

DOI: 10.13718/j.cnki.xdzk.2025.07.003

彭瀚平, 郑馨媛, 刘鉴瑶, 等. 水稻小籽粒突变体 *smg5* 的表型鉴定和候选基因分析 [J]. 西南大学学报(自然科学版), 2025, 47(7): 33-46.

水稻小籽粒突变体 *smg5* 的 表型鉴定和候选基因分析

彭瀚平¹, 郑馨媛¹, 刘鉴瑶¹, 刘墨言¹, 朱洪慧¹,
李映姿¹, 雷良喆¹, 曹晨¹, 张婷^{1,2}, 李云峰^{1,2}, 庄慧¹

1. 西南大学 水稻研究所/农业科学研究院/转基因植物与安全控制重庆市重点实验室, 重庆 400715;
2. 宜宾西南大学研究院, 四川 宜宾 644000

摘要: 水稻产量主要由单位面积有效穗数、每穗粒数和粒质量决定, 其中粒质量主要受籽粒形态的影响。鉴定并克隆调控粒型的新基因, 对完善粒型调控机制和提高水稻产量有重要意义。从籼稻保持系西大 1B(XD1B)的甲基磺酸乙酯(ethylmethanesulfonate, EMS)诱变库中鉴定到 1 个小籽粒突变体(*small grain 5*, *smg5*), 与野生型相比, *smg5* 突变体籽粒极显著变小, 植株矮化、穗型直立。组织细胞学分析显示: *smg5* 突变体的小籽粒表型与颖壳细胞扩展和细胞增殖异常有关, 导致细胞数目和面积减小。遗传分析表明: *smg5* 突变体性状受 1 对隐性单基因控制。通过 MutMap 将 *SMG5* 定位在水稻第 7 条染色体上 27.5~29.2 Mb 中, 结合重测序和 PCR 测序结果, 发现突变体中 *LOC_Os07g47950* 的第 5 个外显子的第 37 位发生了 C-T 单碱基替换, 导致氨基酸由苏氨酸(Thr)变为异亮氨酸(Ile)。该位点在 F_2 代突变表型和野生表型植株的突变率分别为 100% 和 15%, 因此可将 *SMG5* 的候选基因暂定为 *LOC_Os07g47950*。

关键词: 水稻; 小籽粒突变体; 表型鉴定; 基因定位

中图分类号: S511 文献标识码: A

文章编号: 1673-9868(2025)07-0033-14

开放科学(资源服务)标识码(OSID):



Identification of Phenotype and Analysis of Candidate Gene of Rice Small Grain Mutant *smg5*

收稿日期: 2025-02-11

基金项目: 重庆市现代农业产业技术体系项目(CQMAITS202301); 四川科技局项目(2024NSFSC0321); 四川省科技计划项目(2024JDRC0064); 国家级大学生创新创业训练计划项目(202410635113); 重庆市大学生创新创业训练计划项目(S202410635012)。

作者简介: 彭瀚平, 硕士研究生, 主要从事水稻籽粒形态发育分子机制研究。

通信作者: 庄慧, 博士, 副教授, 硕士研究生导师。

PENG Hanping¹, ZHENG Xinyuan¹, LIU Jianyao¹,
LIU Moyan¹, ZHU Honghui¹, LI Yingzi¹, LEI Liangzhe¹,
CAO Chen¹, ZHANG Ting^{1,2}, LI Yunfeng^{1,2}, ZHUANG Hui¹

1. Rice Research Institute, Southwest University/Academy of Agricultural Sciences/Key Laboratory of Application and Safety Control of Genetically Modified Crops, Chongqing 400715, China;

2. Yibin Academy of Southwest University, Yibin Sichuan 644000, China

Abstract: Rice yield is mainly determined by effective panicle number per unit area, grains per panicle and grain weight, in which grain weight is mainly influenced by grain size. Identifying and cloning the new genes regulating grain size is of great significance for improving the regulation mechanism of grain size and increasing rice yield. This study reported a small grain mutant named *small grain 5* (*smg5*) identified from the mutagenesis population of an indica rice maintainer line Xida1B (*XD1B*) induced by ethyl methane sulfonate (EMS). Compared with the wild type, *smg5* mutant exhibited significantly smaller grains along with dwarf plant and erect panicles. Histochemical analysis showed that the small grain phenotype of *smg5* mutant was related to the abnormal expansion and proliferation of the glume cells, which led to decreased cell number and size. Genetic analysis showed that the trait of *smg5* mutant was controlled by a pair of recessive single gene. *SMG5* was mapped to a region of 27.5–29.2 Mb on chromosome 7 by MutMap. Moreover, re-sequencing and PCR sequencing identified a C-T single base substitution at the 37th base of the fifth exon of *LOC_Os07g47950* from the mutant, resulting in an amino acid change from threonine (Thr) to isoleucine (Ile). The mutation rate of this SNP in the mutant and wild phenotype plants of the F2 population was 100% and 15%, respectively. Therefore, the *LOC_Os07g47950* was tentatively identified as the candidate gene of *SMG5*.

Key words: rice (*Oryza sativa* L.); small grain mutant; phenotype identification; gene mapping

随着全球人口的持续增长,粮食需求日益增加,水稻作为主要粮食作物之一,其产量直接关系到国家的粮食安全。粮食安全不仅是国家发展的基本保障,也是社会稳定的重要基础,因此,提高水稻产量成为水稻育种的核心目标之一。水稻产量主要由单位面积有效穗数、每穗粒数和粒质量 3 个因素决定,其中粒质量主要受到籽粒形态和灌浆程度的影响。水稻籽粒具有谷类作物种子的典型特征,其内部的胚和胚乳被一层薄种皮包裹,储存灌浆期积累的淀粉和其他营养物质,占据成熟种子的大部分。籽粒外层由内颖和外颖组成的颖壳包裹,在发育早期,颖壳细胞快速分裂以增加细胞数量;而后细胞分裂逐渐减慢,细胞开始扩展以增大面积;最终颖壳不同维度的细胞数目和细胞大小决定了籽粒长度、宽度和厚度,从而限制灌浆充实的程度。因此,籽粒形态主要由颖壳细胞增殖和细胞扩展调节,是与水稻产量密切相关的重要农艺性状^[1-2]。

近年来,分子生物学和基因组学的发展为探究水稻粒型的调控机制带来了新的变革。大量调控水稻粒型的数量性状遗传位点(QTL)以及相关基因被成功鉴定与解析^[3],其中多数基因通过调控颖壳细胞的增殖或/和扩展来影响水稻粒型,其功能也在随后研究中得到验证。目前,已有多条水稻粒型调控途径被鉴定,如泛素—蛋白酶体降解途径、G 蛋白信号途径、植物激素途径以及转录因子调控途径等。这些调控途径的关键基因在水稻籽粒发育进程中担当重要角色,如 *GRAIN WIDTH 2* (*GW2*) 位于泛素—蛋白酶体降解途径,其编码一个 RING-like E3 泛素连接酶,通过降解其锚定到蛋白酶体的底物负调节细

胞分裂。*GW2* 的功能缺失突变体颖壳细胞数目增加, 粒宽和粒质量增加^[4]。*RICE HETEROTRIMERIC G-PROTEIN ALPHA SUBUNIT 1 (RGA1)* 和 *RICE HETEROTRIMERIC G-PROTEIN BETA SUBUNIT 1 (RGB1)* 基因位于 G 蛋白信号途径, 分别编码 G 蛋白复合体中的 $G\alpha$ 亚基和 $G\beta$ 亚基, 通过正向调控细胞增殖来影响籽粒大小, 其功能缺失突变体表现为籽粒变小^[5-7]。*DWARF 2 (D2)* 和 *DWARF 11 (D11)* 位于油菜素内酯(BR)信号途径, 编码细胞色素 P450 家族蛋白, 通过正向调控颖壳细胞扩展影响籽粒大小^[8-10]。*BIG GRAIN 1 (BG1)* 位于生长素(Auxin)信号途径, 编码一个膜定位蛋白, 通过正向调控颖壳细胞增殖和扩展影响籽粒大小^[11]。*SHORT AND WIDEN GRAIN 1 (SWG1)* 编码一个转录因子, 通过正向调控细胞扩展影响籽粒长度, 同时可负向调控横向细胞增殖与扩展影响籽粒宽度, 从而在不同方向上呈现出相反的调控效应^[12]。*GRAIN WIDTH 8 (GW8)* 编码一个包含 SBP 结构域的转录因子 *OsSPL16*, *GW8* 的高表达可以促进细胞增殖, 导致籽粒变宽。*GRAIN WIDTH 7 (GW7)* 编码一个 TONNEAU1 募集基序蛋白, 其表达量上调能增加颖壳纵向细胞分裂并减少横向细胞分裂。*GW8* 能直接与 *GW7* 的启动子结合并抑制其表达, 最终实现对水稻粒宽的正向调控^[13-15]。

此外, 丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)级联反应也对调控水稻籽粒形态起到了重要作用。MAPK 级联反应是真核生物中保守的信号转导机制, 由 MAPK、MAPK 激酶(MKK)和 MAPKK 激酶(MKKK) 3 类激酶通过顺序磷酸化, 将外源或发育信号传递至下游靶分子^[16-18]。在典型机制中, MKKK 在质膜受体刺激下通过磷酸化 MKK 的丝氨酸/苏氨酸残基使其激活, 随后被激活的 MKK 双重磷酸化 MAPK 的 T-X-Y 保守基序中的苏氨酸和酪氨酸残基, 最终通过底物的磷酸化实现信号传递^[19]。研究表明, 植物可利用编码的 MKKK、MKK 和 MAPK 蛋白组合成数千种 MKKK-MKK-MAPK 级联反应, 进而调节不同生物学过程^[20]。在水稻中 *OsMKKK10-OsMKK4-OsMAPK6* 级联反应途径可影响穗部与籽粒形态的发育。*SMALL GRAIN 2 (SMG2)*、*SMALL GRAIN 1 (SMG1)*、*DWARF AND SMALL GRAIN 1 (DSG1)* 分别编码 *OsMKKK10*、*OsMKK4*、*OsMAPK6*, 这 3 个基因突变均导致植株矮化、穗型直立密集, 并因限制颖壳细胞增殖而使籽粒变小。*OsMKKK10* 能与 *OsMKK4* 互作并将其磷酸化, *OsMKK4* 继而磷酸化 *OsMAPK6*, 形成一条正向调控颖壳细胞增殖的级联反应^[21]。此外, *GRAIN SIZE AND NUMBER 1 (GSN1)* 基因编码一个丝裂原活化蛋白激酶磷酸酶 *OsMKP1*, 可直接与 *OsMAPK6* 互作, 并通过去磷酸化使后者失活。当 *GSN1* 的表达水平降低时, 籽粒虽增大但籽粒数减少; 反之, 表达水平升高使籽粒数增多但籽粒变小。由此可见, *GSN1* 通过负调控 *OsMKKK10-OsMKK4-OsMAPK6* 级联途径, 在水稻每穗粒数与籽粒大小之间进行平衡^[22]。另外, 研究还发现编码 WRKY 转录因子的 *OsWRKY53* 是该级联反应的直接下游靶基因。*oswrky53* 突变体籽粒变小, 而超量表达 *OsWRKY53* 则使籽粒增大^[23-24]。

综上所述, 影响籽粒形态的基因数量庞大, 且粒型调控网络相当复杂。部分基因上下游的调控关系及作用机制尚不完善, 我们仍需要鉴定并克隆更多基因以完善粒型调控网络。本研究中, 我们发现了 1 个与水稻籽粒发育相关的突变体, 其主要表现为细胞增殖与扩展异常导致籽粒变小。遗传分析表明, 该突变性状受 1 个隐性单基因控制, 我们将其命名为 *small grain 5 (smg5)*。利用 MutMap 方法, 我们将 *SMG5* 的候选基因定位在水稻第 7 条染色体上 27.5~29.2 Mb 中。结合重测序和 PCR 测序结果发现, *smg5* 突变体中 *LOC_Os07g47950* 基因第 5 外显子的第 37 位发生了 C-T 单碱基替换, 从而导致原本翻译的氨基酸由苏氨酸变为异亮氨酸。*LOC_Os07g47950* 基因编码一个丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶, 其功能此前未被鉴定。本研究为解析 *SMG5* 基因调控籽粒形态发育的分子机制, 进而完善水稻粒型调控网络奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

本研究中的水稻小籽粒突变体 *small grain 5 (smg5)* 来源于西南大学水稻研究所籼稻保持系西大

1B(XD1B)的甲基磺酸乙酯(EMS)诱变库,经过多代自交进行分离纯化后,突变体性状得到稳定遗传。本研究中所用到的水稻材料均种植在重庆市歇马实验基地。

1.2 形态与组织学分析

在野生型和 *smg5* 突变体成熟期选取籽粒,用扫描电镜和体视镜进行表型观察并拍照,抽穗期选取未开花的小穗,置于 FAA 固定液(由 50% 无水乙醇,0.9 mol/L 的冰乙酸和 3.7% 甲醛混合配制)中,浸泡超过 48 h 以固定细胞形态。样本依次进行乙醇梯度脱水、二甲苯透明处理、石蜡浸泡和包埋,调整蜡块形状并固定在石蜡切片机上,切出 10 μm 厚蜡带;用毛笔轻挑蜡带平放于载玻片上,进行预检查和分段后,转移至涂有多聚赖氨酸的载玻片上,分别于展片机和烘箱中(42 $^{\circ}\text{C}$)进行展片与烘片;最后进行番红染色,并用中性树脂封片,用光学显微镜(NikonE600)观察制作好的石蜡切片并拍照。

1.3 统计分析

统计分析于 2023 年夏季水稻抽穗期与成熟期进行。在农艺性状的统计分析中,随机选取 10 株野生型和 10 株突变体,统计穗长、一次枝梗数、二次枝梗数、每穗粒数、结实率、粒长、粒宽和千粒质量等农艺性状。在细胞形态和数目统计分析中,随机选取野生型和突变体成熟期的 10 个籽粒进行扫描电镜观察,统计颖壳纵向细胞数量与细胞长度;随机选取抽穗期 10 个小穗进行石蜡切片观察,每张切片统计小穗颖壳横向细胞数量与细胞面积。差异显著性均采用 t 检验, $p < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

1.4 遗传分析

以西大 1B 和 *smg5* 突变体为亲本进行杂交获得 F_1 代, F_1 代自交获得 F_2 代。观察并统计 F_2 代群体中野生型表型和突变体表型单株数,计算 F_2 代群体性状分离比并进行卡方检验。

1.5 基因定位

基于混合群体分离分析法(Bulked segregant analysis, BSA),将西大 1B 和 *smg5* 突变体杂交,所获 F_2 代群体用于目标基因的定位。 F_2 代群体中出现明显性状分离,在分离群体中选取野生型单株和突变型单株各 30 株,混取等量叶片分别构建野生型基因池和突变型基因池,将样品送至深圳华大基因股份有限公司进行基因组重测序分析。

将野生型基因池和突变型基因池中的测序结果分别与日本晴参考基因组序列进行比对,运用 Sugihara 等^[25]在 GitHub 平台上发布的 MutMap v2.3.8 软件包筛选 SNP。首先,运用 Trimmomatic 软件处理原始测序获得的 reads 并去除低质量序列;随后,利用 BWA 和 SAMtools 软件进行 reads 比对和初步变异检测,借助 BCFtools 软件,依据映射质量不低于 26、碱基质量不小于 18 的标准筛选 InDel/SNP,计算 InDel/SNP 指数,去除突变型基因池中与野生型相同的 InDel/SNP;最后,用 Mutplot 软件绘制 InDel/SNP 在水稻 12 条染色体上的滑动窗口分布图,据此确定候选基因的定位区间。选取定位区间内在突变型基因池中 SNP 指数大于 0.9 的 SNP 为候选 SNP,利用 IGV(Integrative Genomics Viewer)浏览器查看候选 SNP 在基因组上的位置,结合在国家水稻数据中心(<https://www.ricedata.cn/gene/>)查询获得的基因注释信息及表达情况进一步筛选候选基因。

1.6 候选基因分析与克隆

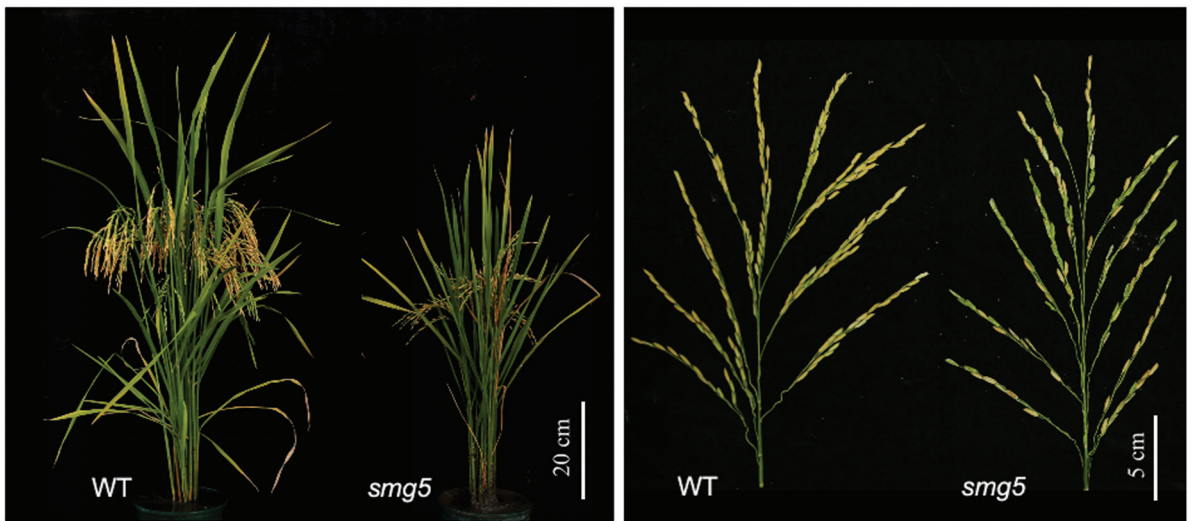
从 Gramene 网站查询并下载候选基因序列,用 Vector NTI 10.5 软件设计特异性扩增引物,引物名称 *LOC_Os07g47950*,正向序列(5'-3')GCAGCAGTGTGTACTGTTCTTCG,反向序列(5'-3')GGGAGGGCTTACTCTGTATCAGG,分别以野生型、*smg5* 突变体以及 F_2 群体中正常表型植株和突变表型植株的 DNA 为模板扩增目标序列。PCR 总体系为 25.0 μL : 含 10 \times PCR buffer 12.5 μL , dNTPs 5 mmol/L, ddH₂O 4.4 μL , 10 $\mu\text{mol/L}$ 的前后引物各 0.8 μL , 模板 DNA 1.0 μL , 5 U/ μL Taq 酶 0.5 μL 。PCR 程序为:94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min;94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s,57 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 复性 1 min,

35 个循环; 72 °C 延伸 5 min。PCR 扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳后, 送至北京擎科生物科技有限公司进行测序分析, 利用 Vector NTI 10.5 软件对测序结果进行序列比对, 用 Chromas2 软件查看测序峰图, 确定突变位点并完成候选基因鉴定。

2 结果与分析

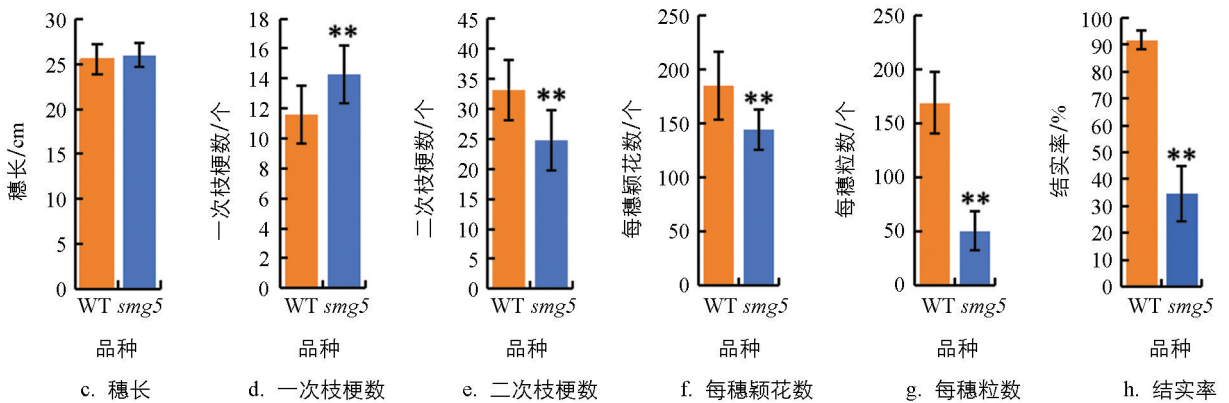
2.1 *smg5* 突变体的表型分析

与野生型(WT)相比, *smg5* 突变体成熟期植株的株型与穗型发生了明显变化。相较于野生型, *smg5* 突变体植株矮化, 表现为株型整体紧凑; 突变体穗型直立, 而野生型植株穗多且下垂(图 1a、1b)。对穗部各项农艺性状进行统计分析, 发现突变体穗长平均为 26 cm, 略长于野生型的 25.5 cm(图 1c); 一次枝梗数平均为 14.2 个, 较野生型显著增加了 22.99%(图 1d); 二次枝梗数平均为 24.7 个, 较野生型减少了 25.5%(图 1e); 此外, 突变体平均每穗颖花数和每穗粒数分别为 145 个和 50.8 个, 较野生型分别降低 14.51%和 71.6%(图 1f、1g), 后者的大幅降低导致其结实率极显著低于野生型, 仅为 34.6%(图 1h)。由此推断, *smg5* 突变体的穗型变化可能与其二次枝梗数和每穗粒数的降低有关。



a. 成熟期的株型

b. 成熟期的穗型



** 表示 $p < 0.01$, 差异有统计学意义。

图 1 野生型(WT)和 *smg5* 突变体株型和穗型鉴定和农艺性状统计

smg5 突变体与野生型(WT)在籽粒形态上也存在显著差异。与野生型相比, *smg5* 突变体籽粒显著变小, 其粒长降低了 4.28%, 平均为 9.1 mm(图 2a、2c); 粒宽降低了 12.6%, 平均为 2.22 mm(图 2b、2d);

长宽比为 4.03, 相较于野生型增加了 11.1%(图 2e), 整体呈现小籽粒表型。由于 *smg5* 突变体粒长、粒宽均降低, 其千粒质量比野生型降低了 10.69%, 平均为 22.22 g(图 2f)。

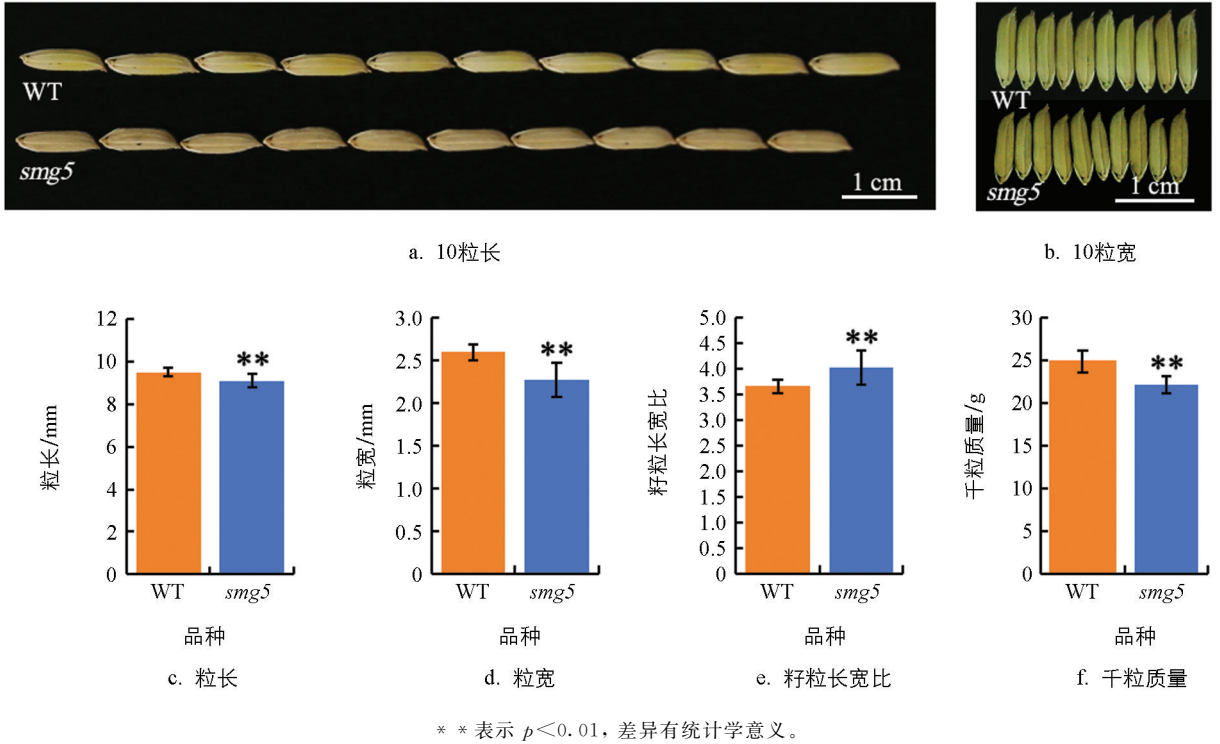


图 2 野生型(WT)和 *smg5* 突变体籽粒表型鉴定和农艺性状统计

2.2 *smg5* 突变体颖壳的组织细胞学分析

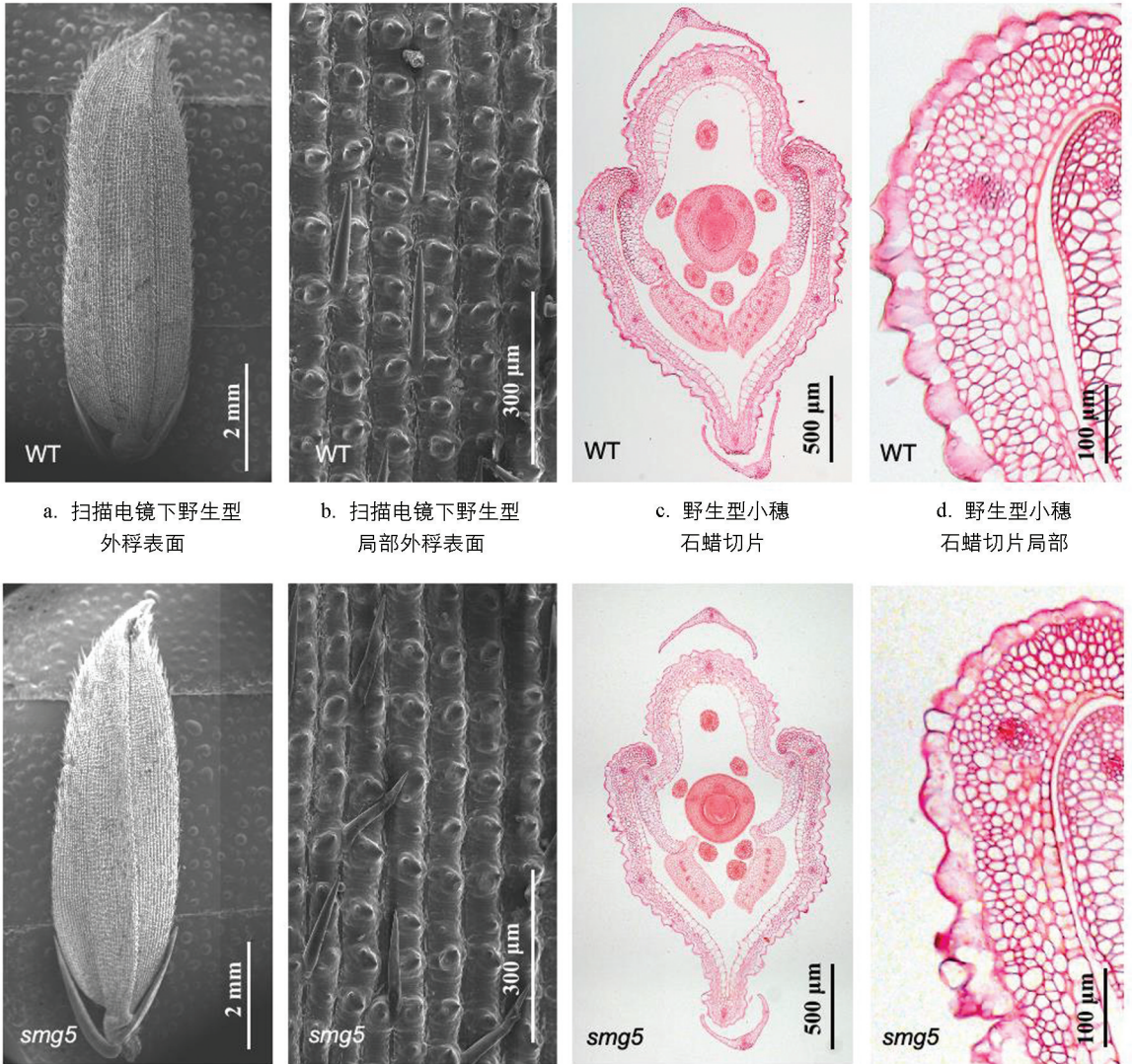
水稻籽粒形态主要由颖壳细胞的大小与数目决定, 为进一步探究 *smg5* 突变体籽粒变小的原因, 我们对野生型和突变体成熟籽粒的颖壳进行了组织细胞学分析。利用扫描电镜对野生型和突变体籽粒颖壳的纵向细胞特征进行观察, 结果显示, 二者内外稃外表皮细胞均发生明显硅化, 并在每个细胞上分布有瘤状突起, 细胞间分布有不均一毛刺(图 3a、3e)。统计籽粒内外稃交界处纵向排列的细胞总数, 发现突变体相较于野生型减少了 7.43%(图 3i)。统计籽粒内外稃交界处相同部位 2 mm 范围内的细胞个数, 发现二者均约为 23 个, 表明籽粒外稃纵向排列细胞长度差异无统计学意义(图 3b、3f、3j)。因此, 突变体籽粒长度降低主要是外稃纵向排列细胞增殖水平降低、细胞数目减少所致。

通过石蜡切片, 进一步分析和统计野生型和突变体开花期小穗颖壳的横向细胞特征。观察发现, 野生型和突变体内外稃细胞组成和特征无明显差异, 由外向内依次由 1 层明显硅化的外表皮细胞、2~5 层染色较深且面积较小的厚壁细胞、2 层染色较浅且面积较大的薄壁细胞和 1 层大小不一的内表皮细胞组成(图 3c、3g)。统计突变体与野生型外稃横向外表皮层的细胞数量, 发现二者均约为 21 个(图 3k); 统计突变体与野生型外稃横向内表皮层细胞的数量, 发现二者均约为 50 个(图 3l)。结果表明, 突变体与野生型籽粒外稃细胞的横向增殖能力差异无统计学意义。由于颖壳横截面横向排列细胞在线性排列上无明显规律, 无法准确测量细胞的平均宽度, 故统计外稃相同位置的细胞数目与面积, 计算发现突变体外稃横向细胞的面积平均为 $92 \mu\text{m}^2$, 显著低于野生型(图 3d、3h、3m), 表明突变体外稃细胞的横向扩展能力较低。综上所述, 突变体籽粒变窄主要是外稃横向细胞扩展水平降低、细胞面积减小所致。*SMG5* 基因可通过正向调控颖壳纵向细胞增殖与横向细胞扩展, 分别影响籽粒长度和宽度。

2.3 遗传分析

smg5 突变体与 *XD1B* 杂交产生的 F_1 代植株表现正常, F_2 代植株表现出显著的性状分离, 其中, 正

常植株 143 株, *smg5* 突变表型植株 57 株, 总和为 200 株, 分离比为 2.509 : 1。经卡方检验其分离比符合 3 : 1 ($\chi^2 = 1.307 < \chi_{0.05}^2 = 3.84$), 表明 *smg5* 突变体的性状受 1 对隐性单基因控制。



a. 扫描电镜下野生型外稃表面

b. 扫描电镜下野生型局部外稃表面

c. 野生型小穗石蜡切片

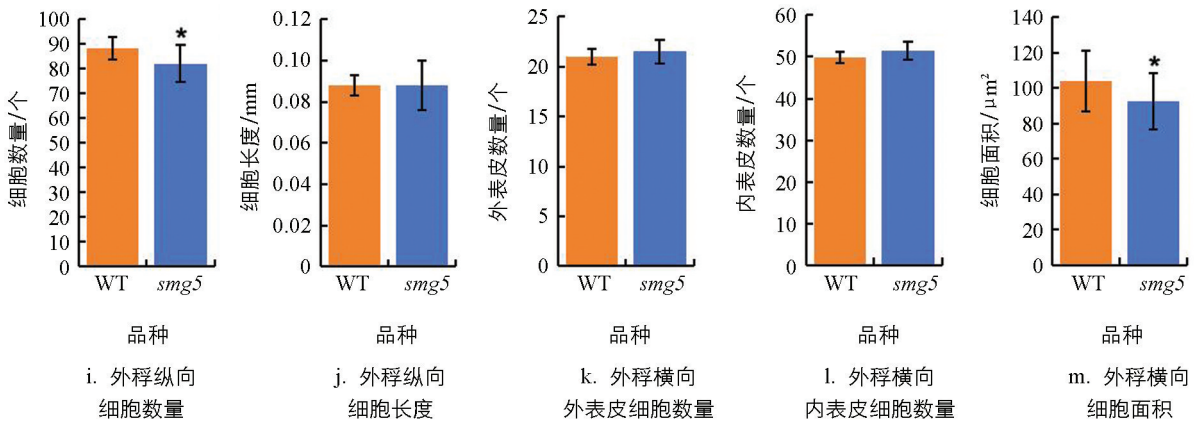
d. 野生型小穗石蜡切片局部

e. 扫描电镜下突变体外稃表面

f. 扫描电镜下突变体局部外稃表面

g. 突变体小穗石蜡切片

h. 突变体小穗石蜡切片局部



* 表示 $p < 0.05$, 差异有统计学意义。

图 3 野生型和 *smg5* 突变体颖壳的组织细胞学分析

2.4 SMG5 基因定位

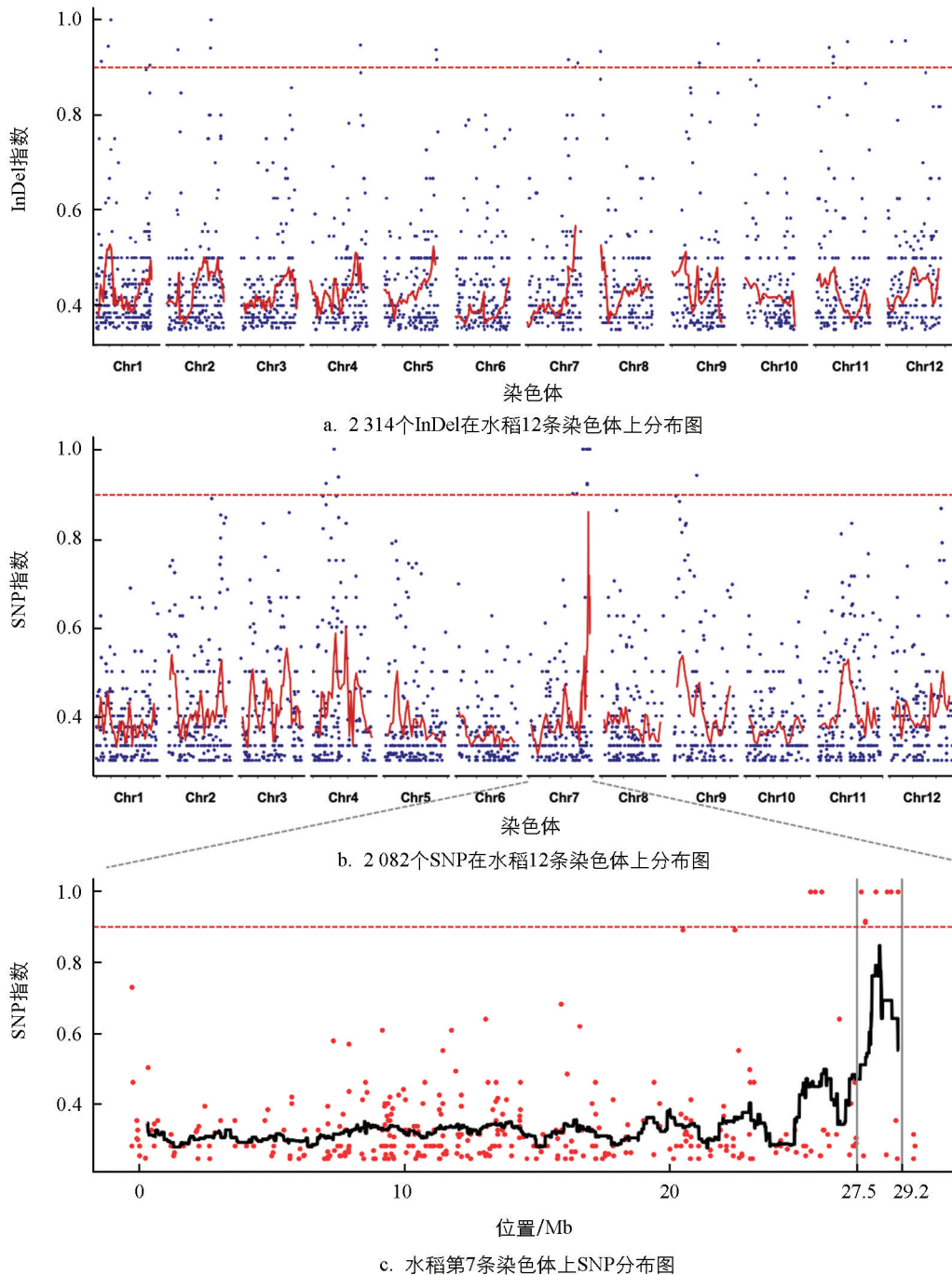
以 *smg5* 突变体与野生型 *XD1B* 为亲本杂交后的 F_2 代为定位群体, 基于 BSA 法, 构建了目标性状的分组基因池: 30 株野生型构成野生型基因池、30 株突变体构成突变型基因池。对分组基因池进行重测序后, 分别从野生型基因池和突变型基因池获得 73 709 928 个和 78 564 001 个 reads, 在水稻基因组的覆盖率分别为 98.56% 和 98.49%。使用 MutMap 软件筛选获得 2 314 个 InDel 和 2 082 个 SNP, 计算获得其在两个基因池中的 InDel/SNP 指数(I)。

基于遗传学原理进一步筛选 InDel/SNP: ① 突变型基因池单株表型较准确, 引起突变表型的位点在基因池单株中应大部分发生突变, 理论上 $I \approx 1$ 。由于测序过程中可能产生其他错误导致出现假阳性位点, 规定 $I \geq 0.9$; ② 野生型基因池包含野生型单株(即引起突变表型的位点均未发生突变, $I=0$)以及杂合突变单株(即引起突变表型的位点在同源染色体中的 1 条染色体发生突变, $I=0.5$), 规定 $I=0 \sim 50\%$ 。以 1 500 kb 为窗口大小, 150 kb 为步长, 分别绘制 InDel/SNP 指数在水稻 12 条染色体上的滑动窗口分布图(图 4a, 4b)。InDel 指数除在第 7 条染色体末端有较明显起峰外, 于 12 条染色体间分布差异不大(图 4a); 但 SNP 指数在第 7 条染色体末端有明显峰点, 表明该区域上 SNP 与突变表型紧密连锁(图 4b)。由此将候选基因定位于水稻第 7 条染色体末端, 其突变由 SNP 变异导致。以 1 000 kb 为窗口大小, 100 kb 为步长, 绘制 SNP 指数在第 7 条染色体上的滑动窗口分布图(图 4c)。选取突变型基因池中 SNP 指数大于等于 0.9 的 12 个 SNP 为候选 SNP, 其在野生型基因池中的 SNP 指数均符合 0~50% 的理论比例。由图 4c 可知, 候选 SNP 中有 7 个集中分布于第 7 条染色体上 27.5~29.2 Mb 中。

利用 IGV 软件查看候选 SNP 在水稻基因组中的位置, 在国家水稻数据中心网站上查询对应基因在水稻中的注释信息及表达情况。由表 1 可知, 有 6 个 SNP 位于基因上, 仅有 3 个基因(*LOC_Os07g38130*、*LOC_Os07g43270*、*LOC_Os07g47950*)的 SNP 位于外显子区域, 其余 SNP 位于内含子区域。结合注释信息进一步分析 SNP 的突变效应, 发现 *LOC_Os07g38130* 基因编码一个多聚半乳糖醛酸酶抑制蛋白, 其上 SNP 突变为苏氨酸的无义突变; *LOC_Os07g43270* 基因编码一个 SKP1 蛋白, 其上 SNP 突变为丙氨酸的无义突变; *LOC_Os07g47950* 基因编码一个丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶, 其上 SNP 突变代表苏氨酸变为异亮氨酸的有义突变。*LOC_Os07g47950* 在水稻花穗中表达量较高, 与籽粒发育过程中颖壳形态的建成相适应。综合以上结果, 我们将 *LOC_Os07g47950* 基因暂定为 *SMG5* 的候选基因。

表 1 12 个候选 SNP 的突变情况及基因注释

染色体	位置/ bp	碱基 变化	是否在基因上	突变效应	是否 表达	基因注释	SNP 指数	
							WT	<i>smg5</i>
Chr7	20 907 403	A-T	否	—	—	—	0.14	0.90
Chr7	22 875 377	G-A	<i>LOC_Os07g38130</i>	ACG-ACA Thr	是	多聚半乳糖醛酸酶抑制蛋白	0.21	0.90
Chr7	25 739 913	C-T	否	—	—	—	0.28	1.00
Chr7	25 918 809	C-A	<i>LOC_Os07g43270</i>	GCC-GCA Ala	否	SKP1 蛋白	0.33	1.00
Chr7	26 162 584	T-C	<i>LOC_Os07g43710</i>	内含子	是	CSLA7-纤维素合酶样家族 A; 甘露聚糖合酶	0.28	1.00
Chr7	27 661 363	A-T	<i>LOC_Os07g46370</i>	内含子	是	含 WD 结构域和 G- β 重复结构域的蛋白	0.20	1.00
Chr7	27 813 347	A-T	否	—	—	—	0.30	0.92
Chr7	27 813 348	C-T	否	—	—	—	0.28	0.92
Chr7	28 214 858	G-A	否	—	—	—	0.21	1.00
Chr7	28 641 222	C-T	<i>LOC_Os07g47950</i>	ACU-AUU Thr-Ile	是	丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶	0.20	1.00
Chr7	28 791 669	A-C	<i>LOC_Os07g48200</i>	内含子	是	含 B3 DNA 结合结构域蛋白	0.00	1.00
Chr7	29 055 597	T-C	否	—	—	—	0.15	1.00



图中红色虚线是 InDel/SNP 指数为 0.9 的阈值线。

图 4 *SMG5* 基因定位

2.5 *SMG5* 候选基因鉴定

为进一步确定候选基因, 比对 *LOC_Os07g47950* 基因上 SNP 在 BSA 混池中的差异, 并利用 PCR 测序进一步验证。结果显示, 该基因上 SNP 在突变型基因池、野生型基因池和野生型亲本中的 SNP 指数分别为 1.0、0.2 和 0, 符合遗传学比例。PCR 扩增结果显示, 6 株 *smg5* 突变体的 *LOC_Os07g47950* 基因第 5 个外显子的第 37 位均发生了 C-T 单碱基替换, 导致原本翻译的氨基酸由苏氨酸(Thr)变为了异亮氨酸(Ile)(图 5a)。通过 NCBI 网站分析 *LOC_Os07g47950* 基因及其蛋白信息, 发现 *LOC_Os07g47950* 基因位于水稻第 7 条染色体长臂端, 包含 1 563 个碱基。其编码一个包含 521 个氨基酸的丝氨酸/苏氨酸

蛋白激酶, 其中第 193 到 458 位为 Ser/Thr 蛋白激酶结构域(S_TKc)。smg5 突变体中苏氨酸—异亮氨酸的突变恰好位于该结构域中(图 5b)。

从定位群体 F₂ 中随机选择 10 株野生型植株和 8 株突变体植株的叶片提取 DNA, 利用 PCR 测序进一步验证, SNP 分型统计结果见表 2。Chromas 软件分析显示, smg5 突变体亲本中 LOC_Os07g47950 基因为纯合突变型, 突变率为 100%; 10 株正常表型的植株为纯合野生型(图 5c)或杂合型(图 5d), 突变率为 15%; 8 株突变表型植株为纯合突变型(图 5e), 突变率为 100%。以上结果表明, smg5 突变体的小籽粒表型确认与 LOC_Os07g47950 中的 C-T 碱基突变有关。

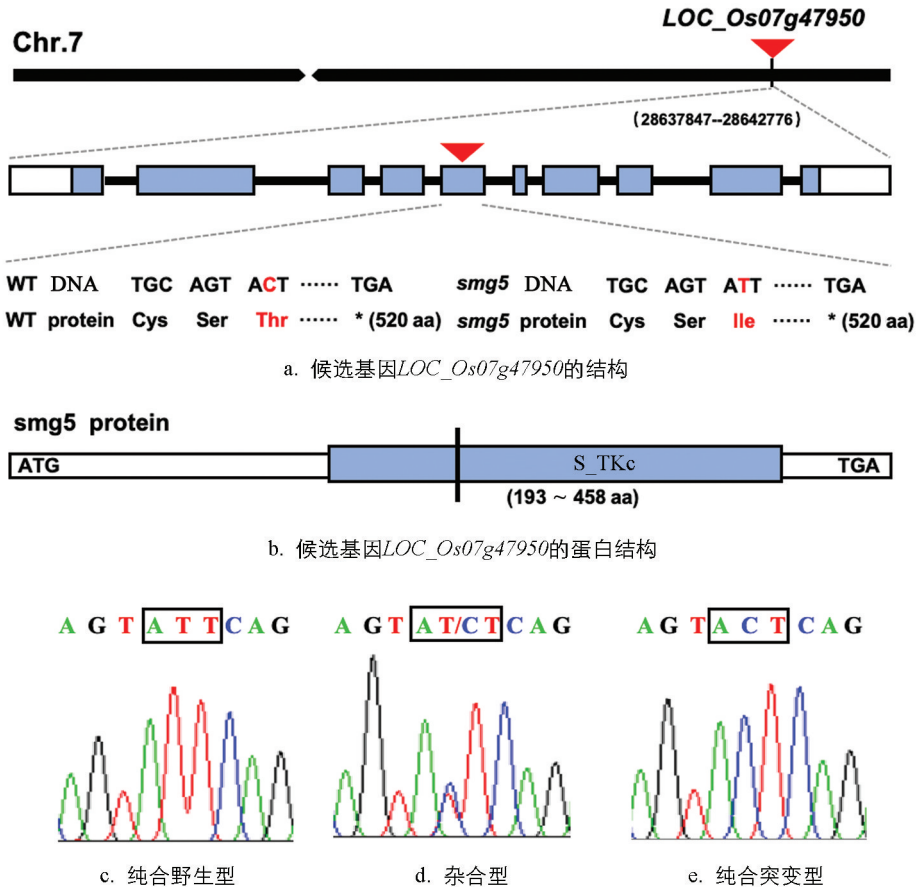


图 5 候选基因 *LOC_Os07g47950* 的鉴定

运用 qRT-PCR 对候选基因 *LOC_Os07g47950* 进行表达模式分析, 结果显示, 该基因在水稻中组成型表达, 尤在穗中表达量较高(图 6), 这与网站查询所得的表达情况相符。综合以上结果, 我们最终将 *LOC_Os07g47950* 基因定为 *SMG5* 的候选基因。

表 2 候选基因 *LOC_Os07g47950* 的 PCR 验证分型统计结果

表现型	验证株数	突变位点基因型			突变率/%
		野生型(C)	突变型(T)	杂合型(C/T)	
亲本	6	0	6	0	100
正常表型	10	7	0	3	15
突变表型	8	0	8	0	100

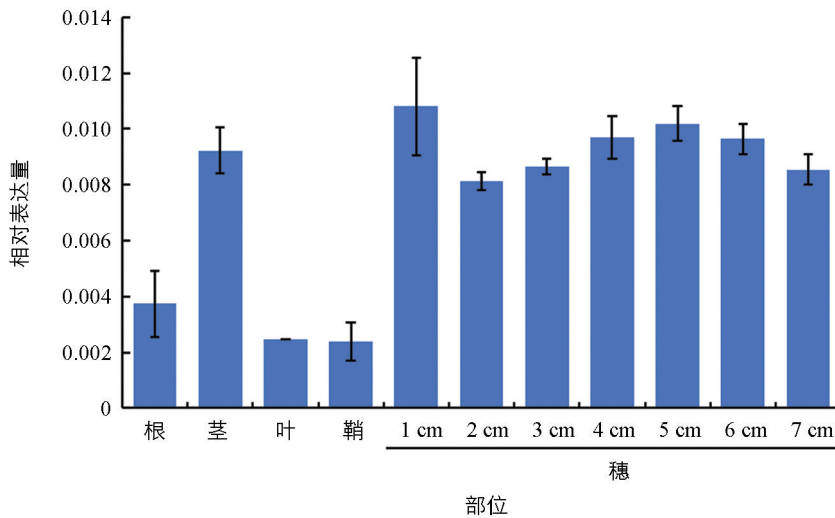


图 6 候选基因 *LOC_Os07g47950* 的表达模式分析

3 讨论与结论

3.1 讨论

3.1.1 *SMG5* 通过同时调控颖壳细胞的增殖和扩展影响籽粒形态

水稻籽粒形态主要由颖壳细胞增殖和细胞扩展调节。近年来, 已鉴定到许多与籽粒发育相关的基因, 其中已知多个调控小籽粒形态的基因, 他们主要通过单独调控细胞增殖使籽粒变小。例如, *SMG2/OsMKKK10* 正向调控颖壳细胞增殖, *smg2* 突变体外稃纵向细胞和横向细胞的数量均显著低于野生型, 致使其粒长和粒宽减少^[26]; *SMG1/OsMKK4* 相应突变体与野生型相比, 其颖壳表皮细胞面积差异不显著, 但细胞数量显著降低, 说明 *SMG1/OsMKK4* 主要影响细胞增殖调控粒型^[27]; *DSG1/OsMAPK6* 正向调控籽粒外稃表皮细胞增殖, 其突变体粒长与粒宽均降低^[28]。此外, 还有基因通过单独调控细胞扩展影响籽粒形态。例如, *small grain 1 (smg11)* 突变体籽粒的颖壳外表皮细胞面积显著减小, 但细胞数量与野生型相似, 说明 *SMG11* 主要影响颖壳细胞扩展正向调控籽粒大小^[29]。目前所鉴定的小籽粒表型相关基因, 大多数通过单独影响细胞增殖或细胞扩展调控籽粒形态, 但能同时调控细胞增殖和扩展使籽粒变小的基因较为少见。

本研究中, 通过组织细胞学分析深入解析了 *smg5* 突变体籽粒变小的原因。在纵向上, 突变体外稃纵向细胞长度与野生型差异无统计学意义, 但纵向细胞总数显著低于野生型, 说明 *SMG5* 基因通过调控细胞增殖影响籽粒长度; 在横向上, 突变体籽粒颖壳外稃的细胞数目与野生型相似, 但相同部位单个细胞面积显著低于野生型, 表明 *SMG5* 基因通过影响细胞扩展调控籽粒宽度, 因此, *SMG5* 基因能够同时正向调控纵向细胞增殖和横向细胞扩展, 从而影响籽粒的形态发育。深入探究其粒型调控机制有益于解析这一特殊的调控方式。

3.1.2 利用 MutMap 方法克隆 *SMG5* 候选基因

MutMap 是 Abe 等^[30] 于 2012 年提出的一种基因克隆方法。基于 BSA 法, MutMap 结合高通量二代测序技术, 通过比对突变型与野生型基因池的测序结果及等位基因频率, 降低遗传背景的干扰, 准确定位到与目标性状紧密连锁的 InDel/SNP 突变位点上^[31]。随后, Sugihara 等^[25] 于 2022 年在 GitHub 平台上发布 MutMap v2.3.8 软件包, 在 Abe 等的基础上优化算法, 使测序数据处理速度提升了 5~6 倍, 并可以精确识别出基因池间的 InDel/SNP 差异。与图位克隆等传统的基因克隆方法相比, MutMap 无需构建复杂的遗

传群体和遗传图谱。基于全基因组测序数据,使得该方法能够更全面、准确、迅速地锁定目标基因。MutMap 方法综合运用了全基因组学、生物信息学和分子遗传学等多学科技术,在不断实践与优化中成为一种成熟的基因克隆方法,为水稻等作物的育种研究提供了丰富的基因资源。

MutMap 方法现已被广泛应用于克隆水稻的各项产量性状基因,并在籽粒发育相关基因研究中展现出较大潜力,如调控小籽粒形态的基因 *SMG2/OsMKKK10*、*SMG11/D2* 等,均通过 MutMap 方法进行了克隆。*SMG2/OsMKKK10* 编码蛋白激酶参与 MAPK 途径调控籽粒形态^[26],*SMG11/D2* 编码细胞色素 P450 参与 BR 植物激素途径影响籽粒形态^[29]。此外,王涛^[32]运用 MutMap 方法克隆到长籽粒基因 *GRAIN LENGTH 5(GL5)*,其编码一个酪氨酸磷酸酶蛋白。*GL5* 可与 *MAPK6* 互作,参与协调 MAPK 级联反应调控粒型,因此 MutMap 对于鉴定水稻粒型新基因有重要意义。

本研究运用 MutMap v2.3.8 软件包筛选并绘制 InDel/SNP 指数在水稻 12 条染色体上的滑动窗口分布图,结合遗传学原理,将发生 SNP 变异的 *SMG5* 候选基因定位于水稻第 7 条染色体上 27.5~29.2 Mb 内,根据基因信息最终将候选基因暂定为 *LOC_Os07g47950*,该基因编码一个丝氨酸(Ser)/苏氨酸(Thr)蛋白激酶,其功能尚未被鉴定。

结合 PCR 测序结果可知,*smg5* 突变体中 *LOC_Os07g47950* 基因发生的 C-T 单碱基变化导致苏氨酸—异亮氨酸变化,此突变恰好位于该基因所编码的 Ser/Thr 蛋白激酶结构域中。在籽粒大小调控 *OsMKKK10-OsMKK4-OsMAPK6* 级联反应途径中,*OsMKK4* 激酶和 *OsMKKK10* 激酶也同样含有 Ser/Thr 蛋白激酶结构域。*OsMKKK10* 可与 *OsMKK4* 相互作用并磷酸化 *OsMKK4*,但 *MKKK10* 中 Ser/Thr 蛋白激酶结构域中的点突变会导致其对 *MKK4* 的磷酸化活性消失^[21]。另有研究表明 Ser/Thr 残基的保守性磷酸化通常对于 MAPK 活化十分关键,活化的 MAPKKs 首先磷酸化 MKKs 的 Ser/Thr 残基,随后活化的 MKKs 对下游 MAPKs 保守结构域进行双重磷酸化,从而触发 MAPKs 对下游底物的活化^[33]。候选基因 *LOC_Os07g47950* 中单碱基突变所导致的氨基酸变化可能会改变其所编码的激酶活性,从而影响其对上下游激酶的磷酸化/去磷酸化过程,最终调控籽粒形态,但其具体的分子机制仍需后续试验进一步验证。综上,克隆 *SMG5* 基因,通过功能分析解析 *SMG5* 调控粒型的分子机制,对于完善水稻粒型调控网络具有重要意义。

3.2 结论

本研究从籼稻保持系 *XD1B* 的 EMS 诱变库中鉴定到 1 个水稻小籽粒突变体 *smg5*。与野生型相比,*smg5* 突变体粒长、粒宽和千粒质量显著降低;植株整体紧凑且矮化,穗型直立,且二次枝梗数、每穗颖花数、每穗粒数和结实率均显著低于野生型。组织细胞学分析表明,*SMG5* 基因通过正向调控颖壳纵向细胞增殖和横向细胞扩展,分别影响籽粒的长度和宽度。遗传分析表明,该突变体性状受 1 对隐性单基因控制。利用 *XD1B* 和 *smg5* 突变体构建 F₂ 分离群体,采用 MutMap 方法将 *LOC_Os07g47950* 基因暂定为 *SMG5* 的候选基因。PCR 测序显示,*LOC_Os07g47950* 基因的第 5 个外显子的第 37 位发生了 C-T 单碱基替换,导致原本编码的氨基酸由苏氨酸变为了异亮氨酸。该突变位点恰好位于其所编码的 Ser/Thr 蛋白激酶结构域中。本研究进一步丰富了与籽粒形态相关的突变体材料,为深入理解水稻粒形调控网络提供了基因资源。

参考文献:

- [1] LI N, XU R, DUAN P, et al. Control of Grain Size in Rice [J]. *Plant Reprod*, 2018, 31(3): 237-251.
- [2] LI N, XU R, LI Y H. Molecular Networks of Seed Size Control in Plants [J]. *Annual Review of Plant Biology*, 2019, 70: 435-463.

- [3] 李堂, 曹华盛, 熊亮, 等. 水稻粒型调控基因功能研究进展 [J]. 广东农业科学, 2023, 50(12): 12-28.
- [4] SONG X J, HUANG W, SHI M, et al. A QTL for Rice Grain Width and Weight Encodes a Previously Unknown RING-Type E3 Ubiquitin Ligase [J]. Nature Genetics, 2007, 39(5): 623-630.
- [5] ASHIKARI M, WU J, YANO M, et al. Rice Gibberellin-insensitive Dwarf Mutant Gene *Dwarf 1* Encodes the Alpha-Subunit of GTP-binding Protein [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1999, 96(18): 10284-10289.
- [6] WANG L, XU Y Y, MA Q B, et al. Heterotrimeric G Protein Alpha Subunit is Involved in Rice Brassinosteroid Response [J]. Cell Research, 2006, 16(12): 916-922.
- [7] UTSUNOMIYA Y, SAMEJIMA C, TAKAYANAGI Y, et al. Suppression of the Rice Heterotrimeric Gprotein B-subunit Gene, *RGB1*, Causes Dwarfism and Browning of Internodes and Lamina Joint Regions [J]. The Plant Journal, 2011, 67(5): 907-916.
- [8] HONG Z, UEGUCHI-TANAKA M, UMEMURA K, et al. A Rice Brassinosteroid-Deficient Mutant, *Ebisu Dwarf (D2)*, is Caused by a Loss of Function of a New Member of Cytochrome P450 [J]. The Plant Cell, 2003, 15(12): 2900-2910.
- [9] TANABE S, ASHIKARI M, FUJIOKA S, et al. A Novel Cytochrome P450 is Implicated in Brassinosteroid Biosynthesis via the Characterization of a Rice Dwarf Mutant, *Dwarf11*, with Reduced Seed Length [J]. The Plant Cell, 2005, 17(3): 776-790.
- [10] SHI Z Y, RAO Y C, XU J, et al. Characterization and Cloning of *SMALL GRAIN 4*, a Novel *DWARF11* Allele that Affects Brassinosteroid Biosynthesis in Rice [J]. Science Bulletin, 2015, 60(10): 905-915.
- [11] LIU L C, TONG H N, XIAO Y H, et al. Activation of *Big Grain1* Significantly Improves Grain Size by Regulating Auxin Transport in Rice [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2015, 112(35): 11102-11107.
- [12] 朱洪慧, 李映姿, 高远卓, 等. 水稻短宽粒基因 *SWG1* 的图位克隆 [J]. 中国农业科学, 2023, 56(7): 1260-1274.
- [13] WANG S K, WU K, YUAN Q B, et al. Control of Grain Size, Shape and Quality by *OsSPL16* in Rice [J]. Nature Genetics, 2012, 44(8): 950-954.
- [14] WANG S K, LI S, LIU Q, et al. The *OsSPL16-GW7* Regulatory Module Determines Grain Shape and Simultaneously Improves Rice Yield and Grain Quality [J]. Nature Genetics, 2015, 47(8): 949-954.
- [15] WANG Y X, XIONG G S, HU J, et al. Copy Number Variation at the *GL7* Locus Contributes to Grain Size Diversity in Rice [J]. Nature Genetics, 2015, 47(8): 944-948.
- [16] ANDREASSON E, ELLIS B. Convergence and Specificity in the Arabidopsis MAPK Nexus [J]. Trends in Plant Science, 2010, 15(2): 106-113.
- [17] ZHANG M M, ZHANG S Q. Mitogen-activated Protein Kinase Cascades in Plant Signaling [J]. Journal of Integrative Plant Biology, 2022, 64(2): 301-341.
- [18] WIDMANN C, GIBSON S, JARPE M B, et al. Mitogen-activated Protein Kinase: Conservation of a Three-Kinase Module from Yeast to Human [J]. Physiological Reviews, 1999, 79(1): 143-180.
- [19] YANG K Y, LIU Y, ZHANG S. Activation of a Mitogen-activated Protein Kinase Pathway Is Involved in Disease Resistance in Tobacco [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2001, 98(2): 741-746.
- [20] SEGER R, KREBS E G. The MAPK Signaling Cascade [J]. FASEB Journal, 1995, 9(9): 726-735.
- [21] XU R, DUAN P G, YU H Y, et al. Control of Grain Size and Weight by the *OsMKKK10-OsMKK4-OsMAPK6* Signaling Pathway in Rice [J]. Molecular Plant, 2018, 11(6): 860-873.

- [22] GUO T, CHEN K, DONG N Q, et al. *GRAIN SIZE AND NUMBER1* Negatively Regulates the OsMKKK10-OsMKK4-OsMPK6 Cascade to Coordinate the Trade-off between Grain Number Per Panicle and Grain Size in Rice [J]. *The Plant Cell*, 2018, 30(4): 871-888.
- [23] CHUJO T, MIYAMOTO K, OGAWA S, et al. Overexpression of Phosphomimic Mutated *OsWRKY53* Leads to Enhanced Blast Resistance in Rice [J]. *PLoS One*, 2014, 9(6): e98737.
- [24] HU L F, YE M, LI R, et al. The Rice Transcription Factor *WRKY53* Suppresses Herbivore-Induced Defenses by Acting as a Negative Feedback Modulator of Mitogen-activated Protein Kinase Activity [J]. *Plant Physiology*, 2015, 169(4): 2907-2921.
- [25] SUGIHARA Y, YOUNG L, YAEGASHI H, et al. High-performance Pipeline for MutMap and QTL-Seq [J]. *PeerJ*, 2022, 10: e13170.
- [26] GUO T, LU Z Q, SHAN J X, et al. *ERECTA1* Acts Upstream of the OsMKKK10-OsMKK4-OsMPK6 Cascade to Control Spikelet Number by Regulating Cytokinin Metabolism in RiceFree [J]. *The Plant Cell*, 2020, 32(9): 2763-2779.
- [27] DUAN P G, RAO Y C, ZENG D L, et al. *SMALL GRAIN 1*, which Encodes a Mitogen-activated Protein Kinase Kinase 4, Influences Grain Size in Rice [J]. *Plant Journal*, 2014, 77(4): 547-557.
- [28] LIU S Y, HUA L, DONG S J, et al. OsMAPK6, a Mitogen-Activated Protein Kinase, Influences Rice Grain Size and Biomass Production [J]. *The Plant Journal*, 2015, 84(4): 672-681.
- [29] FANG N, XU R, HUANG L J, et al. *SMALL GRAIN 11* Controls Grain Size, Grain Number and Grain Yield in Rice [J]. *Rice*, 2016, 9(1): 64.
- [30] ABE A, KOSUGI S, YOSHIDA K, et al. Genome Sequencing Reveals Agronomically Important Loci in Rice Using MutMap [J]. *Nature Biotechnology*, 2012, 30(2): 174-178.
- [31] MICHELMORE R W, PARAN I, KESSELI R V. Identification of Markers Linked to Disease-resistance Genes by Bulk Segregant Analysis: A Rapid Method to Detect Markers in Specific Genomic Regions by Using Segregating Populations [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1991, 88(21): 9828-9832.
- [32] 王涛. 一个水稻粒型相关基因的克隆与功能研究 [D]. 雅安: 四川农业大学, 2018.
- [33] FIIL B K, PETERSEN K, PETERSEN M, et al. Gene Regulation by MAP Kinase Cascades [J]. *Current Opinion in Plant Biology*, 2009, 12(5): 615-621.

责任编辑 周仁惠

