

# 玉米褐色叶中脉突变体 *bm-like1* 的 基因克隆与转录组分析

何田利<sup>1,2</sup>, 杨悦<sup>2</sup>, 张红伟<sup>2</sup>, 杨宗莹<sup>2</sup>, 卢雨晴<sup>2</sup>, 李润植<sup>1</sup>, 郑军<sup>2</sup>

(<sup>1</sup>山西农业大学农学院, 晋中 030801; <sup>2</sup>中国农业科学院作物科学研究所, 北京 100081)

**摘要:** 本研究在田间发现了一个自然突变的玉米褐色叶中脉突变体, 并命名为 *bm-like1*。多代自交后发现 *bm-like1* 的褐色叶中脉性状能够稳定遗传。通过突变体 *bm-like1* 和自交系 B73 杂交构建了 F<sub>2</sub> 群体, 遗传分析发现, *bm-like1* 的褐色叶中脉表型由隐性单基因 *BM3* 控制。利用 BSA-Seq 和精细定位方法, 对有褐色叶中脉表型的 F<sub>2</sub> 植株进行定位, 将目标区段定位在玉米第 4 号染色体 32~36 Mb 之间。通过玉米数据库检索发现, 该定位区间内存在一个已报道的 *BM3* 基因。*BM3* 基因编码咖啡酸-O-甲基转移酶, 是玉米木质素生物合成途径中一个重要的酶。利用纯合突变体 *bm-like1* 与 *bm3* 突变体做杂交进行等位测验, 发现杂交后代表现出褐色叶中脉的表型。经序列分析发现突变体 *bm-like1* 中 *BM3* 基因在起始密码子 ATG 上游 144 bp 处有一个 1439 bp 的 *hAT* 转座子插入, 而 *bm3* 突变体在 *BM3* 基因第 2 外显子上有一个 5452 bp 的序列插入。利用实时荧光定量 PCR 实验和转录组分析发现, 突变体 *bm-like1* 中 *BM3* 基因的表达量显著低于自交系 B73, 突变体 *bm-like1* 与自交系 B73 之间的差异表达基因主要集中在次生代谢物的合成和代谢途径。

**关键词:** 玉米; 褐色叶中脉; 木质素; *BM3*; BSA-Seq

## Gene Isolation and Transcriptome Analysis of a Maize Brown Midrib Mutant *bm-like1*

HE Tian-li<sup>1,2</sup>, YANG Yue<sup>2</sup>, ZHANG Hong-wei<sup>2</sup>, YANG Zong-ying<sup>2</sup>, LU Yu-qing<sup>2</sup>, LI Run-zhi<sup>1</sup>, ZHENG Jun<sup>2</sup>

(<sup>1</sup>College of Agriculture, Shanxi Agricultural University, Jinzhong 030801; <sup>2</sup>Institute of Crop Sciences,

Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081)

**Abstract:** This study reported *bm-like1*, a naturally-occurring brown midrib mutant in maize. Segregation analysis in the F<sub>2</sub> population derived from the homozygous *bm-like1* mutant crossing with B73 inbred line indicated that the brown midrib phenotype in *bm-like1* was controlled by a single recessive gene that named *BM3*. Using BSA-seq and fine mapping, the target region was mapped to the interval of 32-36 Mb on maize chromosome 4, where the *BM3* gene was resided. *BM3* encodes a caffeic acid o-methyltransferase, which is an important enzyme in lignin biosynthesis. By crossing *bm-like1* with the *bm3* mutant, the F<sub>1</sub> plants were observed with a brown midrib, indicating that *BM3* was the causal gene for *bm-like1* mutant. Genomic sequence analysis revealed a 1439 bp *hAT* transposon at 144 bp upstream of transcription start site of *BM3* in *bm-like1*, whereas the *bm3* mutant represented a 5452 bp insertion in the second exon of *BM3* gene. Real-time quantitative PCR and transcriptomic analysis approved a reduction on the expression of *BM3* gene in *bm-like1* to the wild type. Moreover, the differentially expressed genes between *bm-like1* and wild type were mainly enriched in the secondary metabolites biosynthesis and metabolic pathway.

**Key words:** maize; brown midrib; lignin; *BM3*; BSA-Seq

收稿日期: 2021-03-03 修回日期: 2021-03-24 网络出版日期: 2021-04-14

URL: <http://doi.org/10.13430/j.cnki.jpgr.20210303001>

第一作者研究方向为青贮玉米基因克隆与利用, E-mail: hetianli@126.com; 杨悦、张红伟为共同第一作者

通信作者: 李润植, 研究方向为植物分子遗传与基因工程, E-mail: rli2001@126.com

郑军, 研究方向为玉米重要农艺性状基因的定位、克隆及功能研究, E-mail: zhengjun02@caas.cn

基金项目: 中国农业科学院创新工程专项经费资助

**Foundation Project:** Agricultural Science and Technology Innovation Program of Chinese Academy of Agricultural Sciences

玉米作为青贮饲料,具有籽粒产量、淀粉和生物量高等优点,青贮玉米逐渐成为一种重要的家畜饲料<sup>[1]</sup>。褐色叶中脉玉米材料木质素含量低,反刍动物食用消化率和营养价值高,是良好的青贮玉米材料<sup>[2]</sup>。随着国家对青贮玉米产业发展的重视和粮改饲政策试点的推进<sup>[3]</sup>,对玉米褐色叶中脉突变体的育种利用研究逐渐成为玉米科研人员的关注方向。

褐色叶中脉玉米最早于1924年发现,共发现6个玉米褐色叶中脉突变体<sup>[4-9]</sup>,即 *bm1*、*bm2*、*bm3*、*bm4*、*bm5* 和 *bm6*,分别被定位于第5、1、4、9、5和2号染色体上。玉米 *BM1* 基因编码的肉桂醇脱氢酶(CAD, cinnamyl-alcohol dehydrogenase)催化肉桂醛转化成肉桂醇<sup>[10-11]</sup>,是木质素单体合成的最后一步。*BM2* 基因编码亚甲基四氢叶酸还原酶(MTHFR, methylenetetrahydrofolate reductase), MTHFR参与S-腺苷-甲硫氨酸(SAM, S-adenosyl-methionine)前体代谢,*BM2* 基因突变降低愈创木基木质素的含量<sup>[12]</sup>。*BM3* 基因编码咖啡酸-O-甲基转移酶(COMT, caffeic acid o-methyltransferase),能够催化咖啡酸、5-羟基松柏醛和5-羟基松柏醇甲基化分别生成阿魏酸、芥子醛和芥子醇,主要参与紫丁香基木质素(S-木质素, syringyl lignin)的生物合成<sup>[5-6, 12]</sup>。*BM3* 基因突变改变玉米茎秆木质素组分,显著提高青贮玉米的体内消化率和营养价值<sup>[13]</sup>。*BM4* 基因编码叶酰聚谷氨酸合成酶(FPGS, folylpolyglutamate synthetase),将谷氨酸残基结合在单谷氨酸四氢叶酸的 $\gamma$ -羧基上,生成具有多尾的四氢叶酸,为C1代谢途径提供重要供体<sup>[14]</sup>。*BM5* 基因编码4-香豆酸-辅酶A连接酶(4CL, 4-coumarate-CoA ligase),将对-香豆酸、芥子酸和阿魏酸等转化成相应的CoA酯<sup>[15]</sup>。Chen等<sup>[16]</sup>将*BM6*定位到了玉米第2号染色体180 kb的区间内,获得4个候选基因。挖掘玉米褐色叶中脉的基因有助于了解木质素合成的关键基因,从而为这些基因资源的利用奠定基础。

集群分离分析技术(BSA, bulked segregant analysis)通过对具有极端表型值的个体DNA进行混池测序,通过识别与目标性状紧密连锁的分子标记进行基因定位<sup>[17]</sup>。基于高通量测序的BSA-Seq已经成功应用于多个物种的主效基因或QTLs的定位,如拟南芥<sup>[18]</sup>、玉米<sup>[19]</sup>、水稻<sup>[20]</sup>、酵母<sup>[21]</sup>等。相比于传统的基因定位方法,BSA-Seq可以直接借

助两个亲本之间具有多态性的分子标记进行基因定位,从而节省时间和研究经费。精细定位是一种基因定位的方法,根据重组个体表型和基因型的关系缩小目标位点的定位区间<sup>[22]</sup>。利用BSA-Seq和精细定位可以实现对玉米褐色叶中脉表型的遗传定位。

本研究鉴定到一个新的玉米褐色叶中脉突变体,将其命名为*bm-like1*。通过对*bm-like1*进行遗传分析和基因定位,并借助等位测验发现,*bm-like1*是一个新的*BM3*基因等位突变体。基因序列分析表明,启动子区段的1439 bp的*hAT*转座子插入可能是导致*bm-like1*褐色叶中脉表型的原因。生物信息学分析发现,*bm-like1*和野生型的差异表达基因具有氧化还原酶活性、催化活性和多糖结合等分子功能,同时参与木质素、苯丙烷和次生代谢物的代谢合成等生物过程。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

玉米突变体*bm-like1*来自本实验室试验田中的一个褐色叶中脉突变体,属于自然突变。通过突变体*bm-like1*和自交系B73杂交后自交构建F<sub>2</sub>群体,进行遗传分析。利用纯合突变体*bm-like1*与*bm3*突变体杂交进行等位测验。*bm3*基因突变体408E *bm3*-91598-3订购于Maize Genetics Cooperation Stock Center (maizecoop.cropsci.uiuc.edu/)。

### 1.2 表型鉴定与木质素含量测定

突变体*bm-like1*在大田播种后生长至9叶期时,其叶片表现出明显的褐色叶中脉表型。突变体*bm-like1*与自交系B73构建的F<sub>2</sub>群体表现为白色叶中脉或褐色叶中脉两种表型。观察并统计F<sub>2</sub>白色叶中脉和褐色叶中脉植株株数,利用统计学方法计算分离比并进行卡方检验。随机选取蜡熟期无果穗的自交系B73、突变体*bm3*和*bm-like1*植株各9株,每3株为1个生物学重复。样品经杀青和烘干后进行粉碎,利用MPA型近红外光谱分析仪测定样品酸性洗涤木质素含量。

### 1.3 目的基因的定位及等位测验

本研究利用突变体*bm-like1*(父本)和自交系B73(母本)及2000株F<sub>2</sub>分离群体为试验材料,对F<sub>2</sub>中421株褐色叶中脉的单株取样,CTAB法提取DNA。利用NanoDrop2000C超微量分光光度计检测DNA浓度,取421株单株的DNA等量混合,构建DNA池。将混池送到北京安诺优达基

因科技有限公司测序,测序深度为  $30 \times$ ,参考基因组为 B73V4 版本的玉米基因组。参照 BSA-Seq 和精细定位实验流程<sup>[17,23]</sup>,比对及注释分析,提取并分析 SNP 位点,确定候选基因的潜在区间。根据 BSA-Seq 获得 InDel 标记,在初定位区间内的不同位置设计 InDel 分子标记(表 1)。在突变体 *bm-like1* 和自交系 B73 两个亲本中筛选多态性标记,利用多态性 InDel 标记对 421 个 DNA 进行 PCR 扩增,根据扩增的基因型对褐色叶中脉表型进行精细定位。

根据 *bm-like1* 基因的精细定位区间,在玉米数据库([www.maizgedb.org/](http://www.maizgedb.org/))上搜索该区间内的基因注释信息发现,该区间内存在一个已报道的玉米褐色叶中脉 *BM3* 基因<sup>[6]</sup>。于 2019 年冬分别种植 *bm-like1* 和 *bm3* 突变体各 1 行,每行 20 株。雄穗散粉时,取突变体 *bm-like1* 单株花粉与 *bm3* 杂交得到  $F_1$ 。于 2020 年夏种植  $F_1$  植株,生长至 9 叶期后观察叶中脉颜色。

#### 1.4 *bm-like1* 基因的克隆和序列分析

利用 CTAB 法提取 *bm-like1* 和 *bm3* 突变体的基因组 DNA,根据自交系 B73 参考基因组的 *BM3* 基因序列设计引物(表 1),扩增突变体中的 *BM3* 基因和启动子序列,PCR 扩增体系为 50  $\mu$ L,包含模板 DNA 2  $\mu$ L、 $2 \times$  phanta Max Buffer 25  $\mu$ L、dNTP Mix 1  $\mu$ L、DNA Polymerase 1  $\mu$ L、*bm-like1*-F 和 *bm-like1*-R 各 2  $\mu$ L、ddH<sub>2</sub>O 17  $\mu$ L。PCR 扩增程序为:95 $^{\circ}$ C 3 min;95 $^{\circ}$ C 15 s,58 $^{\circ}$ C 15 s,72 $^{\circ}$ C 2 min 30 s,32 个循环,72 $^{\circ}$ C 5 min,4 $^{\circ}$ C 保存。将 PCR 产物送至北京擎科新业生物技术有限公司测序。在玉米数据库上检索自交系 B73、W22、Mo17-CAU、Mo17-YAN、PH207、CML247、Tzi8、M37W、Oh7B、F7 和 EP1 的基因组序列,比较 *BM3* 基因的编码序列和启动子序列在突变体 *bm-like1* 和以上自交系之间的序列差异。利用 PlantCARE([bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/](http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/))预测 *BM3* 基因启动子区的调控元件。

表 1 本研究所用的引物

Table1 Primers used in this study

引物名称 Primer name	正向序列 Forward sequence (5'-3')	反向序列 Reverse sequence (5'-3')	引物用途 Purpose of primer
InD18-F/R	AAGCCAACAAGCAAGCTCTC	AAATGTCCCTAGTGTCTTGATT	精细定位 Fine mapping
InD23-F/R	CAACCTGAGCTGGAAGGTA	GGACATGGAGACCACAATCC	
InD28-F/R	TGTTCTGGGAAAGTCGATCC	GGAACCTGGATCGAGGAACA	
InD30-F/R	TCTGTGCGGGTGTATTTGT	CGGTCAGGGACAATTGCAAAA	
InD32-F/R	GATGGAATTAATGGCAGTCCA	GGTCATGCGACCCTGTACTC	
InD34-F/R	TTGGTGTGGATGGGGTTGA	GGACTGTAAAGCATGGTAAAGCG	
InD35-F/R	CCAGGACGGCCATTTAACA	ACAAGGAACGGAGGAAGACG	
InD36-F/R	ACCCACGAATCGTTGTTGAC	TTCGCTACCACAACCTCTGCT	
InD38-F/R	CTGAGATGCTCATGCCACAT	TCAGCAGGCAAGAACAAGTG	
InD78-F/R	TGCACACGGCGTATTGGTAT	TACTGCCAGACAGTACCGC	
InD90-F/R	TACAATGTTGCGCTGCTTCG	TGCTCCTTTGTAGCACAAAGTCA	
InD140-F/R	TTGTCACATAATGCGGCGAC	TAAGTGCACTACCACCTGG	
InD150-F/R	GGGGCATGGATGGCCATTAG	TCACAACCTACAACCGGCAG	
<i>bm-like1</i> -F/R	GAGCCCAGCAGAGAAAAGGC	CCGCCATGTAATTGTATCGTAAGT	扩增基因 Amplified gene
Pro-F/R	GTTGCCAAGATCGCAATTTA	GGCGTTCTTCAGCGTCAT	
<i>BM3</i> -q-F/R	GCGCTCATGAACCAGGACAA	AGTGGTTCTTCATGCCCTCG	实时荧光定量 PCR qRT-PCR
GAPDH-F/R	CCCTTCATCACCACGGACTAC	AACCTTCTGGCACCACCT	

### 1.5 *bm-like1* 基因表达分析

分别将生长7周的自交系B73、突变体 *bm-like1* 的叶片(去除中脉)与中脉2种不同部位的材料混合取样3株作为1个生物学重复,每组材料设计3个生物学重复。利用植物总RNA提取试剂盒(北京天根生化科技公司,货号DP432)分别提取总RNA。使用NanoDrop 2000微量分光光度计检测RNA样品的纯度和浓度,并用1%琼脂糖凝胶电泳检测RNA样品的质量。使用反转录试剂盒(北京全式金生物技术有限公司,货号AU311-03)将RNA反转录为cDNA。设计BM3基因引物(BM3-q-F/R,表1),GAPDH-F/R作为内参引物(表1),进行实时定量的表达分析,所用仪器为ABI 7300实时荧光定量PCR仪。PCR扩增体系为20  $\mu$ L,包含模板cDNA 1  $\mu$ L、Dye I 0.4  $\mu$ L、10  $\times$  qMix 10  $\mu$ L、引物 0.4  $\mu$ L、ddH<sub>2</sub>O 7.8  $\mu$ L。PCR扩增程序为:95  $^{\circ}$ C 2 min; 95  $^{\circ}$ C 15 s, 58  $^{\circ}$ C 20 s, 72  $^{\circ}$ C 30 s, 40个循环。在72  $^{\circ}$ C延伸30 s阶段收集荧光,并添加溶解曲线,用公式 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 计算BM3基因的表达量<sup>[24]</sup>。

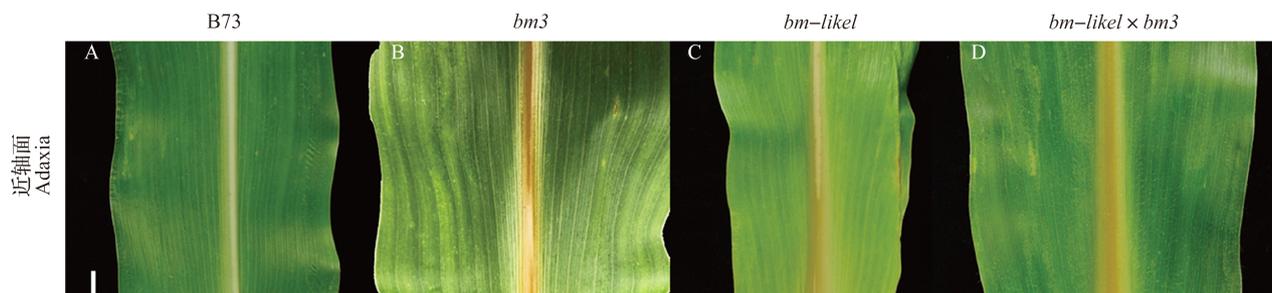
### 1.6 RNA-Seq 和差异表达分析

将RNA送到北京安诺优达基因科技有限公司进行文库构建和转录组测序。用R语言DESeq2包进行基因差异表达分析,以表达差异倍数 $|\log_2 \text{Fold Change}| > 2$ 和差异显著性 $\text{padj} < 0.01$ 为标准筛选差异表达基因。利用AgriGo v2.0([systemsbiology.cau.edu.cn/agriGOv2/index.php](http://systemsbiology.cau.edu.cn/agriGOv2/index.php))分析差异表达基因主要富集的功能分类。通过KOBAS([kobas.cbi.pku.edu.cn/kobas3/annotate/](http://kobas.cbi.pku.edu.cn/kobas3/annotate/))分析差异表达基因显著性富集的代谢途径和信号通路,将富集最显著的20条pathway条目在KEGG富集结果中进行展示。

## 2 结果与分析

### 2.1 突变体 *bm-like1* 的表型和遗传分析

植株生长到9叶期时,自交系B73叶中脉呈正常白色,*bm3*和*bm-like1*突变体叶中脉呈褐色(图1A~C)。统计F<sub>2</sub>中白色叶中脉和褐色叶中脉植株的分离比(表2),经 $\chi^2$ 检验发现结果符合3:1,表明突变体*bm-like1*褐色叶中脉表型是由单隐性核基因调控的。



A: B73 叶中脉; B: *bm3* 叶中脉; C: *bm-like1* 叶中脉; D: *bm-like1* 和 *bm3* 杂交后的 F<sub>1</sub> 植株的叶中脉; 标尺=1 cm

A: Phenotype of B73 leaf midrib, B: Phenotype of *bm3* leaf midrib, C: Phenotype of *bm-like1* mutant leaf midrib,

D: Phenotype of *bm-like1* mutant  $\times$  *bm3* leaf midrib, Bar=1 cm

图1 *bm-like1* 突变体表型鉴定

Fig.1 Phenotypic characterization of *bm-like1* mutant phenotypes

表2 F<sub>2</sub> 分离群体中白色叶中脉和褐色叶中脉的分离统计

Table 2 Segregation of white and brown midrib on F<sub>2</sub> population segregating

植株基因型 Plant genotype	叶中脉表型 Midrib phenotype			$\chi^2$ (3:1)
	白色叶中脉 White midrib	褐色叶中脉 Brown midrib	总数 Total	
F <sub>2</sub> (B73 $\times$ <i>bm-like1</i> )	69	21	90	0.059
	64	19	83	0.100
	66	25	91	0.179
	67	17	84	0.778
	71	19	90	0.533

$\chi^2(0.05)(1)=3.84$

### 2.2 基因定位、等位测验和木质素含量测定

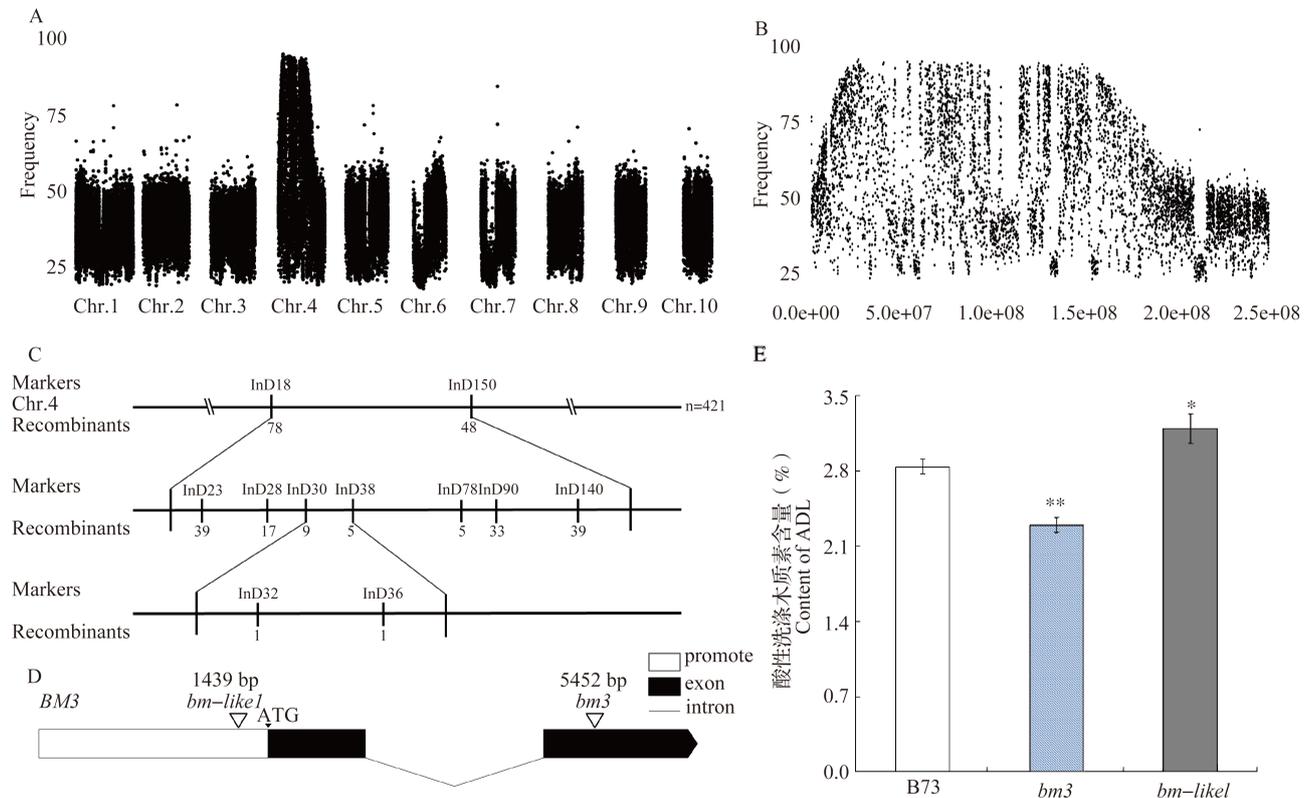
BSA-Seq 数据分析表明,玉米4号染色体的着丝粒附近有1个明显的峰(图2A、B)。利用421株F<sub>2</sub>褐色叶中脉植株精细定位,最终将*bm-like1*定位在32~36 Mb、物理距离约4 Mb的区间内(图2C)。在玉米基因库上检索发现,该定位区间内包含一个已报道的编码咖啡酸-O-甲基转移酶的BM3基因。为了验证BM3基因是否为导致突变体*bm-like1*表型的原因,进行了等位测验试验。结果显示,F<sub>1</sub>全部表现出褐色叶中脉表型(图1D),表明*bm-like1*褐色叶中脉表型是由BM3基因的突变造成的。经

近红外光谱分析仪测定发现,相比于自交系 B73, *bm3* 突变体的酸性洗涤木质素含量极显著降低 ( $P=1.86\times 10^{-5}$ ); *bm-like1* 突变体中酸性洗涤木质素含量显著增加 12.68% ( $P=0.02$ ) (图 2E)。

### 2.3 *bm-like1* 基因的克隆和序列分析

*BM3* 基因组序列全长 2327 bp, 开放阅读框长度为 1095 bp, 包含 2 个外显子。基因组序列比对发现, 突变体 *bm-like1* 中 *BM3* 基因在起始密码子 ATG 上游 144 bp 处有一个 1439 bp 的 *hAT* 转座子插入, 其编码区没有特异变化位点; 而 *bm3* 突变体

在 *BM3* 基因第 2 外显子上有一个 5452 bp 的序列插入 (图 2D), 由此证明 *bm-like1* 和 *bm3* 突变体的 *BM3* 基因突变方式不同。启动子预测结果显示, *BM3* 基因起始密码子 ATG 上游 145~141 bp 处有一个胁迫响应元件 (STRE, stress response element), 其核心序列为 AGGGG。突变体 *bm-like1* 中 *BM3* 基因启动子上 *hAT* 转座子插入位于 STRE 上。本研究表明 *BM3* 基因启动子上 *hAT* 转座子的插入可能导致 *BM3* 基因不能正常转录, 从而导致突变体 *bm-like1* 的褐色叶中脉表型。



A、B: 利用 BSA-Seq 方法对 *bm-like1* 突变体基因的初定位; C: *bm-like1* 突变体的精细定位; n: 群体大小; Recombinants: 重组单株数;

D: *BM3* 基因结构图和突变位置; E: 自交系 B73、突变体 *bm3* 和 *bm-like1* 的酸性洗涤木质素含量;

\* 和 \*\*: 分别表示  $P=0.05$  和  $P=0.01$  水平上差异显著, 下同

A, B: Gene mapping of *bm-like1* mutant using BSA-Seq strategy, C: Fine mapping of *bm-like1* mutant, n: Number of individuals,

Recombinants: Number of Recombinants, D: Gene structure of *BM3* and mutation site, E: Content of ADL in B73,

*bm3* and *bm-like1*, \* and \*\*: Respectively indicate significant differences at  $P=0.05$  and  $P=0.01$ , the same as below

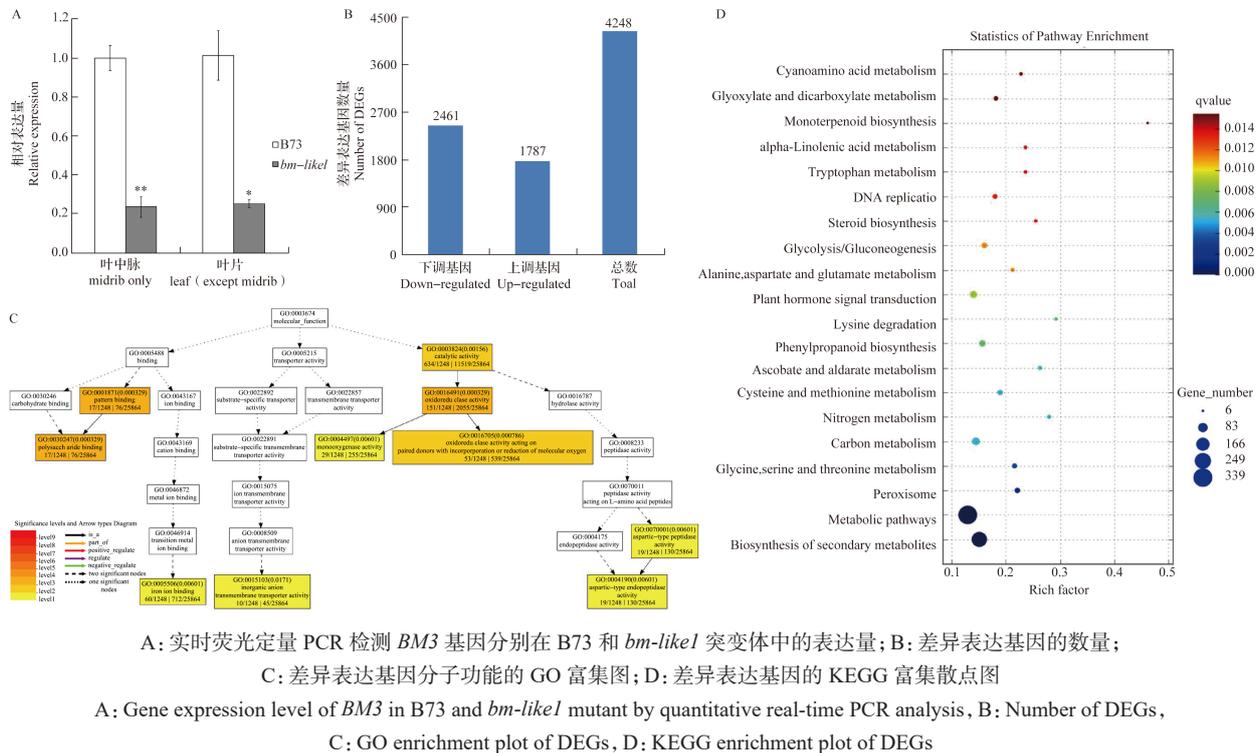
图 2 *bm-like1* 突变体基因的定位

Fig.2 Gene mapping of *bm-like1* mutant

### 2.4 基因表达分析

为了验证 *hAT* 转座子插入是否与 *BM3* 基因的表达有关, 我们利用实时荧光定量 PCR 技术检测 *BM3* 基因在亲本之间的表达量, 发现突变体 *bm-like1* 叶片 (除去中脉) 和中脉中 *BM3* 基因的表达

量显著低于自交系 B73 (图 3A)。转录组数据分析共筛选出 4248 个差异表达基因, 其中显著性差异表达的上调基因共 1787 个, 显著性差异表达的下调基因共 2461 个 (图 3B), *BM3* 存在于下调基因中, 与实时荧光定量 PCR 结果一致。

图 3 *bm-like1* 突变体中的基因表达分析Fig.3 Gene expression analysis using *bm-like1* mutant

GO 富集分析结果显示,差异表达基因在细胞组分、分子功能和生物过程中的所占比例分别为 47.2% (1959 个)、44.3% (1836 个) 和 8.5% (354 个)。对差异表达基因的分子功能进一步分析发现,主要富集的条目包括氧化还原酶活性 (Oxidoreductase activity)、催化活性 (catalytic activity) 和多糖结合功能 (polysaccharide binding) 等 (图 3C),这些分子功能在木质素的合成中具有重要作用。KEGG 富集分析表明,差异表达基因参与 118 个代谢通路,如次生代谢物的生物合成 (Biosynthesis of secondary metabolites)、代谢途径 (Metabolic pathways)、过氧化物酶 (Peroxisome)、甘氨酸丝氨酸和苏氨酸的新陈代谢 (Glycine, serine and threonine metabolism) 等,富集在次生代谢物的生物合成、代谢途径和过氧化物酶通路的差异表达基因分别有 339、249 和 166 个 (图 3D)。

### 3 讨论

BSA-Seq 具有快速、高效和成本低的特点,广泛应用于基因定位。玉米基因组大且复杂程度高,利用传统的定位方法挖掘玉米中突变基因的工作往往是一个艰难的过程。Zhang 等<sup>[17]</sup>利用 BSA 技术鉴定到玉米中一个株高相关基因 *qPH7*,该基因编

码 NF-YC 转录因子,表明 BSA 是一种基因克隆的有效方法。本研究利用 BSA-Seq 将目的基因初步定位在玉米 4 号染色体 18~150 Mb,定位区间跨度较大的原因可能与 *BM3* 基因位于着丝粒附近有关。利用 421 个突变体 DNA 进行进一步精细定位,将定位区间缩小至 32~36 Mb,该区间包含一个已报道的褐色叶中脉 *BM3* 基因。本研究表明利用 BSA 技术结合精细定位是进行基因克隆的有效方法。

植物启动子在调控基因转录水平方面具有重要作用。启动子中许多顺式作用元件通过与转录因子相互协调作用调节基因的表达,从而影响植物的生长和抗逆性。STRE 最早在酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 中有所报道,是热休克转录因子在热休克基因的启动子中能够识别的一种独特顺式热休克元件<sup>[25]</sup>。Freitas 等<sup>[26]</sup>发现 SEB (staphylococcal enterotoxin B) 转录因子结合粗糙链孢菌 (*Neurospora crassa*) 的 STRE 基序,调控应激反应和碳水化合物新陈代谢等多种生物过程。本研究发现突变体 *bm-like1* 中 *BM3* 基因启动子上 1439 bp 的 *hAT* 转座子插入位于 STRE 基序上,可能影响 *BM3* 基因不能与转录因子相互作用来调控基因的正常表达。实时荧光定量 PCR 和转录组数据分析结果显示突变体 *bm-like1* 中 *BM3* 基因的

表达水平显著下降,进一步说明 *BM3* 基因启动子 STRE 基序上 *hAT* 转座子插入使得 *BM3* 基因的转录受到抑制,从而导致 *bm-like1* 产生褐色叶中脉表型。测定自交系 B73、突变体 *bm3* 和 *bm-like1* 的酸性洗涤木质素含量发现, B73 中酸性洗涤木质素含量显著高于 *bm3* 突变体,这与前人研究结果一致<sup>[1,27]</sup>。同时发现, *bm-like1* 突变体中酸性洗涤木质素含量显著高于 B73 和 *bm3* 突变体,我们推测出现这样结果的原因可能是由于 *bm-like1* 突变体的遗传背景差异导致,具体原因有待于进一步研究证实。本研究对突变体 *bm-like1* 中 *BM3* 基因启动子的克隆和分析,为进一步研究 *BM3* 分子功能提供了新材料和理论基础。

本研究利用 RNA-Seq 技术鉴定到突变体 *bm-like1* 与自交系 B73 之间共有 4248 个差异表达基因,这些差异表达基因具有氧化还原酶活性、催化活性和多糖结合功能等分子功能,研究表明这些分子功能对木质素生物合成至关重要<sup>[8,28]</sup>。在木质素合成过程中, *CCoAOMT* (caffeoyl CoA-O-methyltransferase) 和 *COMT* 均是以 SAM 为底物的 O-甲基转移酶<sup>[5]</sup>。甲基转移反应是木质素合成中必不可少的反应。转录组数据显示依赖于 SAM 的甲基转移酶基因表达水平在亲本间表现出极显著差异,如 Zm00001d015217 和 Zm00001d051017 表达下调, Zm00001d015224 和 Zm00001d006149 表达上调。SAM 依赖的甲基转移酶相关基因表达水平发生变化,可能与突变体 *bm-like1* 中 *COMT* 与 *CCoAOMT* 对底物 SAM 的竞争发生改变有关。因此,转录组数据分析结果为揭示 *BM3* 基因调控木质素合成的机理研究提供了线索。

## 4 结论

本研究发现了一个玉米褐色叶中脉突变体 *bm-like1*, 由单隐性核基因调控。利用 BSA-Seq 结合精细定位技术,将突变体 *bm-like1* 定位到玉米 4 号染色体 32~36 Mb 区间内。等位测验表明突变体 *bm-like1* 是 *BM3* 基因的一个新的等位突变体。序列比对结果显示,突变体 *bm-like1* 中 *BM3* 基因启动子上 *hAT* 转座子插入位于 STRE 上。借助 qRT-PCR 和 RNA-Seq 方法,分析了突变体 *bm-like1* 的表达情况和基因功能注释,为将来玉米褐色叶中脉的生物途径和分子机制提供了新的材料和参考依据。

## 参考文献

- [1] 卞云龙,邓德祥,徐向阳,王益军. 褐色中脉突变体在青贮玉米中的应用. 玉米科学, 2006, 14(2): 4-5  
Bian Y L, Deng D X, Xu X Y, Wang Y J. Application for brown midrib mutant on silage corn. Journal of Maize Sciences, 2006, 14(2): 4-5
- [2] 刘豪,许庆方. 褐色中脉突变体的研究进展. 畜牧与饲料科学, 2009, 30(9): 75-76  
Liu H, Xu Q F. Research advances on brown midrib. Animal Husbandry and Feed Science, 2009, 30(9): 75-76
- [3] 黄季焜. 农业供给侧结构性改革的关键问题: 政府职能和市场作用. 中国农村经济, 2018(2): 2-14  
Huang J K. Key issues on supply-side structural reform in agriculture: Government functions and market roles. Chinese Rural Economy, 2018(2): 2-14
- [4] Vermerris W, Thompson K J, McIntyre L M. The maize *brown midrib1* locus affects cell wall composition and plant development in a dose-dependent manner. Heredity, 2002, 88(6): 450-457
- [5] Tang H M, Liu S, Hill-Skinner S, Wu W, Reed D, Yeh C T, Nettleton D, Schnable P S. The maize *brown midrib2* (*bm2*) gene encodes a methylenetetrahydrofolate reductase that contributes to lignin accumulation. The Plant Journal, 2014, 77(3): 380-392
- [6] Vignols F, Rigau J, Torres M A, Capellades M, Puigdomènech P. The *brown midrib3* (*bm3*) mutation in maize occurs in the gene encoding caffeic acid O-methyltransferase. The Plant Cell, 1995, 7(4): 407-416
- [7] Robertson D S. Genetic analyses of a putative mutator-induced deletion involving the *blue fluorescent1* (*bfl*) and *brown midrib4* (*bm4*) loci in maize. Genome, 1996, 39(2): 433-438
- [8] Xiong W D, Wu Z Y, Liu Y C, Li Y, Su K L, Bai Z T, Guo S Y, Hu Z B, Zhang Z M, Bao Y, Sun J, Yang G F, Fu C X. Mutation of 4-coumarate: coenzyme a ligase 1 gene affects lignin biosynthesis and increases the cell wall digestibility in maize *brown midrib5* mutants. Biotechnology for Biofuels, 2019, 12(1): 1-13
- [9] Sattler S E, Saathoff A J, Haas E J, Palmer N A, Funnell-Harris D L, Sarath G, Pedersen J F. A nonsense mutation in a cinnamyl alcohol dehydrogenase gene is responsible for the sorghum *brown midrib6* phenotype. Plant Physiology, 2009, 150(2): 584-595
- [10] 李波,倪志勇,王娟,吕萌,范玲. 木质素生物合成关键酶咖啡酸-O-甲基转移酶基因(*COMT*)的研究进展. 分子植物育种, 2010, 8(1): 117-124  
Li B, Ni Z Y, Wang J, Lv M, Fan L. Advances on key enzyme gene (*COMT*) involved in lignin biosynthesis. Molecular Plant Breeding, 2010, 8(1): 117-124
- [11] Guillaumie S, Pichon M, Martinant J P, Bosio M, Goffner D, Barrière Y. Differential expression of phenylpropanoid and related genes in brown-midrib *bm1*, *bm2*, *bm3*, and *bm4* young near-isogenic maize plants. Planta, 2007, 226(1): 235-250
- [12] Wu Z Y, Ren H, Xiong W D, Roje S, Liu Y C, Su K L, Fu C X. Methylenetetrahydrofolate reductase modulates methyl metabolism and lignin monomer methylation in maize. Journal of Experimental Botany, 2018, 69(16): 3963-3973
- [13] Chen W, vanOpdorp N, Fitzl D, Tewari J, Friedemann P,

- Greene T, Thompson S, Kumpatla S, Zheng P Z. Transposon insertion in a cinnamyl alcohol dehydrogenase gene is responsible for a *brown midrib1* mutation in maize. *Plant Molecular Biology*, 2012, 80 ( 3 ): 289-297
- [ 14 ] Li L, Hill-Skinner S, Liu S, Beuchle D, Tang H M, Yeh C T, Nettleton D, Schnable P S. The maize *brown midrib4* (*bm4*) gene encodes a functional folylpolyglutamate synthase. *The Plant Journal*, 2015, 81 ( 3 ): 493-504
- [ 15 ] 谷振军, 张党权, 黄青云. 木质素合成关键酶基因与造纸植物转基因改良应用研究. *中南林业科技大学学报*, 2010, 30 ( 3 ): 67-74
- Gu Z J, Zhang D Q, Huang Q Y. Transgenic modification on pulp plants by key genes regulating lignin biosynthesis. *Journal of Central South University of Forestry & Technology*, 2010, 30 ( 3 ): 67-74
- [ 16 ] Chen Y S, Liu H J, Ali F, Scott M P, Ji Q, Frei U K, Lübberstedt T. Genetic and physical fine mapping of the novel brown midrib gene *bm6* in maize (*Zea mays* L.) to a 180 kb region on chromosome 2. *Theoretical and Applied Genetics*, 2012, 125 ( 6 ): 1223-1235
- [ 17 ] Zhang H W, Wang X, Pan Q, Li P, Liu Y J, Lu X D, Zhong W S, Li M Q, Han L Q, Li J, Wang P X, Li D D, Liu Y, Li Q, Yang F, Zhang Y M, Wang G Y, Li L. QTG-Seq accelerates QTL fine mapping through QTL partitioning and whole-genome sequencing of bulked segregant samples. *Molecular Plant*, 2019, 12 ( 3 ): 426-437
- [ 18 ] Allen R S, Nakasugi K, Doran R L, Millar A A, Waterhouse P M. Facile mutant identification via a single parental backcross method and application of whole genome sequencing based mapping pipelines. *Frontiers in Plant Science*, 2013, 4: 362
- [ 19 ] Klein H, Xiao Y, Conklin P A, Govindarajulu R, Kelly J A, Scanlon M J, Whipple C J, Bartlett M. Bulk-segregant analysis coupled to whole genome sequencing (BSA-Seq) for rapid gene cloning in maize. *Genes, Genomes, Genetics*, 2018, 8 ( 11 ): 3583-3592
- [ 20 ] Fekih R, Takagi H, Tamiru M, Abe A, Natsume S, Yaegashi H, Sharma S, Sharma S, Kanzaki H, Matsumura H, Saitoh H, Mitsuoka C, Utsushi H. MutMap+: genetic mapping and mutant identification without crossing in rice. *PLoS ONE*, 2013, 8 ( 7 ): e68529
- [ 21 ] Ehrenreich I M, Torabi N, Jia Y, Kent J, Martis S, Shapiro J A, Gresham D, Caudy A A, Kruglyak L. Dissection of genetically complex traits with extremely large pools of yeast segregants. *Nature*, 2010, 464 ( 7291 ): 1039-1042
- [ 22 ] 吕洪坤, 郑军. 图位克隆技术在玉米基因分离中的应用. *分子植物育种*, 2013, 11 ( 3 ): 460-468
- Lv H K, Zheng J. The application of map-based cloning in maize gene isolation. *Molecular Plant Breeding*, 2013, 11 ( 3 ): 460-468
- [ 23 ] Takagi H, Abe A, Yoshida K, Kosugi S, Natsume S, Mitsuoka C, Uemura A, Utsushi H, Tamiru M, Takuno S, Innan H, Cano L M, Kamoun S, Terauchi R. QTL-seq: rapid mapping of quantitative trait loci in rice by whole genome resequencing of DNA from two bulked populations. *The Plant Journal*, 2013, 74 ( 1 ): 174-183
- [ 24 ] 王瑞, 张秀艳, 陈阳松, 杜依聪, 汤继华, 王国英, 郑军. 一个新的玉米 *Vp15* 基因等位突变体的遗传分析与分子鉴定. *作物学报*, 2018, 44 ( 3 ): 369-375
- Wang R, Zhang X Y, Chen Y S, Du Y C, Tang J H, Wang G Y, Zheng J. Genetic analysis and molecular characterization of a new allelic mutant of *vp15* gene in maize. *Acta Agronomica Sinica*, 2018, 44 ( 3 ): 369-375
- [ 25 ] Kobayashi N, McEntee K. Identification of cis and trans components of a novel heat shock stress regulation pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and Cellular Biology*, 1993, 13 ( 1 ): 248-256
- [ 26 ] Freitas F Z, Virgilio S, Cupertino F B, Kowbel D J, Fioramonte M, Gozzo F C, Glass N L, Bertolini M C. The SEB-1 transcription factor binds to the STRE motif in *Neurospora crassa* and regulates a variety of cellular processes including the stress response and reserve carbohydrate metabolism. *Genes, Genomes, Genetics*, 2016, 6 ( 5 ): 1327-1343
- [ 27 ] Kuc J, Nelson O E, Flanagan P. Degradation of abnormal lignins in the brown-midrib mutants and double mutants of maize. *Phytochemistry*, 1968, 7 ( 8 ): 1435-1436
- [ 28 ] 刘玉倩. 刺梨果实中木质素合成及相关基因的表达分析. 贵阳: 贵州大学, 2015
- Liu Y Q. Lignin biosynthesis and the expression of related genes in *rosa roxburghii* tratt. Guiyang: Guizhou University, 2015