

基于 CSSLs 群体定位和图位克隆水稻长芒基因 *GAD1-2*

杨德卫, 郑向华, 程朝平, 叶宁, 黄凤凰, 叶新福

福建省农业科学院水稻研究所, 福州 350018

摘要: 水稻是世界上最早驯化的重要粮食作物之一。水稻芒可以保护水稻种子不被鸟啄食, 是水稻重要的驯化性状之一。芒在野生稻中普遍存在, 对野生稻的生存和传播至关重要, 然而在驯化和人工选择过程中该性状逐渐被淘汰。定位和克隆水稻长芒相关基因是研究水稻芒驯化遗传机制的基础。本研究以籼稻恢复系东南恢 810 为受体、漳浦野生稻为供体构建的 146 个染色体片段置换系(chromosome segment substitution lines, CSSLs)为研究材料, 调查了 146 个 CSSLs 株系和双亲的芒长, 结果表明在 4 个置换系中检测到 1 个控制水稻芒长主效基因 *GAD1-2*, 位于水稻第 8 号染色体; 利用重叠代换作图法, 将 *GAD1-2* 定位在 Ind8-10 和 RM4936 标记之间, 遗传距离约为 4.75 Mb。选择分离群体中的显性单株, 利用开发的标记, 最终将 *GAD1-2* 基因定位在两个 Indel 标记之间, 两者间的物理距离约为 27 kb, 该区域内只有两个候选基因 *Os08g0485500* 和 *Os08g0485400*。经测序和分析表明, *Os08g0485500* 是 *GAD1-2* 的候选基因, *GAD1-2* 在保守的 ORF 区域存在 6 个碱基缺失, 导致丝氨酸和半胱氨酸这两个氨基酸缺失, 从而表现长芒的性状; 在 *Os08g0485500* 基因位点已克隆了 1 个控制水稻芒长的 *GAD1* 基因, 推测 *GAD1-2* 与 *GAD1* 为等位基因。本研究为进一步理解水稻起源演化和水稻芒长发育基因的遗传机制奠定了基础。

关键词: 水稻; 长芒; 染色体片段置换系; 定位; 克隆

Mapping and cloning of *GAD1-2* for long awn using CSSLs in rice (*Oryza sativa* L.)

Dewei Yang, Xianghua Zheng, Chaoping Cheng, Ning Ye, Fenghuang Huang, Xinfu Ye

Institute of Rice, Fujian Academy of Agricultural Sciences, Fuzhou 350018, China

Abstract: Rice is an important food crop in the world. The awn may protect rice seeds from being cut by birds, which is

收稿日期: 2018-02-13; 修回日期: 2018-07-01

基金项目: 福建省公益项目(编号: 2017R1021-5), 福建省农业科学院青年创新团队项目(编号: STIT2017-3-3), 福建省农业科学院一般项目(编号: A2017-13)和福建省农业科学院科技创新项目(编号: PC2018-2)资助[Supported by the Special Fund for Agro-scientific Research in the Public Interest of Fujian Province (No. 2017R1021-5), Youth Technology Innovation Team of Fujian Academy of Agricultural Sciences (No. STIT2017-3-3), General Project of Fujian Academy of Agricultural Sciences (No. A2017-13) and Science and Technology Innovation Project of Fujian Academy of Agricultural Sciences (No. PC2018-2)]

作者简介: 杨德卫, 博士研究生, 研究方向: 水稻遗传育种。E-mail: dewei-y@163.com

通讯作者: 叶新福, 博士, 硕士生导师, 研究方向: 水稻遗传育种。E-mail: yexinfu@126.com

DOI: 10.16288/j.ycz.18-044

网络出版时间: 2018/8/6 9:22:47

URI: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1913.R.20180806.0922.002.html>

important in rice domestication, survival and diffusion. However, the characteristic of awn is gradually washed out during rice domestication and artificial selection. Mapping and cloning of rice awn genes is the basis of studying the genetic mechanism of awn domestication. In this study, 146 chromosome segment substitution lines (CSSLs) derived from DongNanHui 810/ZhangPu wild rice with DongNanHui 810 as the recurrent parent were used to analyze the quantitative trait loci (QTL) controlling the long awn of rice. The results showed that four CSSLs contained one QTL for the long awn. Using substitution mapping, the *GADI-2* gene was mapped between two markers (Ind8-10 and RM4936) on chromosome 8, with a genetic distance of about 4.75 Mb. Using the dominant individuals of segregating populations, the *GADI-2* gene was eventually located between two Indel markers, with a physical distance of about 27 kb, which contained only two candidate genes *Os08g0485500* and *Os08g0485400*. Sequencing analysis showed that *Os08g0485500* was the candidate gene of *GADI-2*. Further analysis showed that there were six bases missing in the conservative ORF region, resulting in the absence of serine and cysteine that led to the long awn of the four CSSLs. The *GADI* gene was also cloned in this position, suggesting that *GADI-2* and *GADI* were allelic. This study laid a foundation for further understanding of the genetic regulation mechanism and genetic evolution of the awn gene in rice.

Keywords: rice; the long awn; chromosome segment substitution lines; mapping; cloning

水稻(*Oryza sativa* L.)是世界上最早驯化的重要粮食作物之一,栽培稻均是由野生稻驯化而来。在驯化过程中,许多农艺性状不仅受到自然选择的影响,同时最为重要的是受到人工选择的结果,如水稻芒的有无、种皮颜色、籽粒的落粒性、产量以及株高等性状^[1]。驯化的主要目标是淘汰水稻中对生产不利的因素,同时增加对人类有利的因素。从基因与分子水平方面,驯化的主要方向就是改良与这些因素相关的基因,尤其是选择对人类有利的基因^[2]。因此,研究这些性状的基因功能和遗传机理,对进一步了解稻作起源具有十分重要的理论和实践意义。

植物芒是水稻、小麦(*Triticum aestivum* L.)、大麦(*Hordeum vulgare* L.)和高粱(*Sorghum*)等禾本科植物形态学特征之一,芒的形状、着生数量、长度在不同作物之间存在明显的差异^[2]。研究发现,水稻无芒或短芒会遭受鸟的捕食,而有刺芒的水稻就免受鸟类的捕食^[3]。芒是水稻最重要的驯化性状之一,目前大部分栽培稻都是短芒或无芒的,因此开展水稻长芒基因的鉴定和遗传机理等研究显得尤为重要。

近年来,科研人员已鉴定到一些与水稻芒性状相关的基因,有些基因已成功克隆。Kubo 等^[4]、Cai 等^[5]、Matsushita 等^[6]和 Thomson 等^[7]利用不同的材料定位了 18 个与芒相关的 QTL,分布于水稻第 1、

3、4、5、6、7、8、9、10、11 和 12 号染色体上。2013 年 Luo 等^[8]从普通野生稻中分离了一个长芒基因 *An-1*,这是水稻中第一个被克隆的长芒基因。2015 年 Hua 等^[9]和 Gu 等^[10]分别克隆了两个长芒基因—*LABA1* 和 *An-2*。2016 年 Jin 等^[11]从野生稻中分离出一个长芒基因 *GADI*。

目前调控水稻芒生长的遗传机制尚不清楚,而定位和克隆水稻芒长相关基因是研究水稻芒驯化遗传机制的前提和基础,对深入了解稻作起源具有极其重要的意义。因此,本研究以籼稻品种东南恢 810 为遗传背景、漳浦野生稻为染色体片段供体而构建的 146 个染色体片段置换系(chromosome segment substitution lines, CSSLs)为材料,通过检测获得了 4 份稳定遗传具有长芒性状的 CSSLs,并对 *GADI-2* 基因进行定位和克隆。本研究为进一步理解水稻起源演化和水稻芒长发育基因的遗传调控机制奠定了基础。

1 材料和方法

1.1 供试材料

以籼稻品种东南恢 810 为遗传背景、漳浦野生稻为染色体片段供体而构建的 146 个 CSSLs 及两个

亲本(受体亲本东南恢 810 和供体亲本漳浦野生稻)为供试材料, 这些材料均为本实验室构建的永久性群体。在 146 个 CSSLs 中, 其中 145 个株系只携带一个置换片段, 1 个株系携带两个置换片段, 分布于水稻的 12 条染色体, 平均长度为 7.79 Mb, 置换片段对水稻基因组的覆盖总长度为 1683.75 Mb, 平均覆盖率为 100%^[12]。

1.2 材料种植和性状调查

供试材料于 2015 年 7 月种植于福建省农业科学院水稻研究所实验农场。146 个 CSSLs 及两个亲本分别种植 1 个小区, 每个小区设置 3 个重复, 且每个小区 3 行, 每行 20 株, 小区种植按置换系编号顺序排列, 常规管理。

146 个 CSSLs 及两个亲本齐穗后, 以整穗完全无芒作为无芒单株; 定位群体齐穗后, 调查群体中有芒和无芒单株的分离比例。

1.3 水稻粒长和芒长的测定

水稻成熟时单株收取种子, 稻谷粒长的测定参照 Tan 等^[13]方法进行; 每个水稻株系随机取 10 粒进行芒长测定, 然后取其平均值。

1.4 水稻基因组 DNA 的提取及电泳检测

水稻成熟期叶片基因组 DNA 的提取、PCR 扩增及扩增产物的电泳检测均参照杨德卫等^[14]方法。

1.5 重叠代换作图法对控制水稻长芒的 QTL 进行鉴定

重叠代换作图法是鉴定作物 QTL 的重要方法之一^[15]。本文采用重叠代换作图法对控制水稻长芒 QTL 进行鉴定, 参照何风华^[16]的方法并作适当修改。如果在相互重叠的两个或两个以上的 CSSL 的置换片段上都鉴定有长芒 QTL, 则认为控制该长芒的 QTL 位于这些置换片段的重叠区段上; 如果在一个 CSSL 的置换片段上检测出长芒 QTL, 在与置换片段的某一区段相互重叠的另一个或多个 CSSLs 中未检测出, 则认为控制该长芒的 QTL 位于非重叠的区段上。

1.6 水稻长芒遗传分析

将 CSSL108 和 CSSL109 分别与东南恢 810 杂交, 根据 F_1 的表型和调查 F_2 代分离群体中长芒单株与无芒单株比例, 来确定该长芒性状是遗传特性。

1.7 水稻长芒基因 *GADI-2* 初步定位

GADI-2 基因的置换片段长度的计算按 Young 等^[17]方法进行。当染色体某一区段的两端的标记基因型均为供体基因型时, 则认为这一区段为 100% 的供体片段; 当染色体某一区段的两端的标记基因型均为受体基因型时, 则认为这一区段为 0% 的供体片段; 当染色体某一区段的一端的标记基因型为受体基因型, 另一端的标记基因型为供体基因型时, 则认为这一区段为 50% 的供体片段。

1.8 水稻长芒基因 *GADI-2* 的精确定位

为了进一步定位 *GADI-2* 基因, 分别构建东南恢 810 与 CSSL108、CSSL109、CSSL110 和 CSSL111 次级分离群体, 获得 2726 单株, 其中 1836 个为显性单株。

利用 1836 个显性单株, 并通过已经公布的水稻数据库引物及水稻基因组序列, 在目标基因附近区域筛选并合成新的 SSR 引物, 经检测获得 25 对多态性较好的引物。如果在目标区域筛选不到多态性 SSR 引物时, 进一步开发并合成新的 Indel 标记, 经检测获得 4 对多态性较好的引物, 进而完成精细定位。Indel 标记的开发以及两个分子标记间物理距离的确定均参照杨德卫等^[14]方法。用于精细定位的 *GADI-2* 基因具体引物见表 1。

1.9 候选基因的预测

在精细定位的基础上, 利用水稻数据库 RAD (rice automatic interpretation database, <http://ricegaas.dna.affrc.go.jp/rgadb/>) 和 RAP-DB (rice annotation project database, <http://rapdb.dna.affrc.go.jp/>), 分析定位区间内所有的基因信息。同时与 Gramene (http://www.gramene.org/rice_mutant/) 中基因信息进行分析 and 比对, 对候选基因进行预测, 从而确定候选基因。

表 1 本研究开发的 SSR 和 Indel 分子标记引物序列

Table 1 Indel and SSR molecular markers used in this study

标记	引物序列(5'→3')	位点	扩增片段大小(bp)
CM-2	F: TGGATGCGGGAGAGGTTGTCTG	P0461F06	196
	R: TTCTATCACTTTGCCGGCCTAATCG		
CM-4	F: GGAGGAGAGCCAAGCGATGG	P0013B04	111
	R: ACCGTCTTGACGCTGAGAGTGC		
CM-5	F: CGACGAGCAAGTAGAGCACACG	P0451G12	157
	R: AGAATCTGACGACTGTGGGAACC		
CM-9	F: CATCTACCTATGACATGAGACC	OJ1111_E05	110
	R: CTCTAAGATTAGCGTTCCAGAGAGC		
CM-11	F: GCTTCGATTTAGCTATTGGTACGG	OJ1666_A04	94
	R: GTGCCAGCATGAAGAGGTATGG		
CM-61	F: CAGCTAGTGCCGAAAGATTCG	OJ1113_A10	200
	R: CCCATGCAGTATATTCGGTTGG		
CM-65	F: GTTCTTGAGGCACTCCCGATACC	OJ1113_A10	292
	R: CTTAAGCTCGCCAAGAACACACC		
CM-14	F: GCAGGTGCAATTTACTCATAGGG	OSJNBb0092C08	249
	R: GGATGATGATGACGACGATTACG		
CM-17	F: CGTCGTCTCCGATCAAATCC	OJ1111_H02	375
	R: CTGGCTCGGTGTTCCAGTCG		
CM-21	F: CAGTCCAACGGGTTTCGTCATCG	P0481F05	392
	R: TACCTGCAGTGCCTCCTCCAGTCC		
CM-26	F: ATGATTGCATCTGCATCACTGC	P0481F05	379
	R: ATACCTGTTTCCAATGCGTAGCC		
CM-29	F: CGGTCCGAGGTGTACACGAAGC	P0028A08	236
	R: GAGGAGATCCGGTGGGATTGC		
CM-68	F: CGATCAGATCTCCGCAAGTTGG	P0605H02	361
	R: GGCGTGGTTGATGGTGAACG		
CM-71	F: TGTCAGTGAGGTAGGTCAATAGC	P0605H02	200
	R: AGGCCCTAAGTCATATCTTCC		
CM-32	F: GATGGAGCCAAGACACGAAAGC	P0686H11	127
	R: TGACTTCGTCCGTATGCTACTGC		
CM-75	F: TTGCTACACCTTAGCTGCTGTGC	P0686H11	300
	R: GGTGTTCTTGTGCTAGGAGATGC		
CM-35	F: TCCTCTCGTCATCTCACCTCACC	B1142B04	178
	R: CTCACCCACTCCTGTGTGACTCC		
CM-39	F: CTCTCCTCCTCACCTACGCATCC	OJ1118_A06	289
	R: GAAGTCCGGCTGGGAGTAGTGC		
CM-42	F: TGCAGAAGAATACTGAGAGAAGACG	OJ1345_D02	135
	R: CATCTCCTTCAACCTGCCTTCC		
CM-77	F: AGGTTGACCTGTGTGAGTAGCAAGG	OJ1345_D02	294
	R: ACATCGCCAACCATCTCAAGG		

续表

标记	引物序列(5'→3')	位点	扩增片段大小(bp)
CM-46	F: CAATAAATCTCGCCCTCGTTGC	OJ1134_H03	333
	R: GTGAGGTCGGCCTTGAAGTACC		
CM-47	F: CCATCTCAACTCCTTCGTTTACTGC	OSJNBa0025J22	297
	R: TCGACTGTTTGCTTGGGAATAGGC		
CM-51	F: GTCGGTCACGAAGTTCAGATCC	B1168A08	186
	R: TCAGGCCAAAGTTGAAGATGGTAGC		
CM-52	F: CGGCGAGGTAGAAGGTGACG	OSJNBa0016N23	196
	R: CAGTGATTGTGTGACAGTGTGAGAGG		
CM-58	F: TCGATGGAGGAGGAGGAGTACG	P0711H09	100
	R: AAATTGATCGCTCCTCCACTGC		
Indel-3	F: CAGATGGCGAGTTGTCAGTTGC	P0419H09	232
	R: CATCTCGCCGATCCAAGTAAGC		
Indel-5	F: ACAGCCTATAGCTCACACCAAACC	P0419H09	224
	R: GAACACCTCCGTCTCCATTGC		
Indel-8	F: GACGCTGTAGAGACACAGATACATGG	P0481F05	397
	R: CTGTTGGTGATGGCCTTAGTGC		
Indel-11	F: AAGCTGCAGTTGGGTGAGAAGC	P0481F05	484
	R: GCCCAAGATACAGCAAGTTCTCG		

2 结果与分析

2.1 亲本及置换系的芒长和粒长性状比较

对双亲的粒长和芒长进行表型观察和调查, 结果表明, 亲本东南恢 810 表现无芒, 而漳浦野生稻表现长芒, 差异达到显著水平。在 146 个 CSSLs 中, CSSL108、CSSL109、CSSL110 和 CSSL111 这 4 个株系与受体亲本东南恢 810 相比表现长芒, 差异达到显著水平(图 1, 表 2); 东南恢 810 与漳浦野生稻粒长差异不显著, 而在 146 个 CSSLs 中, CSSL108、CSSL109、CSSL110 和 CSSL111 这 4 个株系与受体亲本东南恢 810 相比表现粒型变长, 差异达到极显著水平(表 2, 图 2C)。

2.2 利用重叠代换作图法对控制水稻长芒的 QTL 进行鉴定

通过比较 146 个 CSSLs 的芒长与东南恢 810 的差异, 发现有 4 个 CSSLs 的芒长显著大于东南恢 810, 分别是 CSSL108、CSSL109、CSSL110 和 CSSL111,

差异均达到极显著水平; 而余下置换系的芒长与东南恢 810 之间未检测到显著差异(图 2, 表 2)。这 4 个 CSSL 的置换片段来源于同一个亲本—漳浦野生稻^[12](图 3), 表明这 4 个 CSSL 中存在控制芒长性状的 QTL。

2.3 长芒性状的遗传分析

为了进一步对该长芒性状进行遗传分析, 本文从 4 个长芒 CSSLs 中随机选择 CSSL108 和 CSSL109



图 1 亲本芒长性状差异比较

Fig. 1 Comparison of the differences in parents

表 2 双亲和置换系材料芒长、粒长性状比较

Table 2 Comparison of long awn and grain length traits between parents and CSSLs

性状	株系名称						
	漳浦野生稻	东南恢 810	漳浦野生稻/东南恢 810	CSSL108	CSSL109	CSSL110	CSSL111
芒长(mm)	34.6**	0	34.2**	28.4**	28.6**	29.1**	28.6**
粒长(mm)	98.1	96.8	98.3	103.2*	103.6*	104.5*	103.6*

*与东南恢 810 相比差异达到显著水平($P < 0.05$) ; **与东南恢 810 相比差异达到极显水平($P < 0.01$)。



图 2 亲本东南恢 810 和 CSSL108 的穗部性状比较

Fig. 2 Comparison of the panicle traits between DongNanHui 810 and CSSL108

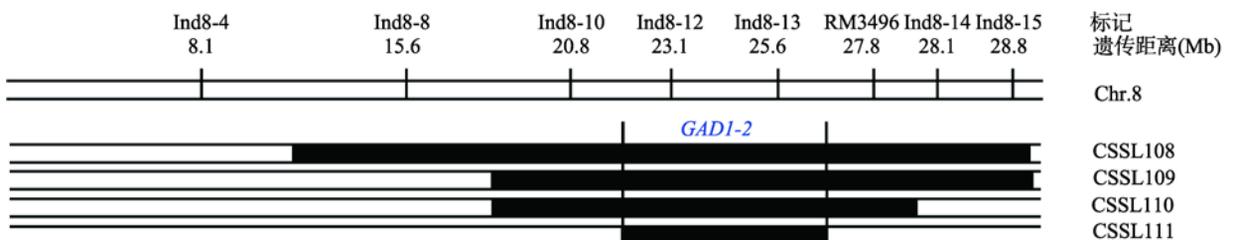


图 3 水稻长芒基因 *GADI-2* 的初步定位

Fig. 3 Primary mapping of the *GADI-2* gene

分别与东南恢 810 杂交, F_1 代均表现长芒的表型。将 F_1 自交种子全部种下, 田间调查 F_2 代分离比, 经卡平方(χ^2)检验($\chi^2 c < \chi^2_{0.05} = 3.84$), 长芒单株与无芒单株的分离符合孟德尔遗传 3 : 1 比例(表 3), 表明该长芒性状是由 1 对显性单基因控制的。

2.4 水稻长芒基因初步定位

分析发现, CSSL108、CSSL109、CSSL110 和 CSSL111 共 4 个 CSSLs 株系控制水稻长芒基因在同一个区域, 命名为 *GADI-2*。由于 *GADI-2* 在 CSSL108、CSSL109、CSSL110 和 CSSL111 这 4 个 CSSLs 株系中均能检测到, 表明 *GADI-2* 位于这 4 个置换片段的重叠区段上。按 Young 等^[17]方法进行置换片段长度计算, 将 *GADI-2* 定位在 2 个标记 Ind8-10 和 RM4936 之间, 遗传距离约为 4.75 Mb (图 3)。

2.5 长芒基因 *GADI-2* 的精确定位

为了将 *GADI-2* 基因界定在较小的区域内, 本文将东南恢 810 分别与 CSSL108、CSSL109、CSSL110 和 CSSL111 杂交, 构建了 4 个分离群体。2017 年 6 月 8 日将这 4 个分离群体种植在福建省农业科学院水稻研究所福州市仓山区城门镇水稻实验基地, 共获得 2726 单株。由于 *GADI-2* 是受 1 对显性单基因控制, 显性纯合和杂合体均表现长芒的表型, 显性纯合和杂合的单株均含有 *GADI-2* 基因。显性纯合单株合基因型为 *GADI-2/GADI-2*, 杂合体单株基因型为 *GADI-2/gadl-2*, 隐性纯合单株合基因型为 *gadl-2/gadl-2*, 而隐性纯合单株不含有 *GADI-2* 基因, 同时显性纯合单株和杂合单株总数量接近是隐性纯合单株数量 3 倍(AA Aa aa=1 : 2 : 1)。为了更有效和准确的定位 *GADI-2* 基因, 本文选择显性单株进行定位, 4 个分离群体中共获得 1836

个显性单株。

本文利用 Ind8-10、Ind8-12、Ind8-13 和 RM4936 标记对 1836 个显性单株进行检测, 将 *GADI-2* 基因界定在标记 Ind8-12 和 Ind8-13 之间, 遗传距离约为 2.5 Mb (图 4 A)。

为了将 *GADI-2* 基因界定在更小的区域内, 本文在标记 Ind8-12 和 Ind8-13 之间合成 78 对引物, 经检测获得 25 对多态性较好的引物(引物信息见表 1)。利用这 25 对引物分别对 1836 个显性单株进行检测, 最终将 *GADI-2* 基因定位在标记 CM-17 和 CM-21 之间, 物理距离约 164 kb (图 4 B)。

为了进一步图位克隆 *GADI-2* 基因, 本文在标记 CM-17 和 CM-21 之间开发 12 对 Indel 引物, 经检测获得 4 对多态性引物, 分别是 Indel-3、Indel-5、Indel-8 和 Indel-11 (引物信息见表 1)。利用这 4 对引物对 1836 个显性单株进行分析, 结果表明, Indel-3 检测到的所有显性单株均与 CM-17 检测到的显性单株重叠, 而 Indel-5、Indel-8 和 Indel-11 检测到的所有显性单株均与 CM-21 检测到的显性单株重叠, 且 Indel-11 检测到的显性单株包含所有 Indel-8 检测到的显性单株, Indel-8 检测到的显性单株包含所有 Indel-5 检测到的显性单株。因此 *GADI-2* 基因位于标记 Indel-3 和 Indel-5 之间, 物理距离约 27 kb (图 4 C)。

利用 CM-17、Indel-3、Indel-5、Indel-8、Indel-11 和 CM-21 分子标记, 对 Line 143、Line 207、Line 746、Line 960 和 Line 1088 共 5 个显性单株进行基因型分析。结果表明, 只有 Line 207 单株表现纯合基因型, 其他 4 个单株均表现杂合基因型。其中, Line 143 在 CM-17 和 Indel-3 标记位点表现杂合基因型, Line 746 在 CM-17、Indel-3、Indel-5、Indel-8、Indel-11 和 CM-21 标记位点均表现杂合基因型, Line 960 和 Line 1088 在 Indel-5、Indel-8、Indel-11 和 CM-21 标

表 3 长芒性状的遗传分析

Table 3 Genetic analysis of the long awn

杂交组合	F_1 表型	F_2 群体			$\chi^2(3 : 1)$	P
		长芒株数	无芒株数	总株数		
CSSL108/东南恢 810	长芒	580	182	762	0.302*	0.5~0.75
CSSL109/东南恢 810	长芒	492	183	675	0.486*	0.25~0.5

*表示在 0.05 显著水平上, 长芒株数和无芒株数的分离比例符合 3 : 1。

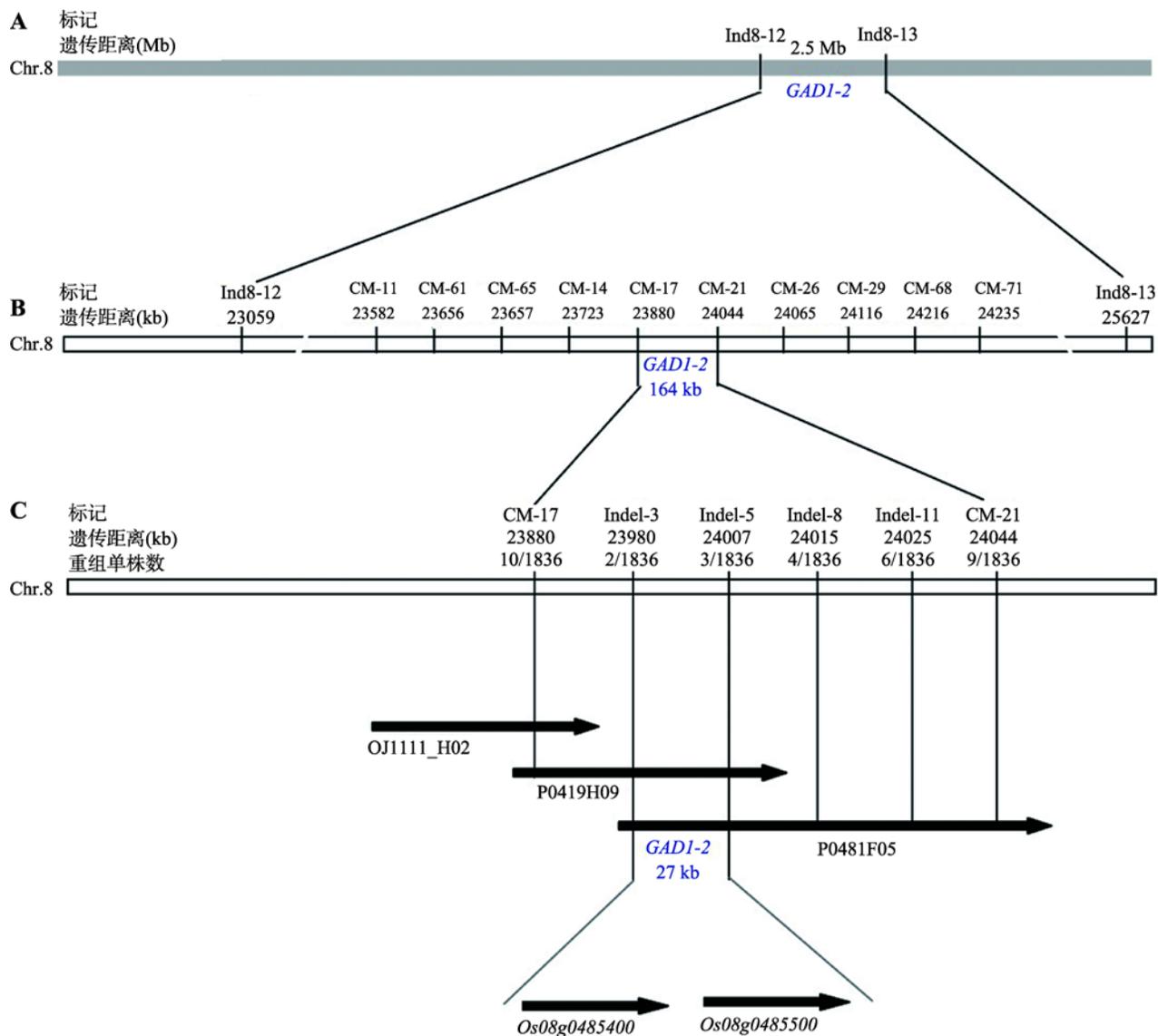


图 4 水稻长芒基因 *GADI-2* 物理图谱的构建

Fig. 4 Genetic and physical maps of the *GADI-2* gene

A: *GADI-2* 基因的初步定位; B: *GADI-2* 基因的精细定位; C: *GADI-2* 候选基因的确定。

记位点表现杂合基因型(图 5)。

2.6 长芒基因 *GADI-2* 候选基因的确定

为了确定 *GADI-2* 的候选基因, 本文对 27 kb 区域进行候选基因预测和分析, 发现该 27 kb 区域内只有 *Os08g0485400* 和 *Os08g0485500* 这 2 个候选基因(图 4C)。本文对这 2 个候选基因分别进行测序, 发现东南恢 810、CSSL108 和漳浦野生稻在 *Os08g0485400* 基因内的序列没有任何差异, 而在 *Os08g0485500* 基因序列, 东南恢 810、CSSL108 和漳浦野

生稻均有差异, CSSL108 和漳浦野生稻在差异位置缺失 6 个碱基(图 6A)。

本课题组前期研究发现, 水稻长芒发育相关基因 *GADI* 也在 *Os08g0485500* 基因内^[12], 因此, 本文推测 *GADI-2* 与 *GADI* 是等位基因。本文进一步对东南恢 810、CSSL108 和漳浦野生稻 *Os08g0485400* 基因进行测序, 通过比对和分析可知, *GADI-2* 中 6 个碱基缺失的位置在 *Os08g0485400* 保守的 ORF 区域, 本文推测这 6 个碱基的缺失导致丝氨酸和半胱氨酸缺失(图 6B), 从而引起水稻长芒的表型。

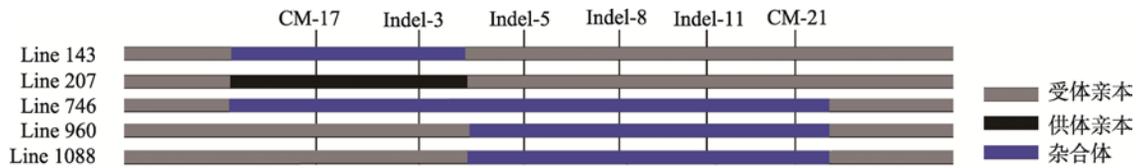


图 5 精细定位中 5 个显性单株的基因型分析
Fig. 5 Genotype analysis of five dominant plants

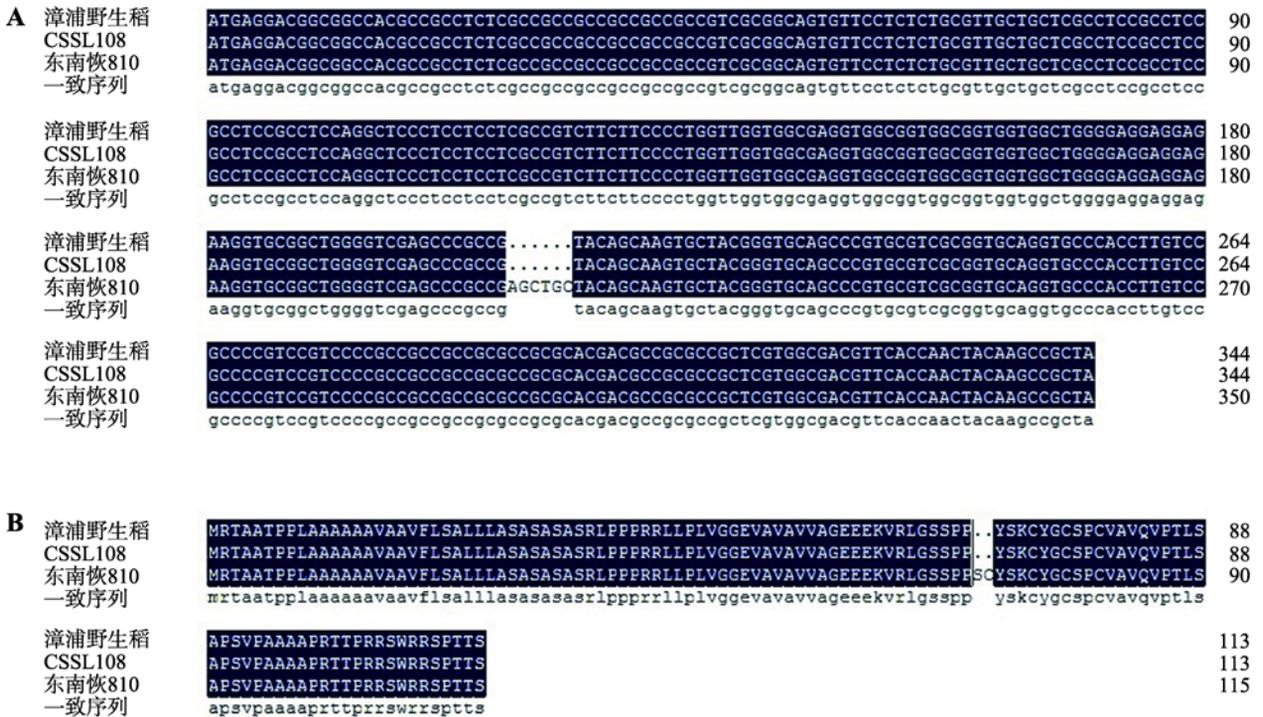


图 6 漳浦野生稻、CSSL108 与受体亲本东南恢 810 中 *Os08g0485400* 的序列比对分析
Fig. 6 Sequence comparison and analysis of *Os08g0485400* during DongNanHui 810, ZhangPu wild rice and CSSL108

A : cDNA 比对分析 ; B : 氨基酸序列的比对分析。

3 讨论

3.1 水稻芒长性状的驯化和遗传研究

在水稻驯化过程中，也伴随着人类对水稻性状选择的过程。因此，对水稻驯化过程中相关基因的深入研究，将为水稻起源演化过程提供有利的证据。水稻芒性状是一个复杂的数量性状，受到光照、温度、逆境和海拔等影响，而出现不同表型，如出现芒长的有无和芒的长短等现象。亲本均无芒的籼粳材料杂交后，后代分离群体中会出现有芒的个体，显然水稻芒是一个不稳定的性状^[1]。研究表明，水

稻芒性状是由显性基因控制，并且可能是同时由几对基因控制，基因之间还存在上位性^[18]。

由于芒的产生可能存在多基因互作和遗传的复杂性，因此需要更为精细的材料才能进行深入研究。CSSLs 与其受体亲本之间除了在置换片段上存在差异外，其余部分均与受体亲本相同，遗传背景较单一。通过 CSSLs 与其受体亲本之间以及 CSSLs 之间的性状比较，可以检测出置换片段上的 QTL，进一步通过重叠代换作图就可以对检测的基因进行鉴定和分离^[12,19]。本研究利用重叠代换作图方法鉴定了 1 个控制水稻长芒的基因 *GADI-2*，遗传分析表明该长芒性状是由 1 对显性单基因控制的。

3.2 已鉴定的芒基因比较和分析

近年来,随着测序技术的快速发展,科研人员已鉴定出多个与水稻芒性状相关的基因,分布在水稻不同的染色体上^[3]。本研究鉴定的水稻长芒基因 *GADI-2*,经分析发现与 Jin 等^[12]从野生稻中分离的长芒基因 *GADI* 是等位基因。*GADI* 基因使水稻表现长芒、籽粒变长和每穗粒数减少等性状^[12],本研究从漳浦野生稻鉴定了一个控制长芒的基因 *GADI-2*,含有该基因的 CSSL108 株系与受体亲本赣优 810 相比表现长芒和粒型变长(表 2)(图 2, B 和 C),与 *GADI* 基因控制的性状一致。但是,本研究发现含有 *GADI-2* 基因的 CSSL108 株系与受体亲本赣优 810 相比,每穗粒数并没有减少(图 2 A),这可能是由于插入片段大小不同,影响基因之间互作和效应,从而影响其每穗粒数。

3.3 利用显性单株鉴定和分离水稻显性基因

在定位由显性性状控制的基因时,一般均是利用分离群体中的隐性单株。本研究利用 CSSLs 群体鉴定了一个显性的水稻长芒基因 *GADI-2*,利用显性单株将该基因定位在物理距离约 27 kb 区域内(图 4C),该区域只有 2 个候选基因。

本研究在分离群体中共获得 2726 单株,其中显性单株是 1836 个,依据遗传学中的单基因控制基因型分离比例(AA Aa aa=1 2 1),隐性单株不会超过 890 个。如果利用 890 个隐性单株很难将该长芒基因 *GADI-2* 定位在 27 kb 区域内,当然会有个例情况。本研究利用分离群体中的 2726 单株,将该基因定位在较小的区间,证明该方法可以有效分离和定位由显性性状控制的基因。

同时,本文对定位区间中 5 个显性单株的基因型进行了分析,结果表明,5 个与 *GADI-2* 基因紧密连锁的单株中,只有 1 个单株 Line 207 在这两个标记上表现纯合基因型,而其余 4 个单株均表现杂合的基因型(图 5)。显然,4 个杂合基因型单株在精细定位 *GADI-2* 基因时发挥了重要作用。

参考文献(References):

[1] Yao GQ, Zhang Q, Wu JT, Hu GL, Li ZC. Mapping awn

gene *AWN3-1* with near-isogenic line of rice. *J Chin Agric Univ*, 2010, 15(5): 1–5.

姚国新,张强,吴建涛,胡广隆,李自超.利用近等基因系对水稻芒基因 *AWN3-1* 的遗传定位. *中国农业大学学报*, 2010, 15(5): 1–5. [DOI]

[2] Wei MY. The localization and cloning of *AWN_2* for rice long-awn gene[Dissertation]. Guangxi University, 2016.

韦敏益.水稻长芒基因 *AWN_2* 的定位与克隆[学位论文]. 广西大学, 2016. [DOI]

[3] Hua L. The cloning and molecular evolution of the wild rice long-awn gene[Dissertation]. China Agricultural University, 2015.

华磊.野生稻长、刺芒基因的克隆及其分子演化[学位论文]. 中国农业大学, 2015. [DOI]

[4] Kubo T, Takano KT, Yoshimura A. RFLP mapping of genes for long kernel and awn on chromosome 3 in rice. *Rice Genet Newsl*, 2001, 18: 26–28. [DOI]

[5] Cai H, Morishima H. QTL clusters reflect character associations in wild and cultivated rice. *Theor Appl Genet*, 2002, 104(8): 1217–1228. [DOI]

[6] Matsushita S, Sanchez PL, Sobrizal N, Doi K, Yoshimura A. Identification of new alleles of awnness genes, *An7* and *An8*, in rice using *Oryza glumaepatula* introgression lines. *Rice Genet Newsl*, 2003, 20: 19–20. [DOI]

[7] Thomson MJ, Tai TH, McClung AM, Lai XH, Hinga ME, Lobos KB, Xu Y, Martinez CP, McCouch SR. Mapping quantitative trait loci for yield, yield components and morphological traits in an advanced backcross population between *Oryza rufipogon* and the *Oryza sativa* cultivar Jefferson. *Theor Appl Genet*, 2003, 107(3): 479–493. [DOI]

[8] Luo JH, Liu H, Zhou TY, Gu BG, Huang XH, Shangguan YY, Zhu JJ, Li Y, Zhao Y, Wang YC, Zhao Q, Wang AH, Wang ZQ, Sang T, Wang ZX, Han B. *An-1* encodes a basic helix-loop-helix protein that regulates awn development, grain size, and grain number in rice. *Plant Cell*, 2013, 25(9): 3360–3376. [DOI]

[9] Gu BG, Zhou TY, Luo JH, Liu H, Wang YC, Shangguan YY, Zhu JJ, Li Y, Sang T, Wang ZX, Han B. *An-2* encodes a cytokinin synthesis enzyme that regulates awn length and grain production in rice. *Mol Plant*, 2015, 8(11): 1635–1650. [DOI]

[10] Hua L, Wang DR, Tan LB, Fu YC, Liu FX, Xiao LT, Zhu ZF, Fu Q, Sun X, Gu P, Cai HW, McCouch SR, Sun CQ. *LABA1*, a domestication gene associated with long, barbed awns in wild rice. *Plant Cell*, 2015, 27(7): 1875–1888. [DOI]

[11] Jin J, Hua L, Zhu ZF, Tan LB, Zhao XH, Zhang WF, Liu FX, Fu YC, Cai HW, Sun XY, Gu P, Xie DX, Sun CQ.

- GAD1 encodes a secreted peptide that regulates grain number, grain length, and awn development in rice domestication. *Plant Cell*, 2016, 28(10): 2453–2463. [DOI]
- [12] Yang DW, Ye XF, Zheng XH, Cheng CP, Ye N, Huang FH. Development and evaluation of chromosome segment substitution lines carrying overlapping chromosome segments of the whole wild rice genome. *Front Plant Sci*, 2016, 7: 1737, doi: 10.3389/fpls.2016.01737. [DOI]
- [13] Tan YF, Xing YZ, Li JX, Yu SB, Xu CG, Zhang QF. Genetic bases of appearance quality of rice grains in Shanyou 63, an elite rice hybrid. *Theor Appl Genet*, 2000, 101(5–6): 823–829. [DOI]
- [14] Yang DW, Lu LB, Cheng CP, Zeng MJ, Zheng XH, Ye N, Liu CD, Ye XF. Morphological characteristics and gene mapping of a palea degradation mutant in rice. *Hereditas (Beijing)*, 2012, 34 (8): 1064–1072.
杨德卫, 卢礼斌, 程朝平, 曾美娟, 郑向华, 叶宁, 刘成德, 叶新福. 一个水稻内颖退化突变体的形态特征及基因的精确定位. *遗传*, 2012, 34(8): 1064–1072. [DOI]
- [15] Wissuwa M, Wegner J, Ae N, Yano M. Substitution mapping of *Pupl*: a major QTL increasing phosphorus uptake of rice from a phosphorus-deficient soil. *Theor Appl Genet*, 2002, 105(6–7): 890–897. [DOI]
- [16] He FH, Xi ZY, Zeng RZ, Talukdar A, Zhang FQ. Mapping of heading date QTLs in rice (*Oryza sativa* L.) using single segment substitution lines. *J Integr Agric*, 2005, 38(8): 1505–1513.
何风华, 席章营, 曾瑞珍, Talukdar A, 张桂权. 利用单片段代换系定位水稻抽穗期 QTL. *中国农业科学*, 2005, 38(8): 1505–1513. [DOI]
- [17] Young ND, Tanksley SD. Restriction fragment length polymorphism maps and the concept of graphical genotypes. *Theor Appl Genet*, 1989, 77(1): 95–101. [DOI]
- [18] Xiao K, Gong YJ, Zhang JZ, Zhang YJ, Dong YJ. Mapping of quantitative trait loci for length and distributive characteristic of awn in rice (*Oryza sativa* L.). *J Shanghai Norm Univ (Nat Sci)*, 2008, 37(6): 606–612.
肖珂, 巩迎军, 张俊芝, 张永娟, 董彦君. 水稻芒长及其分布特征相关 QTL 的定位. *上海师范大学学报: 自然科学版*, 2008, 37(6): 606–612. [DOI]
- [19] Zhu WY, Lin J, Yang DW, Zhao L, Zhang YD, Zhu Z, Chen T, Wang CL. Development of chromosome segment substitution lines derived from backcross between two sequenced rice cultivars, *indica* recipient 93-11 and *japonica* donar Nipponbare. *Plant Mol Bio Rep*, 2009, 27(2): 126–131. [DOI]

(责任编辑: 储成才)