

引用格式:

黄希来, 姚威, 林晋军, 陈倩茹, 何贝, 袁筱, 徐铨扬, 刘雄伦, 刘金灵. 茶陵野生稻种皮颜色驯化基因的分子标记辅助选择研究[J]. 湖南农业大学学报(自然科学版), 2026, 52(2): 1–12.

HUANG X L, YAO W, LIN J J, CHEN Q R, HE B, YUAN X, XU C Y, LIU X L, LIU J L. Molecular marker-assisted selection of domestication genes for pericarp color in Chaling wild rice[J]. Journal of Hunan Agricultural University(Natural Sciences), 2026, 52(2): 1–12.

投稿网址: <http://xb.hunau.edu.cn>



茶陵野生稻种皮颜色驯化基因的分子标记辅助选择研究

黄希来¹, 姚威¹, 林晋军¹, 陈倩茹¹, 何贝¹, 袁筱¹, 徐铨扬¹, 刘雄伦^{1,2,3,4}, 刘金灵^{1,2,3,4*}

(1. 湖南农业大学农学院, 湖南 长沙 410128; 2. 国家南方粮油作物协同创新中心, 湖南 长沙 410128;
3. 作物基因工程湖南省重点实验室, 湖南 长沙 410128; 4. 岳麓山实验室, 湖南 长沙 410128)

摘要: 以茶陵野生稻(CL)、4个栽培稻及CL与栽培稻三交(CL/伦5S//R996)的F₂代分离群体为材料, 利用分子标记辅助选择(MAS)技术对其红色种皮驯化性状基因*Rc*和*Rd*进行选择剔除。结果表明: 茶陵野生稻*Rc*与栽培稻中的等位基因序列差异明显, 其中第6外显子内插入了14 bp的InDel序列, 导致茶陵野生稻中*Rc*等位基因编码序列延长, 增加了1个外显子, 而栽培稻中因缺失此片段, 导致翻译过程提前终止; 茶陵野生稻与栽培稻中的*Rd*等位基因序列无明显差异, 说明*Rc*是控制茶陵野生稻棕红色种皮形成的关键基因; 4个功能分子标记(*Rc*-1、*Rc*-2、*Rc*-3、*Rc*-4)中, *Rc*-2、*Rc*-3和*Rc*-4 3个标记表现出多态性, 可用于群体的MAS选择; 将*Rc*-2、*Rc*-3和*Rc*-4标记转化为高分辨率熔解曲线标记, 可实现对*Rc*基因型的非凝胶电泳高通量鉴定。

关键词: 野生稻; 驯化性状; 种皮颜色; 分子标记辅助选择(MAS); 高分辨率熔解曲线标记

中图分类号: S511.03

文献标志码: A

文章编号: 1007-1032(2026)02-0001-12

Molecular marker-assisted selection of domestication genes for pericarp color in Chaling wild rice

HUANG Xilai¹, YAO Wei¹, LIN Jinjun¹, CHEN Qianru¹, HE Bei¹, YUAN Xiao¹,
XU Chengyang¹, LIU Xionglun^{1,2,3,4}, LIU Jinling^{1,2,3,4*}

(1. College of Agronomy, Hunan Agricultural University, Changsha, Hunan 410128, China; 2. Southern Regional Collaborative Innovation Center for Grain and Oil Crops in China, Changsha, Hunan 410128, China; 3. Hunan Provincial Key Laboratory of Crop Gene Engineering, Changsha, Hunan 410128, China; 4. Yuelushan Laboratory, Changsha, Hunan 410128, China)

Abstract: The Chaling wild rice(CL), four cultivated rice accessions, and a segregating F₂ population derived from CL and a three-way cross of CL/Lun5S//R996 were used to select against the domestication genes *Rc* and *Rd* for pericarp color using marker-assisted selection(MAS). Significant sequence divergence was identified between the CL *Rc* allele and those of cultivated cultivars. Notably, a 14-bp InDel insertion in exon 6 of the CL *Rc* gene introduced an additional exon, thereby extending the coding sequence, whereas this insertion is absent in cultivated cultivars, leading to premature termination of translation. In contrast, the *Rd* alleles showed no functional variation between CL and cultivated rice, suggesting that *Rc* is the critical gene responsible for the brown-red pericarp of CL. Four functional markers(*Rc*-1, *Rc*-2, *Rc*-3 and *Rc*-4) were developed, of which *Rc*-2, *Rc*-3, and *Rc*-4 showed polymorphism between CL and cultivated rice and were effective for MAS. These markers were further converted into high-resolution melting(HRM) markers, enabling high-throughput genotyping without electrophoresis.

收稿日期: 2025-05-14

修回日期: 2025-09-30

基金项目: 湖南省自然科学基金项目(2025JJ50127); 湖南省教育厅科学研究计划项目(24A0165)

作者简介: 黄希来(1999—), 男, 湖南常德人, 硕士研究生, 主要从事水稻分子遗传研究, 1792267706@qq.com; *通信作者, 刘金灵, 博士, 副教授, 主要从事水稻分子遗传与分子育种研究, liujinling@hunau.edu.cn

Keywords: wild rice; domestication trait; pericarp color; marker-assisted selection(MAS); high resolution melting marker

水稻是保障世界粮食安全的重要粮食作物之一^[1]。随着全球人口的不断增长,持续提升水稻产量和品质,满足人口增长对粮食的需求,成为水稻育种面临的重大任务。但是,当前育种利用的核心骨干亲本过于集中,导致推广水稻品种同质化程度高、品种间遗传背景狭窄、遗传多样性偏低等问题,严重限制了水稻产量潜力的进一步提升^[2]。引入新的种质资源或优异基因,拓宽水稻品种的遗传基础成为当前水稻育种中亟须解决的问题。

野生稻是栽培稻的驯化祖先,蕴含着丰富的优异性状基因(如抗病、抗虫、耐逆、优质、高产等)^[3-4]。研究表明,野生稻驯化过程中,有近1.76%的优异性状基因被选择性地丢失^[5]。因此,将野生稻中丢失的优异性状基因再导入栽培稻成为拓宽水稻遗传基础、进一步提升育种水平的重要途径。当前野生稻中优异性状基因的利用主要包括杂交渗入选择和人工再驯化2条途径^[6-7]。

杂交渗入是野生稻育种利用的主要途径,即利用野生稻与栽培稻的优异骨干亲本杂交,从后代分离群体中选择携带野生稻优异目标性状的渗入系,进行育种利用。该方法为我国水稻育种取得突破性进展发挥了重要作用。例如,三系不育系细胞质雄性不育基因WA352^[8]、抗白叶枯病基因Xa21^[9]、抗稻瘟病基因Pi9^[10]等,都来源于野生稻。但是,由于野生稻中株高、落粒性、长芒和种皮颜色等驯化性状基因存在连锁遗传,易形成连锁累赘且难以高效剔除,导致杂交渗入选择群体分离类型复杂、材料稳定周期长、育种选择效率偏低等问题。因此,解决野生稻驯化性状基因连锁累赘的瓶颈问题,是提升野生稻杂交渗入育种效率的关键所在。

人工再驯化主要依托基因编辑技术,对作物野生种的驯化性状相关基因进行定点突变,将野生种质快速改良至农艺性状趋近栽培品种的优异资源^[11]。目前,该技术已在野生番茄^[12]、野生稻^[13]等作物的野生种质中成功实现了驯化性状的定向编辑与遗传改良。但是,基因编辑技术仅能对已知功能的主

效基因进行编辑改良,而野生作物中还有大量的驯化性状微效基因和非育种目标性状基因未被鉴定,尚难以实现对野生作物真正的完全驯化利用^[14],还需结合栽培品种进行杂交渗入利用。

野生稻驯化过程中,株型、落粒性、长芒和种皮颜色等性状是受驯化选择的主要性状。目前对这些性状形成的调控基因已有较清楚的解析。前人已克隆了控制野生稻匍匐生长和分蘖角度的基因*PROG1*^[15]、*TAC1*^[16]和*LAI1*^[17],控制落粒性的基因*qSH1*^[18]、*sh4*^[19]、*sh-h*^[20]、*SHAT1*^[21]、*OsSh1*^[22]、*OsGRF4*^[23]、*OsNPC1*^[24]、*Osh15*^[25]、*GL4*^[26]、*ObSH3*^[27]和*SSH1*^[28],控制芒长的基因*An-1*^[29]、*An-2*^[30]、*OsRAE2*^[31]、*An-4*^[32]、*OsRAE3*^[33]、*OsEPF2*、*OsEPFL7*、*OsEPFL9*、*OsEPFL10*^[34],控制种皮颜色的基因*Rc*、*Rd*、*qDRC-9*、*qDRC-11*等^[35]。这些驯化性状基因的克隆,不仅揭示了水稻驯化性状形成的遗传机理,也为在野生稻利用中借助分子标记辅助选择(MAS)技术定向、精准地剔除野生稻不利驯化性状奠定了重要的技术基础。

种皮颜色是野生稻驯化选择的重要性状之一。野生稻种皮多呈红色或棕红色,而现代栽培稻种皮以白色为主^[36]。水稻种皮颜色主要受*Rc*、*Rd* 2个主效基因调控。*Rc*和*Rd*基因的不同表达模式决定了水稻种皮的颜色。当*Rc*、*Rd*同时表达时,种皮呈红色;仅*Rc*表达时,种皮呈棕红色;*Rc*不表达时,种皮呈白色^[37]。种皮颜色关键基因的挖掘与鉴定,为野生稻种皮颜色性状的MAS辅助育种提供了重要技术支持。

尽管MAS技术已被广泛应用于水稻抗病、抗虫、品质和产量等性状的定向育种选择^[38],但MAS技术用于野生稻驯化性状基因的精准选择与剔除的相关研究尚少见报道。为验证MAS技术在野生稻驯化性状精准选择与剔除中的可行性和应用效率,本研究以湖南茶陵县野生稻^[39]为材料,分析茶陵野生稻种皮颜色调控基因*Rc*和*Rd*的单倍型,并开发其功能分子标记,对茶陵野生稻与栽培稻杂交后代分

离群体中控制红色种皮颜色性状的基因*Rc*、*Rd*进行MAS选择研究,旨在构建借助MAS技术剔除野生稻利用中非目标驯化性状基因的育种体系。

1 材料与方法

1.1 材料

普通野生稻为茶陵野生稻(CL),栽培稻有籼稻品种9311、R996、4628和粳稻品种日本晴(NPB),以及茶陵野生稻/伦5S//R996复交F₂代分离群体。

1.2 方法

1.2.1 茶陵野生稻*Rc*和*Rd*基因单倍型分析

从本课题组前期测序组装的茶陵野生稻、R996和4628基因组及已公布的水稻日本晴(IRGSP-1.0)和9311(ASM465v1)基因组中提取种皮颜色调控基因*Rc*、*Rd*的等位基因DNA序列。利用SnapGene 7.0.1的Local alignment(Smith-Waterman)程序对5份材料的*Rc*、*Rd*基因序列进行比对,分析等位基因的DNA序列差异,并进行单倍型分型。

1.2.2 茶陵野生稻*Rc*基因结构预测及氨基酸序列分析

利用Softberry(www.softberry.com)网站的FGENESH程序对*Rc*^{CL}、*Rc*⁹³¹¹、*Rc*^{R996}、*Rc*⁴⁶²⁸的DNA序列进行基因编码结构预测。利用BioEdit软件对*Rc*^{CL}、*Rc*^{NPB}、*Rc*⁹³¹¹、*Rc*^{R996}、*Rc*⁴⁶²⁸氨基酸序列进行比对,分析野生稻与4个栽培稻品种中*Rc*基因编码结构和氨基酸序列的差异。

1.2.3 茶陵野生稻*Rc*基因功能分子标记的设计与多态性验证

利用SnapGene软件中MAFFT程序比对*Rc*^{CL}、*Rc*^{NPB}、*Rc*⁹³¹¹、*Rc*^{R996}和*Rc*⁴⁶²⁸序列,分析5份材料等位基因的序列差异,以差异序列中InDels区域(≥14 bp)作为分子标记设计目标区段,针对该变异区段设计特异性PCR扩增引物。以5份参考材料的基因组DNA为模板进行PCR扩增,验证设计标记在供试材料中的多态性。

1.2.4 水稻DNA的提取与分子标记的PCR扩增检测

参考车凡昊等^[40]的方法,使用CTAB法提取水稻DNA。PCR扩增反应体系为10 μL,反应液包含5 μL Buffer Mix(Vzyme 2×Taq Master Mix(Dye Plus))、0.5 μL 10 μmol/L正向引物(F)、0.5 μL 10 μmol/L反向引物(R)、1 μL DNA模板、3 μL ddH₂O。扩增程序为:95 °C预变性5 min;95 °C变性30 s,退火温度以及延伸时间根据设计引物信息进行调整,扩增35个循环后,72 °C继续延伸7 min,降温至16 °C结束反应。通过琼脂糖凝胶或聚丙烯酰胺凝胶电泳检测PCR扩增产物。

1.2.5 分子标记的高分辨率熔解曲线分析与检测

使用2×ChamQ SYBR qPCR Master Mix试剂盒在X960型全自动医用PCR分析系统中进行实时荧光定量PCR反应,反应体系20 μL,反应液包含10 μL SYBR Premix EX Taq II, 2 μL DNA模板,0.5 μL正向引物(F)、0.5 μL反向引物(R)、7 μL ddH₂O。反应程序为:95 °C预变性30 s;95 °C变性10 s,60 °C退火延伸30 s,并同步采集荧光信号,反应40个循环。熔解曲线采集程序为:95 °C维持15 s,60 °C恒温60 s,最后升温至95 °C保持15 s,分析熔解曲线的相对荧光强度变化,并根据熔解温度判断目的片段大小差异。

2 结果与分析

2.1 茶陵野生稻*Rc*和*Rd*基因的变异与单倍型分析

观察茶陵野生稻的糙米,发现种皮和胚乳均呈棕红色,而4个栽培稻品种NPB、9311、R996、4628的种皮和胚乳均为白色(图1)。为明确控制种皮颜色的主效基因*Rc*、*Rd*在茶陵野生稻中等位基因的单倍型,对茶陵野生稻和4份栽培稻品种*Rc*和*Rd*等位基因的DNA序列进行比较分析。结果(图2)表明,*Rd*^{CL}与*Rd*^{NPB}间的CDS序列完全一致,与*Rd*⁹³¹¹、*Rd*^{R996}和*Rd*⁴⁶²⁸间的CDS序列仅存在3个单核苷酸多态性(SNP)差异,其中第1外显子515 bp处的碱基G突变为A,导致第13个氨基酸缬氨酸(V)突变为异亮氨酸(I),另外2个SNP为同义突变,未引起氨基酸改变。

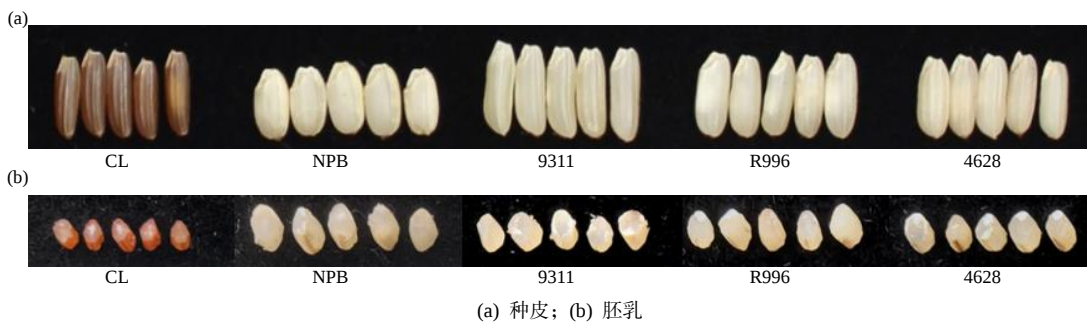
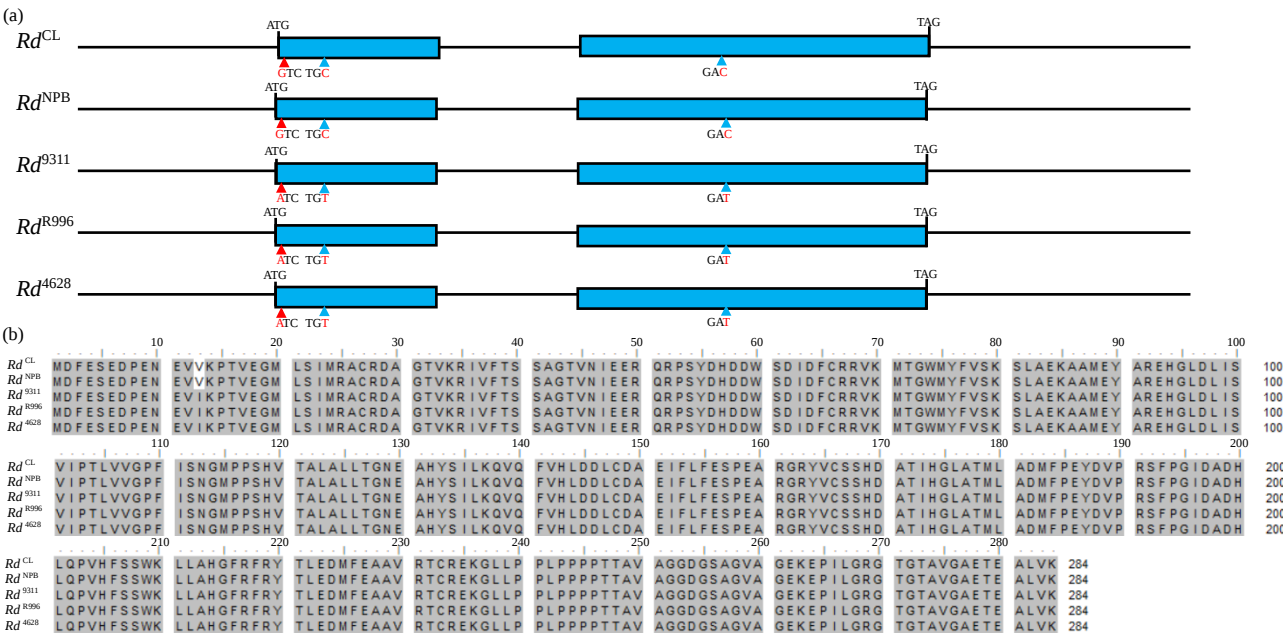


图1 茶陵野生稻与4个栽培稻品种种皮和胚乳颜色表型

Fig.1 Phenotype of pericarp and endosperm color in Chaling wild rice and 4 cultivars



(a) 茶陵野生稻和4个栽培稻品种中Rd等位基因的结构; (b) 茶陵野生稻和4个栽培稻品种中Rd等位基因的编码氨基酸序列比对

图2 茶陵野生稻和4个栽培稻品种中Rd等位基因编码结构预测与氨基酸序列比对结果

Fig. 2 Gene-encoding structure and amino acid sequence alignment for Rd alleles in Chaling wild rice and 4 cultivars

*Rc*等位基因 Rc^{CL} 、 Rc^{NPB} 、 Rc^{9311} 、 Rc^{R996} 和 Rc^{4628} 序列间存在明显的差异。 Rc^{CL} 与4个栽培稻中 Rc^{NPB} 、 Rc^{9311} 、 Rc^{R996} 和 Rc^{4628} 基因间的DNA相似度分别为99.43%、96.98%、96.90%和96.90%(表1)。差异序列分析结果表明, Rc^{CL} 与 Rc^{NPB} 、 Rc^{9311} 、 Rc^{R996} 、 Rc^{4628} 分别存在13、22、21、22个SNP变异和7、11、10、

10个InDel变异(表1和图3)。多数变异位于基因的启动子和内含子区域,只有2个SNP和1个InDel位于*Rc*基因的外显子区域,其中,第1外显子28 bp处的碱基T突变为A,导致第7个氨基酸组氨酸(H)突变为谷氨酰胺(Q);第1外显子71 bp处的碱基T突变为A,导致第22个氨基酸半胱氨酸(C)突变为丝氨酸(S)。

表1 茶陵野生稻与4个栽培稻品种中Rc等位基因间DNA序列的变异分析结果

Table 1 DNA sequence variation of the Rc alleles in the Chaling wild rice and 4 cultivars

Rc等位基因	来源材料	所在染色体	与Rc ^{CL} DNA序列相似度/%	SNP变异数	InDel变异数
Rc ^{NPB}	NPB	7	99.43	13	7
Rc ⁹³¹¹	9311	7	96.98	22	11
Rc ^{R996}	R996	7	96.90	21	10
Rc ⁴⁶²⁸	4628	7	96.90	22	10

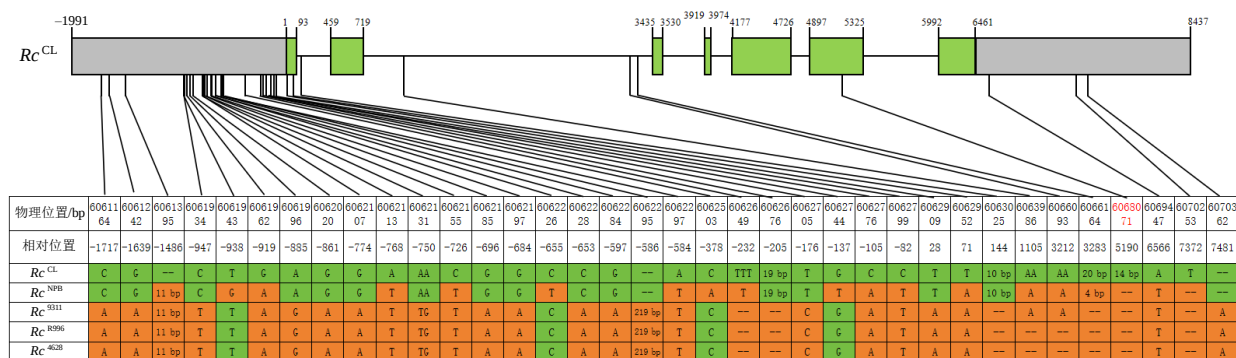
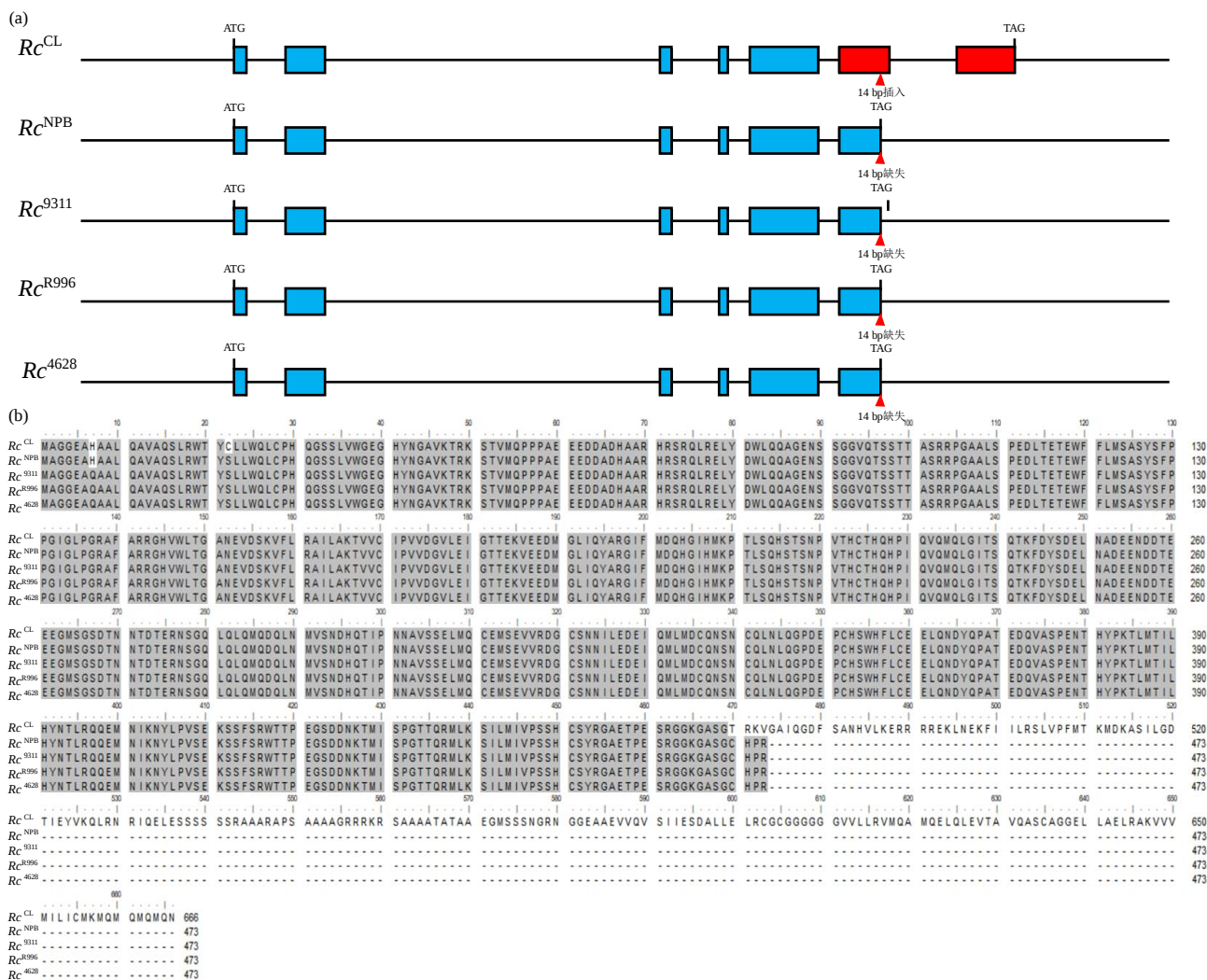


图3 茶陵野生稻和4个栽培稻品种中Rc等位基因DNA序列变异和单倍型分析结果

Fig. 3 The DNA sequence variation and haplotype analysis for Rc alleles in Chaling wild rice and 4 cultivars

茶陵野生稻Rc基因第6外显子区域存在一段14 bp的插入序列(ACGCGAAAAGTCGG), 该插入序列导致Rc^{CL}等位基因的编码区发生延伸, 增加了1个外显子, 而4个栽培稻品种中Rc^{NPB}、Rc⁹³¹¹、Rc^{R996}和Rc⁴⁶²⁸等位基因因缺失该14 bp片段, 导致编码氨基

酸翻译提前终止(图4(a))。对5个等位基因编码的蛋白质氨基酸序列进行比对, 发现Rc^{CL}等位基因编码的蛋白长度为666 aa, 而Rc^{NPB}、Rc⁹³¹¹、Rc^{R996}和Rc⁴⁶²⁸等位基因编码的蛋白仅有473 aa(图4(b))。



(a) 茶陵野生稻和4个栽培稻品种中Rc等位基因的结构; (b) 茶陵野生稻和4个栽培稻品种中Rc等位基因的编码氨基酸序列

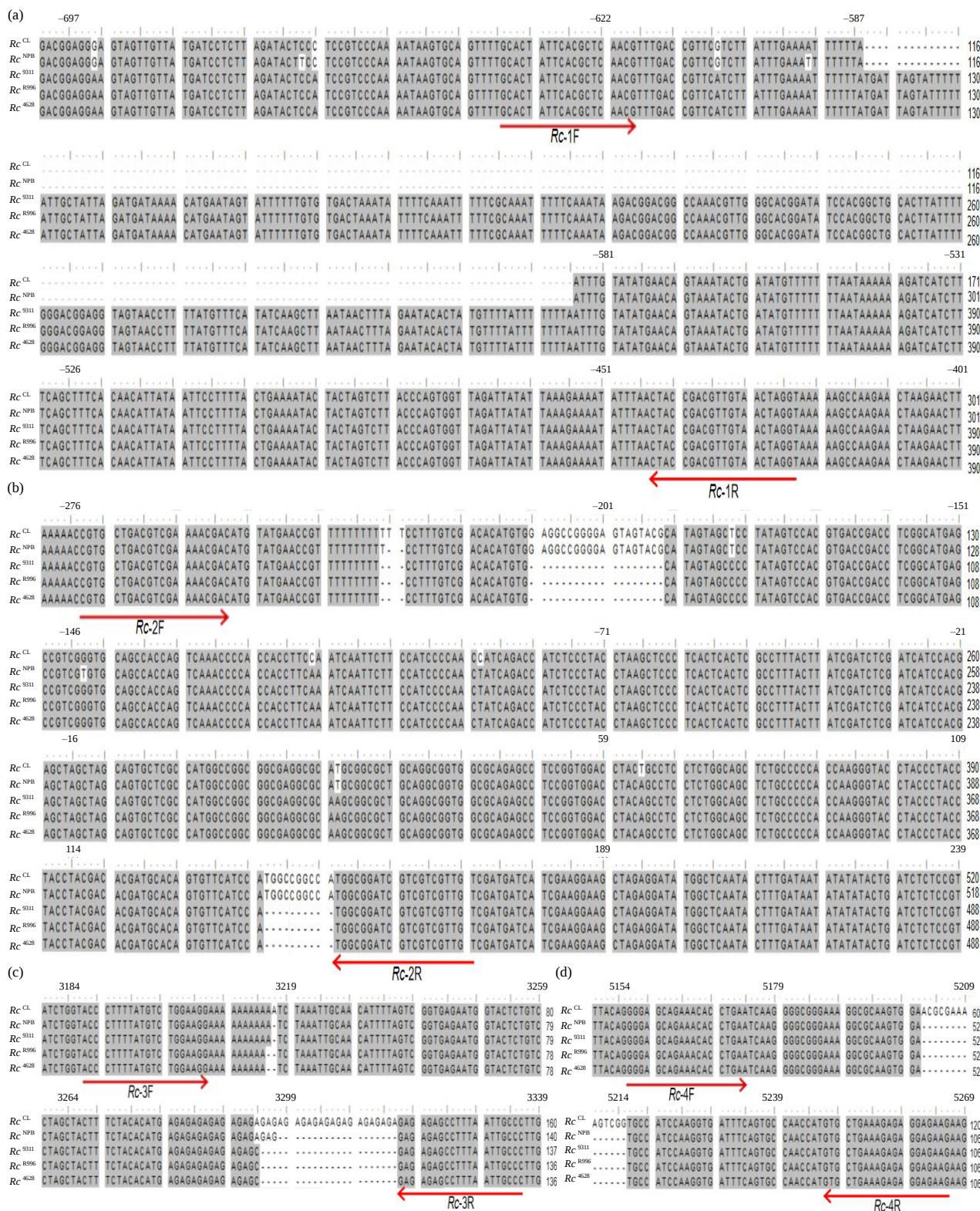
图4 茶陵野生稻和4个栽培稻品种中Rc等位基因编码结构预测与氨基酸序列比对结果

Fig. 4 Gene-encoding structure and amino acid sequence alignment for Rc alleles in Chaling wild rice and 4 cultivars

2.2 *Rc*基因功能分子标记的设计与多态性验证

以从5个*Rc*等位基因(*Rc*^{CL}、*Rc*^{NPB}、*Rc*⁹³¹¹、*Rc*^{R996}和*Rc*⁴⁶²⁸)序列中鉴定的6个InDel位点作为多态性分

子标记靶位点,设计4个分子标记*Rc*-1、*Rc*-2、*Rc*-3与*Rc*-4(图5),其引物信息如表2所示。



(a) *Rc*-1; (b) *Rc*-2; (c) *Rc*-3; (d) *Rc*-4

图5 茶陵野生稻和4个栽培稻品种的*Rc*基因分子标记的设计

Fig. 5 Design of molecular markers for *Rc* alleles in Chaling wild rice and 4 cultivars

表2 *Rc*基因分子标记引物信息

Table 2 Primer information for <i>Rc</i> functional molecular markers						
引物名称	引物序列(5'—3')	扩增片段长度/bp				
		CL	NPB	9311	R996	4628
<i>Rc</i> -1F	GCACTATTACGCTCAACG	213	213	432	432	432
<i>Rc</i> -1R	ACCTAGTTACAACGTCGGTAG					
<i>Rc</i> -2F	CGTGCTGACGTCGAAAACGAC	445	443	413	413	413
<i>Rc</i> -2R	ACAACGACGACGATCCGCCA					
<i>Rc</i> -3F	ACCCTTTTATGTCTGGAAGG	150	113	129	128	128
<i>Rc</i> -3R	GGGCAATTAAAGGCTCTCTC					
<i>Rc</i> -4F	GGGAGCAGAAACACCTGAA	111	97	97	97	97
<i>Rc</i> -4R	CTTCTCCTCTCTTTCAGCAC					

对设计的分子标记进行多态性验证，结果表明，4个分子标记的PCR扩增DNA片段大小与预期相符。标记*Rc*-1、*Rc*-2能准确地区分*Rc*^{CL}与*Rc*⁹³¹¹、*Rc*^{R996}、*Rc*⁴⁶²⁸(图6(a)、图6(b))，但是无法区分*Rc*^{CL}

与*Rc*^{NPB}。标记*Rc*-3、*Rc*-4能准确地区分*Rc*^{CL}与4个栽培稻等位基因*Rc*^{NPB}、*Rc*⁹³¹¹、*Rc*^{R996}、*Rc*⁴⁶²⁸(图6(c)、图6(d))。这表明4个标记均可用于*Rc*等位基因的分子鉴定。

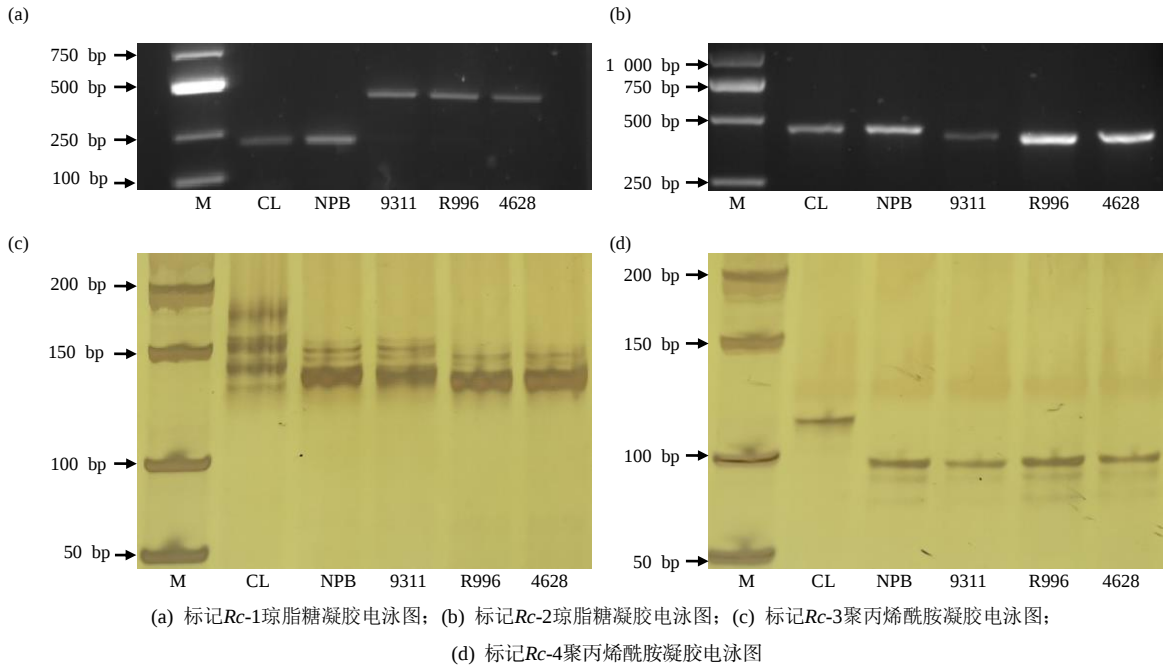


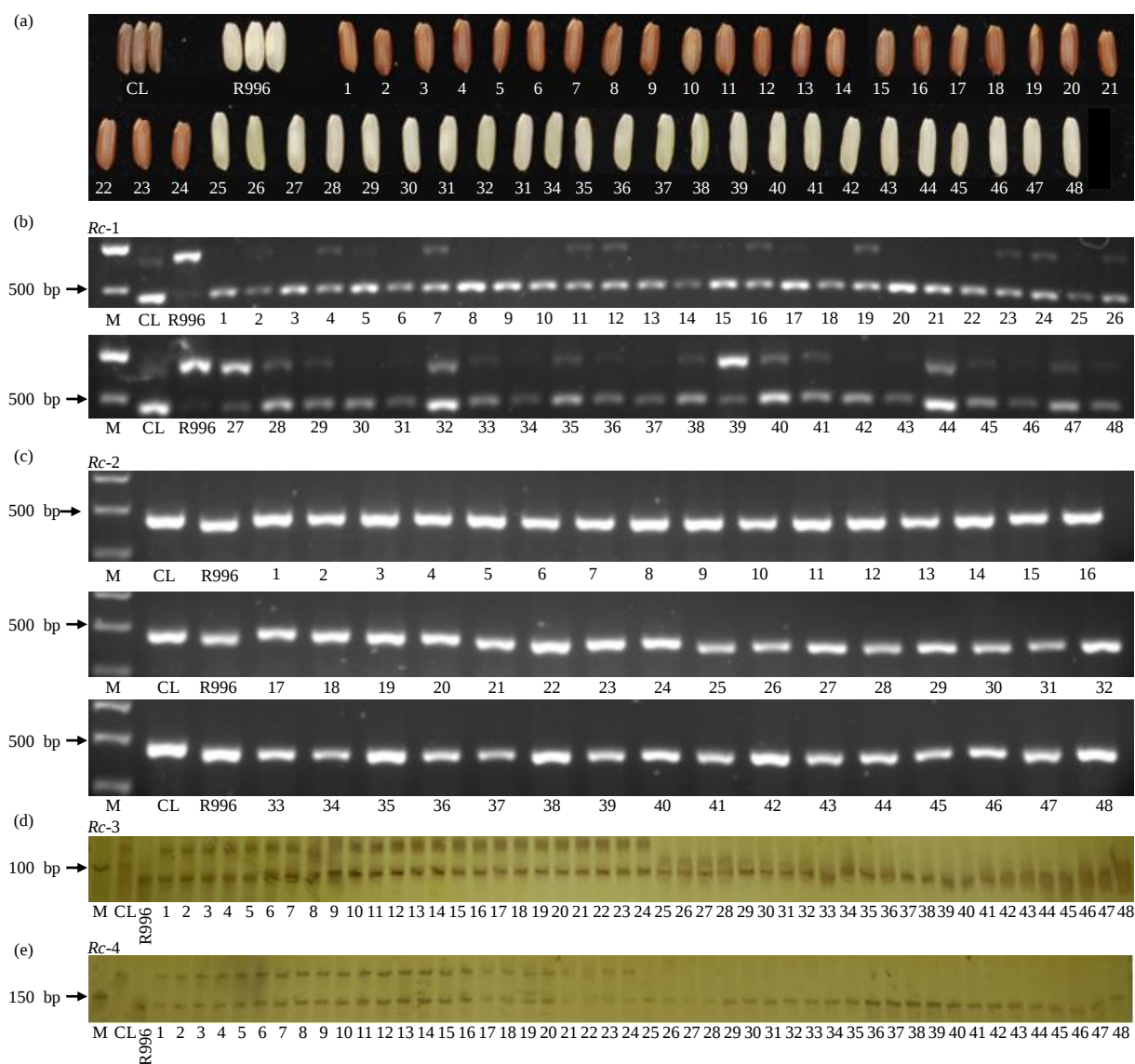
图6 *Rc*分子标记在茶陵野生稻和4个栽培稻品种中多态性验证结果

Fig. 6 Validation of polymorphism of *Rc* molecular markers in Chaling wild rice and 4 cultivars

2.3 *Rc*分子标记的MAS选择应用

为进一步验证上述设计的分子标记在MAS应用中的可行性和精准性，以茶陵野生稻/伦5S//R996复交F₂代分离群体为材料，对*Rc*-1、*Rc*-2、*Rc*-3与*Rc*-4标记在群体中的选择效率进行分析。结果表明，在鉴定的48个株系中，红色种皮和白色种皮株系各

24个(图7(a))。分子标记基因型鉴定结果表明，标记*Rc*-1扩增产物的DNA带型无法区分红色种皮和白色种皮株系(图7(b))，而标记*Rc*-2、*Rc*-3和*Rc*-4的扩增带型与相应亲本及分离群体株系种皮颜色表型高度吻合(图7(c)~图7(e))，说明*Rc*-2、*Rc*-3和*Rc*-4可用于茶陵野生稻与栽培稻杂交后代群体种皮颜色性状的MAS选择。



图(a)中编号1~48为茶陵野生稻/伦5S/R996复交 F_2 分离群体中的48个株系；图(b)~图(e)中编号1~48分别为48个株系对应的分子标记鉴定的电泳带型。

(a) 茶陵野生稻/伦5S/R996复交 F_2 代分离群体株系糙米种皮颜色表型；(b) 标记*Rc-1*琼脂糖凝胶电泳图；(c) 标记*Rc-2*琼脂糖凝胶电泳图；(d) 标记*Rc-3*聚丙烯酰胺凝胶电泳图；(e) 标记*Rc-4*聚丙烯酰胺凝胶电泳图

图7 *Rc*分子标记在茶陵野生稻/伦5S/R996复交 F_2 代分离群体中的MAS应用

Fig. 7 MAS application of *Rc* molecular markers in the F_2 segregating population from the cross of Chaling wild rice/Lun5S/R996

2.4 *Rc*分子标记的高分辨率熔解曲线标记转化与应用

为实现*Rc*基因标记辅助选择的高效基因型鉴定，本研究对开发的标记进行高分辨率熔解曲线(HRM)标记转化与效能分析。结果(图8)表明，4个

标记中，*Rc-2*、*Rc-3*和*Rc-4*标记的扩增产物熔解曲线的峰值温度均能很好地区分茶陵野生稻和4份栽培稻材料，但*Rc-1*标记的扩增产物熔解曲线的峰值温度不能有效区分茶陵野生稻和4份栽培稻材料。以上结果说明本研究设计的*Rc-2*、*Rc-3*和*Rc-4*这3个分子标记可以转化为HRM标记，用于基因型鉴定。

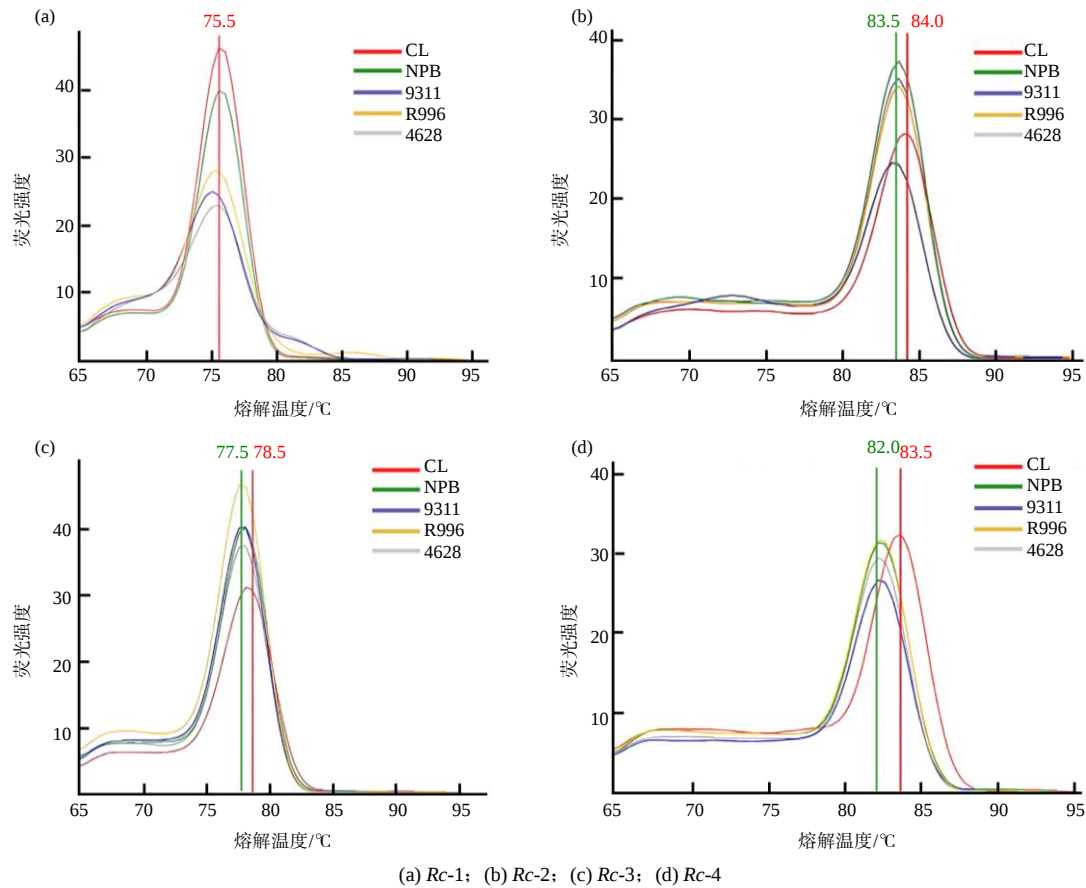


图8 *Rc*分子标记的高分辨率熔解曲线标记分析验证

Fig. 8 Validation of high-resolution melting curve markers(HRM) derived from *Rc* molecular markers

进一步选用区分效果较好的*Rc*-3和*Rc*-4这两个标记对茶陵野生稻/伦5S//R996复交F₂代分离群体开展基因型鉴定。结果表明，标记*Rc*-3和*Rc*-4可以通过HRM特征差异有效区分亲本*Rc*^{CL}、*Rc*^{R996}及分离

群体中不同种皮颜色的株系(图9和表3)，说明本研究设计的*Rc*-3和*Rc*-4这两个标记可应用于HRM技术体系，实现育种群体的高效基因型鉴定。

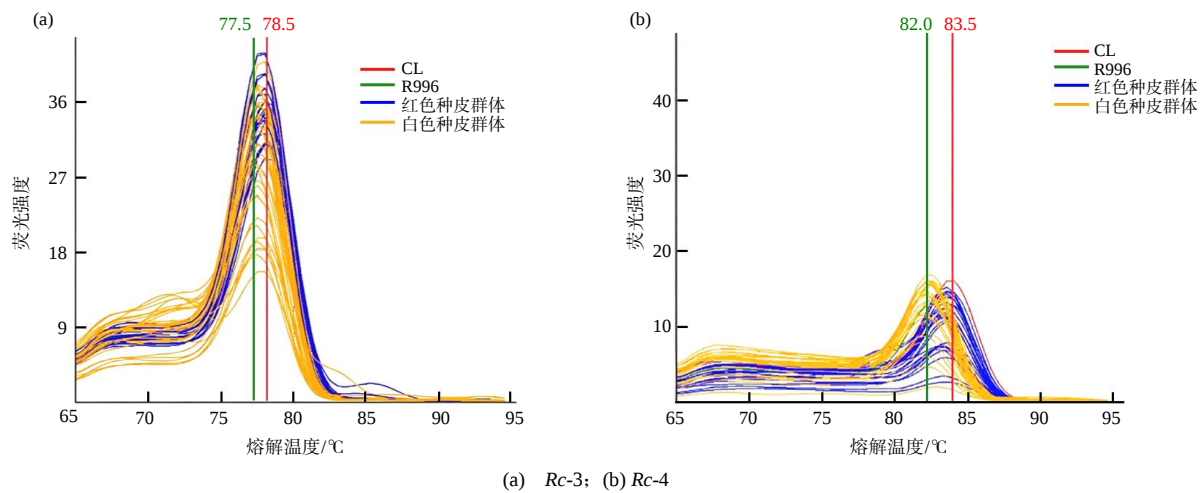


图9 *Rc*高分辨率溶解曲线标记在茶陵野生稻/伦5S//R996复交F₂代分离群体中的鉴定应用

Fig. 9 Validation and application of the HRM for the *Rc* marker in the F₂ segregating population from the cross of Chaling wild rice/Lun5S//R996

表3 高分辨率溶解曲线标记在分离群体中验证的熔解温度

Table 3 Validated annealing temperatures for HRM markers in the segregating population			
品种/株系	种皮表型	Rc-3标记熔解温度/°C	Rc-4标记熔解温度/°C
CL	棕红色	78.5	83.5
R996	白色	77.5	82.5
株系1~24	棕红色	78.0	83.5
株系25~48	白色	77.5	82.5

3 结论与讨论

野生稻遗传多样性丰富，蕴含大量高产、优质和抗逆等优异性状基因^[41]，是解决当前水稻品种同质化问题、拓宽栽培稻遗传背景的重要资源。传统杂交渗入法是挖掘和利用野生稻优异基因的重要手段，但野生稻携带的控制落粒性、长芒、匍匐生长和高株高等性状的非目标驯化基因存在连锁累赘，导致改良群体分离复杂、非目标性状难以剔除、性状稳定周期长等问题，严重限制了野生稻资源的高效利用^[42]。MAS技术在不依赖表型鉴定的情况下，可以实现对目标性状基因快速、精准选择，已广泛应用于作物育种^[43]。近年来，大量野生稻驯化性状和优异性状基因的成功鉴定与克隆^[44]，为利用MAS技术精准剔除野生稻与栽培稻杂交后代中的非目标驯化性状基因提供了技术支持。

为验证利用MAS技术精准剔除野生稻非目标驯化性状基因的可行性，本研究对茶陵野生稻中红色种皮基因Rc和Rd开展了MAS应用研究。已有研究表明，红色种皮性状主要受水稻第7染色体的Rc与第1号染色体的Rd 2个主效基因控制，其中Rc基因起决定性作用，Rc基因突变导致红米变为白米^[37]。本研究对茶陵野生稻中Rc和Rd基因进行了克隆和序列分析，发现茶陵野生稻中Rc基因与栽培稻中的Rc等位基因序列差异明显，而Rd基因与栽培稻中的Rd等位基因序列无明显差异，说明茶陵野生稻种皮颜色性状主要受Rc基因控制。茶陵野生稻中Rc基因第6外显子处存在1个14 bp的InDel变异，该变异导致了Rc^{CL}基因编码结构延长，增加了1个外显子，而栽培稻Rc等位基因则缺失了该片段，导致翻译过程提前终止，这与SWEENEY等^[45]的研究结果一致，说明茶陵野生稻中Rc基因是控制其棕红色种皮的关键基因。

根据茶陵野生稻和栽培稻中Rc等位基因序列

中的InDel变异设计了4个分子标记，对茶陵野生稻及4份栽培稻品种进行了多态性分析，结果表明4个分子标记均可有效区分茶陵野生稻和4份栽培稻品种Rc等位基因。进一步利用茶陵野生稻/伦5S//R996复交F₂代群体对4个标记在育种群体中的选择效率进行分析，结果表明，Rc-2、Rc-3和Rc-4标记可以有效区分该群体中的红米和白米株系，可有效转化为HRM功能标记，适用于育种群体的基因型鉴定，这为简化分子标记鉴定程序、提高标记基因型鉴定效率提供了新的方法。综上，MAS技术可以用于野生稻驯化性状基因连锁累赘的定向选择与剔除。尤其对于野生稻松散株型、高株高、长芒和红色种皮等需在植株生长后期通过表型观测识别剔除的驯化性状，可以利用MAS技术对野生稻和栽培稻杂交分离世代的种子或者幼苗进行精准基因型鉴定和剔除。MAS辅助选择可有效解决传统育种选择群体大、不利性状剔除周期长等问题，为野生稻优异基因快速导入、拓宽栽培稻遗传多样性提供了新的思路。

本研究仅对1份野生稻的种皮颜色这一驯化性状基因进行了MAS筛选与剔除研究，而野生稻资源丰富，不同的野生稻因遗传背景不同，驯化性状多样，调控驯化性状的遗传基础也存在差异。因此，后续还需扩大野生稻资源，针对多类野生稻材料及多种驯化性状基因开展系统的MAS筛选与剔除，以完善野生稻利用中驯化不利性状基因的MAS辅助选择体系。

参考文献：

[1] SONG L, TAO Y, VAN GROENIGEN K J, et al. Rising atmospheric carbon dioxide concentrations increase gaps of rice yields between low- and middle-to-high-income countries[J]. Nature Food, 2024, 5(9): 754–763.

[2] 邓宏中, 王彩红, 徐群, 等. 中国水稻地方品种与选育品种的遗传多样性比较分析[J]. 植物遗传资源学报, 2015, 16(3): 433–442.

[3] HUANG X H, KURATA N, WEI X H, et al. A map of rice genome variation reveals the origin of cultivated rice[J]. Nature, 2012, 490: 497–501.

[4] 杨晓红, 周晋峰, 冯璐. 中国野生稻种质资源利用与保护[J]. 中国稻米, 2023, 29(1): 1–8.

[5] ZHENG X M, ZHONG L M, PANG H B, et al. Lost genome segments associate with trait diversity during rice domestication[J]. BMC Biology, 2023, 21(1): 20.

- [6] CHEN E W, HUANG X H, TIAN Z X, et al. The genomics of *Oryza* species provides insights into rice domestication and heterosis[J]. *Annual Review of Plant Biology*, 2019, 70: 639–665.
- [7] ZHU X G, ZHU J K. Precision genome editing heralds rapid *de novo* domestication for new crops[J]. *Cell*, 2021, 184(5): 1133–1134.
- [8] LUO D P, XU H, LIU Z L, et al. A detrimental mitochondrial-nuclear interaction causes cytoplasmic male sterility in rice[J]. *Nature Genetics*, 2013, 45(5): 573–577.
- [9] SONG W Y, WANG G L, CHEN L L, et al. A receptor kinase-like protein encoded by the rice disease resistance gene, *Xa21*[J]. *Science*, 1995, 270(5243): 1804–1806.
- [10] LIU G, LU G, ZENG L, et al. Two broad-spectrum blast resistance genes, *Pi9(t)* and *Pi2(t)*, are physically linked on rice chromosome 6[J]. *Molecular Genetics and Genomics*, 2002, 267(4): 472–480.
- [11] ØSTERBERG J T, XIANG W, OLSEN L I, et al. Accelerating the domestication of new crops: feasibility and approaches[J]. *Trends in Plant Science*, 2017, 22(5): 373–384.
- [12] ZSÖGÖN A, CERMAK T, VOYTAS D, et al. Genome editing as a tool to achieve the crop ideotype and *de novo* domestication of wild relatives: case study in tomato[J]. *Plant Science*, 2017, 256: 120–130.
- [13] YU H, LIN T, MENG X B, et al. A route to *de novo* domestication of wild allotetraploid rice[J]. *Cell*, 2021, 184(5): 1156–1170. e14.
- [14] CHOUDHARY M, SINGH V, MUTHUSAMY V, et al. Harnessing crop wild relatives for crop improvement[J]. *International Journal of Life Sciences*, 2017, 6(2): 73.
- [15] TAN L B, LI X R, LIU F X, et al. Control of a key transition from prostrate to erect growth in rice domestication[J]. *Nature Genetics*, 2008, 40(11): 1360–1364.
- [16] JIANG J H, TAN L B, ZHU Z F, et al. Molecular evolution of the *TAC1* gene from rice(*Oryza sativa* L.)[J]. *Journal of Genetics and Genomics*, 2012, 39(10): 551–560.
- [17] LI Z, LIANG Y, YUAN Y D, et al. OsBRXL4 regulates shoot gravitropism and rice tiller angle through affecting LAZY1 nuclear localization[J]. *Molecular Plant*, 2019, 12(8): 1143–1156.
- [18] KONISHI S, IZAWA T, LIN S Y, et al. An SNP caused loss of seed shattering during rice domestication[J]. *Science*, 2006, 312(5778): 1392–1396.
- [19] LI C B, ZHOU A L, SANG T. Genetic analysis of rice domestication syndrome with the wild annual species, *Oryza nivara*[J]. *New Phytologist*, 2006, 170(1): 185–194.
- [20] JI H, KIM S R, KIM Y H, et al. Inactivation of the CTD phosphatase-like gene *OsCPL1* enhances the development of the abscission layer and seed shattering in rice[J]. *The Plant Journal*, 2010, 61(1): 96–106.
- [21] ZHOU Y, LU D F, LI C Y, et al. Genetic control of seed shattering in rice by the APETALA2 transcription factor *SHATTERING ABORTION1*[J]. *The Plant Cell*, 2012, 24(3): 1034–1048.
- [22] LIN Z W, LI X R, SHANNON L M, et al. Parallel domestication of the *Shattering1* genes in cereals[J]. *Nature Genetics*, 2012, 44(6): 720–724.
- [23] SUN P Y, ZHANG W H, WANG Y H, et al. *OsGRF4* controls grain shape, panicle length and seed shattering in rice[J]. *Journal of Integrative Plant Biology*, 2016, 58(10): 836–847.
- [24] CAO H S, ZHUO L, SU Y, et al. Non-specific phospholipase C1 affects silicon distribution and mechanical strength in stem nodes of rice[J]. *The Plant Journal*, 2016, 86(4): 308–321.
- [25] YOON J, CHO L H, ANTT H W, et al. KNOX protein OSH15 induces grain shattering by repressing lignin biosynthesis genes[J]. *Plant Physiology*, 2017, 174(1): 312–325.
- [26] WU W G, LIU X Y, WANG M H, et al. A single-nucleotide polymorphism causes smaller grain size and loss of seed shattering during African rice domestication[J]. *Nature Plants*, 2017, 3: 17064.
- [27] LV S W, WU W G, WANG M H, et al. Genetic control of seed shattering during African rice domestication[J]. *Nature Plants*, 2018, 4(6): 331–337.
- [28] JIANG L Y, MA X, ZHAO S S, et al. The APETALA2-like transcription factor SUPERNUMERARY BRACT controls rice seed shattering and seed size[J]. *The Plant Cell*, 2019, 31(1): 17–36.
- [29] LUO J H, LIU H, ZHOU T Y, et al. *An-1* encodes a basic helix-loop-helix protein that regulates awn development, grain size, and grain number in rice[J]. *The Plant Cell*, 2013, 25(9): 3360–3376.
- [30] HUA L, WANG D, TAN L B, et al. *LABA1*, a domestication gene associated with long, barbed awns in wild rice[J]. *The Plant Cell*, 2015, 27(7): 1875–1888.
- [31] JIN J, HUA L, ZHU Z F, et al. *GAD1* encodes a secreted peptide that regulates grain number, grain length, and awn development in rice domestication[J]. *The Plant Cell*, 2016, 28(10): 2453–2463.
- [32] QIN B X, LU T A, XU Y B, et al. Identification and characterization of *An-4*, a potential quantitative trait locus for awn development in rice[J]. *BMC Plant Biology*, 2021, 21(1): 298.

- [33] BESSHO-UEHARA K, MASUDA K, WANG D R, et al. *Regulator of Awn Elongation 3*, an E3 ubiquitin ligase, is responsible for loss of awns during African rice domestication[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2023, 120(4): e2207105120.
- [34] GUO T, LU Z Q, XIONG Y H, et al. Optimization of rice panicle architecture by specifically suppressing ligand-receptor pairs[J]. *Nature Communications*, 2023, 14: 1640.
- [35] DONG Y J, XU J L, XIAO K, et al. Genomic regions associated with the degree of red coloration in pericarp of rice(*Oryza sativa* L.)[J]. *Journal of Cereal Science*, 2008, 48(2): 556–560.
- [36] XIE L J, WU D Y, FANG Y, et al. Population genomic analysis unravels the evolutionary roadmap of pericarp color in rice[J]. *Plant Communications*, 2024, 5(3): 100778.
- [37] FURUKAWA T, MAEKAWA M, OKI T, et al. The *Rc* and *Rd* genes are involved in proanthocyanidin synthesis in rice pericarp[J]. *The Plant Journal*, 2007, 49(1): 91–102.
- [38] 周庚, 黄俊, 邹玉莹, 等. 分子标记辅助选择*Pigm*基因改良水稻不育系桃农1A的苗瘟抗性[J]. *华北农学报*, 2024, 39(2): 39–46.
- [39] 王志龙, 伍丹丹, 郭崇炎, 等. 茶陵普通野生稻种质资源评价及其利用进展[J]. *植物遗传资源学报*, 2018, 19(4): 815–820.
- [40] 车凡昊, 黄俊, 邹玉莹, 等. *Pi9*基因标记辅助选择改良水稻不育系金23A稻瘟病抗性[J]. *湖南农业大学学报(自然科学版)*, 2023, 49(5): 503–508, 515.
- [41] HUANG J F, ZHANG Y L, LI Y P, et al. Haplotype-resolved gapless genome and chromosome segment substitution lines facilitate gene identification in wild rice[J]. *Nature Communications*, 2024, 15: 4573.
- [42] ZHENG X M, PENG Y L, QIAO J Y, et al. Wild rice: unlocking the future of rice breeding[J]. *Plant Biotechnology Journal*, 2024, 22(11): 3218–3226.
- [43] OLADOSU Y, RAFII M Y, SAMUEL C, et al. Drought resistance in rice from conventional to molecular breeding: a review[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2019, 20(14): 3519–3540.
- [44] HENRY R J. Wild rice research: advancing plant science and food security[J]. *Molecular Plant*, 2022, 15(4): 563–565.
- [45] SWEENEY M T, THOMSON M J, PFEIL B E, et al. Caught red-handed: *Rc* encodes a basic helix-loop-helix protein conditioning red pericarp in rice[J]. *The Plant Cell*, 2006, 18(2): 283–294.

责任编辑: 毛友纯

英文编辑: 罗 维