

付颖,柴晓娇,白晓雷,等. 谷子矮秆突变体 *si-dw4* 的遗传分析及基因定位[J]. 江苏农业科学,2022,50(18):269-273.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2022.18.041

谷子矮秆突变体 *si-dw4* 的遗传分析及基因定位

付颖,柴晓娇,白晓雷,王显瑞,沈轶男,张 婷

(赤峰市农牧科学研究所,内蒙古赤峰 024031)

摘要:目前,矮化育种是解决谷田倒伏的有效手段,但育种中可利用的矮秆资源仍存在早衰和遗传基础不明确的问题,导致很难在育种中利用,因此对控制谷子株高相关基因的遗传和分子机制的研究具有重要意义。对经过自然突变形成的一个谷子突变体 *si-dw4* 进行表型鉴定、遗传分析和基因定位的研究。通过对比野生型 ZT002 的茎秆部性状,发现 *si-dw4* 的株高为 35.9 cm 左右,仅为野生型的 27.4%;*si-dw4* 的节间数目不变,相对应节间长度均显著变短。遗传分析表明,*si-dw4* 的矮秆性状是隐性性状,且由主效基因控制。利用 BSA(分离群体分组分析)与 QTLseq 相结合的方法对突变基因进行定位,将该基因定位在第 5 染色体的 In5-6.23 与 In5-8.12 标记之间的 1.89 Mb 区间内。这个隐性矮秆突变体的发现,为谷子实现矮化育种提供了可以利用的矮源,进一步丰富和发展了谷子矮化的分子机理。

关键词:谷子;矮秆突变体;遗传分析;基因定位

中图分类号:S515.032 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2022)18-0269-05

谷子(*Setaria italica* L.),又称为粟^[1],脱壳后称为小米,具有自花授粉、基因组较小(约 430 Mb)、抗旱耐瘠和粮草兼用等特点^[2],是民众膳食结构改善和种植业结构调整的主体作物^[3]。近年来,随着分子生物学和基因组学研究的不断深入,谷子已经发展成为禾本科基因组研究的模式植物之一^[4-5]。

收稿日期:2022-03-29

基金项目:内蒙古自治区自然科学基金(编号:2018BS03008);财政部和农业农村部:国家现代农业产业技术体系项目。

作者简介:付颖(1983—),女,内蒙古赤峰人,博士,副研究员,主要从事谷子栽培及遗传育种研究。E-mail:fuying2008@126.com。

尽管我国是谷子的起源地,拥有丰富的种质资源,同时依靠六十日、昭谷 1 号、矮 88、吨谷等几个谷子核心资源的发现和利用^[6],谷子育种已经取得了显著的进步,但这也造成了遗传背景狭窄,大多主栽品种仍以中秆和中高秆品种为主。因此,发掘、鉴定和利用新的谷子矮源,已成为实现谷子矮化育种最为直接的手段。此外,谷子高质量全基因组测序的完成^[7-9]及一些矮秆早熟品种高效遗传转化体系的建立^[10],也为谷子功能基因组学的研究提供了扎实的基础。

我国对于谷子矮化机理的研究起步较晚,前期主要是对谷子矮化突变体进行遗传分析和生理研

herbicide-tolerant rice by gene targeting[J]. The Plant Journal, 2007,52(1):157-166.

[5] Powles S B, Yu Q. Evolution in action: plants resistant to herbicides[J]. Annual Review of Plant Biology, 2010, 61: 317-347.

[6] Rajguru S N, Burgos N R, Shivrani V K, et al. Mutations in the red rice *ALS* gene associated with resistance to imazethapyr[J]. Weed Science, 2005, 53(5): 567-577.

[7] 刘定富,尹合兴,应继锋. 中国水稻百年育种的一些关键基因[J]. 中国稻米, 2022, 28(2): 1-11.

[8] 费云燕,杨杰,范方军,等. 水稻咪唑啉酮抗性的遗传分析及其紧密连锁分子标记的筛选与应用[J]. 作物学报, 2018, 44(5): 716-722.

[9] 王广达,高鹏,杨文艳,等. 金粳 818 抗咪唑啉酮类除草剂基因的功能标记开发与利用[J]. 中国水稻科学, 2020, 34(4): 316-324.

[10] 王芳权,杨杰,范方军,等. 水稻抗咪唑啉酮类除草剂基因 *ALS* 功能标记的开发与应用[J]. 作物学报, 2018, 44(3):

324-331.

[11] 左示敏,周娜娜,陈宗祥,等. SSR 标记在江苏粳稻品种鉴定中的应用研究[J]. 扬州大学学报(农业与生命科学版), 2014, 35(4): 46-51.

[12] 水稻品种鉴定技术规程 SSR 标记法: NY/T 1433—2014[S]. 北京: 中国农业出版社, 2014.

[13] 房经贵,章镇,刘大钧,等. 一种从贮藏较久番茄叶中提取适于 PCR 扩增的 DNA 的方法[J]. 植物生理学通讯, 2000, 36(1): 47-50.

[14] 贺闽,尹俊杰,冯志明,等. 水稻稻瘟病和纹枯病抗性鉴定方法[J]. 植物学报, 2020, 55(5): 577-587.

[15] Hu K M, Cao J B, Zhang J, et al. Improvement of multiple agronomic traits by a disease resistance gene via cell wall reinforcement[J]. Nature Plants, 2017, 3: 17009.

[16] 李燕敏,祁显涛,刘昌林,等. 除草剂抗性农作物育种研究进展[J]. 作物杂志, 2017(2): 1-6.

究。进入 21 世纪之后,研究人员才陆续开始对谷子矮化基因进行定位、克隆等研究。高俊华等报道了一个谷子矮秆突变体安矮 3 号,并将突变基因定位在谷子 3 号染色体上^[11]。钱继岳通过对 47 份谷子矮秆材料中矮秆基因的等位性分析,发现获得的 58 个矮秆杂交组合中有 45 个组合含有非等位基因,7 个组合含有等位基因^[12]。赵美丞在谷子中首次利用图位克隆的方法分离了自然矮化突变体 84133 的半显性矮秆基因 *SiDW1-2*,其编码一个 DELLA 蛋白,与赤霉素(GA)信号转导有关^[13]。随后,谷子隐性矮秆基因 *SiDW2*^[14] 和 *SiDW3*^[15] 也相继被发现,分别定位在 3 号染色体和 8 号染色体上。近些年来,一些研究人员在谷子矮秆基因的定位、克隆方面已经取得了初步成果,但深入的基因解析尚未开展。目前,国内育种人员利用矮 88 及其衍生系培育出的品种大多都是中秆品种^[6]。同时很多的谷子矮秆种质还普遍存在不同程度的早衰现象,很难在育种中利用。因此,挖掘更多的农艺性状优良的矮秆资源,就成为了当前谷子矮化育种中亟待解决的问题。

谷子突变体 *si-dw4* 是经过自然突变形成的一个矮秆突变体,其叶片直立,茎秆粗壮,株型紧凑,是优良的谷子矮秆种质资源。本研究以野生型 ZT002 为对照,对 *si-dw4* 的表型进行了系统的鉴定分析,同时利用 BSA(分离群体分组分析)与 QTLseq 相结合的方法对突变基因进行定位,旨在为谷子矮化育种提供可以利用的矮源,丰富和发展谷子矮化的分子机理,为进一步进行分子辅助选择育种奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

2012 年在谷子高秆品种中发现的 1 株经过自然突变形成的矮秆突变体(命名为 *si-dw4*),经过多代自交纯合后,其矮化性状可稳定遗传,野生型为 ZT002。

豫谷 1 号(Yugu1)是我国夏谷区广泛栽培的品种,并最早完成了全基因组测序。SSR41 是来自韩国的一个地方品种,目前已经完成全基因组测序,该数据由中国农业科学院刁现民课题组提供。

1.2 试验方法

1.2.1 遗传分析群体及作图群体的构建 2016 年夏,将矮秆突变体 *si-dw4*(母本)与株高正常的 Yugu1(父本)和 SSR41(父本)分别进行杂交即 *si-*

dw4 × Yugu1 和 *si-dw4* × SSR41,该试验于赤峰市农牧科学研究所试验站(118°52'0"E、42°17'38"N)进行。2016 年冬在海南三亚南滨农场种植 2 个杂交组合的 F₁ 代,并分别收集 F₁ 代真杂种的种子。2017 年春在赤峰市农牧科学研究所试验站种植 2 个杂交组合的 F₂ 代群体。2 个杂交组合的 F₂ 代群体均用于基因精细定位,仅有 *si-dw4* × Yugu1 组合的 F₂ 代群体用来做突变体的遗传分析。同时,将野生型 ZT002 也在同一地块进行种植,用于 *si-dw4* 的表型鉴定。

1.2.2 突变体 *si-dw4* 的表型鉴定及遗传分析 于植株进入成熟期时,随机选取 6 株 *si-dw4* 和 ZT002 进行相关农艺性状调查。同时调查 *si-dw4* 和豫谷 1 号、F₁ 及 F₂ 群体各单株的株高,统计正常株高与矮秆植株的比率,并用卡方测验分析统计结果。

1.2.3 BSA + QTLseq 法进行突变基因的定位 在 2 组 F₂ 群体中分别选取 30 株极端矮秆植株,按单株剪取 1~2 张健康叶片用于 DNA 的提取,并测定其浓度,然后将 30 株单株的 DNA 等量混合,分别构建 2 个矮秆混池。

通过 Illumina HiSeq 2500 测序平台对 2 个混池样本进行高通量测序,利用 QTLseq 法^[16]对 2 个混池的测序数据进行比对分析,初步确定突变基因所在的染色体和候选区间,然后在初定位的基础上利用 BSA 法^[17]进行基因定位。根据重测序得到的亲本之间纯合的 SNP(单核苷酸多态性)和 InDel(插入缺失序列)设计多态性好的标记,并利用这些标记定位基因。

2 结果与分析

2.1 突变体 *si-dw4* 的表型分析

前期研究发现,突变体 *si-dw4* 叶片直立,茎秆粗壮,穗茎节显著缩短,株型紧凑,抗倒性强,是优良的谷子矮秆种质资源。在成熟期,对突变体 *si-dw4* 和野生型 ZT002 的茎秆部性状进行调查,发现 *si-dw4* 的株高为 35.90 cm, ZT002 的株高为 130.83 cm,突变体的株高只是野生型 ZT002 的 27.44%(表 1,图 1-B)。同时发现 *si-dw4* 的茎秆也更加粗壮,达到 10.13 mm(表 1)。对突变体 *si-dw4* 与 ZT002 的节间进行比对后发现,*si-dw4* 和 ZT002 均具有 13 个节间,并且每一个节间都比野生型中相应的节间短(图 1-A),这与前人研究结果^[18]基本一致,都是由于节间缩短导致的矮化。

表1 突变体 <i>si-dw4</i> 和野生型 ZT002 茎秆部农艺性状统计			
类型	株高 (cm)	茎节数 (个)	茎粗 (mm)
ZT002	130.83 ± 5.95	12.67 ± 0.52	6.64 ± 0.32
<i>si-dw4</i>	35.90 ± 1.02 **	12.67 ± 0.52	10.13 ± 0.56 **

注: ** 代表突变体和野生型在 0.01 水平上存在极显著差异。

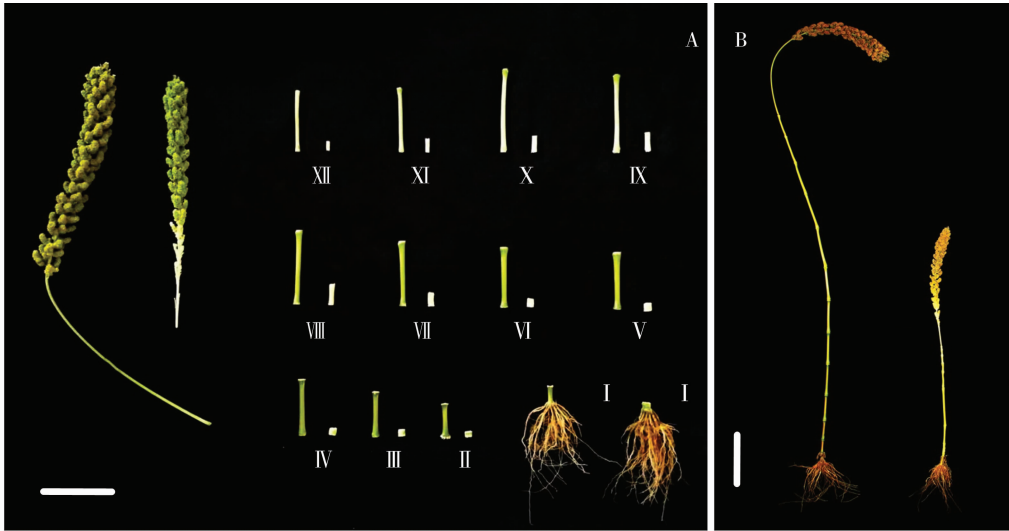
2.2 *si-dw4* 矮秆性状的遗传分析

si-dw4 在赤峰和海南连续种植多代,均表现为矮秆性状。将突变体与具有正常株高的 Yugu1 做杂交,得到的 F₁ 代植株全部表现为正常株高,表明矮秆性状是隐性性状。在杂交得到的 F₂ 分离群体中株高分离明显,存在中间类型,通过测量 358 株

F₂ 群体的株高,发现最矮植株的株高为 33.50 cm,最高为 142.30 cm,株高位于 120.6 ~ 130.0 cm 区间的植株最多,且符合正态分布规律(图 2)。充分说明 F₂ 分离群体的株高由主效基因控制,可以把株高性状看作质量性状进行分析定位。

2.3 F₂ 群体株高的统计分析

F₂ 群体的株高性状分离情况见表 2。结果显示,在 F₂ 分离群体中矮秆株数与正常株高株数的比例为 86 : 272,经 χ^2 测验, χ^2 值为 0.134 58,小于 $\chi^2_{0.05} = 3.84$,符合 1 : 3 的分离比例。可以表明突变体的矮秆性状由 1 对主效隐性矮秆基因控制。



每幅图左侧所示为 ZT002,右侧为突变体 *si-dw4*。A 为植株茎节对比,茎节从根部向顶部进行排序(bar=10 cm); B 为完整植株对比图(bar=20 cm)

图1 突变体 *si-dw4* 和野生型 yugu1 的表型比较

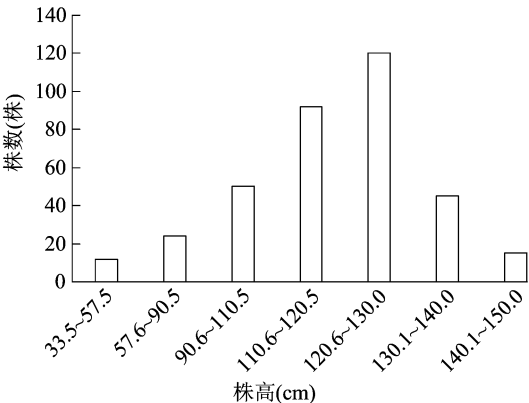


图2 F₂ 群体株高统计分析

2.4 *si-dw4* 突变基因的定位

对 *si-dw4* × Yugu1 F₂ 和 *si-dw4* × SSR41 F₂ 分离群体的矮秆隐性混池进行高通量测序。对 2 个混池的测序结果进行比较分析,发现 SNP 数量在 100 万 ~ 200 万,InDel 在 20 万 ~ 40 万,利用 QTLseq 软件作图,并不能得到显著的峰值。因此,本研究利用排除法进行进一步分析,首先将 *si-dw4* × Yugu1 和 *si-dw4* × SSR41 2 个群体都检测到的变异位点取交集,再利用 Yugu1 和 SSR41 的全基因组数据库内的所有变异位点做过滤,结果发现一半以上变异位点集中在 5 号染色 5 ~ 9 Mb 区间内,因此将

表2 F₂ 代的株高性状分离情况统计分析

群体组合	矮秆株数(株) (<110.5)	正常株高株数(株) (110.6 ~ 150.0)	实际比值	预期比值	χ^2
<i>si-dw4</i> × Yugu1	86	272	1 : 3.2	1 : 3	0.134 58

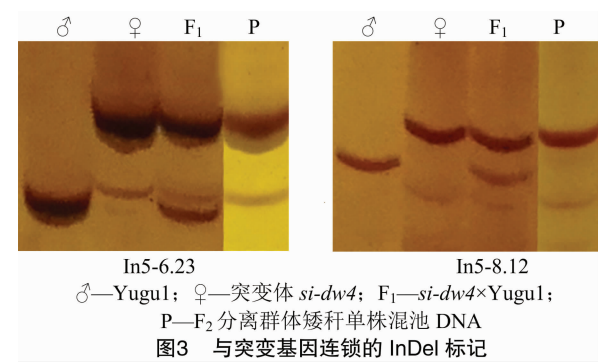
注: $df=1, \chi^2_{0.05} = 3.84$ 。

该区间作为候选区间。根据候选区间内的 InDel 位点设计了多个标记(表 3),并利用 *si-dw4* × *Yugu1* 的 F₂ 分离群体进行验证,发现标记 In5-6.23 和 In5-8.12 扩增混池 DNA 可以得到与母本带型一致的条带(图 3),说明突变基因与这 2 个标记紧密连锁。

根据重测序分析结果,已经几乎没有 InDel 位点可以使用,再无法设计出 InDel 标记将定位区间进一步缩小。因此,将 *si-dw4* 突变基因定位于 In5-6.23(6 225 727 bp)与 In5-8.12(8 123 723 bp)之间的 1.89 Mb 区间内。

表 3 基因定位所用的标记

引物名	位置 (bp)	上游引物(5'→3')	下游引物(3'→5')
5-5.72	5719739	CCTTGCTCCAAACCCCGAT	TCCGATGTGATCCGATGTGAT
5-6.23	6225727	CGGCGTGCAAACCTCTTTAG	GATCGGTACTAAAGGACCCCC
5-6.79	6794162	ACATGTTCTATTTTTACCTCAGTC	AAGATTCAAACAGCTCCCATGT
5-6.80	6807452	CCATTGGCTCTGAAATGCCA	TCAGAAATGAGGGGCACGTT
5-6.86	6858555	GGCATCGTCTTTAGCCCTGA	CAGAGGTTGGAATACATGAAACA
5-8.12	8123723	TGCACGCCAAGTTTCTCAAC	ATGACAAAGTCTGCCACGCTG
5-8.21	8207636	CAACCCAATGCCCGCACTAG	GCCGCATACATCATCTGGTG



性,使株型紧凑等^[21]。当然随着矮秆种质资源的不断利用,植物的矮化机理研究已经取得了较大进展,育成的多个矮秆、抗倒、高产、优质的作物品种也得到了迅速推广。但在谷子矮化育种中,目前可以利用的矮秆资源却仍然存在早衰和遗传基础不明确等问题,导致很难在育种中利用,阻碍了谷子的产业化进程。因而,更多新的矮秆基因的发掘不但可以为谷子矮化育种水平的提高带来更多的新突破,也为其他农作物、园艺作物的矮化改良提供了先进经验。

3 讨论与结论

3.1 对 *si-dw4* 突变基因的分析

本研究中,对突变体 *si-dw4* 和野生型 ZT002 的节间长度进行调查分析,发现 *si-dw4* 和 ZT002 的节间数目一致,并没有发生变化,说明 *si-dw4* 的矮化是由于节间缩短导致的。在前期对突变体农艺性状的研究中,通过与野生型相比,*si-dw4* 的叶片呈直立状,株型也更加紧凑,说明该突变基因也参与了株型的调控。前人研究表明,在水稻中 *dm*、*dn* 和 *n1* 这 3 种矮秆突变体的矮化都是节间明显缩短而导致的^[19]。同样,在玉米矮秆突变体中,最为明显的表型特征也是节间的变化,一般多表现为节间数目减少,节间长度缩短,特别是雌穗以下的节间变化尤为明显^[20]。随着研究的深入,目前在水稻、玉米、茄科和葫芦科植物中均已鉴定出这类矮秆突变体,它们的突变基因可以使节间数目减少,节间长度缩短,导致植株产生矮化,同时也发现了部分基因兼具株型调控作用,如控制叶片的直立

3.2 *si-dw4* 突变基因的精细定位

本研究将突变基因定位在第 5 染色体 1.89 Mb 区间内,没能完成精细定位。一方面由于标记 In5-6.23 与 In5-8.12 之间已没有可利用的 InDel 位点,很难再开发出新的 InDel 标记;另一方面原因是作图群体数量较少,构建的遗传图谱精度较低,导致进行基因定位时检测到的重组图谱偏大而检测不到重组事件^[22],进而表现为重组交换率偏低。为解决这些问题,本研究计划一方面基于重测序获得的 SNP 位点信息,利用 dCAPS Finder 2.0^[23] 和 Primer 3 ([http://bioinfo. ut. ee/primer3 - 0. 4. 0/](http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/)) 来开发 CAPS(酶切扩增多态性)标记引物,进一步加密遗传图谱;另一方面增大作图群体数量,构建精度更高的遗传图谱,精细定位突变基因。

参考文献:

[1]郭晓丽,白丽荣,时丽冉,等. 谷子矮秆突变体对外源赤霉素的响应研究[J]. 种子,2019,38(6):105-106,110.

- [2] 张雪峰. 中国谷子产业发展问题研究[D]. 哈尔滨:东北农业大学,2013.
- [3] 刁现民. 禾谷类杂粮作物耐逆和栽培技术研究新进展[J]. 中国农业科学,2019,52(22):3943–3949.
- [4] Li P H, Brutnell T P. *Setaria viridis* and *Setaria italica*, model genetic systems for the panicoid grasses[J]. Journal of Experimental Botany, 2011,62(9):3031–3037.
- [5] Diao X M, Schnable J, Bennetzen J L, et al. Initiation of *Setaria* as a model plant[J]. Frontiers of Agricultural Science and Engineering, 2014,1(1):16–20.
- [6] 贾冠清, 刁现民. 中国谷子种业创新现状与未来展望[J]. 中国农业科学,2022,55(4):653–665.
- [7] Bennetzen J L, Schmutz J, Wang H, et al. Reference genome sequence of the model plant *Setaria* [J]. Nature Biotechnology, 2012,30(6):555–561.
- [8] Zhang G Y, Liu X, Quan Z W, et al. Genome sequence of foxtail millet (*Setaria italica*) provides insights into grass evolution and biofuel potential [J]. Nature Biotechnology, 2012,30(6):549–554.
- [9] Jia G Q, Huang X H, Zhi H, et al. A haplotype map of genomic variations and genome-wide association studies of agronomic traits in foxtail millet (*Setaria italica*) [J]. Nature Genetics, 2013,45(8):957–961.
- [10] Yang Z R, Zhang H S, Li X K, et al. A mini foxtail millet with an *Arabidopsis*-like life cycle as a C_4 model system [J]. Nature Plants, 2020,6(9):1167–1178.
- [11] 高俊华, 王润奇, 毛丽萍, 等. 安矮 3 号谷子矮秆基因的染色体定位[J]. 作物学报,2003,29(1):152–154.
- [12] 钱继岳. 谷子矮秆基因的等位性和 GA_3 敏感性测定[D]. 石家庄:河北师范大学,2009.
- [13] 赵美丞. 谷子半显性矮秆基因 *SiDw1* 的图位克隆及形成机制分析[D]. 北京:中国农业科学院,2013.
- [14] Xue C X, Zhi H, Fang X J, et al. Characterization and fine mapping of *SiDWARF2* (*D2*) in foxtail millet [J]. Crop Science, 2016,56(1):95–103.
- [15] Fan X K, Tang S, Zhi H, et al. Identification and fine mapping of *SiDWARF3* (*D3*), a pleiotropic locus controlling environment-independent dwarfism in foxtail millet [J]. Crop Science, 2017,57(5):2431–2442.
- [16] Takagi H, Abe A, Yoshida K, et al. QTL-seq: rapid mapping of quantitative trait loci in rice by whole genome resequencing of DNA from two bulked populations [J]. The Plant Journal, 2013,74(1):174–183.
- [17] Michelmore R W, Paran I, Kesseli R V. Identification of markers linked to disease-resistance genes by bulked segregant analysis: a rapid method to detect markers in specific genomic regions by using segregating populations [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1991,88(21):9828–9832.
- [18] Takeda K. Internode elongation and dwarfism in some gramineous plants [J]. Gamma Field Symposium, 1977,16:1–18.
- [19] 刘浩, 王加峰, 孙大元, 等. 水稻矮秆基因研究进展[J]. 广东农业科学,2013,40(22):139–144.
- [20] 杨秀. 玉米矮生突变体 *das* 的鉴定和基因定位[D]. 北京:中国农业科学院,2019.
- [21] 宋秋平, 俞佳虹, 刘佳, 等. 植物矮化基因相关研究进展[J]. 广东农业科学,2021,48(8):19–28.
- [22] 姚丹. 遗传作图群体中 SNP 识别软件开发及杨树高密度遗传图谱构建[D]. 南京:南京林业大学,2019.
- [23] Neff M M, Turk E, Kalishman M. Web-based primer design for single nucleotide polymorphism analysis [J]. Trends in Genetics, 2002,18(12):613–615.
- (上接第 262 页)
- editing in allotetraploid cotton (*Gossypium hirsutum*) using CRISPR/Cas9 system [J]. Plant Biotechnology Journal, 2018,16(1):137–150.
- [11] Shen L, Hua Y F, Fu Y P, et al. Erratum to: rapid generation of genetic diversity by multiplex CRISPR/Cas9 genome editing in rice [J]. Science China Life Sciences, 2019,62(9):1270.
- [12] 曾秀英, 侯学文. CRISPR/Cas9 基因组编辑技术在植物基因功能研究及植物改良中的应用[J]. 植物生理学报,2015,51(9):1351–1358.
- [13] 胡春华, 邓贵明, 孙晓玄, 等. 香蕉 CRISPR/Cas9 基因编辑技术体系的建立[J]. 中国农业科学,2017,50(7):1294–1301.
- [14] 李希陶, 刘耀光. 基因组编辑技术在水稻功能基因组和遗传改良中的应用[J]. 生命科学,2016,28(10):1243–1249.
- [15] Svitashv S, Young J K, Schwartz C, et al. Targeted mutagenesis, precise gene editing, and site-specific gene insertion in maize using Cas9 and guide RNA [J]. Plant Physiology, 2015,169(2):931–945.
- [16] Zhao Y P, Zhang C S, Liu W W, et al. An alternative strategy for targeted gene replacement in plants using a dual-sgRNA/Cas9 design [J]. Scientific Reports, 2016,6:23890.
- [17] 张磊. 沙柳 *SpsLAZY1a, b* 基因克隆及功能初步分析[D]. 呼和浩特:内蒙古农业大学,2018.
- [18] 时欢, 林玉玲, 赖钟雄, 等. CRISPR/Cas9 介导的植物基因编辑技术研究进展[J]. 应用与环境生物学报,2018,24(3):640–650.
- [19] Fu Y F, Sander J D, Reyon D, et al. Improving CRISPR-Cas nuclease specificity using truncated guide RNAs [J]. Nature Biotechnology, 2014,32(3):279–284.
- [20] Chen C H, Xiao T, Xu H, et al. Improved design and analysis of CRISPR Knockout Screens [J]. Bioinformatics, 2018,34(23):63–73.
- [21] 张成, 何明亮, 汪威, 等. 一种 CRISPR-Cas9 介导的拟南芥高效基因编辑系统的构建与应用[J]. 中国农业科学,2020,53(12):2340–2348.