

DOI: 10.3724/SP.J.1006.2013.01799

水稻 *Ef7* 基因的一个新等位基因 *Ef7-l* 的遗传效应及表达分析

赵冬生 张昌泉 顾铭洪 刘巧泉*

扬州大学农学院 / 江苏省作物遗传生理重点实验室 / 教育部植物功能基因组学重点实验室, 江苏扬州 225009

摘要: 水稻 *Ef7* 基因控制抽穗期。本研究从我国籼稻品种龙特甫中克隆了 *Ef7* 的等位基因 *Ef7-l*, 序列比对表明, *Ef7-l* 编码序列与日本晴 *Ef7* 相比存在 5 个氨基酸的差异。利用两个等位基因的序列差异, 以日本晴为受体构建了含有 *Ef7-l* 的近等基因系 CL63。CL63 在长日照条件下比轮回亲本日本晴延迟抽穗约 6 d, 但在短日照条件下两者抽穗期无显著差异。田间性状分析显示 *Ef7-l* 等位基因在长日照条件下能够使植株茎秆变粗, 粒重显著增加, 这可能是通过上调 *OsPHYB* 的表达水平而延迟水稻抽穗期实现的。

关键词: 水稻; 抽穗期; *Ef7-l*; 等位基因; 表达分析

Genetic and Expression Analyses of *Ef7-l*, a Novel *Ef7* Allele, in Rice

ZHAO Dong-Sheng, ZHANG Chang-Quan, GU Ming-Hong, and LIU Qiao-Quan*

Jiangsu Key Laboratory for Crop Genetics and Physiology / Key Laboratory of Plant Functional Genomics of Ministry of Education, Yangzhou University, Yangzhou 225009, China

Abstract: *Ef7* controls rice heading date. In the present study, an allele of *Ef7*, *Ef7-l*, was cloned from the *indica* rice cultivar Longtefu. Sequence analysis indicated that *Ef7-l* is a novel *Ef7* allele and there are five amino acid substitutions in *Ef7-l* compared with its wild type from Nipponbare. Based on the sequence variation between *Ef7-l* and *Ef7*, we developed a near-isogenic line (NIL) CL63 with the background of *japonica* Nipponbare via marker-assisted selection. The heading date of the NIL CL63 was postponed for approximate six days under long day (LD) condition compared with Nipponbare. In short day (SD) condition, there was no obvious difference in heading date between Nipponbare and CL63. Under the natural field at Yangzhou, the novel allele *Ef7-l* could result in significant increase of plant height and grain weight in CL63 compared with Nipponbare. The qRT-PCR analysis revealed that there was not significant difference in *Ef7* gene expression level between Nipponbare and CL63 under both LD and SD conditions. But the *Ef7-l* allele could affect rice heading date by up-regulating the expression level of *OsPHYB* gene under LD condition.

Keywords: *Oryza sativa* L.; Heading date; *Ef7-l*; Allele; Expression analysis

水稻生育期长短对最终产量形成有着极其重要的影响。因此, 发掘并利用控制水稻生育期相关基因的新等位变异, 对于培育高产广适性水稻新品种具有重要实用价值。水稻抽穗期和产量性状都属数量性状, 并对环境变化极为敏感^[1]; 因此有很多已定位的 QTL 区间往往对这两类性状具有多效性, 产量的提高往往伴随着抽穗期的延迟。控制抽穗期相关基因的等位变异一般都与品种的地域和季节适应性相关, 因此在育种实践中育种家往往倾向于筛选

适合特定生态区域的品种^[2-4]。

环境条件和植物自身调节机制都会影响水稻抽穗期, 而在这些因素中光周期是最重要的开花诱导影响因子^[5]。不同类型的品种会表现出不同的遗传特性, 而同一品种的抽穗期也会由于不同光温条件的影响而表现各异。我国水稻主要栽培品种的抽穗期与其感光性、基本营养生长习性有着显著线性关系^[4]。水稻抽穗期遗传机制复杂, 根据对 Gramene 网站 QTL 数据库(<http://www.gramene.org/qtl/index.html>)

本研究由国家高技术研究发展计划(863 计划)项目(2012AA10A302-7), 国家自然科学基金项目(31071383), 江苏省杰出青年基金项目(BK2012010)和江苏省作物学优势学科项目资助。

* 通讯作者(Corresponding author): 刘巧泉, E-mail: qqliu@yzu.edu.cn

第一作者联系方式: E-mail: zds_yzdx@163.com

Received(收稿日期): 2013-02-21; Accepted(接受日期): 2013-05-25; Published online(网络出版日期): 2013-07-09.

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.1809.S.20130709.1600.011.html>

的分析,显示有超过 700 个涉及生育期的 QTL, 分布于水稻所有 12 条染色体上。目前以 *Hd3a*、*Hd1*、*Ehd1*、*Ghd7* 和 *Ghd8* 等为代表的控制水稻抽穗期的重要基因位点都已相继被克隆^[6-15]。拟南芥中与抽穗开花相关的基因,一般在水稻中都能找到与之同源的基因,并且有着相似的功能。因此,得益于拟南芥开花调控机制的研究,有关光周期控制水稻开花的调控网络也有了较好的阐述^[16-17]。

拟南芥 *ELF3* 被证明是控制光信号输入生物节律钟的重要基因,在长日照条件下可促进拟南芥开花^[16]。在水稻中,位于第 1 染色体上的 *OsELF3* 基因与拟南芥 *ELF3* 基因高度同源,其 T-DNA 插入突变体 *osef3* 在长日照和短日照条件下都表现出延迟抽穗,同时还具有多效性^[18]。最近,在水稻第 6 染色体上定位的 *ELF3* 的同源基因 *Ef7*,也是控制抽穗期的关键基因^[19],其通过调节植株昼夜节律、下调开花抑制因子 *Ghd7* 的表达来促进水稻抽穗开花^[20-23]。研究表明, *Ef7* 不同的等位变异形式在不同光照条件下的抽穗期表现会有所不同^[20-23]。其中 *ef7* 突变体 HS276 在长日照和短日照下均能延迟抽穗, T-DNA 插入突变体 *osef3-1* 在长短日照条件下均不同程度延迟抽穗;但是,含有越光 *Ef7* 等位基因 *Hd17* 的近等基因系只在长日照下延迟抽穗, *Tos17* 突变体 *osef3* 也只在长日照下延迟抽穗,短日照下抽穗期和野生型相比无明显差异。

本研究根据已克隆的日本晴 *Ef7* 基因序列,从我国籼稻杂交稻重要亲本龙特甫中克隆了该基因的等位基因,命名为 *Ef7-l*。在此基础上,以日本晴为轮回亲本构建了 *Ef7-l* 的近等基因系,分析了 *Ef7-l* 控制的抽穗期和产量性状的表现。

1 材料与方法

1.1 试验材料

选用粳稻品种日本晴(*Oryza sativa* L. subsp. *japonica* cv. Nipponbare)和籼稻品种龙特甫(*Oryza sativa* L. subsp. *indica* cv. Longtefu); 以及分别以这 2 个品种为轮回亲本和供体亲本来源的一个高世代(BC₄F₂)的回交系 CL42。以日本晴为轮回亲本,继续和 CL42 回交 2 次,并自交 3 代,经分子标记辅助选择,在 BC₆F₃ 世代中选育获得含有来源于龙特甫第 6 染色体短臂 *Ef7* 基因区段的近等基因系 CL63。

1.2 DNA 提取及 PCR 检测

按 CTAB 法^[24]从水稻叶片中提取基因组 DNA,用于 PCR 反应。20 μL 的 PCR 反应体系包括 1 μg 的模板 DNA、0.5 μL (10 mmol L⁻¹)引物、0.4 μL (10 mmol L⁻¹) dNTP、2 μL 10×PCR 缓冲液、1 U *rTaq* DNA 聚合酶和 15.5 μL 超纯水。在 Biometra PCR 仪上进行 PCR 扩增,反应条件为: 95°C 预变性 4 min; 94°C 下 30 s, 55°C 下 30 s, 72°C 下 40 s, 共 35 个循环; 72°C 下延伸 5 min。反应产物经 3% 琼脂糖凝胶电泳,溴化乙锭染色后在凝胶成像仪上成像,分析检测样品间的多态性。

1.3 基因克隆与序列分析

使用高保真 DNA 聚合酶 *pfu* (Ferments) 从水稻基因组 DNA 中扩增目的基因片段,所用引物是针对 *Ef7* (LOC_Os06g05060) 基因设计的特异性引物 *Ef7-gDNA* (表 1)。按产品推荐的程序进行 PCR 反应,将扩增产物送南京金斯瑞生物科技有限公司测序。在 NCBI 网站(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)上查找相关基因的核酸序列,在水稻全基因组信息数据

表 1 本研究中使用的引物
Table 1 Primers used in this study

引物 Primer	物理位置 Physical position	正向序列 Forward sequence (5'-3')	反向序列 Reverse sequence (5'-3')
Chr608	1 704 190-1 704 139	ACACGTACGGTCGATCGG	TTAATGGTGTAGCTAGATCGAGA
Chr601	2 094 933-2 094 766	AAACAGTGGGAAAAAGTTTCGGTATT	AAACGCAACACCAAAAATGAAGAAG
INDEL7	2 239 733-2 240 020	TGAGGAAGCTGACAATGAGC	GGCCCGGAAAAATTATACTCC
RM587	2 291 804-2 292 076	ACGCGAACAATAACAGCC	CTTTGCTACCAGTAGATCCAGC
INDEL3	2 339 885-2 340 045	ATAATGAAGCCAGGGCGAAG	CATCGTTGGAGATGGATGG
<i>Ef7-gDNA</i>	2 233 084-2 238 217	CGTGCTACTCCATTTTCAGGGTC	CCAATGGGCGTATGGATGA
<i>Ef7-RT</i>	2 234 435-2 235 519	TGATTCTCTCGGTGGAGTGTATA	GTTGCGACTAAAAGAGGTTGTG
Actin-RT	29 067 481-29 067 957	CCAAGGCCAATCGTGAGAAGA	AATCAGTGAGATCACGCCAG

库(<http://rice.plantbiology.msu.edu/>)上查询基因功能基本注释, 在 Gramene 网站(<http://www.gramene.org/>)上查询基于日本晴的水稻序列信息, 在 UniProt 网站(<http://www.uniprot.org/>)上分析蛋白质基本信息, 利用软件 DNASTAR 和 Vector NTI 9.0 分析一些核苷酸和氨基酸序列。

1.4 田间试验

2011 年夏季和冬季分别在江苏省扬州大学校内试验基地和海南陵水南繁基地种植近等基因系 CL63 及其受体日本晴, 上述 2 个种植环境分别具自然长日照和短日照条件。种植每个材料 3 个重复, 每个重复 40 苗, 调查性状时取每个重复中间 20 苗。此外, 还于 2011 年夏季在扬州大学校内试验基地设置短和长日照两个光周期处理, 其中短日照处理为光照 8 h/黑暗 16 h, 长日照处理为自然光照 14 h/黑暗 10 h, 每个材料 3 个重复, 每个重复 20 苗, 选取每个重复中间 10 苗用于调查抽穗期。

1.5 性状调查和统计分析

自开始抽穗后每 2 d 调查一次抽穗情况, 以一个植株第 1 穗抽出 1 cm 当日计为该株的抽穗日, 以播种日到抽穗日的天数计为抽穗期。成熟期考察 CL63 和日本晴的主要农艺性状, 包括株高、主穗长、每株穗数、每穗粒数、结实率、千粒重。使用 SPSS 16.0 软件对所有数据进行独立样本 *t* 测验, 以分析相关数值在日本晴和 CL63 之间的差异显著性, 数据以平均数±标准差(mean±SD)的形式表示。

1.6 定量 RT-PCR 分析

使用 RNA 提取试剂盒(北京天根生化科技有限公司)提取水稻幼苗总 RNA。使用变性琼脂糖凝胶电泳和 NanoDrop 仪(Thermo)检测 RNA 的质量, DNaseI 酶消化总 RNA, 利用反转录试剂盒(Fermentas)获得 cDNA。以 cDNA 为模板扩增水稻内参基因 *Actin* (LOC_Os03g0718100), 调节 cDNA 的模板浓度趋于一致。用于 *Ef7* 基因和 *Actin* 基因表达量分析的引物分别为 *Ef7*-RT 和 *Actin*-RT (表 1)。在 ABI 公司的 ABI 7500 仪器上进行荧光定量 PCR, 按照 SYBR Green qRT-PCR 方法推荐的 25 μL 反应体系; PCR 扩增条件为 94℃预变性 3 min; 94℃变性 15 s, 55℃退火 15 s, 72℃延伸 35 s, 循环数 40。以溶解曲线分析确定扩增产物的特异性, 使用相对定量的方法分析实验结果^[25]。

2 结果与分析

2.1 籼稻品种龙特甫 *Ef7* 等位基因(*Ef7-l*)的克隆与序列分析

为了深入分析我国栽培水稻中 *Ef7* 基因不同等位变异的效应, 根据日本晴 *Ef7* 基因序列, 采用同源克隆技术, 从我国籼型杂交稻一个重要亲本龙特甫中克隆了该基因的等位基因 *Ef7-l*, 并测定了其全序列(GenBank 登录号为 KC204687)。克隆的 *Ef7-l* 序列全长 5134 bp, 其中包括全部编码区序列和部分上下游序列。将 *Ef7-l* 与已发表的日本晴 *Ef7* 基因序列(LOC_Os06g05060)比对, 发现两者在内含子序列上存在 6 处差异, 但这些差异都远离内含子与外显子剪接位点处; 而在外显子序列上有 6 个单核苷酸变异(SNP), 涉及 5 个位置的氨基酸残基的变化, 分别由日本晴的氨基酸残基 P(脯氨酸)、S(丝氨酸)、L(亮氨酸)、V(缬氨酸)和 S(丝氨酸)变为龙特甫中 L(亮氨酸)、G(甘氨酸)、S(丝氨酸)、A(丙氨酸)和 G(甘氨酸)(图 1-c)。另一个 SNP 由于密码子简并性未产生氨基酸残基的变化, 位于氨基酸序列的第 8 位。

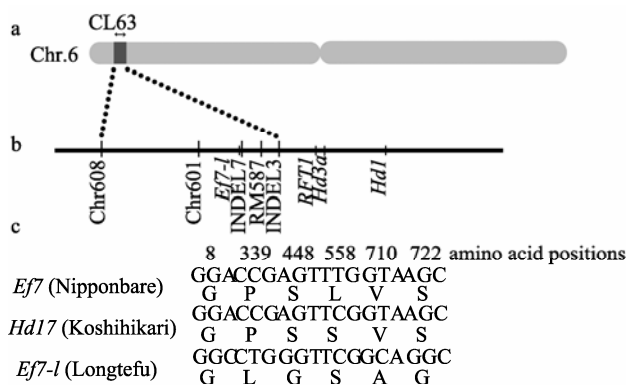


图 1 *Ef7* 基因编码序列比较及近等基因系 CL63 的遗传背景
Fig. 1 Comparison of coding sequences of *Ef7* among different rice cultivars, and the genetic background of near-isogenic line CL63

a: 近等基因系 CL63 在第 6 染色体上导入片段示意图, 箭头指示黑色区域为龙特甫来源的替换片段; b: 导入片段区间位置; c: 3 个水稻品种中 *Ef7* 等位基因编码氨基酸序列比对分析。G: 甘氨酸; P: 脯氨酸; S: 丝氨酸; L: 亮氨酸; V: 缬氨酸; A: 丙氨酸。

a: The introgression segment in the near-isogenic line CL63 on chromosome 6. Arrows on the top indicate the black region substituted by Longtufu; b: The position of introgression segment interval; c: Alignment analyses of coding sequences of *Ef7* alleles among three rice cultivars. G: glycine; P: proline; S: serine; L: leucine; V: valine; A: alanine.

2.2 近等基因系 CL63 的构建及其遗传背景分析

为进一步了解龙特甫中 *Ef7-l* 等位变异是否可产生不同的遗传效应, 构建了该基因的近等基因系。本实验室在前期研究中, 以日本晴为轮回亲本、不同籼稻品种为供体亲本, 构建了一系列高世代回交材料。利用与 *Ef7* 基因紧密相邻的一个 InDel 标记 (INDEL7, 表 1) 作为辅助选择手段, 从以龙特甫为供体的高世代 (BC₄F₂) 回交材料中筛选获得了一个系 CL42, 该系含有来源于龙特甫的 *Ef7-l* 基因区段。继续以日本晴为轮回亲本与 CL42 回交 2 次、自交 3 次, 经分子标记辅助选择, 在 BC₆F₃ 世代中选育获得只含有来源于龙特甫 *Ef7* 基因区段的近等基因系 CL63 (图 1-a, b)。

为检测 CL63 近等基因系的背景, 利用均匀分布于水稻 12 条染色体上的 140 对分子标记^[26]检测。表明 CL63 近等基因系中除 *Ef7* 区域附近的 5 对标记 (Chr608、Chr601、INDEL7、RM587 和 INDEL3; 图 1-b) 与供体亲本龙特甫相同外, 其余分子标记的带型均与日本晴相同。并且 CL63 系中目标基因区段之外的附近已克隆的抽穗期相关基因 *Hd3a*、*RFT1*、*Hd1* 都已回复为日本晴的基因型 (图 1-b)。据此推测, 近等基因系 CL63 中只含有一个来源于龙特甫的导入片段, 区间为 Chr608-INDEL7-INDEL3 (图 1-b), 在此导入片段区间只含有一个抽穗期相关基因 *Ef7*, 覆盖的物理距离大约为 636 kb (表 1)。

2.3 不同光周期条件下 CL63 的抽穗期响应

将近等基因系 CL63 与日本晴杂交获得杂种 F₁ 代, 在扬州正季自然长日照条件下同时种植日本晴、CL63 及其 F₁ 杂种, CL63 抽穗期比轮回亲本日本晴延迟约 6 d (图 2-a 和表 2), 而 F₁ 植株的抽穗期

与日本晴一致。说明近等基因系 CL63 迟抽穗表型属隐性遗传。在海南陵水冬季自然短日照条件下, CL63 与日本晴两者抽穗期无显著差异, 都约为 68 d (表 2)。2011 年在扬州夏季条件下, 保持相同的温度条件, 进行不同时间长度的光照处理后比较 CL63 和日本晴的抽穗期。在长光照处理下, CL63 的抽穗天数约为 85 d, 而轮回亲本日本晴的抽穗天数约为 79 d, CL63 比轮回亲本延迟抽穗约 6 d。在短光照条件下, 两者抽穗期无显著差异, 但其抽穗期相对于长光照处理条件均明显提前, 都为 54 d 左右 (表 3)。

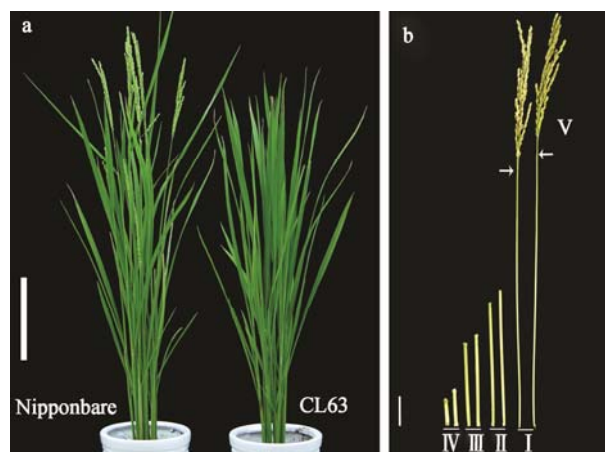


图 2 扬州正季长日照条件下日本晴和近等基因系 CL63 植株表型比较

Fig. 2 Plant phenotype of Nipponbare and near-isogenic line CL63 in the field in Yangzhou

a: 日本晴(左)和 CL63(右)抽穗期时的表型; b: 日本晴(左)和 CL63(右)的节间形态; I: 倒一节间; II: 倒二节间; III: 倒三节间; IV: 倒四节间; V: 穗长。

a: Phenotype of Nipponbare (left) and CL63 (right) of heading in the field of Yangzhou, bar represents 20 cm. b: Phenotypic exhibition of internodes of Nipponbare (left) and CL63 (right), bar represents 5 cm. I: the first internode; II: the second internode; III: the third internode; IV: the fourth internode; V: the panicle.

表 2 日本晴和 CL63 的主要农艺性状比较

Table 2 Comparison of the main agronomic traits between Nipponbare and CL63 (mean±SD, n=20)

性状 Trait	扬州正季长日照条件 Long day condition at Yangzhou		海南冬季短日照条件 Short day condition at Hainan	
	日本晴 Nipponbare	CL63	日本晴 Nipponbare	CL63
抽穗期 Heading date (d)	81.00±1.10	87.30±1.08**	68.67±1.52	69.33±0.82
株高 Plant height (cm)	96.90±2.72	101.40±1.99*	72.75±2.15	72.96±2.00
主穗长 Panicle length (cm)	20.45±1.34	20.08±0.31	17.67±0.62	17.31±0.43
每株穗数 No. of panicles per plant	9.72±3.26	9.06±1.81	16.44±2.85	16.05±2.48
每穗粒数 Grains per panicle	117.33±11.67	111.80±9.43	80.20±4.96	79.83±5.25
结实率 Seed setting rate (%)	94.33±2.02	95.80±2.11	47.10±6.80	48.00±7.30
千粒重 1000-grain weight (g)	25.00±0.57	25.90±0.74**	25.70±0.15	25.82±0.16

*和**分别代表在 $P<0.05$ 和 $P<0.01$ 水平上差异显著。

*and ** represent significant difference at $P<0.05$ and $P<0.01$, respectively.

表 3 日本晴和 CL63 在不同光照时间处理下的抽穗期

Table 3 Heading date of Nipponbare and CL63 under different light conditions (mean \pm SD, $n=10$)

材料	长光照	短光照
Material	Long day condition	Short day condition
日本晴		
Nipponbare	79.5 \pm 1.6	53.8 \pm 1.7
CL63	85.6 \pm 1.5**	54.6 \pm 1.2

代表在 $P<0.01$ 水平上差异显著。 represents the significant differences at $P<0.01$.

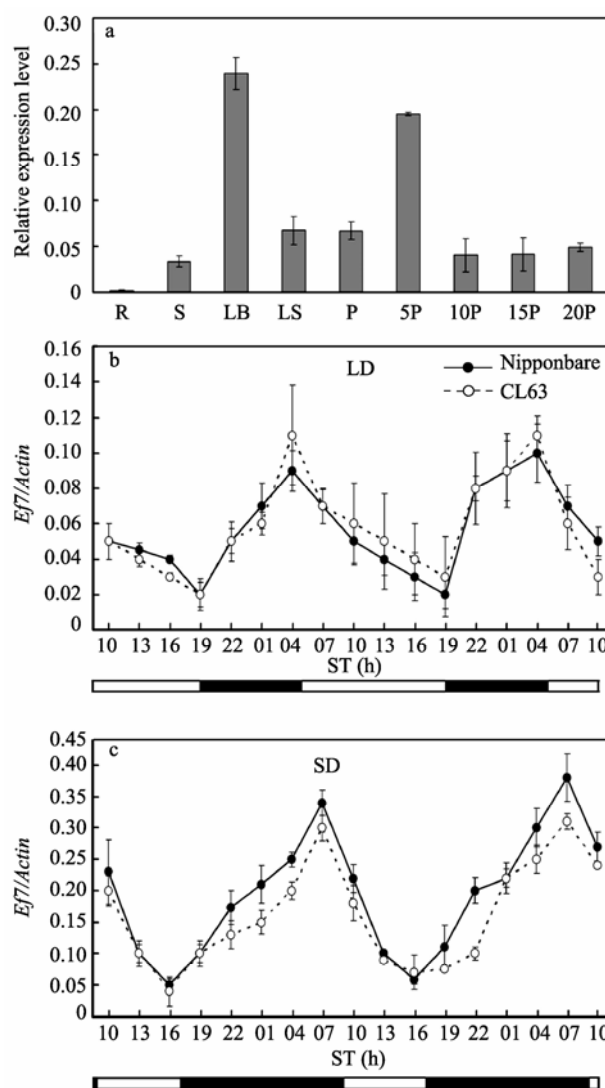
2.4 CL63 的主要农艺性状表现

扬州正季自然光温条件下, 成熟期 CL63 的各个节间长度相对于日本晴均有所增长, 导致它的株高与野生型日本晴相比有显著升高(图 2); 同时发现 CL63 的茎秆相对于日本晴略粗, 预示其抗倒伏能力可能有所增强。与日本晴相比, CL63 粒重显著增加, 但其他主要性状并没有显著变化(表 2)。在海南冬季短日照自然条件下, 由于 CL63 与日本晴的抽穗期没有差异, 两者的主要农艺性状也没有显著不同(表 2)。

2.5 *Ef7-l* 基因的表达分析

为了解 *Ef7* 基因的表达特性, 首先选取日本晴不同器官, 提取总 RNA 进行实时定量 RT-PCR 分析(图 3-a), 这些器官包括: (1)根; (2)茎秆; (3)叶片; (4)叶鞘; (5)抽穗前的幼穗; (6)开花后 5 d 的幼穗; (7)开花后 10 d 的穗; (8)开花后 15 d 的穗; (9)开花后 20 d 的穗。结果表明, *Ef7* 在日本晴叶片中的表达量显著高于其他组织(图 3-a), 表明该基因可能类似于其在拟南芥中的同源基因 *ELF3* 中的表达模式和作用机制, 在水稻中同样参与了光调控作用。在上述研究的基础上, 重点以不同光照条件下生长的 CL63 和日本晴幼苗期叶片为材料, 在 48 h 时间节律周期内每隔 3 h 取样用于提取总 RNA 进行 RT-PCR 分析, 进一步分析 *Ef7-l* 等位基因随时间节律的表达特性(图 3-b, c)。结果表明, 无论在长光照条件下还是在短光照条件下, 相对于 CL63 中的 *Ef7-l* 等位基因随昼夜振荡的表达规律与日本晴中的 *Ef7* 基因基本一致(图 3-b, c), 说明 *Ef7-l* 等位变异并没有影响基因的转录。

已有研究表明, 拟南芥中 *ELF3* 在植株生长前期通过参与结合 PHYB 来介导光信号的输入, 从而调节开花时间^[27]。在水稻中, *Ef7* 基因可通过下调开花抑制因子 *Ghd7* 的表达来促进开花^[20-23], 而 *Ghd7* 的转录也可受 *OsPHYB* 基因(Os03g19590)的调控^[12]。为进一步了解 *Ef7* 是否通过调节 *OsPHYB* 基因来抑制 *Ghd7* 的转录水平, 我们比较了 CL63 和日本晴中 *OsPHYB* 的表达特性(图 4)。结果显示, 在长

图 3 *Ef7* 基因在日本晴和 CL63 中的表达模式Fig. 3 Expression pattern of the *Ef7* gene in Nipponbare and CL63

a: *Ef7* 基因在日本晴植株不同器官中的表达; R: 根; S: 茎秆; LB: 叶片; LS: 叶鞘; P: 抽穗前的幼穗; 5P: 开花后 5 d 的幼穗; 10P: 开花后 10 d 的穗; 15P: 开花后 15 d 的穗; 20P: 开花后 20 d 的穗。b: *Ef7* 基因长日照条件下的表达模式; c: *Ef7* 基因在短日照条件下的表达模式。表达水平以相对于持家基因 *Actin* 的表达水平衡量; ST 表示一天中的取样时间; 黑色实圈表示日本晴, 白色空圈表示 CL63。

a: *Ef7* gene expression of various organs of Nipponbare; R: root, S: stem, LB: leaf blade, LS: leaf sheath, P: young panicle before heading, 5P: young panicle 5 days after flowering, 10P: panicle 10 days after flowering, 15P: panicle 15 days after flowering, 20P: panicle 20 days after flowering. b: Expression level of *Ef7* between Nipponbare and CL63 under LD conditions; c: Expression level of *Ef7* between Nipponbare and CL63 under SD conditions. Expression level was normalized against expression of *Actin* gene. ST: sampling time in one day. Solid dark circles represent Nipponbare, and open white circles represent CL63.

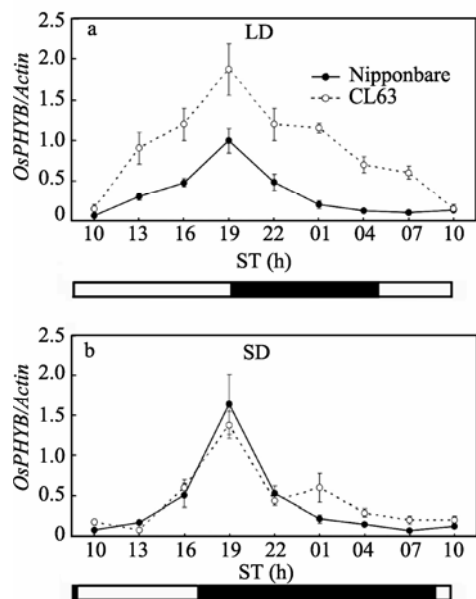


图 4 日本晴和 CL63 中水稻光敏色素 B 基因的昼夜表达水平
Fig. 4 Diurnal expression level of *OsPHYB* gene in Nipponbare and CL63

a: 长日照条件下光敏色素 B 基因在日本晴和 CL63 中的表达模式; b: 短日照条件下光敏色素 B 基因在日本晴和 CL63 中的表达模式。表达水平以相对于看家基因 *Actin* 的表达水平衡量;

ST 表示一天中的取样时间。黑色实圈表示日本晴, 白色空圈表示 CL63。

a: Diurnal expression patterns of *OsPHYB* in Nipponbare and CL63 in LD conditions; b: Diurnal expression patterns of *OsPHYB* in Nipponbare and CL63 in SD conditions. The expression levels are relative to the *Actin* mRNA. ST: sampling time in one day. Solid dark circles represent Nipponbare and open white circles represent CL63.

光照条件下日本晴中 *OsPHYB* 表达水平显著低于 CL63 中(图 4-a), 而在短光照条件下 2 份水稻材料中 *OsPHYB* 的表达水平并无显著差异(图 4-b)。

3 讨论

近等基因系因其遗传背景与轮回亲本较为一致, 因此是准确鉴定等位基因遗传效应的最好材料; 此外, 具有良好表型的近等基因系还可以直接应用于品种改良。Matsubara 等^[23]以越光为供体亲本和日本晴为受体亲本构建近等基因系, 克隆了一个抽穗期基因 *Hd17*, 证明是 *Ef7* 的等位基因。*Hd17* 与日本晴 *Ef7* 基因相比, 仅在氨基酸序列第 558 位处的亮氨酸突变为丝氨酸^[23]。本研究从我国籼稻品种龙特甫中克隆鉴定了 *Ef7* 的等位基因 *Ef7-l*, 与 *Hd17* 相比, *Ef7-l* 编码区有 5 个序列变异, 导致 4 个氨基酸残基变化(图 1-c)。可见, 本研究所克隆的 *Ef7* 的等位基因 *Ef7-l* 可能是一个新的等位变异类型。我们初步的

研究表明, 在我国许多籼稻品种中的 *Ef7* 基因都与 *Ef7-l* 相似, 预示该基因在不同地域产生了明显的分化。

我们以龙特甫为供体和日本晴为受体构建了 *Ef7-l* 的近等基因系 CL63。CL63 在长光照条件下能够延迟抽穗, 而在短光照条件下抽穗期与受体亲本无显著差异。同样以日本晴为受体, 越光为供体构建的 *Hd17* 近等基因系, 在短日照下的抽穗期与受体亲本相同, 而在长日照条件下 *Hd17* 对抽穗期有明显的延迟效应^[23]。由此说明, 虽然 *Ef7-l* 和 *Hd17* 在序列上存在较多的差异, 但是两者对于抽穗期的效应较为相似。

水稻抽穗期长短和产量密切相关, 具有较迟抽穗期的品种往往能产生更多的生物产量^[28]。而控制抽穗期的基因往往具有多效性, 目前至少有 2 个具有一因多效的抽穗期基因已被克隆, 即 *Ghd7* 和 *Ghd8* (*DTH8*)^[11,13-15], 这 2 个基因对抽穗期和产量性状兼具主效作用。本研究克隆的 *Ef7-l* 等位基因在长日照条件下可延迟抽穗, 含该位基因的近等基因系植株的各节间长度与受体亲本相比有所增加, 茎秆直径变粗, 株高和千粒重有显著增加, 具有显著的增产潜力。一般高纬度地区的日照时间往往较长, 因此该等位基因可能在高纬度地区有重要的实际应用价值。

野生型 *Ef7* 基因在叶片中表达量最高, 且在不同光照条件下 *Ef7-l* 的表达量与野生型 *Ef7* 基因无显著差异; 但是在长光照下 *Ef7-l* 基因能够上调 *OsPHYB* 的转录水平。由此推测, 在长光照条件下 CL63 中的 *Ef7-l* 等位变异可能导致 *OsPHYB* 转录水平上调, 从而延迟抽穗期; 而在短光照条件下 *Ef7-l* 等位变异对 *OsPHYB* 的转录并无明显影响, 因此对抽穗期也没有影响。但是有关该等位基因延迟抽穗的机制还有待更深入的研究。

4 结论

本研究从籼稻品种龙特甫中克隆了一个 *Ef7* 基因的新等位基因 *Ef7-l*, 并构建了近等基因系 CL63。CL63 在长光照条件下能够延迟抽穗, 而在短光照条件下抽穗期无显著变化。长日照下 CL63 的各节间长度, 与受体亲本相比均有所增加, 茎秆直径变粗, 株高和千粒重显著增加。*Ef7-l* 在叶片中表达量最高, 且在不同光照条件下 *Ef7-l* 的表达量与野生型 *Ef7* 基因无显著差异; 在长光照下 *Ef7-l* 基因能够上调

OsPHYB 的转录水平。

References

- [1] Xing Y Z, Zhang Q F. Genetic and molecular bases of rice yield. *Annu Rev Plant Biol*, 2010, 61: 11.1–11.22
- [2] Guo L(郭梁), Zhang Z-H(张振华), Zhuang J-Y(庄杰云). Quantitative trait loci for heading date and their relationship with the genetic control of yield traits in rice (*Oryza sativa*). *Chin J Rice Sci* (中国水稻科学), 2012, 26(2): 235–245 (in Chinese with English abstract)
- [3] Wei X, Liu L, Xu J, Jiang L, Zhang W, Wang J, Zhai H, Wan J. Breeding strategies for optimum heading date using genotypic information in rice. *Mol Breed*, 2010, 25: 287–298
- [4] Wei X-J(魏祥进), Xu J-F(徐俊峰), Jiang L(江玲), Wang H-J(王洪俊), Zhou Z-L(周振玲), Zhai H-Q(翟虎渠), Wan J-M(万建民). Genetic analysis for the diversity of heading date of cultivated rice in China. *Acta Agron Sin* (作物学报), 2012, 38(1): 10–22 (in Chinese with English abstract)
- [5] Luan W, Chen H, Fu Y, Si H, Peng W, Song S, Liu W, Hu G, Sun Z, Xie D, Sun C. The effect of the crosstalk between photoperiod and temperature on the heading-date in rice. *PLoS ONE*, 2009, 4: 5891
- [6] Hu S-K(胡时开), Su Y(苏岩), Ye W-J(叶卫军), Guo L-B(郭龙彪). Advance in genetic analysis and molecular regulation mechanism of heading date in rice (*Oryza sativa* L.). *Chin J Rice Sci* (中国水稻科学), 2012, 26(3): 373–382 (in Chinese with English abstract)
- [7] Kojima S, Takahashi Y, Kobayashi Y, Monna L, Sasaki T, Araki T, Yano M. *Hd3a*, a rice ortholog of the *Arabidopsis FT* gene, promotes transition to flowering downstream of *Hd1* under short-day conditions. *Plant Cell Physiol*, 2002, 43: 1096–1105
- [8] Yano M, Katayose Y, Ashikari M, Yamanouchi U, Monna L, Fuse T, Baba T, Yamamoto K, Umehara Y, Nagamura Y, Sasaki T. *Hd1*, a major photoperiod sensitivity quantitative trait locus in rice, is closely related to the *Arabidopsis* flowering time gene *CONSTANS*. *Plant Cell*, 2000, 12: 2473–2484
- [9] Endo-Higashi N, Izawa T. Flowering time genes *Heading date 1* and *Early heading date 1* together control panicle development in rice. *Plant Cell Physiol*, 2011, 52: 1083–1094
- [10] Doi K, Izawa T, Fuse T, Yamanouchi U, Kubo T, Shimatani Z, Yano M, Yoshimura A. *Ehd1*, a B-type response regulator in rice, confer short-day promotion of flowering and controls *FT-like* gene expression independently of *Hd1*. *Genes Dev*, 2004, 18: 926–936
- [11] Xue W Y, Xing Y Z, Weng X Y, Zhao Y, Tang W J, Wang L, Zhou H J, Yu S B, Xu C G, Li X H, Zhang Q F. Natural variation in *Ghd7* is an important regulator of heading date and yield potential in rice. *Nat Genet*, 2008, 40: 761–767
- [12] Osugi A, Itoh H, Ikeda-Kawakatsu K, Takano M, Izawa T. Molecular dissection of the roles of phytochrome in photoperiodic flowering in rice. *Plant Physiol*, 2011, 157: 1128–1137
- [13] Wei X J, Xu J F, Guo H N, Jiang L, Chen S H, Yu C Y, Zhou Z L, Hu P S, Zhai H Q, Wan J M. *DTH8* suppresses flowering in rice, influencing plant height and yield potential simultaneously. *Plant Physiol*, 2010, 153: 1747–1758
- [14] Yan W, Wang P, Chen H, Zhou H, Li Q, Wang C, Ding Z, Zhang Y, Yu S, Xing Y, Zhang Q. A major QTL, *Ghd8* plays pleiotropic roles in regulating grain productivity, plant height, and heading date in rice. *Mol Plant*, 2011, 4: 319–330
- [15] Dai X, Ding Y, Tan L, Fu Y, Liu F, Zhu Z, Sun X, Sun X, Gu P, Cai H, Sun C. *LHD1*, an allele of *DTH8/Ghd8*, controls late heading date in common wild rice (*Oryza rufipogon*). *J Integr Plant Biol*, 2012, 54: 790–799
- [16] Tsuji H, Taoka K, Shimamoto K. Regulation of flowering in rice: two florigen genes, a complex gene network, and natural variation. *Curr Opin Plant Biol*, 2011, 14: 45–52
- [17] Song Y-L(宋远丽), Luan W-J(栾维江). Regulatory pathways of rice flowering in different light and temperature conditions. *Chin J Rice Sci* (中国水稻科学), 2012, 26(4): 383–392 (in Chinese with English abstract)
- [18] Fu C, Yang X O, Chen X, Chen W, Ma Y, Hu J, Li S. *OsEF3*, a homologous gene of *Arabidopsis ELF3*, has pleiotropic effects in rice. *Plant Biol*, 2009, 11: 751–757
- [19] Yuan Q, Saito H, Okumoto Y, Inoue H, Nishida H, Tsukiyama T, Teraishi M, Tanisaka T. Identification of a novel gene *ef7* conferring an extremely long basic vegetative growth phase in rice. *Theor Appl Genet*, 2009, 119: 675–684
- [20] Saito H, Ogiso-Tanaka E, Okumoto Y, Yoshitake Y, Izumi H, Yokoo T, Matsubara K, Hori K, Yano M, Inoue H, Tanisaka T. *Ef7* encodes an ELF3-like protein and promotes rice flowering by negatively regulating the floral repressor gene *Ghd7* under both short- and long-day conditions. *Plant Cell Physiol*, 2012, 53: 717–728
- [21] Yang Y, Peng Q, Chen G X, Li X H, Wu C Y. OsELF3 is involved in circadian clock regulation for promoting flowering under long-day conditions in rice. *Mol Plant*, 2013, 6: 202–215
- [22] Zhao J, Huang X, Ou-Yang X, Chen W, Du A, Zhu L, Wang S, Deng X, Li S. *OsELF3-1*, an ortholog of *Arabidopsis EARLY FLOWERING3*, regulates rice circadian rhythm and photoperiodic flowering. *PLoS ONE*, 2012, 7: 43705
- [23] Matsubara K, Ogiso-Tanaka E, Hori K, Ebana K, Ando T, Yano M. Natural variation in *Hd17*, a homolog of *Arabidopsis ELF3* that is involved in rice photoperiodic flowering. *Plant Cell Physiol*, 2012, 53: 709–716
- [24] Murray M G, Thompson W F. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucl Acids Res*, 1980, 5: 4321–4325
- [25] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using realtime quantitative PCR and the 2⁻(Delta Delta C(T)) method. *Methods*, 2001, 25: 402–408
- [26] Zhang H, Zhao Q, Sun Z Z, Zhang C Q, Feng Q, Tang S Z, Liang G H, Gu M H, Han B, Liu Q Q. Development and high-throughput genotyping of substitution lines carrying the chromosome segments of *indica* 9311 in the background of *japonica* Nipponbare. *J Genet Genomics*, 2011, 38: 603–611
- [27] Liu X L, Covington M F, Fankhauser C, Chory J, Wagner D R. *ELF3* encodes a circadian clock-regulated nuclear protein that functions in an *Arabidopsis PHYB* signal transduction pathway. *Plant Cell*, 2001, 13: 1293–1304
- [28] Kawano K, Tanaka A. Growth duration in relation to yield and nitrogen response in rice plant. *Jpn J Breed*, 1968, 18: 46–52