

# 一个水稻穗部突变体 *zhao1* 的遗传和连锁分析

欧阳晨林<sup>1</sup>, 赵志超<sup>2</sup>, 邢欣欣<sup>2</sup>, 柳波娟<sup>2</sup>, 张海涛<sup>1</sup>, 程治军<sup>2</sup>

(<sup>1</sup>安徽农业大学农学院, 合肥 230026; <sup>2</sup>中国农业科学院作物科学研究所, 北京 100081)

**摘要:** 穗顶部退化型在生产中十分常见, 它影响穗粒数、结实率和单株产量, 需要在育种实践中尽量避免; 而直立密穗型是一种能够适应密植栽培的穗型。分离和克隆这两个性状的相关基因对水稻的分子设计育种具有重要意义。本研究报道了一个水稻穗部突变体 *zhao1* 的研究结果。*zhao1* 表现为密穗和穗顶部退化的双重表型, 利用该材料与 IRAT129 杂交, F<sub>2</sub> 群体中分离出穗型和顶部退化两个独立遗传的性状。遗传分析表明, 直立密穗性状为单基因显性性状, 而穗顶部退化性状可能涉及不多于两对的基因。分别对这两个性状开展了连锁分析和图位克隆, 发现密穗性状的候选基因为 *DEP1*, 其突变方式与 *dep1* 的突变方式相同。穗顶部退化性状的连锁和图位克隆结果将穗顶部退化候选基因确定在第 3 号染色体 6.85~6.93 Mb 区间内。该区间包含 8 个推测的基因, 其中基因 *LOC\_Os03g12790* 的表达量下调了 27 倍, 是可能的候选基因, 为最终克隆穗顶部退化候选基因奠定了基础。

**关键词:** 水稻; 直立密穗; 穗顶部退化; 精细定位

## Genetic and Linkage Analysis of a Rice Panicle Mutant *zhao1*

OUYANG Chenlin<sup>1</sup>, ZHAO Zhichao<sup>2</sup>, XING Xinxin<sup>2</sup>, LIU Bojuan<sup>2</sup>, ZHANG Haitao<sup>1</sup>, CHENG Zhijun<sup>2</sup>

(<sup>1</sup>College of Agronomy, Anhui Agricultural University, Hefei 230036; <sup>2</sup>Institute of Crop Sciences, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081)

**Abstract:** Panicle apical abortion is often observed in rice production, which impairs the number of grains per panicle, the seed setting rate and the yield of single plant, and should be avoided in breeding practice. The dense and erect panicle is a plant type adaptable to dense planting. It is of importance to isolate the genes related to these two traits in molecular design breeding. Here, we present the research result of a rice panicle mutant *zhao1*, which displays the dense panicle and panicle apical abortion. Either dense panicle or panicle apical abortion was segregated independently in the F<sub>2</sub> population derived from *zhao1* crossed with IRAT129. Genetic analysis showed that the dense and erect panicle trait is controlled by a single dominant gene, while the panicle apical abortion trait may involve no more than two pairs of genes. Based on the linkage analysis and map-based cloning at both traits respectively, the gene *DEP1* was found to be the candidate for the dense panicle trait in *zhao1* which carries the identity mutation as the *dep1*. The linkage mapping and map-based cloning to the trait of panicle apical abortion finally delimited the candidate gene to the physical interval of 6.85-6.93 Mb on chromosome 3, where 8 putative genes are annotated. The gene *LOC\_Os03g12790* was observed with the most significant decrease on transcriptional profile, and served as the best candidate for the panicle apical abortion phenotype. Collectively, our results laid the foundation for the future cloning of the functional gene in rice.

**Key words:** rice; dense and erect panicle; panicle apical abortion; fine mapping

收稿日期: 2023-04-26 修回日期: 2023-05-05 网络出版日期: 2023-05-22

URL: <https://doi.org/10.13430/j.cnki.jpgr.20230426003>

第一作者研究方向为水稻分子育种, E-mail: 1441647747@qq.com; 赵志超为共同第一作者

通信作者: 程治军, 研究方向为水稻重要农艺性状基因克隆, E-mail: chengzhijun@caas.cn

基金项目: 科技创新项目(2022ZD04004)

Foundation project: Technological Innovation Projects(2022ZD04004)

水稻产量是一种数量性状,主要是由每株穗数、每穗粒数和千粒重三个因素决定<sup>[1-2]</sup>。稻穗是水稻最重要的库以及产量最终的表达部位,直接决定了每穗粒数和千粒重<sup>[3]</sup>,水稻穗顶部颖花退化的现象,往往导致穗顶部颖花退化变白、败育脱落,是水稻育种和生产中需要避免的性状。由于此性状受环境影响很大,表型鉴定不易,只有在育种工作亲本选配的源头进行基因型鉴定,才能保证育成品种不会带有这个不良性状。

穗顶部退化的原因可能多样,在穗顶部退化的基因克隆上,对一个根变短、叶片细胞死亡、株高变矮、穗变短、顶部小穗退化、花药和花粉粒发育异常的突变体 *tut1* 的研究表明, *TUT1* 基因编码一个 SCAR/WAVE 同源蛋白,通过激活 Arp2/3 参与调控微丝排列, *tut1* 突变体的微丝排列缺陷导致植株整体发育受到阻碍<sup>[4]</sup>。编码 SQUAMOSA 类启动子结合蛋白的基因 *SPL6* 的突变,抑制了内质网胁迫信号的输出,从而导致了突变体的穗部退化,株型变劣<sup>[5]</sup>。Zafar 等<sup>[6]</sup>研究发现,编码含胱硫醚- $\beta$  合成酶结构域蛋白质的 *DPS1* 基因突变,产生了半不育的穗顶部退化表型。Zhu 等<sup>[7]</sup>也发现编码果胶酸裂解酶类蛋白的 *DELI* 基因突变,产生了矮秆、多蘖、穗顶部退化突变体 *tutou2*。编码类枯草杆菌素丝氨酸蛋白酶的基因 *SUBSRP1* 的突变,影响了花药蜡质的合成和皮层的发育,导致了穗顶部退化<sup>[8]</sup>。对穗顶部退化突变体 *paa1* 的研究表明,编码苹果酸转运蛋白基因 *OsALMT7* 发生突变,导致了穗顶部退化现象,表明穗顶部退化与植株顶部小穗的营养(尤其是苹果酸)的供给存在着明显的关系<sup>[9]</sup>。

多数育种材料的穗顶部退化表型是微效多基因控制的数量性状,不同作图群体、不同的年份和地点 QTL 的重复检出率较低。徐华山等<sup>[10]</sup>在 9311 和日本晴代换系群体中重复检测到位于第 1、2、4、7 和 9 染色体上的 5 个微效 QTL,只有在抽穗期遇到低温的环境下,第 9 染色体上的 QTL *ds-9* 才有可能成为主效 QTL。在抽穗期高温的武汉, *ds-9* 的贡献率为 1.6%;在海南南繁时,由于抽穗期遇低温, *ds-9* 贡献率上升为 20.0%。王斌等<sup>[11]</sup>利用“越光 $\times$ 桂朝 2 号”重组自交系群体,发现了 6 个分别位于第 1、2、3、5、6 和 7 染色体上的 QTL,贡献率在 4.5%~9.7% 之间。Wang 等<sup>[12]</sup>从一个来自于昌恢 121 和越光的片段置换系上精细定位到了 1 个穗顶部退化 QTL *qPAA7*。L-05261 是一个穗顶部退化材料,高素伟

等<sup>[13]</sup>的研究表明,它的穗顶部退化表型涉及第 3、4、5、8 染色体上 4 个 QTL,贡献率变化在 7.3%~15.8%。在此基础上,Cheng 等<sup>[14]</sup>、张兴元等<sup>[15]</sup>和张杰瑜等<sup>[16]</sup>分别对第 8 和第 3 染色体上的 *qPAA8* 和 *qPAA3* 进行了定位,并发现 *qPAA8* 是 1 个对低温敏感的穗顶部退化 QTL。Tan 等<sup>[17]</sup>也利用 9311 和日本晴代换系群体定位了第 3 染色体上 *qPDS3*,它能解释 11% 的穗顶部退化变异。Jiang 等<sup>[18]</sup>在一个源自于七山占和秋光的片段置换系 *Ats1* 系中定位到了 1 个主效 QTL *ATSI*,与之前报道的 *qPAA8* 的位置重叠。然而,目前并没有成功克隆出穗顶部退化的 QTL,这一方面与微效 QTL 表型易受环境条件影响有关,不易鉴定,另一方面,有明显穗顶部退化的表型往往涉及多个 QTL,不易将它们分开。

水稻穗属于一种有限生长的圆锥花序,由一次枝梗、二次枝梗、穗轴和小穗组成<sup>[19]</sup>,其形态和大小也是株型的重要组成部分,如密穗型的品种增强品种间的通风透光,利于合理密植。自我国北方粳稻第一个直立穗型品种辽粳 5 号育成推广以来,直立穗型品种逐渐成为我国粳稻区的主要穗型品种<sup>[20]</sup>。Huang 等<sup>[21]</sup>发现 *DEP1* 是 1 个控制水稻产量性状的主效 QTL,对密集穗、每穗高粒数和直立穗具有多效性,同时发现其等位基因 *dep1* 能够增强分生组织活性并促进细胞增殖。*DNI* 与 *qPE9-1* 也是 *DEP1* 的 1 个等位基因, *DNI* 基因功能丧失导致水稻半矮秆和穗粒数的增加<sup>[22]</sup>, *qPE9-1* 是偶然的丧失性自然突变,可以调控直立穗内的株型<sup>[23]</sup>。*DEP2* 也是直立穗基因,主要影响穗轴和一二次枝梗的长度,但并不减弱穗原基的初始和形成<sup>[24-26]</sup>。*ep3* 突变显著增加了小维管束的数目和穗轴的粗壮度,产生了直立穗表型<sup>[27]</sup>。本研究在北方粳稻的育种实践中,在育种高世代材料中发现了一个突变体 *zhao1*,表现为密穗与穗顶部退化的表型,利用该材料与 IRAT129 杂交,  $F_2$  群体中分离出穗型和顶部退化两个性状。遗传分析表明,直立密穗性状为单基因显性性状,而穗顶部退化可能仅涉及不超过两对基因,并对其中的穗顶部退化基因进行了精细定位,为最终克隆出该基因奠定了基础。

## 1 材料与方 法

### 1.1 试验材料表型及遗传规律分析

突变体 *zhao1* 和对照均来自于育种田里 1 个  $F_5$  高世代材料(未命名),对照为性状稳定的高代材

料,突变体具有密穗与穗顶部退化的表型。除此以外,突变体还表现出分蘖减少,株高降低,茎秆变粗。2020年,在海南三亚中国农业科学院作物科学研究所基地,利用该材料与正常表型品种 IRAT129 杂交,配制遗传作图群体,杂交种经过中国农业科学院作物科学研究所北京顺义试验基地正季(2021月夏季)繁殖后,2021年冬季在海南试验基地种植 F<sub>2</sub> 群体。2022年夏季在北京正季种植 F<sub>3</sub> 群体 1500株左右,每行10株,株距15 cm,行距20 cm。成熟时,对突变体及对照10株的株高、分蘖数、主穗长、一次枝梗数、二次枝梗数、结实率、粒长、粒宽、千粒重等农艺性状进行考种。为了研究性状的遗传分离规律,利用 F<sub>3</sub> 株系单株表型的分离规律来判断 F<sub>2</sub> 单株的基因型,并利用卡方测验进行遗传分析。

### 1.2 目标基因的定位及新引物的开发

在田间分别取亲本 IRAT129, *zhao1* 叶片以及 F<sub>3</sub> 群体 600个显性穗顶部退化表型和 416个隐性直立密穗表型样本叶片。利用 CTAB 法<sup>[28]</sup>提取叶片样本的 DNA,各选取极端表型的 10个叶片,构成连锁

分析用的混池。利用遍布水稻 12条染色体总共 200多个 Indel 和 SSR 引物,筛选出 IRAT129 和 *zhao1* 之间具有多态性的引物 127对用于初步的基因定位。在初定位的基础之上,利用网站 Gramene (<https://www.gramene.org/>) 上水稻和粳稻日本晴的基因组序列,在初定位区间内寻找插入/缺失位点,用 Primer3 在线软件 (<https://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>) 设计 Indel 分子标记,委托北京擎科生物公司合成新引物,继续进一步的精细定位。采用北京宝日医生物技术有限公司的 Premix Taq 进行 PCR 扩增,所有新开发的 PCR 引物见表 1。采用 10 μL 的 PCR 扩增体系,PCR 反应体系: Premix Taq 5 μL、正反向引物各 0.5 μL (浓度 10 μmol/L)、DNA 模板 1 μL、ddH<sub>2</sub>O 1 μL。PCR 反应条件设置为: 94 °C 预变性 3 min; 94 °C 变性 30 s, 退火温度 58 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 30 s; 72 °C 延伸 5 min, 4 °C 保存。产物经过 8% 非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳分离,银染显色后观察记录<sup>[29]</sup>。扩增精细定位区间的候选基因全基因组序列,委托北京诺禾公司测序。

表 1 新开发的用于突变体 *zhao1* 基因定位的多态性引物

Table 1 Newly developed polymorphic primers for gene mapping of mutant *zhao1*

| 引物名称        | 正向序列(5'-3')             | 反向序列(5'-3')               |
|-------------|-------------------------|---------------------------|
| Primer name | Forward sequence(5'-3') | Reverse sequence(5'-3')   |
| Y9-30       | AAGACGAACGGGTCAAACAT    | AAAGACTGTGTCTGAAGCCATAAAA |
| Y9-46       | TGGACACCCACTGTATCCAC    | GGGTTTTGGACTTTTGGTCA      |
| Y9-63       | ATCTCCCGCCACTTCTTCTC    | TCGGCCACGATCTTATCTCT      |
| O9-8        | ACATCTCTGCTCGCCATTCT    | GCGAGGTTTGTAGTATGCTGG     |
| O9-10       | CGGGCACTAAATGATCGTGG    | GGCGACGTGTACAAGAGGTT      |
| SS9-25      | CGCCAAATACTTGTCTTGAT    | AAGGAGGAAGGCGATTTAGA      |
| Y3-59       | CGTTTTATCCGACGTGACACT   | GCACTATGGGGAAGAGAGGG      |
| O9-40       | TTTGGGAGGAAGCCAGAGTT    | CAGAGCCAGAGATGCGTTTC      |
| Y3-53       | TGTCACCAAACCTCGATTGCC   | CATGGGCACATCCTCTTTCC      |
| Y3-3        | GGTTGCTGGACACCAGAGAT    | GTGGCCAAACTACGACCAAT      |
| Y3-35       | CAAGATGCTCGCCTAGTTGC    | TTGTCTCATAACCACCCCA       |
| IN1-1       | CGTTTCGATCGATCTCTCTCC   | TGTTTCGTGCAACACACAAT      |

### 1.3 候选基因的表达量分析

对照和突变体的幼苗进行取样置于 2 mL 管中,使用天根公司试剂盒进行目标 RNA 的提取。利用北京宝日医生物技术有限公司的 PrimeScript II 1st Strand cDNA Synthesis Kit 试剂盒合成 cDNA。使用 TaKaRa 公司 TB Green™ Premix ExTaq™II

(Tli RNaseH Plus 试剂盒),将反转录后的第一条链 cDNA 作为反应模板进行 PCR 扩增反应。采用两步法进行 PCR 扩增,标准程序:第 1 步 95 °C 30 s 预变性;第 2 步 95 °C 5 s, 60 °C 30 s, 40 个循环;第 3 步,溶解曲线。内参采用水稻基因 *Ubiquitin (Os08g40930)*,新开发的引物见表 2,每个样品设置 3 个生物学重复。

表 2 用于检测可能候选基因表达水平的引物序列

Table 2 Primer sequences employed to detect the expression level of possible candidate gene

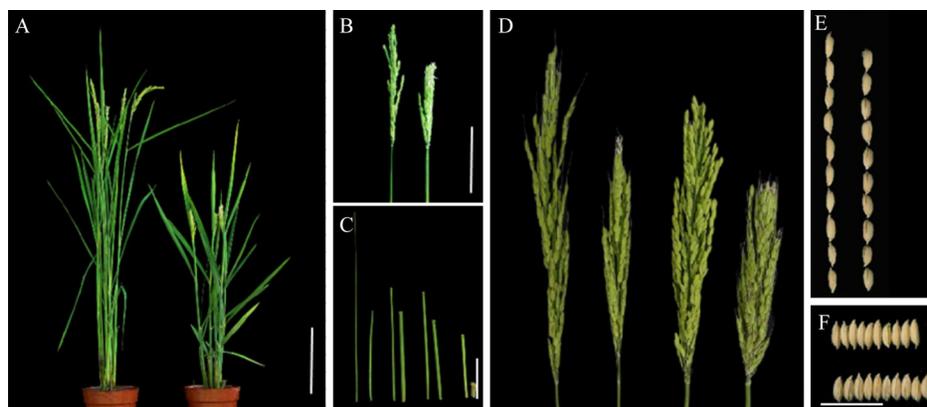
| 引物名称<br>Primer name   | 正向序列(5'-3')<br>Forward sequence(5'-3') | 反向序列(5'-3')<br>Reverse sequence(5'-3') |
|-----------------------|--|--|
| <i>LOC_Os03g12790</i> | GCCGGTCTCCATTTTCATCTTTCTC              | GCTGCTCAGCTTGGTTATACAGAC               |
| <i>LOC_Os03g12810</i> | ACCTCTGTGGAAGCTATTGTTGG                | CTTCAGCATGGGCAGTCAGTTG                 |
| <i>LOC_Os03g12815</i> | TCTCCTTCGTGCCCTTTCTGTTG                | TCAACGCTACCAGGGATAGAGACG               |
| <i>LOC_Os03g12820</i> | CGTACAACCTGCTTCAAGAGAGGAC              | AGCGCAAGAACCGGATGAAC                   |
| <i>LOC_Os03g12830</i> | TCCGTGAACCTTTGGAGCAGATG                | AGTGTTTCGGATCAAGCCCTCTC                |
| <i>LOC_Os03g12840</i> | TTGGCGTCTATCGATTTCCAAGAG               | AGTGGTCTTGAGGAAGTTCTGAG                |
| <i>LOC_Os03g12850</i> | AGGATGTGGTAGCGTTGTGC                   | CAGAGTCCCTCTTCTCTCCTTTC                |
| <i>LOC_Os03g12860</i> | CGCTTTAGCGAAGCAACTGAACC                | CCGTCTGCTTCAGCTTTGTCTTG                |
| <i>Ubiquitin</i>      | GCTCCGTGGCGGTATCAT                     | CGGCAGTTGACAGCCCTAG                    |

## 2 结果与分析

### 2.1 *zhao1* 突变体的表型分析

*zhao1* 突变体是来自于育种田里一个高世代变异材料, 表现为密穗与穗顶部退化表型(图1)。农艺性状考察结果表明(表3), 突变体的株高降低(突变体 58.8 cm, 对照 97.87 cm); 分蘖减少(突变体 4.3 个, 对照的 12.0 个); 主穗变短(突变体 12.1 cm, 对照

19.6 cm); 一次枝梗数增多(突变体 24.0 个, 对照 11.1 个); 总小花数增多(突变体 204.0 个, 对照 141.7 个); 由于退化小花数多(突变体 73.7 个, 对照 13.3 个), 导致突变体和对照的每穗实粒数相近(突变体 130.3 粒, 对照 128.3 粒); 突变体的千粒重与对照相比明显降低(突变体 17.8 g, 对照 22.7 g)。以上结果表明, *zhao1* 是一个穗型和株型等多个性状发生了突变的材料。



A: 对照(左)与突变体 *zhao1*(右)抽穗期后植株的表型图, 比例尺为 15 cm; B: 对照(左)与突变体 *zhao1*(右)抽穗期的穗部形态; 比例尺为 6 cm; C: 对照(左)与突变体 *zhao1*(右)抽穗同时期第一节间、第二节间、第三节间、第四节间对比图, 比例尺为 2 cm; D:  $F_2$  群体中, 分离出正常穗、正常穗+秃尖、密穗、密穗+秃尖(从左到右)4 种表型; E: 突变体 *zhao1*(左)与对照(右)籽粒长度比较, 比例尺为 2 cm; F: 突变体 *zhao1*(上)与对照(下)籽粒宽度比较, 比例尺为 2 cm

A: Plant phenotypes of wild type CK (left) and mutant *zhao1* (right) after heading stage, bar=15 cm; B: Panicle morphology comparison of wild type CK (left) and mutant *zhao1* (right) at heading stage; bar=6 cm; C: Comparison between the first, second, third and fourth internodes of CK (left) and mutant *zhao1* (right) heading at the same time, bar=2 cm; D: In  $F_2$  population, four phenotypes were isolated from left to right: normal panicle, normal panicle + bald tip, dense panicle, dense panicle + bald tip; E: Comparison of grain length between mutant *zhao1* (left) and CK (right), bar=2 cm; F: Comparison of grain width between mutant *zhao1* (top) and CK (bottom), bar=2 cm

图 1 对照品种和突变体 *zhao1* 的表型鉴定

Fig.1 Phenotypic characterization of CK and the *zhao1*

表3 对照品种和突变体农艺性状比较

Table 3 Agronomic traits comparison between wild type and mutant

| 农艺性状<br>Agronomic traits               | 对照<br>CK     | 突变体<br>Mutant |
|--|--------------|---------------|
| 株高(cm)Plant height                     | 97.87±5.49   | 58.80±2.07**  |
| 分蘖数Tiller number                       | 12.00±2.14   | 4.30±0.74**   |
| 主穗长(cm)Main panicle length             | 19.61±2.07   | 12.15±0.51**  |
| 一次枝梗数Primary branch number             | 11.11±0.83   | 24.00±3.05**  |
| 二次枝梗数Secondary branch number           | 23.44±5.16   | 19.50±6.34    |
| 总小花数Total number of spikelets          | 141.67±25.23 | 204.00±39.60  |
| 退化小花数Total number of aborted spikelets | 13.33±5.08   | 73.70±24.95** |
| 每穗实粒数Grain number per panicle          | 128.33±24.32 | 130.30±24.76  |
| 结实率(%)Seed setting rate                | 90.52±0.04   | 64.65±0.08**  |
| 粒长(mm)Seed length                      | 8.04±0.64    | 8.71±0.19     |
| 粒宽(mm)Seed width                       | 3.12±0.23    | 2.90±0.13     |
| 千粒重(g)1000-grain weight                | 22.71±2.49   | 17.86±1.67**  |

所有的数值表示为平均值±标准误(n=10); t测验, \*\*表示在P<0.01有显著性差异; 下同

All data are presented as mean±SE (n=10); \*\* indicates significant difference at P<0.01, as determined by t-test; The same as below

## 2.2 *zhao1* 突变体的遗传分析

由于突变体的表型为穗顶部退化与直立密穗。初步判断该突变体可能涉及两个以上基因的突变, 该材料可能含有已经被广泛应用的密穗型基因 *depl*, 同时又渗入了穗顶部退化的基因。为了区分基因, 利用一个表型正常的品种 IRAT129 作亲本, 配制杂交组合, F<sub>1</sub> 表现直立密穗与穗顶部退化表型, 显示了这两个性状均为显性。由于穗顶部退化极易受环境影响, 在 F<sub>3</sub> 群体获得穗型和穗顶部退化单个性状的分离株系, 并通过这些单个性状分离家系的分离比例来判定性状的遗传规律。在 F<sub>3</sub> 的 5 个穗型分离家系 242 个单株中, 密穗与正常穗株系的比例为 175 直立密穗:67 正常穗, 经过卡方检验, 符合 3:1 ( $\chi^2=0.93 < \chi^2_{0.05}=3.84$ ) 的分离规律, 所以密穗性状为单基因显性性状。同样地, 调查了 4 个穗顶部退化分离 F<sub>3</sub> 家系 196 个单株, 穗顶部退化株系总数与正常株系总数比为 163 穗顶部退化:33 正常穗, 穗顶部退化单株数远远超过了单基因模型中的株数, 其分离比介于 3 退化穗:1 正常穗和 15 退化穗:1 正常穗之间, 涉及不多于两对的穗顶部退化基因。

## 2.3 候选基因的定位与分析

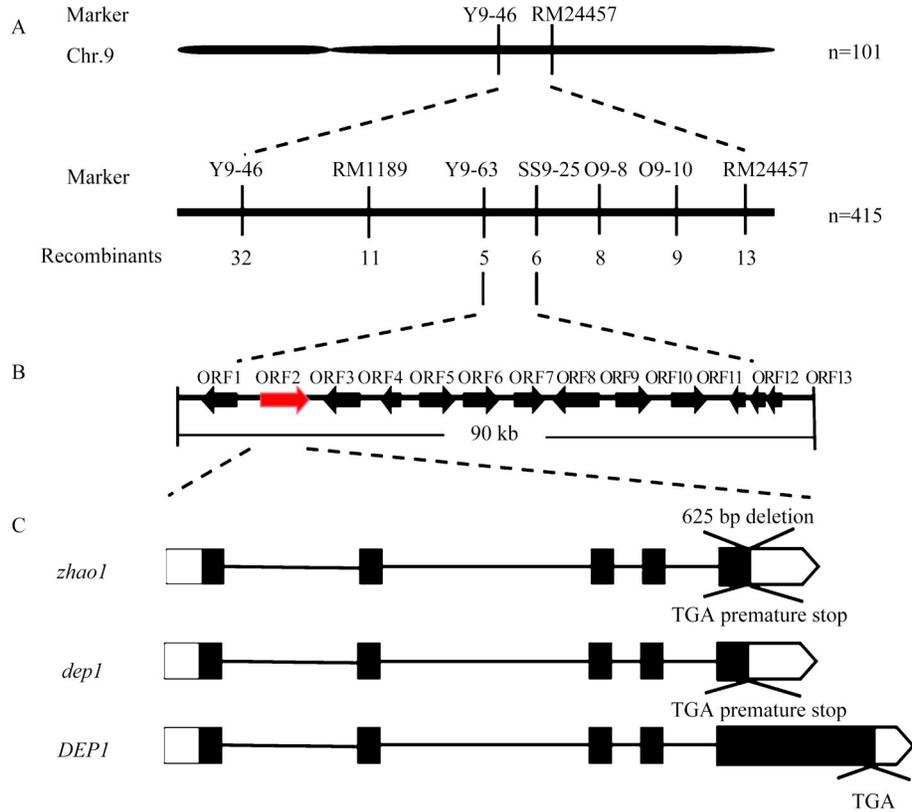
为了确定控制 *zhao1* 直立密穗以及穗顶部退化基因, 利用两个亲本 *zhao1* 和 IRAT129 间有多态的

127 对引物, 对分别取样的密穗群体和穗顶部退化群体分别进行连锁分析。就直立穗性状而言, 在确定连锁关系后, 先用 F<sub>3</sub> 群体中直立密穗表型的 101 株小群体进行初定位, 将直立密穗基因定位于第 9 号染色体两个标记 RJ9-8 和 RM24457 之间大约 1.4 Mb 的物理距离内, 进一步开发了 6 对多态性引物 Y9-30、Y9-46、Y9-63、O9-8、O9-10 和 SS9-25 (表 1), 同时将样本群体扩大至 415 个, 最终将密穗基因定位在引物 Y9-63 和 SS9-25 之间的 16.40~16.49 Mb 区间内。由于该 90 kb 区间有已知的穗型基因 *DEP1*, 它的直立密穗型突变体 *depl* 在第 5 个外显子上有 12 bp 插入和 637 bp 的缺失, CDS 序列变短。对突变体 *zhao1* 的 *DEP1* 基因测序结果表明, 突变体 *zhao1* 在 *DEP1* 基因上也有 12 bp 插入和 637 bp 片段缺失, 提前形成终止密码子, 与 *depl* 突变方式相同 (图 2)。

利用穗顶部退化样本进行连锁分析, 在对混池分析的基础上, 先用 F<sub>3</sub> 群体中穗顶部退化表型的 64 个小样本将穗顶部退化基因初步定位于第 3 号染色体分子标记 RM3872 和 RM1338 之间, 进一步扩大群体至 600 株, 连续筛选和开发新的引物 (表 1), 最终将候选基因限定在标记 RM3872 和 IN1-1 之间 6.85~6.93 Mb 约 80 kb 的范围内 (图 3), 该区间包括 8 个候选基因, 包括 5 个功能基因、2 个表达蛋白以

及 1 个假定蛋白。同时,利用已知位于第 6、8 号染色体上穗顶部退化 QTL 连锁的分子标记 JL6-28、JL6-30.7、JL6-31.56、RJ8-3、RJ8-6、RJ8-11、RJ8-14、RJ8-16<sup>[29]</sup>, 分别对非 3 号染色体的穗顶部退化单株

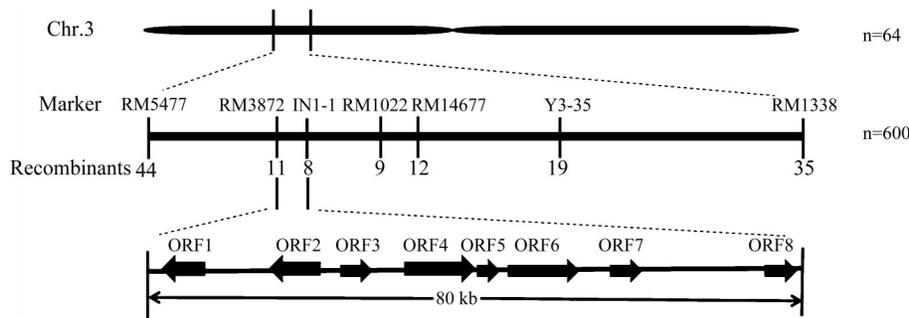
DNA 进行连锁分析,发现 *zhao1* 突变体还存在着 1 个位于第 8 号染色体上的位点 *qPAA8*, 从而证实了 *zhao1* 可能含有两对穗顶部退化基因。



A: 直立密穗型基因精细定位于引物 Y9-63 与 SS9-25 之间的 90 kb 物理距离内, n 表示用于定位直立密穗型单株的数目; 横线上方表示用于精细定位的引物标记, 下方表示该标记下的重组交换株数, 下同; B: 直立密穗性状精细定位区间内的候选基因图, 红色箭头框为目的基因; C: *DEP1* 与等位基因 *dep1* 的结构变异图

A: The dense and erect panicle gene of the *zhao1* mutant located within 90 kb physical distance flanked by the primers of Y9-63 and SS9-25, with n indicating the number of individual plants that would target the dense and erect panicle genotype. The upper part of the horizontal line is the primer marker for the gene mapping, and the lower part is the number of recombinant exchange plants under the marker, the same as below; B: Candidate gene maps within the fine mapping interval of the dense and erect panicle trait, the red arrow box is the target gene; C: Structural variation of *DEP1* and allele *dep1*

图 2 密穗基因的精细定位  
Fig.2 Fine mapping of dense panicle gene



突变体 *zhao1* 穗顶部退化基因精细定位于 RM3872 与 IN1-1 的 80 kb 物理区间内, n 表示用于定位穗退化型单株的数目  
The apical abortion gene of the mutant *zhao1* located within 80 kb physical distance between RM3872 and IN1-1, n indicating the number of individual plants that would target the apical abortion genotype

图 3 穗顶部退化基因的精细定位  
Fig. 3 Fine mapping of panicle apical abortion gene

## 2.4 穗顶部退化候选基因的表达量分析

根据水稻基因组数据库,发现穗顶部退化基因的精细定位区间内有8个候选基因,分别是 *LOC\_Os03g12790*、*LOC\_Os03g12810*、*LOC\_Os03g12815*、*LOC\_Os03g12820*、*LOC\_Os03g12830*、*LOC\_Os03g12840*、*LOC\_Os03g12850*、*LOC\_Os03g12860*。为进一步确定候选基因,对它们进行测序,8个基因完全测通,在CDS区没有发现差异。比较这8个候选基因的表达量(图4),与对照相比,突变体的基因 *LOC\_Os03g12790* 表达量仅是对照的1/27,而基因 *LOC\_Os03g12820* 和 *LOC\_Os03g12815* 的表达量分别增加了2.6倍和3倍,差异显著。

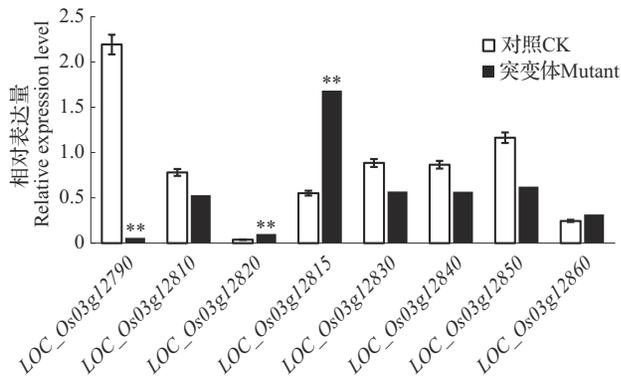


图4 穗退化型候选基因的表达分析

Fig. 4 Expression analysis of candidate genes for apical abortion type

## 3 讨论

本研究报道了1个育种高世代的变异材料 *zhao1* 的表型和遗传规律,并对突变的性状进行了候选基因定位。突变体的表型为直立密穗与穗顶部退化,除此以外还表现分蘖减少、株高降低、茎秆变粗、结实率降低、千粒重下降,产量也因此受到影响。在F<sub>2</sub>群体中,可以分离出正常穗、正常穗与穗顶部退化、密穗、密穗与穗顶部退化4种表型,预示着穗型和穗顶部退化是两个独立性状。利用F<sub>3</sub>独立的两个性状分离群体进行定位,将直立密穗型基因定位于第9号染色体引物Y9-63和SS9-25之间的90 kb物理距离内,区间内含有已经克隆的 *DEP1* 基因,测序结果显示突变体的 *DEP1* 基因在外显子处发生637 bp缺失和12 bp插入突变,形成提前终止密码子,说明 *zhao1* 含有密穗基因 *depl*。

对另一个穗顶部退化性状的遗传和图位克隆的结果发现, *zhao1* 中可能存在不超过两对控制穗顶部退化的基因,精细定位的结果表明,其中的1个

位点位于第3染色体的分子标记RM3872和IN1-1之间6.85~6.93 Mb约80 kb的范围内。目标区域中含有8个候选基因,其中包含2个未知功能植物蛋白编码基因 *LOC\_Os03g12815* 和 *LOC\_Os03g12850*, 1个假定蛋白编码基因 *LOC\_Os03g12830*, 1个脱落酸外排转运蛋白编码基因 *LOC\_Os03g12790*, 1个maf蛋白编码基因 *LOC\_Os03g12810*, 1个SRO蛋白编码基因 *LOC\_Os03g12820*, 1个1,3,4-三磷酸肌醇5/6-激酶编码基因 *LOC\_Os03g12840*, 和1个同源异型盒相关含亮氨酸拉链结构的编码基因 *LOC\_Os03g12860*。定量结果显示,基因 *LOC\_Os03g12790* 表达量变化最大,突变体相对于对照品种下调了27倍,而基因 *LOC\_Os03g12820* 和 *LOC\_Os03g12815* 的表达量分别增加了2.6倍和3倍,这些基因值得进一步的关注。尽管基因 *LOC\_Os03g12820* 和 *LOC\_Os03g12815* 的表达量显著增加,根据测序结果,突变体和野生型之间并没有序列差异,排除了它们作为候选基因的可能性。Upadhyay等<sup>[30]</sup>和Qin等<sup>[31]</sup>研究发现 *LOC\_Os03g12790* 编码一个含有MATE结构域的ABA外排转运蛋白 *DGI*, 突变体 *dgl* 中缺失了MATE结构域,导致籽粒灌浆障碍, *DGI* 介导的ABA运输与籽粒灌浆有关,且对温度敏感。目前仍未测通 *LOC\_Os03g12790* 的启动子区上游序列,该基因是否与穗顶部退化相关仍需研究。先前的研究中,在05261的第3染色体14.5~21.4 Mb区段和9311第3染色体8.0~13.45 Mb区段均检测到微效穗顶部退化QTL<sup>[13-14]</sup>,它们可能是同一个穗顶部退化基因,预示着穗顶部退化基因可能广泛存在于品种和资源中,值得进一步的研究和分析。本研究对于揭示该基因在穗顶部退化中的作用具有重要启示。

## 参考文献

- [1] 邢永忠,徐才国,华金平,谈移芳. 水稻穗部性状的QTL与环境互作分析. 遗传学报, 2001, 28(5): 439-446  
Xing Y Z, Xu C G, Hua J P, Tan Y F. QTL and environmental interaction analysis of rice panicle traits. Acta Genetica Sinica, 2001, 28(5): 439-446
- [2] Xing Y Z, Zhang Q F. Genetic and molecular bases of rice yield. Annual Review of Plant Biology, 2010, 61: 421-442
- [3] 霍中洋,叶全宝,李华,张洪程,戴其根,许轲. 水稻源库关系研究进展. 中国农学通报, 2002, 18(6): 72-77  
Huo Z Y, Ye Q B, Li H, Zhang H C, Dai Q G, Xu K. Research progress on the source sink relationship of rice. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2002, 18(6): 72-77
- [4] Bai J T, Zhu X D, Wang Q, Zhang J, Chen H Q, Dong G J, Zhu

- L, Zheng H K, Xie Q J, Nian J Q, Chen F, Fu Y, Qian Q, Zuo J R. Rice *TUTOUI* encodes a suppressor of cAMP receptor-like protein that is important for actin organization and panicle development. *Plant Physiology*, 2015, 169 (2) : 1179-1191
- [5] Wang Q L, Sun A Z, Chen S T, Chen L S, Guo F Q. *SPL6* represses signaling outputs of *ER* stress in control of panicle cell death in rice. *Nature Plants*, 2018, 4(5):280-288
- [6] Zafar S A, Patil S B, Uzair M, Fang J J, Zhao J F, Guo T T, Yuan S J, Luo Q, Shi J X, Schreiber L, Li X Y. *DEGENERATED PANICLE AND PARTIAL STERILITY 1 (DPSI)* encodes a cystathionine beta-synthase domain containing protein required for anther cuticle and panicle development in rice. *New Phytologist*, 2020, 225(1):356-375
- [7] Zhu Z C, Luo S, Lei B, Li X Y, Cheng Z J. Locus *TUTOU2* determines the panicle apical abortion phenotype of rice (*Oryza sativa* L.) in *tuto2* mutant. *Journal of Integrative Agriculture*, 2022, 21(3):10
- [8] Ali A, Wu T, Zhang H, Xu P, Zafar S A, Liao Y, Chen X, Zhou H, Liu Y, Wang W. A putative *SUBTILISIN-LIKE SERINE PROTEASE 1 (SUBSP1)* regulates anther cuticle biosynthesis and panicle development in rice. *Journal of Advanced Research*, 2022, 42:273-287
- [9] Heng Y Q, Wu C Y, Long Y, Luo S, Ma J, Chen J, Liu J F, Zhang H, Ren Y L, Wang M, Tan J J, Zhu S S, Wang J L, Lei C L, Zhang X, Guo X P, Wang H Y, Cheng Z J, Wan J M. *OsALMT7* maintains panicle size and grain yield in rice by mediating malate transport. *Plant Cell*, 2018, 30(4):889-906
- [10] 徐华山, 孙永建, 周红菊, 余四斌. 构建水稻优良恢复系背景的重叠片段代换系及其效应分析. *作物学报*, 2007, 33(6): 979-986
- Xu H S, Sun Y J, Zhou H J, Yu S B. Construction of overlapping fragment substitution lines with excellent restorer line background in rice and analysis of their effects. *Acta Agronomica Sinica*, 2007, 33(6):979-986
- [11] 王斌, 刘贺梅, 毛毕刚, 高素伟, 徐宏斌, 葛建贵. 水稻顶部小穗退化性状的 QTL 分析. *中国水稻科学*, 2011, 25(5): 561-564
- Wang B, Liu H M, Mao B G, Gao S W, Xu H B, Ge J G. QTL Analysis of the panicle apical abortion traits of rice. *Chinese Journal of Rice Science*, 2011, 25(5):561-564
- [12] Wang X L, Li L F, Sun X T, Xu J, Ouyang L J, Bian J M, Chen X R, Li W X, Peng X S, Hu L F, Cai Y C, Zhou D H, He X P, Fu J R, Fu H H, He H H, Zhu C G. Fine mapping of a novel major quantitative trait locus, *qPAA7*, that controls panicle apical abortion in rice. *Frontiers in Plant Science*, 2021, 12: 683329
- [13] 高素伟, 张玲, 毛毕刚, 王久林, 程治军, 万建民. 水稻穗顶部退化突变体 *L-05261* 的遗传分析. *作物学报*, 2011, 37(11): 1935-1941
- Gao S W, Zhang L, Mao B G, Wang J L, Cheng Z J, Wan J M. Genetic analysis of rice mutant *L-05261* with panicle apical abortion trait. *Acta Agronomica Sinica*, 2011, 37(11): 1935-1941
- [14] Cheng Z J, Mao B G, Gao S W, Zhang L, Wang J L, Lei C L, Zhang X, Wu F Q, Guo X P, Wan J M. Fine mapping of *qPAA8*, a gene controlling panicle apical development in rice. *Journal of Integrative Plant Biology*, 2011, 53(9):710-718
- [15] 张兴元, 罗胜, 王敏, 丛楠, 赵志超, 程治军. 与 *SPI* 互作的水稻穗顶部退化基因 *qPAA3* 的精细定位. *中国农业科学*, 2015, 48(12):2287-2295
- Zhang X Y, Luo S, Wang M, Cong N, Zhao Z C, Cheng Z J. Fine mapping of the panicle apical abortion gene *qPAA3* interacting with *SPI*. *Scientia Agricultura Sinica*, 2015, 48(12):2287-2295
- [16] 张杰瑜, 朱婷婷, 姜树坤, 刘鑫, 寻子琦, 程治军. 利用一个  $F_{2,3}$  单基因分离群体精细定位水稻穗顶部退化基因 *ATSI*. *植物遗传资源学报*, 2022, 23(4):1124-1131
- Zhang J Y, Zhu T T, Jiang S K, Liu X, Xun Z Q, Cheng Z J. Utilize an  $F_{2,3}$  fine mapping of the panicle apical abortion gene *ATSI* in a single gene segregated population. *Journal of Plant Genetic Resources*, 2022, 23(4):1124-1131
- [17] Tan C J, Sun Y J, Xu H S, Yu S B. Identification of quantitative trait locus and epistatic interaction for degenerated spikelets on the top of panicle in rice. *Plant Breeding*, 2011, 130(2): 177-184
- [18] Jiang S K, Wang J Y, Liu D, Chen L L, Zhang X J, Xu F, Sun S C, Jiang H, Ding G H, Wang T T, Bai L M, Zhang F M, Xu Z J. Mapping and candidate gene analysis for a new top spikelet abortion mutant in rice. *Plant Breeding*, 2016, 135: 155-165
- [19] 丛斌, 贾红武, 李严, 张丕方, 孙崇荣. 水稻幼穗形态发生与顶端分生组织的研究. *西北植物学报*, 1999, 19(3):415-421
- Cong B, Jia H B, Li Y, Zhang P F, Sun C R. Studies on morphogenesis and apical meristem of young spike in rice. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*, 1999, 19(3): 415-421
- [20] 徐正进, 陈温福, 张树林, 张文忠, 马殿荣, 刘丽霞, 周淑清. 辽宁水稻穗型指数品种间差异及其与产量和品质的关系. *中国农业科学*, 2005, 38(9):1926-1930
- Xu Z J, Chen W F, Zhang S L, Zhang W Z, Ma D R, Liu L X, Zhou S Q. Differences in panicle type index among rice varieties in Liaoning and their relationship with yield and quality. *Scientia Agricultura Sinica*, 2005, 38(9):1926-1930
- [21] Huang X Y, Qian Q, Liu Z B, Sun H Y, He S Y, Luo D, Xia G M, Chu C G, Li J Y, Fu X D. Natural variation at the *DEPI* locus enhances grain yield in rice. *Nature Genetics*, 2009, 41: 494-497
- [22] Fumio T S, Yasushi K, Hiroshi K, Haruko O, Akemi T, Naho H, Akio M, Hirohiko H, Hidemi K, Masahiro Y, Seiichi T. A loss-of-function mutation of rice *DENSE PANICLE 1* causes semi-dwarfness and slightly increased number of spikelets. *Breeding Science*, 2011, 61(1): 17-25
- [23] Zhou Y, Zhu J Y, Li Z Y, Yi C D, Liu J, Zhang H G, Tang S Z,

- Gu M H, Guo H L. Deletion in a quantitative trait gene *qPE9-1* associated with panicle erectness improves plant architecture during rice domestication. *Genetics*, 2009, 183(1):315-324
- [24] Abe Y, Mieda K, Ando T, Kono I, Yano M, Kitano H, Iwasaki Y. The *SMALL AND ROUND SEED1 (SRS1/DEP2)* gene is involved in the regulation of seed size in rice. *Genes & Genetic Systems*, 2010, 85(5):327-339
- [25] Li F, Liu W, Tang J, Chen J, Tong H, Hu B, Li C, Fang J, Chen M, Chu C. Rice *DENSE AND ERECT PANICLE 2* is essential for determining panicle outgrowth and elongation. *Cell Research*, 2010, 20(7):838-849
- [26] Zhu K, Tang D, Yan C, Chi Z, Yu H, Chen J, Liang J, Gu M, Cheng Z. *ERECT PANICLE 2* encodes a novel protein that regulates panicle erectness in indica rice. *Genetics*, 2010, 184(2):343-350
- [27] Piao R, Jiang W, Ham T H, Choi M S, Qiao Y, Chu S H, Park J H, Woo M O, Jin Z, An G, Lee J, Koh H J. Map-based cloning of the *ERECT PANICLE 3* gene in rice. *Theoretical & Applied Genetics*, 2009, 119(8):1497-1506
- [28] Murray M G, Thompson W F. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Research*, 1980, 8(19):4321-4325
- [29] Sanguinetti C J, Dias N E, Simpson A J. Rapid silver staining and recover of PCR products separated on polyacrylamide gels. *Biotechniques*, 1994, 17(5):915-919
- [30] Upadhyay N, Kar D, Mahajan D B, Nanda S, Rahiman R, Panchakshari N, Bhagavatula L, Datta S. The multitasking abilities of MATE transporters in plants. *Journal of Experimental Botany*, 2019, 70(18):4643-4656
- [31] Qin P, Zhang G, Hu B, Wu J, Chen W, Ren Z, Liu Y, Xie J, Yuan H, Tu B, Ma B, Wang Y, Ye L, Li L, Xiang C, Li S. Leaf-derived ABA regulates rice seed development via a transporter-mediated and temperature-sensitive mechanism. *Science Advances*, 2021, 7(3): eabc8873