

摘 要

水稻分蘖角度是决定水稻株型和单株产量的关键农艺性状。适宜的分蘖角度既能实现高密度种植，又能保持有效的光截留并减小与邻近植物间的竞争，从而实现水稻高产。鉴于对水稻产量的显著影响，近年来分蘖角度性状一直受到育种家和植物生物学家们的关注，因此，阐明分蘖角度的控制机理对培育适应不同的环境和实践条件的理想水稻株型结构具有重要意义。本研究根据 SBP 结构域构建系统发育树确定 *E204* 同源基因，并构建 *E204-eGFP* 表达载体，转入水稻原生质体，观察 *E204* 蛋白的亚细胞定位。利用转基因手段获得 *E204* 过表达和敲除转基因植株，通过表型调查和表达量检测初步确定 *E204* 功能，并结合杂交后代的遗传分离和表达鉴定进一步验证其功能。从细胞学角度利用切片技术观察分蘖基部的细胞学特征。最后，综合实验结果，确定 *E204* 基因调控分蘖角度的分子机制。主要研究结果如下：

1. *E204* 基因过量表达可以使水稻分蘖角度增加，过表达植株的分蘖角度在各个时期均显著大于对照 ZH11。*E204* 基因还会影响水稻其他农艺性状，如株高、穗长、穗颈长、一次枝梗数、粒长和生育期。结合遗传分析证明分蘖角度由 *E204* 单基因控制。

2. 作为 SBP 转录因子，*E204* 基因和 *SPL4* 高度同源，二者都显著的影响株高、穗长、一次枝梗数、籽粒大小等农艺性状。另外，和转录因子的表达特点相同，*E204* 基因在细胞核内发挥功能。

3. 组织学分析表明，*E204* 基因过表达引起水稻分蘖角度变大是其分蘖基部 TB2 细胞变小引起。

4. *E204* 基因主要通过两种途径控制水稻分蘖角度，一是降低 *LAZY1*、*ARF12* 和 *ARF25* 表达水平，使生长素呈不对称分布，诱导 *WOX6* 和 *WOX11* 的不对称表达，从而出现分蘖角度增大的表型。另一种是作为 *TAC3* 的上游基因，激活 *TAC3* 的转录表达，从而调控水稻分蘖角度。

E204 基因的功能鉴定和分子机制研究，为水稻分蘖角度调控网络的研究提供了新的思路，丰富了水稻分蘖角度调控机制，有助于育种人员培育出具有最佳分蘖角度水稻新品种，最终实现水稻产量的提高。

关键词：水稻；株型；分蘖角度；生长素运输；转录因子

英文缩略词

缩写词	英文名称	中文名称
DNA	deoxyribonucleic acid	脱氧核糖核酸
EMS	ethyl methyl sulfonate	甲基磺酸乙酯
QTL	quantitative trait locus	数量性状基因座
SSR	simple sequence repeats	简单序列重复
CTAB	cetyltriethylammnonium bromide	十六烷基三甲基溴化铵
dNTP	deoxy-ribonucleoside triphosphate	脱氧核糖核苷三磷酸
EDTA	ethylene diamine tetraacetic acid	乙二胺四乙酸
gDNA	genomic DNA	基因组DNA
PCR	polymerase chain reaction	聚合酶链式反应
LB	luria-bertani	LB培养基
DMSO	dimethyl sulfoxide	二甲基亚砷
rpm	revolutions per minute	每分钟转速
qRT-PCR	quantitative real-time PCR	实时荧光定量PCR
ddH ₂ O	double distilled water	双蒸水
kb	Kilobases	千碱基对
mg	Milligram	毫克
ml	Millilitre	毫升
μg	Microgram	微克
μl	Microlitre	微升
CDS	Coding sequence	编码区
cDNA	Complementary DNA	互补DNA

目 录

1 前言	1
1.1 水稻分蘖角度的研究基础	2
1.1.1 分蘖角度的定义	2
1.1.2 分蘖角度的控制机理	2
1.2 水稻分蘖角度的影响因素	3
1.2.1 环境对分蘖角度的影响	3
1.2.2 激素对分蘖角度的影响	3
1.3 水稻分蘖角度的遗传学研究	4
1.3.1 水稻分蘖角度为多基因控制的数量性状	5
1.3.2 水稻分蘖角度为主效基因控制的质量性状	6
1.4 SBP 转录因子的研究	10
1.5 本研究的目的意义	11
1.6 本研究的技术路线	11
2 材料与方法	13
2.1 实验材料	13
2.1.1 植物材料	13
2.1.2 实验菌株、载体、工具酶	13
2.1.3 主要试剂和仪器设备	13
2.1.4 数据分析与作图软件	14
2.1.5 主要试剂配制方法	14
2.2 水稻农艺性状调查方法及杂交技术	16
2.2.1 水稻分蘖角度测量方法	16
2.2.2 其他农艺性状测量方法	16
2.2.3 水稻杂交技术	16
2.3 水稻 gDNA 的提取方法	17
2.4 PCR 扩增	18
2.4.1 PCR 扩增反应	18
2.4.2 PCR 产物电泳检测	19

2.4.3 PCR 产物回收	19
2.5 DNA 转化与质粒 DNA 的提取.....	20
2.5.1 转化大肠杆菌感受态细胞	20
2.5.2 质粒 DNA 的提取	21
2.6 定量表达分析	22
2.6.1 表达材料取样	22
2.6.2 植物总 RNA 的提取.....	22
2.6.3 残留基因组 DNA 去除和逆转录 cDNA.....	22
2.6.4 定量 RT-PCR 检测.....	23
2.7 亚细胞定位方法	23
2.7.1 pRTVc- <i>E204</i> -GFP 载体构建	23
2.7.2 水稻原生质体提取	23
2.7.3 质粒的转化与鉴定	24
2.8 分蘖基部细胞学观察方法	24
2.8.1 塑料半薄切片	24
2.8.2 细胞大小和数目测量方法	25
2.9 转基因水稻的鉴定	25
2.9.1 基因过表达材料的鉴定	25
2.9.2 基因敲除材料的鉴定	26
3 结果与分析	27
3.1 <i>E204</i> 基因的结构特点与系统发育树.....	27
3.1.1 <i>E204</i> 基因的结构特点.....	27
3.1.2 <i>E204</i> 基因系统发育树.....	29
3.2 <i>E204</i> 基因编码核定位蛋白.....	30
3.3 <i>E204</i> 基因过表达转基因材料特征.....	31
3.3.1 <i>E204</i> 基因过表达转基因材料的表型特征.....	31
3.3.2 过表达转基因材料在不同部位表达量分析	33
3.3.3 <i>E204</i> 基因影响水稻其他性状.....	34
3.3.4 其他基因参与 <i>E204</i> 基因对分蘖角度的调控.....	35

3.4 分蘖基部细胞变大导致分蘖角度增大	37
3.5 <i>E204</i> 基因在不同水稻品种均表现出大角度	38
3.6 分蘖角度由 <i>E204</i> 单基因控制	39
3.7 <i>E204</i> 基因敲除转基因材料特征	40
4 讨论与结论	42
4.1 讨论	42
4.1.1 <i>E204</i> 基因是水稻分蘖角度的正调控因子	42
4.1.2 <i>SPL</i> 基因家族在水稻生长发育中起重要作用	43
4.1.3 <i>E204</i> 基因具有一因多效	44
4.1.4 <i>E204</i> 调控分蘖角度通路	44
4.1.5 研究展望	45
4.1.6 创新之处与不足之处	45
4.2 结论	46
参考文献	48
附录	54
致谢	54

1 前言

水稻是最重要的粮食作物之一，世界上半以上的人口以稻米作为主食（A. A. E. *et al.*, 2021）。2020年以来，在新冠肺炎疫情和气候变化的影响下，全球粮食供应陷入危机（于宏源等，2021）。与此同时，世界人口快速增长与消费水平逐渐提高，粮食安全问题再度升级，因此，提高水稻单产水平成为解决粮食问题的关键所在。

株型作为水稻形态特征中的重要表型，对提高水稻产量、改善稻谷品质和提高植株抗性都有一定的影响（马梦影等，2020）。作物的株型主要由分蘖角度、分蘖数、株高、叶型和穗部形态等这几个方面构成。20 世纪 30 年代，Health（1938）等认为物质生产差异在很大程度上受到植株叶片的姿态和数目的影响，进而作物的株型问题得到广泛关注。Donald（1968）年提出理想株型一词，认为在作物育种中应该选择能高效利用光能且个体间竞争强度小的植株作为理想类型。日本学者松岛省三等（1973）认为理想株型应具有短穗、短秆、多穗的特征，只要能培育出理想株型就一定能获得高产。此后，在育种工作中作物的理想株型得到广泛重视，育种家们提出了很多理想株型经典模式。广东省农科院黄耀祥等（1994）提出半矮秆丛生“早长”超高产水稻株型模式，成为我国水稻育种研究工作的一大突破。国际水稻研究所 Khush GS（1986）等提出新株型水稻育种计划，该株型水稻的特点有根系发达、产量高、有效分蘖多、穗大、不易倒伏。周开达等（1995）认为选育亚种间重穗型模式水稻是实现超高产育种的重要手段，该类型水稻根系发达、茎秆直挺、株型松紧程度适中、叶肉厚且叶片直立。沈阳农业大学杨守仁等（1982）提出理想株型应具有三大特点，即耐肥抗倒、适合密植、谷草比大。袁隆平院士（1997）提出超高产稻株形态模式，该模式下水稻株型适度紧凑，株高 100cm 左右，上部三叶叶片较厚，叶面积指数 6.5 左右。育种工作者提出的这些模式都是希望通过改善作物株型来提高产量。

分蘖角度是水稻理想株型的重要组成部分，它决定了水稻种植最佳密度，并通过改变水稻冠层结构影响叶片的光能利用率，最终影响水稻的产量。水稻分蘖是具有圆锥花序的特殊分枝，圆锥花序由一次分枝、二次分枝和籽粒组成。因此，水稻分枝决定了分蘖数和每穗粒数（Wang *et al.*, 2022）。在实际生产中，分蘖角度过大或过小都不利于提高水稻产量。分蘖角度过大时会导致株型松散，单株占用空间大，种植密度低，从而引起产量降低；而分蘖角度过小时会使株型过于紧凑，群体透光和透风差，使得植株易感病害，产量降低。因此，适当的分蘖角度对于高密度种植和最大化水稻

群体产量至关重要（梁彦等，2016）。

1.1 水稻分蘖角度的研究基础

1.1.1 分蘖角度的定义

由于分蘖角度不易精准测量和动态变化性强，目前还没有统一标准对分蘖角度的定义进行划分。徐云碧等（1993）将分蘖角度定义为抽穗前主茎和分蘖之间形成的夹角。谢元璋等（1994）认为分蘖角度是分蘖盛期第一级分蘖的第一号和第二号分蘖与主茎间夹角的平均数。沈圣泉等（2005）将水稻最大分蘖角度定义为自然环境下水稻最外围分蘖与中轴间所成的夹角。张步龙等（2009）认为在分蘖盛期束集型的分蘖角度小于20°，紧凑型的分蘖角度在21-32°，松散型的分蘖角度大于33°。分蘖角度不仅受遗传因素影响，环境因素对其影响同样不可忽视。温度、湿度、水分和土壤肥力等都会在一定程度上使分蘖角度发生改变，因此分蘖角度的定义会因不同的测量时期与测量方法而不同。

1.1.2 分蘖角度的控制机理

目前研究表明，控制水稻分蘖角度的主要有三大途径：植物驯化与驯化后的选择，植物的向地性和生长素的不对称分配。

在农业社会发展进程中，植物的驯化及驯化后的选择对社会文明产生了积极的影响。在野生稻驯化成栽培稻的过程中，植物株型性状发生了一系列显著的变化。野生稻匍匐生长的习性增加了其在自然环境中的竞争能力，而在农业生产条件下，栽培稻转变为直立生长有利于增加种植密度，从而提高产量（Hu *et al.*, 2018）。

植物的向地性对控制水稻分蘖角度有重要作用（Li *et al.*, 2007）。目前研究认为向地性响应包括 3 个部分，即重力感应、信号传导和生长素再分配引起分蘖角度变化（Morita *et al.*, 2004）。重力感应是植物向地性的第一步，淀粉平衡体假说认为，重力是在特化细胞中通过含有淀粉粒的淀粉质体的沉积感知的（Sack, 1997），因此，淀粉粒在淀粉质体中的积累对水稻分蘖角度和重力响应的控制具有重要作用。

如上所述，淀粉体沉积可能触发信号转导，改变生长素在重力反应细胞中的转运方向，诱导生长素的不对称再分配，说明生长素的不对称分布在调节水稻分蘖角度方面也起着重要作用。2007 年科学家克隆出具有匍匐生长习性的基因 *LAI1*，认为该基因通过介导生长素在重力刺激下的不对称再分配来调控水稻分蘖角度和向地性（Li *et al.*, 2007）。进一步研究表明，*HSA2D* 和 *WOX6/11* 分别作用于 *la1* 介导的生长素不对称

分布通路的上游和下游，建立了一个由 *la1* 依赖生长素不对称分布介导的控制水稻分蘖角的核心调控通路 (Zhang *et al.*, 2018)。

1.2 水稻分蘖角度的影响因素

1.2.1 环境对分蘖角度的影响

植物的生长发育处在不断变化的环境中，因此植物发育具有显著的可塑性，以适应环境变化。水稻分蘖角度在形成过程中会受周围生长环境影响，如光照、肥力、营养条件、农艺措施、水分等环境因子都会影响分蘖角度 (Gao *et al.*, 2019)。

光是调节植物生长发育的重要环境信号之一。高等植物可以根据光照的变化改变生长方向，当光周期较短时可以使水稻分蘖角度向直立方向发展。另外，光质可以通过影响 *OsPIL15* 基因的蛋白表达水平来影响水稻分蘖角度 (Xie *et al.*, 2019)。在水稻分蘖角度发育后期，株型会比前期更加紧凑，使植株间叶片遮阴量降低，以获得更高的光合效率从而提高产量 (Yu *et al.*, 2007)。

肥力通过影响植物的生长量，改变分蘖数目，从而控制水稻分蘖角度。在一定范围内，分蘖角度随肥力水平增加而增大 (于亚辉等, 2006)。2021年《政府工作报告》中提出“碳达峰、碳中和”的目标，并指出现代农业生产需要向高效、绿色、低碳模式发展。因此，矿质营养对作物生长发育的调控得到研究者的广泛重视。氮和磷是促进作物增产的主要肥料成分，也是植物需要从外界摄取的两种最主要的矿质元素。国外研究表明，许多转录因子通过控制其下游靶基因可以调控氮元素的吸收和利用，从而影响植株株型 (Wu *et al.*, 2020)。国内的研究结果也表明，在三种不同的氮素水平下，高氮水平处理后的水稻分蘖角度增加最大 (于亚辉等, 2006)。此外，植物在能量代谢、光呼吸作用等过程中都有磷的参与。研究表明在缺磷环境下，磷元素感应蛋白 *SPX1* 和 *SPX2* 被诱导，最终使植物出现直立表型 (Liu *et al.*, 2021)。

1.2.2 激素对分蘖角度的影响

水稻分蘖角度不仅会受到环境影响，还有受到植物内源激素的调控。目前，已知参与分蘖角度调控的植物激素有生长素 (IAA)、细胞分裂素 (CTK)、赤霉素 (GA)、独脚金内酯 (SLs) 和油菜素内酯 (BR) (黄卫衡等, 2019)。

生长素 (IAA) 是最早发现促进植物生长的激素，主要在植物顶端分生组织中合成，然后沿茎-根以极性方式从细胞运输到细胞 (De Smet *et al.*, 2007)。生长素能够促进顶端优势，抑制作物分蘖的生长，最终影响作物的分蘖数和分蘖角度 (梁振兴等,

1998)。目前已知通过影响生长素的分布来调控水稻分蘖角度的基因主要有*LA1* (Li *et al.*, 2007)、*HSFA2D* (Zhang *et al.*, 2018)、*OsPIN2* (Chen *et al.*, 2012)、*PAY1* (Zhao *et al.*, 2015) 和*FucT* (Harmoko *et al.*, 2016)。这些研究均表明, 生长素在水稻分蘖角的调控中起着重要作用。

作为主要在植物的根尖合成的植物激素, 细胞分裂素 (CTK) 可以通过木质部向地上部运输而产生生理效应, 促进细胞分裂、细胞横向伸长以及腋芽的分化, 在植物发育过程中发挥着重要作用 (Durán-Medina *et al.*, 2017)。研究发现, CTK 能够通过促进分蘖腋芽的分化, 改变植株的分蘖角度和分蘖数目 (梁振兴等, 1998)。

赤霉素 (GA) 是六大植物激素中的一类, 主要作用是促进细胞伸长与分裂、打破种子休眠、调控植物的生殖发育 (王松等, 2022)。有研究表明赤霉素也参与了芽向地性和分蘖角的调节。生长素的不对称再分配导致*OsGA3ox1*的不对称表达, 引发GA响应, 使得受GA调控的木葡聚糖内转糖基酶的不对称表达, 从而引起叶鞘细胞壁松动, 促进水稻向地生长 (Cui *et al.*, 2005)。

独脚金内酯 (SLs) 是一类新的萜类内酯类植物激素, 在高等植物中具有抑制枝条分枝的作用 (Gomez-Roldan *et al.*, 2008)。科学家对*la1*抑制子进行筛选, 发现了SLs通过抑制生长素的局部合成来调控植株向地性和分蘖角度的新功能 (Sang *et al.*, 2014)。通过对SL途径基因的修饰, 可以优化水稻分蘖角度和分蘖数, 从而提高水稻产量。

油菜素内脂 (BR) 作为植物的第六大激素, 广泛存在于植物体内, 参与植物生长发育的各个过程 (孟祥春等, 2001)。研究表明, 高水平的 BR 可以激活 *OsLIC* 编码一种新型的 CCCH 型锌指蛋白, 而该蛋白能直接干扰 BR 信号 (Wang *et al.*, 2008)。一项全基因组关联研究表明, 水稻 BR 生物合成酶基因中编码细胞色素 P450 的突变体 *dwarf2* (*d2*) 出现分蘖角度降低的表型 (Dong *et al.*, 2016)。由此可以说明, 油菜素内脂 (BR) 同样参与水稻分蘖角度调控过程。

如上所述, 越来越多的研究表明, 水稻分蘖角和向地性受到多种植物激素及其相互作用的复杂调节。

1.3 水稻分蘖角度的遗传学研究

目前对水稻分蘖角的遗传控制有两种主要观点, 一种是水稻分蘖角受多基因控制表现为数量性状, 另一种则认为水稻分蘖角度受主效基因控制表现为质量性状。

以上内容仅为本文档的试下载部分，为可阅读页数的一半内容。如要下载或阅读全文，请访问：<https://d.book118.com/806114154131011031>