

基于染色体片段置换系的野生稻粒宽 QTL-*qGW8.1* 的精细定位

孙妍^{1,2}, 苏龙^{1,2}, 乔卫华², 郑晓明², 齐兰², 丁膺宾^{1,2},
许睿², 张丽芳², 程云连², 兰进好¹, 杨庆文²

(¹青岛农业大学农学院, 青岛 266109; ²中国农业科学院作物科学研究所, 北京 100081)

摘要: 利用以栽培稻 9311 为受体、普通野生稻为供体的染色体单片段置换系 CSSL182, 检测到一个与粒宽相关的 QTL。CSSL182 与受体亲本 9311 粒型性状差异显著, 且只在 8 号染色体有一个野生稻导入片段。构建 CSSL182/9311 的 F₂ 次级分离群体, 将粒宽 QTL 初定位在 8 号染色体的标记 RM447 和 RM264 之间, 贡献率达 22.49%, 将该 QTL 命名为 *qGW8.1*。随后进一步设计区间内多态性分子标记引物, 检测 F₂ 群体的 2000 株分离个体以及 F_{2:3} 群体交换单株, 结合后代表型验证, 最终将 *qGW8.1* 精细定位到 8 号染色体 10 kb 区间内。该区间内含有 3 个候选基因, 基因测序发现这 3 个基因在双亲之间均含有丰富的变异。对双亲子粒颖壳细胞电镜扫描观察发现, CSSL182 的颖壳细胞宽度比 9311 减少 16.7%。这一结果表明 *qGW8.1* 中来自野生稻的等位基因通过改变颖壳细胞形状影响粒型。

关键词: 水稻; CSSL; 粒型; 粒宽; QTL 定位

Fine Mapping of a Wild Rice Grain Width QTL-*qGW8.1* Using a Chromosome Segment Substitution Line

SUN Yan^{1,2}, SU Long^{1,2}, QIAO Wei-hua², ZHENG Xiao-ming², QI Lan², DING Ying-bin^{1,2},
XU Rui², ZHANG Li-fang², CHENG Yun-lian², LAN Jin-hao¹, YANG Qing-wen²

(¹College of Agronomy, Qingdao Agricultural University, Qingdao 266109;

²Institute of Crop Sciences, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081)

Abstract: In the study, one chromosome single segment substitution line (CSSL), CSSL182 which developed from cultivated rice 9311 as the receptor parent and common wild rice (*Oryza rufipogon* Griff.) as the donor parent, was selected for grain shape QTL identification. The CSSL182 has significant shorter grain width and lighter grain weight compared with receptor parent 9311. We constructed a CSSL182/9311 F₂ population, one QTL associated with grain width was located between RM447 and RM264 on Chr. 8 and then was named *qGW8.1*. Using additional molecular markers, 2000 F₂ individuals and F₃ recombinant plants were detected and then *qGW8.1* was finally fine mapped to a 10 kb region. DNA sequencing found that 3 candidate genes were located in this region. The electron microscope scanning showed that width of CSSL182's glumes cell was 16.7% narrower than 9311's, indicated that the alleles from wild rice might control grain width by affecting glumes cell shape.

Key words: rice; chromosome segment substitution lines; grain size; grain width; QTL mapping

收稿日期: 2017-08-07 修回日期: 2017-10-11 网络出版日期: 2017-12-26

URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.4996.S.20171226.1513.022.html>

基金项目: 国家自然科学基金(31471471); 国家重点研发计划(水稻种质创新利用研究 2016YFD0100101-01-02); 农业部财政专项(农作物种质资源保护与利用 2016NWB036-01-12); 山东农业大学重点实验室开放课题(2016KF08)

第一作者研究方向为稻种资源及创新利用研究, E-mail: sun_yan1990@126.com; 苏龙为共同第一作者, E-mail: rizhaosulong@163.com

通信作者: 兰进好, 研究方向为作物遗传育种研究。E-mail: jinhao2005@163.com

乔卫华, 研究方向为种质资源创新利用研究。E-mail: qiaoweihua@caas.cn

杨庆文, 研究方向为种质资源创新利用研究。E-mail: yangqingwen@caas.cn

水稻粒型(粒长、粒宽和长宽比)是衡量稻米外观品质的重要指标之一,同时也是影响水稻千粒重等产量性状的重要因素^[1]。发掘新的控制水稻粒型性状的基因资源,准确鉴定和定位水稻粒型 QTL,是当前水稻遗传学家和水稻育种家共同关注的焦点^[2-4]。

普通野生稻是栽培稻的祖先种,其基因组内蕴藏着许多栽培稻在驯化过程中丢失或者削弱了的优异基因,是水稻育种的天然基因库。但普通野生稻遗传异质性强,与栽培稻杂交后,具有较高的几率出现不利基因间的互作,用传统的表型鉴定方法难以对其准确鉴定^[5]。染色体片段置换系群体能够消除遗传背景在基因定位过程中的影响,为进一步定位和研究普通野生稻中优异基因创造了条件^[6-8]。虽然野生稻的整体农艺性状劣于栽培稻,但研究发现野生稻中仍然存在大量与产量性状相关的优异基因^[9],同时,发掘野生稻中影响水稻粒型的新等位基因,对开展水稻粒型分子生物学研究和分子育种均具有重要意义。

在水稻粒宽基因研究方面,GW2 是第 1 个被克隆的粒宽相关基因,由 X. J. Song 等^[10]通过窄粒品种 FAZ-1 和宽粒品种 WY3 构建定位群体,精细定位到 2 号染色体 8.2 kb 的区间;在这区间内只有 1 个候选基因,功能验证发现一个点突变导致 WY3 的等位基因转录过程提前终止,导致功能基因失活,使颖壳细胞数目增加,最终使得子粒变宽。Y. Li 等^[11]克隆了位于第 5 染色体短臂上控制粒型和产量的 QTL *GS5*; *GS5* 编码丝氨酸羧基酯酶,通过控制粒宽、灌浆和粒重来调节子粒大小。X. Wan 等^[12]通过 IR24(长粒)和 Asominori(宽粒)构建的 CSSL 群体,将 *GW5* 基因定位到区间为 49.7 kb 的片段内;经过对 2 个亲本的序列对比,发现亲本 Asominori 在 *GW5* 位点上有一个长约 1.2 kb 的片段缺失,蛋白质互作实验发现 *GW5* 参与泛素酶降解途径,调控水稻子粒的细胞分化过程^[13]。*GW8* 编码一个 SBP 结构域的转录因子,通过抑制 *GW7* 基因的表达调节水稻子粒的粒宽,提高水稻的粒重及产量^[14-15]。水稻粒宽 QTL 的定位与克隆也为水稻分子标记辅助选择及分子设计育种奠定了良好的理论基础,S. K. Wang 等^[14]将克隆到的 8 号染色体上粒宽相关的基因 *GW8* 与基因 *GS3* 相聚合,成功培育出新品种 Huabiao1。

本研究利用以普通野生稻为供体栽培稻 9311 为受体构建的染色体片段置换系,挑选出粒型性状与其他置换系以及亲本 9311 差异显著的一个单片

段置换系 CSSL182 为研究材料,通过与受体亲本回交建立次级分离群体,进行表型性状与基因型的关联分析,将一个来自于野生稻的粒宽相关 QTL-*qGW8.1* 定位在 8 号染色体的 10 kb 区间内,并对候选基因进行预测,对亲本进行细胞学观察,为之后粒宽基因克隆与功能验证工作奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

本实验室以普通野生稻为供体亲本,测序栽培稻品种 9311 为轮回亲本,通过与轮回亲本的多代回交,结合分子标记辅助选择技术,构建出覆盖野生稻全染色体基因组的 200 个染色体片段置换系。通过对整套置换系群体的粒型性状检测,挑选出粒型和粒重表型与受体亲本 9311 差异显著的单片段置换系 CSSL182 进行粒型相关 QTL 的鉴定。CSSL182 只含有 1 个来自于野生稻的导入片段,如图 1 所示。将 CSSL182 与轮回亲本 9311 杂交,获得 F_1 种子,在三亚(2016 年 300 株)、昌平(2016 年 1500 株)和南京(2016 年 1500 株)3 个地点分别种植 F_2 分离群体,并选择置换片段内的交换单株在南京种植 F_3 株系,用于 QTL 的精细定位。

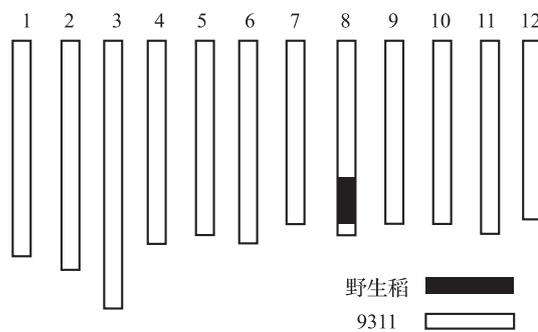


图 1 染色体片段置换系 CSSL182 基因型图示

Fig. 1 Graphical genotypes of CSSL182

1.2 方法

1.2.1 田间种植 2015 年 12 月在三亚种植 300 株 CSSL182/9311 的 F_2 分离群体作为初定位群体。2016 年 4 月在北京昌平种植 1500 株 CSSL182/9311 的 F_2 群体、2016 年 5 月在南京种植 1500 株 CSSL182/9311 的 F_2 群体作为精细定位群体(表 1)。经考种,从三亚种植的 F_2 群体中挑选出粒型和粒重之间差异较大,且根据初定位结果在目标区间内存在基因型差异,其他区间的基因型为父本或母本的纯合基因型的 50 株单株,取其种子在南京每份材料种植 4 行,建立 $F_{2,3}$ 群体。

表 1 试验材料种植地点信息列表

Table 1 Information of test environments in which the experimental populations were evaluated

环境编号 Environment	种植地点 Crop location	种植周期 Cropping season	播种日期 Seeding date	插秧日期 Transplanting date
E1	北京昌平 40.20°N, 115.51°E	2016 年 4-10 月	2016 年 4 月 28 日	2016 年 6 月 2 日
E2	江苏南京 32.03°N, 118.47°E	2016 年 5-10 月	2016 年 5 月 11 日	2016 年 6 月 13 日
E3	海南三亚 18.15°N, 109.3°E	2015 年 12 月-2016 年 5 月	2015 年 12 月 5 日	2016 年 1 月 5 日

春季材料播种后 30 d 插秧,夏季材料播种后 25 d 插秧。种植规格是:行距 16 cm × 26 cm, 每行 10 株。田间管理为普通大田管理。

1.2.2 性状调查 选取到达成熟期的水稻种子(抽穗后 40 d), 每株材料选取主穗收取 600 ~ 800 粒种子, 烘干箱内烘干后进行子粒性状调查。调查采用 SC-G 型万深自动考种及千粒重测量仪, 进行水稻子粒的粒长、粒宽和千粒重表型的测量。每份材料进行 2 次重复, 每次测量 150 ~ 200 粒种子。

1.2.3 颖壳细胞观察 参照 K. Kitagawa 等^[16]的方法, 取 CSSL182 和 9311 见穗当天的颖花, 去掉内颖, 将外颖分为两半, 取中部约 5 mm 长度的外颖置于固定液中, 固定时间 24 h 以上, 然后转入 95% 的乙醇当中过夜。经过乙醇逐级脱水、中间液代换、CO₂

临界点干燥、粘贴、离子溅射仪上对金属台喷金、镀膜, 然后使用 Hitachi S-4800 扫描电镜观察颖壳内、外表皮并拍照, 观察计算细胞长度和宽度。FAA 固定液配方是: 89% 乙醇、6% 冰乙酸、5% 甲醛。

1.2.4 引物设计 本试验共使用 2 种分子遗传标记用于检测基因型与构建基因连锁图谱。第 1 种为 SSR 标记, 来源于美国 Cornell 大学公布的研究成果以及 Gramene 网站, 第 2 种为 InDel 标记。根据已经测序完成的日本晴和 9311 的序列信息, 使用 primer5 软件进行标记引物设计, 设计好的引物均在 Gramene 网站进行在线比对, 验证其所在染色体位置, 确保设计引物的准确性。挑选出的引物全部在两亲本间进行多态性鉴定, 选择多态性良好的引物作为标记引物(表 2)。

表 2 试验所用引物序列信息

Table 2 Information of the primers used in this study

标记名称 Marker name	标记类型 Marker type	片段大小(bp) Fragment size	正向引物 Forward primer	反向引物 Reverse primer
RM149	SSR	353	AACGATGACAACCTTACCGATGC	TCTCCAGACGCCTATACAAGATGC
InDel 8-11	InDel	188	AACCATGAATGAATCCCTGA	TGCAACTGCATCCTGCAAT
RM419	SSR	277	GAGATGATGGTGATGGTGAACG	GCTTGAACACAGCATGTCAATGG
RM447	SSR	318	GTTATTCCGTTGCAACACACG	CCACGGGAGTGTAATATAGGAATAGG
RM264R	SSR	121	GTTGCGTCTACTGCTACTTC	GATCCGTGTCGATGATTAGC
InDel 8-12	InDel	178	TGAATTGAACCTCCGTCCTC	AGAACTGCACCAGGAAGCTC
RM22814	SSR	176	GCAGCGGAGGTGGTTAGATTGC	ATCTTCGACAGCGGCTGGAACC
RM22869	SSR	158	CTTCTTGGCTGTGTGACTGAGTAGC	GCAACACCACTCCTCCATGC
RM22891	SSR	160	GTAGAGCAAGTTTGCTCCTTGG	CACTGCACACTGCCAACTTATCC
RM23035	SSR	181	TAAAGCTAGCCGTAGTACTCTCACC	GGATGGCATGCATGTAATATGG
RM23078	SSR	196	CACAATTGATAGGCTGATCTGG	TTAGAAGCTCTGTTTGCTCAGC
RM22846	SSR	144	GGCTAAAGCCTCAGAGCCAACC	ATTTCGTTGCTGCTTCCGTTCCG
SL8.3	InDel	190	ATCTCGCTGCCAGACTTA	TTCTACCGACACCCTCAT
SL8.2	InDel	195	TTGGCATCGGACTATCCG	AAACGCTCACCCAAACCC
RM22867	SSR	164	TCAGATAGCACTCCCATCTCACC	AGCCTAGGGTTTACCAGGTTTGG
SL8.1	InDel	165	AGTTTAGGCTTTGGATTG	CTTGTCCCATGTAGTTCCCT
RM22869	SSR	158	CTTCTTGGCTGTGTGACTGAGTAGC	GCAACACCACTCCTCCATGC

1.2.5 QTL 分析和候选基因的预测 通过 QTL 分析软件 QTL IciMapping^[17-18] 对染色体置换系的 F₂ 分离群体以及 F_{2,3} 群体的基因型和表型数据进行处理, 软件中 LOD 值定为 2.5, 即只有当 LOD 值大于 2.5 时才能说明具有有效 QTL 的存在。当 QTL 定位到较小的 DNA 片段之间时, 利用美国水稻基因组注释计划 (<http://rice.plantbiology.msu.edu/cgi-bin/gbrowse/rice/#search>) 中基因的注释分析, 筛选与目标性状相关的候选基因。在 NCBI 数据库 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 中, 下载候选区域的 9311 序列, 并设计测序引物将双亲的候选区域全部测通, 所得测序数据使用 DNASTAR 软件进行拼接与对比^[19]。

2 结果与分析

2.1 CSSL182 粒型相关性状鉴定

本试验通过对整套 200 份置换系材料的性状调

查分析, 选取置换系 CSSL182 为试验起始材料进行水稻粒型与粒重性状 QTL 研究。通过对置换系材料 2013-2015 年 3 年的调查结果发现, CSSL182 水稻子粒粒型和粒重与置换系轮回亲本 9311 相比差异较大。3 年调查的 CSSL182 与 9311 表型均值结果如下: CSSL182 的粒长为 9.64 ± 0.24 mm, 亲本 9311 的粒长为 9.75 ± 0.28 mm; CSSL182 的粒宽为 2.65 ± 0.11 mm, 亲本 9311 的粒宽为 2.83 ± 0.23 mm; CSSL182 的粒重为 27.93 ± 0.89 g, 亲本 9311 的粒重为 32.08 ± 1.87 g。差异均达到显著水平, 其中粒宽与粒重差异极显著, 适合粒宽与粒重相关 QTL 的定位。

在南京与昌平两地种植的 F₂ 群体较大, 分别对这两个群体进行表型测定, 发现在这两个群体中, 水稻粒宽性状均为连续正态分布, 并做 Q-Q 图进行验证, 其指数都分布在一 条直线上 (图 2), 表明粒宽性状是受多基因调控的数量性状。

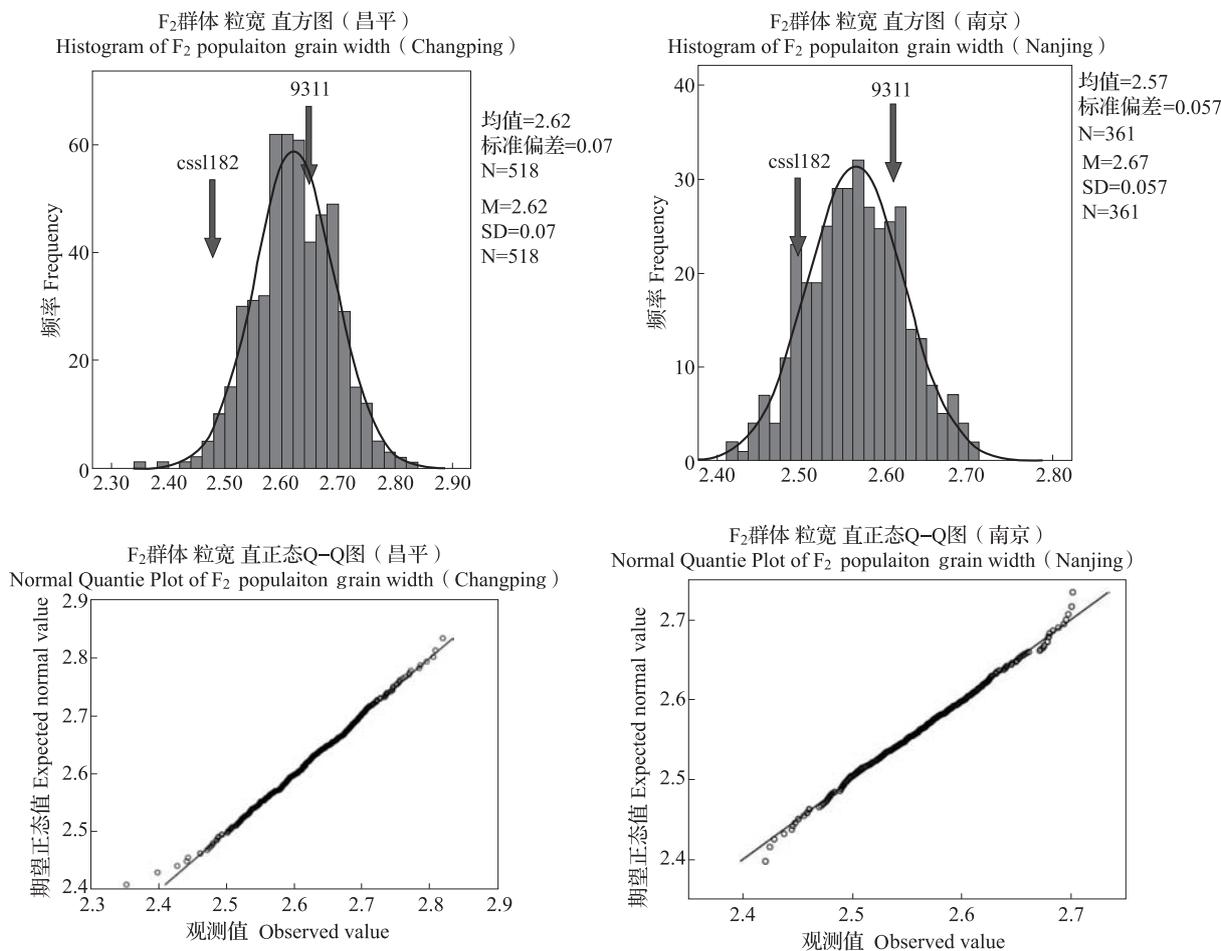


图 2 昌平、南京 CSSL182/9311 F₂ 群体粒宽表型正态分布图以及正态 Q-Q 图
Fig. 2 Normal distribution and Q-Q graph of grain width of CSSL182/9311 F₂ population in Nanjing and Changping locations

2.2 粒宽 QTL 初定位

将 CSSL182 与 9311 进行杂交获得 F_1 , 经过 F_1 植株的自交所得种子在海南三亚种植, 得到的 300 株 F_2 次级分离群体, 作为 CSSL182 置换系的初定位群体。对 300 株 F_2 植株进行粒型和粒重数据的测量, 使用导入片段区间的分子标记引物 RM149、Indel8-11、RM419、RM264、RM447、Indel8-12 作为初定位标记引物, 通过 QTL IciMapping 分析软件, 定位到 1 个粒宽相关的 QTL, 在 8 号染色体的标记 RM447 和 RM264 之间, 片段长度为 1376 kb, 该 QTL 的 LOD 值为 10.14, 贡献率为 22.49%, 将其命名为 *qGW8.1*。

NCBI 数据库中查找发现, 水稻 8 号染色体的标记 RM447 和 RM264 区间附近有 1 个已克隆的粒宽相关的基因 *GW8*^[14], 位于 8 号染色体物理位置 26501167 ~ 26506218 bp 之间, 能够调控水稻粒宽性状。为了排除该基因在置换系中的影响, 在美国基因组研究所的水稻基因组注释计划网站 (<http://rice.plantbiology.msu.edu/cgi-bin/gbrowse/rice/#search>) 找到该基因序列并设计引物, 在两亲本 CSSL182 和 9311 中扩增该基因并进行测序, 发现双亲间该基因序列完全一致, 表明 *qGW8.1* 并非已克

隆的 *GW8* 基因。因此, 扩大 CSSL182/9311 F_2 群体进行粒宽 QTL-*qGW8.1* 的精细定位。

2.3 粒宽 QTL-*qGW8.1* 精细定位

经初定位将 *qGW8.1* 定位于 8 号染色体标记 RM447 和 RM264 之间。为了验证初定位结果, 在定位区间附近设计 4 个分子标记引物, 分别为 RM149、Indel8-11、RM419、Indel8-12, 将 1500 株南京 F_2 群体材料和 1500 株昌平 F_2 群体进行定位分析。通过将基因型和表型数据的结合发现, 在南京和昌平均在 RM447 和 RM264 之间发现粒宽相关的 QTL, 表现为减性效应。根据结果, 从这两个 F_2 分离群体中筛选交换单株。经筛选, 从昌平 F_2 分离群体中筛选出 518 株交换单株, 从南京 F_2 分离群体中筛选出 361 株交换单株。

分别以筛选得到的 518 株昌平 F_2 交换单株和 361 株南京 F_2 交换单株为定位群体, 在 RM447 ~ RM264 区间内设计 5 个 SSR 分子标记引物 RM22814、RM22869、RM22891、RM23035、RM23078 进行筛选, 且已鉴定这 5 个加密引物在两个亲本间具有良好多态性。通过 QTL IciMapping 软件对基因型结果分析, 在两个不同群体中 *qGW8.1* 均被定位到 RM447 和 RM22869 之间, 长约 210 kb 的片段(图 3)。

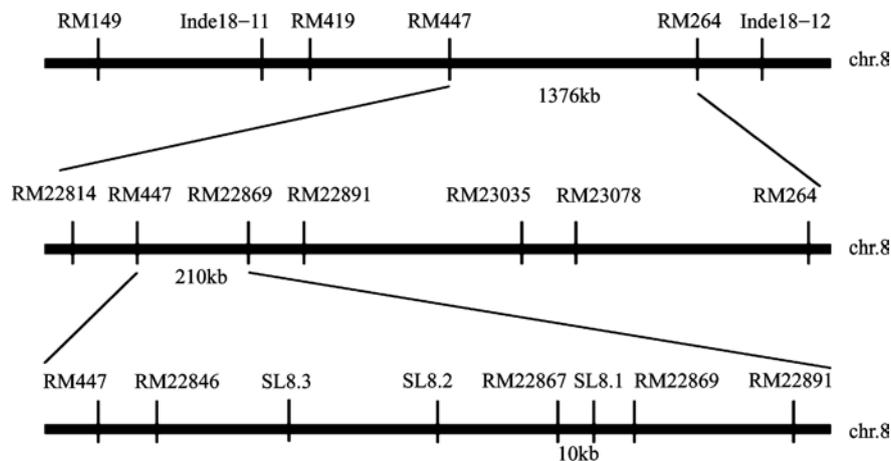


图 3 *qGW8.1* 的精细定位

Fig. 3 Fine mapping of *qGW8.1*

为了精细定位该 8 号染色体上控制粒宽的 *qGW8.1*, 用 RM22814 和 RM23035 两个标记进行交换单株筛选, 最终得到 14 个交换单株, 分别命名为 N1 ~ N14。在这两个标记中间成功加密了 5 个在双亲间具有良好多态性的 SSR 标记, 并在 RGAP 计划 (<http://rice.plantbiology.msu.edu/cgi-bin/gbrowse/rice/#search>) 网站上找到该片段的序列, 利用 Primer5 软件进行引物设计, 设计好的引物在 Gramene 网

站上进行引物特异性检测, 最后经过双亲间检测多态性得到 3 个引物 SL8.1、SL8.2 和 SL8.3, 使用这 8 个标记对 14 个交换单株进行基因型分析与表型粒宽的测量。经分析发现, N1、N2、N3、N4、N5、N6 等 6 个单株 *qGW8.1* 的基因型为 9311 纯合基因型, 粒宽表型为宽粒; N7、N8、N9、N10、N11、N12、N13、N14 等 8 个单株 *qGW8.1* 的基因型为 CSSL182 (野生稻) 纯合基因型, 粒宽表型为窄粒。结合基因型与表型

的结果,根据 N6、N8 和 N14 单株基因型信息,将 *qGW8.1* 的左边界定于 RM22867 标记处;根据 N4、N7 和 N12 单株信息,将 *qGW8.1* 的右边界定于

SL8.1,即 8 号染色体上粒宽性状相关的 *qGW8.1* 精细定位于 RM22867 ~ SL8.1 区间内,区间长度约 10 kb(图 4)。

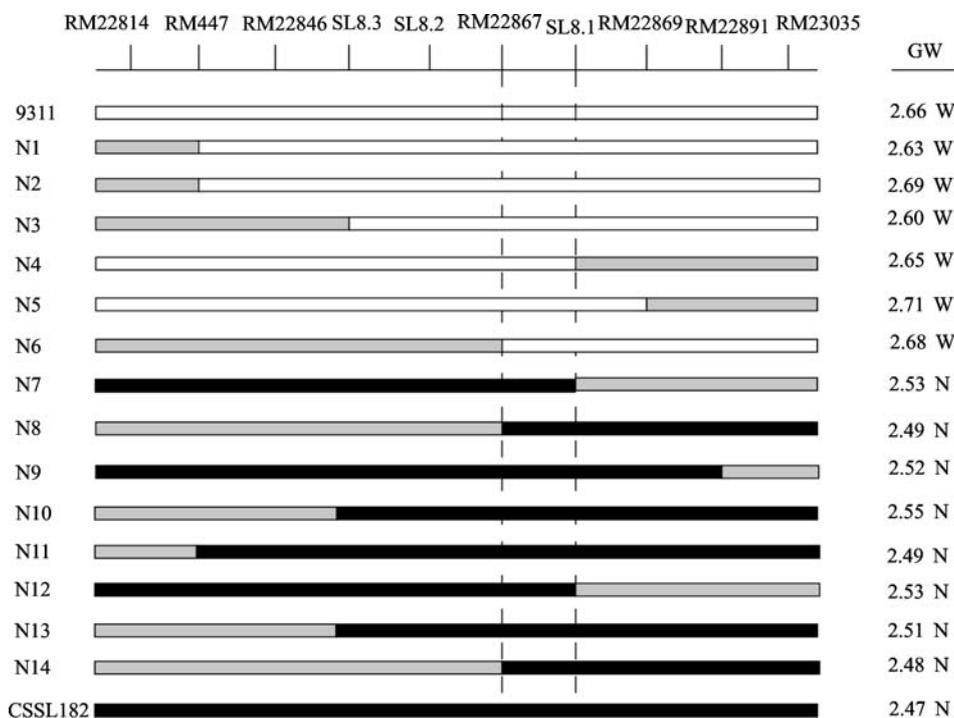


图 4 RM22814 ~ RM23035 区间内重组交换单株基因型与表型

Fig. 4 The genotype and phenotype of recombinants in the interval of RM22814-RM23035

2.4 候选基因预测

qGW8.1 最终定位于标记 RM22867 和加密引物 SL8.1 之间 10 kb 的区间内。将序列在 RGAP 计划 (<http://rice.plantbiology.msu.edu/cgi-bin/gbrowse/rice>) 和 RAP-DB 的 IRGSP1.0 (<http://rapdb.dna.affrc.go.jp/>) 进行候选基因预测,发现该段序列在两个数据库中分析到的候选基因完全相同,均是含有 3 个候选基因,且有 3 个开放阅读框 (ORFs),分别为 ORF1 (LOC_Os08g42360)、ORF2 (LOC_Os08g42370)、ORF3 (LOC_Os08g42380)。根据水稻基因组的注释 ORF1 (LOC_Os08g42360) 尚未预测出功能,ORF2 (LOC_Os08g42370) 编码一种反式作用因子锌指蛋白,ORF3 (LOC_Os08g42380) 编码一种线粒体外膜转位酶。

从 NCBI 数据库 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 中下载 9311 候选基因的序列,并设计了 12 个引物将亲本 9311 和 CSSL182 候选基因序列全部测通。同时将 9311 和野生稻两个亲本的序列用 SOFTBERRY 软件结合单子叶模型分析模式分析可

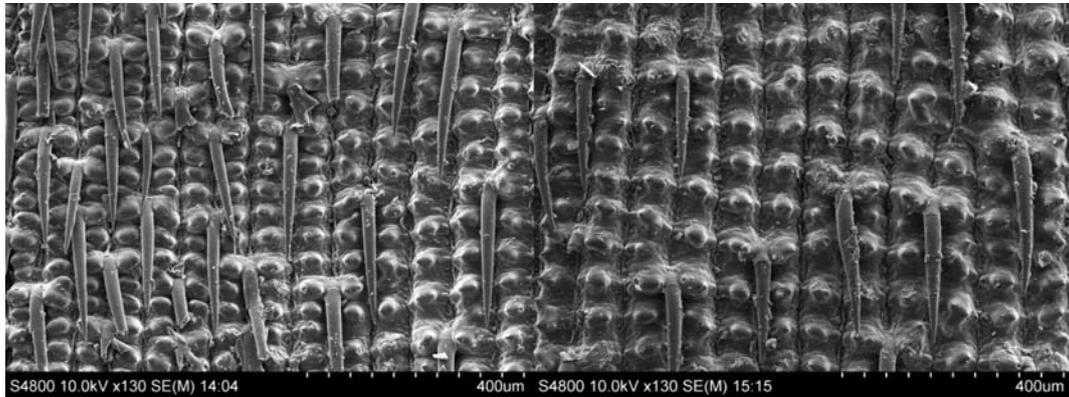
能的候选基因 (<http://linux1.softberry.com/>),结合软件分析结果,也预测到 ORF1 (LOC_Os08g42360)、ORF2 (LOC_Os08g42370)、ORF3 (LOC_Os08g42380) 这 3 个候选基因。

将 9311 和 CSSL182 在 3 个候选基因区段的测序结果对比,发现 LOC_Os08g42360、LOC_Os08g42370 都具有丰富的变异。LOC_Os08g42360 区间内含有 13 个 SNP,置换系 CSSL182 第 2 个外显子上有一个长为 15 bp 的片段缺失,经分析发现可能为 9311 亲本出现的 DNA 重复突变;9311 具有 2 个各为 8 bp 和 4 bp 的片段缺失,导致这 2 个缺失片段之间出现移码突变,出现氨基酸编码差异。LOC_Os08g42370 区间内含有 22 个 SNP,其中的 4 个 SNP 导致编码的核苷酸发生突变,CSSL182 有一个 2 bp 的缺失,原因可能是 DNA 复制过程中的 DNA 缺失导致;9311 具有一个长为 5 bp 的片段缺失,原因也可能由于 DNA 复制过程中的 DNA 缺失导致。LOC_Os08g42380 区间内含有 13 个 SNP,其中的 5 个 SNP 导致了氨基酸变异。

2.5 细胞学观察

利用扫描电镜对两个亲本 9311 与 CSSL182 的颖壳细胞进行细胞学观察。取样同一环境、同一时期的 9311 和 CSSL182 的子粒,将其固定于固定液中,处理后扫描电镜观察颖壳的外表皮细胞。扫描结果显示,在相同的视距内,CSSL182 材料的颖壳细

胞有 14 列,平均细胞宽度为 72.88 μm ,而 9311 材料的颖壳细胞只有 12 列,平均细胞宽度为 85.02 μm (图 5)。经显著性检验得出,9311 的颖壳细胞宽度显著大于 CSSL182 材料的颖壳细胞宽度,9311 比 CSSL182 增加 16.7%。



左为亲本 CSSL182,右为亲本 9311

Left is CSSL182, right is 9311

图 5 两个亲本的颖壳细胞扫描电镜观察

Fig. 5 The scanning electron microscope detection of glumes cells

3 讨论

3.1 *qGW8.1* 的精细定位及其应用前景分析

水稻的粒型性状往往与水稻的品质相关联。目前已有大量水稻粒宽相关的 QTL 基因被定位与克隆。来自栽培稻的 *GW2*^[10]、*GS5*^[11]、*GW5*^[12-13] 以及 *GW7*^[14]、*GW8*^[15] 相继被克隆并进行了功能研究。来自于野生稻的控制粒宽的基因很少报道。本试验通过单片段染色体置换系与亲本回交,构建次级分离群体并在三亚、南京、北京 3 个不同环境下进行粒型数据分析,在 8 号染色体上定位到来自野生稻的控制粒宽的 QTL-*qGW8.1*,表明 *qGW8.1* 是在不同环境下稳定遗传的粒宽 QTL。*qGW8.1* 最终定位于 8 号染色体标记 RM22867 和 SL8.1 之间的 10 kb 区间,区间内含有 3 个候选基因:ORF1 (LOC_Os08g42360)、ORF2 (LOC_Os08g42370)、ORF3 (LOC_Os08g42380)。经测序发现这 3 个候选基因在两个亲本之间均有丰富的变异,查阅基因注释未发现明显与子粒性状的注释。下一步的工作需要通过表达分析以及转基因功能验证等实验确定 3 个候选基因与粒型性状的相关性。

近 40 年来的水稻育种工作发展十分迅速,水稻在高产、品质、抗虫、抗病、抗逆等方面有长足的进

步。近些年来,水稻的产量一直在提高,然而水稻粒型品质改良工作一直没能得到广大育种家应有的重视,仅有少数育种家在提高水稻产量的同时改良水稻品质。如 S. K. Wang 等^[14] 将来源于 8 号染色体的降低粒宽的等位基因 *GW8* 与 3 号染色体的提高粒长的等位基因 *GS3* 聚合到华梗粳 74 品种中,结果粒长增加,粒宽减少而产量保持不变,成功培育出新品种 Huabiao1。还有很多学者将一些粒型与粒重相关 QTL 聚合到一起,虽然没有选育出新的品种,但在一定程度上起到改良水稻品质的作用^[20-21]。本试验通过对单片段置换系 CSSL182 和栽培稻材料 9311 农艺性状的调查分析,发现两个亲本间在抽穗期、穗粒数、穗长等方面没有差异,只有在粒型方面差异最为明显。因此,利用 *qGW8.1* 可以进行水稻外观品质方面的改良,通过改变稻米外型使子粒外观更加美观并且适应机械化收获,为培育利于稻米机械化加工的水稻品种提供种质资源。同时,找到该基因在栽培稻中正调控粒宽的等位基因,也可以为高产育种提供基因资源。CSSL182 的导入片段内是否还具有抗虫、抗病、抗逆等方面特性尚有待进一步的调查研究。目前有关野生稻中粒宽性状的 QTL 研究较少,虽然野生稻的综合产量性状劣于栽培稻,但有研究表明野生稻中仍然存在与高产相关的

QTL,野生稻中存在大量的与粒型相关的 QTL 尚待发掘;粒型也是水稻驯化过程中重点选择的性状,找到野生稻中控制粒型的新等位基因,也有助于理解水稻的起源与驯化过程。

3.2 *qGW8.1* 对粒宽性状影响的细胞学证据

水稻的组织器官由细胞组成,其形状、大小是由细胞大小、数目和排列方式决定的。因此有 2 种控制水稻子粒宽度的方式,第 1 种为调控子粒细胞宽度控制粒宽,第 2 种为调控水稻子粒横向细胞数量控制粒宽。通过对前人研究发现,*GW2*^[10]、*GS5*^[11]、*GW5*^[19] 和 *GW8*^[14] 基因均是通过调控颖壳细胞横向细胞数目控制水稻粒宽,而 *SRSI*^[22] 则通过调控颖壳细胞的长度和宽度来实现对水稻粒型的影响。

利用扫描电镜对 CSSL182 和 9311 进行颖壳表皮细胞观察,发现 9311 颖壳细胞的平均宽度比 CSSL182 高 16.7%,这与二者粒型的变化基本一致,故而得出 *qGW8.1* 控制水稻粒宽的方式是通过调控颖壳细胞宽度来实现的。下一步工作将首先通过转基因方法对 *qGW8.1* 进行功能验证,确定候选基因,然后分析 *qGW8.1* 对颖壳细胞生长、影响颖壳细胞大小的相关基因的调控模式。本研究既可以为水稻品质育种提供种质资源,又为粒型相关基因的分子生物学研究提供了基因资源与理论依据。

参考文献

[1] 祁祖白,李宝健,杨文广,等. 水稻籽粒外观品质及脂肪的遗传研究[J]. 遗传学报,1983,10(6):45-52

[2] Shomura A, Izawa T, Ebana K, et al. Deletion in a gene associated with grain size increased yields during rice domestication [J]. Nat Genet, 2008, 40(8):1023-1028

[3] Xue W, Xing Y, Weng X, et al. Natural variation in *Ghd7* is an important regulator of heading date and yield potential in rice [J]. Nat Genet, 2008, 40(6):761-767

[4] Jin J, Huang W, Gao J P, et al. Genetic control of rice plant architecture under domestication [J]. Nat Genet, 2008, 40(11):1365-1369

[5] Tanksley S D, McCouch S R. Seed banks and molecular maps: Unlocking genetic potential from the wild [J]. Science, 1997, 277(5329):1063-1066

[6] Ali M L, Sanchez P L, Yu S, et al. Chromosome segment substitution lines: a powerful tool for the introgression of valuable genes

from *Oryza wild species* into cultivated rice (*O. sativa*) [J]. Rice, 2010, 3(4):218-234

[7] Bian J M, Jiang L, Liu L L, et al. Construction of a new set of rice chromosome segment substitution lines and identification of grain weight and related traits QTLs [J]. Breed Sci, 2010, 60(4):305-313

[8] Qiao W H, Qi L, Cheng Z J, et al. Development and characterization of chromosome segment substitution lines derived from *Oryza rufipogon* in the genetic background of *O. sativa spp. indica* cultivar 9311 [J]. BMC Genomics, 2016, 17:580

[9] Tian F, Li D J, Fu Q, et al. Construction of introgression lines carrying wild rice (*Oryza rufipogon* Griff.) segments in cultivated rice (*Oryza sativa* L.) background and characterization of introgressed segments associated with yield-related traits [J]. Theor Appl Genet, 2006, 112(3):570-580

[10] Song X J, Huang W, Shi M, et al. A QTL for rice grain width and weight encodes a previously unknown RING-type E3 ubiquitin ligase [J]. Nat Genet, 2007, 39(5):623-630

[11] Li Y, Fan C, Xing Y, et al. Natural variation in *GS5* plays an important role in regulating grain size and yield in rice [J]. Nat Genet, 2011, 43(12):1266-1269

[12] Wan X, Weng J, Zhai H, et al. Quantitative trait loci (QTL) analysis for rice grain width and fine mapping of an identified QTL allele *gw-5* in a recombination hotspot region on chromosome 5 [J]. Genetics, 2008, 179(4):2239-2252

[13] Weng J, Gu S, Wan X, et al. Isolation and initial characterization of *GW5*, a major QTL associated with rice grain width and weight [J]. Cell Res, 2008, 18(12):1199-1209

[14] Wang S K, Wu K, Yuan Q, et al. Control of grain size, shape and quality by *OsSPL16* in rice [J]. Nat Genet, 2012, 44(8):950-955

[15] Wang S K, Li S, Liu Q, et al. The *OsSPL16-GW7* regulatory module determines grain shape and simultaneously improves rice yield and grain quality [J]. Nat Genet, 2015, 47:949-954

[16] Kitagawa K, Kurinami S, Oki K, et al. A novel kinesin 13 protein regulating rice seed length [J]. Plant Cell Physiol, 2010, 51(8):1315-1329

[17] Meng L, Li H, Zhang L, et al. QTL IciMapping: Integrated software for genetic linkage map construction and quantitative trait locus mapping in biparental populations [J]. Crop J, 2015, 3(3):269-283

[18] Zhang L, Li H, Li Z, et al. Interactions between markers can be caused by the dominance effect of quantitative trait loci [J]. Genetics, 2008, 180(2):1177-1190

[19] Burland T G. DNASTAR's Lasergene sequence analysis software [J]. Methods Mol Biol, 2000, 132:71-91

[20] 张剑霞. 利用分子标记辅助选择转移野生稻增产 QTL 和聚合水稻优良基因[D]. 武汉:华中农业大学, 2009

[21] 杨梯丰, 曾瑞珍, 朱海涛, 等. 水稻粒长基因 *GS3* 在聚合育种中的效应[J]. 分子植物育种, 2010, 8(1):59-66

[22] Abe Y, Mieda K, Ando T, et al. The *SMALL AND ROUND SEED1 (SRSI/DEP2)* gene is involved in the regulation of seed size in rice [J]. Genes Genet Syst, 2009, 85(5):327-339