

# 水稻小粒矮秆突变体*sgd1(t)* 的表型分析及基因克隆

汪鹏 蔡跃 陈韦韦 马婧 陈新刚 唐小洁 尤小满 孔飞 张杰 燕海刚 汪国湘  
江玲 张文伟\* 万建民

(南京农业大学 作物遗传与种质创新国家重点实验室/长江流域杂交水稻协同创新中心/农业部长江中下游粳稻生物学与遗传育种重点实验室, 南京 210095; \* 通讯联系人, E-mail: zhangww@njau.edu.cn)

## Phenotyping and Gene Cloning of a Small-grain Dwarf Mutant *sgd1(t)* in Rice

WANG Peng, CAI Yue, CHEN Wei-wei, MA Jing, CHEN Xin-gang, TANG Xiao-jie, YOU Xiao-man, KONG Fei, ZHANG Jie, YAN Hai-gang, WANG Guo-xiang, JIANG Ling, ZHANG Wen-wei\*, WAN Jian-min

(State Key Laboratory of Crop Genetics and Germplasm Enhancement, Nanjing Agricultural University/The Yangtze River Valley Hybrid Rice Collaboration Innovation Center/Key Laboratory of Biology, Genetics and Breeding of japonica Rice in Mid-lower Yangtze River, Ministry of Agriculture, Nanjing 210095, China; \* Corresponding author, E-mail: zhangww@njau.edu.cn)

WANG Peng, CAI Yue, CHEN Weiwei, et al. Phenotyping and gene cloning of a small-grain dwarf mutant *sgd1(t)* in rice. *Chin J Rice Sci*, 2016, 30(1): 1-9.

**Abstract:** A small-grain dwarf mutant, designated as *sgd1(t)*, was identified from the T-DNA insertion mutant lines of Nipponbare. The mutant, genetically stable, was characterized by dwarf plant, small grain, dark green leaves and thick husk. Scanning electron microscope analysis on cell morphology of stem and hull revealed that stem cells in *sgd1(t)* failed to form normal cell column and vascular bundles, while epidermal cells with irregular shape in hulls were tightly packed, resulting in confusion in cell arrangement, and *sgd1(t)* was a GA-sensitive dwarf mutant. Genetic analysis showed that this trait of dwarfism was controlled by a pair of recessive nuclear gene. Through map-based cloning, the gene *sgd1(t)* was mapped in an interval of 230 kb between the markers DF13 and DF26 on the short arm of chromosome 9. There was a dwarf gene *BC12/GDD1* in this region. Sequence analysis showed that *sgd1(t)* had a single-base substitution (G to T) in the fourth exon of the gene, resulting in the replacement of glycine by valine in 186th conservative amino acid.

**Key words:** rice (*Oryza sativa* L.); small grain and dwarfism; gene cloning; *BC12/GDD1*; single-base substitution

汪鹏, 蔡跃, 陈韦韦, 等. 水稻小粒矮秆突变体 *sgd1(t)* 的表型分析及基因克隆. 中国水稻科学, 2016, 30(1): 1-9.  
**摘要:** 在日本晴 T-DNA 突变体库中筛选得到小粒矮秆突变体 *sgd1(t)*, 经多代自交稳定遗传。*sgd1(t)* 出现植株矮化、粒型圆小、叶色深绿和颖壳厚实等表型。茎秆及颖壳细胞扫描电镜结果表明, *sgd1(t)* 茎秆细胞不能形成正常细胞列、维管束发育异常; 颖壳表皮细胞排列紧密但不规则; GA 信号转导途径响应正常。遗传分析表明突变体 *sgd1(t)* 的矮秆性状受一对隐性核基因控制。采用图位克隆方法, 将 *sgd1(t)* 定位于第 9 染色体短臂 Indel 标记 DF13 和 DF26 之间, 物理距离约为 230 kb。该区间存在已克隆的矮秆基因 *BC12/GDD1*。测序结果显示, *sgd1(t)* 在该基因第 4 个外显子发生由 G 到 T 的单碱基突变, 导致第 186 位保守氨基酸由甘氨酸突变为缬氨酸。

**关键词:** 水稻; 小粒矮秆; 基因克隆; *BC12/GDD1*; 单碱基突变

**中图分类号:** Q343.5; Q785

**文献标识码:** A

**文章编号:** 1001-7216(2016)01-0001-09

株高是水稻株型建成重要的农艺性状之一, 直接影响水稻品种的生产潜力和抗倒伏性。20 世纪 60 年代, 绿色革命基因的成功应用, 使水稻单产提高了 20%~30%<sup>[1]</sup>, 之后杂种优势的利用和超级稻育种的兴起, 都建立在矮化育种的成果之上。由此可见, 株型改良一直以来都是水稻育种工作的主线

之一。

目前, 已定位的株高基因达到 132 个, 涉及水稻的全部染色体, 其中, 已克隆的株高基因达到 21 个 (<http://www.shigen.nig.ac.jp/rice/oryzabase>; <http://www.ricedata.cn>)。大多数株高基因与植物激素相关, 包括赤霉素 (Gibberellins, GA) 相关基

**收稿日期:** 2015-01-29; **修改稿收到日期:** 2015-05-09。

**基金项目:** 国家科技支撑计划资助项目(2011BAD35B02-02); 生物种业能力提升计划资助项目([2012]1961); 江苏省自主创新课题资助项目[CX(12)1003]。

因,如 *sd1*、*d35*、*slr1*、*gid2*<sup>[2-5]</sup>,油菜素内酯(Brassinosteroids, BR)相关基因,如 *d2*、*d61*<sup>[6-8]</sup>,以及独脚金内酯(Strigolactones, SL)相关基因,如 *d10*、*d14*等<sup>[9-11]</sup>。其中,GA合成途径相关基因 *SD1* 编码 GA<sub>20</sub>氧化酶,催化 GA<sub>53</sub>形成 GA<sub>20</sub>。在 *sd1* 突变体中,GA合成前体物质 GA<sub>53</sub>含量显著升高导致有活性的 GA<sub>20</sub>和 GA<sub>1</sub>减少,植株变矮。*D35* 编码 GA合成初始阶段的内根-贝壳杉烯氧化酶(*OsKO2*),*OsKO2*是催化贝壳杉烯向贝壳杉酸转化过程的关键酶之一,该基因突变使得GA合成受阻,导致半矮化表型。此外,高秆基因 *slr1*和矮秆基因 *gid2*均为GA信号转导途径基因。*SLR1*编码一个包含 DELLA 结构域的蛋白,是GA信号的抑制子;*GID2*编码GA信号转导中的一个正向调控因子,*GID2*是 SCF<sup>GID2</sup>复合体的一部分,该复合体能与磷酸化的 *SLR1*结合,引起泛素化介导的 *SLR1*蛋白的降解,使GA信号向下游传递<sup>[12-13]</sup>。因此,深入研究GA相关的株高突变体是一项非常重要的工作。

目前育种上利用的矮化基因主要是 *sd1*及其等位基因,这种单一的遗传背景已经成为水稻新品种选育的瓶颈<sup>[14]</sup>。因此,挖掘和鉴定新的矮化基因,开展株高相关基因的定位、克隆和功能研究,阐明其遗传、分子及生理生化机制,对水稻育种和生产具有十分重要的指导意义。在本研究中,我们从日本晴(Nipponbare)T-DNA突变体库中筛选得到一个小粒矮秆突变体 *sgd1(t)*<sup>[15]</sup>,并对 *sgd1(t)*进行表型分析及基因定位,结合细胞学观察和激素响应,拟初步揭示引起 *sgd1(t)*矮化表型的遗传和分子机理。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

小粒矮秆突变体 *sgd1(t)*是在日本晴(Nipponbare)T-DNA突变体库中筛选得到的,经潮霉素检测,发现并不具备潮霉素抗性基因的表型,因此 *sgd1(t)*应是在组培过程中发生的变异,同时 *sgd1(t)*经江苏南京和海南三亚多代自交繁殖,其突变特征及各方面农艺性状均已稳定。

### 1.2 遗传分析及定位群体的构建

2011年8月,在南京实验基地将 *sgd1(t)*与 Pusher、NJ-11、Dular 配制3个杂交组合用于定位,同时配制 *sgd1(t)*/日本晴和日本晴/*sgd1(t)*正反交组合用于遗传分析,按单株收获 F<sub>1</sub>种子,经海南南繁获得 F<sub>2</sub>种子。2012年7月,在南京土桥实验基

地单株种植各亲本和 F<sub>2</sub>群体;在成熟期,对 F<sub>2</sub>群体中株高正常的植株和矮秆植株,进行株数调查统计用于遗传分析。选用后代高矮分离相对明显的 *sgd1(t)*/Dular 的 F<sub>2</sub>群体用于定位,鉴定并选取其中具有小粒矮化表型的约2500个极端单株用于初定位及精细定位,同时筛选群体中分子标记为杂合型的单株,最终按单株收取极端单株及杂合型单株的种子。

### 1.3 农艺性状调查

抽穗期以播种至抽穗的天数来表示。在水稻抽穗期考查小粒矮秆突变体 *sgd1(t)*和野生型日本晴的多项重要形态指标,包括株高、单株分蘖数、穗长、每穗粒数、粒长、粒宽、粒厚、千粒重、节间长度等。

### 1.4 茎秆、颖壳的细胞学扫描电镜观察

分别取成熟期 *sgd1(t)*和日本晴的最上节间和种子;FAA固定液固定样品2 h以上,70%、80%、90%、100%乙醇梯度脱水,每级5 min,脱水剂体积高于材料的3倍;置于烘箱,临界点干燥;将样品用导电胶固定于铜台上,并将样品调整至适合观察的位置;样品喷金,扫描电镜观察。

### 1.5 GA处理实验

采用何祖华等<sup>[16]</sup>的方法进行实验,略作改动。

1)将 *sgd1(t)*和日本晴种子用1%的次氯酸钠溶液浸种1 h,用无菌水清洗3次,然后将种子浸入水中24 h,黑暗条件下置于30℃培养箱生长1 d;

2)当种子露白时,挑选发芽一致的种子转移至含有梯度浓度的 GA<sub>3</sub>溶液的1%琼脂培养基上,置于14 h光照/10 h黑暗、25℃的培养箱生长,并开始计时;

3)10 d后,测其第2叶鞘伸长长度。同时设置清水对照,每个梯度实验设置3个重复。

### 1.6 色素含量的测定

*sgd1(t)*和日本晴植株在抽穗后至成熟前,植株叶片颜色差异显著。随机取5片叶片,剪成长宽1 cm(0.02 g左右)片段后,称其实际重量,将其浸泡于5 mL的95%的乙醇溶液中,在室温黑暗条件下浸泡48 h。用分光光度计测量665 nm、649 nm和470 nm三个波长下溶液的光密度。根据 Lichtenthaler等<sup>[17]</sup>对 Arnon 法进行修正后提出的计算公式:

$$C_a = 13.95D_{665} - 6.88D_{649};$$

$$C_b = 24.96D_{649} - 7.32D_{665};$$

$$C_x = (1000D_{470} - 2.05C_a - 114C_b)/245。$$

求得各色素的浓度后,再依据:细胞色素含量( $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ )=(叶绿素的浓度 $\times$ 提取液体积 $\times$ 稀释倍数)/样品鲜重,计算组织中各细胞色素的含量。*sgd1(t)* 和日本晴分别取 3 个植株进行测定。

1.7 基因定位

利用已发表的分布于水稻 12 条染色体上的 SSR 序列,采用极端个体分组和隐性基因组分析法,取 *sgd1(t)* /Pusher  $F_2$  群体中 10 株极端个体构建两个隐性池,利用全基因组中在 *sgd1(t)* 和 Pusher 间存在多态的标记进行连锁分析,找到与 *sgd1(t)* 基因连锁的分子标记。根据基因初步的定位结果,在目标基因附近区域的 BAC 序列上继续设计分子标记,同时扩大定位群体对基因进行精细定位;并利用已公布的日本晴数据库中的序列信息,找到各标记所对应的 BAC 克隆,构建覆盖目的基因的物理图谱。

SSR 标记的开发:利用日本水稻基因组研究计划(<http://rgp.dna.affrc.go.jp/IRGSP/index.html>)下载粳稻日本晴的第 9 染色体的 BAC/PAC 序列;将 400~500 bp 长的序列在 NCBI 上(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/Genome/plantBlast.shtml>)与相应的 93-11 序列进行比对,如果两者的 SSR 重复次数有差异,利用 Primer Premier 5.0 软件设计合成 SSR 引物。

Indel 标记的开发:利用 NCBI 的 BLAST 程序将相应区段粳稻日本晴基因组的克隆序列与籼稻 93-11 基因组的克隆序列进行比对(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>),据此发现插入/缺失(insertion/deletion, InDel)序列差异(选择标准:100~200 bp 之间大小的片段有 3 bp 以上的差异)。然

后利用 Primer Premier 5.0 引物设计软件在其两侧设计引物。研究设计并用于精细定位的多态性 SSR 及 InDel 引物见表 2。

2 结果与分析

2.1 突变体 *sgd1(t)* 表型分析

由图 1-A 和表 1 可以看出,突变体 *sgd1(t)* 表现出明显的矮化,其中野生型日本晴的株高为  $106.79 \pm 9.90$  cm,而 *sgd1(t)* 的株高为  $36.64 \pm 3.01$  cm,只有野生型的 31.82%。*sgd1(t)* 植株 5 个节间和日本晴相比,都明显缩短,但缩短比例各不相同,倒 1、2、3、4、5 节间分别为野生型的 32.1%、43.0%、44.4%、69.9% 和 50.0%(图 1-C, D)。除了植株矮化外,*sgd1(t)* 还表现出多分蘖的特征(图 1-A, 表 1),抽穗期延迟了 10 d 左右。此外,*sgd1(t)* 颖壳表皮粗糙、厚实,粒长、粒宽、粒厚、千粒重及每穗粒数均显著下降(表 1)。

*sgd1(t)* 的叶片深绿,叶绿素含量测定表明,Chl a/b 比值与野生型相比没有明显差异,但 *sgd1(t)* 的色素含量明显高于野生型(图 2)。

2.2 *sgd1(t)* 茎秆及颖壳切面细胞学形态观察

将茎秆进行纵切后观察,日本晴节间分生区细胞呈规则的长方形,排列整齐,形成纵向细胞列(图 3-A);*sgd1(t)* 植株中,未伸长茎节的细胞呈方形甚至圆形,排列散乱,不能形成正常细胞列,在纵向上不能正常伸长(图 3-B)。表明 *sgd1(t)* 节间细胞不伸长是其节间未伸长的主要原因。

从外向内,日本晴的横切面由厚壁细胞、维管束及薄壁细胞组成;维管束整齐均匀地分布在薄壁细胞之间(图 3-C, E)。而在 *sgd1(t)* 植株中,茎秆的

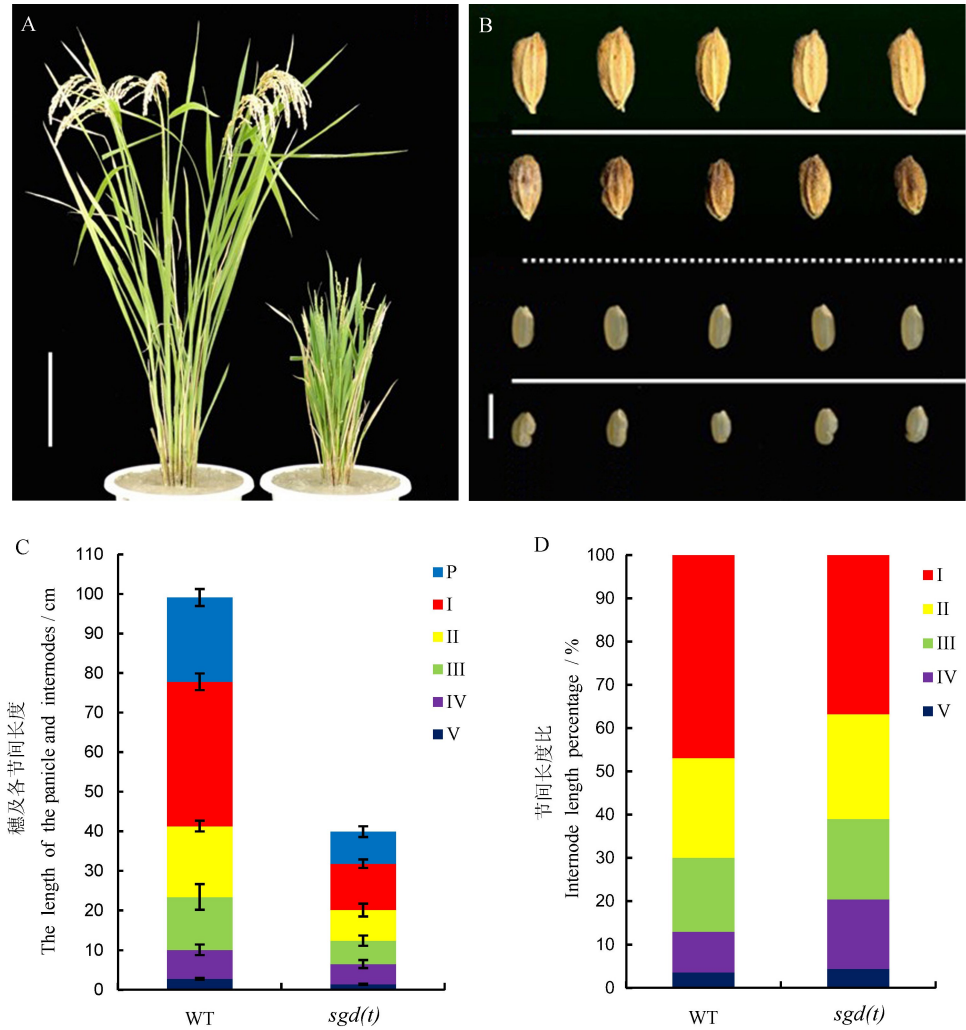
表 1 日本晴和 *sgd1(t)* 的主要农艺性状比较

Table 1. Comparison of agronomic traits between Nipponbare and *sgd1(t)* .

农艺性状 Agronomic traits	日本晴 Nipponbare	<i>sgd1(t)</i>
株高 Plant height/cm	$106.79 \pm 9.90$	$36.64 \pm 3.01^{**}$
单株分蘖数 Tiller number per plant	$19.6 \pm 3.44$	$22.0 \pm 4.96^{**}$
粒长 Grain length/mm	$7.81 \pm 0.38$	$5.42 \pm 0.30^{**}$
粒宽 Grain width/mm	$3.21 \pm 0.15$	$2.37 \pm 0.45^{**}$
粒厚 Grain thickness/mm	$2.17 \pm 0.11$	$1.13 \pm 0.25^{**}$
千粒重 1000-grain weight/g	$25.58 \pm 1.34$	$18.21 \pm 1.51^{**}$
每穗粒数 No. of grains per panicle	$114.50 \pm 20.17$	$30.62 \pm 6.10^{**}$

数据表示为平均值 $\pm$ 标准差 ( $n=10$ ); \*\* 表示经  $t$ -测验在 0.01 水平上差异显著。

Data are the mean $\pm$ SD ( $n=10$ ); \*\*, Significant at  $P<0.01$  by  $t$ -test.



A—日本晴和 *sgdl(t)* 在成熟期植株形态比较,标尺 30 cm; B—日本晴和 *sgdl(t)* 稻谷及糙米表型( $n=5$ ),标尺 5 mm; C,D—穗及各节间长度模型。P, I, II, III, IV, V 分别代表稻穗,倒 1、2、3、4、5 节间( $n=10$ )。  
A, Gross morphology of Nipponbare and *sgdl(t)* at the mature stage, bar=30 cm; B, Morphology of seed and brown rice of Nipponbare and *sgdl(t)* ( $n=5$ ), bar=5 mm; C and D, Diagram of the length of the panicles and internodes ( $n=10$ ). P, I, II, III, IV, V indicate the panicle and the five upper internodes, respectively.

图 1 日本晴和 *sgdl(t)* 性状比较  
Fig. 1. Morphological characterization of Nipponbare and *sgdl(t)*.

横切面结构显示,茎秆的薄壁细胞较野生型小,且发育不成熟,但细胞层数有所增加。*sgdl(t)* 茎秆的维管束发育不正常,未能形成正常的中空结构,且散乱地分布在薄壁细胞之间。这说明 *sgdl(t)* 茎秆维管束的发育受到了影响(图 3-D,F)。

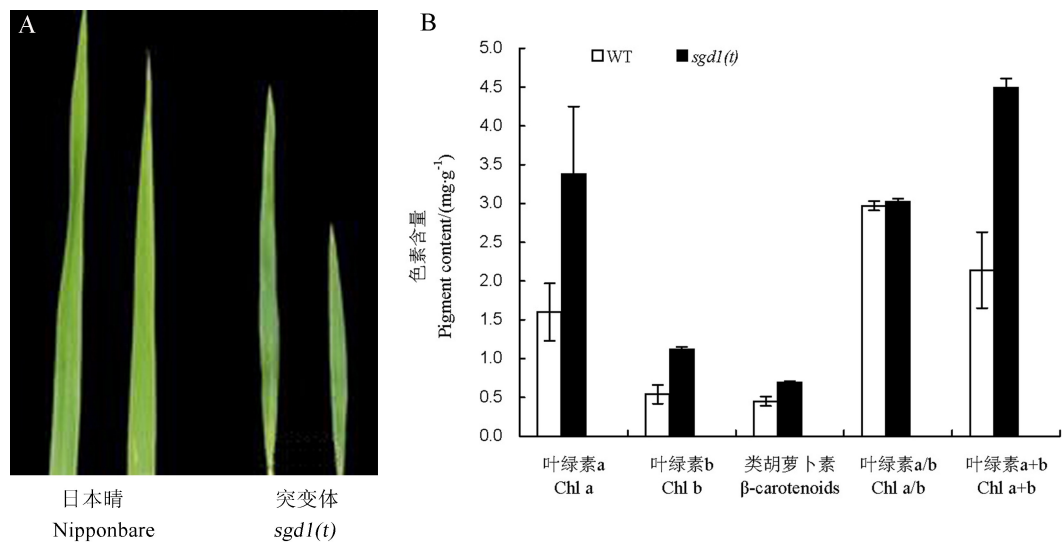
通过电镜扫描可以观察到,日本晴颖壳表皮细胞呈圆形、排列整齐、细胞间隙均匀有规律,而突变体 *sgdl(t)* 表皮细胞排列紧密、呈不规则状、细胞形状发生改变,导致整体细胞呈现小突起状(图 4-A,B);同时对颖壳中部进行横切面扫描,结果显示

日本晴横切面细胞能够均衡地分布在表皮细胞之下,而突变体 *sgdl(t)* 横切面细胞不规则,细胞形态发生变化,有大有小,从而导致细胞间填充物散乱(图 4-C,D)。

2.3 *sgdl(t)* 对 GA 的敏感性

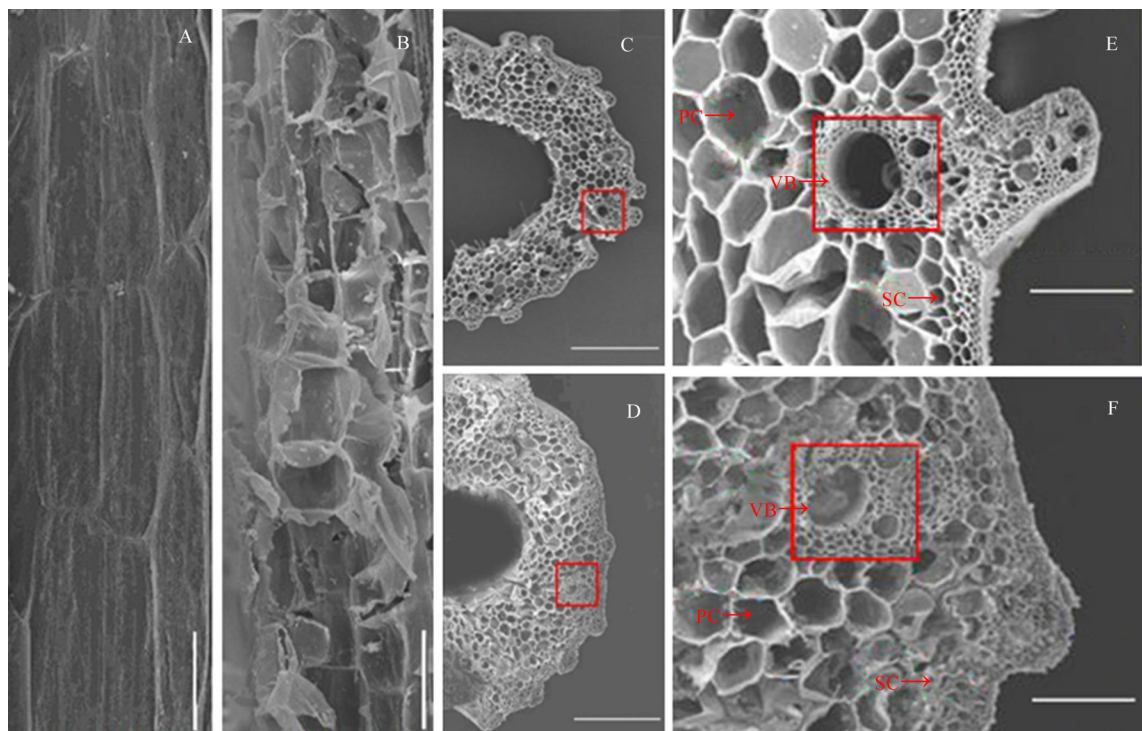
根据对外源 GA 的反应,与 GA 相关的矮化突变可分为 GA 缺陷型突变和 GA 钝感型突变<sup>[18]</sup>, GA 缺陷型突变指 GA 代谢途径受阻导致内源 GA 含量降低甚至缺乏<sup>[19]</sup>,外施 GA 能恢复野生型表型;GA 钝感型突变指由于 GA 信号传导受阻导致对





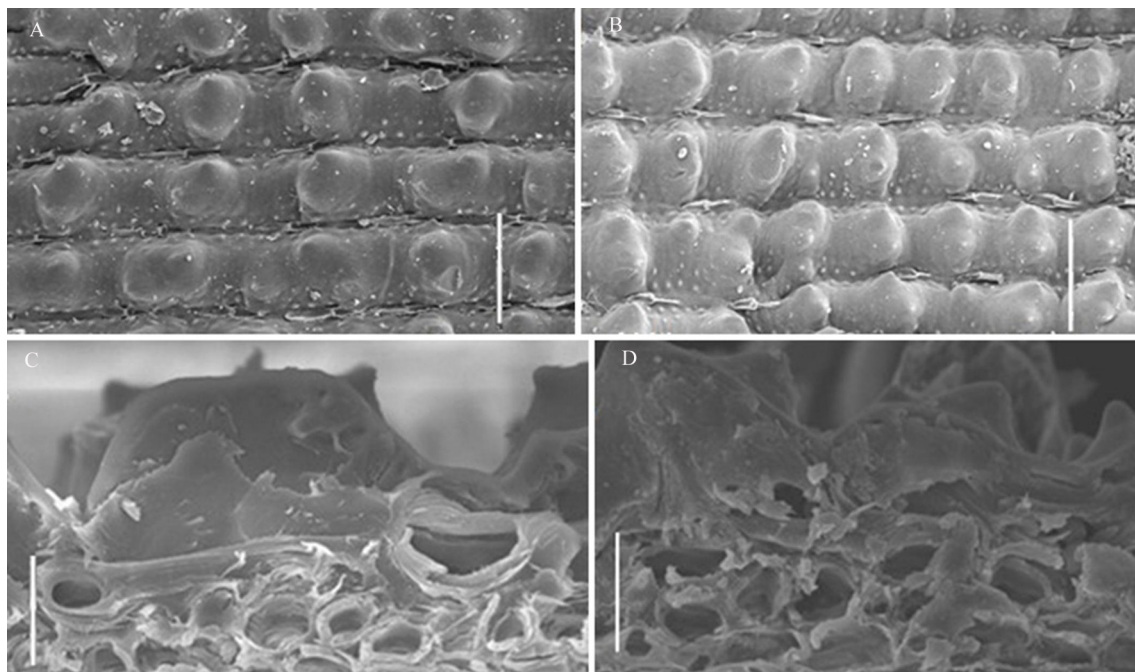
A—叶片颜色;B—色素含量水平( $n=3$ )。Chl a—叶绿素 a; Chl b—叶绿素 b;  $\beta$ -carotenoids—类胡萝卜素; Chl a/b—叶绿素 a 与叶绿素 b 的比值; Chl a+b—叶绿素 a 与叶绿素 b 之和。  
A, Leave color; B, Pigment contents ( $n=3$ ). Chl a, Chlorophyl a; Chl b, Chlorophyl b; Chl a/b, Ratio of chlorophyl a to chlorophyl b; Chl a+b, Sum of chlorophyl a and chlorophyl b.

图 2 日本晴和 *sgd1(t)* 的叶片  
Fig. 2. Leaves of Nipponbare and *sgd1(t)*.



A、B 茎秆纵切面,标尺 100  $\mu\text{m}$ ; C、D 茎秆横切面,标尺 1mm; E、F 为 C、D 方框区域放大图,标尺 100  $\mu\text{m}$ ; SC, 厚壁细胞; VB,维管束; PC, 薄壁细胞。  
A and B, Longitudinal sections, bar=100  $\mu\text{m}$ ; C and D, Transverse sections, bar=1 mm; E and F, Magnifications of indicated regions in C and D, bar=100  $\mu\text{m}$ . SC, Sclerenchyma cells; VB, Vascular bundle; PC, Parenchyma cells.

图 3 日本晴和 *sgd1(t)* 的茎秆切面电镜扫描  
Fig. 3. Electronic microscopy analysis of culm cells of Nipponbare and *sgd1(t)*.



A,B分别为野生型和突变体的颖壳表皮细胞,标尺 200  $\mu\text{m}$ ; C,D分别为野生型和突变体中部颖壳横切面细胞,标尺 50  $\mu\text{m}$ 。

A and B, Epidermis cells, bar=200  $\mu\text{m}$ ; C and D, Transverse sections, bar=50  $\mu\text{m}$ .

图4 日本晴和 *sgdl(t)* 的颖壳电镜扫描

Fig. 4. Electronic microscopy analysis of the glume cells of Nipponbare and *sgdl(t)*.

GA响应的改变<sup>[20]</sup>,外施GA不能恢复到野生型表型。由图5可以看出,不同浓度GA<sub>3</sub>处理野生型和*sgdl(t)*发现,两者第2叶鞘都明显伸长,说明*sgdl(t)*对GA敏感,低浓度能使其恢复部分表型;GA<sub>3</sub>浓度为 $10^{-4}$  mol/L,*sgdl(t)*基本上能和野生型达到同一高度,证实了*sgdl(t)*的GA信号转导途径正常,外施GA能够得到响应(图5)。

## 2.4 *sgdl(t)* 的遗传分析

为鉴定*sgdl(t)*是由显性还是隐性基因控制,将*sgdl(t)*与几个籼稻广亲和高秆品种配组,然后对各组合株高性状进行调查,结果发现所有杂种F<sub>1</sub>的株高都稍高于高值亲本(即高秆父本)。由此可知F<sub>1</sub>中存在超亲遗传,推测*sgdl(t)*矮秆性状受隐性基因控制;同时*sgdl(t)*和日本晴正反交的F<sub>1</sub>株高相当,表明控制*sgdl(t)*的矮秆基因受核基因控制,与细胞质遗传无关。同时调查*sgdl(t)*/Dular组合的F<sub>2</sub>群体株高,发现在F<sub>2</sub>群体里的株高分离比例经过卡方检验( $\chi^2=2.37 < \chi^2_{0.05}=3.84$ )大致符合3:1分离(图6),这说明*sgdl(t)*的矮秆表型由隐性单核基因控制。

## 2.5 *sgdl(t)* 基因的定位

利用*sgdl(t)*/Dular F<sub>2</sub>群体56个极端单株进行连锁分析,将其中的10个等量提取DNA构成混池,发现在第9染色体上SSR标记RM444和RM524与矮秆基因连锁,在此位置附近用其他引物对F<sub>2</sub>群体极端个体进行验证,发现Indel标记D28和BC3也与矮秆基因连锁,初步将基因定位在Indel标记C3和SSR标记RM219之间,遗传距离为20.7 cM。

在初定位的基础上开发标记,最终将矮秆基因定位在第9染色体短臂末端Indel标记DF26和DF13之间,物理距离为230 kb(图7-A,表2)。使用Rice Genome Annotation Project网站(<http://rice.plantbiology.msu.edu/>)预测该定位区间内的基因,在该区段内有一个已报道的矮秆基因*GDD1*(LOC\_Os09g02650)<sup>[21]</sup>。*GDD1*是一种具有转录调控活性的驱动蛋白,可以通过调控水稻中GA的合成来调节细胞的伸长,与之前报道的脆秆基因*BC12*<sup>[22]</sup>等位。鉴于此,将*BC12/GDD1*确定为候选基因。使用DNASar软件将测序结果与从

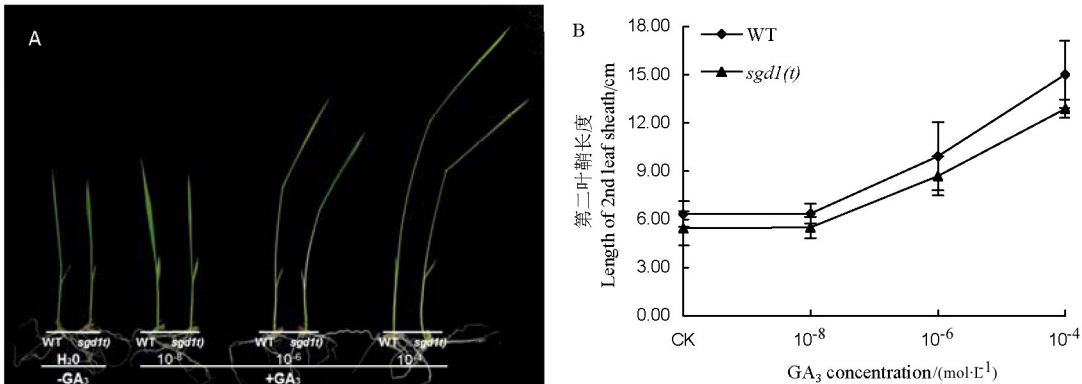


图 5 GA<sub>3</sub> 处理野生型和 *sgd1(t)* 的幼苗表型(A)及第 2 叶鞘长度(B) ( $n=3$ )  
Fig. 5. Seeding phenotype(A) and length of second leaf sheath(B) with GA<sub>3</sub> treatment between wild type and *sgd1(t)* ( $n=3$ ).

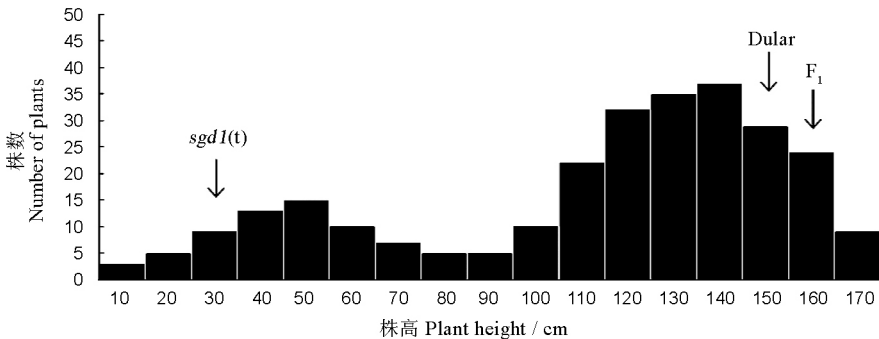


图 6 *sgd1(t)* 与 Dular 杂交 F<sub>2</sub> 群体株高分离频率  
Fig. 6. Distribution of plant height in F<sub>2</sub> population derived from *sgd1(t)* /Dular.

NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 查到的 *BC12/GDD1* 的基因序列比对分析,发现突变体的 *BC12/GDD1* 基因在第 4 个外显子发生单碱基突变,由 G 变为 T(图 7-B),导致第 186 位甘氨酸突变为缬氨酸。

3 讨论

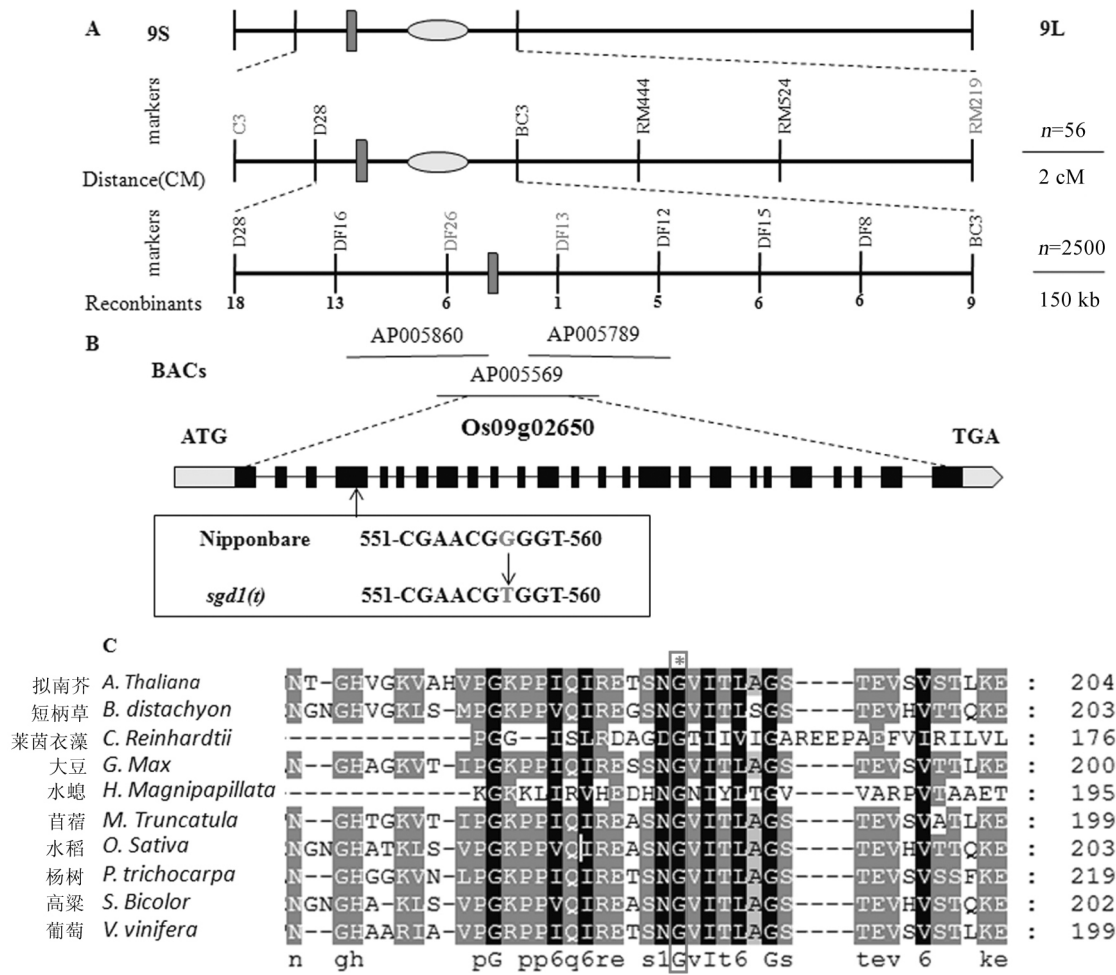
根据水稻前 4 到 5 个节间的伸长模式将矮化突

变体分为五种,即“dn”穗及以下节间均缩短、“dm”倒 1 节缩短、“d6”穗颈节以下节间缩短、“nl”上部节间比下部节间显著缩短和“sh”穗颈节缩短<sup>[23]</sup>。相对于野生型, *sgd1(t)* 穗及各节间均有不同程度的缩短,因此属于“dn”型。

通过图位克隆方法将突变基因 *sgd1(t)* 定位到水稻第 9 染色体 Indel 标记 DF26 和 DF13 之间约 230kb 区域。Zhang 等<sup>[21]</sup> 和 Li 等<sup>[22]</sup> 在该区域克隆

表 2 用于精细定位的多态性 Indel 引物  
Table 2. Indel markers designed for fine-mapping.

标记	正向引物序列(5'-3')	反向引物序列(5'-3')
Marker	Sequence of forward primer(5'-3')	Sequence of reverse primer(5'-3')
D28	CATATCAACTAGCCCTACCG	GTCCATTATTGGCGTCCC
DF16	CAGATGGAGGTTACTCTGCTTCG	TAGTCAATGTGCCACCAGTAGGG
DF26	ATGGAATTAACCGTGGCT	GCTTTGGCCTCCATCAG
DF13	TATTGCACCTGCCTATTCTG	TTGATGCCACCATCCTCTT
DF12	TCTCATAAGCCCAAATCGT	TAGTAGTCGTGCGCGTCAT
DF15	ATCAGGGCATTACCTCCG	TAGCACCCACAGCTCAAA
BC3	TGATAGTGCAACGGCAAGG	GTGGAGTTGTCAGCAGTGG



A—*sgd1(t)* 的物理图谱; B—*sgd1(t)* 的突变位点; C—BC12/GDD1 蛋白同源序列比对。  
A, Physical mapping of *sgd1(t)*; B, Mutation site of *sgd1(t)*; C, Comparison of amino acid sequences of BC12/GDD1.

图 7 *sgd1(t)* 的图位克隆

Fig. 7. Map-based cloning of *sgd1(t)*.

了矮秆基因 *BC12/GDD1*, 该基因编码一个 kinesin-4 亚家族的驱动蛋白, 参与调控细胞周期进程、纤维素微丝的排布及细胞壁的组成, 通过调控 GA 生物合成途径来介导细胞伸长。表型比较发现, *BC12/GDD1* 突变体 *bc12*、*gdd1* 与 *sgd1(t)* 在植株表型上相似度很高, 都表现为株高降低, 穗及各节间长度显著缩短。测序结果显示, *sgd1(t)* 在该基因第 4 个外显子处发生单碱基突变, 导致保守氨基酸的改变。由此, 我们推定 *sgd1(t)* 编码基因与 *BC12/GDD1* 等位。

对比基因突变位点可以发现, *bc12* 在基因第 4 个外显子处发生 26 bp 的缺失, 引起移码突变; *gdd1* 在基因第 19 和 20 个外显子之间发生 27 bp 缺失, 阻断 mRNA 的剪切, 而 *sgd1(t)* 在该基因第

4 个外显子处发生单碱基由 G 到 T 的突变, 使甘氨酸突变为缬氨酸。因此, *sgd1(t)* 与 *bc12* 及 *gdd1* 在突变位点及方式上存在差异。kinesin-4 亚家族蛋白含有三个高度保守的结构域: N 端驱动蛋白结构域、螺旋卷曲结构域和 C 端球形结构域<sup>[24]</sup>。在 *BC12/GDD1* 中也存在一个基于微管且依赖 ATP 酶的驱动蛋白结构域, 包含第 1 到 405 个氨基酸, 其中第 186 位甘氨酸在动植物中高度保守(图 7-C)。但在 *sgd1(t)* 中, 第 186 位甘氨酸突变为缬氨酸, 可能影响了这个驱动蛋白结构域的构象, 从而不利于该蛋白对微管的结合及移动, 进而导致微管排布异常, 纤维素微丝异常沉积, 细胞形态发生改变。这与 *AtKRP125c* 突变引起皮层微管组织混乱和细胞形状异常的情况类似<sup>[25]</sup>。但 *sgd1(t)* 仅仅是单碱基



替换,突变基因仍具有部分功能,因此可能未产生类似 *bc12/gddl* 的脆秆表型。

目前,克隆的水稻矮秆基因大多数来自粳稻,但这些矮秆材料农艺性状较差,难以在育种中直接利用,而一些矮秆的弱等位基因突变体不良性状相对缓和,在株型塑造上存在应用价值。本研究鉴定的小粒矮秆突变体 *sgd1(t)* 是已报道的矮秆基因 *BC12/GDD1* 的复等位基因,株高降低,但茎秆机械强度没有下降。因此,这对于培育高产、抗倒伏的水稻品种具有积极意义。

### 参考文献:

- [1] Peng J, Richards D E, Hartley N M, et al. 'Green revolution' genes encode mutant gibberellin response modulators. *Nature*, 1999, 400(6741): 256-261.
- [2] Itoh H, Ueguchi-Tanaka M, Sentoku N, et al. Cloning and functional analysis of two gibberellin 3 beta-hydroxylase genes that are differently expressed during the growth of rice. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, 98(15): 8909-8914.
- [3] Ueguchi-Tanaka M, Ashikari M, Nakajima M, et al. *GIBBERELLIN INSENSITIVE DWARF1* encodes a soluble receptor for gibberellin. *Nature*, 2005, 437(7059): 693-698.
- [4] Sasaki A, Ashikari M, Ueguchi-Tanaka M, et al. Green revolution: A mutant gibberellin-synthesis gene in rice. *Nature*, 2002, 416(6882): 701-702.
- [5] Gomi K, Sasaki A, Itoh H, et al. GID2, an F-box subunit of the SCF E3 complex, specifically interacts with phosphorylated SLR1 protein and regulates the gibberellin-dependent degradation of SLR1 in rice. *Plant J*, 2004, 37(4): 626-634.
- [6] Yamamuro C, Ihara Y, Wu X, et al. Loss of function of a rice brassinosteroid insensitive1 homolog prevents internode elongation and bending of the lamina joint. *Plant Cell*, 2000, 12(9): 1591-1606.
- [7] Hong Z, Ueguchi-Tanaka M, Umemura K, et al. A rice brassinosteroid-deficient mutant, *ebisu dwarf (d2)*, is caused by a loss of function of a new member of cytochrome P450. *Plant Cell*, 2003, 15(12): 2900-2910.
- [8] Li H, Jiang L, Youn J H, et al. A comprehensive genetic study reveals a crucial role of CYP90D2/D2 in regulating plant architecture in rice (*Oryza sativa*). *New Phytol*, 2013, 200(4): 1076-1088.
- [9] Arite T, Iwata H, Ohshima K, et al. DWARF10, an RMS1/MAX4/DAD1 ortholog, controls lateral bud outgrowth in rice. *Plant J*, 2007, 51(6): 1019-1029.
- [10] Arite T, Umehara M, Ishikawa S, et al. *d14*, a strigolactone-insensitive mutant of rice, shows an accelerated outgrowth of tillers. *Plant Cell Physiol*, 2009, 50(8): 1416-1424.
- [11] Zhou F, Lin Q, Zhu L, et al. D14-SCF<sup>D8</sup>-dependent degradation of D53 regulates strigolactone signalling. *Nature*, 2013, 504(7480): 406-410.
- [12] Sasaki A, Itoh H, Gomi K, et al. Accumulation of phosphorylated repressor for gibberellin signaling in an F-box mutant. *Science*, 2003, 299(5614): 1896-1898.
- [13] Hirano K, Asano K, Tsuji H, et al. Characterization of the molecular mechanism underlying gibberellin perception complex formation in rice. *Plant Cell*, 2010, 22(8): 2680-2696.
- [14] 黄耀祥. 半矮秆、早长根深、超高产、特优质中国超级稻生态育种工程. 广东农业科学, 2001, 3(3): 2-6.  
Huang Y X. Ecological breeding engineering for maximum yield, super high quality of China super-rice with semi-dwarf and early growth and deep root. *Guangdong Agric Sci*, 2001, 3(3): 2-6. (in Chinese with English abstract)
- [15] 陈韦韦. 水稻小粒矮秆突变体 *sgd1(t)* 的表型分析及基因精细定位. 南京: 南京农业大学, 2011.  
Chen W W. Phenotype analysis and gene fine mapping of *sgd1(t)*, a small-grain dwarfness mutant in rice (*Oryza Sativa* L.). Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2011. (in Chinese with English abstract)
- [16] 何祖华, Etoukossi, 石春海, 等. 水稻株高基因对 GA<sub>3</sub> 敏感性及其与酶的关系. 中国水稻科学, 1993, 7(3): 143-147.  
He Z H, Etoukossi, Shi C H, et al. Sensitivity of plant height genes to GA<sub>3</sub> and their relationship with enzymes in rice. *Chin J Rice Sci*, 1993, 7(3): 189-196. (in Chinese with English abstract)
- [17] Lichtenthaler H K. Chlorophylls and carotenoids: Pigments of photosynthetic biomembranes. *Methods Enzymol*, Academic Press, 1987, 350-382.
- [18] Mitsunaga S, Tashiro T, Yamaguchi J. Identification and characterization of gibberellin-insensitive mutants selected from among dwarf mutants of rice. *Theor Appl Genet*, 1994, 87(6): 705-712.
- [19] Hedden P, Phillips A L. Gibberellin metabolism: New insights revealed by the genes. *Trends Plant Sci*, 2000, 5(12): 523-530.
- [20] Gomi K, Matsuoka M. Gibberellin signalling pathway. *Curr Opin Plant Bio*, 2003, 6(5): 489-493.
- [21] Li J, Jiang J, Qian Q, et al. Mutation of rice BC12/GDD1, which encodes a kinesin-like protein that binds to a GA biosynthesis gene promoter, leads to dwarfism with impaired cell elongation. *Plant Cell*, 2011, 23(2): 628-640.
- [22] Zhang M, Zhang B, Qian Q, et al. Brittle Culm 12, a dual-targeting kinesin-4 protein, controls cell-cycle progression and wall properties in rice. *Plant J*, 2010, 63(2): 312-328.
- [23] 马良勇, 包劲松, 李西明, 等. 水稻矮生基因的克隆和功能研究进展. 中国水稻科学, 2009, 23(1): 1-11.  
Ma L Y, Bao J S, Li X M, et al. Progress on cloning and functional analysis of dwarfism related genes in rice. *Chin J Rice Sci*, 2009, 23(1): 1-11. (in Chinese with English abstract)
- [24] Mazumdar M, Misteli T. Chromokinesins: Multitalented players in mitosis. *Trends Cell Biol*, 2005, 15(7): 349-355.
- [25] Bannigan A, Scheible W, Lukowitz W, et al. A conserved role for kinesin-5 in plant mitosis. *J Cell Sci*, 2007, 120: 2819-2827.