

水稻高温敏感侧根缺失突变体表型性状的初步研究

郝 西¹, 郭晓琴², 邓士政^{3*}

(1. 河南省农业科学院 经济作物研究所, 河南 郑州 450002; 2. 中州大学, 河南 郑州 450044;
3. 河南省种子管理站, 河南 郑州 450046)

摘要: 为揭示温度影响水稻侧根发育的机制, 从水稻甲基磺酸乙酯(EMS)突变体库中筛选出一个高温敏感侧根缺失突变体 *hts1*, 初步研究了该突变体苗期性状及农艺性状对不同温度的反应。结果表明, 该突变体在 26 °C 侧根表型正常, 28~32 °C 表现为少侧根, 34 °C 以上表现为无侧根以及不定根数目显著增加; 34 °C 高温处理下, 相比野生型对照, 突变体的分蘖数、株高以及结实率等分别降低了 42.5%、14.0%、58.2%。遗传分析表明, 该突变体是单隐性基因突变。该基因的突变使水稻生长发育尤其是侧根发育和育性对 34 °C 以上的高温表现出超敏感。

关键词: 水稻; 侧根; 高温; 突变体

中图分类号: S511 **文献标志码:** A **文章编号:** 1004-3268(2013)06-0032-05

Preliminary Study on Phenotypic Traits of Rice Lateral Rootless Mutant with High Temperature Sensitivity

HAO Xi¹, GUO Xiao-qin², DENG Shi-zheng^{3*}

(1. Industrial Crop Institute, Henan Academy of Agricultural Sciences, Zhengzhou 450002, China;
2. Zhongzhou University, Zhengzhou 450044, China;
3. Seed Management Station of Henan Province, Zhengzhou 450046, China)

Abstract: To investigate the effect of temperature on the development of rice lateral root, a lateral rootless mutant *hts1* was screened from an EMS mutant library, and its seedling phenotype and agronomic traits were studied. The mutant showed the deficiency of lateral roots and the increase of adventitious roots at 34 °C, but it was normal at 26 °C and presented an intermediate phenotype from 28 °C to 32 °C. Compared with its wild type Kasalath, the tiller, plant height and fertility of *hts1* after high temperature treatment decreased by 42.5%, 14.0% and 58.2%, respectively. Genetic analysis indicated that the mutation was controlled by a single recessive gene. Because of the gene mutation, the growth and development of *hts1* became extremely sensitive to high temperature, especially for lateral roots and fertility.

Key words: rice; lateral root; high temperature; mutant

侧根是植物根系的重要组成部分, 对于植物固定、营养和水分吸收及根际微生物活动等具有重要作用^[1]。侧根的发生是高等植物激素和环境共同调控的一个发育过程, 大致分为发生的起始、原基形成、分生组织形成和活化等几个关键时期^[2]。前人

对双子叶模式植物拟南芥侧根发生、发育的生理生化、基因调控等领域已进行了较多研究^[3-5], 但对于单子叶植物如水稻的侧根发育了解还很少。目前已经报道了一些水稻无侧根突变体^[6-7], 但经过功能鉴定的只有几个水稻生长素途径蛋白, 如 OsIAA1、

收稿日期: 2013-01-25

作者简介: 郝 西(1979-), 男, 河南平顶山人, 博士, 主要从事作物生理研究。E-mail: hx1997@163.com

* 通讯作者: 邓士政(1960-), 男, 河南孟州人, 高级农艺师, 博士, 主要从事农作物种子管理工作。

OsIAA11、OsIAA13、OsIAA23^[8-11]。整体上,人们对植物侧根发生、发育的机制还不是很清楚。

高温对植物生长乃至生存(包括作物产量)均有负面影响,根据 David^[12]等的研究结果,植物生长季的平均温度升高 1 °C,作物产量减少 17%。目前,高温已经成为水稻产量的主要限制因素,随着全球温室效应的加剧,高温胁迫危害水稻生产的问题愈发突出^[13-14]。水稻生长发育最适温度为 22~30 °C,其中根系生长的最适温度是 25~30 °C,温度过高或过低都会抑制水稻生长。

目前,在水稻等作物中已经报道了一些温度相关突变体,如叶色^[15-16]、温敏不育^[17]、类病斑^[18-20]突变体等,但有关水稻侧根对温度敏感的突变体还未见报道。本研究从水稻 EMS(ethyl methylsulphonate, 甲基磺酸乙酯)突变体库筛选出一个对高温敏感的侧根缺失突变体 hts1,初步进行了突变体的遗传分析,研究了该突变体苗期性状及农艺性状对不同温度梯度的反应,旨在为该突变基因的克隆及功能研究提供参考。

1 材料和方法

1.1 试验材料

试验于 2007—2008 年在杭州市浙江大学生命科学学院试验田进行。供试材料为籼稻野生型品种 Kasalath。

1.2 试验方法

1.2.1 水稻 Kasalath 突变体库的建立 取饱满的野生型种子(M₀),先用自来水浸泡 5 h,再用 1%的 EMS 浸泡 12 h(需在通风橱里操作),处理完毕后用自来水冲洗,尽量除尽表面的 EMS。将 M₀ 种子直播于大田,待成熟后,单株收获种子(M₂),M₂ 种子的收获表示 EMS 突变体库的初步建立。

1.2.2 突变体筛选 以 M₂ 群体进行突变体筛选,种子先用蒸馏水冲洗干净,用 0.66%的稀 HNO₃ 破休眠处理 16 h,37 °C 下暗处催芽约 2 d 至露白。将露白的种子播于水稻水培培养液中,在水稻玻璃温室中(白天/黑夜:34~36 °C/22~25 °C,12 h/12 h)培养 7 d,以侧根数量的变化为目标性状进行突变体的筛选。

1.2.3 突变体苗期参数分析 从 24~36 °C,每隔 2 °C,昼夜恒温生长 7 d。分别在野生型和突变体 hts1 种子播种后第 7 天取样,每个处理随机取 10 株,用刻度尺分别测量株高和种子根长度,目测统计不定根数目。用透射扫描仪 STD 1 600 Scanner(Epson, Japan)扫描水稻根系,采用 WinRHIZO

(Regent Instruments Inc, Canada)图像分析软件统计根系的侧根数目。

1.2.4 突变体侧根表型的遗传分析 用纯合突变体 hts1 作母本,野生型 Kasalath 作父本杂交获得 F₁ 个体。F₁ 种子在 34 °C 恒温条件下生长 7 d 统计侧根表型;F₁ 自交获得 F₂ 群体,随机选取 F₂ 群体的种子在 34 °C 高温条件下生长 7 d,统计野生型表型和突变体表型的分离比并进行 χ^2 测验分析。

1.2.5 农艺性状分析 盆栽采用统一规格的塑料桶,将均匀拌好肥料(尿素 0.326 g/kg、磷酸二氢钾 0.192 g/kg、氯化钾 0.141 g/kg)的土壤按 10 kg/桶进行分装。然后,将在水稻营养液里生长 14 d 的野生型和突变体 hts1 幼苗各 10 株移栽入桶中,分别在两种环境下生长,一种正常温度条件(白天/黑夜:30~32 °C/22~24 °C,12 h/12 h),一种高温条件(白天/黑夜:34~36 °C/22~24 °C,12 h/12 h)。分别统计抽穗期、分蘖数、株高、穗长、结实率、千粒重等农艺性状。

2 结果与分析

2.1 突变体 hts1 的获得

利用籼稻品种 Kasalath 的 EMS 突变体库,采用水培条件,白天气温 34~36 °C,晚上 22~25 °C,培养 7 d,以水稻根系为目标性状筛选突变体。发现一个侧根分段生长且种子根长变短的突变体(图 1),其侧根数量为野生型的 72%,分析这种侧根表型可能与昼夜温度节律变化有关。经连续自交分析,该性状能够稳定遗传。



图 1 播种后 7 d 的籼稻野生型(左)与突变体 hts1(右)表型

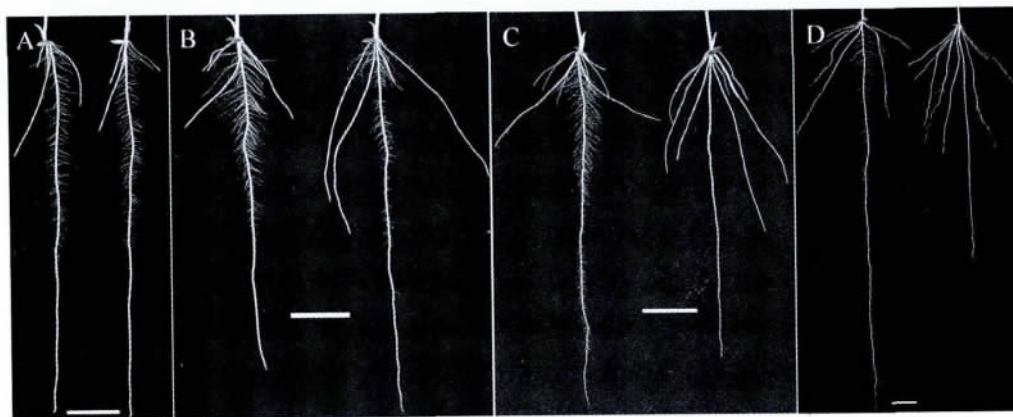
2.2 不同温度对突变体根系性状的影响

结果表明,在 24 °C 和 26 °C 条件下,野生型和突变体的侧根表型没有明显差异;28~32 °C,突变体相比野生型表现为少侧根表型,侧根数目和侧根密度相比野生型明显减少;34 °C 和 36 °C 时突变体表现为无侧根表型,而野生型的侧根生长相对正常(图 2 A—C,图 3 D)。但在 34 °C 恒温生长 14 d,突变体

发生少量侧根,约为野生型的 16%,尤其是不定根上新生了部分侧根(图 2 D)。

同时进行了 7 d 苗龄的其他苗期表型参数分析。在 24 °C、26 °C 和 28 °C 下生长 7 d,野生型和突变体的株高没有明显差异。从 32 °C 突变体的株高开始降低,36 °C 时相比野生型降低了 35% (图 3 A)。在 24 °C、26 °C、28 °C 生长 7 d 时,野生型和突变体的种子根长没有明显差异,而 30 °C 和

32 °C 时突变体种子根长比野生型长,34 °C 和 36 °C 时突变体的种子根长相比野生型开始明显降低,36 °C 时相比野生型降低了 28% (图 3 B)。在 24~30 °C 生长 7 d 时,突变体的平均不定根数少于野生型,但差异不显著;32~36 °C,野生型和突变体之间的平均不定根数差异变大,突变体明显多于野生型,36 °C 时相比野生型增加了 59% (图 3 C)。



A、B、C 分别代表昼夜 26 °C、30 °C 和 34 °C 7 d 的表型,D 代表 34 °C 恒温 14 d 的表型

图 2 播种后 7 d 和 14 d 的野生型 WT(左)和突变体 hts1(右)

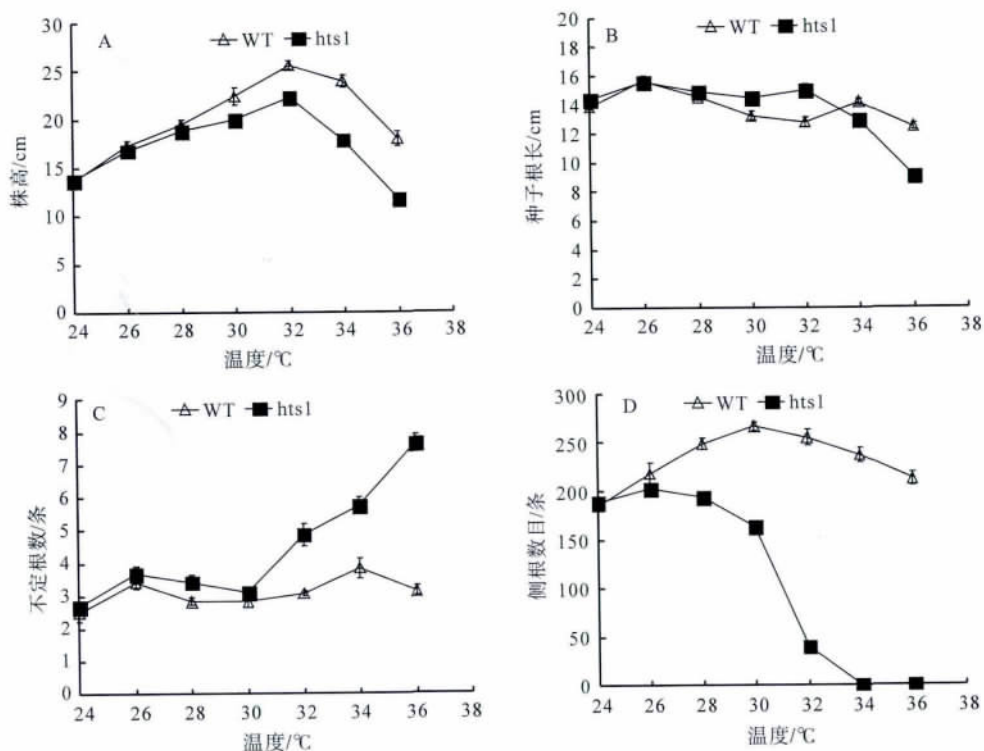


图 3 播种后 7 d 的野生型 WT 和突变体 hts1 在不同温度条件下表型参数

2.3 突变体侧根表型的遗传分析

用纯合突变体 hts1 作母本,野生型 Kasalath 作

父本杂交获得 F_1 个体。 F_1 在 34 °C 恒温条件下生长 7 d,侧根表型为野生型,表明该突变体为隐性突

变体。F₁ 自交获得 F₂ 群体,F₂ 群体的种子在 34 ℃ 高温条件下生长 7 d,野生型表型和突变体表型分离比为 174∶66,经 χ^2 测验分析,符合 3∶1 分离比,因此,该突变为单隐性基因突变(表 1)。

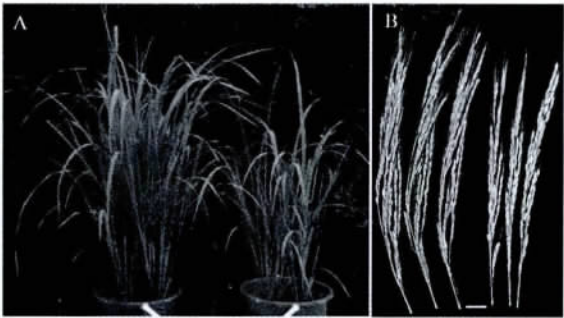
表 1 突变体 hts1 的遗传分析

基因型	侧根表型		总计	$\chi^2(3:1)$	P
	野生/株	无侧根/株			
WT	10	0	10		
hts1	0	10	10		
(hts1×WT)F ₁	10	0	10		
(hts1×WT)F ₂	174	66	240	0.67	0.41

表 2 正常和高温胁迫条件下野生型 WT 和突变体 hts1 农艺性状分析(n=10)

农艺性状	正常温度		高温胁迫	
	WT	hts1	WT	hts1
抽穗期/d	82	82	79	74*
株高/cm	116±6	116±7	114±5	98±4**
分蘖数/个	12.7±1.8	12.8±0.8	11.3±0.8	6.5±0.3**
穗长/cm	24.7±0.5	24.4±0.6	24.5±0.3	22.2±0.3*
穗粒数/粒	109.6±4.9	108.2±5.0	99.5±4.3	40.6±5.2**
结实率/%	90.5±1.5	90.3±0.7	89.7±1.3	37.5±1.8**
千粒重/g	20.5±0.5	19.3±0.2	20.2±0.4	7.8±0.1**

注:*,** 分别表示在 5%和 1%水平上差异显著,下同。



A. 60 d 表型; B. 后期结实率差异

图 4 高温条件下生长的野生型 WT(左)和突变体 hts1(右)

3 结论与讨论

温度是限制和决定植物地理分布的主要因子,也是影响植物生长发育和产量形成的重要因子^[21]。本研究表明,水稻高温敏感侧根缺失突变属于单隐性基因突变,突变后导致侧根表现出一种依赖于温度的调控方式,34~36 ℃时突变体表现出侧根完全缺失、株高降低、不定根增多、分蘖减少、结实率降低等多种表型;26 ℃时突变体为野生型表型,而 28~32 ℃时则为中间表型。2001 年郝再彬^[7]报道了一个水稻无侧根突变体 RM109;近年来还发现一些生长素信号途径蛋白如 OsIAA1、OsIAA11、OsIAA13、OsIAA23 等与侧根发生发育密切相关^[8-11],

2.4 突变体与野生型农艺性状分析

研究结果表明(表 2),正常温度条件下,野生型和突变体 hts1 在分蘖数、抽穗期、株高、穗长、穗粒数、结实率和千粒重等农艺性状上都没有显著差异。

在高温条件下,突变体相比野生型表现出显著的高温敏感性(表 2),其中分蘖数减少 42.5%,株高变矮 14%,抽穗期提前 5 d(图 4 A)。后期结实率降低了 58.2%(图 4 B),穗粒数降低了 59.2%,种子干瘪皱缩,灌浆过程严重受阻,千粒重降低了 61.4%(表 2)。

这些基因功能的缺失导致水稻产生少侧根或无侧根表型,但均未表现出受温度调控的表型。因此,该突变基因的深入研究有助于进一步揭示温度调控植物侧根发育的机制。

温度显著影响作物的生长发育尤其是育性。水稻在孕穗、抽穗期对温度极为敏感(即抽穗前后各 10 d),最适宜的温度为 25~30 ℃^[22]。开花灌浆期 35 ℃高温持续 5 d 以上,将严重影响水稻结实率及稻米品质。相比野生型,该突变体的分蘖数、结实率及千粒重等性状表现出对 34~36 ℃高温的超敏感,结实率降低了 58.2%,灌浆过程严重受阻,千粒重降低了 61.4%。一般影响作物育性的因素有温度^[22]、花器官的发育状况^[23]、花粉活力^[24]等,因此在高温条件下,针对突变体 hts1 花器官发育是否正常以及花粉活力的高低等方面需要进行详细的观察比较。

鉴于该突变基因对于水稻侧根发生及育性等多种性状的重要功能,进一步深入研究该突变体与野生型的生理生化代谢差异,通过基因克隆与基因表达调控技术探讨该基因在侧根发育与抗高温胁迫中的重要功能;通过转基因技术研究该基因的超表达能否增强作物抗高温胁迫的能力,都具有较大的理论与应用价值。

参考文献:

- [1] 何开平, 吴楚. Aux/IAA 和 ARF 蛋白对植物侧根形成的影响[J]. 现代农业科技, 2011(22): 55-58.
- [2] 张志勇, 王素芳, 田晓莉, 等. 生长素调节植物侧根发育过程的机制[J]. 作物杂志, 2009(1): 11-13.
- [3] Peret B, Larrieu A, Bennett M J. Lateral root emergence: a difficult birth[J]. J Exp Bot, 2009, 60(13): 3637-3643.
- [4] Peret B, De Rybel B, Casimiro I, et al. Arabidopsis lateral root development: an emerging story[J]. Trends Plant Sci, 2009, 14(7): 399-408.
- [5] Casimiro I, Beeckman T, Graham N, et al. Dissecting Arabidopsis lateral root development[J]. Trends Plant Sci, 2003, 8(4): 165-171.
- [6] Rebouillat J, Dievart A, Verdeil J, et al. Molecular genetics of rice root development[J]. Rice, 2009, 2(1): 15-34.
- [7] 郝再彬. 水稻侧根突变体 RM109 的农艺性状[J]. 东北农业大学学报, 2001, 32(1): 75-79.
- [8] Nakamura A, Umemura I, Gomi K, et al. Production and characterization of auxin-insensitive rice by overexpression of a mutagenized rice IAA protein[J]. Plant J, 2006, 46(2): 297-306.
- [9] Song Y, You J, Xiong L. Characterization of OsIAA1 gene, a member of rice Aux/IAA family involved in auxin and brassinosteroid hormone responses and plant morphogenesis[J]. Plant Mol Biol, 2009, 70(3): 297-309.
- [10] Zhu Z X, Liu Y, Liu S J, et al. A gain-of-function mutation in OsIAA11 affects lateral root development in rice[J]. Mol Plant, 2011, 5(1): 154-161.
- [11] Ni Jun, Wang Gaohang, Zhu Zhenxing, et al. OsIAA23-mediated auxin signaling defines postembryonic maintenance of QC in rice[J]. Plant J, 2011, 68(3): 433-442.
- [12] David B L, Gregory P A. Climate and management contributions to recent trends in U. S. agricultural yields[J]. Science, 2003, 299(5609): 1032.
- [13] Peng S, Huang J, Sheehy J E, et al. Rice yields decline with higher night temperature from global warming[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2004, 101(27): 9971-9975.
- [14] Grover A, Chandramouli A, Agarwal S, et al. Transgenic rice for tolerance against abiotic stresses[C]// Datta S K. Rice Improvement in the Genomic Era. USA: Hawarth Press, 2009, 237-267.
- [15] 吴军, 陈佳颖, 赵剑, 等. 2 个水稻温敏叶色突变体的光合特性研究[J]. 中国农学通报, 2012, 28(21): 16-21.
- [16] 何颖红, 邹国兴, 饶玉春, 等. 水稻白条叶突变体(st10)的遗传分析与基因定位[J]. 分子植物育种, 2011, 9(2): 136-142.
- [17] 王昌虎, 马镇荣, 张明永. 水稻温敏核不育突变体 0A15-1 的育性表现及遗传学研究[J]. 热带亚热带植物学报, 2004, 12(4): 331-336.
- [18] 马健阳, 陈孙禄, 张建辉, 等. 一个水稻类病条纹斑突变体的鉴定和遗传定位[J]. 中国水稻科学, 2011, 25(2): 150-156.
- [19] Yamanouchi U, Yano M, Lin H, et al. A rice spotted leaf gene *Spl7*, encodes a heat stress transcription factor protein[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2002, 99(11): 7530-7535.
- [20] Zeng L R, Qu S H, Bordeos A, et al. Spotted leaf 11, a negative regulator of plant cell death and defense, encodes a U-box/armadillo repeat protein endowed with E3 ubiquitin ligase activity[J]. Plant Cell, 2004, 16(10): 2795-2808.
- [21] 姚明亮. 植物抗寒基因研究进展[J]. 生物学教学, 2002, 27(2): 25-26.
- [22] 周伟辉, 薛大伟, 张国平. 高温胁迫下水稻叶片的蛋白响应及其基因型和生育期差异[J]. 作物学报, 2011, 37(5): 820-831.
- [23] Wu J G, Shi C H, Chen S Y, et al. The cytological mechanism of low fertility in the naked seed rice[J]. Genetica, 2004, 121(3): 259-267.
- [24] 张彬, 芮雯奕, 郑建初, 等. 水稻开花期花粉活力和结实率对高温的响应特征[J]. 作物学报, 2007, 33(7): 1177-1181.