

水稻直立穗突变体 *ep7* 的鉴定及其候选基因分析

朱海涛, 柯善文, 冯小龙, 邹龙海, 曾秀瑜, 张向前

(华南农业大学 农学院, 广东省植物分子育种重点实验室, 广东 广州 510642)

摘要:在梗稻中花 11 的组培后代中发现 1 个突变体 *ep7*, 其稻穗直立, 且株高、有效穗、粒长和千粒质量等均显著降低; 利用该突变体与籼稻华梗粳 74 构建 F_2 分离群体对突变体进行遗传分析, 结果表明, 该突变表型由 1 对核隐性基因控制, 并用分子标记将该基因定位于第 7 染色体长臂上, 命名为 *EP7*, 其与 InDel 标记 ID5198-2 和 ID4309-1 的遗传距离分别为 0.7 cM 和 0.5 cM; 生物信息学和序列多态性分析表明, 可能是大片的 DNA 插入造成候选基因功能缺失, 导致该突变表型的产生。

关键词:水稻; 穗部性状; 直立穗突变体; 基因定位

中图分类号: Q78 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-7091(2014)04-0044-05

Identification of an Erect Panicle Mutant *ep7* in Rice and Analysis of the Candidate Gene

ZHU Hai-tao, KE Shan-wen, FENG Xiao-long, ZOU Long-hai, ZENG Xiu-yu, ZHANG Xiang-qian

(Guangdong Key Laboratory of Plant Molecular Breeding, College of Agronomy,

South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

Abstract: A rice mutant erect panicle 7 (*ep7*), obtained from tissue culture of a *japonica* variety Zhonghua 11, showed a dense and erect panicle and significantly reduced plant height, effective panicle number per plant, grain length and 1000-grain weight. The genetic analysis of a F_2 segregation population derived from the cross between *ep7* and an *indica* variety Huajingxian 74 demonstrated that the mutant phenotype was controlled by a single recessive gene on the long arm of chromosome 7, termed *EP7*, between two InDel markers ID5198-2 and ID4309-1 with 0.7 cM and 0.5 cM genetic distance, respectively. Moreover, bioinformatic analysis and sequence polymorphism revealed that the mutant phenotype might be caused by a large DNA fragment insertion in *EP7* gene.

Key words: Rice; Panicle trait; Erect panicle mutant; Gene mapping

穗和花序作为水稻 (*Oryza sativa* L.) 最顶端的器官, 同时也是其经济产品器官, 对水稻的产量起着至关重要的作用。穗部性状包括穗长、一次和二次枝梗数、颖花/籽粒数以及籽粒重等, 是由多个因素共同决定的。以往的研究多集中对穗部枝梗数、籽粒数以及粒重的研究, 而关于穗型的研究相对缺乏^[1]。依据主茎的颈穗弯曲度, 可将水稻稻穗划分为 3 种类型: 小于 40° 的直立穗型 (Erect Panicle, EP), 40 ~ 50° 的半直立穗型 (Semi-erect Panicle) 以及大于 50° 的弯曲穗型 (Drooping Panicle, DP)^[2]。在灌浆结实期, 直立穗型可有效减少遮光, 可降低反射、辐射, 有利于改善群体结构与受光态势; 既影响

水稻植株同化产物的总积累量, 又影响光合产物向穗部籽粒的分配, 对水稻增产有重要作用^[1,3-4]。已有研究表明, 直立穗型是继矮化和理想株型后水稻株型适应高产要求的又一重要形态变化^[5]。20 世纪 80 年代以来, 我国北方地区出现了以辽梗 5 号为代表的一大批典型直立穗型品种, 在生产上产生了巨大的影响, 直立穗型品种由此引起人们的重视, 相关研究日渐增多和深入^[6-7]。然而, 目前种植的直立穗型品种大部分衍生于意大利古老品种巴利拉, 遗传基础狭窄, 异质性差。因此, 丰富水稻穗型的研究已成为必要。

本研究对梗稻品种中花 11 组培诱发的直立穗

收稿日期: 2014-05-11

基金项目: 国家自然科学基金项目 (30900884); 广东省自然科学基金项目 (9451064201003804); 高等学校博士学科点专项科研基金项目 (20094404120011)

作者简介: 朱海涛 (1978-), 男, 广东梅州人, 实验师, 硕士, 主要从事植物分子育种研究。

通讯作者: 张向前 (1975-), 男, 河南汝州人, 副教授, 博士, 主要从事植物分子育种研究。

突变体 *ep7* 进行表型观察和分析,利用分子标记对突变体进行直立穗型基因的定位,并对候选基因进行了分析。本研究将为拓宽现有的直立穗型品种的遗传基础开辟新途径。

1 材料和方法

1.1 试验材料与种植

试验在华南农业大学教学试验农场进行。水稻突变体 *ep7* 源自粳稻品种中花 11 的组织培养后代。华粳粳 74 为正常的籼稻品种。

1.2 遗传分析和基因定位群体的构建

以突变体 *ep7* 为父本,分别与中花 11 和华粳粳 74 杂交,获得 F₂ 分离群体,用于突变体的遗传分析和突变基因的定位。从定位群体中选择了 440 株具有典型突变性状的植株用于基因定位。

1.3 标记分析

选择均匀分布于水稻 12 条染色体上的 SSR (Simple sequence repeat) 多态性标记,选取 20 株 F₂ 突变体单株,进行共分离分析,将相关基因定位在某—染色体,继而在该染色体相应区段筛选多态标记,并对整个 F₂ 群体的突变单株进行共分离分析。SSR 分析中所用到的 RM 系列引物序列引自 GRAMENE 数据库 ([http:// www. gramene. org/](http://www.gramene.org/)), PSM 系列引物为广东省植物分子育种重点实验室开发的 SSR 引物。利用 Shen 等^[8] 开发的水稻全基因组 DNA 多态数据库,在目标区域开发 InDel (Insertion/Deletion) 标记(表 1),引物由北京奥科鼎盛生物科技有限公司合成。水稻基因组 DNA 提取采用简易的 TPS 法^[9],PCR 扩增产物用 6% 聚丙烯酰胺凝胶电泳分离,银染检测。

表 1 两亲本间表现多态的 InDel 标记和 *EP7* 候选基因分析所用引物

Tab. 1 Primers used in InDel Makers both parents showed and in the analysis of candidate gene <i>EP7</i>				
标记 Marker		引物序列(5'→3') Primer sequence (5'→3')	产物长度/bp Product length	PAC 克隆 PAC clones
ID5193-1	L	AATGCTAAATCCCAGCCGCA	257	AP005193
	R	AGCTTTGCATGGATACACGCCC		
ID3700-1	L	GCGGCGGAGGTGAGCGATTTC	170	AP003700
	R	GGGGGAAACGGGAGAGCGGTG		
ID5198-2	L	AGCTCCCCCAAACAGGGCCTA	185	AP005198
	R	ACCTAGTGCTTGCATTTGCGGGT		
ID4309-1	L	TCTCGCGGTTTACAGCGCAGTT	271	AP004309
	R	GCACGGCTGAGATTGCGCCT		
ID4009-1	L	GTAAGCCCAAAGCCCAGTGGACC	250	AP004009
	R	GTGCGGCCCCAACTCCTGT		
ID3752-1	L	AACTGCCACTGCGCCACGTC	148	AP003752
	R	AGCCGTGGCCGCGATTTGAT		
P1	L	CCTTCAACCCCTTTCTTGCC	1 568	AP005198
	R	TCTCCCTGGATGTTCCACA		
P2	L	TATGCTGTACGCAGGTTGCC	1 502	AP005198
	R	GCCAGGGCATCAACTTTGGA		
P3	L	AGTTGTCTGTACTACTTCATCACG	1 545	AP005198
	R	GCATGCTTCAGCCATTAGC		
P4	L	TTGGAACCCCTGTTGGAACC	1 571	AP005198
	R	CATCAATGCACTAAGGGTGTGT		
P5	L	GGGCCAAATTCTCTCGGTCT	1 501	AP005198
	R	CCATCAGCACCTCGTGTCTT		
P6	L	TGCTGACTCAGACAGTGAGAA	1 592	AP005198
	R	ACGGACACAAAACGGTGGA		
P7	L	TCTCTCTAAATACCACCCA	644	AP005198
	R	GAGGCATCCCACCATTAGCA		

1.4 数据分析

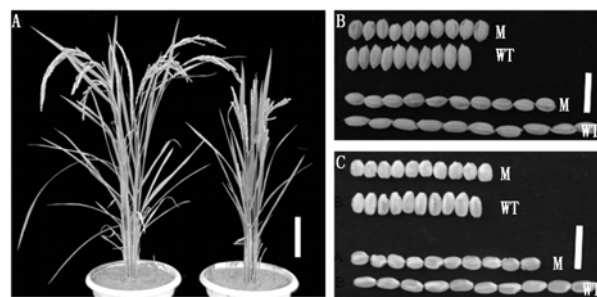
用 Excel 2003 软件对数据进行统计分析, Mapmaker 3.0 软件应用于连锁分析^[10]。

2 结果分析

2.1 突变体 *ep7* 的表型特征

本研究所用的材料中花 11 属于弯曲穗型品种,

突变体 *ep7* 是由中花 11 组培诱发的直立穗突变体, 比较它们的主要农艺性状(表 2), 可以看出, 突变体 *ep7* 的株高(图 1-A)、剑叶长、穗长和单株有效穗数等都显著地低于野生型中花 11; 在结实方面, 中花 11 的穗粒数为 111.97 粒, 每穗实粒数为 103.27, 结实率为 92.19%。而突变体 *ep7* 的穗粒数仅 81.30 粒, 每穗实粒数 70.70, 结实率为 86.89%, 显著低于中花 11; 在粒形方面, 中花 11 的谷粒长宽比和米粒长宽比分别为 2.50 和 1.85, 而突变体 *ep7* 粒形长度显著变短, 宽度显著变宽(图 1-B, C), 谷粒长宽比和米粒长宽比分别为 1.63 和 1.30(表 2), 两者在粒形上是有显著差异的; 在粒重方面, *ep7* 的谷粒千粒质量为 21.78 g、米粒千粒质量为 18.64 g, 均显著低于中花 11, 分别相差 2.91 g 和 3.64 g(表 2)。



A. 株型(左. 野生型; 右. 突变体); B. 谷粒; C. 米粒; M. 突变体; WT. 野生型(中花 11); 标尺 = 10 cm(A) 和 1 cm(B 和 C)。

A. Plant shape(Left. Wild-type; Right. Mutant); B. Grain (s); C. Brown rice. M. Mutant; WT. Wild-type(WT, Zhonghua 11). Bar = 10 cm (A), and Bar = 1 cm (B and C).

图 1 野生型和突变体 *ep7* 的表型特征

Fig.1 Phenotypic characterization of wild-type(WT) and *ep7* mutant

表 2 突变体 *ep7* 与野生型之间的主要农艺性状比较

Tab.2 Comparison of major agronomic traits between *ep7* mutant and wild-type

性状 Trait	平均数 ± 标准误 Mean ± S. E.		<i>t</i> 测验 <i>P</i> 值 <i>t</i> test <i>P</i> value
	WT	<i>ep7</i>	
株高/cm Plant height	83.00 ± 0.55	55.92 ± 0.70	4.86E-73
剑叶长/cm Flag leaf length	27.30 ± 0.52	22.65 ± 0.37	1.55E-11
穗长/cm Panicle length	21.30 ± 0.21	13.07 ± 0.18	2.81E-42
单株有效穗数 Effective panicles per plant	8.08 ± 0.73	5.44 ± 0.19	6.58E-04
穗粒数 Spikelets per panicle	111.97 ± 3.26	81.30 ± 2.25	9.31E-11
每穗实粒数 Filled grains per panicle	103.27 ± 3.05	70.70 ± 2.37	2.44E-12
结实率/% Seed setting rate	92.19 ± 0.57	86.89 ± 1.45	1.38E-03
谷粒长/mm Grain length	7.50 ± 0.03	5.81 ± 0.03	1.94E-151
谷粒宽/mm Grain width	3.02 ± 0.01	3.57 ± 0.01	5.68E-103
谷粒长宽比 Ratio of grain length to width	2.50 ± 0.01	1.63 ± 0.01	1.45E-176
谷粒千粒质量/g 1000-grain weight	24.69 ± 0.15	21.78 ± 0.23	3.43E-09
米粒长/mm Brown rice length	5.35 ± 0.04	4.14 ± 0.02	2.45E-44
米粒宽/mm Brown rice width	2.89 ± 0.01	3.19 ± 0.01	3.28E-30
米粒长宽比 Ratio of brown rice length to width	1.85 ± 0.02	1.30 ± 0.01	1.23E-45
米粒千粒质量/g 1000-brown rice weight	22.28 ± 0.16	18.64 ± 0.13	1.24E-07

2.2 突变体 *ep7* 的遗传分析

在突变体 *ep7* 与中花 11 杂交构建的 6 个 F_2 株系、共 1 196 个单株的分离群体中, 野生型(弯曲穗型)植株为 920 株, 突变型(直立穗型)植株为 276

株(表 3), χ^2 测验结果表明野生型与突变型分离比为 3:1, 符合孟德尔单基因遗传分离定律, 说明该直立穗突变表型由单隐性核基因控制。

表 3 突变体 *ep7* 的遗传分析

Tab.3 Genetic analysis of *ep7* mutant

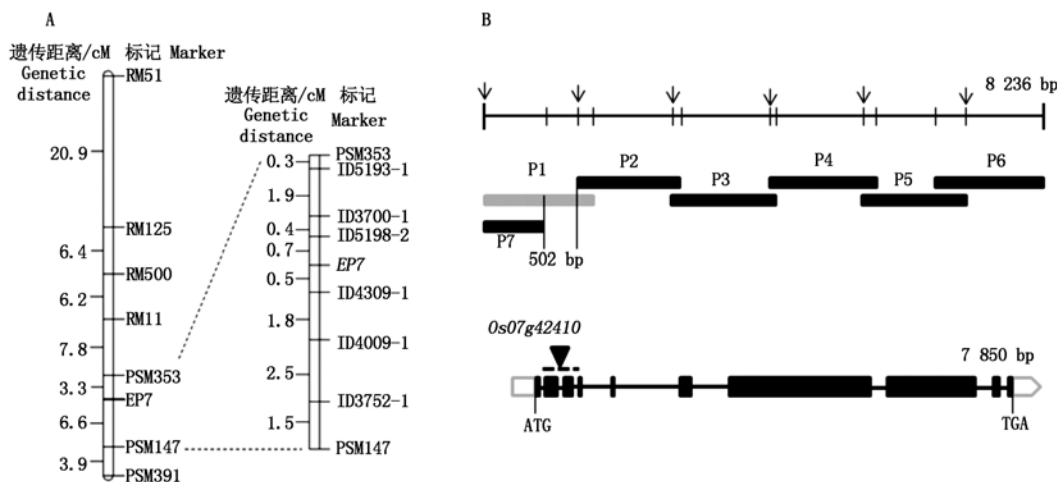
材料 Materials	群体 Population size	野生型 Wild-type	突变型 Mutant	分离比 Segregation ratio	$\chi^2_{(3:1)}$ 测验 <i>P</i> 值 $\chi^2_{(3:1)}$ test <i>P</i> value
Zhonghua11/ <i>ep7</i> -1	200	155	45	3.44	0.42
Zhonghua11/ <i>ep7</i> -2	200	154	46	3.35	0.52
Zhonghua11/ <i>ep7</i> -3	197	155	42	3.69	0.24
Zhonghua11/ <i>ep7</i> -4	200	156	44	3.55	0.33
Zhonghua11/ <i>ep7</i> -5	199	151	48	3.15	0.78
Zhonghua11/ <i>ep7</i> -6	200	149	51	2.92	0.88
合计 Total	1 196	920	276	3.33	0.13

2.3 突变体 *ep7* 的基因定位和候选基因分析

以突变体 *ep7* 与华粳 74 的 F_2 群体中的 440 个有突变表型的单株, 作为定位群体。首先均匀地选择 96 个有多态的 SSR 标记对 20 个突变株进行全基因组连锁分析。发现位于第 7 染色体长臂上的 PSM353 与突变表型存在明显的相关性, 再利用标记 PSM147 和 PSM353 对全部的 440 个突变体单株进行分子标记检测, 初步将直立穗基因定位在水稻第 7 染色体长臂上, 位于分子标记 PSM353 和 PSM147 之间, 与 PSM353 的遗传距离为 3.3 cM, 与 PSM147 的遗传距离为 6.6 cM (图 2)。在此基础上, 在这两标记之间又开发了多对 InDel 标记, 用这些标记对亲本进行多态性分析, 共有 6 对标记在两亲本间有多态 (表 1)。利用这 6 对多态性标记对 440 个突变体单株进行分析, 水稻直立穗基因 *EP7* 被定位在 InDel 标记 ID5198-2 和 ID4309-1 之间, 遗传距离分别为 0.7 cM 和 0.5 cM。

为进一步鉴定突变体候选基因, 利用生物信息

学结合已发表文章对定位区间的候选基因进行了综合分析。数据分析表明 *LOC_Os07g42410* 可能为 *EP7* 候选基因, 该基因全长 7 850 bp, 包含 10 个外显子, 9 个内含子, 编码一个植物所特有的蛋白。为了验证该推测, 依据水稻基因组序列设计 6 对引物 (表 1、图 2-B), 检测了候选基因 (*LOC_Os07g42410*) 的基因组序列。分析表明, P2 ~ P6 引物对在野生型和突变体 *ep7* 中均能正常扩增, 且 PCR 产物符合预期大小, 进一步测序表明野生型和突变体 *ep7* 相应区段无序列差异。但是, 引物对 P1 仅能在野生型中扩增得到预期的 PCR 产物, 而在突变体 *ep7* 中无相应 PCR 产物, 据此推测该突变表型可能是由于 DNA 片段缺失或较大 DNA 片段插入所造成的。为此, 在 P1 区段设计了 1 对引物 P7 (图 2-B), PCR 结果表明 P7 在野生型和突变体 *ep7* 中均能有效扩增。综合分析表明, 突变体 *ep7* 在基因靠前端 502 bp 区段内可能有大片段 DNA 插入 (图 2-B)。



A. *EP7* 在水稻第 7 染色体上的连锁分析; B. *EP7* 候选基因 *Os07g42410* 突变位点分析, 依据水稻基因组序列设计 7 对引物 (P1 ~ P7, 覆盖 *Os07g42410* 区段) 分别检测野生型 (中花 11) 和突变体 *ep7*; 箭头所示为正向引物对应位置, 短线显示反向引物 (图 2-B 上); 黑色长方形表示野生型 (中花 11) 和突变体 *ep7* 中可扩增的 PCR 产物, 浅灰色长方形, 仅野生型能扩增出相应产物, 但突变体无相应产物 (图 2-B 中); *Os07g42410* 全长 7 850 bp, 包含 10 个外显子, 9 个内含子; 黑色长方形代表外显子, 内含子以黑线条表示, 三角形表示插入突变相应位置 (图 2-B 下)。

A. Linkage analysis of *EP7* on the rice chromosome 7; B. Analysis on mutation sites of candidate gene *EP7* (*Os07g42410*), according to the rice genomic sequence, we designed 7 pairs of primers (P1-P7, the coverage containing *Os07g42410*) to detect wild-type (WT, Zhonghua 11) and *ep7* mutant, respectively; The arrows indicate the corresponding sites of forward primers, and the short lines show reverse primers (Top panel in Fig. 2-B); The black rectangles show the possibly amplified PCR products from wild-type (WT, Zhonghua 11) and *ep7* mutant, the light grey rectangles show the WT can amplify the corresponding product, but no corresponding product can be amplified in the mutant (Medium panel in Fig. 2-B); The full-length of *Os07g42410* is 7 850 bp, including 10 exons and 9 introns; The black rectangles show exons, black lines show introns, and the triangle shows corresponding sites of insertion mutation (Bottom panel in Fig. 2-B).

图 2 *EP7* 在水稻第 7 染色体上的连锁分析和突变位点分析

Fig. 2 Linkage analysis and mutation site analysis of *EP7* on the rice chromosome 7

3 讨论

直立穗突变体 *ep7* 与中花 11 的主要农艺性状 (株高、剑叶长、有效穗、结实率、粒形长宽比和千粒质量等) 具有显著差异。遗传分析表明, 突变表型由单隐性核基因控制, 两者的多个性状差异显著, 可

能是一因多效的关系。

直立穗品种株型紧凑、耐肥抗倒、抗寒性好, 直立穗型水稻品种 (如: 辽粳 5 号) 的大面积推广, 显示出良好的应用前景。近几年, 已有多项有关水稻直立穗基因定位克隆的研究。DEP1 位点与 *qPE9-1* 等位, 位于第 9 染色体, 是一个控制水稻产量性状的

主效 QTL,该位点上的显性等位基因是一个功能性获得性突变,它能引起稻穗变短、直立和着粒密集^[11-12]。*DEP1* 基因编码 1 个与磷脂酰乙醇胺结合蛋白有类似功能域的蛋白,能促进细胞分裂,降低穗颈节长度,并使稻穗变密以及枝梗数、穗粒数增多,从而促进水稻增产。目前,在我国东北和长江中下游地区大面积种植的直立和半直立穗型的高产水稻品种都含有突变的 *DEP1* 基因。

Piao 等^[13]用化学试剂诱变的方法获得一个粳型直立穗型突变体,该突变体的小维管束的数量和穗轴的粗壮度显著增加,其候选基因 *EP3* (*LOC_Os02g15950*) 位于第 2 染色体短臂,编码一个 F-box 蛋白。*dep3* 是一种直立、密穗型粳稻突变体,与野生型相比,该突变体的维管束更小、茎更粗。利用图位克隆技术,鉴定出候选基因 *DEP3* (*LOC_Os06g46350*),预测其编码一个含有 patatin 样磷脂酶 A2 (PLA2) 超家族结构域的蛋白^[14]。直立、密穗型基因 *DEP2*^[15] 与小圆粒基因 *SRS1*^[16] 和 *EP2*^[17] 是同一个基因位点。*DEP2/SRS1/EP2* (*LOC_Os0742410*) 位于水稻第 7 染色体,该基因不仅调节水稻穗型,而且参与调节种子大小,其突变体 *srs1/dep2* 表现为直立穗、圆粒等特征^[15-17]。

本研究利用突变体与华梗粳 74 杂交构建的 F₂ 分离群体,将控制直立穗的基因 *EP7* 定位于第 7 染色体长臂上,位于 SSR 标记 RM234 与 PSM353 之间。通过比较分析,表明 *DEP2* (*LOC_Os0742410*) 在本研究所得的定位区间之中,进一步分析表明,本研究所定位的基因 *EP7* 与直立、密穗型基因 *DEP2* 为等位基因。

参考文献:

- [1] 王嘉宇,徐正进,张世春. 水稻直立穗型研究进展与应用前景[J]. 种子,2005,24(8):58-61.
- [2] 徐正进,陈温福,张龙步. 水稻直立穗型的初步观察[J]. 沈阳农业大学学报,1989,20(2):150-153.
- [3] 徐正进,陈温福,张龙步,等. 水稻不同穗型群体冠层光分布的比较研究[J]. 中国农业科学,1990,23(4):10-16.
- [4] 徐正进,陈温福,张文忠,等. 水稻冠层垂直反射率的品种间差异及其影响因素初步分析[J]. 中国农业科学,2008,41(9):2868-2872.
- [5] 陈温福,徐正进,张龙步. 水稻超高产育种生理基础[M]. 沈阳:辽宁科学技术出版社,1995:229-244.
- [6] 徐正进,陈温福,张文忠,等. 北方粳稻新株型超高产育种研究进展[J]. 中国农业科学,2004,37(10):1407-1413.
- [7] 陈温福,徐正进,张文忠,等. 水稻新株型创造与超高产育种[J]. 作物学报,2001,27(5):665-672.
- [8] Shen Y, Jiang H, Jin J, et al. Development of genome-wide DNA polymorphism database for map-based cloning of rice genes [J]. Plant Physiology, 2004, 135(3):1198-1205.
- [9] 张向前,邹金松,朱海涛,等. 水稻早熟多子房突变体 *fon5* 的遗传分析和基因定位[J]. 遗传,2008,30(10):1349-1355.
- [10] Lander E S, Green P, Abrahamson J, et al. Mapmaker: an interactive computer package for constructing primary genetic linkage maps of experimental and natural populations [J]. Genomics, 1987, 1(2):174-181.
- [11] Zhou Y, Zhu J, Li Z, et al. Deletion in a quantitative trait gene *qPE9-1* associated with panicle erectness improves plant architecture during rice domestication [J]. Genetics, 2009, 183(1):315-324.
- [12] Huang X, Qian Q, Liu Z, et al. Natural variation at the *DEP1* locus enhances grain yield in rice [J]. Nature Genetics, 2009, 41(4):494-497.
- [13] Piao R, Jiang W, Ham T, et al. Map-based cloning of the *ERECT PANICLE 3* gene in rice [J]. Theor Appl Genet, 2009, 119(8):1497-1506.
- [14] Qiao Y, Piao R, Shi J, et al. Fine mapping and candidate gene analysis of dense and erect panicle 3, *DEP3*, which confers high grain yield in rice (*Oryza sativa* L.) [J]. Theor Appl Genet, 2011, 122(7):1439-1449.
- [15] Li F, Liu W, Tang J, et al. Rice DENSE AND ERECT PANICLE 2 is essential for determining panicle outgrowth and elongation [J]. Cell Research, 2010, 20(7):838-849.
- [16] Abe Y, Mieda K, Ando T, et al. The *SMALL AND ROUND SEED1* (*SRS1/DEP2*) gene is involved in the regulation of seed size in rice [J]. Genes & Genetic Systems, 2010, 85(5):327-339.
- [17] Zhu K, Tang D, Yan C, et al. Erect panicle2 encodes a novel protein that regulates panicle erectness in indica rice [J]. Genetics, 2010, 184(2):343-350.