

水稻开颖突变体的遗传分析和基因克隆

毛兴学, 郑晓钰, 潘大建, 孙炳蕊, 江立群, 张静, 吕树伟, 于航, 李晨, 陈文丰

(广东省农业科学院水稻研究所 / 农业农村部华南优质稻遗传育种重点实验室(部省共建) / 广东省水稻育种新技术重点实验室 / 广东省水稻工程实验室, 广州 510640)

摘要: 花器是种子生成的基础, 水稻花器发育直接影响稻谷产量与品质。源美丝苗与P704杂交后代中发现一株开颖突变体(*oh*, open-hull), 其穗部发育有缺陷, 主要表现为: 开颖, 结实率显著下降, 种子变小。遗传分析发现开颖表型由一对隐性细胞核基因控制。通过BSA分析, 开颖基因被定位于水稻第3染色体上, 检索发现候选区间与*OsMADS1*(*LOC_Os03g11614*)基因重合, 与蜀恢498参考基因序列进行比对, *oh*中*OsMADS1*的第一外显子第118位发生碱基颠换, 导致编码的天冬氨酸变成酪氨酸, 将该等位基因命名为*OsMADS1^{oh}*。从*oh*中克隆*OsMADS1^{oh}*并构建过表达载体, 通过农杆菌介导转入易转化材料(中花11)中, 转基因后代出现开颖表型, 证实*OsMADS1^{oh}*导致开颖。另外, RNA定量分析结果表明, *MADS8*和*YABB5*的表达受*OsMADS1*调控。本研究从育种材料中筛选到开颖突变体, 并从中鉴定了新的*OsMADS1*等位基因, 为阐明花器形成的分子机理研究提供了特异种质和基因资源。

关键词: 水稻(*Oryza sativa* L.); 开颖突变体; 基因克隆

Genetic Analysis and Gene Cloning of an Open-hull Mutant in Rice

MAO Xing-xue, ZHENG Xiao-yu, PAN Da-jian, SUN Bing-rui, JIANG Li-qun,
ZHANG Jing, LYU Shu-wei, YU Hang, LI Chen, CHEN Wen-feng

(Rice Research Institute, Guangdong Academy of Agricultural Science/Key Laboratory of Genetics and Breeding of High Quality Rice in Southern China (Co-construction by Ministry and Province), Ministry of Agriculture and Rural Affairs/Guangdong Key Laboratory of New Technology in Rice Breeding/Guangdong Rice Engineering Laboratory, Guangzhou 510640)

Abstract: Floral organ is the basis of seed growth, and the development of rice floral organ directly affects the yield and quality. An open-hull mutant (*oh*) was found in the progenies of rive cultivar Yuanmeisimiao crossed with P704. The *oh* mutant displayed abnormal floral organ with unclosed lemma and palea, decreased seed setting rate and smaller seeds. Genetic analysis showed that the open-hull phenotype was controlled by a pair of recessive nuclear genes. Using bulked-segregant analysis (BSA) method, the open-hull gene was allocated in the interval 22806614~23000408 on rice chromosome 3, where the *OsMADS1* gene (*LOC_Os03g11614*) is present. Through alignment with the homologous gene in the Shuhui498 reference genome, the nucleotide transversion (aspartic acid to tyrosine) at the 118th nucleotide of the first exon of *OsMADS1* in *oh* was identified

收稿日期: 2022-12-12 修回日期: 2023-03-27 网络出版日期: 2023-04-23

URL: <https://doi.org/10.13430/j.cnki.jpgr.20221212001>

第一作者研究方向为水稻种质资源, E-mail: maoxingxue@qq.com

通信作者: 陈文丰, 研究方向为水稻遗传育种, E-mail: 18-cwf@163.com

李晨, 研究方向为水稻种质资源, E-mail: lic11111@sina.com

基金项目: 广东省自然科学基金(2019A1515011208); 广东省重点领域研发计划项目(2020B0202090003, 2022B0202110003); 广东省农业科学院农业优势产业学科团队建设项目(202101TD); 广东省学科类重点实验室运行项目(2020B1212060047); 2022年省级乡村振兴战略专项资金(2022-NBH-00-012)

Foundation projects: Guangdong Provincial Natural Science Foundations (2019A1515011208); The Key Field Research and Development Projects of Guangdong Province(2020B0202090003, 2022B0202110003); Agricultural Competitive Industry Discipline Team Building Projects of Guangdong Academy of Agricultural Sciences (202101TD); Projects of Guangdong Key Laboratory (2020B1212060047); Special Funds for Guangdong Provincial Rural Revitalization Strategy in 2022 (2022-NBH-00-012)

(designated *OsMADS1^{oh}*). *OsMADS1^{oh}* was cloned from *oh* and used to construct overexpression vector. The overexpression vector was introduced into the transformable material (ZH11) by *Agrobacterium*-mediated transformation. The lines over-expressing *OsMADS1^{oh}* showed the open-hull phenotype. In addition, the RNA expression results of real-time quantitative PCR showed that the expression of *MADS8* and *YABB5* were regulated by *OsMADS1*. Collectively, this study approved the *OsMADS1^{oh}*, as a new allelic variant of *OsMADS1*, and provided specific resources for elucidating the molecular mechanism of floral organ formation.

Key words: rice (*Oryza sativa* L.); open-hull mutant; gene cloning

水稻(*Oryza sativa* L.)是全球主要的粮食作物之一,花器的发育与品质、产量密切相关,研究其遗传机理和调控机制具有重要意义^[1]。颖壳是水稻花器的重要组成部分,扬花期间,颖壳开放,利于雄蕊散粉、雌蕊接受花粉,开颖是有利性状;选育杂交稻亲本时,颖壳开放程度是重要性状之一。扬花后,颖壳关闭,对种子起到保护作用,特别是高温高湿条件下,开颖容易滋生病原菌,引起种子变质或穗萌。颖壳与种子成长密切相关^[2],了解颖壳发育具有重要意义。

水稻中有多个开颖相关基因被报道,*sll* 编码 C2H2 型锌指转录因子,突变后颖壳开裂,出现钩状颖,雄蕊发育成雌蕊,不育^[3-5]。*OsMADS1* 编码 MADS(Mini chromosome maintenance 1, AGAMOUS, DEFICIENS, Serum response factor)类转录因子,控制颖壳发育,由于变异位点不同,出现多种表型差异。颖壳发育异常,浆片变异,有叶状颖壳出现^[6-11]。在 *bsg1-1* 突变体中,1 个 DUF640 基因变异导致颖壳弯曲,不能完全闭合,千粒重约降低一半^[12]; *OsWOX3A* 编码转录激活子,变异后内外颖不能闭合,种子发育受抑制^[13]。过表达 miR172 家族基因导致开颖,外稃、内稃增长,花器官发育异常^[14]。假性胎生突变体(*pho*)、内颖萎缩突变体(*dep*)和花发育异常突变体(*afo*)也呈现出开颖表型^[15]。另外,也有颖壳发育异常但是不开裂的报道,如 *osoat-1*^[16]。

OsMADS1 属于植物特有的 MADS 蛋白,在水稻花器官的分生和发育过程中发挥关键作用^[11]。*OsMADS1* 的 RNA 干扰后代呈开颖表型,过表达 microRNA172 产生类似表型, *OsMADS1* 负调控 microRNA172 的表达, microRNA172 的靶标基因是 5 个 *AP2* 基因,过表达 *AP2-3* 可恢复干扰 *OsMADS1* 所呈现的开颖表型, *OsMADS1*-microRNA172-*AP2* 通路可能控制颖壳发育^[14]。生化研究表明 *OsMADS1* 与多个花器发育的 MADS 蛋白互作, *OsMADS1* 可能通过 *OsMADS3*、*OsMADS17* 和 *OsMADS58* 蛋白来调控花器发育^[17]。颖壳的大小与种子大小密切

相关, *OsMADS1* 基因的可变剪切直接影响粒型^[18]; 杂种优势基因 *GW3p6* 实际上是 *OsMADS1* 等位基因,其剪切方式的改变造成 C 端失去 32 个氨基酸,最终使粒长、粒重与产量都增加^[19]。已克隆的 3 个非典型 G 蛋白 γ 亚基 *GS3*、*DEP1* 和 *GGC2* 均被证实参与调控水稻种子大小,分子证据表明他们均可通过 *OsMADS1* 蛋白调控粒型^[20-21]。粒宽控制基因 *WG7* 可结合 *OsMADS1* 启动子区域,激活其转录进而增加粒宽^[22]。这些结果表明基因 *OsMADS1* 与产量性状密切相关,相关调控机制值得深入研究。

野生稻保留着栽培稻不具有的或已经消失了的遗传基因^[23],通过花粉管导入或杂交技术可向栽培稻引入野生稻基因片段,进而从后代中筛选出性状优异的材料。目前已通过这种方法育成一批优异品种^[24],也发现了一些特异的种质资源,可用于基础研究^[25]。在野生稻导入系的利用过程中,发现了 1 个能稳定遗传的开颖突变体,本研究对该突变体进行了表型分析、遗传分析和基因克隆。

1 材料与方法

1.1 供试材料

本研究供试材料水稻开颖突变体(*oh*, open-hull)来自籼稻源美丝苗和 P704 的杂交后代 F_6 世代。源美丝苗是 2020 年广东省审定的常规籼稻品种。P704 是将小粒野生稻 DNA 通过花粉管通道法导入青桂占(常规籼稻中间材料,无开颖表型),从其后代中选育的稳定中间材料。源美丝苗和 P704 均没有开颖表型, *oh* 的开颖表型应是自然变异引起的。取 *oh* 单株,连续两季套袋自交,后代开颖表型稳定。取表型正常单株,套袋自交,筛选无开颖后代的株系作为野生型对照。转基因实验采用易于转化的粳稻中花 11 作为受体。

1.2 遗传群体的构建

源美丝苗和 P704 的杂交后代 F_6 世代,种植于广东省农业科学院白云试验基地,2021 年早季分单株收集表型正常的种子,2021 年晚季种植 4 个 F_7 家系,

其中3个F₂家系中出现开颖和闭颖(正常颖壳)两种表型,将这类家系记为分离群体,调查其小花表型,统计分离比例,利用Excel软件进行卡方 χ^2 检验。

1.3 开颖基因的定位

采用BSA法定位开颖基因。从分离群体中随机选取开颖和闭颖的植株各20株,提取每个单株基因组DNA,相同表型植株的DNA等量混合形成一个基因池,构建开颖和闭颖两个基因池。以蜀恢498基因组为参照,检测野生型、*oh*和混池DNA的SNP,利用混池间的SNP频率差异做关联分析,由北

京诺禾致源生物公司完成。根据候选基因序列信息,利用在线软件(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>)设计扩增引物(Psnp118),由上海生工生物有限公司合成(引物序列见表1)。采用高保真DNA聚合酶KOD-FX(东洋纺(上海)生物科技有限公司,上海,中国)扩增,按照KOD-FX说明书配置反应体系,反应条件:94℃ 30s,60℃ 30s,68℃ 30s,30个循环。分别扩增野生型和*oh*的候选基因序列,由上海生工生物有限公司利用反向引物进行测序。

表1 引物列表

Table 1 List of primers used in this study

引物名称 Primer name	序列(5'-3') Sequence(5'-3')		目的 Purpose
	上游引物 Upstream primer	下游引物 Downstream primer	
Psnp118	TTTGCTCCCCACTCCCTCG	GAGACCCCAAACTCCAAGCATA	SNP118位点检测
PMADS	GAGAACTAGTATGGGAGGGGAAGGT	CATAGGATCCAAGCCTGAAGCCTGAACTGAA	载体构建
HPT	ATTTGTGTACGCCGACAGT	GTGCTTGACATTGGGGAGTT	转基因后代鉴定
EF1 α	TTTCACTCTTGGTGTGAAGCAGAT	GACTTCCTTCACGATTTTCATCGTAA	基因表达分析
MADS1re	TGGCAAGATGGTGGTGGG	GCTTCATTGCTCAGATGGTCC	
GW2Re	CCTTTTCAGTGCCGTCATAACC	GCCAAATCGCTTCCATAACC	
MADS14re	AGAAAGTCCAGAAGCAACAAGTGC	TGGCAGCCCAATGCGAAC	
MADS15re	CTTATGCTTGAGTCCATTTCGG	TGGTCCCACTGCCCTACTTG	
MADS5re	GGTCGCCCTCATCATCTTCTC	GCGGTATCGCTCCAGTGTCT	
MADS55re	GGGAAAACAGATAAGCAGCC	TGAATGCCCTTTCGTTGGAG	
MADS8re	AGGTCGCCCTCATCATCTTCT	AGGTACTCATTGCGGCTGCTT	
YABBY5re	TAGGGTCCTGCATGTCTC	ATACGATCGATGCATGCC	
AP2-3re	ACAGGGGCGTCACCTTCTACA	GCACAAACTCCTCCTTGGTCC	
AP2-5re	ATTACGAGGATGACCTGAAGCA	CGAACAGCCCAAGTAGACG	

1.4 过表达材料创制

取*oh*幼穗,用Trizol提取总RNA,用EvoM-MLV反转录试剂盒(艾科瑞生物工程有限公司,湖南,中国)反转录成cDNA(具体操作见试剂盒说明书),以此为模板,加入引物(PMADS),聚合酶KOD-FX,按照KOD-FX说明书配置反应体系进行扩增,扩增条件:94℃ 30s,58℃ 30s,68℃ 50s,30个循环,回收扩增产物,双酶切(*SpeI/BamHI*)插入过表达载体pOX(刘耀光院士馈赠),*OsMADS1^{oh}*的表达受Pubi启动子控制;再通过农杆菌介导的遗传转化法导入中花11。在T₁代苗期提取DNA,利用潮霉素引物(HPT)扩增,筛选转基因单株。

1.5 颖壳切片观察

抽穗当天,采集野生型和*oh*的小穗,参照Li等^[7]方法,包埋后横切,获得切片后用甲苯胺蓝染色,显微镜下进行观察拍照。

1.6 表达分析

幼穗长至5cm左右取样,取5个小穗,混合后,用Trizol提取总RNA;测定浓度,取1 μ g的总RNA反转录获得cDNA,以*EF1 α* 基因为内源参照基因,根据荧光定量试剂盒(艾科瑞生物工程有限公司,湖南,中国)配置荧光定量PCR反应试剂(具体操作见试剂盒说明书)。利用实时荧光定量PCR仪(Bio-Rad)进行定量分析,扩增程序为:95℃ 3min;95℃ 5s,60℃ 30s,循环40次,引物见表1。基因相对表达量的计算用2^{- $\Delta\Delta$ Ct}法。设3个生物学重复,通过*t*测验进行显著性分析。

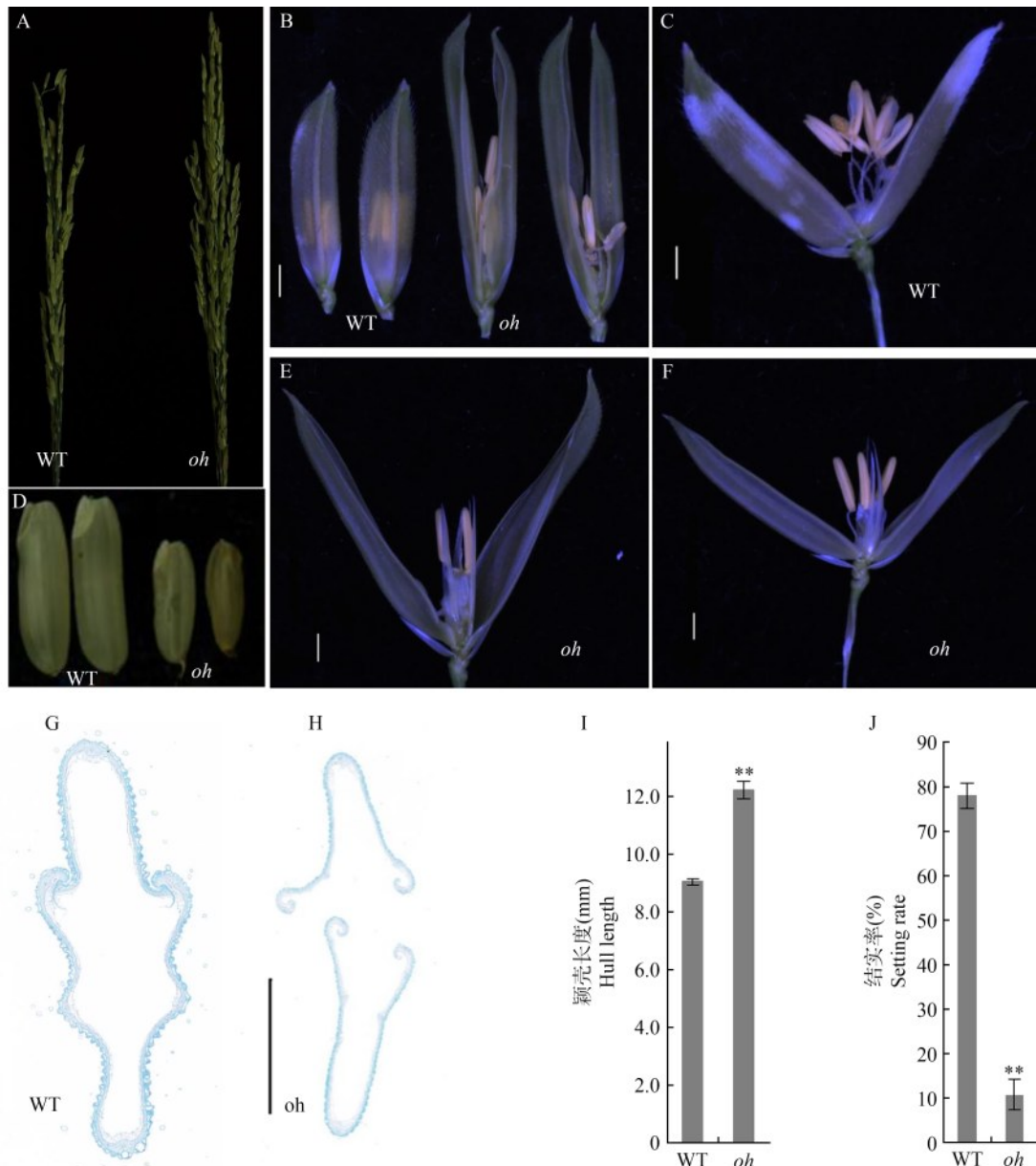
2 结果与分析

2.1 *oh*的基本性状调查

开颖突变体*oh*和野生型在营养生长期差异不明显。抽穗后,野生型小花的内外颖相互闭合,*oh*的

内外颖扭曲变形,颖壳开裂不闭合,全部小花呈开颖状态(图1A、B)。野生型小花含6个雄蕊(图1C),*oh*的雄蕊退化,小花中的雄蕊个数2~6个不等(图1E、F);与野生型相比,*oh*的颖壳极显著增长(图1B、I);抽穗当天,采集小花,从中部横切,观察颖壳形态,

野生型的外颖向内卷曲,内颖向外卷曲,两者在边缘处挂扣闭合(图1G),*oh*的内外颖均发生内卷,不能正常闭合(图1H)。正常收获期,统计结实率,*oh*结实率下降(图1J),种子瘦小(图1D)。



A: 野生型与 *oh* 穗子; B: 野生型和 *oh* 的小花; C、E、F: 剥开颖壳后小花; D: 籽粒表型; G、H: 小花颖壳的横切面; I、J: 野生型和 *oh* 的颖壳长度和结实率比较; WT: 野生型; 标尺: 1 mm; **表示差异极显著; 下同
 A: The panicles of WT and *oh*; B: The spikelets of WT and *oh*; C, E, F: Spikelet after opening the hulls; D: Seeds phenotype; G, H: Transverse section of spikelets hulls; I, J: Comparison of hull length and setting rate between WT and *oh*; WT: Wild type; Bar: 1 mm; ** indicates extremely significant difference; The same as below

图1 开颖突变体(*oh*)的形态特征

Fig.1 Morphological characteristics of open-hull mutant

2.2 开颖性状的遗传分析

oh 开颖表型在多个世代稳定表达,表明该表型是可遗传的,是基因变异的结果。考察 F_7 家系,选

取3个分离群体,调查分析颖花表型,3个 F_7 分离群体中,闭颖单株数与开颖单株数之比都符合为3:1(表2),表明开颖性状是由一对隐性核基因控制。

表2 F₇分离群体的开颖表型统计Table 2 Statistical analysis of open-hull trait in F₇ segregated population

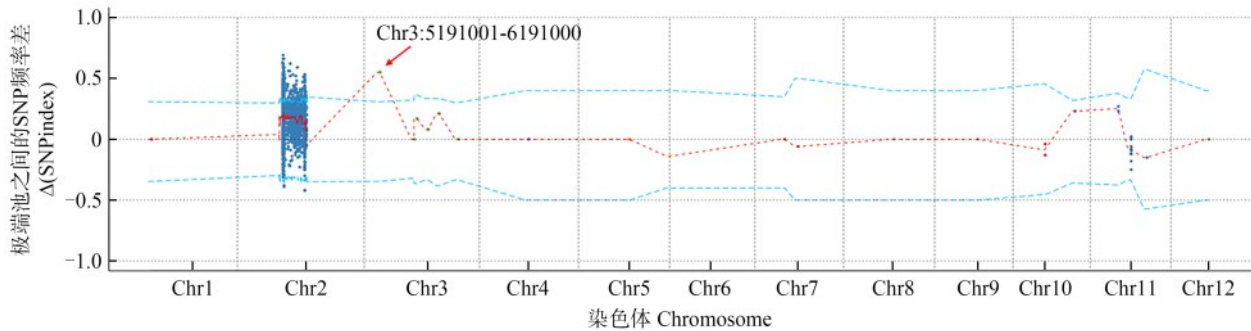
F ₇ 家系 F ₇ family line	闭颖株数 Number of wild-type plants	开颖株数 Number of open-hull plants	χ^2
1	149	35	3.196
2	163	42	2.353
3	201	55	1.505

$$\chi^2_{(0.05,1)}=3.84(3:1)$$

2.3 开颖控制基因的定位

为了鉴定开颖控制基因,利用分离群体构建极端池进行BSA分析。测序结果共获得了59.9 Gb的

有效数据,野生型、闭颖池、*oh*和开颖池分别获得13.0 Gb、17.2 Gb、13.1 Gb和16.6 Gb的有效数据。各池的Q30均大于92.68%,GC含量分布正常(43.65%~44.19%);以蜀恢498为参考基因组(<https://www.mbkbase.org/R498/>),共鉴定出1138024个SNP。野生型和*oh*均来源于F₆世代,因此二者DNA水平差异性低;2号染色体差异位点较多,其余几条染色体很少有差异位点。以1Mb为窗口,1kb为步长,计算每个窗口中极端池之间的SNP频率差^[26],选取95%置信水平作为阈值线,在3号染色体短臂上鉴定出1个候选区域(5191001~6191000bp)(图2)。



红色虚线为 $\Delta(\text{SNP-index})$;蓝色的线为95%阈值线;红色箭头指示候选区段

The red dotted line is $\Delta(\text{SNP-index})$; The blue lines represent thresholds of 95%; The red arrow indicates the candidate interval

图2 混池间SNP变异频率差分布

Fig.2 Distribution of $\Delta(\text{SNP-index})$ between two pools

结合前面的遗传分析结果,候选变异在闭颖池中应该是杂合的,在开颖池中是纯合的。以此为标准,从候选区间915个SNP中筛选到2个SNP(表3)。

表3 候选区间的2个SNP

Table 3 Two SNPs in candidate region

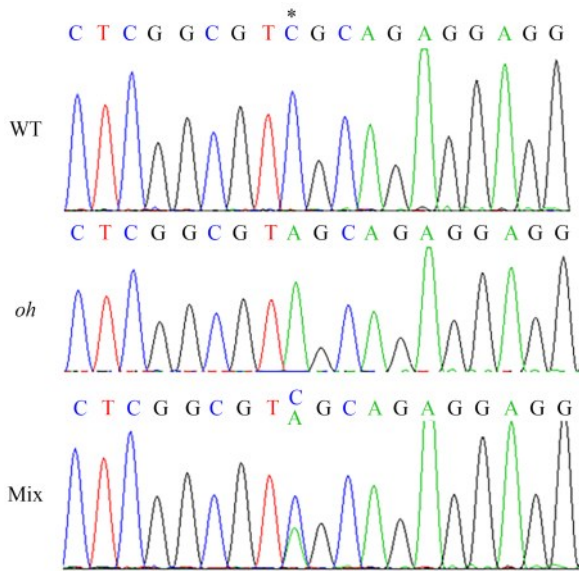
位置 Position	参考 Reference	变异 Alteration	注释 Annotation
Chr3:5219419	G	T	基因间变异
Chr3:6190903	C	A	OsR498G0305455800.01(OsMADS1),非同义突变

根据SNP注释结果,3号染色体5219419位SNP位于OsR498G0305399400.01上游446碱基,参照MBKbase(<https://www.mbkbase.org/>)统计结果,该变异在栽培稻中出现频率为24.44%,推测其与开颖表型无关。3号染色体6190903位SNP位于OsMADS1第一外显子的第118位碱基(SNP118),由此产生1个新等位基因,命名为OsMADS1^{oh}。OsMADS1^{oh}编码蛋白的第40位氨基酸由天冬氨酸变成酪氨酸。OsMADS1属于MADS-Box转录因子家族,调控花分

生组织分化与花器官发育^[7, 18, 27]。推测OsMADS1^{oh}可能是*oh*开颖表型的候选基因。在SNP118上下游分别设计引物;以野生型、*oh*和二者混合DNA为模板进行扩增,利用反向引物测序,结果表明:*oh*的SNP118位点发生了碱基颠换变异,两种类型DNA的扩增效率相近,不会发生竞争性抑制(图3)。再随机挑选另外50个开颖单株,进行验证,这些单株的SNP118位碱基与*oh*相同。

2.4 转基因验证

构建OsMADS1^{oh}的过表达载体(Ubi启动子控制转录),以中花11为受体,通过转基因创制OsMADS1^{oh}的过表达材料,共得到8个独立株系(OE1~8)。抽穗后5个株系的颖壳明显开裂,取3个株系进行拍照(图4A);提取穗部RNA,利用引物对(MADS1reF/MADS1reR)进行表达量分析,与中花11相比,OsMADS1^{oh}过表达材料中的OsMADS1和OsMADS1^{oh}总表达量显著升高(图4B),推测上调部分是OsMADS1^{oh}的表达量,开颖表型是过表达OsMADS1^{oh}引起的。

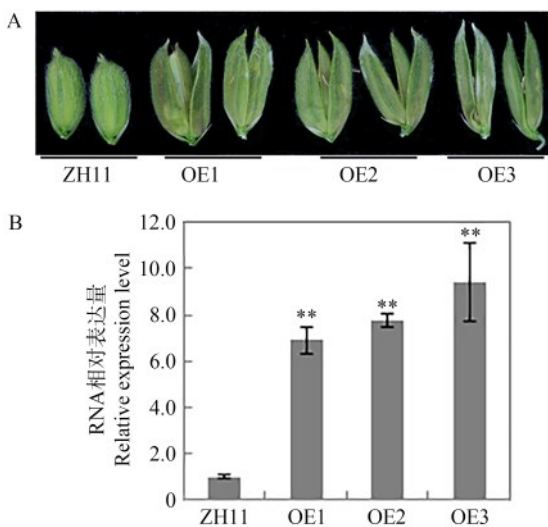


* 指示了SNP118位点; Mix: 野生型与 *oh* 的混合DNA

* indicates SNP118 site; Mix: The mixed DNA of WT and *oh*

图3 SNP118的测序结果

Fig.3 Sequence results of SNP118



A: 过表达 *OsMADS1^{oh}* 转基因后代的开颖表型; B: 转基因后代 *OsMADS1* 和 *OsMADS1^{oh}* 的总表达量检测结果; ZH11: 中花 11;

OE1, OE2, OE3: 3个 *OsMADS1^{oh}* 过表达转基因株系

A: Open-hull phenotype of *OsMADS1^{oh}*-overexpression lines;
B: Total expression level of *OsMADS1* and *OsMADS1^{oh}* in panicles of *OsMADS1^{oh}*-overexpression lines; ZH11: Zhonghua 11; OE1, OE2, OE3: Three *OsMADS1^{oh}*-overexpression lines

图4 过表达 *OsMADS1^{oh}* 导致开颖表型

Fig.4 Overexpression of *OsMADS1^{oh}* in ZH11 resulted in open-hull phenotype

2.5 花器发育相关基因表达分析

OsMADS1 是花器、种子发育的关键调控基因, 可能受其调控的下游基因有很多^[7, 14, 27]; 在幼穗约 5cm 时取样, 分析部分花器发育相关基因在野生型和 *oh* 中的表达情况。 *MADS8* 在 *oh* 中的表达水平明

显下调, 而 *YABBY5* 在 *oh* 中的表达水平明显上调(图 5), 说明这两个基因的表达受 *OsMADS1^{oh}* 影响。

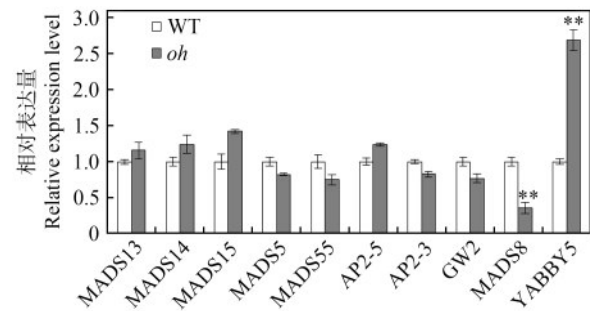


图5 相关基因的表达分析

Fig.5 The expression analysis of the related genes

3 讨论

本研究对来源于野生稻的开颖突变体(*oh*)进行了遗传分析和基因克隆研究, 找到 *OsMADS1* 的 1 个新等位基因, 命名为 *OsMADS1^{oh}*。与野生型 *OsMADS1* 基因相比, *OsMADS1^{oh}* 的碱基变异(SNP118)导致编码蛋白的第 40 位氨基酸发生改变, 变异位于 MADS 结构域。野生型过表达 *OsMADS1*, 穗子扭曲、颖壳伸长、穗分枝和小穗数目减少, 内外颖闭合^[28]; 过表达 *OsMADS1^{oh}* 和 *lhs1* 均引起开颖表型^[7, 11]; 过表达 *OsMADS1^{oh}* 后代的内外颖不能正常闭合, 说明 *OsMADS1^{oh}* 可导致开颖表型。

OsMADS1 是花器发育的关键基因, 既影响抽穗期又控制多种花器的发育, 已有多个变异等位基因被发现, 变异后代的表型不尽相同^[7, 11]。与野生型 *OsMADS1* 蛋白相比, 类燕麦稻(Oat-Like Rice)的 *OsMADS1^{oh}* 变异位点(第 27 位氨基酸由甘氨酸变为天冬氨酸)位于 MADS 结构域, 变异引起开颖表型, 类燕麦稻的 F₂ 群体出现严重偏分离^[7], *oh* 分离群体中未发现偏分离, 尚不清楚这种差异是否与变异位点相关。类燕麦稻的颖壳长度是对照(粳稻日本晴)的 2 倍以上^[7], *oh* 的颖壳长度约为野生型的 1.3 倍, 两种等位基因对颖壳大小的影响程度不同; 前者的亲本是短粒粳稻, *oh* 的亲本是长粒籼稻, 暗示籼粳稻之间的粒长差异基因受 *OsMADS1* 调控^[7, 20]。在外颖与内颖结合处, *oh* 的外颖过度卷曲, 与 *dep*、*af* 的表现相似^[14]; 比 *bsg1-1*^[12] 和 *nal2/3*^[13] 的卷曲程度高, 可能这些变异对内外颖发育协调性的影响程度不同。 *OsMADS1* 影响很多基因的表达, 本研究对部分基因的表达情况进行了检测, *oh* 中的 *MADS8* 基因显著下调, 与 *ohms1* 中的变化趋势一致^[8]; *oh* 中的 *YABBY5* 基因显著上调, 与 *osmads1ko* 中的变化趋势

相反^[27]。前人报道的*AP2-2*和*GW2*可能是*OsMADS1*的下游调控基因^[7, 14],在*oh*幼穗中未检测到这些基因的表达发生变化。导致这些差异的具体原因还有待进一步研究。本研究在转基因验证时首先扩增*OsMADS1*上游1.8Kb的启动子区,再拼接野生型CDS区,然后转基因导入*oh*,得到了转基因苗,但是转基因后代仍旧表现开颖表型(相关结果未展示);前人也曾发现*OsMADS1*表达大幅下调,其上游2Kb序列与日本晴参考序列无差异^[29];这说明*OsMADS1*上游1.8 kb不能正常启动其表达,关于*OsMADS1*的启动子的详细信息还需另行研究。

*OsMADS1*基因对花器发育的调控功能已得到确认,但其详细调控机制还不明确。通过miR172-AP2s通路的调控假说获得了较为可靠的结果,还需要更多的研究来进行多方面验证。*OsMADS1*既调控花器发育,又影响产量性状,深入解析其作用机制就显得十分必要。*oh*突变体的发现为*OsMADS1*基因研究提供了新种质,有望促进花器发育研究。将小粒野生稻DNA通过花粉管通道法导入青桂占获得P704,*oh*突变体是在P704后代中发现的,该突变有可能与野生稻基因导入有关,本研究结果为后续相关研究提供了重要参考。

参考文献

- [1] 姜树坤,张喜娟,王嘉宇,张凤鸣. 水稻幼穗-颖花发育的研究进展. 植物遗传资源学报,2012,13(6):1018-1022,1030
Jiang S K, Zhang X J, Wang J Y, Zhang F M. Research advancement on young panicle and spikelet development in rice (*Oryza sativa* L.). Journal of Plant Genetic Resources, 2012, 13(6):1018-1022,1030
- [2] Li N, Xu R, Duan P, Li Y. Control of grain size in rice. Plant Reproduction, 2018, 31(3): 237-251
- [3] Xiao H, Tang J, Li Y, Wang W, Li X, Jin L, Xie R, Luo H, Zhao X, Meng Z, He G, Zhu L. *STAMENLESS 1*, encoding a single C2H2 zinc finger protein, regulates floral organ identity in rice. The Plant Journal, 2009, 59(5): 789-801
- [4] Duan Y, Diao Z, Liu H, Cai M, Wang F, Lan T, Wu W. Molecular cloning and functional characterization of *OsJAG* gene based on a complete-deletion mutant in rice (*Oryza sativa* L.). Plant Molecular Biology, 2010, 74(6): 605-615
- [5] Luo H, Li Y, Yang Z, Zhong B, Xie R, Ren M, Luo D, He G. Fine mapping of a pistilloid-stamen (PS) gene on the short arm of chromosome 1 in rice. Genome, 2006, 49(8): 1016-1022
- [6] 陈晓东,李飞,李丹阳,刘灵芝,乔守晨,孙红正,李俊周,张静,彭廷,谭金芳,杜彦修,赵全志. 水稻内颖畸形或缺失基因*OsAPPI*的图位克隆及表达分析. 植物遗传资源学报, 2021, 22(2): 416-426
Chen X D, Li F, Li D Y, Liu L Z, Qiao S C, Sun H Z, Li J Z, Zhang J, Peng T, Tan J F, Du Y X, Zhao Q Z. Map-based cloning and expression analysis of rice abnormal or absent palea gene *OsAPPI*. Journal of Plant Genetic Resources, 2021, 22(2): 416-426
- [7] Li P, Li H, Liu Z, Zhuang Y, Wei M, Gu Y, Liu Y, Sun X, Tang Y, Yue L, Lu L, Luo D, Huang W, Tu S, Wang S. Characterization of the 'Oat-Like Rice' caused by a novel allele *OsMADS1^{olr}* reveals vital importance of *OsMADS1* in regulating grain shape in *Oryza sativa* L. Rice, 2020, 13(1): 73
- [8] Sun L P, Zhang Y X, Zhang P P, Yang Z F, Zhan X D, Shen X H, Zhang Z H, Hu X, Xuan D D, Wu W X, Cao L Y, Cheng S H. K-domain splicing factor *OsMADS1* regulates open hull male sterility in rice. Rice Science, 2015, 22(5): 207-216
- [9] Chen Z X, Wu J G, Ding W N, Chen H M, Wu P, Shi C H. Morphogenesis and molecular basis on naked seed rice, a novel homeotic mutation of *OsMADS1* regulating transcript level of AP3 homologue in rice. Planta, 2006, 223(5): 882-890
- [10] Zhang J, Cai Y, Yan H, Jin J, You X, Wang L, Kong F, Zheng M, Wang G, Jiang L, Zhang W, Wan J. A critical role of *OsMADS1* in the development of the body of the palea in rice. Journal of Plant Biology, 2018, 61(1): 11-24
- [11] Jeon J S, Jang S, Lee S, Nam J, Kim C, Lee S H, Chung Y Y, Kim S R, Lee Y H, Cho Y G, An G. leafy hull sterile1 is a homeotic mutation in a rice MADS box gene affecting rice flower development. Plant Cell, 2000, 12(6): 871-884
- [12] Yan D, Zhou Y, Ye S, Zeng L, Zhang X, He Z. *BEAK-SHAPED GRAIN 1/TRIANGULAR HULL 1*, a DUF640 gene, is associated with grain shape, size and weight in rice. Science China(Life Sciences), 2013, 56(3): 275-284
- [13] Cho S H, Yoo S C, Zhang H, Pandeya D, Koh H J, Hwang J Y, Kim G T, Paek N C. The rice *narrow leaf2* and *narrow leaf3* loci encode WUSCHEL-related homeobox 3A (*OsWOX3A*) and function in leaf, spikelet, tiller and lateral root development. New Phytologist, 2013, 198(4): 1071-1084
- [14] Dai Z, Wang J, Zhu M, Miao X, Shi Z. *OsMADS1* represses microRNA172 in elongation of palea/lemma development in rice. Front Plant Science, 2016, 7: 1891
- [15] Wang K, Tang D, Hong L, Xu W, Huang J, Li M, Gu M, Xue Y, Cheng Z. *DEP* and *AFO* regulate reproductive habit in rice. PLoS Genetics, 2010, 6(1): e1000818
- [16] Liu C, Xue Z, Tang D, Shen Y, Shi W, Ren L, Du G, Li Y, Cheng Z. Ornithine δ -aminotransferase is critical for floret development and seed setting through mediating nitrogen reutilization in rice. The Plant Journal, 2018, 96(4): 842-854
- [17] Hu Y, Liang W, Yin C, Yang X, Ping B, Li A, Jia R, Chen M, Luo Z, Cai Q, Zhao X, Zhang D, Yuan Z. Interactions of *OsMADS1* with floral homeotic genes in rice flower development. Molecular Plant, 2015, 8(9): 1366-1384
- [18] Yu J, Miao J, Zhang Z, Xiong H, Zhu X, Sun X, Pan Y, Liang Y, Zhang Q, Abdul Rehman R M, Li J, Zhang H, Li Z. Alternative splicing of *OsLG3b* controls grain length and yield in *japonica* rice. Plant Biotechnology Journal, 2018,

- 16(9): 1667-1678
- [19] Wang C, Tang S, Zhan Q, Hou Q, Zhao Y, Zhao Q, Feng Q, Zhou C, Lyu D, Cui L, Li Y, Miao J, Zhu C, Lu Y, Wang Y, Wang Z, Zhu J, Shang G Y, Gong J, Yang S, Wang W, Zhang J, Xie H, Huang X, Han B. Dissecting a heterotic gene through GradedPool-Seq mapping informs a rice-improvement strategy. *Nature Communications*, 2019,10(1): 2982
- [20] Liu Q, Han R, Wu K, Zhang J, Ye Y, Wang S, Chen J, Pan Y, Li Q, Xu X, Zhou J, Tao D, Wu Y, Fu X. G-protein β subunits determine grain size through interaction with MADS-domain transcription factors in rice. *Nature Communications*, 2018,9(1): 852
- [21] Sun S, Wang L, Mao H, Shao L, Li X, Xiao J, Ouyang Y, Zhang Q. A G-protein pathway determines grain size in rice. *Nature Communications*, 2018,9(1): 851
- [22] Huang Y, Bai X, Cheng N, Xiao J, Li X, Xing Y. Wide grain 7 increases grain width by enhancing H3K4me3 enrichment in the *OsMADS1* promoter in rice (*Oryza sativa* L.). *The Plant Journal*, 2020,102(3): 517-528
- [23] 张静, 范芝兰, 潘大建, 刘维, 江立群, 吕树伟, 孙炳蕊, 刘清, 毛兴学, 陈文丰, 李晨. 广东普通野生稻对水稻白叶枯病的抗性评价及分析. *植物遗传资源学报*, 2022,23(2): 422-429
- Zhang J, Fan Z L, Pan D J, Liu W, Jiang L Q, Lv S W, Sun B R, Liu Q, Mao X X, Chen W F, Li C. Identification and analysis of the bacterial blight resistance of common wild rice in Guangdong province. *Journal of Plant Genetic Resources*, 2022,23(2): 422-429
- [24] 潘大建, 李晨, 范芝兰, 孙炳蕊, 陈文丰, 江立群, 张静, 吕树伟, 刘清, 毛兴学. 广东省农业科学院水稻种质资源研究60年: 成就与展望. *广东农业科学*, 2020,47(11): 18-31
- Pan D J, Li C, Fan Z L, Sun B R, Chen W F, Jiang L Q, Zhang J, Lv S W, Liu Q, Mao X X. Sixty years' research on rice germplasm resources of Guangdong Academy of Agricultural Sciences: Achievements and prospects. *Guangdong Agriculture Science*, 2020,47(11): 18-31
- [25] 肖汉祥, 李燕芳, 张扬, 黄炳超. 野栽杂种后代水稻品种对褐稻虱抗性机制的研究. *广东农业科学*, 2011,38(2): 14-15
- Xiao H X, Li Y F, Zhang Y, Huang B C. Studies on the resistance mechanism of offspring of wide rice to *Nilaparvata lugens*(stal). *Guangdong Agriculture Science*, 2011,38(2): 14-15
- [26] Takagi H, Abe A, Yoshida K, Kosugi S, Natsume S, Mitsuoka C, Uemura A, Utsushi H, Tamiru M, Takuno S, Innan H, Cano L M, Kamoun S, Terauchi R. QTL-seq: Rapid mapping of quantitative trait loci in rice by whole genome resequencing of DNA from two bulked populations. *The Plant Journal*, 2013,74(1): 174-183
- [27] Kannan P, Chongloi G L, Majhi B B, Basu D, Veluthambi K, Vijayraghavan U. Characterization of a new rice *OsMADS1* null mutant generated by homologous recombination-mediated gene targeting. *Planta*, 2021,253(2): 39
- [28] Wang L, Zeng X Q, Zhuang H, Shen Y L, Chen H, Wang Z W, Long J C, Ling Y H, He G H, Li Y F. Ectopic expression of *OsMADS1* caused dwarfism and spikelet alteration in rice. *Plant Growth Regulation*, 2017, 81(3): 433-442
- [29] 陈立凯, 黄明, 刘永柱, 王慧, 陈志强, 郭涛. 水稻开颖半不育突变体的观察、遗传分析和基因定位. *中国农业科学*, 2016, 49(1): 1-13
- Chen L K, Huang M, Liu Y Z, Wang H, Chen Z Q, Guo T. Observation, genetic analysis and gene mapping of an open hull semi-sterility mutant in rice (*Oryza sativa*). *Scientia Agricultura Sinica*, 2016, 49(1): 1-13