

研究报告 Original Papers

贵州地方粳稻‘黎平杂边禾’矮秆小粒突变体*dss1*鉴定与基因定位曾晓芳¹, 黄仁权¹, 陈锡², 李岩¹, 李建容¹, 赵德刚^{1,2,*}¹贵州大学农业生物工程研究院/生命科学学院, 山地植物资源保护与种质创新教育部重点实验室, 贵州省农业生物工程重点实验室, 贵阳550025²贵州省农业科学院, 国家DUS中心贵州分中心, 贵阳550006

摘要: 本研究从贵州地方粳稻(*Oryza sativa* ssp. *japonica*)品种‘黎平杂边禾’甲基磺酸乙酯(EMS)突变体库中筛选获得一份能稳定遗传的矮秆小粒突变体, 暂命名为*dss1* (*dwarf and small seed 1*)。与野生型相比, *dss1*表现为植株矮化、株型直立、叶色深绿、籽粒变小、第二节间严重缩短、穗长增加等典型油菜素内酯(BR)缺陷突变体的性状。显微观察结果表明*dss1*叶鞘表皮细胞的长度变短, 可能是突变体第二叶鞘长度比野生型短的原因。对突变体的暗形态建成与BR敏感性研究表明, 黑暗条件下突变体表现为去黄化表型, 对外源BR敏感。遗传特性分析证明*dss1*突变体由一个隐性单基因位点控制。利用MutMap技术将*dss1*基因定位于3号染色体上, 筛选获得一个候选基因, 测序结果表明, *dss1*候选基因为BR合成途径关键酶基因*OsDWARF*, *dss1*是由于该基因第5个外显子上第335位的氨基酸由苏氨酸(ACT)突变为异亮氨酸(ATT)所引起的。定位得到的矮化小粒基因*DSS1*为一个新的*OsDWARF*等位基因。

关键词: 水稻; 矮化小粒突变体*dss1*; 基因定位; *OsDWARF*基因; 油菜素内酯

水稻(*Oryza sativa*)是一种重要的粮食作物, 世界超过半数的人口以大米为主食, 水稻生产在我国和全球粮食安全以及可持续发展中具有极其重要的地位和作用(Wang等2013; 肖景华等2015)。水稻株高和籽粒大小与水稻产量和品质密切相关, 是水稻生产的重要农艺性状(Yang和Hwa 2008)。“绿色革命”就是成功利用了矮秆基因, 助推了作物“矮化育种”技术的广泛应用。随着DNA分子标记和基因组测序技术的发展, 水稻理想株型分子设计育种更加受到重视, 穗大、粒多、适当株高成为了水稻株型育种重要的选择目标(Qian等2016)。根据目前的研究资料分析, 水稻株型的形成受多方面因素的影响, 其中植株体内的植物激素是调控株高和籽粒发育的主要内在因素, 尤其是油菜素内酯(brassinosteroid, BR)与赤霉素(gibberellin或gibberellic acid, GA)。BR是甾醇类激素的统称, 目前已经发现有60余种(Saleh等2006)。BR通过诱导细胞分裂和伸长、促使细胞壁松弛、增加细胞渗透吸水以及调节微管分布的方向等促进植株伸长生长, 且能特异调节一些参与生长的基因表达(Saleh等2006; Wei和Li 2016)。因此, BR合成代谢及信号转导相关基因的突变或功能丧失会导致植物株高及籽粒性状的变化(Yamamuro等2000; Hong

等2002; Nakamura等2006; Shi等2015; Liu等2016; Zhang等2018)。

早期BR代谢与信号转导途径相关基因功能的研究主要是以拟南芥和长春花等少数双子叶植物为研究对象来进行的。作为单子叶模式植物, 水稻中BR的研究方法与拟南芥相类似, 即通过大规模筛选BR相关突变体, 再分离和克隆相关基因。随着水稻大量BR相关突变体的发现及水稻基因组研究的快速发展, 多个水稻BR合成与信号转导相关的基因被克隆, 其作用机制已有较深入的研究(Yamamuro等2000; Hong等2002, 2003; Nakamura等2006; Clouse 2011)。虽然水稻中对BR作用机制研究取得了一系列进展, 但是相对于拟南芥中BR代谢及信号传递途径研究而言还相对滞后, 很多BR相关调控问题仍需解决。因此, 创制和鉴定更多水稻BR相关突变体, 分离其突变基因, 并深入分析基因的结构和功能, 可以进一步阐明BR在水稻

收稿 2018-04-09 修定 2018-06-05

资助 国家转基因生物新品种培育科技重大专项(2016ZX08-010003)、贵州省科技重大专项(黔科合重大专项字[2012]6005)和贵州省高层次创新型人才培养项目[黔科合人才(2016)4003号]。

* 通讯作者(dgzhaod@gzu.edu.cn)。

生长发育过程中的作用机制, 也能为水稻理想株型创制、提高水稻产量提供理论依据。

本研究在贵州地方高秆稻种材料‘黎平杂边禾’的甲基磺酸乙酯(ethyl methane sulfonate, EMS)突变体库中筛选到一份能稳定遗传的矮化小粒突变体(暂命名为*dwarf and small seed 1*, *dss1*), 该突变体表现为植株矮化、株型直立、叶色深绿、籽粒变小、穗长增加等BR缺陷突变体的性状。通过对*dss1*突变体表型、细胞学特征及遗传进行分析, 并对控制矮化小粒性状基因进行定位研究, 为进一步阐明BR对水稻株型和粒形调控的分子机制提供新的研究资料, 为水稻分子育种提供理论依据, 同时也为水稻育种创造新种质。

1 材料与方法

1.1 植物材料

利用浓度为0.5% (*m/V*) EMS诱变贵州黔东南州种植的地方农家粳稻(*Oryza sativa* L. ssp. *japonica*) ‘黎平杂边禾’, 获得能稳定遗传的矮化小粒突变体*dss1*及用于遗传性状分析的‘黎平杂边禾’野生型(wild type, WT), 由本实验室收集和保存。籼稻(*O. sativa* ssp. *indica*)亲本‘9311’为贵州省农业科学院水稻研究所朱速松研究员惠赠。水稻材料夏季种植于贵州大学贵阳水稻种植示范基地, 冬季种植于贵州省农业科学院水稻研究所三亚水稻种植基地。

1.2 实验方法

1.2.1 *dss1*突变体表型分析

在贵阳的水稻种植基地种植WT及*dss1*突变体, 各种植5行, 每行10株, 常规肥水管理。水稻黄熟期随机选取WT及*dss1*突变体植株各20株, 测定植株高度、节间长度、分蘖数、剑叶长、剑叶角度、穗长等, 种子收获后对有效粒数、千粒重等农艺性状进行考察。

1.2.2 遗传性分析

遗传群体构建: 配置*dss1* (母本)/‘9311’ (父本)、*dss1*/WT杂交组合。成熟期对杂交F₁代植株进行农艺性状考察, 观察矮化性状是否表现, 确定*dss1*突变为隐性或是显性遗传。利用F₁自交获得F₂分离群体, 扬花期统计各杂交F₂群体植株株高分离情况。

1.2.3 *dss1*突变体细胞学分析

为研究突变体细胞学特性, 取苗龄14 d突变体与WT第二叶叶鞘, 参考曾晓芳等(2014)的方法, 利

用刮片法, 将叶鞘叶肉细胞刮除, 留下表皮细胞, 在Leica Microsystems Wetzlar GmbH 301-185.104-000光学显微镜下观察叶鞘表皮细胞形态特征并拍照, 并对细胞长度进行测定, 测定细胞数目各15个。

1.2.4 *dss1*突变体暗形态建成

取*dss1*突变体及WT成熟种子经0.5% (*V/V*) NaClO消毒20 min后, 42°C浸种2 d, 37°C培养箱中催芽1 d, 播种于带有稻田土的培养盆中, 分别于30°C光照(光照16 h/黑暗8 h, 光照强度288 μmol·m⁻²·s⁻¹)及完全黑暗条件下进行培养, 7 d后观察*dss1*突变体暗形态建成情况。每个处理10粒种子, 重复3次。

1.2.5 *dss1*突变体对外源BR敏感性

取*dss1*突变体及WT成熟种子经0.5% NaClO消毒20 min后, 42°C浸泡至露白, 37°C催芽1 d后播种于含有浓度为0、10⁻³、10⁻²、10⁻¹、1.0 μmol·L⁻¹表油菜素内酯(24-epibrassinolide, BL)的Yoshida培养液中培养, 置于30°C、光照16 h/黑暗8 h条件下培养, 14 d后测量突变体与WT根长及第三叶叶角。每个处理10粒种子, 重复3次。

1.2.6 *dss1*突变体基因定位

本研究参考Abe等(2012)利用MutMap方法对*dss1*突变体进行基因定位与克隆。以*dss1*与WT杂交F₂代分离群体作为定位群体。在水稻扬花期分别取杂交F₂代群体中正常株高植株与半矮化植株各20株叶片, 提取DNA, 构建DNA混池。对亲本DNA及F₂分离群体DNA混池进行全基因组测序。测序结果与参考基因组‘日本晴’进行比对, 得到单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphism, SNP)数据库。去除WT和混池DNA相同的SNPs, 挑选出混池DNA特有SNPs, 最后计算每个SNPs的SNP-index, SNP-index为该位点检测的突变序列的频次除以该位点的总深度。挑选SNP-index为1的SNPs为候选SNPs。对候选SNPs进行注释后, 得到候选基因。

1.2.7 候选基因突变位点确定

根据候选基因SNP所在区域的DNA序列, 设计引物(表1), 以*dss1*突变体与WT基因组DNA为模板, 进行PCR扩增后, 送英潍捷基公司广州测序部测序, 根据峰图判断突变体中SNP的突变位点。

1.2.8 数据处理

利用Microsoft Excel 2013与SPSS 18.0软件对实验数据进行处理和统计分析。

表1 测序使用的PCR引物

Table 1 PCR primers used for sequencing

引物名称	引物序列(5'→3')
<i>dss1</i> -F1	TGAAGCAACCCACCACA
<i>dss1</i> -R1	GCTCCGCCTCCATACAC
<i>dss1</i> -F2	TGTTCAAGGACGCACATC
<i>dss1</i> -R2	GCCAAGCACAAGGGT
<i>dss1</i> -F3	CTTGGCACCATCTCC
<i>dss1</i> -R3	AAACGGCTGTCTAATC

2 实验结果

2.1 *dss1*突变体表型特征

*dss1*突变体在苗期表现出比WT植株矮小、根长缩短、叶夹角变小的特性(图1-A), 成熟期表现出株型直立、植株矮化、叶色深绿、穗长增加、籽粒变小等BR缺陷型突变体典型性状(图1-B~D)。调查还发现, *dss1*开花期和结实期与WT相同, 但在成熟期后, 突变体表现出延迟衰老的性状, 即当WT叶片大部变黄时, 突变体叶片仍保持绿色(图1-C)。与WT相比, *dss1*突变体的株高、剑叶角、剑叶长、有效穗粒数、粒长、粒宽和千粒重显著降低, 其中, 株高与剑叶角分别为WT的55.88%和11.67%; 穗长则比WT显著增加, 为WT的1.56倍, 达到极显著差异水平; 剑叶变窄, 差异达显著水平; 分蘖数与籽粒厚度略有减小, 但差异尚未达显著水平(表2)。对各茎节节间长度进行测定发现, *dss1*突

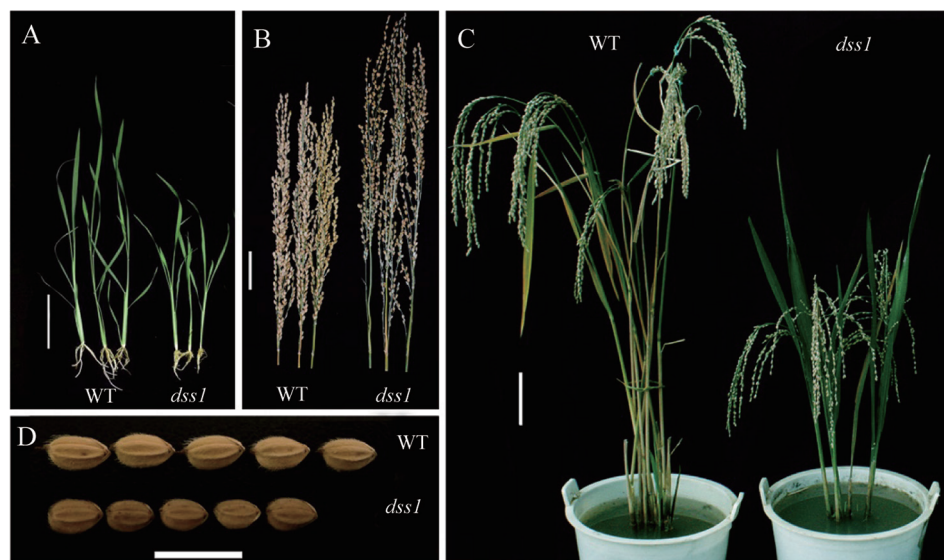
变体的第二、第三与第四节间均严重缩短, 其中突变体第二节间几乎未伸长, 长度仅为0.61 cm, 为WT的29.23 cm长度的2.09%, 表明*dss1*矮化是由于节间长度缩短所引起的, 属于dm型矮化突变(图2)。

2.2 *dss1*突变体细胞学形态

*dss1*突变体在苗期生长较WT缓慢, 苗长及叶片长度均比WT短(图3-A)。选取苗龄为14 d的*dss1*及WT植株的第二叶叶鞘, 利用刮片法除去叶肉细胞, 保留叶鞘表皮细胞, 在显微镜下观察叶鞘表皮细胞形态, 发现突变体的叶鞘表皮细胞长度比WT短(图3-B和C), 对突变体及WT叶鞘表皮细胞长度进行测定, 发现突变体细胞长度缩短为WT的59.80% (图3-D), 这说明苗期*dss1*突变体叶鞘变短的原因是由于细胞长度变短所引起的。

2.3 *dss1*突变体暗形态建成及对外源BR反应

部分水稻BR缺陷突变体黑暗条件下会表现出去黄化特征(非正常光/暗形态建成, deetiolated phenotype, DET phenotype), 即水稻中胚轴及节间无法伸长, 因此部分BR生物合成和信号转导相关基因的突变可通过暗形态建成来进行鉴别(Hong等2002)。结果表明, 在正常光照培养条件下, *dss1*突变体与WT植株节间和中胚轴均不伸长, 而在黑暗条件下培养7 d后, WT植株节与中胚轴伸长, 但*dss1*突变体的节与中胚轴则未伸长, 表明*dss1*植株暗形态反应受阻(图4)。

图1 WT与*dss1*突变体表型Fig.1 Phenotypes of WT and *dss1* mutant

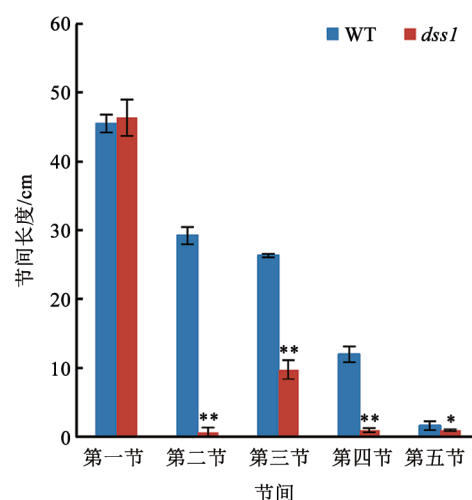
A: 苗龄40 d的植株, 标尺长度代表5 cm; B: 穗部性状, 标尺长度代表5 cm; C: 成熟期植株, 标尺长度代表10 cm; D: 籽粒, 标尺长度代表1 cm。

表2 WT与*dss1*突变体农艺性状Table 2 Agronomic characteristics of WT and *dss1* mutant

性状	WT	<i>dss1</i>
株高/cm	166.10±6.36	92.81±7.63**
有效分蘖数	6.90±1.37	6.00±0.95
剑叶长/cm	41.92±4.20	31.98±4.15**
剑叶宽/cm	2.31±0.28	1.86±0.14*
剑叶角/°	94.10±11.13	10.98±2.27**
穗长/cm	27.44±1.40	42.74±2.62**
有效穗粒数	264.85±21.75	219.71±27.92**
千粒重/g	31.32±1.80	21.47±1.63**
粒长/mm	7.12±0.14	5.34±0.85**
粒宽/mm	3.49±0.14	2.88±0.28**
粒厚/mm	2.45±0.09	2.50±0.14

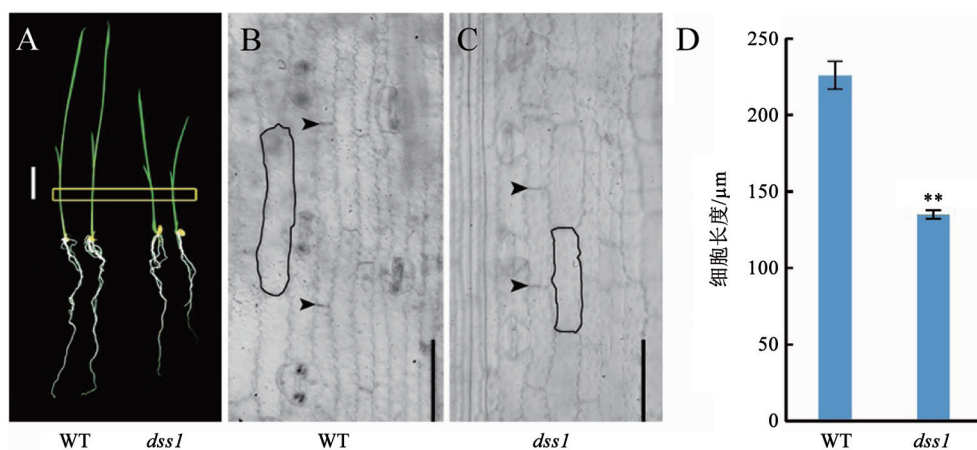
*与**分别表示同一指标相同情况的两个数据间存在显著差异(在*t*检验中 $P<0.05$ 水平上)与极显著差异(在*t*检验中 $P<0.01$ 水平上),下同。 $n=20$,图2同。

为进一步确定*dss1*是由于BR合成受阻还是信号转导途径受阻所引起的,研究了*dss1*对外源BR的反应。通过不同浓度的外源BR对*dss1*进行处理发现,突变体与WT的变化趋势相同,随着外源BR浓度的增加,突变体与WT第三叶倾角均变大,根长变短,突变体第三叶角度的变化比WT小,但根长缩短的趋势比WT大(图5),表明*dss1*突变体对外源BR有反应,*dss1*根与叶片对BR的响应敏感性存在特异性,即突变体叶片对外源BR的敏感性比WT弱,根对BR的敏感性比WT强,综上表现为可能不是BR信号相关突变体,可能为BR合成受阻突变体。

图2 WT与*dss1*突变体节间长度Fig.2 Internode lengths of WT and *dss1* mutant

2.4 *dss1*突变体遗传性分析

以突变体*dss1*分别与WT及籼稻‘9311’配置杂交组合,成熟期对构建的杂交组合F₁代进行农艺性状考察。研究发现,*dss1*突变体与WT及‘9311’杂交组合的F₁代植株株高与籽粒均表现正常,未产生矮化与小粒性状,这表明突变体*dss1*矮化小粒突变为—隐性突变。统计1274株*dss1*与‘9311’杂交F₂代群体,其中株高正常植株994株,突变性状植株330株。卡方检测结果显示,突变性状与正常性状植株符合1:3分离比($\chi^2=0.56$, $\chi^2_{0.05}=3.84$, $\chi^2<\chi^2_{0.05}$);统计282株*dss1*与WT杂交F₂代群体中,株高正常植株

图3 WT与*dss1*突变体叶鞘表皮细胞比较Fig.3 Comparison of epidermal cell lengths in leaf sheath in WT and *dss1* mutant

A: 苗龄为14 d的WT与*dss1*突变体植株,黄色框线为取样部位,标尺长度代表2 cm; B: WT第二叶叶鞘表皮细胞,标尺长度代表100 μm; C: *dss1*突变体第二叶叶鞘表皮细胞,标尺长度代表100 μm; D: WT与*dss1*突变体细胞长度, $n=15$ 。



图4 水稻突变体*dss1*去黄化表型

Fig.4 DET phenotypes of the wild type and *dss1* mutants grown in the dark

三角表示中胚轴, 箭头所示为节, 标尺长度代表1 cm。

207株, 突变性状植株75株。卡方检测结果显示, 突变性状与正常性状植株符合1:3分离比($\chi^2=0.38$, $\chi^2_{0.05}=3.84$, $\chi^2 < \chi^2_{0.05}$), 表明*dss1*突变性状受一对隐性基因控制。

2.5 *dss1*突变体基因定位

我们利用MutMap方法对突变体基因进行定位。从*dss1*突变体与WT杂交的F₂代群体中挑选出突变性状表型与正常株高植株各20株, 进行混池

测序, 同时对WT及*dss1*进行测序作为对照, 然后进行SNP分析。我们在*dss1*突变体混池中检测到1 179个特异SNP, 其中SNP-index等于1 (即测序所得的SNP与突变性状连锁共分离)的有14个(表3), 在14个SNP位点所在候选基因中, 5个SNP位点位于基因间隔区, 7个SNP位点位于内含子区域, 1个SNP位于基因上游, 仅有SNP3位点所在候选基因LOC_Os03g40540发生了非同义突变。查阅水稻基因组注释计划, 其中LOC_Os03g32630编码一个ATP结合盒式(ATP-binding cassette, ABC)转运蛋白, 主要参与水稻对非生物环境胁迫(Nguyen等2014); LOC_Os03g39580、LOC_Os03g37430、LOC_Os03g29206编码未分类的还原转座子蛋白, 未见与水稻株高发育相关的功能报道; LOC_Os03g40830编码推测的OsSub30枯草杆菌蛋白酶, 未见有与水稻株高发育相关功能的报道; LOC_Os03g44710为已克隆的落粒性基因*OsSh1*, 调控水稻落粒性(Lin等2012); LOC_Os03g39500编码推测的长末端重复Ty3-gypsy亚族还原转座子蛋白; LOC_Os03g39598编码CACTA, 增强抑制突变(enhancer/suppressor-mutator, En/Spm)亚族转座子蛋白, 也未见有与水稻株高相关功能的报道; 仅有发生非同义突变的LOC_Os03g40540为已克隆的水稻细胞色素P450家族基因*OsDWARF/OsBR6ox*, 编码BR合成的关键酶BR-6氧化酶, 具有调控水稻株高及籽粒发育功能。因此, 我们认为LOC_Os03g40540为最佳候选基因。

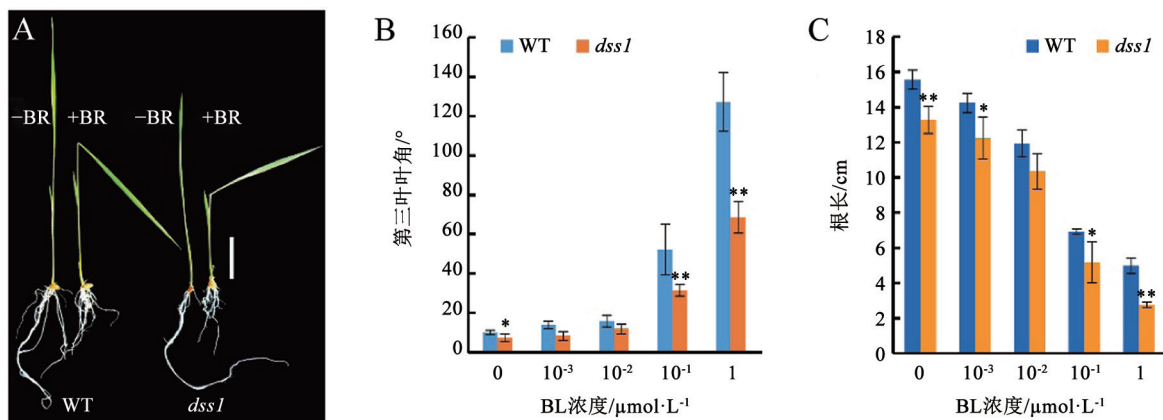


图5 WT与*dss1*突变体对外源BR的响应

Fig.5 Responses of WT and *dss1* mutant to exogenous BR

A: WT与*dss1*突变体对1.0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 外源BR处理的反应表型, 标尺长度代表1 cm; B: 不同浓度外源BR处理下第三叶叶角; C: 不同浓度外源BR处理下植株根长。

表3 *dss1*突变体在3号染色体定位区段内候选基因SNP位点Table 3 Candidate genes in rice chromosome 3 mapping region for *dss1* mutant

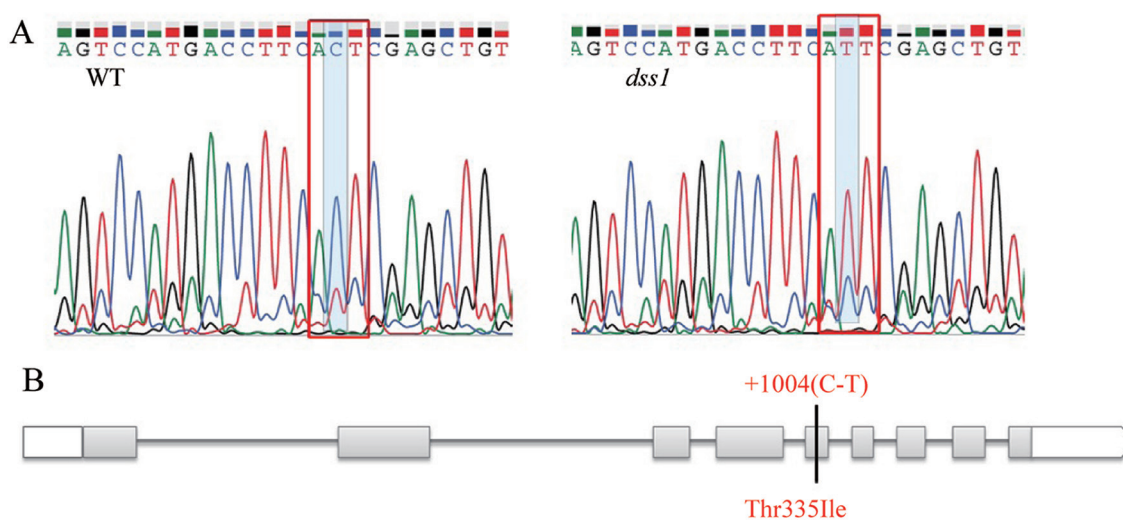
编号	位点/bp	基因型(WT/ <i>dss1</i>)	基因编号	所在基因位置	基因功能注释
SNP1	18 689 781	C/T	LOC_Os03g32630	基因上游	ABC 转运蛋白, ATP 绑定蛋白
SNP2	21 977 913	C/T	LOC_Os03g39580	内含子	假定的未分类还原转座子蛋白
SNP3	22 541 368	C/T	LOC_Os03g40540	非同义突变	推测的细胞色素P450
SNP4	22 295 066	C/T	—	基因间隔区	—
SNP5	20 766 944	C/T	LOC_Os03g37430	内含子	未分类的还原转座子蛋白
SNP6	22 706 580	C/T	LOC_Os03g40830	内含子	推测的OsSub30枯草杆菌蛋白酶
SNP7	17 200 452	C/T	—	基因间隔区	—
SNP8	13 081 990	C/T	—	基因间隔区	—
SNP9	26 589 916	G/A	—	基因间隔区	—
SNP10	16 607 942	C/T	LOC_Os03g29206	内含子	假定的还原转座子蛋白
SNP11	21 921 376	C/T	—	基因间隔区	—
SNP12	21 939 376	C/T	LOC_Os03g39500	内含子	Ty3-gypsy亚族还原转座子蛋白
SNP13	21 991 150	C/T	LOC_Os03g39598	内含子	CACTA, En/Spm亚族转座子蛋白
SNP14	25 202 426	G/A	LOC_Os03g44710	内含子	落粒性基因 <i>OsSh1</i>

2.6 突变位点的验证

为了进一步验证*dss1*突变体的候选突变位点(SNP3), 设计*OsDWARF*基因扩增引物。PCR扩增及测序显示, *dss1*突变体在LOC_Os03g40540的第5个外显子上的第1 004位编码碱基由WT的C突变为T, 从而导致第335位的氨基酸由苏氨酸(threonine, Thr)突变为异亮氨酸(isoleucine, Ile) (图6)。因此, 我们推测矮化小粒基因*dss1*为*OsDWARF*的一个新的等位基因。

3 讨论

水稻株高控制基因大致可分为与节间数调控相关基因及与节间伸长相关基因(Komorisono等2005; Xue等2008; Yan等2011)。GA、BR及独角金内酯等激素参与控制水稻节间的伸长, 因此, 参与这些激素生物合成和信号转导途径相关基因的突变会导致水稻植株株高的改变(Hong等2003, 2005; Sakamoto等2004; Tanabe等2005; Arite等2007; Wang

图6 *dss1*候选基因检测Fig.6 Identification of *dss1* candidate gene

A: WT与*dss1*突变体在突变位点的测序峰图, 红色框表明WT与*dss1*突变体突变位点碱基; B: 候选基因*OsDWARF*结构图, 图中+1004(C-T)表示*dss1*突变体的第1 004位碱基由WT的C突变为T, Thr335Ile表示*dss1*突变体第335位氨基酸由WT的苏氨酸变为异亮氨酸。

和Li 2008, 2011; Xue等2008; Yang和Hwa 2008; Xie等2010; Tong等2012; Guo等2013)。从前人的研究报道来看,与BR相关的水稻矮化突变体常表现为第二节严重缩短、穗颈节长度伸长、叶色深绿、株型直立等性状(Kitagawa等2010)。*dss1*突变体植株同样表现为植株叶夹角变小、第二节间与第三节间严重缩短、穗长增加等BR缺陷型表型。暗培养条件下,BR缺陷突变体的幼苗表现为中胚轴与节间均不伸长的去黄化表型,即暗形态建成受到影响,可以依据此特征来判断是否为BR缺陷突变体(Yamamuro等2000; Hong等2003, 2005)。黑暗处理一周的*dss1*幼苗中胚轴与节延长受到影响,表现为去黄化表型,表明*dss1*的暗形态建成受阻。同时,*dss1*对外源BR敏感,说明*dss1*可能为一份BR合成相关突变体。

通过MutMap技术对突变体基因定位发现,*dss1*候选基因为BR合成途径中关键酶基因*OsDWARF*,*dss1*是由于第5外显子处的非同义突变引起的335位的氨基酸由苏氨酸突变为异亮氨酸所造成的。*OsDWARF*编码水稻BR合成途径中BR-6氧化酶,属于细胞色素P450家族(Hong等2002; 孙超和黎家2017; 李辉等2015)。目前已报道的水稻*OsDWARF*基因突变体有4个,其中*brd1*、*brd1-1*及*brd1-2*均表现为极度矮化、节间不伸长、叶片弯曲、穗形与籽粒变小,而*brd1-3*突变体矮化没有和其他3个突变体明显,但株高也仅能达到30 cm (Hong等2002; Mori等2002)。研究表明,*brd1*突变体是由于第4和第5外显子间193 bp的缺失及5 bp的插入(AGTAC)导致基因移码突变,蛋白的大部分序列被破坏;*brd1-1*是由于内含子6与外显子7之间113 bp缺失导致蛋白缺少P450活性所必需的绑定位点;*brd1-2*则是由于所有CYP85、CYP90与CYP88家族最保守的第111位甘氨酸被缬氨酸所替代引起的;而矮化性状稍弱的*brd1-3*则是由于单核苷酸突变所造成的P450家族非保守氨基酸变化所引起的(Hong等2002; Mori等2002)。本研究中*dss1*突变体表型与这4个突变体不同,而与已报告的水稻突变体*d2*及*d61*突变体表型更相似,表现为株高半矮化、叶片直立、穗长增加等性状,推测原因可能为*dss1*仅为单碱基突变引起的氨基酸变化,且该位点的氨基酸未在P450关键区域,因此,*dss1*表现出区别于*brd1*等蛋白保守区域变化的极端矮化突变体的表型。

BR可以通过反馈抑制调控BR生物合成与信号相关基因表达来维持植物体内BR的内稳定态,因此,水稻的一些BR合成受阻的缺陷型突变体,如*d2* (Hong等2003)、*brd1* (Hong等2002)及*lidd10* (Liu等2016)等,由于内源BR的减少,导致BR信号转导相关基因表达上调,对外源BR敏感性增加。在我们的研究中也得到了同样的结果,即*dss1*突变体根对外源BR的敏感性比WT强。由于BR不能在根与芽之间进行长距离运输,但是BR可以通过调节生长素的运输来调控植株生理和形态反应(Jiang等2012),水稻对外源BR的反应具有组织特异性,即根及胚芽鞘对外源BR的敏感性强于叶片,因此,本研究中*dss1*突变体叶片对外源BR的敏感性低于根。水稻BR缺陷突变体如*cpb1*、*d11*、*d2*及*brd1*等常表现为叶色深绿(Hong等2002, 2003; Tanabe等2005; Wu等2016),水稻*lhdd10*突变体中叶绿素含量增加,是由于突变体中叶绿素合成相关基因表达上调所引起的,表明BR可能参与叶绿素的合成(Liu等2016)。我们在前期研究中也发现,*dss1*突变体叶绿素含量比WT高,最大光合效率比WT高,但其有效利用光能的能力比WT弱,突变体丙二醛(malondialdehyde, MDA)含量增加,差异达到极显著水平,说明*dss1*突变基因的水稻光合特性与MDA含量相关(陈锡等2016)。因此,BR在水稻叶绿素合成及光合特性方面的作用,还需要进一步的研究。

参考文献(References)

- Abe A, Kosugi S, Yoshida K, et al (2012). Genome sequencing reveals agronomically important loci in rice using MutMap. *Nat Biotechnol*, 30: 174–178
- Arite T, Iwata H, Ohshima K, et al (2007). *DWARF10*, an *RMS1/MAX4/DAD1* ortholog, controls lateral bud outgrowth in rice. *Plant J*, 51 (6): 1019–1029
- Chen X, Zeng X, Zhao D (2016). The photosynthetic characteristics and protect enzyme activity of a small grain and dwarf mutant *dss-1* of Lipingzabianhei Guizhou local rice cultivar. *Mol Plant Breed*, 14 (6): 1602–1608 (in Chinese with English abstract) [陈锡, 曾晓芳, 赵德刚(2016). 贵州黎平杂边禾突变体*dss-1*光合生理特性与保护酶活性研究. *分子植物育种*, 14 (6): 1602–1608]
- Clouse SD (2011). Brassinosteroid signal transduction: from receptor kinase activation to transcriptional networks regulating plant development. *Plant Cell*, 23 (4): 1219–1230
- Guo X, Hou X, Fang J, et al (2013). The rice *GERMINATION DEFECTIVE 1*, encoding a B3 domain transcriptional

- repressor, regulates seed germination and seedling development by integrating GA and carbohydrate metabolism. *Plant J*, 75 (3): 403–416
- Hong Z, Ueguchi-Tanaka M, Fujioka S, et al (2005). The Rice brassinosteroid-deficient *dwarf2* mutant, defective in the rice homolog of *Arabidopsis* DIMINUTO/DWARF1, is rescued by the endogenously accumulated alternative bioactive brassinosteroid, dolichosterone. *Plant Cell*, 17 (8): 2243–2254
- Hong Z, Ueguchi-Tanaka M, Shimizu-Sato S, et al (2002). Loss-of-function of a rice brassinosteroid biosynthetic enzyme, C-6 oxidase, prevents the organized arrangement and polar elongation of cells in the leaves and stem. *Plant J*, 32 (4): 495–508
- Hong Z, Ueguchi-Tanaka M, Umemura K, et al (2003). A rice brassinosteroid-deficient mutant, *ebisu dwarf* (*d2*), is caused by a loss of function of a new member of cytochrome P450. *Plant Cell*, 15 (12): 2900–2910
- Jiang Y, Bao L, Jeong SY, et al (2012). XIAO is involved in the control of organ size by contributing to the regulation of signaling and homeostasis of brassinosteroids and cell cycling in rice. *Plant J*, 70 (3): 398–408
- Kitagawa K, Kurinami S, Oki K, et al (2010). A novel kinesin 13 protein regulating rice seed length. *Plant Cell Physiol*, 51 (8): 1315–1329
- Komorisono M, Ueguchi-Tanaka M, Aichi I, et al (2005). Analysis of the rice mutant *dwarf and gladius leaf 1*. Aberrant katanin-mediated microtubule organization causes up-regulation of gibberellin biosynthetic genes independently of gibberellin signaling. *Plant Physiol*, 138 (4): 1982–1993
- Li H, Zuo QY, Tu SB (2015). Advances in brassinosteroid biosynthesis and metabolism. *Plant Physiol J*, 51 (11): 1787–1798 (in Chinese with English abstract) [李辉, 左钦月, 涂升斌(2015). 油菜素内酯生物合成和代谢研究进展. *植物生理学报*, 51 (11): 1787–1798]
- Lin Z, Li X, Shannon LM, et al (2012). Parallel domestication of the *Shattering1* genes in cereals. *Nat Genet*, 44 (6): 720–724
- Liu X, Feng ZM, Zhou CL, et al (2016). Brassinosteroid (BR) biosynthetic gene *lhdd10* controls late heading and plant height in rice (*Oryza sativa* L.). *Plant Cell Rep*, 35 (2): 357–368
- Mori M, Nomura T, Ooka H, et al (2002). Isolation and characterization of a rice dwarf mutant with a defect in brassinosteroid biosynthesis. *Plant Physiol*, 130 (3): 1152–1161
- Nakamura A, Fujioka S, Sunohara H, et al (2006). The role of *OsBRII* and its homologous genes, *OsBRL1* and *OsBRL3*, in rice. *Plant Physiol*, 140 (2): 580–590
- Nguyen VNT, Moon S, Jung KH (2014). Genome-wide expression analysis of rice ABC transporter family across spatio-temporal samples and in response to abiotic stress- es. *J Plant Physiol*, 171 (14): 1276–1288
- Qian Q, Guo L, Smith SM, et al (2016). Breeding high-yield superior quality hybrid super rice by rational design. *Natl Sci Rev*, 3: 283–294
- Sakamoto T, Miura K, Itoh H, et al (2004). An overview of gibberellin metabolism enzyme genes and their related mutants in rice. *Plant Physiol*, 134 (4): 1642–1653
- Saleh A, Lumbieras V, Lopez C, et al (2006). Maize DBF1-interactor protein 1 containing an R3H domain is a potential regulator of DBF1 activity in stress responses. *Plant J*, 46 (5): 747–757
- Shi Z, Rao Y, Xu J, et al (2015). Characterization and cloning of *SMALL GRAIN 4*, a novel *DWARF11* allele that affects brassinosteroid biosynthesis in rice. *Sci Bull*, 60 (10): 905–915
- Sun C, Li J (2017). Biosynthesis, catabolism, and signal transduction of brassinosteroids. *Plant Physiol J*, 53 (3): 291–307 (in Chinese with English abstract) [孙超, 黎家 (2017). 油菜素甾醇类激素的生物合成、代谢及信号转导. *植物生理学报*, 53 (3): 291–307]
- Tanabe S, Ashikari M, Fujioka S, et al (2005). A novel cytochrome P450 is implicated in brassinosteroid biosynthesis via the characterization of a rice dwarf mutant, *dwarf11*, with reduced seed length. *Plant Cell*, 17 (3): 776–790
- Tong H, Liu L, Jin Y, et al (2012). DWARF AND LOW-TILLERING acts as a direct downstream target of a GSK3/SHAGGY-like kinase to mediate brassinosteroid responses in rice. *Plant Cell*, 24 (6): 2562–2577
- Wang N, Long T, Yao W, et al (2013). Mutant resources for the functional analysis of the rice genome. *Mol Plant*, 6 (3): 596–604
- Wang Y, Li J (2008). Molecular basis of plant architecture. *Annu Rev Plant Biol*, 59: 253–279
- Wang Y, Li J (2011). Branching in rice. *Curr Opin Plant Biol*, 14: 94–99
- Wei Z, Li J (2016). Brassinosteroids regulate root growth, development, and symbiosis. *Mol Plant*, 9: 86–100
- Wu Y, Fu Y, Zhao S, et al (2016). *CLUSTERED PRIMARY BRANCH 1*, a new allele of *DWARF11*, controls panicle architecture and seed size in rice. *Plant Biotechnol J*, 14: 377–386
- Xiao JF, Wu CY, Yuan M, et al (2015). The progress and perspective of rice functional genomics research in China. *Chin Sci Bull*, 60 (18): 1711–1723 (in Chinese with English abstract) [肖景华, 吴昌银, 袁猛等(2015). 中国水稻功能基因组研究进展与展望. *科学通报*, 60 (18): 1711–1723]
- Xie X, Yoneyama K, Yoneyama K (2010). The strigolactone story. *Annu Rev Phytopathol*, 48: 93–117
- Xue W, Xing Y, Weng X, et al (2008). Natural variation in *Ghd7* is an important regulator of heading date and yield

- potential in rice. *Nat Genet*, 40 (6): 761–767
- Yamamuro C, Ihara Y, Wu X, et al (2000). Loss of function of a rice *brassinosteroid insensitive1* homolog prevents internode elongation and bending of the lamina joint. *Plant Cell*, 12 (9): 1591–1605
- Yan WH, Wang P, Chen HX, et al (2011). A major QTL, *Ghd8*, plays pleiotropic roles in regulating grain productivity, plant height, and heading date in rice. *Mol Plant*, 4 (2): 319–330
- Yang XC, Hwa CM (2008). Genetic modification of plant architecture and variety improvement in rice. *Heredity*, 101 (5): 396–404
- Zeng X, Liao X, Zhao D (2014). Identification and phenotypic expression of a semi-dwarf mutant *bgsd-2* of the Guizhou local black glutinous rice cultivar. *Guizhou Agr Sci*, 42 (5): 1–6 (in Chinese with English abstract) [曾晓芳, 廖宣峰, 赵德刚(2014). 贵州黑糯稻半矮秆突变体***bgsd-2***的鉴定及性状表现. *贵州农业科学*, 42 (5): 1–6]

Identification and gene mapping of a dwarf and small seed mutant *dss1* in ‘Lipingzabianhe’, a japonica rice landrace in Guizhou

ZENG Xiao-Fang¹, HUANG Ren-Quan¹, CHEN Xi², LI Yan¹, LI Jian-Rong¹, ZHAO De-Gang^{1,2,*}

¹*Institute of Agro-bioengineering / College of Life Sciences, Key Laboratory of Plant Resources Conservation and Germplasm Innovation in Mountainous Region (Ministry of Education), Guizhou Key Laboratory of Agro-bioengineering, Guizhou University, Guiyang 550025, China*

²*Guizhou Academy of Agricultural Sciences, Guiyang Station for DUS Testing Center of New Plant Varieties of MOA, Guiyang 550006, China*

Abstract: A stably inherited dwarf and small seed mutant *dss1* was identified from ethyl methane sulfonate (EMS) mutant progeny of ‘Lipingzabianhe’, a rice (*Oryza sativa* ssp. *japonica*) landrace in Guizhou. Compared to wild type (WT), *dss1* mutant showed the typical brassinosteroid (BR)-deficient phenotype, with erect and dark green leaves, small seeds, un-elongated second internodes and longer panicles. The leaf sheath epidermal cells were shorter than those of the wild types. To determine whether the dwarf phenotype of mutant plants was caused by BR deficiency or insensitivity, we analyzed the response of *dss1* to exogenous BR treatment and skotomorphogenesis. The results suggest that the *dss1* plant showed a deetiolated phenotype in the darkness, and was sensitive to exogenous BR. Genetic analysis and F₂ progeny segregation results reveal *dss1* was controlled by a pair of recessive genes. By employing the MutMap method, we revealed that *dss1* contains a mutation in the *OsDWARF* gene on chromosome 3. The *dss1* mutation occurred in the 5th exon of *OsDWARF*, which caused a nonsense mutation of a threonine (ACT) codon change to an isoleucine (ATT) at residue 335. We confirmed that *DSS1* mapped in this study is a new allelic gene of *OsDWARF*.

Key words: rice; dwarf and small seed mutant *dss1*; gene mapping; *OsDWARF* gene; brassinosteroids

Received 2018-04-09 Accepted 2018-06-05

This work was supported by the Genetically Modified Organisms Breeding Major Projects of China (2016ZX08010003), Guizhou Science and Technology Major Project ([2012]6005), and Guizhou Top Level Innovation Talents Cultivation Project [(2016)4003].

*Corresponding author (dgzhao@gzu.edu.cn).