DOI: 10.3724/SP.J.1006.2021.03015

玉米籽粒突变体 *smk7* 的表型分析和基因定位

蒋成功^{1,2} 石慧敏² 王红武² 李 坤² 黄长玲² 刘志芳² 吴宇锦²
李树强² 胡小娇^{2,*} 马 庆^{1,*}

¹ 作物抗逆育种与减灾国家地方联合工程实验室, 安徽合肥 230036; ² 中国农业科学院作物科学研究所 / 作物分子育种国家工程实验室, 北京 100081

摘 要: 利用甲基磺酸乙酯(EMS)对玉米自交系 B73 进行诱变, 获得一个可以稳定遗传的小籽粒突变体 *smk7* (*small kernel 7*)。 *smk7* 成熟籽粒表现为体积变小, 胚和胚乳发育缺陷, 百粒重显著降低。突变籽粒发芽率仅为 10%, 且幼苗黄化不能生长成正常植株。成熟 *smk7* 胚乳中淀粉、蛋白、油分含量与野生型籽粒相比无显著差异, 但突变体胚乳淀粉颗粒体积明显变小且形状不规则。 *smk7* 突变籽粒在授粉后 12 d 即可观察到明显的小籽粒和空瘪表型, 石蜡切片显微观察显示突变籽粒的胚和胚乳发育迟缓, 胚乳基部转移层细胞(BETL)相对于野生型细胞壁向内生长减少, 发育受阻。用杂合植株(+/*smk7*)与多个自交系分别杂交, 构建不同背景的 F₂ 分离群体, 遗传分析结果表明该性状受单隐性核基因控制。利用靶向测序基因型分型(genotyping by target sequencing, GBTS)技术将基因初定位于 2 号染色体短臂, 进一步精细定位发现该基因位于 RM1433917 和 RM1535316 两个标记之间约 120 kb 的物理范围内, 共有 8 个蛋白编码基因。本研究为进一步克隆和解析 *SMK7* 基因调控玉米籽粒发育的分子机制奠定了基础。

关键词: 玉米; 小粒突变体; 遗传分析; 基因定位

Phenotype analysis and gene mapping of small kernel 7 (*smk7*) mutant in maize

JIANG Cheng-Gong^{1,2}, SHI Hui-Min², WANG Hong-Wu², LI Kun², HUANG Chang-Ling², LIU Zhi-Fang²,
WU Yu-Jin², LI Shu-Qiang², HU Xiao-Jiao^{2,*}, and MA Qing^{1,*}

¹ National Engineering Laboratory of Crop Stress Resistance Breeding, School of Life Sciences, Anhui Agricultural University, Hefei 230036, Anhui, China; ² Institute of Crop Sciences, Chinese Academy of Agricultural Sciences, National Engineer Laboratory of Crop Molecular Breeding, Beijing 100081, China

Abstract: In this study, a stable small kernel mutant, named *small kernel 7* (*smk7*), was isolated from ethylmethane sulfonate (EMS) mutagenesis of maize inbred line B73. Compared with wild type, the *smk7* mutants showed smaller kernel size, defective embryo and endosperm development and a significant decrease in 100-kernel weight. The *smk7* kernels showed a low level of germination rate at 10% and cannot grow into normal plants. No significant changes were detected in protein, starch and oil content between mature wild type and *smk7* kernels, but the starch grains became significantly smaller and irregular in *smk7* kernels compared with wild type. The *smk7* kernels could be clearly distinguished from the wild type as early as 12 days after pollination (DAP), on the basis of their smaller and emptier phenotype. Microscopic inspection of the paraffin sections revealed that the development of embryo and endosperm were delayed, and the cell wall in growth in basal endosperm transfer layers (BETL) were arrested in *smk7* compared with wild type. The F₂ populations with multiple backgrounds were constructed by crossing heterozygous plants (+/*smk7*) with several other inbred lines. Genetic analysis showed that the mutant phenotype was controlled by a single recessive gene. Based on genotyping by target sequencing (GBTS) strategy, the *SMK7* was initially mapped on the short arm of chromosome 2. The fine mapping results suggested that *SMK7* was located between markers RM1433917 and RM1535316, with a physical distance of 120 kb. There were eight protein-coding genes in this region. This study laid a foundation for further

本研究由国家自然科学基金项目(31500984), 中国农业科学院科技创新工程和中国农业科学院重大科研联合攻关任务“玉米藏粮于技”项目(CAAS-ZDRW202004)资助。

This study was supported by the National Natural Science Foundation of China (31500984), the Agricultural Science and Technology Innovation Program of CAAS, and the Storing Grain in Technology for Maize (CAAS-ZDRW202004).

* 通信作者(Corresponding authors): 马庆, E-mail: mqmmq@126.com; 胡小娇, E-mail: huxiaojiao@caas.cn

第一作者联系方式: E-mail: 1928680076@qq.com

Received (收稿日期): 2020-03-11; Accepted (接受日期): 2020-08-19; Published online (网络出版日期): 2020-09-10.

URL: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1809.S.20200909.0925.002.html>

genes cloning and research of the *SMK7* function in regulating maize kernel development.

Keywords: maize; small kernel mutant; genetic analysis; gene mapping

玉米是世界第一大粮食作物,也是重要的饲料和工业原料^[1],玉米产量对全球粮食安全具有举足轻重的作用。玉米籽粒发育状况决定着玉米的产量和品质,因此籽粒遗传发育机制一直是玉米研究的热点^[2-3]。玉米的籽粒由胚、胚乳和表皮 3 个部分组成。胚是籽粒的关键部分,是精子与卵细胞融合形成的二倍体。胚乳占籽粒的绝大部分,为籽粒的早期发育提供营养物质,是精子与中央细胞极核融合形成的三倍体^[4]。发掘调控胚和胚乳发育的关键基因并解析其分子机制,对指导玉米高产优质育种具有重要意义^[5]。

籽粒突变体是研究胚和胚乳发育机制的良好材料。早在 1980 年,Neuffer 和 Sheridan^[6]利用 EMS 化学诱变玉米材料,发现大约 300 个基因上的相关位点与玉米籽粒发育有关。随后,学者们根据突变籽粒的表型将玉米籽粒突变体大致分为,小籽粒(small kernel, *smk*)、籽粒严重缺陷(defective kernel, *dek*)、胚特异缺陷(embryo defective, *emb*)、粉质胚乳(opaque 或 *floury*)和空果皮(empty pericarp, *emp*)等类型^[7]。

胚乳是玉米籽粒营养的主要储存部位,包括淀粉胚乳、糊粉层、转移层及胚周层 4 个区域。粉质胚乳突变体具有不透明胚乳,通常赖氨酸含量较高。赖氨酸具有促进生长发育及增强免疫的作用,因此这类突变体被广泛研究。目前已克隆 *opaque* 或 *floury* 突变体有 14 个,如隐性突变 *o2*、*o5-7*、*o10*、*o11*^[8-10],半显性突变 *fl1*^[11]等。其中研究最早的 *o2* 突变体赖氨酸含量较野生型增加约 69%^[12]。*O2* 基因编码 Bzip 转录因子调控醇溶蛋白基因表达,突变后醇溶蛋白含量显著降低,富含赖氨酸的非醇溶蛋白含量增加,从而极大提高籽粒中赖氨酸含量^[13-15]。而其余 *opaque* 或 *floury* 基因也均与醇溶蛋白的结构、分布和积累密切相关。近期克隆的 *fl3* 在淀粉胚乳细胞中特异表达,通过与 RNA 聚合酶 III 互作调控 5S rRNA 和 tRNA 的转录^[16]。胚乳基部转移层(basal endosperm transfer layer, BETL)位于胚和胚乳之间,是籽粒从母体获取营养的重要部位,并且还具有细胞分裂素合成、能量代谢、防御反应以及母本和籽粒之间信号传导等多种功能。一旦受损会严重影响籽粒发育,如 *mn1*、*dek37*、*dek41*、*dek44* 等突变体。*Mn1* 编码细胞壁转化酶, *mn1* 突变体胚乳基部转移层缺乏己糖的合成,导致

BETL 细胞发育受到影响,引起籽粒缺陷表型^[17]。*DEK37* 编码 P 亚家族的三角状五肽重复蛋白(PPR),该蛋白功能的丧失导致线粒体复合体 I 亚基 *nad2* 的第一个内含子剪接效率降低^[15]。*DEK41* 编码 1 个 P 型的 PPR 蛋白,与玉米 *nad4* 内含子 3 的顺式剪切有关,突变导致转移层细胞中线粒体结构和功能遭到破坏,引起 BETL 层细胞发育受损^[18]。糊粉层包裹着胚和胚乳细胞,种子萌发时,糊粉层产生水解酶,分解胚乳中的营养物质。目前已知调控糊粉层发育的基因有 *DEK1*、*CR4*、*SAL1*、*THK1* 和 *NKD1*。*DEK1* 基因编码胚乳中糊粉层细胞的 1 个蛋白酶, *CR4* 编码受体激酶, *SAL1* 编码 1 个 E 类液泡蛋白,在质膜的囊泡运输上起作用, *CR4* 和 *DEK1* 参与糊粉层细胞特化的信号接收与传导, *SAL1* 降解或者循环 *DEK1*, *CR4* 来维持质膜上二者的浓度,起负调控作用^[19]。

胚是玉米籽粒具有生命活性的部分。胚特异突变体通常表现为籽粒大小正常,但是没有可见胚或胚发育畸形。已克隆的胚发育特异基因有 *EMB8156*、*EMB8522*、*LEM1*、*EMB12*、*EMB14*、*EMB16*、*EMB-7L*^[20]等。*EMB8516*、*LEM1*、*EMB14* 和 *EMB16* 的功能均与质体核糖体形成相关, *Emb12* 编码质体起始因子 3 (IF3),质体基因的正确表达对玉米胚发生具有重要意义。*PPR8522* 与 *EMB-7L* 均编码叶绿体靶向的 PPR 蛋白,突变后叶绿体受损,代谢产物合成受抑制^[21]。除了上述突变体外,还有一类胚和胚乳都有缺陷的突变体,如 *small kernel* 突变体的胚和胚乳发育都比较滞后。*SMK6* 基因编码 1 个 PPR-E+ 型蛋白,突变导致线粒体 *nad1-740*、*nad4L-110*、*nad7-739* 和 *mtb-138*、*139* 位置上 C-U 的编辑受到影响,损害了线粒体活性^[22]。*SMK4* 基因碱基的缺失突变导致线粒体复合物 IV 细胞色素 C 氧化酶 1 (cox1)转录本的 1489 位 C 被 U 编辑^[23]。总而言之,在玉米籽粒突变中,大部分的籽粒突变是由 PPR 蛋白的突变导致的。而 PPR 蛋白分为 PLS、E、E+、DYW 几种类型,直接或间接参与 RNA 稳定、翻译、切割、剪切、编辑等^[24]。

本研究以玉米自交系 B73 经 EMS 诱变产生的籽粒突变体 *smk7* 为研究材料,对突变籽粒的表型和显微结构进行观察,同时构建不同遗传背景的 F₂ 分离群体,开展性状的遗传解析和基因定位。结合对定

位区间的基因注释,为候选基因的克隆及功能研究奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

利用EMS诱变玉米B73自交系花粉构建突变体库,经过筛选获得1个表型可稳定遗传的小粒突变体 *smk7* (*small kernel 7*)。由于 *smk7* 发芽率低,且不能生长成正常植株,我们将杂合植株(+/*smk7*)自交4代(M₄)获得的分离果穗用于突变表型分析。2017年和2018年在北京昌平基地,分别以昌7-2、Mo17和郑58为母本,以M₄代杂合植株(+/*smk7*)为父本,杂交得到F₁群体,再自交获得不同遗传背景的F₂分离群体。F₂群体用于后续的遗传分析和基因定位。

1.2 实验方法

1.2.1 扫描电镜观察淀粉粒结构 取M₄代分离果穗上的野生型和突变体籽粒,在65℃烘箱内连续烘48h,确保籽粒完全脱水干燥,把胚乳部分敲碎,固定在贴有导电条的圆形金属样品台上,置于离子溅射仪中镀金膜,用HITACHI SU8020扫描电镜对突变体胚乳的淀粉大小和结构变化进行观察。

1.2.2 石蜡切片 取授粉后12d的M₄代分离果穗上的突变体和野生型籽粒,用FAA固定液保存,固定后的组织材料进行脱水、透明、浸蜡与包埋,将包埋好的蜡块切片黏附于载玻片上,然后盖上盖玻片在45℃烘箱里干燥。再用OLYMPUS BX53正置显微镜(奥林巴斯,日本)观察并照相。

1.2.3 籽粒蛋白、油分和淀粉含量的测定 淀粉含量的测定:取野生型籽粒和突变体籽粒在65℃烘箱中烘6h以上,用磨样机磨样,称取2.5g粉末,加10mL CaCl₂-乙酸溶液润湿,再加50mL CaCl₂溶液充分混匀,置于120℃油浴锅中加热30min,放入冷水槽冷却至室温,将水解液全部加入带漏斗100mL容量瓶中,并加1mL硫酸锌溶液摇匀,在加1mL硫酸亚铁溶液充分沉淀蛋白质,蒸馏水定容至100mL,摇匀过滤。用空白液调整旋光仪零点,再将滤液装满旋光仪室温下测定。结果计算:

$$\text{粗淀粉}(\%) = \alpha \times 10^5 / L \times W \times (100 - H) \times 203.$$

式中, α 为旋光仪上读出的旋转角度;L为炫光管长度(dm);W为样品重(g);203为淀粉比旋度;H为样品含水量(%)。

籽粒蛋白和油分测定:用德国BRUKER MPA近红外光谱仪测定油分和蛋白含量,分别选取大小

均一的突变体和野生型籽粒置于样品杯中,用透射方式扫描获得籽粒近红外样品的吸收光谱图,每个样品重复装样扫描3次,实验设置3个生物学重复。根据本实验室已构建的蛋白和油分模型,利用BRUKER公司的OPUS软件进行数据分析。

1.2.4 基因的初定位和精细定位 以突变体与Mo17杂交构建的F₂群体为材料开展基因定位。提取F₂果穗上的45粒突变籽粒及双亲的基因组DNA。委托博瑞迪生物技术有限公司进行基于20K GBTS (genotyping by target sequencing) 靶向测序基因型分型^[3]。计算每个多态性SNP标记的基因型频率(SNP index),即亲本型基因型占有所有F₂样本基因型的频率,SNP index越接近1,表明标记与目标基因连锁越紧密。然后用MaizeGDB和Gramene等网站比对和下载定位区间内的核苷酸序列,用Primer 5等软件开发InDel和SNP标记。进一步扩大定位群体,筛选标记处的交换单株,完成基因精细定位。

利用试剂盒DP360(天根生化科技(北京)有限公司)提取正常籽粒和突变籽粒的DNA,操作步骤如下:样品充分研磨,加入裂解液,涡旋离心,转移上清过柱,将滤液和无水乙醇等体积混合,将混合液过柱,倒掉滤液,加漂洗液漂洗2次,离心,加ddH₂O溶解2min,得到的DNA溶液置于-20℃保存。选用25μL扩增体系,上下游引物各1.25μL,PCR mix 12.5μL, DNA 2μL, ddH₂O 8μL。扩增程序为:98℃预变性3min;98℃变性10s、60℃退火20s、72℃延伸30s,共35个循环;72℃终延伸5min。利用1%琼脂糖凝胶电泳检测PCR产物。

2 结果与分析

2.1 小粒突变体 *smk7* 的表型分析

*smk7*是玉米自交系B73经EMS诱变产生的小籽粒突变体。对M₄和F₂代成熟分离果穗进行观察发现,*smk7*突变体与野生型相比,种皮皱缩,籽粒扁平,胚与胚乳发育缺陷(图1-A, B)。仅有10%的突变籽粒可以发育成苗,但幼苗植株生长发育缓慢,叶色浅黄,最终不能发育为正常植株(图1-C)。百粒重测量结果表明,突变体籽粒百粒重显著降低,仅约野生型籽粒的35%(图2)。对*smk7*和野生型籽粒胚乳结构进行扫描电镜观察发现,野生型淀粉粒呈球形,形状规则,而突变体淀粉粒变小,结构不规则。突变体与野生型蛋白体结构无明显差异(图3)。

表 1 基因定位引物序列

Table 1 Primer sequences for gene mapping used in the study

引物 Primer	正向序列 Forward sequence (5'–3')	反向序列 Reverse sequence (5'–3')
In4.3	AACGCATCATCTATGTCCAAC	GGGTGAAGCCAGCCATTATTT
In1.9	ATGGTACGATCAACATAAAGGGAA	GGCGTCACCGAAGAAATACAC
In0.83	GCAAGAAGCACCAGCCCT	CGAGCGAAAGAAAGGAATGT
In1.16	ACATGACCCACGATCCAGACA	TGCAGCCACTCTCCTTATGGT
SNP1	TTAGGGTGGAGTTGCTTCGC	TTATGAATGAAGCACGAAATGA
SNP2	TTAGGGTGGAGTTGCTTCGC	TTATGAATGAAGCACGAAATGA
SNP3	AAGGAATGGAGGCTTGGGTT	ACAGCCGCCTTCGGATTC
SNP4	AGCGGTCCTTGACTTATTGTA	CATTACACGACCAATACAGCCA
SNP5	TGGCTTTTCATACCCTCCTCC	CCTTCGCTGTGACTTGGATGT

图 1 *smk7* 突变体表型

Fig. 1 Morphological phenotypes of the *smk7*

A: M₄ 代果穗; B: *smk7* 与野生型籽粒表型比较; C: *smk7* 和野生型幼苗表型比较。

A: maize ear of M₄ generation, B: comparison of the phenotype between *smk7* and WT kernels; C: comparison of the phenotype between *smk7* and WT seedlings.

图 2 突变体籽粒和野生型籽粒的百粒重

Fig. 2 Hundred-kernel weight of wild type and *smk7* kernels

**表示野生型与突变体在 0.01 水平差异显著。

** represents significant differences between the *smk7* mutant and wild type at the 0.01 probability level.

2.2 小粒突变体 *smk7* 的籽粒成分测定

smk7 突变体籽粒成分测定结果表明, M₄ 代分离果穗的 *smk7* 突变籽粒淀粉含量和蛋白含量低于野生型籽粒, 油分含量突变籽粒略高于野生型籽粒, 均未达到显著水平。F₂ 代分离果穗的 *smk7* 突变籽粒

图 3 *smk7* 及野生型成熟籽粒扫描电镜照片

Fig. 3 Scanning electron microscopy (SEM) of mature *smk7* and WT kernels

A: 野生型胚乳; B: *smk7* 胚乳; SG 为淀粉粒; PB 为蛋白体; 标尺为 20 μm。

A: wild type endosperm; B: *smk7* endosperm; SG: starch granule; PB: protein body; Bar = 20 μm.

淀粉和油分含量显著低于野生型, 而蛋白含量显著高于野生型, 可能是由于不同背景的影响导致 F_2 代籽粒淀粉、油分和蛋白的含量发生变化(图 4)。

图 4 野生型籽粒和 *smk7* 籽粒的成分测定

Fig. 4 Determination and analysis of WT and *smk7* kernel components

**表示野生型与突变体在 0.01 水平差异显著。

** represents significant differences between *smk7* mutant and wild type at the 0.01 probability level.

2.3 小粒突变体 *smk7* 授粉后不同时期胚和胚乳的观察分析

对授粉后 12、15、18、21、25 和 30 d 的 M_4 代分离果穗进行观察发现, 授粉后 12 d 即可明显区分出 *smk7* 突变籽粒。与野生型籽粒相比, *smk7* 籽粒明显体积较小, 胚乳不饱满, 胚发育迟滞, 几乎不可见。随着发育进程的增加, 突变表型更加显著, 授粉后 21~25 d, 胚发育明显滞后, 大小不足野生型胚的 1/10, 胚乳灌浆不饱满。授粉后 30 d, 突变籽粒果皮和胚乳间出现较大空隙, 籽粒皱缩体积约为野生型

的 1/3, 胚和胚乳略有增大, 但结构畸形明显, 以上结果表明 *smk7* 突变产生与籽粒发育的早期(图 5-A, B)。进一步对授粉后 12 d 的野生型和 *smk7* 籽粒制作石蜡切片, 显微观察发现, 结果发现与野生型籽粒相比, 突变体发育严重滞后, 突变体的胚乳转移层细胞(BETL)存在明显发育异常。授粉后 12 d, 野生型籽粒 BETL 区细胞发育完善, 成带状和基部胚乳细胞接触更为紧密, 有明显的细胞壁内突, 而 *smk7* 突变体 BETL 区细胞与基部分离, 细胞壁内突不明显(图 6)。由此推测 *SMK7* 基因突变可能导致 BETL 细胞发育异常, 影响母体营养物质向胚和胚乳传递, 造成了籽粒的发育缺陷表型。

2.3 *smk7* 受单隐性核基因控制

利用杂合植株(+/*smk7*)分别与自交系 Mo17、昌 7-2、郑 58 杂交得到 F_1 群体, F_1 自交获得不同遗传背景的 F_2 群体。挑选杂合体 F_1 植株进行自交, 对 M_2 、 M_3 和 F_2 分离果穗中的小粒突变体和正常籽粒进行统计, 计算分离比, 卡方测验结果表明, 正常籽粒与突变籽粒之比均符合 3:1 分离规律($\chi^2 < 3.84$) (表 2)。表明 *smk7* 小籽粒性状受 1 对隐性单基因控制, 是细胞核遗传。

2.4 *SMK7* 基因的定位

以 Mo17 为遗传背景的 F_2 分离果穗为材料, 利用 CTAB 法提取 45 个粒突变籽粒及其亲本 DNA, 利用 20K GBTS 靶向测序技术分析样本基因型。去除杂合及双亲之间无多态的位点后, 共得到 7903 个 SNP 多态性标记, 占总位点数的 39.5%, 其中 1 号染色体最多为 1314 个, 10 号染色体最少为 586 个(图 7)。通过计算各条染色体, 每个多态性 SNP 标记的基因型频率(SNP index), 发现 2 号染色体上 0.04 Mb~

图 5 授粉后不同时期胚和胚乳观察分析

Fig. 5 Observation of embryo and endosperm of WT and *smk7* at different development stages

A: 野生型籽粒在 12、15、18、21、25 和 30 DAP 胚和胚乳及完整种子的观察分析; 标尺为 3 mm。B: 突变型籽粒(*smk7*)在 12、15、18、21、25 和 30 DAP 胚和胚乳及完整种子的观察分析; DAP: 授粉后天数; 标尺为 3 mm。

A: the observation of embryo, endosperm and whole seed of wild type at 12, 15, 18, 21, 25, and 30 DAP; Bar = 3 mm. B: the observation of embryo, endosperm and whole seed of *smk7* at 12, 15, 18, 21, 25, and 30 DAP; DAP: days after pollination; Bar = 3 mm.

图 6 授粉后不同天数野生型和突变体籽粒石蜡切片观察
Fig. 6 Observation of paraffin sections of wild type and *smk7* kernels on different days after pollination
A: 野生型授粉后 12 d 籽粒; 标尺为 1000 μm 。B: *smk7* 授粉后 12 d 籽粒; 标尺为 1000 μm 。C: WT 授粉后 12 d 籽粒胚乳基部转移; 标尺为 150 μm ; D: *smk7* 授粉后 12 d 籽粒胚乳基部转移层; 标尺为 150 μm ; BETL: 胚乳基部转移层细胞。
A: wild type kernels at 12 DAP; Bar = 1000 μm . B: *smk7* kernels at 12 DAP; Bar = 1000 μm . C: the basal endosperm transfer layer of WT endosperm at 12 DAP; Bar = 150 μm . D: the basal endosperm transfer layer of *smk7* at 12 DAP; Bar = 150 μm ; BETL: basal endosperm transfer layers.

表 2 不同群体的遗传分离比检验
Table 2 Genetic segregation test of different populations

世代 Populations	总粒数 Total kernels	正常籽粒数 Normal kernels	突变籽粒数 Mutant kernels	实际比例 Actual ratio	理论比例 Theoretical ratio	卡方值 χ^2
M ₂	6372	4742	1630	2.91:1	3:1	1.1151
M ₃	9821	7412	2409	3.08:1	3:1	1.1367
F ₂ (Mo17× <i>smk7</i>)	5123	3870	1253	3.09:1	3:1	0.7730
F ₂ (Z58× <i>smk7</i>)	2016	1512	504	3:1	3:1	0.1120

$\chi^2_{(0.05)} = 3.84$

图 7 多态性 SNP 标记的数目
Fig. 7 Number of SNP markers

9.54 Mb 区间可能与目标性状连锁(图 8)。扩大定位群体, 提取 274 个突变籽粒 DNA, 同时开发

In0.83、In1.16、In1.9 和 In4.3 若干对 InDel 标记, 将 *SMK7* 定位在 0.83 Mb~1.9 Mb 区间。继续扩大定位群体到 399, 开发 SNP1、SNP2、SNP3、SNP4 和 SNP5 等若干对 SNP 标记, 最终将 *SMK7* 基因定位在 2 号染色体的 SNP2 和 SNP3 两个 SNP 标记之间, 左侧标记处交换单株数为 4, 右侧标记处交换单株数为 9, 物理距离为 120 kb (图 9)。利用 Gramene (<http://www.gramene.org/>) 网站检索到此区间内含有 8 个蛋白编码基因。对 *Zm00001d001818* 和 *Zm00001d001820* 两个基因进行测序并和 B73 序列比对发现无变化; 其余 6 个基因分别编码: 乙酰化酶家族蛋白(*Zm00001d001819*)叶绿体 β 亚基邻氨基苯甲酸合成酶(*Zm00001d001823*)、Dof 锌指蛋白(*Zm00001D001824*)和 WD40 重复超家族转导蛋白(*Zm00001D001825*); 还有 2 个功能

图 8 SNP index 全基因组频率分布图
Fig. 8 Distribution profile of SNP index on whole genome

未知蛋白(Zm00001d001821 和 Zm00001d001822)
(表 3)。

3 讨论

籽粒是玉米主要营养储存器官，也是研究禾本科种子发育的模式器官。开展籽粒突变体研究对于克隆籽粒发育关键基因及解析籽粒发育调控分子机制具有重要意义。

本研究中 *smk7* 突变体属于小粒(small kernel)类型突变体，表现为胚和胚乳发育迟滞的表型。成熟的 *smk7* 突变体种子体积较小，胚和胚乳发育缺陷，尚有少数可以成苗，幼苗具有黄化现象。这种表型不同于 *emp*、*emb* 等类型的突变体，*emp* 是胚和胚乳严重缺陷的致死突变，而 *emb* 突变体仅胚发育存在异常。小部分 *dek* 突变体表型与 *smk7* 类似，如 *dek36*、*dek37*、*dek40*、*dek42* ^[25] 等发育成幼苗。对 *smk7* 授粉后 12 d 的籽粒石蜡切片观察发现，突变体 BETL 层细胞壁向内生长受阻，发育迟缓。胚乳基部转移层是一类 2~3 层高度特异的细胞，含有大量线粒体，参与细胞的信号转导，激素合成等重要功能，种子灌浆发育需要通过 BETL 从母体中获取营养。表明 *SMK7* 基因可能调控胚乳基部转移层细胞形成，进而影响胚和胚乳发育。

图 9 *SMK7* 基因的精细定位
Fig. 9 Fine mapping of *SMK7*

N: 群体大小; Recombinants: 重组单株数。
N: the number of individuals; Recombinants: the number of recombinants.

表 3 候选区间内基因信息
Table 3 Gene information in the candidate region

基因名称 Locus name	基因注释 Gene annotation
ZM00001D001818	Probable polyol transporter 4
ZM00001D001819	N-acetylglucosaminyl-phosphatidylinositol de-N-acetylase family protein
ZM00001D001820	Protochlorophyllide reductase1
ZM00001D001821	Unknown
ZM00001D001822	Unknown
ZM00001D001823	Anthranilate synthase beta subunit 1 chloroplastic
ZM00001D001824	Dof zinc finger protein DOF1.6
ZM00001D001825	Transducin/WD40 repeat-like superfamily protein

目前已克隆的 *smk* 突变体有 *smk1*、*smk2*、*Zmsmk3*、*smk4*、*smk6* 和 *Zmsmk9* [26-29]。*smk1* 突变体胚和胚乳发育滞后, 种皮和胚乳之间有很大空隙, 约 10% 的突变籽粒可萌发。*SMK1* 基因编码 1 个 E 型 PPR 蛋白, 参与了线粒体 *nad7-836* 的编辑。*smk2* 突变体籽粒变小, 胚败育, 胚乳细胞少, BETL 细胞发育受阻。*SMK2* 位于 4 号染色体, 编码谷氨酰胺酶参与 vitamin B₆ 的合成。*Zmsmk3* 突变体表现为胚与胚乳发育滞后, BETL 细胞发育严重受损, 约 30% 突变籽粒可萌发成苗。*ZmSMK3* 位于 3 号染色体, 编码 1 个线粒体转录终止因子(mTERF)蛋白, 参与 *nad1* 的第 4 内含子和 *nad4* 的第 1 内含子剪切过程;*smk4* 小粒突变体 95% 可以成苗, 但是植株生长发育缓慢且花期延后。基因克隆结构表明 *SMK4* 位于 4 号染色体编码 E 亚类 PPR 蛋白, 参与线粒体 *cox1* 转录本 C-U 的编辑;*smk6* 是 1 个小粒胚致死突变体, *SMK6* 基因位于 10 号染色体, 该基因编码 E 型 PPR 蛋白, 影响线粒体基因的编辑功能;*Zmsmk9* 突变体胚与胚乳发育滞后, 但是能正常萌发并发育成株。*ZmSMK9* 位于 1 号染色体, 编码 1 个 P 型 PPR 蛋白, 参与 *nad5* 的剪切。由此可知大部分 *smk* 突变均与线粒体功能缺陷有关, 线粒体作为细胞的能量工厂和进行有氧呼吸的主要场所, 在胚乳 BETL 细胞功能及籽粒发育中具有重要的作用。

本研究中 *smk7* 被定位在 RM1433917~RM1535316 两个 SNP 标记之间, 物理距离约为 120 kb。通过 MaizeGDB 和 Gramene 生物信息学网站分析发现该区段包含了 8 个新的蛋白编码基因。对其中 *Zm00001d001818* 和 *Zm00001d001820* 进行 PCR 扩增并和诱变亲本 B73 进行序列比对发现无突变位点;*Zm00001d001819* 编码氮-乙酰氨基葡萄糖基磷脂酰肌醇-氮-乙酰化酶家族蛋白, 目前今发现在哺乳动物、酵母和原生动物中有活性^[30];*Zm00001d001823* 的编码叶绿体 β 亚基邻氨基苯甲酸合成酶 1, 可能参与 IAA 合成的色氨酸途径^[31]。在核分化过程中, IAA 控制着糖和蛋白质的代谢, 是胚乳 BETL 形成的必要条件, IAA 通过 CK 或 ABA 直接或间接地调控玉米醇溶蛋白编码基因的转录。*Zm00001d001824* 编码 Dof 锌指蛋白, 广泛参与碳氮代谢、花和花粉发育、种子发育和萌发、次生代谢、维管发育和叶片等植物生长发育过程。*Zm00001d001825* 编码 WD40 重复超家族转导蛋白, 可能与 AP2 形成复合物协同作用于网格蛋白介导的内吞作用^[32]。玉米 *edh1* 突变体中

与网格蛋白内吞作用的基因发生突变, 导致突变体籽粒变小, 因此 WD40 也可能参与籽粒发育调控。所以后续还需通过候选基因测序、基因表达分析等分子实验进一步确定候选基因。

4 结论

本研究以 B73 为背景材料通过 EMS 诱变得得到 1 个可以稳定遗传的籽粒突变体, 该突变体籽粒变小, 胚和胚乳发育严重滞后, 胚乳 BETL 层细胞发育迟缓, 细胞壁发育向内生长受阻。利用图位克隆将 *SMK7* 定位在 2 号染色体短臂 RM1433917~RM1535316 这 2 个 SNP 标记内, 物理距离约为 120 kb, 在该区间内没有已克隆的籽粒发育相关基因, 因此 *SMK7* 可能是 1 个调控籽粒发育的新基因。

References

- [1] Nuss E T, Tanumihardjo S A. Quality protein maize for Africa: closing the protein inadequacy gap in vulnerable populations. *Adv Nutr*, 2011, 2: 217-224.
- [2] Berger F. Endosperm development. *Curr Opin Plant Biol*, 1999, 2: 28-32.
- [3] Guo Z F, Wang, Tao J J, Ren Y H, Xu C, Wu K S, Zou C, Zhang J A, Xu Y B. Development of multiple SNP marker panels affordable to breeders through genotyping by target sequencing (GBTS) in maize. *Mol Breed*, 2019, 39: 37-49.
- [4] Sun X, Shantharaj D, Kang X, Ni M. Transcriptional and hormonal signaling control of *Arabidopsis* seed development. *Curr Opin Plant Biol*, 2010, 13: 611-620.
- [5] 任雪梅. 玉米籽粒发育基因 *Emp11* 及 *ZmSmk3* 的克隆及功能分析. 华中农业大学博士学位论文, 湖北武汉, 2018.
Ren X M. Cloning and Functional Analysis of *Emp11* and *ZmSmk3* Controlling Kernel Development in Maize. PhD Dissertation of Huazhong Agricultural University, Wuhan, Hubei, China, 2018 (in Chinese with English abstract).
- [6] 李见坤. 玉米籽粒发育基因 *UBL1* 的克隆与功能分析. 中国农业大学博士学位论文, 北京, 2016.
Li J K. Cloning and Characterization of *UBL1* Controlling Kernel Development in Maize. PhD Dissertation of China Agricultural University, Beijing, China, 2016 (in Chinese with English abstract).
- [7] Neuffer M G, Sheridan W F. Defective kernel mutants of maize: I. Genetic and lethality studies. *Genetics*, 1980, 95: 929-944.
- [8] Wang G, Sun X, Wang G, Wang F, Gao Q, Sun X, Tang Y, Chang C, Lai J, Zhu L, Xu Z, Song R. *Opaque7* encodes an acyl-activating enzyme-like protein that affects storage protein synthesis in maize endosperm. *Genetics*, 2011, 189: 1281-1295.
- [9] 姚东升. 玉米 *opaque10* 突变体基因的图位克隆和功能分析. 上海大学博士学位论文, 上海, 2016.
Yao D S. The Map-based Cloning and Functional Analysis of Maize *opaque10* Gene. PhD Dissertation of Shanghai University, Shanghai, China, 2016 (in Chinese with English abstract).
- [10] Yao D, Qi W, Li X, Yang Q, Yan S, Ling H, Wang G, Wang G,

- Song R. Maize *opaque10* encodes a cereal-specific protein that is essential for the proper distribution of zeins in endosperm protein bodies. *PLoS Genet*, 2016, 12: e1006270.
- [11] Holding D R, Otegui M S, Li B, Meeley R B, Dam T, Hunter B G, Jung R, Larkins B A, Larkins B A. The maize *floury1* gene encodes a novel endoplasmic reticulum protein involved in zein protein body formation. *Plant Cell*, 2007, 19: 2569–2582.
- [12] Mertz E T, Bates L S, Nelson O E. Mutant gene that changes protein composition and increases lysine content of maize endosperm. *Science*, 1964, 145: 279–280.
- [13] Schmidt R J, Burr F A, Aukerman M J, Burr B. Maize regulatory gene *opaque-2* encodes a protein with a “leucine-zipper” motif that binds to zein DNA. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1990, 87: 46–50.
- [14] Schmidt R J, Ketudat M, Aukerman M J, Hoschek G. *Opaque-2* is a transcriptional activator that recognizes a specific target site in 22-kD zein genes. *Plant Cell*, 1992, 4: 689–700.
- [15] Cord-Neto G, Yunes J A, da Silva M J, Vettore A L, Arruda P, Leite A. The involvement of *opaque 2* on beta-prolamin gene regulation in maize and coix suggests a more general role for this transcriptional activator. *Plant Mol Biol*, 1995, 27: 1015–1029.
- [16] Li Q, Wang J, Ye J, Zheng X, Xiang X, Li C, Fu M, Wang Q, Zhang Z, Wu Y. The maize imprinted gene *FLOURY3* encodes a PLATZ protein required for tRNA and 5S rRNA transcription through interaction with RNA polymerase III. *Plant Cell*, 2017, 29: 2661–2675.
- [17] Silva-Sanchez C, Chen S, Li J, Chourey P S. A comparative glycoproteome study of developing endosperm in the hexose-deficient *miniature1* (*mn1*) seed mutant and its wild type *Mn1* in maize. *Front Plant Sci*, 2014, 5: 63–77.
- [18] Zhu C, Jin G, Fang P, Zhang Y, Feng X, Tang Y, Qi W, Song R. Maize pentatricopeptide repeat protein *DEK41* affects *cis*-splicing of mitochondrial *nad4* intron 3 and is required for normal seed development. *J Exp Bot*, 2019, 70: 3795–3808.
- [19] Tian Q, Olsen L, Sun B, Lid S E, Brown R C, Lemmon B E, Fosnes K, Gruis D F, Opsahl-Sorteborg H G, Otegui M S, Olsen O A. Subcellular localization and functional domain studies of *DEFECTIVE KERNEL1* in maize and *Arabidopsis* suggest a model for aleurone cell fate specification involving *CRINKLY4* and *SUPERNUMERARY ALEURONE LAYER1*. *Plant Cell*, 2007, 19: 3127–3145.
- [20] Yuan N, Wang J, Zhou Y, An D, Xiao Q, Wang W, Wu Y. *EMB-7L* is required for embryogenesis and plant development in maize involved in RNA splicing of multiple chloroplast genes. *Plant Sci*, 2019, 287: 110203.
- [21] Shen Y, Li C, McCarty D R, Meeley R, Tan B C. *Embryo defective12* encodes the plastid initiation factor 3 and is essential for embryogenesis in maize. *Plant J*, 2013, 74: 792–804.
- [22] Ding S, Liu X Y, Wang H C, Wang Y, Tang J J, Yang Y Z, Tan B C. *SMK6* mediates the C-to-U editing at multiple sites in maize mitochondria. *J Plant Physiol*, 2019, 240: 152992.
- [23] Wang H C, Sayyed A, Liu X Y, Yang Y Z, Sun F, Wang Y, Wang M, Tan B C. *SMALL KERNEL4* is required for mitochondrial *cox1* transcript editing and seed development in maize. *J Integr Plant Biol*, 2019.
- [24] Lurin C, Andres C, Aubourg S, Bellaoui M, Bitton F, Bruyere C, Caboche M, Debast C, Gualberto J, Hoffmann B, Lecharny A, Le Ret M, Martin-Magniette M L, Mireau H, Peeters N, Renou J P, Szurek B, Taconnat L, Small I. Genome-wide analysis of *Arabidopsis* pentatricopeptide repeat proteins reveals their essential role in organelle biogenesis. *Plant Cell*, 2004, 16: 2089–2103.
- [25] Wang Y, Liu W, Wang H, Du Q, Fu Z, Li W X, Tang J. *ZmEHD1* is required for kernel development and vegetative growth through regulating auxin homeostasis. *Plant Physiol*, 2019, 182: 1467–1480.
- [26] Li X J, Zhang Y F, Hou M, Sun F, Shen Y, Xiu Z H, Wang X, Chen Z L, Sun S S, Small I, Tan B C. *Small kernel 1* encodes a pentatricopeptide repeat protein required for mitochondrial *nad7* transcript editing and seed development in maize (*Zea mays*) and rice (*Oryza sativa*). *Plant J*, 2014, 79: 797–809.
- [27] Yang Y Z, Ding S, Wang Y, Li C L, Shen Y, Meeley R, McCarty D R, Tan B C. *Small kernel2* encodes a glutaminase in Vitamin B₆ biosynthesis essential for maize seed development. *Plant Physiol*, 2017, 174: 1127–1138.
- [28] Pan Z, Ren X, Zhao H, Liu L, Tan Z, Qiu F. A mitochondrial transcription termination factor, *ZmSmk3*, is required for *nad1* intron4 and *nad4* intron1 splicing and kernel development in maize. *G3: Genes Genom Genet*, 2019, 9: 2677–2686.
- [29] Pan Z, Liu M, Xiao Z, Ren X, Zhao H, Gong D, Liang K, Tan Z, Shao Y, Qiu F. *ZmSMK9*, a pentatricopeptide repeat protein, is involved in the *cis*-splicing of *nad5*, kernel development and plant architecture in maize. *Plant Sci*, 2019, 288: 110205.
- [30] Handa N, Terada T, Kamewari Y, Hamana H, Tame J R, Park S Y, Kinoshita K, Ota M, Nakamura H, Kuramitsu S, Shirouzu M, Yokoyama S. Crystal structure of the conserved protein TT1542 from thermus thermophilus HB8. *Protein Sci*, 2003, 12: 1621–1632.
- [31] 王家利, 刘冬成, 郭小丽, 张爱民. 生长素合成途径的研究进展. *植物学报*, 2012, 47: 292–301.
Wang J L, Liu D C, Guo X L, Zhang A M. Research progress of auxin synthesis pathway. *Chin Bull Bot*, 2012, 47: 292–301 (in Chinese with English abstract).
- [32] Bashline L, Li S, Zhu X, Gu Y. The TWD40-2 protein and the AP2 complex cooperate in the clathrin-mediated endocytosis of cellulose synthase to regulate cellulose biosynthesis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2015, 112: 12870–12875.