

水稻矮秆小粒突变体 *dsg-j* 的鉴定及基因定位

金久岩^{1,2}, 姜文洙², 严永峰¹, 吴涛², 朴日花¹, 陈莫军^{1*}, 金成海^{1*}

(1. 吉林省农业科学院, 长春 130033; 2. 吉林大学植物科学学院, 长春 130062)

摘要: 水稻是我国最重要的粮食作物之一, 株高和粒型是决定水稻产量的重要因素。通过挖掘水稻株高和粒型调控基因, 阐明株高和粒型的调控机制对提高水稻产量的重要意义。在水稻品种吉大718的EMS诱变突变体后代中, 筛选出一株矮秆小粒突变体, 命名为dwarf and small grain-JD718(*dsg-j*)。与野生型吉大718相比, 突变体株高变矮, 籽粒变小, 千粒重下降。通过茎秆第一节间切片观察证实, 突变体矮化表型是由细胞变小所致。遗传分析表明, 突变体的表型由隐性单基因控制。进一步利用BSA-Seq分析技术将突变体*dsg-j*基因初步定位在第7染色体。本研究为*dsg-j*基因的克隆及功能分析奠定了基础, 为进一步揭示株高和粒型调控的分子机制提供线索。

关键词: 水稻; 株高; 粒型; 突变体; BSA-Seq 分析

中图分类号: S511

文献标识码: A

文章编号: 2096-5877(2024)02-0011-06

Identification and Gene Mapping of the Dwarf Small-Grain Mutant *dsg-j* in Rice

JIN Jiuyan^{1,2}, JIANG Wenzhu², YAN Yongfeng¹, WU Tao², PIAO Rihua¹, CHEN Mojun^{1*}, JIN Chenghai^{1*}

(1. Jilin Academy of Agricultural Sciences, Changchun 130033; 2. College of Plant Science, Jilin University, Changchun 130062, China)

Abstract: Rice is one of the most important cereal crops in China. Plant height and grain type are crucial factors determining rice yield. Exploring the genes regulating plant height and grain type is of great significance for improving rice productivity. In this study, a dwarf and small grain mutant was screened from the progeny of EMS-induced mutations in the rice variety Jida 718, and it was named dwarf and small grain-JD718 (*dsg-j*). Compared to the wild-type, the mutant exhibited reduced plant height, smaller grains, and decreased thousand-grain weight. Observation of stem internode sections confirmed that the dwarf phenotype was caused by decreased cell size in the mutant. Genetic analysis revealed that the mutant phenotype was controlled by a single recessive gene. Further analysis using BSA-Seq technique preliminarily mapped the *dsg-j* gene to the seventh chromosome. This study laid the foundation for cloning and functional analysis of the *dsg-j* gene, providing clues for further elucidation of the molecular mechanisms underlying plant height and grain type regulation.

Key words: Rice; Height; Grain shape; Mutants; BSA-Seq

水稻是我国主要的粮食作物之一, 对保障国家粮食安全起到重要作用^[1-3]。基于我国人多地少的基本国情, 提高单产是水稻遗传育种研究中的一个迫切需要解决的问题。株高是决定水稻产量

的重要因素。20世纪中叶, 南方籼稻矮化育种对水稻产量提升做出了重要贡献, 被称为水稻育种的“绿色革命”。半矮秆基因 *sd-1* 的广泛应用, 有效降低了水稻的株高, 育成了一大批综合性状良好的水稻品种, 这些品种不仅耐肥抗倒, 产量也有显著提升, 平均产量较高秆品种提高 20%~30%^[4]。水稻株高的遗传机制复杂, 由主效基因控制, 同时也受到微效修饰基因、调节基因的影响^[5]。水稻的株高与植物激素密切相关, 在已克隆的株高基因中, 与赤霉素有关的有 *sd1*^[6]、*EUI1*^[7]、*OsRPH1*^[8]、*SGL*^[9]等, 与油菜素内酯有关的有 *OsBZR1*^[10]、*OsGSK1*^[11]、*OsWRKY53*^[12]、*DLT*^[13]等, 与生

收稿日期: 2024-01-04

基金项目: 吉林省农业科技创新工程项目(KYJF2023DX001); 吉林省科技发展计划项目(20210302007NC)

作者简介: 金久岩(1998-), 男, 在读硕士, 主要从事水稻生物育种研究。

通讯作者: 陈莫军, 男, 博士, 副研究员, E-mail: chmj123@126.com
金成海, 男, 硕士, 副研究员, E-mail: jinchhai77@126.com

长素有关的有 *OsGH3.8*^[14]、*OsSPL7*^[14-15]、*qTGW3*^[16]等。这些基因直接参与或调控植物激素的合成与信号转导,进而影响水稻的株高。

尽管目前已经克隆了多个与水稻株高相关的基因,但多数基因在导致株高变矮的同时会出现籽粒变小、植株整体发育异常等不良性状,限制了其在育种中的应用。迄今为止,生产上利用的控制株高的基因几乎全是半矮秆基因 *sd-1*,而单一基因的长期应用势必诱发遗传脆弱性。因此,发掘、鉴定更多的控制水稻株高的基因,并进行基因定位、克隆及作用机理研究,对水稻株高基因资源的丰富和理想株型的构建具有重要的理论意义和应用价值。水稻品种吉大718经EMS诱变后,出现一个矮秆小粒突变体,连续种植该突变体,考察其株高、粒型及其他相关农艺性状,矮秆小粒性状可稳定遗传,且表型稳定一致,命名该突变体为 dwarf and small grain-JD718(*dsg-j*)。展开对 *dsg-j* 基因的定位研究,丰富了水稻株高的调控网络。

1 材料与方法

1.1 试验材料

突变体材料是由水稻品种吉大718经甲基磺酸乙酯(EMS)化学诱变处理后,筛选得到的一个水稻矮秆小粒突变体,连续多代自交后稳定遗传,命名为 dwarf and small grain-JD718(*dsg-j*)。吉大718(WT)由吉林大学植物科学学院培育,2013年通过国家水稻品种区域试验,审定编号为:国审稻2013043。

1.2 农艺性状调查

在吉林省长春市吉林大学农业实验基地种植突变体 *dsg-j* 和吉大718。按小区种植,每个小区种植10行,行距30 cm,株距20 cm。对于所有种植区域实施相同水平的田间管理。在水稻整个生长期进行详细的农艺性状观察,并做好记录。

茎秆节间长度和株高的测定:2022年,将吉大718和突变体 *dsg-j* 同时种植于吉林大学农业实验基地,齐穗后测量茎秆节间长度和株高,分别测量20株和10株,取平均值。

籽粒性状测定:籽粒成熟后,取吉大718和突变体 *dsg-j* 稻谷各20粒,利用游标卡尺测量粒长、粒宽、粒厚;利用数粒仪分别取1 000粒吉大718和突变体 *dsg-j* 籽粒称重,取平均值记作千粒重。

穗部性状考察:取吉大718和突变体 *dsg-j* 的稻穗各10个,测量穗长。

1.3 茎秆节间的细胞学观察

在始穗期(5%出穗),取吉大718和 *dsg-j* 第一

节间,用FAA固定液进行固定,制成石蜡切片,观察细胞长度、宽度和体积。石蜡切片的具体制作参考Wu等^[9]的方法。

1.4 群体构建及遗传分析

将突变体 *dsg-j* 作为母本,与吉大718进行杂交获得F₁,自交后得到F₂分离群体,统计F₂分离群体中个体的表型及分离比,用Excel 2016进行连续性矫正下的卡方检验。

1.5 BSA分析

从 *dsg-j*/吉大718的F₂分离群体中,筛选出极端株高个体(野生型表型和突变体表型)各30个单株,通过CTAB法提取每个单株的DNA,做好分类和编号,然后再利用NanoDrop 2000(cThermo Scientific)仪器检测DNA浓度和质量,符合标准后,将其等量混合,构建极端混池W-pool(野生型表型)和M-pool(突变体表型)。利用野生型吉大718、突变体 *dsg-j* 及极端混池(W-pool和M-pool)进行重测序。BSA文库构建测序和数据处理均委托北京百迈客生物科技有限公司完成。

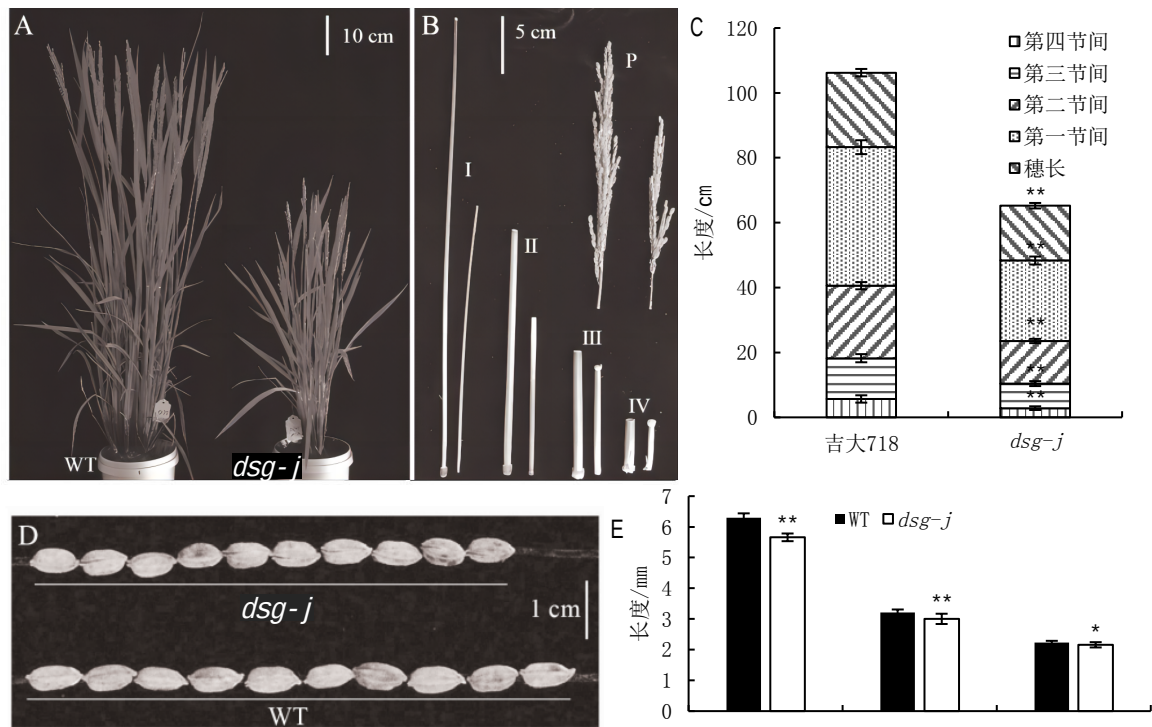
2 结果与分析

2.1 突变体 *dsg-j* 的表型鉴定

粳稻品种吉大718经EMS诱变后获得突变体 *dsg-j*。与野生型相比,突变体 *dsg-j* 株高变矮、籽粒变小。抽穗后,吉大718株高为109.15 cm,而突变体 *dsg-j* 株高仅为69.39 cm,降低了36.43%(图1A、表1)。取突变体和野生型的主穗茎秆,调查节间数目,并测量各个节间长度。结果发现,突变体和野生型具有相同的茎秆节间数,但突变体各节间长度均较野生型有不同程度的缩短,其中,第一节的节间长度缩短最为明显(图1B、图1C)。

在籽粒性状上,突变体和野生型也存在较大差异。突变体的谷粒长度和宽度较野生型均有极显著降低,成熟吉大718的谷粒平均粒长和粒宽分别为6.30 mm和3.24 mm,而突变体的平均粒长和粒宽分别为5.66 mm和3.00 mm;突变体和野生型的平均粒厚分别为2.16 mm和2.24 mm,两者也存在显著差异(图1D、图1E、表1)。籽粒形态上的差异导致突变体 *dsg-j* 的千粒重显著低于吉大718(表1)。

此外,突变体的穗部性状也发生了变化。相较于野生型,突变体 *dsg-j* 的穗型并没有明显变化,但穗长却极显著缩短(图1B、表1),有效穗数也显著减少(表1)。



注: A 为抽穗后, 吉大 718 和 *dsg-j* 的植株表现, 比例尺为 10 cm; B 为吉大 718 和 *dsg-j* 各节间和稻穗表现, 比例尺为 5 cm; C 为吉大 718 和 *dsg-j* 各节间和稻穗的统计数据比较; D 为吉大 718 和 *dsg-j* 的籽粒, 比例尺为 1 cm; E 为吉大 718 和 *dsg-j* 籽粒特征比较。“*”表示在 0.05 水平上差异显著, “**”表示在 0.01 水平上差异显著, 下同

图 1 吉大 718 和 *dsg-j* 的表型比较

表 1 吉大 718 与突变体 *dsg-j* 主要农艺性状比较

性状	突变体(<i>dsg-j</i>)	吉大 718(WT)	比 WT 增减/%
株高/cm	67.40±1.30	109.15±1.15	-38.25%**
穗长/cm	16.90±0.34	22.25±0.33	-24.04%**
有效穗数/个	8.60±0.50	26.40±2.14	-67.42%**
千粒重/g	20.88±0.26	22.03±0.17	-5.22%*
粒长/mm	5.66±0.13	6.30±0.14	-10.16%**
粒宽/mm	3.00±0.17	3.22±0.09	-6.83%**
粒厚/mm	2.16±0.09	2.24±0.05	-8.04%*

注: “*”表示差异显著 ($P<0.05$), “**”表示差异极显著 ($P<0.01$)

2.2 突变体 *dsg-j* 茎节细胞学观察

为了探明突变体植株变矮的细胞学基础, 取野生型和突变体的茎秆第一节间, 利用石蜡切片对其横、纵切面进行观察。结果显示, 突变体茎秆厚度明显小于野生型, 细胞也明显变小(图 2)。通过测量发现, 突变体细胞宽度、长度及面积均显著小于野生型, 说明植物细胞伸展受到抑制是导致突变体出现植株变矮、籽粒变小的主要因素。

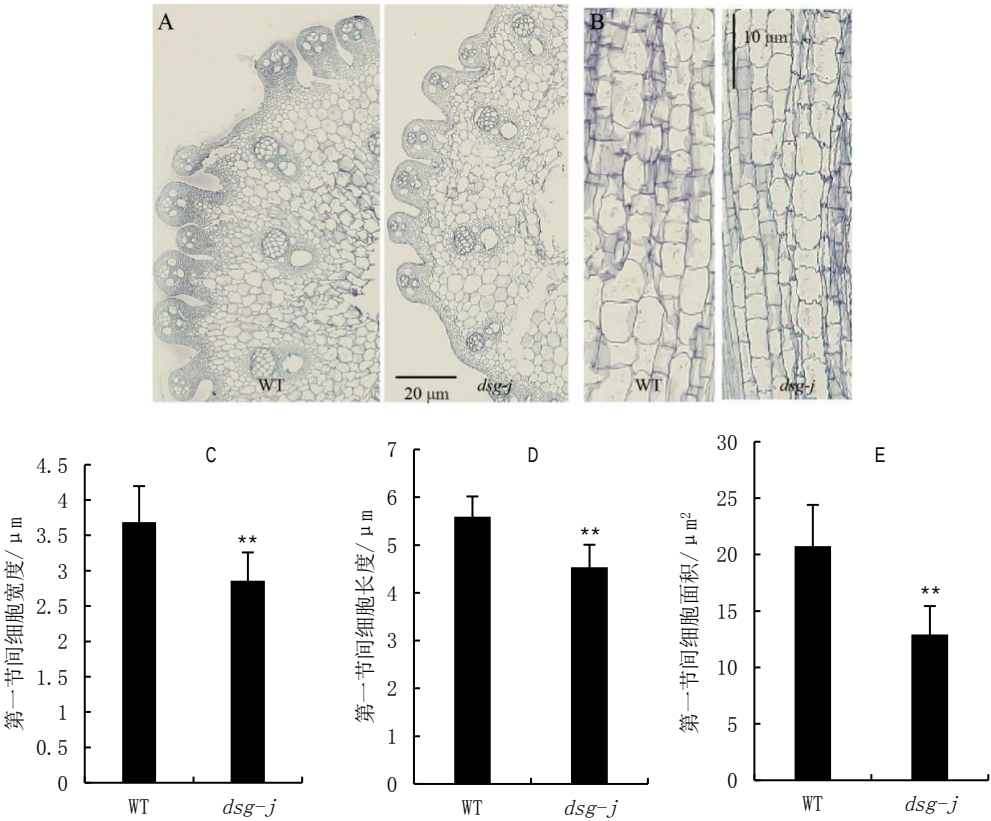
2.3 突变体 *dsg-j* 的遗传分析

以突变体 *dsg-j* 作为母本, 以吉大 718 为父本, 杂交获得 F_1 , 自交后获得 F_2 分离群体, 利用 F_2 变异群体进行遗传分析和基因定位研究。通过表型调查发现, 在随机选取的 200 个 F_2 单株中, 表型正常

的单株为 160 个, 矮秆表型的植株数量为 40 个。通过卡方检验, 野生型和突变体的卡方值为 2.41 (表 2), 小于 3.84, 分离比符合 3:1, 说明突变体表型由隐性单基因控制。

2.4 突变体 *dsg-j* 的基因定位

通过高通量测序对亲本和极端混池共 4 个样品进行分析, 共获得数据量为 53.17 Gbp, Q30 达到 94.55。测序平均覆盖深度为 32.00 X, 基因组覆盖度达到 98.00%。吉大 718 和突变体之间共获得 53 542 个 SNP (其中非同义突变的 SNP 948 个); 混池之间获得 421 027 个 SNP, 其中非同义突变的 SNP 共 9 039 个。另外, 两个亲本及混池之间分别存在 14 055 和 84 543 个 Small InDel (图 3)。



注：A为吉大718和dsj-j第一节间横切面比较，比例尺为20μm；B为吉大718和dsj-j第一节间纵切面比较，比例尺为10μm；C为吉大718和dsj-j第一节间细胞宽度比较；D为吉大718和dsj-j第一节间细胞长度比较；E为吉大718和dsj-j第一节间细胞面积比较

图2 吉大718和dsj-j第一节间的细胞学观察

表2 突变体dsj-j表型遗传分析

杂交组合	正常个体数	矮秆个体数	期望比	卡方值χ²(3:1)	P _{0.05}
dsj-j/WT	160	40	3:1	2.41	3.84

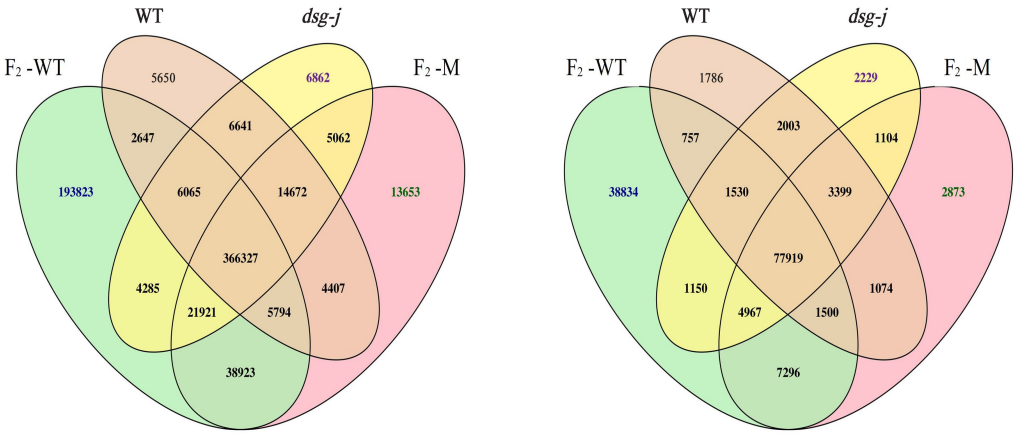


图3 样品间SNP(左)和Small InDel(右)的统计Venn图

通过ED算法和SNP-index方法对检测到的SNP进行关联性分析。根据ED算法关联阈值判定,共得到5个与籽粒大小关联的染色体区域,分别位于4、6、7号染色体上(图4);根据SNP-index方法关联阈值判定,利用拟合后ΔSNP-index的99百分位数(即0.57),共得到3个与籽粒大小相关

联的染色体区域,都位于7号染色体上,区间大小分别为2.54 Mb、0.31 Mb和0.85 Mb(图5)。通过两种方法的分析结果,并对二者取交集获得候选区域,将目标基因限定在水稻第7染色体上,包含400个基因(表3)。

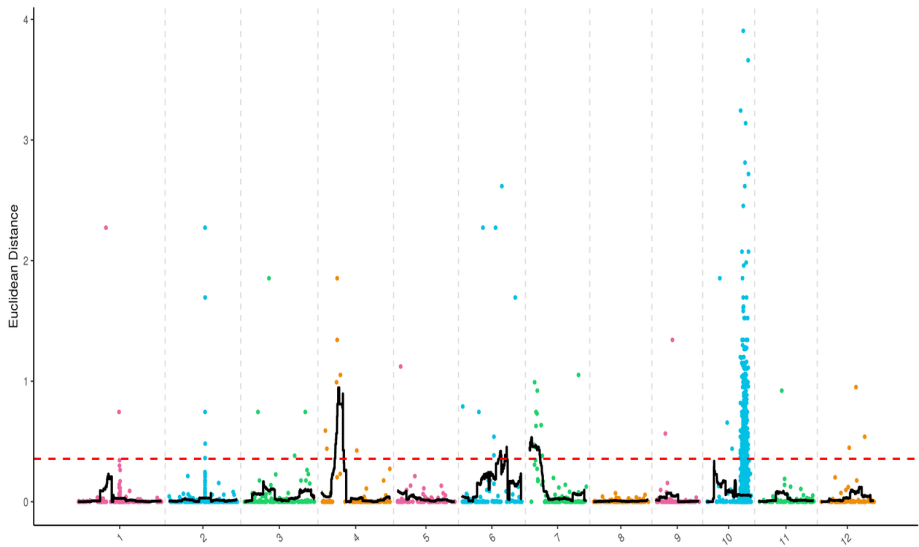
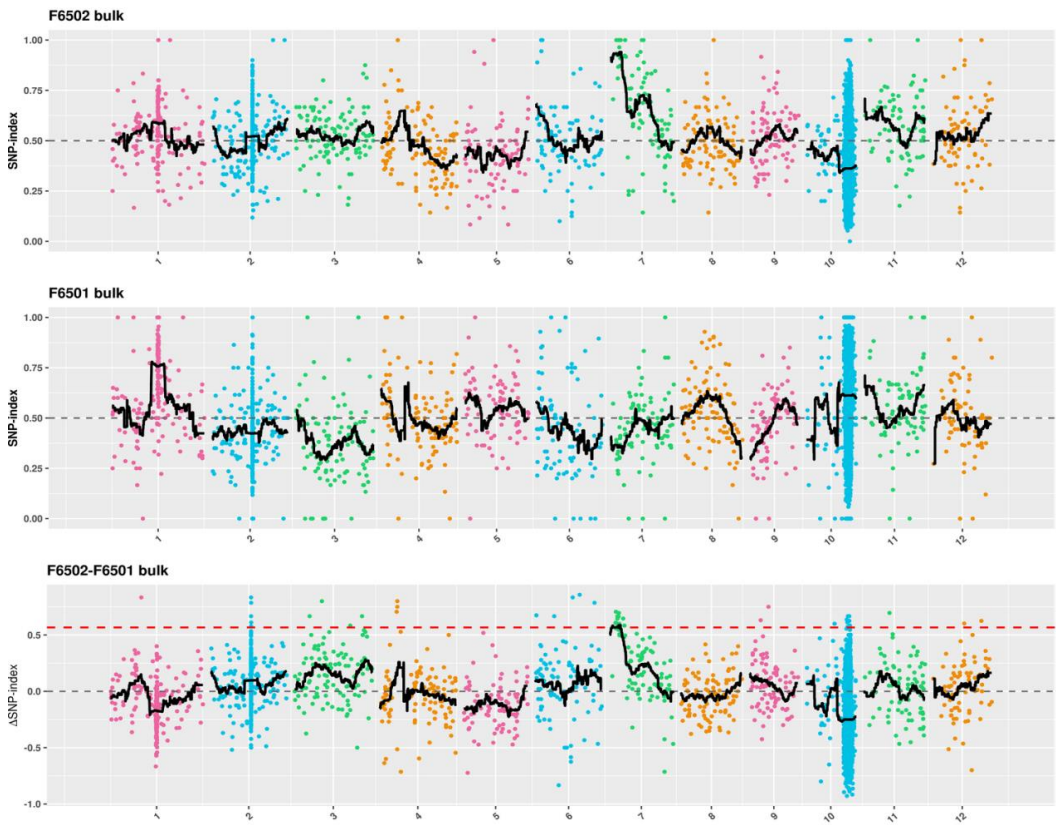


图4 ED 关联值在染色体上的分布



注: Δ SNP-index 值的分布图,其中虚线代表 99 百分位数的阈值线

图5 SNP-index 关联值在染色体上的分布

表3 候选区域信息统计

染色体	关联区域 起始位置	关联区域 终止位置	区间大小 /Mb	基因数量
Chr7	1 120 000	3 660 000	2.54	272
Chr7	3 870 000	4 180 000	0.31	39
Chr7	4 230 000	5 080 000	0.85	89
Total	—	—	—	400

3 讨论与结论

株高和粒型是水稻产量的重要决定因素,解析株高和粒型的形成机制对提高水稻产量具有重要的理论指导意义。本研究通过EMS诱变获得了一个水稻矮秆小粒突变体 *dsg-j*,其株高变矮、籽粒变小。多数研究认为,矮秆基因通过缩短节间长度或减少细胞个数,从而导致水稻植株形态

学或细胞学的变化,进而造成植株矮化。目前,已发现的矮秆基因多数是通过调控相关激素的合成量从而造成植株高度及其他表型变化,其中,对植物株高影响最大的两类激素是赤霉素和油菜素内酯,但也发现一些植物矮化突变与生长素、独脚金内酯、细胞分裂素、细胞色素P450介导脂信号有关。本研究发现突变体*dsg-j*各个节间长度较野生型均显著降低,对茎秆第一节间的石蜡切片观察发现突变体的细胞长度、宽度及大小均显著小于野生型,这说明*DSG-J*突变后,细胞的伸展会受到抑制,导致细胞体积变小,而突变体株高变矮及籽粒变小的表型极有可能是细胞伸展受到抑制导致的。但突变体的矮化是否和某种植物激素有关还需要进一步研究。

变异群体的表型卡方检验结果表明,*dsg-j*的突变表型受隐性单基因控制。通过Mutmap方法将目标基因定位在水稻第7染色体上,包含400个基因,其中包括已报道的矮秆基因*d6/OSH15*、*Os-EIN2*、*OsGA20ox3*。*OSH15*敲除突变体的落粒性降低、矮秆、节间的木质素含量较高^[17]。*OSEIN2*反义表达转基因株系表型发育迟缓,茎伸长受到抑制^[18]。*OsGA20ox3*的RNAi植株表现出半矮秆表型,对稻瘟病菌和白叶枯病菌抗性增强^[19]。但通过测序,这3个基因的序列在突变体和野生型之间并无差异,说明*dsg-j*可能是一个控制水稻株高和粒型的新基因。但目前的定位区间仍比较大,需要进一步对目标基因进行精细定位和克隆。

参考文献:

- [1] 孟祥宇,冉成,李金平,等. 秸秆还田对东北黑土稻区土壤养分及水稻产量的影响[J]. 东北农业科学, 2023, 48(2): 64-67, 89.
- [2] 刘佳,石凤梅,马立功,等. 低温胁迫对水稻生长与产量品质的影响及应对措施[J]. 东北农业科学, 2022, 47(2): 4-10.
- [3] 滕祥勇,李鹏志,林秀云,等. 碱性盐胁迫对水稻苗期矿质离子吸收与分配的影响[J]. 东北农业科学, 2022, 47(1): 11-16.
- [4] 陈温福,徐正进,张文忠,等. 水稻新株型创造与超高产育种[J]. 作物学报, 2001, 27(5): 665-667.
- [5] Nakayama K. Growth retardant effects of dwarfing genes on some organs in rice plants (a prelim Note)[J]. Japan Journal Genet, 1937, 13: 196-199.
- [6] A Sasaki, M Ashikari, M Ueguchi-Tanaka, et al. A mutant gibberellin-synthesis gene in rice[J]. Nature, 2002, 416: 701-702.
- [7] Zhu Y, Nomura T, Xu Y, et al. Elongated uppermost internode encodes a cytochrome P450 monooxygenase that epoxidizes gibberellins in a novel deactivation reaction in rice[J]. The Plant Cell, 2006, 18(2): 442-456.
- [8] Ma Z, Wu T, Huang K, et al. A novel ap2/erf transcription factor, *osrph1*, negatively regulates plant height in rice[J]. Frontiers in Plant Science, 2020, 11: 709.
- [9] Wu T, Shen Y, Zheng M, et al. Gene *SGL*, encoding a kinesin-like protein with transactivation activity, is involved in grain length and plant height in rice[J]. Plant Cell Reports, 2014, 33(2): 235-244.
- [10] Bai M, Zhang L, Srinivas S, et al. Functions of OsBZR1 and 14-3-3 proteins in brassinosteroid signaling in rice[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2007, 104(34): 13839-13844.
- [11] Liu D, Yu Z, Zhang G, et al. Diversification of plant agronomic traits by genome editing of brassinosteroid signaling family genes in rice[J]. Plant Physiology, 2021, 187(4): 2563-2576.
- [12] Tian X, Li X, Zhou W, et al. Transcription factor OsWRKY53 positively regulates brassinosteroid signaling and plant architecture[J]. Plant Physiology, 2017, 175(3): 1337-1349.
- [13] Tong H, Jin Y, Liu W, et al. Dwarf and low-tillering, a new member of the gras family, plays positive roles in brassinosteroid signaling in rice[J]. Plant Journal for Cell & Molecular Biology, 2009, 58(5): 803-816.
- [14] Dai Z, Wang J, Yang X, et al. Modulation of plant architecture by the miR156f-OsSPL7-OsGH3.8 pathway in rice[J]. Journal of Experimental Botany, 2018, 69(21): 5117-5130.
- [15] Wang L, Ming L, Liao K, et al. Bract suppression regulated by the miR156/529-SPLs-NL1-PLA1 module is required for the transition from vegetative to reproductive branching in rice[J]. Molecular Plant, 2021, 14(7): 1168-1184.
- [16] Ma M, Shen S, Ba C, et al. Control of grain size in rice by TGW3 phosphorylation of OsIAA10 through potentiation of OsIAA10-OsARF4-mediated auxin signaling[J]. Plant Cell Reports, 2023, 42(3): 112187.
- [17] Niu M, Wang H, Yin W, et al. Rice DWARF AND LOW-TILLERING and the homeodomain protein OSH15 interact to regulate internode elongation via orchestrating brassinosteroid signaling and metabolism[J]. The Plant Cell, 2022, 34(10): 3754-3772.
- [18] Jun S, Han M, Lee S, et al. OsEIN2 is a positive component in ethylene signaling in rice[J]. Plant and Cell Physiology, 2004, 45(3): 281-289.
- [19] Liu J, Zhao W, Chen X, et al. Gibberellin 20-Oxidase gene *OsGA20ox3* regulates plant stature and disease development in rice[J]. Molecular Plant-Microbe Interactions, 2013, 26(2): 227-239.

(责任编辑:范杰英)