



植物遗传资源学报

Journal of Plant Genetic Resources

ISSN 1672-1810, CN 11-4996/S

《植物遗传资源学报》网络首发论文

题目: 玉米矮化突变体 d309 的基因定位与遗传分析
作者: 张恩会, 李健, 王逸茹, 王小东, 马朋涛, 郑军
DOI: 10.13430/j.cnki.jpgr.20240312004
收稿日期: 2024-03-12
网络首发日期: 2024-06-06
引用格式: 张恩会, 李健, 王逸茹, 王小东, 马朋涛, 郑军. 玉米矮化突变体 d309 的基因定位与遗传分析[J/OL]. 植物遗传资源学报.
<https://doi.org/10.13430/j.cnki.jpgr.20240312004>



网络首发: 在编辑部工作流程中, 稿件从录用到出版要经历录用定稿、排版定稿、整期汇编定稿等阶段。录用定稿指内容已经确定, 且通过同行评议、主编终审同意刊用的稿件。排版定稿指录用定稿按照期刊特定版式(包括网络呈现版式)排版后的稿件, 可暂不确定出版年、卷、期和页码。整期汇编定稿指出版年、卷、期、页码均已确定的印刷或数字出版的整期汇编稿件。录用定稿网络首发稿件内容必须符合《出版管理条例》和《期刊出版管理规定》的有关规定; 学术研究成果具有创新性、科学性和先进性, 符合编辑部对刊文的录用要求, 不存在学术不端行为及其他侵权行为; 稿件内容应基本符合国家有关书刊编辑、出版的技术标准, 正确使用和统一规范语言文字、符号、数字、外文字母、法定计量单位及地图标注等。为确保录用定稿网络首发的严肃性, 录用定稿一经发布, 不得修改论文题目、作者、机构名称和学术内容, 只可基于编辑规范进行少量文字的修改。

出版确认: 纸质期刊编辑部通过与《中国学术期刊(光盘版)》电子杂志社有限公司签约, 在《中国学术期刊(网络版)》出版传播平台上创办与纸质期刊内容一致的网络版, 以单篇或整期出版形式, 在印刷出版之前刊发论文的录用定稿、排版定稿、整期汇编定稿。因为《中国学术期刊(网络版)》是国家新闻出版广电总局批准的网络连续型出版物(ISSN 2096-4188, CN 11-6037/Z), 所以签约期刊的网络版上网络首发论文视为正式出版。

玉米矮化突变体 *d309* 的基因定位与遗传分析

张恩会^{1,2}, 李健², 王逸茹², 王小东², 马朋涛¹, 郑军²

(¹烟台大学生命科学学院, 山东烟台 264005; ²中国农业科学院作物科学研究所, 北京 100080)

摘要：玉米的株高是决定其产量和稳定性的关键因素之一。本研究旨在通过优化玉米株型来提高玉米的单产。我们在 B73 的诱变材料中发现了一个矮化突变体 *d309*, 该突变体通过连续自交得以稳定遗传。遗传分析揭示, *d309* 突变体的表型受单一隐性基因控制。与 B73 自交系相比, *d309* 突变体展现出显著降低的株高和缩短的节间。细胞学研究表明, *d309* 突变体在第 5 和第 6 茎节间的细胞长度显著减少。通过构建 *d309* 与 PH6WC 的 F₂ 分离群体, 并运用 BSR-Seq 技术, 我们初步将突变位点定位在第 3 号染色体的 3.47-17.47 Mb 区间。进一步通过基因定位将突变位点定位于 5-4 和 5-7 两对分子标记之间, 该区间内只有一个开放阅读框, 编码赤霉素 3-氧化酶(gibberellin 3-oxidases, *GA3ox*, *Zm00001d039634*), 已被报道为 *Dwarf1*。测序结果显示, *d309* 突变体在 *Zm00001d039634* 基因 CDS 区存在单个核苷酸的突变, 导致氨基酸序列改变。蛋白质结构预测表明, 该突变位点位于 Fe(II)2OGD(iron 2-oxoglutarate dioxygenase)结构域内。外通过外源施加赤霉素, 我们观察到 *d309* 突变体的矮化表型得到恢复, 从而确认 *d309* 为一个赤霉素合成缺陷型突变体。此外, *d309* 突变体与已报道的 *Dwarf1* 等位突变体在突变机制上存在差异, 表明 *d309* 可能是 *Dwarf1* 基因的一个新等位基因。

关键词：玉米株高; 矮化突变体; 图位克隆; 赤霉素合成

Gene Mapping and Genetic Analysis of the Dwarf Mutant *d309* in Maize

ZHANG Enhui^{1,2}, LI Jian², WANG Yiru², WANG Xiaodong², MA Pengtao¹, ZHENG Jun²

(¹ College of Life Sciences, Yantai University, Yantai 264005, Shandong; ² Institute of Crop Sciences, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100080)

Abstract: Plant height is one of the key factors determining yield and stability in maize. This research aims to increase the individual yield of maize by optimizing the plant architecture. We have discovered a dwarf mutant, *d309*, in the mutagenized material of the maize variety B73, and was stably inherited through continuous selfing. Genetic analysis revealed that the phenotype of the *d309* mutant is controlled by a single recessive gene. When compared to the B73 inbred line, the *d309* mutant exhibited a significantly reduced plant height and shortened internodes. Cytological studies indicated that the cell length between the 5th and 6th internodes of the *d309* mutant was significantly reduced. By constructing an F₂ population from the cross of *d309* and PH6WC and employing BSR-Seq technology, we preliminarily mapped the mutation site to an interval of 3.47 to 17.47 Mb on chromosome 3. Further gene mapping localized the mutation site between two molecular markers, 5-4 and 5-7, within which there is only one open reading frame encoding gibberellin 3-oxidases (*GA3ox*, *Zm00001d039634*), which has been reported as *Dwarf1*. Sequencing results showed that the *d309* mutant has a single nucleotide mutation in the CDS region of the *Zm00001d039634* gene, leading to an amino acid sequence change. Protein structure prediction suggested that the mutation site is located within the Fe(II)2OGD (iron 2-oxoglutarate dioxygenase) domain. Exogenous application of gibberellin restored the dwarf phenotype of the *d309* mutant, confirming it as a gibberellin synthesis-deficient mutant. Additionally, the *d309* mutant differs from the reported *Dwarf1* allelic mutants in its mutation mechanism, indicating that *d309* is a new allelic variant of the *Dwarf1* gene.

Keywords: Maize plant height; Dwarf mutant; Map cloning; Gibberellin synthesis

自绿色革命以来, 小麦、水稻、玉米等作物广泛应用了高产、半矮秆品种, 使得粮食产量迅速增加,

收稿日期: 2024-03-12

第一作者研究方向为基因定位及分子标记开发, E-mail: enhuien@163.com

通信作者: 郑军, 玉米分子育种, E-mail: zhengjun02@caas.cn

基金项目: 国家重点研发计划基金 (2023YFD1200500)

Foundation project: National Key Research and Development Program (2023YFD1200500)

解决了发展中国家一半人口的吃饭问题,避免了大规模的粮食危机^[1]。玉米产量的提高主要依赖于植株高度、种植密度、叶面积指数、光合作用等因素^[2]。近年来,研究人员发现通过基因工程手段调控植物内源激素水平的潜力,制定合理方案来提高粮食产量^[3]。

玉米株高受到多种因素影响,包括遗传背景、环境条件、水分和养分供给、植株密度及田间管理等。特别是,茎节长度、节间数以及细胞形态异常均会影响玉米株高^[4];此外,植物激素如赤霉素(Gibberellin, GA)、油菜素内酯(Brassinolide, BR)、生长素(Indole Acetic Acid, IAA)等对株高具有显著调控作用^[5]。植物矮化可由激素合成缺陷或信号转导受阻引起,前者可通过外源激素恢复,而后者则不能^[6]。目前报道的已被克隆的玉米矮秆基因有近 40 个,调控玉米株高的 QTLs 约 219 个^[7],与玉米矮秆相关的基因主要有生长素(*Bv1*、*Vt2*、*BR2*、*ZmPIN1a*、*ZmGLR*)^[8-12]、油菜素内酯(*Brd1*、*BR1a*、*Na1*、*Na2*)^[13-16]、乙烯(*Sdw3/ZmACS7*)^[17-18]、赤霉素(*GID1*、*Kn1*、*D11*、*D2003*、*D8*、*D9*、*Ct2*、*ZmGA3ox2*)^[19-25]和独脚金内酯(*ZmCCD8*)等^[26]。其中 GA 是一类四环二萜类激素,参与调控种子萌发、植物开花及茎的伸长发育等过程^[27],其生物合成途径在多种作物中已得到阐明,涉及赤霉烷酸合成酶(copalyl diphosphate synthase, CPS)、赤霉醇酸合成酶(kaurene synthase, KS)、赤霉酮酸合成酶(kaurene oxidase, KO)、赤霉醇脱氢酶(gibberellin 20-oxidase, GA20-oxidase)和赤霉素 3-氧化酶等多种酶催化^[28-29]。GA3ox 作为多种活性 GA 合成的关键限速酶,其编码蛋白含有 2OG-FeII/Oxy 和 DIOXN 两个保守结构域^[30]。CRISPR/Cas9 技术用于编辑 *Osga3ox2* 基因,产生的突变体表现出的显著降低株高,证实 GA20 至 GA1 的转化在调节水稻高度中的作用^[29]。大豆中 *Gmdwarf1* 突变体株高极显著低于野生型,外源施加赤霉素后可恢复突变体株高表型^[31]。*Gmga3ox1* 突变体赤霉素生物合成减少,光合作用增强^[32]。Fe/2OG 双加氧酶参与许多生物化学反应过程,如催化乙烯、赤霉素、花青素等植物激素的生物合成^[33-34]。Fe(II)2OGD 是赤霉素合成途径中的限速步骤之一,对植物的生长和发育有重要影响。

近年来,随着高通量测序技术的发展,基因定位和验证过程中开发了大量分子标记。利用分子标记精细定位和鉴定矮秆基因,有助于进一步解析矮秆基因的功能和调控机制,并为相关性状的遗传改良和育种工作提供重要信息。本研究报道了一种新的玉米矮化突变体 *d309*,通过田间表型鉴定、遗传分析和图位克隆,我们推测它可能是 *Dwarf1* 基因的一个新等位突变体。对 *Dwarf1* 蛋白的进化保守性、表达模式和结构变异进行了分析,特别发现第 308 位氨基酸在多种作物中高度保守,且该位点的突变引起了蛋白结构的显著变化。这些发现不仅为玉米矮秆品种的选育提供了宝贵的遗传资源,也为深入探索株高基因的优异等位变异和 *Dwarf1* 矮化机理提供了科学依据。

1. 材料与方法

1.1 实验材料

d309 是实验室前期从 B73 的诱变材料中获得的矮化突变体,具有明显的矮化表型,经过多代自交后矮化表型可以稳定遗传。本实验以矮化突变体 *d309* 和玉米自交系 PH6WC 作为亲本杂交产生 F₁ 种子,经自

交后产生 F₂ 群体。

1.2 茎节间组织形态学观察

待田间玉米自交系 B73 和矮化突变体 *d309* 生长至 6 周时, 取第 5、6 节间浸没在固定液中(50%乙醇 89 mL、甘油 1 mL、冰醋酸 5 mL、福尔马林 5 mL 混合而成), 避光 4℃ 固定。用 3% 的琼脂糖包埋后, 用震荡切片机(Leica VT1000s)切成 45 μm 左右薄片, 0.05% 甲苯胺蓝染色 15 s, 超纯水清洗, 观察细胞形态并拍照。细胞面积计算: 计算 0.28 mm² 面积内的细胞数目, 用单位面积除以细胞数目获得单个细胞面积(不计算维管束)。细胞长度计算: 单位长度除以单位长度内细胞数目, 3 次重复^[35]。

1.3 BSR-Seq 初定位

对 F₂ 分离群体中突变体和野生型植株进行转录组测序, 每个混池中各 30 个样本。提取拔节期植株叶片总 RNA(天根生化科技公司 RNA 快速提取试剂盒)后, 由安诺优达基因科技有限公司进行 cDNA 文库构建和转录组测序, 测序平台使用 Illumina Nova Seq 6000, 测序策略为双端 150 bp(pair-end 150, PE150)。转录组测序数据分析由美国堪萨斯州立大学刘三震教授团队根据其已报道的分析方法完成^[36]。

1.4 *d309* 图位克隆及区间内候选基因分析

PH6WC×*d309* F₂ 分离群体中鉴定到 1,347 株具有矮化表型, 用 CTAB 法提取玉米叶片组织 DNA, PCR 采用江苏康为 2×Es Taq MasterMix(Dye)和诺唯赞 2×3G Taq Master Mix for PAGE, SSR 标记参照 Maize(GDB) (<https://maizegdb.org/>)和实验室现有标记, 引物合成和 DNA 测序由上海生工生物有限公司北京分部完成。通过聚丙烯凝胶电泳利用特异性分子标记筛选区间内重组个体, 通过设计 InDel 标记(primer3: <https://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>)进一步缩小区间。利用 Maize(GDB)查找候选区间内基因, 分析基因功能, 进行基因序列扩增寻找突变位点。

1.5 外源赤霉素处理

大田种植玉米自交系 B73 和矮化突变体 *d309*, 进行赤霉素(GA)喷洒试验, 赤霉素浓度 50 mg/L, 各设置 3 个生物学重复^[35]。从 6 叶期开始, 每间隔 7d 进行一次赤霉素处理, 直至抽雄期, 在玉米成熟期调查株高, 记录并统计。

1.6 荧光定量 PCR(qRT-PCR)

用 primer3 设计候选区间内基因的 qRT-PCR 特异性引物, PCR 产物长度 150-300 bp, 分别提取幼芽和植株叶片的总 RNA (天根植物 RNA 提取试剂盒)并进行反转录(天根反转录试剂盒)得到 cDNA, 进行 qRT-PCR, 各设置 3 个生物学重复, 采用 2^{-ΔΔCT} 法分析基因的相对表达量。

1.7 蛋白结构域预测

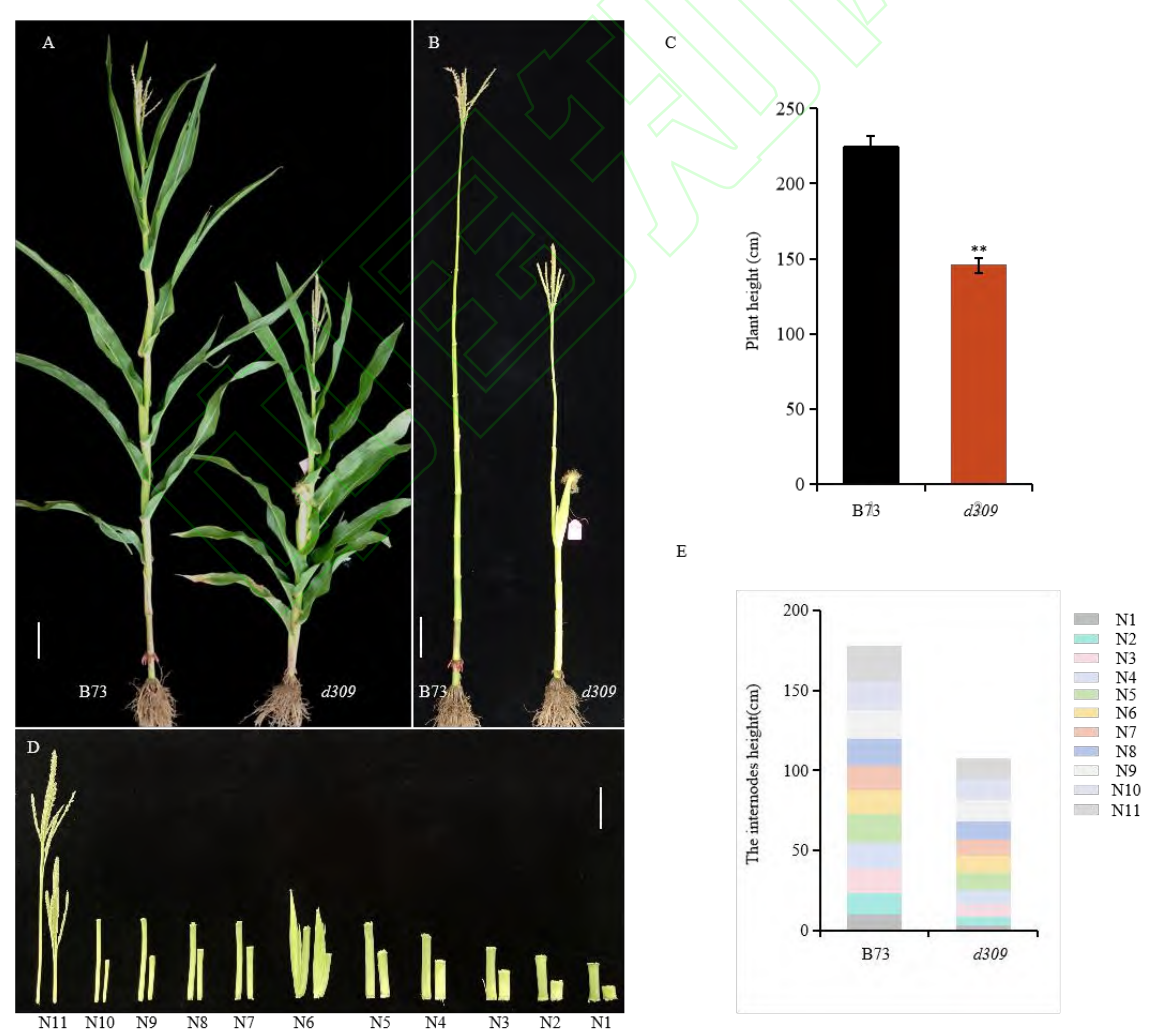
从 NCBI(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)数据库下载玉米 *Dwarf1* 基因在多个物种中的同源氨基酸序列, 利用 InterPro 数据库 (<https://www.ebi.ac.uk/interpro/>)对下载的同源序列进行蛋白结构域预测。采用 MAGE7

工具构建系统发育树，以比较 *d309* 突变体氨基酸序列与其他作物序列之间的同源性。通过 Phyre2 平台 (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2>) 建立目标蛋白的三维模型，并分析 *D309* 突变对蛋白结构的潜在影响。

2. 结果与分析

2.1 表型鉴定和遗传分析

与 B73 相比，矮化突变体 *d309* 表现出显著的植株矮化特征，包括缩短的茎节、紧凑而浓绿的叶片布局以及较多的分蘖数(图 1A、B)。田间数据表明，B73 的平均株高约为 224 cm，而 *d309* 的平均株高仅为 145 cm，这意味着 *d309* 的株高相比野生型 B73 显著降低了约 35% (图 1C)。由于玉米株高主要是由节间数目和节间长度决定，为探究突变体 *d309* 株高降低的原因，我们对 B73 和 *d309* 成熟期茎秆的茎节数和各节间长度进行测量和统计分析，结果表明 *d309* 节间数目没有明显变化，但 N1-N11 各节间长度均明显缩短(图 1D、E)。这些结果指出，*d309* 突变体株高降低是由于节间缩短造成的。



A、B: B73 和 *d309* 灌浆期的植株，标尺=10 cm; C: B73 和 *d309* 的株高比较, n=30, **表示在 0.01 水平差异显著; D: 从左往右分别是 B73 和 *d309* 不同

节间长度比较, N1 代表由地面往上第一节间; E: B73 和 *d309* 成熟期茎节, 标尺=10 cm。
A, B: plants of B73 and *d309* at filling stage, Bar=10 cm; C: comparison of plant height between B73 and *d309*, n=30, **: significant difference at $P < 0.01$; D:
From left to right, the comparison of different internode lengths between B73 and *d309*, N1 represents the first section from the ground up; E: maturity node of
B73 and *d309*, Bar=10 cm.

图 1 B73 和突变体 *d309* 的表型分析

Fig. 1 Phenotypic Analysis of B73 and mutant *d309*

d309 与 PH6WC 杂交产生 F_1 , 自交后产生约 7600 株 F_2 分离群体, 统计分析发现正常植株与矮化植株的比例接近 3: 1 (表 1), 表明 *d309* 突变体矮化性状受一个隐性单基因控制。

表 1 矮化突变体 F_2 群体分离比统计表

Table 1 Statistical table of segregation ratio of dwarf mutant F_2 population

数据来源 Data source	正常表型 (株) Wild type (strain)	突变表型 (株) Mutant type (strain)	分离比 Segregation ratio	P 值 p-value
19SG-1	217	58	3: 1	0.134
19SG-2	241	74	3: 1	0.573
19SG-3	161	46	3: 1	0.356
19SG-4	223	71	3: 1	0.736
19SG-5	194	51	3: 1	0.130
19SG-6	182	52	3: 1	0.326
19SG-7	161	46	3: 1	0.356
19SG-8	182	52	3: 1	0.326
19SG-9	168	52	3: 1	0.640
19SG-10	174	53	3: 1	0.565

注: 数据来源于 *d309* × PH6WC 产生的 F_1 单穗。

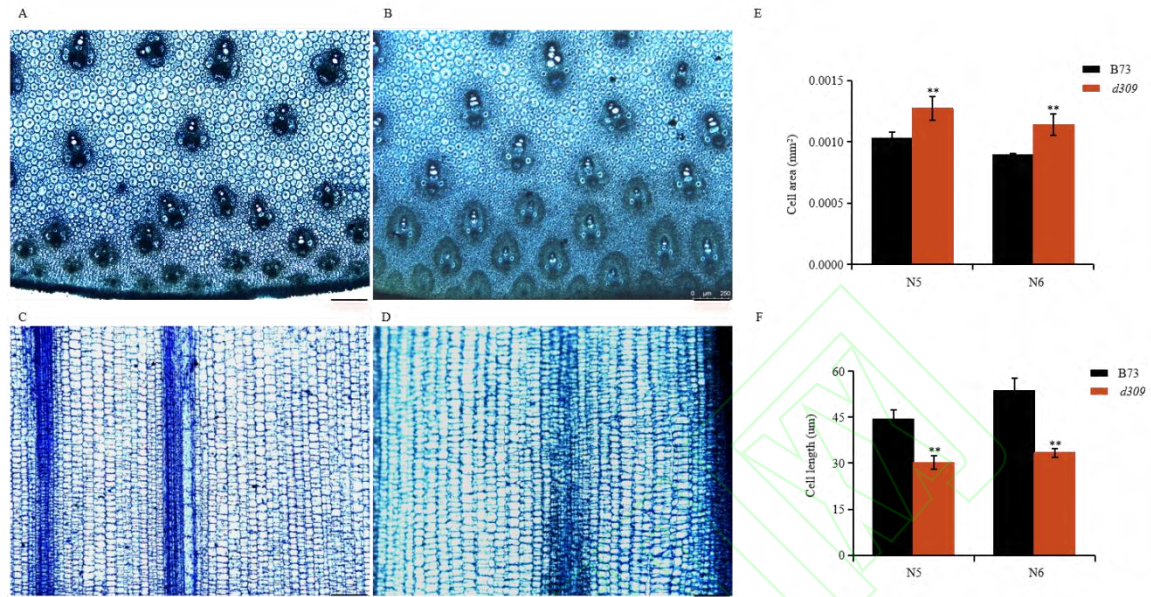
Note: The data were derived from the F_1 single ear produced by *d309* × PH6WC.

2.2 茎节间细胞形态比较

为了深入探究影响突变体 *d309* 株高降低的微观因素, 我们选取生长 6 周后的 B73 和矮化突变体 *d309* 的第 5、6 节间进行精确的组织横切和纵切分析, 结果如下图所示, 如图 2A、B 所示, 与 B73 相比, *d309* 第 5 节间横切面上, 薄壁组织细胞排列不规则, 细胞大小参差不齐, 整体呈现出较为杂乱的状态, 细胞数目减少, 维管束增多; 茎秆的纵切面观察结果显示, B73 的细胞呈现出规则的长方体状, 紧密而平行地纵向排列 (图 2C), 而矮化突变体 *d309* 的细胞则呈圆角矩形, 纵向排列较为疏松 (图 2D)。

进一步分析发现, 矮化突变体 *d309* 第 5、6 节间的平均细胞面积约为 0.0013 mm²、0.0011 mm², 均显著大于 B73 的相应节间细胞面积; 无论是 B73 还是 *d309*, 第 5 节间的细胞面积均大于第 6 节间(图 2E)。通

过统计单位长度内的细胞数目并计算细胞长度，我们发现 *d309* 突变体的第 5、6 节间的平均细胞长度约为 30.17 μm 、33.35 μm ，均显著低于 B73，减少幅度分别为 31.99%和 37.78%(图 2F)。这一发现表明，细胞长度的缩短可能是导致 *d309* 株高变化的另一关键因素。



A、B: B73 和 *d309* 生长 6 周后第 5 节间茎秆横切，标尺=250 μm ; C、D: B73 和 *d309* 生长 6 周后第 5 节间茎秆纵切，标尺=250 μm ; E: B73 和 *d309* 茎秆横切细胞面积比较; F: B73 和 *d309* 茎秆纵切细胞长度比较; **: 表示在 0.01 水平差异显著。

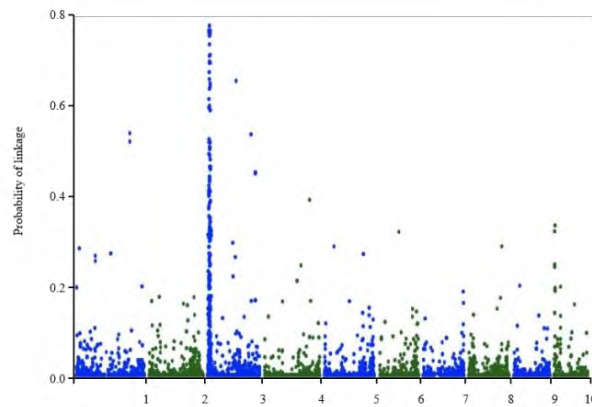
A, B: Cross cut the 5th internode stem after 6 weeks of growth of B73 and *d309*, Bar=250 μm ; C, D: longitudinal cutting of the 5th internode stem after 6 weeks of growth of B73 and *d309*, Bar=250 μm ; E: Comparison of cell area of B73 and *d309* of crosscut stem; F: Comparison of cell length between B73 and *d309*; **: significant difference at $P < 0.01$.

图 2 B73 和突变体 *d309* 的茎节间细胞形态比较

Fig. 2 Morphological comparison of internode cells between B73 and mutant *d309*

2.3 BSR-Seq 初定位及 *D309* 基因图位克隆

在玉米拔节期，我们对 F_2 分离群体中正常植株和矮化植株进行了表型调查与鉴定，提取叶片总 RNA 后，分别构建野生型和突变体混合样本库，用于进行转录组测序。使用经验贝叶斯方法来估计连锁概率，根据每个 SNP 在参考基因组中的物理坐标来绘制其连锁概率图。结果显示在 B73 参考基因组 3 号染色体上 3.47-17.47 Mb ($P > 0.2$) 的位置观察到一个极显著的单峰。初定位矮化突变体目的基因所在区间为 14 Mb(图 3)。



每个 SNP 的连锁概率根据参考基因组中的物理坐标绘制($P>0.2$)。

Translation: The linkage probability of each SNP is plotted based on the physical coordinates in the reference genome ($P>0.2$).

图 3 BSR-Seq 分析结果

Fig. 3 BSR-Seq analysis results

基于初步定位的结果，本研究进一步开发分子标记定位目的基因。将 F_2 群体中鉴定的 1347 株矮化突变体作为精细定位群体，在 maizeGDB 上筛选 3 号染色体 3.47-17.47Mb 内的 SNP 位点，从中筛到 29 对 SSR 标记。经过聚丙烯酰胺凝胶电泳分析，我们确定了两对可用的 SSR 标记：umc1425 和 3-14.9，其中 3-14.9 标记离近 *D309* 基因更近。进一步在该区间设计 InDel 标记位点，共设计 79 对引物，从中筛选到 1-17 和 2-35，将目标区间缩小至 3.14 Mb。区间缩小至 3.14 Mb。在此区间内共设计 53 对引物，并通过 InDel 标记 4-4 和 4-18 将区间缩小至 1.37 Mb。最终，利用 364-1 和 637-1 两对分子标记将区间缩小至 78.8 Kb，该区间有四个候选基因：*Zm00001d039634*、*Zm00001d039635*、*Zm00001d039636* 和 *Zm00001d039637*。通过 5-4 和 5-7 将候选基因确定为 *Zm00001d039634*（图 4，表 2），该基因已被命名为 *Dwarf1*，编码玉米 GA3ox 合成酶，包含有 OG-FeII₂O₂ 和 DIOXN 两个保守结构域。通过序列对比发现 *d309* 中 *Zm00001d039634* 基因第三个外显子上有一个 C 到 T 单碱基突变，编码氨基酸由 Pro 变为 Leu(图 5A、B)，该位点在 OG-FeII₂O₂ 结构域内(图 5C)。因此，我们推测 *D309* 可能是一个新的 *Dwarf1* 等位基因。

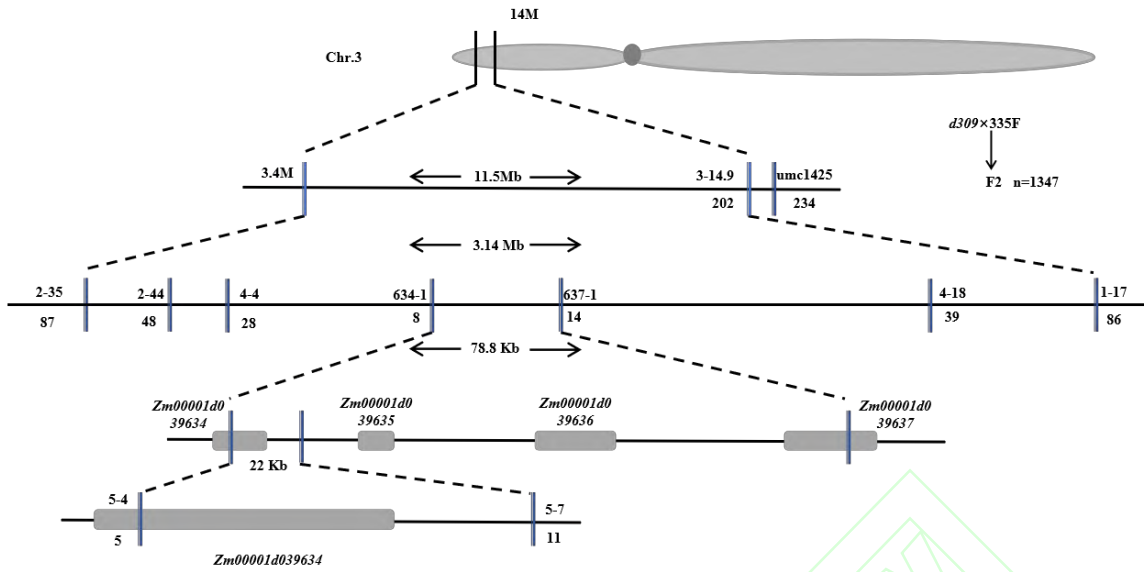


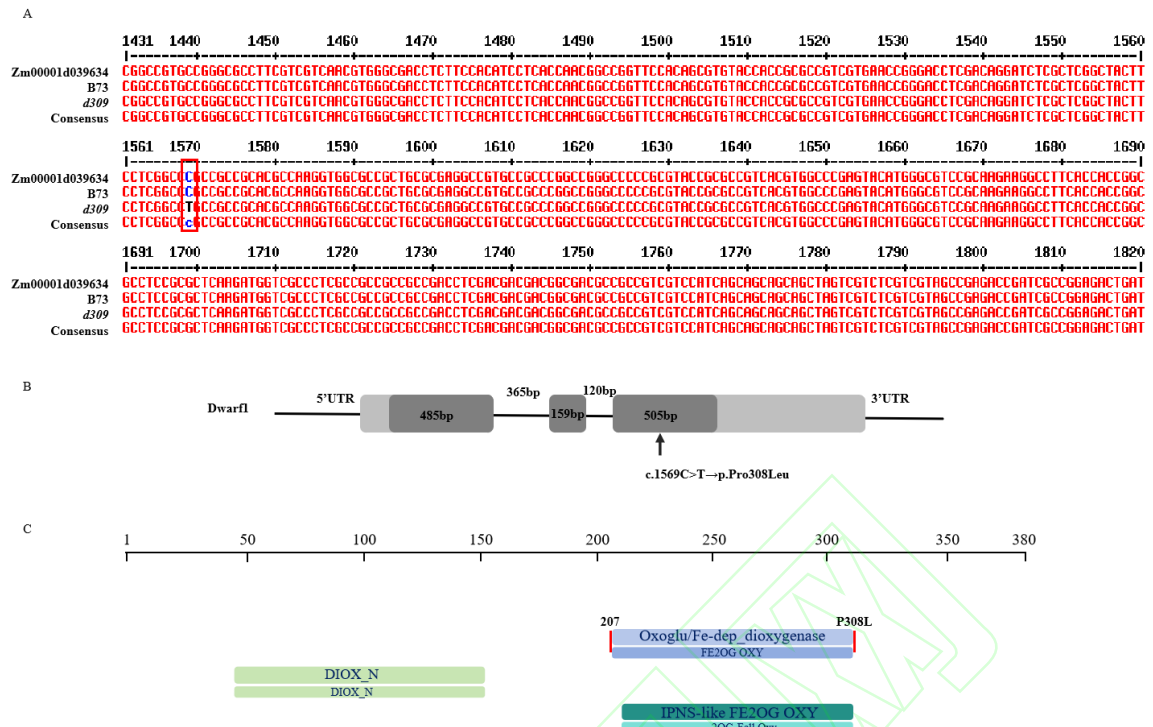
图 4 *d309* 突变体基因在玉米第 3 染色体上的精细定位

Fig. 4 Fine Mapping of the *d309* Mutant Gene on Chromosome 3 of Maize

表 2 本研究所用的引物

Table 2 Primers used in this study

引物 Primer	正向序列 Forward sequence (5'–3')	反向序列 Reverse sequence (5'–3')
umc1425	ATAGTCAAGCAGCCAACAAAATCC	CTGTAATCGCTAACGGGGTAACAT
3-14.9	GGACCTCAAACCTGTGCGATAAAT	CATCACCACCTCAGAATGTCAGTG
1-17	CTCAAACAGCCAAGCAAGC	ATCTTCTCTCCGTGCTGTGT
2-3	CACGGCAAGTTGGAATATGA	TCCGGTACTTCTCATTTCTGTT
2-35	AGATAGTGGCGTCATGAACCA	CGTAAATGGATGTTTGGGTTCA
2-44	TGTACGTGCGAGAGAGTGAG	CCGTCCCTCCTCAACCATCTA
4-4	ATGACCCATGGCTCGCGT	CGGCGATCACATCAACGG
4-18	AAGAGCTACACAACCCGAA	CGAGTGTTACAAAGTGAGGTGT
634-1	TGGAGAGAACAGGTCGATGG	CCAGTTTCGAGGGTGTGTGC
637-1	CTGCTTTACCTGCTTTGCCA	CCAGCTCCCAACTTGCATTA
5-4	CGACGACTACACCAGCTTCT	GACCTGCTGCTGTACCTGTA
5-7	CCGAGATAGAGCAACGCAAC	CTGCCTACCTACCCAGAGTG
411	CACGCCATGTACTTCTCTGC	GACCTGCTGCTGTACCTGTA
412	CGACGACTACACCAGCTTCT	TGAGGATGTGGAAGAGGTGC
413	CATGCATCTCAACTGGTGGG	CGGCCCGTCATCTATATCGA
414	AACTAATCCGTTCCGCAGC	TCTCCACTGCTACTCACTGC



A: B73 和突变体 *d309* 基因测序结果比对结果; B: *Dwarf1* 基因结构及 *d309* 突变位点, 深灰色区域为 *Dwarf1* 基因编码区, 浅灰色区域分别代表 5'UTR 和 3'UTR 区; C: *d309* 突变位点所在的蛋白结构域。

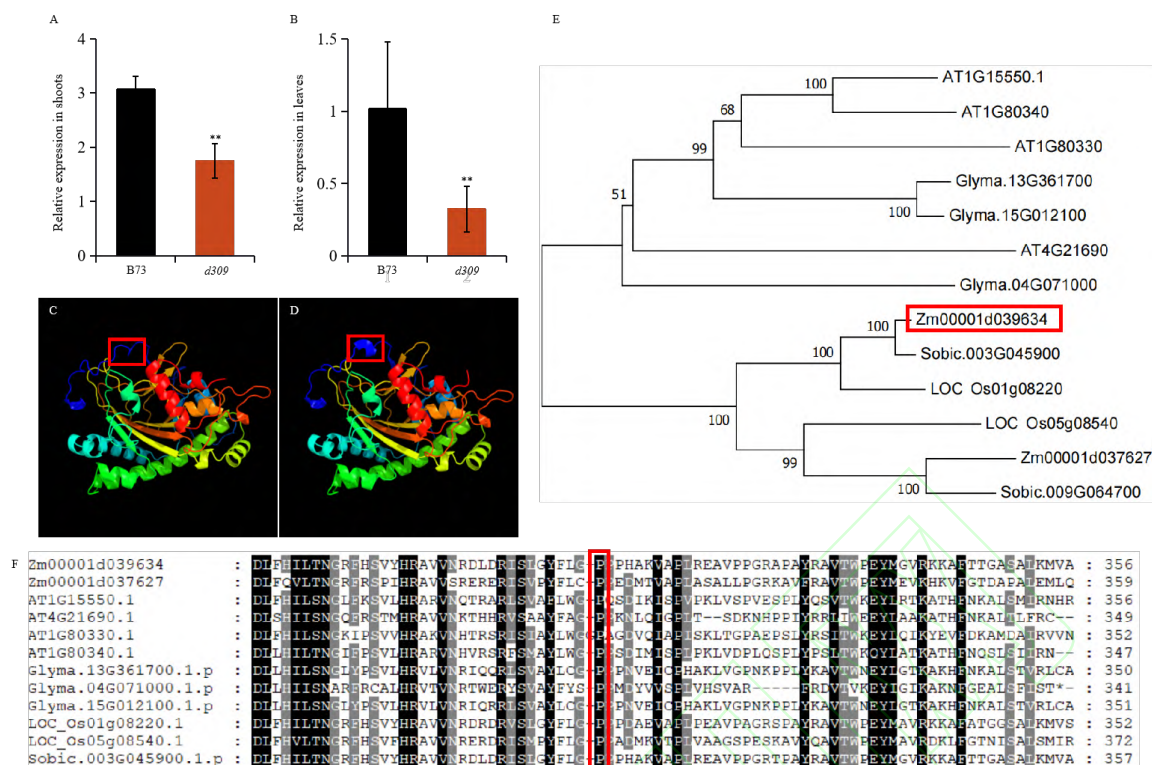
A: Comparison of B73 and mutant *d309* gene sequencing results; B: Structure of the *Dwarf1* gene and mutation site *d309*. the dark grey area denotes the coding sequence of the *Dwarf1* gene, and the light grey areas represent the 5' untranslated region (5' UTR) and the 3' untranslated region (3' UTR), respectively; C: Protein domains where the *d309* mutation site is located.

图 5 *d309* 突变体基因突变位点及其蛋白结构域预测

Fig. 5 Mutation Site of the *d309* Mutant Gene and Prediction of Its Protein Structural Domains

2.4 *D309* 基因初步功能分析及验证

我们检测了 *Dwarf1* 在 B73 和 *d309* 中基因相对表达量。结果显示, 在幼芽和叶片中, B73 基因相对表达水平平均显著高于突变体(图 6A、B)。此外, 我们利用 Phyre2 平台构建了 *Dwarf1* 蛋白的三维模型, 分析氨基酸突变对目标蛋白序列的影响。模型预测显示, 与 B73 相比, *d309* 第 308 位发生蛋白结构改变 Phyre2 平台构建了蛋白的三维模型, 以分析氨基酸突变对蛋白结构的影响。模型预测显示, 与 B73 相比, *d309* 在第 308 位的氨基酸突变导致了蛋白结构的改变(图 6C、D)。在 NCBI 上下载了 Zm00001d039634 在玉米、水稻、大豆、高粱等作物中的同源蛋白序列, 用 MAGE7 进行系统发育树的构建, 发现该基因与高粱的氨基酸序列同源性最高(图 6E)。进一步的蛋白序列分析发现, *Dwarf1* 的第 308 位氨基酸在这些作物中极为保守(图 6F)。这表明这一位置的氨基酸对蛋白功能至关重要。



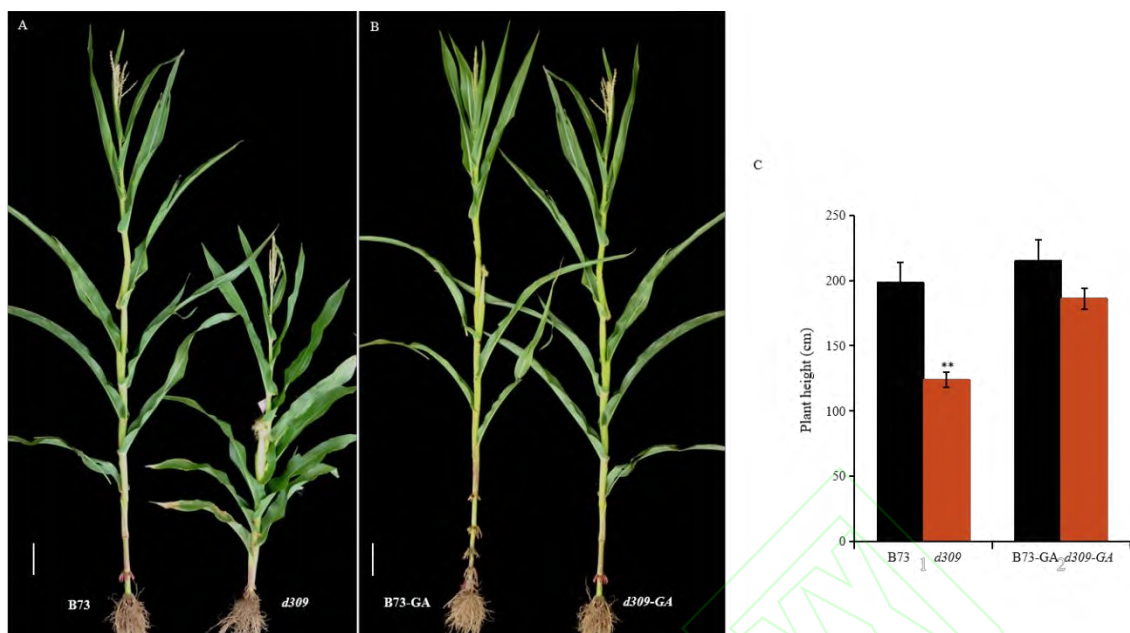
A、B: *Dwarf1* 在 B73 和 *d309* 突变体幼芽和叶片中的基因相对表达量; C、D: B73 和 *d309* 突变体中 *Dwarf1* 蛋白三维模型比对; E: *Dwarf1* 系统发育进化树; F: *Dwarf1* 在不同物种中同源氨基酸序列比对。

A, B: The relative expression of *Dwarf1* in the buds and leaves of B73 and *d309* mutants; C, D: Three-dimensional model alignment of *Dwarf1* protein in B73 and *d309* mutants; E: *Dwarf1* phylogenetic tree; F: *Dwarf1* homologous amino acid sequence alignment in different species.

图 6 基因功能初步验证

Fig. 6 Preliminary Verification of Gene Function

前人研究表明, *Dwarf1* 基因编码的 GA3ox 合成酶在赤霉素的生物合成中起着关键作用, 该基因突变会导致赤霉素合成缺陷, 外施赤霉素可以恢复突变体表型^[37], 为了验证 *D309* 是否为 *Dwarf1* 的等位基因, 本研究试通过施加赤霉素恢复株高表型, 结果显示, *d309*-GA 株高与 B73 相似, 略低于 B73-GA, 但两者之间并不存在显著性差异, 结果表明 *d309* 能对外源赤霉素做出响应(图 7A、B)。此外, 外源赤霉素处理使 *d309* 株高恢复至接近野生型的水平(图 7C)。进一步支持了 *d309* 作为 *Dwarf1* 等位基因的假设。



A: 未经赤霉素处理的 B73 和 *d309*, 标尺=10 cm; B: 外源赤霉素处理后 B73 和 *d309* 突变体对比, 标尺=10 cm; C: B73、*d309* 及赤霉素处理后的 B73、*d309* 株高比较, n=20。

A: B73 and *d309* without gibberellin treatment, Bar=10 cm; B: Comparison of B73 and *d309* mutants after exogenous gibberellin treatment, Bar=10 cm; C: Comparison of plant height between B73, *d309*, B73-GA and *d309*-GA, n=20.

图 7 外源赤霉素田间处理 B73 和 *d309* 突变体

Fig7 Field Treatment with Exogenous Gibberellin in B73 and *d309* Mutant

3. 讨论

株高作为影响作物产量的关键性状, 对作物的生长、光合作用、抗倒伏能力以及农机收割等方面均具有显著影响。合理设计的株型是提升作物产量的有效策略之一。自绿色革命以来矮化突变体的研究与应用显著提高了作物产量。禾本科植物株高通常受到节间数和节间长度共同影响, 如水稻 *htd3* 突变体和玉米 *a2* 突变体均因节间数减少和节间长度缩短导致植株矮化^[38-39]; *Zmte1* 突变体和小麦突变体 *NAUHL67* 则是由茎节严重缩短导致的矮化^[40-41]; 本研究中, 与野生型相比, *d309* 突变体节间数未发生变化, 但各茎节均显著缩短, 细胞长度缩短且细胞面积增大, 表明细胞的纵向发育可能受到了影响。值得注意的是, 与 *Dwarf1* 在水稻中的研究不同, 水稻 *d1* 突变体由于节间的细胞分裂受到抑制, 节间细胞分裂减少造成矮化, 而不是细胞长度缩短^[42], 说明同源基因在不同物种中的作用机制也可能存在差异。

目前已发现的矮化突变体多数与激素合成和转运相关^[43]。GA3ox 是赤霉素合成后期的关键酶, 催化合成赤霉素活性分子。在拟南芥中, *ga4-1* 突变体由于赤霉素合成、运输和传导受到影响, 导致茎尖细胞发育延迟, 茎尖长度缩短^[44]。此外, 相较于野生型, *d309* 突变体的叶片展现出更深的绿色, 这表明其叶绿素含量较高, 有利于提升植株的光合作用效率, 这一发现与之前的研究结果相吻合^[37]。目前, 玉米中鉴定到的矮秆基因多为极端矮化, 对产量造成的负面影响较大。已存在的文献中提到的矮化突变体 *d11*, 除了降低

株高之外，还会引起籽粒的畸形或减小籽粒大小^[21]。与此相反，*d309* 突变体的籽粒形态保持与 *B73* 相似，且其百粒重仅下降了 25%，这为其在作物改良和育种中的潜在应用提供了希望。玉米的株高与产量之间存在正相关关系，单一的矮秆基因突变可能导致产量下降，因此直接应用矮化突变体相对困难。为了培育出既矮秆又高产的玉米品种，为了培育出既矮秆又高产的玉米品种，可以关注多个群体中共同定位的主要 QTL 位点，或者通过基因聚合技术同时改善开花时间、抗逆境能力、产量和品质等综合性状。这种育种方法有助于将矮化突变体运用到生产实践中，开发出具有优良性状的矮秆玉米品种。

随着高通量测序技术的进步，大量的分子标记得以开发，同时也伴随着玉米基因数据量不断增加^[45]。本文利用分子标记构建了一个玉米矮化突变体的遗传连锁图谱，结合转录组数据和分子标记将突变位点定位在 3 号染色体上，通过精细定位将突变位点确定在 5-4 和 5-7 这两对分子标记之间，通过测序发现 *Zm00001d039634* 第三个外显子上有一个 C 到 T 单碱基突变，研究发现 *d309* 与已报道的 *Dwarf1* 等位突变体 *gad39*、*d1-6016*、*d1-4*、*d1-6039* 和 *d1-3286* 的突变方式不同，我们推测 *d309* 可能是一个新的 *Dwarf1* 等位突变体。通过对蛋白结构域分析及预测，发现该突变位点在 OG-FeII/Oxy 结构域内。脯氨酸和亮氨酸在侧链结构上存在差异，前者具有芳香环结构，而后者是一种支链烷基氨基酸，氨基酸的替换可能导致局部结构变化，进而对蛋白质的整体结构产生影响。研究 GA3ox 在玉米内源 GA 合成过程中的作用，研究 GA3ox 在玉米内源赤霉素合成过程中的作用，将有助于深化我们对各种活性 GA 的生理功能的理解。

4. 结论

我们在玉米 *B73* 的诱变材料中鉴定出一个表现为节间缩短和叶片浓绿的矮化突变体 *d309*，利用 BSR-Seq 技术，我们将 *D309* 初定位于第 3 号染色体的 3.47-17.47 Mb 区域。经过精细定位，我们发现 *D309* 基因第三个外显子 1569 位碱基由胞嘧啶替换为胸腺嘧啶，这一变化导致编码的氨基酸序列中脯氨酸被亮氨酸所替代。基于这些发现，我们推测 *d309* 可能是一个新的 *Dwarf1* 等位突变体，为 *Dwarf1* 基因功能的深入研究提供了宝贵的遗传材料。

参考文献

- [1] Conway G, Toenniessen G. Feeding the world in the twenty-first century. *Nature*.1999, 402:C55–C58.
- [2] Sher A, Khan A, Cai L J, Ahmad, M I, Asharf U, Jamoro S A. Response of maize grown under high plant density: performance, issues and management-a critical review[J]. *Adv.Crop Sci. Technol*, 2017, 5(3): 1-8.
- [3] Ku L X, Zhang L K, Tian Z Q, Guo S L, Su H H, Ren Z Z, Wang Z Y, Li G H, Wang X B, Zhu Y G, Zhou J L, Chen Y H. Dissection of the genetic architecture underlying the plant density response by mapping plant height-related traits in maize (*Zea mays* L.). *Mol Genet Genomics*. 2015 Aug; 290(4):1223-33.
- [4] Wu L, Zhang D F, Xue M, Qian J J, He Y, Wang S C. Overexpression of the maize GRF10, an endogenous truncated growth-regulating factor protein,

leads to reduction in leaf size and plant height. *J Integr Plant Biol.* 2014 Nov;56(11):1053-63.

- [5] 虞慧芳, 曹家树, 王永勤. 植物矮化突变体的激素调控[J]. 生命科学, 2002, 14(2): 85-88.
- Yu H F, Cao J S, Wang Q Y. Hormones regulation in plant dwarfing mutants [J]. *Life Science*, 2002, 14(2): 85-88.
- [6] 白丽君,尹淑霞.植物矮化突变体的来源及矮化机理研究进展[J].生物技术通报, 2014,(6):34-39.
- Bai L J, Yin S X. Progress on Origins and Mechanism of Dwarfish Plants Mutant [J].*Biotechnology Bulletin*, 2014, (6) : 34-39.
- [7] 王天依,王荣焕,王夏青,张如养,徐瑞斌,焦炎炎,孙轩,王继东,宋伟,赵久然.玉米矮秆基因与矮秆育种研究[J].生物技术通报,2023,39(8):43-51.
- Wang T Y, Wang R H, Wang X Q, Zhang R Y, Xu R B, Jiao Y Y, Sun X, Wang J D Song W, Zhao J R, Research in Maize Dwarf Genes and Dwarf Breeding [J]. *Biotechnology Bulletin*, 2023,39 (8) : 43-51.
- [8] Avila LM, Cerrudo D, Swanton C, Lukens L. Brevis plant1, a putative inositol polyphosphate 5-phosphatase, is required for internode elongation in maize. *J Exp Bot.* 2016 Mar; 67(5):1577-88.
- [9] Phillips K A, Skirpan A L, Liu X, Christensen A, Slewinski T L, Hudson C, Barazesh S, Cohen JD, Malcomber S, McSteen P. vanishing tassel2 encodes a grass-specific tryptophan aminotransferase required for vegetative and reproductive development in maize. *Plant Cell.* 2011 Feb; 23(2):550-66.
- [10] Multani DS, Briggs SP, Chamberlin MA, Blakeslee JJ, Murphy AS, Johal GS. Loss of an MDR transporter in compact stalks of maize *br2* and sorghum *dw3* mutants. *Science.* 2003 Oct 3; 302 (5642) :81-4.
- [11] Li Z X, Zhang X R, Zhao Y J, Li Y J, Zhang G F, Peng Z H, Zhang J Z. Enhancing auxin accumulation in maize root tips improves root growth and dwarfs plant height [J]. *Plant Biotechnol J*, 2018, 16(1): 86-99.
- [12] Wang C, Zhang H, Xia Q, Yu J, Zhu D, Zhao Q. *ZmGLR*, a cell membrane localized microtubule-associated protein, mediated leaf morphogenesis in maize. *Plant Sci.* 2019 Dec;289:110248.
- [13] Makarevitch I, Thompson A, Muehlbauer G J, Springer N M. *Brd1* gene in maize encodes a brassinosteroid C-6 oxidase[J]. *PLoS One*, 2012, 7(1): e30798.
- [14] Kir G, Ye H X, Nelissen H, Neelakandan A K, Luo A, Inz D, Sylvester A W, Yin Y H1, Becraft P W. RNA interference knockdown of BRASSINOSTEROID INSENSITIVE1 in maize reveals novel functions for brassinosteroid signaling in controlling plant architecture[J]. *Plant Physiol*, 2015, 169(1): 826-839.
- [15] Hartwig T, Chuck G S, Fujioka S, Klempien A, Weizbauer R, Potluri D P, Choe S, Johal G S, Schulz B. Brassinosteroid control of sex determination in maize [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2011, 108(49): 19814-19819.
- [16] Dt NB, Hartwig T, Budka J, Shozo Fujioka s, Johal G, Schulz B, Dilkes B P. Nana plant2 encodes a maize ortholog of the Arabidopsis brassinosteroid biosynthesis gene *DWARF1*, identifying developmental interactions between brassinosteroids and gibberellins [J]. *Plant Physiol*, 2016, 171(4): 2633-2647.
- [17] Vu GT, Wicker T, Buchmann JP, Chandler PM, Matsumoto T, Graner A, Stein N. Fine mapping and syntenic integration of the semi-dwarfing gene *sdw3* of barley. *FunctIntegr Genomics.* 2010 Nov;10(4):509-21.
- [18] Li H C, Wang L J, Liu M S, Dong Z P, Li Q F, Fei S L, Xiang H T, Liu B S, Jin W W. Maize plant architecture is regulated by the ethylene biosynthetic gene *ZmACS7* [J]. *Plant Physiol*, 2020, 183(3): 1184-1199.
- [19] Yamaguchi I, Nakajima M, Park SH. Trails to the gibberellin receptor, GIBBERELLIN INSENSITIVE *DWARF1* [J]. *BiosciBiotechnolBiochem*, 2016, 80(6): 1029-1036.
- [20] Bolduc N, Hake S. The maize transcription factor *KNOTTED1* directly regulates the gibberellin catabolism gene *ga2ox1* [J]. *The Plant Cell*, 2009, 21(6): 1647-1658.

- [21] 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 [J]. PLoS One, 2013, 8(6): e66466.
- [22] Lv HK, Zheng J, Wang TY, Fu JJ, Huai JL, Min HW, Zhang X, Tian BH, Shi YS, Wang GY. The maize *d2003*, a novel allele of *VP8*, is required for maize internode elongation. Plant Mol. Biol, 2014, 84: 243-257.
- [23] Lawit S J, Wych H M, Xu D P, Kundu S, Tomes D T. Maize DELLA proteins dwarf plant8 and dwarf plant9 as modulators of plant development [J]. Plant Cell Physiol, 2010, 51(11): 1854-1868.
- [24] Bommert P, Je BI, Goldshmidt A, Jackson D. The maize *Ga* gene COMPACT PLANT2 functions in CLAVATA signalling to control shoot meristem size. Nature. 2013 Oct 24;502(7472):555-8.
- [25] Teng F, Zhai L, Liu R, Bai W, Wang L, Huo D, Tao Y, Zheng Y, Zhang Z. *ZmGA3ox2*, a candidate gene for a major QTL, qPH3.1, for plant height in maize. Plant Journal . 2013 Feb;73(3):405-16.
- [26] Guan J C, Koch K E, Suzuki M, Wu S, Latshaw S, Petruff T, Goulet C, Klee HJ, McCarty DR. Diverse roles of strigolactone signaling in maize architecture and the uncoupling of a branching-specific subnetwork. Plant Physiol, 2012, 160(3): 1303-1317.
- [27] Graebe, J. E. & Ropers, H. J. in Phytohormones and Related Compounds-A Comprehensive Treatise, eds. Letham, D. S., Goodwin, P. B. & Higgins, T. J. V., 1978, Vol. 1, pp. 107-204.
- [28] 李强, 吴建明, 梁和, 黄杏, 丘立杭. 高等植物赤霉素生物合成及其信号转导途径[J]. 生物技术通报, 2014, 0(10): 16-22.
- Li Q, Wu J M, Liang H, Huang X, Qiu L H. Gibberellins Biosynthesis and Signaling Transduction Pathway in Higher Plant[J]. Biotechnology Bulletin, 2014, 0(10): 16-22.
- [29] 郝小花, 胡爽, 赵丹, 等. *OsGA3ox* 通过合成不同活性 GA 调控水稻育性及株高[J]. 遗传, 2023, 45(9): 845-855.
- Hao XH, Hu S, Zhao D, et al. *OsGA3ox* genes regulate rice fertility and plant height by synthesizing diverse active GA. Yi Chuan. 2023 Sep 20;45(9):845-855.
- [30] 殷小林, 张超, 王有成, 等. 水稻赤霉素 3 β 羟化酶基因(*OsGA3ox1*)同源基因的生物信息学分析[J]. 分子植物育种, 2019, 17(4): 1054-1060.
- Yin X L, Zhang C, Wang Y C, et al. Bioinformatics analysis of homologous genes of rice gibberellin 3 β -hydroxylase gene (*OsGA3ox1*) [J]. Molecular plant breeding, 2019, 17 (4) : 1054-1060.
- [31] 李赵博. 大豆 *Gmdwarf1* 的矮化晚花性状基因定位[D]. 黑龙江大学, 2016.
- Li Z B. Gene mapping of dwarfing late flowering trait in soybean *Gmdwarf1* [D]. Heilongjiang : Heilongjiang University, 2016.
- [32] Hu D Z, Li X, Yang Z Y, Liu S L, Hao D R, Chao M N, Zhang J Y, Yang H, Su X Y, Jiang M Y, Lu S Q, Zhang D, Wang L, Kan G Z, Wang H, Cheng H, Wang J, Huang F, Tian Z X, Yu D Y. Downregulation of a gibberellin 3 β -hydroxylase enhances photosynthesis and increases seed yield in soybean. New Phytologist. 2022 Jul;235(2):502-517.
- [33] Martinez S, Hausinger RP. Catalytic Mechanisms of Fe(II)- and 2-Oxoglutarate-dependent Oxygenases. J. Biol. 2015;290:20702–20711.
- [34] Eng JGM, Shahsavarani M, Smith DP, Hájíček J, De Luca V, Qu Y. A *Catharanthus roseus* Fe(II)/ α -ketoglutarate-dependent dioxygenase catalyzes a redox-neutral reaction responsible for vindoline biosynthesis. Nat Commun. 2022 Jun 9;13(1):3335.
- [35] Lv H K. Map-based Cloning and Functional Analysis of the Dwarf Gene *D2003* in Maize [D]. Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2015.
- [36] Liu S Z, YEH CT, TANG H M, NETTLETON D, SCHNABLEPS. Gene mapping via bulked segregant RNA-Seq(BSR-Seq). The Public Library of Science ONE, 2012, 7: e36406.

- [37] Chen Y, Hou M M, Liu L J, Wu S, Shen Y, Ishiyama K, Kobayashi M, McCarty DR, Tan BC. The maize *DWARF1* encodes a gibberellin 3-oxidase and is dual localized to the nucleus and cytosol. *Plant Physiol.* 2014, Dec;166(4):2028-39.
- [38] Zhang B, Tian F, Tan L, Xie D, Sun C. Characterization of a novel high-tillering *dwarf3* mutant in rice. *J Genet Genomics.* 2011 Sep 20;38(9):411-8.
- [39] 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[J].玉米科学, 2019.
Dong C L, Zhai G Q, Zhang Z, Yang R, Zhang M Y, Zhang Y Q, Yang L L, Chang J Z. Phenotypic characterization and transcriptome analysis of maize dwarf mutant A2 [J]. *Maize Science*, 2019.
- [40] Wang F X, Yu Z P, Zhang M L, Wang M L, Lu X D, Liu X, Li Y B, Zhang X S, Tan B C, Li C L, Ding Z-J. *ZmTE1* promotes plant height by regulating intercalary meristem formation and internode cell elongation in maize. *Plant Biotechnol J.* 2022, Mar; 20(3):526-537.
- [41] 卞能飞,温明星,高润红,等.普通小麦望水白矮秆多蘖突变体的鉴定及遗传分析[C]//中国遗传学会第九次全国会员代表大会暨学术研讨会. 2013: 87-87.
Bian N F, Wen M X, Gao R H, et al. Identification and genetic analysis of dwarf and tiller mutant of common wheat Wangshuibai [C] The 9th National Congress and Academic Seminar of Chinese Society of Genetics, 2013: 87-87.
- [42] Yuki Izawa, Yoshiyuki Takayanagi, Noriko Inaba, Yuki Abe, Miho Minami, Yukiko Fujisawa, Hisaharu Kato, Shizuka Ohki, Hidemi Kitano, Yukimoto Iwasaki, Function and Expression Pattern of the α Subunit of the Heterotrimeric G Protein in Rice, *Plant and Cell Physiology*, Volume 51, Issue 2, February 2010, Pages 271–281.
- [43] Wang Y, Li J Molecular basis of plant architecture. *Annu Rev Plant Biol* , 2008, 59:253–279.
- [44] 张冬野,郭蕊,刘唐婧君,王雪,刘林,龙鸿.拟南芥赤霉素突变体 *ga4-1* 和 *gai-1* 营养生长时相转变研究[J].沈阳农业大学学报,2016,47(4):399-405.
Zhang D Y, Guo R, Liutang Q J, Wang X, Liu L, Long H. Vegetative Phase Change of GA-related Mutants *ga4-1* and *gai-1* in Arabidopsis [J]. *Journal of Shenyang Agricultural University*, 2016,47 (4) : 399-405.
- [45] 张小伟,刘江娜,刘伟,张爱萍,白云凤.玉米 CRISPR/Cas 基因编辑研究进展和前景[J/OL].分子植物育种:1-32[2024-03-02].
Zhang X W, Liu J N, Liu W, Zhang A P, Bai Y F. Progress and Prospect of CRISPR/Cas-mediated Genome Editing in Maize. *Molecular Plant Breeding*, 2023,11,17(1-32).