DOI: 10.13718/j. cnki. xdzk. 2020.06.001

利用 RNA 干涉研究水稻 OsROSES1 基因的功能

龚晓平¹, 王 楠², 况晓明¹, 曾正明³, 张长伟², 李加胜¹, 刘 勤¹, 张致力¹, 何光华², 罗 挺¹

1. 重庆市渝东南农业科学院,重庆 涪陵 408000;

2. 西南大学 水稻研究所/转基因植物与安全控制重庆市重点实验室, 重庆 400715;

3. 四川省农业科学院水稻高粱研究所,四川德阳 618000

摘要: 生物体最终的大小或者生物体个体器官的大小都受细胞增殖、扩张等因素的调控. 通过 RNA 干涉对水稻 器官大小变小且伴随叶片早衰基因 OsROSES1 的功能进行研究,实时定量 PCR 分析结果显示,干涉转基因植株 OsROSES1 基因表达水平显著下调. 与野生型相比,干涉转基因植株 OsROSES1 表达水平下调的转基因株系整 体变矮,叶片卷曲且明显变短变窄,叶片横切面维管束数目减少,表明 OsROSES1 基因的下调引起细胞数量的 减少和细胞大小减小导致水稻器官大小明显减小,同时,叶片气孔密度和开度的增加导致叶片提前衰老. 结果表 明, ROSES1 可作为水稻 BEL1-Like"同源盒基因"在植物器官发育过程中通过调控细胞增殖和扩张从而控制器官 大小和光合作用.

关键词:水稻;器官大小;RNA干涉;气孔密度;叶片衰老

中图分类号: S511 文献标志码: A 文章编号: 1673 - 9868(2020)06 - 0001 - 10

随着环境不断的变化,多细胞生物体经历着细胞的增殖、膨胀和分化的基本过程,促使其连续不断地 生长和发育^[1].尽管发育中的器官最终大小受周围环境条件刺激的影响,但其拥有内在的遗传因子决定了 它们最终的大小^[2-4].在动物中,器官的大小是由多种多样的细胞生长、增殖和细胞凋亡过程调控的.那些 过程主要由雷帕霉素靶蛋白途径和 Hippo 信号通路调控^[5-6].在植物器官形成期间,器官生长由细胞增殖 和细胞扩增调控,达到其特征尺寸是由细胞数量或细胞大小决定或两者同时决定的^[2-3].

在植物中,主要通过促进细胞增殖而达到促进植物器官生长的调控因子有 ANT,JAGGED /JAG,AR-GOS,AtGRFs,AtGIFs,KLUH/CYP78A5 和 GLUCOSE-6-PHOSPHATE TRANSPORTER/GPT2^[4,7-8]. 而通过限制细胞增殖负调控器官大小的调控因子有 CIN,ARF2,PPD1/2,STERILE APETALA/SAP 和 CINNAMOYL CoA REDUCTASE/CCR1^[9-11]. 同时,植物器官大小也被细胞扩增调控. 目前,已经报道有 大量通过促进细胞扩增而达到调控器官生长的调控因子,如 ROT3,AN,ARL,SAUR,OSR2,KUA1,AtE-XPA1,AtEXP10,POM-POM2,ABP1 等^[12-15]. 而通过负调控细胞扩张而控制器官生长的几个调控因子有 BPEp,RPT2a,OsMPS,AtPRX71,SI-IAA17,KNOPE1,AtKIN13A 和 RALF^[15-18].

另外,已经报道了几个同时调控细胞扩增和细胞数量的调控因子,这些调控因子被证明可调控器官的大小,如 CYCA2/1,DA1,MED25/EOD1/BIG BROTHER,SUPPRESSOR OF DA1/UBP15^[19-21].然而,细胞增殖和细胞扩增能够相互补偿,影响最终的器官大小.在这种情况下,植物器官大小是由细胞增殖和细胞扩增协同或反对(向)决定的.现在已鉴定出一些植物响应内在或环境诱导的调控因子,这些

收稿日期: 2019-06-01

基金项目:重庆市(重点)基础科学与前沿技术研究项目(cstc2015jcyjBX0109);重庆市基础研究与前沿探索项目(cstc2018jcyjAX0447).

作者简介:龚晓平(1980-),男,博士,副研究员,主要从事水稻遗传育种、分子生物学的研究.

调控因子通过协同细胞数量和细胞扩增从而调控器官大小.例如,光敏色素 B(Phytochrome B)和光敏色素互作因子(PIFs)^[1].

在本课题组的前期工作中,通过图位克隆技术分离了一个水稻器官变小且伴随叶片早衰基因 OsRO-SES1(Reduced Organ size with Early Senescence),利用细胞学观察、生理学测定分析突变体 roses1 表型特征,并构建由 ROSES1 启动子驱动的 GUS 信号表达载体,利用根癌农杆菌(Agrobacterium tumefaciens)介导转化法获得了转基因植株.表型观察结果表明,ROSES1 作为水稻 BEL1-Like"同源盒基因"通过调控细胞增殖和扩张从而控制器官大小和光合作用,在植物器官发育过程中具有重要调控作用^[15].本研究 拟通过 RNA 干涉(RNA interference, RNAi)方法^[22]下调 OsROSES1 基因的表达,以进一步探讨其在水稻 生长发育调控中的功能.

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

本研究粳稻品种中花 11 种子由西南大学农学与生物科技学院作物品质改良重点实验室提供.水稻籼型恢复系涪恢 9802 种子由重庆市渝东南农业科学院提供.载体 pMD19-T 购于大连 TaKaRa 公司.大肠杆菌(*Escherichia coli*)菌株 DH5α,根癌农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*)EHA105,植物表达载体 pCAMBIA1301,pTCK303等由西南大学农学与生物科技学院作物品质改良重点实验室保存.植物 RNA 提取试剂盒、反转录试剂盒、基因组 DNA 提取试剂盒、质粒提取试剂盒和琼脂糖胶回收试剂盒购于北京 全式金公司.DNA 聚合酶、限制性内切酶、T4 连接酶、实时 PCR 试剂盒购于 TaKaRa 公司.引物设计采用 Primer Premier 6.0 软件^[23],由上海英骏公司合成.序列测定由北京华大基因公司完成.

1.2 OsROSES1 系统进化树的构建

*OsROSES*1 与其他相关同源蛋白的比对、分析和下载在 NCBI(http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi), Phytozome 10.3 (http://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html)和 UniProt(http://www.uniprot.org/)网站上进行.进化树的构建使用 MEGA 7.0 进行^[24],各蛋白氨基酸序列的比对在 ClustalW 上进行,进化树的构建使用邻接法(Neighbor-joining)进行,采用 Poisson model, Bootstrap 值为 1 000 次重复.

1.3 OsROSES1 基因 RNAi 载体构建

在 NCBI 网站(https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi)上对 OsROSES1 基因的编码序列进行 BLAST,确定 OsROSES1 基因的特异区间,在特异区间内设计一对干涉引物用于扩增干涉片段,干涉片 段长度为 269 bp,位于 OsROSES1 基因的编码框内,在用于扩增正向片段的引物两端加上 KpnI 和 SpeI 酶切位点,在用于扩增反向片段的引物两端加上 BamHI 和 SacI 酶切位点,引物 5′端均加上 GCC 保护碱 基,引物 Ri-ROSES1 序列为 5′-GGTACCCTCCGCGTGGTCGTACATG-3′和 5′-GGATCCCTATGTC-CCACTCCCAGGGTTT-3′.以野生型的 cDNA 为模板,用这两对引物扩增正反向干涉片段,1%琼脂糖 凝胶电泳检测并回收,使用相应的内切酶酶切回收产物后-20 ℃保存备用;使用 KpnI 和 SpeI 酶切 pTCK303 载体并回收酶切后的载体骨架,T4 连接酶连接正向片段的酶切片段入载体骨架中,转化后挑 单斑测序,提取测序正确菌液的质粒作为中间载体,采用 BamHI 和 SacI 酶切中间载体,连接反向片 段的酶切产物入中间载体转化后挑单斑测序,提取测序正确菌液的质粒即为 OsROSES1 基因组干涉 载体,-20 ℃保存备用.

1.4 转化野生型植株获得干涉植株及鉴定

由农杆菌介导 OsROSES1 基因组干涉载体转化野生型的愈伤组织并经过分化获得 OsROSES1 基因的 干涉植株,转化及分化过程由武汉伯远公司操作完成,转基因植株经过 GUS 活性检测后种植于西南大学 水稻基地,提取野生型、OsROSES1 RNAi 转基因 T。代植株基因组 DNA,利用 pTCK303 载体上的潮霉素 抗性标记 Hpt 基因序列(Genebank 登录号: E00777)进行 PCR 检测.用扩增引物 HPTF: 5'-TCGTTAT-GTTTATCGGCACTTTG-3'和 HPTR; 5'-GCGTCTGCTGCTCCATACAAG-3'鉴定转基因阳性植株.

1.5 OsROSES1 基因 RNAi 转基因植株表型分析

为了检测 OsROSES1 基因干涉对植株田间性状的影响,在分蘖期测定野生型、3 个 T₁ 代 RNAi 转基

因株系的株高、叶片卷曲度、叶片光合色素质量分数,并观察叶片气孔密度和开度.在成熟期测定转基因 植株株高、有效穗数、结实率和千粒质量.

1.6 OsROSES1 基因表达分析

分别从野生型涪恢 9802 和 roses1 突变体抽穗期植株根、茎、节、叶和颖花中提取总 RNA,合成第1 链 cDNA,利用实时定量 PCR 进行 OsROSES1 基因组织差异性表达分析.以 ACTIN(GeneBank 登录号为 X16280)作为内参基因,所用实时定量 PCR 引物为 RTACTF: 5'-GACCCAGATCATGTTTGAGACCT-3'; RTACTR: 5'-CAGTGTGGCTGACACCATCAC-3'; Ri-ROSES1F: 5'-GGTACCCTCCGCGTG-GTCGTACATG-3'; Ri-ROSES1R: 5'-GGATCCCTATGTCCCACTCCCAGGGTTT-3'. 扩增程序为 95 ℃ 预变性 30 s; 95 ℃变性 5 s, 60 ℃退火 30 s, 72 ℃延伸 15 s,循环 40 次; 扩增后,65 ℃退火 5 s; 95 ℃溶 解 5 s(每次循环增加 0.5 ℃,循环 60 次)进行溶解曲线分析.实时 PCR 在 Bio-Rad CFX 96 上运行,数据用 CFX Manager 2.0 软件进行分析.

2 结果与分析

2.1 OsROSES1 基因进化树分析

结构域分析结果表明, ROSES1 蛋白含有 779 个氨基酸碱基, 编码包含一段植物特定的 POX 结构域 的 BEL1-Like"同源盒基因"转录因子. 进化树分析表明这些蛋白细分为单子叶和双子叶 2 个主要分枝, 具 有高度的保守性(图 1). 在蛋白结构域鉴定的基础上, 同源结构域和 POX 域存在于所有单子叶和双子叶植 物的 ROSES1 同源染色体上, 表明 ROSES1 蛋白可能在单子叶和双子叶分枝之前出现.



ROSES1在23个物种中有同源蛋白,主要分为2个进化分枝,具有高度的保守性.

图 1 ROSES1 的进化树分析

2.2 转基因 RNAi 植株的获得及表型分析

利用 RNAi 技术进一步确认 OsROSES1 基因功能,构建 RNAi 载体 pUbi: ROSES1-RNAi 并转化到 野生型中花 11(Oryza sativa ssp. japonica)中,获得 19 株转基因植株,其中阳性植株分蘖期开始表现为 植株整体变矮,叶片变短且内卷(图 2a 和 b).与中花 11 相比较,阳性干涉转基因植株(RNAi1,RNAi2 和 RNAi11)的 OsROSES1 表达水平显著降低(图 2c);干涉转基因植株叶片后 3 叶(剑叶、倒 2 叶和倒 3 叶)的 卷曲度分别为 56%,52%和 44%(图 2d);石蜡切片显示干涉转基因植株叶片卷曲部位泡状细胞明显变小 (图 2e).生长期 60 d时,对气孔密度增加的转基因植株叶片取样在常温条件下每隔 0.5 h 称量叶片鲜质量 1 次,一直到 2.5 h,然后进行失水率分析(图 2f),结果表明干涉转基因植株下调了 OsROSES1,显著增加 了叶片气孔导度,引起叶片失水速度加快.进一步检测抽穗期干涉转基因植株光合色素质量分数,结果与 中花 11 相比,3 个干涉转基因植株光合色素质量分数显著降低(图 2g).





图 2 OsROSES1 基因的干涉验证

为了验证 OsROSES1 基因是否调控水稻气孔发育和运动,通过电镜扫描 60 d 大小的中花 11 和 3 个干 涉转基因植株叶片气孔,观察比较气孔密度和开度.叶片上下表面气孔的数量和分布如图 3a 至图 3c,每张 叶片反面气孔数目比叶片正面气孔数目多.相比于中花 11,干涉转基因植株 RNAi1,RNAi2 和 RNAi11 的 正面叶片单位面积气孔数目分别增加了 7.72%,10.91%和 7.29%,反面叶片单位面积气孔数目分别增加

了 12.68%,14.32%和 12.32%. 抽穗期对中花 11 和 3 个干涉转基因植株叶片气孔全开、半开和全闭 3 种状态的数量进行了统计,结果显示, RNAi1, RNAi2 和 RNAi11 气孔全开状态百分比分别为 47.4%,48.8% 和 46.2%,显著高于中花 11 的 42.2%,而 RNAi1, RNAi2 和 RNAi11 气孔全闭状态百分比分别为 22.2%, 19.2%和 21.4%,显著低于中花 11 的 28.1%(图 3d). 干涉转基因植株下调了 OsROSES1,导致叶片气孔 密度和开度显著增加.



箭头所指处为气孔排列的位置. * 表示 p<0.05, 差异有统计学意义.

图 3 OsROSES1 基因的下调增加了水稻叶片气孔密度和影响气孔的开度

在成熟期对干涉转基因植株农艺性状调查结果表明,与中花 11 相比较,阳性干涉转基因植株 (RNAi1,RNAi2 和 RNAi11)的株高、有效穗数和千粒质量显著降低,结实率极显著降低(表 1).由于 Os-ROSES1 功能的缺失影响了细胞增殖和扩展,使器官细胞数目变少和细胞大小变小,植株表现出株高变 矮、有效穗数减少、结实率和千粒质量降低.

材料	株高/cm	有效穗数	穗长/cm	每穗粒数	结实率/%	千粒质量/g
中花 11	93.4±2.8	8.5 \pm 1.5	20.0 \pm 1.9	154.2 \pm 27.6	94.6 \pm 2.0	26.0 \pm 1.0
RNAi1	90.1 \pm 2.4 *	6.7 \pm 1.4 *	19.0 \pm 2.0	148.2 \pm 22.3	86.8 \pm 3.8 * *	24.8 \pm 0.8*
RNAi2	89.5 \pm 2.6*	6.6 \pm 1.5 *	19.2 \pm 1.8	149.6 \pm 23.6	86.5 \pm 3.6**	24.9 \pm 0.7 *
RNAi11	90.2 \pm 2.5 *	6.7 \pm 1.3 *	19.1 \pm 1.6	148.7 \pm 21.9	86.9 \pm 3.2 * *	24.9 \pm 0.8 [*]

表 1 中花 11 和 3 个干涉转基因植株 (RNAi1, RNAi2 和 RNAi11) 农艺性状分析

注: * 表示 p<0.05, * * 表示 p<0.01, 差异有统计学意义.

实时定量 PCR 分析结果表明, OsROSES1 基因在所有器官中表达,其中在幼嫩的叶片和叶鞘中表达 水平较高(图 4a).用以调控气孔密度和开度相关基因、保卫细胞离子通道调控基因、液泡膜 Na⁺/K⁺逆向 转运蛋白及水通道蛋白等相关基因对野生型涪恢 9802 和 roses1 突变体进行定量表达分析,结果表明,与 野生型涪恢 9802 相比较, roses1 突变体正调控表皮细胞不对称分裂,增加叶片气孔密度和开度的调控因子 OsSPCH1,OsSPCH2,OsMUTE 和保卫细胞离子通道蛋白 OsCAM3 表达量极显著升高,而抑制表皮细胞 不对称分裂的调节因子 OsERL,液泡膜 Na⁺/K⁺逆向转运蛋白 OsNHX2 和水通道蛋白 OsAQP 表达量极 显著降低(图 4b,表 2),该结果与植株整体大小变小、叶片变短且内卷、叶片气孔密度和开度增加、叶片蒸 腾速率加快引起叶片卷曲的干涉阳性转基因植株表型一致.



(b) 与气孔发育相关的 18 个基因在野生型涪恢 9802 和突变体 roses1 中的表达水平

表 2 实时定量 PCR 分析所用引物

基因名称	正向序列(5'-3')	反向序列(5'-3')		
actin	TGGCATCTCTCAGCACATTCC	TGCACAATGGATGGGTCAGA		
Os TMM	CCATGGCAACAACCTCACATC	ATGCTTAGGTGCTGGAACTTGAA		
OsERL	TCAGTCTTGGTATCTCTCCAC	AGGTTGATGTGTGTGTGTCTTTGAG		
OsER	TCCCATCAACGCTCTCACAG	TCAGTCTTGGTATCTCTCCAC		
OsERL1/2	ATATTGCTCTGCGTTCTGCTG	ACAAGTGGCTGTGGTTGATTTG		
OsEPF1/2	GCATGGTGCACAAGACGAAA	TGGCCTGCTGTGGTGAGAT		
OsYODA1	TGGAAGTGTTTCACCATTGCA	TCATGACGGTTTGTTGGAGATT		
OsYODA2	GCGTGTGGAATTTGCATGAT	GATCCTCAAAGCCCTTCTGTGA		
OsFAMA	CGAGTCCTCCGCTCACTCA	CCACCTATGATGGATGCTTGGT		
OsSPCH1	AAGTATAGCATGCAGCAGAAACAGA	ACACAGAGAGCCCAACACGTATT		
OsSPCH2	TTGGTGACCGTAGCTAGACTCATC	CGTCGCTGTCCACCAAGAG		
OsMUTE	CGACCAGGCGTCGATCAT	AGCGATTGCAGTAGCGTCTGT		

^{* *} 表示 p<0.01, 差异有统计学意义.

图 4 水稻抽穗期 OsROSES1 基因的表达分析和气孔发育相关基因的表达量分析

7

<u> </u>		
基因名称	正向序列(5'-3')	反向序列(5'-3')
OsAQP	ATCGCCATCGGCTTCATCGT	CGGGTTCCCAAAGGTCCACA
OsPMA 3	ATGAGTCCATTGCCGCTTTAC	ATACTTGTGCTCTGGGAATACACC
OsNHX1	GAGCCGTCGGGACAATGATAT	TCTCCTACATCCAGCGTTCCA
OsNHX2	CCACACTCAACTCCCTAGTAATGC	GTCAGGAGCCCAAAGACCAT
OsCAM1	GTTTCTCAACCTGATGGCACG	CTTGTCAAATACACGGAAGGCTC
OsCAM3	ACGCAAGATGAAGGACACCG	TGAAGCCGTTCTGGTCTTTGTC
OsYDA	GCACCTCCACGCCTCTGTCT	TCTCTTTCCAAACTGAGGGCTTAG

3 讨 论

结表 ?

植物成熟器官的形成需要经历两个过程:首先通过紧密协调的细胞生长与细胞分裂实现细胞增殖,随后转为伴随着核内复制的细胞扩展与分化^[25-26].这两个过程是连续进行的,许多基因能通过转录调节、蛋白酶体合成或降解、植物激素调节或松弛细胞壁、小 RNA 调控等途径作用于这两个过程调控器官的大小. OsROSES1 基因编码包含一段植物特定的 POX 结构域的 BEL1-Like"同源盒基因",在水稻根或顶端分生 组织、居间分生组织和维管束细胞组织部位高表达,并参与调控顶端生长和侧生器官原基的细胞分裂和细 胞扩展过程^[15].本文利用 RNA 干涉下调 OsROSES1 的表达,阳性转基因植株从分蘖期开始,植株逐渐变 矮,叶片变短且内卷,光合色素质量分数显著下降.叶片卷曲部位泡状细胞明显变小,单位面积气孔数目 和气孔导度增加,蒸腾速率加快使叶片呈现卷曲;分蘖期叶片光合色素质量分数显著下降,导致植株成熟 期株高变矮、有效穗数减少、结实率和千粒质量降低.表明 OsROSES1 通过调控细胞增殖和扩张控制器官 大小,改变叶片气孔密度和开度,从而影响光合作用.

对于水稻器官大小的调控,目前仅报道了 WUS,OSH1,OSH15 等少数几个调控因子,WUS 是水稻形成分蘖(顶端分生)初始化分生组织非常重要的同源转录因子^[27].同时,水稻 WUSCHEL-RELATED HO-MEOBOX(WOX)基因被证明是明显促进根的顶端分生组织和冠根的形成^[28].同样,水稻 ORYZA SATI-VA HOMEOBOX1(OSH1)和 KNOTTED -LIKE HOMEOBOX^[29]基因被证明促进顶端分生组织处于未分化状态^[30].水稻 osh1 突变体发芽之后表现为促进顶端分生组织的形成.水稻 osh1 和 d6(编码同源框蛋白 OSH15)基因双突变体表现为顶端分生组织不发达,结果表明在水稻胚胎形成期间需要这 2 个基因激活或促进顶端分生组织形成^[30].本研究的 ROSES1 蛋白属于同源框亚科,包含 2 个功能域:1 个 DNA 同源结构域和 1 个植物特有未知功能 POX 结构域^[31].水稻 WUS 同源基因和其他同源框基因对顶端分生组织、根的分生组织的萌发和腋生器官的原始形成起到重要调控作用,与之不同的是,OsROSES1 是同时在胚胎形成期间启动初生分生组织和所有腋生器官及组织的次生分生组织,如侧根、分蘖、花穗分枝、小穗原基和分别在茎周围和叶主脉两侧的维管束^[15],但是,OsROSES1 是如何协同 WUS 和其他同源框基因调控分生组织的形成需要进一步研究.

水稻 roses1 突变体器官大小的变小影响叶片气孔的密度和开度,蒸腾速率加快使叶片呈现卷曲,引起 叶片光合色素质量分数显著下降,导致水稻 roses1 突变体叶片发生早衰,表明 OsROSES1 可能通过调控下 游的一些目标基因从而调控气孔密度和开度^[15].类似的研究表明,一个属于 IV 级同源框—亮氨酸链家族 的同源框 START 转录因子的激活表达,使气孔的密度减少提高其抗旱能力^[32].作为植物气孔密度和开度 的正调控因子,b HLH 转录因子 SPCH 促进拟分生组织母细胞的形成,调控起始不等分裂、扩增不等分裂 和间隔不等分裂^[33-34],而 MUTE 终止拟分生组织细胞的干细胞活性并促进其分化为保卫母细胞^[33]. ERECTA-LIKE(ERL)通过抑制保卫母细胞的分化负调控气孔发育,在叶表皮气孔细胞中广泛表达^[35]. NHX(Na⁺, K⁺/H⁺反向转运体)主要负责将胞质中多余的 Na⁺和 K⁺储存在液泡里,同时将 H⁺从液泡排 到胞质中,拟南芥气孔开启依赖 NHX1 和 NHX2 在保卫细胞液泡积累 K⁺的过程^[36].钙调蛋白作为钙离子的主要感受器,以 Ca²⁺信使途径参与了干旱和 ABA 引起的地上部叶片气孔开闭的胞间信号传导过程^[37].水通道蛋白(aquaporin, AQP)参与调节叶肉细胞内二氧化碳的运输,影响植物叶片气孔运动及光合作用^[38].本研究中,与野生型涪恢 9802 相比较,roses1 突变体正调控表皮细胞不对称分裂,增加叶片气孔密度和开度的调控因子 OsSPCH1,OsSPCH2,OsMUTE 和保卫细胞离子通道蛋白 OsCAM3 表达量极显著升高,而抑制表皮细胞不对称分裂的调节因子 OsERL、调控叶片气孔开度的质膜上的 H⁺泵家族基因OsNHX2 和水通道蛋白 OsAQP 表达量极显著降低.该结果表明 OsROSES1 可能直接或间接调控了气孔的密度和开度以及气孔运动涉及囊泡运输、液泡融合、膜 H⁺泵和离子平衡蛋白.OsROSES1 是如何调控水稻器官发育还需要进一步研究.

4 结 论

本研究利用 RNA 干涉下调 OsROSES1 的表达,分蘖期植株整体变矮,叶片变短且内卷,卷曲部位泡 状细胞明显变小,增加了叶片单位面积气孔数目,由于蒸腾速率加快引起叶片卷曲,从而显著降低了植株 光合色素质量分数,导致水稻 roses1 突变体叶片发生早衰,成熟期植株表现出株高变矮、有效穗数减少、 结实率和千粒质量降低,该结果进一步表明 ROSES1 可作为水稻 BEL1-Like"同源盒基因",在植物器官发 育过程中通过调控细胞增殖和扩张从而控制器官大小和光合作用.这为下一步研究 OsROSES1 在水稻器 官发育调控网络中的功能奠定了基础.

参考文献:

- JOHANSSON H, JONES H J, FOREMAN J, et al. Arabidopsis Cell Expansion is Controlled by a Photothermal Switch
 [J]. Nature Communications, 2014(5): 4848.
- [2] MIZUKAMI Y. A Matter of Size: Developmental Control of Organ Size in Plants [J]. Current Opinion in Plant Biology, 2001, 4(6): 533-539.
- [3] SUGIMOTO-SHIRASU K, ROBERTS K. "Big it Up": Endoreduplication and Cell-size Control in Plants [J]. Current Opinion in Plant Biology, 2003, 6(6): 544-553.
- [4] ANASTASIOU E, LENHARD M. Growing up to One's Standard [J]. Current Opinion in Plant Biology, 2007, 10(1): 63-69.
- [5] PAN D. Hippo Signaling in Organ Size Control [J]. Genes & Development, 2007, 21(8): 886-897.
- [6] ZENG Q, HONG W J. The Emerging Role of the Hippo Pathway in Cell Contact Inhibition, Organ Size Control, and Cancer Development in Mammals [J]. Cancer Cell, 2008, 13(3): 188-192.
- [7] VAN DINGENEN J, DE MILDE L, VERMEERSCH M, et al. Chloroplasts are Central Players in Sugar-Induced Leaf Growth [J]. Plant Physiology, 2016, 171(1): 590-605.
- [8] VERCRUYSSEN L, TOGNETTI V B, GONZALEZ N, et al. GROWTH REGULATING FACTOR5 Stimulates Arabidopsis Chloroplast Division, Photosynthesis, and Leaf Longevity [J]. Plant Physiology, 2015, 167(3): 817-832.
- [9] WHITE D W R. PEAPOD Regulates Lamina Size and Curvature in Arabidopsis [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2006, 103(35): 13238-13243.
- [10] XUE J S, LUO D X, XU D Y, et al. CCR1, an Enzyme Required for Lignin Biosynthesis in Arabidopsis, Mediates Cell Proliferation Exit for Leaf Development [J]. The Plant Journal, 2015, 83(3): 375-387.
- [11] WANG Z B, LI N, JIANG S, et al. SCF^{SAP} Controls Organ Size by Targeting PPD Proteins for Degradation in Arabidopsis Thaliana [J]. Nature Communications, 2016(7): 11192.
- [12] TSUGE T, TSUKAYA H, UCHIMIYA H. Two independent and polarized processes of cell elongation regulate leaf blade expansion in Arabidopsis thaliana (L.) Heynh [J]. Development, 1996, 122: 1589-1600.
- [13] KIM G T, TSUKAYA H, UCHIMIYA H. The ROTUNDIFOLIA3 Gene of Arabidopsis Thaliana Encodes a New Member of the Cytochrome P-450 Family that is Required for the Regulated Polar Elongation of Leaf Cells [J]. Genes &.

Development, 1998, 12(15): 2381-2391.

- [14] SPARTZ A K, REN H, PARK M Y, et al. SAUR Inhibition of PP2C-D Phosphatases Activates Plasma Membrane H⁺-ATPases to Promote Cell Expansion in Arabidopsis [J]. The Plant Cell, 2014, 26(5): 2129-2142.
- [15] GONG X P, ZHANG Z L, YUE J Y, et al. Phenotypic Characterization, Fine Mapping, and Altered Expression Profiling of *Roses1* Mutation that Affects Organ Size and Water Loss through Regulating Stomatal Density in Rice [J]. Crop Science, 2018, 58(2): 486-506.
- [16] RAGGI S, FERRARINI A, DELLEDONNE M, et al. The Arabidopsis Thaliana Class III Peroxidase AtPRX71 Negatively Regulates Growth under Physiological Conditions and in Response to Cell Wall Damage [J]. Plant Physiology, 2015, 169(4): 2513-2525.
- [17] TESTONE G, CONDELLO E, DI GIACOMO E, et al. The KNOTTED-like Genes of Peach (Prunus Persica L. Batsch) are Differentially Expressed during Drupe Growth and the Class 1 KNOPE1 Contributes to Mesocarp Development [J]. Plant Science, 2015, 237: 69-79.
- [18] BERGONCI T, SILVA-FILHO M C, MOURA D S. Antagonistic Relationship between AtRALF1 and Brassinosteroid Regulates Cellexpansion-related Genes [J]. Plant Signaling & Behavior, 2014, 9(10): e976146.
- [19] NATH U. Genetic Control of Surface Curvature [J]. Science, 2003, 299(5611): 1404-1407.
- [20] LI Y, ZHENG L, CORKE F, et al. Control of Final Seed and Organ Size by the DA1 Gene Family in Arabidopsis Thaliana [J]. Genes & Development, 2008, 22(10): 1331-1336.
- [21] DU L, LI N, CHEN L L, et al. The Ubiquitin Receptor DA1 Regulates Seed and Organ Size by Modulating the Stability of the Ubiquitin-Specific Protease UBP15/SOD2 in Arabidopsis [J]. The Plant Cell, 2014, 26(2): 665-677.
- [22] FIRE A, XU S Q, MONTGOMERY M K, et al. Potent and Specific Genetic Interference by Double-stranded RNA in Caenorhabditis Elegans [J]. Nature, 1998, 391(6669): 806-811.
- [23] 陈 蒙, 刘海峰. 山葡萄 C4H 基因的克隆表达及遗传转化分析 [J]. 西南大学学报(自然科学版), 2019, 41(10): 11-21.
- [24] KUMAR S, STECHER G, TAMURA K. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets [J]. Molecular Biology and Evolution, 2016, 33(7): 1870-1874.
- [25] XU R, LI Y H. The Mediator Complex Subunit 8 Regulates Organ Size in Arabidopsis thaliana [J]. Plant Signaling & Behavior, 2012, 7(2): 182-183.
- [26] INZÉ D, DE VEYLDER L. Cell Cycle Regulation in Plant Development [J]. Annual Review of Genetics, 2006, 40(1): 77-105.
- [27] TANAKA W, OHMORI Y, USHIJIMA T, et al. Axillary Meristem Formation in Rice Requires the WUSCHEL Ortholog TILLERS ABSENT1 [J]. The Plant Cell, 2015, 27(4): 1173-1184.
- [28] ZHAO Y, HU Y F, DAI M Q, et al. The WUSCHEL-Related Homeobox Gene WOX11 is Required to Activate Shoot-Borne Crown Root Development in Rice [J]. The Plant Cell, 2009, 21(3): 736-748.
- [29] LONG J A, MOAN E I, MEDFORD J I, et al. A Member of the KNOTTED Class of Homeodomain Proteins Encoded by the STM Gene of Arabidopsis [J]. Nature, 1996, 379(6560): 66-69.
- [30] TSUDA K, ITO Y, SATO Y, et al. Positive Autoregulation of a KNOX Gene is Essential for Shoot Apical Meristem Maintenance in Rice [J]. The Plant Cell, 2011, 23(12): 4368-4381.
- [31] DOERKS T. Systematic Identification of Novel Protein Domain Families Associated with Nuclear Functions [J]. Genome Research, 2002, 12(1): 47-56.
- [32] YU L, CHEN X, WANG Z, et al. Arabidopsis Enhanced Drought Tolerance1/HOMEODOMAIN GLABROUS11 Confers Drought Tolerance in Transgenic Rice without Yield Penalty [J]. Plant Physiology, 2013, 162(3): 1378-1391.
- [33] MACALISTER C A, OHASHI-ITO K, BERGMANN D C. Transcription Factor Control of Asymmetric Cell Divisions that Establish the Stomatal Lineage [J]. Nature, 2007, 445(7127): 537-540.
- [34] ROBINSON S, BARBIER DE REUILLE P, CHAN J, et al. Generation of Spatial Patterns through Cell Polarity Switching [J]. Science, 2011, 333(6048): 1436-1440.

- [35] SHPAK E D. Stomatal Patterning and Differentiation by Synergistic Interactions of Receptor Kinases [J]. Science, 2005, 309(5732): 290-293.
- [36] SILVA P, FAÇANHA A R, TAVARES R M, et al. Role of Tonoplast Proton Pumps and Na⁺/H⁺ Antiport System in Salt Tolerance of Populus Euphratica Oliv [J]. Journal of Plant Growth Regulation, 2010, 29(1): 23-34.
- [37] ALLEN G J. Alteration of Stimulus-Specific Guard Cell Calcium Oscillations and Stomatal Closing in Arabidopsis Det3 Mutant [J]. Science, 2000, 289(5488): 2338-2342.
- [38] UEHLEIN N, OTTO B, HANSON D T, et al. Function of *Nicotiana tabacum* Aquaporins as Chloroplast Gas Pores Challenges the Concept of Membrane CO₂ Permeability [J]. The Plant Cell, 2008, 20(3): 648-657.

Function Analysis of a Reduced Organ Size with Early Senescence Gene (OsROSES1) by RNA Interference

GONG Xiao-ping¹, WANG Nan², KUANG Xiao-ming¹, ZENG Zheng-ming³, ZHANG Chang-wei², LI Jia-sheng¹, LIU Qin¹, ZHANG Zhi-li¹, HE Guang-hua², LUO Ting¹

1. Yudongnan Academy of Agricultural Sciences, Fuling Chongqing 408000, China;

 Rice Research Institute, Southwest University/Chongqing Key Laboratory of Application and Safety Control of Genetically Modified Crops, Chongqing 400715, China;

3. Institute of Rice and Sorghum, Sichuan Academy of Agricultural Sciences, Deyang Sichuan 618000, China

Abstract: The ultimate size of an organism and its organs is regulated by cell proliferation and cell expansion. The function of a "reduced organ size with early senescence gene", *OsROSES1*, was analyzed by RNA interference in this study. The results of semi-quantitative RT-PCR and quantitative PCR analyses indicated that *OsROSES1* expression levels were significantly downregulated in the transgenic plants. Compared with the wild-type plants, the *OsROSES1*-RNAi transgenic lines had reduced plant height, shorter and narrower curled leaves and fewer vascular bundles. Phenotypic analysis of the *OsROSES1*-RNAi transgenic lines demonstrated that the drastic reduction in organ size was attributed to decreased cell number and cell size, whereas the early leaf senescence probably resulted from increased stomatal density and aperture. The above results suggested that ROSES1 acts and coordinates with WUS or other homeobox genes to regulate meristem maintenance involved in controlling organ size and photosynthesis by regulating both cell proliferation and cell expansion.

Key words: rice (Oryza sativa L.); organ size; RNA interference; stomatal density; senescence

责任编辑 周仁惠