

水稻侧根发育突变体 *lrp1* 鉴定及表达分析

易浩昆 罗堰木 黄敏 杜何为* 李曼菲*

(长江大学 生命科学学院, 湖北 荆州 434025; *通信作者, email: 200457@yangtzeu.edu.cn; mfli_maize@163.com)

Identification and Expression Analysis of the Rice Lateral Root Development Mutant *lrp1*

YI Haokun, LUO Yanmu, HUANG Min, DU Hewei*, LI Manfei*

(College of Life Sciences, Yangtze University, Jingzhou 434025, China; *Corresponding author, email: 200457@yangtzeu.edu.cn; mfli_maize@163.com)

Abstract: 【Objective】This study aims to investigate the function of the *OsLRP1* gene (*Os01g72490*) in rice lateral root development by phenotypic characterization and expression analysis of the *lrp1* mutant. 【Method】The *lrp1* mutant was first identified through PCR amplification and sequencing. Bioinformatics methods were then employed to analyze the protein structure, conserved domains, transmembrane domains, and signal peptides of OsLRP1. Multiple sequence alignment and phylogenetic tree construction were conducted to explore the evolutionary relationship between OsLRP1 and LRP1 proteins from other species. Quantitative real-time PCR (qRT-PCR) was used to detect the expression levels of *OsLRP1* in different rice tissues. Confocal laser scanning microscopy was utilized to observe the subcellular localization of the OsLRP1 protein. Finally, an auxin treatment experiment was performed to determine whether the regulation of lateral root development by *OsLRP1* is mediated by auxin. 【Result】Phenotypic analysis revealed that compared with the wild-type Zhonghua 11, the *lrp1* mutant exhibited a 32% reduction in lateral root primordia number and a 21% decrease in lateral root number. At the maturity stage, the panicle length and 100-grain weight of *lrp1* were reduced by 12.5% and 7.4%, respectively, compared with the wild-type. Bioinformatics analysis showed that the *OsLRP1* gene belongs to the SHI transcription factor family, encoding a protein of 340 amino acids. Conserved domain analysis indicated that it is a member of the DUF (Domain of Unknown Function) family. No signal peptide or transmembrane domain was detected in the OsLRP1 protein. Subcellular localization in tobacco demonstrated that the OsLRP1 protein is localized in the nucleus. qRT-PCR results indicated that *OsLRP1* is expressed in roots, stems, and leaves, with the highest expression level in leaves. Two auxin response elements (AuxREs) were identified within the 1-kb promoter region upstream of *OsLRP1*. The auxin treatment experiment confirmed that lateral root development in the *lrp1* mutant is affected by auxin. 【Conclusion】In summary, *OsLRP1* regulates lateral root development in rice in an auxin signaling dependent manner and is involved in rice growth, development, and stress responses, further elucidating its crucial role in rice lateral root development.

Keywords: rice; root development; lateral root primordium; LRP1 protein

摘要:【目的】本研究旨在通过对水稻 *OsLRP1*(*Os01g72490*)突变体 *lrp1* 的表型鉴定与表达水平分析,探究 *OsLRP1* 基因在水稻侧根发育过程中的功能。【方法】首先通过 PCR 扩增及测序完成 *lrp1* 突变体的鉴定。其次,通过生物信息学方法分析 OsLRP1 蛋白结构、保守结构域、跨膜结构域、信号肽,并通过多序列比对及进化树构建,分析 OsLRP1 蛋白与其他物种中 LRP1 蛋白的系统发育关系;通过 qRT-PCR 技术,检测 *OsLRP1* 在水稻不同组织中的表达水平。借助激光共聚焦显微镜,观察 OsLRP1 蛋白在细胞内的精确定位。然后通过生长素处理实验验证 *OsLRP1* 对侧根发育的调控是否受生长素影响。【结果】表型鉴定结果显示,相较于野生型中花 11, *lrp1* 侧根原基数目减少 32%,侧根数目减少 21%;成熟期时, *lrp1* 穗长和百粒重较野生型分别减少 12.5%和 7.4%;生物信息学分析结果显示 *OsLRP1* 基因属于 SHI 转录因子,编码 340 个氨基酸。保守结构域分析结果表明,其属于 DUF(Domain Of Unknown Function)家族;OsLRP1 蛋白无信号肽及跨膜结构。烟草亚细胞定位结果显示 OsLRP1 蛋白定位于细胞核。qRT-PCR 结果显示, *OsLRP1* 在根、茎和叶中均有表达,且在叶中表达量最高。在 *OsLRP1* 上游 1 kb 启动子区域内发现两种生长素响应元件 AuxRE,生长素处理实验证实 *lrp1* 突变体侧根发育受生长素影

收稿日期: 2024-12-24; 修改稿收到日期: 2025-02-16。

基金项目: 湖北省自然科学基金创新群体项目(2022CFA030); 国家自然科学基金面上项目(32072069); 国家自然科学基金资助项目(32301910); 长江大学大学生创新创业项目(Yz2023236)。

响。【结论】综上所述, *OsLRP1* 依赖生长素信号途径调控水稻侧根发育, 参与水稻生长发育及抗逆性, 进一步揭示了该基因在水稻侧根发育中的关键作用。

关键词: 水稻; 根系发育; 侧根原基; LRP1 蛋白

水稻(*Oryza sativa* L.)作为世界上三大粮食作物之一, 其产量和品质的提升对保障粮食安全具有重要意义。水稻根系是吸收水分和养分的主要器官, 其生长发育状况直接影响水稻的生长和产量。侧根作为水稻根系的重要组成部分, 不仅增加了根系的表面积, 提高了对土壤中水分和养分的吸收效率; 还通过其分布的深度和广度, 增强了水稻对不同环境条件的适应性^[1], 侧根形成和发育直接影响着水稻的产量和品质^[2]。因此, 研究水稻侧根生长发育相关基因具有重要意义。

在侧根形成的起始阶段, 位于韧皮部的两个中柱鞘细胞进行垂周分裂, 快速分裂产生四个子细胞^[3]; 随后与中柱鞘相邻的内胚层细胞开始分裂。随着发育的进行, 中柱鞘细胞和内胚层细胞经历垂周分裂和平周分裂形成侧根原基^[4]。在模式生物拟南芥中, 侧根形成共分为 8 个阶段, 在第 I 阶段中侧根原基开始形成, 根尖附近的中柱鞘细胞开始分裂, 细胞数量呈径向迅速增加; 第 II、III 阶段中, 源自第 I 阶段的中心细胞经过平周分裂形成内外两层细胞; 第 IV 阶段中, 内层细胞进行平周分裂形成两层内层细胞, 此时侧根原基突破内胚层; 第 V 阶段, 外层细胞分裂三次, 而内层细胞呈放射状生长, 将外层细胞向外推, 使侧根原基进入皮质层; 在第 VI 阶段, 外层细胞继续分裂, 内层细胞表现出维管束的特征, 在侧根原基周围形成内胚层、皮质层和表皮层, 侧根原基进入初生根表皮; 在第 VII、VIII 阶段, 大部分细胞进行垂周分裂, 侧根原基通过表皮向外生长, 最终发育成侧根^[5-6]。

近年来, 随着分子生物学和遗传学技术的发展, 对侧根发育分子机制的研究取得了重要进展。研究者们已经鉴定出多个调控侧根发育的关键基因和信号通路, 揭示了生长素、细胞分裂素等植物激素的作用及其相互调控网络^[7]。生长素是最早发现的植物激素, 在调节细胞伸长生长^[8]、调控植物向性生长^[9]以及侧根和不定根形成^[10]等过程中发挥重要功能。生长素在侧根起始和形态建成中起作用, 侧根形成最早是从根尖开始的, 侧根原基最早形成于侧根起始位点, 生长素响应因子 *ARF7*(*Auxin Response Factors 7*) 和 *LBD*(*Lateral Organ Boundaries-domain*) 家族基因 *LBD16* 已被证实在这一过程中发挥功能^[11]。然而不是所有的侧根起始位

点都能发育为侧根原基。生长素调控转录因子 *GATA23*(*GATA Franscription Factor 23*) 是调控侧根原基形成的第一个分子标记, 它特异表达于木质部中柱鞘细胞中, 在生长素浓度达到最大值时会产生一种振荡信号, 当中柱鞘细胞接收到振荡信号后, 通过 *Aux/IAA28*(*Auxin/Indole- 3-acetic Acid 28*) 依赖的生长素信号途径调控侧根原基形成^[12]。此外, *MYB*(*Myeloblastosis*) 家族转录因子 *MYB93* 也协同生长素参与这一过程的调控^[13]。生长素通过介导 *IDA*(*Inflorescence Deficient In Abscission*) 结合 *HEA/HSL2*(*Haesa/Haesa-Like2*) 受体, 调控下游 *XTR6*(*Xyloglucan Endotransglycosylase 6*)、*EXP17*(*Expansina 17*) 等 *CWR*(*Cell Wall Remodelling*) 基因的表达, 通过调节内皮层(EN) 细胞壁中果胶降解从而使细胞壁松动和破碎, 进而促进侧根形成^[14]。在侧根发育的第 VIII 阶段中, 生长素通过内流载体 *LAX3*(*Lateral Root Formation Defective 3*) 快速富集在皮质层(CO) 和表皮层(EP) 中, 介导 *IAA14* 通过 *ARF7* 转录因子调控下游 *IDA- HEA/HSL2* 信号途径, 通过介导 *MKK4*(*Mitogen- Activated Protein Kinase Kinase 4*)/*MKK5-MPK3* (*Mitogen-Activated Protein Kinase 3*)/*MPK6* 信号途径调控侧根发育^[15]。另外, 生长素通过 *Auxin- MPK14-ERF13*(*Ethylene Response Factor 13*) 信号途径调控下游 *KSC*(*Ketoacyl-CoA Synthase*) *16/8/18* 基因的表达, 抑制长链脂肪酸合成, 限制了侧根发育第 IV 阶段中侧根原基突破内胚层的过程, 极大减少了侧根数量^[16]。此外, *ARF7/19* 生长素响应因子对介导三种 *PLT*(*Plethora*) 转录因子 *PLT3*、*PLT5*、*PLT7* 调控侧根原基的形成^[17]。细胞分裂素和生长素在根干细胞的形态建成上存在拮抗关系, 共同调控根分生组织的大小^[18]。在根分生组织中, 细胞分裂素依赖的 *ARR1*(*Arabidopsis Response Regulator 1*) 转录因子激活 *SHY2*(*Short Hypocotyl 2*) 的表达, *SHY2*(*Short Hypocotyl 2*) 通过结合 *ARF* 转录因子负调节 *PIN1/3/7*(*PIN-Formed1/3/7*) 的表达, 抑制生长素的运输, 与此同时生长素又能刺激泛素介导的 *SHY2* 降解途径^[19-20]。此外, *ARR1* 通过诱导 *GH3.17*(*GRETCHEN HAGEN 3.17*) 表达来调控生长素降解^[21]。

研究者们从水稻中鉴定出了一系列侧根发育相关基因, *OsIAA11* 参与根冠中生长素信号传导,

从而影响侧根生长发育^[22]; *OsWOX10*(*WUSCHEL-related homeobox*)通过与 *QHB*(*Quiescent-Center-Specific Homeobox Gene*)的相互作用, 响应生长素信号及环境胁迫, 共同调控水稻侧根的发有^[23]; *OsCYP2*(*Cyclophilin 2*)通过与 *OsSGT1*(*Salicylic Acid Glucosyltransferase 1*)互作, 影响 AUX/IAA 蛋白的降解从而调控侧根发育^[24]; *OsAUX1* 编码一种生长素向内运输载体, 参与生长素的极性运输, 调控侧根生长发育^[25]; *OsPIN2* 通过精细调控根尖生长素转运和极性运输, 控制根的向地性生长, 并参与调节 ABA(Absciscic Acid)信号途径和活性氧的积累, 从而影响侧根的发有和形态^[26]; *OsLA13* 参与生长素极性运输过程, 介导生长素参与水稻侧根起始和发育^[27]。 *OsSLR1*(*Slender Rice 1*)基因功能缺失后导致水稻短根, 抑制水稻对二价金属离子如锰、铁、锌、镁和钙的吸收^[28]。然而这些基因之间是否有相关性, 是否存在一个复杂的级联网络参与侧根形成和发育的调控却不得而知。因此, 发掘调控侧根发育新基因、剖析侧根形成调控网络是后续研究的重点。

玉米中 *ZmLRP1* 基因编码一个 *ZmLRP1* 蛋白, 参与调控侧根原基的形成^[29]。为了进一步发掘水稻中调控侧根发育相关基因, 我们对玉米中已报道的侧根原基发育基因 *ZmLRP1* 进行序列同源性比对, 在水稻中发现了一个高度同源的基因 *OsLRP1*。为了确定水稻中 *OsLRP1* 基因的功能, 在本研究中筛选并鉴定了一个侧根原基突变体 *lrp1*。通过测定 *lrp1* 突变体与野生型中花 11 的全生育期、苗期侧根长、侧根数目、侧根原基数目及成熟期的产量性状, 分析 *OsLRP1* 基因功能缺失后对水稻生长发育的影响; 通过生长素处理实验观察 *lrp1* 突变体侧根生长发育是否受生长素调控。进一步克隆 *OsLRP1* 基因, 构建 *pSuper1300-OsLRP1-eGFP* 重组表达载体并通过农杆菌转化烟草叶片, 确定 *OsLRP1* 蛋白的亚细胞定位的位置; 通过实时荧光定量 PCR 分析 *OsLRP1* 基因在根、茎、叶中的组织表达量情况; 明确了 *OsLRP1* 基因参与调控水稻侧根发育, 以期水稻根系发育探明新途径。

1 材料与方法

1.1 试验材料

野生型中花 11(粳型常规水稻)及 *lrp1* 突变体均购买自百格基因科技(江苏)有限公司。

pSuper1300 载体由中国农业大学张美玲惠赠,

含有 eGFP 荧光蛋白标签, 用于构建烟草亚细胞定位的同源重组表达载体。

1.2 多序列比对及进化树分析

通过 NCBI-BLAST 数据库对 *ZmLRP1* 蛋白质序列进行比对分析, 分别查找粳稻(*Oryza sativa japonica* group)、非洲稻(*Oryza sativa indian* group)、五节芒(*Miscanthus floridulus*)、高粱(*Sorghum bicolor* L.)、柳枝稷(*Panicum virgatum* L.)、霍尔稷草(*Panicum Hallii*)及小麦(*Triticum aestivum* L.)的 *LRP1* 蛋白质序列并进行多序列比对和进化树分析, 探究 *LRP1* 蛋白的保守性。

1.3 *lrp1* 突变体基因型鉴定

lrp1 突变体种子在培养皿中发芽, 待幼苗生长至 3 cm 时进行移栽。准备直径 40 cm, 高 50 cm 的塑料桶, 装入土壤与营养基质 1:1 的混合土壤, 将水稻移栽至桶中, 每桶种植 10 株。水稻移栽三周后, 取样并使用 CTAB 法进行 DNA 提取。通过 NCBI 数据库获取基因序列并设计基因特异性引物, *LRP1-F*(CCTTCTCACCTCCCAAACCA)和 *LRP1-R*(CGTACAAGTCCGAGTGCACC)。以基因组 DNA 为模板进行 PCR 扩增, 用 2%的琼脂糖凝胶电泳进行检测, 使用胶回收试剂盒对 PCR 产物片段进行回收后通过一代测序技术对编辑位点附近序列进行验证。验证后的突变体用于后续研究。

1.4 *OsLRP1* 基因的生物信息学分析

利用 TMHMM-2.0 预测跨膜结构; 利用 ExPASy 预测 *LRP1* 蛋白的分子量、理论等电点 PI、氨基酸残基及疏水性和不稳定系数等理化性质; 利用 Pfam 和 NPS@: SOPMA 进行 *LRP1* 蛋白质结构预测; 利用 NetPhos-3.1 进行 *LRP1* 蛋白磷酸化位点预测; 利用 SignalP 6.0 Server 预测 *OsLRP1* 基因编码的信号肽; 通过 NCBI 预测保守结构域及同源性比对分析; 通过 Place 数据库预测 *OsLRP1* 启动子区域顺式作用元件。所用工具网站请见表 1。

1.5 苗期根系表型统计

在苗期对植株进行清洗并拍照, 分别统计中花 11 和 *lrp1* 突变体的株高、侧根长和侧根数目。同时, 取中花 11 和 *lrp1* 突变体的根系, 对距根尖 1 cm 处进行亚甲基蓝染色观察侧根原基数目的变化。

1.6 *OsLRP1* 蛋白的亚细胞定位

利用 WoLF PSORT II和iPSORT预测*LRP1*蛋白的亚细胞定位结果, 构建*OsLRP1-eGFP*融合表达载体转化本氏烟草叶片, 通过激光共聚焦显微镜观察*OsLRP1*蛋白的亚细胞定位位置。首先利用Trizol法提取水稻总RNA并使用试剂盒反转录为cDNA, 通过

表 1 生物信息学分析所用网站

Table 1. Websites used for bioinformatics analysis

名称 Name	网址 URL
TMHMM-2.0	https://services.healthtech.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/
Expasy	https://www.expasy.org/
InterPro	https://www.ebi.ac.uk/interpro/
NPS@:SOPMA	https://npsa.lyon.inserm.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=/NPSA/npsa_sopma.html
NetPhos-3.1	https://services.healthtech.dtu.dk/services/NetPhos-3.1/
SignalP 6.0 Server	https://services.healthtech.dtu.dk/services/SignalP-6.0/
NCBI	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/
WoLF PSORT II	https://wolfsort.hgc.jp/
iPSORT	https://ipsort.hgc.jp/
New PLACE	https://www.dna.affrc.go.jp/PLACE/

NCBI-CDS 网站设计 CDS 扩增引物 LRP1-CDS-F (ATGGCCGACGTCGGGATGGT) 和 LRP1-CDS-R (GTTTCATGGTGTACCATAGC)。以上述 cDNA 为模板用高保真酶扩增 *OsLRP1* 基因的 CDS 序列。选用 pSuper1300 载体进行融合载体构建, 根据载体上的同源臂区域序列设计引物: LRP1-MCS-CDS-F (TCTAGAAAGCTTCTGCAGATGGCCGACGTCGGG) 和 LRP1-MCS-CDS-R (CATGGTACCGGATCCACTAGTGTTTCATGGTGTACCATAGC)。使用 *Pst*I (酶切位点 CTGCAG) 和 *Spe*I (酶切位点 ACTAGT) 两种限制性核酸内切酶对 pSuper1300 载体进行双酶切, 使用同源重组酶对线性化后的载体和目的片段进行同源重组, 并通过一代测序技术对构建好的同源重组载体进行验证。重组载体构建及烟草转化参照李曼菲等的方法^[30]。将注射后的烟草植株放回 26℃ 恒温组培室中分别避光生长 1 d、正常生长 1 d。随后, 用尖头镊子轻轻撕取烟草注射区域下表皮, 用浓度为 0.2 μmol/L 的 DAPI 染料染色 10 min 后用 1 mmol/L PBS 缓冲液 (含 0.137 mol/L NaCl, 2.7 mmol/L KCl, 0.01 mol/L Na₂HPO₄, 1.8 mmol/L KH₂PO₄, 调 pH 至 7.4) 冲洗三遍后制成装片, 在激光共聚焦显微镜下分别以 400 nm 和 488 nm 的激发波长观察 DAPI 核染料的蓝色荧光及 *OsLRP1*-eGFP 绿色荧光, 验证 *OsLRP1* 蛋白表达的亚细胞位置。

1.7 *OsLRP1* 表达模式分析

为研究 *OsLRP1* 基因在中花 11 中的表达模式, 利用基因特异性荧光定量 PCR 引物 (qRT-*OsLRP1*-F1: CGTTTAGGGAGAGCTTGCCA; qRT-*OsLRP1*-R1: GGTCGTACAGGAACCCCTTG), 采用实时荧光定量 qRT-PCR 对基因在同一植株根、茎、叶中的表达水平进行分析。对同一水稻植株的根、茎、叶进行取样后立即投入液氮中冷冻, 样品的 RNA 提

取、cDNA 反转录参考杜何为等^[31]的方法。每个样品设 3 个生物学重复, 相对表达量计算采用 2^{-ΔΔCt} 法^[32]计算。

1.8 外源生长素处理实验

通过外源生长素处理实验验证 *OsLRP1* 基因对水稻侧根生长发育的影响是否与生长素相关。在 9 mm 培养皿中采用 Yoshida 水稻营养液培育水稻幼苗, 待发芽 6 d 后施加 150 μL 浓度为 0.1 μmol/L 的 IAA 处理 7 d, 间隔 2 d 更换营养液。处理结束后将植株取出进行拍照观察。

2 结果与分析

2.1 *OsLRP1* 基因选择及 *lrp1* 突变体获取

玉米中 *ZmLRP1* 基因被报道与侧根原基发育相关, 为进一步发掘水稻中编码 LRP1 蛋白的基因, 利用 NCBI-BLASTP 网站对 *ZmLRP1* 编码的蛋白质序列进行比对 (包括粳稻、非洲稻、五节芒、高粱、柳枝稷、霍尔稷草及小麦中的 LRP1 蛋白序列, 图 1), 结果显示 LRP1 蛋白在进化上高度保守, 通过进化树分析发现粳稻中 *OsLRP1* 蛋白 (EEC72181.1) 与玉米 *ZmLRP1* 蛋白 (XP_008656860.1) 的同源性最高, 推测 *OsLRP1* 基因可能调控水稻侧根原基发育。

2.2 *lrp1* 突变体鉴定

lrp1 突变体电泳结果如图 2-A, 扩增片段长度为 491 bp。用胶回收试剂盒将扩增产物进行胶回收处理并进行测序分析, 该突变体编辑靶点 (TGTTGCAGACGCGTCGTTTAGGG) 第 19 位 T 碱基发生缺失, 造成移码突变导致翻译提前终止, 较正常 LRP1 蛋白少编码 106 个氨基酸 (图 2-B)。

2.3 中花 11 和 *lrp1* 突变体的生育期统计

对野生型和 *lrp1* 突变体的全生育期进行统计,

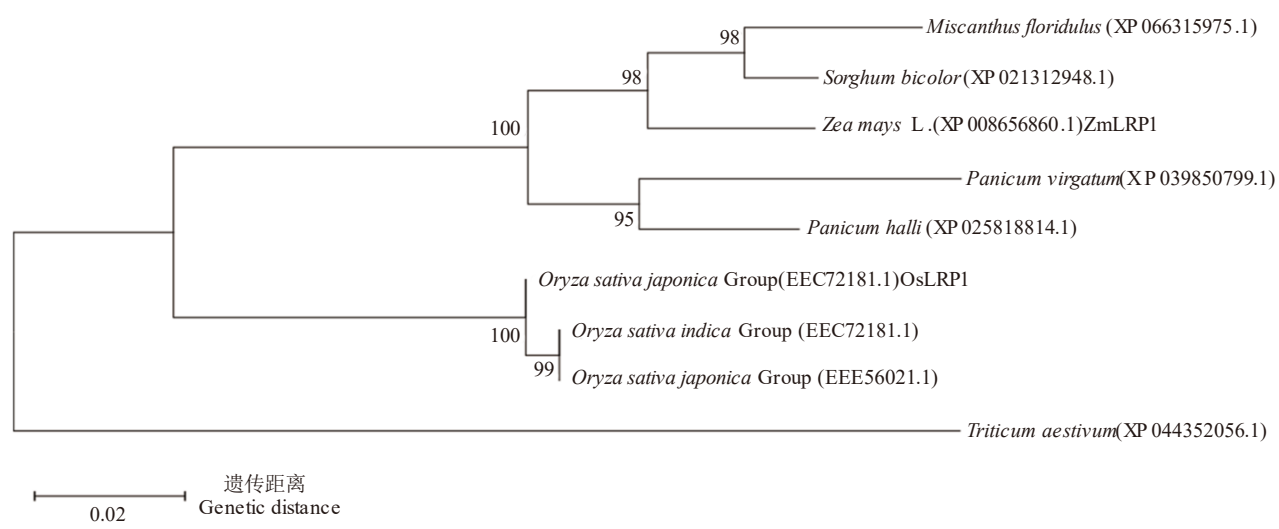


图 1 不同物种中 LRP1 蛋白系统进化树

Fig. 1. Phylogenetic tree of the LRP1 protein across different species

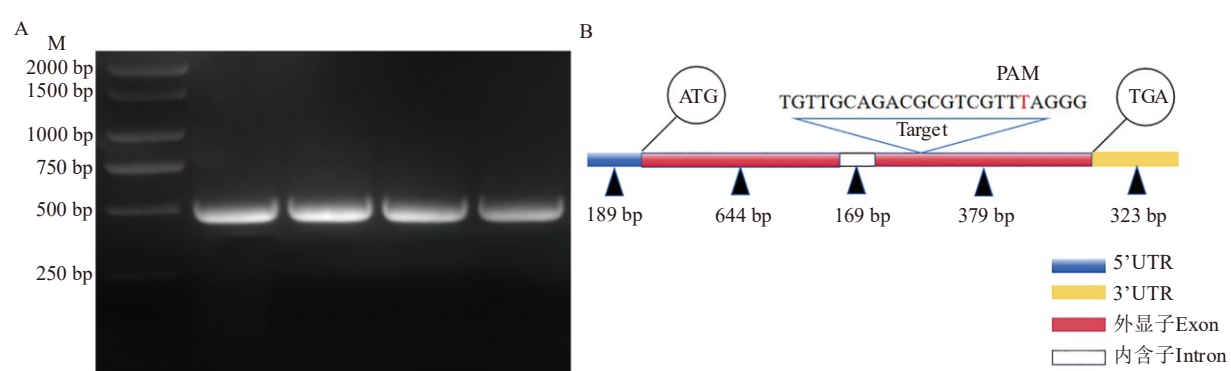


图 2 突变体 *lrp1* PCR 扩增电泳图 (A) 及突变靶点信息 (B)

Fig. 2. PCR amplification electrophoresis of mutant *lrp1* (A) and information of mutant targets(B)

包括出芽期、幼苗期、分蘖期、拔节期、抽穗期、扬花期、孕穗期、灌浆期、成熟期。发现野生型中花 11 完整生育期为 152 d, *lrp1* 突变体完整生育期为 154 d, 相较于野生型, *lrp1* 突变体从扬花期时起至植株成熟, 整体生育期推迟 2 d 左右(表 2)。

2.4 *OsLRP1* 基因的生物信息学分析

2.4.1 LRP1 蛋白的理化性质

利用 ExPASy 在线网站对 LRP1 蛋白质进行预测,发现 LRP1 蛋白分子式为 C₁₄₇₆H₂₃₀₃N₄₅₇O₄₉₀S₁₅, 由 340 个氨基酸组成, 分子质量为 34.7719 kDa, 分子式为理论等电点为 7.27, 消光系数为 20440, 所带正负电荷的氨基酸残基均为 26 个, 脂肪氨基酸系数 54.71, 不稳定系数为 35.52, 是一种稳定蛋白, 平均亲水性为-0.415, 属于亲水性蛋白。

NetPhos-3.1 预测 LRP1 蛋白包含 26 个丝氨酸位点、15 个苏氨酸位点和 4 个酪氨酸位点, 共 45 个磷酸化位点。

2.4.2 LRP1 蛋白结构分析

利用 InterPro 和 NPS@: SOPMA 进行预测, 发现 LRP1 蛋白属于 SHI 转录因子家族成员。同时 LRP1 蛋白的 340 个氨基酸中, α 螺旋占 9.12%, 延伸链占 6.18%, 无规则卷曲占 84.71%。SignalP 6.0 server 结果显示 LRP1 蛋白无信号肽。TMHMM-2.0 预测结果显示有一段长 340 个氨基酸的膜外结构(图 3), 这表明 LRP1 蛋白为非跨膜蛋白。

2.4.3 LRP1 蛋白保守结构域预测

利用 NCBI 数据库进行保守结构域预测, 结果显示 *OsLRP1* 基因编码的序列含有一个 DUF702 结

表 2 *lrp1* 突变体的生育期

Table 2. Growth periods of the <i>lrp1</i> mutant d			
时期 Period	中花 11 Zhonghua 11	<i>lrp1</i>	<i>P</i> 值 <i>P</i> -value
出芽期 Budding stage	2.9±0.4	3.1±0.4	0.1047
幼苗期 Seedling stage	10.3±0.4	10.3±0.5	0.7315
分蘖期 Tillering stage	40.4±0.5	40.5±0.7	0.5988
拔节期 Jointing stage	60.4±0.5	60.5±0.5	0.5309
抽穗期 Heading stage	72.2±0.5	72.3±0.6	0.7699
扬花期 Anthesis stage	85.3±0.5	87.1±0.5	6.19×e ⁻¹⁵
孕穗期 Booting stage	100.3±0.5	102.3±0.5	4.98×e ⁻¹⁶
灌浆期 Grain filling stage	120.3±0.4	122.4±0.5	8.71×e ⁻¹⁷
成熟期 Maturity stage	152.3±0.4	154.3±0.4	8.19×e ⁻¹⁷

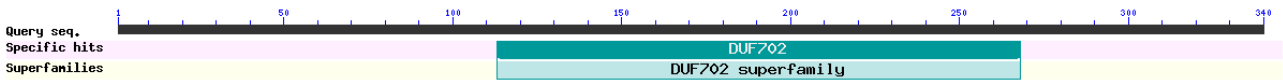


图 3 OsLRP1 蛋白结构域预测
Fig. 3. Prediction of OsLRP1 protein domain

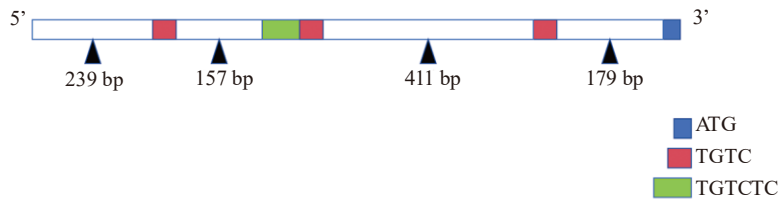


图 4 *OsLRP1* 启动子区域顺式作用元件分析
Fig. 4. Analysis of *cis*-acting elements in the promoter region of *OsLRP1*

构域, 该结构域高度保守, 具体功能暂未可知, 但相关研究显示, DUFs 蛋白家族参与调控植物生长发育、植物对病虫害的防御反应和植物对非生物胁迫的应答反应等生物学过程, 由此推测 *OsLRP1* 蛋白同样参与调控植物生长发育过程。

2.4.4 *OsLRP1* 启动子区域顺式作用元件预测

采用 New PLACE 数据库对 *OsLRP1* 基因起始密码子上游 1 kb 范围的启动子区域进行顺式作用元件预测, 发现有两种生长素响应元件 AuxRE: 5'-TGTCTC-3'(1 个)和 5'-TGTC-3'(3 个), 推测 *OsLRP1* 基因调控水稻侧根发育受生长素信号介导(图 4)。

2.5 *lrp1* 根系表型统计

在苗期(水稻发芽后 35 d), 分别对野生型和 *lrp1* 突变体植株进行清洗和拍照, 并统计株高、根长和根数。结果显示, 相较于野生型, *lrp1* 突变体株高(图 5-A)和侧根长无明显差异(图 5-B), 但是侧根数目下降了 21%(如图 5-B、E), 可能是 *OsLRP1* 功能丧失导致侧根原基数目下降, 进而导致侧根发育数量减少。分别对野生型和 *lrp1* 突变体的根尖 1 cm 处进行亚甲基蓝染色并观察, 发现 *lrp1* 侧根原基较野生

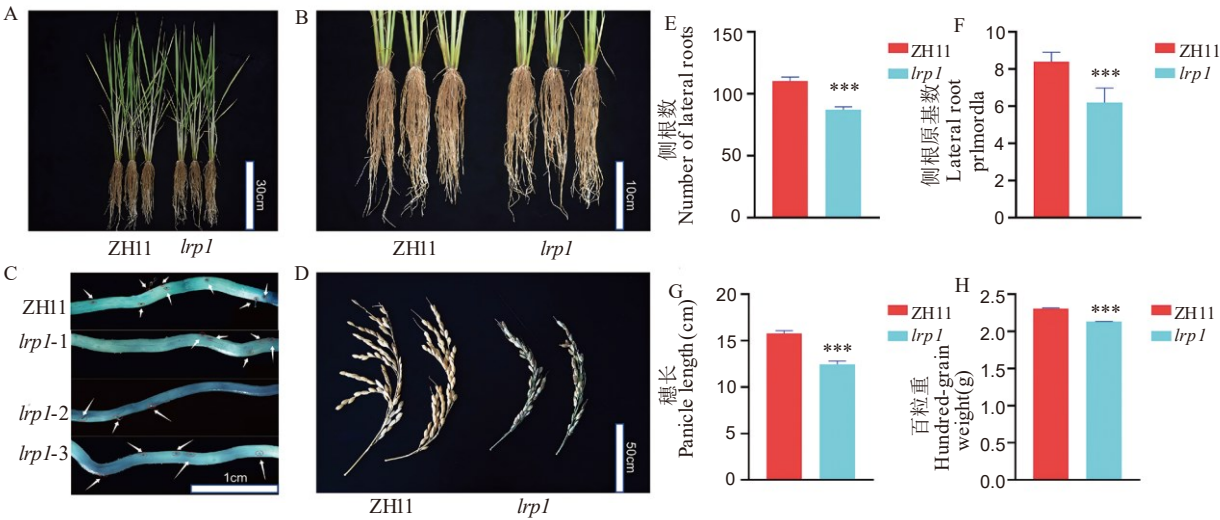
型显著减少了 32%(图 5-C、F)。在成熟期, 相较于野生型, *lrp1* 突变体的穗长减少 12.5%(图 5-G), 百粒重降低 7.4%(图 5-H)。综上所述, *OsLRP1* 基因突变导致侧根原基数目减少, 进而引起侧根数量减少, 严重影响了水稻的生长发育和产量。

2.6 *OsLRP1* 蛋白的亚细胞定位

利用 WoLF PSORT Prediction 和 Plant-mPLoc server 对 LRP1 蛋白的亚细胞定位进行预测。结果显示, *OsLRP1* 蛋白可能定位于细胞核。激光共聚焦显微镜观察发现, *OsLRP1*-GFP 融合蛋白在细胞核中呈现明显绿色荧光, 且与 DAPI 特异性核染料的蓝色荧光信号重叠, 说明 *OsLRP1* 蛋白位于细胞核(图 6)。

2.7 *OsLRP1* 表达模式分析

分别取苗期野生型水稻的根、茎、叶组织, 通过实时荧光定量 PCR 进行表达量分析, 使用 2^{-ΔΔC_t} 法分析获得相对表达量结果。发现 *OsLRP1* 基因在根、茎、叶部位中均表达, 且在叶中表达量最高(图 7), 然而叶片表型在野生型与突变体之间无明显差异。

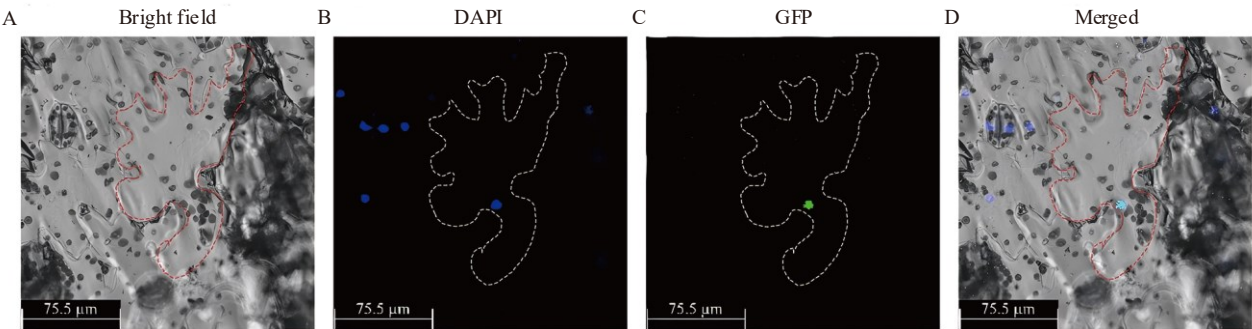


A: 整株表型; B: 根系表型; C: 亚甲基蓝染色结果 (图中黑点为侧根原基); D: 穗部表型; E: 侧根数; F: 侧根原基数; G: 穗长; H: 百粒重。图 C 中红圈及白色箭头示侧根原基部位。

A, Whole-plant phenotypes; B, Root system phenotypes; C, Methylene blue staining results (black dots indicate lateral root primordia); D, Panicle phenotypes; E, Statistical graph of lateral root number; F, Statistical graph of lateral root primordia number; G, Statistical graph of panicle length; H, Statistical graph of 100-grain weight. In figure C, Red circles and white arrows indicate the positions of lateral root primordia.

图 5 *lrp1* 突变体苗期根系表型及成熟期穗部性状

Fig. 5. Root phenotype of *lrp1* at the tillering stage and panicle phenotype at the maturity stage



A 和 D 图中红色虚线、B 和 C 中白色虚线为烟草细胞轮廓, DAPI 为细胞核特异性染料, 蓝色荧光信号标注的为细胞核部位。

In figures A and D, the red dashed lines indicate the cell contours of tobacco cells. In figures B and C, the white dashed lines indicate the cell contours of tobacco cells. DAPI is a specific nuclear dye, and the blue fluorescence signals mark the positions of the nuclei.

图 6 *OsLRP1* 蛋白亚细胞定位结果

Fig. 6. Results of subcellular localization of *OsLRP1* protein

2.8 外源生长素处理实验

外源生长素处理 7 d 后将水稻植株进行清洗后观察, 结果显示在 0.1 μmol/L IAA 处理 7 d 后, *lrp1* 的侧根数目及长度均显著增加, 但未达到野生型水平(图 8)。由此推断 *OsLRP1* 调控水稻侧根发育过程受生长素影响。

3 讨论

OsLRP1 是根系发育中少数已克隆的影响侧根形成的基因之一。本研究在水稻品种中花 11 中鉴定了一个 *OsLRP1* 基因的功能突变体 *lrp1*。测序结

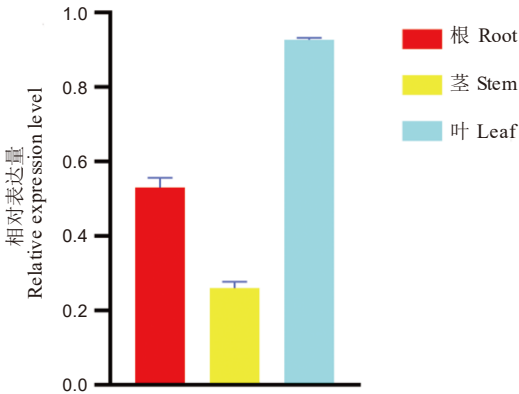


图 7 *OsLRP1* 基因相对表达量

Fig. 7. Relative expression level of *OsLRP1*

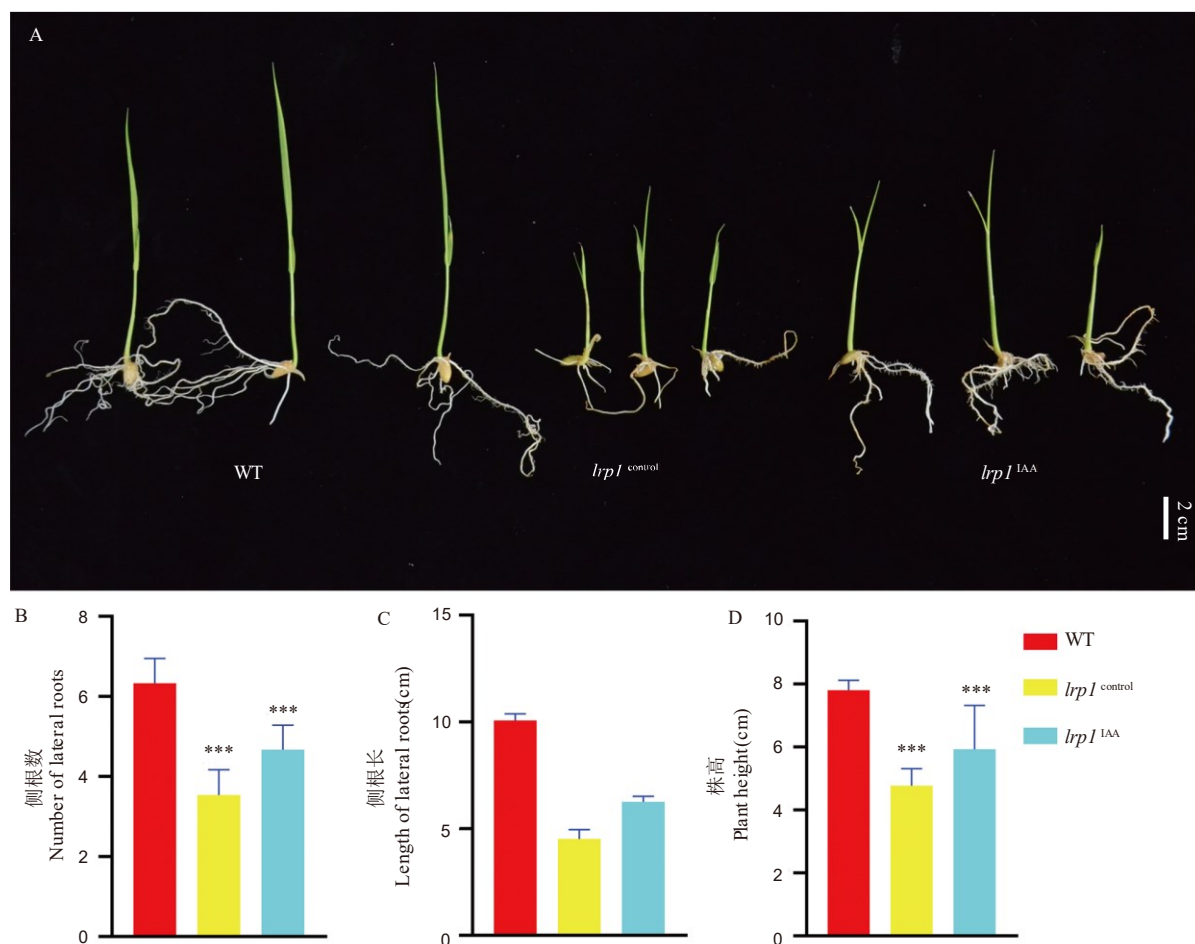


图 A 中 WT 为正常生长的中花 11, *lrp1*^{control} 为正常生长的 *lrp1* 突变体, *lrp1*^{IAA} 为 IAA 处理生长的 *lrp1* 突变体, 每三株为一组分别对应下方标注, 标尺 = 2 cm。图 B 为侧根数, 图 C 为侧根长, 图 D 为株高。

In figure A, WT represents normally grown Zhonghua 11, *lrp1*^{control} represents normally grown *lrp1* mutant, and *lrp1*^{IAA} represents IAA-treated *lrp1* mutant. Each group of three plants corresponds to the labels below, Bar = 2 cm. Figure B is a bar chart of lateral root number, figure C is a bar chart of lateral root length, and figure D is a bar chart of plant height.

图 8 *lrp1* 突变体生长素处理实验结果

Fig. 8. Results of auxin treatment experiments of *lrp1*

果显示, 第 648 位碱基 T 发生缺失, 导致翻译提前终止, 缺失 106 个氨基酸。该突变体较野生型生育期推迟 2 d, 侧根原基数目减少 32%, 侧根数目减少 21%, 穗长减少 12.5%, 百粒重降低 7.4%, 推测这些表型由侧根数量减少引起的生长发育紊乱所致。通过克隆 *OsLRP1* 基因并进行生物信息学分析发现, *OsLRP1* 蛋白的等电点为 7.27, 与大多数 LRP1 蛋白一致。 *OsLRP1* 基因编码的 *OsLRP1* 蛋白包含一个 DUF 结构域, 它在植物的发育和逆境适应过程中发挥重要功能^[33]。例如 *AtRDUF1* 编码的含有 DUF1117 结构域的 E3 泛素连接酶在拟南芥中正调控盐胁迫响应过程^[34]; 含有 DUF4206 结构域的蛋白与 Ras 样 GTP 酶, 尤其是 Rap 和 Rab 家族成员相互作用, 在信号转导过程中发挥重要作用^[35]。此外, 通过结合生物信息学方法, 推测本研究中的 DUF702 结构域可能参与植物生长发育及非生物胁迫

响应。*OsLRP1* 蛋白属于 SHI 转录因子家族成员, 亚细胞定位结果显示定位于细胞核, 与多数 *LRP1* 基因一致。实时荧光定量 PCR 发现, *OsLRP1* 基因在根、茎、叶中均有表达, 且在叶中的表达量显著高于茎和根, 然而并未发现 *lrp1* 突变体叶部性状较野生型有明显差别。在玉米中, *ZmLRP1* 基因在侧根原基发育早期被激活, 有趣的是它仅在早期侧根原基和分生组织中表达, 这与我们在水稻中发现的结果有差异。然而导致这一差异的原因尚不清楚。

侧根形成受多个信号途径调控, 其中生长素依赖的信号途径发挥关键作用。在侧根形成早期, 生长素信号紊乱会影响 *ARF7* 和 *LBD16* 介导的侧根原基位置决定过程, 使早期侧根形成位点无法正确识别生长素信号, 导致侧根原基无法顺利完成身份转变, 侧根原基起始位点数量显著减少^[36]。生长素一方面以 *ARF7/19* 依赖的方式诱导 VIK(VH1-

interaction Kinase)转录, 另一方面通过 TMK1 (Transmembrane kinase 1)激活 VIK 的激酶活性进而磷酸化 LBD18 和 ERF13, 磷酸化的 LBD18 性质更加稳定, 更能促进侧根起始; ERF13 磷酸化后解除对侧根原基形成过程的抑制作用^[37]。在模式生物拟南芥中, MTPC(Multiple C2 Domain And Transmembrane Region Protein)蛋白家族成员 MTPC3、MTPC4 和 MTPC6 作用并影响 *ARF7* 和 *ARF19* 细胞质凝聚体形成和核定位, 通过调节 *ARF7* 和 *ARF19* 的核质分布调节生长素信号, 从而促进侧根形成^[38]。在玉米中, *ZmLRP1* 是 Aux/IAA-ARF 模块的下游靶基因, 由 AUX/IAA 蛋白 RUM1(Rootless with undetectable meristem 1)直接调控^[31]。

为了验证生长素是否参与调控 *OsLRP1* 基因的表达, 对 *OsLRP1* 起始密码子上游 1 kb 的启动子区域进行分析, 发现了两种生长素响应元件 AuxRE: 5'-TGTCTC-3'(1 个)和 5'-TGTC-3'(3 个)。5'-TGTCTC-3'是生长素响应元件的核心基序, 位于生长素调控基因的启动子区域, 该元件可通过其 B3 结构域与生长素响应因子 ARF 特异性结合, 介导生长素信号对下游基因的表达调控^[39]。5'-TGTC-3'可能作为 5'-TGTCTC-3'的简并形式, 在部分基因启动子中弱化结合, 但仍保留有部分生长素响应能力^[40]。在拟南芥中, 5'-TGTCTC-3'突变为 5'-TGTC-3'后显著降低了 ARF 元件的结合活性及下游生长素诱导的靶基因表达水平, 表明 5'-TGTC-3'无法单独有效发挥 AuxRE 功能^[41]。水稻中有关研究表明, *OsARF19* 可能识别类似 5'-TGTC-3'的简并序列, 但其结合效率显著低于拟南芥^[42]。由此推测生长素可能通过 ARF 特异性结合 5'-TGTCTC-3'和 5'-TGTC-3'调控 *OsLRP1* 基因表达。通过生长素处理实验, 证实了 *lrp1* 突变体的侧根生长发育受生长素诱导。

本研究为侧根形成过程提供了新的理论依据, 探究 *OsLRP1* 基因调控侧根原基数目变化如何响应生长素信号调控, 是后续工作的重点。

参考文献:

- [1] 杨建昌. 水稻根系形态生理与产量、品质形成及养分吸收利用的关系[J]. 中国农业科学, 2011, 44(1): 36-46.
Yang J C. Relationships of rice root morphology and physiology with the formation of grain yield and quality and the nutrient absorption and utilization[J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2011, 44(1): 36-46. (in Chinese with English abstract)
- [2] Liu. The role of brassinosteroids in plant development[J]. *Annual Review of Plant Biology*, 2018, 69: 611-634.
- [3] Yamauchi T, Tanaka A, Inahashi H, Nishizawa N K, Tsutsumi N, Inukai Y, Nakazono M. Fine control of aerenchyma and lateral root development through AUX/IAA- and ARF-dependent auxin signaling[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2019, 116(41): 20770-20775.
- [4] Jansen L, Roberts I, de Rycke R, Beeckman T. Phloem-associated auxin response maxima determine radial positioning of lateral roots in maize[J]. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 2012, 367(1595): 1525-1533.
- [5] Bell J, McCully M E. A histological study of lateral root initiation and development in *Zea mays*[J]. *Protoplasma*, 1970, 70: 179-205.
- [6] Torres-Martínez H H, Napsucialy-Méndivil S, Dubrovsky J G. Cellular and molecular bases of lateral root initiation and morphogenesis[J]. *Current Opinion in Plant Biology*, 2022, 65: 102-115.
- [7] Smith D L, Fedoroff N V. *LRP1*, a gene expressed in lateral and adventitious root primordia of Arabidopsis[J]. *Plant Cell*, 1995, 7(6): 735-745.
- [8] Lin W, Zhou X, Tang W, Takahashi K, Pan X, Dai J, Ren H, Zhu X, Pan S, Zheng H, Gray W M, Xu T, Kinoshita T, Yang Z. TMK-based cell-surface auxin signalling activates cell-wall Acidification[J]. *Nature*, 2021, 599(7884): 278-282.
- [9] 张莉, 岳晶晶, 张静. 植物的向光性研究进展[J]. 分子植物育种, 2018, 16(6): 2015-2027.
Zhang L, Yue J J, Zhang J. Research advance of phototropism in plants[J]. *Molecular Plant Breeding*, 2018, 16(6): 2015-2027. (in Chinese with English abstract)
- [10] Lv B, Wei K, Hu K, Tian T, Zhang F, Yu Z, Zhang D, Su Y, Sang Y, Zhang X, Ding Z. MPK14-mediated auxin signaling controls lateral root development via ERF13-regulated very-long-chain fatty acid biosynthesis[J]. *Molecular Plant*, 2021, 14(2): 285-297.
- [11] Du Y, Scheres B. Lateral root formation and the multiple roles of auxin[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2018, 69(2): 155-167.
- [12] de Rybel B, Vassileva V, Parizot B, Demeulenaere M, Grunewald W, Audenaert D, van Campenhout J, Overvoorde P, Jansen L, Vanneste S, Möller B, Wilson M, Holman T, van Isterdael G, Brunoud G, Vuylsteke M, Vernoux T, de Veylder L, Inzé D, Weijers D, Bennett M J, Beeckman T. A novel aux/IAA28 signaling cascade activates GATA23-dependent specification of lateral root founder cell identity[J]. *Current Biology*, 2010, 20(19): 1697-1706.
- [13] Gibbs D J, Voß U, Harding S A, Fannon J, Moody L A, Yamada E, Swarup K, Nibau C, Bassel G W, Choudhary A, Lavenus J, Bradshaw S J, Stekel D J, Bennett M J, Coates J C. *AtMYB93* is a novel negative regulator of lateral root development in Arabidopsis[J]. *New Phytologist*, 2014, 203(4): 1194-1207.
- [14] Kumpf R P, Shi C L, Larrieu A, Stø I M, Butenko M A, Péret B, Riiser E S, Bennett M J, Aalen R B. Floral organ abscission peptide IDA and its HAE/HSL2 receptors control cell separation during lateral root emergence[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2013, 110(13): 5235-5240.
- [15] Zhu Q, Shao Y, Ge S, Zhang M, Zhang T, Hu X, Liu Y, Walker J, Zhang S, Xu J. A MAPK cascade downstream of IDA-HAE/HSL2 ligand-receptor pair in lateral root emergence[J]. *Nature Plants*, 2019, 5(4): 414-423.
- [16] Lü B, Wei K, Hu K, Tian T, Zhang F, Yu Z, Zhang D, Su Y, Sang Y, Zhang X, Ding Z. MPK14-mediated auxin signaling controls lateral root development via ERF13-regulated very-long-chain fatty acid biosynthesis[J]. *Molecular Plant*, 2021, 14(2): 285-297.
- [17] Hoffhuis H, Laskowski M, Du Y, Prasad K, Grigg S, Pinon V, Scheres B. Phyllotaxis and rhizotaxis in

- Arabidopsis* are modified by three PLETHORA transcription factors[J]. *Current Biology*, 2013, 23(11): 956-962.
- [18] Dello Ioio R, Nakamura K, Moubayidin L, Perilli S, Taniguchi M, Morita M T, Aoyama T, Costantino P, Sabatini S. A genetic framework for the control of cell division and differentiation in the root meristem[J]. *Science*, 2008, 322(5906): 1380-1384.
- [19] Tian Q, Uhlir N J, Reed J W. *Arabidopsis* SHY2/IAA3 inhibits auxin-regulated gene expression[J]. *Plant Cell*, 2002, 14(2): 301-319.
- [20] Teale W D, Paponov I A, Palme K. Auxin in action: Signalling, transport and the control of plant growth and development[J]. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2006, 7(11): 847-859.
- [21] di Mambro R, De Ruvo M, Pacifici E, Salvi E, Sozzani R, Benfey P N, Busch W, Novak O, Ljung K, Di Paola L, Marée A F M, Costantino P, Grieneisen V A, Sabatini S. Auxin minimum triggers the developmental switch from cell division to cell differentiation in the *Arabidopsis* root[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2017, 114(36): 7641-7649.
- [22] 朱振兴. *OsIAA11* 介导的生长素信号调控水稻侧根的起始[D]. 杭州: 浙江大学, 2011.
Zhu Z X. *OsIAA11*-mediated auxin signaling controls lateral root initiation in rice[D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2011. (in Chinese with English abstract)
- [23] Kawai T, Shibata K, Akahoshi R, Nishiuchi S, Takahashi H, Nakazono M, Kojima T, Nosaka-Takahashi M, Sato Y, Toyoda A, Lucob-Agustin N, Kano-Nakata M, Suralta R R, Niones J M, Chen Y, Siddique K H M, Yamauchi A, Inukai Y. WUSCHEL-related homeobox family genes in rice control lateral root primordium size[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2022, 119(1): e2101846119.
- [24] 张忠臣. 水稻侧根发育基因 *OsCYP2(cyclophilin2)* 的克隆和功能分析[D]. 杭州: 浙江大学, 2007.
Zhang Z C. Cloning and functional analysis of *OsCYP2(cyclophilin2)* in regulation of lateral root development[D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2007. (in Chinese with English abstract)
- [25] Zhao H, Ma T, Wang X, Deng Y, Ma H, Zhang R, Zhao J. *OsAUX1* controls lateral root initiation in rice (*Oryza sativa* L.)[J]. *Plant Cell and Environment*, 2015, 38(11): 2208-2222.
- [26] Inahashi H, Shelley I J, Yamauchi T, Nishiuchi S, Takahashi-Nosaka M, Matsunami M, Ogawa A, Noda Y, Inukai Y. *OsPIN2*, which encodes a member of the auxin efflux carrier proteins, is involved in root elongation growth and lateral root formation patterns via the regulation of auxin distribution in rice[J]. *Physiologia Plantarum*, 2018, 164(2): 216-225.
- [27] Kitomi Y, Inahashi H, Takehisa H, Sato Y, Inukai Y. *OsIAA13*-mediated auxin signaling is involved in lateral root initiation in rice[J]. *Plant Science*, 2012, 190: 116-122.
- [28] 贾利强. 水稻侧根发育基因 *OsSLR1* 的克隆和功能研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2008.
Jia L Q. Cloning and functional analysis of rice lateral root development related gene *OsSLR1*[D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2011. (in Chinese with English abstract)
- [29] Zhang Y, von Behrens I, Zimmermann R, Ludwig Y, Hey S, Hochholdinger F. LATERAL ROOT PRIMORDIA 1 of maize acts as a transcriptional activator in auxin signalling downstream of the *Aux/IAA* gene rootless with undetectable meristem 1[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2015, 66(13): 3855-3863.
- [30] 李曼菲. KNR6 调控玉米行粒数的分子机理研究[D]. 武汉: 华中农业大学, 2021.
Li M F. The molecular mechanism of KNR6 regulating kernel number per row in maize[D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2021. (in Chinese with English abstract)
- [31] 杜何为, 黄敏, 何凯. 水稻、玉米、小麦成熟种子总 RNA 的快速提取[J]. 分子植物育种, 2015, 13(9): 2091-2094.
Du H W, Huang M, He K. A method of rapid isolation of total RNA from mature seeds in rice, maize, and wheat[J]. *Molecular Plant Breeding*, 2015, 13(9): 2091-2094. (in Chinese with English abstract)
- [32] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta CT) method[J]. *Methods*, 2001, 25(4): 402-408.
- [33] 罗成科, 肖国举, 李明. 不同未知功能结构域蛋白家族 (DUFs) 基因在植物中的生物学功能[J]. 植物生理学报, 2015, 51(2): 153-158.
Luo C K, Xiao G J, Li M. Biological functions of different domains of unknown function protein families (DUFs) genes in plants[J]. *Plant Physiology Journal*, 2015, 51(2): 153-158. (in Chinese with English abstract)
- [34] Lü P, Wan J, Zhang C, Hina A, Al Amin G M, Begum N, Zhao T. Unraveling the diverse roles of neglected genes containing domains of unknown function (DUFs): Progress and Perspective[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2023, 24(4): 4187.
- [35] Jacobson M P, Kalyanaraman C, Zhao S, Tian B. Leveraging structure for enzyme function prediction: Methods, opportunities, and challenges[J]. *Trends in Biochemical Sciences*. 2014, 39(8): 363-71.
- [36] Zhang Y, Mitsuda N, Yoshizumi T, Horii Y, Oshima Y, Ohme-Takagi M, Matsui M, Kakimoto T. Two types of bHLH transcription factor determine the competence of the pericycle for lateral root initiation[J]. *Nature Plants*, 2021, 7(5): 633-643.
- [37] Shang E, Wei K, Lü B, Zhang X, Lin X, Ding Z, Leng J, Tian H, Ding Z. VIK-mediated auxin signaling regulates lateral root development in *Arabidopsis*[J]. *Advanced Science*, 2024, 11(33): e2402442.
- [38] Xuan L, Li J, Jiang Y, Shi M, Zhu Y, Bao X, Gong Q, Xue H W, Yu H, Liu L. *MCTP* controls nucleocytoplasmic partitioning of AUXIN RESPONSE FACTORS during lateral root development[J]. *Developmental Cell*, 2024, 59(24): 3229-3244.e5.
- [39] Ulmasov T, Hagen G, Guilfoyle T J. *ARF1*, a transcription factor that binds to auxin response elements[J]. *Science*, 1997, 276(5320): 1865-1868.
- [40] Guilfoyle T J, Hagen G. Auxin response factors[J]. *Current Opinion in Plant Biology*, 2007, 10(5): 453-460.
- [41] Zemlyanskaya E V, Wiebe D S, Omelyanchuk N A, Levitsky V G, Mironova V V. Meta-analysis of transcriptome data identified TGTCNN motif variants associated with the response to plant hormone auxin in *Arabidopsis thaliana* L[J]. *Journal of Bioinformatics and Computational Biology*, 2016, 14(2): 1641009.
- [42] Diao D, Hu X, Guan D, Wang W, Yang H, Liu Y. Genome-wide identification of the *ARF* (auxin response factor) gene family in peach and their expression analysis[J]. *Molecular Biology Reports*, 2020, 47(6): 4331-4344.