

刘津, 汤艳芳, 杜何为, 等. 玉米籽粒发育突变体 *emp35* 的表型分析与基因定位[J]. 华中农业大学学报, 2024, 43(2): 85-92.
DOI: 10.13300/j.cnki.hnlkxb.2024.02.010

玉米籽粒发育突变体 *emp35* 的表型分析与基因定位

刘津^{1,2}, 汤艳芳³, 杜何为¹, 张祖新²

1. 长江大学生命科学学院, 荆州 434023; 2. 华中农业大学作物遗传改良全国重点实验室, 武汉 430070;
3. 湖北中医药大学检验学院, 武汉 430065

摘要 为解析玉米籽粒形成的遗传基础, 探究 *Emp35* 基因在玉米籽粒发育中的作用, 对籽粒缺陷突变体 *empty pericarp35(emp35)* 进行表型鉴定、胚乳细胞显微观察、胚乳贮藏物质含量测定及图位克隆。结果显示: 突变体籽粒发育缓慢, 明显小于同期发育的正常籽粒, 成熟籽粒干瘪呈空皮状; 胚乳细胞显微观察发现 *emp35* 的胚和胚乳发育严重滞后, 胚乳细胞中线粒体结构异常; 淀粉和蛋白质积累减少; F_2 代分离果穗上正常籽粒与发育缺陷籽粒呈 3:1 分离, 表明籽粒缺陷表型由单个隐性核基因突变所致。采用集团分离分析法 (bulked segregant analysis, BSA) 将 *Emp35* 定位于第 8 染色体 127.90~163.36 Mb 区间, 在该区间内开发了 4 个 InDel 标记, 连锁作图将 *Emp35* 精细定位于 139 571 117~146 176 858 区间。

关键词 玉米 (*Zea mays* L.); 籽粒发育; 集团分离分析法; 基因定位; 表型鉴定

中图分类号 S513.3 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2024)02-0085-08

玉米籽粒产量由单位面积穗数、每穗粒数和籽粒质量 3 个因素构成。籽粒质量由籽粒库容和胚乳充实程度所决定^[1], 籽粒发育与充实程度影响籽粒产量。玉米籽粒发育包括胚胎发育、胚乳细胞分化和贮藏物质积累 3 个关键过程, 每个发育过程都受众多基因调控。目前, 研究者已经克隆了百余个控制籽粒发育进程的基因^[2]。

胚是玉米授粉后籽粒中最早开始发育的器官, 也是决定种子发育的关键组织。胚发育缺陷突变体主要涉及能量供应和重要蛋白质合成相关功能, 如 *Lem1* 和 *Emb14* 控制质体核糖体的形成与组装^[3-4]; *Emb8522* 参与叶绿体 RNA 的转录后加工^[5]; *Bige1* 编码转运体蛋白, 参与信号通路的反馈调节^[6]。一方面, 玉米胚乳的发育和分化决定籽粒大小和籽粒质量, 影响胚乳发育的基因多与淀粉和蛋白质的合成加工相关。如 *Opaque2* 编码转录因子, 调控相关醇溶蛋白合成基因的表达^[7]; *Sh2* 和 *Bt2* 分别编码腺苷二磷酸葡萄糖焦磷酸化酶的大、小亚基, 共同构成淀粉合成系统中重要的酶^[8]; *Fl2*、*Opaque1*、*Opaque10* 基因参与贮藏蛋白质加工并形成蛋白质体的生理过

程^[9-11]。另一方面, 胚乳细胞在发育过程中会分化出功能特异的细胞群, 如基底胚乳传递层、糊粉层细胞和胚周围组织细胞, 这些细胞可以从植株母体组织向籽粒运输营养物质, 与籽粒的发育和充实有着密切的关系^[12]。如 *INCW2(Mn1)*、*Cr4* 等基因变异引起胚乳细胞异常分化, 导致胚和胚乳发育不良^[13-14]。玉米籽粒发育和充实的调控途径仍有待深入解析。

本研究以 1 个从 γ 射线诱变 B73 的突变体库中筛选得到的空种皮 (*empty pericarp, emp*) 籽粒表型突变体 *emp35* 为材料, 分析该突变体籽粒中胚和胚乳的动态发育和主要贮藏物质的含量变化, 并开展 *Emp35* 基因定位, 以期从发育生物学和遗传学角度解析突变体的籽粒表型, 进而全面解析籽粒质量形成的遗传基础, 为玉米籽粒质量的遗传改良提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

本研究所用的 *emp35* 突变体由长江大学杜何为教授提供。将 B73 种子经 γ 射线诱变处理后种植于大田, 植株自交。突变体 *emp35* 是从自交果穗中分离

收稿日期: 2023-04-26

基金项目: 国家自然科学基金项目 (32072069); 湖北省自然科学基金创新群体项目 (2022CFA030); 湖北洪山实验室重大项目 (2022hszd029)

刘津, E-mail: 13317194570@163.com

通信作者: 杜何为, E-mail: 200457@yangtzeu.edu.cn

出来的籽粒发育缺陷突变体。由于纯合 *emp35/emp35* 无法繁殖,以 *emp35* 杂合体植株 (+/*emp35*) 自交繁殖保存突变体基因型。通过 +/*emp35* 与 Mo17 杂交,然后自交,选择表型分离的自交果穗用于遗传分析和基因定位。

1.2 籽粒发育表型观察与遗传分析

种植 +/*emp35* 杂合单株,授粉后分别选取授粉后 10、12、14、18 d 自交果穗上的幼嫩籽粒,纵向分割,保留籽粒中部厚 2~3 mm 的组织用于包埋。石蜡包埋、染色以及切片参考 Ren 等^[15] 的方法。切片样片用体视显微镜观察拍照。

取授粉后 9、14 d 的幼嫩籽粒,从籽粒中部靠近顶端的位置进行横切,切片厚约 2 mm,浸泡于 2.5% 戊二醛中固定。扫描电镜制样参照文献^[15] 的方法进行。样品于华中农业大学电镜平台的 JSM-6390LV 扫描电镜 (NTC, 日本) 下观察拍照。

取授粉后 10 d 的野生型和突变体籽粒,从籽粒上部取微量胚乳组织固定于 2.5% 戊二醛溶液中。透射电镜制样参考 Cai 等^[16] 的方法。制样后在华中农业大学电镜平台 Hitachi-H7650 透射电子显微镜 (Hitachi, 日本) 下观察拍照。

收获 +/*emp35* 自交成熟果穗,选取 21 个正常发育且籽粒数目较多的果穗,统计干瘪皱缩籽粒和饱满圆润籽粒数,计算野生型籽粒与突变籽粒的分离比,进行 χ^2 检验。

1.3 籽粒淀粉含量和蛋白组分含量测定

从 +/*emp35* 植株自交果穗上随机挑选野生型和突变体成熟籽粒,使用淀粉测定试剂盒 (K-TSTA-100A/K, Megazyme, Ireland) 提取并测定玉米籽粒总淀粉含量,3 次生物学重复,每个生物学重复包括 3 次技术重复。具体步骤见操作手册。

采用硼酸钠浸取法提取籽粒总蛋白质,再用无水乙醇萃取总蛋白溶液分离醇溶蛋白和非醇溶蛋白^[17]。采用 BCA (bicinchoninic acid)-标准曲线试剂盒 (KTP3006, Abbkine, China) 测定野生型和突变体籽粒总蛋白、醇溶蛋白和非醇溶蛋白的含量,3 次生物学重复,每个生物学重复包括 3 次技术重复。具体步骤见操作手册。

1.4 BSA 测序及数据分析

将 +/*emp35* 单株与 Mo17 杂交获得 F_1 , F_1 单株分别自交,选取籽粒表型发生分离的授粉后 14 d 的果穗。在果穗上挑选 30 粒正常籽粒和 30 粒发育缺陷籽粒,分别混合构建野生型池 (bulk-WT, Bwt) 和突变型池 (bulk-Mut, Bmt)。采用 CTAB 法提取基

因组 DNA^[18]。取亲本 B73、Mo17、Bwt 和 Bmt 基因组 DNA 各 200 ng,按照 Illumina Nextera DNA Library Prep Kit (FC-121-1030, Illumina, America) 说明书构建测序文库,构建好的 DNA 文库使用 Illumina HiSeq4000 测序仪 (Illumina, USA) 分别进行双端 150 bp (PE150) 测序。B73 和 Mo17 测序深度为 $100\times$,每个混池的测序深度为 $30\times$ 。

对于测序原始数据,首先使用 Cutadapt^[19] (version 1.13) 和 Trimmomatic^[20] (version 0.36) 软件进行筛选,过滤得到高质量的 clean data,后用 FastQC (<https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>) 对测序长度、GC 含量、测序质量参数等数据进行统计。用 BWA^[21] (version 0.7.15-r1140) 软件的 MEM 算法将质量合格的 PE reads (paired-end reads, 双端测序片段) 比对到 B73 参考基因组 AGPv4 (http://plants.ensembl.org/Zea_mays/Info/Index) 上,然后使用软件 Samtools^[22] (version 1.3.1) 将文件转化为 BAM 格式。接着使用 Picard (version 1.9.1) 工具中的 SortSam 对 BAM 文件中的 reads 进行排序,得到最终可以用于变异分析 (variant calling) 的 BAM 文件。使用 GATK^[23] (version 3.7) 的 HaplotypeCaller 模块和 GenotypeGVCFs 模块进行变异检测,包括单核苷酸多态性 (single nucleotide polymorphisms, SNPs) 和小片段 (<10 bp) 插入和缺失 (insertion/deletion, InDel)。

完成变异检测后,分别计算 Bwt 和 Bmt 基因组上各变异位点的突变 reads 与总 reads 的比值,即 SNP-index。再计算 SNP-index (WT) 与 SNP-index (Mut) 的差值,即 Δ (SNP-index)。 Δ (SNP-index) 值高于阈值 (在 $P < 0.01$ 水平下进行 10 000 次计算) 的基因区间即可认为可能为目的基因所在区段。

1.5 候选基因的分子标记定位

根据上述分析结果,选择目标基因区间在 B73 和 Mo17、Bwt 和 Bmt 之间的 InDel 变异,进一步将 B73 序列与 Mo17 参考基因组 (<http://maize.plantbiology.msu.edu/>) 进行比对,确定 InDel 变异的真实性,并设计 InDel 标记引物 (表 1)。用所设计的 InDel 标记检测 +/*emp35* \times Mo17 构建的 F_2 群体中的突变体籽粒的基因型。将基因型数据导入 QTL IciMapping 3.0 软件中,按照规定格式将 Mo17 特有带型记作 “2”,B73 特有带型记作 “0”,杂合带型记作 “1”。构建遗传连锁图谱,计算重组率和遗传图距。

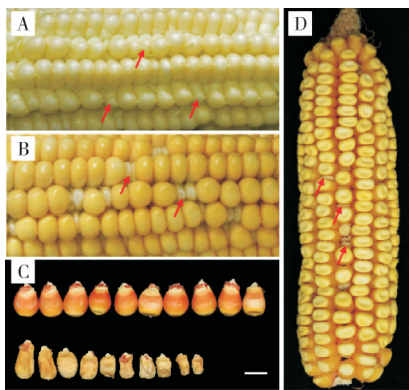
表1 *Emp35* 定位研究所用引物序列
Table 1 Primers used in *Emp35* gene mapping

引物名 Primer name	物理位置 Position	正向引物(5'→3') Forward primer	反向引物(5'→3') Reverse primer
ID128	128 194 772	TGGTCTGTCTTCTCACGCCTC	CACCTCCGACATGCACGCGA
ID134	134 506 973	CCAAACGTGAATCCAGACAG	GACGTTGCGCTTCACTATGG
ID140	139 571 147	ATACAGTCCACTTGTGAGAG	TCTGGATACAGACAGACTTG
ID146	146 176 858	CGTAGAATCTACACGATGG	CCTGCTTTCAGGAGAGAAGG

2 结果与分析

2.1 突变体籽粒表型

从 γ 射线诱变B73的突变体库中筛选到1个籽粒发育缺陷突变体,突变体籽粒干瘪,只有空种皮,没有或只有少量内容物,命名为 *empty pericarp 35* (*emp35*),该突变体只能以杂合体形式保存。选取+/ *emp35* 杂合体植株自花授粉后不同时间的果穗,观察籽粒发育的动态变化。授粉后12 d,籽粒颜色都为乳白色,野生型和突变体籽粒大小已有区别,突变体种皮皱缩(图1A)。授粉后18 d野生型籽粒呈现黄色,而突变体籽粒呈乳白色、胚乳不充实、籽粒大小明显小于野生型(图1B)。成熟果穗上的野生型籽粒圆润饱满、呈现金黄色,而突变体籽粒干瘪皱缩或成片状、籽粒无胚乳或仅有少量胚乳(图1C、D)。



A: 授粉后12 d的分离果穗表型。B: 授粉后18 d的分离果穗表型。C: 野生型与突变体籽粒。D: 具有野生型和突变体籽粒分离的成熟果穗。箭头指示突变体籽粒。标尺=1 cm。A: Developing ear 12 days after pollination with wild-type and mutant kernel segregation. B: Developing ear 18 days after pollination with wild-type and mutant kernel segregation. C: Wild-type and mutant kernels. D: Mature ear with wild-type and mutant kernel segregation. Arrows indicates mutant kernels. Scale bar = 1 cm.

图1 野生型和突变体的籽粒表型

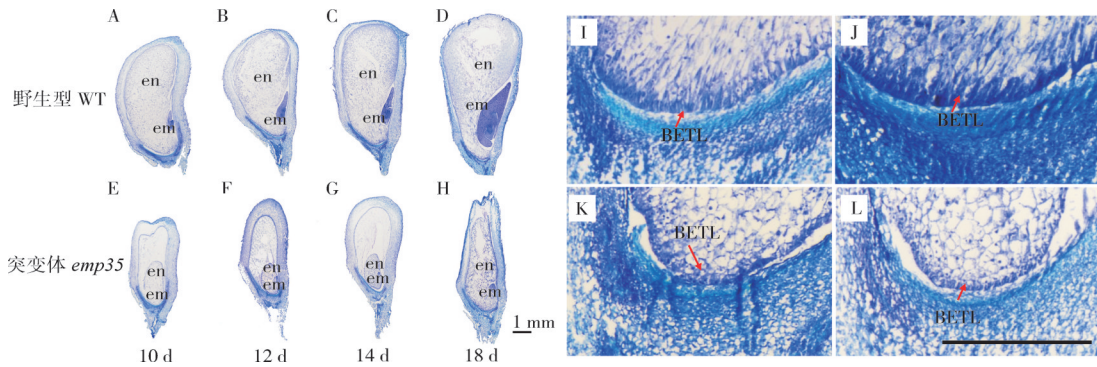
Fig.1 Phenotypes of wild-type and mutant kernels

从不同发育时期的+/ *emp35* 自交果穗上,选取野生型和突变体籽粒进行石蜡切片和显微观察。授粉后10和12 d野生型籽粒胚分化产生胚芽鞘,胚乳细胞分化、数目多且分布致密(图2A、B);同时期突变体籽粒的胚为未分化的胚体,胚乳细胞数量少且分布松散,胚乳与种皮之间存在较大空隙(图2E、F)。授粉后14 d,野生型籽粒胚分化出多片叶原基(图2C),而突变体胚的分化仍停留在原胚阶段(图2G)。授粉后18 d,野生型籽粒胚发育接近完成,胚乳充实(图2D);而突变体籽粒的胚仅分化出盾片,胚乳中的基底胚乳传递层(basal endosperm transfer layer, BETL)细胞和糊粉层细胞没有正常分化,籽粒外种皮皱缩(图2H)。可见, *emp35* 籽粒的胚发育迟缓,胚乳细胞的发育与分化异常,胚乳干物质积累减少。

BETL是营养物质从母体向籽粒运输的组织。显微观察发现,授粉后12和15 d野生型籽粒已形成成熟的BETL细胞和多层的传递层细胞,BETL细胞沿垂直方向伸长,次生细胞壁向胞内交错生长(图2I、J);而突变籽粒中仅有1层分化异常的BETL细胞(图2K、L)。这些结果表明, *Emp35* 基因突变会导致BETL细胞的发育和分化异常,影响营养物质从母体向籽粒运输。

扫描电子显微镜观察发现,授粉后9 d的野生型籽粒胚乳细胞中已有较多成熟淀粉粒,淀粉粒分布集中(图3A),授粉后15 d的野生型胚乳细胞中的淀粉粒充实、堆积紧密(图3B)。授粉后9 d的 *emp35* 籽粒胚乳细胞中几乎无淀粉粒存在(图3C),授粉后15 d胚乳细胞中存在少量淀粉粒且分布零散(图3D)。这些结果表明, *emp35* 籽粒胚乳细胞干物质积累明显落后于正常籽粒。

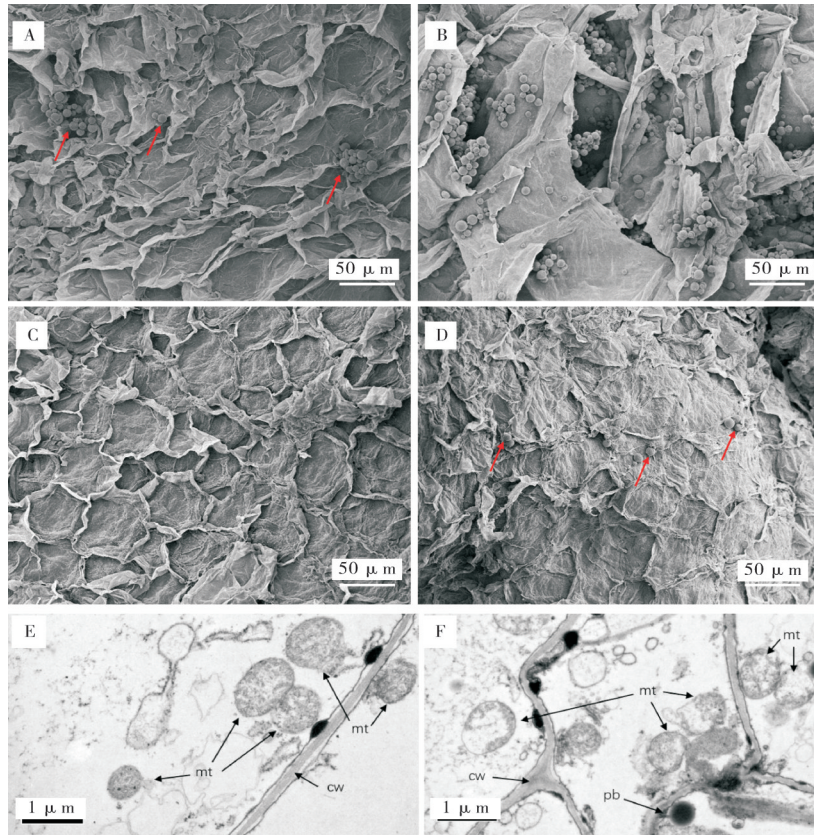
通过透射电子显微镜观察发现,授粉后10 d野生型胚乳细胞中的线粒体形态完整,线粒体内膜堆积排列规律整齐、内嵴清晰可见、无明显空泡(图3E)。而突变体胚乳细胞中的线粒体结构异常、体积缩小,线粒体内嵴结构松散且有明显空泡化现象(图3F)。线粒体结构缺陷可能导致供给细胞生长的能



A-D: 分别为授粉后 10、12、14、18 d 的野生型籽粒; E-H: 分别为授粉后 10、12、14、18 d 的突变体籽粒; I, K: 授粉后 12 d 的野生型(I)和突变体(K)籽粒的基底胚乳传递层; J, L: 授粉后 15 d 野生型(J)和突变体(L)籽粒的基底胚乳传递层。en: 胚乳; em: 胚; BETL: 基底胚乳传递层; 标尺=1 mm。A-D: Wild-type kernels of 10, 12, 14, 18 days after pollination. E-H: Mutant kernels of 10, 12, 14, 18 days after pollination. I, K: The basal endosperm transfer layers of 12 days after pollination wily-type (I) and mutant (K) kernels. J, L: The basal endosperm transfer layers of 15 days after pollination wily-type (J) and mutant (L) kernels. en: Endosperm; em: Embryo; BETL: Basal endosperm transfer layer. Scale bar=1 mm.

图2 野生型和突变体籽粒发育进程的细胞学观察

Fig.2 Cytological observation of the development processes of wild-type and mutant kernels



A, C: 授粉后 9 d 的野生型(A)和突变体(C)胚乳中的淀粉粒; B, D: 授粉后 15 d 的野生型(B)和突变体(D)胚乳中的淀粉粒; 箭头指示淀粉粒; E: 授粉后 10 d 的野生型胚乳细胞中的线粒体; F: 授粉后 10 d 的突变体胚乳细胞中的线粒体。mt: 线粒体; cw: 细胞壁; pb: 蛋白体。A, C: Starch grains in endosperms of 9 days after pollination wily-type (A) and mutant (C) kernels; B, D: Starch grains in endosperms of 15 days after pollination wily-type (B) and mutant (D) kernels; Arrows point out starch grains; E: Mitochondria in wild-type endosperm cells from developing kernel 10 days after pollination; F: Mitochondria in mutant endosperm cells from developing kernel 10 days after pollination. mt: Mitochondria; cw: Cell wall; pb: Protein body.

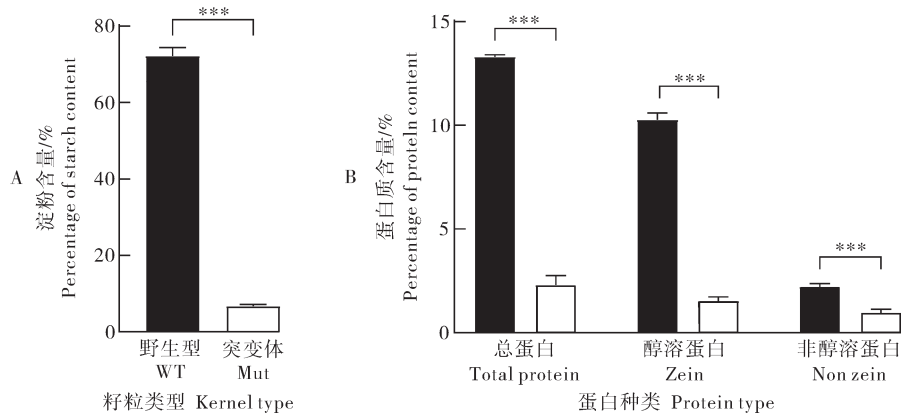
图3 野生型和突变体籽粒胚乳细胞的扫描电镜及透射电镜观察

Fig.3 Scanning electron microscopic and transmission electron microscopic observation of wild-type and mutant endosperms

量不足,对胚乳充实乃至整个籽粒发育过程产生不良影响。

2.2 突变体籽粒干物质积累

胚乳细胞中淀粉和蛋白质定量检测结果显示,平均每颗野生型籽粒中胚乳淀粉含量占胚乳干物质的72.17%,而平均每颗 *emp35* 籽粒中胚乳淀粉含量则仅占胚乳干物质比的6.72%(图4A),显著低于野生型($P<0.001$)。这与扫描电镜观察到的淀粉粒积累受阻现象吻合。



A: 野生型与突变体籽粒胚乳淀粉含量占胚乳干物质的比; B: 野生型和突变体籽粒中总蛋白、醇溶蛋白和非醇溶蛋白的含量。***: $P<0.001$ 。A: The proportion of starch content to dry matter in endosperm of wild-type and mutant kernels. B: The contents of total protein, zein, and non zein of wild-type and mutant kernels. ***: $P<0.001$.

图4 *emp35*籽粒中的淀粉和蛋白质含量

Fig. 4 Starch and protein content in wild-type and mutant kernels

2.3 *emp35*基因的定位

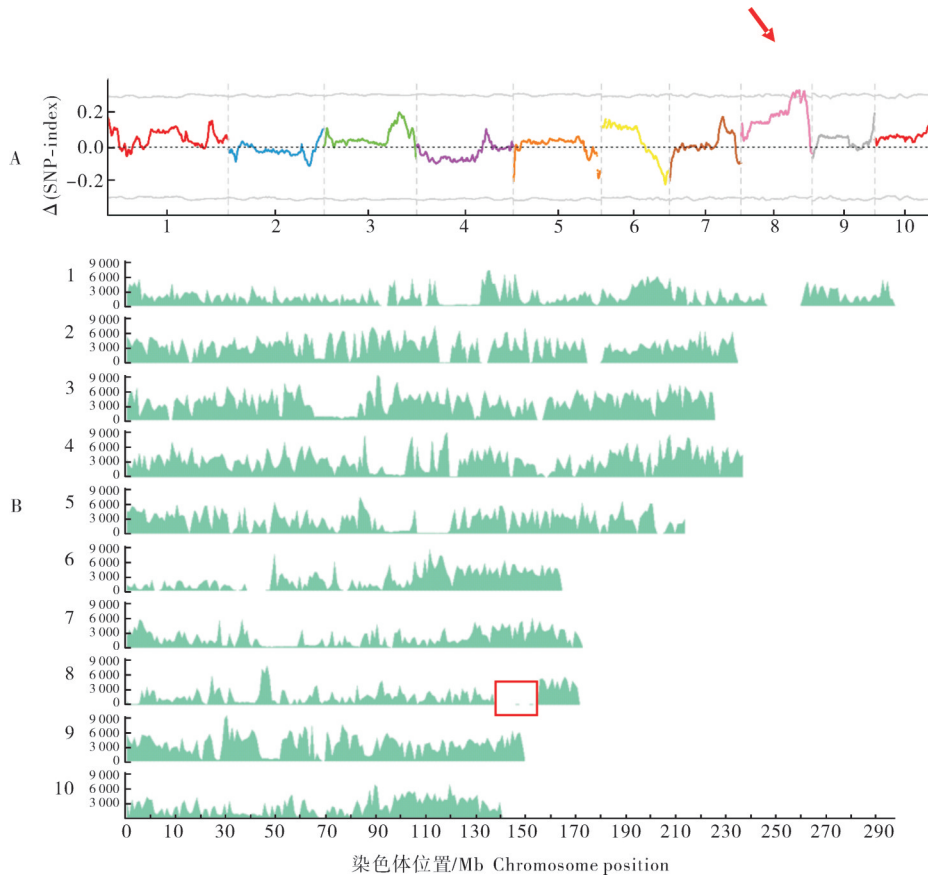
以+/*emp35*杂合植株与Mo17杂交, F_1 代植株自交,部分 F_2 植株上的果穗存在正常籽粒与干瘪籽粒的分离。在21个分离果穗中,共有野生型籽粒4 675粒、突变体籽粒1 545粒,野生型与突变型分离比=3.02:1。 χ^2 检验表明,分离果穗上正常籽粒与突变体籽粒符合3:1的分离比($\chi^2=0.085$, $P<0.05$),表明籽粒缺陷表型是由单个核基因隐性突变所致。

从表型分离的果穗上分别挑选30粒野生型和30粒突变体籽粒,构建野生型(Bwt)和突变体(Bmt)混池,对亲本B73和Mo17及混池进行重测序,结果显示,B73与Mo17分别获得422 989 871和377 327 339个reads,分别可覆盖参考基因组的95.03%和79.90%,覆盖深度达36.87 \times 和30.76 \times 。Bwt和Bmt混池则分别获得330 257 568和270 665 372个reads,可覆盖B73参考基因组的90.90%和90.03%,覆盖深度为25.82 \times 和21.67 \times 。将所有样品的reads序列比对到B73参考基因组上,在2个混池间共筛选到5 114 337个SNP位点和681 377个InDel位点。使用

野生型和突变体籽粒中总蛋白、醇溶蛋白和非醇溶蛋白的含量测定结果显示,*emp35*籽粒总蛋白占籽粒质量的2.29%,显著低于野生型籽粒的13.30% ($P<0.001$)(图4B)。同时,*emp35*籽粒醇溶蛋白和非醇溶蛋白的质量比分别为1.53%和0.96%,显著低于野生型籽粒的10.26%和2.21% ($P<0.001$),表明*emp35*基因突变严重影响籽粒总蛋白、醇溶蛋白及非醇溶蛋白的积累。

Δ (SNP-index)值进行候选基因定位, Δ (SNP-index)值超过设定阈值的reads集中在玉米第8号染色体上127.90~163.26 Mb的物理区间内,该区间的物理距离为35.36 Mb(图5A),*Emp35*基因可能位于该区间内。

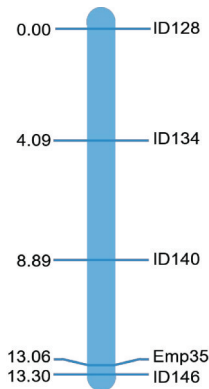
BSA-seq分析结果显示,第8染色体146~163 Mb区间测序数据量低、核苷酸变异少,难以开发多态性标记(图5B)。因而,我们仅在第8染色体128~146 Mb区间内每隔6 Mb选取1个InDel变异,开发了4个InDel标记(ID128、ID134、ID140和ID146)。检测发现这4个标记在B73和Mo17、Bwt及Bmt之间均存在多态性,表明4个InDel标记都与*emp35*连锁。选取授粉后14 d的 F_2 果穗,共挑选421粒突变体种子,提取胚乳DNA,进行基因型分析,构建该染色体区段的分子标记遗传连锁图,将*Emp35*基因定位在139 571 147~146 176 858 Mb(ID140的物理位置为chr8: 139 571 147~139 571 148, ID146的物理位置为chr8: 146 176 858~146 176 859),与ID140和ID146的遗传距离分别为4.17和0.24 cM,对应物理距离约为6.25 Mb和359 kb(图6)。



A: $\Delta(\text{SNP index})$ 值在各染色体上的分布,横坐标数字代表玉米的染色体编号,箭头表示 $\Delta(\text{SNP index})$ 超过阈值的区域。B: SNP和InDel在染色体上的分布。纵坐标数字分别代表玉米的染色体编号及测序片段数量,红框表示初定位区间内测序数据量少、核苷酸变异少的区段。A: Distribution of $\Delta(\text{SNP index})$ on maize chromosomes. The numbers on the x -axis represents the chromosome number of maize, arrow represents for the region where the value of $\Delta(\text{SNP index})$ exceeds the threshold. B: Distribution of SNPs and indels on chromosome. The numbers on the y -axis represent the chromosome number and of maize and the number of reads. Red frame represents for the interval with small numbers of reads and small numbers of nucleotide variation within the initial localization interval.

图5 $\Delta(\text{SNP index})$ 值及SNP/InDel在各染色体上的分布

Fig.5 Distribution of the $\Delta(\text{SNP index})$ and SNP/InDel's on maize chromosomes



4个InDel标记基因型及籽粒表现型构建的遗传连锁图(ID128、ID134、ID140和ID146)。Genetic linkage map is constructed by 4 molecular markers (ID128, ID134, ID140 and ID146).

图6 128~146 Mb区间的分子标记遗传连锁图

Fig.6 Molecular marker genetic linkage map in 128 to 146 Mb interval

3 讨论

玉米籽粒发育是决定产量的重要因素,而玉米籽粒发育缺陷突变体是研究籽粒发育机制的重要资源。空种皮突变体是一类胚和胚乳发育异常、籽粒皱缩、种子败育,对产量产生极大影响的籽粒发育缺陷突变体。已克隆的 *Emp* 基因大多数为编码35肽重复蛋白家族 (pentatricopeptide repeat protein, PPR)。PPR蛋白家族是一类由多个串联重复基序组成的蛋白质,重复数为2~30,每个基序由35个低保守度的氨基酸组成^[24]。PPR蛋白可以特异性识别并结合线粒体与叶绿体基因的转录本,参与线粒体和叶绿体基因转录本的RNA剪接、RNA编辑、RNA翻译、RNA稳定化和RNA的成熟等转录后加工过程^[25]。PPR家族基因突变会直接影响线粒体成熟和

正常功能,使呼吸作用受阻,进而导致籽粒发育供能不足,引起籽粒变小和皱缩等严重缺陷表型。例如: Emp8蛋白参与线粒体基因 *nad1* 第四内含子的反式剪接和 *nad4* 第一内含子的顺式剪接, *emp8* 突变体胚与胚乳发育缓慢,籽粒变小^[26]。EMP9参与线粒体 *ccmB-43* 和 *rps4-335* 位点的 C-to-U 编辑, *emp9* 突变体籽粒干瘪皱缩^[27]。本研究中的籽粒发育缺陷突变体 *emp35* 具有胚发育滞后、胚乳细胞发育不良、胚乳干物质积累严重不足、种皮干瘪塌陷、籽粒无生活力等表型。透射电镜观察发现 *emp35* 胚乳细胞的线粒体内嵴排列松散,线粒体腔存在较多空泡。线粒体结构的异常可能导致细胞代谢水平降低,细胞生长发育和细胞内生化反应所需的能量供应短缺,致使胚和胚乳发育异常。*emp35* 突变体展现的籽粒发育表型、生理生化指标、微观细胞结构与 PPR 基因的突变体类似,因此,我们推测 *Emp35* 可能编码 1 个线粒体结构或功能相关蛋白,并可能是 PPR 家族基因。

本研究中, F₂ 群体的遗传分析表明, *emp35* 的突变表型是由单个核基因隐性突变所致。通过 BSA-seq 将 *Emp35* 基因定位在 8 号染色体上 127.90~163.26 Mb 的区间内。用 4 个 InDel 标记分析 F₂ 群体中的突变体表型籽粒的基因型并作出遗传连锁图, 将 *Emp35* 精细定位于 139 571 147~146 176 858 区间内。目前该定位区间内没有已克隆的玉米籽粒发育基因, 表明 *Emp35* 是一个新发现的籽粒发育相关基因。在后续研究中, 将开展 *Emp35* 的精细定位与基因克隆, 探究 *Emp35* 基因的表达部位, 研究线粒体基因的转录翻译过程以验证 *Emp35* 突变基因对线粒体合成的影响, 解析 *Emp35* 基因在籽粒发育过程中的生理功能及作用机制, 为玉米籽粒质量的改良与稳产品种的选育提供理论依据。

参考文献 References

- [1] 王汉宁, 王晓明. 从源库观点看玉米籽粒产量的形成[J]. 甘肃农业大学学报, 1992, 27(1): 86-92. WANG H N, WANG X M. Viewing the formation of maize grain yield from the source-sink theory[J]. Journal of Gansu Agricultural University, 1992, 27(1): 86-92 (in Chinese with English abstract).
- [2] DAI D W, MA Z Y, SONG R T. Maize kernel development [J/OL]. Molecular breeding, 2021, 41(1): 2 [2023-04-26]. <https://doi.org/10.1007/s11032-020-01195-9>.
- [3] MA Z R, DOONER H K. A mutation in the nuclear-encoded plastid ribosomal protein S9 leads to early embryo lethality in maize[J]. The plant journal, 2004, 37(1): 92-103.
- [4] LI C L, SHEN Y, MEELEY R, et al. Embryo defective 14 encodes a plastid-targeted cGTPase essential for embryogenesis in maize[J]. The plant journal, 2015, 84(4): 785-799.
- [5] SOSSO D, CANUT M, GENDROT G, et al. PPR8522 encodes a chloroplast-targeted pentatricopeptide repeat protein necessary for maize embryogenesis and vegetative development [J]. Journal of experimental botany, 2012, 63(16): 5843-5857.
- [6] SUZUKI M, SATO Y, WU S, et al. Conserved functions of the MATE transporter BIG EMBRYO1 in regulation of lateral organ size and initiation rate[J]. The plant cell, 2015, 27(8): 2288-2300.
- [7] SCHMIDT R J, KETUDAT M, AUKERMAN M J, et al. Opaque-2 is a transcriptional activator that recognizes a specific target site in 22-kD zein genes [J]. The plant cell, 1992, 4(6): 689-700.
- [8] GIROUX M J, HANNAH L C. ADP-glucose pyrophosphorylase in shrunken-2 and brittle-2 mutants of maize [J]. Molecular & general genetics, 1994, 243(4): 400-408.
- [9] COLEMAN C E, CLORE A M, RANCH J P, et al. Expression of a mutant alpha-zein creates the floury2 phenotype in transgenic maize [J]. PNAS, 1997, 94(13): 7094-7097.
- [10] 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.
- [11] YAO D S, QI W W, LI X, et al. Maize opaque10 encodes a cereal-specific protein that is essential for the proper distribution of zeins in endosperm protein bodies [J/OL]. PLoS genetics, 2016, 12(8): e1006270 [2023-04-26]. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1006270>.
- [12] BOMMERT P, WERR W. Gene expression patterns in the maize caryopsis: clues to decisions in embryo and endosperm development [J]. Gene, 2001, 271(2): 131-142.
- [13] MILLER M E, CHOUREY P S. The maize invertase-deficient miniature-1 seed mutation is associated with aberrant pedicel and endosperm development [J]. The plant cell, 1992, 4(3): 297-305.
- [14] BECRAFT P W, STINARD P S, MCCARTY D R. CRINKLY4: a TNFR-like receptor kinase involved in maize epidermal differentiation [J]. Science, 1996, 273(5280): 1406-1409.
- [15] REN X M, PAN Z Y, ZHAO H L, et al. EMPTY PERICARP11 serves as a factor for splicing of mitochondrial *nad1* intron and is required to ensure proper seed development in maize [J]. Journal of experimental botany, 2017, 68(16): 4571-4581.
- [16] CAI M J, LI S Z, SUN F, et al. Emp10 encodes a mitochondrial PPR protein that affects the cis-splicing of *nad2* intron 1 and seed development in maize [J]. The plant journal, 2017, 91(1): 132-144.
- [17] CHEN X Z, YAO D S, SONG R T. Maize endosperm protein extraction and analysis [J/OL]. Bio-protocol, 2013, 3(14): e832 [2023-04-26]. <https://doi.bio-protocol.org/e832>.
- [18] DOYLE J. DNA protocols for plants [M]//HEWITT G M, JOHNSTON A W B, YOUNG J P W. Molecular techniques

- in taxonomy. Berlin: Springer, 1991: 283-293.
- [19] MARTIN M. Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads[J/OL]. EMBnet.journal, 2011, 17(1): 10 [2023-04-26]. <https://doi.org/10.14806/ej.17.1.200>.
- [20] BOLGER A M, LOHSE M, USADEL B. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data[J]. Bioinformatics, 2014, 30(15): 2114-2120.
- [21] LI H, DURBIN R. Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform[J]. Bioinformatics, 2009, 25(14): 1754-1760.
- [22] LI H, HANDSAKER B, WYSOKER A, et al. The sequence alignment/map format and SAMtools [J]. Bioinformatics, 2009, 25(16): 2078-2079.
- [23] MCKENNA A, HANNA M, BANKS E, et al. The genome analysis Toolkit: a MapReduce framework for analyzing next generation DNA sequencing data [J]. Genome research, 2010, 20(9): 1297-1303.
- [24] SMALL I, PEETERS N. The PPR motif: a TPR-related motif prevalent in plant organellar proteins[J]. Trends in biochemical sciences, 2000, 25(2): 45-47.
- [25] SCHMITZ-LINNEWEBER C, SMALL I. Pentatricopeptide repeat proteins: a socket set for organelle gene expression[J]. Trends in plant science, 2008, 13(12): 663-670.
- [26] SUN F, ZHANG X Y, SHEN Y, et al. The pentatricopeptide repeat protein EMPTY PERICARP8 is required for the splicing of three mitochondrial introns and seed development in maize[J]. The plant journal, 2018, 95: 919-932.
- [27] YANG Y Z, DING S, WANG H C, et al. The pentatricopeptide repeat protein EMP9 is required for mitochondrial *cc-mB* and *rps4* transcript editing, mitochondrial complex biogenesis and seed development in maize [J]. New phytologist, 2017, 214(2): 782-795.

Phenotype identification and gene mapping of maize kernel development mutant *emp35*

LIU Jin^{1,2}, TANG Yanfang³, DU Hwei¹, ZHANG Zuxin²

1. College of Life Science, Yangtze University, Jingzhou 434023, China;

2. National Key Laboratory of Crop Genetic Improvement, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China;

3. College of Laboratory Medicine, Hubei University of Chinese Medicine, Wuhan 430065, China

Abstract The phenotype identification, microscopic observation of endosperm cells, determining the content of storage substance in endosperm, and map-based cloning of a defective maize kernel mutant named as empty pericarp35 (*emp35*) were conducted to study its physiological function in the development of maize kernel and map the *Emp35* gene. The results showed that the development of *emp35* kernels was slow and significantly smaller than that of the wild-type kernels during the same period of development, resulted in the shrunken and empty pericarp kernels. The development of embryo and endosperm in the *emp35* was severely delayed, and the mitochondrial structure in endosperm cells was abnormal. The accumulation of starch and protein in the *emp35* was reduced. The seeds in the F₂ population segregated in a ratio of 3 wild type to 1 empty pericarp, indicating that the defective kernel phenotype is controlled by a single recessive nuclear gene. The *Emp35* gene was mapped at the interval between 127.90 Mb and 163.36 Mb on the chromosome 8 of maize with a bulked segregant analysis (BSA). Four InDel markers were developed within this interval, and *Emp35* gene was finely mapped at the interval between 139 571 117-146 176 858.

Keywords maize (*Zea mays* L.); kernel development; bulked segregant analysis (BSA); gene mapping; phenotype identification

(责任编辑:张志钰)