



一个新的*OsBRI1*弱等位突变体的鉴定及其调控种子大小的功能研究

管柳蓉^{1,2}, 刘祖培^{2,3}, 徐冉², 段朋根², 张国政^{2,3}, 于海跃^{2,3}
李静^{2,3}, 罗越华^{1*}, 李云海^{2*}

¹海南大学热带作物学院, 海南省热带生物资源可持续利用重点实验室, 海口 570228; ²中国科学院遗传与发育生物学研究所, 植物细胞与染色体工程国家重点实验室, 北京 100101; ³中国科学院大学, 北京 100039

摘要 水稻(*Oryza sativa*)籽粒大小是影响其产量的关键农艺性状, 克隆并研究水稻籽粒大小相关基因对于提高水稻产量具有重要意义。为深入探究水稻籽粒大小的调控机制, 通过EMS诱变品种宽叶梗(KYJ), 分离了一系列水稻籽粒大小改变的突变体, 其中*smg12*表现为籽粒变小, 株高变矮, 一级枝梗数和二级枝梗数减少。遗传分析表明, 该小粒突变体受隐性单基因控制。细胞学分析显示, 该突变体颖壳纵向细胞长度显著变短, 表明*SMG12*主要影响细胞扩展。利用Mutmap方法对候选基因进行克隆, 筛选出*SMG12*的候选基因*OsBRI1*, 该基因编码油菜素内酯受体激酶。*OsBRI1*外显子上的第2 074个碱基发生了由C到T的置换, 产生非同义突变, 使得该位置编码的脯氨酸变为丝氨酸, 从而影响*OsBRI1*的功能。综上, 该研究鉴定了*OsBRI1*基因的1个新等位变异, 揭示了油菜素内酯途径调控水稻籽粒大小的细胞和分子基础。

关键词 水稻, 籽粒大小, 细胞扩展, Mutmap, *OsBRI1*

管柳蓉, 刘祖培, 徐冉, 段朋根, 张国政, 于海跃, 李静, 罗越华, 李云海 (2020). 一个新的*OsBRI1*弱等位突变体的鉴定及其调控种子大小的功能研究. 植物学报 55, 279–286.

水稻(*Oryza sativa*)作为最重要的谷物粮食之一, 是全世界超过一半人口的主要食物来源。然而, 现阶段人口和粮食需求不断增加, 使农业面临巨大挑战, 且随着可利用土地面积和自然资源逐渐减少, 需要提高作物的生产效率, 其中增加单位面积产量尤为重要(Li et al., 2018)。高等植物的种子由胚、胚乳和种皮三部分组成, 它们分别由受精卵、受精卵中心细胞和母体细胞发育而来, 共同协调控制种子大小。水稻胚乳占据成熟种子大部分空间, 主要成分为淀粉, 是人类的主要食物来源, 也是决定粮食重量的直接因素(James et al., 2003; Zhou et al., 2013)。影响水稻产量的主要因素是单位面积有效穗数、每穗粒数、千粒重和灌浆速率(Sakamoto and Matsuoka, 2008; Xing and Zhang, 2010)。粒重受水稻籽粒宽度、长度和粒厚协调控制, 说明水稻籽粒大小与产量息息相关。在单子叶植物水稻中, 籽粒长在颖壳内且籽粒大小受颖壳限制

(Song et al., 2007; Shomura et al., 2008)。籽粒大小受颖壳细胞数目和细胞大小调控, 细胞数目主要通过细胞增殖改变, 细胞大小受细胞扩展影响。近年来, 与水稻籽粒大小相关的基因逐渐被克隆, 其中一些基因对于提高水稻产量具有重要意义(宫李辉等, 2011)。

目前的研究已经揭示了多条调控水稻籽粒大小的信号途径, 包括泛素蛋白酶体途径、G蛋白信号途径、丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)途径、转录调控因子及植物激素等(Zuo and Li, 2014; Li et al., 2019)。控制粒宽和粒重的基因*GW2*编码1个E3泛素连接酶, 负向调控细胞分裂。*GW2*功能的丧失导致颖壳细胞数目增加, 产生更大更宽的颖壳并加快灌浆速率, 从而使籽粒更宽更重, 产量更高(Song et al., 2007)。*GS3*编码异源三聚体G蛋白的G γ 亚基, 是植物籽粒大小和器官大小的负调控因子。野生型等位基因对应中等大小籽粒, N

收稿日期: 2019-12-25; 接受日期: 2020-03-23

基金项目: 国家自然科学基金(No.31960421)

* 通讯作者。E-mail: yhlh@genetics.ac.cn; lyhkh@163.com

端OSR (organ size regulation)结构域功能缺失突变体籽粒变长,而C端的TNFR (tumor necrosis factor receptor)/NGFR (nerve growth factor receptor)和VWFC (von Willebrand factor type C)结构域对OSR结构域的功能有抑制作用,C端结构域功能缺失则会产生非常短的籽粒(Fan et al., 2006; Mao et al., 2010)。丝裂原活化蛋白激酶信号通路在真核生物中的作用非常保守,且与植物生长发育以及防御反应的多个过程相关(Meng and Zhang, 2013)。MAPK途径组成包括MAPK激酶激酶(MKKK)、MAPK激酶(MKK)和MAPK,这3种激酶依次激活控制下游基因的表达,调控植物生长发育。水稻OsMKKK10、OsMKK4和OsMAPK6作为1个级联信号通路促进细胞增殖,从而正向调控水稻籽粒大小和粒重(Xu et al., 2018b)。其功能缺失突变体*osmkkk10*、*osmkk4*和*osmapk6*由于颖壳细胞增殖过程受到限制,导致籽粒变小(Liu et al., 2015b; Xu et al., 2018a, 2018b)。OsSPL16编码1种细胞增殖的正调控蛋白,过表达该基因会促进细胞分裂和灌浆,使水稻籽粒变宽,产量增加(Wang et al., 2012)。水稻中重要的数量位点GLW7编码植物特异性转录因子OsSPL13,通过正向调控颖壳细胞大小提高籽粒长度和产量(Si et al., 2016)。植物激素对种子发育有重要作用并直接影响籽粒大小。BG1是正向调控籽粒大小的膜蛋白,有研究显示BG1能够响应生长素变化,且与生长素转运过程相关,表明其可能通过生长素信号来调控籽粒生长。BG1的激活促进细胞扩展,从而增加籽粒大小和粒重,而BG1的表达被抑制时会形成小的籽粒(Liu et al., 2015a)。近年来,油菜素内酯对种子发育的调控机制已经在水稻、拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)及其它植物中进行了深入研究。油菜素内酯对株高、叶夹角、分蘖数、籽粒大小和产量都有不同程度的影响(Morinaka et al., 2006)。水稻中油菜素内酯受体基因D61的突变和油菜素内酯信号的负调控基因GSK2的过表达植株都会产生更小的籽粒(Tanabe et al., 2005; Tong et al., 2012)。BU1编码1个具有螺旋-环-螺旋结构的转录因子,作为响应油菜素内酯信号的正调控因子作用于D61基因的下游,BU1基因过表达导致水稻籽粒变大(Tanaka et al., 2009)。上述结果表明,籽粒大小调控是非常复杂的过程,涉及多种信号转导以及生化代谢途径。

为深入研究水稻籽粒大小的调控机制,我们在品种宽叶粳(KYJ)背景下筛选到1个小粒突变体*smg12*。利用Mutmap方法对*smg12*的候选基因进行克隆(Abe et al., 2012; Takagi et al., 2015),鉴定到候选基因为OsBRI1。

1 材料与方法

1.1 材料

以水稻宽叶粳(*Oryza sativa* L. subsp. *japonica*) KYJ为原始材料,经过甲基磺酸乙酯(ethyl-methanesulphonate, EMS)诱变后获得一系列水稻籽粒大小改变的突变体。其中小粒突变体*smg12*表现为籽粒变小,株高变矮,一级枝梗数和二级枝梗数减少(图1A, B)。本研究用水稻材料均种植于海南陵水农场和浙江省富阳市中国水稻研究所试验基地。

1.2 方法

1.2.1 表型和基本农艺性状调查

在水稻成熟期选取野生型和突变体植株各24株,测量株高并统计其主穗一级枝梗数和二级枝梗数。取主穗上相同位置饱满均匀的种子60粒,使用万深SC-G型自动考种分析仪(杭州万深检测科技有限公司)测量其长和宽。选取成熟期饱满均匀的野生型和小粒突变体种子各1 000粒,均取10组重复,称量并统计其千粒重。上述统计数据均进行t检验。

1.2.2 遗传分析

将突变体*smg12*与野生型KYJ杂交,获得F₁群体。F₁自交构建F₂分离群体。抽穗期以后观察F₂代分离群体植株的籽粒大小变化情况,统计野生型表型和小粒表型的植株数目,并进行卡方检验。

1.2.3 扫描电镜观察

收集成熟期种子,分别选取野生型和小粒突变体主穗相同位置饱满均匀的种子各12粒。将样品置于65°C烘箱中干燥2天,以去除种子中多余的水分。然后进行粘台,镀膜,在冷冻扫描电镜(HITACHI S-3000N, 日本; Quorum PP3000T, 英国)下观察,并选取合适的角度和放大倍数进行观察和拍照。最后,统计野生型和小粒突变体籽粒颖壳的横向与纵向细胞数目以

及大小, 并进行 *t* 检验。

1.2.4 使用Mutmap方法筛选候选基因

本研究采用Mutmap方法对候选基因进行克隆(Abe et al., 2012; Takagi et al., 2015)。将小粒突变体*smg12*与野生型KYJ杂交获得F₁, F₁自交获得F₂分离群体。在抽穗期以后取50株小粒矮秆表型植株的叶片, 等重量叶片混合后提取DNA并进行全基因组重测序, 并以F₂代中与野生型表型相似的50株植株作为对照进行基因组重测序, 然后进行SNP分析。

1.2.5 候选基因的鉴定

利用网站(<http://helix.wustl.edu/dcaps/dcaps.html>)设计合适的dCAPS (derived Cleaved Amplified Poly-

morphism Sequences)标记, 在网站中导入野生型和突变体序列, 分析突变位点, 找到合适的酶切位点和限制性内切酶, 然后设计合适的上下游引物, 扩增目的片段。该dCAPS标记(表1)可用于突变位点的验证以及目的基因的连锁分析。

2 结果与讨论

2.1 突变体*smg12*的形态

取成熟期的水稻种子, 对野生型和突变体*smg12*的基本表型进行测量统计(图1A–H)。结果表明, 与野生型KYJ相比, 突变体*smg12*的籽粒宽度无显著变化(突变体和野生型的籽粒宽度均为0.33 cm) (图1C)。突变体*smg12*的籽粒平均长度为0.62 cm, 野生型KYJ的平

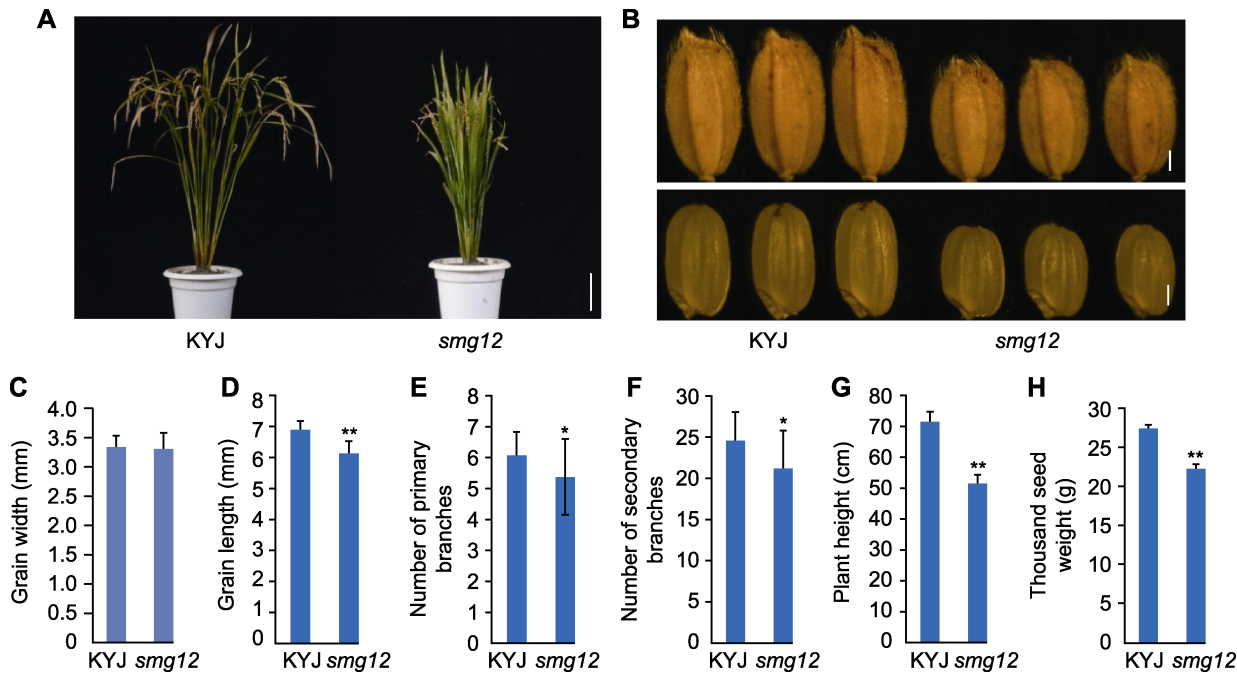


图1 水稻突变体*smg12*的表型分析 (A) KYJ (野生型)和*smg12*突变体表型(Bar=10 cm); (B) KYJ和*smg12*的籽粒(Bar=1 cm); (C) 粒宽; (D) 粒长; (E) 一级枝梗数; (F) 二级枝梗数; (G) 株高; (H) 千粒重。显著性分析采用*t*检验, * 表示差异显著($P<0.05$), ** 表示差异极显著($P<0.01$)。

Figure 1 Analysis of rice *smg12* mutant phenotypes (A) KYJ (wild type) and *smg12* mutant phenotype (Bar=10 cm); (B) Grains of KYJ and *smg12* (Bars=1 cm); (C) Grain width; (D) Grain length; (E) Number of primary branches; (F) Number of secondary branches; (G) Plant height; (H) Thousand seed weight. Significance is determined using *t*-test, * indicates significant differences at $P<0.05$, ** indicates significant differences at $P<0.01$.

表1 用于dCAPS分析的引物和酶

Table 1 Primer and enzyme for dCAPS analysis

Primer name	Primer sequence (5'→3')	DNA fragment length (bp)	Enzyme
<i>smg12-1</i>	CTTTCTCGGCACTTTCCTTG CTATGGTCACATGGTGGCGGTG	154	<i>HphI</i>

均籽粒长度为0.69 cm, 即突变体的籽粒长度是野生型的89.9% ($P<0.01$) (图1D)。突变体籽粒表现为扁圆形。

除了籽粒大小差异, 突变体*smg12*和野生型KYJ的其它农艺性状也有显著差异。突变体的一级枝梗数和二级枝梗数分别为5和21, 而野生型的一级枝梗数和二级枝梗数分别为6和25, 即突变体*smg12*的一级枝梗数和二级枝梗数分别只有野生型的83%和84% (图1E, F)。突变体*smg12*平均株高为51.6 cm, 而野生型的平均株高为71.6 cm, 突变体株高为野生型的72%, 且差异极显著(图1G)。相较于野生型KYJ, 突变体*smg12*的千粒重极显著性降低, 仅为野生型的82% (图1H)。

2.2 SMG12对细胞大小的影响

在水稻中, 颖壳大小通常决定籽粒大小, 而颖壳的大小由颖壳细胞大小和细胞数目协调控制。我们利用扫描电镜观察并统计了野生型KYJ和突变体*smg12*的颖壳细胞大小和数目。结果显示, 突变体*smg12*与野生型KYJ颖壳的纵向和横向细胞数目无显著差异(图2A, B), 但突变体纵向细胞长度极显著低于野生型(图2C)。突变体*smg12*的单个细胞长度为野生型的88.7%, 但横向细胞宽度与野生型无显著差异(图2D)。由此表明, 突变体*smg12*籽粒变短与颖壳细胞变小有直接关系, *SMG12*主要通过控制颖壳细胞的大小影响籽粒大小(图2E)。

2.3 突变体*smg12*的遗传特性

为了探究*smg12*的遗传特性, 我们将*smg12*与野生型KYJ杂交, 考察F₁代籽粒大小, 结果表明F₁代均表现为野生型表型。F₁自交构建F₂代分离群体, F₂代表型发生分离。待种子成熟后, 考察F₂分离群体中籽粒大小的变化情况, 并统计野生型KYJ大粒单株数 and *smg12*小粒单株数。结果显示, F₂群体中大粒植株和小粒植株数目的比例接近3:1。卡方适合度检验($\chi^2_{0.05,1}=3.84$)进一步表明, *smg12*的表型由单一隐性基因控制(表2)。

表2 水稻突变体*smg12*的遗传分析

Table 2 Genetic analysis of the rice mutant *smg12*

Hybrid combinations	Phenotype of F ₁	F ₂ generation			$\chi^2_{3:1}$
		Wild-phenotypic plant number	Mutant-phenotypic plant number	Total number	
<i>smg12</i> /KYJ	Wild type	168	52	220	0.151

2.4 突变体*smg12*候选基因的克隆

我们利用Mutmap方法对突变体候选基因进行克隆(Abe et al., 2012; Takagi et al., 2015)。将野生型KYJ与突变体*smg12*杂交获得F₁代, F₁自交得F₂代, 从F₂群体中挑取50株小粒矮秆表型植株进行等量混池测序, 并且以F₂代中与野生型表型相似的50株植株作为对照进行基因组重测序, 然后进行SNP分析。结果显示, 在*smg12*突变体中共检测到7 761个混池特异

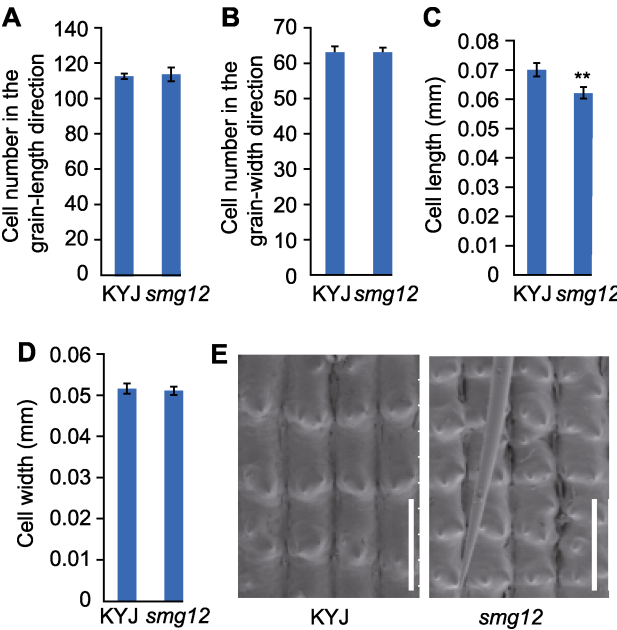


图2 *SMG12*调控水稻颖壳细胞大小

(A) 颖壳纵向细胞数目; (B) 颖壳横向细胞数目; (C) 颖壳单个细胞纵向长度; (D) 颖壳单个细胞横向宽度; (E) 细胞学分析图 (Bars=0.1 mm)。** 表示突变体与野生型之间差异极显著($P<0.01$)。

Figure 2 *SMG12* regulates cell size in grain hulls of rice (A) Outer epidermal cell number in the grain-length direction of the glume; (B) Outer epidermal cell number in the grain-width direction of the glume; (C) The longitudinal length of a single cell in the glume; (D) Transverse width of a single cell in the glume; (E) Cytological analysis diagram (Bars=0.1 mm). ** indicates extremely significant difference between the mutant and the wild type ($P<0.01$).

SNP, 其中SNP_index等于1的有12个(表3)。并且只有基因LOC_Os01g52050中的碱基突变造成氨基酸突变, 影响蛋白质编码。因此, 基因LOC_Os01g-52050为最佳候选基因。为了进一步验证smg12突变体的候选突变位点, 我们根据LOC_Os01g52050中的突变碱基设计dCAPS标记(表1)。利用该分子标记鉴定野生型KYJ和突变体smg12。结果显示, smg12能被相应内切酶正确切割而野生型KYJ不能被切开, 且F₂代群体中表型和基因型连锁, 与预期结果相同(图3A, B)。因此, 上述结果表明, smg12中确实存在C-T的突变。

在国家水稻数据中心网站(<http://www.ricedata.cn/>)上进行搜索, 发现该基因为*OsBRI1*, 编码油菜素内酯受体激酶, 包含跨膜结构域、亮氨酸富集结构域和蛋白激酶结构域。*OsBRI1*外显子上第2 074个碱基处发生了由C到T的置换, 产生非同义突变, 导致CDS在翻译过程中第692个氨基酸由脯氨酸(Pro)变为丝氨酸(Ser) (图3C, D)。因此, LOC_Os01g52050可能为smg12突变体的候选基因。

2.5 讨论

水稻是主要的谷物粮食作物, 提高水稻产量是育种学家的重要研究目标。水稻产量很大程度上与籽粒大小相关, 因此水稻籽粒大小相关基因的克隆和研究对于

提高水稻产量具有积极意义(Miura et al., 2011)。然而, 水稻籽粒大小调控是个非常复杂的过程, 受多种因素影响。为深入研究水稻籽粒大小调控机制, 本研究通过EMS诱变品种KYJ筛选得到1个小粒突变体smg12, 利用Mutmap方法鉴定出小粒突变体smg12的候选基因可能为*OsBRI1*。

*OsBRI1*编码1个由1 211个氨基酸残基组成的油菜素内酯受体激酶, 包含跨膜结构域、亮氨酸富集结构域和蛋白激酶结构域, 是拟南芥*BRI1*基因的直系同源基因。油菜素内酯在植物种子萌发、株高增加和生长发育等过程中都有重要作用(Zhang et al., 2014)。

水稻突变体d11株高变矮, 叶片直立, 籽粒变短但宽度无变化。研究发现D11基因编码1种新的细胞色素P450, 与油菜素内酯生物合成相关的几种酶的编码基因同源性很高, 且施加油菜素内酯能够恢复d11突变体的表型, 表明D11对于油菜素内酯的合成至关重要, 且油菜素内酯影响水稻籽粒大小(Tanabe et al., 2005)。在突变体d54中, *OsBRI1*编码区第2 500个碱基发生了由A到T的突变, 导致激酶结构域上该位置编码的异亮氨酸变为脯氨酸, 且*OsBRI1*激酶结构域上该位置编码的异亮氨酸作用非常保守, 因此这一突变使*OsBRI1*激酶活性急剧下降。突变体表现出植株半矮化和叶片直立的表型, 一级枝梗数和二级枝梗数减少, 且籽粒纵向长度缩短, 变得更圆更小

表3 smg12突变体的候选SNPs分析

Table 3 Analysis of the candidate SNPs for the smg12 mutant

Chromosomal position	Physical location (bp)	Genotype (KYJ/smg12)	Gene location	Gene locus name	Frequency of sequencing (KYJ/smg12)	Mutation type
Chr. 1	15686971	G/A	Upstream of the gene	LOC_Os01g28040	0/6	/
Chr. 1	27750517	G/A	In the gene compartment	LOC_Os01g48420; LOC_Os01g48430	0/12	/
Chr. 1	28534819	G/A	Upstream and downstream of the gene	LOC_Os01g49630; LOC_Os01g49614	0/14	/
Chr. 1	29397508	G/A	In the gene compartment	LOC_Os01g51140; LOC_Os01g51154	0/12	/
Chr. 1	29788896	G/A	Upstream of the gene	LOC_Os01g51810	0/17	/
Chr. 1	29929259	G/A	Exon	LOC_Os01g52050	0/19	Changes in amino acids
Chr. 1	33892012	T/A	Upstream of the gene	LOC_Os01g58620	0/1	/
Chr. 1	39503252	G/A	Downstream of the gene	LOC_Os01g67980	0/11	/
Chr. 1	30392222	G/A	Upstream of the gene	LOC_Os01g52840; LOC_Os01g52851	0/5	/
Chr. 1	33745383	G/A	Intron	LOC_Os01g58400	0/8	/
Chr. 3	19627588	C/A	Upstream of the gene	LOC_Os03g35390	0/6	/
Chr. 6	17710551	G/A	Intron	LOC_Os06g30610	0/8	/

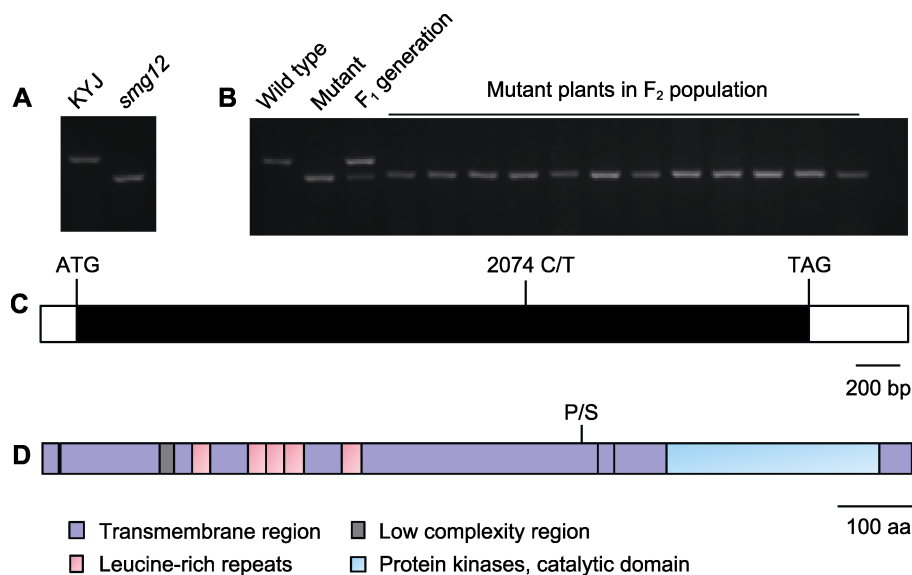


图3 候选基因的鉴定

(A) *smg12*突变的dCAPS标记验证; (B) 候选基因*LOC_Os01g52050*的群体连锁分析; (C) *LOC_Os01g52050*的基因结构图, 开放的方框表示基因5'和3'端的未翻译区, 封闭的方框表示编码区, 且图中标注起始密码子(ATG)和终止密码子(TAG)以及*LOC_Os01g52050*中的突变位点(C/T); (D) *LOC_Os01g52050*的蛋白结构域。P/S表示*LOC_Os01g52050*编码蛋白结构域中的突变位点。

Figure 3 Identification of candidate genes

(A) The dCAPS marker was developed to detect the *smg12* mutation; (B) Population linkage analysis of the candidate gene *LOC_Os01g52050*; (C) The *LOC_Os01g52050* gene structure, open boxes show the 5' and 3' untranslated regions, the closed box shows the coding sequence, and the start codon (ATG), the stop codon (TAG) and the *LOC_Os01g52050* mutation site (C/T) are indicated; (D) Schematic of the *LOC_Os01g52050* protein. P/S indicated the *LOC_Os01g52050* mutation site.

(Zhao et al., 2013)。激酶结构域的突变使水稻产生株高变矮及籽粒变小等一系列异常表型, 说明*OsBRI1*的激酶活性对于油菜素内酯维持植株正常生长发育至关重要。

*smg12*突变体*OsBRI1*外显子上的第2 074个碱基处发生了由C到T的置换, 产生非同义突变, 导致*OsBRI1*跨膜结构域上该位置编码的脯氨酸(Pro)变为丝氨酸(Ser)。通过比较*OsBRI1*在水稻和拟南芥中同源基因的氨基酸序列, 发现*OsBRI1*编码区第692位的脯氨酸在各同源基因中非常保守。而这个脯氨酸的突变使得跨膜结构域蛋白编码异常, 可能会影响油菜素内酯激酶活性。*smg12*突变体表现为株高变矮、一级枝梗数和二级枝梗数减少, 叶片直立、籽粒变短但宽度无变化, 表型类似于突变体*d11*和*d54*。因此, 推测跨膜结构域对于*OsBRI1*行使功能非常重要, 且油菜素内酯能够调控水稻籽粒的大小。

油菜素内酯影响植株生长(侯雷平和李梅兰, 2001)。之前报道过*OsBRI1*的多个等位突变体, 其中

仅编码的氨基酸发生改变的弱等位突变体表型变化比较微弱, 使得水稻株高变矮和籽粒变小, 其突变体表型与*smg12*类似(Nakamura et al., 2006)。但另外一些由于重要氨基酸改变或者编码提前终止将会导致表型严重受损甚至不育。突变体*d61-4*在*OsBRI1*的第847个氨基酸处由谷氨酸变为终止密码子, 造成编码提前终止, 使其缺失了几乎所有蛋白激酶结构域, 表现为植株明显矮化、叶片严重扭曲(Nakamura et al., 2006)。因此*smg12*可能是*OsBRI1*的一个新的弱等位突变。此外, *OsBRI1*调控种子大小的细胞学基础并不清楚, 本研究表明其通过调控细胞大小从而决定种子大小。

综上, 本研究筛选到1个新的弱等位突变体。进一步推测跨膜结构域对于*OsBRI1*发挥作用很重要, 且油菜素内酯对于植株正常生长发育以及水稻籽粒大小调控有重要作用。研究结果对于丰富水稻籽粒大小的调控网络和种质资源具有积极意义, 后续可通过调控油菜素内酯生物合成和信号转导过程改变水稻

株型以及籽粒大小提高水稻产量。该研究验证了利用 Mutmap 方法克隆水稻籽粒大小相关基因的有效性。同时, 研究明确了 *OsBRI1* 通过调控细胞大小从而决定种子大小的细胞学基础。在后续研究中, 我们将进一步构建基因互补载体, 对突变体 *smg12* 进行转化, 以验证候选基因的正确性, 并探索跨膜结构域对油菜素内酯激酶活性的影响, 以及 *OsBRI1* 调控水稻籽粒大小变化的遗传和分子机制。

参考文献

- 宫李辉, 高振宇, 马伯军, 钱前 (2011). 水稻粒形遗传的研究进展. *植物学报* **46**, 597–605.
- 侯雷平, 李梅兰 (2001). 油菜素内酯(BR)促进植物生长机理研究进展. *植物学通报* **18**, 560–566.
- Abe A, Kosugi S, Yoshida K, Natsume S, Takagi H, Kanzaki H, Matsumura H, Yoshida K, Mitsuoka C, Tamiru M, Innan H, Canno L, Kamoun S, Terauchi R (2012). Genome sequencing reveals agronomically important loci in rice using Mutmap. *Nat Biotechnol* **30**, 174–178.
- Fan CC, Xing YZ, Mao HL, Lu TT, Han B, Xu CG, Li XH, Zhang QF (2006). GS3, a major QTL for grain length and weight and minor QTL for grain width and thickness in rice, encodes a putative transmembrane protein. *Theor Appl Genet* **112**, 1164–1171.
- James MG, Denyer K, Myers AM (2003). Starch synthesis in the cereal endosperm. *Curr Opin Plant Biol* **6**, 215–222.
- Li N, Xu R, Duan PG, Li YH (2018). Control of grain size in rice. *Plant Reprod* **31**, 237–251.
- Li N, Xu R, Li YH (2019). Molecular networks of seed size control in plants. *Annu Rev Plant Biol* **70**, 435–463.
- Liu LC, Tong HN, Xiao YH, Che RH, Xu F, Hu B, Liang CZ, Chu JF, Li JY, Chu CC (2015a). Activation of *Big Grain1* significantly improves grain size by regulating auxin transport in rice. *Proc Natl Acad Sci USA* **112**, 11102–11107.
- Liu SY, Hua L, Dong SJ, Chen HQ, Zhu XD, Jiang JE, Zhang F, Li YH, Fang XH, Chen F (2015b). OsMAPK6, a mitogen-activated protein kinase, influences rice grain size and biomass production. *Plant J* **84**, 672–681.
- Mao HL, Sun SY, Yao JL, Wang CR, Yu SB, Xu CG, Li XH, Zhang QF (2010). Linking differential domain functions of the GS3 protein to natural variation of grain size in rice. *Proc Natl Acad Sci USA* **107**, 19579–19584.
- Meng XZ, Zhang SQ (2013). MAPK cascades in plant disease resistance signaling. *Annu Rev Phytopathol* **51**, 245–266.
- Miura K, Ashikari M, Matsuoka M (2011). The role of QTLs in the breeding of high-yielding rice. *Trends Plant Sci* **16**, 319–326.
- Morinaka Y, Sakamoto T, Inukai Y, Agetsuma M, Kitano H, Ashikari M, Matsuoka M (2006). Morphological alteration caused by brassinosteroid insensitivity increases the biomass and grain production of rice. *Plant Physiol* **141**, 924–931.
- Nakamura A, Fujioka S, Sunohara H, Kamiya N, Hong Z, Inukai Y, Miura K, Takatsuto S, Yoshida S, Ueguchi-Tanaka M, Hasegawa Y, Kitano H, Matsuoka M (2006). The role of *OsBRI1* and its homologous genes, *OsBRL1* and *OsBRL3*, in rice. *Plant Physiol* **140**, 580–590.
- Sakamoto T, Matsuoka M (2008). Identifying and exploiting grain yield genes in rice. *Curr Opin Plant Biol* **11**, 209–214.
- Shomura A, Izawa T, Ebana K, Ebitani T, Kanegae H, Konishi S, Yano M (2008). Deletion in a gene associated with grain size increased yields during rice domestication. *Nat Genet* **40**, 1023–1028.
- Si LZ, Chen JY, Huang XH, Gong H, Luo JH, Hou QQ, Zhou TY, Lu TT, Zhu JJ, Shangguan YY, Chen EW, Gong CX, Zhao Q, Jing YF, Zhao Y, Li Y, Cui LL, Fan DL, Lu YQ, Weng QJ, Wang YC, Zhan QL, Liu KY, Wei XH, An K, An G, Han B (2016). *OsSPL13* controls grain size in cultivated rice. *Nat Genet* **48**, 447–456.
- Song XJ, Huang W, Shi M, Zhu MZ, Lin HX (2007). A QTL for rice grain width and weight encodes a previously unknown RING-type E3 ubiquitin ligase. *Nat Genet* **39**, 623–630.
- Takagi H, Tamiru M, Abe A, Yoshida K, Uemura A, Yaegashi H, Obara T, Oikawa K, Utsushi H, Kanzaki E, Mitsuoka C, Natsume S, Kosugi S, Kanzaki H, Matsumura H, Urasaki N, Kamoun S, Terauchi R (2015). Mutmap accelerates breeding of a salt-tolerant rice cultivar. *Nat Biotechnol* **33**, 445–449.
- Tanabe S, Ashikari M, Fujioka S, Takatsuto S, Yoshida S, Yano M, Yoshimura A, Kotano H, Matsuoka M, Fujisawa Y, Kato H, Lwasaki Y (2005). A novel cytochrome P450 is implicated in brassinosteroid biosynthesis via the characterization of a rice dwarf mutant, *dwarf11*, with reduced seed length. *Plant Cell* **17**, 776–790.
- Tanaka A, Nakagawa H, Tomita C, Shimatani Z, Ohtake M, Nomura T, Jiang CJ, Dubozet JG, Kikuchi S, Sekimoto H, Yokota T, Asami T, Kamakura T, Mori M (2009). *BRASSINOSTEROID UPREGULATED1*, encoding a helix-loop-helix protein, is a novel gene involved in brassinosteroid signaling and controls bending of the

- lamina joint in rice. *Plant Physiol* **151**, 669–680.
- Tong HN, Liu LC, Jin Y, Du L, Yin YH, Qian Q, Zhu LH, Chu CC** (2012). DWARF AND LOW-TILLERING acts as a direct downstream target of a GSK3/SHAGGY-like kinase to mediate brassinosteroid responses in rice. *Plant Cell* **24**, 2562–2577.
- Wang SK, Wu K, Yuan QB, Liu XY, Liu ZB, Lin XY, Zeng RZ, Zhu HT, Dong GJ, Qian Q, Zhang GQ, Fu XD** (2012). Control of grain size, shape and quality by *OsSP-L16* in rice. *Nat Genet* **44**, 950–954.
- Xing YZ, Zhang QF** (2010). Genetic and molecular bases of rice yield. *Annu Rev Plant Biol* **61**, 421–442.
- Xu R, Duan PG, Yu HY, Zhou ZK, Zhang BL, Wang RC, Li J, Zhang GZ, Zhuang SS, Lyu J, Li N, Chai TY, Tian ZX, Yao SG, Li YH** (2018a). Control of grain size and weight by the *OsMKKK10-OsMKK4-OsMAPK6* signaling pathway in rice. *Mol Plant* **11**, 860–873.
- Xu R, Yu HY, Wang JM, Duan PG, Zhang BL, Li J, Li Y, Xu JS, Lyu J, Li N, Chai TY, Li YH** (2018b). A mitogen-activated protein kinase phosphatase influences grain size and weight in rice. *Plant J* **95**, 937–946.
- Zhang C, Bai MY, Chong K** (2014). Brassinosteroid-mediated regulation of agronomic traits in rice. *Plant Cell Rep* **33**, 683–696.
- Zhao JF, Wu CX, Yuan SJ, Yin L, Sun W, Zhao QL, Zhao BH, Li XY** (2013). Kinase activity of *OsBRI1* is essential for brassinosteroids to regulate rice growth and development. *Plant Sci* **199–200**, 113–120.
- Zhou SR, Yin LL, Xue HW** (2013). Functional genomics based understanding of rice endosperm development. *Curr Opin Plant Biol* **16**, 236–246.
- Zuo JR, Li JY** (2014). Molecular genetic dissection of quantitative trait loci regulating rice grain size. *Annu Rev Genet* **48**, 99–118.

Identification of a New *OsBRI1* Weak Allele and Analysis of its Function in Grain Size Control

Liurong Guan^{1,2}, Zupei Liu^{2,3}, Ran Xu², Penggen Duan², Guozheng Zhang^{2,3}, Haiyue Yu^{2,3}, Jing Li^{2,3}, Yuehua Luo^{1*}, Yunhai Li^{2*}

¹Hainan Key Laboratory for Sustainable Utilization of Tropical Bioresources, College of Tropical Crops, Hainan University, Haikou 570228, China; ²State Key Laboratory of Plant Cell and Chromosome Engineering, Institute of Genetics and Developmental Biology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China; ³University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100039, China

Abstract Rice (*Oryza sativa*) grain size and grain weight are key agronomic traits that affect rice yield. Cloning and study of grain size genes are helpful to increase rice production. In order to further understand the mechanism of rice grain size control, a set of mutants with altered grain size from an EMS-treated elite *japonica* cultivar KYJ (Kuanyejing) were isolated. *smg12* exhibits small grains, short plants, and reduced number of primary branches and secondary branches. Genetic analyses show that the *smg12* mutant phenotypes are controlled by a single recessive gene. Our cellular analyses show that the small grain size phenotype of *smg12* is caused by the decrease in cell size of glumes, indicating that *SMG12* affects cell expansion. By using the Mutmap method, we reveal that the candidate gene for *SMG12* is *OsBRI1*, which encodes a brassinolide receptor kinase. The *smg12* mutant causes a substitution of the 2 074th base (C to T) in *OsBRI1*, which results in an amino acid change (proline to serine). Therefore, this study identified a new mutant allele of *OsBRI1* and provides a cellular and molecular basis for BR-mediated grain size control in rice.

Key words rice, grain size, cell expansion, Mutmap, *OsBRI1*

Guan LR, Liu ZP, Xu R, Duan PG, Zhang GZ, Yu HY, Li J, Luo YH, Li YH (2020). Identification of a new *OsBRI1* weak allele and analysis of its function in grain size control. *Chin Bull Bot* **55**, 279–286.

* Authors for correspondence. E-mail: yhli@genetics.ac.cn; lyhkhk@163.com

(责任编辑: 朱亚娜)