

水稻 *OsDOG1-like* 基因家族突变体种子的萌发势及其 GA 敏感性的研究

黄新元¹ 张英² 陶迎梅¹ 江青山² 魏丕伟^{1,3}

(¹四川轻化工大学食品与酿酒工程学院, 644005, 四川宜宾; ²宜宾市农业科学院, 644000, 四川宜宾;

³长江上游地区白酒数智化管理与生态决策优化四川省重点实验室, 644005, 四川宜宾)

摘要 拟南芥 *DOG1* (*DELAY OF GERMINATION 1*) 基因是控制种子休眠数量性状位点 (QTL) 的主效基因。水稻 *OsDOG1-like3* 基因可通过增强脱落酸 (ABA) 通路促进种子休眠, *OsDOG1-like1* 和 *OsDOG1-like2* 基因的功能尚不明确。采用 CRISPR-Cas9 技术创制了 *osdog1l-2*、*osdog1l-3* 等单突变体, 以及 *osdog1l-2/3* 双突变体和 *osdog1l-1/2/3* 三突变体。结果表明, *osdog1l-2*、*osdog1l-3* 等单突变体的种子休眠表型变化很微弱。贮藏 6 个月后, 与浸种后第 10 天野生型种子的萌发率 (72.92%) 相比, *osdog1l-2/3* 和 *osdog1l-1/2/3* 的萌发率分别降至 16.67% 和 8.33%。0.1 和 1.0 $\mu\text{mol/L}$ 低浓度赤霉素 GA_3 处理使 *osdog1l-2/3* 的萌发率提高到 45.83%, 而对 *osdog1l-1/2/3* 的萌发率基本没有影响。*osdog1l-1/2/3* 三突纯合子对低浓度 GA_3 和 GA_{4+7} 几乎不敏感, 这说明 *OsDOG1-like1* 对水稻种子萌发在响应 GA 信号时至关重要, 或者 *OsDOG1-L1*、*L2*、*L3* 三者存在功能上的冗余。高浓度 GA_3 (10.0 $\mu\text{mol/L}$) 处理一定程度上提高了 *osdog1l-1/2/3* 的萌发率, 达 27.08%, 同种方法使用 GA_{4+7} 处理则具有类似的规律。这些结果表明 *OsDOG1-like* 基因作用于 GA 信号的上游 (或共同) 调控水稻种子萌发。TTC 染色证实了 *osdog1l-2/3* 和 *osdog1l-1/2/3* 突变体胚胎的高活力, 可萌发的种子后期能正常生长。

关键词 水稻; *OsDOG1-like* 基因家族; 三重突变体; 种子萌发

水稻 (*Oryza sativa* L.) 作为主要的粮食作物之一, 世界上超过一半的人口以水稻为主要食物^[1]。近年来, 随着水稻免耕直播技术的推广普及和机插秧比例的不断增加, 育苗过程中对种子发芽特性的标准也在不断提高^[2]。高活力和发芽力强的种子, 不仅能够育秧时大幅缩减出苗时间, 使出苗整齐, 而且能够应对田间播种环境中的不良因素^[3]。

种子萌发开始于种子休眠的逐步释放和解除, 是作物生命周期中的起始阶段, 决定作物生长状态。从成熟的干种子吸收水分开始, 到胚轴伸长结束, 胚根穿透周围结构, 萌发才算完成^[4]。种子萌发并非简单的吸水膨胀过程, 包含代谢重启、能量物质动员及激素调控等生理过程^[5]。其中, 在调节种子发芽的各种因素中, 激素是调控种子从休眠向萌发转换的主要内因, 而脱落酸 (ABA) 和赤霉素 (GA) 是该过程中最重要的信号^[6], ABA、GA 合成和信号转导通路中相关调控基因的功能异常均会对种子萌发时间产生影响^[7-9]。

种子休眠形成于胚胎发育的成熟阶段, 是指完整有活力的种子成熟后即使处于适宜的环境条件下, 仍在一段时间内无法萌发的现象^[10]。在农业生产中, 休眠强的种子可能导致发芽延迟或出苗不整齐, 而低休眠的种子在高温、高湿环境下容易发生收获前发芽, 即穗发芽 (pre-harvest sprouting, PHS)^[11]。种子休眠是植物适应环境变化的重要生理机制, 其精确调控对农业生产具有重要意义。*DOG1* 基因是在拟南芥中发现的首个控制休眠的数量性状位点, 在诱导种子休眠过程中起重要作用。随着种子成熟度的增加, *DOG1* 蛋白水平与拟南芥种子休眠深度呈正相关^[12]。*DOG1* 属于一个小基因家族, 普遍存在于双子叶和单子叶植物中, 在拟南芥中包括 5 个成员 (*AtDOG1*, *AtDOGIL1-4*)^[12], 其中只有 *AtDOG1* 参与种子的休眠。而谷物中的 *DOGIL1-4* 在拟南芥中异位表达时, 能诱导种子休眠, 表现出一定的功能保守性^[13]。在水稻中存在多个 *DOG1* 的同源基因 (*OsDOGIL1-5*)^[13], 其中 *OsDOGIL-1* 位于 1 号染色体上, 由 2 个外显子构

作者简介: 黄新元, 研究方向为水稻遗传育种, E-mail: 482151489@qq.com

魏丕伟为通信作者, 研究方向为分子遗传学, E-mail: pwwei@suse.edu.cn

基金项目: 国家自然科学基金 (31701513); 宜宾五粮液股份有限公司资助课题 (CXY2022ZR008)

收稿日期: 2025-05-19; 修回日期: 2025-06-17; 网络出版日期: 2025-09-18

成, *OsDOGIL-2* 位于 5 号染色体上, 不具有内含子。二者与调控种子休眠与萌发的拟南芥 *AtDOG1* 基因和小麦 *TaDOGIL4* 基因之间存在 3 个相同的保守域, 但这 4 个基因的同源性较低^[14]。

为了探索水稻 *OsDOG1-like* 的功能, Wang 等^[15]通过非休眠品种南粳 35 中用玉米泛素启动子过表达强休眠品种 N22 的 *OsDOGIL-1*、*OsDOGIL-2* 和 *OsDOGIL-3* 等位基因, 相对于对照, 过表达 *OsDOGIL-3* 的转基因植株种子的休眠性得到了大大提高; 而 *OsDOGIL-1* 和 *OsDOGIL-2* 的过表达 OE 植株的萌发势差异不大。其研究结果表明 *OsDOGIL-3* 可通过增强 ABA 合成酶的转录水平以提高种子中 ABA 含量, 且能增加 *OsABI3*、*OsABI5* 等 ABA 信号转导成员的转录水平, 导致 ABA 敏感性提高。

张洋洋^[14]通过比较弱休眠品种 9311 和强休眠品种东乡野生稻胚中 *OsDOGIL-1* 和 *OsDOGIL-2* 的表达量变化, 发现 *OsDOGIL-2* 的表达量在 2 个品种的胚中具有显著差异。在胚胎发育阶段, 东乡野生稻 *OsDOGIL-2* 的转录表达远高于 9311。在东乡野生稻的胚中, 随发育成熟 *OsDOGIL-2* 表达量逐渐增加 (花后 30 d 是 15 d 的 4 倍), 在胚乳中不具有这种趋势, 这与种子休眠的建立是同步的。在萌发阶段, 强休眠的东乡野生稻胚中 *OsDOGIL-2* 的表达量明显高于 9311, 表明 *OsDOGIL-2* 的表达与强休眠呈正相关。*OsDOGIL-1* 表达规律则与 *OsDOGIL-2* 相反, 它在胚胎发育后期呈降低趋势, 在萌发阶段弱休眠品种 9311 中反而有显著的高表达。

OsDOGIL-2 表达的时空特异性及 *OsDOGIL-3* 强启动子驱动过表达能增强转基因植株的种子休眠均显示, 它们与水稻种子休眠正相关^[15]。而 *OsDOGIL-1* 可能与种子休眠特性无明显的关联。为了克服基因家族间潜在的功能冗余, 本研究构建了 *osdog11-2/3* 双突变体, 并在此基础上敲除 *OsDOGIL-1* 基因, 创制了 *osdog11-1/2/3* 三突变体。与日本晴 WT 浸种第 10 天的萌发率 (72.92%) 相比, *osdog11-2/3* 和 *osdog11-1/2/3* 的萌发率分别降至 16.67% 和 8.33%。这些被认为与休眠呈正相关的基因突变体反而出现了萌发势的下降。因此, 我们对突变体胚胎做了 TTC 染色活力检测, 并使用 GA₃ 和 GA₄₊₇ 处理, 观察其萌发势变化, 发现 *osdog11-2/3*

双突变体萌发率有明显的增加, 而 *osdog11-1/2/3* 的萌发率几乎不受影响。本试验发现, *OsDOG1-like1* 对水稻种子萌发在响应 GA 信号时至关重要, 甚至影响水稻种子的正常萌发。这对认识水稻 *OsDOG1-like* 基因家族成员调控种子休眠和萌发具有较大的推动意义。

1 材料与方法

1.1 试验材料

以新鲜收获、储藏 5 周的日本晴背景 (*Nipponbare*, *Nip*) WT、*osdog11-2* 单突变体 (YN-49, YN-56) 水稻种子, 以及储藏 6 个月的 WT、*osdog11-2/3* 双突变体 (ZKY-75) 和 *osdog11-1/2/3* 三重突变体 (ZKY-74) 水稻种子为材料。水稻材料种植于海南陵水的中国科学院南繁基地和四川轻化工大学酿酒专用水稻实验室。用于萌发试验的水稻种子均为同一时间同一生长条件下收获。

1.2 试验方法

1.2.1 *osdog11-like* 突变体的构建与鉴定 通过 NCBI 查询获得 *OsDOGIL-1* (LOC_Os01g06560)、*OsDOGIL-2* (LOC_Os05g48650) 和 *OsDOGIL-3* (LOC_Os01g20030) 的 CDS, CRISPR/Cas9 基因编辑的靶点分别设计在 *OsDOGIL-1* 的第 1 个外显子和 *OsDOGIL-3* 的第 2 个外显子, 序列如表 1。

表 1 水稻 *OsDOG1-like* 家族基因编辑的靶点序列
Table 1 The target sequence for gene editing
of the *OsDOG1-like* family in rice

靶点名称 Target name	序列 (5'-3') Sequence (5'-3')
<i>OsDOGIL-1</i> target 1	TTGGCGAACGACTCGCCGGAGGG
<i>OsDOGIL-2</i> target 1	CCTCTGGCTCCGCGGGCTGCGGG
<i>OsDOGIL-3</i> target 1	GACGAACGGGCGGCGTATTATGG

通过 CRISPR/Cas9 基因编辑技术创制 *osdog11-2* 和 *osdog11-3* 单突变体, 通过水稻杂交技术创制 *osdog11-2/3* 双突变体 F₁ 代, 并在 F₂ 中测序鉴定 2 个位点的纯合子。以单株 DNA 为模板进行 PCR 扩增, 对 PCR 扩增产物进行琼脂糖凝胶电泳。将扩增成功的 PCR 产物送至生工生物工程 (上海) 股份有限公司, 使用其上游引物进行测序。其检测引物如表 2 所示。使用 DNAS-TAR Lasergene 的 Seq Man 软件分析测序结果。在双突变体材料 (筛选到纯合子名称为 *osdog5-4* 和 *osdog8-1*) 基础上, 挑选不含 Cas9 插入的单株。使用胚胎组织形成的

愈伤作为受体，进行遗传转化，敲除 *OsDOGIL-1* 基因，创制 *osdogil-1/2/3* 三重突变体。

表 2 *OsDOG1-like* 基因家族成员鉴定所用引物及序列
Table 2 Primers and sequences used for identification of *OsDOG1-like* gene family members

基因名称 Gene name	引物名称 Primer name	引物序列 (5'-3') Primer sequence (5'-3')
<i>OsDOGIL-1</i>	DOG1L1-F1	GGCCACCAGTATTTCTCTGC
	DOG1L1-R1	CGCACCAGAGGTAGAGGTTCT
<i>OsDOGIL-2</i>	Sg7047-F1	CACCTATCGCCTCCTCAT
	Sg7047-R1	GCCGACAGCGTCCACACC
<i>OsDOGIL-3</i>	GP7029-5796-F	CTCGCCTCGTCTCTTCCTTC
	GP7029-5796-R	CACGCCCAGAGGAAGGTG

1.2.2 突变体种子的萌发率 选取新鲜收获和储藏 5 周后的 WT 和 *osdogil-2* 单突变体 (YN-49、YN-56) 水稻种子、新鲜收获的 WT 和 *osdogil-3* 单突变体 (A9-83) 种子。用 1% NaClO 溶液消毒 15 min，无菌水清洗 4~5 次，将种子放置于铺有滤纸的培养皿内 (每皿 30 颗)，加入 5 mL 无菌水。每 2 d 更换一次无菌水，每组设置 3 个生物学重复，于 25 °C 恒温培养箱内，12 h 光照/12 h 黑暗循环培养。每隔 24 h 定时记录萌发数，以胚根突破种皮长度≥2 mm 计作萌发，萌发率 (%) = 正常萌发的种子数/供试种子总数×100。选取储藏 6 个月后的 WT、ZKY-75 和 ZKY-74 水稻种子，种子消毒方法同前。将种子置于 6 孔板内 (每孔 16 颗)，加入 2 mL 无菌水，每组设置 3 个生物学重复。温度、光照条件和记录方法同上。

1.2.3 浸种后 GA₃ 和 GA₄₊₇ 处理的方法 选取储藏 6 个月后的 ZKY-75 和 ZKY-74 种子，种子消毒方

法同上。将种子置于 6 孔板内 (每孔 16 颗)，分别加入 2 mL 0.1、1.0、10.0 μmol/L 的 GA₃ 和 GA₄₊₇ 溶液进行处理，每组设置 3 个生物学重复。温度、光照条件和记录方法同上。

1.2.4 突变体种子的活力 选取储藏 6 个月后的 WT、ZKY-75 和 ZKY-74 种子各 20 粒。30 °C 温水浸泡 2~6 h，使种子吸胀。吸胀种子去壳，纵切，于 TTC 染色液中 35 °C 恒温处理 2~3 h，光学显微镜下拍照记录。当整个种子胚胎染成红色时判定为种子活力强，淡红色为活力弱，无色 (或发白) 判定为无活力。将对照组于 105 °C 烘干 2 h，进行种子灭活，随后采用同样的方法进行 TTC 染色检测。

2 结果与分析

2.1 *OsDOG1-like* 家族成员基因型鉴定

对 *OsDOG1-like* 基因家族基因编辑苗的 T₂ 代植株进行鉴定，如图 1 所示。单突变体 YN-49 和 YN-56 的 *OsDOGIL-2* 基因分别缺失 CGCGGGC (-7 bp) 和缺失 GCTCCGCGGGCTG (-13 bp) 纯合，鉴定为 *osdogil-2* 单突变的纯合子；A9-83 在 *OsDOGIL-3* 位点缺失 CGTA (-4 bp) 纯合，鉴定为 *osdogil-3* 单突变的纯合子；ZKY-75 在 *OsDOGIL-2* 和 *OsDOGIL-3* 位点分别缺失 CGCGGGC (-7 bp) 和 CGTA (-4 bp)，且已经纯合，鉴定为 *osdogil-2/3* 的双突纯合子；ZKY-74 除在 *OsDOGIL-2* 和 *OsDOGIL-3* 位点发生相同的变异，在 *OsDOGIL-1* 位点插入 G (+1 bp) 且纯合，为 *osdogil-1/2/3* 的三突纯合子。

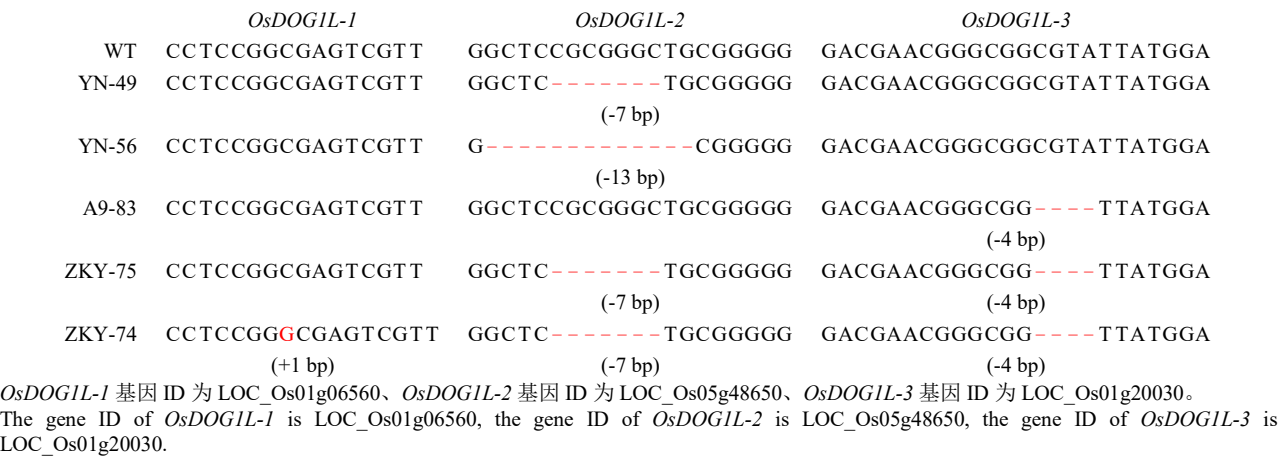


图 1 *OsDOG1-like* 基因家族成员突变类型的鉴定
Fig.1 Identification of mutation types of *OsDOG1-like* gene family members

2.2 *osdog1l-2* 单突纯合子种子萌发率的变化

由图 2 可知, *osdog1l-2* 单突变体 (YN-49 和 YN-56) 的新鲜种子 (图 2a) 和储藏 5 周后的种子 (图 2b), 在无菌水中浸种时, 萌发率与 WT 无明显差异, 表明 *OsDOGL-2* 基因与其他家族成员可能存在功能冗余, 单个成员的突变不足以使其彻底丧失功能。

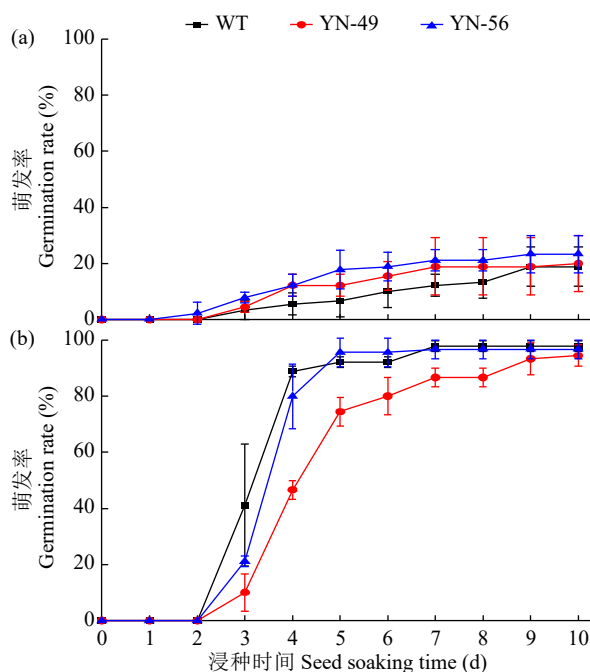


图 2 *osdog1l-2* 单突变体种子萌发势的比较

Fig.2 Comparison of seed germination potential of *osdog1l-2* single mutant

2.3 *osdog1l-3* 单突纯合子种子萌发率的变化

由图 3 可知, *osdog1l-3* 单突变体 (A9-83) 的新鲜种子, 在无菌水浸种时, 萌发率与 WT 无明显差异。 *osdog1l-3* 单突变体的萌发趋势与图 2a 中的 *osdog1l-2* 单突变体表现非常相似。因此在二者基础上通过杂交构建双突变体, 探索 *OsDOGL-like* 家族

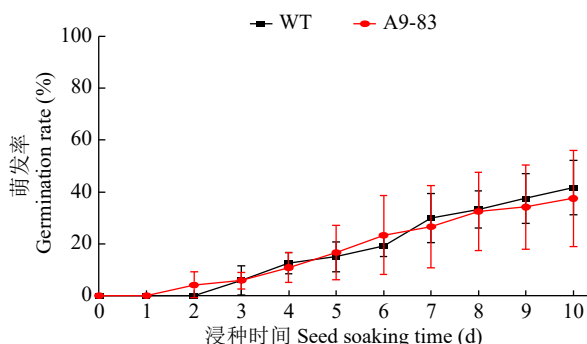


图 3 *osdog1l-3* 单突变体种子萌发势的比较

Fig.3 Comparison of seed germination potential of *osdog1l-3* single mutant

成员之间是否存在功能冗余。

2.4 *osdog1l-2/3* 和 *osdog1l-1/2/3* 纯合子种子萌发率的变化

对杂交后代进行单株叶片的 DNA 提取, 测序鉴定, 发现如图 1 所示 ZKY-75 为 *osdog1l-2/3* 的双突纯合子, 而 ZKY-74 为 *osdog1l-1/2/3* 的三突纯合子。由图 4 可知, 种子被收获并储藏 6 个月左右, 在浸种第 10 天 (day after imbibition-10, 以下简称 DAI-10), WT 的萌发率最高 (72.92%), ZKY-75 的萌发率较低 (16.67%), ZKY-74 的萌发率更低 (8.33%)。说明随着 *OsDOGL-like* 家族更多成员的移码突变, 其种子的活力逐步降低, 更加不耐受储藏。这与拟南芥 *dog1-1* 种子寿命缩短的表型有一定相似性^[13], 暗示了水稻 *osdog1-like* 突变体种子在成熟发育方面也有一定的缺陷。结合 *osdog1l-2* 和 *osdog1l-3* 单突变体种子的萌发率与 WT 接近, 而 *osdog1l-2/3* (ZKY-75) 萌发率明显不同于 WT, 这反映了 *OsDOGL-L2* 与 *OsDOGL-L3* 基因突变具有一定的加性效应。如果能将 *OsDOGL-L2* 或 *OsDOGL-L3* 的互补表达载体转入 *osdog1l-2/3*, 均能恢复萌发率低的表型, 则可揭示二者存在功能上的冗余。

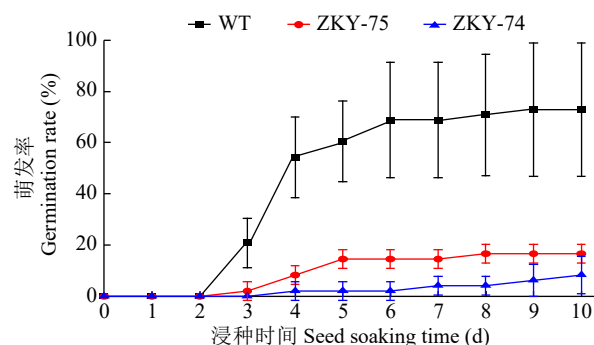


图 4 *osdog1l-2/3* 双突变体与 *osdog1l-1/2/3* 三重突变体种子萌发势的比较

Fig.4 Comparison of seed germination potential between *osdog1l-2/3* double mutant and *osdog1l-1/2/3* triple mutant

2.5 *osdog1l-2/3* 双突变体种子萌发率对 GA 信号处理的响应情况

由图 5a 可知, 0.1 和 1.0 $\mu\text{mol/L}$ GA_3 在 DAI-10 时, ZKY-75 萌发率提高至 45.83%, 高于对照组萌发率 (16.67%)。用 0.1、1.0 $\mu\text{mol/L}$ 浓度的 GA_{4+7} 处理, 萌发率的改变虽不如 GA_3 处理那么明显, 但具有相似的变化趋势 (图 5b)。这说明 *osdog1l-2/3* 双突变体的种子萌发一定程度上可以被 GA_3 和 GA_{4+7} 所启动, 该突变体仍存在 GA 信号通路, 具

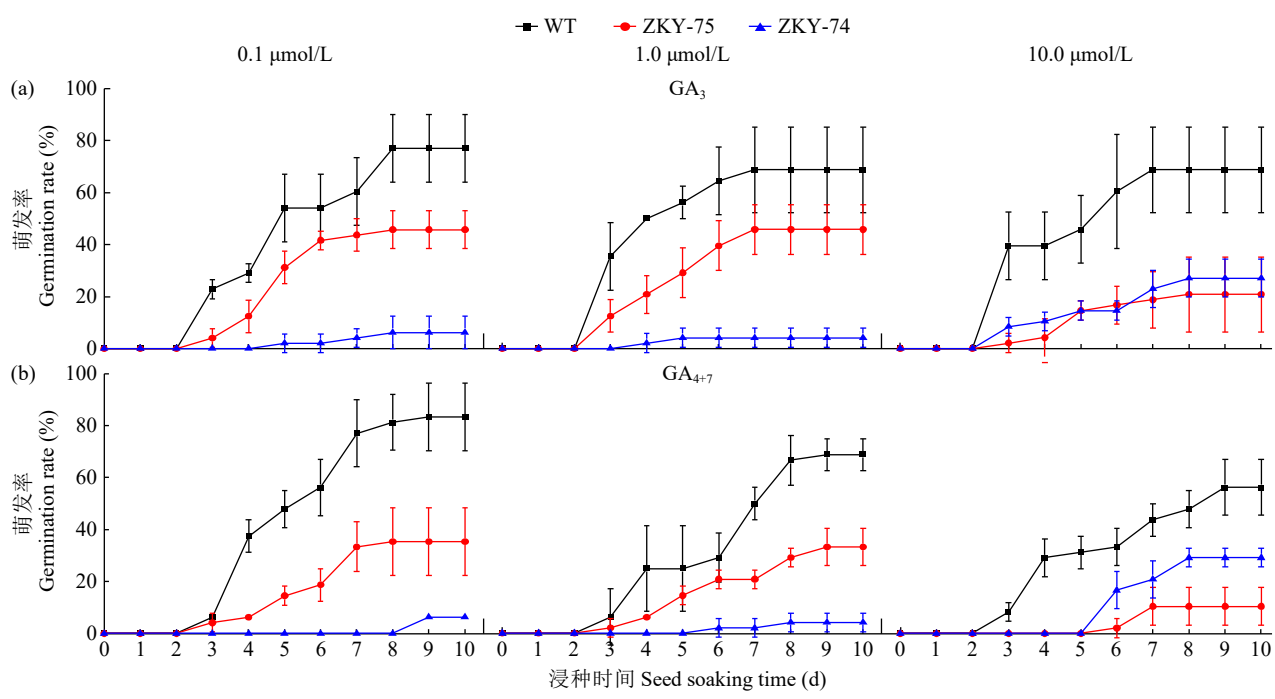


图 5 GA 处理下 *osdog1l-2/3* 双突变体与 *osdog1l-1/2/3* 三重突变体种子萌发率的比较

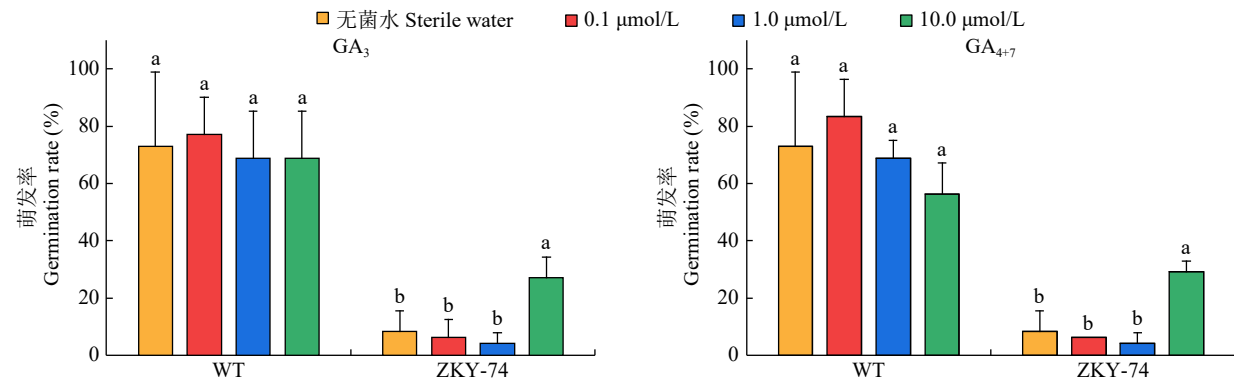
Fig.5 Comparison of seed germination rate of *osdog1l-2/3* double mutants and *osdog1l-1/2/3* triple mutants under GA treatment

有 GA 敏感性。

2.6 *osdog1l-1/2/3* 三重突变体种子萌发率对 GA 信号处理的响应情况

由图 5、图 6 可见，*osdog1l-1/2/3* 三重突变体 (ZKY-74) 无法被低浓度 GA_3 启动更多种子萌发，

仅在 $10.0 \mu\text{mol/L}$ GA_3 处理时能提高萌发率至 27.08%；用 $10.0 \mu\text{mol/L}$ 浓度的 GA_{4+7} 处理，变化趋势与 GA_3 处理相似 (图 5 和图 6)。由此可见，*osdog1l-1/2/3* 三重突变体的种子萌发仍需要 GA 信号的刺激，这与拟南芥 *dog1-1* 是相似的^[13]，本研



不同小写字母表示差异显著 ($P < 0.05$)。

Different lowercase letters indicate significant differences ($P < 0.05$).

图 6 不同 GA 浸泡处理下 *osdog1l-1/2/3* 三突变体萌发率在浸种第 10 天的变化

Fig.6 Germination rate changes of *osdog1l-1/2/3* triple mutant under different GA soaking treatments on 10th day after imbibition

究中使用外源 GA 得到了比较一致的验证。

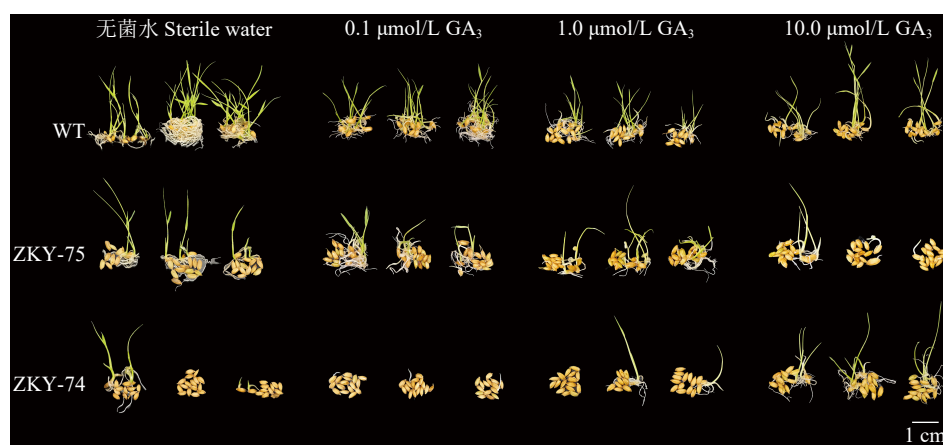
2.7 水稻 *osdog1-like* 突变体幼苗生长情况的变化

由图 7 可知，在无菌水 DAI-10 处理下，WT 萌发生长情况最好，ZKY-75 的幼苗生长受阻，ZKY-74 的幼苗生长受阻更加严重，即使萌发的种子在幼苗期也生长迟缓。ZKY-74 经 $10.0 \mu\text{mol/L}$ GA_3 处理，其萌发率幼苗生长水平有一定程度的恢

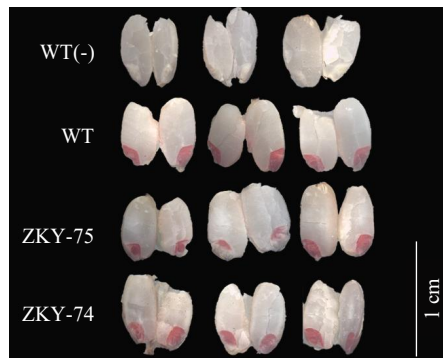
复。 GA_{4+7} 处理也有类似的作用。*osdog1-like* 突变体种子萌发的异常、幼苗的生长异常与 GA 处理后的变化，三者具有一定的相关性，即双突变体的表型变异大于单突变体，三重突变体的异常程度又大于双突变体。

2.8 水稻 *osdog1-like* 突变体胚胎活力的检测

为了检测 ZKY-74 严重不萌发、幼苗生长迟缓

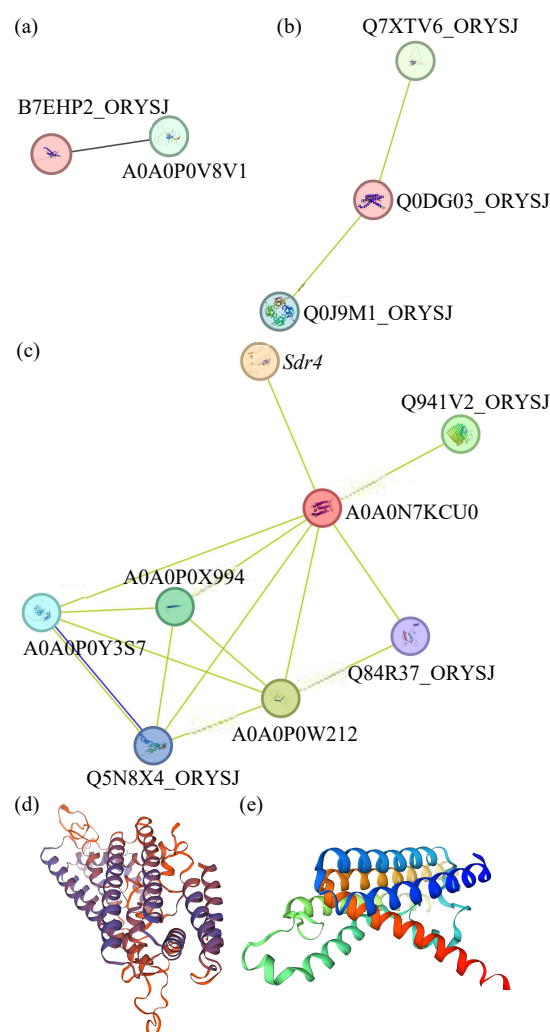
图 7 *osdog1-like* 突变体种子萌发后第 10 天的幼苗生长情况Fig.7 Seedling growth status of *osdog1-like* mutants seeds on the 10th day after germination

等表型是否与种子活力有关，相同条件下进行了 TTC 活力检测。由图 8 可知，经过高温灭活的 WT (-) 种子胚胎未染上色，即种子无活力，表明本试验的操作方法可行。WT、ZKY-75 和 ZKY-74 的种子胚胎着色程度比较一致，均具有较好的种子活力，这表明 ZKY-75 和 ZKY-74 的种子萌发率较低并非是胚胎活力丧失，而是由于种子萌发启动或穿刺破壳阶段的不正常所导致的。

图 8 *osdog1-like* 突变体的胚胎 TTC 染色结果Fig.8 Embryo TTC staining results of *osdog1-like* mutants

2.9 水稻 *OsDOG1-like* 基因家族互作蛋白及基因功能预测

利用 String 在线分析软件 (<https://cn.string-db.org/>) 预测互作情况，最低交互要求分数 >0.400 为筛选阈值，结果如图 9 所示。与 *OsDOGIL-1* 基因编码的 B7EHP2_ORYSJ 蛋白发生互作的蛋白仅有 1 种；与 *OsDOGIL-2* 基因编码的 Q0DG03_ORYSJ 蛋白互作的蛋白有 2 种，其中图 9b 中 Q0J9M1 为 Os04g0643600/OsCNGC6；与 *OsDOGIL-3* 基因编码的 A0A0N7KCU0 蛋白互作的蛋白有 7 种，均由 Textmining 方式获得，其中交互分数最高的是水稻



(a)、(b)、(c)分别为 *OsDOGIL-1*、*OsDOGIL-2*、*OsDOGIL-3* 基因互作蛋白预测。(d)和(e)为预测的 *OsDOGIL-2* 基因编码蛋白的三维结构。

(a), (b), and (c) represent the predictions of the interaction proteins of the *OsDOGIL-1*, *OsDOGIL-2*, and *OsDOGIL-3* genes, respectively. (d) and (e) are structures of *OsDOGIL-2* protein by SWISS-MODEL.

图 9 *OsDOG1-like* 基因家族成员互作蛋白预测Fig.9 Prediction of interaction proteins among members of the *OsDOG1-like* gene family

休眠 QTL 的主效基因 *Sdr4*, 其次是 Os03g0728900、Os07g0637150 和 Os11g0578100 等蛋白。

基于 Plant-mPLoc 的数据, *OsDOGIL-1*、*OsDOGIL-2* 和 *OsDOGIL-3* 基因编码的蛋白质定位于细胞核, 其很可能具有转录因子的功能。基于 SWISS-MODEL, 仅得到了 OsDOGIL-2 蛋白的三维结构 (<https://swissmodel.expasy.org/repository/uniprot/q0dg03>) (图 9d、9e), 可信度得分为 93.17。与其结构相似度最高的蛋白模板是 8gyz.1.A, 由拟南芥转录因子 TGA7 所编码。利用 UniProt 蛋白质数据库 (<https://www.uniprot.org/>) 查询 *OsDOGIL-1*、*OsDOGIL-2* 和 *OsDOGIL-3* 相对应的蛋白 B7EHP2_ORYSJ、Q0DG03_ORYSJ、A0A0N7KCU0 的 GO 功能注释, 推测其生物学功能均与转录调控相关, 进而影响水稻的生长发育过程。

3 讨论

植物种子休眠和萌发受 ABA 与 GA 信号通路的协同调控。研究^[12]发现, 拟南芥种子休眠调控关键基因 *DOG1* 突变后仍具有一定 ABA 敏感性, 而渗入强休眠等位基因 *Cvi* 的近等基因系 NIL-DOG17-1 表现出较高的 ABA 敏感性, 以此增强种子休眠。拟南芥新鲜种子中 DOG1 蛋白水平与休眠程度正相关, 尽管拟南芥 *dog1* 突变体种子中 ABA 含量降低, GA 含量升高, 但研究显示它不依赖于 ABA 途径等激素途径来调控休眠^[16]。以拟南芥 *dog1-2* 单突变体为对照, *dog1-2/cyp707a2-1* 双突变体即使内源 ABA 激素水平很高, 也不能进入休眠^[16], 因此 *DOG1* 对于拟南芥种子休眠仍是必需的。DOG1 蛋白可与 ABA 信号转导中 *PP2C* 家族 *AHG1* 和 *AHG3* 形成复合体。*dog1* 突变体种子不具有休眠性, 但 *dog1/ahg1/ahg3* 休眠性大大增加, 不仅如此, *ahg1/ahg3* 双突变体还对 *dog1* 突变具有上位效应。*AHG1* 和 *AHG3* 处于 *DOG1* 的下游来完成对种子休眠的调控^[17]。*DOG1* 在介导周期性的低温启动萌发方面也发挥了重要作用^[18-20]。*DOG1* 和 *MFT* 基因表达与休眠深度呈正相关, 可能通过调控 ABA 信号敏感性而非 ABA 绝对浓度维持深度休眠^[21]。然而本研究中通过对 *osdog1l-1/2/3* 三重突变体观察, 并未见穗发芽现象, 三重突变体种子浸种后的萌发率反而低于 WT。

DOG1 在种子成熟期和种子传播后土壤内的

休眠解除阶段的功能是不同的。在过表达拟南芥 *DOG1-Cvi* 的独行菜 (*Lepidium sativum*) 转基因种子中, 低温 18 °C 条件下的 GA 代谢高于 24 °C, 特别是对于 *GA20ox* 的转录水平的上调, 进而弱化种皮的机械强度, 促进胚乳破裂 (endosperm rupture, ER)^[19]。这种 *DOG1* 过表达后能促进萌发的现象, 仅在低温时才能表现出来, 在拟南芥和独行菜中均得到了验证。在 24 °C 条件下, 相对 WT 的对应基因的转录水平持续上升, 过表达拟南芥 *DOG1* 的强休眠种子中细胞壁松弛相关因子的 *EXPA2*、*EXPA9*、*EXLA1* 和 *XTH19* 呈下降趋势^[19], 进而阻碍了坚硬组织的弱化 (胚芽鞘的穿破)。最新研究^[22]表明, GA 通过 DELLA-MBW-TTG2 信号级联模块调控拟南芥果胶的生物合成, 并在维持细胞黏附和促进幼苗生长方面具有重要作用。推测这与本文中 *osdog1-like* 突变体的胚胎有活力但无法突破颖壳和种皮现象有一定的关联。

Li 等^[23]发现拟南芥 *dog1-2* 突变体的种子完全丧失休眠, 比较 WT 和 *dog1-2* 突变体种子的转录组差异, 发现无论是干种子还是吸胀 6 h 的种子, 其 GA 合成代谢相关的 DEGs (*GA20ox1*、*GA20ox2*、*GA20ox3* 和 *GA3ox1*、*GA3ox2*、*GA3ox4*) 在 *dog1-2* 突变体种子中上调, 而 GA 分解代谢相关的 DEGs (*GA2ox3*、*GA2ox6* 和 *ELA2*) 下调。水稻中内源生物活性物质 GA 的含量和种子萌发率与这些酶 (*GA20ox*、*GA3ox* 和 *GA2ox*) 的编码基因的表达水平有关^[24]。*dog1-2* 突变体种子的 ABA 和生长素 (IAA) 的内源信号强度显著降低, GA、油菜素甾醇 (BR) 和细胞分裂素的内源信号强度显著增加^[23]。由此看来, GA 信号在 *DOG1* 在调控种子萌发时扮演了重要的角色。

同一基因家族成员之间通常具有相似或相同的功能, 当其中一个基因失活时, 部分基因家族成员部分或完全替代彼此功能维持表型稳定性, 实现功能冗余^[25]。但在复杂的调控通路中, 部分基因家族成员之间可能相互拮抗。例如, 属于同一磷脂酰乙醇胺结合蛋白 (PEBP) 家族的 *OsMFT1* 和 *OsMFT2* 在调控水稻种子穗发芽时的作用相反^[26-27]。然而, 同一基因家族部分成员可能具有不同的功能。拟南芥 *dog1* 突变体表现出种子休眠丧失, 但 *dog1l-1*、*dog1l-2* 和 *dog1l-3* 的单突变体未观察到明显表型, 仅 *dog1l-4* 突变体的种子表现出休眠适度

增强^[12], 与 *dog1* 突变体表型相反。*DOGIL-4* 的序列与 *DOG1* 的相似性很低, 只有 23.4%^[12], 其缺少一个 bZIP 结构域, 与 *DOG1* 不同的是, *DOGIL-4* 由 ABA 诱导, 在介导种子积累贮藏蛋白 (SSP) 时发挥主要作用^[28]。过表达 *DOGIL-3* 导致种子萌发时 ABA 超敏, 而过表达 *DOGIL-5* 则不会引发该效应^[29], 表明拟南芥 *DOG1* 和 *DOG1-like* 在种子休眠调控时具有各自独立的的不同功能。

DOG1 蛋白是一种诱导休眠必需的蛋白^[30], *DOG1* 的发现和功能探索对研究种子休眠与萌发具有重要意义^[31]。*DOG1* 除参与调控种子休眠外, 也参与种子成熟、种子寿命和萌发调控^[12,32-33]。目前, 有关 *DOG1* 的研究进展主要是基于拟南芥突变体的种子, 在水稻中, 仅 *OsDOGIL-3* 已被明确报道通过增强 ABA 通路促进种子休眠。虽然 *DOG1* 的功能在禾谷类植物中表现出一些功能保守性, 但在参与水稻种子休眠与萌发中的作用并不清楚。胚胎成熟发育期间, 水稻 *dog1* 突变体中是否缺少一些胚胎晚期发育储藏物 (如 LEA 蛋白) 的合成仍需进一步的研究。Carrillo-Barral 等^[30]提出, *AtDOG1* 及其同源基因是控制种子休眠的候选基因。将小麦 *TaDOGIL4* 和大麦 *HvDOGIL2* 置于 35S 强启动子下转入拟南芥, 其转基因后代的休眠性高于 WT^[13]。然而, *OsDOG1-like* 基因家族成员的功能及其与 GA 信号途径的关系尚不清楚。

Huo 等^[34]研究发现, *DOG1* 可以通过影响 microRNAs (miRNAs) miR156 和 miR172 的水平来调节莴苣 (*Lactuca sativa*) 和拟南芥的种子休眠和开花时间。在莴苣中, 抑制 *LsDOG1* 表达使种子能够在高温下发芽, 并促进早期开花, 这与 miR156 水平降低和 miR172 水平升高有关。在拟南芥中, miR156 基因过表达增强了种子休眠和延迟开花。*OsDOG1-like* 基因的突变是否影响了水稻开花时间, 进而影响结实率, 需要更进一步的观察。

GA 既能促进细胞伸长和茎秆发育, 又能调节花药发育。Dong 等^[35]利用 CRISP/Cas9 技术研究了 bZIP 转录因子家族的 *OsbZIP01*, 相比于 WT, *osbzip01* 突变体在抽穗期的株高更高, 种子萌发也更快; OE-bZip01 则株高更低, 萌发速率更慢。外源施用 GA₃ 能够恢复 OE-OsbZIP01 半矮化表型。这表明 *OsbZIP01* 可能通过调节水稻 GA 平衡而影响株高和萌发。一方面, *OsbZIP01* 作为转录抑制

子负调控了“绿色革命”基因 *SD1* 的表达, 使得 GA 生物合成减少。另一方面, GA 生物合成基因 *OsCPS1* 及信号转导基因 *GID1* 和 *GID2* 的功能缺失突变会诱导绒毡层程序性细胞死亡 (PCD) 缺陷, 最终导致雄性不育^[36]。Jin 等^[37]发现, GA 激素信号被整合到花药遗传程序中, 并通过 GA-DELLA-OsMS188 模块调控水稻花药发育。鉴于上述报道, 发现 *OsDOG1-like* 基因的优异等位基因或者与其互作的优异等位, 培育出株高降低、抗倒伏, 且休眠性增强、抗穗发芽的优良品系, 将是未来一项有实际价值的工作。本文为研究 *OsDOGIL-1*、*OsDOGIL-2* 和 *OsDOGIL-3* 基因调控水稻种子的萌发提供了重要线索, 对水稻种子萌发的激素调控机制研究具有一定的理论意义。

对于种子休眠深度的差异, 下一步使用新鲜收获的种子同时进行种子萌发、胚胎内源 GA 含量的测定, 将有助于从激素水平上揭示 *OsDOG1-like* 调控种子休眠与萌发的生理机制。提高 *osdog1l-1/2/3* 种子萌发率的人为技术手段, 同样有待后续进一步的摸索。

4 结论

本研究表明, *osdog1l-2/3* 双突变体对低浓度 GA₃ (0.1 和 1.0 μmol/L) 表现非常敏感, 而 *osdog1l-1/2/3* 三重突变体的种子对 0.1 和 1.0 μmol/L GA₃ 表现不敏感, 这可能是与 *osdog1l-2/3* 双突变体种子相比, 增加了 *OsDOGIL-1* 的敲除导致 GA 信号转导的缺陷被加重。GA₄₊₇ 处理所得出的规律性变化与 GA₃ 相似度极高。*osdog1l-2/3* 和 *osdog1l-1/2/3* 突变体胚胎均有活力, 且已萌发的种子能生成结构正常的幼苗, 暗示本文 *OsDOG1-like* 基因并不影响胚胎活力, 而在种子休眠和萌发过程中起作用。

参考文献

- [1] Awika J M, Piironen V, Bean S, et al. Advances in cereal science: implications to food processing and health promotion. Washington DC: American Chemical Society, 2011.
- [2] Mahender A, Anandan A, Pradhan S K. Early seedling vigour, an imperative trait for direct-seeded rice: an overview on physio-morphological parameters and molecular markers. *Planta*, 2015, 241(5): 1027-1050.
- [3] Miura K, Lin S, Araki H, et al. Genetical studies on germination of seed and seedling establishment for breeding of improved rice varieties suitable for direct seeding culture. *Japan Agricultural Research Quarterly*, 2004, 38: 1-5.
- [4] Bewley J D, Bradford K, Hilhorst H, et al. Seeds: physiology of

- development, germination and dormancy. New York: Springer, 2013.
- [5] Tuan P A, Sun M, Nguyen T, et al. I-Molecular mechanisms of seed germination//Feng H, Nemzer B, DeVries J W. Sprouted grains: nutritional value, production, and applications. Saint Paul: AACC International Press, 2019: 1-24.
- [6] Shu K, Liu X D, Xie Q, et al. Two Faces of One Seed: hormonal regulation of dormancy and germination. *Molecular Plant*, 2016, 9(1): 34-45.
- [7] Cutler S R, Rodriguez P L, Finkelstein R R, et al. Absciscic acid: emergence of a core signaling network. *Annual Review of Plant Biology*, 2010, 61: 651-679.
- [8] Yamaguchi S. Gibberellin metabolism and its regulation. *Annual Review of Plant Biology*, 2008, 59: 225-251.
- [9] Nonogaki H. Seed dormancy and germination-emerging mechanisms and new hypotheses. *Frontiers in Plant Science*, 2014, 5: 233.
- [10] Penfield S. Seed dormancy and germination. *Current Biology*, 2017, 27(17): 874-878.
- [11] Lee H, Choi M, Hwang W, et al. Occurrence of rice preharvest sprouting varies greatly depending on past weather conditions during grain filling. *Field Crops Research*, 2021, 264: 108087.
- [12] Bentsink L, Jowett J, Hanhart C J, et al. Cloning of *DOG1*, a quantitative trait locus controlling seed dormancy in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2006, 103(45): 17042-17047.
- [13] Ashikawa I, Abe F, Nakamura S. *DOG1*-like genes in cereals: investigation of their function by means of ectopic expression in *Arabidopsis*. *Plant Science*, 2013, 208: 1-9.
- [14] 张洋洋. 水稻 *DOG1-like* 基因克隆、表达分析与功能预测. 北京: 中国科学院大学, 2016.
- [15] Wang Q, Lin Q B, Wu T, et al. *OsDOGIL-3* regulates seed dormancy through the abscisic acid pathway in rice. *Plant Science*, 2020, 298: 110570.
- [16] Nakabayashi K, Bartsch M, Xiang Y, et al. The time required for dormancy release in *Arabidopsis* is determined by DELAY OF GERMINATION 1 protein levels in freshly harvested seeds. *The Plant Cell*, 2012, 24(7): 2826-2838.
- [17] Née G, Kramer K, Nakabayashi K, et al. DELAY OF GERMINATION 1 requires PP2C phosphatases of the ABA signalling pathway to control seed dormancy. *Nature Communications*, 2017, 8(1): 72.
- [18] Kendall S L, Hellwege A, Marriot P, et al. Induction of dormancy in *Arabidopsis* summer annuals requires parallel regulation of *DOG1* and hormone metabolism by low temperature and CBF transcription factors. *The Plant Cell*, 2011, 23(7): 2568-2580.
- [19] Graeber K, Linkies A, Steinbrecher T, et al. *DELAY OF GERMINATION 1* mediates a conserved coat-dormancy mechanism for the temperature and gibberellin-dependent control of seed germination. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2014, 111(34): 3571-3580.
- [20] Footitt S, Müller K, Kermod A R, et al. Seed dormancy cycling in *Arabidopsis*: chromatin remodelling and regulation of *DOG1* in response to seasonal environmental signals. *The Plant Journal*, 2015, 81(3): 413-425.
- [21] Footitt S, Douterelo-Soler I, Clay H, et al. Dormancy cycling in *Arabidopsis* seeds is controlled by seasonally distinct hormone-signaling pathways. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2011, 108(50): 20236-20241.
- [22] Xu Y, Du J G, Hao R L, et al. Gibberellin signaling regulates pectin biosynthesis in *Arabidopsis*. *Nature Communications*, 2025, 16(1): 4065.
- [23] Li Q J, Chen X, Zhang S N, et al. DELAY OF GERMINATION 1, the master regulator of seed dormancy, integrates the regulatory network of phytohormones at the transcriptional level to control seed dormancy. *Current Issues in Molecular Biology*, 2022, 44: 6205-6217.
- [24] Xiong M, Chu L Y, Li Z Y, et al. Brassinosteroid and gibberellin coordinate rice seed germination and embryo growth by regulating glutelin mobilization. *The Crop Journal*, 2021, 9(4): 1039-1048.
- [25] Nowak M A, Boerlijst M C, Cooke J, et al. Evolution of genetic redundancy. *Nature*, 1997, 388(6638): 167-171.
- [26] Zhang J L, Liu F, Yang K, et al. The fourth exon confers antagonistic activity of *OsMFT1* and *OsMFT2* in rice pre-harvest sprouting. *The Crop Journal*, 2025, 13(1): 135-144.
- [27] Shen J, Zhang L, Wang H Y, et al. The phosphatidylethanolamine-binding proteins *OsMFT1* and *OsMFT2* regulate seed dormancy in rice. *The Plant Cell*, 2024, 36(9): 3857-3874.
- [28] Sall K, Dekkers B J W, Nonogaki M, et al. DELAY OF GERMINATION 1-LIKE 4 acts as an inducer of seed reserve accumulation. *The Plant Journal*, 2019, 100(1): 7-19.
- [29] Nishimura N, Tsuchiya W, Moresco J J, et al. Control of seed dormancy and germination by *DOG1-AHG1* PP2C phosphatase complex via binding to heme. *Nature Communications*, 2018, 9(1): 2132.
- [30] Carrillo-Barral N, Rodriguez-Gacio M D, Matilla A J. Delay of Germination-1 (*DOG1*): a key to understanding seed dormancy. *Plants*, 2020, 9(4): 480.
- [31] Nonogaki H. Seed germination and dormancy: the classic story, new puzzles, and evolution. *Journal of Integrative Plant Biology*, 2019, 61(5): 541-563.
- [32] Li P, Ni H H, Ying S B, et al. Teaching an Old Dog a New Trick: multifaceted strategies to control primary seed germination by DELAY OF GERMINATION 1 (*DOG1*). *Phyton-International Journal of Experimental Botany*, 2020, 89(1): 1-12.
- [33] Dekkers B J W, He H, Hanson J, et al. The *Arabidopsis* 1 gene affects 5 (5) expression and genetically interacts with 3 during *Arabidopsis* seed development. *The Plant Journal*, 2016, 85(4): 451-465.
- [34] Huo H, Wei S, Bradford K J. *DELAY OF GERMINATION 1 (DOG1)* regulates both seed dormancy and flowering time through microRNA pathways. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2016, 113(15): 2199-2206.
- [35] Dong X L, Zhou Y, Zhang Y Q, et al. *OsbZIP01* Affects plant growth and development by regulating *OsSD1* in rice. *Rice Science*, 2024, 31(1): 77-86.
- [36] Aya K, Ueguchi-Tanaka M, Kondo M, et al. Gibberellin Modulates Anther Development in Rice via the Transcriptional Regulation of *GAMYB*. *The Plant Cell*, 2009, 21(5): 1453-1472.
- [37] Jin Y, Song X Y, Chang H Z, et al. The GA-DELLA-OsMS188 module controls male reproductive development in rice. *New Phytologist*, 2022, 233(6): 2629-2642.

Influence of *OsDOG1-like* Family Mutants on Seed Germination Potential and Gibberellin Sensitivity in Rice

Huang Xinyuan¹, Zhang Ying², Tao Yingmei¹, Jiang Qingshan², Wei Piwei^{1,3}

(¹College of Food and Brewing Engineering, Sichuan University of Science & Engineering, Yibin 644005, Sichuan, China; ²Yibin Academy of Agricultural Sciences, Yibin 644000, Sichuan, China;

³Sichuan Provincial Key Laboratory of Digital-Intelligent Management and Ecological Decision-Making Optimization for Baijiu in the Upper Yangtze River Region, Yibin 644005, Sichuan, China)

Abstract The *Arabidopsis thaliana* *DOG1* (*DELAY OF GERMINATION 1*) is a regulator gene responsible for the quantitative trait locus (QTL) controlling seed dormancy. In rice, the *OsDOG1-like3* gene promotes seed dormancy by enhancing the abscisic acid (ABA) pathway, whereas the functions of *OsDOG1-like1* and *OsDOG1-like2* remain unclear. This study employed CRISPR-Cas9 technology together with conventional crossing to generate *osdog1l-2* and *osdog1l-3* single mutants, and *osdog1l-2/3* double mutants and *osdog1l-1/2/3* triple mutants. The results showed that there were few phenotypic changes in seed germination rates in *osdog1l-2* and *osdog1l-3* single mutants. However, the germination rates of *osdog1l-2/3* and *osdog1l-1/2/3* mutants decreased to 16.67% and 8.33% respectively, in contrast to the 72.92% germination rate of wild-type (WT) seeds at 10 days after imbibition. Treatment with low concentration of gibberellin (0.1 and 1.0 $\mu\text{mol/L}$ GA₃) increased the germination rate of *osdog1l-2/3* to 45.83%, while the germination rate of *osdog1l-1/2/3* remained largely unaffected. The homozygous *osdog1l-1/2/3* mutant seeds exhibited insensitivity to GA₃ and GA₄₊₇, indicating that *OsDOG1-like1* would be critical for rice seed germination in response to GA signal, or that *OsDOG1-L1*, *OsDOG1-L2*, and *OsDOG1-L3* had functional redundancy in the regulation of seed germination. High-concentration GA₃ (10.0 $\mu\text{mol/L}$) partially restored the germination rate of *osdog1l-1/2/3* to 27.08%, with GA₄₊₇ treatment showing similar effects. These results suggest that *OsDOG1-like* genes act upstream of (or in parallel with) GA signaling to regulate rice seed germination. Embryo viability in both *osdog1l-2/3* and *osdog1l-1/2/3* mutants was confirmed to be similar to that of WT by TTC staining, and normal post-germination growth occurred in the germinated seeds.

Key words Rice; *OsDOG1-like* gene family; Triple mutant; Seed germination