

水稻籽粒灌浆突变体 *gef1* 的鉴定及其基因定位

杜康兮^{①†}, 江青山^{②†}, 徐培洲^①, 韩保林^①, 彭永彬^①, 傅瑶^①, 吴挺开^①, 赵德明^②,
陈家彬^②, 陈晓琼^①, 张红宇^{①*}, 吴先军^{①*}

① 四川农业大学水稻研究所, 西南作物基因资源与遗传改良教育部重点实验室, 成都 611130;

② 四川省宜宾市农业科学院, 宜宾 644000

† 同等贡献

* 联系人, E-mail: zhanghysd@163.com; wuxj@sicau.edu.cn

2016-03-03 收稿, 2016-05-12 修回, 2016-05-16 接受, 2016-08-11 网络版发表

农业部公益性行业(农业)科研专项(201403002-3)、四川省农作物育种攻关项目和四川省科技厅项目(2016HH0044)资助

摘要 籽粒灌浆是水稻(*Oryza sativa*)生长发育过程中极为重要的阶段, 涉及复杂的遗传调控网络和环境互作, 直接关系到水稻产量和品质的形成. 本研究通过甲基磺酸乙酯(EMS)诱变籼稻品种宜香1B, 筛选到一个能稳定遗传的籽粒灌浆延长突变体*gef1*(grain extended filling 1). 与野生型相比, 该突变体灌浆速率下降, 灌浆延长约30 d, 且籽粒变大, 结实率下降. 相关生理指标测定表明, 突变体*gef1*在整个灌浆过程中光合同化物供应正常, 但同化物的分配与转化效率较低. 对突变体*gef1*组织细胞学观察发现, 穗轴与茎秆部位的大维管束数量减少, 表明同化物的运输效率降低是影响灌浆速率的原因之一; 颖壳内表皮细胞纵向伸长且数量增多, 推测籽粒大小的改变与细胞的数量及形状有关. 基因表达分析表明, *gef1*影响籽粒中糖代谢相关酶的表达; 遗传分析表明, 该突变表型受单隐性核基因控制, 利用图位克隆法将*gef1*基因定位于水稻第3染色体短臂标记InDel3-1与InDel3-2之间198 kb的范围内, 在该区域内尚未有与水稻籽粒灌浆相关基因的报道.

关键词 水稻, 籽粒灌浆, 遗传分析, 基因定位, *gef1*

水稻(*Oryza sativa*)进入生殖生长后, 籽粒灌浆成为了极其重要的过程. 水稻籽粒灌浆是光合同化物向籽粒转运、积累的过程^[1]. 大穗型水稻灌浆过程中存在严重的灌浆差异问题, 位于穗下部的籽粒往往灌浆不充分, 结实率低, 严重限制其高产潜力的发挥^[2]. 造成水稻籽粒灌浆速率降低的原因, 大致可分为光合同化物供应限制、库限制以及“流”不畅^[3]. 目前水稻籽粒灌浆研究主要集中在温度^[4,5]、土壤水分^[6]、矿物质营养元素^[7,8]、同化物代谢相关酶活性^[9~11]以及植物激素^[12~14]等对灌浆的影响, 而对于水稻籽粒灌浆的遗传基础研究相对较少.

近年来, 在水稻籽粒灌浆遗传研究方面, 细胞壁

转移酶对水稻灌浆的影响研究较为清楚. Wang等人^[15]从中花11的突变体中筛选到一株灌浆不完全突变体*gif1*(grain incomplete filling), 研究发现该突变体由一个编码细胞壁转移酶的基因控制, 该基因主要在快速伸长的节间、柱头导管、胚珠以及根部表达, 在水稻籽粒发育时, 控制蔗糖的运输卸载与灌浆, 从而影响籽粒灌浆. Hirose等人^[16]与Wang等人^[17]研究发现, 另一个细胞壁转移酶基因*OsCIN1* (cell-wall invertase gene 1)在水稻籽粒灌浆早期的颖壳中表达, 因此, 推测*OsCIN1*主要是通过影响颖壳细胞分裂与质外体途径蔗糖的转运与卸载从而影响水稻灌浆; 同时还发现*GIF1* (grain incomplete filling 1)与*OsCIN1*源自稻

引用格式: 杜康兮, 江青山, 徐培洲, 等. 水稻籽粒灌浆突变体 *gef1* 的鉴定及其基因定位. 科学通报, 2016, 61: 2800–2810

Du K X, Jiang Q S, Xu P Z, et al. Identification and gene mapping of a grain-filling mutant *gef1* in rice (in Chinese). Chin Sci Bull, 2016, 61: 2800–2810, doi: 10.1360/N972015-01412

属植物基因组一个片段的倍增,是一对倍增基因。Cho等人^[18]发现,水稻中存在7个CIN基因,通过组织特异性表达发现,OsCIN1, OsCIN2, OsCIN4与OsCIN7在灌浆期的籽粒中表达,推测这些基因与蔗糖的分配转运和卸载有关。

除细胞壁转移酶外,其他与水稻灌浆相关的基因陆续被发掘, Sosso等人^[19]在研究SWEET糖转运蛋白家族过程中发现, SWEET4c基因在水稻与玉米(*Zea mays* L.)的籽粒灌浆过程中起十分关键的作用,该基因在籽粒灌浆期能促进蔗糖向籽粒中转运,如果该基因突变或失去功能会导致产生空果皮。Sun等人^[20]报道了一个细胞核基因OsNF-YB1 (nuclear factor Y),该基因为胚乳特异性表达基因,抑制该基因的表达会导致细胞周期通路相关基因的表达变化,从而产生胚和胚乳发育缺陷种子。Bai等人^[21]通过对OsNF-YB1基因进行敲除和表达干扰,发现该基因能直接调控水稻籽粒灌浆和淀粉积累,并且OsNF-YB1能直接结合3个蔗糖转运蛋白OsSUT2, OsSUT3与OsSUT4的基因表达调控区从而调控蔗糖向胚乳转运。Manimaran等人^[22]在研究钙依赖型蛋白激酶OsCPK31 (calcineurin B-like-interacting protein kinase gene 31)的过程中,对OsCPK31基因进行过表达与沉默时发现该蛋白激酶与水稻籽粒灌浆有密切联系。

在水稻灌浆相关QTL (quantitative trait locus)研究方面, Liu等人^[23]对95个水稻品种在开花后不同时间段进行灌浆速率分析,发现在水稻除第7染色体外的其他染色体上都能检测到与水稻籽粒灌浆相关的QTL,并且有部分位点在水稻灌浆的整个时期都能被检测。贾小丽等人^[24]以小穗小粒型水稻Milyang 46和大穗大粒型水稻FJCD构建重组自交系在灌浆期的5个阶段对灌浆速率进行QTL动态定位及环境互作研究,共检测到10个加性QTLs,其中有3个存在显著环境互作效应。Takai等人^[25]以Milyang 23与Akihikari为研究材料,发现在水稻第8与12号染色体上有2个QTLs能增加籽粒的充实度,并且推测第8号染色体上的QTL可能直接参与非结构碳水化合物在叶鞘与茎干的转运。诸如此类的QTL研究较多,但由于研究材料存在差异,环境不同以及研究方法各异,导致研究结果不尽相同。

为促进培育高产优质水稻品种的研究,近几年本实验室以籼稻材料宜香1B为野生型通过甲基磺酸乙酯(ethyl methane sulphonate, EMS)诱变创制了十分

丰富的水稻突变体库,并积累了丰富的突变体筛选与定位经验。该突变体库表型主要涉及株叶形态(株高、叶色、叶形、分蘖等)、穗部形态(粒形、花发育、穗形、灌浆、颖壳颜色)等,其遗传背景相对明确。本文报道了来自该突变体库的一个水稻籽粒灌浆突变体*gef1*,对其进行了农艺性状调查、生理生化特性测定、组织细胞学观察、相关基因表达分析、遗传分析以及基因定位等研究。结果表明, *gef1*是一个灌浆延迟、籽粒变大突变体,突变性状能稳定遗传,连续世代自交不产生分离性状;该性状由一对隐性核基因控制,并将其定位于水稻第3染色体上,为进一步研究水稻灌浆分子机制与调控网络奠定了基础。

1 材料与方法

(i) 供试材料和主要农艺性状调查。 籼稻(*Oryza sativa* L. subsp. *indica*)保持系品种宜香1B,来自四川宜宾市农业科学院,经EMS诱变,在M₂获得一份灌浆延长、籽粒变大突变体*gef1*,经过连续多代自交,该突变性状能稳定遗传。以该突变体*gef1*为母本,籼稻品种宜香1B、粳稻品种Kitaake和02428为父本分别构建F₂定位群体。自2013年起所有材料交替种植在四川温江和海南陵水两地,成熟期分别调查突变体与野生型的主要农艺性状,包括株高、穗长、分蘖数、粒长、粒宽、千粒重以及结实率等。

(ii) 水稻灌浆速率的测定。 参照左清凡等人^[26]的方法,于水稻开花期,选择生长整齐一致(以穗抽出2 cm为标准)的野生型与突变体单穗各60个,并挂牌标记。自开花后3 d第一次取样,后每隔3 d取样一次,直至收获期结束。每次取样于上午9:00~9:30,每次取穗同一中上部位籽粒共50粒,并在冰上剥去颖壳,称其鲜重,然后105℃下杀青30 min,在80℃下恒温烘干48 h,称其干重,重复3次,取其平均值进行籽粒灌浆动态分析。

(iii) 颖果中可溶性糖含量及果皮叶绿素含量的测定。 颖果中可溶性糖含量的测定采用蒽酮比色法,具体测定方法参照邹琦^[27],于水稻开花起每隔3 d取样一次,直至水稻成熟,每阶段测定各取突变体与野生型的颖果10粒。水稻果皮中叶绿素含量的测定参照沈伟其^[28]的方法,取样方法与上述一致,测定结果均重复3次,取平均值。

(iv) 组织细胞学观察。 在水稻抽穗期,参照李剑平^[29]的方法制备样品,分别取突变体与野生型颖

壳, 在环境扫描电子显微镜(FEI, QUANTA 450, 美国)下观察并拍照. 在水稻成熟期, 分别取突变体与野生型成熟风干的种子, 选择具有代表性的糙米, 在其近中部轻轻敲击, 使其在自然状态下横向断裂, 制成2 mm左右的横切面, 依照上述方法拍摄照片, 观察颖果内部淀粉体的排列与结构. 在水稻灌浆期, 同时取突变体与野生型植株的倒一节间、倒二节间与主穗轴的横切面制作简易装片, 在显微镜(OLYMPUS, PM-10AD, 日本)下观察大维管束的结构及数目差异.

(v) 相关基因的表达分析. 当水稻进入开花期, 分别取突变体与野生型开花后3, 6, 9 d的颖果, 采用Trizol试剂(Invitrogen, 美国)提取总RNA, 使用逆转录试剂盒HiScript Q RT SuperMix for qPCR (+gDNA wiper)(Vazyme, 中国), 将总RNA纯化反转成cDNA. 以10 ng μL^{-1} cDNA为模板, 对淀粉合成酶IIIa基因OsSSIIIa (starch synthase IIIa) (Os08g0191433)^[30]、水稻蔗糖合成酶基因SUS3 (sucrose synthase 3) (Os07g0616800)^[9]、腺苷二磷酸葡萄糖焦磷酸化酶大亚基基因OsAGPL2 (ADP-glucose pyrophosphorylase large subunit 2)(Os01g0633100)与小亚基基因OsAGPS2b (ADP-glucose pyrophosphorylase shrunken-2b)(Os08g-0345800)^[31]等进行定量分析, 引物序列见表1. 反应体系及反应程序参照Vazyme公司SYBR Green Master Mix说明书, 反应在BIO-RAD CFX96™ Real-time System 荧光定量PCR仪(BIO-RAD, 美国)

上进行.

(vi) 遗传分析. 2014年夏在四川温江以突变体 *gef1* 为母本, 分别与野生型宜香1B、Kitaake和02428杂交, 将收获的F₁种子于2014年秋种植于海南陵水, 自交得到F₂种子, 于2015年夏将 *gef1*/宜香1B, *gef1*/Kitaake, *gef1*/02428的3个F₂群体种植于四川温江. 对F₁及F₂群体进行表型调查分析, 并用 *gef1*/02428与 *gef1*/Kitaake的F₂群体进行遗传定位分析.

(vii) 基因定位与遗传连锁图谱构建. 选取均匀分布于水稻12条染色体上的510对SSR标记, 以宜香1B分别与Kitaake和02428的DNA为模板, PCR扩增分析与筛选亲本间存在多态性的标记. 参照Michelmore等人^[32]的BSA (bulk segregation analysis)法对多态性标记进行连锁分析, 利用筛选出的连锁标记对 *gef1*/Kitaake的F₂群体中具有突变表型的单株进行初定位. 通过进一步扩大定位群体, 利用SSR标记以及插入缺失(InDel)标记对目标基因进行进一步定位分析. 本研究采用的SSR标记序列下载自Gramene数据库 (<http://www.gramene.org/>), 插入缺失标记(InDel)引物是根据RGP(<http://rgp.dna.affrc.go.jp/>), NCBI(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)以及RIS(<http://rice.genomics.org.cn/rice/index2.jsp>)公共数据库提供的籼稻9311与粳稻日本晴序列数据进行比对, 运用生物学软件Primer 5.0设计而成(表1). 所用的引物序列均由成都擎科梓熙生物技术有限公司合成, DNA提取参照

表1 基因定位分子标记引物及qRT-PCR引物序列

Table 1 The sequences of molecular makers used for gene mapping and qRT-PCR makers

引物名称	正向引物序列(5'→3')	反向引物序列(5'→3')
RM5474	AAAGTGTGTTGGTAGCATAGC	TTTGTGTTTGGAGAGACGAG
RM7576	CTGCCCTGCCTTTTGTACAC	GCGAGCATTCTTTCTTCCAC
A3-7	CTCCTTCCTCTCGTCTCTC	CAACGGCATAACACCAATT
A3-8	ACAAGCATCCCTATGAAAGA	ATCACCGATATGAGCAATTC
RM14614	GCACGCATTGTTTCGTGATAGG	GAACCGAACGCAAAGCTAATACC
InDel3-1	TGTTGGTGATTTGGGTTGCC	AGACAGCCGCATATATCCCC
InDel3-2	TCTTGCACTGTTCTTCAATC	GACTCCTTCTCGCTACTTA
OsSSIIIa	GCCTGCCCTGGACTACATTG	GCAAACATATGTACACGGTTCTGG
SUS3	TCAGCGCATCGAGGAGAAGT	GGCCAATGGAACGGTGGTAG
OsAGPL2	TCTTGAGGACTATTACAAGCA	GTCCATAGTCAGATGCTCGA
OsAGPS2b	TCTATGACCGGTCTGCTCCA	CAGAAATGCAGGACCGGAGT
Actin	ATCCATCTTTGGCATCTCTCAGC	CACAATGGATGGGCCAGACT

Mccouch等人^[33]的方法, PCR反应及检测参照Panaud等人^[34]的方法.

2 结果与分析

2.1 突变体的形态特征及主要农艺性状分析

在田间正常种植条件下, 通过对突变体与野生型的农艺性状考察发现(图1, 表2), 在植株形态方面, 突变体与野生型之间除株高与有效穗外, 穗长、结实率与每穗实粒数等主要农艺性状都存在显著性差异, 其中突变体穗长缩短约12%, 结实率降低约24%, 每穗实粒数减少约41%. 在种子大小方面, 突变体的种子的粒长增加11.4%, 粒宽增加9.9%和千粒重增加20%, 粒长与粒宽的增加使得长宽比无明显变化. 进入灌浆期突变体颖壳外表面会出现不规则的斑点, 而野生型表现正常. 在稻米品质方面, 与野生型相比, 突变体*gef1*出糙率无差异, 胶稠度、蛋白质含量与整精米率显著降低(表3), 其中垩白率和垩白度均增加约70%, 从而造成米粒透明度降低.

2.2 突变体*gef1*的组织细胞学观察

水稻维管束系统是源-库之间光合同化物运输的主要途径, 因此通过观察维管束结构及数目可反映光合同化物的运输状况. 野生型宜香1B与突变体*gef1*穗轴(图2(a), (d))、倒一节间(图2(b), (e))和倒二节间(图2(c), (f))相同部位横切面的观察结果显示, 突变体*gef1*在上述3个部位大维管束的平均个数为12.5, 15.3, 32.2, 而野生型对应的大维管束平均个数为

15.8, 18.6, 34.9, 两者之间对应部位大维管束个数差异变化幅度为2~7个, 穗轴壁和茎秆壁的厚度无明显变化, 髓腔面积略为减小, 说明在光合同化物的运输途径存在限制. 颖壳内表皮电子显微镜扫描结果表明, 与野生型比较, 突变体颖壳内表皮光滑, 细胞长度增加, 宽度减小使得细胞变小, 从而导致单位面积内细胞数量增加(图2(g), (h)). 淀粉体扫描结果显示, 突变体的淀粉体呈球形, 排列松散; 而野生型淀粉体呈无规则多边形, 排列紧密(图2(i), (j)).

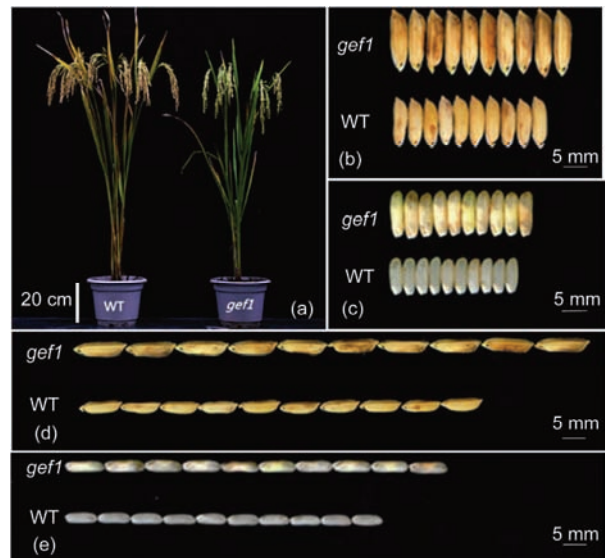


图1 (网络版彩色)突变体(*gef1*)与野生型(WT)表型比较. (a) 开花后25 d的植株表型; (b)~(e) 粒形

Figure 1 (Color online) Plant phenotype and grain shape of *gef1* and WT. (a) Plant phenotype of 25 d after flowering; (b)~(e) Grain shape

表2 突变体*gef1* 与其野生型的农艺性状比较^{a)}

Table 2 Comparison of agronomic traits between *gef1* and its wild type^{a)}

材料	株高(cm)	有效穗	穗长(cm)	结实率(%)	每穗实粒数	粒长(mm)	粒宽(mm)	长宽比	千粒重
宜香1B	116.4±2.07	8.4±1.14	28.8±0.71	90.96±0.02	196.2±7.60	9.70±0.07	2.72±0.11	3.57±0.12	29.53±0.48
<i>gef1</i>	115±1.22	7±1.00	25.26±0.86**	68.98±0.06**	115.2±7.26**	10.81±0.05**	2.99±0.04*	3.61±0.04	35.45±0.05**

a) *, **表示突变体*gef1*与野生型宜香1B间的差异分别达0.05, 0.01显著水平

表3 突变体*gef1* 与其野生型的稻米品质测定比较^{a)}

Table 3 Comparison of rice quality between *gef1* and its wild type^{a)}

材料	出糙率(%)	整精米率(%)	垩白粒率(%)	垩白度(%)	胶稠度(mm)	直链淀粉(%)	蛋白质(%)
宜香1B	78.9	72.6	1	0.1	82	14.7	11.6
<i>gef1</i>	77.8	46.9**	69**	7.6**	66**	15.4	9.5*

a) *, **表示突变体*gef1*与野生型宜香1B间的差异分别达0.05, 0.01显著水平

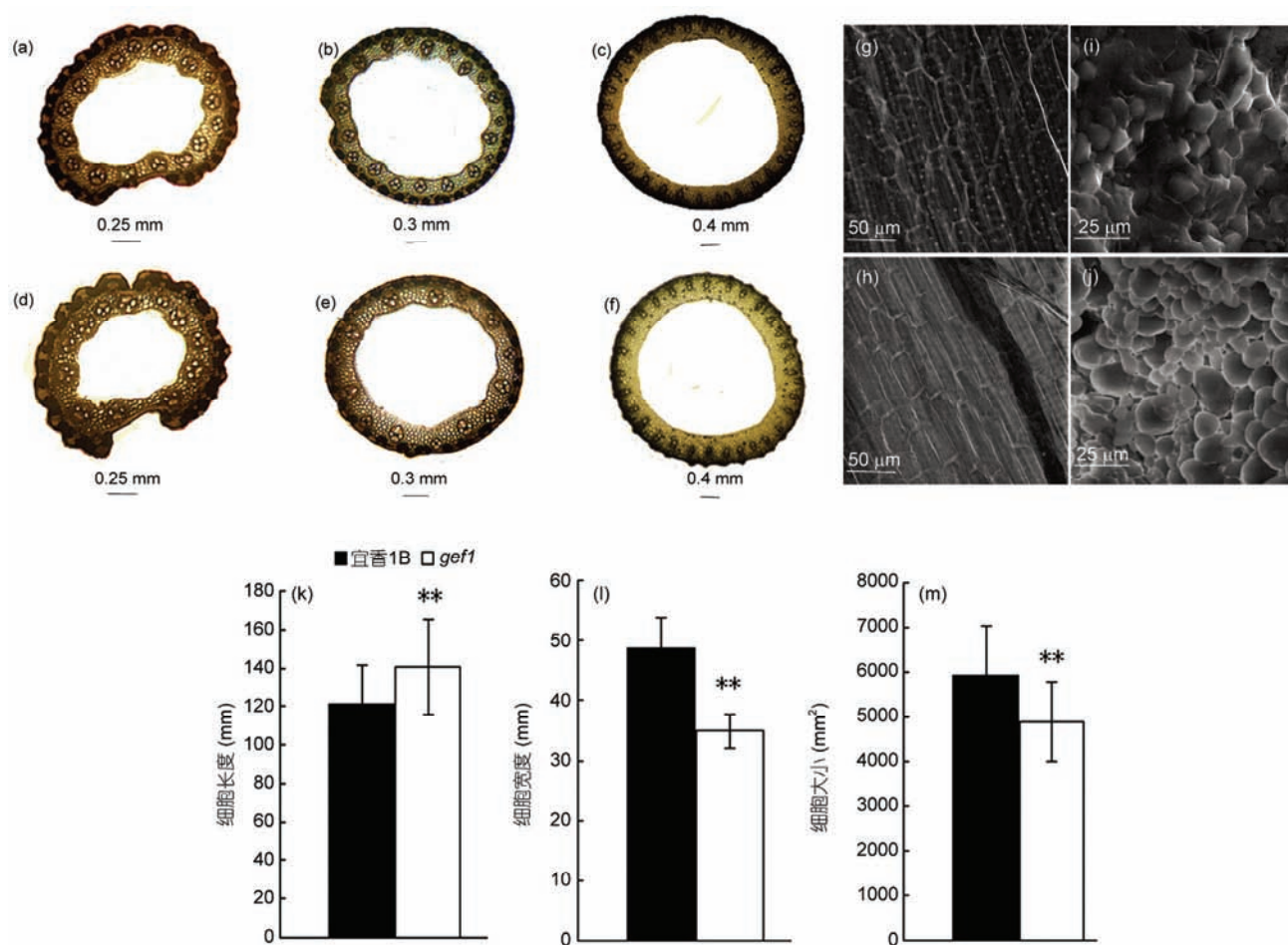


图2 (网络版彩色)突变体*gef1*与野生型宜香1B组织细胞学观察。野生型(a)与突变体*gef1*(d)穗轴横切面比较;野生型(b)与突变体*gef1*(e)倒1节间横切面比较;野生型(c)与突变体*gef1*(f)倒2节间横切面比较;野生型(g)与突变体*gef1*(h)颖壳内表皮细胞比较;野生型(i)与突变体*gef1*(j)淀粉体结构比较。突变体*gef1*与野生型颖壳内表皮细胞长度(k)、细胞宽度(l)及细胞大小(m)的比较

Figure 2 (Color online) Histological observations of *gef1* and wild type plants. Cross section of the rachis in wild type (a) and *gef1* (d) plants, respectively; cross section of top first internodes in wild type (b) and *gef1* (e) plants, respectively; cross section of top second internodes in wild type (c) and *gef1* (f) plants, respectively; cell number and size of inner epidermis in wild type (g) and *gef1* (h) plants, respectively; structure of amyloplast in wild type (i) and *gef1* (j) plants, respectively; comparisons of cell length (k), cell width (l) and cell size (m) between *gef1* and its wild type

2.3 突变体*gef1*的灌浆速率分析

从颖果发育来看(图3(a)), 突变体从开花至种子成熟所经历的时间比野生型迟30 d左右, 约为野生型的2倍。突变体颖果前期发育缓慢, 发育完全成形较野生型长约12 d。比较突变体与野生型的灌浆速率发现(图3(b), (c)), 野生型在开花后18 d之前处于快速灌浆期, 大量的同化物被转运至颖果中, 颖果干、鲜重持续增加; 而突变体的快速灌浆期维持有36 d, 并且突变体籽粒的灌浆速率明显低于野生型。综上表明, 突变体籽粒发育的乳熟期、腊熟期与完熟期的各个阶段都比野生型缓慢。

2.4 突变体*gef1*颖果中可溶性糖及叶绿素含量的变化

水稻灌浆过程中运输到水稻籽粒中的光合产物最初是以可溶性糖的形式存在, 可溶性糖经过相关酶作用形成淀粉。由图4(a)可见, 野生型籽粒中的可溶性糖含量呈单峰曲线变化, 且在整个发育过程中含量维持在较低水平; 而突变体籽粒中可溶性糖含量却呈现双峰趋势, 且最大值明显大于野生型。野生型籽粒中可溶性糖含量在15 d后开始下降, 说明该时间段是淀粉合成的高峰期, 而突变体籽粒中可溶性糖含量在25 d后才开始下降, 并且在开花后25 d之前,

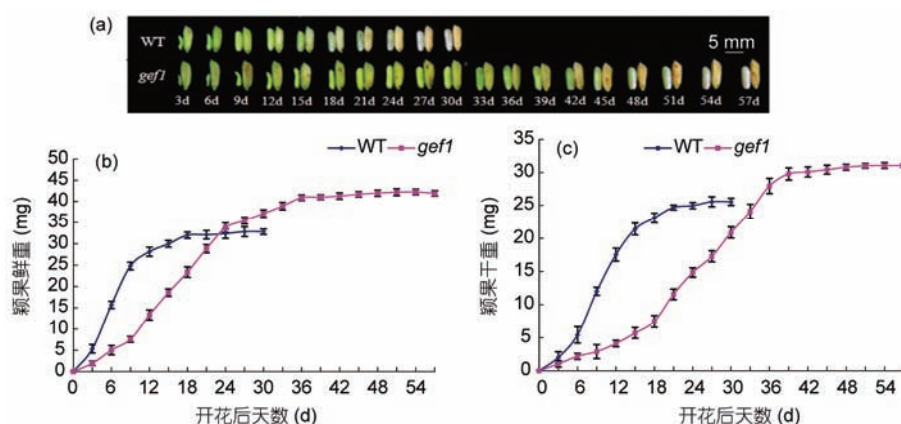


图3 (网络版彩色)突变体*gef1*与野生型的胚乳灌浆动态。(a) 突变体*gef1*与野生型的颖果和种子发育形态;(b) 颖果鲜重随时间的增加;(c) 颖果干重随时间的增加

Figure 3 (Color online) The characterization of grain filling in *gef1* and its wild type. (a) The seed morphology and growth of *gef1* and wild type; (b) time-course of caryopsis fresh weight increase; (c) time-course of caryopsis dry weight increase

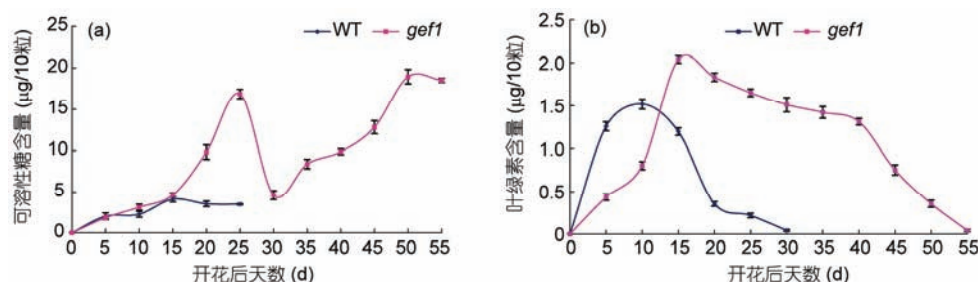


图4 (网络版彩色)突变体*gef1*与野生型颖果中可溶性糖含量 (a) 与叶绿素含量;(b) 随开花后天数的变化

Figure 4 (Color online) Dynamic changes of soluble sugar content (a) and chlorophyll content; (b) in caryopsis with different days after flowering in *gef1* and wild type

籽粒中可溶性糖的积累效率与含量明显高于野生型。开花30 d后, *gef1*籽粒中的可溶性糖含量又急剧增加, 表明该时间段籽粒中可溶性糖的积累效率明显高于淀粉的合成效率。根据图4(b)可见, 突变体颖果叶绿素含量在开花40 d后才开始急速下降, 说明颖果表皮持绿时间较长, 背部维管束能维持长时间的运输功能。

2.5 灌浆初期糖代谢相关基因的表达分析

在植株开花后, 分别取开花后3, 6和9 d的颖果分析糖代谢相关基因的表达发现(图5), 相比野生型, *SUS3*在突变体灌浆初期的变化幅度不明显, 而*SUS3*对灌浆期碳分配具有潜在作用^[9], 说明前期光合同化物在籽粒中的分配效率较低。 *OsSSIIIa*与*SUS3*类似, *OsSSIIIa*是水稻淀粉合成的第2个关键酶, 灌浆初期在突变体中的表达始终维持在某一较低水平, 而在野生型中却逐渐升高。此外, 控制光合同化物转化为淀粉过程中一个限速酶的两个大小亚基基因

*OsAGPL2*与*OsAGPS2b*在突变体与野生型灌浆初期的表达存在明显差异, 在突变体中的表达均低于野生型, 并且二者都呈现逐渐升高趋势, 说明在灌浆前期该突变体籽粒中淀粉的合成效率低于野生型。

2.6 突变体的遗传分析

以*gef1*为母本, 宜香1B、02428和Kitaake为父本分别构建了*gef1*/宜香1B, *gef1*/02428和*gef1*/Kitaake 3个群体, 考查F₁植株与F₂群体的性状。结果表明, 3个组合的F₁植株均表现正常, 说明该突变性状受隐性基因控制。表4中不同组合F₂群体中突变表型单株数与正常表型单株数的数据分析表明, 正常性状与突变性状个体的分离比符合3:1。以上结果表明该突变性状受单隐性核基因控制。

2.7 突变体基因定位及遗传连锁图谱的构建

采用BAS (bulk segregation analysis)法构建突变

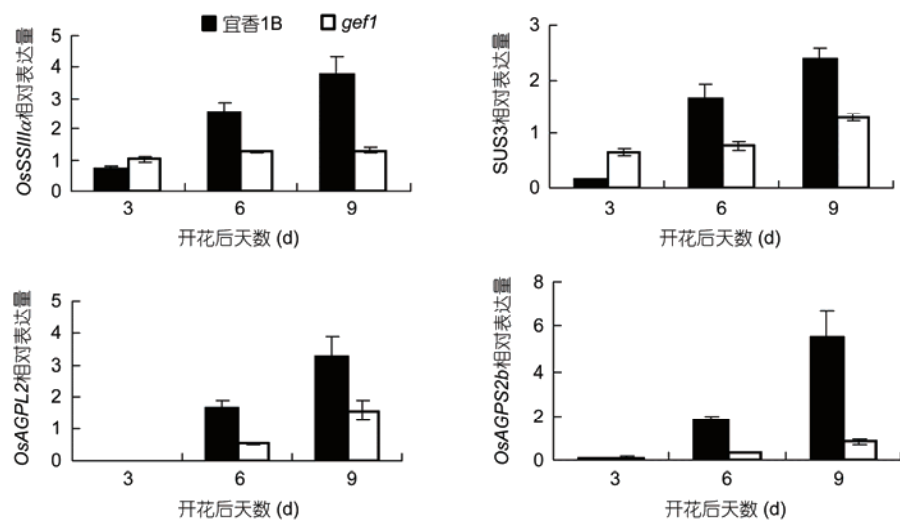


图5 糖代谢相关基因在灌浆初期的表达分析
Figure 5 Expression analysis of glycometabolism-related genes in the early stage of grain filling

表4 突变体 $gef1$ 的遗传分析
Table 4 Genetic analysis of the mutant $gef1$

组合	F ₁	F ₂			$\chi^2(3:1)$
		植株总数	突变体表型单株数	野生型表型单株数	
<i>gef1</i> /宜香1B	正常表型	596	137	459	1.29
<i>gef1</i> /02428	正常表型	1340	348	992	0.67
<i>gef1</i> /Kitaake	正常表型	280	65	215	0.48

体与正常灌浆的DNA池各一个并采用 $gef1$ /Kitaake F₂群体中的65个隐性单株作为初定位群体. 利用在亲本间存在多态性且均匀分布于水稻12条染色体上的341对标记对上述两个DNA池进行多态性分析. 结果发现, 在水稻第3染色体短臂的标记RM5474,

RM7576, A3-7和A3-8在DNA混池间存在多态性, 初步表明该目标基因位于第3染色体上(图6). 为了进一步对目标基因进行定位分析, 在该区间内寻找SSR多态性标记以及根据粳稻日本晴和籼稻9311序列进一步设计InDel标记, 再采用348个隐性单株进行定位,

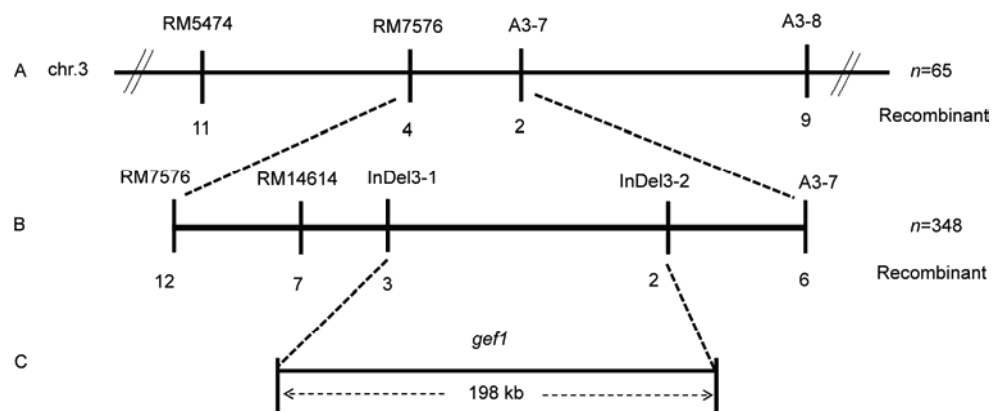


图6 $gef1$ 基因在水稻第3染色体上的分子定位
Figure 6 Molecular mapping of $gef1$ on chromosome 3 of rice

表 5 候选基因

Table 5 Candidate gene

基因位点	基因注释	基因位点	基因注释
LOC_Os03g12680	protein kinase, putative, expressed	LOC_Os03g12810	maf, putative, expressed
LOC_Os03g12690	expressed protein	LOC_Os03g12815	expressed protein
LOC_Os03g12700	expressed protein	LOC_Os03g12820	rice homologue of SRO
LOC_Os03g12710	clathrin adaptor complex small chain domain containing protein, expressed	LOC_Os03g12830	hypothetical protein
LOC_Os03g12720	expressed protein	LOC_Os03g12840	inositol 1,3,4-trisphosphate 5/6-kinase gene
LOC_Os03g12730	receptor kinase	LOC_Os03g12850	expressed protein
LOC_Os03g12750	expressed protein	LOC_Os03g12860	homeobox associated leucine zipper, putative, expressed
LOC_Os03g12760	helix-loop-helix DNA-binding domain containing protein, expressed	LOC_Os03g12870	expressed protein
LOC_Os03g12780	hypothetical protein	LOC_Os03g12879	expressed protein
LOC_Os03g12790	MATE efflux family protein, putative, expressed	LOC_Os03g12890	aminotransferase domain containing protein, putative, expressed
LOC_Os03g12900	squalene monooxygenase, putative, expressed		

最终将该基因定位在InDel3-1与InDel3-2之间, 物理距离约为198 kb. 该区间共有21个开放阅读框(LOC_Os03g12680~LOC_Os03g12900)(表5), 候选基因的进一步鉴定工作正在进行中.

3 讨论

本研究通过对糖代谢相关基因的表达分析发现, 在水稻灌浆初期, 随着时间的增加, 突变体中糖代谢相关基因的表达开始逐渐升高, 但其表达量明显低于野生型. 结合颖果中可溶性糖含量的变化, 发现突变体在开花25 d之前, 可溶性糖的积累量不断升高并达到最高, 表明灌浆前期随着可溶性糖被不断转运至颖果中, 淀粉合成效率不断升高, 但淀粉的合成效率低于可溶性糖的运输效率, 并且始终低于野生型; 开花后25~30 d可溶性糖含量又开始急速下降, 表明该时间段淀粉的转化效率不断升高并达到最大; 开花30 d以后可溶性糖含量又开始升高最终达到一稳定值, 表明淀粉合成效率开始下降或维持在某一较低水平. 根据上述淀粉合成相关基因的表达变化, 并结合可溶性糖的一系列动态变化, 推测*gef1*可能通过影响淀粉合成速率而延长灌浆, 同时影响淀粉结构, 使垩白增加, 推测*gef1*还可能使其他小分子物质的转运和加工效率降低, *gef1*籽粒中蛋白质含量下降, 或许是游离氨基酸的转运效率降低或蛋白质合成降低所致, 需要进一步验证.

水稻籽粒灌浆主要与光合同化物的转运与贮藏

有关. 由于直接测定光合同化物的转运难度极大, 马均等人^[35]认为可通过观察维管束的数目与结构来反映同化物的运输状况. 本研究发现, 突变体*gef1*茎秆与主穗轴部位的大维管束数目相比野生型明显减少, 降低了光合同化物向穗部的转运效率, 因此推测“流不畅”可能是造成突变体灌浆缓慢的原因之一. 顾蕴洁等人^[36]在研究水稻颖果发育过程中发现, 子房背部维管束周围的绿色细胞能维持背部维管束在输导灌浆物质时对能量的需求, 所以与*gif1*突变体不一样, *gef1*突变体颖果果皮叶绿素含量从开花后40 d才开始明显下降, 说明突变体子房背部维管束能长时间维持运输灌浆物质的功能, 不断向颖果内部供应光合同化物, 保证籽粒的充实度, 因而使得籽粒千粒重增加. 同时, 籽粒变大相当于库容变大, Kato^[2]认为库容限制也是影响水稻灌浆的因素之一. 由此可知, 在*gef1*的影响下, 同化物运输能力降低, 要充实更大的库容量, 需要延长灌浆时间.

关于水稻籽粒大小的研究, Song等人^[37]研究发现, GW2功能的丧失导致了细胞数目增加, 颖壳变大, 从而影响水稻粒宽与粒重, 并且能使灌浆速率加快, 增加有效穗数, 降低每穗粒数与主穗长度等. 与GW2类似, Wang等人^[38]在研究水稻籽粒大小时发现, GW8通过编码一个正调控细胞增殖蛋白, 促进细胞分裂与灌浆. 本研究发现, 较野生型而言, 突变体*gef1*籽粒变大、每穗粒数与结实率降低, 但灌浆速率却降低, 并且*gef1*的颖壳内表皮细胞形态与数目也相

应改变,说明*gef1*籽粒大小与颖壳细胞的形状与数目改变有关.类似地,Wang等人^[39]认为,*GL7*调节细胞纵向伸长,同时能减少垩白率与垩白度,改善稻米外观品质,然而突变体*gef1*的垩白率与垩白度却显著增加,稻米品质显著降低.Yan等人^[40]研究发现,籽粒大小基因*qSW5* (QTL for seed width 5)正调控*GIF1*的表达,*GW2*与*GS3*负调控*GIF1*的表达,说明籽粒大小基因与水稻灌浆充实基因之间存在相互调控关系.综上所述,可推测本研究的*gef1*基因可能直接或间接调控水稻颖壳细胞的分裂,从而影响水稻籽粒的大小.

在定位区间内的21个候选基因中,已有3个基因被克隆,分别是受体激酶基因*OsBRR1* (LOC_Os03g-12730)^[41]、*SRO*同源基因*OsSRO1c* (LOC_Os03g-12820)^[42]与1,3,4-三磷酸肌醇5/6-激酶基因*DSM3* (LOC_Os03g12840)^[43].*OsBRR1*与水稻对稻瘟病的抗病反应有关,而*OsSRO1c*与*DSM3*与水稻响应非生物胁迫有关,故可以排除该3个基因与突变体*gef1*之

的关联.根据上述结果可推测,在该区间的候选基因中,除去一些表达蛋白与假定蛋白,其余的候选基因中含有如LOC_Os03g12760, LOC_Os03g12860等能够编码具有转录因子结构域的基因,此类基因在水稻生长发育过程中可能参与多个基因或者某一类基因的转录调控,从而影响*gef1*的籽粒灌浆以及其他表型.

水稻籽粒灌浆是一个极其复杂的遗传调控网络过程,并受环境影响.通过水稻灌浆突变体的研究,挖掘控制水稻灌浆速率的新基因,对深入认识水稻灌浆机理,细化水稻灌浆过程具有重要意义.本研究对水稻灌浆突变体*gef1*进行了农艺性状调查、生理生化特性测定以及基因定位的初步研究.深入认识*gef1*在调控水稻灌浆方面的作用,需要进一步开展*gef1*基因的克隆与功能分析,明确*gef1*是否与已知籽粒发育基因存在互作以及*gef1*对水稻籽粒灌浆及种子发育的调控网络,以便在水稻高产优质育种中更好地加以应用.

参考文献

- 1 Watanabe Y, Nakamura Y, Ishii R. Relationship between starch accumulation and activities of the related enzymes in the leaf sheath as a temporary sink organ in rice (*Oryza sativa*). *Funct Plant Biol*, 1997, 24: 563–569
- 2 Kato T. Effect of spikelet removal on the grain filling of Akenohoshi, a rice cultivar with numerous spikelets in a panicle. *J Agric Sci*, 2004, 142: 177–181
- 3 Yang J C. Mechanism and regulation in the filling of inferior spikelets of rice (in Chinese). *Acta Agron Sin*, 2010, 36: 2011–2019 [杨建昌. 水稻弱势粒灌浆机理与调控途径. 作物学报, 2010, 36: 2011–2019]
- 4 Ahmed N, Tetlow I J, Nawaz S, et al. Effect of high temperature on grain filling period, yield, amylose content and activity of starch biosynthesis enzymes in endosperm of basmati rice. *J Sci Food Agric*, 2015, 95: 2237–2243
- 5 Cao Y Y, Duan H, Yang L N, et al. Effect of high temperature during heading and early filling on grain yield and physiological characteristics in indica rice. *Acta Agron Sin*, 2009, 35: 512–521
- 6 Wang W, Cai Y X, Ynag J C, et al. Effects of soil water deficit on physiological causes of rice grain-filling. *Chin J Plant Ecol*, 2011, 35: 195–202
- 7 Yoneyama T, Ishikawa S, Fujimaki S. Route and regulation of Zinc, Cadmium, and iron transport in rice plants (*Oryza sativa* L.) during vegetative growth and grain filling: Metal transporters, metal speciation, grain Cd reduction and Zn and Fe biofortification. *Int J Mol Sci*, 2015, 16: 19111–19129
- 8 E S Z, Yuan J C, Ding Z Y. Study on the dynamic of accumulation of Fe, Zn, Cu, Mn, Mg and Ca in rice grains during filling stage (in Chinese). *Chin Agric Sci Bull*, 2009, 25: 154–159 [俄胜哲, 袁继超, 丁志勇, 水稻灌浆过程中籽粒 Fe、Zn、Cu、Mn、Mg、Ca 的积累动态. 中国农学通报, 2009, 25: 154–159]
- 9 Hirose T, Scofield G N, Terao T. An expression analysis profile for the entire sucrose synthase gene family in rice. *Plant Sci*, 2008, 174: 534–543
- 10 Hirose T, Terao T. A comprehensive expression analysis of the starch synthase gene family in rice (*Oryza sativa* L.). *Planta*, 2004, 220: 9–16
- 11 Aoki N, Hirose T, Scofield G N, et al. The sucrose transporter gene family in rice. *Plant Cell Physiol*, 2003, 44: 223–232
- 12 Wu C Y, Trieu A, Radhakrishnan P, et al. Brassinosteroids regulate grain filling in rice. *Plant Cell*, 2008, 20: 2130–2145
- 13 Yang J C, Wang Z Q, Zhu Q S, et al. Regulation of ABA and GA to the grain filling of rice. *Acta Agron Sin*, 1999, 25: 341–348
- 14 Zhang H, Chen T, Wang Z, et al. Involvement of cytokinins in the grain filling of rice under alternate wetting and drying irrigation. *J Exp Bot*, 2010, 61: 3719–3733
- 15 Wang E, Wang J J, Zhu X D, et al. Control of rice grain-filling and yield by a gene with a potential signature of domestication. *Nat Genet*, 2008, 40: 1370–1374
- 16 Hirose T, Takano M, Terao T. Cell wall invertase in developing rice caryopsis: Molecular cloning of *OsCIN1* and analysis of its expression

- in relation to its role in grain filling. *Plant Cell Physiol*, 2002, 43: 452–459
- 17 Wang E, Xu X, Zhang L, et al. Duplication and independent selection of cell-wall invertase genes *GIF1* and *OsCIN1* during rice evolution and domestication. *BMC Evol Biol*, 2010, 10: 108
- 18 Cho J I, Lee S K, Ko S, et al. Molecular cloning and expression analysis of the cell-wall invertase gene family in rice (*Oryza sativa* L.). *Plant Cell Rep*, 2005, 24: 225–236
- 19 Sosso D, Luo D P, Li Q B, et al. Seed filling in domesticated maize and rice depends on SWEET-mediated hexose transport. *Nat Genet*, 2015, 47: 1489–1493
- 20 Sun X, Lin Q S, Lu Z, et al. *OsNF-YB1*, a rice endosperm-specific gene, is essential for cell proliferation in endosperm development. *Gene*, 2014, 551: 214–221
- 21 Bai A N, Lu X D, Li D Q, et al. *NF-YB1*-regulated expression of sucrose transporters in aleurone facilitates sugar loading to rice endosperm. *Cell Res*, 2015, 26: 384–388
- 22 Manimaran P, Mangrauthia S K, Sundaram R M, et al. Constitutive expression and silencing of a novel seed specific calcium dependent protein kinase gene in rice reveals its role in grain filling. *J Plant Physiol*, 2015, 174: 41–48
- 23 Liu E, Liu X, Zeng S, et al. Time-course association mapping of the grain-filling rate in rice (*Oryza sativa* L.). *PLoS One*, 2015, 10: e0119959
- 24 Jia X L, Ye J H, Miao L G, et al. Developmental genetic mechanism research on grain filling rate in rice (in Chinese). *Chin J Trop Crops*, 2012, 33: 622–626 [贾小丽, 叶江华, 苗利国, 等. 水稻籽粒灌浆速率的发育遗传机制研究. *热带作物学报*, 2012, 33: 622–626]
- 25 Takai T, Fukuta Y, Shiraiwa T, et al. Time-related mapping of quantitative trait loci controlling grain-filling in rice (*Oryza sativa* L.). *J Exp Bot*, 2005, 56: 2107–2118
- 26 Zuo Q F, Xie P, Song Y, et al. Analyses of genotype and environment interaction and heredity of filling rate in the different developmental stages of rice grain (in Chinese). *Sci Agric Sin*, 2002, 35: 465–467 [左清凡, 谢平, 宋宇, 等. 水稻籽粒不同发育时期灌浆速率的遗传及其与环境互作的分析. *中国农业科学*, 2002, 35: 465–467]
- 27 Zou Q. *Plant Physiological and Biochemical Experiment Guidance* (in Chinese). Beijing: China Agricultural Press, 1995. 163–165 [邹琦. 植物生理生化实验指导. 北京: 中国农业出版社, 1995. 163–165]
- 28 Shen W Q. Extraction of mixed solution for determination of chlorophyll content in rice leaf blade (in Chinese). *Plant Physiol Commun*, 1988, 3: 62–64 [沈伟其. 测定水稻叶片叶绿素含量的混合液提取法. *植物生理学通讯*, 1988, 3: 62–64]
- 29 Li J P. Requirements and preparation of scanning electron microscope sample (in Chinese). *Analy Test Technol Instrum*, 2007, 13: 74–77 [李剑平. 扫描电子显微镜对样品的要求及样品的制备. *分析测试技术与仪器*, 2007, 13: 74–77]
- 30 Fujita N, Mayumi Y, Kondo T, et al. Characterization of SSIIa-deficient mutants of rice: The function of SSIIa and pleiotropic effects by SSIIa deficiency in the rice endosperm. *Plant Physiol*, 2007, 144: 2009–2023
- 31 Lee S K, Hwang S K, Han M, et al. Identification of the ADP-glucose pyrophosphorylase isoforms essential for starch synthesis in the leaf and seed endosperm of rice (*Oryza sativa* L.). *Plant Mole Biol*, 2007, 65: 531–546
- 32 Michelmore R W, Paran I, Kesseli R V. Identification of markers linked to disease-resistance genes by bulked segregant analysis: A rapid method to detect markers in specific genomic regions by using segregating populations. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1991, 88: 9828–9832
- 33 Mccouch S R, Teytelman L, Xu Y, et al. Development and mapping of 2240 new SSR markers for rice (*Oryza sativa* L.). *DNA Res*, 2002, 9: 199–207
- 34 Panaud O, Chen X, Mccouch S R. Development of microsatellite markers and characterization of simple sequence length polymorphism (SSLP) in rice (*Oryza sativa* L.). *Mol Gen Genet*, 1996, 252: 597–607
- 35 Ma J, Zhou K D, Ma W B, et al. The characteristics of vascular bundles in the first internode and grain-filling of heavy panicle hybrid rice (in Chinese). *Sci Agric Sin*, 2002, 35: 576–579 [马均, 周开达, 马文波, 等. 重穗型杂交稻穗颈节间维管束与籽粒充实关系的研究. *中国农业科学*, 2002, 35: 576–579]
- 36 Gu Y J, Wang Z, Chen J, et al. The structure and function of pericarp in rice (in Chinese). *Acta Agron Sin*, 2002, 28: 439–444 [顾蕴洁, 王忠, 陈娟, 等. 水稻果皮的结构与功能. *作物学报*, 2002, 28: 439–444]
- 37 Song X J, Huang W, Shi M, et al. A QTL for rice grain width and weight encodes a previously unknown RING-type E3 ubiquitin ligase. *Nat Genet*, 2007, 39: 623–630
- 38 Wang S K, Wu K, Yuan Q B, et al. Control of grain size, shape and quality by *OsSPL16* in rice. *Nat Genet*, 2012, 44: 950–954
- 39 Wang Y X, Xiong G S, Hu J, et al. Copy number variation at the *GL7* locus contributes to grain size diversity in rice. *Nat Genet*, 2015, 47: 944–948
- 40 Yan S, Zuo G H, Li S J, et al. Seed size is determined by the combinations of the genes controlling different seed characteristics in rice. *Theor Appl Genet*, 2011, 123: 1173–1181
- 41 Peng H, Zhang Q, Li Y D, et al. A putative leucine-rich repeat receptor kinase, *OsBRR1*, is involved in rice blast resistance. *Planta*, 2009, 230: 377–385
- 42 You J, Zong W, Li X K, et al. The SNAC1-targeted gene *OsSRO1c* modulates stomatal closure and oxidative stress tolerance by regulating hydrogen peroxide in rice. *J Exp Bot*, 2013, 64: 569–583
- 43 Du H, Liu L H, You L, et al. Characterization of an inositol 1,3,4-trisphosphate 5/6-kinase gene that is essential for drought and salt stress responses in rice. *Plant Mol Biol*, 2011, 77: 547–563

Identification and gene mapping of a grain-filling mutant *gef1* in rice

DU KangXi¹, JIANG QingShan², XU PeiZhou¹, HAN BaoLin¹, PENG YongBin¹,
FU Yao¹, WU TingKai¹, ZHAO DeMing², CHEN JiaBin², CHEN XiaoQiong¹,
ZHANG HongYu¹ & WU XianJun¹

¹Key Laboratory of Southwest Crop Genetic Resources and Improvement, Ministry of Education, Rice Research Institute of Sichuan Agricultural University, Chengdu 611130, China;

²Yibin Agricultural Science Research Institute, Sichuan Province, Yibin 644000, China

Grain filling is an extremely important process in rice growth and development. This process which involves complex genetic regulatory networks and environmental interaction, is directly related to the formation of rice yield and quality. A stable inherited mutant with grain extended filling (*gef1*) was identified from an EMS mutagenized population of Yixiang 1B. The investigation of agronomic traits, measurement of physiological and biochemical characteristics, histology observation, gene expression analysis and gene mapping were performed in this study. Compared with the wild type plants, the grain filling rate of *gef1* was significantly lower than that of Yixiang 1B, resulting in the grain filling time of *gef1* was about 30 days delay. Meanwhile, the 1000-grain weight of *gef1* became bigger and seed setting rate decreased by 22%. During the development of caryopsis, we found that the soluble sugar content in wild type showed a single peak curve, and the content maintained at a low level throughout the grain filling stage. However, the soluble sugar content of the *gef1* was significantly higher than that of the wild type, and showing a bimodal curve. It revealed that the transportation and distribution of photosynthate, and starch synthesis were inefficiency in *gef1*. In addition, histocytological analysis showed that the number of big vascular bundles in the same transection parts of rachis, the first top internodes and the second top internodes were all decreased in *gef1*, and indicated that the transport efficiency of photosynthate was one of the limiting factors in the rate of grain filling. The scanning electron microscope showed that the glume of *gef1* had smooth surface and slender cells. Scanning of grain transection showed that *gef1* had spherical amyloplasts and arranged loosely, but the wild type had unregular polygon amyloplasts and packed closely. These results suggested that the changes of grain size associated with the cell number and shape of glume, and *gef1* had impact on rice quality. Additionally, by analyzing the expression of the glycometabolism-related genes in developing caryopsis, we found that all of them were keeping at a low level in *gef1* compared with the wild type. By analyzing the three crosses *gef1*/Yixiang 1B, *gef1*/02428 and *gef1*/Kitaake, we found that the F₁ plants of these three crosses were all normal and indicated that the mutant trait was controlled by a recessive gene. The ratio of normal plants to mutant plants in the three F₂ populations was 3:1 and indicating that the mutant trait was controlled by a single recessive nuclear gene. *gef1* was preliminarily mapped on the short arm of rice chromosome 3, and was narrowed to a 198 kb region between InDel3-1 and InDel3-2. This region has 21 open reading frames and there was no homologous gene had been reported within it, and the further identification work of candidate genes is ongoing.

rice, grain filling, genetic analysis, gene mapping, *gef1*

doi: 10.1360/N972015-01412