中国水稻科学 (Chin J Rice Sci), 2010, 24(6):652~654
http://www.ricesci.cn
DOI:10.3969/j.issn.1001-7216.2010.06.015

水稻短根突变体 *ksr1* 的遗传分析和基因定位

宁永强　丁沃娜　朱世华*　余红卫　於　宏　陆开形
(宁波大学 植物分子生物学研究室, 浙江 宁波 315211; * 通讯联系人, E-mail:zhushihua@nbu.edu.cn)

Genetic Analysis and Gene Mapping of a Short Root Mutant *ksr1* in Rice

NING Yong-qiang, DING Wo-na, ZHU Shi-hua*, YU Hong-wei, YU Hong, LU Kai-xing
(Laboratory of Plant Molecular Biology, Ningbo University, Ningbo 315211, China; * *Corresponding author, E-mail: zhushihua@nbu.edu.cn*)

NING Yongqiang, DING Wona, ZHU Shihua, et al. Genetic analysis and gene mapping of a short root mutant *ksr1* in rice. Chin J Rice Sci, 2010, 24(6):652-654.
Abstract: A short root mutant *ksr1* with the Kasalath background was isolated from an EMS mutagenized population in rice. The root length of 6-day-old *ksr1* plants was only about 20% of the wild type. Genetic analysis indicated that the short root phenotype of *ksr1* was controlled by a recessive mutation in a single nuclear-encoded gene. To map the *ksr1* mutation, an F_2 population was generated by crossing the *ksr1* mutant with Nipponbare. The *KSR1* locus was linked to the SSR marker RM1223 on chromosome 4. Another eight SSR markers and two InDel markers were developed around this marker. The *KSR1* gene was further mapped to a 155 kb region, flanked by the InDel marker 4-24725K and the SSR marker RM17182.
Key words: rice; short root; gene mapping; molecular marker

宁永强, 丁沃娜, 朱世华, 等. 水稻短根突变体 *ksr1* 的遗传分析和基因定位. 中国水稻科学, 2010, 24(6):652-654.
摘　要: 从甲基磺酸乙酯诱变的 Kasalath 突变体库中, 在苗期筛选到一个水稻短根突变体 *ksr1*, 6 d 苗龄时该突变体的根长只有野生型的 20%左右, 遗传分析表明该突变性状由一对隐性核基因控制。利用突变体与粳稻日本晴杂交发展的 F_2 群体对突变基因进行了定位分析, 初步定位结果显示目的基因 *KSR1* 与第 4 染色体上 SSR 标记 RM1223 连锁。在该标记附近进一步发展了 8 对 SSR 标记和 2 对 InDel 标记, 将突变基因定位于 InDel 标记 4-24725K 和 SSR 标记 RM17182 之间, 该区段物理距离为 155 kb。
关键词: 水稻; 短根; 基因定位; 分子标记
中图分类号: Q943.2; S511.03　　文献标识码: A　　文章编号: 1001-7216(2010)06-0652-03

根系是植物从土壤中吸收水分和氮、磷、钾等各种养分的主要器官。根系能合成氨基酸、植物激素等生物活性物质, 如生长素、脱落酸、乙酰胆碱等, 这些物质除了参与根系发育外, 还能调节地上部的生长和发育。此外, 根系具有分泌有机酸、酶、生物碱等物质的能力, 影响根系对土壤中的矿物质的吸收和根际微生物的种类和数量。而根系的长度是根构型的一个重要指标, 根的长度可对许多重要的性状产生影响, 如养分吸收、抗倒伏性、抗旱性和产量等。根长对农作物产量和抗逆性具有重要作用, 已经成为农作物育种的一个重要研究内容, 受到越来越多的重视。

根的伸长主要由两个连续的过程决定:细胞分裂和细胞伸长。拟南芥作为一种模式生物已经发展了一定数量的突变体, 并克隆和研究了一些与短根有关的基因, 如 *RML*、*HBT*、*ELIL*、*PRC1* 等[1-4]。其中 *HBT* 基因编码与 CDC27 同源的基因, 对于根尖的分生组织形成是必需的, 其突变体 *hbt* 缺少根的分生组织, 导致根短小。*ELIL* 基因在根的伸长区和其他组织中起作用, 调节细胞的膨胀从而促进细胞增大, 同时抑制次生细胞壁的形成, 其突变体 *elil* 因木质化沉积异常, 影响次生壁的形成, 导致植株矮小根短。近年来, 在水稻中也发现了一些短根突变体并克隆了一些短根相关基因, 如 *GLR3.1*、*OsGNA1* 和 *OsCyt-invl* 等。位于第 2 染色体的 *OsCyt-invl* 基因编码碱性/中性蔗糖转化酶 (alkaline/neutral invertase), 与根细胞的发育和分裂有关, 其突变体根细胞纵向长度减小, 蔗糖积累而己糖含量降低, 外源供给葡萄糖可部分恢复短根缺陷[5]。位于第 9 染色体的 *OsGNA1* 基因编码葡萄糖氨-6 磷酸酰基转移酶 (glucosamine-6-phosphate acetyltransferase) 基因, 参与糖基化供体 UDP-GlcNAc 合成途径, *OsGNA1* 基因突变后, 内源 UDP-GlcNAc 水平显著降低, 导致 N 或 O 连接的 GlcNAc 糖基化水平相应降低, 同时细胞代谢、细胞形状和微管稳定性出现异常, 导致短根[6]。位于第 4 染色体的 *GLR3.1* 基因为编码植物离子通道型谷氨酸受体的基因, 与根系的生长发育相关, 参与调控根尖分生组织细胞的分裂和凋亡[7]。

在本研究中, 水稻短根突变体 *ksr1* 在苗期只表现为短根性状, 地上部性状与野生型没有显著差异, 对该突变体的研究, 能帮助我们进一步了解水稻根系伸长的可能分子机制。

1　材料与方法

1.1　突变体材料和培养条件

从甲基磺酸乙酯 (EMS) 诱变的籼稻 Kasalath 突变体库

收稿日期: 2010-03-08; 修改稿收到日期: 2010-04-27。
基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (31071388); 浙江省自然科学基金重点资助项目 (Z306401); 宁波市自然科学基金资助项目 (2008A610070)。

中筛选到一个短根突变体 *ksr1*（Kasalath short root 1）。在温度为32℃、光照12 h条件下，pH 5.0的0.5×培养液[8]培养6 d后观察根的表型并测量根长。

1.2　短根突变体的遗传分析

将突变体 *ksr1* 与野生型 Kasalath 杂交，观察 F_1 的表型。F_1 自花授粉得到 F_2，种植于32℃培养箱中，6 d后观察并统计 F_2 植株的分离情况并进行适合度测验。

1.3　定位群体构建

将短根突变体 *ksr1* 与粳稻日本晴杂交，自交获得 F_2，选择其中表现为 *ksr1* 突变表型的植株用于基因定位。

1.4　水稻总 DNA 的提取

剪取2 cm长的水稻叶片放入1.5 mL的离心管中，加入200 μL的 TPS（100 mmol/L Tris Cl pH 8.0，10 mmol/L EDTA，1 mol/L KCl）抽提液并捣碎，然后75℃下水浴20 min，15 000 r/min下离心5 min，取上清液120 μL到新的离心管中并加入等体积的异丙醇，摇匀，12 000 r/min下离心10 min，倒掉上清液，沉淀用70%的乙醇清洗，12 000 r/min下离心5 min，待乙醇挥发干净后，用20 μL超纯水溶解上述沉淀，以1%琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 的质量与浓度。

1.5　突变基因的定位分析

在已公布的 SSR 标记中，均匀选取分布在12条染色体上的208对引物，分析籼稻 Kasalath 与粳稻日本晴间的多态性，将其中在两亲本间表现多态性的标记用于突变相关基因的定位分析。在无多态性 SSR 标记的情况下，通过比较已公布的日本晴和9311的核酸序列，对差异的部位设计引物，筛选多态性 InDel 标记。

2　结果与分析

2.1　突变体的表型及遗传分析

取于32℃条件下生长6 d的的幼苗进行观察，发现突变体 *ksr1* 的地上部与野生型没有显著差异，*ksr1* 不定根和单位根长的侧根数与野生型没有显著差异。*ksr1* 主根、不定根和侧根均比野生型短，*ksr1* 主根长为（3.12±0.38）cm，野生型主根长为（15.54±1.16）cm，突变体 *ksr1* 主根长只有野生型的20%左右，差异非常显著（图1）。

以突变体 *ksr1* 为父本，与野生型 Kasalath 杂交，F_1 植株表型与野生型 Kasalath 完全一致，说明 *ksr1* 为隐性突变。F_1 自花授粉所得的 F_2 中，正常植株与短根植株的分离比为264/81＝3.26，卡方检测结果为 $0.44 < \chi^2_{0.05} = 3.84$，正常植株与短根植株的比例符合一对基因控制的3∶1分离比，表明该突变体是隐性单基因突变体，将该基因命名为 *KSR1*。

2.2　*KSR1* 基因的染色体定位

利用筛选到的多态性标记对21个 F_2 的突变单株定位群体进行初定位。结果发现在第4染色体的标记 RM1223 处，21个突变单株全部扩增出与亲本 Kasalath 相同的带型，说明突变基因 *KSR1* 与标记 RM1223 连锁，且距离较近（图2）。

2.3　*KSR1* 基因的精细定位

在初定位的基础上，我们根据 Gramene（http://www.gramene.org）网站上提供的数据，合成了 RM1223 附近的20

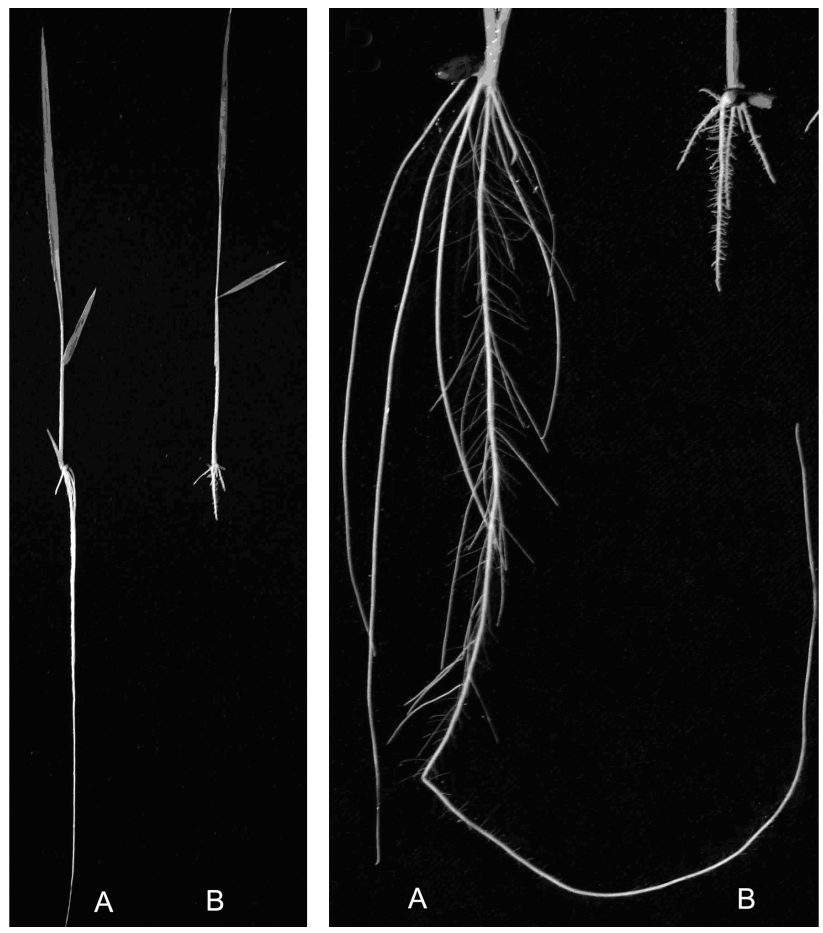


图1　野生型 Kasalath（A）和 *ksr1* 突变体（B）的苗期表型

Fig. 1　Phenotypes of Kasalath（A）and *ksr1* mutant（B）at the seedling stage.

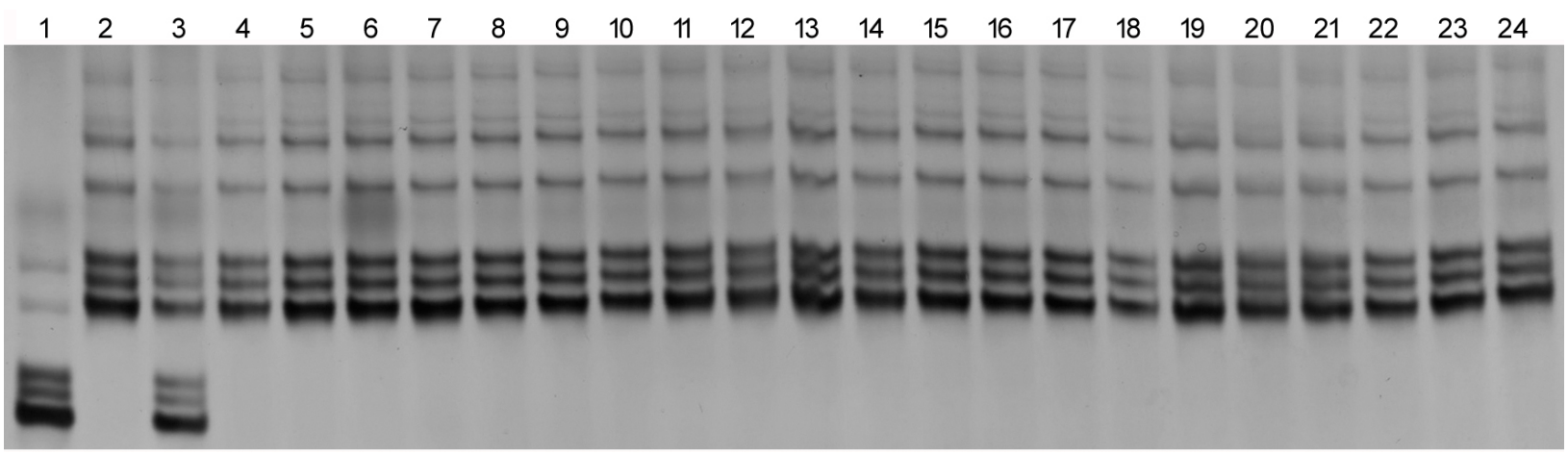


图2　与 *KSR1* 基因连锁的 SSR 标记 RM1223 的扩增结果

Fig. 2. Electrophoresis of the SSR marker RM1223 linked with the *KSR1* locus.

1—日本晴；2—Kasalath；3—F_1（日本晴×*ksr1*）；4～24—F_2 短根单株。

Lane 1, Nipponbare; Lane 2, Kasalath; Lane 3, F_1 (Nipponbare × *ksr1*); Lanes 4 to 24, Short root individuals in F_2 population.

表 1 具有多态性的 InDel 标记的引物序列

Table 1. Sequence of polymorphic InDel markers.

引物名称 Primer name	正向引物 Forward sequence	反向引物 Reverse sequence
4-24725K	TTGAGATTACATGCGAAATG	TATCAACCAGTACATCGTCTAC
4-24856K	AGTTGGTGACAATCTCATTGAAC	GCTTTACTGAAACGCCATTG

对引物, 其中有 8 对在 Kasalath 和日本晴间表现多态性。利用这些多态性标记, 我们分析了 735 个 F_2 突变单株, 将 *KSR1* 基因定位于分子标记 RM17169 和 RM17182 之间约 245 kb 的范围内, 与 RM17169 有 2 个重组子, 与 RM17182 有 1 个重组子。为了进一步缩小范围, 我们利用在这个区域内公布的水稻品种日本晴和 9311 的序列, 分析两者的差异, 用引物设计软件 Primer Premier 5.0 设计了 7 对 InDel 引物。经过多态性筛选, 其中有 2 对表现多态性, 分别为 4-24725K 和 4-24856K (表 1)。用这 2 对引物对 F_2 定位群体进行扩增, 分别筛选出 2 个和 0 个重组个体, 且标记 4-24725K 和 RM17169 的重组子是相同的, 这样就把基因 *KSR1* 定位在标记 4-24725K 和 RM17182 之间约 155 kb 范围内 (图 3)。

3 讨论

水稻根系与养分吸收、产量、抗旱、抗倒伏等性状密切相关, 高产水稻需要发达和较长的根系, 但水稻根系改良目前并没有在水稻育种计划中得到具体的体现和重视。吴伟明和程式华先生提出了水稻根系育种的理论和概念, 指出可以通过塑造理想的根型、稳定持久的根系机能、适应性广的根系生态特征, 配合水稻地上部生理生态性状的优化, 最终达到高产、稳产和高效以及环保的目的[9]。所以, 根长分子机制研究对于水稻根系改良育种具有重要的指导意义。

本研究通过对 EMS 筛选得到的 *ksr1* 短根突变体进行遗传分析, 发现该突变由一对隐性核基因控制。利用分子标记对该基因进行定位, 最终将 *KSR1* 位点定位在水稻第 4 染色体 InDel 标记 4-24725K 和 SSR 标记 RM17182 之间, 物理距离约 155 kb。生物信息学分析表明, 在这 155 kb 的范围内有 21 个可编码蛋白的预测基因, 没有已知的与根伸长相关的基因, 因此, *KSR1* 是一个新基因。

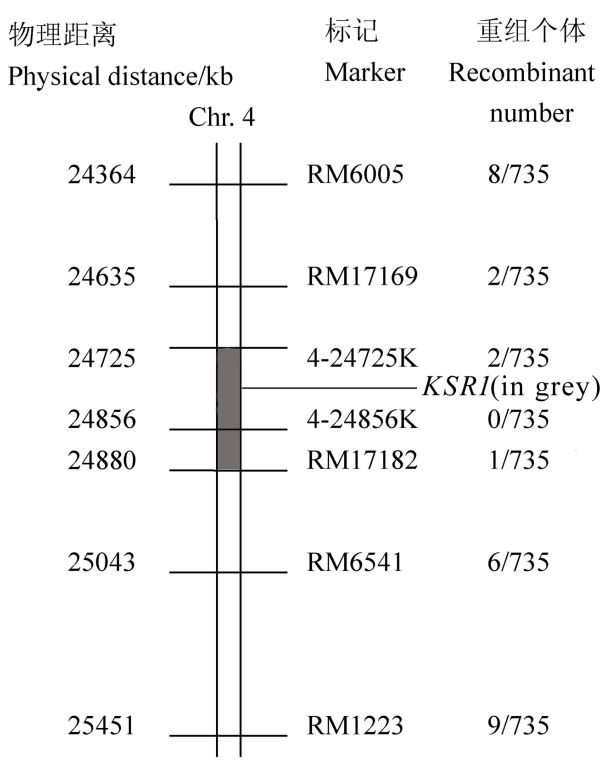


图 3 *KSR1* 基因在水稻第 4 染色体上的位置

Fig. 3. Location of the *KSR1* gene on chromosome 4 of rice.

尽管对植物根系伸长已有了一定的研究, 并且也克隆了一些与根系伸长相关的基因, 但是我们对根系伸长的分子机理的了解还是很零碎的, 整个调控的途径更不清楚, 需要利用更多突变体来逐步阐明根系伸长的分子机理。由于根系性状大多与地上部性状关联, 影响根系生长基因也常影响到地上部的表型, 所以很多已研究的与根系伸长相关基因在根系育种时, 因为涉及到地上部的影响而会限制其应用。本研究筛选到的短根突变体 *ksr1*, 在苗期只表现为短根性状, 地上部性状与野生型没有显著差异, 所以该突变体是一个很好的研究根系伸长的模型。*KSR1* 基因的克隆将会有助于阐明水稻根系伸长的分子机制并具有很好的应用价值。

谢辞 浙江大学生命科学学院吴平教授对本研究给予了大力的支持和帮助, 王宽诚教育基金会给予了资助, 谨致谢忱。

参考文献:

[1] Vernoux T, Wilson R C, Seeley K A, et al. The *ROOT MERISTEMLESS1/CADMIUM SENSITIVE2* gene defines a glutathione-dependent pathway involved in initiation and maintenance of cell division during postembryonic root development. *Plant Cell*, 2000, 12: 97-109.

[2] Blilou I, Frugier F, Folmer S, et al. The *Arabidopsis HOBBIT* gene encodes a CDC27 homolog that links the plant cell cycle to progression of cell differentiation. *Genes & Dev*, 2002, 16: 2566-2575.

[3] Cano-Delgado A, Metzlaff K, Bevan M W. The *eli1* mutation reveals a link between cell expansion and secondary cell wall formation in *Arabidopsis thaliana*. *Development*, 2000, 127: 3395-3405.

[4] Fagard M, Desnos T, Desprez T, et al. *PROCUSTE1* encodes a cellulose synthase required for normal cell elongation specifically in roots and dark-grown hypocotyls of *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 2000, 12: 2409-2424.

[5] Jia L Q, Zhang B T, Mao C Z, et al. OsCYT-INV1 for alkaline/neutral invertase is involved in root cell development and reproductivity in rice (*Oryza sativa* L.). *Planta*, 2008, 228: 51-59.

[6] Jiang H W, Wang S M, Dang L, et al. A novel short-root gene encodes a glucosamine-6-phosphate acetyltransferase required for maintaining normal root cell shape in rice. *Plant Physiol*, 2005, 138: 232-242.

[7] Li J, Zhu S H, Song X W, et al. A rice glutamate receptor-like gene is critical for the division and survival of individual cells in the root apical meristem. *Plant Cell*, 2006, 18: 340-349.

[8] Yoshida S, Forno D A, Cock J H, et al. Laboratory Manual for Physiological Studies of Rice. 3rd ed. Manila: IRRI, 1976: 61-64.

[9] 吴伟明, 程式华. 水稻根系育种的意义与前景. 中国水稻科学, 2005, 19(2): 174-180.