

# 玉米矮化突变体 *d309* 的基因定位与遗传分析

张恩会<sup>1,2</sup>, 李健<sup>2</sup>, 王逸茹<sup>2</sup>, 王小东<sup>2</sup>, 马朋涛<sup>1</sup>, 郑军<sup>2</sup>

(<sup>1</sup>烟台大学生命科学学院, 山东烟台 264005; <sup>2</sup>中国农业科学院作物科学研究所, 北京 100081)

**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。本课题组在 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缩短。通过构建 *d309* 与 PH6WC 的 F<sub>2</sub> 分离群体, 并运用 BSR-seq 技术, 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 1 个开放阅读框 (*Zm00001d039634*), 编码赤霉素 3-氧化酶 (GA3ox, gibberellin 3-oxidases), 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。通过外源施加赤霉素, *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<sup>1,2</sup>, LI Jian<sup>2</sup>, WANG Yiru<sup>2</sup>, WANG Xiaodong<sup>2</sup>, MA Pengtao<sup>1</sup>, ZHENG Jun<sup>2</sup>

(<sup>1</sup>College of Life Sciences, Yantai University, Yantai 264005, Shandong; <sup>2</sup>Institute of Crop Sciences, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081)

**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, which was stably inherited through continuous selfing. Genetic analysis revealed that the phenotype of the *d309* mutant is controlled by a single recessive gene. 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 F<sub>2</sub> population from the cross of *d309* and PH6WC and employing BSR-seq technology, the mutation site was mapped to an interval of 3.47-17.47 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 (*Zm00001d039634*) encoding gibberellin 3-oxidases (GA3ox), 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. The dwarf phenotype of the *d309* mutant was observed to be rescued upon exogenous application of gibberellins, thereby confirming *d309* as a gibberellin biosynthesis-deficient mutant.

收稿日期: 2024-03-12 网络出版日期: 2024-08-12

URL: <https://doi.org/10.13430/j.cnki.jpgr.20240312004>

第一作者研究方向为玉米矮秆基因定位, 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 (2023YFD1200500)

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

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.

**Key words:** maize plant height; dwarf mutant; map cloning; gibberellin synthesis

自绿色革命以来,高产、半矮秆品种已广泛应用于小麦、水稻、玉米等作物,使得粮食产量迅速增加,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<sup>[1]</sup>。玉米产量的提高与植株高度、种植密度、叶面积指数、光合作用等密切相关<sup>[2]</sup>。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<sup>[3]</sup>。

玉米株高受到多种因素影响,包括遗传背景、气候条件、水分和养分供给、植株密度及田间管理等。茎节长度、节间数以及细胞形态异常均会影响玉米株高<sup>[4]</sup>。植物激素如赤霉素(GA, gibberellin)、油菜素内酯(BR, brassinolide)、生长素(IAA, indole acetic acid)等对株高具有显著调控作用<sup>[5]</sup>。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<sup>[6]</sup>。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<sup>[7]</sup>,与玉米矮秆相关的基因主要有生长素(*Bv1*、*Vt2*、*BR2*、*ZmPIN1a*、*ZmGLR*)<sup>[8-12]</sup>、油菜素内酯(*Brd1*、*BR11a*、*Na1*、*Na2*)<sup>[13-16]</sup>、乙烯(*Sdw3*/*ZmACS7*)<sup>[17-18]</sup>、赤霉素(*GID1*、*Kn1*、*D11*、*D2003*、*D8*、*D9*、*Ct2*、*ZmGA3ox2*)<sup>[19-25]</sup>和独脚金内酯(*ZmCCD8*)<sup>[26]</sup>等。其中赤霉素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<sup>[27]</sup>,其生物合成途径在多种作物中已得到阐明,涉及赤霉素合成酶(CPS, copalyl diphosphate synthase)、赤霉醇酸合成酶(KS, kaurene synthase)、赤霉酮酸合成酶(KO, kaurene oxidase)、赤霉醇脱氢酶(GA20-oxidase, gibberellin 20-oxidase)和赤霉素3-氧化酶(GA3ox, gibberellin 3-oxidase)等多种酶催化<sup>[28-29]</sup>。GA3ox作为多种活性赤霉素合成的关键限速酶,其编码蛋白含有2OG-FeII<sub>2</sub>Oxy和DIOXN两个保守结构域<sup>[30]</sup>。CRISPR/Cas9技术用于编辑*Osga3ox2*基因,产生的突变体表现出显著降低株高,证实了GA20至GA1的转化在调节水稻高度中的作用<sup>[29]</sup>。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<sup>[31]</sup>。*Gmga3ox1*突变体赤霉素生物合成减少,光合作用增强<sup>[32]</sup>。Fe(II)2OGD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<sup>[33-34]</sup>。Fe(II)2OGD结构发生改变会限制赤霉素合成的速率,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候选基因,有助于进一步解析候选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。本研究报道了一个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,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。本研究结果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 试验材料

*d309*是本课题组前期从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。本研究以矮化突变体*d309*和玉米自交系PH6WC作为亲本杂交产生F<sub>1</sub>种子,经自交后产生F<sub>2</sub>群体。F<sub>2</sub>群体于2022年夏季种植在北京顺义中国农业科学院作物科学研究所试验基地,共计480行,行长5 m,行距0.6 m,株距25 cm,与亲本、F<sub>1</sub>材料种植方法一致。种植4周后调查表型,并统计F<sub>2</sub>群体中正常表型植株与矮化表型的分离比,选取10个F<sub>1</sub>单穗种植后获得的相应F<sub>2</sub>穗行进行卡方测验。待野生型和突变体植株生长至成熟期,使用塔尺进行株高和节间距测量,记录数据并分析。

### 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(50%乙醇89 mL、甘油1 mL、冰醋酸5 mL、福尔马林5 mL混合而成)中,避光4℃固定。用3%的琼脂糖包埋后,用震荡切片机(LeicaVT1000s)切成45 μm左右薄片,0.05%甲苯胺蓝染色15 s,超纯水清洗,使用LEICA DM4 B光学显微镜观察细胞形态并拍照。细胞面积计算:计算0.28 mm<sup>2</sup>面积内的细胞数目,

用面积除以细胞数目获得单个细胞面积(不计算维管束),3次重复。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<sup>[35]</sup>。

### 1.3 BSR-seq 初定位

在玉米拔节期,对  $F_2$  分离群体中正常植株和矮化植株进行株高调查与鉴定,提取叶片总 RNA(天根生化科技公司 RNA 快速提取试剂盒)后,分别构建正常植株和矮化植株混合样本库,每个混池中各 30 个样本,用于进行转录组测序。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<sup>[36]</sup>。使用经验贝叶斯方法估计连锁概率,根据每个 SNP 在参考基因组中

的物理坐标绘制其连锁概率图。

### 1.4 *d309* 图位克隆及区间内候选基因分析

PH6WC×*d309*  $F_2$  分离群体中鉴定到 1347 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,程序与体系参照对应说明书。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。通过聚丙烯酰胺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(表 1)。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。

表 1 本研究所用的引物

Table 1 Primers used in this study

引物 Primer	正向序列 (5'-3') Forward sequence (5'-3')	反向序列 (5'-3') Reverse sequence (5'-3')
umc1425	ATAGTCAAGCAGCCAACAAAATCC	CTGTAATCGCTAACGGGGTAACAT
3-14.9	GGACCTCAAACCTGTGCGATAAAT	CATCACCACCTCAGAATGTCAGTG
1-17	CTCAAACAGCCAAGCAAGC	ATCTTCTCTCCGTGCTGTGT
2-3	CACGGGCAAGTTGGAATATGA	TCCGGTACTTCTCATTCTGTT
2-35	AGATAGTGGCGTCATGAACCA	CGTAAAATGGATGTTGGGTTCA
2-44	TGTACGTGCGAGAGAGTGAG	CCGTCTCCTCAACCATCTA
4-4	ATGACCCATGGCTCGCGT	CGGCGATCACATCAACGG
4-18	AAGAGCTACACAACCCGGAA	CGAGTGTTACAAAGTGGAGTGT
634-1	TGGAGAGAACAGGTCGATGG	CCAGTTTCGAGGGTGTGTC
637-1	CTGCTTTACCTGCTTTGCCA	CCAGCTCCCAACTTGCATTA
5-4	CGACGACTACACCAGCTTCT	GACCTGCTGCTGTACCTGTA
5-7	CCGAGATAGAGCAACGCAAC	CTGCCTACCTACCCAGAGTG
411	CACGCCATGACTTCTCTGC	GACCTGCTGCTGTACCTGTA
412	CGACGACTACACCAGCTTCT	TGAGGATGTGGAAGAGGTCG
413	CATGCATCTCAACTGGTGGG	CGGCCCGTCATCTATATCGA
414	AACTAATTCGGTCCGCAGC	TCTCCACTGCTACTACTGC

### 1.5 外源赤霉素处理

分别在大田种植 6 行玉米自交系 B73 和 6 行矮化突变体 *d309*, 进行赤霉素喷洒试验,赤霉素浓度为 50 mg/L,各设置 3 个生物学重复<sup>[35]</sup>。B73 和 *d309* 分别取 30 株,从 6 叶期开始,每间隔 7 d 进行一次赤霉素处理,直至抽雄期,在玉米成熟期调查株高,使用塔尺测量由地面到雄穗顶端的距离,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,正向序列 (5'-3'): TCCCTCCTTCCTTG GTCTCTAG, 反向序列 (5'-3'): ATAGATTACG CACGCTGGGATT, PCR 产物长度 150~300 bp; 内参基因为 GAPDH, 正向序列 (5'-3'): CCCTTC ATCACCACGGACTAC, 反向序列 (5'-3'): AACCTT CTTGGCACCACCCT。分别提取野生型 B73 和突

变体的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,体系和程序均按试剂盒说明书进行操作,采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法分析基因的相对表达量。

### 1.7 蛋白结构域预测

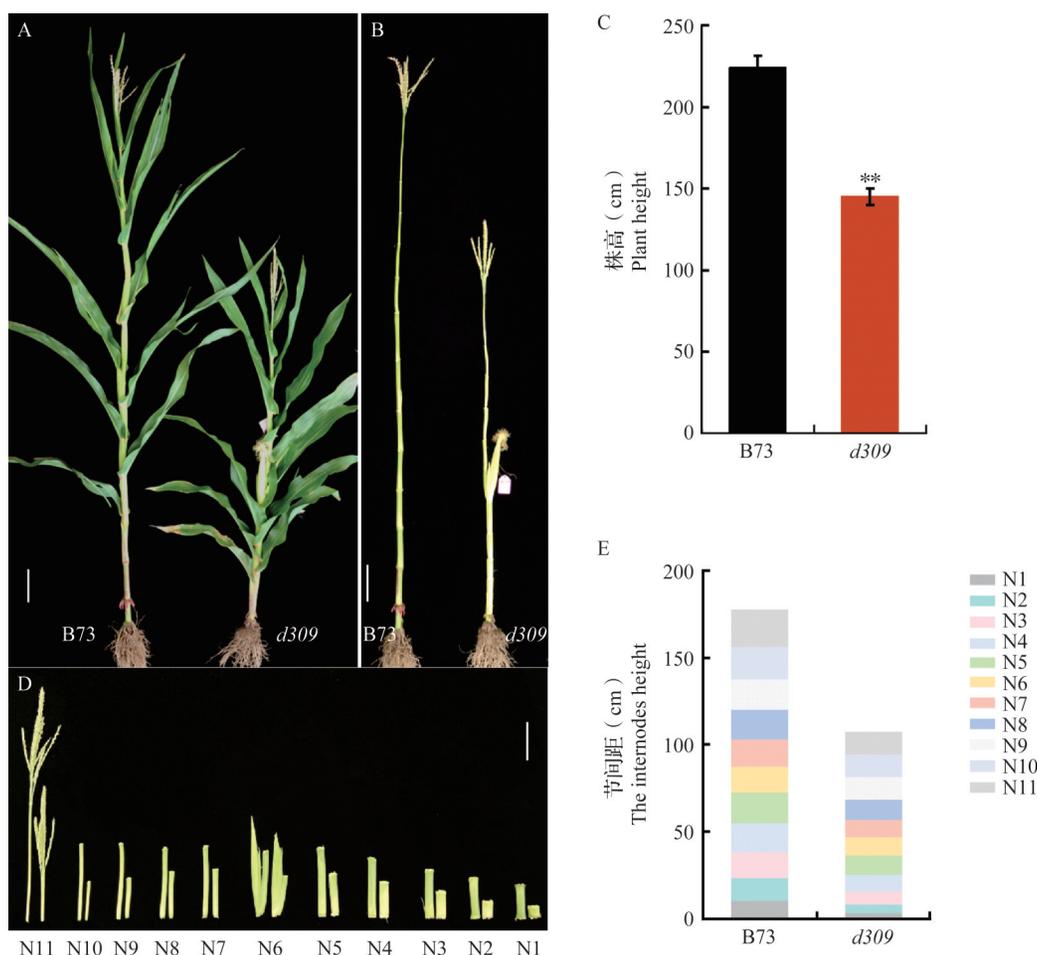
从NCBI(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)数据库下载玉米*Dwarf1*基因在多个物种中的同源氨基酸序列,利用InterPro数据库(<https://www.ebi.ac.uk/interpro/>)对下载的同源序列进行蛋白结构域预测。采用MAGE7工具构建系统发育树,以比较*d309*突变体氨基酸序列与其他作物序列之间的同源性。通过Phyre2平台(<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2>)

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,*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,对B73和*d309*成熟期茎秆的茎节数和各节



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 $P<0.01$ 水平差异显著,下同; D: B73(左)和*d309*(右)不同节间长度比较, N1代表由地面往上第一节间,以此类推,标尺=10 cm; E: B73和*d309*成熟期茎节

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  $P<0.01$ , the same as below; D: The comparison of different internode lengths between B73(left) and *d309*(right), N1 represents the first section from the ground up, and so on, Bar=10 cm; E: Maturity node of B73 and *d309*

图1 B73和突变体*d309*的表型分析

Fig. 1 Phenotype comparison of wild type B73 and mutant *d309*

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,但第一节间~第十一节间各节间长度均明显缩短(图 1D、E)。以上结果指出, *d309* 突变体株高降低是由于节间缩短造成的。

*d309* 与 PH6WC 杂交产生  $F_1$ , 自交后产生  $F_2$  分离群体,约 7600 株,通过统计发现正常植株与矮化植株的比例接近 3:1 (表 2),表明 *d309* 突变体矮化性状受一个隐性单基因控制。

表 2  $F_2$  群体中部分穗行分离比统计表

Table 2 Statistical table of partial spike segregation ratio of  $F_2$  population

穗行编号 Ear rows code	正常表型 Wild type	突变表型 Mutant type	分离比 Segregation ratio	卡方值 Chi-square 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

穗行来源于 *d309* × PH6WC 产生的  $F_1$  单穗

The ear rows 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,选取生长 6 周后的 B73 和矮化突变体 *d309* 的节间进行精确的组织横切和纵切分析。结果如图 2 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(图 2A、B);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  $0.0013 \text{ mm}^2$ 、 $0.0011 \text{ mm}^2$ ,均极显著大于 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,发现 *d309* 突变体的第 5、6 节间的平均细胞长度约为  $30.17 \mu\text{m}$ 、 $33.35 \mu\text{m}$ ,均极显著低于 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。

## 2.3 BSR-Seq 初定位及 *D309* 基因图位克隆

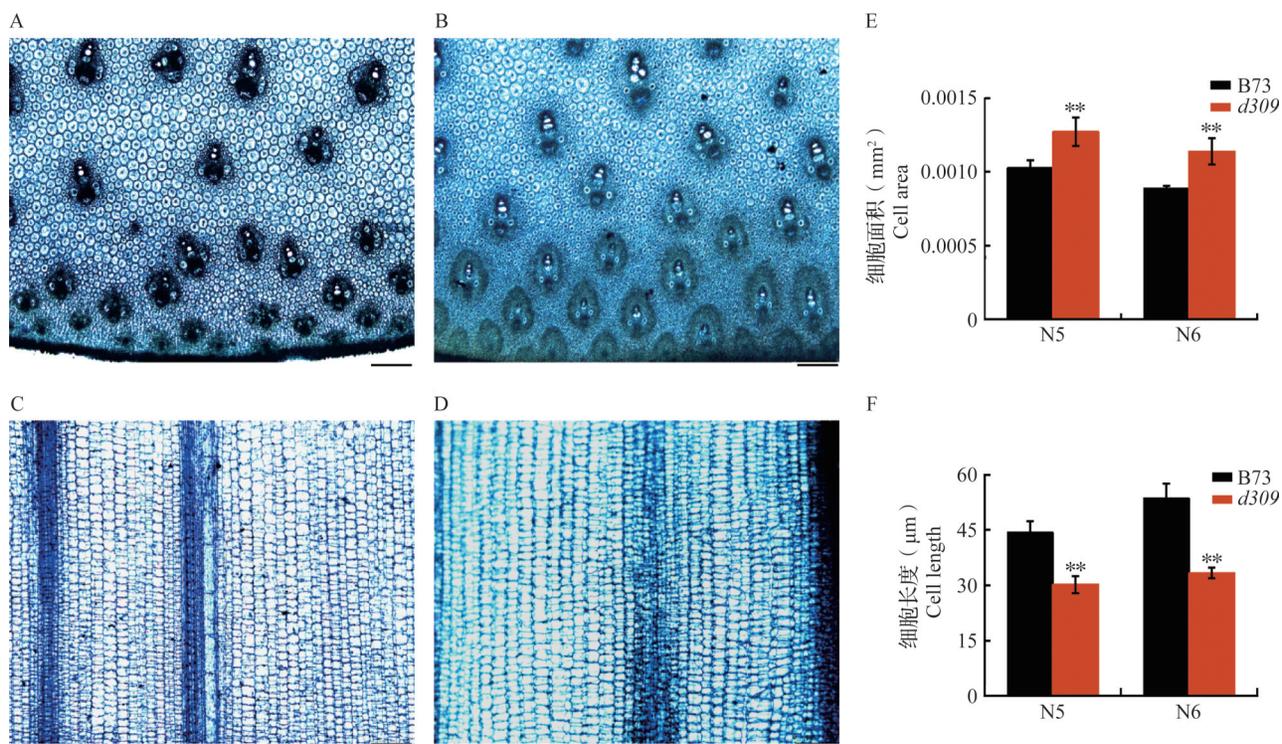
在玉米拔节期,对  $F_2$  分离群体鉴定取样,进行转录

组测序。测序结果经分析后,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 参考基因组第 3 号染色体上 3.47~17.47 Mb ( $P > 0.2$ ) 的位置有一个极显著的单峰,初定位矮化突变体目的基因所在区间为 14 Mb(图 3)。

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 Maize (GDB) 上筛选第 3 号染色体 3.47~17.47 Mb 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,确定了两对可用的 SSR 标记: umc1425 和 3-14.9,两者筛选到的交换单株基本一致,判断为目的基因同一侧标记,其中 3-14.9 标记离目标基因更近。进一步在 3.47 Mb 至 3-14.9 标记区间内设计 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。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 634-1 和 637-1 两对分子标记将区间缩小至 78.8 kb,该区间有 4 个候选基因: *Zm00001d039634*、*Zm00001d039635*、*Zm00001d039636* 和 *Zm00001d039637*。进一步通过 5-4 和 5-7 将候选基因确定为 *Zm00001d039634*(图 4),该基因已被命名为 *Dwarf1*,编码玉米 GA3ox 合成酶,包含有 Fe(II)

2OGD和DIOXN两个保守结构域。通过序列对比发现,*d309*中*Zm00001d039634*基因第3个外显子上有一个C到T的单碱基突变,编码氨基酸由

Pro变为Leu(图5A,B),该位点在Fe(II)2OGD结构域内(图5C)。因此,推测*D309*可能是一个新的*Dwarf1*等位基因。

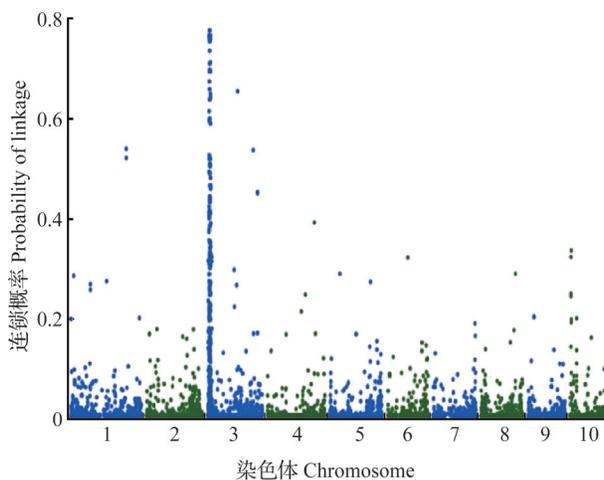


A: B73生长6周后第5节间茎秆横切,标尺=250  $\mu\text{m}$ ; B: *d309*生长6周后第5节间茎秆横切,标尺=250  $\mu\text{m}$ ; C: B73生长6周后第5节间茎秆纵切,标尺=250  $\mu\text{m}$ ; D: *d309*生长6周后第5节间茎秆纵切,标尺=250  $\mu\text{m}$ ; E: B73和*d309*茎秆横切细胞面积比较;  
F: B73和*d309*茎秆纵切细胞长度比较

A: Cross cut the 5th internode stem after 6 weeks of growth of B73, Bar=250  $\mu\text{m}$ ; B: Cross cut the 5th internode stem after 6 weeks of growth of *d309*, Bar=250  $\mu\text{m}$ ; C: longitudinal cutting of the 5th internode stem after 6 weeks of growth of B73, Bar=250  $\mu\text{m}$ ; D: longitudinal cutting of the 5th internode stem after 6 weeks of growth of *d309*, Bar=250  $\mu\text{m}$ ; E: Comparison of cell area of B73 and *d309* of crosscut stem;  
F: Comparison of cell length between B73 and *d309* of longitudinal section

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*



每个SNP的连锁概率根据参考基因组中的物理坐标绘制( $P>0.2$ )

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

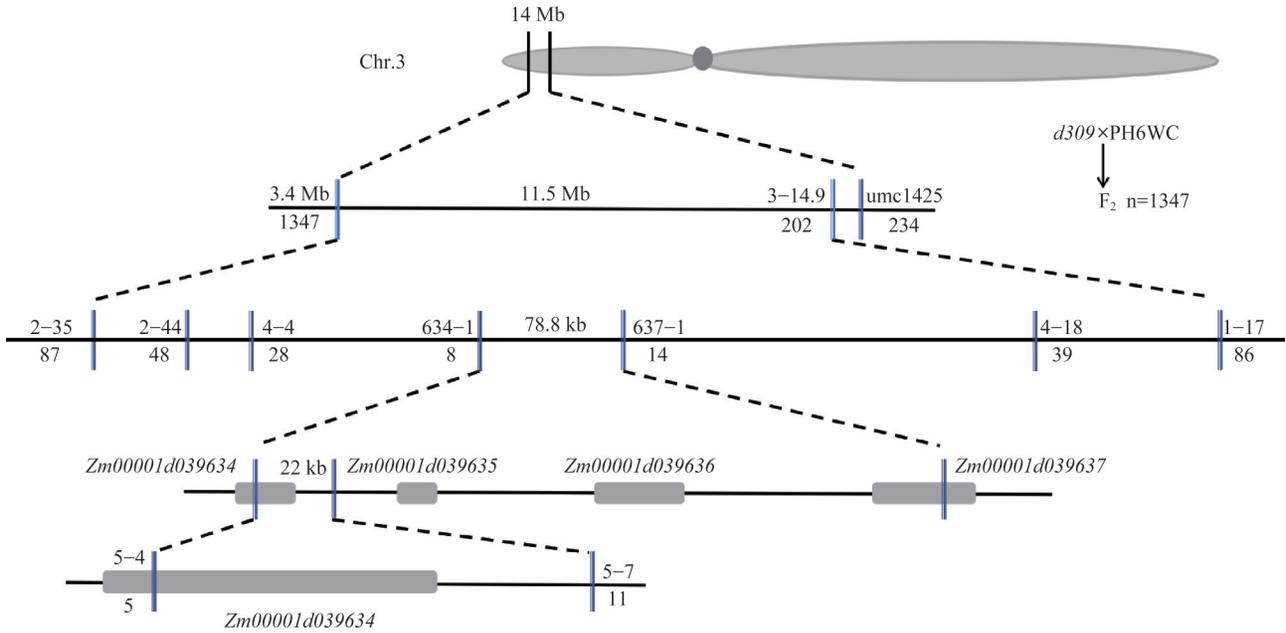
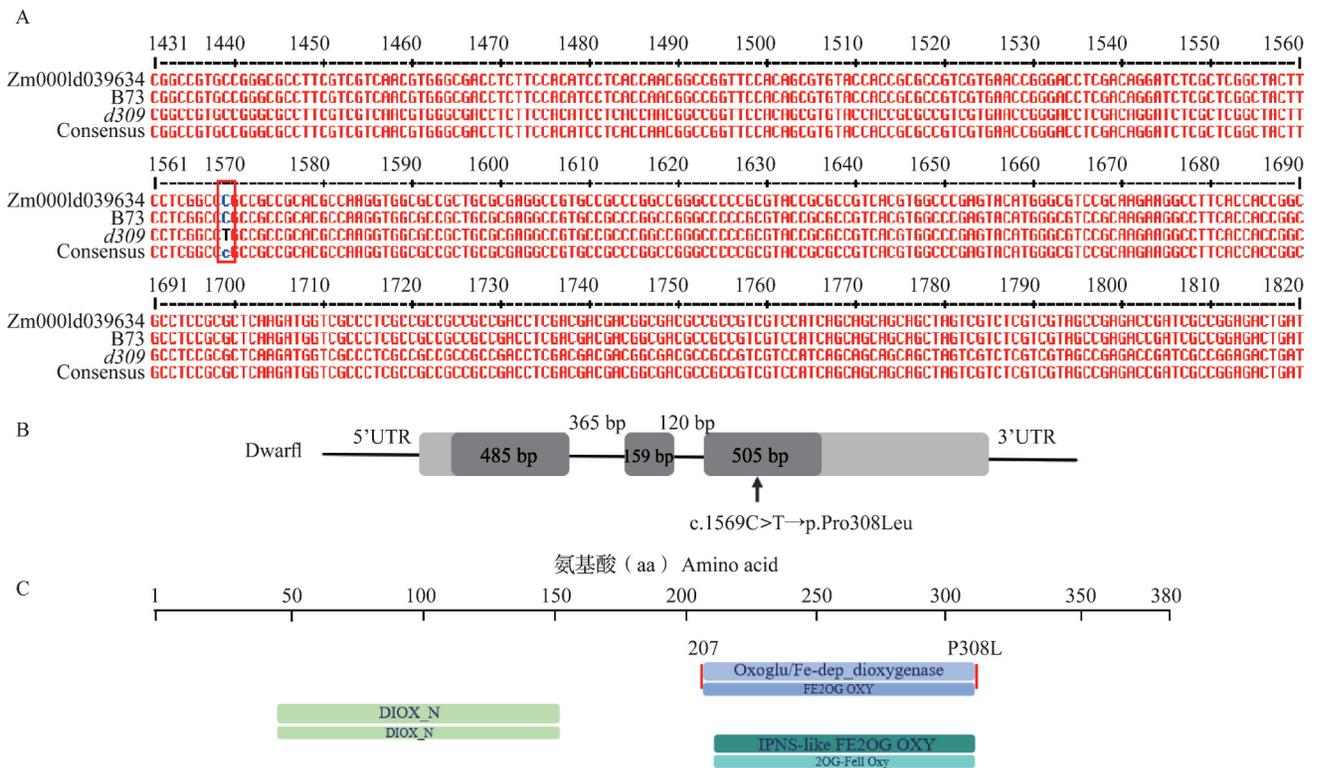


图 4 *d309* 突变体基因在玉米第 3 号染色体上的精细定位  
 Fig. 4 Fine mapping of the *d309* on maize chromosome 3



A: B73 和突变体 *d309* 基因测序结果对比; 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 代表碱基序列的变化, p 是氨基酸序列变化; C: *d309* 突变位点所在的蛋白结构域, 该结构域全长由 308 个氨基酸构成  
 A: Comparison of wild-type 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. The c represents changes in the base sequence, while p represents changes in the amino acid sequence; C: Protein domains where the *d309* mutation site is located. The full length of this domain is composed of 308 amino acids

图 5 *d309* 突变体基因突变位点及其蛋白结构域预测

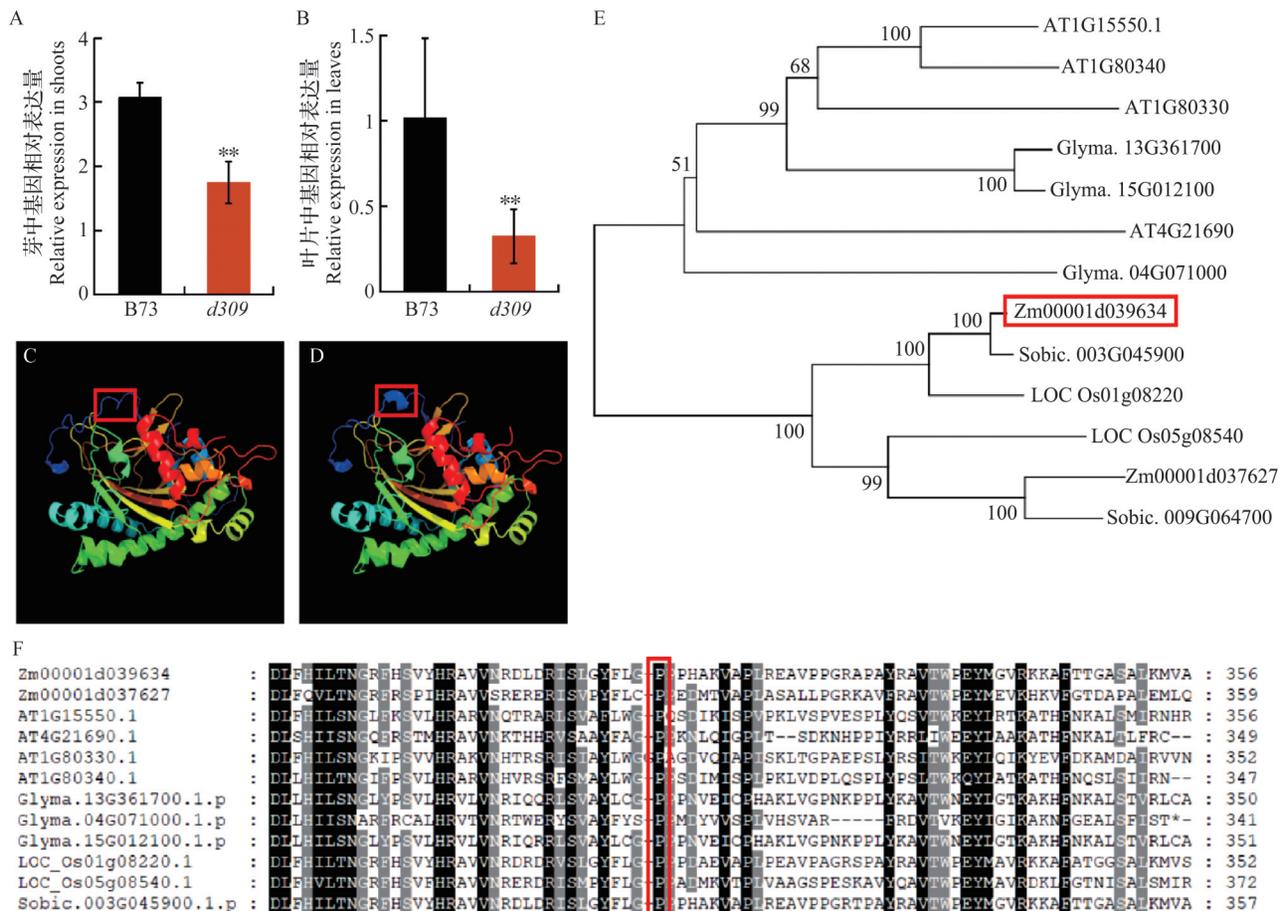
Fig. 5 Prediction of gene mutation sites and protein structural domains of *d309*

## 2.4 *Dwarf1*基因初步功能分析及验证

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 基因平均相对表达量均极显著高于突变体(图 6A、B)。此外,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* 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。

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<sup>[37]</sup>。为了验证 *D309* 是否为 *Dwarf1* 的等位基因,本研究通过施加赤霉素恢复株高表型,结果显示,经过赤霉素处理的矮化突变体 (*d309-GA*) 株高略低于经过赤霉素处理的野生型



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,红框标注的地方为网站预测的突变位点; E: *Dwarf1* 系统发育进化树,红框标注的为目的基因; F: *Dwarf1* 在不同物种中同源氨基酸序列比对,红框标注的氨基酸位点为突变位点

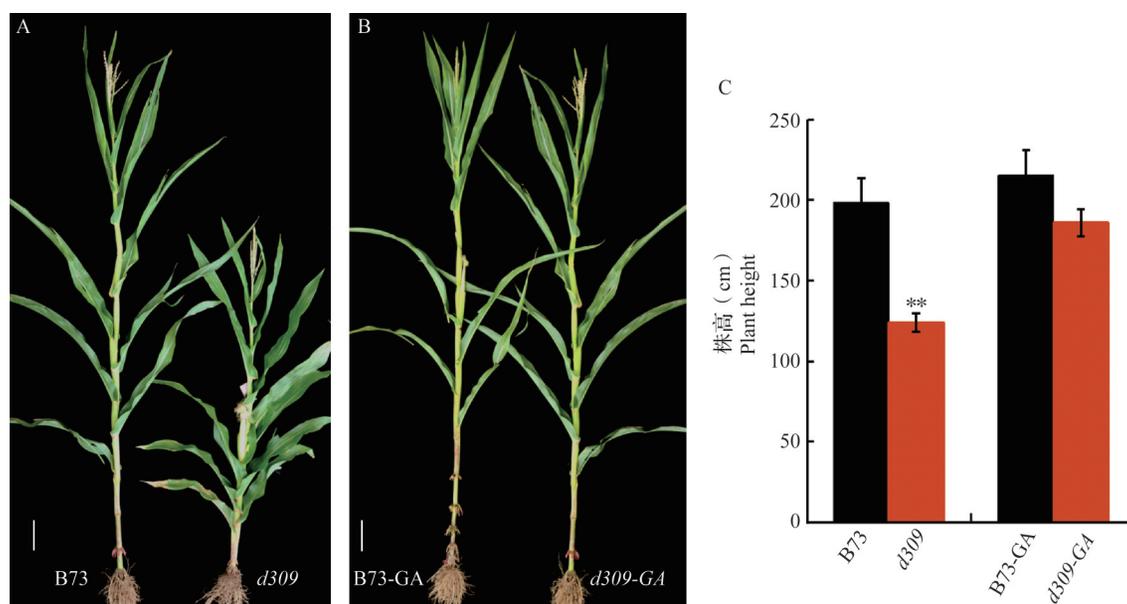
A, B: The relative expression of *Dwarf1* in the buds and leaves of B73 and *d309* mutants; C, D: Three-dimensional model alignment of *Dwarf1* protein in B73 and *d309* mutants, the areas marked with a red box are the predicted mutation sites on the website; E: *Dwarf1* phylogenetic tree, the gene marked with a red box is the target gene; F: *Dwarf1* homologous amino acid sequence alignment in different species, and the amino acid sites marked with red boxes are the mutation sites

图6 基因功能初步验证

Fig. 6 Preliminary verification of gene function

(B73-GA),但两者之间并不存在显著性差异,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(B73-GA) 和 *d309*(*d309*-GA) 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(B73-GA) and *d309* mutants(*d309*-GA) 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

Fig. 7 Exogenous gibberellin treatment in B73 and *d309* mutant in the field

### 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 *hd3* 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<sup>[38-39]</sup>; *Zmte1* 突变体和小麦突变体 *NAUHI67* 则是由茎节严重缩短导致的矮化<sup>[40-41]</sup>。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<sup>[42]</sup>,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<sup>[43]</sup>。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<sup>[44]</sup>。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<sup>[37]</sup>。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<sup>[21]</sup>。与此相反,*d309* 突变体的籽粒形态与 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,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发展,大量分子标记被

开发,同时玉米基因组数据的积累也在不断增长。本研究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第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的单碱基突变,这与已报道的*Dwarf1*等位突变体*gad39*、*d1-6016*、*d1-4*、*d1-6039*和*d1-3286*的突变方式不同,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Fe(II)2OGD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。

#### 4 结论

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,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,发现*D309*基因第3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,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. *Advanced in Crop Science and Technology*, 2017, 5(3): 25997438
- [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.). *Molecular Genetics and Genomics*, 2015, 290(4):1223-1233
- [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. *Journal of Integrative Plant Biology*, 2014, 56(11):1053-1063
- [5] 虞慧芳,曹家树,王永勤.植物矮化突变体的激素调控.生命科学, 2002, 14(2):85-88
- [6] Yu H F, Cao J S, Wang Q Y. Hormones regulation in plant dwarfing mutants. *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.生物技术通报, 2014(6):34-39
- [7] Bai L J, Yin S X. Progress on origins and mechanism of dwarfish plants mutant. *Biotechnology Bulletin*, 2014(6): 34-39
- [7] 王天依,王荣煊,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.生物技术通报, 2023, 39(8):43-51
- [8] Wang T Y, Wang R H, Wang X Q, Zhang Y R, Xu R B, Jiao Y Y, Sun X, Wang J D, Song W, Zhao J R. Research in maize dwarf genes and dwarf breeding. *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. *Journal of Experimental Botany*, 2016, 67(5):1577-1588
- [9] Phillips K A, Skirpan A L, Liu X, Christensen A, Slewinski T L, Hudson C, Barazesh S, Cohen J D, Malcomber S, McSteen P. Vanishing tassel2 encodes a grass-specific tryptophan aminotransferase required for vegetative and reproductive development in maize. *Plant Cell*, 2011, 23(2): 550-566
- [10] Multani D S, Briggs S P, Chamberlin M A, Blakeslee J J, Murphy A S, Johal G S. Loss of an MDR transporter in compact stalks of maize *br2* and sorghum *dw3* mutants. *Science*, 2003, 302(5642): 81-84
- [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. *Plant Biotechnology Journal*, 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 Science*, 2019, 289:110248
- [13] Makarevitch I, Thompson A, Muehlbauer G J, Springer N M. *Brd1* gene in maize encodes a brassinosteroid C-6 oxidase. *PLoS ONE*, 2012, 7(1): e30798
- [14] Kir G, Ye H X, Nelissen H, Neelakandan A K, Luo A, Inzé D, Sylvester A W, Yin Y H, Becraft P W. RNA interference knockdown of BRASSINOSTEROID INSENSITIVE1 in maize reveals novel functions for brassinosteroid signaling in controlling plant architecture. *Plant Physiology*, 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. *Proceedings of the National Academy of Sciences of The United States of America*, 2011, 108(49): 19814-19819
- [16] Dt N B, Hartwig T, Budka J, Shozo F 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. *Plant Physiology*, 2016, 171(4): 2633-2647
- [17] Vu G T, Wicker T, Buchmann J P, Chandler P M, Matsumoto T, Graner A, Stein N. Fine mapping and syntenic integration of the semi-dwarfing gene *sdw3* of barley. *Functional & Integrative Genomics*, 2010, 10(4): 509-521
- [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*. *Plant Physiology*, 2020, 183(3): 1184-1199
- [19] Yamaguchi I, Nakajima M, Park S H. Trails to the gibberellin receptor, GIBBERELLIN INSENSITIVE DWARF1. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 2016, 80(6): 1029-1036
- [20] Bolduc N, Hake S. The maize transcription factor *KNOTTED1* directly regulates the gibberellin catabolism gene *ga2ox1*. *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. *PLoS ONE*, 2013, 8(6): e66466
- [22] Lv H K, Zheng J, Wang T Y, Fu J J, Huai J L, Min H W, Zhang X, Tian B H, Shi Y S, Wang G Y. The maize *d2003*, a novel allele of *VP8*, is required for maize internode elongation. *Plant Molecular Biology*, 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. *Plant and Cell Physiology*, 2010, 51(11): 1854-1868
- [24] Bommert P, Je B I, Goldshmidt A, Jackson D. The maize *Ga* gene *COMPACT PLANT2* functions in CLAVATA signalling to control shoot meristem size. *Nature*, 2013, 502(7472): 555-558
- [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. *The Plant Journal*, 2013, 73(3): 405-416
- [26] Guan J C, Koch K E, Suzuki M, Wu S, Latshaw S, Petrucci T, Goulet C, Klee H J, McCarty D R. Diverse roles of strigolactone signaling in maize architecture and the uncoupling of a branching-specific subnetwork. *Plant Physiology*, 2012, 160(3): 1303-1317
- [27] Graebe J E, Ropers H J, Letham D S, Goodwin P B, Higgins T J V. *Phytohormones and related compounds-A comprehensive treatise*. Amsterdam: Elsevier, 1978: 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. *生物技术通报*, 2014(10): 16-22
- Li Q, Wu J M, Liang H, Huang X, Qiu L H. Gibberellins biosynthesis and signaling transduction pathway in higher plant. *Biotechnology Bulletin*, 2014(10): 16-22
- [29] 郝小花, 胡爽, 赵丹, 田连福, 谢子靖, 吴莎, 胡文俐, 雷晗, 李东屏. *OsGA3ox* 通过合成不同活性 GA 调控水稻育性及株高. *遗传*, 2023, 45(9): 845-855
- Hao X H, Hu S, Zhao D, Tian L F, Xie Z J, Wu S, Hu W L, Lei H, Li D P. *OsGA3ox* genes regulate rice fertility and plant height by synthesizing diverse active GA. *Heredity*, 2023, 45(9): 845-855
- [30] 殷小林, 张超, 王有成, 袁定阳, 谭炎宁, 段美娟. 水稻赤霉素 3 $\beta$ 羟化酶基因 (*OsGA3ox1*) 同源基因的生物信息学分析. *分子植物育种*, 2019, 17(4): 1054-1060
- Yin X L, Zhang C, Wang Y C, Yuan D Y, Tan Y N, Duan M J. Bioinformatics analysis of homologous genes of rice gibberellin 3 $\beta$ -hydroxylase gene (*OsGA3ox1*). *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. 哈尔滨: 黑龙江大学, 2016
- Li Z B. Gene mapping of dwarfing late flowering trait in soybean *Gmdwarf1*. Harbin: 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 $\beta$ -hydroxylase enhances photosynthesis and increases seed yield in soybean. *New Phytologist*, 2022, 235(2): 502-517
- [33] Martinez S, Hausinger R P. Catalytic mechanisms of Fe(II)- and 2-oxoglutarate-dependent oxygenases. *Journal of Biological Chemistry*, 2015, 290: 20702-20711
- [34] Eng J G M, Shahsavarani M, Smith D P, Hájíček J, De Luca V, Qu Y. A catharanthus roseus Fe(II)/ $\alpha$ -ketoglutarate-dependent dioxygenase catalyzes a redox-neutral reaction responsible for vindoline biosynthesis. *Nature Communications*, 2022, 13(1): 3335
- [35] 吕洪坤. 玉米矮化基因 D2003 的图位克隆与功能分析. 北京: 中国农业科学院, 2013
- Lv H K. Map-based cloning and functional analysis of the dwarf gene D2003 in maize. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2013
- [36] Liu S Z, Liu S Z, Yeh C T, Tang H M, Nettleton D, Schnable P S. Gene mapping via bulked segregant RNA-Seq (BSR-Seq). *PLoS ONE*, 2012, 7: e36406
- [37] Chen Y, Hou M M, Liu L J, Wu S, Shen Y, Ishiyama K, Kobayashi M, McCarty D R, Tan B C. The maize *DWARF1* encodes a gibberellin 3-oxidase and is dual localized to the nucleus and cytosol. *Plant Physiology*, 2014, 166(4): 2028-2039
- [38] Zhang B, Tian F, Tan L, Xie D, Sun C. Characterization of a novel high-tillering *dwarf3* mutant in rice. *Journal of Genetics and Genomics*, 2011, 38(9): 411-418
- [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. *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 characterization and transcriptome analysis of maize dwarf mutant *A2*. *Maize Science*, 2019, 27(4): 52-57
- [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. *ZmTEI* promotes plant height by regulating intercalary meristem formation and internode cell elongation in maize. *Journal of Genetics and Genomics*, 2022, 20(3): 526-537
- [41] 卞能飞,温明星,高润红,王海燕,王秀娥. 普通小麦望水白矮秆多蘖突变体的鉴定及遗传分析//中国遗传学会. 中国遗传学会第九次全国会员代表大会暨学术研讨会论文集. 北京: 中国遗传学会, 2013: 87
- Bian N F, Wen M X, Gao R H, Wang H Y, Wang X E. Identification and genetic analysis of a dwarf and tiller mutant in common wheat, Wangshui Bai//Genetics Society of China. The 9th national congress and academic symposium of the genetics society of China. Beijing: Genetics Society of China, 2013: 87
- [42] Izawa Y, Takayanagi Y, Inaba N, Abe Y, Minami M, Fujisawa Y, Kato H, Ohki S, Kitano H, Iwasaki Y. Function and expression pattern of the  $\alpha$  subunit of the heterotrimeric G protein in rice. *Plant and Cell Physiology*, 2010, 51(2): 271-281
- [43] Wang Y, Li J. Molecular basis of plant architecture. *Annual Review of Plant Biology*, 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. *沈阳农业大学学报*, 2016, 47(4): 399-405
- Zhang D Y, Guo R, Liu T Q J, Wang X, Liu L, Long H. Vegetative phase change of GA-related mutants *ga4-1* and *gai-1* in Arabidopsis. *Journal of Shenyang Agricultural University*, 2016, 47(4): 399-405