3芒的研究进展

3.1生物学意义

对人类而言,禾本科植物是最重要的植物,因为人类赖以生存的粮食作物几乎都是禾本科植物。禾本科又是地球上分布最广的植物类型,一方面取决于其强大的营养繁殖能力,另外那些为了适应种子自然传播所进化出来的性状也非常重要,如芒,刚毛和柔毛,它们与种子构成了繁殖体以帮助种子的传播(0stergaard,2010) ?其中芒是着生于颖或内、外稃顶端的针状结构,芒的形状(弯曲或直)、着生数量、长度在不同的物种间存在丰富的变异,通常根据芒的功能将芒分为为吸湿芒和刚性芒两类(Peart, 1979)。

由于吸湿芒在帮助种子自埋中的适应性意义,一直受到人们的关注。很多禾本科植物具有这种芒,如针茅、三芒草、野生高粱等。在干燥的条件下,吸湿芒通常具有至少一个膝曲,膝曲到种子的部分呈螺旋扭转状,膝曲到芒的末端为笔直的尾部,表面布满刚毛。芒的螺旋部分对湿度的变化敏感,湿度大时会打开螺旋,干燥时会形成螺旋,人们把这种周期性的湿度变化所引起的螺旋和解螺旋的循环称为"吸湿运动”,芒的尾部不会发生扭转,而是与螺旋部保持一定的夹角(青秀玲等,2007)。Peart首次用实验证明了禾本科6个种的吸湿芒能帮助种子钻入土壤,这种自我掩埋的行为有利于种子的萌发和子代的成活(Peart,1979)。Gamier等在西非草原上发现种子埋藏深度与芒的长度呈正相关,埋入土壤中的种子因能躲避一年一度的火烧而存活(Gamier,2001)。野燕麦芒的研究表明芒内外相邻细胞群的木质素含量和纤维素排列方向具有显著差异,揭示了芒吸湿运动的细胞学基础。

与吸湿芒相比,刚性芒坚硬、笔直而没有膝曲、不因湿度变化而发生形变(Stinsonetal, 1979)。对具有刚性芒的未本科植物的研究表明,在种子从母体脱落并下落的过程中,刚性芒能平衡种子使其种子的一端先着地并埋入土壤,因为胚处于种子尖端的位置,所以胚被埋入土壤中,有利于胚的萌发;另外种子上的表皮毛还能锚住土壤,为根穿透土壤提供了反作用力,因此有利于幼苗的成活(Peart, 1981; Peart, 1984; Peart, 1987)。近年来,某些刚性芒也被发现具有吸湿运动,Elabaum发1受到昼夜干湿交替的影响,野生四倍体小麦的成对长芒不断地打开和闭合,芒表面众多刚毛能错住土壤并使种子只能向一个方向滑动,类似“蛙泳”的原理,一点一点将自己埋入土壤。对芒的细胞结构的研究表明,引起这种吸湿运动是芒基部不对称的细胞群的细胞壁中的纤维素微丝排列的差异所致(Elabaumetal.,2007)。

所以,具有吸湿能力的芒是植物对干旱、半干旱环境长期适应的结果,虽然它们在形态和对湿度变化的响应不同,但它们的功能都需要芒表面的刚毛(芒刺)的结构,因为芒刺能在种子自埋的过程中铺住土壤,防止种子从土壤中退出,所以芒刺是芒发挥生物学功能所必须的结构,然而前人对芒刺的研究很少。

最近,Kulic等以控制实验的手段对狐尾草(Foxtail Grass,即野生大麦Bonieum murinum)芒刺的物理学性质和形变的环境对传播体的作用机制做了详细研究:芒的表面被高度各向异性的锋利的微刚毛覆盖,这些刚毛冲向一个方向并与水平方向有约35度夹角,平均长度50微米。当一个柔软、多孔的介质与芒的-?部分发生接触并试图向芒基部的方向移动时,芒刺首先会铺定(勾住)在介质上,具有弹性的芒不断积累朝向底物方向上的弯曲度而增加了芒刺受压的数量,进一步增大了摩擦力,从而减少了制动失败的可能性。

另外,除了在水平方向的摩擦力外,芒剌还提供了垂直方向的粘附力。这两种作用力使狐尾草只能向一个方向移动,并有效地抑制了向反方向的运动。对芒在惯性主导的和不断形变的环境中的运动模式的研究表明芒刺能够固定于任何柔软多孔的介质(如土壤、动物皮毛等)上,并能把外部环境作用于芒的各个方向的力转化为指向芒基部的单一方向的运动,另外,芒长度的增加带来更多的芒刺而放大芒刺的效应并能传播的更远。

这项研究奠定了芒刺在动物传播和种子自埋过程中的物理学基础(Kulic et al.,2009)。末本科繁殖体利用芒表面的几何形状使其在正反两个方向产生截然不同的摩擦力,从而能够利用环境的波动,做出定向移动,是植物长期进化出来的巧妙的生存策略。然而这种非均衡表面结构并不是禾本科芒的专利,蛇与赃顿腹部皮肤的刚毛使其在向前和向后两个方向上存在显著不同的摩擦力,能够提高移动效率,只不过姬顿和蛇利用了来自自身的动力(Hazeletal.,1999)。

人们在一个世纪前就己经注意到大麦、小麦的芒能够提高产量。它们的芒具有相似的解剖结构,它们都具有一个三角形的横截面,包含两个绿色细胞的区域和三个维管束,芒表面具有气孔(You et al., 2012)。前人的研究表明芒是一个高光合效率和低蒸腾的器官,芒位于冠层顶端,有利于光合作用和气体交换,而且芒与籽粒距离最近,有利于光合同化物就近转运到籽粒中。芒的总表面积可达旗叶的1/3 ~ 1/2,穗部的50% ~ 70%,芒的叶绿素含量和光合作用相关酶活性也高于颖壳和旗叶,但芒的蒸腾作用只占穗部的10%~ 20%,具有很高的水分利用效率。有人推测大麦和小麦的长芒是它们对千旱环境条件的适应,长芒的存在有利于水分和光合同化物向籽粒的运输(Blum, 1985)。在大麦中的研究表明具芒大麦相对于无芒大麦具有显著的产量优势,芒对产量的贡献可达10% (Grundbacher, 1963; Qualset et al.,1965)。

相反,水稻的芒由于具有单一的维管束、内部没有绿色细胞的组织,所以不能进行光合作用(Toriba et al.,2010)。这也是为什么在驯化过程中大麦和小麦保留了一定长度的芒,而水稻的芒则显著减少。

3.2遗传分析及进展

禾本科作物(如水稻、小麦、大麦等)在芒的有无、长短和分布特性上都存在很大变异,而且芒的有无和长短受到光周期、温度和非生物胁迫(如干旱)等环境条件的影响。前人的研究表明,芒是一个多基因控制的复杂性状。在水稻中,控制芒性状的基因在水稻12条染色体上都有分

布(Shigetoshi etal., 1996; Xiongetal.,1999; Cai and Morishima, 2002; Thomson et al., 2003;GuetaL, 2005),大部分控制芒的有无与芒的长短和分布比例的QTL分布在相同的染色体区域(肖河等,2008)。

在这些QTL中,位于第4染色体上的乂和位于第8染色体上的Xwn-柏不同定位群体中检出频率较髙,说明这两个位点是水稻驯化的重要位点。大麦中控制芒的有无和长短有关的基因在除1H和6H的染色体上都有分布,其中位于2HL的和7HL的是大麦最主要的的两个自然变异。LsAJ为显性无芒基因,主要分布在/fortfeiOTinerme^WEngleawnless, M:2为隐性短芒基因,广泛分布在东亚(如中国、日本、韩国和印度)的大麦品种中,可能是大麦对东亚潮湿气候条件的一种适应(Youetal., 2012)。

Watkins和Enerton认为小麦存在5个决定芒发育的基因:B1’ B2, B3, A, Hd,除了 为促进芒生长的基因外,其他均为芒抑制基因,57、52和册分别位于5A、6B和4B染色体上(Sears,1954; Rao, 1981)。通过单体研究,发现了更多与芒发育有关的基因位于2A、3A、4A、IB、2B、3B、5B、2D、3D、6D 和 7D 染色体上(Bozzini et al., 1971)。

关于芒刺的遗传学研究仅在大麦中报道了位于5H染色体长臂上两个隐性光滑芒的基因或携带当它们单独存在时,具有变短和减少的芒剌,当同时存在时,大麦芒非常光滑几乎不产生芒刺。它们都存在于欧洲和西亚的一些大麦品种中,这两个基因能够提高青!t词料的适口性而受到人工选择(Takahashi, 1995)。

3.3分子水平调控

禾本科中第一个被克隆的芒长基因为大麦的Lks2。Lks2编码一个SHI家族转录因子,而且的突变不仅使芒长变短,而且雌蓉柱头线毛也会变稀疏,说明具有多效性。Lks2在芒和雌藏中特异表达。组织学研究表明短芒是由于细胞数目的减少所致,因此可能与芒细胞的增殖有关。对大麦品种的该基因的自然变异的研究发现,的变异主要分为3种类型,他们都具有引起IGGH结构域Proline到Leucine改变的SNP,它们的芒长减少为长芒品种的一半,具有正常种子育性。在携带的大麦品种中,和分布在中国东部、韩国和日本地区,/)b2.W在序列上与前两种类型差异较大,可能具有独立起源,携带这种等位基因的品种主要分布在喜马拉雅地区(包括印度、尼泊尔和西藏)。/ib2的突变只发生在部分大麦品种中,所以该突变是驯化后产生的变异。

东亚的大麦品种具有相当高比例的短芒品种,可能与东亚多雨的气候有关,短芒品种可能因为有利于减少倒伏而受到人工选择(Youetal.,2012)。

Luo et al. (2013)从普通野生稻中分离了一个控制芒长的主效QTL ^4?-/编码bHLH转录因子,在芒原基表达量最高。基因互补验证表面野生稻^-7具有增加芒长和粒长,减少穗粒数的功能进而降低产量。An-1能够通过促进细胞的增殖促进芒原基的形成和籽粒的伸长,在支梗原基中通过抑制细胞分裂素直接激活酶LOG的表达,抑制分生组织活性,从而使穗粒数下降。群体遗传学表明栽培稻在An-J位点的遗传多样性发生显著下降,说明该位点是水稻驯化中人工选择的重要位点,对an-7的选择不仅能够使芒消失,而且还能够增加单株产量。

水稻突变体的研究也发现了一些与芒的发育相关的基因,\_DROOPINGLEAF WD,SHOOTLESS2、SHL2、, SHOOT ORGANIZATION 1 (SHOl) , SH02, TONGARI-BOUSHIl (TOBl)等。这些基因的突变体都在某种程度上不能维持分生组织活性或者建立近-远轴极性,它们为芒的发育调控机制提供了重要的线索。

DROOPING LEAF (DZ)编码一个YABBY蛋白,控制心皮的分化和叶片叶脉的形成。该基因突变由于叶脉形成缺陷而导致披叶表型。在长芒的Kasalath遗传背景下,抑制Di基因的表达除了披叶表型外,还能够显著减少芒长和有芒籽粒所占比例,并具有剂量效应。RNAi分析表明芒的形成与DZ基因的表达水平有关。ZXL基因只在芒原基下方的外颖中脉维管束周围细胞特异表达,在芒原基没有表达,表明m在调控芒的形成过程具有非细胞自主性。因为能够通过促进叶片原基中心的细胞增殖而影响叶片中脉的形成,所以芒的形成可能是Z)Z促进芒原基下方维管束周围的细胞增殖导致的(Toribaetal.,2014)。

SHL2基因编码一个RNA依赖的RNA聚合酶,在无芒的粳稻Nipponbare背景下该基因会导致花器官和外颖的近轴面丢失,外颖呈棒状,并且棒状外颖顶端形成长芒。该结果表明5HL2是一个抑制芒发育的基因。的功能是合成反式作用RNA(ta-siRNA),其祀标为生长素响应因子(?五7T/iV2(Qs￡Tr2)基因,所以该基因的突变会导致基因的增强和异位表达,表明Os￡rT2是促进芒形成的基因。通过在淑2突变体和长芒的Kasalath植株中降低QsiTT前表达量,结果转基因植株的芒显著减少,证实了上述猜测。0述m在Kasalath芒原基表皮第一、二层细胞、维管束和心皮原基表达,在Nipponbare和T65的芒原基无表达但在维管束与心皮原基正常表达,表明as￡:7T2表达部位与芒原基形成紧密相关(Toribaetal.,2014)。

Kasalath背景的突变体中,QsiTn能够正常表达;在Kasalath中干扰as￡Tr2的表达能够抑制芒的形成,并且没有披叶的表型产生,表明的表达是不依赖(?五7T2的,而且单独的的表达对芒的形成是不够的,说明和(?五m在调控芒的形成中处于独立的路径(Toribaetal.,2014)。水稻的芒呈福射对称,as￡7T2特异地在芒原基的第一、二层细胞中表达,突变体sM-ro!2中0沾7T2的增强和异位表达,导致了芒的形成和远轴化的棒状外颖,在的表达与形态上,芒都与远轴化的棒状外颖极为相似,表明同时影响了芒原基的远轴化(abaxializing)和伸长。

但是其他禾本科作物如小麦、大麦的芒具有近-远轴极性的分化,这有可能是因为在水稻的进化过程中,水稻的芒丢失了其近轴面特性,因此水稻的芒在近-远轴极性调控方面具有一套独特的机制。

TOB1 (OsYABBYS)编码一个YABBY转录因子,该基因突变导致水稻颖花多种形态的改变,如形成圆锥形器官而非内外颖,花分生组织的提前终止和内外颖的缺失等,这些表型表明花分生组织不能正常保持和分化。但是只在已分化器官原基中表达(护颖、颖荀和内外颖),不在分生组织中表达,所以推测在后生器官与分生组织直接的联系过程中具有重要作用,能够非细胞自主性地调控花分生组织活性。另外在toW突变体中,所有外颖顶端产生一个长芒,因此rosy是一个芒的抑制因子(Tanakaetal., 2012)。

3.4水稻芒的研究进展

与落粒性类似,目前已克隆的水稻芒性基因(表1-3)可分为两种:一种是受到过人工选择的驯化基因。主要利用野生稻、有芒栽培稻与无芒栽培稻构建群体,采用图位克隆技术得到,例如v4n-J、LAR47等。一种是无驯化相关证据支持通过诱变得到的,例如DKOOiWVG此AFO)王),TONGARI-BOUSHI1iTOBl)等。

韩斌实验室W无芒釉稻广陆矮4号为轮回亲本,普通野生稻W1943为供体亲本构建染色体片段代换系,通过初步定位得到和^心2两个与芒性相关的QTLs,利用10500株群体将精细定位在四号染色体长臂70kb区间内。通过互补、RNAi、进表达转基因从区间的两个预测基因中确定如-八它编码一个具有bHLH(basicHelix-Loop-Helix)结构域的转录因子。其在栽培稻中主要有两种亚型——a-7(Tn+)和an-7(G-)。其中an-7(Tn+)是无芒材料基因启动子区域存在4.4忱转座子插入等一系列变异,引起表达下调,导致芒原基不能正常分裂发育成苦。an-/(G-)则是由于单碱基缺失导致翻译提前终止。

进一步分析转基因植株发现如正向调控芒长和粒长,负向调控穗粒数(Luoefa/.,2013)。定位于四号染色体长臂下端56kb区间内,编码的化L0化6蛋白具有催化细胞分裂素合成的功能。在釉稻广陆矮4号中,由于该基因第一个外显子单碱基缺失造成移码,导致蛋白失活而不具芒。通过转基因验证发现能够増加细胞分裂促进芒伸长,但减少穗粒数和分葉数导致产量降低。基因表达模式分析显示,调控芒原基的形成,而促进芒的伸长。与野生稻相比,栽培稻中^和位点核巧酸多样性显著降低,表明这两个基因受到过人工选择(Guefa/.,2015)。

Hua等利用元江普通野生稻和釉稻%11构建的6655株F2分离群体,将调控普通野生稽芒长和芒刺的基因巳化定位在四号染色体长臂34.6此区域内,RNAi及互补验证表明L0CJ9地哈yWO为目的基因。该基因编码一个细胞分裂素激活酶,在9311中乂因单碱基缺失移码,导致转录提前终止,降低芒原基中的细胞分裂素的浓度,破坏了芒則形成和芒的伸长。该基因亚细胞定位于细胞质和细胞核,主要在发育的穗中表达。单倍型分析表明该基因起源于梗稻亚种,通过基因渗入(introgression)整合到釉稻遗传背景中,并在早期驯化中经历过人工选择(Huaetah,2015)

化4位是新近克隆的芒性调控基因,研究者们利用无芒非洲稻和无芒賴稻Koshihikari构建染色体片段代换系的8000株分离群体将化佔2定位于8号染色体长臂80化区间内,通过互补验证确定目的基因。化4拉编码一个表皮构型因子类蛋白垃>化厶属于EPF/EPFL家族,是植物特异的分泌化段,具有一个保守的富含半脫氨酸的区域,其前体被加工酶基因化W特异剪切,成熟的肤段能够诱导芒的伸长。时空表法分析显示化4捉在在幼穗中表达量比其它组织高10倍。基因序列分析表明其存在一个高度变异的高GC区域,该区域包含多种引起编码蛋白功能破坏的突变,从而导致部分亚洲栽培稻的无芒表型,但在无芒非洲栽培稻中却存在具有功能的化(Bessho-Ueharaefa/.,2016)。

此外,一项利用全基因组测序快速鉴定水稻农艺性状基因的GWAS研究也发现了该基因,研究者们使用MLM模型,分别做了基于SNPs和基因的关联分析,通过置换检验确定了全基因组显著性的阀值,然后通过单倍型分析筛选出了芒性调控基因扣7890,通过将功能性单倍型和丧失功能单倍型基因转入日本晴,验证了该基因功能(Yanoetah^2016)〇

分离自突变体的基因和化脚TCV2(0泌7T2)在有芒釉稽Kasalath中参与芒的调控。公王编码具有YABBY结构域的蛋白,调控水稻中脉、也皮(Yamaguchiefa/.,2004)和花分生组织(LiWa/.,2011)的形成与发育,0泌7了2是一种生长素响应因子(Wange/a/.,2007)。通过对突变体遗传分析和RNAi实验证明芒的形成与OL表达水平有关,而降低化￡777的表达会抑制芒形成。但两个基因单独存在时却不能调控芒发育。此外0S公乃2在釉稻芒原基表达,在搜稻中无表达,而￡)王在釉稻和硬箱中均有表达(1'〇1化3311<11111〇11〇,2014)。因此研究者认为猎稽中化左712的功能丧失可能与賴稻中芒性丧失有关。但这一假说需要更多证据,该实验仅用Kasala出、日本晴W及台中65=份材料,不足W代表整个釉稻和硬稻。类似通过突变体分离出的芒性基因还有7D公7和5/2^(57/00化￡说2),7D及7编码一个YABBY转录因子,它突变导致水箱小穗芒的伸长和花器官发育(TanakaWa/.,2012)。5/比2编码-个RNA依赖性的RNA聚合酶,参与反式作用干扰小RNA(ta-siRNA)的形成,其突变会导致芒的伸长(Toribaefa/.,2010)这些基因可能与栽培稻驯化无关。

通过对与驯化相关的芒性基因硏究,可W使我们更清晰了解栽培稻驯化的分子机理;而研究从突变体鉴定出的芒性基因,可W巧宽我们对水稽芒性调控途径的认知。尽管目前已有水稻芒性基因被克隆,但考虑到能够影响芒原基分裂的基因都可能对芒性具有调控作用,该调控途径可能涉及相当多基因。而且根据定位结果(表1-2),除了4号和8号染色体外的其他染色体上还有更多芒性基因等待发掘克隆和解析功能。

3.5立题意义