

水稻空间诱变矮秆新种质 CHA-1 的遗传分析及基因定位

李惠珠*, 王慧*, 郭涛, 刘永柱, 张建国, 陈志强
(华南农业大学植物航天育种研究中心, 广东 广州 510642)

摘要:经空间诱变获得1个稳定遗传的水稻矮秆突变体 CHA-1, 对该突变体进行了株高遗传分析. 结果表明, CHA-1 的新矮生基因(暂命名为 *h*) 为1对隐性主效基因, 与 *sd-1* 基因之间存在互补作用, 并且表现为一定程度的连锁关系, 2对矮生基因共同控制着 CHA-1 的株高性状. 利用 SSR 分子标记将 CHA-1 的新矮生基因 *h* 定位在水稻第1染色体的长臂上, 与标记 RM302 遗传距离为 5.1 cM.

关键词:水稻; 空间诱变; 矮秆种质; 遗传分析; 基因定位

中图分类号: S335

文献标识码: A

文章编号: 1001-411X(2009)01-0006-04

Genetic Analysis and Gene Mapping of a New Dwarf Rice CHA-1 Induced by Space Mutation

LI Hui-zhu*, WANG Hui*, GUO Tao, LIU Yong-zhu, ZHANG Jian-guo, CHEN Zhi-qiang
(Plant Space Breeding Research Center, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

Abstract: A special dwarf mutant rice CHA-1, obtained by space mutation, was a stable and inherited rice material. Genetic analysis of the height showed that the new mutant gene *h* (named as *h* temporarily) from CHA-1 was a major recessive gene which linked with *sd-1* in a certain extent. The two genes had complementary interaction and controlled the dwarf trait of CHA-1 together; The dwarf gene *h* was located on chromosome 1 linked with SSR marker RM302 and the genetic distance was 5.1 cM.

Key words: rice; space mutation; dwarf germplasm; genetic analysis; gene mapping

20世纪50~60年代矮秆水稻的培育成功, 引发了全球水稻生产上的第1次绿色革命, 给水稻生产带来了突破性飞跃^[1-3]. 但目前水稻矮化育种中所利用的几个矮源携带的矮秆基因主要都是半矮秆基因 *sd-1* 或其等位基因. 1987年, 卢永根等^[4]较系统地研究了我国籼稻矮脚南特、矮仔占、低脚乌尖和广场矮的矮生性遗传, 结果认为这四大矮源的矮生性属简单遗传, 受1对隐性主基因 *sd-1* 控制, 同时也存在一些修饰基因. 这种狭窄的遗传背景和单一基因的广泛利用潜藏着一定的遗传脆弱性, 同时也可能是制约水稻产量潜力进一步提高的原因之一. 因此, 继续发掘、鉴定新的具有育种利用价值的矮生基因,

研究水稻的矮生性状, 将有助于增加矮源利用的多样性, 为水稻育种实现新的产量突破创造条件. 利用传统育种方法获得水稻新矮源^[1-3]的报道已有不少, 而利用空间诱变的途径获得水稻新矮源的研究还不多. 在通过空间诱变途径创造矮秆突变体研究方面, 1996年浙江省农科院原子能应用研究所利用返回式卫星搭载特早熟晚粳品种丙95-503, 在诱变后代中鉴定出1个株高仅56cm左右的多穗矮秆突变体R955, 在水稻矮化育种上可能具有一定的应用价值^[5]. 为探索空间条件对水稻干种子的诱变作用, 徐建龙等^[6]1999年对晚香糯ZR9纯系的单株种子经高空气球和返回式卫星搭载处理后在地面种植,

收稿日期: 2008-09-20

作者简介: 李惠珠(1982—), 女, 硕士; 王慧(1965—), 女, 副教授, 博士研究生; *对本文具有同样贡献; 通讯作者: 陈志强(1956—), 男, 教授, E-mail: chenlin@scau.edu.cn

基金项目: 国家863计划项目(2007AA100101); “十一五”国家科技支撑计划重点项目(2008BAD97B02); 广东省科技计划项目(2004A20107001, 2006A20202006, 2007A020400003); 广东省自然科学基金(010353, 05006656)

筛选出已稳定遗传的矮秆、早熟糯稻突变系航育1号和矮秆、中熟粳稻突变系香粳10号,并对其进行遗传学和分子生物学分析研究,结果表明这2个突变系的矮生性均受1对矮秆基因 *sd1* 控制. 实践证明,利用水稻空间诱变育种技术获得新基因源和创造新种质的方法是切实可行的.

本文所研究的材料是由籼稻品种特华占经高空气球搭载后在地面种植诱变后代的过程中选育出来的能稳定遗传的特异矮秆突变体 CHA-1. 前期研究表明 CHA-1 具有与 *sd1* 不等位的矮秆基因^[7-8]. 为弄清 CHA-1 矮生基因的遗传规律,本文利用 CHA-1 与高秆材料惠阳珍珠早进行杂交,对其 F₂ 代分离群体进行株高遗传分析,进一步确定控制 CHA-1 矮生性的基因对数及与 *sd1* 基因之间的关系. 并在此基础上,将 CHA-1 与 02428 进行杂交,以其 F₂ 代植株作为定位群体,对 CHA-1 的矮生基因进行初步定位,为最终的精细定位和分离克隆奠定基础.

1 材料与方法

1.1 试验材料

空间诱变矮秆突变体 CHA-1 (籼稻),该矮秆突变体株高在 50~65 cm,茎秆直立、叶片挺直、分蘖力较强、天然异交率偏高、谷粒长宽比大、外观品质好. 形态学和细胞学的观察结果表明,该矮秆突变体属于 dn 型的水稻矮秆突变体,其节间缩短是由节间细胞数目减少所致(图1).



图1 矮秆突变体 CHA-1 特华占与特华占

Fig.1 Dwarf mutant rice CHA-1 and original variety Tehuazhan

惠阳珍珠早(高秆携带 *Sd1* 基因,籼稻品种);

02428(携带有半矮秆基因 *sd1*,粳稻品种).

1.2 遗传分析

以 CHA-1 为母本与惠阳珍珠早配制杂交组合,获得杂交种子. 2007 年早造种植亲本和 F₁ 代植株,严格去掉假杂种,收获 F₁ 植株所结的种子. 2007 年晚造种植亲本及 F₂ 代植株.

成熟期分别调查亲本、F₁ 代和 F₂ 代群体各个单株的株高(株高的标准为植株基部至最高穗顶端谷粒的长度). 亲本和 F₁ 代的株高以调查数据的平均值进行分析,测量 F₂ 代每个单株的株高. 将测得的 F₂ 世代株高数据进行分组整理,作株高次数分布柱状图,其中组数和组距根据样本的大小和数据的极差确定,然后以波谷处的株高值划分高秆和矮秆,并统计高秆和矮秆两类群的个数,计算它们的分离比例并进行卡平方测验.

1.3 水稻 DNA 的提取、PCR 扩增和电泳检测

配制 CHA-1 与 02428 的杂交组合,以其杂种 F₂ 代群体(共 4 000 余株)作为基因定位群体. 在孕穗期分单株收取作图群体中的全部矮秆植株、部分高秆植株和两亲本植株的叶片,共收获了 563 株矮秆植株和 40 株高秆植株的叶片.

水稻 DNA 的提取方法参考 McCouch 等^[9]的方法,稍加修改.

PCR 所用引物的序列均来自于 <http://www.gramene.org/db/cmap>,主要由上海生工合成,共 227 对,均匀地分布于水稻的 12 条染色体上. PCR 的反应体系为:1 × PCR Buffer (含有 1.5 × 10⁻³ mol/L MgCl₂);1 U 的 DNA 聚合酶;1 × 10⁻⁴ mol/L dNTPs;2 × 10⁻⁷ mol/L 的引物;20~50 ng 的模板 DNA;灭菌双蒸水补至 25 μL. 反应程序为:94 °C 预变性 5 min, (94 °C 变性 1 min, 55 °C 退火 1 min, 72 °C 延伸 1 min) 35 个循环,72 °C 再延伸 5 min. 扩增产物取出后于 4 °C 保存备用.

电泳和银染程序^[10]:PCR 扩增产物在 6 g/L 的聚丙烯酰胺凝胶中电泳后,在蒸馏水中洗胶 2 次,每次 1 min,再用 1 g/L AgNO₃ 溶液染色 10 min,蒸馏水中同样洗胶 2 次,然后用显影液(3.75 g NaOH、0.05 g 四硼酸钠、1 mL 甲醛,加去离子水定容至 250 mL)摇动显影后观察分析.

1.4 矮秆基因的初步定位

近等基因池的构建:从 F₂ 代定位群体中随机选取 10 个高秆植株的 DNA 各 50 μL,混合成高秆基因池;同样选取 10 株矮秆植株的 DNA 各 50 μL 混合成矮秆基因池.

差异标记筛选与连锁分析:首先用分离群体分析法,即用 227 对水稻微卫星标记对此组合的两亲本进行多态性筛选,然后用在两亲本间表现多态性

的微卫星引物筛选两基因池,寻找与矮秆基因连锁的候选标记.再用隐性群体分析法,即用在亲本间和两池间表现多态性的SSR标记分析 F_2 代中的全部矮秆单株.

数据分析用MAPMARKER3.0软件对 F_2 代分离群体中株高性状和分子标记的分离数据进行连锁分析,利用Kosambi函数将重组值转化为遗传图距(Centimorgan, cM),构建出目标基因的分子连锁图.

2 结果与分析

2.1 CHA-1的株高遗传分析

CHA-1与高秆品种惠阳珍珠早杂交,其 F_1 代植株的株高平均为139.83 cm,都表现为高秆类型,且都超过双亲,说明控制CHA-1矮生性状的基因为隐性主效基因.

而 F_2 代群体的株高出现明显的高矮分离,株高分布呈连续的双峰分布,表现出主效基因的分模式(图2).根据图中波谷处的株高,可将群体分为高秆和矮秆2种类型,由此算得高秆共617株,矮秆共391株,高矮植株的分离比例为1.58:1.卡平方测验表明,该比例既不符合3:1的分离模式,又不符合9:7或15:1的分离模式(表1).

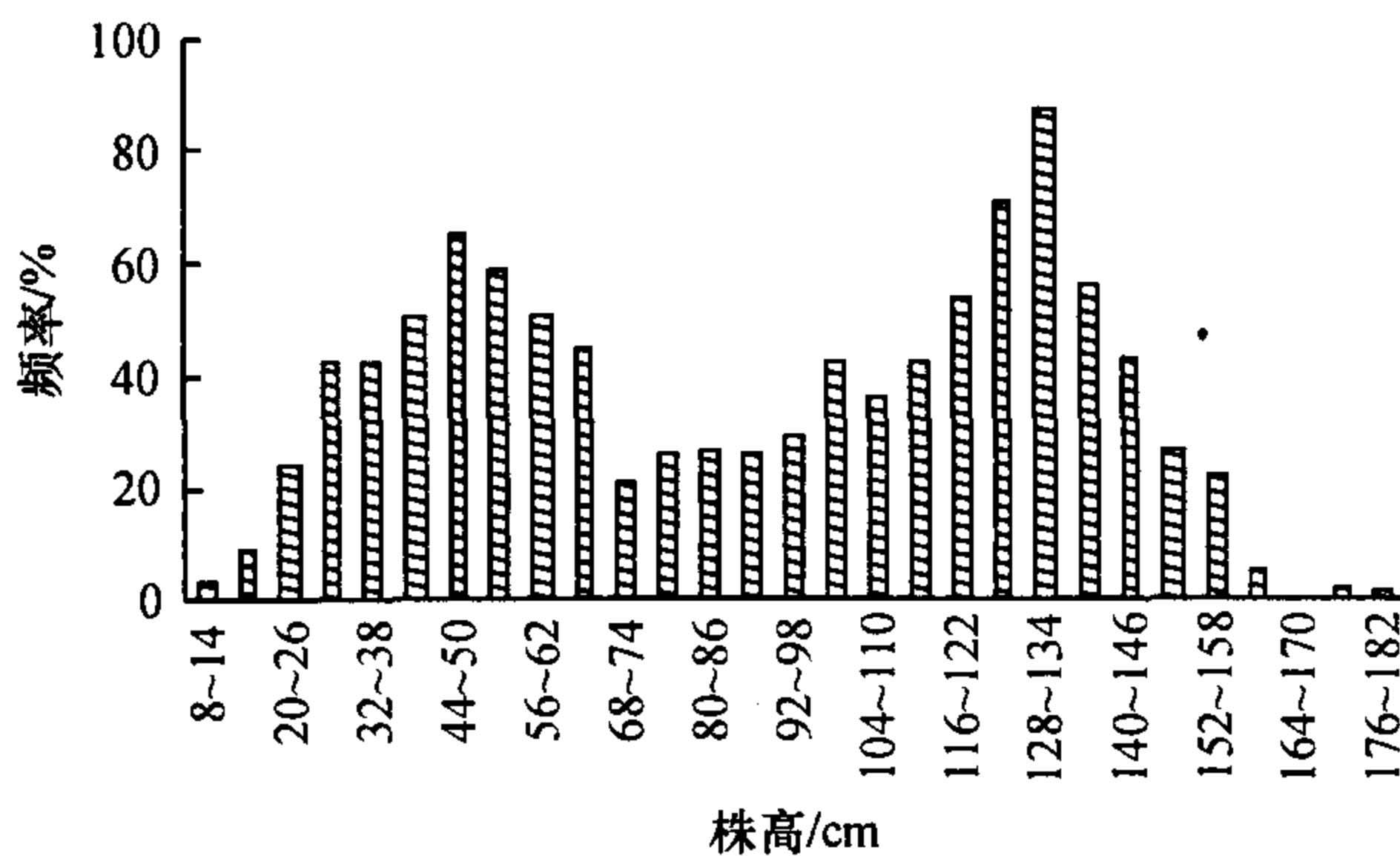


图2 (CHA-1/惠阳珍珠早) F_2 代株高频次分布图

Fig. 2 Frequencies distributed histogram of plant height in F_2 population from the cross of CHA-1 and Huiyangzhenzhuzao

表1 (CHA-1/惠阳珍珠早) F_2 代株高分离¹⁾

Tab. 1 Segregate pattern of F_2 population from the cross of CHA-1 and Huiyangzhenzhuzao

类型	实际株数	理论株数 (3:1)	理论株数 (9:7)	实际比例	χ^2 (3:1)	χ^2 (9:7)
高秆	617	756	567			
矮秆	391	252	441	1.58:1	102.23	9.76
总株数	1 008	1 008	1 008			

1) $\chi_{0.01}^2 = 6.63$, $\chi_{0.05}^2 = 3.84$, $\nu = 1$

前期的研究^[7]用CHA-1与特华占及矮脚南特(都携带有sd1基因)杂交, F_1 代都表现为高秆,株高超过双亲,表明CHA-1含有非sd1的新矮生基因

(暂命名为h),而且该矮生基因与sd1不等位.在它们的 F_2 代群体中,株高出现分离,呈连续的双峰分布,完全符合1对主效株高基因控制的3:1的分离模式,说明了CHA-1与特华占或矮脚南特之间只存在1个株高基因的差异,由此推断CHA-1可能也携带有sd1基因.

根据以上推断,CHA-1与携带有sd1基因的高秆品种杂交,其 F_2 代理论上会呈现出3种分离模式:(1)假如新的矮生基因h与sd1位于同一染色体上,两者之间没有互作,并且不发生交换,此时 F_2 代群体高矮植株应表现为3:1的分离模式;(2)假如新的矮生基因h独立于sd1遗传,两者共同控制着CHA-1的株高表现,此时 F_2 代群体的株高分离情况应为高株:半矮株:矮株为9:6:1;(3)假如新的矮生基因h与sd1连锁,并且两者存在着互补作用,共同控制着CHA-1的株高表现,任何1对基因纯合都将导致CHA-1的株高变矮,这样 F_2 代群体的株高分离比例将会介于3:1与9:7(1.29:1)之间.本研究的株高遗传分析结果高矮株比例1.58:1介于3:1与9:7之间,符合上述的第3种情况,因此可以推测CHA-1空间诱变产生的新矮生基因h与sd1基因之间存在互补作用,并且表现为一定程度的连锁关系,所以CHA-1的株高基因型应为hhsd1sd1.

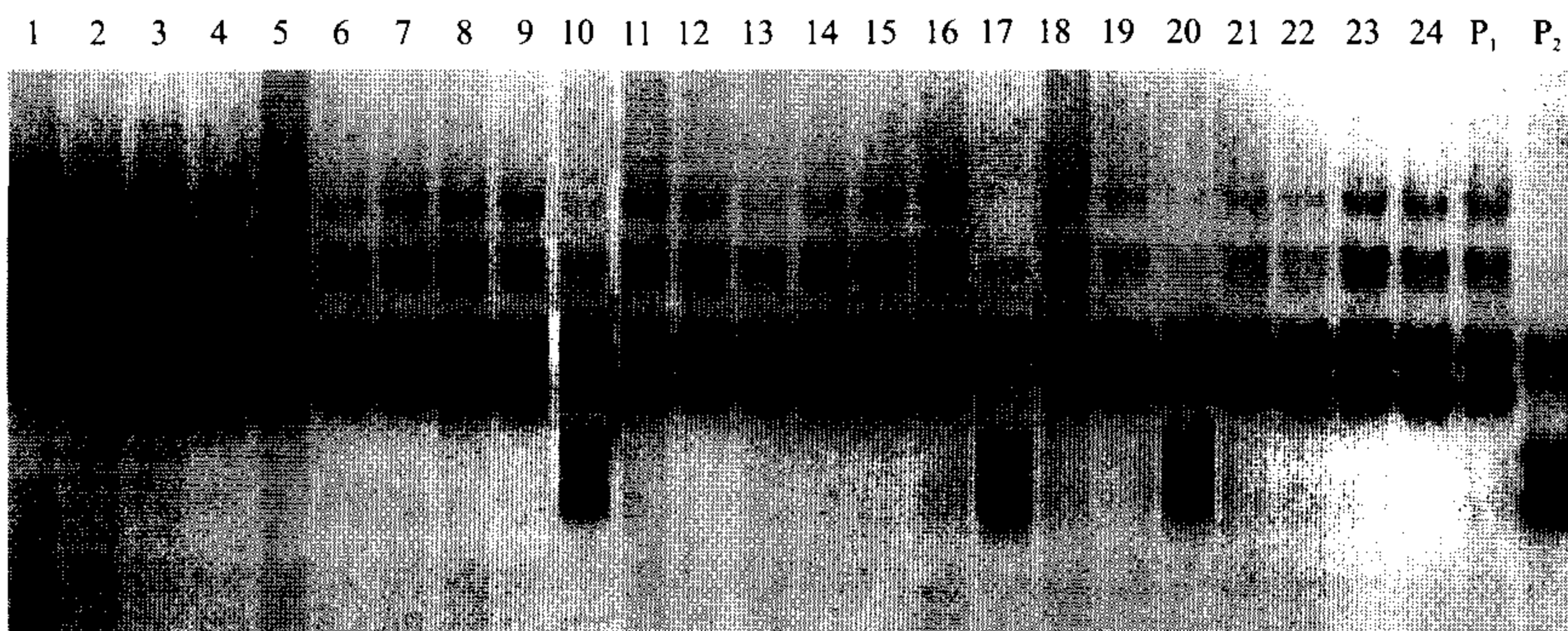
2.2 候选标记的筛选与连锁分析

选用227对均匀分布于水稻染色体上的SSR引物对亲本CHA-1和02428进行多态性筛选,结果发现在199对有效扩增的引物中,有125对在CHA-1与02428中存在多态性.用这125对有多态性的引物分别扩增高、矮基因池(以亲本作为对照),发现位于第1染色体长臂上的标记RM302在高矮基因池及两亲本中皆表现出多态性,说明该标记有可能与矮秆基因h连锁.为了确证h与RM302和RM168的连锁关系,利用标记RM302对从(CH A-1/02428) F_2 代群体中随机选出来的30株矮秆植株进行小群体分析,发现标记RM302与矮秆基因h有连锁关系. RM302在30个矮株中有3个的PCR扩增带型表现为杂合带型,其余的与CHA-1的带型相同(图3).

2.3 基因的初步定位

根据以上分析结果,进一步用标记RM302扩增 F_2 代群体的单株,共检测了563个矮株个体,在563个矮株中, RM302筛选到5个与父本02428带型一致的矮株,48个兼具有母本CHA-1和父本02428的带型的矮株,其余矮株的带型都与母本CHA-1的一致(图3).

用MAPMARKER3.0软件对标记数据进行连锁分析,用Kosambi函数将重组率转化为遗传距离(cM).CHA-1的新矮生基因h与标记RM302,遗传距离为5.1 cM.



P₁ 为矮秆突变体 CHA-1; P₂ 为父本 02428; 1~24 为 F₂ 代群体中的矮秆个体

图3 SSR 标记 RM302 部分矮株个体的电泳检测结果

Fig. 3 Amplification results of SSR marker RM302 in some dwarf plants

3 讨论

要明确一个突变性状是否由新基因引起的,首先要对该性状进行基本的遗传分析,然后与已发表的具有控制该性状基因的种质进行等位性测验,研究其与已有的控制该性状基因的等位性关系,初步推断该突变基因是否为新发现的基因。然后再通过基因定位,明确该基因在染色体上的位置,对照目前在水稻染色体上已经被分子标记定位出来的具有相关性状的基因,从而确定该突变基因是否为新发现的基因。

在前期研究中,CHA-1 与特华占和矮脚南特(都携带有 *sd1* 基因)杂交后代的遗传分析表明,CHA-1 除了携带 *sd1* 基因外,还通过空间诱变产生了新的非 *sd1* 的矮秆基因 *h*。利用 SSR 标记对新发现的 CHA-1 的矮生基因 *h* 进行初步定位,将该矮生基因定位于第 1 染色体长臂上,与标记 RM302 遗传距离为 5.1 cM。由此可以确定 CHA-1 的矮秆基因 *h* 与目前育种和生产上普遍利用的半矮基因 *sd1* 不等位。目前,在水稻第 1 染色体上已经被分子标记定位的水稻矮秆和半矮秆基因还有 *d2*、*d18* (*d25*)、*d10* (*d15*、*d16*)、*d61*, 其中 *d2*、*d18* (*d25*) 为畸形矮生基因,*d2* 与分子标记 Npb359 连锁,遗传距离为 15.6 cM^[11],*d18* (*d25*) 与分子标记 Npb96 连锁,遗传距离为 4.1 cM^[12]; *d10* (*d15*、*d16*) 为多蘖矮生基因,位于第 1 染色体短臂上,与分子标记 RG462 连锁^[13]; *d61* 已被克隆,该基因位于第 1 染色体长臂上,与 RFLP 标记 C1370 紧密连锁^[14]。通过对比水稻第 1 染色体上已经被分子标记定位的矮生基因,发现本研究中 CHA-1 经空间诱变产生的矮秆基因 *h* 与上述第 1 染色体上的矮秆和半矮秆基因都不等位,因此可以认为突变基因 *h* 是一个新的矮秆基因。通过对该基因的获得,丰富了水稻的矮秆基因资源。本研究的初步定位结果,也为该基因的进一步定位打下了良好的基础。

参考文献:

[1] 熊振民, 闵绍楷, 程式华. 我国水稻矮源的研究与利用

[J]. 水稻文摘, 1988, 7(4): 1-5.

- [2] 程式华, 闵绍楷. 中国水稻品种现状与展望[J]. 中国稻米, 2000, 1: 13-16.
- [3] 谷福林, 翟虎渠, 万建民, 等. 水稻矮秆性状研究及矮源育种利用[J]. 江苏农业学报, 2003, 19(1): 48-54.
- [4] 卢永根, 王国昌, 王润华, 等. 四个籼稻矮生性基因源的表型表现和遗传传递的研究[J]. 华南农业大学学报, 1987, 8(4): 20-30.
- [5] 徐建龙, 李春寿, 王俊敏, 等. 空间环境诱发水稻多蘖矮秆突变体的筛选与鉴定[J]. 核农学报, 2003, 17(2): 90-94.
- [6] 徐建龙, 林贻滋, 奚永安, 等. 空间条件诱发水稻突变体[J]. 浙江农业学报, 1999, 11(2): 63-66.
- [7] 王慧, 刘永柱, 张建国, 等. 空间诱变水稻矮秆突变体 CHA-1 对赤霉素的反应及其遗传分析[J]. 中国水稻科学, 2004, 18(5): 391-395.
- [8] 刘永柱. 水稻空间诱变特异矮秆突变体 CHA-1 遗传与利用评价研究[D]. 广州: 华南农业大学农学院, 2004.
- [9] McCOUCH S R, CHEN X, PANAUD O, et al. Microsatellite marker development, mapping and applications in rice genetics and breeding[J]. Plant Mol Biol, 1997, 35 (1-2): 89-99.
- [10] PANAUD O, CHEN X, MCCOUCH S R. Development of microsatellite markers and characterization of simple sequence length polymorphism (SSLP) in rice (*Oryza sativa* L.) [J]. Mol Gen Genet, 1996, 252: 597-607.
- [11] IDETA O, YOSHIMURA A, ASHIKATI M, et al. Integration of conventional and RFLP linkage maps in rice: III. Chromosomes 5, 7, 8, and 12 [J]. Rice Gene Newsl, 1994, 11: 116-117.
- [12] IDETA O, YOSHIMURA A, MATSUMOTO T, et al. Integration of conventional and RFLP linkage maps in rice: I. Chromosome 1, 2, 3 and 4 [J]. Rice Genet Newsl, 1992, 9: 128-129.
- [13] YU J, STEFFENSON B J, FRANCKOWIAK J D. Linkage between the Rpg1 gene for stem rust resistance and the f5 locus on barley chromosome 1 [J]. Crop Sci, 1993, 33: 642-643.
- [14] YAMAMURO C, IHARA Y, WU X. Loss of function of a rice brassinosteroid insensitive homolog prevents internode elongation and bending of the lamina joint [J]. Plant Cell, 2000, 19(12): 1591-1606.

【责任编辑 周志红】