

水稻硅含量 QTL *qHUS6.1* 的精细定位

龚俊义, 吴季荣, 王凯, 樊叶杨, 庄杰云*

中国水稻研究所国家水稻改良中心, 水稻生物学国家重点实验室, 杭州 310006

* 联系人, E-mail: jz1803@hzcnc.com

2010-01-20 收稿, 2010-04-30 接受

国家高技术研究发展计划(2009AA101101)和国家自然科学基金(30571062)资助项目

摘要 硅是水稻的有益元素之一. 针对位于水稻第 6 染色体短臂的谷壳硅含量 QTL *qHUS6.1*, 从前期建立的剩余杂合体衍生群体自交后代中, 经目标区间的 13 个 SSR 标记检测, 挑选出杂合区间彼此交迭的 3 个剩余杂合体, 构建了 3 套近等基因系. 在田间种植条件下, 测量成熟后水稻谷壳、剑叶和茎秆的硅含量. 表型分布和方差分析结果都显示, 异质区间为 RM19410~RM5815 的近等基因系具有显著的基因型效应, 而异质区间为 RM4923~RM19410 和 RM19417~RM204 的近等基因系未呈显著变异. 经比较, 将 *qHUS6.1* 定位在 RM19410 和 RM19417 之间约 64.2 kb, 含 9 个候选基因的区域, 该 QTL 作用较强且同时控制水稻谷壳、剑叶和茎秆硅含量, 增效等位基因来自父本密阳 46, 总体上呈加性遗传. 本研究为 *qHUS6.1* 的克隆奠定了基础, 并为 QTL 精细定位材料的构建和应用提供了新思路.

关键词

水稻
硅含量
QTL
精细定位
剩余杂合体
近等基因系

自 20 世纪 90 年代以来, 水稻数量性状座位(quantitative trait locus, QTL)分析全面展开, 并逐步发展到 QTL 的精细定位和克隆, 在抽穗期^[1]、产量^[2]、抗逆^[3]和驯化^[4]等多种类别的性状上不断取得进展. 与主基因克隆常常利用的突变性状不同, 绝大多数水稻 QTL 精细定位和克隆研究的性状为自然变异产生. 自然变异一般涉及大量 QTL, 而效应较小 QTL 的精细定位仍富有挑战性^[3].

水稻是典型的喜硅植物, 硅积累有助于缓解水稻的多种生物胁迫和非生物胁迫^[5], 并以提高结实率为主要途径获得增产^[6,7]. 不同水稻基因型对硅的吸收、分配和积累存在显著差异^[8-10], 这为研究水稻硅含量遗传机理、培育具有高硅含量的水稻品种提供了基础. 近年来, 研究人员已经发现了 3 个水稻群体的硅含量 QTL. Dai 等人^[11]应用籼粳交组合珍汕 97B/密阳 46 的 244 个重组自交系(recombinant inbred line, RIL), 在田间种植条件下将控制水稻不同组织硅含量的 QTL 定位于染色体 1, 5, 6, 11 和 12; Wu 等人^[12]

应用粳粳交组合 Kinmaze/DV85 的 81 个 RIL, 在水培条件下将控制水稻苗期硅吸收的 QTL 定位于染色体 1, 3, 7, 8, 9 和 11; Norton 等人^[13]应用籼粳交组合 Bala/Azucena 的 79 个 RIL, 在田间种植条件下将控制水稻叶片硅含量的 QTL 定位于染色体 5 和 10.

在前期研究中, 我们针对水稻第 6 染色体短臂上的谷壳硅含量 QTL *qHUS6*^[11], 在初步验证^[14]的基础上建立了具有同质遗传背景的分离群体, 将 *qHUS6* 分解为 3 个 QTL, 即 *qHUS6.1*, *qHUS6.2a* 和 *qHUS6.2b*, 其中, *qHUS6.1* 已界定在 147.0 kb 的 RM510~RM19417 区间内, 而 *qHUS6.2a* 和 *qHUS6.2b* 仅分别定位于 1.9 和 2.0 Mb 的 RM19706~RM19795 和 RM314~M19665 区间; 而且, 根据基因组物理位置比较, *qHUS6.1* 和 *qHUS6.2a* 所处区间未见其他水稻硅含量 QTL 和硅相关基因的报道^[15]. 本研究构建了异质区间相互交迭并覆盖了 *qHUS6.1* 区域的 3 套近等基因系材料, 将 *qHUS6.1* 进一步界定在 64.2 kb 的范围内, 并确定其同时控制水稻谷壳、剑叶和茎秆的硅

英文版见: Gong J Y, Wu J R, Wang K, et al. Fine mapping of *qHUS6.1*, a quantitative trait locus for silicon content in rice (*Oryza sativa* L.). Chinese Sci Bull, 2010, 55, doi: 10.1007/s11434-010-4031-5

含量.

1 材料与方法

(i) 水稻材料. 前期应用 208 个多态性水稻 SSR 标记, 从珍汕 97B/密阳 46 F₇ 群体中筛选出一个剩余杂合体(residual heterozygous line, RHL), 自交建立了 1 个 F_{2:3} 群体, 开展水稻第 6 染色体短臂产量性状和硅含量 QTL 的验证与分解^[15,16]. 除第 6 染色体短臂约 7.3 Mb 目标区间和第 1, 2, 4, 5 染色体上分别有 1 个 3.8, 1.1, 2.0, 0.6 Mb 的区间为杂合外, 该 RHL 的其他区间均呈纯合状态^[16]. 本研究所用材料来源于该 RHL 自交 3 代后的 3 个不同单株, 本文称为 TF6-2, TF6-15 和 TF6-17, 它们在 *qHUS6.2a* 和 *qHUS6.2b* 区间均呈父本纯合型, 而在 *qHUS6.1* 及其二侧区域的部分区间呈杂合并相互交迭. 经选用覆盖 *qHUS6.1* 区域的 13 个 SSR 标记(包括 *qHUS6.1* 界定标记 RM510 和 RM19417, 区间内标记 5 个和区间外二侧标记 6 个)检测, TF6-2, TF6-15 和 TF6-17 的杂合区间分别为 RM4923~RM19410, RM19410~RM5815 和 RM19417~RM204 (图 1). 自交形成 3 个 F₂ 群体, 再经上述 13 个标记检测, 分别挑选在分离区间未发生交换的非重组材料, 其中, 从 TF6-2 群体筛选出 10 个母本型纯合子和 10 个父本型纯合子, 从 TF6-15 和 TF6-17 群体中分别筛选出 10 个母本型纯合子、10 个父本型纯合子和 20 个杂合子. 自交后获得 3 套近等基因系, 分别延续其源单株的名字称为 TF6-2, TF6-15 和 TF6-17 近等基因系.

(ii) DNA 提取和分子标记检测. 移栽后 7 d, 每个单株取 3 cm 叶片, 按照 Zheng 等人^[17]的方法提取 DNA. SSR 引物信息来自 Gramene 网站(www.gramene.org), PCR 扩增参照 Chen 等人^[18]的方法, 扩增产物用 6% 的非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳分离、银染检测.

(iii) 性状考察和数据分析. 2007 年夏在浙江富阳种植 3 套近等基因系, 每个株系 12 个单株, 株距和行距 20 cm × 23 cm, 设 2 个重复. 成熟后每个重复每个株系取中间 10 株的主茎, 将茎秆(茎和叶鞘)、剑叶和穗分开后分别混合, 烘干, 取 100 粒饱满的籽粒用砻谷机脱壳获得谷壳. 茎秆、剑叶和谷壳样品磨粉后 60℃ 烘干至恒重, 采用钼蓝比色法测定各样品的硅含量^[19], 所得结果为 SiO₂ 的含量(%). 每样品测 2 次, 取平均值, 运用 SAS 软件的一般线性模型(Proc GLM)^[14,20]对每套近等基因系中不同基因型的表型差异进行方差分析.

2 结果与分析

2.1 3 套近等基因系的表型分布和变异

在所分析的谷壳、剑叶和茎秆硅含量这 3 个性状上, 每套近等基因系各株系的表型平均值均呈现一定程度的变异(图 2), 但从同一套材料不同基因型的表型分布上看, 则 3 套近等基因系存在明显差异. TF6-15 表现为单基因分离的分布模式, 并以剑叶硅含量的分布尤为典型: 母本型株系的表型值变幅为 6.85%~8.35%, 父本型株系为 9.31%~10.37%, 杂合型株系为 8.38%~10.19%; 谷壳和茎秆硅含量的不同基因型分布差异略不明显, 但仍表现出父本型趋于高值区、母本型趋于低值区、杂合型趋中的基本分布. 与此相异的是, TF6-2 和 TF6-17 的不同基因型材料未显示出明显的分布差异, 父本型和母本型株系散布于各个区域.

从这些结果可以推测, 近等基因系 TF6-15 的不同基因型材料之间可能存在控制水稻谷壳、剑叶和茎秆硅含量的等位基因差异, 而近等基因系 TF6-2 和 TF6-17 的不同基因型材料之间则不存在控制这 3 个性状的等位基因差异.

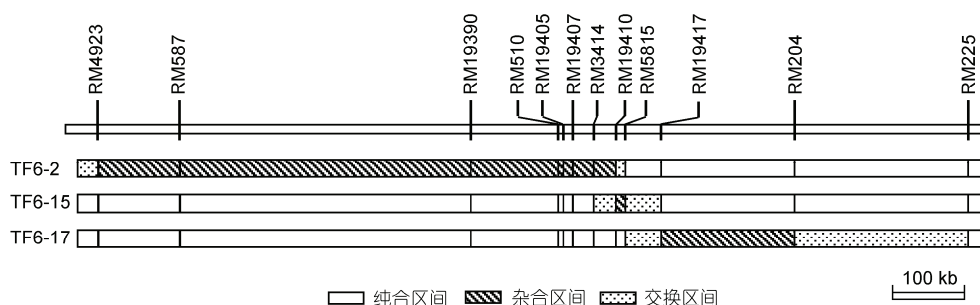


图 1 3 个剩余杂合体在水稻第 6 染色体短臂 RM4923~RM225 区间的基因型

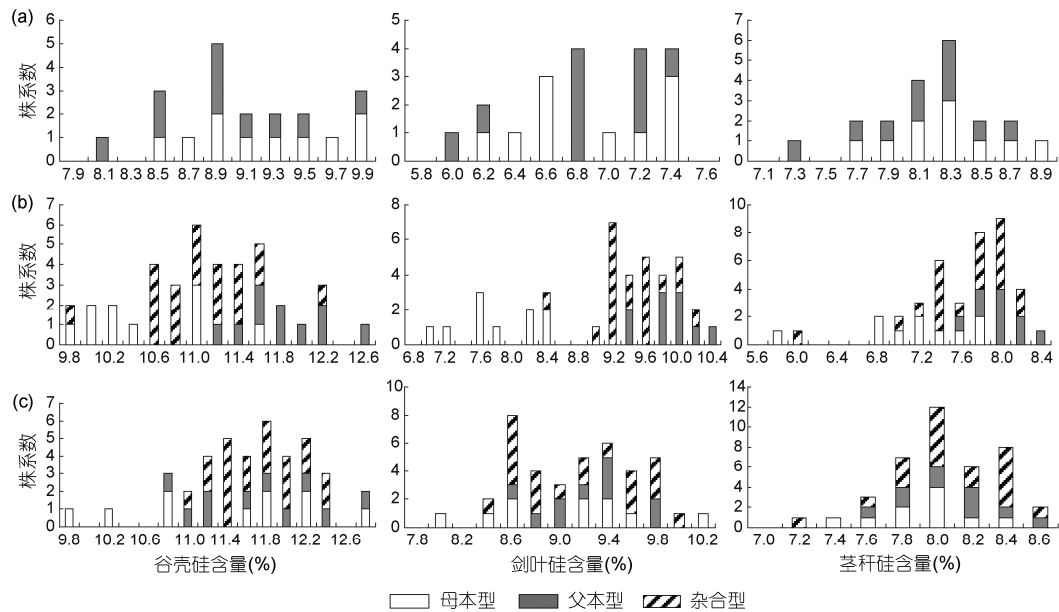


图2 3套近等基因系谷壳、剑叶和茎秆硅含量的分布
(a) TF6-2 近等基因系; (b) TF6-15 近等基因系; (c) TF6-17 近等基因系

2.2 *qHUS6.1* 的精细定位和作用分析

在 TF6-2, TF6-15 和 TF6-17 这 3 套近等基因系中, 不同基因型材料的差异表现在 *qHUS6.1* 及其二侧区域的特定区间. 对于同一套近等基因系的不同基因型材料, 如果其表型呈显著差异, 则可判断对应的异质区间存在控制目标性状的 QTL; 如果其表型不呈显著差异, 则可判断对应的异质区间不存在控制目标性状的 QTL. 进而比较不同近等基因系异质区间的位置和交迭情况, 就可能将 *qHUS6.1* 界定在更小的区间中, 并确定该 QTL 对所分析的各个性状的作用. 方差分析结果显示(表 1), 在 3 套近等基因系中, 只有

TF6-15 的不同基因型呈现出显著的表型差异. 该结果与各近等基因系的表型分布特征一致, 表明 *qHUS6.1* 在 TF6-15 近等基因系中存在等位基因变异. 在 TF6-2 和 TF6-17 近等基因系中不存在等位基因变异; 换句话说, *qHUS6.1* 所处区间在 TF6-15 近等基因系为异质、在另 2 套近等基因系中为同质.

与 RHL TF6-15 的杂合区间(图 1)相对应, 近等基因系 TF6-15 的异质区间为 RM19410~RM5815, 其二侧交换区间 RM3414~RM19410 和 RM5815~RM19417 也可能呈异质, 故可将 *qHUS6.1* 界定在 RM3414~RM19410~RM5815~RM19417 的范围内. 在未检测到

表 1 水稻第 6 染色体上 3 个区间在同质遗传背景下对谷壳、剑叶和茎秆硅含量的作用

近等基因系	异质区间	性状	基因型(平均值±标准差) ^{a)}			方差分析结果		<i>A</i> ^{b)}	<i>D</i> ^{c)}	<i>D/[A]</i> ^{d)}	<i>R</i> ^{2e)}
			母本型	父本型	杂合型	<i>F</i>	<i>P</i>				
TF6-2	RM4923~RM19410	谷壳硅含量	8.13±1.15	7.78±1.07	n.a.	1.99	0.1749				
		剑叶硅含量	8.03±1.21	7.99±1.15	n.a.	0.00	0.9960				
		茎秆硅含量	7.94±0.99	7.87±0.75	n.a.	1.19	0.2893				
TF6-15	RM19410~RM5815	谷壳硅含量	10.41±0.77	11.75±0.90	10.95±0.81	18.46	<0.0001	0.67	-0.13	-0.19	26.2
		剑叶硅含量	7.69±0.99	9.78±1.31	9.35±1.04	72.50	<0.0001	1.05	0.62	0.59	35.6
		茎秆硅含量	7.03±0.88	7.92±0.72	7.51±0.69	8.85	0.0007	0.45	0.04	0.08	15.5
TF6-17	RM19417~RM204	谷壳硅含量	11.31±1.04	11.61±0.85	11.65±0.87	0.99	0.3829				
		剑叶硅含量	8.94±0.88	9.17±0.85	9.08±0.96	0.50	0.6086				
		茎秆硅含量	7.83±0.57	7.94±0.62	7.96±0.68	0.71	0.4991				

a) n.a., 基因型缺失. b) 加性效应, 指 1 个父本型等位基因取代母本型等位基因产生的效应. c) 显性效应. d) 显性度. e) 贡献率(%)

显著 QTL 效应的 2 套近等基因系中, TF6-2 的异质区间为 RM4923~RM19410, 覆盖了 RM3414~RM19410, 说明 *qHUS6.1* 位于 RM3414~RM19410 之外, 可将其进一步界定在 RM19410~RM5815~RM19417 的范围内; TF6-17 的异质区间为 RM19417~RM204, 不涵盖上述 *qHUS6.1* 区间, 未呈显著的基因型效应是合理的. 综合 3 套近等基因系的分析结果, 可将 *qHUS6.1* 界定在 RM19410~RM19417 区间内, 对应于水稻第 6 染色体日本晴序列 2914082~2978314 bp 和 9311 序列 3453590~517784 bp(www.gramene.org), 距离约为 64.2 kb.

在 *qHUS6.1* 呈现等位基因变异的 TF6-15 近等基因系中, 基因型作用表现在分析的所有 3 个性状上, 且均为父本型最高、母本型最低、杂合型居中; 对谷壳、剑叶和茎秆硅含量的加性效应分别为 0.67%, 1.05% 和 0.45%, 显性效应分别为 -0.13%, 0.62% 和 0.04%, 基因型效应对表型变异的贡献率分别为 26.2%, 35.6% 和 15.5% (表 1). 这些结果表明, *qHUS6.1* 作用较强且同时控制水稻谷壳、剑叶和茎秆硅含量, 增效等位基因来自父本密阳 46, 总体上呈加性遗传.

3 讨论

硅是地球上含量最丰富的元素之一, 在水稻的生长过程中具有重要的生理作用, 但水稻硅的遗传学研究长期以来重视不足, 直到近年才报道了应用自然变异的 QTL 定位^[11-13]和应用突变体的基因克隆^[21-24]. 本研究应用异质区间相互交迭的近等基因系, 将 1 个控制水稻不同组织硅含量的 QTL *qHUS6.1* 界定在 RM19410~RM19417 之间约 64.2 kb 的范围内; 根据 Gramene 网站(www.gramene.org)提供的日本晴基因组注释信息, 该区间共有 9 个候选基因. 本研究为 *qHUS6.1* 的克隆提供了良好的基础, 而且, 本研究证明了前期提出的 QTL 精细定位策略^[25,26]是可行的, 即先应用杂合区间较大的 RHL 衍生群体, 将相互连锁、单基因效应较低的 QTL 分解开, 然后, 筛选在较小区间内呈杂合且相互交迭的 RHL, 衍生分离群体或近等基因系, 利用较小样本量的群体将 QTL 定位在仅含几个候选基因的区间中.

qHUS6.1 区间的 9 个候选基因有 2 个功能未知, 为 LOC_Os06g06330 和 LOC_Os06g06370; 2 个与已

知基因对应, 为编码磷脂酰乙醇胺结合蛋白的 LOC_Os06g06300 和 LOC_Os06g06320, 分别与控制水稻抽穗期的基因 *RFT1* 和 *Hd3a*^[1]对应. 在其余 5 个候选基因中, LOC_Os06g06310 编码假定的 porin-like 蛋白, 是一类电压门控性通道蛋白, 参与植物叶绿体和线粒体中阴离子选择性跨膜运输^[27,28]; LOC_Os06g06340 编码非特异性脂类转运蛋白, 是一类参与植物脂肪酸、磷脂、糖脂和固醇类跨膜运输的可溶蛋白^[29]; LOC_Os06g06350 编码假定的单磷酸腺苷结合酶, 是一类包含肽类抗生素合成酶、聚酮合成酶、4-香豆酰辅酶 A 连接酶、乙酰辅酶 A 合成酶和荧光素酶的超家族蛋白^[30]; LOC_Os06g06360 编码 WRKY 转录因子, 是一类参与调控植物抗逆反应、衰老和发育的蛋白^[31]; LOC_Os06g06380 编码假定的 NBS-LRR 类蛋白, 与植物的抗病相关^[32]. 候选基因的进一步筛选工作在进行中.

前人曾分析了水稻苗期根和地上部硅含量^[10]以及成熟后根、叶和茎秆硅含量^[8]的品种差异, 根据其发表的数据分析, 可发现不同组织硅含量未呈显著相关; 在已克隆的硅转运基因中, *Lsi1*^[21]和 *Lsi2*^[22]控制根部硅吸收和转运, 但并不影响硅在不同水稻组织的分配, *Lsi6*^[23,24]则控制硅在地上部的积累而不影响根部的吸收. 这些结果说明, 水稻硅含量基因中有一部分对不同组织硅含量具有相似作用, 另一部分则对不同组织硅含量具有不同作用. 本研究定位的 *qHUS6.1* 同时控制水稻成熟后谷壳、剑叶和茎秆硅含量, 且父本等位基因对 3 个性状均起增效作用, 说明 *qHUS6.1* 可能对硅在水稻各个组织的积累具有相似的作用; 同时可发现, *qHUS6.1* 在 3 个性状上的作用模式和对表型变异的贡献率呈现一定差异, 说明可能存在影响 *qHUS6.1* 作用的其他因素. 参考前人研究结果可以推测, 遗传背景中的其他硅含量基因有一部分对水稻谷壳、剑叶和茎秆硅含量具有不同作用, 有的还可能与 *qHUS6.1* 有相互作用, 从而导致 *qHUS6.1* 对谷壳、剑叶和茎秆硅含量的作用出现差异; 同时, 不同组织硅含量测定的误差差异, 也可能引起各参数出现偏差. 这两方面因素对 *qHUS6.1* 作用变异的影响, 尚有待于进一步研究.

参考文献

- 1 Tsuji H, Tamaki S, Komiya R, et al. Florigen and the photoperiodic control of flowering in rice. *Rice*, 2008, 1: 25—35

- 2 Huang X, Qian Q, Liu Z, et al. Natural variation at the *DEP1* locus enhances grain yield in rice. *Nat Genet*, 2009, 41: 494—497
- 3 Gao J P, Chao D Y, Lin H X. Toward understanding molecular mechanisms of abiotic stress responses in rice. *Rice*, 2008, 1: 36—51
- 4 Vaughan D A, Lu B R, Tomooka N. Was Asian rice (*Oryza sativa*) domesticated more than once? *Rice*, 2008, 1: 16—24
- 5 Ma J F. Role of silicon in enhancing the resistance of plants to biotic and abiotic stresses. *Soil Sci Plant Nutr*, 2004, 50: 11—18
- 6 Tamai K, Ma J F. Reexamination of silicon effects on rice growth and production under field conditions using a low silicon mutant. *Plant Soil*, 2008, 307: 21—27
- 7 官贵德, 方利根. 烟后稻施用硅肥效应及关键技术. *福建稻麦科技*, 2009, 27: 21—23
- 8 Majumder N D, Rakshit S C, Borthakur D N. Genetics of silica uptake in selected genotypes of rice (*O. sativa* L.). *Plant Soil*, 1985, 88: 449—453
- 9 甘秀芹, 江立庚, 徐建云, 等. 水稻硅素积累与分配特征及其基因型差异. *植物营养与肥科学报*, 2004, 10: 531—535
- 10 刘辉, 张静, 杜彦修, 等. 水稻苗期吸收积累硅素的品种差异研究. *植物遗传资源学报*, 2009, 10: 278—282
- 11 Dai W M, Zhang K Q, Duan B W, et al. Genetic dissection of silicon content in different organs of rice. *Crop Sci*, 2005, 45: 1345—1352
- 12 Wu Q S, Wan X Y, Su N, et al. Genetic dissection of silicon uptake ability in rice (*Oryza sativa* L.). *Plant Sci*, 2006, 171: 441—448
- 13 Norton G J, Deacon C M, Xiong L, et al. Genetic mapping of the rice ionome in leaves and grain: Identification of QTLs for 17 elements including arsenic, cadmium, iron and selenium. *Plant Soil*, 2010, 329: 139—153
- 14 Dai W M, Zhang K Q, Wu J R, et al. Validating a segment on the short arm of chromosome 6 responsible for genetic variation in the hull silicon content and yield trait of rice. *Euphytica*, 2008, 160: 317—324
- 15 吴季荣, 范方军, 杜景红, 等. 水稻第6染色体短臂谷壳硅含量 QTL 的分解. *中国水稻科学*, 2010, 24: 12—17
- 16 杜景红, 樊叶杨, 吴季荣, 等. 水稻第6染色体短臂产量性状 QTL 簇的分解. *中国农业科学*, 2008, 41: 939—945
- 17 Zheng K, Huang N, Bennett J, et al. PCR-based marker-assisted selection in rice breeding. *IRRI Discussion Paper Series No.12*. Manila: International Rice Research Institute, 1995
- 18 Chen X, Temnykh S, Xu Y, et al. Development of a microsatellite framework map providing genome-wide coverage in rice (*Oryza sativa* L.). *Theor Appl Genet*, 1997, 95: 553—567
- 19 戴伟民, 张克勤, 段彬伍, 等. 测定水稻硅含量的一种简易方法. *中国水稻科学*, 2005, 19: 460—462
- 20 SAS Institute Inc. *SAS/STAT user's guide*. SAS Institute, Cary, NC, 1999
- 21 Ma J F, Tamai K, Yamaji N, et al. A silicon transporter in rice. *Nature*, 2006, 440: 688—691
- 22 Ma J F, Yamaji N, Mitani N, et al. An efflux transporter of silicon in rice. *Nature*, 2007, 448: 209—212
- 23 Yamaji N, Mitani N, Ma J F. A transporter regulating silicon distribution in rice shoots. *Plant Cell*, 2008, 20: 1381—1389
- 24 Yamaji N, Ma J F. A transporter at the node responsible for intervacular transfer of silicon in rice. *Plant Cell*, 2009, 21: 2878—2883
- 25 杜景红, 樊叶杨, 王磊, 等. 应用剩余杂合体衍生的近等基因系分解水稻产量性状 QTL. *中国水稻科学*, 2008, 22: 1—7
- 26 余守武, 杨长登, 樊叶杨, 等. 水稻第1染色体千粒重 QTL 的遗传分解. *科学通报*, 2008, 53: 1389—1394
- 27 Mannella C A. Minireview: On the structure and gating mechanism of the mitochondrial, VDAC. *J Bioenerg Biomembr*, 1997, 29: 525—531
- 28 Fuks B, Homble F. A voltage-dependent porin-like channel in the inner envelope membrane of plant chloroplasts. *J Biol Chem*, 1995, 270: 9947—9952
- 29 Cheng H C, Cheng P T, Peng P, et al. Lipid binding in rice nonspecific lipid transfer protein-1 complexes from *Oryza sativa*. *Protein Sci*, 2004, 13: 2304—2315
- 30 Shockey J, Schnurr J, Browse J. Characterization of the AMP-binding protein family in *Arabidopsis thaliana*: Will the real acyl-CoA synthetases please stand up? *Biochem Soc Trans*, 2000, 28: 955—957
- 31 Ulker B, Somssich I E. WRKY transcription factors: From DNA binding towards biological function. *Curr Opin Plant Biol*, 2004, 7: 491—498
- 32 DeYoung B J, Innes R W. Plant NBS-LRR proteins in pathogen sensing and host defense. *Nat Immunol*, 2006, 7: 1243—1249