

水稻矮化少蘖突变体 *dlt3* 的基因定位和蛋白质组学分析

张敏娟^{1,2} 李帅军^{1,2} 陈琼琼¹ 景秀清¹ 陈坤明¹ 石春海^{3,*} 李文强^{1,*}

(¹西北农林科技大学 生命科学学院/旱区作物逆境生物学国家重点实验室, 陕西 杨凌 712100; ²西北农林科技大学 动物科技学院, 陕西 杨凌 712100; ³浙江大学 农业与生物技术学院 农学系, 杭州 310058; *通讯联系人, E-mail: wqli@nwsuaf.edu.cn; chhshi@zju.edu.cn)

Genetic Mapping and Proteomic Analysis of the Dwarf and Low-tillering Mutant *dlt3* in Rice

ZHANG Minjuan^{1,2}, LI Shuaijun^{1,2}, CHEN Qiongqiong¹, JING Xiuqing¹, CHEN Kunming¹, SHI Chunhai^{3,*},
LI Wenqiang^{1,*}

(¹State Key Laboratory of Crop Stress Biology in Arid Areas, College of Life Sciences, Northwest A&F University, Yangling 712100, China; ²College of Animal Science and Technology, Northwest A&F University, Yangling 712100, China; ³Department of Agronomy, College of Agriculture and Biotechnology, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China; *Corresponding author, E-mail: wqli@nwsuaf.edu.cn; chhshi@zju.edu.cn)

Abstract: 【Objective】Plant height is an important agronomic trait for crops because dwarf cultivars are more resistant to lodging. Many factors are responsible for dwarfism in plants, but gibberellin (GA) and brassinosteroid (BR) are the most intensely studied factors, since their molecular mechanism in regulating plant height is important for both basic and applied researches of plant breeding. **【Method】**In the present study, we reported the characterization and genetic mapping of a dwarf and low-tillering mutant, *dlt3*, gained through gamma ray mutagenesis of *O. sativa indica* 9311. The agronomic traits of the *dlt3* mutant including plant height, tiller number, lamina inclination, leaf length and width, and seed-setting rate were analyzed by morphological observation and statistics. The responses to GA and BR were detected based on the changes of leaf angle by exogenous application of BR and GA-induced α -amylase activity. The F₂ population and molecular markers were used for genetic mapping of the *dlt3* gene. Furthermore, isobaric tags for the relative and absolute quantitation (iTRAQ)-based proteomic method were applied to determine the proteomics of the *dlt3* mutant as compared with wild type. **【Result】**The plant height, tiller number, leaf angle, leaf length and seed-setting rate were significantly reduced in *dlt3*. The mutant also showed increased width of leaf blades, dark green and crinkled leaves. The mutant showed normal response to GA, but no response to exogenous BR. Genetic analysis revealed that the *dlt3* phenotype was controlled by a single recessive nuclear gene. The *dlt3* gene was mapped on the short arm of chromosome 6 between molecular markers RM2615 and R6M14. The iTRAQ-based proteomic analysis revealed that a total of 330 proteins were differentially expressed in the *dlt3* mutant, including 222 up-regulated proteins and 108 down-regulated proteins. It showed that four proteins were directly involved in BR signaling pathway and several proteins involved in plant height and developmental regulation were differentially expressed in the mutant. Furthermore, many proteins especially some kinase and phosphatase related proteins, Ca²⁺ binding related proteins and zinc finger containing proteins were significantly enriched in the mutant. **【Conclusion】**These results indicate that the *dlt3* is a BR-insensitive dwarf and low-tillering mutant. The *DLT3* locus, whose mutation results in abnormal BR signaling, could play important roles in regulating both plant height and other aspects of rice growth and development.

Key words: rice; dwarf and low-tillering; *dlt3*; brassinosteroid (BR); genetic mapping; proteomics

摘 要: 【目的】株高是农作物的重要农艺性状之一。导致株高变矮的原因很多, 最受关注的是赤霉素(GA)和油菜素内酯(BR)对株高的影响, 其调控机制的阐明对于植物科学基础研究及遗传育种研究均具有重要意义。【方法】利用 γ 射线诱变水稻材料 9311, 获得一个矮化少蘖突变体, 命名为 *dlt3* (*dwarf and low-tillering 3*), 通过形态学调查手段分析 *dlt3* 突变体的株高、分蘖数、叶夹角、叶形态和结实率等性状, 通过叶枕部位的伸直情况和 α -淀粉酶活性检测分析其对外源 BR 和 GA 应答的敏感性, 通过构建遗传群体和筛选分子标记对其进行基因定位, 并利用基于 iTRAQ 的定量蛋白质组学技术分析 *dlt3* 突变体的蛋白质组表达谱。【结果】表型分析显示 *dlt3* 突变体具有半矮化、少分蘖、叶夹角减小、叶表面皱褶、叶形变短变宽和结实率降低等多个突变表型; 突变体对 GA 正常应答,

收稿日期: 2018-01-07; 修改稿收到日期: 2018-02-10。

基金项目: 陕西省自然科学基金基础研究计划项目(2014JQ4134); 国家自然科学基金项目(31570181, 31200148); 中央高校基本科研业务费专项资金项目(2452018149)。

而对 BR 处理表现为不应答。遗传分析显示 *dlt3* 突变因单个基因隐性突变导致; 利用分子标记将 *dlt3* 基因定位在第 6 染色体标记 RM2615 和 R6M14 之间。定量蛋白质组学分析在 *dlt3* 突变体中鉴定到 330 个差异表达蛋白, 包括 222 个上调和 108 个下调表达蛋白。其中, 4 个差异表达蛋白与 BR 信号途径直接相关; 多个差异表达蛋白与水稻株高或生长发育调控直接相关; 此外, 多个差异表达蛋白, 如丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶、Ca²⁺结合蛋白和锌指结构域蛋白等在 *dlt3* 突变体中大量富集。【结论】*dlt3* 是一个 BR 不敏感的矮化少蘖突变体, *DLT3* 基因突变引起 BR 信号途径的异常, 进而可能导致胞内蛋白磷酸化信号转导和转录激活途径受到广泛影响, 从而引起植株生长发育等多方面性状异常。

关键词: 水稻; 矮化少蘖; *dlt3*; 油菜素内酯; 基因定位; 蛋白质组学

中图分类号: Q343.5; S511.01

文献标志码: A

文章编号: 1001-7216(2018)06-0529-09

株高是农作物的重要农艺性状之一, 第一次“绿色革命”就是利用半矮化植株来培育抗倒伏作物新品种, 从而大幅度提高了粮食产量^[1,2]。在水稻中, 已被报道的矮化或半矮化突变体基因超过 60 个(<http://www.ricedata.cn/gene/>), 大多数基因突变还伴随除株高外的其他农艺性状的改变。导致株高矮化的原因很多, 如植物激素代谢异常、细胞壁异常和细胞延伸异常等。目前研究最深入且最受关注的是植物激素, 尤其是赤霉素(gibberellin, GA)和油菜素内酯(brassinosteroid, BR)等对株高的调控^[3]。

植物激素作为植物体内的微量信号分子, 对于调节植物生长发育的各种过程和对环境的应答都具有十分重要的意义^[4]。GA 和 BR 调控多个相同或类似的生长发育进程。其中, GA 作为一大类四环二萜羧酸类植物激素, 几乎参与植物生长发育与形态建成的所有方面, 包括种子萌发、下胚轴伸长、根茎叶和果实的生长、花的诱导、种子发育以及发育时期的转换等^[3]。此外, 植物还通过调节内源性 GA 的水平来反馈其自身对环境因子的应答^[5]。BR 作为一类多羟基固醇类植物激素, 分布于植物的各种组织或器官中, 在结构上类似于动物的类固醇激素。BR 主要通过促进细胞延伸、分裂和分化等过程来调控植物的正常生长发育和形态建成, 包括种子萌发、根的延伸、茎秆伸长、叶片伸展、木质部分化、花粉管生长和开花等过程^[6]。

本研究对矮化少蘖突变体 *dlt3*(*dwarf and low-tillering 3*)进行了表型和主要农艺性状、GA 和 BR 应答调查, 并进行了遗传分析、分子标记定位以及基于 iTRAQ 技术的定量蛋白质组学分析, 深入分析了 *dlt3* 基因的功能, 为进一步探索 *DLT3* 基因调控水稻株型相关性状的分子机制奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

水稻 *dlt3* 突变体来源于籼稻 9311 经 γ 射线诱变

的 M₂ 群体。基因定位群体为 *dlt3* 突变体与粳稻品种 02428 杂交, 然后自交获得的 F₂ 群体, 在 F₂ 群体中通过表型鉴定筛选出具有 *dlt3* 突变表型的单株用于 DNA 提取及基因定位分析。野生型(9311)、*dlt3* 突变体及基因定位群体于 2014 年至 2016 年正季种植于陕西省勉县的水稻试验田。

1.2 方法

1.2.1 外源施加 GA 诱导 α -淀粉酶活性检测

GA 诱导 α -淀粉酶活性检测参考 Lanahan 和 Ho^[7] 报道的方法。将无胚的半粒米粒在马铃薯琼脂平板上培养, 然后用碘溶液染色观察。

1.2.2 幼苗对 BR 的敏感性检测

植株对外源 BR 敏感性检测根据 Tong 等^[8]报道的方法进行。将 24-表油菜素内酯(BL)用 75% 乙醇溶解, 分别使每 1 μ L 乙醇包含的 BL 含量为 0、10、100 和 1000 ng。用枪头精确吸取 1 μ L 不同浓度 BL 溶液滴加到发芽 5 d 的幼苗的顶叶叶尖部位, 3 d 后观察并测定第 2 叶叶枕部位的伸直情况。

1.2.3 分子标记检测及基因定位方法

水稻基因组 DNA 的提取采用 CTAB 法^[9]。SSR 分析的 PCR 体系包括 DNA 模板 1 μ L(约 200 ng), 10 μ mol/L 正反向引物各 1 μ L, 2.5 μ mol/L dNTPs 1.6 μ L, 10 \times PCR 缓冲液(含 Mg²⁺)2 μ L, Taq 酶 0.2 μ L(1 个单位), 用超纯水补足 20 μ L。PCR 程序为: 94 $^{\circ}$ C 下 5 min; 94 $^{\circ}$ C 下 30 s, 55 $^{\circ}$ C 下 30 s, 72 $^{\circ}$ C 下 30 s, 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 下 5 min。反应结束后取 2~3 μ L PCR 产物进行 8% 非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳, 银染后用数码相机拍照记录。基因定位时用上述所筛选到的连锁标记对定位群体进行分析, 进而确定目标基因的大概位置, 并进一步利用水稻 SSR 数据库中的标记, 逐渐向目标基因逼近。根据分子标记分析结果, 将具有 *dlt3* 突变体(母本)带型的单株重组数记为“0”, 具有 02428(父本)带型的单株重组数记为“2”, 同时具有双亲带型的单株重组数“1”。根据重组数及各分子标记在染色体上的物理位置绘制分子标记定位图谱。

1.2.4 定量蛋白质组学分析方法

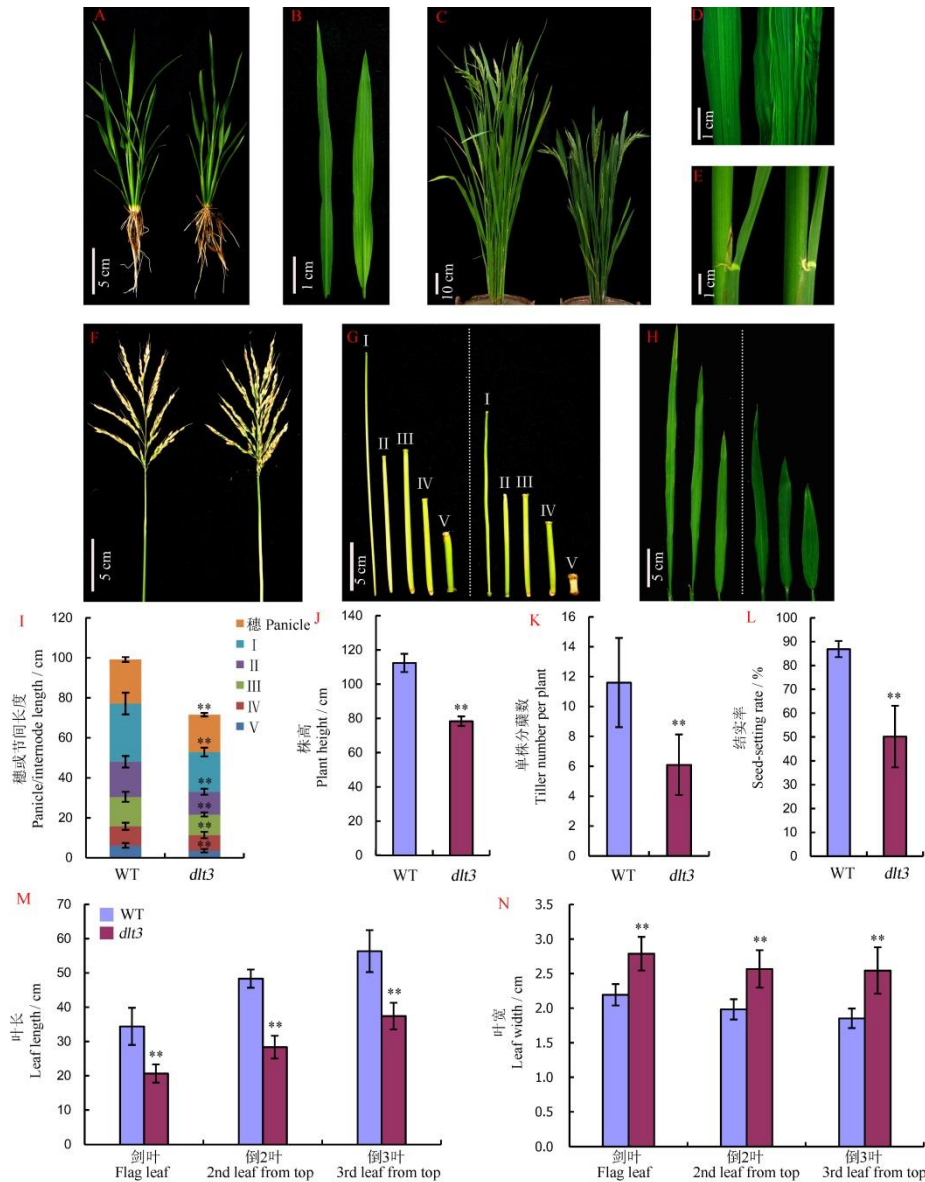
取分蘖早期的野生型和 *dlt3* 突变体植株叶片各两个生物学重复, 液氮速冻后保存备用。利用同位素标记相对和绝对定量(isobaric tags for the relative and absolute quantitation, iTRAQ)技术进行定量蛋白质组学分析(主要实验分析委托杭州景杰生物技术有限公司完成)。iTRAQ 实验的具体操作步骤参考 Wang 等^[10]已报道的方法。质谱数据用 Mascot 服务器(<http://www.matrixscience.com/>)进行分析, 然后进行蛋白质功能检索及生物信息学分析。本研究中相

对表达量比值(*dlt3*/WT)大于 1.3 或小于 0.77(即 1/1.3)且 *t* 检验值 $P < 0.05$ 被确定为差异表达蛋白。

2 结果与分析

2.1 突变体 *dlt3* 的表型分析

形态学观察发现 *dlt3* 突变体除了植株变矮、分蘖变少之外, 还具有多个异常表型(图 1)。与野生型相比, *dlt3* 突变体在分蘖期表现为叶片明显变宽(图 1-B), 并表现出半矮化、叶色深绿、叶表面皱褶、



A, B分别为分蘖期植株和叶片; C~H分别为成熟期的植株(C)、叶中部(D)、叶枕(E)、穗(F)、茎秆各节间(G)和植株上部三片功能叶的形态(H)。左为野生型, 右为突变体*dlt3*。图中所显示数值为平均数±标准差(n=12)。**表示突变体与野生型间的差异达0.01显著水平。

A and B, Plant and leaf blade at the tillering stage. C to H, Morphology of mature plant, middle portion of blade, lamina joint, panicle, internodes and top three leaf blades. The left represents wild type and the right the *dlt3* mutant. Mean \pm SD, $n=12$. **Difference between mutant and WT was significant at 0.01 level.

图 1 野生型与突变体 *dlt3* 的表型特征及农艺性状比较

Fig. 1. Phenotypic characterization of WT and *dlt3* mutant.

叶夹角变小、叶片变短、稻穗一次枝梗增多和节间长度变短等异常表型(图 1-C~H)。农艺性状统计学分析结果表明 *dlt3* 突变体的穗长(P)、第 I、II、III、IV 和 V 节间的长度都比野生型极显著降低(图 1-I)，导致 *dlt3* 突变体的植株高度极显著降低(图 1-J)；野生型植株在成熟期的有效分蘖数平均达到 12 个，而突变体植株平均约 6 个(图 1-K)，*dlt3* 突变体表现为少分蘖表型。此外，*dlt3* 突变体在成熟期时剑叶(顶叶)、倒 2 叶和倒 3 叶的叶片长度均极显著变小(图 1-L)，叶片宽度均极显著变大(图 1-M)，结实率也极显著降低(图 1-N)。上述结果表明 *dlt3* 突变导致水稻植株具有多个异常表型。

2.2 突变体 *dlt3* 对 GA 和 BR 的应答特性分析

同先前已报道的一些 GA 或 BR 相关的半矮化突变体的表型比较，本研究获得的 *dlt3* 突变体的表型具有 GA 相关矮化突变体的一些特征，即矮化、叶片变宽和叶色深绿等表型；同时 *dlt3* 也具有 BR 相关突变体的特征，即矮化，叶片皱缩、籽粒变圆等表型。因此，本研究进一步对外源 GA 诱导胚乳中 α -淀粉酶活性及外源施加 BR 对幼苗叶夹角的影响进行了分析。如图 2-A 所示，野生型和 *dlt3* 突变体在含 GA₃ 的淀粉平板上均能诱导产生 α -淀粉酶活性，两者并没有显著差异，表明 *dlt3* 突变体中与 GA 相关信号途径表现正常。我们进一步检测了野生型和 *dlt3* 突变体对 BR 的敏感性。如图 2-B 所示，用不同浓度 24-表油菜素内酯(BL)处理野生型和 *dlt3* 突变体幼苗，野生型幼苗随着施加 BL 浓度上升，叶枕伸展角度增大，表明野生型对 BR 正常应

答；而 *dlt3* 突变体在外源施加了不同浓度 BL，叶枕伸展角度完全未发生变化，表明 *dlt3* 突变体中 BR 相关信号途径发生异常，因而对外源 BR 处理不应答。上述结果表明 *dlt3* 突变体是一个对 BR 不敏感的矮化少蘖突变体。

2.3 突变体 *dlt3* 的遗传分析及分子标记定位

为了进行 *dlt3* 基因的遗传定位，本研究将 *dlt3* 突变体与 02428 杂交，F₁ 植株表现为正常表型。在获得的 450 个 F₂ 植株中，106 株表现为突变表型，其与 *dlt3* 突变体在株高、叶色、叶片形状和叶夹角等突变性状均表现一致。F₂ 群体中野生型和突变体植株分离比符合 3:1，表明 *dlt3* 突变体表型是由于细胞核单基因隐性突变所致。

本研究利用 SSR 标记对 *dlt3* 突变体进行了基因定位。首先，我们对水稻全基因组范围内 350 对 SSR 标记在 *dlt3* 突变体和 02428 之间的多态性进行了筛选，在每条染色体上获得了 7~8 对基本均匀分布的多态性 SSR 标记，然后用这些标记对 106 个 F₂ 突变单株进行 SSR 分析。结果发现第 6 染色体上多个分子标记(表 1)与 *dlt3* 基因连锁，标记 RM1163 与 *dlt3* 基因共发生了 21 次交换，重组率(21/212)为 9.9%，RM1163 与 *dlt3* 基因连锁(图 3)。RM1163 在第 6 染色体的物理位置为 4201 kb，进一步分析发现 RM1163 右侧的分子标记与 *dlt3* 基因的连锁程度更加紧密，随后在 RM1163 右侧发展了多个分子标记，包括 RM3408、RM19556、RM2615、RM276、R6M14 和 RM527 等(表 1，图 3-A)。

利用分子标记将 *dlt3* 基因定位到第 6 染色体短

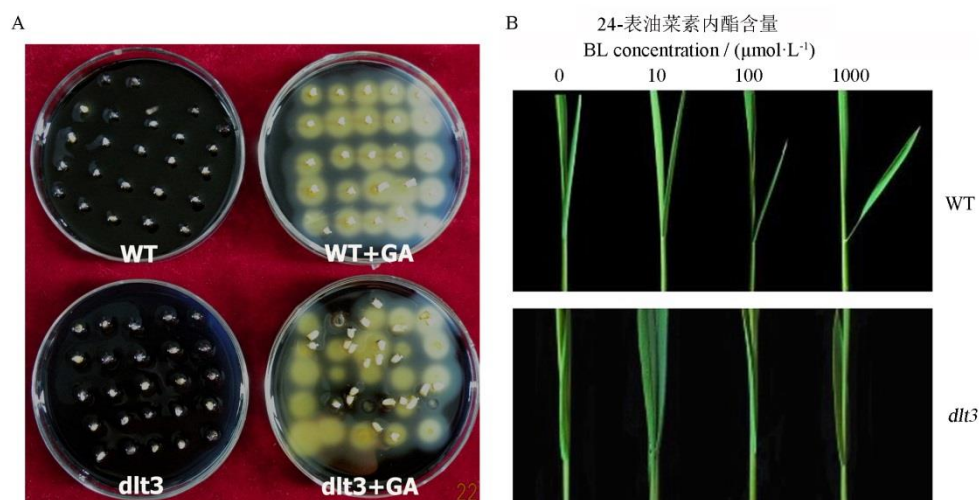
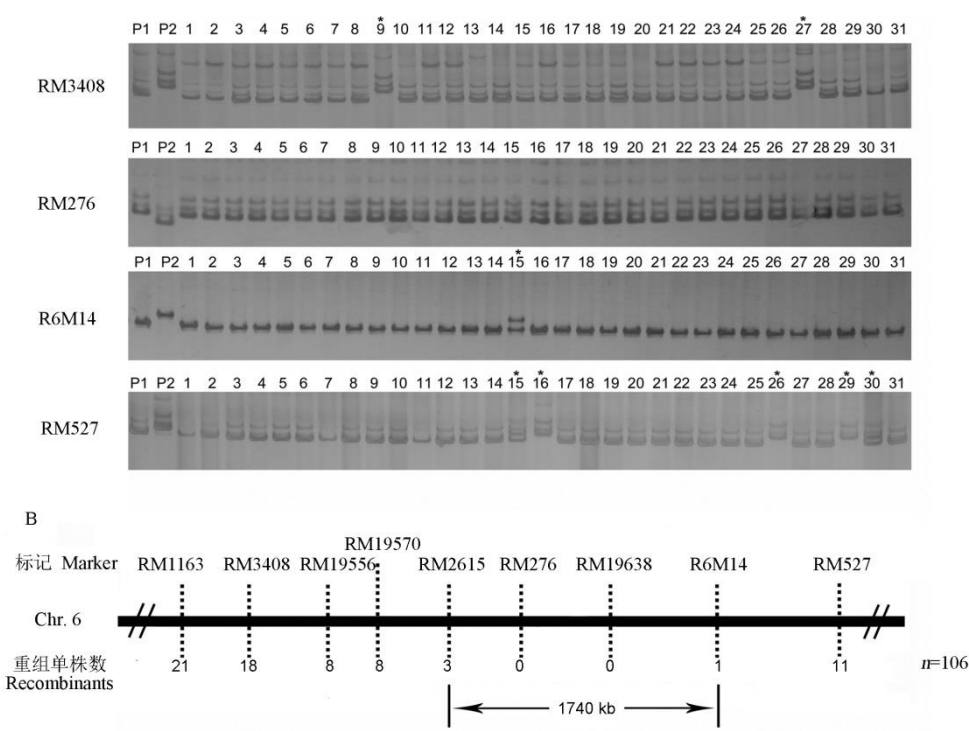


图2 野生型与突变体*dlt3*对外源GA(A)和BR(B)的应答分析

Fig. 2. Responses of WT and *dlt3* to exogenous GA and BR based on the changes of α -amylase activity(A) and lamina inclination(B).

表 1 本研究中 *dlt3* 基因定位所用分子标记及序列

标记名称	正向引物序列(5'-3')	反向引物序列(5'-3')	染色体	物理位置
Marker name	Forward primer sequence	Reverse primer sequence	Chromosome	Physical position/kb
RM1163	TGGACGCGGATAGGAGGAGACG	TCCTCCGCAAGGTCGGTTTCC	6	4021
RM3408	AGTGAATCCCATCAGATCACTCC	CATATCAAATCGCCGAGAAGG	6	4608
RM19556	TTCTGGCCTATGAGGGATGATCG	ACCAAATATCAAGCCTGCACAGC	6	5249
RM19570	CCCAGATATTCTGTGTGATCATGAGG	GAGTGAATGTGAGCCGTCTATTGG	6	5422
RM2615	ATCTCGTTCATACTGCTTGACC	GACTGGTTTCCTTCATGTTACC	6	5970
RM276	GTCCTCCATCGAGCAGTATCAGC	CTAGCAAGACATGGACCTCAACG	6	6241
RM19638	CCACACTGTACCGGTCTGAAGACG	CTCTACAACCTGCAGCCCTGTCAGC	6	6387
R6M14	AAATGTCCATGTGTTTGCTTC	CATGTGTGGAATGTGGTTG	6	7710
RM527	CGGTTTGTACGTAAGTAGCATCAGG	TCCAATGCCAACAGCTATACTCG	6	9874



A 为 *dlt3* 基因的连锁分子标记 RM3408、RM276、R6M14 和 RM527 检测部分 F₂ 突变体单株的电泳分析结果；B 为 *dlt3* 基因的初定位结果，目的基因被定位在第 6 染色体分子标记 RM2615 和 R6M14 区间。*代表重组单株。

A, Genotyping of F₂ mutant plants by *dlt3*-linked molecular markers RM3408, RM276, R6M14 and RM527; B, Genetic mapping of *dlt3* gene by the molecular markers. *Recombinant.

图 3 分子标记连锁分析及基因定位

Fig. 3. Genetic linkage analysis and molecular mapping of *dlt3* gene.

臂(图 3-B)。分子标记 RM1163、RM3408、RM19556、RM19570 和 RM2615 分别检测到的交换染色体数目为 21、18、8、8 和 3；RM276 和 RM19638 与目的基因共分离，所检测到的交换数目均为 0；R6M14 和 RM527 则位于 *dlt3* 基因的右侧，分别检测到的交换数目为 1 和 11。*dlt3* 基因被定位到第 6 染色体 SSR 标记 RM2615 和 InDel 标记 R6M14 之间，所在

区间物理距离约 1740 kb；区间内分子标记 RM276 和 RM19638 与 *dlt3* 基因共分离。

2.4 突变体 *dlt3* 的 iTRAQ 定量蛋白质组学分析

对生长至分蘖早期的野生型和 *dlt3* 突变体进行基于 iTRAQ 技术的定量蛋白质组学分析(表 2)。在野生型和 *dlt3* 突变体中检测到 4500 个蛋白，其中有 3400 个蛋白的表达量已被 iTRAQ 技术所定

表 2 iTRAQ 定量蛋白质组学分析鉴定到的部分差异表达蛋白

Table 2. Selected differentially expressed proteins identified by iTRAQ-based quantitative proteomic analysis.

蛋白登录号 Protein accession	水稻基因号 RAP_locus	蛋白质功能描述 Protein description	表达量变化 Ratio (<i>dlt3</i> /WT)	P 值 P-value	上(下)调 Regulation
油菜素内酯相关蛋白 Brassinosteroid related proteins					
Q6Z730	Os02g0122300	Translation initiation factor eIF3 subunit domain containing protein, Brassinosteroid receptor kinase (BR1)-interacting protein 121, BIP121	0.651	1.08×10^{-2}	Down
Q0JBZ3	Os04g0501600	AT hook, DNA-binding, conserved site domain containing protein, brassinosteroid receptor kinase (BR1)-interacting protein 106, BIP106	1.372	9.26×10^{-3}	Up
Q6K624	Os02g0612800	AT hook, DNA-binding, conserved site domain containing protein, brassinosteroid receptor kinase (BR1)-interacting protein 135, BIP135	1.374	4.11×10^{-2}	Up
Q0J5J5	Os08g0430500	14-3-3 protein, Florigen receptor, G-box factor 14-3-3c protein, OsGF14c	3.355	3.15×10^{-3}	Up
生长素相关蛋白 Auxin related proteins					
Q0DSY8	Os03g0280000	Similar to MDR-like ABC transporter, P-Glycoprotein 13, OsABCB13, OsPGP13	1.329	2.71×10^{-2}	Up
Q0IR61	Os11g0673200	Similar to Auxin-induced beta-glucosidase	1.828	1.65×10^{-2}	Up
Q84QW4	Os08g0524400	Protein of unknown function DUF568, DOMON-like domain containing protein, auxin-responsive family protein AIR12	1.857	4.48×10^{-2}	Up
激酶和磷酸酯酶相关蛋白 Kinase and phosphatase related proteins					
Q0D6J6	Os07g0472400	Serine/threonine protein kinase-related domain containing protein	0.548	1.01×10^{-2}	Down
Q69NF8	Os09g0529900	Pyruvate/Phosphoenolpyruvate kinase, catalytic core domain containing protein	0.716	8.12×10^{-3}	Down
Q5Z8F2	Os01g0337600	Suppressor of Mek, PH domain-like protein	0.697	1.38×10^{-2}	Down
Q0D4F7	Os07g0628700	Similar to Receptor protein kinase	1.328	1.51×10^{-2}	Up
Q5QLG3	Os01g0682500	Similar to Protein Kinase C630.09c	1.431	1.86×10^{-3}	Up
Q2R2T6	Os11g0549615	Ser/Thr protein phosphatase family protein, purple acid phosphatase 3a	1.889	2.72×10^{-2}	Up
Q0IP84	Os12g0236400	Adenylate kinase A (EC 2.7.4.3) (ATP-AMP transphosphorylase)	1.471	1.44×10^{-2}	Up
Q60DT7	Os05g0190500	Similar to acid phosphatase, HAD superfamily phosphatase, VEGETATIVE STORAGE PROTEIN 2, OsVSP2	1.550	3.50×10^{-2}	Up
Q6AVA8	Os05g0405000	floury endosperm 4, pyruvate orthophosphate dikinase, OsPBDK	1.641	7.29×10^{-4}	Up
Q6H444	Os09g0279400	Rhodanese-like domain containing protein, Rhodanese / Cell cycle control phosphatase superfamily protein	2.096	8.54×10^{-3}	Up
Q0IPL3	Os12g0189300	Pyruvate/Phosphoenolpyruvate kinase, catalytic core domain containing protein	2.248	6.06×10^{-4}	Up
Q6KA61	Os02g0285800	Similar to GTP-binding protein typA (Tyrosine phosphorylated protein A)	3.491	3.91×10^{-4}	Up
Q7XQZ5	Os04g0661300	ATP/GTP binding protein	1.356	1.09×10^{-2}	Up
Q0JQ62	Os01g0179700	Similar to GTP-binding protein YPTM2, ras-related protein, OsRab1	1.302	2.27×10^{-2}	Up
Q0DH67	Os05g0489600	ADP-ribosylation factor, Ras-related small GTP-binding family protein	1.608	3.99×10^{-3}	Up
Q84T71	Os03g0854100	Similar to ARF GAP-like zinc finger-containing protein ZIGA2, GTPase-activating protein	1.322	3.38×10^{-3}	Up
钙结合蛋白 Ca^{2+} binding related proteins					
Q6F334	Os05g0491000	EF-Hand type domain containing protein, calmodulin-like protein 9, OsCML9	0.621	1.71×10^{-3}	Down
Q84VG0	Os08g0117400	Calmodulin-related calcium sensor protein, Ser/Thr kinase/calmodulin, OsCML7, OsSTKC	0.732	7.55×10^{-3}	Down
Q0DFA8	Os06g0104400	IQ calmodulin-binding motif family protein	1.458	1.17×10^{-4}	Up
Q0D7H6	Os07g0246200	Similar to calreticulin, CRT	1.325	6.48×10^{-6}	Up
锌指结构域蛋白 Zinc finger containing proteins					
Q6K977	Os02g0831100	Zinc finger CCCH domain-containing protein 19	0.400	4.02×10^{-3}	Down
Q2R4J4	Os11g0472000	Zinc finger CCCH-type domain containing protein 63	0.436	2.02×10^{-3}	Down
Q6Z6E6	Os02g0203700	Zinc finger family protein, SRZ1	0.563	5.50×10^{-3}	Down
Q5NAV3	Os01g0257400	Zinc finger CCCH-type domain containing protein, OsC3H5	0.638	1.30×10^{-2}	Down
Q6YUR8	Os02g0121100	Zinc finger CCHC-type domain containing protein, cold shock domain protein 1, CSD protein 1	0.679	8.90×10^{-3}	Down
Q6K4N0	Os02g0789400	Similar to 9G8-like SR protein, RNA recognition motif and CCHC-type zinc finger domains containing protein	1.332	4.31×10^{-2}	Up
Q75LJ7	Os03g0836200	Similar to RNA-binding protein RZ-1, zinc finger-containing glycine-rich RNA-binding protein 1	1.374	2.39×10^{-3}	Up
Q6YTY3	Os07g0608400	PHD/F-BOX containing protein, PHD zinc finger protein ALFIN-LIKE 9	1.313	1.73×10^{-2}	Up
水稻株型调控相关蛋白 Regulation of plant architecture and growth related proteins					
Q6EU14	Os02g0672200	Similar to AGO1 homologous protein, OsAGO1a	0.471	1.96×10^{-3}	Down
Q2QN08	Os12g0583500	Broad Complex BTB domain with non-phototropic hypocotyl 3 NPH3 domain, BTB domain containing protein	0.375	9.84×10^{-3}	Down
Q0J0F4	Os09g0513000	Similar to TGB12K interacting protein 3, ankyrin repeat domain containing protein, XA21 binding protein 25	0.712	3.06×10^{-2}	Down
Q10L71	Os03g0356700	Villin/gelsolin superfamily protein, Actin binding protein, Regulation of plant architecture, VLN2	1.350	2.66×10^{-2}	Up
Q0ITK1	Os11g0247300	Tubulin/FtsZ domain containing protein, Cell elongation and division, TWISTED DWARF 1, Tubulin alpha-2, small and round seed 5, TID1, TubA2, SRS5	2.936	3.45×10^{-3}	Up
Q0DH37	Os05g0494000	Cytochrome P450	1.507	4.15×10^{-3}	Up
Q2R176	Os11g0615200	SSXT family protein, GRF-interacting factor 2, protein binding/transcription coactivator	1.428	2.04×10^{-2}	Up
Q7XHW8	Os07g0681000	Zinc-binding domain of translation initiation factor 2 beta	1.429	4.84×10^{-4}	Up
Q0JAK9	Os04g0592400	Protein transport protein-related, t-snare domain containing protein	1.574	9.88×10^{-4}	Up
Q0IP92	Os01g0235400	Similar to Importin-alpha re-exporter, Cellular apoptosis susceptibility protein homolog	2.102	1.54×10^{-2}	Up

量。数据分析结果表明,在 *dlt3* 突变体中鉴定到 330 个差异表达蛋白,其中上调表达的蛋白有 222 个,下调表达的蛋白 108 个。根据蛋白结构域对差异表达蛋白进行功能富集分析,主要有锌指蛋白(CCCH-type Zinc finger)、内质网蛋白 ERp29、糖苷水解酶类(glycoside hydrolase domain)、硫氧还蛋白(Thioredoxin domain)和二硫键异构酶(disulfide isomerase)等蛋白结构域被显著富集。在差异表达蛋白中,有 4 个蛋白与 BR 途径直接相关。其中,蛋白 Os02g0122300 被注解为 BR 受体激酶互作蛋白 BIP121(BRI1-interacting protein 121),在 *dlt3* 突变体中下调表达;蛋白 Os04g0501600 和 Os02g0612800 分别被注解为 BR 受体激酶互作蛋白 BIP106 和 BIP135,在 *dlt3* 突变体中均上调表达;蛋白 Os08g0430500 被注解为 14-3-3 蛋白,该蛋白作为 BR 信号途径关键调控因子 OsBZR1 的互作蛋白,在 *dlt3* 突变体中表达量大幅上调(表 2)。结果进一步表明在 *dlt3* 突变体中 BR 相关途径发生异常。另外,还鉴定到 3 个与生长素途径相关蛋白,包括 Os03g0280000、Os11g0673200 和 Os08g0524400 在 *dlt3* 突变体中均上调表达,显示 *dlt3* 突变也影响到生长素调控的相关代谢过程。

蛋白激酶或磷酸酯酶等相关蛋白、 Ca^{2+} 结合相关蛋白和锌指蛋白结构域相关蛋白在 *dlt3* 突变体中大量富集,约占总差异蛋白数的 8.5%。如表 2 所示,16 个差异表达蛋白与磷酸化/去磷酸化等功能有关联。其中,Os07g0472400、Os07g0628700 和 Os01g0682500 分别被注解为丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶结构域蛋白或受体蛋白激酶;Os01g0337600 被注解为 Mek(MAP kinase kinase, MKK)抑制蛋白,其表达量的下调表明在 *dlt3* 突变体中 MPAK 信号通路的应答增强;蛋白 Os02g0285800、Os04g0661300、Os01g0179700、Os05g0489600 和 Os03g0854100 被注解为 ATP/GTP 结合蛋白或小 G 蛋白 Ras 相关蛋白,其功能均与 G 蛋白介导的信号转导途径相关。4 个差异蛋白与 Ca^{2+} 结合相关。其中,Os05g0491000 和 Os08g0117400 分别被注解为钙调蛋白(OsCML9)或钙调蛋白相关的丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶(OsCML7),它们可能在 Ca^{2+} 作为胞内第二信使的信号转导途径中发挥功能。8 个差异蛋白被注解为锌指结构域蛋白,其本质为 DNA 或 RNA 结合蛋白,可能是影响植株生长发育相关转录调控因子。考虑到 *dlt3* 是一个 BR 相关矮化少蘖突变体,上述结果表明 BR 途径异常可能导致胞内蛋白磷酸化信号转导或转录激活信号均受到不同程度影响。

此外,还鉴定到多个与水稻株型和生长发育调控相关蛋白差异表达(表 2)。其中,Os02g0672200 与水稻叶卷曲调控直接相关^[11];Os03g0356700 为绒毛蛋白,其突变可导致根和茎在幼苗时期扭曲、叶片下垂褶皱、穗下垂扭曲、植株半矮化,结实率、千粒重、粒宽和粒厚降低^[12];Os11g0247300 为微管蛋白,直接调控水稻籽粒长宽比、叶形态卷曲和植株高度等农艺性状^[13]。上述株型或发育相关调控蛋白所调控的性状与 *dlt3* 突变表型具有很多相似点,它们差异表达显示 *dlt3* 突变体中控制株型和生长发育相关蛋白的功能可能受到影响。

3 讨论

目前,已报道的水稻矮化或半矮化突变体基因超过了 60 个,大多数还同时伴随其他农艺性状的改变,如分蘖数、叶形态、叶色、结实率和抽穗期等性状的改变(<http://www.ricedata.cn/gene/>)。本研究对一个源于水稻材料 9311 经 γ -射线诱变获得的矮化少分蘖突变体 *dlt3* 进行了表型分析、BR 应答分析、基因定位和定量蛋白质组分析。*dlt3* 突变体表现为株高矮化、分蘖减少、叶片夹角减小、叶色深绿、叶片短宽皱褶等,表明控制 *dlt3* 突变体表型的突变基因具有多效性,这与我们先前已报道的 *d62* 突变表型非常相似^[14]。突变体 *d62* 与突变体 *dlt* (*dwarf and low-tillering*)为等位突变^[8, 14],它们同时在 GA 和 BR 应答方面异常,即表现为对外源 BR 处理不敏感及 GA 诱导的 α -淀粉酶活性降低^[8, 14]。近来研究表明 *dlt/d62* 突变体所在基因位点 *GRAS-32* 可能作为包括 GA、BR 以及生长素多种激素信号交叉对话的一个重要节点^[15-17]。本研究对 *dlt3* 突变体进行了 GA 和 BR 相关的两个实验,即 GA 诱导的 α -淀粉酶活性和 BR 诱导叶枕角度变化实验。结果表明,外源施加 GA 后 *dlt3* 突变体和野生型的 GA 诱导的 α -淀粉酶活性无明显差异,表明 *dlt3* 突变体表型与 GA 途径无相关性。然而,*dlt3* 突变体对不同浓度的外源 BR 处理后均不应答,而野生型能正常应答,表明 *dlt3* 突变体是一个 BR 不敏感突变体,即与 BR 信号途径关系密切。

基因定位结果显示 *dlt3* 突变体基因位于第 6 染色体短臂 SSR 标记 RM2615 和 R6M14 间 1540 kb 的物理区间。该区间内遗传交换发生的比率较低。根据在染色体上的位置,先前报道的 *dlt/d62* 基因也位于第 6 染色体短臂上^[8, 14],但与 *dlt3* 基因候选区间相距约 4.5 Mb 的物理距离。*dlt3* 突变体基因所在

候选区间较大, 1540 kb 的物理区间大约有 200 个基因被注解。*dlt3* 突变体对外源 BR 不敏感, 说明该基因功能与 BR 密切相关。我们结合 *dlt3* 突变体功能进行了候选基因预测。根据水稻基因组数据库注解信息, 候选区间有多个被预测或已被克隆的 BR 途径相关基因。例如, Os06g0225300 编码 SERK 家族类受体蛋白激酶, 被认为是油菜素内酯不敏感基因 *OsBAK1* 的同源基因[bri1-associated receptor kinase 1 (BAK1) homologue 3], 其与 BR 信号传导途径关系十分密切^[18]。候选区间内 *Os06g0226500* 基因是一个受 BR 诱导的 *BUI*(BRASSINOSTEROID UPREGULATED 1)基因, 其参与 BR 信号传导和控制叶片结合处的弯曲^[19-20]。研究表明过量表达 *BUI* 基因的转基因植株表现与 BR 处理类似的表型, 而抑制 *BUI* 表达的 RNAi 植株出现直立叶表型^[19], 与 *dlt3* 突变体表型具有很多相似性。因此, *Os06g0225300* 和 *Os06g0226500* 均是 *DLT3* 可能的候选基因。在 *dlt3* 突变体的 iTRAQ 定量蛋白质组数据中, 有 3400 个蛋白的表达量被 iTRAQ 技术所定量, 上述两个候选基因或蛋白并不在其中, 可能由于蛋白的相对表达量较低。因此, 创建较大的 F₂ 群体, 从而精细定位 *dlt3* 突变基因是下一步研究工作的重点方向。

本研究对 *dlt3* 突变体进行了基于 iTRAQ 的定量蛋白质组学分析。在鉴定到的 330 个差异表达蛋白中, 有 3 个蛋白(Os02g0122300、Os04g0501600 和 Os02g0612800)被预测为 BR 受体激酶互作蛋白(BRI1-interacting protein), 其在 *dlt3* 突变体中差异表达表明 *DLT3* 基因在 BR 信号途径中可能发挥重要功能。另外, 14-3-3 家族蛋白 OsGF14c/Os08g0430500 在 *dlt3* 突变体中大幅上调表达。先前研究报道显示 OsGF14c 是成花素受体, 在水稻抽穗和开花时间调控中发挥重要功能^[21]。研究还表明 14-3-3 蛋白在 BR 胞内受体的降解等过程中发挥重要作用, 从而影响到植物发育的多个过程^[22]。因此, *dlt3* 突变体中 OsGF14c 蛋白表达上调的分子机制值得进一步关注。另外, 在 *dlt3* 突变体中多个蛋白磷酸化途径相关蛋白、钙调素蛋白和锌指蛋白结构域差异表达。先前已有报道^[23]表明 Ca²⁺结合相关的钙调蛋白 Os05g0491000/OsCML9、Os08g0117400/OsCML7 在 Ca²⁺作为胞内第二信使的胞内信号传递过程中发挥重要功能。结果也进一步暗示 *DLT3* 基因突变引起 BR 信号途径的异常, 进而可能导致胞内蛋白磷酸化信号转导和转录激活途径受到不同影响, 从而引起 *dlt3* 突变体生长发育多方面异常。

参考文献:

- [1] Sasaki A, Ashikari M, Ueguchi-Tanaka M, Itoh H, Nishimura A, Swapan D, Ishiyama K, Saito T, Kobayashi M, Khush G S, Kitano H, Matsuoka M. Green revolution: A mutant gibberellin-synthesis gene in rice. *Nature*, 2002, 416(6882): 701-702.
- [2] Hedden P. The genes of the green revolution. *Trends Genet*, 2003, 19(1): 5-9.
- [3] Smith S M, Li C, Li J. 1-Hormone function in plants. *Horm Metabol Signal Plants*, 2017: 1-38.
- [4] Santner A, Calderon-Villalobos L I A, Estelle M. Plant hormones are versatile chemical regulators of plant growth. *Nat Chem Biol*, 2009, 5(5): 301-307.
- [5] Hedden P, Phillips A L. Gibberellin metabolism: New insights revealed by the genes. *Trends Plant Sci*, 2000, 5(12): 523-530.
- [6] Clouse S D, Sasse J M. Brassinosteroids: Essential regulators of plant growth and development. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 1998, 49(49): 427-451.
- [7] Lanahan M B, Ho T H (1988) Slender barley: A constitutive gibberellin-response mutant. *Planta*, 1988, 175(1): 107-114.
- [8] Tong H N, Jin Y, Liu W B, Li F, Fang J, Yin Y H, Qian Q, Zhu L H, Chu C C. DWARF AND LOW-TILLERING, a new member of the GRAS family, plays positive roles in brassinosteroid signaling in rice. *Plant J*, 2009, 58(5): 803-816.
- [9] Murray M G, Thompson W F. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucl Acids Res*, 1980, 8(19): 4321-4325.
- [10] Wang Z Q, Xu X Y, Gong Q Q, Xie C, Fan W, Yang J L, Lin Q S, Zheng S J. Root proteome of rice studied by iTRAQ provides integrated insight into aluminum stress tolerance mechanisms in plants. *J Proteomics*, 2014, 98(4): 189-205.
- [11] 李磊, 薛芴, 左示敏, 陈宗祥, 张亚芳, 李前前, 朱俊凯, 马玉银, 潘学彪, 潘存红. 抑制 *OsAGO1a* 基因的表达导致水稻叶片近轴面卷曲. *中国水稻科学*, 2013, 27(3): 223-230.
- [12] Li L, Xue X, Zuo S M, Chen Z X, Zhang Y F, Li Q Q, Zhu J K, Ma Y Y, Pan X B, Pan C H. Suppressed expression of *OsAGO1a* leads to adaxial leaf rolling in rice. *Chin J Rice Sci*, 2013, 27(3): 223-230.
- [12] Wu S Y, Xie Y R, Zhang J J, Ren Y L, Zhang X, Wang J L, Guo X P, Wu F Q, Sheng P K, Wang J, Wu C, Wang H, Huang S, Wan J. *VLN2* regulates plant architecture by affecting microfilament dynamics and polar auxin transport in rice. *Plant Cell*, 2015, 27(10): 2829-2845.
- [13] Sunohara H, Kawai T, Shimizu-Sato S, Sato Y, Sato K, Kitano H. A dominant mutation of *TWISTED DWARF 1*

- encoding an alpha-tubulin protein causes severe dwarfism and right helical growth in rice. *Genes Genet Syst*, 2009, 84(3): 209-218.
- [14] Li W, Wu J, Weng S, Zhang Y, Zhang D, Shi C. Identification and characterization of *dwarf 62*, a loss-of-function mutation in *DLT/OsGRAS-32* affecting gibberellin metabolism in rice. *Planta*, 2010, 232(6): 1383-1396.
- [15] Tong H N, Liu L C, Jin Y, Du L, Yin Y H, Qian Q, Zhu L H, Chu C C. *DWARF AND LOW-TILLERING* acts as a direct downstream target of a GSK3/SHAGGY-like kinase to mediate brassinosteroid responses in rice. *Plant Cell*, 2012, 24(6): 2562-2577.
- [16] Hirano K, Yoshida H, Aya K, Kawamura M, Hayashi M, Hobo T, Sato-Izawa K, Kitano H, Ueguchi-Tanaka M, Matsuoka M. *SMALL ORGAN SIZE 1* and *SMALL ORGAN SIZE 2/DWARF AND LOW-TILLERING* form a complex to integrate auxin and brassinosteroid signaling in rice. *Mol Plant*, 2017, 10(4): 590-604.
- [17] Sun L, Li X, Fu Y, Zhu Z, Tan L, Liu F, Sun X, Sun X, Sun C. *GS6*, a member of the GRAS gene family, negatively regulates grain size in rice. *J Integr Plant Biol*, 2013, 55(10): 938-949.
- [18] Li D, Wang L, Wang M, Xu Y Y, Luo W, Liu Y J, Xu Z H, Li J, Chong K. Engineering *OsBAK1* gene as a molecular tool to improve rice architecture for high yield. *Plant Biotechnol J*, 2009, 7(8): 791-806.
- [19] Tanaka A, Nakagawa H, Tomita C, Shimatani Z, Ohtake M, Nomura T, Jiang C, Dubouzet J G, Kikuchi S, Sekimoto H, Yokota T, Asami T, Kamakura T, Mori M. *BRASSINOSTEROID UPREGULATED1*, encoding a helix-loop-helix protein, is a novel gene involved in brassinosteroid signaling and controls bending of the lamina joint in rice. *Plant Physiol*, 2009, 151(2): 669-680.
- [20] Sakamoto T, Morinaka Y, Inukai Y, Kitano H, Fujioka S. Auxin signal transcription factor regulates expression of the brassinosteroid receptor gene in rice. *Plant J*, 2013, 73(4): 676-688.
- [21] Purwestri Y A, Ogaki Y, Tamaki S, Tsuji H, Shimamoto K. The 14-3-3 protein GF14c acts as a negative regulator of flowering in rice by interacting with the florigen Hd3a. *Plant Cell Physiol*, 2009, 50(3): 429-438.
- [22] Bai M Y, Zhang L Y, Gampala S S, Zhu S W, Song W Y, Chong K, Wang Z Y. Functions of OsBZR1 and 14-3-3 proteins in brassinosteroid signaling in rice. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, 104(34): 13839-13844.
- [23] Boonburapong B, Buaboocha T. Genome-wide identification and analyses of the rice calmodulin and related potential calcium sensor proteins. *BMC Plant Biol*, 2007, 7(1): 4.

欢迎订阅 2019 年《中国稻米》杂志

《中国稻米》是由农业农村部主管，中国水稻研究所主办，全国农业技术推广服务中心等单位协办的全国性水稻科学技术期刊，兼具学术性、技术性、知识性、信息性等特点。2014 年被国家新闻出版广电总局认定为首批学术类期刊，为中文核心期刊和中国科技核心期刊，还荣获全国农业期刊金犁奖技术类一等奖、浙江省优秀科技期刊一等奖等奖项。适合我国水稻产区各级技术人员及农业与粮食行政管理人员、科研教学人员和稻农阅读。

《中国稻米》为双月刊，标准大 16 开本，单月 20 日出版。每期定价 10.00 元，全年 60.00 元，全国公开发行，邮发代码：32-31，国内刊号：CN33-1201/S，国际统一刊号：ISSN 1006-8082。

欢迎新老读者到当地邮局订阅，也可直接汇款到本刊编辑部订阅。E-mail: zgdm@163.com; 网址: www.zgdm.net; 地址: 浙江省杭州市富阳区新桥水稻所路 28 号; 邮政编码: 311401; 电话(传真): 0571-63370271, 63370368。