

水稻穗异常突变体 *tutou4* 的鉴定及基因定位

宋远辉, 花 芹, 林泉祥, 郑思怡, 欧阳晨林, 杨 晔, 孙家猛, 陈庆全, 李金才, 张海涛
(安徽农业大学农学院, 合肥 230036)

摘要: 水稻穗异常退化现象在水稻的生长发育过程中经常发生。穗部退化可引起穗长、枝梗数、每穗粒数和结实率下降, 影响单株产量。穗退化性状因其遗传基础复杂、受环境和生理因素影响较大, 其分子机制及其遗传网络仍知之甚少。*tutou4* 是一个来自于组织培养的穗异常退化突变体, 该突变体表现为穗部部分颖花退化, 每穗粒数和枝梗数减少, 单株产量降低。遗传分析表明, 该性状由一对隐性核基因控制, 通过图位克隆的方法最终将候选基因定位在水稻第 8 染色体短臂端 Os8-3-2 和 Os8-3-3 之间, 遗传距离为 39.09 kb 的范围内。该区间包括 3 个编码基因, 通过测序发现 *tutou4* 突变体中基因 *LOC_Os08g06480* 的起始密码子上游有 4325 bp 的片段缺失, 且最后一个外显子 (7538 bp) 上碱基 A 被替换成碱基 G, 但氨基酸未改变。荧光定量 PCR 的结果表明, 该基因在突变体中表达量显著下降。因此, *tutou4* 穗异常性状可能是由 *Tutou4* 启动子缺失或外显子碱基替换造成的基因表达量降低引起的表型突变。*Tutou4* 为已报道基因 *OsLIS-L1/OsREL2/ASP1* 的等位基因。*Tutou4* 穗发育异常的表型为研究穗部发育的分子机制提供了新的材料基础。

关键词: 水稻; 穗异常; 表型分析; 花粉败育; 图位克隆

Identification and Fine Mapping of a Panicle Aberrant Mutant *tutou4* in Rice (*Oryza sativa* L.)

SONG Yuan-hui, HUA Qin, LIN Quan-xiang, ZHENG Si-yi, OUYANG Chen-lin,
YANG Ye, SUN Jia-meng, CHEN Qing-quan, LI Jin-cai, ZHANG Hai-tao
(College of Agronomy, Anhui Agricultural University, Hefei 230036)

Abstract: Aberrant degeneration of panicle (ADP) usually occurs during the reproductive growth in rice. It causes yield loss due to the reductions of panicle length, branch number, grain number per panicle and seed setting. However, the molecular mechanism of ADP remains largely unknown since the complicated genetic basis and sensitivity to environmental and physiologic factors. *tutou4* is a panicle degeneration mutant derived from tissue culture, and shows abnormal panicle, reduction of grain number and branch number per panicle, as well as single plant yield. Genetic analysis showed that the ADP trait was controlled by a pair of recessive nuclear gene. The candidate region was finally mapped to the short arm of chromosome 8, flanked by both Indel markers Os8-3-2 and Os8-3-3, with an interval of 39.09 kb, which contained three encoding genes. The sequencing results showed a 4325 bp deletion in the promoter region and one base alternation (7538 bp, A → G, synonymous) of the gene *LOC_Os08g06480*, which was designated as *OsLIS-L1/OsREL2/ASP1*. Real-time PCR analysis revealed the reduction of this gene expression in mutant to that of the wild type. Considering the expression level decreased in the *tutou4*, this mutant will be an useful germplasm in the study of abnormal panicle degeneration.

Key words: rice; aberrant panicle; phenotypic analysis; pollen abortion; map-based cloning

收稿日期: 2021-03-16 修回日期: 2021-03-25 网络出版日期: 2021-06-23

URL: <http://doi.org/10.13430/j.cnki.jpgr.20210316003>

第一作者研究方向水稻分子育种, E-mail: 1846743028@qq.com; 花芹为共同第一作者

通信作者: 张海涛, 研究方向为水稻分子育种, E-mail: 43647174@qq.com

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31871603, 31201205); 国家留学基金委项目 (201708340008); 安徽省科技厅项目 (KJ2017A143, gxfxZD2016022); 安徽省科技重大专项 (1803071176)

Foundation projects: National Natural Science Foundation of China (31871603, 31201205), China Scholarship Council (201708340008), Department of Education, Anhui Province (KJ2017A143, gxfxZD2016022), Anhui Province Major Special Science and Technology Project (1803071176)

水稻 (*Oryza sativa* L.) 是世界上最重要的粮食作物之一,高产稳产一直是育种家们致力追求的育种目标。构成产量的三要素,即每亩有效穗数、每穗粒数、千粒重都与稻穗的正常发育有关,如果水稻穗发育异常就会引起单株产量下降,群体产量降低。穗异常导致的退化在水稻发育过程中经常发生,因其遗传基础复杂,受环境和生理等因素影响较大,外界的温度、湿度、光照、土壤中营养条件的变化都有可能造成穗部异常发育^[1]。穗的形成过程包括生殖分化、花序形态建成、小穗分化和颖花发育等过程^[2]。目前已经克隆了许多与穗部性状相关的基因,如从腋生分生组织起始的调控基因 *LAX1* (*LAX Panicle 1*)^[3]、*RFL* (*Rice Floricula/Leafy*)^[4]、*LAX2* (*LAX Panicle 2*)^[5]、*MOCI* (*Monoculum 1*)^[6]与 *MOC3* (*Monoculum 3/Tillers Absent 1/Sterile and Reduced Tillering 1*)^[7]等,这些基因的突变导致枝梗原基和小穗原基无法正常分化,从而影响成花数和籽粒产量。一些调控分生组织分化时间的基因如 *APO1* (*Aberrant Panicle Organization 1*)^[8]、*APO2* (*Aberrant Panicle Organization 2*)^[9]、*TAW1* (*Tawawa 1*)^[10]、*OsMADS 22* (*MADS-box transcription factor 22-like*)^[10]、*OsMADS 47* (*MADS-box transcription factor 47-like*)^[10]、*OsMADS 55* (*MADS-box transcription factor 55-like*)^[10]与 *FZP* (*Frizzy Panicle*)^[11]突变导致花器官的形成受到抑制,严重时颖花形态异常。植物激素如调控细胞分裂素变化的基因 *Gn1a* (*Grain Number 1a*)^[12]、*DST* (*Drought and Salt tolerance*)^[13]、*LOG* (*Lonely Guy*)^[14]、*LP* (*Larger Panicle*)^[15]、*OsVIL 2* (*VIN3-Like 2*)^[16]与 *SP 3* (*Short Panicle 3*)^[17]的突变引起花序分生组织中细胞分裂素的积累,影响了分生组织的体积,间接影响枝梗和小穗的数目。调控油菜素内酯含量的基因如 *OsDof 12* (*DNA-binding with one finger 12*)^[18]、*OsER1* (*Erecta 1*)^[19]、*PMMI* (*Panicle Morphology Mutant 1*)^[20]、*TBP1* (*Top Bending Panicle 1*)^[21]的突变不仅影响枝梗和小穗分化,花粉活性也会受到不同程度的影响。穗部退化包括枝梗退化和小穗退化,由于遗传机理复杂,目前对穗异常退化相关的研究较少。在水稻中已经发现了许多与穗退化相关的基因和 QTL, Yamagishi 等^[22]利用粳稻回交自交系的后代群体,在第 1、10、11 染色体上检测到了 3 个控制开花前穗部小花败育的主效 QTL。基因 *SPI* (*Short Panicle 1*) 编码一个 PTR 家族的转运蛋白,在幼穗枝梗的韧皮部组织中表达, *spi* 突变

植株变矮,穗基部一次枝梗原基发育正常,但在枝梗延伸过程出现缺陷,导致幼穗基部的枝梗和小穗发育迟缓甚至停滞,严重影响穗长和穗粒数^[23]。与穗基部退化相比,穗顶部退化现象在水稻育种过程中更为普遍。徐华山等^[24]在以日本晴为背景导入籼稻品种 9311 的染色体片段构建的染色体片段代换系群体,检测到了分别位于第 1、2、3、4、6、7 和 9 染色体上的 7 个与控制穗顶部颖花退化相关的 QTL,其中位于第 9 染色体的 *ds-9* 位点对穗顶部退化的贡献率高达 20%。Tan 等^[25]同样也检测到了这 7 个穗顶部退化的 QTL,并且发现位于第 3 染色体上的 QTL 对第 9 染色体的 QTL 存在上位性的关系。王斌等^[26]利用水稻品种越光与桂朝 2 号所构建的 RILs 群体,检测到 6 个分别位于第 1、2、3、5、6 和 7 染色体上参与控制穗顶部退化的 QTL 位点,贡献率在 4.49%~9.74% 之间。高素伟等^[27]报道了一个 *L-05261* 穗顶部退化材料,其退化程度占整个穗子的 50% 以上,该退化性状至少由 3 对以上的显性基因控制,并且在第 3、4、5 和 8 染色体上检测到 4 个控制穗顶端退化的 QTL 位点,贡献率在 7.25%~15.82% 之间。Cheng 等^[28]对杂交组合 *L-05261* × *IRAT129* 的 F_2 进行检测发现了第 3、4、5、6、7 和 8 染色体上共有 7 个穗顶端退化 QTL 位点。通过精细定位将第 8 染色体上的 QTL 位点 *qPAA8* 定位到物理距离大约为 37.6 kb 的标记之间。Bai 等^[29]报道了水稻穗退化突变体 *tutou1* 多效的表型,在穗发育中存在严重缺陷。*Tutou1* 编码一种调节肌动蛋白组织的瘢痕样蛋白,其突变导致多效性表型包括圆锥花序顶端败育。*OsALMT7* (*Aluminium-activated malate Transporter 7*) 编码一个铝激活的苹果酸转运蛋白,突变导致苹果酸的向顶运输产生障碍,顶部小穗细胞内苹果酸含量的下降引发细胞内的氧化还原平衡遭到破坏,从而诱发顶部小穗的细胞程序性死亡^[30]。基因 *OsCIPK31* (*Rice Calcineurin B-Like Protein-Interacting Protein Kinase 31*) 编码一个钙调磷酸酶蛋白激酶,该突变调控植物穗部激素进而调控活性氧的积累导致穗部颖花发生程序性死亡,其突变体 *paa1019* 表现为植株变矮、主穗轴上端的初级枝梗退化^[31]。由于穗异常退化是由多个基因和外部环境相互作用产生的复杂性状,对其分子机制的研究尚不系统,尚未建立其遗传网络,克隆穗顶部退化相关基因,解析其机制,对于理解穗异常退化的形成原因及其预防具有重要的意义。本研究以水稻穗异常发育突变体 *tutou4*

为研究材料,将突变体与穗正常发育的 Dular 杂交,构建了遗传作图群体。通过连锁分析定位到了目的基因 *Tutou4*,为进一步解析 *Tutou4* 在穗部发育中的作用机制奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

水稻穗发育突变体 *tutou4* 来源于粳稻品种 Kitaake 的组织培养突变体,其穗基部、中部和顶部小穗出现明显的枝梗和小穗退化现象,穗长及每穗粒数明显减少,严重影响单株产量。在自然环境条件下,经多年种植,表型均能稳定遗传。试验于 2017 年 2 月至 2020 年 10 月在安徽农业大学合肥大杨农场进行。

1.2 定位群体的构建

用 Dular 作父本与 *tutou4* 配制杂交组合,获得 F_1 ,自交获得 F_2 遗传定位群体。亲本、 F_1 杂交种和 F_2 群体播种于安徽农业大学合肥大杨农场,经 25 d 育秧后单株移栽,每行 10 株,行距为 15 cm × 20 cm,管理同大田生产。在抽穗后 15 d 根据穗部表型取样,共获得 2457 个穗异常隐性单株,并统计 F_2 群体中正常单株和突变体植株的分离比。

1.3 农艺性状考察与花粉活力的测定

自营养生长转向生殖生长开始,以野生型 Kitaake 为对照,幼穗长 4 cm、10 cm、15 cm、25 cm 时取同时期 *tutou4* 的幼穗,观察不同长度的幼穗枝梗和颖花退化的动态过程。成熟时,随机选取突变体 *tutou4* 与野生型各 10 株,测量并考察主茎株高、主茎穗长、节间长、每穗粒数和空瘪粒数等农艺性状,种子自然风干后测量籽粒长度、宽度和千粒重。利用 SPSS 20.0 软件进行统计分析。每个样本 3 次生物学重复。

采集 25 cm 左右幼穗,观察幼穗颖花形态和花粉粒活性,2% I_2 -KI 溶液染色,在 BA410 型显微镜下利用 5 点法随机观察 5 个视野,计算花粉活力。

1.4 目标基因定位及分子标记的开发

利用 Gramene (<http://www.gramene.org>) 和 NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>) 数据库,对比日本晴和 9311 基因组序列,寻找插入/缺失位点,用 Primer 3.0 (<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0>) 软件开发 SSR 分子标记,新开发的分子标记在 RAP-DB/HOME 的 Blast 网站 (<https://rapdb.dna.affrc.go.jp>) 比对特异性,将特异性较好的引物送上海生工生物工程有限公司合成。以 Dular 和 *tutou4* DNA 为亲本,开发出均匀分布于 12 条染色体具有多态性

的 SSR 分子标记和 Indel 标记共 156 对。从 F_2 群体中选取具有穗发育异常表型的 10 株,采用 CTAB 法^[32]提取叶片总 DNA,构建 *tutou4* 定位的 DNA 混池。利用覆盖全基因组的 SSR 和 Indel 标记寻找与目标基因的连锁位点,在此基础上进行目标基因的初步定位。再开发新的标记,扩大定位群体,对目标基因进行精细定位。PCR 扩增采用 10 μ L PCR 反应体系:2 × Taq PCR StarMix 5 μ L、正反向引物(10 μ mol/L)各 1 μ L、DNA 模板 1 μ L、10% 聚乙烯吡咯烷酮(PVP, polyvinyl pyrrolidone) 1 μ L 和 ddH₂O 1 μ L。PCR 反应条件设置为:94 $^{\circ}$ C 预变性 2 min,94 $^{\circ}$ C 变性 30 s,退火温度 55~58 $^{\circ}$ C 退火 30 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min,设置 35 个循环;72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min,4 $^{\circ}$ C 保存。PCR 产物经 8% 非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳、银染显色后观察拍照、记录^[33]。

1.5 候选基因测序及 TAIL-PCR

根据定位群体获得的精细定位结果,结合 Gramene (<http://www.gramene.org>) 在线网站信息,对区间内候选基因通过 Primer 3.0 进行引物设计,并由 RAP-DB/HOME 网站检测引物特异性,区间中的候选基因在野生型和突变体上进行 PCR 扩增。PCR 扩增采用 20 μ L PCR 反应体系:2 × Taq PCR StarMix 10 μ L、正反向引物(10 μ mol/L)各 2 μ L、DNA 模板 2 μ L、10% PVP 2 μ L 和 ddH₂O 2 μ L。PCR 反应条件设置为:98 $^{\circ}$ C 预变性 2 min,98 $^{\circ}$ C 变性 15 s,退火温度 55~58 $^{\circ}$ C 退火 15 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 2 min,设置 34 个循环;72 $^{\circ}$ C 延伸 8 min,4 $^{\circ}$ C 保存。PCR 产物经 1.2% 琼脂糖凝胶电泳 30 min 后观察结果。将条带清晰单一的未纯化的 PCR 产物送测,使用 DNAMAN 软件分析测序结果,寻找两者编码区有差异的基因。基于交错式热不对称 PCR(TAIL-PCR, thermal asymmetric interlaced PCR)获得 *Tutou4* 候选基因 ATG 上游侧翼序列,TAIL-PCR 体系和扩增条件设置参照 Liu 等^[34]。TAIL-PCR 第 3 阶段产物由生工生物技术(中国)用链终止法^[35]纯化并测序。用于测序及 TAIL-PCR 的引物见表 1。

1.6 RNA 提取与 Real-time PCR 表达分析

取 10 cm 幼穗,用 RNA 试剂盒(北京,康润公司)提取总 RNA。RNA 反转录试剂盒(江苏,愚公司)获得 cDNA。利用 *Tutou4* CDS 设计荧光定量 PCR 引物,内参采用水稻基因 *Ubiquitin* (*Os03g0234200*),反应体系采用 Takara 公司试剂盒 TB Green™ Premix ExTaq™ II (Tli RNaseH Plus),在 BIO-RAD CFX96™ 型荧光定量 PCR 仪(BIO-RAD,美国)上

表 1 本研究使用的引物

Table 1 Primers used in this study

类型 Type	名称 Name	正向引物序列 (5'-3') Forward primer sequence	反向引物序列 (5'-3') Reverse primer sequence	
图位克隆 Mapping	Os8-2	GAAAACATAAAAGCAGAGGA	TAATCCAAAATGGATAGCTT	
	Os8-3	TGCTGCATTATCGACACACATCC	CGATCTCTTCATCGAAAGCGAC	
	RJ8-4	TTATCTGGGATCCATCGAGC	GCTCGATGGATCCCAGATAA	
	Os8-6	CCAAAAACATTTAAAATATCATG	GAATGGTAATGACCAACAAGC	
	Os8-8	TAGGTTGGCAGACCTTTTCG	CGCTACGAGGATGATCTTGAC	
	Os8-9	AGAGAAGAGAGAAGCGCACG	CCGTCTCGTGTGATGTATG	
	Os8-10	CAAAGCTGTATTTTGAAGGCTCT	AAAAAGGTTCCCCAGAAAA	
	Os8-3-1	AGACCTCACACTCTCACAGC	CAGGGAAGGAAGAAAGCGAG	
	Os8-3-2	TCAAAGTGAAACAGGGCTTGC	CGACGTCTCCAACCCAATA	
	Os8-3-3	AACATGCAGGATTTGTGATCACTG	GACTCGTGCATGGTTCGGTTC	
	Os8-3-4	GTCGTCGAAAACCTCCATC	GGAAGACGAGAGAGGCAAGT	
	Os8-4-1	GGGTGCTCCAGACTCAGATT	CCTTGGAAATTTGGGGGCA	
	Os8-4-2	CTTAGTCAGTCTCACGAGAAAGG	TTCGATCTGAGAGCCCTTCC	
	Os8-4-3	GCTAAAACCAGAAAGTTGCG	AAAGGGTGAAGCATGGAAGC	
	基于交错式热不对称 PCR TAIL-PCR	AD3	NGACGA (G/C)(A/T) GANA (A/T) GTT	
	测序	Primer 1R	CGATATGCTTAGGAGATTGCTGAC	
	Sequencing	Primer 1F	CATACATGGAATCATAACCAACC	
Primer 2		GTCAGCAATCTCCTAAGCATAATCG	TGGAGGTTTGAGTTGGTGAGG	
Primer 3		CAGAATCTAGACTCCCTCCATC	CGCTTATAGTATCGTGTTAAAGGC	
实时荧光定量 PCR	Primer 4	GAGATCCGGAAGCAGAAGTACC	GATACTCGTGAAGGATCTCAAGG	
	Ubiquitin	GCCCAAGAAGAAGATCAAGAAC	GACTTTTATGCTTCCGTTGTTATCT	

进行扩增反应。每个样品重复 3 次,以 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法^[36] 计算 *Tutou4* 的相对表达量,用 T 测验分析。

2 结果与分析

2.1 *tutou4* 突变体表型分析

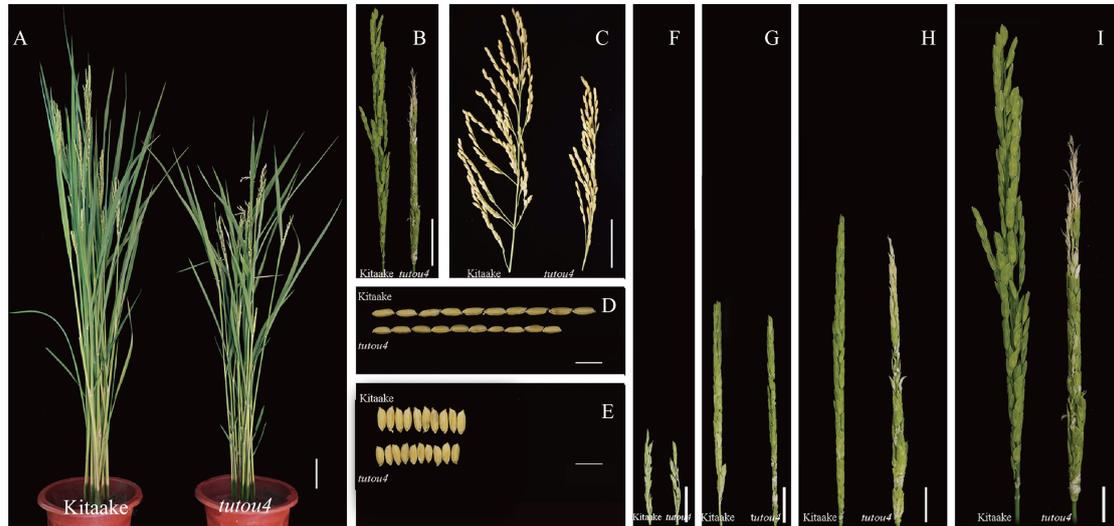
水稻穗异常发育突变体 *tutou4* 来自于粳稻品种 Kitaake 的组织培养后代,在合肥多年的田间观察发现,突变体性状稳定。突变体与野生型 Kitaake 在营养生长阶段没有明显差异;进入生殖生长阶段后,突变体生长变缓,抽穗后穗基部、中部和顶部的部分枝梗和小穗出现退化现象,表现为干瘪和发白(图 1A)。为了进一步了解穗退化的过程,对 4 cm、10 cm、15 cm 生殖生长阶段的小穗进行了观察。结果发现,在 4 cm 之前的幼穗阶段时,野生型和 *tutou4* 突变体没有明显差异(图 1F);但是当幼穗发育到 10 cm 时,突变体穗基部出现了白色退化枝梗(图 1G);当幼穗发育到 15 cm 时,在突变体的穗中部和基部出现白色退化枝梗,同时,基、中和顶部小穗发育停滞(图 1H);抽穗以后,突变体退化的枝梗和小穗干瘪坏死,穗顶部退化现象尤为明显(图 1I)。结果表明,突变体 *tutou4* 的穗异常表型发

生在幼穗伸长中后期。

如表 2 所示, *tutou4* 突变体平均株高为 112.1 ± 3.2 cm,显著低于野生型 (137.9 ± 3.9 cm),突变体的第 1 节间缩短了 22.9%,穗长缩短了 27.6%。与野生型相比, *tutou4* 每穗粒数 (75.3 ± 2.1) 仅是野生型每穗粒数 (172.6 ± 5.2) 的 43.6%,且 *tutou4* 大部分是空瘪粒(占总穗粒数的 71%)。突变体籽粒的千粒重 (14.1 g) 仅为野生型的 49.1%。以上结果表明,突变体的枝梗和小穗及籽粒的发育均存在着严重障碍。

2.2 花粉活力的分析

由于 *tutou4* 育性较低,利用 I_2 -KI 染色法检测了突变体 *tutou4* 和野生型 Kitaake 成熟花粉的活力。与野生型相比, *tutou4* 正常颖花的花粉囊染色较浅(图 2A、B)。在显微镜下的观察发现,野生型花粉粒发育正常,单个视野中的花粉粒数野生型(图 2C)显著多于突变体 *tutou4*(图 2D),染色较深的花粉粒占计数总数的 98.4%。而突变体视野内的花粉粒少,且着色较深的花粉粒仅占计数总数的 36.5%(图 2E),表明 *Tutou4* 基因突变会导致花粉育性降低。



A: 野生型 Kitaake 和突变体 *tutou4* 抽穗期的植株形态, 比例尺为 10 cm; B、C: 野生型 Kitaake 和突变体 *tutou4* 抽穗期、完熟期穗部形态, 比例尺为 5 cm; D、E: 野生型 Kitaake 和突变体 *tutou4* 籽粒长度、宽度比较, 比例尺为 1 cm; F-I: 野生型 Kitaake (左) 幼穗在长 4 cm、10 cm、15 cm 和 25 cm 时穗部表型和同时期突变体 *tutou4* 的穗部形状比较 (右), 比例尺为 2 cm

A: Plant phenotype comparison of wild type Kitaake and *tutou4* at heading stage, bar=10 cm, B, C: Panicle morphology comparison of wild type Kitaake and *tutou4* at heading stage (B) and at mature stage (C), bar=5 cm, D, E: Grain size comparison of wild type Kitaake and *tutou4* in grain length (D) and grain width (E), bar=1 cm, F-I: Dissection of developing panicles of wild type Kitaake (left) and *tutou4* (right), showing different stages indicated by panicle length of 4 cm (F), 10 cm (G), 15 cm (H) and final size (I), bar=2 cm

图 1 野生型 Kitaake 和突变体 *tutou4* 的表型鉴定

Fig.1 Phenotypic characterization of wild type Kitaake and the *tutou4*

表 2 野生型和突变体农艺性状比较

Table 2 Agronomic traits comparison between wild type and the *tutou4*

农艺性状 Agronomic traits	野生型 Kitaake	突变体 <i>tutou4</i>
株高 (cm) Plant height	137.9 ± 3.9	112.1 ± 3.2**
主穗长 (cm) Main panicle length	25.0 ± 1.1	18.1 ± 0.6**
每穗粒数 Grain number per panicle	172.6 ± 5.2	75.3 ± 2.1**
结实率 (%) Seed setting rate	82.8 ± 1.8	29.0 ± 5.2
第一节间长 (cm) The first internode length	41.9 ± 1.5	32.3 ± 1.7**
第二节间长 (cm) The second internode length	22.9 ± 1.5	22.4 ± 0.9
第三节间长 (cm) The third internode length	18.4 ± 1.5	16.5 ± 1.3
第四节间长 (cm) The fourth internode length	11.2 ± 2.0	10.1 ± 1.1
第五节间长 (cm) The fifth internode length	5.4 ± 1.1	5.3 ± 0.3
粒宽 (mm) Grain width	3.1 ± 0.1	2.7 ± 0.1*
粒长 (mm) Grain length	8.5 ± 0.1	7.7 ± 0.2*
千粒重 (g) 1000-kernel weight	28.7 ± 1.5	14.1 ± 1.3**

*: 表示在 $P < 0.05$ 水平上差异显著, **: 表示在 $P < 0.01$ 水平上差异显著; 数值表示为平均值 ± 标准误; 下同, n=10

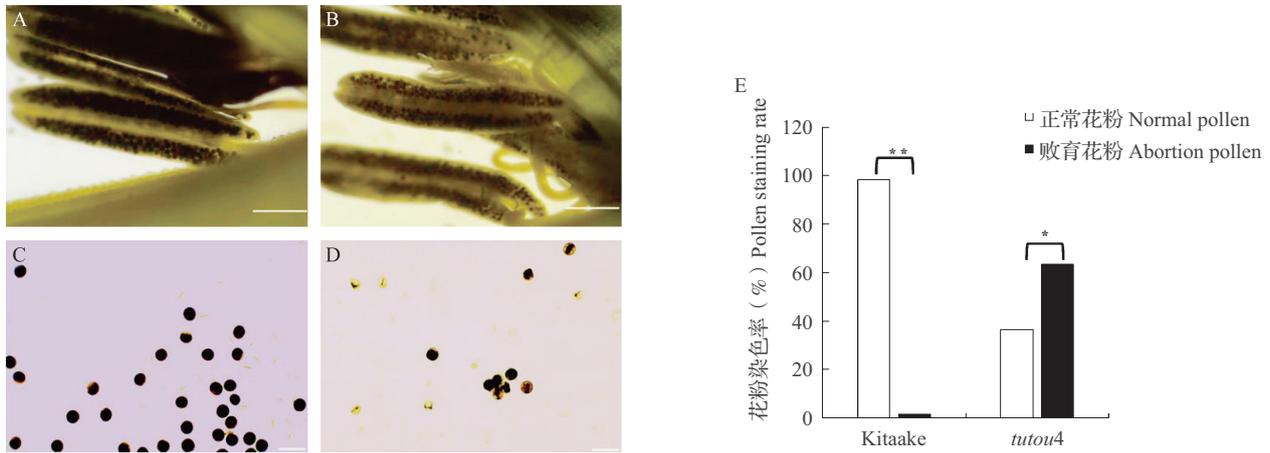
*: Significant at $P < 0.05$ level, **: Significant at $P < 0.01$ level, data are presented as mean ± SE, the same as below, n=10

2.3 *tutou4* 遗传分析

以 *tutou4* 为母本, Dular 为父本配制杂交组合, F_1 植株发育正常, F_2 单株则出现正常表型和穗异常表型分离, 随机调查 158 株 F_2 单株发现, 正常穗型和异常穗型植株数分别为 122 株和 36 株, 符合 3:1 ($\chi^2 = 0.227 < \chi_{0.05, 1}^2 = 3.84$) 的分离规律。因此推断突变体 *tutou4* 的表型性状受 1 对隐性核基因控制。

2.4 穗退化基因的定位

利用遗传定位群体的两个亲本 *tutou4* 和 Dular 的 156 对具有多态性的 SSR 和 Indel 引物标记, 对来自于由 10 株 F_2 穗异常单株组成的突变体 DNA 池进行连锁分析, 发现位于第 8 染色体上的 Os8-2 与亲本 *tutou4* 的带型一致, 进一步利用 Os8-2 附近的标记进行连锁分析, 发现了另外 5 对多态性引物 Os8-3、Os8-6、Os8-8、Os8-9 和 Os8-10。利用这 6 对多态性引物对杂交组合 Dular × *tutou4* 的 500 株 F_2 穗异常单株进行进一步定位。发现目标基因 *Tutou4* 位于引物 Os8-3 和 Os8-6 之间的 1.6 Mb 内 (图 3)。利用 Gramene 上日本晴第 8 染色体的序列信息, 在 Os8-3 和 Os8-6 之间开发出 8 对新的 SSR 和 Indel 标记 (表 1), 继续利用其他 1952 株 F_2 穗异常单株进行精细定位, 将 *Tutou4* 锁定在 Os8-3-2 和 Os8-3-3 之间物理距离为 39.09 kb 的范围内 (图 3)。

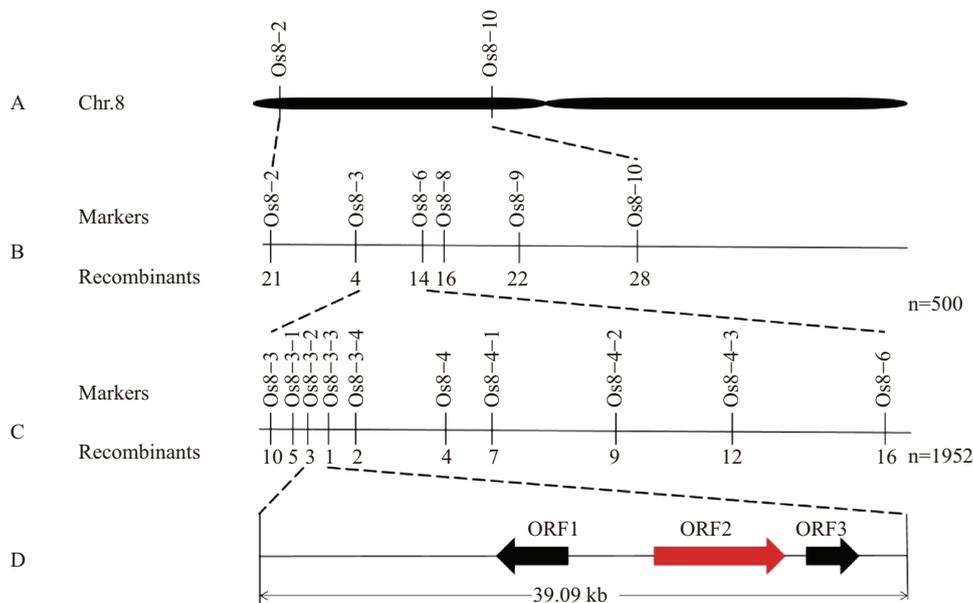


A、B: 野生型 Kitaake 与突变体 *tutou4* 花粉囊染色比较, 比例尺为 1 mm; C、D: 单个视野中野生型 Kitaake 与突变体 *tutou4* 花粉粒染色比较, 比例尺为 125 μ m; E: 野生型 Kitaake 与突变体 *tutou4* 的花粉染色率, n=200

A, B: Comparison of pollen sac staining between Kitaake and *tutou4*, C, D: Comparison of pollen grain staining between Kitaake and *tutou4* in a single field of view, E: Pollen staining rate of Kitaake and *tutou4*, n=200. Bars=1 mm in (A) and (B), 125 μ m in (C) and (D)

图 2 I₂-KI 染色法检测野生型 Kitaake 和突变体 *tutou4* 花粉活力

Fig.2 Comparison of mature pollen activity of wild type Kitaake and mutant *tutou4* by I₂-KI staining test



横线的上方为定位所用的分子标记, 横线下为交换单株数, 红色箭头框为目的基因

The numbers beneath the bold lines represented the recombinants identified by the corresponding markers, the red arrow box is the target gene

图 3 *Tutou4* 的精细定位

Fig.3 Fine mapping of *Tutou4*

2.5 候选基因分析

利用 Gramene 网站和 Rice Genome Annotation Project (<http://rice.plantbiology.msu.edu/cgi-bin/gbrowse/rice/>) 上的基因预测信息, 发现上述 39.09 kb 定位区间内共有 3 个编码基因 (表 3)。测序结果表明, 野生型 Kitaake 和突变体 *tutou4* 的基因组在 ORF1 和 ORF3 上没有差异。ORF2 (*LOC_Os08g06480*) 含有 25 个外显子和 24 个内含子。

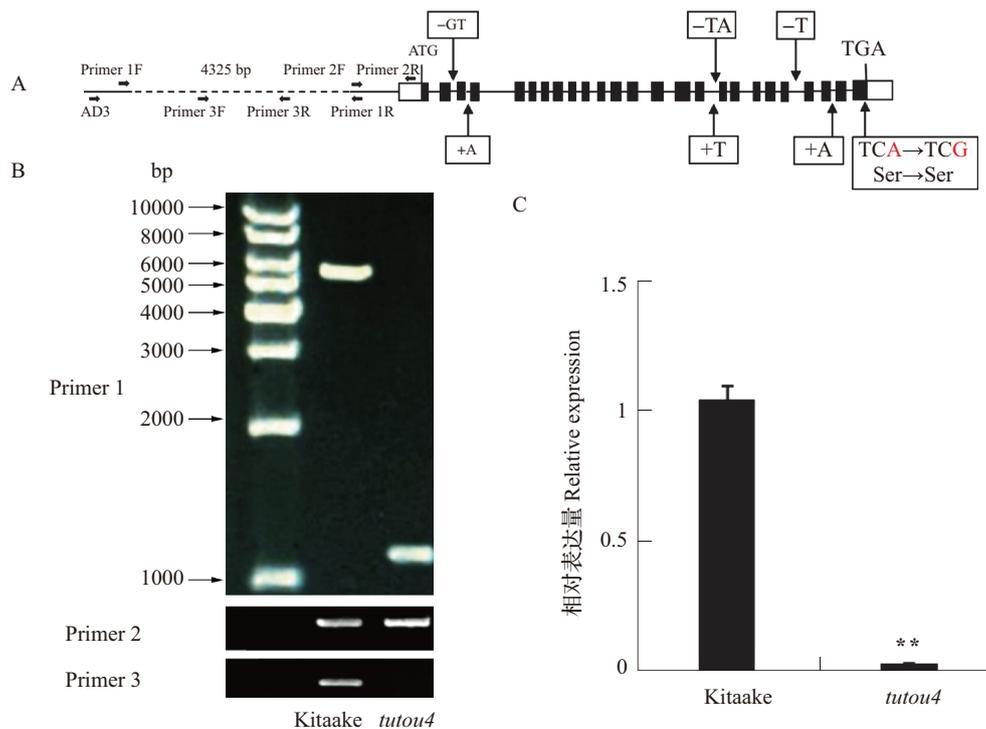
TAIL-PCR 的测序结果表明, 在 ATG 上游 -1224~ -5549 bp 间存在 4325 bp 的片段缺失, 此外 ORF2 的内含子和外显子上存在多个 SNP 和 Indel 变化, 如第 2 个内含子 (438~439 bp, 从起始密码子起, 下同) 存在 2 个碱基 GT 的缺失, 第 3 个内含子 (592 bp 后) 上存在 1 个碱基 A 的插入, 第 16 个内含子 (4634 bp) 上存在 1 个碱基 T 的插入和 4760~4672 bp 处 2 个碱基 TA 缺失, 第 21 个内含子 (6388 bp) 上出现 1

个碱基 T 的缺失,第 23 个内含子(6730 bp)上出现 1 个碱基 A 的插入和最后一个外显子(7538 bp)上碱基 A 被替换成碱基 G,外显子上的碱基替换并没有改变氨基酸(图 4A)。对 10 cm 长幼穗基因 *LOC_Os08g06480* 的定量检测表明,突变体中该基因的表达量仅为野生型的 3.2%(图 4C),表明突变体的穗异常表型可能是由于 *LOC_Os08g06480* 的表达量降低造成的。该基因是已经报道的基因 *OsREL2/OsLIS-L1/ASPI*^[37-39] 的等位基因,编码类 lissencephaly-1 型同源蛋白。

表 3 精细定位区间内注释基因

Table 3 Annotated genes in the fine mapping range

开放阅读框 ORF	基因名称 Gene name	注释功能 Putative function
1	<i>LOC_Os08g06478</i>	表达蛋白 Expressed protein
2	<i>LOC_Os08g06480</i>	类 lissencephaly-1 型同源蛋白 Lissencephaly type-1-like homology motif, putative, expressed
3	<i>LOC_Os08g06490</i>	三角状五肽 Pentatricopeptide, putative, expressed



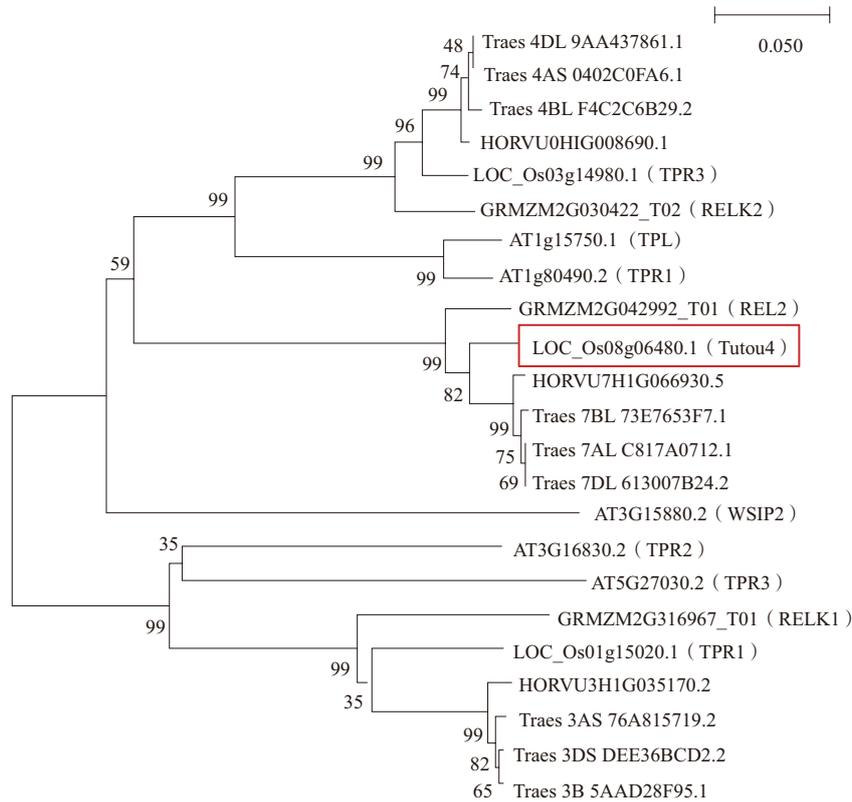
A: 候选基因 *Tutou4* (*LOC_Os08g06480*) 结构图,方框代表内含子内碱基的缺失和替换,虚线代表缺失片段,用箭头所示的引物扩增 DNA 片段;B: 引物 Primer 1F/R、Primer 2F/R 和 Primer 3F/R 扩增 *Tutou4* 启动子区基因组序列,鉴定缺失位点;C: 野生型和 *tutou4* Real-time PCR 分析。n=3

A: A schematic representation of the *Tutou4* gene, the boxes represent the deletion and replacement of bases in introns, the dotted line represents the missing fragment, the DNA fragment was amplified with the primers shown by the arrow, B: Identification of the deleted site in *Tutou4* by amplifying the DNA fragments, using the primers indicated by arrows in (A), C: Real-time PCR analysis of *Tutou4* expression in WT and *tutou4*. n=3

图 4 候选基因 *Tutou4* 的鉴定

Fig.4 Identification of candidate gene *Tutou4*

利用线上网站 Phytozome13 (<https://phytozome.jgi.doe.gov>) 上公布的 *LOC_Os08g06480* 基因的序列信息,在水稻、小麦、玉米、大麦和拟南芥的基因组数据库中搜索 *LOC_Os08g06480* 的同源蛋白,利用 MEGA7.0 软件对 *Tutou4* 及同源蛋白的氨基酸序列进行比对并构建系统进化树,发现水稻中存在 *LOC_Os03g14980* (*OsTPR3*) 和 *LOC_Os01g15020* (*OsTPR1*) 2 个同源基因,同源性分别为 82.1% 和 79.2% (图 5)。



引导程序值以节点上的百分比显示

Bootstrap values are shown as percentages at the nodes

图 5 *Tutou4* 和 *Tutou4* 类蛋白的系统发育分析

Fig.5 Phylogenetic analysis of *Tutou4* and *Tutou4*-like proteins in different plant species

3 讨论

穗的形成和发育是一个涉及生殖分化、花序形态建成、小穗分化和籽粒发育的复杂生理生化过程,受到众多基因与植物激素的调控^[40]。*tutou4* 进入生殖生长阶段后,突变体生长变缓,抽穗后穗基部、中部和顶部的部分枝梗和小穗出现退化现象,表现为干瘪和发白的一因多效表型,与野生型相比,*tutou4* 每穗粒数仅是野生型的 43.6%,且 *tutou4* 大部分是空瘪粒(占总穗粒数的 71%)。*tutou4* 花粉粒少,且着色较深的花粉粒仅占计数总数的 36.5%,与 *oslis-11/osrel2/asp1* 表型相似。Gao 等^[38]对突变体 *oslis-11* 的研究发现,T-DNA 插入 *OsLIS-11* 的第 21 个内含子导致 *oslis-11* 生长迟缓和花粉育性缺陷。与野生型的结实率 81.4% 相比,*oslis-11* 的结实率仅为 11.3%,粒长和粒宽减少了 15.1% 和 29.6%。Kwon 等^[37]报道了在第 13 个外显子上 T-DNA 插入突变体 *osrel2*,*osrel2* 存在明显的包茎现象,表现出直立的穗型,一级枝梗更短和二级枝梗数量减少,致使 *osrel2* 穗粒数只有野生型的 64.0%,但野生型的穗长与 *osrel2* 的穗长不存在明显差异。Yoshida

等^[39]对第 12 个外显子碱基插入的突变体 *asp1* 的研究表明,*asp1* 颖花的平均数量减少到野生型的 60%,枝梗和小穗等器官的发育也存在部分缺陷等多效表型。与以上的突变体相比,*tutou4* 是一个启动子区有大片段缺少的突变体。启动子区域是 RNA 聚合酶特异性识别和结合,能正确有效起始转录的一段 DNA 序列。上游启动子 T-DNA 插入或片段缺失均会影响相应的蛋白因子结合效率,引起基因表达量的降低。除此之外,*Tutou4* 最后一个外显子上碱基 A 被替换成碱基 G,出现了一个高度可信的 m⁶A 位点,该外显子是一个 WD40 基序位点,也可能对基因的表达量有影响。进化树分析表明,水稻中存在 *LOC_Os03g14980* (*OsTPR3*) 和 *LOC_Os01g15020* (*OsTPR1*) 两个与 *Tutou4* 同源的基因(图 5)。TPR/TPL 蛋白是 *Groucho* (*Gro*)/*Tup1* 家族中保守的转录共阻遏物,可以通过与包含乙烯反应元件结合因子相关双亲和基序(LxLxL/DLNxxP)的转录因子相互作用而抑制靶基因的表达,在水稻穗发育中起关键作用^[41]。在没有 Karrikin-Like Signals (KLs) 配体的情况下,TPR 蛋白与 *OsSMAX1* 形成一个 SMAX1-TPR 复合物,抑制了与

OsSMAX1 相互作用的转录因子的活性。在 KL 信号存在的情况下, D14L 感知配体并募集 SCFD3 复合物至多泛素化 *OsSMAX1*, 其随后被 26S 蛋白酶体降解。*OsSMAX1* 的降解导致与 *OsSMAX1* 相互作用的转录因子从 *TPR* 转录共表达载体释放, 并改变其下游靶基因的表达, 调控参与 BR 信号通路来控制幼嫩器官发育^[42]。深入对 *oslis-11/osrel2/asp1/tutou4* 形成原因及该基因分子机制的解析, 有利于揭示该基因在穗生长发育过程中的作用和水稻穗型的遗传改良, 对水稻的高产稳产育种具有重要的理论与实践意义。

4 结论

本研究报道了一个从组织培养后代植株中筛选出的水稻穗部异常发育的突变体 *tutou4*, 该突变体穗基、中和顶部都表现出退化, 并且穗一直保持直立的形态。不同发育阶段幼穗形态的观察结果表明 *tutou4* 基、中和顶部枝梗和小穗在 4 cm 前发育正常, 在 10 cm 后枝梗和小穗出现生长停滞, 然后逐渐表现为干瘪和发白。在颖花期突变体 *tutou4* 花粉发育异常, 败育率高达 63.5%。籽粒成熟之后, 突变体 *tutou4* 顶部退化的小穗几乎全部脱落, 导致穗长、穗粒数以及株高均显著降低, 最终对单株产量造成影响。对 Dular 与 *tutou4* 配制杂交组合的 F₂ 遗传定位群体分析表明, 该穗异常表型由一对隐性核基因控制。通过图位克隆最终将基因定位在水稻第 8 染色体短臂端 Os8-3-2 和 Os8-3-3 之间, 遗传距离为 39.09 kb。该区间内有 3 个候选基因, 测序结果发现 ORF2 (*LOC_Os08g06480*) 基因的启动子区有大片段缺失, 内含子和外显子上存在多个 SNP 和 Indel 位点, 野生型 10 cm 幼穗和同时期的 *tutou4* 突变体提取 RNA 进行 Real-time PCR 分析结果表明, *Tutou4* 表达水平极显著降低, 因此推测突变基因 *Tutou4* (ORF2) ATG 上游 -1224~-5549 bp 间片段缺失或最后一个外显子上碱基 A 被替换成碱基 G 导致该基因表达量改变而引起突变。

致谢: 感谢中国农业科学院作物科学研究所程治军研究员在实验设计和论文修改中给予的帮助。感谢《植物资源遗传学报》编辑部老师在论文修改中给予的帮助。

参考文献

[1] Yao Y, Yamamoto Y, Yoshida T, Nitta Y, Miyazaki A. Response of differentiated and degenerated spikelets to top-dressing, shading and day/night temperature treatments in rice cultivars with large panicles. *Soil Science and Plant Nutrition*,

2000, 46(3): 631-641

[2] Deveshwar P, Prusty A, Sharma S, Tyagi A K. Phytohormone-mediated molecular mechanisms involving multiple genes and QTL govern grain number in rice. *Frontiers in Genetics*, 2020, 11(1): 586462-586484

[3] Skirpan A, Wu X T, McSteen P. Genetic and physical interaction suggest that BARREN STALK1 is a target of BARREN INFLORESCENCE2 in maize inflorescence development. *Plant Journal*, 2008, 55(5): 787-797

[4] Deshpande G M, Ramakrishna K, Chongloi G L, Vijayraghavan U. Functions for rice *RFL* in vegetative axillary meristem specification and outgrowth. *Journal of Experimental Botany*, 2015, 66(9): 2773-2784

[5] Qin F, Sakuma Y, Tran L S P, Tran K, Maruyama S. *Arabidopsis* DREB2A-interacting proteins function as ring E3 ligases and negatively regulate plant drought stress-responsive gene expression. *The Plant Cell*, 2008, 20(6): 1693-1707

[6] Tabuchi H, Zhang Y, Hattori S, Omae M, Sato Y. *Lax panicle 2* of rice encodes a novel nuclear protein and regulates the formation of axillary meristems. *The Plant Cell*, 2011, 23(9): 3276-3287

[7] Shao G N, Lu Z F, Xiong J S B, Wang Y H, Jing X B. Tiller bud formation regulators MOC1 and MOC3 cooperatively promote tiller bud outgrowth by activating *FON1* expression in rice. *Molecular Plant*, 2019, 12(8): 1090-1102

[8] Ikeda-Kawakatsu K, Yasuno N, Oikawa T, Iida S, Nagato Y, Maekawa M, Kyojuka J. Expression level of *ABERRANT PANICLE ORGANIZATION 1* determines rice inflorescence form through control of cell proliferation in the meristem. *Plant Physiology*, 2009, 150(2): 736-747

[9] Ikeda-Kawakatsu K, Maekawa M, Izawa T, Jun-Ichi I, Nagato Y. *ABERRANT PANICLE ORGANIZATION2/RFL*, the rice ortholog of *Arabidopsis LEAFY*, suppresses the transition from inflorescence meristem to floral meristem through interaction with *APO1*. *Plant Journal*, 2012, 69(1): 168-180

[10] Yoshida A, Sasao M, Yasuno N, Takagi K, Daimon Y, Chen R, Yamazaki R, Tokunaga H, Kitaguchi Y, Sato Y. *TAWAWAI*, a regulator of rice inflorescence architecture, functions through the suppression of meristem phase transition. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2013, 110(2): 767-772

[11] Komatsu M, Chujo A, Nagato Y, Shimamoto K, Kyojuka J. *FRIZZY PANICLE* is required to prevent the formation of axillary meristems and to establish floral meristem identity in rice spikelets. *Development*, 2003, 130(16): 3841-3850

[12] Ashikari M, Sakakibara H, Lin S, Yamamoto T, Matsuoka M. Cytokinin oxidase regulates rice grain production. *Science*, 2005, 309(5737): 741-745

[13] Li S, Zhao B, Yuan D, Duan M, Li C. Rice zinc finger protein *DST* enhances grain production through controlling *Gn1a/OsCKX2* expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2013, 110(8): 3167-3172

[14] Kurakawa T, Ueda N, Maekawa M, Kobayashi K, Kojima M, Nagato Y, Sakakibara H, Kyojuka J. Direct control of shoot meristem activity by a cytokinin-inactivating enzyme. *Nature*, 2007, 445(7128): 652-655

[15] Li M, Tang D, Wang K, Wu X, Lu L, Yu H, Gu M, Yan C, Cheng Z. Mutations in the F-box gene *LARGER PANICLE*

- improve the panicle architecture and enhance the grain yield in rice. *Plant Biotechnology Journal*, 2011, 9(9): 1002-1013
- [16] Yang J, Cho L, Yoon J, Yoon H, Wai A H, Hong W, Han M, Sakakibara H, Liang W, Jung K. Chromatin interacting factor *OsVIL2* increases biomass and rice grain yield. *Plant Biotechnology Journal*, 2019, 17(1): 178-187
- [17] Yong H, Bai X, Luo M, Xing Y. *Short Panicle 3* controls panicle architecture by upregulating *APO2/RFL* and increasing cytokinin content in rice. *Journal of Integrative Plant Biology*, 2019, 61(9): 987-999
- [18] Wu Q, Li D Y, Li D J, Liu X, Zhao X, Li X, Li S, Zhu L. Overexpression of *OsDof12* affects plant architecture in rice (*Oryza sativa* L.). *Frontiers Plant Science*, 2015, 6: 833-845
- [19] Guo T, Lu Z Q, Shan J X, Ye W W, Dong N Q, Lin H X. *ERECTA1* acts upstream of the *OsMKKK10-OsMKK4-OsMPK6* cascade to control spikelet number by regulating cytokinin metabolism in rice. *The Plant Cell*, 2020, 32(9): 2763-2779
- [20] Li Y, Li X M, Fu D B, Wu C. *Panicle Morphology Mutant 1 (PMM1)* determines the inflorescence architecture of rice by controlling brassinosteroid biosynthesis. *BMC Plant Biology*, 2018, 18(1): 348-360
- [21] Lin Y, Zhao Z G, Zhou S R, Liu L, Kong W, Chen H, Long W, Feng Z, Jiang L, Wan J. Top bending panicle1 is involved in brassinosteroid signaling and regulates the plant architecture in rice. *Plant Physiology of Biochemistry*, 2017, 121: 1-13
- [22] Yamagishi J, Miyamoto N, Hirotsu S, Laza R C, Nemoto K. QTLs for branching, floret formation, and pre-flowering floret abortion of rice panicle in a temperate *japonica* × tropical *japonica* cross. *Theoretical and Applied Genetics*, 2004, 109(8): 1555-1561
- [23] Li S B, Qian Q, Fu Z M, Zeng D, Meng X, Kyojuka J, Maekawa M, Zhu X, Zhan J G, Li J. *Short panicle1* encodes a putative PTR family transporter and determines rice panicle size. *Plant Journal*, 2009, 58(4): 592-605
- [24] 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
- [25] Tan C J, Sun Y J, Xu H S, Yu S B. Identification of quantitative trait locus and epistatic interaction for degenerated spikelets on the top of panicle in rice. *Plant Breeding*, 2011, 130(2): 177-184
- [26] 王斌, 刘贺梅, 毛毕刚, 高素伟, 徐宏斌, 葛建贵. 水稻顶部小穗退化性状的 QTL 分析. *中国水稻科学*, 2011, 25(5): 561-564
- Wang B, Liu H M, Mao B G, Gao S W, Xu H B, Ge J G. QTL analysis on apical spikelet abortion in rice. *Chinese Journal of Rice Science*, 2011, 25(5): 561-564
- [27] 高素伟, 张玲, 毛毕刚, 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, 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
- [28] 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 *qPA48*, a gene controlling panicle apical development in rice. *Journal of Integrative Plant Biology*, 2011, 53(9): 710-718
- [29] 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 *TUTOUI* encodes a suppressor of cAMP receptor-like protein that is important for actin organization and panicle development. *Plant Physiology*, 2015, 169(2): 1179-1191
- [30] Heng Y, Wu C, Long Y, Luo S, Ma J, Chen J, Liu J, Zhang H, Ren Y, Wang M. *OsALMT7* maintains panicle size and grain yield in rice by mediating malate transport. *The Plant Cell*, 2018, 30(4): 889-906
- [31] 彭永彬. 水稻穗顶退化突变体 *paa1019* 和 *paa74* 的基因克隆与功能分析. 成都: 四川农业大学, 2018
- Peng Y B. Cloning and functional characterization of *panicle apical abortion 1019* and *panicle apical abortion 74* in rice. Chengdu: Sichuan Agriculture University, 2018
- [32] Murray M G, Thompson W F. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Research*, 1980, 8(19): 4321-4325
- [33] Sanguinetti C J, Dias N E, Simpson A J. Rapid silver staining and recover of PCR products separated on polyacrylamide gels. *Biotechniques*, 1994, 17(5): 915-919
- [34] Liu Y G, Chen Y. High-efficiency thermal asymmetric interlaced PCR for amplification of unknown flanking sequences. *Biotechniques*, 2007, 43(5): 649-656
- [35] Sanger F, Nicklen S, Coulson A R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1977, 74(12): 5463-5467
- [36] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method. *Methods*, 2001, 25(4): 402-408
- [37] Kwon Y, Yu S I, Park J H, Ying L, Han J H, Alavilli H, Cho J I, Kim T H, Jeon J S, Lee B H. *OsREL2*, a rice TOPLESS homolog functions in axillary meristem development in rice inflorescence. *Plant Biotechnology Reports*, 2012, 6(3): 213-224
- [38] Gao X X, Chen Z H, Zhang J, Wu C. *OsLIS-L1* encoding a lissencephaly type-1-like protein with WD40 repeats is required for plant height and male gametophyte formation in rice. *Planta*, 2011, 235(4): 713-727
- [39] Yoshida A, Ohmori Y, Kitano H, Taguchi-Shiobara F, Hirano H Y. *ABERRANT SPIKELET AND PANICLE 1*, encoding a TOPLESS-related transcriptional co-repressor, is involved in the regulation of meristem fate in rice. *Plant Journal for Cell and Molecular Biology*, 2012, 70(2): 327-339
- [40] Tankaka W, Pautler M, Jackson D, Hirano H Y. Grass meristems II: inflorescence architecture, flower development and meristem fate. *Plant and Cell Physiology*, 2013, 54(3): 313-324
- [41] Krogan N T, Long J A. Why so repressed? Turning off transcription during plant growth and development. *Current Opinion in Plant Biology*, 2009, 12(5): 628-636
- [42] Zheng J S, Hong K, Zeng L J, Wang L, Kang S J, Qu M H, Dai J R, Zou L Y, Zhu L X, Tang Z P, Meng X B, Wang B, Hu J, Zeng D L, Zhao Y H, Cui P, Wang Q, Qian Q, Wang Y H, Li J Y, Xiong G S. Karrikin signaling acts parallel to and additively with strigolactone signaling to regulate rice mesocotyl elongation in darkness. *The Plant Cell*, 2020, 32(9): 2780-2805