

水稻颖壳不闭合基因 *SG5* 的鉴定与克隆

薛炮^{1,2} 王友霜¹ 何弯弯^{1,2} 黄晨博³ 张涵³ 丁震乾¹ 陈秋丽¹ 范运新¹ 丁成伟¹
孙廉平^{3,*} 胡婷婷^{1,2*}

(¹ 江苏徐淮地区徐州农业科学研究所, 江苏 徐州 221131; ² 生物育种钟山实验室, 南京 210014; ³ 中国水稻研究所 国家水稻改良中心/水稻生物育种全国重点实验室, 杭州 311401; *通信作者, email: htt713@163.com; sunlianping@caas.cn)

Identification and Cloning of *SG5* in Rice

XUE Pao^{1,2}, WANG Youshuang¹, HE Wanwan^{1,2}, HUANG Chenbo³, ZHANG Han³, DING Zhenqian¹,
CHEN Qiuli¹, FAN Yunxin¹, DING Chengwei¹, SUN Lianping^{3,*}, HU Tingting^{1,2*}

(¹ Xuzhou Agricultural Sciences Research Institute in Jiangsu Xuhuai Area, Xuzhou 221131, China; ² Zhongshan Biological Breeding Laboratory, Nanjing 210014, China; ³ State Key Laboratory of Rice Biology and Breeding/National Center of Rice Improvement, China National Rice Research Institute, Hangzhou 311401, China; *Corresponding author; email: htt713@163.com; sunlianping@caas.cn)

Abstract: 【Objective】 Rice glume development directly affects both grain yield and quality. Identifying genes that control glume development and characterizing their functions can provide valuable genetic resources for breeding. 【Method】 The *split glume 5* (*sg5*) mutant was isolated from a mutant library generated by ethyl methanesulfonate (EMS) mutagenesis of the rice variety Xudao 3 (XU3). Phenotypic investigation and analysis were performed on both the wild type and the *sg5* mutant. *SG5* was identified using a combination of map-based cloning and bulked segregant analysis sequencing (BSA-seq). The temporal and spatial expression patterns of *SG5* were examined by qRT-PCR and GUS staining. Subcellular localization of *SG5* was observed in rice protoplasts. An evolutionary tree was constructed to analyze the natural selection of *SG5*. 【Result】 The mutant exhibited normal glume development before flowering, but the glumes remained split until maturity. Compared with the wild type, the mutant showed earlier heading, longer panicles, reduced grain length and width, and a significantly lower seed-setting rate, while plant height and effective panicle number remained unchanged. Microscopic observation indicated that the split glume phenotype was caused by persistent swelling of the lodicules. *SG5* was mapped to a 3.72 Mb physical interval between InDel5-11 and InDel5-13 on chromosome 5. In the *sg5* mutant, a G-to-A mutation at the junction of intron 3 and exon 4 of *LOC_Os05g50890* led to alternative splicing and premature protein termination. Knockout experiments confirmed that *SG5* is the target gene. *SG5* is constitutively expressed, with higher transcript levels in roots, stems, and leaves. The *SG5* protein localizes to both the cytoplasm and nucleus. Evolutionary analysis revealed that *SG5* has undergone differentiation between *indica* and *japonica* subspecies during evolution. 【Conclusion】 This study identifies a novel allele of *OsJar1* and reveals that *SG5* has diverged between *indica* and *japonica* under natural selection. These findings provide new clues for further dissection of the molecular regulatory network controlling glume development and offer valuable genetic resources for precision breeding in rice.

Key words: rice; glume cracking; lodicule; *sg5* mutant

摘要: 【目的】水稻颖壳发育直接影响稻米产量与品质, 挖掘颖壳发育基因并探究其分子功能, 可为水稻优质高产遗传改良提供更多的基因资源。【方法】利用 EMS 诱变徐稻 3 号获得一个颖壳开裂后不闭合的突变体 *sg5* (*split glume 5*); 对其农艺性状和不同开花时间进行浆片表型和细胞学观察; 通过图位克隆与 BSA-seq 相结合的方法鉴定 *SG5* 基因; 结合野生型各组织表达量检测及 GUS 转基因株系各组织染色情况, 分析 *SG5* 组织表达特异性; 利用激光共聚焦显微镜观察 *SG5* 蛋白在原生质体中的亚细胞定位; 通过进化树分析, 探讨了 *SG5* 在进化过程中的选择情况。【结果】突变体 *sg5* 在开花前颖壳发育正常, 开花后颖壳保持开裂状态直至成熟。与野生型相比, 突变体株高和有效穗数无显著变化, 抽穗期显著提前, 穗长增加, 粒长、粒宽降低, 结实率极显著降低。体视显微镜观察结果显示, 突变体颖壳开裂是浆片保持膨大状态导致的。*SG5* 基因定位在第 5 染色体 InDel5-

收稿日期: 2025-03-12; 修改稿收到日期: 2025-06-05。

基金项目: 徐州市基础研究计划-青年科技人才项目 (KC23042); 生物育种钟山实验室项目 (ZSBBL-KY2023-01-04); 徐州市农业科学院科研基金项目(高层次人才类)(GC2023004)。

11-InDel5-13 区间内,物理间距为 3.72 Mb,图位克隆表明 *sg5* 突变体中 *LOC_Os05g50890* 的第 3 内含子和第 4 外显子连接处发生 G-A 突变导致发生可变剪接,蛋白翻译提前终止。敲除实验证实 *SG5* 基因即为目的基因。*SG5* 基因为组成型表达,在根、茎、叶中表达水平较高。*SG5* 蛋白定位在细胞质和细胞核中。*SG5* 在进化过程中发生籼稻、粳稻分化。【结论】本研究鉴定了 *OsJar1* 基因一个新的等位突变,发现 *SG5* 在自然选择过程中发生了籼、粳分化。本研究为后续深入研究颖壳调控分子机制提供了新的线索,并为水稻设计育种提供新的基因资源。

关键词: 水稻; 颖壳开裂; 浆片; *sg5* 突变体

籽粒是水稻产量和外观品质最直观的检测指标,而水稻颖壳发育对籽粒形态的建成起到了关键作用^[1,2],但颖壳发育的分子机制仍有待于进一步深入研究。水稻颖花结构从外至内分别为 1 片外稃、1 片内稃、2 枚浆片、6 枚雄蕊以及 1 个雌蕊,基部还有 2 片退化的颖片以及 1 片护颖。水稻是单子叶植物,但其花器官发育特征也部分适用双子叶植物花器官发育的 ABCDE 模型^[3-5]。A 类基因主要调控水稻内、外稃的发育,并和 B 类基因协同调控浆片的形态建成;B 类基因和 C 类基因共同调控雄蕊发育,雌蕊发育则主要由 C 类基因调控;D 类基因决定胚珠的形成;E 类基因对四轮花器官发育均有参与^[6,7]。

水稻的雄蕊、雌蕊都能在双子叶植物中找到相匹配的器官及相似的基因调控方式,但内、外稃与花萼形态功能上仍存在较大差异^[8]。*DPI1* 编码一个 AT-hook DNA 结合蛋白,突变后表现为内稃退化、扭曲变形或发育成外稃状,而外稃、雌雄蕊发育正常^[9-10]; *DP2* 突变后内稃发育不良,而外稃和雌雄蕊发育正常,颖壳呈弯曲状^[11]。内稃和外稃并不同步发生变化,这一现象表明,颖壳内、外稃可能并非同源器官。因此,对水稻颖壳发育相关的基因鉴定有助于探索水稻内、外稃的调控机制。

MADS-box 家族基因广泛参与水稻花器官发育过程。*OsMADS1* 是最先被鉴定的基因,在维持花序分生组织特异性分化及花器官发育中是不可或缺的。过表达 *OsMADS1* 会促进花序分生组织转变及内、外稃的形成^[12]; *OsMADS1* 敲除后会干扰内稃和外稃中特定细胞的分化,产生类似颖片的特征^[13,14]。*OsMADS1* 同样可以通过与 *OsMADS16* 互作参与 *OsMADS16*-*OsMADS3*/*OsMADS58* 调控通路参与花分生组织特异性及浆片、雄蕊的形成^[15]。*OsMADS14* 参与第 1 轮花器官发育,在内外稃中表达,但在所有器官原基发育成熟后在雌蕊、雄蕊中表达^[16]。*osmads15/dep* 内稃退化,外稃和颖片略微伸长^[17],同样为水稻颖壳内、外稃非同源器官提供了证据。*MADS14;15;18i pap2-1* 转基因植株在生殖生长过程中严重受阻,无法形成正常的颖花,说明 *OsMADS14*/*OsMADS15*/*OsMADS18* 能够与 *OsMADS34*/*PAP2* 共同决定花序分生组织的转变^[18]。

OsMADS2 可以控制浆片的形成而不影响雄蕊发育,在浆片特有导管发育并维持浆片器官大小中发挥重要作用^[19]; *OsMADS4* 在浆片和雄蕊形成中同样重要,降低 *OsMADS4* 的表达水平,浆片转变为内外稃,雄蕊转变为心皮, *OsMADS4* 与 *OsMADS2* 在 *MADS-box* 结构域中相似度极高,在功能上部分冗余^[20]。*OsMADS6/MFO1/AFG1* 属于类 *AGL6* 亚家族基因, *osmads6-1* 内稃变宽导致颖壳无法正常闭合,且增加了类似外稃维管模式的 5~6 个维管束,外稃发育正常^[21-23]; *osmads6-5* 是一个无效等位突变,导致除外稃之外的其他花器官均同源异地地转变为类外稃器官,并产生不确定的花分生组织,从而形成由重复的外稃和类外稃器官轮生组成的突变小花^[24]。*OsMADS32/CFO1* 属于 *MIKC^c* 类 *MADS-box* 家族,突变后内稃增宽,浆片异化成颖壳或雌蕊或颖壳-浆片或颖壳-浆片-雌蕊嵌合体,雄蕊数目减少,雌蕊数目增多等表现^[25]。

除了 *MADS-box* 家族基因外,其他基因也能影响水稻颖壳的发育。*PAL1* 突变后内稃缺失异化成叶状,外稃发育正常^[26]。*SL1* 编码一个 C2H2 型锌指蛋白,突变后颖壳开裂不闭合,内轮花器官中形成大量的心皮或类心皮状器官,并在心皮和扭曲的内、外稃之间形成长短不一的内、外稃状器官^[27]。*DFO1/CCP1* 编码一个植物特异的类 EMF1 蛋白, *DFO1/CCP1* 通过维持 H3K27 三甲基化介导 *OsMADS58* 基因的表观沉默调控水稻内稃的发育。*DFO1* 突变后内稃萎缩,颖壳开裂籽粒小且畸形^[28,29]。*DBOP/REP1* 基因编码一个 TCP 家族转录因子,通过抑制内稃边缘伸展调控内稃发育。*REP1* 在花发育早期仅在内稃原基表达,花发育后在雄蕊和内外稃维管束中表达,但突变后内稃发育显著缓慢,总体变小,内稃中有 5 个维管束,与外稃结构类似^[30,31]。*OsSNB* 编码一个 AP2 转录因子,是穗分生组织向花分生组织转变以及花器官模式的形成所必需的。但其突变体会额外形成内外稃或者类似于内外稃的结构,在内稃一侧偶尔会形成异位的浆片,且浆片的长度比野生型长,雄蕊数目减少,偶尔形成额外的心皮^[32]。*MFS1* 同样编码一个 AP2 转录因子, *mfs1* 则表现为从穗分生组织向花分生组织转变延

迟, 出现一个额外的类颖壳器官和一个伸长的小穗轴, 内稃退化^[33]。 *AFD1/BSG1* 编码一个 DUF640 蛋白, 在调控水稻内外颖发育中发挥重要作用, *BSG1* 突变后花器官的组成和形态均正常, 但内外颖扭曲细长无法闭合, 籽粒粉质化严重^[34, 35]。

水稻颖壳发育异常会影响产量和稻米品质, 因此鉴定更多颖壳发育相关的突变体, 将有助于我们深入研究水稻花器官发育的遗传机理, 为精细调控颖壳发育保障水稻产量、提高稻米品质奠定基础。本研究在徐稻 3 号(XU3)的 EMS 诱变库中鉴定一个颖壳开裂不闭合, 但其他花器官发育正常的突变体, 命名为 *sg5 (split glume 5)*, 对其开展农艺性状考察、形态学分析、基因定位及克隆、qRT-PCR 及进化树分析, 以期解析水稻颖壳发育调控的分子机制提供新的基因资源。

1 材料与方法

1.1 实验材料及农艺性状考察

本研究实验材料 *sg5* 突变体是粳稻品种徐稻 3 号经化学诱变剂甲基磺酸乙酯(Ethyl Methanesulfonate, EMS)诱变获得的, 经多代自交其性状稳定遗传。材料种植于徐州现代农业试验示范

基地, 每行种 8 株, 株行距为 13.2 cm×25 cm, 肥水管理同大田生产。在开花前, 对野生型和突变体上长势一致的颖壳进行标记, 之后从第一日 18:00 到第二日 18: 00 的不同时间, 在野生型和突变体上分别摘取 10 粒标记的颖壳, 使用体视显微镜(Nikon SMZ1500)观察颖壳及浆片发育形态。成熟期随机选取野生型和突变体(≥10 株)分别对其株高、穗长、每穗粒数、粒长、粒宽等农艺性状进行考察。

1.2 遗传群体构建及候选基因确定

以纯合 *sg5* 突变体为母本, 籼稻 9311 为父本构建性状分离的 F₂ 群体, 选取具有突变体表型的 316 株用于基因定位。随机选取 F₂ 群体中 7 个具有突变体极端表型及 7 个具有野生型表型的单株, 分别提取 DNA 并等量混合, 形成两个 DNA 池, 利用筛选得到的在徐稻 3 号和 9311 中具有多态性的 188 对 InDel 标记进行连锁分析, 然后扩大群体加密标记进行定位。相关定位引物见表 1。

同时, 在以 *sg5* 突变体为母本, 徐稻 3 号为父本杂交并自交获得的 F₂ 群体中, 分别选取 40 株具有野生型表型、突变体表型的单株叶片, 10 株 *sg5* 突变体、徐稻 3 号的叶片构建 4 个子代池进行 BSA(Bulked Segregant Analysis)测序分析得到差异基因, 与连锁分析结果相互验证获得候选基因。基

表 1 本研究所用的引物序列

Table 1. Primer sequences used in this study

引物名称 Primer name	引物序列 (5'→3') Primer sequence (5'→3')	功能 Function
InDel 5-11F	GGAGTTCTGGTGGCTTTCC	基因定位 Gene mapping
InDel 5-11R	CAGTTCCTCCATTTCCCTCTA	
InDel 5-13F	TGAGTTTCCGGTGTTCCATA	
InDel 5-13R	AAGGCAAAGTCGTTTCAGCTT	
SG5-Cas9-F	ggcaATATTGAGCCCTATATCCAG	基因编辑 Gene editing
SG5- Cas9-R	aaacCTGGATATAGGGCTCAATAT	
SG5-1305-GUS-F	catgattacgaattcATCACCTCTGCCCAAAACCA	GUS 载体构建
SG5-1305-GUS-R	tcagatctaccatggTGTAATGGTAGAATCCTGGCTTTACCA	Construction of GUS vector
SG5-1305-GFP-F	aagtcggagctagctctagaATGACGATCTGCAGCTGTGAGG	亚细胞定位 Subcellular localization
SG5-1305-GFP-R	ggtctctgagacgtctctagaAAATCCATAGGCAGTACTGAAATAACTTTGGG	
Hyg-F	ACGGTGTCTGTCATCACAGTTTGCC	潮霉素基因检测
Hyg-R	TTCCGGAAGTGCTTGACATTGGGGA	Detection of hygromycin resistance gene
Cas9-F	CGTGGAAGATCGGTTCAACGC	阳性株检测 Sequencing of positive plants
Cas9-R	CTGCCGGCCAGATTGGCA	
CR-SG5-F	TGATGCCAACTCCTACTGCAC	突变位点检测 Mutation site detection
CR-SG5-R	ACTTGGGCTTTCCGTGTGTT	
UBQ10-qPCR-F	TGGTCAGTAATCAGCCAGTTTGG	qRT-PCR
UBQ10-qPCR-R	GCACCACAAATACTTGACGAACAG	
SG5-qPCR-F	GATACCTACCAAGTGGTCACTG	
SG5-qPCR-R	TCCTAAACGCGTAAGATGTACGG	

引物序列小写字母表示载体接头。
Lowercase letters indicate vector adapter sequences.

于 Rice Genome Annotation Project (<http://rice.plantbiology.msu.edu/index.shtml>) 网站预测的候选基因, 设计引物分别扩增 *sg5* 突变体和野生型的基因组序列, 利用 Geneious 软件进行序列比对, 找到突变位点初步判断目的基因。

1.3 载体构建及转化

使用线上网站 CRISPR-P2.0 (<http://cbi.hzau.edu.cn/cgi-bin/CRISPR2/CRISPR>) 设计 *SG5* 靶序列。采用重叠 PCR 法将 sgRNA 与 *pC1300-Ubi-Cas9-SK-5G* (ffw) 表达载体通过 *AarI* 酶切位点连接, 并将连接产物转化大肠杆菌 DH5 α 感受态进行培养, 挑选阳性单克隆进行测序; 为了检测 *SG5* 的时空表达模式, 通过 *EcoRI*、*NcoI* 酶切位点将 5' UTR 前 2038 bp 作为 *SG5* 的启动子区, 连接到 *pCMBIA1305-GUS* 载体上构建 35S::*pSG5-GUS* 表达载体, 将正确连接的载体转化至农杆菌 EHA105 感受态并在徐稻 3 号背景下进行水稻遗传转化。引物序列见表 1。

1.4 转基因阳性株系鉴定

针对敲除株系, 在获得 T_0 代转基因植株后, 利用 CTAB 法提取各单株叶片的 DNA, 分别使用 Hyg-F/R 和 Cas9-F/R 引物扩增潮霉素抗性基因及 Cas9 编码基因用于鉴定阳性植株, 并以无菌水为模板作为阴性对照。同时根据靶序列设计引物, 扩增阳性株检测基因编辑位点突变方式。引物序列见表 1。

针对 35S::*pSG5-GUS* 转基因植株, 在 T_0 代幼苗时期利用配制的 GUS(β -葡萄糖苷酸酶)染液初步判断阳性株。随着植株的生长发育, 在与时空表达相对应的时期剪取一定长度和数量的根、茎、叶片、叶鞘、幼穗浸没在 GUS 染液中染色, 抽真空 30 min 使得 GUS 染液没过各组织, 用锡箔纸黑暗处理, 置于 37°C 培养箱中, 1~2 d 即可看到各组织着色。之后可用 90% 无水乙醇水浴脱色, 至脱色完全后扫描拍照。

1.5 亚细胞定位

为检测 *SG5* 蛋白表达的亚细胞位置, 扩增去终止密码子的 *SG5* 编码序列, 并与通过 *XbaI* 线性化的 *pCMBIA1305-GFP* 载体上的 GFP 蛋白融合, 并在水稻原生质体中瞬时表达, 利用激光共聚焦显微镜检测绿色荧光蛋白信号。所用引物序列见表 1。

1.6 实时荧光定量 PCR

利用天根 RNAPrep Pure 试剂盒提取野生型的根、茎秆、叶片、叶鞘及幼穗总 RNA 后, 使用东洋纺公司的定量反转录试剂盒(ReverTra Ace qPCR RT Master Mix with gDNA Remover)将 RNA 反转为 cDNA。荧光定量 PCR 采用 SYBR Green Mix 荧光

染料, 20 μ L 反应体系并设 3 次重复。qRT-PCR 程序: 95°C 下预变性 10 min; PCR: 95°C 下变性 15 s, 58°C 下退火 30 s, 72°C 下延伸 30 s, 共 40 个循环; 溶解曲线分析: 95°C 下变性 15 s, 58°C 下退火 1 min, 接着以 0.11°C/s 的速率升温至 95°C; 最后降温至 50°C 完成反应。选用 *UBQ10* 作为内参基因, 采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 方法计算基因相对表达量^[36]。表达量检测引物见表 1。

1.7 *SG5* 进化分析

利用 InterproScan 对 40 份水稻核心种质资源(附表 1)的蛋白序列进行 GH3 结构域的检索, 对获得的包含 GH3 结构域的蛋白序列进行去重。通过 MAFFT 进行蛋白序列的比对后使用 Trimal 对比对后的序列进行修剪, 采用 IQtree 软件中的 ML 法(Maximum Likelihood, 最大似然法)构建进化树, 并使用 Treeviewer 美化进化树。

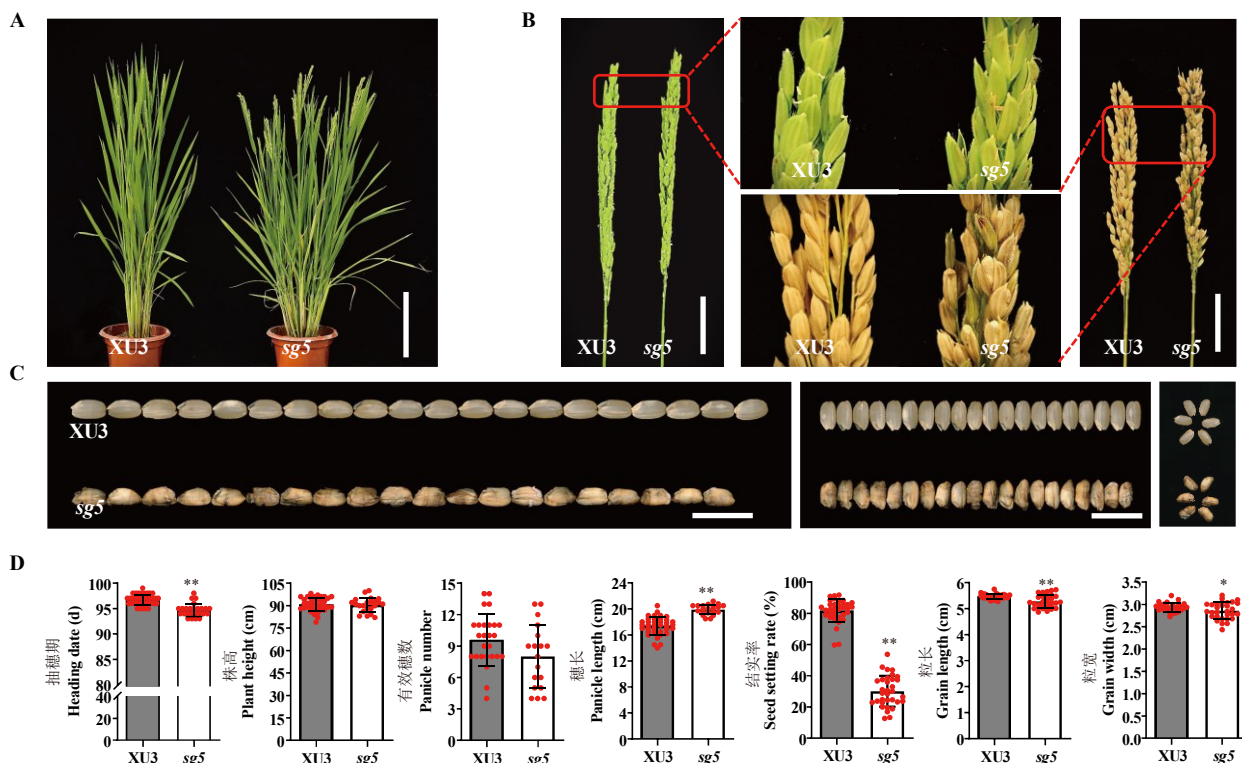
2 结果与分析

2.1 水稻颖壳开裂不闭合突变体 *sg5* 的表型特征

对突变体及野生型农艺性状考察发现, 在抽穗期, 突变体株高与野生型无显著差异, 但抽穗期提前(图 1-A, D)。在灌浆期, 野生型受精后颖壳内外稃紧密钩合在一起, 籽粒发育正常; *sg5* 颖壳开裂内外稃正常发育但不钩合, 受精后仍保持开裂状态, 直至成熟(图 1-B)。在成熟期, 与野生型相比, *sg5* 粒长、粒宽均降低且粉质化, 霉化严重(图 1-C); 穗长增加但结实率降低, 有效穗数无明显差异(图 1-D)。

2.2 水稻颖壳不闭合是由浆片持续膨胀引起的

在野生型及突变体刚抽穗 5 cm 时对其颖壳发育状态进行观察, 发现在开花前两者颖壳内外稃均发育正常(图 2-A、B), 但在开花受精之后, 野生型颖壳闭合而突变体保持颖壳开裂状态(图 2-A-C、D)。为探究 *sg5* 突变体颖壳开裂后不闭合的细胞学原因, 我们对野生型及突变体未开花的颖壳进行标花处理, 并从前一天 18: 00 开始, 在不同时间内摘取颖花解剖观察其浆片结构。结果显示, 随着时间的推移, 野生型及突变体的浆片不断膨大。野生型浆片在次日 11: 00 达到最大, 此时内外稃完全张开, 在 12: 00 浆片逐渐萎缩, 颖壳缓慢闭合; 而突变体则是在次日 12: 00 达到最大, 表明突变体的开花时间较突变体迟。野生型浆片不断萎缩, 在 13: 00 后内外稃闭合; 而突变体浆片则略有萎缩但仍处于膨大状态, 致使内外稃无法钩合而一直开裂(图 2-



A: 抽穗时野生型及突变体单株表型, 比例尺=20 cm; B: 野生型及突变体颖壳及穗部形态, 比例尺=5 cm; C: 野生型及突变体籽粒性状, 比例尺=1 cm; D: 抽穗期、株高、有效穗数、穗长、结实率、粒长、粒宽表型差异。数据表示为平均值±标准差 ($n \geq 20$), 学生氏 t -检验计算差异显著性。*突变体与野生型间的表型差异在 $P < 0.05$ 水平上显著; **突变体与野生型间的表型差异在 $P < 0.01$ 水平上极显著。

A, Characterization of plant type in wild type and *sg5*. Scale bar=20 cm. B, Glume morphology and panicle morphology in wild type and *sg5*. Scale bar=5 cm. C, Comparison of grain size in wild type and *sg5*. Scale bar=10 mm. D, Comparison of heading date, plant height, panicle number, panicle length, seed setting rate, grain length and grain width in wild type and *sg5*. Data are given as Mean $\pm$ SD ($n \geq 20$). Student's t -test was used to generate P value. *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$.

图 1 野生型徐稻 3 号与 *sg5* 表型特征

Fig. 1. Phenotypic characterization of wildtype (Xudao 3, XU3) and *sg5*

E)。以上结果表明, 突变体颖壳不闭合是由浆片持续处于膨大状态引起的。

2.3 SG5 基因定位及候选基因分析

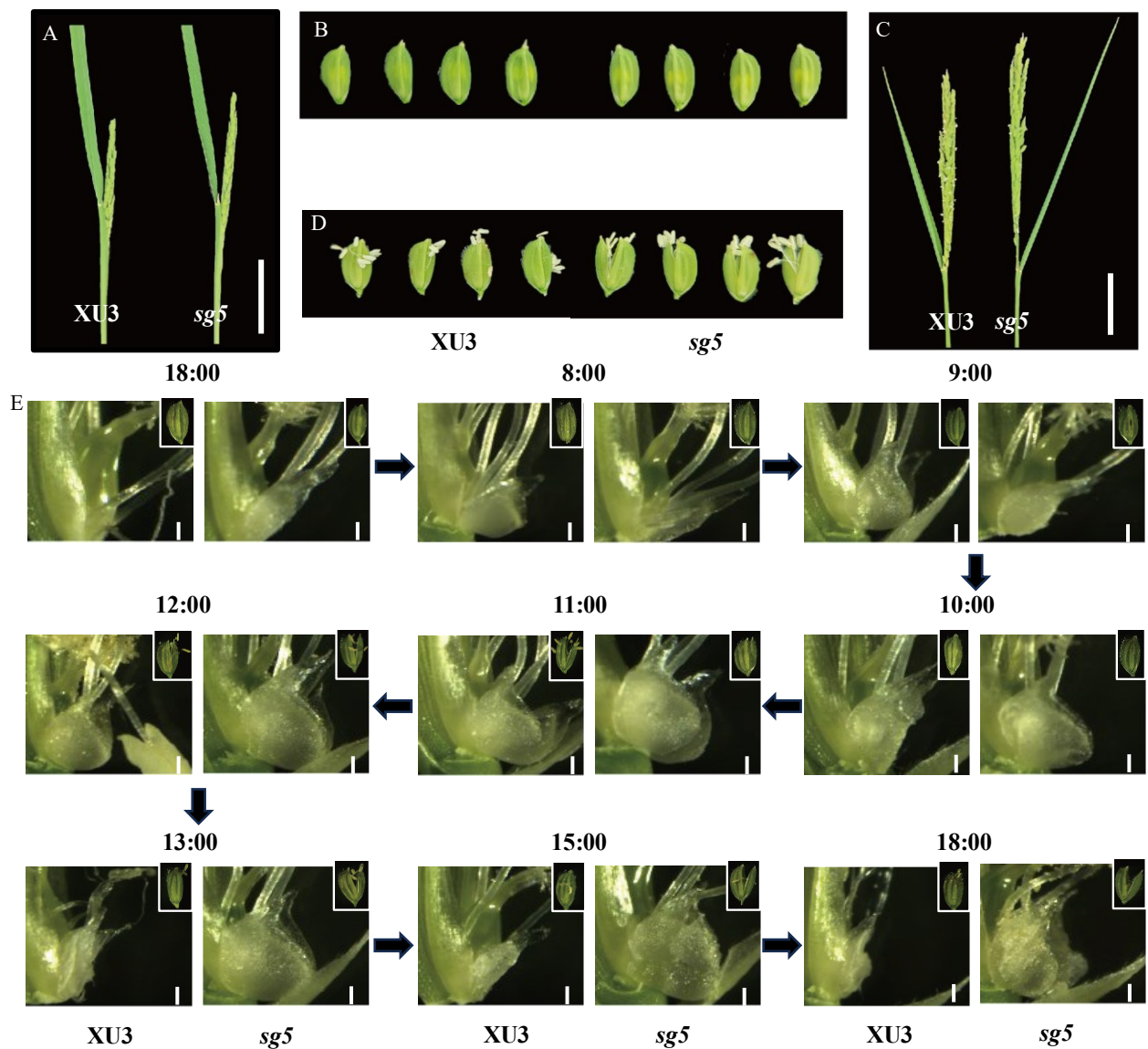
利用均匀分布在水稻 12 条染色体, 并在徐稻 3 号和 9311 具有多态性的 InDel 标记对突变体性状进行连锁分析, 并结合突变体表型单株去除假阳性区间, 最终检测到 5 号染色体 InDel5-11 和 InDel5-13 标记与颖壳是否开裂存在连锁现象, 物理间距为 3.72 Mb(图 3-A)。

同时, 利用 *sg5*/徐稻 3 号获得的 F_2 群体, 经 BSA 测序分析共得到 1265 个 SNP 差异位点(表 2), 在 5 号染色体目标区间内共有 21 个差异位点基因, 有 9 个基因变异位点发生在外显子和剪接受体处, 根据基因功能注释共筛选 3 个候选基因, 分别为 *LOC_Os05g50080*、*LOC_Os05g50890*、*LOC_Os05g51230*(图 3-A)。其中, *LOC_Os05g50890* 为已报道的水稻颖壳开放和花药开裂基因

OsJAR1/OsGH3-5, 编码茉莉酸氨基酸合成酶。进一步以 *sg5*/9311 构建的 F_2 群体中突变体表型单株提取的 DNA 为样品, 将 3 个候选基因分别扩增并测序, 结果显示, 仅在 *LOC_Os05g50890* 中检测到突变位点, 突变体在第 3 内含子及第 4 外显子连接处发生 G-A 突变, 造成可变剪接, 蛋白翻译提前终止(图 3-B)。*sg5* 与 *OsJar1 Tos17* 插入引起的突变表型相似, 初步表明 *sg5* 表型是由 *OsJAR1/OsGH3-5* 基因突变导致。

2.4 SG5 功能分析

利用 CRISPR/Cas9 技术在靠近 *SG5* 起始密码子处设计靶序列进行基因编辑。后代 T_0 代转基因苗经潮霉素及 Cas9 序列扩增检测后, 对阳性株测序检测其具体的突变方式, 最终发现两种不同突变方式的纯合突变株系(图 3-C)。株叶形态考察发现, *SG5#CR-1*、2 与野生型相比, 抽穗期提前, 但株高较矮(图 3-D)。对其颖壳形态检测发现, *SG5#CR-1*、



野生型及突变体未开花前穗部状态(A)、颖壳形态(B)、开花后穗部状态(C)和开花后颖壳形态(D), 比例尺=5 cm; E: 野生型及突变体前期长势一致的颖花, 在开花前后不同时间的颖壳及浆片形态变化, 比例尺=20μm。白框中是相对应的颖花。

A, Characterization of panicle before flowering(A), glume before flowering(B), panicle after flowering(C), glume after flowering(D) in the wild type and *sg5*(Scale bar=5 cm). E, Florets of consistent early growth from wild type and *sg5*, showing morphological changes of glumes and lodicules at various time points around flowering. Scale bar = 20 μm. The white boxes indicate the corresponding florets.

图2 野生型(XU3)和 *sg5* 在开花前后不同时间颖壳及浆片的发育形态变化

Fig. 2. Developmental morphological changes of glumes and lodicules in wild type (XU3) and *sg5* at various time points around flowering

2 在抽穗期颖壳开裂不闭合且一直持续到成熟期(图 3-E、F), 与突变体表型一致。对其他农艺性状考察发现, *SG5*#*CR-1*、2 株系抽穗期提前、株高降低, 穗长增加、结实率降低, 有效穗数无差异(图 3-G), 同 *sg5* 表型基本一致(图 1), 表明 *SG5* 确为目的基因。*SG5* 编码茉莉酸氨基酸合成酶, 是 *OsJAR1/OsGH3-5* 的一个新的等位基因。在成熟期对籽粒进行检测发现, 与野生型相比, *sg5* 突变体及 *SG5*#*CR-1* 株系中大量籽粒颖壳发霉且胚乳霉变, 每穗实粒数极低, 严重影响水稻产量(图 3-H)。

以上结果表明, *SG5* 在正常行使功能时, 可确保颖壳受精后内外稃钩合, 而突变后会导致颖壳开裂不闭合, 严重影响籽粒结实率及种子活力。

2.5 *SG5* 基因的组织表达模式分析

在水稻幼穗分化期, 通过 qRT-PCR 检测野生型的根、茎、叶、叶鞘、幼穗等不同组织中 *SG5* 基因的表达水平。结果显示, *SG5* 是组成型表达, 且在根、茎、叶中的表达水平较高, 在幼穗中表达较低, 但随着幼穗分化其表达水平逐步提高(图 4-A)。对 35S::p*SG5*-GUS 阳性转基因株各组织进

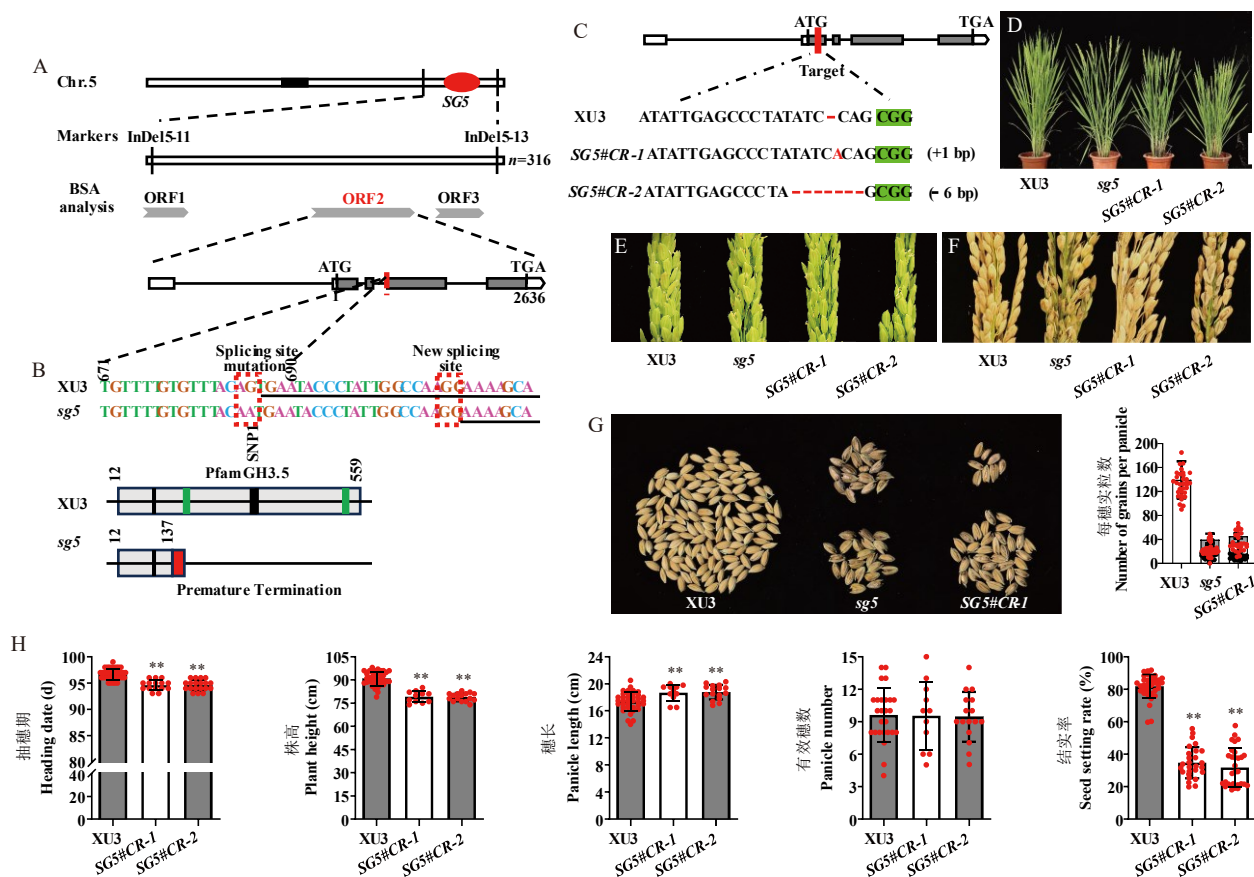


图 3 *SG5* 图位克隆及功能验证

A: *SG5* 图位克隆; B: 野生型、突变体 DNA 序列及蛋白序列分析; 下划线表示野生型 *SG5* 第 4 外显子前端序列, 其他序列代表第 3 内含子后半部分; 虚线红框表示剪接突变位点及新的剪接位点。黑色竖线表示茉莉酸酯位点; 绿色竖线表示 L- α -氨基酸位点。C: *SG5* 基因编辑及纯合突变株序列; D: 野生型、突变体、*SG5#CR-1*、*SG5#CR-2* 抽穗时单株表型, 比例尺=20 cm; E: 野生型、突变体、*SG5#CR-1*、*SG5#CR-2* 受精后颖壳形态; F: 野生型、突变体、*SG5#CR-1*、*SG5#CR-2* 成熟期穗部形态, 比例尺=5 cm; G: 野生型、突变体、*SG5#CR-1* 每穗实粒数; 红点: 正常籽粒; 黑点: 发霉籽粒。H: 抽穗期、株高、有效穗数、穗长、结实率、粒长、粒宽表型差异。红点: 单株数目。数据表示为平均值 $\pm$ 标准差 ($n \geq 10$), 学生氏 *t* 检验计算差异显著性。*表示表型在 $P < 0.05$ 水平显著; **表示表型在 $P < 0.01$ 水平极显著。

A, Map-based cloning of *SG5*. B, Characterization of DNA and protein sequences in Xudao 3(XU3) and *sg5*. Underlined nucleotides are the sequence of the first half of exons 4 in XU3, others are at the terminal of the intron 3. Red boxes are the splicing site mutation and new splicing sites. Black vertical line, the site of jasmonate. Green vertical line, the site of L- α -amino acid. C, Gene editing and homozygous mutant sequences. D, Characterization of plant type in XU3, *sg5* mutant, *SG5#CR-1*, and *SG5#CR-2*. Scale bar=20 cm. E, Glume morphology of XU3, *sg5* mutant, *SG5#CR-1*, and *SG5#CR-2*; F, Panicle morphology of wild type, *sg5* mutant, *SG5#CR-1*, and *SG5#CR-2*. Scale bar=5 cm. G, Number of grains per panicle in XU3, *sg5* mutant, and *SG5#CR-1*; Red dot, Normal seeds. Black dot, Moldy seeds. H, Comparison of heading date, plant height, panicle length, panicle number, and seed setting rate in XU3, *SG5#CR-1*, and *SG5#CR-2*. Red dot, Number of plants investigated. Data are given as Mean $\pm$ SD ($n \geq 10$). Student's *t*-test was used to generate *P* value. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$.

图 3 *SG5* 图位克隆及功能验证

Fig. 3. Map-based cloning and functional verification of *SG5*

行 GUS 染液染色, 结果表明 *SG5* 启动子启动的 GUS 蛋白在各个组织中均能检测到, 且在根、茎、叶中着色较深, 表明该基因在根、茎、叶的表达量较高; 在幼穗中着色较弱, 表明该基因在幼穗中表达量较低, 这一结果与 qRT-PCR 检测结果一致(图 4-B)。

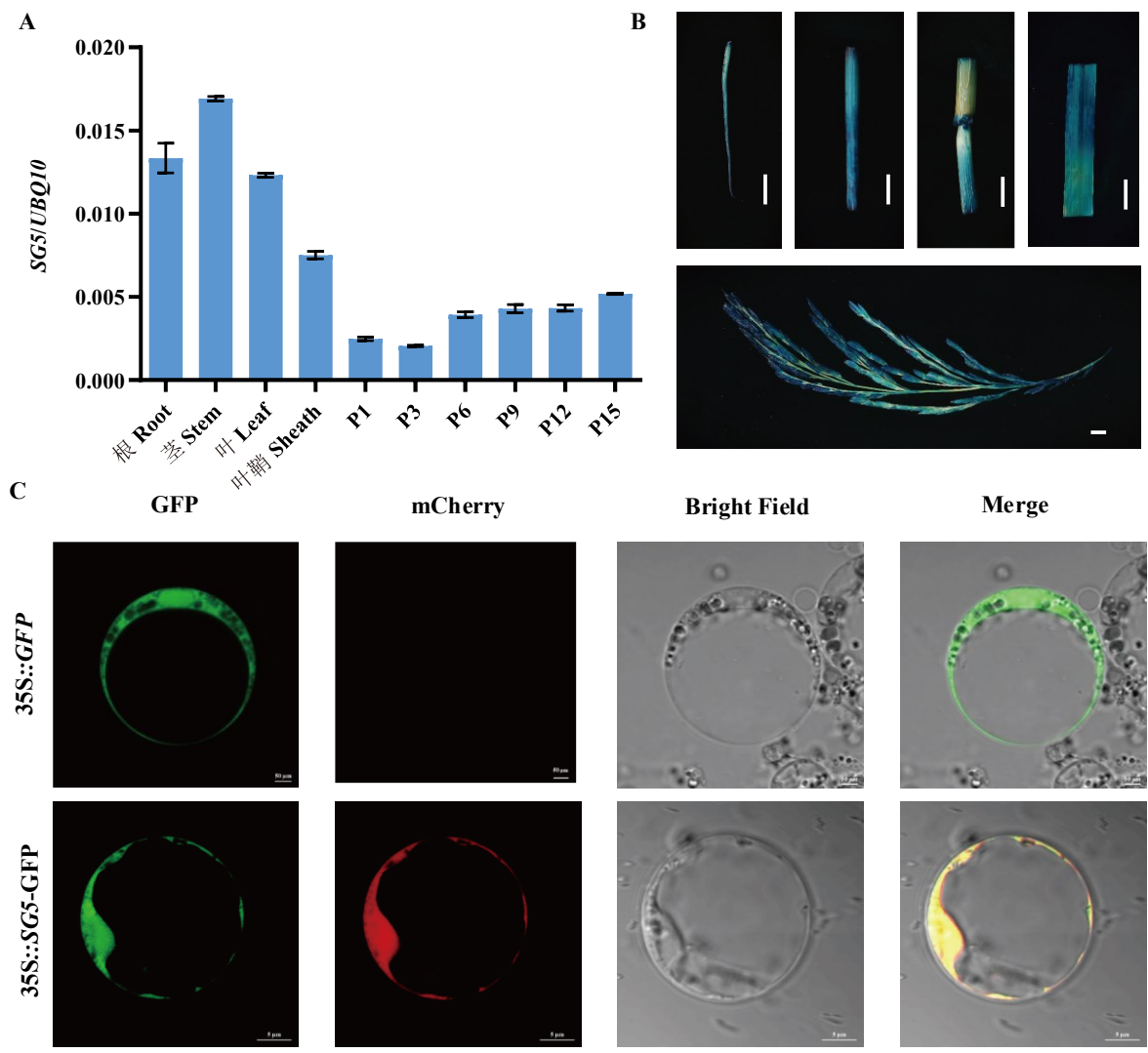
2.6 *SG5* 亚细胞定位

将构建的 *pCAMBIA1305::SG5-GFP* 和 *pYBA1138-mCherry* 载体共转入水稻原生质体中进行瞬时表达分析。通过激光共聚焦观察 *SG5* 蛋白在

水稻原生质体中的亚细胞位置, 结果显示 35S::*SG5-GFP* 融合蛋白和 *pYBA1138-mCherry* 标记蛋白在细胞质、细胞核中重叠, 表明 *SG5* 在细胞质和细胞核中表达(图 4-C)。

2.7 *SG5* 进化树分析及蛋白多序列比对

SG5 蛋白结构域分析显示其包含一个 GH3-5 结构域(图 3-D)。通过 InterProScan 对 40 份水稻种质资源中具有 GH3 结构域的蛋白序列进行进化树分析, 在 34 个种质资源中均检测到 *SG5* 蛋白。进化树分析表明, 在籼稻中 *SG5* 与尼瓦拉野生稻



A: *SG5* 基因的组织表达模式分析, 数据表示为平均值±标准差 ($n=3$); B: *SG5* 启动子启动 GUS 蛋白在各个组织部位中的染色情况(比例尺=10 mm)。C: *SG5* 在原生质体中的亚细胞定位, 35S::GFP 空载 (比例尺=50 μ m); 35S::SG5-GFP 载体(比例尺=5 μ m)。
A, qRT-PCR analysis of *SG5* gene expression in various tissues. Data are given as Mean $\pm$ SD ($n=3$). B, Histochemical analysis of GUS activity in various tissues.(Scale bar=10 mm). C, Subcellular localization of *SG5* in rice protoplast. 35S::GFP(scale bar=50 μ m). 35S::SG5-GFP(scale bar=5 μ m).

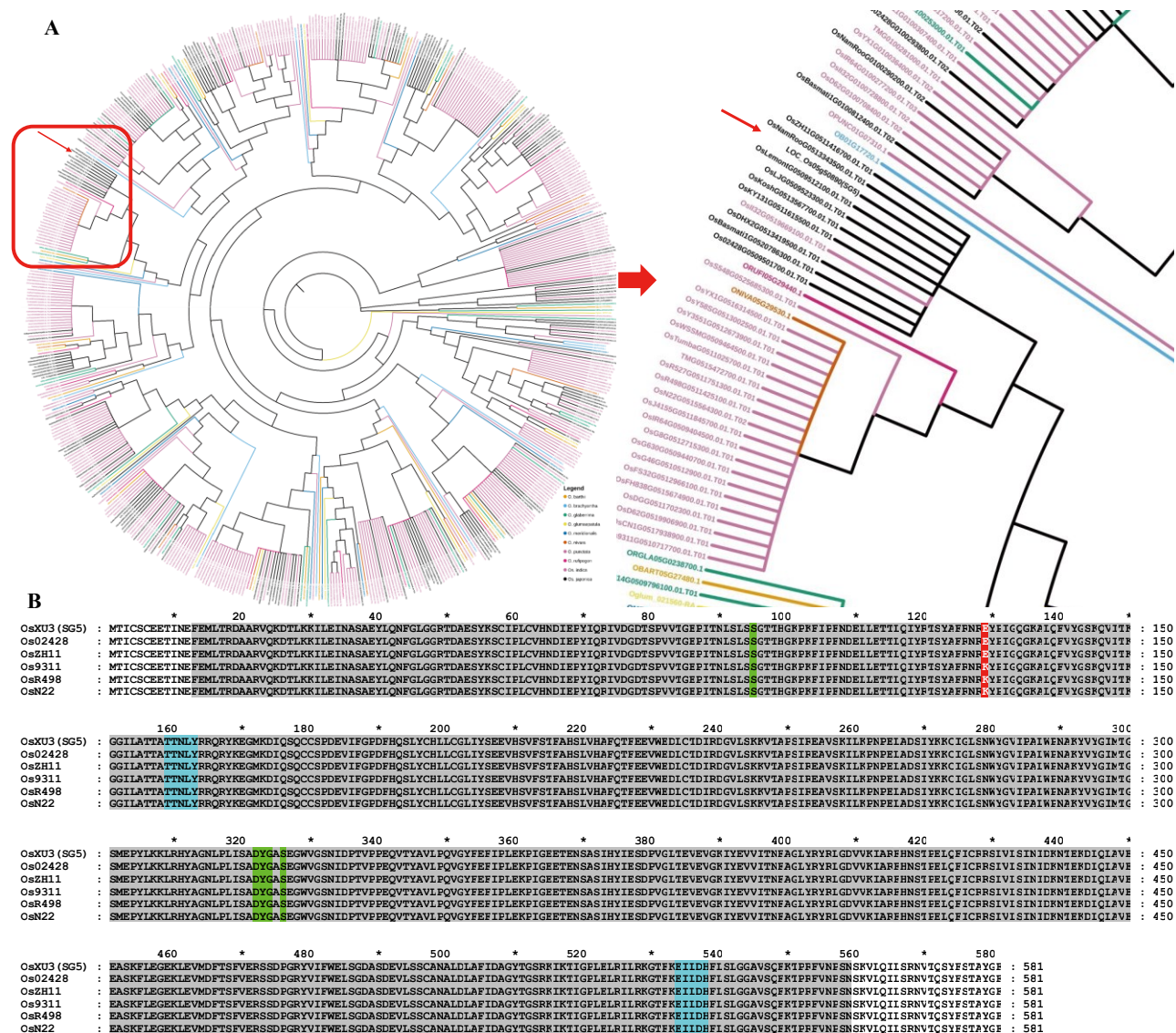
图 4 *SG5* 时空表达模式及亚细胞定位

Fig. 4. Expression pattern analysis of *SG5* and subcellular localization

表 2 BSA 分析检测的差异位点汇总

Table 2. Summary of differentially expressed genes detected using BSA analysis

差异种类 Category	差异基因数目 Number of differential genes
基因上游 Upstream	638
功能获得型 Stop gain	6
功能缺失型 Stop loss	2
5' UTR	10
3' UTR	14
保守结构缺失/插入 Conservative inframe deletion / insertion	4
散乱结构缺失/插入 Disruptive inframe deletion / insertion	3
移码突变 Frameshift variant	23
错义突变 Missense variant	119
同义突变 Synonymous variant	98
剪接受体变异 Splice acceptor variant & intron variant	4
内含子变异 Intronic	60
基因间变异 Intergenic region	72
基因下游 Downstream	212
合计 Total	1265



A: SG5 蛋白进化树分析。红框: 具有 GH3-5 结构域的种质资源; 红色箭头指向: SG5 目的蛋白。B: SG5 蛋白多序列比对分析。灰色框: GH3-5 结构域; 绿色框: 茉莉酮酸酯; 红色框: 变异位点氨基酸; 蓝色框: L- α -氨基酸位点。

A, Phylogenetic tree analysis of SG5 in rice. Red frame, Rice resources with the GH3-5 domain. Red arrow, SG5 protein. B, Multiple sequence alignment of SG5 in rice. Gray frame, The domain of GH3-5. Green frame, The site of jasmonate. Blue frame, The site of L- α -amino acid.

图 5 SG5 进化树分析及蛋白多序列比对

Fig. 5. Phylogenetic tree and multiple sequence alignment analysis of SG5 in rice

(*O. nivara*) 亲缘关系更近, 而在粳稻中 SG5 与普通野生稻(*O. rufipogon*) 具有更近的亲缘关系(图 5-A)。SG5 蛋白多序列比对结果显示, 尼瓦拉野生稻蛋白序列与 21 个籼稻品系完全一致; 普通野生稻在 GH3-5 结构域上与 10 个粳稻品种蛋白序列完全一致。在 6 个常用的水稻品种(3 个粳稻品种: 徐稻 3 号、02428、中花 11; 3 个籼稻品种: 9311、N22、R498) 中, 粳稻和籼稻中仅在第 129 位氨基酸存在 E-K(谷氨酸-赖氨酸) 的差异, 以上结果表明 SG5 在水稻中高度保守, 且在进化过程中发生了粳稻、籼稻分化(图 5-B, 附图 1)。

3 讨论

内稃和外稃是禾本科植物特有的器官, 其形态结构决定颖花是否正常闭合。浆片和小穗轴的结构决定着颖花开放的程度和时间, 在花的局部瞬时打开, 使雄蕊能够伸出而进行异花授粉这一过程具有独特的功能, 其功能缺失会导致糙米部分外露, 外观品质较正常籽粒会附着更多的霉斑、裂纹、虫蛀等不利性状, 严重影响种子活力(图 1-C; 图 3-C)。因此, 水稻颖壳的发育是决定水稻产量和稻米品质的

因素之一, 深入了解水稻颖花结构及其发生机制对水稻品种改良、提高杂交制种产量提供新的思路和基因资源。

王忠等^[37]研究表明, 水稻颖壳开裂是淀粉在淀粉酶的作用下溶解为可溶性糖并随着水势压力差进入浆片, 使得浆片体积膨大, 脱开内外颖接槽后推开外颖。之后, 小穗轴抽调浆片中的水分及内含物使得浆片萎缩, 在弹力的作用下外颖向内颖靠拢而闭颖。*OsMADS2*具有控制沿小穗轴近轴到远轴细胞分裂和分化的功能, 是薄壁组织和浆片特有维管束的发育以及维持浆片大小所必需的, *OsMADS2*功能缺失会导致浆片近端区域的细胞向内稃边缘区域转化^[19]; *OsMADS4*与*OsMADS2*高度同源, *OsMADS4*-RNAi转基因植株表现为浆片伸长向内稃转变, 雄蕊转变为心皮^[20]。*SG5*突变后内外稃发育正常, 仅浆片失水萎缩缓慢, 并持续保持膨大状态, 导致内外稃无法正常闭合(图2), 表明与*osmads2*、*osmads4*调控浆片发育的机制并不一致。*UG1(unclosed glumes 1)*初定位于3号染色体, 其突变体的颖壳开裂率超过90%, 籽粒质量差, 但内外稃形态特征正常^[38], 与*sg5*表型相似, 表明*SG5*可通过其他途径调控花器官发育。

Aux/IAA(生长素)、*SAUR*(Small Auxin Up RNA, 生长素上调小RNA)和*GH3*基因家族是植物生长素的3类原初反应基因。图位克隆及基因编辑结果证明, *SG5*是*OsJAR1/OsGH3-5*新的等位基因, 不同之处在于*sg5*是第3内含子和第4外显子交接处发生单碱基替换, 使得内含子不能正常剪接导致*SG5*蛋白发生移码突变, 翻译提前终止(图3-A), 而*osjar1-1*、*osjar1-2*是T-DNA分别插入第4和第3外显子导致的突变, 均表现出颖壳不闭合, 结实率下降的表型, 影响水稻花器官的形成和籽粒发育^[39-41]。水稻中共有12个*GH3*基因, *OsGH3-3*和*OsGH3-5*编码茉莉酸异亮氨酸合酶, 其他基因均编码吲哚乙酸氨基化合成酶, 在植物生长发育、胁迫响应及抗病防御等方面发挥重要作用。其中*OsGH3-1*、2、4、8对生长素响应更为敏感, 当外源2,4-D处理时基因表达水平显著提升, 其他基因表达水平变化较小^[42]。*OsGH3-1/LCI*通过催化游离的IAA与氨基酸结合降低水稻中IAA的含量, 维持IAA的体内平衡, 增强防御反应和对真菌的抗性^[43]。*OsGH3-2*参与调控水稻体内IAA和ABA(脱落酸)的含量, 对植株的耐冷性和抗旱性分别起正向和负向调控作用, 同时通过促进氨基酸-IAA的形成, 提高水稻的广谱抗性^[44, 45]。在盐胁迫下, *OsGH3-4*在水稻幼苗地上部和根部表达水平显

著提高^[46]。*OsGH3-6*是*OsNAC2*的一个下游靶基因, *OsNAC2*可整合IAA和CTK(细胞分裂素)信号途径, 负调控水稻初生根和冠状根的数量^[47]。*OsGH3-8*表达上调可激活对白叶枯的抗性, 且不依赖于SA(水杨酸)和JA(茉莉酸)依赖的信号传导通路, 但会引起植株发育缓慢^[48]。*OsGH3-8*表达水平受*OsMADS1*和*OsMADS6*的调控, 当其表达水平降低时, 心皮发育和花粉活性均受到影响, 导致育性降低^[49]。

在种子萌发过程中, *OsGH3-5/OsJAR1*可通过JA信号协调种子休眠解除^[50]。在水稻的光形态建成中, *OsGH3-5/OsJAR1*可作为连接phyA、phyB蛋白及水稻JA-ZIM结构域蛋白的桥梁参与调控光和JA介导的信号调控。在光照下, phyB与*OsJar1*启动子相结合, 诱导其转录, 并激活JA下游基因促进花药绒毡层细胞分化、花粉粒形成及花药开裂, 确保花药正常发育和授粉^[40, 51]。在裸露的种子受到昆虫取食、病菌侵染时, 植株体内会积累JA-Ile, 表明*OsGH3-5/OsJAR1*可能通过调控颖花发育时间间接增强抗逆性^[50, 52]。*OsGH3-5/OsJAR1*同样参与生长素介导的调控通路, 生长素响应因子*OsARF19*可通过调控*OsGH3-5/OsJAR1*的表达水平调控水稻叶夹角^[53]。这些结果表明*OsGH3-5/OsJAR1/SG5*在水稻花器官发育、颖壳在适宜光照下开放且花药正常裂解过程中发挥着重要作用。

在本研究中, *SG5*突变后颖壳不闭合表型是因浆片在膨大后不能及时萎缩导致的, 最新研究表明, 浆片的膨大和萎缩同样是由JA调控的, JA生物合成基因*OsAOS1*在浆片中促进内源JA合成及水稻日开花时间中发挥重要作用^[54]。因此, 我们推测浆片发育的缺陷可能是由两种原因导致的。第一个原因是*SG5*功能突变导致其参与的茉莉酸调控途径受阻, 致使浆片功能缺陷; 第二个原因是生理结构缺陷, *SG5*功能缺失使得浆片中小维管束数目减少, 连接小穗轴和浆片的大维管束减少, 导致*sg5*浆片膨大后需要更长的时间才能解除膨大状态, 同时小穗轴和外稃连接处细胞定型, 小穗轴及护颖的反弹能力减弱, 即使浆片萎缩后内外稃也无法闭合^[55], 其中具体原因仍需进一步的探索。进化树分析及蛋白多序列比对表明, *SG5*在自然及人工选择过程中发生籼粳分化。发掘更多水稻颖壳发育相关基因的研究, 能够解析水稻花器官发育甚至是不育系颖壳不闭合的分子机理, 为提高制种产量提供新的思路。深入探索*SG5*的功能, 能够为精准调控水稻开花、提高授粉效率、增强水稻抗逆性、培育高产抗病品种提供基因资源。

在线辅助性信息: 附表1和附图1请见《中国水稻科学》网站(<http://www.ricesci.cn>)

参考文献:

- [1] Xing Y Z, Zhang Q F. Genetic and molecular bases of rice yield[J]. *Annual Review of Plant Biology*, 2010, 61: 421-442.
- [2] 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.
- [3] Theissen G, Melzer R. Molecular mechanisms underlying origin and diversification of the *Angiosperm* flower[J]. *Annals of Botany*, 2007, 100(3): 603-619.
- [4] Soltis D E, Chanderbali A S, Kim S, Buzgo M, Soltis P S. The ABC model and its applicability to basal angiosperms[J]. *Annals of Botany*, 2007, 100(2): 155-163.
- [5] Maoileidigh D S O, Graciet E, Wellmer F. Gene networks controlling *Arabidopsis thaliana* flower development[J]. *New Phytologist*, 2014, 201: 16-30.
- [6] Krizek B A, Fletcher J C. Molecular mechanisms of flower development: An armchair guide[J]. *Nature Reviews Genetics*, 2005, 6(9): 688-698.
- [7] Causier B, Schwarz-Sommer Z, Davies B. Floral organ identity: 20 years of ABCs[J]. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 2010, 21(1): 73-79.
- [8] 郭爽, 李云峰, 任德勇, 王增, 杜青, 何光华. 水稻内稃扭曲突变体 *palea distortion 1 (pd1)* 的鉴定与基因定位[J]. 分子植物育种, 2011, 9(3): 256-260.
Guo S, Li Y F, Ren D Y, Wang Z, Du Q, He G H. Identification and gene mapping of a *palea distortion 1 (pd1)* mutant in rice (*Oryza sativa* L.)[J]. *Molecular Plant Breeding*, 2011, 9(3): 256-260. (in Chinese with English abstract)
- [9] Jin Y, Luo Q, Tong H N, Wang A J, Cheng Z J, Tang J F, Li D Y, Zhao X F, Li X B, Wan J M, Jiao Y L, Chu C C, Zhu L H. An AT-hook gene is required for palea formation and floral organ number control in rice[J]. *Developmental Biology*, 2011, 359(2): 277-288.
- [10] 陈东, 毛毕刚, 潘银林, 彭彦, 韶也, 吴天昊, 赵炳然. 水稻颖花畸形突变体(gm(t))的遗传分析与基因定位[J]. 分子植物育种, 2019, 17(15): 5026-5031.
Chen D, Mao B G, Pan Y L, Peng Y, Shao Y, Wu T H, Zhao B R. Genetic analysis and gene mapping of glume malformation mutant(gm(t)) in rice[J]. *Molecular Plant Breeding*, 2019, 17(15): 5026-5031. (in Chinese with English abstract)
- [11] 薛大伟. 两个水稻花器官突变体的遗传分析[D]. 北京: 中国农业科学院, 2006.
Xue D W. The genetic analysis of two floral organ mutants from rice[D]. *Chinese Academy of Agricultural Sciences*, 2006. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2006. (in Chinese with English abstract)
- [12] 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[J]. *The Plant Cell*, 2000, 12(6): 871-884.
- [13] 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[J]. *Plant Molecular Biology*, 2005, 59(1): 125-135.
- [14] 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[J]. *The Plant Journal*, 2005, 43(6): 915-928.
- [15] Hu Y, Liang W Q, Yin C S, Yang X L, Ping B Z, Li A X, Jia R, Chen M J, Luo Z J, Cai Q, Zhao X X, Zhang D B, Yuan Z. Interactions of *OsMADS1* with floral homeotic genes in rice flower development[J]. *Molecular plant*, 2015, 8(9): 1366-1384.
- [16] Pelucchi N, Fornara F, Favalli C, Masiero S, Lago C, P E M, Colombo L, Kater M M. Comparative analysis of rice MADS-box genes expressed during flower development[J]. *Sexual Plant Reproduction*, 2002, 15(3): 113-122.
- [17] Wang K J, Tang D, Hong L L, Xu W Y, Huang J, Li M, Gu M H, Xue Y B, Cheng Z K. *DEP* and *AFO* regulate reproductive habit in rice[J]. *PLoS Genetics*, 2010, 6(1): e1000818.
- [18] Kobayashi K, Yasuno N, Sato Y, Yoda M, Yamazaki R, Kimizu M, Yoshida H, Nagamura Y, Kyoizuka J. Inflorescence meristem identity in rice is specified by overlapping functions of three AP1/FUL-like MADS box genes and PAP2 a SEPALLATA MADS box gene[J]. *The Plant Cell*, 2012, 24(5): 1848-1859.
- [19] Yadav S R, Prasad K, Vijayraghavan U. Divergent regulatory *OsMADS2* functions control size, shape and differentiation of the highly derived rice floret second-whorl organ[J]. *Genetics*, 2007, 176(1): 283-294.
- [20] Yao S G, Ohmori S, Kimizu M, Yoshida H. Unequal genetic redundancy of rice PISTILLATA orthologs, *OsMADS2* and *OsMADS4*, in lodicule and stamen development[J]. *Plant & Cell Physiology*, 2008, 49(5): 853-857.
- [21] Yu X Q, Xia S S, Xu Q K, Cui Y J, Gong M, Zeng D L, Zhang Q, Shen L, Jiao G A, Gao Z Y, Hu J, Zhang G H, Zhu L, Guo L B, Ren D Y, Qian Q. *ABNORMAL FLOWER AND GRAIN 1* encodes *OsMADS6* and determines palea identity and affects rice grain yield and quality[J]. *Science China Life Sciences*, 2020, 63(2): 228-238.

- [22] Ohmori S, Kimizu M, Sugita M, Miyao A, Hirochika H, Uchida E, Nagato Y, Yoshida H. *MOSAIC FLORAL ORGANS1*, an *AGL6* -like MADS box gene, regulates floral organ identity and meristem fate in rice[J]. *The Plant Cell*, 2009, 21(10): 3008-3025.
- [23] Zhang J, Nallamilli B R, Mujahid H, Peng Z H. *OsMADS6* plays an essential role in endosperm nutrient accumulation and is subject to epigenetic regulation in rice (*Oryza sativa*)[J]. *The Plant Journal*, 2010, 64(4): 604-617.
- [24] Duan Y L, Xing Z, Diaio Z J, Xu W Y, Li S P, Du X Q, Wu G H, Wang C L, Lan T, Meng Z, Liu H Q, Wang F, Wu W R, Xue Y B. Characterization of *Osmads6-5*, a null allele, reveals that *OsMADS6* is a critical regulator for early flower development in rice (*Oryza sativa* L.)[J]. *Plant Molecular Biology*, 2012, 80(4-5): 429-442.
- [25] Wang H H, Zhang L, Cai Q, Hu Y, Jin Z M, Zhao X X, Fan W, Huang Q M, Luo Z J, Chen M J, Zhang D B, Yuan Z. *OsMADS32* interacts with PI-like proteins and regulates rice flower development[J]. *Journal of Integrative Plant Biology*, 2015, 57(5): 504-513.
- [26] Luo Q, Zhou K D, Zhao X F, Zeng Q C, Xia H A, Zhai W X, Xu J C, Wu X J, Yang H S, Zhu L H. Identification and fine mapping of a mutant gene for palealess spikelet in rice[J]. *Planta*, 2005, 221(2): 222-230.
- [27] Xiao H, Tang J F, Li Y F, Wang W M, Li X B, Jin L, Xie R, Luo H F, Zhao X F, Meng Z, He G H, Zhu L H. *STAMENLESS 1*, encoding a single C₂H₂ zinc finger protein, regulates floral organ identity in rice[J]. *The Plant Journal*, 2009, 59(5): 789-801.
- [28] Yan D W, Zhang X M, Zhang L, Ye S H, Zeng L J, Liu J Y, Li Q, He Z H. *CURVED CHIMERIC PALEA 1* encoding an EMF1-like protein maintains epigenetic repression of *OsMADS58* in rice palea development[J]. *The Plant Journal*, 2015, 82(1): 12-24.
- [29] Zheng M, Wang Y H, Wang Y L, Wang C M, Ren Y L, Lv J, Peng C, Wu T, Liu K, Zhao S L, Liu X, Guo X P, Jiang L, Terzaghi W, Wan J M. *DEFORMED FLORAL ORGAN1 (DFO1)* regulates floral organ identity by epigenetically repressing the expression of *OsMADS58* in rice (*Oryza sativa*)[J]. *The New Phytologist*, 2015, 206(4): 1476-1490.
- [30] Yuan Z, Gao S, Xue D W, Luo D, Li L T, Ding S Y, Yao X, Wilson Z A, Qian Q, Zhang D B. *RETARDED PALEA1* controls palea development and floral zygomorphy in rice[J]. *Plant Physiology*, 2009, 149(1): 235-244.
- [31] Zeng D D, Qin R, Alamin M, Liang R, Yang C C, Jin X L, Shi C H. *DBOP* specifies palea development by suppressing the expansion of the margin of palea in rice[J]. *Genes and Genomics*, 2016, 38(11): 1095-1103.
- [32] Lee D Y, Lee J, Moon S, Park S Y, An G. The rice heterochronic gene *SUPERNUMERARY BRACT* regulates the transition from spikelet meristem to floral meristem[J]. *The Plant Journal*, 2007, 49(1): 64-78.
- [33] Ren D Y, Li Y F, Zhao F M, Sang X C, Shi J Q, Wang N, Guo S, Ling Y H, Zhang C W, Yang Z L, He G H. *MULTI-FLORET SPIKELET1*, which encodes an AP2/ERF protein, determines spikelet meristem fate and sterile lemma identity in rice[J]. *Plant Physiology*, 2013, 162(2): 872-884.
- [34] Ren D Y, Rao Y C, Wu L W, Xu Q K, Li Z Z, Yu H P, Zhang Y, Leng Y J, Hu J, Zhu L, Gao Z Y, Dong G J, Zhang G H, Guo L B, Zeng D L, Qian Q. The pleiotropic *ABNORMAL FLOWER AND DWARF1* affects plant height, floral development and grain yield in rice[J]. *Journal of Integrative Plant Biology*, 2016, 58(6): 529-539.
- [35] Yan D W, Zhou Y, Ye S H, Zeng L J, Zhang X M, He Z H. *BEAK-SHAPED GRAIN 1/TRIANGULAR HULL 1*, a DUF640 gene, is associated with grain shape, size and weight in rice[J]. *Science China Life Sciences*, 2013, 56(3): 275-283.
- [36] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-ΔΔCT} method[J]. *Methods*, 2001, 25(4): 402-408.
- [37] 王忠, 顾蕴洁, 高煜珠. 水稻开颖机理的探讨: III. 浆片的结构及其在开颖过程中内含物的变化[J]. 作物学报, 1991, 17(2): 96-101, 161-162.
- Wang Z, Gu Y J, Gao Y Z. Studies on the mechanism of the anthesis of rice III. Structure of the lodicule and changes of its contents during flowering[J]. *Acta Agronomica Sinica*, 1991, 17(2): 96-101, 161-162. (in Chinese with English abstract)
- [38] 秦鹏. 水稻颖壳发育基因 *hzp* 和 *ug1* 的研究[D]. 长沙: 湖南农业大学, 2021.
- Qin P. The study on genes *hzp* and *ug1* controlling rice glume development[D]. Changsha: Hunan Agricultural University, 2021. (in Chinese with English abstract)
- [39] Terol J, Domingo C, Talón M. The GH3 family in plants: Genome wide analysis in rice and evolutionary history based on EST analysis[J]. *Gene*, 2006, 371(2): 279-290.
- [40] Riemann M, Riemann M, Takano M. Rice JASMONATE RESISTANT 1 is involved in phytochrome and jasmonate signalling[J]. *Plant, Cell & Environment*, 2008, 31(6): 783-792.
- [41] Xiao Y G, Chen Y, Charnikhova T, Mulder P P J, Heijmans J, Hooogenboom A, Agalou A, Michel C, Morel J B, Dreni L, Kater M M, Bouwmeester H, Wang M, Zhu Z, Ouwerkerk P B F. *OsJAR1* is required for JA-regulated floret opening and anther dehiscence in rice[J]. *Plant Molecular Biology*, 2014, 86(1/2): 19-33.
- [42] Jain M, Kaur N, Tyagi A K, Khurana J P. The auxin-responsive GH3 gene family in rice (*Oryza sativa*)[J]. *Functional & Integrative Genomics*, 2006, 6(1): 36-46.
- [43] Zhao S Q, Xiang J J, Xue H W. Studies on the rice LEAF

- INCLINATION1 (LC1), an IAA-amido synthetase, reveal the effects of auxin in leaf inclination control[J]. *Molecular Plant*, 2013, 6(1): 174-187.
- [44] Du H, Wu N, Fu J, Wang S P, Li X H, Xiao J H, Xiong L Z. A GH3 family member, OsGH3-2, modulates auxin and abscisic acid levels and differentially affects drought and cold tolerance in rice[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2012, 63(18): 6467-6480.
- [45] Fu J, Yu H H, Li X H, Xiao J H, Wang S P. Rice GH3 gene family: Regulators of growth and development[J]. *Plant Signaling Behavior*, 2011, 6(4): 570-574.
- [46] Kong W L, Zhong H, Deng X X, Gautam M, Gong Z Y, Zhang Y, Zhao G Q, Liu C, Li Y S. Evolutionary analysis of GH3 genes in six *Oryza* Species/Subspecies and their expression under salinity stress in *Oryza sativa ssp. japonica*[J]. *Plants*, 2019, 8(2): 30.
- [47] Mao C J, He J M, Liu L, Deng Q M, Yao X F, Liu C M, Qiao Y L, Li P, Ming F. OsNAC2 integrates auxin and cytokinin pathways to modulate rice root development[J]. *Plant Biotechnology Journal*, 2020, 18(2): 429-442.
- [48] Ding X H, Cao Y L, Huang L L, Zhao J, Xu C G, Li X H, Wang S P. Activation of the Indole-3-Acetic Acid-Amido synthetase GH3-8 suppresses expansin expression and promotes salicylate- and jasmonate-independent basal immunity in rice[J]. *The Plant Cell*, 2008, 20(1): 228-240.
- [49] Yadav S R, Khanday I, Majhi B B, Veluthambi K, Vijayraghavan U. Auxin-responsive OsMGH3, a common downstream target of OsMADS1 and OsMADS6, controls rice floret fertility[J]. *Plant and Cell Physiology*, 2011, 52(12): 2123-2135.
- [50] Fukumoto K, Alamgir K M, Yamashita Y, Mori I C, Matsuura H, Galis I. Response of rice to insect elicitors and the role of OsJAR1 in wound and herbivory-induced JA-Ile accumulation[J]. *Journal of Integrative Plant Biology*, 2013, 55(8): 775-784.
- [51] Song S S, Qi T C, Huang H, Ren Q C, Wu D W, Chang C Q, Peng W, Liu Y, Peng J R, Xie D X. The jasmonate-ZIM domain proteins interact with the R2R3-MYB transcription factors MYB21 and MYB24 to affect jasmonate-regulated stamen development in *Arabidopsis*[J]. *The Plant Cell*, 2011, 23(3): 1000-1013.
- [52] Wakuta S, Suzuki E, Saburi W, Matsuura H, Nabeta K, Imai R, Matsui H. OsJAR1 and OsJAR2 are jasmonyl-L-isoleucine synthases involved in wound- and pathogen-induced Jasmonic acid signalling[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2011, 409: 634-639.
- [53] Zhang S N, Wang S K, Xu Y X, Yu C L, Shen C J, Qian Q, Geisler M, Jiang D A, Qi Y H. The auxin response factor, OsARF19, controls rice leaf angles through positively regulating OsGH3-5 and OsBR11[J]. *Plant, Cell and Environment*, 2015, 38: 638-654.
- [54] Ding W Y, Gou Y J, Li Y J, Li J J, Fang Y D, Liu X P, Zhu X Y, Ye R J, Heng Y Q, Wang H Y, Shen R X. A jasmonate-mediated regulatory network modulates diurnal floret opening time in rice[J]. *New phytologist*, 2024, 244(1): 176-191.
- [55] 王忠, 顾蕴洁, 高煜珠. 水稻开颖机理的探讨: V.不育系与可育系浆片和花丝结构的比较[J]. 作物学报, 1994, 20(1): 13-17, 129-131.
- Wang Z, Gu Y J, Gao Y Z. Studies on the mechanism of the anthesis of rice V. comparison of lodicule and filament structure between sterile line and fertile line[J]. *Acta Agronomica Sinica*, 1994, 20(1): 13-17, 129-131. (in Chinese with English abstract)