

# 水稻开颖半不育突变体的观察、遗传分析和基因定位

陈立凯, 黄明, 刘永柱, 王慧, 陈志强, 郭涛

(华南农业大学国家植物航天育种工程技术研究中心, 广州 510642)

**摘要:** 【目的】通过对一份航天诱变水稻 (*Oryza sativa* L.) 开颖半不育突变体 *ohss* (*open-hull semi-sterility*) 进行形态特性调查、遗传分析和基因定位, 筛选候选基因, 为下一步基因克隆和功能分析奠定基础。【方法】以籼稻品种航恢七号为材料, 通过“神舟八号”飞船搭载, 诱变获得一份水稻开颖半不育突变体 *ohss*。对其进行形态特征解剖观察, 分析颖花器官发育突变特点。调查突变体和野生型的花粉可育率、自然结实率和套袋自交结实率, 对其育性进行鉴定。随机选取 5 个成熟单株, 考察穗部谷粒相关性状并进行统计分析。通过覆盖全基因组的 SSR 分子标记检测, 解析空间诱变的分子变异效应。以航恢七号、Francis 和 02428 与突变体 *ohss* 配制杂交组合, 观察 F<sub>1</sub> 和 F<sub>2</sub> 植株的花器官表型, 进行  $\chi^2$  测验, 对突变性状进行遗传分析。以 02428/*ohss* 的 F<sub>2</sub> 分离群体作为目标基因定位群体, 同时利用 SSR 标记以及新开发的多个 InDel 分子标记开展基因定位研究。利用 RAP 水稻基因组注释数据库对定位区间的候选基因进行预测, 通过序列比对和基因表达分析筛选候选基因。【结果】开颖半不育花器官突变体 *ohss* 与野生型相比, 抽穗期穗部明显包茎, 颖花发育出现异常, 内外稃片瘦弱、扭曲变形且开裂不抱合, 颖花内部发育类似内稃状的器官, 部分颖花没有内稃的分化。*ohss* 发育异常颖花中可育花粉率 58.74%, 导致单株结实率、穗重、穗实粒数与野生型相比极显著降低。全基因组 SSR 标记检测表明突变体 *ohss* 总变异频率为 0.0336, 除了第 7、12 染色体未检测到突变位点, 其他染色体上检测到突变频率范围为 0.0143—0.0889。遗传分析结果显示 *ohss* 的开颖半不育表型受单隐性核基因 *ohss(t)* 控制, 并将 *ohss(t)* 定位在水稻第 3 染色体上 2 个 InDel 标记 InDe16043 和 InDe16070 之间约 27.6 kb 的物理距离内。该区域有 3 个预测注释基因, 序列比对和表达分析表明突变体 *ohss* 的 *OsMADS1* 编码区及启动子序列未发生突变, 但是表达模式发生强烈改变。【结论】开颖半不育的花器官发育突变体 *ohss* 受单隐性核基因 *ohss(t)* 控制, *ohss(t)* 定位在水稻第 3 染色体上 InDe16043 和 InDe16070 标记之间约 27.6 kb 的物理距离内, 其 *OsMADS1* 的编码序列及 5'UTR 区未发生碱基突变但表达受到强烈抑制。

**关键词:** 水稻; 航天诱变; 花器官发育; 遗传分析; 基因定位

## Observation, Genetic Analysis and Gene Mapping of an Open Hull Semi-Sterility Mutant in Rice (*Oryza sativa*)

CHEN Li-kai, HUANG Ming, LIU Yong-zhu, WANG Hui, CHEN Zhi-qiang, GUO Tao

(National Engineering Research Centre of Plant Space Breeding, South China Agricultural University, Guangzhou 510642)

**Abstract:** 【Objective】The paper is order to carry out a morphological characteristics investigation and genetic analysis of an open-hull semi-sterility mutant (*ohss*) of rice (*Oryza sativa* L.), induced by spaceflight, laid the groundwork for further gene cloning and function analysis by fine mapping and preliminary screening of the candidate gene responsible for the mutated trait. 【Method】The *ohss* mutant was derived from rice variety Hanghui 7, which was induced on Spaceship “Shenzhou 8”. The morphological characteristics of *ohss* were anatomically observed to analyze the mutagenic features of floral organ development. Subsequently,

收稿日期: 2015-07-13; 接受日期: 2015-09-08

基金项目: 国家自然科学基金 (31200250)、国家“863”计划 (2012AA101201)、广州市对外科技合作项目 (2014J4500030)、引进国际先进农业科学技术计划 (948) 项目 (2013-Z67)、国家现代农业产业技术体系建设专项 (CARS-01-12)

联系方式: 陈立凯, E-mail: leeking1113@163.com. 通信作者郭涛, E-mail: guo.tao@vip.163.com; 通信作者陈志强, E-mail: chenlin@scau.edu.cn

pollen fertility, natural seed setting rate and bagged seed setting rate were investigated for fertility evaluation. Five plants of *ohss* mutation and WT were random selected to survey the panicle and grain related traits. SSR markers covering the whole genome were used to detect the mutagenic effect of *ohss*. Moreover, genetic analysis was conducted using the crosses between *ohss* and three wild type varieties, Hanghui 7, Francis and 02428 where the phenotypes of the F<sub>1</sub> and F<sub>2</sub> were surveyed and  $\chi^2$  test was performed. A population from the cross of 02428/*ohss* was used to map the *ohss(t)* gene using SSR markers and newly developed InDel markers. The candidate gene was predicted based on the RAP gene annotation database of the mapping region and screened through sequences alignment and expression of candidate genes. **【Result】** Compared with wild-type, panicles of mutant *ohss* were enclosed and florets showed abnormalities at the reproductive stage, and the palea and lemma were weak, distorted and dehiscent, with organ similar to the palea in the floret, while some of florets had no palea differentiation. Sterility testing showed that pollen grain rate of the abnormal spikelet of *ohss* was 58.7%, leading to significantly lower seed set, less panicle weight per plant and filled grain number per panicle compared with the wild-type. Mutation survey based on SSR markers revealed a total of 0.0336 of variation frequency was caused between *ohss* and WT, and variation frequency of different chromosome varied from 0.0143 to 0.0889, except chromosome 7 and 12. Genetic analysis indicated that the mutant phenotype in *ohss* was controlled by a single recessive nuclear gene, namely *ohss(t)*, which had been fine mapped to a ~27.6 kb physical distance between two InDel markers, InDel6043 and InDel6070 on chromosome 3, where three annotated genes were predicted. Based on the result of sequencing, semi-quantitative RT-PCR and real time quantitative PCR, there was no mutation occurring in the coding and promoter sequence of *OsMADS1* of *ohss*, but strong changes on gene expression pattern. **【Conclusion】** The mutated trait of *ohss* was controlled by a single recessive nuclear gene *ohss(t)*, which was fine mapped to a ~27.6 kb physical distance between InDel6043 and InDel6070 on chromosome 3. No nucleotide sequence mutation was found to occur in the coding sequence or the 5'UTR of *OsMADS1*, but expression of *OsMADS1* was strongly inhibited in *ohss(t)*.

**Key words:** rice (*Oryza sativa* L.); spaceflight mutagenesis; floral organ development; genetic analysis; gene mapping

## 0 引言

**【研究意义】**水稻 (*Oryza sativa* L.) 花器官既是繁殖器官,也是形成籽粒的基础,其发育直接影响稻谷产量和稻米品质。对于高产优质水稻育种,水稻花器官发育的遗传机理和相关调控基因的研究具有重要意义。另一方面,航天诱变的诱变效应和机理研究仍落后作物航天育种应用<sup>[1]</sup>,对航天诱变产生新的突变体进行深入研究是揭示其诱变效应的重要手段。**【前人研究进展】**植物花器官发育是决定花器官位置、数目、大小及类型的过程,受多个基因共同控制,且不同基因相互关联。花器官发育经典的“ABC”模型<sup>[2-3]</sup>,较好地解释了花同源异型基因的表达模式,被广泛用于阐明花器官突变体的形成机制<sup>[4]</sup>。随着调控花器官发育的调节因子不断被发现,“ABC”模型被扩展为“ABCDE”模型或“ABCE”模型<sup>[5-6]</sup>,目前已成为阐释花器官发育分子机制的主要模型。水稻具有独特花形态结构,在单子叶植物花器官中具有代表性,被认为是研究单子叶植物花器官发育的模式材料<sup>[7]</sup>。水稻的颖花是花序的结构单位,共包括四轮构造,由外到内分别是内/外稃、浆片、雄蕊、雌蕊<sup>[8]</sup>。调控水稻花器官发育的基因相继被发现,不少于 50 个重要的调节因子分别在水稻花器官发育过程中发挥作用<sup>[7]</sup>。3

个 AP1/FUL 基因 *OsMADS14*<sup>[9]</sup>、*OsMADS15*<sup>[10]</sup>、*OsMADS18*<sup>[11]</sup>被认为属于水稻的 A 类基因,这些基因最主要的作用在于调控植株向花器官发育过渡。B 类基因 *OsMADS2*<sup>[12]</sup>、*OsMADS4*<sup>[13-14]</sup>、*MADS16/SPW1* (*SUPERWOMANI*)<sup>[15]</sup>,前两者是 PI 同源基因,而后者为 AP3 类基因,这些基因功能相对比较保守,主要在水稻浆片和雄蕊中表达。水稻 C 类的基因主要有 *OsMADS3*<sup>[16]</sup>、*OsMADS58*<sup>[16]</sup>、*DROOPING LEAF (DL)*<sup>[17]</sup>和 *OsMADS32*<sup>[18-23]</sup>,调节雄蕊和心皮的器官身份决定、抑制 A 类基因表达以及花分生组织的决定。*OsMADS13*、*OsMADS21*和 *OsMADS29*属于水稻 D 类基因,而 E 类基因有 *OsMADS1*、*OsMADS5*、*OsMADS7*、*OsMADS8*和 *OsMADS34*<sup>[12]</sup>。*OsMADS1*研究最为深入,其控制水稻内外颖特异细胞类型的分化,是内轮花器官的一个早期作用调节因子<sup>[24]</sup>,发生突变会导致水稻内外稃呈叶状且伸长,浆片呈内外稃状,雄蕊数目减少,心皮数目增加<sup>[25]</sup>。由此可见,MADS box 基因是水稻花器官发育最重要的一类基因,涵盖 A—E 等类型基因。此外,还有一些花器官身份确认和顶端分生调控相关的非 MADS 基因以及特异调控雄蕊和雌蕊发育的重要因子<sup>[7]</sup>。**【本研究切入点】**目前发现的多个组织器官变异的水稻颖花突变体较少,且其研究仍多限于形态学和遗传学层面。航天诱变方式具有独特

的诱变效应, 诱变机理尚不明确。【拟解决的关键问题】本研究通过空间诱变获得一个开颖半不育的花器官发育突变体 *ohss*, 通过表型特征、遗传分析、基因定位等方面对其进行分析。在明确其开颖半不育性状遗传模式基础上, 利用分子标记实现精细定位, 并借助定位区间的注释基因功能预测和基因表达模式对候选基因进行筛选, 为候选基因的克隆及功能研究奠定基础。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 供试材料

水稻航恢七号是国家植物航天育种工程技术研究中心选育的优良水稻恢复系<sup>[26]</sup>, 花器官发育正常, 取多代隔离自交纯化的干种子(含水量约 12.5%) 约 2 000 粒于 2011 年 11 月 1 日搭载“神舟八号”飞船升空, 同年 11 月 17 日返回地面, 其运行轨道的近地点与远地点分别为 200 和 330 km, 共计太空飞行 398 h。保留等量种子作为原种对照。

诱变群体后代种植参照郭涛等<sup>[27]</sup>方法。在诱变 M2 群体筛选获得一株花器官发育突变体, 经过连续 3 代的自交繁殖获得稳定突变株系, 命名为 *ohss* (*open-hull semi-sterility*)。

水稻品种 02428 和 Francis 作为亲本与突变体 *ohss* 配制杂交组合, 用于遗传分析。

### 1.2 田间种植和农艺性状调查

突变体 *ohss* 和野生型种植于华南农业大学科研教学实验基地, 小区种植, 常规田间管理。全生育期观察田间表型, 重点观察抽穗时间、花器官发育动态及开花习性等。穗部谷粒性状调查参考《农作物品种区域试验技术规范 水稻》(NY/T 1300-2007), 植株成熟后随机选取 5 株, 考查株高、单株穗重、每株有效穗数、每穗粒数、每穗实粒数、结实率和千粒重等。

### 1.3 形态解剖

于抽穗期和灌浆期分别取突变体和野生型的小穗, 装入封口袋, 在体视镜下解剖、观察并拍照。

### 1.4 育性调查

随机取当天开花单株的上、中、下穗部各 3—4 个颖花, 用卡诺固定液固定 48 h, 然后取 3—5 枚花药置载玻片上, 捣碎, 用 1% I<sub>2</sub>-KI 溶液进行花粉染色, 在显微镜下检测花粉染色率, 并拍照记录。每个材料调查 5 个单株的育性。开花前随机标记 10 穗和套袋 10 穗, 30 d 后统计每穗总粒数和实粒数, 计算自然结实率和套袋自交结实率。

### 1.5 SSR 标记来源及 InDel 标记的开发

选择已公布的均匀分布染色体的 SSR 标记用于突变检测和基因定位, 共计 617 对, 引物序列参照 gramene 数据库 (<http://www.gramene.org/>)。根据粳稻日本晴和籼稻 93-11 的序列差异比对设计 InDel 引物, 引物由上海生工生物工程有限公司合成。

### 1.6 DNA 提取及 SSR、InDel 标记的 PCR 检测

按 CTAB 法<sup>[28]</sup>提取水稻基因组 DNA。PCR 扩增体系为 2×PCR Reaction Mix 10 μL (含 100 mmol·L<sup>-1</sup> KCl、20 mmol·L<sup>-1</sup> Tris-HCl、3 mmol·L<sup>-1</sup> MgCl<sub>2</sub>、400 mmol·L<sup>-1</sup> dNTP)、Taq DNA 聚合酶 (5 U·μL<sup>-1</sup>) 0.2 μL、引物 (10 μmol·L<sup>-1</sup>) 各 0.8 μL、模板 DNA 1.0 μL, 超纯水补至 20 μL。

反应条件为 94℃ 5 min; 94℃ 30 s, 55℃—57℃ (根据不同引物调整) 30 s, 72℃ 30 s, 33—35 个循环; 72℃ 5 min。扩增产物经 8.0% 非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳 (电泳缓冲液 1×TBE, 电压 145 V, 时间 2.5 h), 0.1% AgNO<sub>3</sub> 银染显色, BIORAD 凝胶成像系统照相、读带。

### 1.7 群体构建和遗传分析

以航恢七号、Francis 和 02428 为母本, 突变体 *ohss* 为父本, 配制 3 个杂交组合。种植 F<sub>1</sub> 植株, 调查记录花器官发育特征。调查 F<sub>2</sub> 群体各单株的花器官性状, 计算分离比例, 进行 χ<sup>2</sup> 测验。

### 1.8 基因定位与候选基因测序

以 02428×*ohss* 的 F<sub>2</sub> 群体用于基因定位。利用分子标记检测, 将具有 02428 带型的单株记为 A, 具有 *ohss* 突变型带型的单株记为 B, 具有杂合带型的单株记为 H。根据公式  $[(H+2A)/2n] \times 100$  计算遗传距离, 公式中 H 表示群体中出现杂合带型单株的数量, A 表示出现野生型带型的单株数, n 表示隐性个体数。采用 Michelmore 等<sup>[29]</sup>提出的近等基因池分析法筛选突变基因连锁标记, 具体是: 根据 F<sub>2</sub> 单株个体表型, 分别选取 15 株野生表型植株和 15 株突变表型植株, 剪取等量叶片提取混合 DNA 样品, 构建正常基因池和突变基因池。通过引物筛选寻找基因池间扩增有差异的标记, 再用分离后代单株验证该多态性标记是否真正与目标基因连锁。通过 The Rice Annotation Project Database (<http://rapdb.dna.affrc.go.jp/index.html>) 查找与突变基因紧密连锁标记在水稻基因组 (日本晴) 上的位置, 构建覆盖目的基因的物理图谱。利用该数据库的水稻基因注释系统预测候选基因和获取基因序列。

设计扩增编码区、启动子引物序列, 分别以 cDNA 和 gDNA 为模板采用高保真酶 KOD Fx Taq (东洋纺上海生物科技有限公司) 对目标区域进行 PCR 扩增, 详细操作按照说明书进行。由 Life Technologies 生物技术公司测定 PCR 产物序列, 正反向引物双向测序, 采用 DNASTar 软件的 SeqMan 模块拼接出完整序列。

### 1.9 RNA 提取、半定量 RT-PCR 和实时荧光定量 PCR

参照郭涛等<sup>[30]</sup>方法提取突变体和野生型各组织总 RNA。以第一链 cDNA 为模板, 应用引物组合进行 PCR 扩增, 琼脂糖凝胶电泳检测。PCR 程序为 94℃ 2 min; 94℃ 30 s, 58℃ 30 s, 72℃ 30 s, 共 30 个循环; 72℃ 7 min, 同时设定 *Actin* 为内部参照。通过调整模板浓度, 使材料中 *Actin* 的 PCR 扩增产物量一致。采用实时荧光定量 PCR, 分析候选基因表达差异。参照郭涛等<sup>[31]</sup>方法, 并稍作修改, 采用 2×SYBRGreen master mix 荧光染料, 25 μL PCR 体系, 设 3 次重复, 荧光 PCR 反应在 StepOnePlus 定量 PCR 仪上进行。程序为 95℃ 30 s; 95℃ 5 s, 58℃ 30 s, 72℃ 30 s, 共 40 个循环, *Actin* 为内参, 应用  $2^{-\Delta\Delta CT}$  的方法计算基

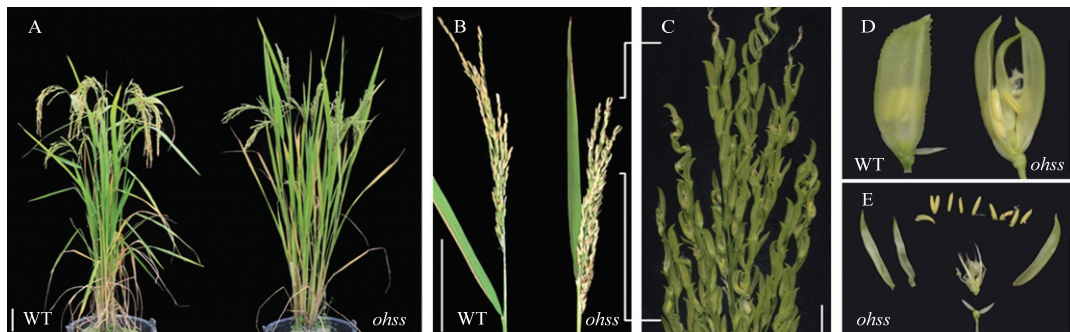
因表达量的相对变化。引物由上海生工生物工程有限公司合成。

## 2 结果

### 2.1 突变体 *ohss* 的表型特征

营养生长期, *ohss* 突变体与野生型相比没有明显的变化, 突变表型主要出现在生殖生长期的穗部发育和灌浆结实阶段 (图 1-A)。突变体 *ohss* 穗部明显包茎, 剑叶夹角显著减小 (图 1-B), 颖花发育出现明显异常 (图 1-C)。正常水稻顶生小花具有相对闭合的外稃和内稃, 与野生型相比, *ohss* 的内外稃片瘦弱、扭曲变形且开裂不抱合, 部分颖花只有外稃发育, 没有内稃的分化。*ohss* 突变体在颖花内部发育类似内稃状的器官, 位于内外稃之间, 浆片变态发育成丝状, 分布在雌蕊周围 (图 1-D 和图 1-E)。*ohss* 的雄蕊数目产生变化, 在 5—10 枚, 花丝在一定空间内扭曲变形 (图 1-E)。

对 360 个来自 18 个突变体 *ohss* 单株的颖花进一步调查, 颖花发育异常的个数为 318 个, 占总数的 88.3%。这些异常颖花中, 具有类似内稃状器官异常类型占 46.7%, 不分化发育内稃器官类型占 29.3%。



A: 灌浆期野生型和 *ohss* 的植株表型; B: 野生型和 *ohss* 的穗部表型; C: *ohss* 的穗部局部; D: 野生型和 *ohss* 的颖花表型; E: *ohss* 颖花结构解剖。Bars=100 mm (A 和 B); Bars=10 mm (C、D、E 和 F)

A: Phenotype of WT and *ohss* individual plant during the filling stage; B: Phenotype of the panicle of WT and *ohss*; C: Part of the panicle of *ohss*; D: Phenotype of floral organs of *ohss* and WT; E: Anatomic structure of *ohss*. Bars=100 mm (A and B); Bars=10 mm (C, D, E and F)

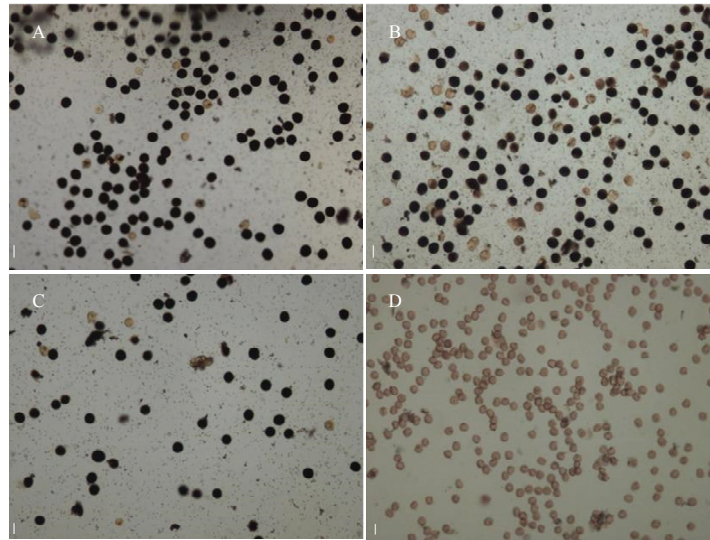
图 1 突变体 *ohss* 及野生型的表型特征

Fig. 1 Phenotype of *ohss* and WT

### 2.2 突变体 *ohss* 的育性调查

由于突变体 *ohss* 雄蕊器官发育出现明显异常, 可能影响育性, 因此, 对突变体 *ohss* 花粉粒的可育率、自然结实率和套袋自交结实率进行调查。野生型品种航恢七号花粉可育率 89.87% (图 2-A, 表 1)。*ohss* 花粉粒育性因不同的颖花表型差异较大, 个别发育正常的颖花, 其花粉育性比较高 (图 2-C), 而占大部

分的发育异常颖花育性显著降低 (图 2-B), 还观察到穗下部局部的花粉染色率接近于 0 (图 2-D), 而野生型同部位花粉育性正常, 达到 85% 以上。*ohss* 单株的花粉染色率平均为 58.74%, 与野生型相比, 极显著降低 (表 1)。突变体 *ohss* 的自然结实率和套袋自交结实率均极显著降低, 平均值分别为 34.33% 和 10.53% (表 1)。



A: 野生型花粉染色; B: *ohss* 的花器官发育异常的花粉染色; C: *ohss* 正常花器官发育正常单株的花粉染色; D: *ohss* 穗下部花粉染色。Bars=1 mm  
A: Pollen stainability of CK; B: Pollen stainability of abnormal spikelets of *ohss*; C: Pollen stainability of normal spikelets of *ohss*; D: Pollen stainability of the bottom spikelet of *ohss*. Bars=1 mm

图 2 突变体 *ohss* 及野生型的花粉育性

Fig. 2 The pollen fertility of *ohss* and WT

表 1 突变体 *ohss* 的育性调查

Table 1 Fertility traits of *ohss* mutant

材料	花粉可育率	自然结实率	套袋自交结实率
Material	Pollen fertility (%)	Natural seed setting rate (%)	Bagged seed setting rate (%)
野生型 Wild-type	89.87±0.83	90.25±1.79	85.54±1.00
突变体 <i>ohss</i>	58.74±1.60**	34.33±2.46**	10.03±1.33**

\*\*在 0.01 水平上显著差异。下同 \*\* Significantly different at  $P<0.01$ . The same as below

### 2.3 突变体穗部性状调查分析

对野生型和突变体 *ohss* 穗部谷粒性状进行考察 (表 2)。野生型单株穗重为 23.64 g, 而突变体与其相比极显著降低, 平均仅 7.48 g; 突变体穗实粒数也极显著减少, 原种对照 172.62, 突变体减少至 50.80。穗数、千粒重两者差异不显著。突变体 *ohss* 大部分谷粒是开裂, 籽粒发育不良, 形态大小明显不同于野生型。

### 2.4 突变体 *ohss* 基因组 SSR 位点变异分析

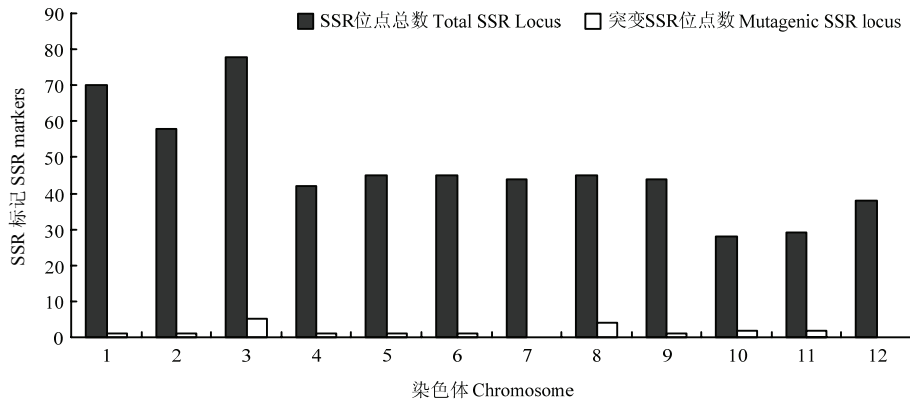
航天搭载在分子生物学效应、突变频率和突变方

向等方面呈现出与地面传统诱变不同的变异特点。为了从分子水平上研究空间诱变效应, 进一步明确突变体 *ohss* 与野生型原种在基因组水平的差异, 选取水稻基因组均匀分布的 566 对 SSR 标记, 检测突变体 *ohss* 和野生型航恢七号在 SSR 位点的变异情况 (图 3)。统计分析表明, 突变体 *ohss* 与野生型相比总变异频率为 0.0336, 其中第 7、12 染色体未检测到突变位点, 其他染色体上检测突变频率范围在 0.0143 (第 1 染色体)—0.0889 (第 8 染色体)。

表 2 原种对照 (CK) 和突变体 *ohss* 的穗部谷粒性状调查

Table 2 Panicle and grain related trait of the CK and *ohss*

材料	单株穗重	穗数	穗实粒数	千粒重
Material	Panicle weight per plant (g)	Number of panicles	Filled grain number per panicle	1000-grain weight (g)
野生型 Wild-type	23.64±5.49	6.38±1.39	172.62±24.14	21.83±1.47
突变体 <i>ohss</i>	7.48±1.37**	6.00±0.71	50.80±10.06**	20.91±0.96

图3 突变体 *ohss* 及其原种对照 SSR 标记变异检测Fig. 3 Mutation detection of *ohss* and CK using SSR markers

## 2.5 *ohss(t)*的遗传分析

*ohss* 花器官发育突变表型多个世代稳定表达, 表明该突变性状并非由环境因素造成, 而是由基因突变导致的。将突变体 *ohss* 与表型正常的品种, 野生型亲本航恢七号、Francis 和 02428 分别杂交,  $F_1$  植株在花器官发育正常 (表 3), 与野生型亲本相同。

根据花器官发育表型,  $F_2$  群体的单株均可划分为两类, 一类表型为花器官发育正常; 另一类与突变体花器官表型相似, 两者分离比例符合 3 : 1 (表 3)。表明 *ohss* 的突变表型受 1 对隐性核基因控制, 暂命名为 *ohss(t)*。

## 2.6 *ohss(t)*定位和物理图谱构建

为了定位分离花器官发育异常基因 *ohss(t)*, 以  $02428 \times ohss$  杂交构建的  $F_2$  群体作为定位群体, 选用均匀分布于 12 条染色体上的 617 对 SSR 标记逐个检测亲本 *ohss* 和 02428 的多态性, 共 309 个标记表现出多态, 多态率为 50.008%。进一步以两亲本间表现出多态的标记, 扩增正常基因池和突变基因池, 并利用 2 个池间表现出多态的标记检测  $F_2$  群体单株, 确定与 *ohss(t)* 是否连锁。基因池检测结果发现第 3 染色体的 2

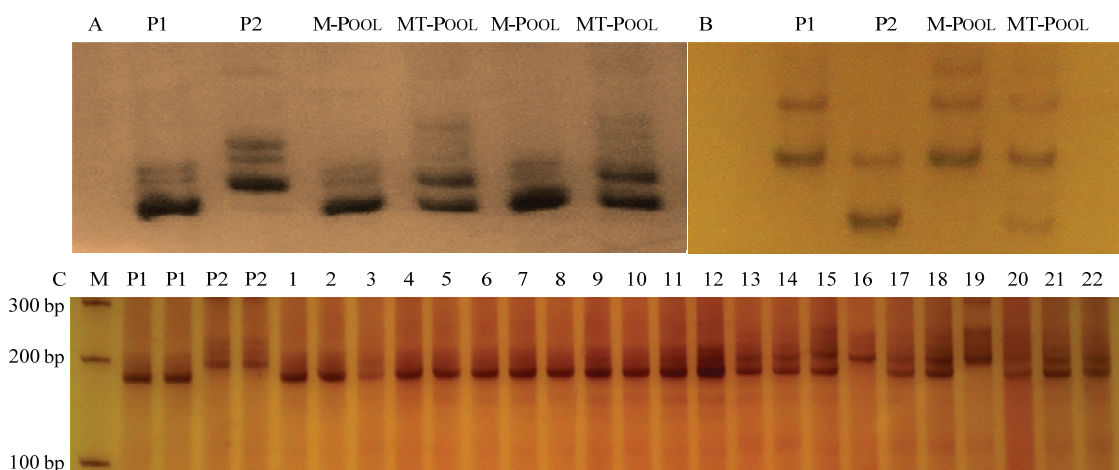
个 SSR 标记 RM14758 和 RM7 与目标基因连锁 (图 4-A 和图 4-B), 从  $F_2$  群体中随机选 22 个植株进行小群体验证分析, 确认标记 RM14758 与 *ohss(t)* 存在明显连锁 (图 4-C)。

通过对 RM14758 标记物理位置附近进一步筛选多态性标记并进行连锁分析 (图 5-A), 发现 *ohss(t)* 与 RM1324 存在 3 个重组, 而与 RM14607 存在 16 个重组, 并且 2 个标记的重组个体 (交换株) 互不重叠。*ohss(t)* 被初步定位在 RM1324—RM14607 区域内。

为了进一步缩小 *ohss(t)* 的定位区间, 进行精细定位, 将  $F_2$  作图群体隐性单株数目增加至 958 个, 并在初步定位区间内开发多个 InDel 分子标记, 其中 6 个有多态性 (表 4)。利用 RM1324、RM14607 以及 6 个 InDel 标记对 958 个单株进行检测, 发现在 InDel6043、InDel6070、InDel6079、InDel6111、InDel612、InDel624 与 *ohss(t)* 间分别发生 3、4、4、4、7、9 个重组事件, 并且 InDel6043、InDel6070 2 个标记的重组个体 (交换株) 互不重叠。最终将 *ohss(t)* 定位在 InDel6043—InDel6070 区间内, 与 2 个标记间的遗传距离分别为 0.157 和 0.209 cM (图 5-A)。利用

表 3 突变体 *ohss* 的遗传分析Table 3 Genetic analysis of mutation *ohss*

组合 Cross	F <sub>1</sub> 表型 Phenotype of F <sub>1</sub>	F <sub>2</sub> 表型 Phenotype of F <sub>2</sub>				$\chi^2_{(3:1)}$	$\chi^2_{0.05}$
		花器官正常	花器官异常	总数	实际比例		
		Normal floral organ	Abnormal floral organ	Total	Actual ratio		
02428/ <i>ohss</i>	花器官正常 Normal flower organ	461	128	589	3.60	3.183	3.841
航恢七号/ <i>ohss</i> Hanghui 7/ <i>ohss</i>	花器官正常 Normal flower organ	441	135	576	3.27	0.669	
Francis/ <i>ohss</i>	花器官正常 Normal flower organ	439	144	583	3.05	0.014	



A: RM14758 的 BSA 检测; B: RM7 的 BSA 检测; C: 小分离群体验证 RM14758; P1: *ohss*; P2: 02428; M-Pool: 突变表型基因池; WT-Pool: 野生表型基因池; 1—22: F<sub>2</sub> 单株

A: BSA(bulk segregation analysis) of RM14758; B: BSA(bulk segregation analysis) of RM7; C: Small-scale segregation population validation of RM14758; P1:*ohss*; P2:02428; M-Pool: mutant-phenotype pool; WT-Pool: Wild-phenotype pool; 1-22: F<sub>2</sub> individual

图 4 *ohss(t)* 的连锁分析

Fig. 4 Linkage analysis of *ohss(t)* gene

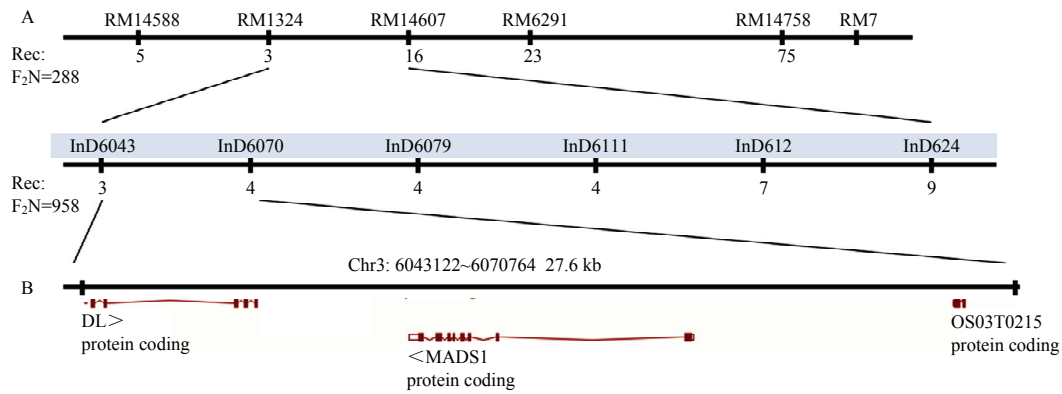
表 4 定位 *ohss(t)* 的 InDel 标记引物和 RT-PCR 引物序列

Table 4 InDel markers primer sequence used for *ohss(t)* mapping and RT-PCR

序号 No.	标记/基因 Marker/gene	引物序列 Primer sequence (5'-3')	扩增产物长度 Length of amplified products (bp)	物理位置 Location (bp)	退火温度 Annealing temperature (°C)
1	InDel6043	CTTCTACCAAGCAGGGAGAG ATCCAACACAAGAAGCAACCA	290	6043122	55
2	InDel6070	GGTCAAAGTGTATCAACCCAGA CGCATATATACCCCATCAATAA	114	6070651	56
3	InDel6079	AGAACATCAACTGGGCTTTCAT GATCGACCTCCTCTGTATGTC	198	6079249	56
4	InDel6111	GACGATCTCGAACTGACATGA TACTCTAGTATGGCAGCGCAA	200	6111365	55
5	InDel612	GGAATCGGATAAGAGAAATGGA CCCGTTTTGATTTCAGAAA	218	6124241	55
6	InDel624	AGCCAGGTAGAACCTTTTGGAG GCTTGTGAAATATAAGGGCCTGT	254	6243771	56
7	OsMADS1_CDS	TGCAAAGGGGATAGAGTAGTAGAGA GGGAGAAGGTCGTAAGAGA	982		58
8	OsYABBY_CDS	CTCAGTGCTAGGGCTAGCTTGTGT GCACAGATATATGCTAAAGGGGAACGA	820		56
9	OsMADS1_5UTR	GTTGTACCACCTACCTAGGGGT AAGATGGGGAGGGGAAGGTGG	2242		57
10	Actin1	TGTGTTGACTCTGGTGATG CAGGGCGATGTAGGAAAGC	221		57
11	OsMADS1_RT	CTACATGGACCATCTGAGCAATGA AAGAGAGCACGCACGTACTTAG	222		57
12	OsYABBY_RT	CACTGCAACAACCTCTCCTTC AAACCGTCGATGAGCAG	343		57

物理位置是以引物序列在日本晴基因组 (IRGSP-1.0) 进行 BLAST 获得

Physical coordinates of primers were identified through BLAST searching in the Nipponbare rice genome (IRGSP-1.0)



A: *ohss(t)*被精细定位在第3染色体 InDel 标记 InDel6043和 InDel6070in 染色体3. B: 通过 RAP 数据库 (<http://rapdb.dna.affrc.go.jp/index.html>) 预测 27.6 kb 区间内有 3 个候选基因

A: Gene *ohss(t)* was fine mapped to the interval between InDel markers InDel6043and InDel6070in chromosome 3. B: In the 27.6 kb region, 3 putative genes were annotated in RAP database (<http://rapdb.dna.affrc.go.jp/index.html>)

图5 *ohss(t)*的定位

Fig. 5 Mapping of *ohss(t)* gene

The Rice Annotation Project Database (<http://rapdb.dna.affrc.go.jp/index.html>) 数据库, 将与 *ohss(t)* 两侧距离最近的标记 InDel6043 和 InDel6070 进行物理位置的锚定, 对应于日本晴第3染色体序列 (5'-3') 6 043 122—6 070 764 bp, 物理距离约为 27.6 kb (图 5-B)。

## 2.7 候选基因测序和表达分析

根据参考基因组的基因注释, 预测定位区域共包含 3 个蛋白编码基因 (表 5, 图 5-B)。其中 Os03t0215200-01 是假定的转录因子, 编码 YABBY 蛋白。该基因目前已被克隆, 即披叶基因 (*drooping leaf-1; DL; OsYABBY*)<sup>[32]</sup>, 调节水稻花器官的心皮决定性、花分生组织的确定性、叶片中脉的发育以及参与调控芒的发育<sup>[33]</sup>。Os03t0215400-01 则是编码一个含有

MADS-box 结构域的转录因子, 目前已被克隆, 即叶状颖壳不育基因 (*Leafy hull sterile 1; LHS1; OsMADS1; AFO*)。该基因控制内外稃特异细胞类型的分化, 是一个内轮花器官早期作用调节子<sup>[34]</sup>。第 3 个注释基因 Os03t0215600-00 为假定蛋白 (hypothetical protein), 预测编码含有逆转录病毒型 CCHC 锌指结构域蛋白。

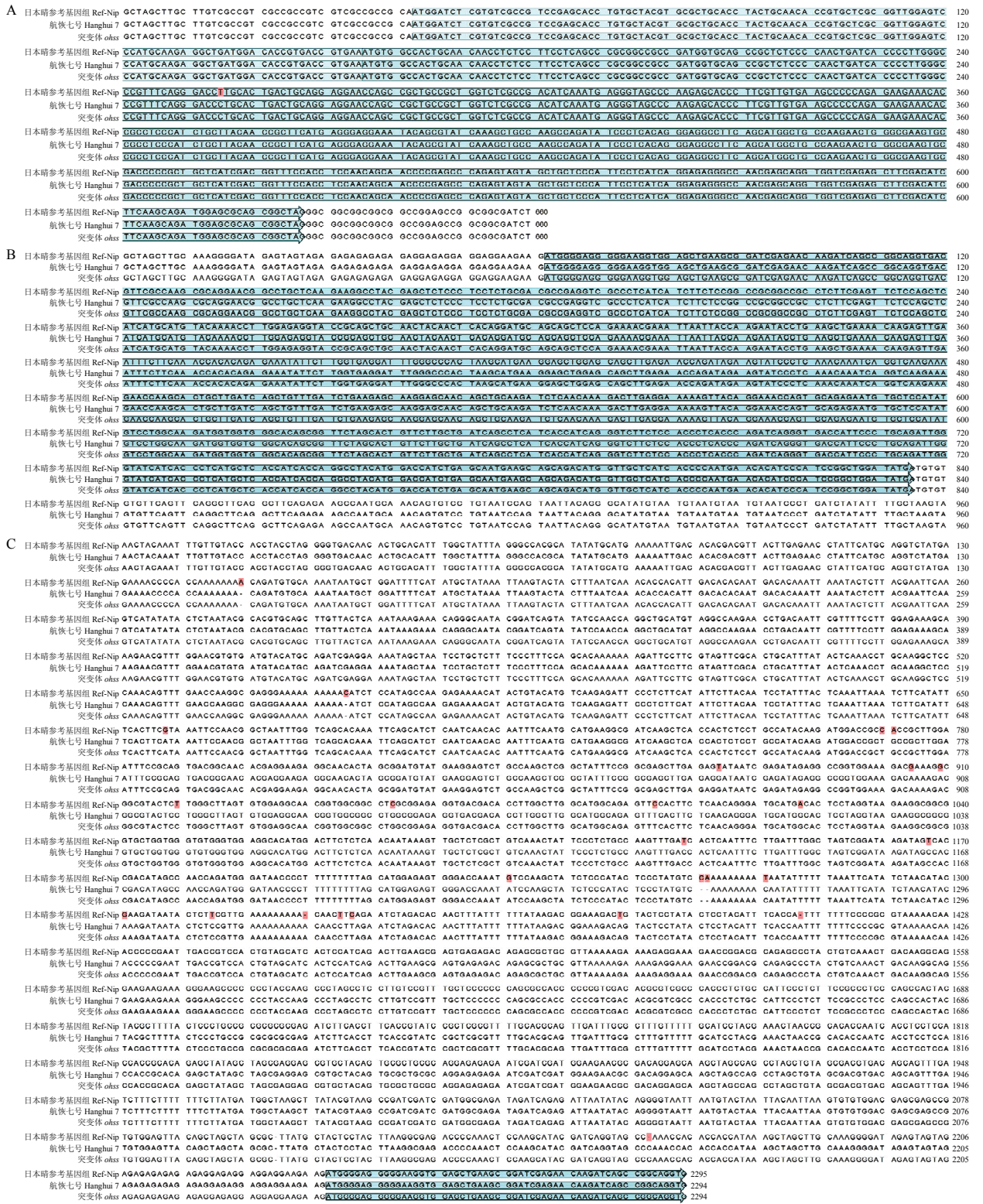
从候选基因预测结果看出, *OsYABBY* 和 *OsMADS1* 与花器官发育相关。以突变体 *ohss* 和野生型航恢七号的 cDNA 为模板, 设计引物 (表 4) 对 2 个候选基因 *OsYABBY* 和 *OsMADS1* 的编码区序列进行扩增测序, 序列比对 (图 6-A 和图 6-B) 未检测到序列突变, 表明突变并非来源于候选基因编码区碱基序列变异。

表 5 定位区间基因功能注释

Table 5 Gene annotated in mapping region

编号 No.	基因号 Gene ID	基因注释 Description	登录号 Accession	起始 Start	终止 End	正负链 Strand	编码蛋白注释 InterPro
1	Os03t0215200-01	假定转录因子, 心皮特化, 叶脉形成 Putative transcription factor, Carpel specification, Midrib formation	AB106554, BAD06552	6041245	6048687	+	YABBY 蛋白, 高流动性组盒结构域 YABBY protein (IPR006780), High mobility group box domain (IPR009071)
2	Os03t0215400-01	MADS 结构域蛋白, 有性繁殖 MADS-domain-containing protein, Sexual reproduction	L34271, AK069728, AK070981	6052902	6061365	-	MADS 盒转录因子, K 盒转录因子 Transcription factor, MADS-box (IPR002100), Transcription factor, K-box (IPR002487)
3	Os03t0215600-00	锌指结构, CCHC 逆转录病毒型结构域蛋白 Zinc finger, CCHC retroviral-type domain containing protein	EU950651	6069091	6069426	+	CCHC 逆转录病毒型锌指结构域蛋白 Zinc finger, CCHC retroviral-type (IPR013084)





A: *OsMADS1* 的 CDS 区域序列比对; B: *OsYABBY* 的 CDS 区域序列比对; C: *OsMADS1* 上游区域序列比对  
A: Sequence alignment of coding region of *OsMADS1*; B: Sequence alignment of coding region of *OsYABBY*; C: Sequence alignment of upstream region of *OsMADS1*

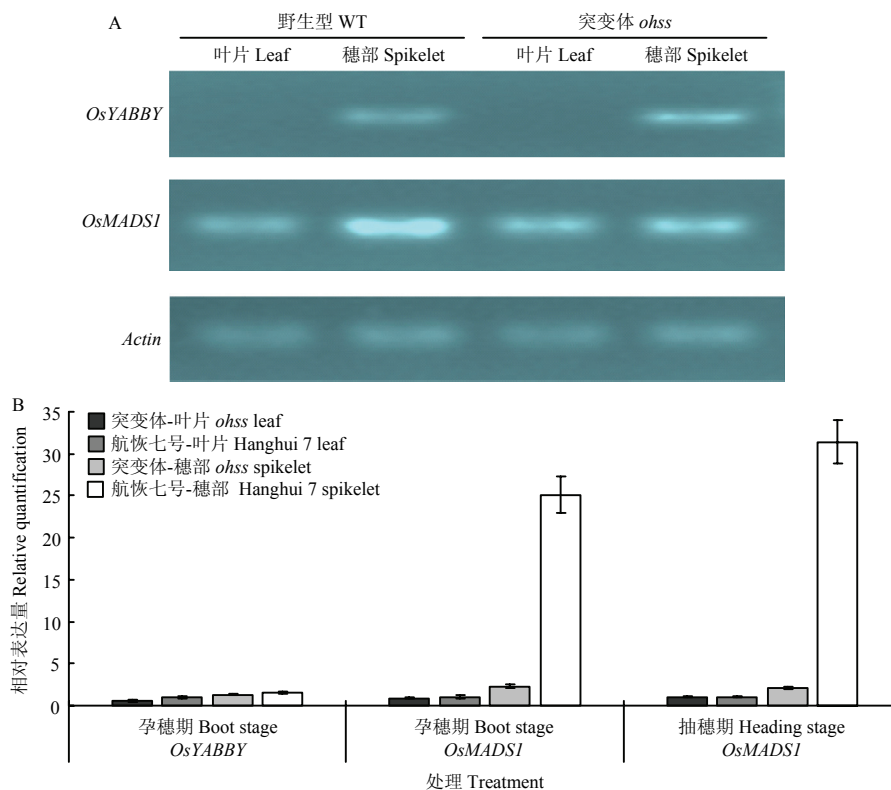
图 6 *OsYABBY*、*OsMADS1* 编码区及 *OsMADS1* 上游区的序列比对

Fig. 6 Amplification of coding region of *OsYABBY* and *OsMADS1* and upstream region of *OsMADS1*

随后,对花器官发育调控有关的 2 个候选基因 *OsYABBY* 和 *OsMADS1* 的表达水平进行检测。半定量 RT-PCR 检测发现 *OsYABBY* 在野生型和 *ohss* 水稻叶片均不表达,在穗部表达量基本一致; *OsMADS1* 在野生型和 *ohss* 水稻叶片表达基本一致且均较穗部低,但是在穗部野生型的表达量明显高于突变体 *ohss* (图 7-A)。进一步利用荧光定量 qRT-PCR 检测 *OsYABBY* 和 *OsMADS1* 在野生型和 *ohss* 的表达模式 (图 7-B)。孕穗时期, *OsYABBY* 在 2 个材料的叶片和穗部表达基本一致 (图 7-B), 而 *OsMADS1* 在野生型的叶片、穗

部均高于突变体 *ohss*, 并且显示在穗部野生型表达量是突变体 *ohss* 的 10 倍以上。在抽穗期 *OsMADS1* 的表达模式与孕穗期接近 (图 7-B)。根据表达分析结果,相对于野生型,突变体 *ohss* 的 *OsMADS1* 的表达受到强烈抑制。

导致突变体 *ohss* 的 *OsMADS1* 在穗部的表达水平显著降低,是否 5'UTR 序列发生突变了? 对启动 *OsMADS1* 上游约 2 kb 区域进行扩增测序和序列比对 (图 6-C)。结果表明,野生型航恢七号以及突变体 *ohss* 虽然与日本晴参考基因组存在多个 SNP (可能是



A: *OsYABBY* 和 *OsMADS1* 在叶片和穗部的半定量 RT-PCR 检测; B: *OsYABBY* 和 *OsMADS1* 在叶片和穗部的 qRT-PCR 检测  
A: Semi-quantitative RT-PCR analysis of *OsYABBY* and *OsMADS1* in leaf and spikelet; B: qRT-PCR analysis of *OsYABBY* and *OsMADS1* in leaf and spikelet

图 7 半定量 RT-PCR 和荧光定量 qRT-PCR 检测 *OsYABBY* 和 *OsMADS1* 表达水平

Fig. 7 Semi-quantitative RT-PCR and qRT-PCR analysis of the expression level of *OsYABBY* and *OsMADS1*

籼粳亚种间的多态性碱基差异),但是它们两者序列完全一致,因此推测并非是 *OsMADS1* 上游区域碱基序列突变而导致的基因表达改变。

### 3 讨论

水稻花器官既是繁殖器官,也是形成籽粒的基础,其发育直接影响稻谷产量和稻米品质<sup>[4]</sup>。水稻花器官

发育过程中,涉及到由穗到颖花的分生组织转换、包括内/外稃、浆片、雄蕊、雌蕊的各轮花器官发育和各器官分生组织的确定性 (determinancy) 等复杂机制。生殖器官的异常会导致育性下降,结实显著降低从而致使水稻大幅度减产,甚至绝收。研究表明,花器官发育的相关基因影响水稻产量构成因子,对水稻产量具有重要影响<sup>[35]</sup>。因此,阐明有关调控花器官发育变

异机理, 揭示其遗传分子调控机制, 对于提高水稻产量具有重要的意义。

MADS-box 基因遍布整个植物界, 主要功能是参与花器官的发育调控。研究发现, 该类基因参与调控作物从营养生长转换生殖生长、光周期的反应、开花时间调控、花器官的发育、胚囊和花粉的发育以及育性等<sup>[36]</sup>。本研究基于定位区间基因功能注释和表达分析, 预测 *ohss(t)* 可能是 *OsMADS1* 的一个新等位基因。目前研究发现, *OsMADS1* 的错义突变体的穗出现典型的表型改变, 如小穗的内外稃延长呈叶状, 颖壳张开, 两对浆片呈叶状类似于内外稃, 雄蕊数量减少, 心皮数量增加, 此外, 一些小穗从相同的小穗轴上产生额外的小花<sup>[37]</sup>。测序分析和互补试验表明 *OsMADS1* 与 *lhs1* 为同一个基因, 突变体 *lhs1* 是 *OsMADS1* 的 2 个核苷酸突变的一个同源异形突变(homeotic mutation), 产生叶状颖壳不育现象<sup>[37]</sup>。*OsMADS1* 的表达抑制扰乱了内外稃特异细胞类型的分化, 在许多 *OsMADS1* 被抑制表达的植株里花的内轮形成类似护颖的器官<sup>[34]</sup>。*OsMADS1* 功能完全丧失突变导致了 3 个内轮器官(浆片、雄蕊和心皮)发生完全同源异型转变, 变成了外稃和内稃类似的结构。这种畸形结构在同一朵小花中部的花柄重复形成, 说明花分生组织丧失了决定性<sup>[38]</sup>。本研究中, *ohss* 的 *OsMADS1* 编码区和 2 kb 的上游非编码区碱基序列与野生型一致, 理论上可推测其编码的 *OsMADS1* 蛋白与野生型蛋白功能一致。但是基因表达模式的改变显示“量”的层面上的差异。*OsMADS1* 具有 E 类基因的功能, 参与内外稃属性决定和发育, 其表达的大幅度下调一方面造成该基因功能受到限制, 致使组织器官分化产生紊乱; 另一方面会通过基因互作的方式对下游基因产生影响, 对颖花发育调控基因网络造成干扰。

*ohss* 从表型上与报道的突变有所不同, 并且在候选基因的编码区序列检测未发现野生型和突变体出现碱基突变, 而 *OsMADS1* 穗部表达极显著下调, 这说明突变产生在转录水平上, 是一种新的突变模式。有可能是涉及到表观遗传机制, 例如 DNA 甲基化作用<sup>[39]</sup>、microRNA<sup>[40-41]</sup>等表达调控。

水稻颖花发育的模式及机理一直是植物学领域研究的焦点和热点, 而水稻颖花发育相关突变体又是研究其遗传发育机理的重要材料<sup>[42]</sup>。本研究材料 *ohss* 是由空间搭载诱变处理筛选获得的突变体, 当基因突变或染色体重排导致花形态发生的遗传控制改变时, 就会产生变异的花<sup>[43]</sup>。突变体的研究有利于进一步揭

示多种调节因子在花器官特化和组织分生过程中基因的调控作用。

## 4 结论

空间诱变水稻后代群体筛选获得一个开颖半不育(花器官发育异常)的突变体 *ohss*。与野生型相比, 突变体 *ohss* 抽穗期穗部明显包茎, 颖花发育出现异常, 内外稃片瘦弱、扭曲变形且开裂不抱合, 颖花内部发育类似内稃状的器官, 部分颖花没有内稃的分化。*ohss* 发育异常的颖花中可育花粉率为 58.74%, 导致单株结实率、穗重、穗实粒数与野生型相比极显著降低。*ohss* 的开颖半不育表型受单隐性核基因 *ohss(t)* 控制, 并将 *ohss(t)* 定位在水稻第 3 染色体上 2 个 InDel 标记 InDel6043 和 InDel6070 之间约 27.6 kb 的物理距离内。该区域有 3 个预测注释基因, *ohss(t)* 的 *OsMADS1* 的编码序列及 5'UTR 区未发生碱基突变, 但表达受到强烈抑制。

## References

- [1] 陈志强, 郭涛, 刘永柱, 王慧. 水稻航天育种研究进展与展望. 华南农业大学学报, 2009(1): 1-5.  
Chen Z Q, Guo T, Liu Y Z, Wang H. Achievements and perspective outlook of rice space induced mutation breeding in China. *Journal of South China Agricultural University*, 2009(1): 1-5. (in Chinese)
- [2] Weigel D, Meyerowitz E M. The ABCs of floral homeotic genes. *Cell*, 1994, 782: 203-209.
- [3] Coen E S, Meyerowitz E M. The war of the whorls: Genetic interactions controlling flower development. *Nature*, 1991, 353: 31-37.
- [4] 李进波, 万丙良, 戚华雄. 水稻花器官发育的遗传研究进展. 湖北农业科学, 2010, 10: 2563-2566.  
Li J B, Wan B L, Qi H X. Progress of genetic research on floral organ development of rice. *Hubei Agricultural Sciences*, 2010, 10: 2563-2566. (in chinese)
- [5] Theissen G. Development of floral organ identity: Stories from the MADS house. *Current Opinion in Plant Biology*, 2001, 41: 75-85.
- [6] Theissen G, Saedler H. Plant biology: Floral quartets. *Nature*, 2001, 409: 469-471.
- [7] Yoshida H, Nagato Y. Flower development in rice. *Journal of Experimental Botany*, 2011, 6214: 4719-4730.
- [8] Yamaguchi T, Hirano H Y. Function and diversification of MADS-box genes in rice. *Scientific World Journal*, 2006, 6: 1923-1932.
- [9] Pelucchi N, Fornara F, Favalli C, Masiero S, Lago C, Pè E M, Colombo L, Kater M M. Comparative analysis of rice MADS-box

- genes expressed during flower development. *Sexual Plant Reproduction*, 2002, 153: 113-122.
- [10] Lu S, Wei H, Wang Y, Wang H, Yang R, Zhang X, Tu J. Overexpression of a transcription factor OsMADS15 modifies plant architecture and flowering time in rice (*Oryza sativa* L.). *Plant Molecular Biology Reporter*, 2012, 306: 1461-1469.
- [11] Fornara F, Parenicova L, Falasca G, Pelucchi N, Masiero S, Ciannamea S, Lopez-Dee Z, Altamura M M, Colombo L, Kater M M. Functional characterization of OsMADS18, a member of the API/SQUA subfamily of MADS box genes. *Plant Physiology*, 2004, 1354: 2207-2219.
- [12] Xiang C, Qu L J, Gao Y M, Shi Y Y. Flower development and photoperiodic control of flowering in rice. *Rice Science*, 2013, 2: 79-87.
- [13] Kang H G, An G. Morphological alterations by ectopic expression of the rice OsMADS4 gene in tobacco plants. *Plant Cell Report*, 2005, 242: 120-126.
- [14] Yao S G, Ohmori S, Kimizu M, Yoshida H. Unequal genetic redundancy of rice PISTILLATA orthologs, OsMADS2 and OsMADS4, in lodicule and stamen development. *Plant Cell Physiology*, 2008, 495: 853-857.
- [15] Lee S, Jeon J S, An K, Moon Y H, Lee S, Chung Y Y, An G. Alteration of floral organ identity in rice through ectopic expression of OsMADS16. *Planta*, 2003, 2176: 904-911.
- [16] Yamaguchi T, Lee D Y, Miyao A, Hirochika H, An G, Hirano H Y. Functional diversification of the two C-class MADS box genes OSMADS3 and OSMADS58 in *Oryza sativa*. *The Plant Cell*, 2006, 181: 15-28.
- [17] Yamaguchi T, Nagasawa N, Kawasaki S, Matsuoka M, Nagato Y, Hirano H Y. The YABBY gene DROOPING LEAF regulates carpel specification and midrib development in *Oryza sativa*. *The Plant Cell*, 2004, 162: 500-509.
- [18] Yamaguchi T, An G, Miyao A, Hirochika H, Hirano H. Differentiation of function between two class C genes, OsMADS3 and OsMADS58, in rice. *Genes & Genetic Systems*, 2004, 796: 416.
- [19] Kyozuka J, Shimamoto K. Ectopic expression of OsMADS3, a rice ortholog of AGAMOUS, caused a homeotic transformation of lodicules to stamens in transgenic rice plants. *Plant and Cell Physiology*, 2002, 431: 130-135.
- [20] Yamaguchi T, Lee D Y, Miyao A, Hirochika H, An G H, Hirano H Y. Functional diversification of the two C-class MADS box genes OSMADS3 and OSMADS58 in *Oryza sativa*. *The Plant Cell*, 2006, 181: 15-28.
- [21] Li H, Liang W, Yin C, Zhu L, Zhang D. Genetic interaction of OsMADS3, DROOPING LEAF, and OsMADS13 in specifying rice floral organ identities and meristem determinacy. *Plant Physiology*, 2011, 1561: 263-274.
- [22] Sang X, Li Y, Luo Z, Ren D, Fang L, Wang N, Zhao F, Ling Y, Yang Z, Liu Y, He G. CHIMERIC FLORAL ORGANS1, encoding a monocot-specific MADS box protein, regulates floral organ identity in rice. *Plant Physiology*, 2012, 1602: 788-807.
- [23] Wang H, Zhang L, Cai Q, Hu Y, Jin Z, Zhao X, Fan W, Huang Q, Luo Z, Chen M, Zhang D, Yuan Z. OsMADS32 interacts with PI-like proteins and regulates rice flower development. *Journal of Integrative Plant Biology*, 2015, 575: 504-513.
- [24] Prasad K, Parameswaran S, Vijayraghavan U. OsMADS1, a rice MADS-box factor, controls differentiation of specific cell types in the lemma and palea and is an early-acting regulator of inner floral organs. *The Plant Journal*, 2005, 436: 915-928.
- [25] Agrawal G K, Abe K, Yamazaki M, Miyao A, Hirochika H. Conservation of the E-function for floral organ identity in rice revealed by the analysis of tissue culture-induced loss-of-function mutants of the OsMADS1 gene. *Plant Molecular Biology*, 2005, 591: 125-135.
- [26] 刘永柱, 陈志强, 张建国, 王慧, 郭涛, 林轩东. 空间诱变水稻广谱恢复系航恢七号的选育及利用. *核农学报*, 2008, 4: 439-442.
- Liu Y Z, Chen Z Q, Zhang J G, Wang H, Guo T, Lin X D. Breeding of "HANGHUI No.7", a wide restorer line of rice by space mutation and its utilization. *Journal of Nuclear Agricultural Sciences*, 2008, 4: 439-442. (in Chinese)
- [27] 郭涛, 蔡金洋, 王慧, 刘永柱, 张建国, 陈志强. 水稻空间诱变 SP<sub>2</sub> 代品质性状变异分析. *华南农业大学学报*, 2007, 1: 6-9.
- Guo T, Cai J Y, Wang H, Liu Y Z, Zhang J G, Chen Z Q. Variation analysis on grain quality of SP<sub>2</sub> generation by space mutation in *Oryza sativa*. *Journal of South China Agricultural University*, 2007, 1: 6-9. (in Chinese)
- [28] Rogers S O, Bendich A J. Extraction of DNA from milligram amounts of fresh, herbarium and mummified plant tissues. *Plant Molecular Biology*, 1985, 52: 69-76.
- [29] Michelmore R W, Paran I, Kesseli R V. Identification of markers linked to disease-resistance genes by bulked segregant analysis: A rapid method to detect markers in specific genomic regions by using segregating populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1991, 8821: 9828-9832.
- [30] 郭涛, 黄宣, 黄永相, 刘永柱, 张建国, 陈志强, 王慧. 一个控制水稻叶色白化转绿及多分蘖矮秆性状基因 hw-1(t) 的鉴定. *作物学报*,

- 2012, 1: 23-35.
- Guo T, Huang X, Huang Y X, Liu Y Z, Zhang J G, Chen Z Q, Wang H. Characterizations of a mutant gene *hw-1(t)* for green-revertible Albino, high tillering and dwarf in rice (*Oryza sativa* L.). *Acta Agronomica Sinica*, 2012, 1: 23-35. (in Chinese)
- [31] 郭涛, 黄永相, 罗文龙, 黄宣, 王慧, 陈志强, 刘永柱. 水稻叶色白化转绿及多分蘖矮秆突变体 *hfa-1* 的基因表达谱分析. 作物学报, 2013, 12: 2123-2134
- Guo T, Huang Y X, Luo W L, Huang X, Wang H, Chen Z Q, Liu Y Z. Gene differential expression of a green-revertible Albino and high-tillering dwarf mutant *hfa-1* by using rice microarray. *Acta Agronomica Sinica*, 2013, 12: 2123-2134. (in Chinese)
- [32] Yamaguchi T, Nagasawa N, Kawasaki S, Matsuoka M, Nagato Y, Hirano H Y. The YABBY gene DROOPING LEAF regulates carpel specification and midrib development in *Oryza sativa*. *The Plant Cell*, 2004, 162: 500-509.
- [33] Toriba T, Hirano H Y. The DROOPING LEAF and OsETTIN2 genes promote awn development in rice. *The Plant Journal*, 2014, 774: 616-626.
- [34] Prasad K, Parameswaran S, Vijayraghavan U. OsMADS1, a rice MADS-box factor, controls differentiation of specific cell types in the lemma and palea and is an early-acting regulator of inner floral organs. *The Plant Journal*, 2005, 436: 915-928.
- [35] Xing Y, Zhang Q. Genetic and molecular bases of rice yield. *Annual Review of Plant Biology*, 2010, 61: 421-442.
- [36] Arora R, Agarwal P, Ray S, Singh A K, Singh V P, Tyagi A K, Kapoor S. MADS-box gene family in rice: Genome-wide identification, organization and expression profiling during reproductive development and stress. *BMC Genomics*, 2007, 8: 242.
- [37] Jeon J S, Jang S, Lee S, Nam J, Kim C, Lee S H, Chung Y Y, Kim S R, Lee Y H, Cho Y G, An G. Leafy hull sterile1 is a homeotic mutation in a rice MADS box gene affecting rice flower development. *The Plant Cell*, 2000, 126: 871-884.
- [38] Agrawal G K, Abe K, Yamazaki M, Miyao A, Hirochika H. Conservation of the E-function for floral organ identity in rice revealed by the analysis of tissue culture-induced loss-of-function mutants of the OsMADS1 gene. *Plant Molecular Biology*, 2005, 591: 125-135.
- [39] 刘合霞, 周坚. DNA 甲基化对植物发育调控的研究进展. 安徽农业科学, 2012, 2: 637-639.
- Liu H X, Zhou J. Research progress of DNA methylation on plant developmental regulation. *Journal of Anhui Agricultural Sciences*, 2012, 2: 637-639. (in Chinese)
- [40] 赵利旦, 董园园, 李海燕. 植物 microRNA 调控及其应用研究进展. 北方园艺, 2015, 6: 173-178.
- Zhao L D, Dong Y Y, Li H Y. Research advance in plant microRNA regulation and application. *Northern Horticulture*, 2015, 6: 173-178. (in Chinese)
- [41] 杨曦, 何玉科. 植物 microRNA 的生物合成和调控功能. 生命科学, 2010, 7: 688-696.
- Yang X, He Y K. Biogenesis and regulatory function of plant microRNA. *Chinese Bulletin of Life Sciences*, 2010, 7: 688-696. (in Chinese)
- [42] 杨德卫, 叶新福. 水稻颖花突变体的最新研究进展. 分子植物育种, 2010, 1: 106-116.
- Yang D W, Ye X F. New research progress on the spikelet-mutant in rice. *Molecular Plant Breeding*, 2010, 1: 106-116. (in Chinese)
- [43] 黄方, 迟英俊, 喻德跃. 植物 MADS-box 基因研究进展. 南京农业大学学报, 2012, 5: 9-18.
- Huang F, Chi Y J, Yu D Y. Research advances of MADS-box genes in plants. *Journal of Nanjing Agricultural University*, 2012, 5: 9-18. (in Chinese)

(责任编辑 李莉)