

一个水稻显性短根突变体的遗传分析和基因定位

林 丽¹, 陈文笔², 庄飘飘², 丁沃娜², 朱世华^{2*}

(1. 宁波大学 海洋学院, 浙江 宁波 315211; 2. 宁波大学 科学技术学院, 浙江 宁波 315211)

摘要: 研究所用的水稻短根突变材料 *ksr3* 是从甲基磺酸乙酯诱变的籼稻品种 Kasalath 突变体库中筛选获得. 该突变体在苗期表现为主根、侧根和不定根明显变短且扭曲, 根毛异常浓密, 长度明显增加, 成熟期植株明显矮化. 遗传分析表明该短根突变性状受一对显性基因控制. 用突变体 *ksr3* 和 Nipponbare 杂交构建的 F₂ 群体进行基因定位, 将该基因定位于第 7 染色体上, 与 STS 标记 S3569 和 S5817 连锁, 在 2 个标记间发展 4 个新的 STS 标记, 最终将 *KSR3* 定位在 S3702 和 S4046 之间的 312 kb 范围内.

关键词: 水稻; 根系基因; 遗传分析; 基因定位

中图分类号: S511

文献标志码: A

文章编号: 1001-5132 (2015) 02-0009-04

水资源的短缺使得提高水稻的抗旱性乃至旱作成为水稻栽培和育种发展的一个重要方向, 根系作为吸收土壤中水分的主要器官, 其性状和构型与抗旱性密切相关^[1-2]. Champoux 等^[3]首次利用分子标记进行了水稻根系性状与抗旱性的 QTL 研究, 发现 14 个抗旱性 QTL 中就有 12 个与根系性状相关, 随后更多的 QTL 研究也发现水稻抗旱性与根系性状相关^[4-6]. 最近通过 QTL 定位, 图位克隆到了能提高水稻抗旱性的深根基因 *DROI*, 这是个与根系构型和长度相关的基因^[7]. 越来越多的证据表明水稻根系性状与产量相关^[8-10], 张耗等^[11]发现根长和根干重等 6 个根系性状与产量呈极显著线性正相关, 梁永书等^[12]发现根长和根干重等 6 个根系性状与株高和单株产量等 6 个地上部性状呈正相关, 并且认为根长是根系中最重要的性状.

基于对水稻根系重要性的认识, 有研究通过对根系突变体和 QTL 等材料进行了根系性状基因的定位和克隆, 探讨根系生长发育、抗旱和产量等相关性的分子机理^[13], 但对生长发育的调控网络和分子机理的解析有待更多根系基因被克隆和研究. 笔者从 EMS 诱变的 Kasalath 突变体库中筛选得到 1 个短根突变体 *ksr3*, 对 *KSR3* 进行基因定位.

1 材料与方法

1.1 水稻材料

水稻短根突变体 *ksr3*(*kasalath short root 3*)由浙江大学植物生理学与生物化学国家重点实验室提供, 其短根性状能够稳定遗传. 将 *ksr3* 分别与籼稻品种 Kasalath 和粳稻品种 Nipponbare 杂交, F₁ 自交获得 F₂ 群体, 分别用于遗传分析和基因定位.

1.2 突变体的表型分析

将突变体 *ksr3* 和野生型 Kasalath 用 0.6%稀 HNO₃ 破休眠处理 16 h, 37 °C 暗处理催芽约 1.5 d, 将露白种子播于漂浮在水稻营养液^[13](pH=5.0)中的尼龙网纱上. 水培 7 d 后, 随机抽取突变体 *ksr3* 和野生型 Kasalath 各 15 株, 统计植株的株高、主根长度、不定根长度和不定根数目; 用照相机摄取整株照和根部照; 用 Leica M205C 对水稻根部进行观察, 统计侧根和根毛长度.

1.3 遗传分析

将 *ksr3* 与 Kasalath 杂交获得的 F₂ 种子在水稻营养液中培养 7 d 后, 统计野生型和突变体表型植株的数量, 进行 χ^2 检验, 按孟德尔遗传规律分析该短根突变表型是否由单基因控制.

收稿日期: 2014-03-07.

宁波大学学报(理工版)网址: <http://journal.lg.nbu.edu.cn/>

基金项目: 国家自然科学基金(31371595); 宁波大学胡岗优秀博士基金.

第一作者: 林丽(1989-), 女, 浙江丽水人, 在读硕士研究生, 主要研究方向: 植物分子生物学. E-mail: 734130460@qq.com

*通信作者: 朱世华(1963-), 男, 浙江宁波人, 博士/教授, 主要研究方向: 植物遗传学. E-mail: zhushihua@nbu.edu.cn

1.4 DNA 提取

采集 Kasalath、Nipponbare、F₁ 和 F₂ 分离群体叶片,TPS 法提取 DNA 用于 PCR 反应和检测^[14]。

1.5 突变基因的定位分析

在已公布的 SSR 序列(<http://www.gramene.org/microsat/ssr.html>)中,选取均匀分布在 12 条染色体上对 Kasalath 和 Nipponbare 有多态性的引物进行粗定位。比较 Nipponbare 和 9311 的核酸序列,在有差异之处设计 STS 标记,筛选有多态性的 STS 标记对 *KSR3* 进行精细定位。

2 结果与分析

2.1 突变体的表型分析

将突变体 *ksr3* 和野生型 Kasalath 在水稻营养液中培养 7 d 后观察表型,发现突变体根部性状较野生型,主根、侧根和不定根都明显变短,其中,主根和不定根长度分别约为野生型的 15.71%和 22.35%,侧根的平均长度仅为野生型的 43.10%。在体视镜下观察发现,突变体的侧根比野生型粗壮,并伴有扭曲,且突变体的根毛数量明显增加,变得十分浓密,长度是野生型的 2 倍左右。此外,突变体成熟期植株明显矮化(图 1、表 1)。

2.2 突变体的遗传分析

将水稻短根突变体 *ksr3* 与 Kasalath 杂交,其 F₁ 个体均表现为短根,说明该短根突变性状受显性

表 1 野生型和突变体 *ksr3* 生长 7 d 的植株表型比较

性状	WT	<i>ksr3</i>	野生型增减/%
株高/cm	14.4±0.41	10.1±0.64	-29.86 ⁴⁾
主根/cm	14.0±0.22	2.2±0.13	-84.29 ⁵⁾
不定根 ¹⁾ /cm	3.6±0.44	0.8±0.09	-77.65 ⁵⁾
不定根数/个	3.1±0.22	3.3±0.46	6.45
侧根 ²⁾ /cm	5.8±0.60	2.5±0.14	-56.90 ⁵⁾
侧根数/个	177.4±10.95	33.7±3.95	-81.00 ⁵⁾
根毛 ³⁾ /μm	426.5±7.18	867.8±9.85	-03.47 ⁵⁾

注: 1) 3 根最长不定根的平均值; 2) 最长 20 根侧根的平均长度; 3) 最长 20 根根毛的平均长度,距根茎结合部 2~3 cm 处; 4) 在 0.01 水平上差异显著; 5) 在 0.05 水平上差异显著。

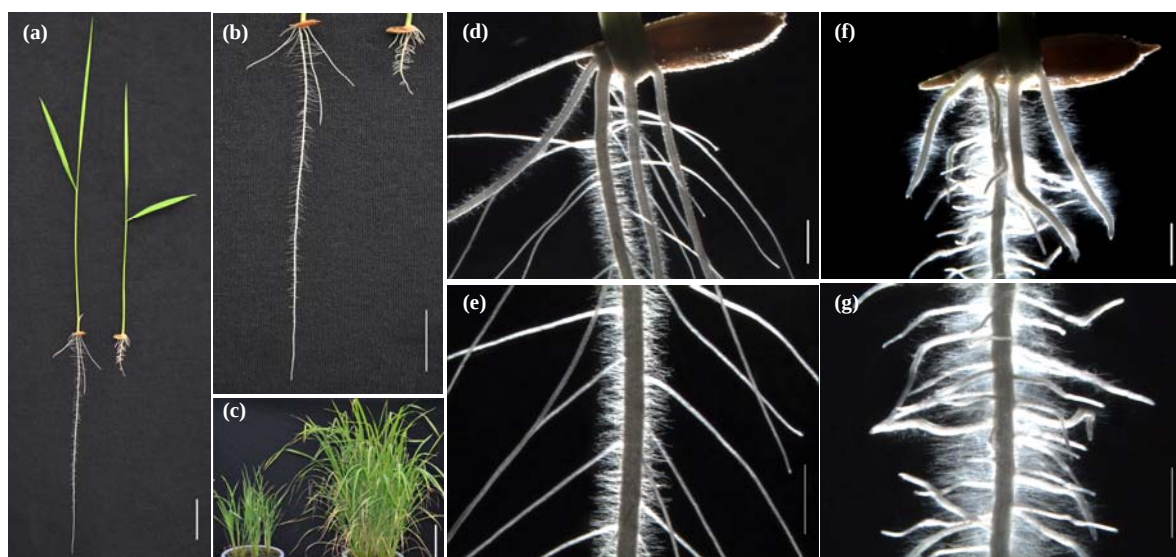
核基因控制。400 个 F₂ 单株间根长出现分离,经卡方检测,长根与短根株数符合 1:3 的分离比例($\chi^2 = 1.92 < \chi_{0.05}^2 = 3.84$)(表 2)。因此,该短根性状是由 1 对显性基因控制。

表 2 短根突变体 *ksr3* 的遗传分析

杂交组合	F ₁ 表型	F ₂ 群体			χ^2
		正常型株数	短根株数	总株数	
<i>ksr3</i> /Kasalath	短根	88	312	400	1.92

2.3 突变基因 *KSR3* 的分子定位

以突变体 *ksr3* 与 Nipponbare 杂交的 F₂ 群体作为定位群体,并从中分离群体中随机选取 30 株长根植株分别抽提 DNA,然后取等量 DNA 混合,构建为突变池。以突变池作为模板,两亲本(Kasalath



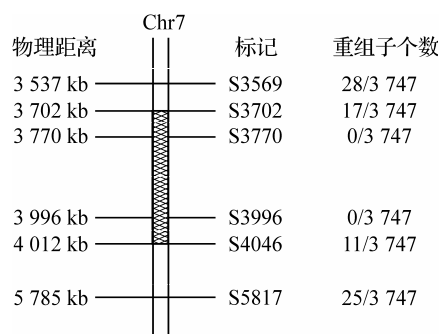
(a)和(b)为野生型 WT(左)和突变体 *ksr3*(右)生长 7 d 的表型(Bars=2 cm); (c)为野生型 WT(右)和突变体 *ksr3*(左)的成熟期表型(Bars=20 cm); (d)和(e)为野生型主根的体视镜照(Bars=1 mm); (f)和(g)为突变体 *ksr3* 主根的体视镜照(Bars=1 mm)。

图 1 水稻野生型和突变体 *ksr3* 的表型

表3 用于突变体 *ksr3* 基因定位的分子标记序列

引物名称	正向引物(5'—3')	反向引物(5'—3')
S3569	CATGCAGTGATGGCAACTATA	TACTAACGAGCCAAGACCTGT
S3702	TCTGGAAACTCATGAAAGATACA	TTCCCATATCCGTAACACTAAAT
S3770	GCCACCAACAAGGAC	TGTATGTAAGGAAACACAA
S3996	GGCTGCTTTGCTTTGATTCTC	CCATTTGTGCTGCTCCCTC
S4046	CTGACGTCGAGATCAAATGTC	GTCACTGATGCGAATGGGATC
S5817	TGTCCATTGTGGATCTATCTCTA	CGGTTAATTTTAAGTCAAGGT

和 Nipponbare) 和 F_1 的 DNA 为对照, 在 12 条染色体上均匀分布的具有多态性 SSR 标记以及根据 Nipponbare 和 9311 的基因组序列差异自行设计的 STS 标记上进行扩增。最后发现 STS 标记 S3569 和 S5817 突变池 DNA 的 PCR 产物偏向 Nipponbare 带型。因此, 将 *KSR3* 粗定位在 S3569 和 S5817 间, 进一步扩大 F_2 群体, 得到具有长根表型的 F_2 单株 3 747 株。与此同时, 在 S3569 和 S5817 间发展了 4 个在两亲本间具多态性的 STS 分子标记(表 3)。通过精细定位, 最终将 *KSR3* 定位在 S3702 和 S4046 之间, 2 个标记间的物理距离约 312 kb。

图2 *KSR3* 在第 7 染色体上的分子定位

3 讨论与结论

水稻是我国最重要的粮食作物之一, 通过对水稻品种的地上部改良, 特别是在矮秆基因利用和杂交水稻育种方面的研究, 使我国水稻产量取得了两次巨大飞跃, 但对于地下部水稻根系的研究相对较少。根系长度是根构型的最重要指标之一, 可对许多重要性状如养分吸收、抗倒伏性、抗旱性和产量等产生影响^[12]。水稻根系的长度受生长素^[15-17]和细胞分裂素^[18]等激素调控, 并与细胞代谢中糖代谢、细胞壁多糖和纤维素合成^[19-21]、离子的吸收^[22]等相关。但对根系伸长的分子机理的了解较为零碎, 整个调控途径仍不清楚, 需要筛

选更多的突变体和研究更多的突变基因来帮助阐明根系伸长的分子机理。

本研究中 *KSR3* 是 1 个多效基因, 突变体 *ksr3* 的主根、侧根和不定根长明显变短, 但其根毛长度却比野生型长, 密度也增加, 同时侧根变得粗壮; 成熟期植株明显矮化。遗传分析结果显示, 该基因受 1 对显性的核基因控制。利用分子标记对 *KSR3* 进行定位, 最终将其定位在第 7 染色体上 STS 标记 S3702 和 S4046 之间的 312 kb 范围内, 与已报道的水稻根系基因所在的染色体位置均不同, 因此推测 *KSR3* 是一个新的控制水稻根系发育的基因, 为接下来的基因克隆、功能研究和阐明水稻根系发育的分子遗传机理奠定了基础。

参考文献:

- [1] 凌祖铭, 徐保国, 张洪春. 极早熟陆稻新品系“秦爱”的抗旱性试验[J]. 北京农业大学学报, 1983, 9(1):11-20.
- [2] 孙传清, 张文绪. 水稻根系性状和叶片水势的遗传及其相关研究[J]. 中国农业科学, 1995, 28(1):42-48.
- [3] Champoux M C, Wang G, Sarkarung S, et al. Locating genes associated with root morphology and drought avoidance in rice via linkage to molecular markers[J]. Theor Appl Genet, 1995, 90(7/8):969-981.
- [4] Uga Y, Okuno K, Yano M. *Dro1*, a major QTL involved in deep rooting of rice under upland field conditions[J]. J Exp Bot, 2011, 62:2485-2494.
- [5] Ding Xipeng, Li Xiaokai, Xiong Lizhong. Evaluation of near-isogenic lines for drought resistance QTL and fine mapping of a locus affecting flag leaf width, spikelet number, and root volume in rice[J]. Theor Appl Genet, 2011, 123(5):815-826.
- [6] Uga Y, Hanzawa E, Nagai S, et al. Identification of qSOR1, a major rice QTL involved in soil-surface rooting in paddy fields[J]. Theor Appl Genet, 2012, 124(1):75-86.
- [7] Uga Y, Sugimoto K, Ogawa S, et al. Control of root system architecture by *DEEPER ROOTING 1* increases

- rice yield under drought conditions[J]. Nat Genet, 2013 45(9):1097-1102.
- [8] 凌启鸿, 陆卫平, 蒋建中. 水稻不同层次根系功能对产量形成作用的研究[J]. 中国农业科学, 1984, 17(5):3-11.
- [9] 吴伟明, 宋祥甫, 孙宗修, 等. 不同类型水稻的根系分布特征比较[J]. 中国水稻科学, 2001, 15(4):276-280.
- [10] 蔡昆争, 骆世明, 段舜山. 水稻根系的分布及其与产量的关系[J]. 华南农业大学学报: 自然科学版, 2003, 24(3):1-4.
- [11] 张耗, 黄钻华, 王静超, 等. 江苏中籼水稻品种演进过程中根系形态生理性状的变化及其与产量的关系[J]. 作物学报, 2011, 37(6):1020-1030.
- [12] 梁永书, 占小登, 高志强, 等. 超级稻协优9308衍生群体根系与地上部重要农艺性状的相关性[J]. 作物学报, 2011, 37(10):1711-1723.
- [13] 史俊颖, 丁沃娜, 朱世华. 水稻根系基因克隆与功能研究的进展[J]. 宁波大学学报: 理工版, 2013, 26(4):7-12.
- [14] 宁永强, 丁沃娜, 朱世华, 等. 水稻短根突变体 *ksr1* 的遗传分析与基因定位[J]. 中国水稻科学, 2010, 24(6):652-654.
- [15] Nakamura A, Umemura I, Gomi K, et al. Production and characterization of auxin-insensitive rice by overexpression of a mutagenized rice IAA protein[J]. Plant J, 2006, 46(2):297-306.
- [16] Song Yaling, You Jun, Xiong Lizhong. Characterization of *OsIAA1* gene, a member of rice Aux/IAA family involved in auxin and brassinosteroid hormone responses [J]. Plant Mol Biol, 2009, 70(3):297-309.
- [17] Shen Cenja, Wang Suikang, Zhang Saina, et al. OsARF16, a transcription factor, is required for auxin and phosphate starvation response in rice (*Oryza sativa* L.)[J]. Plant Cell Environ, 2013, 36(3):607-620.
- [18] Liu Wei, Xu Zhihong, Luo Da, et al. Roles of OsCKI1, a rice casein kinase I, in root development and plant hormone sensitivity[J]. Plant J, 2003, 36(2):189-202.
- [19] Qin Chen, Li Yuanya, Gan Jian, et al. OsDGL1, a homolog of an oligosaccharyltransferase complex subunit, is involved in N-glycosylation and root development in rice[J]. Plant Cell Physiol, 2013, 54(1):129-137.
- [20] Zhang Jinwei, Xu Lei, Wu Yunrong, et al. OsGLU3, a putative membrane-bound endo-1,4-beta-glucanase, is required for root cell elongation and division in rice (*Oryza sativa* L.)[J]. Mol Plant, 2012, 5(1):176-186.
- [21] Jia Liqiang, Zhang Botao, Mao Chuanzao, et al. OsCYT-INV1 for alkaline/ neutral invertase is involved in root cell development and reproductivity in rice (*Oryza sativa* L.)[J]. Planta, 2008, 228(1):51-59.
- [22] Li Jing, Zhu Shihua, Song Xinwei, et al. A rice glutamate receptor-like gene is critical for the division and survival of individual cells in the root apical meristem[J]. Plant Cell, 2006 18(2):340-349.

Genetic Analysis Based Gene Mapping of a Dominant Short-Root Mutant in Rice

LIN Li¹, CHEN Wen-bi², ZHUANG Piao-piao², DING Wo-na², ZHU Shi-hua^{2*}

(1.School of Marine Sciences, Ningbo University, Ningbo 315211, China;

2.College of Science and Technology, Ningbo University, Ningbo 315211, China)

Abstract: A leaky rice mutant is singled out from an ethylmethane sulfonate (EMS)-mutagenized rice library based on its short root phenotype. The primary root, lateral root and crown root of *ksr3* are found to be shorter in length, and accompanied with distortion. Opposite to what is expected, the root hairs of the mutant are thicker and longer. The plants are shorter than the wild type. The genetic analysis indicates that the mutation is controlled by a single dominant nuclear gene. To map *KSR3*, an F₂ population is formed by crossing the mutant *ksr3* with Nipponbare wild type. Using the published SSR markers and newly designed STS markers, *KSR3* is first mapped between the microsatellite markers S3569 and S5817 on chromosome 7. Then, four new polymorphic sequence-tagged site markers are developed in the region. *KSR3* is finally mapped between markers S3702 and S4046 with a physical distance of 312 kb. The finding is expected to help in cloning, functional study and breeding applications.

Key words: rice (*Oryza sativa* L.); root gene; genetic analysis; gene mapping

(责任编辑 章践立)