

DOI: 10.11931/guihaia.gxzw202110029

李斌, 李明玉, 杜志焯, 等. 环境变化对水稻 *osfh1* 突变体成蛋白家族表达的影响 [J]. 广西植物, 2022, 42(11): 1811–1821.

LI B, LI MY, DU ZY, et al. Environment change effects on the expression level of *Formins* in rice *osfh1* mutant [J]. *Guihaia*, 2022, 42(11): 1811–1821.



环境变化对水稻 *osfh1* 突变体成蛋白家族表达的影响

李斌¹, 李明玉¹, 杜志焯¹, 汪开顺¹, 肖凯¹, 王鑫¹,
石杨¹, 姬红丽², 陈稷³, 黄进^{1*}

(1. 成都理工大学 生态环境学院, 成都 610059; 2. 四川省农业科学院 植物保护研究所, 成都 610066; 3. 四川农业大学 农学院, 成都 611130)

摘要: 水稻成蛋白基因成员 *OsFH1* 在水稻根毛的生长发育中起着关键作用, 这一过程受到环境因素的调控, 当前的研究对环境因素如何与 *OsFH1* 互作调控水稻根毛的机制尚未阐明。为探索水稻成蛋白成员是否在环境因素介导的 *osfh1* 突变体根毛表型恢复中发挥作用, 该研究使用 1/2 MS 液体培养液与 1/2 MS 固体培养基处理 *osfh1* 突变体, 通过 qRT-PCR 技术分析成蛋白家族成员表达量, 并对成蛋白家族进行生物信息学分析。结果表明: (1) 与野生型相比, 在液培中 *osfh1* 突变体主根根毛缺失, 地上部分较短, 侧根数量增加, 在固体培养中 *osfh1* 突变体根毛缺失表型得到恢复。(2) 与野生型相比, 当 *osfh1* 突变体从液培到固培环境时, *OsFH16* 表达量下降, *OsFH17* 表达量上升, 并且差异显著。(3) *OsFH1*、*OsFH16*、*OsFH17* 都是第一类成蛋白亚家族成员, 都具有生长素、赤霉素以及厌氧等与环境胁迫相关顺式作用元件, 并且预测到 *OsFH1*、*OsFH16* 和 *OsFH17* 定位于质膜行使功能。(4) *OsFHs* 在不同组织的表达模式分析表明, *OsFH1* 在根部表达水平较高, 而 *OsFH16*、*OsFH17* 在根部表达量相对较低。综上认为, 由于 *OsFH16*、*OsFH17*、*OsFH1* 之间亲缘关系较高, 调控模式相近且三者都可能在细胞质膜上行使功能, 因此 *OsFH16*、*OsFH17* 可能参与环境因素与 *osfh1* 共同改变根毛表型这一过程。该研究结果为解析环境与 *osfh1* 基因共同调控水稻根毛发育机制奠定了一定理论基础, 为探索植物成蛋白基因功能提出了新方向。

关键词: 成蛋白, *OsFH1*, 根毛, qRT-PCR, 水稻, 生物信息分析

中图分类号: Q943 文献标识码: A 文章编号: 1000-3142(2022)11-1811-11

Environment change effects on the expression level of *Formins* in rice *osfh1* mutant

LI Bin¹, LI Mingyu¹, DU Zhiye¹, WANG Kaishun¹, XIAO Kai¹, WANG Xin¹,
SHI Yang¹, JI Hongli², CHEN Ji³, HUANG Jin^{1*}

(1. College of Ecology and Environment, Chengdu University of Technology, Chengdu 610059, China; 2. Institute of Plant Protection, Sichuan Academy of Agricultural sciences, Chengdu 610066, China; 3. College of Agronomy, Sichuan Agricultural University, Chengdu 611130, China)

收稿日期: 2022-03-28

基金项目: 国家自然科学基金(31870383); 四川省青年科技基金(2017JQ0004) [Supported by National Natural Science Foundation of China(31870383); Fund of Sichuan Youth Science and Technology (2017JQ0004)]。

第一作者: 李斌(1994-), 硕士研究生, 研究方向为分子遗传, (E-mail) libin@stu.cdut.edu.cn。

*通信作者: 黄进, 博士, 研究员, 研究方向为分子遗传, (E-mail) huangjin18@cdut.edu.cn。

Abstract: *Oryza sativa* formin homology 1 (*OsFH1*) plays a crucial role in rice root-hair growth and development, and the short root-hair phenotype of *osfh1* was changed by environmental factors. However, the mechanism of how environmental factors interact with *OsFH1* to regulate rice root-hair phenotype is still unknown. To determine whether *OsFHs* function in the process of *osfh1* mutant root-hair phenotype recovery. The expression of *OsFHs* was analyzed by qRT-PCR in the *osfh1* mutant treated under 1/2 MS liquid culture and 1/2 MS solid culture. Furthermore, qRT-PCR results were compared with bioinformatics analysis results. The results were as follows: (1) When compared with the wild type, *osfh1* primary root showed a no root-hair. The *osfh1* mutant showed a shorter shoot and more lateral roots. However, the no root-hair phenotype of *osfh1* recovered under 1/2 MS solid culture treatment. (2) The expression of *OsFH16* decreased and the expression of *OsFH17* increased in the *osfh1* mutant from liquid culture treatment to solid culture treatment with significant differences. (3) *OsFH1*, *OsFH16* and *OsFH17* all belonged to the Type II subfamily, and all had *cis*-acting elements related to environmental stress, such as auxin, gibberellin, and anaerobic. *OsFH1*, *OsFH16*, and *OsFH17* may be located in the plasma membrane to perform functions. (4) Analysis of the tissue-specific expression pattern of *OsFHs* showed that *OsFH1* was highly expressed in the roots, while *OsFH16* and *OsFH17* were lowly expressed in the roots. In conclusion, this study suggests that *OsFH1*, *OsFH16*, *OsFH17* have conservative structures and similar regulatory modes, and all three may function on the cell plasma membrane, therefore, *OsFH16*, *OsFH17* may be involved in the process that environmental factors and *osfh1* together alter the root-hair phenotype. Overall, this study lays a theoretical foundation for the mechanism research of environmental factors and *osfh1* gene co-regulation of rice root-hair development and proposes a new direction for exploring the function of plant formin genes.

Key words: formin, *OsFH1*, root-hair, qRT-PCR, rice, bioinformatic analysis

成蛋白 (formin) 是动植物细胞形态变化的关键调控因子 (Shimada et al., 2004; Xu et al., 2004)。微生物和动物成蛋白的结构通常包括 FH1 (formin homology 1)、FH2 (formin homology 2)、FH3 (formin homology 3)、GBD (GTPase binding domain)、DID (diaphanous inhibitory domain)、DAD (diaphanous auto-regulatory domain) 等 (Janni et al., 1998; Peter & Magdalena, 2013)。其中, FH2 蛋白结构域是成蛋白行使功能的关键结构域, 也是确定蛋白是否为成蛋白的主要依据 (Janni et al., 1998; Peter & Magdalena, 2013)。在动植物中的研究表明, 成蛋白通过聚合肌动蛋白单体影响微丝微管、细胞骨架的动态调控, 从而调控细胞分裂以及细胞的极性生长 (Shimada et al., 2004; Xu et al., 2004)。近年来的研究表明, 当酿酒酵母 *Bnip1* 和 *Bud6* 基因共同突变时, 酵母对高温敏感; 而当 *Bnip1* 单突变时, 会降低酵母氮源利用率和对过氧化氢敏感性 (Graziano et al., 2013; Juanes & Piatti, 2016)。这些结果表明成蛋白不仅参与细胞正常的生长发育以及其形态的变化, 也有可能参与酵母抵抗外界环境胁迫。

成蛋白通过介导肌动蛋白调控细胞形态, 如小立碗藓 II 类成蛋白突变后, 细胞肌动蛋白结构

以及细胞极性生长被破坏, 导致其无法伸长生长 (Luis & Magdalena, 2012)。拟南芥 *AtFH8* 的过表达促进根毛细胞的伸长生长, 而其突变体却抑制了根毛的发育 (Yi et al., 2005; Pei et al., 2012)。水稻 *OsFH5* 促使 G-actin 单体或 Actin/ Profilin 配合物形成的肌动蛋白聚合成核, 调控植物形态变化 (Yang et al., 2011)。此外, *OsFH15* 还参与调控水稻籽粒的生长发育 (Sun et al., 2017)。植物的生长发育同时受到遗传因素和外界环境的共同调控, 如课题组前期研究中发现, 水稻成蛋白基因 *OsFH1* 可能通过调控极性生长参与水稻根毛伸长调控。在不同的培养条件下 (固体培养基表面或者水培), *OsFH1* 的突变体有不同的表型, 在固体培养基的表面, 即使在 *OsFH1* 基因缺失的情况下, 突变体也可长出正常的根毛 (Huang et al., 2013)。由此可知, 某种未知的环境因素可能通过某个信号通路可弥补 *OsFH1* 的缺陷造成的根毛极性生长, 即水稻成蛋白基因 *OsFH1* 与环境因素共同调控水稻根毛的极性生长。在这个过程中, 外界环境是通过改变哪些基因或者信号通路补偿 *OsFH1* 基因的缺失以实现水稻根毛的正常生长仍有待探索和验证。结构相似的蛋白之间可能存在功能代偿情况, 一个基因功能丧失导致植物或动

物生长发育出现的缺陷被其他基因弥补一部分,如莱氏野村菌过氧化氢酶超家族基因 *NrCat1* 和 *NrCat4*,单独敲除一个基因会引起另一个基因表达上调,代偿其功能缺失,而当两个基因同时突变则影响莱氏野村菌的抗逆性(苏宇,2018)。植物通过其肽配体 CLAVATA3 (CLV3) 及其受体蛋白激酶 CLAVATA1 (CLV1) 构成高度保守的负反馈信号通路维持其干细胞稳态(Cara et al., 2016)。在拟南芥中,当 CLV1 缺失后,其旁系同源物 BARELY ANY MERISTEM (BAM) 表达量增加以补偿 CLV1 的丢失造成的表型缺陷(Diss et al., 2014; Nimchuk et al., 2015)。Fatima 等(2004)以及课题组未发表数据表明,水稻成蛋白家族共有 17 个成员,并且大部分成员的结构保守性很高,即它们在功能上可能也具有较高的相似性。因此,为探究在固体培养条件下,*osfh1* 突变体根毛生长的恢复是否有可能是由其他水稻成蛋白基因表达产生的代偿作用来实现的,本研究在 1/2 MS 固体培养(固培)和 1/2 MS 液体培养基(液培)条件下,分别处理水稻 *osfh1* 突变体,并以野生型植株作为对照,对成蛋白家族成员的表达量进行分析。此外,通过对水稻成蛋白基因家族进行生物信息学分析,预测水稻成蛋白家族成员可能的功能,对潜在的代偿基因功能进行进一步探索。

1 材料与amp;方法

1.1 材料

所采用的植物材料为水稻 T-DNA 插入突变体 *osfh1* (*PGF-1A-08638*) 及对应的野生型水稻。

1.2 材料处理

首先,使用 0.1% 咪鲜胺浸泡消毒 *osfh1* 突变体和野生型水稻种子 8 h,在无光条件下进行萌芽 36 h (37 °C);挑选萌芽成功种子培养 5 d 后取样,条件为 26 °C 恒温,16 h 光照 8 h 无光循环处理。然后,使用 70% 乙醇对去皮的 *osfh1* 突变体以及野生型种子进行消毒,每次消毒 1 min,重复 2 次。最后,将消毒后的种子加入 2% 有效次氯酸钠于摇床上消毒 30 min (37 °C, 60 r · min⁻¹) 后进行清洗;将消毒完成后的种子置于 1/2 MS (Murashige and Smoking culture medium) 培养基中培养 5 d 后取样,条件为 26 °C 恒温,16 h 光照 8 h 无光循环处理。

1.3 根毛表型观察

利用 Nikon 显微镜和 Imaging View 显微成像系统拍摄,采用 Image J 测量根毛数据,利用 Microsoft Office Excel 进行数据计算和数理统计等。

1.4 生物信息分析

通过 TAIR (<https://www.arabidopsis.org/>) 获取拟南芥 AtFHs 蛋白序列,使用 EnsemblPlant 数据库 (<http://plants.ensembl.org/index.html>) 下载水稻蛋白组序列。以拟南芥 AtFHs 作为参考序列使用 TBtools v1.089 在水稻基因组中比对鉴定水稻成蛋白基因家族。通过 MEGA.7 的 ClustalW 算法比对氨基酸水平的保守性,并通过邻接法构建系统进化树,Bootstrap 值设为 1 000。成蛋白结构域以及其功能通过 NCBI CDD 进行分析 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/bwrpsb/bwrpsb.cgi>)。成蛋白基序的保守性通过 MEME-Suit 进行分析 (<https://meme-suite.org/meme/>)。通过 Rice Genome Annotation Project (<http://rice.plantbiology.msu.edu/index.shtml>) 获得成蛋白基因家族上游序列,通过 PlantCARE (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>) 网站分析启动子顺式作用元件。在 MultiLoc2 (<http://abi.inf.uni-tuebingen.de/Services/MultiLoc2>) 网站上传水稻成蛋白 Loc number 预测水稻成蛋白亚细胞表达;通过 The Rice Annotation Project (RAP) (<https://rapdb.dna.affrc.go.jp/>) 数据库获取水稻成蛋白染色体、氨基酸残基分子量、蛋白分子量、等电点、蛋白亲水性等相关信息;通过 RiceXPro 数据库 (<https://ricexpro.dna.affrc.go.jp/>) 获得水稻成蛋白组织表达(根、种子、叶、地上部分、花药、穗、雌蕊、愈伤组织)数据;制图均采用 TBtools 软件。

1.5 基因表达分析

采用艾德莱生物技术有限公司 EASYspin plus 植物 RNA 提取试剂盒提取固培以及液培处理的野生型和 *osfh1* 突变体根系组织总 RNA。分别取 1 μg 的根系组织的总 RNA,通过 Thermo 反转录试剂盒合成第 1 链 cDNA,并稀释 20 倍备用。本实验室引物全部为自行设计并交由擎科生物科技有限公司进行引物合成(表 1)。qRT-PCR 扩增在德国耶拿 qTOWER3G 上进行,以不同处理的根部组织逆转录的 cDNA 为模板,利用水稻成蛋白的特异引物对成蛋白进行扩增;并以 *Ubiquitin* 作为内参基因,正向引物为 5'-ATCACGCYGGAGGTGGAGT-

3', 反向引物为 5'-AGGCCTTCTGGTTGTAGACG-3'。扩增的总反应体系为 10 μL , 其中含有 $2 \times \text{SYBR Green 5 } \mu\text{L}$ 、 $2.5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 正向引物 1 μL 、 $2.5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 反向引物 1 μL 、模板 cDNA 3 μL , 设 3 次重复。扩增基因的反应循环数为 40 个, PCR 条件: $95 \text{ }^\circ\text{C}$ 下预变性 2 min, $95 \text{ }^\circ\text{C}$ 下变性 15 s, $55 \text{ }^\circ\text{C}$ 下退火 15 s, $72 \text{ }^\circ\text{C}$ 下延伸 20 s。通过 qPCR soft 4.0 软件对数据进行分析。

2 结果与分析

2.1 水稻 *osfh1* 突变体表型

以水稻 *osfh1* 突变体以及野生型植株进行固培和液培处理观察水稻主根根毛表型发现, *osfh1* 突变体地上部分长度比野生型短, 并且在固体培养处理后野生型和突变体都有一定伸长 (图 1: A-B)。*osfh1* 突变体主根较野生型长, 且在固体培养处理后野生型和 *osfh1* 突变体主根根长都有一定增加 (图 1: C-D)。*osfh1* 突变体主根在 1/2 MS 液体培养条件下无根毛, 当突变体在 1/2 MS 固体培养基上生长时, 主根根毛表型得到一定恢复且差异显著 (图 1: E-F)。这表明 *OsFH1* 基因参与水稻生长发育的调控, 在主根根毛的生长发育中具有关键作用, 并且 *osfh1* 突变体在不同环境下表型发生改变表明环境因素通过与 *OsFH1* 基因的突变共同作用改变水稻主根根毛表型。此外, 液培处理下的 *osfh1* 侧根数量和长度均有增加。

2.2 qRT-PCR 分析不同环境下野生型和 *osfh1* 突变体成蛋白家族基因成员表达量变化

研究认为, 结构高度相似的蛋白可能行使类似的功能, 而同一家族成员结构功能往往类似 (苏宇, 2018; Nimchuk et al., 2015)。因此, 成蛋白家族其他成员很可能在不同环境因素处理下 *osfh1* 根毛表型恢复的过程中行使一定功能。鉴于此, 本研究使用 qRT-PCR 技术对固培液培处理下的野生型以及 *osfh1* 突变体根部的成蛋白家族成员基因表达进行分析。

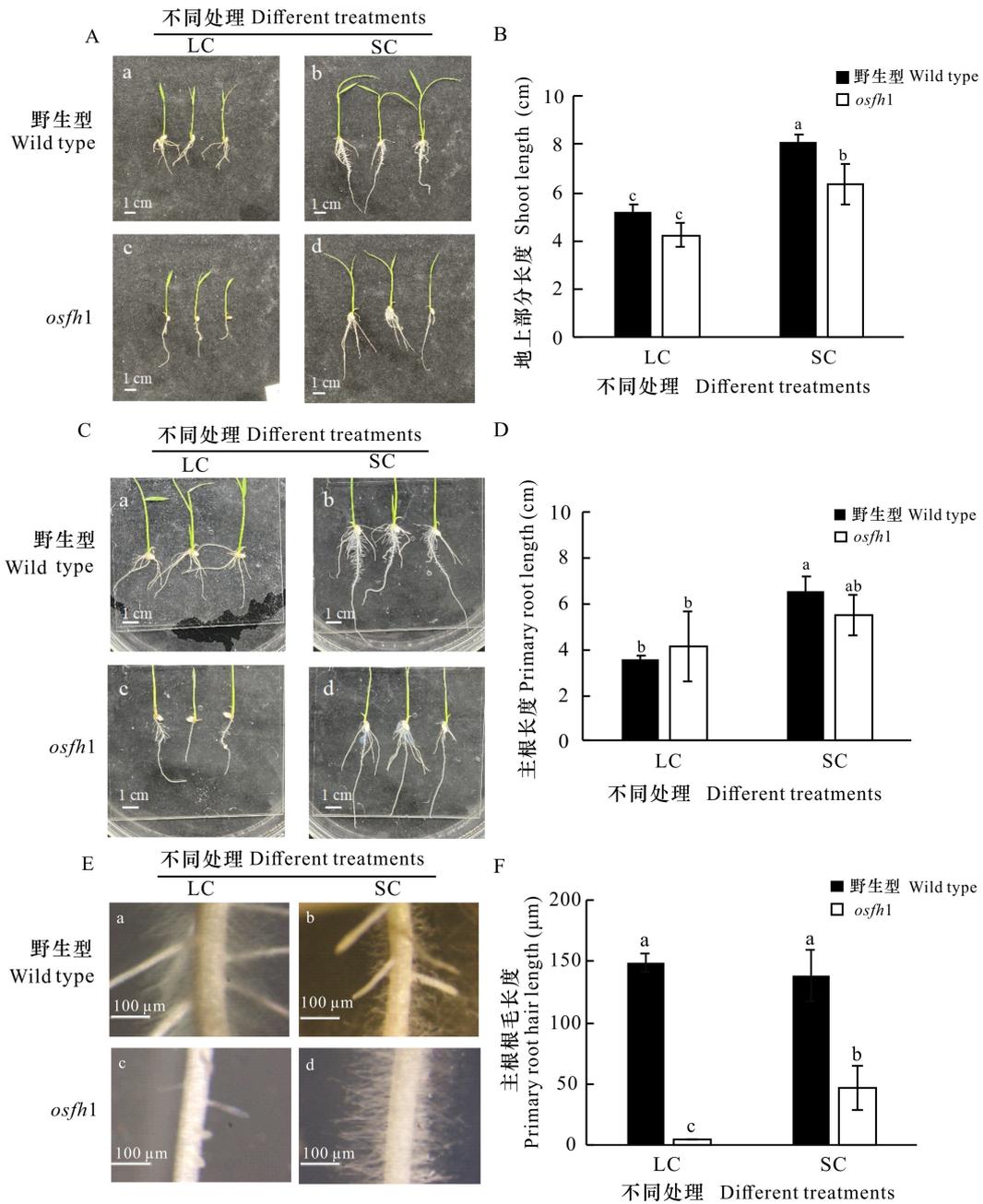
从图 2 可以看出, 当培养条件由液培到固培中时, *osfh1* 突变体中的 *OsFH3*、*OsFH5*、*OsFH8*、*OsFH10*、*OsFH11*、*OsFH13*、*OsFH17* 表达量上调, *OsFH1*、*OsFH2*、*OsFH4*、*OsFH12*、*OsFH14*、*OsFH16* 表达量下调, 而 *OsFH6*、*OsFH7*、*OsFH9* 表达量无变化。其中, *OsFH16* 在突变体中表达量大幅度下调,

表 1 水稻成蛋白家族 qRT-PCR 引物设计
Table 1 qRT-PCR primer design of *OsFHs* in rice

基因名称 Gene name	基因 ID Gene ID	引物方向 Primer direction	引物序列 Primer sequence
<i>OsFH1</i>	Os01g0897700	Primer-F	CCCAATGATGCCACAGTTG
		Primer-R	TCAAGGTGATGATGCTGAAG
<i>OsFH2</i>	Os04g0461800	Primer-F	CGCACCGAAACAGCAGAGCAG
		Primer-R	TCCATCATCTTCTCTGCCAGCC
<i>OsFH3</i>	Os10g0119300	Primer-F	TCCAAACTGAGACTGTTTGC
		Primer-R	CTTGTTGTTTCTAGCTCGAG
<i>OsFH4</i>	Os10g0347800	Primer-F	GACCTTAGTAAAGATGGCTC
		Primer-R	CATTCTGTTCCCTGTCCTC
<i>OsFH5</i>	Os07g0596300	Primer-F	CGCTCTCCCGAAATTTCTCC
		Primer-R	AGTAATCCCTGTACTCATCTCC
<i>OsFH6</i>	Os08g0280200	Primer-F	TCTGTCAAAGTTCAAGTGCCG
		Primer-R	GGGATGGAAATGATGAAAGGTC
<i>OsFH7</i>	Os02g0794900	Primer-F	TCAAGAAACCCGCCGATGG
		Primer-R	CTGCAACACCTCTTATGTGG
<i>OsFH8</i>	Os03g0204100	Primer-F	CAACAACGGGAGCAGCTCAATGGC
		Primer-R	TGGCGATGTTCTGCGCTTCTTGG
<i>OsFH9</i>	Os08g0431200	Primer-F	GCATTTCCAAGGATGGAGGT
		Primer-R	CTTCAATTCAGTGCAAGCTCC
<i>OsFH10</i>	Os02g0161100	Primer-F	CGCCATCTTTCTTGTGGACCAG
		Primer-R	TCCCGTGAATGACTCGATAAC
<i>OsFH11</i>	Os07g0545500	Primer-F	GCCTCATCTCTGTGCAGCTC
		Primer-R	CCAATCCACACTTGACCCATG
<i>OsFH12</i>	Os04g0245000	Primer-F	CTGGTTTCAGGCTTGTCTCCC
		Primer-R	GCCAACCGCTTTCTCACAATG
<i>OsFH13</i>	Os07g0588200	Primer-F	TGCGCTTCGAGAGATGGATG
		Primer-R	TCCGATGATCTCTTAACCACC
<i>OsFH14</i>	Os05g0104000	Primer-F	AGGGAGGTGTGCTTACTGG
		Primer-R	TAAGCTCTCTCATTTGGTG
<i>OsFH15</i>	Os09g0517600	Primer-F	TGCAACCAGGAGAACAAGGTC
		Primer-R	CGCAAATGGTATCGCAAGCAC
<i>OsFH16</i>	Os02g0739100	Primer-F	GCAGGCAATCGGATGAATGC
		Primer-R	ATGGACCCTGACTTGTGGAG
<i>OsFH17</i>	Os04g0100300	Primer-F	CGCCATTCAAGAAGCTCGCC
		Primer-R	TTTGGATGGCACTAACTTTGT

调, 并且与野生型中 *OsFH16* 和 *OsFH17* 的表达趋势相反, 因此 *OsFH16*、*OsFH17* 极有可能参与环境表明其可能受到 *OsFH1* 的调控; 而 *OsFH17* 大幅度上与 *osfh1* 突变体互作改变根毛表型这一过程。

通过比较固培环境与液培环境处理下 *osfh1* 和野生型根部的 *OsFHs* 表达量, 进一步分析了不同环境处理下 *OsFHs* 表达趋势, 结果见图 3。从图 3 可以看出, 从水培到固培中野生型以及 *osfh1* 体内 *OsFH3*、*OsFH5*、*OsFH7*、*OsFH10*、*OsFH11*、*OsFH13*、*OsFH15* 表达趋势一致都呈上升趋势,



A. 野生型和 *osfh1* 突变体地上部分的表型；B. 野生型和 *osfh1* 突变体地上部分长度柱形图；C. 野生型和 *osfh1* 突变体根部的表型；D. 野生型和 *osfh1* 突变体主根长度柱形图；E. 野生型和 *osfh1* 突变体主根根毛的表型；F. 野生型和 *osfh1* 突变体主根根毛长度柱形图。LC. 1/2MS 液体培养；SC. 1/2MS 固体培养 ($P < 0.05$)。下同。

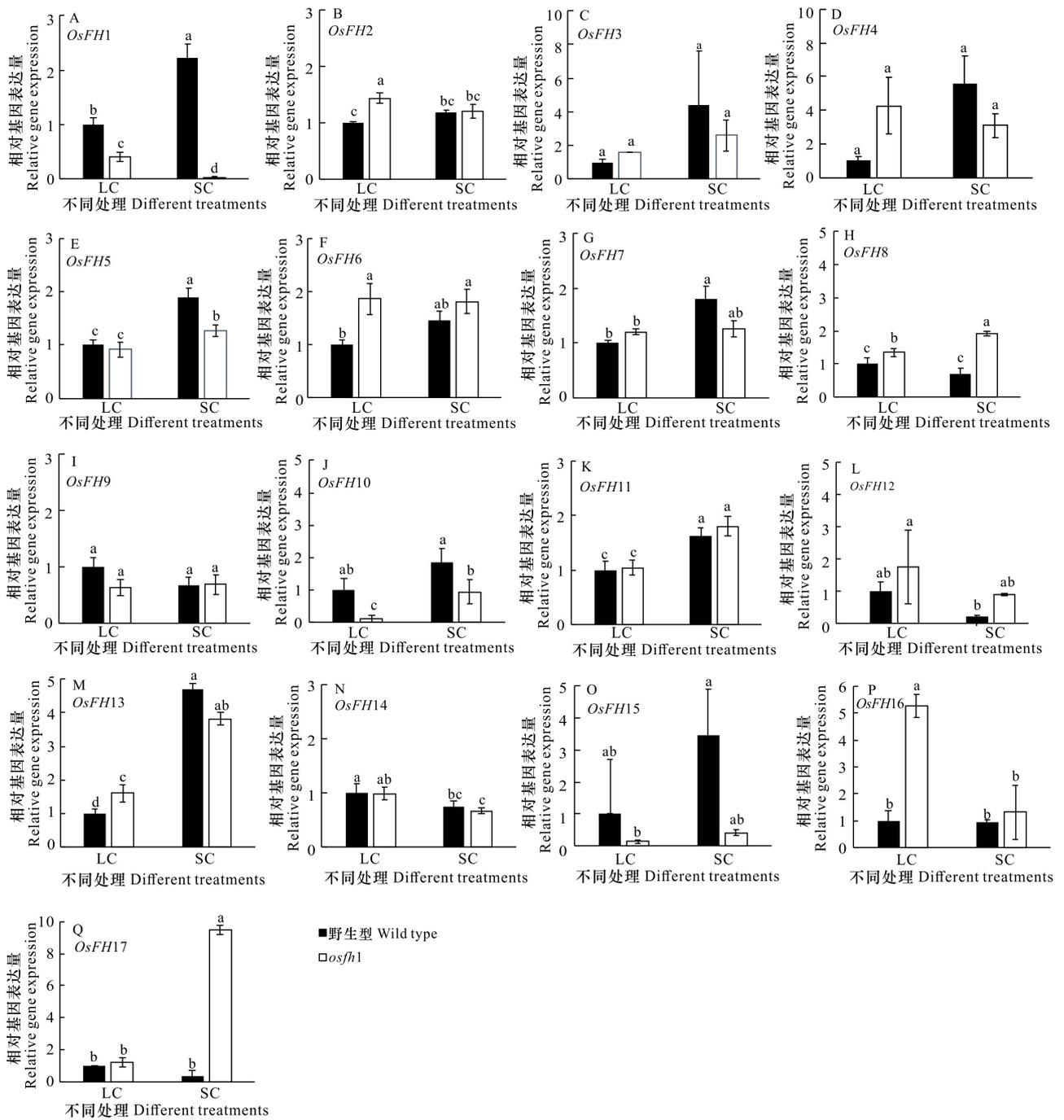
A. Phenotypes of the aerial parts of wild type and *osfh1* mutants; B. Length bar graphs of aerial parts of wild type and *osfh1* mutants; C. Phenotypes of wild type and *osfh1* mutant roots; D. Bar graph of wild type and *osfh1* mutant taproot lengths; E. Phenotypes of taproot root-hairs of wild type and *osfh1* mutants; F. Length bar graphs wild type and *osfh1* mutant taproot root hair lengths; LC. 1/2MS liquid culture; SC. 1/2MS solid culture ($P < 0.05$). The same below.

图 1 水稻野生型和 *osfh1* 突变体在不同处理下表型差异

Fig. 1 Phenotypic difference of wild-type rice and *osfh1* mutants under different treatments

OsFH12、*OsFH14*、*OsFH16* 都呈下降趋势，而 *OsFH1*、*OsFH2*、*OsFH4*、*OsFH8*、*OsFH9*、*OsFH17* 表达趋势相

反。其中，*osfh1* 突变体中 *OsFH10*、*OsFH15* 表达量虽然大幅度增加，但其表达量趋势与野生型一致，



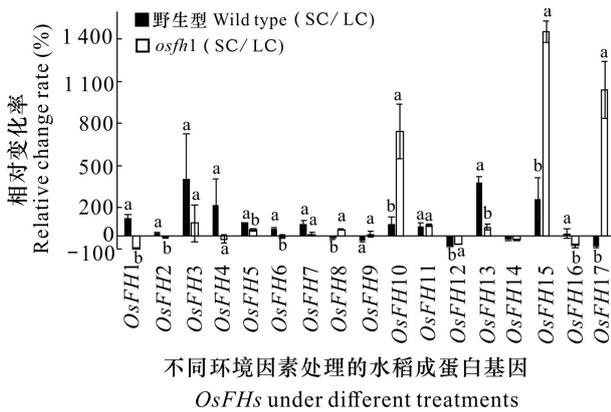
A-Q 分别是野生型和 *osfh1* 根部 *OsFHs* 家族的表达量。小写字母表示不同处理下野生型和 *osfh1* 之间差异显著性 ($P < 0.05$)。下同。

A-Q are the expression levels of wild-type and *osfh1* root *OsFHs* respectively. lowercases indicate the significant differences between wild-type and *osfh1* under different treatments ($P < 0.05$). The same below.

图 2 不同处理下 *osfh1* 突变体与野生型 *OsFHs* 基因家族表量变化
 Fig. 2 *OsFHs* expression changes between WT and *osfh1* under different treatments

并且表达量低于野生型。野生型中 *OsFH16* 表达量无变化,但在 *osfh1* 突变体中大幅度下降。野生型和

突变体中 *OsFH17* 表达趋势相反,*osfh1* 中 *OsFH17* 表达急剧上升,并且差异显著。



相对变化率为 *osfh1* 和野生型根部 *OsFHs* 家族在 1/2 MS 固体培养(SC) 处理下的表达量比上 1/2 MS 液体培养(LC) 处理下的表达量的比值。
Relative change rate is the *OsFHs* expressions of the *osfh1* mutant and wild-type root under 1/2 MS solid culture treatment (SC) compared to those under 1/2 MS liquid culture treatment (LC).

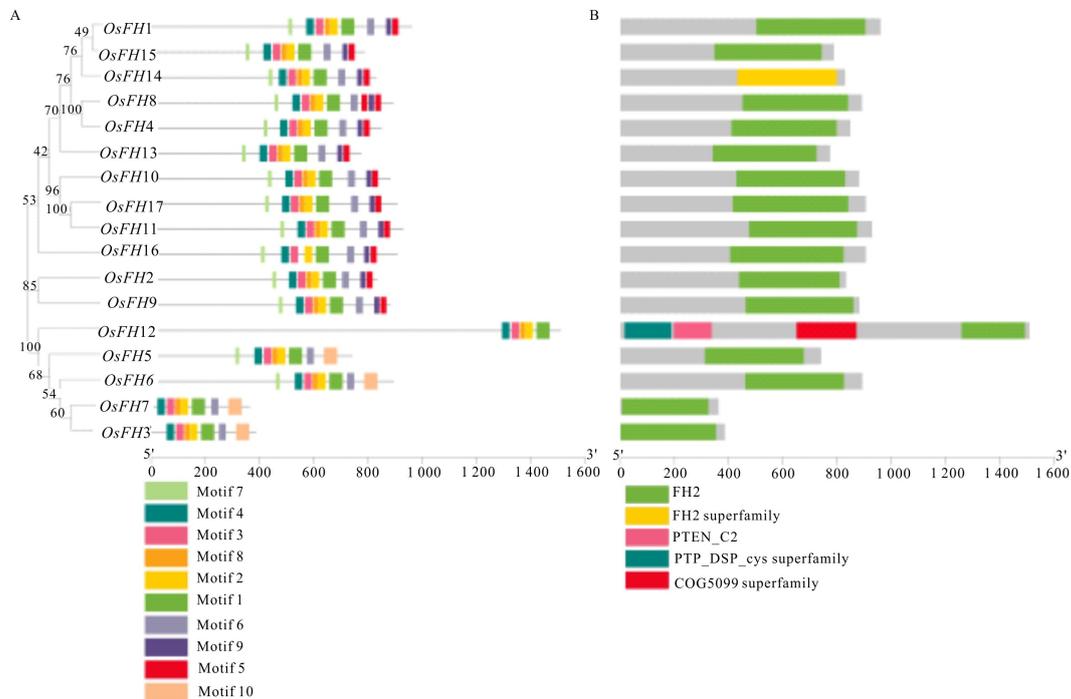
图 3 1/2 MS 固培和 1/2 MS 液培处理下 *OsFHs* 相对表达量分析(*osfh1* 与野生型相比较)

Fig. 3 Relative expression analysis of *OsFHs* under 1/2 MS solid and 1/2 MS liquid treatments (compared with the expression level in wild type)

2.3 水稻成蛋白生物信息分析

qRT-PCR 分析表明不同环境处理 *osfh1* 突变体导致其体内成蛋白基因家族 *OsFH16*、*OsFH17* 表达量被改变。基于代偿理论,我们认为 *OsFH16*、*OsFH17* 可能参与不同环境因素处理下 *osfh1* 表型恢复过程。通过生物信息学对水稻成蛋白的结构、功能可能受到的调控以及 *OsFH16* 和 *OsFH17* 是否可能参与根毛生长发育的调控和水稻成蛋白家族可能的功能进行了分析。

2.3.1 水稻成蛋白结构域预测、序列比对与进化分析 蛋白可能行使的功能与其蛋白的结构密切相关,因此基于课题组未发表数据鉴定的 17 个水稻成蛋白家族成员,分析其可能的功能,利用生物信息技术对水稻中成蛋白保守蛋白结构域以及基序进行了比较分析(图 4)。本研究结果表明,水稻成蛋白家族成员高度保守,且都具有 FH2 关键结构域,与 Fatima 等(2004)关于拟南芥以及早先水稻相关成蛋白的研究结果一致。水稻成蛋白可分为两个亚家族,即第一类亚家族(*OsFH1*、*OsFH2*、*OsFH4*、*OsFH8*、*OsFH9*、*OsFH10*、*OsFH11*、*OsFH13*、*OsFH14*、*OsFH15*、*OsFH16*、*OsFH17*) 和第二类亚家



A. *OsFHs* 家族系统进化树和保守基序分析; B. *OsFHs* 家族蛋白分析。

A. *OsFHs* family phylogenetic tree and conservative motif analysis; B. *OsFHs* family conservative protein analysis.

图 4 水稻成蛋白进化树、保守蛋白结构域以及保守基序分析

Fig. 4 Phylogenetic, conserved motif and protein domains analysis of *OsFHs* in rice

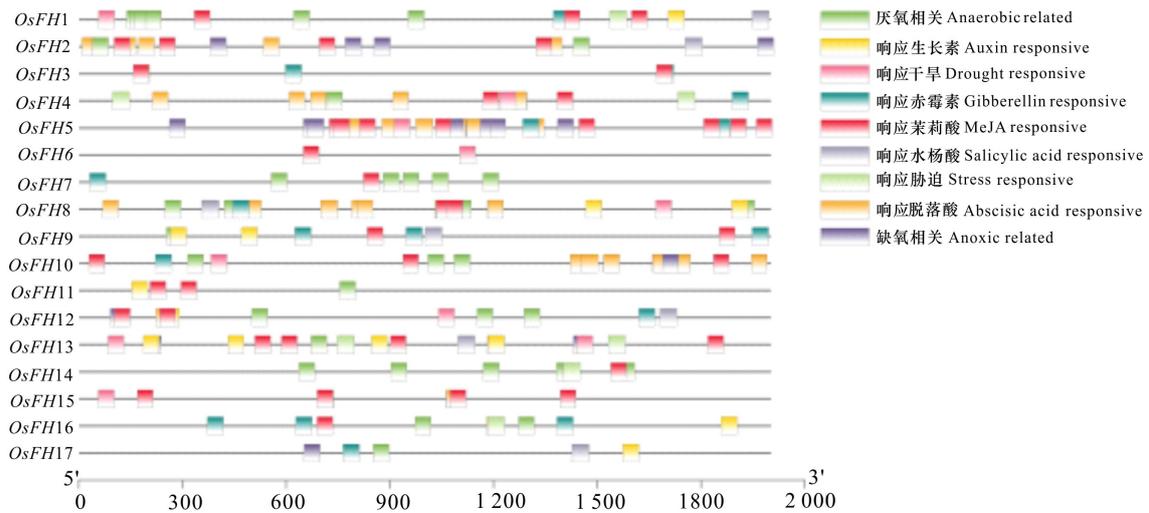


图 5 水稻成蛋白顺式作用元件预测

Fig. 5 *Cis*-acting elements predicted in the promoter regions of *OsFHs*

族 (*OsFH3*、*OsFH5*、*OsFH6*、*OsFH7*、*OsFH12*)。在水稻第二类亚家族中, *OsFH12* 还存在于植物领域中未阐明的结构域 PTEN。此外, 通过蛋白序列同源性分析也表明水稻成蛋白的 FH2 结构域在氨基酸水平上是保守的。与 *OsFH1* 亲缘关系最近的是 *OsFH15*, 而 *OsFH17* 与 *OsFH16* 与 *OsFH1* 亲缘关系较远。但是, 保守基序分析结果显示, 水稻成蛋白第一类亚家族基序保守性较高, 表明第一类亚家族成员的功能可能类似, 因此为了进一步分析水稻成蛋白可能存在的功能, 本研究对其顺式作用元件以及亚细胞定位进行分析。

2.3.2 水稻成蛋白顺式作用元件以及亚细胞定位分析 顺式作用元件分析表明成蛋白家族成员上游存在多个响应激素以及胁迫调控相关的元件 (图 5)。这些成蛋白成员中除 *OsFH17* 以外, 其他水稻成蛋白都可能受到茉莉酸调控, 而除了 *OsFH3*、*OsFH5* 和 *OsFH6* 以外其他水稻成蛋白成员都有厌氧调控相关的顺式作用元件。此外 *OsFH1*、*OsFH4*、*OsFH5*、*OsFH6*、*OsFH8*、*OsFH10*、*OsFH12*、*OsFH13*、*OsFH15* 都具有干旱响应元件。*OsFH1*、*OsFH8*、*OsFH9*、*OsFH11*、*OsFH13*、*OsFH15*、*OsFH16*、*OsFH17* 都具有生长素调控相关原件, 表明其可能参与生长素相关调控。

其中, *OsFH16*、*OsFH17*、*OsFH1* 都具有厌氧相关的顺式作用元件、赤霉素调控相关顺式作用元件以及生长素调控相关顺式作用元件。而研究表明水

稻根毛生长发育受到生长素以及赤霉素调控 (Maekawa et al., 2009; Wang et al., 2017)。在本实验中固培、水培环境变化也包括氧气含量的变化, 但当前并无相关研究。因此, 环境变化改变根毛表型可能是通过生长素以及赤霉素相关信号通路调控, 而养分含量也可能作为环境因素参与调控。

亚细胞定位表明 *OsFH1*、*OsFH4*、*OsFH6*、*OsFH7*、*OsFH9* 定位于细胞液中, *OsFH2* 定位于胞外, 而 *OsFH4*、*OsFH5*、*OsFH6* 定位于质体, 并且 *OsFH4* 可能在细胞核内起着一定作用。此外, *OsFH8*、*OsFH11*、*OsFH12*、*OsFH13*、*OsFH14*、*OsFH15*、*OsFH16*、*OsFH17* 都定位于质膜, 表明大部分水稻成蛋白可能在质膜上行使功能。并且 *OsFH6* 定位于过氧化物酶体, *OsFH13* 定位于液泡, *OsFH3* 定位于线粒体表明这些水稻成蛋白可能参与这些细胞器的形成。*OsFH10*、*OsFH13* 定位于高尔基体, *OsFH14*、*OsFH15* 定位于内质网表明其可能参与蛋白的分泌与转运 (表 2)。而 *OsFH1* 和 *OsFH16*、*OsFH17* 之间定位的差异, 表明 *OsFH1* 功能可能和 *OsFH16*、*OsFH17* 存在一定差异。

2.3.3 水稻组织成蛋白表达水平分析 基因在植物不同部位的表达差异可能决定了其参与的功能, 通常在某个部位高表达的基因会参与特定部位的生长发育, 以及对胁迫进行响应。通过 RiceXPro 数据库 (<https://ricexpro.dna.affrc.go.jp/>) 获取水稻成蛋白家族在不同部位表达量数据, 进

表 2 水稻成蛋白信息
Table 2 Information of rice formin proteins

基因名称 Gene name	基因 ID Gene ID	染色体 Chromosome	蛋白质特性 Protein properties				定位预测 Location predictor
			氨基酸残基 Amino acid residues	分子量 Molecular weight	等电点 Isoelectric point	分子重量 Molecular weight	预测网站: Winner Takes All Prediction website: Winner Takes All
<i>OsFH1</i>	<i>Os01g0897700</i>	1	244	27 081.3	6.726 29	-0.291 803	胞质溶胶 Cytosol
<i>OsFH2</i>	<i>Os04g0461800</i>	4	833	88 904.1	8.593 54	-0.359 064	胞外 Extracellular
<i>OsFH3</i>	<i>Os10g0119300</i>	10	417	46 634.6	8.682 83	-0.330 695	线粒体 Mitochondrion
<i>OsFH4</i>	<i>Os10g0347800</i>	10	855	93 421.6	11.598 5	-0.561 754	质体、细胞质、细胞核 Plastid, cytosol, nucleus
<i>OsFH5</i>	<i>Os07g0596300</i>	7	741	78 254.2	10.525 1	-0.657 355	质体 Plastid
<i>OsFH6</i>	<i>Os08g0280200</i>	8	481	56 441.6	7.850 69	0.008 731 81	质体、细胞质、过氧化物酶体 Plastid, cytosol, peroxisome
<i>OsFH7</i>	<i>Os02g0794900</i>	2	1 379	150 528	6.311 74	-0.376 795	细胞质 Cytosol
<i>OsFH8</i>	<i>Os03g0204100</i>	3	892	95 349	9.553 66	-0.512 444	质膜 Plasma membrane
<i>OsFH9</i>	<i>Os08g0431200</i>	8	520	58 251.9	6.419 62	-0.549 615	细胞质 Cytosol
<i>OsFH10</i>	<i>Os02g0161100</i>	2	881	96 468.4	5.799 26	-0.366 969	高尔基体 Golgi
<i>OsFH11</i>	<i>Os07g0545500</i>	7	929	100 995	8.042 58	-0.374 919	质膜 Plasma membrane
<i>OsFH12</i>	<i>Os04g0245000</i>	4	1 270	137 947	5.141 94	-0.386 772	质膜 Plasma membrane
<i>OsFH13</i>	<i>Os07g0588200</i>	7	774	83 814.9	8.723 01	-0.447 416	液泡、质膜、高尔基体 Vacuole, plasma membrane, Golgi
<i>OsFH14</i>	<i>Os05g0104000</i>	5	830	90 226.7	8.429 25	-0.413 855	质膜、内质网 Plasma membrane, endoplasmic reticulum
<i>OsFH15</i>	<i>Os09g0517600</i>	9	788	84 584.9	8.805 02	-0.337 183	质膜、内质网 Plasma membrane, endoplasmic reticulum
<i>OsFH16</i>	<i>Os02g0739100</i>	2	409	41 765.2	11.392 3	-0.576 528	质膜 Plasma membrane
<i>OsFH17</i>	<i>Os04g0100300</i>	4	823	86 801.9	9.293 19	-0.472 539	质膜 Plasma membrane

一步探索水稻成蛋白家族成员可能具有的功能。

水稻成蛋白组织表达分析表明, *OsFH7* 在水稻根部高表达, *OsFH13*、*OsFH10*、*OsFH2*、*OsFH4*、*OsFH8*、*OsFH11*、*OsFH16*、*OsFH1*、*OsFH5* 在水稻根部均有表达, 而 *OsFH14*、*OsFH6*、*OsFH3* 在根部有表达, 但表达量较低, 表明这些成蛋白家族成员可能在根部具有一定作用。水稻 *OsFH1* 在根部的表达也与 *osfh1* 突变体表型相吻合, 但根部 *OsFH17* 表达量较低(图 6)。

3 讨论与结论

水稻根毛作为一种根部表皮细胞的特化结构, 参与水稻获取外界养分、微生物互作、土壤固定等关键生理过程(李斌等, 2020)。Salazar-Henao 等(2016)研究认为水稻根毛的伸长是通过根部表皮细胞的极性生长往外延伸, 但对于其如何进行极性生长过程尚不清楚。成蛋白作为细胞极性生长的

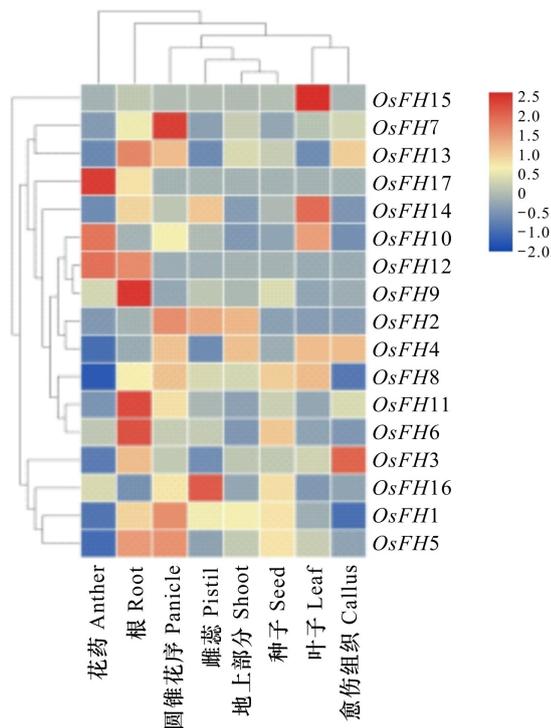


图 6 水稻成蛋白在不同组织表达水平
Fig. 6 Expression pattern of *OsFHs* in rice

关键蛋白,在动植物中都有一定研究,如 *AtFH3*、*AtFH5* 调控拟南芥花粉管极性生长 (Liu et al., 2018; Lan et al., 2018)。拟南芥 *AtFH8* 介导植株根毛形态发育 (Pei et al., 2012)。水稻相关研究表明, *osfh1* 突变体根毛无法进行伸长,说明 *OsFH1* 参与根毛的极性过程 (Huang et al., 2013)。此外, *OsFH1* 突变体的根毛表型缺陷在不同环境的处理下得到一定程度恢复,表明环境因素参与了 *osfh1* 介导的根毛生长发育。基于这一结论结合相关研究中所得到的结构高度相似的基因之间可能存在代偿作用的观点,探究水稻成蛋白家族是否能够在 *osfh1* 突变情况下取代其作用,从而促进根毛的生长 (Diss et al., 2014; Nimchuk et al., 2015)。

qRT-PCR 分析结果显示水稻成蛋白中 *OsFH16*、*OsFH17* 在 1/2 MS 固培以及 1/2 MS 液培处理下中表达量差异显著,表明 *OsFH16*、*OsFH17* 可能参与不同环境处理改变 *osfh1* 突变体根毛表型的调控。*OsFH16*、*OsFH17* 都和 *OsFH1* 一样属于第一类成蛋白家族成员。亚细胞定位表明 *OsFH16*、*OsFH17* 都定位于细胞质膜,与相关研究一致,即酵母成蛋白定位于细胞极性生长位点,促

进物质传输,并且通过聚合肌动蛋白促进细胞极性生长 (Billault & Martin, 2019; Cifrova et al., 2020)。并且拟南芥研究也证实了这一点,如 *AtFH5* 通过定位在细胞膜极性生长点介导囊泡运输物质 (Liu et al., 2018)。在本研究中, *OsFH16*、*OsFH17* 基因上游都具有植物激素、厌氧、缺氧相关顺式作用元件,结合酵母研究表明成蛋白可能参与抵抗温度胁迫,响应过氧化氢等结果,表明 *OsFH16*、*OsFH17* 极有可能可能受到环境的调控从而代偿 *osfh1* 突变导致的水稻根毛无法伸长。此外,对 *OsFH16*、*OsFH17* 表达趋势进行分析发现 *OsFH17* 从液培到固培表达量急剧增加,表明其可能在环境处理改变 *osfh1* 突变体根毛表型的调控中具有更重要的作用,但对于其具体功能还需进一步探索。

在对水稻成蛋白的结构分析时发现水稻第二类成蛋白 *OsFH12* 与其他成员不同,只有一个 PTEN 结构域。PTEN 是在人类癌症调控的关键基因,PTEN 主要通过去磷酸化参与细胞调控,并且通过结合膜磷脂定位于细胞质膜 (van Gpac et al., 2012)。*OsFH12* 蛋白具有的 PTEN 结构域表明其可能通过该结构定位在细胞膜行使功能,并且该结果与亚细胞分析结果一致。因此, *OsFH12* 极有可能在细胞质膜上行使功能。结合 *OsFH12* 的组织表达数据, *OsFH12* 极有可能参与花药的生长发育。此外,本研究发现 1/2 MS 液培处理下的 *osfh1* 突变体中侧根数量以及长度多于野生型,表明 *OsFH1* 可能参与侧根的起始。拟南芥研究也表明其侧根的起始依赖于细胞骨架以及肌动蛋白介导的中柱鞘细胞不对称细胞分裂,从而形成侧根原基促使侧根生长 (Barro et al., 2019; Fernandez et al., 2020)。成蛋白主要功能是调控肌动蛋白以及细胞骨架,因此水稻 *OsFH1* 也可能通过调控细胞骨架和肌动蛋白促进水稻侧根起始。

目前,关于水稻成蛋白在水稻根毛发育过程中行使功能的研究较少,并且对于不同环境通过调控哪些基因促进 *osfh1* 突变体恢复表型也尚未阐明。本研究通过分析不同环境处理下 *osfh1* 突变体成蛋白基因家族的表达量、利用生物信息手段对水稻成蛋白基因家族成员进行系统性分析,结果表明在固体表面培养时,环境变化可能通过 *OsFH16*、*OsFH17* 等基因的改变以补偿 *OsFH1* 基因的缺陷,进而确保植物可产生正常的根毛。但

是,该论断仍需要利用突变体,过表达体及遗传学方法的进一步验证。

参考文献:

- BARRO AV, STÖCKLE D, THELLMANN M, et al., 2019. Cytoskeleton dynamics are necessary for early events of lateral root initiation in *Arabidopsis* [J]. *Curr Biol*, 29(15): 2443.
- BILLAULT CI, MARTIN SG, 2019. Capping protein insulates Arp2/3-assembled actin patches from formins [J]. *Curr Biol*, 29(19): 3165.
- CARA LS, SEAN RJ, ZACHARY LN, 2016. Ready, aim, shoot: stem cell regulation of the shoot apical meristem [J]. *Curr Opin Plant Biol*, 29: 163–168.
- CHANG L, YI Z, HAIYUN R, 2018. Actin polymerization mediated by AtFH5 directs the polarity establishment and vesicle trafficking for pollen germination in *Arabidopsis* [J]. *Mol Plant*, 11(11): 1389–1399.
- CIFROVÁ P, OULEHOVÁ D, KOLLÁROVÁ E, et al., 2020. Division of labor between two actin nucleators — the formin FH1 and the ARP2/3 complex — in *Arabidopsis* epidermal cell morphogenesis [J]. *Front Plant Sci*, 11: 148.
- DISS G, ASCENCIO D, DELUNA A, et al., 2014. Molecular mechanisms of paralogous compensation and the robustness of cellular networks [J]. *J Exp Zool Part B*, 322(7): 488–499.
- FATIMA C, MARIAN N, DENISA P, et al., 2004. Formin homology 2 domains occur in multiple contexts in angiosperms [J]. *BMC*, 5(1): 44.
- FERNANDEZ AI, VANGHELUWE N, XU K, et al., 2020. GOLVEN peptide signalling through RGI receptors and MPK6 restricts asymmetric cell division during lateral root initiation [J]. *Nat Plants*, 6(5): 533.
- GRAZIANO BR, JONASSON EM, PULLEN JG, et al., 2013. Ligand-induced activation of a formin-NPF pair leads to collaborative actin nucleation [J]. *J Cell Biol*, 201(4): 595–611.
- HUANG J, CHUL MK, XUAN YH, et al., 2013. Formin homology 1 (OsFH1) regulates root-hair elongation in rice (*Oryza sativa*) [J]. *Planta*, 237(5): 1227–1239.
- JANNI P, OLAF N, RICHARD E, et al., 1998. FH3, a domain found in formins, targets the fission yeast formin Fus1 to the projection tip during conjugation [J]. *J Cell Biol*, 141(5): 1217–1228.
- JUANES MA, PIATTI S, 2016. Control of formin distribution and actin cable assembly by the E3 ubiquitin ligases Dma1 and Dma2 [J]. *Genetics*, 204(1): 205–220.
- LAN YX, LIU XN, FU Y, et al., 2018. *Arabidopsis* class I formins control membrane-originated actin polymerization at pollen tube tips [J]. *PLoS Genet*, 14(11): e1007789.
- LI B, HUANG J, WANG L, et al., 2020. The role of environmental stress and related plant hormones in the development of rice root hairs [J]. *Chin J Rice Sci*, 34(4): 287–299.[李斌, 黄进, 王丽, 等. 2020. 环境胁迫及相关植物激素在水稻根毛发育过程中的作用[J]. 中国水稻科学, 34(4): 287–299.]
- LIU C, ZHANG Y, REN HY, 2018. Actin polymerization mediated by AtFH5 directs the polarity establishment and vesicle trafficking for pollen germination in *Arabidopsis* [J]. *Mol Plant*, 11(11): 1389–1399.
- LUIS V, MAGDALENA B, 2012. *Physcomitrella patens*: a model for tip cell growth and differentiation [J]. *Curr Opin Plant Biol*, 15(6): 625–631.
- MAEKAWA T, MAEKAWA YM, TAKEDA N, et al., 2009. Gibberellin controls the nodulation signaling pathway in *Lotus japonicus* [J]. *Plant J*, 58(2): 183–194.
- NIMCHUK ZL, ZHOU Y, TARR PT, et al., 2015. Plant stem cell maintenance by transcriptional cross-regulation of related receptor kinases [J]. *Development*, 142(6): 1043–1049.
- PEI WK, DU F, ZHANG Y, et al., 2012. Control of the actin cytoskeleton in root hair development [J]. *Plant Sci*, 187: 10–18.
- PETER ACVG, MAGDALENA B, 2013. Plant formins: membrane anchors for actin polymerization [J]. *Trends Cell Biol*, 23(5): 227–233.
- SALAZAR-HENAO JE, VELEZ-BERMUDEZ IC, SCHMIDT W, 2016. The regulation and plasticity of root hair patterning and morphogenesis [J]. *Development*, 143(11): 1848–1858.
- SHIMADA A, NYITRAI M, VETTER IR, et al., 2004. The core FH2 domain of diaphanous-related formins is an elongated actin binding protein that inhibits polymerization [J]. *Mol Cell*, 13(4): 511–522.
- SU Y, 2018. Construction of an efficient gene disruption method for *Nomuraea rileyi* and functional study of three genes related to reactive [D]. Chongqing: Chongqing University: 153. [苏宇, 2018. 莱氏野村菌高效基因敲除体系的建立和三个活性氧代谢相关基因功能的研究[D]. 重庆: 重庆大学: 153.]
- SUN TT, LI SW, REN HY, 2017. OsFH15, a class I formin, interacts with microfilaments and microtubules to regulate grain size via affecting cell expansion in rice [J]. *Sci Rep*, 7(1): 6538.
- VAN GISBERGEN PAC, LI M, WU SZ, et al., 2012. Class II formin targeting to the cell cortex by binding PI(3, 5) P(2) is essential for polarized growth [J]. *J Cell Biol*, 198(2): 235–250.
- WANG T, LI CX, WU ZH, et al., 2017. Abscisic acid regulates auxin homeostasis in rice root tips to promote root hair elongation [J]. *Front Plant Sci*, 8: 1121.
- XU YW, JAMES BM, ISABELLE S, et al., 2004. Crystal structures of a Formin Homology-2 domain reveal a tethered dimer architecture [J]. *Cell*, 116(5): 711–723.
- YANG WB, REN SL, ZHANG XM, et al., 2011. BENT UPPERMOST INTERNODE1 encodes the class II formin FH5 crucial for actin organization and rice development [J]. *Plant Cell*, 23(2): 661–680.
- YI KX, GUO CQ, CHEN D, et al., 2005. Cloning and functional characterization of a formin-like protein (AtFH8) from *Arabidopsis* [J]. *Plant Physiol*, 138(2): 1071–1082.

(责任编辑 李莉)