

水稻穗发芽突变体的筛选及候选基因鉴定

倪浩凌, 吴文诗, 颜艳敏, 方亦圆, 王嘉茵, 陈碧湖, 李芷怡, 唐晓艳, 吴建新

(华南师范大学生命科学学院 / 广东省植物发育生物工程重点实验室, 广州 510631)

摘要: 水稻穗发芽是一种多发性的自然灾害, 给水稻生产造成了严重的经济损失。由于穗发芽机制还不清楚, 如何培育抗穗发芽的水稻品种, 已成为世界性的难题。本研究利用水稻甲基磺酸乙酯诱变突变体库, 通过田间筛选, 获得 9 个水稻穗发芽突变体。并对其中 2 个突变体进行研究, 利用基于基因组重测序的 SIMM 方法和高分辨率溶解曲线分析技术, 分别获得其穗发芽候选基因 LOC_Os03g08570 和 LOC_Os07g10490。LOC_Os03g08570 编码一个八氢番茄红素脱氢酶, LOC_Os07g10490 编码一个 ζ -胡萝卜素脱氢酶, 它们都参与脱落酸前体类胡萝卜素的合成。本研究的结果进一步证明类胡萝卜素的合成在水稻休眠中的关键作用。同时, 本研究获得的这些穗发芽突变体为后续深入研究水稻穗发芽的分子机制及开展分子设计育种提供了宝贵材料。

关键词: 水稻; 休眠; 穗发芽; 基因定位

Screening and Gene Mapping of Pre-harvest Sprouting Mutants in Rice

NI Hao-ling, WU Wen-shi, YAN Yan-min, FANG Yi-yuan, WANG Jia-yin,

CHEN Bi-hu, LI Zhi-yi, TANG Xiao-yan, WU Jian-xin

(School of Life Sciences, South China Normal University/ Guangdong Provincial Key

Laboratory of Biotechnology for Plant Development, Guangzhou 510631)

Abstract: Pre-harvest sprouting (PHS) is a frequently-occurring disaster that results in a serious economic loss in rice production. Breeding for PHS-resistant rice varieties has limited worldwide due to the mechanism of PHS that remains unclear. Here, nine independent mutants conferring PHS were identified by screening of an Ethyl methylsulfone mutant library, and two of them were subjected for further study. By taking use of whole genome resequencing, SIMM method and HRM technology, two PHS mutant genes (LOC_Os03g08570 and LOC_Os07g10490) were molecularly cloned. LOC_Os03g08570 codes a phytoene desaturase, and LOC_Os07g10490 codes a ζ -carotene desaturase. Both were reported to be involved in the biosynthesis of carotenoid as the precursor of ABA. In summary, our data highlights the critical role of carotenoid that participates in rice dormancy. Further studies of these PHS mutants would allow revealing the mechanism of PHS and breeding for PHS-resistant rice varieties.

Key words: rice; dormancy; pre-harvest sprouting; gene mapping

谷物种子在收获前, 遇到高温多雨季节, 在穗上萌发的现象称为穗发芽。穗发芽在水稻、小麦、大麦和玉米等谷类作物中多有发生。穗发芽不仅会影响

谷物的产量, 同时也会影响谷物的质量, 造成巨大的经济损失。水稻穗发芽在我国大部分产区都有不同程度的发生。仅在华南地区, 每年约有 6% 常规稻

收稿日期: 2020-01-09 修回日期: 2020-02-07 网络出版日期: 2020-05-19

URL: <http://doi.org/10.13430/j.cnki.jpgr.20200109002>

第一作者研究方向为水稻穗发芽的分子机制, E-mail: nihaoling@outlook.com

通信作者: 吴建新, 研究方向为水稻重要农艺性状形成的分子机制, E-mail: wjxin@m.scnu.edu.cn

基金项目: 广东省自然科学基金 (2017A030313104); 福建省自然科学基金 (2017J01427)

Foundation projects: Natural Science Foundation of Guangdong Province (2017A030313104), Natural Science Foundation of Fujian Province (2017J01427)

种植区和 20% 杂交稻种植区会出现严重的穗发芽。水稻穗发芽不仅会严重影响稻米的产量,同时也会影响稻米的品质,造成重大的经济损失^[1-2]。

水稻的穗发芽是一个复杂的生理过程,受多种因素影响,包括水稻穗部和籽粒的结构、种子含水量、淀粉酶活性、内源激素含量、环境因素等^[3]。水稻穗粒的密度、蜡质状态、绒毛的有无、颖壳的形状、坚韧度、包裹籽粒紧实度对穗发芽的发生均有不同程度的影响。不易穗发芽的品种,颖壳背面茸毛少,细胞排列紧密,细胞间隙较小,孔洞小,不利于种子透水、透气^[4]。成熟脱水是种子发育成熟的后期事件,易穗发芽的水稻品种,种子在后期不能进行正常的脱水干燥,成熟的种胚处在较高的含水量水平,当外界温度合适时,就容易萌发。在水稻种子萌发的过程中,淀粉酶水解淀粉为种子萌发提供能量来源。水稻种子中的 α -淀粉酶活性与穗发芽率具有极显著的正相关关系, α -淀粉酶活性高的种子更易发生穗发芽^[5]。种子中的内源激素影响种子的萌发。赤霉素(GA, gibberellic acid)和脱落酸(ABA, abscisic acid)是影响种子萌发的主要激素。GA 能够解除种子的休眠,促进种子萌发;而 ABA 作用则相反,它能够促进种子休眠,抑制种子萌发^[6]。环境因素是引起穗发芽的外部条件。温度会影响种子内贮藏物质的代谢和分解,内源激素的含量,以及对内源激素的敏感性等,从而影响种子的休眠。潮湿气候使水稻一直处在高湿环境,种子内含水量增加,促进种子萌发,易引起穗发芽^[7-8]。

近年来,通过对水稻突变体的研究,陆续克隆到了一些影响水稻穗发芽的基因。Agrawal 等^[9]通过筛选水稻 *Tos17* 插入突变体库,获得了水稻中玉米黄质环氧酶(ZEP, zeaxanthin epoxidase)的突变体,ZEP 是 ABA 合成途径中重要的酶,其将玉米黄质变为紫黄质,突变后植物体内 ABA 含量减少,从而导致穗发芽。Fang 等^[10]在 2008 年报道了类胡萝卜素(ABA 合成前体)的合成缺陷导致水稻穗发芽,并伴随着纯合突变体白化的表型。其在 T-DNA 插入突变体库筛选出一系列的穗发芽突变体,其中有八氢番茄红素脱氢酶(OsPDS, phytoene desaturase)、 ζ -胡萝卜素脱氢酶(OsZDS, ζ -carotene desaturase)、类胡萝卜素异构酶(OsCRTISO, carotenoid isomerase)和番茄红素 β -环化酶(β -OsLCY, lycopene β -cyclase)的突变,导致类胡萝卜素合成受阻,植株内 ABA 合成量减少,减弱了植株休眠,从而导致穗发芽。在

ABA 合成中,钼辅因子在催化黄质醛转化为 ABA 醛的过程中发挥作用,最新研究表明 MoCo 合成基因 *OsCNX1* 和 *OsCNX6* 的突变,使得植株内 ABA 含量减少,削弱了 ABA 反应,最终导致了穗发芽及纯合致死^[11]。最近研究发现一个谷氧还蛋白 PHS9 参与水稻休眠过程,其与一个脱落酸受体互作蛋白 OsGAP 相互作用,参与调控 ROS 稳态,并负调控 ABA 信号通路^[12]。水稻异淀粉酶(ISA1)是能够将葡萄糖转变成支链淀粉的一个酶,最新研究表明 *ISA1* 的突变会导致胚乳中小分子糖的积累,从而抑制 ABA 信号通路中两个重要转录因子 *OsABI3* 和 *OsABI5* 的表达,阻碍了 ABA 信号的转导,最终导致穗发芽表型^[2]。通过构建籼稻(Kasalath)与粳稻(Nipponbare)的近等基因系,发现了影响水稻休眠的 *Sdr-4* 基因,Kasalath 品种中的 *Sdr4-k* 等位基因比 Nipponbare 中的 *Sdr4-n* 赋予水稻更强的休眠特性。*Sdr4* 受 *OsABI3* 正向调控,并正向调控下游 3 个 *OsDOG1-like* 基因的表达,从而调控水稻休眠^[13]。最新研究表明 miR156 参与到调控赤霉素合成与信号途径,从而影响种子休眠。miR156 调控谷物作物的株型以及种子的粒型,miR156 分为两类,其中 II 类的突变增强种子的休眠,抑制穗发芽,但对植株株型、种子粒型和产量没有影响。II 类 miR156 的突变导致其对靶基因 *Ideal Plant Architecture 1 (IPAI)* 抑制解除,从而使得 *IPAI* 能够调控赤霉素合成与信号途径的一系列基因的表达,减少了赤霉素的含量,增强了种子的休眠^[14]。通过对水稻穗发芽突变体的研究,人们对穗发芽现象的机制有了一定的了解,但是对其具体的分子机制还不是很清楚。

为了进一步阐明水稻穗发芽的分子机制,本研究利用前期已经构建好的水稻 EMS 突变体库;利用广东初夏高温高湿的气候特点,在田间筛选获得 9 个水稻穗发芽突变体;对其中两个突变体进行 SIMM 分析,结合基因型表型连锁分析,获得它们的突变候选基因,其中一个基因编码 ζ -胡萝卜素脱氢酶,另一个基因编码八氢番茄红素脱氢酶。本研究不仅揭示了 ABA 合成途径的关键基因在水稻穗发芽中的重要功能,同时筛选获得的多个穗发芽突变体也为后续深入研究水稻穗发芽的分子机制奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

水稻优质品种黄华占以及基于黄华占构建的 EMS 诱变突变体库^[15]。

1.2 穗发芽突变体的筛选

在 2018 年 3 月中旬,将 M_2 突变体种子种植于深圳光明试验基地,并在 7 月初到田间观察穗发芽表型。对出现穗发芽的植株,分析表型并单株收种。

1.3 穗发芽表型的验证

将野生型和水稻突变体的黄熟期的穗子从植株上取下后随即置于底部铺有湿润滤纸的发芽盒中,28 °C,12 h 光照 (6000 lux) / 12 h 黑暗培养,定期观察种子萌发情况,并在处理 48 h 后统计种子萌发率。

1.4 SIMM 定位候选基因

利用单株收种的穗萌突变体株系,种植 96 株的群体,作为测序群体。将 M_2 突变体恒温高湿处理 48 h 后,取最先萌发出的 30 株幼苗叶片,等量混合后提取 DNA,送至诺禾致源进行基因组高通量重测序。测序数据使用 SIMM v1.0 进行突变基因的确定。分析过程中依次使用了 SIMM 的 soap、soapsnp、genotype 和 identify 4 个功能模块,其中 soap、genotype 模块均使用了默认参数;soapsnp 模块除 -q 调整为 0, -m 调整为 3,其他均为默认参数;identify 模块除 -depth 调整为 10,其他均为默认参数。得到的候选位点使用高分辨率溶解曲线分析在分离群体中进行验证,最终确定突变基因^[16]。

1.5 基因型表型连锁分析

将 M_2 穗发芽杂合突变体的种子即 M_3 播种于大田,待黄熟期时,将穗子取下,置于底部铺有湿润滤纸的发芽盒中,28 °C 培养,观察记录穗发芽情况。将 M_3 的植株提取 DNA,利用高分辨率溶解曲线 (HRM, High resolution melting analysis)^[17] 对每一株进行基因分型。具体操作过程如下。

引物设计:在基因突变位点的上下游设计引物,扩增长度为 80~100 bp 之间。

DNA 提取:参照 CTAB 法提取植株的 DNA。

PCR 扩增条件:DNA 1 μ L; 10 $\times$ PCR buffer 1 μ L; 2 mmol/L dNTP 0.1 μ L; 10 μ mol/L 引物 F 和 R 各 0.1 μ L; rTaq 0.1 μ L; EvaGreen 0.1 μ L; ddH₂O 7.5 μ L; 总体积 10 μ L。PCR 条件:95 °C 预变性 3 min; 95 °C 变性 30 s, 55 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 10 s, 40 个循环; 72 °C 延伸 2 min, 98 °C 3 min。

在 bio-rad Blackwell 96 孔板中加入 1 μ L HRM 低温内标,随后将 PCR 产物加入其中,离心,上机分析。

本实验中用于分析 *hzm00148* 基因型的引物为 5' -GATGAGTTATCCATGCAGTGC-3' 和 5' -CACACATGACCATAGAGCAACA-3' ; 用于分析 *hzm03804* 基因型的引物为 5' -CATTGCAAATAATGAAGCGTG-3' 和 5' -CTGAAGTGAGTTTTGAAAGAT-3'。

2 结果与分析

2.1 穗发芽突变体的筛选及验证

通过对总计 2 万多个独立的 M_2 突变体株系进行大田观察,发现 9 个具有穗发芽表型的突变体。其中,有两个编号分别为 *hzm00148* 和 *hzm03804* 的突变体穗发芽后的幼苗发生白化现象。为了验证穗发芽的表型,我们将野生型黄华占、*hzm00148* 和 *hzm03804* 杂合突变体的穗子放在湿润的发芽盒中,恒温高湿培养,在 48 h 后统计种子萌发情况,并在处理 72 h 后拍照 (图 1)。与田间观察的结果一致,当野生型种子还没有萌发的时候,*hzm00148* 和

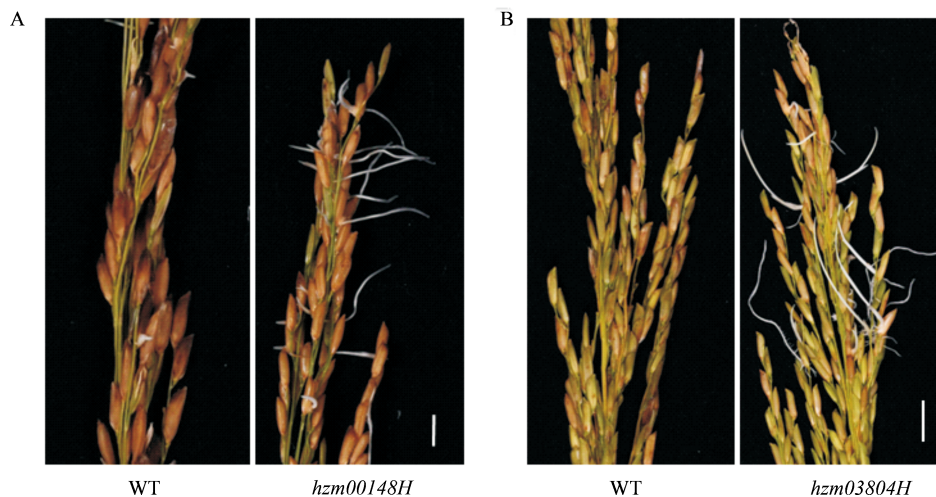


图 1 WT, *hzm00148H* 和 *hzm03804H* 的穗发芽表型

Fig. 1 The pre-harvest sprouting phenotype of WT, *hzm00148H* and *hzm03804H*

hzm03804 杂合突变体的穗子出现部分种子萌发, 且萌发率接近 25%, 符合卡方分布 ($\chi^2_{0.05, 1}=3.84$) (表 1), 说明 *hzm03804* 和 *hzm00148* 的表型都由单一隐性基因控制。另外, 与田间发现的表型相似, 最早萌发的种子最后都发育成白化苗, 暗示这两个突变体的突变基因可能与叶绿体的发育有关。

表 1 杂合突变体 *hzm00148H* 和 *hzm03804H* 后代突变表型的遗传分析

Table 1 The Genetic analyses of the <i>hzm00148H</i> and <i>hzm03804H</i>			
突变体 Mutant	萌发种子数 The number of germinated seeds	总的种子数 The number of tested seeds	$\chi^2_{3; 1}$
<i>hzm00148H</i>	156	596	0.44
<i>hzm03804H</i>	187	812	1.68

2.2 突变基因的 SIMM 定位

为了研究 *hzm00148* 和 *hzm03804* 出现穗发芽的分子机制, 本研究利用 SIMM 方法对这两个突变体的突变位点进行定位。将 M_2 代 *hzm00148* 和 *hzm03804* 的杂合突变体穗发芽的幼苗共 30 株等量混合后提取 DNA, 进行基因组重测序。测序后数据以日本晴基因组为参比基因组, 并以前期测

序的其他黄华占水稻突变体为对照, 进行 SIMM 分析。

通过 SIMM 分析, 发现 *hzm00148* 突变体中有 1 个候选 SNP 位点, 由 C 变为 T, 造成密码子由 CAG 变为终止密码子 TAG。该位点位于基因 LOC_Os03g08570 的编码序列中, LOC_Os03g08570 编码一个八氢番茄红素脱氢酶 (OsPDS, phytoene desaturase)。 *hzm03804* 突变体中有 8 个候选 SNP 位点, 其中有 6 个为错义突变, 1 个突变在 3'UTR, 1 个突变成终止密码子 (表 2)。 *hzm03804* 的候选基因中, LOC_Os01g63200 编码漆酶前体蛋白, 与植物次生代谢过程有关; LOC_Os03g02800 编码水稻矮缩病毒增殖相关蛋白, 与水稻矮缩病毒的抗性有关; LOC_Os03g60620 编码植物热休克蛋白, 与逆境条件下维持细胞稳态有关; LOC_Os07g40520 编码肌动蛋白结合蛋白, 调节肌动蛋白结合, 与维持细胞稳态有关; LOC_Os07g10490 编码一个 ζ -胡萝卜素脱氢酶 (OsZDS, ζ -carotene desaturase), 参与合成 ABA 的前体物质胡萝卜素的合成; 其余候选基因的功能未知。根据这些基因的功能, 以及它们突变的类型, 我们推测 LOC_Os07g10490 是靶基因的概率最大 (表 3)。

表 2 *hzm00148* 突变候选基因列表

Table 2 Analysis of the candidate SNPs for the *hzm00148* mutant

编号 No.	染色体 Chr.	物理位置 (bp) Physical location	基因型 Genotype	所在位置 Detailed location	基因位点名称 Gene ID	突变性质 Mutation type	突变频次 Mutation frequencies	总频次 Total frequencies	背景突变 频次 Background mutation frequencies	背景 总频次 Total background frequencies
SNP1	Chr. 3	4412538	C/T	外显子	LOC_Os03g08570	提前终止	44	47	0	82

表 3 *hzm03804* 突变候选基因列表

Table 3 Analysis of the candidate SNPs for the *hzm03804* mutant

编号 No.	染色体 Chr.	物理位置 (bp) Physical location	基因型 Genotype	所在位置 Detailed location	基因位点名称 Gene ID	突变性质 Mutation type	突变频次 Mutation frequencies	总频次 Total frequencies	背景突变 频次 Background mutation frequencies	背景 总频次 Total background frequencies
SNP1	Chr. 7	5649171	T/A	外显子	LOC_Os07g10490	提前终止	38	40	9	80
SNP2	Chr. 1	36635131	G/T	外显子	LOC_Os01g63200	错义突变	25	30	1	90
SNP3	Chr. 3	1093159	G/A	外显子	LOC_Os03g02800	错义突变	21	26	1	78
SNP4	Chr. 3	34073392	T/A	外显子	LOC_Os03g59840	错义突变	16	17	7	83
SNP5	Chr. 3	34449715	T/A	外显子	LOC_Os03g60620	错义突变	31	31	10	78
SNP6	Chr. 4	26108928	G/A	外显子	LOC_Os04g44090	错义突变	44	46	2	101
SNP7	Chr. 4	30852286	A/T	3'UTR	LOC_Os04g51970	/	31	31	3	79
SNP8	Chr. 7	24276740	C/T	外显子	LOC_Os07g40520	错义突变	9	10	6	44

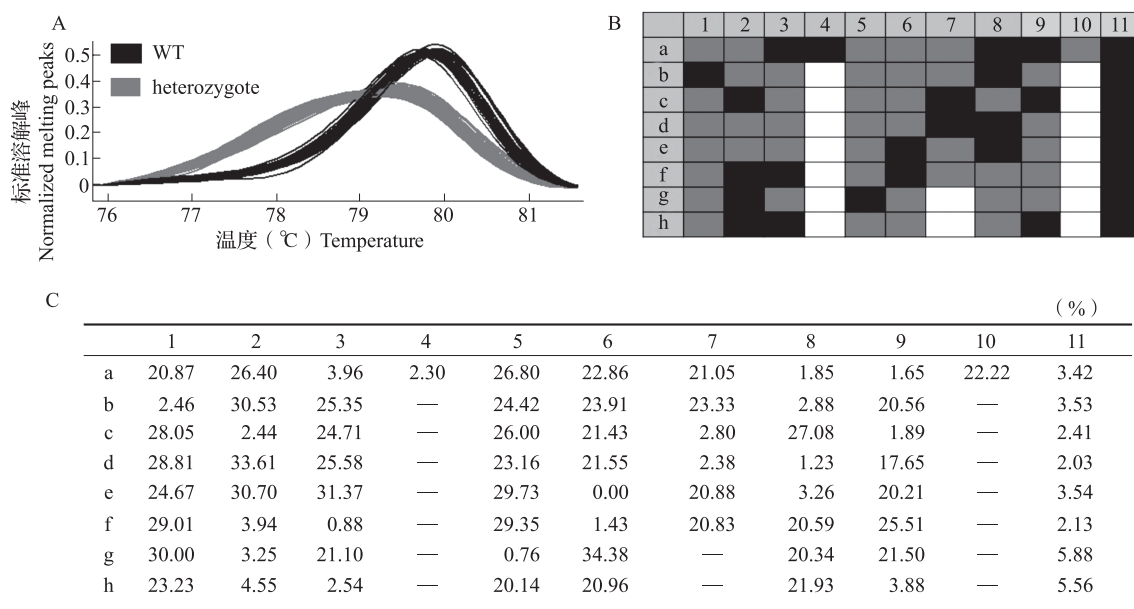
2.3 候选基因的遗传验证

为了进一步验证这些候选位点/基因是否是造成穗发芽表型的原因,本研究利用高分辨率溶解曲线(HRM, High resolution melting analysis)分析技术对突变体 M_3 自交分离群体的基因型进行分型,并对自交群体在恒温高湿处理 48 h 后的萌发率进行统计,结合穗发芽表型进行基因型-表型连锁性分析。在 *hzm00148* 突变体的 M_3 分离群体中,去除白化苗,其余绿色植株的基因型可分为两种类型,一种为野生型,一种为杂合型(图 2A),分离群体中每一植株的基因型如图 2B 中所示;对应的这些植株的穗发芽情况如图 2C 中所示。在理论上,杂合基因型植株的穗上种子萌发率为 25%;而实验结果也与理论预期相吻合,杂合基因型植株的种子萌发率在 20.14%~31.37% 之间,野生基因型的植株的种子萌发率只有不到 6%。这些结果表明 LOC_Os03g08570 基因中的 SNP 位点与穗发芽表型完全连锁,说明 LOC_Os03g08570 的突变就是造成 *hzm00148* 杂合突变体出现穗发芽的原因(图 2)。同样,在 *hzm03804* 的分离群体中,LOC_Os07g10490 基因的突变位点与穗发芽表型完全连锁,说明 LOC_Os07g10490 就是 *hzm03804* 突变体

的突变基因(图 3)。

3 讨论

甲基磺酸乙酯(EMS, ethyl methylsulfonate)是一种广泛使用的化学诱变剂。EMS 处理造成鸟嘌呤烷基化,烷基化的鸟嘌呤与胸腺嘧啶配对,从而导致碱基 C/G 到 T/A 的替换。EMS 诱变效率高,遗传稳定,并且诱变产生的突变主要以点突变为主,便于遗传分析。相比利用转基因 T-DNA 插入构建突变体库,利用 EMS 诱变,造成的基因突变频率更高,更容易获得全基因组饱和突变体库,同时 EMS 诱变后能获得特定位点氨基酸密码子的突变,有利于蛋白功能的研究;但 EMS 诱变突变体的基因定位较复杂,周期较长^[18]。随着近年测序技术的发展,利用基因组重测序结合生物信息学的方法,开发出了 Mutmap、SIMM 等 EMS 突变位点快速定位技术,使得构建 EMS 突变体库成为研究功能基因的一种高效策略^[16,19]。本研究利用前期构建好的 EMS 诱变突变体库,经过田间筛选,获得 9 个穗发芽突变体。为了快速定位候选基因,本研究对其中两个突变体,直接利用 M_2 杂合突变体的自交后代中的纯合植株,进行基因组重测序,并利用 SIMM



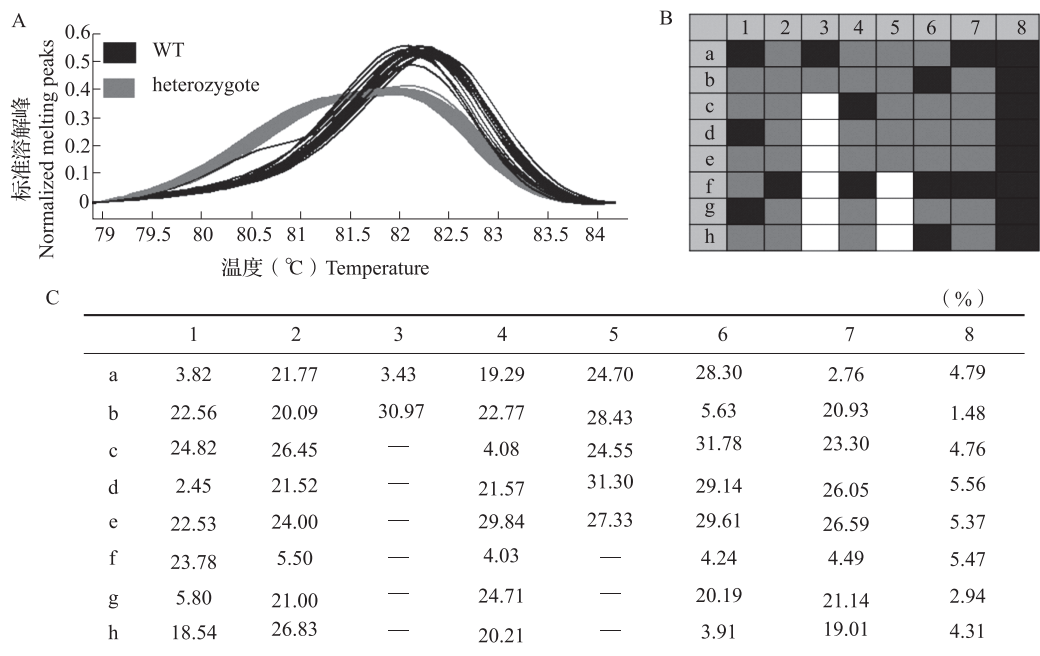
A: 包含突变位点的 DNA 片段的溶解曲线; B: 根据溶解曲线分型出的不同基因型; 白色代表无样品, 黑色代表野生型的基因型, 灰色代表杂合基因型。第 1~10 列为 M_3 分离群体植株, 第 11 列为野生型对照。a~h 和 1~11 代表田间植物种植的行列编号;

C: 模拟恒温高湿环境后, B 中对应植株种子在恒温高湿处理 48 h 后的萌发率

A: the dissociation curve of DNA fragments containing SNP, B: genotypes based on the dissociation curve. White boxes: no sample, black boxes: WT, gray boxes: heterozygote. 1-10 lines: the M_3 population, the 11th line: WT. The column number a-h and the line number 1-11 in B and C represent the positions of plants in paddy field, C: the seed germination rates of the plants in B under hot and humid environment

图 2 *hzm00148* 自交 M_3 群体的基因型与表型连锁分析

Fig. 2 Genotype and phenotype analyses of the M_3 population of *hzm00148*



A~C: 图注同图 2; B: 第 1~7 列为 M_3 分离群体植株, 第 8 列为野生型对照
A~C: Legends are same as fig.2, B: 1-7 lines: the M_3 population, the 8th line: WT
图 3 *hzm03804* 自交 M_3 群体的基因型与表型连锁分析
Fig. 3 Genotype and phenotype analyses of the M_3 population of *hzm03804*

方法,结合基因型与表型连锁关系的分析,快速成功的定位到了这两个突变体的候选基因。在本项目中,未构建突变体与野生型回交群体,而只利用突变体的自交群体,结合基因组重测序和 SIMM 方法、HRM 技术,也能快速有效地定位突变体的候选基因,该研究策略对快速定位 EMS 诱变突变体的突变候选基因具有借鉴意义。

通过基因定位,本研究发现 *hzm00148* 突变体的靶标基因为 LOC_Os03g08570,编码一个八氢番茄红素脱氢酶 (OsPDS, phytoene desaturase,)。八氢番茄红素脱氢酶是 ABA 前体类胡萝卜素合成的关键酶。在 *hzm00148* 突变体中, *OsPDS* 基因 CDS 的第 907 个碱基发生了突变,由 C 变为 T,密码子由 CAG 变为终止密码子 TAG,导致蛋白翻译的提前终止。在玉米中, PDS 突变后会造成穗发芽、植株白化等表型^[20-21]。同样,水稻中 *OsPDS* 的 T-DNA 插入突变体也会出现穗发芽、植株白化的表型^[10]。与已报道的研究结果相似,本研究发现 *hzm00148* 杂合突变体植株出现穗发芽的现象,并且穗发芽的种子都发育成为白化苗。 *hzm03804* 突变体的靶标基因为 LOC_Os07g10490,编码一个 ζ -胡萝卜素脱氢酶 (OsZDS, ζ -carotene desaturase)。 ζ -胡萝卜素脱氢酶是 ABA 前体类胡萝卜素合成的限速酶。 *OsZDS* 基因全长 1737 bp,编码含有

579 个氨基酸残基的蛋白。在突变体 *hzm03804* 中, *OsZDS* 基因 CDS 的第 1059 个碱基发生了突变,由 T 变为 A,密码子由 TGT 变为 TGA,导致蛋白翻译的提前终止,成熟蛋白缺少了之后的 225 个氨基酸。在玉米中, ZDS 功能突变会造成玉米发生穗发芽^[22]。在水稻中, *OsZDS* 基因的 T-DNA 插入功能缺失突变体和基因片段缺失突变体也会造成水稻中 ABA 合成受阻,种子休眠缩短,发生穗发芽现象,且出现白化表型^[10]。我们的研究也同样发现 *hzm03804* 杂合突变体出现严重的穗发芽现象,且纯合突变体出现白化。本研究对 *OsZDS* 基因和 *OsPDS* 基因新等位突变体的发现和研究,进一步验证了类胡萝卜素合成途径在 ABA 合成和水稻休眠中的重要作用。

随着全球气候的变化,水稻穗发芽现象日趋严重,给农业的安全生产带来重大风险。如何控制水稻穗发芽已经成为亟需解决的科学问题。研究表明,通过喷施外源穗发芽抑制剂,如马来酰肼、烯效唑、丁香油酚等物质,能够在一定程度上抑制穗发芽^[23]。然而,需要从根本上解决穗发芽问题,还要依赖于遗传改良育种。近年来,研究人员已经挖掘到一些与水稻休眠相关的 QTL,其中已精细定位的 QTL 有位于 3 号染色体上的 *sdr1*,位于 12 号染色体上的 *qSD12* 以及位于 7 号染色体上的 *sdr4*

等^[13, 24-25]。含有 *qSD12* 或者 *sdr4-k* 的水稻植株都显著提高了种子的休眠性^[13, 24]。这些研究表明,利用穗发芽相关基因进行遗传育种,是一种高效的防治穗发芽的策略。因此,后续对本研究筛选到的穗发芽突变体的进一步研究,不仅有助于我们解析水稻穗发芽的分子机制,同时也为培育耐穗发芽的水稻品种提供更多的基因资源。

参考文献

- [1] Fang J, Chu C C. Absciscic acid and the pre-harvest sprouting in cereals. *Plant Signaling & Behavior*, 2008, 3(12): 1046-1048
- [2] Du L, Xu F, Fang J, Gao S P, Tang J Y, Fang S, Wang H R, Tong H N, Zhang F X, Chu J F, Wang G D, Chu C C. Endosperm sugar accumulation caused by mutation of *PHS8/ISA1* leads to pre-harvest sprouting in rice. *The Plant Journal*, 2018, 95(3): 545-556
- [3] 陈兵先, 刘军. 水稻穗萌及其调控的研究进展. *种子*, 2017, 36(2): 49-55
Chen B X, Liu J. Research progress of rice vivipary and its regulation. *Seeds*, 2017, 36(2): 49-55
- [4] 蔡建秀, 陈伟. 水稻穗上发芽生理生化及颖壳扫描电镜观察. *中国农学通报*, 2007(8): 207-211
Cai J X, Chen W. Study on the physiological biochemistry of pre-harvest sprouting and scanning electron microscopy of glume in rice. *Agricultural Science & Technology*, 2007(8): 207-211
- [5] Kaneko M, Itoh H, Ueguchi-Tanaka M, Ashikari M, Matsuoka M. The alpha-amylase induction in endosperm during rice seed germination is caused by gibberellin synthesized in epithelium. *Plant Physiology*, 2002, 128(4): 1264-1270
- [6] Shu K, Liu X D, Xie Q, He Z H. Two faces of one seed: Hormonal regulation of dormancy and germination. *Molecular Plant*, 2016, 9(1): 34-45
- [7] Graeber K, Nakabayashi K, Miatton E, Leubner-metzger G, Soppe W J J. Molecular mechanisms of seed dormancy. *Plant Cell & Environment*, 2012, 35(10): 1769-1786
- [8] Rajjou L, Duval M, Gallardo K, Catusse J, Bally J, Job C, Job D. Seed germination and vigor. *Annual Review of Plant Biology*, 2012, 63(1): 507-533
- [9] Agrawal G K, Yamazaki M, Kobayashi M, Hirochika R, Miyao A, Hirochika H. Screening of the rice viviparous mutants generated by endogenous retrotransposon *Tos17* insertion. Tagging of a zeaxanthin epoxidase gene and a novel *osTATC* gene. *Plant Physiology*, 2001, 125(3): 1248-1257
- [10] Fang J, Chai C L, Qian Q, Li C L, Tang J Y, Sun L, Huang Z J, Guo X L, Sun C H, Liu M, Zhang Y, Lu Q T, Wang Y Q, Lu C M, Han B, Chen F, Cheng Z K, Chu C C. Mutations of genes in synthesis of the carotenoid precursors of ABA lead to pre-harvest sprouting and photo-oxidation in rice. *Plant Journal*, 2008, 54(2): 177-189
- [11] Liu X, Wang J, Yu Y, Kong L N, Liu Y M, Liu Z Q, Li H Y, Wei P W, Liu M L, Zhou H, Bu Q Y, Fang J. Identification and characterization of the rice pre-harvest sprouting mutants involved in molybdenum cofactor biosynthesis. *New Phytologist*, 2019, 222(1): 275-285
- [12] Xu F, Tang J Y, Gao S P, Cheng X, Du L, Chu C C. Control of rice pre-harvest sprouting by glutaredoxin-mediated abscisic acid signaling. *Plant Journal*, 2019, 100(5): 1036-1051
- [13] Sugimoto K, Takeuchi Y, Ebana K, Miyao A, Hirochika H, Hara N, Ishiyama K, Kobayashi M, Ban Y, Hattori T, Yano M. Molecular cloning of *sdr4*, a regulator involved in seed dormancy and domestication of rice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2010, 107(13): 5792-5797
- [14] Miao C B, Wang Z, Zhang L, Yao J J, Hua K, Liu X, Shi H Z, Zhu J K. The grain yield modulator miR156 regulates seed dormancy through the gibberellin pathway in rice. *Nature Communications*, 2019, 10(1): 3822-3833
- [15] 陈竹锋, 卢嘉威, 卢启清, 王娜, 王成旭, 谢刚, 周向阳, 唐晓艳. 优质水稻黄华占雄性不育突变体的筛选及初步分析. *广东农业科学*, 2014, 41(19): 1-4
Chen Z F, Lu J W, Lu Q Q, Wang N, Wang C X, Xie G, Zhou X Y, Tang X Y. Screening and analysis of male sterile mutants derived from elite indica cultivar Huanghuazhan. *Guangdong Agricultural Sciences*, 2014, 41(19): 1-4
- [16] Yan W, Chen Z F, Lu J W, Xu C J, Xie G, Li Y Q, Deng X W, He H, Tang X Y. Simultaneous identification of multiple causal mutations in rice. *Frontiers in Plant Science*, 2016, 7: 2055-2066
- [17] Lochlainn S O, Amoah S, Graham N S, Alamer K, Rios J J, Kurup S, Stoute A, Hammond J P, Ostergaard L, King G J, White P J, Broadley M R. High resolution melt (HRM) analysis is an efficient tool to genotype EMS mutants in complex crop genomes. *Plant Methods*, 2011, 7(1): 43
- [18] Kim Y, Schumaker K S, Zhu J K. Ems mutagenesis of arabidopsis/SALINAS J, SANCHEZ-SERRANO J J. Arabidopsis protocols. Totowa NJ: Humana Press, 2006: 101-103
- [19] Abe A, Kosugi S, Yoshida K, Natsume S, Takagi H, Kanzaki H, Matsumura H, Yoshida K, Mitsuoka C, Tamiru M, Innan H, Cano L, Kamoun S, Terauchi R. Genome sequencing reveals agronomically important loci in rice using MutMap. *Nature Biotechnology*, 2012, 30(2): 174-178
- [20] Hable W E, Oishi K K, Schumaker K S. *Viviparous-5* encodes phytoene desaturase, an enzyme essential for abscisic acid (ABA) accumulation and seed development in maize. *Molecular and General Genetics*, 1998, 257(2): 167-176
- [21] Zhao Y L, Wang Y K, Yang H, Wang W, Wu J Y, Hu X L. Quantitative proteomic analyses identify ABA-related proteins and signal pathways in maize leaves under drought conditions. *Frontiers in Plant Science*, 2016, 7: 1827-1849
- [22] Chen Y, Li J, Fan K, Du Y, Ren Z, Xu J, Zheng J, Liu Y, Fu J, Ren D, Wang G. Mutations in the maize zeta-carotene desaturase gene lead to viviparous kernel. *PloS ONE*, 2017, 12(3): e0174270
- [23] Hu Q J, Fu Y Y, Guan Y J, Lin C, Cao D D, Hu W M, Sheteiwy M, Hu J. Inhibitory effect of chemical combinations on seed germination and pre-harvest sprouting in hybrid rice. *Plant Growth Regulation*, 2016, 80(3): 281-289
- [24] Gu X Y, Liu T, Feng J, Suttle J C, Gibbons J. The *qsd12* underlying gene promotes abscisic acid accumulation in early developing seeds to induce primary dormancy in rice. *Plant Molecular Biology*, 2010, 73(1): 97-104
- [25] Takeuchi Y, Lin S Y, Sasaki T, Yano M. Fine linkage mapping enables dissection of closely linked quantitative trait loci for seed dormancy and heading in rice. *Theoretical and Applied Genetics*, 2003, 107(7): 1174-1180