

# 水稻包穗突变体 *esp2* 的遗传分析与基因精细定位

官华忠<sup>①②\*</sup>, 段远霖<sup>①②\*</sup>, 刘华清<sup>③\*</sup>, 陈志伟<sup>①②</sup>, 卓敏<sup>①</sup>, 庄丽君<sup>①</sup>, 元文明<sup>①</sup>, 潘润森<sup>①②</sup>, 毛大梅<sup>①②</sup>, 周元昌<sup>①②</sup>, 王锋<sup>③†</sup>, 吴为人<sup>①②†</sup>

① 福建农林大学作物遗传育种与综合利用教育部重点实验室, 福州 350002;

② 福建农林大学福建省水稻分子标记辅助育种重点实验室, 福州 350002;

③ 福建省农业科学研究院, 福州 350002

\* 同等贡献

† 联系人, E-mail: wuwr@fjau.edu.cn; wf@fjage.org

2010-10-26 收稿, 2011-02-23 接受

国家转基因重大专项(2009ZX08009-109B)、福建省自然科学基金(2010J01077)、国家高技术研究发展计划(2006AA10Z128)和福建省高等学校新世纪优秀人才支持计划(KY0010057)资助项目

**摘要** 水稻的包穗现象主要是由倒一节间缩短造成的。阐明包穗形成的分子机制, 对解决水稻不育系的包穗问题, 创造水稻新种质具有重要意义。我们在籼稻品种明恢 86 的组织培养后代中获得了 1 个包穗突变体, 命名为 *esp2(enclosed shorter panicle 2)*, 其穗部被剑叶叶鞘完全包裹, 倒一节间几乎完全退化, 而其余各节间长度则没有明显改变。遗传分析表明, *esp2* 受一对隐性基因控制, 能稳定遗传且不受遗传背景的影响。显然, *ESP2* 是控制水稻倒一节间发育的一个关键基因。利用 *esp2* 与粳稻品种秀水 13 杂交的 F<sub>2</sub> 群体以及 SSR 和 InDel 标记, 将 *ESP2* 精细定位在 1 号染色体短臂末端一个 14 kb 的区域内。根据水稻基因组序列的注释, 该区域内只存在 1 个完整的基因, 亦即一个假定的磷脂酰丝氨酸合成酶(putative phosphatidylserine synthase)基因。对野生型和突变体的测序分析结果表明, 该基因内部插入了一个 5287 bp 的反转座子序列。因此, 我们将该基因作为 *ESP2* 的候选基因。本研究结果为 *ESP2* 基因的克隆和功能分析奠定了基础。

## 关键词

水稻  
包穗突变体  
*ESP2* 基因  
精细定位

目前我国杂交稻种植面积达  $1.733 \times 10^7$  hm<sup>2</sup>, 占水稻种植面积的一半以上, 每年所需制种面积约为  $1.5 \times 10^5$  hm<sup>2</sup>[1,2]。目前使用的水稻籼型雄性不育系均存在不同程度的包穗, 表现为穗颈节缩短、穗部约 30%~60% 的颖花包裹在剑叶叶鞘中。生产上通常采用在抽穗期喷施赤霉素(GA<sub>3</sub>)的方法来克服不育系的包穗现象, 以提高制种产量, 但喷施赤霉素存在增加制种成本、降低种子质量、加剧环境污染等缺点[3]。因此, 从遗传上消除不育系的包穗特性, 一直是杂交稻育种的一个重要目标。

Rutger 等人[4]在粳稻杂交的 F<sub>3</sub> 群体中发现了 1 个最上节间伸长的隐性突变体, 并将控制该突变性

状的基因命名为 *eui*。Yang 等人[5]采用核诱变技术在籼稻品种协青早 B 中获得了与之等位和不等位的 2 种 *eui* 突变基因, 分别命名为 *eui1* 和 *eui2*。He 等人[6]发现, *eui1* 突变体含高水平的 GA, 且对外源 GA 较敏感。Zhu[7]和 Zhu 等人[8]先后克隆了 *EUI2* 和 *EUI1* 基因, 发现 *EUI1* 是 1 个细胞色素 P450 家族成员, 而 *EUI2* 与环氧化物酶有关, 它们的功能都是使水稻的内源 GA 合成减少。它们的功能缺失会造成 GA 的积累, 从而使水稻的穗颈节伸长。*eui* 突变体的最上节间异常伸长在克服不育系包穗和提高恢复系传粉能力上可能具有重要的应用价值。然而, 实践证明, *eui1* 和 *eui2* 基因并不能完全解除水稻不育系的包穗

英文版见: Guan H Z, Duan Y L, Liu H Q, et al. Genetic analysis and fine mapping of an enclosed panicle mutant *esp2* in rice (*Oryza sativa* L.). Chinese Sci Bull, 2011, 56, doi: 10.1007/s11434-011-4552-9

现象,说明水稻不育系的穗颈节中 GA 合成的水平很低<sup>[5,9-12]</sup>.

因此,要解决水稻不育系的包穗问题,还应从促进不育系穗颈节的 GA 合成方面入手.为此,需要对包穗形成的原因进行深入研究.目前已报道了5种水稻包穗突变体<sup>[13-16]</sup>,均表现出植株矮化、倒一节间缩短和包穗的特性.然而,迄今对这些包穗突变体的研究还不深入,大多停留在形态学、细胞学和经典遗传学分析的水平上,仅1个突变基因(*shp6*)有染色体定位的研究报道<sup>[13]</sup>.

我们在水稻组织培养后代中获得了1个表现为完全包穗的单基因隐性突变体 *esp2*.本研究对该突变体进行了形态学观察和遗传分析,并对 *ESP2* 基因进行精细定位,为该基因的克隆和功能分析奠定基础.

## 1 材料与方法

(i) 植物材料. 突变体 *esp2* 来自籼稻品种明恢86的组织培养后代.其他供试材料包括 *esp2* 的原始野生型明恢86,籼稻品种早R974和粳稻品种秀水13.

(ii) 遗传分析. 将 *esp2* 分别与明恢86,早R974和秀水13杂交,于抽穗期调查 F<sub>2</sub> 群体中正常株与突变株的分离情况,计算正常株与突变株的分离比例并进行卡平方测验.

(iii) 分子标记. 采用 Gramene 网站(<http://www.gramene.org/>)上公布的 RM 系列水稻 SSR 标记进行初步定位.在目标基因所在区域,利用 Gramene 网站提供的 SSRIT 软件扫描粳稻品种 Nipponbare 的基因组序列(<http://rapdb.dna.affrc.go.jp/download/>),查找新的 SSR 位点,并通过 BLAST 程序比对 Nipponbare 和籼稻品种 93-11 的基因组序列(<http://rice.genomics.org.cn/rice/link/download.jsp>),寻找插入缺失(InDel)位点.然后利用 Web-Premier 软件(<http://www.yeastgenome.org/cgi-bin/web-primer>)在 SSR 和 InDel 两侧设计特异引物,开发新的 SSR 标记(以 SSR 作为前缀命名,以示区别)和 InDel 标记.

(iv) 基因定位. 利用 *esp2* × 秀水13 的 F<sub>2</sub> 群体进行基因定位.根据混合分离分析(BSA)的原理<sup>[17]</sup>,从 F<sub>2</sub> 群体中随机选取正常株和突变株各15株,分别构建正常 DNA 池和突变 DNA 池,以两亲本为对照,快速寻找与目标基因连锁的标记.将筛选到的连锁标记进一步对 F<sub>2</sub> 群体中的突变体进行基因型测定,用 Mapmaker/Exp 3.0 软件<sup>[18]</sup>对基因型数据进行分析,

确定目标基因和分子标记之间的连锁关系.总 DNA 提取和分子标记检测皆参照 Duan 等人的<sup>[19]</sup>方法.

(v) 序列分析和候选基因的确定. 利用水稻基因组数据库(<http://rice.plantbiology.msu.edu/>)提供的水稻基因组序列注释,找出目标基因所在区间的所有基因,初步确定候选基因,进一步通过测序分析确认候选基因.

## 2 结果分析

### 2.1 *esp2* 的形态特征

突变体 *esp2* 的营养生长正常,在苗期和分蘖期的表型与野生型(明恢86)相似,但抽穗后植株明显矮化,其穗部完全被剑叶叶鞘包裹,倒一节间基本不伸长(长度 < 0.3 cm, 而野生型约为 30 cm),而其余各节间的长度则没有明显改变(图1).另外, *esp2* 突变体的穗长略短(约比野生型短 14%),穗粒数也相应减少(约比野生型少 12%).因此,我们将该突变体命名为 *enclosed shorter panicle 2 (esp2)*; 这里数字 2 只是为了与我们发现的另外 1 个包穗突变体相区别).但 *esp2* 的育性不受影响,能够正常结实.

### 2.2 突变性状的遗传

突变体 *esp2* 与明恢86,早R974和秀水13杂交的 F<sub>1</sub> 代均表现出正常抽穗, F<sub>2</sub> 代皆出现正常株与突变

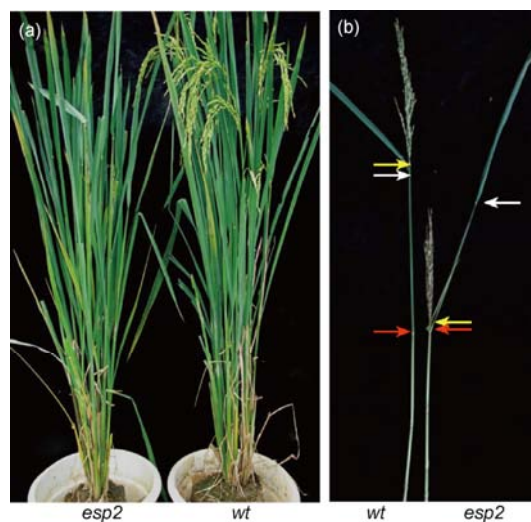


图1 水稻包穗突变体 *esp2* 与野生型的表型 (a) 植株; (b) 穗与上部茎秆. 白箭头: 剑叶叶枕; 黄箭头: 穗颈节; 红箭头: 倒一节; *esp2*: 突变体; *wt*: 野生型

株的分离, 分离比例均符合 3:1 (表 1), 表明该突变性状是由单隐性核基因控制. 而且, 在不同的遗传背景中, 突变体的包穗特征都很典型, 说明该突变性状能稳定遗传.

### 2.3 ESP2 的初步定位

用 165 个 RM 系列的 SSR 标记对两亲本(*esp2* 和秀水 13)及正常 DNA 池和突变 DNA 池进行检测, 发现位于水稻 1 号染色体短臂末端上的 3 个 SSR 标记 RM84, RM1282 和 RM495 在 2 个池间表现多态, 说明它们可能与目标基因 *ESP2* 连锁. 进一步用这 3 个标记对 770 个 F<sub>2</sub> 突变株进行分析, 结果表明, *ESP2* 位于 RM1282 和 RM84 之间, 遗传距离分别为 1.01 和 10.29 cM (图 2).

### 2.4 ESP2 的精细定位

在 RM1282 和 RM84 之间的区域上共设计了 9 个 SSR 标记, 其中有 3 个标记(命名为 SSR1, SSR2 和 SSR3, 引物序列见表 2)在两亲本间表现为多态. 用这 3 个 SSR 标记对 770 个 F<sub>2</sub> 突变株进行分析, 结果表明, *ESP2* 位于 SSR1 和 SSR3 之间, 遗传距离分别

表 1 包穗突变体与不同品种杂交 F<sub>2</sub> 代的分离情况

杂交组合	正常株	突变株	$\chi^2$ (3:1)	P (大于)
<i>esp2</i> /明恢 86	302	105	0.14	0.70
<i>esp2</i> /早 R974	427	147	0.11	0.70
<i>esp2</i> /秀水 13	4225	1380	0.43	0.50



图 2 *ESP2* 的初步定位结果

为 0.50 和 2.67 cM, 并与 SSR2 表现为共分离. 从水稻基因组序列中找出 SSR2 所在的 BAC 克隆 (AP002541) 及其相邻的 2 个克隆 (AP002747 和 AP002868), 通过比较粳稻 (Nipponbare) 和籼稻 (93-11) 的序列差异, 设计了 17 个 InDel 标记, 其中有 5 个标记(命名为 InDel1~ InDel5, 引物序列见表 2)在两亲本间表现多态. 利用这 5 个 InDel 标记和 SSR2 对 2720 个 F<sub>2</sub> 突变株进行分析, 结果表明, *ESP2* 位于 InDel2 和 SSR2 之间, 遗传距离皆为 0.018 cM (1 个交换株), 相应的物理距离约为 14 kb (图 3).

### 2.5 ESP2 的候选基因

根据水稻基因组数据库 (<http://rice.plantbiology.msu.edu/>) 提供的水稻基因组序列注释, *ESP2* 所在的 14 kb 区域中只存在 2 个基因(图 3): 一个为假定的磷脂酰丝氨酸合成酶 (putative phosphatidylserine synthase) 基因; 另一个为假定的葡萄糖基转移酶 (putative glycosyltransferase) 基因. 后者有部分序列位于 14 kb 区域之外, 因此我们认为前者应是 *ESP2* 的候选基因, 这得到了测序结果的支持. 测序分析表明, 突变体中这个假定的磷脂酰丝氨酸合成酶基因内部(起始密码子下游 1296 bp 处)插入了 1 个 5287 bp 的反转座子序列(图 3), 而葡萄糖基转移酶基因的序列则与野生型完全一致.

## 3 讨论

水稻的包穗现象主要是由于倒一节间缩短而造成的, 倒一节间缩短的程度决定了包穗的程度. 本研究发现的突变体 *esp2* 有 2 个重要的特征: (i) 倒一节间几乎完全退化, 基本不伸长, 从而导致稻穗全部包裹在剑叶叶鞘中; (ii) 节间缩短具有高度的特异性, 仅局限在倒一节间上, 其余各节间的长度皆没有明

表 2 用于 *ESP2* 精细定位的标记及其引物序列

标记	上游引物(5'→3')	下游引物(5'→3')	所在 BAC 克隆
SSR1	TTGCAATCCAAACCTCTGTG	AATCTGCTTCCTCCAGTT	AP003338
Indel1	CAGCAAGAGGGTTCAAGTAG	TTTAATGTGGGAAAGACACC	AP002541
Indel2	CACTCATGCCCTTTGAAAT	TGGATTGACCGTAGTGGAGA	AP002541
SSR2	GGCTTCAGCTACCTTCTTCT	AGCAGGGAAGTAAAAGAGAG	AP002541
Indel3	TGCAGCTCTGTACAAGGTAGT	TGCTTGATCTTCTCAGGAC	AP002541
Indel4	GTTGTCATGTTTCTGTTTGC	CCAACCTTGACCTGTGATGT	AP002541
Indel5	AGGTGGAGCTATGCTTTGA	GCCTCCATGACATTATTTGT	AP002868
SSR3	TTGTGTGTGAATTGTGTTGG	GCAATCTGAGAGCGTTTTTA	AP003214

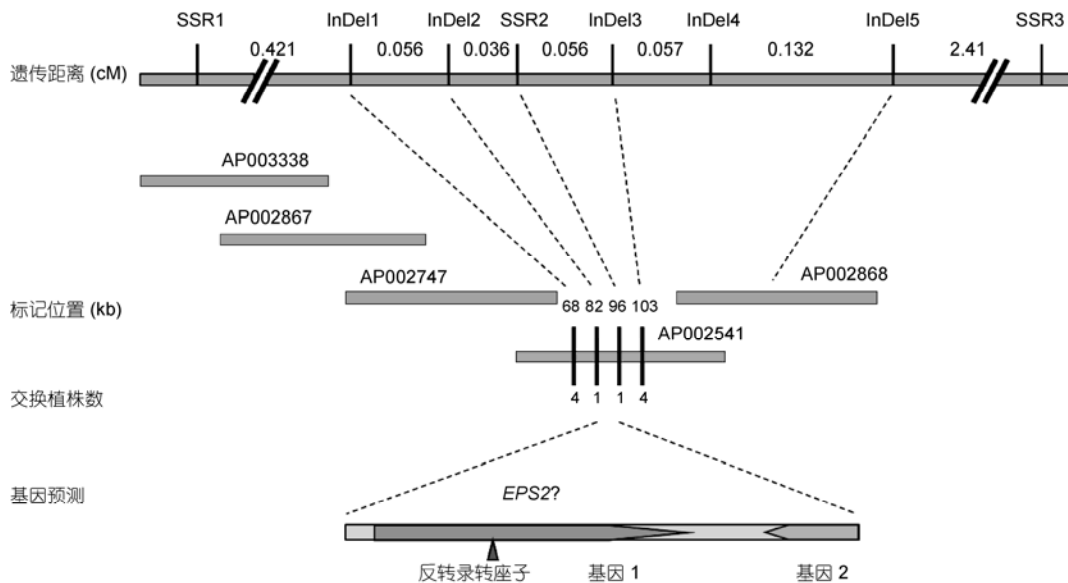


图3 *ESP2* 的精细定位结果及其候选基因的确定

显的变化. 这 2 个特征反映了 *ESP2* 基因对倒一节间发育的重要性和专一性. 由第 2 个特征可以看出, 水稻倒一节间的发育和伸长似乎存在一个独立于其他节间的调控机制. 这种机制可能与倒一节间所处的特殊位置(穗与茎之间的连接处)以及它在生殖发育过程(抽穗)中的重要作用有关. 因此, 深入研究 *ESP2* 基因的功能, 对了解水稻倒一节间发育和抽穗的分子机制具有重要的意义.

目前在水稻中已报道了 5 种包穗突变体, 包括 *shp1*, *shp2*, *shp5*, *shp6* 和 *fsp*<sup>[13-16]</sup>, 其中大多数表现为半包穗, 与 *esp2* 完全不同. 虽然 *fsp* 也表现为全包穗, 但它的倒 1~倒 5 节间均有不同程度的短缩, 不像 *esp2* 那样只特异地作用于倒一节间. 迄今为止, 只有看到 *SHp6* 基因被定位在 2 号染色体上的报道<sup>[13]</sup>, 这与 *ESP2* 基因显然是不等位的, 而其他包穗基因皆未见定位研究的报道. 总的来看, *esp2* 应该是一种新的包穗突变体, 而 *ESP2* 则是水稻中第一个被精细定位的包穗基因.

本研究利用 1 个大群体将 *ESP2* 基因精细定位在 1 个 14 kb 的区域内. 根据序列注释, 该区域中仅存在 1 个完整的基因, 亦即 1 个假定的磷脂酰丝氨酸合成酶基因. 对野生型和突变体的测序分析表明, 该基因很可能就是 *ESP2*. 磷脂酰丝氨酸(phosphatidylserine)是细胞膜磷脂的重要成分之一, 能够调控细胞膜关键蛋白的功能状态, 对细胞代谢具有重要的调节作用, 并在细胞膜受体和第二受体之间起中介作用<sup>[20]</sup>. 磷脂酰丝氨酸合成酶属于磷脂酰二酯合成酶类, 它以磷脂类物质为底物, 催化其与水相中亲核供体发生转脂反应, 是合成磷脂酰丝氨酸的工具酶<sup>[21]</sup>. 目前在细菌、酵母、哺乳动物和植物中均发现了具有功能的磷脂酰丝氨酸合成酶基因. 作为一个编码磷脂酰丝氨酸合成酶的基因, 为何 *ESP2* 会在水稻倒一节间发育中起到如此重要和特异的作用, 确实是一个令人感兴趣的问题. 目前我们正在从多方面对 *ESP2* 候选基因的功能进行深入的研究, 期望解开这个谜.

**致谢** 感谢福建农林大学作物遗传改良研究所的林荔辉、兰涛、赵季志、张绪璋、杨帆、官智勤、唐唯其、张世远、陈利平、林艳秋和黄玎参与群体构建工作.

参考文献

1 吴成, 邓晓建, 刘爱秋, 等. 我国杂交水稻基因工程育种策略探讨. 生物技术通报, 2003, (1): 4-7

- 2 邓华凤, 何强, 舒服, 等. 中国杂交粳稻研究现状与对策. 杂交水稻, 2006, 21: 1-6
- 3 李安祥, 李慈厚, 丁克信, 等. 杂交制种稻粒黑粉病的综合防治. 江苏农业科学, 1995, 4: 34-36
- 4 Rutger J N, Camahan H L. A fourth genetic element to facilitate hybrid cereal productions recessive tall in rice. Crop Sci, 1981, 21: 373-376
- 5 Yang R C, Zhang S B, Huang R H, et al. Breeding technology of eui-hybrids of rice. Agr Sci China, 2002, 4: 359-363
- 6 He Z H, Li D B. Relations of plant height genes to the sensitivity of GA<sub>3</sub> and to the regulation of endogenous in different rice growth stages. Plant Physiol Commun, 1994, 30: 170-174
- 7 朱宏波. 水稻穗颈伸长基因 *EUI2(t)* 的精细定位与克隆. 博士学位论文. 福州: 福建农林大学, 2003
- 8 Zhu Y Y, Nomura T, Xu Y H, et al. Elongated uppermost internode encodes a cytochrome P450 monooxygenase that epoxidizes gibberellins in a novel deactivation reaction in rice. Plant Cell, 2006, 18: 442-456
- 9 何祖华, 申宗坦. 水稻长节间基因对 GA<sub>3</sub> 敏感性和不育系改良. 作物学报, 1994, 20: 161-167
- 10 梁康迳, 王乃元, 杨仁崔. 水稻穗伸出度的遗传及其在育种上的应用. 福建农学院学报, 1992, 21: 380-385
- 11 申宗坦, 杨长登, 何祖华. 消除籼型野败不育系包颈现象的研究. 中国水稻科学, 1987, 1: 95-99
- 12 Virmani S S, Dalmacio R D, Lopez M T. *EUI* gene for elongated uppermost internode transferred to indica rice. Int Rice Res Newsl, 1988, 13: 6-9
- 13 朱克明. 水稻包穗基因 *SHP6* 的遗传与定位. 硕士学位论文. 江苏: 扬州大学, 2006
- 14 Kinoshita T. Report of the committee on gene symbolization nomenclature and linkage groups. Rice Genet News, 1990, 7: 16-50
- 15 刘庄, 罗丽娟. 水稻矮秆鞘包穗突变体茎的形态解剖学研究. 中国农学通报, 2006, 22: 409-412
- 16 王伟平, 朱飞舟, 唐俐, 等. 一种水稻全包穗突变体的发现及初步分析. 中国农学通报, 2008, 24: 212-216
- 17 Michelmore R W, Paran I, Kesseli R V. Identification of markers linked to disease-resistance genes by bulked segregant analysis: A rapid method to detect markers in specific genomic regions by using segregating populations. Proc Natl Acad Sci USA, 1991, 88: 9828-9832
- 18 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. Genomics, 1987, 1: 174-181
- 19 段远霖, 吴为人, 张丹凤, 等. 水稻幼穗分化受阻突变体 *lhd* 的遗传分析与基因定位. 科学通报, 2003, 48: 1662-1665
- 20 Kidd P. Phosphatidylserine: Membrane nutrient for memory. A clinical and mechanistic assessment. Altern Med Rev, 1996, 1: 70-84
- 21 Leiros I, McSweeney S, Hough E. The reaction mechanism of phospholipase D from *Streptomyces* sp. strain PMF. Snapshots along the reaction pathway reveal a pentacoordinate reaction intermediate and an unexpected final product. J Mol Biol, 2004, 339: 805-820