

成果与应用

水稻分蘖的分子机理研究*

李学勇¹ 钱前² 李家洋¹

(1 遗传与发育生物学研究所 北京 100101 2 中国水稻研究所 杭州 310006)

摘要 分蘖是水稻等禾谷类作物最重要的农艺性状之一,它直接决定着水稻穗数的多少并进而影响水稻单位面积的产量;分蘖又是单子叶植物一种特殊的分枝现象,具有重要的发育生物学意义。我们与合作者共同努力,克隆了控制水稻分蘖的关键基因 *MOC1*,并对其作用机理进行了初步分析,部分研究结果已发表在 2003 年 4 月 10 日出版的 *Nature* 上^[1]。

关键词 水稻,分蘖,单秆突变体 *monoculm 1*, *MOC1* 基因

1 研究背景

水稻是世界上最重要的粮食作物之一,世界半数以上的人口以水稻为主食。分蘖是影响水稻与小麦等主要农作物穗数多少并进而影响单产的重要农艺性状之一,是单子叶植物在生长发育过程中形成的一种特殊的分枝特性。分蘖与双子叶植物分枝的本质区别在于:分蘖生于茎秆基部的不伸长节间,并且生有不定根,可以与主茎分离而单独存活,而分枝一般发生在茎秆上部的伸长节间,没有不定根,不能单独存活。

水稻分蘖的形成过程可分为两个主要步骤,即分蘖芽的形成和分蘖芽的伸长。通常在每个叶子的叶腋里都能形成一个腋芽,即分蘖芽,但只有位于茎秆基部不伸长节间上的分蘖芽才能够伸长生长为分蘖;而茎秆上部伸长节间上的腋芽一般不伸长而处于休眠状态。在主茎上形成的分蘖称为一级分蘖,一级分蘖上可形成二级分蘖,依次类推。在正常(野生型)水稻中,以一级与二级分蘖为主,更高级别的分蘖则很少形成。稻秧生长至 4 个叶片时进入分蘖期。由于水稻的大部分营养器官,如叶片、分蘖和根系都是在这个时期形成的,因此,分蘖期是水稻生长发育过程中的重要时期。穗数是水稻产量的决定因素,而单株分蘖数又是决定穗数的重要因

素,过低或过高的分蘖数都会影响单位面积产量。

一般认为,分蘖数目是多基因控制的数量性状,且很容易受到环境条件的影响。至今已发现了 23 个影响分蘖数目的数量性状位点(QTLs),分布在除第 9、第 10 号之外的其余 10 条染色体上^[2]。目前,已经分离出一些分蘖数目发生改变的水稻突变体,如分蘖数目减少的突变体(reduced culm number, *rcn*)和矮化丛生的多分蘖突变体。但对这些突变体的研究主要局限于形态描述与初步的染色体定位,没有克隆出相应的基因^[3],更未能对控制水稻分蘖的分子机理进行探究。

我们与中国水稻研究所等单位紧密合作,对水稻分蘖进行了深入的分子遗传学研究,以自然发生的水稻极端少分蘖突变体(单秆突变体 *monoculm 1*, *moc1*)为材料,采用图位克隆的方法分离出了控制水稻分蘖的 *MOC1* 基因。*MOC1* 基因控制着腋生分生组织的起始和分蘖芽的形成,同时还有促进分蘖芽伸长的功能。因此,*MOC1* 是水稻分蘖的关键调控基因。

2 主要研究内容

在粳稻品种 H89025 中发现的天然 *moc1* 突变体,完全丧失了分蘖能力,只有一个主茎秆。遗传分析表明,该突变体是由单个核基因的隐性突变造成

* 收稿日期:2003 年 6 月 25 日

的,而且是一个未知的控制水稻分蘖的遗传位点。

为了分离 MOC1 基因,我们采用了图位克隆的策略。将 moc1 突变体与籼稻品种明恢 63 杂交,选取 F₂ 代中具有突变体表型的 2 010 个单株作为遗传定位群体。通过利用微卫星序列长度多态性 (Simple Sequence Length Polymorphism, SSLP)和限制性片段长度多态性 (Restriction Fragment Length Polymorphism, RFLP)等分子标记,将 MOC1 基因初步定位在第 6 染色体长臂上 RFLP 标记 R1559 和 S1437 之间。继而通过筛选水稻 BAC (Bacterial Artificial Chromosome) 文库, BAC 末端杂交以及 BAC 克隆指纹图谱分析等技术构建了覆盖 MOC1 位点的 BAC 重叠群(物理图谱)。然后根据重叠群中 BAC 克隆的 DNA 序列发展出了多个新的 CAPS (Cleaved Amplified Polymorphic Sequence) 分子标记,并将 MOC1 基因最终精细定位于 20 kb 的 DNA 序列之内。

通过对这 20 kb 碱基序列进行注解,我们发现其中一个基因(ORF1)编码的蛋白质与番茄 Lateral suppressor (LS) 同源性高达 44%。番茄 ls 突变体由于腋分生组织不能起始而不能产生分枝^[4]。基因序列和突变体表型的相似性表明,ORF1 很可能就是 MOC1 基因。因此,我们进一步利用 PCR (Polymerase Chain Reaction) 技术分别从野生型品种 H89025 和突变体 moc1 中扩增出 ORF1,序列分析表明 moc1 突变体在 ORF1 编码区内插入了一个 1.9 kb 的逆转座子序列,造成蛋白质的翻译提前终止。随后我们进行了功能互补实验,即将野生型 ORF1 基因组 DNA 片段转化 moc1 突变体,转基因当代分蘖性状恢复了正常,并能稳定遗传下去。以上实验结果说明 ORF1 就是控制水稻分蘖的 MOC1 基因。

同源性分析表明,MOC1 属于植物特有的 GRAS 家族蛋白^[5]。已知的 GRAS 家族成员参与了植物侧枝形成、根辐射方向结构分布、光信号传导、植物激素赤霉素的信号传导和植株高度控制等多种重要的生理和发育过程。GRAS 家族蛋白 C 端保守性很高,具有两个亮氨酸七聚体重复序列 (Leucine Heptad Repeats)包围的 VHIID 结构域,而 N 端在序列和长度上是高度可变的,从而决定了各

个成员的特异性。一般认为,GRAS 家族蛋白的生化功能是转录因子,但在 MOC1 内部没有发现典型的核定位信号(Nuclear Location Signal, NLS)。然而,MOC1 与绿色荧光蛋白 (Green Fluorescent Protein, GFP)的融合蛋白在 MOC1-GFP 转基因水稻中却能进入细胞核内,说明 MOC1 是一个细胞核定位的蛋白,并可能作为转录因子发挥功能。

为了明确 MOC1 在水稻分蘖过程中的功能与作用机理,我们对 moc1 突变体的分蘖缺陷进行了深入细致的观察和分析。水稻幼苗基部不伸长节间的解剖研究表明,野生型水稻有分蘖芽的形成,而 moc1 突变体则没有,说明单秆表型是由于分蘖芽形成的缺陷造成的。组织切片分析进一步显示,分蘖芽的缺失是由于在叶腋里腋生分生组织不能起始导致的,因此,MOC1 是腋分生组织起始和分蘖芽形成所必需的。这一结论得到了通过 mRNA 组织原位杂交所揭示的 MOC1 基因时空表达模式的进一步证实。观察表明,在侧芽形成的起始期,虽然观察不到任何形态学的变化,MOC1 就已经在叶腋里的少数表皮或亚表皮细胞里表达;随着发育的进程,MOC1 的表达范围逐渐扩展到腋生分生组织和整个分蘖芽。然而,在顶端分生组织检测不到 MOC1 的表达。

在野生型水稻中,一般在每个叶腋里都能形成一个腋芽;但只有基部不伸长节间上的腋芽才能伸长生长发育成分蘖,而上部伸长节间上的腋芽一般不伸长而处于休眠状态。在一级分蘖上经常形成二级分蘖,但更高级别的分蘖如三级、四级和五级分蘖则很少发生。然而,这种正常的分蘖模式在有多个 MOC1 拷贝插入的转基因水稻中发生了改变。在转基因植株中,上部伸长节间上的分蘖芽和高级别的分蘖芽大部分能够伸长并生长发育成分蘖,而且在某些叶腋里形成了不止一个分蘖。这表明除了参与分蘖芽的形成,MOC1 还具有促进分蘖芽伸长的功能。我们还发现,伴随着 MOC1 转基因水稻分蘖能力的提高,植株高度明显降低。这种分蘖数目与植株高度的负相关现象在水稻栽培品种中也存在^[2],这一现象的分子机理值得进一步研究。

水稻分蘖是一个复杂的基因表达调控过程。根据 MOC1 在分蘖芽形成和伸长两个阶段都起重要

作用和 MOC1 蛋白质属于 GRAS 家族转录因子的事实,MOC1 很可能是这一过程中的关键调控因子。通过 RT-PCR 和组织原位杂交技术,我们发现至少有 2 个与水稻分生组织和侧枝生长发育有关的基因,即参与分生组织起始、建立和维持的 OSH1 基因^[6]和控制侧芽伸长的 OsTB1 基因^[7],受到了 MOC1 基因的调控。这两个基因在 moc1 突变体内表达量明显降低。因此,MOC1 很可能是控制水稻分蘖的基因开关。

3 理论意义与应用价值

水稻分蘖控制基因 MOC1 的克隆是近年来在植物形态建成特别是侧枝形成研究领域中最重要的进展之一。*Nature Reviews Genetics* 为此而刊登的专门评论中,称水稻 MOC1 基因及其在蕃茄和拟南芥中的同源基因 LS^[4]和 LAS^[8]为株型建成的关键因子,并预言这些基因将成为植物遗传与发育研究领域中的热点^[9]。

近年来,我国在水稻基础研究领域取得了世界关注的重大研究成果,相继完成了籼稻全基因组框架图与第 4 号染色体全序列图。目前,我国已投入巨资开展全面的水稻功能基因组研究,重点探索控制水稻产量、品质与抗逆性的分子机理。水稻分蘖基因 MOC1 的克隆标志着我国在水稻功能基因组研究领域取得了重要突破。

致谢 此项工作得到了国家科学技术部、国家自然科学基金委员会、中国科学院的支持。

主要参考文献

1 Li X et al. Control of tillering in rice. *Nature*, 2003, 422: 618-621.

2 Yan J et al. QTL analysis for the developmental behavior of tiller number in rice (*Oryza sativa* L.). *Theor. Appl. Genet.*, 1998, 97: 267-274.

3 Iwata N et al. List of genes for various traits (with chromosome and main literature). *Rice Genet. Newsl.*, 1995, 12: 61-93.

4 Schumacher K et al. The Lateral Suppressor (LS) gene of tomato encodes a new member of the VHIID protein family. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1999, 96: 290-295.

5 Pysh L D et al. The GRAS gene family in Arabidopsis: sequence characterization and basic expression analysis of the SCARECROW-LIKE genes. *Plant J.*, 1999, 18:111-119.

6 Sato Y et al. A rice homeobox gene, OSH1, is expressed before organ differentiation in a specific region during early embryogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1996, 93: 8 117-8 122.

7 Takeda T et al. The OsTB1 gene negatively regulates lateral branching in rice. *Plant J.*, 2003, 33: 513-520.

8 Greb T et al. Molecular analysis of the LATERAL SUPPRESSOR gene in Arabidopsis reveals a conserved control mechanism for axillary meristem formation. *Genes Dev.*, 2003, 17:1 175-1 187.

9 Baxter C. Branching out. *Nature Reviews Genetics*, 2003, 4: 402-403.

Progress in Elucidating the Molecular Mechanism of Rice Tillering

Li Xueyong *et al.*

(Institute of Genetics and Developmental Biology, CAS, 100101 Beijing)

Rice is a staple food for more than half of the world population. Tillering in rice is one of the most important agronomical traits that determine grain yield. Tillering is also of developmental importance because tiller is a special type of branches, which is quite different from that of dicot plants. We recently reported in *Nature* the isolation and functional characterization of a novel gene MOC1 that controls tillering in rice. Here we briefly described the main discoveries and impact of this work.

Keywords rice, tillering, monocolm 1 mutant, MOC1 gene

李学勇 男,遗传与发育生物研究所遗传学博士,即将赴美国耶鲁大学做博士后研究。1972 年 5 月出生于山东东阿。攻读博士学位期间,在导师李家洋院士的指导下,开展了关于水稻分蘖调控机理的分子遗传学研究,取得的重要研究进展发表在 *Nature* 上。