

DOI: 10.3724/SP.J.1006.2011.00955

水稻半矮秆基因 *iga-1* 的鉴定及精细定位

郭 涛 霍 兴** 饶得花 刘永柱 张建国 陈志强 王 慧*

华南农业大学 / 国家植物航天育种工程技术研究中心, 广东广州 510642

摘 要: 在前期通过空间诱变获得半矮秆隐性突变基因 *iga-1* 的基础上, 进一步对 *iga-1* 进行鉴定。农艺性状调查表明携带 *iga-1* 的矮秆株系 CHA-2、CHA-2N 与原种特占 13 相比存在明显变异。节间长度测量显示 CHA-2、CHA-2N 节间比例正常, 属 dn 型。外源 GA₃ 处理、内源 GA₃ 测定和 α-淀粉酶活性检测揭示 *iga-1* 与 GA₃ 调控无关。利用 CHA-2 与粳稻品种 02428 杂交获得的 F₂ 群体将 *iga-1* 定位在水稻第 5 染色体两个 InDel 标记 DL18 和 DL19 间 32.01 kb 的物理距离内。该区域有 5 个阅读框架, 其中包括赤霉素信号传导调控基因 *DL1*。序列分析表明 CHA-2、CHA-2N 和特占 13 在 *DL1* 位点上基因组序列不存在差异, 推测 *DL1* 并非 *iga-1* 的候选基因。比较水稻第 5 染色体上其他矮秆基因发现 *iga-1* 可能与半矮秆基因 *sd-7* 来自同一位点。

关键词: 水稻; 半矮秆突变体; *iga-1* 基因; 精细定位

Identification and Fine Mapping of a Semidwarf Gene *iga-1* in Rice

GUO Tao, HUO Xing**, RAO De-Hua, LIU Yong-Zhu, ZHANG Jian-Guo, CHEN Zhi-Qiang, and WANG Hui*

South China Agricultural University / National Engineering Research Center of Plant Space Breeding, Guangzhou 510642, China

Abstract: A semidwarf gene *iga-1* of rice (*Oryza sativa* L.) by mutagenesis of outer space treatment from Texianzhan 13 was identified. The dwarf lines CHA-2 and CHA-2N which carried *iga-1* showed great variation in agronomic traits. On the basis of the internode length of CHA-2 and CHA-2N, the mutant belongs to the dn type of dwarfing. GA₃ treatment, endo-GA₃ measurement and α-amylase activity analysis in endosperm showed that *iga-1* is independent of gibberellin acid. Using a large F₂ population derived from a cross between the CHA-2 and an *japonica* rice variety, 02428, the *iga-1* gene was fine mapped into a 32.01 kb physical distance between two InDel markers, DL18 and DL19 on chromosome 5, where five open reading frames were predicted, one of which was the rice gibberellin-insensitive dwarf mutant gene *DL1*. Sequence analysis showed that no variation in *DL1* locus was detected among CHA-2, CHA-2N and Texianzhan 13. Thus, *DL1* can not be the candidate gene of *iga-1*. Comparing the other dwarf genes on chromosome 5 showed that *iga-1* is possibly allelic to the semidwarf gene *sd-7*.

Keywords: Rice; Semidwarf mutant; *iga-1*; Fine mapping

水稻是世界上最重要的农作物之一, 全球约一半人口以稻米为主食。20 世纪 60 年代, 与矮秆基因发掘和利用密切相关的“绿色革命”带来水稻产量的一次大飞跃^[1]。自 1922 年印度学者 Parnell 等^[2]报道第一个由隐性单基因控制的水稻矮秆突变体以来, 迄今已登记的矮秆基因达 80 多个, 包括小粒矮秆(*d1*, *d7*, *d11*, *d13*, *d28*, *d30*, *d58* 等)、畸形矮秆(*d2*, *d6*, *d20*, *d21*, *d23*, *d26*, *d29*, *d31*, *d32*, *d42*, *d51*, *d52*, *d53*, *d54*, *d56*, *d57* 等)、半矮秆(*sd-1*, *sd-g*, *sd-t* 等)和多蘖矮秆(*htd1*, *tdr1*, *tdr2* 等)(<http://shigen.lab.nig.ac.jp/rice/>

<http://shigen.lab.nig.ac.jp/rice/> oryabase/genes)。根据地上部 4 个或 5 个伸长节间的相对长度, Takeda^[3]将水稻矮秆突变体的节间分布模型分为 5 类, 即 dn、dm、d6、nl 和 sh 型。除了 dn 型的节间相对于野生型都有缩短外, 其余各类型的矮秆突变体都是由于地上部某一个或几个节间相对缩短造成的。

具有强矮化作用的矮秆基因大部分来自粳稻品种, 且多属“一因多效”, 经常伴随其他不良性状, 难以在生产上利用。目前矮化育种的矮源主要来自籼稻半矮秆突变体, 对其系谱分析表明, 我国乃至全

本研究由国家自然科学基金项目(30771313)和国家科技支撑计划项目(2008BAD97B02)资助。

* 通讯作者(Corresponding author): 王慧, E-mail: wanghui@scau.edu.cn

第一作者联系方式: E-mail: guo.tao@vip.163.com, Tel: 020-38604903

**共同第一作者

Received(收稿日期): 2010-10-27; Accepted(接受日期): 2011-03-06.

球推广种植的半矮秆籼稻品种的矮生性多由 *sd-1* 等位基因控制^[4]。显然,对某一基因的过度利用必然潜伏着遗传背景单一所带来的风险。1978年韩国由于大面积推广同一类型的半矮秆品种,结果在稻瘟病和低温的双重影响下,造成当年水稻大减产^[5]。此外,20世纪80年代以来全球水稻产量徘徊不前,也与 *sd-1* 的过度利用不无关系。

植株的矮化常常与赤霉素(gibberellin acid, GA)等植物激素的生物合成或信号传导有关^[6-7]。根据对外源 GA 的反应,与 GA 相关的矮化突变可分为 GA 缺陷型突变和 GA 钝感型突变^[8]。GA 缺陷型矮化突变是由于 GA 代谢途径受阻导致内源 GA 含量降低甚至缺乏^[9],施加外源 GA 后可恢复野生表型。近年来,研究人员已在拟南芥、水稻和其他高等植物中陆续鉴定参与 GA 代谢的基因^[10-11],并逐渐揭示高等植物复杂的 GA 代谢途径^[9,12-13]。GA 钝感型矮化突变是由于 GA 信号传导阻滞导致对 GA 应答的改变^[14],此类突变体内源 GA 含量变化不大,有时甚至高于野生型,施加外源 GA 不能恢复野生表型。目前已克隆的参与水稻 GA 信号传导的矮秆基因包括 *D1*、*GID1*、*GID2*^[15-18]。

本研究在前期工作基础上^[19],拟探索水稻空间诱变矮秆突变株系 CHA-2 和 CHA-2N 的农艺性状及 GA 调控机理,并精细定位半矮秆突变基因 *iga-1*。通过对 *iga-1* 的研究,有望进一步明确水稻矮化机制,同时为空间诱变创造新矮源提供理论支持。

1 材料与方法

1.1 水稻材料

2003年,从籼稻品种特占13(*sd-1sd-1*)空间诱变后代中发现一个矮秆突变株系 CHA-2,遗传分析表明该突变株系携带2个半矮秆基因,其中一个为已知半矮秆基因 *sd-1*,另一个为未知半矮秆基因,命名为 *iga-1*^[19]。将 CHA-2 与高秆品种惠阳珍珠早(*Sd-1 Sd-1 Iga-1 Iga-1*)杂交,在杂交后代中分离得到只含 *iga-1* 的纯合半矮秆株系 CHA-2N。将 CHA-2 与粳稻半矮秆材料 02428(*sd-1 sd-1 Iga-1 Iga-1*)配制杂交组合,杂种 F₁ 自交后获得 F₂ 群体,从 12 000 株 F₂ 植株中收集 3 000 株矮秆个体作为 *iga-1* 基因定位群体。

1.2 *iga-1* 矮秆株系农艺性状调查

在水稻成熟期田间调查 CHA-2、CHA-2N 和特占 13 的茎节间长度、株高、剑叶长和宽,并从每

个小区随机取 5 株于室内考种,主要考察的农艺性状包括单株穗重、有效穗、千粒重、十粒长、十粒宽、谷粒长宽比、穗长、实粒数、结实率、第一枝梗数。

1.3 外源赤霉素处理

参照王慧等^[20]的方法,选取适当数量的饱满种子,用质量分数为 0.1% 的 HgCl₂ 溶液消毒 5 min,自来水冲洗干净后用蒸馏水洗 3 次,室温下浸种 24 h,放在垫有吸水纸的锥形瓶内于 27℃ 培养箱中催芽 2 d,期间适当补充水分,之后每个材料分别挑选基本整齐一致的发芽种子播于 96 孔 PCR 板(下端剪掉)中,每孔 1 粒种子,PCR 板置于离心管盒,分别加入 5、10、20、30 和 40 mg L⁻¹ 的外源赤霉素(GA₃)溶液 400 μL,以等量的蒸馏水为对照,每个处理 30 苗,3 次重复,自然光照,10 d 后测量苗高。对试验数据进行方差分析,比较各处理间苗高的差异显著性。

1.4 α-淀粉酶活性测定

采用碘熏蒸法测定 α-淀粉酶活性^[21]。制配 0.2% 马铃薯淀粉和 2% 琼脂溶液,含 10 mmol L⁻¹ 的 NaAc 和 2 mmol L⁻¹ 的 CaCl₂, pH 5.3。高压灭菌,冷却到 50℃ 以下,加入适量氨苄青霉素,一半加入 GA₃ 使浓度为 1 μmol L⁻¹,另一半不加 GA₃ 作对照,制备琼脂平板。种子去壳,用 30% 的次氯酸钠表面灭菌 30 min,再用蒸馏水清洗 6 次。将种子切去一半,无胚的一半垂直放在凝固的琼脂平板上,用封口膜密封培养皿,30℃ 黑暗条件下培养 4 d。用 I₂ 蒸汽熏蒸使培养皿中的琼脂平板染色,有淀粉酶分泌的半粒种子周围由于淀粉的降解而呈现无色透明,没有淀粉酶分泌的则转变为蓝紫色。

1.5 内源赤霉素测定

按照谢君等^[22]的方法稍加改动测定水稻分蘖期新鲜叶片的内源赤霉素含量。用蒸馏水洗净叶片,擦干,去中脉,精确称取 1 g。人工剪碎,弱光条件下加入液氮迅速研磨至粉末,按 1:10 比例加入 10 mL 预冷的 80% 甲醇,4℃ 冰箱浸提 24 h。4℃ 8 000×g 离心 15 min,滤纸过滤,滤液 4℃ 保存备用,滤渣按 1:5 加入 5 mL 预冷的 80% 甲醇,4℃ 冰箱浸提 12 h,4℃ 8 000×g 离心 10 min,重复 2 次。将上述步骤得到的滤液合并,25℃ 真空旋转干燥至剩余水相。等体积石油醚萃取,震荡 15 min,弃石油醚相,重复 3 次。水相用等体积乙酸乙酯萃取 2 次,弃水相。有机相真空干燥。用 5 mL 100% 重蒸甲醇溶解,过 0.45 μm 微孔滤膜,4℃ 保存待测。取待测样品 20 μL 上色

谱仪(日本 SHIMADZU 公司 LC-20AT)测定。采用外标法,以保留时间定性,峰高定量,每个样品重复 3 次,取其平均值作为最后结果。

准确称取 GA₃ 0.01 g, 分别用 5 mL 80% 甲醇溶解作为母液。将母液稀释不同倍数得到 5 个浓度梯度作为标准液。高效液相色谱测定其保留时间, 峰高值。重复 3 次, 以峰高(X)和对应的浓度(Y)绘制标准曲线, 单位是 $\mu\text{g g}^{-1}$ 。

1.6 DNA 提取及 PCR 检测

采用 CTAB 法提取水稻基因组 DNA [23]。PCR 扩增体系含: 2×PCR Reaction Mix 10 μL (含 100 mmol L⁻¹ KCl、20 mmol L⁻¹ Tris-HCl、3 mmol L⁻¹ MgCl₂、400 mmol L⁻¹ dNTP), *Taq* DNA 聚合酶(5 U μL^{-1}) 0.2 μL , 引物(10 $\mu\text{mol L}^{-1}$)各 1 μL , 模板 DNA 1 μL , 超纯水补至 20 μL 。反应条件为 94℃ 预变性 5 min; 94℃ 变性 30 s, 55℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 30 s, 35 个循环; 72℃ 延伸 7 min。扩增产物经 8.0% 非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳(电泳缓冲液 1×TBE, 电压 75 V, 时间 2.5 h), 0.1% AgNO₃ 染色, BIORAD 凝胶成像系统观察、照相、读带。

1.7 SSR 标记来源及 InDel 标记的开发

选择已公布的 SSR 标记用于矮秆基因定位, 引物序列来自 <http://www.gramene.org/>。

按照 Shen 等[24]的方法, 在 NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)上对粳稻日本晴和籼稻 93-11 已公布的核苷酸序列进行 BLAST 对比, 在已定位区间内寻找插入缺失 5~20 bp 的序列, 根据其上下游序列

设计 InDel 标记引物。

1.8 遗传分析

采用 Michelmore 等[25]提出的近等基因池分析法筛选矮秆基因连锁标记。在 F₂ 群体中随机挑选 10 个高秆植株和 10 个矮秆植株, 分别取等量 DNA 混合, 构建高秆基因池和矮秆基因池。通过引物筛选寻找基因池间扩增有差异的标记, 再用分离后代单株验证该多态性标记是否真正与目标基因连锁。利用 MAPMAKER 作图软件构建目标基因区域的连锁图谱。通过 Gramene 网站(<http://www.gramene.org/>)查找与矮秆基因紧密连锁的标记在水稻基因组(日本晴)上的位置, 构建覆盖目的基因的物理图谱。用禾本科基因组自动注释系统(<http://www.gramene.org/>)预测候选区域的基因组序列可能的编码区(ORF)。

1.9 DNA 测序

水稻基因组目的片段经 PCR 扩增后直接送北京华大基因科技有限公司测序。采用 DNAMAN 软件对 DNA 序列进行比对拼接。

2 结果与分析

2.1 *iga-1* 矮秆株系的农艺性状分析

由图 1 可见, 矮秆突变体 CHA-2 矮而粗壮, 叶片宽而直立, 叶色墨绿, 谷粒小而圆, 生育期提前 10~15 d。与原种特籼占 13 (108.4 cm) 比较, CHA-2 株高(52.8 cm)明显降低, 仅为原种的 48.7%, 其他 12 个农艺性状有 10 个发生不同程度的正负向变异,

图 1 *iga-1* 矮秆株系 CHA-2、CHA-2N 的表型(从左到右: CHA-2、CHA-2N、特籼占 13、矮脚南特)

Fig. 1 Phenotype of the *iga-1* dwarf line CHA-2, CHA-2N (from left to right: CHA-2, CHA-2N, Texianzhan13, Aijiaonante)

A: 灌浆期叶片, 标尺=10 cm; B: 谷粒, 标尺=0.5 cm; C: 灌浆期稻穗, 标尺=5 cm; D: 灌浆期植株, 标尺=30 cm。

A: leaf blades in grain-filling stage, bar=10 cm; B: grain, bar=0.5 cm; C: panicles in grain-filling stage, bar=5 cm; D: Gross morphology in grain-filling stage, bar=30 cm.

且均达到极显著水平(表 1)。不含 *sd-1* 的半矮秆株系 CHA-2N 叶片宽, 茎秆和剑叶较直立, 穗颈轴粗而挺直, 谷粒小而圆, 生育期提前 10~15 d (图 1)。与特籼占 13 比较, CHA-2N 除了株高(80.2 cm)降低明显外, 其他多数性状与特籼占 13 相比也存在明显变异, 达到极显著/显著水平。十粒长、谷粒长宽比均显著下降, 形成小而圆粒型; 千粒重、单株穗重、穗

长、实粒数也明显下降; 剑叶长、剑叶宽、十粒宽和结实率则增加, 其中结实率达到 79.17% (表 1)。CHA-2 和 CHA-2N 的有效穗数较特籼占 13 均无明显变化。

2.2 *iga-1* 基因对水稻节间比例的影响

比较 CHA-2、CHA-2N、特籼占 13 和矮脚南特发现四者均具有 5 个伸长节间且节间比例相似(图 2)。

表 1 *iga-1* 矮秆株系 CHA-2、CHA-2N 主要农艺性状特征值
Table 1 Agronomic traits of *iga-1* dwarf line CHA-2, CHA-2N ($\bar{x} \pm SE$)

性状 Trait	特籼占 13 Texianzhan 13	CHA-2	CHA-2N
株高 Plant height (cm)	108.4±1.98	52.80±1.15**	80.16±2.70**
单株穗重 Panicle weight per plant (g)	31.56±5.64	19.88±1.43**	18.47±1.56**
有效穗数 Number of effective panicle	9.00±0.71	8.00±0.84	8.00±0.98
千粒重 1000-grain weight (g)	20.82±0.41	10.63±0.27**	12.38±0.36**
剑叶长 Flag leaf length (cm)	38.98±3.40	26.25±0.59**	42.06±2.34
剑叶宽 Flag leaf width (cm)	1.90±0.07	2.75±0.27**	2.45±0.37*
十粒长 10-grain length (cm)	8.73±0.16	5.80±0.12**	6.03±0.06**
十粒宽 10-grain width (cm)	2.45±0.14	2.90±0.15**	2.89±0.16**
谷粒长宽比 Length/width ratio of grains	3.56±0.15	2.14±0.11**	2.07±0.12**
穗长 Panicle length (cm)	22.85±1.23	14.35±1.15**	17.54±1.90**
实粒数 Filled grains FG	265±7.83	223.57±8.29**	177.13±9.28**
结实率 Seed setting rate (%)	63.55±0.35	67.07±0.21	79.17±0.19**

*和**分别表示在 0.05 和 0.01 水平上显著水平。
* and ** mean significant at the 0.05 and 0.01 probability levels, respectively.

图 2 不同水稻材料的节间长度
Fig. 2 Internodes length of rice varieties
A: 节间长度比例; B: 节间形态, 标尺=10 cm。
A: diagrammatic comparison of internodes length; B: Morphology of internodes, Bar=10 cm.

其中 CHA-2N 节间长度与矮脚南特相似, 比特粳占 13 缩短, 第 1 至第 5 节间分别缩短 8.59、2.97、0.72、1.77 和 1.40 cm, 基本呈等比例缩短, 没有节间异常缩短现象。矮脚南特属典型的 *dn* 型, 根据各材料的节间比例可判断 CHA-2、CHA-2N、特粳占 13 与矮脚南特一致, 均属 *dn* 型, 表明 *iga-1* 对节间比例影响不明显。

2.3 不同品种对外源 GA_3 处理的反应

方差分析表明, 用不同浓度的 GA_3 处理水稻材料, 其苗高与对照相比, 差异均达极显著水平, 但不同材料对 GA_3 的反应有所不同。由图 3 可见, 特粳占 13 和矮脚南特(*sd-1 sd-1 Iga-1 Iga-1*)经 GA_3 处理后苗高均超过未施加 GA_3 的高秆品种惠阳珍珠早(*Sd-1 Sd-1 Iga-1 Iga-1*)。在同时施加 GA_3 的条件下, 浓度达到 5 mg L^{-1} 时, 矮脚南特、特粳占 13 与惠阳珍珠早苗高相似; 当浓度为 10 mg L^{-1} 时, 特粳占 13 苗高接近惠阳珍珠早。上述结果表明外源 GA_3 处理可使特粳占 13 和矮脚南特的株高恢复到野生表型, 说明 *sd-1* 基因对外源 GA_3 是敏感的。这与前人的研究结果一致^[26-27]。

半矮秆材料 CHA-2N (*Sd-1 Sd-1 iga-1 iga-1*)经外源 GA_3 处理后苗高以及苗高增长率均显著低于特粳占 13 和矮脚南特(图 3 和图 4), 由于 CHA-2N 只含有半矮秆基因 *iga-1*, 而特粳占 13、矮脚南特仅含有半矮秆基因 *sd-1*, 说明 *iga-1* 对 GA_3 敏感性弱于 *sd-1*。此外, CHA-2N 施加不同浓度 GA_3 后苗高均显著增长, 但未超过对照处理($GA_3\ 0\text{ mg L}^{-1}$)惠阳珍珠早, 外施 GA_3 不能使 CHA-2N 完全恢复野生型, 表明 CHA-2N 不属于 GA_3 钝感型突变体, 也不属于 GA_3 缺陷型突变体。双矮秆突变体 CHA-2 施加 GA_3 后苗高增长率与特粳占 13 和矮脚南特相近, 由于 CHA-2 与特粳占 13 仅在 *iga-1* 位点上存在差异, 说明 *iga-1*、*sd-1* 同时存在与 *sd-1* 单独存在对 GA_3 的

敏感性一致。综合上述结果, 初步推断 *iga-1* 可能与内源 GA_3 合成和信号传导无关, 不参与 GA_3 的调控。

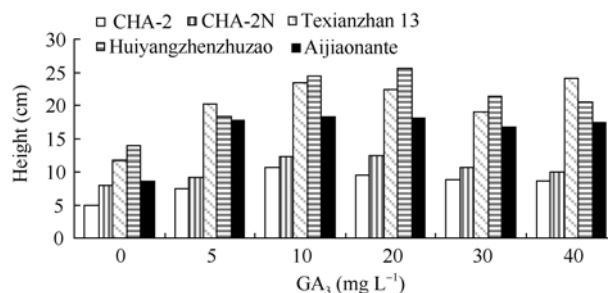


图 3 不同水稻材料幼苗期施加 GA_3 后的苗高
Fig. 3 Seedling height of rice varieties with GA_3 treatments

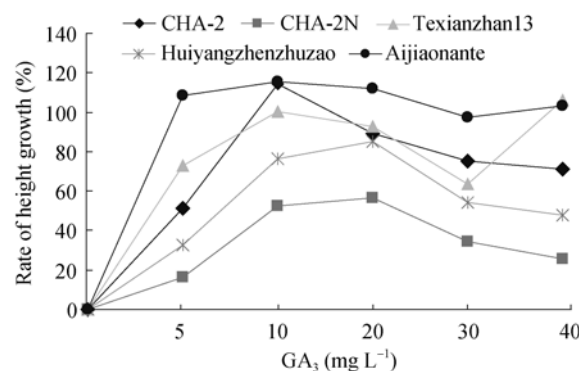


图 4 不同水稻材料幼苗期施加 GA_3 后苗高增长率
Fig. 4 Seedling growth rate of rice varieties with GA_3 treatments

2.4 内源 GA_3 的测定

为了进一步验证半矮秆基因 *iga-1* 不参与内源 GA_3 合成的推论, 对矮秆突变体及野生型材料进行内源 GA_3 测定。从图 5 可知, 含 *sd-1* 基因的水稻材料(矮脚南特、特粳占 13)内源 GA_3 含量远低于惠阳珍珠早(*Sd-1 Sd-1*), 与半矮秆基因 *sd-1* 属于 GA_3 缺陷型结论一致^[28]。CHA-2 和特粳占 13 在 GA_3 含量上没有明显差异, 表明 *iga-1* 和 *sd-1* 同时存在时, *iga-1* 不会增加或减少内源 GA_3 的含量。CHA-2N 与高秆

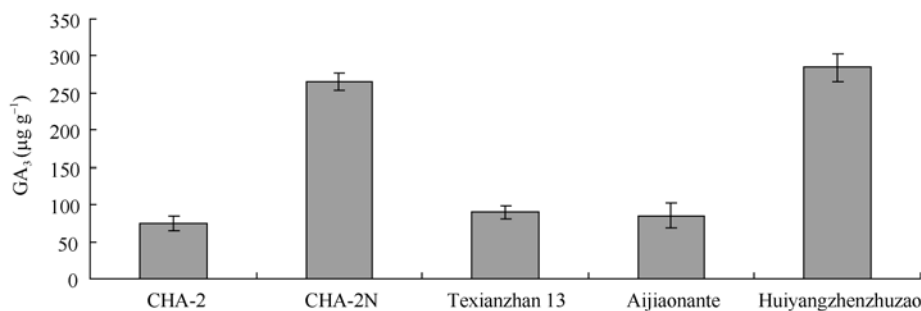


图 5 不同水稻材料苗期内源 GA_3 含量
Fig. 5 GA_3 contents of rice varieties in seedling stage

品种惠阳珍珠早内源 GA_3 含量相近, 远高于特籼占13, 表明 *iga-1* 不会影响内源 GA_3 的含量。上述结果证明 *iga-1* 不会阻碍水稻体内 GA_3 的合成。

2.5 GA_3 处理对 α -淀粉酶生成的诱导反应

淀粉酶是糊粉层中 GA 所诱导的含量最丰富的酶。具有生物活性的 GA 先在胚中合成, 然后转运到糊粉层与正向共转录因子共同作用, 在转录水平上引发 α -淀粉酶合成^[29]。因此通过检查 α -淀粉酶活性可判断突变体是否在 GA 信号传导途径上产生变化。图6表明, CHA-2、CHA-2N 和原种特籼占13 培养基在没有施加 GA_3 的条件下均染成蓝色, 而添加 GA_3 的另一组处理在种子周围均形成一个白色斑圈, 说明 CHA-2、CHA-2N 与原种特籼占13 一样, 在 GA_3 诱导下能合成 α -淀粉酶, 由此推断 *iga-1* 不会影响 GA 的信号传导。

2.6 半矮秆基因 *iga-1* 的分子定位

为定位半矮秆基因 *iga-1*, 首先选择均匀分布于水稻染色体上的 SSR 标记, 逐个在高矮秆基因池间进行多态性分析, 然后利用在2个池间表现出多态的标记进一步检测 F_2 群体, 分析矮秆基因 *iga-1* 是否与 SSR 标记存在连锁关系。结果对第5号染色体上20个 SSR 标记的多态性分析发现有2个标记(RM6082

和 RM440)在高矮秆基因池间表现出多态性, 利用 RM6082、RM440 对116个 F_2 矮秆单株进行共分离分析, 表明两者与 *iga-1* 矮秆基因存在连锁关系, 它们的排列顺序是 RM6082-*iga-1*-RM440。进一步从水稻第5染色体 RM6082 和 RM440 区间内挑选出11个 SSR 标记(RM3381、RM6645、RM3838、RM516、RM3969、RM8211、RM3695、RM473B、RM39、RM146、RM291)进行多态性检测, 其中4个标记(RM6645、RM3838、RM146、RM164)在高矮秆基因池间检测出多态性, 对912个 F_2 矮秆单株进行共分离分析, 发现均与 *iga-1* 存在不同程度的连锁。它们在连锁图上的顺序为 RM6082-RM6645-*iga-1*-RM3838-RM146-RM164-RM440。初步将矮秆基因 *iga-1* 定位在 RM6645 和 RM3838 之间, 与 RM6645 和 RM3838 的遗传距离分别为 0.07 cM 和 1.21 cM (图7)。

2.7 *iga-1* 基因的精细定位

在初步定位的基础上, 从水稻第5染色体的 RM6645 和 RM3838 区间内查找新标记, 共获得22个 SSR 标记, 将其用于高矮秆基因池的多态性筛选, 有8个标记在基因池间表现出多态性。对 F_2 群体2140个矮秆单株共分离分析发现目的基因 *iga-1* 与

图6 α -淀粉酶的诱导
Fig. 6 A plate assay of α -amylase induction

G+表示添加 GA_3 ; G-表示没有添加 GA_3 。

G+ means GA_3 treatment; G- means without GA_3 treatment.

RM18405、RM18413 之间分别存在 1 个和 14 个重组, 最终将目的基因 *iga-1* 定位在 RM18405 和 RM18413 之间, 与 2 个标记的遗传距离为 0.047 cM 和 0.650 cM (图 7)。

为了进一步缩小定位区间, 在 RM18405 和 RM18413 区间内设计 20 对 InDel 标记引物, 同样进行高矮池的多态性筛选, 并将定位群体扩大至 3 000 株。共分离分析表明基因 *iga-1* 与标记 DL18 (F: 5'-GAATTGTTCCCATGACCTC-3', R: 5'-TACCTGGTCCACCGTAGTAT-3'), DL19 (F: 5'-CGAGCCACG GTCAGTGGT-3', R: 5'-CGGTCTCCTCCCTCTTCAAG-3') 间分别存在 1 个和 2 个重组事件, 最终将 *iga-1* 定位在 DL18 和 DL19 之间, 遗传距离分别为 0.033 cM 和 0.067 cM (图 7)。

2.8 矮秆基因定位区域物理图谱构建

从 Gramene 数据库(<http://www.gramene.org/>)下

载矮秆基因 *iga-1* 所在区域的克隆序列, 根据克隆之间的重叠关系将克隆首尾相连, 随后将 RM18405 与 RM18413 之间的多态性标记与克隆序列进行整合, 4 个与 *iga-1* 座位紧密连锁的多态性标记锚定在 AC137748、AC117264 和 AC134342 三个克隆上(图 8), 其中与 *iga-1* 两侧距离最近的标记 DL18 和 DL19 分别锚定在克隆 AC117264 的 44 kb 和 76 kb 处, 最终将 *iga-1* 座位界定在 DL18 和 DL19 之间 32.01 kb 的物理距离内, 对应于日本晴第 5 染色体序列(5'-3')15 531 063~15 563 073 bp 区间(<http://www.gramene.org/>)。

根据禾本科植物基因组自动注释系统(<http://www.gramene.org/>)对该区域的基因组序列进行预测, 得到 5 个 ORF, 其中 3 个编码未知蛋白(1: LOC_Os05g26860.1, 2: LOC_Os05g26870, 3: LOC_Os05g26880.1), 1 个编码 *dnaJ* 伴随蛋白(5: LOC_Os05g

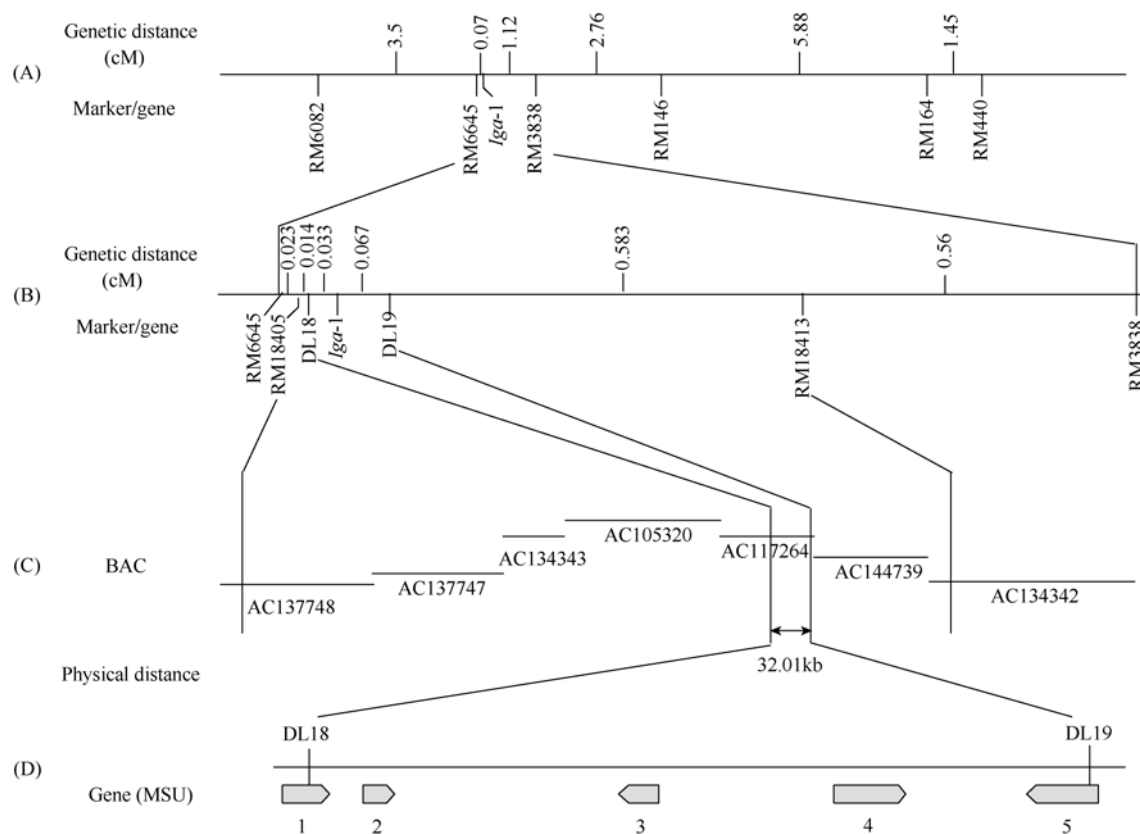


图 7 *iga-1* 的精细基因定位

Fig. 7 Fine mapping of the *iga-1* gene

A: *iga-1* 被初步定位在第 5 染色体 SSR 标记 RM6645 和 RM3838 区间内; B: *iga-1* 被精细定位在第 5 染色体 InDel 标记 DL18 和 DL19 区间内; C: *iga-1* 被锁定在 BAC 克隆 AC117264 内 32.01 kb 物理距离内; D: 通过 RAP-DB 数据库预测 32.01 kb 区间内有 5 个候选基因(1: LOC_Os05g26860.1; 2: LOC_Os05g26870; 3: LOC_Os05g26880.1; 4: LOC_Os05g26890.1; 5: LOC_Os05g26902.1)。

A: *iga-1* was mapped to the interval between SSR markers RM6645 and RM3838 in chromosome 5; B: *iga-1* was fine map to the interval between InDel markers DL18 and DL19 in chromosome 5; C: *iga-1* gene was fine mapped into a 32.01 kb physical distance; D: In the 32 kb region, five putative genes were annotated in RAP-DB database. (1: LOC_Os05g26860.1; 2: LOC_Os05g26870; 3: LOC_Os05g26880.1; 4: LOC_Os05g26890.1; 5: LOC_Os05g26902.1).

26902.1), 还有1个已克隆的基因 *D1* (4: LOC_Os05g26890.1), 该基因编码 GTP 结合蛋白(G 蛋白)的 α 亚基。已知 *D1* 基因参与赤霉素的信号传导, 已报道的 *d1* 突变体由于丧失正常的赤霉素信号传导功能, 导致植株严重矮化, 外施 GA_3 未能恢复株高表型^[15]。

2.9 *D1* 座位序列分析

为了进一步确认 *iga-1* 是否位于 *D1* 座位上, 以日本晴基因组作为参考序列, 针对 *D1* 及其上下游基因组序列设计 8 对引物, 对 CHA-2、CHA-2N 和特粒占 13 进行扩增, 扩增片段覆盖 *D1* 基因组序列及其 5'侧翼序列 796 bp 和 3'侧翼序列 923 bp。序列拼接比对表明, CHA-2、CHA-2N 与原种特粒占 13 在该区段的基因组序列不存在任何差异, 说明 CHA-2 矮化突变不是由于 *D1* 基因座上序列突变造成的, *iga-1* 可能位于其他几个候选基因位点上。

3 讨论

矮秆资源的利用和矮化育种是 20 世纪 50 年代以来水稻育种最重要的成果, 迄今利用最多的水稻矮秆基因源主要有矮脚南特、矮仔占、低脚乌尖、花龙水田谷和矮种水田谷等^[30]。由于上述矮源的矮生性均由 *sd-1* 控制, 对其过度利用容易导致品种遗传背景单一, 难于实现综合性状的超越。虽然, 国内外育种家一直没有停止水稻矮秆资源的挖掘, 但已发现的矮源常常存在农艺性状不良的问题。Chang 等^[31]于 1985 年鉴定了 145 个非 *sd-1* 矮源衍生的矮秆材料, 绝大多数品种农艺性状差, 穗型、粒型小, 籽粒充实度低, 难脱粒。由高秆品种 Calrose 诱变获得的携带 *sd-2* 和 *sd-4* 基因的两个半矮秆品种, 因其植株偏高和具有不良的基因多效性, 在矮化育种中的作用远不及 *sd-1* ^[32-33]。矮秆突变系 Labelle 携带半矮秆基因 *sd-5*, 其产量低于原高秆品种, 且与高秆亲本杂交后 F_1 植株大量不育^[34]。

空间诱变作为一种创制新种质的途径, 通过实践已证明能够有效诱导作物性状产生突变。目前已有利用空间诱变成功创造矮秆突变体的例子。浙江省农业科学院原子能应用研究所对水稻品种“丙 95-503”经空间诱变处理产生多穗矮秆突变体“R955”, 株高接近半矮生型, 籽粒大小正常, 熟期适中, 叶色淡绿, 株型好, 经 GA_3 反应鉴定和遗传初步分析, 其矮秆基因与其他多穗矮秆携带的矮秆基因不等位, 在培育多穗型水稻品种上可能具有应用价值^[35]。王慧等^[20]在利用返回式卫星搭载的籼稻

特华占诱变后代中发现特异矮秆突变体 CHA-1, 其表现为茎秆直立、叶片挺直、分蘖力极强、天然异交率高、配合力好, 而且谷粒长宽比大、外观品质好, 利用 CHA-1 已配制出一批优良的品种(品系)。本研究中的 CHA-2N 经多代的观察, 植株较矮, 叶片直立挺拔, 株型和穗型紧凑, 茎秆粗壮, 节间长度分配合理, 抗倒性强, 结实率较高, 从而使单位面积既能容纳较多有效穗又能保持良好的通风透光性。CHA-2N 与不同的亲本杂交, 其 F_1 代均表现出不同的杂种优势, 在培育密粒型品种方面有一定应用价值。

本研究通过外源 GA_3 处理、内源 GA_3 测定以及 α 淀粉酶活性检测表明 CHA-2N 与 GA_3 无关。除了 GA 外, 油菜素类固醇(brassinosteroids, BR)和其他激素对植物的株高也存在影响。已克隆的与 BR 相关的矮秆基因包括 *d61*、*brt1*、*d11* 和 *brt2* ^[36-39], 功能分析表明它们参与 BR 合成和信号传导。上述 BR 相关的矮秆基因分别位于第 1、第 3、第 4 和第 10 染色体, 显然并非 *iga-1* 的候选基因。

本研究将 *iga-1* 定位在第 5 染色体 2 个 InDel 标记 DL18 和 DL19 之间 32.01 kb 的区间内, 该区间有 5 个候选基因, 其中 *D1* 基因编码 GTP 结合蛋白(G 蛋白)的 α 亚基, 参与赤霉素的信号传导。已报道的 *d1* 突变体由于编码区缺失 19 个碱基, 丧失编码 G 蛋白 α 亚基的功能, 从而影响赤霉素的信号传导, 导致植株矮化。虽然 *iga-1* 定位区间包括了 *D1* 基因, 但系列的证据表明 *iga-1* 与矮秆基因 *d1* 并非同一个基因。首先, 两者对 GA 的反应不同。实验证明 *d1* 突变体属 GA 钝感型矮秆突变体, 外施 GA_3 不能恢复野生型, 同时外施 GA_3 不能有效诱导糊粉层 α -淀粉酶产生^[15]。本研究 *iga-1* 半矮秆株系 CHA-2N 既不属于 GA 缺陷型, 外施 GA_3 也能有效诱导 α -淀粉酶产生。第二, 两者的株高不同, 含 *d1* 纯合矮秆基因的水稻 ID-1 株高约为 30 cm, 而含 *iga-1* 的半矮秆株系 CHA-2N 平均株高 80.16 cm, 远高于 ID-1。第三, 节间比例不同。除 dn 型以外的矮秆类型都存在某一节间显著缩短的特征, 这表明不同的矮秆基因作用于水稻的不同节间, 即矮秆基因对植株的矮化作用只在某一特定生长期发生, 并导致某些节间缩短^[2]。*d1* 突变体由于第 2 节间比其他节间显著缩短, 被认为是典型的 dm 型矮秆突变体。本研究 CHA-2N 各节间比例与高秆品种的节间比例相似, 不存在某一节间的显著缩短, 明显不同于 *d1* 突变体。第四, 两

者序列不同, *d1* 比野生型在编码区缺失了 19 bp, 而 *iga-1* 矮秆株系和原种的 *D1* 基因组序列不存在差异, 说明 *iga-1* 不是来自 *D1* 序列的突变。虽然有报道发现 *D1* 基因前端启动子区域的甲基化修饰会阻碍 *D1* 基因的表达, 导致矮化突变, 但启动子区域的修饰产生的突变表型与 *d1* 突变体的类似, 明显不同于 CHA-2N^[40]。

水稻矮秆基因大多数通过标志基因分析法、易位法和三体分析法被定位到水稻不同染色体上。目前已定位的矮秆基因超过 60 个, 定位结果多数被释放到(日本)遗传资源共享信息数据库(<http://shigen.lab.nig.ac.jp/rice/oryzabase/genes>)。已定位的矮秆基因不均匀地分布于水稻 12 条染色体上, 其中第 1 染色体最多, 有 19 个矮秆基因, 第 10 染色体最少, 只有 1 个。第 5 染色体有 4 个, 分别是 *d1*、*gid1*、*sd-7* 和 *sd-g*^[15-17,41-43], *gid1* 的编码区序列位于日本晴基因组 19806383 ~ 19808090 (+) bp 处(<http://www.gramene.org/>), *sd-g* 与 RFLP 标记 RZ182 连锁, 遗传距离为 4.3 cM, RZ182 在日本晴基因组中的位置是 20, 483, 739-20, 484, 186 (-) bp。显然 *gid1*、*sd-g* 与 *iga-1* 在染色体上位置不同, 不可能是 *iga-1* 的候选基因。*sd-7* 是从 Taichung 65 的 X 射线诱变后代中发现的 1 个半矮秆基因^[41]。遗传分析表明该基因与已知的 *d1* 矮秆基因紧密连锁, 但并非与 *d1* 是同一个基因^[42]。根据 Tsai 对 *sd-7* 的描述, 携带 *sd-7* 半矮秆株系 T65*sd-7* 与携带 *iga-1* 的半矮秆株系 CHA-2N 在农艺性状上存在很多相似之处, 如两者株高比原种矮、成熟期提前、节间比例相似、单株穗数减少等, 推测 *sd-7* 可能与 *iga-1* 来自同一位点。

4 结论

水稻半矮秆基因 *iga-1* 不影响节间比例, 与 GA 的调控无关, 与已报道的 *d1* 基因不等位, 且与已克隆的 BR 相关基因不在同一染色体, 表明 *iga-1* 可能受不同的分子机制调控。

References

- [1] Silverstone A L, Sun T. Gibberellins and the green revolution. *Trends Plant Sci*, 2000, 5: 1-2
- [2] Parnell F R, Rangswani G N, Ayyanggar C R S. The inheritance of characters in rice. *Agric India Bot Ser*, 1922, 11: 185-208
- [3] Takeda K. Internode elongation and dwarfism in some gramineous plants. *Gamma Field Sym*, 1977, 17: 1-18
- [4] Nagano H, Onishi K, Ogasawara M, Horiuchi Y, Sano Y. Genealogy of the "Green Revolution" gene in rice. *Genes Genet Syst*, 2005, 80: 1-6
- [5] Chang T T. Genetics and breeding. In: Westport. Rice: Production and Utilization. Connecticut: AVI Press, 1980. pp 146-187
- [6] Wilhelm R. Growth retardants: effects on gibberellin biosynthesis and other metabolic pathways. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 2000, 51: 501-531
- [7] Fujioka S, Yokota T. Biosynthesis and metabolism of brassinosteroids. *Annu Rev Plant Biol*, 2003, 54: 137-164
- [8] Mitsunaga S, Tashiro T, Yamaguchi J. Identification and characterization of gibberellins-insensitive mutants selected from among dwarf mutants of rice. *Theor Appl Genet*, 1994, 87: 705-712
- [9] Hedden P, Phillips A L. Gibberellins metabolism: new insights revealed by the genes. *Trends Plant Sci*, 2000, 5: 523-530
- [10] Tomoaki S, Koutarou M, Hironori I, Tomoko T, Miyako U T, Kanako I, Masatomo K, Ganesh K A, Shin T, Kiyomi A, Akio M, Hirohiko H, Hidemi K, Motoyuki A, Makoto M. An overview of gibberellin metabolism enzyme genes and their related mutants in rice. *Plant Physiol*, 2004, 134: 1642-1653
- [11] Grennan A K. Gibberellin metabolism enzymes in rice. *Plant Physiol*, 2006, 141: 524-526
- [12] Sun T, Gubler F. Molecular mechanism of gibberellin signaling in plants. *Annu Rev Plant Biol*, 2004, 55: 197-223
- [13] Yamaguchi S. Gibberellin metabolism and its regulation. *Annu Rev Plant Biol*, 2008, 59: 225-251
- [14] Gomi K, Matsuoka M. Gibberellin signalling pathway. *Curr Opin Plant Biol*, 2003, 6: 489-493
- [15] Fujisawa Y, Kato T, Ohki S, Ishikawa A, Kitano H, Sasaki T, Asahi T, Iwasaki Y. Suppression of the heterotrimeric G protein causes abnormal morphology, including dwarfism, in rice. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, 96: 7575-7580
- [16] Ueguchi-Tanaka M, Nakajima M, Katoh E, Ohmiya H, Asano K, Saji S, Hongyu X, Ashikari M, Kitano H, Yamaguchi I, Matsuoka M. Molecular interactions of a soluble gibberellin receptor, *GID1*, with a rice DELLA protein, *SLR1*, and gibberellin. *Plant Cell*, 2007, 19: 2140-2155
- [17] Hartweck L M, Olszewski N E. Rice gibberellin insensitive Dwarf1 is a gibberellin receptor that illuminates and raises questions about GA signaling. *Plant Cell*, 2006, 18: 278-82
- [18] Gomi K, Sasaki A, Itoh H, Ueguchi-Tanaka M, Ashikari M, Kitano H, Matsuoka M. *GID2*, an F-box subunit of the *SCF E3* complex, specifically interacts with phosphorylated *SLR1* protein and regulates the gibberellin-dependent degradation of *SLR1* in rice. *Plant J*, 2004, 37: 626-634
- [19] Rao D-H(饶得花), Guo T(郭涛), Wang H(王慧), Liu Y-Z(刘永柱), Zhang J-G(张建国), Chen Z-Q(陈志强). Genetic analysis of a semidwarf mutant in *indica* rice and the response to gibberellin. *J South China Agric Univ* (华南农业大学学报), 2009, 30(1): 19-22 (in Chinese with English abstract)
- [20] Wang H(王慧), Liu Y-Z(刘永柱), Zhang J-G(张建国), Chen Z-Q(陈志强). Genetic analysis of space induced rice dwarf mu-

- tant *CHA-1* and its response to gibberellic acid (GA_3). *Chin J Rice Sci* (中国水稻科学), 2004, 18(5): 391–395 (in Chinese with English abstract)
- [21] Lanahan M B, Ho T H. Slender barley: A constitutive gibberellin-response mutant. *Planta*, 1988, 175: 107–114
- [22] Xie J(谢君), Zhang Y-Z(张义正). Determination of plant intrinsic hormones by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *J Instrumental Anal* (分析测试学报), 2001, 20(1): 60–62 (in Chinese with English abstract)
- [23] Murray M G, Thompson W F. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucl Acids Res*, 1980, 8: 4321–4325
- [24] Shen Y J, Jiang H, Jin J P, Zhang Z B, Xi B, He Y Y, Wang G, Wang C, Qian L, Li X, Yu Q B, Liu H J, Chen D H, Gao J H, Huang H, Shi T L, Yang Z N. Development of genome-wide DNA polymorphism database for map-based cloning of rice genes. *Plant Physiol*, 2004, 135: 1198–1205
- [25] Michelmore R W, Paran I, Kesseli R V. Identification of markers linked to disease-resistance genes by bulked segregation analysis: a rapid method to detect markers in specific genomic regions by using segregation population. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1991, 88: 9828–9832
- [26] Lin H-X(林鸿宣), Xiong Z-M(熊振民), Min S-K(闵绍楷), Yu G-L(俞桂林), Zhu X-D(朱旭东). The responses of semidwarf rice lines to gibberellic acid. *Chin J Rice Sci* (中国水稻科学), 1991, 5(1): 13–18 (in Chinese with English abstract)
- [27] Song P(宋平), Cao X-Z(曹显祖), Wu Y-H(吴永宏), Zhu X-H(朱晓红), Liang J-S(梁建生). Regulation of gibberellin-binding proteins on dwarfism of rice (*Oryza sativa* L.). *Acta Agron Sin* (作物学报), 1996, 22(6): 652–656 (in Chinese with English abstract)
- [28] Ashikari M, Sasaki A, Ueguchi-Tanaka M, Itoh H, Nishimura A, Datta S, Ishiyama K, Saito T, Kobayashi M, Khush G S, Kitano H, Matsuoka M. Loss-of-function of a rice gibberellin biosynthetic gene, *GA20 oxidase (GA20ox-2)*, led to the rice ‘Green Revolution’. *Breed Sci*, 2002, 52: 143–150
- [29] Gubler F, Kalla R, Roberts J K, Jacobsen J V. Gibberellin regulated expression of a *myb* gene in barley aleurone cells: evidence for *Myb* transactivation of a high-pl α -amylase gene promoter. *Plant Cell*, 1995, 7: 1879–1891
- [30] Zhu L-H(朱立宏), Gu M-H(顾铭洪), Xue Y-L(薛元龙). Inheritance of dwarf stature in *Oryza sativa* L. subsp. *Hsien* and its utilization. *J Nanjing Agric Univ* (南京农业大学学报), 1980, (2): 1–7 (in Chinese with English abstract)
- [31] Chang T T, Zuro C, Marciano-Romena A, Loresto G C. Semidwarf in rice germplasm collections and their potentials in rice improvement. *Phytobreedon*, 1985, 1: 1–42
- [32] Foster K W, Rutger J N. Inheritance of semidwarfism in rice. *Oryza sativa* L. *Genetics*, 1978, 88: 559–574
- [33] Mackill D J, Rutger J N. The inheritance of induced-mutant semidwarfing gene in rice. *J Hered*, 1979, 70: 335–341
- [34] McKenzie K S, Rutger J N. A new semidwarf mutants in a large grain rice cultivar. *Crop Sci*, 1986, 26: 81–84
- [35] Xu J-L(徐建龙), Li C-S(李春寿), Wang J-M(王俊敏), Luo R-T(骆荣挺), Zhang M-X(张铭铣). Screening and identification of tillering dwarf mutant of rice induced by space environment. *Acta Agric Nucl Sin* (核农学报), 2003, 17(2): 90–94 (in Chinese with English abstract)
- [36] Yamamuro C, Ihara Y, Wu X, Noguchi T, Fujioka S, Takatsuto S, Ashikari M, Kitano H, Matsuoka M. Loss of function of a rice brassinosteroid insensitive1 homolog prevents internode elongation and bending of the lamina joint. *Plant Cell*, 2000, 12: 1591–606
- [37] Hong Z, Ueguchi-Tanaka M, Shimizu-Sato S, Inukai Y, Fujioka S, Shimada Y, Takatsuto S, Agetsuma M, Yoshida S, Watanabe Y, Uozu S, Kitano H, Ashikari M, Matsuoka M. Loss-of-function of a rice brassinosteroid biosynthetic enzyme, C-6 oxidase, prevents the organized arrangement and polar elongation of cells in the leaves and stem. *Plant J*, 2002, 32: 495–508
- [38] Tanabe S, Ashikari M, Fujioka S, Takatsuto S, Yoshida S, Yano M, Yoshimura A, Kitano H, Matsuoka M, Fujisawa Y, Kato H, Iwasaki Y. A novel cytochrome *P450* is implicated in brassinosteroid biosynthesis via the characterization of a rice dwarf mutant, *dwarf11*, with reduced seed length. *Plant Cell*, 2005, 17: 776–790
- [39] Hong Z, Ueguchi-Tanaka M, Fujioka S, Takatsuto S, Yoshida S, Hasegawa Y, Ashikari M, Kitano H, Matsuoka M. The rice brassinosteroid-deficient *dwarf2* mutant, defective in the rice homolog of Arabidopsis *DIMINUTO/DWARF1*, is rescued by the endogenously accumulated alternative bioactive brassinosteroid, dolichosterone. *Plant Cell*, 2005, 17: 2243–54
- [40] Kotaro M, Masakazu A, Hidemi K, Atsushi Y, Makoto M, Steven E J, Motoyuki A. A metastable *DWARF1* epigenetic mutant affecting plant stature in rice. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009, 106: 11218–11223
- [41] Tsai K H. An induced dwarfing gene, *sd-7(t)*, obtained in Taichung 65. *Rice Genet Newsl*, 1989, 6: 99–101
- [42] Tsai K H. Tight linkage of gene *sd-7(t)* and *d1* found in a cross of Taichung 65 isogenic lines. *Rice Genet Newsl*, 1991, 8: 104
- [43] Liang C Z, Gu M H, Pan X B, Liang G H, Zhu L H. RFLP tagging of a new semidwarfing gene in rice. *Theor Appl Genet*, 1994, 88: 898–900