

# 水稻转录因子基因 *OsSHR2* 的表达特征及其在营养生长中的调控作用

张占田 孙雅菲 艾昊 罗闻真 冯冰 孙文献 徐国华 孙淑斌\*

(南京农业大学 资源与环境科学学院, 南京 210095; \*通讯联系人, E-mail: sunshubin@njau.edu.cn)

## Expression Patterns and Regulation of Transcription Factor Gene *OsSHR2* in Vegetative Growth in Rice

ZHANG Zhantian, SUN Yafei, AI Hao, LUO Wenzhen, FENG Bing, SUN Wenxian, XU Guohua, SUN Shubin\*

(College of Resources and Environmental Science, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China; \*Corresponding author, E-mail: sunshubin@njau.edu.cn)

**Abstract:** 【Objective】*OsSHR2*(LOC\_Os03g31880) is a homologous gene of *AtSHR* of *Arabidopsis thaliana*, which falls into GRAS transcription factor family together with *OsSHR1*, *OsSCR1* and *OsSCR2* in rice. It has been reported that the transcription factor genes *SHR* and *SCR* regulate the development of roots and leaves, and participate in various life activities. We analyzed the temporal and spatial expression patterns and the way *OsSHR2* regulates vegetative growth in rice. 【Method】The function of *OsSHR2* was verified by bioinformatics analysis, expression pattern analysis, germination kinetic analysis and hydroponic experiments. 【Result】Biomechanical analysis showed that *OsSHR2*, *OsSHR1*, *OsSCR1* and *OsSCR2* had high homology with *SHR* subfamily and *SCR* subfamily in *Arabidopsis thaliana* and other species. The expression pattern analysis by qRT-PCR and *pOsSHR2::GUS* staining showed that *OsSHR2* was strongly expressed in the roots, leaves, vascular tissues and reproductive organs during the whole vegetative and reproductive growth stages, and especially in the stele of the root tip, lateral root primordium and the central of leaf and stem vascular tissue. Additionally, the relative expression of *OsSHR2* was down-regulated in Pi-deficiency in shoots and roots of wild type. The seed germination and hydroponic experiment analysis of CRISPR-Cas9 mutant *osshr2* showed that seed germination of *osshr2* was delayed and with lower germination rate than that of WT, in addition the length of shoot and root of *osshr2* were significantly shorter than WT under Pi-sufficient and Pi-deficient conditions. 【Conclusion】*OsSHR2* plays an important role in the development of shoots and roots, the formation of vascular tissue and various activity in vegetative and reproductive growth, which lays an important theoretical basis for the application of *OsSHR2* in molecular breeding.

**Key words:** rice; *OsSHR2*; temporal and spatial expression pattern; vegetative growth; phosphorus

**摘要:**【目的】水稻 *OsSHR2*(LOC\_Os03g31880)基因为拟南芥 *AtSHR* 的同源基因,与 *OsSHR1*、*OsSCR1* 和 *OsSCR2* 同属于水稻 GRAS 转录因子家族。已有研究报道,转录因子基因 *SHR* 和 *SCR* 共同调控植物根系、叶片的发育,并参与各项生命活动。本研究旨在阐明 *OsSHR2* 在水稻中的时空表达特征及其在营养生长中的调控作用。【方法】通过生物信息学分析、表达模式分析、萌发动力学分析和水培实验验证该基因的功能。【结果】生物信息学分析发现 *OsSHR2*、*OsSHR1*、*OsSCR1* 和 *OsSCR2* 与拟南芥和其他物种的 *SHR* 亚家族和 *SCR* 亚家族成员具有很高的序列一致性;表达模式和 *pOsSHR2::GUS* 材料染色分析发现, *OsSHR2* 在整个生长发育过程中的根系、叶片、维管组织和生殖器官中表达强烈,并集中在根尖的中柱、侧根原基和叶片及茎维管组织的中心表达,在野生型的地上部和根系中, *OsSHR2* 受缺磷影响下调表达;对获得的 *OsSHR2* 的 CRISPR-Cas9 突变体 *osshr2* 进行种子萌发实验和水培实验,发现与野生型相比, *osshr2* 的萌发时间延后,萌发率降低,在正常供磷和缺磷处理下, *osshr2* 的地上部和根系长度显著小于野生型。【结论】*OsSHR2* 在地上部和根系的发育、维管组织形成以及营养与生殖生长中具有重要作用,这为今后 *OsSHR2* 在分子育种等领域的应用奠定理论基础。

**关键词:** 水稻; *OsSHR2*; 时空表达特征; 营养生长; 磷

中图分类号: Q755; S511.01

文献标识码: A

文章编号: 1001-7216(2018)05-0427-10

收稿日期: 2017-03-30; 修改稿收到日期: 2017-08-18。

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(31672226); 国家转基因植物研究计划资助项目(2016ZX08009-003-005); 江苏省自然科学基金资助项目(BK20141367)。

随着日愈复杂的环境变化以及日愈多样化的人类需求,我国的水稻育种重点也不仅限于产量育种,科研工作者也侧重水稻品质多样性、环境高适应和低资源投入,这些对水稻分子育种提出了更高的要求。因此,不仅仅需要持续深入系统地了解水稻重要农艺性状的生长发育分子机制,还要完善现有分子育种相关的种质资源信息系统,培育具有杂种优势与理想基因型的高产优质、耐逆抗病的水稻新品种<sup>[1]</sup>。

细胞分裂、增殖和分化的主要调节者是转录因子,转录因子与DNA结合启动基因的表达,最终决定细胞和完整组织的特征,从而调控植物的发育过程<sup>[2]</sup>。水稻 *SHR2*(short root 2, LOC\_Os03g31880)与拟南芥 *AtSHR* 高度同源,与 *OsSHR1*(short root 1, LOC\_Os07g39820)、*OsSCR1*(scarecrow 1, LOC\_Os11g03110)、*SCR2*(scarecrow 2, LOC\_Os12g02870)同属于水稻 GRAS 转录因子家族<sup>[3-6]</sup>。之前研究显示了在不同物种中 *SHR* 和 *SCR* 同源基因的时空表达模式具有很高的保守性。拟南芥主根的结构是围绕中柱的3个同心单细胞层组成的基本组织,从根的外部依次为表皮、皮层和内皮层<sup>[7]</sup>,对植物体主根时空表达模式进行分析,发现 *AtSHR* 和 *AtSCR* 分别定位在拟南芥主根的中柱和内皮层中<sup>[8,9]</sup>, *AtSHR* 蛋白能激活 *AtSCR* 的转录表达,与 *AtSCR* 共同调控拟南芥主根基本组织形成的模式<sup>[4,5]</sup>,水稻同源基因(*OsSHR2* 和 *OsSHR1*)和双穗短柄草同源基因(*BdSHR*)转入拟南芥突变体 *atshr* 验证了同源基因在根系基本组织形成和植株生长的相似功能<sup>[6]</sup>。在水稻中, *OsSHR1* 和 *OsSCR1* 分别定位在根中柱和内皮层中<sup>[10]</sup>;在玉米中, *ZmSCR* 在根内皮层和静止中心(quiescent center)表达<sup>[11]</sup>;在白羽扇豆中, *LaSCR1* 和 *LaSCR2* 在根的内皮层及静止中心共表达<sup>[12]</sup>;在小黑杨中, *PtSHR1* 在小黑杨根尖的中柱表达<sup>[13]</sup>。对植物体胚发育过程中的时空表达模式分析表明, *AtSCR* 定位在拟南芥具有平周细胞分裂特性的胚初始细胞中<sup>[14]</sup>。 *OsSHR1* 在水稻发育早期种子、幼穗和胚中表达量较高<sup>[15]</sup>。对植物体叶片发育过程中的时空表达模式分析,发现 *AtSHR* 和 *AtSCR* 分别在叶片维管束和维管束鞘中表达<sup>[16,17]</sup>, *PtSHR1* 定位在小黑杨叶原基的前维管组织细胞的中心区域<sup>[13]</sup>, *OsSHR2* 和 *OsSCR2* 在水稻叶片的气孔、叶原基和叶舌发育前体细胞中表达,对气孔、叶片和叶舌的形成具有重要作用<sup>[18]</sup>。对植物体侧根发育过程中的时空表达模式进行分析,发现 *AtSHR* 在拟南芥侧根和根毛以及干细胞中表达<sup>[19,20]</sup>, *AtSCR* 定位

在侧根静止中心<sup>[21,22]</sup>, *PtSHR1* 也在小黑杨侧根中表达<sup>[13]</sup>。可见,在 GRAS 转录因子家族基因中, *SHR* 亚家族和 *SCR* 亚家族一致定位在植物体中根、叶片、维管组织和生殖器官,涉及根、叶片和维管组织的发育,与营养和生殖生长息息相关。

*SHR* 和 *SCR* 同源基因在根系、叶片和种子胚中均有表达,调控组织细胞的分裂、增殖和分化,它们的缺失或沉默会显著影响植物体的表型及生长发育。在拟南芥中,与野生型相比,突变体 *atshr* 和 *atscr* 根系变短,且 *atscr* 叶片变小<sup>[8,9]</sup>,水稻同源基因(*OsSHR1* 和 *OsSHR2*)以及双穗短柄草同源基因(*BdSHR*)转入拟南芥突变体 *atshr* 后其表型恢复且根系和叶片都有显著增长<sup>[6]</sup>,但 *AtSHR* 的部分沉默会加快拟南芥地上部和根系的生长速率<sup>[13]</sup>;白羽扇豆同源基因(*LaSCR1*)沉默材料的根系长度和生物量显著低于野生型<sup>[12]</sup>,但小黑杨同源基因(*PtSHR1*)的沉默材料却有更快的生长速率<sup>[13]</sup>。因此,推测 *SHR* 同源基因调控植物的生长存在剂量性效应。可见, *SHR* 同源基因的缺失或沉默会差异调控植物的营养生长。

植物的生长离不开各种营养元素,而磷是植物生长必需的大量营养元素之一,参与植物体内一系列的生长发育过程(光合作用和能量代谢等),磷也是细胞内DNA、RNA、蛋白质、磷脂、ATP和ADP等生物大分子的重要结构组成成分<sup>[23-25]</sup>。水稻中有很多基因家族响应外界磷素变化,如磷转运蛋白基因(*Pht1*)家族<sup>[26-29]</sup>和MYB-CC转录因子基因(*OsPHR*)家族<sup>[30-33]</sup>等。白羽扇豆同源基因 *LaSCR1* 和 *LaSCR2* 在缺磷条件下根系的表达量没有变化,但是调控了缺磷条件下排根的生成<sup>[12]</sup>。目前,水稻转录因子基因 *OsSHR2* 与磷素或者其他营养元素的响应关系还未见报道。

本研究通过生物信息学分析、实时荧光定量qRT-PCR、GUS染色观察、种子萌发动力学实验和水培实验探究 *OsSHR2* 的时空表达特征和在营养生长过程中的作用,为全面揭开 *OsSHR2* 在水稻中的功能提供依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 供试材料

供试材料包括东粳野生型(wild type, WT)、纯合CRISPR-Cas9突变体 *ossr2* 和 *OsSHR2* 的启动子接 *GUS* 组织定位材料 *pOsSHR2::GUS*。

## 1.2 不同物种的 *SHR* 和 *SCR* 同源基因生物信息学分析

水稻 *OsSHR2* 与 *OsSHR1*、*OsSCR1* 和 *OsSCR2* 同属于 GRAS 转录因子家族<sup>[3-6]</sup>。根据基因的登录号在 NCBI(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)和 RGAP(<http://rice.plantbiology.msu.edu/>)网站上获得相应的核苷酸序列或氨基酸序列。利用 DNAMAN 软件对序列进行氨基酸和核苷酸一致性分析; 将氨基酸序列输入基因家族分析网站 InterPro (<http://www.ebi.ac.uk/interpro/>), 分析基因的 GRAS 保守结构域和 VHIID 基序的存在及位置; 将部分已报道 GRAS 家族 *SHR* 和 *SCR* 同源基因氨基酸序列导入 ClustalX 和 MEGA 5.0 软件制作进化树, 自展值(bootstrap)设为 500。

## 1.3 组织定位材料和突变体材料的获得及鉴定

### 1.3.1 组织定位材料(*pOsSHR2::GUS*)的获得

利用 DNAMAN 软件对 *OsSHR2* 的启动子序列进行酶切位点分析, 结合表达载体 1300GN 确定使用限制性内切酶 *Hind*III 和 *Kpn* I, 通过 Primer Premier 5.0 设计含有相应酶切位点的特异性引物(F: 5'-GCAGGATCCCCGACTCAAACAA-3'和 R: 5'-GAGGGTACCCCTGAAGAGGGTAT-3')。利用特异性引物从水稻基因组中克隆了 *OsSHR2* 翻译起始位点(ATG)上游 2025 bp 的启动子序列, 将 PCR 扩增获得的 *OsSHR2* 启动子片段克隆到克隆载体 pEASY blunt 上, 测序验证序列的正确性, 利用 *Hind*III 和 *Kpn* I 从克隆载体 pEASY blunt 上双酶切序列正确的 *OsSHR2* 片段, 通过 T4 DNA 连接酶连接至带有 GUS 报告基因的 1300GN 表达载体上, 载体质粒转化至根癌农杆菌 EHA105 中。运用水稻转基因技术通过农杆菌浸染粳稻成熟胚愈伤组织将表达载体转入水稻基因组中, 组织培养获得  $T_0$  材料。通过 GUS 染色和潮霉素筛选从构建获得的  $T_0$  材料中鉴定出 10 个独立的株系, 从中挑选 3 个株系用于组织特异性分析。

### 1.3.2 突变体材料(*osshr2*)的获得

首先依据识别位点的要求选取 2 个 *OsSHR2* 靶点序列(5'-TTCCTCCCGCCAGTTCCTACT-3'和 5'-CGCCAGTTCCTACTCGGGAAC-3'), 并将 *Bsa* I 酶切位点整合到靶点序列, 后将各引物合成并退火, 与已被 *Bsa* I 酶切的 U3Pro::Bsa I -*Bsa* I ::sgRNA 载体连接, 转化大肠杆菌 DH5 $\alpha$ 。利用 Gateway 技术将 pOs-sgRNA 载体上的 sgRNA 和 spacer 序列置换到 Ph-Ubi-cas9-7 表达载体中, 转化大肠杆菌 DH5 $\alpha$ 。经测序验证后, 由农杆菌 EHA105 介导转入水稻愈

伤组织中, 获得 CRISPR-Cas9 突变体 *osshr2*。少量快速提取  $T_0$  各株系的 DNA 后, 利用特异性引物扩增靶点序列并测序, 从纯合株系中选择两个不同靶点序列突变的株系 *osshr2c-410* 和 *osshr2c-207*, 进行后续种子萌发动力学实验和水培实验。

## 1.4 水稻的水培及田间盆栽实验

将水稻种子用 75%乙醇消毒 1 min, 再用稀释的 30%NaClO 灭菌 30 min, 然后用去离子水冲洗干净。种子在 25℃的黑暗中萌发 3 d, 水培实验在光周期 16 h 光照(30℃)/8 h 黑暗(22℃)的人工气候室中进行, 相对湿度保持 70%左右。将 10 d 苗龄的水稻幼苗去种子移入 7 L 中转箱中, 每箱 20 棵苗, 转移到完全营养液中; 缺磷处理, 则设置正常供磷营养液(0.3 mmol/L  $KH_2PO_4$ , +P)和缺磷营养液(0.0 mmol/L  $KH_2PO_4$ , -P), 缺磷处理的营养液中用 0.3 mmol/L 的 KCl 补足  $K^+$  含量, 其他营养成分参照国际水稻研究所水稻完全营养液配方。每个株系设置 4 次重复, 每天调 pH 至 5.5, 每 3 d 换一次营养液。在水稻种子萌发动力学实验和水培实验中, 连续测量并观察记录水稻种子及幼苗在生长过程中地上部和根系长度; 采集水稻幼苗缺磷处理 7 d 的地上部和根系样品, 贮存于 -70℃下, 用于后续 *OsSHR2* 的缺磷表达模式分析和时空表达模式分析。

田间盆栽试验在南京农业大学牌楼基地试验田进行, 正常水肥管理, 试验所用土壤为江苏省南京市地区酸性黄棕壤(pH=5.08)。田间盆栽实验的水稻萌发和前期的生长与水培实验一致, 每个株系设置 4 次重复, 将生长到 21 d 苗龄的水稻幼苗移入盆钵中盆栽至收获。分别对 *pOsSHR2::GUS* 三个株系的苗期、扬花期和灌浆期不同组织、器官采样, 进行后续的 GUS 染色分析和时空表达模式分析。

### 1.5 *pOsSHR2::GUS* 材料全生育期的 GUS 染色

将 *pOsSHR2::GUS* 材料 3 个株系置于田间进行盆栽实验至收获, 期间分别在苗期、扬花期和灌浆期三个生长发育阶段剪取不同组织部位浸没在 GUS 染液<sup>[34]</sup>中, 37℃下过夜染色, 最后置于体视镜下观察染色组织部位。

## 1.6 植物组织样品 RNA 提取和实时荧光定量 PCR

使用 Trizol 试剂(Invitrogen)从贮存于 -70℃冰箱中的不同组织部位样品中提取总 RNA, 用反转录试剂盒(RR047A, TaKaRa)合成 cDNA, SYBY 定量 RT-PCR 试剂(DRR041A)进行实时 PCR 检测。分析 *OsSHR2* 的时空表达模式和缺素表达模式。其中 *OsActin*、*OsSHR1* 和 *OsSHR2* 的定量引物分别是(F: 5'-CAACACCCCTGCTATGTACG-3'、R: 5'-CATC

ACCAGAGTCCAACACAA-3')、(F: 5'-TGTGTGT CACGATCGACATTAATG-3'、R: 5'-CGCTGTTTC AAAACCCTACATG-3')和(F: 5'-GCGGGTTGAAT GGAAGAG-3'、R: 5'-TGCTGGCTGAAAAACCC TAAG-3')。

1.7 数据统计分析

用软件 Office Excel 2010、SigmaPlot 10.0 和 Adobe Photoshop CS6 进行数据统计分析和绘图。

2 结果与分析

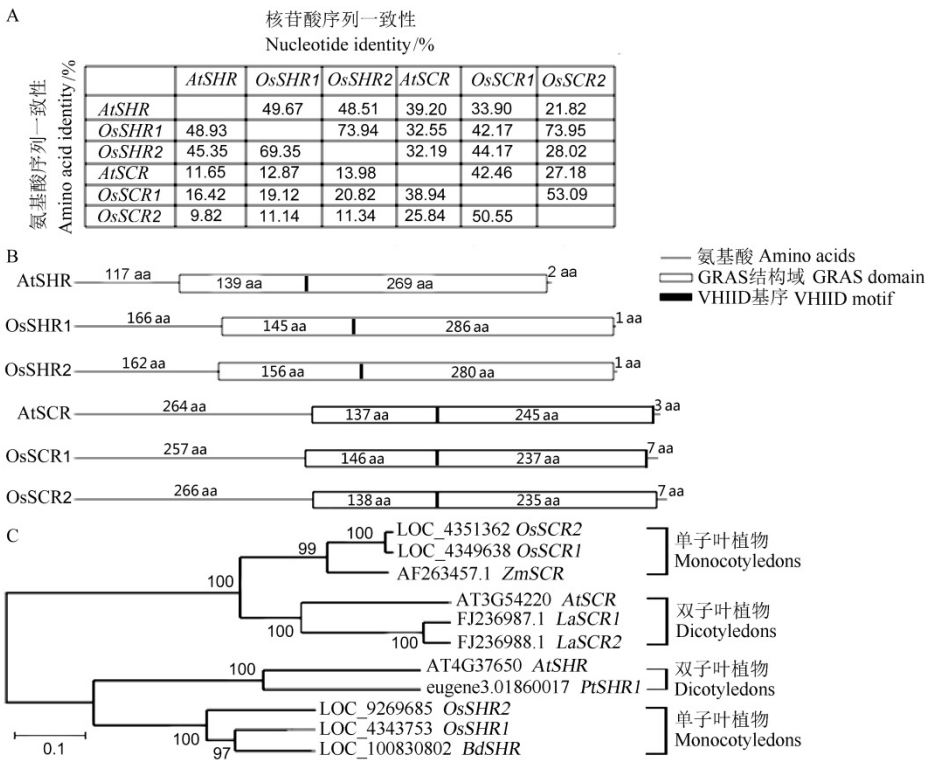
2.1 不同物种 SHR 和 SCR 同源基因的生物信息学分析

为了探究 *OsSHR2* 在水稻中的功能,推测 *SHR* 和 *SCR* 同源基因在不同物种中的相似功能,对 *OsSHR2* 与不同物种 *SHR* 和 *SCR* 同源基因进行生物信息学分析。如图 1 所示,水稻 *SHR* 和 *SCR* 亚家族基因与拟南芥对应同源基因的氨基酸和核苷酸

的序列一致性非常高,均超过 40%(*OsSCR2* 除外)。在水稻中,*SHR* 亚家族的氨基酸和核苷酸的序列一致性均超过 65%,*SCR* 亚家族均超过 50%(图 1-A)。可见,在拟南芥和水稻中,*SHR* 和 *SCR* 同源基因氨基酸和核苷酸序列一致性非常高;对拟南芥与水稻 *SHR* 和 *SCR* 同源基因进行 GRAS 保守结构域和 VHIID 基序的定位及预测,发现两者的 *SHR* 和 *SCR* 同源基因都具有 GRAS 保守结构域和 VHIID 保守基序(图 1-B);对 GRAS 家族中的 *SHR* 和 *SCR* 同源基因的进化树分析表明,不同物种 *SHR* 和 *SCR* 同源基因在单子叶与双子叶植物、*SHR* 亚家族与 *SCR* 亚家族成员具有明显不同的保守进化关系(图 1-C),可见,*SHR* 和 *SCR* 同源基因在物种进化过程中高度保守。

2.2 *OsSHR1* 和 *OsSHR2* 在水稻中的时空表达模式

为了分析 *OsSHR1* 和 *OsSHR2* 的时空表达模式,推测 *OsSHR2* 在水稻中的功能,以东粳野生型为实验材料,进行田间盆栽实验。在水稻生长发育过程



A—拟南芥和水稻的 *SHR* 和 *SCR* 同源基因氨基酸和核苷酸的序列一致性分析; B—通过基因家族分析网站 InterPro(<http://www.ebi.ac.uk/interpro/>)进行拟南芥与水稻的 *SHR* 和 *SCR* 同源基因 GRAS 保守结构域和保守基序 VHIID 的位置预测; C—不同物种 *SHR* 和 *SCR* 同源基因的进化树分析。

A, Sequence homology analysis of amino acids and nucleic acid of *SHR* and *SCR* homologous genes in *Arabidopsis thaliana* and rice; B, Prediction of the positions of *SHR* and *SCR* homologous GRAS conserved domains and conserved motifs in *Arabidopsis thaliana* and rice by InterPro (<http://www.ebi.ac.uk/interpro/>); C, Phylogenetic tree analysis of *SHR* and *SCR* homologous genes of different species.

图 1 不同物种 *SHR* 和 *SCR* 同源基因的生物信息学分析

Fig. 1. Bioinformatics analysis of *SHR* and *SCR* homologous genes of different species.

中, 分别在水稻的苗期(6周)、分蘖期(9周)、孕穗期(12周)、扬花期(14周)和灌浆期(16周)5个时期对水稻的不同部位(根、根茎结合处、叶片、叶鞘、剑叶、剑叶鞘、其他叶片、其他叶鞘、幼穗、茎、枝梗、穗轴、颖花和颖壳)进行取样, 提取RNA以及实时荧光定量PCR分析, 检测 *OsSHR2* 在水稻不同时期、不同组织中的表达强度。如图2所示, 在水稻不同时期, *OsSHR1* 和 *OsSHR2* 的表达强度基本一致且在水稻多个组织部位均有表达, 但在叶片和叶鞘中表达稍弱。在营养生长阶段(苗期和分蘖期), *OsSHR1* 和 *OsSHR2* 在根系和茎基部表达最强烈, 在叶片和叶鞘中表达较弱(图2-A, B); 在生殖生长阶段(孕穗期、扬花期和灌浆期), *OsSHR1* 和 *OsSHR2* 在根系表达最强烈, 维管组织和生殖器官的表达略强, 在叶片和叶鞘中表达稍弱(图2-C-E)。推测 *OsSHR1* 和 *OsSHR2* 可能在水稻生长发育的各个时期都发挥重要作用。

### 2.3 *OsSHR2* 在水稻中的组织定位分析

进一步研究 *OsSHR2* 在水稻组织器官中的时空

表达特征, 对获得的 *pOsSHR2::GUS* 材料进行 GUS 染色分析(图3)。*OsSHR2* 在各时期各组织几乎均有 GUS 表达。*OsSHR2* 具体在根尖(图3-A、B)、叶(图3-C、D)、叶原基(图3-E)、叶舌(图3-F)、维管组织(茎、茎基部和节)(图3-G~J)、颖壳、小穗轴(图3-K)和生殖器官(花丝、子房和胚)(图3-L、M)中强烈表达; 另外, *OsSHR2* 集中在水稻根尖的中柱、侧根发生处和叶片及茎维管组织的中心特异表达(图3-A~D, I)。推测 *OsSHR2* 可能调控水稻根系基本组织和地上部维管组织的发育, 在生长发育各时期的不同组织中发挥重要作用。

### 2.4 *OsSHR2* 正调控水稻的萌发及营养生长

为了探明 *OsSHR2* 对水稻种子萌发的影响, 进行了水稻种子萌发动力学实验(图4)。与野生型相比, 突变体 *osshr2* 在萌发14 d后地上部长度平均减少约39%, 根系长度平均减少约15%(图4-B、C); 与野生型相比, 突变体 *osshr2* 萌发时间延后(图4-A)、萌发率降低(数据未列)。根据突变体 *osshr2* 在水稻种子萌发过程中与野生型的差异和 *OsSHR2* 的表达定

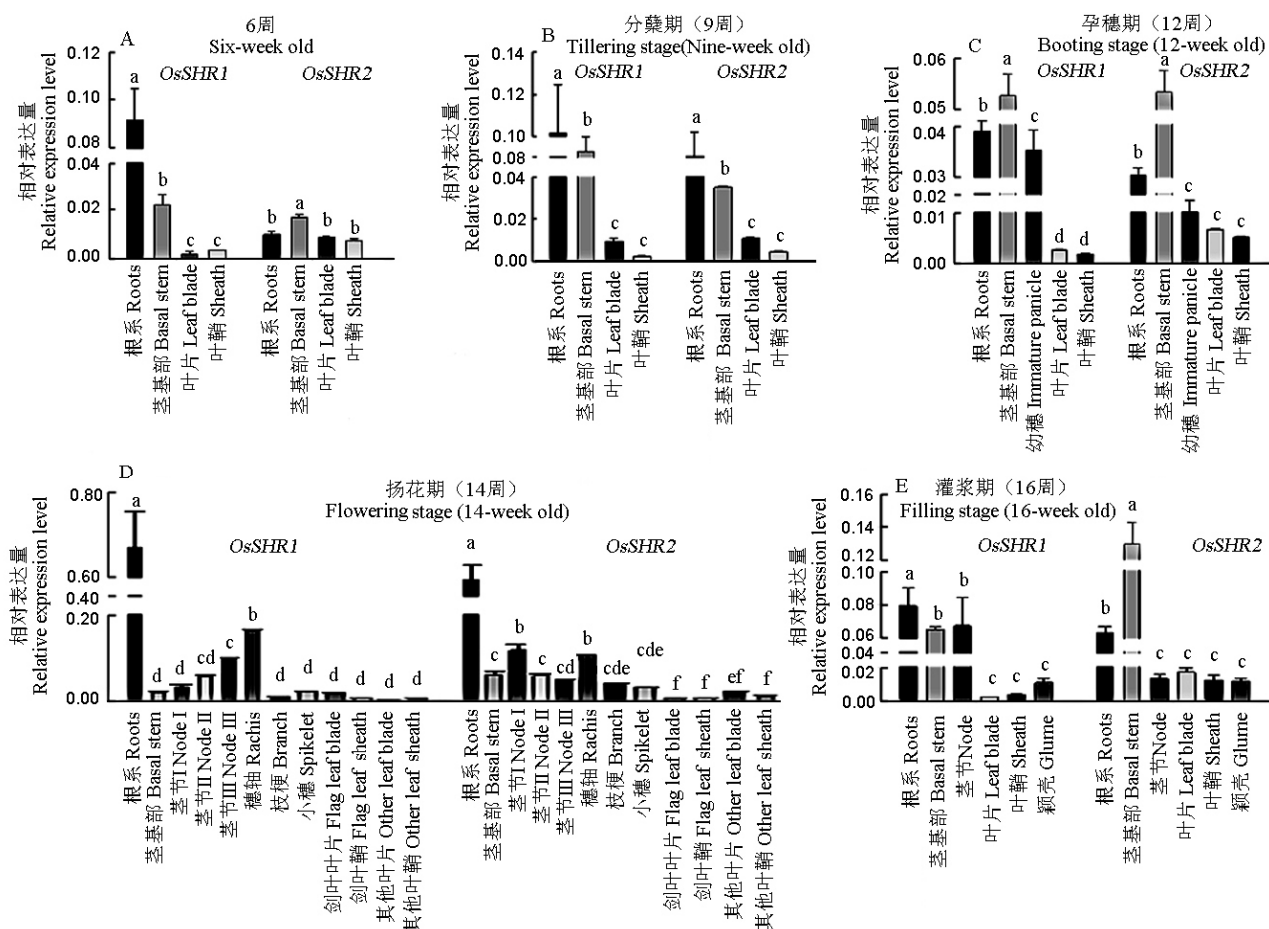
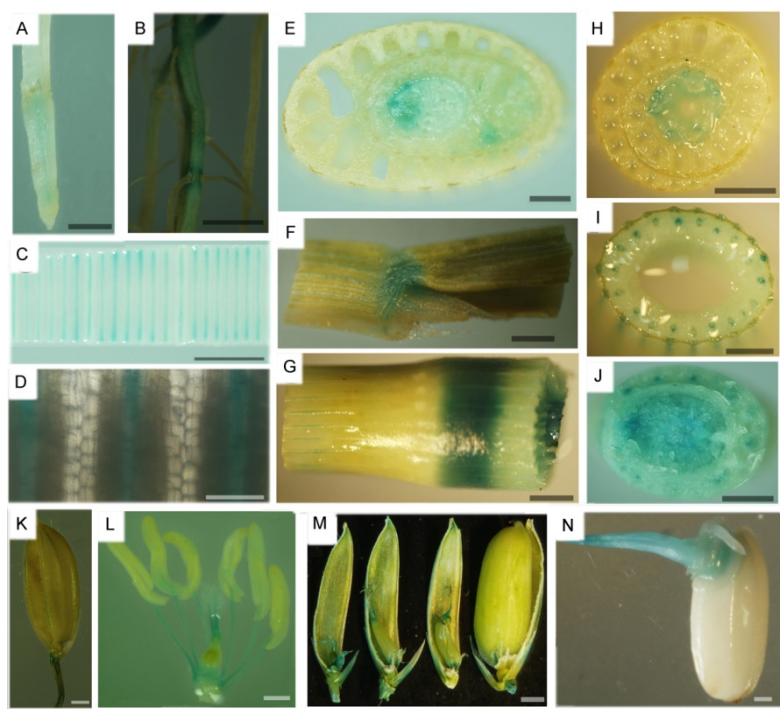


图2 *OsSHR1* 和 *OsSHR2* 在水稻中的时空表达模式分析

Fig. 2. Temporal and spatial expression pattern of *OsSHR1* and *OsSHR2* in rice.

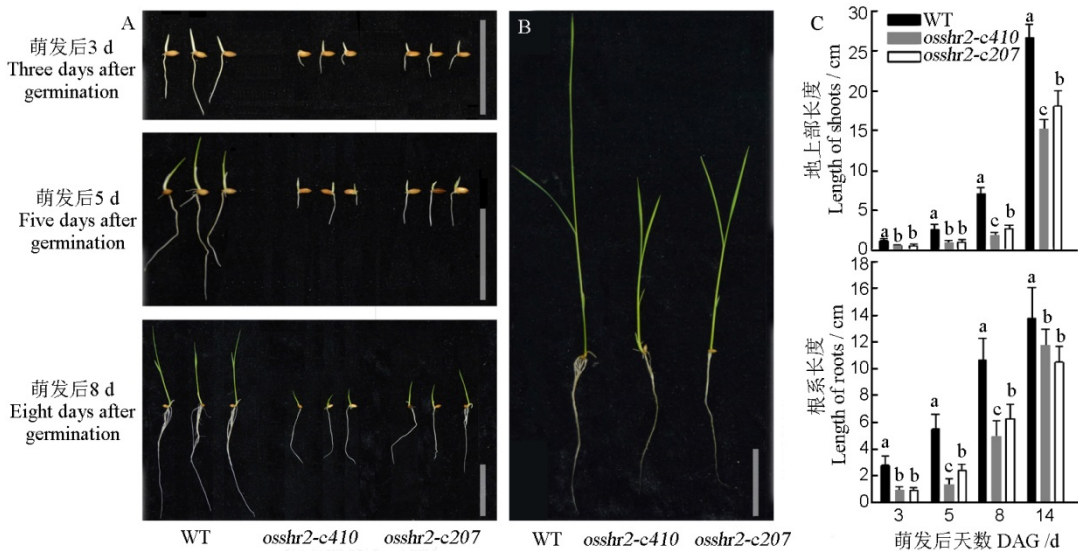


A—种子根; B—种子根及侧根; C—新叶; D—新叶的放大图; E—叶原基; F—叶舌; G—茎节; H—茎及叶鞘; I—茎; J—茎基部; K—颖壳及小穗轴; L—颖花; M—子房和柱头; N—胚(萌发后 3 d)。A~E, J: 水稻苗期; F, G, I, K~N: 水稻灌浆期; H: 分蘖期。A~J 中标尺为 2 mm; K~N 中标尺为 0.5 mm。

A, Seed root; B, Seed root and lateral root; C, Young leaf; D, The enlarged view of the young leaf; E, Leaf primordium; F, Ligule; G, Node; H, Stem and leaf sheath; I, Stem; J, Basal stem; K, Husk and rachilla; L, Spikelet; M, Ovary and stigma; N, Embryo(three days after germination). A-E, J: Seedling stage; F, G, I, K-N: Grain filling stage; H, Tilling stage. A-J, Bar=2 mm; K-N, Bar=0.5 mm.

图 3 pOsSHR2::GUS 材料的 GUS 染色鉴定

Fig. 3. Identification of *O<sub>s</sub>SHR2* promoter-driven tissue-specific GUS staining.

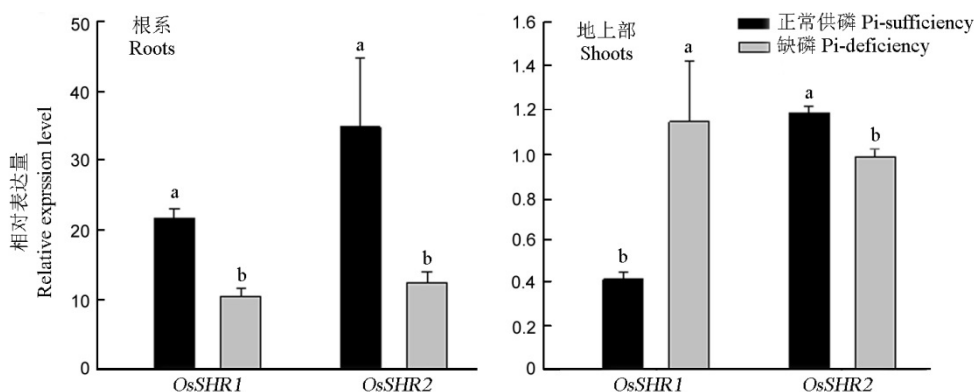


A—萌发表型(萌发后 3 d、5 d 和 8 d), 标尺为 5 cm; B—水培表型(萌发后 14 d), 标尺为 5 cm; C—材料地上部和根系长度统计(萌发后 3 d、5 d、8 d 和 14 d); DAG—萌发后天数。

A, Germination phenotype(3, 5 and 8 days after germination), bar=5 cm; B, Hydroponics phenotype(14 days after germination), bar=5 cm; C, Shoot and root length (3, 5, 8 and 14 days after germination); DAG, Day after germination.

图 4 WT 和突变体 *osshr2* 的萌发及水培下的表型

Fig. 4. Phenotype and statistics of seed germination and hydroponics experiments of WT and *osshr2*.

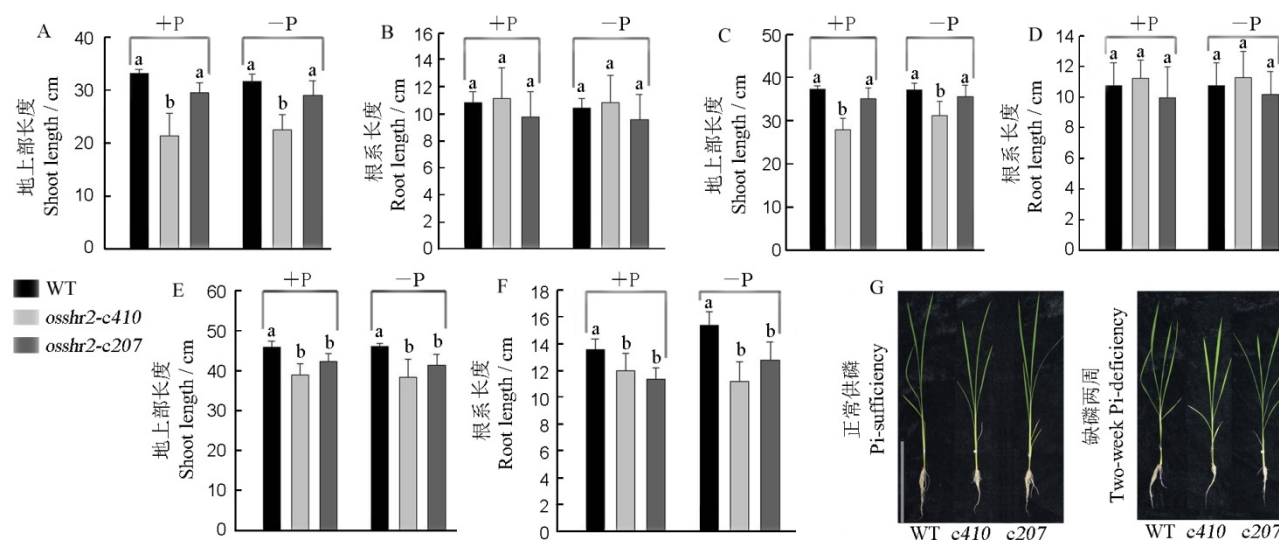


A—*OsSHR1* 和 *OsSHR2* 在水稻地下部的相对表达量; B—*OsSHR1* 和 *OsSHR2* 在水稻地上部的相对表达量。

A, The relative expression of *OsSHR1* and *OsSHR2* in the roots; B, The relative expression of *OsSHR1* and *OsSHR2* in the shoots.

图 5 *OsSHR1* 和 *OsSHR2* 在水稻正常供磷与缺磷条件下的相对表达量

Fig. 5. Relative expression level of *OsSHR1* and *OsSHR2* under Pi-sufficient and Pi-deficient conditions in rice.



A 和 B—缺磷 3 d; C 和 D—缺磷 1 周; E 和 F—缺磷 2 周; G—缺磷 2 周的表现, 标尺为 20 cm。

A and B, Pi-deficient lasting three days; C and D, Pi-deficient lasting one week; E and F, Pi-deficient lasting two weeks; G, The phenotype of material under Pi-sufficient and Pi-deficient lasting two weeks, bar=20 cm. *c410*, *osshr2-c410*; *c207*, *osshr2-c207*.

图 6 WT 和突变体 *osshr2* 在正常供磷和缺磷条件下的表现

Fig. 6. Phenotype of the wild type (WT) and *osshr2* under Pi-sufficient and Pi-deficient conditions.

位, 推测 *OsSHR2* 正调控水稻的萌发及营养生长。

## 2.5 *OsSHR1* 和 *OsSHR2* 在水稻正常供磷与缺磷条件下的表达模式分析

生物信息学分析发现, *OsSHR1* 和 *OsSHR2* 基因启动子均包含缺磷响应元件(W-BOX、PHO-like 和 P1BS), 推测 *OsSHR1* 和 *OsSHR2* 响应缺磷, 因此以东粳野生型为实验材料进行水培实验。缺磷处理 7 d 后, 检测 *OsSHR1* 和 *OsSHR2* 受缺磷相对表达量的变化。相对于正常供磷, 缺磷条件下 *OsSHR1* 和 *OsSHR2* 在根系的相对表达量分别降低了 52% 和 64%(图 5-A); 地上部 *OsSHR1* 相对表达量增长了 1.8 倍, *OsSHR2* 降低了 23%(图 5-B)。说明 *OsSHR1* 在根部和地上部对缺磷响应不同, 而 *OsSHR2* 地上

部和根系受缺磷下调。推测 *OsSHR1* 和 *OsSHR2* 在根部和地上部可能对缺磷响应机制不同, 从而在水稻磷素吸收响应过程中发挥不同的调控作用。

## 2.6 *OsSHR2* 正调控水稻营养生长阶段地上部和根系的长度

为了探究 *OsSHR2* 对水稻营养生长的影响和缺磷信号的响应, 进一步设计了不同磷处理条件下的水培实验。如图 6 所示, 无论是正常供磷还是缺磷条件下, 野生型地上部和根系的长度均大于突变体 *osshr2*。缺磷 2 周时, 与野生型相比, 突变体 *osshr2* 地上部长度平均降低约 13%, 突变体 *osshr2* 根系长度平均降低约 17%(图 6-E、F); 然而, 野生型和突变体 *osshr2* 的地上部和根系长度在正常供磷和缺磷

条件下的表型差异无明显不同。说明 *OsSHR2* 的缺失影响水稻正常供磷和缺磷条件下的营养生长, 但并不能推出 *OsSHR2* 受缺磷影响特异调控水稻营养生长表型。

### 3 讨论

在拟南芥和其他物种中, *SHR* 和 *SCR* 同源基因处于上下游关系, 它们作为转录因子共同调控植物根系和叶片的形成等生命活动。在对 *OsSHR2* 进行生物信息学分析的同时, 研究 *OsSCR1*、*OsSCR2* 和 *OsSHR1* 的序列结构信息可以进一步验证 *SHR* 同源基因在物种进化过程中极高的保守性和发挥的相似作用。*OsSHR2*(LOC\_Os03g31880)位于水稻第3染色体上, DNA全长2475 bp, cDNA全长1812 bp, 编码603个氨基酸, 只有1个外显子。*OsSHR2* 与 *OsSHR1*、*OsSCR1*、*OsSCR2* 同属于水稻 GRAS 转录因子家族<sup>[3-6]</sup>。VHIID 基序是 GRAS 转录因子家族的保守基序, 它是使 *SHR* 同源蛋白具有正常的核定位和蛋白互作作用的关键保守基序<sup>[6]</sup>。生物信息学分析水稻 *OsSHR2* 及其同源基因的氨基酸和核苷酸的序列一致性、GRAS 保守结构域和 VHIID 保守基序<sup>[4-6]</sup>的预测定位以及物种进化关系(图1)。根据以上3种生物信息学分析结果, 推测 *SHR* 同源基因在拟南芥和水稻中功能上的相似性、时空表达特征上的一致性和物种进化过程中的保守性。

在水稻中, *OsSHR1* 作为 *OsSHR2* 在水稻中亲缘关系最近的同源基因, 在对 *OsSHR2* 进行时空表达特征分析的同时一并研究 *OsSHR1* 的时空表达特征也可以验证 *SHR* 同源基因在物种进化过程中极高的保守性和发挥的相似作用。已有研究表明不同物种中 *SHR* 同源基因具有相似的定位及功能, 在植物体各组织器官中均有表达, 在根尖中柱、侧根、胚和叶片维管束中表达特异<sup>[6, 9-13]</sup>。本研究发现 *OsSHR1* 和 *OsSHR2* 在水稻不同时期不同组织器官均有表达, *OsSHR2* 在水稻根、维管组织和生殖器官表达强烈, *OsSHR2* 在根尖的中柱、侧根发生处和叶片及茎的维管组织中心强烈表达。可见 *OsSHR1* 和 *OsSHR2* 与其他物种同源基因的时空表达特征具有很高的一致性<sup>[6, 9-13]</sup>, 这可能与拟南芥和水稻 *SHR* 同源基因都具有 VHIID<sup>[6]</sup>保守基序有关。说明 *OsSHR1* 和 *OsSHR2* 可能在水稻生长发育的各个时期、各个组织中发挥重要调控作用并调控根系基本组织和地上部维管组织的发育。*OsSHR2* 缺失显著影响水稻的萌发和地上部、根系的长度, 说明

*OsSHR2* 在水稻的营养生长过程起非常重要的正调控作用。已有研究表明 *SHR* 同源基因在拟南芥和小黑杨中剂量性地调控植株的营养生长<sup>[8, 9, 13]</sup>, 可见, *OsSHR2* 与其他物种 *SHR* 同源基因在调控植物营养生长方面具有很高的保守性。

不同物种的 *SHR* 同源基因调控植物对养分的利用机理鲜有报道<sup>[12]</sup>, 但研究 *SHR* 同源基因与营养元素的关系具有非常重要的现实意义。在此基础上, 已知 *OsSHR2* 含缺磷响应元件 W-BOX、类 PHO 和 P1BS<sup>[31, 40]</sup>, 即 *OsSHR2* 在水稻缺磷条件下的表达量增加。但是在正常供磷和缺磷条件下, 突变体 *osshr2* 的地上部和地下部长度均小于野生型, 说明 *OsSHR2* 并不特异调控缺磷条件下的水稻营养生长表型。推测 *OsSHR2* 响应缺磷可能通过一条复杂的通路, 与缺磷响应基因共同调控植物体内磷素的吸收和分配。

本研究表明, *OsSHR2* 在物种进化过程中具有高度的保守性, 而且它在水稻的不同时期、不同部位均有表达, 其时空表达特征与其他物种同源基因有极高的一致性。在 *OsSHR2* 调控水稻萌发和营养生长过程中, 我们推测了 *OsSHR2* 参与磷素的调控可能通过一条极为复杂的通路。可见 *OsSHR2* 转录因子对水稻各项生命活动至关重要, 对该基因的研究可能在营养生长与分子育种方面有重要意义。

### 参考文献:

- [1] 朱义旺, 林雅容, 陈亮. 我国水稻分子育种研究进展. 厦门大学学报, 2016, 55(5): 661-671.  
Zhu Y W, Lin Y R, Chen L. Research progress of rice molecular breeding in China. *J Xiamen Univ*, 2016, 55(5): 661-671. (in Chinese with English abstract)
- [2] Riechmann J L, Heard J, Martin G, Reuber L, Jiang C Z, Keddie J, Adam L, Pineda O, Ratcliffe O J, Samaha R R, Creelman R, Pilgrim M, Broun P, Zhang J Z, Ghandehari D, Sherman B K, Yu G L. *Arabidopsis* transcription factors: Genome-wide comparative analysis among eukaryotes. *Science*, 2000, 290(5499): 2105-2110.
- [3] Pysh L D, Wysocka-Diller J W, Christine C, David B, Benfey P N. The GRAS gene family in *Arabidopsis*: Sequence characterization and basic expression analysis of the SCARECROW-LIKE genes. *Plant J Cell & Mol Biol*, 1999, 18(1): 111.
- [4] Cui H, Levesque M P, Vernoux T, Jung J W, Paquette A J, Gallagher K L, Wang J Y, Blilou I, Scheres B, Benfey P N. An evolutionarily conserved mechanism delimiting SHR movement defines a single layer of endodermis in plants. *Science*, 2007, 316(5823): 421-425.
- [5] Dolan L. SCARECROWS at the Border. *Science*, 2007, 316(5823): 377-378.

- [6] Wu S, Lee C M, Hayashi T, Price S, Divolb F, Henryb S, Pauluzzib G, Perinb C, Gallaghera K L. A plausible mechanism, based upon short-root movement, for regulating the number of cortex cell layers in roots. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2014, 111(45): 16184-16189.
- [7] Benfey P N, Scheres B. Root development. *Curr Biol*, 2000, 10(22): 813-815.
- [8] Benfey P N, Linstead P J, Roberts K, Schiefelbein J W, Hauser M T, Aeschbacher R A. Root development in *Arabidopsis*: Four mutants with dramatically altered root morphogenesis. *Development*, 1993, 119(1): 57-70.
- [9] Laurenzio L D, Wysockadiller J, Malamy J E, Pysh L, Helariutta Y, Freshour G, Hahn M G, Feldmann K A, Benfey P N. The *SCARECROW* gene regulates an asymmetric cell division that is essential for generating the radial organization of the *Arabidopsis* root. *Cell*, 1996, 86(3): 423-433.
- [10] 倪君. *OsIAA23* 介导的生长素信号胚后维持水稻根静止中心. 杭州: 浙江大学, 2011.  
Ni J. *OsIAA23*-mediated auxin signaling defines postembryonic maintenance of QC in primary in rice. Hangzhou: Zhejiang University, 2011. (in Chinese with English abstract)
- [11] Lim J, Benfey P N. Molecular analysis of the *SCARECROW* gene in maize reveals a common basis for radial patterning in diverse meristems. *Discuss Pap*, 2000, 12(8): 1307-1318.
- [12] Sbabou L, Bucciarelli B, Miller S, Liu J, Berhada F, Filali-Maltouf A, Allan D, Vance C. Molecular analysis of *SCARECROW* genes expressed in white lupin cluster roots. *J Exp Bot*, 2010, 61(5): 1351-1363.
- [13] Wang J, Anderssongunneras S, Gaboreanu I, Hertzberg M, Tucker M R, Zheng B, Lesniewska J, Mellerowicz E J, Laux T, Sandberg G, Jones B. Reduced expression of the *SHORT-ROOT* gene increases the rates of growth and development in hybrid poplar and *Arabidopsis*. *PloS ONE*, 2011, 6(12): e28878.
- [14] Wysockadiller J W, Helariutta Y, Fukaki H, Malamy J E, Benfey P N. Molecular analysis of *SCARECROW* function reveals a radial patterning mechanism common to root and shoot. *Development*, 2000, 127(3): 595-603.
- [15] 霍胜楠. 水稻胚胎发生相关基因的表达及其功能鉴定. 济南: 山东农业大学, 2008.  
Huo S N. Isolation and characterization of rice genes involved in embryo development. Jinan: Shandong Agricultural University, 2008. (in Chinese with English abstract)
- [16] Cui H, Kong D, Liu X, Hao Y. *SCARECROW*, *SCR-LIKE 23* and *SHORT-ROOT* control bundle sheath cell fate and function in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J Cell & Mol Biol*, 2014, 78(2): 319-327.
- [17] Gao X R, Wang C L, Cui H C. Identification of bundle sheath cell fate factors provides new tools for C3-to-C4 engineering. *Plant Signal & Behav*, 2014, 9(6): e29163.
- [18] Morikami A. The *SCARECROW* gene's role in asymmetric cell divisions in rice plants. *Plant J*, 2003, 36(1): 45-54.
- [19] Lucas M, Swarup R, Paponov I A, Swarup K, Casimiro I, Lake D, Peret B, Zappala S, Mairhofer S, Whitworth M, Wang J H, Ljung K, Marchant A, Sandberg G, Holdsworth M J, Palme K, Pridmore T, Mooney S, Bennett M J. Short-Root regulates primary, lateral, and adventitious root development in *Arabidopsis*. *Plant Physiol*, 2011, 155(1): 384-398.
- [20] Tian H, Jia Y, Niu T, Yu Q, Ding Z. The key players of the primary root growth and development also function in lateral roots in *Arabidopsis*. *Plant Cell Rep*, 2014, 33(5): 745-753.
- [21] Goh T, Toyokura K, Wells D M, Swarup K, Yamamoto M, Mimura T, Weijers D, Fukaki H, Laplace L, Bennett M J, Guyomarc'h S. Quiescent center initiation in the *Arabidopsis* lateral root primordia is dependent on the *SCARECROW* transcription factor. *Development*, 1991, 113(18): 3363.
- [22] Lavenus J, Goh T, Guyomarc'h S, Hill K, Lucas M, Voß U, Kenobi K, Wilson M H, Farcot E, Hagen G, Guilfoyle T J, Fukaki H, Laplace L, Bennett M J. Inference of the *Arabidopsis* lateral root gene regulatory network suggests a bifurcation mechanism that defines primordia flanking and central zones. *Plant Cell*, 2015, 27(5): 1368-1388.
- [23] Bielecki R. Phosphate pools, phosphate transport, and phosphate availability. *Ann Rev Plant Physiol*, 1973, 24(1): 225-252.
- [24] Muchhal U S, Pardo J M, Raghothama K G. Phosphate transporters from the higher plant *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, 93(19): 10519-105123.
- [25] Wang L, Shan L, Ye Z, Li Z, Du X, Liu D. Comparative genetic analysis of *Arabidopsis* purple acid phosphatases *AtPAP10*, *AtPAP12*, and *AtPAP26* provides new insights into their roles in plant adaptation to phosphate deprivation. *J Integr Plant Biol*, 2014, 56(3): 299-314.
- [26] Rausch C, Bucher M. Molecular mechanisms of phosphate transport in plants. *Planta*, 2002, 216(1): 23-37.
- [27] Paszkowski U, Kroken S, Roux C, Briggs S P. Rice phosphate transporters include an evolutionarily divergent gene specifically activated in arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99(20): 13324-13329.
- [28] Liu F, Chang X J, Ye Y, Xie W B, Wu P, Lian X M. Comprehensive sequence and whole-life-cycle expression profile analysis of the phosphate transporter gene family in rice. *Mol Plant*, 2011, 4(6): 1105-1122.

- [29] Zhang F, Sun Y, Pei W, Jain A, Sun R, Cao Y, Wu X N, Jiang T T, Zhang L, Fan X R, Chen A Q, Shen Q R, Xu G H, Sun S B. Involvement of *OsPht1;4* in phosphate acquisition and mobilization facilitates embryo development in rice. *Plant J Cell & Mol Biol*, 2015, 82(4): 556.
- [30] Rubio V, Linhares F, Solano R, Martín A C, Iglesias J, Leyva A, Paz-Ares J. A conserved MYB transcription factor involved in phosphate starvation signaling both in vascular plants and in unicellular algae. *Genes & Dev*, 2001, 15(16): 2122-2133.
- [31] Bustos R, Castrillo G, Linhares F, Puga M I, Rubio V, Perez-Perez J, Solano R, Leyva A, Paz-Ares J. A central regulatory system largely controls transcriptional activation and repression responses to phosphate starvation in *Arabidopsis*. *PLoS Genet*, 2010, 6(9): e1001102.
- [32] Wu P, Wang X. Role of *OsPHR2* on phosphorus homeostasis and root hairs development in rice (*Oryza sativa* L.). *Plant Signal & Behav*, 2008, 3(9): 674-675.
- [33] Zhou J, Jiao F, Wu Z C, Li Y Y, Wang X M, He X W, Zhong W Q, Wu P. *OsPHR2* is involved in phosphate-starvation signaling and excessive phosphate accumulation in shoots of plants. *Plant Physiol*, 2008, 146(4): 1673-1686.
- [34] Raghothama K G, Maggio A, Narasimhan M L, Kononowicz A K, Wang G, D'Urzo M P, Hasegawa P M, Bressan R A. Tissue-specific activation of the *OsMotin* gene by ABA, C<sub>2</sub>H<sub>4</sub> and NaCl involves the same promoter region. *Plant Mol Biol*, 1997, 34(3): 393-402.
- [35] Liao H, Rubio G, Yan X, Cao A, Brown K M, Lynch J P. Effect of phosphorus availability on basal root shallowness in common bean. *Plant & Soil*, 2001, 232(1): 69-79.

## 《植物遗传资源学报》2019 年征订启事

《植物遗传资源学报》是中国农业科学院作物科学研究所和中国农学会主办的学术期刊,中国科技核心期刊、全国中文核心期刊、中国科学引文数据库(CSCD)核心期刊,被国内多家数据库和 CA 化学文摘(美)(2014)收录,荣获 2015 年度中国自然资源学会高影响力十佳期刊。据《中国科技期刊引证报告》(核心版)统计,2017 年影响因子 1.180。据 CNKI《中国学术期刊影响因子年报》统计,2017 年复合影响因子 1.663,综合影响因子为 1.294,分别比 2016 年提高 11.24%和 3.03%。

报道内容为有关植物遗传资源基础理论研究、应用研究方面的研究成果、创新性学术论文和高水平综述或评论。如种质资源的考察、收集、保存、评价、利用、创新,信息学、管理学等;起源、演化、分类等系统学;基因发掘、鉴定、克隆、基因文库建立、遗传多样性研究。

双月刊, A4 开本, 216 页, 彩色铜版纸印刷。定价 68 元, 全年 408 元。各地邮局发行。邮发代号: 82-643。国内连续出版物号 CN11-4996/S, 国际连续出版物号 ISSN1672-1810。本刊编辑部常年办理订阅手续, 如需邮挂每期另加 3 元。

地 址: 北京市中关村南大街 12 号《植物遗传资源学报》编辑部

邮 编: 100081

电 话: 010-82105794; 010-82109494

网 址: <http://www.zwyczy.cn>

E-mail: [zwyczyxb2003@163.com](mailto:zwyczyxb2003@163.com); [zwyczyxb2003@caas.cn](mailto:zwyczyxb2003@caas.cn); [zwyczyxb2003@sina.com](mailto:zwyczyxb2003@sina.com)

微信 ID: 植物遗传资源学报

作者 QQ 群: 372958204