

1 个新巨胚等位基因的鉴定与表达分析及其性状考察

平宝哲, 时亚琼, 谢米雪, 张鑫, 王鑫, 张涛, 李建粤*

(上海师范大学 生命与环境科学学院, 植物种质资源开发中心, 上海 200234)

摘要: 该研究以‘超 2-10’水稻和‘上师大 5 号’巨胚水稻为材料, 分析了 2 种水稻的胚重、胚与糙米质量比、巨胚性状的遗传, 克隆和分析了其巨胚基因(*GE*)序列, 并对巨胚基因进行了表达分析。结果显示: (1) ‘上师大 5 号’的胚重、胚与糙米质量比均极显著大于‘超 2-10’, 且‘超 2-10’的胚重接近或大于一些已报道的巨胚水稻; (2) ‘上师大 5 号’巨胚表型由 1 对隐性基因控制, 并与韩国巨胚稻‘M-2-565-11-3-B(*ge*)’属于相同的等位基因突变; (3) ‘超 2-10’、‘上师大 5 号’和‘M-2-565-11-3-B(*ge*)’3 种水稻各自具有 1 个新的 *GE* 等位基因, 它们的突变位点分别位于启动子、启动子及编码链、编码链; (4) ‘上师大 5 号’启动子及编码链都有突变的 *GE* 等位基因(*ge^c*), 在开花后 4~7 d 的颖果中表达量持续增加, 完全不同于只有编码链突变的 *GE* 等位基因呈持续下降的表达模式。该研究首次报道了突变在启动子、突变同时发生在启动子及编码链 2 种新型巨胚等位基因。

关键词: 巨胚基因; ‘上师大 5 号’; ‘超 2-10’; ‘M-2-565-11-3-B(*ge*)’; 新等位基因; 表达分析

中图分类号: Q789

文献标志码: A

Molecular Characterization, Phenotype Investigation and Expression Analysis of a New Giant Embryo Allele

PING Baozhe, SHI Yaqiong, XIE Mixue, ZHANG Xin, WANG Xin, ZHANG Tao, LI Jianyue*

(Development Center of Plant Germplasm Resources, College of Life and Environment Sciences, Shanghai Normal University, Shanghai 200234, China)

Abstract: In this paper, we used normal embryo rice ‘Chao2-10’ and giant embryo rice ‘Shangshida No. 5’ as materials. The embryo weight and mass ratio of embryo to brown rice of ‘Shangshida No. 5’ were compared with those of ‘Chao2-10’. Then we did the genetic analysis of giant embryo phenotype. Giant embryo gene (*GE*) of ‘Shangshida No. 5’, ‘Chao2-10’ and Korea giant embryo rice ‘M-2-565-11-3-B(*ge*)’ were cloned to analyse their sequence. The expression levels of *GE* gene in ‘Shangshida No. 5’, ‘Chao2-10’ were analysed by Real time-PCR with the ‘Nipponbare’ as a control. The results were as follows: (1) Both embryo weight and mass ratio of embryo of brown rice ‘Shangshida No. 5’ were significantly larger than these of ‘Chao2-10’ ($P < 0.01$). However, embryo weight of the ‘Chao2-10’ is close to or more than some of the giant embryo rice cultivars reported previously; (2) Giant embryo phenotype of ‘Shangshida No. 5’ is controlled by a single recessive gene, which is same to ‘M-2-565-11-3-B(*ge*)’; (3) *GE* gene in these three cultivars is also a new *GE* allele; ‘Chao2-10’ has a mutation (*ge^b*) in the promoter; ‘Shangshida No. 5’ has mutations (*ge^c*) both in the promoter and CDS; ‘M-2-565-11-3-B(*ge*)’ only has a mutation (*ge^b*) in CDS; (4) The expression pattern of the *ge^c* in young caryopses was different from other *GE* alleles reported, which increase steadily from 4 day to 7 day after flowering. This paper first reported two new *GE* alleles, one is mutated in the promoter, and the other has mutations in both promoter and CDS.

Key words: giant embryo gene; ‘Shangshida No. 5’; ‘Chao2-10’; ‘M-2-565-11-3-B(*ge*)’; new allele; expression analysis

收稿日期: 2015-04-07; 修改稿收到日期: 2015-06-08

基金项目: 上海市科委项目(063919141)

作者简介: 平宝哲(1988—), 男, 硕士, 主要从事分子遗传学与基因工程研究。E-mail: 18217098045@163.com

* 通信作者: 李建粤, 副教授, 主要从事分子遗传学与基因工程研究。E-mail: lijianyue01@aliyun.com

近几年来随着人们对食品营养品质的追求,对功能性稻米的研究越来越为人所关注。巨胚稻是一种胚变大的水稻突变体,其胚表型比正常的水稻胚增大 2 倍以上。巨胚糙米中的 γ -氨基丁酸(GABA)^[1-2]、维生素 E^[1,3-7]、多种氨基酸^[1,4,7]、谷维素^[1,6]、酚类^[1,6]和矿物质^[3,6-7]的含量都显著高于正常水稻的糙米。

有文献报道,巨胚性状由隐性单基因控制^[3,8-10]。钱前等^[9]利用‘金南风/南京 11’F₂ 群体对‘金南风’的巨胚基因(*GE*)进行了定位,将巨胚基因定位在第 7 染色体上 RG678 和 RZ395 之间,遗传距离分别是 6.2cM 和 13cM。Koh 等^[11]利用‘Hwacheongbyeog-ges/Milyang23’F₂ 群体,将巨胚基因定位在第 7 染色体上的 RZ395 和 CD0497 之间,遗传距离分别为 2.4cM 和 3.4cM。近年来,人们对巨胚基因的进一步研究认为,巨胚基因,即 Os07g0603700,编码细胞色素 P450 家族中的一种蛋白^[3,10,12-15],目前该蛋白被定名为 CYP78B5^[15]。Chen 等^[15]研究表明,CYP78B5 蛋白在内质网和过氧化物酶体内完成代谢过程,该蛋白功能缺失会导致 IAA 水平急剧下降,影响细胞分裂和膨大,从而导致胚与胚乳比例的改变。

目前已报道的 *GE* 等位基因有 *ge-1*、*ge-2*、*ge-3*、*ge-4*、*ge-5*、*ge-6*、*ge-7*、*ge-8*、*ge-9*、*ge-10*^[12]、*ge'*^[3],以及 10217 巨胚稻^[10]、Kita-ake 巨胚稻^[15]中的 *GE* 等位基因,它们分别在不同地域水稻品种中被发现。虽然已有十多个巨胚等位基因的报道,但这些等位基因的突变都在编码链上。目前还不清楚对于 *GE* 等位基因是否会在编码链外发生突变。

观察‘超 2-10’的胚,虽然比不上现已报道的较多巨胚水稻品种^[1,3,6,10,13,15],但比‘日本晴’水稻大。目前还不清楚‘超 2-10’的 *GE* 等位基因是否有突变。本实验室在将‘超 2-10’成熟胚离体培养时,曾发生胚表型突变,由此形成了一个胚更大的‘上师大 5 号’水稻^[16]。为了探索导致‘上师大 5 号’巨大胚表型的突变基因,本研究以‘超 2-10’和‘上师大 5 号’为材料,对‘上师大 5 号’的巨胚性状及巨胚基因开展了研究。

1 材料和方法

1.1 水稻材料

‘上师大 5 号’由‘超 2-10’在水稻组织培养环境中发生胚性状突变而获得的新巨胚水稻^[16]。‘超 2-10’和‘上师大 5 号’是本研究中 2 种最主要的水稻

材料;为了分析‘上师大 5 号’是否与目前已报道的其他巨胚水稻属于相同等位基因突变,本研究还选用由韩国‘花晴’水稻突变得到的巨胚稻‘M-2-565-11-3-B(*ge*)’作为研究材料;为了对‘上师大 5 号’巨胚基因的遗传规律进行分析,本研究又选取了 2 种正常胚水稻:两系不育系‘261S’和常规早稻‘IRAT109’作为试验材料。正常胚水稻‘日本晴’作为体式显微镜观察的对照材料。

1.2 水稻糙米及胚性状考察

取‘上师大 5 号’和‘超 2-10’的稻谷各 300 粒,分 3 组,每组 100 粒,按照朱映东等方法^[17]称量糙米百粒重、百粒胚重,并计算胚与糙米质量比。

选取‘上师大 5 号’、‘超 2-10’、‘M-2-565-11-3-B(*ge*)’和‘日本晴’水稻具有代表性的糙米,在 LeicaDFC290 体式显微镜下观察不同水稻糙米的胚大小并进行拍照。

1.3 ‘上师大 5 号’巨胚突变性状的遗传分析

以‘上师大 5 号’为母本,分别与 3 种正常胚水稻‘超 2-10’、‘261S’和‘IRAT109’进行杂交。收获 F₁ 种子以及从 F₁ 植株上分单株收获 F₂ 种子,去掉 F₂ 种子颖壳,以‘上师大 5 号’为对照,直接观察 F₂ 糙米胚大小,并进行小胚和巨胚分离比统计分析。以‘261S’×‘上师大 5 号’组合 F₁ 植株为父本,与‘261S’回交,收获回交 F₁ 种子,观察回交 F₁ 植株自交所结种子的胚大小,统计分析有巨胚种子单株和无巨胚种子单株的分离比。采用 χ^2 检验杂交后代巨胚和小胚分离比,以及回交植株有无巨胚种子单株的分离比,分析控制巨胚性状的遗传模式。

将巨胚稻‘上师大 5 号’与‘M-2-565-11-3-B(*ge*)’杂交及自交,收获 F₁ 和 F₂ 种子,剥去颖壳,直接观察 F₁ 和 F₂ 糙米胚大小。

1.4 水稻巨胚基因的扩增及序列比对

使用 TPS 法^[18]微量提取‘超 2-10’、‘上师大 5 号’和‘M-2-565-11-3-B(*ge*)’3 种水稻苗期叶片总 DNA。在 rice genome annotation (<http://rice.plantbiology.msu.edu/analyses.shtml>)查找‘日本晴’水稻 LOC_Os07g41240 基因(NCBI 网站中为 Os07g0603700)序列,并截取该基因 CDS 区上下游分别延伸 3 kb 和 1 kb 的序列。利用 Primer Premier 5.0 软件,以该基因起始密码子 ATG 的 A 碱基为起点(+1 bp),在上游-2 649 bp 至下游+2 090 bp,分 4 段设计 4 对引物(表 1)。预测每个 PCR 扩增产物长度介于 1 333~1 563 bp 之间,每段 PCR 产物相互搭接至少大于 200 bp。使用高保真酶

表 1 水稻巨胚基因扩增所用引物
Table 1 Primers of *GE* gene of rice

引物序列(5'→3') Sequence of primer		退火温度 Annealing temperature/°C	延伸时间 Extension time/s	片段大小 Product length/bp
上游引物 Forward primer	下游引物 Reverse primer			
ATCGTCATCTGCCTTAC	GGATTTCAACGCCTGTC	50	50	1419
CACATTTTGTGCTTTCCTA	ATAGCGTAATCAAAGGGTCA	52	45	1333
TACTCCCTTCCCTCTGGTT	CCGTGTCCGTCCTCTA	55	55	1563
TCACCGAAGGGTACGACC	TGACAGCCAACCTGGAGAAATA	54	50	1393

KOD(KOD-101, TOYOBO),以‘超 2-10’、‘上师大 5 号’和‘M-2-565-11-3-B(ge)’水稻叶片总 DNA 为模板,进行 PCR 扩增。采用 50 μ L PCR 反应体系, ddH₂O 32 μ L, 10 \times Buffer 5 μ L, dNTP(2 mmol/L) 5 μ L, MgSO₄ 3 μ L, 10 μ mol \cdot L⁻¹ 的上下游引物各 1.5 μ L, KOD 酶 1 μ L, 模板 1 μ L。PCR 程序为:94 $^{\circ}$ C 预变性 2 min;94 $^{\circ}$ C 变性 15 s, 50~55 $^{\circ}$ C 退火(不同片段扩增采用不同的退火温度,表 1)30 s, 68 $^{\circ}$ C 延伸 45~55 s(不同片段扩增采用不同的延伸时间,表 1),35 个循环;最后 68 $^{\circ}$ C 充分延伸 5 min。PCR 产物进行 1.2% 琼脂糖凝胶电泳检测。回收预期分子量正确(表 1)的目的条带,送上海华大基因公司测序。使用 DNAMAN 软件对 3 种水稻 Os07g0603700 基因测序结果进行拼接和比对,以‘日本晴’水稻的 Os07g0603700 基因序列为对照进行比较分析。

1.5 水稻巨胚基因表达分析

分别取‘日本晴’、‘超 2-10’和‘上师大 5 号’3 种水稻开花后 4~7 d 的幼嫩种子, -80 $^{\circ}$ C 冷冻保存。剥去 3 种水稻幼嫩种子颖壳,用 Trizol (Cat. No. 15596-026, Invitrogen) 试剂提取颖果总 RNA。采用反转录试剂盒 (DRR047A, TAKARA) 进行基因组 DNA 消化和 cDNA 合成,用实时荧光定量 RT-PCR 法检测 3 种水稻 Os07g0603700 基因的相对表达量 (PCR 仪为 Bio-Rad 公司产品,美国)。Os07g0603700 和内参 *actin* 基因引物以及扩增反应程序参照 Wang 等^[5] 的报道。每种样品都做 3 个生物学重复。基因相对表达量以 2 ^{Δ CT} 表示。

表 2 ‘超 2-10’与‘上师大 5 号’糙米及胚性状比较

Table 2 Comparison on the brown rice and embryo characters of ‘Shangshida No. 5’ and ‘Chao2-10’

水稻品种 Rice cultivar	百粒糙米重 100-brown rice weight/g	百粒胚重 100-embryo weight/g	胚与糙米质量比 Mass ratio of embryo to brown rice/%
超 2-10 Chao2-10	2.18 \pm 0.01A	0.12 \pm 0.01B	5.50 \pm 0.46B
上师大 5 号 Shangshida No. 5	1.88 \pm 0.01B	0.26 \pm 0.02A	13.83 \pm 0.84A

注:表中数据为平均值 \pm 标准差(n=3)。同列中不同的大写字母表示品种间存在极显著性差异(P<0.01)。

Note: Values are the mean \pm SD of three analyses (n = 3). Different capital letters in the same column indicate significant difference (P < 0.01) between ‘Shangshida No. 5’ and ‘Chao2-10’ rice.

2 结果与分析

2.1 ‘上师大 5 号’和‘超 2-10’糙米及胚性状考察

分析‘上师大 5 号’和‘超 2-10’的糙米及胚性状。结果(表 2)显示,‘上师大 5 号’平均百粒胚重和胚与糙米质量比值分别为 0.26g 和 13.83%, 都极显著高于‘超 2-10’(0.12 g 和 5.50%)。

体式显微镜对‘上师大 5 号’、‘超 2-10’、‘M-2-565-11-3-B(ge)’和‘日本晴’水稻糙米拍照结果(图 1)显示,‘上师大 5 号’的胚远远大于‘超 2-10’和‘日本晴’;‘M-2-565-11-3-B(ge)’水稻胚虽显著大于‘超 2-10’和‘日本晴’,但小于‘上师大 5 号’;2 种正常胚水稻中,‘超 2-10’胚大于‘日本晴’。

2.2 ‘上师大 5 号’巨胚性状遗传分析

观察‘上师大 5 号’分别与‘超 2-10’、‘261S’和‘IRAT109’3 种小胚水稻杂交的 F₁ 种子,发现所有 F₁ 种子均表现小胚。从 3 个杂交组合中各取 1 棵 F₁ 植株,观察其 F₁ 植株自交获得的 F₂ 种子,将



图 1 4 种水稻糙米比较

1. 日本晴;2. 超 2-10;3. 上师大 5 号;4. M-2-565-11-3-B(ge)

Fig. 1 Comparison of four kinds of brown rice

1. Nipponbare;2. Chao 2-10;3. Shangshida No. 5;
4. M-2-565-11-3-B(ge)

胚大小与‘上师大5号’相似的定为巨胚,其余为小胚。3个杂交组合 F_2 种子小胚/巨胚种子数分别为 729/239、246/69 和 719/250,3组杂交 F_2 代种子中小胚与巨胚种子的分离比 χ^2 检测均符合 3:1。将‘261S’×‘上师大5号’ F_1 植株与‘261S’回交,收获的 F_1 种子都为小胚性状。但是观察回交 F_1 植株所结种子发现,完全结小胚种子的植株数和含有巨胚与小胚分离的植株数分别为 24 和 26。采用 χ^2 检测回交结果符合 1:1 分离比。通过杂交及回交分析,说明‘上师大5号’巨胚性状是受 1 对隐性单基因控制。

将巨胚水稻‘上师大5号’与‘M-2-565-11-3-B(ge)’水稻进行正反杂交,收获的 F_1 种子均为巨胚表型,而且自交后代种子都是巨胚表型。由此表明,‘上师大5号’与‘M-2-565-11-3-B(ge)’水稻中的巨胚基因属于相同等位基因突变。

2.3 水稻巨胚基因序列分析

为了解‘上师大5号’巨胚基因 *GE* 是否属于目前已报道的 *Os07g0603700* 巨胚基因突变,扩增和测序了‘上师大5号’以及对照‘超2-10’的 *Os07g0603700* 巨胚基因序列,并与‘日本晴’*Os07g0603700* 基因序列进行比较。

以 *Os07g0603700* 巨胚基因起始密码子第一个腺嘌呤脱氧核苷酸(A)为+1 bp,从上游-2 570 bp 至下游 +1 990 bp,‘超2-10’的 *Os07g0603700* 基

因序列与‘日本晴’水稻仅在启动子-777 与-778 之间有 1 个腺嘌呤脱氧核苷酸(A)的插入,其他序列都相同;‘超2-10’与‘上师大5号’的 *Os07g0603700* 基因序列,仅在‘上师大5号’第一外显子+125 bp 处的 G 突变为 A。

杂交试验检测显示,‘上师大5号’与‘M-2-565-11-3-B(ge)’的巨胚基因为等位基因。比较分析‘日本晴’和‘M-2-565-11-3-B(ge)’的 *Os07g0603700* 基因序列,发现‘M-2-565-11-3-B(ge)’在起始密码子第一个腺嘌呤脱氧核苷酸(A)+1bp 至上游-2 570 bp 之间的序列与‘日本晴’水稻完全相同,而在起始密码子第一个腺嘌呤脱氧核苷酸(A)+1 bp 至下游 +1 990 bp 之间的序列中,位于第二外显子+1 260 处的碱基由 G 突变为 A,其他序列都与‘日本晴’水稻相同。目前,已明确突变位点的各个 *GE* 等位基因及本研究分析的 2 种巨胚水稻 *GE* 等位基因,在编码链上脱氧核苷酸突变引起氨基酸前后种类变化以及氨基酸发生改变的位置主要分布在 *Os07g0603700* 基因前 2 个区域中(图 2)。

2.4 水稻巨胚基因 RT-PCR 分析

采用定量 RT-PCR 分析‘日本晴’、‘超2-10’和‘上师大5号’在开花后 4~7 d 幼嫩颖果中 *Os07g0603700* 巨胚基因表达,发现 *Os07g0603700* 基因在‘日本晴’中表达量都非常低,在‘超2-10’开花后 4 和 5d 的幼嫩颖果中表达量非常低,但在开

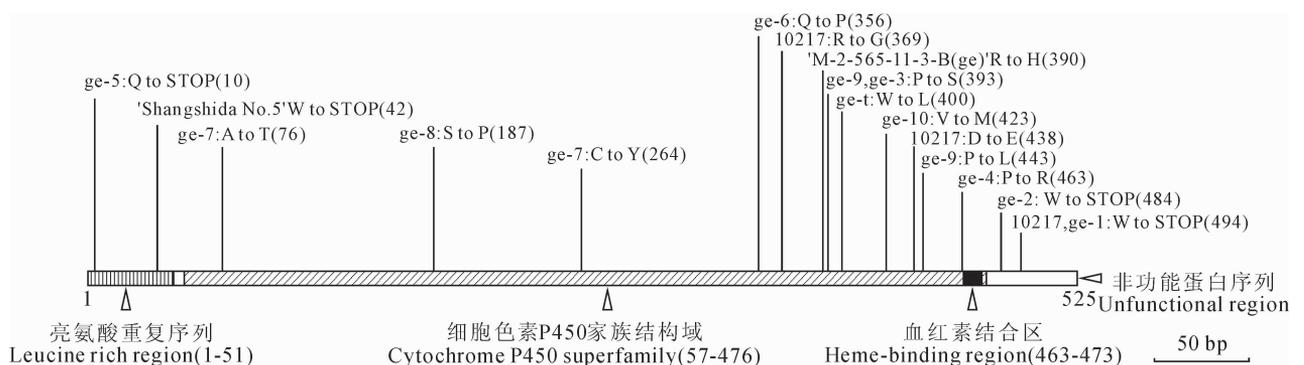


图 2 *GE* 各等位基因编码蛋白的氨基酸突变种类及位点

Q to STOP. 谷氨酰胺突变为翻译终止;W to STOP. 色氨酸突变为翻译终止;A to T. 丙氨酸突变为苏氨酸;S to P. 丝氨酸突变为脯氨酸;C to Y. 半胱氨酸突变为酪氨酸;Q to P. 谷氨酰胺突变为脯氨酸;R to G. 精氨酸突变为甘氨酸;R to H. 精氨酸突变为组氨酸;P to S. 脯氨酸突变为丝氨酸;W to L. 色氨酸突变为亮氨酸;V to M. 缬氨酸突变为甲硫氨酸;D to E. 天冬氨酸突变为谷氨酸;P to L. 脯氨酸突变为亮氨酸;P to R. 脯氨酸突变为精氨酸

Fig. 2 Mutation point on proteins of different *GE* alleles

Q to STOP. Glutamine mutates into stop codon;W to STOP. Tryptophane mutates into stop codon;A to T. Alanine mutates into Threonine;S to P. Serine mutates into Proline;C to Y. Cysteine mutates into Tyrosine;Q to P. Glutamine mutates into Proline;R to G. Arginine mutates into Glycine;R to H. Arginine mutates into Histidine;P to S. Proline mutates into Serine;W to L. Tryptophane mutates into Leucine;V to M. Valine mutates into Methionine;D to E. Aspartic mutates into Glutamic;P to L. Proline mutates into Leucine;P to R. Proline mutates into Arginine

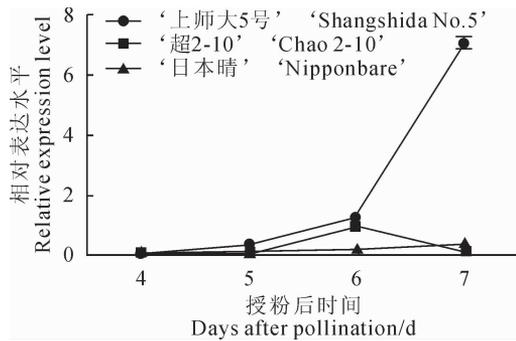


图3 水稻幼嫩颖果巨胚基因的相对表达

Fig. 3 Expression analysis of Os07g0603700 gene in young caryopses

花后6 d时,表达量增加,在开花后7 d时,表达量又非常低;而在‘上师大5号’开花后4~6 d的幼嫩颖果中,Os07g0603700巨胚基因表达模式与‘超2-10’相似,但在开花后7 d的表达量增加(图3)。

3 讨论

目前已报道的巨胚等位基因有十多个,但是这些等位基因都是位于Os07g0603700基因编码区的突变。与正常小胚水稻‘日本晴’比较,‘超2-10’的GE基因启动子具有一个脱氧核苷酸插入突变,同时胚体积大于‘日本晴’水稻。与前人报道比较,‘超2-10’胚重不仅明显超过已报道的小胚水稻,而且接近甚至超过了部分巨胚水稻品种^[4,6,19-21]。相对于‘上师大5号’而言,虽然我们将‘超2-10’称为小胚水稻,但与前人文献比较显示,‘超2-10’实际上应该属于巨胚水稻,只是它的胚体积和胚重增大程度不如有些编码链突变位点的巨胚水稻明显。韩国的‘M-2-565-11-3-B(ge)’巨胚水稻已有文献报道^[2],本研究进一步报道了其GE基因序列。研究结果显示,引起‘上师大5号’和‘M-2-565-11-3-B(ge)’2种水稻巨胚表型的GE基因都属于Os07g0603700基因突变,并且都属于新的Os07g0603700等位基因,可分别用 ge^h 和 ge^c 表示。本研究还报道了1个属于启动子突变类型的GE等位基因,用 ge^p 表示。‘上师大5号’中的 ge^c 基因是在 ge^p 基础上的再次突变,属于编码链和启动子都有突变的等位基因类型。与前人报道比较,‘上师大5号’的胚重几乎超过了目前已报道的所有巨胚水稻^[1,3,4,6,7,19-21]。

在启动子上一些特定的脱氧核苷酸序列还可能作为调控基因表达的重要顺式作用元件^[22-24]。本研究利用PlantCARE网站(<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>)对‘超2-10’及‘上师大5号’编码链上游-2570~-1 bp序

列进行启动子元件分析,在这2种水稻启动子的突变位点上没有预测到顺式作用元件的存在。

虽然在启动子上有些调控元件序列及功能目前可能并未被发现,但是通过对序列有突变的个体进行基因表达分析,从而会使人们对启动子上某些或某个脱氧核苷酸的作用有了新的认识。目前有研究显示,Os07g0603700基因呈反调控模式,巨胚突变体表达量明显高于正常的小胚水稻^[5,13]。与‘日本晴’水稻比较,在Os07g0603700基因启动子存在相同突变的‘超2-10’和‘上师大5号’两种水稻,在种子发育5~6 d,它们Os07g0603700基因的表达模式相同,都有表达上调的现象。由此推测,位于Os07g0603700基因启动子上游-777 bp和-778 bp之间插入腺嘌呤脱氧核苷酸后,对该基因的表达发挥了一定的作用。对于有些基因,如果在启动子上和编码链特定位点都出现脱氧核苷酸突变,有可能使该基因的表达产生一种新的表达模式。Nagasawa等分析了具有 $ge-10$ 巨胚等位基因水稻发育早期颖果中的Os07g0603700基因表达,结果发现,从开花4~7 d, $ge-10$ 巨胚等位基因的表达量呈现连续下降的趋势^[13]。本研究发现,对于启动子在-777 bp与-778 bp之间具有腺嘌呤脱氧核苷酸插入突变以及编码链+125脱氧核苷酸由G突变为A的 ge^c 巨胚等位基因,从开花4~7 d,其表达量呈现连续上调的趋势,完全不同于 $ge-10$ 等位基因。

CYP78B5蛋白具有一些结构比较保守的结构域^[15],如N端的亮氨酸富集区,它与膜定位有关^[25];P450家族结构域,包含一个非常保守的氧结合位点来行使单加氧功能;血红素结合区,与Fe结合从而行使酶催化功能。与其他GE等位基因突变位点比较,发现‘上师大5号’的突变位点导致蛋白翻译在第41个氨基酸处被提前终止,只具有一个不完整亮氨酸富集区,后面的细胞色素P450结构域和血红素结合区完全丢失。而目前报道的所有突变位点除 $ge-5$ 在亮氨酸富集区提前终止之外,其他GE等位基因都是在细胞色素P450家族保守结构域序列中出现单个氨基酸的替换,或在保守结构域之后翻译提前终止。Nagasawa等发现,在相同遗传背景下,巨胚基因合成蛋白功能受损程度,以及突变位点所在基因结构域的保守程度都与胚大小性状关系密切,如在Kinmaze水稻背景下 $ge-5$ 等位基因的水稻胚大于 $ge-1$ 和 $ge-4$ 等位基因的水稻胚;在Taichung水稻背景下, $ge-9$ 等位基因水稻的胚大于其他等位基因导致的巨胚表型^[13]。在‘上师大5

号’中被发现的 ge^e 等位基因,不仅在编码链最上游存在突变,由此表明, ge^e 等位基因是一个更具巨胚的亮氨酸富集区发生了突变,而且在启动子区域也潜力的优良巨胚等位基因。

致谢:本研究使用的韩国‘M-2-565-11-3-B(ge)’巨胚水稻由上海市农业科学研究所朴钟泽研究员提供,‘261S’和早稻‘IRAT109’分别由上海市闵行区农科所陆文龙高级农艺师和上海师范大学董彦君教授提供。特此致谢。

参考文献:

- [1] SEO W D, KIM J Y, PARK D-S, *et al.* Comparative analysis of physico-chemicals and antioxidative properties of new giant embryo mutant, yr23517acp79, in rice (*Oryza sativa* L.) [J]. *Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry*, 2011, **54**(5): 700–709.
- [2] PU ZH Z(朴钟泽), ZHANG J M(张建明), LU J A(陆家安), *et al.* The breeding and application of a new variety of functional rice named giant embryo japonic No. 1 [J]. *China Rice* (中国稻米), 2009, **15**(3): 34–35 (in Chinese).
- [3] PARK D S, PARK S K, LEE B C, *et al.* Molecular characterization and physico-chemical analysis of a new giant embryo mutant allele (ge^e) in rice (*Oryza sativa* L.) [J]. *Genes & Genomics*, 2009, **31**(4): 277–282.
- [4] ZHANG L L, HU P S, TANG S Q, *et al.* Comparative studies on major nutritional components of rice with a giant embryo and a normal embryo [J]. *Journal of Food Biochemistry*, 2005, **29**(6): 653–661.
- [5] WANG X, SONG Y E, LI J Y. High expression of tocochromanol biosynthesis genes increases the vitamin E level in a new line of giant embryo rice [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2013, **61**(24): 5 860–5 869.
- [6] JENG T L, SHIH Y J, HO P T, *et al.* Gamma-oryzanol, tocopherol and mineral compositions in different grain fractions of giant embryo rice mutants [J]. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2012, **92**(7): 1 468–1 474.
- [7] ZHANG L L, SHU X L, WANG X Y, *et al.* Characterization of indica-type giant embryo mutant rice enriched with nutritional components [J]. *Cereal Research Communications*, 2007, **35**(3): 1 459–1 468.
- [8] SATOH H, OMURA T. New endosperm mutations induced by chemical mutagens in rice (*Oryza sativa* L.) [J]. *Japanese Journal of Breeding*, 1981, **31**(3): 316–326.
- [9] QIAN Q, XIONG Z M, MIN S K, *et al.* The RFLP of tagging of giant embryo gene [J]. *Rice Science*, 1995, **10**(2): 65–67.
- [10] ZHANG S B(张所兵), QIN G J(秦根基), *et al.* Molecular characterization and development of molecular marker of a new giant embryo allele (ge) in rice (*Oryza sativa* L.) [J]. *Molecular Plant Breeding* (分子植物育种), 2011, **9**(5): 525–530 (in Chinese).
- [11] KOH H J, HEU M H, MCCOY S R. Molecular mapping of the ge^a gene controlling the super-giant embryo character in rice (*Oryza sativa* L.) [J]. *Theoretical and Applied Genetics*, 1996, **93**(1–2): 257–261.
- [12] CAHOON R E, HEPPARD E P, *et al.* Alteration of embryo/endosperm size during seed development, US Patent 20,030,126,645 [P]. 2003–07–03
- [13] NAGASAWA N, HIBARA K I, HEPPARD E P, *et al.* Giant embryo encodes CYP78A13, required for proper size balance between embryo and endosperm in rice [J]. *The Plant Journal*, 2013, **75**(4): 592–605.
- [14] YANG W B, GAO M J, YIN X, *et al.* Control of rice embryo development, shoot apical meristem maintenance, and grain yield by a novel cytochrome P450 [J]. *Molecular Plant*, 2013, **6**(6): 1 945–1 960.
- [15] CHEN Y L, LIU L L, SHEN Y Y, *et al.* Loss of function of the cytochrome P450 gene CYP78B5 causes giant embryos in rice [J]. *Plant Molecular Biology Reporter*, 2015, **33**(1): 69–83.
- [16] REN Y G(任永刚), ZHANG J ZH(张建中), ZHANG H M(张红梅), *et al.* A new mutants for rice giant embryo induced through *in vitro* culture of mature embryos and analyses of its characters and grain qualities [J]. *Journal of Shanghai Normal University* (Natural Sciences) (上海师范大学学报·自然科学版), 2011, **40**(3): 289–294 (in Chinese).
- [17] ZHU Y D(朱映东), SHI Y Q(石亚琼), *et al.* Development of aromatic giant-embryo rice by molecular marker-assisted selection [J]. *Journal of Shanghai Normal University* (Nat. Sci. Ed.) (上海师范大学学报·自然科学版), 2013, **42**(6): 623–628 (in Chinese).
- [18] MIURA K, YAMAMOTO E, MORINAKA Y, *et al.* The hybrid breakdown 1(t) locus induces interspecific hybrid breakdown between rice *Oryza sativa* cv. *koshihikari* and its wild relative *O. nivara* [J]. *Breeding Science*, 2008, **58**(2): 99–105.
- [19] ZHAO Z SH(赵则胜), JIANG J Y(蒋家云). Preliminary study on high-nutritive and functional large-embryo rice [J]. *Acta Agriculturae Shanghai* (上海农业学报), 2002, **18**(B12): 5–8 (in Chinese).
- [20] ZHANG Q Q(章清杞), YANG Y L(杨艳荔), LI Y(李毓), *et al.* Development of giant embryo CMS line TgeA [J]. *Journal of Nuclear Agricultural Sciences* (核农学报), 2003, **17**(4): 245–248 (in Chinese).
- [21] LIU L L(刘玲珑), JIANG L(江玲), LIU SH J(刘世家), *et al.* Accumulation of the γ -aminobutyric acid in brown rice—a new rice strain W025 with giant-embryo during water soaking [J]. *Acta Agronomica Sinica* (作物学报), 2006, **31**(10): 1 265–1 270 (in Chinese).
- [22] JETHA K, GUNTER T, RAINER M. Arabidopsis *SEPALLATA* proteins differ in cooperative DNA-binding during the formation of floral quartet-like complexes [J]. *Nucleic Acids Research*, 2014, **42**(17): 10 927–10 942.
- [23] BEHRINGER C, BASTAKIS E, RANFTL Q L, *et al.* Functional diversification within the family of B-GATA transcription factors through the leucine-leucine-methionine domain [J]. *Plant Physiology*, 2014, **166**(1): 293–305.
- [24] KAUMANN K, MUINO J M, JAUREGUI R, *et al.* Target genes of the MADS transcription factor *SEPALLATA3*: Integration of developmental and hormonal pathways in the arabidopsis flower [J]. *PLoS Biology*, 2009, **7**(4): 854–875.
- [25] ZONDLO S C, IRISH V F. CYP78A5 encodes a cytochrome P450 that marks the shoot apical meristem boundary in *Arabidopsis* [J]. *The Plant Journal*, 1999, **19**(3): 259–268.

(编辑: 宋亚珍)