

OsELF3-1 与 OsARID3 互作调控水稻根部性状

孙琪¹, 芦佳浩¹, 陈昊¹, 王潇澈¹, 于之雯¹, 赵辰妃¹, 徐铨¹, 马殿荣^{1,2}

(¹沈阳农业大学水稻研究所, 沈阳 110866; ²辽宁省水稻研究所, 沈阳 110101)

摘要: 根系是水稻植株的重要组成部分, 在植物固定、水分和营养物质获取等生长发育过程中起重要作用。本研究发现 *oself3-1* 突变体的根系显著变短, 将突变体与野生型笹锦杂交构建 F₂ 分离群体进行遗传分析, 表明突变性状由一个隐性单基因调控。通过图位克隆将 *OsELF3-1* 定位在 6 号染色体一段 50.9 kb 的区间内, 该区间内共有 4 个开放阅读框 (ORF), 通过序列比对发现突变体仅在 ORF4 (*OsELF3-1*) 的第二个外显子上缺失 7 个碱基, 导致基因发生移码并提前终止, 推测 *OsELF3-1* 为目标基因。*OsELF3-1* 的 CRISPR/Cas9 敲除突变体的根系显著短于野生型笹锦, 验证 *OsELF3-1* 参与根系长度调控。为进一步阐明 *OsELF3-1* 的调控网络, 利用酵母双杂交筛选到 *OsELF3-1* 的互作蛋白 *OsARID3*, *OsARID3* 具有 ARID 功能结构域 (ARID3 DNA binding domain)、 α -晶体蛋白/热休克蛋白 20 结构域 (α -crystallin/Hsp domain) 及热休克蛋白 20 (Hsp20) 等结构域, 以及依靠钾离子的钠离子/钙离子交换的结构域 (K⁺-dependent and Na⁺/Ca²⁺ exchange domain)。调查 *OsARID3*-RNAi 突变体发现其根系显著短于野生型笹锦, 说明 *OsARID3* 可能参与根系长度调控。通过 3 K 测序数据分析发现 *OsARID3* 自然变异共有 15 个单倍型, 且存在明显的籼稻、粳稻分化, 粳稻主要属于单倍型 I、IV 和 VI。综上所述, 本研究发现 *OsELF3-1* 与 *OsARID3* 互作调控水稻根系, 为进一步深入解析水稻根系生长发育调控网络提供理论基础和种质资源。

关键词: 水稻; 根系; *OsELF3-1*; *OsARID3*; 图位克隆

OsELF3-1 Interacts with OsARID3 to Regulate Root Traits in Rice

SUN Qi¹, LU Jiahao¹, CHEN Hao¹, WANG Xiaocheng¹, YU Zhiwen¹, ZHAO Chenfei¹, XU Quan¹, MA Dianrong^{1,2}

(¹Rice Research Institute of Shenyang Agricultural University, Shenyang 110866;

²Rice Research Institute of Liaoning Province, Shenyang 110101)

Abstract: The root system is a critical component of rice plant, playing essential roles in plant fixation, water uptake, and nutrient acquisition. In this study, we observed that the root system of the *oself3-1* mutant was significantly shorter compared to the wild type. To investigate the genetic basis of this trait, the mutant was crossed with the wild-type cultivar Sasaishiki to generate an F₂ population. Genetic analysis revealed that the mutant phenotype is controlled by a recessive single gene. Through map-based cloning, *OsELF3-1* was located in a 50.9 kb interval on chromosome 6, which contains four open reading frames (ORFs). Sequence analysis identified a 7-base pair deletion in the second exon of ORF4 (*OsELF3-1*), resulting in frameshift mutation and premature termination. *OsELF3-1* was hypothesized as the causal gene. Knockout mutants of *OsELF3-1* exhibited significantly shorter roots than the wild type Sasaishiki, thereby validating the role of *OsELF3-1* in regulating root length. To further elucidate the regulatory network of *OsELF3-1*, we employed a yeast two-hybrid screening and identified *OsARID3* as an interacting protein. *OsARID3* contains several functional domains, including an ARID domain, an α -crystallin/Hsp domain, a Hsp20 domain, and a potassium dependent sodium/calcium ion exchange domain. Investigation of *OsARID3*-RNAi mutants revealed that their mutants also displayed significantly shorter roots than wild type Sasaishiki, suggesting that *OsARID3* is involved

收稿日期: 2024-06-28 网络出版日期: 2024-08-08

URL: <https://doi.org/10.13430/j.cnki.jpgr.20240628001>

第一作者研究方向为遗传育种和栽培生理生态, E-mail: sunqi03@163.com

通信作者: 徐铨, 水稻分子育种, E-mail: kobexu34@syau.edu.cn

马殿荣, 水稻遗传育种和栽培生理生态, E-mail: madianrong@163.com

基金项目: 沈阳市科学技术局种业创新专项 (23-410-2-02-01)

Foundation project: Shenyang Science and Technology Bureau Seed Industry Innovation Project (23-410-2-02-01)

in the regulation of root length. Analysis of natural variation in *OsARID3* using 3K rice genome sequencing data identified 15 haplotypes, with distinct differentiation between indica and japonica subspecies. Notably, japonica rice predominantly harbored haplotypes I, IV and VI. In summary, this study found that *OsELF3-1* and *OsARID3* interact to regulate rice root development. These findings provide a theoretical basis and valuable germplasm resources for further exploration of the regulatory networks underlying root growth and development.

Key words: rice; root; *OsELF3-1*; *OsARID3*; map cloning

水稻是重要的粮食作物,为我国超过半数的人口提供主食。近年来耕地面积减少,温室气体排放增加,全球气温升高,气候灾害频发,增加了绿色农业可持续发展和保障粮食安全的难度。因此提高水稻单产以满足逐年增长的人口粮食需求,对维护国家粮食安全战略具有重要的意义^[1-2]。水稻根系是吸收水分、营养及激素合成的重要器官,影响水稻生长。因此强壮的根系是水稻生产力的关键,也是分子生物学研究和育种的重要目标性状^[3-4]。

水稻根系是由主根、不定根、侧根和根毛组成的须根系,在正常条件下水稻根长、根数和根体积在各生育期均与产量呈极显著正相关^[5]。近年来的分子生物学研究成功克隆了多个根系发育调控基因,其中大多数和水稻的抗性产量相关^[6-8]。在这些水稻根系性状调控基因克隆的研究进展中,根长相关基因受到较多的关注,其中 *GLR3.1* 基因编码类谷氨酸受体蛋白,对水稻幼苗早期根尖分生组织维持细胞分裂和细胞存活不可或缺, *glr3.1* 突变体的初生根、不定根和侧根都变短,初生根顶端直径变小,组织学和DNA合成分析表明突变体根的分生组织活性丧失,伴随着细胞程序性死亡的提高,苗期后的营养生长期和生殖生长期长出的根则与野生型差别不大^[9]。水稻中另一个与根长相关的重要基因是深根基因 *DRO1*,其受到生长素负向调控,并且影响根尖部位的细胞伸长,从而导致根系的不对称生长和对重力相应的向下弯曲。*DRO1* 高表达可以增加根生长角度,使其生长方向更为竖直。提高 *DRO1* 表达量能够改变根系形态,从而提高水稻避旱能力^[10-11]。此外硝酸盐转运蛋白伴侣蛋白 *OsNAR2.1* 能与 *OsNRT2.1/2.2* 和 *OsNRT2.3a* 互作,调控不定根长度^[12-13]。

水稻 *OsELF3* 基因家族与拟南芥 *AtELF3* 家族同源,水稻基因组中存在两个 *OsELF3* 家族基因,分别为 *OsELF3-1/Hd17/Ef7* 及 *OsELF3-2*。前人已经对基因 *OsELF3-1* 进行了克隆,其在水稻昼夜节律和光周期途径开花方面发挥重要功能。*OsELF3-1* 通过正调控 *OsLHY* 的表达进而影响水稻昼夜节律,

通过激活 *Ehd1* 和抑制 *Ghd7* 在长短日照条件下均促进水稻开花^[14-15]。*OsELF3-1* 可以与 *OsLUX*、*OsELF4s* 形成水稻三元抑制蛋白复合物,在耐盐性方面发挥作用^[16]。*OsELF3-2* 负调控水稻对稻瘟病菌的免疫反应,其突变体 *oself3-2* 比野生型中花11更抗稻瘟病^[17]。最新研究发现泛素连接酶 *IPI1* 通过影响 E3 泛素连接酶的活性进而直接或间接地影响 *OsELF3-1* 和 *OsELF3-2* 的稳定性,进而协同调控水稻的开花和抗病^[18-19]。虽然水稻中两个 *OsELF3* 基因已经被成功克隆,在抽穗期和稻瘟病抗性上的分子调控网络也逐渐清晰,但是在根系生长调控上的功能仍需进一步研究。本研究采用图位克隆鉴定到一个调控水稻根系长度的目标基因 *OsELF3-1*,利用 CRISPR/Cas9 对 *OsELF3-1* 的功能进行验证,通过酵母双杂交筛选到 *OsELF3-1* 与 *OsARID3* 互作,使用 RNAi 技术构建 *OsARID3*-RNAi 转基因植株验证了 *OsARID3* 参与调控水稻根系生长,本研究为解析水稻根系生长基因调控网络提供理论基础和种质资源。

1 材料与方法

1.1 试验材料

从实验室的籼锦 EMS 诱变突变体库筛选得到根系变短的 *oself3-1* 突变体。试验以籼锦为野生型材料,再利用 CRISPR/Cas9 载体构建新的 *oself3-1* 突变体, RNA 干扰技术构建 *OsARID3*-RNAi 株系, *oself3-1* 突变体与野生型杂交获得的 F₁ 及 F₂ 群体(124株),突变体与丰锦杂交构建包含1344个植株的 F₂ 群体用于突变基因精细定位。野生型籼锦、*oself3-1* 突变体、*oself3-1* 突变体与野生型籼锦杂交获得的 F₁ 材料、*OsARID3*-RNAi 株系均于2022年种植于沈阳农业大学水稻所研究基地,行长5m,行距30cm,株距13.5cm,其中野生型籼锦、*oself3-1* 突变体和 *OsARID3*-RNAi 株系均种植5行,3次重复,栽培方式均与大田生产相同,小区纯氮施用量为150kg/hm²,施肥比例为基肥:分蘖肥:穗肥=5:3:2,磷肥75kg/hm²全部基施;钾肥75kg/hm²,施肥比例为基肥:穗肥=

8:2, 基肥均于播前整地时施入。在野生型籼锦、*oself3-1* 突变体及 *OsARID3*-RNAi 株系的拔节期与齐穗期各取 6 株进行取样鉴定基因表达量。

1.2 目标基因的图位克隆及区间内候选基因分析

利用突变体 *oself3-1* 与野生型籼锦杂交得到 F₁ 植株, F₁ 植株自交得到包含 124 个植株的 F₂ 群体。水培条件下在培养箱内 (14 h 光照 30℃/ 10 h 黑暗 22℃) 播种 4 d 后, 将突变体、野生型籼锦、F₁ 植株和 F₂ 群体根系摆放在盛有一薄层水的透明塑料器皿 (30 cm×30 cm) 中, 用扫描仪 (Epson Expression 1680 Scanner) 进行图像扫描, 再用根系分析系统 (WinRHIZO) 进行分析, 计算根长, 分析突变体根系长度差异性状是否受单隐性核基因控制。另将突变体与丰锦杂交构建包含 1344 个植株的 F₂ 群体进

行突变基因精细定位, 明确目的基因的定位区间。利用水稻基因组注释数据库 (<http://rice.plantbiology.msu.edu/>) 预测定位区间内的开放阅读框 (ORF, open reading frames)。试验 DNA 均采用 CTAB 法提取, 水稻材料播种后 14 d 取嫩叶提取 DNA, 使用在线软件 Primer 5.0 设计定位用引物 (表 1)。PCR 反应体系: 25 μL 2 × Rapid Taq Master Mix (诺唯赞), 上游引物 2 μL, 下游引物 2 μL, DNA 模板 2 μL, ddH₂O 19 μL。PCR 扩增程序: 95℃ 3 min; 95℃ 15 s, 60℃ 15 s, 72℃ 15 s, 共 30 个循环; 72℃ 5 min, 分别扩增出这些 ORF 的序列, 测序并比对分析其在丰锦和突变体中的序列差异, 引物合成和测序由上海生工有限公司北京分公司完成。

表 1 本研究的引物列表

Table 1 List of primers used in this study

引物名称 Primer name	上游引物(5'-3') Forward primer(5'-3')	下游引物(5'-3') Reverse primer(5'-3')	作用 Function
P1	ACACAGGGATCGATCGAGAG	GACCATCGCTTCTGCAGTTC	精细定位
P2	TTTTTATACGCTAGTAAATTGG	TTTCAAACCTCAACAAATTAAGA	精细定位
P3	GTGTCGCCCTTCATCCTAGA	AGATCGTGCGGTCAAGAAAT	精细定位
P4	TGGGTTTCATCACTGGTATGC	TGGAGCCAAGTCTACAGCAA	精细定位
P5	CCTCGAGCATCTCCACCAC	GCTACGGTCTCGTTCTGCTC	精细定位
P6	TTTCCTTGGTGGCTAAGAGTC	GGATACGTGCGATTCGTTT	精细定位
<i>oself3-1-Cas9</i>	GGCATTCAGAACCTCCAATGAGAA	AAACTTCTCATTGGAGGGTTCTGAA	CRISPR/Cas9 靶位点
<i>oself3-1</i>	TTCAGAACCCTCCAATGAGAA	TCATCGATGGTTGCGACTAA	CRISPR/Cas9 鉴定
<i>OsARID3</i> -RNAi-positive	ATAAAGGAAAGGCCATCGTTGAA	AGCTGGACTGGACGCATACAT	RNAi
<i>OsARID3</i> -RNAi-reverse	TATATGTATGCGTCCAGTCCAG	ATAAAAACCCATCTCATAAATAAC	RNAi
<i>Actin</i>	TCCATCTTGGCATCTCTCAG	GTACCCGCATCGGCATCTG	qRT-PCR
<i>OsELF3-1</i>	CATGATCGTCGTCGACCTCCTC	TCATCGTCCCGACAGGTAGGAG	qRT-PCR
<i>OsARID3</i>	TTGCCCTCCCGCATTG	CGAATGGTGCACGGACAA	qRT-PCR
<i>OsARID3</i> -RNAi	GTTCGGAGAACCAAAGATTG	GTCCATGGAGAGTGACAACCTGCCGA	qRT-PCR
OsELF3-1-BD	CGGGATCCATGGCGACGAGGGGAGGAGG CGGAGGAG	GAGCTCTCAATCATCTCGTTGCCGTT CCATTTGT	酵母双杂
OsARID3-AD	CGGGATCCATGGCCCAGTTTAGGTCTGCG CCTGTGG	GAGCTCTTACTTTGACTGCTCGAATG GTGCACGG	酵母双杂

1.3 CRISPR/Cas9 载体构建与遗传转化

根据 *OsELF3-1* 的基因组序列, 在 CRISPR-GE (<http://skl.scau.edu.cn/targetdesign/>) 进行靶位点设计 (表 1), 构建 CRISPR/Cas9 载体 (pRGEB32)^[20]。利用农杆菌介导法, 将构建好的 CRISPR/Cas9 农杆

菌载体活化后侵染已培养 30 d 的野生型籼锦愈伤组织, 将愈伤组织阴干后共培养 3 d (暗培养, 20~25℃), 之后转移到筛选一培养基 (潮霉素) 上培养 15 d (培养箱 30℃ 光照 10 h, 28℃ 暗培养 14 h), 将原始愈伤周围新长的、贴着培养基的愈伤用镊子轻轻

转移到筛选二培养基(潮霉素及头孢)上,放在与筛选一培养基相同条件的培养箱里培养10 d,按照以上筛选标准挑出符合条件的愈伤,均匀撒在分化培养基上,约40 d分化出幼苗。PCR反应体系及扩增程序同1.2,利用PCR反应鉴定转基因阳性植株。跨越靶点设计引物(表1),直接测序检测阳性转基因植株靶位点的突变情况。选取基因突变的株系与野生型籼锦在培养箱内(14 h光照30℃/10 h黑暗22℃)共同培养14 d后观察根系表型并拍照,鉴定其功能。

1.4 RNAi转基因植株载体构建、RNA提取及鉴定

根据*OsARID3*序列进行RNAi载体构建,分别通过*Kpn I/Sal I*和*BamH I/Sac I*限制性内切酶将同一特异性片段以正向和反向连接到RNAi表达载体上,根据载体和基因的CDS序列设计引物(表1)。利用与CRISPR/Cas9遗传转化相同的农杆菌介导法转化到野生型籼锦株系愈伤组织中,在上述特异性片段序列中选择150~200 bp设计引物进行qRT-PCR(表1),取T₀代植株叶片检测RNAi植株的*OsARID3*表达量,3次生物学重复,3次技术重复。分别取拔节期和齐穗期野生型籼锦及*OsARID3*-RNAi的根、茎、叶、穗提取RNA。利用普洛麦格公司Easstep® Super Total RNA Extraction Kit的RNA提取试剂盒提取根、茎、叶、穗的RNA,利用康为世纪公司的HiFiScript gDNA Removal RT MasterMix反转录试剂盒合成cDNA,cDNA应立即使用或保存于-20℃备用。采用实时荧光定量PCR仪,测定基因的表达,3次生物学重复,3次技术重复,以水稻*Actin*为内参,反应体系包括反转录产物2.5 μL,前后引物各0.4 μL,PCR预混液(2×SGExcel FastSYBR Mixture)10 μL,100×ROX Reference Dye 0.4 μL,ddH₂O 6.3 μL。扩增程序为95℃ 3 min;95℃ 5 s,60℃ 20 s,共40个循环;熔解曲线分析程序为95℃ 15 s,60℃ 1 min,95℃ 15 s,60℃ 15 s,利用QuantStudio™ 5 Real-Time PCR System收集荧光,基因相对表达量采用2^{-ΔΔCT}[21]方法计算。野生型籼锦和*OsARID3*-RNAi植株在培养箱内(30℃光照10 h,28℃暗培养14 h)培养14 d后,将野生型籼锦与*OsARID3*-RNAi的根系进行对比并拍照。

1.5 *OsARID3*生物信息学分析

利用在线工具InterPro(<https://www.ebi.ac.uk/interpro/>)对蛋白质结构域进行预测。在数据库(<https://snp-seek.irri.org/index.zul>)查找目标基因在3010份种质资源中的SNP[22],利用在线工具<https://www.chiplot.online/>对目标基因的SNP进行进化树制图。在网站https://ricevarmap.ncpgr.cn/vars_in_gene/进行单体型分析[23]。

www.chiplot.online/对目标基因的SNP进行进化树制图。在网站https://ricevarmap.ncpgr.cn/vars_in_gene/进行单体型分析[23]。

1.6 酵母双杂

为了解析*OsELF3-1*的基因功能,对*OsELF3-1*进行酵母双杂交,筛选出与*OsELF3-1*互作的*OsARID3*。利用SnapGene软件设计带有*BamH I*和*Sac I*酶切位点的引物(表1),将克隆好的*OsELF3-1*与*OsARID3*的CDS序列片段分别连接到双酶切成功的pGBKT7(BD)和pGADT7(AD)载体上,构建好的载体分别为pGBKT7-*OsELF3-1*和pGADT7-*OsARID3*。阳性对照的共转质粒为pGBKT7-53(具有自激活活性)与pGADT7-T(AD空载),阴性对照的共转质粒为pGBKT7-Lam(BD空载)与pGADT7-T。酵母自激活采用阳性对照、阴性对照、pGADT7-T空载及构建好的pGBKT7-*OsELF3-1*载体,自激活试验培养基为Servicebio公司提供的二缺培养基(SD/-Leu/-Trp)及四缺培养基(SD/-Leu/-Trp/-His/-Ade),观察阳性对照、阴性对照、pGADT7-T空载及构建好的pGBKT7-*OsELF3-1*共转酵母在二缺和四缺培养基上的生长情况,pGBKT7-*OsELF3-1*与pGADT7-T空载的共转酵母在二缺及四缺培养基上均无法生长,可以进行后续试验。为了验证*OsELF3-1*与*OsARID3*的相互作用是准确无误的,将pGBKT7-*OsELF3-1*与pGADT7-*OsARID3*共转化到酵母Y2H-Gold感受态中,涂二缺培养基,30℃培养3 d,挑取单克隆进行酵母细胞培养,培养至适当的OD值,测OD₆₀₀=0.55,取10 μL菌液分别稀释10倍、100倍和1000倍,在Servicebio公司提供的SD/-Leu/-Trp和SD/-Leu/-Trp/-His/-Ade培养基上培养生长。

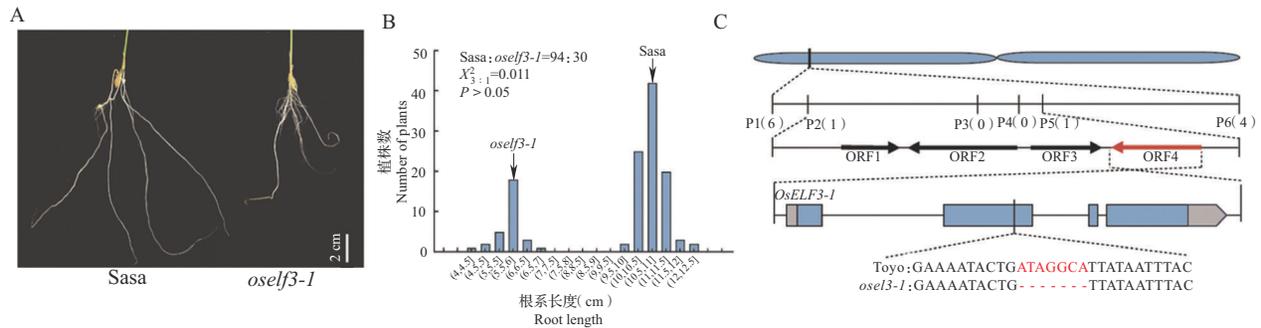
2 结果与分析

2.1 *oself3-1*突变体根系表型鉴定及图位克隆

前期于筛选籼锦突变体库发现突变体*oself3-1*根系较野生型籼锦的根系明显变短(图1A),将突变体与野生型籼锦杂交获得F₁植株,F₁植株自交得到包含124个植株的F₂群体,调查F₂群体表型发现有30株与*oself3-1*表型相似(根系长度大于5 cm),而有94株与野生型籼锦表型相似(根系长度大于10 cm),分离比经卡方检验符合3:1分离比($\chi^2=0.011$)(图1B),说明突变体较野生型籼锦根系变短由一个隐性单基因引起。利用突变体与丰锦杂交获得的F₂群体进一步精细定位,将目标基因锁定在第6染色体分子标记P2和P5之间一段50.9 kb的区间内,比

对数据库发现该区间内共含有 4 个开放阅读框 (ORF1~4), 通过测序比对发现突变体和丰锦只在 ORF4 上存在多态性, 测序结果显示突变体中 ORF4 在第二个外显子上有 7 个碱基的缺失, 导致其因移码而提前终止 (图 1C)。ORF4 (*OsELF3-1*) 与拟南

芥中 ELF3 蛋白的编码基因同源, 水稻中 *OsELF3-1* 已被克隆, 并有报道称其参与抽穗期和耐盐性的调控^[14-16], 但尚未见其调控水稻根系生长的报道, 本研究结果说明 *OsELF3-1* 可能具有调控根系的新功能。



A: 野生型籼锦 (Sasa) 与 *oself3-1* 突变体根系长度差异; B: F_2 群体根系长度与植株数量; C: 定位区间内预测的 ORF 及候选基因 *OsELF3-1* (*LOC_Os06g05060*) 的基因结构及在丰锦 (Toyo) 和 *oself3-1* 的序列差异, 红色箭头表示候选 ORF, 红色字母表示 ORF4 在丰锦和 *oself3-1* 突变体之间的序列变异, - 为碱基缺失

A: Differences in the root system of wild type Sasaishiki (Sasa) and *oself3-1* mutant; B: Root length and number of plants in F_2 population; C: Predicted ORFs in the location interval and gene structure of the candidate gene *OsELF3-1* (*LOC_Os06g05060*) and the sequence difference between Toyonishiki (Toyo) and *oself3-1*, the red arrow indicates the candidate ORF, the letters in red color indicate the sequence variation of ORF4 between Toyonishiki and *oself3-1* mutant, - is the missing base

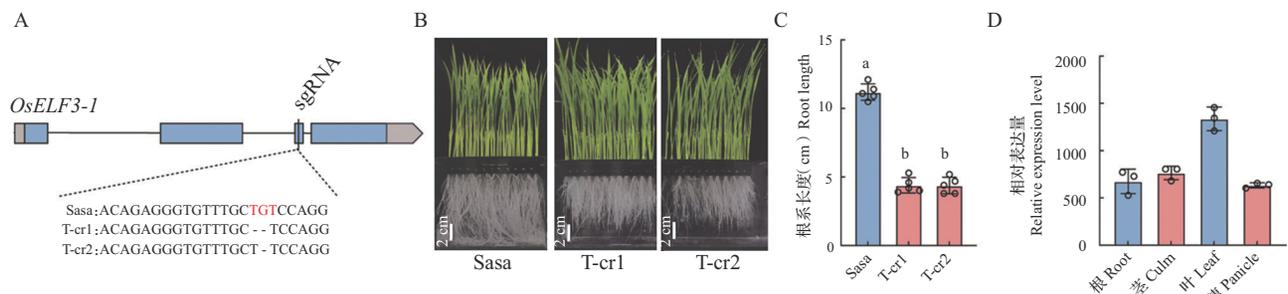
图 1 突变体根部表型分析及精细定位

Fig. 1 Root phenotype of the mutant and its fine mapping

2.2 *OsELF3-1* 基因编辑植株鉴定及根系表型分析

为了验证 *OsELF3-1* 参与调控水稻根系生长, 在粳稻品种野生型籼锦遗传背景下通过 CRISPR/Cas9 技术构建了 *OsELF3-1* 敲除突变体 (T-cr1 和 T-cr2), 测序结果表明 T-cr1 和 T-cr2 分别在第 3 个外显子上有 2 个碱基和 1 个碱基的缺失 (图 2A)。调查培养 14 d 的幼苗根系发现, T-cr1 和 T-cr2 的根系均

显著短于野生型籼锦的根系, 野生型籼锦根系长度达到 10 cm 以上, 但是突变体根系长度未达到 5 cm (图 2B、C), 验证了 *OsELF3-1* 参与调控水稻根系生长。对野生型籼锦齐穗期的根、茎、叶片及穗进行 qRT-PCR 试验测定 *OsELF3-1* 表达量, 发现 *OsELF3-1* 在水稻根、茎、叶片及穗中均有表达, 在叶片中表达量最高 (图 2D)。



A: *OsELF3-1* 的基因结构及在野生型籼锦和 *oself3-1* 突变体中的序列差异, T-cr1、T-cr2 分别为 *oself3-1* 的两个突变体; B: 野生型籼锦及 *oself3-1* 突变体的幼苗根系性状对比; C: 野生型籼锦及突变体根系长度的变化, 不同字母表示差异显著 ($P < 0.05$), 下同;

D: 野生型籼锦不同器官中 *OsELF3-1* 的相对表达量

A: Gene structure of the candidate gene *OsELF3-1* and the sequence difference between wild type Sasaishiki and *oself3-1*, T-cr1 and T-cr2 are two mutants of *oself3-1*, respectively; B: Comparison of seedling root traits between Sasaishiki and *oself3-1* mutants; C: Changes in root length in Sasaishiki and mutant organisms, different letters indicate significant differences ($P < 0.05$), the same as below;

D: Relative expression of *OsELF3-1* in different organs of Sasaishiki

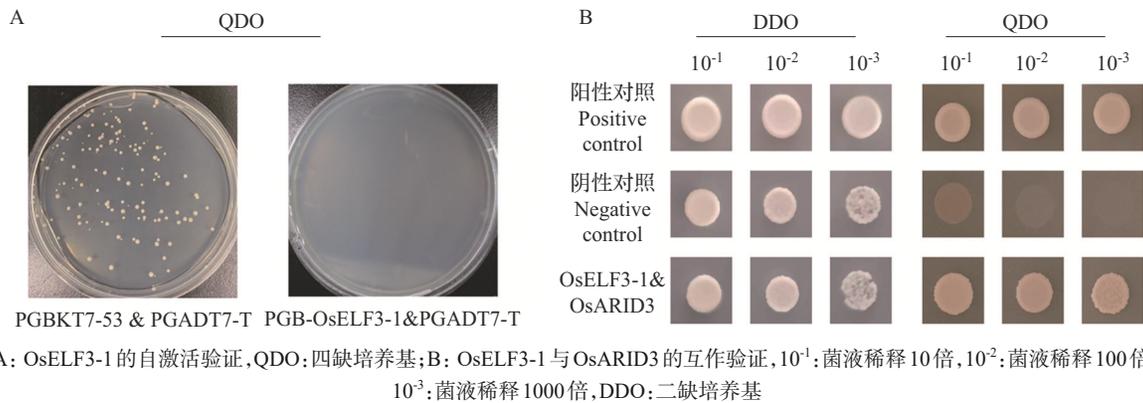
图 2 CRISPR/Cas9 技术构建 *OsELF3-1* 敲除突变体的验证及根系表型变化

Fig. 2 Validation of *OsELF3-1* knockout mutant constructed by CRISPR/Cas9 technology and root phenotypic changes

2.3 OsELF3-1 互作蛋白的筛选

为了解析 *OsELF3-1* 调控水稻根系生长的基因网络,通过酵母双杂交筛选 *OsELF3-1* 的互作蛋白。四缺培养基酵母自激活结果显示 *OsELF3-1* 没有自激活现象(图 3A),可以开展后续验证实验,结果发现 *OsELF3-1* 可能与 *OsARID3* 互作。为了进一步验证这一结果,将构建好的 pGBKT7-*OsELF3-1*

和 pGADT7-*OsARID3* 的重组质粒共转入酵母感受态细胞中,*OsARID3* 与 *OsELF3-1* 共转的酵母细胞能够在二缺培养基上正常生长,说明 *OsARID3* 与 *OsELF3-1* 均已经全部转化进酵母细胞中。吸取菌液进行稀释后,微量点在四缺培养基上,结果显示菌液能够正常生长,说明 *OsELF3-1* 与 *OsARID3* 存在互作关系(图 3B)。



A: *OsELF3-1* 的自激活验证, QDO: 四缺培养基; B: *OsELF3-1* 与 *OsARID3* 的互作验证, 10⁻¹: 菌液稀释 10 倍, 10⁻²: 菌液稀释 100 倍, 10⁻³: 菌液稀释 1000 倍, DDO: 二缺培养基
A: Self-activation verification of *OsELF3-1*, QDO: Synthetic dextrose minimal medium without adenine, histidine, leucine, tryptophan;
B: Identification of interaction between *OsELF3-1* and *OsARID3*, 10⁻¹: The bacterial solution is diluted 10 times, 10⁻²: The bacterial solution is diluted 100 times, 10⁻³: The bacterial solution is diluted 1000 times, DDO: Synthetic dextrose minimal medium without leucine, tryptophan

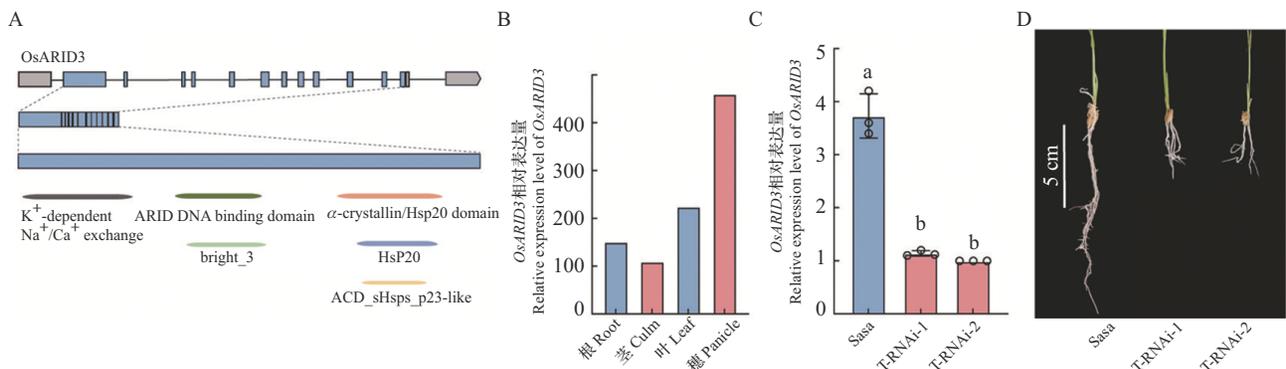
图 3 *OsELF3-1* 酵母双杂交筛选互作蛋白

Fig. 3 *OsELF3-1* yeast two-hybrid screening of interacting proteins

2.4 *OsARID3* 的结构域功能分析及 *OsARID3*-RNAi 株系表型鉴定

基因结构分析发现 *OsARID3* 有 15 个外显子,采用 InterPro 对蛋白质功能结构域进行分析,蛋白质结构域中含有 ARID 功能结构域 (ARID3 DNA binding domain)、 α -晶体蛋白/热休克蛋白 20 结构域 (α -crystallin/Hsp domain)、热休克蛋白 20 (HsP20)

等结构域,*OsARID3* 结构域中还存在依靠钾离子的钠离子/钙离子交换的结构域 (K^+ -dependent and Na^+/Ca^+ exchange domain) (图 4A)。*OsARID3* 在野生型笹锦的根、茎、叶、穗中均有表达,在穗部表达量最高(图 4B)。为了进一步验证 *OsARID3* 的功能,使用 CRISPR/Cas9 基因编辑技术构建了 *OsARID3* 的敲除突变体,但是所有纯合突变植株全部致死,暗示



A: *OsARID3* 蛋白功能结构域预测; B: 野生型笹锦不同器官中 *OsARID3* 的相对表达量; C: 野生型笹锦、T-RNAi-1 及 T-RNAi-2 中 *OsARID3* 的相对表达量, T-RNAi-1、T-RNAi-2 为 *OsARID3* 的 RNAi 植株; D: 野生型笹锦与 *OsARID3*-RNAi 根系性状比较

A: Prediction of functional conserved domain of *OsARID3* protein; B: Relative expression levels of *OsARID3* in different organs of wild type Sasanishiki; C: Expression of *OsARID3* in Sasaishiki, T-RNAi-1 and T-RNAi-2, T-RNAi-1 and T-RNAi-2 are the RNAi plants of *OsARID3*; D: Comparison of Sasaishiki and *OsARID3*-RNAi root traits

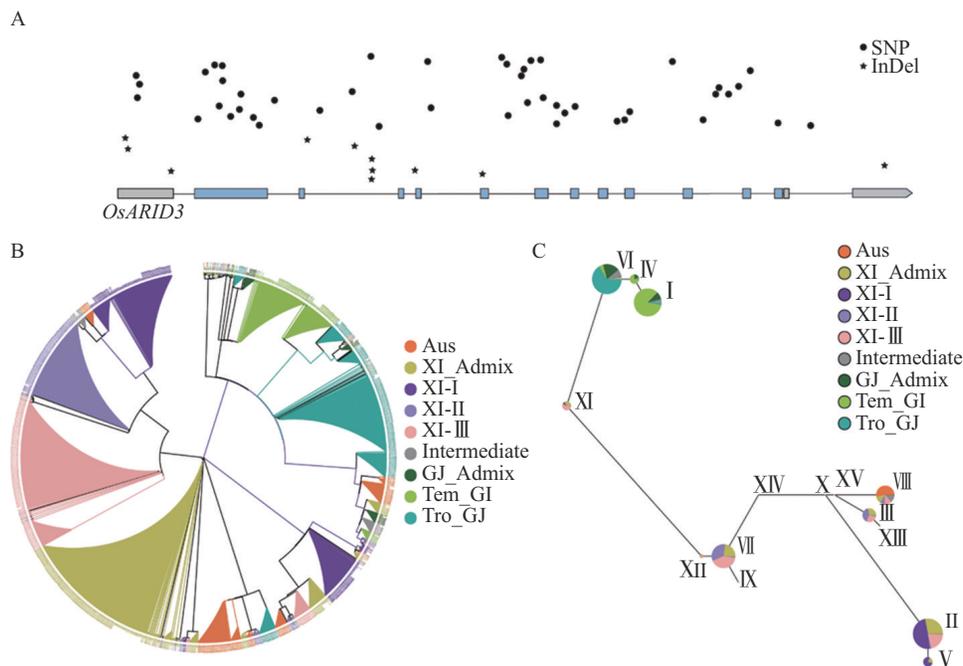
图 4 *OsARID3* 结构域预测及 *OsARID3*-RNAi 突变体的根系变化

Fig. 4 Domain prediction of *OsARID3* and root changes of *OsARID3*-RNAi mutants

其在水稻生长发育过程中起至关重要的作用。进一步构建了两个 *OsARID3* 的 RNAi 株系,对构建好的 RNAi 转基因植株进行定量分析,发现 T-RNAi-1 及 T-RNAi-2 中 *OsARID3* 的表达量显著低于野生型籼锦(图 4C)。对培养 7 d 的幼苗根系进行对比,发现 T-RNAi-1 及 T-RNAi-2 的根系短于野生型籼锦的根系(图 4D),说明 *OsARID3* 参与水稻根系生长调控。

2.5 *OsARID3* 的生物信息学分析

为了进一步分析 *OsARID3* 的自然变异分布和其进化规律,对 3010 份水稻种质资源测序数据进行分析,发现 *OsARID3* 的基因组 DNA 区域在 3010 份种质资源种中存在丰富的多态性,包括 50 个 SNP 和 11 个 InDel(图 5A)。进化树分析结果表明 *OsARID3* 存在明显的籼稻、粳稻分化(图 5B)。单倍型分析表明 *OsARID3* 可以分为 15 种单倍型,其中粳稻主要属于单倍型 I、IV 和 VI(图 5C)。



A: SNP 和 InDel 的多态性分布; B: *OsARID3* 的聚类分析, Aus: 孟加拉稻, XI_Admix: 籼稻混合类型, XI-I/ XI-II/ XI-III: 籼稻亚群, Intermediate: 中间类型, GJ_Admix: 粳稻混合类型, Tem_GJ: 粳稻亚群温带粳稻, Tro_GJ: 热带粳稻; C: *OsARID3* 的单倍型分析, I-XV: 不同单倍型类型

A: SNP and InDel polymorphism distribution; B: Cluster analysis of *OsARID3*, Aus: Aus, XI_Admix: Indica admix, XI-I/ XI-II/ XI-III: Indica, Intermediate: Intermediate type, GJ_Admix: Japonica admix, Tem_GJ: Temperate japonica, Tro_GJ: Tropical japonica; C: Haplotype analysis of *OsARID3*, I-XV: Different haplotype types

图 5 *OsARID3* 的序列单倍型分析

Fig. 5 Sequence haplotype analysis of *OsARID3*

3 讨论

水稻根系的发育是一个复杂的生物学过程,参与该过程的基因众多,因此目前已经克隆的根系发育调控基因往往具有一因多效性。*OsELF3-1* 是拟南芥 *AtELF3* 的同源基因,在拟南芥中,ELF3、ELF4 和 LUX 形成晚间复合体(EC, evening complex),直接调节植物生长^[24]。水稻中 *OsELF3-1* 同样可以与 *OsLUX* 和 *OsELF4s* 形成三元复合体 *OsEC*。*OsEC* 可以直接抑制 *Ghd7*, 增强下游 *Ehd1*、*Hd3a* 和 *RFT1* 的表达,促进水稻开花,还可以直接作用于 *OsGI* 进而调控水稻的耐盐性^[16]。然而 *OsELF3-1* 是否能与

其他转录因子互作,调控其他生物学进程仍然未知。本研究通过酵母双杂交筛库发现 *OsELF3-1* 与一个能与富含 AT 的 DNA 特异结合的关键转录调控因子 *OsARID3* 互作。*OsARID3* 参与生长素及细胞分裂素相关通路, *osarid3* 突变体的愈伤组织中生长素浓度增加,但细胞分裂素浓度降低,根系无法长出,说明 *OsARID3* 与根系生长发育有关^[25]。本研究发现 *OsARID3* 的纯合突变体致死,因此利用 RNAi 技术构建 *OsARID3*-RNAi 突变体,突变体的根系短于野生型籼锦。综上所述, *OsARID3*-RNAi 植株根系与 *oself3-1* 突变体植株根系均短于野生型籼锦植株根系,说明 *OsELF3-1* 可能通过与 *OsARID3* 互作

调控水稻根系生长。ARID蛋白在植物的生长发育和细胞分化等生物进程有重要作用^[26-27], ARID具有能特异地结合于靶基因的 AT-rich DNA 序列的 DNA-binding 蛋白, 蛋白质结构域还有属于热蛋白家族的 α -crystallin 及 HSP20, 热蛋白家族在植物生长发育及逆境生理中发挥作用, 因此 *OsARID3* 基因可能与水稻胁迫机制有关^[25, 28-29]。同时拟南芥 ELF3 蛋白的类朊病毒结构域 (PrD, prion like virus domain) 能够感受外界温度信号, 促使 ELF3 蛋白发生相变, 在活化和非活化状态间转换, 是植物中重要的热感受器^[30], 暗示水稻中 *OsARID3* 和 *OsELF3-1* 可能也同时参与对温度的响应和水稻胁迫相关机制。根系变短也可能会导致水稻植株的耐盐性和抗旱性的减弱, 对外源生长素及细胞分裂素更敏感, 导致生长素的极性运输受到影响^[10-11, 31-32]。因此 *OsELF3-1* 和 *OsARID3* 在植物生长发育及非生物胁迫机制方面的更多功能值得更深层次的研究。

水稻中 ELF3 的另一个同源基因编码蛋白为 *OsELF3-2*, *OsELF3-2* 的 T-DNA 插入突变体与 *OsELF3-1* 敲除突变体表型相似, 在长短日照下都通过延长基础营养生长期来延迟抽穗^[15, 33]。与 *OsELF3-1* 相似, *OsELF3-2* 的 T-DNA 插入突变体根长较野生型变短^[32], 暗示 *OsELF3-1* 和 *OsELF3-2* 在生育期和根系发育上具有相似的功能。此外 *OsELF3-2* 可以与 E3 连接酶 APIP6 相互作用, 影响稻瘟病抗性^[17], 暗示水稻中两个 ELF3 同源物还存在不同作用机制调控相应的性状。*OsLUX* 与 *OsELF3-1* 和 *OsELF3-2* 的相互作用相似, 而与 *OsELF3-2* 相比, *OsELF3-1* 与 *OsLUX* 的相互作用更强^[34], 这种与 *OsLUX* 相互作用强度的变化可能是 *OsELF3-1* 和 *OsELF3-2* 不同功能的分子基础, *OsELF3-1* 主要作为连接 *OsELF4s* 和 *OsLUX* 的桥梁, 进而实现转录抑制。相反 *OsELF3-2* 可能在转录后水平上发挥作用, 通过与不同蛋白质的相互作用增强病原体免疫力^[34]。综上所述, 阐明协同调控 *OsELF3-1* 和 *OsELF3-2* 的分子机理, 对同时改良水稻品种生育期、根长、稻瘟病抗性等重要农艺性状具有深远意义, *OsELF3-1* 和 *OsELF3-2* 是水稻分子设计育种的重要改良位点。

参考文献

- [1] Stephanie S, Ive D S. Root system architecture: Insights from *Arabidopsis* and cereal crop. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 2012, 367 (1595): 1441-1452
- [2] 王留艳. 缺氮胁迫下细胞分裂素对水稻幼苗氮素分配及叶片衰老的调控作用. 武汉: 华中农业大学, 2017
Wang L Y. The regulation of cytokinin on nitrogen distribution and leaf senescence in rice seedlings under nitrogen deficiency. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2017
- [3] 褚光. 不同水分、养分利用效率水稻品种根系特征及其调控技术. 扬州: 扬州大学, 2016
Chu G. Roots traits for rice varieties with different water and nitrogen use efficiencies and their regulation techniques. Ynagzhou: Agricultural College Yangzhou University, 2016
- [4] Lynch J. Root architecture and plant productivity. *Plant Physiology*, 1995, 109: 7-13
- [5] 谷娇娇, 胡博文, 贾琰, 沙汉景, 李经纬, 马超, 赵宏伟. 盐胁迫对水稻根系相关性状及产量的影响. *作物杂志*, 2019 (4): 176-182
Gu J J, Hu B W, Jia Y, Sha H J, Li J W, Ma C, Zhao H W. Effects of salt stress on root related traits and yield of rice. *Crops*, 2019 (4): 176-182
- [6] Rebouillat J, Dievart A, J. Verdeil L, Escoute J, Giese G, Bretiler J C, Gantet P, Espeout S, Guiderdoni E, Périn C. Molecular genetics of rice root development. *Rice*, 2009, 2 (1): 15-34
- [7] E Z G, Ge L, Wang L. Molecular mechanism of adventitious root formation in rice. *Plant Growth Regulation*, 2012, 68(3): 325-331
- [8] Yu P, Gutjahr C, Li C J, Hochholdinger F. Genetic control of lateral root formation in cereals. *Trends in Plant Science*, 2016, 21(1): 951-961
- [9] Li J, Zhu S H, Song X W, Shen Y, Chen H M, Yu J, Yi K K, Liu Y F, Valerie J K, Wu P, Deng X W. A rice glutamate receptor-like gene is critical for the division and survival of individual cells in the root apical meristem. *The Plant Cell*, 2006, 18(2): 340-349
- [10] Yusaku U, Kazuhiko S, Satoshi O, Jagadish R, Manabu I, Naho H, Yuka K, Yoshiaki I, Kazuko O, Noriko K, Haruhiko I, Hinako T, Ritsuko M, Yoshiaki N, Wu J Z, Takashi M, Toshiyuki T, Kazutoshi O, Masahiro Yano. Control of root system architecture by *DEEPER ROOTING 1* increases rice yield under drought conditions. *Nature Genetics*, 2013, 45: 1097-1102
- [11] 王萌冉, 秦俭, 吴凡, 王学春, 黎腊梅, 胡瑶, 赵长坤, 陈婷, 杨国涛, 陈永军, 胡运高. 不同基因型杂交水稻根系分布特征及其对水稻耐旱能力的影响. *东北师大学报: 自然科学版*, 2021, 53(4): 84-92
Wang M R, Qin J, Wu F, Wang X C, Li L M, Hu Y, Zhao C K, Chen T, Yang G T, Chen Y J, Hu Y G. Root distribution characteristics of hybrid rice with different genotypes and their effects on drought tolerance of rice. *Journal of Northeast Normal University: Natural Science Edition*, 2021, 53 (4): 84-92
- [12] Song M Q, Fan X R, Chen J G, Qu H Y, Luo L, Xu G H. *OsNAR2.1* interaction with *OsNIT1* and *OsNIT2* functions in

- root-growth responses to nitrate and ammonium. *Plant Physiology*, 2020, 183(1): 289-303
- [13] Huang S J, Chen S, Liang Z H, Zhang C M, Yan M, Chen J G, Xu G H, Fan X R, Zhang Y L. Knockdown of the partner protein OsNAR2.1 for high-affinity nitrate transport represses lateral root formation in a nitrate-dependent manner. *Scientific Reports*, 2015, 5: 18192
- [14] Kazuki M, Eri O T, Kiyosumi H, Kaworu E, Tsuyu A, Masahiro Y. Natural variation in *Hdl17*, a homolog of arabidopsis *ELF3* that is involved in rice photoperiodic flowering. *Plant & Cell Physiology*, 2012, 53(4): 709-716
- [15] Hiroki S, Eri O T, Yutaka O, Yoshihiro Y, Haruka I, Takayuki Y, Kazuki M, Kiyosumi H, Masahiro Y, Hiromo I, Takatoshi T. *Ej7* encodes an ELF3-like protein and promotes rice flowering by negatively regulating the floral repressor gene *Ghd7* under both short- and long-day conditions. *Plant & Cell Physiology*, 2012, 53(4): 717-728
- [16] Wang X L, He Y Q, Wei H, Wang L. A clock regulatory module is required for salt tolerance and control of heading date in rice. *Plant Cell & Environment*, 2021, 44: 3283-3301
- [17] Ning Y S, Shi X T, Wang R Y, Fan J B, Chan H P, Zhang C Y, Zhang T, Ouyang X H, Li S G, Wang G L. OsELF3-2, an Ortholog of *Arabidopsis* *ELF3*, interacts with the E3 ligase APIP6 and negatively regulates immunity against *magnaporthe oryzae* in rice. *Molecular Plant*, 2015, 8: 1679-1682
- [18] Yi H, Shi H, Mao W, Yin J J, Ma Y Y, Xu L, Jing L J, He M, Zhu X B, Lu X, Xiong Q, Tang Y Y, Hou Q Q, Song L, Wang L, Li W T, Yu H, Chen X W, Li J Y, Wang J. E3 ubiquitin ligase IPI1 controls rice immunity and flowering via both E3 ligase-dependent and -independent pathways. *Developmental Cell*, 2024, 59(20):2719-2730
- [19] Xu X, Shi X T, You X M, Hao Z Y, Wang R Y, Wang M, He F, Peng S S, Tao H, Liu Zheng, Wang J S, Zhang C Y, Feng Q, Wu W X, Wang G L, Ning Y S. A pair of E3 ubiquitin ligases control immunity and flowering by targeting different ELF3 proteins in rice. *Developmental Cell*, 2024, 59(20):2731-2744
- [20] Sun Q, Yu Z W, Wang X C, Chen H, Lu J H, Zhao C F, Jiang L L, Li F C, Xu Q, Ma D R. EARLY FLOWERING 3-1 represses *Grain number*, *plant height*, and *heading date7* to promote *ABC1 REPRESSOR1* and regulate nitrogen uptake in rice. *Plant Physiology*, 2024, 196(3): 1857-1868
- [21] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *Methods*, 2001, 25(4): 402-408
- [22] Locedie M, Roven R F, Dmytro C, Frances N B, Jeffrey D, Juan M A S, Kevin P, Alexandre P, Inna D, Victor S, Ruairaidh S H, Kenneth L M, Nickolai A, Ramil M. SNP-Seek II: A resource for allele mining and analysis of big genomic data in *Oryza sativa*. *Current Plant Biology*, 2016, 7-8: 16-25
- [23] Zhao H, Yao W, Ouyang Y D, Yang W N, Lian G W, Lian X M, Xing Y Z, Chen L L, Xie W B. RiceVarMap: A comprehensive database of rice genomic variations. *Nucleic Acids Research*, 2015, 43: 1018-1022
- [24] Dmitri A N, Anne H, Elizabeth E H, Jasmine J K, Takato I, Thomas F S, Eva M F, Steve A K. The ELF4-ELF3-LUX complex links the circadian clock to diurnal control of hypocotyl growth. *Nature*, 2011, 475(7356): 398-402
- [25] 徐艳. 水稻 OsSKIPa 互作蛋白 OsTMF 和 OsARID3 在抗逆和发育中的功能鉴定. 武汉: 华中农业大学, 2015
- Xu Y. Functional characterization of OsSKLPa-interacting proteins OsTMF and OsARID3 in stress resistance and development. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2015
- [26] Kortschak R D, Tucker P W, Saint R. ARID proteins come in from the desert. *Trends in Biochemical Sciences*, 2000, 25(6): 294-299
- [27] Deborah W, Antonia P, Peter B D, Elizabeth M. ARID proteins: A diverse family of DNA binding proteins implicated in the control of cell growth, differentiation, and development. *Cell growth & Differentiation*, 2002, 13(3): 95-106
- [28] Xu Y, Zong W, Hou X, Yao J L, Liu H B, Li X H, Zhao Y D, Xiong L Z. OsARID3, an AT-rich Interaction Domain-containing protein, is required for shoot meristem development in rice. *The Plant Journal*, 2015, 83(5): 806-817
- [29] 项聪英. HSP20 基因的克隆及功能初步分析. 杭州: 浙江师范大学, 2016
- Xiang C Y. Cloning and preliminary function on analysis of HSP20 gene. Hangzhou: Zhejiang Normal University, 2016
- [30] Hicks K A, Albertson T M, Wagner D R. *EARLY FLOWERING3* encodes a novel protein that regulates circadian clock function and flowering in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 2001, 13: 1281-1292
- [31] 褚越洋. 拟南芥 *AtHD2D* 基因对根系发育的影响初探. 杨凌: 西北农林科技大学, 2021
- Chu Y Y. A basic study on effect of *AtHD2D* gene on root development in *Arabidopsis thaliana*. Yangling: Northwest A & F University, 2021
- [32] 吴玲玲. *OsPIN1* 同源基因对水稻根系发育的影响. 杭州: 浙江大学, 2021
- Wu L L. Effect of *OsPIN1* paralogous genes on the development of rice root system. Hangzhou: Zhejiang University, 2021
- [33] Fu C, Yang X O, Chen X, Chen W, Ma Y, Hu J, Li S. *OsEF3*, a homologous gene of *Arabidopsis* *ELF3*, has pleiotropic effects in rice. *Plant Biology*, 2009, 11: 751-757
- [34] Wang Q, Su Q M, Nian J Q, Zhang J, Guo Meng, Dong G J, Hu J, Wang R S, Wei C H, Li G W, Wang W, Guo H S, Lin S Y, Qian W F, Xie X Z, Qian Q, Chen F, Zuo J R. The *Ghd7* transcription factor represses *ARE1* expression to enhance nitrogen utilization and grain yield in rice. *Molecular Plant*, 2021, 14(6): 1012-1023