



植物遗传资源学报

Journal of Plant Genetic Resources

ISSN 1672-1810, CN 11-4996/S

## 《植物遗传资源学报》网络首发论文

题目: OsELF3-1 与 OsARID3 互作调控水稻根部性状  
作者: 孙琪, 芦佳浩, 陈昊, 王潇澈, 于之雯, 赵辰妃, 徐铨, 马殿荣  
收稿日期: 2024-06-28  
网络首发日期: 2024-08-08  
引用格式: 孙琪, 芦佳浩, 陈昊, 王潇澈, 于之雯, 赵辰妃, 徐铨, 马殿荣. OsELF3-1 与 OsARID3 互作调控水稻根部性状[J/OL]. 植物遗传资源学报. <https://link.cnki.net/urlid/11.4996.S.20240808.0956.002>



**网络首发:** 在编辑部工作流程中, 稿件从录用到出版要经历录用定稿、排版定稿、整期汇编定稿等阶段。录用定稿指内容已经确定, 且通过同行评议、主编终审同意刊用的稿件。排版定稿指录用定稿按照期刊特定版式(包括网络呈现版式)排版后的稿件, 可暂不确定出版年、卷、期和页码。整期汇编定稿指出版年、卷、期、页码均已确定的印刷或数字出版的整期汇编稿件。录用定稿网络首发稿件内容必须符合《出版管理条例》和《期刊出版管理规定》的有关规定; 学术研究成果具有创新性、科学性和先进性, 符合编辑部对刊文的录用要求, 不存在学术不端行为及其他侵权行为; 稿件内容应基本符合国家有关书刊编辑、出版的技术标准, 正确使用和统一规范语言文字、符号、数字、外文字母、法定计量单位及地图标注等。为确保录用定稿网络首发的严肃性, 录用定稿一经发布, 不得修改论文题目、作者、机构名称和学术内容, 只可基于编辑规范进行少量文字的修改。

**出版确认:** 纸质期刊编辑部通过与《中国学术期刊(光盘版)》电子杂志社有限公司签约, 在《中国学术期刊(网络版)》出版传播平台上创办与纸质期刊内容一致的网络版, 以单篇或整期出版形式, 在印刷出版之前刊发论文的录用定稿、排版定稿、整期汇编定稿。因为《中国学术期刊(网络版)》是国家新闻出版广电总局批准的网络连续型出版物(ISSN 2096-4188, CN 11-6037/Z), 所以签约期刊的网络版上网络首发论文视为正式出版。

# OsELF3-1 与 OsARID3 互作调控水稻根部性状

孙琪<sup>1</sup>, 芦佳浩<sup>1</sup>, 陈昊<sup>1</sup>, 王潇澈<sup>1</sup>, 于之雯<sup>1</sup>, 赵辰妃<sup>1</sup>, 徐铨<sup>1</sup>, 马殿荣<sup>2</sup>

(<sup>1</sup>沈阳农业大学水稻所, 沈阳, 110866; <sup>2</sup>辽东学院农学院, 丹东, 118001)

**摘要:** 根系是水稻植株的重要组成部分, 在植物固定、水份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, 将突变体与野生型杂交构建 F<sub>2</sub> 分离群体, 进行遗传分析表明突变性状由隐性单基因调控。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。调查 *OsELF3-1* 的 CRISPR/Cas9 敲除突变体发现其根系显著短于野生型, 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、 $\alpha$ -crystallin/Hsp\_domain、SHSP 结构域, 以及依靠钾离子的钠离子/钙离子交换的结构域。调查 *OsARID3*-RNAi 突变体发现其根系显著短于野生型, 说明 *OsARID3* 可能参与根系长度调控。通过 3 K 测序数据分析 *OsARID3* 自然变异发现其共有 15 个单倍型, 且存在明显的籼粳分化, 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 Qi<sup>1</sup>, LU Jiahao<sup>1</sup>, CHEN Hao<sup>1</sup>, WANG Xiaocheng<sup>1</sup>, YU Zhiwen<sup>1</sup>, ZHAO Chenfei<sup>1</sup>, XU Quan<sup>1</sup>, MA Dianrong<sup>2</sup>

(<sup>1</sup>Rice Research Institute of Shenyang Agricultural University, Shenyang, 110866; <sup>2</sup>College of Agronomy, Liaodong University, Dandong, 118001)

**Abstract:** The root system is an important part of rice plant and plays an important role in plant fixation, water and nutrient acquisition. In this study, it was found that the root system of *oself3-1* mutant became significantly shorter, the mutant was crossed with wild type to construct F<sub>2</sub> isolated population, and genetic analysis showed that the mutant trait was regulated by recessive single gene. By mapping cloning, *OsELF3-1* was located in a 50.9 kb interval of chromosome 6, in which there were four open reading frames (ORFs), sequence comparison revealed that the mutant had 7 bases missing on the second exon of ORF4 (*OsELF3-1*), causes the gene to frameshift and terminate prematurely, and *OsELF3-1* was presumed to be the target gene. The root system of CRISPR/Cas9 mutant with *OsELF3-1* was significantly shorter than that of wild type, which verified that *OsELF3-1* was involved in regulating root length. In order to further clarify the regulatory network of *OsELF3-1*, the interacting protein *OsARID3* of *OsELF3-1* was screened by yeast two-hybridization, *OsARID3* has an ARID functional domain, an  $\alpha$ -crystallin/Hsp\_domain, a SHSP domain, and a potassium dependent sodium/calcium ion exchange domain. Investigation of *OsARID3*-RNAi mutants showed that their roots were significantly shorter than those of the wild type, *OsARID3* may be involved in the regulation of root length. Natural variation of *OsARID3* was analyzed by 3 K sequencing data and 15 haplotypes were found, and there was obvious differentiation between indica and japonica, japonica rice mainly belonged to haplotypes I, IV and VI. In summary, this study found that *OsELF3-1* and *OsARID3* interact to regulate rice roots, providing theoretical basis and germplasm resources for further analysis of rice root growth and development regulation network.

**Keyword:** 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

收稿日期: 2024-06-28

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

通讯作者: 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)

年增长的人口主食需求，对维护国家粮食安全战略具有重要的意义<sup>[1-2]</sup>。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<sup>[3-4]</sup>。

水稻是由主根、不定根、侧根和根毛组成的须根系单子叶植物，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<sup>[5]</sup>。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及其产量相关<sup>[6-8]</sup>。在这些水稻根系性状调控基因克隆的研究进展中，根长性状受到较多的关注，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单个细胞存活不可或缺，其突变体的初生根、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<sup>[9]</sup>。水稻中另一个与根长相关的重要基因是深根基因 *DRO1*，*DRO1* 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。通过该基因能够改变根系形态，从而提高水稻避旱能力<sup>[10-11]</sup>。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<sup>[12-13]</sup>。

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。此外 *OsELF3-1* 通过激活 *Ehd1* 和抑制 *Ghd7* 在长短日照条件下都促进水稻开花<sup>[14-15]</sup>。*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<sup>[16]</sup>。*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<sup>[17]</sup>。最新研究发现泛素连接酶 *IPI1* 可以通过一条依赖或不依赖其 E3 泛素连接酶活性的途径，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<sup>[18-19]</sup>。虽然水稻中两个 *OsELF3* 基因已经被成功克隆，其在抽穗期和稻瘟病抗性上的分子调控网络也逐渐清晰，但是其在根系生长调控上的功能仍需进一步深入研究。本试验采用图位克隆定位鉴定基因 *OsELF3-1* 为调控水稻根系生长的目标基因，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amp;方法

## 1.1 试验材料及培养条件

筛选突变体库得到了根系变短的 *oself3-1* 突变体。试验以籼锦为野生型材料，利用 Crispr/Cas9 载体构建了 *oself3-1* 突变体，RNA 干扰技术构建 *osarid3-RNAi* 株系。在所有的营养液培养试验中，植物生长环境由温室控制，具体条件为：14 h 光照周期（30°C）/ 10 h 黑暗周期（22°C），相对湿度 60%。野生型及突变体材料均种植于沈阳农业大学水稻所研究基地，栽培方式与大田生产相同。

## 1.2 目标基因的图位克隆及区间内候选基因分析

将从突变体库中得到的突变体 *oself3-1* 与野生型杂交产生的 F<sub>1</sub> 和 F<sub>2</sub> 群体进行基因定位，F<sub>1</sub> 群体自交收获 F<sub>2</sub> 群体的种子，以根系长度为表型分离根系表型与 WT 和 *oself3-1* 相似的水稻株数，测定培养了 14 天的 124 株水稻幼苗的根系，将根系摆放在盛有一薄层水的玻璃皿中（30 cm\*30 cm），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，对突变体基因进行精细定位，明确目的基因的区间。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（open reading frames, ORF）。用 CTAB 法提取水稻叶片 DNA，Primer 5.0 设计引物，PCR 采用诺唯赞 2x Rapid Taq Master，PCR 反应体系：25 μL 2 x Rapid Taq Master Mix，上游引物 2 μL，下游引物 2 μL，DNA 模板 2 μL，ddH<sub>2</sub>O 19 μL，扩增程序：95°C 下 3 min，95°C 下 15 s，60°C 下 15 s，72°C 15 s，72°C 下 32 s，72°C 下 5 min，共 30 个循环，分别扩增出这些 ORF 的序列，测序并比对分析其在野生型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。

## 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，构建 Crispr/Cas9 载体（pRGEB32）。利用农杆菌介导法转化到目的株系愈伤组织中，将构建好的 Crispr/Cas9 农杆菌载体活化后侵染进已培养 30 天的籼锦愈伤组织中，将愈伤组织阴干后共培养 3 天（暗培养，20~25°C），共培养 3 天后的愈伤组织转移到筛选一培养基上培养 15 天（30°C 光周期 10 h，28°C 暗培养 14 h），将筛选一培养基上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上，放在与筛选一相同条件的培养箱里培养 10 天，按照筛选二的标准挑出符合条件的愈伤，均匀撒在分化的培养基上，约 40 天分化出幼苗。

PCR 反应体系及扩增程序与 1.2 中相同，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，鉴定其功能。

#### 1.4 RNAi 转基因植株载体构建及鉴定

根据 *OsARID3* 的 CDS 序列进行 RNAi 载体构建，分别通过 KpnI/SalI 和 BamHI/SacI 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），检测 T<sub>0</sub> 代 RNAi 植株的 *OsARID3* 表达量。

#### 1.5 RNA 的提取及 qRT-PCR

分别取拔节期野生型（籼锦）及 *OsARID3*-RNAi 的叶片提取 RNA。利用 RNA 提取试剂盒提取 RNA。利用反转录试剂盒进行 cDNA 合成，cDNA 可以立即使用或者存于 -20 °C 备用。采用实时荧光定量 PCR 仪，测定基因的表达，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（2X SGExcel FastSYBR Mixture）10 μL，100X ROX Reference Dye 0.4 μL，去离子水 6.3 μL，每个样品 3 次重复，扩增程序：95°C 下 3 min，95°C 下 5 s，60°C 下 20 s，共 40 个循环，溶解曲线分析程序：95°C 下 15 s，60°C 下 1 min，95°C 下 15 s，60°C 下 15 s，利用 QuantStudio™ 5 Real-Time PCR System 收集荧光，基因相对表达量采用  $2^{-\Delta\Delta CT[20]}$  方法计算。利用 Primer 5.0 设计特异性引物：

表 1 引物列表

Table 1 List of primers

引物名称 Primer name	上游引物 Forward Primer	下游引物 Reverse Primer	作用 Function
<i>oself3-1</i>	TTCAGAACCCCTCCAATGAGAA	TCATCGATGGTTGCGACTAA	CRISPR/Cas9
<i>OsARID3</i> -RNAi-正向	ATAAAGGAAAGGCCATCGTTGAA	AGCTGGACTGGACGCATACAT	RNAi
<i>OsARID3</i> -RNAi-反向	TATATGTATGCGTCCAGTCCAG	ATAAAAACCCATCTCATAAATAAC	RNAi
<i>Actin</i>	TCCATCTTGGCATCTCTCAG	GTACCCGCATCGGCATCTG	qRT-PCR
<i>OsELF3-1</i>	CATGATCGTCGTCGACCTCCTC	TCATCGTCCCACAGGTAGGAG	qRT-PCR
<i>OsARID3</i>	TTGCCCTCCCGATTG	CGAATGGTGCACGGACAA	qRT-PCR
<i>OsARID3</i> -RNAi	GTTCGGAGAACCAAAGATTG	GTCCATGGAGAGTGACAACCTGCCGA	qRT-PCR
<i>OsELF3-1</i> -BD	CGGGATCCATGGCGACGAGGGGA GGAGGCGGAGGAG	GAGCTCTCAATCATCTCGTTGCCGTTCC ATTTGT	酵母双杂
<i>OsARID3</i> -AD	CGGGATCCATGGCCAGTTTAGG TCTGCGCCTGTGG	GAGCTCTTACTTTGACTGCTCGAATGGT GCACGG	酵母双杂

## 1.6 *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 <https://snp-seek.irri.org/index.zul> 数据库查找目标基因在 3000 种质资源中的 SNP<sup>[21]</sup>，利用在线工具 <https://www.chiplot.online/> 对目标基因的 SNP 进行进化树制图。[https://ricevarmap.ncpgr.cn/vars\\_in\\_gene/](https://ricevarmap.ncpgr.cn/vars_in_gene/) 进行单体型分析<sup>[22]</sup>。

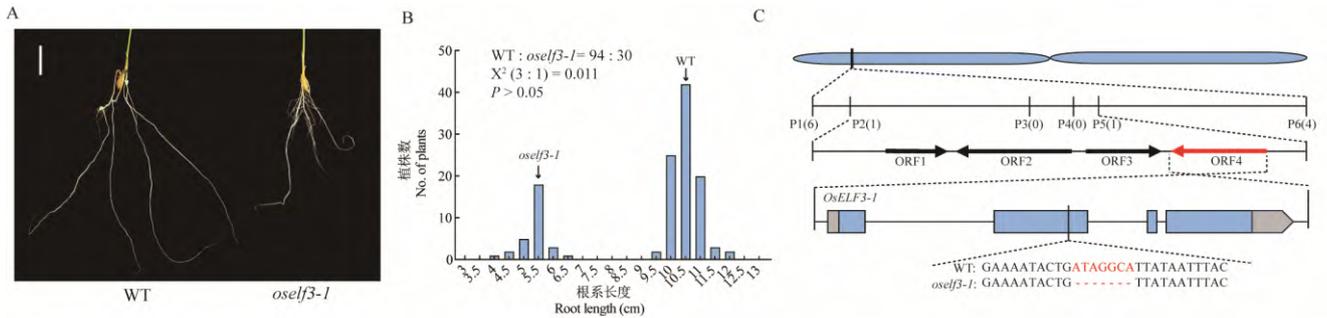
## 1.7 酵母双杂

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 BamHI 和 SacI 酶切位点的引物（表 1），将克隆好的片段分别连接到双酶切成功的 pGBKT7 和 pGADT7 载体上。将 BD-*OsELF3-1* 与 AD-*ARID3* 共转化到酵母 Y2H-Gold 感受态中，在 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

筛选突变体库发现一突变体根系较野生型显著变短（图 1A），将突变体与 WT 杂交获得 F<sub>1</sub> 植株，F<sub>1</sub> 植株自交得到包含 124 个植株的 F<sub>2</sub> 群体，调查 F<sub>2</sub> 群体表型发现有 30 株与 *oself3-1* 表型相似，而有 94 株与 WT 表型相似，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根系变短由隐性单基因调控。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野生型只在 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 2C）。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<sup>[14-16]</sup>，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 *LOC\_Os06g05060* 的基因结构及在野生型和 *oself3-1* 中的序列差异

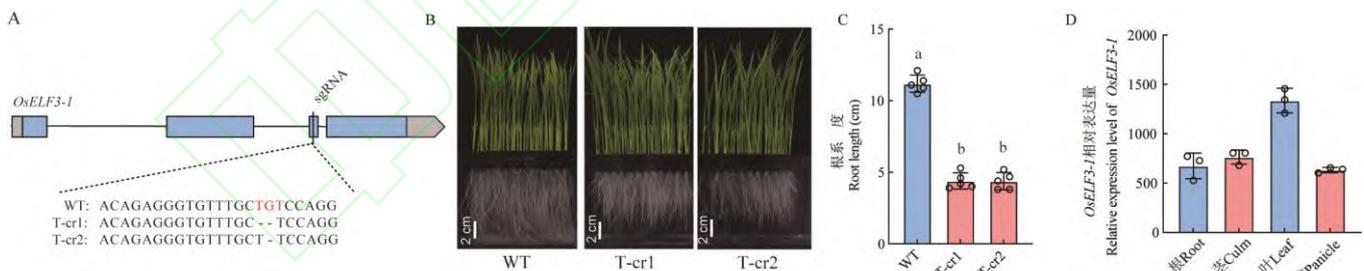
A: Differences in the root system of wild type and *oself3-1* mutant; (B) Root length and number of plants in  $F_2$  population; (C) Predicted ORFs in the location interval and Gene structure of the candidate gene *LOC\_Os06g05060* and the sequence difference between WT and *oself3-1*

图 1 表型分析及精细定位

Fig. 1 Phenotyping and 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，在粳稻品种筐锦遗传背景下通过 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 天的幼苗根系发现 T-cr1 和 T-cr2 的根系均显著短于野生型，野生型培养 14 天后根系长度达到 10 cm 以上，但是突变体根系长度未达到 5 cm (图 2B 和图 2C)，验证了 *OsELF3-1* 参与调控水稻根系生长。表达量分析发现 *OsELF3-1* 在水稻根系、茎、叶片及穗中均有表达，在叶片中表达量最高 (图 2D)。



A: *LOC\_Os06g05060* 的基因结构及在野生型和 *oself3-1* 突变体中的序列差异; B: 野生型及 *oself3-1* 突变体的幼苗根系性状对比; C: 野生型及突变体根系长度的变化; D: 植物不同器官中 *OsELF3-1* 的相对表达量

A: Gene structure of the candidate gene *LOC\_Os06g05060* and the sequence difference between WT and *oself3-1*; B: Comparison of seedling root traits between wild-type and *OsELF3-1* mutants; C: Changes in root length in wild-type and mutant organisms; D: Relative expression of *OsELF3-1* in different organs of plants

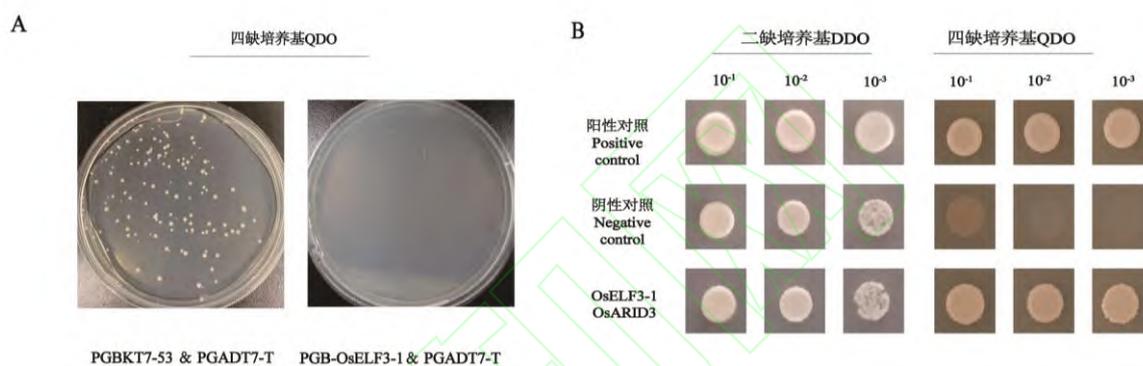
图 2 CRISPR/Cas9 技术构建 *OsELF3-1* 敲除突变体的验证及根系表型变化

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，通过酵母双杂交筛库筛选 *OsELF3-1* 的互作蛋白。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。平板中选取克隆进行菌落 PCR 扩增，并电泳检测，将扩增的目的条带回收后送测序，并分析比对测序，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 SD/-Leu/-Trp 上正常生长，说明 OsARID3 与 OsELF3-1 两个质粒已经全部转化进入酵母细胞中。吸取菌液微量点在 SD/-Leu/-Trp/-His/-Ade 培养基上，结果显示能够正常生长，说明 OsELF3-1 与 OsARID3 存在互作关系（图 3B）。



A: OsELF3-1 的自激活验证 B: OsELF3-1 与 OsARID3 的互作验证

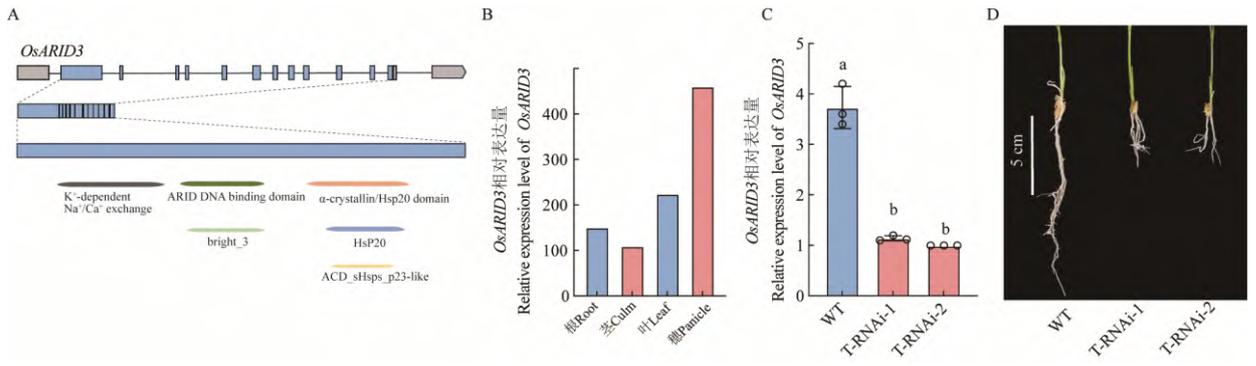
A: Self-activation verification of OsELF3-1 B: Identification of interaction between OsELF3-1 and OsARID3

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， $\alpha$ -crystallin/Hsp\_domain 及 SHSP 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（图 4A）。*OsARID3* 在水稻根系、茎、叶片以及穗当中均有表达，在穗部表达量最高（图 4B）。为了进一步验证 *OsARID3* 的功能，我们使用 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，暗示其在水稻生长发育过程中起至关重要的作用。我们随后构建了 *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（图 4C）。本试验对培养 7 天的幼苗根系进行对比，发现 T-RNAi-1 及 T-RNAi-2 的根系短于野生型的根系（图 4D），说明 *OsARID3* 参与水稻根系生长调控。



A: *OsARID3* 蛋白功能结构域预测; B: 植物不同器官中 *OsARID3* 的相对表达量; C: 野生型、T-RNAi-1 及 T-RNAi-2 中 *OsARID3* 的表达量; D: 野生型与 *OsARID3*-RNAi 根系性状比较

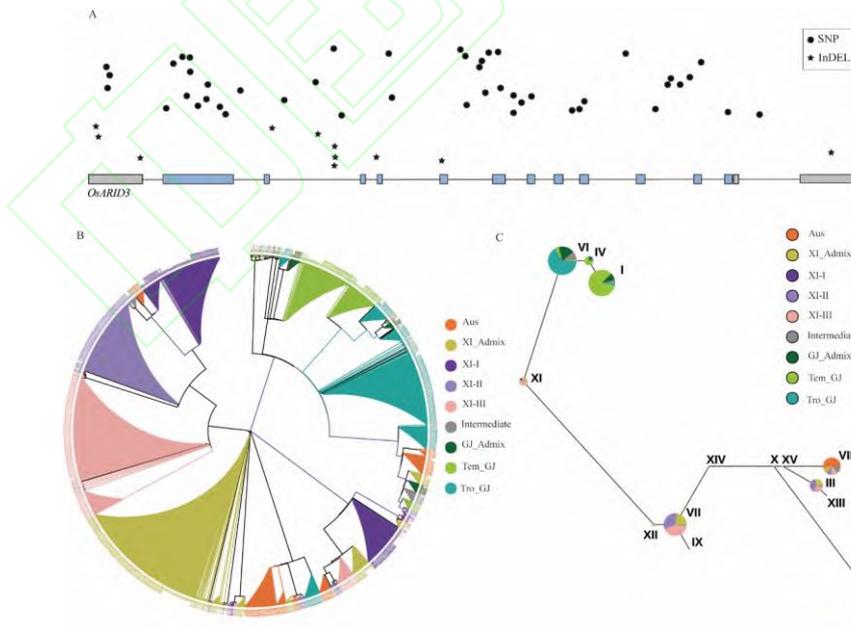
A: Prediction of functional conserved domain of *OsARID3* protein; B: Relative expression of *OsELF3-1* in different organs of plants; C: Expression of *OsARID3* in wild-type, T-RNAi-1 and T-RNAi-2; D: Comparison of wild-type and *OsARID3*-RNAi root traits

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

## 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* 存在明显的籼粳分化 (图 5B)。单体型分析表明 *OsARID3* 可以分为 15 种单体型, 其中粳稻主要属于单体型 I、IV 和 VI (图 5C)。



A: SNP 和 Intel 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* 的单倍体分析, I-XV: 不同单倍体类型

A: SNP and Intel polymorphism distribution,; B: Cluster analysis of *OsARID3*, Aus: Aus; XI\_Admix: indica admix; XI-I/ XI-II/ XI-III: indica; Intermediate: Intermediate; 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* 的生物信息学分析Fig. 5 Bioinformatics 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 *ELF3* 的同源基因，在拟南芥中，*ELF3*、*ELF4* 和 *LUX* 形成晚间复合体（EC），直接调节植物生长<sup>[23]</sup>。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<sup>[16]</sup>。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。本试验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<sup>[24]</sup>。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。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<sup>[25-26]</sup>，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  $\alpha$ -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<sup>[24, 27-28]</sup>。同时拟南芥 *ELF3* 蛋白的类朊病毒结构域（PrD）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<sup>[29]</sup>，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<sup>[10-11, 30-31]</sup>。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的研究。

水稻中 *ELF3* 的另一个同源基因编码蛋白 *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<sup>[15, 32]</sup>。与 *OsELF3-1* 相似，*OsELF3-2* 的 T-DNA 插入突变体根长较野生型变短<sup>[32]</sup>，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<sup>[17]</sup>，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。*OsELF4-1* 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<sup>[33]</sup>。这种与 *OsLUX* 相互作用强度的变化可能是它们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<sup>[33]</sup>。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有重要意义, *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的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. Yangzhou: 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, Breidler 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 *Hd17*, 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 Hong, Shi Hui, Mao Wei, 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, DOI10.1016/j.devcel.2024.06.014
- [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, DOI10.1016/j.devcel.2024.06.013
- [20] 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
- [21] Locedie M, Roven R F, Dmytro C, Frances N B, Jeffrey D, Juan M A S, Kevin P, Alexandre P, Inna D, Victor S, Ruaraidh 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
- [22] 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
- [23] 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
- [24] 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
- [25] Kortschak R D, Tucker P W, Saint R. ARID proteins come in from the desert. *Trends in biochemical sciences*, 2000, 25(6): 294-299
- [26] 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
- [27] 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
- [28] 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
- [29] 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
- [30] 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
- [31] 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
- [32] 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
- [33] 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