

赤霉素 GA4 是水稻矮化特征的重要调节因子

黄升财¹, 王冰¹, 谢国强², 刘中来², 张美娟¹, 张树清¹, 程宪国¹

(¹ 中国农业科学院农业资源与农业区划研究所, 北京 100081; ² 九江农业科学院, 江西九江 332101)

摘要:【目的】以水稻幼胚组培过程中获得的一株半矮化水稻突变体为研究对象, 解析水稻半矮化突变体株高变矮及分蘖增多等表型异常的原因, 为克服水稻过度矮化发育障碍因子及培育抗倒伏高产水稻品种提供科学理论依据。【方法】首先统计分析半矮化水稻突变体与野生型的表型差异, 利用体式显微镜和光学显微镜观察突变体花的结构及其细胞特征; 通过转录组测序及 qRT-PCR 分析差异基因的表达特征, 并通过外源喷施赤霉素 GA3 处理检测突变体对外源赤霉素的敏感性; 最后利用高效液相色谱和质谱联仪检测突变体内赤霉素的含量与富集特征。

【结果】表型观测与统计结果表明, 突变体水稻株高比野生型减少 56.59%, 有效分蘖数高出 47.44%, 差异均达到极显著水平。突变体的表皮毛消失且花发育迟缓, 雄蕊变小。尽管突变体分蘖数较高但结实率明显降低, 仅为野生型的 12.62%, 且种子长度和宽度均减小, 差异极显著。通过显微镜观察茎的纵切切片, 发现突变体细胞长度减少 23%, 差异极显著。外源喷施赤霉素后突变体的株高、有效分蘖、结实率、种子大小、表皮毛和茎秆细胞长度均有不同程度的恢复, 说明植物体内赤霉素合成不足可能是引起水稻矮化的主要原因。转录组测序结果显示突变体中 *OsGA13ox* 显著上调, qRT-PCR 验证结果与转录组测序结果一致。由于 *OsGA13ox* 控制 GA12 转化为 GA53, 而 GA12 和 GA53 分别转化为 GA4 和 GA1, GA4 的活性高于 GA1, 因此, 突变体中 GA4 减少可能是导致半矮化的主要原因。赤霉素检测结果表明突变体中 GA4 含量减少 94.9%, 与预测结果一致。此外, D14 作为 SL (独脚金内酯) 的特异性受体, 参与调控植物 SL 信号转导, 抑制枝条分枝或者分蘖。qRT-PCR 结果显示, 与野生型相比, 突变体中 *D14* 显著下调, 而经过 GA3 处理的野生型和突变体中 *D14* 均显著上调。*D14* 上调可能导致有效分蘖数减少, 而其下调可能致使有效分蘖数增加。统计结果表明突变体中有效分蘖显著增多, 而经过 GA 处理之后, 野生型和突变体有效分蘖数均显著低于未经 GA3 处理前, 表明 *D14* 在水稻中的表达可能受到 GA 的调控从而影响水稻分蘖。【结论】*OsGA13ox* 异常表达导致活性更高的 GA4 在水稻中的富集减少, 形成水稻半矮化突变体; 赤霉素可能通过影响 *D14* 的表达间接调控水稻的分蘖。

关键词: 水稻; 半矮化突变体; *OsGA13ox*; 赤霉素 GA4; *D14*; 有效分蘖

Enrichment Profile of GA4 is an Important Regulatory Factor Triggering Rice Dwarf

HUANG ShengCai¹, WANG Bing¹, XIE GuoQiang², LIU ZhongLai², ZHANG MeiJuan¹,
ZHANG ShuQing¹, CHENG XianGuo¹

(¹ Institute of Agricultural Resources and Regional Planning, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081;

² Jiu Jiang Academy of Agricultural Sciences, Jiujiang 332101, Jiangxi)

Abstract: 【Objective】A dwarf rice mutant was generated by culturing rice embryo tissues and characterized to elucidate the reasons for leading to an occurrence of semi-dwarf rice with more tiller number. It is expected that this study will provide a theoretical

收稿日期: 2018-11-06; 接受日期: 2018-12-09

基金项目: 转基因重大专项 (2016ZX08010005-9)

联系方式: 黄升财, E-mail: huangshengcai_123@163.com. 通信作者张树清, E-mail: zhangshuqing@caas.cn. 通信作者程宪国, Tel: 010-82105031; E-mail: chengxianguo@caas.cn

basis for scientifically cultivating rice varieties of lodging-resistant and high-yielding in overcoming the dwarf obstacle factors.

【Method】In this study, both the rice dwarf mutant and wild type were phenotypically profiled, and the structural characteristics of flower and cell appearance of leaves were investigated by stereomicroscope and light microscopy; The differential gene expression profiles were analyzed by both the transcriptomics and qRT-PCR, and the sensitivity of the mutant to exogenous gibberellin was detected by spraying exogenous GA3; The enrichment profiles of gibberellin in the mutant were detected by a high performance liquid chromatography and a mass spectrometry. **【Result】**Data showed that the mutant demonstrated a decrease of 56.59% in the average plant height and an increase of 47.44% in the effective tiller number compared with the wild type, respectively ($P < 0.01$). Observation showed that the mutant led to disappearance of the epidermis and revealed a smaller stamen accompanying a delayed development in the flower organs. Although the mutant has a higher effective tiller number, but significantly lowers the seed setting rate, which only accounts for 12.62% of that in the wild type. The length and the width of grains also are significantly reduced ($P < 0.01$). Stem longitudinal sections reveal that the mutant decreased the cell length of 23% compared with the wild type ($P < 0.01$). However, when the mutant was exposed to exogenous gibberellin, the plant height, effective tiller number, seed setting rate, seed size, epidermis and the stem cell length were obviously restored, indicating that the dwarf mutant possibly results from the shortage of GA's synthesis in plant. Transcriptome sequencing showed that the mutant significantly up-regulated the *OsGA13ox* gene, and exhibited an identical result with the qRT-PCR analyses. Since the *OsGA13ox* controls the conversion of the GA12 to the GA53, both of which are converted to the GA4 and the GA1, respectively. Particularly, the GA4 exhibits a higher activity than the GA1, suggesting that rice dwarf might be triggered by the reduction of GA4 enrichment in plant. Measurement confirmed that the accumulation of the GA4 in the mutant was decreased by 94.9% compared with the wild type. Additionally, as a specific receptor for SL (Strigolactone), the *D14* gene is involved in the SL signaling transduction in plant, and thus inhibits branching or tillering. The qRT-PCR showed that the mutant significantly down-regulated the *D14* gene compared to the wild type, however, both the wild type and the mutant significantly up-regulated after spraying GA3. The data suggested that the up-regulation of the *D14* gene might lower the effective tiller number, while the down-regulation of the *D14* gene possibly increase the effective tiller number. Statistical analyses demonstrates that the mutant significantly increased the effective tiller number, but both the wild type and mutant decreased the effective tiller number after spraying GA3, indicating that the expression profiles of the *D14* gene in rice might be modulated by GA, and thereby exert on the tiller number. **【Conclusion】**Semi-dwarfed rice mutant is likely caused by a decrease of GA4 enrichment because of abnormal expression of the *OsGA13ox* gene, and GA might indirectly regulate rice tiller by affecting the expression of the *D14* gene.

Key words: rice; semi-dwarf mutant; *OsGA13ox*; GA4; *D14*; effective tiller

0 引言

【研究意义】水稻是人类生存至关重要的粮食作物之一, 水稻产量通常由分蘖数、穗粒数、单粒重及株高等农艺性状决定。随着人口压力逐渐增加, 耕地面积逐渐减小, 气候和环境恶化等问题的出现, 人类对粮食产量和质量的要求愈来愈高。探明水稻矮化和分蘖增多的分子机制, 为培育抗倒伏及高有效分蘖的水稻品种提供科学的理论支持, 对保证人类粮食安全具有重要的意义。 **【前人研究进展】**植物生长高度在很大程度上受内源激素的影响, 包括赤霉素^[1-2]、油菜素类固醇^[3-4]以及独脚金内酯^[5-6]等。其中赤霉素(GAs)是一类二萜类化合物, 可促进植物生命周期各个阶段的生长: 种子萌发、茎伸长、叶片膨大、开花和花发育^[7]。赤霉素的合成受古巴焦磷酸合成酶(copalyl pyrophosphate synthase, CPS)、内根-贝壳杉烯合成酶

(ent-kaurene synthase, KS)、内根-贝壳杉烯 19-氧化酶(ent-kaurene oxidase, KO)、GA-20-氧化酶(gibberellin-20-oxidase, GA20ox)及 GA-3-氧化酶(gibberellin-3-oxidase, GA3ox)等多个酶统一调控^[8]。在拟南芥中, *gal* (CPS 突变体)^[9]、*ga2* (KS 突变体)^[10]、*ga3* (KO 突变体)^[11]均出现矮化现象。水稻赤霉素合成基因 *OsKS*^[12]、*OsKO* (*d35*)^[13]及 *OsGA20ox1* (*sd1*)^[1]突变也会使水稻出现不同程度的矮化。一般情况下, 赤霉素合成突变体除了株高会发生变化之外, 另外一个特征是对外源 GA 敏感。而水稻 *gid1*^[14]和 *slr1*^[15]突变体均对外源 GA 不敏感, 表明 GID1 (赤霉素特异性受体) 和 SLR1 (DELLA 蛋白) 参与植物体内赤霉素信号的转导。相关研究表明, 当细胞外 GA 浓度较低时, GID1 不与 GA 结合, 其 N 端结构域(N-Ex)呈疏松状态, 使 DELLA 蛋白与 GA 早期应答基因结合, 并通过抑制应答基因的翻译过程进而使其失活。当细胞外 GA

浓度较高时, GA 诱导 GID1 构象发生变化, 并与其结合形成 GA-GID1 复合物。该复合物具有疏水性的表面以便与 DELLA 蛋白形成三聚体, 促进 DELLA 与泛素 E3 连接酶复合体结合, 诱导 DELLA 蛋白被 26S 蛋白酶降解, 进而 GA 信号得以释放^[16]。矮化突变体除了株高变矮之外, 通常还伴随着花发育异常和分蘖增多等现象。尹昌喜^[17]研究表明 *OsGA3ox2* 下调表达及 *OsGA2ox1* 上调表达导致穗茎节间 GA1 含量减少是水稻出现半矮化和包穗的原因。而张玲^[18]和 WANG 等^[19]分别利用图位克隆和 BSA 鉴定了新的基因 *DDF2* 和 *DDF3*, 这两个基因的突变均能导致水稻半矮化且花发育异常。独脚金内酯 (strigolactone, SL) 是一组类胡萝卜素衍生的内酯, 拟南芥多从枝突变体^[20]及水稻多分蘖突变体^[21]均证实了 SL 在抑制腋芽生长方面具有保守作用。【本研究切入点】笔者在转基因水稻中获得稳定遗传的半矮化突变体, 与已被鉴定的其他水稻矮化植株的表型有较大差异。【拟解决的关键问题】本研究利用转录组学及生物信息学分析确定造成突变体表型异常的主要基因, 并利用高效液相色谱-质谱联仪对突变体内的激素进行检测, 与转录组测序结果相互验证。矮化成因的解析对克服过度矮化障碍因子及培育抗倒伏高产水稻品种具有理论与应用价值。

1 材料与方法

1.1 突变体材料

在水稻日本品种 Kitaake (*Oryza sativa Japonica*) 幼胚组培过程中, 获得一株半矮化突变体, 通过网室自然条件下土壤培养 3 代之后, 未出现性状分离, 表型稳定, 突变体用 *sd13* (*semi-dwarf13*) 表示。

1.2 突变体表型分析

挑选发育饱满的野生型和突变体种子于玻璃培养皿中, 自来水浸泡, 置于 30℃ 恒温培养箱中暗发芽 1 d。第 2 天用湿润的滤纸代替自来水继续培养, 第 4 天转移到光照培养箱中, 光照条件为白天 16 h 28℃/黑夜 8 h 22℃。第 5 天转移到土壤中, 水稻土和蛭石比例为 2 : 1, 培养白盆的尺寸 54 cm×35 cm×12 cm (长×宽×高), 土壤重量为 4 kg, 每天上午和下午各浇一次水。培养地点是中国农业科学院资源区划所东区网室。

在水稻生长至抽穗期时, 用直尺量取地上部高度 (5 次生物学重复)。选取 5 株水稻进行有效分蘖数统计。利用立体式显微镜 (LECIA M165 FC, 德国) 观察水稻小穗及花内部构造的差异。小穗采自穗的同

一位置, 然后用镊子将外稃和内稃分开露出雄蕊和雌蕊。选取穗茎节间的茎, 用刀片刮至茎透明为止, 刮的时候需滴两滴蒸馏水以确保茎保持湿润, 然后利用光学显微镜 (LEICA DM6 B, 德国) 观察细胞大小, 并统计 30 个细胞的长度。在水稻成熟之后, 选取 10 株统计其结实率。然后用游标卡尺测量种子长和宽, 重复 6 次。

1.3 转录组测序

对苗期生长 3 周的水稻进行外源 GA 处理, 喷施 20 mL 浓度为 $1.5 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 GA3, 3 d 喷施 1 次, 共 3 次, 于喷施后第 8 天选取水稻第 2 片叶进行转录组测序, 所有处理均按 3 次生物学重复进行。首先用 Easy Pure Plant RNA (北京全式金) 试剂盒提取 RNA, 然后用带有 Oligo(dT) 的磁珠富集 mRNA, 加入 fragmentation buffer 将 mRNA 打断成短片段, 随后, 用六碱基随机引物 (random hexamers) 以 mRNA 为模板进行反转录合成一链 cDNA, 再加入缓冲液、dNTPs 和 DNA 聚合酶 I 合成二链 cDNA。其次利用 AMPure XP beads 纯化双链 cDNA, 对纯化后的双链 cDNA 进行末端修复、加 A、加接头。通过 AMPure XP beads 对双链 cDNA 进行片段大小选择, 最后进行 PCR 扩增以构建 cDNA 文库。使用 Agilent 2100 对文库的插入片段大小进行检测, 文库质检合格后, 利用 Illumina 高通量测序平台进行测序。

使用 DEseq 和 DEseq2 检测转基因与野生型株系之间的差异表达基因, 差异基因筛选的条件为: 差异倍数 ≥ 2 和 Q 值 (或 FDR) ≤ 0.01 。然后使用 Gene Ontology (GO 富集)^[22]和 KEGG 富集^[23]对差异基因进行分析。

1.4 突变体外源 GA 敏感性检测

土培水稻外源喷施 GA 处理与转录组测序的水稻一致, 在转录组测序取样之前, 观察并记录表型差异。水培水稻外源 GA 处理是待水稻在恒温培养箱中发芽 3 d 后, 进行水培, 营养液 (Hoagland, pH5.8) 3 d 更换 1 次, 并在营养液中分别添加浓度为 1.5×10^{-4} 、 3×10^{-5} 和 $6 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 GA3, 10 d 后, 观察突变体的表型。

1.5 qRT-PCR 分析

待水稻生长至孕穗期, 进行外源 GA 处理, 与转录组测序取样之前的处理方式相同, 之后选取花、穗茎节间的茎及第 2 片叶提取 RNA。首选液氮进行研磨, 之后用 Easy Pure Plant RNA 试剂盒 (北京全式金) 进行 RNA 提取。将提取后的 RNA 用浓度测定仪

(Nanodrop 2000, 美国)测定其浓度。利用反转录试剂盒 Transscript One-step gDNA Removal and cDNA Synthesis SuperMix (北京全式金)将 1.5 μg RNA 反转录为 cDNA。使用 ChamQ™ Universal SYBR qPCR Master Mix (南京诺唯赞)进行荧光定量 PCR, 总反应溶液体积为 20 μL, 包括 10 μL 2×ChamQ™ Universal SYBR qPCR Master Mix、0.4 μL 正反引物(表 1)、2 μL cDNA 模板和 7.2 μL 无 RNA 酶水, 重复 3 次。使用 ABI 7500 (美国)荧光定量 PCR 仪进行定量 PCR 扩增, PCR 扩增条件为 94℃ 30 s; 95℃ 10 s, 60℃ 30 s, 40 个循环。以 *β-Actin* 作为内参, 扩增结束后使用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 公式计算相对表达量。

表 1 荧光定量 PCR 引物
Table 1 Fluorescent quantitative PCR primers

基因 Gene	引物序列 Primer sequence (5'-3')
<i>β-Actin</i>	F: CTGACAGGATGAGCAAGGAG
	R: GGCAATCCACATCTGCTGGA
<i>OsGA13ox</i>	F: AGAAGTGAGAAAAAGACTACGG
	R: CAATGATCTTTCTCTGGTGTGC
<i>D14</i>	F: AGAAAGAGAGAGAAGAAGCGAG
	R: CGCGCTCCCTTTTATATACTA

1.6 赤霉素含量检测

1.6.1 赤霉素的提取 称取新鲜水稻叶片约 1 g 于液氮中研磨粉碎, 加入 10 mL 异丙醇/盐酸提取缓冲液和 8 μL 1 μg·mL⁻¹ 内标溶液, 4℃震荡 30 min; 随后加入 20 mL 二氯甲烷, 4℃震荡 30 min; 之后 13 000 r/min (4℃)离心 5 min, 取下层有机相, 避光用氮吹仪(杭州美欧)吹干有机相, 用 400 μL 甲醇(0.1%甲酸)溶解, 0.22 μm 滤膜过滤, 最后用高效液相色谱(Agilent1290, 美国 Aglient)-质谱(SCIEX-6500Qtrap, 美国 AB)联仪检测。

1.6.2 标准曲线绘制 以甲醇(0.1%甲酸)为溶剂配制梯度为 0.1、0.2、0.5、2.0、5.0、20.0、50.0 和 200.0 ng·mL⁻¹ 的 GA1 和 GA4 标准溶液, 并加入终浓度为 20.0 ng·mL⁻¹ 的内标溶液。每个浓度 2 个重复。

1.6.3 液相和质谱条件 液相条件: 色谱柱采用 poroshell 120 SB-C18 反相色谱柱(2.1 mm×150 mm, 2.7 μm); 柱温: 30℃; 流动相: A : B= (甲醇/0.1%甲酸) : (水/0.1%甲酸); 洗脱梯度: 0—1 min, A=20%; 1—9 min, A 递增至 80%; 9—10 min, A=80%; 10—10.1 min, A 递减至 20%; 10.1—15min, A=20%; 进样体积: 2 μL。

质谱条件: 气帘气为 15 psi; 喷雾电压: 4 500 V; 雾化气压力: 65 psi; 辅助气压力: 70 psi; 雾化温度: 400℃。

1.7 统计分析

利用 Excel 2010 和 SPSS 12.0 软件对实验数据进行统计分析, 用 Duncan 法进行差异显著性检验。

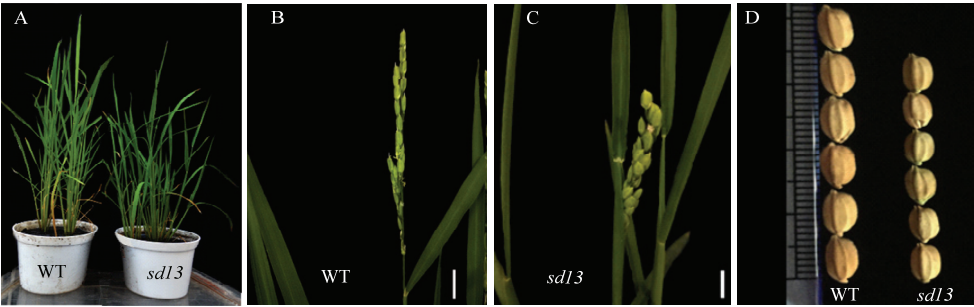
2 结果

2.1 半矮化突变体 *sd13* 的表型差异

水稻半矮化突变体的表型发育异常。与野生型相比, 突变体株高变矮且分蘖数增多(图 1-A)并出现包穗现象, 穗不能完全伸出剑叶鞘(图 1-B 和图 1-C); 突变体种子变小(图 1-D)且小穗发育异常, 外稃与内稃上的表皮毛消失(图 2-A 和图 2-C); 花发育延迟, 雄蕊变小(图 2-E 和图 2-G); 茎节间细胞长度减小(图 3)。统计分析显示突变体株高减少 56.29%, 且各个节间长度均减小(图 4-A), 差异极显著; 突变体有效分蘖数比 WT 高出 47.44%(图 4-B), 方差分析差异极显著; 突变体结实率低, 仅为 WT 的 12.62%(图 4-C); 种子长度和宽度均减小, 经方差分析差异显著($P<0.05$)(图 4-D 和图 4-E)。利用显微镜对突变体的茎纵切片统计分析, 发现突变体的细胞长度减少约 23%, 差异极显著($P<0.01$)(图 4-F)。

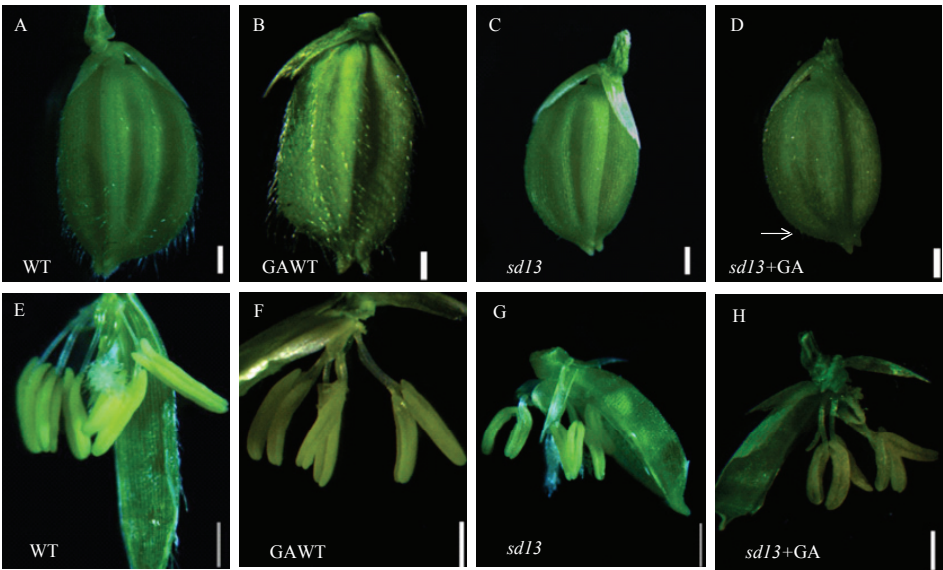
2.2 突变体对外源 GA 敏感性检测

为了深入探究突变体遗传突变的分子应答与赤霉素合成基因之间是否存在依存关系, 对水稻进行外源喷施 GA3 处理, 结果表明, 经赤霉素处理的突变体的株高、分蘖、包穗、结实率、种子大小、表皮毛和茎细胞长度均得到一定程度的恢复(图 2-C 和图 2-D, 图 4-B—图 4-F, 图 5-A)。与喷施 GA3 前相比, 野生型和突变体在喷施 GA3 之后, 有效分蘖数均减小, 差异均达显著水平。喷施 GA3 后, 与野生型相比, 虽然突变体结实率差异仍然极显著, 但是与喷施 GA3 之前相比显著增高($P<0.01$)。种子的长与宽在喷施 GA3 后均得到一定程度的恢复, 但是与喷施 GA 前差异不明显。在喷施 GA3 后, 突变体表皮毛出现了一定的恢复, 但是没有测试具体数量指标。突变体在喷施 GA3 后, 其茎细胞长度显著变长($P<0.01$)。水培的突变体经过 GA3 处理也出现相似的现象(图 5-B), 结果显示, 在营养液中添加不同浓度 GA3 之后, 突变体株高均增加, 其中以低浓度处理(6×10^{-6} mol·L⁻¹)的突变体恢复最佳, 说明突变体极有可能是 GA 敏感型突变体。



A: 孕穗期野生型和突变体形态; B: 野生型小穗 (比例尺, 2 cm); C: 突变体小穗 (比例尺, 2 cm); D: 野生型和突变体成熟种子大小
A: Morphological characteristics at booting stage; B: Spikelet in the WT (Scale bar, 2 cm); C: Spikelet in the *sd13* (Scale bar, 2 cm); D: Mature seed size

图 1 野生型和突变体的表型差异
Fig. 1 Phenotypic differences between the WT and the *sd13*



A—D: GA 喷施前后野生型和突变体水稻小穗形态 (比例尺, 0.4 mm); E—H: GA 喷施前后野生型和突变体水稻花的特征 (比例尺, 0.4 mm)
A-D: The spikelet morphology of the WT and the *sd13* before and after the application of GA3 (Scale bar, 0.4 mm); E-H: The flower characteristic of the WT and the *sd13* before and after the application of GA3(Scale bar, 0.4 mm)

图 2 水稻野生型和突变体的微观表型
Fig. 2 Microscopic phenotypes of the WT and the *sd13*

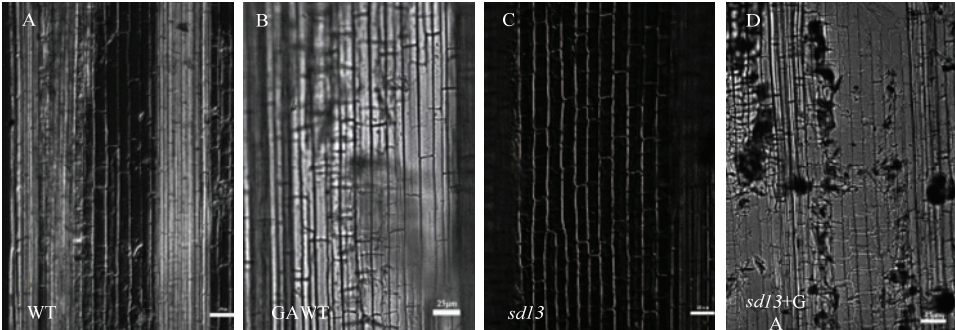
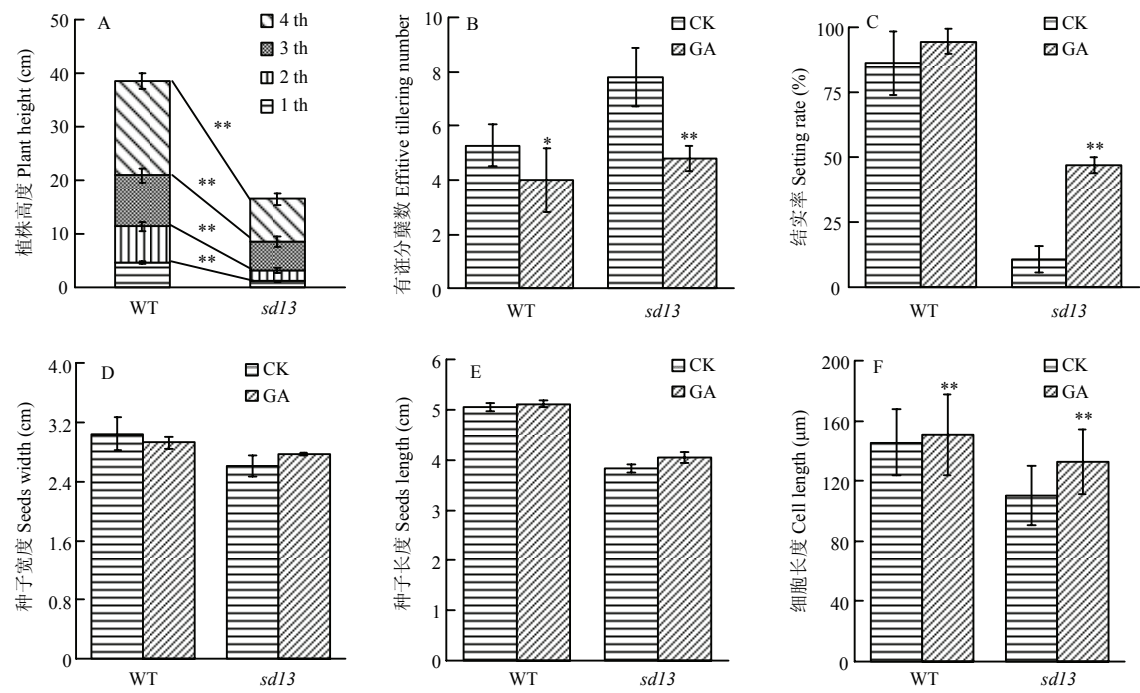


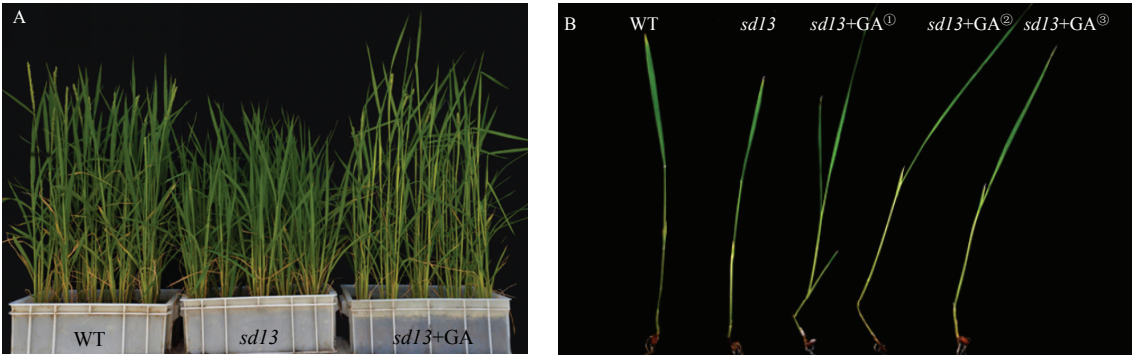
图 3 喷施 GA3 前后野生型和突变体水稻穗茎节间茎细胞大小 (比例尺, 25 μm)
Fig. 3 The apical internode cell size of the WT and the *sd13* before and after spraying GA (Scale bar, 25 μm)



**代表差异极显著, $P<0.01$; *代表差异显著, $P<0.05$ 。下同
** indicates a extremely significant difference, $P<0.01$; * indicates a significant difference, $P<0.05$. The same as below

图 4 野生型和突变体水稻表型及茎细胞长度统计分析

Fig. 4 Statistical analyses of phenotype and stem cell lengths of the WT and the *sd13*



A: 土培突变体喷施 GA 后的表型变化; B: 营养液添加不同浓度 GA 后突变体表型变化, GA^①、GA^②和 GA^③分别代表 GA3 浓度为 1.5×10^{-4} 、 3.0×10^{-5} 和 6.0×10^{-6} mol·L⁻¹
A: Phenotypic changes after application of GA by soil culture mutants; B: Mutant phenotypic changes after adding different concentrations of GA in nutrient solution, the GA^①, GA^② and GA^③ represents the concentration of GA3 is 1.5×10^{-4} , 3.0×10^{-5} and 6.0×10^{-6} mol·L⁻¹, respectively

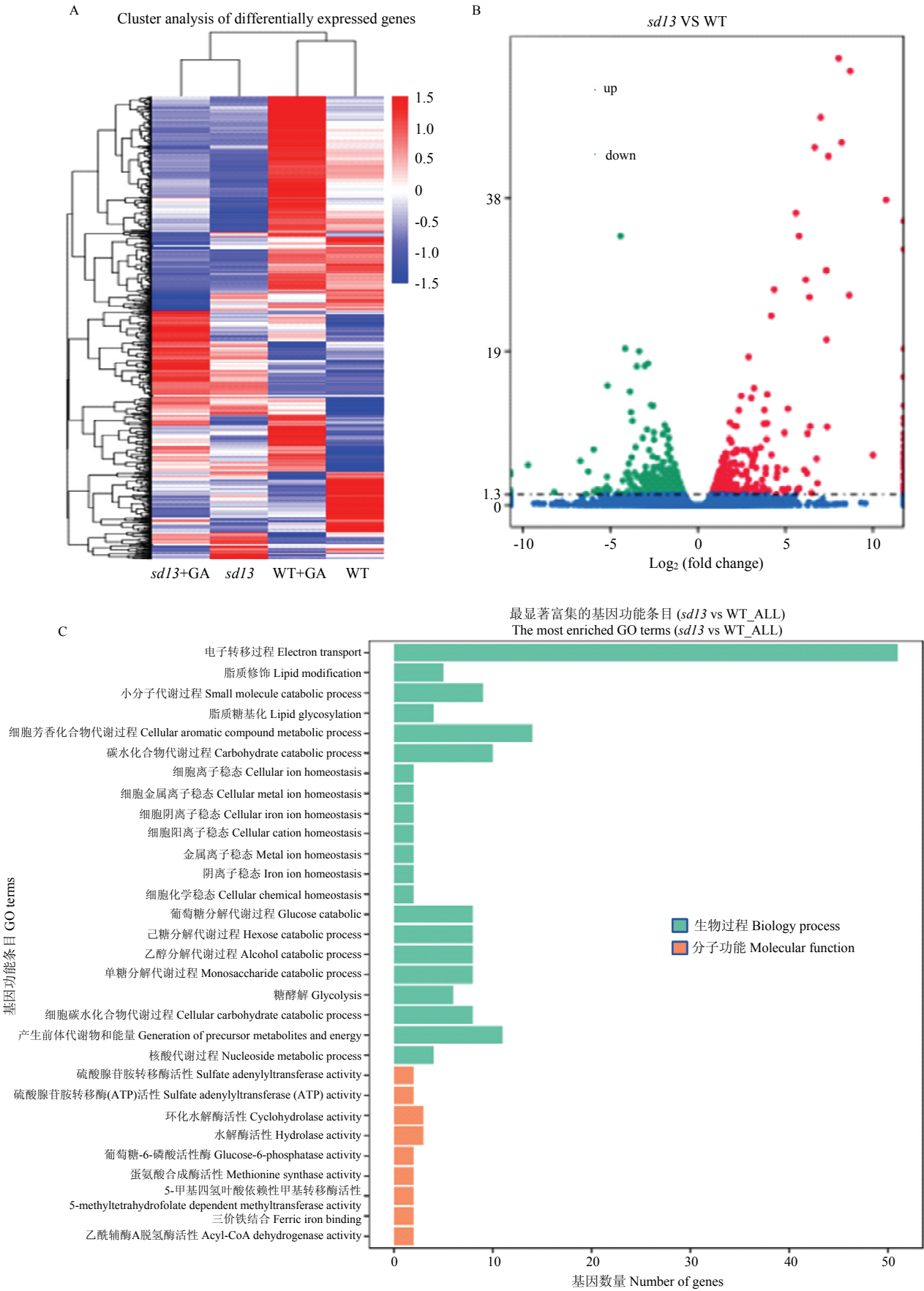
图 5 GA 处理后突变体的表型变化

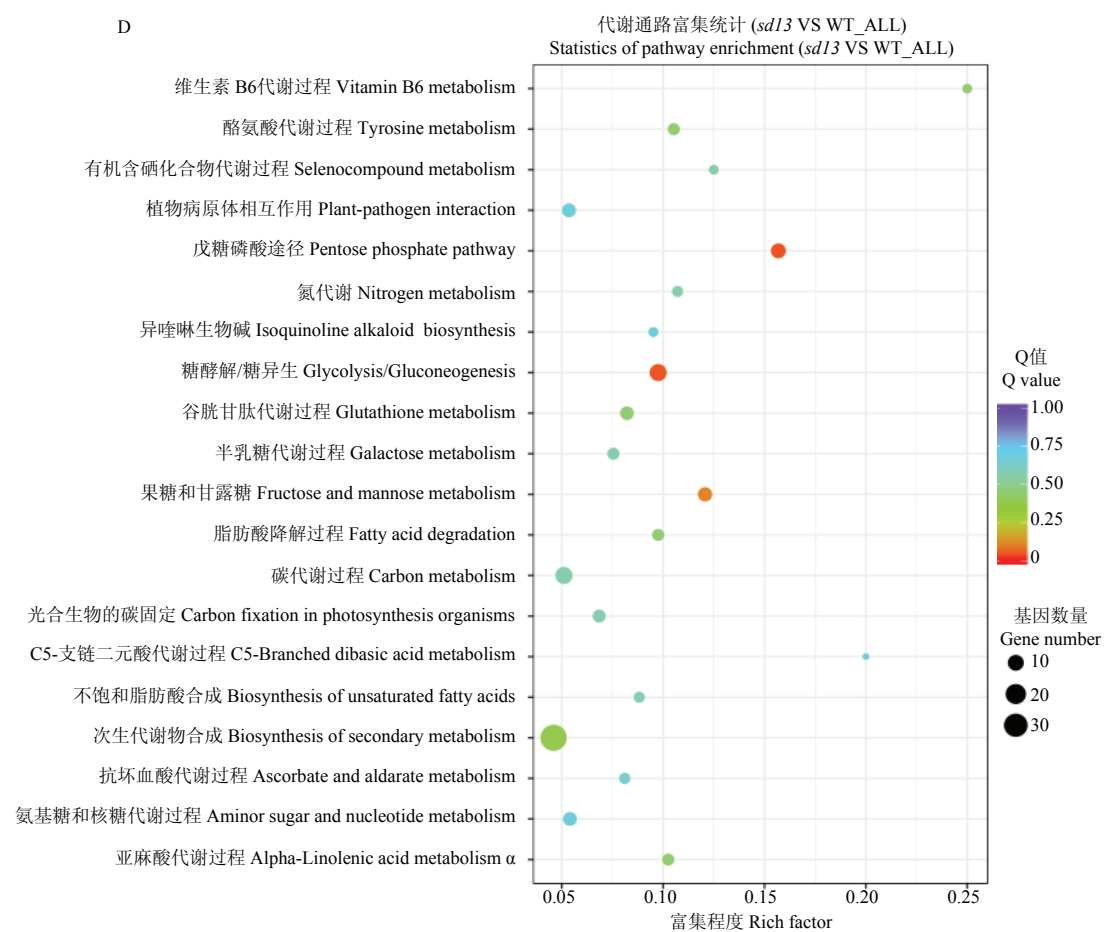
Fig. 5 Phenotypic changes of the *sd13* after GA treatment

2.3 基于转录组学分析的差异基因表达特征

为了深入探究 *sd13* 遗传突变的分子机制,将培养 3 周的水稻进行转录组测序。测序结果显示,与 WT 相比,突变体共有 631 个差异基因,其中 326 个上调,

305 个下调(图 6-B)。GO (Gene Ontology) 富集显示,差异基因主要富集在电子转移过程,涉及电子转移的基因有 50 个(图 6-C)。KEGG(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) 富集显示差异基因主要参与糖





A: 差异基因聚类图。每一行表示一个基因，每一列表示一个样，颜色从红到蓝，表示表达水平从大到小，颜色相近聚类区内的基因表达模式相近，说明这些基因可能具有相似的功能或参与调控同一条代谢通路；B: 差异基因火山图。差异表达显著的基因用红点（上调）和绿点（下调）表示，差异表达不显著的基因用蓝点表示；C: 差异基因 GO 富集图。绿色代表生物过程，橙色代表分子功能；D: 差异基因 KEGG 富集散点图。点的大小表示此 pathway 中差异表达基因个数多少，而点的颜色对应于不同的 Qvalue 值，值越小说明富集越显著

A: Differential gene clustering. Each row represents a gene and each column represents a sample. The color is from red to blue, indicating that the expression level is from large to small, and the expression patterns of genes in similar clusters are similar, indicating that these genes may have similar functions or participate in regulation of the same metabolic pathway; B: Differential gene volcano map. Genes with significant differential expression are indicated by red dot (up-regulation) and green dot (down-regulation), and genes with insignificant differential expression are represented by blue dots; C: Differential gene GO enrichment map. Green represents biological processes and orange represents molecular function; D: Differential gene KEGG enrichment scatter plot. The size of the dot indicates the number of differentially expressed genes in the pathway, and the color of the dot corresponds to a different Qvalue. The smaller the value, the more significant the enrichment

图 6 转录组测序结果

Fig. 6 Transcriptome sequencing results

酵解和磷酸戊糖等代谢途径（图 6-D）。说明半矮化突变体的某一个或者多个基因突变导致了下游参与电子转移基因的异常表达，异常表达的基因极有可能是一些与糖代谢有关的活性酶。

为进一步分析挖掘差异表达基因的累积分布特征，对突变体中喷施 GA 前后得到的 8 个表达不一致的差异基因进行了分析（表 2），结果表明，这 8 个差异基因对外源 GA 较为敏感。利用生物信息学分析，发现有一个与赤霉素合成相关的 *OsGA13ox*，在突变体中表达明

显上调，而喷施 GA 后表达出现下调。*OsGA13ox* 在植物体内负责将 GA12 转化为 GA53，而 GA12 和 GA53 又分别转化为 GA4 和 GA1，GA4 的活性强于 GA1，暗示半矮化突变体极有可能是 *OsGA13ox* 表达异常引起的。对突变体的花、茎和叶提取 RNA 进行 qRT-PCR 验证，结果（图 7）显示，*OsGA13ox* 在突变体各器官中的表达均高于野生型，尤其在茎中的表达量较高且与 WT 相比差异极显著；*OsGA13ox* 在突变体叶中的表达量也较高，与 WT 相比差异极显著；但在花中的差异不明显。

对突变体进行 GA 处理之后, *OsGA13ox* 的表达量出现不同程度的下降, 其中在茎和叶中与喷施 GA 之前相比差异极显著。说明突变体是由 *OsGA13ox* 表达异常引起的, 且 *OsGA13ox* 对外源 GA 敏感。

表 2 突变体喷施 GA 前后表达相反的基因
Table 2 Expressing opposite genes before and under GA application in the *sd13*

基因 Gene	功能 Function
<i>Os01g0115600</i>	蛋白激酶功能, 结合 ATP Kinase function, binding with ATP
<i>Os01g0781700</i>	ATP 结合功能 ATP binding
<i>Os10g0463800</i>	功能未知 Unknown function
<i>Os03g0332100</i>	GA13ox, 催化 GA12 转化为 GA53, 决定 GA4 和 GA1 的比例 ^[24] GA13ox, Converts GA12 into GA53, determines the ratio of GA4 and GA1 ^[24]
<i>Os04g0223500</i>	黄素腺嘌呤二核苷酸, 单加氧酶活性 FAD, monooxygenase activity
<i>Os04g0606000</i>	酰基转移酶活性 Transferase activity, transferring acyl groups
<i>Os06g0364500</i>	多糖结合功能 Polysaccharide binding
<i>Os12g0231700</i>	推测是转位子蛋白 Transposon protein, putative

所有基因功能均查阅自 Uniprot 蛋白数据库及相关文献, 下同
All gene functions are reviewed from the UniProt database and related paper, the same below

2.4 水稻突变体 GA 的富集特征

为明确突变体中 *OsGA13ox* 表达上调是否引起水稻中 GA4 含量变化, 用高效液相和质谱联仪对突变体中的 GA1 和 GA4 进行检测分析。结果表明, 与 WT 相比, 突变体中的 GA1 含量无显著变化, 但活性更强的 GA4 减少了 94.9%(图 8), 差异极显著 ($P<0.01$),

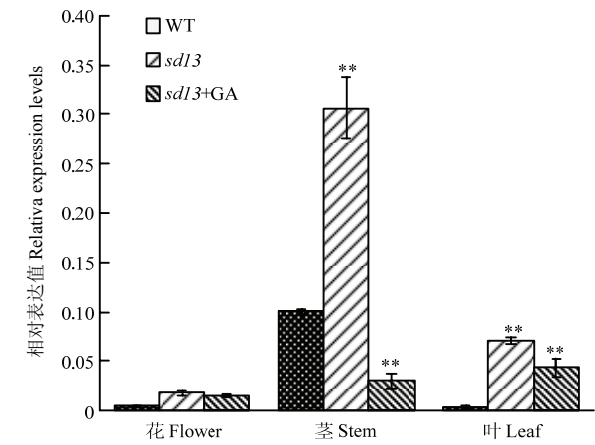


图 7 *OsGA13ox* 在突变体各器官中的相对表达量
Fig. 7 Relative expression of the *OsGA13ox* gene in flowers, stem and leaf of the *sd13*

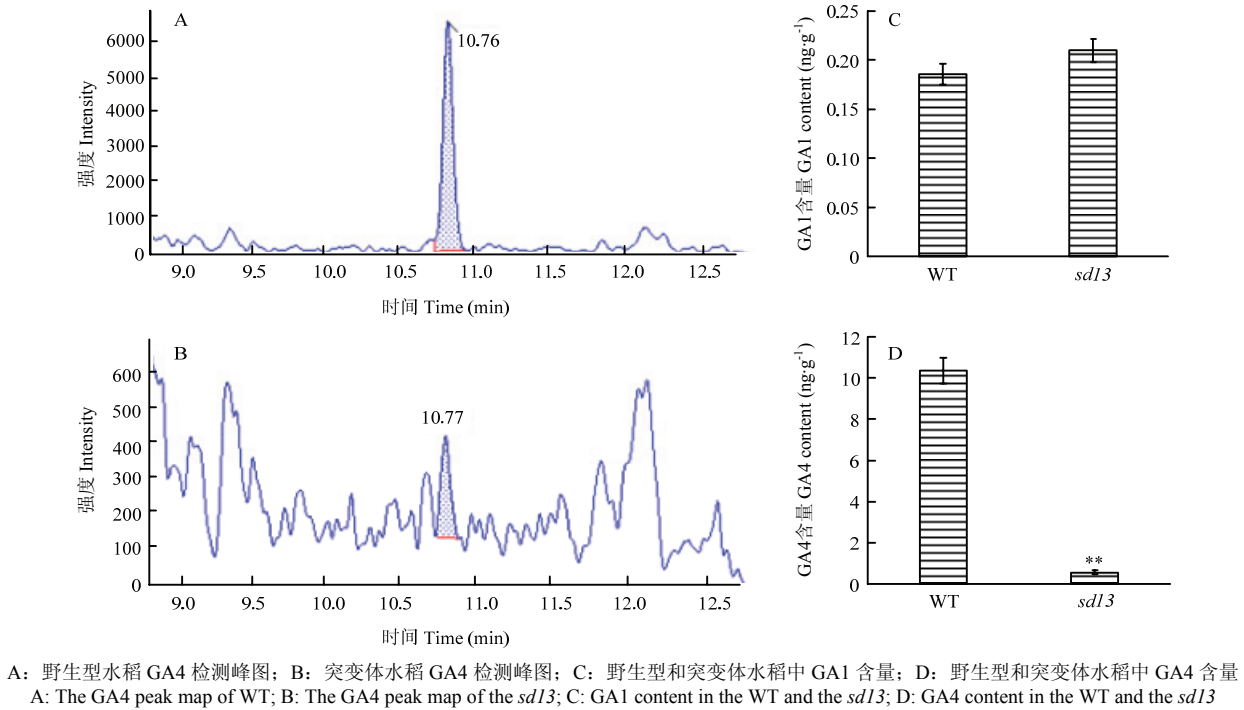


图 8 水稻野生型和突变体中 GA 的检测结果
Fig. 8 GA test results in the WT and the *sd13*

与预测结果一致,说明半矮化突变体是由 GA4 减少引起的。

2.5 GA 对水稻分蘖的影响

赤霉素 (GA) 和独脚金内酯 (SL) 通常参与调控植物的枝条分枝或分蘖^[25], 并且 GA 和 SL 之间存在着竞争 DELLA 蛋白结合位点的关系^[26]。转录组测序分析韦恩图显示, 野生型和突变体有 12 个共同对 GA 应答的基因 (图 9-A), 利用 GO 注释获得这 12 个基因的功能 (表 3)。有趣的是, 最后 3 个基因

Os03g0203200、*Os03g0251350* 和 *Os03g0856500* 在突变体中也下调表达。*Os03g0203200* 是 D14 蛋白, 作为独脚金内酯 (SL) 的特异性受体, 可与赤霉素受体 GID1 竞争 DELLA 蛋白结合位点, 调控植物的生长发育^[27]。qRT-PCR 结果显示 (图 9-B), 与野生型相比, *D14* 在突变体中下调表达, 差异极显著。野生型和突变体喷施 GA 后, *D14* 均上调表达, 其中野生型 *D14* 上调表达较高, 差异极显著 ($P<0.01$), 而突变体中虽然也出现了上调表达, 但与喷施 GA 之前相比, 差异不显著。

表 3 野生型和突变体共表达的 12 个 GA 应答基因
Table 3 A total of 12 genes responding to GA in both WT and *sd13*

基因 Gene	功能 Function
<i>Novel00727</i>	Lnc RNA, 可能参与调控植物的表型 Lnc RNA, probably participate in regulating the phenotype of plants
<i>Os01g0191200</i>	磷酸激酶活性 Acid phosphatase activity
<i>Os01g0198900</i>	功能未知 Unknow function
<i>Os01g0368900</i>	谷胱甘肽-二硫化物氧化还原酶活性 Has a glutathione-disulfide oxidoreductase activity
<i>Os01g0501800</i>	参与光合系统 II 的组装和稳定 Involved in photosystem II assembly and stabilization
<i>Os01g0600900</i>	光受体, 捕捉光信号 The light-harvesting complex functions as a light receptor
<i>Os01g0948200</i>	转录因子 DNA-binding transcription factor activity
<i>Os03g0159900</i>	功能未知 Unknow function
<i>Os03g0196250</i>	功能未知 Unknow function
<i>Os03g0203200</i>	D14 蛋白参与独脚金内酯 (SL) 信号通路; 与赤霉素竞争 DELLA 结合位点 ^[27] Involved in strigolactone signaling pathway; Competition with GA for DELLA binding sites ^[27]
<i>Os03g0251350</i>	转录因子, 调控长日照开花 ^[28] Probable transcription factor involved in the regulation of flowering time under long day ^[28]
<i>Os03g0856500</i>	与核糖体小亚基结合, 负调控蛋白翻译 Ribosomal small subunit binding, negative regulation of translational elongation

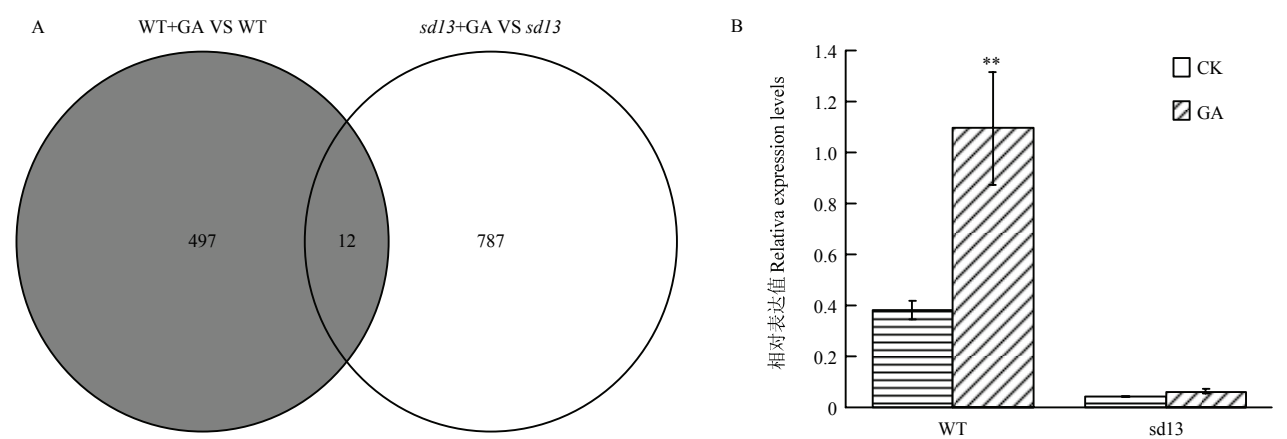


图 9 差异基因韦恩图及 *D14* 在野生型和突变体茎中的相对表达量
Fig. 9 Venn diagram of differential genes and relative expression levels of *D14* in the stems of the WT and the *sd13*

3 讨论

3.1 *OsGA13ox* 异常表达使 GA4 含量减少是突变体半矮化的原因

许多研究表明水稻的矮化及半矮化与赤霉素合成或信号转导受阻有关, ITOH 等^[29]研究表明水稻 *OsGA3ox2* 突变是 *d18* 突变体矮化的原因, 而 LO 等^[30]发现超表达 *OsGA2ox* 水稻也会出现矮化等现象。这些现象产生的原因是 GA3ox 氧化酶是控制合成 GA1 和 GA4 的关键因子, 而 GA2ox 氧化酶可以使 GAs 钝化失活^[31]。本研究发现一株半矮化突变体, 其株高变矮, 分蘖增多, 且花发育异常, 结实率低。该突变体对外源 GA 敏感, 并且喷施 GA₃ 能使表型得到一定程度的恢复, 说明该突变体为功能缺失型突变体。赤霉素的合成主要受内根-贝壳杉烯合成酶 (KS)、内根-贝壳杉烯 19-氧化酶 (KO)、GA-13-羟化酶 (GA13ox) 及 GA-20-氧化酶 (GA20ox) 等酶的统一调控 (图 10)。已有研究表明, 在拟南芥^[32-33]和水稻^[34]中, GA1 的生物活性低于 GA4, 而 GA13ox 作为调控 GA4 和 GA1

的枢纽, 对植物体内赤霉素的相对稳定具有十分重要的作用。MAGOME 等^[24]发现 *OsGA13ox* 在水稻中超表达可导致水稻半矮化, 而 GA13 突变体却表现出植株增高, 穗茎节间变长。造成这种现象的原因是 *GA13ox* 超表达致使活性更高的 GA4 富集减少, *gal13* 突变体则相反, 由此可说明 *GA13ox* 在控制植物体内 GA4 和 GA1 的相对稳定发挥着重要的作用。本研究转录组测序和 qRT-PCR 结果显示, 与 WT 相比, 半矮化突变体 *OsGA13ox* 表达上调, 使活性更高的 GA4 含量减少, 破坏 GA4 和 GA1 之间的相对平衡, 这与前人研究结论相似, 再次证明了 GA13ox 对植物体内赤霉素的相对平衡是至关重要的。

3.2 *sd13* 的突变基因可能是能够抑制 *OsGA13ox* 基因表达的转录因子

通常基因的转录水平受转录因子的调节, ZHANG 等^[35]研究发现水稻转录因子 OsWRKY71 是赤霉素信号转导的抑制子, 而 OsGAMYB 是 GA 诱导型转录激活因子, 其启动子中含有 W 盒功能性保守基序 TGAC, OsWRKY71 可以与该基序特

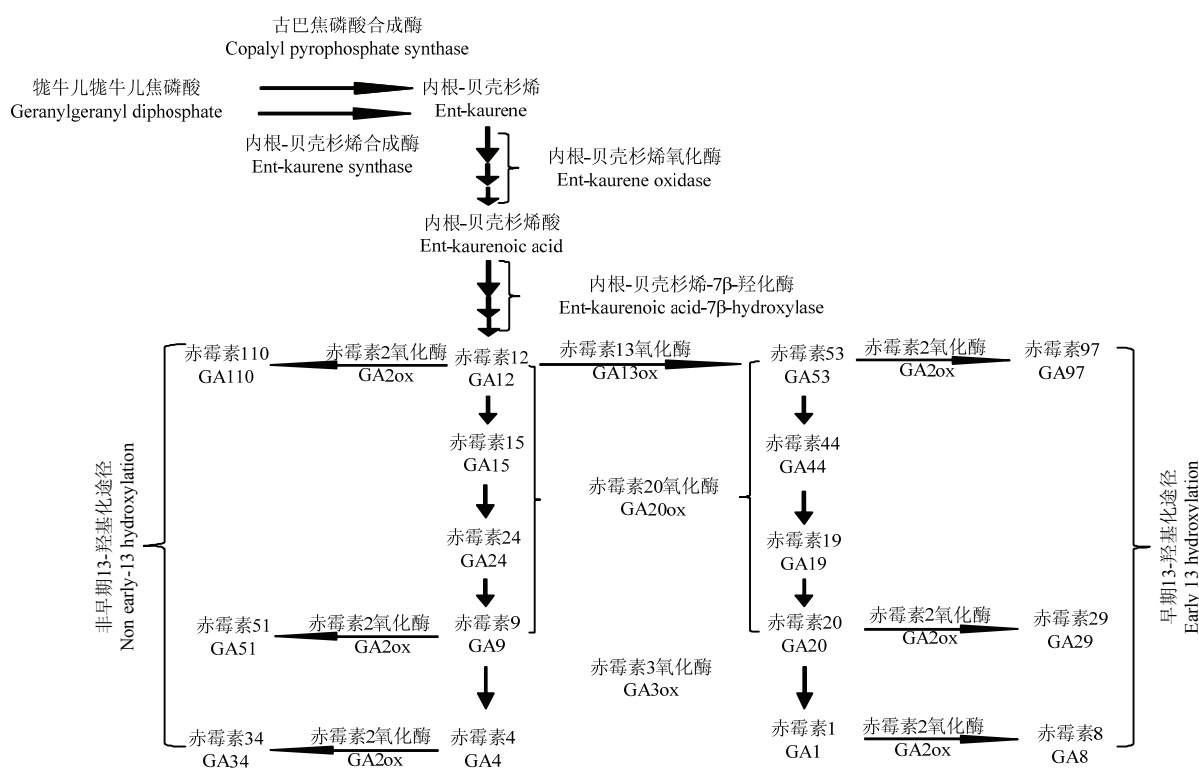


图 10 植物体内赤霉素合成途径^[31]

Fig. 10 Gibberellin synthesis pathway in plants^[31]

异性结合而抑制 OsGAMYB 的激活，导致 GA 信号的转导受到阻碍。ZHANG 等^[36]又发现 *OsWRKY24* 也可以抑制赤霉素信号的转导。GUO 等^[37]研究表明拟南芥 *GDI* 是编码具有抑制活性的含 B3 结构域的转录因子，*gdl* 突变体致使拟南芥出现矮化等现象，同时发现赤霉素（GA）失活基因 *OsGA2ox3* 的表达显著增加；并且验证了 *gdl* 突变体中 *OsGA20ox1*、*OsGA20ox2* 和 *OsGA3ox2* 3 种 GA 生物合成基因表达减少，导致内源 GA4 富集明显降低。外源 GA 处理不仅可以诱导拟南芥 *GDI* 表达，而且能够部分缓解 *gdl* 突变体的矮化程度，说明 *GDI*

能够抑制植物体内赤霉素失活基因的表达。因此，推测本研究中 *OsGA13ox* 的异常表达可能与具有抑制活性的转录因子突变有关。利用植物转录因子数据库（<http://plantfdb.cbi.pku.edu.cn>）对 *OsGA13ox* 转录起始位点前 500 位和后 100 位启动子序列进行基序预测，结果如表 4 所示。除此之外，据报道，茉莉酸（JA）可以通过强烈抑制 *GA20ox* 和 *GA13ox* 的转录拮抗 GA 的合成^[38]，说明高水平 JA 可能拮抗茎中 GA 的生物合成。所以与 *OsGA13ox* 相关的转录因子是否突变有待于进一步深入研究，并且探索茉莉酸合成基因或其他基因是否与 *OsGA13ox* 的异常表达有关。

表 4 *OsGA13ox* 启动子序列中的基序预测结果

Table 4 The predicted results of the motif in the *OsGA13ox* gene promoter

基因 Gene	基序 Motif	家族 Family	功能 Function
<i>Os03g0224200</i>	CAGTATCTTT	ARR-B	参与细胞分裂素信号的转导 ^[39] Participation in the transduction of cytokinin signaling ^[39]
<i>Os06g0130600</i>	CACTCACATTCTCTGCACA	BBR-BPC	调控大麦 <i>BKn3</i> 的表达 ^[40] Regulate the expression of <i>BKn3</i> gene in barley ^[40]
<i>Os10g0419200</i>	TTTTTTTTTTTG	C2H2	促进植物营养生长到生殖生长的转变 ^[41] Promote the transformation of plant vegetative growth to reproductive growth ^[41]
<i>Os07g0236700</i>	GTATCTTTTTTTTTTTCGCC	Dof ^[42]	可能参与碳水化合物代谢基因的光调节，植物防御机制 Possible involvement in light regulation of carbohydrate metabolism genes, plant defense mechanisms
<i>Os03g0821200</i>	AACAAAGCTAAACATAAGGG	Dof ^[42]	参与种子萌发，发芽后糊粉中的赤霉素反应等基因的调控 Involving in seed germination, regulation of gibberellin reactions in aleurone after germination
<i>Os03g0324300</i>	GTCTAGATTCATTAC	EIL	乙烯信号响应的正向调控因子 ^[43] Positive regulator of ethylene signal response ^[43]
<i>Os03g0324200</i>	GTCTAGATTCATTAC	EIL	在植物受伤时，参与乙烯信号的转导 ^[44] Participation in the transduction of ethylene signals when plants are injured ^[44]
<i>Os09g0490200</i>	TAATGAATCTA	EIL	参与乙烯信号转导 Participation in ethylene signal transduction
<i>Os11g0681200</i>	GAAACACGCGCGCGC	FAR1	参与抵抗疾病 ^[45] Enhance the resistance of disease ^[45]
<i>Os02g0680700</i>	TAGATATTA	MYB_related ^[46]	功能未知 Unknown function
<i>Os08g0157600</i>	TAGATATTA	MYB_related ^[46]	功能未知 Unknown function

3.3 GA 可能通过调控 *D14* 的表达间接调控水稻分蘖

拟南芥 *gal-3* 突变体拥有更多的分枝，超表达 *OsGA2ox* 的水稻也表现出分蘖增多^[30]，而水稻 *d61* 突变体中赤霉素合成基因上调表达使得分蘖减少^[47]，说明 GA 能够抑制水稻分蘖。ITO 等^[25]已证明外源 GA 能够使水稻分蘖异常突变体得到恢复。除赤霉素之外，独脚金内酯（SL）也能够抑制枝条分枝或者分蘖^[48]，且 SL 的合成受 GA 信号调控^[49]。D14 蛋白为 SL 的特异性受体，二者能够和 DELLA 蛋白结合

形成复合物，从而调控下游基因的表达，间接调节枝条分枝或者分蘖。本研究发现，与 WT 相比，突变体的 *D14* 下调表达，而 *D14* 作为 SL 的特异性受体，下调表达会使 SL 信号减弱，从而使分蘖增多，这与突变体的分蘖增多相符合。外源喷施 GA 使 *D14* 上调表达，会增强 SL 信号从而使分蘖减少，而 WT 喷施 GA 后分蘖减少也验证了这一猜测。本研究推测 GA 可能通过 *D14* 的表达间接调控植物体的枝条分枝或分蘖。

4 结论

半矮化突变体是由 *OsGA13ox* 异常表达导致 GA4 富集减少引起的; 赤霉素可能通过 *D14* 间接调控水稻的分蘖。

References

- [1] SPIELMEYER W, ELLIS M H, CHANDLER P M. Semidwarf (sd-1), "green revolution" rice, contains a defective gibberellin 20-oxidase gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2002, 99(13): 9043-9048.
- [2] PENG J, RICHARDS D E, HARTLEY N M, MURPHY G P, DEVOS K M, FLINTHAM J E, BEALES J, FISH L J, WORLAND A J, PELICA F. 'Green revolution' genes encode mutant gibberellin response modulator. *Nature*, 1999, 400: 256-261.
- [3] YAMAMURO C, IHARA Y, WU X, NOGUCHI T, FUJIOKA S, TAKATSUTO S, ASHIKARI M, KITANO H, MATSUOKA M. Loss of function of a rice brassinosteroid insensitive 1 homolog prevents internode elongation and bending of the lamina joint. *The Plant Cell*, 2000, 12: 1591-1606.
- [4] HONG Z, UEGUCHI-TANAKA M, FUJIOKA S, TAKATSUTO S, YOSHIDA S, HASEGAWA Y, ASHIKARI M, KITANO H, MATSUOKA M. The Rice brassinosteroid-deficient dwarf2 mutant defective in the rice homolog of *Arabidopsis* DIMINUTO/DWARF1, is rescued by the endogenously accumulated alternative bioactive brassinosteroid, dolichosterone. *The Plant Cell*, 2005, 17: 2243-2254.
- [5] ARITE T, IWATA H, OHSHIMA K, MAEKAWA M, NAKAJIMA M, KOJIMA M, SAKAKIBARA H, KYOZUKA J. DWARF10, an RMs1/MAX4/DAD1 ortholog, controls lateral bud out-growth in rice. *The Plant Journal*, 2007, 51(6): 1019-1029.
- [6] ISHIKAWA S, MAEKAWA M, ARITE T, ONISHI K, TAKAMURE I, KYOZUKA J. Suppression of tiller bud activity in tillering dwarf mutants of rice. *Plant Cell Physiology*, 2005, 46(1): 79-86.
- [7] FLEET C M, SUN T P. A DELLAcate balance: the role of gibberellin in plant morphogenesis. *Current Opinion in Plant Biology*, 2005, 8(1): 77-85.
- [8] 谈心, 马欣荣. 赤霉素生物合成途径及其相关研究进展. 应用与环境生物学报, 2008, 14(4): 571-577.
TAN X, MA X R. Advance in research of gibberellin biosynthesis pathway. *Chinese Journal of Applied and Environmental Biology*, 2008, 14(4): 571-577. (in Chinese)
- [9] THOMAS S G, SUN T P. Update on gibberellin signaling. A tale of the tall and the short. *Plant Physiology*, 2004, 135: 668-676.
- [10] YAMAGUCHI S, SUN T P, KAWAIDE H, KAMIYA Y. The GA2 locus of *Arabidopsis thaliana* encodes ent-kaurene synthase of gibberellin biosynthesis. *Plant Physiology*, 1998, 116: 1271-1278.
- [11] HELLIWELL CA, POOLE A, PEACOCK W J, DENNIS E S. *Arabidopsis* ent-kaurene oxidase catalyzes three steps of gibberellin biosynthesis. *Plant Physiology*, 1999, 119(2): 507-510.
- [12] MARGIS-PINHEIRO M, ZHOU X R, ZHU Q H, DENNIS E S, UPADHYAYA N M. Isolation and characterization of a Ds-tagged rice (*Oryza sativa* L.) GA-responsive dwarf mutant defective in an early step of the gibberellin biosynthesis pathway. *Plant Cell Reports*, 2005, 23(12): 19-33.
- [13] ITOH H, TATSUMI T, SAKAMOTO T, OTOMO K, TOYOMASU T, KITANO H, ASHIKARI M, ICHIHARA S, MATSUOKA M. A rice semi-dwarf gene, Tan-ginbozu (D35), encodes the gibberellin biosynthesis enzyme, ent-kaurene oxidase. *Plant Molecular Biology*, 2004, 54(4): 533-547.
- [14] UEGUCHI-TANAKA M, ASHIKARI M, NAKAJIMA M, ITOH H, KATOH E, KOBAYASHI M, CHOW TY, HSING YI, KITANO H, YAMAGUCHI I, MATSUOKA M. GIBBERELLIN INSENSITIVE DWARF1 encodes a soluble receptor for gibberellin. *Nature*, 2005, 437(7059): 693-698.
- [15] GOMI K, SASAKI A, ITOH H, UEGUCHI-TANAKA M, ASHIKARI M, KITANO H, MATSUOKA M. GID2, an F-box subunit of the SCF E3 complex, specifically interacts with phosphorylated SLR1 protein and regulates the gibberellin-dependent degradation of SLR1 in rice. *The Plant Journal*, 2004, 37(4): 626-634.
- [16] SUN T P. Gibberellin-GID1-DELLA: A pivotal regulatory module for plant growth and development. *Plant Physiology*, 2010, 154(2): 567-570.
- [17] 尹昌喜. 细胞质雄性不育水稻包穗的激素调控[D]. 南京: 南京农业大学, 2007: 6.
YIN C X. Plant hormone regulation on panicle enclosure in cytoplasmic male sterile rice[D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2007: 6. (in Chinese)
- [18] 张玲. 水稻矮化并花发育异常突变体 *dwarf and deformed flower 2 (ddf2)* 的基因定位与候选基因分析[D]. 重庆: 西南大学, 2015: 6.
ZHANG L. Gene mapping and candidate gene analysis of *dwarf and deformed flower 2 (ddf2)* mutants in rice (*Oryza sativa*) [D]. Chongqing: Southwestern University, 2015: 6. (in Chinese)
- [19] WANG Y P, TANG S Q, WU Z F, SHI Q H, WU Z M. Phenotypic analysis of a *dwarf and deformed flower 3 (ddf3)* mutant in rice (*Oryza sativa* L.) and characterization of candidate genes. *Journal of Integrative Agriculture*, 2018, 5(17): 1057-1065.

- [20] SOREFAN K, BOOKER J, HAUROGNÉ K, GOUSSOT M, BAINBRIDGE K, FOO E, CHATFIELD S, WARD S, BEVERIDGE C, RAMEAU C, LEYSER O. MAX4 and RMS1 are orthologous dioxygenase-like genes that regulate shoot branching in *Arabidopsis* and pea. *Genes & Development*, 2003, 17: 1469-1474.
- [21] JIANG L, LIU X, XIONG G, LIU H, CHEN F, WANG L, MENG X, LIU G, YU H, YUAN Y, YI W, ZHAO L, MA H, HE Y, WU Z, MELCHER K, QIAN Q, XU H E, WANG Y, LI J. DWARF 53 acts as a repressor of strigolactone signalling in rice. *Nature*, 2013, 504(7480): 401-405.
- [22] YOUNG M D, WAKEFIELD M J, SMYTH G K, OSHLACK A. Gene ontology analysis for RNA-seq: Accounting for selection bias. *Genome Biology*, 2010, 11(2): R14.
- [23] KANEHISA M, ARAKI M, GOTO S, HATTORI M, HIRAKAWA M, ITOH M, KATAYAMA T, KAWASHIMA S, OKUDA S, TOKIMATSU T, YAMANISHI Y. KEGG for linking genomes to life and the environment. *Nucleic Acids Research*, 2008, 36: D480-D484.
- [24] MAGOME H, NOMURA T, HANADA A, TAKEDA-KAMIYA N, OHNISHI T, SHINMA Y, KATSUMATA T, KAWAIDE H, KAMIYA Y, YAMAGUCHI S. CYP714B1 and CYP714B2 encode gibberellin 13-oxidases that reduce gibberellin activity in rice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2013, 110(5): 1947-1952.
- [25] ITO S, YAMAGAMI D, ASAMI T. Effects of gibberellin and strigolactone on rice tiller bud growth. *Journal of Pesticide Science*, 2018, 43(3): 220-223.
- [26] ZOU J, ZHANG S, ZHANG W, LI G, CHEN Z, ZHAI W, ZHAO X, PAN X, XIE Q, ZHU L. The rice HIGH-TILLERING DWARF1 encoding an ortholog of *Arabidopsis* MAX3 is required for negative regulation of the outgrowth of axillary buds. *The Plant Journal*, 2006, 48: 687-698.
- [27] NAKAMURA H, XUE Y L, MIYAKAWA T, HOU F, QIN H M, FUKUI K, SHI X, ITO E, ITO S, PARK S H, MIYAUCHI Y, ASANO A, TOTSUKA N, UEDA T, TANOKURA M, ASAMI T. Molecular mechanism of strigolactone perception by DWARF14. *Nature Publishing Group*, 2013, 4: 2613.
- [28] KIM S K, PARK H Y, JANG Y H, LEE K C, CHUNG Y S, LEE J H, KIM J K. OsNF-YC2 and OsNF-YC4 proteins inhibit flowering under long-day conditions in rice. *Planta*, 2016, 243(3): 563-576.
- [29] ITOH H, UEGUCHI-TANAKA M, SENTOKU N, KITANO H, MATSUOKA M, KOBAYASHI M. Cloning and functional analysis of two gibberellin 3 β -hydroxylase genes that are differently expressed during the growth of rice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2001, 98(15): 8909-8914.
- [30] LO S F, YANG S Y, CHEN K T, HSING YI, ZEEVAART JA, CHEN L J, YU S M. A novel class of gibberellin 2-oxidases control semidwarfism, tillering, and root development in rice. *The Plant Cell*, 2008, 20(10): 2603-2618.
- [31] PETER H, VALERIE S. A century of gibberellin research. *Journal of Plant Growth Regulation*, 2015, 34: 740-760.
- [32] COWLING R J, KAMIYA Y, SETO H, HARBERD N P. Gibberellin dose-response regulation of GA4 gene transcript levels in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 1998, 117(4): 1195-1203.
- [33] TALON M, KOORNNEEF M, ZEEVAART J A. Endogenous gibberellins in *Arabidopsis thaliana* and possible steps blocked in the biosynthetic pathways of the semidwarf GA4 and GA5 mutants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1990, 87(20): 7983-7987.
- [34] UEGUCHI-TANAKA M, NAKAJIMA M, KATOH E, OHMIYA H, ASANO K, SAJI S, HONGYU X, ASHIKARI M, KITANO H, YAMAGUCHI I, MATSUOKA M. Molecular interactions of a soluble gibberellin receptor, GID1, with a rice DELLA protein, SLR1, and gibberellin. *The Plant Cell*, 2007, 19(7): 2140-2155.
- [35] ZHANG Z L, XIE Z, ZOU X, CASARETTO J, HO T H, SHEN Q J. A rice WRKY gene encodes a transcriptional repressor of the gibberellin signaling pathway in aleurone cells. *Plant Physiology*, 2004, 134(4): 1500-1513.
- [36] ZHANG Z L, SHIN M, ZOU X, HUANG J, HO T H, SHEN Q J. A negative regulator encoded by a rice WRKY gene represses both abscisic acid and gibberellins signaling in aleurone cells. *Plant Molecular Biology*, 2009, 70(1/2): 139-151.
- [37] GUO X, HOU X, FANG J, WEI P, XU B, CHEN M, FENG Y, CHU C. The rice GERMINATION DEFECTIVE 1, encoding a B3 domain transcriptional repressor, regulates seed germination and seedling development by integrating GA and carbohydrate metabolism. *The Plant Journal*, 2013, 75(3): 403-416.
- [38] HEINRICH M, HETTENHAUSEN C, LANGE T, WÜNSCHE H, FANG J, BALDWIN I T, WU J. High levels of jasmonic acid antagonize the biosynthesis of gibberellins and inhibit the growth of *Nicotiana attenuata* stems. *The Plant Journal*, 2013, 73(4): 591-606.
- [39] ITO Y, KURATA N. Identification and characterization of cytokinin-signalling gene families in rice. *Gene*, 2006, 382: 57-65.
- [40] SANTI L, WANG Y, STILE M R, BERENDZEN K, WANKE D, ROIG C, POZZI C, MÜLLER K, MÜLLER J, ROHDE W, SALAMINI F. The GA octadynucleotide repeat binding factor BBR participates in the transcriptional regulation of the homeobox gene

- Bkn3. *The Plant Journal*, 2003, 34(6): 813-826.
- [41] WU C, YOU C, LI C, LONG T, CHEN G, BYRNE M E, ZHANG Q. RID1, encoding a Cys2/His2-type zinc finger transcription factor, acts as a master switch from vegetative to floral development in rice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2008, 105(35): 12915-12920.
- [42] LIJAVETZKY D, CARBONERO P, VICENTE-CARBAJOSA J. Genome-wide comparative phylogenetic analysis of the rice and *Arabidopsis* Dof gene families. *BMC Evolutionary Biology*, 2003, 1: 17.
- [43] MAO C, WANG S, JIA Q, WU P. OsEIL1, a rice homolog of the *Arabidopsis* EIN3 regulates the ethylene response as a positive component. *Plant Molecular Biology*, 2006, 61(1): 141-152.
- [44] HIRAGA S, SASAKI K, HIBI T, YOSHIDA H, UCHIDA E, KOSUGI S, KATO T, MIE T, ITO H, KATOU S, SEO S, MATSUI H, OHASHI Y, MITSUHARA I. Involvement of two rice ETHYLENE INSENSITIVE3-LIKE genes in wound signaling. *Molecular Genetics and Genomics*, 2009, 282(5): 517-529.
- [45] RICE CHROMOSOMES 11 AND 12 SEQUENCING CONSORTIA. The sequence of rice chromosomes 11 and 12, rich in disease resistance genes and recent gene duplications. *BMC Biology*, 2005, 3: 20.
- [46] KIRIK V, BAUMLEIN H. A novel leaf-specific MYB-related protein with a single binding repeat. *Gene*, 1996, 183(1/2): 109-113.
- [47] LI W Q, WU J G, WENG S L, ZHANG Y, ZHANG D, SHI C. Identification and characterization of dwarf 62, a loss-of-function mutation in DLT/OsGRAS-32 affecting gibberellin metabolism in rice. *Planta*, 2010, 232(6): 1383-1396.
- [48] UMEHARA M, HANADA A, YOSHIDA S, AKIYAMA K, ARITE T, TAKEDA-KAMIYA N, MAGOME H, KAMIYA Y, SHIRASU K, YONEYAMA K, KYOZUKA J, YAMAGUCHI S. Inhibition of shoot branching by new terpenoid plant hormones. *Nature*, 2008, 455(7210): 195-200.
- [49] ITO S, YAMAQAMI D, UMEHARA M, HANADA A, YOSHIDA S, SASAKI Y, YAJIMA S, KYOZUKA J, UEGUCHI-TANAKA M, MATSUOKA M, SHIRASU K, YAMAGUCHI S, ASAMI T. Regulation of strigolactone biosynthesis by gibberellin signaling. *Plant Physiology*, 2017, 174(2): 1250-1259.

(责任编辑 李莉)