

doi:10.7668/hbxb.2014.05.002

# 普通野生稻矮化突变体的株高与分蘖基因的 QTL 定位及主效基因的遗传分析

王 兰,李 智,郑杏梅,蔡英钦,罗 敏,聂益勇

(华南农业大学 广东省植物分子育种重点实验室,亚热带农业生物资源保护与利用国家重点实验室,广东 广州 510642)

**摘要:**为了挖掘和克隆更多控制株高与分蘖的基因应用于水稻育种,利用多分蘖普通野生稻矮秆突变体与少分蘖高秆南特号组配杂交组合  $F_1$  并构建分离群体  $F_2$ ; 并且对该群体的株高与有效分蘖数进行性状遗传分析以及基因型检测,利用 IciMapping V3.0 对株高与分蘖数进行 QTL 连锁遗传分析。结果表明,两亲本的株高与分蘖数均为多基因控制的性状,且存在极显著的正相关;利用平均分布于水稻 12 条染色体上的 345 对分子标记对两亲本普通野生稻矮秆突变体与南特号进行多态性筛选,共筛出 194 对差异明显的多态标记,多态率为 56.23%;利用 122 对基因型清晰的多态标记对 571 株  $F_2$  分离群体进行连锁分析,共获得 33 个与株高相关的 QTLs,19 个与分蘖数相关的 QTLs;检测到 1 个与株高有关的主效 QTLs,定位于 1 号染色体 RM302 ~ RM104 标记之间,对表型贡献率达 71.72%。找到一个控制株高的主效 QTL,与分子标记 RM302 和 RM104 紧密连锁,对株高具有极强的矮化效果,该结果为进一步克隆矮秆基因与株型分子育种提供理论基础。

**关键词:**水稻;野生稻;株高;分蘖;QTLs;遗传分析

中图分类号:Q78 文献标识码:A 文章编号:1000-7091(2014)05-0005-05

## Mapping Quantitative Trait Loci Associated with Height and Tillers of *Oryza rufipogon* Griff. Dwarf Mutant and Genetic Analysis of Major Quantitative Locus

WANG Lan, LI Zhi, ZHENG Xing-mei, CAI Ying-qin, LUO Min, NIE Yi-yong

(Guangdong Provincial Key Laboratory of Plant Molecular Breeding, State Key Laboratory for Conservation and Utilization of Subtropical Agro-bioresources, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

**Abstract:** In order to exploit and isolate more genes controlling plant height and effective tillers, and applies these genes into breeding practice. In this paper, an  $F_2$  isolated population was constructed derived from a cross between a multi-tillering dwarf wild rice mutant and minor-tillering tall Nantehao variety; plant height and effective tillers of the  $F_2$  population were investigated and their genotypes were tested, and QTLs linkage genetic analysis was conducted by using IciMapping V3.0 soft. Plant height and effective tillers of the two parents were all quantitative traits controlled by multi-genes and had obvious positive relation. 194 pairs of molecular markers were identified to have polymorphism between the parents by screening 345 pairs of molecular markers even distributing on 12 chromosomes in rice and the polymorphic ratio was of 56.23%. In the  $F_2$  population, 33 height QTLs and 19 tillers QTLs were obtained using linkage analysis of 122 pairs of molecular markers. One major QTL controlling height was identified and located in the interval markers of RM302 and RM104 on chromosome 1. The major QTL explained 71.72% phenotypic variation. In our studies, a major QTL controlling plant height was obtained which was closely linkage with molecular markers of RM302 and RM104. It had very strong dwarfed ability. Our results would provide a theoretical basis for cloning dwarf genes and molecular breeding of constructing ideal plant shape.

**Key words:** Rice; *Oryza rufipogon*; Height; Tillers; QTLs; Genetic analysis

收稿日期:2014-06-27

基金项目:国家自然科学基金青年项目(30800597);教育部博士点基金项目(20094404120018);广东省大学生创新项目(1056412068);国家公益性行业(农业)科研专项(201003021)

作者简介:王 兰(1975-),女,湖南洞口人,副教授,博士,主要从事水稻分子育种研究。

水稻株型是影响稻米产量的重要农艺性状,而株高和分蘖是水稻株型的两大重要特征<sup>[1]</sup>。植株过高容易倒伏,影响籽粒干物质积累、增加收获难度,导致产量下降<sup>[2]</sup>;分蘖数太少,穗数减少,直接影响水稻单位面积的产量。适当矮化,增加有效分蘖,塑造“理想株型”,不仅可以提高水稻的耐肥抗倒能力,而且可以提高群体的光合效率,最终达到增产增收的目的。

迄今为止,对于水稻矮秆与分蘖基因的遗传研究已有不少报道。目前,大约有 80 多个水稻矮秆突变体被发现和鉴定,近 45 个被精细定位或克隆<sup>[3]</sup>。根据与矮秆连锁的性状,矮秆突变体可分为小粒矮秆(*d1*、*d7*、*d11* 等)、畸形矮秆(*d2*、*d6*、*d20* 等)、半矮秆(*sd-1*、*sd-g*、*sd-t* 等)和多分蘖矮秆(*d-3*、*d-10*、*d-14* 等)4 种类型<sup>[4]</sup>。不同矮秆基因的作用机理不同,如矮秆突变体 *d1* 具有转导胞外信号的作用,编码 GTP 结合蛋白  $\alpha$ -亚基,如果有突变产生,使得 GTP 蛋白不能执行正常功能,引起赤霉素信号传递途径受阻产生矮秆表型<sup>[5]</sup>; *d-3* 编码 F 盒富含亮氨酸重复转录因子,与拟南芥 *MAX2* 同源,作为泛素 E3 连接酶复合物的构成成分,抑制腋芽活性,导致分蘖增加,植株变矮<sup>[6]</sup>。随着水稻分子生物学及基因组学的快速发展,被发现和鉴定的分蘖基因有近 80 个,其中质量性状近 30 个,数量性状约 50 个。已克隆的分蘖基因 11 个(*Moc1*、*OsTb1*、*D10* 等),均为质量性状,还未克隆过数量性状的分蘖 QTL<sup>[7]</sup>。研究表明,已克隆的分蘖基因行使的功能不同,*MOC1* 为水稻分蘖过程中的关键调控基因,编码 MOC1 蛋白<sup>[8]</sup>。*OsTb1* 编码一个 TCP 结构域的转录因子,主要是控制从腋芽原基到侧枝形成的生长过程,受 *MOC1* 调节<sup>[9]</sup>。

由此可见,对于水稻矮秆与分蘖的分子生物学已有一定的深入研究,但对基因功能的研究还仅限于单个基因的克隆与功能分析。另外,虽然已鉴定和发现了大量的矮秆、半矮秆基因,但只有半矮秆基因 *sd-1* 在育种上得到了广泛的应用<sup>[10]</sup>。*sd-1* 基因与一些不良农艺性状连锁,使其在生产上广泛利用潜伏着遗传脆弱性<sup>[11]</sup>。已克隆的分蘖基因在育种上的应用还很少,关于水稻是如何控制分蘖发生的生理过程尚不清楚<sup>[12]</sup>。株高与分蘖是多基因控制的数量性状,为了进一步研究这些基因互作的网络调控模式,矮秆基因应用多源化,深入探讨分蘖发生的生理过程,有必要挖掘和克隆更多控制株高与分蘖的基因应用于水稻育种。

华南农业大学亚热带农业生物资源保护与利用

国家重点实验室刘向东教授在种质资源保存基地的广东遂溪普通野生稻中发现了一株极端矮秆多蘖突变体,本研究利用该突变体与高秆南特号构建杂种  $F_1$  及基因定位分离群体  $F_2$ ,利用 194 对亲本间有多态的分子标记对  $F_2$  群体进行基因型检测,并对水稻株高与分蘖性状进行 QTL 连锁遗传分析,为矮秆与分蘖基因的进一步精细定位、克隆及水稻高产分子育种提供理论依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 水稻材料

本基地的广东遂溪普通野生稻多蘖极端矮秆突变体,高秆籼稻品种南特号及其杂种  $F_2$  定位分离群体,2012 年早季种植于华南农业大学农场进行统计观察与分析。

### 1.2 方法

1.2.1 性状调查 参照江海燕等<sup>[13]</sup>的方法,稍作修改。水稻成熟期,测量地上与地下部分的交界处到每株最高穗尖顶部的高度,每株测量 3 根最高穗,取其平均值作为该株株高;计算每株有效穗数,实际为主茎与分蘖数之和。

1.2.2 DNA 的提取与分子标记分析 水稻总 DNA 的提取参照 Dellaporta 等<sup>[14]</sup>的简易 SDS 提取法,稍作修改。分别取各试验材料的幼嫩叶片提取水稻总 DNA,作为 PCR 扩增的模板。每个 PCR 反应液(20  $\mu$ L) 组成为:1  $\times$  PCR Buffer,0.2 mmol/L dNTPs,1 U *Taq* 酶,250 nmol/L 每种引物,1  $\mu$ L 模板 DNA。PCR 反应在 My Cycler(BioRad) 热循环仪上进行。反应程序为:94  $^{\circ}$ C 预变性 3 min;扩增 35 个循环,每个循环 94  $^{\circ}$ C 40 s,55  $^{\circ}$ C 40 s,72  $^{\circ}$ C 40 s;最后 72  $^{\circ}$ C 2 min。

根据 McCouch 等<sup>[15]</sup>开发的水稻 SSR 标记、黄朝锋<sup>[16]</sup>开发的 PSM 标记,以及根据 NCBI 数据库(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)提供的 93-11 与日本晴序列设计的 In/Del 标记,选取 345 对,约每 5 cM 一对,平均分布于水稻的 12 条染色体上,送华大生物技术服务公司合成。

分子标记在群体中的基因型通过 6% 聚丙烯酰胺凝胶电泳分离,银染检测分析,具体方法参照王兰等<sup>[17]</sup>的检测方法。

1.2.3 QTL 连锁分析及数据统计分析 利用 Ici-Mapping V3.0 软件进行 QTL 分析<sup>[18]</sup>。以 Group 命令分组, Kosambi 方法计算遗传距离。以 LOD 值 2.5 作为 QTL 存在的阈值,同时计算加性和显性效应。数据相关性分析及显著测验利用 SPSS 软件完成。

2 结果与分析

2.1 突变体野生稻及其 F<sub>2</sub> 群体的株高与分蘖性状的遗传分析

本实验室所获得的普通野生稻突变体平均株高为 59.67 cm, 通过几年早季与晚季的连续种植, 表型已经稳定遗传, 群体内无株高分离; 且具有普通野生稻的通性—多分蘖, 每株达 30 个左右有效分蘖。由此, 本研究选取高秆、少分蘖的南特号作为母本与普通野生稻突变体杂交, 构建 F<sub>2</sub> 定位分离群体。性状调查结果表明: 两亲本株高与分蘖数差异极显著; F<sub>2</sub> 群体中两性状均出现明显的双向超亲分离, 变异幅度很大, 峰度与偏度小于 1 或略大于 1 (表 1)。说明株高与分蘖性状在 F<sub>2</sub> 群体上均呈连续分布, 是多

基因控制的数量性状。株高与分蘖之间呈现极显著的正相关( $r=0.40^{**}$ )。

F<sub>2</sub> 群体中两性状呈连续分布, 但均出现双峰 (图 1), 株高性状中, 如果以株高 107.45 cm 为界, 高秆与矮秆比值为 3.49:1, 卡平方测验值为 2.47 ( $\chi^2_{0.05,1}=3.84$ ), 符合一对基因控制的表型分离比 3:1, 高秆为显性性状; 分蘖性状中, 以有效分蘖数 7 个为界, 少分蘖与多分蘖的比值为 17.4:1, 卡平方测验值为 93.91 ( $\chi^2_{0.01,1}=6.63$ ), 远远偏离一对基因控制的表型分离比 3:1, 少分蘖为显性性状。说明在该分离群体中, 存在一对控制株高的主效基因, 多对控制分蘖的主效基因, 控制株高的这对基因效应很强, 而控制分蘖的这些基因的效应略小。

表 1 双亲及其 F<sub>2</sub> 群体株高与分蘖性状的表型分析

Tab.1 Phenotypic value of height and tillers traits of parents and its F<sub>2</sub> population

性状 Trait	亲本 Parents			平均值 Means	变异幅度 Range of variance	标准差 SD	偏度 Skewness	峰度 Kurtosis	变异/% CV
	南特号 Nantehao (P <sub>1</sub> )	野生稻 Wild rice (P <sub>2</sub> )	P <sub>1</sub> - P <sub>2</sub> <sup>1)</sup>						
株高/cm Height	147.33	59.67	87.66 <sup>**</sup>	120.49	37.50 ~ 184.30	31.81	-0.86	-0.14	0.26
分蘖/个 Tillers	7	30	25 <sup>**</sup>	9.93	1.00 ~ 35.00	5.45	1.02	1.17	0.55

注: <sup>1)</sup>. 双亲差值; <sup>\*\*</sup>. 代表 0.01 水平差异显著水平。  
Note: <sup>1)</sup>. Difference between two parents; <sup>\*\*</sup>. Denotes significant at the 0.01 level.

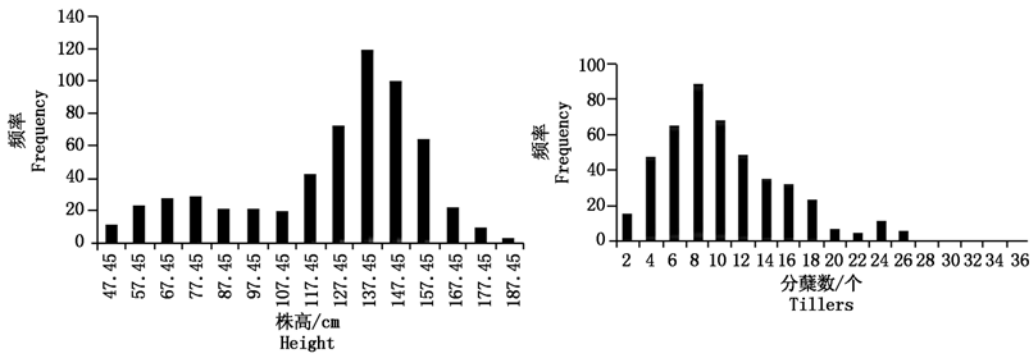


图 1 F<sub>2</sub> 群体中株高与分蘖性状的频率分布

Fig.1 Frequency distribution for height and tillers in F<sub>2</sub> individuals

2.2 遗传图谱的构建与分子标记分析

利用 345 对分子标记对亲本野生稻突变体与南特号进行多态分析, 其中 194 对标记在亲本间具有多态性, 多态性引物所占比例为 56.23%。利用这些多态标记对 571 株 F<sub>2</sub> 个体进行基因型检测, 选取 F<sub>2</sub> 群体中带型清晰、杂带少且在基因组中分布较为均匀的 122 对标记构建连锁遗传图。图谱覆盖了水稻的 12 号染色体, 连锁群总长度为 1 598.93 cM, 相邻标记间的遗传距离为 13.11 cM, 平均每条染色体 4 ~ 16 个标记。标记在染色体上的顺序与 McCouch 等<sup>[15]</sup>所构建的高密度分子标记连锁图谱基本一致。

122 对多态标记中, 50 对标记发生了偏分离, 其

中 12 对标记偏向多分蘖的野生稻矮秆突变体, 占总标记的 9.84%; 38 对偏向少分蘖的高秆南特号, 占总标记的 31.15%。除第 6 和第 10 号染色体外, 每条染色体上含有 2 ~ 13 个偏分离位点。单个标记 ICIM-SMA (Inclusive composite interval mapping of for epistatic mapping for single marker analysis) 分析表明, 标记 RM302 与 RM104 对表型贡献率最大, 分别为 26.16% 和 29.06%, 其 LOD 值分别为 35.96 和 40.71。说明 RM104 和 RM302 与株高基因紧密连锁。

2.3 QTL 定位和遗传效应分析

应用复合区间作图法对水稻株高与有效分蘖数进行 QTL 定位, 共检测到 33 个与株高相关的 QTLs,

19 个与分蘖数相关的 QTLs。除第 10 号染色体外,其他染色体均有 1~5 个 QTLs。定位于 1 号染色体的 RM302~RM104 区间的 QTL 对表型的贡献率最大,为 71.72%,被鉴定为主效 QTL。该基因来自矮秆野生稻突变体的等位基因,为减效基因,促使植株矮化(图 2)。

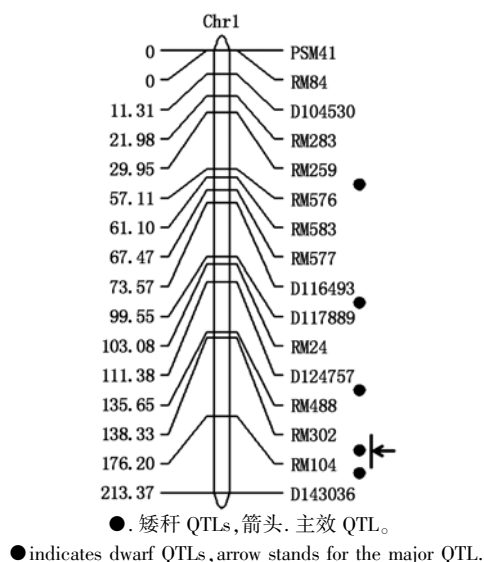


图 2 Chr1 的矮秆 QTL 连锁遗传图

Fig. 2 The linkage genetic map of dwarf QTLs on Chromosome 1

### 3 讨论与结论

普通野生稻是栽培水稻的祖先种,蕴含丰富的有利基因,如多分蘖、抗逆等。充分利用普通野生稻的有利基因进行品种改良已成为当今分子育种的研究热点。目前,已定位和克隆了一批控制水稻株高与分蘖的基因,但基本上均来自栽培稻。张帆涛等<sup>[19]</sup>利用水稻矮秆突变体 *ddl* 与籼稻品种 Tai-chung Native 1 杂交,将 *ddl* 定位于水稻第 10 号染色体长臂 RM25923~RM6673 约 70.4 kb 区域内。隋炯明等<sup>[20]</sup>以多蘖矮与南京 6 号杂交,将半矮秆基因 *sdt3* 定位于第 11 号染色体 SSR98~SSR35 0.19 cM 范围内。Ishikawa 等<sup>[6]</sup>利用栽培稻 Shiokari 及其 5 个突变体克隆分离了矮化多分蘖基因 *D3*。已克隆的分蘖基因仅限于利用突变体进行研究的数量性状。Li 等<sup>[8]</sup>利用粳稻 H8902 分蘖芽形成突变体分离了第一个与水稻分蘖有关的基因 *MOC1*。Zhou 等<sup>[21]</sup>利用粳稻品种中花 11 多分蘖突变体分离了分蘖基因 *MT1*。

本研究通过构建普通野生稻矮秆突变体的分离群体,获得 1 个控制株高的主效 QTL,对表型的贡献率达 71.72%。该区段已克隆了一个半矮秆基因 *sd-1*, *sd-1* 编码赤霉素 G20 氧化酶,调控赤霉素的生

物合成,控制植物基部节间生长<sup>[22-24]</sup>。本研究结果表明,在该区段除控制株高的半矮秆基因 *sd-1* 外,还存在一个新的未克隆的控制矮秆的主效 QTL,与分子标记 RM302 与 RM104 紧密连锁。本研究所获得的该主效矮秆 QTL 具有极强的矮化能力,矮秆亲本平均株高只有 59.67 cm,  $F_2$  分离群体中也有株高极矮的植株,最矮的植株只有 37.50 cm。但是本研究所定位的主效 QTL 区间还很大,跨度为 37.87 cM,中间包括的基因还很多。所以还需构建近等近基因系,对该主效 QTL 进行进一步精细定位,并通过分子标记辅助选择以及杂交、自交,把 *sd-1* 基因排除在定位区间外,克隆该矮秆基因。

另外,在该群体中,定位到 19 个与分蘖有关的 QTLs,但没有定位到明显的主效 QTLs。由于野生稻具有极强的分蘖能力,在其中一定存在控制分蘖的基因,需要进一步通过其他的群体进行的鉴定。

以多分蘖野生稻矮秆突变体为母本,少分蘖高秆品种南特号为父本,构建杂种  $F_1$  及其分离群体  $F_2$ 。利用 122 对带型清晰的多态标记对 571 株  $F_2$  个体进行连锁遗传分析,获得 33 个与株高相关的 QTLs,19 个与分蘖数相关的 QTLs。同时检测到 1 个与株高有关的主效 QTLs,定位于 1 号染色体 RM302~RM104 标记之间,对表型贡献率达 71.72%,该区间存在一个未克隆的矮化能力极强的矮秆基因,和分子标记 RM302 和 RM104 紧密连锁。

致谢:本研究还得到了华南农业大学农学院刘向东教授和俞淑红老师的协助与指导,在此表示感谢。

### 参考文献:

- [1] 高振宇,刘晓辉,郭龙彪,等. 一新的水稻多蘖矮秆突变体 *tdll(t)* 的分离及基因的精细定位[J]. 科学通报, 2009, 54(9): 1238-1243.
- [2] 邹德堂,崔成焕,赵宏伟,等. 水稻倒伏指数的配合力分析[J]. 东北农业大学学报, 1997, 28(4): 17-22.
- [3] 曾美娟. 一个水稻矮秆突变体的遗传分析及基因的精细定位[D]. 福州:福建农林大学, 2012.
- [4] Iwata N, Takamure I, Wu H K, et al. List of genes for various traits (with chromosome and main literature) [J]. Rice Genet Newslett, 1995, 12: 61-93.
- [5] Ashikari M, Wu J, Yano M, et al. Rice gibberellin-insensitive dwarf mutant gene *Dwarf1* encodes the alpha-subunit of GTP-binding protein [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1999, 96(18): 10284-10289.
- [6] Ishikawa S, Maekawa M, Arite T, et al. Suppression of tiller bud activity in tillering dwarf mutants of rice [J]. Plant and Cell Physiology, 2005, 46(1): 79-86.

- [7] 李万昌,王永飞,马三梅,等. 水稻多分蘖突变体 *ht1* 的遗传分析和分子定位[J]. 遗传,2010,32(10):1065 – 1070.
- [8] Li X Y, Qian Q, Fu Z M, *et al.* Control of tillering in rice [J]. Nature, 2003, 422(6932): 618 – 621.
- [9] Takeda T, Suwa Y, Suzuki M, *et al.* The *OsTBI* gene negatively regulates lateral branching in rice [J]. The Plant Journal : for Cell and Molecular Biology, 2003, 33(3): 513 – 520.
- [10] 于永红,斯华敏. 水稻矮化相关基因的研究进展[J]. 植物遗传资源学报,2005,6(3):334 – 347.
- [11] 薛建峰,汤永荣,查仁明,等. 2 个水稻矮秆突变体的遗传分析[J]. 中国农学通报,2011,27(27):60 – 64.
- [12] 刘 杨,丁艳锋,王强盛,等. 植物生长调节剂对水稻分蘖芽生长和内源激素变化的调控效应[J]. 作物学报,2011,37(4):670 – 676.
- [13] 江海湃,张淑英,包劲松,等. 水稻多分蘖矮秆突变体 *htd1-2* 的遗传分析和基因定位[J]. 遗传,2009,31(5):531 – 539.
- [14] Dellaporta S, Wood T, Hicks T. A plant DNA mini preparation: version II [D]. Plant Mol Biol Rep, 1983, 1: 19 – 21.
- [15] McCouch S R, Chen X, Panaud O, *et al.* Microsatellite marker development, mapping and applications in rice genetics and breeding [J]. Plant Molecular Biology, 1997, 35(1/2): 89 – 99.
- [16] 黄朝锋. 水稻 PSM 标记的发展及抗虫基因的分子定位[D]. 广州:华南农业大学,2003:59 – 68.
- [17] 王 兰,龙云铭,刘耀光. 一种用于 PCR 的植物基因组 DNA 快速制备方法[J]. 分子植物育种,2009,7(2):425 – 428.
- [18] Wang J, Wan X, Li H, *et al.* Application of identified QTL-marker associations in rice quality improvement through a design-breeding approach [J]. Theoretical and Applied Genetics. Theoretische und Angewandte Genetik, 2007, 115(1): 87 – 100.
- [19] 张帆涛,方 军,孙昌辉,等. 水稻矮秆突变体 *dull1* 的分离鉴定及其突变基因的精细定位[J]. 遗传,2012,34(1):79 – 86.
- [20] 隋炯明,梁国华,李 欣,等. 籼稻多蘖矮半矮秆基因的遗传分析和基因定位[J]. 作物学报,2006,32(6): 845 – 850.
- [21] Zhou Y, Zhu J Y, Li Z Y, *et al.* Fine mapping and cloning of *MT1*, a novel allele of *D10* [J]. Progress in Natural Science, 2009, 19(12): 1683 – 1689.
- [22] Monna L, Kitazawa N, Yoshino R, *et al.* Positional cloning of rice semidwarfing gene, *sd-1*: rice "green revolution gene" encodes a mutant enzyme involved in gibberellin synthesis [J]. DNA Research : an International Journal for Rapid Publication of Reports on Genes and Genomes, 2002, 9(1): 11 – 17.
- [23] Sasaki A, Ashikari M, Ueguchi-Tanaka M, *et al.* Green revolution: a mutant gibberellin-synthesis gene in rice [J]. Nature, 2002, 416(6882): 701 – 702.
- [24] Spielmeier W, Ellis M H, Chandler P M. Semidwarf (*sd-1*), "green revolution" rice, contains a defective gibberellin 20-oxidase gene [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2002, 99(13): 9043 – 9048.