

水稻果胶甲基转移酶 *OsTSD2* 基因突变体的分析

张 飞^{1,2} 曲良焕¹ 罗 杰¹

1. 华中农业大学作物遗传改良国家重点实验室, 武汉 430070;

2. 淮北师范大学生命科学学院, 淮北 235000

摘要 探讨水稻果胶甲基转移酶 *OsTSD2* 基因的功能, 尤其是对生长发育的影响, 筛选并鉴定了 *OsTSD2* 基因突变的 3 个突变体 *tsd2a*、*tsd2b* 和 *tsd2c*。表型观察显示: 突变体水稻结实率下降、种子粒长变短、粒宽变窄、千粒重下降; 突变体的颖壳颜色变暗, 颖壳的破裂程度加重并出现新的背部破裂; 荧光免疫标记试验研究发现, 突变体种子萌发率下降可能是由于突变体种子盾片中的甲基化果胶含量低所致。结果表明, *OsTSD2* 基因的下调导致水稻的种子在发育和萌发过程中存在明显的缺陷。

关键词 水稻; 果胶甲基转移酶; *OsTSD2*; 种子; 萌发

中图分类号 S 511; Q 78 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2017)03-0025-07

果胶对植物果实的成熟具有显著的影响, 它的积累决定了果实的柔软程度^[1-2]。另外, 果胶在种子萌发过程中具有不可忽视的作用^[3], 果胶含量以及甲基化程度影响着植物种子的形成^[4], 在拟南芥中果胶影响种子粘液层的形态和结构, 进而决定种皮的状态^[5-6]。

果胶甲基转移酶 (pectin methyltransferases, PMTs) 和甲脂化酶^[7] (pectin methylesterases, PME) 的协同作用可以打破种子的休眠、促进种子萌发^[8-11]。Frank 等^[12] 在拟南芥中首先报道 *TSD2* (tumorous shoot development 2, *TSD2*, AT1G78240) 基因的突变体, 该基因的突变会导致植株矮小和发育迟缓、细胞间的粘附性产生缺陷、分生组织的活性受到影响、根的生长发育受到抑制^[12-14]。水稻中 *OsTSD2* 基因在根的时空发育和激素对根的生长调节中扮演了重要角色^[15]。本研究从水稻突变体库中筛选并鉴定 *OsTSD2* 基因发生突变的 3 个等位突变体 *tsd2a*、*tsd2b* 和 *tsd2c*, 探讨水稻果胶甲基转移酶基因的功能, 以期水稻遗传改良提供材料。

1 材料与方法

1.1 试验材料

本研究以水稻粳稻品种中花 11 (*Oryza sativa* L. ssp. *japonica* cv. *zhonghua* 11, ZH11) 为试验材

料。研究中涉及到的突变体, 是中花 11 经过农杆菌介导的遗传转化所产生的 T-DNA 插入植株^[16-17]。水稻种植于华中农业大学试验田和温室。

载体构建所用的菌株为 *E. coli* DH5 α 和 *E. coli* Top10, 遗传转化农杆菌菌株为 EHA105, 载体包括遗传转化载体和中间载体, 均由华中农业大学作物遗传改良国家重点实验室提供。

1.2 基因的表达量检测

选择种植于华中农业大学试验田的水稻材料, 提取抽穗期的剑叶 RNA, 采用发转录试剂盒将 RNA 进行反转录成 cDNA 作为 PCR 检测的模板, 利用引物 F: 5'-AAAAAGCAGGCTTACAGG-GAAATCTCGGGTTGTC-3'、R: 5'-AGAAAGCT-GGGTACGCTGCGGATCTCACGGC-3' 构建载体, 利用引物 F: 5'-TGGAAGTTGATCGCATCCTAC-3'、R: 5'-CCACCTGAGCTGTGTTACAA-3' 进行半定量 PCR 和荧光实时定量 PCR, 检测 *OsTSD2* 基因的表达量^[18-19]。

1.3 农艺性状统计

选用材料为 2015 年夏季在华中农业大学试验田收获的水稻粳稻品种中花 11 的种子, 包括野生型和突变体。收获的种子密封后贮存于低温冰箱中。随机挑选 ZH11 及突变体 *tsd2a*、*tsd2b*、*tsd2c* 的种子各 300 粒, 测量及统计结实率、千粒重和颖壳破裂

收稿日期: 2016-06-15

基金项目: 国家“973”计划项目(2013CB127001); 国家自然科学基金青年科学基金项目(31301396)

张 飞, 硕士研究生. 研究方向: 水稻基因组学. E-mail: zfly1991@webmail.hzau.edu.cn

通信作者: 罗 杰, 博士, 教授. 研究方向: 植物代谢组学. E-mail: jie.luo@mail.hzau.edu.cn

情况;再挑选饱满的米粒 30 粒,测量粒长,18 粒测粒宽。每个家系 3 组技术重复。

1.4 种子萌发试验

选取田间收获的饱满的 ZH11 及突变体 *tsd2a*、*tsd2b*、*tsd2c* 的脱壳的种子 150 粒,消毒后点种至透明的加有 1/2MS 培养基的方皿上,每皿点 4 个家系的种子各 20 粒,每隔 12 h 以露芽为标准统计每皿发芽情况,3 组技术重复。

1.5 果胶甲基化程度分析

利用购自 Plantprobes 公司的单克隆抗体 LM20(标记果胶分子高甲基化水平)和 FITC 标记二抗,再结合石蜡切片对突变体根部果胶甲基化水平进行组织间差异检测,通过荧光显微镜和 CCD (charge-coupled device, CCD) 图像传感器进行观察和拍照(统一曝光参数)。借助图片分析软件,对不同家系萌发 36 h 后的种子盾片进行荧光信号的比较与分析^[18]。

1.6 生物信息学分析

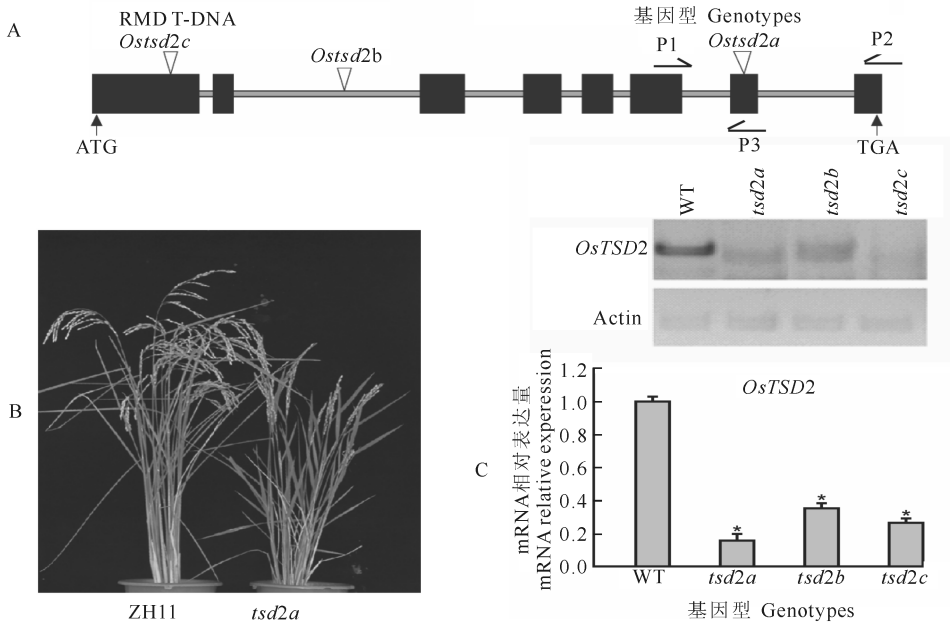
经过 TAIL PCR 获得的突变体侧翼序列在 Rice Genome Annotation Project ([http://rice.](http://rice.plantbiology.msu.edu/analyses_search_blast.shtm)

[plantbiology.msu.edu/analyses_search_blast.shtm](http://rice.plantbiology.msu.edu/analyses_search_blast.shtm)) 进行 blastn 分析。并根据 Rice Genome Annotation Project 数据库提供的蛋白序列在水稻数据库 RAP-DB(<http://rapdb.dna.affrc.go.jp/>)和拟南芥数据库 TAIR(<http://www.arabidopsis.org/>)进行 blastp 分析,检索与该蛋白序列同源的蛋白,以 *E*-value 值 $1e^{-85}$ 为阈值,选取同源性比较高的蛋白;再下载全部基因的氨基酸序列在 Cluster 和 MEGA5 软件中,使用邻接法构建系统进化树,了解目的基因在进化上的位置。

同时,还对 *OsTSD2* 基因编码的蛋白序列进行结构预测。使用 Motif Scan 网站(http://myhits.isb-sib.ch/cgi-bin/motif_scan)和 Pfam 数据库(<http://pfam.xfam.org/>)预测 *OsTSD2* 蛋白质结构域。

1.7 数据分析

所有试验均以野生型 (type wild, WT) 水稻 ZH11 为对照,利用 SPSS 22.0 软件数据统计以及双尾卡方检验和 Student's *t*-test 检验,进行显著性差异分析。



A. *OsTSD2* 基因的结构及 3 个等位基因的 T-DNA 插入位点(黑框代表外显子,线条代表内含子); B. WT 与 *tsd2a* 植株的表型; C. 3 个等位突变体中 *OsTSD2* 基因的表达量分析: * 表示差异显著, ** 表示差异极显著。A. Schematic diagram of *OsTSD2* gene structure and three alleles of T-DNA insertion mutants, *tsd2a*, *tsd2b* and *tsd2c* (Exons and introns are indicated by block box and lines, respectively. Gene-specific primers used for the analysis of T-DNA integration are indicated by arrows); B. Plant phenotype of wildtype ZH11 and *tsd2a*; C. The expression levels of *OsTSD2* in three mutant alleles; Values are the means \pm SD ($n=3$), * shows $P<0.05$, ** show $P<0.01$ level.

图 1 突变体的表型和基因型分析

Fig.1 The analysis of phenotype and genotype in mutants

2 结果与分析

2.1 3 个等位突变体的获取及表型

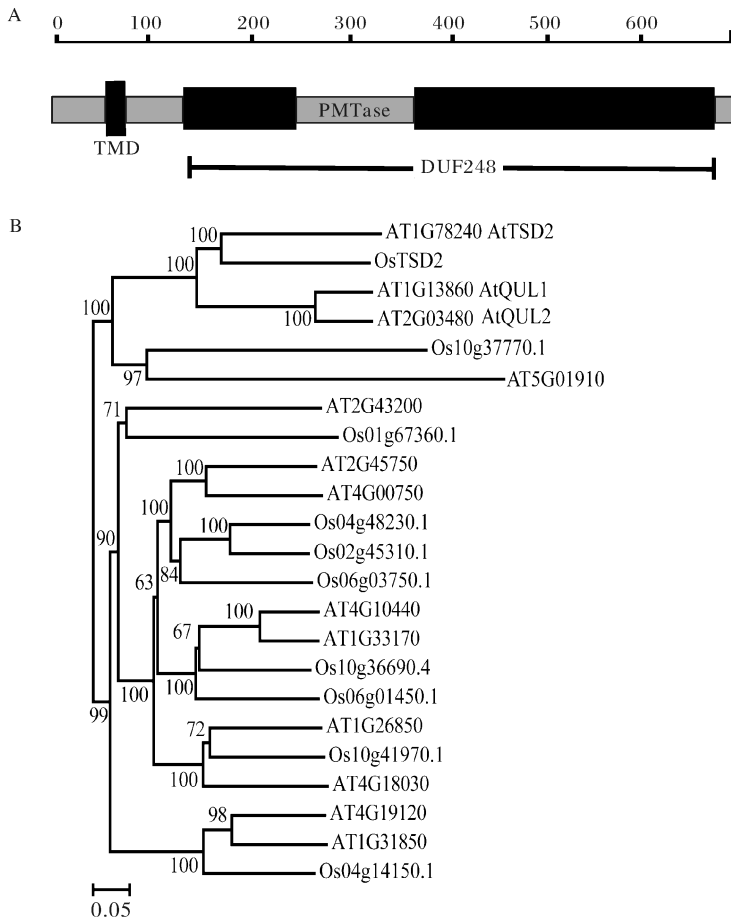
从作物遗传改良国家重点实验室水稻突变体库筛选并鉴定了 *OsTSD2* 基因突变的 3 个突变体 *tsd2a*、*tsd2b* 和 *tsd2c*。经过分离侧翼 TAIL PCR 发现, *tsd2a* 突变体是由于该基因第 7 个外显子上的 T-DNA 插入造成的; *tsd2b* 和 *tsd2c* 分别是 T-DNA 插入 *OsTSD2* 的第 2 个内含子和第 1 个外显子上(图 1A)。

表型观察显示, 成熟期 *tsd2a* 突变体矮于 WT, 剑叶短, 穗形小(图 1B)。利用剑叶 RNA 进行半定量 PCR 以及定量 PCR, 检测 *OsTSD2* 基因的表达量, 结果显示: 与 WT 相比, 在这 3 个等位突变体中 *OsTSD2* 基因表达量受到严重抑制, 三者的表达量

仅有 WT 的 15.6%、35.2%、26.4%, 都显著低于 WT 中 *OsTSD2* 基因的表达量(图 1C), 所以这 3 个等位突变体是属于表达量下调抑制型的突变体。

2.2 *OsTSD2* 基因的蛋白结构以及进化分析

经过初步的生物信息学分析发现, *OsTSD2* 基因编码蛋白含 661 个氨基酸。对 *OsTSD2* 基因编码蛋白进行网站预测得知, 该蛋白具有 1 个 N 端的跨膜结构域、1 个功能不明的 DFU248 结构域和 1 个果胶甲基转移酶的结构域(图 2A)。将 *OsTSD2* 基因编码的氨基酸序列在 NCBI 数据库中水稻和拟南芥的同源蛋白序列进行进化树分析(图 2B)发现, *OsTSD2* 与拟南芥 *AtTSD2*、*AtQUL1* 和 *AtQUL2* 在进化树上位于同一个分支, *OsTSD2* 与 *AtTSD2* 序列高度相似, 表明 *OsTSD2* 可能编码果胶甲基转移酶, *tsd2* 可能是一个果胶甲基转移酶基



A. *OsTSD2* 蛋白结构分析; B. *OsTSD2* 基因编码蛋白的进化树分析。A. The domain analysis of *OsTSD2* protein; B. Phylogenetic tree of *OsTSD2* protein.

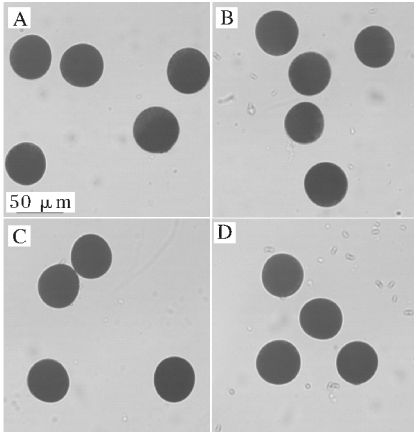
图 2 *OsTSD2* 的蛋白结构及进化分析

Fig.2 The domain analysis and phylogenetic analyses of *OsTSD2* in rice and *Arabidopsis*

因突变体。

2.3 *OsTSD2* 基因突变对种子形成的影响

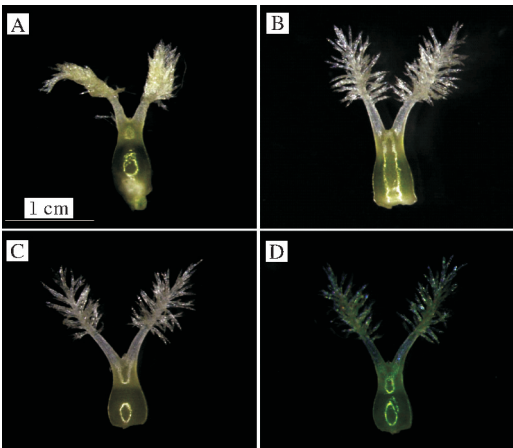
1) 突变体的花粉粒活性以及雌蕊形态。以生长在温室的水稻为试验材料,解剖镜下观察授粉前的花粉粒活性和雌蕊的形态,发现 3 个等位突变体 *tsd2a*、*tsd2b*、*tsd2c* 材料用碘液染色结果与 WT 相比没有差异(图 3)。突变体材料与 WT 雌蕊形态也没有差异(图 4)。据此推测 *OsTSD2* 基因不影响水稻的花粉以及雌蕊的生长发育。



A.WT; B.*tsd2a*; C.*tsd2b*; D.*tsd2c*.

图 3 突变体的花粉粒活性

Fig.3 The pollen grains activity of mutants



A.WT; B.*tsd2a*; C.*tsd2b*; D.*tsd2c*.

图 4 突变体的雌蕊形态

Fig.4 The pistil morpha of mutants

2) 突变体的结实率。结实率统计分析结果显示:WT 的结实率为 86%,T-DNA 插入外显子上的等位突变体 *tsd2a*、*tsd2c* 材料的结实率分别为 69%、62%,这 2 个突变体的结实率极显著下降;T-DNA 插入内含子上的等位突变体 *tsd2b* 的结实率是 83%(图 5)。表明 *OsTSD2* 基因功能与水稻

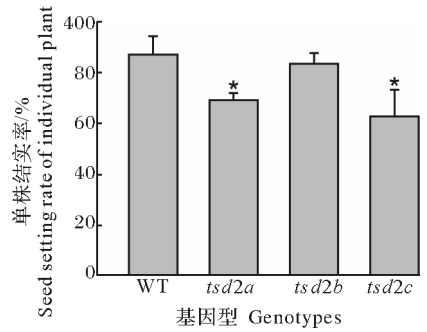


图 5 突变体单株结实率的变化

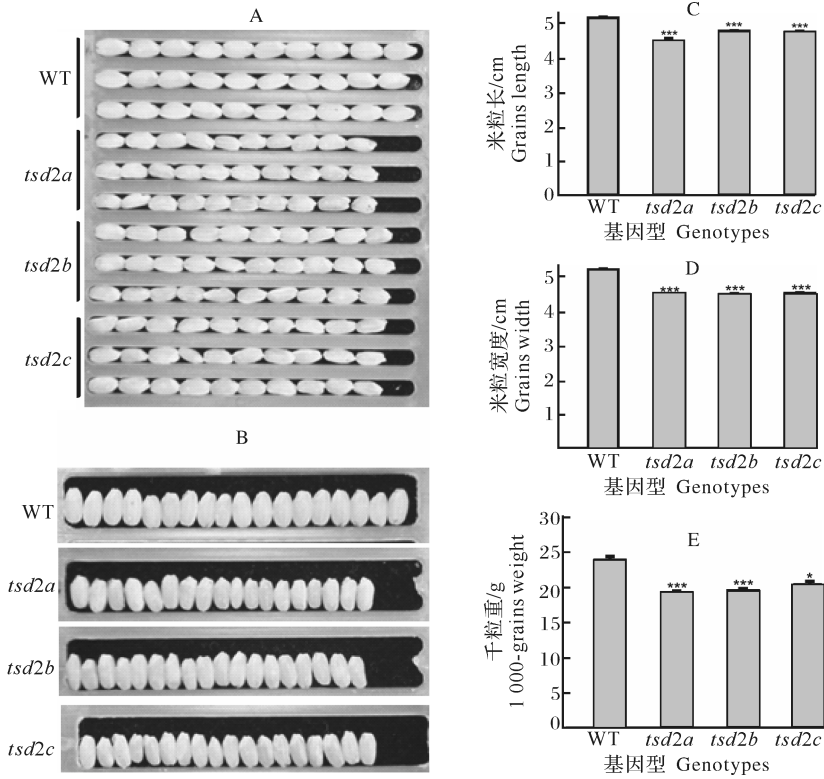
Fig.5 The change of individual plant seed setting rate in mutant

结实率密切相关。

3) 突变体的粒型和千粒重的变化。为研究 *OsTSD2* 基因在水稻种子形成过程中的作用,采用 2015 年在华中农业大学水稻试验田里收获的一批种子进行米粒的形态观察及统计分析得到如下结果:(1)3 个等位突变体的米粒长度明显短于 WT(图 6A),统计分析显示米粒长度下降程度都极为显著(图 6C),由此推测 *OsTSD2* 基因可能调控种子的粒长表型;(2)3 个等位突变体的米粒宽度明显窄于野生型(图 6B),统计分析显示米粒宽度下降也极为显著(图 6D),由此推测 *OsTSD2* 基因可能调控种子的粒宽表型;(3)3 个等位突变体的千粒重低于 WT,统计分析也表明千粒重下降显著(图 6E),由此推测,*OsTSD2* 基因可能调控种子的大小。综合种子粒型和千粒重的结果,推测 *OsTSD2* 基因可能影响水稻种子的粒型、大小。

4) 突变体颖壳的颜色及破裂情况。对种子颖壳颜色进行观察(图 7),发现 3 个等位突变体种子颖壳的颜色与 WT 相比较为灰暗。对种子颖壳的破裂程度(图 8)进行统计分析,结果显示:WT 只存在很低比例的外稃与内稃连接的侧面破裂,而 3 个等位突变体中不仅存在高比例的侧面破裂,还存在着相当高比例的与枝梗相连的外稃背部的破裂;3 个等位突变体种子颖壳的破裂程度比 WT 严重,三者颖壳总体破裂比例分别是 57%、48%、51%,其中侧裂比例分别是 29%、14%、17%,背裂比例分别是 28%、34%、34%。

综上,果胶甲基转移酶 *OsTSD2* 基因对于水稻种子颖壳的颜色和形成可能有着重要的作用,它可能通过影响果胶的修饰进而对颖壳的颜色及破裂产生影响。



A. 突变体的粒长变化表型；B. 突变体的粒宽变化表型；C. 突变体的粒长变化的数据统计；D. 突变体的粒宽变化的数据统计；E. 突变体千粒重变化的数据统计。A. Phenotype of grain length change in mutants; B. Phenotype of grain width change in mutants; C. Grain length change in mutants; D. Grain width change in mutants; E. 1 000-grains weight change in mutants.

图 6 突变体的粒长、粒宽和千粒重的表型变化

Fig.6 Mutant phenotype change analysis, including grain length, grain width and 1000-grains weight

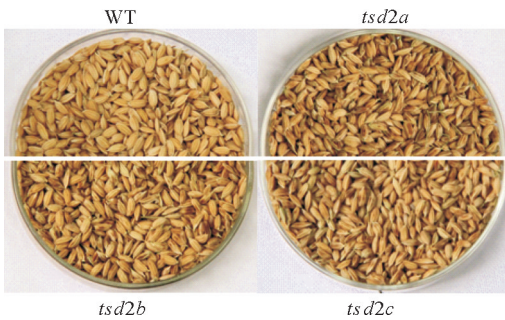


图 7 突变体的颖壳颜色变化表型

Fig.7 The change of glume shell color in mutant

2.4 *OsTSD2* 基因突变对种子萌发的影响

在正常条件下, 3 个等位突变体种子在 36、48、60、88 h 等时间的萌发率与 WT 相比显著降低(图 9), 表明 *OsTSD2* 基因参与调控水稻种子的萌发过程。采用荧光免疫标记探针 LM20(标记果胶高甲基化位点)对萌发 36 h 的水稻种子的盾片进行 LM20 免疫实验, 观察结果显示突变体 *tsd2a* 的萌发种子盾片中 LM20 绿色免疫信号与 WT 相比变弱(图 10), 表明突变体 *tsd2a* 的甲基化位点要比野

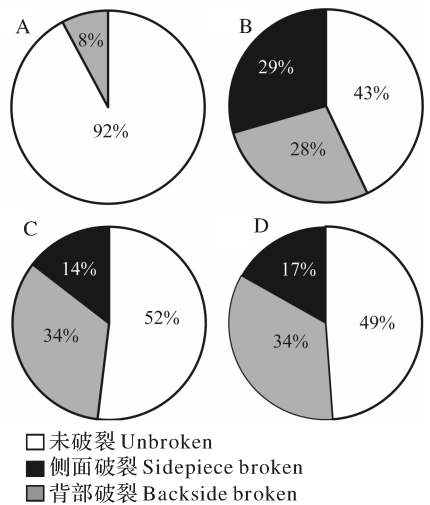
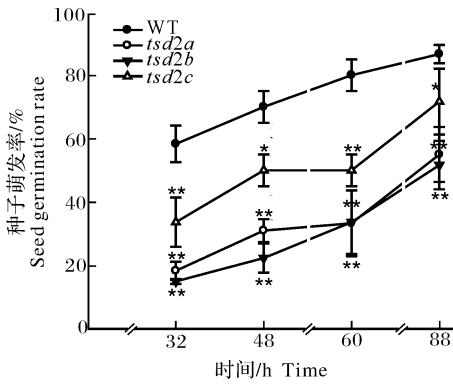


图 8 突变体的颖壳破裂比例

Fig.8 Analysis of glume shell broken ratio situation in mutants

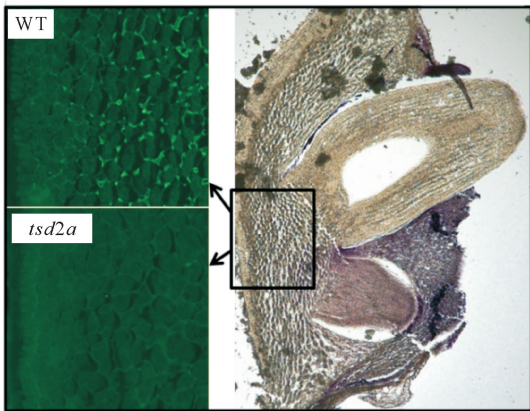
统计同一批次的野生型和突变体颖壳的未破裂、侧面破裂和背部破裂的比例: A. WT; B. *tsd2a*; C. *tsd2b*; D. *tsd2c*. Calculate the glume shell unbroken, sidepiece broken, backside broken ratio of WT and mutants in the same batch; A. WT; B. *tsd2a*; C. *tsd2b*; D. *tsd2c*.



正常条件下,统计 WT 与 3 个等位突变体在点种后 32、48、60 h 和 88 h 的萌发率。In normal right conditions, calculate the seed germination ratio of WT and three mutant alleles after the seed point in the culture medium 32 h, 48 h, 60 h, 88 h.

图 9 突变体的萌发率分析

Fig.9 Analysis of the seed germination ratio in mutants



萌发 36 h 的 WT 与 *tsd2a* 种子的盾片进行荧光标记,观察其中的果胶甲基化情况。Fluorescence labeling on WT and *tsd2a* scutellum of seeds after germination 36 h and observation the situation of pectin methylation.

图 10 突变体 *tsd2a* 种子萌发后的盾片中果胶的甲基化分析
Fig.10 Analysis of pectin methylation in the scutellum of mutant *tsd2a* germinal seed

生型的弱,说明突变体 *tsd2a* 萌发种子盾片中的甲基化修饰果胶含量是低于野生型的。综上, *OsTSD2* 基因可能是通过改变果胶的修饰程度,进而影响水稻的种子萌发。

3 讨论

T-DNA 插入突变体是用于植物基因挖掘和功能探究的有效研究工具^[20],在正向及反向遗传学研究中都起到重要作用。本研究在 *tsd2* 突变体中没有发现花粉粒活性降低以及雌蕊形态的改变;相对于 WT, *tsd2* 突变体的结实率下降、粒长变短、粒宽

变窄,推断 *OsTSD2* 基因可能影响水稻种子的形成,但是其中的机制还需要进一步研究。

相对于 WT,突变体的颖壳颜色变暗、破裂程度严重,并且还出现了新的较高比例背部破裂,预测可能是 *OsTSD2* 基因影响了植物体在种子颖壳上的色素积累才导致了突变体材料的颖壳颜色变暗,结合果胶与色素积累机制之间的关系有必要进行深入的研究。

本研究结果表明, *OsTSD2* 甲基转移酶基因可以通过改变果胶的修饰程度,进而影响水稻的种子萌发,但这一结论还需要更多的试验验证。虽然已经明确 *OsTSD2* 基因影响水稻的种子萌发,但其中复杂的调控机制不是很清楚,需要进一步深入挖掘基因、果胶和种子萌发三者之间关系的生物学机制。另外,赤霉素(gibberellin, GA)和 ABA 在水稻种子萌发过程中有重要的影响,那么 *OsTSD2* 基因与激素 GA 和 ABA 在水稻种子萌发中存在怎样的联系,以及它们之间的调控机制对种子的萌发产生怎样的影响都是迫切需要探究的问题。

参 考 文 献

- [1] MURAYAMA H, KATSUMATA T, HORIUCHI O, et al. Relationship between fruit softening and cell wall polysaccharides in pears after different storage periods[J]. Postharvest Bio Tec, 2002, 26: 15-21.
- [2] RECA I, LIONETTI V, CAMARDELLA L, et al. A functional pectin methyltransferase inhibitor protein (SolyPMEI) is expressed during tomato fruit ripening and interacts with PME-1 [J]. Plant Mol Biol, 2012, 79: 429-442.
- [3] MITCHAM E J, MCDONALD R E. Cell wall modification during ripening of 'Keitt and Tommy Atkins' mango fruit [J]. Am Soc Hortic Sci, 1992, 117: 919-924.
- [4] MULLER K, LEVESQUE-TREMBLAY G, BARTELS S, et al. Demethylesterification of cell wall pectins in *Arabidopsis thaliana* plays a role in seed germination[J]. Plant physiology, 2013, 161: 305-316.
- [5] SAEZ-AGUAYO S, RALET M, BERGER A, et al. Pectin methyltransferase inhibitor 6 promotes *Arabidopsis* mucilage release by limiting methylesterification of homogalacturonan in seed coat epidermal cells[J]. Plant cell, 2013, 25: 308-323.
- [6] VOINICIUC C, DEAN G, GRIFFITHS J, et al. Flying saucer1 is a transmembrane ring E3 ubiquitin ligase that regulates the degree of pectin methylesterification in *Arabidopsis* seed mucilage[J]. Plant cell, 2013, 25: 944-959.
- [7] 寿建昕. 水稻果胶甲基酯酶基因的克隆及表达研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2007.
- [8] HARPAZ-SAAD S, MCFARLANE H, XU S, et al. Cellulose

- synthesis via the FEI2 RLK/SOS5 pathway and CELLULOSE SYNTHASE 5 is required for the structure of seed coat mucilage in *Arabidopsis*[J]. *Plant J*, 2011, 68: 941-953.
- [9] SMADAR H, TAMARA L W, JOSEPH J K. The FEI2-SOS5 pathway and cellulose synthase 5 are required for cellulose biosynthesis in the *Arabidopsis* seed coat and affect pectin mucilage structure[J]. *Plant signaling & behavior*, 2012, 7: 285-288.
- [10] GABRIEL L, KERSTIN M, SHAWN D M, et al. Highly methyl esterified seeds is a pectin methyl esterase involved in embryo development[J]. *Plant physiology*, 2015, 167: 725-737.
- [11] CLAUDIA S, KARIN W, SIMON P P, et al. Promotion of testa rupture during garden cress germination involves seed compartment-specific expression and activity of pectin methyl esterases [J]. *Plant physiology*, 2015, 167: 200-215.
- [12] FRANK M, GUIVARCH A, KRUPKOVÁ E, et al. Tumorous shoot development (*TSD*) genes are required for co-ordinated plant shoot development[J]. *Plant J*, 2002, 29: 73-85.
- [13] KRUPKOVÁ E, IMMERZEEL P, PAULY M, et al. The tumorous shoot development 2 gene of *Arabidopsis* encoding a putative methyltransferase is required for cell adhesion and co-ordinated plant development[J]. *Plant J*, 2007, 50: 735-750.
- [14] FUENTES S, PIRES N, ØSTERGAARD L. A clade in the *QUASIMODO2* family evolved with vascular plants and supports a role for cell wall composition in adaptation to environmental changes[J]. *Plant Mol Biol*, 2010, 73: 605-615.
- [15] LIANG H Q, CHUN Y W, FEI Z, et al. Rice putative methyltransferase gene *OsTSD2* is required for root development involving pectin modification[J]. *J Exp Bot*, 2016, 67: 5349-5362.
- [16] CHEN W J S, WANG M, ZHANG F, et al. Distribution and characterization of over 1000 T-DNA tags in rice genome[J]. *Plant J*, 2003, 36: 105-113.
- [17] LI A H, ZHANG Y F, WU C Y, et al. Screening for and genetic analysis on T-DNA-inserted mutant pool in rice[J]. *Acta Genet Sin*, 2006, 33: 319-329.
- [18] 吴春燕. ABA 介导的水稻 *OsTSD2* 基因对根发育的调控研究 [D]. 武汉: 华中农业大学, 2014.
- [19] FEI Z, PAN Z, YU Z, et al. Identification of a peroxisomal-targeted aldolase involved in chlorophyll biosynthesis and sugar metabolism in rice[J]. *Plant science*, 2016, 250: 205-215.
- [20] BENNETZEN J L. Transposable element contributions to plant gene and genome evolution[J]. *Plant Mol Biol*, 2000, 42: 251-269.

Mutants of rice pectin methyltransferase *OsTSD2* gene

ZHANG Fei^{1,2} QU Lianghuan¹ LUO Jie¹

1. National Key Laboratory of Crop Genetic Improvement/College of Life Science & Technology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China;
2. College of Life Science, Huaibei Normal University, Huaibei 235000, China

Abstract To study the function of rice pectin methyltransferase *OsTSD2* genes and its effects on growth and development, a dwarf mutant was found by screening the mutants and experimentally verified. The T-DNA was inserted in the seventh intron of the gene *OsTSD2*. This mutant was named as *tsd2a* (tumorous shoot development 2a). Other two allelic mutants *tsd2b* and *tsd2c* were found as well. Three allelic mutants had lower seed setting percentage, shorter grain length, narrowed grain width and reduced 1 000-grain weight. The glume of mutant had darkened colors, aggravating the degree of rupture, new and seriously broken backside. Results of fluorescence immunoassay indicated that the declined germination rate of mutant seed was due to lower methylation pectin in scutellum of germinating mutant seeds. Defective function of pectin methyltransferase *OsTSD2* gene may obviously make the defective development and germination of the rice seeds.

Keywords rice; pectin methyltransferase; *OsTSD2* gene; seeds; germination