# 转录组测序解析超级稻淮稻 5 号灌浆速率快的机理

刘 喜<sup>1,3</sup>, 王 迪<sup>2</sup>, 高 浩<sup>2</sup>, 王颖洁<sup>3</sup>, 王贵枝<sup>3</sup>, 王彦雁<sup>3</sup>

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

摘要:灌浆速率是水稻重要而复杂的农艺性状之一,直接影响产量和品质。淮稻5号是由7208×武育粳3号杂交后代选 育而成的粳稻优良品种,具有较高的灌浆速率,但其重要的分子特征尚不清楚。通过对淮稻5号和武育粳3号受精后14天的 种子提取 RNA 进行转录组分析。采用实时荧光定量 PCR 分析籽粒灌浆速率相关基因的表达水平,采用 Sanger 测序法分析淮稻 5号和武育粳3号中已克隆的灌浆速率相关基因序列差异。在淮稻5号和武育粳3号之间检测到3230个上调基因和1171个 下调基因。GO 富集分析表明,这些基因主要参与淀粉和蔗糖生物合成、光合作用、碳同化、激素生物合成和信号转导途径。 与武育粳3号相比,淮稻5号激活了更多参与淀粉和蔗糖生物合成的基因。一共检测到63个激素相关差异表达基因,其中 35个基因参与生长素途径,表明生长素在水稻籽粒灌浆过程中起着重要作用。一些已知的灌浆速率相关基因(GFR1、OsPFP1、 OsPH01;2、OsSWEET13、OsCIN2)在淮稻5号中显著上调。Sanger 测序表明 GFR f<sup>tusidaos</sup>是控制灌浆速率的优异单倍型。

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

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

LIU Xi<sup>1,3</sup>, WANG Di<sup>2</sup>, GAO Hao<sup>2</sup>, WANG Ying-jie<sup>3</sup>, WANG Gui-zhi<sup>3</sup>, WANG Yan-yan<sup>3</sup>

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

**Abstract:** Grain filling rate is an important and complex agronomic trait that directly affects rice yield and quality. Huaidao 5, a superior rice *japonica* variety, derived from the 7208 ×Wuyujing 3 cross, shows a high grain filling rate, whereas its functional mechanism remains unclear. A transcriptome analysis in Huaidao 5 and Wuyujing 3 was performed by harvesting 14-days-after-fertilization grains. Real time fluorescent quantitative PCR was used to analyze the transcripts of few candidate genes, and Sanger sequencing was applied to identify their polymorphisms between Huaidao 5 and Wuyujing 3. 3,230 up-regulated and 1,171 down-regulated genes were detected between Huaidao 5 and Wuyujing3. Gene ontology analysis indicated that these differentially-expressed genes were primarily involved in starch and sucrose biosynthesis, photosynthesis, carbon assimilation, and hormone biosynthesis and signaling transduction pathway. If compared to Wuyujing 3, more genes involved in starch and sucrose biosynthesis between hormone-related differentially expressed genes were detected, of which 35 genes were involved in the auxin pathway, suggesting that auxin plays an important role in the rice grain filling process.

收稿日期: 2022-10-18 修回日期: 2022-11-10 URL:

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

网络出版日期:

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

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

**基金项目:** 江苏省自然科学基金(BK20190239、BK20191055),江苏省青蓝工程优秀骨干青年教师,淮安市农科院科研基金发展项目(HNY202002) Foundation project: Natural Science Foundation of Jiangsu Province (BK20190239, BK20191055), outstanding backbone young teachers of Jiangsu Qinglan Project, scientific research fund development project of Huai'an Academy of Agricultural Sciences (HNY202002)

Several identified grain-filling-rate-related genes (*GFR1*, *OsPFP1*, *OsPHO1*;2, *OsSWEET13*, *OsCIN2*) were significantly up-regulated in Huaidao 5. Moreover, Sanger sequencing revealed an elite haplotype *GFR1*<sup>Huaidao5</sup>, which contributes to the fast grain filling rate in Huaidao 5.

Key words: rice (Oryza sativa L.); Huaidao5; transcriptome; grain filling rate; GFR1

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

近年来,在水稻中发现并分离了许多与灌浆速率相关的基因<sup>[4-6]</sup>。细胞壁转化酶基因 OsGIF1/OsCIN2 已 被鉴定为在早期灌浆阶段参与碳分配的驯化选择基因<sup>[2]</sup>。四个糖转运基因 OsSWEET4、OsSWEET11、 OsSWEET14 和 OsSWEET15 是籽粒灌浆和胚乳发育所必需的<sup>[7-9]</sup>。此外,已发现两种 NAM/ATAF/CUC(NAC) 转录因子,即 ONAC127 和 ONAC129,通过直接结合 OsSWEET4 的启动子正调节籽粒灌浆<sup>[10]</sup>。miR1432 表 达抑制的植株表现出增强的籽粒灌浆率和显著增加的籽粒产量<sup>[3]</sup>。OsPHO1;2 编码磷酸转运蛋白,正调控水 稻籽粒灌浆,过表达 OsPHO1;2 能提高水稻产量,尤其是在低磷条件下<sup>[11]</sup>。刘二宝等<sup>[12]</sup>利用穞稻(Ludao) 与粳稻恢复系 C 堡(C-bao)构建的近等基因系克隆了控制水稻灌浆速率的主效数量性状位点基因 GFR1。 GFR1 基因编码细胞膜定位蛋白,并通过与 Rubisco 小亚基 OsRbcS 相互作用,提高 Rubisco 活性,促进水 稻籽粒灌浆<sup>[12]</sup>。转录组测序技术价格低廉、数据采集周期短,在水稻遗传育种研究中得到广泛应用。Kong 等<sup>[13]</sup>利用转录组分析了籼稻和粳稻对盐胁迫反应差异的机制,并鉴定了 18 个盐胁迫相关候选基因。Sun 等 <sup>[14]</sup>利用转录组分析了水稻强势粒与弱势粒灌浆动态过程,鉴定到 19442 个差异表达基因,并发现大多数淀 粉合成基因在弱势粒中的延迟表达可能是造成灌浆早期弱势粒灌浆速率低的重要因素。

准稻 5 号是由 7208×武育粳 3 号杂交选育的超级稻品种。相比武育粳 3 号,淮稻 5 号具有较高的灌浆速率。本研究拟利用转录组解析淮稻 5 号灌浆速率快的内在机理,鉴定其调控灌浆速率的基因。本研究对淮稻 5 号与武育粳 3 号灌浆速率进行鉴定,选取淮稻 5 号与武育粳 3 号灌浆速率差异最大的时期取样进行转录组测序,分析鉴定差异表达基因,以期解析淮稻 5 号灌浆速率的内在机制,为水稻高产优质分子设计育种奠定理论基础。

## 1 材料与方法

#### 1.1 试验材料

粳稻品种淮稻5号(Huaidao5; HD5)与武育粳3号(Wuyujing3; WYJ3)。每年5月至10月种植在 江苏省淮安市淮阴师范学院生物科技园内。

### 1.2 灌浆速率测定

随机选取 5 株生长整齐一致的淮稻 5 号和武育粳 3 号标记同一天开花的颖花,每株标记 50 粒颖花,在 受精后第 7、14、21、28 和 35 天从穗上收获。新鲜的籽粒样品在 105 ℃高温干燥 30 min,然后在 85 ℃下干 燥至恒重。对去壳的籽粒进行称重,根据刘二宝等<sup>[12]</sup>的方法计算灌浆速率,设置 3 次生物学重复。

#### 1.3 转录组测序

使用江苏康为世纪 RNApure 植物试剂盒提取 HD5 和 WYJ3 的受精后(DAF, days after fertilization) 14 天 籽粒总 RNA。然后,通过委托 GENE DENOVO(中国广州)在 Illumina 测序平台(HiSeq2500)上构建 cDNA 文库测序,并通过 FPKM (fragments per kilobase of transcript per million reads mapped)评估基因表达<sup>[15]</sup>,设置 三次生物学重复。使用 DESeq2 鉴定差异表达基因(DEGs, differentially expressed genes),设定的参数为|log<sub>2</sub>(Fold Change)|≥1 和 FDR<0.05。

#### 1.4 基因表达分析

用 Trizol 试剂从 HD5 和 WYJ3 受精后 14 天籽粒中提取总 RNA,并通过实时荧光定量 PCR 分析淀粉和糖生物合成相关基因、灌浆速率相关基因的表达水平。用于检测这些基因表达水平的引物参考刘二宝等<sup>[12]</sup>和孔飞等<sup>[16]</sup>。PCR 反应体积为 20µL(8.8µL 稀释 cDNA, 1.2µL 引物, 10 µL TB Green®Premix Ex Taq<sup>™</sup>II),并使用 BioRad CFX96 触摸实时 PCR 检测系统进行定量 PCR。以水稻 UBQ (LOC\_Os03g13170) 基因为对照,设置三次生物学重复。

#### 1.5 灌浆速率相关基因 GFR1 基因型鉴定

使用 Hi-DNAsecure 植物试剂盒(Cat#DP350,北京天根生化)提取 HD5 和 WYJ3 的基因组 DNA,并使用 KOD DNA 聚合酶进行 PCR。PCR 程序如下:在 98 ℃下变性 10 s,在 55℃下退火 30 s,在 68 ℃下延伸 2 min。 用于鉴定 *GFR1* 基因型引物见表 1。PCR 产物委托安徽通用生物测序。使用 BioXM2.6 软件对序列进行分析和比 对。

#### 表 1 基因型鉴定所用的引物序列

#### Table 1 Primers used for genotype identification

名称 Name	正向引物 Forward primer sequence (5' $\rightarrow$ 3')	反向引物 Revers primer sequence $(5' \rightarrow 3')$	
GFR1-1	CTCGAGTTCAAGTTAAGACT	CTTACGGTTAATCGAGTATT	
GFR1-2	ACTTTAAACTTTCTTCCCATGT	CGAGCCGCTTCACCTCCGAC	
GFR1-3	CACGATTCGCCGGAATTCGA	CCCGCTTTTACCCAAACCAA	
GFR1-4	CAGTTGGCAATTGTCACGAG	TCGAACATATCCAAGCCTCC	
GFR1-5	AAATCACAAAGCTCGCGAATT	ATGTTAGCTGCGCAATCTGC	
GFR1-6	GCAGATTGCGCAGCTAACAT	CGTGAAACGAGATAGGTCGT	

## 2 结果与分析

#### 2.1 淮稻5号和武育粳3号主要农艺性状比较

相比武育粳3号,淮稻5号株高显著增高,达到93.64 cm,提高约14%(图1A-B)。在分蘖数与穗长方面, 淮稻5号与武育粳3号无显著差异(图1C-D)。淮稻5号的结实率与千粒重均显著高于武育粳3号,分别达到94.41% 与28.54g(图1E-F)。淮稻5号的穗粒数与粒长均显著高于武育粳3号,而粒宽则无差异(图1G-I)。上述结果 表明,相比武育粳3号,淮稻5号农艺性状具有较好的综合表现。



A:成熟期 HD5 和 WYJ3 植株表型。比例尺为 5 厘米。B:成熟期 HD5 和 WYJ3 株高。C:成熟期 HD5 和 WYJ3 分蘖数。D:成熟期 HD5 和 WYJ3 種长。E:成熟期 HD5 和 WYJ3 种子结实率。F:成熟期 HD5 和 WYJ3 种子千粒重。G:成熟期 HD5 和 WYJ3 穗粒数。H:成熟期 HD5 和 WYJ3 种子结实率。F:成熟期 HD5 和 WYJ3 种子千粒重。G:成熟期 HD5 和 WYJ3 穗粒数。H:成熟期 HD5 和 WYJ3 种子粒宽。数据表示为平均值±标准差(n=10)。\*\*代表在 0.01 水平上差异极显著。

A:Phenotypes of HD5 and WYJ3 at maturity. Bar=5 cm; B: Plant height of HD5 and WYJ3 at maturity. C: Number of tillers of HD5 and WYJ3 at maturity. D: Panicle length of HD5 and WYJ3 at maturity. E: Seed setting rate of HD5 and WYJ3 at maturity. F: 1000-grain weight of HD5 and WYJ3 at maturity. G: Grains per panicle of HD5 and WYJ3 at maturity. H: Grain length of HD5 and WYJ3 at maturity. I: Grain width of HD5 and WYJ3 at maturity. Data are expressed as mean ± SD (n = 10). \*\* represents extremely significant differences at 0.01 level.

图 1 HD5 与 WYJ3 主要农艺性状比较



#### 2.2 淮稻5号和武育粳3号灌浆速率比较

为了明确淮稻5号与武育粳3号籽粒灌浆的差异,我们测定了在受精后7、14、21、28、35天 HD5与WYJ3 的籽粒灌浆速率。灌浆前期阶段 HD5 的籽粒灌浆速率显著高于其父本 WYJ3(图 2A-B)。HD5 的灌浆速率在受 精后 14 天达到最高值 1.297 mg grain<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>,但 WYJ3 的最高灌浆速率在受精后 21天,且仅为 0.818 mg grain<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>(图 2B)。然而,在受精后 21 和 28天时,HD5 的籽粒灌浆速率低于 WYJ3(图 2B)。



A: 不同灌浆期 HD5 和 WYJ3 糙米的表型。比例尺为1厘米。B: 在受精后7、14、21、28 和 35 天时 HD5 和 WYJ3 的籽粒灌浆速率。数据表示为平均值±标准差(n=3)。\*与\*\*分别代表在0.05、0.01 水平上差异显著与极显著。

A:Phenotypes of HD5 and WYJ3 brown grains at different grain filling stages. Bar=1 cm; B:Grain filling rates of HD5 and WYJ3 at 7 DAF, 14 DAF, 21 DAF, 28 DAF, and 35 DAF. Data are expressed as mean ± SD (n = 3). \* and \*\* represent significant and extremely significant differences at 0.05 and 0.01 levels,

respectively.

图 2 HD5 与 WYJ3 籽粒灌浆速率

Fig. 2 Grain filling rates of HD5 and WYJ3

#### 2.3 淮稻5号和武育粳3号差异表达基因的鉴定

为了探究 HD5 和 WYJ3 之间灌浆差异的分子机制,我们在 14 DAF 时对淮稻 5 号与武育粳 3 号籽粒进行转录 组分析。我们从 6 个样本中获得了总计 273,164,090 个 clean reads,每个样本平均 45,527,348 个 clean reads。6 个样本的测序质量值 Q30 平均值为 92.27%,范围为 91.96%-93.00%。上述测序数据表明转录组测序是成功可信 的。

我们在 HD5 和 WYJ3 之间共鉴定了 4401 个差异表达基因(DEG,图 3A-B)。相较于 WYJ3,在 HD5 中有 3230 个上调基因和 1171 个下调基因(图 3A-B)。为了验证转录组数据的可靠性,我们随机选择 5 个上调和 5 个下调表达基因进行 qRT-PCR 分析。如图 3C 所示,qRT-PCR 结果与转录组数据一致。



A: 差异表达基因的数目; B: 差异表达基因火山图; C: 5个上调和5个下调表达基因的表达水平分析。3个独立的实验进行验证。\*与\*\*分别表示在 0.05、0.01 水平上差异显著与极显著。

A: Number of up- and down-regulated DEGs; B: Volcano plot of DEGs; C: The expression levels of 5 up- and 5 down-regulated DEGs in HD5 and WYJ3. Three independent experiments were performed. \*and \*\* respectively indicate significant and extremely significant differences at *P*<0.05 and 0.01.

图 3 受精后 14 天的 HD5 与 WYJ3 籽粒转录组分析

Fig.3 Transcriptome analysis of HD5 and WYJ3 grains at 14 DAF

我们对 DEGs 进行了基因本体(GO)富集分析(图 4),发现它们在 GO 催化活性(GO:0003824)和氧化 还原酶活性(GO:0016491)方面显著富集(图 4)。相比 WYJ3,在 HD5 中上调表达基因在代谢过程、细胞过程 和单生物体过程中显著富集(图 4)。







### 2.4 淀粉和糖生物合成相关基因的转录水平分析

水稻等谷物灌浆过程涉及淀粉和糖的生物合成和积累[17]。因此,我们主要关注可能与光合作用、淀粉和糖代

谢或碳同化有关的 DEGs,发现 19 个 DEGs 参与光合作用(*LHCA6、CHLD、DXR、PSBS1*),碳同化(*OsRbcS3、OsRbcS4、OsRbcS2、OsRbcX1*)途径在 HD5 中上调(附表 1)。此外,我们发现 34 个 DEGs 参与淀粉和糖的生物合成,其中有 26 个基因上调,如 *OsPK3、OsAGPS1、SUS1*和 *SSI*(图 5A)。

为了进一步分析 HD5 和 WYJ3 之间与淀粉和糖代谢相关基因的表达水平差异,我们进行了 qRT-PCR 检测淀 粉和糖代谢相关基因表达水平。如图 5B 所示, IAS1、ISA1、GBSSII、SUSY2、AGPL1、OsAGPAS2a、BEII 和 BEIIb 的表达水平在 HD5 中显著上调,而 SSIIa、BEI 和 PPDKB 在 HD5 中受到抑制。上述结果表明,相比武育粳 3 号, 淀粉和糖代谢相关基因在淮稻 5 号中具有更高的表达。



A: 淀粉和糖代谢相关基因的转录组分析。纵坐标显示 HD5 基因表达水平与 WYJ3 相比的对数值; B: 通过三次生物学重复的 qRT-PCR 检测参与淀粉 和糖生物合成的其他基因的表达水平。\*: 在 0.05 水平差异极显著; \*\*: 在 0.01 水平差异极显著。

A:Transcriptome analysis of genes related to starch and sugar metabolism. The ordinate shows the  $log_2$  ratio of the expression levels in HD5 compared to WYJ3; B: The expression levels of other genes involved in starch and sugar biosynthesis through qRT-PCR with three biological repetitions. \*: Significant difference at 0.05 level; \*\*: Significant difference at 0.01 level.

#### 图 5 淀粉与糖代谢途径的差异表达基因



#### 2.5 生长素途径相关基因的转录水平分析

生长素(IAA)、油菜素内酯(BR)、脱落酸(ABA)等激素在植物生长发育中起着重要作用<sup>[18]</sup>。我们在 HD5 和 WYJ3 之间检测到 63 个激素相关的 DEGs(表 2 和附表 1)。其中 35 个基因参与生长素途径;7 个基因 参与ABA 途径;BR 途径涉及 6 个基因;赤霉素(GA)途径涉及 5 个基因。生长素上调 RNA 小基因 OsSAUR2、 生长素原初响应基因 IAA8、IAA12 和 IAA13、生长素响应因子 OsARF10、OsARF22、ATP 结合盒转运体 OsABCG11、 OsABCG28 和 OsABCG35 在 HD5 籽粒中高表达,而 OsSAUR32、生长素内流转运体 OsAUX3、生长素外排载体 OsPIN5c、OsIAA9、OsIAA20 和 OsABCG25 在 HD5 中受到抑制(表 2)。此外,9-顺式-环氧类胡萝卜素双加氧 酶 OsNCED3、应激激活蛋白激酶 OsSAPK9、BRI1-相关受体激酶 OsBAK1、油菜素内酯负调控因子 OsGSK2;GA 受体基因 GID1、赤霉素 2-氧化酶基因 OsGA2ox3、OsGA2ox6;细胞分裂素脱氢酶 OsCKX5;茉莉酸 ZIM 结构域 蛋白基因 OsJAZ6、OsJAZ7、OsJAZ8 和 OsJAZ10 在 HD5 籽粒中显著上调(附表 1)。

#### 表 2 生长素途径的差异表达基因

基因	Log <sub>2</sub>	<i>P</i> 值	预测功能
Gene	(HD5/WYJ3)	P-value	Predicted functions
Os10g0479900	1.00	6.87×10 <sup>-8</sup>	Auxin response factor 22
(OsARF22)			
Os04g0519700	1.78	6.06×10 <sup>-4</sup>	Auxin response factor 10
(OsARF10)			
Os06g0714300	-2.16	5.16×10-9	Auxin-responsive protein SAUR32
(OsSAUR32)	11.1.5	1 12 10 3	
Os01g0/68333	11.16	1.43×10-3	Auxin-responsive protein SAUR2
(OsSAUR2)	1.01	1.02, 10-4	Ain toon on too liles mustain
$(O_{S}AUX1)$	1.01	1.05×10	Auxin transporter-like protein
$O_{S}O_{S}O_{A}O_{A}O_{A}O_{A}O_{A}O_{A}O_{A}O_{A$	-1.12	$1.26 \times 10^{-26}$	Auxin transporter-like protein
(OsAUX3)	-1.12	1.20/10	Advin transporter-like protein
Os01g0785400	-1.65	1.94×10 <sup>-3</sup>	Indole-3-acetic acid-amido synthetase
(OsGH3.1)			·····
Os03g0162000	1.19	4.27×10-3	Indole-3-pyruvate monooxygenase
(OsYUCCA8)			
Os01g0732700	1.13	5.49×10 <sup>-4</sup>	Indole-3-pyruvate monooxygenase
(OsYUCCA3)			
Os03g0693600	1.45	6.37×10-6	Indole-3-acetate beta-glucosyltransferase
(OsIAGLU)	2.02	2 22 10-33	A
Osubgu529000	-2.03	5.52×10-55	Auxin efflux carrier component 5c
(OSPINSC) Os02a0743400	1 23	1 37×10-3	Auxin offlux corrier component 1a
(OsPIN1a)	1.23	1.57×10	Auxin ernux carrier component ra
Os02g0228900	1 69	4 46×10 <sup>-5</sup>	Auxin-responsive protein
(OsIAA7)	107	1110/010	runni responsive protein
Os02g0723400	2.61	1.66×10-3	
(OsIAA8)			
Os02g0805100	-1.12	1.21×10-3	
(OsIAA9)			
Os03g0633800	4.58	6.02×10-3	
(OsIAA12)	1.00	1 00 10 16	
$O_{s03g0/42900}$	1.82	1.80×10 <sup>-10</sup>	
(OSIAA15) Os06c0166500	1 75	2.08×10-11	
$(O_{S}IAA20)$	-1.75	2.08×10	
Os02g0693700	1 41	2.34×10 <sup>-6</sup>	ABC transporter B family member protein
(ABCB2)		2101010	
Os01g0695800	2.63	1.76×10 <sup>-7</sup>	
0-02-0290000	1.02	6 12 10-15	
050580280000	1.05	0.12×10	
Os03g0755100	1.19	1.23×10 <sup>-12</sup>	
Os04g0209200	1.08	4.62×10-3	ABC transporter C family member protein
Os06ø0731200	1 25	4 03×10 <sup>-5</sup>	ABC transporter G family member protein
(ABCG28)	1120	100/010	
Os09g0472100	1.32	1.23×10-4	
0 01 0177000	1.20	1 11. 10-36	
(ABCG31)	1.30	1.11×10**	
$O_{3}O_{4}O_{5}O_{8}O_{0}$	1 38	$7.49 \times 10^{-14}$	
030720520500	1.50	/.=/^10	
Os01g0609300	1.57	1.11×10 <sup>-13</sup>	
Os05g0222200	1.59	7.77×10 <sup>-13</sup>	
Os07g0522500	2.25	1.61×10 <sup>-33</sup>	
(ABCG43)			

Table 2 DEGs involved in auxin pathway

Os01g0609200 (ABCG35)	3.13	2.92×10 <sup>-3</sup>
Os04g0194500	3.19	5.22×10-7
Os11g0587600	1.14	5.41×10 <sup>-4</sup>
Os07g0288700	6.95	8.63×10 <sup>-3</sup>
Os01g0342750	2.37	4.88×10 <sup>-4</sup>
Os08g0384500	2.37	4.32×10 <sup>-21</sup>
Os11g0177400	-1.03	2.19×10 <sup>-8</sup>
Os09g0332700	-1.52	5.09×10 <sup>-6</sup>

#### 2.6 灌浆速率相关基因的表达水平分析

为了进一步探讨 HD5 和 WYJ3 分子机制的差异,我们通过 qRT-PCR 检测了水稻已克隆的 6 个灌浆速率相关 基因的转录水平。与我们预期一致, OsCIN2、GFR1、OsSWEET13、焦磷酸果糖 6-磷酸 1-磷酸转移酶 OsPFP1 和 OsPHO1;2 的表达水平在 HD5 籽粒中表达水平显著高度 WYJ3(图 6)。然而, OsGIF2 在 HD5 中的表达水平低 于 WYJ3(图 6B)。



图 6 6个水稻籽粒灌浆相关基因的表达水平

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

#### 2.7 灌浆速率相关基因 GFR1 基因型分析

*GFR1*在 HD5 中的表达水平高于 WYJ3(图 6A),这表明 GFR1 可能在控制 HD5 的籽粒灌浆速率中发挥重要作用。为了验证这一假设,我们进行 PCR 扩增和测序 HD5 和 WYJ3的 *GFR1*基因组。如图 7A 所示,与 WYJ3 相比, HD5 中 *GFR1*的编码区中有 1 个 InDel 和 4 个 SNPs,导致 HD5 中的一个氨基酸缺失和三个氨基酸替换(图 7B),而 *GFR1*的启动子序列无差异。为进一步明确 WYJ3 与 HD5 中 GFR1 蛋白的差异,我们利用 I-TASSER 在线软件预测分析了 GFR1 的蛋白结构。如图 7C 所示,相比 WYJ3,HD5 中 GFR1 蛋白的一个氨基酸缺失和三 个氨基酸替换导致蛋白结构发生变异。此外,HD5 中 *GFR1*的基因型与穞稻相同,而 *GFR1*<sup>Ludao</sup> 促进水稻籽粒灌浆速率<sup>[12]</sup>。



В

WYJ3 MLQKFALAFKTKTIEFFAEEEEDEDADGGVSAAAAAAAVGVGEGGVLAGQRVVVLKPDTVQSPNPSGGVGVVVGEA HD5 MLQKFALAFKTKTIEFFAEEEEDEDADGGVS<sub>32</sub>AAAAAAVGVGEGGVLAGQRVVVLKPDTVQSPNPSGGVGVVVGEA WYJ3 AAVEAALATASSFQAAYLHLQAAHAPFLPDAAAAADAAAVSHLRRLSEVKRLARDPGVGGGALTAHLEAQVRENQALL HD5 AAVEAALATASSFQAAYLHLQAAHAPFLPDAAAAADAAAVSHLRRLSEVKRLARDPGVGGGALTAHLEAQVRENQALL WYJ3 RSFDAVVNRLQAALDGKDAAAASLRRDHAELADGNARLGARLDRALAPPPGAGGDDALGAMLSAGVFDSVLRDALRVA HD5 RSFDAVVNRLQAALDGKDAAAASLRRDHAELADGNARLGARLDRALAPPPGAGGDDALGAMLSAGVFDSVLRDALRVA WJ3 HRFTRSLADLLRCAGWDLAAVAAAVYPGVAYSRPGHCRYVLLSRVCLSMFDGFDSYQFGGSTDATTLEGIDLAIRRNESL HD5 HRFTRSLADLLRCAGWDLAAAAAAVYPGVAYSRPGHCRYVLLSRVCLSMFDGFDSYQFGGSTDATTLEGIDLAIRRNESL 274 WJ3 QQFIEHSDADPMELINSSPDCEFAQFCDRKYKQLIHPGIESSLFGNSDCGKLPVLGVAGPLYEJFVAMASSIWTLHRLAWAY WJ3 DPAVGIFQIGQGAEYSVVYMENIVRSKGFSGSKELGKMMRPKVGFTVVPGFRLGGTVIQCRVYLDCGKREGIIGE HD5 DPAVGIFQIGQGAEYSVVYMENIVRSKGFSGSKELGKMMRPKVGFTVVPGFRLGGTVIOCRVYLDCGKREGIIGE

C



GFR1<sup>WYJ3</sup>



GFR1<sup>HD5</sup>

A: HD5、Ludao 和 WYJ3 之间 GFR1 基因变异示意图; B: HD5 和 WYJ3 的 GFR1 氨基酸序列比对; C: HD5 和 WYJ3 的 GFR1 蛋白结构分析。

A:Schematic of the *GFR1* gene variation among HD5, Ludao and WYJ3; B: Amino acid sequence alignment of GFR1 of HD5 and WYJ3; C: Protein structural analysis of GFR1 of HD5 and WYJ3.

图 7 在 HD5 与 WYJ3 间鉴定基因 GFRI 变异

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

## 3 讨论

谷物灌浆速率是一个重要的农艺性状,受遗传和环境因素控制<sup>[19-20]</sup>。在本研究中,我们进行了转录组 分析,以探索超级稻淮稻 5 号中与籽粒灌浆速率有关的基因和途径。我们的结果表明,与淀粉和糖代谢、 光合作用、激素生物合成和信号转导途径有关的基因在调节 HD5 籽粒灌浆过程中发挥重要作用。

在受精后 14 天时,在 HD5 和 WYJ3 间共检测到 4401 个差异表达基因,其中 59 个基因参与淀粉、糖 代谢和光合作用。在这 59 个基因中,一些基因突变会导致水稻籽粒灌浆缺陷<sup>[4]</sup>。*OsPK3* 编码丙酮酸激酶, 其突变导致丙酮酸激酶活性降低,并导致蔗糖从源到库的运输缺陷<sup>[21]</sup>;OsTPP7 调节海藻糖-6-磷酸代谢,提 高蔗糖利用率<sup>[22]</sup>。此外,许多 DEGs 编码蔗糖和淀粉合成酶,包括单糖转运体 MST1、蔗糖合成酶(SUS1、 SUS2、SUT3 和 SUS6)、淀粉合成酶 I OsSSI、ADP 葡萄糖焦磷酸化酶小亚基 OsAGPS1。这些结果表明, 与蔗糖和淀粉合成相关的高活性酶促进水稻籽粒灌浆。

植物激素调节植物生长和发育的多种过程,如粒型、胁迫反应、籽粒灌浆和株高<sup>[23-25]</sup>。ABA和IAA尤 其通过激活水稻中蔗糖到淀粉转化相关基因的表达来促进籽粒灌浆<sup>[26-27]</sup>。此外,低水平的ABA和IAA导致 谷物中的籽粒灌浆不良<sup>[26-27]</sup>。油菜素类固醇(BRs)通过刺激同化物从源流向库,促进水稻籽粒灌浆,甾醇 C-22羟化酶过表达的植株籽粒产量增加15%-44%<sup>[6]</sup>。此外,许多研究表明,IAA和BR相关基因,如*OsARF4、 OsAUX3、OsGSK2*和*OsI-BAK1*,调节水稻粒型<sup>[28-31]</sup>。这些粒型基因的突变通常会影响水稻籽粒灌浆,可能 是由库的变化引起的。在本研究中,与WYJ3相比,HD5中生长素、BRs、ABA信号和生物合成相关基因 的转录丰度显著增加。此外,与WYJ3相比,HD5中生长素外流和内流基因*OsPIN1a*和*OsAUX1*上调,暗 示生长素运输在促进水稻籽粒灌浆中具有重要作用。ABA生物合成基因*DSM2*和*OsNCED3*;ABA信号基 因*OsSAPK2、OsSAPK7、OsSAPK9*和*PYL9*;而BR信号基因*OsGSK2、OsBAK1*和*OsSERK3*在HD5中都 被激活。这些结果表明生长素运输、ABA生物合成和信号传导以及BR信号在促进水稻籽粒灌浆中也起着 关键作用。

GFR1的启动子序列在淮稻5号和武育粳3之间无差异,而其编码区存在碱基缺失与替换,导致GFR1 蛋白结构发生变异。GFR1<sup>Ludao</sup>与GFR1<sup>C-bao</sup>均可以与Rubisco小亚基OsRbcS相互作用,但是GFR1<sup>Ludao</sup>-OsRbcS互作强度显著高度GFR1<sup>C-bao</sup>-OsRbcS<sup>[12]</sup>。在日本晴背景中过表达GFR1<sup>Ludao</sup>可以显著提高水稻籽粒灌浆速率,且GFR1<sup>Ludao</sup>转入粳稻恢复系C堡也可以提高籽粒灌浆速率<sup>[12]</sup>。穭稻GFR1单倍型促进水稻籽粒灌浆速率,与淮稻5号单倍型一致。这些结果表明,GFR1可能是一个调控淮稻5号籽粒灌浆速率的重要基因。下一步,我们将筛选GFR1的相互作用蛋白,深入揭示GFR1的分子功能。

#### 参考文献

[1]Xing Y, Zhang Q. Genetic and molecular bases of rice yield. Annual Review of Plant Biology, 2010, 61:421-442

[4]陈孙禄, 詹成芳, 蒋红, 李琳涵, 张红生. 水稻籽粒灌浆速率的分子机制与遗传调控研究进展. 植物学报, 2021, 56:80-89

<sup>[2]</sup>Wang E, Wang J, Zhu X, Hao W, Wang L, Li Q, Zhang L, He W, Lu B, Lin H, Ma H, Zhang G, He Z.Control of rice grain-filling and yield by a gene with a potential signature of domestication. Nature Genetics, 2008, 40:1370-1374

<sup>[3]</sup>Zhao Y F, Peng T, Sun H Z, Teotia S, Wen H L, Du Y X, Zhang J, Li J Z, Tang G L, Xue H W, Zhao Q Z. miR1432-OsACOT (Acyl-CoA thioesterase) module determines grain yield via enhancing grain filling rate in rice. Plant Biotechnology Journal, 2019, 17:712-723

Chen S L, Zhan C F, Jiang H, Li L H, Zhang H S. Advances in the molecular mechanism and genetic regulation of grain-filling rate in rice. Chinese Bulletin of Botany, 2021, 56:80-89

- [5] 贾小丽,叶江华,苗利国,林红梅,林文雄.水稻籽粒灌浆速率的发育遗传机制研究.热带作物学报,2012,33:622-626 Jia X L, Ye J H, Miao L G, Lin H M, Lin W X. Developmental genetic mechanism research on grain-filling rate in rice. Chinese Journal of Tropical Crops, 2012, 33:622-626
- [6]Wu C Y, Trieu A, Radhakrishnan P, Kwok S F, Harris S, Zhang K, Wang J, Wan J, Zhai H, Takatsuto S, Matsumoto S, Fujioka S, Feldmann K A, Pennell R I. Brassinosteroids regulate grain filling in rice. Plant Cell, 2008, 20:2130-2145
- [7]Sosso D, Luo D, Li QB, Sasse J, Yang J, Gendrot G, Suzuki M, Koch K E, McCarty D R, Chourey P S, Rogowsky P M, Ross-Ibarra J, Yang B, Frommer W B. Seed filling in domesticated maize and rice depends on SWEET-mediated hexose transport. Nature Genetics, 2015, 47:1489-1493
- [8]Yang J, Luo D, Yang B, Frommer W B, Eom J S. SWEET11 and 15 as key players in seed filling in rice. New Phytoloist, 2018, 218:604-615
- [9]Fei H, Yang Z, Lu Q, Wen X, Zhang Y, Zhang A, Lu C. OsSWEET14 cooperates with OsSWEET11 to contribute to grain filling in rice. Plant Science, 2021, 306:110851
- [10]Ren Y, Huang Z, Jiang H, Wang Z, Wu F, Xiong Y, Yao J. A heat stress responsive NAC transcription factor heterodimer plays key roles in rice grain filling. Journal of Experimental Botany, 2021, 72:2947-2964
- [11]Ma B, Zhang L, Gao Q, Wang J, Li X, Wang H, Liu Y, Lin H, Liu J, Wang X, Li Q, Deng Y, Tang W, Luan S, He Z. A plasma membrane transporter coordinates phosphate reallocation and grain filling in cereals. Nature Genetics, 2021, 53:906-915
- [12]Liu E, Zeng S, Zhu S, Liu Y, Wu G, Zhao K, Liu X, Liu Q, Dong Z, Dang X, Xie H, Li D, Hu X, Hong D. Favorable alleles of *GRAIN-FILLING RATE1* increase the grain-filling rate and yield of rice. Plant Physiology, 2019, 181:1207-1222
- [13]Kong W, Sun T, Zhang C, Deng X, Li Y. Comparative transcriptome analysis reveals the mechanisms underlying differences in salt tolerance between indica and japonica rice at seedling stage. Frontiers in Plant Science, 2021, 12:725436
- [14]Sun H, Peng T, Zhao Y, Du Y, Zhang J, Li J, Xin Z, Zhao Q. Dynamic analysis of gene expression in rice superior and inferior grains by RNA-Seq. PLoS One, 2015, 10:e0137168
- [15]Trapnell C, Williams B A, Pertea G, Mortazavi A, Kwan G, van Baren M J, Salzberg S L, Wold B J, Pachter L.Transcript assembly and quantification by RNA-Seq reveals unannotated transcripts and isoform switching during cell differentiation. Nature Biotechnology, 2010, 28:511-515

[16]孔飞. 水稻 dull 突变体 w54 的基因图位克隆和温度敏感型黄叶突变体 yl2(t)的表型分析与基因定位.南京农业大学, 2016 Kong F. Gene map-based cloning of a rice dull mutant w54 and phenotypic analysis and gene mapping of a thermo-sensitive yellow leaf mutant yl2(t). Nanjing Agricultural University, 2016

- [17]Shaw B P, Sekhar S, Panda B B, Sahu G, Chandra T, Parida A K. Biochemical and molecular processes contributing to grain filling and yield in rice. Plant Physiology and Biochemistry, 2022, 179:120-133
- [18]Durbak A, Yao H, McSteen P. Hormone signaling in plant development. Current Opinion Plant Biology, 2012, 15:92-96
- [19]Wang G Q, Li H X, Feng L, Chen M X, Meng S, Ye N H, Zhang J.Transcriptomic analysis of grain filling in rice inferior grains under moderate soil drying. Journal of Experimental Botany, 2019, 70:1597-1611
- [20]叶菀,齐智伟,李晓静,饶玉春 各种植物激素对水稻籽粒灌浆的影响及其机制.安徽农业科学, 2013, 41:9-11

Ye W, Qi Z W, Li X J, Rao Y C. Influence and mechanism of each kind of plant hormones on rice grain filling. Journal of Anhui Agricultural Science, 2013, 41:9-11

- [21]Hu L, Tu B, Yang W, Yuan H, Li J, Guo L, Zheng L, Chen W, Zhu X, Wang Y, Qin P, Ma B, Li S. Mitochondria-associated pyruvate kinase complexes regulate grain filling in rice. Plant Physiology, 2020, 183:1073-1087
- [22]Kretzschmar T, Pelayo M A, Trijatmiko K R, Gabunada L F, Alam R, Jimenez R, Mendioro M S, Slamet-Loedin I H, Sreenivasulu N, Bailey-Serres J, Ismail A M, Mackill D J, Septiningsih E M. A trehalose-6-phosphate phosphatase enhances anaerobic germination tolerance in rice. Nature Plants, 2015, 1:15124
- [23]Santner A, Estelle M. Recent advances and emerging trends in plant hormone signalling. Nature, 2009, 459:1071-1078
- [24]Durbak A, Yao H, McSteen P. Hormone signaling in plant development. Current Opinion Plant Biology, 2012, 15:92-96
- [25]Blázquez M A, Nelson D C, Weijers D. Evolution of plant hormone response pathways. Annual Review of Plant Biology, 2020, 71:327-353
- [26]Zhang H, Tan G, Yang L, Yang J, Zhang J, Zhao B. Hormones in the grains and roots in relation to post-anthesis development of inferior and superior spikelets in japonica/indica hybrid rice. Plant Physiology and Biochemistry, 2009, 47:195-204
- [27]Zhu G, Ye N, Yang J, Peng X, Zhang J. Regulation of expression of starch synthesis genes by ethylene and ABA in relation to the development of rice inferior and superior spikelets. Journal of Experimental Botany, 2011, 62:3907-3916
- [28]Tong H, Liu L, Jin Y, Du L, Yin Y, Qian Q, Zhu L, Chu C. DWARF AND LOW -TILLE RING acts as a direct downstream target of a GSK3/SHAGGY-like kinase to mediate brassinosteroid responses in rice. Plant Cell, 2012, 24:2562-2577
- [29]Khew C Y, Teo C J, Chan W S, Wong H L, Namasivayam P, Ho C L. Brassinosteroid insensitive 1-associated kinase 1 (OsI-BAK1) is associated with grain filling and leaf development in rice. Journal of Plant Physiology, 2015, 182:23-32
- [30]Hu Z, Lu S J, Wang M J, He H, Sun L, Wang H, Liu X H, Jiang L, Sun J L, Xin X, Kong W, Chu C, Xue H W, Yang J, Luo X, Liu J X. A novel QTL qTGW3 encodes the GSK3/SHAGGY-Like kinase OsGSK5/OsSK41 that interacts with OsARF4 to negatively regulate grain size and weight in rice. Molecular Plant, 2018, 11:736-749

[31]Qiao J, Jiang H, Lin Y, Shang L, Wang M, Li D, Fu X, Geisler M, Qi Y, Gao Z, Qian Q. A novel miR167a-OsARF6-OsAUX3 module regulates grain length and weight in rice. Molecular Plant, 2021, 14:1683-1698