

转录组测序解析超级稻淮稻5号灌浆速率快的机理

刘喜^{1,3}, 王迪², 高浩², 王颖洁³, 王贵枝³, 王彦雁³

(¹淮阴师范学院江苏省环洪泽湖生态农业生物技术重点实验室/江苏省区域现代农业与环境保护协同创新中心, 淮安 223300; ²江苏省徐淮地区淮阴农业科学研究所, 淮安 223001; ³淮阴师范学院生命科学学院, 江苏淮安 223300)

摘要: 灌浆速率是水稻重要而复杂的农艺性状之一, 直接影响产量和品质。淮稻5号是由7208×武育粳3号杂交后代选育而成的粳稻优良品种, 具有较高的灌浆速率, 但其重要的分子特征尚不清楚。对淮稻5号和武育粳3号受精后14 d的种子提取RNA进行转录组分析。采用实时荧光定量PCR分析籽粒灌浆速率相关基因的表达水平, 采用Sanger测序法分析淮稻5号和武育粳3号中已克隆的灌浆速率相关基因序列差异。在淮稻5号和武育粳3号之间检测到3230个上调基因和1171个下调基因。GO富集分析表明, 这些基因主要参与淀粉和蔗糖生物合成、光合作用、碳同化、激素生物合成和信号转导途径。与武育粳3号相比, 淮稻5号激活了较多参与淀粉和蔗糖生物合成的基因。共检测到63个激素相关差异表达基因, 其中38个基因参与生长素途径, 表明生长素在水稻籽粒灌浆过程中起着重要作用。一些已知的灌浆速率相关基因(*GFR1*、*OsPFP1*、*OsPHO1*; 2、*OsSWEET13*、*OsCIN2*) 在淮稻5号中显著上调。Sanger测序表明 *GFR1*^{Huaidao5} 可能是控制灌浆速率的优异单倍型。

关键词: 水稻 (*Oryza sativa* L.); 淮稻5号; 转录组; 灌浆速率; *GFR1*

Deciphering the Functional Mechanism of Fast Grain Filling Rate in a Super Rice Huaidao 5 by Transcriptome Analysis

LIU Xi^{1,3}, WANG Di², GAO Hao², WANG Ying-jie³, WANG Gui-zhi³, WANG Yan-yan³

(¹Huaiyin Normal University, Key Laboratory of Eco-Agricultural Biotechnology around Hongze Lake/Regional Cooperative Innovation Center for Modern Agriculture and Environmental Protection, Huai'an 223300; ²Huaiyin Institute of Agricultural Sciences of Xuhuai Region in Jiangsu, Huai'an 223001; ³Huaiyin Normal University, School of Life Sciences, Jiangsu Huai'an 223300)

Abstract: Grain filling rate is an important and complex agronomic trait that directly affects rice yield and quality. Huaidao 5, a superior rice *japonica* variety, derived from the 7208 × Wuyujing 3 cross, shows a high grain filling rate, whereas its functional mechanism remains unclear. A transcriptome analysis in Huaidao 5 and Wuyujing 3 was performed by harvesting 14-days-after-fertilization grains. Real time fluorescent quantitative PCR was used to analyze the transcripts of few candidate genes, and Sanger sequencing was applied to identify their polymorphisms between Huaidao 5 and Wuyujing 3. 3230 up-regulated and 1171 down-regulated genes were detected between Huaidao 5 and Wuyujing 3. Gene ontology analysis indicated that these differentially-expressed genes were primarily involved in starch and sucrose biosynthesis, photosynthesis, carbon assimilation, and hormone biosynthesis and signaling transduction pathway. If compared to Wuyujing 3, more genes involved in starch and sucrose biosynthesis were up-regulated in Huaidao 5. Sixty-three hormone-related differentially expressed genes were detected, of which 38 genes were involved in the auxin pathway, suggesting that auxin plays an important role in the rice grain filling process. Several identified grain-filling-rate-related genes (*GFR1*,

收稿日期: 2022-10-18 修回日期: 2022-11-10 网络出版日期: 2022-12-10

URL: <https://doi.org/10.13430/j.cnki.jpgr.20221018001>

第一作者研究方向为水稻遗传育种, E-mail: 1240623244@qq.com

通信作者: 刘喜, 研究方向为水稻遗传育种, E-mail: 1240623244@qq.com

王迪, 研究方向为水稻遗传育种, E-mail: wangdirice@163.com

基金项目: 江苏省自然科学基金(BK20190239, BK20191055); 江苏省青蓝工程优秀青年骨干教师; 淮安市农科院科研基金发展项目(HNY202002)

Foundation projects: Natural Science Foundation of Jiangsu Province (BK20190239, BK20191055); Outstanding Backbone Young Teachers of Jiangsu Qinglan Project; Scientific Research Fund Development Project of Huai'an Academy of Agricultural Sciences (HNY202002)

OsPFPI, *OsPHO1*;2, *OsSWEET13*, *OsCIN2*) were significantly up-regulated in Huaidao 5. Moreover, Sanger sequencing showed that *GFR1*^{Huaidao5} might be an excellent haplotype to control the grain filling rate.

Key words: rice (*Oryza sativa* L.); huaidao5; transcriptome; grain filling rate; *GFR1*

水稻是世界上最重要的粮食作物之一,提高水稻产量是保障全球粮食安全的重要目标。水稻产量主要由单株穗数、每穗粒数和粒重控制^[1],而粒重最重要的影响因子是灌浆速率^[2-3]。水稻籽粒灌浆受多种内在和外在的因素影响,灌浆过程极其复杂。因此,研究水稻籽粒灌浆的内在生理生化机制,分离鉴定水稻灌浆相关基因,发掘灌浆相关基因优异单倍型,可为水稻高产优质分子育种提供理论依据。

近年来,在水稻中发现并分离了许多与灌浆速率相关的基因^[4-6]。细胞壁转化酶基因 *OsGIF1*/*OsCIN2* 已被鉴定为在早期灌浆阶段参与碳分配的驯化选择基因^[2]。4个糖转运基因 *OsSWEET4*、*OsSWEET11*、*OsSWEET14* 和 *OsSWEET15* 是籽粒灌浆和胚乳发育所必需的^[7-9]。此外,已发现两种 NAM/ATAF/CUC(NAC) 转录因子,即 ONAC127 和 ONAC129,通过直接结合 *OsSWEET4* 的启动子正调节籽粒灌浆^[10]。miR1432 表达抑制的植株表现出增强的籽粒灌浆率和显著增加的籽粒产量^[3]。*OsPHO1*;2 编码磷酸转运蛋白,正调控水稻籽粒灌浆,过表达 *OsPHO1*;2 能提高水稻产量,尤其是在低磷条件下^[11]。Liu 等^[12] 利用粳稻(Ludao)与梗稻恢复系 C 堡(C-bao)构建的近等基因系克隆了控制水稻灌浆速率的主效数量性状位点基因 *GFR1*。*GFR1* 基因编码细胞膜定位蛋白,并通过与 Rubisco 小亚基 OsRbcS 相互作用,提高 Rubisco 活性,促进水稻籽粒灌浆^[12]。转录组测序技术价格低廉、数据采集周期短,在水稻遗传育种研究中得到广泛应用。Kong 等^[13] 利用转录组分析了籼稻和粳稻对盐胁迫反应差异的机制,并鉴定了 18 个盐胁迫相关候选基因。Sun 等^[14] 利用转录组分析了水稻强势粒与弱势粒灌浆动态过程,鉴定到 19442 个差异表达基因,并发现大多数淀粉合成基因在弱势粒中的延迟表达可能是造成灌浆早期弱势粒灌浆速率低的重要因素。

淮稻5号是由 7208×武育梗3号杂交选育的超级稻品种。相比武育梗3号,淮稻5号具有较高的灌浆速率。本研究拟利用转录组解析淮稻5号灌浆速率快的内在机理,鉴定其调控灌浆速率的基因。本研究对淮稻5号与武育梗3号灌浆速率进行鉴定,选取淮稻5号与武育梗3号灌浆速率差异最大

的时期取样进行转录组测序,分析鉴定差异表达基因,以期解析淮稻5号灌浆速率的内在机制,为水稻高产优质分子设计育种奠定理论基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

粳稻品种淮稻5号(HD5, huaidao5)与武育梗3号(WYJ3, wuyujing3)。2021-2022年5月至10月种植在江苏省淮安市淮阴师范学院生物科技园内。

1.2 农艺性状测定

在成熟期分别随机选取淮稻5号与武育梗3号各10株进行农艺性状测定。人工统计测量株高、分蘖数、穗长、穗粒数和结实率。使用万深 SC-G1 型考种仪测量千粒重、粒长以及粒宽。取10个单株相应性状的平均值作为性状数值。采用 *t* 检验进行差异显著性分析。

1.3 灌浆速率测定

随机选取5株生长整齐一致的淮稻5号和武育梗3号标记同一天开花的颖花,每株标记50粒颖花,在受精后第7、14、21、28和35d从穗上收获。新鲜的籽粒样品在105℃高温干燥30min,然后在85℃下干燥至恒重。对去壳的籽粒进行称重,根据Liu等^[12]的方法计算灌浆速率,设置3次生物学重复。

1.4 转录组测序

使用江苏康为世纪 RNAPure 植物试剂盒提取淮稻5号和武育梗3号的受精后14d籽粒总RNA。然后,通过委托 GENE DENOVO(中国广州)在 Illumina 测序平台(HiSeq2500)上构建cDNA文库测序,并通过 FPKM (Fragments per kilobase of transcript per million reads mapped) 评估基因表达^[15],设置3次生物学重复。使用 DESeq2 鉴定差异表达基因(DEGs, differentially expressed genes),设定的参数为 $|\log_2(\text{Fold Change})| \geq 1$ 和 $\text{FDR} < 0.05$,利用在线软件 WEGO (Web Gene Ontology Annotation Plotting) 进行差异表达基因的 GO 富集分析。

1.5 基因表达分析

用 Trizol 试剂从淮稻5号和武育梗3号受精后14d籽粒中提取总RNA,并通过实时荧光定量PCR分析淀粉和糖生物合成相关基因、灌浆速率相关基因的表达水平。用于检测这些基因表达水平的引

物参考 Liu 等^[12]和孔飞^[16]。PCR 反应体积为 20 μL (8.8 μL 稀释 cDNA, 1.2 μL 引物, 10 μL TB Green® Premix Ex Taq™II), 并使用 BioRad CFX96 触摸实时 PCR 检测系统进行定量 PCR。以水稻 UBQ (*LOC_Os03g13170*) 基因为对照, 正向引物序列为 5'-CTGTCAACTGCCGCAAGAAG-3', 反向引物序列为 5'-GGCGAGTGACGCTCTAGTTC-3', 设置 3 次生物学重复。

表 1 基因型鉴定所用的引物序列

Table 1 Primers used for genotype identification

引物名称 Primer name	正向引物序列(5'→3') Forward primer sequence (5'→3')	反向引物序列(5'→3') Revers primer sequence (5'→3')
GFR1-1	CTCGAGTTCAAGTTAAGACT	CTTACGGTTAATCGAGTATT
GFR1-2	ACTTTAAACTTTCTTCCCATGT	CGAGCCGCTTCACTCCGAC
GFR1-3	CACGATTGCGCGGAATTCGA	CCCCTTTTACCCAAACCAA
GFR1-4	CAGTTGGCAATTGTCACGAG	TGGAACATATCCAAGCCTCC
GFR1-5	AAATCACAAGCTCGCGAATT	ATGTTAGCTGCGCAATCTGC
GFR1-6	GCAGATTGCGCAGCTAACAT	CGTGAAACGAGATAGGTCGT

2 结果与分析

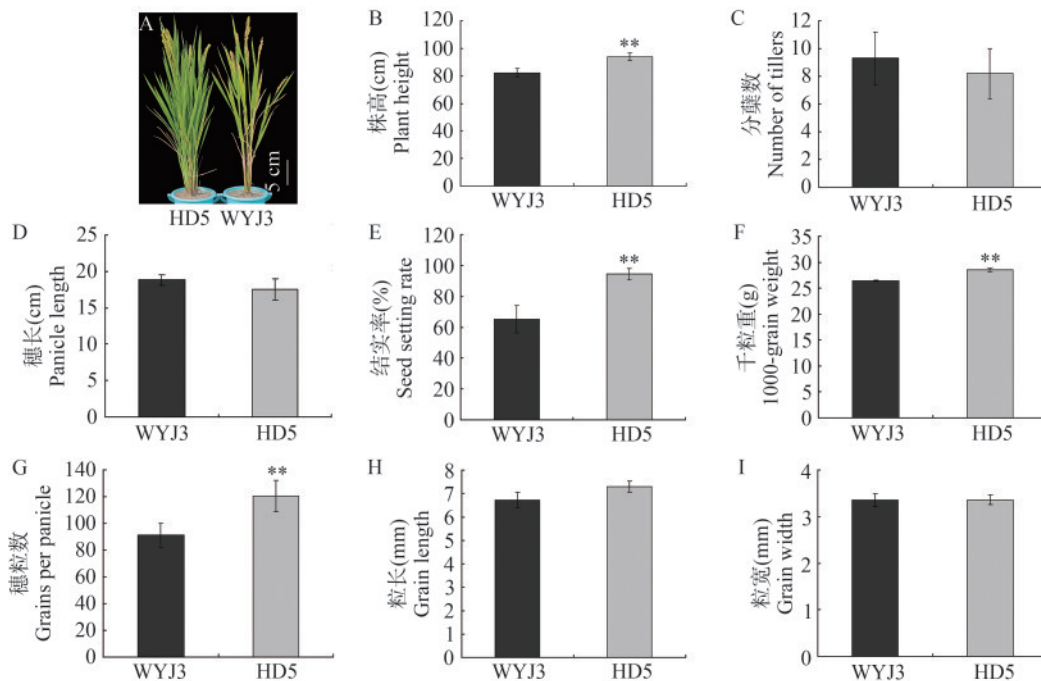
2.1 淮稻 5 号和武育粳 3 号主要农艺性状比较

相比武育粳 3 号, 淮稻 5 号株高显著增高, 达到 93.64 cm, 提高约 14%(图 1A、B)。在分蘖数与穗长方面, 淮稻 5 号与武育粳 3 号无显著差异(图 1C、D)。

1.6 灌浆速率相关基因 *GFR1* 基因型鉴定

使用 Hi-DNAsecure 植物试剂盒 (Cat#DP350, 北京天根生化) 提取淮稻 5 号和武育粳 3 号的基因组 DNA, 并使用 KOD DNA 聚合酶进行 PCR。PCR 程序如下: 在 98 $^{\circ}\text{C}$ 下变性 10 s, 在 55 $^{\circ}\text{C}$ 下退火 30 s, 在 68 $^{\circ}\text{C}$ 下延伸 2 min, 33 个循环。用于鉴定 *GFR1* 基因型引物见表 1。PCR 产物委托安徽通用生物测序。使用 BioXM2.6 软件对序列进行分析和比对。

淮稻 5 号的结实率与千粒重均显著高于武育粳 3 号, 分别达到 94.41% 与 28.54 g(图 1E、F)。淮稻 5 号的穗粒数与粒长均显著高于武育粳 3 号, 而粒宽则无差异(图 1G~I)。上述结果表明, 相比武育粳 3 号, 淮稻 5 号农艺性状具有较好的综合表现。



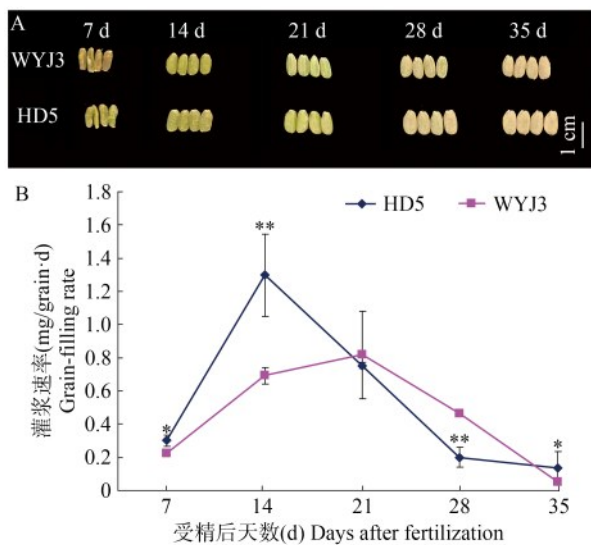
数据表示为平均值 \pm 标准差($n=10$);**代表在 $P<0.01$ 水平上差异极显著;HD5和WYJ3分别代表淮稻5号与武育粳3号;下同
Data are expressed as mean \pm SD ($n = 10$). ** represents extremely significant differences at $P<0.01$ level; HD5 and WYJ3 represent Huaidao 5 and Wuyujing 3 respectively; The same as below

图 1 淮稻 5 号与武育粳 3 号成熟期主要农艺性状比较

Fig.1 Comparison of main agronomic traits between HD5 and WYJ3 at maturity

2.2 淮稻5号和武育梗3号灌浆速率比较

为了明确淮稻5号与武育梗3号籽粒灌浆的差异,测定了淮稻5号与武育梗3号在受精后7、14、21、28、35 d的籽粒灌浆速率。在受精后14 d淮稻5号籽粒充实度显著高于其父本武育梗3号(图2A)。灌浆前期阶段淮稻5号的籽粒灌浆速率显著高于武育梗3号(图2B)。淮稻5号的灌浆速率在受精后14 d达到最高值1.297 mg/grain·d,但武育梗3号的最高灌浆速率在受精后21 d,且仅为0.818 mg/grain·d(图2B)。在受精后21 d和28 d时,淮稻5号的籽粒灌浆速率低于武育梗3号(图2B)。



A:不同灌浆期HD5和WYJ3糙米的表型。B:在受精后7、14、21、28和35 d时HD5和WYJ3的籽粒灌浆速率。数据表示为平均值±标准差(n=3)。*代表在P<0.05水平上差异显著,下同

A: Phenotypes of HD5 and WYJ3 brown grains at different grain filling stages; B: Grain filling rates of HD5 and WYJ3 at 7, 14, 21, 28, and 35 days after fertilization. Data are expressed as mean ± SD (n = 3). * represent significant differences at P<0.05 levels, the same as below

图2 淮稻5号与武育梗3号籽粒灌浆速率
Fig.2 Grain filling rates of HD5 and WYJ3

2.3 淮稻5号和武育梗3号差异表达基因的鉴定

为了探究淮稻5号与武育梗3号之间灌浆差异的分子机制,在受精14 d时对准稻5号与武育梗3号籽粒进行转录组分析。从6个样本中获得了总计273,164,090个Clean reads,每个样本平均45,527,348个Clean reads。6个样本的测序质量值Q30平均值为92.27%,范围为91.96%~93.00%。上述测序数据表明转录组测序是成功可信的。

在淮稻5号与武育梗3号之间共鉴定了4401个差异表达基因。相较于武育梗3号,在淮稻5号中有3230个上调基因和1171个下调基因(图3A、B)。

为了验证转录组数据的可靠性,随机选择5个上调和5个下调表达基因进行qRT-PCR分析。如图3C、D所示,qRT-PCR结果与转录组数据一致。

对差异表达基因进行GO富集分析,结果显示,相比武育梗3号,在淮稻5号中上调表达的基因主要富集在代谢过程、细胞、催化活性等GO条目;在淮稻5号中下调表达的基因主要富集在代谢过程、细胞部分、催化活性、结合等GO条目(图4)。

2.4 淀粉和糖生物合成相关基因的转录水平分析

水稻等谷物灌浆过程涉及淀粉和糖的生物合成和积累^[17]。因此,本研究主要关注可能与光合作用、淀粉和糖代谢或碳同化有关的差异表达基因,发现参与光合作用(LHCA6、CHLD、DXR、PSBS1等)与碳同化(OsRbcS3、OsRbcS4、OsRbcS2、OsRbcX1等)途径的26个差异表达基因在淮稻5号中上调(详见<https://doi.org/10.13430/j.cnki.jpgr.20221018001>,附表1),9个在淮稻5号中下调。此外,发现34个差异表达基因参与淀粉和糖的生物合成,其中有26个基因上调,如OsPK3、AGPS1、SUS1和SSI(图5A)。

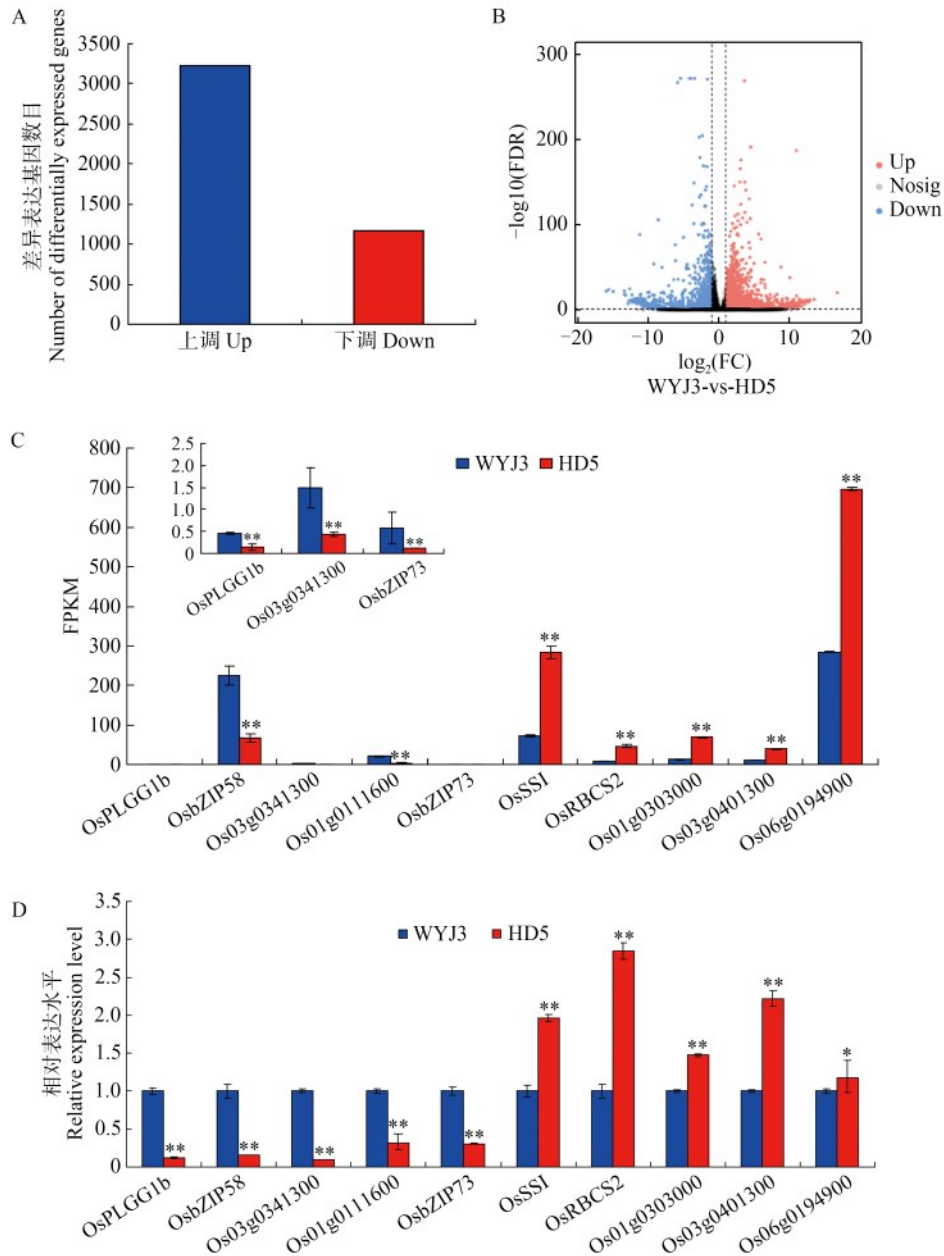
为了进一步分析淮稻5号和武育梗3号之间与淀粉和糖代谢相关基因的表达水平差异,利用qRT-PCR检测淀粉和糖代谢相关基因表达水平。如图5B所示,IAS1、ISAI、GBSSII、SUSY2、AGPL1、OsAGPAS2a、BEII和BEIIb的表达水平在淮稻5号中极显著上调,而SSIIa、BEI和PPDKB在淮稻5号中受到抑制。上述结果表明,相比武育梗3号,淀粉和糖代谢相关基因在淮稻5号中具有更高的表达。

2.5 生长素途径相关基因的转录水平分析

生长素(IAA)、油菜素内酯(BR)、脱落酸(ABA)等激素在植物生长发育中起着重要作用^[18]。在淮稻5号和武育梗3号之间检测到63个激素相关的DEGs(表2、详见<https://doi.org/10.13430/j.cnki.jpgr.20221018001>,附表1)。其中38个基因参与生长素途径;7个基因参与ABA途径;BR途径涉及6个基因;赤霉素(GA)途径涉及5个基因。生长素上调小RNA基因OsSAUR2、生长素原初响应基因IAA8、IAA12和IAA13、生长素响应因子OsARF10、OsARF22、ATP结合盒转运体OsABCG11、OsABCG28和OsABCG35在淮稻5号籽粒中高表达,而OsSAUR32、生长素内流转运体OsAUX3、生长素外排载体OsPIN5c、OsIAA9、OsIAA20和OsABCG25在淮稻5号中受到抑制(表2)。此外,9-顺式-环氧类胡萝卜素双加氧酶OsNCED3、应激激活蛋白激酶OsSAPK9、BRI1-相关受体激酶OsBAK1、油菜素内酯负调控因子

OsGSK2; GA受体基因 *GID1*、赤霉素2-氧化酶基因 *OsGA2ox3*、*OsGA2ox6*; 细胞分裂素脱氢酶 *OsCKX5*; 茉莉酸ZIM结构域蛋白基因 *OsJAZ6*、*OsJAZ7*、

*OsJAZ8*和 *OsJAZ10*在淮稻5号籽粒中显著上调(详见 <https://doi.org/10.13430/j.cnki.jpgr.20221018001>, 附表1)。



A: 差异表达基因的数目; B: 差异表达基因火山图, WYJ3-vs-HD5代表淮稻5号相比武育梗3号; C: 随机选取的5个上调和5个下调表达基因的转录组结果; D: 5个上调和5个下调表达基因的表达水平分析

A: Number of up-regulated and down-regulated DEGs; B: Volcano plot of DEGs, WYJ3-vs-HD5 represents Huaidao 5 compared with Wuyujing 3; C: Transcriptome results of 5 up-regulated and 5 down-regulated genes randomly selected; D: The expression levels of 5 up-regulated and 5 down-regulated DEGs in HD5 and WYJ3

图3 受精后14 d的淮稻5号与武育梗3号籽粒转录组分析

Fig.3 Transcriptome analysis of HD5 and WYJ3 grains at 14 days after fertilization

2.6 灌浆速率相关基因的表达水平分析

为了进一步探讨淮稻5号和武育梗3号分子机制的差异,通过qRT-PCR检测了水稻已克隆的6个灌浆速率相关基因的转录水平。与预期一致, *OsCIN2*、

GFR1、*OsSWEET13*、焦磷酸果糖6-磷酸1-磷酸转移酶 *OsPFPI*和 *OsPHO1*;2的表达水平在淮稻5号籽粒中显著高于武育梗3号(图6)。然而, *OsGIF2*在淮稻5号中的表达水平低于武育梗3号(图6B)。

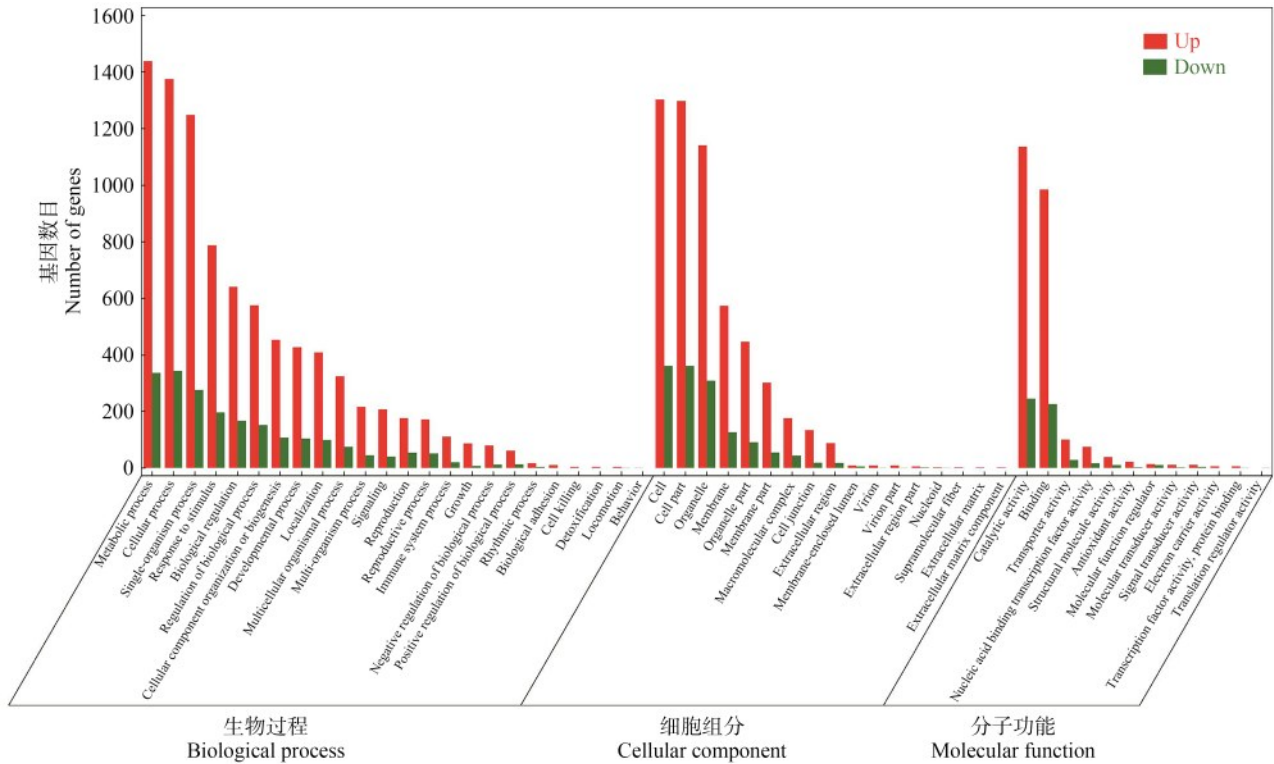
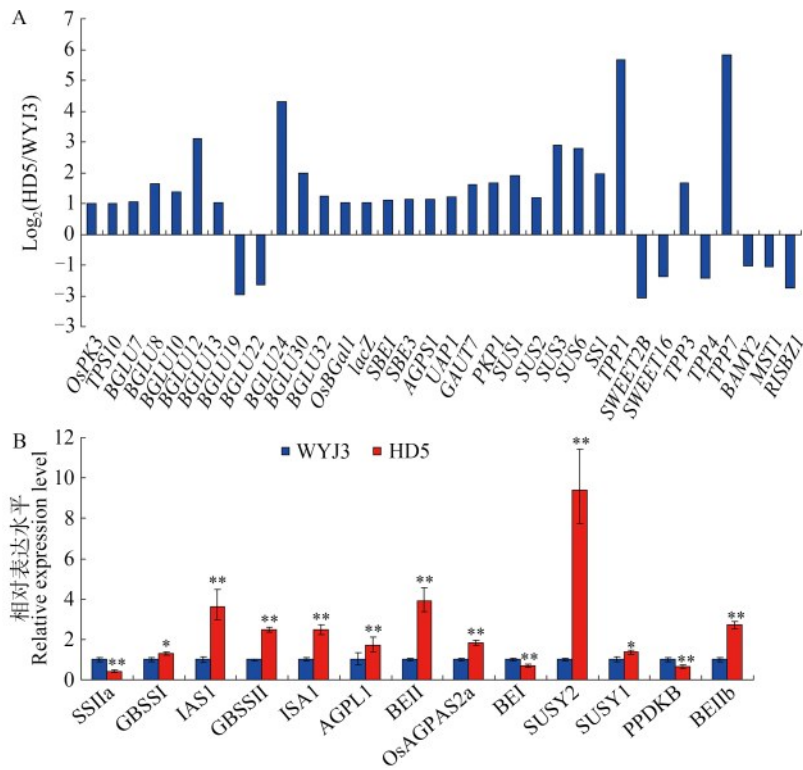


图 4 差异表达基因 GO 富集分析

Fig.4 Go enrichment analysis of DEGs between HD5 and WYJ3



A: 淀粉和糖代谢相关基因的转录组分析。纵坐标显示 HD5 基因表达水平与 WYJ3 相比的对数值; B: 通过 3 次生物学重复的 qRT-PCR 检测参与淀粉和糖生物合成的其他基因的表达水平

A: Transcriptome analysis of genes related to starch and sugar metabolism. The ordinate shows the \log_2 ratio of the expression levels in HD5 compared to WYJ3; B: The expression levels of other genes involved in starch and sugar biosynthesis through qRT-PCR with three biological repetitions

图 5 淀粉与糖代谢途径的差异表达基因

Fig.5 DEGs involved in starch and sugar metabolism between HD5 and WYJ3

表2 生长素途径的差异表达基因

Table 2 DEGs involved in auxin pathway

基因 Gene	Log ₂ (HD5/WYJ3)	P值 P-value	预测功能 Predicted functions
<i>Os10g0479900 (OsARF22)</i>	1.00	6.87×10^{-8}	生长素响应因子22
<i>Os04g0519700 (OsARF10)</i>	1.78	6.06×10^{-4}	生长素响应因子10
<i>Os06g0714300 (OsSAUR32)</i>	-2.16	5.16×10^{-9}	生长素响应蛋白SAUR32
<i>Os01g0768333 (OsSAUR2)</i>	11.16	1.43×10^{-3}	生长素响应蛋白SAUR2
<i>Os01g0856500 (OsAUX1)</i>	1.01	1.03×10^{-4}	类生长素转运蛋白
<i>Os05g0447200 (OsAUX3)</i>	-1.12	1.26×10^{-26}	类生长素转运蛋白
<i>Os01g0785400 (OsGH3.1)</i>	-1.65	1.94×10^{-3}	吲哚-3-乙酸酰胺合成酶
<i>Os03g0162000 (OsYUCCA8)</i>	1.19	4.27×10^{-3}	吲哚-3-丙酮酸单加氧酶
<i>Os01g0732700 (OsYUCCA3)</i>	1.13	5.49×10^{-4}	吲哚-3-丙酮酸单加氧酶
<i>Os03g0693600 (OsIAGLU)</i>	1.45	6.37×10^{-6}	吲哚-3-乙酸β-葡萄糖基转移酶
<i>Os08g0529000 (OsPIN5c)</i>	-2.03	3.32×10^{-33}	生长素载体蛋白5c
<i>Os02g0743400 (OsPIN1a)</i>	1.23	1.37×10^{-3}	生长素载体蛋白1a
<i>Os02g0228900 (OsIAA7)</i>	1.69	4.46×10^{-5}	生长素响应蛋白
<i>Os02g0723400 (OsIAA8)</i>	2.61	1.66×10^{-3}	
<i>Os02g0805100 (OsIAA9)</i>	-1.12	1.21×10^{-3}	
<i>Os03g0633800 (OsIAA12)</i>	4.58	6.02×10^{-3}	
<i>Os03g0742900 (OsIAA13)</i>	1.82	1.80×10^{-16}	
<i>Os06g0166500 (OsIAA20)</i>	-1.75	2.08×10^{-11}	
<i>Os02g0693700 (ABC B2)</i>	1.41	2.34×10^{-6}	ABC转运体B家族成员蛋白
<i>Os01g0695800</i>	2.63	1.76×10^{-7}	
<i>Os03g0280000</i>	1.03	6.12×10^{-15}	
<i>Os03g0755100</i>	1.19	1.23×10^{-12}	
<i>Os04g0209200</i>	1.08	4.62×10^{-3}	ABC转运体C家族成员蛋白
<i>Os06g0731200 (OsABC G28)</i>	1.25	4.03×10^{-5}	ABC转运体G家族成员蛋白
<i>Os09g0472100</i>	1.32	1.23×10^{-4}	
<i>Os01g0177900 (ABC G31)</i>	1.36	1.11×10^{-36}	
<i>Os04g0528300</i>	1.38	7.49×10^{-14}	
<i>Os01g0609300</i>	1.57	1.11×10^{-13}	
<i>Os05g0222200</i>	1.59	7.77×10^{-13}	
<i>Os07g0522500 (ABC G43)</i>	2.25	1.61×10^{-33}	
<i>Os01g0609200 (OsABC G35)</i>	3.13	2.92×10^{-3}	
<i>Os04g0194500</i>	3.19	5.22×10^{-7}	
<i>Os11g0587600</i>	1.14	5.41×10^{-4}	
<i>Os07g0288700 (OsABC G11)</i>	6.95	8.63×10^{-3}	
<i>Os01g0342750</i>	2.37	4.88×10^{-4}	
<i>Os08g0384500</i>	2.37	4.32×10^{-21}	
<i>Os11g0177400 (OsABC G25)</i>	-1.03	2.19×10^{-8}	
<i>Os09g0332700</i>	-1.52	5.09×10^{-6}	

2.7 灌浆速率相关基因 *GFR1* 基因型分析

GFR1 在淮稻5号中的表达水平高于武育梗3号(图6A), 这表明 *GFR1* 可能在控制淮稻5号的籽粒灌浆速率中发挥重要作用。*GFR1* 编码1个未知功能的蛋白, 仅含有1个外显子。为了验证这一假设, 对淮稻5号和武育梗3号的 *GFR1* 基因进行PCR扩增和测序。如图7A所示, 与武育梗3号相比, 淮稻5号中 *GFR1* 的编码区中有1个InDel和4个SNPs, 导致淮稻5号中的1个氨基酸缺失和3个氨基酸替

换(图7B), 而 *GFR1* 的启动子序列无差异。为进一步明确武育梗3号与淮稻5号中 *GFR1* 蛋白的差异, 利用I-TASSER在线软件预测分析了 *GFR1* 的蛋白结构。如图7C所示, 相比武育梗3号, 淮稻5号中 *GFR1* 蛋白结构发生变异。此外, 淮稻5号中 *GFR1* 的基因型与籼稻相同, 而 *GFR1*^{Ludao} 促进水稻籽粒灌浆速率^[12], 因此推测 *GFR1* 是控制淮稻5号灌浆速率快的主要基因之一。

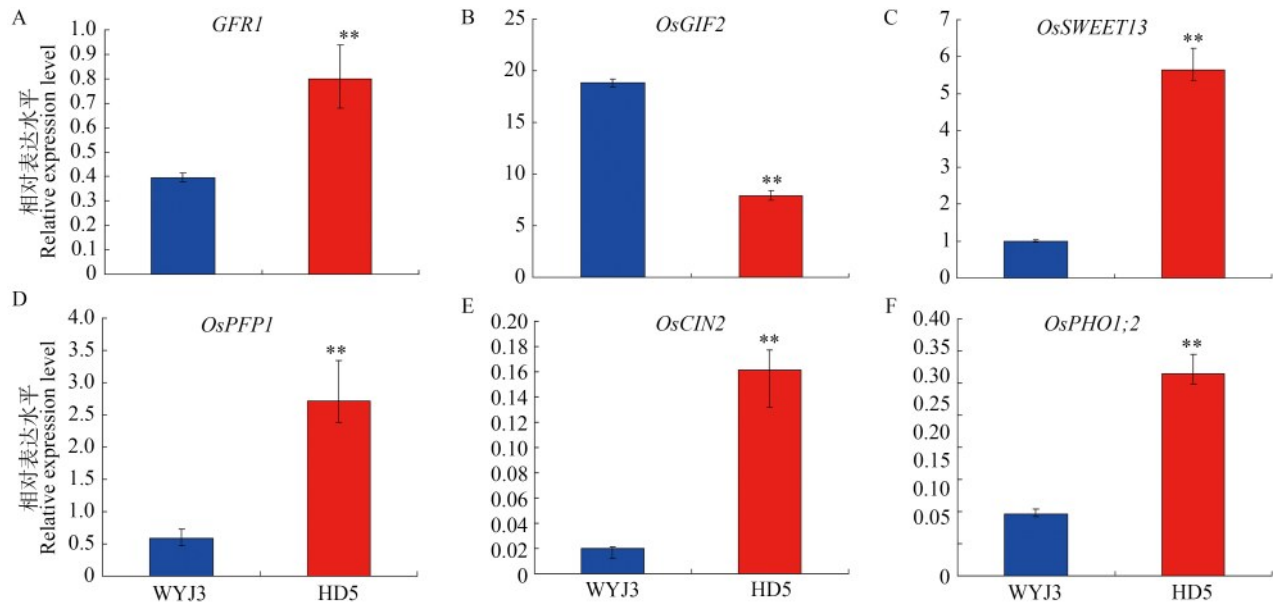
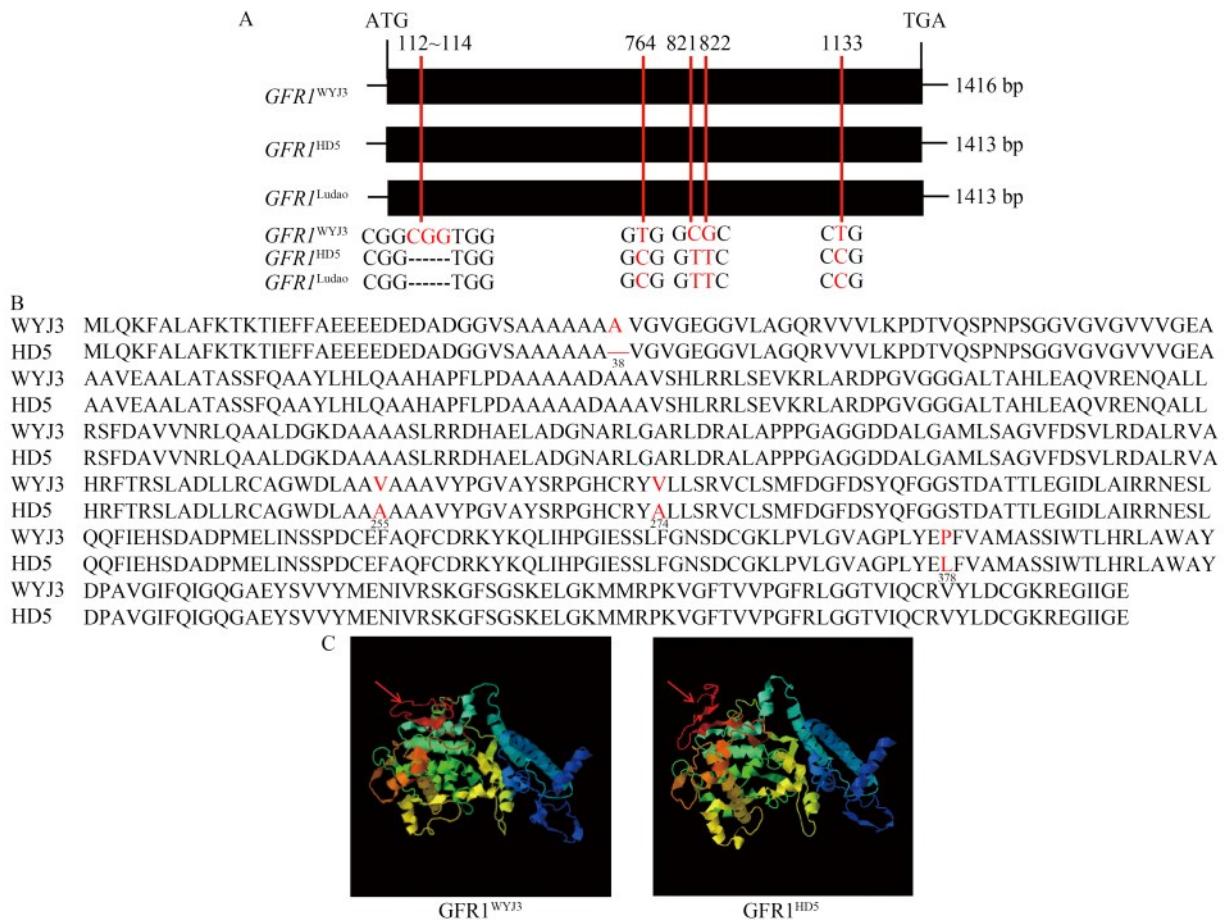


图6 6个水稻籽粒灌浆相关基因的表达水平

Fig.6 The expression levels of 6 grain filling rate genes for HD5 and WYJ3



A: HD5、Ludao和WYJ3之间GFR1基因变异示意图。黑色框代表外显子; B: HD5和WYJ3的GFR1氨基酸序列比对; C: HD5和WYJ3的GFR1蛋白结构分析。红色箭头指示蛋白结构差异之处

A: Schematic of the *GFR1* gene variation among HD5, Ludao and WYJ3. Black box represents exon; B: Amino acid sequence alignment of *GFR1* of HD5 and WYJ3; C: Protein structural analysis of *GFR1* of HD5 and WYJ3. Red arrows indicate differences in protein structure

图7 在准稻5号与武育粳3号间鉴定基因GFR1变异

Fig.7 Identification of the *GFR1* variation between HD5 and WYJ3

3 讨论

谷物灌浆速率是一个重要的农艺性状,受遗传和环境因素控制^[19-20]。本研究通过转录组分析探索了超级稻淮稻5号中与籽粒灌浆速率有关的基因和途径。结果表明,与淀粉和糖代谢、光合作用、激素生物合成和信号转导途径有关的基因在调节淮稻5号籽粒灌浆过程中发挥重要作用。

在受精后14 d时,在淮稻5号和武育粳3号间共检测到4401个差异表达基因,其中66个基因参与淀粉、碳同化、糖代谢和光合作用。在这66个基因中,一些基因突变会导致水稻籽粒灌浆缺陷^[4]。*OsPK3*编码丙酮酸激酶,其突变导致丙酮酸激酶活性降低,并导致蔗糖从源到库的运输缺陷^[21]; *OsTPP7*调节海藻糖-6-磷酸代谢,提高蔗糖利用率^[22-23]。此外,许多差异表达基因编码蔗糖和淀粉合成酶,包括单糖转运体MST1、蔗糖合成酶(*SUS1*、*SUS2*、*SUT3*和*SUS6*)、淀粉合成酶I *OsSSI*、ADP葡萄糖焦磷酸化酶小亚基*AGPS1*。综上,与蔗糖和淀粉合成相关的高活性酶促进水稻籽粒灌浆。

植物激素调节植物生长和发育的多种过程,如粒型、胁迫反应、籽粒灌浆和株高^[24-26]。ABA和IAA通过激活水稻中蔗糖到淀粉转化相关基因的表达来促进籽粒灌浆^[27-28]。此外,低水平的ABA和IAA导致谷物中的籽粒灌浆不良^[27-28]。油菜素类固醇(BRs)通过刺激同化物从源流向库,促进水稻籽粒灌浆,甾醇C-22羟化酶过表达的植株籽粒产量增加15%~44%^[6]。此外,许多研究表明,IAA和BR相关基因,如*OsARF4*、*OsAUX3*、*OsGSK2*和*OsI-BAK1*,调节水稻粒型^[29-32]。这些粒型基因的突变通常会影晌水稻籽粒灌浆,可能是由库的变化引起的。本研究中,与武育粳3号相比,淮稻5号中生长素、BRs、ABA信号和生物合成相关基因的转录丰度显著增加。此外,与武育粳3号相比,淮稻5号中生长素外流和内流基因*OsPIN1a*和*OsAUX1*上调,暗示生长素运输在促进水稻籽粒灌浆中具有重要作用。ABA生物合成基因*DSM2*和*OsNCED3*; ABA信号基因*OsSAPK2*、*OsSAPK7*、*OsSAPK9*和*PYL9*; BR信号基因*OsGSK2*、*OsBAK1*和*OsSERK3*在淮稻5号中都被激活。这些结果表明生长素运输、ABA生物合成和信号传导以及BR信号在促进水稻籽粒灌浆中也起着关键作用。

*GFR1*的启动子序列在淮稻5号和武育粳3号之间无差异,而其编码区存在碱基缺失与替换,导

致*GFR1*蛋白结构发生变异。*GFR1^{Ludao}*与*GFR1^{C-bao}*均可以与Rubisco小亚基*OsRbcS*相互作用,但是*GFR1^{Ludao}-OsRbcS*互作强度显著高于*GFR1^{C-bao}-OsRbcS*^[12]。在日本晴背景中过表达*GFR1^{Ludao}*可以显著提高水稻籽粒灌浆速率,且*GFR1^{Ludao}*转入粳稻恢复系C堡也可以提高籽粒灌浆速率^[12]。粳稻*GFR1*单倍型促进水稻籽粒灌浆速率,与淮稻5号单倍型一致。这些结果表明,*GFR1*可能是一个调控淮稻5号籽粒灌浆速率的重要基因。下一步,将筛选*GFR1*的相互作用蛋白,深入揭示*GFR1*的分子功能。

参考文献

- [1] Xing Y, Zhang Q. Genetic and molecular bases of rice yield. *Annual Review of Plant Biology*, 2010, 61:421-442
- [2] Wang E, Wang J, Zhu X, Hao W, Wang L, Li Q, Zhang L, He W, Lu B, Lin H, Ma H, Zhang G, He Z. Control of rice grain-filling and yield by a gene with a potential signature of domestication. *Nature Genetics*, 2008, 40:1370-1374
- [3] Zhao Y F, Peng T, Sun H Z, Teotia S, Wen H L, Du Y X, Zhang J, Li J Z, Tang G L, Xue H W, Zhao Q Z. miR1432-OsACOT (Acyl-CoA thioesterase) module determines grain yield via enhancing grain filling rate in rice. *Plant Biotechnology Journal*, 2019, 17:712-723
- [4] 陈孙禄,詹成芳,蒋红,李琳涵,张红生. 水稻籽粒灌浆速率的分子机制与遗传调控研究进展. *植物学报*, 2021, 56:80-89
- [5] Chen S L, Zhan C F, Jiang H, Li L H, Zhang H S. Advances in the molecular mechanism and genetic regulation of grain-filling rate in rice. *Chinese Bulletin of Botany*, 2021, 56:80-89
- [6] 贾小丽,叶江华,苗利国,林红梅,林文雄. 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
- [7] Jia X L, Ye J H, Miao L G, Lin H M, Lin W X. Developmental genetic mechanism research on grain-filling rate in rice. *Chinese Journal of Tropical Crops*, 2012, 33:622-626
- [8] Wu C Y, Trieu A, Radhakrishnan P, Kwok S F, Harris S, Zhang K, Wang J, Wan J, Zhai H, Takatsuto S, Matsumoto S, Fujioka S, Feldmann K A, Pennell R I. Brassinosteroids regulate grain filling in rice. *Plant Cell*, 2008, 20:2130-2145
- [9] Sosso D, Luo D, Li Q B, Sasse J, Yang J, Gendrot G, Suzuki M, Koch K E, McCarty D R, Chourey P S, Rogowsky P M, Ross-Ibarra J, Yang B, Frommer W B. Seed filling in domesticated maize and rice depends on SWEET-mediated hexose transport. *Nature Genetics*, 2015, 47:1489-1493
- [10] Yang J, Luo D, Yang B, Frommer W B, Eom J S. SWEET11 and 15 as key players in seed filling in rice. *New Phytologist*, 2018, 218:604-615
- [9] Fei H, Yang Z, Lu Q, Wen X, Zhang Y, Zhang A, Lu C. OsSWEET14 cooperates with OsSWEET11 to contribute to grain filling in rice. *Plant Science*, 2021, 306:110851
- [10] Ren Y, Huang Z, Jiang H, Wang Z, Wu F, Xiong Y, Yao J. A heat stress responsive NAC transcription factor heterodimer

- plays key roles in rice grain filling. *Journal of Experimental Botany*, 2021, 72:2947-2964
- [11] Ma B, Zhang L, Gao Q, Wang J, Li X, Wang H, Liu Y, Lin H, Liu J, Wang X, Li Q, Deng Y, Tang W, Luan S, He Z. A plasma membrane transporter coordinates phosphate reallocation and grain filling in cereals. *Nature Genetics*, 2021, 53:906-915
- [12] Liu E, Zeng S, Zhu S, Liu Y, Wu G, Zhao K, Liu X, Liu Q, Dong Z, Dang X, Xie H, Li D, Hu X, Hong D. Favorable alleles of *GRAIN-FILLING RATE1* increase the grain-filling rate and yield of rice. *Plant Physiology*, 2019, 181:1207-1222
- [13] Kong W, Sun T, Zhang C, Deng X, Li Y. Comparative transcriptome analysis reveals the mechanisms underlying differences in salt tolerance between indica and japonica rice at seedling stage. *Frontiers in Plant Science*, 2021, 12:725436
- [14] Sun H, Peng T, Zhao Y, Du Y, Zhang J, Li J, Xin Z, Zhao Q. Dynamic analysis of gene expression in rice superior and inferior grains by RNA-Seq. *PLoS ONE*, 2015, 10:e0137168
- [15] Trapnell C, Williams B A, Pertea G, Mortazavi A, Kwan G, van Baren M J, Salzberg S L, Wold B J, Pachter L. Transcript assembly and quantification by RNA-Seq reveals unannotated transcripts and isoform switching during cell differentiation. *Nature Biotechnology*, 2010, 28:511-515
- [16] 孔飞. 水稻 dull 突变体 *w54* 的基因图位克隆和温度敏感型黄叶突变体 *y12(t)* 的表型分析与基因定位. 南京: 南京农业大学, 2016
- Kong F. Gene map-based cloning of a rice dull mutant *w54* and phenotypic analysis and gene mapping of a thermo-sensitive yellow leaf mutant *y12(t)*. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2016
- [17] Shaw B P, Sekhar S, Panda B B, Sahu G, Chandra T, Parida A K. Biochemical and molecular processes contributing to grain filling and yield in rice. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2022, 179:120-133
- [18] Durbak A, Yao H, McSteen P. Hormone signaling in plant development. *Current Opinion Plant Biology*, 2012, 15:92-96
- [19] Wang G Q, Li H X, Feng L, Chen M X, Meng S, Ye N H, Zhang J. Transcriptomic analysis of grain filling in rice inferior grains under moderate soil drying. *Journal of Experimental Botany*, 2019, 70:1597-1611
- [20] 叶苑, 齐智伟, 李晓静, 饶玉春. 各种植物激素对水稻籽粒灌浆的影响及其机制. *安徽农业科学*, 2013, 41:9-11
- Ye W, Qi Z W, Li X J, Rao Y C. Influence and mechanism of each kind of plant hormones on rice grain filling. *Journal of Anhui Agricultural Science*, 2013, 41:9-11
- [21] Hu L, Tu B, Yang W, Yuan H, Li J, Guo L, Zheng L, Chen W, Zhu X, Wang Y, Qin P, Ma B, Li S. Mitochondria-associated pyruvate kinase complexes regulate grain filling in rice. *Plant Physiology*, 2020, 183:1073-1087
- [22] Kretzschmar T, Pelayo M A, Trijatmiko K R, Gabunada L F, Alam R, Jimenez R, Mendioro M S, Slamet-Loedin I H, Sreenivasulu N, Bailey-Serres J, Ismail A M, Mackill D J, Septiningsih E M. A trehalose-6-phosphate phosphatase enhances anaerobic germination tolerance in rice. *Nature Plants*, 2015, 1:15124
- [23] 高振楠, 郝媛媛, 李春寿, 黄福灯, 赵向前, 田志宏. 水稻调控淀粉合成基因的研究进展. *植物遗传资源学报*, 2023, 24(1): 61-74
- Gao Z N, Hao Y Y, Li C S, Huang F D, Zhao X Q, Tian Z H. Study on genes regulating starch synthesis in rice. *Journal of Plant Genetic Resources*, 2023, 24(1):61-74
- [24] Santner A, Estelle M. Recent advances and emerging trends in plant hormone signalling. *Nature*, 2009, 459:1071-1078
- [25] Durbak A, Yao H, McSteen P. Hormone signaling in plant development. *Current Opinion Plant Biology*, 2012, 15:92-96
- [26] Blázquez M A, Nelson D C, Weijers D. Evolution of plant hormone response pathways. *Annual Review of Plant Biology*, 2020, 71:327-353
- [27] Zhang H, Tan G, Yang L, Yang J, Zhang J, Zhao B. Hormones in the grains and roots in relation to post-anthesis development of inferior and superior spikelets in japonica/indica hybrid rice. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2009, 47:195-204
- [28] Zhu G, Ye N, Yang J, Peng X, Zhang J. Regulation of expression of starch synthesis genes by ethylene and ABA in relation to the development of rice inferior and superior spikelets. *Journal of Experimental Botany*, 2011, 62:3907-3916
- [29] Tong H, Liu L, Jin Y, Du L, Yin Y, Qian Q, Zhu L, Chu C. DWARF AND LOW-TILLE RING acts as a direct downstream target of a GSK3/SHAGGY-like kinase to mediate brassinosteroid responses in rice. *Plant Cell*, 2012, 24:2562-2577
- [30] Khew C Y, Teo C J, Chan W S, Wong H L, Namasivayam P, Ho C L. Brassinosteroid insensitive 1-associated kinase 1 (Os-BAK1) is associated with grain filling and leaf development in rice. *Journal of Plant Physiology*, 2015, 182:23-32
- [31] Hu Z, Lu S J, Wang M J, He H, Sun L, Wang H, Liu X H, Jiang L, Sun J L, Xin X, Kong W, Chu C, Xue H W, Yang J, Luo X, Liu J X. A novel QTL *qTGW3* encodes the GSK3/SHAGGY-Like kinase OsGSK5/OsSK41 that interacts with OsARF4 to negatively regulate grain size and weight in rice. *Molecular Plant*, 2018, 11:736-749
- [32] Qiao J, Jiang H, Lin Y, Shang L, Wang M, Li D, Fu X, Geisler M, Qi Y, Gao Z, Qian Q. A novel miR167a-OsARF6-OsAUX3 module regulates grain length and weight in rice. *Molecular Plant*, 2021, 14:1683-1698

附表 1 转录组结果

Supplementary table 1 Transcriptome results

功能 Function	基因 Gene	Log2(HD5/WYJ3)
	Os08g0366000	1.087412
	Os03g0811100 (<i>CHLD</i>)	1.366064
	Os04g0690800	1.841302
	Os01g0869800 (<i>PSBS1</i>)	2.341297
	Os01g0938100	2.631505
	Os01g0687400	4.598259
	Os09g0439500 (<i>LHCA6</i>)	3.448226
	Os03g0592500	-1.01867
	Os01g0279100	-1.02342
	Os06g0348800	-1.69642
光合作用 Photosynthesis	Os10g0567400	-1.69875
	Os09g0296800	-2.17598
	Os02g0744900	-1.07647
	Os01g0106900 (<i>DXR</i>)	1.726732
	Os02g0680600	1.046921
	Os02g0603800	1.262829
	Os02g0647900	1.525827
	Os11g0210500	1.515909
	Os01g0591300	3.279423
	Os10g0571200	1.097355
	Os01g0855000	1.105363
	Os04g0459500	1.136593
	Os01g0637600	1.216484
	Os11g0186200	1.08681
	Os12g0291100 (<i>OsRbcS3</i>)	1.483883
	Os12g0292400 (<i>OsRbcS4</i>)	2.114724
	Os12g0274700 (<i>OsRbcS2</i>)	2.582336
碳同化 Carbon assimilation	Os08g0425200 (<i>OsRbcX1</i>)	2.885279
	Os07g0197100	1.515038
	Os01g0940100	1.523673
	Os05g0187100	1.808157
	Os01g0190400	1.104781
激素途径 Hormone pathway	Os03g0645900 (<i>OsNCED3</i>)	2
	ABA 途径	

	Os03g0125100	1.220329955
	Os07g0622000	1.25128806
	Os04g0432000	1.318508034
	Os12g0586100 (<i>OsSAPK9</i>)	2.573796259
	Os06g0562200	1.546907558
	Os07g0500300	1.165341427
	Os05g0101600	-1.01720929
	Os02g0465400	1.203836602
	Os05g0207500 (<i>OsGSK2</i>)	1.398890077
BR 途径	Os06g0225300	1.752907138
	Os11g0514500 (<i>OsBAK1</i>)	2.384559083
	Os07g0569100	3.026062297
	Os07g0160100	1.02484628
	Os05g0407500(<i>GIDI</i>)	1.146129013
	Os08g0417000	1.991732384
GA 途径	Os05g0560900 (<i>OsGA2ox3</i>)	2.911066272
	Os04g0522500 (<i>OsGA2ox6</i>)	4.584962501
	Os01g0197700	-2.227805918
	Os01g0775400 (<i>OsCKX5</i>)	1.7770336
	Os04g0546800	2.45597606
	Os03g0402800 (<i>OsJAZ6</i>)	1.68552221
其他激素途径	Os03g0181100 (<i>OsJAZ10</i>)	1.782651668
	Os09g0439200 (<i>OsJAZ8</i>)	1.860131658
	Os07g0615200 (<i>OsJAZ7</i>)	1.899657991
