

水稻粒簇生材料 Cgr320 的鉴定及遗传偏分离分析

周军杰¹, 李兴星¹, 郑 剑¹, 南文斌¹, 秦小健¹, 张启军³, 杨永清¹, 张汉马¹, 梁永书^{1,2}

(¹重庆师范大学生命科学学院/植物环境适应分子生物学重庆市重点实验室, 重庆 401331;

²水稻生物学国家重点实验室, 杭州 310006; ³江苏省农业科学院粮食作物研究所, 南京 210014)

摘要:籽粒簇生稻 Cgr320 为一类水稻突变材料, 其性状表现为 2~3 朵颖花(籽粒)簇生在水稻主穗轴或枝梗顶部。为了进一步明确其簇生性状的遗传机制, 本研究用 Cgr320 作父本分别与武运粳 24 和 93-11 配制了 2 个杂交组合, 获得杂种 F₁、F₂ 分离群体, 对亲本、F₁ 和 F₂ 群体的簇生性状进行了形态学观察和遗传连锁分析。结果表明, Cgr320 其他农艺性状与普通栽培稻差异不显著。簇生性状在 F₁ 植株表现为野生型, 在 F₂ 群体中出现严重偏离孟德尔(3:1)遗传分离, 卡方测验值 $X^2_{(3:1)}$ 为 7.71 和 144.87。随机选取第 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11 和 12 染色体上 RM493、RM3762、RM1338、RM3217、RM249、RM20155、RM3325、RM22418、RM6797、RM1146、RM7557 和 RM27706 等 12 对微卫星标记对武运粳 24/Cgr320 22 个 F₂ 隐性(簇生)单株进行遗传连锁分析, 发现 12 个标记所扩增产的 22 个 F₂ 隐性单株基因型都极显著偏向武运粳 24, 卡方检验值 $X^2_{(1:2:1)}$ 大于 $X^2_{(0.05, 2)}$ 临界值 5.991, 控制 *cgr320* 簇生性状基因存在严重偏分离遗传, 这种遗传现象必将误导我们判定控制籽粒簇生基因所在的连锁群。本研究结果将为水稻基因定位研究提供参考信息。

关键词: 水稻; 簇生稻; 分子标记; 遗传分析; 偏分离

Observation and Genetic Segregation Distortion Analysis on Clustered Spikelets in Rice Resource Cgr320

ZHOU Jun-jie¹, LI Xing-xing¹, ZHENG Jian¹, NAN Wen-bin¹, QIN Xiao-jian¹,
ZHANG Qi-jun³, YANG Yong-qing¹, ZHANG Han-ma¹, LIANG Yong-shu^{1,2}

(¹Chongqing Key Laboratory of Molecular Biology of Plant Environmental Adaptations, Chongqing

Normal University, Chongqing 401331; ²State Key Laboratory of Rice Biology, Hangzhou 310006;

³Institute of Food Crops, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Nanjing 210014)

Abstract: Clustered grain rice (Cgr320) is a type of mutant material that clustered 2-3 grains on top of the main panicle. In order to clarify its genetic mechanism, we developed two F₂ segregating populations derived from crosses between Cgr320 and WYJ24 or 93-11 and carried out the phenotypic observation experiment and analyses on genetic linkage of gene underlying Cgr320. The results showed that there were no significance differences in nine agronomical traits between Cgr320 and WYJ24 or 93-11 except clustered grain rice (*Cgr*), which showed recessive phenotype in F₁ plants, indicating that the mutant is controlled by recessive gene. The segregation ration of mutant type plants to wild type plants in WYJ24/Cgr320 F₂ population was seriously deviated from the Mendel's laws of 3:1, the chi-square(χ^2) test values for *Cgr* genetic segregation were 7.71 and 144.87, respectively. Twelve SSR markers distributing on rice chromosome 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 and 12 were used to perform analysis on genetic linkage of gene underlying *Cgr* using 22 F₂ recessive (mutant) plants, which showed serious segregation toward

收稿日期: 2015-10-29 修回日期: 2015-11-17 网络出版日期: 2016-08-12

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.4996.S.20160812.1315.002.html>

基金项目: 国家“973”前期专项(2014CB160306); 重庆师范大学博士启动基金(13XLB017); 重庆市自然科学基金(cstc2014jcyjA80003); 重庆市教委项目(KJ1400516)

第一作者主要从事水稻分子生物学研究。E-mail: cqnjunjiezhou@163.com

通信作者: 梁永书, 从事水稻遗传与育种研究。E-mail: Yongshuliang@yeah.net

WYJ24, and the chi-square(χ^2) test values for these markers were bigger than that of $X^2_{(0.05, 2)} 5.991$, this will mislead us to judge the correct linkage group of gene controlling *Cgr*. To our knowledge, this is a rare case of segregating distorting in rice gene mapping project analysis.

Key words: *Oryza sativa*; clustered grain rice (*Cgr*); molecular marker; genetic analysis; segregation distortion

水稻 (*Oryza sativa* L.) 是我国重要的第 1 大粮食作物, 在保障国家粮食安全中扮演着重要角色^[1]。水稻具有禾谷类作物基因组序列的共线性排列和较小的基因组序列特性, 现已成为单子叶植物分子生物学的模式生物, 其遗传基础理论与育种应用研究长期以来受到高度重视。回顾我国半个多世纪来的水稻遗传育种的研发展历程, 每个优质高产新品种的成功培育和每篇世界顶级杂志所刊发水稻相关论文都离不开水稻优异种质资源的创新利用^[1-2]。特别是在水稻杂种优势利用方面: 诸如野败型、冈. D 型和印尼水田谷型等雄性不育资源的发掘与利用助推水稻单产大大提高^[3], 在现代分子生物学研究领域诸如分蘖数^[4-5]、实粒数^[6]、粒重^[7-10]、粒长^[11]、结实率^[12]等控制重要农艺性状基因的成功克隆也同样受益于水稻种质资源的创新利用。因此, 挖掘水稻优异种质资源不仅可用于开发新品种, 还可用于水稻分子生物学基础研究。现代分子生物学研究的成果将为超级稻培育提供新技术保障, 传统水稻育种研究中优异遗传资源创制为分子生物学研究提供了基因资源, 二者互相渗透、协调发展, 最终促成水稻产量的不断提高。

在长期的水稻育种实践中, 穗型的遗传改良是水稻理想新株型育种的热点、重点、难点。1996 年国家农业部启动超级稻育种计划的基本理念就是基于“杂种优势利用 + 理想新株型育种”的育种策略开展新品种培育。穗型直接决定着水稻的产量、群体结构及稻米品质的遗传表现^[13], 深入研究水稻穗型有助于揭示水稻穗性状形态建成的调控机理, 更有利于超级稻育种的理想新株型成功塑造。然而, 水稻穗型遗传机理的遗传解析相对滞后于水稻产量性状, 其原因在于水稻穗型由多基因调控网络完成, 其形成发育过程较为复杂。不断发掘利用的水稻穗型遗传新资源为其遗传机理解析奠定了材料基础, 自 1957 年美国学者 N. E. Jodon^[14]报道了首个水稻籽粒簇生性突变体后, 国内外学者对水稻籽粒簇生性状的遗传育种研究产生了浓厚的兴趣。S. Nagao 等^[15]、陈红旗等^[16]、P. R. Thanga 等^[17]、郑雷英等^[18]、张毅等^[19]和田翠等^[20]利用不同水稻籽粒簇

生资源开展了遗传研究。目前, 已有多个水稻穗型相关性状基因被成功定位、分离、克隆, 包括卷穗^[21]、穗粒数^[22]、花絮^[23]、直立穗^[24]和理想株型^[25]等穗部性状基因, 上述研究成果将有助于我们清晰地了解认识水稻穗型的遗传机制, 更有助于开展水稻穗型的遗传改良研究。

本研究用 1 份籽粒簇生突变体为研究材料, 该材料来源于水稻常规育种研究的自然变异获得, 其性状表现在穗顶部簇生双粒, 暂定名为 Cgr320。本研究构建了武运粳 24/Cgr320 和 93-11/Cgr320F₂ 群体, 对籽粒簇生性状进行表型鉴定与遗传连锁分析。借助基因图位克隆技术, 本研究用隐性(簇生)单株群体开展簇生基因遗传连锁分析时, 发现水稻 12 条染色体上 12 个 SSR 标记都与控制簇生性状基因存在严重地遗传偏分离, 且所有标记带型均偏向亲本武运粳 24, 这种基因定位中存在遗传偏分离现象将误导人们准确判断控制籽粒簇生基因所在连锁群。本研究的结果期望能给正在开展农作物重要农艺性状基因定位研究的同仁们提供参考信息。

1 材料与方法

1.1 试验材料

籽粒簇生突变体 Cgr320(粳型)表现为主穗或小穗枝梗顶部簇生 2~3 朵颖花, 分别在江苏、海南、重庆 3 地多年多代套袋自交, 簇生性状均表现稳定, 且能稳定遗传, 全生育期 145 d, 其他供试材料为武运粳 24(简称 WYJ24)和 93-11。所有试验材料种植在重庆师范大学生命科学学院试验田, 每份材料每个小区种植 4 行, 每行种植 12 株, 采用常规肥水管理。

1.2 方法

1.2.1 遗传群体构建和田间性状调查 2014 年 7 月在重庆师范大学生命科学学院人工气候室以 Cgr320 为父本, 配制武运粳 24/Cgr320 和 93-11/Cgr320 杂交组合。同年 8 月, 在海南省陵水县四川农业科学院水稻南繁育种基地种植杂种 F₁。同年 12 月, 获得 F₂ 种子。2015 年 3 月在重庆师范大学生命科学学院试验田种植亲本、F₁ 和 F₂ 群体, 在水稻抽穗后调查突变性状分离情况, 记录群体总单株

数、野生/突变型单株数、计算分离比例,并进行卡方检验。

在水稻抽穗期和成熟期考查双亲和 F_1 植株的抽穗期、株高、穗数等 9 类农艺性状表现值,每类性状考查 5 个单株,求平均值用于表征亲本和 F_1 植株农艺性状的表现值。

1.2.2 形态观察 在水稻抽穗期随机选取 Cgr320、武运梗 24、93-11 和武运梗 24/Cgr320 F_1 植株成熟颖花在解剖镜下观察,重点观察它们内外颖、花丝、花药、雄蕊、雌蕊、柱头和子房等花器官的形态特征和数目结构变异情况并拍照保存。

1.2.3 育性检测 采用碘化钾染色法,在水稻抽穗扬花期随机摘取 Cgr320、武运梗 24 和武运梗 24/Cgr320 F_1 植株数朵即将开花的颖花,用 1% I_2 -KI 染液染色,在 10 倍显微镜(OLYMPUS, CX21, Japan)镜下观察花药染色深度和花粉粒外形特征,判断花粉育性情况,并统计可育性比例,以武运梗 24 作对照。

1.2.4 DNA 提取、PCR 扩增和 PAGE 凝胶电泳 在水稻抽穗期采集水稻 Cgr320、武运梗 24 及其 F_2 群体籽粒簇生和非簇生单株叶片,在液氮中碾磨至粉末状,用 CTAB 法^[26]提取全基因组 DNA,溶解在适量 ddH₂O 中,用作 PCR 反应的模板。20 μ L PCR 反应体系:包括 DNA 模板 2 μ L,前后引物混合液(10 pmol/mL)2 μ L, dNTP(2.5 mmol/mL)1 μ L, PCR 缓冲液(含 Mg^{2+})2 μ L, Taq 酶(5 U/ μ L)0.1 μ L, ddH₂O 12.8 μ L。PCR 扩增程序为:94 $^{\circ}$ C 预变性 3 min, 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 55 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min, 总循环数 30 个,最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min。退火温度根据引物的熔解温度(T_m)作适当调整,PCR 产物经 8% 聚丙烯酰胺凝胶电泳检测、0.5% AgNO₃

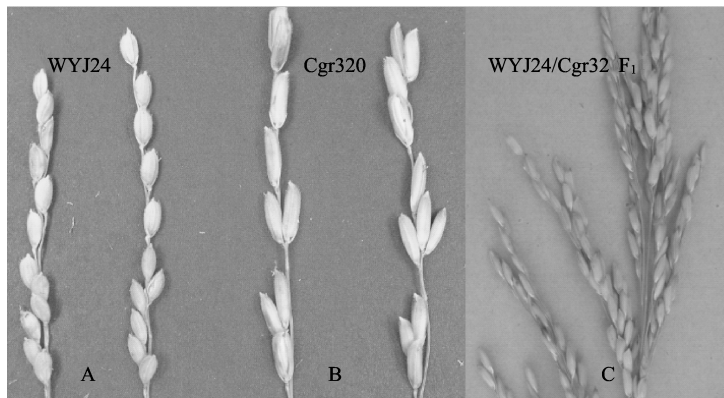
溶液银染、甲醛和 NaOH 溶液显色、拍照并统计分析基因型。

1.2.5 遗传偏分离分析 所用 450 对 SSR 引物由上海英俊生物技术有限公司合成,引物序列信息来源于 www. gramene. org 网站。首先用 450 对 SSR 引物对供试亲本进行多态检测,借助基因图位克隆策略,然后用多态性 SSR 引物对武运梗 24/Cgr320 22 个 F_2 籽粒簇生(隐性)单株进行遗传连锁分析,根据多态性标记所扩增簇生(隐性)单株电泳带型来确定控制簇生性状基因所在水稻连锁群,根据卡方测验值判定单个标记遗传分离规律。所有数据采用 Microsoft Excel 2003 软件完成处理, DPS 统计软件进行统计分析单个标记的基因型频率。

2 结果与分析

2.1 突变体形态特征

从图 1 可以看出,突变体 Cgr320 主穗轴或小穗枝梗顶部籽粒簇生双粒,比普通栽培稻穗顶部多长出 1 粒稻谷。分别比较 Cgr320、武运梗 24、93-11 重要农艺性状表现间差异(表 1), Cgr320 穗长、穗粒数、千粒重和着粒密度等 4 类性状表现值介于武运梗 24 和 93-11 之间,分别为 18.3 cm、145、30.10 g、7.82 粒/cm。抽穗期 95 d,略早于武运梗 24 和 93-11。株高 95.50 cm,略低于武运梗 24 和 93-11。穗数和结实率分别为 9.70 和 87.50%,略高于武运梗 24 和 93-11。总之, Cgr320 突变性状仅表现在穗顶部簇生双粒,其他农艺性状与普通栽培稻差异不显著。簇生性状在武运梗 24/Cgr320 和 93-11/Cgr320 F_1 植株表现为非簇生,其余 9 类农艺性状表现值介于双亲之间,呈中亲遗传。



A: 武运梗 24 籽粒; B: 突变体 Cgr320 籽粒; C: 武运梗 24/Cgr320 F_1 植株籽粒

A: grain of WYJ24, B: grain of cgr320, C: grain of WYJ24/Cgr320 F_1 plants

图 1 突变体 Cgr320、武运梗 24 和武运梗 24/Cgr320 F_1 植株籽粒的形态特征

Fig. 1 Morphology of the grain in the WYJ24, Cgr320 and WYJ24/Cgr320 F_1 plants

表 1 Cgr320 和普通栽培稻农艺性状表现

Table 1 Comparison of several main agronomic traits between Cgr320 and other rice cultivated varieties

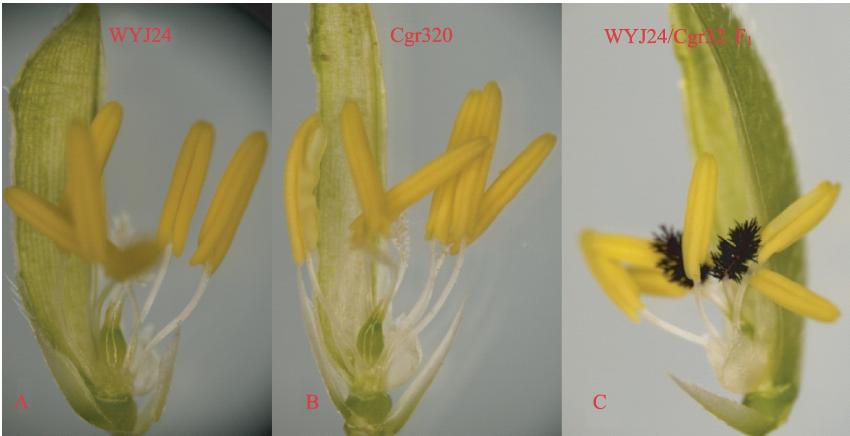
性状 Traits	Cgr320	武运粳 24 WYJ24	93-11	武运粳 24/Cgr320 F ₁ 植株 WYJ24/Cgr320 F ₁ plants	93-11/Cgr320 F ₁ 植株 93-11/Cgr320 F ₁ plants
抽穗期(d) Heading days	95	110	105	107	100
株高(cm) Plant height	95.50	100.80	110.50	105.00	112.80
穗数 Number of panicle per plant	9.70	8.50	7.80	9.50	8.65
穗长(cm) Panicle length	18.30	16.50	19.73	20.50	21.50
穗粒数 Number of grains per panicle	145.45	125.56	165.80	158.60	169.80
结实率(%) Seed-setting rate	87.50	85.30	84.90	86.80	83.50
千粒重(g) 1000-grain weight	30.10	25.40	30.59	28.5	31.50
着粒密度 Grain setting density	7.82	7.58	8.20	7.7	7.40
籽粒簇生双粒 Clustered grain rice	有	无	无	无	无

2.2 突变体镜检观察

突变体 Cgr320 解剖镜检观察发现,与对照武运粳 24 相比,突变体 Cgr320 和武运粳 24/Cgr320 F₁ 植株内外颖发育正常。突变体 Cgr320 子房正常发育,单子房、未发现外形畸变或巨变,胚囊发育正常,子房发育正常,与武运粳 24 子房发育一样,且能在 F₁ 植株正常表现(图 2A、B)。突变体 Cgr320 柱头发育正常,白色双柱头,与武运粳 24 柱头颜色相同,F₁ 植株柱头为黑色。突变体 Cgr320 花丝正常发育,白色花丝,在 F₁ 植株中表现正常。突变体 Cgr320 花药为 6 枚,表现为黄色,F₁ 植株花药正常,为蛋黄色。总之,突变体 Cgr320 内外颖、子房、

胚囊、花药、花丝和柱头都没发现数目与形态结构的异常变异。

花粉粒碘化钾染色镜检结果表明,Cgr320 花粉发育正常,花粉可育率达 96%(图 3A),染色较淡。武运粳 24 花粉发育正常,花粉可育率达到 94%(图 3B),染色较深。Cgr320 与武运粳 24 花粉可育率差异不显著。Cgr320 能在自然环境条件下正常开花结实,且能在多年多环境下稳定遗传表现。同时,武运粳 24/Cgr320 F₁ 植株花粉可育率达 80%,表现出正常开花结实(表 1)。总之,Cgr320 花药花粉粒发育正常,且能随种子稳定遗传,没有观察到花药花粉发育异常的情况。



A:武运粳 24 颖花;B:突变体 Cgr320 颖花;C:武运粳 24/Cgr320 F₁ 植株颖花

A: A floret of WYJ24, B: the floret of cgr320, C: A the floret of WYJ24/Cgr320 F₁ plants

图 2 突变体 Cgr320、武运粳 24 和武运粳 24/Cgr320 F₁ 植株颖花的形态特征

Fig. 2 Morphology of the floret in the Cgr320, WYJ24 and WYJ24/Cgr320 F₁ plants

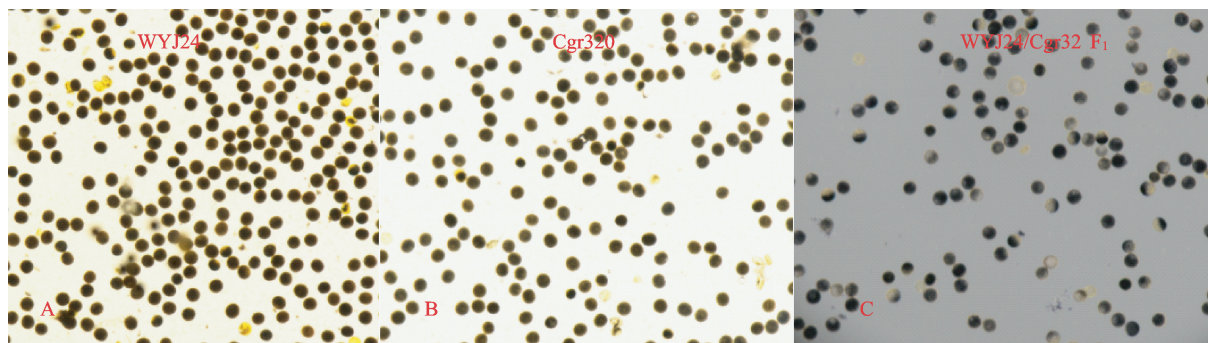
2.3 突变性状的遗传分析

在水稻成熟期调查亲本、武运粳 24/Cgr320 和武运粳 24/Cgr320 F₁ 植株主穗轴、小穗枝梗穗顶部簇生性状、株高、分蘖数等 9 类农艺性状。结果表明,所有 F₁ 植株穗顶部籽粒簇生性状表现为野生型

(非簇生),该性状由隐性基因控制。调查发现武运粳 24/Cgr320 119 个 F₂ 单株中分离出 65 个非簇生和 54 个簇生单株。调查 93-11/Cgr320 F₂ 532 个单株,同样发现该 F₂ 群体中分离出 289 个非簇生和 243 个簇生单株,分别统计两个群体两类性状表型

单株的数量。经过卡方 $X^2_{(3:1)}$ 检验,两群体中子粒非簇生和簇生 2 种表型植株分离比例严重偏离孟德尔

遗传分离(3:1)比例(表 2),卡方测验值 $X^2_{(3:1)}$ 分别为 7.71 和 144.87。



A: Cgr320 花粉可育率 96%; B: 武运梗 24 花粉可育率 94%; C: 武运梗 24/Cgr320 F₁ 植株花粉可育率 80%

A: Pollen with a fertility rate of approximate 96% in Cgr320; B: Pollen with a fertility rate of approximate 94% in WYJ24

C: Pollen with a fertility rate of approximate 96% in the WYJ24/Cgr320 F₁ plants

图 3 突变体 Cgr320、武运梗 24 和武运梗 24/Cgr320 F₁ 植株花粉育性特征

Fig. 3 Morphology of pollen fertility in the Cgr320, WYJ24 and WYJ24/Cgr320 F₁ plants

表 2 Cgr30 籽粒簇生性状的遗传分析

Table 2 Genetic analysis of Clustered grain rice Cgr320

组合 Cross	F ₁ 表型 Phenotype of F ₁ plants	F ₂ 群体 F ₂ population			$X^2_{(3:1)}$	$X^2_{(0.05,2)}$
		总单株数	籽粒非簇生单株	籽粒簇生单株		
		No. of plants	Wild type	Cgr320		
武运梗 24/Cgr320	野生型 Wild type	119	65	54	7.71	5.991
93-11/Cgr320	野生型 Wild type	532	279	253	144.87	

2.4 遗传偏分离分析

用 450 对均匀分布在水稻 12 条染色体上的 SSR 标记筛选亲本间多态性,由于武运梗 24/Cgr320 多态性最丰富,有 155 对多态性标记,将该群体作为籽粒簇生性状基因遗传连锁分析群体。随机选取水稻第 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11 和 12 染色体上 12 对 SSR 引物对 F₂ 群体 22 个簇生(隐性)单株进行遗传连锁分析(表 3)。结果发现,第 12 染色体上 RM27706 标记能在 22 个 F₂ 簇生单株中扩增出 18 个单株带型与亲本武运梗 24 相同(图 4 和表 4),基因型频率值为 81.82%,卡方测验值 $X^2_{(1:2:1)}$ 为 172.31,该标记极显著偏离孟德尔定律(1:2:1)分离比,且极显著偏向武运梗 24。RM3762、M3217、RM249、RM20155、RM3325、RM22418 和 RM1146 能在 22 个簇生单株中扩增出 17 个单株带型与武运梗 24 相同,基因型频率值同样极显著偏向武运梗 24; RM493、RM1338、RM6797 和 RM7557 能在 22 个簇生单株中扩增出 16 个单株带型与武运梗 24 相同,卡方测验值 $X^2_{(1:2:1)}$ 分别为 122.73、122.73、122.73 和 124.71。综合以上分析,随机选取水稻 12 条染色体上 12 对 SSR 引物所扩增 22 个 F₂ 簇生(隐性)

单株带型都呈现出严重偏离孟德尔定律(1:2:1)比例,且偏离方向为武运梗 24,卡方测验值 $X^2_{(1:2:1)}$ 大于 $X^2_{(0.05,2)}$ 临界值 5.991。

为了进一步验证簇生性状偏分离遗传的真实性,我们利用上述 12 对 SSR 引物对随机选取武运梗 24/Cgr320 22 个籽粒非簇生(显性) F₂ 单株进行遗传分析(图 5 和表 5)。结果表明:仅第 3 染色体上标记 RM1338 扩增 22 个 F₂ 粒非簇生单株的基因型频率值遵循经典(1:2:1)遗传规律,卡方测验值 $X^2_{(1:2:1)}$ 为 0.41。RM493、RM3762、RM3325、RM22418、RM6797、RM1146、RM7577 和 RM27706 标记扩增 22 个 F₂ 非簇生单株基因型频率卡方值 $X^2_{(1:2:1)}$ 分别为 9.09、14.04、14.13、10.32、10.32、10.32、14.13 和 7.44; RM3217、RM249 和 RM20155 基因型频率卡方值 $X^2_{(1:2:1)}$ 分别为 23.54、33.88 和 27.27。这些标记卡方测验值大于 $X^2_{(0.05,2)}$ 临界值 5.991,极显著偏离孟德尔(1:2:1)遗传定律。其中, RM3762、RM3217、RM22418 和 RM6797 标记遗传偏向武运梗 24; RM493、RM249、RM3325 和 RM7557 标记遗传偏向杂合体; RM20155、RM1146 和 RM27706 基因型频率偏向亲本 Cgr320。

表 3 Cgr320 簇生性遗传分析标记

Table 3 some molecular markers for Cgr320 genetic analysis

引物	染色体	物理位置 (bp)	前引物 (5'-3')	后引物 (3'-5')
Primer	Chromosome	Genomic position	Forward primer	Reverse primer
RM493	1	12281334	TAGCTCCAACAGGATCGACC	GTACGTAAACGCGGAAGGTG
RM3762	2	22462453	GACGGGTCAGCTACCGTAAG	TCCCCCTCTAAAACCCCTAG
RM1338	3	8393670	GAAGGGATTCAAGGGGTAGG	TCCAGTCATCCCTGTGAAAG
RM3217	4	30302551	GTTGCAAGGTTGCAACACAG	GTGGCAGCCAAGATGGAC
RM249	5	10755704	GGCGTAAAGGTTTTGCATGT	ATGATGCCATGAAGGTCAGC
RM20155	6	19613300	GTCTCGTCTCGTCGTCTTCTCC	CCTCTAACCTCGTCGGAATCG
RM3325	7	2218259	GGAGCCCTGAACTTTTGTG	GGGAATCCTACTTGCTTCC
RM22418	8	3321115	GCAGTATCACGCAGTAGCACACC	CCATCTCTTCCTCATCACAG
RM6797	9	22712967	CCTCCTCCATCAGGATCATC	GCTAGGTTGAATGCCCGTAC
RM1146	10	19688135	ACCCCGATGATCGATTGTAC	CCCTATTCCCGTGAAATCG
RM7557	11	2344648	GTGTACTGCCATGAAAGGCC	GAAGTGCCTTTGCAAGAGAG
RM27706	12	5029856	ACTCCCTCCGACACCATCATCC	ATACGGGAACCTCACCCTACC

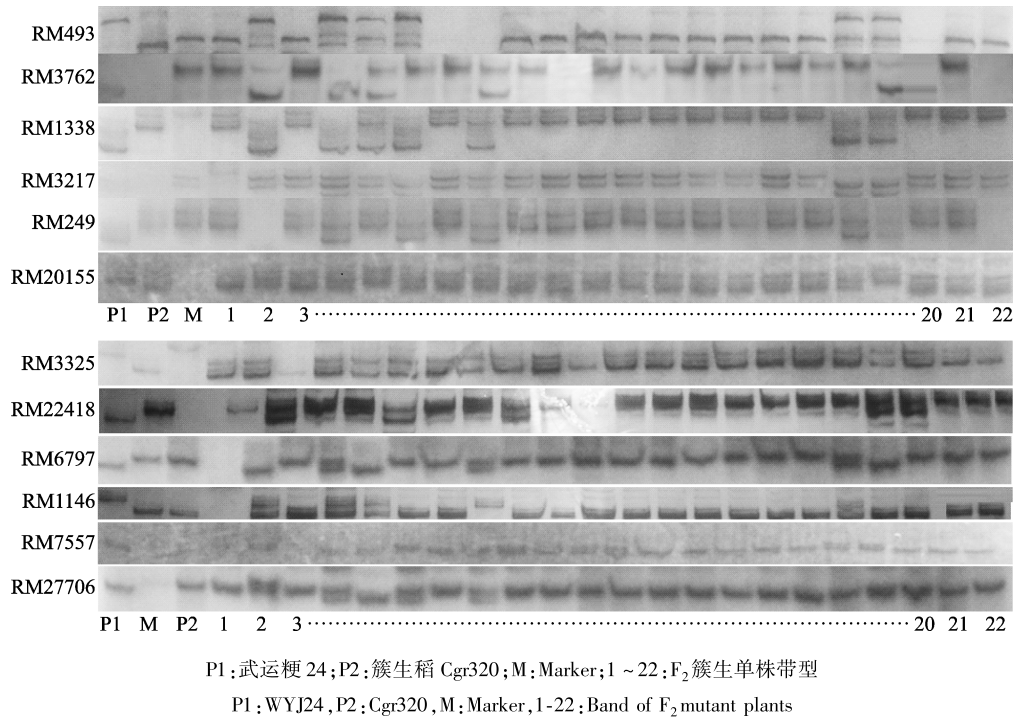


图 4 SSR 标记在武运粳 24/Cgr320 F₂ 簇生单株的遗传分离

Fig. 4 Genetic segregation of SSR marker in the WYJ24/Cgr320 F₂mutant plants

总之,本研究选用水稻 12 条染色体上 12 个 SSR 标记分别对武运粳 24/Cgr320 22 个 F₂籽粒簇生和非簇生单株进行分析。结果表明,12 个 SSR 标记在 22 个 F₂籽粒簇生和非簇生单株中都存在不同程度的遗传偏分离。但仔细分析分子数据,不难发现 12 个 SSR 标记扩增 22 个簇生单株基因型频率遗传偏分离程度远不及这些标记在 22 个非簇生单株基因型频率,且簇生单株小群体偏分离方向不一致,呈无规律遗传偏离, RM3762、RM3217、RM22418 和 RM6797 标记偏向武运粳 24, RM493、RM249、RM3325 和 RM7557 标记偏向杂合体, RM20155、RM1146 和 RM27706 标

记偏向 Cgr320。然而,所有 12 个 SSR 标记在簇生单株小群体中都存在极为严重的遗传偏分离,且偏分离规律一致,都极其显著偏向武运粳 24。

3 讨论

3.1 水稻簇生性状的遗传

前人研究报道的水稻簇生突变体主要归为两大类:即顶小穗双粒和三粒突变型^[14-15,18-20]。本研究选用簇生材料为穗顶部簇生双粒突变体,该材料与多子房突变体形态差异较大,属于不同类遗传表型突变体。突变体 Cgr320 每颗籽粒内外颖、子房、柱

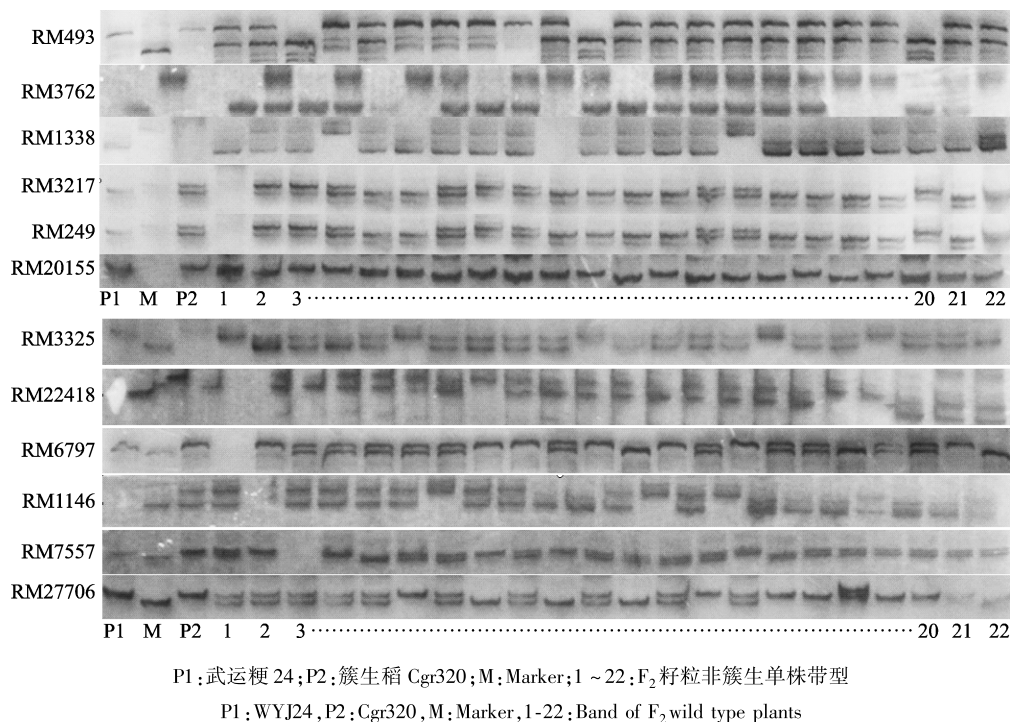


图 5 SSR 标记在武运梗 24/Cgr320 F₂ 籽粒非簇生单株中分离

Fig. 5 Genetic segregation of SSR marker in the WYJ24/Cgr320 F₂ wild type plants

头发育均表现正常,花药和花丝均未发现数目和与形态结构突变,能正常开花结实,谷粒充实饱满度好,籽粒细长,簇生双粒谷与非簇生单粒谷的外形大小无差异。因此,该突变材料将为水稻籽粒簇生性状遗传分子生物学研究提供遗传资源。目前,多数研究者认为水稻籽粒簇生性状由不完全显性的单基因控制。陈红旗等^[16]和张毅等^[19]研究发现 F₂ 非簇生比例超过 1/4 的遗传现象。然而,田翠等^[20]研究中发现 F₂ 群体呈 3:1 显隐性遗传,该性状受 1 对不完全显性基因控制。本研究发现 Cgr320 簇生性状在 F₁ 植株中表现为野生型,按照经典孟德尔遗传理论推定该性状受隐性基因控制,但在 F₂ 群体中呈 (1:1) 显/隐性遗传分离。按照经典遗传学理论从性状表现 (1:1) 去推定该性状由 Aa 配子控制,倘若 F₁ 植株的簇生性状由 Aa 配子控制则该性状在 F₁ 植株应该表现为突变型,而 F₁ 植株簇生性状的田间表现为野生型,这有悖于孟德尔遗传自由组合和分离规律。本研究结论与前人研究报告差异较大,这种不一致的遗传现象可能源于以下 2 种因素:(1) Cgr320 簇生性表型由多个基因突变所致;(2) 在构建杂交组合时非簇生亲本携带有影响簇生性状遗传外在表现的内在遗传因子。因此,其深层次的遗传机制有待进一步研究。

3.2 水稻簇生性的遗传偏分离

偏分离是生物界广泛存在的一种遗传现象,指

在一个分离群体中观察到的基因型比例显著偏离预期孟德尔分离规律的现象,难以用经典遗传学理论与方法加以分析^[27-29]。偏分离可以增加群体中杂合等位基因或者异型染色体的频率,一直被认为是生物进化的主要动力之一^[30-31]。自 1926 年 P. C. Mangelsdorf 等^[31]在玉米研究中首次发现偏分离现象后,国内外学者利用分子标记绘制分子遗传图谱来开展 QTLs 定位研究时发现大量偏分离位点分布在连锁群上。迄今为止,人们已在水稻、小麦、玉米等农作物中发现了偏分离位点^[32-40]。现有研究报道的偏分离位点的偏离形式主要有 2 种:一种是无规律的随机偏向任何亲本或杂合体;另一种是多数偏分离位点偏离方向一致^[41]。比较分析前人有关遗传偏分离的研究报道,不难看出已有偏分离研究主要集中在 RIL、DH 和 F₂ 遗传作图群体。目前,在基因定位研究的 F₂ 隐性群体中报道的遗传偏分离较少。本研究的初衷尝试运用图位克隆技术定位水稻籽粒簇生性基因,笔者随机选用水稻 12 条染色体上的 12 对 SSR 标记扩增 F₂ 簇生(隐性)单株,发现 12 对 SSR 标记都极显著遗传偏向武运梗 24,按照国内外水稻基因定位研究学者的经验,若多态性标记在 10 个簇生(隐性)单株中能扩增出 7 个单株带型与隐性亲本一致,则该标记与目标基因存在连锁的可能性较大。为此,本研究选用 12 个不同连锁群

表 4 武运粳 24/Cgr320 F₂ 群体簇生单株基因型分析

Table 4 Genotypes of SSR markers in the WYJ24/Cgr320 F₂ mutant plants

标记	染色体	物理位置 Chr. (bp) Gp	武运粳 24/Cgr320 F ₂ 群体突变单株基因型																						基因型频率 (%) (A: H: B)		X ² _(1:2:1)	X ² _(0.05,2)
			Genotypes of SSR marker in the F ₂ mutant plants of WYJ24/Cgr320 population																									
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	Genotype frequency			
RM493	1	12281334	B	A	B	A	H	A	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	H	H	B	B	B	13. 64: 13. 64: 72. 73	122. 73			
RM3762	2	22462453	B	H	B	A	H	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	H	B	4. 55: 18. 18: 77. 27	146. 26			
RM1338	3	8393670	B	A	B	A	H	B	A	H	B	B	B	B	B	B	B	B	H	B	B	B	B	13. 64: 13. 64: 72. 73	122. 73			
RM3217	4	30302551	B	B	B	H	H	A	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	H	H	B	B	B	4. 55: 18. 18: 77. 27	146. 15			
RM249	5	10776494	B	B	B	H	B	H	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	H	B	B	B	0. 00: 22. 72: 77. 27	149. 17			
RM20155	6	19613300	B	H	B	H	B	B	B	B	B	B	B	B	H	B	B	B	H	B	B	H	B	0. 00: 22. 72: 77. 27	149. 17			
RM3325	7	2218259	B	B	B	H	H	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	H	B	H	B	B	B	0. 00: 31. 82: 68. 18	106. 19			
RM22418	8	3321115	B	H	B	B	H	B	B	H	B	B	B	B	B	B	B	B	H	H	B	B	B	0. 00: 22. 72: 77. 27	149. 17			
RM6797	9	22712967	B	A	B	H	A	B	B	H	B	B	B	B	B	B	B	B	H	A	B	B	B	13. 64: 13. 64: 72. 73	122. 73			
RM1146	10	19688135	B	H	B	H	H	B	B	A	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	H	B	4. 55: 18. 18: 77. 27	146. 15			
RM7557	11	2344648	B	H	H	B	H	B	B	H	B	B	B	B	B	B	B	B	H	H	B	B	B	0. 00: 27. 27: 72. 73	124. 71			
RM27706	12	5029856	B	B	B	H	A	H	B	H	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	4. 55: 13. 64: 81. 82	172. 31			

A: Cgr320 基因型; H: 杂合基因型; B: 武运粳 24 基因型, 下同
A: Cgr320 Genotype, H: Heterogous, B: WYJ24 genotype; the same as below

表 5 武运粳 24/Cgr320 F₂ 非簇生性单株基因型分析

Table 5 Genotypes of SSR marker on rice in the WYJ24/Cgr320 F₂ wild type plants

标记 Marker	染色体 Chr.	物理位置 (bp) Gp	武运粳 24/Cgr320 F ₂ 群体非簇生单株基因型																						基因型频率(%) (A: H: B)		X ² _(1:2:1)	X ² _(0.05,2)
			Genotypes of SSR marker in the F ₂ wild type plants of WYJ24/Cgr320 population																									
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	Genotype frequency			
RM493	1	10811135	H	H	B	A	H	A	A	A	H	B	H	H	H	H	H	H	H	B	H	H	H	H	22.73:63.64:13.64	9.09		
RM3762	2	22462453	A	H	A	H	A	B	A	A	B	A	A	H	H	H	H	B	B	A	H	B	B	B	B	40.90:36.36:22.72	14.04	
RM1338	3	9206570	A	H	A	B	H	A	H	H	B	H	H	H	H	B	A	A	A	H	H	B	B	B	B	27.27:50.00:22.73	0.41	
RM3217	4	12831501	H	B	B	H	A	A	H	B	H	A	A	A	H	H	A	A	A	A	B	H	B	B	B	45.45:31.82:22.73	23.54	
RM249	5	10776494	B	B	B	B	H	H	H	H	B	H	H	H	H	B	H	H	H	H	H	B	B	B	B	0:63.64:36.36	33.88	
RM20155	6	16272091	H	A	B	B	H	H	B	B	B	A	B	A	A	A	A	B	A	B	H	H	B	B	B	27.27:27.27:45.45	27.27	
RM3325	7	16871728	A	B	H	B	H	A	H	H	H	A	H	H	H	H	A	A	H	A	H	H	A	A	A	27.73:63.64:9.10	14.13	
RM22418	8	3321115	A	A	A	H	H	H	A	B	H	A	H	H	A	H	H	A	B	B	A	H	H	H	H	36.36:50.00:13.64	10.32	
RM6797	9	16580764	A	A	H	H	H	H	A	A	H	A	B	A	H	A	H	H	B	B	H	H	A	B	B	36.36:50.00:13.64	10.32	
RM1146	10	19688135	H	H	H	H	H	A	H	H	B	B	H	A	H	A	B	B	B	B	H	B	B	H	H	13.64:50.00:36.34	10.32	
RM7557	11	2344648	A	H	A	A	B	H	H	A	H	A	H	H	H	A	B	H	H	H	H	H	H	H	H	27.27:63.64:9.10	14.13	
RM27706	12	17750076	B	B	B	B	H	B	H	A	H	A	H	A	B	H	H	H	H	H	B	A	B	A	B	18.18:45.45:36.36	7.44	

的 SSR 标记都与簇生性状基因存在连锁,就很难判断目标基因所在水稻连锁群上的物理位置。目前,单基因定位研究中有关 F_2 隐性群体中遗传偏分离现象的报道较少,其原因可能与胚子体或孢子体的选择^[42]或染色体重排有关^[43]。本研究在开展水稻籽粒簇生基因定位中发现遗传偏分离现象,仅对该遗传偏分离现象进行描述性的报道,这种新的遗传现象将丰富水稻遗传学研究内容。希望给正在开展作物重要农艺性状基因挖掘的同仁们提供参考信息,但导致偏分离的原因有待进一步研究。

谢辞:感谢江苏省农业科学粮食作物研究所张启军博士提供水稻簇生材料 Cgr320。

参考文献

- [1] 程式华. 中国超级稻育种[M]. 北京: 科学出版社, 2010, 38-42
- [2] 袁隆平. 水稻的雄性不孕性[J]. 科学通报, 1966, 17(4): 185-188
- [3] 曾千春, 周开达, 朱祯, 等. 中国水稻杂种优势利用现状[J]. 中国水稻科学, 2000, 14(4): 243-246
- [4] Li Q B, Wang D, Dong H, et al. Rice APC/CTE controls tillering by mediating the degradation of monoculm1 [J]. Nat Commun, 2012, DOI:10. 1038/ncomms 1716
- [5] Xu C, Wang Y, Yu Y, et al. Degradation of MONOCULM 1 (MOC1) by APC/CTAD1 regulates rice tillering[J]. Nat Commun, 2012, DOI:10. 1038/ncomms 1743
- [6] Motoyuki A, Hitoshi S, Shaoyang L, et al. Cytokinin Oxidase Regulates Rice Grain Production[J]. Science, 2015, 309(741): 741-745
- [7] Mao H L, Sun S Y, Yao J L, et al. Linking differential domain functions of the GS3 protein to natural variation of grain size in rice[J]. PNAS, 2010, 107(45): 19579-19584
- [8] Song X J, Huang W, Shi M, et al. A QTL for rice grain width and weight encodes a previously unknown RING-type E3 ubiquitin ligase[J]. Nature Genetics, 2007, 39: 623-630
- [9] Weng J F, Gu S H, Wan X Y, et al. Isolation and initial characterization of GW5, a major QTL associated with rice grain width and weight[J]. Cell Research, 2008, 18(12): 1199-1209
- [10] Hu J, Wang Y X, Fang Y X, et al. A rare allele of GS2 enhances grain size and grain yield in rice[J]. Molecular plant, 2015, 8(10): 1455-1465
- [11] Wang Y X, Xiong G S, Hu J, et al. Copy number variation at the GL7 locus contributes to grain size diversity in rice[J]. Nature Genetics, 2015, 47: 944-948
- [12] Li S C, Li W B, Huang B, et al. Natural variation in PTBI regulates rice seed setting rate by controlling pollen tube growth[J]. Nat Commun, 2013, DOI:10. 1038/ncomms 3793
- [13] 刘坚, 陶红剑, 施思, 等. 水稻穗型的遗传和育种改良[J]. 中国水稻科学, 2012, 26(2): 227-234
- [14] Jodon N E. Inheritance of some of the more striking characters in rice[J]. J Hered, 1957, 48: 181-192
- [15] Nagao S, Takahashi M E. Trial construction of twelve linkage groups in Japanese rice (Genetical studies on rice plant, XXVII) [J]. J Fac Agric Hokkaido Univ, 1963, 53: 72-130
- [16] 陈红旗, 刘刚, 朱旭东, 等. 水稻簇生穗突变体的鉴定及遗传[J]. 南京农业大学学报, 2002, 25(3): 116-118
- [17] Thanga P R, Thiagarajan K. Inheritance of floral traits in spontaneous mutant in rice (*Oryza sativa* L.) [J]. Current Science, 2004, 87: 1051-1052
- [18] 郑雷英, 朱旭东, 钱前, 等. 水稻穗部突变体 Cl 的形态和定位分析[J]. 科学通报, 2003, 48: 264-267
- [19] 张毅, 沈福成, 杨正林, 等. 水稻籽粒簇生材料 Z1820 簇生性的遗传分析[J]. 中国农学通报, 2005, 21(7): 64-72
- [20] 田翠, 张涛, 蒋开锋, 等. 水稻小穗簇生突变体的遗传分析及其基因的初步定位[J]. 分子植物育种, 2010, 8(1): 29-34
- [21] Mai K, Atsushi C, Yasuo N, et al. FRIZZY PANICLE is required to prevent the formation of axillary meristems and to establish floral meristem identity in rice spikelets[J]. Development, 2003, 130(16): 3841-3850
- [22] Motoyuki A, Hitoshi S, Shaoyang L, et al. Cytokinin oxidase regulates rice grain production[J]. Science, 2005, 309(741): 741-745
- [23] Kyoko I, Momoyo I, Nobuhiro N, et al. Rice ABERRANT PANICLE ORGANIZATION 1, encoding an F-box protein, regulates meristem fate[J]. The Plant Journal, 2007, 51(6): 1030-1040
- [24] Huang X Z, Qian Q, Liu Z B, et al. Natural variation at the DEPI locus enhances grain yield in rice[J]. Nature Genetics, 2009, 41: 494-497
- [25] Jiao Y Q, Wang Y H, Xue D W, et al. Regulation of OsSPL14 by OsmiR156 defines ideal plant architecture in rice[J]. Nature Genetics, 2010, 42(6): 541-544
- [26] Murray M G, Thompson W F. Rapid isolation of high-molecular weight plant DNA[J]. Nucleic Acids Research, 1980, 8(19): 4321-4325
- [27] Sano Y. The genic nature of gamete eliminator in rice[J]. Genetics, 1990, 125: 183-191
- [28] Harushina Y, Kurata N, Yano M, et al. Detection of segregation distortions in an indica-japonica rice cross using a high-resolution molecular map[J]. Theor Appl Genet, 1996, 92(2): 145-150
- [29] Lu H, Romero-Severson J, Bemardo R. Chromosomal regions associated with segregation distortion in maize[J]. Theor Appl Genet, 2002, 105: 622-628
- [30] Charlesworth B. Driving genes and chromosomes [J]. Nature, 1988, 332: 394-395
- [31] Mangelsdorf P C, Jones D F. The expression of mendelian factors in the gametophyte of maize[J]. Genetics, 1926, 11: 423-455
- [32] Zhao B, Deng Q M, Zhang Q J, et al. Analysis of segregation distortion of molecular markers in F_2 population of rice [J]. Acta Genetica Sinica, 2006, 33(5): 449-457
- [33] 刘刚, 许盛宝, 倪中福, 等. 小麦 RIL 群体 SSR 标记偏分离的遗传分析[J]. 农业生物技术学报, 2007, 15(5): 828-833
- [34] Konishi T, Yano Y, Abe K. Geographic distribution of alleles at the Ga2 locus for segregation distortion in barley[J]. Theor Appl Genet, 1992, 85: 419-422
- [35] Pereira M G, Lee M, Bramel-Cox P, et al. Construction of an RFLP map in sorghum and comparative mapping in maize[J]. Genome, 1994, 37: 236-243
- [36] 张德水, 陈受宜, 惠东威, 等. 栽培大豆与半野生大豆杂种 F_2 群体中 RFLP 标记的偏分离及其形成原因的分析[J]. 遗传学报, 1997, 24(4): 362-367
- [37] Song X L, Wang K, Guo W Z, et al. A comparison of genetic maps romero-severson J constructed from haploid and BC₁ mapping populations from the same crossing between *Gossypium hirsutum* L × *G. barbadense* L [J]. Genome, 2005, 48(3): 378-390
- [38] 肖炳光, 徐照丽, 陈学军, 等. 利用 DH 群体构建烤烟分子标记遗传连锁图[J]. 中国烟草学报, 2006, 12(4): 35-40
- [39] 于拴仓, 王永健, 郑晓鹰. 大白菜分子遗传图谱的构建及重要农艺性状的 QTL 定位[J]. 中国农业科学, 2003, 36(2): 190-195
- [40] 刘海燕, 催金腾, 高用明. 遗传群体偏分离研究进展[J]. 植物遗传资源学报, 2009, 10(4): 613-617
- [41] 彭勇, 梁永书, 王世全, 等. 水稻 SSR 标记在 RI 群体的偏分离分析[J]. 分子植物育种, 2006, 4(6): 786-790
- [42] Lyttle T W. Segregation distorter[J]. Annu Rev Genet, 1991, 25: 511-557
- [43] Tanksley S D. Linkage relationships and chromosomal locations of enzyme-coding genes in pepper [J]. Capsicum Annual Chromosomal, 1984, 89: 352-360