

水稻株高 QTL *Qph1* 的精细定位

孔会利 刘文俊 王令强 高冠军 何予卿

华中农业大学作物遗传改良国家重点实验室, 武汉 430070

摘要 利用珍汕 97B 与南阳占的重组自交系 (recombinant inbred line, RILs) 构建了以珍汕 97B 为背景的近等基因系 (near isogenic line, NILs) BC₃F₂, 通过对其 320 株随机分离小群体的研究, 发现 *Qph1* 同时具有加性效应和显性效应, 其可解释的遗传变异达 71.28%, 局部 QTL 连锁分析把该 QTL 定位于 2.1 cM、180.2 kb 的 RM6333-RM11961 区间内; 进一步发展 6 000 株大群体, 筛选出 230 株极端隐性重组单株, 利用重叠作图法将 *Qph1* 进一步精细定位于距离约为 90 kb 的 SSR 标记 SHL4 和 InDel (Insertion Deletion) 标记 HL13 间, 通过与已克隆的 *sd1* 基因比较, 发现二者并不在同一个区域, 这为进一步克隆该 QTL 和分子标记辅助选择培育矮秆水稻新品种奠定了基础。

关键词 水稻; 株高; QTL; 近等基因系; 精细定位

中图分类号 S 511.503.53 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2012)03-0265-05

新的矮秆基因与半矮秆基因的发掘、研究和利用对水稻育种和植物生长发育机制研究有重要的作用。在水稻和其他谷类作物中, 株高是影响丰产潜力、耐肥性和抗倒能力的重要农艺性状, 自 1960 年半矮秆基因 *sd1* 导入到禾本科植物中, 选育了无数的半矮品种, 极大地提高了粮食产量。这种巨大的影响被称之为绿色革命^[1]。长期以来, 对水稻株高遗传控制的研究一直深受重视, 已定位了 43 个控制矮秆、半矮秆性状的主效基因和 1 011 个与株高相关的 QTL (www.gramene.org), 并应用图位克隆、同源克隆等方法克隆了近 20 个矮秆相关基因^[2]。水稻株高是 1 个由主效基因和微效基因共同控制的质量-数量性状, 且株高相关 QTL 往往与主效基因具有相似的基因组位置。此外, 在水稻品种全面实现半矮秆化以后, “矮中求高” 已成为高产育种的重要策略^[3], 这显然有赖于株高 QTL 的利用。

水稻中半矮秆基因 *sd1* 首先通过经典遗传学和分子遗传学定位在水稻第 1 染色体上^[4]。随后 3 个独立的研究小组克隆了该基因^[5-7]。功能验证表明该基因编码 GA 氧化酶, 首次阐明 GA 在株高形成中的机理。

许多研究者在水稻第 1 染色体都定位了控制株

高的主效 QTL^[8-11], 这些 QTLs 都位于半矮秆基因 *sd1* 相近的区段。Ishimaru 等^[12] 采用候选基因方法克隆了 1 个控制株高的基因 QTL *ph1*。该基因编码葡萄糖磷酸合成酶, 它是与 *sd1* 紧密连锁的控制株高的基因。

在本研究中, 笔者利用珍汕 97B 和南阳占组合衍生的株高 QTL 近等基因系精细定位了 1 个与水稻半矮秆基因 *sd1* 紧密连锁的株高基因, 建立其近等基因系和分子标记辅助选择体系, 旨在为该基因的克隆以及矮秆水稻新品种的培育提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 水稻材料

刘文俊等^[13] 利用珍汕 97B/南阳占重组自交系群体 (RILs) F₈ 代在第 1 染色体上的标记 RM472-RM104 间检测到 1 个主效株高 QTL, 基因解释表型的遗传效应达 45.9%。本研究以此 QTL 为目标片段构建以珍汕 97B 为遗传背景的 BC₃F₂ 近等基因系 (NILs)。亲本之一珍汕 97 (*Oryza Sativa* L. ssp. *indica*) 为我国广泛应用的优良杂交稻汕优 63 的亲本, 南阳占 (*Oryza sativa* L. ssp. *indica*) 为红米特异种质材料。

收稿日期: 2011-11-14

基金项目: 国家自然科学基金项目 (30971550)、“863”项目 (2012AA100103)、“973”项目 (2011CB100200) 和植物转基因专项 (2011ZX08009-003)

孔会利, 硕士, 研究方向: 植物分子遗传学, E-mail: konghui@webmail.hzau.edu.cn

通讯作者: 何予卿, 博士, 教授, 研究方向: 水稻分子遗传与育种, E-mail: yqhe@rmail.hzau.edu.cn

1.2 田间种植管理

2008 年夏在华中农业大学试验农场种植 320 株随机分离群体 BC₃F₂, 同年在海南陵水继续发展 6 000 株 BC₃F₂ 大群体。两地株行距为 16.5 cm × 26.4 cm, 正常大田生产管理, 成熟期测量株高^[13]。

1.3 标记检测

DNA 的抽提参考 CTAB 法^[14]。每株取新鲜叶片 2~3 cm, 详细操作参照岳兵^[15]介绍的方法。待 DNA 完全溶解后, 用 DNA 微量测定仪 (DNA Fluorometer) 测定 DNA 浓度。本研究应用的 DNA 分子标记除了来源于前人发表的 SSR 标记外 (www.gramene.org), 还包括根据水稻基因组序列设计的 2 个 SSR 标记和 2 个 InDel 标记。所有的标记均用 4% 变性聚丙烯酰胺凝胶 (SDS-PAGE) 检测。

1.4 数据分析

应用 MAPMAKER/EXP 3.0 作图软件构建在第 1 染色体长臂 RM472-RM104 分离区间的连锁图谱, 用 Kosambi 函数将重组率转化成遗传距离 (cM), 利用 QTL Cartographer 2.0^[16] 复合区间作图法 (composite interval mapping, CIM) 对随机群体的株高进行扫描检测, 采用 LOD 值 2.0 作为阈值来判断 QTL 存在与否, 若标记区间 LOD ≥ 2.0, 则认为该区间存在 1 个控制该性状的 QTL。6 000 株大群体中筛选出约 1 000 株重组单株, 利用重叠作图法对这其中的 230 株极端隐性重组单株 (株高低于 80 cm) 进行分析定位。

2 结果与分析

2.1 随机群体的分析

BC₃F₂ 随机小群体在武汉的株高分离明显, 表现为典型的数量性状, 亲本相差约 48 cm (表 1)。对株高表型值进行分组, 制作次数分布图 (图 1), 呈现很明显的双峰分布, 在株高 100 cm 处有 1 个断点。卡方测验 $\chi^2 = 3.0625$ 、 $P = 0.01$ 的水平上达到极显著, 株高 QTL 在近等基因系中的分离符合孟德尔遗传分离比, 即 F₂ 代呈现 3:1, 表明该 QTL 的近等

表 1 随机群体的株高表型值分布

Table 1 Phenotypic performance of plant

height in random population cm

性状 Trait	珍汕 97B Zhenshan 97B	南洋占 Nanyangzhan	平均值 ± 标准差 Mean ± SD	变幅 Range
株高 Plant height	90.7	138.7	108.3 ± 16.8	43.0~143.0

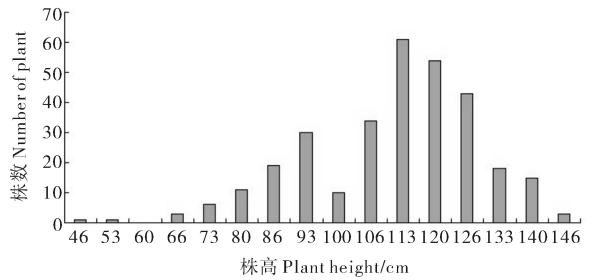


图 1 随机群体 BC₃F₂ 株高次数分布图

Fig. 1 Frequency distribution of plant height in random population

基因系背景已经纯合, 可以用于精细定位。

2.2 Qph1 的验证和局部 QTL 连锁分析

该株高 QTL 初定位区间是标记 RM472-RM104, 区间的遗传距离是 13.8 cM, 物理距离是 2.1 Mb, 相对较大。在 Gramme 网站数据库 (www.gramene.org) 中需找多对 SSR 标记, 其中得到 5 对多态性的标记, 从上到下分别是 RM6333、RM11961、RM12042、RM3523、RM12084, 其引物序列见表 2。用上述 5 个标记检测随机群体, 应用 MAPMAKER/EXP 3.0 作图软件构建局部连锁图谱, 用 Kosambi 函数将重组率转化成遗传距离 (cM), 综合随机群体的株高表型值, 利用 QTL Cartographer 2.0 复合区间作图法对随机群体的株高进行扫描检测, 将株高 QTL Qph1 定位于 RM6333 和 RM11961 间, 基因解释表型的效应值高达 71.28%, LOD 值为 42.34 (表 2)。

表 2 局部 QTL 连锁分析结果¹⁾

Table 2 Result of local QTL linkage analysis

QTL	染色体 Chr.	区间 Interval	LOD	A ¹⁾	D ²⁾	Var/%
Qph1	1	RM6333-RM11961	42.34	-18.15	9.29	71.28

1) A. 加性效应 The additive effect caused by QTL; 2) D. 显性效应 The dominant effect caused by QTL; Var. 贡献率 The phenotypic variation explained by the QTL.

2.3 Qph1 的精细定位

为了进一步缩小区间, 在海南发展 1 个 6 000 株的大群体, 用于精细定位, 大群体的株高分离明显, 仍然表现为典型的数量性状。为了避免随机群体 QTL 定位的误差, 用标记 RM472-RM104 筛选重组单株, 共筛到约 1 000 株重组交换单株, 分别量取成熟期的株高。利用极端隐性法分析该株高 Qph1 的位置。

精细定位是图位克隆的关键步骤之一, 从 1 000 个重组交换单株中挑选出 230 个矮单株用来精细定

位,将 *Qph1* 定位于 RM6333 和 RM11961 间,在该区间开发新的 SSR 和 InDel 标记。其中 SSR 标记主要是利用 gramene 网站上 SSR tool 寻找重复序列, InDel 标记主要根据网上公布的粳稻品种 Nipponbare 的基因组序列 (<http://ran.dna.affrc.go.jp>) 以及籼稻品种 93-11 的基因组序列 (<http://rice.genomics.org.cn/>),利用软件 Primer 5 设计 7 对 SSR 标记和 5 对 InDel 标记,其中 3 对 SSR 标记和 2 对 InDel 标记有多态性,见表 3。用发展的 5 对分子标记定位 230 株矮秆单株,进一步将 QTL 的区间缩小,最后将 *Qph1* 定位于标记 SHL4-HL13

间,2 个标记的物理距离约为 90 kb。该区域跨 2 个 BAC: AP003297 和 AP003261 (图 2)。通过在 TIGR Rice Genome Annotation (Osa1) Release 6.1 网站上对 SHL4 和 HL13 之间的序列进行检索,发现此区域共有 12 个预测的 ORF,其中 8 个有预测功能,4 个为未知蛋白。8 个有预测功能的 ORF 包括:1 个结合蛋白,1 个 SnRK1 互作蛋白,1 个有丝分裂蛋白,1 个半乳糖转移酶,1 个 PHD-finger 结合蛋白,1 个 HAIKU2 前导类蛋白激酶和 2 个氨基酸转运子的基因。通过与已克隆的 *sd1* 基因比较,发现 *sd1* 基因并不在该区域。

表 3 精细定位所用到的 SSR 和 InDel 引物

Table 3 Sequences of SSR and InDel primers in fine mapping

标记 Maker	类型 Type	前引物 Forward primer	后引物 Reverse primer
RM6333	SSR	ACTCACTCACTCACCCACACAGC	TTGGAGAGGGAAGAGAAGACACG
RM11961	SSR	GTCGAATCGCGATAGTCAGAGC	GGTCAGTTTGGCACTTTGAATGG
RM12042	SSR	TGTAGGTAGCTGAACGAGATGAGTGC	CAGGATTGATCCTCATCCCAAGC
RM3523	SSR	TCTTGGCTGCTATTGTGGTTGG	AAGTCGTTTCGTTGCATGAAGAGG
RM12084	SSR	AATCGGCGAGGTTTGCTAATGG	ATACGTGGTACGTGACGCTTTGC
SHL0a	SSR	AAACTCCTCATTTGCTCC	TTGACGAGGCTCTTGATAGC
SHL2	SSR	TCATCGTACAGTGCAGGAG	TCCCTCAGAATCGGCATA
SHL4	SSR	CTTCTCACGCCACCTTCC	CTTCCATGCCATTACCA
HL4	InDel	CCAAGGACCAACTATGACG	GCAGTCTAAGGGAGATAACAAG
HL13	InDel	ACAGGTCAGGTGCAAAAAGCT	AACGCGAACTGGAAACAGAG

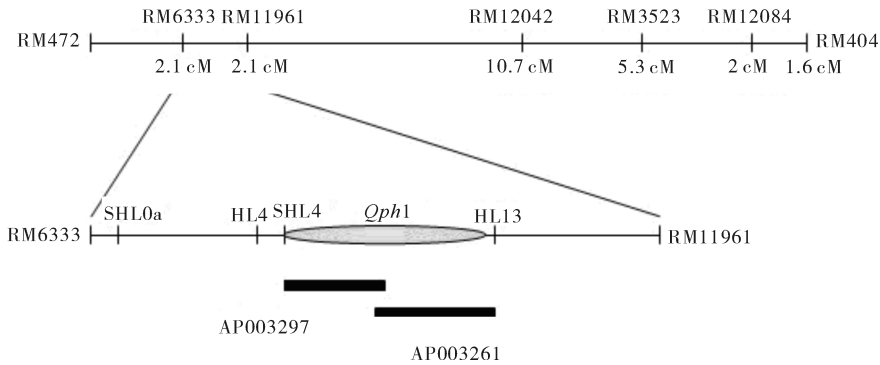


图 2 *Qph1* 精细定位结果

Fig. 2 Result of fine mapping of *Qph1*

3 讨论

图位克隆基因是基于遗传作图和物理作图的一种分离基因的方法。这一方法首先是初步定位基因,然后对基因精细定位,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,最后是构建覆盖目的基因区域的物理图谱,筛选和鉴定候选基因片段克隆。

稻高产育种具有重要的作用。在以矮化育种为标志的“绿色革命”的鼓舞下,水稻矮秆、半矮秆基因的发掘和鉴定一直深受重视,并在近年克隆了一批基因。不过,对于“矮中求高”的现代高产育种策略,更重要的是在半矮秆范围内发掘和利用株高 QTL。本研究利用具有相同遗传背景的近等基因系分离群体,逐步缩小分离区间,将株高 QTL *Qph1* 界定在水稻第 1 染色体长臂上约 90 kb 的区间内,为其克隆提供了良好的基础。刘文俊等^[13]利用珍汕 97B/南洋

株高是水稻的重要农艺性状,其性状改良对水

占的重组自交系群体,在第 1 染色体的 RM472-RM104 间检测到该 QTL,效应值为 45.9%,将该位点构建成近等基因系后,其效应增加到 71.28%,该 QTL 在不同地点、不同年份表现出稳定的效应,有利于保证其分子标记辅助选择在不同水稻种植区域的普遍作用。

近十几年来报道了大量的水稻株高 QTL,检测到的株高 QTL 遍及整个水稻基因组,第 1 染色体上除了 *sd1* 外,很多研究^[15-17]都在 RM472-RM104 间检测到株高 QTL,但是都没有对其进行精细定位,难以判断其作用是单基因还是与其连锁的基因。已定位或克隆的水稻矮秆或半矮秆主效基因有 5 个位于第 1 染色体,其基因组位置可以通过检索 Gramene (www.gramene.org) 等公开数据库获得,其中已经克隆的 *d18*^[18] 和 *d2*^[19] 位于第 1 染色体的短臂上,这显然与位于长臂的 *Qph1* 不在同一区域,*d61* 与 RFLP 标记 C1370 紧密连锁^[20],而其物理位置是 29 446 995 bp 附近,与 *Qph1* 不在同一个物理位置(38 048 609~38 136 790 bp),*d10* 定位于 RM1095-RM3411 间^[21],其物理位置是 30 923 877~31 311 319 bp 间,与 *Qph1* 的物理位置也不相符合。根据文献[2]对株高的分类,将 50 cm 以下的定位矮秆,大于 70 cm 的称为半矮秆,随机群体和极端隐性的单株株高都在 70~90 cm 间,明显不是上述矮秆基因的作用所致,而应该是半矮秆基因的作用。

通过公共数据网(<http://www.gramene.org/Oryza/>)可知,*sd1* 在第 1 染色体的长臂,而且也位于 *Qph1* 相邻的区域,但是 SHL4、HL13 与 *sd1* 的 BAC 没有一致性。SHL4、HL13 和 *sd1* 分别位于 3 个 BAC: AP003297、AP003261 和 AP003561。离 *sd1* 最近的标记 HL13 位于第 1 染色体的 38 136 kb 处,而 *sd1* 则位于 38 381 kb 处,二者至少相距 245 kb,并非同一个位置。似乎本研究中定位的株高 QTL *Qph1* 与 *sd1* 基因紧密连锁。

参 考 文 献

- [1] HEDDEN P. The genes of the green revolution[J]. Trends in Genetics, 2003, 19: 5-9.
- [2] 马良勇,包劲松,李西明,等. 水稻矮生基因的克隆和功能研究进展[J]. 中国水稻科学, 2009, 23(1): 1.
- [3] HUANG N, BRIGITTE C, GURDEV S K, et al. Association of quantitative trait loci for plant height with major dwarfing genes in rice[J]. Heredity, 1996, 77: 130-137.
- [4] MAEDA H, ISHII T, MORI H, et al. High density molecular map of semidwarfing gene *sd1* in rice (*Oryza sativa* L.) [J]. Breeding Sci, 1997, 47: 317-320.
- [5] SASAKI A, ASHIKARI M, UEGUCHI-TANAKA M, et al. Green revolution: a mutant gibberellin synthesis gene in rice. (new insight into the rice variant that helped to avert famine over thirty years ago) [J]. Nature, 2002, 416: 701-702.
- [6] SPIELMEYER W, ELLIS M H, CHANDLER P M. Semidwarf (*sd1*), "green revolution" rice, contains a defective gibberellin 20-oxidase gene[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2002, 99: 9043-9048.
- [7] MONNAL L, KITAZAWA N, YOSHINO R, et al. Positional cloning of rice semi dwarfing gene, *sd1*: rice "green revolution gene" encodes a mutant enzyme involved in gibberellin synthesis[J]. DNA Research, 2002, 9(1): 11-17.
- [8] XIAO J, LI J, YUAN L. Identification of QTLs affecting traits of agronomic importance in a recombinant inbred population derived from a subspecific rice cross[J]. Theor Appl Genet, 1996, 92: 230-244.
- [9] XIAO J, LI J, GRANGDILLO S, et al. Identification of trait-improving quantitative trait loci alleles from a wild rice relative, *Oryza rufipogon*[J]. Genetics, 1998, 150: 899-909.
- [10] XILNG L, LIU K, DAI X, et al. Identification of genetic factors controlling domestication-related traits of rice using an F₂ population of a cross between *Oryza sativa* and *O. rufipogon*[J]. Theor Appl Genet, 1999, 98: 243-251.
- [11] ISHIMARU K, YANO M, AOKI N, et al. Toward the mapping of physiological and agronomic characters on a rice function map: QTL analysis and comparison between QTLs and expressed sequence tags[J]. Theor Appl Genet, 2001, 102: 792-800.
- [12] ISHIMARU K, ONO K, KASHIWAGI T. Identification of a new gene controlling plant height in rice using the candidate-gene strategy[J]. Planta, 2004, 218: 388-395.
- [13] 刘文俊,王令强,何予卿. 利用 2 个相关群体定位和比较水稻株高与抽穗期 QTL[J]. 华中农业大学学报, 2007, 26(2): 161-166.
- [14] MURRAY M G, THOMPSON W F. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA [J]. Nucleic Acids Res, 1980, 23(8): 4321.
- [15] 岳兵. 水稻后期抗旱遗传基础研究[D]. 武汉: 华中农业大学生命科学与技术学院, 2005.
- [16] ZENG Z B. Precision mapping of quantitative trait loci[J]. Genetics, 1994, 136: 1457-1468.
- [17] 张玉山. 水稻重要农艺性状的 QTL 的分析和主效 QTL 近等基因系的构建[D]. 武汉: 华中农业大学生命科学与技术学院, 2006.
- [18] ITOH H, UEGUCHI-TANAKA M, SENTOKU N, et al. Cloning and functional analysis of two gibberellin 3 β -hydroxylase genes that are differentially expressed during the growth of rice

- [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2001, 98(15): 8909-8914.
- [19] HONG Z, UEGUCHI-TANAKA M, UMEMURA K, et al. A rice brassinosteroid deficient mutant, ebisu dwarf (*d2*), is caused by a loss of function of a new member of cytochrome P450[J]. Plant Cell, 2003, 15(5): 2900-2910.
- [20] YAMAMURO C, IHARA Y, WU X, et al. Loss of function of a rice *Brassinosteroid insensitive 1* homolog prevents internode elongation and bending of the lamina joint[J]. Plant Cell, 2000, 12(9): 1591-1605.
- [21] ARITE T, IWATA H, OHSHIMA K, et al. *DWARF10*, an *RMS1/MAX4/DAD1* ortholog, controls lateral bud outgrowth in rice[J]. Plant J, 2007, 51: 1019-1029.

Fine mapping of a plant height QTL *Qph1* in rice

KONG Hui-li LIU Wen-jun WANG Ling-qiang GAO Guan-jun HE Yu-qing

National Key Laboratory of Crop Genetic Improvement, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China

Abstract Dwarfism is one of the most important agronomic traits of rice. Fine mapping and functional studies of the plant height gene reveal the mechanisms for high yielding rice. In early research of this study, a main QTL *Qph1* for plant height was mapped between the interval RM472-RM104 on the long arm of chromosome 1 in recombinant inbred line (RILs) population of Zhenshan 97B/Nanyangzhan. Then this QTL was used as a target fragment to construct a near isogenic line (NILs) BC₃F₂ whose genetic background was Zhenshan 97B. Firstly we detected the effect of *Qph1* in NILs by a random population contained 320 plants, and it can explain 71.28% of phenotypic variation. Then the *Qph1* was located between the interval RM6333-RM11961 through local QTL linkage analysis. In order to further reduce the target region, we planted a large genetic population which segregate in regions covering *Qph1* and screened about 230 extreme recessive recombinant plants. The *Qph1* locus was delimited to a 90 kb region flanked by SSR marker SHL4 and InDel marker HL13 by overlapping mapping, and compared with the *sd1* has been cloned and found that they were not in the same area. It is a good foundation for cloning of the QTL.

Key words rice; plant height; quantitative trait loci (QTL); near isogenic line (NILs); fine mapping

(责任编辑: 杨锦莲)