DMT1编码一个丝氨酸/半胱氨酸蛋白酶调控水稻分蘖并参与干旱胁迫响应

芦涛¹, 殷文晶¹, 戴若惠¹, 陈振概¹, 沈芷琦¹, 叶涵斐¹, 杨丽君¹, 严钢¹, 吴思思¹, 何瑞², 张琪³, 李三峰², 王跃星^{2*}, 饶玉春^{1*}

1. 浙江师范大学化学与生命科学学院, 金华 321004;

2. 中国水稻研究所, 水稻生物学国家重点实验室, 杭州 310006;

3. 浙江金华生态环境监测中心, 金华 321004

* 联系人, E-mail: ryc@zjnu.cn; wangyuxing@caas.cn

收稿日期: 2021-11-01; 接受日期: 2022-01-20; 网络版发表日期: 2022-06-09

国家科技重大专项子课题(批准号: 2016ZX08009003-003-008)、国家自然科学基金(批准号: U20A2030, 31971921)和中国水稻生物学国家重点实验室开放项目(批准号: 20200102)资助

摘要 水稻分蘖的形成是一个复杂的过程, 受到环境及遗传因素的影响, 合适的分蘖可以显著提高水稻产量. 本研究利用甲基磺酸乙酯(ethyl methanesulfonate, EMS)诱变粳稻秀水11得到一份矮化、多分蘖突变体, 将其命名为 *dwarf and multiple tillers 1(dmt1)*, 并对其进行表型观察, 生理生化分析, 遗传分析, 基因定位和激素处理. 结果发现, 在 *dmt1* 在分蘖期出现株高变矮, 叶片面积变小, 分蘖数增多等特征. 遗传分析表明, 该 *dmt1* 为单隐性核基因控制, 图位克隆的结果显示, *DMT1* 位于第4染色体上, 编码一个丝氨酸/半胱氨酸蛋白酶, 是 *NAL1* 的等位基因. 亚细胞定位的结果表明, *DMT1* 蛋白在细胞核、细胞质和叶绿体上均有表达. 为探究该基因突变是否会影响水稻对激素的敏感程度, 本研究通过施加外源激素发现 *dmt1* 地上部分对 NAA 敏感程度降低, 而地下部分对于 GA₃ 敏感程度升高. 并且在 *dmt1* 中生长素合成相关基因表达量降低. 通过干旱处理发现 *dmt1* 的耐旱能力下降, 在干旱胁迫下 *dmt1* 的发芽率降低. 由实验可得, *DMT1* 突变会导致植株产生株高变矮, 分蘖增多的表型, 通过 qRT-PCR 发现可能是由于生长素合成障碍引起的表型. 这为研究水稻分蘖机制的遗传网络提供了新的信息.

关键词 水稻, 分蘖, 遗传分析, *DMT1*, 外源激素, 干旱处理

水稻(*Oryza sativa* L.)是世界上最重要的粮食作物. 水稻株高和分蘖数是影响水稻产量的两个重要因素^[1]. 分蘖数会影响水稻产生的穗数从而影响水稻的产量^[2], 水稻分蘖数过多或者过少均会对水稻的产量造成一定的影响, 产生的能结出有效穗的分蘖称为有

效分蘖, 不能产生抽穗或者不能结出籽粒的分蘖被称为无效分蘖. 当水稻分蘖时间越早, 其生长期时间也会相对延长, 更容易结出有效穗.

环境因素, 如光照、水分和温度等也会影响水稻分蘖数量^[3], 水稻分蘖最合适的温度在30~32℃, 温度

引用格式: 芦涛, 殷文晶, 戴若惠, 等. *DMT1*编码一个丝氨酸/半胱氨酸蛋白酶调控水稻分蘖并参与干旱胁迫响应. 中国科学: 生命科学, 2023, 53: 529–542
Lu T, Yin W J, Dai R H, et al. *DMT1* encodes a serine/cysteine protease that regulates rice tillering and participates in drought stress response (in Chinese). *Sci Sin Vitae*, 2023, 53: 529–542, doi: 10.1360/SSV-2021-0397

过高或者过低都会影响水稻分蘖数^[4]。此外,湿度对于水稻分蘖的影响也较大,当稻田湿度较小时,干旱会影响分蘖的生长,导致茎变细,叶色发黄^[5]。同时稻田里浅水比深水更有利于水稻的分蘖,原因是水的深浅合适时分蘖芽的光照和空气较为充足,有利于分蘖芽的生长^[6]。

植物激素对于水稻分蘖也起着至关重要的作用^[7],目前对水稻分蘖相关激素的研究主要在于生长素(auxin, IAA)、细胞分裂素(cytokinin, CTK)和独脚金内酯(strigolactones, SLs)^[8]。生长素可以形成顶端优势,而顶端优势不利于水稻产生分蘖^[9],降低生长素的活性或者含量可以促进水稻长出更多的分蘖^[10]。生长素合成相关基因,如*YUC*家族的基因发生突变就会导致生长素含量降低,进而对水稻分蘖产生一定的影响^[11]。独脚金内酯可以抑制水稻分蘖芽的生长,独脚金内酯合成或者运输途径相关基因发生突变可解除对分蘖芽的抑制作用,从而表现出多分蘖的表型^[12]。细胞分裂素属于嘌呤类衍生物,目前认为细胞分裂素可以解除侧芽在生长时受到的抑制作用^[13],并且细胞分裂素可以促进生长素的极性运输,进而影响水稻株型和分枝发育^[14]。

随着对水稻分蘖研究的深入,已经有许多与分蘖相关的基因被克隆出来,其中包括单蘖基因*MOC1*^[15], *MOC2*^[16]和*MOC3*^[17]。*MOC1*编码一个GRS家族蛋白,发生突变会引起水稻不能产生分蘖, Liao等人^[18]发现, *MOC1*通过与Della蛋白SLR1结合而免受降解, *MOC3*作为一个转录抑制因子,与*MOC1*结合成为共激活因子结合在*FON1*的启动子区,调控*FON1*的表达^[19]。*MOC2*编码一个果糖-1,6-二磷酸酶,该基因的突变会导致水稻植株体内的蔗糖供应不足,从而引起分蘖芽生长受到抑制。除了这些基因外,独脚金内酯合成与运输相关的基因的突变也会引起水稻产生矮秆多分蘖的表型,如*D3*^[20], *D10*^[21], *D17(HTD1)*^[22], *D27*^[23], *D14(HTD2)*^[24]和*D53*^[25]等基因,其中基因*D27*, *D17*, *D10*参与独脚金内酯的生物合成,将类胡萝卜素转化为独脚金内酯,这类基因突变体可通过施加独脚金内酯人工类似物来恢复表型。而基因*D14*, *D3*, *D53*参与独脚金内酯信号转导,这类基因突变体施用人工类似物不能恢复表型。Wang等人^[26]发现了一个功能部分丧失的等位基因*HTD1^{HZ}*,可以增加水稻的分蘖数同时提高产量,并与*SD1*在近些年的水稻育种中被共同选择。

分蘖是水稻的一个重要农艺性状,合适的分蘖数对于提高水稻产量有着至关重要的作用。本研究通过甲基磺酸乙酯(ethyl methanesulfonate, EMS)诱变获得一个矮秆多分蘖突变体,通过统计生理性状,相关基因表达,图位克隆等进一步研究该基因的功能,为今后培育优良性状的水稻品种提供理论依据。

1 实验材料与方法

1.1 材料来源

通过EMS化学诱变粳稻品种秀水11,诱变完成25℃催芽后播种,单株插秧单株收种,生长时期按常规大田管理。通过筛选鉴定到一份矮化多分蘖突变体,连续自交多代发现该突变体性状可以稳定遗传,并将其命名为*dwarf and multiple tillers 1(dmt1)*。

1.2 定位群体构建

用矮化多分蘖突变体*dmt1*作为母本与籼稻品种华丝占(HSZ)进行杂交,同时进行反交,收获F₁代杂交种。将收获的F₁代种子烘干后于同年种植于海南陵水实验基地,根据其植株高度变矮、茎秆变细及分蘖增加等表型考察F₁代植株的表型特征。收取F₂代种子烘干,于2020年6月种植于杭州富阳试验田,等表型出现时,统计其分离比,判断*DMT1*基因的显隐性情况,并将有表型的单株取回进行提取DNA进行图位克隆。

1.3 主要农艺性状调查

在杭州富阳试验田种植野生型秀水11和突变体*dmt1*,等到开始分蘖后每隔7天统计分蘖数,待水稻生长进入成熟期后随机选取秀水11和*dmt1*各10株,对其每个单株进行测量,统计叶长、叶宽、叶面积、有效穗数、穗长、每穗粒数、一次枝梗数、二次枝梗数、结实率、千粒重等表型特征。

1.4 叶绿素含量测定

取分蘖盛期长势基本相同的秀水11和*dmt1*的叶片,除去叶脉,取0.2 g浸于95%酒精中,每组做3个重复,用锡纸包裹并放于室温保存24 h,每隔8 h上下反转一次,直到叶片绿色完全褪去,随后取上清,分别检测665, 649和470 nm处吸光值,使用Lichtenthaler^[27]的方法计算:

叶绿素a(Chla)浓度=13.95 A_{665} –6.88 A_{649} ,
叶绿素b(Chlb)浓度=24.96 A_{649} –7.32 A_{665} ,
类胡萝卜素(Car)浓度=(1000 A_{470} –2.05Chla–114Chlb)/245.

1.5 外源激素处理

将野生型和突变体*dmt1*的成熟种子机械去壳, 用70%的乙醇溶液消毒2 min, 重复3次, 再用30%的次氯酸钠溶液消毒30 min, 之后接种在含0, 10, 20 ng/mL浓度的NAA培养基以及0, 500, 1000 nmol/L等浓度的GA₃培养基上, 放在人工气候培养箱中培养14天后分别统计茎和根的长度并拍照. 培养箱设置条件为光照14 h, 黑暗10 h, 温度为28℃.

1.6 *DMT1*基因定位

将*dmt1*与华丝占进行杂交得到F₁代, F₁自交得到F₂, 利用自交得到的群体对目的基因进行图位克隆. 利用本实验室保存的均匀分布于水稻12条染色体的SSR引物对突变体, 华丝占以及F₁进行多态性筛选, 然后用21个F₂中出现表型的单株进行连锁分析, 初步确认目的基因所在的染色体位置. 在定位区间内进一步开发了6对多态性较好的Indel标记(表1), 同时对F₂分离群体中268株表现出突变体表型的单株对目的基因进行精细定位.

表 1 精细定位相关引物序列

Table 1 Sequences of molecular markers for fine mapping

引物名称	正向引物(5'→3')	反向引物(5'→3')
M1	GAAGCTGAAAATGTACCAAGAGC	CGCAACTCCTGGAAACAATA
M2	TCGGCCGAAGTAATATCGTA	TCTCCCTAAATCCCTCCATA
M3	GGCATCAAGGCTACGGAGTA	GGCCGTACTATGTCGTCGAT
M4	TTCACAAAACAGTGGCTGAAA	AAGACGCAAATAGCCCCGTTT
M5	AGCAATGATCGGTCCAGTGT	CCCCTCGCACAAGACAATA
M6	ATGCATATGGCTTGACATGG	TGAAGAAAATACAATGTAAGATTTGTC

表 2 载体构建相关引物序列

Table 2 Vector construction related primers

引物名称	引物序列
<i>DMT-pAN580</i> -speI-F	GCCCAGATCAACTAGTATGAAGCCTTCGGACGATAAGGCGC
<i>DMT-pAN580</i> -xbaI-R	TCGAGACGTCTCTAGATTCTCCAGGTCAAGGCTTGATCCG

1.7 亚细胞定位

为了探究DMT1在细胞当中表达位置, 本团队构建了*pAN580-DMT1-eGFP*载体, 以该基因的cDNA为模板, 利用*DMT-pAN580*-speI-F和*DMT-pAN580*-xbaI-R扩增出带接头的目的片段(表2), 再通过In-fusion酶连接用Spe I 酶和Xba I 酶切开的*pAN580-eGFP*载体, 获得*pAN580-DMT1-eGFP*载体, 将载体转入大肠杆菌(DH5α)进行扩繁, 再将质粒提取出来转入农杆菌中(EHA105), 通过农杆菌介导烟草的瞬时转化, 利用激光扫描共聚焦显微镜观察绿色荧光蛋白在细胞中的位置.

1.8 *DMT1*敲除植株的构建

*DMT1*的CRISPR/Cas9载体由江苏百格基因科技有限公司进行构建, 继而导入秀水11中进行转化, 转化回来的阳性植株通过测序确定敲除位置.

1.9 启动子区域顺式元件分析

在国家水稻数据中心(<http://www.ricedata.cn/gene/>)下载得到*DMT1*基因的序列, 取基因起始密码子上游2500 bp启动子序列, 利用在线软件PlantCARE(<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>)进行序列分析.

1.10 实时荧光定量PCR

利用AXYGEN试剂盒(天根生化科技有限公司, 北京)提取水稻植株的总RNA, 使用TOYOBO试剂盒(东洋纺生物科技有限公司, 上海)逆转录为cDNA. 使用qRT-PCR分别检测秀水11与*dmt1*中与生长素合成与传导的基因的表达水平(表3), 以水稻*OsActin*为内参基因, 每个样品做4个生物学重复, 反应体系为: 1 μ L cDNA (浓度为500 ng/ μ L), 1 μ L的上下游引物(浓度为10 μ mol/L), 5 μ L 2 $\times$ SYBR Mix. 反应程序为: 95 $^{\circ}$ C 30 s, 95 $^{\circ}$ C 5 s, 55 $^{\circ}$ C 10 s, 72 $^{\circ}$ C 5 s, 55个循环. 定量结果采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 方法[28]进行分析. 用Excel和SPSS 21.0等软件对数据进行显著性差异分析, 实验数据间的显著性差异使用*t*检验进行比较. $P<0.05$ 代表具有显著性差异.

1.11 生长素含量测定

取分蘖期野生型和*dmt1*相同部位的叶片, 用液氮磨成粉末后取0.1 g, 利用质谱法进行测量, 每组进行3个重复, 测定完成后用UHPLC-ESL-MS/MS分析数据[29].

1.12 抗旱性分析

(1) 渗透胁迫下种子发芽率测定. 挑选成熟、谷粒饱满且大小一致的秀水11和*dmt1*种子各120颗. 按质量比分别配置10%和20%的PEG-6000溶液, 用蒸馏水作为CK组, 将120颗种子随机分成3组, 每组40颗置于培养皿中, 向培养皿注入等量不同浓度的PEG-6000溶液, 使种子完全浸入液体当中, 放入28 $^{\circ}$ C培养箱. 每隔3天

记录每个培养皿发芽的种子数并计算发芽率、种子萌发指数和萌发胁迫指数:

萌发率(%)=发芽种子数/总种子数 $\times$ 100,

种子萌发指数=1.00nd3+0.66nd6+0.33nd9,

萌发胁迫指数(%)=野生型萌发指数/突变体萌发指数 $\times$ 100%,

其中, 1.00, 0.66, 0.33分别为相应萌发天数所赋予的耐干旱系数.

(2) 水稻苗期抗旱鉴定. 取三叶期生长状况一致的秀水11和*dmt1*, 用20%的PEG-6000模拟干旱对水稻进行干旱胁迫4天. 记录PEG-6000处理前后秀水11和突变体*dmt1*表型的变化, 同时分别提取进行PEG-6000处理处理与未处理的秀水11和*dmt1*的RNA并进行反转录, 通过qRT-PCR分析相关耐旱基因表达变化情况(表4).

2 结果与分析

2.1 *dmt1*表型分析及农艺性状统计

在大田条件下, *dmt1*在分蘖盛期分蘖数要比野生型高出3.2倍, 并伴随着叶色加深, 叶长叶宽叶面积减小, 到成熟期时*dmt1*的株高仅为野生型的53%, 分蘖数始终显著高于野生型. 由于*dmt1*在分蘖盛期颜色要明显深于野生型, 因此本团队对分蘖盛期*dmt1*和秀水11的叶绿素含量进行测定. 通过测定发现*dmt1*中叶绿素b的含量要显著高于野生型, 而叶绿素a和类胡萝卜素的含量没有明显变化(图1), 因此推测*dmt1*表现出叶色

表 3 qRT-PCR引物序列

Table 3 qRT-PCR primer sequence

引物名称	正向引物(5'→3')	反向引物(5'→3')
<i>OsActin</i>	TGGCATCTCTCAGCACATTCC	TGCACAATGGATGGGTCAGA
<i>YUC1</i> -qRT	TCATCGGACGCCCTCAACGTCGC	GGCAGAGCAAGATTATCAGTC
<i>YUC2</i> -qRT	GTCCAAAGGGAGGAGTCGTCCAG	GCATGATGTTTACACCCGGCCTT
<i>YUC5</i> -qRT	ACCTCCTACGACGCCGCCATGATC	CTCCCAACACAGCGACGACAGAAC
<i>YUC7</i> -qRT	AACACAGTGATCGCATGGACA	TCGAGGTAGTCGATGAAGTGG
<i>YUC8</i> -qRT	ACTGTAGTGATGCAAGAGGAGA	CCCAAGAACCGATGAGCTAAG
<i>TAR1</i> -qRT	ATACTTCGGCGGTGACGACG	CGTCGGAGAAGTAGCTCATC
<i>TAR2</i> -qRT	CGCCCTACTACTCGTCATACC	GATTGTTCGGGGAGCAGAC
<i>TAR3</i> -qRT	GCTCCATGCAGCTCATCAAC	TCCCGGCCGTCAAACATGTC
<i>TAR4</i> -qRT	GGTGGCATCGCTTGAGCTAC	CCGTCGAACATGACGGTCTG

表 4 耐旱相关基因引物序列

Table 4 Drought tolerance related gene primer sequence

引物名称	正向引物(5'→3')	反向引物(5'→3')
<i>OsNAC6</i> -qRT	CGCTGTACGGAGAGAAGGAG	ACTCGTGCATGATCCAGTTG
<i>OsNAC9</i> -qRT	AGTCGGAGATCGTGGACAAC	ATGCCCTGGATATCGTCGTA
<i>OsNAC52</i> -qRT	CGACAAGACCAACTGGATCA	TGGCTCATCATATTCGAACG
<i>OsNAC2</i> -qRT	GGGGAAGGACAAGGACATCT	ACACCCACTCGTTCTTGGA
<i>OsNAC8</i> -qRT	ACCCACTGGGAGACGTACTG	ACTGGTTCAGCAGCAGGATT
<i>SNAC3</i> -qRT	CAGCATGCATCTGTCGTTCT	TGGGAGTGAGGAATTGAAGC
<i>OsNAC095</i> -qRT	GAGCGCGAGTGGTACTTCTT	GTCTTCTTGAGGCCGATGAG
<i>OsNAC022</i> -qRT	AAGGAGGACATGGTGCTCTG	GGATGAGGACTGGATCAGGA

图 1 分蘖表型及动态变化图. A: 野生型和突变体*dmt1*分蘖盛期表型图, 标尺为15 cm; B: 野生型和*dmt1*的分蘖数随播种后日期的动态变化; C: 野生型与*dmt1*叶绿素a、叶绿素b和类胡萝卜素含量测定. 采用*t*测验, *和**表示在0.05和0.01水平上差异显著

Figure 1 Tillering phenotype and dynamic changes. A: Phenotypes of wild-type and mutant *dmt1* at the tillering stage, bar=15 cm; B: the number of tillers of wild-type and *dmt1* changes dynamically with the date after sowing; C: determination of chlorophyll a, chlorophyll b and carotenoid content of wild-type and *dmt1*, using the *t* test, * and ** indicate significant differences at the levels of 0.05 and 0.01

加深表型的原因是由于叶绿素b含量的提高引起的. 此外, *dmt1*的有效穗数、一次枝梗数、二次枝梗数、千粒重、每穗粒数及结实率均显著低于野生型(表5).

2.2 *dmt1*外源激素响应

为了探究DMT1突变后*dmt1*对于NAA和GA₃的响

应情况, 本团队将秀水11和*dmt1*的种子分别接种在添加了不同浓度NAA和GA₃的培养基上, 培养14 d后统计茎长和根长. 结果发现, 在不添加NAA的培养基上秀水11和*dmt1*的茎长和根长没有差异, 而在低浓度NAA中秀水11的茎长要长于*dmt1*, 在高浓度NAA中秀水11的茎长要短于*dmt1*, 表现出抑制的趋势, 说明秀水

表 5 野生型和*dmt1*的主要农艺性状比较^{a)}

Table 5 Comparison of main agronomic traits between wild-type and *dmt1*^{a)}

农艺性状	野生型(xs11)	突变体(<i>dmt1</i>)
株高(cm)	124.2±5.16	66.2±4.38**
叶长(cm)	32.2±2.76	14.35±1.98**
叶宽(cm)	1.6±0.68	0.65±0.12**
叶面积(cm ²)	36.25±2.94	8.56±1.36**
有效穗数	20.17±2.92	14.45±2.11**
穗长(cm)	15.1±1.04	13.4±0.79*
一次枝梗数	12.69±0.92	10.5±0.82**
二次枝梗数	20.33±1.97	12.13±2.75**
每穗粒数	141.27±17.57	98.83±9.93**
千粒重(g)	32.271±0.859	28.869±1.133**
结实率(%)	94.22%±3.31%	76.82%±6.27%**

a): 采用*t*测验, *和**表示在0.05和0.01水平上差异显著

11的地上部分对于NAA的敏感程度要大于*dmt1*。且在低浓度及低浓度GA₃处理下, 野生型和*dmt1*的茎长均表现出促进的趋势, 说明野生型和*dmt1*的茎对于GA₃均不敏感, 同时在低浓度GA₃处理下秀水11和*dmt1*的根均表现出促进的趋势, 但在高浓度GA₃处理下*dmt1*的根长表现出抑制的趋势, 而秀水11的根长没有明显变化, 表明*dmt1*的根对于GA₃的敏感程度要大于秀水11(图2)。

2.3 *dmt1*的遗传分析

通过*dmt1*与华丝占进行正反交得到F₁, 发现F₁的表型与野生型一致。F₁自交得到的F₂群体中有部分单株出现了与*dmt1*一致的表型, 经过统计发现, 正常表型与多分蘖表型的比例约为3:1(表6), 经卡方检验, 证明符合孟德尔分离定律, *dmt1*为单核隐性基因控制。

2.4 *DMT1*的图位克隆

利用F₂群体对*DMT1*进行图位克隆, 初定位将*DMT1*定位到第4染色体长臂上分子标记B4-19到B4-21之间。随后开发新的Indel标记, 最终将*DMT1*定位到了分子标记M1到M2之间, 物理距离为502 kb, 该区域内包含53个开放阅读框(open reading frame, ORF)。通过测序(见网络版附件)发现, *LOC_Os04g52479*的第4个外显子的403位碱基插入了一个A, 导致移码突变, 引起蛋白质翻译提前终止。而其他ORF与野生型相比

没有发生改变(测序数据请见电子版附录)。因此, 将*LOC_Os04g52479*作为*DMT1*的候选基因。为了验证*DMT1*的突变是否是引起该表型的原因, 本团队利用CRISPR/Cas9技术对秀水11中的*LOC_Os04g52479*基因进行敲除, 通过测序确定敲除位点, 发现与野生型相比, *dmt1-ko*缺失了第112~114位碱基, 导致最终翻译的蛋白质产物的第38位缺少1个精氨酸, 在纯合的敲除植株中发现该转基因幼苗同样表现出株高变矮, 叶片变小以及分蘖数增多的表型, 由此证明在秀水11背景下*LOC_Os04g52479*的突变会导致植株出现多分蘖的表型(图3)。对比前人研究结果发现, *DMT1*是*NAL1*的等位基因^[30], 突变位点和背景不同导致*dmt1*出现了与*nal1*不同的多分蘖表型。

2.5 *DMT1*的亚细胞定位

通过将构建好的*pAN580-DMT1-eGFP*载体和*pAN580-eGFP*空载转入农杆菌中侵染烟草, 并利用激光共聚焦扫描显微镜观察烟草叶肉细胞, 发现荧光主要出现在细胞核、细胞质上, 有少部分的荧光出现在叶绿体上, 表明*DMT1*在叶绿体中也有微弱的表达(图4)。

2.6 *DMT1*顺式作用元件分析

通过网站对*DMT1*上游2500 bp的顺式作用元件进行分析, 发现除TATA-box和CAAT-box这类核心启动子元件以外, 还存在参与光反应的顺式元件, 与胁迫相关如厌氧诱导、低温相应、干旱诱导以及跟应激反应相关的元件。此外, 还存在激素反应相关元件, 如水杨酸反应元件TCA-element, 赤霉素反应元件P-box, 生长素反应元件AuxRR-core(表7)。通过预测表明, *DMT1*在激素调控水稻分蘖以及对抗胁迫的反应中发挥着重要作用。

2.7 生长素相关基因表达分析及生长素含量测定

有文献报道植物的株高与生长素相关^[31], 因此本团队利用qRT-PCR检测了野生型和*dmt1*在分蘖盛期与生长素合成和运输途径相关基因, 发现在突变体中与生长素合成相关基因*YUC1*, *YUC2*, *YUC5*, *YUC7*, *YUC8*, *TAR1*, *TAR4*的表达量均显著低于野生型, 而生长素受体*TAR3*表达量显著高于野生型。同时检测了分蘖期野生型和*dmt1*的生长素含量, 发现分蘖期*dmt1*的

图 2 激素处理对野生型和 *dmt1* 幼苗的影响。A 和 B: 不同浓度的 NAA 处理下野生型和 *dmt1* 的表型, 标尺为 3 cm; C 和 D: 不同浓度的 NAA 处理下野生型和 *dmt1* 地上部分和地下部分的长度; E 和 F: 不同浓度的 GA₃ 处理下野生型和 *dmt1* 的表型, 标尺为 3 cm; G 和 H: 不同浓度的 NAA 处理下野生型和 *dmt1* 地上部分和地下部分的长度。* 和 ** 表示在 0.05 和 0.01 水平上差异显著

Figure 2 Effects of hormone treatment on wild-type and *dmt1* seedlings. A and B: The phenotype of wild-type and *dmt1* under different concentrations of NAA treatment, bar=3 cm; C and D: the length of the above-ground and underground parts of wild-type and *dmt1* under different concentrations of NAA treatment; E and F: the phenotype of wild-type and *dmt1* under different concentrations of GA₃ treatment; G and H: the length of the above-ground and underground parts of wild-type and *dmt1* under different concentrations of GA₃ treatment. * and ** indicate significant differences at the levels of 0.05 and 0.01

表 6 F₂代分离群体统计结果

Table 6 Statistical results of F₂ generation segregating population

杂交组合	F ₁ 表型	F ₂ 表型			$\chi^2(3:1)$
		正常表型	突变表型	总株数	
<i>dmt1</i> /华丝占	正常表型	830	268	1098	0.205
华丝占/ <i>dmt1</i>	正常表型	921	301	1222	0.088

图 3 *DMT1*基因的图位克隆与敲除验证。A~E: *DMT1*在染色体上的位置; F: *DMT1*的突变位点; G: 野生型与*dmt1*中*DMT1*的氨基酸序列; H: *dmt1-ko*的敲除位点; I: 野生型、*dmt1*与*dmt1-ko*的表型图

Figure 3 Map-based cloning and knockout verification of *DMT1* gene. A~E: Position of *DMT1* on the chromosome; F: mutation site of *DMT1*; G: amino acid sequence of *DMT1* in wild-type and *dmt1*; H: knockout site of *dmt1-ko*; I: phenotype of wild-type, *dmt1* and *dmt1-ko*

图 4 DMT1蛋白的亚细胞定位
Figure 4 Subcellular localization of DMT1 protein

表 7 DMT1基因启动子调控元件功能预测
Table 7 Function prediction of regulatory elements of DMT1 gene promoter

基序	序列	功能
G-box	CAGACGTGGCA	参与光反应性的顺式作用调节元件
TCA-element	TCAGAAGAGG	参与水杨酸反应的顺式作用元件
TATA-box	TACAAAA	转录开始-30左右的核心启动子元件
ARE	AAACCA	厌氧诱导所必需的顺式作用调节元件
TC-rich repeats	GTTTTCTTAC	参与防御和应激反应的顺式作用元件
P-box	CCTTTTG	赤霉素反应元件
LTR	CCGAAA	参与低温响应的顺式作用元件
GC-motif	CCCCCG	参与缺氧特异性诱导的增强子样元件
MBS	CAACTG	MYB结合位点参与干旱诱导
AuxRR-core	GGTCCAT	参与生长素反应的顺式作用调控元件
CAAT-box	CCAAT	启动子和增强子区域中常见的顺式作用元件

IAA含量仅为野生型的46%，表明在*dmt1*中存在生长素合成障碍(图5)，进而导致植株高度降低和分蘖增多的表型。

2.8 耐旱性分析

目前的研究表明，种子在干旱胁迫下的发芽率的高低可以反映该品种抗旱能力的强弱^[32]，将野生型和

*dmt1*的种子浸入不同浓度的PEG-6000溶液中，分别统计发芽率，发现随着PEG-6000浓度的提高，野生型和突变体种子的发芽率均受到不同程度的抑制，并且*dmt1*萌发的抑制指数要高于野生型(表8)。同时本团队利用PEG-6000模拟了干旱胁迫对苗期野生型和突变体的影响，发现用PEG-6000模拟干旱处理4天后，突变体*dmt1*的叶片卷曲、发黄，叶尖枯死，而野生型的叶片

图5 生长素及合成相关基因的检测。A: 生长素合成与信号传导相关基因表达水平; B: 野生型和*dmt1*在分蘖期时的生长素含量。*和**分别表示在0.05和0.01水平差异显著

Figure 5 Detection of auxin and synthesis-related genes. A: The expression levels of genes related to auxin synthesis and signal transduction; B: the auxin content of wild-type and *dmt1* at the tillering stage. * and ** indicate significant differences at the levels of 0.05 and 0.01

表8 不同浓度的PEG-6000胁迫下野生型和*dmt1*发芽率

Table 8 Germination rate of wild-type and *dmt1* under different concentrations of PEG-6000

种子	CK(0)			10%			20%			种子萌发指数	
	3 d	6 d	9 d	3 d	6 d	9 d	3 d	6 d	9 d	10%	20%
秀水11	100%	100%	100%	73.3%	96.6%	96.6%	13.3%	73.3%	73.3%	84.9%	54.9%
<i>dmt1</i>	86.6%	100%	100%	65%	89.8%	90%	5.9%	57.1%	57.1%	83.75%	36.1%

只有微微卷曲。分别提取处理前后的野生型和突变体的RNA,用qRT-PCR的方法检测处理前后与抗旱相关基因的表达式,发现处理后野生型中*NAC6*和*NAC95*的表达式有大幅上升,说明*DMT1*的突变会引起植株对PEG-6000的抗性降低(图6)。

3 讨论

分蘖是水稻的重要农艺性状,多分蘖突变体在水稻分蘖调控途径研究过程中有十分重要的作用,同时其调控基因的克隆、功能研究以及有利等位型挖掘,对水稻分蘖调控分子机制和高产新品种选育具有重要的理论和现实意义。本研究发现一个矮秆多分蘖突变体*dmt1*,其在分蘖盛期的分蘖数是野生型的3.2倍,同时还伴随着叶长、叶宽、叶面积以及株高减少的特点。通过测量*dmt1*和野生型的叶绿素含量,发现*dmt1*叶色变深主要是由于叶绿素b含量升高引起的。激素对分蘖芽的调控是影响水稻分蘖的一个重要原因,通过施加NAA,发现*dmt1*地上部分的敏感性相较于野生型降低了。而施加GA₃发现*dmt1*地下部分的敏感程度有所

提高。利用qRT-PCR检测野生型和*dmt1*与生长素合成与信号传导基因的表达式,发现在*dmt1*中的生长素合成相关基因的表达式有显著降低,同时利用质谱法测定了野生型和*dmt1*在分蘖期的生长素含量,发现在*dmt1*中生长素含量仅为野生型的46%,说明在*dmt1*中存在生长素合成障碍。

利用图位克隆的方式将*DMT1*定位于4号染色体长臂,进一步进行精细定位将该区间缩小在M1-M2这个502 kb的范围内,对该范围内的基因进行测序发现*LOC_Os04g52479*上第4个外显子的403位有一个单碱基的插入,引起了移码突变,导致产生终止密码子,蛋白质翻译提前终止,最后翻译产生的蛋白质缺少164个氨基酸,引起构象发生改变。该基因是之前已报道的*NAL1*的等位基因^[30],该基因编码一个丝氨酸/半胱氨酸蛋白酶,在ZF802背景下的*NAL1*中由于第四外显子上有30 bp的缺失导致最后翻译的蛋白质缺少10个氨基酸,因此*nal1*表现出株高半矮化,叶面积减小的表型。而*dmt1*除了这些特点以外,还表现出分蘖数显著升高的特点,这说明除了突变位点不同会引起不同表型外,不同遗传背景下的等位基因也可以造成植株表型产生

图 6 PEG-6000胁迫对野生型和*dmt1*的影响. A: 不同浓度PEG-6000处理下野生型和*dmt1*种子发芽情况; B: PEG-6000处理前后野生型和*dmt1*表型图, 标尺为2 cm; C和D: PEG-6000处理前后野生型与*dmt1*中耐旱相关基因表达水平. *和**分别表示在0.05和0.01水平差异显著

Figure 6 The effect of PEG-6000 stress on wild-type and *dmt1*. A: Germination of wild-type and *dmt1* seeds under different concentrations of PEG-6000; B: phenotype map of wild-type and *dmt1* before and after PEG-6000 treatment, bar=2 cm; C and D: expression levels of drought tolerant genes in wild-type and *dmt1* before and after PEG-6000 treatment. * and ** indicate significant differences at the levels of 0.05 and 0.01

差异. 同时*DMT1*在不同背景下的不同突变形式会引起不同表型, 这也表明*DMT1*在水稻中具有一因多效的功能, 可以控制植株的多个性状. 同时本研究构建了*pAN580-DMT1-eGFP*载体, 注射烟草发现该基因除了在细胞质细胞核中表达, 在叶绿体中也有微弱的表达. *nal1*中茎秆维管系统发育存在缺陷, 导致生长素极性运输的活性显著下降, 表现出叶宽、叶面积和株高的下降. 在拟南芥中*uch1*和*uch2*同样编码一个丝氨酸/半胱氨酸蛋白酶, 突变同样会产生株高和叶片发育方面的缺陷. *NAL1*的其他等位基因*LSCHL4*可以使籼稻93-11增产^[33]. Chen等人^[34]定位到一个与旗叶宽的QTL, 通过精细定位发现这可能是由于*nal1*的可变剪切引起. Xu等人^[35]发现, *NAL^{nl6}*和*DEP1-1*等位基因的聚合在使粳稻的氮吸收以及提高产量方面有着重要的作用, 可以有效提高水稻的分蘖数和籽粒数并减少对氮肥的需求, 这为建设环境友好型农业提供了一种重要思路. 以上的结果均证明, *DMT1*的不同等位基因在改良水稻株型和提高水稻产量方面具有极大的应用潜

力. 通过合理选择*DMT1*的等位基因可以提高水稻的有效分蘖数进而增加产量. 第一次绿色革命通过*SD1*培育了半矮秆品种的水稻, 通过提高倒伏能力使水稻产量提高, 而在未来通过聚合分蘖相关基因来塑造水稻理想株型以及提高产量方面有着不可小视的作用.

干旱也是造成水稻减产的一个重要因素^[36]. 通过利用PEG-6000对野生型和*dmt1*进行模拟干旱处理发现, PEG-6000胁迫下*dmt1*的发芽率减少, 通过苗期对野生型和*dmt1*进行PEG-6000胁迫, 发现*dmt1*在处理后的叶尖枯萎, 而野生型中与抗旱正调控相关基因, 如*NAC6*和*NAC9*显著上调, 表明*dmt1*抗旱能力与野生型相比下降. 而种子萌发期PEG-6000胁迫也表明, 突变体*dmt1*在受到干旱胁迫时发芽率会降低, 说明当*DMT1*发生突变时会显著降低植株的耐旱能力. Cho等人^[37]发现, *nal1*的等位基因*nal5*会影响不定根的生长, 因此不定根数量的减少可能引起*dmt1*在遇到胁迫时无法吸收更多水分, 导致抗旱能力下降.

目前激素影响水稻株型调控网络已有了部分进

展,但仍有很多问题尚不清楚.仍需要挖掘更多的多分蘖突变体并对这些基因功能进行研究,以期培育出具有合适株型的水稻来提高产量,缓解日益严重的粮食短缺问题.干旱是影响水稻产量的另一个重要因素,通过挖掘耐旱品种的水稻来提高产量也是当今研究的热点.本研究中,*DMT1*的突变会引起植株表型发生改

变,造成矮化分蘖数增多的特点,同时突变体*dmt1*中存在生长素合成障碍,这可能是导致植株出现表型的原因.同时*DMT1*基因的突变会导致植株的耐旱性下降.本研究为培育水稻理想株型,提高水稻产量,解析水稻分蘖机制以及抵御干旱胁迫提供了新思路,为培育高产水稻新品种打下良好的理论和实验基础.

参考文献

- Wang J, Fan F J, Zhu J Y, et al. Genetic analysis and gene mapping of rice dwarf mutant *htd7(t)* (in Chinese). *Chin Agric Sci Bull*, 2016, 32: 138–142 [王军, 范方军, 朱金燕, 等. 水稻多蘖矮秆突变体*htd7(t)*的遗传分析与基因定位. *中国农学通报*, 2016, 32: 138–142]
- Wang Y S, Wang J, Duan J Y, et al. Isolation and genetics preliminary study on rice extreme tillering mutant (in Chinese). *Acta Agron Sin*, 2002, 28: 235–239 [王永胜, 王景, 段静雅, 等. 水稻极度分蘖突变体的分离和遗传学初步研究. *作物学报*, 2002, 28: 235–239]
- Rao Y C, Lin H, Xiao S Q, et al. QTL mapping and candidate gene analysis for submergence tolerance in rice (in Chinese). *J Zhejiang Norm Univ (Nat Sci)*, 2020, 43: 312–319 [饶玉春, 林晗, 肖飒清, 等. 水稻耐淹性的QTL定位与候选基因分析. *浙江师范大学学报(自然科学版)*, 2020, 43: 312–319]
- Takeda T, Suwa Y, Suzuki M, et al. The *OsTBI* gene negatively regulates lateral branching in rice. *Plant J*, 2003, 33: 513–520
- Meng D X, Guo Y J, Liu Y, et al. Physiological characteristics of rice tiller formation and its gene regulation (in Chinese). *Liaoning Agric Sci*, 2010, 4: 41–44 [孟德璇, 郭亚晶, 刘杨, 等. 水稻分蘖形成的生理特性及其基因调控. *辽宁农业科学*, 2010, 4: 41–44]
- Ren X, Weng Q M, Zhu L L, et al. Mapping of QTL for tillering ability in rice (in Chinese). *J Wuhan Univ (Sci)*, 2003, 49: 533–537 [任翔, 翁清妹, 祝莉莉, 等. 水稻分蘖能力QTL的定位. *武汉大学学报(理学版)*, 2003, 49: 533–537]
- Zhao Y. Auxin biosynthesis and its role in plant development. *Annu Rev Plant Biol*, 2010, 61: 49–64
- Wang B, Smith S M, Li J. Genetic regulation of shoot architecture. *Annu Rev Plant Biol*, 2018, 69: 437–468
- Zou C X, Men S Z. Research progress on the PIN protein family of auxin delivery carriers (in Chinese). *Chin J Cell Biol*, 2013, 35: 574–582 [邹纯雪, 门淑珍. 生长素的外输载体PIN蛋白家族研究进展. *中国细胞生物学学报*, 2013, 35: 574–582]
- Xu J X. Hormonal regulation and molecular mechanism of the transition between germination and dormancy of rice tiller buds (in Chinese). Dissertation for Doctoral Degree. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2015 [许俊旭. 水稻分蘖芽萌发与休眠相互转换的激素调控和分子机制. 博士学位论文. 南京: 南京农业大学, 2015]
- Abu-Zaitoon Y M, Bennett K, Normanly J, et al. A large increase in IAA during development of rice grains correlates with the expression of tryptophan aminotransferase *OsTARI* and a grain-specific *YUCCA*. *Physiol Plant*, 2012, 146: 487–499
- Waldie T, McCulloch H, Leyser O. Strigolactones and the control of plant development: lessons from shoot branching. *Plant J*, 2014, 79: 607–622
- Wen X X. Map-based cloning of rice low tillering and dwarfing gene *OsDLT10* (in Chinese). Dissertation for Master's Degree. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2020 [温小霞. 水稻少蘖矮秆基因*OsDLT10*的图位克隆. 硕士学位论文. 北京: 中国农业科学院, 2020]
- Wang Y. The brassinosteroid signaling pathway transcription factor *BES1* is involved in the regulation of plant branching mediated by strigolactone signaling (in Chinese). Dissertation for Doctoral Degree. Shanghai: Fudan University, 2014 [王园. 油菜素甾醇信号通路转录因子*BES1*参与调控独脚金内酯信号所介导的植物分枝. 博士学位论文. 上海: 复旦大学, 2014]
- Li X, Qian Q, Fu Z, et al. Control of tillering in rice. *Nature*, 2003, 422: 618–621
- Koumoto T, Shimada H, Kusano H, et al. Rice monoculm mutation *MOC2*, which inhibits outgrowth of the second tillers, is ascribed to lack of a fructose-1,6-bisphosphatase. *Plant Biotechnol*, 2013, 30: 47–56
- Nardmann J, Werr W. The shoot stem cell niche in angiosperms: expression patterns of WUS orthologues in rice and maize imply major modifications in the course of mono- and dicot evolution. *Mol Biol Evol*, 2006, 23: 2492–2504
- Liao Z, Yu H, Duan J, et al. *SLR1* inhibits MOC1 degradation to coordinate tiller number and plant height in rice. *Nat Commun*, 2019, 10: 2738
- Shao G, Lu Z, Xiong J, et al. Tiller bud formation regulators *MOC1* and *MOC3* cooperatively promote tiller bud outgrowth by activating *FON1* expression in rice. *Mol Plant*, 2019, 12: 1090–1102
- Ishikawa S, Maekawa M, Arite T, et al. Suppression of tiller bud activity in tillering dwarf mutants of rice. *Plant Cell Physiol*, 2005, 46: 79–86

- 21 Arite T, Iwata H, Ohshima K, et al. *DWARF10*, an *RMS1/MAX4/DAD1* ortholog, controls lateral bud outgrowth in rice. *Plant J*, 2007, 51: 1019–1029
- 22 Zou J, Zhang S, Zhang W, et al. The rice *HIGH-TILLERING DWARF1* encoding an ortholog of Arabidopsis *MAX3* is required for negative regulation of the outgrowth of axillary buds. *Plant J*, 2006, 48: 687–698
- 23 Lin H, Wang R, Qian Q, et al. *DWARF27*, an iron-containing protein required for the biosynthesis of strigolactones, regulates rice tiller bud outgrowth. *Plant Cell*, 2009, 21: 1512–1525
- 24 Liu W, Wu C, Fu Y, et al. Identification and characterization of *HTD2*: a novel gene negatively regulating tiller bud outgrowth in rice. *Planta*, 2009, 230: 649–658
- 25 Duan J, Yu H, Yuan K, et al. Strigolactone promotes cytokinin degradation through transcriptional activation of *CYTOKININ OXIDASE/DEHYDROGENASE 9* in rice. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2019, 116: 14319–14324
- 26 Wang Y, Shang L, Yu H, et al. A strigolactone biosynthesis gene contributed to the green revolution in rice. *Mol Plant*, 2020, 13: 923–932
- 27 Lichenthaler H K. Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. In: *Methods in Enzymology*. New York: Academic Press, 1987. 350–382
- 28 Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *Methods*, 2001, 25: 402–408
- 29 Zhao J, Yu N, Ju M, et al. ABC transporter *OsABCG18* controls the shootward transport of cytokinins and grain yield in rice. *J Exp Bot*, 2019, 70: 6277–6291
- 30 Qi J, Qian Q, Bu Q, et al. Mutation of the rice *Narrow leaf1* gene, which encodes a novel protein, affects vein patterning and polar auxin transport. *Plant Physiol*, 2008, 147: 1947–1959
- 31 Qin H. *OsEIL1* regulates rice auxin biosynthesis and primary root growth (in Chinese). Dissertation for Doctoral Degree. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2017 [秦华. *OsEIL1*调控水稻生长素生物合成和初生根的生长. 博士学位论文. 北京: 中国农业科学院, 2017]
- 32 An Y P, Qiang A L, Zhang Y Y, et al. Rice seed germination characteristics and drought resistance identification indicators under osmotic stress (in Chinese). *J Plant Genet Resour*, 2006, 7: 421–426 [安永平, 强爱玲, 张媛媛, 等. 渗透胁迫下水稻种子萌发特性及抗旱性鉴定指标研究. 植物遗传资源学报, 2006, 7: 421–426]
- 33 Zhang G H, Li S Y, Wang L, et al. *LSCHL4* from *Japonica* cultivar, which is allelic to *NALI*, increases yield of *Indica* super rice 93-11. *Mol Plant*, 2014, 7: 1350–1364
- 34 Chen M, Luo J, Shao G, et al. Fine mapping of a major QTL for flag leaf width in rice, *qFLW4*, which might be caused by alternative splicing of *NALI*. *Plant Cell Rep*, 2012, 31: 863–872
- 35 Xu X, Wu K, Xu R, et al. Pyramiding of the *dep1-1* and *NALI^{NJ6}* alleles achieves sustainable improvements in nitrogen-use efficiency and grain yield in japonica rice breeding. *J Genet Genomics*, 2019, 46: 325–328
- 36 Rao Y C, Dai Z J, Zhu Y T, et al. Research progress in rice resistance to drought stress (in Chinese). *J Zhejiang Norm Univ (Nat Sci)*, 2020, 43: 417–429 [饶玉春, 戴志俊, 朱怡彤, 等. 水稻抗干旱胁迫的研究进展. 浙江师范大学学报(自然科学版), 2020, 43: 417–429]
- 37 Cho S H, Yoo S C, Zhang H, et al. Rice *NARROW LEAF1* regulates leaf and adventitious root development. *Plant Mol Biol Rep*, 2014, 32: 270–281

***DMT1* encodes a serine/cysteine protease that regulates rice tillering and participates in drought stress response**

LU Tao¹, YIN WenJing¹, DAI RuoHui¹, CHEN ZhenGai¹, SHEN ZhiQi¹, YE HanFei¹,
YANG LiJun¹, YAN Gang¹, Wu SiSi¹, HE Rui², ZHANG Qi³, LI SanFeng²,
WANG YueXing² & RAO YuChun¹

¹ College of Chemistry and Life Sciences, Zhejiang Normal University, Jinhua 321004, China;

² State Key Laboratory of Rice Biology, China National Rice Research Institute, Hangzhou 310006, China;

³ Zhejiang Jinhua Ecological and Environmental Monitoring Center, Jinhua 321004, China

The formation of rice tillers is a complicated process. It is affected by environmental and genetic factors. Proper tillers can significantly increase rice yield. In this study, ethyl methanesulfonate (EMS) was used to mutate japonica rice Xiushui 11 to obtain a dwarf, multi-tillering mutant, named *dwarf and multiple tillers 1* (*dmt1*), and performed phenotypic observation, physiological and biochemical analysis, genetic analysis, gene mapping and hormone treatment. It was found that *dmt1* had plant height changes at the tillering stage shorter, smaller leaf area, increased tiller number and other characteristics. Genetic analysis shows that the *dmt1* is controlled by a single recessive nuclear gene. The results of map-based cloning show that *DMT1* is located on chromosome 4 and encodes a serine/cysteine protease and is an allele of *NALI*. The results of cell localization show that DMT1 protein is expressed in the nucleus, cytoplasm, and chloroplasts. In order to explore whether this gene mutation will affect the sensitivity of rice to hormones, we found that the aboveground parts of *dmt1* are less sensitive to NAA by applying exogenous hormones. The underground part is more sensitive to GA₃. And the expression of genes related to auxin synthesis in *dmt1* is reduced. Through drought treatment, it is found that the drought tolerance of *dmt1* is reduced, and the germination rate of *dmt1* is reduced under drought stress. *DMT1* can be obtained from the experiment. Mutations can cause plants to produce phenotypes with shorter plant heights and increased tillers. The phenotypes may be caused by auxin synthesis disorders through qRT-PCR. This provides new information for the genetic network of rice tillering mechanisms.

rice, tiller, genetic analysis, *DMT1*, exogenous hormones, drought treatment

doi: [10.1360/SSV-2021-0397](https://doi.org/10.1360/SSV-2021-0397)