

利用 RNA 干涉研究水稻锌指蛋白基因 *OsZRL* 的功能

玉晓红¹ 晁丽¹ 陈昌冬¹ 刘永胜^{1,2} 牛向丽^{1,2,*}

(¹重庆大学 生命科学学院, 重庆 400044; ²合肥工业大学 生物与食品工程学院, 安徽 合肥 230009; * 通讯联系人, E-mail: niu_xiangli@163.com)

Function Analysis of a Rice Zinc Finger Protein Gene *OsZRL* by RNA Interference

YU Xiao-hong¹, CHAO Li¹, CHEN Chang-dong¹, LIU Yong-sheng^{1,2}, NIU Xiang-li^{1,2,*}

(¹College of Life Sciences, Chongqing University, Chongqing 400044, China; ²School of Biotechnology and Food Engineering, Hefei University of Technology, Hefei 230009, China; * Corresponding author, E-mail: niu_xiangli@163.com)

YU Xiaohong, CHAO Li, CHEN Changdong, et al. Function analysis of a rice zinc finger protein gene *OsZRL* by RNA interference. *Chin J Rice Sci*, 2013, 27(1): 9–16.

Abstract: The function of a rice zinc-finger protein gene (*OsZRL*) was investigated by RNA interference. The results of semi-quantitative RT-PCR and quantitative PCR analysis indicated that *OsZRL* expression levels were significantly downregulated in the transgenic plants. The *OsZRL*-RNAi transgenic lines were characterized by bigger leaves, stronger roots and stems compared to wild type plants, indicating that the suppression of *OsZRL* had a positive effect on rice growth. The expression pattern and transgenic seedlings phenotypes revealed that *OsZRL* was involved in gibberellin or abscisic acid signaling pathway. It suggests that zinc-finger protein *OsZRL* might perform its function of negative regulator in rice growth through the regulation of gibberellin and abscisic acid.

Key words: rice zinc-finger protein; RNA interference; negative regulation; gibberellin; abscisic acid

玉晓红, 晁丽, 陈昌冬, 等. 利用 RNA 干涉研究水稻锌指蛋白基因 *OsZRL* 的功能. 中国水稻科学, 2013, 27(1): 9–16.

摘 要: 通过 RNA 干涉对一个水稻锌指蛋白基因 *OsZRL* 的功能进行分析。半定量 RT-PCR、定量 PCR 分析结果显示, 转基因植株 *OsZRL* 基因表达水平显著下调。与野生型相比, *OsZRL* 表达水平下调的转基因株系叶片变大, 根系、茎秆更为发达, 表明 *OsZRL* 的下调对水稻植株的生长有促进作用。*OsZRL* 基因的表达模式和转基因幼苗表型显示 *OsZRL* 参与赤霉素、脱落酸信号途径。因而推测锌指蛋白 *OsZRL* 是受赤霉素、脱落酸调节的水稻生长发育负调控因子。

关键词: 水稻锌指蛋白; RNA 干涉; 负调控; 赤霉素; 脱落酸

中图分类号: Q755; S511.032

文献标识码: A

文章编号: 1001-7216(2013)01-0009-08

生物的生命活动需要基因在精密调控下转录表达, 转录因子掌控着这种调控开关。通过转录因子与启动子区顺式元件的特异结合而激活或抑制基因的转录, 控制基因的表达和机体的功能。锌指蛋白(zinc-finger protein)是一类研究较深入的转录因子家族^[1], 因其具有可以结合锌离子的指状结构-锌指结构域(zinc-finger domain)而命名。依据结构域中半胱氨酸(C)和组氨酸(H)残基的不同可将锌指蛋白分为 C2H2、C2HC、C2C2 等亚类。锌指结构域可以单个或多个相同、不同亚类组合成簇出现, 形成具有不同结合特性的锌指蛋白家族成员, 并因此赋予锌指蛋白转录调控、染色质重构等多种生理功

能^[1-2]。

在植物基因组中普遍存在着庞大的锌指结构域编码基因家族, 其成员可能通过基因复制(gene duplication)机制在进化中变异而形成^[3-4], 并产生了一些与植物营养生活方式相关的植物特有的锌指蛋白基因。已有研究表明, 植物锌指蛋白广泛参与各时期生长发育调控、胁迫应答等^[2,5-7]。虽然单子叶植物中锌指蛋白基因的功能研究还相对较少, 但已有报道表明它同样在发育调控中发挥重要作用。如玉米中锌指蛋白 ID1 调控开花时间, 其水稻同源基因 RID1 控制植株从营养生长向生殖生长的转变^[8-9]。

收稿日期: 2012-03-21; 修改稿收到日期: 2012-05-02。

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30971752, 30970260); 重庆市科技攻关计划资助项目(2010AA1019)。

在本课题组的前期工作中,分离了一个水稻 C2H2 型锌指蛋白基因 *OsZRL* (*Zinc-finger Root-less*),并构建 *OsZRL* 过量表达载体,利用农杆菌介导转化法获得了转基因植株。转基因株系的表型显示,锌指蛋白基因 *OsZRL* 参与调控水稻的根系发育^[10],但 *OsZRL* 表达显著上调的转基因小苗因根系不能正常发育,移入土壤生长约 1 周后即萎蔫死亡。本研究拟通过 RNA 干涉(RNA interference, RNAi)方法^[11]下调 *OsZRL* 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

1.1.1 水稻材料

粳稻品种日本晴(*Oryza sativa* L. ssp. japonica cv. Nipponbare)种子由本实验室提供。

1.1.2 菌株、质粒和试剂

大肠杆菌(*Escherichia coli*)DH5 α 、根癌农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*)EHA105 由本实验室保存。载体 pMD18-T 购于 TaKaRa 公司;pSK 质粒由本实验室保存;植物表达载体 pHB 由上海植物生理研究所杨洪全先生惠赠。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生物技术有限公司。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 5.0 软件,由上海英骏生物技术有限公司合成。序列测定由北京华大基因科技股份有限公司完成。

1.2 方法

1.2.1 *OsZRL* 基因生物信息学分析

利用 SMART 软件(<http://smart.embl-heidelberg.de/>)预测 *OsZRL* 基因(NM_001062214)编码序列功能结构域。通过 BLAST(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>)寻找 *OsZRL* 基因在其他植物中的同源基因,并通过 ESPript 软件(<http://esprpt.ibcp.fr/ESPrpt/cgi-bin/ESPrpt.cgi>)分析 *OsZRL* 同源基因保守序列。对 *OsZRL* 基因上游序列应答元件用 PLACE(<http://www.dna.affrc.go.jp/PLACE/index.html>)和 PlantCARE(<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>)软件进行分析。

1.2.2 *OsZRL* 基因表达分析

分别从野生型日本晴成熟植株根、茎、节、叶和颖花中提取总 RNA,合成第 1 链 cDNA,进行 *OsZRL* 基因组织差异性表达分析。取日本晴成熟种子经 1% 次氯酸钠表面消毒后,加入适量蒸馏水 37℃ 下过夜,然后放入光照培养箱(28℃,12 h 光照/12 h 黑暗)生长 7 d。将幼苗移至带有滤纸的培养皿中,每皿 20 个。加入相同体积的蒸馏水、1 μ mol/L ABA(脱落酸)、10 μ mol/L GA(赤霉素)、10 μ mol/L NAA(萘乙酸),诱导 5 d 后整个植株用于 RNA 提取,进行不同诱导培养条件下 *OsZRL* 基因表达水平定量分析。以 ACTIN (GeneBank 登录号为 X16280)作为内参基因。所用实时定量 PCR 引物如下:RTACTF,5'-AGTGATTGCACCACCA GAAAGA-3'; RTACTR,5'-CAGGACCAGATTC ATCATACTCG-3'; RTZRLF,5'-GGATGAAGA AGACGATGATGACG-3'; RTZRLR,5'-CGATC CCTCGCTATGTACTTGC-3'。扩增程序如下:95℃ 下 30 s;95℃ 下 5 s,60℃ 下 30 s,72℃ 下 15 s (40 个循环);扩增后,65℃ 下 5 s;95℃ 下 5 s (每个循环增加 0.5℃,60 个循环)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。

1.2.3 *OsZRL* 基因 RNAi 载体构建

根据 NCBI 登录序列(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore>, NM_001062214)以及 TIGR 数据库(<http://compbio.dfci.harvard.edu/tgi/plant.html>)登录 EST 信息,设计 *OsZRL* 基因引物,扩增用于构建 RNAi 载体的正、反向片段。正向片段引物为 5'-CTCGAGGATCCGAATCATACG CTTTCGACGAC-3'和 5'-AAGCTTCGATCAATC ATTAGATGCTGA-3' (两端分别引入 *Xho* I、*Bam*H I 和 *Hind* III 酶切位点);反向片段引物为 5'-GAGCTCGAATCATACGCTTCGACGAC-3'和 5'-CTGCAGCGATCAATCATTAGATGCTGA-3' (两端分别引入 *Sac* I 和 *Pst* I 酶切位点)。从野生型日本晴叶片中提取总 RNA,反转录合成第 1 链 cDNA 作为 *OsZRL* 基因片段扩增模板。扩增产物连接于 pMD18-T 载体,转化 DH5 α 感受态细胞,鉴定阳性克隆后送测序。

将测序正确的正向片段经 *Xho* I 和 *Hind* III 酶切回收连接于 pSK 质粒,反向片段经 *Sac* I 和 *Pst* I 酶切回收连接于已连接上述正向片段的 pSK 质

粒,形成正、反向重复基因片段。然后利用 *Bam*H I 和 *Sac* I 酶切正、反向重复序列连接于植物表达载体 pHB,构建 35S::OsZRL-RNAi 载体,命名为 pHB-OsZRLRi。通过冻融法将 pHB-OsZRLRi 质粒转化农杆菌 EHA105,并鉴定阳性克隆用于遗传转化。

1.2.4 *OsZRL* 基因 RNAi 载体遗传转化

水稻遗传转化采用农杆菌介导法^[12]。将日本晴成熟种子去壳,分别用 75%乙醇溶液、25%次氯酸钠溶液进行表面消毒,接种于诱导培养基中 28℃下暗培养诱导愈伤组织。愈伤继代两次后预培养 4 d,用于农杆菌侵染。预培养愈伤在农杆菌菌液中侵染 20 min,移入共培养基 28℃下暗培养 2 d,然后转入含潮霉素的选择培养基筛选抗性愈伤(潮霉素浓度依次为 30 mg/L、40 mg/L 和 50 mg/L)。将抗性愈伤转入分化培养基,10~15 d 后选取分化明显的幼苗接于生根培养基中。待幼苗生长 7~10 d 后移入温室中炼苗,约 3 周后移入田间培养。

诱导培养基:NB + 2 mg/L 2, 4-D, pH 5.8~5.9;预培养培养基:NB + 2 mg/L 2, 4-D, pH 5.8~5.9;共培养培养基:NB + 2 mg/L 2, 4-D + 100 μmol/L 乙酰丁香酮, pH 5.2;筛选培养基:NB + 2 mg/L 2, 4-D + 30~50 mg/L 潮霉素, pH 5.8~5.9;分化培养基:NB + 10 mg/L KT + 0.4 mg/L NAA, pH 5.8~5.9;生根培养基:1/2 MS, pH 5.8~5.9。

1.2.5 *OsZRL* 转基因 RNAi 植株鉴定

提取野生型、*OsZRL* RNAi 转基因 T₀代植株基因组 DNA,利用 pHB 载体上的潮霉素抗性标记 *Hpt* 基因序列(GeneBank 登录号:E00777),进行 PCR 检测鉴定转基因阳性植株。扩增引物为 HPTF: 5'-TCGTTATGTTTATCGGCACTTTG-3'和 HPTR:5'-GCGTCTGCTGCTCCATACAAG-3'。将阳性植株叶片提取 RNA 进行反转录,通过半定量 RT-PCR 验证 *OsZRL* 基因在 RNAi 植株中的表达情况,ACTIN 引物为 ACTF(5'-AAGATCC TGACGGAGCGTGGTTAC-3')和 ACTR(5'-CTT CCTAATATCCACGTCGCACTTC-3')。*OsZRL*引物为 ZRLIF(5'-GAATCATACGCTTCGACGAC-3')和 ZRLIR(5'-CGATCAATCATTAGATGCTG A-3')。由此确定 3 个独立的 *OsZRL* 明显下调转基因株系(Ri-a、Ri-b 和 Ri-c)和一个 *OsZRL* 未显著下调的株系(Ri-d)进行再繁,获得 T₁代植株。选取来

自 Ri-a、Ri-b、Ri-c 和 Ri-d 株系的转基因阳性单株(Ri-a6、Ri-b3、Ri-c5 和 Ri-d2)提取 RNA,利用 RT-PCR、实时定量 PCR 验证 *OsZRL* 基因表达水平,并获得 T₂代成熟种子。

1.2.6 *OsZRL* 基因 RNAi 转基因植株表型分析

测定野生型、4 个 T₁代 RNAi 转基因株系(Ri-a~Ri-d)的株高、分蘖数、穗长、每穗粒数、秕谷率和千粒重,并在每个单株随机选取 5 片剑叶测量叶长和叶宽,检测 *OsZRL* 基因干涉对植株田间性状的影响。

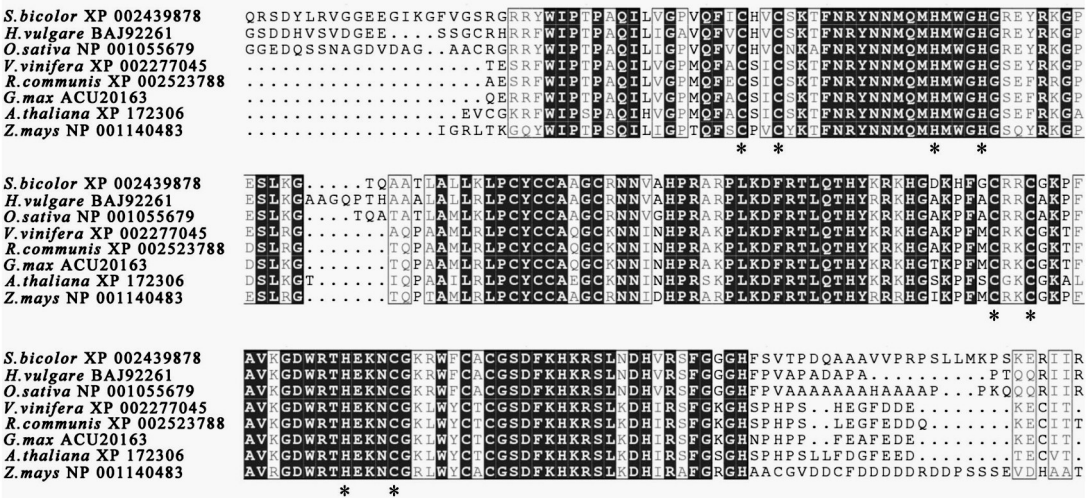
选取野生型、T₂代纯合转基因株系(Ri-a6、Ri-b3、Ri-c5)成熟种子加入适量蒸馏水放入光照培养箱(28℃,12 h 光照/12 h 黑暗)生长。选取长势相当(苗长相近)的野生型、转基因水稻幼苗各 15 个,放于同一培养皿中,分别加入蒸馏水、1 μmol/L ABA、10 μmol/L GA,测量诱导 5 d 后幼苗苗长,检测 RNAi 转基因幼苗对 GA、ABA 的应答情况。

2 结果与分析

2.1 *OsZRL* 基因生物信息学分析

SMART 软件结构域分析表明,在 *OsZRL* 基因编码序列第 211-233 位氨基酸有一个 C2H2 型锌指结构域,第 298-320 位氨基酸有一个 C2HC 型锌指结构域。同源比对显示,水稻(*O. sativa*)的 *OsZRL* 编码序列与高粱(*S. bicolor*)、大麦(*H. vulgare*)、玉米(*Z. mays*)以及双子叶植物拟南芥(*A. thaliana*)、大豆(*G. max*)、葡萄(*V. vinifera*)和蓖麻(*R. communis*)中同源基因在锌指结构域高度保守(图 1),提示这些同源基因在不同植物物种中可能具有相似功能。

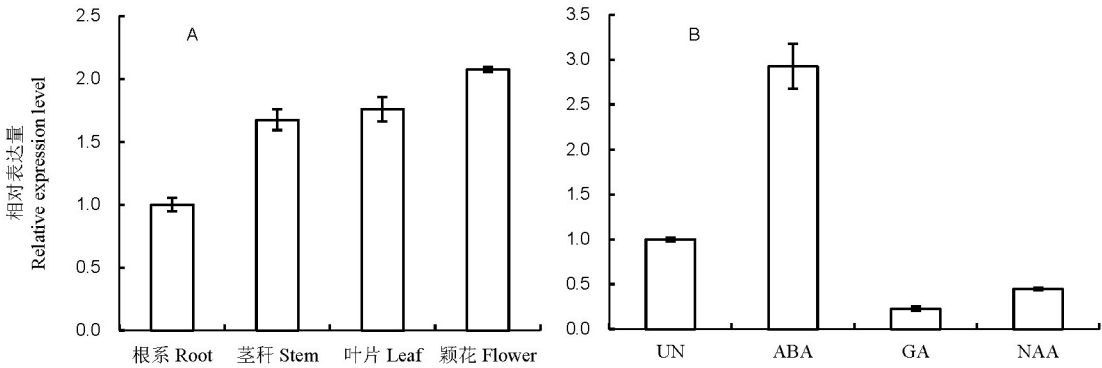
利用 PLACE 和 PlantCARE 软件对 *OsZRL* 基因上游序列元件的分析显示,*OsZRL* 基因转录起始位点上游-11 bp 处有 1 个生长素应答元件(auxin-responsive element)AACGAC,4 个脱落酸应答相关元件(ABRE-related sequence),分别为 ACACA TG (-60)、CACGCGC (-171, -195) 和 ACACGCG (-180);5 个赤霉素应答元件(gibberellin-responsive element),分别为 AAACA GA(-379, -557)、TATCCAC(-592)和 TAACA AA(-776, -785);在转录起始位点上游-478 bp 处有 1 个 GA、ABA 协同表达基因调控元件TTTTTTCC。此外,还有多个光应答元件(CACG AC, GATAA)以及叶肉细胞表达基因顺式元件



O. sativa NP 001055679 为 *OsZRL* 基因编码蛋白;重要的保守氨基酸半胱氨酸(C)和组氨酸(H)用星号标示。
O. sativa NP 001055679 is the encoded protein of *OsZRL*. The essential conserved amino acids, cysteine (C) and histidine (H) are indicated by asterisks.

图 1 *OsZRL* 同源基因的氨基酸序列比对

Fig. 1. Amino acid sequence alignment among *OsZRL* homologous genes.



A—成熟水稻植株根、茎、叶和花中 *OsZRL* 的表达; B—未处理(UN)、1 $\mu\text{mol/L}$ ABA、10 $\mu\text{mol/L}$ GA、10 $\mu\text{mol/L}$ NAA 诱导水稻幼苗中 *OsZRL* 的表达水平。

A, Expression of *OsZRL* in root, stem, leaf and flower of mature rice; B, Expression of *OsZRL* in untreated (UN) rice seedlings and seedlings treated with 1 $\mu\text{mol/L}$ ABA, 10 $\mu\text{mol/L}$ GA or 10 $\mu\text{mol/L}$ NAA.

图 2 水稻 *OsZRL* 基因表达分析

Fig. 2. Expression analysis of rice *OsZRL*.

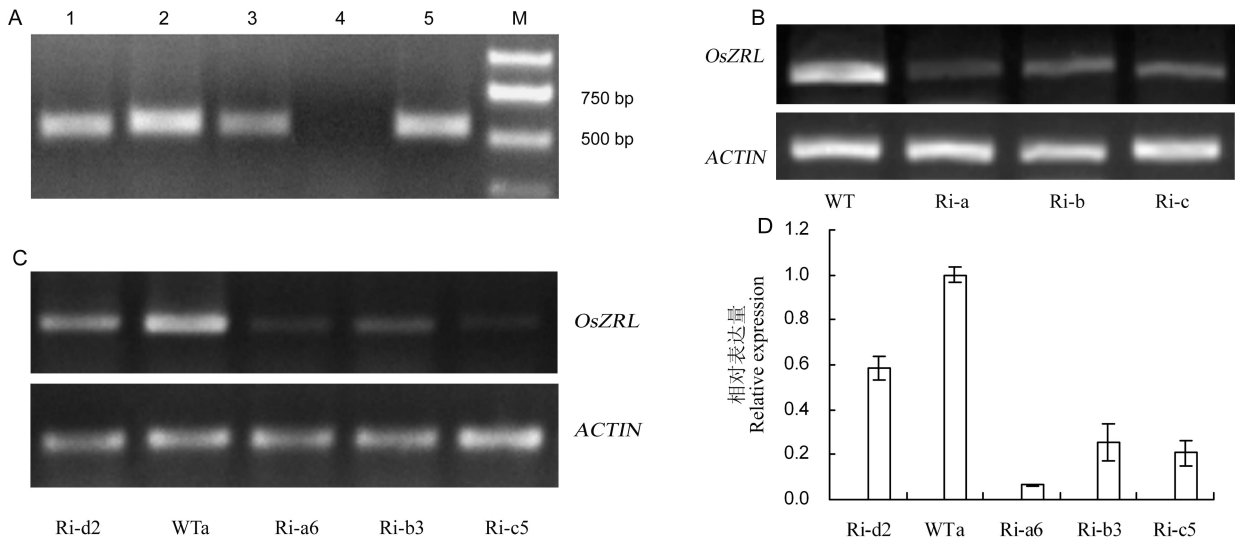
(CACT, TACT)。因而推测 *OsZRL* 基因的表达可能与 ABA、GA、IAA 和光信号有关。

2.2 *OsZRL* 基因表达分析

实时定量 PCR 分析结果表明, *OsZRL* 基因在成熟日本晴植株的各个组织均有表达, 在叶片、颖花中表达较多(图 2-A)。 *OsZRL* 在 1 $\mu\text{mol/L}$ ABA 处理时表达量升高, 而在 10 $\mu\text{mol/L}$ GA、10 $\mu\text{mol/L}$ NAA 诱导下表达水平略有降低(图 2-B)。

2.3 *OsZRL*-RNAi 转基因植株的获得

构建 pHB-*OsZRL*Ri 重组质粒, 利用农杆菌介导法进行水稻遗传转化。提取野生型、 *OsZRL* RNA 干涉转基因 T₀ 代植株基因组 DNA, 进行潮霉素抗性标记 *Hpt* 基因 PCR 扩增。阳性转基因植株扩增出 *Hpt* 目标条带(560 bp), 而野生型植株无相应扩增产物, 说明转化片段已整合于受体植株基因组中(图 3-A)。对鉴定的阳性植株进行 RT-PCR 分



A—*T₀*代转基因阳性植株 PCR 鉴定。1—3,转基因植株 Ri-a、Ri-b 和 Ri-c；4—阴性对照,野生型；5—阳性对照,pHB-*OsZRL*Ri 质粒；M—DL2000；B—半定量 PCR 鉴定野生型植株(WT)和 *T₀*代转基因植株 Ri-a、Ri-b、Ri-c 中 *OsZRL* 表达水平；C—半定量 PCR 鉴定 *T₁*代转基因植株中 *OsZRL* 的表达水平。Ri-a6、Ri-b3、Ri-c5、Ri-d2 和 WTa 分别是来自 *T₁*代转基因株系 Ri-a、Ri-b、Ri-c、Ri-d 和野生型的单株；D—定量 PCR 鉴定 *T₁*代转基因植株中 *OsZRL* 的表达水平。

A, PCR analysis of *T₀* positive transgenic plants. 1-3, Transgenic plants, Ri-a, Ri-b and Ri-c; 4, Negative control, wild type; 5, Positive control, pHB-*OsZRL*Ri; M, DL2000; B, Semi-quantitative PCR analysis of *OsZRL* expression levels in wild type and *T₀* transgenic plants, Ri-a, Ri-b and Ri-c; C, Semi-quantitative PCR analysis of *OsZRL* in *T₁* transgenic plants. Ri-a6, Ri-b3, Ri-c5, Ri-d2 and WTa are single plants derived from *T₁* transgenic lines, Ri-a, Ri-b, Ri-c, Ri-d and wild type, respectively; D, Real-time PCR analysis of *OsZRL* expression levels in *T₁* transgenic plants.

图 3 转基因植株的阳性鉴定和 *OsZRL* 表达分析

Fig. 3. Identification of positive transgenic plants and analysis of *OsZRL* expression.

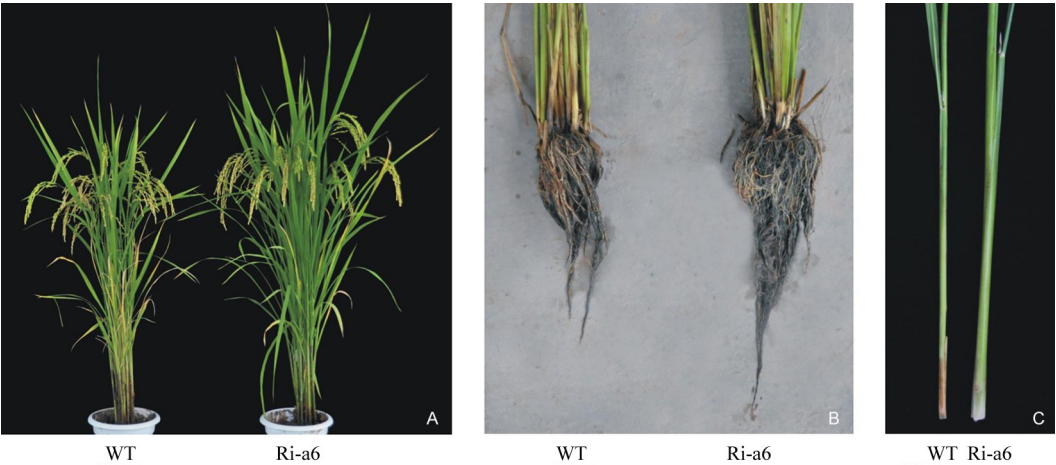
表 1 *OsZRL* RNA 干扰 *T₁*代转基因株系表型

Table 1. Performance of *OsZRL* RNA interference *T₁* transgenic lines.

株系(单株数)	株高	分蘖数	叶长	叶宽	穗长	每穗粒数	秕谷率	千粒重
Line(No. of single plants)	Plant height /cm	Tillering number	Leaf length /cm	Leaf width /cm	Panicle length /cm	Grain number per panicle	Sterile grain rate/%	1000-grain weight/g
Ri-d (<i>n</i> =20)	102.8±4.6	18±5	33.2±2.3	1.5±0.1	20.5±1.5	127±13	11.1±3.0	24.8±0.9
WT (<i>n</i> =20)	104.6±4.8	17±3	34.8±2.7	1.4±0.1	20.8±1.3	124±11	7.6±3.2	25.3±0.6
Ri-a (<i>n</i> =20)	107.3±3.9	17±3	37.5±2.8	1.6±0.1	21.1±0.9	128±13	21.2±4.9	25.6±0.7
Ri-a ^P (<i>n</i> =16)	108.9±1.9	17±4	38.1±2.8	1.6±0.1	21.3±0.7	127±14	22.6±4.2	25.7±0.7
Ri-a ^N (<i>n</i> =4)	101.2±3.7	16±2	35.2±1.8	1.5±0.1	20.1±0.9	130±10	15.6±3.1	25.4±0.7
Ri-b (<i>n</i> =20)	106.4±4.4	21±8	36.2±2.4	1.5±0.1	23.0±1.7	133±14	14.1±3.5	24.5±0.6
Ri-b ^P (<i>n</i> =15)	108.1±3.9	21±8	37.1±2.1	1.5±0.1	23.6±1.5	135±14	15.3±3.0	24.5±0.6
Ri-b ^N (<i>n</i> =5)	101.6±1.5	18±9	33.6±1.3	1.4±0.1	21.3±0.9	129±13	10.5±2.4	24.3±0.4
Ri-c (<i>n</i> =20)	106.9±5.3	15±3	37.6±2.6	1.5±0.1	21.5±0.7	128±9	17.3±3.0	24.7±0.8
Ri-c ^P (<i>n</i> =17)	107.7±5.2	15±3	38.1±2.6	1.6±0.1	21.5±0.7	129±8	18.0±2.5	24.8±0.8
Ri-c ^N (<i>n</i> =3)	102.6±3.5	17±5	35.3±1.5	1.5±0.1	21.3±0.6	121±12	13.1±1.5	24.1±0.4

WT—野生型；Ri-a~Ri-d—*T₁*代转基因株系；Ri-a^P、Ri-b^P和 Ri-c^P为分别来自 *T₁*代转基因株系 Ri-a、Ri-b、Ri-c 的阳性单株,Ri-a^N、Ri-b^N和 Ri-c^N为分别来自 *T₁*代转基因株系 Ri-a、Ri-b、Ri-c 的阴性单株。

WT, Wild type; Ri-a to Ri-d, *T₁* transgenic lines; Ri-a^P, Ri-b^P and Ri-c^P are positive plants derived from *T₁* transgenic lines, Ri-a, Ri-b and Ri-c, respectively. Ri-a^N, Ri-b^N and Ri-c^N are negative plants derived from *T₁* transgenic lines, Ri-a, Ri-b and Ri-c, respectively.



A—成熟期野生型(WT)与转基因植株(Ri-a6)；B—野生型和 Ri-a6 根系；C—野生型和 Ri-a6 茎秆。
A, Mature plants of wild type (WT) and transgenic plant (Ri-a6); B, Roots of WT and Ri-a6; C, Stems of WT and Ri-a6.

图 4 转基因植株 Ri-a6 表型

Fig. 4. Phenotype of transgenic plant Ri-a6.

析,结果表明获得了 *OsZRL* 基因干涉转基因 T_0 代植株。图 3-B 显示其中 3 个独立的 *OsZRL* 表达量明显下调转基因植株(Ri-a、Ri-b 和 Ri-c)半定量分析结果。

将 *OsZRL* 明显下调 T_0 代转基因植株(Ri-a、Ri-b 和 Ri-c)以及 *OsZRL* 表达未显著下调的阳性植株(Ri-d)进行再繁,获得 T_1 代株系。提取野生型、分别来源于转基因株系 Ri-a~Ri-d 的 PCR 鉴定阳性单株(Ri-a6、Ri-b3、Ri-c5 和 Ri-d2)叶片 RNA,利用 RT-PCR、实时定量 PCR 检测 *OsZRL* 基因表达水平。与野生型相比,Ri-a6、Ri-b3 和 Ri-c5 中 *OsZRL* 基因的表达量明显降低(图 3-C~D),表明已获得稳

定遗传的 RNAi 转基因植株。Ri-d2 则作为转基因对照株系参与表型分析。

2.4 转基因植株表型分析

与同期平行栽种野生型日本晴相比, T_1 代 RNAi 株系阳性植株株高、叶长、叶宽、穗长增加,但结实率下降(表 1)。*OsZRL* 明显下调表达单株(Ri-a6、Ri-b3 和 Ri-c5)植株变高、叶片变大,根系更发达,茎秆更为粗壮(图 4)。转基因植株的表型分析结果提示 *OsZRL* 基因是一个水稻生长发育的负调控因子。

将所获得 T_2 代纯合转基因株系种子与野生型日本晴种子进行发苗实验。转基因幼苗(Ri-a6、

表 2 10 μmol/L GA、1 μmol/L ABA 处理 5 d 后幼苗苗长

Table 2. Shoot lengths of seedlings treated with 10 μmol/ L GA or 1 μmol/ L ABA for 5 days.										cm
株系 Line	ddH ₂ O			GA			ABA			
	诱导前	诱导后	增长率	诱导前	诱导后	增长率	诱导前	诱导后	增长率	
	Before	After	Rate of	Before	After	Rate of	Before	After	Rate of	
	inducement	inducement	increase/%	inducement	inducement	increase/%	inducement	inducement	increase/%	
WT	3.8±0.6	6.1±0.8	60.4±7.6	3.8±0.3	8.2±1.0	117.7±10.2	3.9±0.5	5.4±0.6	39.9±5.5	
Ri-a6	4.0±0.7	6.6±0.7	65.9±14.3	4.0±0.5	10.4±0.8	159.9±17.1*	3.9±0.2	6.7±0.6	72.1±6.5*	
Ri-b3	3.8±0.4	6.4±1.0	69.7±12.4*	3.8±0.4	9.2±0.5	141.1±13.6*	3.8±0.4	6.3±0.8	65.6±9.0*	
Ri-c5	3.9±0.5	6.4±0.7	62.6±7.1	3.7±0.4	9.0±1.3	140.5±12.7*	4.1±0.6	6.6±0.7	62.5±10.4*	

* 表示与野生型相比有明显差异, $P<0.05$ 。转基因对照株系 Ri-d2 与野生型无明显差异,未列出。WT—野生型; Ri-a6、Ri-b3 和 Ri-c5 为 T_2 转基因幼苗; $n=15$ 。

* indicate significant difference compared with wild type plants, $P<0.05$. Transgenic line Ri-d2 without significant difference compared with wild type plants is not listed. WT, Wild type; Ri-a6, Ri-b3 and Ri-c5, T_2 transgenic seedlings; $n=15$.

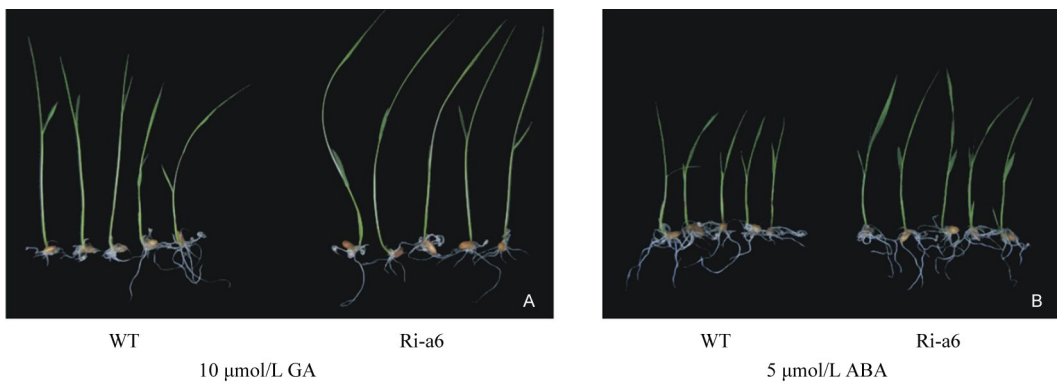


图 5 GA、ABA 诱导 5 d 后 T_2 代转基因幼苗表型

Fig. 5. Phenotypes of T_2 transgenic seedlings induced by GA and ABA for 5 days.

Ri-b3、Ri-c5)较野生型苗长增长更快(表 2)。在 GA 诱导下,野生型和转基因幼苗均表现为茎伸长加快,但转基因幼苗更为明显(表 2,图 5-A)。在 ABA 诱导下,野生型出现生长抑制,而转基因幼苗则对此浓度的 ABA 不敏感(表 2,图 5-B)。实验结果表明,*OsZRL* 基因功能受 GA、ABA 信号途径调控。

3 讨论

尽管对植物锌指蛋白的研究已进行了 20 多年,但所克隆的基因多局限于双子叶植物^[3-7]。在本课题组的前期工作中,分离了水稻锌指蛋白基因 *OsZRL*,其过表达转基因植株由于几乎无根系而无法长成成体植株^[10],但过表达转基因幼苗的表型显示 *OsZRL* 基因是水稻植株,至少是根系生长发育的负调控因子,并据此将该基因命名为 *OsZRL* (Zinc-finger Rootless)。为对 *OsZRL* 基因功能进行进一步分析,本研究利用 RNA 干涉和遗传转化方法下调 *OsZRL* 的表达,所获得 *OsZRL* 下调转基因植株的根系、茎叶均较野生型发达,进一步说明 *OsZRL* 在水稻生长发育中具有负调控作用。

在对 *OsZRL* 基因上游顺式元件分析时发现 1 个生长素应答元件、多个脱落酸、赤霉素响应元件,以及光诱导元件和叶肉细胞表达基因特征序列。*OsZRL* 基因的表达模式也显示, *OsZRL* 在富含叶肉细胞的成熟植株叶片中表达量较高;赤霉素、脱落酸诱导下 *OsZRL* 的表达水平发生变化。在 GA 诱导下,野生型植株 *OsZRL* 表达量下降,可以降低其对植株生长的负调节效应;*OsZRL* 下调转基因幼苗中,由于抑制了 *OsZRL* 的这种负调节作用而使茎节表现出较野生型更快的生长伸长趋势。在 ABA 诱

导下,野生型植株 *OsZRL* 表达量升高,可能通过适度的生长抑制而更有利于植物对逆境的应答;*OsZRL* 下调转基因幼苗中,由于 *OsZRL* 的减少而使其表现为对 ABA 生长抑制效应不敏感。因此,可以推测 *OsZRL* 基因的水稻生长负调节作用受植物激素 GA、ABA 调控。此外,本研究也对转基因幼苗进行了 10 μ mol/L NAA 诱导处理和暗培养实验,但转基因和野生型植株表型差异并不明显。生长素、光信号在 *OsZRL* 功能机制中的作用还有待进一步的研究。

植物锌指蛋白广泛参与植物的生长发育调控。如矮牵牛中锌指蛋白 EPF 家族基因,以及拟南芥中锌指蛋白 SUPERMAN、NNT 控制其生殖发育^[13-15]。水稻锌指蛋白基因 PROG1 在株型发育调控和驯化中起重要作用^[16]。本研究中 *OsZRL* 属 WIP 亚家族锌指蛋白基因^[17],相应功能研究还很少。已知在拟南芥中 WIP 锌指蛋白 TT1 (Transparent Testa 1)与种子外皮发育相关^[18],这一家族基因在水稻根系等植株发育中的功能还未见报道。在已有水稻根系发育研究中,*CRL1* 和 *WOX11* 基因分别通过介导生长素信号传导或生长素/细胞分裂素信号整合调控水稻不定根的生长发育^[19-20];另一类转录因子 bHLH (basic helix-loop-helix) 基因 *RSL4* 可以控制根部细胞的大小^[21]。本研究中,当通过过量表达使 *OsZRL* 表达水平较野生型提高约 25~30 倍时根系生长受到严重抑制^[10],反之,在 *OsZRL* 表达量降低的 RNA 干涉转基因植株中根系较为发达,是一个有益的田间性状,同时,茎秆更为粗壮,叶片也变大,均有利于产量的增加,但转基因植株中秕谷率的增加限制了这些有利因素。

*OsZRL*在颖花中表达量最高,锌指蛋白调控植物的花发育过程也多有报道^[9, 13-15], 如何降低 *OsZRL* 基因对水稻生殖发育的不利影响,无疑也是进一步深入研究 *OsZRL* 基因作用机制并应用于水稻遗传改良的一个重要方面。

参考文献:

[1] Gamsjaeger R, Liew C K, Loughlin F E, et al. Sticky fingers: Zinc-fingers as protein-recognition motifs. *Trends Biochem Sci*, 2007, 32(2): 63-70.

[2] Liu L, White M J, MacRae T H. Transcription factors and their genes in higher plants: Functional domains, evolution and regulation. *Eur J Biochem*, 1999, 262 (2): 247-257.

[3] Englbrecht1 C C, Schoof H, Böhm S. Conservation, diversification and expansion of C2H2 zinc finger proteins in the *Arabidopsis thaliana* genome. *BMC Genom*, 2004, 5: 39.

[4] Riechmann J L, Heard J, Martin G. *Arabidopsis* transcription factors: Genome-wide comparative analysis among eukaryotes. *Science*, 2000, 290: 2105-2110.

[5] Takatsuji H. Zinc-finger transcription factors in plant. *Cell Mol Life Sci*, 1998, 54(6): 582-596.

[6] Singh K, Foley R C, Onate-Sanchez L. Transcription factors in plant defense and stress responses. *Curr Opin Plant Biol*, 2002, 5(5): 430-436.

[7] 杨致荣, 王兴春, 李西明, 等. 高等植物转录因子的研究进展. *遗传*, 2004, 26(3): 403-408.

[8] Kozaki A, Hake S, Colasanti J. The maize ID1 flowering time regulator is a zinc finger protein with novel DNA binding properties. *Nucleic Acids Res*, 2004, 32(5): 1710-1720.

[9] Wu C, You C, Li C, et al. RID1, encoding a Cys2-His2-type zinc finger transcription factor, acts as a master switch from vegetative to floral development in rice. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105(35): 12915-12920.

[10] 玉晓红, 曾正明, 牛向丽, 等. 水稻锌指蛋白基因 *OsZRL* 过表达对根系发育的影响. *山西农业大学学报*, 2011, 11(4): 343-348.

[11] Fire A, Xu S Q, Montgomery M K, et al. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 1998, 391: 806-811.

[12] Hiei Y, Ohta S, Komari T, Kumashiro T. Efficient transformation of rice (*Oryza sativa* L.) mediated by *Agrobacterium* and sequence analysis of the boundaries of the T-DNA. *Plant J*, 1994, 6(2): 271-282.

[13] Kobayashi A, Sakamoto A, Kubo K, et al. Seven zinc-finger transcription factors are expressed sequentially during the development of anthers in petunia. *Plant J*, 1998, 13(4): 571-576.

[14] Sakai H, Medrano L J, Meyerowitz E M. Role of SUPERMAN in maintaining *Arabidopsis* floral whorl boundaries. *Nature*, 1995, 378: 199-203.

[15] Crawford B C W, Ditta G, Yanofsky M F. The *NTT* gene is required for transmitting-tract development in carpels of *Arabidopsis thaliana*. *Curr Biol*, 2007, 17(13): 1101-1108.

[16] Jin J, Huang W, Gao J P, et al. Genetic control of rice plant architecture under domestication. *Nat Genet*, 2008, 40: 1365-1369.

[17] Appelhagen I, Huep G, Lu G H, et al. Weird fingers: Functional analysis of WIP domain proteins. *FEBS Lett*, 2010, 584(14): 3116-3122.

[18] Sagasser M, Lu G H, Hahlbrock K, et al. *A. thaliana* TRANSPARENT TESTA 1 is involved in seed coat development and defines the WIP subfamily of plant zinc finger proteins. *Gene & Dev*, 2002, 16(1): 138-149.

[19] Inukai Y, Sakamoto T, Ueguchi-Tanaka M, et al. Crown rootless1, which is essential for crown root formation in rice, is a target of an AUXIN RESPONSE FACTOR in auxin signaling. *Plant Cell*, 2005, 17: 1387-1396.

[20] Zhao Y, Hu Y, Dai M, et al. The WUSCHEL-related homeobox gene *WOX11* is required to activate shoot-borne crown root development in rice. *Plant Cell*, 2009, 21(3): 736-748.

[21] Yi K, Menand B, Bell E, et al. A basic helix-loop-helix transcription factor controls cell growth and size in root hairs. *Nat Genet*, 2010, 42(3): 264-267.