

水稻基因组加倍对籽粒大小调控基因表达的影响

张红宇¹, 崔晓云¹, 侯飞雪¹, 王一伊¹, 吴挺开¹, 刘禹彤¹,
杨定乾¹, 张洪凯¹, 傅瑶¹, 张向阳¹, 李文丽², 吴先军¹

1. 四川农业大学水稻研究所, 西南作物基因资源与遗传改良教育部重点实验室, 成都 611130;
2. 临沂大学药学院, 临沂 276005

摘要: 水稻是最重要的粮食作物之一, 提高水稻产量一直是育种的主要目标。水稻四倍体相对于二倍体具有籽粒变大、粒重增加的特点, 研究基因组加倍后籽粒大小基因的调控模式, 在育种应用方面具有十分重要的意义。本文以二倍体–四倍体水稻为材料, 分析 6 个控制籽粒大小基因在幼穗发育中的表达差异, 同时结合转基因实验, 探讨基因剂量增加对基因表达水平和籽粒大小的影响。结果发现: 基因组加倍后, 水稻的发育进程不变, 但株高增加, 叶片变宽, 籽粒变大, 增大后的籽粒在籼稻表现为长、宽均增加显著, 而在粳稻中长度比宽度增加更为明显。进一步分析控制籽粒大小基因的表达差异情况, 发现这些基因的表达不仅受发育时期的影响, 在籼粳亚种间也明显不同, 即受遗传背景的影响。在基因组加倍的情况下, 正调控基因 *GS5*、*HGW* 的表达普遍高于对应的二倍体; 负调控基因 *GS3* 在籼稻 D9311 中趋于下调或沉默, 而在粳稻 DBI 中趋于上调, *GW2* 在 D9311 中上调, 而在 DBI 中趋于沉默。通过转基因实验分析负调控基因 *GW2* 在二倍体 BI 中的表达趋势, 发现其在基因剂量线性增加的情况下, 表达水平高于二倍体和四倍体, 导致其籽粒变小。本研究结果有助于了解水稻中控制籽粒大小的基因在二倍体和四倍体中的表达模式, 为高产育种提供理论依据。

关键词: 水稻; 基因组加倍; 四倍体; 籽粒大小基因; 负调控

Effects of genome doubling on expression of genes regulating grain size in rice

Hongyu Zhang¹, Xiaoyun Cui¹, Feixue Hou¹, Yiyi Wang¹, Tingkai Wu¹, Yutong Liu¹,
Dingqian Yang¹, Hongkai Zhang¹, Yao Fu¹, Xiangyang Zhang¹, Wenli Li², Xianjun Wu¹

1. Key Laboratory of Southwest Crop Genetic Resources and Improvement Ministry of Education, Rice Institute of Sichuan Agricultural University, Chengdu 611130, China;
2. School of Pharmacy of Linyi University, Linyi 276005, China

Abstract: Rice is one of the most important staple crops. It has been the major focus in breeding program to im-

收稿日期: 2016-06-03; 修回日期: 2016-10-28

基金项目: 国家重点研发计划(编号: 2016YFD0100406)资助[Supported by the National Key Research and Development Program of China (No. 2016YFD0100406)]

作者简介: 张红宇, 博士, 副研究员, 研究方向: 水稻基因组发育调控。E-mail: zhanghysd@163.com

崔晓云, 博士研究生, 研究方向: 拟南芥表观遗传学。E-mail: xiaoyun.cui@u-psud.fr

张红宇和崔晓云为共同第一作者。

通讯作者: 吴先军, 博士, 教授, 研究方向: 水稻分子生物学和遗传育种。E-mail: wuxj@sicau.edu.cn

DOI: 10.16288/j.yczs.16-202

网络出版时间: 2016/11/9 10:20:37

URI: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.1913.R.20161109.1020.002.html>

prove grain yield. A unique feature of tetraploid rice is the increased grain size and weight compared to diploid. Therefore, investigating the effects of genome doubling on expression of genes regulating grain size is important for yield improvement in rice breeding program. In this study, we analyzed differential expression of six genes regulating grain size in young panicles of various developmental stages between diploid and tetraploid rice. Transgenic approaches were employed to explore the dosage effects on gene expression and grain size. The results showed that genome duplications did not influence the developmental patterns of rice growth, but enhanced plant height, leaf width and grain size. The grain length and width in *Indica* tetraploid increased significantly, but the grain length showed more obvious change than width in *Japonica* tetraploid. The expression levels were affected not only by the developmental stages, but also by genetic background. Upon genome doubling, the positive regulation gene *GS5* and *HGW* expression levels were generally higher in tetraploid than the corresponding diploid. Negative regulation gene *GS3* in *Indica* tetraploid tended to be down-regulated or silenced, but increased in *Japonica* tetraploid. Another negative regulation *GW2* was up-regulated in *Indica* tetraploid and silenced in *Japonica* tetraploid. The extra copies of *GW2* in diploid transgenic lines exerted a gene dosage effect that resulted in the higher expression level than that of wild type diploid and tetraploid, which causes small grain formation in transgenic lines. Our results will help to understand the function of genes regulating the grain size in the diploid and tetraploid, and provide a theoretical basis for yield improvement.

Keywords: rice; genomic doubling; tetraploid; genes controlling grain size; negative regulation

研究表明, 50%~70%的有花植物在进化过程中均经历了一次或多次染色体加倍^[1,2]。植物中的多倍体直接影响器官包括种子大小, 造成器官尺寸变化的原因可能是多倍体改变了多个基因的表达。Lee 和 Chen^[3]报道了在二倍体拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)中依靠倍数改变基因表达, 结果器官大小不相同。近十几年来, 在多倍体植物谱系的分子进化方面, 人们主要研究了芸苔属(*Brassica*)^[4]、小麦属(*Triticum*)^[5]、拟南芥属^[3,6]、稻属(*Oryza*)^[7]和棉属(*Anemone*)^[8]。同一属内, 不同倍性的物种或亚种基因的表达变化具有不同的特点。因此, 研究多倍体对基因组冲击(Genomic shock)的快速响应和基因表达调控网络的变化具有重要意义^[9]。

水稻是最重要的粮食作物之一, 籽粒大小是影响产量和品质的重要因素。已有的研究表明, 水稻粒长、粒宽和长宽比都是多基因控制的数量性状^[10,11]。近年来, 通过图位克隆的方法从水稻中相继克隆了一系列控制籽粒性状的基因, 包括控制粒长的 *GS3*^[12]、*GW6a*^[13]和 *GLW7*^[14], 控制粒宽的 *GW2*^[15]、*GW5*^[16,17]、*GS5*^[18,19]和 *GW8*^[20], 控制粒重的 *HGW*^[21], 以及控制灌浆速率的 *GIF1*^[22]和 *TGW6*^[23]。已知籼稻(*Indica*)和粳稻(*Japonica*)粒型有差异, 人工加倍为四

倍体后, 籼稻粒长和粒宽都增加, 但粳稻仅粒长增加明显。针对四倍体水稻亚种间籽粒大小变化的不同, 本文对控制籽粒大小相关基因的表达进行分析, 探究基因组加倍后对这些基因表达的影响, 有可能利用在四倍体中籽粒大小相关基因表达水平的特性, 实现增大二倍体水稻籽粒的愿望, 从而为水稻增产提供新的资源或者途径。

1 材料和方法

1.1 材料

4 套二倍体(2N)–同源四倍体(4N)水稻材料见表 1, 四倍体水稻系通过秋水仙碱加倍获得, 并经过倍性鉴定, 多年种植, 育性正常。

1.2 载体及菌株

实验所用克隆载体为 pEASY-Blunt, 目标基因的过表达载体为 D-163+1300, 转基因所用农杆菌菌株为 EHA105。

1.3 RNA 提取及反转录

采用 Trizol 试剂(Invitrogen)提取总 RNA, 使用反转录试剂盒 HiScript Q RT SuperMix for qPCR (+gDNA wiper)(Vazyme), 将总 RNA 纯化并反转录

表 1 供试材料

Table 1 Experimental materials

材料	简称	倍性	亚种	来源
Balilla	Bl	2N	粳稻	湖北大学
加倍 Balilla	DBl	4N		
南京 11	Nj11	2N	籼稻	湖北大学
加倍南京 11	DNj11	4N		
海天	Ht	2N	籼稻	中科院成都生物所
加倍海天	DHt	4N		
93-11	9311	2N	籼稻	湖北大学
加倍 93-11	D9311	4N		

成 cDNA。反应体系及反应程序参照 Vazyme 公司试剂盒说明书。

1.4 微卫星鉴定

选取均匀分布于水稻 12 条染色体上的 38 对 SSR 标记,以 4 套二倍体-四倍体水稻的叶片的 DNA 为模板,PCR 扩增分析与筛选材料间是否存在差异性的标记。本研究采用的 SSR 标记序列下载自 Gramene 数据库(<http://www.gramene.org/>),PCR 扩增及检测参照 Panaud 等^[24]方法。

1.5 qPCR 检测

用软件 Beacon Designer 7.0 对目标基因跨内含子设计定量表达引物。引物序列见附表 1。采用 Roche 公司 SYBR Green Master(ROX)进行定量表达检测。反应体系及反应程序参照 SYBR Green Master Mix 说明书,在 BIO-RAD CFX96™ Real-time System 荧光定量 PCR 仪上进行扩增。

1.6 基因克隆及转化

利用水稻公共数据库 NCBI(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)以及 RIS(<http://rice.genomics.org.cn/rice/index2.jsp>)获得 GW2 基因序列。以 Bl 为实验材料,利用生物学软件 Primer 5.0 设计引物,扩增目的基因,并连接到 pEASY-Blunt 载体上。引物序列为:

上游引物 F(GW2-F): 5'-GATGGGGAACAGG-ATAGG-3';

下游引物 R(GW2-R): 5'-CCAACCCTTGCGA-GT-3'。

以 Bl 的 cDNA 为模板,用以上引物对扩增 GW2 基因。反应总体积为 50 μL,包括: cDNA 模板 2 μL,

5×TransStar FastPfu Buffer 10 μL, 2.5 mol/L dNTPs 5 μL, GW2-F(10 μmol/L) 2 μL, GW2-R(10 μmol/L)2 μL, TransStar FastPfu DNA Polymerase 1 μL, ddH₂O 28 μL。

反应程序 95℃预变性 5 min,95℃变性 30 s,59℃复性 30 s,72℃延伸 50 s,共进行 35 个循环;最后再 72℃延伸 7 min,12℃运行 5 min 后结束。

按农杆菌介导法进行水稻愈伤组织的遗传转化。选取成熟且饱满的 Bl 种子,诱导愈伤,浸菌后清洗,放在含 400 mg/L 的羧苄青霉素和 50 mg/L 的潮霉素的筛选培养基上筛选抗性愈伤,2~3 周后转至含 200 mg/L 羧苄青霉素、50 mg/L 的潮霉素的分化培养基上分化出苗。具体培养基配方和转化方法参照 Nishimura 等^[25]方法。

2 结果与分析

2.1 微卫星标记鉴定倍性材料的基因组差异

为确认水稻品种加倍后,基因组没有发生变异,利用 38 对微卫星引物,分别对这 4 套倍性水稻材料进行了多态性分析。结果发现,这 38 对引物在二倍体和四倍体材料中都没有扩增出差异条带。仅有 11 个微卫星标记表现出粳稻和籼稻之间的差别,但是加倍后基因组和原品种没有差别(附图 1)。

2.2 水稻基因组加倍后的籽粒表型差异

水稻加倍后,茎秆变粗、剑叶变宽变长、叶色加深、植株变高(表 2)、籽粒变大等(图 1),生育期仅仅比对应二倍体推迟 4~6 d。针对籽粒的粒长(Grain length, GL)、粒宽(Grain width, GW)、长宽比(Length/width, L/W)、表面积(Grain surface, GS)以及周长(Grain circle, GC)等性状进行调查(附表 2)。结果显示,当水稻加倍后,籼稻籽粒的长度和宽度的增加在 15% 以上;粳稻籽粒长度增加显著(23%),但是宽度增加较少(3%)。总之,千粒重增加约 31.3%(图 2),差异达到极显著水平。

表 2 水稻二倍体和四倍体株高比较

Table 2 Height of diploid and autotetraploid rice

倍性	Nj11	Bl	9311	Ht
2N	90.1 cm	107.5 cm	113.9 cm	125.7 cm
4N	95.3 cm	112.2 cm	130.0 cm	130.1 cm



图 1 倍性材料的植株外形和籽粒对比

Fig. 1 Comparison of plant and seed phenotypes of autotetraploid and diploid rice

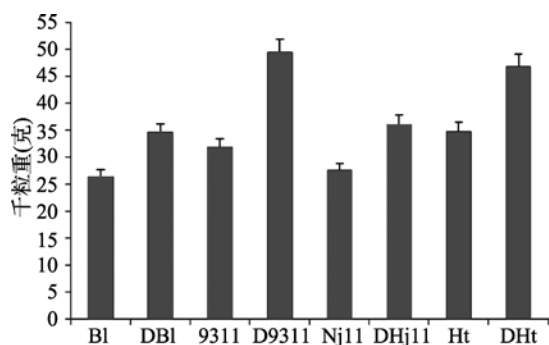


图 2 二倍体和四倍体水稻的千粒重比较

Fig. 2 Thousand-grain weight of diploid and autotetraploid rice

2.3 电镜扫描观察二倍体和四倍体的幼穗发育差别

水稻幼穗的发育是否因基因组的加倍而发生改变? 本研究选择幼穗发育的 2 个关键时期(二次枝梗始形成期和雌雄蕊形成期)进行扫描电镜观察(图 3)。结果发现: 在二次枝梗始形成期时, 2N 和 4N 水稻幼穗的一次枝梗皆已大量形成, 其上形成多个突起, 表明二次枝梗开始形成; 在雌雄蕊形成期, 2N 和 4N 颖花原基的内颖和外颖内皆出现一些类似一窝鸡蛋的雌雄蕊原基, 外形和数量差异不大。以上结果说明基因的剂量改变后, 并没有改变 2N 和 4N 的幼穗发育进程。

2.4 幼穗中 6 个控制籽粒大小基因的定量表达差异

针对基因组加倍后籽粒增大的表型, 本研究以

B1-DB1 和 9311-D9311 这两对倍性水稻为研究材料, 以控制籽粒大小的 6 个主要基因(*GW2*、*GW5*、*HGW*、*qGW8*、*GS3* 和 *GS5*)为目标基因, 分析它们在幼穗发育中的定量表达变化。

2.4.1 基因表达具有材料特异性

按照 Ikeda 等^[26]方法, 将水稻幼穗的发育划分为 5 个时期, 即 in1、in2、in3、in4、in5, 进行目标基因的定量表达检测(图 4)。结果发现, 除 *GW5* 外, 其他 5 个基因都能检测到表达的变化。但是这 5 个基因在这两对材料中的表达也分别不同。如 *qGW8* 在 DB1 中 in3 期以后发生沉默, 但是在 D9311 中 in2 期以后表达一直处于上升趋势, 至 in5 期表达量约为 9311 的 8.35 倍; *GS3* 在 DB1 中的表达量一直高于 B1, 表达变化是先降后升; 而在 D9311 中 in4 期以后没有检测到表达; *GW2* 在两对倍性材料中的表达的情况则与 *GS3* 相反; *GS5* 和 *HGW* 在两对材料中的表达情况基本相似, 即是在幼穗发育过程中四倍体一直处于上升趋势, 而相应的二倍体的表达则基本维持在较低水平。以上结果说明, 控制籽粒大小基因在基因组加倍后的表达受遗传背景的影响。

2.4.2 籽粒大小基因的表达趋势和水平存在亚种间的差异

在加倍后的籼稻和粳稻中, 这 5 个基因的表达趋势不同。在 9311-D9311(籼稻)的倍性材料中, 主

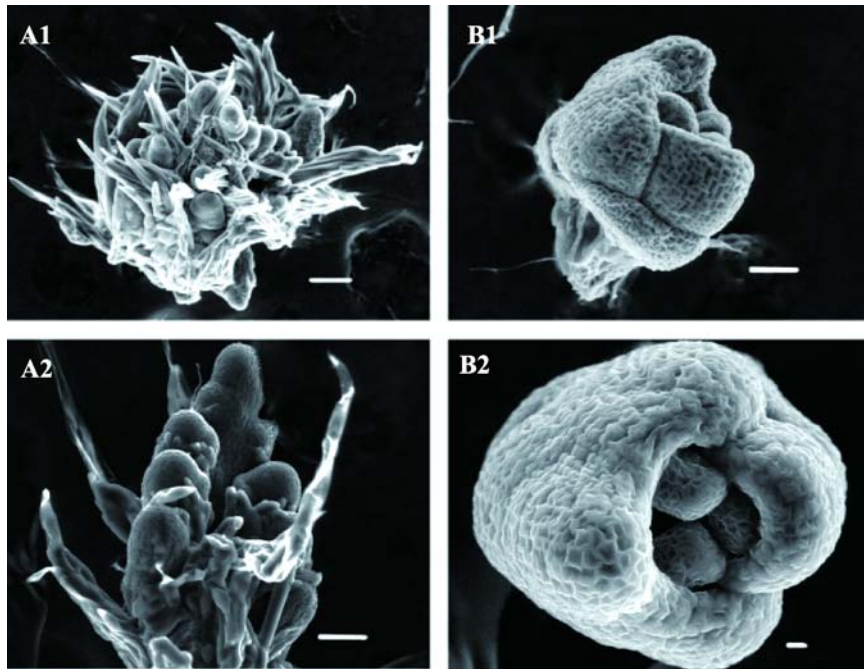


图 3 B1 和 DBI 的幼穗发育进程的电镜观察

Fig. 3 Scanning electron microscopy of inflorescence development of diploid (Balilla) and autotetraploid (DBa-lilla) rice

A1、A2 分别是 B1、DBI 二次枝梗始形期；B1、B2 分别是 B1、DBI 雌雄蕊形成期；bars：50 μm 。

要表现为先升后降的基因表达趋势，即有 4 个基因 (*GW2*、*HGW*、*GS3* 和 *GS5*) 在 4N 中的表达在 in3 或 in4 达到最高水平，而 *qGW8* 基因则在 4N 中一直处于上升趋势，至 in5 期达到最高表达水平。相反，在 B1-DBI(粳稻)倍性材料中主要表现为先降后升的基因表达趋势，即这 5 个基因在 4N 的 in1 时期中表达水平最高，然后在 in2 时期急速下降，但 *GS3*、*HGW* 和 *GS5* 基因在 in3 时期时表达水平开始回升，而 *qGW8*、*GW2* 基因的表达则继续保持下降直至沉默。此外，四倍体粳稻中基因的最高表达水平高于四倍体籼稻。如在 DBI 中，*GS3* 基因表达水平最高 (113.5 倍)；除了负调控基因 *GW2* 外，其他 3 个基因的表达水平在 5.76~44.74 倍之间。在 D9311 中，表达水平最高的是 *qGW8* 基因(约 9 倍)，其他基因的表达水平仅为 2.5~4.5 倍。以上结果说明，基因组加倍对不同亚种间基因表达的影响不同，有可能与其粒型差异有关。

2.4.3 基因表达水平与种子表型的一致性

在 *GW2*、*HGW*、*qGW8*、*GS3* 和 *GS5* 个基因中，其中正调控功能的基因为 *GS5*、*HGW* 和 *qGW8*，

负调控基因为 *GS3* 和 *GW2*。正调控功能的基因，表达水平越高，种子就越大。本研究发现，在 9311-D9311 的倍性材料中，3 个正调控基因在 4N 中的表达水平一直高于对照(2N)；在 B1-DBI 倍性材料中，正调控基因 *GS5* 和 *HGW* 在 4N 中的表达水平都高于 2N，但是 *qGW8* 的表达水平则仅在 in1 期高于对照，而后表达量发生下降乃至沉默。针对负调控功能的基因，表达水平越低，则会导致种子越大。本研究发现，在 9311-D9311 的倍性材料中，*GS3* 在 in3 期以后就发生沉默；在 B1-DBI 倍性材料中，在 in3 期以后发生沉默的基因是 *GW2*。

以上结果说明，从整体上看，大多数基因的表达变化最终与籽粒变大的性状是相符合的。但存在的正调控基因低表达和负调控基因的高表达的例外，说明调控基因表达网络的复杂性。

2.5 负调控籽粒大小基因的剂量效应

如上所述，基因组加倍后，基因的表达量一般都会上升，但对于负调控基因，在基因组剂量增加的条件下，基因表达出现下调(如 *GS3* 在 D9311 中，*GW2* 在 DBI 中)或上升(如 *GW2* 在 D9311 中，*GS3*

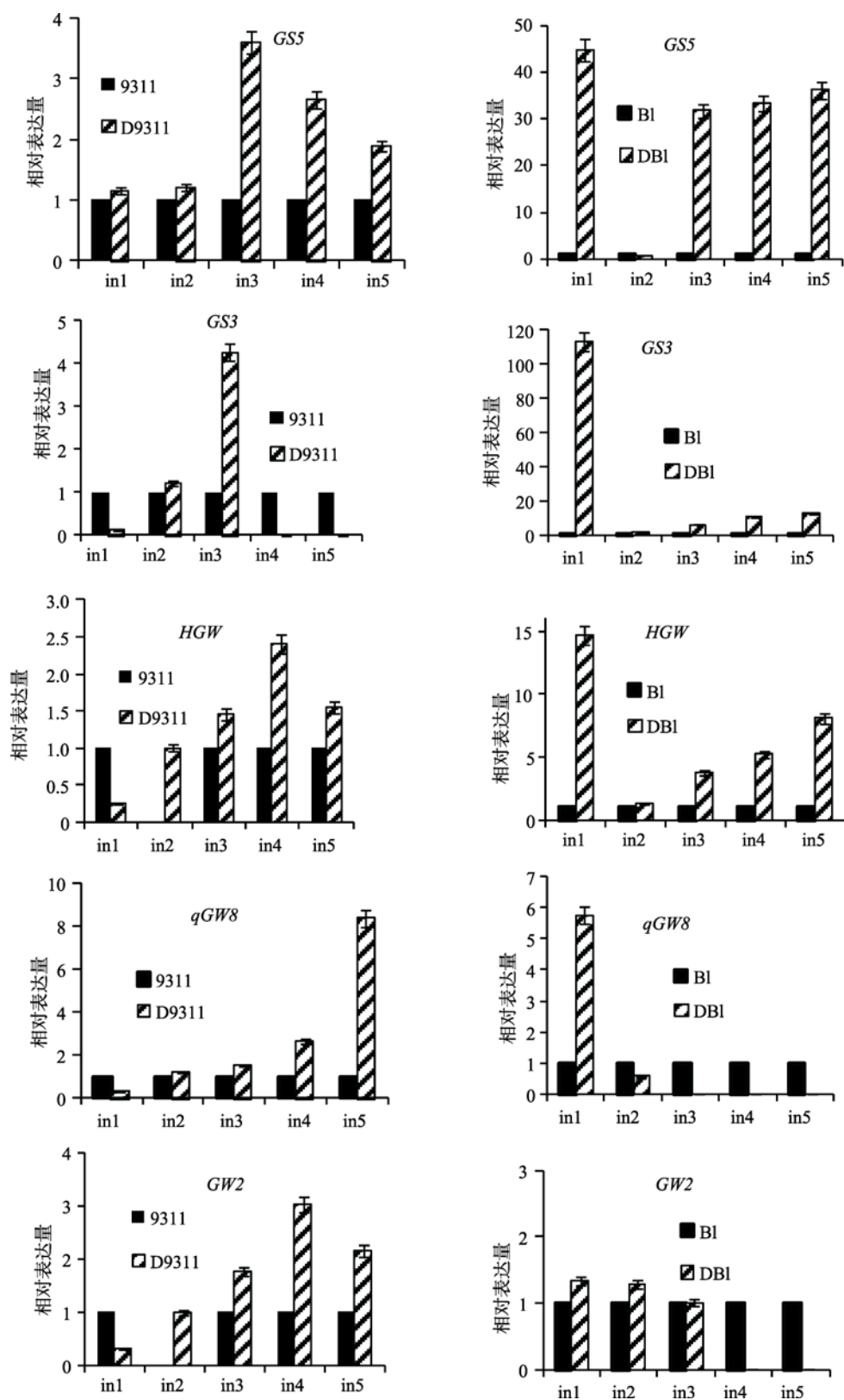


图 4 5 个基因在 2 对倍性水稻中的定量表达结果

Fig. 4 qPCR analysis of five genes related to grain size in inflorescence developmental 2N and 4N rice

in : 指发育时期。

在 DBI 中)。在二倍体水稻中,单纯增加控制籽粒大小基因的剂量,基因的表达水平和籽粒大小又是怎样的?为此,本研究选择在二倍体水稻中过表达负调控基因 *GW2*,并对照 4N 水稻中 *GW2* 的表达情况,分析单个基因过表达与整个基因组加倍,分别对籽粒大小的调控作用。

2.5.1 农杆菌介导的转基因

以 B1 为材料,克隆 *GW2* 基因,构建过表达载体,以 B1 成熟种子诱导出的愈伤组织为转化对象,利用常规农杆菌介导法,对愈伤组织进行侵染、筛选、分化和再生(附图 2)。最后共获得转基因植株 35 株,经潮霉素标记的 PCR 筛选(附图 3),最后确定 28 株阳性植株(B1^T)。

2.5.2 转基因植株籽粒表型对比

与对照 B1 和 DBI 比较,转基因植株 B1^T 农艺性状主要表现在植株变矮,分蘖增多,叶片变窄等(图 5)。针对籽粒的性状进行考种,结果显示转基因植株的籽粒变窄,明显小于对照 B1 和 DBI,且千粒重仅为 22.3 g,仅达到对照 B1 的 70%,DBI 的 55%(图 5)。本结果说明负调控基因 *GW2* 在 B1^T 中进行过表达时,基因能够行使正常的功能,从而使籽粒变小。

2.5.3 转基因植株的定量表达检测

针对转基因阳性植物,提取幼穗的 RNA,反转录后,通过实时荧光定量 PCR 检测其幼穗中 *GW2* 的表达水平。结果发现,*GW2* 在 B1^T 中的表达量比对照 B1 高约 2 倍,比 DBI 高约 5 倍(图 6)。表明转基因阳性植株 B1^T 中的 *GW2* 转化成功,并正常表达。

3 讨论

3.1 水稻基因组加倍后控制籽粒大小的基因表达在籼粳亚种间存在显著差异

同源四倍体水稻是通过秋水仙素处理二倍体水稻,使染色体加倍形成。伴随着基因组的倍增,四倍体水稻在籽粒大小、蛋白含量以及生物量方面比二倍体有优势^[28]。谷幽兰等^[29]研究发现,通过染色体加倍后,水稻米粒变大,单粒重明显增加,因此更具有增产潜力,但是,研究同时发现染色体加倍后,部分品种垩白度增高,整精米率低,米质下降。说明染色体加倍,一些基因发生遗传变异,甚至表达水平也发生改变。本研究结果发现水稻基因组加倍后,籽粒也随之增大。粳稻的籽粒增加以长度变化为主,而籼稻籽粒的增大则同时涉及宽度和长度的增加,千粒重的增加,在籼稻中表现尤为显著。分

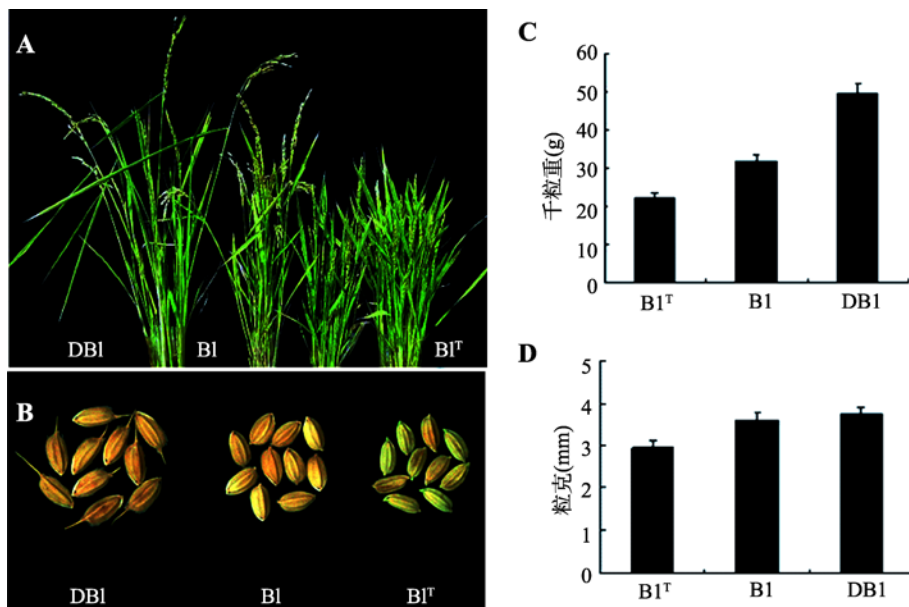


图 5 B1^T 与对照和 DBI 的籽粒及其他农艺性状的比较

Fig. 5 A comparison of grain size and other agronomic traits among B1^T, B1 and DBI

A、B: 转基因株系表型及种子大小比较; C、D: T₁ 代种子的考种数据。

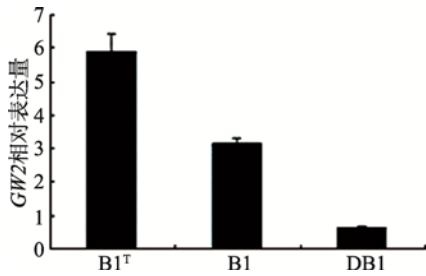


图 6 B1、DB1 和 B1^T 的幼穗中 GW2 的定量表达水平比较
Fig. 6 A comparison of expression levels of GW2 in B1, DB1 and B1^T

析粳稻 DB1 中籽粒相关基因表达时,发现 *GS5* 和 *HGW* 高表达,而 *GW2* 和 *qGW8* 在幼穗发育中后期沉默,与籽粒表型变化一致;但是抑制粒长的负调控因子 *GS3* 高表达,说明 DB1 的粒长增加没有 *GS3* 的贡献,推测或有其他控制粒长基因的作用,但需要实验验证。针对籼稻 D9311 5 个基因都是高表达,其中 *qGW8* 的高表达是对粒宽的贡献,负调控基因 *GS3* 在幼穗发育后期的沉默对粒长增加有贡献,但是 *GW2* 的高表达,也有可能是保证籼稻长粒型籽粒的一种调控方式。

本文检测的 6 个籽粒性状相关基因在基因组加倍后水稻材料中的表达情况,说明控制籽粒性状需要很多基因参与,且相互间可能存在复杂的调控网络。事实上,无论植物还是动物,在其发育过程中,每一个器官的生长,都可能受到了严格的调控。在器官大小的发育研究中,首先要明确对最终器官形成的最关键组织(或基因),其次是这个组织(或基因)在发育过程中哪个阶段发生了什么重要事件,导致器官形态的改变。本研究虽然发现了四倍体籼稻和粳稻中 6 个基因的表达情况,但是需要进一步确定控制籽粒大小最关键基因及其时空表达特性、调控网络,从而在育种实践中加以利用,通过单独沉默或者提高这些最关键基因的表达水平,显著改变四倍体籽粒或二倍体籽粒的大小,提高水稻产量。

3.2 负调控籽粒大小基因的剂量效应在基因组倍增和单个基因增加的情况下调控方式不同

剂量效应对单一基因的影响具有多样性。苏琰等^[27]在研究染色体重组对转基因 *gfp* 遗传表达的作用时,发现剂量效应可能是影响外源基因在大麦中

稳定表达和遗传的主要因素。对四倍体棉花中同源基因的研究表明,同源基因的表达差异及沉默在不同植株组织及发育阶段是可变的^[28]。Zhao 等^[31]在研究芸薹属多倍体植物进化及适应性的分子机制研究中发现,芸薹属六倍体中有些基因在特定组织中的表达高于双亲之和,体现了基因的剂量效应。本研究同样表明,基因剂量加倍后,大多数基因表达水平上升,且随着发育时期的改变,表达水平也发生改变。显示了剂量效应可以影响单一基因或性状^[32]。

本研究发现,大多数情况下基因组倍增会导致基因表达上升,但是针对基因的功能(正调控或负调控),负调控因子的表达在不同的遗传背景下,可能上调(如 *GW2* 在 D9311 中的表达, *GS3* 在 DB1 中的表达)或下调乃至沉默(如 *GS3* 在 D9311 中的表达, *GW2* 在 DB1 中的表达)。针对这一现象,本研究调查了在二倍体中过表达负调控因子 *GW2* 的转基因水稻的籽粒表型,并与四倍体水稻中的籽粒表型进行对比。结果发现仅仅增加单个基因的表达,籽粒变小的性状与基因的功能相符。Song 等^[15]研究发现, *GW2* 沉默导致水稻籽粒变大。而本研究表明,在粳稻 B1 中,负调控因子 *GW2* 在基因组剂量增加时表达下降乃至沉默,籽粒变大,而在单个基因剂量增加时,表达上调,籽粒变小。基因的剂量效应,在等位基因倍增和基因的线性增加时出现表达的差异,并影响性状发育,是如何起作用的,还需要进一步研究。

多倍体中基因表达的改变,有遗传和表观遗传两方面的原因^[33]。表观遗传由于其可恢复性,为多倍体的进化提供一个十分有效和有弹性的机制来适应环境。在拟南芥人工合成多倍体中发现有去甲基化而重新具有活性的逆转录因子^[34]。Lee 和 Chen^[3]发现拟南芥异源四倍体中 10 个基因发生沉默,可通过去甲基化使其恢复活性。推测本研究中负调控因子在剂量加倍的情况下,有可能是通过表观遗传方式对 *GW2* 的表达进行下调乃至沉默,该推论仍然需要后续的实验来验证。

附录:

附表、附图见文章电子版 www.chinagene.cn。

参考文献(References):

- [1] Wendel FJ. Genome evolution in polyploids. *Plant Mol Biol*, 2000, 42(1): 225–249. [\[DOI\]](#)
- [2] Masterson J. Stomatal size in fossil plants: Evidence for polyploidy in majority of angiosperms. *Science*, 1994, 264(5157): 421–424. [\[DOI\]](#)
- [3] Lee HS, Chen ZJ. Protein-coding genes are epigenetically regulated in *Arabidopsis* polyploids. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, 98(12): 6753–6758. [\[DOI\]](#)
- [4] Song K, Lu P, Tang K, Osborn TC. Rapid genome change in synthetic polyploids of Brassica and its implications for polyploid evolution. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995, 92(17): 7719–7723. [\[DOI\]](#)
- [5] Kashkush K, Feldman M, Levy AA. Gene loss, silencing and activation in a newly synthesized wheat allotetraploid. *Genetics*, 2002, 160(4): 1651–1659. [\[DOI\]](#)
- [6] Comai L, Tyagi AP, Winter K, Holmes-Davis R, Reynolds SH, Stevens Y, Byers B. Phenotypic instability and rapid gene silencing in newly formed *Arabidopsis* allotetraploids. *Plant Cell*, 2000, 12(9): 1551–1568. [\[DOI\]](#)
- [7] Tian CG, Xiong YQ, Liu TY, Sun SH, Chen LB, Chen MS. Evidence for an ancient whole-genome duplication event in rice and other cereals. *Acta Genet Sin*, 2005, 32(5): 519–527.
田朝光, 熊煜青, 刘铁燕, 孙守红, 陈良标, 陈明生. 水稻和其他禾本科植物基因组多倍体起源的证据. *遗传学报*, 2005, 32(5): 519–527. [\[DOI\]](#)
- [8] Adams KL, Wendel JF. Exploring the genomic mysteries of polyploidy in cotton. *Biol J Linn Soc*, 2004, 82(4): 573–581. [\[DOI\]](#)
- [9] Pikaard CS. Genomic change and gene silencing in polyploids. *Trends Genet*, 2001, 17(12): 657–677. [\[DOI\]](#)
- [10] Tan YF, Xing YZ, Li JX, Yu SB, Xu CG, Zhang QF. Genetic bases of appearance quality of rice grains in Shanyou 63, an elite rice hybrid. *Theor Appl Genet*, 2000, 101(5–6): 823–829. [\[DOI\]](#)
- [11] Xing YZ, Tan YF, Hua JP, Sun XL, Xu CG, Zhang Q. Characterization of the main effects, epistatic effects and their environmental interactions of QTLs on the genetic basis of yield traits in rice. *Theor Appl Genet*, 2002, 105(2–3): 248–257. [\[DOI\]](#)
- [12] Fan CH, Xing YZ, Mao HL, Lu TT, Han B, Xu CG, Li XH, Zhang QF. 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*, 2006, 112(6): 1164–1171. [\[DOI\]](#)
- [13] Song XJ, Kuroha T, Ayano M, Furuta T, Nagai K, Komeda N, Segami S, Miura K, Ogawa D, Kamura T, Suzuki T, Higashiyama T, Yamasaki M, Mori H, Inukai Y, Wu JZ, Kitano H, Sakakibara H, Jacobsen SE, Ashikari M. Rare allele of a previously unidentified histone H4 acetyltransferase enhances grain weight, yield, and plant biomass in rice. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2014, 112(1): 76–81. [\[DOI\]](#)
- [14] 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. *OsSPL13* controls grain size in cultivated rice. *Nat Genet*, 2016, 48(4): 447–456. [\[DOI\]](#)
- [15] Song XJ, Huang W, Shi M, Zhu MZ, Lin HX. A QTL for rice grain width and weight encodes a previously unknown RING-type E3 ubiquitin ligase. *Nat Genet*, 2007, 39(5): 623–630. [\[DOI\]](#)
- [16] Shomura A, Izawa T, Ebana K, Ebitani T, Kanegae H, Konishi S, Yano M. Deletion in a gene associated with grain size increased yields during rice domestication. *Nat Genet*, 2008, 40(8): 1023–1028. [\[DOI\]](#)
- [17] Weng JF, Gu SH, Wan XY, Gao H, Guo T, Su N, Lei CL, Zhang X, Cheng ZJ, Guo XP, Wang JL, Jiang L, Zhai HQ, Wan JM. Isolation and initial characterization of *GW5*, a major QTL associated with rice grain width and weight. *Cell Res*, 2008, 18(12): 1199–1209. [\[DOI\]](#)
- [18] Li YB, Fan CC, Xing YZ, Jiang YH, Luo LJ, Sun L, Shao D, Xu CJ, Li XH, Xiao JH, He YQ, Zhang QF. Natural variation in *GS5* plays an important role in regulating grain size and yield in rice. *Nat Genet*, 2011, 43(12): 1266–1269. [\[DOI\]](#)
- [19] Xu CJ, Liu Y, Li YB, Xu XD, Xu CG, Li XH, Xiao JH, Zhang QF. Differential expression of *GS5* regulates grain size in rice. *J Exp Bot*, 2015, 66(9): 2611–2623. [\[DOI\]](#)
- [20] Wang SK, Wu K, Yuan QB, Liu XY, Liu ZB, Lin XY, Zeng RZ, Zhu HT, Dong GJ, Qian Q, Zhang GQ, Fu XD. Control of grain size, shape and quality by *OsSPL16* in rice. *Nat Genet*, 2012, 44(8): 950–954. [\[DOI\]](#)
- [21] Li J, Chu HW, Zhang YH, Mou TM, Wu CY, Zhang QF, Xu J. The rice *HGW* gene encodes a ubiquitin-associated (UBA) domain protein that regulates heading date and grain weight. *PLoS One*, 2012, 7(3): e34231. [\[DOI\]](#)
- [22] Wang ET, Wang JJ, Zhu XD, Hao W, Wang LY, Li Q, Zhang LX, He W, Lu BR, Lin HX, Ma H, Zhang GQ, He ZH. Control of rice grain-filling and yield by a gene with a potential signature of domestication. *Nat Genet*, 2008, 40(11): 1370–1374. [\[DOI\]](#)

- [23] Ishimaru K, Hirotsu N, Madoka Y, Murakami N, Hara N, Onodera H, Kashiwagi T, Ujiie K, Shimizu B, Onishi A, Miyagawa H, Katoh E. Loss of function of the IAA-glucose hydrolase gene *TGW6* enhances rice grain weight and increases yield. *Nat Genet*, 2013, 45(6): 707–711. [DOI]
- [24] Panaud O, Chen X, McCouch SR. Development of micro-satellite markers and characterization of simple sequence length polymorphism (SSLP) in rice (*Oryza sativa* L.). *Mol Gen Genet*, 1996, 252(5): 597–607. [DOI]
- [25] Nishimura A, Aichi I, Matsuoka M. A protocol for *Agrobacterium*-mediated transformation in rice. *Nat Protoc*, 2006, 1(6): 2796–2802. [DOI]
- [26] Ikeda K, Sunohara H, Nagato Y. Developmental course of inflorescence and spikelet in rice. *Breeding Sci*, 2004, 54(2): 147–156. [DOI]
- [27] Su Y, Li R, Chen JM. Expression of *gfp* gene in transgenic *gfp* barley (*Hordeum vulgare* L.) by semi-quantitative RT-PCR analysis. *GAB*, 2015, 34(9): 1934–1938.
苏琰, 李融, 陈建民. 转 *gfp* 基因大麦中 *gfp* 基因表达的半定量 RT-PCR 方法分析. 基因组学与应用生物学, 2015, 34(9): 1934–1938. [DOI]
- [28] Wei RC, Yu QH, Ma XJ, Tan XM, Li XY, Shi LJ, Bai LH. Research progress of plant polyploid. *Seed*, 2013, 32(7): 50–53.
韦荣昌, 吴庆华, 马小军, 谭小明, 李小勇, 施力军, 白隆华. 植物多倍体的研究进展. 种子, 2013, 32(7): 50–53. [DOI]
- [29] Gu YL, Dai XM, Li JX. Rice quality analysis of different ploidy rice. *J Zhengzhou Univ (Nat Sci Ed)*, 2015, 47(4): 81–85.
谷幽兰, 代西梅, 李建欣. 不同倍性水稻品种米质分析研究. 郑州大学学报(理学版), 2015, 47(4): 81–85. [DOI]
- [30] Adams KL, Cronn R, Percifield R, Wendel JF. Genes duplicated by polyploidy show unequal contributions to the transcriptome and organ-specific reciprocal silencing. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100(8): 4649–4654. [DOI]
- [31] Zhao Q, Zou J, Meng JL, Mei SY, Wang JB. Tracing the transcriptomic changes in synthetic trigenomic allohexaploids of *Brassica* using an RNA-Seq approach. *PLoS One*, 2013, 8(7): e68883. [DOI]
- [32] Guo M, Birchler JA. Trans-acting dosage effects on the expression of model gene systems in maize aneuploids. *Science*, 1994, 266(5193): 1999–2002. [DOI]
- [33] Chen ZJ. Genetic and epigenetic mechanisms for gene expression and phenotypic variation in plant polyploids. *Annu Rev Plant Biol*, 2007, 58: 377–406. [DOI]
- [34] Madlung A, Tyagi AP, Watson B, Jiang H, Kagochi T, Doerge RW, Martienssen R, Comai L. Genomic changes in synthetic *Arabidopsis* polyploids. *Plant J*, 2005, 41(2): 221–230. [DOI]

(责任编辑: 储成才)

附表 1 定量表达引物序列

Supplementary Table 1 The sequences of qPCR primers

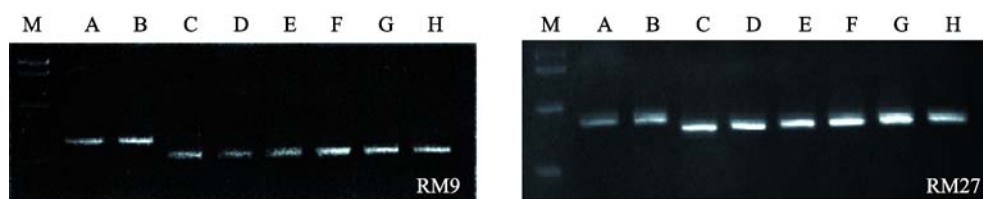
内参和基因	上游引物序列(5'-3')	下游引物序列(5'-3')
GS3	TTGGAGAGGTCAGAGGAT	GCAGAGAGGTTGACGAAT
HGW	TGAGGCTGAGAAGGAGAA	TGAGGCTGAGAAGGAGAA
qGW8	CCAATGACAATGAGATGAAC	GAAACTAAGGCAGCAACA
GW2	AAAGGAGGAAAGGAGCATAG	TTGGTCGGTGTGATTGTT
GW5	TCAAAGTGGGATGGATTAGT	TGGGTAGAGGGATGTGTA
GS5	GAGCAGCACTAGAGTTCA	TTGGAGAGGTCAGAGGAT
UBQ-5	ACCACTTCGACCGCCACTACT	ACGCCTAAGCCTGCTGGTT

附表 2 四倍体和二倍体水稻籽粒大小的差异

Supplementary Table 2 Comparison of rice size between autotetraploids and deploids in rice

品种	性状	二倍体		四倍体		Df	F	t	P
		平均	范围	平均	范围				
B1	GL	6.77	5.97–7.44	8.33	7.33–9.56	298	10.626	–35.985	0.000**
	GW	3.61	2.70–4.08	3.73	2.80–4.26		8.636	–4.464	0.000**
	L/W	1.88	1.55–2.66	2.24	1.89–2.83		9.445	–21.155	0.000**
	GS	18.56	14.13–21.25	23.05	17.69–27.45		19.775	–22.807	0.000**
	GC	17.37	15.07–19.37	20.62	18.33–23.08		14.078	–33.644	0.000**
9311	GL	9.09	8.17–10.37	11.73	9.81–14.55	298	50.744	–36.970	0.000**
	GW	2.85	2.25–3.31	3.48	2.75–5.01		40.274	–18.746	0.000**
	L/W	3.20	2.72–3.85	3.40	2.53–4.41		40.274	–5.671	0.000**
	GS	20.55	15.67–25.45	29.74	22.22–39.05		28.226	–32.393	0.000**
	GC	21.44	19.51–25.33	27.61	22.99–40.43		28.533	–32.812	0.000**
Nj11	GL	7.65	6.78–8.66	9.04	7.64–10.33	296	31.416	–24.628	0.000**
	GW	3.16	2.60–3.51	3.69	2.64–4.70		14.453	–21.569	0.000**
	L/W	2.42	2.10–2.92	2.46	1.93–3.49		28.433	–1.647	0.101ns
	GS	18.59	13.55–21.45	23.99	17.71–28.87		29.785	–25.519	0.000**
	GC	18.55	16.43–20.29	21.75	18.91–24.16		44.760	–27.305	0.000**
Ht	GL	9.54	7.95–11.16	12.59	8.86–18.38	298	27.137	–33.449	0.000**
	GW	3.19	2.45–4.32	3.67	2.81–6.00		39.747	–12.291	0.000**
	L/W	3.00	2.23–3.82	3.47	1.87–4.60		39.747	–12.661	0.000**
	GS	23.75	18.32–28.01	33.90	19.96–50.43		51.595	–25.081	0.000**
	GC	22.59	19.22–25.97	29.60	24.62–43.89		34.725	–31.908	0.000**

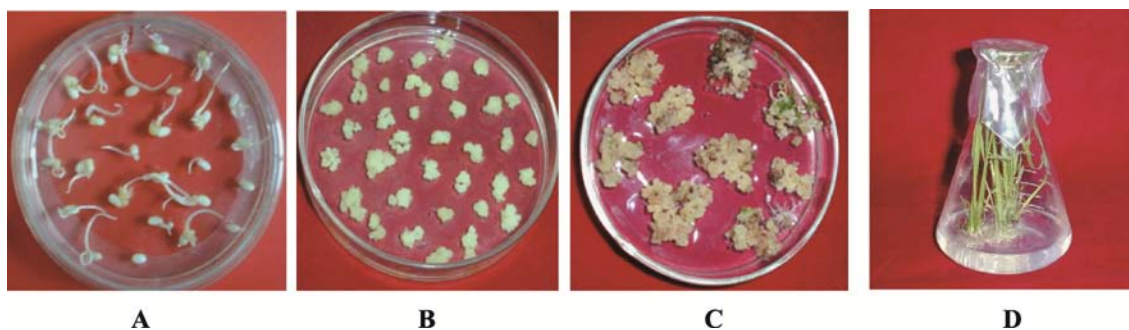
注：*, **: 分别代表差异显著水平 $P < 0.05$ (显著)和 $P < 0.01$ (极显著)。GL：粒长；GW：粒宽；L/W：长宽比；GS：籽粒表面积；GC：籽粒周长。



附图 1 微卫星标记 RM9 和 RM27 在 4 套倍性材料中的筛选结果

Supplementary Fig.1 Selection of SSR marker RM9 and RM27 among 4 sets of polyploids in rice

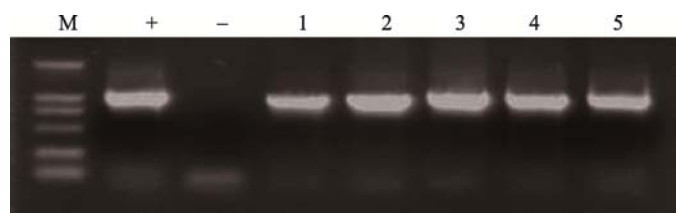
M: DL2000 Marker; A: BI(2N); B: DBI(4N); C: Nj11; D: DNj11; E: Ht; F: DHt; G: 9311; H: D9311。



附图 2 水稻愈伤组织的诱导及分化再生

Supplementary Fig.2 Callus induction and plant regeneration of rice

A: 成熟种子诱导愈伤组织; B: 继代培养; C: 愈伤组织分化; D: 生根培养。



附图 3 转基因植株的潮霉素分子检测

Supplementary Fig.3 Hyg resistance detection of transgenic lines

M: DL2000 Marker; +、- 分别代表阳性对照和阴性对照; 1~5: 转 GW2 基因的 T₀ 代植株, 皆为阳性植株。