

水稻早抽穗突变体 *ehd(t)* 的遗传分析和分子定位

李万昌 姜丽娜 王俊伟 余娇娇

(河南师范大学 生命科学院,河南 新乡 453007)

摘要:水稻品种的抽穗期是重要农艺性状之一,鉴定和定位抽穗期基因,分析其遗传效应对改良水稻抽穗期至关重要。在水稻品种 Nipponbare 中发现一个早抽穗植株,经过多代自交获得稳定的早抽穗突变株,突变体 *ehd(t)* 比 Nipponbare 早抽穗 15 d。遗传分析表明,该突变受 1 对显性核基因控制,暂命名为 *EHD(t)*。通过 2 个 F_2 定位群体,利用微卫星标记将 *EHD(t)* 定位于第 8 号染色体 RM223 和 RM584 之间,其遗传距离分别为 5.2 cM 和 6.1 cM。

关键词:水稻;早抽穗基因;遗传分析;基因定位

中图分类号:Q78 文献标识码:A 文章编号:1000-7091(2011)06-0055-04

Genetic Analysis and Molecular Mapping of A Early Heading Date Mutant(*ehd(t)*) in Rice

LI Wan-chang, JIANG Li-na, WANG Jun-wei, YU Jiao-jiao

(College of Life Sciences, Henan Normal University, Xinxian 453007, China)

Abstract: Rice heading date is an important agronomic trait. Mapping heading date gene is important for rice improvement. A rice(*Oryza sativa* L.) mutant with a early heading date, designated as *edh(t)*, was found from a *ja-ponica* rice variety Nipponbare. This early heading date mutant phenotype was stably expressed through successive five self-crossed generations, and its heading date was earlier 15 days than that in wild-type. Genetic analysis showed that the phenotype of *edh(t)* was controlled by a single dominant nuclear gene, temporarily designated as *EHD(t)*. By means of molecular marker technique, the *EHD(t)* gene was mapped to an interval between two SSR markers RM223 and RM584 on chromosome 8 with two F_2 segregating population, with genetic distances of 5.2 cM and 6.1 cM to each marker respectively. This is the basis for marker-assisted selection and map-based cloning this *EHD(t)* gene.

Key words: Rice; Early heading date gene; Genetic analysis; Molecular mapping

抽穗期是水稻重要的农艺性状,它直接决定一个品种的地域适应性和季节适应性,对品种的高产稳产起重要作用。抽穗期长短主要由品种的感光性(Photoperiod sensitivity, PS)、感温性(Temperature sensitivity, TS)和基本营养生长性(Basic vegetative growth, BVG)决定^[1]。一般认为,抽穗期是由主效基因和微效基因共同控制,其遗传基础较为复杂,但也有研究认为,抽穗期既有表现为连续变异的数量性状遗传,也有表现为质量性状遗传。利用分子标记进行水稻抽穗期 QTL(Quantitative trait locus)定位和克隆已有不少研究报道。Yano 等^[2]定位了

Hd1-Hd3a、*Hd3b-Hd14* 等 14 个抽穗期 QTL,其中 *Hd1*、*Hd3a* 和 *Hd6* 已被克隆^[3-6], *Hd2*、*Hd4*、*Hd5*、*Hd8* 和 *Hd9* 已被精细定位^[7-10]。Doi 等^[11]克隆了抽穗期 QTL-*Ehd1*,该基因在拟南芥中找不到同源基因。Izawa 等^[12]克隆了控制水稻光周期相关基因 *Se5*。Xue 等^[13]克隆了同时控制抽穗期、株高和产量的 *Ghd7*。

选育早熟高产的水稻品种一直为水稻育种家所重视。水稻早熟基因的发现和利用将有助于解决早熟与丰产难以兼顾的矛盾,也有利于克服籼粳亚种间 F_1 超亲迟熟的障碍。因此,发掘和鉴定水稻早抽

收稿日期:2011-06-08

基金项目:河南省科技攻关资助项目(102102310318);河南省教育厅资助项目(2010A210021)

作者简介:李万昌(1974-),男,河南汝州人,教授,博士,主要从事植物学的教学和科研工作。

穗期基因(包括 QTL),开展抽穗期基因定位、克隆等方面的研究,具有重要的理论意义和应用价值。

1 材料和方法

1.1 供试水稻材料

早抽穗突变体材料 *ehd(t)* (Early heading date):系 Nipponbare(粳稻)中发现的自然突变体,经过连续 5 代自交和选择,遗传性状稳定。常规材料: Nipponbare 和 Dular(广亲和品种)。

以每株主穗抽出 1 cm 作为该株始穗的标准,以播种到始穗的天数作为抽穗期。*ehd(t)* 和 Nipponbare 各调查 20 株,求其平均作为抽穗期。分离群体调查每个单株的抽穗期。

1.2 遗传分析和定位群体的构建

2006 年和 2007 年在江苏南京利用水稻早抽穗突变体 *ehd(t)* 与 Nipponbare 配置正反杂交组合, F_1 自交获得 F_2 群体用于水稻早抽穗性状的遗传分析。*ehd(t)* 和 Nipponbare 分别与广亲和品种 Dular 配置杂交组合, F_1 自交获得 F_2 将 *ehd(t)* /Dular 和 Nipponbare/Dular 的 F_2 群体用于早抽穗基因的分子定位。

1.3 水稻 DNA 的提取

采用 SDS 法^[14]提取水稻 DNA,做了部分调整。

1.4 SSR 分析

参照 <http://www.gramene.org/microsat/>,由上海生工生物工程有限公司合成 SSR 引物。SSR 分析参照 Li^[14]的方法:PCR 反应总体积为 10 μ L,含 1.0 μ L 10 \times PCR Buffer、0.6 μ L 25 mmol/L $MgCl_2$ 、0.2 μ L 2.5 mmol/L dNTPs、6.1 μ L 的 ddH₂O、1.0 μ L 10 μ mol/L 引物、1.0 μ L 模板 DNA、0.1 μ L 5 U/mL Taq DNA 聚合酶。PCR 反应程序为 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min;94 $^{\circ}$ C 变性 30 s 55 $^{\circ}$ C 退火 30 s 72 $^{\circ}$ C 复性 1 min,35 个循环;72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。PCR 产物经 10% 的非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳,快速银染后观察。

1.5 连锁分析

根据 SSR 分析的结果,利用 MapMaker Exp 3.0b 作图软件^[15],构建目标基因区域的分子标记连锁图谱。

2 结果与分析

2.1 突变体 *ehd(t)* 的遗传分析

突变体 *ehd(t)* 和其野生型 Nipponbare 在相同的条件下种植、管理, Nipponbare 的抽穗期在南京为 91 d,突变体 *ehd(t)* 的抽穗期为 76 d,比野生型抽穗期提前 15 d(图 1) 结实率下降,其他农艺性状没有

显著差异。为了明确突变体 *ehd(t)* 中突变基因的遗传特点,用突变体 *ehd(t)* 和其野生型 Nipponbare 做正反交,调查 F_1 的抽穗期,结果显示, F_1 群体的抽穗期正反交之间没有显著差异,全部是 81 d 左右。*ehd(t)* /Dular F_2 群体的抽穗期分布为连续的双峰分布(图 1),在 80 d 和 91 d 处有较明显的 2 个峰,最低谷出现在 87 d;以 87 d 为界线进行分组,可分成早抽穗(220 株)和晚抽穗(78 株)两个集团,对早抽穗集团和晚抽穗集团进行 3:1 χ^2 测验,结果发现其 $\chi^2 = 0.161 < \chi^2_{0.05,1} = 3.84$,适合 3:1 的比例,表明 *ehd(t)* 早抽穗性状的遗传是由 1 对显性核基因控制,暂命名为 *EHD(t)*。

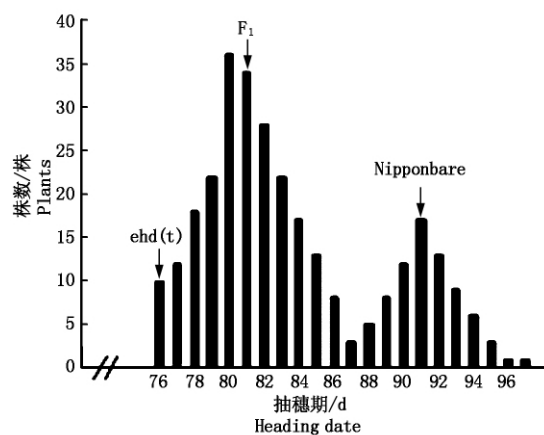


图 1 *Ehd(t)* /Nipponbare F_2 群体的抽穗期次数分布 ($n = 298$)

Fig. 1 Frequency distribution for days to heading in *ehd(t)* /Nipponbare F_2 population ($n = 298$)

2.2 早抽穗基因 *EHD(t)* 的定位

为了对早抽穗基因 *EHD(t)* 进行定位研究,选择抽穗期和 Nipponbare 相近的广亲和品种 Dular 组配 *ehd(t)* /Dular 和 Nipponbare/Dular 2 个 F_2 群体。这样既可克服籼粳杂种半不育问题,又可避免亲本间多态性差的问题。在 *ehd(t)* /Dular 和 Nipponbare/Dular 2 个 F_2 分离群体中随机选取早抽穗单株 20 株及晚抽穗单株 20 株,分别将各株的叶片等量混合后提取 DNA 构成 2 个早抽穗混合基因组池和 2 个晚抽穗混合基因组池。用覆盖水稻全基因组的 565 对 SSR 引物对早抽穗混合基因组池和晚抽穗混合基因组池及 3 个亲本进行多态性分析,共发现 3 个 SSR 标记在基因组池和亲本间均有多态,它们分别是第 7 染色体上的 RM118 和 RM505,第 8 染色体上的 RM223,这些标记可能与 *EHD(t)* 位点连锁。

随即用覆盖第 7 和第 8 染色体的 95 对 SSR 引物来筛选 *ehd(t)*、Nipponbare 和 Dular 之间的多态性,其中有 29 对 SSR 引物在双亲间表现出多态性,占所用引物的 30.5%。用这 29 对引物分别对 *ehd*

(*t*) /Dular 和 Nipponbare/Dular F_2 群体中的 182 株和 205 株个体进行定位分析。利用 Nipponbare/Dular F_2 群体在第 7 染色体上检测到 1 个抽穗期 QTL, 位于标记 RM118 和 RM505 之间, 距两标记的距离分别为 6.6 cM 和 8.8 cM(图 2), LOD 值为 2.71, 贡献率为 8.2%, 加性效应为 -0.1045 。利用 *ehd(t)* /Dular 的 F_2 群体在第 7 染色体的相同位置检测到 1 个抽穗期 QTL, LOD 值为 2.77, 贡献率为 7.8%, 加性效应为 0.077 2; 在第 8 染色体上检测到早抽穗基因 *EHD(t)*, 位于标记 RM223 和 RM284 之间, 距两标记的距离分别为 5.2 cM 和 6.1 cM(图 3), LOD 值为 18.46, 贡献率为 49.2%, 加性效应为 0.172 1。由此可以确定 *EHD(t)* 就是引起突变体 *ehd(t)* 早抽穗的基因, 因利用 Nipponbare/Dular 的 F_2 群体把一个抽穗期 QTL 已排除掉。

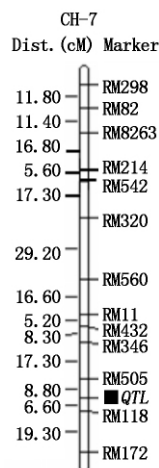


图 2 7 号染色体上检测到的抽穗期 QTL

Fig. 2 Location of QTL for heading date on chromosome 7

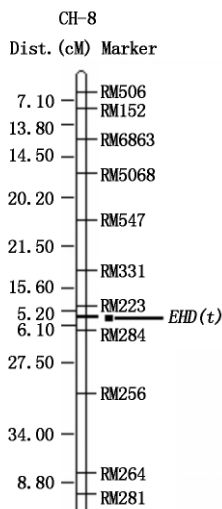


图 3 8 号染色体上检测到的早抽穗基因 *EHD(t)*

Fig. 3 Early heading date gene *EHD(t)* on chromosome 8

3 结论与讨论

人们利用不同的遗传群体对水稻抽穗期基因进行了大量的遗传研究, 但结果不尽相同。一方面可能是由于不同的材料遗传背景不同, 定位到的 QTL 数目和位于染色体上的位置也不同; 另一方面可能是存在等位基因或复等位基因。到目前为止, 国内外已报道的水稻抽穗期基因及其修饰基因有 30 多个。

研究者在水稻第 8 染色体上定位了许多抽穗期基因/QTL^[2, 8, 16-21], 比较发现与本研究鉴定的主效基因 *EHD(t)* 位置不一致, 说明本研究得到的是一个早抽穗基因。至于利用 Nipponbare/Dular 和 *ehd(t)* /Dular 2 个 F_2 群体共同在第 7 染色体上检测到的微效 QTL, 可能是 Nipponbare 和 Dular 遗传背景不一致而造成的, 不是突变体自身的突变引起的。本研究分别利用野生型和突变体与同一个亲本组配的 2 个群体进行定位研究, 就是为了排除遗传背景不一致而导致的误差, 因此, 本研究的早抽穗性状是由于基因 *EHD(t)* 突变造成的。研究水稻抽穗期基因和 QTL 的最终目的是促进水稻遗传育种, 实现水稻早熟高产。如将显性早熟基因导入杂交稻亲本不育系或恢复系, 有利于扩大早熟杂交稻 2 个亲本的亲缘关系, 使杂种优势更大程度地发挥; 另一方面, 利用显性早熟基因能使亚种间 F_1 杂种显性或超显性迟熟基因的效应或部分效应得到抑制或抵消, 从而有效地解决亚种间 F_1 生育期的障碍。而本研究鉴定到的 *EHD(t)* 基因是个早熟的显性基因, 该基因的发现为利用该基因改良水稻品种的抽穗期提供了很好的资源材料。

参考文献:

- [1] 魏祥进, 江玲, 徐俊锋, 等. 我国华北地区粳稻品种抽穗期遗传分析[J]. 中国水稻科学 2009 23(6): 595-603.
- [2] Yano M, Kojima S, Takahashi Y *et al.* Genetic control of flowering time in rice, a short-day plant[J]. Plant Physiology 2001 127(4): 1425-1429.
- [3] Yano M, Katayosi Y, Ashikari M *et al.* A major photoperiod sensitivity quantitative trait locus in rice is closely related to the Arabidopsis flowering time gene *CONSTANS* [J]. The Plant Cell 2000 12(12): 2473-2484.
- [4] Kojima S, Takahashi Y, Kobayashi Y *et al.* *Hd3a*, a rice ortholog of the Arabidopsis *FT* gene, promotes transition to flowering downstream of *Hd1* under short-day conditions[J]. Plant Cell Physiol 2002 43(10): 1096-1105.
- [5] Yamamoto T, Lin H X, Sasaki T *et al.* Identification of

- heading date quantitative trait locus *Hd6* and characterization of its epistatic interactions with *Hd2* in rice using advanced back-cross progeny [J]. *Genetics*, 2000, 154 (2): 885 – 891.
- [6] Takahashi Y, Shomuru A, Sasaki T, *et al.* *Hd6*, a rice quantitative trait locus involved in photoperiod sensitivity encodes the a subunit of protein kinase CK2 [J]. *PNAS* 2001, 98(14): 7922 – 7927.
- [7] Yamamoto T, Kuboki Y, Lin S Y, *et al.* Finemapping of quantitative trait loci *Hd-1*, *Hd-2* and *Hd-3*, controlling heading date of rice as single Mendelian factors [J]. *Theor Appl Genet*, 1998, 97: 37 – 44.
- [8] Lin H X, Liang Z W, Sasaki T, *et al.* Fine mapping and characterization of quantitative trait loci *Hd4* and *Hd5* controlling heading date in rice [J]. *Breeding Science*, 2003, 53: 51 – 59.
- [9] Takeuchi Y, Lin S Y, Sasaki T. Fine linkage mapping enables dissection of closely linked quantitative trait loci for seed dormancy and heading in rice [J]. *Theor Appl Genet* 2003, 107: 1174 – 1180.
- [10] Lin H X, Ashikari M, Yamanouchi U, *et al.* Identification and characterization of a quantitative trait locus *Hd9*, controlling heading date in rice [J]. *Breeding Science*, 2002, 52: 35 – 41.
- [11] Doi K, Izawav T, Fuse T, *et al.* *Ehd1*, a B-type response regulator in rice confers short-day promotion of flowering and controls FT-like gene expression independently of *Hd1* [J]. *Genes & Development*, 2004, 18(18): 926 – 936.
- [12] Izawav T, Oikawav T, Sugyamav N, *et al.* Phytochrome mediates the external light signal to repress FT orthologs in photoperiodic flowering of rice [J]. *Genes and Development* 2006, 16: 2002 – 2020.
- [13] Xue W Y, Xing Y Z, Weng X Y, *et al.* Natural variation in *Ghd7* is an important regulator of heading date and yield potential in rice [J]. *Nature Genetics*, 2008, 40 (6): 761 – 767.
- [14] Li W C, Jiang L, Zhou S R, *et al.* Fine mapping of *pss1*, a pollen semi-sterile gene in rice (*Oryza sativa* L.) [J]. *Theoretical and Applied Genetics* 2007, 114(5): 939 – 946.
- [15] Lander E S, Green P, Abrahamson J, *et al.* Mapmaker: An interactive computer package for constructing primary genetic linkage maps of experimental and natural populations [J]. *Genomics*, 1987, 1(2): 174 – 181.
- [16] Zhou Y, Li W, Wu W, *et al.* Genetic dissection of heading time and its components in rice [J]. *Theor Appl Genet* 2001, 102(8): 1236 – 1242.
- [17] 刘冠明, 李文涛, 曾瑞珍, 等. 水稻单片段代换系代换片段的 QTL 鉴定 [J]. *遗传学报* 2004, 31(12): 1395 – 1400.
- [18] Zhang Y S, Luo L J, Xu C G, *et al.* Quantitative trait loci for panicle size, heading date and plant height co-segregating in trait-performance derived near-isogenic lines of rice (*Oryza sativa* L.) [J]. *Theor Appl Genet* 2006, 113 (2): 361 – 368.
- [19] Nonoue Y, Fujino K, Hirayama Y, *et al.* Detection of quantitative trait loci controlling extremely early heading in rice [J]. *Theor Appl Genet*, 2008, 116(5): 715 – 722.
- [20] 杨德卫, 张亚东, 朱 镇, 等. 基于 CSSL 的水稻抽穗期 QTL 定位及遗传分析 [J]. *植物学报* 2010, 45(2): 189 – 197.
- [21] 黄 成, 姜树坤, 刘梦红, 等. 水稻抽穗期的 QTL 剖析 [J]. *华北农学报* 2009, 24(3): 11 – 13.