化处理^[18];以“FDR≤0.01和|log₂ Ratio (FC, Fold Change)|≥2”作为阈值筛选差异表达基因。对差异表达基因进行GO功能注释、KEGG通路富集分析。

选取6个差异表达基因,参照PrimeScript 1st Strand cDNA synthesis Kit(Takara)试剂盒说明书进行cDNA的合成。内参选择玉米管家基因 *Actin1* (表1),反应体系(10 μL):2×Taq Pro Universal SYBR qPCR Master Mix 5.0 μL,正反引物各0.2 μL, cDNA模板2.2 μL, ddH₂O 2.4 μL,进行qRT-PCR, 2^{-ΔΔCt}方法计算基因的相对表达量,进一步比较分析基因相对表达量值的Log₂(FC)与RNA-seq测序计算出的Log₂(FC)值。

1.2.3 候选基因同源分析 BSA-reseq与RNA-seq联合分析获得候选基因,参考候选基因序列设计交叉

引物,其中引物2035-1、2035-2对应*Zm00001d032035*, 2422对应*Zm00001d032422*(表1)。对K718d和K718 DNA进行扩增,电泳后回收纯化,连接载体转

化,分别挑选出与预测片段大小一致的阳性克隆序列,用DNAMAN软件进行序列拼接和比对。候选基因qRT-PCR分析同1.2.2。

表1 引物序列及作用

Table 1 Sequence and use of primers

引物名称 Primer name	正向引物 Forward primer	反向引物 Reverse primer	引物作用 Use of primers
<i>Actin1</i>	TCACCCTGTGCTGCTGACCG	GAACCGTGTGGCTCACACCA	qRT-PCR
<i>Zm00001d029913</i>	TCCTTGTGTGCTACAGCAG	TTGCCGTCCTGAAGATG	qRT-PCR
<i>Zm00001d045563</i>	CTCGTCAACATCTCCTTCG	GAAGACGGAAATCTCCAGC	qRT-PCR
<i>Zm00001d043019</i>	ATCCGCCAGATAAGGACTG	TGGGTAGGTCTTGTCTCCC	qRT-PCR
<i>Zm00001d042953</i>	TGTTGACGGCAAAGGTGT	CACTCATCAGCAGAGGCTT	qRT-PCR
<i>Zm00001d037118</i>	GCCAAAGGAAGACGATACCT	AATCAGCGACCACCTGTT	qRT-PCR
<i>Zm00001d014614</i>	TCATCCTCTCTGGTCCAATC	CAGTTCGTCTCTCAGCAAGA	qRT-PCR
2035-1	TCCGCGTTCCACTCCACAGT	AGCAGAGCAGGTGCTACATCG	克隆 <i>Zm00001d032035</i>
2035-2	GTCCTTACCATGACAAACGTC	TGTAACGTATTCAGAGGGAGG	克隆 <i>Zm00001d032035</i>
2422	CGGTGCTACTGACGGTTGCTCTAG	CACTCACTCCATAACATAGGTC	克隆 <i>Zm00001d032422</i>
<i>Zm00001d032035</i>	TTCAACCAGATGTTCCGCC	GTCCATTAGCAGTGCCTTG	qRT-PCR
<i>Zm00001d032422</i>	ATGCTGGACAAGCTGTGGGA	TCGCTGTAGGCCAGTCGTAGA	qRT-PCR

2 结果与分析

2.1 BSA重测序基因定位

2.1.1 杂交后代株高分离 K718d×K718的F₁群体

共42株,均表现为高秆。F₂群体共571株,其中高秆433株,矮秆138株,经卡方检验,高秆植株与矮秆植株分离比例符合3:1(表2),说明K718d矮秆性状是由隐性单基因控制的质量性状。

表2 株高分离比例

Table 2 Separation ratios of plant height

群体 Population	总株数 Total plants	高秆植株 High plants	矮秆植株 Dwarf plants	预期比例 Expected ratio(H:D)	χ^2
K718d×K718 F ₁	42	42	0	—	—
K718d×K718 F ₂	571	433	138	3:1	0.169

$\chi^2(0.05, 1)=3.84$, $\chi^2(0.01, 1)=6.63$

2.1.2 测序数据统计与比对 对两个亲本K718d、K718以及F₂群体高秆池、矮秆池进行重测序,GC含量在45.16%以上,Q30达到93%以上,平均比对率

为99.15%,平均测序深度23.50×,说明样品测序正常(表3)。

表3 亲本K718d、K718和两个极端池的基因组测序数据统计

Table 3 Summary of the sequencing data for K718d, K718 and two bulks

样品 Sample	过滤后的读段 Clean reads	GC含量(%) GC content	Q30(%)	平均测序深度(×) Average depth of sequencing	定位百分比(%) Mapped percent
K718	98,867,181	45.40	94.01	12	99.32
K718d	99,584,067	45.21	93.70	12	99.13
BH1	276,066,479	45.21	93.37	34	99.06
BD1	290,029,483	45.16	93.52	36	99.10

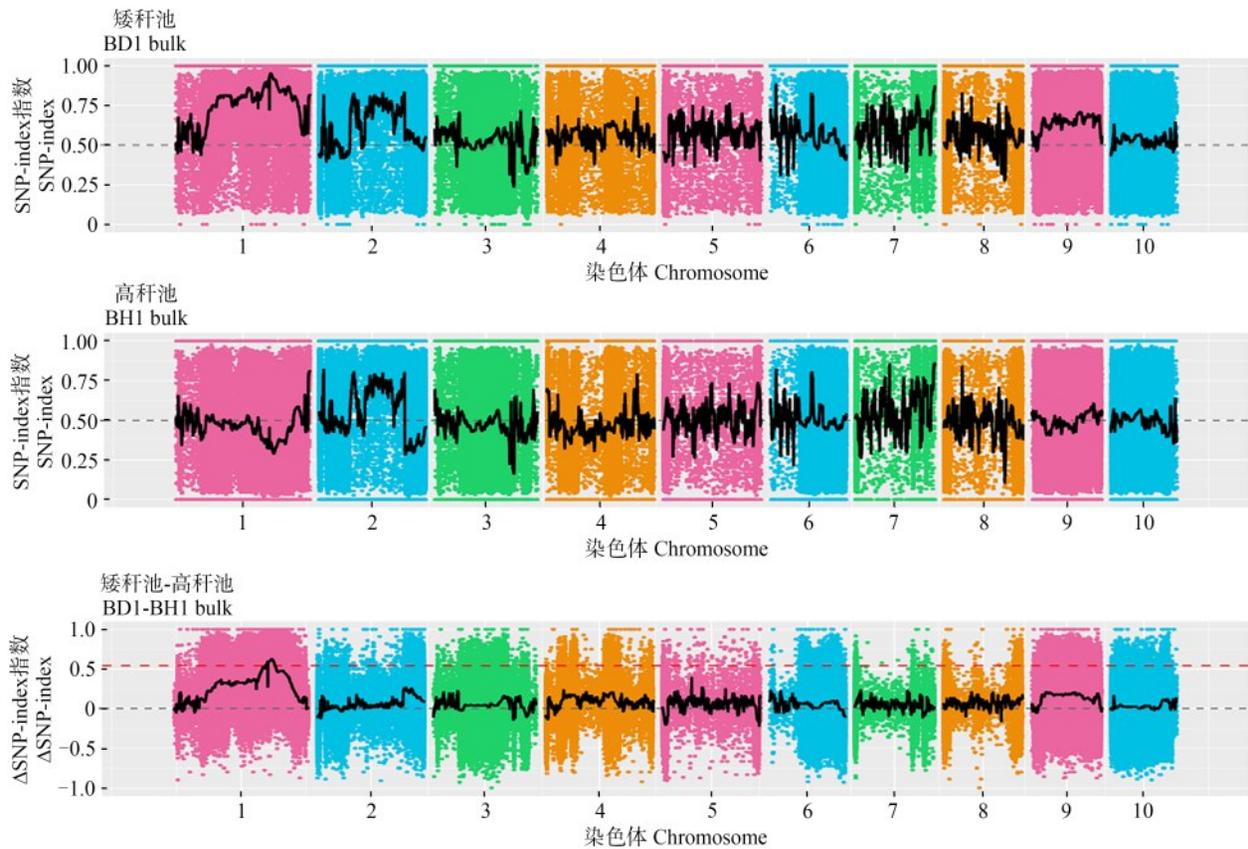
BH1:高秆混池;BD1:矮秆混池

BH1: High plant mixed pool; BD1: Dwarf plant mixed pool

2.1.3 候选区间的鉴定 利用两个极端混池的SNP值计算SNP-index值,再进一步将两个混池得到的

SNP-index值相减即是 Δ (SNP-index),将 Δ (SNP-index)分别对应到SNP所在的染色体位置进行作图,

利用拟合后 Δ SNP-index 的 99 百分位数, 即 0.54, 共获得位于 1 号染色体的 3 个区段: 208.48~208.56 Mb、209.64~213.78 Mb、214.45~231.26 Mb, 共包含 438 个基因(图 1)。



彩色的点代表计算出来的 Δ SNP-index; 黑色的线为拟合后的 Δ SNP-index; 红色虚线为显著性关联阈值

The colored dots represent the calculated Δ SNP-index; The black line is the fitted Δ SNP-index; The red dashed line is the threshold of significance association

图 1 SNP-index 关联值在染色体上的分布

Fig.1 Distribution of SNP-index correlation values on chromosomes

2.2 转录组分析

2.2.1 RNA-seq 数据统计与比对 对 3 个野生型生物学重复(W1、W2、W3), 3 个矮秆突变体生物学重复(d1、d2、d3)进行转录测序分析, Q30 碱基百分比

在 91.88% 及以上, GC 含量在 52.89% 及以上, 比对效率从 82.05% 到 86.93% 不等, 表明测序质量理想, 可用于后续分析(表 4)。

表 4 转录组数据比对统计

Table 4 Comparative statistics of transcriptome data

样品 Samples	获得的读段 Obtained reads	Q30 (%)	GC 含量(%) GC content	比对效率(%) Mapped reads
W1	20,617,779	92.41	53.82	82.33
W2	23,222,472	92.54	52.89	86.93
W3	25,358,241	91.88	53.29	82.06
d1	22,427,634	92.30	53.76	82.33
d2	22,160,781	92.34	53.99	82.05
d3	22,991,081	93.56	53.95	82.81

W1, W2, W3: 野生型生物学重复; d1, d2, d3: 矮秆突变体生物学重复

W1, W2, W3: Wild-type biological replicates; d1, d2, d3: Dwarf mutant biological replicates

2.2.2 差异表达基因的 GO 与通路富集分析 在 K718d 与 K718 幼茎组织中, 共鉴定出 2374 个 DEGs,

其中上调基因 1452 个, 下调基因 922 个。GO 分析表明, 生物学过程中, 主要注释到代谢过程、细胞

过程和单生物过程等;细胞组分中,主要注释到细胞、细胞部分和细胞器等;分子功能中,主要注释到催化活性、结合、核酸结合转录因子活性等(图2)。

KEGG 通路分析表明,富集的代谢途径主要有苯丙烷代谢、脂肪酸链延长和半乳糖代谢生物合成等途径(表5)。

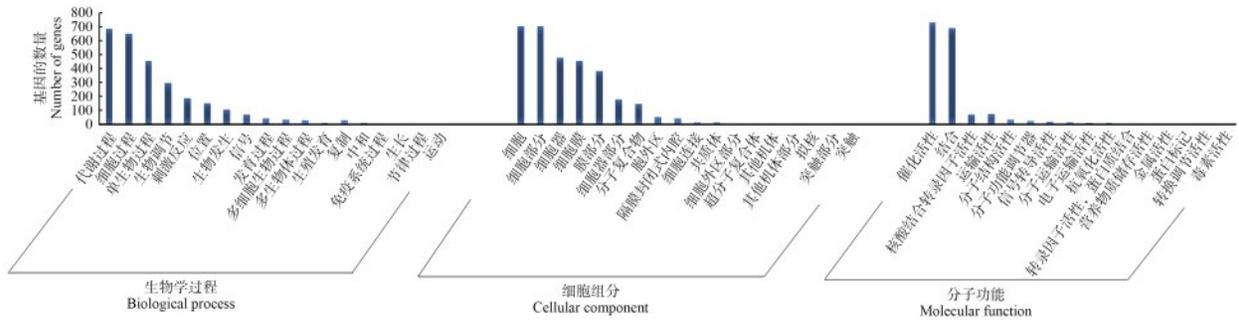


图2 差异表达基因的GO注释分类统计

Fig.2 Statistics of GO annotation classification of differentially expressed genes

表5 差异表达基因的通路富集分析

Table 5 Pathway enrichment analysis of differentially expressed genes

通路 ID	通路描述 Description	q 值 q-value	基因数量 Gene number
ko00360	苯丙烷酸代谢	1.78E-01	10
ko00062	脂肪酸伸长	2.21E-01	9
ko00052	半乳糖代谢	2.21E-01	17
ko00940	苯丙素生物合成	2.24E-01	32
ko00603	鞘糖脂的生物合成	2.40E-01	5
ko00591	亚油酸的新陈代谢	2.94E-01	5
ko00945	二苯乙烯类、二芳基庚烷类和姜辣素的生物合成	2.94E-01	9
ko00073	角质、亚硫酸盐和蜡的生物合成	3.08E-01	8
ko00942	花青素生物合成	3.08E-01	2
ko00500	淀粉和蔗糖代谢	3.08E-01	32
ko00950	异喹啉生物碱生物合成	4.02E-01	6
ko00943	异黄酮类生物合成	4.02E-01	4
ko00941	类黄酮生物合成	4.02E-01	13
ko00430	牛磺酸和低牛磺酸代谢	4.02E-01	2
ko04626	植物-病原互作	5.28E-01	56
ko00195	光合作用	5.67E-01	9
ko00920	硫代谢	5.67E-01	7
ko00650	丁酸盐代谢	5.67E-01	6
ko02010	ABC 转运	5.67E-01	12
ko04145	吞噬体	5.67E-01	13

2.2.3 差异表达基因功能分析 为了对差异表达基因进行功能注释,将挖掘到的差异表达基因,在NCBI数据库进行功能注释分析,结果表明,差异表达基因参与众多生物学过程。基于K718d矮秆材料表型,本研究集中分析可能与矮秆表型相关的差异表达基因。与野生型K718相比,矮秆突变体K718d中与细胞生长发育相关的Zm00001d037118

(MYB23)等基因表达量上调,Zm00001d037911(Rop3小GTP结合蛋白)等基因下调;与细胞壁组成相关的Zm00001d029913(细胞膨胀素B4)等基因表达量上调,Zm00001d008266(过氧化物酶24)等基因下调;与植物激素合成代谢等相关的Zm00001d045563(D3)等基因表达量上调(表6)。通过研究可能与K718d矮化表型相关的基因,为后续筛选候选基因

提供参考。

2.2.4 差异表达基因的qRT-PCR分析 为验证转录组测序的质量,选取*Zm00001d037118*、*Zm00001d029913*、*Zm00001d014614*、*Zm00001d043019*、*Zm00001d045563*和*Zm00001d042953*等6个分别与细胞生长发育、细

胞壁组成、木质素分解、赤霉素合成和ABC转运家族相关的基因在K718d与K718幼茎中进行qRT-PCR定量验证。与K718相比,6个基因在K718d中表达量上调。分析结果与转录组测序结果基本一致,说明RNA-seq的结果可靠(图3)。

表6 差异表达基因功能注释

Table 6 Functional annotation of differentially expressed genes

生物学过程 Biological process	上调或下调 Up or down	基因ID Gene ID
细胞生长发育 Cell growth	上调	<i>Zm00001d037118</i> 、 <i>Zm00001d017268</i> 、 <i>Zm00001d038338</i> 、 <i>Zm00001d046518</i> 、 <i>Zm00001d051269</i> 、 <i>Zm00001d052397</i>
	下调	<i>Zm00001d037911</i> 、 <i>Zm00001d047483</i> 、 <i>Zm00001d020408</i>
细胞壁组成 Cell wall composition	上调	<i>Zm00001d029913</i> 、 <i>Zm00001d014614</i> 、 <i>Zm00001d047293</i> 、 <i>Zm00001d009152</i> 、 <i>Zm00001d024386</i> 、 <i>Zm00001d045048</i> 、 <i>Zm00001d051526</i>
	下调	<i>Zm00001d008266</i> 、 <i>Zm00001d032465</i> 、 <i>Zm00001d045138</i> 、 <i>Zm00001d031479</i> 、 <i>Zm00001d049432</i>
纤维素合成分解 Cellulose biosynthetic and catabolic process	上调	<i>Zm00001d041972</i> 、 <i>Zm00001d044744</i>
	下调	<i>Zm00001d017949</i>
木质素分解过程 Lignin catabolic process	上调	<i>Zm00001d012477</i> 、 <i>Zm00001d042905</i> 、 <i>Zm00001d043019</i>
赤霉素合成 Gibberellin biosynthetic	上调	<i>Zm00001d045563</i> 、 <i>Zm00001d037724</i>
生长素代谢 Auxin catabolic process	上调	<i>Zm00001d033463</i> 、 <i>Zm00001d030661</i> 、 <i>Zm00001d013302</i> 、 <i>Zm00001d023904</i> 、 <i>Zm00001d008201</i> 、 <i>Zm00001d041462</i> 、 <i>Zm00001d037724</i>
	下调	<i>Zm00001d050972</i> 、 <i>Zm00001d036415</i>
脱落酸 Abscisic acid	下调	<i>Zm00001d005867</i> 、 <i>Zm00001d047968</i>
乙烯 Ethylene	下调	<i>Zm00001d038852</i>
水杨酸 Salicylic acid	上调	<i>Zm00001d039963</i>
茉莉酸 Jasmonic acid	上调	<i>Zm00001d006638</i> 、 <i>Zm00001d027901</i> 、 <i>Zm00001d033050</i>

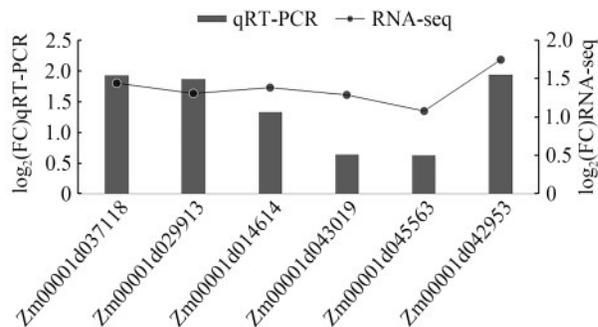


图3 实时荧光定量PCR与转录组测序结果比较

Fig.3 Comparison of the relative expression abundance measured by qRT-PCR and RNA-seq

2.3 候选基因同源分析

2.3.1 候选基因的筛选 BSA-reseq与转录组测序结果进行联合分析,将候选区间内的基因与差异表达基因进行比对,共筛选出基因26个,其中非同义突变

基因19个。进一步结合同源基因功能注释、基因表达量与生物信息学分析,初步获得2个与植物激素调节相关的基因*Zm00001d032035*和*Zm00001d032422*。*Zm00001d032035*编码香叶醇8-羟化酶,属于细胞色素P450家族706亚家族,与拟南芥*AT4G12320*基因同源,编码细胞色素P450。另一个基因是*Zm00001d032422*,在玉米基因组中尚未注释,与拟南芥*AT2G33830*基因同源,编码非特异性磷脂酶C4(表7)。

2.3.2 候选基因的PCR扩增 根据*Zm00001d032035*和*Zm00001d032422*基因组序列,设计交叉覆盖基因组的引物进行PCR扩增、测序、拼接和比对。结果显示,与K718相比,K718d中*Zm00001d032035*基因,在第90位碱基处插入12 bp,同时存在16处单碱基突变,2处缺失和1处插入,编码区全长1568 bp(图4a)。由于K718d的*Zm00001d032035*编码区在

第792位碱基处插入1个腺嘌呤脱氧核苷酸(A),导致其氨基酸序列在第264位氨基酸处发生移码突变,编码517个氨基酸(图4b)。

表7 候选区段内基因的注释

Table 7 Annotation of genes in candidate regions

基因名称 Gene name	功能注释 Functional annotation	上调或下调 Up or down
Zm00001d032035	香叶醇8-羟化酶	下调
Zm00001d032422	—	下调
Zm00001d032047	胚芽样蛋白亚家族3成员	下调
Zm00001d032069	假定的蛋白激酶超家族蛋白	上调
Zm00001d032090	细胞色素P450还原酶	上调
Zm00001d032245	DNA修复蛋白RAD4	下调
Zm00001d032261	环丙烷-脂肪酰基磷脂合酶	上调
Zm00001d032376	抗病蛋白Pik-2	下调
Zm00001d032424	胆汁酸钠1	上调
Zm00001d032465	网格蛋白结合蛋白	下调
Zm00001d032532	谷氨酰tRNA还原酶1 叶绿体	上调
Zm00001d032210	—	上调
Zm00001d032402	—	下调
Zm00001d032404	—	下调
Zm00001d032410	—	下调
Zm00001d032423	—	下调
Zm00001d032543	—	下调
Zm00001d032265	—	上调
Zm00001d032375	—	下调

— 无注释

— Uncommented

与K718相比,K718d中的Zm00001d032422在第140位碱基处存在1处单碱基突变,第181位碱基处缺失9 bp,编码区全长348 bp(图5a)。其氨基酸序列在第47位氨基酸处由甲硫氨酸(Met)突变为苏氨酸(Thr),在第59位氨基酸处缺失3个氨基酸,编码115个氨基酸(图5b)。

2.3.3 候选基因的qRT-PCR分析

对突变体K718d与野生型K718的幼茎组织进行qRT-PCR分析。结果表明,Zm00001d032035和Zm00001d032422基因在突变体K718d中的表达量均极显著低于K718($P < 0.001$)。推测K718d矮化可能与这两个基因表达量降低有关(图6)。

3 讨论

研究发现,与赤霉素相关的矮化突变主要是通

过GA的合成代谢与信号转导两个途径对植株高度进行调控^[19]。在赤霉素合成中,内根-贝壳杉烯被氧化生成GA12-醛,这一过程需要两种细胞色素P450酶,内根-贝壳杉烯氧化酶(KO, inner root-kaurine oxidase)和内根-贝壳杉烯酸氧化酶(KAO, inner root - kauri acid oxidase)。KO与KAO任一基因突变,都会引起植株矮化,例如拟南芥 *ga3*^[20]、豌豆 *lh*^[21]、水稻 *OsKO*^[22],均是由于KO基因突变,导致植株高降低;大麦 *grd*^[23]、玉米 *dwarf3*^[24]、豌豆 *na*^[25],均是由于KAO基因突变,导致植株矮化。本研究中Zm00001d032035属于细胞色素P450家族706亚家族,编码细胞色素P450,克隆发现其编码区碱基和氨基酸序列均发生突变,且在K718d中的表达量极显著低于K718。由此推测,Zm00001d032035的突变或表达量降低,可能导致其功能不能正常行使,进一步导致赤霉素生物合成大量减少,引起K718d矮化,这与董丽等^[13]猜测造成K718d矮化的原因之一可能是某一特定时期赤霉素合成过少一致。*br1*是早期发现的一个玉米矮秆基因,定位于1号染色体bin 1.07处,至今未被克隆^[26]。经等位性鉴定,K718d是*br1*等位突变体,植株形态与*br1*相似^[13]。因而Zm00001d032035可能编码具有KO或KAO基因功能的细胞色素P450家族基因,在K718d矮化过程中起到关键作用,并为*br1*克隆提供参考。

Zm00001d032422与拟南芥AT2G33830基因同源,编码非特异性磷脂酶C4。磷脂酶是一类水解酶,在植物生长发育、生物胁迫及非生物胁迫中起重要的调控作用^[27]。非特异性磷脂酶C(NPC, nonspecific phospholipase C)是由磷脂酶C水解生成。近年研究表明,NPC在胁迫响应方面具有重要作用,并参与脱落酸(ABA)、油菜素内酯(BL)等激素信号传导途径^[28]。胡利芹等^[29]将谷子中发现的*SiNPC4*基因转入拟南芥中,发现该基因对脱落酸(ABA)和油菜素内酯(BL)激素的敏感性降低。关于NPCs如何参与调控植物激素的功能依然不是很清楚。本研究发现1个与拟南芥AT2G33830基因同源,编码非特异性磷脂酶C4的基因Zm00001d032422,与野生型相比,K718d中Zm00001d032422编码区碱基及氨基酸均有改变,表达量极显著低于K718。推测Zm00001d032422突变或表达量降低可能与K718d矮化有一定关联。本研究通过BSA-reseq与RNA-seq分析,确定了两个可能与K718d矮化相关的候选基因,并且两个基因在K718d中的表达量极



图5 Zm00001d032422 序列比对
Fig.5 Sequence alignment of Zm00001d032422

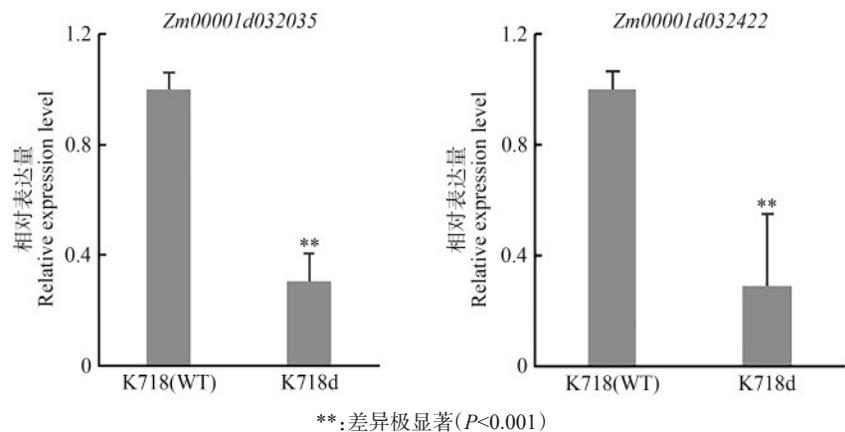


图6 K718d 和 K718 中的 Zm00001d032035 和 Zm00001d032422 的表达量分析
Fig.6 Expression analysis of Zm00001d032035 and Zm00001d032422 in K718d and K718

参考文献

[1] Li C , Tang J , Hu Z Y , Wang J W , Yu T , Yi H Y , Cao M J . A novel maize dwarf mutant generated by *Ty1-copia* LTR-retrotransposon insertion in *Brachytic2* after spaceflight. *Plant Cell Reports*, 2019, 39(6): 1-16

[2] Spielmeier W , Ellis M H , Chandler P M . Semidwarf (*sd-1*), "green revolution" rice, contains a defective gibberellin 20-oxidase gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2002, 99 (13): 9043-9043

[3] Peng J , Richards D E , Hartley N M , Murphy G P , Devos K M , Flintham J E , Beales J , Fish L J , Worland A J , Pelica F , Sudhakar D , Christou P , Snape J W , Gale M D , Harberd N P . 'Green revolution' genes encode mutant gibberellin response modulators. *Nature*, 1999, 400(6741): 256-261

[4] Sun T P , Kamiya Y . Arabidopsis *GAI* locus encodes the cyclase *ent*-kaurene synthetase a of gibberellin biosynthesis. *Plant Cell*, 1994, 6(10): 1509-1518

[5] 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 *dhw3* mutants. *Science*, 2003, 302(5642): 81-84

[6] Lawit S J , Wych H M , Xu D , Kundu S , Tomes D T . Maize DELLA proteins dwarf plant8 and dwarf plant9 as modulators of plant development. *Plant Cell Physiol*, 2010, 51(11): 1854-1868

[7] 王立静,哈丽旦,张素梅,徐春花,李启芳,刘保申.新的玉米矮秆突变基因的鉴定与遗传分析. *华北农学报*, 2008(5): 23-25

Wang L J , Ha L D , Zhang S M , Xu C H , Li Q F , Liu B S . Identification and genetic analysis of new dwarf mutation genes in maize. *Acta Agriculturae Boreali-Sinica*, 2008 (5): 23-25

[8] Wang Y J , Deng D X , Ding H D , Xu X M , Zhang R , Wang S X , Bian Y L , Yin Z T , Chen Y . Gibberellin biosynthetic deficiency is responsible for maize dominant Dwarf11 (*D11*) mutant phenotype: Physiological and transcriptomic evidence. *PLoS ONE*, 2013, 8(6): e66466

[9] 董春林,翟广谦,张正,杨睿,张明义,张彦琴,杨丽莉,常建忠.玉米矮秆突变体 A2 的表型鉴定及转录组分析. *玉米科学*, 2019, 27(4): 52-57

Dong C L , Zhai G Q , Zhang Z , Yang R , Zhang M Y , Zhang Y Q , Yang L L , Chang J Z . Phenotypic identification and transcriptome analysis of maize dwarf stalk mutant A2. *Journal*

- of Maize Sciences, 2019, 27(4): 52-57
- [10] 陈浣,夏菲,吴新儒,孙玉合. 集群分离分析法在植物基因定位上的应用. 基因组学与应用生物学, 2016, 35(6): 1546-1551
Chen H, Xia F, Wu X R, Sun Y H. Application of cluster isolation analysis method in plant gene localization. Genomics and Applied Biology, 2016, 35(6): 1546-1551
- [11] Gao J, Gao D X, Zhou W Y, Liang H F, Huang J, Qing D J, Chen W W, Wu H, Yang X H, Li D T, Gao L J, Deng G F. Mapping and identifying a candidate gene *Plr4*, a recessive gene regulating purple leaf in rice, by using bulked segregant and transcriptome analysis with next-generation sequencing. International Journal of Molecular Sciences, 2019, 20(18): 4335
- [12] Sunggil K, Cheol W K, Minkyu P, Doil C. Identification of candidate genes associated with fertility restoration of cytoplasmic male-sterility in onion (*Allium cepa* L.) using a combination of bulked segregant analysis and RNA-seq. Theoretical & Applied Genetics, 2015, 128(11): 2289-2299
- [13] 董丽,石海春,赵长云,余学杰,柯永培. 玉米矮秆突变体 K718d 的遗传鉴定. 华北农学报, 2021, 36(6): 71-77
Dong L, Shi H C, Zhao C Y, Yu X J, Ke Y P. Genetic identification of maize dwarf mutant K718d. Acta Agriculturae Boreali-Sinica, 2021, 36(6): 71-77
- [14] Li H, Durbin R. Fast and accurate short read alignment with burrows-wheeler transform. Bioinformatics, 2009, 25(14): 1754-1760
- [15] McKenna A, Hanna M, Banks E, Sivachenko A, Cibulskis K, Kernytsky A, Garimella K, Altshuler D, Gabriel S, Daly M, DePristo M A. The genome analysis tool kit: A map reduce framework for analyzing next generation DNA sequencing data. Genome Research, 2010, 20(9): 211-230
- [16] 李盼,李超,张瑞茂,张显强,罗京. 甘蓝型矮秆直立株油菜株高性状基因的初步定位. 植物遗传资源学报, 2020, 21(1): 83-93
Li P, Li C, Zhang R M, Zhang X Q, Luo J. Preliminary localization of high trait genes in cabbage-type dwarf upright rape plants. Journal of Plant Genetic Resources, 2020, 21(1): 83-93
- [17] Kim D, Langmead B, Salzberg S L. HISAT: A fast spliced aligner with low memory requirements. Nature Methods, 2015, 12(4): 357-360
- [18] Florea L, Song L, Salzberg S L. Thousands of exon skipping events differentiate among splicing patterns in sixteen human tissues. F1000Research, 2013, 2: 188
- [19] 刘磊,詹为民,丁武思,刘通,崔连花,姜良良,张艳培,杨建平. 玉米矮化突变体 *gad39* 的遗传分析与分子鉴定. 作物学报, 2022, 48(4): 886-895
Liu L, Zhan W S, Ding W S, Liu T, Cui L H, Jiang L L, Zhang Y P, Yang J P. Genetic analysis and molecular identification of the *dwarf* mutant *gad39* in maize. Acta Agronomica Sinica, 2022, 48(4): 886-895
- [20] Helliwell C A, Sheldon C C, Olive M R, Walker A R, Zeevaart J A, Peacock W J, Dennis E S. Cloning of the *Arabidopsis ent*-kaurene oxidase gene *GA3*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1998, 95(15): 9019-9024
- [21] Davidson S E, Smith J J, Helliwell C A, Poole A T, Reid J B. The pea gene *LH* encodes *ent*-kaurene oxidase. Plant Physiol, 2004, 134(3): 1123-1134
- [22] Sakamoto T, Miura K, Itoh H, Tatsumi T, Ueguchi-Tanaka M, Ishiyama K, Kobayashi M, Agrawal G K, Takeda S, Abe K, Miyao A, Hirochika H, Kitano H, Ashikari M, Matsuoka M. An overview of gibberellin metabolism enzyme genes and their related mutants in rice. Plant Physiol, 2004, 134(4): 1642-1653
- [23] Helliwell C A, Chandler P M, Poole A. The CYP88A cytochrome P450, *ent*-kaurenoic acid oxidase, catalyzes three steps of the gibberellin biosynthesis pathway. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2001, 98(4): 2065-2070
- [24] Winkler R. The maize *Dwarf3* gene encodes a cytochrome P450-mediated early step in gibberellin biosynthesis. Plant Cell, 1995, 7(8): 1307-1317
- [25] Davidson S E, Elliott R C, Helliwell C A, Poole A T, Reid J B. The pea gene *NA* encodes *ent*-kaurenoic acid oxidase. Plant Physiol, 2003, 131(1): 335-344
- [26] Hoisington D A, Coe E H. Mapping in maize using RFLPs// Gustafson J P. Gene manipulation in plant improvement II. stadler genetics symposia series. Boston, MA: Springer US, 1990: 331-352
- [27] 帅良,孙健,段振华,李丽,何雪梅,李昌宝,廖玲燕. 植物非特异性磷脂酶 C 的研究进展. 江苏农业科学, 2019, 47(18): 30-37
Shuai L, Sun J, Duan Z H, Li L, He X M, Li C B, Liao L Y. Research advances in plant nonspecific phospholipase C. Jiangsu Agricultural Sciences, 2019, 47(18): 30-37
- [28] 孙大千,董金晔,李洋,肖红庆,徐赫韩,李海燕,王法微. 磷脂酰肌醇特异性磷脂酶 C 基因研究进展. 生物技术, 2017, 27(1): 92-97
Sun D Q, Dong J Y, Li Y, Xiao H Q, Xu H H, Li H Y, Wang F W. Research advances in phosphatidylinositol-specific phospholipase C gene. Biotechnology, 2017, 27(1): 92-97
- [29] 胡利芹,薛飞洋,李微微,王二辉,徐兆师,李连城,周永斌,贾冠清,刁现民,马有志,陈明. 谷子非特异性磷脂酶 C 基因 *SiNPC4* 的克隆及功能分析. 作物学报, 2015, 41(7): 1017-1026
Hu L Q, Xue F Y, Li W W, Wang E H, Xu Z S, Li L C, Zhou Y B, Jia G Q, Diao X M, Ma Y Z, Chen M. Cloning and functional analysis of non-specific phospholipase C gene *SiNPC4* in foxtail millet (*Setaria italica*). Acta Agronomica Sinica, 2015, 41(7): 1017-1026