作物学报 ACTA AGRONOMICA SINICA 2012, 38(5): 904–908
ISSN 0496-3490; CODEN TSHPA9
http://www.chinacrops.org/zwxb/
E-mail: xbzw@chinajournal.net.cn

DOI: 10.3724/SP.J.1006.2012.00904

研究简报

OsBTF3 基因在水稻光合作用和生长发育中的功能

李广旭[1,2] 陈华民[1] 吴茂森[1] 何晨阳[1,*]

[1] 中国农业科学院植物保护研究所 / 植物病虫害生物学国家重点实验室, 北京 100193; [2] 辽宁省农业科学院果树研究所, 辽宁熊岳 115009

摘 要: 为了揭示转录因子OsBTF3 在水稻生长发育中的功能, 比较分析了*OsBTF3* 过量表达和RNAi转基因水稻T_1代株系叶片生长和株型发育的表型。结果表明, 与野生型对照株相比, 过量表达株系在叶绿素含量、叶绿体数量、光合速率、叶片大小、株高、节间长方面显著增加或增强; 而RNAi株系的明显降低或减弱。*OsBTF3* 基因的增量或减量表达显著影响水稻光合作用、叶片生长和株型发育。说明OsBTF3 在水稻生长发育中具有重要调控功能, 可能在水稻转基因分子育种方面具有潜在的应用价值。

关键词: 水稻; *OsBTF3*; 转基因; 光合作用; 生长发育

Functions of *OsBTF3* Gene in Regulation of Photosynthesis, Growth and Development in Rice

LI Guang-Xu[1,2], CHEN Hua-Min[1], WU Mao-Sen[1], and HE Chen-Yang[1,*]

[1] State Key Laboratory for Biology of Plant Diseases and Insect Pests / Institute of Plant Protection, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193, China; [2] Institute of Pomology, Liaoning Academy of Agricultural Sciences, Xiongyue 115009, China

Abstract: To reveal the regulatory roles of transcription factor OsBTF3 in growth and development of rice, we comparably analyzed the growth and development of the transgenic rice with over-expressed or RNAi-silenced *OsBTF3* gene. Results showed that significant increases in chlorophyll content, chloroplast number, photosynthetic rate, leaf size, plant heights and stem internode length were found in T_1 generation of transgenic rice lines with the over-expressed gene compared to wild-type control plants, while remarkable decreases in above phenotypes were observed in plants with the RNAi-silenced gene. Over-expression or silencing of transgene *OsBTF3* in rice resulted in significant changes in photosynthesis, growth and development of rice. Therefore, OsBTF3 functions as a key regulator in growth and development, and might be potentially used in molecular breeding of rice for improving agronomic traits.

Keywords: Rice; *OsBTF3*; Transgenic; Photosynthesis; Growth and development

BTF3 蛋白作为转录因子或新生多肽关联复合体[1-3], 其在真核生物中的生物学功能主要涉及烟草叶片生长发育[4]、果蝇和小鼠胚胎死亡[5-6]、线虫细胞程序性死亡[7]、与水稻细胞周期蛋白和拟南芥翻译起始因子互作[8-9]等方面。然而, 长期以来对该基因在水稻中的功能却鲜见报道。

在前期研究工作中, 本实验室开展了水稻与白叶枯病菌互作的基因表达谱分析, 从中发现了水稻基因*OsBTF3* 被显著诱导而上调表达[10]。为阐明该基因在水稻中的功能, 我们对该基因进行了分子克隆、定性和表达分析, 并构建过量表达和RNAi载体通过农杆菌介导的水稻转化体系, 获得了该基因过量表达和RNAi株系[11-12], 对转基因株系的抗病性和抗逆性(如抗旱、抗低温、抗高盐)等方面进行了功能鉴定(实验室待发表资料)。然而这个受病原菌诱导表达的基因在水稻生长发育中的功能至今仍不清楚。

本文报道以*OsBTF3* 基因过量表达(OE)株系和RNAi(RI)株系为试验材料, 比较分析T_1代转基因株系植株的光合作用、叶片生长和株型发育的研究结果, 发现了*OsBTF3* 基因的增/减量表达显著影响水稻植株的生长发育, 初步揭示了OsBTF3 在水稻生长发育中的调控功能, 为OsBTF3 在水稻转基因分子育种中的应用评价提供了科学实验依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

由中国农业科学院作物科学研究所提供转基因受体水稻品种日本晴, 用野生型作对照株(WT), *OsBTF3* 过量

本研究由国家转基因生物新品种培育重大专项(2009ZX08009-044B, 2008ZX08001-002)资助。

* 通讯作者(Corresponding author): 何晨阳, E-mail: cyhe@caas.net.cn, Tel: 010-62894147

Received(收稿日期): 2011-09-13; Accepted(接受日期): 2012-01-19; Published online(网络出版日期): 2012-03-05.
URL: http://www.cnki.net/kcms/detail/11.1809.S.20120305.1035.001.html

表达(OE)株系(OE11、OE37 和OE39)和RNAi (RI)株系(RI17、RI30 和RI32)由本实验室创制和保存[13-14]。

1.2　水稻叶片总 RNA 提取和 cDNA 合成

参照文献[13]的方法，取不同T_1代转基因株系幼苗叶片 2 g，经液氮冷冻研磨成粉末。加入 80℃预热的RNA抽提缓冲液(含 100 mmol L^{-1} Tris-HCl、100 mmol L^{-1} LiCl、10 mmol L^{-1} EDTA、1%SDS、pH 8.0)与TE饱和酚的等体积混合液，振荡混匀；加入 1/2 体积的氯仿，振荡混匀；离心取上清，氯仿抽提至两相界面干净为止。上清中加入 1/3 体积的 8 mol L^{-1} LiCl，0℃沉淀过夜。离心收集沉淀，75%乙醇洗涤后真空干燥，溶于TE中。取 1 μL总RNA进行 1.2%琼脂糖凝胶电泳，检测RNA完整性。在反转录之前，用DNase处理总RNA。按照M-MLV Reverse Transcriptase (Invitrogen)试剂盒方法合成cDNA。

1.3　实时定量 PCR 分析

利用 Primer premier 5.0 软件设计 *OsBTF3* 和内标基因 *actin* 的特异引物。*OsBTF3* 引物序列为 5′-TGAGCAGTTCCAGAAGCAGG-3′，5′-TCTTCCACCTCCGCTTCCTT-3′。*actin*引物序列为 5′-CTGGTATCGTGTTGGACTCTGG-3′，5′-CCCGTTCAGCAGTGGTAGTG-3′。以合成的cDNA为模板，按照IQ SYBR Green Supermix试剂盒(Bio-Rad, USA)的方法，用iCycler IQTM实时定量PCR仪(Bio-Rad, USA)进行RT-Q-PCR的检测。参照文献[14]的方法，以*actin*基因为内标参照，*OsBTF3* 相对表达量= $2^{-\Delta\Delta Ct}$，其中$\Delta\Delta Ct=(Ct_{target}-Ct_{actin})$Time X$-(Ct_{target}-Ct_{actin})$ Time 0，Ct为荧光阈值。

1.4　叶绿素含量测定

按照文献[15]报道的丙酮提取法，测定分蘖期水稻叶片叶绿素含量。根据Lambert-Beer定律，叶绿素浓度 $C_T=20.2\ A_{645}+8.02\ A_{663}$，叶绿素含量(μg g^{-1})=C_T×提取液总量(mL)/鲜重(g)。

1.5　光合速率测定

用光合测定系统CID-310 (CID，美国)测定抽穗后期叶片净光合速率。每个株系随机选取 5 片旗叶，每个叶片测定 5 个数据。叶面积为输入叶室的实际叶面积数值(cm^2)、流速为 0.4 L min^{-1}、反应时间和添加时间间隔均为 5 s。采用开系统、连续测定、追加方式测定。

1.6　水稻叶组织超微结构电镜观察

按照文献[16]的方法。取分蘖期的水稻叶片，沿叶脉方向剪成 5 mm× 10 mm的长方形小片，在 0.1 mol L^{-1}磷酸缓冲液配制的 2.5%戊二醛溶液中固定。然后经漂洗、锇酸固定、乙醇脱水、临界点干燥、镀膜，用于扫描电镜(ESEM XL-30)观察。部分叶片样品经包埋、Reichert超薄切片机进行切片、染色，用于透射电镜(JEM-1230)观察。

1.7　水稻植株生长发育性状测定

将经潮霉素抗性(Hyg^R)筛选出的T_1代转基因植株置于正常温度条件下生长。按照文献[17]的方法，于水稻灌浆期测定株高、茎节数、节间长度、旗叶长度和宽度等性状指标；采收期调查结实率、穗长、千粒重等生物学相关性状指标，对各指标数据进行统计分析。

1.8　数据分析

以 3 次重复平均值±标准差为表征值，用 Microsoft Excel 软件制作图表；以 SPSS 软件中 LSD 法进行多重比较，比较分析 WT 和转基因株系间显著差异性($P<0.05$)。

2　结果与分析

2.1　*OsBTF3* 在T_1代OE和RI转基因株系中的表达

实时定量 PCR 检测表明，在 OE 株系 OE11、OE37 和 OE39 中，*OsBTF3* 基因表达水平分别为野生型对照株的 4.27、4.56 和 3.85 倍；而在 RI 株系 RI17、RI30 和 RI32 中，*OsBTF3* 基因表达水平分别为野生型对照株的 0.14、0.03 和 0.05 倍。说明 *OsBTF3* 基因在 OE 株系中过量表达，而在 RI 株系中的表达被有效抑制。

2.2　*OsBTF3* 转基因株系光合作用

2.2.1　叶绿素含量和叶绿体数量　与WT叶绿素总量(491.9 μg g^{-1} FW)相比，3 个OE株系叶绿素含量(平均 535.1 μg g^{-1} FW)显著升高，3 个RI株系含量(平均 457.4 μg g^{-1} FW)明显降低(图 1)。说明*OsBTF3* 基因表达显著地影响了水稻叶绿素含量。

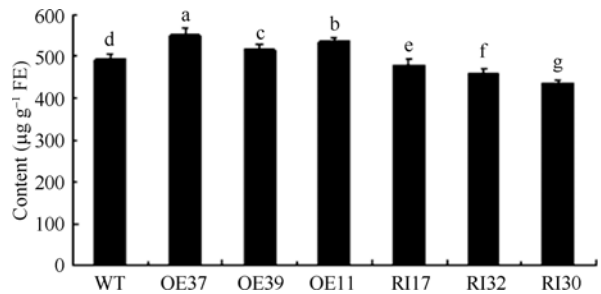

图 1　*OsBTF3* 转基因水稻株系植株叶绿素含量

Fig. 1　Chlorophyll contents of transgenic rice lines with over-expressed and RNAi-silenced *OsBTF3* gene

图柱上不同字母表示样品之间的差异显著($P<5\%$)。

Bars superscribed by different letters are significantly different at 5% probability level among samples.

叶肉细胞超微结构观察发现，WT 和 OE37 株系叶肉细胞形态完好，叶绿体形态完整，排列紧密，充满整个细胞；OE37 株系叶绿体比 WT 的更丰富；而 RI30 株系叶肉细胞中叶绿体形态发生不规则改变，排列较为松散(图 2)。

2.2.2　光合速率　与WT净光合速率(2.19 μmol m^{-2} s^{-1})相比，3 个过量表达株系的(平均 3.31 μmol m^{-2} s^{-1})显著增加，株系间无显著差异；而 3 个RI株系的(平均 1.15 μmol m^{-2} s^{-1})明显降低，株系间无显著差异(图 3)。说明*OsBTF3* 基因表达显著影响了水稻光合速率。

2.3　*OsBTF3* 转基因株系叶片生长

3 个 OE 株系平均叶长为 22.1 cm，而 3 个 RNAi 株系为 18.6 cm，WT 为 21.2 cm (图 4-A)；3 个 OE 株系平均叶

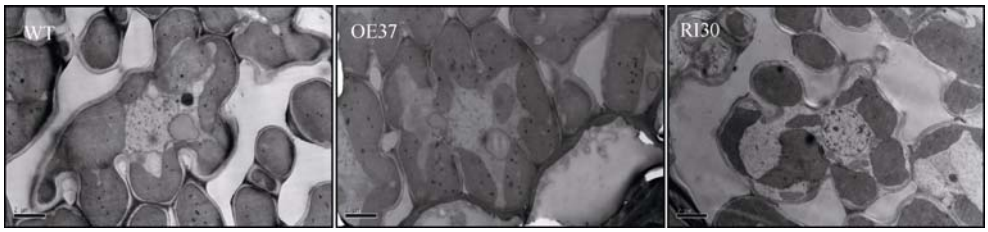

图 2 *OsBTF3* 转基因水稻株系叶肉细胞超微结构

Fig. 2 Ultra-structure of leaf cells on transgenic rice lines with over-expressed and RNAi-silenced *OsBTF3* gene

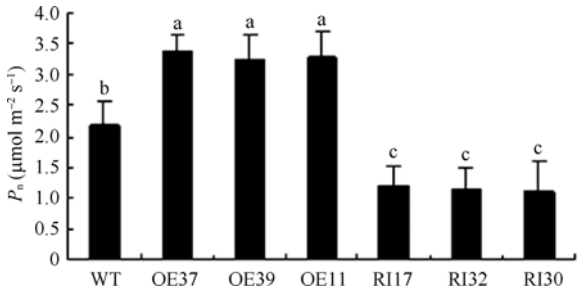

图 3 *OsBTF3* 转基因水稻株系叶片光合速率

Fig. 3 Net photosynthetic rate of transgenic rice lines with over-expressed and RNAi-silenced *OsBTF3* gene

图柱上不同字母表示样品之间的差异显著(P<5%)。

Bars superscribed by different letters are significantly different at 5% probability level among samples.

宽为 14.7 cm, 而 3 个 RNAi 株系为 11.8 cm, WT 为 14.1 cm (图 4-B)。说明 *OsBTF3* 基因增量表达增加了水稻旗叶面积, 而减量表达则作用相反。

扫描电镜观察表明, 与 WT 相比, OE37 和 RI30 叶片乳突密度加大, 气孔变小, 气孔沿叶脉方向排列更紧密; 气孔平均长度为 WT (24.7 μm) > RI30 (23.3 μm) > OE37 (21.1 μm) (图 5)。说明 *OsBTF3* 基因增量或减量表达均影响水稻叶片乳突密度和气孔大小。

3.4 *OsBTF3* 转基因株系的株型发育

OE 株系生长旺盛, 株型高大, 在成熟期平均株高达 82.2 cm, 比 WT (79 cm)高 12.2 cm; 而 RI 株系严重矮化、叶片披散, 生长较弱, 平均株高只有 61.3 cm, 比 WT 矮 9 cm (图 6)。说明 *OsBTF3* 基因增量表达可以促进水稻生长和株型发育, 而减量表达则作用相反。

WT、OE37 及RI30 株系的茎节间(I_1、I_2、I_3和I_4)数量基本相同, OE37 各茎节间均长于WT, 其中I_4增长最显著; RI30 I_1长度大于WT, 而I_2、I_3和I_4长度小于WT, 其I_1占总节间长的比例为 49%, 明显高于WT和OE37, 说明RI株系的矮化主要是I_2、I_3和I_4节间变短所致(图 7)。说

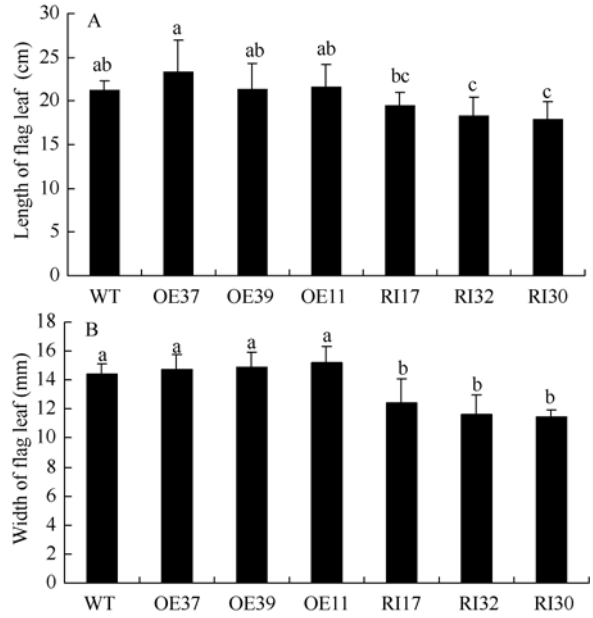

图 4 *OsBTF3* 转基因水稻株系的旗叶长度(A)和宽度(B)

Fig. 4 Flag leaf size of transgenic rice lines with over-expressed and RNAi-silenced *OsBTF3* gene

图柱上不同字母表示样品之间的差异显著(P<5%)。

Bars superscribed by different letters are significantly different at 5% probability level among samples.

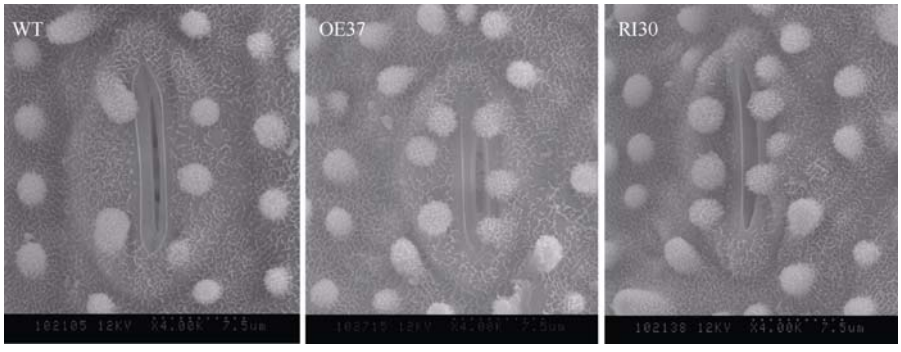

图 5 *OsBTF3* 转基因水稻株系叶片表面结构

Fig. 5 Leaf surface structure of transgenic rice lines with over-expressed and RNAi-silenced *OsBTF3* gene

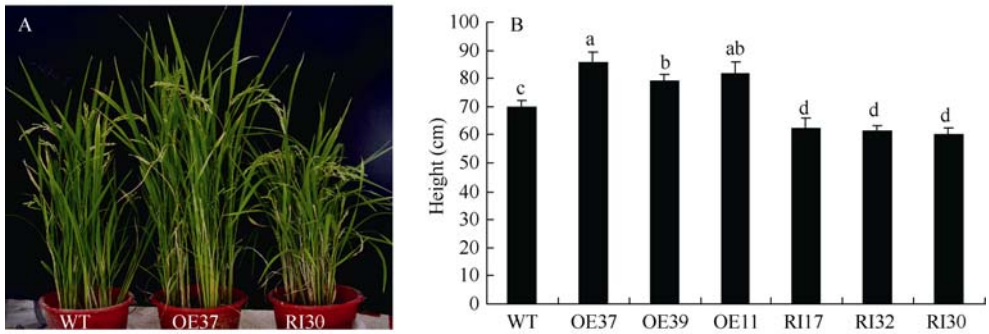

图 6　***OsBTF3*** **转基因水稻株系植株长势(A)和株高(B)**

Fig. 6　Plant growth (A) and height (B) of transgenic rice lines with over-expressed and RNAi-silenced *OsBTF3* gene

B 图柱上不同字母表示样品之间的差异显著(P<5%)。

Bars superscribed by different letters are significantly different at 5% probability level among samples in Figure B.

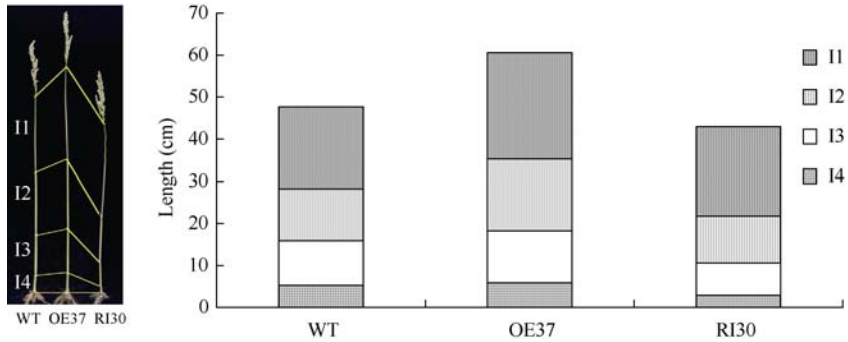

图 7　***OsBTF3*** **转基因水稻株系植株节间长**

Fig. 7　Length of stem internodes of transgenic rice lines with over-expressed and RNAi-silenced *OsBTF3* gene

明 *OsBTF3* 基因对株高的影响在茎节间发育早期更为明显。

3　讨论

本研究发现OE株系叶绿素含量、叶绿体数量和净光合速率明显高于WT，而RNAi株系明显降低，这些光合因子的变化直接导致光合作用的差异。*OsBTF3* 过量表达可以促进水稻叶片的光合作用。RNAi株系叶绿素含量、叶绿体数量的变化与烟草中的研究结果相似[9]，说明植物BTF3 活性的丧失可能是通过阻碍新生蛋白进入细胞器，而影响叶绿体的发育及其生理学功能。此外，本实验室在后续研究中还发现，*OsBTF3* 过量表达对穗长、穗粒数、千粒重等籽粒性状具有强烈的促进作用(待发表资料)，这可能是OE株系光合作用增强所致。

本研究发现*OsBTF3* 基因沉默导致水稻植株叶片生长和株型发育受到显著影响，RNAi株系植株普遍比较矮小，叶片披散，生长较弱。这一结果与前人有关*BTF3* 基因突变具有致死效应或生长发育不良[4-7]的研究结果相吻合。本研究还发现，*OsBTF3* 过量表达株系植株高大，生长旺盛，表明该基因增量表达对水稻植株整体生长发育具有显著的促进作用。

References

[1] Zheng X M, Moncollin V, Egly J M, Chambon P. A general transcription factor forms a stable complex with RNA polymerase B (II). *Cell*, 1987, 50: 361–368

[2] Wiedmann B, Sakai H, Davis T A, Wiedmann M. A protein complex required for signal-sequence-specific sorting and translocation. *Nature*, 1994, 370: 434–440

[3] Lauring B, Kreibich G, Wiedmann M. The intrinsic ability of ribosomes to bind to endoplasmic reticulum membranes is regulated by signal recognition particle and nascent polypeptide-associated complex. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995, 92: 9435–9439

[4] Yang K S, Kim H S, Jin U H, Lee S S, Park J A, Lim Y P, Pai H S. Silencing of *NbBTF3* results in developmental defects and disturbed gene expression in chloroplasts and mitochondria of higher plants. *Planta*, 2007, 225: 1459–1469

[5] Möller I, Beatrix B, Kreibich G, Sakaic H, Lauringa B, Wiedmann M. Unregulated exposure of the ribosomal M-site caused by NAC depletion results in delivery of non-secretory polypeptides to the Sec61 complex. *FEBS Lett*, 1998, 441: 1–5

[6] Deng J M, Behringer R R. An insertional mutation in the BTF3 transcription factor gene leads to an early postimplantation lethality in mice. *Transgenic Res*, 1995, 4: 264–269

[7] Bloss T A, Witze E S, Rothman J H. Suppression of CED-3-independent apoptosis by mitochondrial beta-NAC in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 2003, 424: 1066–1071

[8] Cooper B, Hutchison D, Park S, Guimil S, Luginbühl P, Ellero C, Goff S A, Glazbrook J. Identification of rice (*Oryza sativa*) proteins linked to the cyclin-mediated regulation of the cell cycle. *Plant Mol Biol*, 2003, 53: 273–279

[9] Freire M A. Translation initiation factor (iso) 4E interacts with BTF3, the β subunit of the nascent polypeptide-associated complex. *Gene*, 2005, 345: 271–277

[10] Wu M-S(吴茂森), Tian F(田峰), Qi F-J(齐放军), He C-Y(何晨阳). cDNA-AFLP analysis of gene expression response to *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* and identification of genes expressed differentially during this compatible interaction in rice suspension cultured cells. *Sci Agric Sin* (中国农业科学), 2007, 40(2): 277–282 (in Chinese with English abstract)

[11] Li G-X(李广旭), Wu M-S(吴茂森), Wu J(吴静), He C-Y(何晨阳). Molecular characterization and expression of *OsBTF3*, a rice gene up-regulated by *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. *Sci Agric Sin* (中国农业科学), 2009, 42(7): 2608–2614 (in Chinese with English abstract)

[12] Li G-X(李广旭), Wu M-S(吴茂森), He C-Y(何晨阳). Gene expression response of transcription factor OsBTF3 in rice to bacterial and fungal infection and signal molecule treatment revealed by quantitative real-time PCR analysis. *Acta Phytopathol Sin* (植物病理学报), 2009, 39(3): 272–277 (in Chinese with English abstract)

[13] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. Molecular Cloning: a Laboratory Manual, 2nd edn. Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989

[14] 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: 402–408

[15] Arnon D I. Copper enzymes in isolated chloroplasts: polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. *Plant Physiol*, 1949, 24: 1–15

[16] Sato Y, Sentoku N, Miura Y. Loss-of-function mutations in the rice homeobox gene *OSH15* affect the architecture of internodes resulting in dwarf plants. *EMBO J*, 1999, 18: 992–1002

[17] Ogi Y. The effects on culm and other agronomic characters caused by semi-dwarfing genes at the sd-locus in rice. *Jpn J Breed*, 1993, 43: 267–275