

水稻穗顶部退化突变体 *tutou3* 的基因精细定位

邢欣欣, 郭秀平, 李 帅, 常艳琪, 寻子琦, 张 欣

(中国农业科学院作物科学研究所 / 农作物基因资源与基因改良国家重大科学工程, 北京 100081)

摘要: 水稻穗顶部退化在水稻生产中时有发生, 影响水稻的穗粒数, 严重时会导致水稻产量下降。目前, 虽然从水稻穗顶部退化突变体中已经鉴定出了一些基因如 *PAA1*、*PAA2*、*TUT1* 等, 但是对穗顶部退化发生的分子机制的认知仍十分有限。本研究报道了一个穗顶部退化的隐性突变体 *tutou3* 的基因定位及克隆结果。该突变体在营养生长期表现为株高变矮, 穗发育后期穗顶部发生严重退化, 每穗实粒数、穗长、千粒重极显著降低。遗传分析表明, *tutou3* 受 1 对隐性基因控制。利用 *tutou3* × IRAT129 杂交组合 F₂ 分离群体中的 856 个穗顶部退化极端个体, 将基因 *TUTOU3* 定位在了 4 号染色体长臂端的 29 kb 区间内, 测序研究发现, 区间内一个编码质膜 H⁺-ATP 酶基因 *LOC_Os04g56160* 的第 8 外显子存在 1 个 C → A 单碱基替换, 导致第 608 个氨基酸从丙氨酸突变为天冬氨酸。qRT-PCR 分析发现, *TUTOU3* 基因在水稻中呈组成型表达, 在突变体中该基因表达量下降。诱发穗顶部细胞程序性死亡的基因 *OsVPE2* 和 *OsVPE3* 在突变体 *tutou3* 中表达量极显著上升。对 *TUTOU3* 基因的深入研究将会揭示 H⁺-ATP 酶在穗顶部细胞的生长发育中的作用, 有助于深入阐明穗顶部退化在细胞水平上发生的机制。

关键词: 水稻; 顶部退化; 精细定位; H⁺-ATP 酶

Fine Mapping of Panicle Apical Abortion Mutant *tutou3* in Rice

XING Xin-xin, GUO Xiu-ping, LI Shuai, CHANG Yan-qi, XUN Zi-qi, ZHANG Xin

(Institute of Crop Sciences, Chinese Academy of Agricultural Sciences / National Key Facility for Crop Gene Resources and Genetic Improvement, Beijing 100081)

Abstract: Panicle apical abortion occurs frequently in rice production, which can affect grain number per panicle and when serious may lead to the reduction of grain yield. Although some rice panicle apical abortion genes such as *PAA1*, *PAA2*, and *TUT1* have been identified, their underlying molecular mechanism are still poorly understood. In this study, we report a gene mapping and cloning of a recessive PAA *tutou3* mutant in rice. The mutant had shorter plant height during vegetative development stage and serious panicle apical abortion at the later stage of panicle development, which resulted in significantly reduced grain number per panicle, panicle length and 1000-grain weight. Genetic analysis demonstrated that the phenotype of *tutou3* was determined by a single recessive gene. Using 856 individuals with serious panicle apical abortion in the F₂ segregating population derived from *tutou3* × IRAT129, *TUTOU3* locus was mapped in a 29 kb interval flanked by markers A-2 and A-17 on chromosome 4 containing 3 putative open reading frames (ORFs). Sequence analysis revealed a single nucleotide substitution of C to A at the eighth exon of *LOC_Os04g56160*, a plasma membrane H⁺-ATPase encoding gene, in *tutou3*, resulting in an amino acid change from alanine to aspartic acid. qRT-PCR analysis showed that *TUTOU3* gene was constitutively expressed in rice, and its expression level decreased in the mutants. The mRNA expression levels of *OsVPE2* and *OsVPE3*, which induce programmed cell death of apical panicle,

收稿日期: 2020-12-23 修回日期: 2021-01-14 网络出版日期: 2021-03-01

URL: <http://doi.org/10.13430/j.cnki.jpgr.20201223001>

第一作者研究方向为农艺与种业, E-mail: 1102652822@qq.com

通信作者: 张欣, 研究方向为水稻重要农艺性状基因克隆及遗传转化, E-mail: zhangxin02@caas.cn

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31871603); 转基因生物新品种培育重大专项 (2016ZX08010004)

Foundation projects: National Natural Science Foundation of China (31871603), Major Special Project for Breeding of New Genetically Modified Organisms (2016ZX08010004)

increased significantly in the degraded spikelets in *tutou3*. Further study of *TUTOU3* gene will reveal the role of H^+ -ATPase in the growth and development of panicle apical cells and help to elucidate the mechanism of panicle apical abortion at the cellular level.

Key words: rice; apical abortion; fine mapping; H^+ -ATPase

水稻 (*Oryza sativa* L.) 穗部性状是决定其产量的关键因素,直接影响到产量三要素中的穗粒数和千粒重性状。当水稻处于发育阶段时,顶部或基部小花往往会产生“开花前小花退化”(Pre-flowering floret abortion),导致小花干瘪、发白、变干,最终会造成穗长变短、穗粒数减少,严重影响单株产量^[12]。由于外部环境包括温度和水分等都能影响水稻穗部退化程度^[3-5],造成穗部退化性状的表型精准鉴定困难,因此对于其遗传和分子机理研究报道较少。

穗退化主要包括 2 种类型:穗基部退化和穗顶部退化。穗顶部退化现象在水稻育种生产中时有发生^[6]。水稻穗顶部退化大部分属于数量性状遗传,已经报道了很多 QTL 位点。徐华山等^[7]从粳稻品种日本晴为背景的籼稻品种 9311 片段置换系中检测到 5 个 QTL,其中贡献率最高的是位于 9 号染色体的 de-9 位点,贡献率达到 20%。高素伟等^[8]从一个穗顶部退化自然变异株 L-05261 中检测到了 5 个穗顶部退化 QTL,分布在 3、4、5、8 号染色体上。Cheng 等^[9]通过精细定位将位于 8 号染色体上的 QTL 位点 qAA8 进一步缩小到了物理距离 37 kb 的 RM22476 和 8-In112 两个标记之间, *qPAA8* 的表型受抽穗期和温度影响^[10]。

穗顶部退化突变体是研究穗顶部退化分子机理的理想材料。Bai 等^[11]报道了一个水稻穗顶部退化突变体 *tutou1* (*tut1*),该突变体表现出株高变矮、穗变短、穗顶端退化、花粉和花药发育异常, *TUT1* 基因编码一个 cAMP 类受体蛋白的一个抑制因子,对水稻穗发育及肌动蛋白组装具有重要作用。Zhu 等^[12]报道了 *TOTO2* 基因,该基因编码一个果胶酸裂解酶,它的突变体在穗顶部退化的同时,还会造成叶片衰老,严重影响了株型发育。Zafar 等^[13]报道了一个线粒体定位的基因 *DPS1*,其突变体表现出穗顶端退化、育性降低、花药变白变小和花粉粒变少。Peng 等^[14]报道了一个钙调磷酸酶蛋白互作激酶 *OsCIPK31*,其突变体穗顶部退化严重,穗粒数减少,千粒重降低,推测 *OsCIPK31* 与 MAPK 通路具有协同作用,导致应激反应中过量积累 ROS。孙小涵^[15]报道了一个水稻穗顶部退化突变体 *paa65*,突变体还表现出顶端枝梗退化、穗长结实率降低的

表型,与多种激素水平差异调控有关。Rao 等^[16]报道了一个穗顶部退化突变体 *es1*, *ES1* 基因是 *TUT1* 的等位基因,由于突变体气孔密度增加,苗期易失水导致突变体叶片边缘出现发白枯萎现象。李真等^[17]报道了一个中花 11 穗顶部退化突变体,并将突变基因定位在 2 号染色体上物理距离为 80 kb 的标记 L2-33 和 L2-50 之间,该区间内有 10 个基因,其中候选基因 *LOC_Os02g45100*、*LOC_Os02g45140*、*LOC_Os02g45160* 的表达水平显著提高。Heng 等^[18]报道了一个来自于粳稻品种 Kitaake 的组培突变体 *paa1*,该突变体在营养生长期与野生型无明显差异,在抽穗以后顶端小穗出现退化表型,通过图位克隆发现了候选基因 *OsALMT7*,该基因编码一个 ALMT 家族的苹果酸转运蛋白,突变体转运到穗顶端的苹果酸含量降低,活性氧 (ROS) 积累,造成细胞程序性死亡,产生穗顶部退化表型。

综上所述,穗顶部退化是由多个基因和外部环境相互作用产生的复杂性状,对其分子机制也尚不十分清楚,尚未建立其遗传网络,系统克隆穗顶部退化相关基因,并解析其机制,对于理解穗顶部退化的形成原因及其预防具有重要的意义。本试验的突变体材料表型与 Bai 等^[11]报道的 *tutou1* 和 Zhu 等^[12]报道的 *tutou2* 表型相似,因此将突变体命名为 *tutou3*。通过将突变体与穗顶部正常发育的 IRAT129 杂交,构建了遗传作图群体,利用图位克隆的方法定位到了目的基因 *TUTOU3*。初步结果表明,突变体中目的基因表达量下降,诱发细胞程序性死亡的基因 *OsVPE2* 和 *OsVPE3* 在退化小穗中表达量显著上升,这可能是导致穗顶部退化的原因。该突变体为深入研究控制水稻穗退化机理提供了材料,为进一步解析 *TUTOU3* 的分子机制奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料与性状调查

突变体材料 *tutou3* 来源于中花 11 的组织培养后代,主要表现为穗顶部颖花退化严重。以粳稻品种 IRAT129 作为母本、突变体 *tutou3* 作为父本进行杂交,构建基因定位群体,经过海南南繁加代后, F_2

遗传作图群体种植在中国农业科学院作物科学研究所顺义基地。成熟时,进行田间观察,各考察 10 株突变体和野生型植株的株高、分蘖数、每穗实粒数、一次枝梗数、二次枝梗数、结实率、千粒重等农艺性状,并利用 SPSS 19 软件进行 *t* 检验以分析差异显著性。

1.2 穗退化突变基因的精细定位及其候选基因分析

在田间取 F₂ 分离群体中共 856 个隐性(穗顶端退化)单株及 2 个亲本 IRAT129、*tutou3* 的叶片,用改良的 CTAB 法^[19-20]提取叶片全基因组 DNA。随机取 10 个 F₂ 隐性单株 DNA 构建混池,亲本(*tutou3* 和 IRAT129)作为对照,用实验室保存的均匀分布在 12 条染色体上的、且在双亲间具有多态性的 164 对 Indel 引物进行连锁分析。随后,随机

选取 34 个隐性单株,用于初定位。在 Gramene 网站(http://ensembl.gramene.org/genome_browser/index.html)下载粳稻日本晴和籼稻 9311 的基因组序列,在初定位区间内寻找 SNP/Indel 位点。用 Primer3.0 软件设计引物,在 2 个亲本中检测多态性。引物由上海英潍捷基贸易有限公司合成(表 1)。采用 10 μL 的 PCR 扩增体系,PCR 反应条件为 94 °C 预变性 5 min; 94 °C 变性 30 s, 58 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 30 s, 30 个循环; 72 °C 终延伸 7 min。扩增产物经非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳、银染后观察。利用 Rice Genome Browser(<http://rice.plantbiology.msu.edu/cgi-bin/gbrowse/rice/>)网站查找定位区间内的候选基因,候选基因测序由北京博迈德基因技术有限公司完成。

表 1 用于 *TUTOU3* 基因定位的多态性标记

Table1 Polymorphic markers for mapping *TUTOU3*

标记 Marker	正向序列 Forward sequence (5'-3')	反向序列 Reverse sequence (5'-3')
RJ4-15	CCGCTACTAATAGCAGAGAG	GGAGCTTTGTTCTTGCGAAC
A4-11	CGTGCCATAAAGGACCTGGGATA	AGAAACTTTCCCAATCAGTCTATCT
A-2	TAACAGTGCTCCGTGCCTTA	TTCAGGATGCAGGTCGTTTG
A-33	TCCAATGCGATGCTACTCCA	TGGAGACATCACGAGACCAC
A-17	ACATGCAAAGAACGAGGGGA	TGTCACGATAAAAGTTAACGGTGT
A-7	GAGGAGAAGAGCCCCGTG	CATGGCTTGCTCTTCAGGTG
4-34	GCCGACGGATTGTTTGAGAT	GAAAATCTCGTCAGCCACC

1.3 候选基因及细胞凋亡相关基因表达量分析

使用 TIANGEN 公司的植物总 RNA 提取试剂盒提取目标组织的 RNA。用北京宝日医生物技术有限公司的 PrimeScript II 1st Strand cDNA Synthesis Kit 试剂盒合成 cDNA。在 QuantPrime 网站([https://quantprime.mpimp-golm.mpg.de/?](https://quantprime.mpimp-golm.mpg.de/?page=home)

[page=home](https://quantprime.mpimp-golm.mpg.de/?page=home))设计定量扩增的引物(表 2)。使用 ChamQ SYBR qPCR Master Mix 试剂盒(南京诺唯赞公司)进行荧光定量 RCR,在 Applied Biosystems 7500 Real-time PCR 仪器上进行扩增,每个样品设 3 个重复,以水稻多聚泛素酶基因 *Ubiquitin* 作为内参。

表 2 qRT-PCR 所用引物

Table 2 Primers used for qRT-PCR

基因名称 Gene name	正向序列 Forward sequence (5'-3')	反向序列 Reverse sequence (5'-3')
<i>LOC_Os04g56160</i>	AAGTATGCTGAGCGTGGGCTTC	TCGACTTCTCAGGTACTTCCTGTG
<i>LOC_Os04g56170</i>	GAAGGGCGCAGGCGAATAAATC	TCTTGCTGCTACTTCCTGCTTTG
<i>LOC_Os04g56180</i>	ACAGAGCCATTGTCAAGCACGTG	CATTGCTGGCGAACAAGGAGTTG
<i>LOC_Os03g13170</i>	AACCAGCTGAGGCCCAAGA	ACGATTGATTAAACCAGTCCATGA
<i>OsVPE2</i>	CGGCTCCAACGGCTACTACAAC	TCGGGACCCAGCATAGACA
<i>OsVPE3</i>	CGGTAACACAGGCACCAGGC	GTGACTTCGTCTCCAGTGTAATCC
<i>Ubiquitin</i>	AACCAGCTGAGGCCCAAGA	ACGATTGATTAAACCAGTCCATGA

2 结果与分析

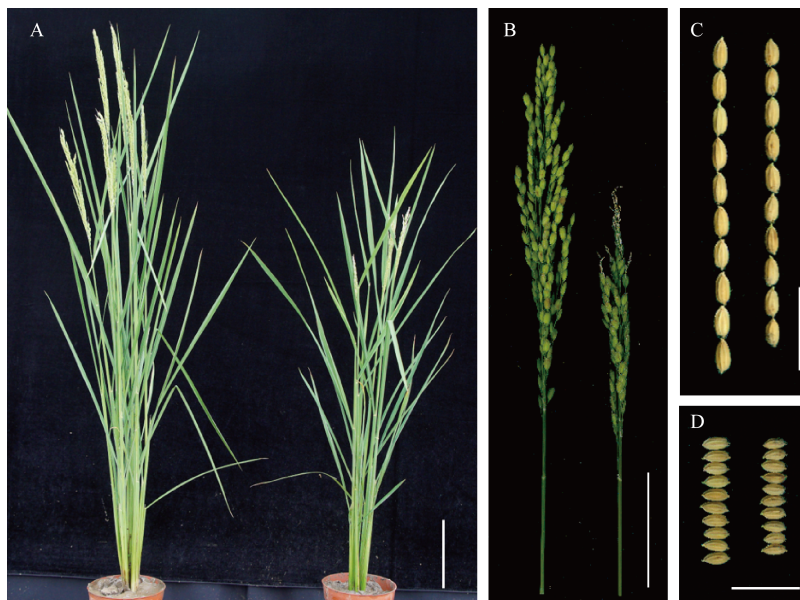
2.1 穗顶部退化突变体 *tutou3* 的表型分析

自然生长条件下,在幼穗发育早期,突变体穗部无明显顶部退化现象,幼穗伸长阶段后期,突变体顶部小穗逐渐退化,先是发白,继而萎缩、坏死直至最后脱落,籽粒成熟之后,顶部退化的的小穗几乎都完全脱落,最终导致株高、穗长、每穗粒数显著降低,籽粒

的外观也有变化,表现在长度、宽度、厚度都减少,千粒重降低(图1)。在北京与海南不同的季节、不同的生长环境,顶部穗退化表型都能够出现,说明该性状能够稳定遗传。

2.2 农艺性状调查

成熟时,分别调查野生型及突变体的农艺性状,结果如表3所示,*tutou3* 突变体与野生型相比,株高、分蘖数、每穗实粒数、千粒重均极显著减少。



A: 中花 11 (左) 与 *tutou3* (右) 抽穗后植株表型, 比例尺为 15 cm; B: 成熟期中花 11 (左) 与 *tutou3* (右) 穗表型, 比例尺为 5 cm; C: 中花 11 (左) 与 *tutou3* (右) 籽粒长度比较, 比例尺为 2 cm; D: 中花 11 (左) 与 *tutou3* (右) 的籽粒宽度比较, 比例尺为 2 cm
A: Phenotype of Zhonghua11 (left) and *tutou3* (right) plants after heading stage, bar = 15 cm, B: Phenotypic comparison of panicle apical abortion between Zhonghua11 (left) and *tutou3* (right) at the filling stage, bar = 5 cm, C: Grain length comparison of Zhonghua11 (left) and *tutou3* (right), bar = 2 cm, D: Grain width comparison of Zhonghua11 (left) and *tutou3* (right), bar = 2 cm

图 1 野生型 (中花 11) 和突变体 (*tutou3*) 的表型比较

Fig.1 Phenotypic comparison between wild type and mutant *tutou3*

表 3 野生型和突变体农艺性状比较

Table 3 Agronomic traits comparison between wild type and mutant

农艺性状 Agronomic trait	野生型 (中花 11) Wild type (Zhonghua 11)	突变体 (<i>tutou3</i>) Mutant (<i>tutou3</i>)
株高 (cm) Plant height	110.95 ± 1.81	93.15 ± 4.48**
分蘖数 Tiller number	9.65 ± 2.29	5.45 ± 1.20**
主穗长 (cm) Main panicle length	24.95 ± 0.71	15.78 ± 1.01**
一次枝梗数 Primary branch number	16.31 ± 0.99	13.20 ± 0.75**
二次枝梗数 Secondary branch number	50.46 ± 7.29	37.70 ± 2.86**
总小花数 Total number of spikelets	206.60 ± 52.20	198.40 ± 21.42
退化小花数 Total number of aborted spikelets	2.80 ± 1.53	86.60 ± 18.81**
每穗实粒数 Grain number per panicle	203.80 ± 51.75	111.80 ± 20.90**
结实率 (%) Seed setting rate	98.63 ± 0.01	56.40 ± 0.08**
粒长 (mm) Seed length	7.51 ± 0.25	6.83 ± 0.34**
粒宽 (mm) Seed width	3.32 ± 0.15	3.10 ± 0.21**
粒厚 (mm) Seed thickness	2.29 ± 0.09	2.08 ± 0.11**
千粒重 (g) 1000-grain weight	27.03 ± 0.54	20.78 ± 0.55**

所有的数值表示为平均值 ± 标准误 (n=10), *t* 测验, ** 表示在 $P<0.01$ 水平差异显著, 下同

All data are presented as mean ± SE (n=10), ** indicates significant difference at $P<0.01$, as determined by *t*-test, the same as below

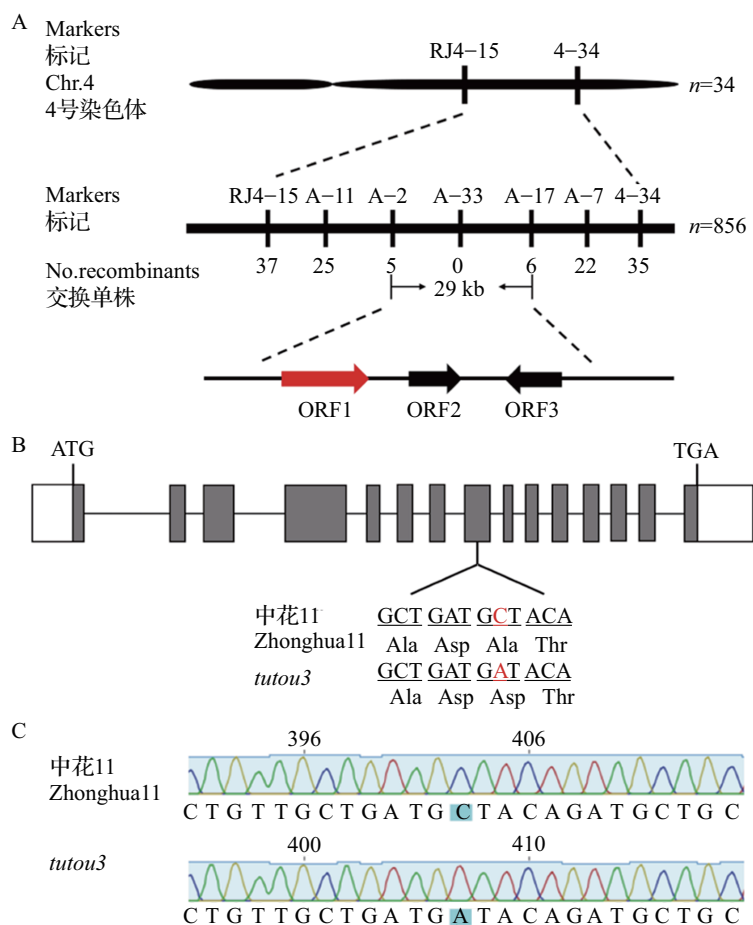
2.3 *tutou3* 的遗传分析

为研究穗顶部退化突变体的遗传方式, 将 *tutou3* 和穗部正常的 IRAT129 品种杂交, 后代分析表明, F_1 植株正常, 对 F_2 1294 个单株进行考察发现, 正常株为 983 株, 顶端退化株为 311 株, 经卡方 (χ^2) 测验 ($\chi^2=0.48$, $\chi^2_{0.05}=3.84$), 符合 3 (显性) : 1 (隐性) 的分离比, 所以穗顶部退化表型是受 1 对隐性基因控制的。

2.4 候选基因定位与克隆

选取 F_2 群体 10 个穗顶端退化单株构建 DNA

混池。用 164 对引物对 DNA 混池进行连锁分析, 利用 34 个取样单株将候选基因初步定位于 4 号染色体长臂末端上的 RJ4-15 和 4-34 两个标记之间约 1.2 Mb 的物理距离内。利用 gramene 网站 (<http://www.gramene.org/>) 进一步开发了位于这 2 个标记之间的 5 个新标记 A-11、A-7、A-2、A-33 和 A-17, 再利用 856 个穗退化单株进行连锁分析, 最终将候选基因 *TUTOU3* 定位在 A-2 和 A-17 之间物理距离为 29 kb 的区间, 其中与区间内的标记 A-33 完全连锁 (图 2)。



A: *TUTOU3* 基因精细定位在 A-2 和 A-17 标记间 29 kb 区间内, n 表示用于定位的穗顶部退化单株的数目, 横线上方标记表示用于精细定位的 Indel 标记, 下方表示该标记下的重组交换株数; B: *TUTOU3* 基因的结构图, 包含 14 个内含子和 15 个外显子; C: 中花 11 与 *tutou3* 测序结果

A: Fine mapping of *TUTOU3* flanked by markers A-2 and A-17 in chromosome 4 with a 29 kb interval, n represents the number of panicle apical abortion plants for the gene mapping, numerals above the line represent the Indel markers used for the gene mapping and the numerals below the line represent recombinants, B: A schematic representation of the *TUTOU3* gene, including 14 introns and 15 exons, C: Sequence comparison between Zhonghua11 and *tutou3*

图 2 *TUTOU3* 基因的精细定位

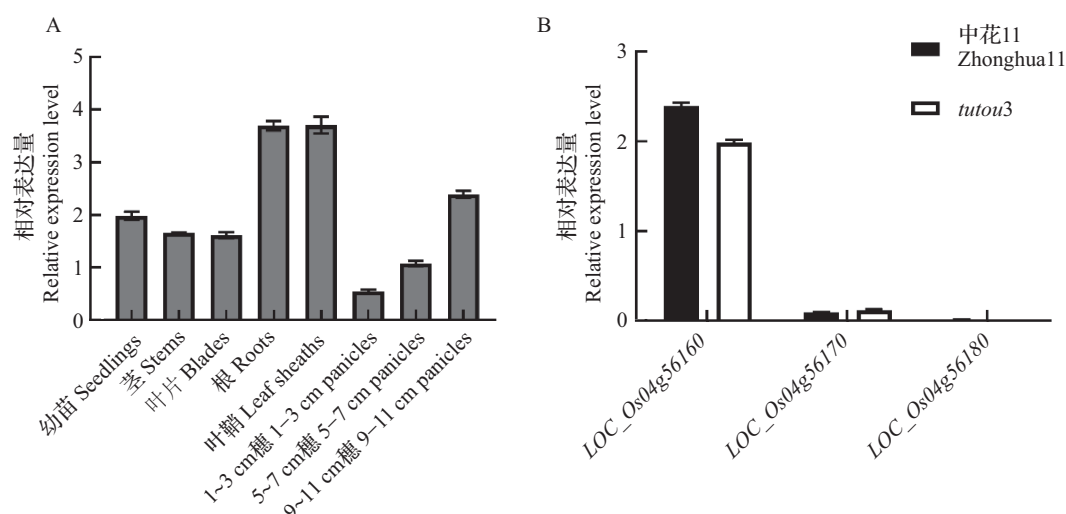
Fig.2 Fine mapping of *TUTOU3* gene

根据 Gramene 网站,该定位区间内包含 3 个开放阅读框,ORF1 编码一个质膜 H^+ -ATP 酶,ORF2 编码一个含有 SBP 结构域的蛋白,ORF3 编码一个过氧化物酶前体。测序结果表明,仅 ORF1 的第 8 个外显子上发生了一个 $C \rightarrow A$ 的突变,导致第 608 位氨基酸从丙氨酸突变为天冬氨酸,由于该基因之前被认为决定了突变体 *PAA-HWa* 的穗退化表型^[21],本研究初步认为突变体 *tutou3* 穗顶部退化的表型也是由该基因的突变引起的。

2.5 *TUTOU3* 基因的表达量分析

为了研究 *TUTOU3* 基因在调控水稻生长及调

节水稻穗顶端小花发育中发挥的作用,本研究取野生型中花 11 不同组织,对 *TUTOU3* 基因的表达量进行了分析,结果显示 *TUTOU3* 呈组成型表达,在水稻的根、茎、叶、叶鞘、幼穗等部位均表达(图 3A),*TUTOU3* 基因在幼穗中的表达量随幼穗伸长而增强。本研究同时比较了 *TUTOU3* 和定位区间其他 2 个基因的表达量发现,相对于 *TUTOU3*,另外 2 个基因的表达量极低,与野生型相比,突变体中 *TUTOU3* 的表达量极显著降低(图 3B),与一些基因突变造成表达量降低的趋势一致^[22],间接支持该基因为候选基因。



A: *TUTOU3* 基因在不同组织中的表达量; B: 候选基因的 qRT-PCR 检测; 数值表示为平均值 $\pm$ 标准误 ($n=3$), t 测验,下同

A: Relative expression levels of *TUTOU3* gene in different tissues, B: Relative expression levels of candidate genes tested

by qRT-PCR, data are presented as mean $\pm$ SE ($n=3$), t test, the same as below

图 3 *TUTOU3* 基因的表达量检测

Fig.3 Expression level of *TUTOU3*

2.6 水稻细胞凋亡相关基因表达量分析

过氧化氢的积累会造成程序性细胞死亡,在 *paal* 突变体研究中,穗顶部过氧化氢含量升高,诱导细胞程序性死亡,造成了穗顶部退化的表型^[18]。水稻中的 *OsVPE2* 和 *OsVPE3* 与动物中的 *Caspas-3* 基因类似,都能够被过氧化氢激活,然后诱发细胞凋亡^[23]。因此,*OsVPE2* 和 *OsVPE3* 的表达水平可以反应过氧化氢的积累程度。本研究对 *OsVPE2* 和 *OsVPE3* 基因的表达量检测表明,突变体 *tutou3* 中这 2 个基因的表达量明显上调(图 4),猜测突变体 *tutou3* 穗顶端小穗退化也可能是由于过氧化氢积累引发细胞程序性死亡造成的。

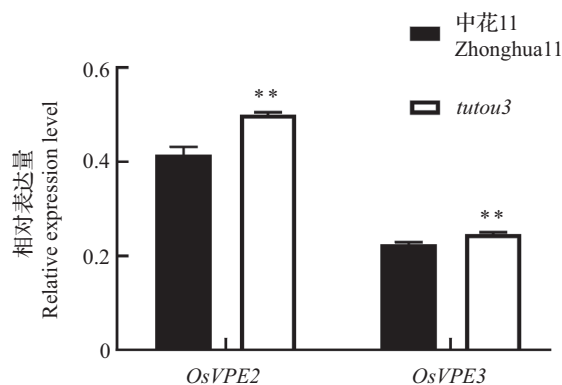


图 4 *OsVPE2* 和 *OsVPE3* 在幼穗中的表达量测定

Fig.4 Relative expression levels of *OsVPE2* and *OsVPE3* in young panicles

3 讨论

利用穗顶部退化突变体克隆相关基因,对于解析其分子机制,理解穗顶部退化的形成原因及其预防具有重要的意义。本研究报道了 1 个来自于粳稻品种中花 11 的组培突变体 *tutou3*,突变体穗顶部严重退化,穗长、一次枝梗数、二次枝梗数、每穗实粒数、千粒重均降低,产量受到严重影响。在穗发育早期,突变体穗顶部退化表型并不明显,但在抽穗期之后,穗顶部颖花退化逐渐明显。对与细胞程序性坏死的标志基因 *OsVPE2* 和 *OsVPE3* 的表达量检测结果表明,突变体这 2 个基因的表达量都上调,猜测 *tutou3* 的穗顶部退化也可能与细胞程序性死亡有关,后续研究还需要进一步测量穗中 H_2O_2 的含量。对杂交组合 *tutou3* × IRAT129 的 F_2 遗传群体分析表明,该表型是 1 个单基因隐性突变引起的,在连锁分析的基础上,将基因定位在了 4 号染色体长臂端的 A-2 和 A-17 两个分子标记之间,遗传距离为 29 kb,区间内基因 *LOC_Os04g56160* 第 8 个外显子上存在 1 个 C → A 单碱基的替换,导致第 608 个氨基酸从丙氨酸突变为天冬氨酸。表达量分析也发现,该基因在各部位均有表达,在幼穗上的表达量也相对较高,突变体的表达量相对下调。该基因编码 1 个组成型表达的质膜 H^+ -ATP 酶,是之前报道的穗顶部退化决定基因 *PAA-HWa* 的等位基因^[21],*PAA-HWa* 表型也与本研究的突变体 *tutou3* 相似,但只定位到了 *LOC_Os04g56160* 基因,未进行功能研究。

Toda 等^[24]报道 *LOC_Os04g56160* (*OSA7*) 与气孔的运动有关。*OSA7* 参与气孔的调节,在保卫细胞中大量表达,蓝光能够诱导 *OSA7* 的倒数第 2 个苏氨酸的磷酸化促进气孔开放,其突变体 (TOS17 Line NE1507) 会导致蓝光诱导的气孔开放受损,表现出严重的生长缺陷,生殖期之前即枯萎死亡。*ESI* 基因是 *TUTOU1* 基因的等位基因^[11],*esi1* 突变体气孔密度更大,蜡质层和叶毛也严重降解,造成水分流失,引起干旱胁迫,进而影响植株的光合能力、呼吸作用,进而引起穗顶部退化的表型。本研究推测 *tutou3* 突变体穗顶部退化表型产生的原因可能与 *esi1* 类似,会在接下来开展相关的研究。

质膜 H^+ -ATP 酶在真菌及植物的膜系统中广泛存在,在植物中 H^+ -ATP 酶将质子从细胞内释放到细胞外,增强膜电位和 pH 梯度,在营养物质的摄取^[25-26]、气孔开放^[27]、生长素极性转运和细胞生长起作用^[28]。位于细胞膜上的 H^+ -ATP 酶介导的 H^+

释放到质外体能够使细胞壁酸化,这对根系伸长至关重要^[29-30]。拟南芥中共有 11 种 H^+ -ATP 酶亚型, *AHA4* 有助于溶质通过内皮层的运输^[31];保卫细胞中的 *AHA1* 在拟南芥蓝光依赖性气孔开放中起重要作用^[32]; *AHA10* 与种子的发育有关,其突变体的种子为黄色,可能是影响了花青素存储液泡的成熟^[33]。

水稻质膜 H^+ -ATP 酶家族有 10 个成员,分别是 *OSHA1*~*OSHA10*。除去 *OSHA10*,其他成员都具有 C 端的自抑制域。调控 *OSHA3* 基因的表达和剪接调控水稻孢子的发育^[34]。*OSHA2* 基因可能与光敏色素有关,与野生型相比,在长日照和短日照条件下突变体均对光周期不敏感^[35]; *OSHA1* 的突变体会削弱水稻吸收养分的能力并减少其分枝,过表达该基因能增强水稻根系对磷酸盐的摄取^[36]; Zhang 等^[37]发现水稻中 H^+ -ATP 酶在植株遭遇酸雨时活性增强,能够促进根系对铵的吸收;其他的研究发现,白羽扇豆 *LHA1* 基因能够通过激活 H^+ -ATP 酶提高植株对缺磷环境的适应能力^[38];在拟南芥中过表达小麦 H^+ -ATP 酶 TaHMA2 会增强拟南芥对 Zn^{2+} 和 Cd^{2+} 的耐受性,促进 Zn^{2+} 和 Cd^{2+} 由根向茎的转运,增加植株的根长和鲜重^[39-40]。但是,目前还没有质膜 H^+ -ATP 酶调控穗顶端发育分子机制方面的报道,穗顶部退化突变体 *tutou3* 的基因精细定位为接下来深入开展该基因的功能研究奠定基础,有助于揭示 H^+ -ATP 酶在穗顶部细胞的生长发育中的作用,解析穗顶部退化在细胞水平上的发生机制。

参考文献

- [1] 宋玥,李飞,王君瑞,乔卫华,王新华,徐志健,吕树伟,汤翠凤,王记林,刘文强,朱业宝,郑晓明,杨庆文. 中国普通野生稻重要农艺性状的遗传多样性研究. 植物遗传资源学报, 2020, 21 (6): 1512-1520
- [2] Song Y, Li F, Wang J R, Qiao W H, Wang X H, Xu Z J, Lv S W, Tang C F, Wang J L, Liu W Q, Zhu Y B, Zheng X M, Yang Q W. Genetic diversity analysis of important agronomic traits of common wild rice germplasm accessions collected from China. Journal of Plant Genetic Resources, 2020, 21 (6): 1512-1520
- [3] Wu C, Cui K H, Wang W C, Li Q, Shah F, Hu Q Q, Huang J L, Nie L X, Mohapatra P K, Peng S B. Heat-induced cytokinin transportation and degradation are associated with reduced panicle cytokinin expression and fewer spikelets per panicle in rice. Frontiers in Plant Science, 2017, 8: 371-386
- [4] Wei H, Chen C, Ma X, Zhang Y, Han J, Mei H, Yu S. Comparative analysis of expression profiles of panicle development among tolerant and sensitive rice in response to drought stress. Frontiers in Plant Science, 2017, 8: 437-447
- [5] Lin G, Yang Y, Chen X, Yu X, Wu Y, Xiong F. Effects of high

- temperature during two growth stages on caryopsis development and physicochemical properties of starch in rice. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2020, 145: 301-310
- [5] 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
Jiang S K, Zhang X J, Wang J Y, Zhang F M. Research advancement on development of young panicle and spikelet in rice (*Oryza sativa* L.). *Journal of Plant Genetic Resources*, 2012, 13(6): 1018-1022
- [6] 倪浩凌, 吴文诗, 颜艳敏, 方亦圆, 王嘉茜, 陈碧湖, 李芷怡, 唐晓艳, 吴建新. 水稻穗发芽突变体的筛选及候选基因鉴定. *植物遗传资源学报*, 2020, 21(5): 1214-1220
Ni H L, Wu W S, Yan Y M, Fang Y Y, Wang J Y, Chen B H, Li Z Y, Tang X Y, Wu J X. Screening and gene mapping of pre-harvest sprouting mutants in rice. *Journal of Plant Genetic Resources*, 2020, 21(5): 1214-1220
- [7] 徐华山, 孙永建, 周红菊, 余四斌. 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(6): 979-986
Xu H S, Sun Y J, Zhou H J, Yu S B. Development and characterization of contiguous segment substitution lines with background of an elite restorer line. *Acta Agronomica Sinica*, 2007, 33(6): 979-986
- [8] 高素伟, 张玲, 毛毕刚, 王久林, 程治军, 万建民. 水稻穗顶部退化突变体 *L-05261* 的遗传分析. *作物学报*, 2011, 37(11): 1935-1941
Gao S W, Zhang L, Mao B G, Wang J L, Cheng Z J, Wan J M. Genetic analysis of rice mutant *L-05261* with panicle apical abortion trait. *Acta Agronomica Sinica*, 2011, 37(11): 1935-1941
- [9] Cheng Z J, Mao B G, Gao S W, Zhang L, Wang J L, Lei C L, Zhang X, Wu F Q, Guo X P, Wan J M. Fine mapping of *qPAA8*, a gene controlling panicle apical development in rice. *Journal of Integrative Plant Biology*, 2011, 53(9): 710-718
- [10] Smirnov N, Arnaud D. Hydrogen peroxide metabolism and functions in plants. *New Phytologist*, 2019, 221(3): 1197-1214
- [11] Bai J T, Zhu X D, Wang Q, Zhang J, Chen H Q, Dong G J, Zhu L, Zheng H K, Xie Q J, Nian J Q, Chen F, Fu Y, Qian Q, Zuo J R. Rice *TUTO1* encodes a suppressor of cAMP receptor-like protein that is important for actin organization and panicle development. *Plant Physiology*, 2015, 169(2): 1179-1191
- [12] Zhu Z C, Luo S, Lei B, Li X Y, Cheng Z J. A locus *TUTO2*, determines the panicle apical abortion phenotype of rice (*Oryza sativa* L.) in *tuto2* mutant. *Journal of Integrative Agriculture*, 2020, 19: 2-11
- [13] Zafar S A, Patil S B, Uzair M, Fang J J, Zhao J F, Guo T T, Yuan S J, Uzair M, Luo Q, Shi J X, Schreiber L, Li X Y. *DEGENERATED PANICLE AND PARTIAL STERILITY 1* (*DPS1*) encodes a cystathionine β -synthase domain containing protein required for anther cuticle and panicle development in rice. *New Phytologist*, 2020, 225(1): 356-375
- [14] Peng Y B, Hou F X, Bai Q, Xu P Z, Liao Y X, Zhang H Y, Gu C J, Deng X S, Wu T K, Chen X Q, Ali A, Wu X J. Rice calcineurin B-like protein-interacting protein kinase 31 (*OsCIPK31*) is involved in the development of panicle apical spikelets. *Frontiers in Plant Science*, 2018, 9: 1661-1680
- [15] 孙小涵. 水稻穗顶端退化突变体 *paa65* 的表型鉴定和基因定位. 成都: 四川农业大学, 2019
Sun X H. Phenotype identification and gene mapping of *paa65* in rice. Chengdu: Sichuan Agriculture University, 2019
- [16] Rao Y C, Yang Y L, Xu J, Li X J, Leng Y J, Dai L P, Huang L C, Shao G S, Ren D Y, Hu J, Guo L B, Pan J W, Zeng D L. *EARLY SENESCENCE1* encodes a SCAR-LIKE PROTEIN2 that affects water loss in rice. *Plant Physiology*, 2015, 169(2): 1225-1239
- [17] 李真, 毛毕刚, 衡月芹, 王久林, 程治军, 万建民. 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(5): 1023-1027
Li Z, Mao B G, Heng Y Q, Wang J L, Cheng Z J, Wan J M. Fine mapping of the panicle apical abortion *PAA2* in rice (*Oryza sativa*). *Journal of Plant Genetic Resources*, 2014, 15(5): 1023-1027
- [18] Heng Y Q, Wu C Y, Long Y, Luo S, Ma J, Chen J, Liu J F, Zhang H, Ren Y L, Wang M, Tan J J, Zhu S S, Wang J L, Lei C L, Zhang X, Guo X P, Wang H Y, Cheng Z J, Wan J M. *OsALMT7* maintains panicle size and grain yield in rice by mediating malate transport. *Plant Cell*, 2018, 30(4): 889-906
- [19] Murray M G, Thompson W F. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Research*, 1980, 8(19): 4321-4325
- [20] 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. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1991, 88(21): 9828-9832
- [21] Akter M B, Piao R H, Kim B, Lee Y, Koh E, Koh H J. Fine mapping and candidate gene analysis of a new mutant gene for panicle apical abortion in rice. *Euphytica*, 2014, 197(3): 387-398
- [22] Ma X F, Cheng Z J, Qin R Z, Qiu Y, Heng Y Q, Yang H, Ren Y L, Wang X L, Bi J C, Ma X D, Zhang X, Wang J L, Lei C L, Guo X P, Wang J, Wu F Q, Jiang L, Wang H Y, Wang J M. *OsARG* encodes an arginase that plays critical roles in panicle development and grain production in rice. *The Plant Journal*, 2013, 73(2): 190-200
- [23] Deng M J, Bian H W, Xie Y K, Kim Y H, Wang W Z, Lin E P, Zeng Z H, Guo F, Pan J W, Han N, Wang J H, Qian Q, Zhu M Y. *Bcl-2* suppresses hydrogen peroxide-induced programmed cell death via *OsVPE2* and *OsVPE3*, but not via *OsVPE1* and *OsVPE4*, in rice. *The FEBS Journal*, 2011, 278(24): 4797-4810
- [24] Toda Y, Wang Y, Takahashi A, Kawai Y, Tada Y, Yamaji N, Ma J F, Ashikari M, Kinoshita T. *Oryza sativa* H^+ -ATPase (*OSA*) is involved in the regulation of dumbbell-shaped guard cells of rice. *Plant and Cell Physiology*, 2016, 57(6): 1220-1230
- [25] Palmgren M G. Plant Plasma Membrane H^+ -ATPases: powerhouses for nutrient uptake. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 2001, 52: 817-845
- [26] Krajinski F, Courty P E, Sieh D, Franken P, Zhang H Q, Bucher M, Gerlach N, Kryvoruchko I, Zoeller D, Udvardi M, Hause B. The H^+ -ATPase *HA1* of *Medicago truncatula* is essential

- for phosphate transport and plant growth during arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Plant Cell*, 2014, 26 (4): 1808-1817
- [27] Wang Y, Noguchi K, Ono N, Inoue S, Terashima I, Kinoshita T. Overexpression of plasma membrane H^+ -ATPase in guard cells promotes light-induced stomatal opening and enhances plant growth. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2014, 111 (1): 533-538
- [28] Rober-Kleber N, Albrechtová J T, Fleig S, Huck N, Michalke W, Wagner E, Speth V, Neuhaus G, Fischer-Iglesias C. Plasma membrane H^+ -ATPase is involved in auxin-mediated cell elongation during wheat embryo development. *Plant Physiology*, 2003, 131 (3): 1302-1312
- [29] Bacete L, Mélida H, Miedes E, Molina A. Plant cell wall-mediated immunity: cell wall changes trigger disease resistance responses. *The Plant Journal*, 2018, 93 (4): 614-636
- [30] Sánchez-Rodríguez C, Rubio-Somoza I, Sibout R, Persson S. Phytohormones and the cell wall in *Arabidopsis* during seedling growth. *Trends in Plant Science*, 2010, 15 (5): 291-301
- [31] Vitart V, Baxter I, Doerner P, Harper J F. Evidence for a role in growth and salt resistance of a plasma membrane H^+ -ATPase in the root endodermis. *The Plant Journal*, 2001, 27 (3): 191-201
- [32] Yamauchi S, Takemiya A, Sakamoto T, Kurata T, Tsutsumi T, Kinoshita T, Shimazaki K I. The plasma membrane H^+ -ATPase AHA1 plays a major role in stomatal opening in response to blue light. *Plant Physiology*, 2016, 171 (4): 2731-2743
- [33] Appelhagen I, Nordholt N, Seidel T, Spelt K, Koes R, Quattrocchio F, Sagasser M, Weisshaar B. TRANSPARENT TESTA 13 is a tonoplast P_{3A} -ATPase required for vacuolar deposition of proanthocyanidins in *Arabidopsis thaliana* seeds. *The Plant Journal*, 2015, 82 (5): 840-849
- [34] Zhang F, Zhang Y C, Liao J Y, Yu Y, Zhou Y F, Feng Y Z, Yang Y W, Lei M Q, Bai M, Wu H, Chen Y Q. The subunit of RNA N6-methyladenosine methyltransferase OsFIP regulates early degeneration of microspores in rice. *PLoS Genetics*, 2019, 15 (5): e1008120
- [35] Reig-Valiente J L, Borredá C, Talón M, Domingo C. The *G123* rice mutant, carrying a mutation in *SE13*, presents alterations in the expression patterns of photosynthetic and major flowering regulatory genes. *PLoS ONE*, 2020, 15 (5): e0233120
- [36] Wang E, Yu N, Bano S A, Liu C, Miller A J, Cousins D, Zhang X, Ratet P, Tadege M, Mysore K S, Downie J A, Murray J D, Oldroyd G E, Schultze M. A H^+ -ATPase that energizes nutrient uptake during mycorrhizal symbioses in rice and *Medicago truncatula*. *Plant Cell*, 2014, 26 (4): 1818-1830
- [37] Zhang B J, Bu J J, Liang C J. Regulation of nitrogen and phosphorus absorption by plasma membrane H^+ -ATPase in rice roots under simulated acid rain. *International Journal of Environmental Science and Technology*, 2017, 14 (1): 101-112
- [38] Stein S, Faust F, Jung S, Schubert S. Expression of plasma membrane H^+ -ATPase in cluster roots of white lupin under phosphorus deficiency. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, 2019, 182 (6): 867-870
- [39] Qiao K, Gong L, Tian Y B, Wang H, Chai T Y. The metal-binding domain of wheat heavy metal ATPase 2 (TaHMA2) is involved in zinc/cadmium tolerance and translocation in *Arabidopsis*. *Plant Cell Reports*, 2018, 37 (9): 1343-1352
- [40] Baxter I R, Young J C, Armstrong G, Foster N, Bogenschutz N, Cordova T, Peer W A, Hazen S P, Murphy A S, Harper J F. A plasma membrane H^+ -ATPase is required for the formation of proanthocyanidins in the seed coat endothelium of *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2005, 102 (7): 2649-2654