

# OsmiR156 过表达对水稻分蘖数与生长生理相关性的影响

封洁琼<sup>1,2</sup>, 刘清<sup>2</sup>, 潘依<sup>1</sup>, 阳晶<sup>1</sup>, 王惠群<sup>1,2\*</sup>

(1. 湖南农业大学生物科学技术学院, 湖南长沙 410128; 2. 植物激素与生长发育湖南省重点实验室, 湖南长沙 410128)

**摘要** [目的]通过比较水稻 *OsmiR156* 组成型过表达材料 D18p、*OsmiR156* 茎秆特异性过表达材料 Ubi1 及其亲本日本晴分蘖期的生理生化特性, 为产量性状的遗传改良提供依据。[方法]设计随机土壤盆栽试验, 测定分蘖期的生物学特性。[结果]分蘖初期, 3 种材料的分蘖数和株高没有显著差异 ( $P > 0.05$ )。在分蘖中后期 D18p 和 Ubi1 的分蘖数高于日本晴, 而株高低于日本晴。在分蘖后期, 3 种材料中 Ubi1 的净光合速率和吲哚乙酸氧化酶活性最高; D18p 和 Ubi1 的叶片生长素含量和脱落酸含量都高于日本晴。[结论]*OsmiR156* 过表达会引起植株矮化, 分蘖数增多, 3 种材料的分蘖数与其叶片生长素含量及吲哚乙酸氧化酶活性呈线性正相关。

**关键词** 水稻; *OsmiR156*; 分蘖期; 生理特性

中图分类号 S511 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2014)11-03172-03

## Effects of *OsmiR156* Overexpression on the Relationship between Tiller Number and Growth Physiology of *Oryza sativa* L.

FENG Jie-qiong, WANG Hui-qun et al (Bioscience and Biotechnology College, Hunan Agricultural University, Changsha, Hunan 410128)

**Abstract** [Objective] Through compare biochemical characteristics of *OsmiR156* constitutive overexpression rice material D18p, *OsmiR156* stem specificity expression rice material Ubi1 and their parent Nipponbare in physiological at tillering stage, this will provide reference basis for genetic improvement of yield traits in rice. [Method] Random soil pot experiment was set up, and rice biological characteristics of tillering stage were determined. [Result] The tiller number and plant height of three materials are no significant difference at early tillering stage. Tiller number of D18p or Ubi1 is higher than Nipponbare, but plant height of D18p or Ubi1 is lower than Nipponbare at mid and late tillering stage. The Ubi1 leaf net light photosynthetic rate and leaf indole acetic acid oxidase activity are the highest among the three materials. The leaf auxin content and abscisic acid content in D18p and Ubi1 are higher than those in Nipponbare. [Conclusion] *OsmiR156* overexpression result in plants dwarfed and tillering number increased in rice. There is positive linear relationship between the tiller number and leaf auxin content in 3 materials, and there is too positive linear relationship between tiller number and IAA oxidase activity.

**Key words** *Oryza sativa* L.; *OsmiR156*; Tillering stage; Physiological character

水稻 (*Oryza sativa* L.) 作为模式作物有着很丰富和深入的基因组研究基础, 水稻产量性状的遗传改良取决于穗型、粒型、分蘖数和株型等一系列因素<sup>[1]</sup>。而分蘖直接影响农作物穗数的多少, 进而影响其单位产量<sup>[2]</sup>。国际水稻研究所的“超高产新株型”、“中国超级稻”和“超级杂交稻”的核心内容都涵盖了水稻的分蘖<sup>[3]</sup>。miRNA 在植物生长发育过程中起着非常重要的调节作用, 由于大多数保守的 miRNA 的靶基因 mRNA 编码转录因子或者对细胞分化决定至关重要的生长调节因子<sup>[4]</sup>, 当这些 miRNA 过量表达或扰乱 miRNA 与靶基因的互补时可使生物体的表型发生明显改变<sup>[5]</sup>。*miR156* 是植物中一个非常保守的 miRNA 基因家族<sup>[6]</sup>, 其靶基因 SP 是植物特有转录因子的典型代表<sup>[7]</sup>, 改变 *miR156* 家族基因或靶基因含量, 不仅引起植物幼年期、成熟期和花期的改变, 还影响水稻分蘖。2006 年熊立仲等报道了水稻过表达 *OsmiR156b* 和 *OsmiR156h* 导致植株变矮, 分蘖增多<sup>[8]</sup>。李家洋等报道了 *OsmiR156* 的靶标基因 *OsSPL14* 具有减少分蘖, 增加小穗数和穗长的功能<sup>[9]</sup>。笔者采用水稻品种日本晴、转基因材料 Ubi1 和转基因材料 D18p 为试验材料, 系统地比较他们在分蘖期的生物学特性, 以期对水稻产量性状的遗传改良提供参考依据。

## 1 材料与方法

**1.1 材料** 供试水稻 (*Oryza sativa* L.), 为日本晴 (Nippon-

bare)、D18p 和 Ubi1。日本晴是转基因材料 D18p 和 Ubi1 的受体, 材料 D18p 是启动子 D18p 启动 *miR156* 在日本晴中的茎秆特异性过表达转基因材料, 材料 Ubi1 是启动子 Ubi1 启动 *miR156* 在日本晴中的组成型过表达转基因材料; 供试材料, 由湖南农业大学植物激素与生长发育湖南省重点实验室提供。

**1.2 试验设计与材料培养** 土壤盆栽试验在湖南农业大学植物激素与生长发育湖南省重点实验室网室进行, 采用随机组合设计, 土壤选用常年种植水稻的稻田土, 供试土壤 pH 5.12, 有机质含量为 47.8 g/kg, 全氮 2.00 g/kg, 碱解氮 203.7 mg/kg, 速效磷 22.5 mg/kg, 速效钾 242.9 mg/kg。圆柱形瓷盆大小为直径 × 高度 = 40 cm × 35 cm。在 2013 年 3 月 26 日对水稻试验材料催芽育苗, 于 4 月 25 日对秧苗进行移栽。共种植 24 盆, 每种材料 8 盆, 每盆插秧 4 株, 水肥栽培措施等参照大田栽培。在水稻分蘖期的前期 (5 月 22 日)、中期 (日本晴 6 月 17 日; D18p 6 月 19 日; Ubi1 6 月 21 日)、后期 (日本晴 7 月 5 日; D18p 7 月 3 日; Ubi1 7 月 23 日) 3 个时期进行生物学性状的测定。

## 1.3 生物学性状测定方法

**1.3.1 株高、叶长和叶宽测定。**用普通的精度为毫米的米尺进行测定。

**1.3.2 光合作用的测定**<sup>[10]</sup>。依王惠群等的方法稍作修改。在水稻分蘖后期的晴朗天气的上午 10:00 ~ 12:00 采用 Li-6400 便携式光合作用系统进行光合作用参数净光合速率、胞间 CO<sub>2</sub> 浓度、气孔导度和蒸腾速率的测定, 测定环境条件为开放式气路、红蓝光源、光通量密度为 1 000 μmol/m<sup>2</sup> · s、相对湿度 1 800 Pa 和温度 20 °C。选取生长一致的 6 盆中的 6

**基金项目** 湖南省科技厅科技计划一般项目 (2013NK3039)。

**作者简介** 封洁琼 (1986 - ), 女, 河北平山人, 硕士研究生, 研究方向: 植物学。\* 通讯作者, 教授, 硕士生导师, 博士, 从事植物学方面的研究。

**收稿日期** 2014-03-09

株的顶下第 2 完全展开叶进行测定。

**1.3.3 吲哚乙酸氧化酶活性的测定。**依王小玲等<sup>[11]</sup>的方法稍作修改,用比色法测定单位时间内吲哚乙酸的消失量,以每毫升酶液每小时破坏 IAA 的微克数表示酶活力的大小。

**1.3.4 植物激素含量的测定。**依 Wang HQ 等的方法测定<sup>[12]</sup>。

**1.4 数据处理方法** 数据统计分析采用 Excel 2003 和 SPSS17.0 数据分析系统。

## 2 结果与分析

**2.1 *OsmiR156* 过表达对分蘖期分蘖数、株高、叶长和叶宽的影响** 由表 1 可知,日本晴、D18p 和 Ubil 3 种试验材料在分蘖的初期、中期和后期的分蘖数、株高、叶长和叶宽 4 个生物学性状指标都呈上升的趋势。在水稻分蘖的初期,3 种材料的分蘖数、株高、叶长和叶宽 4 个指标没有显著性差异 ( $P > 0.05$ )。在分蘖的中期和后期,D18p 和 Ubil 的分蘖个

数都高于日本晴,而株高、叶长和叶宽都低于日本晴。由此可知,*OsmiR156* 在水稻分蘖初期,对于水稻的分蘖数、株高、叶长和叶宽的影响没有显著性差异 ( $P > 0.05$ ),而到水稻分蘖的中期和后期,则具有显著性差异 ( $P < 0.05$ )。

**2.2 *OsmiR156* 对水稻分蘖后期光合作用参数的影响** *OsmiR156* 对水稻分蘖后期的光合作用参数都有着不同程度的影响(表 2)。在水稻分蘖后期,3 种材料的净光合速率没有显著差异 ( $P > 0.05$ )。而 3 种材料的气孔导度都有显著性差异 ( $P < 0.05$ )。Ubil 的气孔导度最大,分别比日本晴和 D18p 的气孔导度高出 81.5% 和 104.8%。3 种材料的胞间  $\text{CO}_2$  浓度也具有显著性差异 ( $P < 0.05$ )。Ubil 的胞间  $\text{CO}_2$  浓度分别高出日本晴与 D18p 胞间  $\text{CO}_2$  浓度 16.1% 和 20.8%。日本晴的蒸腾速率最高,D18p 与 Ubil 的蒸腾速率较为接近,其中日本晴的蒸腾速率分别比 D18p 和 Ubil 的蒸腾速率高出 23.6% 和 24.3%。

表 1 *OsmiR156* 过表达对分蘖期分蘖数、株高、叶长和叶宽的影响

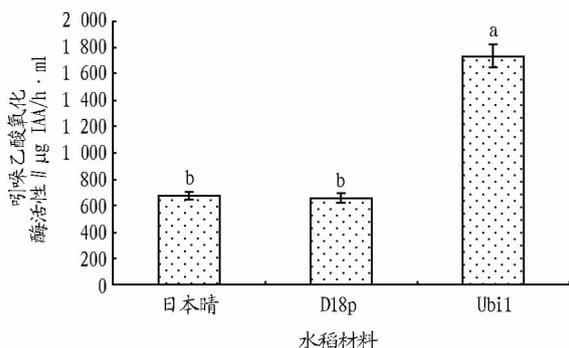
分蘖时期	材料	生物学性状			
		分蘖数//个	株高//cm	叶长//cm	叶宽//cm
分蘖初期	日本晴	3.1 ± 0.7 a	29.3 ± 12.8 a	17.9 ± 1.3 a	4.1 ± 0.3 a
	D18p	3.2 ± 0.7 a	29.9 ± 13.7 a	18.2 ± 1.3 a	4.0 ± 0.3 a
	Ubil	3.4 ± 0.5 a	28.7 ± 19.9 a	18.3 ± 1.4 a	4.0 ± 0.3 a
分蘖中期	日本晴	7.6 ± 0.8 b	82.2 ± 31.3 a	57.7 ± 1.6 a	13.0 ± 0.5 a
	D18p	7.8 ± 0.9 b	76.6 ± 12.0 a	52.3 ± 1.6 a	12.1 ± 0.3 a
	Ubil	16.9 ± 1.4 a	49.4 ± 28.2 b	31.3 ± 1.6 b	7.0 ± 0.3 b
分蘖后期	日本晴	12.3 ± 0.8 b	97.1 ± 20.5 a	62.8 ± 1.8 a	15.1 ± 0.4 a
	D18p	13.1 ± 0.7 b	87.6 ± 20.2 a	59.4 ± 1.7 a	15.0 ± 0.4 a
	Ubil	31.4 ± 2.0 a	54.6 ± 18.7 b	33.9 ± 1.7 b	8.0 ± 0.4 b

注:数据为平均值 ± 标准差(SD)。同列不同字母代表不同材料间在 0.05 水平的差异显著性。

表 2 *OsmiR156* 过表达对分蘖后期光合作用参数的影响

材料	净光合速率	气孔导度	胞间 $\text{CO}_2$ 浓度	蒸腾速率
	$\mu\text{mol}/\text{m}^2 \cdot \text{s}$	$\text{mmol}(\text{H}_2\text{O})/\text{m}^2 \cdot \text{s}$	$\text{mol}(\text{CO}_2)/\text{mol}$	$\text{mmol}(\text{H}_2\text{O})/\text{m}^2 \cdot \text{s}$
日本晴	11.18 ± 0.47 a	0.27 ± 0.03 b	285.20 ± 8.70 b	6.64 ± 0.48 a
D18p	11.40 ± 0.55 a	0.21 ± 0.03 c	262.00 ± 14.18 c	5.37 ± 0.55 b
Ubil	11.48 ± 0.26 a	0.49 ± 0.01 a	331.00 ± 3.35 a	5.34 ± 0.07 b

注:数据为平均值 ± 标准差(SD)。同列不同字母代表不同材料间在 0.05 水平的差异显著性。



注:表中不同字母代表不同材料间在 0.05 水平的差异显著性。

图 1 *OsmiR156* 过表达对水稻分蘖后期叶片吲哚乙酸氧化酶活性的影响

**2.3 *OsmiR156* 过表达对分蘖后期叶片吲哚乙酸氧化酶活性的影响** 图 1 表明,在分蘖后期,Ubil 的叶片吲哚乙酸氧化酶活性最高,与日本晴和 D18p 具有显著性的差异 ( $P < 0.05$ )。

**2.4 *OsmiR156* 过表达对水稻分蘖后期叶片植物激素含量的影响** 由表 3 可知,在水稻分蘖后期,生长素(IAA)含量在

日本晴、D18p 和 Ubil 3 种材料中具有显著性的差异 ( $P < 0.05$ ),其中在 D18p 中 IAA 含量最高,分别是日本晴和 Ubil 的 14.53 倍和 2.53 倍。玉米素(ZR)含量在日本晴、D18p 和 Ubil 3 种材料中也有显著差异 ( $P < 0.05$ ),在日本晴中 ZR 含量最高,分别是 D18p 和 Ubil 中 ZR 含量的 1.62 倍和 1.20 倍。日本晴和 Ubil 的赤霉素 GA 含量没有显著性差异 ( $P > 0.05$ ),但他们与 D18p 具有显著性差异 ( $P < 0.05$ ),分别是 D18p 的 1.80 倍和 1.87 倍。Ubil 的脱落酸(ABA)含量最高,与日本晴和 D18p 的具有显著性差异 ( $P < 0.05$ ),分别高出 2.97 倍和 2.33 倍。

**2.5 *OsmiR156* 过表达对水稻分蘖后期分蘖数与叶片 IAA 含量、吲哚乙酸氧化酶活性的相关性分析** 通过对日本晴、D18p 和 Ubil 3 种材料的植株的分蘖数与生长素含量、分蘖数与吲哚乙酸氧化酶活性的相关性分析(表 4)表明,分蘖数与其叶片生长素含量呈线性正相关,其相关方程为  $Y = 57.175X - 40.364$  ( $R^2 = 0.9561$ ),分蘖数与吲哚乙酸氧化酶活性也呈线性正相关,其相关方程为  $Y = 0.1004X - 1.0708$

( $R^2 = 0.9491$ )。

表3 *OsmiR156* 过表达对分蘖后期叶片植物激素含量的影响

材料	生长素含量 $\mu\text{g/g}$	玉米素含量 $\mu\text{g/g}$	赤霉素含量 $\mu\text{g/g}$	脱落酸含量 $\mu\text{g/g}$
日本晴	0.34 ± 0.08 c	0.43 ± 0.02 a	10.53 ± 0.54 a	1.50 ± 0.02 b
D18p	5.00 ± 0.21 a	0.26 ± 0.01 c	5.86 ± 0.28 b	1.98 ± 0.03 b
Ubil	1.98 ± 0.12 b	0.36 ± 0.03 b	10.98 ± 0.76 a	4.61 ± 0.19 a

注:数据为平均值 ± 标准差(SD)。同列不同字母代表不同材料间在0.05水平的差异显著性。

表4 *OsmiR156* 过表达对分蘖后期分蘖数与生长素含量、分蘖数与吲哚乙酸氧化酶活性的相关性分析

相关性	相关方程	相关系数
分蘖数与生长素含量	$Y = 57.1750X - 40.3640$	$R^2 = 0.9561$
分蘖数与吲哚乙酸氧化酶活性	$Y = 0.1004X - 1.0708$	$R^2 = 0.9491$

### 3 结论与讨论

吕明芳研究表明,当 *OsmiR156* 过量表达时,会使植物出现植株明显矮化,分蘖增加,开花延迟结实率极低或不结实等表型<sup>[13]</sup>。*OsmiR156* 的过表达对水稻的分蘖数、株高、叶长和叶宽都有明显影响。试验结果表明,Ubil 的分蘖数明显高于日本晴和 D18p,而株高、叶长和叶宽则明显低于日本晴和 D18p,这与吕明芳的结果一致。由此可知,*OsmiR156* 的组成型过表达对于水稻的分蘖是有明显促进作用,而对于茎和叶片的生长则起抑制作用。由日本晴与 D18p、Ubil 的比较可以得出,*OsmiR156* 的茎秆过表达对于水稻的分蘖数以及叶片和茎的生长影响不明显。

水稻分蘖期随着分蘖的进行,光合作用的各项指标也会发生相应改变。在詹可等的研究中提出过水稻的成穗率越高,水稻的光合作用率也会相应提高的结论<sup>[14]</sup>。蒋彭炎等得出水稻成穗率与光合作用效率成正比的结果,而水稻的无效分蘖则会降低光合作用效率<sup>[15]</sup>。miR156 是调控水稻分蘖的关键 miRNA 之一。其表达不仅仅影响水稻分蘖过程中的各种性状,同时也影响水稻分蘖后期各项光合作用参数。试验3种材料的结果显示,由于在净光合速率方面,对照组与2种突变体没有明显差异,可以推断 miR156 的表达对水稻分蘖后期植物的光合速率没有明显影响。气孔导度与胞间  $\text{CO}_2$  浓度方面由于三者数值相差明显,可以看出 *OsmiR156* 过表达表达影响气孔导度与胞间  $\text{CO}_2$  浓度的变化。其中 *OsmiR156* 组成型过表达的 Ubil 突变体气孔导度与胞间  $\text{CO}_2$  浓度都是最高。miR156 也影响蒸腾速率的变化,Ubil 突变体的蒸腾速率相对较低。Ubil 突变体的分蘖数多于 D18p 与日本晴,在光合作用指标方面气孔导度和胞间  $\text{CO}_2$  浓度的增加是因为分蘖数的增加影响单个叶片的光合作用效率,为了保证光合作用的有效进行,植物采取了增加底物浓度的方式。而 *OsmiR156* 过表达引起的叶面积的减小则导致了 Ubil 的蒸腾作用小于 D18p 和日本晴。

分蘖是水稻生长发育过程中形成的一种特殊分枝是影响水稻产量的主要因素之一,分蘖芽的形成受到植物激素、

环境及遗传因子的调控,其中植物激素在分蘖的发生和衰亡过程中起着至关重要的作用<sup>[16]</sup>。研究 *OsmiR156* 对水稻分蘖后期分蘖数与生长素含量、吲哚乙酸氧化酶活性的相关性分析发现,*OsmiR156* 过表达引起的分蘖数变化与叶片中的生长素含量成正相关,生长素对分蘖芽的抑制存在顶端优势现象,即其由茎顶端自上而下向基部的极性运输(polar auxin transport, PAT)抑制分蘖芽的生长。例如,高度分蘖的水稻若去掉颖花将促进分蘖伸长,加入 IAA 则起抑制作用细胞分裂素在根中合成,植物失去顶端优势后,在茎中也有合成,受外源生长素抑制其与生长素在水稻体内形成调控网络共同调控水稻分蘖<sup>[17-18]</sup>。

### 参考文献

- [1] 李家洋. 水稻分蘖数目与分蘖角度的分子机理[J]. 中国基础科学, 2008,10(3):14-15.
- [2] 李学勇,钱前,李家洋. 水稻分蘖的分子机理研究[J]. 中国科学院院刊,2003(4):274-276.
- [3] WANG Y H, LI J Y. The Plant architecture of rice (*Oryza sativa* L.) [J]. Plant Mole Bio, 2005, 59:75-84.
- [4] REINHART B J, WEINSTEIN E G, RHOADES M W, et al. MicroRNAs in Plants [J]. Genes Dev, 2002, 16:1616-1626.
- [5] MALLORY A C, VAUCHERET H. Functions of microRNAs and related small RNAs in Plants [J]. NatGenet, 2006, 38:31-37.
- [6] AXTELL M J, BOWMAN J L. Evolution of plant microRNAs and their targets [J]. Trends Plant Sci, 2008, 13:343-349.
- [7] CARDON G, HOHMANN S, KLEIN J, et al. Molecular characterisation of the Arabidopsis SBP-box genes [J]. Gene, 1999, 237:91-104.
- [8] XIE K, WU C, XIANG L. Genomic organization, differential expression, and interaction of SQUAMOSA promoter-binding-like transcription factors and microRNA156 in rice [J]. Plant Physiol, 2006, 142:280-293.
- [9] JIAO Y, WANG Y, XUE D, et al. Regulation of OsSPL14 by *OsmiR156* defines ideal plant architecture in rice [J]. Nature Genet, 2010, 42:541-544.
- [10] 王惠群,肖浪涛,杨艳丽,等. 矮壮素对中薯3号生理特性的影响研究[J]. 云南农业大学学报, 2008, 23(2):200-204.
- [11] 王小玲,赵忠,权金娥,等. 外源激素对四倍体刺槐硬枝扦插生根及其关联酶活性的影响[J]. 西北植物学报, 2011, 31(1):116-122.
- [12] WANG H Q, XIAO L T. Effects of chlorocholine chloride on phytohormones and photosynthetic characteristics in potato (*Solanum tuberosum* L.) [J]. Journal of Plant Growth Regulation, 2009, 28:21-27.
- [13] 吕明芳. 水稻 miR156 基因克隆及其功能初步分析[D]. 金华:浙江师范大学, 2011:1-7.
- [14] 詹可,邹应斌. 水稻分蘖特性及成穗规律研究进展[J]. 作物研究, 2007(12):588-592.
- [15] 蒋鹏炎,洪晓富,冯来定. 水稻中期群体成穗率与后期群体光合效率的关系[J]. 中国农业科学, 1994, 27(6):8-14.
- [16] LEYSER O. Regulation of shoot branching by auxin [J]. Trends in Plant Science, 2003, 8:541-545.
- [17] TANAKA M, TAKEI K, KOJIMA M, et al. Auxin controls local cytokinin biosynthesis in the nodal stem in apical dominance [J]. Plant J, 2006, 45:1028-1036.
- [18] 刘伟,易自陈,陈智勇. 水稻分蘖的激素调控进展[J]. 杂交水稻, 2013, 28(1):1-4.