

矮秆玉米 d8227 的矮化机理及基因精细定位

唐 兰, 李若楠, 吴元奇

(四川农业大学玉米研究所, 成都 611134)

摘 要: 以本地玉米和野生近缘属矮秆高粱经远缘杂交后再回交得到 1 份新的矮秆材料 d8227 为试验材料, 通过农艺性状调查、茎秆细胞学观察、外源激素处理、内源激素含量测定来阐述 d8227 的矮化机理。在课题组前期初步定位的基础上, 利用图位克隆进行精细定位, 为矮秆基因的克隆和功能验证奠定基础。结果表明, 与野生型相比, d8227 的株高、穗位高降低达极显著水平, d8227 的矮化主要是由穗下节间数目的减少和纵切细胞长度的缩短导致。d8227 对 GA₃、IAA、BR 均不敏感, 其矮化可能是由细胞分裂素信号转导途径异常引起的。通过图位克隆将控制玉米 d8227 的矮秆基因定位于玉米第 1 条染色体标记 InDel9420 和 InDel088 之间, 物理距离约为 377 Kb。对定位区间内 3 个候选基因进行表达分析, 发现只有 *Zm00001d031894* 在 d8227 和野生型幼苗期的相对表达量差异达显著水平, 且该基因在玉米的分生组织中具有很高的表达量, 对茎秆生长具有一定的影响, 因此将 *Zm00001d031894* 确定为关键候选基因。

关键词: 玉米; 矮秆; 矮化机理; 精细定位

中图分类号: S513.035.3

文献标识码: A

Dwarfing Mechanism and Fine Localization of Dwarf Maize d8227

TANG Lan, LI Ruo-nan, WU Yuan-qi

(Maize Research Institute, Sichuan Agricultural University, Chengdu 611134, China)

Abstract: Local maize and wild related dwarf sorghum were distantly hybridized and then backcrossed to obtain a new dwarf material d8227 as the test material. The dwarfing mechanism of d8227 was elucidated by investigating agronomic traits, conducting stem cytological observations, applying exogenous hormone treatments, and measuring endogenous hormone contents. Based on the preliminary positioning of the research team, map-based cloning was used for fine positioning, laying the foundation for the cloning and functional verification of dwarf genes. The study found that compared with the wild type, the plant height and ear height of d8227 were significantly reduced. The dwarfing of d8227 was mainly caused by the reduction in the number of internodes under the ear and the shortening of the length of longitudinally cut cells. The dwarf line d8227 was found to be insensitive to GA₃, IAA, and BR, and its dwarfism may be caused by abnormalities in the cytokinin signal transduction pathway. The dwarf gene controlling maize d8227 was located between the markers InDel9420 and InDel088 on the first chromosome of maize through map-based cloning, with a physical distance of approximately 377 Kb. Expression analysis of three candidate genes within the positioning interval found that only *Zm00001d031894* had a significant difference in relative expression between the d8227 and wild-type seedling stages, and this gene has a high expression level in the meristem of maize, which is important for stem growth has a certain impact, so *Zm00001d031894* was identified as a key candidate gene.

Key words: Maize; Dwarf; Fine localization; Dwarfing mechanism

录用日期: 2023-11-23

基金项目: 国家重点研发计划项目(2016YFD0300309)

作者简介: 唐 兰(1998-), 女, 云南曲靖人, 硕士, 主要从事玉米遗传育种。E-mail: 2359145050@qq.com

吴元奇为本文通信作者。E-mail: wuyuanqi@hotmail.com

玉米是一种典型的集粮、经、饲于一体的多元作物^[1], 是确保我国粮食安全、能源安全、经济发展和乡村振兴等诸多方面的主力军。株高与作物的最终产量密切相关^[2-4], 矮秆作为株高性状的一种特殊类型是理想株型的一个重要性状。矮秆玉米具有抗倒伏能力强、株型紧凑、群体光合利用率高及适宜机械

化生产等特点。以矮化品种的培育和推广为主要标志的“第一次绿色革命”带来了全球粮食产量的飞跃,解决了由于人口快速增长而引发的粮食危机^[5]。同时,种子是农业的芯片。因此,继续研究造成矮化的遗传机理,发掘新的矮化基因,选育出优良的矮秆品种,仍然是增加农作物产量的关键着力点。

目前,已报道的玉米矮秆基因已有60多个,除D8、D9、Dt、D8-1023、D*-10、D11为显性基因外,其余大多数为隐性基因^[6-14]。这些材料大多数生长势弱、植株过矮、株型不理想、存在隐性致死等不良性状,育种上利用价值不大。真正服务于育种生产和应用的矮秆基因比较单一,这不仅限制了玉米产量的进一步提高,而且还使育成品种的遗传基础日益狭窄,种质资源多样性降低。因此,对矮化基因的研究不仅有利于丰富株高调控的理论基础,也能为耐密植、抗倒伏和宜机收的株型改良提供理论参考与育种材料。

本研究通过农艺性状调查和组织细胞学观察d8227和野生型的表型和茎秆节间细胞,阐述茎秆节间缩短的原因。对d8227和野生型的幼苗喷施不同浓度的外源激素,同时测定d8227和野生型拔节期茎秆节间中的植物激素含量,明确d8227对外源激素的敏感性及其内源激素的相对表达量,以探讨玉米d8227的矮化机理。课题组前期利用BSA将d8227矮秆基因初定位在1号染色体上1.06 bin-1.07 bin区域处,物理距离为25 Mb。本研究在此基础上,通过扩大定位群体、加密分子标记,逐步缩小定位区间,实现对d8227矮秆基因的精细定位。根据玉米B73参考基因组的注释信息预测定位区间内的关键候选基因,为基因克隆和功能验证奠定基础。

1 材料与方法

1.1 供试材料

所用研究材料d8227为玉米与其野生近缘属矮秆高粱经远缘杂交后代再回交获得的稳定矮秆材料,玉米高秆自交系ZNC442为广西农业科学院玉米研究所提供。以d8227为母本、高秆自交系ZNC442为父本,构建了F₂、BC₁群体。在此基础上,继续以d8227为轮回亲本,在云南元江连续回交3代获得BC₄群体,以BC₄群体里面分离出来的高秆玉米作为野生型,记为WT。

1.2 试验设计

1.2.1 矮秆材料d8227的表型鉴定

2022年秋,在广西南宁种植d8227和野生型,密度为45 000株/hm²,行距80 cm,每行种植10穴,每

穴2株,共种植5行。常规田间管理。待散粉完成后,调查d8227和野生型的株高及其他农艺性状,考察时调查中间3行,再去除每行头尾各1穴,选取10株正常生长的单株用于调查性状。使用Excel和spss软件处理数据。

1.2.2 茎秆细胞学观察

拔节期,选取野生型和d8227长度差异最大的第3节间,横切和纵切固定于FAA固定液中,3次生物学重复。采用石蜡切片方法,在显微镜下进行节间细胞观察并拍照,比较同一倍数和视野下野生型和d8227的细胞大小和数目,用 t 检验来进行比较。

1.2.3 d8227激素敏感性鉴定

不同浓度的GA₃、IAA、BR处理方法参照呼凤兰^[15]、叶建军^[16]、叶宇船^[17]等方法,处理过程中根据需要稍作修改和调整,每种激素设置4种浓度梯度及对照,每盆各有4株WT和d8227,3次生物学重复。试验选择其饱满、大小均匀的种子于发芽盒中,盖细沙催芽。挑选生长一致的幼苗进行沙培,移苗后先壮苗3 d,然后进行第1次激素处理,间隔2 d喷1次激素,每次喷20 mL,共喷施5次,培养第15天时测量苗高。28℃人工气候室中种植处理。用最小显著差数法(LSD)比较相同激素下不同浓度处理间株高的显著性。

1.2.4 d8227内源激素含量测定

拔节期,选取d8227和野生型长度差异最大的第3节间于液氮中速冻,保存于-80℃冰箱,3次生物学重复,送往上海拜谱生物科技有限公司测定本试验样品的内源植物激素含量。

1.2.5 d8227的初定位验证和精细定位

利用CTAB法提取玉米自交系d8227、ZNC442以及(d8227×ZNC442)F₂分离群体中矮化单株的DNA。2022年春,在四川雅安种植F₂群体,密度为45 000株/hm²,行长5 m,行距75 cm,每行种植10穴,每穴2株。常规田间管理,待完全散粉后获得目标植株583株,用于矮秆d8227初定位的验证和精细定位。2022年秋,在广西南宁继续种植F₂定位群体,种植密度为60 000株/hm²,单粒播种,行距为60 cm,株距为28 cm,共获得1 500株目标单株用于进一步精细定位。基于课题组前期BSA初定位的结果,初定位区间内筛选到的多态性标记一部分来自Maizegdb数据库,另一部分InDel标记参考四川大学刘坚课题组基于自然群体测序开发的全基因组InDel标记和利用Primer5.0根据初定位区段内的序列信息设计引物,对F₂分离群体内的矮生单株进行基因型分型,引物由北京擎科生物科技股份有限公司

司合成。SSR 标记、InDel 标记根据差异带型分别标记为 1、2、3,与矮秆 d8227 带型一致的记为 1,自交系 ZNC442 带型一致的记为 2,杂合带型记为 3,缺失带型记为 0。

1.2.6 候选基因的表达分析

为了检测候选基因在不同时期的表达,利用 Trizol 试剂盒提取 WT 和 d8227 在苗期整株的 RNA、拔节期和散粉期长度差异最大节间的 RNA,3 次生物学重复,样品置于-80 ℃冰箱保存。用 NanoVue Plus 核酸蛋白测定仪检测 RNA 的浓度和 OD₂₆₀/OD₂₈₀ 值,检验 RNA 样品质量。将质量符合标准的 RNA 反转录得到 cDNA,根据 MaizeGDB 中提供候选基因

cDNA 信息,利用软件 Primer 5.0 设计 qRT-PCR 引物,以 *GAPDH* 为内参基因。qRT-PCR 反应体系放入仪器 CFX96 real-time PCR system(Bio-Rad)中,反应程序为,95 ℃预变性 5 min;95 ℃变性 5 s,60 ℃退火 30 s,72 ℃延伸 15 s,共进行 40 个循环。3 次生物学重复,4 次技术性重复。扩增后的数据导入 Microsoft Excel,采用 2^{-ΔΔCt} 方法进行基因相对表达量的分析。

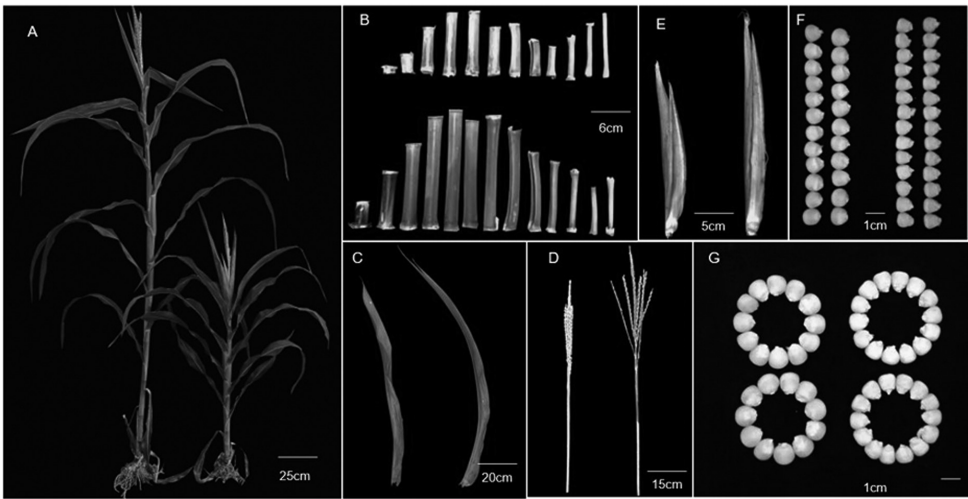
2 结果与分析

2.1 矮秆 d8227 和野生型的农艺性状分析
对 d8227 和野生型的各个性状进行统计分析。

表 1 野生型和 d8227 主要农艺性状和经济性状比较(平均值 ± 标准偏差)
Table 1 Comparison of main agronomic and economic characters between wild type and d8227(mean±SD)

性 状 Character	WT	d8227	差 值 Difference	t 值 t value
株高(cm)	225.04±14.34	125.30±10.87	99.74	11.47**
穗位高(cm)	91.00±10.89	40.50±7.88	50.50	7.75**
雄穗分枝数	11.40±0.60	6.50±0.65	4.90	5.53**
叶长(cm)	103.60±3.04	87.50±1.81	16.10	4.24**
穗重(g)	152.55±39.38	73.24±19.80	79.31	5.69**
穗长(cm)	15.66±1.31	11.97±1.30	3.69	6.32**
秃尖长(cm)	1.11±1.02	0.48±1.03	0.63	1.37
穗粗(mm)	46.29±3.91	37.45±3.61	8.84	5.25**
穗行数(行)	13.80±1.14	12.80±1.03	1.00	2.06
行粒数(粒)	28.00±3.20	23.10±3.70	4.90	3.17**
百粒重(g)	36.29±7.95	25.81±7.27	10.48	3.07**
粒深(mm)	7.30±0.20	6.85±0.15	0.45	1.80

注:**代表 *t* 检验 *P* 值小于 0.01,达极显著水平。下表同。
Note: ** means that *P* value of *t* test is less than 0.01 to reach an extremely significant level. The same below.



注: A、C、D、E、F: 左边为野生型,右边为 d8227; B: 上为 d8227,下为野生型; 标尺单位为 cm。
Note: A, C, D, E, F, left side is wild type, right side is d8227; B, The top is d8227, the bottom is wild type; The unit of the ruler is centimeter.

图 1 野生型和 d8227 性状比较
Fig.1 Comparison of characters between wild type and d8227

由表1可以看出,野生型的株高为225.04±14.34 cm, d8227的株高为125.30±10.87 cm,两者相比, d8227的株高下降了99.74 cm(图1)。野生型的穗位高为91.00±10.89 cm, d8227的穗位高为40.50±9.88 cm, 两者穗位高相差50.50 cm, 差异达极显著水平。WT的穗重、穗长、穗粗、行粒数、百粒重、雄穗分枝数、叶长比 d8227 分别增加了108%、31%、24%、21%、41%、75.38%、18.4%, 均达极显著水平, 穗行数、粒深的变化未达显著水平, 说明 d8227 具有一定的矮化育种价值。

玉米的茎秆节间以穗位为界限且记为0, 穗上节间记为正数, 穗下节间记为负数, 分别测量10株野生型和d8227的茎秆节间数目和节间长度。研究结果表明, d8227的节间数目比野生型的少1~2节, d8227的节间长度也短于野生型, 主要集中在穗下节间。穗上第2节间以下节间与野生型相比, 节间长度变化均达极显著水平, 穗下第-3节间的差异最大, 达极显著水平。因此d8227的矮化主要和穗下节间长度的缩短及茎秆节间数目的减少有关(表2)。

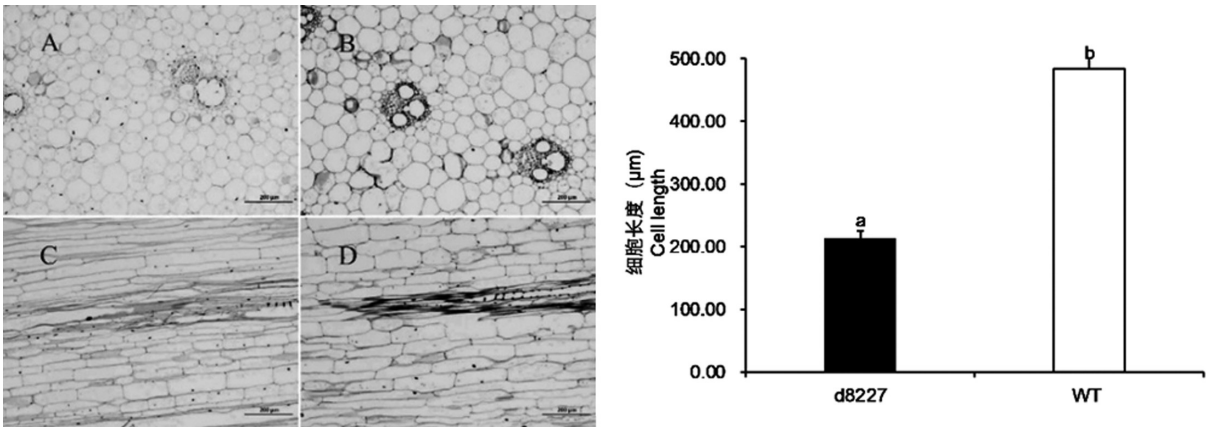
表2 野生型和d8227茎节长度分析(平均值±标准偏差)
Table 2 Analysis of stem segment length of wild type and d8227(mean±SD)

节 间 Internode	节间长度(cm) Internode length/cm		差 值 Difference	t值 t value
	WT	d8227		
穗上第5节间	10.34±2.57	6.27±4.15	4.07	1.75
穗上第4节间	10.40±3.82	6.10±4.22	4.30	1.61
穗上第3节间	11.14±3.03	5.30±2.62	5.84	3.04*
穗上第2节间	12.42±2.84	5.18±1.46	7.24	5.11**
穗上第1节间	12.68±1.15	6.55±1.38	6.13	8.10**
穗位第0节间	13.46±1.24	6.65±0.85	6.81	9.31**
穗下第-1节间	14.40±2.50	8.30±0.48	6.10	5.33**
穗下第-2节间	15.42±1.24	8.00±1.25	7.42	9.89**
穗下第-3节间	16.32±0.87	6.98±2.26	9.34	8.61**
穗下第-4节间	15.46±1.62	6.85±2.11	8.61	6.95**
穗下第-5节间	12.80±1.72	4.93±0.98	7.87	8.21**
穗下第-6节间	9.77±0.85	1.73±0.32	8.02	17.71**
穗下第-7节间	5.76±1.42			

2.2 d8227和野生型的茎秆组织细胞学分析

为了探究 d8227 穗下节间显著缩短的原因, 对

d8227 和野生型在拔节期时选取长度差异最大的节间组织进行细胞形态观察和比较。从野生型和



注: A、C为野生型; B、D为d8227; a、b表示存在极显著差异。
Note: A and C are wild type, B and D are d8227; “a” and “b” indicate extremely significant differences.

图2 野生型和d8227的细胞形态观察
Fig.2 Observation of cell morphology of wild type and d8227 at jointing stage

d8227的横切细胞图可以看出,d8227的维管束排列比较规则,细胞大小和数目与野生型无明显变化(图2);从两者的纵切细胞图可以看出,d8227的细胞长度比野生型明显缩短。通过对同一倍镜下的细胞数目和长度进行统计分析,结果表明,d8227平均细胞长度分别为 $213.33\pm11.55\text{ }\mu\text{m}$,野生型平均长度分别为 $483.33\pm28.87\text{ }\mu\text{m}$,因此d8227的节间缩短是由于纵切细胞长度的缩短导致。

2.3 d8227对外源激素敏感性分析

不同浓度的GA₃、BR、IAA溶液处理d8227和野生型第15天时的表型结果显示,与对照(CK)相比,在GA₃溶液浓度为0时,野生型和d8227的苗期株高无明显变化,随着GA₃浓度的升高,d8227和野生型

的苗期株高与对照相比均有不同程度的增高。可能是由于赤霉素本身的作用导致苗高增高,d8227对赤霉素不一定敏感,后续可通过内源植物激素含量测定来进一步验证。在不同BR溶液处理后,野生型和d8227与对照相比,苗期株高均没有显著变化,说明d8227的矮化与BR的合成缺陷无关。在不同IAA溶液处理后,野生型和d8227与对照相比,当生长素浓度为0时,两者苗期株高没有显著的变化,随着生长素浓度的增加,苗期株高逐渐降低,均与对照中苗期株高达到显著变化,表明生长素浓度过高反而会抑制植株的生长。因此,d8227对GA₃、BR、IAA均不敏感(表3)。

表3 不同浓度的GA₃、IAA、BR处理野生型和d8227的显著性分析
Table 3 Significance analysis of wild type and d8227 treated with GA₃, IAA and BR at different concentrations mg/kg

GA ₃			BR			IAA		
处 理 Treatment	WT	d8227	处 理 Treatment	WT	d8227	处 理 Treatment	WT	d8227
CK	58.50±0.00 c	36.65±0.00 c	CK	58.50±0.00 a	36.65±0.00 a	CK	58.13±0.37 a	38.67±1.48 a
0	66.69±3.40 bc	38.51±1.44 c	0.000	56.07±3.73 a	35.33±3.31 a	0	56.92±0.54 a	32.49±0.43 ab
30	74.28±2.89 ab	53.14±1.26 ab	0.001	60.75±0.29 a	39.06±0.81 a	50	42.01±1.52 b	29.54±1.45 b
40	82.01±2.25 a	54.33±2.64 a	0.010	55.76±1.34 a	35.18±2.01 a	100	41.77±1.37 b	34.53±1.14 ab
50	74.23±6.33 ab	48.44±2.88 b	0.100	59.77±2.00 a	41.96±3.54 a	200	38.43±2.12 b	31.04±4.70 ab

注:不同小写字母a、b、c表示处理的野生型和d8227存在显著差异,若只出现1种字母或者同时出现两种字母则表示处理的野生型和d8227没有存在明显的差异。
Note: The letters a, b, and c indicate that there is a significant difference between the treated wild type and d8227 when different letters appear, and if only one letter or both letters appear at the same time, it means that there is no obvious difference between the treated wild type and the d8227.

2.4 d8227和WT内源激素含量测定

选取d8227和野生型拔节期差异最大的茎秆组织进行植物激素含量的测定,3次生物学重复,共测21种植物激素,其相对表达量结果,GA₃、BR、IAA的P值分别为0.79、0.28和0.21,均大于0.05,表明这3种植物激素的表达量在d8227和野生型中表达量的差异均未达显著变化。内源植物激素结果表明,GA₃在两者之间的相对表达量不显著,说明d8227对GA₃并不敏感。只有反式玉米素核苷的表达量在野生型和d8227中存在显著差异(图3),因此d8227矮化是可能由细胞分裂素-反式玉米素核苷的信号转导途径异常而导致。

2.5 d8227矮秆基因的精细定位

课题组前期通过遗传分析得出该材料的矮化性状由隐性单基因控制,利用玉米矮秆材料d8227为母本和高秆自交系ZNC442为父本构建F₂群体作为

定位群体。通过鉴定选取高秆植株30株、矮秆植株30株和亲本,利用混合群体分离分析法对d8227进行初步定位,结果显示,矮秆基因位于1号染色体1.06 bin-1.07 bin上,物理距离为25 Mb。为了确保初步定位结果的准确性,利用在1号染色体1.06 bin-1.07 bin染色体定位区间内筛选到的两对SSR标记umc1940和bnlg1556,对F₂定位群体中的93株矮化单株进行基因型分型,结果这两对SSR标记与株高矮化的性状是连锁的。因此,将目的基因定位在分子标记umc1940和bnlg1556之间,物理距离约为11 Mb。

根据初定位验证后的区间内继续筛选分子标记,一共筛选出4对新的多态性分子标记,继续扩大群体进行精细定位,利用多态性分子标记bnlg1556、umc1940、umc2050、umc4000、umc8680、umc0500对583株矮化表型单株进行分型,将目标基因定位到

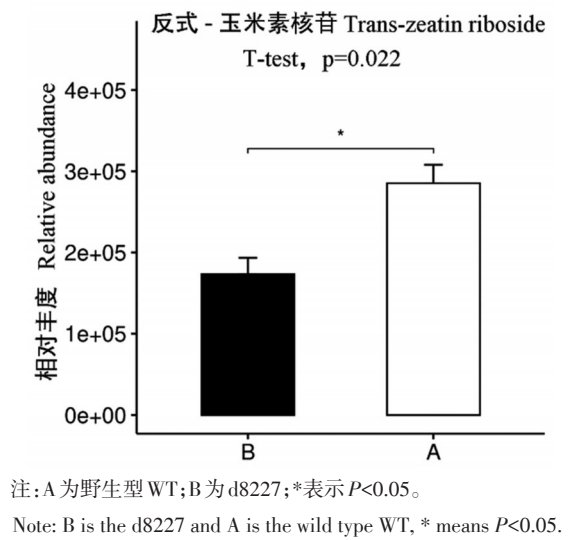


图3 WT和d8227反式玉米素核苷含量的比较分析

Fig.3 Comparative analysis of trans-zeatin nucleoside content in WT and d8227

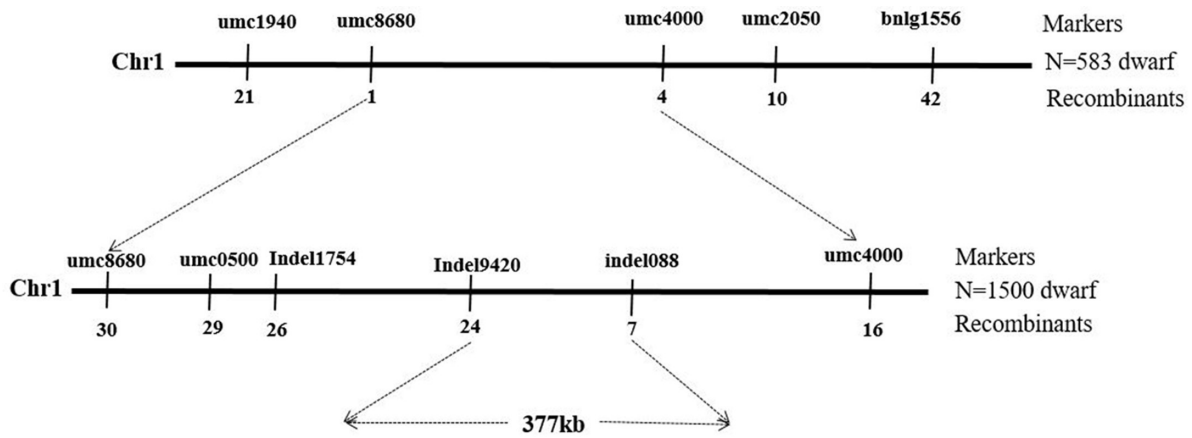


图4 矮秆基因d8227精细定位的图谱

Fig.4 Fine mapping of dwarf gene d8227

表4 基因定位相关标记信息

Table 4 Gene mapping related marker information

标 记 Maker	引 物 Forward primer	引 物 Reverse primer
umc1940	AACGACGTGCCCCATGAAC	TATATAAGCGAGCGAGCCCC
umc8680	CACATTGCCCAGAGACCAG	TTCCCGTTGTAAAAGCAGC
umc0500	CAAAGGATTTGGCCATCACT	CCCTGAGGTTTCATCTACTGG
InDel1754	GTCTGCATCTCTTTTGATCCAACCC	GATACTACTCGGTCACTCA
InDel9420	CTTCCCTATATCACCTCACCCAT	GGCTTGTTCCTGGCTAACAG
InDel088	TAGGGAAGTGGATTAGCAGC	ATGTAGTTTCGGCGTGCC
umc4000	GTTGGGACTTGGGAGGGTAT	CGTAGCTAGGATCGTCGGAG
umc2050	GCATCTCCTTGTGGGGAT	ACGCTCATCGTCGGCTAC
bnlg1556	ACCGACCTAAGCTATGGGCT	CCGGTTATAAACACAGCCGT

标记 umc0500 和 umc4000 之间,物理距离约为 1.6 Mb。为了进一步缩小目标基因所在的定位区

间,继续筛选和设计多态性分子标记,共筛选和设计 3 对 InDel 标记,继续扩大种植 F₂ 定位群体共获得

1 500 株目标单株,用多态性分子标记 InDel1754、InDel9420、InDel088 对 1 500 株矮秆表型单株的 DNA 进行基因型分型,最终将目的基因定位于 InDel 标记 InDel9420 和 InDel088 之间,且两个标记的交换单株不一样,精细定位的物理距离约为 377 Kb(图4)。

2.6 候选基因表达分析

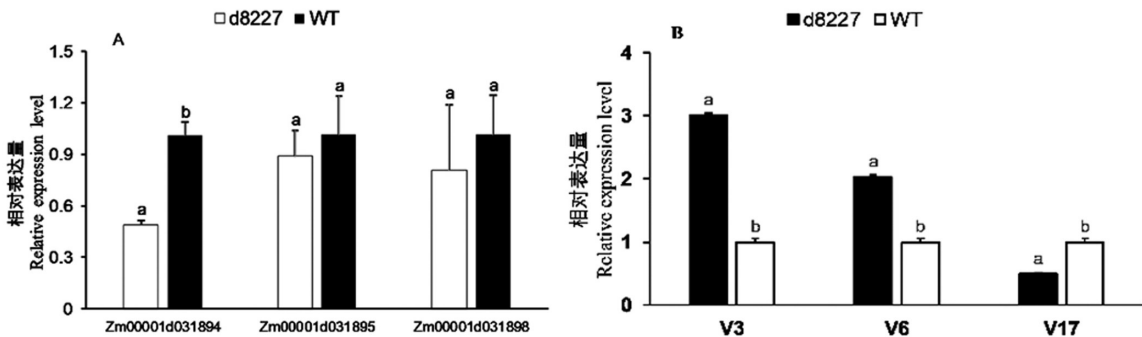
根据 B73-V4 版本的基因注释信息,377 kb 定位区间内共有 3 个候选基因(表 5),根据 3 个候选基因功能注释发现,只有 *Zm00001d031894* 与植物激素有关,其注释该基因为泛素 C 端水解酶,是去泛素化蛋白酶的一个子集,对拟南芥茎的发育很重要,突变后会抑制茎部的生长,单独对细胞分裂素或生长素的敏感性都没有明显的变化。除此之外,泛素 C 端水解酶在促进细胞分裂中起重要作用,并且在玉米

的基因表达图谱中也发现,该基因在分生组织的表达量很高,对玉米的节间伸长具有一定的影响。因此将 *Zm00001d031894* 初步确定为关键候选基因。

以 *GAPDH* 作为内参基因,qRT-PCR 检测幼苗期基因 *Zm00001d031894*、*Zm00001d031895*、*Zm00001d031898* 在矮秆玉米 d8227 和野生型中的相对表达量(图 5),*Zm00001d031894* 在 d8227 和 WT 苗期、拔节期相对表达量均达极显著变化。*Zm00001d031894* 在 d8227 散粉期的相对表达量比野生型极显著降低,在苗期和拔节期的相对表达量比野生型高,达极显著水平。说明该基因在苗期、拔节期的表达量多,在散粉后株高稳定表达量少,从而导致植株矮化,因此将 *Zm00001d031894* 确定为关键候选基因。

表 5 定位区间内候选基因功能注释
Table 5 Candidate gene information table

基因 ID Gene ID	位置信息 Location information	功能注释 Feature comment
<i>Zm00001d031898</i>	205923713-205931758	NAC-transcription factor 89
<i>Zm00001d031895</i>	205806785-205811044	Cys2His2 Zinc Finger150
<i>Zm00001d031894</i>	205692208-205698293	ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 1



注: V3、V6、V17 分别表示玉米植株苗期、拔节期、散粉期。A: 3 个候选基因在 V3 时期野生型和 d8227 中的表达; B: *Zm00001d031894* 在野生型和 d8227 中的表达比较。

Note: A, 3 candidate genes were expressed in wild-type and d8227 during V3 period; B, The expression of *Zm00001d031894* in wild-type and d8227 was compared. And V3, V6 and V17 indicated that maize plants were at seedling stage, jointing stage and pollen stage, respectively.

图 5 候选基因 qRT-PCR 表达分析
Fig.5 Candidate gene qRT-PCR expression analysis

3 结论与讨论

3.1 表型及细胞学观察与 d8227 矮化的关系

通过对矮秆玉米 d8227 的深入研究结果显示,不同矮秆突变体的农艺性状各有不同,如控制玉米矮化的显性基因 *D*-10*,其株高极度矮化,茎秆扭曲,花器官发育异常,不能正常授粉结实^[18]。*Zm-RPH1* 基因,表型为植株变矮,穗位高降低,平均节

间长度缩短达显著变化,结实正常^[19]。矮秆基因 *D11* 植株矮小,花期较早,节间缩短,叶片狭窄且边缘白色,叶片深绿色并伴有轻微卷曲,簇生,花器官发育异常^[20]。综上所述,前人报道的矮化突变体虽然株高降低,但是伴随着一因多效、连锁不良性状等缺陷,可应用于生产育种的矮秆基因较单一,导致遗传基础日益狭窄。因此,目前矮化育种的主要突破口就是利用不同途径创制和挖掘新的矮秆基因,丰

富矮秆种质资源的多样性,为真正服务于实际生产奠定基础。

本研究中d8227为玉米与其野生近缘属矮秆高粱经远缘杂交后代再回交所得的稳定矮秆材料,田间种植观察其表型,矮秆、株型紧凑,雌雄生长协调,抗倒伏,结实正常。通过对野生型和d8227的农艺性状调查可知,矮秆d8227的株高、穗位高与野生型相比降低了50%左右,具有较强的抗倒伏能力。d8227的穗行数、粒深与野生型无显著变化,说明d8227具有一定的育种价值。植物株高由节间数目和节间长度共同组成,大多数作物的矮化主要与节间长度缩短或节间数目减少有关。Zhang等^[21]对矮化突变体*d2014*矮化机制的研究发现,其矮化的原因主要是穗位节间及其下部节间严重缩短而穗上节间无明显变化。通过d8227和WT的表型分析,d8227的株高降低主要是由穗下节间数目的减少和穗上第2节间以下各节间长度均缩短而导致的。

3.2 植物激素与d8227矮化机理的探讨

株高发育与植物激素息息相关,大多数作物的株高主要通过赤霉素、油菜素内酯、生长素的合成、运输和信号转导来调控,根据植物矮化突变体对外源激素的不同反应,分为激素敏感型和钝感型^[22-23]。玉米中的矮秆基因*an1*、*d1*、*d2*、*d8*、*D*-10*、*Dt*等为赤霉素缺陷型突变体,由于赤霉素合成过程受阻而导致的矮化。玉米中的矮秆基因*mi2*、*na2*、*br1*、*br3*、*D8*、*D9*等均对赤霉素不敏感。Multani、Elena均报道了*br2*对赤霉素、生长素、油菜素内酯、细胞分裂素均不敏感。邱正高研究报道,矮秆突变体*dm676*外施GA₃、IAA、BR这3种外源激素均不能使突变体*dm676*恢复到野生型m676的株高。张向歌通过不同时期的玉米茎尖中的生长素含量研究发现,矮秆基因*d2014*突变造成居间分生组织区域过剩的生长素,影响居间分生组织细胞的活动,引起了植株的矮化。

本实验将处理环境改为室内,避免田间环境的影响,对d8227和野生型进行外源激素的处理,明确d8227的激素敏感性。通过对野生型和d8227外施GA₃、BR、IAA这3种植物激素,结果表明,对GA₃、BR、IAA均不敏感^[24-25]。为了进一步探明植物激素与d8227矮化机理的关系,通过选取野生型WT和d8227拔节期差异最大的节间利用高效液相色谱法对其进行内源植物激素含量测定。结果发现,GA₃、BR、IAA的表达量在d8227和野生型中均没有达到显著变化,只有反式玉米素核苷表达量存在显著差异,且d8227的表达量低于WT的表达,二者之间的

变化达显著水平。在茎秆细胞学中发现,d8227纵切细胞长度短于野生型,而细胞分裂素的生理作用为促进细胞分裂、细胞横向生长,抑制茎的伸长,激素含量测定与茎秆细胞学观察结果一致,都与细胞分裂素有关。因此,d8227矮化可能是由细胞分裂素-反式玉米素核苷的信号转导途径异常引起的,具体的矮化机理可通过后续的实验来进一步阐述。

3.3 d8227矮秆基因的精细定位

本研究在吴元奇课题组前期初定位的基础上继续进行精细定位。为了验证初步定位的准确性,在初定位的区域内继续筛选分子标记,将d8227矮秆基因定位于分子标记umc1940和bnlg1556之间,物理距离约为11 Mb。继续扩大定位群体,加密分子标记,最终将矮秆基因d8227定位于分子标记InDel9420和InDel088之间,物理距离约为377 Kb。此定位区间内共有3个新的候选基因,基因号分别为Zm00001d031898、Zm00001d031895、Zm00001d031894。本实验中的细胞学观察发现,d8227的纵切细胞短于野生型推测与细胞分裂素有关,同时测出d8227和野生型的细胞分裂素达显著水平,而且该基因的功能注释中也有相关文献报道,在拟南芥的同源基因中也与细胞分裂素有关,造成拟南芥的矮化。在Zm00001d031894的玉米基因表达图谱中于分生组织的表达量最明显,因此推测Zm00001d031894为关键候选基因。通过qRT-PCR检测幼苗期3个候选基因在矮秆玉米d8227和WT的基因表达量,结果显示,只有Zm00001d031894在d8227和野生型幼苗期相对表达量达极显著水平,且d8227和WT在苗期、拔节期的相对表达量均达极显著水平。散粉期,Zm00001d031894在d8227中相对表达量比野生型极显著的降低;在苗期和拔节期相对表达量比野生型高,达极显著水平,3个时期的表达量不一致可能是由于材料的时空特异性引起的。综上所述,将Zm00001d031894初步确定为关键候选基因,后续通过基因的克隆、转基因和功能验证等实验来进一步验证。

3.4 矮秆玉米d8227在育种上的应用

本研究中,d8227株型紧凑,雌雄正常,无不良性状连锁。通过(d8227×ZNC442)F₂定位群体,获得3个未在玉米中报道过的矮秆基因,与课题组前期利用主基因+多基因模型得出的至少有1对主基因或两对主基因的控制的结果一致^[26]。本研究中得出,d8227的矮化主要由1对主基因控制并且为一个新基因。除此之外,课题组前期利用白玉米矮生材料d8227和综合性状较好的高秆自交系8003、8009

和 8087 进行组配,其综合产量相关性状配合力较好,既能降低株高,又能提高产量。因此,d8227 作为一个新的优良矮秆种质资源,能够应用于育种,也可以通过选择特殊配合力高的优良高秆自交系进行组配,选育能应用于实际生产的杂交种。

参考文献:

- [1] 周文期,连晓荣,刘忠祥,等.玉米株高和穗位高的调控机理研究[J].分子植物育种,2021,19(23):7965-7976.
ZHOU W Q, LIAN X R, LIU Z X, et al. Regulation mechanism of plant height and ear height in maize[J]. Molecular Plant Breeding, 2021, 19(23): 7965-7976. (in Chinese)
- [2] YIN X, MCCLURE M A, JAJA N, et al. In-season prediction of corn yield using plant height under major production systems[J]. Agronomy Journal, 2011, 103(3): 923-929.
- [3] 史振声,李海燕,李凤海,等.玉米株高的年际间变化及其与产量的关系研究[J].玉米科学,2013,21(5):24-29.
SHI Z S, LI H Y, LI F H, et al. Interannual variation of maize plant height and its relationship with yield[J]. Journal of Maize Sciences, 2013, 21(5): 24-29. (in Chinese)
- [4] 黄中文,王伟,徐新娟,等.大豆动态株高及其生长速率与产量的相关分析[J].河南科技学院学报(自然科学版),2010,38(2):16-19.
HUANG Z W, WANG W, XU X J, et al. Correlation analysis of dynamic plant height, growth rate and yield of soybean[J]. Journal of Henan University of Science and Technology(Natural Science Edition), 2010, 38(2):16-19. (in Chinese)
- [5] SASAKI A, ASHIKARI M, UEGUCHI-TANAKA M, et al. Green revolution: a mutant gibberellin-synthesis gene in rice[J]. Nature, 2002, 416(6882): 701-702.
- [6] OTTO L S. Rates of leaf initiation in two mutants of *Zea mays*, Dwarf-1 and Brachytic-2[J]. American Journal of Botany, 1955, 42(10): 885-892.
- [7] BOMMERT P, LUNDE C, NARDMANN J, et al. thick tassel dwarf1 encodes a putative maize ortholog of the Arabidopsis CLAVATA1 leucine-rich repeat receptor-like kinase[J]. Development(Cambridge, England), 2005, 132(6): 1235-1245.
- [8] ANDRZEJ B, ANDRZEJ T. The chemical characteristic and distribution of brassinosteroids in plants[J]. Phytochemistry, 2003, 62(7): 1027-1046.
- [9] 石云素,于永涛,宋燕春,等.一个新矮生玉米种质资源矮生性状 QTL 的定位[J].作物学报,2010,36(2):256-260.
SHI Y S, YU Y T, SONG Y C, et al. Mapping of a dwarf trait QTL for a new germplasm resource of dwarf maize[J]. Acta Agronomica Sinica, 2010, 36(2): 256-260. (in Chinese)
- [10] FENG T, LIHONG Z, RUIXIANG L, et al. *ZmGA3ox2*, a candidate gene for a major QTL, qPH3.1, for plant height in maize[J]. The Plant Journal, 2013, 73(3): 405-416.
- [11] WEI X J, TANG S Q, SHAO G N, et al. Fine mapping and characterization of a novel dwarf and narrow-leaf mutant dnl1 in rice[J]. Genetics and Molecular Research: GMR, 2013, 12(3): 3845-3855.
- [12] IRINA M, ADDIE T, GARY J M, et al. *Brd1* gene in maize encodes a brassinosteroid C-6 oxidase[J]. PLoS One, 2012, 7(1): e30798.
- [13] DILBAG S M, STEVEN P B, MARK A C, et al. Loss of an MDR transporter in compact stalks of maize br2 and sorghum dw3 mutants[J]. Science, 2003, 302(5642): 81-84.
- [14] YIJUN W, DEXIANG D, HAIDONG 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): e66466.
- [15] 呼凤兰.5种植物激素对黑豆种子萌发的影响[J].种子,2019,38(6):95-99.
HU F L. Effects of five plant hormones on seed germination of black bean[J]. Seed, 2019, 38(6): 95-99. (in Chinese)
- [16] 叶建军.吲哚乙酸浓度对紫薇嫩枝扦插的影响[J].安徽林业科技,2018,44(4):19-21.
YE J J. Effect of indoleacetic acid concentration on cuttings of *Crerostromyrt crerstrope*s[J]. Anhui Forestry Science and Technology, 2018, 44(4): 19-21. (in Chinese)
- [17] 叶宇船,李润唐,王碧才,等.油菜素内酯对香蕉幼苗生长的影响[J].中国热带农业,2013(2):50-53.
YE Y C, LI R T, WANG B C, et al. Effects of brassinolide on the growth of banana seedlings[J]. Chinese Tropical Agriculture, 2013(2): 50-53. (in Chinese)
- [18] 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.
WANG Y J, MIAO N, SHI Y T, et al. Genetic analysis of a dominant dwarf stalk mutant in maize[J]. Journal of North China Agricultural Sciences, 2010, 25(5): 90-93. (in Chinese)
- [19] LI W, GE F, QIANG Z, et al. MaizeZmRPH1 encodes a microtubule-associated protein that controls plant and ear height[J]. Plant Biotechnology Journal. 2020, 18(6): 1345-1347.
- [20] WANG Y, DENG D, DING H, et al. Gibberellin biosynthetic deficiency is responsible for maize dominant Dwarf11(D11) mutant phenotype: physiological and transcriptomic evidence[J]. PLoS One, 2013, 8(6): e66466.
- [21] 张向歌.玉米矮化基因 *d2014* 的克隆及其调控节间伸长的机制解析[D].雅安:四川农业大学,2018.
- [22] 王月华,韩烈保,曾会明,等.植物赤霉素矮化突变体研究进展[J].中国生物工程杂志,2006(8):22-27.
WANG Y H, HAN L B, ZENG H M, et al. Research progress of dwarfing mutants of gibberellin in plants[J]. Chinese Journal of Bio-engineering, 2006(8): 22-27. (in Chinese)
- [23] 邱正高.玉米矮秆突变体 *dm676* 的遗传分析及育种潜能研究[D].雅安:四川农业大学,2016.
- [24] 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(5642): 81-84.
- [25] CASSANI E, VILLA D, DURANTE M, et al. The brachytic 2 and 3 maize double mutant shows alterations in plant growth and embryo development[J]. Plant Growth Regulation, 2011, 64(2): 185-192.
- [26] 徐维.一份白玉米矮生材料的育种潜能及遗传模式[D].雅安:四川农业大学,2019.

(责任编辑:朴红梅)