水稻穗顶退化突变体 *paa1331* 的鉴定及基因定位

侯飞雪, 彭永彬, 韩小行, 白鹤, 顾朝剑, 孙朝伟, 何曜, 张红宇*

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

* 联系人, E-mail: zhanghysd@163.com

2018-08-08 收稿, 2018-09-28 修回, 2018-09-28 接受, 2018-10-29 网络版发表

四川省科技厅项目(2016HH0044)和四川省农作物育种攻关项目资助

摘要 水稻穗部是影响产量的重要农艺性状, 其发育健全与否直接决定了水稻产量的高低. 过去几十年已经有大量的粒型和穗粒数相关基因被克隆报道, 但调控穗顶发育相关基因的克隆与功能的报道较少. 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穗顶退化突变体材料 *paa1331* (*panicle apical abortion 1331*). 与野生型相比, 该突变体主要表现为穗顶端严重退化(退化率高达53%), 株高变矮, 分蘖减少, 穗粒数降低. 台盼蓝染色结果表明, 穗顶端退化伴随细胞程序性死亡; 激素测定结果证明, 突变体穗顶部生长素含量高于野生型. 遗传分析表明, 该突变性状受隐性单基因控制; 通过图位克隆与重测序分析发现, 基因 *LOC_Os04g40720* 第4外显子的碱基A突变成G, 导致编码的氨基酸由天冬酰胺变为天冬氨酸. 目前该基因未见报道, 暂将该基因定为候选基因.

关键词 水稻, 穗顶退化, 遗传分析, 基因定位, *paa1331*

水稻(*Oryza sativa*)穗部参与植株形态建成, 也承载着水稻整个生育期的结实, 而小穗是同化物最终储存部位, 是产量基本组成的单位. 因此, 单穗粒数对水稻产量有着至关重要的影响. 水稻穗部的发育从花序分生组织开始, 枝梗发育随后, 最后是颖花发育. 生产上往往会出现水稻穗部颖花退化的现象, 对水稻丰收造成了阻碍. 所以, 通过穗退化突变体寻找控制穗退化的基因显得尤为重要.

常见的穗退化现象大致分为穗基部退化和穗顶部退化. 熟知的控制穗基部退化的基因 *SP1* (*short panicle1*), 编码多肽转运蛋白, 该基因突变导致穗基部一次枝梗退化^[1]. 目前克隆的控制穗顶部退化的基因有 *PAA2* (*panicle apical abortion2*)、*TUT1* (*tutou1*)、*OsALMT7* (*aluminum-activated malate transporter*)、*SPL6* (*squamosal promoter-binding protein-like*)^[2~6]. *PAA2* 属于NPF家族, 与硝酸转运有关^[4,5]. *OsTUT1* 编

码cAMP类受体蛋白抑制因子, 通过研究发现穗顶退化表型与角质层的缺陷有关^[6]. Heng等人^[2]研究发现 *OsALMT7* 是调控穗顶退化的基因, 编码一个苹果酸转运蛋白. 小穗退化伴随着细胞程序性死亡和DNA片段化, 退化部位有过高的过氧化氢水平和MDA积累^[2]. *SPL6* 基因功能缺陷, 造成内质网压力传感器IRE1超活化, 导致穗部细胞死亡^[3].

除了克隆的基因外, 还有一些调控穗顶退化基因的功能有待于进一步研究. 邱杨^[7]在4号染色体的精细定位区间内找到一个调节果胶质甲基酯酶活性基因 *OsPMEI*, 推测与突变体 *ap* 穗顶退化有关. Akter在4号染色体上筛选到了穗顶退化候选基因 *LOC_Os04g56160*, 但功能尚不明确^[8]. 李红平^[9]通过穗顶退化突变体 *tsr* 得到精细定位区间内的候选基因 *Os03g0320000*, 与水通道蛋白基因 *OsSIP2;1* 同源性较高. 袁晓^[10]通过对穗部进行转录组分析, 鉴定出2

引用格式: 侯飞雪, 彭永彬, 韩小行, 等. 水稻穗顶退化突变体 *paa1331* 的鉴定及基因定位. 科学通报, 2018, 63: 3192~3203

Hou F X, Peng Y B, Han X H, et al. Identification and gene mapping of a panicle apical abortion mutant (*paa1331*) in rice (in Chinese). Chin Sci Bull, 2018, 63: 3192~3203, doi: 10.1360/N972018-00801

号染色体上的差异表达基因*LOC_Os02g30200*, 推测其为穗顶退化候选基因。钟萍等人^[11,12]得到以中花11为背景的穗顶退化突变体*spd11*, 通过定位及测序分析发现, 1号染色体上的细胞分裂素激活酶基因*OsLOG*发生突变, 造成了穗顶退化表型。任三娟等人^[13]对穗退化材料*spd-hp7*进行基因定位, 获得4号染色体上RM471和RM273之间的一段区间。还有比较典型的*nsp*突变体, 颖花几乎全部退化, 表现为秃穗状。候选基因*NSP1*是*WUSCHEL*的同源基因, 决定分生组织起始^[14]。

穗顶退化还受到多基因控制, 近年来有一些数量性状基因座被相继报道。Yamagishi等人^[15]发现了3个分别位于第1, 10, 11染色体上控制花前穗基部小花败育的主效QTL。徐华山等人^[16]在第1, 2, 4, 7, 9条染色体上共检测到5个控制穗顶退化的QTL。高素伟等人^[17]也发现了5个控制穗顶退化的QTL, 分布于第3, 4, 5和8号染色体上。Tan等人^[18]报道第3和9染色体上的QTL在调控穗顶退化方面存在互作效应。王斌等人^[19]得到了6个与穗顶部退化相关的QTL, 分别位于第1, 2, 3, 5, 6和7号染色体。

本实验通过EMS诱变处理籼稻品种宜香1B, 得到一份能够稳定遗传的穗顶退化突变体, 命名为*paa1331*, 进行了农艺性状考察、生长动态观察、细胞组织学观察、遗传分析、基因定位、候选基因预测及验证等研究, 为基因功能研究奠定基础, 以期丰富穗退化基因调控网络。

1 材料与方法

(i) 材料。籼稻(*Oryza sativa* L. subsp. *indica*)保持系品种宜香1B, 经过甲基硫酸乙酯(EMS)诱变处理, 在M2代获得一份穗顶部退化突变体材料, 经连续多代自交发现, 该突变性状能够稳定遗传, 将其命名为*paa1331*(*panicle apical abortion 1331*)。

(ii) 农艺性状调查。供试材料自2015年夏起在四川温江和海南陵水两地交替种植。成熟时考察株高、分蘖数、主穗长、一次枝梗数、二次枝梗数、单穗总粒数、单穗实粒数、退化粒数、千粒重等农艺性状, 以退化粒数与总粒数之比作为退化率。

(iii) 解剖镜下观察稻穗发育动态及花粉染色。水稻生育期进入孕穗期后, 从田间随机选取野生型与突变体的新鲜分蘖, 在解剖镜下仔细剥开, 观察幼穗和花蕊发育情况, 并拍照。开花前用0.3% I₂-KI溶

液对野生型和突变体花粉进行染色, 观察花粉育性并拍照。

(iv) 组织染色及细胞学观察。挑选野生型穗顶端正常颖花与突变体的退化颖花, 在煮沸的台盼蓝染液中染色10 min, 取出后在室温下放置12 h, 然后用2.5 mg/mL的水合氯醛溶液进行脱色, 脱色后的样品保存于50%的甘油中。使用体视显微镜观察颖花染色情况并拍照。此外, 使用颖花制作石蜡切片观察横切面, 石蜡切片的制作参照杨捷频^[20]的方法。

(v) 激素含量测定。孕穗期开始后, 到田间取新鲜分蘖, 分别剥取野生型和突变体退化前1~2 cm幼穗和退化后7~8 cm幼穗, 用武汉永辉生物技术有限公司提供的试剂盒检测激素含量, 提取方法参照说明书。

(vi) 遗传分析。2016年夏, 以突变体为母本, 与野生型宜香1B杂交, 将F₁种子在冬季种植于海南陵水, 自交得到F₂种子, 2017年夏将F₂群体种植于四川温江。对F₁及F₂群体的表型进行调查。

(vii) 基因定位与克隆。用突变体与02428杂交所得F₂群体进行基因定位。参照Michelmore等人^[21]的BSA(bulk segregation analysis)法对水稻12条染色体上的510对SSR标记进行连锁分析。再利用这些连锁标记对*paa1331*/02428的F₂群体中的隐性单株进行初定位。再分别选取20株*paa1331*/宜香1B的F₂群体中的隐性单株和宜香1B植株, 进行全基因组重测序。MutMap分析结合初定位, 寻找SNP, 在SNP前后设计引物, 以野生型和突变体模板进行扩增并比对序列差异。所涉及的SSR标记序列下载自Gramene数据库(<http://archive.gramene.org/>), 扩增引物由生物学软件Primer 5.0设计而成, 序列比对使用生物学软件DNAMAN完成, 全基因组重测序分析由北京诺禾致源科技股份有限公司完成, 引物合成及小片段测序由成都擎科梓熙生物技术有限公司完成。DNA提取用CTAB^[22]法。

(viii) 候选基因验证。根据所提供的候选基因序列号, 到Rice Genome Annotation Project (<http://rice.plantbiology.msu.edu/index.shtml>)下载基因序列, 找到突变位点, 利用网站(<http://primer1.soton.ac.uk/primer1.html>)在线设计四引物, 以野生型和显隐性单株的DNA为模板扩增, 并电泳检测产物片段。

(ix) 候选基因表达分析及生物学功能预测。在整个生育期内, 使用Roche公司提供的Tripure Isola-

tion Reagent试剂提取野生型不同组织的总RNA, 用诺唯赞公司的反转录试剂盒(HiScript® II Q RT SuperMix for qPCR)反转得到cDNA, 再用q-PCR试剂盒(SYBR Green Master Mix)对候选基因进行定量表达(表1). 定量PCR使用CFX96TM Real-time System (BIO-RAD)荧光定量PCR仪.

在NCBI(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)比对蛋白质序列, 寻找功能类似的蛋白.

2 结果与分析

2.1 突变体的表型分析及主要农艺性状调查

在相同的田间种植条件下, 突变体*paa1331*的性状主要表现为穗顶部出现严重的颖花退化. 穗顶部小花甚至其着生的枝梗表现出枯死、卷曲, 容易脱落(图1(b)). 对突变体和野生型进行主要农艺性状调查发现, 突变体的株高、分蘖数均低于野生型(图1(a)), 对植株进行分茎节测量结果表明, 突变体仅穗长比野生型短, 各茎节与野生型无明显差异(图1(c)和(d)), 说明穗顶部退化性状缩短了稻穗长度, 导致株高变矮. 野生型与突变体植株分别选取10株, 深入考察稻穗生长情况, 结果表明, 突变体的枝梗数也低于野生型. 因此, 突变体的每穗总粒数显著少于野生型, 下降约23%. 而退化率远远高于野生型, 达到53%(表2). 在籽粒形态方面, 突变体籽粒的粒长较短(图1(e)), 粒宽与野生型没有差异(图1(f)).

2.2 突变体*paa1331*的生长动态

已知水稻幼穗的长度可以作为鉴定幼穗发育时期的参考. 为了探明突变体发生退化的时间, 我们参考任三娟等人^[13]的鉴定方法剥取不同发育阶段的突变体幼穗, 进行测量长度并观察差异. 结果发现, 与野生型相比, 突变体在花粉母细胞形成期的穗部顶端并未出现退化现象(图2(a)), 在花粉母细胞减数分裂期开始出现退化小穗(图2(b)), 随着稻穗的生长, 退化小穗逐渐增多且都位于一次枝梗的终端部位,

分布位置从上往下逐渐减少, 呈现出发育的“顶端劣势”(图2(c)). 同时期的花器官也相应出现变化, 花粉母细胞形成时期的*paa1331*花器官完整, 具有6枚雄蕊, 柱头和浆片, 雄蕊发育出四棱柱形状的药室, 与野生型并无差异(图2(d)和(g)). 进入花粉母细胞减数分裂时期后, 野生型正常发育, 突变体的花药开始皱缩(图2(e)和(h)); 至开花前, 突变体*paa1331*的颖花皱缩, 明显小于野生型(图2(f)), 野生型的花粉成熟, 而突变体的所有花器官已经变为线形(图2(i)). 对突变体*paa1331*和野生型宜香1B的花粉粒染色结果显示, *paa1331*不产生花粉粒(图3). 以上结果说明花粉母细胞减数分裂期开始的退化抑制了花粉粒的形成.

2.3 组织细胞学观察

为了检验穗顶端退化的小穗是否发生细胞死亡, 对野生型和突变体小穗进行台盼蓝染色, 结果显示突变体中发生退化的小穗着色较深(图4(a)和(b)), 说明小穗退化伴随着细胞程序性死亡. 突变体与野生型的小穗横切面观察结果显示, 突变体*paa1331*的雄蕊皱缩, 内外稃扭曲(图4(c)和(d)). 枝梗的维管束结构也发生了改变, 筛管和韧皮部被厚壁细胞取代, 起支撑作用的绿色细胞消失(图4(e)和(f)). 根据这些结果我们推测可能是因为细胞程序化死亡和维管束的退化, 导致雄蕊等发生退化, 最终顶部枝梗的小穗不能正常发育.

2.4 突变体*paa1331*退化前后穗部激素含量的变化

水稻幼穗发育过程中, 激素发挥着重要的影响作用^[23]. 已知在穗部发育中生长素的分布具有“顶端优势”的特点, 而本突变体材料的退化小穗分布同样占据一次枝梗的顶端, 因此我们检测了穗部顶端部分退化小穗的激素(IAA和CTK)含量变化(设计3次重复). 由图5可以看到, 退化发生前后, 突变体幼穗中IAA的含量均高于野生型, 相反地, CTK的含量都极显著性地低于野生型. 推测由于穗顶部IAA积累过多, 抑制了小穗的发育.

表1 定量表达的引物序列

Table 1 Primer sequences of Q-PCR

基因名称	正向引物5'→3'	反向引物5'→3'
ACTIN	ATCCATCTTTGGCATCTCTCAGC	CACAATGGATGGGCCAGACT
<i>paa1331</i>	AGTGGAGCAGTGGAGGTA	TCAGAAGCCAGATCAGTAG

图 1 (网络版彩色)突变体(*paa1331*)与野生型(WT)表型比较。(a) 植株比较;(b) 稻穗比较;(c)和(d) 分茎节比较(P: 穗子; I: 倒 1 节; II: 倒 2 节; III: 倒 3 节; IV: 倒 4 节);(e)和(f) 籽粒长宽比较

Figure 1 (Color online) Contrasting phenotype between *paa1331* and Yixiang 1B. (a) Plant phenotype; (b) compare of panicle; (c) and (d) compare of internodes (P: Panicle; I: top first internodes; P: top second internodes; III: top third internodes; IV: top fourth internodes); (e) and (f) compare of grain size

表 2 突变体*paa1331* 与野生型的农艺性状比较

Table 2 Comparison of agronomic traits between Yixiang1B and *paa1331*

材料	株高(cm)	分蘖数	主穗长(cm)	一次枝梗数	二次枝梗数	穗总粒数	退化率(%)	千粒重(g)
宜香1B	122.9±0.77	12.4±0.57	30.76±0.60	9.6±0.25	39.7±1.48	202.2±7.21	4±1	31.5±0.48
<i>paa1331</i>	110.1±0.59	10.2±0.44	20.53±0.58	8.1±0.22	29.8±0.70	155.8±4.58 ^{a)}	53±2	25.8±0.34

a) 表示突变体*paa1331*与野生型宜香1B之间的差异达到0.05显著水平

2.5 突变体的遗传分析

以突变体*paa1331*为母本,野生型宜香1B和02428分别为父本进行杂交,构建了*paa1331*/宜香回交F₂群体和*paa1331*/02428的定位群体,并调查F₁与F₂群体的性状表现。结果显示,回交F₁单株的表型与野生型一致,回交和定位F₂群体皆出现性状分离,正常单株数目与突变单株数目比例符合3:1分离比(表3),说明该突变表型是由一对单隐性核基因控制的。

2.6 基因定位及候选基因克隆

利用突变体与02428杂交的F₂群体,以BSA法进行定位。首先用正常单株和退化单株的DNA各10个构建显性池和隐性池,利用512对多态性标记进行初步连锁分析,发现在4号染色体的RM5979和RM252标记与突变性状之间存在连锁多态性(图6(a))。对突变单株和野生型单株进行全基因组重测序,Mutmap分析表明,在该区间内有一个index值为1的SNP位点

图2 突变体 $paa1331$ 的穗部发育动态观察及其与野生型花器官比较. (a) 花粉母细胞形成期的突变体幼穗; (b) 花粉母细胞减数分裂时期的突变体幼穗; (c) 开花前的突变体的穗; (d)–(i) 野生型与突变体花器官((d)和(g)为花粉母细胞形成时期, (e)和(h)为花粉母细胞减数分裂时期, (f)和(i)为开花前)

Figure 2 Dynamic observation on the development of $paa1331$. (a) Pollen mother cell formation period of young spike in $paa1331$; (b) pollen mother cell meiosis period of young spike in $paa1331$; (c) panicle before flowering; (d)–(i) the flower of WT and $paa1331$ ((d) and (g) pollen mother cell formation period; (e) and (h) pollen mother cell meiosis period; (f) and (i) before flowering)

图3 突变体 $paa1331$ 与野生型的花粉粒检测. (a) 开花前野生型花药饱满; (b) 野生型花粉粒染色; (c) 开花前突变体($paa1331$)药室干瘪接近透明; (d) 突变体花药染色, 药室内无花粉粒

Figure 3 Pollen staining. (a) The anthers of Yixiang1B were full of pollen before flowering; (b) the pollen of Yixiang1B were stained black by I_2 -KI; (c) the anthers of $paa1331$ were wizened close to hyaline; (d) no pollen was stained black in $paa1331$

(图6(b)). 该SNP位点定位于基因 $LOC_Os04g40720$ 上. 对突变体中该基因进行小片段克隆验证并测序, 发现该基因的第4外显子上碱基A变为G, 导致编码的氨基酸由天冬酰胺变为天冬氨酸(图6(c)~(e)), 与Mutmap分析结果一致. 因此, 我们暂将 $LOC_Os04g40720$ 定为突变体的候选基因. 在水稻基因数据库中(<http://www.ricedata.cn/gene/index.htm>)查询, 发现该基因注释为: 编码未知的表达蛋白, 所以暂将它命名为PAA1331.

2.7 候选基因验证

为了验证候选基因的功能, 我们针对基因 $PAA1331$ 的突变位点, 在线设计四引物(<http://primer1.soton.ac.uk/primer1.html>), 使用突变体 $paa1331$ 与野生型的回交 F_3 群体进行突变位点验证. 电泳结果见图7, 野生型条带大小为193 bp, 隐性单株条带大小为223 bp, 显性单株条带杂合或与野生型相同, 外引物条带一致, 大小为357 bp, 说明基因 $PAA1331$ 的突变与穗退化性状共分离. 利用突变体进行基因互补验证工作正在进行中.

2.8 候选基因的表达谱分析

为了探究基因 $PAA1331$ 的表达模式, 检测了其在野生型整个生育期内不同组织中(根、叶、茎、穗)的表达情况(图8). 结果发现, 该基因为组成型表达, 但在各组织中的表达量普遍较低, 仅在茎和叶片的

图 4 突变体*paa1331* 与野生型小穗台盼蓝染色及切片观察. (a) 野生型小穗台盼蓝染色; (b) *paa1331* 小穗台盼蓝染色; (c)和(d) 野生型与*paa1331* 小花横切; (e)和(f) 野生型与*paa1331* 枝梗横切(L: 外稃; P: 内稃; S: 雄蕊; VB: 维管束; GC: 绿色细胞; P: 韧皮部; T: 筛管)

Figure 4 Trypan blue staining and transverse section. (a) and (b) Trypan blue staining of wild type and *paa1331*; (c) and (d) transverse section of spikelet in wild type and *paa1331*; (e) and (f) transverse section of branch in wild type and *paa1331* (L: lemma; P: palea; S: stamen; VB: vascular bundles; GC: green cell; P: phloem; T: tube)

图 5 突变体*paa1331* 与野生型幼穗退化前后激素含量变化. (a) 野生型与突变体在退化发生前后的IAA含量变化; (b) 野生型与突变体在退化发生前后的CTK含量变化. pba: 退化发生前; paa: 退化发生后. **表示突变体*paa1331* 与野生型宜香 1B之间的差异达到0.01 显著水平.

Figure 5 Determination of hormone content. (a) Change of IAA content in Yixiang1B and *paa1331*; (b) change of CTK content in Yixiang1B and *paa1331*. pba: Panicle before abortion; paa: panicle after abortion. ** denote the difference between *paa1331* and Yixiang 1B has reached 0.01 significant levels

表 3 变体 *paa1331* 的遗传群体分析Table 3 Genetic analysis of the mutant *paa1331*

杂交组合	总株数	正常单株数	突变单株数	χ^2 值
<i>paa1331</i> /宜香1B	300	231	69	0.537
<i>paa1331</i> /02428	1000	777	223	3.745

表达量稍高,尤其在成熟叶片中最高;根部的表达始终处于低水平,在1~4 cm穗和12~13 cm穗中表达高于其他时期,暗示穗退化表型是因为基因 *PAA1331* 突变导致基因功能发生改变而引发,与其表达量水平关联不大。

2.9 候选基因的生物功能预测

在NCBI(<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)对

PAA1331蛋白进行氨基酸序列比对,查找其相似蛋白,除了一些相似度较高的假定蛋白外,注释蛋白相似度较高的分别是牙本质涎磷蛋白和微管结合蛋白(表4)。牙本质涎磷蛋白在动物体内具有维持牙齿发育、矿化的重要作用^[24]。其中植物微管结合蛋白在植物组织中具有广泛作用,例如支持微管骨架并进行物质转运^[25]。因此我们推测PAA1331蛋白可能参与物质转运调节。

3 讨论

3.1 *PAA1331*是一个调控穗顶退化的新基因

穗退化是水稻及其他谷类植株中普遍存在的生理缺陷,导致水稻产量降低^[26]。然而,关于穗退化的

图6 (网络版彩色)目标基因分子定位及突变检测。(a) 候选基因定位在4号染色体分子标记RM5979和RM252之间;(b) SNP在4号染色体上的分布频率及SNP index;(c) *LOC_Os04g40720* 基因结构示意图,黑色部分代表外显子,折线代表内含子;(d) 包含SNP的基因扩增片段(泳道1~4为1212 bp扩增片段,5~8为772 bp扩增片段);(e) 突变位点序列比对,由A变为G

Figure 6 (Color online) Genetic and physical maps of candidate gene. (a) The candidate gene was located on chromosome 4 between marker RM5979 and RM252; (b) the frequency and SNP index of SNP on chromosome 4; (c) the gene structure of *LOC_Os04g40720*, the black rectangles and broken line indicated exons and intron, respectively; (d) amplified Gene fragment contain SNP (泳道1~4: 1212 bp; 5~8: 772 bp; 1, 2, 5, 6: Yixiang1B; 3, 4, 7, 8: *paa1331*); (e) alignment of sequence contain SNP, base substitution from A to G

图7 (网络版彩色) 突变体 $paa1331$ 突变位点共分离验证. (a) 电泳图像(M: Marker; 1: 野生型, 2: 突变体, 3~10: 隐性单株; 11~18: 显性单株); (b) 引物在基因上位置示意图

Figure 7 (Color online) Analysis of $paa1331$ mutation sites. (a) Electrophoresis image (M: Marker; 1: wild type, 2: mutant type, 3~10: recessive plants, 11~18: dominant plants); (b) map of primers in gene position

图8 基因 $PAA1331$ 在野生型不同组织中的表达量比较. SS: 幼苗期; TS: 分蘖期; BS: 孕穗期; HS: 成熟期

Figure 8 Expression analysis of $PAA1331$. SS: Seeding stage; TS: tillering stage; BS: booting stage; HS: heading stage

遗传与分子机制目前尚未明确. 在本研究中, 成功鉴定了一个突变体 $paa1331$, 植株主要表现为严重的穗顶端退化性状, 退化率高达53%. 与野生型相比, 突

变体呈现生长弱势. 同时突变体还具有株高变矮, 分蘖数减少, 枝梗数目和单穗粒数降低, 籽粒变小, 千粒重降低等性状. 采用基因定位与测序分析相结合,

表 4 *PAA1331* 相似蛋白

Table 4 Similar proteins of *PAA1331*

蛋白名称	相似度(%)	登录号	功能
牙本质涎磷蛋白	44	XP_002448075.1	维持牙齿正常发育、矿化
结合蛋白	46	XP_010240039.1	调节微管结构与功能, 支持微管骨架, 进行物质转运

确定候选目标基因 *LOC_Os04g40720*. 在当前已报道的穗顶退化基因中, *PAA2* 和 *OsALMT7* 及袁晓等人所得的候选基因 *LOC_Os02g30200* 均位于 2 号染色体上^[2,5,10]; *TUT1* 与 *OsLOG* 共同位于 1 号染色体上^[6,12]; 突变体 *tsr* 的候选基因 *Os03g0320000* 位于 3 号染色体上^[9]. 而本研究发现候选基因 *LOC_Os04g40720* 位于 4 号染色体上, 与 Akter 等人^[8] 所得同在 4 号染色体上的候选基因 *LOC_Os04g56160* 的物理距离约为 9.3 cM. 此外, 4 号染色体上候选基因 *OsPMEI* 可调节果胶质甲基酯酶活性^[7]. 本研究发现的候选基因 *LOC_Os04g40720* 编码未知的表达蛋白, 因此, *LOC_Os04g40720* 可能是一个新的调控水稻穗发育的基因, 但还需要通过转基因阳性互补植株验证目标基因的功能.

3.2 生长素积累与穗顶退化有关

植物生长过程中出现的顶芽抑制侧芽生长的现象叫做顶端优势^[27], 而顶端优势的产生依赖于生长素的调节^[28]. 枝梗上的颖花分化是由上向下的, 枝梗顶端的颖花最早分化, 发育成强势花; 基部的颖花分化迟, 为弱势花. 在水稻穗发育过程中也存在顶端优势现象, 是由生长素的极性运输引起的. 有研究表明, 生长素的合成转导途径关联到花序、花分生组织以及花器官发育的调控^[29-31]. 在小麦中发现较低含量的 IAA 可以提高小花的育性^[32], 而在水稻 *dao* 突变体中, 因对 IAA 起催化作用的双加氧酶基因 *DAO* 发生突变, 造成生长素含量升高, 引起相关基因表达差异, 导致花药不开裂等表型^[33]. 而本研究发现, 突变体在幼穗长度约 5 cm 后开始顶端退化, 退化程度随着幼穗的生长而加深, 退化颖花数量也逐渐增多, 但整体分布呈现从穗顶端向下逐渐减少的趋势; 与生长素引起的“顶端优势”相反. 突变体花器官发育异常, 不能够产生花粉粒; 且通过幼穗激素测定, 发现突变体 *paa1331* 在退化前后的两个时期所含生长素相

对含量高于同期野生型幼穗, 推测颖花发育受阻可能与生长素水平过高有关.

3.3 维管束发育障碍导致穗顶端退化

水稻穗部发育是一个快速延伸的过程, 且包含着生殖器官的发育, 需要充分的营养物质和能量供给. 维管束是植物体内的疏导组织, 负责长距离运输, 在“源-库-流”系统中扮演“流”的角色. 多项研究表明维管束的数量与水稻抗倒伏能力正相关^[34-37], 说明维管束还具有结构支撑的作用. 研究发现在玉米穗发育过程中, 穗柄和穗轴内维管束的数量和面积都与穗粒数等显著正相关^[38], 而玉米顶端败育籽粒的小穗柄维管系统发育较差^[39]. 在水稻 *pla3* 突变体中表现出幼穗发育畸形, 通过细胞形态观察发现, 该突变体的维管束发育异常, 不能通向穗轴, 可能是幼穗发育畸形的原因之一^[40]. 超高产水稻中花 15 号的枝梗维管束中的筛管总面积和发育程度较高, 可提高光合产物向颖果的运输效率^[41]. 本研究发现, 突变体穗顶端退化枝梗的维管束整体呈现发育缺陷, 小维管束堵塞, 绿色细胞消失, 失去支撑作用, 且花器官发育停滞, 无花粉粒产生. 综上, 推测穗顶端小穗退化的可能原因是由于细胞程序性死亡和维管束的退化, 导致维管束中营养物质的运输发生堵塞, 小穗中的雄蕊因没有营养供给而发生细胞程序性死亡, 发育停滞在早期, 最终引起顶端小穗退化.

众所周知, 穗退化容易受到环境胁迫的影响, 例如高温胁迫、水分胁迫等. 挖掘调控穗退化的基因, 深究其调控途径及其一些关键基因的表达变化, 一方面可完善穗发育分子调控网络, 另一方面可以通过改变基因的表达, 例如使发挥正调控作用的基因过表达, 阻止穗退化现象发生, 保证粮食产量. 本研究对水稻穗顶退化突变体 *paa1331* 进行了相关生理及分子实验研究, 以为候选基因的功能分析提供基础.

参考文献

- Li S B, Qian Q, Fu Z M, et al. Short panicle1 encodes a putative PTR family transporter and determines rice panicle size. *Plant J*, 2009, 58: 592–605
- Heng Y, Wu C, Long Y, et al. OsALMT7 maintains panicle size and grain yield in rice by mediating malate transport. *Plant Cell*, 2018, 30: 889–906
- Wang Q L, Sun A Z, Chen S T, et al. SPL6 represses signalling outputs of ER stress in control of panicle cell death in rice. *Nat Plants*, 2018, 4: 280–288
- Li Z, Mao B G, Heng Y Q, et al. Fine mapping of the panicle apical abortion *PAA2* in rice (*Oryza sativa*) (in Chinese). *J Plant Genet Resour*, 2014, 15: 1023–1027 [李真, 毛毕刚, 衡月芹, 等. 水稻穗顶部退化基因 *PAA2* 的精细定位. 植物遗传资源学报, 2014, 15: 1023–1027]
- Luo S. Positional Cloning of Rice Panicle Apical Development-related Gene *PAA2* (in Chinese). Doctor Dissertation. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2016 [罗胜. 水稻穗顶端发育相关基因 *PAA2* 的克隆研究. 博士学位论文. 北京: 中国农业科学院, 2016]
- Bai J, Zhu X, Wang Q, et al. Rice TUTOU1 encodes a SCAR-like protein that is important for actin organization and panicle development. *Plant Physiol*, 2015, 169: 1179–1191
- Qiu Y. Fine mapping of Dominant Dwarf and Panicle Degeneration Genes in Rice (in Chinese). Doctor Dissertation. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2007 [邱杨. 水稻显性矮秆和穗退化基因的精细定位. 博士学位论文. 北京: 中国农业科学院, 2007]
- Akter M B, Piao R, Kim B, et al. Fine mapping and candidate gene analysis of a new mutant gene for panicle apical abortion in rice. *Euphytica*, 2014, 197: 387–398
- Li H P. Gene Mapping and Candidate Genes Cloning of An Panicle Apical Abortion Mutant (*tsr*) in Rice (in Chinese). Doctor Dissertation. Fuzhou: Fujian Agriculture and Forestry University, 2015 [李红平. 水稻顶端穗退化 *tsr* 突变体的基因定位及候选基因的克隆. 博士学位论文. 福州: 福建农林大学, 2015]
- Yuan X. Map-based Cloning for OTL on Panicle Apical Degeneration of Rice (in Chinese). Master Dissertation. Beijing: Beijing Institute of Genomics Chinese Academy of Sciences, 2014 [袁骁. 水稻穗顶部退化相关 QTL 的图位克隆. 硕士学位论文. 北京: 中国科学院北京基因组研究所, 2014]
- Zhong P, Chen P R, Wang Q, et al. Genetic analysis and candidate gene identification of the panicle degradation mutant *spd11* in rice (in Chinese). *Sci Agric Sin*, 2016, 49: 1835–1843 [钟萍, 陈璞睿, 王迁, 等. 水稻穗退化突变体 *spd11* 的遗传分析及候选基因鉴定. 中国农业科学, 2016, 49: 1835–1843]
- Zhong P. Genetic Analysis and Gene Cloning of Panicle Degradation Mutant *spd11* and Green-revertible Yellow Mutant *d78* in Rice (in Chinese). Master Dissertation. Chengdu: Sichuan Agricultural University, 2016 [钟萍. 水稻穗退化突变体 *spd11* 和黄化转绿突变体 *d78* 的遗传分析与基因克隆. 硕士学位论文. 成都: 四川农业大学, 2016]
- Ren S J, Sun C, Tong C, et al. Genetic analysis and gene mapping of a rice spikelet degradation mutant (*spd-hp73*) (in Chinese). *J Zhejiang Univ (Agric & Life Sci)*, 2013, 39: 267–273 [任三娟, 孙出, 童川, 等. 水稻小穗退化突变体 *spd-hp73* 的遗传分析及基因定位. 浙江大学学报(农业与生命科学版), 2013, 39: 267–273]
- Zhang D, Fang Y X, Pang R J, et al. Genetic analysis and fine mapping of the gene for a no spikelet mutant *nsp1* in rice (in Chinese). *J Nucl Agric Sci*, 2017, 31: 1–7 [张栋, 方云霞, 潘江杰, 等. 水稻秃穗突变体 *nsp1* 的遗传分析和精细定位. 核农学报, 2017, 31: 1–7]
- Yamagishi J, Miyamoto N, Hirotsu S, et al. QTLs for branching, floret formation, and pre-flowering floret abortion of rice panicle in a temperate japonica × tropical japonica cross. *Theor Appl Genet*, 2004, 109: 1555–1561
- Xu H S, Sun Y J, Zhou H J, et al. Development and characterization of contiguous segment substitution lines with background of an elite restorer line (in Chinese). *Acta Agron Sin*, 2007, 33: 979–986 [徐华山, 孙永建, 周红菊, 等. 构建水稻优良恢复系背景的重叠片段代换系及其效应分析. 作物学报, 2007, 33: 979–986]
- Gao S W, Zhang L, Mao B G, et al. Genetic analysis of rice mutant *L-05261* with panicle apical abortion trait (in Chinese). *Acta Agron Sin*, 2011, 37: 1935–1941 [高素伟, 张玲, 毛毕刚, 等. 水稻穗顶部退化突变体 *L-05261* 的遗传分析. 作物学报, 2011, 37: 1935–1941]
- Tan C J, Sun Y J, Xu H S, et al. Identification of quantitative trait locus and epistatic interaction for degenerated spikelets on the top of panicle in rice. *Plant Breed*, 2011, 130: 177–184
- Wang B, Liu H M, Mao B G, et al. QTL analysis on apical spikelet abortion in rice (in Chinese). *Chin J Rice Sci*, 2011, 25: 561–564 [王斌, 刘贺梅, 毛毕刚, 等. 水稻顶部小穗退化性状的 QTL 分析. 中国水稻科学, 2011, 25: 561–564]

- 20 Yang P J. Improvement of traditional paramn section preparation method (in Chinese). *J Biol*, 2006, 23: 45–46 [杨捷频. 常规石蜡切片方法的改良. *生物学杂志*, 2006, 23: 45–46]
- 21 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
- 22 Murray M G, Thompson W F. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Res*, 1980, 8: 4321–4325
- 23 Lu H, Dai Z, Li L, et al. OsRAMOSA2 Shapes panicle architecture through regulating pedicel length. *Front Plant Sci*, 2017, 8: 1538
- 24 Zhang R. Study on the Function of Dentin Siloposphoprotein During the Tooth Development, Mineralization and Dental Pulp Reparation After Injury (in Chinese). Doctor Dissertation. Xi'an: Fourth Military Medical University, 2001 [张蓉. 牙本质涎磷蛋白在牙齿发育、矿化及牙髓损伤修复中作用的研究. 博士学位论文. 西安: 第四军医大学, 2001]
- 25 Sedbrook J C. MAPs in plant cells: Delineating microtubule growth dynamics and organization. *Curr Opin Plant Biol*, 2004, 7: 632–640
- 26 Sheehy J E, Dionora M J A, Mitchell P L. Spikelet numbers, sink size and potential yield in rice. *Field Crops Res*, 2001, 71: 77–85
- 27 Horvath D P, Anderson J V, Chao W S, et al. Knowing when to grow: Signals regulating bud dormancy. *Trends Plant Sci*, 2003, 8: 534–540
- 28 Stirnberg P, Chatfield S P, Leyser H M O. AXR1 acts after lateral bud formation to inhibit lateral bud growth in *Arabidopsis*. *Plant Physiol*, 1999, 121: 839–847
- 29 Mcsteeen P. Auxin and monocot development. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2010, 2: a001479
- 30 Pagnussat G C, Alandete-Saez M, Bowman J L, et al. Auxin-dependent patterning and gamete specification in the *Arabidopsis* female gametophyte. *Science*, 2009, 324: 1684–1689
- 31 Sundberg E, Østergaard L. Distinct and dynamic auxin activities during reproductive development. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2009, 1: a001628
- 32 Sheng J, Feng C N, Guo W S, et al. Relation of endogenous hormone contents in spikes to floret development of wheat (in Chinese). *Jiangsu Agric Res*, 2001, 22: 5–8 [盛婧, 封超年, 郭文善, 等. 小麦幼穗内源激素含量与小花发育的关系. *江苏农业研究*, 2001, 22: 5–8]
- 33 Zhao Z, Zhang Y, Liu X, et al. A role for a dioxygenase in auxin metabolism and reproductive development in rice. *Dev Cell*, 2013, 27: 113–122
- 34 Shao P. Research on Physiological Elasticity Lodging Resistance in Semi-high-stem Hybrid Rice with Higher Biomass (in Chinese). Master Dissertation. Jingzhou: Yangtze University, 2015 [邵平. 半高秆高生物量型杂交稻生理弹性抗倒研究. 硕士学位论文. 荆州: 长江大学, 2015]
- 35 Li H J, Zhang X J, Li W J, et al. Initial research on lodging resistance in super high-yielding japonica rice cultivars (in Chinese). *North Rice*, 2008, 38: 24–27 [李红娇, 张喜娟, 李伟娟, 等. 超高产粳稻品种抗倒伏性的初步研究. *北方水稻*, 2008, 38: 24–27]
- 36 Mo Y S, Cai Z Q, Yang Q Q, et al. The breaking resistance of higher, thicker, and tougher rice (in Chinese). *Chin Agric Sci Bull*, 2008, 24: 193–198 [莫永生, 蔡中全, 杨亲琼, 等. 高大韧稻茎秆的抗折力研究. *中国农学通报*, 2008, 24: 193–198]
- 37 Shen G L. Study on Physiological Mechanism and Evaluation Method of Rice Anti-lodging (in Chinese). Master Dissertation. Hefei: Anhui Agricultural University, 2008 [申广勤. 水稻抗倒伏生理机制与评价方法研究. 硕士学位论文. 合肥: 安徽农业大学, 2008]
- 38 He Q P, Dong S T, Gao R Q. Relationship between development of spike vascular bundle and sink capacity of ear and kernel in maize (*Zea mays* L.) (in Chinese). *Acta Agron Sin*, 2005, 31: 995–1000 [何启平, 董树亭, 高荣岐. 玉米果穗维管束系统的发育及其与穗粒库容的关系. *作物学报*, 2005, 31: 995–1000]
- 39 Zhang F L, Cui Y H, Wang Z M, et al. Studies on the relation between pedicel vascular development and maize kernel abortion (in Chinese). *J Hebei Agric Univ*, 1999, 22: 16–19 [张凤路, 崔彦宏, 王志敏, 等. 玉米籽粒小穗柄维管束发育状况与籽粒败育关系研究. *河北农业大学学报*, 1999, 22: 16–19]
- 40 Fu J. Study of *pla3* Mutant on Young Panical Development of Rice (in Chinese). Master Dissertation. Changsha: Hunan Agricultural University, 2015 [付娟. 水稻 *pla3* 突变体幼穗发育的研究. 硕士学位论文. 长沙: 湖南农业大学, 2015]
- 41 Zhang D Y. Study on the Development of Vascular Bundles of Rice Spikelets (in Chinese). Master Dissertation. Beijing: Beijing Normal University, 2005 [张丹莹. 水稻小穗柄维管束发育的研究. 硕士学位论文. 北京: 北京师范大学, 2005]

Summary for “水稻穗顶退化突变体 *paa1331* 的鉴定及基因定位”

Identification and gene mapping of a panicle apical abortion mutant (*paa1331*) in rice

Feixue Hou, Yongbin Peng, Xiaohang Han, Que Bai, Chaojian Gu, Chaowei Sun, Yao He & Hongyu Zhang*

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

* Corresponding author, E-mail: zhanghysd@163.com

Rice panicle is an important agronomic organ which influences yield, and its development directly determines the yield potential. Over the past decades, a large number of genes related to grain size and grain number have been cloned, but there are few reports on cloning and function characterization of genes related to panicle development. We aim to explore the genes that regulate the degeneration of rice spike, improve the regulation network of panicle development, and provide theoretical basis for molecular breeding. In this study, a stably inherited mutant showing perturbed development of panicle (*panicle apical abortion 1331*) was isolated from an ethyl methyl sulfate(EMS)mutagenized population of Yixiang 1B. Compared with the wild type, the mutant mainly showed a severe degeneration at the panicle tip (the affected florets account for as high as 53%), in addition to this, the plant height, tiller number and grain number were also affected. Observation on the development of panicle showed that the top spikelets of mutant *paa1331* began to degrade during meiosis of the pollen mother cell, and the number of degenerated spikelets increased with the elongation of the young spike, distributing at the top of the first branch of the stem, while the number of degenerated spikelets showed a tendency to decrease gradually from top to bottom. Anatomical observations showed that the stamens of the mutant degenerated spikelets degenerated into linear, and the pulp was withered. The tissue section of mutant *paa1331* and pollen staining assay showed that there were no pollen grains in the mutant anther, indicating that degeneration hindered the development of pollen; the vascular bundle of the mutant degenerated stem showed developmental defects, which may cause the transport of the material to be obstructed Trypan blue staining assay showed severe coloration of degraded spikelets on top of mutants, indicted that the panicle apical abortion was associated with programmed cell death. Hormone assay suggested that the IAA content of mutants was higher than that of wild type. Genetic analysis showed that mutant trait was controlled by a recessive gene. Combined the analysis of map-based cloning and *De novo* genome sequencing, we found one gene *LOC_Os04g40720*, of which the fourth exon has an A-to-G single base substitution, which resulted in a change from Asn to Asp. At present, this gene has not been reported to confer function in panicle development, thus we treated it as candidate gene.

rice, panicle apical abortion, genetic analysis, gene mapping, *paa1331*

doi: 10.1360/N972018-00801