

水稻脆秆突变体 *bc16* 的鉴定和基因精细定位

舒亚洲 曾冬冬 秦冉 金晓丽 郑希 石春海*

(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: chhshi@zju.edu.cn)

Identification and Gene Fine Mapping of a *Brittle Culm 16* (*bc16*) Mutant in Rice

SHU Ya-zhou, ZENG Dong-dong, QIN Ran, JIN Xiao-li, ZHENG Xi, SHI Chun-hai*

(College of Agriculture and Biotechnology, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China; * Corresponding author, E-mail: chhshi@zju.edu.cn)

SHU Yazhou, ZENG Dongdong, QIN Ran, et al. Identification and gene fine mapping of a *brittle culm 16* (*bc16*) mutant in rice. *Chin J Rice Sci*, 2016, 30(4): 345-355.

Abstract: Brittle culm mutants are one of the important materials to study plant mechanical strength. A brittle culm mutant named as *bc16* (*brittle culm 16*) was isolated from Nipponbare through EMS (Ethyl Methane Sulphonate) treatment. Compared with wild type, *bc16* featured fragile and easily broken stems, leaves, roots, lower plant height and filled grains per panicle, shorter panicle length and main root length. The components analysis of stem cell wall showed that the cellulose content in *bc16* mutant was sharply decreased, while hemi-cellulose content was evidently increased and no significant difference had been found in the lignin content between *bc16* mutant and wild type. The cell shape and arrangement of parenchyma cells in *bc16* mutant became irregular and disordered. Moreover, the parenchyma cell walls and the secondary cell walls of sclerenchyma cells in *bc16* mutant under the epidermis layer were thinner than those in wild type. The results of genetic analysis revealed that the mutant trait was controlled by a single recessive gene, which was mapped in a 66.6-kb region between InDel (insertion-deletion) markers 2-F and 2-H on chromosome 2 with 7 candidate genes. Among these genes, *Os02g0738900*, which is allelic to *BC3* gene, was specially focused on. There was a T to A substitution at the very end of the 13th intron of *Os02g0738900* which was at the 5113th base location from initiation codon by sequencing, which led an splicing forward mutation in the process of transcription, and six nucleotides were cut into mRNA as a result, which finally cause the stop of translation. Additionally, in the mutant, there were significant decrease in the expression of *bc16* gene in roots, culms and leaves by real-time PCR method. The *bc16* might affect the synthesis of sclerenchyma secondary cell wall and parenchyma primary cells wall, which could affect the mechanical strength of rice stem.

Key words: rice; brittle culm; gene mapping; cell wall synthesis

舒亚洲, 曾冬冬, 秦冉, 等. 水稻脆秆突变体 *bc16* 的鉴定和基因精细定位. 中国水稻科学, 2016, 30(4): 345-355.

摘要: 脆秆突变体是一类研究植物机械强度的重要材料。利用 EMS(甲基磺酸乙酯)诱变梗稻品种日本晴, 筛选获得一个脆秆突变体, 命名为 *bc16* (*brittle culm16*)。与野生型植株相比, *bc16* 茎秆、叶片和根明显变脆, 而株高、穗粒数降低, 穗长和主根长变短。茎秆细胞壁成分分析表明, *bc16* 纤维素含量显著低于野生型植株, 半纤维素含量则显著增加, 而木质素含量差异不显著。突变体 *bc16* 薄壁细胞形状无规则、排列紊乱, 表皮层下厚壁细胞次生壁和薄壁细胞壁变薄。遗传分析表明 *bc16* 突变体由隐性单基因控制, 位于水稻第 2 染色体长臂端 InDel 标记 2-F 和 2-H 间 66.6 kb 的区间内。该区间共有 7 个候选基因, 其中 *Os02g0738900* 是 *bc3* 脆秆基因的等位基因。测序结果表明, *bc16* 突变体中的 *Os02g0738900* 基因从 ATG 开始第 5113 位, 在第 13 内含子近末端发生了 T→A 的置换, 导致转录过程中该内含子末端 6 个核苷酸被剪切到 mRNA 中, 最终导致翻译提前终止。实时荧光定量 PCR 结果表明 *Os02g0738900* 基因在 *bc16* 脆秆突变体根、茎、叶中的表达量降低。 *bc16* 基因可能通过调控厚壁组织次生细胞壁和薄壁细胞初生壁的合成来影响水稻茎秆机械强度。

关键词: 水稻; 脆秆; 基因定位; 细胞壁合成

中图分类号: Q343.5; Q754

文献标识码: A

文章编号: 1001-7216(2016)04-0345-11

收稿日期: 2015-12-14; 修改稿收到日期: 2016-02-26。

基金项目: 国家科技支撑计划资助项目(2011BAD35B02); 浙江省科技厅水稻产业科技创新服务平台; 高等学校学科创新引智计划资助项目(Grant B14027); 浙江省重大科技攻关专项(2012C12901-2); 教育部创新团队资助项目(IRT1185)。

植物机械强度是一种重要的农艺性状,直接影响着作物的抗倒性。研究表明,引起水稻倒伏的主要原因是茎秆机械强度不足^[1]。植物细胞壁是由多糖、蛋白质等成分组成的复杂网状结构,支撑着植株形态的建成^[2,3]。作为植株骨架的细胞壁,其主要成分是纤维素、半纤维素和木质素,这些成分含量的高低密切影响着植株的机械强度。植物机械组织主要对植株起支撑和保护作用,可分为厚壁组织和厚角组织两类,其中位于维管组织周围和表皮层以下的几层厚壁细胞起着主要的支持作用,是影响水稻茎秆强度的主要结构因子。脆秆突变体是一类茎秆机械强度降低、脆性增加的材料。一般而言,水稻脆秆突变体在细胞壁成分上通常会表现出纤维素含量降低,在结构上表现为厚壁组织次生细胞壁变薄^[4,5]。

脆秆突变体是一类比较常见的突变体,拟南芥^[6]、大麦^[7,8]、小麦^[9,10]和水稻^[11]等植物中均已发现该类突变体。目前,发现并命名的水稻脆秆突变体有 20 多个,如 *bc9311-1*、*NBC(t)*、*dbc1* 等^[12-14],已精细定位或克隆了 *BC1*~*BC8*、*BC10*~*BC12*、*BC14* 和 *BC15* 等基因,并对 *BC1*、*BC3*、*BC6*、*BC7*、*BC12*、*BC14*、*BC15* 等基因的功能进行了研究,研究表明多数脆秆基因参与了纤维素的代谢^[15]。Li 等^[16]克隆了可编码 COBRA 蛋白的基因 *BC1*,该基因突变后会引起水稻细胞壁的次生壁变薄,纤维素含量降低,半纤维素和木质素含量增加等。Hirano 等^[17]和 Zhang 等^[18]发现水稻脆秆突变体 *bc3*,该突变体表现出根、茎、叶变脆易折断,根长变短,厚壁组织细胞壁和薄壁细胞壁变薄等特点,进一步研究表明水稻脆秆基因 *BC3* 编码 1 个经典的发动蛋白家族 OsDPR2B 蛋白,参与水稻次生壁的合成。Kotake 等^[19]对位于第 9 染色体上的不完全显性基因 *BC6* 进行研究,结果表明该基因参与了编码纤维素合酶催化亚基,其突变后能够显著降低纤维素含量。Yan 等^[20]从⁶⁰Co- γ 射线诱导粳稻品种中花 11 中获得脆秆突变体 *bc7(t)*,将编码纤维素合酶亚基突变基因定位于水稻第 1 染色体长臂 8.4 kb 的区域内。Zhang 等^[21]在粳稻品种 C418 发现的脆秆突变体 *bc12*,其纤维素含量变化不明显,而半纤维素含量增加了 50%,纤维素微纤丝方向发生改变和木质素含量显著增加引起植株茎秆变脆;进一步研究发现编码水稻驱动蛋白 *BC12* 是一个双靶向驱动蛋白,在细胞核和细胞质中均有分布,主要参与了细胞分裂中微管的排列。Zhang 等^[22]研究显示,*BC14* 编码

的水稻核苷酸糖转运蛋白 OsNST1 位于高尔基体上,该基因突变可导致细胞壁纤维素含量降低,从而引起植物机械强度的下降而表现脆性。Wu 等^[23]在中花 8 号胚性愈伤组织中获得了一个稳定遗传的脆秆突变体 *bc15*,其纤维素含量较野生型降低 23%,而阿拉伯糖和木糖分别增加 58%和 77%;该基因已定位于第 9 染色体标记 M2 和 M3 之间 114 kb 内,序列分析发现 *Os09g0494200* 基因编码区发生了一个错义突变,导致 213 位丙氨酸突变成亮氨酸;蛋白功能研究表明 *BC15* 编码了一个膜相关的类几丁质酶蛋白,其突变会导致纤维素含量的降低,进而导致茎秆机械强度的下降。虽然已有的水稻脆秆突变体和基因对于茎秆机械强度分子机理的揭示起到了重要的作用,但是其分子机理有待进一步深入研究。发掘新的脆秆突变体,定位和克隆新的脆秆基因,有助于进一步揭示茎秆机械强度的分子机理。

本实验室通过 EMS 诱变粳稻品种日本晴,获得了一个脆秆突变体 *bc16*,从表型、生理、遗传等方面对该突变体进行鉴定,明确了相应的遗传特性,并对该突变基因进行了精细定位;同时采用实时荧光定量 PCR 对 *bc16* 基因在根、茎、叶中表达量进行了分析。通过对该突变体的研究,有利于进一步了解水稻茎秆机械强度的分子机理,为水稻抗倒育种提供理论依据和材料基础。

1 材料与方法

1.1 材料

利用 EMS 诱变粳稻品种日本晴(Nipponbare),从中筛选到一个脆秆突变体,经多代连续自交,突变性状能够稳定遗传,命名为 *bc16* (*brittle culm 16*)。遗传分析和定位群体分别为突变体与日本晴和明恢 63 杂交形成的 F₂。

1.2 突变体表型分析

2015 年 5 月将脆秆突变体 *bc16* 和野生型日本晴种植于浙江大学实验农场,各个材料种植 8 行,每行 6 株,株行距为 17 cm×17 cm。成熟时随机选取 10 株野生型和突变体,分别统计株高、主穗长度、剑叶长、节间长度、总粒数、结实率等性状。

1.3 纤维素、半纤维素、木质素含量测定

采用 van Soest 等^[24]的方法测定成熟期茎秆纤维素、半纤维素和木质素含量,稍有改进(消泡剂使用 n-辛醇代替十氢化萘)。采用上海新嘉电子有限公司 CXC-06 粗纤维测定仪测定中性洗涤纤维和酸

性洗涤纤维含量,用意大利公司生产的 VELP CSF 膳食纤维测定仪测定纤维素含量。3 次重复,利用 EXCEL 分析实验结果。

1.4 细胞学观察

1.4.1 石蜡切片观察

切取成熟期突变体 *bc16* 和日本晴茎秆倒一节间中间部位 1 cm 组织,将样品用 FAA 固定液(38%甲醛 5 mL,冰醋酸 5 mL,70%酒精 90 mL)固定 24 h。样品经脱水、包埋、切片、脱蜡后用间苯三酚染色,倒置荧光显微镜拍照(NIKON ECLIPSE TI-SR)。

1.4.2 透射电镜观察

取成熟期突变体 *bc16* 和日本晴倒一节间中间部位 1 cm 组织,用刀片纵切成 5~6 个小片。样品于 2.5%戊二醛溶液中 4℃ 下固定过夜,经漂洗、包埋等处理后利用 Reichert 超薄切片机切取 70~90 nm 薄片。切片在柠檬酸铅溶液、醋酸双氧铀 50%乙醇饱和溶液中各染色 15 min,之后采用透射电镜(Hitachi H-7650)观察、拍照。

1.5 *bc16* 突变体基因定位和测序

采用 Michelmores 等^[25]提出的 BSA(Bulk Segregation Analysis)法,在定位群体中分别取突变和正常单株各 12 株,利用 CTAB 法提取单株 DNA,将其浓度均调至 200 ng/ μ L。突变株和正常单株的 DNA 分别取 50 μ L 构成突变池和正常池。利用本实验室在日本晴和明恢 63 中筛选到的 334 对多态引物对两个池进行连锁标记筛选,对得到的连锁标记用 F_2 群体突变单株进行验证。利用 Gramene (<http://www.gramene.org>) 数据库和 NCBI 序列匹配数据库 ([\) 以及 DNASTAR 等软件设计新引物,进一步进行精细定位。根据水稻基因组注释计划数据库 \(<http://rice.plantbiology.msu.edu/cgi-bin/gbrowse/rice>\) 和 水稻注释计划数据库 \(<http://rapdb.dna.affrc.go.jp/index.html>\) 对候选基因进行功能注释,并对其测序,最终确定目的基因及其突变位点。](http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE=MegaBlast&PROGRAM=blastn&BLAST_PROGRAMS=megaBlast&PAGE_TYPE=BlastSearch&BLAST_SPEC=blast2seq&QUERY=&SUBJECTS=)

1.6 RT-PCR

采用 Trizol 法提取 *bc16* 脆秆突变体和野生型 3 叶期根、茎、叶部位总 RNA,随后将总 RNA 反转

录合成 cDNA 第一条链。利用实时荧光定量 PCR 分析目的基因在野生型和突变体根、茎、叶中的表达量。每个样品中各基因的相对表达量以野生型为对照用内参照基因 *OsActin1* 进行归一化处理,相对表达量计算方法为 $2^{-\Delta\Delta CT}$ ^[26]。荧光定量操作步骤参照 Takara 去除基因组逆转录试剂盒 [Primer Script[™] RT reagent Kit with gDNA Eraser (Perfect Real Time)] 说明书。实验所用试剂为 Takara 公司的定量 PCR 试剂盒 (SYBR Premix ExTaq[™]),所用仪器为 CFX96[™] 荧光定量 PCR 仪。实时 qPCR 体系包括 cDNA 模板 2 μ L、SYBRPremix ExTaq 12.5 μ L、正反向引物各 1 μ L、超纯水 8.5 μ L。每个样品重复 4 次。PCR 扩增采用两步法,程序如下:95℃ 下 30 s;95℃ 下 5 s,60℃ 下 30 s,39 个循环。溶解曲线分析:95℃ 下 10 s,65℃ 下 5 s,95℃ 下 5 min。

2 结果与分析

2.1 *bc16* 表型特征和农艺性状分析

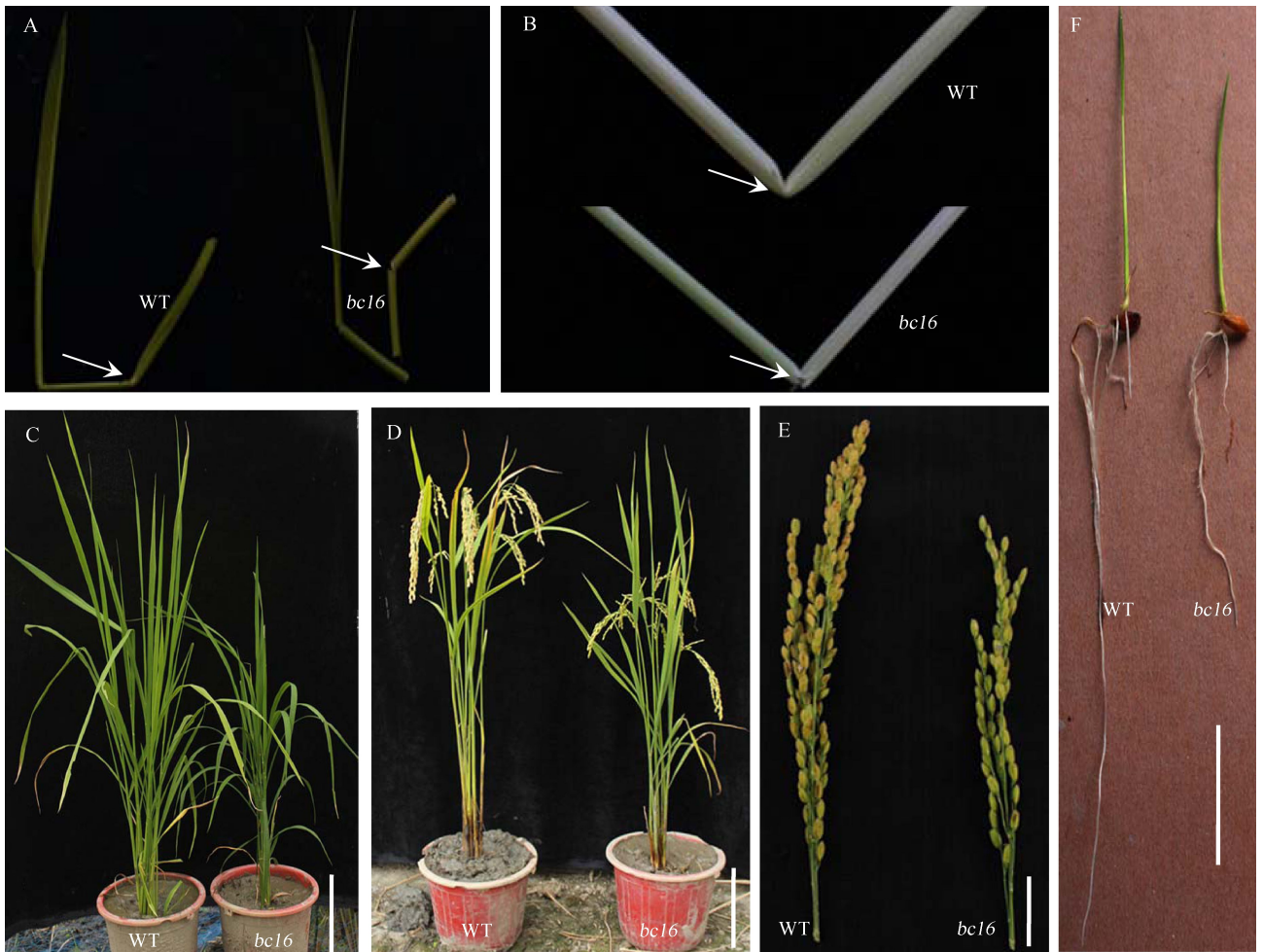
突变体 *bc16* 茎秆、叶片、根从苗期就开始表现脆性,直至成熟期(图 1-A、B)。与野生型相比,突变体 *bc16* 的株高降低、穗长变短、每穗粒数明显减少(图 1-C、D、E),而结实率和千粒重的差异则不明显(表 1)。同时,突变体 *bc16* 还表现出主根长(图 1-F)、剑叶、倒 2 叶、倒 3 叶叶片变短,抽穗、灌浆、成熟时间推迟。此外,各节间长度统计表明,突变体 *bc16* 倒 1 节间、倒 2 节间、倒 3 节间、倒 5 节间长度明显低于野生型植株,而倒 4 节间长度有明显增加,差异都达到了极显著水平(表 1)。

2.2 *bc16* 细胞壁主要组分含量分析

成熟期野生型和突变体 *bc16* 细胞壁纤维素、半纤维素和木质素等主要组成成分含量的测定结果表明,突变体 *bc16* 的茎秆纤维素含量要比野生型植株降低 36.9%,而半纤维素含量则提高了 23.6%,均达到极显著水平,但木质素含量差异不明显(图 2)。

2.3 茎秆横切面细胞学观察

倒置荧光显微镜观察发现突变体 *bc16* 的薄壁细胞表现为近圆形、细胞规则且排列均匀,而野生型薄壁细胞的形状无规则、排列紊乱(图 3-A、B 黑色箭头所示);突变体 *bc16* 和野生型表皮层下的厚壁组织细胞壁厚度(图 3-A、B 方框所示)有明显差异。透射电镜观察发现突变体 *bc16* 的厚壁组织细胞壁厚度明显变薄(图 3-C、D)、次生细胞壁变窄,而初生



A—苗期；B—成熟期；C—拔节期；D—成熟期；E—稻穗；F—苗期根长比较。标尺=12.0 cm(C)、15.0 cm(D)、3.0 cm(E)、2.5 cm(F)。
A, Seedling stage; B, Mature stage; C, Wild type and *bc16* mutant at the elongation stage; D, Wild type and *bc16* mutant at the mature stage;
E, Panicles; F, Root length at seedling stage. Bar=12.0 cm (C), 15.0 cm (D), 3.0 cm (E) and 2.5 cm (F).

图1 野生型和突变体 *bc16* 表型

Fig. 1. Phenotype of wild type and *bc16* mutant.

表1 野生型和突变体 *bc16* 的农艺性状比较

Table 1. The comparison of agronomic traits between wild type and *bc16*.

性状 Trait	野生型 Wild type	<i>bc16</i>
株高 Plant height/cm	100.43±3.93	70.21±1.64**
穗长 Panicle length/cm	22.05±0.99	17.87±1.06**
每穗粒数 Filled grain number per panicle	125.70±7.54	74.60±8.20**
结实率 Seed-setting rate /%	89.79±2.43	88.83±3.28
千粒重 1000-grain weight /g	24.70±0.56	22.40±0.99
剑叶长 Flag leaf length/cm	31.51±6.12	26.01±3.21*
倒1节间 1st internode from the top/cm	37.01±1.98	26.49±3.22**
倒2节间 2nd internode from the top/cm	18.83±0.88	11.91±1.47**
倒3节间 3rd internode from the top/cm	12.57±1.33	6.46±0.73**
倒4节间 4th internode from the top/cm	4.84±0.91	5.91±0.69**
倒5节间 5th internode from the top/cm	2.97±0.72	1.50±0.35**

数据为平均值±标准差($n=10$,其中千粒重 $n=3$)。*、**表示 t -测验在 0.01 水平上差异显著,* 表示 t -测验在 0.05 水平上差异显著。

Figures are mean ±SD($n=10$, for 1000-grain weight, $n=3$).*, ** indicate significant difference at $P<0.05$ and $P<0.01$ between wild type and *bc16* mutant, respectively. The same as below.

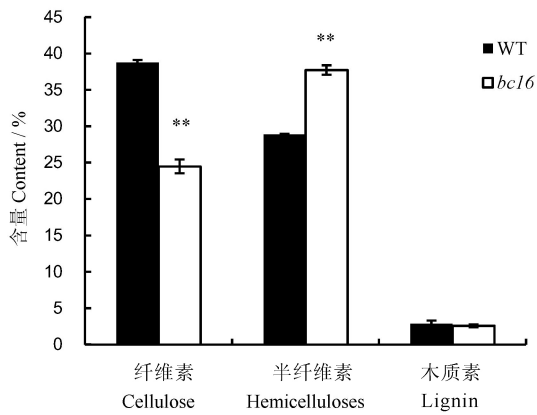


图2 野生型和突变体 *bc16* 植株细胞壁的主要成分含量
Fig.2. Contents of main ingredients in cell wall of WT and *bc16*.

细胞壁厚度差异不明显;此外 *bc16* 次生壁分层较为明显,而野生型则完全未分层(3-E、F);突变体 *bc16* 薄壁细胞壁明显薄于野生型,细胞结合方式不规则(图 3-G、H)。上述结果表明,脆性基因 *bc16* 可导致表皮下厚壁细胞次生壁和薄壁细胞壁变薄,薄壁细胞结合方式发生改变。

2.4 突变体 *bc16* 的遗传分析

利用表型正常的日本晴与突变体 *bc16* 配制杂交组合, F_1 植株表型正常, 158株 F_2 群体中出现明显

的表型分离,正常单株有 120 株,突变单株有 38 株。卡方检验结果符合 3 : 1 的分离比例 ($\chi^2 = 0.08 < \chi_{0.05}^2 = 3.84$),表明 *bc16* 受一对隐性核基因控制。

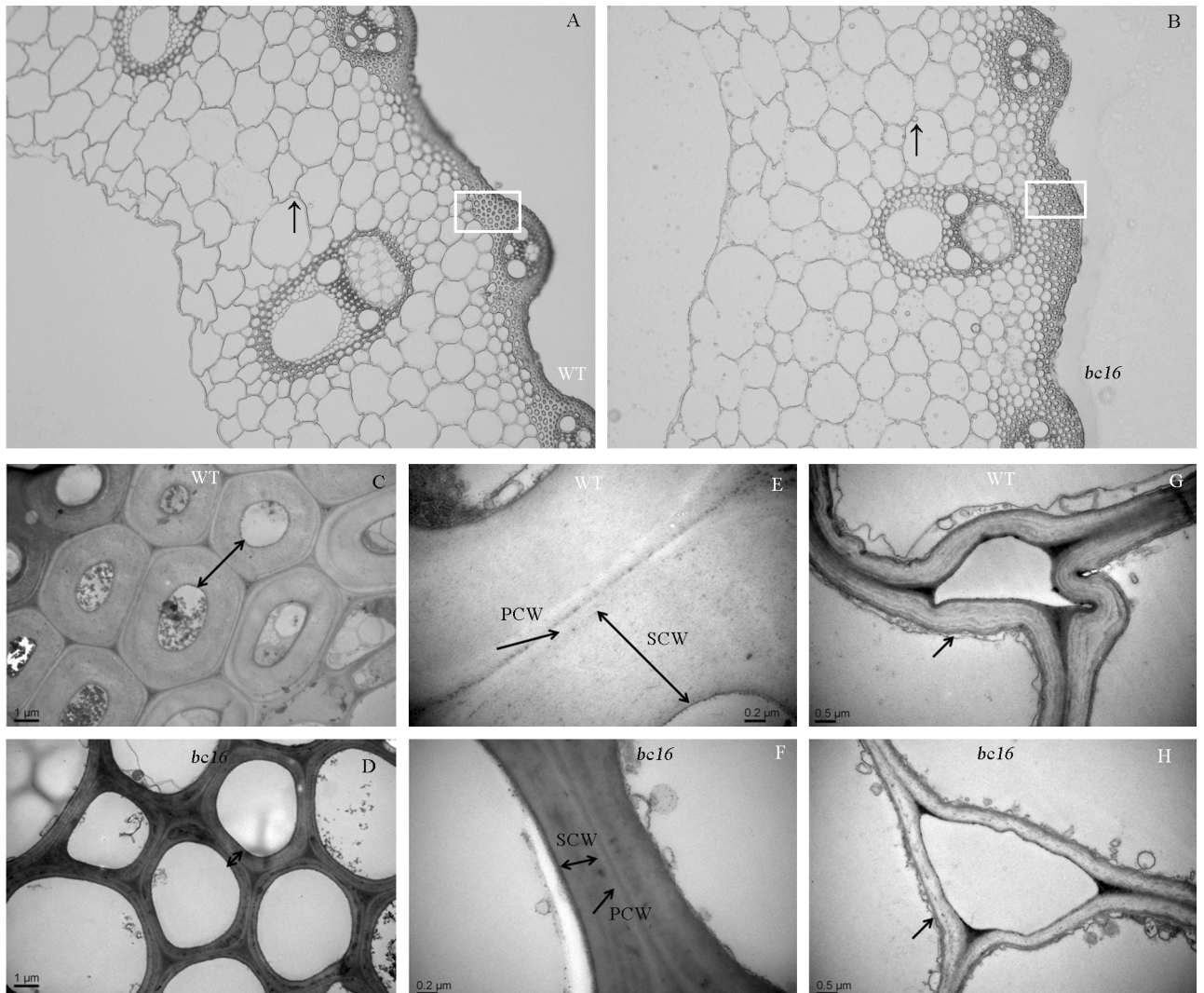
2.5 *bc16* 基因定位

利用在亲本间筛选到的 334 对多态性引物对突变池和正常池进行多态性条带筛选,结果发现第 2 染色体 SSR 标记 RM64、RM66、RM5607、RM14099 在两池间有多态性(表 2)。利用 12 个 F_2 单株验证这些标记,只有 RM66 存在一个单交换,其他标记没有单交换,这表明这些标记与目的基因连锁。采用另外 21 个 F_2 单株扩增 RM64、RM5607、RM66,发现交换单株在这些标记间均相同,交换单株数目分别为 4、4、6,根据标记在染色体上的位置可以推知目的基因位于标记的左侧(图 4-A)。通过扩大 F_2 群体和设计新的 InDel 标记,将目的基因进一步定位于标记 2-C 和 2-D 之间(图 4-B);随后利用 871 个单株最终将 *bc16* 基因精细定位于 2-F 和 2-H 之间 66.6 kb 的候选区间内(图 4-C)。在该区间里存在 7 个候选基因(图 4-D),其中 *Os02g0738900* 是 *bc3* 脆秆基因的等位基因,编码一个经典的发动蛋白 OsDRP2B,该蛋白是次生壁形成所必需的^[17,27]。因此,推测 *Os02g0738900* 基因可能就是目的基因。

表 2 *bc16* 基因定位部分引物

Table 2. Part of primers for *bc16* gene mapping.

标记 Marker	正向引物(5'→3') Forward primer	反向引物(5'→3') Reverse primer	用途 Purpose
RM64	GGTTCAAACCAAGCTGATCA	GATGAAGGCCTTCCACGCAG	定位 Mapping
RM66	GGTCTGGGTCAATAATTGGGTTACC	TTGCTGCATGATCCTAAACCGG	定位 Mapping
RM68	CCATTCTGAGAGAAGATCTGA	CACCTCATCTCGTAACGCC	定位 Mapping
RM5607	TTTCTTGCCACACGACTACGG	TACGTGGCCAACTGGCTATACATACG	定位 Mapping
RM1405	CGGCTTGTTTATGCTACCAGAGG	CGAGGAGACTAACCAAATTTGATCG	定位 Mapping
RM14099	GGTAGCTGAGCAATTGGCATGG	GATGATCAGGAACCTATCCATCTCC	定位 Mapping
2-B	ATGGTTCTTGTTTCTCTGCTGATG	TGGATACTGATGTTGCTGGCTAAG	定位 Mapping
2-C	ATATGCATGCAAATCGACCAACTC	CAGCATAAGCACCGCCATCA	定位 Mapping
2-D	TCCTCGCCCTCCGCCTCCTT	ATCACCGCATTCCCCTACCAT	定位 Mapping
2-F	CGACGATGGTTGGTGGGATAG	CAGAGTGTGTTGGGTAATGCTAATG	定位 Mapping
2-J	ATAAAAGCCGGCTTGATACTGT	CCCGATGAAAAGGATGAGC	定位 Mapping
2-L	AGCATACGCGCACAGAAAAGGC	GGCGCAGTTGGCATGAAAAGG	定位 Mapping
2-H	TTTGCTGGGCTCGGGGTTTAC	GCTGCCACGTTGCTTGATGATG	定位 Mapping
2-1C	ACAAAGAAGAATGGAAAGGCAACG	ACCACCAGGCCAGCAACC	定位 Mapping
2-E	TTGGCCTTCGCTTGTTTGG	AGTGCGAATATTTGGGGTCTCTG	定位 Mapping
2-CF	TGAAAAGGCAACGTCGTGAGGATG	TTCACCACCAGGCCAGCAACC	测序 Sequencing
2-CC	GCTCTAGAATGGAGGCCATGGACGAGCT	GCTCTAGATTAATATTTTGGCCCTGGAG	测序 Sequencing
2-CC-2	TTCAGGCTATCTTGCTAAC	GGAGTATTTAAACCTTCAC	测序 Sequencing
2-1D	GGCAGGCTGAAGCGGAGACACT	GCCCGACAAAAGGTTAGGTAGC	RT-PCR
<i>OsActin1</i>	GTGTCGCCCCCTCTGAAAG	GGCTTAGCATCTTGGGTCCG	RT-PCR



A—野生型日本晴部分横切面；B—突变体 *bc16* 部分横切面；C—野生型日本晴表皮下厚壁组织细胞；D—突变体 *bc16* 表皮下厚壁组织细胞；E—野生型日本晴厚壁组织细胞壁,PCW(初生壁)、SCW(次生壁)；F—突变体 *bc16* 厚壁组织细胞壁,PCW(初生壁)、SCW(次生壁)；G—野生型日本晴薄壁细胞壁；H—突变体 *bc16* 薄壁细胞壁。标尺=1 μm (C和D)、0.2 μm (E和F)、0.5 μm (G和H)。

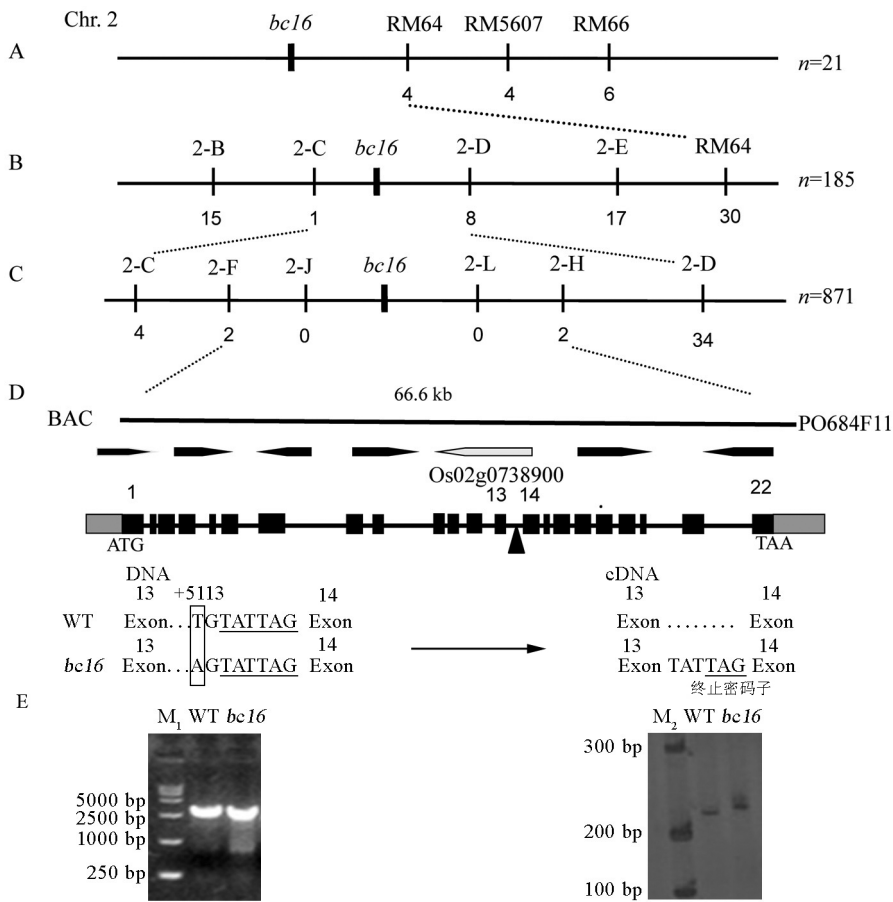
A, Part of cross section of the wild type; B, Part of cross section of *bc16*; C, The wild type sclerenchyma cells below the epidermis layer (bar=1 μm); D, The *bc16* mutant sclerenchyma cells below the epidermis layer (bar=1 μm); E, The wild type sclerenchyma cell wall, PCW(Primary Cell Wall), SCW(Secondary Cell Wall) (bar=0.2 μm); F, The *bc16* mutant sclerenchyma cell wall, PCW(Primary Cell Wall), SCW(Secondary Cell Wall) (bar=0.2 μm); G, The wild type parenchyma cell wall (bar=0.5 μm); H, The *bc16* mutant parenchyma cell wall (bar=0.5 μm).

图3 日本晴野生型和突变体 *bc16* 茎秆倒1节间中间部位横切面组织学和细胞学观察

Fig. 3. Stem cross-sections histology and cytology observation of wild type and *bc16* mutant at the middle of the first internode from the top.

将日本晴和 *bc16* 突变体 *Os02g0738900* 基因进行 PCR 扩增和测序。DNA 测序结果表明 *Os02g0738900* 基因第13内含子从 ATG 开始 5113 位碱基位置发生了 T→A 的置换,造成剪切位点前移,该内含子末端 6 个核苷酸(TATTAG)被剪切到 mRNA 中,造成翻译提前终止(图 4-D)。为进一步

验证突变位点,对野生型和 *bc16* 突变体目的基因全长 cDNA 进行扩增,并在 *bc16* 基因序列发生突变的位点两端设计引物 PCR 扩增目的片段,电泳结果证实了测序结果(图 4-E)。以上结果表明基因 *Os02g0738900* 第13内含子剪切位点前移,内含子的一部分被剪切到 mRNA 中,进而导致蛋白序列



A—*bc16* 基因初定位于第 2 染色体 SSR 标记 RM64、RM5607、RM66 左侧；B—*bc16* 基因初定位于 InDel 标记 2-C、2-D 两侧；C—*bc16* 基因精细定位于 InDel 标记 2-F、2-H 之间 66.6 kb 的区域；D—突变体 *bc16* 和野生型 DNA 和 cDNA 测序目标基因序列结果比较。E—野生型和突变体 *bc16* 全长 cDNA 以及发生突变的部分 cDNA 电泳结果比较，M₁ 为 DL15000，M₂ 为 DL500。

A, *bc16* gene was primarily mapped on the left side of SSR markers RM64, RM5607, RM66 on chromosome 2; B, *bc16* gene was mapped between InDel markers 2-C and 2-D; C, *bc16* gene was fine mapped between InDel markers 2-F and 2-H; D, Target DNA and cDNA sequencing results comparison between *bc16* and wild type; E, The electrophoresis results comparison of full length cDNA, partial cDNA with mutation sites between wild type and *bc16*, M₁ and M₂ are markers DL15000 and DL500, respectively.

图 4 *bc16* 基因定位以及突变体 *bc16* 和野生型日本晴序列匹配

Fig. 4. Gene mapping of *bc16* and the sequence alignment between *bc16* mutant and wild type.

和结构发生了改变,功能发生了缺失。

2.6 *bc16* 基因 RT-PCR 分析

RT-PCR 分析结果表明, *bc16* 基因在根、茎、叶中均有表达,以茎中的表达量为最高,其次是叶和根,且脆秆突变体的表达量均低于野生型(图 5)。说明 *Os02g0738900* 基因突变导致其表达量降低,引起植株根、茎、叶机械强度降低,导致脆性增加。

3 讨论

在已发现的水稻脆秆基因中,至少有两个脆秆基因,即 *bc6*、*bc7* 会导致细胞壁纤维素含量降低、半

纤维素含量升高^[19,20]。*BC6* 和 *BC7* 都是编码纤维素合酶基因,其中 *BC6* 编码 *OsCesA9*,是一个不完全显性基因,而 *BC7* 是 *OsCesA4* 的等位基因。本研究发现的 *bc16* 是一个编码动力蛋白的基因,可能参与到细胞内吞作用和高尔基体转膜过程。这表明茎秆机械强度的调控是一个很复杂的过程,许多不同类型的基因共同作用参与调节茎秆机械强度。Xiong 等^[27]和 Hirano 等^[17]采用不同材料发现 *BC3* 基因,该基因编码一个经典的发动蛋白家族成员,启动子 GUS 分析表明该基因的表达和次生壁的形成是直接相关的。*bc16* 基因和 *bc3* 基因均来源于

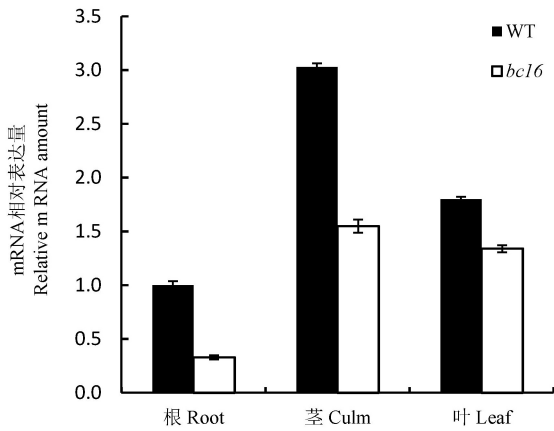


图5 *bc16* (*Os02g0738900*) 基因在水稻不同组织的表达情况

Fig. 5. Expression analysis of the *bc16* (*Os02g0738900*) gene in different tissues of rice.

Os02g0738900 基因,两者在结构和功能上存在不少异同点,如两个基因都能引起水稻茎秆、叶片、根变脆、植株变矮、主根长缩短、厚壁组织次生细胞壁和薄壁细胞初生壁变薄等。但两者之间的差异也非常明显:一是两个基因发生突变的位置不同,*bc3* 基因第3内含子缺失了156个核苷酸,而*bc16* 基因是在第13内含子近末端发生了T→A的置换(图4);二是*bc3* 基因只能使细胞壁纤维素含量降低,而*bc16* 基因不仅可使纤维素含量降低,还能使半纤维素含量明显升高。

发动蛋白与发动蛋白相关蛋白(DRPs)是一类大的GTP酶,与细胞壁的合成紧密相关。该类蛋白不仅存在于细胞膜和囊泡中,而且还存在于反面囊膜网中^[17]。除了纤维素和胼底质外,细胞壁绝大部分成分如半纤维素等是由高尔基体装配和运输到细胞外。半纤维素由位于高尔基体膜上的糖基转移酶合成^[28]。糖基转移酶是专门负责催化糖基化反应的酶类,主要包括GT-A和GT-B两类,它们将活性糖基从糖基供体转移到糖基受体,形成糖苷键。核苷酸糖是糖基供体最主要的化合物,包括UDP-葡萄糖、UDP-半乳糖、UDP-木糖和UDP-葡萄糖醛酸^[29]。水稻OsDRP2B蛋白由位于N端的GTPase结构域、保守的中间结构域、PH结构域、PR结构域和C端GED结构域五部分组成。王海峰^[30]认为具有多个结构域的基因产生的不同剪切体形成的是有功能的蛋白。体外生化实验研究表明OsDRP2B蛋白N端GTPase结构域可以结合和水解GTP^[27]。就*bc16* 突变体而言,由于其翻译的蛋白具有完整的

GTPase结构域,在体内纤维素含量合成量不足的诱导下,其水解GTP形成的GDP可作为合成核苷酸糖的底物,生成的核苷酸糖从而可以产生更多的半纤维素。Kotake等^[19]认为水稻茎秆在纤维素含量降低的情况下,植株体内可能存在的某种机制会使半纤维素含量升高,从而补偿纤维素含量降低对植株生活能力的不利影响。虽然不少水稻脆秆突变体细胞壁纤维素含量显著降低,但并非所有突变体半纤维素含量都升高。这表明这种补偿机制的发生需要一定的条件。核苷酸糖可能是诱发这种机制的一种重要的物质。*bc16* 突变体半纤维素含量升高也可能是由于诱发了这种机制导致的。虽然*bc3* 和*bc16* 基因翻译的蛋白功能缺失,但*bc16* 基因翻译的蛋白具有完整的GTPase。这可能是*bc16* 突变体半纤维素含量升高而*bc3* 突变体半纤维素保持不变的原因。

目前,对于植物次生细胞壁在茎秆机械强度的研究相对较多,而初生细胞壁在茎秆机械强度发挥的作用,相关研究还比较缺乏。Didi等^[31]发现虽然厚壁组织主要决定茎秆机械强度,初生细胞壁也可以为植物提供机械支撑功能。目前水稻中发现的脆性基因绝大部分都会使厚壁组织次生细胞壁变薄,而本研究发现的突变体*bc16* 除了使厚壁组织次生细胞壁变薄外,薄壁细胞壁同时出现了变薄的现象(图3-G,3-H),这说明*bc16* 基因不仅可以调控厚壁组织次生细胞壁的合成,还能影响薄壁细胞壁的合成。虽然薄壁细胞在植物机械支撑方面的作用不如厚壁组织那么明显,但由于薄壁组织细胞数目多且分布广,其在影响机械强度的作用方面也不容忽视。目前在水稻中发现的脆性突变体和野生型薄壁细胞大多没有什么变化,因此突变体*bc16* 可能是一个深入研究薄壁细胞壁机械强度的好材料。

脆秆水稻由于具有独特的机械特性和细胞壁组成,可用于抗倒伏品种和稻饲两用特种稻的选育^[32]。一方面,脆秆水稻由于细胞壁主要成分如纤维素、半纤维素、木质素含量改变,使脆秆水稻抗倒伏能力变弱。通过研究水稻脆性基因的功能,可以了解水稻茎秆强度增加的分子机理,为培育抗倒伏新品种提供理论依据和基础材料。另一方面常规品种水稻茎秆不易断裂,会影响口感,牲畜不喜食,应用于饲料加工中有一定的困难,但是脆秆水稻的粗纤维含量高,牲畜饲用口感相对较好,具有良好的饲料利用前景。汪海峰等^[33]将脆秆全株水稻应用到

生长肥育猪日粮的试验中,发现饲喂含 16%脆秆全株水稻日粮补饲大豆油替代玉米,对猪的生长性能没有显著影响,并且可显著提高胴体中不饱和脂肪酸含量和促进猪肠道中乳酸菌的增生。吕宗友等^[34]通过比较脆秆全株水稻和中花 11 在瘤胃内的降解特性,认为全株脆秆水稻可作为优质饲料稻的选育中间材料。生物能源是利用生物质为原料生产的能源,包括生物乙醇、生物柴油、生物氢气、生物沼气等能源产品^[35]。木质纤维素是潜在的低成本、可再生的生物质原料,可以经水解发酵产生生物乙醇^[36]。木质纤维素是经过人工处理获得的有机絮状纤维物质,主要由纤维素(约占 1/3~1/2)、半纤维素(1/4~1/3)和木质素(1/5~1/4)组成,其中纤维素和半纤维素可经过糖化和发酵生成乙醇,而木质素则不能^[37]。我国木质纤维素资源非常丰富,其原料来源广泛,如农作物秸秆、木本植物、芒草等,但多数没有被很好的利用。我国每年农业生产可产生大约 7 亿 t 秸秆,利用秸秆生产纤维乙醇不仅有利于环境的保护,而且对于能源安全具有重要的战略意义^[38]。杨涛等^[39]利用二级串联式生物反应器,使水稻纤维素发酵 40 h,可获得乙醇浓度达到 25.5 g/L,纤维素转对乙醇的转化率达到 43%。脆性水稻秸秆由于具有易粉碎、纤维素含量少、容易厌氧降解等特点,在生物乙醇生产上具有一定的优势。黄峰等^[40]利用脆秆水稻生产乙醇,经过葡萄糖、酸处理后,每 1 g 脆性秸秆总还原糖含量 $[(541.2 \pm 8.0) \text{ mg}]$ 比普通水稻秸秆高 41.9 mg,采用 *Escherichia coli* SZ470 处理 72 h,脆性秸秆乙醇产量为 $(10.9 \pm 0.4) \text{ g/L}$,是普通秸秆的 1.1 倍。刘晨娟^[41]利用白腐菌 6 号预处理的材料进行同步糖化发酵,在接种量为 5%,发酵温度为 40℃,纤维素酶添加量为 20 FPU/g 的条件下发酵 48h,结果使处理后的脆性秸秆发酵乙醇产量比未处理的脆性秸秆提高了 1.51 倍,而传统水稻秸秆产量仅提高 0.81 倍。洪解放等^[42]认为,充分利用木质纤维素中半纤维素,有望使纤维乙醇在原有基础上产量提高 25%。Wen 等^[43]研究发现复合菌系 WSD-5 对半纤维素具有高效的酶解能力,其酶解转化率与半纤维素含量呈显著的正相关关系。这表明,利用脆性水稻秸秆生产生物乙醇具有较大的研究价值和利用情景。本研究发现的脆秆突变体 *bc16* 是来源于粳稻日本晴的突变体,纤维素含量降低,半纤维素含量显著升高,可应用于水稻秸秆转化生物乙醇研究。

参考文献:

- [1] 饶玉春,李越,董国军,等. 水稻抗倒伏研究进展. 中国稻米, 2009, 15(6): 15-18.
- Rao Y C, Li Y, Dong G J, et al. The research development of rice lodging-resistant. *China Rice*, 2009, 15(6): 15-18. (in Chinese with English abstract)
- [2] 陈曦,郝怀庆,彭励. 植物细胞壁中纤维素合成的研究进展. 热带亚热带植物学报, 2011, 19(3): 283-290.
- Chen X, Hao H Q, Peng L. Recent progress on cellulose synthesis in cell wall of plants. *J Trop Subtrop Bot*, 2011, 19(3): 283-290. (in Chinese with English abstract)
- [3] 宋东亮,沈君辉,李来庚. 高等植物细胞壁中纤维素的合成. 植物生理学通讯, 2008, 44(4): 791-796.
- Song D L, Shen J H, Li L G. Cellulose synthesis in the cell walls of higher plants. *Plant Physiol Comm*, 2008, 44(4): 791-796. (in Chinese with English abstract)
- [4] Xu J D, Zhang Q F, Zhang T, et al. Phenotypic characterization, genetic analysis and gene-mapping for a brittle mutant in rice. *J Integr Plant Biol*, 2008, 50(3): 319-328.
- [5] Tsutomu A, Toshihisa K, Yasuko K, et al. Rice Brittle CULM 5(BRITTLE NODE) is involved in secondary cell wall formation in the sclerenchyma tissue of nodes. *Plant Cell Physiol*, 2009, 50(11): 1886-1897.
- [6] Hao Z Y, Mohnen D. A review of xylan and lignin biosynthesis; Foundation for studying *Arabidopsis* irregular xylem mutants with pleiotropic phenotypes. *Critic Rev Biochem Mol Biol*, 2014, 49(3): 212-241.
- [7] Kokubo A, Kuraishi S, Sakurai N. Culm strength of barley-correlation among maximum bending stress, cell wall dimensions and cellulose content. *Plant Physiol*, 1989, 91(3): 876-882.
- [8] Kokubo A, Sakurai N, Kuraishi S, et al. Culm brittleness of barley (*Hordeum Vulgare* L.) mutants is caused by smaller number of cellulose molecules in cell wall. *Plant Physiol*, 1991, 97(2): 509-514.
- [9] Ansari M J, Kumar R, Singh K, et al. Characterization and molecular mapping of EMS-induced brittle culm mutants of diploid wheat (*Triticum monococcum* L.). *Euphytica*, 2012, 186(1): 165-176.
- [10] Javed Ansari M, Al-Ghamdi A, Usmani S, et al. Characterization and gene mapping of a brittle culm mutant of diploid wheat (*Triticum monococcum* L.). *Acta Physiol Plant*, 2013, 35(8): 2407-2419.
- [11] 李文丽,吴先军. 一个水稻脆性突变体的遗传分析和基因定位. 核农学报, 2006, 20(6): 500-502.
- Li W L, Wu X J. Genetic analysis and gene mapping of a fragile rice mutant. *J Nucl Agric Sci*, 2006(6): 500-502. (in Chinese with English abstract)
- [12] 刘斌美,叶亚峰,章忠贵,等. 一个籼稻脆性突变体的生物学

- 特性及基因定位研究. 植物遗传资源学报, 2011, 12(5): 259-264.
- Liu F M, Ye Y F, Zhang Z G, et al. Characterizations and gene mapping of a brittle culm and leaf mutant in indica rice. *J Plant Genet Resour*, 2011, 12(5): 259-264. (in Chinese with English abstract)
- [13] 王川丽, 王令强, 牟同敏. 水稻脆性突变体 *nbc(t)* 的主要特性和脆性基因的初步定位. 华中农业大学学报, 2012, 31(2): 159-164.
- Wang C L, Wang L Q, Mou T M. The main characteristics of brittle rice mutant *nbc(t)* and gene primary mapping. *J Huazhong Agric Univ*, 2012, 31(2): 159-164. (in Chinese with English abstract)
- [14] 桑贤春, 杜川, 王晓雯, 等. 水稻矮秆脆秆突变体 *dbc1* 的鉴定与基因定位. 作物学报, 2013, 39(4): 626-631.
- San X C, Du C, Wang X W, et al. Identification and gene mapping of dwarf and brittle culm mutant *dbc1* in *Oryza sativa*. *Acta Agron Sin*, 2013, 39(4): 626-631. (in Chinese with English abstract)
- [15] 童川, 童杰鹏, 孙出, 等. 水稻脆性基因的功能研究进展. 分子植物育种, 2013, 11(2): 286-292.
- Tong C, Tong J P, Sun C, et al. Research progress on functions of brittle culm genes in rice. *Mol Plant Breed*, 2013, 11(2): 286-292. (in Chinese with English abstract)
- [16] Li Y H, Qian Q, Zhou Y H, et al. *BRITTLE CULM1*, which encodes a COBRA-like protein, affects the mechanical properties of rice plants. *Plant Cell*, 2003, 15(9): 2020-2031.
- [17] Hirano K, Kotake T, Kamihara K, et al. Rice *BRITTLE CULM 3(BC3)* encodes a classical dynamin OsDRP2B essential for proper secondary cell wall synthesis. *Planta*, 2010, 232(1): 95-108.
- [18] Zhang B C, Zhou Y H. Rice brittleness mutants: A way to open the "Black Box" of monocot cell wall biosynthesis. *Plant Biol*, 2010, 53(2): 136-142.
- [19] Kotake T, Aohara T, Hirano K, et al. Rice brittle culm 6 encodes a dominant-negative form of CesA protein that perturbs cellulose synthesis in secondary cell walls. *J Exper Bot*, 2011, 62(6): 2053-2062.
- [20] Yan C J, Yang S, Zeng X H, et al. Fine mapping and isolation of *Bc7(t)*, allelic to *OsCesA4*. *J Genet Genom*, 2007, 34(11): 1019-1027.
- [21] Zhang M, Zhang B C, Qian Q, et al. Brittle Culm 12, a dual-targeting kinesin-4 protein, controls cell-cycle progression and wall properties in rice. *Plant J*, 2010, 63(2): 312-328.
- [22] Zhang B C, Liu X L, Qian Qian, et al. Golgi nucleotide sugar transporter modulates cell wall biosynthesis and plant growth in rice. *P N A*, 2011, 108(12): 5110-5115.
- [23] Wu B, Zhang B C, Dai Y, et al. Brittle Culm15 encodes a membrane-associated chitinase-like protein required for cellulose biosynthesis in rice. *Plant Physiology*, 2012, 159(4): 1440-1452.
- [24] Van Soest P J, Robertson J B, Lewis B A. Methods for dietary Fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. *J Daily Sci*, 1991, 74(10): 3583-3597.
- [25] Michelmore R W, Paran I, Kesseli R V. Identification of markers linked to disease-resistance genes by bulked segregant analysis: A rapid method to detect makers in specific genomic regions by using segregating population. *PNAS*, 1991, 88(21): 9828-9832.
- [26] Liao L, Shi C H, Zeng D D, et al. Morphogenesis and molecular basis on the unclosed glumes, a novel mutation related to the floral organ of rice. *Plant Mol Biol Rep*, 2014, 33(3): 1-10.
- [27] Xiong G Y, Li R, Qian Q, et al. The rice dynamin-related protein DRP2B mediates membrane trafficking, and thereby plays a critical role in secondary cell wall cellulose biosynthesis. *Plant J*, 2010, 64(1): 56-70.
- [28] Henri K Vibe S, Peter U. Hemicelluloses. *Ann Rev Plant Biol*, 2010, 61(4): 263-289.
- [29] 田鹏, 刘占林. 糖基转移酶超家族. 生命的化学, 2011, 31(5): 732-736.
- Tian P, Liu Z L. Glycosyl transferase superfamily. *Chemistry of Life*, 2011, 31(5): 732-736. (in Chinese with English abstract)
- [30] 王海峰. 利用高通量测序技术研究基因组复制与关系以及可变剪切. 上海: 复旦大学, 2014.
- Wang H F. Analyses of genome duplication and relationships and alternative splicing using high throughput sequencing technology. Shanghai: Fudan University, 2014. (in Chinese with English abstract)
- [31] Vojtěch Didi, Phil Jackson, Jan Hejátko. Hormonal regulation of secondary cell wall formation. *J Exper Bot*, 2015, 66(16): 5015-5027.
- [32] 张水金, 郑轶, 朱永生, 等. 水稻脆性突变体研究进展. 福建农业学报, 2011, 26(5): 895-898.
- Zhang S J, Zheng Z, Zhu Y S, et al. Advance in research on brittleness mutant of rice. *Fujian J Agricu Sci*, 2011, 26(5): 895-898. (in Chinese with English abstract)
- [33] 彭应财, 甘朝洪, 王鹤童, 等. 显性脆秆水稻不育系中脆 A 的选育. 杂交水稻, 2010, 25(4): 9-13.
- Peng Y C, Gan C H, Wang H T, et al. Breeding of dominant brittle culm CMS line Zhongcui A in rice. *Hybrid Rice*, 2010, 25(4): 9-13. (in Chinese with English abstract)
- [34] 吕宗友, 苏衍菁, 赵国琪, 等. 全株脆性水稻在奶牛瘤胃内降解特性的研究. 中国奶牛, 2011, 18(4): 7-11.
- Lu Z Y, Su Y J, Zhao G Q, et al. The research of degradation characteristics of whole brittle rice in cattle remen. *China Dairy Cattle*, 2011, 18(4): 7-11. (in Chinese with English abstract)
- [35] 蔡小艳, 赖志强, 易显凤, 等. 生物能源的利用现状及发展方

- 向: 能源草产业发展战略暨学术研讨会, 南宁, 2014.
- Wang X Y, Lai Z Q, Yi X F, et al. The recent application and development direction of bioenergy. Energy of Grass industry development strategy & Academic conference, Nanning, GuangXi, 2014. (in Chinese with English abstract)
- [36] Gomez L D, Steele-King C G, Mcqueen-Mason S J. Sustainable liquid bio-fuels from biomass: The writings on the walls. *New Phytol*, 2008, 178(3): 473-485
- [37] 陈介南. 木质纤维生物转化乙醇技术. 生物质化学工程, 2006, 40(12): 69-77.
- Chen J N. Bioconversion of lignocelluloses to ethanol. *Biomass Chem Engine*, 2006, 40(12): 69-77. (in Chinese with English abstract)
- [38] 姚秀清, 张全. 植物纤维原料发酵生产燃料乙醇研究进展. 可再生能源, 2011, 29(2): 59-63.
- Yao X Q, Zhang Q. Status of fuel ethanol production by fermentation of vegetable cellulosic material. *Renew Ener Resour*, 2011, 29(2): 59-63. (in Chinese with English abstract)
- [39] 杨涛. 水稻秸秆纤维素发酵转化燃料乙醇的研究. 长沙: 湖南农业大学, 2008.
- Yang T. Studies on the production of the fuel ethanol by the fermentation of rice straw cellulose. Changsha: Hunan Agricultural University, 2008. (in Chinese with English abstract)
- [40] 黄峰, 王永泽, 周胜德, 等. 水稻脆性秸秆发酵产纤维乙醇的研究. 可再生能源, 2014, 32(2): 211-215.
- Huang F, Wang Y Z, Zhou S D, et al. Study on cellulosic ethanol fermentation of brittle rice straw. *Renew Ener Resour*, 2014, 32(2): 211-215. (in Chinese with English abstract)
- [41] 刘晨露. 脆性水稻秸秆的生物预处理和发酵. 武汉: 华中农业大学, 2010.
- Liu C L. The biological pretreatment of brittle rice straw and its fermentation. Wuhan: HuaZhong Agricultural University, 2010. (in Chinese with English abstract)
- [42] 洪解放, 张敏华, 刘成, 等. 代谢木糖生产乙醇的基因工程菌研究进展. 食品与发酵工业, 2005, 31(1): 114-118.
- Hong J F, Zhang M H, Liu C, et al. Progress in metabolic engineering of xylose-utilizing recombinant strains to produce ethanol. *Food Ferment Indus*, 2005, 31(1): 114-118. (in Chinese with English abstract)
- [43] Wen B T, Yuan X F, Cao Y Z, et al. Optimization of liquid fermentation of microbial consortium WSD-5 followed by saccharification and acidification of wheat straw. *Bioresour Technol*, 2012, 118: 141-149.