

高粱 *bmr* 和光周期敏感基因遗传分析及初步定位

王瑞 张福耀* 詹鹏杰 于纪珍 赵婧

(山西省农业科学院 高粱研究所/饲草遗传育种重点实验室,山西 榆次 030600)

摘要 通过田间和实验室相结合把低木质素、高消化率基因 *bmr* 和光周期敏感基因 *PS* 聚合到饲草高粱中,以提高饲草高粱的产量和品质。以含 *PS* 基因的 EBA-3 和含 *bmr* 基因的 Tx623B 配制杂交组合,构建了 F₂ 代分离群体。根据表型分离比例分析,光敏和褐色中脉可能分别受两对彼此独立的非等位基因控制,并且基因之间存在着互作。光敏基因之间存在互补作用,褐色中脉基因之间存在抑制作用。根据高粱的遗传连锁图谱,选取相应的 SSR 标记。经连锁遗传分析,找到了 2 个 SSR 标记,Xtxp7 与 *bmr* 基因连锁,Xtxp20 与 *PS* 基因连锁。由于 Xtxp7 位于连锁群 B,Xtxp20 位于连锁群 G,据此认为高粱有一个 *bmr* 基因位于 B 染色体上和有一个 *PS* 基因位于 G 染色体上。这两个标记的获得可用于标记辅助育种,加速杂交种的转育与利用。此外,对影响开花时间的 QTLs 和主效基因在高粱和水稻上可能一致进行了讨论。

关键词 高粱; *bmr* 基因; *PS* 基因; SSR 标记

中图分类号 S 514

文章编号 1007-4333(2012)06-0117-05

文献标志码 A

Study on inheritance and mapping of sorghum *brown midrib bmr* and photoperiod-sensitive genes

WANG Rui, ZHANG Fu-yao*, ZHAN Peng-jie, YU Ji-zhen, ZHAO Jing

(Key Laboratory of Forage Genetic Breeding, Sorghum Institute,
Shanxi Academy of Agricultural Sciences, Yuci 030600, China)

Abstract The *bmr* (*brown midrib*) gene of low lignin and high digestibility and *PS* (*photoperiod-sensitive*) gene were pyramided into a forage sorghum line through a combined field and laboratory study to improve the yield and quality. EBA-3 with *PS* gene and Tx623B with *bmr* gene were employed to construct a F₂ segregation population. Phenotype segregation ratio showed the two traits *PS* (photoperiod-sensitive) and *bmr* (brown midrib) might be controlled by two independent genetic loci, respectively. The two *PS* loci showing complementary effects, while the two *bmr* loci were inhibitory. SSR marker Xtxp7 in linkage group B, was linked with *bmr* gene, while Xtxp20 in linkage group G was linked with *PS* gene. These markers were used for marker assisted selection for the introgression breeding. Evidence for possible orthologies of the genes detected here with other QTLs and major genes involved in flowering time of sorghum and rice is discussed.

Key words sorghum; *bmr* gene; *PS* gene; SSR marker

在世界许多国家和地区,高粱(*Sorghum bicolor* [L.] Moench)作为一种饲草作物被受到广泛的重视,高粱特有的抗旱性强,水分利用效率高的特点使其在干旱地区成为优势饲草和生物质能源作物^[1]。在饲草高粱和生物质高粱育种中生物产量和

营养价值是育种家追求的重要目标。降低木质素和生态优势利用是饲草和生物质高粱分子生物学研究和育种研究的一个前沿领域。*bmr* 和 *PS* 基因是降低木质素和生态优势利用的关键基因,是饲草高粱和能源高粱研究的热点领域。

收稿日期: 2012-03-07

基金项目: 农业部产业化体系建设项目(CARS-06-01-01)

第一作者: 王瑞,助理研究员,硕士,主要从事高粱分子生物学方面的研究,E-mail:wangrui989@163.com

通讯作者: 张福耀,研究员,主要从事高粱遗传育种研究,E-mail:zfy5607@163.com

褐色中脉(brown midrib)突变体最早在玉米中报道^[2],之后,在高粱^[3]、苏丹草和珍珠粟中^[4]也先后获得了褐色中脉突变体。由于褐色中脉突变体的细胞壁总量减少,木质素含量比正常品种降低5%~50%,显著提高了饲草的适口性,增加了消化率,提高其营养价值^[5-6],因此受到广泛重视。有关 *bmr* 基因与饲草产量、品质、饲喂效果等研究已取得长足进展,*bmr* 基因已成功导入普通高粱和苏丹草品种,并育成高产、优质 BMR 饲草杂交种商品化生产,表现出广阔的利用前景。

日照调节开花的现象被称为光周期。影响高粱开花时间的 6 个成熟基因已被确认 *Ma1*、*Ma2*、*Ma3*、*Ma4*、*Ma5* 和 *Ma6*。以前的孟德尔遗传研究确定了前 4 个主要的成熟位点 *Ma1*、*Ma2*、*Ma3* 和 *Ma4*,它们控制高粱的开花时间。这 4 个成熟基因在长日照下抑制开花但短日照下提早开花。在长日照下,4 个基因中,*Ma1* 位点的突变引起最大的减少,*Ma2*、*Ma3* 和 *Ma4* 的突变引起中度的敏感^[7]。但是,高粱 *ma1*、*ma2* 和 *ma3* 隐性等位基因在长日照下开花更迟^[8]。此外,Rooney 等^[9]发现了 2 个其他的成熟位点 *Ma5* 和 *Ma6*。*Ma5* 和 *Ma6* 基因是一个特殊的情况,因为它们同时 2 个显性出现时,不管日照长短将强烈抑制开花。由于高粱遗传图谱的构建,影响开花时间的 QTL 也被报道。Lin 等^[10]基于 *Sorghum bicolor* 和 *Sorghum propinquum* 种间杂交确定了一个 QTL 位于连锁群 D(相当于 Peirera 等的连锁群 B),确定为 *Mal*。Childs 等^[11]定位了 *Ma3* 在连锁群 A(Peirera 等的连锁群 C),推断这个位点是一个光敏色素 B 基因。

本研究通过田间和实验室相结合,把低木质素、高消化率基因 *bmr* 和光周期敏感基因 *PS* 聚合到饲草和生物质能源高粱中,研究 2 个性状的遗传规律,并将其初步定位,以促进我国饲草和生物质能源高粱的育种和生产。

1 材料与方法

1.1 高粱材料及其 F₂ 分离群体单株育性鉴定

EBA-3 是光周期不敏感的品系,但与其他品系进行杂交后 F₁ 杂交种表现为光周期敏感,即杂交种不开花,直到在生长季节日照小于 12 小时 20 分时才开花,笔者将影响开花这一特性用于饲草高粱生产,将能提高饲草的产量。Tx623B 是褐色中脉品系,成熟时植株茎秆表皮呈浅褐色,髓呈红褐色。它的木质素含量低,显著提高了饲草的适口性,增加了消化率。

以含 *PS* 基因的 EBA-3 和含 *bmr* 基因的 Tx623B 配制杂交组合,获得了 F₂ 分离单株。2009 年分别将父本、母本、F₁ 和 F₂ 代分离群体种植于试验田,田间自然授粉,待植株成熟时调查田间性状,分别为抽穗(PI)、不抽穗(PS)、褐色中脉与非褐色中脉。

1.2 SSR 分析

1.2.1 引物

共 109 对(表 1)。其中,18 对位于 A 连锁群上,21 对位于 B 连锁群上,9 对位于 C 连锁群上,9 对位于 D 连锁群上,7 对位于 E 连锁群上,4 对位于 F 连锁群上,4 对位于 G 连锁群上,9 对位于 H 连锁群上,9 对位于 I 连锁群上,8 对位于 J 连锁群上,

表 1 用于高粱 SSR 分析的引物序列名称及其分布

Table 1 SSR sequences, names and distribution on sorghum chromosomal linkage groups

连锁群	引物名称
A	Xtxp32、Xtxp43、Xtxp46、Xtxp58、Xtxp61、Xtxp75、Xtxp88、Xtxp149、Xtxp208、Xtxp229、Xtxp248、Xtxp279、Xtxp284、Xtxp302、Xtxp316、Xtxp335、Xtxp340、Xtxp357
B	Xtxp1、Xtxp3、Xtxp7、Xtxp8、Xtxp13、Xtxp19、Xtxp25、Xtxp50、Xtxp55、Xtxp56、Xtxp63、Xtxp96、Xtxp100、Xtxp201、Xtxp207、Xtxp211、Xtxp283、Xtxp296、Xtxp297、Xtxp298、Xtxp304
C	Xtxp31、Xtxp33、Xtxp34、Xtxp69、Xtxp114、Xtxp205、Xtxp215、Xtxp228、Xtxp231
D	Xtxp12、Xtxp21、Xtxp24、Xtxp27、Xtxp41、Xtxp177、Xtxp212、Xtxp327、Xtxp343
E	Xtxp36、Xtxp40、Xtxp159、Xtxp168、Xtxp227、Xtxp295、Xtxp312
F	Xtxp67、Xtxp230、Xtxp258、Xtxp289

续表

连锁群	引物名称
G	Xtxp20, Xtxp141, Xtxp217, Xtxp331
H	Xtxp18, Xtxp47, Xtxp105, Xtxp210, Xtxp250, Xtxp292, Xtxp294, Xtxp321, Xtxp354
I	Xtxp6, Xtxp17, Xtxp57, Xtxp95, Xtxp97, Xtxp145, Xtxp265, Xtxp274, Xtxp317
J	Xtxp14, Xtxp15, Xtxp23, Xtxp65, Xtxp94, Xtxp225, Xtxp262, Xtxp303
未知	Xtxp45, Xtxp80, Xtxp91, Xtxp98, Xtxp160, Xtxp162, Xtxp267, Xtxp320, Xtxp329, Xtxp344, Xtxp355

11 对连锁群未知。

1.2.2 PCR 扩增及 SSR 分析

取幼苗叶片,采用酚-氯仿法提取 DNA,用选取的 109 对 SSR 引物进行扩增。PCR 的扩增体系为 10 μL:1 μL 模板 DNA(30 ng/μL);1.0 μL 10× PCR buffer;0.72 μL MgCl₂(25 mmol/L);0.08 μL dNTPs(25 mmol/L);0.8 μL Primers(2 μmol/L);0.08 μL Taq 酶(5 U/μL);6.32 μL ddH₂O。扩增程序:94 °C 5 min;94 °C 45 s, T_m 45 s, 72 °C 45 s, 35 个循环;72 °C 10 min;4 °C 保存。扩增产物用 5%变性聚丙烯酰胺凝胶电泳检测,银染显色,风干,照相。

2 结果与分析

2.1 高粱褐色中脉和光周期敏感遗传研究

Tx623B 和 EBA-3 杂交, F₂ 代有 4 种表现型(表 2),分别是褐色中脉和抽穗,非褐色中脉和抽穗,褐色中脉和不抽穗,非褐色中脉和不抽穗。分别对 2 个性状进行调查统计,232 株不抽穗,158 株抽穗;321 株非褐色中脉,69 株褐色中脉。

表 2 F₂ 代光敏和褐色中脉的遗传模式

Table 2 Inheritance of sorghum brown midrib and photoperiod-sensitive traits

表现型	观察值	理论值	分离比例	χ ² 值
不抽穗(PS)	232	219	9 : 7	1.530
抽穗(PI)	158	171		
非褐色中脉	321	317	13 : 3	0.137
褐色中脉	69	73		

注:χ_{0.05,1}² = 3.84。

经 χ² 检验,不抽穗和抽穗(PS/PI)的分离符合 9 : 7,非褐色中脉和褐色中脉的分离符合 13 : 3。

根据观察,对 PS 反应的遗传控制提出了简单的模型(表 3)。在模型中, F₁ 是 PS 和 F₂ 群体 PS/

PI 的分离是 9 : 7。表明 PS 反应是 2 对互补显性基因控制。

表 3 与 EBA-3 杂交光敏遗传产物分离比例

Table 3 Segregation ratios of the genetic loci of photoperiod sensitivity in crosses with EBA-3

材料	基因型和分离比例	表现型
Tx623B	<i>MaxMaxmaymay</i>	所有非光敏
EBA-3	<i>maxmaxMayMay</i>	所有非光敏
F ₁ -(Tx623B×EBA-3)	<i>MaxmaxMaymay</i>	所有光敏
F ₂ -(Tx623B×EBA-3)	<i>Max-May</i> -(9)	光敏
	<i>Max-maymay</i> (3)	非光敏
	<i>maxmaxMay</i> -(3)	非光敏
	<i>maxmaxmaymay</i> (1)	非光敏

高粱褐色中脉受两对基因控制,可推断遗传模式如下(表 4):褐色中脉基因是 S,非褐色中脉基因是 s,另外存在一个非等位的抑制基因 I,有 I 存在时,可以抑制褐色中脉基因 S 的作用,使 S 不能表现出褐色中脉。只要 i 位点为显性 I₁ 时,无论 s 位点是显性还是隐性,该品系均表现为非褐色中脉;如果 i 位点为隐性,那么有两种情况,当 s 位点是显性 S₂ 时表现为褐色中脉;反之,当 s 位点是隐性纯合时则表现为非褐色中脉,表明高粱褐色中脉由两对独

表 4 与 Tx623B 杂交褐色中脉遗传产物分离比例

Table 4 Segregation ratios of the genetic loci of *bmr* in crosses with Tx623B

材料	基因型和分离比例	表现型
Tx623B	iiSS	所有褐色中脉
EBA-3	IIss	所有非褐色中脉
F ₂ -(Tx623B×EBA-3)	I ₁ S ₁ -(9)	非褐色中脉
	I ₁ ss(3)	非褐色中脉
	iiS ₁ -(3)	褐色中脉
	iiSS(1)	非褐色中脉

立的非等位基因共同作用,并且基因之间存在抑制作用。

2.2 高粱褐色中脉和光周期敏感基因分子标记

2.2.1 SSR引物的筛选

用109对引物在两个亲本间进行筛选,其中有多态性条带产生的引物共62对。大部分引物扩增出5条以上的谱带,最多的扩增出十几条谱带。

进一步取与田间表型相对应的各10株典型株

型的DNA,共40个DNA再筛选62对多态性引物,所得实验结果与田间表现比对,选择吻合度达到70%以上的引物。选出Xtxp7、Xtxp20、Xtxp21、Xtxp32、Xtxp88和Xtxp149共6对引物。

2.2.2 SSR标记的获得

用Xtxp7、Xtxp20、Xtxp21、Xtxp32、Xtxp88和Xtxp149对F₂群体单株进行筛选验证。结果用SAS软件做方差分析,P值见表5。

表5 两性状与6对引物的方差分析

Table 5 Variance analysis of two traits and six SSR markers

	Xtxp7	Xtxp20	Xtxp21	Xtxp32	Xtxp88	Xtxp149
<i>bmr</i>	0.016 4*	0.659 4	0.375 2	0.483 8	0.854 8	0.748 5
<i>PS</i>	0.183 2	0.010 6*	0.754 1	0.603 4	0.365 0	0.452 0

结果说明Xtxp7与*bmr*基因连锁,Xtxp20与*PS*基因连锁。

引物Xtxp7对F₂群体单株验证结果见表6,引物Xtxp7扩增产物与*bmr*基因的重组率为15.5%。引物Xtxp20对F₂群体单株验证结果见表7,引物Xtxp20扩增产物与*PS*基因的重组率为31.1%。

表6 Xtxp7扩增片段多态性在F₂代中的共分离分析

Table 6 Co-segregation analysis of amplified polymorphic fragments in F₂ using primer *Xtxp7*

F ₂	株数	多态性片段		重组率/%
		有	无	
非褐色中脉	121	105	16	15.5
褐色中脉	40	9	31	

表7 Xtxp20扩增片段多态性在F₂代中的共分离分析

Table 7 Co-segregation analysis of amplified polymorphic fragments in F₂ using primer *Xtxp20*

F ₂	株数	多态性片段		重组率/%
		有	无	
不抽穗(<i>PS</i>)	97	68	29	31.1
抽穗(<i>PI</i>)	38	13	25	

3 讨论

本研究中不抽穗与抽穗(*PS/PI*)的分离符合9:7比例,非褐色中脉与褐色中脉的分离符合13:3比例。说明高粱的光敏和褐色中脉分别由2对独立

的非等位基因共同作用,并且光敏基因之间存在互补作用和褐色中脉基因之间存在抑制作用。Rooney等^[9]研究光周期反应的遗传规律表明*PS/PI*的分离比例符合9:7,两个基因位点是互补的显性上位。与本研究结果一致。

本研究利用分离群体分析法对EBA-3和Tx623B组配的F₂分离后代进行了SSR分析,找到了2个SSR标记。Xtxp7与*bmr*基因连锁和Xtxp20与*PS*基因连锁,由于Xtxp7位于高粱连锁群B,Xtxp20位于连锁群G,我们初步认为有一个高粱*bmr*基因位于B连锁群上和有一个*PS*基因位于G连锁群上。

本研究结果与其他研究高粱光周期反应的结果进行了比较。Dufour^[11]在连锁群H上检测到一个影响开花期的QTL,这一QTL与2个成熟基因*Ma5*和*Ma6*其中之一相对应。Lin等^[10]和Paterson等^[12]表明,在连锁群H上有一段区域是连锁群B上包含一个开花期的QTL和一个株高QTL区域的复杂复制。他们认为这2个QTLs可能分别对应*Mal*成熟基因和*Dw2*矮基因^[13]。此外,Pereira等^[14]定位了一个影响株高的QTL在连锁群H上BNL3.06和UMC114标记之间(他们也假设对应*Dw2*)。这说明在连锁群H和B上检测开花期和株高QTLs是可能的。

与水稻光周期反应已经定位的基因进行比较。在高粱连锁群H上携带的一个光敏QTL对应水稻染色体6上一区段,这一区段携带探针RZ144和同工酶*pgi-2*,它们与一个主要的光敏基因*Se-1*连锁。

在同一染色体上 *En-Se-1* 和 *wx* 位点相连锁^[15-17]。此外, Yano 等^[17] 确定了 5 个影响水稻抽穗期的 QTLs, 其中 *Hd-1* 和 *Hd-3* 可能分别对应等位基因 *Se-1* 和 *En-Se-1*。 *Se-1* 和 *Hd-1* 是等位基因后来已被证实^[18]。图谱定位的一致性显示在高粱连锁群 H 检测的 QTL 可能与 *Se-1* 是同源的。

Paterson 等^[12] 观察了水稻染色体 7 和高粱连锁群 F 的共线性。水稻染色体 7 上有两个光敏基因 *Se-2* 和 *E1*^[17,19-20], 但是没有被精确定位。 Yano 等^[17] 定位了 *Hd-4* 和 *Hd-2* (先前提到了 5 个 QTLs 中的 2 个) 在染色体 7 上。此外, *Hd-4* 位于形态学标记 *Rc* 附近, 在这里也检测到光周期反应的 QTLs, *E1* 也和 *Rc* 连锁^[17]。 Lin 等^[10] 在高粱连锁群 F 上也进行了研究, 与水稻同源的光敏基因在高粱连锁群 F 上也能检测到。

光周期敏感是调控生物产量的重要基因之一, 相关的研究虽取得许多进展, 但离遗传操控该基因还有较大距离。所以, 在光周期遗传机制研究中应选用不同来源的基因型并加大群体进行研究, 在分子生物学研究中加大和其他的物种的比对, 尤其是水稻, 进一步加快研究进程, 揭示其分子基础。

参 考 文 献

- [1] 张福耀, 平俊爱, 王瑞. 褐色中脉 *bmr* 高粱研究与利用进展[J]. 中国农业科技导报, 2009, 11(2): 30-33
- [2] Eyster W H. Chromosomes VIII in maize[J]. Science, 1926, 64(1644): 22
- [3] Porter K S, Axtell J D, Lechtenberg V L, et al. Phenotype, fiber composition, and *in vitro* dry matter disappearance of chemically induced brown midrib (*bmr*) mutants of sorghum [J]. Crop Sci, 1978, 18: 205-208
- [4] Cherney J H, Moore K J, Volenec J J, et al. Rate and extent of digestion of cell wall components of brown-midrib sorghum species[J]. Crop Sci, 1986, 26: 1055-1059
- [5] Bucholtz D L, Cantrell R P, Axtell J D, et al. Lignin biochemistry of normal and brown midrib mutant sorghum[J]. J Agric Food Chem, 1980, 28(6): 1239-1241
- [6] Pedersen J F, Vogel K P, Funnell D L. Impact of reduced lignin on plant fitness[J]. Crop Sci, 2005, 45: 812-819
- [7] Quinby J R. The maturity genes of sorghum[C]// Norman A G. Advance in Agronomy. New York: Academic Press, 1967: 267-305
- [8] Pao C I, Morgan P W. Genetic regulation of development in *Sorghum bicolor* I. Role of the maturity genes [J]. Plant Physiol, 1986, 82: 575-580
- [9] Rooney W L, Aydin S. Genetic control of a photoperiod sensitive response in *Sorghum bicolor* (L) Moench [J]. Crop Sci, 1999, 39: 397-400
- [10] Lin Y R, Schertz K F, Paterson A H. Comparative analysis of QTLs affecting plant height and maturity across the Poaceae, in reference to a interspecific sorghum population [J]. Genetics, 1995, 141: 391-411
- [11] Dufour P. Cartographie moléculaire du génome du sorgho (*Sorghum bicolor*, L Moench): application en sélection végétale, cartographie comparée chez les Andropogonées [D]. Orsay: Université Paris XI, 1996: 106
- [12] Paterson A H, Lin Y R, Li Z, et al. Convergent domestication of cereal crops by independent mutations at corresponding genetic loci [J]. Science, 1995, 269: 1714-1717
- [13] Doggett H. Sorghum [M]. Harlow: Longman Scientific & Technical, 1988: 512
- [14] Pereira M G, Lee M. Identification of genomic regions affecting plant height in sorghum and maize [J]. Theor Appl Genet, 1995, 90: 380-388
- [15] Causse M A, Fulton T M, Cho Y G, et al. Saturated molecular map of the rice genome based on an interspecific backcross population [J]. Genetics, 1994, 138: 1251-1274
- [16] Kinoshita T. Report of committee on gene symbolization, nomenclature and linkage groups [J]. Rice Genet Newsl, 1995, 12: 9-153
- [17] Yano M, Harushima Y, Nagamura Y, et al. Identification of quantitative trait loci controlling heading date in rice using a high-density linkage map [J]. Theor Appl Genet, 1997, 95: 1025-1032
- [18] Yano M, Katayose Y, Ashikari M, et al. *Hdl*, major photoperiod-sensitivity QTL in rice, encodes a protein with the structure of zinc finger transcription factor [C] // Workshop Abstracts. Plant & Animal Genome VIII, 2000, January 9-12, 2000, San Diego, USA: 41
- [19] Laurie D A. Comparative genetics of flowering time [J]. Plant Mol Biol, 1997, 35: 167-177
- [20] Sarma R N, Gill B S, Sasaki T, et al. Comparative mapping of the wheat chromosome 5A *Vrn-A1* region with rice and its relationship to QTL for flowering time [J]. Theor Appl Genet, 1998, 97: 103-109