

研究  
简报

## 一个水稻抽穗期主基因 $Hd(t)$ 的遗传分析及分子定位

龚晓平 杨正林 赵芳明 钟秉强 凌英华 何光华\*

(西南大学水稻研究所/农业部生物技术及作物品质改良重点开放实验室, 重庆 400716)

**摘要:** 从缙恢 10/R21 的杂种后代中发现了抽穗期稳定遗传的迟熟恢复系 N91 (110 ~ 114 d), 以早熟不育系 23A (89 ~ 94 d) 作为杂交和回交亲本, 获得的  $F_2$  和  $BC_1F_1$  群体抽穗期均表现双峰分布,  $\chi^2$  检测表明其抽穗期受一对主基因控制, 暂命名为  $Hd(t)$ 。在 400 多对 SSR 引物中筛选出 5 对在早熟基因池和迟熟基因池中表现差异的引物, 进行单株验证, 用回交群体进行基因定位, 发现位于第 7 染色体长臂末端的 SSR 标记 RM1364 和 RM3555 与  $Hd(t)$  连锁, 遗传距离分别为 32.7 cM 和 22.5 cM。在目标区域进一步合成 8 对 SSR 引物, 将  $Hd(t)$  基因定位在 RM22143 与第 7 染色体末端之间, 与 RM22143 相距 12.9 cM。该结果为  $Hd(t)$  基因的精细定位、分子标记辅助育种和基因克隆奠定了基础。

**关键词:** 水稻; 抽穗期; 遗传分析; 基因定位; SSR 标记

## Genetic Analysis and Molecular Mapping of a Dominant Heading Period Gene $Hd(t)$

GONG Xiao-Ping, YANG Zheng-Lin, ZHAO Fang-Ming, ZHONG Bing-Qiang, LING Ying-Hua, and HE Guang-Hua\*

(Rice Research Institute, Southwest University, Key Laboratory of Biotechnology and Crop Quality Improvement, Ministry of Agriculture, Chongqing, 400716, China)

**Abstract:** A restoring line N91 with late heading period (from 110 d to 114 d) was found from the offspring of a cross (Jinhui 10/R21), and N91 was crossed and backcrossed with Jin 23A, which was sterile line with early heading period (89-94 d). The frequency distribution of heading period showed double peaks in  $F_2$  and  $BC_1F_1$  population and  $\chi^2$  square test demonstrated the heading period was controlled by a major gene, which tentatively named as  $Hd(t)$ , and other minor genes. Bulkled segregant analysis was used to map the  $Hd(t)$  by the backcross population, and 5 out of 400 SSR primer pairs showed polymorphism between late and early genome pools. Linkage analysis demonstrated the  $Hd(t)$  linked with two SSR loci (RM1364, RM3555) on chromosome 7. The  $Hd(t)$  were 32.7 and 22.5 cM from loci RM1364 and RM3555 respectively, and two SSR loci located at the same side of the  $Hd(t)$ . Based on the targeted interval, 8 pairs of primers were selected from the public SSR primer pairs according to rice physical map. Through linkage analysis, RM22143 was added into the interval of the RM3555 and  $Hd(t)$  on the distal end of long arm of chromosome 7, and  $Hd(t)$  was 12.9 cM from RM22143. The present result establishes a basic for fine mapping, molecular marker assisted breeding and gene cloning of the  $Hd(t)$ .

**Keywords:** Rice; Heading period; Genetic analysis; Gene mapping; SSR marker

抽穗期是水稻重要的农艺性状之一, 其长短将影响品种的地区和季节适应性, 长期以来受到育种家的广泛重视<sup>[1-4]</sup>。因此, 深入了解水稻抽穗期的遗传规律, 对相关的基因进行精细定位和克隆, 探讨通过分子水平的操作来改良水稻的生育期性状具有广阔的应用前景。同时, 水稻的抽穗期基因等同双子叶植物的开花期基因, 调控植株从营养生长到生殖生长的转变, 是近年来发育生物学的研究热点<sup>[5-7]</sup>。

水稻抽穗期的遗传行为复杂, 多数情况下表现为多基因控制的数量性状<sup>[4]</sup>。但也有一些研究报道, 抽穗期既表现为连续变异的数量性状, 也有质量性状遗传方式<sup>[8-10]</sup>。近年来, 随着 DNA 分子标记技术的建立和发展, 人们利用不同的作图群体已经深入开展了对水稻抽穗期的 QTL 定位研究<sup>[11]</sup>。根据 Gramene 网站 (<http://www.gramene.org>) 2005 年公布的数据, 共定位了 536 个水稻抽穗期 QTL。通过建立特定

基金项目: 国家“十一五”科技支撑计划项目(2006BAD01A01); 重庆市动植物良种创新重大专项资助(CSTC, 2007AA1019)

作者简介: 龚晓平(1980-), 男, 硕士研究生, 专业: 作物遗传育种。E-mail: gong1981\_112@tom.com

\* 通讯作者(Corresponding author): 何光华, 男, 教授, 博士生导师, 研究方向: 水稻遗传育种与生物技术。E-mail: hegh@swu.edu.cn

Received (收稿日期): 2007-04-26; Accepted (接受日期): 2007-06-15.

QTL 的近等基因系, 采用图位克隆法, 分离到 4 个抽穗期基因 (*Hd1*、*Hd3a*、*Hd6* 和 *Ehd1*)<sup>[12-15]</sup>。

近几年水稻抽穗期性状的研究主要集中在 QTL 定位上, 对于受主基因控制的抽穗期性状报道较少。Tsai<sup>[8]</sup> 首先在梗稻上发现显性早熟基因 *Ef-1*, 位于第 10 染色体, 可使水稻抽穗期提早 10 d 左右。Sato 等<sup>[9]</sup> 也在梗稻上发现显性早熟基因 *Ef<sub>x</sub>*, 位于第 2 染色体, 与 *Ef-1* 基因共同起作用时早熟效应显著增加且对温度不敏感。邓晓建等<sup>[10]</sup> 首次发现早抽核不育系 6442S-7 具有完全显性早熟特性, 该特性由 2 对显性早熟基因控制, 其中 1 对 *Ef-cd* 位于第 3 染色体短臂。

N91 是我们通过杂交育种选育的一个抽穗期稳定材料, 其抽穗期受一对主效基因控制, 本文进一步对该基因进行遗传分析和定位, 以期对 *Hd(1)* 基因的分子标记辅助育种和基因克隆奠定基础。

## 1 材料与与方法

### 1.1 群体构建和抽穗期记载

N91 由西南大学水稻研究所提供, 2005 年夏季在重庆用金 23A 与 N91 配制  $F_1$ , 同年秋季在海南种植  $F_1$ , 以金 23A 为回交亲本配制  $BC_1F_1$  并收获  $F_2$  种子。2006 年 3 月在重庆自然条件下, 同时播种亲本、 $F_1$ 、 $F_2$  及  $BC_1F_1$  群体。从 2006 年 6 月 8 日到 2006 年 7 月 8 日对每植株每 2 d 观测一次, 以每一株的第一个穗子抽出 1/3 计为抽穗, 以播种日至抽穗日的天数作为抽穗期, 对亲本、 $F_1$ 、 $F_2$  及回交群体进行记载。

### 1.2 水稻 DNA 的提取

采用 CTAB 法提取基因组 DNA 及  $F_2$  代 DNA 模板<sup>[16]</sup>。采用碱煮法按单株提取回交群体 DNA 备用<sup>[17]</sup>。

### 1.3 SSR 分子标记分析

根据网上已发表的引物序列由英骏公司合成 (<http://www.genemc.org/>) SSR 标记。对 PCR 扩增体系根据引物特性做部分修改, 12.6  $\mu$ L 反应体系中包含 1.25  $\mu$ L  $10 \times$  PCR buffer, 0.75  $\mu$ L 25 mmol  $L^{-1}$  MgCl<sub>2</sub>, 0.1  $\mu$ L 5 U  $\mu$ L<sup>-1</sup> Taq 酶, 0.5  $\mu$ L 2.5 mmol  $L^{-1}$  dNTP, 1.0  $\mu$ L 10  $\mu$ mol  $L^{-1}$  引物, 1.0  $\mu$ L 50 ng  $\mu$ L<sup>-1</sup> 模板 DNA, 8.0  $\mu$ L ddH<sub>2</sub>O。在 Biometra PCR 仪上进行扩增, 程序为 94 $^{\circ}C$  预变性 5 min; 94 $^{\circ}C$  30 s, 55 $^{\circ}C$  30 s, 72 $^{\circ}C$  1 min, 35 个循环; 72 $^{\circ}C$  延伸 10 min。反应产物在 10% 的非变性聚丙烯酰胺凝胶上电泳, 经银染显色后观察记录并拍照保存。

## 1.4 遗传作图

以分子标记对定位群体进行基因型分析, 利用 MAPMAKER 3.0 软件进行连锁分析<sup>[18]</sup>。

## 2 结果与分析

### 2.1 *Hd(1)* 性状表现及遗传分析

N91 的抽穗期为 108 ~ 114 d, 金 23A 为 90 ~ 94 d。  $F_1$  抽穗期为 96 ~ 106 d, 介于亲本之间, 但是更接近 N91, 表明 N91 的迟抽穗对金 23A 的早抽穗为不完全显性 (图 1)。  $F_2$  和  $BC_1F_1$  群体均呈明显的双峰分布 (图 2, 图 3)。以 96 d 为分界,  $F_2$  群体迟熟株与早熟植株的分离比例符合 3:1,  $BC_1F_1$  群体的早熟植株与迟熟株比例符合 1:1, 表明 N91 的迟抽穗性状受一对不完全显性的主效基因控制 (表 1)。回交群体中早熟比较集中, 迟熟群体比较分散, 推测除了受主基因控制外, 可能还受到微效多基因修饰。

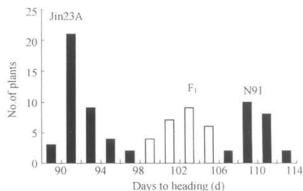


图 1 亲本和  $F_1$  抽穗期分布图  
Fig.1 Frequency distribution of days-to-heading in  $F_1$  and the parental lines

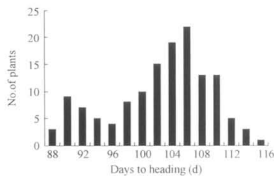


图 2  $F_2$  抽穗期分布图  
Fig.2 Frequency distribution of days-to-heading in  $F_2$  population

表 1 早熟植株和正常株在  $F_2$  和  $BC_1F_1$  群体中的比例

Table 1 The ratio of early heading plants to late heading plants in the  $F_2$  and  $BC_1F_1$

杂交组合 Cross combination	迟熟株数 Late heading plant	早熟株数 Early heading plant	总株数 Total plant	$\chi^2$
Jin23A/N91	159	64	223	1.436(3:1)
Jin23A//Jin23A/N91	600	603	1203	0.003(1:1)

### 2.2 *Hd(1)* 基因的定位

在  $F_2$  群体中, 选择 10 株早抽穗单株构建早熟基因池,

10 株迟抽穗单株构建迟熟基因池, 利用 400 对 SSR 引物对基因池进行筛选, 结果引物 RM3555 和 RM1364 在基因池间表

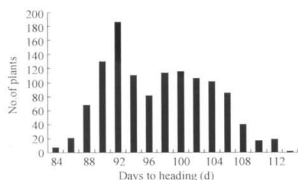


图3  $BC_1F_1$  抽穗期分布图  
Fig. 3 Frequency distribution of days-to-heading in  $BC_1F_1$  population

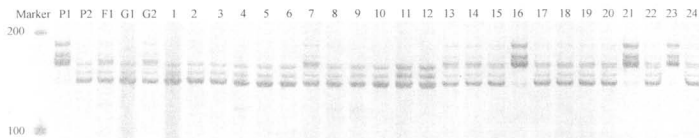


图4 引物 RM3555 对  $F_2$  群体的单株验证  
Fig. 4 SSR patterns amplified with RM3555 in individuals of  $F_2$  segregation population for verification

$P_1$  为迟抽亲本;  $P_2$  为早抽亲本;  $F_1$  为  $P_1$  与  $P_2$  的杂交后代;  $G_1$  为早抽基因池;  $G_2$  为迟抽基因池;  
1-12 为  $F_2$  群体中的早抽群体; 13-24 为  $F_2$  群体中的迟抽群体。

$P_1$ : late heading parent;  $P_2$ : early heading parent;  $F_1$ : offspring of the cross between  $P_1$  and  $P_2$ ;  $G_1$ : early heading bulk;  $G_2$ : late heading bulk; 1-12: individuals of the population with early heading character selected from  $F_2$ ; 13-24: individuals of the population with late heading character selected from  $F_2$ .

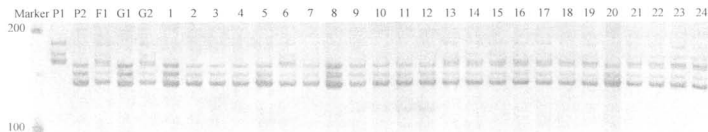


图5 引物 RM3555 对  $BC_1F_1$  群体的单株验证  
Fig. 5 SSR patterns amplified with RM3555 in individuals of  $BC_1F_1$  segregation population for verification

$P_1$  为迟抽亲本;  $P_2$  为早抽亲本;  $F_1$  为  $P_1$  与  $P_2$  的杂交后代;  $G_1$  为早抽基因池;  $G_2$  为迟抽基因池;  
1-12 为  $BC_1F_1$  中的早抽群体; 13-24 为  $BC_1F_1$  中的迟抽群体。

$P_1$ : late heading parent;  $P_2$ : early heading parent;  $F_1$ : offspring of the cross between  $P_1$  and  $P_2$ ;  $G_1$ : early heading bulk;  $G_2$ : late heading bulk; 1-12: individuals of the population with early heading character selected from  $BC_1F_1$ ; 13-24: individuals of the population with late heading character selected from  $BC_1F_1$ .

为了能将  $Hd(t)$  基因限定在更小的范围内,我们在第7染色体 RM3555 与末端区域间合成了8对新引物,对亲本进行 PCR 扩增,其中找到差异引物 RM22143。用引物 RM22143 对  $F_2$  代进行单株验证也表现为连锁,再用该引物对  $BC_1F_1$  进行扩增,表明 RM22143 的重组个体都包含在 RM3555 里面,与  $Hd(t)$  基因相距 12.9 cM (图6)。

### 3 讨论

抽穗期是影响水稻品种地区和栽培季节适应性的重要农艺性状,开展抽穗期基因的定位有助于加速其分子标记辅助选择。为此,国内外学者开展了大量研究,定位了大量的抽穗期基因/QTL。抽穗期的遗传,一般认为受主效基因和/或微效多基因控制。迄今,已报道了29个抽穗期基因及其

现差异,再利用  $F_2$  中的12株早熟株和12株迟熟株进行单株验证(图4),表明2对引物均与目标性状连锁,位于第7染色体长臂末端。由于  $F_2$  群体数量较少,因此,用这两对引物对  $BC_1F_1$  进行检测(图5),同样表现连锁。因  $BC_1F_1$  中迟熟单株较为分散,不如早熟典型,因此,只选用了早熟单株作为定位群体,连锁分析表明,标记 RM1364 和 RM3555 的遗传距离分别为 32.7 cM 和 22.5 cM,且两标记的重组个体呈包含关系,根据物理图谱分析,目标基因处在 RM3555 与第7染色体末端之间。

修饰基因<sup>[19-22]</sup>。在 QTL 定位方面,日本水稻基因组计划(RGP)利用 Nipponbare/Kasalath 衍生的不同分离群体,共定位了14个抽穗期 QTL ( $Hd1 \sim Hd14$ )<sup>[12,23]</sup>。而且 Yano 等通过构建不同 QTL 的近等基因系,对  $Hd1$ 、 $Hd2$ 、 $Hd3$ 、 $Hd6$  和  $Hd9$  进行了精细定位分析,其中  $Hd2$  定位于第7染色体上,距 RFLP 标记 C586 为 0.5 cM<sup>[12,13,24]</sup>。本研究定位的水稻抽穗期主基因  $Hd(t)$  位于第7染色体末端距 RM22143 为 12.9 cM,我们推测该基因可能与  $Hd2$  等位。由于 SSR 标记具有多态性高,实验操作简单、方便、快捷, DNA 需要量少且质量要求不高的优点,适合于大规模的分子育种,因而本研究结果有助于抽穗期的大规模遗传改良<sup>[26]</sup>。然而,二者是否是同一基因,需要进行精细定位或等位性分析,相关工作正在进一步研究之中。

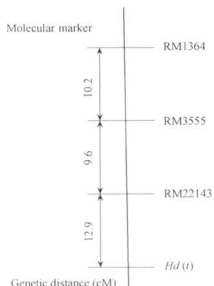


图 6 水稻抽穗期 *Hd(1)* 基因在第 7 染色体上的定位结果  
Fig. 6 Mapping the *Hd(1)* locus on the long arm bottom of chromosome 7

水稻抽穗期的遗传基础非常复杂,关于该性状的研究主要集中在 QTL 定位上,对于受主基因控制的抽穗期性状报道较少。从主基因的显隐性关系来看,不同的实验报道不同, Tsai 和 Sato 等在第 10 染色体和第 2 染色体上分别发现一个显性早熟基因 *Ef-1* 和 *Ef-x*<sup>[8,9]</sup>。李仕贵等和邢永忠等分别发现在第 7 染色体上有一个显性迟熟基因<sup>[1,27]</sup>。本研究发现的抽穗期基因则是一个迟熟对早熟表现为不完全显性的基因。

有关水稻抽穗期的遗传研究已有很多报道,但结果不尽相同,这是由于该性状的遗传基础复杂,涉及到大量的基因座位。这些结果的相互验证和补充,将有利于充分揭示引起抽穗期表型变化的大量基因座位,为相关基因分离和克隆提供重要信息。

## References

[1] Xing Y-Z (邢永忠), Xu C-G (徐才国), Hua J-P (华金平), Tan Y-F (谈移方), Sun X-L (孙新离). Mapping and isolation of quantitative trait loci controlling plant height and heading date in rice. *Acta Bot Sin (植物学报)*, 2001, 43 (7): 712-726 (in Chinese with English abstract)

[2] Zheng K-L (郑康乐). Fine mapping cloning and biological function analysis of heading date QTLs in Rice. *Chin J Rice Sci (中国水稻科学)*, 2005, 19(1): 85-90 (in Chinese with English abstract)

[3] Guo J-X (郭晶心), Chen Z (陈忠), Liu Y-G (刘耀光). Identification of QTLs controlling rice heading date and analysis of the genetic effects. *Mol Plant Breed (分子植物育种)*, 2004, 2(6): 788-794 (in Chinese with English abstract)

[4] Luo L-G (罗林广), Zhai H-Q (翟虎渠), Wan J-M (万建民). Researches on genetics of rice heading date. *Jiangsu J Agric Sci (江苏农业学报)*, 2001, 17 (2): 119-126 (in Chinese with English abstract)

[5] Kyoizuka J, Kobayashi T, Masakazu M, Morita M, Shimamoto K. Spatially and temporally regulated expression of rice MADS box gene with similarity to *Arabidopsis* class A, B, and C genes. *Plant Cell Physiol*, 2000, 41(6): 710-718

[6] Mandel M A, Gustason B C, Svidge B, Yanofsky M F. Molecular characterization of the *Arabidopsis* floral homeotic gene *APETALA1*. *Nature*, 1992, 360: 273-277

[7] Chung Y Y, Kim S R, Finkel D, Yanofsky M F, An G. An early flowering and reduced apical dominance result from ectopic expression of a rice MADS-box gene. *Plant Mol Biol*, 1994, 26: 657-665

[8] Tsai K H. Studies on earliness genes in rice, with special reference to analysis of isalleles at the E locus. *Jpn J Genet*, 1976, 51(2): 115-

128

[9] Sato S, Ogata K, Shinjyo C. Thermo-sensitive action of an earliness gene *Ef-x* in rice. *Oryza sativa L. Jpn J Genet*, 1992, 67: 473-482

[10] Deng X-J (邓晓建), Zhou K-D (周开达), Li R-D (李仁端), Chun Z (淳洋), Li P (李平), Wang W-M (王文明), Zhai W-X (翟文学), Zhu L-H (朱立煌). Identification and gene mapping of completely dominant earliness in rice (*Oryza sativa L.*). *Sci Agric Sin (中国农业科学)*, 2001, 34(3): 233-239 (in Chinese with English abstract)

[11] Yano M, Harushima Y, Kurata N, Nagamura Y, Minobe Y, Sasaki T. Identification of quantitative traitloci controlling heading date in rice using a high-density linkage map. *Theor Appl Genet*, 1997, 95: 1025-1032

[12] Yano M, Katayose Y, Ashikari M, Yamanouchi U, Monna L, Fuse T, Baba T, Yamamoto K, Umehara Y, Nagamura Y, Sasaki T. Hd1, a major photoperiod sensitivity quantitative trait locus in rice, is closely related to the *Arabidopsis* flowering time gene *CONTANS*. *The Plant Cell*, 2000, 12: 2473-2483

[13] Kojima S, Takahashi Y, Kobayashi Y, Kojima S, Takahashi Y, Monna L, Sasaki T, Araki T, Yano M. *Hd3a*, a rice ortholog of the *Arabidopsis FT* gene, promotes transition to flowering downstream of Hd1 under short day conditions. *Plant Cell Physiol*, 2002, 43(10): 1096-1105

[14] Takahashi Y, Shomura A, Sasaki T, Yano M. Hd6, a rice quantitative trait locus involved in photoperiod sensitivity, encodes the a subunit of protein kinase CK2. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, 98(14): 7922-7927

[15] Doi K, Izawa T, Fuse T, Yamanouchi U, Kubo T, Shimatani Z, Yano M, Yoshimura A. Ehd1, a B-type response regulator in rice, confers short-day promotion of flowering and controls FT-like gene expression independently of Hd1. *Genes Dev*, 2004, 18(8): 926-936

[16] Rogers S O, Bendich A J. Extraction of DNA from plant tissues. *Plant Mol Biol Manual*, 1988, A6:1-10

[17] Sang X-C (桑贤春), He G-H (何光华), Zhang Y (张毅), Yang Z-L (杨正林), Pei Y (裴炎). The simple gain of templates of rice genomes DNA for PCR. *Genetics*, 2003, 25(6): 705-707 (in Chinese with English abstract)

[18] Lander E S, Green P, Abrahamson J, Barlow M J, Daly M J, Lincoln S E, Newburg L. MAP-MAKER: an interactive computer for constructing primary genetics linkage maps of experimental and natural populations. *Genomics*, 1987, 1: 174-181

[19] Kinoshita T. Report of committee on gene symbolization, nomenclature and linkage groups. *Rice Genet Newsl*, 1995, 12: 25-125

[20] Okumoto Y, Tanisaka T, Yamagata H. Heading-time genes of the rice varieties grown in the Tohoku-Hokuriku region in Japan. *Jpn J Breed*, 1992, 42: 121-135

[21] Ichitani K, Okumoto Y, Tanisaka T. Genetic analyses of low photoperiod sensitivity of rice cultivars from the northern most regions of Japan. *Plant Breed*, 1998, 117: 543-547

[22] Dung L V, Sane Y. Dissection of a gene complex responsible for photoperiod sensitivity. *Rice Genet Newsl*, 1996, 13: 72-74

[23] Monna L, Lin H X, Kojima S, Sasaki T, Yano M. Genetic dissection of a genomic region for a quantitative trait locus Hd3, into two loci, Hd3a and Hd3b, controlling heading date in rice. *Theor Appl Genet*, 2002, 104: 772-778

[24] Lin H X, Yamamoto T, Sasaki T, Yano M. Characterization and detection of epistatic interactions of three QTLs, Hd1, Hd2, and Hd3, controlling heading date in rice using nearly isogenic lines. *Theor Appl Genet*, 2000, 101: 1021-1028

[25] Yue B (岳兵), Xing Y-Z (邢永忠). Progress on molecular and genetic studies of heading date in rice. *Mol Plant Breed (分子植物育种)*, 2005, 3(2): 222-228 (in Chinese with English abstract)

[26] McCouch S R, Temnykh S, Lukashova A, Coburn J, DeClerck G, Cartinhour S, Harrington S, Thomson M, Septingnisch E, Semon M, Moncada P, Li J M. Microsatellite markers in rice: abundance, distribution, and applications. *Rice Genet*, 2001, 18: 117-135

[27] Li S-G (李仕贵), Ma Y-Q (马玉清), Wang W-M (王文明), Liu G-Q (刘国庆), Zhou K-D (周开达), Zhu L-H (朱立煌). Molecular tagging of a new recessive gene for late heading in a rice cultivar 8987. *Acta Gen Sin (遗传学报)*, 2000, 27(2): 133-138 (in Chinese with English abstract)