DOI: 10.3724/SP.J.1006.2021.03060

玉米籽粒缺陷突变基因 *dek54* 的精细定位及候选基因分析

周 练 刘朝显 陈秋兰 王文琴 姚 顺 赵子堃 朱思颖
洪祥德 熊雨涵 蔡一林*

西南大学玉米研究所 / 农业科学研究院 / 南方山地作物逆境生物学国家级培育基地, 重庆 400715

摘 要: 玉米籽粒与产量和营养品质密切相关, 控制籽粒发育基因的功能研究对解析籽粒发育分子机制, 提高玉米产量, 改善籽粒营养品质提供重要依据。利用甲基磺酸乙酯(ethyl methanesulfonate, EMS)处理 B73 花粉, 筛选到一个玉米籽粒缺陷突变体 *defective kernel 54 (dek54)*。*dek54* 表现出成熟籽粒变小、皱缩、颜色发白等特征; 遗传分析表明 *dek54* 是一个单基因控制的隐性突变体。石蜡切片显示 *dek54* 淀粉胚乳细胞形状不规则且排列致密, 扫描电镜观察成熟籽粒胚乳中心区域发现 *dek54* 淀粉粒周围蛋白体比野生型少且排列疏松。*dek54* 成熟籽粒的总蛋白、醇溶蛋白、各氨基酸组分和全氮含量相比野生型都显著降低。利用 F₂ 分离群体中的 1566 个 *dek54* 单株, 把 *dek54* 定位在 7 号染色体标记 SSR6 和 SSR7 之间, 物理位置约为 290 kb。该区间有 3 个基因, 基因测序发现 *Zm00001d019294* 基因第 2 个外显子上第 351 个碱基由 G 突变为 A, 从而导致蛋白翻译的提前终止。该基因在玉米籽粒中特异性表达, 且在 12 DAP (days after pollination) 籽粒中表达量最高。通过 CRISPR/Cas9 系统进行靶向突变确定候选基因 *Zm00001d019294* 导致该突变表型。*Dek54* 编码一个与 ZmNRT1.5 (nitrate transporter) 具有较高同源性的 MFS (major facilitator super-family) 家族蛋白并定位在玉米原生质体的细胞质膜。该研究为揭示 *dek54* 在玉米籽粒发育的分子机制奠定了重要基础。

关键词: 玉米; *defective kernel 54*; 籽粒发育; 精细定位

Fine mapping and candidate gene analysis of maize defective kernel mutant *dek54*

ZHOU Lian, LIU Chao-Xian, CHEN Qiu-Lan, WANG Wen-Qin, YAO Shun, ZHAO Zi-Kun, ZHU Si-Ying, HONG Xiang-De, XIONG Yu-Han, and CAI Yi-Lin*

¹ Institute of Crop Sciences, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100087, China; ² Beijing Engineering and Technique Research Center for Hybrid Wheat, Beijing Academy of Agriculture and Forestry Sciences / Municipal Key Laboratory of the Molecular Genetics of Hybrid Wheat, Beijing 100097, China

Abstract: Maize kernel is closely related to yield and nutritive quality. Study on the function of maize kernel development relative genes provides important basis for the molecular mechanism analysis, yield increasing and nutritive quality improving. B73 pollen was treated with ethyl methylmethanesulfonate (EMS) and a defective maize kernel *defective kernel 54 (dek54)* was screened. *dek54* had small mature kernel, wrinkled and whitened seed coat phenotype. Genetic analysis indicated that *dek54* is a recessive mutant controlled by a single gene. Paraffin sections showed starchy endosperm cells of *dek54* had irregular shape and dense arrangement at developmental stage. Scanning electron microscopy observation indicated that protein bodies around starch granules in the central region of the *dek54* mature kernel endosperm were fewer and arranged more loosely compare to wild type. Total protein, zein, amino acids components contents and total nitrogen content of *dek54* mature kernel were significantly lowered compared with the wild type. *dek54* was located on chromosome 7 within the interval of the physical distance of about 290 kb between markers SSR6 and SSR7. Sequencing revealed that the 351th base G on the 2nd exon of *Zm00001d019294* gene changed into A, which led to the premature termination of the protein translation. *Zm00001d019294* gene was specifically expressed in immature maize kernel, and has the highest expression in 12 DAP (days after pollination) immature kernel. Targeted mutation was performed using CRISPR/Cas9 system to identify that mutant phenotype was caused by candidate gene *Zm00001d019294*. *Dek54*

本研究由国家自然科学基金项目(31601312)资助。

This study was supported by the National Natural Science Foundation of China (31601312).

* 通信作者(Corresponding author): 蔡一林, E-mail: caiyilin1789@163.com

第一作者联系方式: E-mail: zhoulianjojo@swu.edu.cn

Received (收稿日期): 2020-10-15; Accepted (接受日期): 2021-01-13; Published online (网络出版日期): 2021-03-02.

URL: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1809.S.20210301.1612.013.html>

encoded an MFS (major facilitator superfamily) protein and had high homology with ZmNRT1.5 (nitrate transporter). Besides, Dek54 protein was localized in the plasma membrane of maize protoplasts. The study of *dek54* laid the foundation for the molecular mechanism analysis of maize kernel development.

Keywords: maize (*Zea mays* L.); defective kernel 54; kernel development; fine mapping

玉米(*Zea mays* L.)作为一年生禾本科植物,是我国重要的粮食作物。玉米生产对保障我国粮食安全有着重要的战略意义。随着世界人口和经济水平的不断增长,对玉米产量和营养品质的要求日益增长。玉米的胚和胚乳作为籽粒的主要组成部分,来自植物双受精作用,与玉米产量和营养品质密切相关。玉米籽粒主要是由淀粉、蛋白质和油脂组成。其中淀粉和蛋白质主要储存在胚乳中,油脂主要存在胚中。玉米胚乳由 4 种不同类型的细胞组成,包括淀粉胚乳细胞、基部胚乳转移层细胞、糊粉层细胞和胚包围层细胞^[1-2]。8~14 DAP 胚乳细胞具有很强的有丝分裂活性,到 20~25 DAP 时有丝分裂细胞只在包含糊粉层和亚糊粉层的外周细胞层增殖。淀粉胚乳细胞在胚乳的中央区域,10 DAP 淀粉胚乳细胞从有丝分裂转变为核内复制^[1]。淀粉胚乳细胞储存籽粒中大部分的淀粉和蛋白质,有效地决定籽粒质地和营养品质。玉米籽粒胚乳的外侧是蛋白体含量较多的透明区域,而中心则是由较多淀粉粒和少量蛋白体组成的不透明区域。淀粉粒和蛋白体之间的比例决定着玉米籽粒的硬度,也是玉米品质的重要影响因素。玉米胚乳蛋白的质量也会影响玉米营养品质和病虫害抗性。胚乳蛋白中醇溶蛋白(zein)的含量占籽粒总蛋白量的 70%左右,但醇溶蛋白中人体必需的赖氨酸含量低,极大的降低了玉米的营养价值。因此,醇溶蛋白和非醇溶蛋白的比例也是决定玉米籽粒品质的重要因素之一。

随着玉米全基因组测序的完成,玉米籽粒发育及产量相关的基因功能研究逐渐成为热点。玉米具有大量的籽粒突变体,这些突变体籽粒表型表现异常。根据遗传学分析,可以分为 3 种不同的类型,包括: (1) 单基因隐性突变体: *defective kernel* 突变体 *dek1*^[3-6]、*dek2*^[7]、*dek15*^[8]、*dek36*^[9]、*dek37*^[10]、*dek39*^[11]和 *dek44*^[12]等, *dek* 突变体影响籽粒胚和胚乳的发育,使籽粒产生严重缺陷。例如 *dek44* 突变体产生小粒的胚致死表型, *Dek44* 基因编码一种线粒体核糖体蛋白 L9, 调节细胞生长和籽粒发育^[12]。 *opaque* 突变体 *o1*^[13]、*o2*^[14-15]、*o5*^[16]、*o7*^[17]、*o9-11*^[18]和 *o13-17*^[19]等, *opaque* 突变体籽粒粉质化,通过改变醇溶蛋白含量从而影响胚乳质地和蛋白品质。例如 *o7* 突变体

基因编码蛋白影响 19-kD 和 22-kD α -zein 以及 16-kD γ -zein 的合成,从而引起蛋白体数量减少和变小,出现粉质胚乳表型^[17]。(2) 显性突变体 *Mucronate* (Mc)^[20]和 *Defective endosperm* (De-B30)^[21], DeB30 突变体籽粒的非醇溶蛋白比正常籽粒增加了约 70%。(3) 半显性 *floury* 突变体 *fl*^[22]和 *fl2*^[23], *floury* 突变体也会引起胚乳粉质化。例如 *fl2* 由于单个氨基酸的突变使得 22 kD α -zein 的信号肽不能正常剪切从而导致蛋白体异常^[23]。由于玉米基因组大,且转座子元件较多,相比水稻等主要粮食作物,仍有大量籽粒突变基因的功能及分子机制仍然不清楚。

本研究利用 EMS 处理玉米自交系 B73 花粉得到一个籽粒缺陷突变体 *dek54* (根据已发表的 *dek* 突变体顺序命名)。本研究观察了 *dek54* 籽粒形态学和组织学结构,分析了 *dek54* 籽粒相关生化成分;通过与 Mo17 构建的 F₂ 分离群体对 *dek54* 进行了基因定位,并通过 CRISPR/Cas9 系统靶向突变确定了候选基因 *Dek54*;分析了 *Dek54* 基因在不同组织的时空表达情况及其编码蛋白结构和同源性比对,明确了 *Dek54* 蛋白的细胞质膜定位结果。该研究解析 *Dek54* 在玉米籽粒发育中的分子机制奠定了重要基础。

1 材料与方法

1.1 *dek54* 突变体获得和分离群体构建

2015 年春,于重庆北碚田间种植玉米自交系 B73 和 Mo17,收集 B73 花粉进行 EMS (终浓度 0.67 mL L⁻¹) 诱变处理;将诱变处理后的花粉与 Mo17 植株进行杂交。同年下半年,把获得的 M₀ 代籽粒种植于云南元江,自交后收获果穗,观察表型,筛选出了籽粒皱缩突变体 *dek54*。继续用 *dek54* 为母本与 Mo17 杂交,构建 F₂ 分离群体。提取 1566 个 *dek54* 植株 DNA,鉴定其基因型,筛选重组单株,对 *dek54* 进行精细定位。

1.2 石蜡切片和扫描电镜观察

分别取 16 DAP 果穗上的野生型和 *dek54* 未成熟籽粒,在福尔马林-乙酸-乙醇固定液(FAA, 50%乙醇, 0.9 mmol L⁻¹ 冰醋酸, 3.7% 甲醛)中 4 固定过夜。将样品放置在一系乙醇和二甲苯梯度溶液中脱水,在石蜡中进行包埋。将石蜡样本切成 10 μ m 的厚度,

经烤片并脱水后, 用 1%番红和固绿(Amresco)染色。荧光显微镜下(Leica, D3000)进行观察。分别取 F_2 果穗上野生型和 *dek54* 的成熟籽粒, 经临界干燥、断面喷金后, 在扫描电镜下(Hitachi, SU3500)观察 *dek54* 与野生型的籽粒相同部位胚乳形态结构差异。

1.3 籽粒蛋白、淀粉、氨基酸和全氮含量测定

分别取 F_2 群体中同一个果穗上野生型和 *dek54* 的成熟籽粒, 用水浸泡 5 min, 并去除种皮和胚。将剩余胚乳部分在液氮中研磨成细粉。将真空抽干粉末各称取 50 mg 两份, 加入 1 mL 石油醚, 置于 37 摇床 1 h; 去除石油醚, 加入硼酸钠蛋白提取液和巯基乙醇, 37 摇床过夜。分别提取每个样品的总蛋白、醇溶蛋白和非醇溶蛋白, 并进行蛋白含量测定^[17]。总淀粉含量的测量按照总淀粉测定试剂盒(Megazyme, K-TSTA-100A)使用说明进行。将样品进行蛋白质水解, 去除脂质、色素等, 使用全自动氨基酸分析仪(Hitachi, L-8900)测定氨基酸含量, 每个样品 3 次重复。将样品用浓硫酸/双氧水进行消煮, 使用凯氏定氮仪(Alva, KN580)测定全氮含量。

1.4 *dek54* 连锁标记筛选及精细定位

在 F_2 群体中分别选择 10 株野生型和 10 株突变体, 提取基因组 DNA, 并等量混合, 构建突变体 DNA 池(mutant DNA pool, MP)和野生型 DNA 池(wild-type DNA pool, WP)。利用实验室已有的覆盖玉米全基因组, 在 B73 和 Mo17 之间有多态性的 432 个 SSR 标记对这 2 个 DNA 进行扩增。筛选在 2 个 DNA 池之间具有多态性的分子标记。通过 Gramene 网站(<http://www.gramene.org/>)下载玉米基因组 DNA 序列, 并通过 SSRHunter^[24]开发 SSR 标记; 验证在 B73 和 Mo17 之间具有多态性后用于 *dek54* 的精细定位。

1.5 qRT-PCR

取 B73 根、茎、叶、未成熟雌穗(1~2 cm)和雄穗(1~2 cm)及 12、14、16、18、20 DAP 的未成熟籽粒和成熟籽粒, 迅速冻于液氮。提取总 RNA, 进行反转录生成 cDNA^[25]。qRT-PCR (quantitative reverse transcription-PCR)中利用玉米 *ZmACTIN1* 基因作为内参, 样品间同一基因的相对表达量通过下例公式计算: $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 。

1.6 载体构建及玉米遗传转化

通过对候选基因 *Zm00001d019294* gDNA 序列进行分析, 选择第 2 个外显子的 19 bp (5'-GCCGAGCTACCTCTGCGAC-3')的靶向序列。合成包括靶向序列和 sgRNA 在内的寡核苷酸引物, 采用单编辑策略将该序列克隆到 pCambia3301-Cas9 载体, 并将构建好的载体转入农杆菌 EHA105 菌株。通过农杆

菌介导的玉米未成熟胚遗传转化, 获得玉米转基因植株。通过测序来确定 CRISPR/Cas9 编辑玉米植株目标位置附近的编辑位点, 获得 5 个独立的 CRISPR/Cas9 基因敲除转基因株系, 选择 2 个转基因株系进行后续实验。

1.7 基因注释及系统进化分析

通过 NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)和 MaizeGDB (<https://maizegdb.org/>)等数据库网站, 搜索下载相关基因的基因组、cDNA 和蛋白序列。通过 BLAST CD-Search (basic local alignment search tool conserved domain search, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>) 比对分析目标蛋白的保守序列。将所有进行比对的氨基酸序列转换成 FASTA 格式合并导出, 通过 CLUSTALW 进行多序列比分析, 在使用 MEGA6 进行 N-J (neighbor-joining) 进化树构建。

1.8 亚细胞定位

以玉米 B73 的 12 DAP 未成熟籽粒 cDNA 为模板, 通过 PCR 扩增 *Dek54* 的全长 CDS 序列(除去终止密码子)连接到 pAN580 载体, 构建 *Dek54*-GFP 融合表达载体。将含有正确插入片段的载体和质膜定位标记载体 PM107 (AtPIP1; 2-mCherry)分别通过 PEG 介导共转化玉米原生质体。在激光共聚焦显微镜(LSM800, Carl Zeiss)下观察荧光。

2 结果与分析

2.1 *dek54* 表型鉴定与遗传分析

利用 EMS 化学诱变技术获得了玉米籽粒缺陷突变体 *dek54*。该突变体与 Mo17 杂交, F_1 群体表型表现正常, 自交后 F_2 果穗上产生分离(图 1-A)。统计 5 个 F_2 果穗, 野生型(+/+和 *dek54*/+)与突变型(*dek54/dek54*)籽粒分别有 1549 粒和 499 粒, 适合度测验结果显示, 野生型和突变体籽粒的分离比接近 3 : 1 ($\chi^2 = 0.16 < \chi^2_{0.05} = 3.84$), 说明 *dek54* 是一个单基因控制的隐性突变体。

dek54 与野生型相比表现为, 成熟籽粒变小, 皱缩干瘪, 且颜色发白(图 1-A, B)。对野生型和 *dek54* 成熟籽粒进行徒手切片并在体式显微镜下观察籽粒胚和胚乳的形态。籽粒纵切面显示, 突变体胚的形状正常, 但显著小于野生型(图 1-C), 突变体籽粒较野生型萌发延迟但后续生长正常(附图 1)。籽粒横切面显示, 突变体籽粒胚乳中间不透明的淀粉胚乳面积缩小, 分布在粉质胚乳周围的透明玻璃质胚乳面积显著增大(图 1-D)。野生型和 *dek54* 的百粒重分别

为 31.2 g 和 10.0 g, *dek54* 仅为野生型的 32.0%; *dek54* 十粒长和十粒宽分别为野生型的 79.0% 和 66.7%, 均显著低于野生型(图 1-E)。由此可见, *dek54* 突变显著影响了籽粒胚和胚乳的发育。

2.2 *dek54* 籽粒组织学观察

取 16 DAP 的野生型和突变体籽粒进行石蜡切片观察。结果显示, *dek54* 的种皮与胚乳脱离, 胚乳细胞相比野生型发生了明显变化, 表现在糊粉层细胞相比野生型层数增加, 并且淀粉胚乳细胞组织形态不规则并且相比野生型排列较密且较小(图 2-A)。

图 1 *dek54* 突变体表型鉴定

Fig. 1 Phenotypic characterization of *dek54* mutant

A: 成熟果穗 F₂ 分离群体; B: 籽粒表型; C: 籽粒纵切; D: 籽粒横切; E: F₂ 分离群体上野生型和 *dek54* 突变体籽粒的百粒重、十粒长和十粒宽。标尺为 0.5 cm。Em: 胚; En: 胚乳; SE: 粉质胚乳; VE: 玻璃质胚乳。

A: F₂ segregating population of mature ear; B: phenotypes of kernels; C: cross section of kernels; D: longitudinally section of kernels; E: 100-kernel weight, ten-kernel length, and ten-kernel width of WT and *dek54* mutant kernels from F₂ segregating population. Bar: 0.5 cm. Em: embryo; En: endosperm; SE: starchy endosperm; VE: vitreous endosperm.

说明 *dek54* 突变显著地影响胚乳细胞的发育。推测由于胚乳细胞发育的不完全使得 *dek54* 突变体籽粒表现出皱缩的表型。对成熟籽粒横截面的扫描电镜观察显示, 相同位置的野生型胚乳中淀粉粒周围有密集蛋白体包围, 而 *dek54* 突变体的淀粉周围蛋白体数量较少, 且排列较疏松(图 2-B)。

图 2 *dek54* 突变体的组织学观察

Fig. 2 Histological observation of *dek54* mutant

A: 16 DAP 野生型和 *dek54* 突变体籽粒的石蜡切片纵切观察。标尺为 100 μ m。AL: 糊粉层; SE: 淀粉胚乳。B: 野生型和 *dek54* 突变体成熟籽粒胚乳中心区域扫描电镜观察。标尺为 50 μ m。SG: 淀粉粒; PB: 蛋白体。

A: longitudinal paraffin sections observation of developing WT and *dek54* mutant kernels at 16 DAP. Bar: 100 μ m. AL: aleurone layer; SG: starch endosperm. B: scanning electron microscopy observation of the central regions of WT and *dek54* mutant mature kernel endosperm. Bar: 50 μ m. SG: starch granule; PB: protein body.

2.3 *dek54* 相关生化成分检测

分别提取野生型和 *dek54* 成熟籽粒胚乳中的总蛋白、醇溶蛋白和非醇溶蛋白。结果显示, 突变体的总蛋白和醇溶蛋白含量相比野生型分别降低了 29.2% 和 27.6%, 而非醇溶蛋白没有显著差异(图 3-A)。成熟籽粒胚乳中的淀粉含量测定发现, 突变体的胚乳淀粉含量与野生型没有显著差异(图 3-B)。总氨基酸含量测定显示, 突变体籽粒胚乳中各类氨基酸含量相比野生型均显著降低, 其中赖氨酸含量仅为野生型的 63.0% (图 3-C)。进一步全氮含量测定结果表明, *dek54* 突变体的成熟籽粒中全氮含量显著低于野生型, 降低了 16.5% (图 3-D)。

2.4 *dek54* 突变体的精细定位

利用 432 个在 B73 和 Mo17 基因组间有多态性的 SSR 标记对突变体 DNA 池和野生型 DNA 池进行筛选。发现 SSR 标记 umc2160 在 2 个 DNA 池中检

图 3 *dek54* 突变体的生化成分分析

Fig. 3 Biochemical component analysis of *dek54* mutant

野生型和 *dek54* 突变体成熟籽粒的蛋白(A)、淀粉(B)、各氨基酸组分(C)和全氮含量(D)。

Protein (A), starch (B), amino acid components (C), and total nitrogen contents (D) of WT and *dek54* mutant kernels.

图 4 *dek54* 的连锁 SSR 标记筛选和精细定位

Fig. 4 Linkage SSR marker screening and fine mapping of *dek54*

A: umc2160 的 PCR 扩增产物在 WP 和 MP 之间具有多态性; B: 通过 33 个 *dek54* 单株的基因型确定 SSR 连锁标记 umc2160; C: 通过 F₂ 群体 1566 个单株对 *dek54* 进行精细定位。 *dek54* 定位标记 SSR6 和 SSR7 之间物理距离约为 290 kb 的区间内。黑色垂直实线上方为分子标记名称, 下方数字为该标记鉴定的交换单株数量。

A: the polymorphic PCR products amplified by umc2160 between WP and MP; B: confirmation of linkage SSR marker umc2160 by genotyping 33 *dek54* mutant plants; C: fine mapping of *dek54* using F₂ population including 1566 individuals. *dek54* was mapped to an interval about 290 kb flanked by SSR6 and SSR7. The symbols above and below the black vertical solid lines represent the molecular marker and the number of recombinants, respectively.

表 1 *dek54* 定位 SSR 标记引物序列

Table 1 Sequences of SSR markers for *dek54* mapping

标记类型	标记名称	正向引物序列	反向引物序列
Type	Name	Forward sequence (5'-3')	Reverse sequence (5'-3')
SSR	SSR23403	ACTAGTATGTGGATTGCTCGTCG	GCTGCTGAGCTGTATGTACCA
SSR	SSR1	CCCTGACGAAAGCATGAATGAG	ACAGATGACTCTGCACCTCAAG
SSR	SSR2	TGCCCATAAGAGCTTCGAGGATA	AGCCTTAGTTGTCAGTCCATCG
SSR	SSR3	TGCCCATAAGAGCTTCGAGGATA	AGCCTTAGTTGTCAGTCCATCG
SSR	SSR4	CCATCTGTACTAATGGCACCTGA	GCCAGCAAAGCTTTTCAAGAGT
SSR	SSR5	GGCTACATAAGATGCAAAGCGG	TACCCTTTGACAGAGCCTACCT
SSR	SSR6	GGTGCCAAAAACATCTCCCAAC	TAGCGTGGGGTCATAGCAACA
SSR	SSR7	CATGGCCAAAATATCGCACGAG	TGACGTACATGAACACCTCGG
SSR	SSR8	GCTAGGTGCAGTGCTCTGCTT	CCTTGAACGTGGGGTAGGCT
SSR	SSR10308	GCAAATGTTCTGTGCAAGGCTA	GCCCCACAAGAACTCCATCTAT

表 2 *dek54* 定位区间基因注释

Table 2 Gene annotation in the mapping region of *dek54*

编号	基因 ID	功能注释
No.	Gene ID	Function annotation
1	<i>Zm00001d019292</i>	无注释 No annotation
2	<i>Zm00001d019293</i>	异柠檬酸/异丙基苹果酸脱氢酶 Isocitric acid/isopropyl malate dehydrogenase
3	<i>Zm00001d019294</i>	MFS 家族 Major facilitator superfamily

测出多态性(图 4-A), 该标记位于第 7 号染色体的 7.01 bin。使用 umc2160 检测 33 株 *dek54* 的基因型, 结果显示 30 株 *dek54* 的基因型与表型相一致, 3 株 (17、25 和 27) *dek54* 因为染色体重组表现为杂合基因型(图 4-B), 由此证实了该标记与 *dek54* 基因连锁。在 umc2160 标记邻近的区间开发新的 SSR 标记(表 1)用于 *dek54* 定位。利用 F₂ 群体中 1566 个单株将 *dek54* 初步定位在与 SSR 标记 SSR23403 和 SSR0308 相邻的 8.52 Mb 的物理区间内(图 4-C)。进一步通过重组植株的筛选, 开发并筛选到 8 个具有多态性的 SSR 标记。在 SSR1~8 标记位置各筛选到交换单株 20、11、11、3、2、2、2 和 11 株。最终, *dek54* 定位在玉米 7 号染色体标记 SSR6 和 SSR7 之间物理距离约为 290 kb 的区间内(图 4-C)。

2.5 候选基因序列及表达分析

Gramene 玉米数据库显示 SSR6 和 SSR7 之间物理距离约为 290 kb, 定位区间内仅包括 3 个基因(表 2), 通过扩增并测序, 比较这 3 个基因在 *dek54* 与对照 B73 的 DNA 序列, 发现 *Zm00001d019294* 基因第 2 个外显子上第 351 个碱基位点由 G 突变转换为 A, 导致密码子由 TGG 变为 TAG, 从而造成蛋白翻译的提前终止(图 5-A); 而其他 2 个基因的 DNA 序列没有差异。因此推测 *Zm00001d019294* 基因的突变是

导致 *dek54* 表型产生的原因。

通过 qRT-PCR 的方法, 检测 *Zm00001d019294* 基因在玉米自交系 B73 的不同组织的表达情况, 包括根、茎、叶、雄穗、花丝、12、14、16、18、20 DAP 的未成熟籽粒和成熟籽粒。检测表明, *Zm00001d019294* 基因在未成熟籽粒(12~20 DAP)中特异性表达; 且在 12 DAP 未成熟籽粒中表达量最高, 并随着籽粒发育表达量逐渐下降, 在其他组织和成熟籽粒中均不能检测到其表达(图 5-B)。*Zm00001d019294* 基因在未成熟籽粒中的特异性表达说明其在籽粒发育过程中发挥作用。

2.6 CRISPR/Cas9 靶向突变 *Zm00001d019294* 基因表型鉴定

利用 CRISPR/Cas9 系统对 *Zm00001d019294* 基因进行靶向突变。以 *Zm00001d019294* 的第 2 个外显子为靶标设计 sgRNA 间隔序列。获得了 5 个独立的 CRISPR/Cas9 转基因株系, 通过测序确定其中 2 个(*dek-cas9-1* 和 *dek-cas9-2*)含有由目标序列插入或缺失引起的密码子移位突变(图 6-A)。CRISPR/Cas9 转基因株系的成熟籽粒与 *dek54* 表现出相似的缺陷表型(图 6-B~D)。该结果表明 *Zm00001d019294* 基因是引起该籽粒突变表型的目标基因。

图 5 *Zm00001d019294* 基因突变位点及时空表达分析
Fig. 5 Mutation site and spatio-temporal expression analysis of *Zm00001d019294*
A: *Zm00001d019294* 基因结构图, 红色箭头所示为突变位点; B: *Zm00001d019294* 基因在不同组织及发育中的未成熟籽粒中的表达分析。
A: gene structure diagram of *Zm00001d019294*. The red arrow indicates mutation sites. B: the relative expression level of *Zm00001d019294* in different tissues and developing immature kernel.

图 6 *Zm00001d019294* CRISPR/Cas9 靶向突变表型鉴定
Fig. 6 Phenotypic characterization of CRISPR/Cas9 targeted mutation of *Zm00001d019294*
A: *Zm00001d019294* 的 CRISPR/Cas9 靶位点序列。sgRNA 靶序列为绿色, PAM (protospacer-adjacent motif) 序列为蓝色, 红色字母和短线分别代表插入和缺失; B: *dek54-cas9-1xMo17* 的 F₂ 成熟果穗; C: 成熟的 WT 和 *dek54-cas9-1* 籽粒; D: 成熟的 WT 和 *dek54-cas9-1* 籽粒的纵切。Em: 胚; En: 胚乳。标尺为 0.5 cm。
A: the sequence in the *Zm00001d019294* locus targeted using CRISPR/Cas9. The sgRNA target sequence is green. Protospacer-adjacent motif (PAM) is blue. Red letters and dashes represent insertions and deletions, respectively. B: mature F₂ ear of *dek54-cas9-1xMo17*. C: mature WT and *dek54-cas9-1* kernels. D: longitudinal paraffin sections of mature WT and *dek54-cas9-1* kernels. Em: embryo; En: endosperm. Bars: 0.5 cm.

2.7 Dek54 蛋白预测及亚细胞定位

Dek54 (*Zm00001d019294*)由5个外显子和4个内含子组成。*Dek54*的成熟转录本编码序列长1923 bp, 编码一个由640个氨基酸组成的蛋白。通过BLAST CD-Search比对分析该蛋白的保守序列, 结果表明, *Dek54*蛋白序列中包含MFS保守结构域(图7-A)。蛋白序列比对及系统进化分析发现, *Dek54*蛋白与玉米和拟南芥硝酸盐转运体NRT1类蛋白具有较高的同源性, 且与ZmNRT1.5B和ZmNRT1.5A蛋白序列同源性最高(图7-B)。通过PEG介导的玉米原生质体共转化及荧光显微镜观察显示, *Dek54*蛋白的绿色荧光与质膜标记蛋白红色荧光完全重合(图8), 表明 *Dek54*定位在细胞质膜上。推测 *Dek54*可能是一个位于细胞质膜的硝酸盐转运体。

图 7 Dek54 蛋白保守结构域(A)及进化(B)分析
Fig. 7 Conserved domain (A) and phylogenetic (B) analysis of *Dek54* protein

图 8 玉米原生质体中 Dek54 的亚细胞定位观察
Fig. 8 Observation of subcellular localization of *Dek54* in maize protoplasts
Dek54-GFP 载体与 mCherry 标记的质膜标记(mCherry-PM; CD3-1007)共定位。标尺为 20 μm。
Dek54-GFP was co-localized with a mCherry-labeled plasma membrane marker (mCherry-PM; CD3-1007). Bar: 20 μm.

3 讨论

籽粒缺陷(*defective kernel*, *dek*)突变体是一类主要的玉米籽粒突变体。*dek*突变体表型变化极为显著,主要表现为,胚乳发育缺陷、籽粒较小、种皮与胚乳分离、种皮颜色较浅,且表面皱缩等特征^[26]。本研究中,*dek54*突变体具有*dek*突变体的典型表型特征,其胚发育延迟,胚乳发育不良;相比野生型,*dek54*籽粒的长、宽和粒重都显著降低。*dek54*是一个单基因控制的隐性突变体,显示为功能缺失突变。对玉米籽粒缺陷突变体*dek54*进行精细定位,并通过CRISPR/Cas9系统靶向突变实验确定导致突变表型的基因*Zm00001d019294*。测序结果显示,*dek54*突变体在*Zm00001d019294*基因的第2个外显子上有一个碱基突变导致该密码子突变为终止子,提前终止了蛋白序列。qRT-PCR结果表明,*Zm00001d019294*基因在未成熟籽粒中特异性表达,并随着籽粒的发育表达降低,且在成熟籽粒中不表达。说明*Dek54*基因在玉米籽粒发育过程中起着重要作用。

玉米中*dek*突变体种类多,涉及的机制非常复杂。至今,超过20个*dek*突变体已被鉴定。大部分*dek*突变体都是由PPR (pentatricopeptide repeat)蛋白突变所引起^[7,9-11,27-29]。PPR蛋白在线粒体和质体中特异性作用于RNA编辑、剪辑、稳定性和转录后调控等重要进程^[30],但也有部分*dek*突变体不是PPR蛋白突变引起。例如*Dek1*编码一个钙蛋白酶家族蛋白,影响籽粒胚和胚乳的糊粉层发育^[3],可能在陆地植物表面细胞位置传感和信号传递过程中发挥重要作用^[31];*Dek15*编码一个黏连蛋白装载复合体亚基,决定染色体分离和籽粒发育^[8]。本研究中,*Dek54*基因编码一个含有MFS保守结构域的蛋白。MFS是一类广泛存在细胞膜上的转运蛋白家族,由协同转运体、共转运体和反向转运体共同组成,能够转运多种底物包括无机和有机离子、核酸、氨基酸、短肽和脂类物质^[32],在多种生理生化途径中起着重要作用。所有的MFS转运体都具有一个典型的MFS折叠。这个折叠包含了2个结构域,每个结构域都由6个连续的跨膜基序组成,分别称为N端和C端结构域^[33]。*Dek1*蛋白由一个多跨膜结构域(*multispanning transmembrane domain*, MEM)组成^[3]。序列分析发现,MFS和DEK1-MEM的第16到22个跨膜基序具有相似性,推测MFS蛋白在响应化学渗透梯度促进各种溶质跨膜运输的功能,与MEM感知相邻细胞表面膜和外部环境差异方面功能的作用是相容的^[4]。硝酸盐转运体

NRT1是在高等植物中唯一具有典型的MFS结构的蛋白^[34]。由于对氨基酸残基T101的磷酸化^[35],使得NRT1蛋白对硝酸根离子 NO_3^- 具有双亲和力,即高亲和力和低亲和力^[36]。其中,AtNRT1.5介导 NO_3^- 的外排,并在将 NO_3^- 装载进入木质部,并转运到地上部分起着重要作用^[37]。AtNRT1.8负责从根和木质部中提取 NO_3^- ,并与AtNRT1.5协同调控 NO_3^- 的远距离运输^[38]。将拟南芥和玉米的NRT1家族的蛋白以及*Dek54*蛋白进行比对及系统分析,*Dek54*与ZmNRT1.5B、ZmNRT1.5A、AtNRT1.5和AtNRT1.8分在一个组,且具有最大的序列相似性。进一步研究表明,*Dek54*蛋白定位在玉米原生质体的细胞质膜上。组织学观察显示,*dek54*突变体籽粒淀粉胚乳细胞组织形态不规则,并且相比野生型排列较密且较小,胚乳中心区域的淀粉粒周围的蛋白体相比野生型较小,且数量较少。*dek54*突变成熟体籽粒的总蛋白、醇溶蛋白、各类氨基酸及全氮含量均显著低于野生型。推测*dek54*突变体可能由于硝酸盐转运体的缺失,导致在玉米籽粒发育过程中不能有效的转运氮,从而造成胚乳和胚的发育缺陷。但*Dek54*如何在玉米籽粒发育中发挥功能的具体作用机制仍然不明确。我们发现新的籽粒突变体丰富了玉米籽粒发育的研究材料,为进一步解析该基因在玉米籽粒发育过程的分子机制奠定了基础。

4 结论

通过EMS化学诱变,鉴定了一个新的玉米籽粒缺陷突变体*dek54*。*dek54*被定位在玉米7号染色体标记SSR6和SSR7之间物理距离约为290 kb的区间内。测序发现*Dek54*基因的第2个外显子上第351个碱基由G突变转换为A,从而引起蛋白翻译的提前终止,并在玉米未成熟籽粒中特异性表达。CRISPR/Cas9系统靶向突变实验确定与突变表型相关的候选基因*Dek54*,该基因编码一个MFS家族蛋白并与ZmNRT1.5具有较高的同源性。此外,*Dek54*蛋白定位在玉米原生质体的细胞质膜上。*dek54*突变体为解析玉米籽粒发育的分子机制提供了新的研究材料和理论依据。

References

- [1] Sabelli P A, Larkins B A. The development of endosperm in grasses. *Plant Physiol*, 2009, 149: 14–26.
- [2] Olsen O A. Endosperm development: cellularization and cell fate specification. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 2001, 52: 233–267.

- [3] Lid S E, Gruis D, Jung R, Lorentzen J A, Ananiev E, Chamberlin M, Niu X, Meeley R, Nichols S, Olsen O A. The *defective kernel 1 (dek1)* gene required for aleurone cell development in the endosperm of maize grains encodes a membrane protein of the calpain gene superfamily. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99: 5460–5465.
- [4] Demko V, Perroud P F, Johansen W, Delwiche C F, Cooper E D, Remme P, Ako A E, Kugler K G, Mayer K F, Quatrano R, Olsen O A. Genetic analysis of DEFECTIVE KERNEL1 loop function in three-dimensional body patterning in *Physcomitrella patens*. *Plant Physiol*, 2014, 166: 903–919.
- [5] Becraft P W, Li K, Dey N, Asuncion-Crabb Y. The maize *dek1* gene functions in embryonic pattern formation and cell fate specification. *Development*, 2002, 129: 5217–5225.
- [6] Tian Q, Olsen L, Sun B, Lid S E, Brown R C, Lemmon B E, Fosnes K, Gruis D F, Opsahl-Sorteberg 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.
- [7] Qi W, Yang Y, Feng X, Zhang M, Song R. Mitochondrial function and maize kernel development requires *Dek2*, a pentatricopeptide repeat Protein involved in nad1 mRNA splicing. *Genetics*, 2017, 205: 239–249.
- [8] He Y, Wang J, Qi W, Song R. Maize *Dek15* encodes the cohesin-loading complex subunit SCC4 and is essential for chromosome segregation and kernel development. *Plant Cell*, 2019, 31: 465–485.
- [9] Wang G, Zhong M, Shuai B, Song J, Zhang J, Han L, Ling H, Tang Y, Wang G, Song R. E+ subgroup PPR protein *defective kernel 36* is required for multiple mitochondrial transcripts editing and seed development in maize and *Arabidopsis*. *New Phytol*, 2017, 214: 1563–1578.
- [10] Dai D, Luan S, Chen X, Wang Q, Feng Y, Zhu C, Qi W, Song R. Maize *Dek37* encodes a P-type PPR protein that affects cis-splicing of mitochondrial nad2 intron 1 and seed development. *Genetics*, 2018, 208: 1069–1082.
- [11] Li X, Gu W, Sun S, Chen Z, Chen J, Song W, Zhao H, Lai J. *Defective Kernel 39* encodes a PPR protein required for seed development in maize. *J Integr Plant Biol*, 2018, 60: 45–64.
- [12] Qi W, Lu L, Huang S, Song R. Maize *Dek44* encodes mitochondrial ribosomal protein L9 and is required for seed development. *Plant Physiol*, 2019, 180: 2106–2119.
- [13] Wang G, Wang F, Wang G, Wang F, Zhang X, Zhong M, Zhang J, Lin D, Tang Y, Xu Z, Song R. *Opaque1* encodes a myosin XI motor protein that is required for endoplasmic reticulum motility and protein body formation in maize endosperm. *Plant Cell*, 2012, 24: 3447–3462.
- [14] Schmidt R J, Burr F A, Burr B. Transposon tagging and molecular analysis of the maize regulatory locus *opaque-2*. *Science*, 1987, 238: 960–963.
- [15] 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.
- [16] Myers A M, James M G, Lin Q, Yi G, Stinard P S, Hennen-Bierwagen T A, Becraft P W. Maize *opaque5* encodes monogalactosyldiacylglycerol synthase and specifically affects galactolipids necessary for amyloplast and chloroplast function. *Plant Cell*, 2011, 23: 2331–2347.
- [17] 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.
- [18] Feng F, Qi W, Lü Y, Yan S, Xu L, Yang W, Yuan Y, Chen Y, Zhao H, Song R. OPAQUE11 is a central hub of the regulatory network for maize endosperm development and nutrient metabolism. *Plant Cell*, 2018, 30: 375–396.
- [19] Sarika K, Hossain F, Muthusamy V, Zunjare R U, Baveja A, Goswami R, Thirunavukkarasu N, Jha S K, Gupta H S. *Opaque16*, a high lysine and tryptophan mutant, does not influence the key physico-biochemical characteristics in maize kernel. *PLoS One*, 2018, 13: e0190945.
- [20] Kim C S, Gibbon B C, Gillikin J W, Larkins B A, Boston R S, Jung R. The maize *Mucronate* mutation is a deletion in the 16-kDa gamma-zein gene that induces the unfolded protein response. *Plant J*, 2006, 48: 440–451.
- [21] Kim C S, Hunter B G, Kraft J, Boston R S, Yans S, Jung R, Larkins B A. A defective signal peptide in a 19-kD alpha-zein protein causes the unfolded protein response and an opaque endosperm phenotype in the maize *De*-B30* mutant. *Plant Physiol*, 2004, 134: 380–387.
- [22] Holding D R, Otegui M S, Li B, Meeley R B, Dam T, Hunter B G, Jung R, 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.
- [23] Coleman C E, Lopes M A, Gillikin J W, Boston R S, Larkins B A. A defective signal peptide in the maize high-lysine mutant *floury 2*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995, 92: 6828–6831.
- [24] 李强, 万建民. SSRHunter: 一个本地化的 SSR 位点搜索软件的开发. *遗传*, 2005, 27: 808–810.
Li Q, Wan J M. SSRHunter: development of a local searching software for SSR sites. *Hereditas*, 2005, 27: 808–810.
- [25] Zhou L, Zhou J, Xiong Y, Liu C, Wang J, Wang G, Cai Y. Overexpression of a maize plasma membrane intrinsic protein ZmPIP1;1 confers drought and salt tolerance in *Arabidopsis*. *PLoS One*, 2018, 13: e0198639.
- [26] Sheridan W F, Neuffer M G. Defective kernel mutants of maize: II. morphological and embryo culture studies. *Genetics*, 1980, 95: 945–960.
- [27] 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.
- [28] Ren R C, Wang L L, Zhang L, Zhao Y J, Wu J W, Wei Y M, Zhang X S, Zhao X Y. DEK43 is a P-type pentatricopeptide repeat (PPR) protein responsible for the cis-splicing of *nad4* in maize mitochondria. *J Integr Plant Biol*, 2020, 62: 299–313.
- [29] Dai D, Jin L, Huo Z, Yan S, Ma Z, Qi W, Song R. Pentatricopeptide repeat protein DEK46 is required for multi-sites mitochondrial RNA editing and maize seed development. *J Exp Bot*, 2020,

- [30] Fujii S, Small I. The evolution of RNA editing and pentatricopeptide repeat genes. *New Phytol*, 2011, 191: 37–47.
- [31] Liang Z, Demko V, Wilson R C, Johnson K A, Ahmad R, Perroud P F, Quatrano R, Zhao S, Shalchian-Tabrizi K, Otegui M S, Olsen O A, Johansen W. The catalytic domain CysPc of the DEK1 calpain is functionally conserved in land plants. *Plant J*, 2013, 75: 742–754.
- [32] Saier M H, Jr Reddy V S, Tamang D G, Västermark A. The transporter classification database. *Nucleic Acids Res*, 2014, 42: D251–258.
- [33] Yan N. Structural biology of the Major Facilitator Superfamily transporters. *Annu Rev Biophys*, 2015, 44: 257–283.
- [34] Parker J L, Newstead S. Molecular basis of nitrate uptake by the plant nitrate transporter NRT1.1. *Nature*, 2014, 507: 68–72.
- [35] Liu K H, Tsay Y F. Switching between the two action modes of the dual-affinity nitrate transporter CHL1 by phosphorylation. *EMBO J*, 2003, 22: 1005–1013.
- [36] Liu K H, Huang C Y, Tsay Y F. CHL1 is a dual-affinity nitrate transporter of *Arabidopsis* involved in multiple phases of nitrate uptake. *Plant Cell*, 1999, 11: 865–874.
- [37] Lin S H, Kuo H F, Canivenc G, Lin C S, Lepetit M, Hsu P K, Tildard P, Lin H L, Wang Y Y, Tsai C B, Gojon A, Tsay Y F. Mutation of the *Arabidopsis* NRT1.5 nitrate transporter causes defective root-to-shoot nitrate transport. *Plant Cell*, 2008, 20: 2514–2528.
- [38] Li J Y, Fu Y L, Pike S M, Bao J, Tian W, Zhang Y, Chen C Z, Zhang Y, Li H M, Huang J, Li L G, Schroeder J I, Gassmann W, Gong J M. The *Arabidopsis* nitrate transporter NRT1.8 functions in nitrate removal from the xylem sap and mediates cadmium tolerance. *Plant Cell*, 2010, 22: 1633–1646.

附图 1 野生型和 *dek54* 成熟籽粒的发芽测试(发芽后 5 d)

Fig. S1 Germination test of wildtype and *dek54* mature kernels (5 days after germination)

标尺为 1 cm。Bar: 1 cm.