中国科学 C辑:生命科学 2009 年 第 39 卷 第 10 期: 909 ~ 924
www.scichina.com life.scichina.com
《中国科学》杂志社
SCIENCE IN CHINA PRESS

评 述

中国水稻功能基因组研究进展

肖景华[①], 吴昌银[①], 韩斌[②], 薛勇彪[③], 邓兴旺[④], 张启发[①*]

① 华中农业大学作物遗传改良国家重点实验室, 武汉 430070;
② 中国科学院上海生命科学研究院植物生理生态研究所, 中国科学院国家基因研究中心, 上海 200032;
③ 中国科学院遗传与发育生物学研究所, 北京 100101;
④ 北京大学生命科学学院, 北大-耶鲁植物分子遗传学及农业生物技术联合中心, 北京 100871
* 联系人, E-mail: qifazh@mail.hzau.edu.cn

收稿日期: 2009-07-30; 接受日期: 2009-08-03
国家高技术研究发展计划(批准号: 2006AA10A103)和国家自然科学基金(批准号: 30621065)

摘要 在过去的10年中, 我国在水稻功能基因组研究方面取得了显著成绩, 建立发展了水稻功能基因组研究技术平台, 主要包括水稻大型 T-DNA 插入突变体库、基因全长 cDNA 文库、基因表达谱芯片以及相应的生物信息学分析平台等; 分离鉴定了大批与产量、品质、抗病、抗逆、营养高效利用相关的具有重要应用前景的重要农艺性状基因. 并适时提出了 RICE2020 的研究计划, 旨在积极推动水稻功能基因的深入研究和建立国际合作.

关键词
水稻
功能基因组
研究进展
展望

水稻(*Oryza sativa* L.)是世界重要粮食作物之一, 全世界半数以上的人口以其为主食. 同时, 由于其基因组相对较小, 遗传转化体系成熟, 且与玉米(*Zea mays* L.)、大麦(*Hordeum vulgare* L.)及小麦(*Triticum aestivum* L.)等禾本科粮食作物存在共线性, 使其成为作物分子遗传学及基因组学研究的模式植物.

1998 年, 中国、日本、美国等 10 个国家和地区启动了国际水稻基因组测序计划(International Rice Genome Sequencing Project, IRGSP), 主要内容是开展遗传图和物理图的绘制, 进行基因组序列的测定和注释分析基因序列等研究工作[1,2]. 2002 年, 北京华大基因研究中心和美国的Syngenta公司分别宣布完成籼稻品种"9311"和粳稻品种"日本晴"的全基因组工作框架图[3,4]. 同年, 日本和中国的科学家在*Nature*发表了水稻日本晴第 1 和第 4 染色体的精细测序图谱[5,6]. 2003 年, 第 10 号染色体的全长序列在*Science*上发表[7]. 2005 年, 粳稻"日本晴"基因组的精确序列被完成[8]. 基于精确测序的结果, 水稻基因组大小为 389 Mb, 预测编码约 32000 个基因[9,10]. 由此, 水稻基因组研究全面进入到功能基因组研究时代. 功能基因组研究利用基因组序列信息, 发展和应用新的实验手段, 在基因组水平上大规模、高通量地分析基因的功能, 弄清生物体中各组分是如何工作并形成有功能的细胞、组织及整个生物体[11]. 其目标是明确基因组中全部基因的功能, 揭示植物生长发育、环境应答互作的分子网络, 从而全面阐释植物的生物学基础. 可以预见, 功能基因组研究的成果最终将改变生命科学领域的面貌, 并产生深远的影响.

我国于21世纪初开始了水稻功能基因组研究, 主要包括两大内容: 水稻功能基因组研究的技术平台和重要农艺性状的功能基因组. 借鉴拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)功能基因研究的技术平台, 我国的水稻功能基因组主要创建了大型突变体库, 基因全长 cDNA 文库, 基因表达谱芯片以及相应的生物信息学分析平台. 在重要农艺性状功能基因方面, 瞄准高产、优质、抗逆等重要农艺性状, 为确保我国水稻高产、稳产,

引用格式: 肖景华, 吴昌银, 韩斌, 等. 中国水稻功能基因组研究进展. 中国科学 C 辑: 生命科学, 2009, 39: 909—924

保持水稻的可持续发展储备优良基因资源.

1 水稻功能基因组研究的技术平台

1.1 水稻大型 T-DNA 插入突变体库

突变是指基因在 DNA 水平上碱基序列发生的稳定且可遗传的变异, 基因发生突变后可能导致其功能被破坏, 通过观察对应的基因功能缺失突变体的表型可以了解该基因的功能.

在利用突变体进行基因功能的研究中, T-DNA标签技术被证明是一种高效、快速鉴定和分离基因 的手段. T-DNA(Transferred DNA)是根癌农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*)内Ti质粒(tumor-inducing plasmid)上的一段DNA, 它能侵染并稳定地整合到植物基因组中. Schager等人[12]于 1987 年首次报道农杆菌转化单子叶植物获得成功. 1994 年, Hiei等人[13]将经过乙酰丁香酮预处理的农杆菌与水稻愈伤组织共培养, 建立了高效粳稻转化体系. 随着转基因技术的发展, 大多数粳稻和一些籼稻品种的农杆菌遗传转化体系相继被建立. 通过T-DNA插入的方法破坏基因的功能来创建水稻大型T-DNA插入突变体库成为可能.

利用T-DNA插入法构建突变体库具有独特的优势. T-DNA插入是一个相对随机的事件, 如果T-DNA插入单株足够多, 就可能使基因组内每个基因都有对应的T-DNA标签插入[14,15]. 同时, T-DNA插入的拷贝数低, 平均约为 1.2~2.0 个拷贝[16], 且大多数为单拷贝. 插入位点经多代传递后能稳定遗传, 绝大多数符合孟德尔的分离定律, 遗传分析相对容易[17]. 由于插入的T-DNA序列已知, 插入到植物基因组中的T-DNA类似于给基因贴了一个序列标签. 通过分离T-DNA标签位点的侧翼水稻基因组序列, 可以快捷地找到含有标签的基因, 经过插入标签基因与突变体表型的共分离检测, 从而获得基因的生物学功能.

(1) 水稻大型T-DNA插入突变体库的构建. 国际上 10 余所科研单位, 如韩国的POSTECH研究所、法国的Genoplant研究所和我国台湾地区的植物研究院等相继建立了大型的突变体库[18~21]. 中国在 2000 年末启动了水稻大型突变体库的创建计划. 2001~2005 的 5 年时间, 华中农业大学、中国科学院遗传与发育生物学研究所、中国科学院上海植物生理研究所等单位共创建 T-DNA 插入突变体约 27 万株系, 其中约 15 万份种子已保存到上海农业生物基因中心的种子库. 这些丰富的突变材料, 为大规模发掘和鉴定基因的结构和功能提供了重要的平台.

华中农业大学作物遗传改良国家重点实验室采用带有Enhancer Trap元件的T-DNA插入法, 以水稻粳稻品种中花 11 和中花 15 为受体, 成功创建了约129000 个独立的水稻转基因株系, T-DNA插入的拷贝数较低, 平均约为 2 个拷贝, 并且能稳定遗传[22]. 以此为平台, 收集并整理了一批与抗逆、营养高效、生长发育等性状相关的突变体 3 万多份(图 1), 广泛地开展了基因组表达谱, 发育基因异位表达、逆境胁迫, 病原物胁迫等研究[23]. 一批重要农艺性状的功能基因如水稻抽穗期基因*RID1*[24]、水稻茎秆强度基因*FC1*[25]相继被分离克隆. 2006 年, 水稻大型T-DNA突变体数据库RMD(Rice Mutant Database)(http://rmd.ncpgr.cn/)构建完成并开放使用, 该数据库全面提供了突变单株的详细信息, 包括: 突变体的编号, 突变表型图片、报告基因的表达图片、突变体的T-DNA拷贝数、侧翼序列、种子有无、供种信息等, 研究者可以根据序列、突变表型、表达模式或发育时期等来检索感兴趣的突变体[26]. 据不完全统计, 自 2006 年数据库开放以来, 平均每月来自世界各地的突变体索取量在 200 份以上, 为水稻功能基因组研究提供了材料.

中国科学院上海植物生理研究所于 2003 年开始水稻 T-DNA 插入突变体的创建工作, 以水稻粳稻品种中花 11 为受体, 获得 65000 个独立的转基因阳性单株, 经田间筛选获得近 15000 份 T-DNA 插入纯合的纯系单株种子. 该研究所还对约 6000 份种子的蛋白质含量、淀粉含量、直链淀粉含量、脂肪含量、含水量以及胶稠度等 6 个指标进行了测定, 为稻米品质基因的研究提供了良好的研究材料. 所有信息收录到数据库 SHIP(Shanghai T-DNA Insertion Population, http://ship.plantsignal.cn/home.do).

(2) T-DNA 侧翼序列的分离. 插入突变体库利用的关键是分离标签位点的侧翼水稻基因组序列. 由于插入位点的复杂性, 如在 T-DNA 转化的植株中通



图 1 水稻T-DNA插入突变体库中鉴定的不同类型的突变体(引自文献[27])

(A) 白化苗; (B) 黄化苗; (C) 易倒伏; (D) 多分蘖; (E) 簇生; (F) 耐低氮, 左: 突变体; 右: 野生型对照; (G) 独杆; (H) 晚抽穗, 左: 突变体; 右: 野生型对照; (I) 冷害敏感, 左: 野生型对照; 右: 突变体; (J) 短粒, 左: 野生型对照; 右: 突变体; (K) 耐旱; (L) 类病斑; (M) 节上长分蘖; (N) 叶片卷曲; (O) 穗形态突变, 左: 野生型对照; 右: 突变体

常可以检测到一个位点包含多个T-DNA插入或多个位点包含多个插入; 或产生T-DNA的正向或反向重复、染色体发生重排等, 侧翼序列的分离远远落后于突变体库的构建. Zhang等人[28]分析了 13804 条T-DNA插入侧翼序列, 发现T-DNA偏爱插入到水稻中长度较大的染色体. 在基因组中转座子相关序列中插入显著偏少. 在水稻的基因区域, T-DNA偏爱插入到上游 1 kb和下游 500 bp区而不趋向于插入到编码区. 但在基因的编码区内, T-DNA插入外显子和内含子间不存在偏爱性. 在不同"功能类型"的基因中也存在分布的偏爱性. 2009 年, Krishnan等人[29]收集了全球公布的 206668 条水稻侧翼序列, 其中有 180639 条序列是在基因组中独立插入的. 他们对Tos17, T-DNA, DS, dSpm这些不同的插入类型进行了分析, 发现每种插入类型都有自己的特点. 目前通过分离侧翼序列, 已经获得了 20 多万个插入位点, 覆盖了超过 50%蛋白编码基因, 更多突变位点的侧翼序列的分离还在进行中.

(3) 报告基因表达谱和基因的异位表达. 基因行使功能, 除编码序列外, 控制基因表达的顺式调控元件也具有重要作用. 为了大规模发掘和利用水稻基因组中的调控序列, T-DNA或转座子插入突变体库往往应用基因捕获(gene Trap)策略, 通过检测转基因株系中报告基因的表达模式来跟踪插入位点内源基因的表达谱.

迄今为止, 已发展了几种不同类型的Gene Trap系统. 广义基因捕获主要有 3 种类型: 增强子捕获(enhancer trap)、启动子捕获(promoter trap)和狭义的基因捕获(gene trap)[30]. Gene Trap和Promoter Trap中报告基因不带启动子, 只有正向插入到内源基因的转录区域, 受到内源基因的启动子驱动才能表达. 而Enhancer Trap中, 报告基因带有仅含TATA Box和转录起始点, 不足以启动报告基因的表达, 只有借助邻近的增强子元件才有活性. Gene Trap系统以其巧妙的设计特点受到人们的广泛使用.

在水稻中相继建立了T-DNA介导的Promoter Trap系[31]和Enhancer Trap系[22,32,33]. 华中农业大学作物遗传改良国家重点实验室水稻突变体库的创建采用了带有GAL4/VP16-UAS的Enhancer Trap载体, 由一个转录活化因子GAL4/VP16、一个上游激活UAS及GUS和GFP等报告基因组成[22]. 通过大规模筛选鉴定 5000 多份突变体材料, 建立了不同株系中报告基因GFP的时空表达谱, 获得了 47 个报告基因在水稻生育期不同时期、不同部位特异表达的模式系. 特异表达部位包括: 根、叶鞘(分蘖期、抽穗期)、叶片(分蘖期、抽穗期)、幼叶、茎、茎节、叶枕(叶舌、叶耳)、颖壳、雄蕊、雌蕊、胚、胚乳和全生育期组成型表达[23]. 图 2 显示了鉴定出的部分Enhancer Trap系中报告基因GFP在水稻花、种子中呈现不同的表达模式. 利用这些材料, 通过插入标签分离侧翼基因组序列, 可以高通量地分离不同类型的调控元件. 其次, 依赖报告基因的表达谱, 可以分离一些纯合致死基因和低丰度表达基因. 特异表达的报告基因还可以作为特定发育时期的细胞类型或组织器官的识别标记, 应用于发育生物学研究.

如果Gene Trap中引入"GAL4/UAS"等基因调控表达的双元系统, 可以直接利用报告基因表达的模式系, 实现目的基因的异位表达. 1993 年, 首次在果蝇中建立GAL4/UAS异位表达系统, 并利用其使果蝇的外源基因在时空表达模式上受到严格控制[34,35]. 1998 年修饰过的GAL4/UAS系统首次被运用于拟南芥中[36]. 2003 年带有GAL4/UAS元件的增强子诱捕载体被引入水稻, 建立获得了组织器官特异表达的系列模式系[22]. 梁大成[37]利用该系统鉴定了花模式形成相关的转录因子*SFL*(Seaflower)基因功能, 发现*SFL*在雄蕊中异位表达引起多雌蕊结构的发生, 并诱发肿瘤样结构发生, 而在其他器官如成熟的叶片中异位表达导致细胞死亡, 显示*SFL*在水稻花器官发育中的特异性调控功能. 采用"GAL4/UAS"双因子系统, 只要有了相应的模式系, 就可以将目标基因的表达限定于植物生长的某一特定时期、特定器官甚至特定细胞中, 获得特定的异位表达材料.

近年来新发展的RNA干涉技术也逐渐应用到水稻突变体的创建和基因功能研究中, 其中特别值得关注的是人工小分子RNA(artificial microRNA, amiRNA)技术. Warthmann等人[38]2009 年以水稻内源microRNA前体为骨架, 分别构建了水稻已知功能的 3 个基因的amiRNA, 分别转化水稻的粳稻和籼稻品种, 均出现了预期抑制基因功能的突变表现型, 说明amiRNA技术是一个定向创建水稻丧失功能突变体的

有效工具.

随着各种突变体创制技术的日益完善和发展, 不同类型的水稻突变库相继在各个实验室建立, 同时突变表型和插入位点的基因信息日益丰富, 使得从基因寻找表型性状的反向遗传学和从突变体表型寻找目标基因的正向遗传学两条研究基因功能的途径变得更为快捷, 可以预见通过突变体的途径, 会有大量的水稻基因被分离克隆.

1.2 基因的全长 cDNA 文库

全长 cDNA(full-length cDNA, FLcDNA)提供一个基因完整的 mRNA 的反转录序列, 在基因编码区域的确定、转录和翻译水平上基因的调控及基因的表达分析等方面发挥着不可替代的作用, 分离克隆基因的全长 cDNA 成为水稻功能基因组研究的重要平台之一.

日本FAIS, RIKEN和NIAS等 3 家研究单位于 2000 年初实施了水稻全长cDNA计划. 2003 年, 他们报道分离了 28469 条粳稻品种日本晴的全长cDNA[39]. 同年 10 月, 其序列增至 32127 条, 截止到 2007 年 9 月, 又增加全长cDNA序列 4902 条. 所有FLcDNA的信息可以在KOME(Knowledge-Based *Oryza* Molecular Biological Encyclopedia)页面检索到(http://

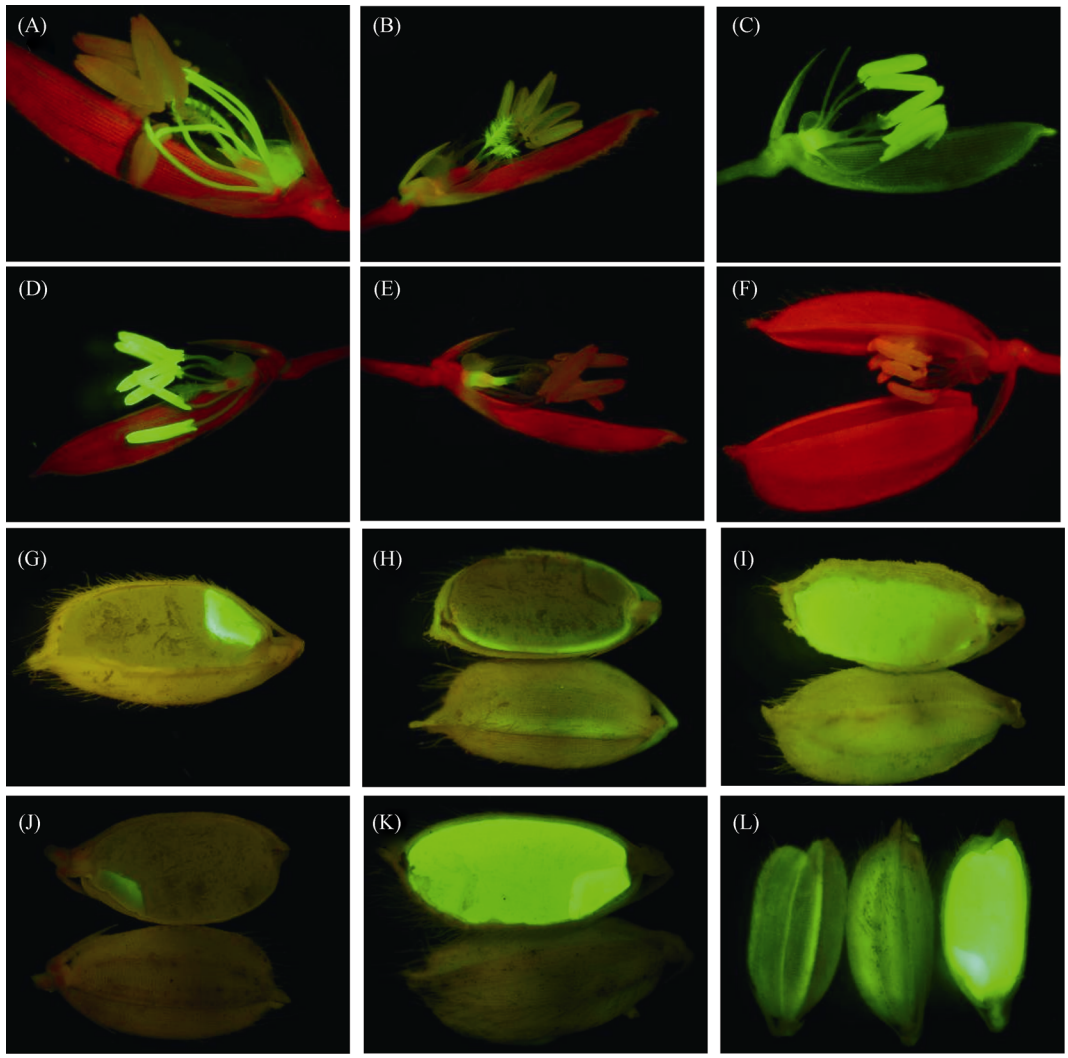


图 2 水稻Enhancer Trap系中报告基因GFP在水稻花、种子中的表达模式(引自文献[27])

A. 花丝 B. 柱头 C. 花 D.雄蕊 E.子房 F.阴性对照 G. 胚 H. 种皮 I. 胚乳 J.部分胚 K.胚、胚乳 L.颖壳、胚、胚乳

cdna01.dna.affrc.go.jp/cDNA/). 这些全长 cDNA 序列的长度为 55~8232 bp, 平均大小为 1.7 kb, 序列的精确度达到了 99.99%, 覆盖了水稻基因组预测基因的一半以上, 其中 94%的序列已经定位到水稻基因组上.

中国水稻功能基因组研究主要致力于籼稻品种的全长cDNA分离. 储昭辉等人[40]以优良杂交稻的恢复系明恢 63 为材料构建包含 9 个不同生育时期的不同组织和病原诱导组织的全生育期平衡化cDNA文库, 获得 6399 条非重复的EST序列. 2005 年, 谢卡斌等人[41]同样以明恢 63 为材料构建了全长cDNA文库, 分离得到 10828 条非冗余的全长cDNA. 在分离到的全长cDNA中, 53%的序列比报道的粳稻全长cDNA有更长的 5′端非翻译区(5′untranslated region, 5′UTR); 90.28%(9776 条)的序列能定位到粳稻基因组序列上, 92.78%(10046 条)的序列可以定位到籼稻基因组序列上; 8216 条序列能与日本晴的全长cDNA序列定位到粳稻基因组序列的同一位置上, 籼粳间cDNA序列的平均相似性为 99.2%; 90%以上的全长cDNA能进行GO(gene ontology)分类; 发现其中 780 条为水 稻新的表达序列. 序列信息收录于REDB(Rice EST Data-Base) 网站 (http://redb.ncpgr.cn/modules/ redbtools/). 2008 年, 国家基因研究中心公布了 20000 多条籼稻品种广矮 4 号和明恢 63 的全长cDNA序列, 收录于RICD(rice *indica* cDNA Database) 网站(http://www.ncgr.ac.cn/ricd/)[42]. 水稻全长cDNA文库序列的建立, 研究者们不仅获得了大量的基因序列结构信息, 对于比较不同品种基因表达差异, 基因功能和表达蛋白的分析具有较大的意义.

1.3 基因芯片和表达谱

研究基因的时空表达模式, 确定其在不同细胞类型、发育阶段与环境条件下的表达差异, 是研究基因功能的一条重要途径. 为了满足功能基因组学研究需要全面、系统、高通量的分析基因差异表达的要求, 已经开发了一系列能够大规模地进行基因差异谱研究的技术, 包括基因表达的系统分析(Serial Analysis of Gene Expression, SAGE)、cDNA 微列阵(cDNA microarry)和 DNA 芯片(DNA chip)等, 这些高通量研究平台的相继建立, 为大规模研究参与某个发育过程或不同处理条件下基因的表达谱创造了条件.

(1) 水稻 4 号染色体Tiling芯片. Tiling芯片是一种针对所有转录本的DNA微阵列, 可以保证对整个基因组全转录本的扫描, 因此对于研究转录本在基因组中的位置, DNA甲基化、组蛋白乙酰化有极好的应用. 2003 年, 北大-耶鲁联合研究中心邓兴旺研究组与中国科学院上海国家基因研究中心韩斌研究组合作, 将精细测序的水稻日本晴 4 号染色体序列分段克隆点成芯片, 创制了水稻 4 号染色体的Tiling芯片, 芯片中染色体序列相邻克隆头尾重叠, 跨越整个染色体 33 Mb(95.5%)[43]. 利用该芯片, 选取 6 种代表性组织和器官对水稻发育过程中染色体转录活性进行研究, 结果显示 82%的预测基因是表达的, 并发现 1643 个新的转录活性区域; 水稻苗期组织中常染色质区转录活性高于转座子富集的异染色质区, 而在成株期的器官中在一定的异染色质区域内某些转座子相关基因的转录活性提高了[43].

(2) 水稻全基因组覆瓦式寡聚核苷酸芯片. 随着水稻全基因组测序的完成, 设计覆盖全基因的寡聚核苷酸芯片成为可能. 2005 年, Li等人[44]利用籼稻和粳稻的 10 号染色体寡聚核苷酸芯片检测幼苗的根、叶、稻穗和悬浮细胞系的基因表达情况, 该芯片分别用 840000 和 750000 万个 36-mer的寡聚核苷酸探针覆盖两个籼粳亚种. 结果发现, 大约预测基因的 3/4 是有转录活性的, 在粳稻染色体上找到了 549 个新的转录单元. 2006 年, Li等人[45]又设计了一种高密度的寡核苷酸Tiling Microarray, 该芯片包含 13078888 个 35-mer长度的探针, 通过高密集的探针数保证对整个基因组全转录本的扫描. 结果显示, 水稻 35970 (81.9%)个预测基因具有转录表达活性, 而另外检测到的 5646 个基因间区域的信号簇, 可能是目前算法和软件无法预测的新基因. 通过将这些可能的新基因序列与植物EST数据库比对发现, 其中近 30%的序列与植物基因存在同源性, 并成功地克隆到了部分新基因的序列. 2008 年, 利用包含 380766 个长度为 36 nt的寡聚核苷酸芯片我国科学家成功检测粳稻品种日本晴染色体DNA甲基化与组蛋白修饰, 并完成了水稻 4 号和 10 号染色体的DNA甲基化和组蛋白H3K4 甲基化的表观遗传学图谱[46].

(3) 全基因组表达谱. 2005 年, 中国科学院北京基因组研究中心和北大-耶鲁联合研究中心合作完成

了全球第一个包含 60000 个长度为 70 nt覆盖水稻全基因组的寡聚核苷酸芯片, 并应用于水稻全基因组转录活性的研究[47], 以及拟南芥和水稻对光信号反应的比较基因组表达图谱的研究. 发现存在大范围(20%)的转录组重编程及转录水平的级联反应, 水稻与拟南芥类似, 不同器官的表达谱有显著差异, 研究中相应找到了高显示度的顺式作用结构域[48]. 同时, 利用cDNA芯片、Affymetrix全基因组表达芯片, 系统地完成了水稻全生育期和不同胁迫条件(低氮、低磷、干旱、低温等)的全基因组表达谱分析, 并初步建成了芯片数据CREP(collection of rice expression profiles)的信息平台http://crep.ncpgr.cn/(数据暂未公布).

Wang 等人(数据暂未公布)以珍汕 97、明恢 63 及汕优 63 三个品种为材料, 提取包括不同发育阶段的愈伤、萌发的种子、胚根、胚芽、根、茎、叶、幼穗、雄蕊、颖壳、胚乳等 39 个器官或组织的 RNA, 与 Affymetrix 全基因组芯片进行杂交, 获得了汕优 63 及两个亲本品种的全生育期不同发育时期不同组织或器官的特异性表达谱.

Lian等人[49]制作了一批cDNA芯片, 用以分析明恢 63 苗期低氮胁迫 20 min, 1 h以及 2 h的基因表达谱, 在根部发现了 471 个EST与低氮胁迫相关. 以合江 19 为材料, 五叶期幼苗进行低氮、低磷胁迫处理, 分别在胁迫处理后的 1 h, 24 h和 7 天分地上部和地下部取样, 抽提RNA后与Affymetrix 水稻全基因组芯片杂交, 获得了水稻苗期氮、磷胁迫不同时间点的全基因组表达谱. 数据分析后鉴定出受氮胁迫影响差异表达基因为 1444 个, 受磷胁迫影响差异表达基因 455 个. 功能分析表明这些基因涉及氮、磷代谢各途径中的很多重要基因, 以及一些功能尚未知的基因, 同时鉴定了对基因表达起调控作用的转录因子 123 个(数据暂未公布). 后续正在对这些基因进行功能鉴定和验证以发掘新的氮、磷高效基因.

多个单位分别建立了以单个水稻品种为材料比较不同时期或不同器官在干旱胁迫后表达谱差异[50]. 熊立仲等人针对已用于抗旱性相关QTL定位的群体的亲本品种进行干旱胁迫后的比较表达谱分析, 为抗旱基因的鉴定提供了更丰富的线索. 他们以旱稻 IRAT109 和水稻珍汕 97 为材料, 用一个包含有 9216 条特异cDNA序列的cDNA 芯片对水稻营养生殖期(5 叶期)干旱胁迫后的表达谱进行分析; 利用Affymetrix 全基因组芯片分析孕穗期干旱胁迫的水稻叶片中基因的表达谱. 根据cDNA微阵列和基因芯片的表达谱以及已知的植物对逆境应答和适应机制的认识. 熊立仲课题组已经挑选了 100 多个逆境相关基因进行了水稻转化和转基因水稻的抗旱性鉴定, 并对能够增强转基因水稻抗旱性的基因进行了功能分析. 结果表明, 至少有 6 个基因的转基因水稻的抗旱性得到显著提高, 这些基因编码的预测蛋白分别为NAC转录因子SNAC1[51]、CBL互作蛋白激酶[52]、LEA蛋 白[53]、类糜蛋白酶抑制子[54]、bZIP转录因子[55]、SKIP同源蛋白[56].

2 水稻重要农艺性状的功能基因组

随着水稻大型突变体库, 基因全长 cDNA 文库, 基因表达谱芯片等一批水稻功能基因组研究平台的建立, 通过插入标签、基因表达信息及图位克隆等方法分离克隆基因的技术体系日益完善, 快速分离克隆控制水稻重要性状的功能基因已成为现实. 近年来, 一大批的控制水稻高产、优质、抗逆和营养高效等重要农艺性状的基因被分离(表 1), 其中许多在农业生产中表现良好的应用前景.

2.1 产量性状相关基因

产量性状属于复杂的数量性状, 在遗传基础上是由多个基因所控制, 在遗传群体中性状分离表现为连续变异. 水稻产量的构成因子主要包括: 有效穗数、穗粒数和粒重. Xue等人[57]采用图位克隆的策略分离到一个同时控制水稻的株高、抽穗期和穗粒数的主效基因*Ghd7*. *Ghd7* 属于CCT基因家族的成员, 将含有来自明恢 63 的基因区段转化合江 19、牡丹江 8 号、日本晴等小穗品种后, 转基因植株表现抽穗延迟, 株高增高, 每穗颖花数显著增加, 证实了该基因是同时控制水稻的株高、抽穗期和穗粒数的基因. Fan等人[58]利用大粒品种明恢 63 和小粒品种川 7 构建的近等基因系, 克隆了位于第 3 染色体上控制粒长和千粒重的主效QTL *GS3*, 该基因编码一个跨膜蛋白. *GS3* 可解释 80%~90%的粒长和千粒重表型变异, 并且对粒宽和粒厚也具有微效作用. 对 180 个不同粒长的品种 *GS3* 比较测序发现, 第 2 个外显子碱基A和C的差异与粒长性状高度关联, 由此开发的功能标记可

以应用于分子标记辅助选择*GS3*基因改良稻米外观、品质和产量[59]. Song等人[60]以小粒籼稻品种“丰矮占1号”(Fengaizhan-1, FAZ1)和大粒粳稻品种“WY3”作为亲本材料, 定位并成功克隆了一个位于第2号染色体上对粒宽性状的贡献率高达65.5%的主效QTL *GW2*. 与小粒亲本FAZ1的等位基因相比, 大粒亲本WY3的*GW2*等位基因存在3处变异, 导致等位基因突变蛋白翻译的提前终止. 比较测序结果显示, 该基因的变异引起大粒表型, 即该基因可能负调控水稻谷粒宽度的发育. 利用分子标记辅助选择将来源于大粒品种WY3的*GW2*导入到小粒品种FAZ1中后, 近等基因系NIL(*GW2*)谷粒和糙米比轮回亲本FAZ1显著变宽, 千粒重提高了49.8%, 表现出极好的应用前景. 此外, 控制穗形态基因*DEP1*[61]和籽粒灌浆充实度基因*GIF1*[62]等均对水稻产量性状的遗传改良具有良好的应用前景.

2.2 株型相关基因

水稻株型指水稻的分蘖数、分蘖角度、植株的高度、叶片与茎杆的夹角等, 理想的水稻株型可以提高光合作用效率, 从而提高单位面积的产量, 是水稻遗传改良的重要农艺性状之一. Li等人[63]通过图位克隆的方法克隆了控制水稻分蘖的基因*MOC1*. *MOC1*突变植株只有主茎, 没有分蘖, *MOC1*编码的蛋白为GRAS家族的成员与番茄(*Lycopersicon esculentum* Mill.)Lateral Suppressor(LS)同源性高达44%, *MOC1*基因不仅控制腋生分生组织的起始和分蘖芽的形成, 同时还具有促进分蘖芽生长的功能. *MOC1*可能是控制水稻分蘖的基因分子开关基因, 转*MOC1*基因的植株分蘖能力明显比野生型强, 表现出重要的育种应用潜力.

对水稻分蘖角度的研究, 2005年, Li等人[64]分离了一个控制水稻分蘖角度的基因*LAZY1*, 它为禾本科植物所特有. LAZY1对植物生长激素的极性运输(polar auxin transport, PAT)具有负调控作用, 在LAZY1功能丧失的突变体中PAT作用加强, IAA在茎中的分配被改变从而导致水稻分蘖角增大. 除了*LAZY1*基因外, 我国科学家近年来还分离克隆了*TAC1*(*Tiller Angle Control 1*), *PROG1*(*PROSTRATEGROWTH 1*)等一些控制分蘖角度的关键基因. 2008年11月, *Nature Genetics*同一期发表了我国的两个不同的实验室用不同的亲本材料克隆的控制野生稻匍匐生长习性的基因*PROG1*[65,66]. 该基因位于水稻第7号染色体短臂上, 编码一个Cys2-His2类锌指蛋白. 在水稻的进化过程中, 由野生稻的*PROG1*基因进化为栽培稻的*prog1*后, 基因的功能丧失, 不仅由匍匐生长变成直立生长, 株型得到改良, 更适合密植, 而且穗粒数增加, 产量大幅度提高. 比较测序发现, 来自不同国家的182个水稻品种的*prog1*基因表现相同的变异, 说明该基因可能是单起源的. 弄清水稻分蘖能力, 分蘖角度的调控机理, 既有利于培育理想株型的水稻品种从而提高单位面积产量, 又有利于机械化种植.

2.3 抗非生物逆境(干旱、盐碱)相关基因

土壤的盐碱化和干旱是粮食生产面临的一个严峻的环境问题, 严重威胁着世界农业生产和粮食供应. 近年来, 我国科学家在抗逆功能基因的分离克隆方面积累了优良的基因资源. 以在沿海沼泽地中发现的高度耐盐的籼稻品种Nona Bokra(*Oryza sativa* L. ssp. *indica* var. Nona Bokra)与盐敏感的优质粳稻栽培品种越光(*Oryza sativa* L. ssp. *japonica* var. Koshihikari)为亲本, 定位了11个与与盐胁迫相关的QTL[67], 并于2005年成功克隆了一个对表型变异的贡献率达到40.1%的主效QTL基因*SKC1*[68]. *SKC1*编码一个HKT(High-affinity K^+ Transporter)家族的离子转运蛋白. 序列分析表明, 两个亲本的SKC1蛋白NSKC1(Nona Bokra)和KSKC1(越光)之间有4个氨基酸的替换. 耐盐品种Nona Bokra的*SKC1*基因导入感盐品种中花11号后, 经140 mmol/L NaCl处理后, 转基因植株的地上部钾离子浓度显著高于对照, 证明*SKC1*是Nona Bokra中的耐盐基因. 采用分子标记辅助选择方法将耐盐品种Nona Bokra的SKC1片段导入轮回亲本越光的遗传背景后获得的近等基因系NIL(SKC1)对盐的耐受能力大大增加, 表明这一基因在水稻甚至其他作物耐盐品种培育中有重要的应用价值.

在基因芯片中寻找水稻干旱胁迫下差异表达基因, 通过超量表达或RNA干涉等技术, 成功分离克隆了多个参与水稻抗旱的关键基因. 其中*SNAC1*是一

个与逆境应答的NAC类转录因子, 它的表达受干旱、高盐、低温和ABA的诱导, 并在干旱条件下在保卫细胞中被特异诱导表达. 超量表达转基因植株虽然与野生型植株没有任何形态差异. 但其在苗期和成株期的抗旱性明显增强, 特别是在重度干旱条件下, 野生型植株的结实率低于 5%, 而转基因水稻的结实率在 20%以上. 扫描电子显微镜观察结果表明, 转基因植株的气孔关闭数要显著高于野生型植株. 在干旱过程中, 转基因植株丧失水分的速率要慢于野生型, 具有更低的临界相对含水量[51]. 最近鉴定的*OsSKIPa*调控了细胞的活力, 超量表达该基因后可以提高水稻在缺水条件下的生存能力, 降低干旱引起的产量损失[56].

2.4 抗病相关基因

白叶枯病是水稻生产中最为严重的细菌性病害之一, 严重影响了水稻生产. 近年来我国研究人员在水稻抗白叶枯病基因的分离克隆和抗病机理研究中取得了重要进展. 2004 年Sun等人[69]克隆了水稻抗白叶枯病基因*Xa26*, 该基因是中国和日本等地粳稻育种中的主要抗白叶枯病主效基因, 属于一个由 4 个成员组成的多基因家族, 编码一个受体激酶类蛋白质. 最近的研究又确定*Xa3* 和*Xa26* 是同一个基因, 命名为*Xa3/Xa26*[70]. *Xa3/Xa26* 基因对部分白叶枯病菌株(如中国菌株JL691)具有全生育期抗性, 而对另外的白叶枯病菌株只有成株期抗性[71,72]. 此外,遗传背景影响*Xa3/Xa26* 基因的功能, 该基因在粳稻背景中能够更好地发挥其抗病功能. *Xa3/Xa26* 基因具有剂量效应, 其表达量越高, 水稻植株的抗性越好[72].

绝大多数已命名的抗白叶枯病基因对白叶枯病菌生理小种 6(代表菌株PXO99)没有抗性. 2006 年分离克隆的抗白叶枯病隐性基因*xa13* 介导水稻对PXO99 的特异性抗性, 显示该基因具有很好地应用前景. 研究发现, *xa13* 是一种新类型的植物抗病基因, 编码的细胞膜蛋白是病原侵染的调节物. 抑制显性基因*Xa13* 的表达可使感病水稻变为抗病, 抑制隐性基因*xa13* 的表达可进一步增强水稻的抗性. 此外, 隐性基因*xa13* 以及它的显性基因*Xa13* 也是花粉发育所必需的基因[73]. 2008 年, Ding等人[74]首度揭示生长素如何作为毒性因子帮助病菌侵染植物的作用机理. 研究发现, *GH3-8/OsDR2* 编码IAA酰胺合成酶, 催化IAA-氨基酸的合成从而抑制生长素的作用, *GH3-8/OsDR2* 通过抑制生长素的功能阻止细胞壁的松弛, 增强水稻对病原菌的自身免疫功能.

2.5 氮、磷营养利用基因

通过对磷高效水稻Kasalath差减扣除文库中的ESTs进行筛选, 2005 年, Yi等人[75]在国际上第一个报道了在植物中能明确提高磷效率功能的转录因子*OsPTF1*. 该基因编码bHLH类转录因子, 研究发现磷低效Nippornbare的PTF1 第 416 位脯氨酸在磷高效的Kasalath中被替换成苏氨酸存在着基因型差异. 磷饥饿条件下该基因在根中被诱导表达, 而在叶中是组成型表达. *OsPTF1* 参与植物磷的利用过程, 超量表达的转基因植株耐磷饥饿能力要高于野生型植株. 在大田低磷的条件下, 转基因植株的分蘖能力、根和茎的生物学产量以及植株体内磷的含量均比对照高 20%.

拟南芥中*AtPHR1* 基因和衣藻*PSR1* 基因已被证明是磷饥饿信号的核心调控因子. 2008 年, Zhou等人[76]从水稻中克隆了拟南芥*AtPHR1* 的同源基因*OsPHR1* 和*OsPHR2*. 这两个基因属于MYB-CC家族的新成员, 具有高度保守的MYB-DNA结合域和CC结构域. 他们的研究表明, *OsPHR1* 和*OsPHR2* 参与磷饥饿信号途径, 调节磷饥饿诱导基因的表达. 但是在低P条件下, 只有*OsPHR2* 的增强表达引起植物地上部有效磷的大量积累. Wang等人[77]利用同源序列比对法, 克隆了水稻耐低磷胁迫相关转录因子*OsSPX1*, 该基因在植物根部特异的受磷饥饿诱导表达. 抑制*OsSPX1* 基因的表达, 植株产生磷过量的毒害表型. 研究发现*OsSPX1* 在*OsPHR2* 超量表达植株和pho2 突变体中表达强, 显示*OsSPX1* 可能在*OsPHR2* 和*PHO2* 的下游发挥作用. 对磷饥饿信号转导途径中 10 个基因的表达分析表明, *OsSPX1* 以负反馈调节调控植物在低磷条件下的生长. 上述研究为深入了解水稻中磷饥饿信号的调控途径提供了重要的分子生物学依据.

2.6 籼粳杂种育性基因

水稻籼粳亚种间具有强大的杂种优势, 但是籼粳杂种 F1 普遍存在不育或者半不育的现象, 限制了亚种间杂种优势的利用. 水稻广亲和品种作为一类

特殊的种质资源, 与籼稻或粳稻品种杂交都可表现为正常的育性. 水稻广亲和品种中的广亲和基因可以有效地克服籼粳亚种间杂种的不育性. 已经发现20多个与水稻杂种育性有关的基因座, 如导致雌配子不育的*S5*, *S7*, *S8*, *S9*, *S15*, *S17*, 导致雄配子不育的*Sa*, *Sb*, *Sc*, *Sd*, *Se*, *Sf*等. 2008年, 在*Proc Natl Acad Sci USA*上分别发表了*S5*和*Sa*对控制杂种育性基因的研究成果, 为深入揭示杂种不育的机理奠定了坚实的基础, 同时也为亚种间杂种优势的利用提供了可能. *S5*基因编码一个天冬氨酰蛋白酶, 通过控制雌配子的育性而影响结实率. 籼粳稻的*S5*等位基因间仅两个碱基的差别, 引起相应蛋白两个氨基酸的替换, 造成其杂种的不育. 广亲和品种的*S5*等位基因(广亲和基因)则因其大片段缺失, 导致功能丧失, 造成蛋白亚细胞定位的改变, 这可能使其功能丧失, 从而使其与籼稻和粳稻杂交, 都不影响杂种的育性[78]. 与*S5*不同, 克隆的*Sa*基因座是影响雄配子育性的基因. *Sa*由2个相邻的基因组成, 第一个基因命名为SaM^+(籼型*indica*)或SaM^-(粳型*japonica*); 第2个基因含有F-Box结构域, 命名为SaF^+(*indica*)或SaF^-(*japonica*). 大部分籼稻具有SaM^+SaF^+基因型, 部分籼稻品系为亲和(中性)的基因型SaM^+SaF^-, 它们与粳稻(SaM^-SaF^-)杂交可以产生亲和性即杂种可育. 转基因和蛋白互作实验表明, SaF蛋白与SaM^-截断蛋白的直接相互作用, 并在与SaM^+的间接相互作用下控制花粉的发育. 本研究提出*Sa*座位杂种不育与亲和的分子作用机理模型: 双基因/三因子互作(two-gene/three-component interaction)模型, 揭示了水稻籼粳杂种雄性不育的分子基础[79].

2.7 细胞质雄性不育和恢复基因

自从20世纪70年代, 中国成功实现杂交水稻三系配套以来, 不少学者致力于水稻细胞质雄性不育及育性恢复的机理研究. Wang等人[80]对水稻CMS-BT细胞质雄性不育机理和育性恢复基因功能解析的研究揭示, 在BT型细胞质雄性不育水稻里有一个异常的线粒体的可读框——*orf79*, 它和*atp6*基因共转录, 编码1个细胞毒素肽. 应用转基因植株证实*orf79*在水稻中表达导致花粉呈雄配子体雄性不育. 并在第10号染色体*Rf-1*遗传位点上发现一个编码含PPR蛋白的多基因簇, 其中至少有2个成员*Rf1a*(=日本研究组报道的PRR791)和*Rf1b*被证明对BT型有育性恢复功能. 2个基因的蛋白(RF1A和RF1B)均为线粒体定位, RF1A以内切方式切断B-*atp6/orf79*的mRNA来阻止ORF79蛋白的产生而使育性恢复, 而RF1B则通过降解B-*atp6/orf79*的mRNA使育性恢复. 有趣的是, 在RF1A和RF1B同时存在时, RF1A具有优先的作用. 他们的研究还表明, RF1A除了具有切断B-*atp6/orf79* mRNA的功能外, 还可以促进*atp6*mRNA的编辑, 推测后者可能是其基本功能, 前者是进化过程中产生的新功能. 该研究结果完整地阐明了水稻CMS-BT型雄性不育和育性恢复的分子机理. 由于迄今所报道的水稻细胞质雄性不育(包括CMS-BT型、CMS-WA型和CMS-HL型)和多种其他植物细胞质雄性不育的育性恢复表现为两位点重叠效应的遗传模式[81,82], 该研究成果对植物细胞质雄性不育和育性恢复的研究具有特别意义. 该成果的发表标志中国在植物细胞质雄性不育及其恢复性的分子机理研究领域已跻身国际先进行列.

2.8 发育相关基因

种子萌发、幼苗的形成、花器官发育、受粉受精、结实、衰老等植物一系列的生长发育过程都与作物的品质和产量密切相关, 植物的生长发育机理一直是功能基因组学研究的重点. Chu等人[83]分离和鉴定了水稻突变体floral organ number 4(fon4). 该突变体表现出在营养和生殖生长阶段分生组织膨大, 所有花器官尤其是内部花器官的数量都有所增加, fon4突变体花发育的异常与fon1突变体的非常相似. 利用图位克隆的方法, 他们克隆到了*FON4*基因, 该基因在顶端分生组织顶端几个细胞中特异性表达, 可能编码一个分泌到细胞外的多肽, 并且与CLV3同源. 进一步研究显示, CLV信号传导途径在单子叶植物水稻中较为保守, 但是CLV3和FON4在功能上存在分化. 除了FON1, 存在着另外FON4的受体, 参与调节水稻的顶端分生组织的发育[84]. 该研究为了解水稻分生组织发育调控机制提供了良好的分子基础. 2009年克隆的控制水稻颖片形成和小穗发育的脂酶基因——

水稻额外颖基因*EXTRA GLUME1*(*EG1*), 该基因编码一脂酶, 在花序原基中表达量高, 不但决定水稻颖片形成, 而且还可控制小花的发育. 与已知的植物脂酶功能不同, EG1 编码的III类脂酶揭示了颖片形成和小穗发育的调控新途径的存在[85]. Sun等人[86]克隆了水稻*JMJ706* 基因, 这是第一个在水稻中阐明功能的组蛋白去甲基化酶基因. *JMJ706* 基因T-DNA插入失活后水稻花发育异常, 内、外颖壳异常甚至缺失, 雌、雄蕊增多等, 全长cDNA互补实验可恢复突变体的表型, 证实*JMJ706* 基因可控制水稻花器官发育. 经体内、体外多种方法检测发现*JMJ706* 可特异去除H3K9的di-和tri-位点的甲基化, *JMJ706* 基因通过改变组蛋白H3K9 甲基化修饰程度来控制花发育过程中的重要基因. 其他如控制水稻绒毡层程序性死亡关键调控因子*TDR*基因[87,88], 控制不定根生长发育的关键调节因子基因*WOX11*[89], 控制水稻成花转换的分子开关基因*RID1*[24], 为阐明水稻生长发育的调控机理提供了重要的实验和理论基础.

表 1 近年来中国实验室分离克隆的部分水稻重要功能基因(引自文献[27])

性状	基因名称	编码蛋白	基因功能	克隆方法	参考文献
产量	*GHD7*	含 CCT 结构域蛋白	株高、生育期、穗大小	图位克隆	[57]
	GS3	含 PEBP 类似结构域蛋白	粒长、粒重	图位克隆	[58]
	GW2	RING 类- E3 泛素连接酶	粒宽、粒重	图位克隆	[60]
	DEP1	类似 PEBP 结构域的蛋白	穗形	图位克隆	[61]
	GIF1	细胞壁蔗糖酶	籽粒充实度	图位克隆	[62]
株型	*FC1*	肉桂醇脱氢酶	木质素合成、茎杆强度	T-DNA 标签	[25]
	MOC1	GRAS 家族蛋白	控制分蘖数量	图位克隆	[63]
	BC1	COBRA 类蛋白	纤维素合成、茎杆强度	图位克隆	[63]
	LAZY1	未知蛋白	分蘖角度	图位克隆	[64]
	PROG1	Cys2-His2 锌指蛋白	分蘖角度	图位克隆	[65,66]
	TAC1	未知蛋白	分蘖角度	图位克隆	[90]
	EUI	细胞色素 P450 单加氧酶	GA 代谢, 穗颈长度	图位克隆	[91]
	SLL1	KANADI 转录因子	调节叶片卷曲度	图位克隆	[92]
抗逆	*SNAC1*	NAC 类转录因子	调控气孔关闭, 抗旱	基因芯片	[51]
	OsSKIPa	Ski-作用蛋白	细胞的活力, 抗旱	基因芯片	[56]
	SKC1	离子转运蛋白	维持钠钾离子平衡, 抗盐	图位克隆	[68]
	Xa26	LRR 类受体蛋白激酶	抗白叶枯病基因	图位克隆	[69]
	xa13	一结瘤素 MtN3 类似基因	隐性抗白叶枯病基因	图位克隆	[73]
营养	*OsPFT1*	一种新的转录因子	低磷胁迫应答	抑制消减杂交	[75]
	OsPHR2	MYB 类转录因子	磷信号转导	同源基因法	[76]
	OsSPX1	SPX 结构域蛋白	磷信号转导	同源基因法	[77]
育性	*S5*	天冬氨酰蛋白酶	籼粳杂种育性	图位克隆	[78]
	Sa	E3 类泛素连接酶、F-box 蛋白	籼粳杂种育性	图位克隆	[79]
	orf79	细胞质雄性不育基因	细胞毒素肽	图位克隆	[80]
	Rf1a,Rf1b	PPR 蛋白	育性恢复	图位克隆	[80]
	PAIR3	coiled-coil 结构域蛋白	同源染色体配对	T-DNA 标签法	[93]
生长发育	*RID1*	锌指类转录因子	成花转换	T-DNA 标签法	[24]
	FON4	与 CLV3 同源的多肽	调节水稻顶端分生组织发育	图位克隆	[83]
	EG1	酯酶	颖片形成和小穗发育	图位克隆	[85]
	JMJ706	组蛋白去甲基化酶	花发育	T-DNA 标签法	[86]
	TDR	bHLH 类转录因子	控制绒毡层程序性死亡	图位克隆	[87]
	WOX11	WOX 类蛋白	不定根生长发育	同源序列法	[89]

3 RICE 2020

随着新技术和新方法的不断发展, 水稻功能基因组研究的内容日益丰富. 如基于基因组图谱和测序基础, 对已知的基因和基因组结构进行比较来了解基因的功能、表达机理和物种进化的比较基因组学; 研究同一细胞在不同生长时期及生长环境下基因表达的信息, 揭示特定调节基因作用机制的转录基因组学; 研究新陈代谢过程中代谢产物的变化规律, 揭示机体生命代谢活动本质的代谢基因组学以及对机体或细胞的所有蛋白质进行鉴定和结构功能分析的蛋白质组学等. 综合国内外水稻功能基因组研究的发展态势, 中国科学家提出了水稻功能基因组 2020 年研究计划[94], 其目标是, 到 2020 年基本明确水稻基因组全部基因的功能, 对于农业上有重要应用前景的基因鉴定其功能多样性, 将功能基因组研究成果应用到水稻育种实践, 实现分子设计育种. Zhang等人[94]建议世界各国的科学家联合起来, 资源共享, 协同合作. (1) 建立国际共享的水稻功能基因组研究的技术平台和基因资源; (2) 系统的鉴定突变体的表现型, 实现基因功能和表现型一一对应; (3) 发展表观基因组学和基因表达分析, 明确基因的调控网络; (4) 深入开展蛋白组学和蛋白互作研究; (5) 启动水稻基因组的深度测序, 建立SNP平台鉴定基因功能的多样性; (6) 建立海量数据搜索和分析的数据库平台, 数据共享; (7) 分子设计育种. 该计划前瞻性地提出了水稻功能基因组未来的发展方向, 得到了世界多国科学家的响应, 将极大地推动包括我国在内的全世界水稻功能基因组的研究进程.

4 展望

在未来 10 年中, 水稻功能基因组研究有望鉴定和分离出控制重要农艺性状的全部基因, 揭示基因的时空表达模式, 弄清在性状形成中基因与基因的互作, 并在此基础上形成对基因调控网络的认识. 届时人们就从基因结构和基因表达调控两个方面对基因进行修饰, 在作物育种实践中实现分子设计育种.

分子设计育种的基本思想是对优良基因的聚合和基因与表达调控元件的有机整合, 依赖于重要功能基因资源的发掘和基因表达调控方式的优化. 中国研究人员已分离了一系列的调控水稻重要农艺性状的关键基因, 深入了解这些基因的调控网络, 采用合适的遗传表达调控体系, 将使这些基因的功能得到合理的应用.

中国是世界人口大国, 人均耕地面积很少, 资源短缺, 实现我国粮食生产高产、稳产的目标形势严峻. 将功能基因组研究成果运用于水稻育种改良, 培育抗病虫、抗旱、营养高效利用、高产、优质的“绿色超级稻”可以缓解或解决我国水肥资源短缺, 生态环境恶化, 粮食安全威胁等问题, 保障我国农业持续高效发展[95]. 同时, 作为禾本科的模式植物, 水稻功能基因组研究过程中产生的新理论、新技术和新方法将直接促进我国的植物功能基因组学研究, 带动中国农业科学和农业生物技术的快速发展.

参考文献

1 Sasaki T. The rice genome project in Japan. Proc Natl Acad Sci USA, 1998, 95: 2027—2028[DOI]

2 Sasaki T, Burr B. International rice genome sequencing project: the effort to completely sequence the rice genome. Curr Opin Plant Biol, 2000, 3: 138—141[DOI]

3 Yu J, Hu S, Wang J, et al. A draft sequence of the rice genome (*Oryza sativa* L. ssp. *indica*). Science, 2002, 296: 79—92[DOI]

4 Goff S, Ricke D, Lan T, et al. A Draft sequence of the rice genome (*Oryza sativa* L. ssp. *japonica*). Science, 2002, 296: 92—100[DOI]

5 Sasaki T, Matsumoto T, Yamamoto K, et al. The genome sequence and structure of rice chromosome 1. Nature, 2002, 420: 312—316[DOI]

6 Feng Q, Zhang Y, Hao P, et al. Sequence and analysis of rice chromosome 4. Nature, 2002, 420: 316—320[DOI]

7 The rice chromosome 10 sequencing consortium. In-depth view of structure, activity, and evolution of rice chromosome 10. Science, 2003, 300:1566—1569[DOI]

8 International rice genome sequencing project. The map-based sequence of the rice genome. Nature, 2005, 436: 793—800[DOI]

9 The rice annotation project. Curated genome annotation of *Oryza sativa* ssp. *japonica* and comparative genome analysis with *Arabi-*

dopsis thaliana. Genome Res, 2007, 17:175 – 183[DOI]

10 Rice annotation project. The rice annotation project database (RAP-DB): 2008 update. Nucleic Acids Res, 2008, 36: 1028—1033[DOI]

11 Hieter P, Boguski M. Functional genomics: it's all how you read it. Science, 1997, 278: 601—602[DOI]

12 Schager W, Gorz A, Kahl G. T-DNA integration and expression in a monocot crop plant after induction of *Agrobacterium*. Nature, 1987, 327: 529—532[DOI]

13 Hiei Y, Ohta S, Komari T, et al. Efficient transformation of rice (*Oryza sativa* L.) mediated by *Agrobacterium* and sequence analysis of the boundaries of the T-DNA. Plant J, 1994, 6: 271—282[DOI]

14 Azpiroz-Leehan R, Feldmann K. T-DNA insertion mutagenesis in *Arabidopsis*: going back and forth. Trends Genet, 1997, 13: 152—156[DOI]

15 Krysan P, Young J, Sussman M. T-DNA as an insertional mutagen in *Arabidopsis*. Plant Cell, 1999, 11: 2283—2290[DOI]

16 Jeon J, Lee S, Jung K, et al. T-DNA insertional mutagenesis genomics in rice. Plant J, 2000, 22: 561—570[DOI]

17 Sallaud C, Gay C, Larmande P, et al. High throughput T-DNA insertion mutagenesis in rice: a first step towards in silico reverse genetics. Plant J, 2004, 39: 450—464[DOI]

18 Jeon J, An G. Gene tagging in rice: a high throughput system for functional genomics. Plant Sci, 2001, 161: 211—219[DOI]

19 Jeong D, An S, Kang M, et al. T-DNA insertional mutagenesis for activation tagging in rice. Plant Physiol, 2002, 130 : 1636—1644[DOI]

20 Chen S, Jin W, Wang M, et al. Distribution and characterization of over 1000 T-DNA tags in rice genome. Plant J, 2003, 36: 105—113[DOI]

21 Hsing Y, Chern C, Fan M, et al. A rice gene activation/knockout mutant resource for high throughput functional genomics. Plant Mol Biol, 2007, 63: 351—364[DOI]

22 Wu C, Li X, Yuan W, et al. Development of enhancer trap lines for functional analysis of the rice genome. Plant J, 2003, 35: 418—427[DOI]

23 李才顺. 水稻 GAL4/UAS 异位表达系统的建立和花模式形成基因 *SFL* 的功能分析. 博士学位论文. 武汉: 华中农业大学生命科学院, 2009

24 Wu C, You C, Li C, et al. *RID1*, encoding a Cys2/His2-type zinc finger transcription factor, acts as a master switch from vegetative to floral development in rice. Proc Natl Acad Sci USA, 2008, 105: 12915—12920[DOI]

25 Li X, Yang Y, Yao J, et al. *FLEXIBLE CULM 1* encoding a cinnamyl-alcohol dehydrogenase controls culm mechanical strength in rice. Plant Mol Biol, 2009, 69: 685—697[DOI]

26 Zhang J, Li C, Wu C, et al. RMD: a rice mutant database for functional analysis of the rice genome. Nucleic Acids Res, 2006, 34: 745—748[DOI]

27 张启发, 林拥军, 王石平, 等. 绿色超级稻的构想与实践. 北京: 科学出版社, 2009

28 Zhang J, Guo D, Chang Y, et al. Non-random distribution of T-DNA insertions at various levels of the genome hierarchy as revealed by analyzing 13804 T-DNA flanking sequences from an enhancer-trap mutant library. Plant J, 2007, 49: 947—959[DOI]

29 Krishnan A, Guiderdoni E, An G, et al. Mutant resources in rice for functional genomics of the grasses. Plant Physiol, 2009, 149: 165—170[DOI]

30 Springer P. Gene traps: tools for plant development and genomics. Plant Cell, 2000, 12: 1007—1020[DOI]

31 Wang A, Chen S, Shen G, et al. Establishment of promoter trapping system mediated by activator/dissociation (beta-glucuronidase) construction in rice. J Plant Physiol Mol Biol, 2005, 31: 575—580

32 Ito T, Eiguchi M, Kurata N. Establishment of an enhancer trap system with *Ds* and GUS for functional genomics in rice. Mol Genet Genomics, 2004, 271: 639—650

33 Johnson A, Hibberd J, Gay C, et al. Spatial control of transgene expression in rice(*Oryza sativa* L.) using the GAL4 enhancer trapping system. Plant J, 2005, 41: 779—789[DOI]

34 Brand A, Perrimon N. Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. Development,

1993, 118: 401—415
35 Phelp C, Brand A. Ectopic gene expression in *Drosophila* using GAL4 system. Methods, 1998, 14: 367—379[DOI]
36 Guyer D, Tuttle A, Rouse S, et al. Activation of latent transgenes in *Arabidopsis* using a hybrid transcription factor. Genetics, 1998, 149: 633—639
37 梁大成. 水稻 GAL4/UAS 异位表达系统的建立和花模式形成基因 *SFL* 的功能分析. 博士学位论文. 武汉: 华中农业大学, 2006
38 Warthmann N, Chen H, Ossowski S, et al. Highly specific gene silencing by artificial miRNAs in rice. PlosS one, 2008, 3: e1829[DOI]
39 Kikuchi S, Satoh K, Nagata T, et al. Collection, mapping, and annotation of over 28,000 cdna clones from *japonica* rice. Science, 2003, 301: 376—379[DOI]
40 储昭晖, 彭开蔓, 张利达, 等. 水稻全生育期均一化 cDNA 文库的构建和鉴定. 科学通报, 2002, 47: 1656—1662
41 谢卡斌, 张建伟, 向勇, 等. 10828 条籼稻全长 DNA 的分离和注释. 中国科学 C 辑: 生命科学, 2005, 35: 6—12
42 Lu T, Huang X, Zhu C, et al. RICD: a rice indica cDNA database resource for rice functional genomics. BMC Plant Biol, 2008, 8: 118[DOI]
43 Jiao Y, Jia P, Wang X, et al. A tiling microarray expression analysis of rice chromosome 4 suggests a chromosome-level regulation of transcription. Plant Cell, 2005, 17: 1641—1657[DOI]
44 Li L, Wang X, Xia M, et al. Tiling microarray analysis of rice chromosome 10 to identify the transcriptome and relate its expression to chromosomal architecture. Genome Biol. 2005, 6: 403[DOI]
45 Li L, Wang X, Stolc V, et al. Genome-wide transcription analyses in rice using tiling microarrays. Nat Genet, 2006, 38: 124—129[DOI]
46 Li X, Wang X, He K, et al. High-resolution mapping of epigenetic modifications of the rice genome uncovers interplay between DNA methylation, histone methylation, and gene expression. Plant Cell, 2008, 20: 259—276[DOI]
47 Ma L, Chen C, Liu X, et al. A microarray analysis of the rice transcriptome and its comparison to *Arabidopsis*. Genome Res, 2005, 15: 1274—1283[DOI]
48 Jiao Y, Ma L, Strickland E, et al. Conservation and divergence of light-regulated genome expression patterns during seedling development in rice and *Arabidopsis*. Plant Cell, 2005, 17: 3239—3256[DOI]
49 Lian X, Wang S, Zhang J, et al. Expression profiles of 10,422 genes at early stage of low nitrogen stress in rice assayed using a cDNA microarray. Plant Mol Biol, 2006, 60: 617—631[DOI]
50 Zhou J, Wang X, Jiao Y, et al. Global genome expression analysis of rice in response to drought and high-salinity stresses in shoot, flag leaf, and panicle. Plant Mol Biol, 2007, 63: 591—608[DOI]
51 Hu H, Dai M, Yao J, et al. Overexpressing a NAM, ATAF, and CUC (NAC) transcription factor enhances drought resistance and salt tolerance in rice. Proc Natl Acad Sci USA, 2006, 103: 12987—12992[DOI]
52 Xiang Y, Huang Y, Xiong L. Characterization of stress-responsive *CIPK* genes in rice for stress tolerance improvement. Plant Physiol, 2007, 144: 1416—1428[DOI]
53 Xiao B, Huang Y, Tang N, et al. Overexpression of a *LEA* gene in rice improves drought resistance under the field conditions. Theor Appl Genet, 2007, 115: 36—45
54 Huang Y, Xiao B, Xiong L. Characterization of a stress responsive proteinase inhibitor gene with positive effect in improving drought resistance in rice. Planta, 2007, 226: 73—85[DOI]
55 Xiang Y, Tang N, Du H, et al. Characterization of *OsbZIP23* as a key player of bZIP transcription factor family for conferring ABA sensitivity and salinity and drought tolerance in rice. Plant Physiol, 2008, 148: 1938—1952[DOI]
56 Hou X, Xie K, Yao J, et al. A homolog of human ski-interacting protein in rice positively regulates cell viability and stress tolerance. Proc Natl Acad Sci USA, 2009, 106: 6410—6415[DOI]
57 Xue W, Xing Y, Weng X, et al. Natural variation in *Ghd7* is an important regulator of heading date and yield potential in rice. Nat Genet, 2008, 40: 761—767[DOI]
58 Fan C, Xing Y, Mao H, et al. *GS3*, a major QTL for grain length and weight and minor QTL for grain width and thickness in rice,

encodes a putative transmembrane protein. Theor Appl Genet, 2006, 112: 1164—1171[DOI]

59 Fan C, Yu S, Wang C, et al. A causal C − A mutation in the second exon of *GS3* highly associated with rice grain length and validated as a functional marker. Theor Appl Genet, 2009, 118: 465—472[DOI]

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

61 Huang X, Qian Q, Liu Z, et al. Natural variation at the *DEP1* locus enhances grain yield in rice. Nat Genet, 2009, 41: 494—497[DOI]

62 Wang E, Wang J, Zhu X, et al. Control of rice grain-filling and yield by a gene with a potential signature of domestication. Nat Genet, 2008, 40: 1370—1374[DOI]

63 Li X, Qian Q, Fu Z, et al. Control of tillering in rice. Nature, 2003, 422: 618—621[DOI]

64 Li P, Wang Y, Qian Q, et al. *LAZY1* controls rice shoot gravitropism through regulating polar auxin transport. Cell Res, 2007, 17: 402—410

65 Tan L, Li X, Liu F, et al. Control of a key transition from prostrate to erect growth in rice domestication. Nat Genet, 2008, 40: 1360—1364[DOI]

66 Jin J, Huang W, Gao J, et al. Genetic control of rice plant architecture under domestication. Nat Genet, 2008, 40: 1365—1369[DOI]

67 Lin H, Zhu M, Yano M, et al. QTLs for Na^+ and K^+ uptake of shoot and root controlling rice salt tolerance. Theor Appl Genet, 2004, 108: 253—260[DOI]

68 Ren Z, Gao J, Li L, et al. A rice quantitative trait locus for salt tolerance encodes a sodium transporter. Nat Genet, 2005, 37: 1141—1146[DOI]

69 Sun X, Cao Y, Yang Z, et al. *Xa26*, a gene conferring resistance to *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* in rice, encodes an LRR receptor kinase-like protein. Plant J, 2004, 37: 517—527[DOI]

70 Xiang Y, Cao Y, Xu C, et al. *Xa3*, conferring resistance for rice bacterial blight and encoding a receptor kinase-like protein, is the same as *Xa26*. Theor Appl Genet, 2006, 113: 1347—1355[DOI]

71 Yang Z, Sun X, Wang S, et al. Genetic and physical mapping of a new gene for bacterial blight resistance in rice. Theor Appl Genet, 2003, 106: 1467—1472

72 Cao Y, Ding X, Cai M, et al. The expression pattern of a rice disease resistance gene *Xa3/Xa26* is differentially regulated by the genetic backgrounds and developmental stages that influence its function. Genetics, 2007, 177: 523—533[DOI]

73 Chu Z, Yuan M, Yao J, et al. Promoter mutations of an essential gene for pollen development result in disease resistance in rice. Genes Dev, 2006, 20: 1250—1255[DOI]

74 Ding X, Cao Y, Huang L, et al. Activation of the indole-3-acetic acid-amido synthetase GH3-8 suppresses expansin expression and promotes salicylate- and jasmonate-independent basal immunity in rice. Plant Cell, 2008, 20: 228—240[DOI]

75 Yi K, Wu Z, Zhou J, et al. *OsPTF1*, a novel transcription factor involved in tolerance to phosphate starvation in rice. Plant Physiol, 2005, 138: 2087—2096[DOI]

76 Zhou J, Jiao F, Wu Z, et al. *OsPHR2* is involved in phosphate-starvation signaling and excessive phosphate accumulation in shoots of plants. Plant Physiol, 2008, 146: 1673—1686[DOI]

77 Wang C, Ying S, Huang H, et al. Involvement of *OsSPX1* in phosphate homeostasis in rice. Plant J, 2009, 57: 895—904[DOI]

78 Chen J, Ding J, Ouyang Y, et al. A triallelic system of *S5* is a major regulator of the reproductive barrier and compatibility of indica-japonica hybrids in rice. Proc Natl Acad Sci USA, 2008, 105: 11436—11441[DOI]

79 Long Y, Zhao L, Niu B, et al. Hybrid male sterility in rice controlled by interaction between divergent alleles of two adjacent genes. Proc Natl Acad Sci USA, 2008, 105: 18871—18876[DOI]

80 Wang Z, Zou Y, Li X, et al. Cytoplasmic male sterility of rice with Boro II cytoplasm is caused by a cytotoxic peptide and is restored by two related PPR motif genes via distinct modes of mRNA silencing. Plant Cell, 2006, 18: 676—687[DOI]

81 Yao F, Xu C, Yu S, et al. Mapping and genetic analysis of two fertility restorer loci in the wild-abortive cytoplasmic male sterility system of rice. Euphytica, 1997, 98: 183—187[DOI]

82 Liu X, Xu X, Tan Y, et al. Inheritance and molecular mapping of two fertility-restoring loci for Honglian gametophytic cytoplasmic

male sterility in rice(*Oryza sativa* L.). Mol Genet Genomics, 2004, 271: 586—594[DOI]

83 Chu H, Qian Q, Liang W, et al. The *FLORAL ORGAN NUMBER4* gene encoding a putative ortholog of *Arabidopsis CLAVATA3* regulates apical meristem size in rice. Plant physiol, 2006, 142: 1039—1052[DOI]

84 Chu H, Zhang D. The shoot apical meristem size regulated by *FON4* in rice. Plant Signal Behav, 2007, 2: 115—116

85 Li H, Xue D, Gao Z, et al. A putative lipase gene *EXTRA GLUME1* regulates both empty-glume fate and spikelet development in rice. Plant J, 2009, 57: 593—605[DOI]

86 Sun Q, Zhou D. Rice jmjC domain-containing gene *JMJ706* encodes H_3K_9 demethylase required for floral organ development. Proc Natl Acad Sci USA. 2008, 105: 13679—13684[DOI]

87 Li N, Zhang D, Liu H, et al. The rice *Tapetum Degeneration Rretardation* gene is required for tapetum degradation and anther development. Plant Cell, 2006, 18: 2999—3014[DOI]

88 Zhang D, Liang W, Yuan Z, et al. Tapetum degeneration retardation is critical for aliphatic metabolism and gene regulation during rice pollen development. Mol Plant, 2008, 1: 599—610[DOI]

89 Zhao Y, Hu Y, Dai M, et al. The WUSCHEL-related homeobox gene *WOX11* is required to activate shoot-borne crown root development in rice. Plant Cell, 2009, 21: 736—748[DOI]

90 Yu B, Lin Z, Li H, et al. *TAC1*, a major quantitative trait locus controlling tiller angle in rice. Plant J, 2007, 52: 891—898[DOI]

91 Zhu Y, Nomura T, Xu Y, 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[DOI]

92 Zhang G, Xu Q, Zhu X, et al. SHALLOT-LIKE1 is a KANADI transcription factor that modulates rice leaf rolling by regulating leaf abaxial cell development. Plant Cell, 2009, 21: 719—735[DOI]

93 Yuan W, Li X, Chang Y, et al. Mutation of the rice gene *PAIR3* results in lack of bivalent formation in meiosis. Plant J, 2009, 59: 303—315[DOI]

94 Zhang Q, Li J, Xue Y, et al. Rice 2020: a call for an international coordinated effort in rice functional genomics. Mol Plant, 2008, 1: 715—719[DOI]

95 Zhang Q. Strategies for developing Green Super Rice. Proc Natl Acad Sci USA, 2007, 104: 16402—16409[DOI]