

DOI: 10.3724/SP.J.1005.2009.00531

水稻多分蘖矮秆突变体 *htd1-2* 的遗传分析和基因定位

江海湃¹, 张淑英², 包劲松³, 王伯伦¹, 王术¹

1. 沈阳农业大学农学院, 沈阳 110161;
2. 中国科学院遗传与发育生物学研究所, 北京 100101;
3. 浙江大学农学院核农所, 杭州 310029

摘要: 文章所采用的多分蘖矮秆突变体为 *htd1-2*(*high-tillering dwarf 1-2*), 是野生型籼稻品种 9311 经 350Gy 的 ⁶⁰Co- γ 射线辐射处理后产生的后代中选育出来的稳定多分蘖矮秆突变体。遗传分析表明, 突变体 *htd1-2* 多分蘖矮秆性状是由一对隐性核基因的突变造成的。文章利用简单重复序列(Simple sequence repeat, SSR)、酶切扩增多态性序列(Cleaved amplified polymorphic sequence, CAPS)和衍生型 CAPS(derived CAPS, dCAPS)等分子标记的方法, 最终将多分蘖矮秆基因 *HIGH-TILLERING DWARF1-2*(*HTD1-2*)定位在水稻第 4 号染色体 116 kb 的物理区间内。在该物理区间内有一个已经克隆的控制水稻分蘖的基因 *HIGH-TILLERING DWARF1*(*HTD1*), 经过测序比对和 dCAPS 特异性分析, 认为 *HTD1* 就是 *HTD1-2* 基因。尽管突变体 *htd1* 与突变体 *htd1-2* 是等位基因的不同位点发生突变, 但是由于遗传背景的不同, 两者表型并不完全相同。此外, 通过去除分蘖芽的实验证明了突变体 *htd1-2* 的矮化部分是由于分蘖过多造成的。

关键词: 水稻; 多分蘖; 矮化; 分子标记; *HTD1* 基因

Genetic analysis and mapping of high-tillering and dwarf mutant *htd1-2* in rice

JIANG Hai-Pai¹, ZHANG Shu-Ying², BAO Jin-Song³, WANG Bo-Lun¹, WANG Shu¹

1. College of Agronomy, Shenyang Agricultural University, Shenyang 110161, China;
2. Institute of Genetics and Developmental Biology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China;
3. Institute of Nuclear Agricultural Sciences, Zhejiang University, Hangzhou 310029, China

Abstract: Tillering is one of the most important agronomic traits of rice. In order to explore the molecular mechanism of rice tillering, a high-tillering dwarf 1-2 (*htd1-2*) mutant was isolated from the offspring of the indica rice (*Oryza sativa* L. ssp. *indica*) variety 9311 treated with 350Gy ⁶⁰Co γ -radiation. Genetic analysis showed that both high tillering and dwarf phenotypes of *htd1-2* were controlled by a single recessive nuclear gene. By means of molecular marker technique, the *HIGH-TILLERING DWARF1-2*(*HTD1-2*) gene was mapped between two CAPS markers A6 and E2 on chromosome 4 within 116 kilobases. Within this region, there is a cloned gene *HIGH-TILLERING DWARF1*(*HTD1*), which controls rice tillering. By comparing sequences of *HTD1* between *htd1-2* and 9311, in combination with the results from dCAPS analysis,

收稿日期: 2008-10-06; 修回日期: 2008-12-23

基金项目: 教育部留学人员回国启动基金项目(编号: 010144)和辽宁省百千万人才工程基金(编号: 2008921057)资助

作者简介: 江海湃(1983-), 男, 硕士研究生, 研究方向: 作物生理学及分子生物学。Tel: 024-88455679; E-mail: haipaijiang@hotmail.com
张淑英(1977-), 女, 博士, 研究方向: 作物生理学及分子生物学。Tel: 010-64870491; E-mail: syzhang@genetics.ac.cn

江海湃和张淑英同为第一作者。

通讯作者: 王术(1968-), 男, 博士, 副教授, 研究方向: 作物生理、品种改良及分子遗传学。Tel: 024-88487135; E-mail: wangshu_sl@yahoo.com

致谢: 本研究得到中国科学院遗传与发育生物学研究所植物基因组学国家重点实验室朱立煌研究员的大力支持, 在此表示衷心的感谢!

we believed that *HTD1* is an orthologue of the gene *HTD1-2*. Because of different genetic backgrounds, *htd1* and *htd1-2* have different phenotypes although they are the allelic mutants. Furthermore, removal of axillary buds proved that dwarfism of *htd1-2* mutant is partly attributed to its excessive tillers.

Keywords: rice (*Oryza sativa* L.); high-tillering; dwarfism; molecular marker; *HTD1* gene

水稻是世界上最重要的粮食作物之一, 水稻的分蘖和株高是组成水稻株型结构的两个重要的农艺性状。由于水稻矮秆突变体在水稻育种及矮化分子机理研究中的重要性, 目前, 大约有 60 多个水稻矮秆突变体被发现和鉴定^[1]。Takeda^[2]根据各节间长度对总节间长度的相对比值将水稻矮秆突变体分成 5 类(*dn*, *dm*, *d6*, *nl*和*sh*)。然而, 一些水稻矮秆突变体也表现出一些其他特征, 如粒小、多分蘖、叶片卷曲直立等, 因此根据这些与矮秆连锁的性状, 矮秆突变体进一步又可分为小粒矮秆、多分蘖矮秆、畸形矮秆和半矮秆^[3]。近年来, 随着水稻*d1*、*semdwarf-1* (*sd-1*)、*d61*和*d2*等一些矮秆基因相继被分离^[4-10], 有关水稻植株矮化的分子机制已经开始为人们所认识, 这些基因的矮化作用都是通过影响内源激素合成或信号传导来发生的。其中携带著名的“绿色革命”基因*sd1*的*sd-1*突变体的矮化是由于*sd-1*在赤霉素 20 氧化酶(Gibberellin 20-oxidase)上的缺陷, 导致突变体的赤霉素合成受阻, 植株基部节间变短所致^[6-8]。

除了株高, 分蘖是影响水稻产量的又一重要农艺性状。近年来, 通过对一些影响水稻分蘖的基因克隆及其功能研究, 人们对于水稻如何控制分蘖发生的分子生物学机制已经有了一定的了解。*MONOCULM1*(*MOC1*)是第一个被克隆的控制水稻分蘖的基因^[11], 其编码的MOC1 蛋白属于GRAS (GAI, RGA, SCR)家族的转录因子, 在分蘖芽形成和伸长两个阶段都起重要作用。通过对水稻*d*系列突变体(*d3*, *d10*, *d14*, *d17*, *d27*)和*htd1*突变体的研究, 用图位克隆的方法已相继克隆了影响水稻分蘖的基因*D3*、*HTD1*和*D10*。经过序列比对发现*D3*、*HTD1*和*D10*分别是拟南芥中参与控制分枝的*more axillary growth*(*MAX*)系列的*MAX2*、*MAX3*和*MAX4*的同源基因^[12-15]。由此推断单子叶植物水稻也像双子叶植物拟南芥一样, 存在控制侧芽生长的茎增殖信号(Shoot-multiplication signal, SMS)途径, 而*D3*、*HTD1*和*D10*则在这一途径中起着关键的作用。尽管如此, 我们对于水稻控制分蘖发生这一复杂的生理过程尚

不十分清楚, 更多的与分蘖相关的突变体的研究对于深入了解水稻分蘖有着重要意义。

本研究所用多分蘖矮秆突变体*htd1-2* 是籼稻品种 9311 经 350Gy 的 ⁶⁰Co-γ射线辐射处理后产生的突变体^[16], 它具有多分蘖、矮化、茎秆细、叶片窄而小和成熟期延迟等特点, 通过去除分蘖芽株高得以部分恢复的实验证明多分蘖是*htd1-2* 的主要特征性状。遗传分析发现, 突变体的表型是受一对隐性核基因控制的, 我们采用简单重复序列(Simple sequence repeat, SSR)、酶切扩增多态性序列(Cleaved amplified polymorphic sequence, CAPS)和衍生型 CAPS(derived CAPS, dCAPS)等分子标记的方法定位了该基因, 本文报道这一基因定位结果。

1 材料和方法

1.1 材料

多分蘖矮秆突变体*htd1-2* 引自江西省水稻生理及遗传重点实验室, 是以 350Gy 的 ⁶⁰Co-γ射线对籼稻 9311 进行辐射处理后产生的突变体, 突变体种子已经纯合^[16]。粳稻台北 309、籼稻 9311、突变体*htd1*和dCAPS分析中所用到的 20 个水稻野生型品种(表 1)为中国科学院遗传与发育生物学研究所朱立煌研究员课题组保存。

表 1 dCAPS 分析中野生型品种种类

号码	品种	籼/粳	号码	品种	籼/粳
1	9311	籼稻	11	台北 309	粳稻
2	Kasalath	籼稻	12	日本晴	粳稻
3	IR64	籼稻	13	C418	粳稻
4	南京 6	籼稻	14	丽江	粳稻
5	IRBB56	籼稻	15	02428	粳稻
6	R527	籼稻	16	巴利拉	粳稻
7	窄叶青	籼稻	17	香水 11	粳稻
8	D62B	籼稻	18	moc1	粳稻
9	珍粳 97B	籼稻	19	京系 17	粳稻
10	盐恢 559	籼稻	20	兰胜	粳稻

1.2 方法

1.2.1 性状调查

2006年夏在北京以突变体 *htd1-2* 做母本, 籼稻 9311 做父本以及台北 309 和多分蘖矮秆突变体 *htd1-2* 分别做父母本, 进行杂交。 F_1 种子于海南加代, 2007年夏于北京种植 F_2 群体。在各杂交组合 F_2 代的抽穗期, 统计野生型和多分蘖矮秆表型个体的数目, 并用统计学方法计算分离比例。籼粳交组合 *htd1-2*/台北 309 的 F_2 代分离群体用于基因的定位。

在插秧后 10 d, 即播种后 43 d 选择籼稻 9311 与突变体 *htd1-2* 各 10 株, 每隔 7 d 调查其株高与分蘖的数目, 直到成熟期。在成熟期选择籼稻 9311 与突变体 *htd1-2* 各 10 株, 每株植株取下一片剑叶, 量取叶片的长和宽。本实验中的分蘖数实际上是主茎与真正的分蘖数的和, 抽穗前测量的植株高度是指从地上与地下部分的交界处到每一株最高的叶片顶部的高度, 抽穗后的植株高度以及最终的植株高度是指地上与地下部分的交界处到每一株最高的穗子顶部的高度。

1.2.2 DNA 的提取

为进行引物多态性的筛选和基因的定位研究, 将多分蘖矮秆突变体 *htd1-2* 与正常株高和分蘖数的粳稻品种台北 309 配制杂交组合, 所得杂种 F_1 自交后得 F_2 , 并在抽穗期分单株收取 F_2 中多分蘖矮秆表型的植株、两亲本以及 F_1 代植株的叶片, 采用 SDS 法小提水稻基因组 DNA。取大约 100 mg 水稻叶片, 经液氮冷冻, 在直径 5 cm 的小研钵中磨成粉状, 转移到 1.5 mL 离心管中提取 DNA, 获得 DNA 的沉淀溶解于 200 μ L ddH₂O 中。每个 PCR 反应用 2 μ L 样品。

1.2.3 引物合成、筛选及电泳分析

SSR 分析中所用到的引物序列由 <http://www.grame.org> 网站上公布的 Class I SSR (93-11) 2005 水稻微卫星标记连锁图中获得。共合成在籼、粳稻间

差异在 20 bp 以上, 且均匀分布在水稻 12 条染色体上的 SSR 引物 186 对, 以 *htd1-2* 和台北 309 两个亲本及其 F_1 为模板筛选多态性引物, 共检测到多态性引物 57 对, 引物有多态性的比率达到 30.6%。精细定位时, 参考了 Zou 等^[13]发表的一篇文献中设计的 CAPS 引物(相应的 CAPS 引物序列与限制性内切酶列于表 2)。为确认 *HTD1-2* 与 *HTD1* 基因的关系, 根据已报道的 *HTD1* 基因的序列在其两端设计引物, H1F: 5'-ATGGCAACACAAGCGATTGCACCGATGc-3'; H1R: 5'-TCATTTCATCTCCCCAGAAACCATGGAATC-3'。为鉴定 *HTD1-2* 基因中突变位点的特异性, 还设计了 dCAPS 标记, 该标记引物序列为: D1F: 5'-TACTACCTCGCCGGGCCGAACATC-3'; D1R: 5'-ACCTGCATGCGTCACTCACGCGTGC-3'。所有引物均由北京诺赛基因组研究中心有限公司合成。

PCR 反应在 PTC-225 型 PCR 扩增仪(MJ 公司)上进行。20 μ L 反应体系包括: 10 \times buffer 2 μ L, 20 \times dNTPs 1 μ L, 10 μ mol/L 引物 1 μ L, 普通 Taq 酶 0.5 μ L, ddH₂O 13.5 μ L, DNA 模板 2 μ L。反应程序: 94 $^{\circ}$ C 预变性 4 min, (94 $^{\circ}$ C 30 s, 60 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 30 s)33 个循环, 72 $^{\circ}$ C 再延伸 10 min。扩增产物在 3%~5% 的琼脂糖凝胶上电泳, 经溴化乙锭染色并于紫外灯下观察和用 BIORAD 凝胶成像仪成像。CAPS 标记的 PCR 产物在 2% 的琼脂糖凝胶中分离。

在突变体 *htd1-2* 和 9311 基因组 DNA 中扩增 *HTD1* 时, 由于片段较长, 为 2 439 bp, 采用日本东洋纺 TOYOBO 公司的 KOD-Plus 酶对其进行扩增。50 μ L 反应体系包括: 10 \times buffer for KOD-Plus 5 μ L, 2 mmol/L dNTPs 5 μ L, 25 mmol/L MgSO₄ 2 μ L, 10 μ mol/L 引物 1.5 μ L, KOD-Plus 1 μ L, ddH₂O 33.5 μ L, DNA 模板 2 μ L。反应程序: 94 $^{\circ}$ C 预变性 4 min; 94 $^{\circ}$ C 30 s, 62 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 2 min 30 s, 29 个循环; 最后再 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。PCR 产物在 1% 的琼脂糖凝胶上电泳, 经溴化乙锭染色并于紫外灯下观察, 并回收目的片段。

表 2 用于精细定位的 CAPS 标记^[13]

酶切扩增多态性序列	引物序列(5' 3')	扩增片段(bp)	限制性内切酶	原始细菌人工染色体号
A6	ATGCCACACGGACAAGACG TGCAAGCCCCCAAGTTACC	1 137	<i>Dra</i>	AL663000
C3	ACGCGTGGGTTGTGGTCT ACTCCCGTATGATGCTGTCTCG	1 110	<i>Hinf</i>	AL663000
F1	CCTTTGGCTGCCTCACCTCAC GGCAAACCGCGCTTAGTCG	1 169	<i>EcoR</i>	AL663000
E2	CGTCTCAATCTACACCTCGTTC GGTTCTTTCTCCCTCGTCTTC	1 136	<i>Xba</i>	AL663000

在用 dCAPS 标记进行特异性分析时, 由于突变位点上下游 GC 含量很高, 采用宝生物工程(大连)有限公司(TaKaRa)生产的 LA-Taq 酶进行扩增。20 μL 体系包括: 2 \times GC-buffer 10 μL , dNTPs 1 μL , 10 $\mu\text{mol/L}$ 引物 1 μL , LA-Taq 酶 0.2 μL , ddH₂O 5.8 μL , DNA 模版 2 μL 。反应程序: 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 4 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 62 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 31 个循环; 最后再 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min。PCR 产物在 3% 的琼脂糖凝胶上电泳, 经溴化乙锭染色并于紫外灯下观察和用 BIORAD 凝胶成像仪成像。

本实验中所用回收试剂盒是上海申能博彩生物科技有限公司产品, pGEM-T Easy Vector 和 CAPS 所用限制性内切酶为 Promega 公司产品, dCAPS 所用限制性内切酶购自纽英伦(NEB)生物技术有限公司。

1.2.4 连锁分析及制图

根据 SSR 分析的结果, 利用 MAPMAKER(EXP 3.0b)软件, 计算分子标记间的遗传距离。用 DNAM AN v6.0.3.40 软件分析测序结果, 并作图。

2 结果与分析

2.1 突变体 *htd1-2* 的表型鉴定

突变体 *htd1-2* 在整个生育期最显著的特点就是分蘖数目多, 植株矮化。在成熟期, 突变体 *htd1-2* 的平均分蘖数(56.3 ± 4.4)是其野生型品种 9311(15.8 ± 2.2)的 3.6 倍, 而植株高度(58.8 ± 1.5)则降到野生型(108.8 ± 2.9)的 54%(图 1 a)。

为了明确 *htd1-2* 突变体植株变矮的原因, *htd1-2* 突变体和野生型的各节间长度被测定。与野生型水稻 9311 相比, 突变体 *htd1-2* 的各节间和穗的长度均缩短(图 1b), 水稻各节间长度对总节间长度的相对比值和野生型相似(表 3), 根据这种比例可将 *htd1-2* 突变体归入 Takeda^[2] 的 *dn* 类矮秆突变体中。

除了分蘖增多和矮化外, 与野生型 9311 相比, 突变体 *htd1-2* 的叶片短而窄(图 1c), 测量数据表明, 野生型品种 9311 剑叶的平均长度(38.9 ± 4.1)是突变体(20.4 ± 1.4)的 1.9 倍, 平均宽度(2.43 ± 0.12)则是突变体(1.65 ± 0.16)的 1.5 倍。与野生型比较, 突变体 *htd1-2* 的穗子变小(图 1, d 和 e), 穗长大约只有野生型的 60%, 同时一次枝梗、二次枝梗和每穗的成粒

数也比野生型品种低很多。

2.2 突变体 *htd1-2* 的株高与分蘖的关系

Zou 等^[14]通过去除分蘖芽的实验表明 *htd1* 突变体的株高变矮是由于分蘖过多造成的。为了明确突变体 *htd1-2* 的株高降低是否与分蘖增多有关, 本文也做了去除分蘖芽的实验。结果表明, 去除分蘖芽对野生型的形态(包括植株高度以及叶片大小)几乎没有影响; 然而, 去除分蘖芽使突变体 *htd1-2* 的植株高度增加, 叶片也变长变宽, 尽管如此, 却没有增加到与野生型相同的水平(图 2)。根据去除分蘖后突变体植株高度部分恢复的现象, 我们认为多分蘖是突变体 *htd1-2* 的主要特征性状, 而植株的矮化一部分可能是由于分蘖增加所引起的。

2.3 突变体 *htd1-2* 在全生育期内分蘖与株高的发生特征

为了认识 *htd1-2* 突变体的分蘖发生规律及株高变化情况, 将突变体 *htd1-2* 与野生型 9311 同时播种, 同时插秧以及进行同样的田间管理。从插秧后第 10 d 即播种后第 43 d 开始进行分蘖数与株高的调查, 以后每隔 7 d 调查一次, 分别将调查的结果绘成动态曲线(图 3)。从分蘖动态曲线可以看出突变体的分蘖在播种后 50 d 已显著多于野生型, 播种后 64 d 至 85 d, 即拔节前期为分蘖高峰期, 突变体分蘖数增加的更明显, 直到播种后 99 d 这种差异达到最大。另外, 从播种后 57 d 一直持续到播种后 99 d, 突变体分蘖的增加速度都比野生型要快的多, 最终导致突变体分蘖数远高于野生型水稻。

从株高方面来看, 在播种后 43 d 突变体的株高已显著低于野生型, 随着生育期的延长, 突变体株高的增加始终比野生型对照要慢, 到生育后期差异更为明显。

2.4 遗传分析和 *htd1-2* 突变位点的初步定位

为了明确 *htd1-2* 突变体中突变基因的遗传特点, 我们配制了 3 组不同的杂交组合, 分别是突变体 *htd1-2* 做母本, 粳稻野生型品种台北 309 和籼稻 9311 分别做父本进行杂交, 还有台北 309 做母本, 突变体 *htd1-2* 做父本进行杂交。所有杂交组合的 F₁ 代均表现野生型的表型, 即株高与分蘖数都是正常的, 而各杂交组合的 F₂ 代中, 正常: 多蘖矮秆的分

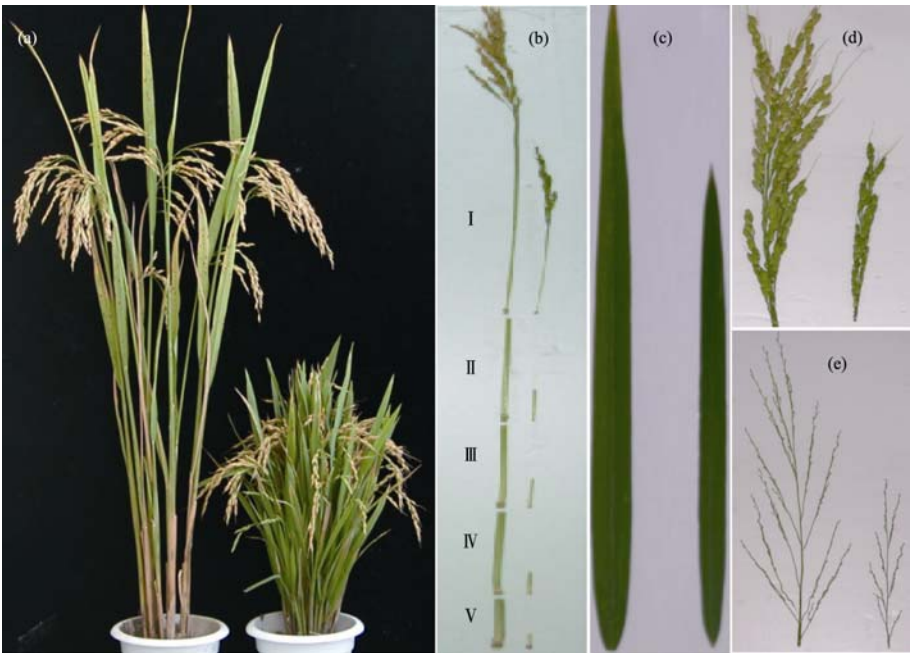


图 1 水稻突变体 *htd1-2* 与野生型 9311 的表型比较 (左边为野生型 9311, 右边为突变体 *htd1-2*)
(a): 整株表型; (b): 各节间长度; (c): 剑叶长度及宽度; (d)、(e): 穗部表型。 ~ 代表从上至下 1~5 节位。

表 3 *htd1-2* 与 9311 每一节间平均长度及所占总节间长度百分比

长度	<i>htd1-2</i> (cm)	占总节间长度百分比(%)	9311(cm)	占总节间长度百分比(%)
第一节间	14.5(±0.99)	46.9	29.5(±2.47)	36.7
第二节间	6.2(±0.76)	20.1	16.6(±1.32)	20.5
第三节间	4.4(±0.81)	14.2	15.3(±1.29)	18.9
第四节间	3.2(±0.66)	10.4	12.3(±0.97)	15.3
第五节间	2.6(±0.45)	8.4	6.8(±2.18)	8.4
总和	30.9(±1.95)		80.6(±3.53)	



图 2 去除分蘖芽实验
9311 和 *htd1-2* 代表正常植株; 9311 和 *htd1-2* 代表去除分蘖芽的植株。

离比都基本符合 3: 1($\chi^2_c < \chi^2_{0.05} = 3.81$; 表 4)。这些结果表明, 突变体的多蘖和矮秆性状是由细胞核内单个基因的隐性突变造成的。

为了定位 *HTD1-2* 基因, 我们选取 *htd1-2*/台北 309 组合 F_2 群体中的 116 株具有多蘖矮秆表型的植株作为定位群体, 之后用有多态性的 SSR 引物扩增此定位群体, 发现位于第 4 染色体上的 SSR 引物 RM17377 与目的基因紧密连锁。然后在 RM17377 附近设计了 10 对新的 SSR 引物, 扩增 116 株突变株, 与目的基因之间各有 7 株和 1 株交换株, 并且一个结果发现两个分子标记 RM17303 和 RM17321(图 4A) 标记检测到发生交换的单株在另一个标记检测中都没有发生交换。利用 Mapmaker/Exp3.0 软件进行连锁分析, 两个分子标记 RM17303 和 RM17321 与目的基因分别相距 3.1 cM 和 0.4 cM(图 5A)。

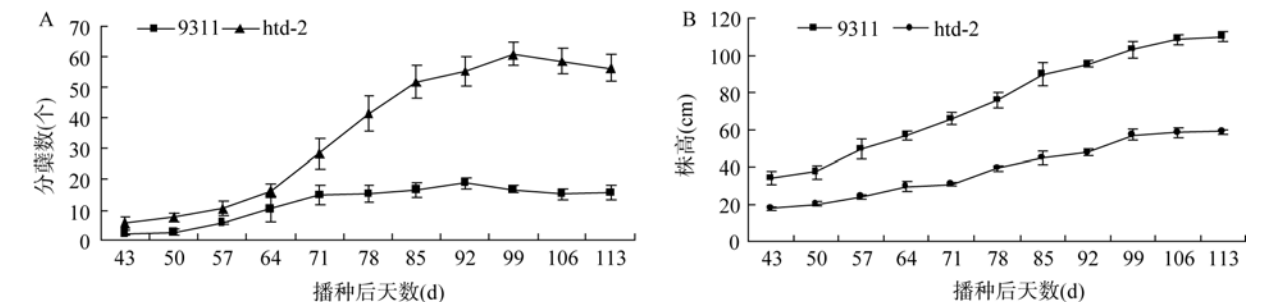


图 3 水稻多分蘖矮秆突变体 *htd1-2* 及其野生型 9311 生育期内分蘖(A)及株高(B)的动态变化

表 4 多蘖矮秆表现型在不同杂交组合 F₂ 代中的分离比

杂交组合	正常表型	多蘖矮秆表型	植株总数	$\chi^2(3:1)$
<i>htd1-2</i> /台北 309	400	116	516	1.61
台北 309/ <i>htd1-2</i>	273	79	352	1.23
<i>htd1-2</i> /9311	318	98	416	0.47

2.5 HTD1-2 基因的精细定位及候选基因的鉴定

用已合成的 CAPS 标记对微卫星标记 RM17303 与 RM17363 区间内已鉴定的交换株进行分析, 结果发现 CAPS 标记 C3 和 F1 与 *HTD1-2* 呈共分离(图 4, B 和 C), 而 CAPS 标记 A6 和 E2 分别和 *HTD1-2* 之间有 2 株和 1 株交换株。通过 CAPS 标记的逼近, 我们最终将 *HTD1-2* 定位在 BAC AL663000 上两个 CAPS 标记 A6 和 E2 之间的 116 kb 的物理区间(图 5 B)。

与已报道的控制水稻分蘖的基因比对, 发现在此区域内有一控制水稻分蘖的基因 *HTD1* 且该基因已被克隆^[13], 我们猜想 *HTD1-2* 可能就是 *HTD1* 基因。根据已报道的 *HTD1* 基因的序列在其两端设计的

引物 H1F、H1R 分别扩增 *htd1-2* 及其野生型 9311, PCR 产物回收后连接到 T-easy 载体上并测序。测序结果经比对发现, 与野生型 9311 相比, 突变体 *htd1-2* 在两个位置发生了突变。一处是在 280 bp 处发生了碱基的突变以及接下来一个碱基的缺失, 最终由两个胸腺嘧啶突变成一个腺嘌呤, 造成移码突变。另一处是在 1 114 bp 处连续两个腺嘌呤的缺失, 但该处的突变发生在一个内含子内, 可能并不影响基因的表达(图 6), 所以我们认为 280 bp 处的移码突变可能是引起 *htd1-2* 突变表型的一个重要原因。

为了鉴定该突变位点的特异性, 我们设计了 dCAPS 标记 D1F、D1R。以水稻基因组 DNA 为模板,

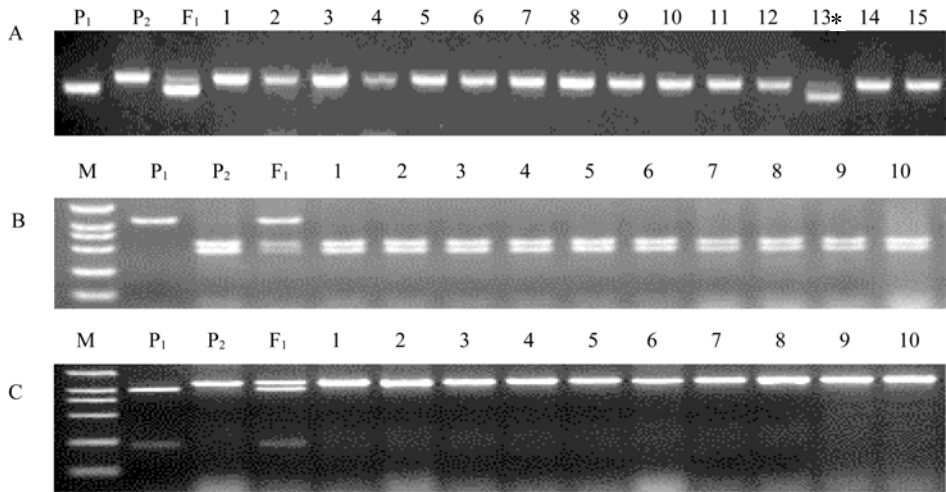


图 4 分子标记与多蘖矮秆性状的紧密连锁图

A: SSR 标记 RM17321 与 *htd1-2* 突变位点的紧密连锁; B: CAPS 标记 C3 与 *htd1-2* 突变位点的共分离; C: CAPS 标记 F1 与 *htd1-2* 突变位点的共分离。P₁: 台北 309; P₂: *htd1-2*; 1~15: F₂ 群体中多蘖矮秆表型植株; M: DL2000 marker; *: 代表交换株。

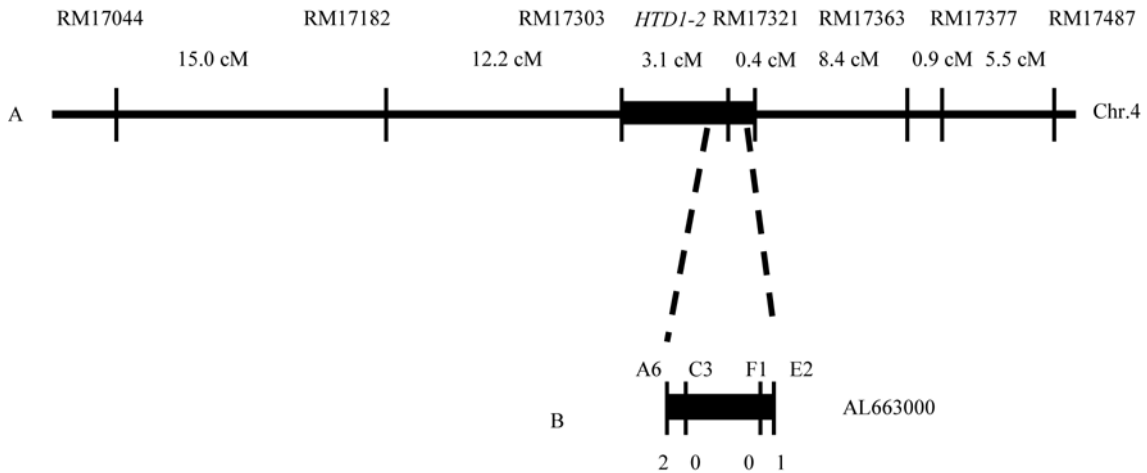


图 5 水稻多分蘖矮秆基因 *HTD1-2* 的精细定位

A: *HTD1-2* 的初步定位; B: *HTD1-2* 的精细定位。B 中横线下面的数字“2, 0, 0, 1”表示相关标记和目的基因间的交换个体数。

9311.seq	CATCCCGCTCCGCGTCACCGAGGGCGGATCCCGCCGACTTCCGGCCGGCACCTACTACCTCGCCGGGCGGGCATCTTCCGACGACACGGCTCC	300
htd1-2.seq	CATCCCGCTCCGCGTCACCGAGGGCGGATCCCGCCGACTTCCGGCCGGCACCTACTACCTCGCCGGGCGGGCATCA..CTCCGACGACACGGCTCC	299
9311.seq	ACCGTCCACCCCTCGACGGCCACGGCTACCTCCGCTCTTCGGCTTCCGGCCGGGACCGCACCATCCACTACTCCGCGGGTAAGTCGCGCGGGG	400
htd1-2.seq	ACCGTCCACCCCTCGACGGCCACGGCTACCTCCGCTCTTCGGCTTCCGGCCGGGACCGCACCATCCACTACTCCGCGGGTAAGTCGCGCGGGG	399
9311.seq	CATGCGACGACGACGGGTTTGTCACTGAGAGCGACGACTGACAGTGCACGCGTGAAGTGACGCATGCAGGTTCTGGAGACGGCGGGCAAGAGGGAGGAG	500
htd1-2.seq	CATGCGACGACGACGGGTTTGTCACTGAGAGCGACGACTGACAGTGCACGCGTGAAGTGACGCATGCAGGTTCTGGAGACGGCGGGCAAGAGGGAGGAG	499
9311.seq	AGCCGGGACGGCGCTCGTGGCGGTTACGCGACCGGGGGCCCTTCCCGTGTGACAGGGCGGGAAAGAGTGGGCAATGTGAAGGTGATGAAGACGTGG	600
htd1-2.seq	AGCCGGGACGGCGCTCGTGGCGGTTACGCGACCGGGGGCCCTTCCCGTGTGACAGGGCGGGAAAGAGTGGGCAATGTGAAGGTGATGAAGACGTGG	599
9311.seq	CCAAACACGAGCTGCTGCGGTGGGGCGGGCGGCTGCTGCTCTGGAGGGCGGGACCGCTACGAGGTTGACCCCGGACGCTCGAGACCGTGGGG	700
htd1-2.seq	CCAAACACGAGCTGCTGCGGTGGGGCGGGCGGCTGCTGCTCTGGAGGGCGGGACCGCTACGAGGTTGACCCCGGACGCTCGAGACCGTGGGG	699
9311.seq	GTTGACCTGCTCGGCTCGCCGCCGACGACGACAAAGGGCGAGAACGCGTCTGCGACGACGCGCGTGGCTGCAGGAGGCGGGCTCGACGCGGG	800
htd1-2.seq	GTTGACCTGCTCGGCTCGCCGCCGACGACGACAAAGGGCGAGAACGCGTCTGCGACGACGCGCGTGGCTGCAGGAGGCGGGCTCGACGCGGG	799
9311.seq	GGCGGCTGCTGCGCCCTGTTCTTAGCGGTGCGTGACACTGTACCGGAGCAGCGGCTCCACTTCGATCGATTCTGACCGAATGATGACGCTGGTGG	900
htd1-2.seq	GGCGGCTGCTGCGCCCTGTTCTTAGCGGTGCGTGACACTGTACCGGAGCAGCGGCTCCACTTCGATCGATTCTGACCGAATGATGACGCTGGTGG	899
9311.seq	GGCGGTGCGTGGTGGTGGAGGGTGTTCGACATGCGGGCAAGAGGCTGCTGGCGCACTACAAAGATCGACCCGCGACGGGGCGGTCTGCTGACGGT	1000
htd1-2.seq	GGCGGTGCGTGGTGGTGGAGGGTGTTCGACATGCGGGCAAGAGGCTGCTGGCGCACTACAAAGATCGACCCGCGACGGGGCGGTCTGCTGACGGT	999
9311.seq	GGCTGCAACCGCGAGGACATGCTCTCCCGGATGCCACTTCACTTCTACGGTCAAGCTGCCATCGCTCGACCAACCGACGATTTTCCATTGCGTCT	1100
htd1-2.seq	GGCTGCAACCGCGAGGACATGCTCTCCCGGATGCCACTTCACTTCTACGGTCAAGCTGCCATCGCTCGACCAACCGACGATTTTCCATTGCGTCT	1099
9311.seq	CCAAAAAATTCACATTGAACGGGTTTCCATGGCAGAGTTTCAGCCCACTTCGACCTCGTCCAGAAGCGTGAGTTCTGCTGCGCGACCACT	1200
htd1-2.seq	CCAAAAAATTCACATTGAACGGGTTTCCATGGCAGAGTTTCAGCCCACTTCGACCTCGTCCAGAAGCGTGAGTTCTGCTGCGCGACCACT	1197

图 6 突变体 *htd1-2* 与野生型 9311 的 *HTD1-2* 基因部分序列的比对
相同的碱基用阴影部分表示。

该对引物可扩增出 216 bp 的 PCR 产物, 野生型 9311 的 PCR 产物经 *Xmn* (识别位点: GAANNNTTC) 酶切后缩小到 194 bp, 由于突变体 DNA 的碱基变化 (280 bp, TT/A) 导致它的 PCR 产物不能被 *Xmn* 酶切, 仍保持 216 bp 的大小。我们选择了 10 个粳稻野生型品种与 10 个籼稻野生型品种进行测验, dCAPS 分析结果发现, 所有测试的 20 个野生型品种的 PCR 产物都能被 *Xmn* 酶切, 从而在琼脂糖胶上显示为 194 bp 的片段, 只有突变体的 PCR 产物由于不能被酶切而

显示为 216 bp 的片段(图 7)。这些结果说明与所测试的野生型品种比较, 突变体的突变位点(280 bp, TT/A)是特异的。由此我们认为, 已经克隆的影响水稻分蘖的基因 *HTD1* 就是我们要定位的 *HTD1-2* 的基因。

2.6 *htd1* 与 *htd1-2* 表型的比较

由上述结果证明突变体 *htd1* 与 *htd1-2* 是等位突变体, 与各自的野生型相比较, 二者均表现为明显的多分蘖矮秆表型。尽管如此, *htd1* 与 *htd1-2* 两者之

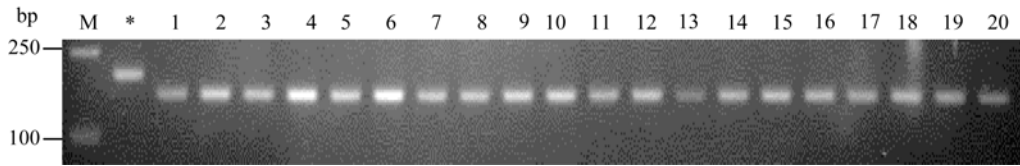


图 7 dCAPS 分析 20 个水稻品种

*: 为突变体 *htd1-2*; 1~20: 为野生型品种, 具体水稻品种编号见表 1; M: DL2000 marker。

间的表型也存在着差异(图 8)。在成熟期, *htd1* 平均分蘖数(99.5 ± 12.2)是 *htd1-2* 平均分蘖数(56.3 ± 4.4)的 1.8 倍, 而 *htd1* 平均株高(82.6 ± 3.2)也比 *htd1-2* 平均株高(58.8 ± 1.5)高出了近 40%。除此之外, *htd1* 的茎秆比 *htd1-2* 更细, 叶片相对于 *htd1-2* 来说是长而窄, 叶色也要明显淡于 *htd1-2*。



图 8 突变体 *htd1* 与 *htd1-2* 的表型比较

3 讨论

Zou等^[13, 14]通过对*htd1* 分蘖芽的解剖学观察证明, 突变体*htd1* 分蘖的增多并不是由于其叶腋内腋芽的发生数目增加, 而是由于腋芽生长的抑制受到了解除或削弱所致。随着*HTD1* 的克隆及进一步的功能研究证实, *HTD1* 是拟南芥*MAX3/CCD7* 的同源蛋白, 它在水稻中参与合成一种抑制分蘖芽发生的激素类物质, 这种激素类物质能够抑制水稻分蘖芽的长出而调控分蘖数的合理发生。我们通过实验已经

证明, 突变体*htd1-2*在*HTD1* 基因内发生了移码突变使其不能正常表达, 因此我们认为*htd1-2* 多分蘖和矮化的性状就是由于*HTD1* 功能丧失引起的。尽管突变体*htd1* 和 *htd1-2* 是等位基因发生突变, 但两者表型却有着较大差异, 我们认为这种差异可能是由于遗传背景的不同造成的。由此可以看出, 即使是在同一物种间, 相同基因功能的丧失, 由于遗传背景的不同, 表型还是会有较大差异。

赤霉素(Gibberellins, GA) 对植物的许多生理反应, 如种子的萌发, 茎节的伸长和花的形成等都存在重要的调节功能。植株体内GA合成或GA信号传导途径受阻, 都能影响茎节的伸长, 最终导致植株的矮化。Mitsunaga等^[17]根据水稻矮秆突变体第二叶鞘和种子胚乳内 α -淀粉酶对外源GA的响应, 将矮秆突变体分为T、D和E3 种类型。T型为GA缺陷型, 即该类突变体的矮化主要是由于体内GA的合成受阻, 如水稻半矮秆基因*sdt3*^[18]和*sd1* 矮秆突变体^[6-8]; D型为GA不敏感型, 即植株矮化与GA的信号传导有关, 如*d1* 矮秆突变体^[4, 5]; E型为GA无关型, 即这类突变体的矮化与GA的合成和信号传导无关, 是其他原因造成, 如水稻显性矮秆突变体*KL908*^[19], 多分蘖矮秆突变体*htd1*^[13, 14]。Zou等^[13, 14]已经证明突变体*htd1* 的矮化与GA无关, 即*htd1* 中GA的合成与信号传导均正常, 我们这个突变体与*htd1* 是等位基因突变, 尽管因为遗传背景的不同, 使两者在表型上有差异, 但GA的合成与信号传导应该是一致的, 即突变体*htd1-2* 的矮化与GA无关。

有研究表明水稻的分蘖数和植株高度呈一定程度的负相关^[3, 20], 在其他植物如拟南芥和豌豆中, 相关的多分枝突变体其植株的高度也有不同程度的降低^[21-23]。Zou等^[14]通过去除分蘖芽的方法证明了水稻的矮化是由于分蘖过多造成的, 突变体*htd1* 在去除分蘖芽后植株几乎恢复到野生型的高度。长久以来, 总是将多分蘖矮秆突变体归入矮秆类突变体中, 现在看来应该将这类多分蘖矮化突变体从矮秆类中分离出来, 它们是研究水稻分蘖机制很好的材

料。本研究中突变体 $htd1-2$ 在去除分蘖芽后株高只是部分恢复, 并未像 $htd1$ 那样完全恢复到野生型高度, 也许这与遗传背景的不同或去除分蘖芽的条件不同有关。

对水稻突变体的观察认为, 大多数分蘖增加的突变体, 都伴随着矮化的特点, 但矮化的突变体并不一定多分蘖, 如 $d1$ 、 $sd1$ 等, 至今还未见报道分蘖数显著增加而株高没有变化的水稻突变体。去除分蘖后的野生型籼稻 9311 的植株高度没有发生变化, 可以说明水稻产生合适的分蘖几乎不会影响植株高度的变化, 关于水稻植株高度的变化是否会影响分蘖的发生, 还有待于进一步研究。

参考文献(References):

- [1] Matsuo T, Futsuhara Y, Kikuchi F, Yamaguchi H. Science of the Rice Plant. Tokyo, Japan: Nobunkyo, 1997, 3: 302–303.
- [2] Takeda K. Internode elongation and dwarfism in some gramineous plants. *Gamma Field Sym*, 1977, 16: 1–18.
- [3] Iwata N, Takamura I, Wu HK, Siddiq EA, Rutger JN. List of genes for various traits (with chromosome and main literature). *Rice Genet Newsl*, 1995, 12: 61–93.
- [4] Ashikari M, Wu J, Yano M, Sasaki T, Yoshimura A. Rice gibberellin-insensitive dwarf mutant gene Dwarf 1 encodes the alpha-subunit of GTP-binding protein. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, 96 (18): 10284–10289. [\[DOI\]](#)
- [5] Ueguchi-Tanaka M, Ashikari M, Itoh H, Kobayashi M, Kitano H, Matsuoka M. Characterization of rice dwarf mutant, Gibberellin-Insensitive Dwarf 1 (GID1). In: 17th International Conference on Plant Growth Substance, 2001, 1–6.
- [6] Monna L, Kitazawa N, Yoshino R, Suzuki J, Masuda H, Maehara Y, Tanji M, Sato M, Nasu S, Minobe Y. Positional cloning of rice semidwarfing gene, $sd-1$: rice "green revolution gene" encodes a mutant enzyme involved in gibberellin synthesis. *DNA Res*, 2002, 9 (1): 11–17. [\[DOI\]](#)
- [7] Sasaki A, Ashikari M, Ueguchi-Tanaka M, Itoh H, Nishimura A, Swapan D, Ishiyama K, Saito T, Kobayashi M, Khush GS, Kitano H, Matsuoka M. Green revolution: a mutant gibberellin-synthesis gene in rice. *Nature*, 2002, 416(6882): 701–702.
- [8] Spielmeyer W, Ellis MH, Chandler PM. Semidwarf ($sd-1$), "green revolution" rice, contains a defective gibberellin 20-oxidase gene. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99 (13): 9043–9048. [\[DOI\]](#)
- [9] 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 (9): 1591–1606. [\[DOI\]](#)
- [10] Hong Z, Ueguchi-Tanaka M, Umemura K, Uozu S, Fujioka S, Takatsuto S, Yoshida S, Ashikari M, Kitano H, Matsuoka M. A rice brassinosteroid-deficient mutant, *ebisu dwarf* ($d2$), is caused by a loss of function of a new member of cytochrome P450. *Plant Cell*, 2003, 15 (12): 2900–2910. [\[DOI\]](#)
- [11] Li X, Qian Q, Fu Z, Wang Y, Xiong G, Zeng D, Wang X, Liu X, Teng S, Hiroshi F, Yuan M, Luo D, Han B, Li J. Control of tillering in rice. *Nature*, 2003, 422 (6932): 618–621. [\[DOI\]](#)
- [12] Ishikawa S, Maekawa M, Arite T, Onishi K, Takamura I, Kyozuka J. Suppression of tiller bud activity in tillering dwarf mutants of rice. *Plant Cell Physiol*, 2005, 46 (1): 79–86. [\[DOI\]](#)
- [13] Zou J, Chen Z, Zhang S, Zhang W, Jiang G, Zhao X, Zhai W, Pan X, Zhu L. Characterizations and fine mapping of a mutant gene for high tillering and dwarf in rice (*Oryza sativa*). *Planta*, 2005, 222 (4): 604–612. [\[DOI\]](#)
- [14] Zou J, Zhang S, Zhang W, Li G, Chen Z, Zhai W, Zhao X, Pan X, Xie Q, Zhu L. The rice HIGH-TILLERING DWARF1 encoding an ortholog of *Arabidopsis* MAX3 is required for negative regulation of the outgrowth of axillary buds. *Plant J*, 2006, 48 (5): 687–698.
- [15] Arite T, Iwata H, Ohshima K, Maekawa M, Nakajima M, Kojima M, Sakakibara H, Kyozuka J. DWARF10, an RMS1/MAX4/DAD1 ortholog, controls lateral bud outgrowth in rice. *Plant J*, 2007, 51 (6): 1019–1029. [\[DOI\]](#)
- [16] 胡标林, 谢建坤, 包劲松, 余守武, 张铮. 籼稻 9311 辐射突变体的分离与鉴定. 分子植物育种, 2006, 4 (2): 181–188.
- [17] Mitsunaga S, Tashiro T, Yamaguchi J. Identification and characterization of gibberellin-insensitive mutants selected from among dwarf mutants of rice. *Theor Appl Genet*, 1994, 87 (6): 705–712.
- [18] 隋炯明, 梁国华, 李欣, 吴书俊, 严松, 赵翔强, 张正球, 顾铭洪. 籼稻多分蘖矮秆基因的遗传分析和基因定位. 作物学报, 2006, 32 (6): 845–850.
- [19] Wei L, Xu J, Li X, Qian Q, Zhu L. Genetic analysis and mapping of the dominant dwarfing gene $D-53$ in rice. *J of Integr Plant Biol*, 2006, 48 (4): 447–452. [\[DOI\]](#)
- [20] Yan JQ, Zhu J, He CX, Benmoussa M, Wu P. Quantitative trait loci analysis for the developmental behavior of tiller number in rice (*Oryza sativa* L.). *Theor Appl Genet*, 1998, 97 (1–2): 267–274. [\[DOI\]](#)
- [21] Beveridge CA, Ross JJ, Murfet IC. Branching in pea (action of genes $Rms3$ and $Rms4$). *Plant Physiol*, 1996, 110 (3): 85–9865.
- [22] Booker J, Auldridge M, Wills S, McCarty D, Klee H, Leyser O. MAX3/CCD7 is a carotenoid cleavage dioxygenase required for the synthesis of a novel plant signaling molecule. *Curr Biol*, 2004, 14 (14): 1232–1238. [\[DOI\]](#)
- [23] Sorefan K, Booker J, Haurogne K, Goussot M, Bainbridge K, Foo E, Chatfield S, Ward S, Beveridge C, Rameau C, Leyser O. MAX4 and RMS1 are orthologous dioxygenase-like genes that regulate shoot branching in *Arabidopsis* and pea. *Genes Dev*, 2003, 17 (12): 1469–1474. [\[DOI\]](#)