

水稻粒形和穗粒数基因 *GSN4* 的克隆与单倍型分析

柴炳泽¹ 王俊格¹ 吴凯雄¹ 刘嘉龙¹ 吴越¹ 王荟森¹ 谭霖¹ 任德勇¹ 高振宇¹
朱丽¹ 张强^{1,2} 张光恒^{1,2} 钱前^{1,2,*} 胡江^{1,2,*}

(¹ 中国水稻研究所 水稻生物育种全国重点实验室, 杭州 310006; ² 三亚中国农业科学院国家南繁研究院院士工作站, 三亚 572024; *通信作者, email: qianqian188@hotmail.com; hujiang588@163.com)

Cloning and Haplotype Analysis of *GSN4*, a Gene for Grain Size and Grain Number in Rice

CHAI Bingze¹, WANG Junge¹, WU Kaixiong¹, LIU Jialong¹, WU Yue¹, WANG Huisen¹, TAN Lin¹,
REN Deyong¹, GAO Zhenyu¹, ZHU Li¹, ZHANG Qiang^{1,2}, ZHANG Guangheng^{1,2}, QIAN Qian^{1,2,*},
HU Jiang^{1,2,*}

[¹ State Key Laboratory of Rice Biology and Breeding, China National Rice Research Institute, Hangzhou 310006, China; ² Academician Workstation, National Nanfan Research Institute (Sanya), Chinese Academy of Agricultural Sciences, Sanya 572024, China; *Corresponding author, email: qianqian188@hotmail.com; hujiang588@163.com]

Abstract: 【Objective】 Grain size is a critical determinant of rice yield. This study aims to explore novel genes regulating grain size and expand the current genetic regulatory network, and provide valuable genetic resources for molecular design breeding of high-yield rice varieties. 【Method】 The large-grain mutant *gsn4*, generated by EMS mutagenesis of the *japonica* rice variety W7, was used as experimental material. A combination of systematic phenotypic identification, cytological observation, gene mapping, functional verification, subcellular localization, and haplotype analysis was performed to clone and functionally characterize the candidate gene. 【Result】 Phenotypic identification revealed that the *gsn4* mutant exhibited pleiotropic effects. Compared with the wild type, its grain length, grain width, and 1000-grain weight were significantly increased, whereas plant height, panicle length, and grain number per panicle were significantly decreased. Cytological analysis indicated that *GSN4* regulates rice grain size by modulating both cell proliferation and expansion in glumes. Map-based cloning, together with CRISPR/Cas9 gene-editing validation, confirmed *LOC_Os04g46450* as the candidate gene underlying *GSN4*. This gene encodes a nuclear-localized E3 ubiquitin ligase protein, which acts as a negative regulator of rice grain size and modulates plant growth and development through the brassinosteroid (BR) biosynthesis pathway. Haplotype analysis further identified Hap1 as the elite haplotype conferring the most favorable effects on grain width and 1000-grain weight. 【Conclusion】 Collectively, this study elucidates the function and regulatory mechanism of *GSN4*, enriches the genetic regulatory network governing rice grain size, and provides important genetic resources and a theoretical basis for molecular design breeding of high-yield rice varieties.

Keywords: grain size; *GSN4*; cell cycle; cell expansion; rice; haplotype; BR

摘要: 【目的】粒形是决定水稻产量的重要因素之一, 挖掘水稻粒形调控新基因, 完善水稻粒形遗传调控网络, 为高产水稻分子设计育种提供基因资源。【方法】以 EMS 诱变粳稻品种武运粳 7 号(W7) 获得的大粒突变体 *gsn4* 为试验材料, 系统开展表型鉴定、细胞学观察、基因定位、功能验证、亚细胞定位及单倍型分析等对候选基因进行克隆和功能分析。【结果】表型鉴定表明, *gsn4* 突变体表现出一因多效性, 与野生型相比, 其粒长、粒宽及千粒重显著增加, 而株高、穗长及每穗粒数显著降低; 细胞学分析显示, *gsn4* 通过影响颖壳细胞的增殖与扩张过程调控水稻籽粒大小。图位克隆结合 CRISPR/Cas9 基因编辑验证, 明确 *LOC_Os04g46450* 为 *GSN4* 的候选基因, 该基因编码核定位的 E3 泛素连接酶蛋白, 属于水稻粒形负调控因子, 通过参与油菜素内酯(BR)生物合成通路调控水稻生长发育进程。单倍型分析结果筛选出对粒宽和千粒重调控效果最优的优异单倍型 Hap1。【结论】本研究明确了 *GSN4* 的功能及调控机制, 丰富了水稻粒形遗传调控网络, 为高产水稻品种的分子设计育种提供了重要的基因资源和理论依据。

关键词: 粒形; *GSN4*; 细胞周期; 细胞扩张; 水稻; 单倍型; 油菜素内酯

收稿日期: 2025-12-27; 修改稿收到日期: 2026-03-17。

基金项目: 三亚中国农业科学院国家南繁研究院南繁专项(YBXM2526); 国家自然科学基金资助项目(32272109, 32188102); 海南省院士创新平台科研项目(YSPTZX202502); 中国农业科学院农业科技创新计划资助项目(ASTIP, CAAS-ZDRW202401)。

水稻(*Oryza sativa* L.)是重要的粮食作物之一,全球有半数以上人口以稻米为主食。据国家统计局数据,2024年全国粮食总产量14130亿斤,其中稻谷产量4150.7亿斤,占粮食总产量的29.38%,这表明水稻在我国粮食生产中具有不可动摇的地位。水稻的产量主要由有效穗数、每穗粒数和粒重组成,而粒形是决定粒重的关键性状,能直接影响水稻产量^[1]。因此,挖掘调控粒形的重要基因及其分子调控网络,可以为高产水稻的育种提供理论基础和遗传资源^[2]。

近年来,分子和育种学家通过图位克隆或全基因组关联分析(GWAS)等方法鉴定出了多个水稻粒形相关基因,初步构建了籽粒大小的分子调控网络。其中,参与泛素-蛋白酶体途径的基因有 *GW2*、*SMG3*、*DGS1* 和 *SCFFBX206* 等^[3-6],参与G蛋白信号途径调控粒形的有 *RGG1*、*RGG2*、*DEP1*、*GS3* 和 *GGC2* 等^[7-9],通过丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)信号途径调控粒形的有 *OsMKKK10*、*OsMKK4* 和 *OsMAPK6* 等^[10]。此外,还有多种植物激素参与调控粒形,其中,油菜素内酯(BR)合成和信号通路的基因被广泛报道能通过影响细胞的伸长和分裂来调控粒形^[11,12],如合成相关基因 *BRD1*、*D2* 和 *D11* 的突变会造成籽粒变小^[13-15],而BR不敏感突变体 *bzr1* 也出现类似的小粒表型^[16,17]。尽管在水稻中与BR相关的研究少于拟南芥,但其主要信号通路是一致的,首先是BR被质膜上的 *OsBRI1*-*OsBAK1* 受体复合物识别,信号随后传递至 *OsBSK3*,进一步抑制 *OsGSK2*,并激活下游BR响应基因的表达^[18-21]。一些响应BR信号的下游基因,尤其是直接或间接受 *OsGSK2* 激酶控制的基因,在粒形调控中起着重要作用,如 *GS2*、*OsOFP8*、*OsOFP14*、*WRKY53*、*SG2*、*BZR1* 等^[17,22-25]。另一方面,一些基因通过影响BR合成或信号转导来控制籽粒大小,如 *RAV6*、*XIAO*、*SLG*、*qRBG1*、*OsBIR3* 就能通过调节BR生物合成基因 *D2*、*D11* 及 *brd2* 的表达来调控粒形^[26-30]。

水稻粒形发育受复杂的分子网络调控,虽多个粒形相关基因已克隆且功能研究取得阶段性进展,但现有成果仍难以全面阐释粒形表型多样性的分子机制。因此,不断挖掘新的粒形基因或新等位型,明确其参与的分子网络,有助于完善粒形的调控机制。鉴于此,本研究利用甲基磺酸乙酯(ethylmethane sulfonate, EMS)诱变筛选获得一个穗粒数减少的大粒突变材料 *gsn4*,利用图位克隆、全基因组测序技术以及转基因验证确定了 *GSN4* 候选基

因,其为 *OsHUB1/MIPI* 的等位基因^[31-33]。*OsHUB1/MIPI* 编码一个核定位E3泛素连接酶,介导组蛋白H2B单泛素化修饰,主要参与调控水稻分蘖、花药发育及抽穗期等性状,但其在调控粒形中的功能尚未见报道^[31-33]。本研究揭示了 *GSN4* 通过BR途径参与粒形与穗粒数的调控,为完善水稻粒形的分子调控机制打下了基础。

1 材料与方法

1.1 遗传材料

突变体 *gsn4* 是通过EMS诱变粳稻品种武运粳7号(W7)获得的,经浙江杭州富阳和海南陵水两地多代种植鉴定, *gsn4* 籽粒增大、穗粒数减少等突变表型均能稳定遗传。图位克隆所用的遗传分离群体为籼稻品种南京6号(NJ6)和 *gsn4* 杂交获得的F₂群体。

1.2 材料种植与农艺性状考察

水稻材料种植在杭州市富阳区中国水稻研究所试验基地(北纬29°54',东经119°56')和海南省陵水黎族自治县试验基地(北纬18°34',东经109°50'),常规水肥管理。

野生型W7和突变体 *gsn4* 同期播种、同期移栽,成熟期各随机选取20株生长一致的单株,测定株高、穗长、叶夹角、枝梗数、每穗粒数等农艺性状;种子自然晾晒后,随机选取400~500粒饱满的种子,使用万深粒形分析扫描仪(Wanshen LA-S,杭州万深)测定粒长、粒宽,分析天平(精度0.001g)测定千粒重,3次重复。

1.3 细胞学观察

孕穗期取W7和 *gsn4* 的颖壳,经FAA固定、梯度脱水、包埋、切片后进行石蜡切片观察;扫描电镜样品经2.5%戊二醛固定、锇酸固定、梯度脱水、CO₂临界点干燥、镀金后,使用Hitachi SU-8010扫描电镜观察颖壳内外表皮细胞形态,ImageJ软件统计细胞大小和数量。

1.4 基因定位与克隆

以 *gsn4* 为母本、NJ6为父本杂交获得F₁,F₁自交获F₂分离群体,从中筛选397株突变体表型单株用于基因定位。取叶片组织研磨成粉,加入CTAB缓冲液65℃裂解;氯仿抽提后取上清,乙醇沉淀DNA;晾干后用ddH₂O溶解备用。利用234对均匀分布于12条染色体的SSR分子标记进行初定位(标记之间平均6.83cM,最大距离小于20cM)。为进一步缩小范围,通过比对日本晴和9311基因组序

列设计 InDel 标记进行精细定位。结合全基因组测序(上海美吉生物医药科技有限公司), 筛选候选基因, 设计特异性引物进行 PCR 扩增和 Sanger 测序(浙江尚亚生物技术有限公司)验证突变位点。

1.5 蛋白结构与功能预测分析

利用 ExPASy ProtParam 在线工具(<https://web.expasy.org/protparam/>)分析 GSN4 蛋白的基本理化性质, 包括氨基酸组成、相对分子质量、理论等电点等。通过 NCBI CDD 数据库(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>)预测蛋白保守结构域。利用 DNAMAN 软件进行同源蛋白的氨基酸序列多重比对。用 MEGA 7 软件构建 GSN4 蛋白与单子叶植物同源蛋白的系统进化树。

1.6 亚细胞定位

使用带有接头的扩增引物, 扩增不带终止密码子的 GSN4 全长 cDNA, 并将其连接到使用内切酶切开的带有绿色荧光蛋白(green fluorescent protein, GFP)标签的载体用于亚细胞定位, 然后将构造好的 GSN4-GFP 载体和空 GFP 载体分别转到水稻原生质体以及烟草中, 使用激光扫描共聚焦显微镜(Zeiss, LSM980)进行亚细胞定位观察和拍照。

1.7 基因编辑载体构建与遗传转化

根据候选基因 GSN4 的编码区序列, 借助 CRISPR/Cas9 靶标设计网站(<http://skl.scau.edu.cn/targetdesign/>)设计 2 个特异性靶位点(GC 含量 50%~60%), 并构造敲除载体 pYLCRISPR/Cas9-MH。采用农杆菌介导法将该载体转化至 W7 中, 获得 GSN4 基因转基因敲除株系(KO)。对获得的株系进行 PCR 鉴定与测序验证, 筛选出纯合敲除株系; 待植株生长至成熟期, 系统考察其农艺性状。

1.8 基因表达分析

采用水稻 RNA 快速提取试剂盒提取不同组织的 RNA, 使用 Nanodrop 分光光度计检测 RNA 浓度和纯度, 并通过 1%琼脂糖凝胶电泳进一步验证。使用逆转录试剂盒将 RNA 反转成 cDNA 后, 采用实时荧光定量 PCR(RT-qPCR)分析基因表达水平, 其中, 野生型与突变体间基因表达差异分析以 *Histone* 为内参基因; 野生型中 GSN4 在根、茎、叶、叶鞘、穗等不同组织的基因表达模式分析以 *Actin* 为内参基因, 采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算相对表达量。孕穗期取 0~10 cm 幼穗进行 RNA-seq 分析(诺禾致源生物科技有限公司), 筛选差异表达基因并进行 KEGG 富集分析。

1.9 激素敏感性分析

挑选饱满种子浸种催芽后, 水培至 2 叶期, 分

别加入不同浓度的 2,4-eBL(0、0.01、0.1、1、5 $\mu\text{mol/L}$) 和 BRZ(0、0.01、0.1、1、5 $\mu\text{mol/L}$), 每个处理 3 个重复, 每个重复 40 株幼苗, 处理 7 d 后分别测定叶夹角。

1.10 数据统计分析

采用 Excel 2019 整理数据, R 4.5.1 软件进行独立样本 *t* 检验, 数据以均值 $\pm$ 标准差表示。

2 结果与分析

2.1 突变体 *gsn4* 的表型鉴定

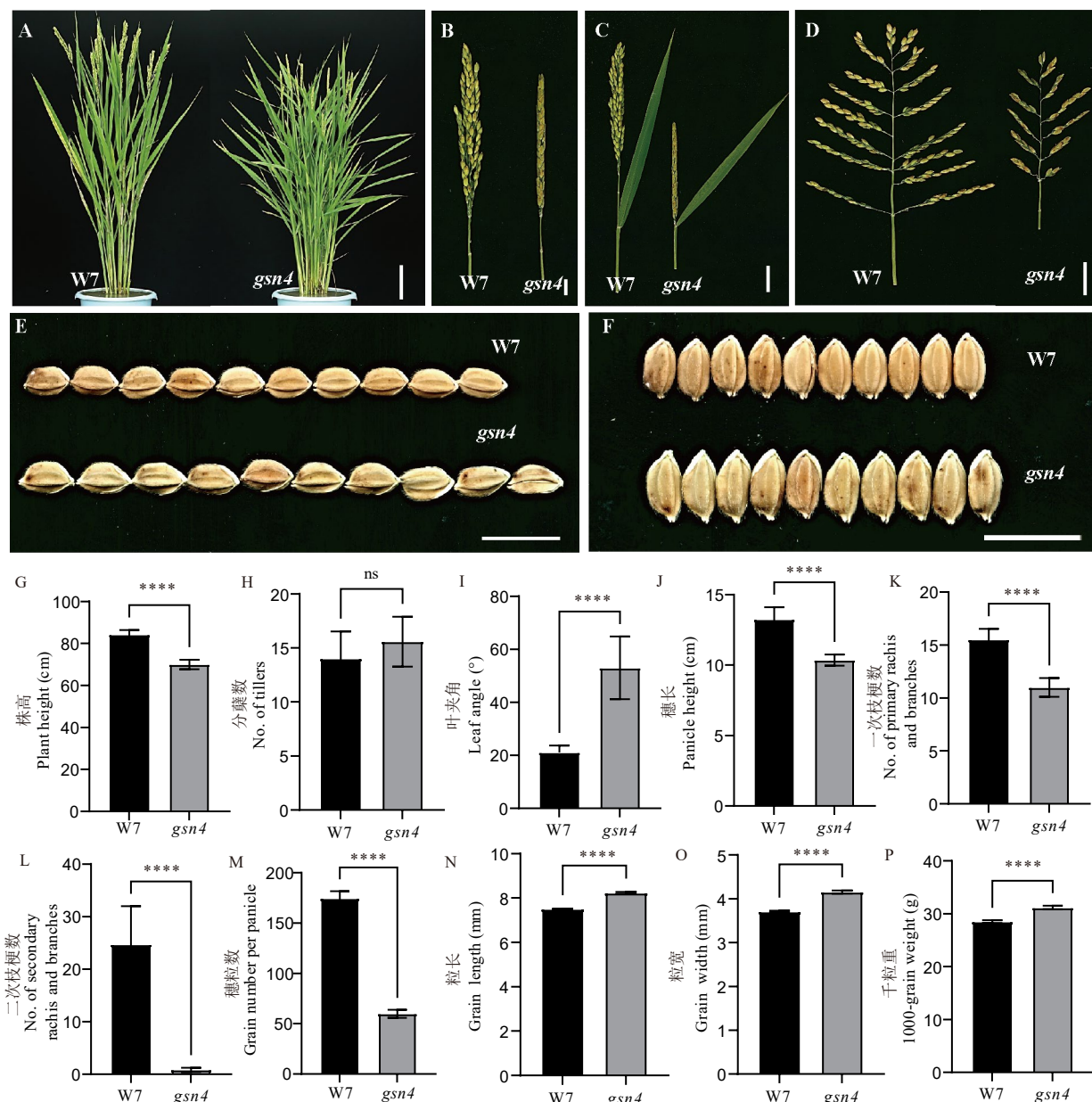
在成熟期对农艺性状测定后发现, *gsn4* 呈现明显的多表型特征(图 1)。其中, 株高从 83.94 cm 显著降至 70.03 cm, 降幅达 16.57%; 穗长由 13.26 cm 缩短至 10.36 cm, 减少 21.87%; 叶夹角由 21°增至 53°, 展开程度显著增加。在枝梗数及穗粒数性状中, *gsn4* 的一次枝梗数从 16 个降至 11 个, 二次枝梗数从 25 个锐减至 1 个, 分别下降 31.2%和 96.0%, 最终导致每穗粒数从 175 粒降至 60 粒, 降幅达 65.71%。在籽粒大小上, *gsn4* 的粒长从 7.50 mm 增至 8.23 mm, 粒宽从 3.76 mm 增至 4.12 mm, 分别增加 9.73%和 9.57%; 千粒重从 26.16 g 提升至 31.19 g, 增幅达 19.23%。

2.2 颖壳细胞学特征分析

为阐明 *gsn4* 籽粒增大的细胞学机制, 在水稻孕穗期分别对野生型 W7 和 *gsn4* 的颖壳进行石蜡切片观察与扫描电镜分析(图 2)。石蜡切片结果显示, *gsn4* 的颖壳细胞数量显著增加, 其外层薄壁细胞总长度增加了 7.88%, 细胞数量增加 9.90%。扫描电镜观察表明, *gsn4* 的颖壳细胞大小也显著增加, *gsn4* 颖壳外表皮细胞长度和宽度分别增加了 21.33%和 19.75%, 而内表皮细胞长度和宽度分别增加了 28.55%和 4.96%。这些结果表明, *gsn4* 通过同时促进颖壳细胞的增殖与扩张, 最终导致了籽粒增大的表型。

2.3 GSN4 基因的定位与功能验证

遗传分析显示, *gsn4* 与 W7 杂交获得的 F₁代植株均表现为野生型表型, F₂代群体中野生型与突变体表型分离比为 496:175($\chi^2=1.63<\chi^2_{0.05}=3.84$), 符合孟德尔单隐性核基因遗传规律, 表明 *gsn4* 突变体表型受单隐性基因控制。以 *gsn4* 为母本、籼稻南京 6 号(NJ6)为父本构建 F₂定位群体, 利用 234 对 SSR 分子标记进行初定位, 将 GSN4 基因定位于 4 号染色体的 B15 和 B16 标记之间(图 3-A)。通过扩大 F₂ 群体规模并设计多对 InDel 标记进行精细定位, 最



A: W7 与 *gsn4* 突变体的植株形态, 标尺为 10 cm; B-D: 两者的穗部形态, 标尺均为 1 cm; E-F: 两者的籽粒性状 (粒长、粒宽), 标尺均为 1 cm. G~P: W7 及 *gsn4* 表型分析。数据以均值±标准差表示 ($n=20$)。****表示 $P<0.0001$, ns 表示不显著。

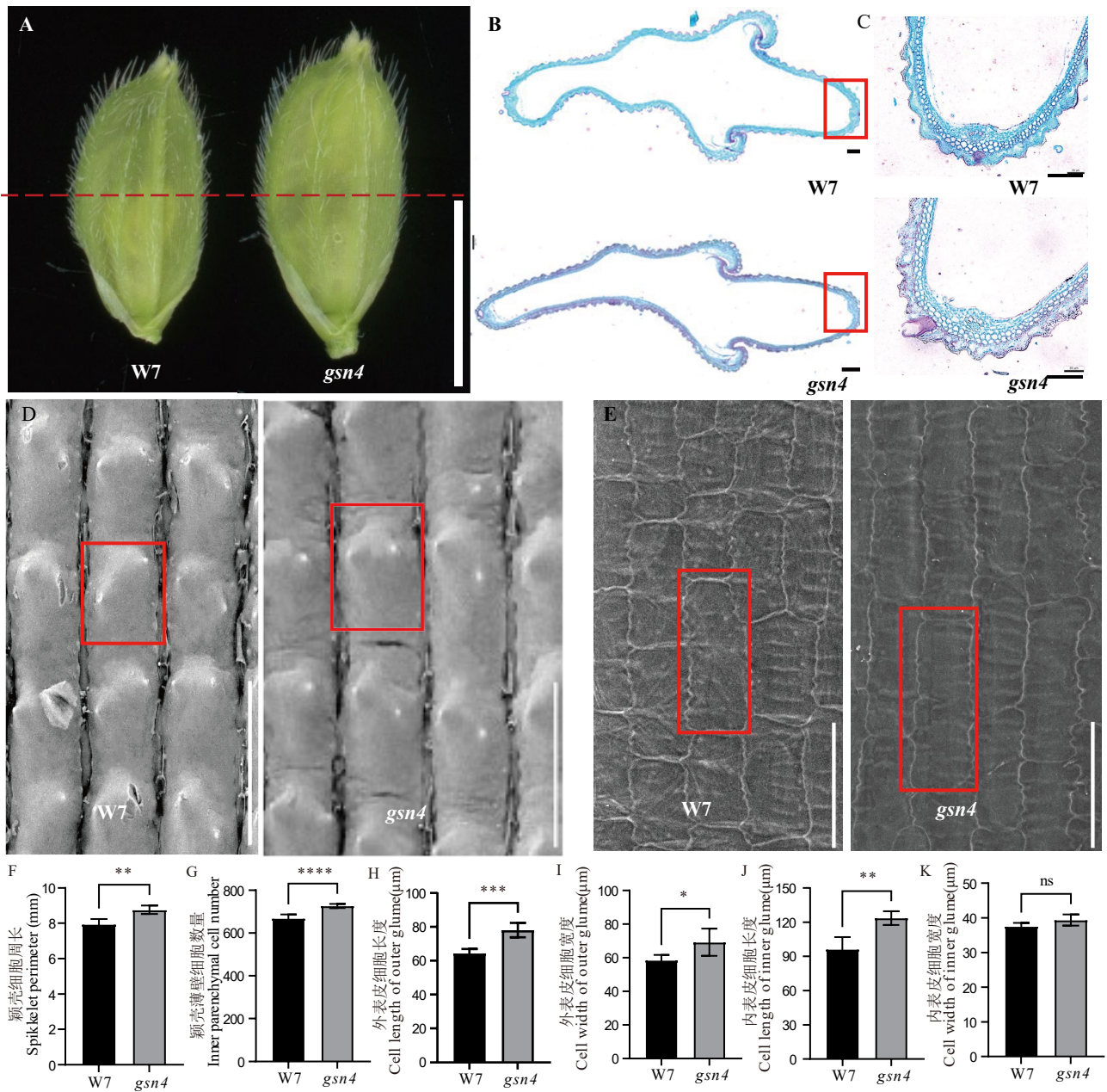
A, Plant morphologies of W7 and *gsn4*, bar = 10 cm; B-D, Panicle morphologies of the two materials, bars = 1 cm; E-F, Grain traits (grain length, grain width) of the two materials, bars = 1 cm; G~P, Phenotypic analysis of W7 and *gsn4*. Data are presented as mean ± standard deviation ($n=20$). ****, $P<0.0001$; ns, Not significant.

图 1 *gsn4* 的表型分析

Fig. 1. Phenotypic analysis of *gsn4*

终将基因锁定在 C41 和 C75 标记之间的 225 kb 区间内, 该区间包含 40 个注释基因(图 3-B)。结合全基因组测序技术, 对 *gsn4* 与 W7 进行测序分析, 该区间内 *LOC_Os04g46450* 基因的 5' UTR 区域 94bp 处存在 G 到 A 的突变, 在外显子处还存在 T 到 C 的单碱基突变, 导致编码氨基酸由缬氨酸(Val)转变为丙氨酸(Ala), 且两种突变方式在突变体 *gsn4* 中稳定存在(图 3-D)。为验证候选基因功能, 以 W7 为

背景, 构建该基因的 CRISPR/Cas9 敲除载体, 通过农杆菌介导的遗传转化获得纯合敲除株系。田间农艺性状考察结果显示, 敲除株系的株高、粒形、穗粒数等农艺性状与 *gsn4* 突变体高度相似(图 3-E~F)。该结果直接证实, 候选基因的功能缺失是导致 *gsn4* 突变体表型的直接原因, 明确了 *GSN4* 为调控水稻粒形和穗粒数的候选基因 *LOC_Os04g46450*, 其为 *OsHUB1/MIPI* 的等位基因^[31-33]。



A: W7 及 *gsn4* 的颖壳, 标尺为 5 mm。B: W7 和 *gsn4* 颖壳的横切面, 标尺为 100 μm。C 图 B 图中横切面局部放大, 标尺为 100 μm。D-E: W7 及 *gsn4* 颖壳外表皮细胞(D)及内表皮细胞(E), 标尺为 100 μm。F-K: W7 及 *gsn4* 颖壳细胞性状统计。数据以均值±标准差表示 (n=20)。****表示 $P<0.0001$, ***表示 $P<0.001$, **表示 $P<0.01$, *表示 $P<0.05$, ns 表示不显著。

A, Glumes of W7 and *gsn4* mutant, bar = 5 mm. B, Cross-sections of glumes of W7 and *gsn4*, bar = 100 μm. C, Partial magnification of the cross-section in B, bar = 100 μm. D-E, Outer epidermal cells (D) and inner epidermal cells (E) of glumes of W7 and *gsn4*, bars = 100 μm. F-K, Statistics of glume cell traits of W7 and *gsn4*. Data are expressed as mean ± standard deviation (n=20). ****, $P<0.0001$; ***, $P<0.001$; **, $P<0.01$; *, $P<0.05$; ns, Not significant.

图 2 W7 及 *gsn4* 颖壳细胞大小分析

Fig. 2. Analysis of the cell size of W7 and *gsn4* glumes

2.4 候选基因 GSN4 的蛋白序列分析

为明确 *GSN4* 基因编码蛋白的核心结构特征, 本研究以其全长 CDS 序列为基础, 借助 ExPASy ProtParam 在线工具开展理化性质预测, 结果显示, *GSN4* 蛋白由 884 个氨基酸残基组成, 相对分子质量约为 100.4 kDa, 理论等电点为 7.97。通过 NCBI CDD 数据库预测结构域发现, *GSN4* 蛋白 C 端区域

存在 HC 型 RING 环指-Brel 样(RING-HC_Brel-like, 824~882aa)结构域, 该结构域在物种间具有高度进化保守性(图 4-A)。系统进化树分析结果进一步表明, *GSN4* 基因在物种演化进程中相对保守, 其与单子叶植物如菰草(*Zizania latifolia*)、黑麦草(*Lolium perenne*)、大麦(*Hordeum vulgare subsp. Vulgare*)、二穗短柄草(*Brachypodium distachyon*)等物种的 E3 泛

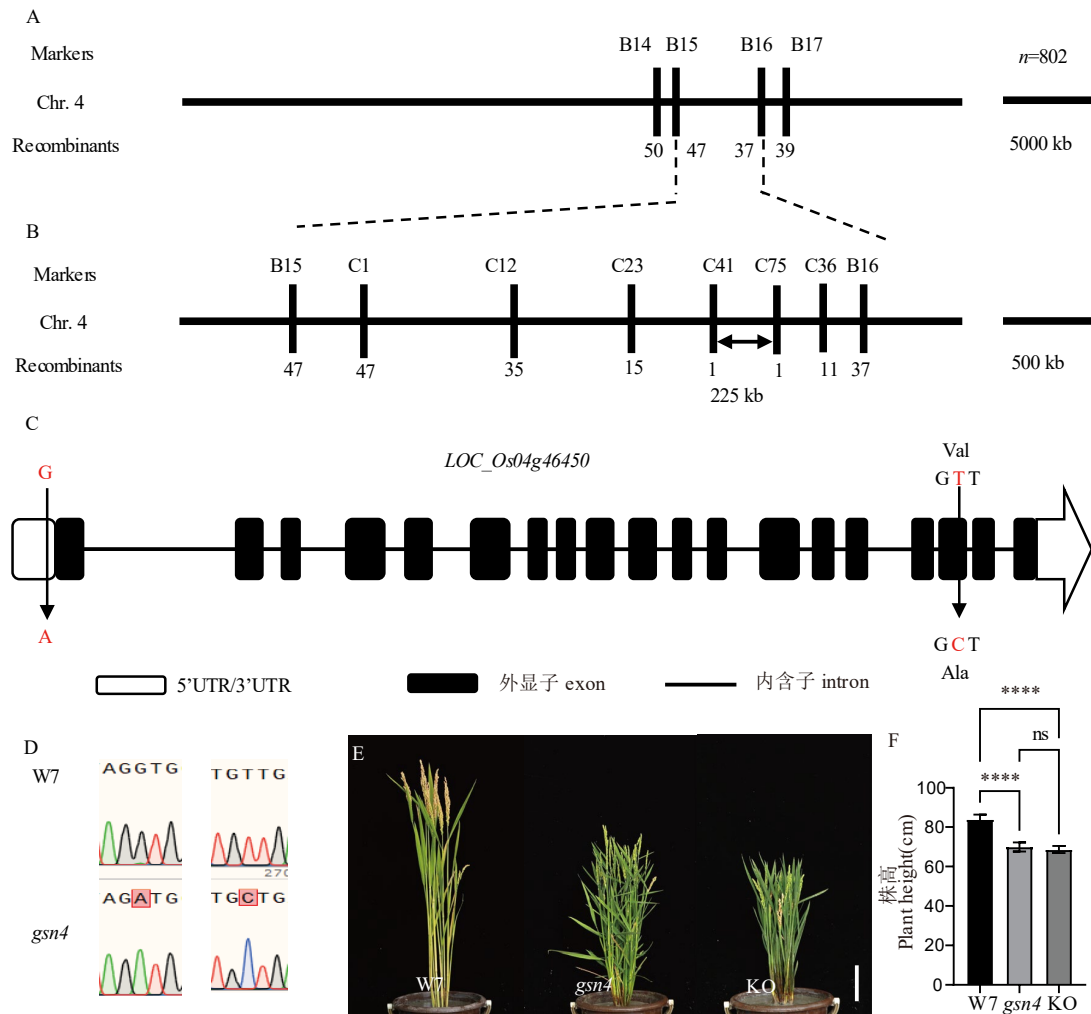


图 3 GSN4 基因的定位与敲除株系表型验证
Fig. 3. Mapping of GSN4 locus and the knockout of GSN4

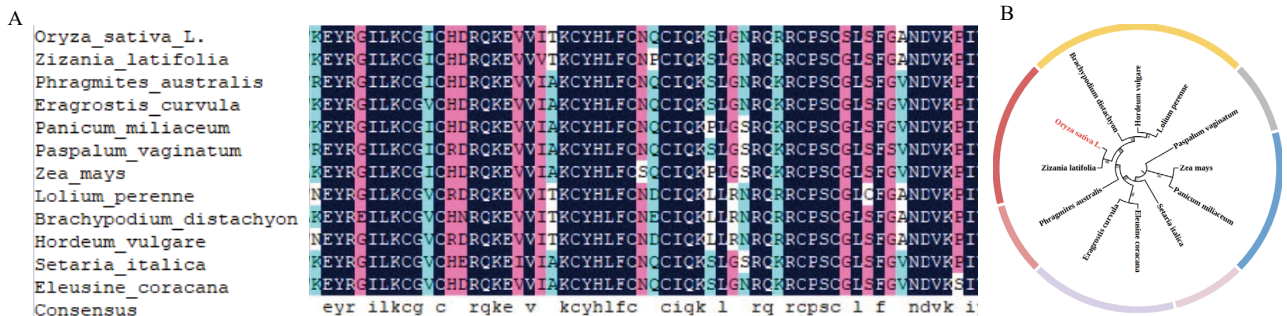
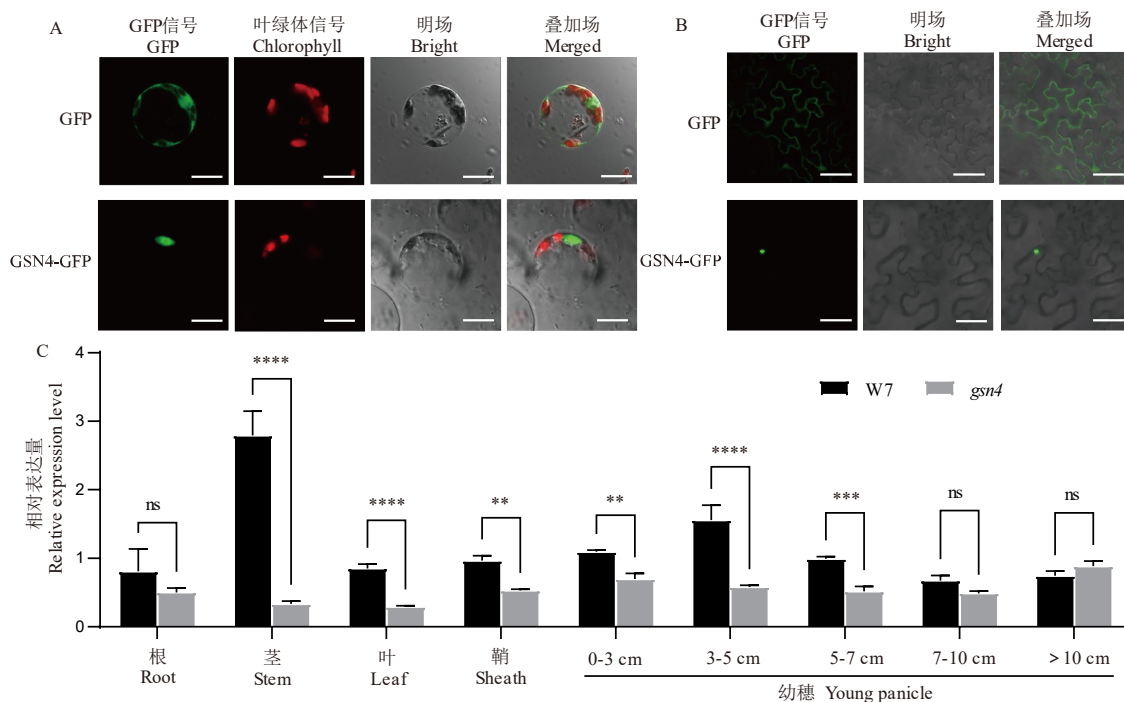


图 4 GSN4 蛋白的系统发育分析
Fig. 4. Phylogenetic analysis of GSN4 protein



A: GSN4 的水稻原生质体亚细胞定位分析。绿色荧光显示 GFP, 红色荧光显示叶绿体自发荧光, 比例尺=10 μ m。B: GSN4 的烟草亚细胞定位分析, 绿色荧光显示 GFP, 比例尺=40 μ m。C: GSN4 在水稻组织的表达模式。数据以均值 $\pm$ 标准差表示 ($n=3$)。****表示 $P<0.0001$, ***表示 $P<0.001$, **表示 $P<0.01$, ns 表示不显著。

A, Subcellular localization analysis of GSN4 in rice protoplasts. Green fluorescence indicates GFP, and red fluorescence indicates chloroplast autofluorescence; scale bar = 10 μ m. B, Subcellular localization analysis of GSN4 in tobacco. Green fluorescence indicates GFP; scale bar = 40 μ m. C, Expression pattern of GSN4 in rice tissues. Data are expressed as mean $\pm$ standard deviation ($n=3$). ****, $P<0.0001$; ***, $P<0.001$; **, $P<0.01$; ns, Not significant.

图 5 GSN4 的亚细胞定位和表达模式分析

Fig. 5. Subcellular localization and expression pattern analysis of GSN4

素连接酶蛋白具有较高的同源性, 据此推测该基因与单子叶植物家族成员存在更为紧密的亲缘关系 (图 4-B)。

2.5 亚细胞定位和组织表达模式分析

为明确 GSN4 蛋白的亚细胞定位特征, 本研究构建 GSN4-GFP 瞬时表达载体, 同时以空 GFP 载体作为对照, 二者分别转入水稻原生质体和烟草中进行瞬时表达 (图 5-A~B)。共聚焦激光扫描显微镜观察结果显示, 空载体 GFP 的绿色荧光在水稻原生质体和烟草的细胞核与细胞质中均有分布, 而 GSN4-GFP 融合蛋白的绿色荧光信号主要集中在细胞核区域。结果表明, GSN4 蛋白定位于细胞核中。

为明确 GSN4 基因的组织表达模式, 采用 RT-qPCR 技术检测了其在野生型 W7 和 gsn4 不同组织及幼穗发育阶段的相对表达量 (图 5-C)。结果显示, GSN4 基因在两者组织中均有表达, 其中在野生型中, GSN4 在茎组织中表达量最高, 3~5 cm 幼穗阶段表达量次之, 表明野生型中 GSN4 在穗部的表达高峰集中于幼穗发育的 3~5 cm 阶段。在突变体 gsn4 中, GSN4 的表达量除根和大于 7 cm 的幼穗外, 均显著下调, 这与 gsn4 的表型主要集中在叶片和穗部是一致的。

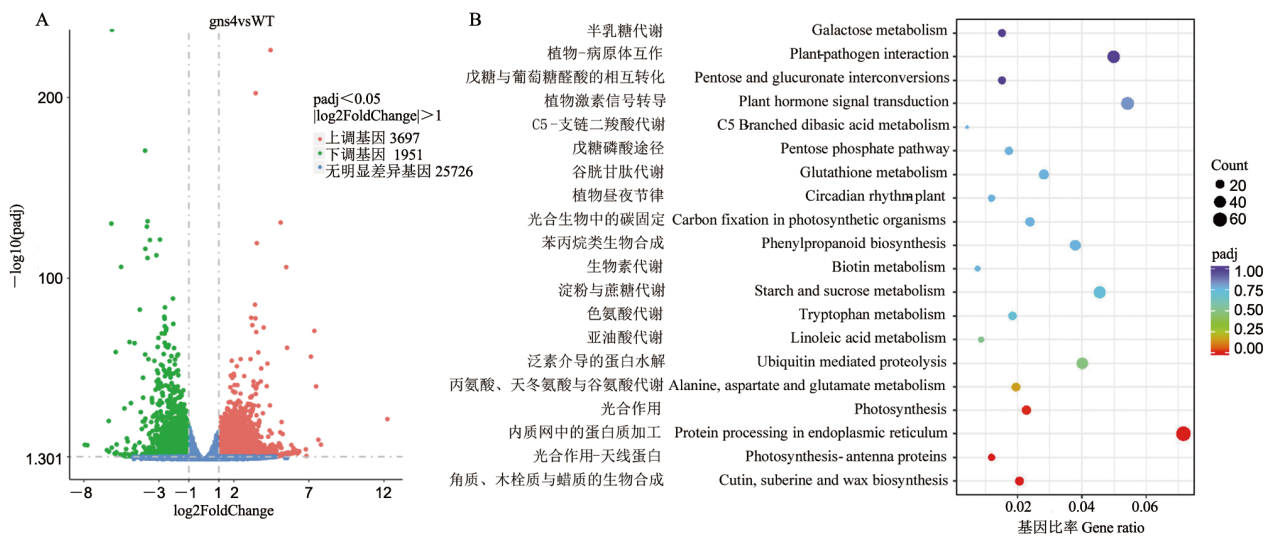
2.6 差异表达基因与通路富集分析

为解析 GSN4 调控水稻粒形的分子调控网络, 对孕穗期 0~10 cm 的幼穗进行转录组(RNA-seq)分析。共鉴定到 5648 个差异表达基因(DEGs), 其中上调表达基因 3697 个, 下调表达基因 1951 个 (图 6-A)。KEGG 富集分析结果显示 (图 6-B), 差异基因主要集中在 20 条核心通路中, 其中与粒形调控直接相关的通路包括植物激素信号转导(KO04075)、淀粉和蔗糖代谢(KO00500)等通路。

进一步筛选转录组差异表达基因中调控粒形及穗粒数相关的基因 (图 7), 发现负调控粒形的 *OsCDPK1* 基因表达量显著下调, 正调控粒形的 *OsMKKK55*、*EXPLA1*、*OsVQ4* 等基因表达量上调; 负调控穗粒数的 *OsFD7*、*OsAP2-39* 等基因表达上调, 正调控穗粒数的 *OsCCA1*、*RDD1*、*OsTPR* 等基因表达下调, 这些基因的表达变化与 gsn4 突变体的表型变异完全一致, 推测 GSN4 可能通过调控这些基因的表达, 进而参与粒形和穗粒数的协同调控。

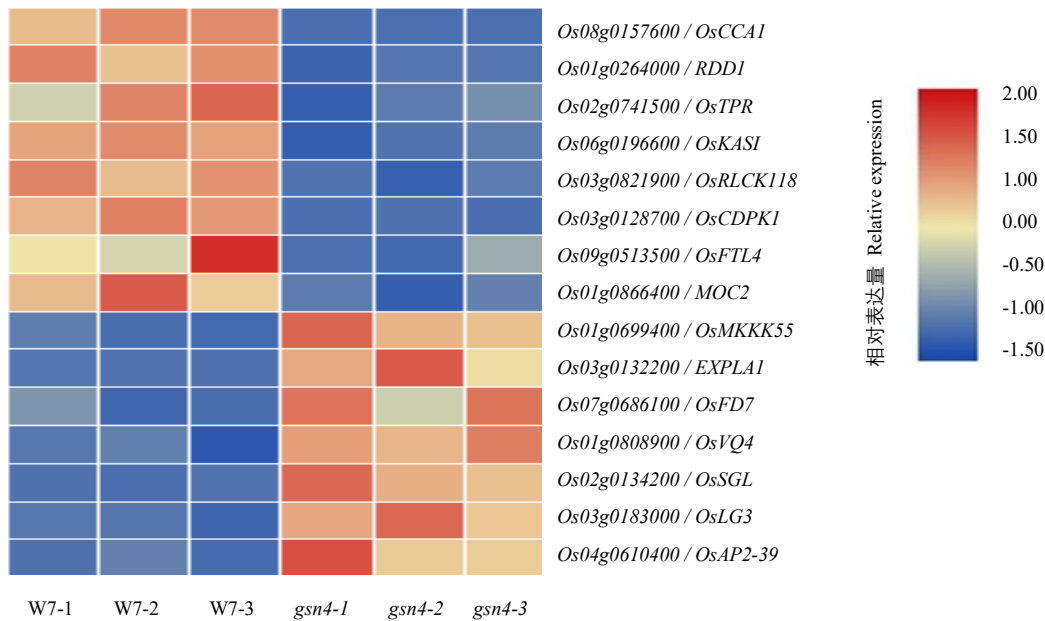
2.7 细胞周期与扩张相关基因的表达特征

对孕穗期 0~10 cm 幼穗中细胞周期和扩张等相关基因的表达分析显示 (图 8), gsn4 突变体中细胞



A: 差异表达基因火山图; B: KEGG 富集分析图。
A, Volcanogram of differentially expressed genes. B, KEGG enrichment analysis diagram.

图 6 野生型 W7 及突变体 *gsn4* 的转录组分析
Fig. 6. RNA-seq analysis of wild-type W7 and mutant *gsn4*



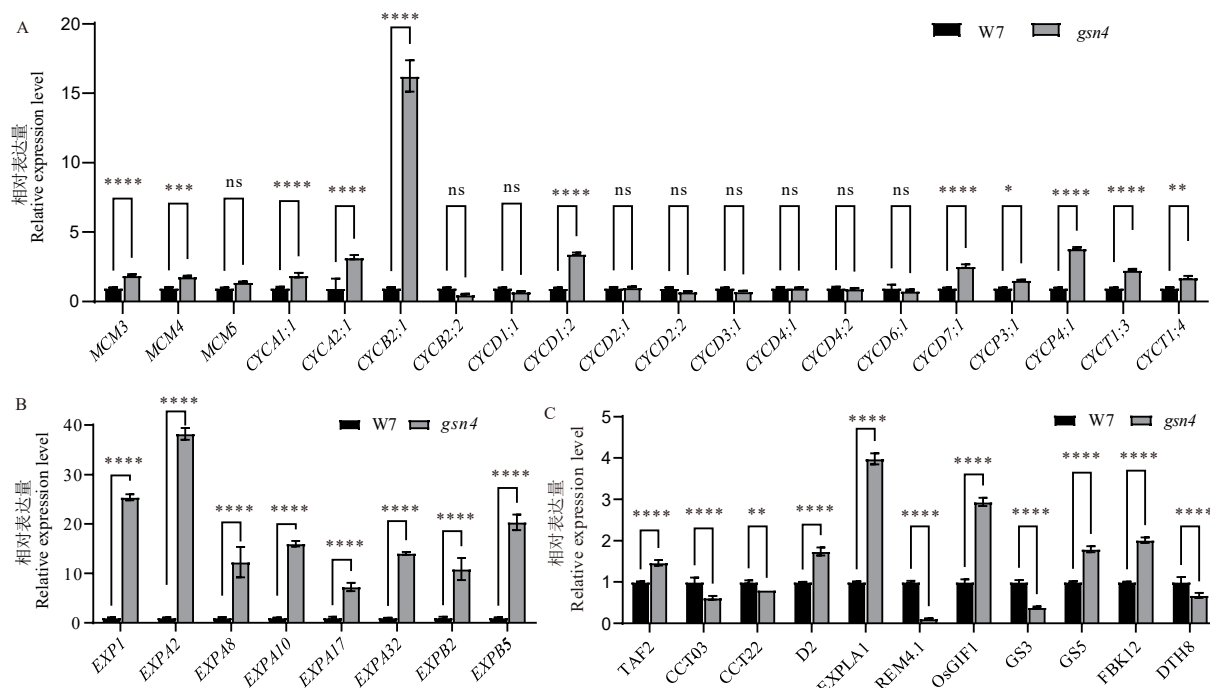
图中颜色代表基因的相对表达量, 红色代表高表达, 蓝色代表低表达。W7 为野生型, *gsn4* 为突变体。
The colors indicates the relative expression level of genes, with red for high expression and blue for low expression. W7 indicates the wild type and *gsn4* indicates the mutant.

图 7 野生型 W7 及突变体 *gsn4* 差异基因表达热图分析
Fig. 7. Cluster analysis of differential gene expression patterns in wild-type W7 and mutant *gsn4*

周期相关基因 *CYCA1;1*、*CYCA2;1*、*CYCB2;1*、*CYCD1;2*、*CYCD7;1*、*CYCP3;1* 等的转录水平均显著上调; 细胞扩张相关基因 *EXPA2*、*EXPA8*、*EXPA10*、*EXPA17*、*EXPA32*、*EXPB2* 和 *EXP5* 的表达量也显著上调。这些基因的表达量变化表明, *GSN4* 的突变导致细胞周期及扩张相关基因的表达

发生变化, 进而影响颖壳细胞的分裂与生长, 最终调控籽粒形态, 这与细胞学观察中 *gsn4* 颖壳细胞增殖与扩张增强的结果吻合。

此外, 对一些已克隆粒形基因进行检测, 发现负调控籽粒大小或正调控穗粒数的基因如 *OsCCT03*、*OsCCT22*、*OsREM4.1*、*GS3* 等在 *gsn4* 中表达量显



A: W7 和 *gsn4* 幼穗中细胞增殖相关基因表达分析; B: W7 和 *gsn4* 幼穗中细胞扩张相关基因表达分析; C: W7 和 *gsn4* 幼穗中粒形相关基因表达分析。数据以均值±标准差表示 ($n=3$)。****表示 $P<0.0001$, ***表示 $P<0.001$, **表示 $P<0.01$, *表示 $P<0.05$, NS 表示不显著。

A, Gene expression analysis of cell proliferation-related genes in young panicles of W7 and *gsn4*; B, Gene expression analysis of cell expansion-related genes in young panicles of W7 and *gsn4*; C, Grain size-related gene expression analysis in young panicles of W7 and *gsn4*. Data are expressed as mean $\pm$ standard deviation ($n=3$). ****, $P<0.0001$; ***, $P<0.001$; **, $P<0.01$; *, $P<0.05$; NS, not significant.

图 8 W7 和 *gsn4* 突变体幼穗中细胞增殖、细胞扩张以及粒形相关基因表达量分析

Fig. 8. Expression analysis of genes related to cell proliferation, cell expansion, and grain size in young panicles of W7 and *gsn4*

著下调, 而正调控籽粒大小或负调控穗粒数的基因如 *TAF2*、*D2*、*EXPLA1*、*OsGIF1*、*GS5* 等则显著上调。推测 *GSN4* 可能通过影响这些基因的表达影响细胞分裂与生长, 从而参与对籽粒大小的调控。

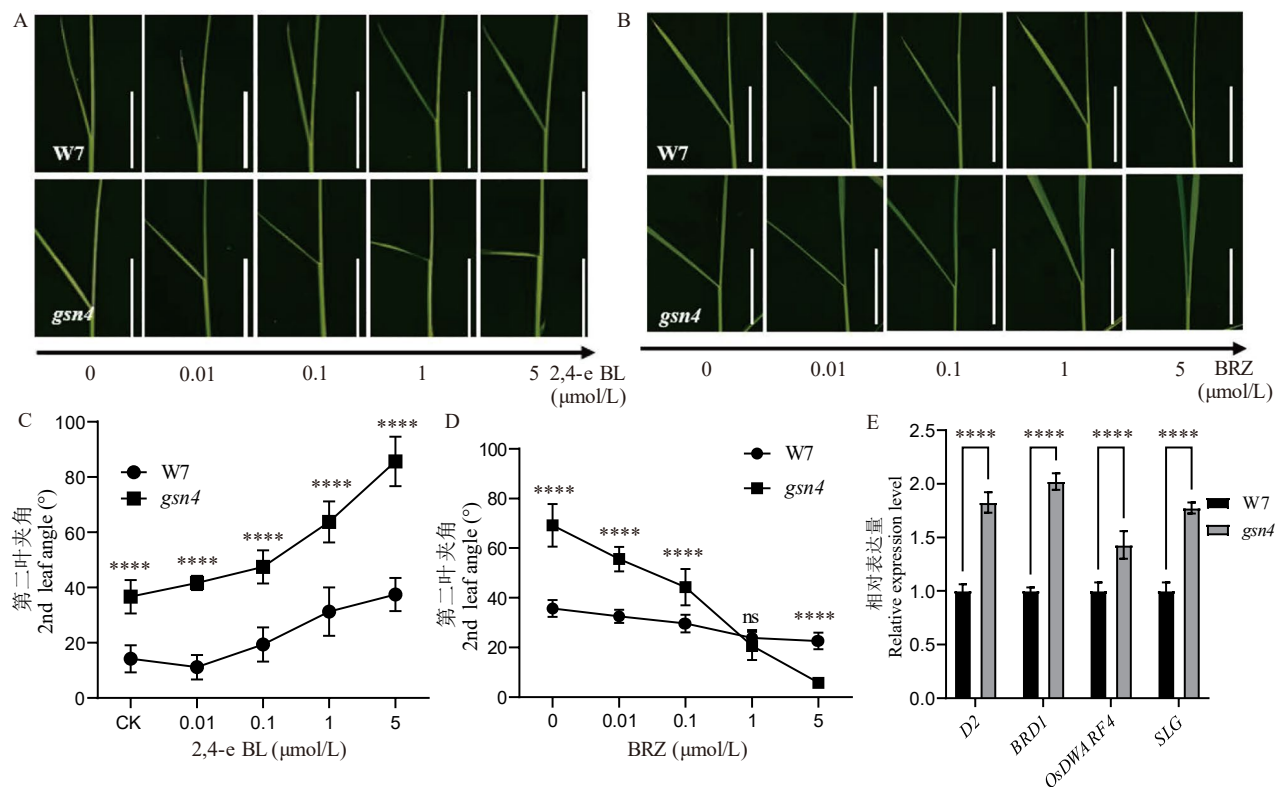
2.8 油菜素内酯(BR)的敏感性分析

由于 *gsn4* 表现出叶片夹角增大、稀穗及籽粒增大等类似 BR 信号增强的表型(图 1), 我们推测 *GSN4* 基因可能参与了 BR 生物合成或信号转导等途径来调控植株发育。通过外施 2,4-表油菜素内酯(2,4-eBL)分析野生型 W7 和 *gsn4* 突变体对于 BR 敏感性, 发现随着 2,4-表油菜素内酯浓度升高, W7 和 *gsn4* 的叶夹角均呈增大趋势, 但 *gsn4* 的增幅显著高于野生型, 表明 *gsn4* 对 BR 更敏感(图 9-A、C)。为进一步验证 *GSN4* 在植物 BR 信号调控途径中的作用, 我们又对野生型 W7 和 *gsn4* 突变体进行了 BR 生物合成抑制剂油菜素唑(BRZ)处理, 结果显示, 二者叶夹角均逐渐减小, 但 *gsn4* 的缩小幅度更为明显, 当 BRZ 浓度达到 $1 \mu\text{mol/L}$ 后, *gsn4* 的叶夹角小于野生型, 呈现近直立状态(图 9-B、D)。同时, RT-qPCR 分析结果显示, 在 *gsn4* 中, BR 生物合成相关基因 *D2*、*DWARF4*、*BRD1* 和 *SLG* 的表达

量均显著上调(图 9-E)。这些结果表明, *gsn4* 可能导致植株体内 BR 的积累。

2.9 单倍型分析

解析粒形调控基因的优异等位变异对高产优质育种具有重要意义。本研究以 3024 份水稻自然群体为材料, 选取 *GSN4* 的 CDS 区域为靶标, 利用 RFGB 单倍型分析平台 (<https://v1.rmbreeding.cn/pages/haplotype.php>) 进行基因型分析, 筛选出群体中频率较高的 3 种优势单倍型(Hap1、Hap2、Hap3), 对应样本数分别为 1168、895、570(表 1)。亚群分布特征显示(表 2), *GSN4* 的主要单倍型呈现显著的亚种分化模式: Hap1 在 GJ(粳稻)亚群与 XI(籼稻)亚群中均有较高富集度, 而 Hap2-Hap3 则集中分布于 XI 亚群, 在 GJ 亚群中极少出现。这种亚群分化模式, 反映了该基因在水稻籼粳亚种驯化过程中受到的定向选择。将这 3 种优势单倍型与粒长(GL)、粒宽(GW)、千粒重(TGW)进行关联分析, 结果表明, 3 种单倍型在粒长无显著性差异, 但在另两个个性状上均存在显著差异: Hap1 的粒宽(3.178 mm)及千粒重(26.032 g)显著优于 Hap2、Hap3(图 10)。因此, Hap1 是 *GSN4* 调控水稻粒宽、千粒重的优异等位变异, 但是否可作为



A~B: 在不同浓度油菜素内酯(2,4-e BL)及油菜素唑(BRZ)的处理下, 野生型 W7 和突变体 *gsn4* 第二片叶的叶夹角变化图, 标尺为 1 cm。C~D: 叶夹角变化统计学分析。数据以均值 $\pm$ 标准差表示 ($n=10$)。E: BR 生物合成基因的表达量。数据以均值 $\pm$ 标准差表示 ($n=3$)。****表示 $P < 0.0001$, ns 表示不显著。

A~B, Scans of leaf angle changes in the second leaf of wild-type W7 and mutant *gsn4* under different concentrations of 2,4-e BL and BRZ treatment, Bar=1 cm. C~D, Statistical analysis of leaf angle change. Data are expressed as mean $\pm$ standard deviation ($n=10$). E, Expression of BR biosynthetic gene. Data are expressed as mean $\pm$ standard deviation ($n=3$). ****, $P < 0.0001$; ns, Not significant.

图 9 野生型 W7 和突变体 *gsn4* 对油菜素内酯的敏感性及其 BR 合成相关基因表达分析

Fig. 9. Brassinosteroid sensitivity and expression analysis of BR biosynthetic-related genes in wild-type W7 and mutant *gsn4*.

表 1 GSN4 基因 Hap1-Hap3 的核心多态性位点基因型

Table 1. Genotypes of core polymorphic sites of Hap1-Hap3 in GSN4

位置 Location	27551959	27552410	27552420	27554431	27554638	27555074	27555189	27555943	27556520	27556903	27557628
SNP	G/A	C/A	C/T	A/G	C/A	A/G	A/G	T/C	G/A	A/T	G/A
Hap1	G	C	C	A	C	A	A	T	G	A	G
Hap2	A	A	T	G	A	G	G	C	A	A	A
Hap3	G	A	C	G	C	G	G	C	A	T	G

表 2 GSN4 基因 Hap1-Hap3 的亚群分布及粒形性状

Table 2. Subgroup distribution and grain traits of Hap1-Hap3 in GSN4

单倍型 Haplotype	亚群 Subgroup	粒长 Grain length(mm)	粒宽 Grain width(mm)	千粒重 1000-grain weight(g)
Hap1	XI: 245; admix: 40; Aus: 43; GJ: 778; Bas: 61; na: 1	8.566	3.178	26.032
Hap2	XI: 880; admix: 14; Aus: 1	8.597	2.893	24.688
Hap3	XI: 415; admix: 14; Aus: 138; GJ: 1; Bas: 2	8.654	2.905	24.231

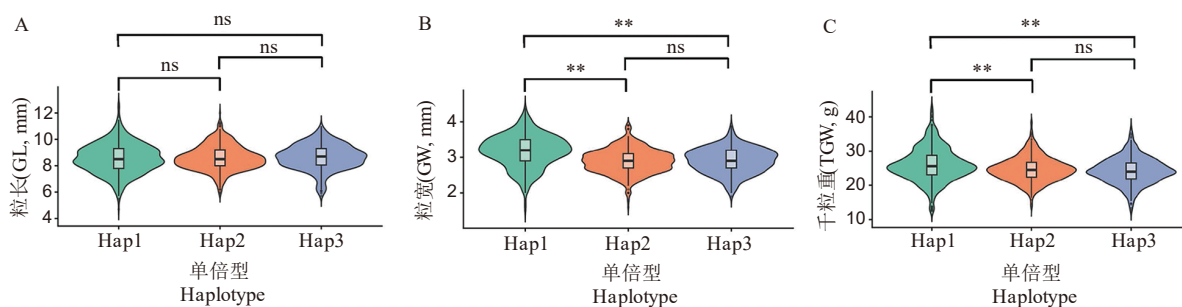
GJ: 粳稻亚群; XI: 籼稻亚群; Aus: Aus 稻亚群; Bas: 巴斯马蒂稻亚群; admix: 混合亚群; na: 未明确亚群。
GJ, Japonica subgroup; XI, Indica subgroup; Aus, Aus rice subgroup; Bas, Basmati rice subgroup; admix, Admixed subgroup; na, Not assigned subgroup.

高产育种的核心基因资源有待进一步验证。

性状, 其中粒形与穗粒数作为决定产量的关键要素, 其相关调控基因的挖掘与分子机制的解析对高产育种具有重要理论价值^[34]。本研究通过对野生型 W7 进行 EMS 诱变获得 *gsn4* 突变体, 其在多代种植中稳定表现为籽粒增大、穗粒数减少、株高矮化

3 讨论

水稻产量是由多种因素共同控制的复杂数量



Hap1-Hap3 单倍型对应粒长(GL)、粒宽(GW)、千粒重(TGW)的小提琴图, 图中箱线代表四分位数, 小提琴轮廓反映表型分布密度。

Violin plots of grain length (GL), grain width (GW), and thousand-grain weight (TGW) corresponding to Hap1-Hap3, respectively. The boxplot in the figure represents quartiles, and the violin outline reflects the phenotypic distribution density.

图 10 *GSN4* 的优势单倍型的粒形性状分布

Fig. 10. Grain trait distribution of dominant haplotypes of *GSN4*

和叶夹角增大等表型。因此, *GSN4* 具有典型的一因多效性, 可同时参与多个生长发育进程。对其调控籽粒大小功能的进一步挖掘, 将有助于丰富水稻粒形的分子调控的分子机制, 从而为分子育种提供理论依据。

遗传分析表明, *gsn4* 突变体表型受单隐性核基因控制, 本研究通过图位克隆与全基因组测序相结合的方法, 并通过 CRISPR-Cas9 敲除验证, 明确 *LOC_Os04g46450* 即为目标基因 *GSN4*, 且与已报道的 *MIP1/OsHUB1* 为等位基因。 *MIP1/OsHUB1* 为一个 E3 泛素连接酶蛋白, 其突变体表现为分蘖增多、育性下降、抽穗期改变, 但在粒形发育中的功能尚未被报道^[31-33], 而本研究的 *gsn4* 突变体特征为籽粒增大、千粒重提高、每穗粒数显著减少, 表明该基因不仅调控株型、育性与抽穗期, 还参与粒形与穗粒数的协同调控。泛素-蛋白酶体途径参与了多个水稻生长发育进程, 其中 E3 泛素连接酶作为该途径的核心组分, 可通过特异性识别靶蛋白并催化泛素分子连接, 调控靶蛋白的降解^[35]。在水稻粒形调控中, 已有多个 E3 泛素连接酶基因被鉴定, 如近期报道的 E3 泛素连接酶 *OsPUB33* 可与正调控粒形的转录因子 *OsNAC120* 相互作用, 导致其被泛素化降解, 进而调控籽粒发育^[37]。粒宽和粒重基因 *GW2*, 可通过泛素降解 *EXPLA1*、*WG1* 等, 负调控细胞增殖, 其功能缺失后可显著增加籽粒大小^[3, 4, 36]。本研究通过正向遗传学定位到 *GSN4* 基因, 该基因也编码一个 E3 泛素连接酶蛋白, 推测其可能发挥了类似的作用, 突变后会促进细胞周期与细胞扩张基因上调, 最终增加籽粒大小。

植物激素在水稻生长发育过程中发挥着重要的调节作用, 其中 BR 作为一种甾醇类内源激素, 与粒形、叶夹角等性状密切相关^[12, 25, 38]。目前已知

多个 BR 相关基因可同时影响籽粒大小与叶夹角, 表明 BR 在调节这两性状上多是协同的。如 BR 合成基因 *D2* 和 *D11* 功能缺失后均可表现为小粒和直立叶表型^[14-15]。 *GSK2* 为 BR 信号传导的中枢负调节因子, 其功能被抑制后会造成叶夹角增加和籽粒增大等表型^[39]。 *DLT*、*WRKY53*、*SG2* 等蛋白能够被 *GSK2* 磷酸化, 从而降低其蛋白稳定性, 导致水稻籽粒和叶夹角变小, 表现出典型 BR 缺陷表型^[20, 24, 25]。本研究中 *gsn4* 突变体表现出的大粒、穗粒数减少、大叶角等表型均与 BR 信号增强的表型相似, 且 BR 处理结果表明 *gsn4* 增强了植株对 BR 的敏感性, 同时突变体中 BR 生物合成基因 *D2*、*DWARF4*、*BRD1* 和 *SLG* 的表达量显著上调, 暗示 *GSN4* 可能通过影响 BR 合成同时调控水稻籽粒大小与叶夹角。

在水稻粒形的复杂调控网络中, 泛素化修饰系统与激素信号通路并非独立发挥作用, 二者往往是紧密协同的。其中, 泛素化修饰可以通过靶向 BR 通路核心蛋白及关键调控因子, 进而调控粒形。 *SMG3* 是水稻中的一种泛素结合酶, 它能与泛素连接酶 *DSG1* 互作, 两者形成一个复合物完成植物体内非正常蛋白的泛素化降解, 该复合物功能缺失无法对异常折叠 BR 信号受体 *BRI1* 进行泛素化标记, 最终影响正常 *BRI1* 蛋白, 从而改变粒形^[5]。水稻中的另一个 E3 泛素连接酶 *OsPUB9* 通过与 *GSK2*、*OsOFP8* 的互作并使其被泛素-蛋白酶体所降解, 从而调控水稻 BR 信号转导, 最终影响籽粒大小与叶夹角^[40]。本研究的候选基因 *GSN4* 也编码一个 E3 泛素连接酶, 其功能缺失突变体呈现出 BR 信号增强表型, 同时在 *gsn4* 突变体中 BR 合成关键基因 *D2*、*DWARF4* 等表达显著上调。由此我们推测 *GSN4* 可能通过泛素化修饰某些参与 BR 合成调控的相关蛋白, 从而调控水稻 BR 信号, 进而影响水稻的生

长发育。

解析粒形调控基因的优异等位变异对高产优质育种具有重要意义。本研究对 3024 份水稻自然材料的单倍型分析显示, *GSN4* 基因主要存在 3 种优势单倍型, 其中单倍型 *Hap1* 在粒宽和千粒重表现最优, 且在籼稻和粳稻亚群中均有较高分布频率。这一结果表明, *GSN4* 基因的优异单倍型在水稻驯化过程中受到定向选择。虽然 *gsn4* 增加了籽粒大小和千粒重, 却引入了穗枝梗数显著降低的不利性状, 但自然群体中的 *Hap1* 单倍型可能是一种有利变异, 因而通过分子标记辅助选择等育种方式, 将 *Hap1* 导入水稻品种进行改良, 有望在不影响其他农艺性状的基础上, 显著提高产量, 为高产水稻新品种的培育提供新途径。

谢辞: 本研究得到了三亚中国农业科学院国家南繁研究院南繁专项(YBXM2526)、国家自然科学基金(32272109, 32188102)、海南省院士创新平台科研项目(YSPTZX202502)、中国农业科学院农业科技创新计划(ASTIP, CAAS-ZDRW202401)的资助。

参考文献:

- [1] Ren D Y, Ding C Q, Qian Q. Molecular bases of rice grain size and quality for optimized productivity[J]. *Science Bulletin*, 2023, 68(3): 314-350.
- [2] Zhou C L, Lin Q B, Ren Y L, Lan J, Miao R, Feng M, Wang X, Liu X, Zhang S Z, Pan T, Wang J C, Luo S, Qian J S, Luo W F, Mou C L, Nguyen T, Cheng Z J, Zhang X, Lei C L, Zhu S S, Guo X P, Wang J, Zhao Z C, Liu S J, Jiang L, Wan J M. A CYP78As–small grain4–coat protein complex II pathway promotes grain size in rice[J]. *The Plant Cell*, 2023, 35(12): 4325-4346.
- [3] Song X J, Huang W, Shi M, Zhu M Z, Lin H X. 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.
- [4] Hao J Q, Wang D K, Wu Y B, Huang K, Duan P G, Li N, Xu R, Zeng D L, Dong G J, Zhang B L, Zhang L M, Inzé D, Qian Q, Li Y H. The GW2-WG1-OsbZIP47 pathway controls grain size and weight in rice[J]. *Molecular Plant*, 2021, 14(8): 1266-1280.
- [5] Li J, Zhang B L, Duan P G, Yan L, Yu H Y, Zhang L M, Li N, Zheng L Y, Chai T Y, Xu R, Li Y H. An endoplasmic reticulum-associated degradation-related E2-E3 enzyme pair controls grain size and weight through the brassinosteroid signaling pathway in rice[J]. *The Plant Cell*, 2023, 35(3): 1076-1091.
- [6] Sun X X, Xie Y H, Xu K Z, Li J X. Regulatory networks of the F-box protein FBX206 and OVATE family proteins modulate brassinosteroid biosynthesis to regulate grain size and yield in rice[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2024, 75(3): 789-801.
- [7] Tao Y J, Miao J, Wang J, Li W Q, Xu Y, Wang F Q, Jiang Y J, Chen Z H, Fan F J, Xu M B, Zhou Y, Liang G H, Yang J. *RGGL*, involved in the cytokinin regulatory pathway, controls grain size in rice[J]. *Rice*, 2020, 13(1): 76.
- [8] Miao J, Yang Z F, Zhang D P, Wang Y Z, Xu M B, Zhou L H, Wang J, Wu S J, Yao Y L, Du X, Gu F F, Gong Z Y, Gu M H, Liang G H, Zhou Y. Mutation of *RGGL*, which encodes a type B heterotrimeric G protein γ subunit, increases grain size and yield production in rice[J]. *Plant Biotechnology Journal*, 2019, 17(3): 650-664.
- [9] Sun S Y, Wang L, Mao H L, Shao L, Li X H, Xiao J H, Ouyang Y D, Zhang Q F. A G-protein pathway determines grain size in rice[J]. *Nature Communications*, 2018, 9: 851.
- [10] Xu R, Duan P G, Yu H Y, Zhou Z K, Zhang B L, Wang R C, Li J, Zhang G Z, Zhuang S S, Lyu J, Li N, Chai T Y, Tian Z X, Yao S G, Li Y H. Control of grain size and weight by the OsMKKK10-OsMKK4-OsMAPK6 signaling pathway in rice[J]. *Molecular Plant*, 2018, 11(6): 860-873.
- [11] Zhang G X, Liu Y Q, Xie Q J, Tong H N, Chu C C. Crosstalk between brassinosteroid signaling and variable nutrient environments[J]. *Science China Life Sciences*, 2023, 66(6): 1231-1244.
- [12] Xiong M, Feng G N, Gao Q, Zhang C Q, Li Q F, Liu Q Q. Brassinosteroid regulation in rice seed biology[J]. *Seed Biology*, 2022, 1(1): 1-9.
- [13] Hong Z, Ueguchi-Tanaka M, Shimizu-Sato S, Inukai Y, Fujioka S, Shimada Y, Takatsuto S, Agetsuma M, Yoshida S, Watanabe Y, Uozu S, Kitano H, Ashikari M, Matsuoka M. 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[J]. *The Plant Journal*, 2002, 32(4): 495-508.
- [14] Hong Z, Ueguchi-Tanaka M, Umemura K, Uozu S, Fujioka S, Takatsuto S, Yoshida S, Ashikari M, Kitano H, Matsuoka M. 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.
- [15] Zhou Y, Tao Y J, Zhu J Y, Miao J, Liu J, Liu Y H, Yi C D, Yang Z F, Gong Z Y, Liang G H. *GNS4*, a novel allele of

- DWARF11*, regulates grain number and grain size in a high-yield rice variety[J]. *Rice*, 2017, 10(1): 34.
- [16] Liu D P, Yu Z K, Zhang G X, Yin W C, Li L L, Niu M, Meng W J, Zhang X X, Dong N N, Liu J H, Yang Y Z, Wang S M, Chu C C, Tong H N. Diversification of plant agronomic traits by genome editing of brassinosteroid signaling family genes in rice[J]. *Plant Physiology*, 2021, 187(4): 2563-2576.
- [17] Qiu R H, Yang J, Hou J Q, Yao P, Xiao H Z, Wu Y Q, Tu D Y, Ye S Q, Zhao X, Ma X C, Zhao Y T, Chen T Y, Li L J. Brassinosteroid signaling mediated by the OsIAA7-OsGSK2-OsBZR1 module regulates seed size in rice[J]. *The Plant Cell*, 2025, 37(7): koaf165.
- [18] Yamamuro C, Ihara Y, Wu X, Noguchi T, Fujioka S, Takatsuto S, Ashikari M, Kitano H, Matsuoka M. Loss of function of a rice brassinosteroid insensitive1 homolog prevents internode elongation and bending of the *Lamina* joint[J]. *The Plant Cell*, 2000, 12(9): 1591.
- [19] Li D, Wang L, Wang M, Xu Y Y, Luo W, Liu Y J, Xu Z H, Li J, Chong K. Engineering *OsBAK1* gene as a molecular tool to improve rice architecture for high yield[J]. *Plant Biotechnology Journal*, 2009, 7(8): 791-806.
- [20] Tong H N, Liu L C, Jin Y, Du L, Yin Y H, Qian Q, Zhu L H, Chu C C. DWARF AND LOW-TILLERING acts as a direct downstream target of a GSK3/SHAGGY-like kinase to mediate brassinosteroid responses in rice[J]. *The Plant Cell*, 2012, 24(6): 2562-2577.
- [21] Zhang B W, Wang X L, Zhao Z Y, Wang R J, Huang X H, Zhu Y L, Yuan L, Wang Y C, Xu X D, Burlingame A L, Gao Y J, Sun Y, Tang W Q. OsBRI1 activates BR signaling by preventing binding between the TPR and kinase domains of OsBSK3 via phosphorylation[J]. *Plant Physiology*, 2016, 170(2): 1149-1161.
- [22] Hu J, Wang Y X, Fang Y X, Zeng L J, Xu J, Yu H P, Shi Z Y, Pan J J, Zhang D, Kang S J, Zhu L, Dong G J, Guo L B, Zeng D L, Zhang G H, Xie L H, Xiong G S, Li J Y, Qian Q. A rare allele of *GS2* enhances grain size and grain yield in rice[J]. *Molecular Plant*, 2015, 8(10): 1455-1465.
- [23] Zhao D S, Li Q F, Zhang C Q, Zhang C, Yang Q Q, Pan L X, Ren X Y, Lu J, Gu M H, Liu Q Q. *GS9* acts as a transcriptional activator to regulate rice grain shape and appearance quality[J]. *Nature Communications*, 2018, 9: 1240.
- [24] Tian X J, He M L, Mei E Y, Zhang B W, Tang J Q, Xu M, Liu J L, Li X F, Wang Z Y, Tang W Q, Guan Q J, Bu Q Y. WRKY53 integrates classic brassinosteroid signaling and the mitogen-activated protein kinase pathway to regulate rice architecture and seed size[J]. *The Plant Cell*, 2021, 33(8): 2753-2775.
- [25] Huang Y S, Dong H, Mou C L, Wang P, Hao Q X, Zhang M, Wu H M, Zhang F L, Ma T F, Miao R, Fu K, Chen Y P, Zhu Z Y, Chen C, Tong Q K, Wang Z R, Zhou S R, Liu X, Liu S J, Tian Y L, Jiang L, Wan J M. Ribonuclease H-like gene *SMALL GRAIN2* regulates grain size in rice through brassinosteroid signaling pathway[J]. *Journal of Integrative Plant Biology*, 2022, 64(10): 1883-1900.
- [26] Zhang X Q, Sun J, Cao X F, Song X W. Epigenetic mutation of RAV6 affects leaf angle and seed size in rice[J]. *Plant Physiology*, 2015, 169(3): 2118-2128.
- [27] Jiang Y H, Bao L, Jeong S Y, Kim S K, Xu C G, Li X H, Zhang Q F. 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[J]. *The Plant Journal*, 2012, 70(3): 398-408.
- [28] Feng Z M, Wu C Y, Wang C M, Roh J, Zhang L, Chen J, Zhang S Z, Zhang H, Yang C Y, Hu J L, You X M, Liu X, Yang X M, Guo X P, Zhang X, Wu F Q, Terzaghi W, Kim S K, Jiang L, Wan J M. *SLG* controls grain size and leaf angle by modulating brassinosteroid homeostasis in rice[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2016, 67(14): 4241-4253.
- [29] Zhang Q L, Wu R H, Hong T, Wang D C, Li Q L, Wu J Y, Zhang H, Zhou K, Yang H X, Zhang T, Liu J X, Wang N, Ling Y H, Yang Z L, He G H, Zhao F M. Natural variation in the promoter of qRBG1/OsBZR5 underlies enhanced rice yield[J]. *Nature Communications*, 2024, 15: 8565.
- [30] Guo J, Zhang H S, Fan M Y, Xiao Y K, Zhu Y S, Chen C P, Shu H, Wei M M, Luo Y T, Yang X R, Liu Y, Xu J Z, Zhao K, Wang S, Yang B, Sun C H, Deng X J, Wang P R. OsBIR3 maintains the homeostasis of OsBRI1, OsREM4.1, and Brd2 protein levels in brassinosteroid pathways in rice[J]. *Plant Biotechnology Journal*, 2025, 23(8): 3024-3040.
- [31] Sun F L, Zhang W P, Xiong G S, Yan M X, Qian Q, Li J Y, Wang Y H. Identification and functional analysis of the MOC1 interacting protein 1[J]. *Journal of Genetics and Genomics*, 2010, 37(1): 69-77.
- [32] Xu Z T, Li E Z, Xue G, Zhang C, Yang Y C, Ding Y. OsHUB2 inhibits function of OsTrx1 in heading date in rice[J]. *The Plant Journal*, 2022, 110(6): 1670-1680.
- [33] Cao H, Li X Y, Wang Z, Ding M, Sun Y Z, Dong F Q, Chen F Y, Liu L A, Doughty J, Li Y, Liu Y X. Histone H2B monoubiquitination mediated by Histone Monoubiquitination1 and Histone Monoubiquitination2 is involved in anther development by regulating tapetum degradation-related genes in rice[J]. *Plant Physiology*,

- 2015, 168(4): 1389-1405.
- [34] Li N, Xu R, Duan P G, Li Y H. Control of grain size in rice[J]. *Plant Reproduction*, 2018, 31(3): 237-251.
- [35] Zheng N, Shabek N. Ubiquitin ligases: Structure, function, and regulation[J]. *Annual Review of Biochemistry*, 2017, 86: 129-157.
- [36] Choi B S, Kim Y J, Markkandan K, Koo Y J, Song J T, Seo H S. GW2 functions as an E3 ubiquitin ligase for rice expansin-like 1[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2018, 19(7): 1904.
- [37] Xie Z Z, Sun Y, Zhan C H, Qu C F, Jin N, Gu X Y, Huang J L. The E3 ligase OsPUB33 controls rice grain size and weight by regulating the OsNAC120-BG1 module[J]. *The Plant Cell*, 2024, 37: koae297.
- [38] Wu Y Z, Fu Y C, Zhao S S, Gu P, Zhu Z F, Sun C Q, Tan L B. *CLUSTERED PRIMARY BRANCH 1*, a new allele of *DWARF11*, controls panicle architecture and seed size in rice[J]. *Plant Biotechnology Journal*, 2016, 14(1): 377-386.
- [39] Zou T, Zhang K X, Zhang J, Liu S J, Liang J, Liu J X, Zhu J, Liang Y Y, Wang S Q, Deng Q M, Liu H N, Jin J H, Li P, Li S C. *DWARF AND LOW-TILLERING 2* functions in brassinosteroid signaling and controls plant architecture and grain size in rice[J]. *The Plant Journal*, 2023, 116(6): 1766-1783.
- [40] Xie Y H, Fan Z P, Liang X Y, Teng K C, Huang Z J, Huang M Y, Zhao H, Xu K Z, Li J X. OsPUB9 modulates leaf angle and grain size through the brassinosteroid signaling pathway in rice[J]. *The Plant Journal*, 2025, 121(3): e17230.