

段镇淳,张昭阳,林拥军.水稻愈伤诱导过程中生长素通路的初步研究[J].华中农业大学学报,2021,40(3):98-104.

DOI:10.13300/j.cnki.hnlkxb.2021.03.011

水稻愈伤诱导过程中生长素通路的初步研究

段镇淳,张昭阳,林拥军

华中农业大学作物遗传育种国家重点实验室/国家植物基因研究中心,武汉 430070

摘要 构建水稻 *LBD* 基因家族中 *CRL1* 基因的 CRISPR/CAS9 基因敲除载体,并转化中花 11 水稻愈伤,获得了 8 个转基因片段缺失家系;对 *CRL1* 基因敲除材料种子进行愈伤诱导实验;结果显示,它们的愈伤组织诱导受到了强烈抑制,与已知的水稻 *OsIAA10* 基因的 RNA 干扰材料表型相似。进行 *OsIAA10* 的亚细胞定位实验,结果显示,*OsIAA10* 同时定位在细胞核与细胞膜上。通过酵母双杂交筛选实验,发现 *OsIAA10* 能与 *OsARF* 家族成员中的 *OsARF5*、*OsARF1*、*OsARF721*、*OsARF23* 四个转录因子发生互作。以 *CRL1* 基因启动子为诱饵构建载体,进行酵母单杂交点对点实验,结果显示,这 4 个转录因子中只有 *OsARF5* 与 *OsARF21* 能特异性结合 *CRL1* 基因启动子区的 *AuxRE* 基序,激活 *CRL1* 基因转录。本研究结果初步证明水稻侧根发育通路与愈伤组织诱导过程存在直接相关,水稻与双子叶植物之间存在保守的生长素调控机制,在水稻种子的愈伤组织诱导过程中发挥着重要的作用。

关键词 水稻;生长素通路;愈伤诱导;*OsIAA10*;*CRL1*;酵母双杂交;基因敲除;根发育;超表达突变体

中图分类号 S 511.053; Q 78 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2021)03-0098-07

生长素在植物的生长和发育中起着至关重要的作用。植物可以快速感知并响应生长素水平的变化,这些应答反应主要涉及 2 类生长素应答基因,即生长素/吲哚-3-乙酸(*Aux/IAA*)基因家族和生长素应答因子(*auxin response factor, ARF*)基因家族^[1]。研究表明,*Aux/IAA* 家族蛋白可以与 *ARF* 形成多个二聚体,在植物发育中具有多种作用,例如根系发育、枝条生长和果实成熟^[2]。*AUX/IAA* 家族的成员已被鉴定为短寿命核蛋白,包含 4 个高度保守的结构域(结构域 I、II、III 和 IV)^[3]。*AUX/IAA* 家族蛋白具有与 *ARF* 相互作用或抑制或激活 *ARF* 基因转录的特定结构域。在低生长素浓度条件下,*Aux/IAA* 蛋白与 *ARF* 因子结合并阻止生长素应答基因的激活。在高生长素水平下,*Aux/IAA* 蛋白被泛素化,随后通过与生长素信号传递受体 *F-BOX(TIR1/AFB)* 相互作用的 26S 蛋白酶体结合而降解^[4]。被释放的 *ARF* 因子可调节下游生长素应答基因的表达。通常,不同的 *TIR1/AFB* 与 *AUX/IAA* 蛋白组合具有不同的生长素结合亲和力,并且生长素水平在不同的组织和发育阶段有所不同,从

而导致不同的生长素感应作用^[5]。生长素水平的时空动态变化可以转化为基因重编程信号,精确地调节植物生长和发育的过程。*OsIAA10* 基因的功能缺失突变体在经过 30 d 的暗光诱导培养后,无法形成正常愈伤组织,且下胚轴不受生长素抑制而伸长^[6]。但是其下游作用于哪个 *ARF* 因子,*ARF* 因子下游作用的具体基因,尚不清楚。

CRL1 启动子区域包含 2 个推定的生长素反应元件(*AuxRE*)。*AuxRE* 基序特异性作用于水稻 *ARF*,并充当 *CRL1* 表达的顺式基序^[7]。*CRL1* 基因编码 1 个侧根形成正调节因子,其表达受生长素信号传导途径中的 *ARF* 直接调节,但具体的 *ARF* 因子还未知。在 *CRL1* 的根起始功能模型中,生长素调控 *AUX/IAA* 的降解,并且 *AUX/IAA* 与 *ARF* 相互作用,释放的 *ARF* 与 *CRL1* 启动子中的 *AuxRE* 相互作用,触发侧根起始区域的 *CRL1* 基因转录,从而导致根形成起始^[8]。本研究通过基因敲除、超表达结合诱导、酵母杂交等研究方法,确定生长素通路中的相互作用因子,揭示水稻愈伤组织形成与其根发育途径的关联性,以期为进一步研究

收稿日期:2020-12-08

基金项目:国家重大专项“抗虫转基因水稻新品种培育”(2016ZX08001001)

段镇淳,E-mail:15207161430@163.com

通信作者:林拥军,E-mail:yongjunlin@mail.hzau.edu.cn

愈伤发生机制打下基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

采用粳稻品种中花 11 进行遗传转化,并以中花 11 黄化幼苗用于原生质体分离。载体构建过程中用到的菌株与载体参见文献[6]。

rTaq 酶、dNTP 等常用 PCR 试剂与限制性内切酶购于 TaKaRa 公司,组培试剂乙酰丁香酮、潮霉素、水解酪蛋白和 2,4-D 等购自 Sigma 公司,引物合成和测序等工作均由生工生物工程(上海)公司承担,详见文献[6]。

1.2 CRL1 基因敲除载体的构建

选择 *CRL1* 基因序列上 CDS 区的 2 个靶位点,分别为 pYLCRISPR/Cas9-MH 多靶点载体构建体系的 U3 靶点和 U6a 靶点,构建 gRNA 表达盒,核酸序列为 GGCCACCATGAACAACCTGGCTGG, ACGACGGCGACGATGGCTGGTGG (核酸序列 5'-3')。

1.3 CRL1 基因超表达载体的构建

以 pCAMBIA1300s(35S 启动子)超表达载体作为克隆载体的骨架,在载体的多克隆位点处插入 *CRL1* 基因的基因组全长序列。PCR 扩增出的目的片段使用试剂盒纯化回收,以 *Bam*H I、*Kpn* I 双酶切载体及目的片段,回收酶切产物^[1]。之后再通过 NEB *T₄*-连接酶的连接体系将目的片段连接至线性化载体。得到的连接产物转化 DH5a 感受态细胞,培养过夜后挑取生长健康的单克隆菌落至对应抗性的 3 mL LB 液体培养基中,过夜培养,抽出质粒后测序鉴定^[9]。

1.4 农杆菌侵染法转化水稻

将测序无误的终载体电转化到农杆菌中,通过挑取单克隆抽提质粒,测序鉴定阳性菌落,筛选培养过程参见文献[6]。

1.5 转化植株分子检测

取 *CRL1* 基因敲除并过表达转化植物的叶片,CTAB 法提取 DNA^[9]。

1) 对转基因植物进行阳性检测。以提取的 DNA 样品为模板,引物为潮霉素通用引物,PCR 程序参见文献[6]。

2) 植物基因组编辑检测。在 2 个目标点外侧 200~400 bp 处设计引物,通过扩增出来的条带的大小判断基因敲除是否成功^[6]。

1.6 CRL1 纯合敲除和超表达 *T₁* 种子的愈伤组织诱导

选择成熟饱满一致的 *CRL1* 基因纯合敲除和过表达的 *T₁* 种子,以野生型作为对照。在正常的诱导培养基中,除去颖壳并挑选状况良好且无病原体感染的种子。将 40 粒种子浸泡于 75%乙醇 30 s,然后用无菌蒸馏水洗涤^[2]。加入 0.15% *HgCl₂* 溶液,浸泡 15~30 min,最后用无菌蒸馏水冲洗,直到白色泡沫消失。每瓶培养基中接种 8 粒种子,每个处理接种 5 瓶;在黑暗中于 28 °C 培育 30 d^[6]。

1.7 OsIAA10 的亚细胞定位

取生长 15 d 左右的水稻幼苗制备原生质体细胞,并构建 *OsIAA10*-GFP 融合表达载体。参照文献[9],于激光共聚焦显微镜下观察融合蛋白在原生质体中的表达部位。

1.8 OsIAA10 互作蛋白筛选

构建 *OsIAA10* 基因的诱饵载体,并与空文库载体 PPR3-N 共转化酵母菌株 NMY51,在 SD/-Trp/-Leu/-His/-Ade 培养基中培养,进行自激活检测^[1],膜蛋白文库筛选过程参照文献[6]进行。

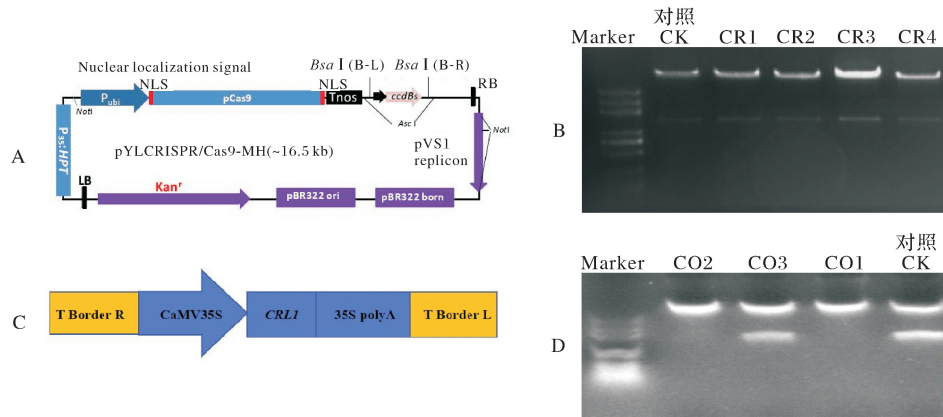
1.9 酵母杂交点对点互作验证实验

构建的重组质粒 AD-*OsARF* 和 BD-*OsIAA10* 共转化至酵母 AH109 中,涂布于 SD/-Trp/-Leu 平板上^[1]。菌落生长后,选择少量单个菌落,并将其溶解在一定量的灭菌 ddH₂O 中。混合后,用移液器吸取 3 μL 的菌液点于 SD/-Trp/-Leu 和 SD/-Trp/-Leu/-His/-Ade 筛板(3 个生物学重复样本)。在 30 °C 恒温培养箱中培养 3 d 后,观察酵母的生长。如果白色菌落在 SD/-Trp/-Leu 和 SD/-Trp/-Leu/-His/-Ade 平板上生长,则表明 *OsARF* 和 *OsIAA10* 蛋白存在相互作用。如果白色菌落仅能在 SD/-Trp/-Leu 平板上生长,而不能在另外的平板上生长,则表明 *OsARF* 与 *OsIAA10* 蛋白没有相互作用^[1]。

2 结果与分析

2.1 CRL1 敲除和超表达载体的构建与检测

CRISPR 终载体质粒构建(图 1A)成功后,阳性质粒串联的 gRNA 表达盒用 *Mlu* I 酶切(图 1B),验证无误后再测序确认。将扩增的 *CRL1* 基因全长序列插入到超表达载体(图 1C),以 *Kpn* I、*Bam* H I 酶切检测。



A. CRISPR 载体构建; B. *Mlu* I 酶酶切 CRISPR 终载体质粒的琼脂糖凝胶电泳; C. 超表达终载体示意图; D. 琼脂糖凝胶电泳检测表达终载体。A. CRISPR vector diagram; B. Agarose gel electrophoresis image of CRISPR final vector plasmid digested by *Mlu* I; C. Schematic diagram of overexpression final vector; D. Agarose gel electrophoresis image of overexpression final vector restriction detection.

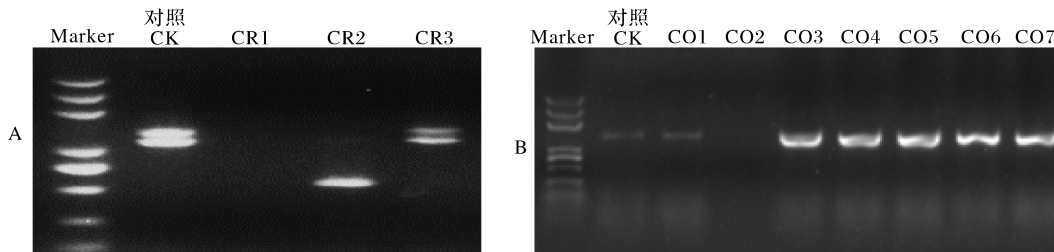
图 1 载体示意图以及酶切检测结果

Fig.1 Vector schematic diagram and enzyme digestion test results

2.2 敲除和超表达载体的遗传转化

将构建的 *CRL1* 基因的 CRISPR/Cas9 载体和超表达载体转入农杆菌菌株 EHA105, 转化中花 11 愈伤, 经过 2 轮潮霉素筛选, 得到的转化苗进行 hpt

阳性检测, *CRL1* 基因敲除转化苗进行基因编辑检测。 *CRL1* 基因的基因敲除突变体 T_0 代得到 8 个大片段缺失突变家系, 超表达突变体 T_1 代得到 113 株阳性突变苗(图 2)。



A. 基因敲除突变体编辑结果的 PCR 检测结果; B. 超表达突变体 PCR 检测结果。A. PCR detection results of the editing results of gene knockout mutants; B. PCR positive detection results of overexpression mutants.

图 2 基因敲除和超表达的分子检测的琼脂糖凝胶电泳

Fig.2 Agarose gel electrophoresis image for molecular detection of gene knockout and overexpression

2.3 *CRL1* 纯合敲除和超表达水稻种子的愈伤诱导

愈伤诱导结果显示, *CRL1* 的纯合超表达家系种子并无显著的诱导率与诱导速率变化; *CRL1* 基因敲除家系种子表现出明显不同表型, 在诱导 15 d 后 *CRL1* 突变体种子未出现不规则的细胞团, 只有下胚轴的伸长。在诱导 30 d 后, 对照组已产生健康的愈伤组织, 而 *CRL1* 敲除突变体的种子没有完整的愈伤组织(图 3)。暗示着 *CRL1* 基因可能是水稻种子愈伤诱导中的关键因子。

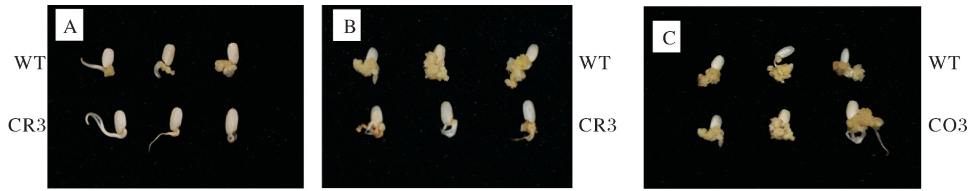
2.4 *OsIAA10* 的亚细胞定位

将融合表达载体转化中花 11 原生质体, 在培养 12~16 h 后, 置于激光共聚焦显微镜下观察, 结果

显示 *OsIAA10* 蛋白定位于细胞核与细胞膜上(图 4)。

2.5 *OsIAA10* 互作蛋白筛选

DUAL 膜系统文库中使用的 cDNA 是野生型中花 11 在整个生长期的各种器官和组织的 cDNA^[1]。由于不清楚蛋白的 N 端、C 端定位情况, 直接对 3 个载体进行自激活检测, 结果显示 *OsIAA10* 只在 pBT3-SUC 载体中没有自激活现象(图 5)。对从相互作用阳性克隆中提取的质粒进行测序, 并与水稻基因组数据库进行比较, 以排除假阳性序列, 获得了 4 个主要的候选相互作用蛋白(表 1), 都是 *OsARF* 家族的成员。



A: 诱导 15 d 后的野生型种子与敲除突变体种子; B: 诱导 30 d 后的野生型种子和敲除突变体种子; C: 诱导 30 d 后的野生型种子和超表达突变体种子。A: Wild-type seeds and knockout mutant seeds 15 days after induction; B: Wild-type seeds and knockout mutant seeds 30 days after induction; C: Wild-type seeds and overexpression mutant seeds 30 days after induction.

图 3 野生型水稻种子与水稻 *CRL1* 基因敲除突变体 CR3、超表达突变体 CO3 种子诱导表型对比

Fig.3 Comparison of seed induced phenotype of wild type rice and rice *CRL1* gene knockout mutant CR3 and gene overexpress mutant CO3 seed induced phenotype

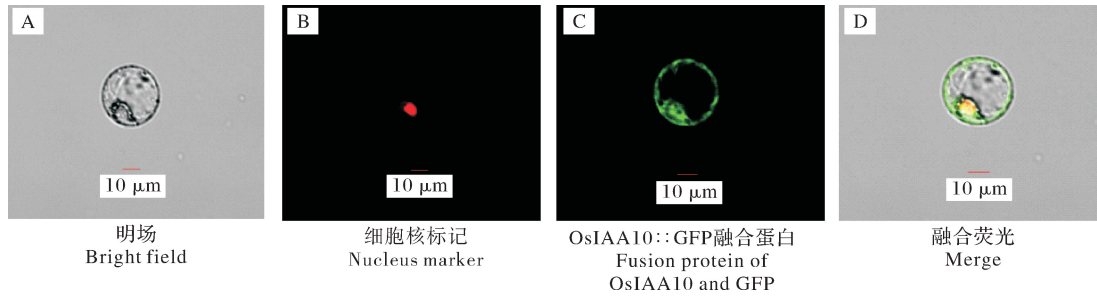


图 4 *OsIAA10* 在水稻原生质体中的亚细胞定位

Fig.4 Subcellular localization of *OsIAA10* in rice protoplasts

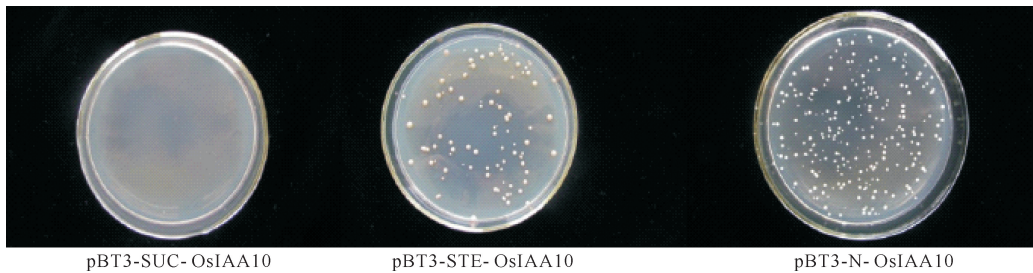


图 5 pGBKT7-*OsIAA10* 自激活检测

Fig.5 pGBKT7 - *OsIAA10* self activated test

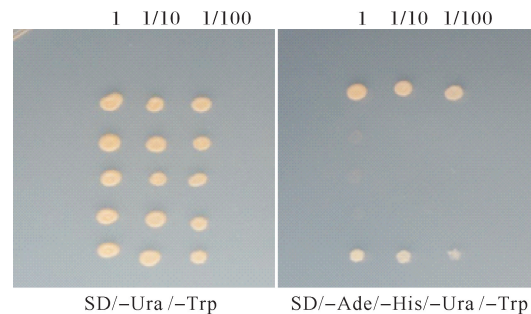
表 1 筛选的候选互作蛋白信息

Table 1 Screening library candidate interaction protein information

位置 Locus	常用名 Common name	注释 Annotation
XM_015771564	OsARF5	Auxin response factor 5
XM_015788357	OsARF17	Auxin response factor, putative
XM_015794269	OsARF21	Auxin response factor, putative
XM_015761702	OsARF23	Auxin response factor, putative
XM_015770897	OsIAA10	Auxin-responsive protein
XM_015784740	OsIAA17	Auxin-responsive protein

2.6 候选互作蛋白的验证

将 *OsARF5*、*OsARF17*、*OsARF21* 和 *OsARF23* 基因全长序列分别插入文库载体 pPR3-N, 构成 4 个筛选载体, 与诱饵载体共转至酵母 AH109 菌株中, 于



分别稀释 10 倍与 100 倍, 第 1 行至第 5 行分别为: 阳性对照、阴性对照、BD-IAA10 加 AD 空载、AD-ARF5 加 BD 空载、BD-IAA10 与 AD-ARF5。Diluting 10 times and 100 times, the first row to the fifth row of the figure are: positive control, negative control, BD-IAA10 plus AD no-load, AD-ARF5 plus BD no-load, BD-IAA10 and AD-ARF5.

图 6 酵母点对点实验

Fig.6 Some yeast point-to-point experiments

SD/-Ade/-His/-Ura/-Trp 平板培养。结果显示,OsARF5、OsARF17、OsARF21 和 OsARF23 在酵母点对点验证实验中均能够和 OsIAA10 发生互作。

2.7 CRL1 与候选基因点对点验证

采用酵母 ABA 杂交系统,将构建的含有转录因子基因的 pGADT 质粒分别转化到诱饵菌株和突变诱饵菌株,pGAD-p53 质粒转化为 p53-ABAI 菌株作为阳性对照^[1]。将转化的酵母菌株涂在 SD/-Leu 培养基上,ABA 的自激活抑制质量浓度为 500

ng/mL,结果显示,在没有 ABA 的培养基上,包含所有转化组合的酵母细胞可以正常生长。在含有 500 ng/mL ABA 的培养基上,含有突变诱饵的酵母菌株根本无法生长,只有含有 CRL1-ABAI + pGADT-OsARF5 或 CRL1-ABAI + pGADT-OsARF21 或阳性对照组合的酵母细胞才可以生长。基于此结果可以推断,转录因子 OsARF5 和 OsARF21 可以结合酵母中 CRL1 基因的启动子区域的基序并激活抗性基因的表达。

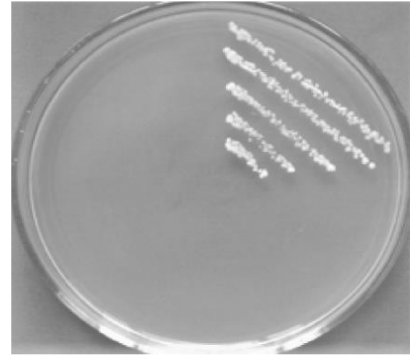
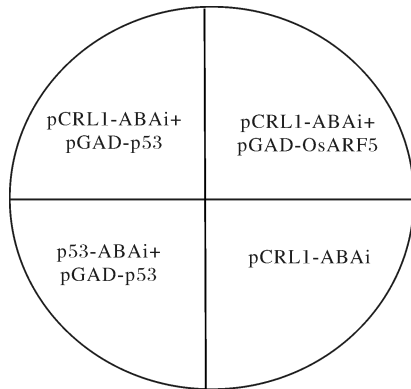


图7 酵母单克隆点对点实验(阳性克隆验证)

Fig.7 Yeast single-clone point-to-point experiments(proof of positive clone)

3 讨论

本研究通过基因敲除、超表达突变体结合突变体种子诱导实验,证明了 CRL1 在调控水稻愈伤组织的形成中发挥重要作用,通过酵母双杂交筛选实验,筛选并验证了 OsIAA10 和 OsARF5、OsARF17、OsARF21、OsARF23 存在相互作用关系。通过酵母单杂交点对点实验,验证了其中的 OsARF5、OsARF21能和 CRL1 启动子区的特定元件结合,以此调控 CRL1 基因的转录。初步证明了 CRL1 基因是生长素通路中 OsIAA10 基因下游的一个关键调控基因,初步阐明了一条在水稻愈伤组织诱导初期发挥重要作用的生长素调控通路。CRL1 基因下游对生理生化过程的影响机制仍然未知,但是单从表型足以认识到它的重要性。同时本研究中对 CRL1 基因的研究将生长素响应的愈伤组织诱导途径与冠根原基发育起始途径两者直接联系起来^[10]。这与同家族的 LBD16、LBD18 等同源基因在拟南芥中发挥的作用类似。同时超表达突变体种子诱导实验未发现异常,说明可能存在着未知的反馈调节通路^[10-13]。

有研究显示水稻 CRL1 基因下游调控基因超过 600 个^[14-15],许多基因和参与侧根形成的拟南芥基因同源,但是其中大约有四分之一是水稻所特有的^[16-18]。600 多个基因中被上调表达的主要是涉及甲基化、转录调控、ROS 和脂质代谢以及细胞壁水解与合成等反应过程的相关基因,下调的主要是与光合作用等反应相关的基因^[19-21],这与愈伤诱导过程中的相关生化反应比较吻合。

进一步的研究可以从以下几个方面进行:(1)本研究结果显示 CRL1 与 OsIAA10、OsARF5、OsARF21之间存在调控关系,而 IAA 家族与 ARF 家族之间存在着保守的互作模式,CRL1 上游是否存在与 OsIAA17 等因子的调控关系?我们将继续对此进行深入的研究。(2)不同的水稻品种对组织培养的耐受能力不同^[22-23],CRL1 在其中发挥的作用是否有差别,结合不同品种与激素条件,改善现有的优良水稻品种组培力,培育出优良的可组培品种,进一步研究籼稻与粳稻品种之间组培力差异的原因,促进优良籼稻品种的生物技术改造和利用^[24-26]。(3)CRL1在愈伤诱导过程中的表达模式是否与根发育过程存在不同?虽然愈伤诱导早期与

根系发育的早期原基形成都受到 *CRL1* 控制^[27], 但之后的生理发育过程却相去甚远, 是下游的哪一个调控步骤造成如此差异? 之后的研究可以从组织分生模式、细胞增殖、激素稳态、转录调控和细胞壁水解与合成^[28-30]等方面开展。

参考文献 References

- [1] ANZOLA J M, SIEBERER T, ORTBAUER M. Putative *Arabidopsis* transcriptional adaptor protein (PROPORZ1) is required to modulate histone acetylation in response to auxin[J]. PNAS, 2010, 107: 10308-10313.
- [2] ATTA R, LAURENS L, BOUCHERONDUBUISSON E. Pluripotency of *Arabidopsis* xylem pericycle underlies shoot regeneration from root and hypocotyl explants grown *in vitro* [J]. Plant journal, 2009, 57: 626-644.
- [3] YANG C, BRATZEL F, HOHMANN N, et al. VAL-and AtB-MI1-mediated H2Aub initiate the switch from embryonic to postgerminative growth in *Arabidopsis* [J]. Curr Biol, 2013, 23: 1324-1329.
- [4] WANG Q, XIE W, XING H, et al. Genetic architecture of natural variation in rice chlorophyll content revealed by a genome-wide association study[J]. Molecular plant, 2015, 8: 946-957.
- [5] BERCKMANS B, VASSILEVA V, SCHMID S P C. Auxin-dependent cell cycle reactivation through transcriptional regulation of *Arabidopsis* E2Fa by lateral organ boundary proteins [J]. The plant cell, 2011, 23: 3671-3683.
- [6] 张昭阳. GWAS 定位水稻成熟种子组培力相关基因及功能分析 [D]. 武汉: 华中农业大学, 2018. ZHANG Z Y. Identification of genes related to rice mature seed culturability by GWAS and functional analysis [D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2018 (in Chinese with English abstract).
- [7] WANG L, XIE W, CHEN Y, et al. A dynamic gene expression atlas covering the entire life cycle of rice [J]. Plant journal for cell & molecular biology, 2010, 61: 752-766.
- [8] VINCENT S, VILHJÁLMSSON B J, ALEXANDER P, et al. An efficient multi-locus mixed model approach for genome-wide association studies in structured populations [J]. Nature genetics, 2012, 44: 825-830.
- [9] 周非凡, 刘瑜, 常鑫磊, 等. OsCPK12 基因功能研究和互作蛋白筛选 [J]. 华中农业大学学报, 2019, 38(6): 48-55. ZHOU F F, LIU Y, CHANG X L, et al. Gene function of OsCPK12 and screening of its interaction proteins [J]. Journal of Huazhong Agricultural University, 2019, 38(6): 48-55 (in Chinese with English abstract).
- [10] BOLIBOK H, RAKOCZYTROJANOWSKA M. Genetic mapping of QTLs for tissue-culture response in plants [J]. Euphytica, 2006, 149: 73-83.
- [11] BOTSTEIN D, RISCH N. Discovering genotypes underlying human phenotypes: past successes for mendelian disease, future approaches for complex disease [J]. Nature genetics, 2003, 33: 228-237.
- [12] TSUWAMOTO R, YOKOI S, TAKAHATA Y. *Arabidopsis* embryomaker encoding an AP2 domain transcription factor plays a key role in developmental change from vegetative to embryonic phase [J]. Plant molecular biology, 2010, 73: 481-492.
- [13] BOUYER D, ROUDIER F, HEESE M. Polycomb repressive complex 2 controls the embryo-to-seedling phase transition [J/OL]. PLoS genetics, 2011, 7: e1002014 [2020-12-08]. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1002014>.
- [14] BRATZEL F, LÓPEZ-TORREJÓN G, KOCH M. Keeping cell identity in *Arabidopsis* requires PRC1 RING-finger homologs that catalyze H2A monoubiquitination [J]. Current biology, 2010, 20: 1853-1859.
- [15] SUNKAR R, LI Y F, JAGADEESWARAN G. Functions of microRNAs in plant stress responses [J]. Trends in plant science, 2012, 17(4): 196-203.
- [16] SALEHIN M, BAGCHI R, ESTELLE M. SCFTIR1/AFB-based auxin perception: mechanism and role in plant growth and development [J]. Plant cell, 2015, 27(1): 9-19.
- [17] RINALDI M A, LIU J, ENDERS T A, et al. A gain-of-function mutation in IAA16 confers reduced responses to auxin and abscisic acid and impedes plant growth and fertility [J]. Plant molecular biology, 2012, 79: 359-373.
- [18] PLOENSE S E, WU M F, NAGPAL P, et al. A gain-of-function mutation in IAA18 alters *Arabidopsis* embryonic apical patterning [J]. Development, 2009, 136: 1509-1517.
- [19] CHANVIVATTANA Y, BISHOPP A, SCHUBERT D. Interaction of polycomb-group proteins controlling flowering in *Arabidopsis* [J]. Development, 2004, 131: 5263-5276.
- [20] CHEN C, LIU Q, ZHANG Y. Genome-wide discovery and analysis of microRNAs and other small RNAs from rice embryogenic callus [J]. RNA biology, 2011, 8: 538-547.
- [21] NEELAKANDAN A K, WANG K. Recent progress in the understanding of tissue culture-induced genome level changes in plants and potential applications [J]. Plant cell reports, 2012, 31(4): 597-620.
- [22] MAJER C, HOCHHOLDINGER F. Defining the boundaries: structure and function of LOB domain proteins [J]. Trends in plant science, 2011, 16(1): 47-52.
- [23] LIAN J, QIN Q, YU W, et al. Rice Dwarf virus P2 protein hijacks auxin signaling by directly targeting the rice OsIAA10 protein, enhancing viral infection and disease development [J/OL]. PLoS Patho, 2016, 12: e1005847 [2020-12-08]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27606959/>. DOI: 10.1371/journal.ppat.1005847.

- [24] VILLALOBOS L I, LEE S C, DE OLIVEIRA C. A combinatorial TIR1/AFB-Aux/IAA co-receptor system for differential sensing of auxin[J]. *Nature chemical biology*, 2012, 8: 477-485.
- [25] NI J, WANG G H, ZHU Z X, et al. OsIAA23 - mediated auxin signaling defines postembryonic maintenance of QC in rice[J]. *Plant journal for cell & molecular biology*, 2011, 68: 433-442.
- [26] IKEUCHI M, SUGIMOTO K, IWASE A. Plant callus: mechanisms of induction and repression[J]. *Plant cell*, 2013, 25: 3159-3173.
- [27] HUANG X, ZHAO Y, WEI X, et al. Genome-wide association study of flowering time and grain yield traits in a worldwide collection of rice germplasm[J]. *Nature genetics*, 2012, 44: 32-39.
- [28] WANG Q X, XIE W B, XING H K, et al. Genetic architecture of natural variation in rice chlorophyll content revealed by a genome-wide association study[J]. *Molecular plant*, 2015, 8(6): 946-957.
- [29] CHAMBERLIN M, CUSHATT J. Morphogenic regulators baby boom and wuschel improve monocot transformation[J]. *Plant cell*, 2016, 28(9): 1998-2015.
- [30] LI S J, YAN S, WANG A, et al. Identification of QTLs associated with tissue culture response through sequencing-based genotyping of RILs derived from 93-11 × Nipponbare in rice (*Oryza sativa*)[J]. *Plant cell reports*, 2013, 32(1): 103-116.

Auxin pathway in process of rice callus induction

DUAN Zhenchun, ZHANG Zhaoyang, LIN Yongjun

State Key Laboratory of Crop Genetics and Breeding / National Plant Gene Research Center, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China

Abstract Rice as a monocot model plant is one of the few crops that achieve mature tissue culture, but the physiological processes and specific molecular mechanisms in the process of tissue culture are still rarely understood. In this study, the CRISPR/CAS9 gene knockout vector of the *CRL1* gene in the rice LBD gene family was constructed and transformed into callus of rice Zhonghua 11. Eight families with missing transgene fragments were obtained. The result of callus induction on the seeds of *CRL1* gene knockout material showed that their callus induction was strongly inhibited, similar to the known RNA interference material phenotype of the rice *OsIAA10* gene. The results of a subcellular localization of *OsIAA10* showed that *OsIAA10* was located on the nucleus and the cell membrane. Through the yeast two-hybrid screening library experiment, it was found that *OsIAA10* can interact with four transcription factors including OsARF5, OsARF 17, OsARF 21, and OsARF 23 among members of the Os-ARF family. A yeast one-hybrid point-to-point experiment was performed using the promoter of *CRL1* gene as a bait to construct a vector. The results showed that only OsARF5 and OsARF21 can specifically bind to the AuxRE motif in the promoter region of the *CRL1* gene and activate the transcription of *CRL1* gene. It is indicated that the development pathway of rice lateral roots is directly related to the process of callus induction. There is a conservative mechanism of auxin regulation between rice and dicots, which plays an important role in the process of callus induction in rice seeds.

Keywords rice; auxin pathway; callus induction; *OsIAA10*; *CRL1*; yeast double hybrid; gene knockout; root development; overexpression mutant

(责任编辑:张志钰)