

任文闯, 王欣, 张亚辉, 等. 玉米籽粒皱缩突变体 *sh2021* 的表型分析和基因定位 [J]. 华南农业大学学报, 2023, 44(5): 750-759.
REN Wenchuang, WANG Xin, ZHANG Yahui, et al. Morphological characterization and genetic mapping of shrunken endosperm mutant *sh2021* in maize [J]. Journal of South China Agricultural University, 2023, 44(5): 750-759.

玉米籽粒皱缩突变体 *sh2021* 的表型分析和基因定位

任文闯[✉], 王欣, 张亚辉, 汤蕴琦, 黄君[✉]
(华南农业大学 农学院, 广东 广州 510642)

摘要:【目的】分析玉米籽粒皱缩突变体的表型特征并进行籽粒相关基因的精细定位, 为揭示该基因调控玉米籽粒发育的分子机制奠定基础。【方法】以玉米自交系‘B73’种植过程中籽粒自发突变个体为材料, 命名为 *shank2021(sh2021)*, 对其形态学和细胞学特征进行观察; 构建分离群体, 通过混合群体分离分析法 (Bulked segregant analysis, BSA) 对基因进行初步定位, 筛选交换单株进一步缩小定位区间, 最后结合转录组测序及基因功能注释推测控制籽粒缺陷性状的候选基因。【结果】与野生型相比, *sh2021* 籽粒凹陷皱缩、颜色加深、籽粒排列不规则, 且百粒质量降低。扫描电镜观察发现, 与野生型相比, *sh2021* 胚乳细胞和淀粉粒均显著变小, 且淀粉粒大小不均匀。遗传分析结果表明, *sh2021* 是由单个隐性基因突变所致。利用 BSA 分析方法将目的基因定位在 3 号染色体末端约 13.25 Mb 区域。进一步扩大分离群体筛选交换单株, 将目的基因定位在标记 ID5 与 ID9 之间的 529.60 kb 范围。通过 *sh2021* 和野生型的转录组测序, 结合基因功能注释结果, 预测 *Zm00001d044119*、*Zm00001d044120*、*Zm00001d044122*、*Zm00001d044129*、*Zm00001d044142* 这 5 个基因可能是影响玉米籽粒发育的重要候选基因。【结论】*sh2021* 的发现与鉴定为进一步深入解析玉米籽粒发育的遗传机制提供了丰富的试验材料, 同时也为后续相关基因的克隆和功能解析奠定了基础。

关键词: 玉米; 籽粒皱缩突变体; 遗传分析; 精细定位

中图分类号: S513

文献标志码: A

文章编号: 1001-411X(2023)05-0750-10

Morphological characterization and genetic mapping of shrunken endosperm mutant *sh2021* in maize

REN Wenchuang[✉], WANG Xin, ZHANG Yahui, TANG Yunqi, HUANG Jun[✉]
(College of Agriculture, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

Abstract: 【Objective】To analyze the phenotypic characteristic of maize shrunk endosperm mutant and fine mapping of related genes, and lay a foundation for further understanding molecular mechanism of maize kernel development. 【Method】The spontaneous shrunken endosperm mutant *shank2021(sh2021)* was isolated from maize inbred line B73. Morphological and cytological characteristics were observed. A segregating population was developed, and the bulked segregant analysis (BSA) was used for preliminary gene mapping. The recombinant plants were screened for further narrowing the mapping interval. Finally the candidate genes controlling grain defect traits were speculated by transcriptome sequencing combined with gene function

收稿日期: 2022-07-22 网络首发时间: 2023-07-10 10:46:56

首发网址: <https://kns.cnki.net/kcms2/detail/44.1110.S.20230707.1707.008.html>

作者简介: 任文闯, 硕士研究生, 主要从事玉米育种研究, E-mail: 172697583@qq.com; 通信作者: 黄君, 副教授, 博士, 主要从事玉米遗传育种研究, E-mail: junhuang@scau.edu.cn

基金项目: 广东省自然科学基金 (2021A1515010552); 广东省重点领域研发计划 (2008B020202013); 国家自然科学基金 (32101706)

annotation analysis. 【Result】 Compared with wild type, *sh2021* displayed sunken and shrunken kernels, darker color, irregular grain arrangement, and lower 100-grain weight. The scanning electron microscope observation revealed that *sh2021* had smaller endosperm cells and starch granules, and the starch granules were varied in size. The genetic analysis results indicated that *sh2021* was caused by a single recessive gene mutation. The BSA indicated that the target gene was located on a 13.25 Mb fragment at the end of chromosome 3. By further expanding the segregating population and screening recombinant plants, the target gene was narrowed down to an interval of 529.60 kb between markers ID5 and ID9. Transcriptome sequencing and gene annotation of *sh2021* and wild type indicated that *Zm00001d044119*, *Zm00001d044120*, *Zm00001d044122*, *Zm00001d044129*, and *Zm00001d044142* might be candidate genes controlling maize kernel development. 【Conclusion】 The identification of *sh2021* provides abundant experimental materials for the study of kernel development, and lays a foundation for further map-based cloning and functional analysis of *sh2021*.

Key words: Maize; Shrunken endosperm mutant; Genetic analysis; Fine mapping

籽粒是玉米储存营养物质的重要器官, 其发育状况与玉米品质和产量密切相关。早在 1980 年, 就有学者利用 EMS 化学诱变对玉米籽粒突变体相关基因进行了研究, 并根据表型将籽粒突变体分成了籽粒不透光、穗发芽、小籽粒、皱缩、空果皮、胚缺陷和胚乳缺陷 7 个类型^[1]。近年来, 随着玉米全基因组测序完成和生物技术的不断发展, 不同类型的玉米籽粒突变体, 包括胚特异突变体、胚乳缺陷突变体、胚和胚乳双缺陷突变体被广泛应用于籽粒发育相关的基因功能研究^[2-9]。

胚特异突变体一般籽粒发育迟缓, 胚的生长受到干扰导致有明显缺陷, 而胚乳发育正常。近年来, 已经筛选出大量的与胚发育相关的 *emb* (Embryo-specific) 突变体, 并证实 *emb* 类突变体相关基因作用于籽粒发育不同阶段^[2]。玉米籽粒胚乳缺陷突变体的典型类型是玉米粉质胚乳突变体, 该突变体会出现不同程度的蛋白体结构或功能缺陷, 表型通常与胚乳内蛋白体或淀粉粒相关^[3]。目前为止, 这类突变体研究较多的是高赖氨酸突变体如 *o2*、*o5* 和 *o7* 等, 高赖氨酸突变体的表达通常与醇溶蛋白的结构、分布和含量密切相关^[4-6]。胚与胚乳发育缺陷突变体按照表型特点主要有 3 种不同类型, 分别是空果皮、胚乳缺陷和小籽粒突变体, 这些突变体相关基因除了 *emp2*、*emp6*、*smk2* 等小部分之外, 大多属于 PRR 基因家族, 主要参与线粒体基因的加工与转录, 包括 RNA 的剪切和编辑, 调控线粒体基因的表达等过程^[7-9]。

虽然玉米籽粒发育相关基因的克隆和分子机理研究已经取得较大的进展, 但由于玉米基因组较大, 转座子原件较多, 相对于拟南芥和水稻而言基因组更加复杂, 仍有大量籽粒突变体基因的功能及

分子机制不清楚。本研究以玉米自发籽粒突变体 *shank2021(sh2021)* 为试验材料, 通过表型鉴定、遗传分析和基因定位等, 为后续该基因的克隆和籽粒发育调控网络的解析奠定基础。

1 材料与方法

1.1 玉米材料

‘B73’ 种植过程中的自发籽粒皱缩突变材料, 命名为 *shank2021(sh2021)*, 以正常玉米自交系 ‘W22’ 为父本与突变体杂交, 通过 F₁ 自交构建 F₂ 分离群体进行后续定位研究。

1.2 籽粒表型观察

观察野生型 (Wild type, WT) 和突变体籽粒的表型, 分析其在籽粒大小、结构、胚和胚乳发育等方面的差异。

1.3 胚质量比及百粒质量的测定

分别取 100 粒野生型和突变体的完熟期籽粒, 室温条件下用水浸泡 36 h 后, 对胚进行剥离, 自然风干至质量不再变化; 分别称量玉米籽粒的胚和非胚部分质量, 计算胚质量比, 重复 3 次, 取平均值。具体计算公式如下:

籽粒总质量 = 胚总质量 + 去胚后余下部分总质量, (1)

胚质量比 = 胚总质量 / 籽粒总质量。 (2)

1.4 籽粒淀粉含量的测定

通过 α -淀粉酶和淀粉葡萄糖苷酶将淀粉水解成 D-葡萄糖, 然后 D-葡萄糖与 GOPOD 试剂缓冲液反应生成昆亚胺染料, 比色法^[10] 测定淀粉含量。

1.5 石蜡切片和扫描电镜观察

将石蜡作为包埋剂, 经过固定、脱水、透明后将材料包埋在石蜡中, 然后利用切片机进行切片。籽

粒经干燥后, 选择有代表性的籽粒, 提取淀粉过 100 目筛, 取约 100 mg 淀粉样品置于载物台上, 压紧, 铺匀, 通过扫描电镜观察。

1.6 定位群体构建与遗传学分析

1.6.1 基因初步定位 选取 F₂ 定位群体中籽粒胚乳缺陷型和正常籽粒单株各 30 株, 每株取幼苗新鲜叶片 0.1 g, 构建 2 个子代 DNA 混合池, 建库进行 30× 基于 Mut Map 的 BSA 测序。将基因组 DNA 随机打断成 DNA 片段, 两端加上 polyA 尾巴和测序接头, 磁珠纯化后扩增建库, 上机进行测序。测序所得的原始数据过滤后进行参考基因组比对、变异检测、标记 SNP 筛选, 最后进行区间定位和候选区域内区间基因及突变注释。

1.6.2 InDel 引物设计及精细定位 根据 BSA 分析所得 InDel 位点设计并合成引物, 筛选出在亲本间具有多态性的引物。在 3 号染色体末端候选区域中, 选取差异较大的 InDel(插入/缺失) 位点, 在变异位点两侧找到合适的位置设计引物, 利用聚丙烯酰胺凝胶电泳筛选出在亲本间具有多态性的可用标记, 引物序列如表 1 所示。在 F₂ 定位群体中选取 384 株隐性植株, 利用多态性 InDel 标记 (ID1~ID4; ID10~ID15; C3-102) 进行基因型鉴定, 筛选交换单株, 确定与目的基因连锁的标记。

1.7 RNA-seq 和基因差异表达分析

取授粉后 16、26 d 的野生型和突变体籽粒, 3 次生物学重复, 送上海凌恩科技有限公司进行转录组测序。利用 FPKM(Fragments per kilo bases per million reads) 衡量每个基因在不同样本中的表达量, 并以 2 倍表达差异 ($|\log_2 \text{Fold-change}| \geq 1$)、 $P < 0.01$ 作为标准, 筛选玉米籽粒在 WT 和 *sh2021* 突变体之间及授粉后 16、26 d 这 2 个时期之间的差异表达基因。

1.8 筛选候选基因及 qRT-PCR 定量验证

利用玉米遗传学和基因组学数据库 MaizeGDB (<https://www.maizegdb.org/>) 和基因本体论 GO 数据库 (<http://www.geneontology.org/>), 查询候选区间中基因的相关信息, 与 Gramene(<http://www.gramene.org/>) 中查询的信息进行比对, 筛选候选基因, 进行功能注释, 分析注释基因的表达特性。借助公共数据库 Uniprot(<https://www.uniprot.org/>) 和 NCBI 中的 CDD (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>)、BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) 公共数据库预测候选基因的保守结构, 寻找在其他物种中的同源或相似基因并分析结果, 筛选候选基因。

表 1 *sh2021* 基因定位引物

Table 1 Primers used for gene mapping of *sh2021*

引物名称	序列(5'→3')
Primer name	Sequence
ID1	F: TACAGCTTGTA AAAAATACAGGGCC R: ATGAGAGTGCATGGTCCGTG
ID2	F: GGCAGCAGGATCAGAAGAGA R: GGAACTTGTTGTGCCAAGG
ID3	F: TCTCGAATCAAGAACCAGCA R: GGAGGGATTGGGTGAAGATT
ID4	F: GTCTACAACCGGCTCCTCAA R: GTGGAAGTGTCTGTCGGTTCT
ID5	F: GCCATCTACAGTGT CAGCCA R: GTCAACGAGATTCTCAGGGC
ID9	F: CTTCCCGTCGAGATCCACG R: GTTGACAGCTTG TGGGGTCT
ID10	F: GCTAGAGATGGCTATTAGGTGCA R: AGCGTGTCTAACCTCACTTATAACA
ID11	F: TAACTGTCTCGCTGGGCTTT R: GGCCTCCGTCCAAATAAA
ID12	F: CCATGAGGAGGCATGTGTGG R: CAGCTGGTTCACGCCACATC
ID13	F: TGCACTTCGAGAGGTTTGTT R: TCATAATAGTCTCGTATCCAGCCT
ID14	F: ACCCAAGGACCCCAAAGAGA R: GCCCTATGCTTGGGGAGTG
ID15	F: GCCTGTCTAGCATATGATGTGAA R: GTCTCATGCCAAACGAGGAT
C3-102	F: CTAGCCAGCCCCATTCTTC R: GCAAGGAGTAGGGAGGACGTG

使用 Primer3Plus(<https://www.primer3plus.com>) 设计 qRT-PCR 引物 (表 2), 以 UBQ7 为内参基因, 使用 2×SYBR premixe Ex Taq II(Takara) 进行 qRT-PCR 检测基因的表达量, 扩增程序为 94 ℃ 30 s; 94 ℃ 5 s, 60 ℃ 30 s, 40 个循环; 增加熔解曲线, 95 ℃ 10 s,

表 2 qRT-PCR 定量验证引物

Table 2 qRT-PCR quantitative verification primers

引物名称	序列(5'→3')
Primer name	Sequence
HX1	F: TTTGAGCGAAACTCCAGTGC R: ATGTTTCATGTGCTGCAGGAC
HX2	F: GAGTCGGAGATCAGCATCGG R: AAAGTGTCTGGCGAAGAACCT
HX3	F: TTGGGAAGACGAAGCCATTG R: AGGTCGGCTTTCCATATGGAC
HX4	F: TCACTGAGCAGCCTTCCAAG R: GACACGTGAGCAGACTCCAA
HX5	F: GCCACGGGATCATGAAGGAG R: TCTCCTCCAACAGACCCTCC

60 °C 5 s, 0.5 °C/s 至 95 °C。本试验有 3 次生物学重复, 每个反应体系配置 3 次技术重复。试验数据采用 $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 法计算基因相对表达量, 用 SPSS 软件分析差异显著性, 并用软件 GraphPadPrism8 绘图。

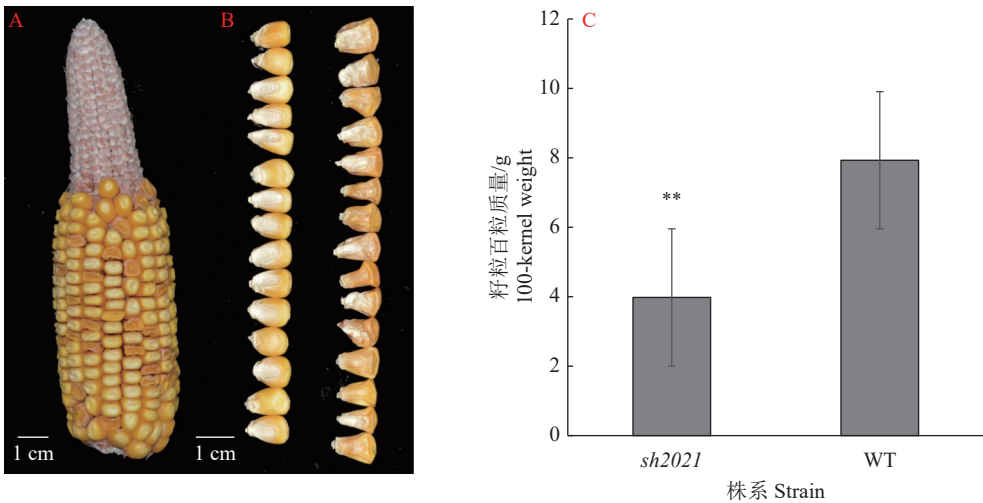
2 结果与分析

2.1 玉米籽粒胚乳突变体的形态学和细胞学分析

将 ‘B73’ 种植过程中的自发突变材料 *sh2021* 与野生型 ‘B73’ 进行杂交, 组配 F₂ 分离群体进行后续相关研究。性状分离果穗表型结果显

示, 与野生型籽粒相比, *sh2021* 籽粒凹陷皱缩、颜色加深、籽粒整体呈现不规则 (图 1A、1B), 突变型籽粒百粒质量比野生型籽粒显著降低 (图 1C)。

成熟期籽粒石蜡切片结果 (图 2) 显示突变体籽粒的胚在籽粒中的占比大于野生型, 基底胚乳转移层无明显差异。对野生型和突变体的籽粒胚质量进行比较发现, 野生型和突变体的胚总质量差异不显著, 野生型籽粒的胚质量比为 9.09%, 而突变体的胚质量比为 14.92%, 表明突变体非胚组织部分在籽粒中所占比例要明显低于野生型材料。



A: 成熟期玉米果穗; B: 籽粒表型; C: 籽粒百粒质量; “**” 表示 *sh201* 与野生型在 0.01 水平差异显著 (*t* 检验)

A: Mature ear; B: Grain phenotype; C: 100-kernel weight; “**” indicate significant difference between wild type and *sh2021* at the 0.01 level (*t* test)

图 1 *sh2021* 突变体表型鉴定 (F₂ 分离群体)

Fig. 1 Phenotypic identification of *sh2021* mutants (F₂ segregating population)

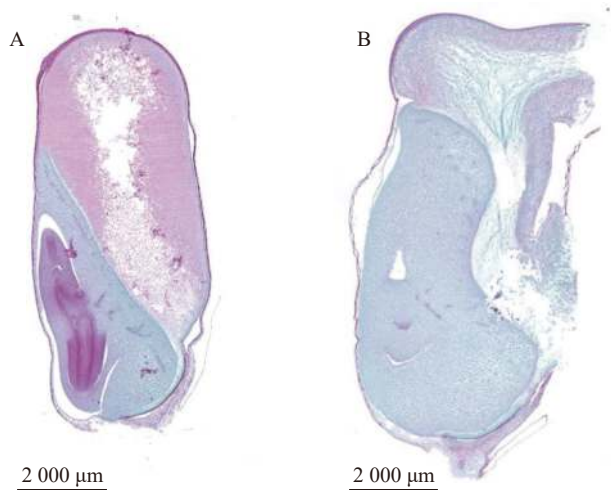


图 2 WT(A) 和 *sh2021*(B) 籽粒的石蜡切片图

Fig. 2 Paraffin sections of mature WT (A) and *sh2021* (B) grains

为明确突变体籽粒胚乳成分的变化, 本研究测定了野生型和 *sh2021* 玉米籽粒淀粉含量, 结果显示野生型籽粒淀粉质量分数为 52.85%, *sh2021* 玉米

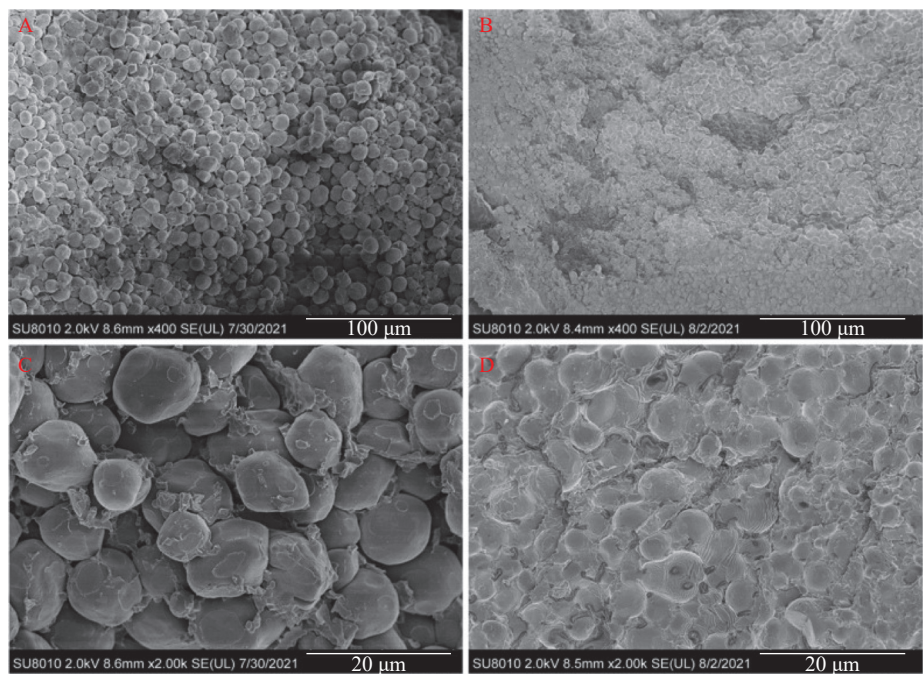
籽粒淀粉质量分数为 14.92%, *sh2021* 籽粒中淀粉质量分数比野生型质量分数减少了 37.93%, 表明突变体籽粒在发育过程中淀粉合成可能受阻。对籽粒进行扫描电镜分析, 发现突变体籽粒的胚乳细胞、淀粉粒比野生型籽粒的小, 且突变体的淀粉粒大小不均匀 (图 3), 说明突变体籽粒淀粉的生物合成存在异常。

2.2 玉米籽粒胚乳突变体的遗传分析

对 F₁、F₂ 代籽粒胚乳发育的分离情况进行调查分析, 结果表明 F₁ 代籽粒胚乳发育正常, F₂ 代籽粒发生性状分离, 在 2 550 粒籽粒中, 正常籽粒数为 1 930, 突变体籽粒数为 620, 正常表型籽粒与突变体表型籽粒比例符合 3:1 的理论分离比, 表明该突变体性状受 1 对隐性等位基因控制。

2.3 玉米籽粒突变体基因的初步定位

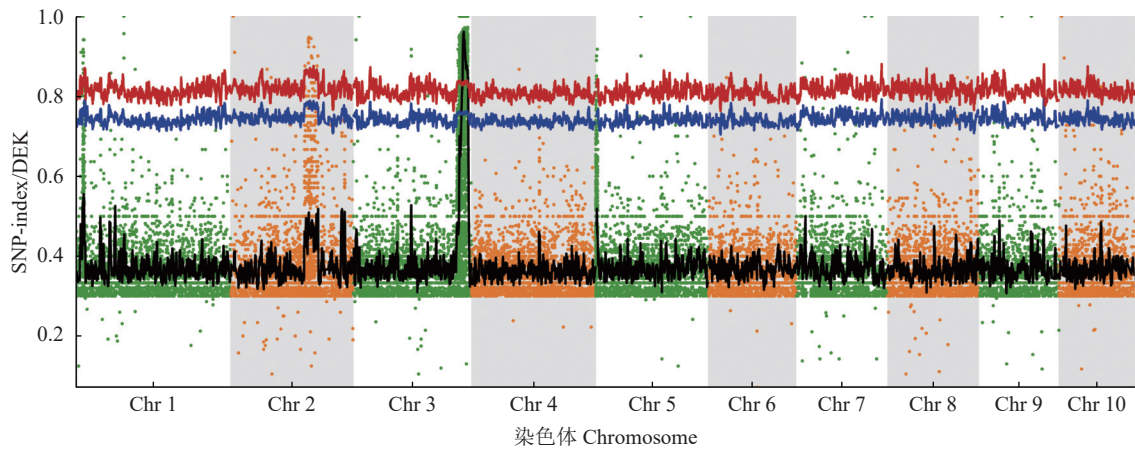
按照滑窗分析方法对获得的 SNP-index 及相关计算结果进行拟合, 以曼哈顿图直观反映 SNP-index 在染色体上的分布情况 (图 4)。结果显示



A、B 分别为 WT、*sh2021* 籽粒胚乳；C、D 分别为 WT、*sh2021* 籽粒淀粉粒
A and B are the endosperms of WT and *sh2021* grains respectively; C and D are starch granules of WT and *sh2021* grains respectively

图 3 野生型与 *sh2021* 籽粒扫描电镜观察

Fig. 3 Scanning electron microscope observation of WT and *sh2021* grains



散点为原始值，黑色曲线为拟合值；蓝色阈值线和红色阈值线分别表示各位点以及窗口的 Δ SNP-index 95% 和 99% 置信区间；横坐标为染色体的分布，每个点代表 Δ SNP-index 值

The scatter points are the original values, and the black curve is the fitted value; Blue threshold line and red threshold line indicate the Δ SNP-index 95% and 99% confidence intervals, respectively; The horizontal coordinate is the distribution of chromosomes, and each dot represents the Δ SNP-index value

图 4 SNP-index 的全基因组分布图

Fig. 4 Genome-wide distribution of SNP-index

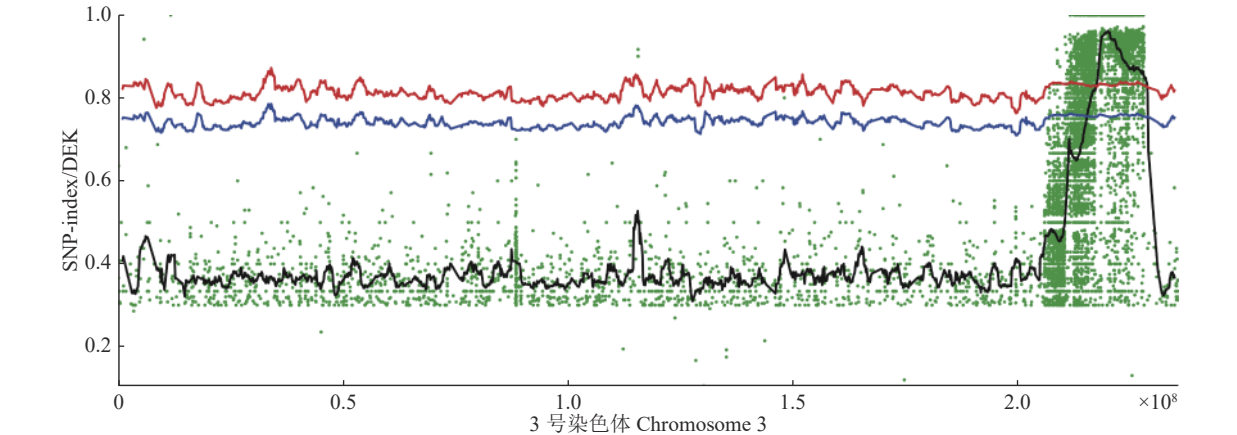
sh2021 基因定位于 3 号染色体末端。进一步对 3 号染色体上 Δ SNP-index 分布图 (图 5) 进行分析，将目的基因初步定位在 3 号染色体末端大小约为 13.25 Mb 的区域。

2.4 玉米籽粒突变体候选基因的精细定位

在 F_2 定位群体中选取 384 株隐性植株，利用多态性 InDel 标记 (ID1~ID4; ID10~ID15; C3-102) 进行基因型鉴定，筛选交换单株，确定与目的基因连锁的 InDel 标记。结果发现，在标记 ID4 和

ID10 处都仅有 1 个交换单株，表明目的基因与这 2 个标记连锁紧密，根据定位结果绘制遗传图谱 (图 6)。

进一步在 ID4 与 ID10 之间 (917.7 kb) 开发标记 ID5、ID9，利用 F_2 群体的 983 株隐性植株进行目的基因精细定位。结果显示在标记 ID5 和 ID9 处各有 17 和 20 个交换单株。将目的基因定位在 ID5 (219 821 271)~ID9(220 350 877) 之间 529.60 kb 范围内 (图 6)，该区间共包含 18 个基因。结合玉米参



散点图为原始值, 黑色曲线为拟合值, 其他横线为指定阈值位置; 横坐标为 3 号染色体的分布, 每个点代表的 Δ SNP-index 值
The scatter plot is the original value, the black curve is the fitted value, and the other horizontal lines are the specified threshold positions; The horizontal coordinate is the distribution of Chr 3, and each dot represents the Δ SNP-index value

图 5 SNP-index 在 3 号染色体上的分布

Fig. 5 Distribution of SNP-index on Chromosome 3

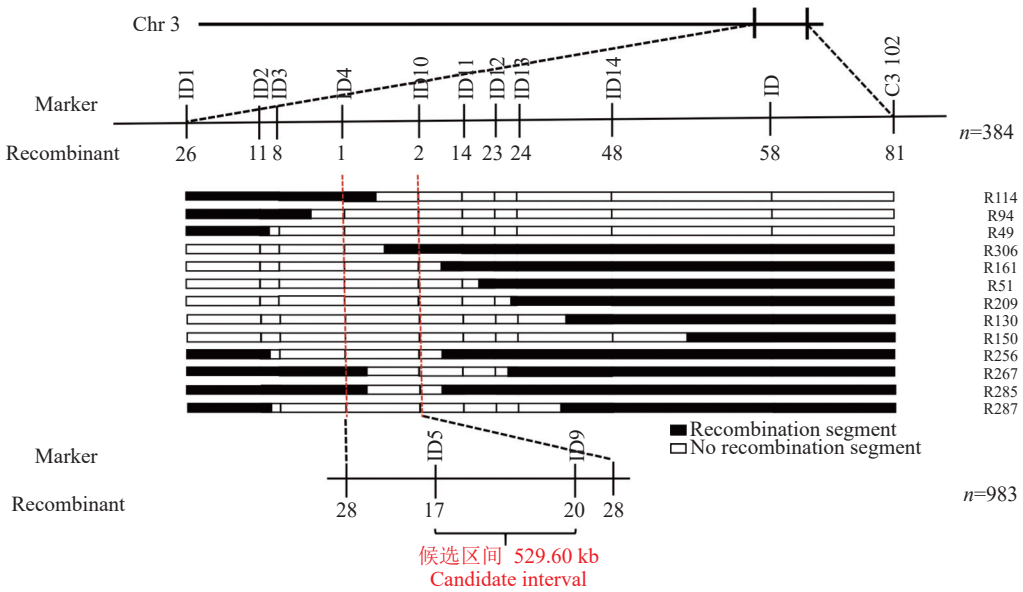


图 6 *sh2021* 基因的精确定位

Fig. 6 Fine mapping of *sh2021* gene

考基因组数据库 (<https://www.maizegdb.org/>) 获取候选基因在不同组织的表达量数据对候选基因进行分析。研究结果发现有 14 个基因在玉米籽粒的胚、胚乳和果皮中均有表达, 另外 4 个基因 (*Zm00001d044135*、*Zm00001d044143*、*Zm00001d044132* 和 *Zm00001d044133*) 在玉米籽粒不同部位的表达量不同 FPKM 均小于 1, 认为基因在玉米籽粒各部位均不表达。

2.5 基因差异表达分析

通过转录组测序检测 WT 和 *sh2021* 在授粉后 16 和 26 d 的差异表达基因。研究结果显示与同时期的 WT 相比, 突变体在授粉后 16 d 的差异表达基因数目是 3 636 个, 其中上调表达的基因是 2 592

个, 下调表达的基因是 1 044 个; 而 *sh2021* 在授粉后 26 d 的差异表达基因是 5 113 个, 上调基因 3 787 个, 下调基因是 1 326 个。授粉后 26 d 的 WT 和 *sh2021* 之间的差异基因明显多于授粉后 16 d, 由此可见, 突变体 *sh2021* 籽粒在发育后期受到的影响更大, 这与籽粒缺陷表型主要在发育后期表现较为一致。从授粉后 16 和 26 d 突变体和野生型的差异表达基因交叉情况, 可以看出, 造成突变体籽粒缺陷的基因可能在籽粒发育后期发挥作用。

2.6 GO 和 KEGG 功能富集分析

为进一步探究玉米缺陷籽粒发育过程的分子调控机制, 本研究对差异表达基因进行 GO 和 KEGG 功能注释及显著性富集分析。

在所有的差异表达基因中，分别有 1362 (授粉后 16 d) 和 1744(授粉后 26 d) 个差异基因能够通过 GO 分析进行功能注释。与同时期的 WT 相比，授粉后 16 和 26 d 的 *sh2021* 分别富集到 45 和 35 条 GO 条目。其中富集最多的是生物学过程类 (Biological process, BP), 其次是分子功能类 (Molecular function, MF), 而细胞组分类 (Cellular component, CC) 只在授粉后 16 d 富集到, 在授粉后 26 d 未富集到。富集程度较高的前 30 个 GO 条目如图 7A、7B 所示，在不同时期的差异基因中，MF 类别主要是以结合和调控活性的基因数目居多，例如调控氧化还原酶的活性，能够参与呼吸过程，直接或间接影响能量产生，进而影响籽粒生长发育及物质积累。在 BP 类别中，基本都是参与细

胞生物合成调控的基因，与基因表达调控相关的基因往往在籽粒的生命活动中扮演着重要角色，可能参与许多功能基因的表达调控过程。在授粉后 16 d 的 CC 类别中主要是以细胞器膜为主，其中包括线粒体膜以及其他细胞器膜，而在授粉后 26 d 的 GO 类别中，不包含 CC，说明籽粒发育后期细胞分化等已经基本完成，主要是大分子生物合成等活动，开始合成积累蛋白质、淀粉、维生素等营养物质，这些差异基因可能影响了包含淀粉在内的生物大分子的合成积累，或者间接影响能够导致籽粒缺陷的其他物质，比如维生素 B6 合成、巯基依赖泛素特异性蛋白酶活性等。

所有的差异表达基因中，有 1405(授粉后 16 d) 和 1554(授粉后 26 d) 个差异基因能够通过 KEGG 进

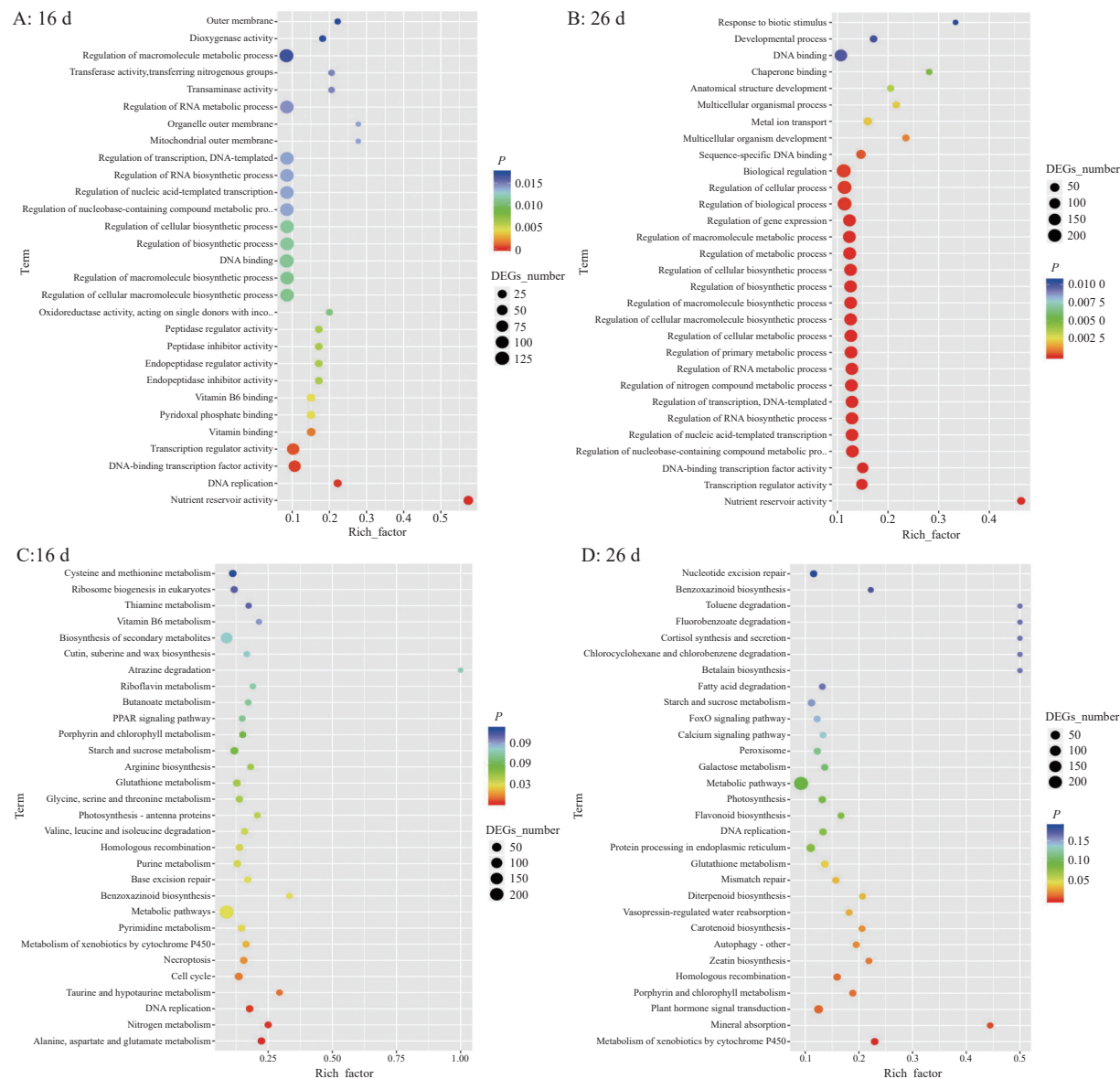


图 7 *sh2021* 和 WT 籽粒在授粉后不同时间的差异表达基因 GO (A、B) 和 KEGG (C、D) 富集分析

Fig. 7 GO(A,B) and KEGG(C,D) enrichment analyses of differentially expressed genes in *sh2021* and WT grains at different time after pollination

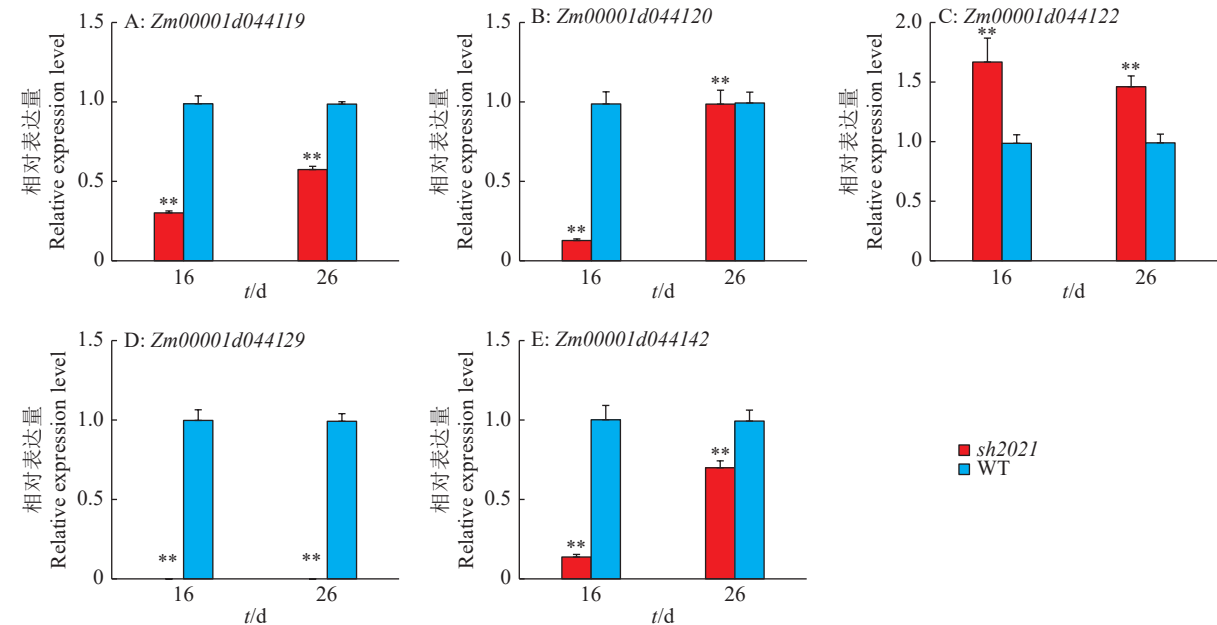
行富集分析, 与同时期的 WT 相比, 授粉后 16 和 26 d 的 *sh2021* 分别富集到 193 和 204 条 KEGG 条目。富集程度较高的前 30 个 KEGG 条目如图 7C、7D 所示, 其中代谢途径、次生代谢物生物合成、抗生素的生物合成在授粉后 16 和 26 d 富集程度都最高, 表明代谢途径在籽粒发育的不同时期保障生命活动正常进行。与转录、翻译、修饰相关的通路在不同时期也有较高富集, 如: 核糖体、内质网中的蛋白质加工、植物激素信号转导、碳代谢、氨基酸的生物合成, 这说明调控突变体缺陷的机制与这些过程都有关联。其他与玉米胚乳发育及淀粉合成相关的途径也有显著富集, 例如淀粉和蔗糖代谢、糖酵解、光合作用、精氨酸和脯氨酸代谢、细胞色素 P450 对外源物质的代谢。

2.7 候选区间内基因差异表达分析及 qRT-PCR 定量验证

结合转录组测序数据, 在 *sh2021* 的定位区间 (Chr3: 219821271~220350877 bp) 进行差异表达基因筛选, 设置 log₂FC(Fold-change) 绝对值大于 2, 即 WT 与突变体之间表达量差异大于 2 倍 ($P<0.05$),

在授粉后 26 d 的 WT 和 *sh2021* 材料中共筛选出 5 个差异表达基因 (*Zm00001d044119*、*Zm00001d044120*、*Zm00001d044122*、*Zm00001d044129* 和 *Zm00001d044142*), 其中只有 4 个差异表达基因 (*Zm00001d044120*、*Zm00001d044122*、*Zm00001d044129* 和 *Zm00001d044142*) 在授粉后 16 d 的转录组数据中被鉴定。说明 *Zm00001d044119* 可能主要在发育靠后的时期发挥作用, 且发挥作用的时期与对候选基因在各个发育时期的表达分析结果保持一致。5 个候选基因中, 除 *Zm00001d044122* 是上调表达外, 其他均是下调表达。

将定位区间与转录组分析的结果进行整合, 共得到 5 个候选基因, 分别对其进行 qRT-PCR 分析。相对表达量验证结果如图 8 所示, 基因 *Zm00001d044119*、*Zm00001d044120*、*Zm00001d044129*、*Zm00001d044142* 较 WT 表达都下调, 而 *Zm00001d044122* 呈上调趋势, 与 RNA-seq 结果完全吻合, 可将这 5 个基因列为 *sh2021* 的候选基因。



“**” 表示 *sh2021* 与 WT 在 0.01 水平差异显著 (t 检验)
“***” indicates significant difference at the level of 0.01 between *sh2021* and WT (t test)

图 8 候选区间内差异表达基因 qRT-PCR 验证

Fig. 8 Validation of differentially expressed genes in candidate intervals by qRT-PCR

3 结论与讨论

本研究发现突变体 *sh2021* 籽粒相较于野生型凹陷皱缩、颜色加深、籽粒整体呈现不规则且淀粉含量低、淀粉粒小而不均匀。不同授粉时期差异表达基因的 GO、KEGG 富集分析表明, 糖酵解、淀

粉-蔗糖合成途径与淀粉合成的关系较为直接。*sh2021* 突变体性状由单隐性基因控制, 目的基因精细定位在标记 ID5 与 ID9 的 529.60 kb 之间。结合转录组分析结果最终预测 *Zm00001d044119*、*Zm00001d044120*、*Zm00001d044122*、

Zm00001d044129、*Zm00001d044142* 这 5 个基因可能是影响玉米籽粒发育的重要候选基因。

突变体 *sh2021* 籽粒成熟时表现为胚乳发育异常，籽粒凹陷皱缩、颜色加深，胚质量增加。在已经报道的籽粒突变体中，*sh2*、*bt1*、*bt2* 等籽粒胚发育正常，胚乳呈现不同程度的皱缩或变小^[11-13]，*sh2021* 突变体籽粒与此表型类似。对突变体成熟籽粒的淀粉含量进行检测，发现其淀粉含量明显降低，胚乳淀粉合成异常。同时 *sh2021* 的淀粉粒变小，这与 *dek101*、*dek48* 相似，但 *dek101*、*dek48* 淀粉粒虽然呈现大小、结构等发育异常，却均具有独立的淀粉粒形态，而本研究中 *sh2021* 突变体的淀粉粒互相黏着，合成受阻^[14-15]。推测淀粉粒结构及大小的异常是导致突变体籽粒胚乳淀粉含量减少、发育缺陷的主要原因。

对突变体 *sh2021* 和 WT 籽粒不同授粉时期的差异表达基因进行 GO、KEGG 富集分析，发现多种生物学过程参与籽粒发育以及淀粉物质合成，其中糖酵解、淀粉-蔗糖合成途径与淀粉合成的关系较为直接，还有许多差异表达基因与能量合成有关。除此之外，一些差异表达基因涉及植物的生长发育调控、激素信号转导、响应生物和非生物胁迫等多个生理过程。筛选的候选基因也有参与到这些途径中，特别是已经报道过的 *Zm00001d044129(sh2)*，主要与显著富集的淀粉-蔗糖代谢，碳水化合物代谢相关，该基因的调控通路再次得到证实。在与玉米籽粒发育缺陷相关的众多途径中，本试验中显著富集到的途径与已发表过的一些调控途径一致，说明这些途径确实与玉米籽粒缺陷息息相关。例如基因 *Dek15* 影响玉米有丝分裂的细胞周期和核内复制，从而影响胚乳细胞的增殖^[16]；*Smk2* 编码参与维生素 B6 从头合成的 PLP 合酶复合物的谷氨酰胺酶亚基，在玉米中维生素 B6 的缺乏对胚乳发育产生较大影响，导致籽粒变小^[9]；*opaque1(o1)* 突变体通过影响内质网形态和运动来影响蛋白质体的生物合成，最终影响胚乳的结构^[17]，*fl2* 与 *fl4* 能导致内质网和蛋白体结构的异常^[18-19]，而 *Mc1* 能引起内质网结合蛋白水平的提高^[20]。由此可见，玉米籽粒缺陷受多方面的协调影响，与之相关的调控网络复杂，值得进一步深入探讨。

根据全基因组重测序和定位结果确定候选区间，结合 RNA-seq 结果，借助公共数据库对区间内基因进行功能和表达量预测，共筛选到 5 个候选基因，包括 *Zm00001d044119*、*Zm00001d044120*、*Zm00001d044122*、*Zm00001d044129*、

Zm00001d044142。其中 *Zm00001d044119* 含有 1 个 CBS 保守结构域，在 Kushwaha 等^[21] 的研究中，CBS 结构域本身没有明确的功能，但对许多酶起调节作用，因此有助于维持细胞内氧化还原平衡。王立成^[22] 对玉米 CBS 家族基因进行了分析，*Zm00001d044119(ZmCBS16)* 也是其中一员，但该研究主要是针对 CBS 家族对干旱的响应作用。我们的研究表明，*ZmCBS16* 基因参与调控 *sh2021* 突变体缺陷籽粒表型，但其如何进行调控待进一步验证。*Zm00001d044120* 所属的 CYP 家族，是植物中最大的酶蛋白家族，具有广泛的催化活性。过往的研究在玉米中发现了参与油菜素内酯合成通路最后一步的 *CYP85A1*，该基因突变使玉米矮化、抗旱性增强；水稻中的 *CYP450* 基因 *DSS1* 突变体植株的粒度显著减小^[23-24]。这些研究为 *Zm00001d044120* 在耐旱和籽粒发育过程中可能发挥的作用提供了一定的参考。*Zm00001d044122* 编码花青素合成的关键酶 DFR，这在不同的植物中都得到了证实，在拟南芥 *tt3-1* 突变体中异源表达红鳞毛蕨中分离出的 *DeDFR2* 导致花青素积累增加；同样，一品红 DFR 在拟南芥中过表达也显著增加了花青素含量，而花青素生物合成途径的基因在玉米籽粒糊粉层中受到调节^[25-27]，那么该基因与玉米籽粒发育之间的调控关系值得进一步研究。*Zm00001d044142* 编码 1 个包含 bHLH_At1BH1_like 保守结构域的未知蛋白，与其相关的有非 DNA 结合 bHLH 转录因子，作为转录阻滞剂，负调控细胞和器官伸长，响应赤霉素和油菜素内酯信号^[28]。刘浩^[29] 在玉米幼胚中筛选出 1 个 bHLH 转录因子 *ABP7*，过表达 *ABP7* 能显著增加穗粗、籽粒大小与粒质量，并推测 *ABP7* 可能通过参与母体组织中细胞壁代谢、糖代谢、营养物质向籽粒转运等过程，促进玉米籽粒的发育。而 *Zm00001d044142* 包含 bHLH_At1BH1_like 结构，可能具有相似的调控作用。*Zm00001d044129(sh2)* 是 1 个功能已知的基因，结合其他 4 个显著定位到的候选基因，推测突变体 *sh2021* 的籽粒缺陷，可能不仅是 *sh2* 单独起调控作用，上调表达基因 *Zm00001d044122* 及其他候选基因都可能在此过程中起到关键调节作用。除 *sh2* 外，其他都鲜见报道，可能是新的玉米籽粒缺陷相关的基因，这在一定程度上丰富了玉米籽粒基因资源，且对后续的育种实践十分有利。

参考文献：

[1] NEUFFER M G, SHERIDAN W F. Defective kernel mutants of maize: I: Genetic and lethality studies[J]. *Ge-*

- netics, 1980, 95(4): 929-944.
- [2] BRUNELLE D C, CLARK J K, SHERIDAN W F. Genetic screening for EMS-induced maize embryo-specific mutants altered in embryo morphogenesis[J]. *G3-Genes Genomics Genetics*, 2017, 7(11): 3559-3570.
- [3] WU Y R, MESSING J. Proteome balancing of the maize seed for higher nutritional value[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2014, 5: 240.
- [4] SCHMIDT R J, BURR F A, AUKERMAN M J, et al. Maize regulatory gene *opaque-2* encodes a protein with a “leucine-zipper” motif that binds to zein DNA[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1990, 87(1): 46-50.
- [5] AZEVEDO R A, LEA P J, DAMERVAL C, et al. Regulation of lysine metabolism and endosperm protein synthesis by the *opaque-5* and *opaque-7* maize mutations[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2004, 52(15): 4865-4871.
- [6] MYERS A M, JAMES M G, LIN Q. Maize *opaque5* encodes monogalactosyldiacylglycerol synthase and specifically affects galactolipids necessary for amyloplast and chloroplast function[J]. *Plant Cell*, 2011, 23(6): 2331-2347.
- [7] FU S N, SCANLON M J. Clonal mosaic analysis of *empty pericarp2* reveals nonredundant functions of the duplicated heat shock factor binding proteins during maize shoot development[J]. *Genetics*, 2004, 167(3): 1381-1394.
- [8] CHETTOOR A M, YI G, GOMEZ E, et al. A putative plant organelle RNA recognition protein gene is essential for maize kernel development[J]. *Journal of Integrative Plant Biology*, 2015, 57(3): 236-246.
- [9] YANG Y Z, DING S, WANG Y, et al. *Small kernel2* encodes a glutaminase in vitamin B₆ biosynthesis essential for maize seed development[J]. *Plant Physiology*, 2017, 174(2): 1127-1138.
- [10] 薛慧, 张国治, 吕飞杰, 等. 抗性淀粉测定方法的研究[J]. *河南工业大学学报(自然科学版)*, 2012, 33(4): 57-60.
- [11] DICKINSON D B, PREISS J. Presence of ADP-glucose pyrophosphorylase in *shrunk-2* and *brittle-2* mutants of maize endosperm[J]. *Plant Physiology*, 1969, 44(7): 1058-1062.
- [12] 周瑞颐, 青芸, 李道杨, 等. 玉米 ZmBT1 研究进展[J]. *分子植物育种*, 2020, 18(20): 6702-6706.
- [13] MAGALIE C, PIERRE C, SYLVIE M, et al. Transcriptional and metabolic adjustments in ADP-glucose pyrophosphorylase-deficient *bt2* maize kernels[J]. *Plant Physiology*, 2008, 146(4): 1553-1570.
- [14] 宋欣冉, 胡书婷, 张凯, 等. 玉米籽粒突变体 *dek101* 的表型分析和精细定位[J]. *作物学报*, 2020, 46(12): 1831-1838.
- [15] 石慧敏, 蒋成功, 王红武, 等. 玉米籽粒突变体 *dek48* 的表型鉴定与基因定位[J]. *作物学报*, 2020, 46(9): 1359-1367.
- [16] HE Y H, WANG J G, QI W W, et al. Maize *Dek15* encodes the cohesin-loading complex subunit SCC4 and is essential for chromosome segregation and kernel development[J]. *The Plant Cell*, 2019, 31(2): 465-485.
- [17] WANG G F, WANG F, WANG G, et al. *Opaque1* encodes a myosin XI motor protein that is required for endoplasmic reticulum motility and protein body formation in maize endosperm[J]. *The Plant Cell*, 2012, 24(8): 3447-3462.
- [18] WANG G, QI W W, WU Q, et al. Identification and characterization of maize *floury4* as a novel semidominant opaque mutant that disrupts protein body assembly[J]. *Plant Physiology*, 2014, 165(2): 582-594.
- [19] GILLIKIN J W, ZHANG F, COLEMAN C E, et al. A defective signal peptide tethers the *floury-2* zein to the endoplasmic reticulum membrane[J]. *Plant Physiology*, 1997, 114(1): 345-352.
- [20] KIM C S, GIBBON B C, GILLIKIN J W, et al. The maize Mucronate mutation is a deletion in the 16-kDa γ -zein gene that induces the unfolded protein response1[J]. *The Plant Journal*, 2006, 48(3): 440-451.
- [21] KUSHWAHA H R, SINGH A K, SOPORY S K, et al. Genome wide expression analysis of CBS domain containing proteins in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh and *Oryza sativa* L. reveals their developmental and stress regulation[J]. *BMC Genomics*, 2009, 10: 200.
- [22] 王立成. 玉米抗早高通量 FOX 文库的构建与验证[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2019.
- [23] 崔会婷, 蒋旭, 张铁军, 等. 植物 CYP450 家族研究进展[J]. *中国草地学报*, 2020, 42(5): 173-180.
- [24] 刘薇, 张彦威, 李伟, 等. 大豆细胞色素 P450 基因 *GmCYP78A69* 的克隆和生物信息学分析[J]. *分子植物育种*, 2020, 18(14): 4523-4531.
- [25] CHEN X, LIU W, HUANG X, et al. Arg-type dihydroflavonol 4-reductase genes from the fern *Dryopteris erythrosora* play important roles in the biosynthesis of anthocyanins[J]. *PLoS One*, 2020, 15(5): e232090. doi: 10.1371/journal.pone.0232090.
- [26] GU Z Y, CHEN H, YANG R N, et al. Identification of DFR as a promoter of anthocyanin accumulation in poinsettia (*Euphorbia pulcherrima*, Willd. ex Klotzsch) bracts under short-day conditions[J]. *Scientia Horticulturae*, 2018, 236: 158-165.
- [27] DEIKMAN J, HAMMER P E. Induction of anthocyanin accumulation by cytokinins in *Arabidopsis thaliana*[J]. *Plant Physiology*, 1995, 108(1): 47-57.
- [28] BAI M Y, FAN M, OH E, et al. A triple helix-loop-helix/basic helix-loop-helix cascade controls cell elongation downstream of multiple hormonal and environmental signaling pathways in *Arabidopsis*[J]. *The Plant Cell*, 2012, 24(12): 4917-4929.
- [29] 刘浩. 转录因子 *ABP7* 在玉米籽粒发育过程中的功能及其分子机理分析[D]. 北京: 中国农业大学, 2017.