

新的玉米矮秆突变基因的鉴定与遗传分析

王立静¹, 哈丽旦², 张素梅¹, 徐春花¹, 刘保申¹

(1. 山东农业大学 农学院, 山东 泰安 271018; 2 新疆维吾尔自治区种子管理总站, 新疆 乌鲁木齐 830006)

摘要: *Dt* 基因是玉米显性矮秆基因, 被定位于玉米的第 10 条染色体长臂, 目前报道的显性矮秆基因只有 *D8* (*Mpl1*) 和 *D9*, 它们分别位于染色体 1 的长臂和染色体 5 的短臂; *Dt* 矮秆突变体属于赤霉素敏感型, 含有 *D8*, *D9* 基因的材料对赤霉素不敏感; *Dt* 基因与 *D8*, *D9* 基因的等位性分析表明, *Dt* 与 *D8*, *D9* 为非等位基因, 进一步证明了 *Dt* 基因是一个新发现的玉米显性矮秆基因。

关键词: 玉米; 矮秆基因; 等位性分析

中图分类号: S513.032 文献标识码: A 文章编号: 1000-7091(2008)05-0023-03

Identification and Genetic Analysis of a New Dwarf Mutant Gene in Maize

WANG Li-jing¹, HA Li-dan², ZHANG Su-mei¹, XU Chun-hua¹, LIU Bao-shen¹

(1. College of Agronomy, Shandong Agricultural University, Tai'an 271018, China;

2. Seed Administration Bureau of Xinjiang, Urumqi 830006, China)

Abstract: *Dt* gene was a dominant dwarf gene we found and it was mapped on the long arm of chromosome 10 in maize. The reported dominant dwarf genes were limited to *Dwarf8* (*Mpl1*) and *Dwarf9*, which were located on the long arm of chromosome 1 and the short arm of chromosome 5, respectively. The *Dt* dwarf mutant was sensitive to gibberellin while accessions that contain *D8* or *D9* were insensitive to gibberellin. Moreover, allelic analysis between *Dt* and *D8* or *D9* indicated that *Dt* was a non-allelic to *D8* or *D9*. Which proved *Dt* gene was a new dominant dwarf gene in maize.

Key words: Maize; Dwarf gene; Allelic analysis

玉米自 2001 年成为世界第一大粮食作物, 也是我国的第二大粮食作物。近年来, 由于各种异常气候的出现, 各种自然灾害频繁发生, 倒伏成了影响玉米高产稳产的重要限制因素。株高是影响玉米抗倒性的重要农艺性状之一, 矮秆作物相对于高秆来说, 耐肥抗倒, 株型比较紧凑^[1], 上疏下密利于通风透光, 因此矮秆玉米较适于密植, 能实现高秆玉米难以达到的高产目标。目前, 矮秆作物在生产上已经显示了巨大的增产潜力, 但矮源的遗传多样性低不利于玉米的产量和品质提高, 矮秆基因的发掘及遗传研究利用在育种中越来越受重视, 创造或筛选新的矮源和矮秆基因, 丰富育种家的亲本圃对玉米育种和生产都具有重要的意义。

2003 年在杂种 CL1077 自交后代一个株系中发现了矮秆突变体, 通过连续多代自交获得纯合矮秆株系 52333, 该材料的矮生性状受一对新的显性矮

秆基因控制, 初步定名为 *Dt*^[2]。为了充分利用此矮秆材料, 有必要明确其遗传方式, 并鉴定与前人所报道矮秆基因的异同, 本试验主要研究了 *Dt* 基因与先前报道显性矮秆基因的等位性关系。

1 材料和方法

1.1 供试材料

52333 是本实验室选育出的矮秆突变体, 121C (含有杂合显性矮秆基因 *D8*) 和 502C (含有杂合显性矮秆基因 *D9*) 由 Maize Genetics Cooperation Stock Center 提供, Lx9801 是山东农科院选育出的普通高秆自交系, 是目前山东常用骨干自交系。

1.2 试验设计及方法

1.2.1 田间调查 2006 年海南种植玉米矮生突变体 52333、121C 和 502C, 取 121C 和 502C 矮秆植株的花粉授于 52333; 2007 年春种植杂种 F₁, 定株取 30

收稿日期: 2008-05-17

基金项目: 山东省农业良种产业项目资助(2007 良种字 < 04 >)

作者简介: 王立静(1980-), 女, 山东人, 硕士, 主要从事作物杂种优势研究与利用研究。

通讯作者: 刘保申(1966-), 男, 山东人, 教授, 博士生导师, 主要从事作物杂种优势研究与利用研究。

个杂种 F_1 植株的花粉授于高秆自交系 Lx9801, 2007 年冬海南种植测交株系并于开花后考查高矮秆植株的分离情况, 根据高矮秆分离比例确定 Dt 与 $D8$ 、 $D9$ 的等位性关系。

1.2.2 基因组 DNA 的提取和基因的初步定位 玉米基因组 DNA 提取采用 CTAB 法。本试验选择已经公布的均匀分布于玉米 10 条染色体上的微卫星标记, 利用郑 58/ 郑 58/ 52333 回交群体中的高秆植株进行 Dt 的初步定位。SSR 分析中所用到的引物序列引自 <http://www.maizegdb.org/ssr/>。引物由上海生工公司合成, 25 μ L 反应体系中包括 10 mmol/L Tris-HCl (pH 8.3), 50 mmol/L KCl, 1.5 mmol/L $MgCl_2$, 1 U *Taq* 酶, 4 nmol/L dNTP, 10 μ mol/L 引物, 20 ng 模板 DNA。在 Biometra PCR 仪上进行 PCR 扩增。反应条件为: 94 $^{\circ}C$ 预变性 5 min; 94 $^{\circ}C$ 1 min, 55 $^{\circ}C$ 1 min, 72 $^{\circ}C$ 1.5 min, 共 35 个循环; 72 $^{\circ}C$ 再延伸 10 min。反应产物在 6% 垂直平板聚丙烯酰胺凝胶上电泳, 经 0.2% 硝酸银染色后观测。

2 结果与分析

2.1 矮秆突变基因 Dt 与多数矮秆基因的遗传特点不同

矮生玉米的遗传机制有单基因矮生体系和多基因矮生体系^[3], 表现为数量性状遗传特点的矮秆性状是由微效多基因累加作用决定的, 而现有的矮生资源大多属隐性单基因, 已经鉴定的具有降低株高效应的矮生单基因有 33 个, 深入的遗传研究发现, 有些矮生基因是等位的, 目前为止有 25 个不同的矮生单基因在染色体上的位置已确定, 如 *an1* (1.08)、*lr* (1.07), *br2* (*mi1*) (1.06), *br3* (5.04), *bw1* (5.04), *bw2* (*rd1*) (1.11), *clt-1* (8.04~ 8.06), *ct1* (8.01), *ct2* (*rd3*) (1.01), *dl* (*d4*) (3.02), *d2* (*d3*) (9.03), *d5* (2.02), *D8* (*Mpl1*) (1.10), *D9* (5.00~ 5.02), *dl10* (2.08), *dl12* (8.08), *nal* (3.06), *na2* (5.03), *na3* (4.05), *py1* (*tan1*) (6.05), *py2* (1.11), *rd2* (6.00) *tdl* (*udl*) (5.04), *wrp1* (2.04), *yd2* (3.06)^[4-9]。

这些基因除 $D8$ (*Mpl1*)^[10, 11] 和 $D9$ ^[12] 外都是隐性的, 且 *Mpl1* 与 $D8$ 是等位基因^[10], 它们与普通的高秆玉米杂交, 后代表现为质量性状的遗传特点, 由于 Dt 表现为显性遗传的特点, 因此, Dt 只可能与 $D8$ 和 $D9$ 基因等位, 而不可能与 *br* 等隐性基因等位。

2.2 Dt 与 $D8$ (*Mpl1*), $D9$ 矮秆突变基因的染色体定位位点不同

为了将矮秆基因 Dt 定位到玉米染色体上, 选择均匀分布于玉米 10 条染色体上的 100 个微卫星

标记, 筛选矮秆材料 52333 和郑 58 之间的多态性标记, 利用在两个亲本间表现出多态性的标记, 以郑 58// 郑 58/ 52333 回交群体中随机选出的 132 个高秆植株进行群体分析。结果发现位于玉米第 10 染色体上的标记 *p-umc1077* 和 *p-umc1453* 可能与基因连锁, 其中矮秆基因与 *p-umc1453* 和 *p-umc1077* 之间的遗传距离分别为 3.13 和 5.6 cM, 大约位于 10.04~ 10.06 仓位。

Mpl1 与 $D8$ 均被定位于染色体 1 的长臂^[11, 13], 位于 1.10 仓位; $D9$ 被定位于染色体 5 的短臂^[12, 14], 位于 5.02 仓位; 表明 Dt 基因与 $D8$ (*Mpl1*) 和 $D9$ 基因所在的染色体位点不同。

2.3 Dt 与 $D8$, $D9$ 矮秆突变基因的遗传效应和矮化机理不同

$D8$, $D9$ 矮秆基因明显的副作用是纯合矮秆材料高度雌雄不协调或雌穗发育不良, 不能自交结实获得纯合矮秆株系, 因此 Maize Genetics Cooperation-Stock Center 保存的含有 $D8$, $D9$ 基因的材料均为杂合状态; 含有 Dt 矮秆基因的材料却能正常结实, 且在郑 58、齐 319、昌 7-2 等遗传背景下也都能获得纯合矮秆材料。

导致株高降低的主要因素是赤霉素的合成或转运受阻, 因此, 不同的玉米矮秆基因对赤霉素的反应有明显的差别, 前人也有不少的研究。为进一步了解 52333 显性矮秆基因的性质, 对纯合矮秆植株 52333 进行幼芽期赤霉素处理, 结果表明, 处理的胚芽鞘和苗高都明显增长, 证明此矮秆基因为赤霉素敏感型, 植株矮化是由于赤霉素的合成过程受阻^[2]。而 Winkle 等^[15-18] 通过研究证明含有 $D8$ 和 $D9$ 基因的材料对 GA_3 不敏感, 矮生基因 Dt 与 $D8$, $D9$ 的矮化机理不同, 也表明它们为非等位基因。

2.4 Dt 与 $D8$, $D9$ 矮秆突变基因的等位性分析

Mpl1 与 $D8$ 是等位基因^[10, 13], 均被定位于染色体 1 的长臂^[11, 12], 位于 1.10 仓位(因此本文进一步研究 $D8$ 与 Dt 的关系时, 不再研究 *Mpl1* 与 Dt 的等位性)。由于含有 $D8$ 和 $D9$ 基因的矮秆材料纯合致死, 进行等位性分析时只能利用杂合材料与 52333 测交, 杂种 F_1 虽然都表现为矮秆, 但其基因型并不一致, 各个单株的自交或测交后代的分离也不同。以与含 $D8$ 基因的材料测交为例: 若与 $D8$ 非等位, 则杂种共有 2 种基因型 $D8d8Dtdt$ 和 $d8d8Dtdt$ 。 $D8d8Dtdt$ 产生 $D8Dt$ 、 $D8dt$ 、 $d8Dt$ 、 $d8dt$ 4 种配子, 与高秆材料(产生 $d8dt$ 1 种配子)测交, 后代有 $D8d8Dtdt$ 、 $D8d8dtdt$ 、 $d8d8Dtdt$ 、 $d8d8dtdt$ 4 种基因型, 表现为 3 矮: 1 高; $d8d8Dtdt$ 产生 $d8Dt$ 、 $d8dt$ 2 种配子, 与高秆材

料测交, 后代有 $d8d8Dtdt$, $d8d8dtdt$ 2 种基因型, 表现为 1 矮 1 高, 也即有 50% 左右的测交后代分离比为 3: 1, 另 50% 左右的测交后代分离比为 1: 1。若与 $D8$ 等位, 则杂种有 2 种基因型 $DtDt$, $Dtdt$ 。 $DtDt$ 产生 Dt 1 种配子, 与高秆材料(产生 dt 1 种配子)测交, 后代有 $Dtdt$ 1 种基因型, 均表现为矮秆; $Dtdt$ 产生 Dt 、 dt 2 种配子, 与高秆材料(产生 dt 1 种配子)测交, 后代有 $Dtdt$ 、 $dtdt$ 2 种基因型, 表现为 1 矮 1 高, 也即有 50% 左右的测交后代全为矮秆, 不发生分离, 另 50% 左右的测交后代分离比为 1: 1。

表 1 Dt 与 $D8$, $D9$ 矮秆突变基因的等位性分析结果

Tab. 1 Result of allelic analysis between Dt and $D8$, $D9$ dwarf mutant genes					
组合 Combinations	测交株数 No. of testcrossing plants	高秆株数 No. of higher plants	矮秆株数 No. of dwarf plants	比例 Ratio	χ^2
Lx9801// 121C/52333	16	1 745	1 723	1: 1	0. 139 6
	14	885	2 811	3: 1	2. 195 0
Lx9801// 502C/52333	17	1 784	1 824	1: 1	0. 443 0
	13	750	2 412	3: 1	2. 767 0

注: $\chi^2_{0.05}(1) = 3. 84$, $\chi^2_{0.01}(1) = 6. 63$ 。

3 结论

迄今发现的 25 个矮秆基因中, 只有 $D8$ 和 $D9$ 基因属于显性矮秆基因。但从表型特点看, 含有 $D8$ 和 $D9$ 这两种矮秆基因的材料农艺性状差、生长势弱、植株过矮、株型不理想、存在隐性致死, 所以都不能得到纯合的植株。而含有 Dt 矮秆基因的材料却能够正常结实, 存在杂合和纯合的矮秆植株。 $D8$ 和 $D9$ 分别被定位于染色体 1 的长臂和染色体 5 的短臂; Dt 基因则被定位于玉米第 10 条染色体上, 与微卫星标记 $p-umc1453$ 和 $p-umc1077$ 之间的遗传距离分别为 3. 13 cM, 5. 6 cM; 另外, 含有 $D8$, $D9$ 基因的材料对赤霉素不敏感, Dt 矮秆突变体属于赤霉素敏感型, 是赤霉素的合成过程受阻, Dt 基因的矮化机理不同于 $D8$, $D9$ 。通过 Dt 与 $D8$ 和 $D9$ 矮秆突变基因的等位性分析, 进一步证明 Dt 基因与 $D8$ 和 $D9$ 基因是非等位基因。因此, 确定 Dt 是一个新的玉米矮秆基因。

参考文献:

[1] 佟屏亚. 紧凑型玉米选育与发展[M]//紧凑型玉米高产理论与技术. 北京: 科学技术文献出版社, 1999: 1- 17.

[2] 张素梅, 刘凤军, 刘保申, 等. 新的玉米显性矮秆基因的发现及初步分析[J]. 玉米科学, 2007, 15(3): 15- 18.

[3] 阎淑琴. 矮生玉米的遗传与育种[J]. 玉米科学, 2000, 8(2): 36- 45.

[4] Bensen R J, Johal G S, Crane V C, et al. Cloning and characterization of the maize *Anl* gene [J]. Plant Cell, 1995, 7: 75- 84.

[5] Abbe E C, Phinney B O. The action of the gene dwarf 1 in the ontogeny of the stem of maize [J]. Abstr Genet, 1942, 27: 129.

[6] Clive R Spray, Masatomo Kobayashi, Yoshihito Suzuki. The dwarf1 (*dl*) mutant of *Zea mays* blocks three steps in the

利用含 Dt 基因的杂种 F_1 各测交 30 株, 与含 $D8$ 基因材料的杂种测交分离后代有 16 株表现为 1 矮 1 高的分离比, 14 株表现大约 3 矮: 1 高的分离比, 经 χ^2 检验, 各个单株均有 95% 以上的概率符合理论分离比; 与含 $D9$ 基因材料的杂种测交分离后代有 17 株表现为 1 矮: 1 高的分离比, 13 株表现大约 3 矮: 1 高的分离比, 经 χ^2 检验各个单株均有 95% 以上的概率符合理论分离比, 表明 Dt 与 $D8$, $D9$ 为非等位基因。表 1 列出了 2 个组合各类单株综合后的 χ^2 检验结果。

gibberellin biosynthetic pathway [J]. Plant Biology, 1996, 93(19): 10515- 10518.

[7] Fujioka S, Yamane H, Spray C R, et al. Qualitative and quantitative analyses of gibberellins in vegetative shoots of normal, dwarf-1, dwarf-2, dwarf-3, and dwarf-5 Seedlings of *Zea mays* L [J]. Plant Physiol, 1988, 88(4): 1367- 1372.

[8] Glover D V. Location of a gene in maize conditioning a reduced plant stature [J]. Crop Sci, 1970, 10(5): 611- 612.

[9] Lunde C. The role of the maize gene, thick tassel dwarf1, in inflorescence architecture [J]. Maize Genetics Conference Abstracts, 2004, 46: 77.

[10] Rodney G, Winkler, Tim Helentjaris. Dominant dwarfs [J]. Maize Genetics Cooperation Newsletter, 1993, 67(176): 110- 111.

[11] Harberd N, Hake S, Freeling M. Programmed periclinal division of epidermal cells during glume development [J]. Maize Genetics Cooperation Newsletter, 1987, 61(33): 23- 24.

[12] Micheltore R W, Paran I, Kesseli R V. Identification of markers linked to disease-resistance genes by bulked segregant analysis: A rapid method to detect markers in specific genomic regions by using segregating populations [J]. Proc Natl Acad Sci, 1991, 88: 9828- 9832.

[13] Coe E. Dominant dwarf $D8$ is between *bz2* and *gs* on chromosome 1 [J]. Maize Genetics Cooperation Newsletter, 1980, 54(26): 27.

[14] Neuffer M G. Linkage of $D9$ and *Nl2* on chromosome 5 [J]. Maize Genetics Cooperation Newsletter, 1991, 65(84): 51- 52.

[15] Winkler R G, Freeling M. Physiological genetics of the dominant gibberellin nonresponsive maize dwarfs, dwarf-8 and dwarf-9 [J]. Planta, 1994, 193(3): 341- 348.

[16] Shozo Fujioka T, Hisakazu Yamane, Clive R Spray. The dominant non-gibberellin-responding dwarf mutant ($D8$) of maize accumulates native gibberellins [J]. Proc Natl Acad Sci, 1988, (85): 9031- 9035.

[17] Peng Jirong, Donald E Richards, Nigel M Hartley. Green revolution genes encode mutant gibberellin response modulators [J]. Nature, 1999, 400: 256- 261.

[18] Nicholas P, Harberd, Michael Freeling. Genetics of dominant gibberellin insensitive dwarfism in maize [J]. Genetica, 1989, 121: 827- 838.