论文

水稻矮化小穗突变 $d18$ 新等位基因的发现及生理功能分析

徐江民^{1†}, 方云霞^{1†}, 曾龙军^{2†}, 徐娜¹, 焦然¹, 胡娟¹, 马路¹, 肖飒清¹, 黄玲¹, 胡江³, 饶玉春^{1*}, 王跃星^{3*}

1. 浙江师范大学化学与生命科学学院, 金华 321004;
2. 中国农业科学院深圳农业基因组研究所, 深圳 518120;
3. 中国水稻研究所, 水稻生物学国家重点实验室, 杭州 310006

† 同等贡献

* 联系人, E-mail: ryc@zjnu.cn; wangyuxing@caas.cn

收稿日期: 2018-02-26; 接受日期: 2018-03-13; 网络版发表日期: 2018-05-23

国家转基因重大科技专项子课题(批准号: 2016ZX08009003-003-008)、国家自然科学基金(批准号: 31671666, 31601285)、浙江省自然科学基金(批准号: LY16C130001)、浙江省科协育才工程项目(批准号: 2017YCGC008)和水稻生物学国家重点实验室开放项目(批准号: 160106)资助

摘要 株高和穗型是决定水稻产量密切相关的农艺性状. 本研究从粳稻品种台北309经甲基磺酸乙酯诱变的群体中分离出一个能稳定遗传的矮化小穗突变体, 主要表现矮化、粒长增加而宽度变小和穗型变小等特点. 遗传分析表明, 该突变体受单隐性核基因控制. 定位于水稻第1号染色体的Indel标记P4和P5之间, 物理距离约为20 kb. 由于该区间只有一个已经克隆的矮化基因 $Dwarf18$ ($d18$), 其功能编码赤霉素 3β -羟化酶(GA3ox2). 所以, 表明突变基因与 $d18$ 可能等位. 测序比对发现, 该突变基因的第2个外显子发生了1个碱基(G)的缺失, 造成无义突变, 实时荧光定量PCR结果显示, $OsGA3ox2$ 基因在突变体中表达量显著下降. 因此, 将该突变基因暂命名为 $d18-1$. 组织切片观察结果显示, 与野生型相比, 突变体的茎部倒三节间纵向细胞长度显著变短, 但细胞数目增多. 生理功能结果分析表明, 突变体对外源激素GA更敏感, 但对外源激素BR不如野生型敏感. 检测与GA和BR生物合成与信号传导途径相关基因的表达结果发现, 与野生型相比, 在突变体中参与GA失活基因 $OsGA2ox3$ 出现了下调表达, GA生物合成相关基因 $OsGA20ox2$ 和 $OsGA3ox2$ 也出现了下调表达, GA信号传导途径中的关键基因都没有明显的差异表达变化. 另外, 参与BR的合成或者信号传导途径的大部分相关基因在突变体中的表达都出现了下调. 由此证明, 突变体矮化是由于GA激素的不能正常合成所导致, 并且对外源活性BR的响应通路受损而造成对BR激素的低敏感反应. 另外, 对孕穗期的野生型和突变体的幼穗进行转录组测序分析表明, 与野生型相比, 突变体检测到1497个差异表达基因, 这些差异基因涉及苯丙素的生物合成、糖代谢和碳代谢等. 因此, 推测突变体中的 $OsGA3ox2$ 基因发生了无义突变影响了GA和BR生物合成与信号传导途径以及穗型发育相关调控途径, 这为更深入研究调控水稻矮化以及穗型的遗传网络提供了新的信息.

关键词 水稻, 矮化, 小穗, $Dwarf18$, 基因定位, 功能分析

引用格式: 徐江民, 方云霞, 曾龙军, 等. 水稻矮化小穗突变 $d18$ 新等位基因的发现及生理功能分析. 中国科学: 生命科学, 2018, 48: 692–704
Xu J M, Fang Y X, Zeng L J, et al. Identification and physiological function analysis of a new dwarf spikelet $Dwarf18$ -allele mutant in rice (in Chinese). Sci Sin Vitae, 2018, 48: 692–704, doi: 10.1360/N052017-00272

水稻(*Oryza sativa* L.)作为常见的一种粮食作物,全世界50%以上的人口以水稻为主食^[1,2],随着人口的不断增加、耕地面积的逐渐减少和环境污染程度的恶化,人们对水稻产量及质量的要求也呈现出上升趋势.以水稻矮化育种和杂交育种技术为标志的水稻绿色革命为全世界的粮食生产作出了巨大的贡献^[3].株高是水稻重要的农艺性状之一,它直接影响水稻的株型和产量.研究发现,赤霉素(gibberelline, GA)是决定植株株高的最重要植物激素^[4].GA在植物生长过程中能促进节间的伸长和细胞分裂、促使细胞壁松弛和增加细胞渗透吸水,故而GA缺陷突变体和GA敏感突变体都表现出株高异常的表型.如水稻*sd1*半矮突变体是由一个参与GA合成相关基因的突变造成^[5],GA代谢途径中的其他一些成员,如*OsGA2ox3*基因的过表达也使水稻节间变短,植株变矮^[6],之后育种家成功地将*SD1*基因在水稻中进行人工选择,并且发现有功能性核苷酸多态性参与到了粳稻的驯化,暗示古代就已经使用了绿色革命基因^[7].水稻*gid1*是对GA不敏感的矮秆突变体,*GID1*编码一个含有354个氨基酸的核定位蛋白,对具有生物活性的GAs具有高度的亲和性,当植物体内的*GID1*过量表达时表现出高敏感性表型^[8].GA合成缺陷突变体*gdd1*编码一个kinesin类型的马达蛋白BC12,*GDD1*的靶基因是GA合成的关键基因*KO2*,其突变导致GA合成水平降低,而使细胞伸长受阻^[9].水稻*d18*突变体是对GA响应的矮化突变体,该基因编码一个赤霉素3 β -羟化酶,其能使植株体内大量积累GA₂₀并以较低的效率将其转化成GA₁,目前已经鉴定了几个等位突变体^[10].在*d18*这些等位突变体中,其中*d18-AD*, *d18h*, *s2-9*和*s1-146a*为严重矮化的强等位突变体,而*d18-dy*和*d18k*则为半矮化的弱等位突变体^[10,11].随着对植物激素的深入研究探讨,发现另一种植物激素油菜素内酯(brassinolide, BR)在植物的株高调控中也发挥着重要的作用.在BR合成过程中许多细胞色素P450单加氧酶的功能缺陷会造成矮化的表型,同时还伴有育性降低或丧失特征.如水稻矮化突变体*d2*, *d11*, *brd1*, *dwarf*和*dwarf4*等^[4,12-15].这些突变体都是在BR生物合成或其信号传导途径中发挥作用,进而调控植物的株高.有研究发现,在水稻中BR可通过调控GA的合成和代谢进而调控细胞伸长,在拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)中也证实了BR同样也通过促进GA的合成来调控植物的生长^[16,17].

水稻的穗型是与产量密切相关的农艺性状,一直是水稻理想株型选育的重要目标性状.穗型主要体现在穗长、穗粒数、枝梗数和粒型等.近年来,报道了许多与水稻穗型相关的调控基因,如*OSHI*, *OsLG1*, *IPA1*, *Ghd7*, *LAX1*, *Gn1a*和*DEP1*等.研究表明这些基因具有多效性,主要是通过增加穗的枝梗数目使穗粒数增加,同时也参与株高、分蘖等性状的调控.*OSHI*编码了一个水稻同源异型盒(KNOX)蛋白,功能缺失导致花序发育受损而变小,同时穗粒数下降^[18].*OsLG1*编码一个含有SBP (AQUAMOSA promoter binding protein)结构域的蛋白,调控水稻在驯化过程中由松散穗型转变为栽培稻的紧穗型^[19,20].*IPA1*编码一个类Squamosa启动子结合蛋白OsSPL14,带有该基因的理想株型分蘖少和大穗,具有更多的枝梗和小花数目^[21].*Ghd7*编码一个具有CCT结构域的蛋白,通过调节穗分枝进而调控产量性状^[22].*LAX1*编码植物中特有的bHLH转录因子,功能缺失导致穗部枝梗数和穗粒数减少^[23].*Gn1a*编码一种降解细胞分裂素的细胞分裂素氧化酶/脱氢酶(OsCKX2),其表达的下降会导致细胞分裂素在花序分生组织中累积,增加了分枝数目,进而使穗粒数增多^[24].*DEP1*编码一个包含PEBP结构域的未知功能蛋白,可能通过调控*OsCKX2*的表达来影响分生组织的活性和细胞的分裂增殖,进而调控枝梗数目和穗粒数目,以直立穗型基因*DEP1*为基础的株型改良将可能实现水稻产量的第三次飞跃^[25,26].

目前矮化育种主要利用的是*sd1*及其等位基因,这种单一资源的应用,存在严重的遗传脆弱性^[27].为了挖掘新的矮化相关基因,从粳稻品种台北309为背景的甲基磺酸乙酯(ethyl methyl sulfonate, EMS)诱变体库中筛选到一份严重矮化并呈现小穗的突变体,遗传分析表明,该突变体受一对隐性核基因控制,图位克隆结果表明该基因与*d18*等位,测序比对发现突变体发生了单碱基的缺失造成无义突变,将该突变体暂命名为“*d18-1*”,基因暂命名为“*d18-1*”.本研究对突变体*d18-1*进行表型分析、细胞学观察以及生理功能分析,为进一步揭示*d18*的生理作用机制提供宝贵的信息资源.

1 材料与方法

1.1 实验材料和群体的构建

本研究利用EMS诱变粳稻品种台北309中筛选到

一份矮化小穗突变体*d18-1*, 经多代自交后能稳定遗传突变体性状。将突变体*d18-1*与常规籼稻TN₁, ZF802进行杂交, 利用F₁代和F₂代的表型及分离比进行遗传分析。同时在F₂分离群体中选择矮化小穗表型的隐性单株提取DNA用于基因的定位。所有材料种植于浙江省金华市浙江师范大学实验田, 管理方式同常规大田。

1.2 基因的精细定位

利用本实验室保存的均匀分布于水稻12条染色体的简单重复序列标记(single sequence repeat, SSR)引物对突变体与TN₁进行多态性筛选, 然后用21个*d18-1*/TN₁中F₂矮化小穗单株进行连锁分析, 初步确认目的基因所在的染色体位置。在与目的基因连锁的标记附近进一步开发了10对多态性较好的InDel (insertion and deletion)标记(表1), 以*d18-1*/TN₁的F₂分离群体中678株表现出突变体表型的单株对目的基因进行精细定位。基因组DNA采用溴化十六烷三甲基铵(cetyltrimethyl ammonium bromide, CTAB)法提取^[28]。10 μL的PCR体系包括: DNA模板1 μL, 10×PCR缓冲液1 μL, 正反引物(10 μmol/L)各0.5 μL, dNTPs 1 μL, rTaq酶0.2 μL, 加ddH₂O补足10 μL。PCR扩增程序如下: 94℃下预变性4 min; 94℃下变性30 s, 55℃~60℃下退火30 s (温度因引物不同而异), 72℃下延伸30 s, 40个循环; 最后72℃下延伸10 min。PCR产物用4%琼脂糖凝胶电泳, 电泳结束后在凝胶成像仪拍照并读胶。

1.3 候选基因分析

根据基因的精细定位结果, 通过水稻数据库(<http://rice.plantbiology.msu.edu/>)对候选基因进行序列分析, 对候选基因进行测序, 找到突变形式, 并对该基因和突变位点进行生物信息学分析, 进一步阐明表型与基因的对应关系。

1.4 石蜡切片分析观察

在成熟期选取新鲜完整、正常且有代表性的野生型台北309和突变体*d18-1*植株的倒三节间, 用锋利的刀片均匀地切割材料, 避免组织破裂, 立即将切下来的材料置于FAA固定液中(70%乙醇:冰醋酸:36%甲醛的体积比为18:1:1)固定, 之后按照Zhang等人^[29]石蜡切片方法操作。

1.5 植株花粉育性观察

花粉育性的观察采用I₂-KI染色方法^[30]。在抽穗期, 选取已抽出1/3主穗或较大分蘖穗, 随机选取穗子中上部未开放的颖花, 用镊子将6枚花药取出置于载玻片上, 并小心将花药夹碎使花粉粒释放浸于适量的1% I₂-KI染液中1~2 min, 去除花药壁等残留物后置于光学显微镜下观察并拍照, 根据花粉粒形态和染色状况统计分析花粉的育性。

1.6 外源植物激素GA₃和BR处理水稻幼苗

外源植物激素GA₃处理实验参考侯雷等人^[11]的方法, 即选取种子饱满、大小一致的种子, 将水稻种子进行表面消毒(70%乙醇溶液消毒10 min, 10%次氯酸钠溶液消毒30 min), 再用去离子水冲洗数次, 置于水中浸种2天, 期间换水一次。再进行37℃培养箱浸种催芽48 h (用湿毛巾包裹, 确保种子的湿度), 待催芽之后挑选露白一致的种子置于剪掉底部的96孔PCR板上, 分成6组, 每组10粒。然后放置于28℃光照培养箱内14 h光照/10 h黑暗条件下水培, 7天后, 分别加入5, 10, 20, 30和40 mg/L的GA₃ (Sigma, 美国)溶液400 mL, 以等量蒸馏水为对照, 处理7天后测量株高。3次重复实验, 计算 $\bar{x} \pm SD$, 采用*t*检验分析各组处理间株高的差异显著性。BR激素对突变体的叶角敏感试验参考Zhang等人^[31]的试验方法, 稍有改动。将野生型和突变体*d18-1*种子催芽、萌发, 然后在无菌蒸馏水中黑暗培养。8天后剪取叶节处2 cm切断分别浸泡在含有0, 0.01, 0.1, 1和10 μmol/L 24-eBL (Sigma)无菌蒸馏水中, 30℃黑暗处理3天, 之后测量叶节的夹角, 统计并拍照。

1.7 抽穗期相关基因的表达分析

利用TRIzol总RNA提取试剂盒(Invitrogen, 美国)提取野生型和突变体*d18-1*抽穗期叶片总RNA和节间部位总RNA, DNase I处理后的RNA样品再按照逆转录试剂盒ReverTra Ace® qPCR RT Kit (Toyobo, 上海)的说明反转录成cDNA。利用实时荧光定量PCR (qRT-PCR)方法, 分析各基因在野生型和突变体*d18-1*中的表达量。以基因*OsActin*作为内参基因, 每个反应做3个平行复孔, 采用2^{-ΔΔC_t}方法进行相对定量分析^[32], 重复做3次独立反应。实时PCR仪器为7500实时PCR体系(ABI, 美国), 对所得到的实验数据通过Excel和SPSS19.0软

表 1 精细定位和测序所用分子标记

引物名称	正向引物(5'→3')	反向引物(5'→3')	引物类型
P1	GGTAACTTTGTTCCCATGCC	GGTCAATCATGCATGCAAGC	Indel
P2	ACCCCATGAGAGCCGAC	GAATGGTTAGGGGTCAGGGG	Indel
P3	TGTCGTAACATGGCTACAACC	GACGGTTTGGTTTGTGTCCA	Indel
P4	GCAGTTTTCACGTCAGCTGT	AGAGTTGCATGTACCGATCTAGT	Indel
P5	GGACAAACTCCCACCAAT	CCTCACAGCCTCACAAA	Indel
P6	GAGCTACTATTTCTTCCGCTTCA	TGTACGTAACGGTCATGGGT	Indel
P7	CCGTTAGGCTGCTAATGTACAG	TGGAAATTATCTAGGCCCATCTC	Indel
P8	TTTGGCGTTTGGAGAGGAC	GGACGGCCGAGATGATCC	Indel
P9	CTCCAAGTAGTCTGTTTAGCGT	AGCTTTAGGACGTGCGTAGA	Indel
P10	AGGTAATAAGCTAGGTGTT	TAGGTACAGTAATACCAAGC	Indel
X1-1	CACTACGCTCCAAAACCTCTCT	GGTGGTAGACGCTGTGGAA	基因测序
X1-2	GGCTTCTTCACCTTCGTGC	TGCTCTGCTTCTCTGCTCTGT	基因测序

件进行统计分析, 采用 t 检验比较不同数据间的差异. qRT-PCR反应体系(20 μ L)是: cDNA模板2 μ L, SYBR qPCR Mix (Toyobo) 10 μ L, 正反引物(10 μ mol/L)各0.8 μ L, ddH₂O补足至20 μ L. qRT-PCR扩增程序如下: 95°C 30 s; 95°C 5 s; 55°C 10 s; 72°C 15 s, 40个循环. 所需引物见表2.

1.8 转录组测序检测基因表达谱变化及数据分析

在孕穗期, 分别剪取野生型和突变体*d18-1*的幼穗, 用液氮速冻, RNA提取按照TRIzol总RNA提取试剂盒(Invitrogen)说明书进行. Illumina HiSeq文库构建是根据制造商的说明(Illumina, 加拿大)进行. 通过磁珠富集带有polyA的mRNA, 采用离子打断的方式, 将RNA打断到200~300 bp片段. 以RNA为模板, 用6碱基随机引物和逆转录酶合成cDNA第一链, 并以第一链cDNA为模板进行第二链cDNA的合成, 第二链cDNA合成时, 其中的碱基T被替换成U, 从而达到链特异性文库的目的. 文库构建完成后, 采用PCR扩增进行文库片段富集, 之后根据片段大小进行文库选择, 文库大小在300~400 bp. 接着, 通过Agilent 2100 Bioanalyzer对文库进行质检, 再对文库总浓度及文库有效浓度进行检测. 然后根据文库的有效浓度以及文库所需数据量, 将含有不同Index序列(各样本加上不同的Index, 最后根据Index区分各样本的下机数据)的文库按比例进行混合. 混合文库统一稀释到2 nmol/L, 通过碱变性, 形

成单链文库. 随后采用第二代测序技术(next-generation sequencing, NGS), 基于Illumina HiSeq测序平台, 对这些文库进行双末端(paired-end, PE)测序.

通过TopHat程序(<http://ccb.jhu.edu/software/tophat/>)和BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi/>)比对和分析测序结果. 利用HTSeq (<http://www-huber.embl.de/users/anders/HTSeq/>)和DESeq (<http://www-huber.embl.de/users/anders/DESeq/>)程序检测差异表达基因. 基因的功能运用KEGG分析工具(<http://www.genome.jp/kegg/>)进行分析. 本研究的测序和生物信息服务在上海派森诺生物科技有限公司完成.

2 结果与分析

2.1 表型分析

田间生长条件下, 突变体*d18-1*从苗期到成熟期一直表现出严重矮化. 在成熟期, 与野生型相比, 突变体*d18-1*有如下特征: 植株矮化, 为野生型的58.42%, 穗长显著变短, 只有野生型的39.28%, 一次枝梗数显著少于野生型, 仅为野生型的47.5%, 单穗结实数也显著减少, 为野生型的22.01%, 结实率显著下降(图1A和B; 表3). 此外, 突变体的粒长增加而宽度变小, 千粒重显著降低(图1E; 表3). 在成熟期, 野生型能正常结实, 而突变体自然结实率低, 有部分都是空瘪粒(图1B). 采用I₂-KI对花粉进行染色, 发现突变体中的花粉存在3种不同

表 2 实时荧光定量PCR的引物序列

分子标记	正向引物(5'→3')	反向引物(5'→3')
<i>OsActin</i>	TGGCATCTCTCAGCACATTCC	TGCACAATGGATGGGTCAGA
<i>GA3ox2</i>	TGGAGGAGTTTCACAAGGAGA	CCTCAAGAACAACCTCAGCA
<i>GA20ox1</i>	GCCACTACAGGGCCGACAT	TGGTTGCAGGTGACGATGAT
<i>GA20ox2</i>	CCAATTTTGGACCCTACCGC	GAGAGAAGCCCAACCCAACC
<i>GA2ox1</i>	TGACGATGATGACAGCGACAA	CCATAGGCATCGTCTGCAATT
<i>GA2ox3</i>	TGGTGGCCAACAGCCTAAAG	TGGTGCAATCCTCTGTGCTAAC
<i>D1</i>	AATGCGGTAACTTTTGTGCTG	AGAGTTCTTGGTCTCCATCATTC
<i>GID1</i>	AGGACAGGGACTGGTACTGG	ACACGATGATGAGGCTCTTG
<i>SLR1</i>	GTGCAGCAGGAGAACTTCG	CGGCGAAGGCGGCGTCG
<i>BRD1</i>	TGACCTTCACTCGAGCTGTT	ACCTCTCTCAAACAGCATGA
<i>DWF4</i>	AGTCGCGTGCTGCCATTCT	AGCTCAGCAAGAGGTCCAGGAT
<i>CPD1</i>	TCTTCTCCATCCCCTTTCTCT	TCAAGAAGCTCCTCAACCATGT
<i>D2</i>	CCTTTTGGTGGTGGGCAGAG	TGGGGAAGTTGACGATGTGGT
<i>OsBLE3</i>	ATTGGCGCTAACAACAGATG	TGGTTGCAGTAGGCGTGTAT
<i>TUD1</i>	GACCAGAGCTGAAACAGCAA	GATGAATACCGTCGATGTGC
<i>DEARF</i>	CTCAAGCAGGGACCCAGTTTC	GTTGTTCCGCCCCAGGATGT

的形式: 染败, 即形状无明显差异但淀粉含量不完全的花粉粒; 空败, 几乎不染色和正常的花粉粒(图1D)。而野生型基本上能全部染色, 表明突变体的育性有所下降(图1C)。

2.2 *d18-1*的节间变化及细胞学形态观察

在成熟期, *d18-1*植株4个节间与野生型相比都明显地缩短, 但缩短比例各不相同, 倒一、二、三和四节间分别为野生型的74.69%, 50.95%, 8.62%和11.03%, 可见*d18-1*中的倒三和倒四节间缩短最为严重(图2A和B)。根据Takeda^[33]对矮秆突变体节间伸长模型的划分标准可以得知*d18-1*对于野生型应为下部节间显著缩短的d6型矮秆。

细胞学观察表明, 与野生型相比, 突变体*d18-1*茎节的细胞长度显著变短, 只有野生型的31.65% (图2D-F), 这可能是突变体*d18-1*矮化的主要原因。同时还发现茎秆宽度没有明显变化, 但细胞数目相对增多(图2G)。

2.3 遗传分析

将突变体*d18-1*和常规籼稻TN₁, ZF802进行杂交

配组, F₁植株均表现正常, 说明*d18-1*受隐性核基因控制。统计F₂群体分离比(表4), 结果发现正常表型的植株和突变体表型的植株的分离比经过卡方检验接近3:1分离($\chi^2 < \chi^2_{0.05} = 3.84$), 这表明*d18-1*的矮化小穗表型是由一对单隐性核基因控制。

2.4 *d18-1*的精细定位

利用120对引物进行候选基因连锁分析。结果发现, 在第1号染色体的端粒附近SSR标记P1处表现出连锁现象。在连锁标记上下游设计新的Indel标记, 用这21个单株将目的基因区间锁定在分子标记P1与P10之间。在此区间再次设计新的分子标记, 用678个F₂单株最终将该基因定位在P4和P5之间大约20 kb的区间内, 根据水稻基因组数据库(<http://rice.plantbiology.msu.edu/>)数据信息, 这一区域只包含一个可读框, 登陆号为LO-C_Os01g08220(*d18*), 该基因编码一个赤霉素3 β -羟化酶(GA3ox2), 预示该基因为候选基因(图3)。利用覆盖候选基因*OsGA3ox2/d18*区域的引物分别扩增野生型和突变体的DNA, 测序结果表明, *d18-1*的*OsGA3ox2*基因的编码区第748号碱基G缺失, 此外, 通过对*Os-GA3ox2*基因的cDNA测序也证明了该结果, 因此导致

图 1 突变体*d18-1*的表型特征

A: 野生型与突变体*d18-1*的抽穗期表型, 标尺: 13 cm; B: 野生型与突变体*d18-1*的小穗表型, 标尺: 6 cm; C: 野生型花粉染色, 标尺: 100 μm ; D: 突变体*d18-1*花粉染色, 标尺: 100 μm ; E: 野生型与突变体*d18-1*的粒长和粒宽比较, 标尺: 1 cm

表 3 水稻突变体*d18-1*和野生型的主要农艺性状比较^{a)}

农艺性状	野生型	<i>d18-1</i>
株高(cm)	95.57 $\pm$ 6.38	55.83 $\pm$ 3.75**
分蘖数	17 $\pm$ 2	18.67 $\pm$ 3.06
粒长(mm)	7.77 $\pm$ 0.13	9.45 $\pm$ 0.21**
粒宽(mm)	3.62 $\pm$ 0.1	3.1 $\pm$ 0.19*
粒厚(mm)	2.49 $\pm$ 0.12	2 $\pm$ 0.19*
一次枝梗	13.33 $\pm$ 1.53	6.33 $\pm$ 1.53**
穗长(cm)	24.1 $\pm$ 1.15	9.47 $\pm$ 0.85**
每穗实粒数	103 $\pm$ 6	22.67 $\pm$ 5.03**
千粒重(g)	27.22 $\pm$ 0.34	23.27 $\pm$ 0.71**

a) *和**分别代表水稻突变体*d18-1*与野生型间差异达显著 ($P<0.05$)和极显著 ($P<0.01$)水平(t 检验)

其编码序列在865 bp处出现终止子TGA, 造成无义突变. 说明, *d18-1*是已克隆*d18*的一个等位变异新基因.

2.5 *d18-1*对激素GA₃和BR处理的响应

利用外源活性GA₃处理水稻幼苗, 结果显示野生型和突变体幼苗株高相对于未加GA₃的对照均显著增高. 在外源GA₃浓度较低时(5 mg/L)就能使突变体的株高恢复, 当在较高浓度GA₃处理时, 突变体的株高显著增加, 并超过了野生型的株高(图4A和B). 由此可以得知*d18-1*对GA₃更为敏感, 推测突变体中GA信号转导途径正常, 能响应外源活性GA₃使其恢复株高.

同时对*d18-1*进行了BR敏感性试验. 结果显示, 在

较低浓度0.01 $\mu\text{mol/L}$ 24-eBL处理下, *d18-1*和野生型的叶倾角差异不大, 当24-eBL的浓度达到0.1 $\mu\text{mol/L}$ 时, 野生型的叶倾角增大幅度明显较大, 其变化比*d18-1*更为明显(图4C和D). 这表明突变体*d18-1*对外源BR的敏感性较野生型明显降低.

2.6 与GA和BR相关基因的表达分析

为了分析突变体*d18-1*中*OsGA3ox2*基因发生无义突变对GA和BR的合成以及信号传导途径相关基因表达模式的影响, 选择4个参与GA合成的基因(*OsGA20ox1*, *OsGA20ox2*, *OsGA2ox1*, *OsGA2ox3*)、3个参与GA信号传导的基因(*D1*, *GID1*, *SLR1*)、4个参与BR合成的基因(*BRD1*, *DWF4*, *CPD1*, *D2*)、3个参与BR信号传导的基因(*OsBLE3*, *TUD1*, *DWARF*), 并对这些基因进行了实时荧光定量PCR分析. 结果如图5, 与野生型相比, 在*d18-1*的节间中参与GA失活基因*OsGA2ox3*和GA生物合成相关基因*OsGA20ox2*都出现了下调表达, 在叶片中GA生物合成相关基因*OsGA3ox2*也出现了非常明显的下调表达, 此外, 介导GA信号传导途径的相关基因基因*D1*, *GID1*和*SLR1*都没有发生明显的变化. 同时发现参与BR的合成或者信号传导途径的大部分相关基因在*d18-1*中的表达都出现了下调, 如基因*BRD1*, *DWARF4*, *CPD1*, *D2*, *TUD1*和*DWARF*. 这些结果说明, *OsGA3ox2*基因发生无义突变导致*d18-1*中GA生物合成功能受阻, BR的生物合成及信号传导途径也受到影响.

图2 成熟期野生型与突变体*d18-1*的节间伸长模式和茎节石蜡切片对比(网络版彩图)

A: 野生型与突变体*d18-1*的节间形态, 标尺: 6 cm; B: 野生型与突变体*d18-1*对应的节间长度比较, 从上至下分别是倒一节间、倒二节间、倒三节间、倒四节间; C: 野生型与突变体*d18-1*各节间长度. *: $P<0.05$; **: $P<0.01$; D: 野生型倒三节间石蜡纵截面, 标尺: 50 μm; E: 突变体*d18-1*倒三节间石蜡纵截面, 标尺: 50 μm; F: 野生型与突变体*d18-1*倒三节间石蜡纵截面的细胞长度测量统计. **: $P<0.01$; G: 野生型与突变体*d18-1*倒三节间石蜡纵截面的细胞宽度测量统计

表4 突变体的遗传分析

杂交组合	F ₁ 表型	F ₂ 表型			χ^2 (3:1)
		正常表型	突变表型	总株数	
<i>d18-1/TN_i</i>	正常表型	2038	678	2716	0.002
<i>d18-1/ZF802</i>	正常表型	634	213	847	0.01

2.7 基因表达谱分析

通过突变型和野生型两样品差异表达检测分析, 在*d18-1*中检测到1497个差异表达基因, 其中896个基因上调表达($\log_2$ 比值 ≥ 1), 601个基因下调表达($\log_2$ 比值 ≤ -1). 根据KEGG分析, 这些差异基因参与了不同的代谢途径和信号通路, 包括了苯丙素的生物合成、萜类化合物的代谢、糖代谢和碳代谢等(图6A; 表5). 有趣的是与GA的生物合成相关基因*OsKOS1*, *OsGA20ox3*, *OsGA2ox1*和*OsGA3ox1*, 与BR的生物合成与信号传导相关基因*DWF4*, *TUD1*, *OsBLE3*, *D1*, *BZR1*, *OsMDP1*和*BUI1*, 与植物激素信号转导相关基因*OsGH3.2*, *OsGH3.8*, *OsZIP70*, *OsARF5*, *OsIAA3*, *OsIAA27*, *OsNCED1*和*D3*, 与穗发育相关基因*CPB1*,

DEP1, *DEP2*, *Gn1a*, *Ghd8*, *IPA1*, *LAX2*, *LPI*, *OsCKX2*, *OsGASR2*, *OSHI*, *RCN1*, *SP1*和*TUT1*, 这些基因在*d18-1*中相比较野生型都出现了显著性的差异(图6B). 说明*OsGA3ox2*发生了无义突变影响了部分穗型相关基因的表达.

3 讨论

水稻是重要的粮食作物, 且作为单子叶植物的模式植物, 近几年来其功能基因组学的研究越来越受到广大科研工作者的关注^[34,35]. 株高是水稻产量和质量的决定性因素, 鉴定和分离水稻株高控制基因在水稻理想株型育种中有着重大的意义. 本研究通过筛选粳稻品种台北309诱变体库, 获得了一份矮化严重的突

图 3 目的基因的图位克隆

A: 目的基因的精细定位; B: *d18*基因的结构示意图和突变形式; C: 野生型的测序峰值; D: 突变体的测序峰值

变体*d18-1*。突变体*d18-1*还表现出穗长显著变短、一次枝梗数目减少、单穗结实数降低等突变表型(图1;表3)。通过图位克隆方法分离该基因发现突变基因是*d18*的一个新的等位基因,该基因编码一个赤霉素3 β 羟化酶(图3)。在突变体*d18-1*中,突变位点位于第2个外显子中,发生鸟嘌呤(G)的缺失,造成无义突变。组织切片观察发现,突变体*d18-1*的纵向细胞长度显著变短,这可能是使植株矮化的主要原因(图2F)。目前已经鉴定了6个*d18*的等位突变体^[10,11]。对*d18*的等位突变体的具体表型及生理分析有*d18-AD*, *s2-9*, *s1-146a*和*d18-dy*,但对于*d18h*和*d18k*突变体没有具体的相关报道。根据本研究对突变体的表型及遗传调控解析可知导致*d18-1*矮化的*d18*新等位基因是强等位基因,因此,将该突变基因暂命名为*d18-1*。本研究结果明确了突变体*d18-1*的表型特征与遗传机制。

水稻矮化突变体大多与GA和BR两种内源激素的生物合成或信号传导有关,如果这两者当中的任何一个出现缺陷,都会导致植物的生长势降低和矮化。本研究的突变体*d18-1*由于在编码区发生了碱基的缺失而造成无义突变,因此推测其编码的蛋白赤霉素3 β 羟化酶丧失了功能。外源激素GA₃处理结果表明,突变体

*d18-1*对激素GA₃非常敏感,当外源激素GA₃浓度为5 mg/L时,*d18-1*的株高变化最明显,并且比野生型的高(图4A和B)。同时利用外源植物激素BR处理结果发现突变体*d18-1*对激素BR没有野生型敏感,野生型表现,出叶夹角异常敏感反应(图4C和D)。研究报道在水稻中BR可通过调整GA代谢来调节细胞的伸长。在正常的生理浓度下,BR诱导GA合成基因*OsGA3ox2*的表达并抑制GA失活基因*OsGA2ox3*的表达,导致活性GA的积累,从而促进植物生长;外源较高浓度的BR反馈抑制自身合成,同时诱导GA失活基因的表达,导致活性GA水平下降,最终抑制植物生长。而GA途径作为BR下游的支路途径之一,会负反馈抑制上游BR反应,包括BR诱导的叶夹角变化。有趣的是,高浓度GA会利用BR信号组分协助促进植物生长^[16]。为此,检测了野生型和突变体*d18-1*中与GA和BR的生物合成以及信号传导途径相关基因表达情况,qRT-PCR定量结果表明,在突变体*d18-1*中*OsGA3ox2*基因的表达明显降低(图5),还发现GA合成相关基因*OsGA20ox2*的表达出现显著性的下调,这说明*d18-1*可能由于不能正常合成GA而造成突变表型。在*d18-1*的节间中GA失活基因*OsGA2ox3*的表达与野生型相比显著下调,研究发现

图4 突变体*d18-1*对GA和BR敏感性反应(网络版彩图)

A: 未处理前和30 mg/L的GA₃处理后的表型, 标尺: 4 cm; B: 在不同浓度的GA₃处理下的株高变化; C: 未处理前和1 μmol/L的24-eBL处理后叶倾角的变化, 标尺: 1 cm; D: 在不同浓度的24-eBL处理下的叶倾角变化

图5 与GA和BR生物合成或者信号传导途径的相关基因的表达情况分析

*: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$, $n = 3$

*OsGA2ox3*是BR介导的抑制细胞伸长的主要转录靶标^[16], 推测该基因的下调表达与*d18-1*节间细胞的长度

显著变短有关。另外, 检测与GA信号传导途径相关基因的表达情况发现*D1*, *GID1*和*SLR1*基因都没有发现

图 6 野生型和突变体*d18-1*相比差异表达基因的KEGG富集分析和挑选的差异表达基因的表达热图

A: 突变体*d18-1*和野生型相比差异表达基因(DEG)的KEGG富集分析; B: 挑选的差异表达基因的表达热图

明显的变化,这也解释了*d18-1*能够响应外源GA反应。此外,还发现在*d18-1*中与BR的生物合成或者信号传导途径相关基因*BRD1*, *DWARF4*, *CPD1*, *D2*, *TUD1*和*DWARF*都出现了显著性下调,其他基因没有发生明显的变化,这进一步证明了*OsGA3ox2*基因的突变确实影响了植株细胞内BR的信号传递及其合成的反馈调节功能。

穗型也是一个与水稻产量和品质密切相关的重要农艺性状,也是育种学家和分子生物学家关注的水稻表型^[36]。本研究通过转录组测序检测了孕穗期突变体*d18-1*和野生型中的基因表达情况,结果表明,与野生

型相比,*d18-1*中检测到1497个差异表达基因,这些基因参与了苯丙素的生物合成、萜类化合物的代谢、糖代谢和碳代谢等代谢途径(图6A;表5),这些途径为穗的发育以及种子灌浆提供了营养物质,本课题组还发现调控穗的发育相关基因都发生了差异性表达(图6B),如调控小穗分生组织形成相关基因*LAX2*和*OSH1*,调控生殖分生组织大小相关基因*LOG*, *DEP1*和*Gn1a*,调控枝梗分生组织形成期向小穗分生组织形成期的转变相关基因*CPB1*, *Ghd8*和*RCN1*,调控枝梗伸长相关基因*DEP2*和*SP1*。此外,还发现与GA的生物合成相关基因、BR的生物合成与信号传导相关基因和生长素的

表 5 野生型和突变体*d18-1*相比最显著的差异表达基因KEGG富集分析表

KEGG通路	差异表达基因数目	P值	FDR
Phenylpropanoid biosynthesis	36	1.75372×10^{-13}	2.94625×10^{-11}
Starch and sucrose metabolism	27	9.59268×10^{-8}	8.05785×10^{-6}
Glyoxylate and dicarboxylate metabolism	12	4.66674×10^{-5}	0.002613375
Carbon fixation in photosynthetic organisms	12	8.95268×10^{-5}	0.003760127
Cyanoamino acid metabolism	9	0.000225364	0.007571632
Drug metabolism - cytochrome P450	9	0.000525434	0.012610409
Galactose metabolism	9	0.000525434	0.012610409
Metabolism of xenobiotics by cytochrome P450	8	0.001646099	0.0328369
Chloroalkane and chloroalkene degradation	4	0.001994842	0.0328369
Naphthalene degradation	3	0.002106456	0.0328369
Ascorbate and aldarate metabolism	7	0.002150041	0.0328369
Carbon metabolism	21	0.002449990	0.034299888
Diterpenoid biosynthesis	6	0.004688576	0.057474804
Pentose and glucuronate interconversions	8	0.004789567	0.05747804
Degradation of aromatic compounds	3	0.006588522	0.0737914464

合成与传导相关基因也出现了显著性的差异表达。由此表明*OsGA3ox2*基因发生突变后会影响穗发育调控基因的表达式进而影响穗的发育。但是*OsGA3ox2*基因是如何调控穗的发育还需要更深入的研究。

参考文献

1 Wang Y, Li J. Branching in rice. *Curr Opin Plant Biol*, 2011, 14: 94–99

2 Zeng D, Tian Z, Rao Y, et al. Rational design of high-yield and superior-quality rice. *Nat Plants*, 2017, 3: 17031

3 Pingali P L. Green Revolution: Impacts, limits, and the path ahead. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2012, 109: 12302–12308

4 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: 2900–2910

5 Spielmeier W, Ellis M H, Chandler P M. Semidwarf (*sd-1*), “green revolution” rice, contains a defective gibberellin 20-oxidase gene. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99: 9043–9048

6 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: 8909–8914

7 Asano K, Yamasaki M, Takuno S, et al. Artificial selection for a green revolution gene during japonica rice domestication. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2011, 108: 11034–11039

8 Ueguchi-Tanaka M, Ashikari M, Nakajima M, et al. *GIBBERELLIN INSENSITIVE DWARF1* encodes a soluble receptor for gibberellin. *Nature*, 2005, 437: 693–698

9 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: 628–640

10 Sakamoto T, Miura K, Itoh H, et al. An overview of gibberellin metabolism enzyme genes and their related mutants in rice. *Plant Physiol*, 2004, 134: 1642–1653

11 侯雷, 袁守江, 尹亮, 等. 两个新水稻*Dwarf18*基因强等位突变体的表型分析及分子鉴定. *作物学报*, 2012, 38: 1416–1424

12 Tanabe S, Ashikari M, Fujioka S, et al. A novel cytochrome P450 is implicated in brassinosteroid biosynthesis via the characterization of a rice dwarf mutant, *dwarf11*, with reduced seed length. *Plant Cell*, 2005, 17: 776–790

- 13 Mori M, Nomura T, Ooka H, et al. Isolation and characterization of a rice dwarf mutant with a defect in brassinosteroid biosynthesis. *Plant Physiol*, 2002, 130: 1152–1161
- 14 Hong Z, Ueguchi-Tanaka M, Shimizu-Sato S, et al. Loss-of-function of a rice brassinosteroid biosynthetic enzyme, C-6 oxidase, prevents the organized arrangement and polar elongation of cells in the leaves and stem. *Plant J*, 2002, 32: 495–508
- 15 Sakamoto T, Morinaka Y, Ohnishi T, et al. Erect leaves caused by brassinosteroid deficiency increase biomass production and grain yield in rice. *Nat Biotechnol*, 2006, 24: 105–109
- 16 Tong H, Xiao Y, Liu D, et al. Brassinosteroid regulates cell elongation by modulating gibberellin metabolism in rice. *Plant Cell*, 2014, 26: 4376–4393
- 17 Unterholzner S J, Rozhon W, Papacek M, et al. Brassinosteroids are master regulators of gibberellin biosynthesis in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 2015, 27: 2261–2272
- 18 Tsuda K, Ito Y, Sato Y, et al. Positive autoregulation of a *KNOX* gene is essential for shoot apical meristem maintenance in rice. *Plant Cell*, 2011, 23: 4368–4381
- 19 Ishii T, Numaguchi K, Miura K, et al. *OsLGI* regulates a closed panicle trait in domesticated rice. *Nat Genet*, 2013, 45: 462–465
- 20 Zhu Z, Tan L, Fu Y, et al. Genetic control of inflorescence architecture during rice domestication. *Nat Commun*, 2013, 4: 2200
- 21 Jiao Y, Wang Y, Xue D, et al. Regulation of *OsSPL14* by *OsmiR156* defines ideal plant architecture in rice. *Nat Genet*, 2010, 42: 541–544
- 22 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
- 23 Oikawa T, Kyozuka J. Two-step regulation of LAX PANICLE1 protein accumulation in axillary meristem formation in rice. *Plant Cell*, 2009, 21: 1095–1108
- 24 Li S, Zhao B, Yuan D, et al. Rice zinc finger protein DST enhances grain production through controlling *Gn1a/OsCKX2* expression. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2013, 110: 3167–3172
- 25 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
- 26 赵明珠, 王青营, 孙健, 等. 水稻直立穗型基因*DEP1*研究进展. 中国科学: 生命科学, 2017, 47: 1036–1042
- 27 马良勇, 朱旭东, 李西明, 等. 两个双矮地方种质中新矮生基因的遗传和等位性分析. 中国水稻科学, 2003, 17: 291–296
- 28 Wu K S, Tanksley S D. Abundance, polymorphism and genetic mapping of microsatellites in rice. *Mol Gen Genet*, 1993, 241: 225–235
- 29 Zhang G H, Li S Y, Wang L, et al. *LSCHL4* from *Japonica* cultivar, which is allelic to *NAL1*, increases yield of *Indica* super rice 93-11. *Mol Plant*, 2014, 7: 1350–1364
- 30 张文辉, 严维, 陈竹锋, 等. 水稻雄性不育突变体*oss125*的遗传分析及基因定位. 中国农业科学, 2015, 48: 621–629
- 31 Zhang C, Xu Y, Guo S, et al. Dynamics of brassinosteroid response modulated by negative regulator LIC in rice. *PLoS Genet*, 2012, 8: e1002686
- 32 Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ method. *Methods*, 2001, 25: 402–408
- 33 Takeda K. Internode elongation and dwarfism in some gramineous plants. *Gamma Field Symp*, 1977, 16: 1–18
- 34 Hirochika H, Guiderdoni E, An G, et al. Rice mutant resources for gene discovery. *Plant Mol Biol*, 2004, 54: 325–334
- 35 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: 生命科学, 2009, 39: 909–924
- 36 淳雁, 李学勇. 水稻穗型的遗传调控研究进展. 植物学报, 2017, 52: 19–29

Identification and physiological function analysis of a new dwarf spikelet *Dwarf18*-allele mutant in rice

XU JiangMin¹, FANG YunXia¹, ZENG LongJun², XU Na¹, JIAO Ran¹, HU Juan¹, MA Lu¹,
XIAO SaQing¹, HUANG Ling¹, HU Jiang³, RAO YuChun¹ & WANG YueXing³

¹ College of Chemistry and Life Sciences, Zhejiang Normal University, Jinhua 321004, China;

² Agricultural Genomics Institute at Shenzhen, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Shenzhen 518120, China;

³ State Key Laboratory of Rice Biology, China National Rice Research Institute, Hangzhou 310006, China

Plant height and panicle architecture are closely related agronomic traits that determine rice yield. In this study, a genetically stable dwarf spikelet mutant was isolated from the *japonica* cultivar “Taipei 309” through ethyl methanesulfonate mutagenesis. The mutant is mainly characterized by dwarfing, long grains, small width, and small panicle architecture. Genetic analysis revealed that the mutant phenotype was controlled by a single recessive nuclear gene, which was mapped to a 20-kb region between indel markers P4 and P5 on chromosome 1. Only one dwarf gene, *Dwarf18* (*D18*), has been cloned in this region, which encodes gibberellin 3 β -hydroxylase (GA3ox2), suggesting that the mutant gene and *D18* may be allelic. Sequence analysis of the mutant gene revealed the deletion of one base (G) in the second exon, causing a nonsense mutation. Quantitative real-time PCR results indicated that *OsGA3ox2* expression in the mutant was significantly decreased. Therefore, we tentatively named the mutant gene “*d18-1*.” Tissue section observation revealed the mutant showed a markedly decreased length of longitudinal cells but an increased number of cells in the stem compared with the wild-type. A physiological function analysis revealed that the mutant was more sensitive to GA treatment but less sensitive to BR treatment than the wild-type. Expression analysis of genes related to GA and BR biosyntheses and signal transduction pathways revealed that GA-inactivating gene *OsGA2ox3* and GA biosynthesis-related genes *OsGA20ox2* and *OsGA3ox2* were downregulated in the mutant; however, there were no significant differences in the expression of the key genes involved in the GA signaling pathway. In addition, downregulation was observed in most of the genes involved in the biosynthesis and signal transduction of BR in the mutant. These results indicate that the dwarf phenotype observed in the mutant was caused by abnormal GA synthesis and further impairment of the response pathway to exogenously active BR, resulting in a low-sensitivity response to BR. In addition, the microarray analysis of the wild-type and mutant panicles at the booting stage detected 1497 differentially expressed genes involved in phenylpropanoid biosynthesis and carbohydrate and carbon metabolisms. Therefore, the nonsense mutation of the *OsGA3ox2* gene in the mutant was considered to affect the regulation of GA and BR biosyntheses and signal transduction pathways as well as panicle architecture development. This study provides new information for further research into the regulation of rice dwarfing and the genetic network of panicle architecture.

rice, dwarf, spikelet, *Dwarf18*, gene mapping, function analysis

doi: [10.1360/N052017-00272](https://doi.org/10.1360/N052017-00272)