

# 水稻脆秆矮生突变体鉴定及基因定位研究

叶亚峰<sup>1,2</sup> 刘斌美<sup>2,3</sup> 许学<sup>2</sup> 章忠贵<sup>2</sup> 吴跃进<sup>2,3</sup> 王钰<sup>1</sup>

(1. 安徽大学资源与环境工程学院,安徽合肥 230601; 2. 中科院离子束生物工程学重点实验室,安徽合肥 230031;  
3. 中科院合肥物质研究院技术生物与农业工程研究所,安徽合肥 230031)

**摘要:** 经过氮离子束处理的籼稻品种 9311 其 M<sub>2</sub> 代中发现 1 株茎、叶均较脆且株高偏矮的突变体,暂定名为矮脆 (*dfr*)。该突变体株高 74.5 cm,而野生型株高为 122.9 cm;细胞壁成分分析表明,突变体和野生型叶片纤维素含量分别为 13.8% 和 23.8%;半纤维素分别为 24.2% 和 20.6%;突变体和野生型茎秆的纤维素含量分别为 22.3% 和 34.1%;半纤维素分别为 30.3% 和 18.6%;细胞壁其他成分无明显变化。遗传分析表明,该突变体脆性矮生性状受单隐性基因控制;以突变体 *dfr* 与 02428 杂交组合的 F<sub>2</sub> 代群体为基因定位群体,利用 SSR 分析标记将 *dfr* 突变位点定位在 2 号染色体,位于 SSR 分子标记的 RM5472 和 RM240 之间,遗传距离分别为 1.1 cM 和 1.6 cM。这些结果为研究脆秆矮生突变体及其基因克隆打下基础。

**关键词:** 水稻; 遗传分析; 脆秆矮生突变体; 基因定位

## IDENTIFICATION AND GENETIC MAPPING OF A FRAGILE AND DWARF RICE MUTANT

YE Ya-feng<sup>1,2</sup> LIU Bin-mei<sup>2,3</sup> XU Xue<sup>2</sup> ZHANG Zhong-gui<sup>2</sup> WU Yue-jin<sup>2,3</sup> WANG Yu<sup>1</sup>

(1. School of Resources and Environmental Engineering, Anhui University, Hefei, Anhui 230601;

2. Key Laboratory of Ion Beam Bioengineering, Chinese Academy of Sciences, Hefei, Anhui 230031;

3. Institute of Technical Biology and Agricultural Engineering, Hefei Institutes of Physical Science, Chinese Academy of Sciences, Hefei, Anhui 230031)

**Abstract:** A fragile and dwarf rice mutant (*dfr*) was obtained from M<sub>2</sub> population of *indica* variety 9311 irradiated by nitrogen ion beam. The plant height of the mutant is 74.5 cm, while that of wild type is 122.9 cm. Cell wall composition analysis indicated that cellulose and hemi-cellulose contents in leaf of the mutant and wild type were 13.8% and 23.8%, 24.2% and 20.6%, respectively, which in stem were 22.3% and 34.1%, 30.3% and 18.6%, respectively. Other cell wall components changed slightly. Genetic analysis showed that the character of *dfr* was controlled by a recessive gene. The *dfr* gene was mapped on rice chromosome 2 by using a F<sub>2</sub> population developed from a cross between the mutant and 02428, and the genetic distances from the gene to the linked SSR markers RM5472 and RM240 were 1.1 cM and 1.6 cM, respectively. The above results laid the basis for the research of the fragile and dwarf mutant and its gene cloning.

**Key words:** rice; genetic analysis; fragile and dwarf culm; gene mapping

水稻的茎秆突变大致分为 3 种类型: 高度、色泽和强度。而高度与强度直接关系到水稻的抗倒伏性和产量。其中, 茎秆高度突变体的研究最为广泛和深入, 由于半矮秆基因 *sd1* 的发现和利用, 引发了全球水稻生

收稿日期: 2011-04-14 接受日期: 2011-06-22

基金项目: 中国科学院方向性研究项目 (KJ CX2-YW-N34), 中国科学院知识创新工程青年人才领域前沿项目 (085FCQ0126), 国家转基因重大科技专项 (2009ZX08009-105B), 国家自然科学基金 (10975153), 安徽省自然科学基金 (11040606Q58)

作者简介: 叶亚峰 (1986-), 男, 安徽安庆人, 硕士, 主要从事细胞生物学研究。E-mail: yyfeng86@163.com

通讯作者: 王钰 (1957-), 女, 安徽六安人, 教授, 主要从事植物分子和细胞生物学研究。E-mail: yuwang800@hotmail.com

产的第一次绿色革命,并取得了巨大的成绩。而茎秆强度突变体的研究早在 20 世纪 60 年代就已开始,至今脆茎突变体的报道也有不少,但与株高相关的脆茎突变体则报道不多。低能离子束作为一种新的诱变源,创建了一批重要的植物突变体(如 *Sdd*)。吴跃进等曾利用低能离子束诱变一半矮秆突变体(Y98149),该半矮秆材料的农艺性状优良,其矮生性表达受 1 对显性基因控制<sup>[1]</sup>。我们从氮离子束辐照的籼稻品种 9311 中获得 1 个脆秆矮生突变体<sup>[2]</sup>,从而能研究株高与强度的分子机理,进一步提高水稻的抗倒伏性和产量。

本研究围绕氮离子束辐照得到的脆秆矮生突变体的农艺性状、细胞壁成分以及控制该性状的基因遗传方式和基因定位开展研究,旨在为脆秆矮生突变体的深入研究和应用打下基础。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

2007 年在合肥物质科学研究院技术生物与农业工程研究所利用氮离子束处理籼稻品种 9311,在  $M_2$  代获得 1 株脆秆矮生突变体,经过  $M_3$  和  $M_4$  代验证性状稳定,命名为矮脆(*dfr*)。

### 1.2 方 法

1.2.1 农艺性状分析 每个材料随机取 5 株考察主要农艺性状,包括:抽穗期、株高、穗长、节间长度、有效穗数、分蘖数、结实率和千粒重。

1.2.2 细胞壁组分含量的分析 取抽穗期的叶片与茎秆,105℃杀青 1h,然后 65℃烘 24h,粉碎后过 40 目筛,装入样品袋备用。根据 Van Soest 等<sup>[3]</sup>方法测定细胞壁组分含量。

1.2.3 遗传分析及基因定位群体构建 2009 年冬在海南三亚水稻试验田配制 *dfr*/02428,9311/*dfr*,*dfr*/日本晴的组合(其中 *dfr* 均为  $M_4$  代),收取各自花授粉的亲本和异花授粉的杂交种子  $F_1$ ,2010 年夏在合肥物质科学研究院技术生物与农业工程研究所水稻试验田种植海南收取的种子  $F_1$ ,成熟后收取其自花授粉的种子  $F_2$ ,由于 *dfr* 植株在苗期即可分辨,故将收取的  $F_2$  种子在实验室温室培养间种植 1 个月获得  $F_2$  幼苗群体,以手折方式判断正常植株与脆秆植株并统计数目。选取 *dfr*/02428 杂交配组的  $F_2$  群体作为定位群体,选取具有 *dfr* 表型的 92 株植株进行定位,分别提取叶片 DNA,同时从这 92 株随机选取 10 株叶片进行混合,提取 DNA,作为突变池将父本 02428 与母本 *dfr* 的叶片

进行混合,提取 DNA,作为  $F_1$  基因组。

1.2.4 SSR 分析 根据已发表的分布于水稻 12 条染色体上的 SSR 序列进行引物合成,对 02428 和 *dfr* 基因组 DNA 进行 PCR 扩增,反应总体积为 20 $\mu$ l,其中模板 DNA 1 $\mu$ l,10 $\mu$ mol/L 的 SSR 引物 2 $\mu$ l,10 $\times$ PCR 缓冲液 2 $\mu$ l,25mmol/L MgCl<sub>2</sub> 2 $\mu$ l,2.5mmol/L dNTPs 1 $\mu$ l,1U/ $\mu$ l Taq 酶 0.8 $\mu$ l,用 ddH<sub>2</sub>O 补足体积。扩增程序:94℃预变性 5min;94℃变性 45s,55℃退火 30s,72℃延伸 45s,39 个循环;再 72℃延伸 10min。

1.2.5 连锁分析 对电泳图片进行数据转换,将与突变体亲本一致的带型记为 0,与野生型亲本一致的带型记为 2,同时具有两亲本带型的记为 1;用 MapDraw 对转换数据进行分析并绘制遗传图谱<sup>[4]</sup>。

## 2 结果与分析

### 2.1 突变体的表型特征

2007 年,在合肥物质科学研究院技术生物与农业工程研究所利用氮离子束处理籼稻品种 9311,在  $M_2$  代获得 1 株脆秆矮生突变体,经过  $M_3$  和  $M_4$  代验证性状稳定。该突变体在整个生长期都表现茎叶较脆,株高较野生型有明显的降低,对野生型与突变体的株高进行测量,野生型的株高为 122.9cm,突变体的株高为 74.5cm(图 1),暂命名为 *dfr*。突变体的节间数目与野生型相比没有变化,但每一节的长度较野生型有不同程度的减少;生育期、籽粒形态等方面与野生型无明显差异。

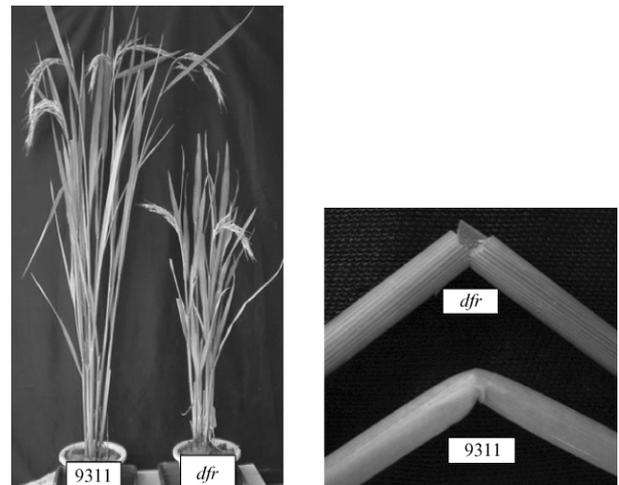


图 1 突变体 *dfr* 与野生型 9311

Fig. 1 Mutant *dfr* and wild type 9311

### 2.2 农艺性状分析

通过对  $M_4$  代突变体和野生型的农艺性状进行分

析表明,突变体的株高和穗长与野生型相比明显降低,穗粒数以及结实率也显著减少,而有效穗数,分蘖数和千粒重均无明显差异(表1)。

表1 突变体与野生型农艺性状分析

Table 1 Agronomic traits of mutants and wild type

性状 trait	野生型 9311 wild type 9311	突变体 <i>dfr</i> mutant <i>dfr</i>
播始历期 days from sowing to heading( d)	116	117
株高 plant height( cm)	122.9 ± 1.40	74.5 ± 2.00 **
穗长 panicle length( cm)	21.3 ± 0.10	18.2 ± 1.05 **
有效穗数 effective panicle number	4.3 ± 0.58	5.3 ± 0.58
分蘖数 tiller number	5.2 ± 0.31	4.9 ± 0.27
穗粒数 number of grain per panicle	212.3 ± 2.25	125.8 ± 13.21 **
千粒重 thousand seed weight( g)	32.1 ± 0.87	30.6 ± 1.12
结实率 seed setting( %)	85 ± 2.31	32 ± 2.19 **

注: \* 和 \*\* 分别表示显著差异 ( $P < 0.05$ ) 和极显著差异 ( $P < 0.01$ )。下同。

Note: \* and \*\* mean significant ( $P < 0.05$ ) and very-significant difference ( $P < 0.01$ ), respectively. The same as Table 2.

对突变体和野生型的各节间长进行测量发现,与野生型相比,突变体第1、2、3、4节间长明显降低,而第5、6节间长则显著增高,但第5、6节间长的增高幅度没有前4个节间长的降低幅度高。因此,突变体 *dfr* 与野生型的株高差异主要体现在第1、2、3、4节间长之间的不同(表2)。

表2 突变体 *dfr* 与野生型 9311 的株高及节间长

Table 2 Plant height and internodes length of mutants *dfr* and wild type 9311 (cm)

特征 trait	野生型 9311 wild type 9311	突变体 <i>dfr</i> mutant <i>dfr</i>
株高 plant height	122.9 ± 1.40	74.5 ± 2.00 **
总秆长 culm length	101.6 ± 1.30	56.3 ± 1.58 **
第1节间 first internode	36.61 ± 2.95	16.20 ± 1.29 **
第2节间 second internode	19.75 ± 1.38	6.35 ± 0.99 **
第3节间 third internode	21.00 ± 1.46	9.25 ± 1.39 **
第4节间 fourth internode	15.51 ± 1.79	12.15 ± 2.74 **
第5节间 fifth internode	6.23 ± 1.48	9.65 ± 1.08 **
第6节间 sixth internode	1.64 ± 0.67	2.99 ± 0.61 **

### 2.3 细胞壁组分含量的分析

纤维素 (cellulose, C)、半纤维素 (hemi-cellulose,

HC)、木质素 (lignin, L) 和无机盐 (主要为  $\text{SiO}_2$ ) 是水稻细胞壁的主要组成成分。突变体茎秆的纤维素、半纤维素、木质素和  $\text{SiO}_2$  的含量分别为 22.3%、30.3%、3.2% 和 7.4%, 而野生型 (WT) 茎秆的为 34.1%、18.6%、4.5% 和 9.1%, 其中纤维素和半纤维素差异极显著, 木质素和  $\text{SiO}_2$  的含量无明显差异(图2)。

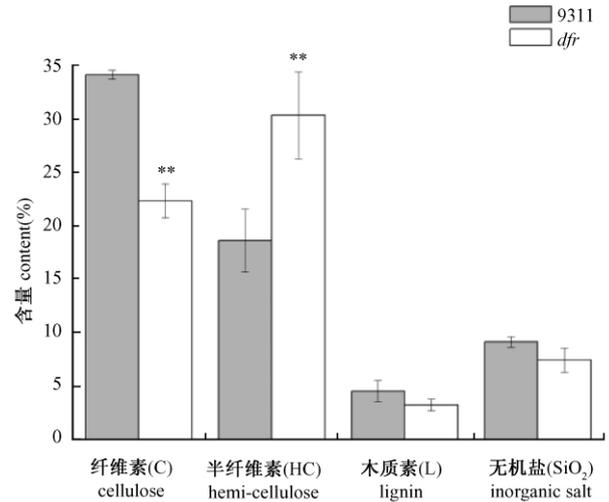


图2 野生型 (WT) 与突变体 *dfr* 茎秆细胞壁成分含量的差异

Fig. 2 Difference of culm cell wall components between wild type (WT) and mutant (*dfr*)

突变体叶片的纤维素、半纤维素、木质素和  $\text{SiO}_2$  的含量分别为 13.8%、24.2%、4.9% 和 10.9%, 而野生型叶片的分别为 23.8%、20.6%、4.9% 和 11.7%, 其中纤维素的含量差异极显著, 半纤维素的含量差异显著, 木质素和二氧化硅含量无明显差异(图3)。可能由于纤维素和半纤维素的差异, 野生型与突变体的细胞壁结构有所变化, 从而突变体表现出茎秆和叶片的脆嫩性状。

### 2.4 突变体 *dfr* 的遗传分析

脆秆矮生突变体 *dfr* 和 3 个正常水稻品种进行杂交, 所有的  $F_1$  均不表现矮秆脆性性状。在  $F_2$  分离群体中, 正常植株与矮秆脆茎植株的比例呈典型的 3:1 分离(表3), 表明突变体 *dfr* 的脆秆矮生性状受单隐性基因控制。

### 2.5 突变体 *dfr* 基因的初步定位

用突变体 *dfr*/02428 杂交组合的  $F_2$  群体作为定位群体(总群体 372 株, 脆秆矮生植株 92 株)。用 408 对分布于水稻 12 条染色体上的 SSR 引物对突变体 *dfr* 和 02428 两亲本进行多态性筛选, 发现 PCR 产物具有多态性的 SSR 引物有 124 对。用具有多态性的 124 对

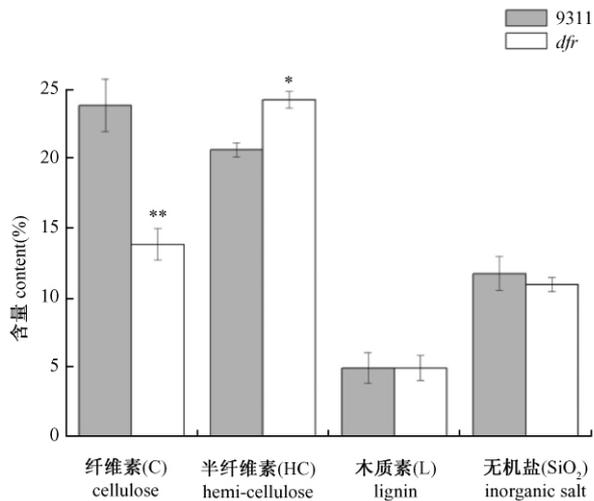


图3 野生型(WT)与突变体 *dfr* 叶片细胞壁组分含量的差异

Fig. 3 Difference of leaf cell wall components between wild type (WT) and mutant (*dfr*)

引物检测  $F_1$  基因组 DNA 和突变池 DNA 进行扩增差异,其中第 2 条染色体上的 SSR 引物 RM5472 和 RM240 在突变池 DNA 和  $F_1$  基因组 DNA 间出现扩增差异(图 4),进一步用 RM5472 和 RM240 分析了  $F_2$  群体中的 92 株脆秆矮生植株,分别检测出 2 个和 3 个重组个体。为更进一步说明该突变体基因与以上 2 个分子标记的连锁性,分别在 RM5472 的上游和 RM240 的下游选取几个分子标记对定位群体中的 92 株突变植株进行分析,遗传连锁分析表明, RM5472 和 RM240 与 *dfr* 位点相距 1.1 和 1.6cM(图 5)。

表 3  $F_2$  群体中突变植株与正常植株的分离

Table 3 Segregation of mutant and normal plants in  $F_2$  population

杂交组合 cross combination	正常植株数 number of normal plant	突变植株数 number of mutant plant	总数 total	$\chi^2(3:1)$	P 值 P value
<i>dfr</i> /02428	280	92	372	0.004	>0.95
9311/ <i>dfr</i>	319	112	431	0.174	~0.95
<i>dfr</i> /日本晴 <i>dfr</i> /Nipponbare	207	74	281	0.200	~0.95

### 3 讨论

与野生型相比, *dfr* 突变体不仅脆嫩度上表现明显差异,而且在株高上也存在显著性差异,其主要在第 1、2、3、4 节间长存在明显降低差异,而第 5、6 节间长

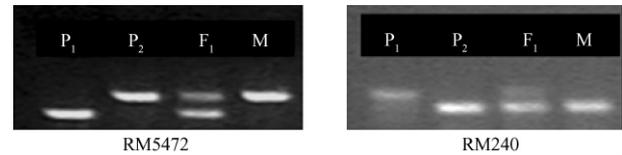


图 4 SSR 分子标记 RM5472 和 RM240 检测  $F_1$

基因组和突变池 DNA 之间的扩增差异

Fig. 4 Amplification difference between  $F_1$  and mutant DNA pool detected by SSR molecular markers RM5472 and RM240

$P_1$ : 父本 02428;  $P_2$ : 母本 *dfr*;  $F_1$ : *dfr* 与 02428

杂交 1 代; M: 突变池

$P_1$ : male parent 02428;  $P_2$ : female parent *dfr*;  $F_1$ : the first hybrid generation of *dfr* and 02428; M: mutant DNA pool

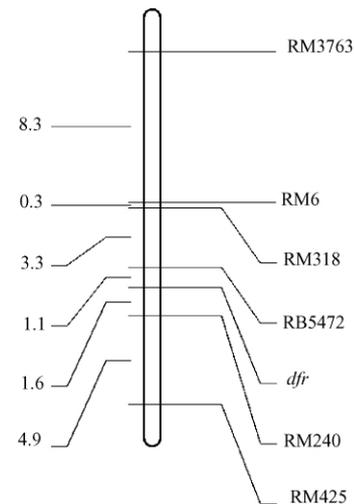


图 5 *dfr* 位点在水稻第 2 条染色体上的遗传图

Fig. 5 Genetic map of *dfr* locus on chromosome 2

虽然有显著增高差异,但幅度没有前 4 个节间长的降低幅度大。通过对突变体 *dfr* 和野生型的农艺性状分析,突变体 *dfr* 的结实率和穗粒数等产量性状要比野生型低很多,这可能与突变体和野生型茎秆的维管束差异有关,影响营养的运输。通过对突变体 *dfr* 的遗传分析,发现 *dfr* 脆性和半矮性状受单基因隐性控制,在  $F_2$  分离群体中发现,只要是表现为脆嫩性状的植株都比正常植株偏矮,由此可推断该基因可能是一因多效,该基因可能直接或间接控制着植株的茎秆强度和高度。

本文研究的水稻脆秆矮生突变体 *dfr* 的叶片与茎秆的纤维素含量比野生型都要低,且差异显著;突变体 *dfr* 伴随着纤维素含量的降低,半纤维素含量有所增高,且差异显著。与纤维素和半纤维素相比,木质素和

无机盐均没有显著性差异,由于细胞壁成分的变化,可能在一定程度上抑制了细胞的延伸,因此突变体 *dfr* 的脆秆矮生性状与纤维素和半纤维素的含量变化有关。拟南芥中已经报道几个脆性相关基因,其中有与木质素合成有关,也有与纤维素合成有关。到目前为止,水稻的脆性突变体已报道有 12 个,从目前的研究看,脆茎突变体都是由于纤维素含量降低,木质素含量增加但粗纤维含量降低而导致茎秆脆性突变的<sup>[6-13]</sup>。李云海等克隆出的 *bc1* 基因,编码了主要在水稻的厚壁组织细胞和维管束中表达的类-cobra 蛋白,不仅可以降低细胞壁厚度和纤维素含量,还可以增加木质素的含量<sup>[14]</sup>。有报道称纤维素含量越高,细胞壁消化率越低<sup>[15]</sup>;也有报道称半纤维素与纤维素的比值与饲草的消化率有极高的相关性,比值越高饲草的消化率越高<sup>[16,17]</sup>,因此,该脆性突变水稻稻草具有被反刍动物高效利用的潜能。

基因的图位克隆是基于遗传作图和物理作图的一种分离基因的方法。这一方法首先要对基因进行初步定位,然后再寻找与基因紧密连锁的分子标记,将基因界定在一个较小的范围内,最后是构建物理图谱和候选基因克隆。*dfr* 突变位点被定位在水稻第 2 条染色体的 SSR 分子标记 RM5472 和 RM240 之间,与它们之间的距离分别为 1.1 和 1.6cM。这与 Ko Hirano 报道<sup>[18]</sup>的 *BC3* 可能属于同一位点基因突变,但是 *BC3* 是粳稻品种日本晴通过  $\gamma$  辐射得到的突变体,而突变体 *dfr* 是籼稻品种 9311 通过氮离子束辐照得到的。在两种不同物理方法处理不同遗传背景的水稻中均能得到相同的表型性状,为进一步研究水稻脆性突变体提供有利的条件。为确定突变体 *dfr* 是否与 *BC3* 属于等位基因,后续工作将进行突变体 *dfr* 与 *BC3* 的等位性检测。

#### 参考文献:

[1] 刘斌美,吴跃进,董继平,吴敬德,余增亮,张瑛,程灿. 水稻显性半矮秆基因的 SCAR 标记及初步定位[J]. 作物学报, 2006, 32(3): 449-454  
[2] 许学,刘斌美,宋美,吴跃进. 氮离子束与  $\gamma$  射线辐照日本晴和“9311”水稻突变体的筛选[J]. 核农学报, 2008, 22(4): 389-393  
[3] Van Soest P J, Robertson J B, Lewis A. Methods for dietary fiber,

neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition [J]. Journal of Dairy Science, 1991, 74: 3583-3598

[4] 刘仁虎,孟金陵. MapDraw,在 Excel 中绘制遗传连锁图的宏[J]. 遗传, 2003, 25(3): 317-321  
[5] 李文丽,吴先军. 一个水稻脆秆突变体的遗传分析与基因定位[J]. 核农学报, 2006, 20(6): 500-502  
[6] Sanchez A C, Khush G S. Chromosomal location of some marker genes in rice using the primary trisomics [J]. J Hered, 1994, 85: 297-300  
[7] 吴超,朱丽,林凤. 水稻脆秆突变体的研究进展[J]. 安徽农业科学, 2007, 35(17): 5085-5086, 5088  
[8] Wei Cunxu, Xie Peisong, Yan Changjie, et al. Anatomical structure and chemical features of leaf in brittle mutant of rice [J]. Acta Agron Sin, 2008, 34(8): 1417-1423  
[9] Khush G S, Sanchez A. Brittle node: A new marker for chromosome 2 [J]. Rice Genetics Newsletter, 1993, 10: 75-77  
[10] Singh K, Multani D S, Khush G S. A new brittle culm mutant in rice [J]. Rice Genetics Newsletter, 1994, 11: 91-92  
[11] Zhou Yihua, Li Shengben, Qian Qian, et al. BC10, a DUF266-containing and Golgi-located type II membrane protein, is required for cell-wall biosynthesis in rice [J]. The Plant Journal, 2009, 57: 446-462  
[12] Zhang Mu, Zhang Baocai, Qian Qian, et al. Brittle Culm 12, a dual-targeting kinesin-4 protein, controls cell-cycle progression and wall properties in rice [J]. The Plant Journal, 2010, 63: 312-328  
[13] 苏衍菁,赵国琦,王小山,严长杰,吕宗友. 不同生育期脆性突变水稻细胞壁组分动态变化研究[J]. 草业学报, 2010, 19(1): 151-157  
[14] Li Yunhai, Qian Qian, et al. Brittle culm 1, which encodes a cobra-like protein, affects the mechanical properties of rice plants [J]. Plant Cell, 2003, 9(15): 2020-2031  
[15] Habib G, Shah S B A, Inayat K, et al. Genetic variation in morphological characteristics, chemical composition and in vitro digestibility of straw from different wheat cultivars [J]. Animal Feed Science and Technology, 1995, 55: 263-274  
[16] Keys J E, DeBarthe J V, et al. Cellulose and hemi-cellulose digestibility in the stomach, small intestine and large intestine of swine [J]. Journal of Animal Science, 1974, 39: 53-56  
[17] Allen M S. Physical constraints on voluntary intake forage by ruminants [J]. Journal of Animal Science, 1996, 74: 3063-3075  
[18] Ko Hirano, Toshihisa Kotake, Kumiko Kamihara, et al. Rice BRITTLE CULM 3 (BC3) encodes a classical dynamin OsDRP2B essential for proper secondary cell wall synthesis [J]. Planta, 2010, 232: 95-108

(责任编辑 王媛媛)