

# 一个玉米矮秆突变体 K123d 的遗传鉴定

徐敏<sup>1,3</sup>, 石海春<sup>1</sup>, 余学杰<sup>1</sup>, 谭义川<sup>3</sup>, 柯永川<sup>2</sup>, 赵长云<sup>2</sup>, 柯永培<sup>1,2</sup>

(<sup>1</sup>四川农业大学农学院, 成都 611130; <sup>2</sup>四川农大正红生物技术有限责任公司, 成都 610213; <sup>3</sup>乐山市农业科学研究院, 乐山 614000)

**摘要:**矮秆已被广泛用于改良作物的抗倒伏性状, 培育理想株型, 从而提高作物产量。玉米矮秆突变体 K123d 由自交系 K123 自然突变产生。本研究比较该突变体与野生型主要农艺性状差异及其对赤霉素的敏感性; 用 K123d 与株高不同的 3 个自交系分别构建 F<sub>1</sub>、BC 和 F<sub>2</sub> 群体, 分析矮秆性状的遗传模式; 以 K169/K123d-F<sub>2</sub> 为定位群体, 采用集团分离分析法 (BSA), 运用 SSR 标记定位矮秆基因 *d123*; 参照 *br-2* 序列信息分段设计特异引物, 同源克隆 *d123*。结果表明, 与野生型相比 K123d 株高降低 35.59%, 穗位高降低、节间缩短、叶片较直立, 但结实率差, 对赤霉素敏感; 在 F<sub>2</sub> 群体和 BC<sub>1</sub> 群体中, 正常植株与矮秆植株分离比例分别符合 3:1 和 1:1, 说明矮秆性状受 1 对隐性基因控制; 其矮秆基因 *d123* 定位于第一条染色体上 SSR 标记 *umc1278* 和 *bnlg1564* 之间, 遗传距离分别为 12.8 cM 和 7.3 cM; 同源克隆显示 *d123* 与 *br-2* 存在 12 个碱基替换, 其中第 4 个外显子编码的一个谷氨酸被替换为赖氨酸。由此可见, 矮秆突变体 K123d 为 *br-2* 的一个突变类型, 对矮化育种具有进一步研究利用价值。

**关键词:**玉米; 矮秆; 基因突变; 遗传分析; SSR 标记; 基因定位; 同源克隆

## Genetic Identification of A Dwarf Mutant K123d in Maize (*Zea mays* L.)

XU Min<sup>1,3</sup>, SHI Hai-chun<sup>1</sup>, YU Xue-jie<sup>1</sup>, TAN Yi-chuan<sup>3</sup>, KE Yong-chuan<sup>2</sup>,  
ZHAO Chang-yun<sup>2</sup>, KE Yong-pei<sup>1,2</sup>

(<sup>1</sup>College of Agronomy, Sichuan Agricultural University, Chengdu 611130; <sup>2</sup>Sichuan Nongda Zhenghong Bio Co., Ltd. Chengdu 610213; <sup>3</sup>Leshan Academy of Agricultural Sciences, Leshan 614000)

**Abstract:** Dwarf has widely been applied to improve the lodging resistance and to breed the ideal plant type in crops, hence increase the crop yield. A maize dwarf mutant K123d was derived from the inbred line K123 via spontaneous mutation. The objective of this study was to compare the differences of main agronomic traits and sensitivity to the gibberellins between the mutant and wild type. Genetic model of dwarf trait was analyzed by using F<sub>1</sub>, BC and F<sub>2</sub> populations derived from K123d and 3 inbred lines with different plant height. SSR primers were used to locate the dwarf gene *d123* through bulked segregation analysis (BSA) by using K169/K123d-F<sub>2</sub> as mapping populations. The specific primers designed based on sequence information of *br-2* were used to clone homology gene *d123*. The results showed that compared with the wild type, K123d had shorter stalk by 35.59%, lower ear location, shorter internodes, erecter leaves, poor fertility and sensitivity to gibberellins. In F<sub>2</sub> and BC<sub>1</sub> populations, the segregation ratios of normal to dwarf plants fitted 3:1 and 1:1 respectively, which demonstrated that the dwarf trait was controlled by a single recessive gene. The dwarf gene *d123* was mapped on chromosome one between SSR markers *umc1278* and *bnlg1564* with distances of 12.8 cM and 7.3 cM, respectively. The homology-based cloning suggested that *d123* be different from *br-2* by 12 bases varied, and the replacement of glutamate by lysine at the fourth exon. Our results demonstrated that dwarf mutant K123d was a *br-2* variable type and it had further research and application value.

收稿日期: 2016-03-05 修回日期: 2016-05-03 网络出版日期: 2016-12-14

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.4996.S.20161214.0944.008.html>

基金项目: 四川省科技支撑计划项目 (2011FZ0119); 四川省战略性新兴产业发展专项资金项目 (SC2013510122023); 四川省“十二五”农作物育种攻关项目 (2011-3-11)

第一作者研究方向为玉米遗传育种研究。E-mail: 282567033@qq.com

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

**Key words:** maize; dwarf; gene mutation; genetic analysis; SSR marker; genetic mapping; homology-based cloning

1953年,布劳格从华盛顿州立大学获得含 *Rht1* 和 *Rht2* 矮秆基因的日本小麦品种农林10号的优良后代系 Norin10 Brevor,成功地解决了矮秆带来的育性差、子粒不饱满和严重感染锈病等问题;同时,地处菲律宾的国际水稻研究所把 Peta 与含 *sd1* 矮秆隐性基因的 Dee-geo-woo-gen(低脚乌尖)进行杂交,产生了株矮、秆硬、分蘖良好、出苗力强,对肥料反应良好、种子休眠适度、抗逆性强的 *IR8*<sup>[1-4]</sup>。以“农林10号”和矮脚南特、矮子占为基础培育的矮秆作物品种,配合化肥使用及机械化的运用,致使世界粮食单产水平和总产量均大幅度提高,改善了部分发展中国家的粮食供应状况,因此被誉为“第一次绿色革命”<sup>[5-10]</sup>。“第一次绿色革命”带来的作物增产,使得作物的株高被认为是衡量优良品种的重要标志之一,与作物的种植密度、抗倒伏能力、耐肥能力和高产密切相关<sup>[11-13]</sup>。

前人研究认为,矮化玉米植株株型紧凑、上疏下密有利于通风透光,较适于密植,增产潜力较大,矮秆玉米杂交种能实现高秆玉米难以达到的高产目标,是玉米理想株型的重要组成因素之一<sup>[6]</sup>。玉米的株高是由节间数与节间长度共同决定的,节间数越多、节间长度越长,株高越高;反之亦然。控制玉米的株高有单基因矮生体系和多基因矮生体系,从 MaizeGDB 数据库中可以查到,已发现 246 个控制玉米株高 QTL,这些 QTL 分布在玉米的 10 条染色体上。目前已报道的玉米矮秆单基因有 *br*、*br-2*、*bv* 和 *D8* 等 60 多个,其中 *D8*、*D9*、*D(t)*<sup>[14]</sup>、*D-10*<sup>[15]</sup>、*D11*<sup>[16]</sup> 和 *D8-1023*<sup>[17]</sup> 等为显性,其余为隐性矮秆基因,已经克隆的有 *br-2*、*an1*<sup>[18]</sup>、*D8*<sup>[19]</sup>、*D9*<sup>[20]</sup> 和 *D(t)* 等基因。根据对外源赤霉素反应的差异,矮秆突变体可分为赤霉素敏感型与赤霉素钝感型。赤霉素敏感型矮秆突变是由于赤霉素生物合成途径酶的缺陷所导致,在施用外源赤霉素后,矮秆突变表型可恢复,赤霉素敏感型玉米矮秆突变体有 *d1*、*d2*、*d3*、*d5*、*D8-1023* 和 *Dt* 等。赤霉素钝感型矮秆突变体对外源赤霉素的施用不敏感,赤霉素钝感型玉米矮秆突变体有 *D8* 和 *D9*。此外,玉米矮秆突变体 *br-2* 的矮秆表型是与茎秆中生长素的极性运输有关<sup>[15,21]</sup>。

生产上应用较广泛的矮秆基因是 *br-2*,美国利用 *br-2* 育成的矮生直立型杂交种在 9.0 万 ~ 12 万株/hm<sup>2</sup> 密度下单产高达 15000 kg/hm<sup>2</sup> 以上,墨西哥

的本雀·比利亚 AN-360 的单产则达 15700 kg/hm<sup>2</sup> 以上,说明 *br-2* 矮秆基因控制的矮秆紧凑型玉米在高密度下优于高秆玉米。河南新乡农科所从当地武陟矮(属 *br-2*)中分离出了矮 154 和矮 544,利用了武陟矮或其同源等位基因先后培育出了矮生玉米自交系和杂交种,如成矮 1 号、登攀 1 号和登攀 2 号等玉米品种,在 20 世纪 70 年代中期取得了较高的产量<sup>[22]</sup>。单基因矮秆材料的应用虽然取得了稳定的矮化育种效果,但由于控制矮生性状的主效基因与其他不良基因紧密连锁,或一因多效的不良性状使矮秆材料的应用受到了很大的局限,导致虽具有群体增产的潜力而达不到实际的产量效果,因此新矮源的发掘及鉴定研究具有十分重要的意义<sup>[23]</sup>。本试验利用在田间发现的自然突变的自交不分离矮生玉米突变体,通过对其进行遗传研究和鉴定,为玉米矮化和理想株型的育种应用提供依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 供试材料

2012 年春,在四川农大正红生物技术有限责任公司辽宁铁岭育种基地的 K123 自交系群体中发现 15 株株高 1 m 左右的矮秆材料,自交后不分离,将其定名为 K123d。将 K123 与 K123d 分别自交且单株收获,并参照自交系株高分级标准<sup>[24]</sup>,用株高不同的自交系 K123(中秆 120 ~ 150 cm)、626(矮秆 < 120 cm)和 K169(高秆 > 150 cm)分别作为母本与 K123d 杂交获得 3 个 F<sub>1</sub> 组合。同年秋季,在公司海南陵水育种基地种植 F<sub>1</sub> 和亲本,组配各组合的 BC<sub>1</sub> 和 BC<sub>2</sub>,F<sub>1</sub> 自交获 F<sub>2</sub>。

### 1.2 K123d 与 K123 的表型鉴定

2013 年春,在四川双流育种基地分别种植自交系 K123 及突变体 K123d 各 28 株,采用育苗盘育苗移栽,2 行区,行长 3.5 m,行距 0.8 m,窝距 0.5 m,每行 7 窝,每窝 2 株苗,种植密度 5 万株/hm<sup>2</sup>,常规田间管理,成熟后测定所有植株的株高和其他农艺性状。用 *t*-检验比较 K123 及 K123d 农艺性状的差异,相关数据运算通过 Excel 软件完成。

### 1.3 外源赤霉素对 K123d 苗高的影响及内源赤霉素含量测定

GA<sub>3</sub> 处理参照 G. Schneider 等<sup>[25]</sup> 和张素梅<sup>[26]</sup> 的

方法并稍作修改。将 K123 及其矮秆突变体 K123d 浸种催芽,待种子萌动后置入 4 °C 冰箱处理 2 d,以促使出苗整齐,待整个胚芽鞘长出后,将发芽种子单粒播种于盛有细沙的瓷盘内。采用随机区组设计,3 次重复,6 对处理,每对处理各 25 株苗,待胚芽鞘出土后,分别用 0 μg/mL、0.1 μg/mL、10 μg/mL、25 μg/mL、50 μg/mL、100 μg/mL GA<sub>3</sub> 溶液每 2 d 浇灌 1 次,在室温中培养。浇灌 2 次后隔 3 d 测量幼苗茎基到顶端高度。

待以上材料测定苗高之后,取叶片样用液氮低温磨碎,以预冷的 80% 甲醇抽提 3 次,滤液用石油醚萃取 3 次,水相用旋转蒸发仪在 45 °C 条件下浓缩,去净甲醇与残留的石油醚,用 1 mol/L HCl 调浓缩液 pH 值在 2.8 ~ 3.0 之间,用乙酸乙酯萃取 3 次,于 42 °C 下旋转蒸干乙酸乙酯,用 5 mL 100% 甲醇溶解残留物,0.22 μm 滤膜过滤,然后用高效液相色谱测定内源赤霉素含量<sup>[27-28]</sup>。用 *t* 检验和 LSD 法对测定的 K123 及 K123d 苗高及内源激素含量进行比较。所有数据分析均利用 Excel 2007 和 SPSS 13.6 完成。

#### 1.4 矮秆性状的遗传分析

2013 年春,在四川双流基地种植杂交组合 K123/K123d、K169/K123d 和 626/K123d 的 F<sub>1</sub>、BC<sub>1</sub>、BC<sub>2</sub> 和 F<sub>2</sub> 群体,密度 5 万株/hm<sup>2</sup>;并在公司辽宁铁岭育种基地种植 K169/K123d 的 F<sub>1</sub>、BC<sub>1</sub>、BC<sub>2</sub> 和 F<sub>2</sub> 群体,密度 6 万株/hm<sup>2</sup>,常规播种和管理。开花散粉后,统计 F<sub>1</sub>、BC<sub>1</sub>、BC<sub>2</sub> 和 F<sub>2</sub> 群体中正常植株(下部节间未明显缩短)及矮秆植株(下部节间明显缩短)的数量,计算正常植株与矮秆植株的分离比例并进行卡方测验,分析矮秆突变体株高的遗传模式,相关数据通过 Excel 与 SPSS 软件运算完成。

#### 1.5 矮秆基因定位

以 K169/K123d-F<sub>2</sub> 分离群体为定位群体,采用集团分离分析法(BSA, bulked segregation analysis)<sup>[29]</sup>。首先,从 K169/K123d-F<sub>2</sub> 群体中选取极高株和极矮株各 10 株,每个单株取等量叶片,将高株和矮株的叶片分别混合,提取总 DNA 作为高秆基因池和矮秆基因池。选用 583 对均匀分布在玉米染色体组上的 SSR 引物对双亲 DNA 进行多态性筛选,用表现多态性的标记进一步筛选高秆基因池和矮秆基因池,以确定连锁的 SSR 标记;用连锁的 SSR 标记对 F<sub>2</sub> 群体中的隐性矮秆单株 DNA 进行 PCR 扩增,初步定位目的矮秆基因。DNA 提取采用 CTAB 法,PCR 反应

采用 15 μL 体系,扩增程序为:94 °C 预变性 5 min,94 °C 变性 30 s,58 °C 退火 30 s,72 °C 延伸 30 s,72 °C 充分延伸 7 min,20 °C 结束程序,共进行 33 个循环。PCR 扩增产物用聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE)检测。对具有 K169 和 K123d 亲本带型的单株分别赋值 a 和 b,具有 K169/K123 d-F<sub>1</sub> 双亲杂合带型的单株赋值 h。利用 MAPMAKER 3.0 作图软件进行连锁分析,用 Kosambi 函数将重组率转化为遗传距离(cM),用 MapDraw V2.1 软件作图。

#### 1.6 矮秆基因的同源克隆

参考 *br-2* 基因(GRMZM2G315375, 7184bp)的序列信息,利用 Primerer 5.0 参照 SSR 引物设计原则设计覆盖 *br-2* 所有位置并相互重叠的 SSR 特异引物。用所设计的引物分别扩增 K123d 中 3 个植株的 DNA,PCR 扩增程序参照基因定位,并根据目标片段大小改变延伸时间。扩增产物首先用 0.8% 的琼脂糖凝胶电泳检测扩增片段,将扩增良好且大小与目标片段相同的 PCR 产物纯化测序。所有有效扩增均做 3 次重复,委托上海生工及上海立菲基因公司分别测序,将测序结果良好的序列拼接之后,与 *br-2* 序列进行比对,比对软件采用 DNAMAN。克隆方法参照刘振林<sup>[30]</sup>的方法。

## 2 结果与分析

### 2.1 K123d 与 K123 的表型差异

突变体 K123d 的平均株高比野生型 K123 极显著降低了 35.59%,穗位高降低了 12.98%;节间缩短,叶夹角比野生型显著降低了 15.30%,说明该突变体比野生型的株型更优良,有利于玉米的理想株型建成;但雄穗长极显著变短,穗行数降低,行粒数和单株产量极显著降低,说明矮秆突变体育性变差(表 1)。同时,K123/K123d-F<sub>2</sub> 群体中分离的矮秆植株(K123/K123d-F<sub>2</sub>d)的性状与突变体相似(表 1,图 1)。

### 2.2 外源赤霉素对 K123d 幼苗生长的影响

不同浓度的赤霉素处理后 K123 及 K123d 苗高及内源赤霉素含量见表 2。从表 2 可知,K123d 与 K123 未经赤霉素处理时,苗高差异显著(K123d 的苗高为 12.04 ± 0.97 cm, K123 的苗高为 15.14 ± 1.31 cm,经 *t* 检验发现  $t = 2.74 > t_{(0.05,6)} = 2.45, P < 0.05$ ),但内源赤霉素浓度之间无显著差异(K123d 的内源赤霉素浓度为 319.21 ± 39.14 ng/g · FW, K123 的内源赤霉素浓度为 293.21 ± 55.52 ng/g · FW,经 *t* 检验发现  $t = 0.64 < t_{(0.05,6)} = 2.45, P > 0.05$ ),说明 K123d 可以正常合成赤

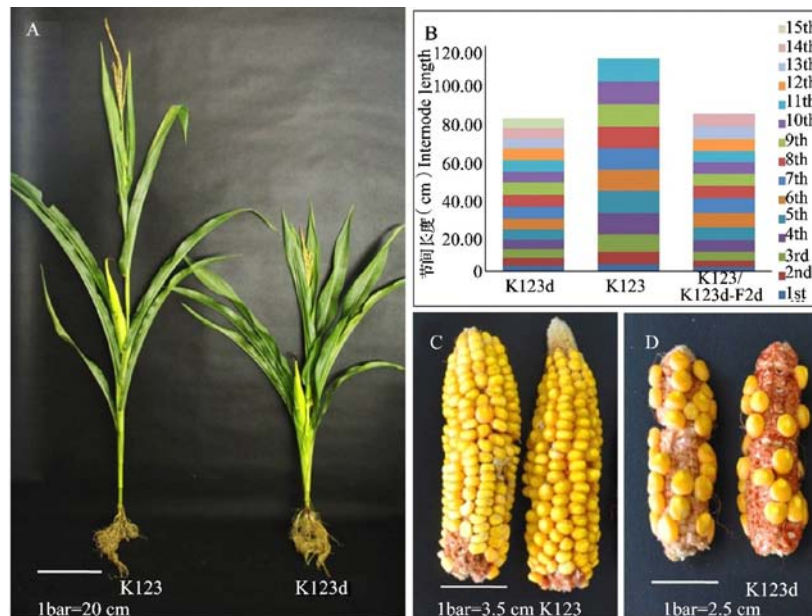


表 1 突变体 K123d 及其野生型 K123 的农艺性状比较 (平均值±标准差)

Table 1 Comparisons of agronomic traits between the mutant K123d and its wild type K123 (mean ± SD)

项目 Entry	野生型 K123 Wild type K123	突变体 K123d Mutant K123d	K123d 的缩减率 (%) Reduction of K123d	K123/K123d-F <sub>2</sub> 中矮秆植株 Dwarf plants of K123/K123d-F <sub>2</sub>
株高 (cm) Plant height	140.05 ± 7.66	90.50 ± 16.04	-35.59**	101.76 ± 10.20
穗位高 (cm) Ear height	40.05 ± 7.19	34.85 ± 6.09	-12.98	40.76 ± 6.17
叶夹角 Leaf angle	27.78 ± 5.66	23.53 ± 7.59	-15.30*	23.73 ± 4.04
雄穗长 (cm) Tassel length	30.18 ± 5.07	19.52 ± 3.47	-35.33**	25.48 ± 4.01
穗行数 Ear rows	11.82 ± 1.89	11.20 ± 1.67	-5.25	11.58 ± 1.07
行粒数 Row grains	21.00 ± 3.97	11.50 ± 2.96	-45.24**	13.95 ± 7.43
单株产量 (g) Yield	57.63 ± 9.40	29.84 ± 9.16	-48.22**	34.71 ± 19.57

\* :0.01 &lt;P≤0.05, \*\* :P≤0.01



A: 植株; B: 节间长度; C: K123 果穗; D: K123d 果穗

A: Plant, B: Internode length, C: Ears of K123, D: Ears of K123d

图 1 矮秆突变体 K123d 和野生型 K123 的性状比较

Fig. 1 Comparisons of characteristics between dwarf mutants K123d and the wild type K123

霉素。由表 2 可看出,与 0  $\mu\text{g}/\text{mL}$  赤霉素处理相比,用 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、25  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  和 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  赤霉素处理 K123d 和 K123 之后苗高均显著增高, K123d 在 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、25  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  赤霉素处理下,内源赤霉素浓度显著增大;而 K123 在 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  赤霉素处理下,内源赤霉素浓度显著增大,由此可见外施赤霉素可影响 K123 和 K123d 内源赤霉素浓度。将外施不同赤霉素浓度获得的 K123d 苗高与未经处理的 K123 的苗高进行比较,发现两者苗高差异不显著或者 K123d 苗高显著增高(当外施赤霉素浓度达到 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  时, K123d 的苗高显著高于未经处理的 K123 的苗高),表明外施赤霉素能使 K123d 苗高

恢复至野生型,说明 K123d 对赤霉素敏感,能转导赤霉素。

### 2.3 矮秆突变体的遗传分析

用具有不同核遗传背景的 3 个自交系(626、K169 和野生型 K123)与突变体 K123d 分别杂交得到 F<sub>1</sub>, F<sub>1</sub> 自交获得 F<sub>2</sub> 分离群体, F<sub>1</sub> 回交得到 BC<sub>1</sub> 群体。各群体在不同地点种植,分别统计正常植株与矮秆植株的株数。试验结果表明,所有 F<sub>1</sub> 群体均表现为正常植株,回交 BC<sub>2</sub> 群体中亦全部为正常植株; BC<sub>1</sub> 分离群体中的正常植株与矮秆植株比例经  $\chi^2$  检验均符合 1:1, F<sub>2</sub> 群体中分离比例均符合 3:1 (表 3),说明该突变体的矮秆性状由 1 对隐性核基因控制。

表 2 不同浓度赤霉素处理后苗高及内源赤霉素含量(平均值±标准差)

Table 2 The seeding height and endogenous GA<sub>3</sub> level of different concentrations of GA<sub>3</sub> treatment (mean ± SD)

处理浓度(μg/mL) Concentrations of treatment	K123d		K123	
	内源赤霉素浓度 (ng/g · FW)	苗高 (cm)	内源赤霉素浓度 (ng/g · FW)	苗高 (cm)
	Concentrations of endogenous GA <sub>3</sub>	Seeding height	Concentrations of endogenous GA <sub>3</sub>	Seeding height
0	319.21 ± 39.14eE	12.04 ± 0.97eD	293.21 ± 55.52dC	15.14 ± 1.31cC
0.1	337.63 ± 35.52eE	13.97 ± 1.60deCD	327.27 ± 44.28dC	15.44 ± 0.70cC
10	438.14 ± 24.39dD	15.10 ± 1.38cdBC	455.40 ± 45.79cdC	18.05 ± 1.01bB
25	654.00 ± 6.25cC	17.54 ± 1.30bAB	526.91 ± 30.40cC	20.56 ± 0.06aA
50	848.69 ± 30.46bB	19.67 ± 0.99aA *	848.77 ± 8.56bB	21.91 ± 1.17aA
100	1180.51 ± 46.86aA	16.22 ± 0.15bcBC	1291.27 ± 149.54aA	18.03 ± 0.71bB

“a,b,c”表示在 0.05 水平显著差异;“A,B,C”表示 0.01 水平极显著差异;“\*”表示在 0.05 水平差异显著

“a,b,c” mean significant difference at 0.05 level, “A,B,C” mean significant difference at 0.01 level, “\*” means significant difference at 0.05 level

表 3 3 个组合后代群体正常和矮秆植株的分离比例

Table 3 Segregation ratios of normal and dwarf plants in progeny populations of three combinations

群体 Populations	组合 Combinations	总株数 Total plants	正常植株数 Normal plants	矮秆植株数 Dwarf plants	期望比例 Expected ratio	卡方 $\chi^2$
F <sub>1</sub>	WT/K123d(S)	37	37	0	—	—
	626/K123d(S)	24	24	0	—	—
	K169/K123d(S)	39	39	0	—	—
	K169/K123d(T)	51	51	0	—	—
BC <sub>1</sub>	WT/K123d//K123d(S)	40	23	17	1:1	0.29
	626/K123d//K123d(S)	57	29	28	1:1	0
	K169/K123d//K123d(S)	76	37	39	1:1	0.01
	K169/K123d//K123d(T)	84	47	37	1:1	0.96
BC <sub>2</sub>	WT/K123d//WT(S)	52	52	0	—	—
	626/K123d//626(S)	48	48	0	—	—
	K169/K123d//K169(S)	74	74	0	—	—
	K169/K123d//K169(T)	67	67	0	—	—
F <sub>2</sub>	WT/K123d ⊗(S)	56	39	17	3:1	0.60
	626/K123d ⊗(S)	56	41	15	3:1	0.02
	K169/K123d ⊗(S)	236	188	48	3:1	2.49
	K169/K123d ⊗(T)	269	206	63	3:1	0.28

$\chi^2(0.05, 1) = 3.84$ ; S = 四川双流; T = 辽宁铁岭

$\chi^2(0.05, 1) = 3.84$ , S = Shuangliu, Sichuan, T = Tieling, Liaoning

## 2.4 矮秆基因定位

选取 K169/K123d-F<sub>2</sub> 群体为定位群体,以平均覆盖玉米 10 条染色体的 583 对 SSR 标记对双亲进行多态性分析,筛选出在 K169 和 K123d 间具有多态性的 138 对引物。再将这 138 对 SSR 标记用于 F<sub>2</sub> 高、矮秆基因池间进行多态性分析,发现其中 6 对引物表现多态性。利用这 6 对标记对 F<sub>2</sub> 群体的 48 个隐性单株 DNA 分别进行 PCR 扩增,扩增产物用聚丙烯酰胺凝胶电泳 (PAGE) 检测。利用

MAPMAKER 3.0 作图软件进行连锁分析,发现目标基因与 umc2236、umc1356、umc1278、bnlg1564、phi002 和 umc10856 的遗传距离分别为 27.8 cM、19.2 cM、12.8 cM、7.3 cM、11.5 cM 和 16.8 cM (图 2)。据此,将该矮秆基因初步定位于玉米第 1 条染色体上 SSR 标记 umc1278 和 bnlg1564 之间,遗传距离分别为 12.8 cM 和 7.3 cM。根据 Maize GDB 查证发现,这两个引物间的物理距离约为 4.2 Mbp,将该矮秆基因暂命名为 *d123*。

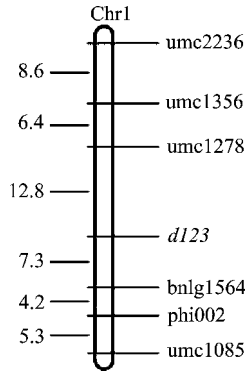


图2 矮秆基因 *d123* 在第1条染色体上的初定位

Fig. 2 Preliminary mapping of dwarf gene *d123* on chromosome 1

表4 同源克隆 *d123* 的引物

Table 4 The primers used in homology-based cloning of *d123*

引物 Primers	上游引物 Forward primer	下游引物 Reverse primer	退火温度(°C) T <sub>m</sub>
d123A	TCTCCACCTCCTCTGCTTTGC	GGGCGAACGATTTGAACAT	56
d123B	CTCTGCTTTGCTCTGCCACTC	GATGGCTGGTCTGTTGG	56
d123C	TACGGGCTCCTGCTCTGGT	GATGGCTGGTCTGTTGG	56
d123D	CACGCAGAGCAGAAGAG	AAGATACCTACCCTACCACTA	56
d123E	GGCAGGCAGTCTGGTTAG	GCCGAGTTCTGGACGATGA	56
d123F	TCCACCTCCGACTTCACCCT	GCGGACACCATCAGACCAT	56
d123G	ACGGGAGCGCAAGATC	GTACGCGATGTCTCGTGGAT	56
d123H	AGCGTTCTACGAGCCCACG	GGTGCCTTGGGAGGTAGAT	56

## 2.5 矮秆基因 *d123* 的同源克隆

矮秆基因 *d123* 定位结果显示其与已知序列的矮秆基因 *br-2* 的位置较近,假设 *d123* 与 *br-2* 存在同源关系,参考 *br-2* 外显子的序列信息设计 SSR 特异引物,其中 8 对覆盖 *br-2* 所有位置并相互重叠的引物(表 4)在 K123d 中成功扩增(图 3)。而这 8 对引物在 K123 中不能正常扩增,以 *br-2* 为模板重新分段设计引物,并调节各种 PCR 条件,均无法得到目标条带。将 K123d 扩增良好的 PCR 产物纯化测序,两个公司的测序结果一致。采用 DNA-MAN 软件,将测序结果拼接比对发现 *d123* 与 *br-2* 外显子存在 12 个碱基替换,但其中 11 个碱基为同

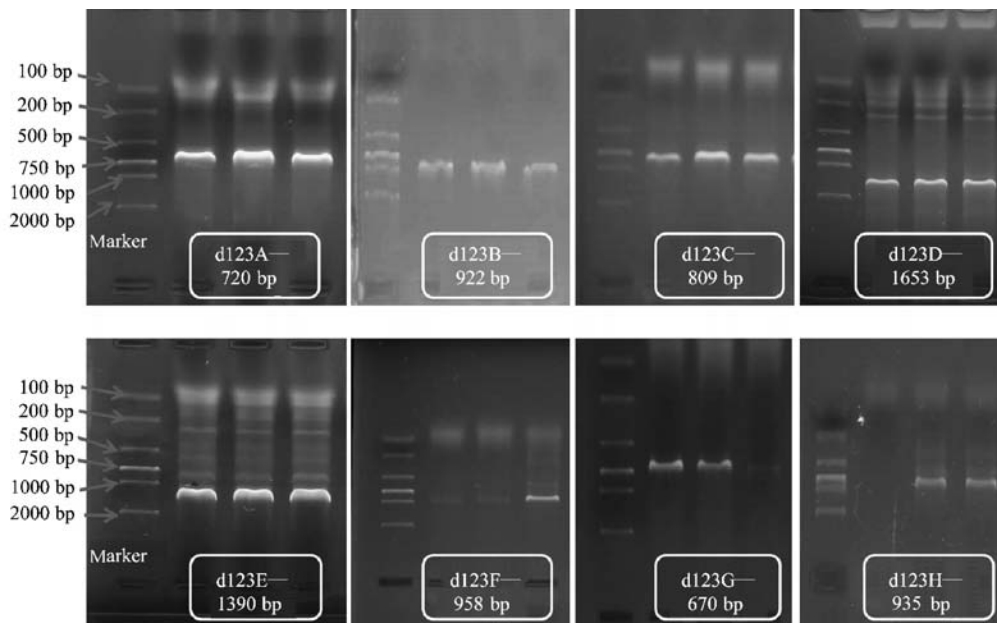


图3 8对SSR引物在K123d中的扩增结果

Fig. 3 Amplification results of K123d with 8 pairs of SSR primers

义突变,仅在该基因第 4 个外显子处编码的第 531 个氨基酸,即 *br-2* 中的谷氨酸在 *d123* 的相同位置被替换为赖氨酸(表 5),氨基酸比对结果见图 4。

以上结果表明,该矮秆基因 *d123* 可能是源于 *br-2* 的一个突变基因。

表 5 *d123* 与 *br-2* 的碱基序列比对

Table 5 Base sequences alignment of *d123* with *br-2*

外显子 Excon	碱基变化 Bases changes	氨基酸比对 Alignment of amino acid	外显子 Excon	碱基变化 Bases changes	氨基酸比对 Alignment of amino acid
第 1 个 First	—	—	第 5 个 Fifth	GGG→GGC	Gly→Gly
第 2 个 Second	CTG→GTC	Val→Val		CGC→CGA	Arg→Arg
第 3 个 Third	CTG→GTT	Val→Val		GTC→GTG	Val→Val
	AGA→AGG	Arg→Arg		GCA→GCC	Ala→Ala
第 4 个 Fourth	CTG→CTT	Leu→Leu		GCC→GCC	Ala→Ala
	GAG→AAG	Glu→Lys		GCC→GCC	Ala→Ala
				GCG→GCT	Ala→Ala



图 4 *d123* 与 *br-2* 的氨基酸序列比对

Fig. 4 Amino acids alignment between *d123* and *br-2*



### 3 讨论

#### 3.1 矮秆突变体 K123d 的遗传特性

植株矮化是促进作物适应人类化肥工业及机械工业发展的基础,矮秆基因的遗传鉴定对育种工作具有重要的指导意义<sup>[6]</sup>。发掘并克隆矮秆基因,通过遗传改良方法降低株高是玉米矮秆育种最有效的途径之一。已知的矮秆基因大多存在不同程度的不利连锁,导致可利用的矮源基础狭窄。现有的矮秆资源大多属于隐性单基因控制的,受外界环境的影响比较小,是稳定的矮生类型<sup>[22]</sup>。目前已知的玉米矮生单基因有 60 多个,这类基因研究及应用最多的是 *br-2*。*br-2* 的主要遗传效应是抑制节间的伸长,这种抑制作用对果穗以下的节间表现更为明显,愈是低位节间,缩短得愈显著。*br-2* 矮秆基因在玉米育种上的广泛应用使单基因矮生系的应用得到了肯定,已有的研究表明 *br-2* 的突变有明显的重演性并且频率十分高,如“搬不倒”、“龙门大心”、“武陟矮”、W153 等均为 *br-2* 突变体<sup>[31]</sup>。在矮生类型发现的早期,利用遗传学方法鉴定出他们的基因型,了解其基因体系并对其分类,这对材料的取舍及应用有十分重要的意义。

前人研究表明,大多数玉米的隐性矮生基因存在于 1、2、3 条染色体上。本研究鉴定了一个受单隐性核基因控制的矮秆突变体 K123d,株高降低了 35.59%,穗位高降低、节间缩短、叶片较直立,但结实率差。已将该矮秆基因定位于第 1 条染色体 bin1.07 处 SSR 标记 *umc1278* 和 *bnlg1564* 之间,遗传距离分别为 12.8 cM 和 7.3 cM,物理距离为 4.2 Mbp。在该定位区间附近,存在 2 个已知序列的矮秆基因 *br-2* 和 *an1*。已有报道显示 *an1* 控制的矮秆植株均表现出观性现象(即雄花序上结种子),本研究矮秆材料 K123d 与其表型不符。因此,选取矮秆基因 *br-2* 作为同源克隆的候选基因。根据 *br-2* 的序列信息同源克隆了 *d123*,并发现其与 *br-2* 的第 4 个外显子存在一个氨基酸差异,推测 *d123* 是 *br-2* 的又一个突变类型。鉴于 *br-2* 及其各类突变体在玉米育种中的广泛应用,如墨西哥的本雀比利亚 AN-360,我国四川的“成矮号”、河北的“登攀号”、新疆的“风光 72”等,均带来了玉米的大幅度增产<sup>[16,27]</sup>,推测 K123d 在玉米株高改良上可能具有一定的应用潜力。

#### 3.2 矮秆突变体 K123d 的矮化机制

矮秆突变体产生的原因有很多种,一般认为

矮秆基因的作用能直接导致玉米植株形态或细胞学的变化,如节间细胞个数减少或细胞长度缩短等原因导致节间变短,从而造成了植株的矮化,而矮秆基因的表达受到各种激素的调控<sup>[32-34]</sup>。研究表明,引起第一次“绿色革命”的基因均与赤霉素密切相关,小麦矮秆基因 *Rht* 与 GA 信号转导途径有关,而水稻半矮秆基因 *sd1* 与 GA 生物合成途径有关<sup>[10,21]</sup>。目前所获得的玉米矮生基因大多是对赤霉素敏感的基因,它们通过某种机制阻止赤霉素的反应,而有些矮生基因的致矮机制还不太清楚,其中赤霉素和油菜素类固醇是影响植株高度最主要的两类激素<sup>[26]</sup>。但 *br-2* 的矮化机制则较为特殊,已有研究表明 *br-2* 株高降低是由于缺少一个 P-糖蛋白,该蛋白可调节茎秆中生长素的极性运输<sup>[35]</sup>。本研究表明 K123d 的赤霉素合成及转导途径正常,随着外源赤霉素施用浓度的增加其内源赤霉素含量显著增加,并使 K123d 苗高恢复至野生型,说明 K123d 对赤霉素敏感,推测 K123d 矮化可能与特定生长时期赤霉素的合成量不足有关。另外,由于 *d123* 与 *br-2* 存在密切关系,K123d 的矮化机制也可能与茎秆中生长素的极性运输有一定关系,有待进一步研究。

### 4 结论

自然突变产生的矮秆突变体 K123d 株高降低 35.59%,穗位高降低、节间缩短、叶片较直立,但结实率差,对赤霉素敏感;矮秆性状受 1 对隐性基因控制,其矮秆基因 *d123* 定位于第 1 条染色体上 SSR 标记 *umc1278* 和 *bnlg1564* 之间,遗传距离分别为 12.8 cM 和 7.3 cM;*d123* 与 *br-2* 存在 12 个碱基替换,其中第 4 个外显子编码的一个谷氨酸被替换为赖氨酸,说明矮秆突变体 K123d 为 *br-2* 的一个突变类型。

#### 参考文献

- [1] Kovi M R, Zhang Y S, Yu S B, et al. Candidacy of a chitin-inducible gibberellin-responsive gene for a major locus affecting plant height in rice that is closely linked to Green Revolution gene *sd1* [J]. *Theor Appl Genet*, 2011, 123: 705-714
- [2] Sasaki A, Ashikari M, Ueguchi-Tanaka M, et al. Green revolution: a mutant gibberellin-synthesis gene in rice [J]. *Nature*, 2002, 416: 701-702
- [3] Sakamoto T K, Matsuoka M. Generating high-yielding varieties by genetic manipulation of plant architecture [J]. *Curr Opin Biotech*, 2004, 15: 144-147
- [4] Landjeva S, Korzun V, Stoimenova E, et al. The contribution of the gibberellin-insensitive semi-dwarfing (*Rht*) genes to genetic variation in wheat seedling growth in response to osmotic stress [J]. *J Agric Sci*, 2008, 146: 275-286
- [5] 戴小枫,程高祥,刘继芬. 第一次绿色革命与 CGIAR 系统的



- 贡献[J]. 世界农业, 1997(12): 35-36
- [6] 余传元. 论水稻新株型育种与绿色革命[J]. 江西农业学报, 1998, 10(1): 60-64
- [7] Pinstrup-Andersen P, Hazell P B R. The impact of the green revolution and prospects for the future[J]. *Food Rev Int*, 1985, 1(1): 1-25
- [8] Davies W P. Anhistorical perspective from the green revolution to the gene revolution[J]. *Nutr Rev*, 2003, 61(61): 124-134
- [9] 周强, 袁中伟, 张连全, 等. 四倍体小麦地方品种矮蓝麦矮秆性状的遗传分析[J]. 作物学报, 2015, 41(12): 1895-1905
- [10] 朱立宏, 顾铭洪, 薛元龙. 籼稻矮秆遗传及其利用[J]. 南京农业大学学报, 1980(2): 1-7
- [11] 陆燕, 赵天祥, 刘国祥, 等. 小麦矮秆圆粒突变体的鉴定与分析[J]. 植物遗传资源学报, 2014, 15(1): 160-164
- [12] 贾小平, 董普辉, 张红晓, 等. 谷子抗倒伏性和株高、穗部性状的相关性研究[J]. 植物遗传资源学报, 2015, 16(6): 1188-1193
- [13] 石云素, 于永涛, 宋燕春, 等. 一个新矮生玉米种质资源的发现与遗传鉴定[J]. 植物遗传资源学报, 2008, 9(4): 521-524
- [14] 王立静. 玉米矮秆基因 *Dt* 和坏死基因 *net-t* 的图位克隆与功能分析[D]. 泰安: 山东农业大学, 2012
- [15] 王益军, 苗楠, 施亚婷, 等. 一份玉米显性矮秆突变体的遗传分析[J]. 华北农学报, 2010, 25(5): 90-93
- [16] Wang Y I, Deng D X, Ding H D, et al. Gibberellin biosynthetic deficiency is responsible for maize dominant dwarf11 (*D11*) mutant phenotype: physiological and transcriptomic evidence [J]. *PLoS ONE*, 2013, 8(6): 1-8
- [17] Cassani E, Bertolini E, Badone F C, et al. Characterization of the first dominant dwarf maize mutant carrying a single amino acid insertion in the VHYNP domain of the *dwarf8* gene [J]. *Mol Breeding*, 2009, 24: 375-385
- [18] Peng J, Richards D E, Hartley N M, et al. "Green revolution" genes encode mutant gibberellin response modulators [J]. *Nature*, 1999, 400: 256-261
- [19] Bensen R J, Johal G S, Crane V C, et al. Cloning and characterization of the maize *An1* gene. [J]. *Plant Cell*, 1995, 7(1): 75-84
- [20] Lawit S J, Wych H M, Xu D, et al. Maize DELLA proteins dwarf plant8 and dwarf plant9 as modulators of plant development [J]. *Plant Cell Physiol*, 2010, 51(11): 1854-1868
- [21] 牛静, 陈赛华, 赵婕好, 等. 水稻株型突变体 *rad-1* 和 *rad-2* 的鉴定与功能基因克隆 [J]. 作物学报, 2015, 41(11): 1621-1631
- [22] 阎淑琴. 矮生玉米的遗传与育种[J]. 玉米科学, 2000, 8(2): 36-37, 45
- [23] 樊景胜. 玉米矮生基因遗传及其利用[J]. 黑龙江农业科学, 1999(1): 29-30
- [24] 彭力行. 玉米株高遗传和育种几个问题的研究[J]. 西北农林科技大学学报: 自然科学版, 1988(1): 39-48
- [25] Schneider G, Schmidt J, Phinney B O, et al. GC-MS identification of GA20-13-O-glucoside formed from GA20 in normal plants and dwarf-1 mutants of *Zea mays* L. [J]. *J Plant Growth Regul*, 1987, 5: 217-223
- [26] 张素梅. 玉米株高突变体的遗传分析和初步基因定位[D]. 泰安: 山东农业大学, 2008
- [27] Tomoya N K, Takaaki N, Masayoshi N, et al. Production of dwarf lettuce by overexpressing a pumpkin gibberellin 20-oxidase gene [J]. *Plant Physiol*, 2001, 126: 965-972
- [28] 程江. 太空诱变玉米核不育突变体的矮败表现及激素分析 [D]. 成都: 四川农业大学, 2009
- [29] Zhou X L, Han D J, Gou H L, et al. Molecular mapping of a stripe rust resistance gene in wheat cultivar Wuhan 2 [J]. *Euphytica*, 2014, 196: 251-259
- [30] 刘振林. 同源序列法克隆甘蓝型油菜核不育基因 *BnMSI* 及其功能研究[D]. 金华: 浙江师范大学, 2010
- [31] 戴景瑞. 玉米的矮生基因及其遗传效应[J]. 遗传, 1979, 1(5): 40-43
- [32] 岳洪. 新的玉米矮秆突变基因的鉴定与遗传分析[D]. 泰安: 山东农业大学, 2008
- [33] 朱国华, 林志珊, 辛志勇, 等. 小麦几个“矮源”品种矮秆基因的遗传分析[J]. 作物学报, 1992, 18(2): 90-98
- [34] 桑贤春, 杜川, 王晓雯, 等. 水稻矮秆脆性突变体 *dbcl* 的鉴定与基因定位[J]. 作物学报, 2013, 39(4): 626-631
- [35] Multani D S, Briggs S P, Chamberlin M A, et al. Loss of an MDR transporter in compact stalks of maize *br2* and sorghum *dw3* mutants [J]. *Science*, 2003, 302: 81-84