

DOI: 10.13718/j.cnki.xdzk.2024.02.001

王晓雯, 王媛媛, 冯蓓祺, 等. 水稻矮化多蘖突变体 *mtd2/htd1-1* 的鉴定与图位克隆 [J]. 西南大学学报(自然科学版), 2024, 46(2): 2-12.

水稻矮化多蘖突变体 *mtd2/htd1-1* 的鉴定与图位克隆

王晓雯¹, 王媛媛¹, 冯蓓祺¹, 雷松翰¹, 范骏扬¹,
杨晶晶¹, 仝瑞建², 田维江¹, 桑贤春¹

1. 西南大学 农学与生物科技学院, 重庆 400715; 2. 菏泽学院 农业与生物工程学院, 山东 菏泽 274000

摘要: 株高是株型构成的重要因子, 分蘖则是有效穗形成的基础, 二者均是水稻重要的农艺性状. 为研究株高和分蘖发育的分子机理, 用甲基磺酸乙酯(EMS)诱变保持系西大 1B, 从中鉴定到 1 个矮化多蘖突变体, 命名为 *mtd2* (*more tiller and dwarfism 2*). 与野生型西大 1B 相比, *mtd2* 的分蘖数(70.00 个)是野生型的 6.25 倍, 株高(49.12 cm)则为野生型的 59.4%, 同时还表现出小穗、短叶等特征. 遗传分析表明: *mtd2* 分蘖增多和植株矮化的突变表型呈共分离现象且受单隐性核基因调控. 利用 *mtd2* 和缙恢 10 号杂交组合的 F₂ 隐性群体, 最终将 *MTD2* 基因精细定位于第 4 染色体分子标记 C04-2 和 C04-3 之间 157 kb 的物理范围内, 该区间内含 1 个已克隆的多蘖矮秆基因 *LOC_Os04g46470-HTD1*. 对定位区间内的 *HTD1* 进行 DNA 测序, 发现其编码区有 11 个碱基缺失, 导致移码突变. 构建互补载体, 转化突变体 *mtd2*, 其矮化多蘖表型恢复正常, 表明 *mtd2* 是 *htd1* 的一个新等位突变体. 细胞学分析发现: *mtd2* 分蘖数增多是由于分蘖芽发育较快所致; qRT-PCR 分析表明: *MTD2* 可能参与独脚金内酯(SLs)相关的分蘖芽发育调控网络, 这为进一步鉴定 *MTD2/HTD1* 基因的功能奠定了基础.

关键词: 水稻; 多蘖矮秆基因(*MTD2/HTD1*);

图位克隆; 激素; 独脚金内酯

中图分类号: S326

文献标志码: A

开放科学(资源服务)标识码(OSID):



文章编号: 1673-9868(2024)02-0002-11

Identification and Map-based Cloning of Multi-tillering Dwarf Mutant *mtd2/htd1-1* in Rice (*Oryza sativa* L.)

WANG Xiaowen¹, WANG Yuanyuan¹, FENG Beiqi¹,
LEI Songhan¹, FAN Junyang¹, YANG Jingjing¹,
TONG Ruijian², TIAN Weijiang¹, SANG Xianchun¹

收稿日期: 2023-08-12

基金项目: 重庆市现代农业产业技术体系创新团队项目(CQMAITS202301); 国家重点研发计划子课题(2022YFD1201600); 重庆市大学生创新创业训练计划项目(S202310635031, S202310635071).

作者简介: 王晓雯, 博士, 高级实验师, 主要从事植物遗传研究.

通信作者: 桑贤春, 博士, 教授.

1. College of Agronomy and Biotechnology, Southwest University, Chongqing 400715, China;
2. College of Agriculture and Biological Engineering of Heze University, Heze Shandong 274000, China

Abstract: Plant height is an important factor of plant architecture, and tillering is the basis for the formation of effective panicle. Both of them are important agronomic traits of rice. To study the molecular mechanism of plant height and tiller development, we used EMS to mutate the maintainer line Xida 1B, and identified a multi-tillering and dwarf mutant named *mtd2*. Compared with wild-type (WT) Xida 1B, *mtd2* had 6.25 times more tillers than WT, and plant height was 49.12 cm, only 59.4% of WT. In addition, *mtd2* had smaller panicles and shorter leaves. Genetic analysis showed that mutant phenotypes of *mtd2* with increased tillers and plant dwarf was co-segregated and regulated by single recessive nuclear genes. Using the F₂ recessive population of *mtd2* and Jinhui 10 crossing, the *MTD2* gene was finally fine-positioned within a physical distance of 157 kb on chromosome 4 between molecular markers C04-2 and C04-3. Bioinformatics analysis revealed that the mapping interval contained a cloned gene *LOC_Os04g46470-HTD1 (HTD1)*. DNA sequencing revealed an 11-base deletion in the *HTD1* coding region, which caused a frameshift mutation. The complementary vector was constructed and transformed into mutant *mtd2*. The dwarf and multi tiller phenotype of *mtd2* returned to normal, proving that *mtd2* is a new allelic mutant of *htd1*. Cytological analysis showed that the increase of tiller number in *mtd2* was due to the rapid development of tiller buds, which led to more tiller buds. In addition, the qRT-PCR results indicated that *MTD2* may be involved in the regulatory network of tillering bud development related to strigolactones (SLs), which laid the foundation for further identification of the function of *MTD2/HTD1* genes.

Key words: rice (*Oryza sativa* L.); multi-tillering and dwarf gene (*MTD2/HTD1*); map-based cloning; hormone; strigolactones (SLs)

有效穗、每穗实粒数和千粒质量是水稻产量构成的 3 大要素, 其中有效穗由分蘖数直接决定, 因此研究分蘖发育机理具有重要的生物学意义和应用价值. 与双子叶植物相对应, 水稻分蘖可以看作是其茎秆上发生的分枝, 一级分蘖直接形成于水稻茎秆基部的分蘖节, 二级分蘖则产生于一级分蘖茎秆基部的分蘖节, 依次类推^[1]. 水稻分蘖发育可分为两个阶段: 分蘖芽的形成和分蘖芽的伸长^[2-3]. 水稻分蘖芽发育始于叶腋处, 通常仅有位于根部和非伸长节间的腋芽才能正常发育成分蘖芽, 并最终形成有效穗^[4].

水稻分蘖数既受环境因素的影响, 也受内源基因的调控^[5]. 环境因素主要有温度、光照、营养和水分等, 基因调控则涉及糖、生长素 (IAA)、独脚金内酯 (SLs) 等多种代谢和信号传导途径^[6-8]. 以营养元素为例, 孙祥武等^[9]探讨不同比例的氮磷钾掺混肥对分蘖的影响, 结果表明氮元素在水稻分蘖期起核心作用. 蒋彭炎等^[10]通过实验揭示了水稻幼苗期含氮量和分蘖之间的相关性, 当水稻幼苗期含氮量保持在 2.7%~3.3% 之间时, 分蘖发生才能正常进行; 当其值低于 1.3% 时, 分蘖芽的发育就只会进行到 3 幼 1 基阶段. 处于分蘖期的水稻植株含磷量低于 0.3%, 分蘖芽则不会伸长发育; 分蘖期间水稻植株含钾量如果低于 0.5%, 分蘖芽的伸长发育就会受阻; 含钾量介于 0.5%~1.4% 之间分蘖芽的伸长发育正常^[11].

通过正向遗传学和反向遗传学, 目前已经克隆了许多水稻分蘖数发育的相关基因 (<https://www.ricedata.cn/gene/>). *MONOCULM 1 (MOC1)* 是水稻中克隆的第 1 个调控分蘖芽形成的关键基因, 编码 1 个 GRAS 转录因子^[12]; *MONOCULM 3 (MOC3)* 编码 1 个 WOX 蛋白家族的转录抑制因子^[13]; *FLORAL ORGAN NUMBER 1 (FON1)* 则编码 1 个与拟南芥中 *CLAVATA1 (CLV1)* 同源的受体激酶, *fon1* 的表型主要集中在花器官的发育异常上^[14]. 研究发现 *FON1* 在水稻腋生分生组织中也高度表达, 突变后尽管能形成正常的分蘖芽, 但是芽向外伸长有缺陷, 从而导致分蘖数减少. 在 *moc1* 和 *moc3* 突变体中

发现 *FON1* 的表达水平显著降低, MOC3 蛋白能直接结合 *FON1* 的启动子, 激活后者表达. MOC1 蛋白尽管不能直接结合 *FON1* 启动子, 但作为 MOC3 蛋白的共激活因子, 可以和 MOC3 蛋白共同激活 *FON1* 的表达, 促进分蘖芽的正常伸长^[15]. 大量的实验及研究证明, 激素对分蘖发育也会产生影响. IAA 可以阻止 *OsIPT* 的表达以此降低细胞分裂素(CKs)的水平来抑制水稻分蘖芽的发育^[16], 外源 IAA 还可以提高 *D10*, *D17* 和 *D27* 的表达量以增加 SLs 的含量^[17]. 此外, 负责降解 CKs 的 CKX 家族基因也受到 IAA 的调控^[18]. 近年来 SLs 作为激素调节分蘖的分子机制已成为研究热点. 在由 SLs 调控的水稻分蘖通路中, *TB1* 是一个作用于 SLs 下游的基因, 其编码 1 个 TCP 家族的转录因子, 抑制水稻侧芽的伸出, 从而负调控水稻的分蘖数. 过量表达 *OsTB1* 则会造成分蘖数显著减少. *TB1* 功能丧失型突变体 *fc1* 的分蘖数会显著增加^[19]. IPA1 蛋白能与 *OsTB1* 的启动子直接结合, 抑制水稻分蘖发生, 也是一个负向调控分蘖的转录因子^[20]. 此外, IPA1 还作为 *D53* 的下游直接调控元件, 可诱导 SLs 的基因表达^[21]. *D10* 编码类胡萝卜素裂解双加氧酶 *OsCCD8*, 是 SLs 生物合成过程中的重要参与酶之一. *OsCCD8* 通过 SLs 控制水稻侧芽向外生长, 最终造成 *d10* 突变体株高变矮, 分蘖增多^[22]. *D27* 蛋白是参与 SLs 生物合成的一个成员, 其突变之后造成植株株高矮化, 分蘖数增多. *d27* 突变体中生长素极性运输增强, 在根部分泌液中检测不到 SLs, 导致分蘖芽向外生长的抑制作用被解除, 因此出现多分蘖的表型^[23]. *T20* 编码 1 个 15-顺式- ζ -胡萝卜素异构酶, 参与 SLs 前体物质类 β 胡萝卜素的合成, 致使其突变体 *t20* 体内的 β 胡萝卜素和 SLs 的含量降低, 表现为株高变矮, 分蘖增多^[24]. *HIGH TILLERING DWARF1(HTD1)* 编码 1 个 SLs 生物合成过程中重要的酶—胡萝卜素裂解双加氧酶 *OsCCD7*, 该酶是 SLs 调控分蘖途径中重要的一员^[25]. *MTD1* 编码蛋白酶抑制因子, 通过调控 *OsmiR156f* 的表达进而调节株高和分蘖数^[26], *OsmiR156f* 过表达植株表现为矮化多蘖^[27].

目前水稻分蘖发育尽管已有一定的分子基础, 但其调控网络尚不清晰. 克隆新基因或者等位基因, 对于研究其功能和选育水稻高产优产的种质资源具有重要的意义.

1 材料与方法

1.1 材料

矮化多蘖突变体 *mtd2* 来源于西南大学水稻研究所籼稻保持系西大 1B 的甲基磺酸乙酯(EMS)诱变体库, 突变表型已稳定遗传. 配制 *mtd2* 与西大 1B 杂交组合用于遗传分析, 利用 *mtd2* 与缙恢 10 号的 F_2 隐性群体进行基因定位. 所用材料均种植于西南大学水稻研究所歇马田间试验基地(重庆北碚), 常规管理.

1.2 表型鉴定

水稻田间播种后, 全生育期观察其分蘖数和株高变化; 成熟后, 随机取 10 株 *mtd2* 突变体和 10 株西大 1B 野生型, 对株高、节间长度、穗长、有效穗、结实率、穗粒数、千粒质量等农艺性状进行考种, 并进行统计分析.

1.3 分蘖芽表型鉴定

取 4 叶期野生型与突变体幼苗, 去除根部和多余叶鞘, 留下 1 cm 左右包含分蘖芽的组织于体式显微镜下观察. 材料经过固定、脱水、透明、浸蜡包埋于石蜡中, 纵向切片, 再经过脱蜡、复水、染色等步骤制成石蜡切片, 于微分干涉差显微镜(DIC)下观察.

1.4 图位克隆

选取 F_2 群体中隐性单株为定位群体, 采用 BSA 法筛选连锁标记^[28]. CTAB 法^[29]提取亲本、基因池和定位单株 DNA. 利用 SSR 引物进行初步定位, 并构建遗传图谱. 基因初步定位后, 在区间内继续设计 SSR 和 InDel 引物, 利用全部 F_2 隐性单株数进行精确定位, 所用引物序列见表 1. PCR 产物经 10% 非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳, 快速银染后观察.

为确定候选基因, 取突变体 *mtd2* 和西大 1B 新鲜叶片, 送至诺禾致源生物科技有限公司进行全基因组测序, 利用 IGV 软件查找精确定位区间内注释基因的碱基差异, 从而初步判定候选基因.

确定候选基因后, 将候选基因的野生型基因组全长 DNA, 包含启动子区域 2 000 bp 以及 3'端 500 bp 连入 *pCAMBIA1301*, 构建互补载体; 后由武汉伯远生物科技有限公司将互补载体转化为突变体, 形成互补转基因植株.

1.5 RNA 提取和 qRT-PCR

取 4 叶期野生型与突变体幼苗, 提取分蘖芽总 RNA, 然后体外反转录成 cDNA. 利用 qRT-PCR 分析调控分蘖相关基因在野生型与突变体中的表达差异. 所用引物见表 1.

表 1 本研究所用引物

引物名称	正向引物(5'-3')	反向引物(5'-3')
RM17407	CCAATCAAACCTGCATAAGCATCC	CTTGCGACATGATTAGGTGAGG
C04-1	TAACTCCTCCCTTGCTGCCTCT	AGCTCGCAGCGACCGATCAG
C04-2	GCTATGGGTTCAATCTTCTGTT	ACTTTCAAATCTGTACTTGAAAGT
C04-3	CCGTATAAGACATAGTATGTGGT	AAGCTATGGTTCAACGAAGATATGT
<i>OsTBI</i> -qPCR	ACCTGAACCACTCATCGTCC	GCAGTAGTGCCGGAATTG
<i>IPA1</i> -qPCR	TGCATTCCAAGGCTCCCCGC	TGCGGCAGCTGCGTTTTCCCT
<i>FON1</i> -qPCR	TCCGCCATTGCTGGCTCCTA	TGTCCACGCCGTCACCGAAC
<i>TAD1</i> -qPCR	GCAGTCGTGACAAGAGCATCCT	AGCCACAGACCTCCGATTTATG
<i>MOC3</i> -qPCR	GCGACGGCTCCCTCTTTCCC	CGCTCACGCCCATGTAGTCC
<i>MOCI</i> -qPCR	TACCTGGCGTTCAACCAGAT	CGTCGAGGTCGAGGATGT
<i>OsACTIN</i> -qPCR	CAACACCCCTGCTATGTACG	CATCACCAGAGTCCAACACAA
<i>PIN1</i> -qPCR	TGCACCCTAGCATTCTCAGCA	CCCTCCTCCCAAATTCTACTT
<i>D10</i> -qPCR	GGTAGCAACGAGAGGCAGTT	TCGACCTTGGTGAGCGTGTT
<i>D27</i> -qPCR	TCTGGGCTAAAGAATGAAAAGGA	AGAGCTTGGGTCACAATCTCG
<i>T20</i> -qPCR	ATCACTAGACATCCACAGA	CCTCCTATCACCATTCCA

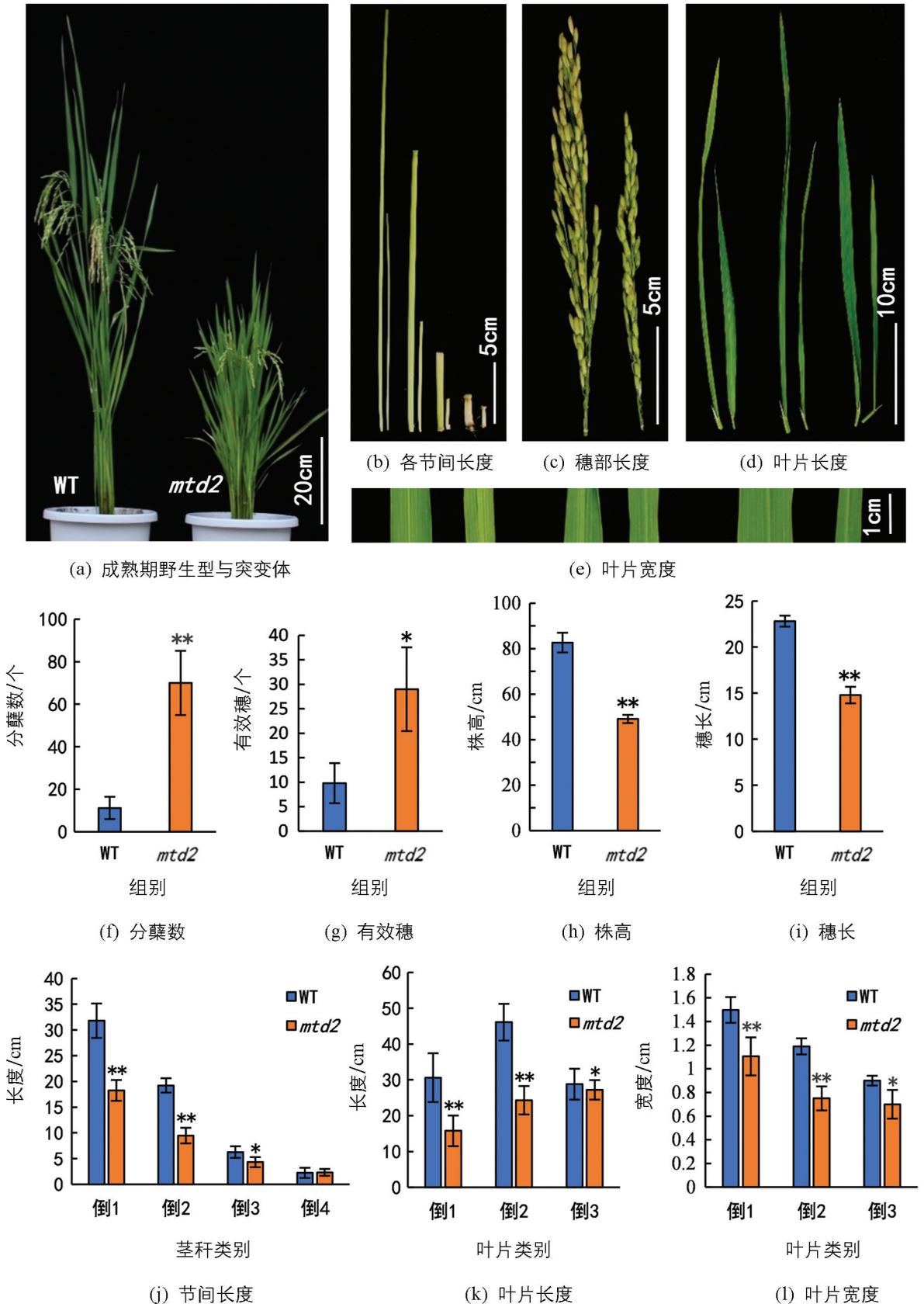
2 结果与分析

2.1 突变体 *mtd2* 的表型观察

相同常规田间种植条件下, 我们发现灌浆期突变体 *mtd2* 分蘖数为 70.00 ± 15.11 个, 远高于野生型的 11.20 ± 5.26 个, 相差约 6.25 倍, 差异有统计学意义 ($p < 0.01$) (图 1a 和 1f); 有效穗数 29.00 ± 8.54 个, 较野生型 9.80 ± 4.08 个相差约 3 倍, 差异有统计学意义 ($p < 0.05$) (图 1g). *mtd2* 的株高为 49.12 ± 1.79 cm, 极显著低于野生型 82.70 ± 4.33 cm (图 1a 和 1h), 仅为野生型的 59.40%. 成熟期统计分析发现, *mtd2* 的倒 1 节间长 18.26 ± 2.03 cm, 倒 2 节间长 9.47 ± 1.50 cm 和倒 3 节间长 4.31 ± 0.98 cm 都明显短于野生型的 31.8 ± 3.35 cm, 19.23 ± 1.39 cm 和 6.27 ± 1.12 cm (图 1b 和 1j); 倒 1 节间长和倒 2 节间长较野生型差异有统计学意义 ($p < 0.01$), 倒 3 节间长差异也有统计学意义 ($p < 0.05$), 而倒 4 节间长差异无统计学意义, 这些节间长度的差异导致突变体株高矮化. *mtd2* 穗长 14.80 ± 0.90 cm 也短于野生型 22.82 ± 0.60 cm (图 1c 和 1i). 除此之外, 成熟期 *mtd2* 的倒 1 叶、倒 2 叶和倒 3 叶的叶片长度较野生型更短 (图 1d 和 1k), 叶片宽度也更窄 (图 1e 和 1l).

2.2 突变体 *mtd2* 的农艺性状

由表 2 可知, *mtd2* 的结实率较野生型差异无统计学意义, 但由于一次枝梗数和二次枝梗数的减少, 其穗粒数极显著减少, 由野生型平均 139.20 粒降低为 72.20 粒. 此外, *mtd2* 籽粒的粒长、粒宽和粒厚变化有统计学意义, 致使千粒质量下降, 但 *mtd2* 相较于野生型产生了更多的有效穗 (图 1g), 使单株产量远超野生型.



* 表示 $p < 0.05$, ** 表示 $p < 0.01$, 差异有统计学意义; 同组中左为野生型(WT), 右为突变体(*mtd2*).

图 1 野生型与 *mtd2* 的表型观察

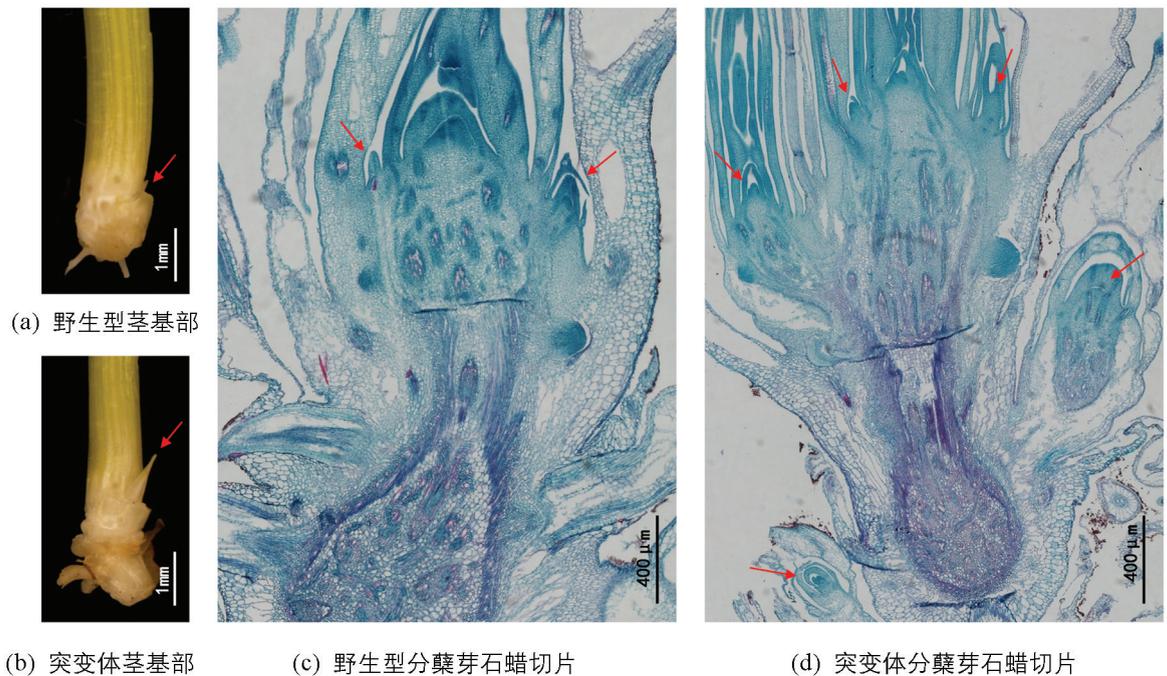
表 2 野生型和突变体的农艺性状统计

材料	野生型	突变体
一次枝梗数	9.80±0.84	8.00±0.71*
二次枝梗数	36.60±3.85	12.20±0.84**
穗粒数	139.20±11.56	72.20±6.94**
结实率/%	94.02	92.29
粒长/mm	9.83±0.45	8.32±0.71**
粒宽/mm	2.54±0.09	2.39±0.16**
粒厚/mm	1.99±0.07	1.91±0.14*
千粒质量/g	21.16±0.23	19.48±0.23**
单株产量/g	28.90±2.79	41.83±7.32**

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

2.3 突变体 *mtd2* 分蘖芽观察

水稻分蘖数增多主要有两方面原因: 一是分蘖芽数量增多, 二是侧生分生组织活跃导致分蘖芽提前伸长. 为了探究 *mtd2* 分蘖数量增多的具体原因, 我们对 4 叶期也就是侧生分生组织发育时期的幼苗茎基部进行了体式显微镜观察. 在去除外层叶鞘后发现野生型的外侧分蘖芽尚未发育(图 2a), 但突变体的分蘖芽已经伸长(图 2b); 而后对 4 叶期野生型和 *mtd2* 的幼苗茎基部进行石蜡切片观察, 发现野生型在此时期有 2 个分蘖芽(图 2c), *mtd2* 则有 5 个分蘖芽(图 2d), 并且外侧 4 个分蘖芽均已开始发育变长. 综上表明 *mtd2* 不仅分蘖芽的数量变多, 而且侧生分生组织也变得活跃.

图 2 4 叶期野生型和突变体 *mtd2* 分蘖芽细胞学观察

2.4 突变体 *mtd2* 的遗传调控

将配制的 *mtd2*/西大 1B, *mtd2*/缙恢 10 号的 F_1 和 F_2 群体种植在水稻田里, 全生育期进行表型观察. 结果发现, F_1 群体均表型正常, 没有出现矮化、多蘖植株; 两个杂交组合的 F_2 群体, 株型性状产生了严重的分离. 以矮化多蘖为判断标准, 471 株 *mtd2*/西大 1B 的 F_2 群体中, 341 个正常株, 130 个突变株; 1 599 株 *mtd2*/缙恢 10 号的 F_2 群体中, 1 213 个正常株和 386 个突变株. 卡方检验表明两个群体中

正常株与突变株的分离比均符合 3 : 1 ($X^2 = 1.56 < X_{0.05}^2 = 3.84$; $X^2 = 0.59 < X_{0.05}^2 = 3.84$). 这些结果显示, *mtd2* 的矮化多蘖性状受 1 对隐性核基因调控.

2.5 MTD2 基因的图位克隆

以 390 株 *mtd2*/缙恢 10 号的 F_2 隐性单株为定位群体进行基因定位, 所用引物为实验室前期筛选出的西大 1B 和缙恢 10 号之间的差异引物^[30]. 从 F_2 群体中选择 10 株典型矮化多蘖单株, 利用亲本间的差异引物进行 PCR 扩增, 统计带纹数, 计算交换值. 结果发现 SSR 标记 RM17407 交换值为 10%, 暗示其可能与 *MTD2* 连锁. 以 RM17407 为中心, 在其两端设计 Indel 和 SSR 标记, 以同样的 10 株典型矮化多蘖单株 DNA 为模板进行扩增, 结果发现 Indel 标记 C04-1 的交换值为 15%, 且交换株与 RM17407 不同, 从而初步将 *MTD2* 限定在第 4 染色体标记 C04-1 和 RM17407 之间.

为精细定位目标基因, 在初步定位区间内设计新的 Indel 标记, 其中 C04-2 和 C04-3 在西大 1B 和缙恢 10 号之间具有多态性. 利用 C04-1, C04-2, C04-3 和 RM17407 共 4 对差异引物对 390 株 *mtd2*/缙恢 10 号的 F_2 隐性单株进行电泳分析, 结果发现其交换株分别为 16, 3, 4 和 19 个, 且前两个标记的交换株与后两个不同, 从而最终将 *MTD2* 限定在水稻第 4 染色体 Indel 标记的 C04-2 和 C04-3 之间 157 kb 的物理范围内(图 3a).

生物信息学分析发现定位区间内有 28 个注释基因(表 3), 其中就有已报道的多蘖矮秆基因 *LOC_Os04g46470-HTD1*, 编码 1 个类胡萝卜素裂解双加氧酶. 随后利用野生型(WT)和 *mtd2* 的全基因组测序, 在 IGV 软件上查找 *LOC_Os04g46470-HTD1* 碱基差异, 发现 *LOC_Os04g46470-HTD1* 在编码区有 1 个 AGATTCCTCCC 共计 11 bp 的缺失, 从而导致移码突变(图 3b). 进一步分析发现, 相较于野生型全长 609 个氨基酸, 该移码突变导致 *HTD1* 在 509 位后编码的所有氨基酸均发生了改变, 全长则变为 604 个氨基酸(图 3c), 所以我们初步将 *LOC_Os04g46470-HTD1* 定为 *MTD2* 的候选基因. 将野生型中包含 2 000 bp 启动子和 3'端 500 bp 的全长 *LOC_Os04g46470-HTD1* 基因组 DNA 导入突变体 *mtd2* 中, 发现阳性转基因植株 *mtd2*^{com} 的株高和分蘖数均回复至野生型水平(图 3d), 因此, 我们确认该突变体的表型是由 *mtd2/htd1* 的突变导致, 并且 *mtd2* 是 *LOC_Os04g46470-HTD1* 的一个全新等位突变体.

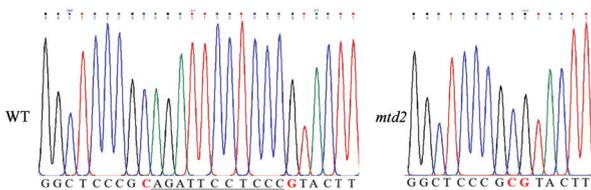
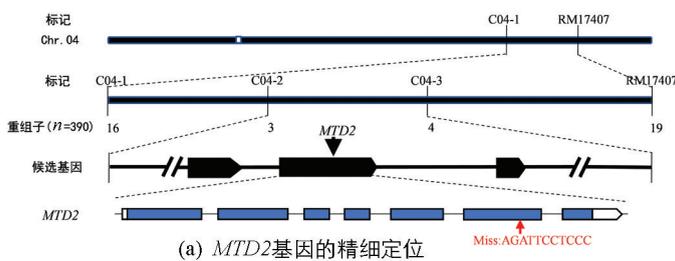


图 3 *MTD2* 基因的精细定位及候选基因鉴定

表 3 定位区间内注释基因

注释基因	预测功能
<i>LOC_Os04g46384</i>	MYB 转录因子
<i>LOC_Os04g46390</i>	DnaJ 蛋白, 热激蛋白
<i>LOC_Os04g46400</i>	水稻 AP2/EREBP 转录因子基因
<i>LOC_Os04g46410</i>	AP2 结构域蛋白, 表达
<i>LOC_Os04g46420</i>	表达蛋白
<i>LOC_Os04g46430</i>	表达蛋白
<i>LOC_Os04g46440</i>	乙烯响应因子
<i>LOC_Os04g46444</i>	表达蛋白
<i>LOC_Os04g46450</i>	MOC1 互作蛋白, 组蛋白单泛素化, E3 连接酶
<i>LOC_Os04g46460</i>	氨基酸激酶, 推测, 表达
<i>LOC_Os04g46470</i>	类胡萝卜素裂解双加氧酶, <i>HTD1</i> , 多蘖矮秆基因
<i>LOC_Os04g46480</i>	表达蛋白
<i>LOC_Os04g46490</i>	水孔蛋白, 液泡膜内在蛋白
<i>LOC_Os04g46500</i>	逆转录转座子蛋白, 推测, 未分类, 表达
<i>LOC_Os04g46510</i>	转座子蛋白, 推测, 未分类, 表达
<i>LOC_Os04g46520</i>	逆转录转座子蛋白, 推测, 未分类, 表达
<i>LOC_Os04g46530</i>	逆转录转座子蛋白, 推测, 未分类, 表达
<i>LOC_Os04g46540</i>	表达蛋白
<i>LOC_Os04g46550</i>	假定蛋白
<i>LOC_Os04g46560</i>	乳酸/苹果酸脱氢酶, 推测, 表达
<i>LOC_Os04g46570</i>	生长调节剂相关蛋白, 推测, 表达
<i>LOC_Os04g46580</i>	Squamosa 启动子结合蛋白
<i>LOC_Os04g46600</i>	锌指蛋白, 推测, 表达
<i>LOC_Os04g46610</i>	PAP 原纤维蛋白家族结构域蛋白, 表达
<i>LOC_Os04g46620</i>	T-复合体蛋白, 推测, 表达
<i>LOC_Os04g46630</i>	前驱体膨胀, 推测, 表达
<i>LOC_Os04g46639</i>	表达蛋白
<i>LOC_Os04g46650</i>	膨大素基因

2.6 分蘖相关基因 qRT-PCR 分析

为了探究 *MTD2* 在分蘖调控网络中的作用, 我们进行了分蘖相关基因的 qRT-PCR 分析(图 4)。 *TB1*, *IPA1*, *D10*, *D27* 和 *T20* 均是独角金内酯(SLs)调控分蘖通路中的关键基因。 *TB1*, *IPA1* 和 *D10* 在 qRT-PCR 结果中相较于野生型(WT)均出现下调趋势, 这与它们在 SLs 调控分蘖通路中起负调控的作用相吻合, 也证实了 *MTD2/HTD1* 确实是由 SLs 介导的分蘖调控途径。另外 *D27* 和 *T20* 虽然也是 SLs 通路中的成员, *D27* 是通过生长素运输抑制 SLs 运输, *T20* 是合成 SLs 前体物质 β 胡萝卜素的重要基因, 但两者在 qRT-PCR 结果中未出现明显变化。另外 *FON1*, *MOC1* 和 *MOC3* 是调控

分蘖的经典基因, 三者在 *mtd2* 中的表达量均明显上调, 表明 *MTD2* 也可能参与此三者的通路进而影响分蘖. *TAD1* 通过赤霉素 (GA) 和脱落酸 (ABA) 信号降解 *MOC1* 来调控分蘖, 在 *mtd2* 中呈下调趋势. 此外影响表达量下调的还有一个生长素运输基因 *Os-PIN1b*, 暗示 *MTD2* 可能也通过生长素调控分蘖.

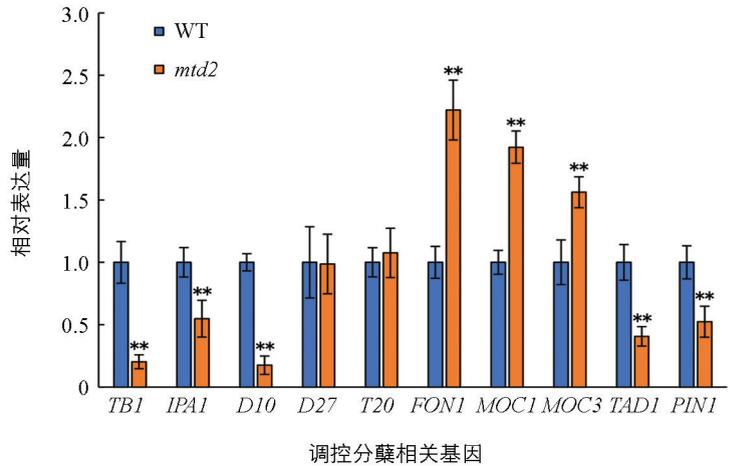
3 讨论与结论

独脚金内酯 (SLs) 是近年来发现的、由类胡萝卜素衍生而来的一类新型植物激素. 最早发现 SLs 能诱导种子萌发、促进丛枝菌的根生长和抑制植物分枝, 后来发现其在叶片衰老、生物胁迫和非生物胁迫等方面也发挥着重要的作用^[31]. 以拟南芥、水稻等为材料, 已鉴定出 30 多种不同结构的 SLs 分子, 在 SLs 生物合成、转运及信号传导等方面均取得了系列研究进展^[32]. 研究发现, SLs 合成及信号传导与生长素 (IAA)、细胞分裂素 (CK)、赤霉素 (GA)、脱落酸 (ABA)、茉莉酸 (JA)、乙烯、水杨酸等其他植物激素存在广泛的交叉互作^[33].

在水稻等农作物中, SLs 通过抑制侧芽的伸长进而控制分蘖的发育, 从而形成有效穗. 理论上, 干扰 SLs 的合成和信号传导途径有望塑造育种需要的理想株型, 而长期以来, SLs 相关基因在育种中的利用还很不清晰. *HTD1/D17* 编码胡萝卜素裂解双加氧酶 *OsCCD7*, 是类胡萝卜素裂解合成独脚金内酯过程中的 1 个关键酶, 负调节水稻分蘖数^[24-25]. 研究发现, *HTD1/D17* 部分功能缺失等位基因可显著增加分蘖数, 进而提高水稻产量, 在水稻生产中得到了广泛应用. 本文通过图位克隆鉴定到 1 个 *HTD1* 的新等位基因 *MTD2*, *MTD2* 在 *HTD1* 编码区中有 1 个 11 碱基的缺失, 导致移码突变, 致使 509 位后翻译的氨基酸完全错乱, 并在翻译 95 个氨基酸后终止. *mtd2* 中 *HTD1* 的缺失位点发生在基因相对靠后的位置, 这为研究 *HTD1* 的 C 端功能提供了条件. 对分蘖相关基因进行 qRT-PCR 分析, 结果发现除了参与 SLs 途径的基因表达量发生变化外, *FON1*, *MOC1* 和 *MOC3* 表达量上调, *TAD1* 和 *PIN1* 表达量下调 (图 4). *MOC1-MOC3-FON1* 途径通过调控分蘖芽的生长调控分蘖数, *FON1* 功能丧失突变体能形成正常的芽, 但芽向外伸长有缺陷, 导致分蘖数减少^[13]. *TAD1* 通过泛素-26S 蛋白酶体途径降解 *MOC1*, 从而调控分蘖数, 其功能缺失突变体表现出多蘖性状.

许多基因具有“一因多效”的功能, 如 *SUI1*, 其功能缺失突变体 *sui1-1* 穗颈节间变短且部分包穗, *sui1-2* 突变体穗颈节间极度变短导致完全包穗. *smg2* 除部分包穗外, 还表型小籽粒等^[28, 34]. *HTD1* 同样具有一因多效性, 大多功能缺失突变体表现为多蘖和植株半矮化, 部分功能缺失突变体表现为株高略矮、分蘖能力增强, 来自皮泰的 *HTD1^{HZ}* 与来自低脚乌尖的 *SD1^{DG^{WG}}* 同时被育种家选择并利用, 促进了籼型水稻育种的“绿色革命”^[35]. 与已报道的 *htd1* 等位突变体相比, *mtd2* 穗与各节间均极显著变短, 穗粒数和千粒质量也极显著下降, 但由于有效穗极显著增加而结实率无明显变化, 导致单株产量提高约 45% (表 2). 由于 *mtd2* 来自籼稻保持系西大 1B 的 EMS 诱变, 生育期只有 90 d 左右, 因此 *mtd2* 在工厂化种植及太空利用等方面具有重要的应用价值.

综上所述, *mtd2* 是一个新鉴定到的 *HTD1* 等位突变体, 其单株产量提高和多蘖矮化等性状为种质资源创制和分蘖的分子机制挖掘提供了新材料.



* * 表示 $p < 0.01$, 差异有统计学意义.

图 4 调控分蘖相关基因的 qRT-PCR 结果

参考文献:

- [1] 隗溟, 廖学群, 李冬霞, 等. 水稻分蘖节位生产力比较 [J]. 植物生态学报, 2012, 36(4): 324-332.
- [2] 潘寿, 骆乐, 刘小红, 等. 氮素对水稻分蘖芽发育的影响及其作用机制 [J]. 南京农业大学学报, 2016, 39(6): 973-978.
- [3] 王秀梅, 梁越洋, 李玲, 等. *OsMAX1a*, *OsMAX1e* 通过参与独角金内酯的合成调控水稻分蘖 [J]. 中国水稻科学, 2015, 29(3): 223-231.
- [4] HUSSIEN A, TAVAKOL E, HORNER D S, et al. Genetics of Tillering in Rice and Barley [J]. The Plant Genome, 2014, 7(1): 93-113.
- [5] 吴先美, 李三峰, 胡萍, 等. 水稻分蘖调控基因 *HTD3* 的克隆与功能研究 [J]. 中国水稻科学, 2021, 35(6): 535-542.
- [6] KARIALI E, MOHAPATRA P K. Hormonal Regulation of Tiller Dynamics in Differentially-Tillering Rice Cultivars [J]. Plant Growth Regulation, 2007, 53(3): 215-223.
- [7] HARRISON M A, KAUFMAN P B. Hormonal Regulation of Lateral Bud (Tiller) Release in Oats (*Avena sativa* L.) [J]. Plant Physiology, 1980, 66(6): 1123-1127.
- [8] 刘杨, 丁艳锋, 王强盛, 等. 植物生长调节剂对水稻分蘖芽生长和内源激素变化的调控效应 [J]. 作物学报, 2011, 37(4): 670-676.
- [9] 孙祥武, 于福庆, 张家成. 氮磷钾养分对水稻分蘖的影响 [J]. 农业与技术, 2006, 26(6): 62-63.
- [10] 蒋彭炎, 马跃芳, 洪晓富, 等. 水稻分蘖芽的环境敏感期研究 [J]. 作物学报, 1994, 20(3): 290-296.
- [11] 孙爱华, 朱士江, 张忠学. 不同灌溉模式下氮磷钾配比及追施比例对水稻生长特征及产量的影响 [J]. 灌溉排水学报, 2016, 35(10): 31-35, 63.
- [12] LI X Y, QIAN Q, FU Z M, et al. Control of Tillering in Rice [J]. Nature, 2003, 422(6932): 618-621.
- [13] SHAO G N, LU Z F, XIONG J S, et al. Tiller Bud Formation Regulators *MOC1* and *MOC3* Cooperatively Promote Tiller Bud Outgrowth by Activating *FON1* Expression in Rice [J]. Molecular Plant, 2019, 12(8): 1090-1102.
- [14] SUZAKI T, SATO M, ASHIKARI M, et al. The Gene *FLORAL ORGAN NUMBER1* Regulates Floral Meristem Size in Rice and Encodes a Leucine-Rich Repeat Receptor Kinase Orthologous to Arabidopsis *CLAVATA1* [J]. Development, 2004, 131(22): 5649-5657.
- [15] 罗宝杰, 许俊旭, 丁艳锋, 等. 内源 CTK 和 IAA 平衡对水稻分蘖芽休眠与萌发的影响 [J]. 作物学报, 2014, 40(9): 1619-1628.
- [16] 安琪, 季雯珺, 何永刚, 等. 水稻成蘖特性及相关氮同化酶活性、基因表达分析 [J]. 湖北农业科学, 2020, 59(23): 174-179.
- [17] WANG G Y, RÖMHELD V, LI C J, et al. Involvement of Auxin and CKs in Boron Deficiency Induced Changes in Apical Dominance of Pea Plants (*Pisum sativum* L.) [J]. Journal of Plant Physiology, 2006, 163(6): 591-600.
- [18] TAKEDA T, SUWA Y, SUZUKI M, et al. The *OsTb1* Gene Negatively Regulates Lateral Branching in Rice [J]. The Plant Journal, 2003, 33(3): 513-520.
- [19] LU Z F, YU H, XIONG G S, et al. Genome-wide Binding Analysis of the Transcription Activator *IDEAL PLANT ARCHITECTURE1* Reveals a Complex Network Regulating Rice Plant Architecture [J]. The Plant Cell, 2013, 25(10): 3743-3759.
- [20] SONG X G, LU Z F, YU H, et al. *IPA1* Functions as a Downstream Transcription Factor Repressed by D53 in Strigolactone Signaling in Rice [J]. Cell Research, 2017, 27(9): 1128-1141.
- [21] ARITE T, IWATA H, OHSHIMA K, et al. *DWARF10*, an *RMS1/MAX4/DAD1* Ortholog, Controls Lateral Bud Outgrowth in Rice [J]. The Plant Journal, 2007, 51(6): 1019-1029.
- [22] LIN H, WANG R X, QIAN Q, et al. *DWARF27*, an Iron-Containing Protein Required for the Biosynthesis of Strigolactones, Regulates Rice Tiller Bud Outgrowth [J]. The Plant Cell, 2009, 21(5): 1512-1525.

- [23] LIU L H, REN M M, PENG P, et al. *MIT1*, Encoding a 15-Cis- ζ -Carotene Isomerase, Regulates Tiller Number and Stature in Rice [J]. *Journal of Genetics and Genomics*, 2021, 48(1): 88-91.
- [24] ZOU J H, CHEN Z X, ZHANG S Y, et al. Characterizations and Fine Mapping of a Mutant Gene for High Tillering and Dwarf in Rice (*Oryza sativa* L.) [J]. *Planta*, 2005, 222(4): 604-612.
- [25] ZOU J H, ZHANG S Y, ZHANG W P, et al. The Rice *HIGH-TILLERING DWARF1* Encoding an Ortholog of Arabidopsis *MAX3* is Required for Negative Regulation of the Outgrowth of Axillary Buds [J]. *The Plant Journal*, 2006, 48(5): 687-698.
- [26] LIU Q, SHEN G Z, PENG K Q, et al. The Alteration in the Architecture of a T-DNA Insertion Rice Mutant *osmtd1* is Caused by Up-Regulation of *MicroRNA156f* [J]. *Journal of Integrative Plant Biology*, 2015, 57(10): 819-829.
- [27] DAI Z Y, WANG J, YANG X F, et al. Modulation of Plant Architecture by the *MiR156f-OsSPL7-OsGH3.8* Pathway in Rice [J]. *Journal of Experimental Botany*, 2018, 69(21): 5117-5130.
- [28] 朱洪慧, 李映姿, 王成洋, 等. 水稻小粒突变体 *smg2* 的表型鉴定和候选基因分析 [J]. *西南大学学报(自然科学版)*, 2023, 45(1): 2-11.
- [29] MURRAY M G, THOMPSON W F. Rapid Isolation of High Molecular Weight Plant DNA [J]. *Nucleic Acids Research*, 1980, 8(19): 4321-4325.
- [30] 谢佳, 张孝波, 陶怡然, 等. 水稻短穗小粒突变体 *sps1* 的鉴定与基因精细定位 [J]. *中国农业科学*, 2018, 51(9): 1617-1626.
- [31] SUN H W, LI W Q, BURRITT D J, et al. Strigolactones Interact with other Phytohormones to Modulate Plant Root Growth and Development [J]. *The Crop Journal*, 2022, 10(6): 1517-1527.
- [32] XU E J, CHAI L, ZHANG S Q, et al. Catabolism of Strigolactones by a Carboxylesterase [J]. *Nature Plants*, 2021, 7(11): 1495-1504.
- [33] OMOARELOJIE L O, KULKARNI M G, FINNIE J F, et al. Strigolactones and Their Crosstalk with other Phytohormones [J]. *Annals of Botany*, 2019, 124(5): 749-767.
- [34] ZHU L, HU J, ZHU K M, et al. Identification and Characterization of *SHORTENED UPPERMOST INTERNODE 1*, a Gene Negatively Regulating Uppermost Internode Elongation in Rice [J]. *Plant Molecular Biology*, 2011, 77(4): 475.
- [35] WANG Y X, SHANG L G, YU H, et al. A Strigolactone Biosynthesis Gene Contributed to the Green Revolution in Rice [J]. *Molecular Plant*, 2020, 13(6): 923-932.

责任编辑 周仁惠