

盐胁迫下 *OsDSR2* RNAi 转基因水稻的 生理特性及转录组学分析

楚乐乐, 罗成科, 李芳兰, 路旭平, 马天利, 李培富
(宁夏大学农学院 / 宁夏优势特色作物现代分子育种重点实验室, 银川 750021)

摘要: 为探究盐胁迫下 *OsDSR2* RNAi 转基因水稻的生理特性和差异基因的表达调控, 以中花 11 (ZH11) 植株为对照, 对 *OsDSR2* RNAi 转基因水稻幼苗进行生理特性和转录组学分析, 结果表明: 正常条件下, ZH11 和 *OsDSR2* RNAi 转基因水稻中叶绿素含量和根部 Na^+/K^+ 均显著低于 ZH11, 其他各项生理指标均没有显著性差异, 而盐胁迫处理后, *OsDSR2* RNAi 转基因水稻中的叶绿素含量、可溶性糖 (SS) 含量、过氧化氢酶 (CAT) 活性与 ZH11 相比没有明显变化, 但转基因植株中的细胞膜透性、丙二醛 (MDA) 含量、 Na^+/K^+ 显著或极显著低于 ZH11, 脯氨酸 (Pro) 含量、超氧化物歧化酶 (SOD) 活性、过氧化物酶 (POD) 活性显著或极显著高于 ZH11。 *OsDSR2* RNAi 转基因水稻在盐胁迫前后共产生 68 个差异表达基因, 其中有 55 个上调表达, 13 个下调表达。 GO 分析结果显示, 差异表达基因主要富集在胁迫应激反应、分解代谢等生物学过程中。 KEGG 分析结果表明, 差异表达基因主要参与类胡萝卜素生物合成、油菜素内酯生物合成以及表皮素、软木脂和蜡质生物合成代谢通路中, 进一步通过 RT-qPCR 验证了 *OsbZIP16*、*OsLEA3*、*RAB21* 等差异表达基因参与水稻的胁迫应答反应。 综上, 在生理层面上, *OsDSR2* RNAi 转基因水稻主要通过降低细胞膜透性、MDA 含量和 Na^+/K^+ , 增加 Pro 含量, 提高 SOD 和 POD 活性, 抑制叶绿素的降解来提高耐盐性; 在分子水平上, *OsDSR2* 主要通过脱落酸 (ABA)、油菜素内酯 (BR) 信号通路参与调控 *OsbZIP16*、*OsLEA3*、*RAB21* 等逆境相关基因的表达来提高苗期水稻的耐盐性, 为进一步阐明 *OsDSR2* 参与调控水稻耐盐的详细分子机制奠定基础。

关键词: 盐胁迫; *OsDSR2*; 水稻; 生理特性; 转录组分析

Analysis of the Physiological Characteristics and Transcriptome Profiles of *OsDSR2* RNAi Transgenic Rice under Salt Stress

CHU Le-le, LUO Cheng-ke, LI Fang-lan, LU Xu-ping, MA Tian-li, LI Pei-fu
(Agricultural College of Ningxia University/ Key Laboratory of Modern Molecular Breeding of
Dominant Characteristic Crops in Ningxia, Yinchuan 750021)

Abstract: In order to explore the physiological characteristics and the transcriptional regulation of *OsDSR2* RNAi transgenic rice under salt stress, we analyzed the physiological indicators and the transcriptome profiles of *OsDSR2* RNAi transgenic rice seedlings compared to Zhonghua 11 (ZH11) plants. Under normal conditions, the chlorophyll content and root Na^+/K^+ of ZH11 and *OsDSR2* RNAi transgenic rice were significantly lower than those of ZH11, and there was no significant difference in other physiological indexes. After salt stress treatments, no significant difference on the content of chlorophyll, soluble sugar (SS) and catalase (CAT) activity of *OsDSR2* RNAi transgenic rice to ZH11 was detected, while the content of cell membrane permeability, malondialdehyde (MDA) and Na^+/K^+ in transgenic rice significantly or extremely significantly lower than those of ZH11; the content of Proline (Pro), superoxide dismutase (SOD) activity and peroxidase (POD) activity were significantly or extremely significantly higher than those of ZH11. The transcriptome analysis revealed 68 differentially expressed genes in *OsDSR2* RNAi transgenic plants before and after salt stress treatment, 55 genes of which were

收稿日期: 2019-11-28 修回日期: 2019-12-03 网络出版日期: 2020-01-21

URL: <http://doi.org/10.13430/j.cnki.jpgr.20191128002>

第一作者研究方向为植物分子生物学, E-mail: 554526777@qq.com

通信作者: 罗成科, 研究方向为植物抗逆分子生物学, E-mail: chkluo2002@163.com

基金项目: 国家自然科学基金 (31560297)

Foundation project: State Natural Sciences Foundation (31560297)

up-regulated and 13 genes of which were down-regulated. GO analysis showed that the differentially expressed genes were enriched in stress response, catabolism and other biological processes. KEGG analysis showed that the differentially expressed genes were mainly involved in the biosynthesis of carotenoids, brassinolactone and the biosynthesis of epidermal, cork and wax biosynthesis pathways. The differential expression of *OsZIP16*, *OsLEA3*, *RAB21* and differently expressed genes under treatments was further verified by RT-qPCR. In summary, on the physiological level, *OsDSR2* RNAi transgenic rice mainly improved salt tolerance by reducing membrane permeability, MDA content and Na^+/K^+ , increasing Pro content, increasing SOD and POD activity, and inhibiting chlorophyll degradation. On the molecular level, *OsDSR2* was mainly involved in regulating the expression of stress related genes such as *OsZIP16*, *OsLEA3*, *RAB21* and so on through abscisic acid (ABA) and brassinolide (BR) signaling pathways to improve the salt tolerance of seedling rice, which laid the foundation for further elucidating the detailed molecular mechanism of *OsDSR2* involved in the regulation of salt tolerance of rice.

Key words: salt stress; *OsDSR2*; rice; physiological characteristics; RNA-seq

水稻是农业生产中重要的粮食作物,全球大约有一半以上的人口以稻米为主食,作为功能基因组研究的模式作物^[1],水稻受到科学界的广泛研究。近年来由于人类活动的影响,土壤盐渍化日趋严重,极大地限制了农业生产的发展。从水稻自身中挖掘并克隆耐盐(相关)基因,进一步利用转基因技术培育耐盐水稻品种,对于提高水稻对盐碱胁迫的适应性,实现盐碱地水稻的稳产、增产具有重要意义。

高盐分可对植物造成渗透胁迫和离子毒害,植物可通过生理和分子机制缓解盐胁迫带来的危害。从生理层面上,植物通过渗透调节、抗氧化酶防御以及外源物质施加等方式缓解盐胁迫^[2]。从分子水平上,利用分子生物学等技术从水稻中挖掘耐盐相关候选基因^[3-4],对其进行分离鉴定并解析其生物学功能,可为水稻耐盐新品种的培育提供基因资源和中间材料。*OsDSR2* (LOC_Os01g62200) 是一个逆境胁迫相关基因,在水稻抗逆过程中起着重要作用^[5]。前期研究表明,*OsDSR2* 基因的超量表达增加了转基因水稻对盐胁迫和干旱胁迫的敏感性,同时降低了对脱落酸 ABA (abscisic) 胁迫的敏感性^[6],说明 *OsDSR2* 可能通过 ABA 介导的信号途径负调控水稻对干旱和盐胁迫的耐受性。为了进一步解析 *OsDSR2* 基因在水稻耐盐中的具体功能,本研究在前期获得 *OsDSR2* RNAi 转基因水稻的基础上,开展了盐胁迫下 *OsDSR2* RNAi 转基因水稻苗期的表型鉴定、生理特性以及转录组学分析研究,为阐明 *OsDSR2* 参与调控水稻耐盐性的作用机理提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料来源

本研究所用的水稻材料为野生型中花 11 (ZH11)

和 T₂ 代 *OsDSR2* RNAi 转基因水稻的两个不同株系 (DR14, DR20)。其中, ZH11 为对照材料 (CK), *OsDSR2* RNAi 转基因水稻为研究材料,该材料是根据 *OsDSR2* 的 cDNA 序列及其蛋白质的保守结构域,通过扩增 *OsDSR2* 基因的 RNAi 目标片段 (约 300 bp), 将其构建到干扰表达载体上,利用农杆菌介导的遗传转化方法而获得的,并对目的基因片段及其表达量进行了检测,筛选出阳性植株,最终选择干扰表达最为明显的两个株系 (DR14 和 DR20) 作为后续研究材料。

1.2 试验材料处理

将转基因水稻种子置于含有潮霉素的 1/2 MS 培养基上筛选发芽,待芽长至 2 cm 左右,将其转至 1/2 MS 培养基上继续培养, ZH11 种子置于 1/2 MS 培养基上发芽生长,待幼苗长至第 3 片叶时进行炼苗培养,挑选长势一致的不同材料的幼苗培养至 4 叶期。针对 2 种不同材料的幼苗,以转移至 Yoshida 水稻营养液中的材料为对照,利用添加 150 mmol/L NaCl 的 Yoshida 水稻营养液进行盐胁迫处理,处理前后统计每种材料的绿叶数并拍照 (盐胁迫后绿色面积达到 80% 以上视为绿叶),处理 24 h 后植株叶片发生不同程度的卷曲时,选择同一时间段内的正常组和盐处理组进行取样,一部分样品用于生理指标的测定,另一部分样品用于转录组测序。

1.3 生理指标的测定与分析

参考《植物生理学实验指导》^[7],利用 DDS-11A 电导仪测定细胞膜相对透性,采用硫代巴比妥酸法测定丙二醛 MDA (malondialdehyde) 含量,采用丙酮-乙醇提取法测定叶绿素含量,利用酸性茚三酮法测定游离脯氨酸 Pro (proline) 含量,利用苯酚法测定可溶性糖 SS (soluble sugar) 含量;参考《现代植物生理学实验指南》^[8],采用愈创木酚法测定过氧化物

酶 POD (peroxidase) 活性,采用氮蓝四唑法测定超氧化物歧化酶 SOD (superoxide dismutase) 活性,采用紫外吸收法测定过氧化氢酶 CAT (catalase) 活性;利用火焰分光光度法测定 Na⁺ 和 K⁺ 含量,并计算 Na⁺/K⁺,具体方法参见王文生^[9]的方法。在进行以上不同生理指标测定时,每个实验重复 3 次。

1.4 转录组测序与分析

1.4.1 总 RNA 提取 按照 Takara RNA 提取试剂盒说明书提取水稻总 RNA。琼脂糖凝胶电泳分析 RNA 降解程度以及是否有污染;Nanodrop 检测 RNA 的纯度 (OD260/280), Qubit 对 RNA 浓度进行精确定量,Agilent 2100 精确检测 RNA 完整性。

1.4.2 测序文库的构建与测序 样品检测合格后,通过试剂盒去除 rRNA,随后加入 fragmentation buffer 将 RNA 打断成短片段 150~200 bp,以短片段 RNA 为模板,合成 cDNA 链并纯化,随后将纯化的双链 cDNA 再进行末端修复、加 A 尾并连接测序接头,然后用 AMPure XP beads 进行片段大小选择,最后进行 PCR 富集得到最终的 cDNA 文库。用 IlluminaTM2500 测序仪对构建合格的测序文库进

行双末端 (Paired-end) 测序。

1.4.3 测序数据处理及分析 对测序得到的原始数据进行测序错误率分布及 GC 含量分布检验,获得高质量的干净序列 (clean reads)。用 FPKM 法 (fragments per kb per million fragments) 来衡量 Unigene 的表达水平^[10]。用 Cufflinks 软件计算两种材料的基因表达水平的 Fold-changes ($P<0.05$),并用 Benjamini-Hochberg 方法对原有假设检验得到的显著性 P 值进行校正,得出 FDR (false discovery rate) 值^[11],以 \log_2 Fold change ≥ 2 、FDR ≤ 0.05 为筛选条件找出差异表达基因,将其注释到 GO 和 KEGG 数据库中,获得差异表达基因的功能注释及相关代谢通路信息。

1.4.4 Real Time-PCR 采用 Primer BLAST 在线工具进行引物设计,引物序列见表 1。每个样品以水稻 *OsActin* 基因 (Loc_Os03g50885) 为内参,3 个技术重复,采用 1.4.1 的方法提取两种材料的总 RNA,按照 Prime Script TM RT reagent Kit with gDNA Eraser (Perfect Real Time) 试剂盒说明书合成 cDNA 的第 1 条链,在荧光定量 PCR 仪中进行扩增反应,反应体系为 20 μ L,每个反应重复 3 次。

表 1 引物序列
Table 1 Primer sequences

基因编号 Gene ID	正向引物 (5'-3') Forward primer	反向引物 (5'-3') Reverse primer
Actin	GACCTTCAACACCCCTGCTA	ACAGTGTGGCTGACACCATC
LOC_Os02g09830	TCCAACATTGCATACCATCCTAG	GCATTTGCTTCATCTTCAGTCAC
LOC_Os05g07810	TGGTGCTTGTCCACGTCAA	ATCATCGGTGAGCCTTGCTG
LOC_Os05g46480	GAGTGAGCAGGTGAAGAGCA	GTGGCAGAGGTGTCCTTGTT
LOC_Os10g30150	TGCTCGACCACCTCTTCTTC	TCAATGGCATGGACAAGCAC
LOC_Os11g26790	CACACCACAGCAAGAGCTAAGTG	TGGTGCTCCATCCTGCTTAAG
LOC_Os04g57350	CTGATTCCAAGCGTCAGGGT	CATGTGCAAGGGTGTCTGA
LOC_Os05g04690	GACGAACATCATCAATGGCGG	CGCAGTATCGCCGAAGAAT
LOC_Os09g25690	GGTTCAAGCGTAGGGTCATCA	ATAACCAGATCCCGAACCAGC

1.5 数据统计与分析

采用 SPSS 19.0 进行单因素方差分析 (one-way ANOVA),采用最小显著差异法 (LSD) 进行多重比较,利用 OriginPro2017 软件进行作图。

2 结果与分析

2.1 *OsDSR2* RNAi 转基因植株表型的初步鉴定

对 T₂ 代 *OsDSR2* RNAi 转基因水稻幼苗进行了表型鉴定,结果表明,在正常条件下,转基因植株与 ZH11 植株的形态无明显差异 (图 1A)。盐胁迫

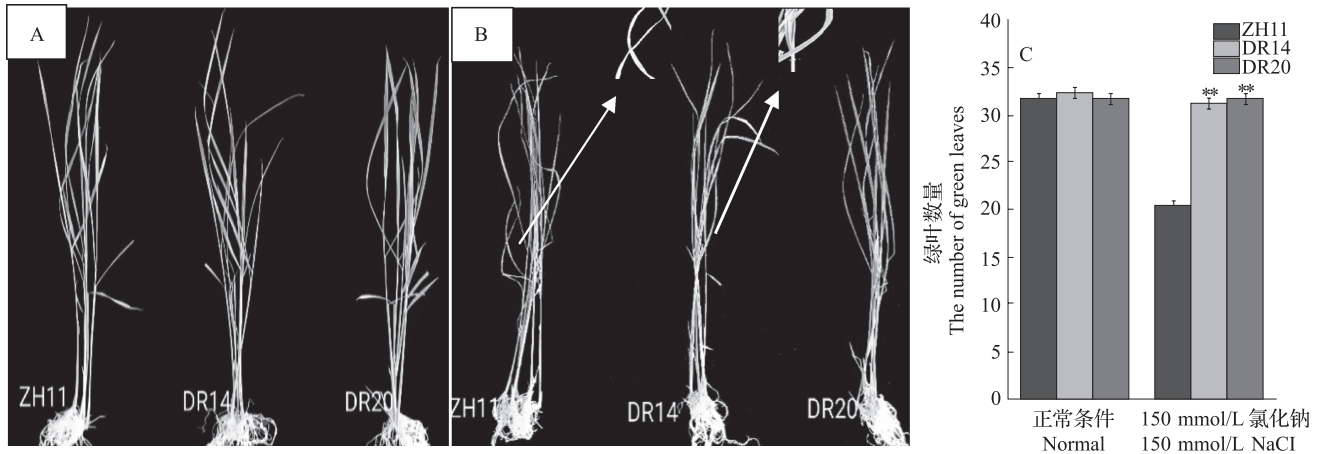
24 h 后, ZH11 植株叶尖蜷曲,茎下端叶片均干枯,而 *OsDSR2* RNAi 转基因植株叶片只有叶尖萎焉,并无干枯现象发生 (图 1B),统计结果表明,盐胁迫下转基因植株的绿叶数量极显著高于 ZH11 植株 ($P<0.01$) (图 1C),表明 *OsDSR2* RNAi 转基因水稻植株具有一定的耐盐性。

2.2 *OsDSR2* RNAi 转基因植株中细胞膜透性、膜质化程度以及叶绿素含量变化特征

由图 2A、B 可知,在正常条件下, *OsDSR2* RNAi 转基因植株和 ZH11 植株的细胞膜透性、

MDA 含量均没有显著性差异; 盐胁迫处理引起了两种不同材料的细胞膜透性和 MDA 含量的增加。其中, 与 ZH11 植株相比, 转基因植株的细胞膜透性极显著降低 ($P<0.01$), MDA 含量显著降低 ($P<0.05$) (图 2A、B), 转基因植株表现出细胞膜稳定性较好, 膜脂过氧化程度较轻, 受到的氧化损伤

较轻。此外正常条件下, *OsDSR2* RNAi 转基因植株的叶绿素含量显著低于 ZH11 植株的 ($P<0.05$); 盐胁迫条件下, 均造成两种不同材料的叶绿素含量下降, 但它们之间不存在显著性差异 (图 2C), 说明 *OsDSR2* RNAi 转基因植株可能通过抑制叶绿素含量的降低来增强耐盐性。



A: 正常条件; B: 150 mmol/L 氯化钠; 每个处理 3 次生物学重复, *SD* 值用误差棒表示, * 表示 $P<0.05$ 的显著水平, ** 表示 $P<0.01$ 的显著水平。下同
A: Normal, B: 150 mmol/L NaCl Three biological repeats of each treatment, *SD* value is represented by error bar, * means the significance level of $P<0.05$, ** means the significance level of $P<0.01$. The same as below

图 1 *OsDSR2* RNAi 转基因植株的表型鉴定与绿叶数量统计

Fig.1 Phenotype identification and the number of green leaves of *OsDSR2* RNAi transgenic plants

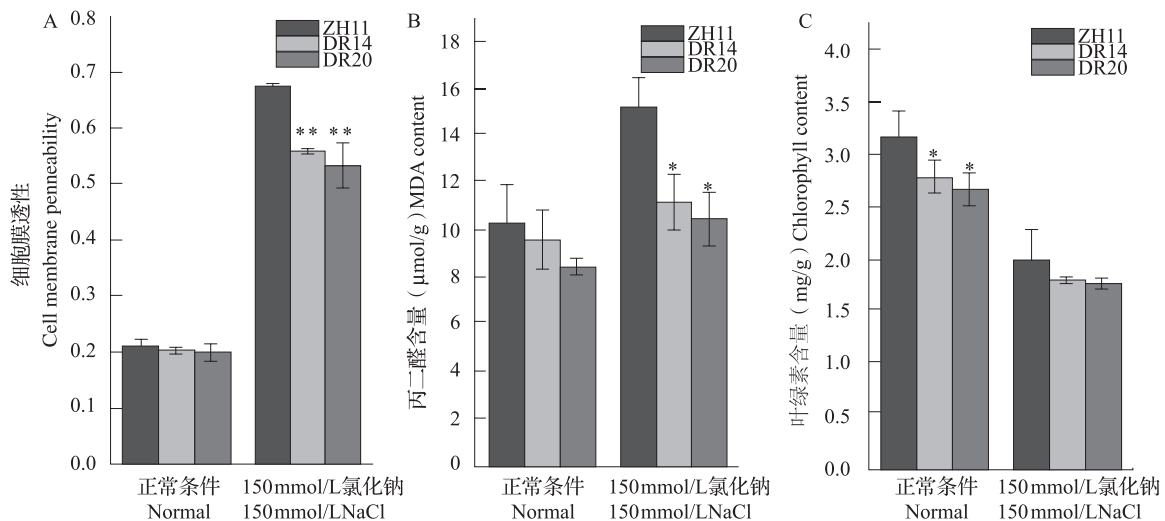


图 2 *OsDSR2* RNAi 转基因植株中细胞膜透性、丙二醛和叶绿素含量

Fig.2 The cell membrane permeability, malondialdehyde and chlorophyll content in *OsDSR2* RNAi transgenic plant

2.3 *OsDSR2* RNAi 转基因植株中脯氨酸 (Pro) 和可溶性糖 (SS) 含量的变化特征

由图 3 可知, 在正常条件下, 与 ZH11 植株相比, *OsDSR2* RNAi 转基因植株中的 Pro 和 SS 含量没有发生明显变化, 盐胁迫处理后, 两种转基因植株的 Pro 和 SS 含量均有不同程度增加, 其中, 转基因

植株中 Pro 含量显著高于 ZH11 植株 ($P<0.05$), SS 含量与 ZH11 植株相比变化不明显 ($P>0.05$), 以上结果说明 *OsDSR2* RNAi 转基因植株主要是通过积累 Pro 含量来增强耐盐性。

2.4 *OsDSR2* RNAi 植株中抗氧化酶活性的变化特征

由图 4 可知, 正常条件下, *OsDSR2* RNAi 转

基因植株和 ZH11 植株的 SOD、POD 和 CAT 活性均没有显著性差异;盐胁迫处理后,与 ZH11 植株相比,转基因植株中 SOD 活性显著高于 ZH11 植株 ($P<0.05$),POD 活性极显著高于 ZH11 植

株 ($P<0.01$),而 CAT 活性与 ZH11 植株之间无显著差异。以上结果表明,*OsDSR2* RNAi 转基因植株可通过增强 SOD 和 POD 的活性来提高水稻耐盐性。

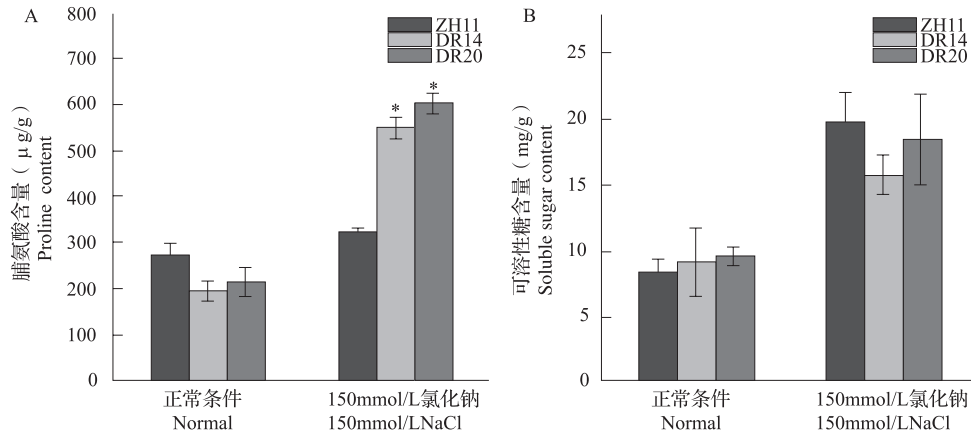


图 3 *OsDSR2* RNAi 转基因植株中的脯氨酸和可溶性糖含量

Fig.3 The proline and soluble sugar contents in *OsDSR2* RNAi transgenic plants

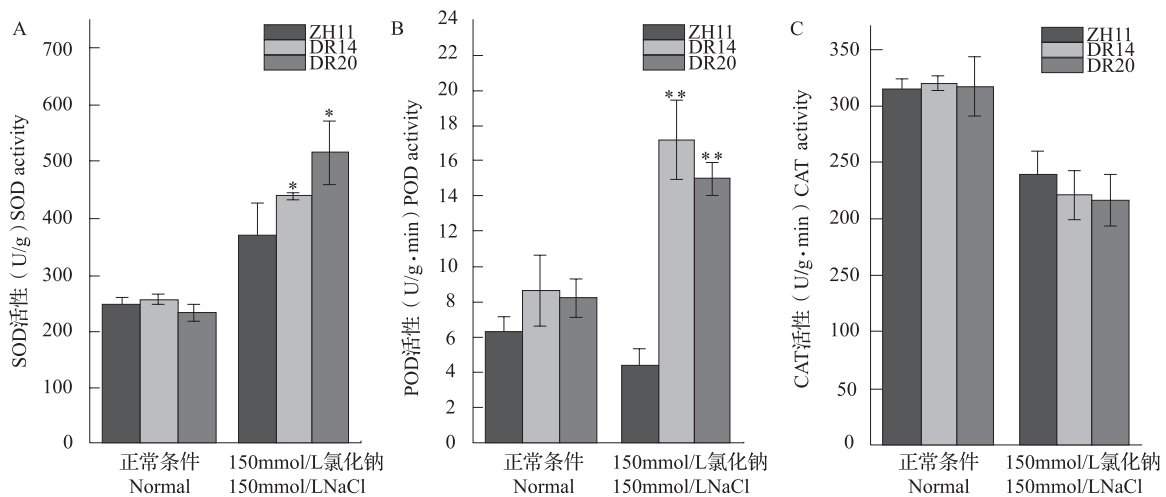


图 4 *OsDSR2* RNAi 转基因植株中的抗氧化酶活性

Fig.4 The activity of antioxidant enzyme in *OsDSR2* RNAi transgenic plant

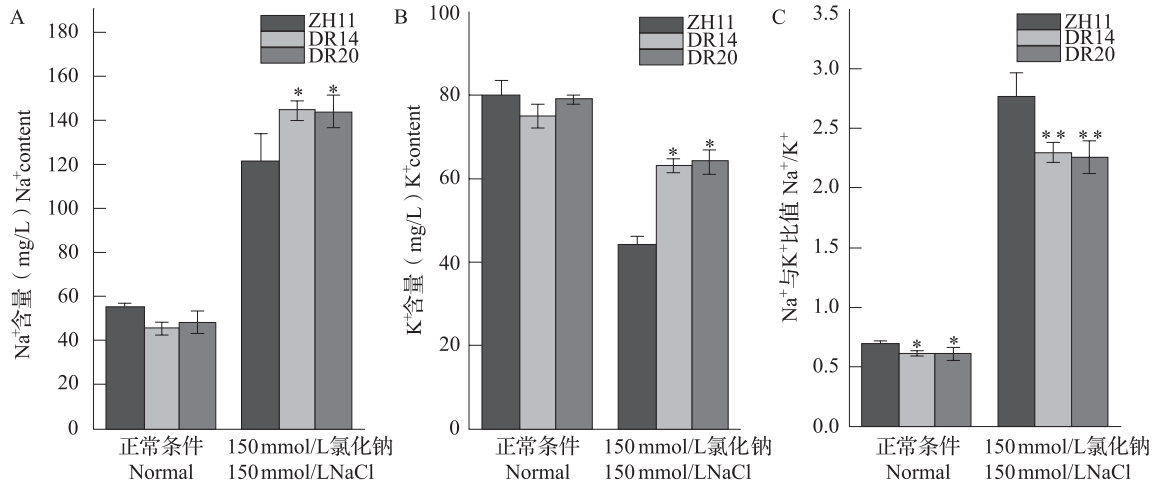
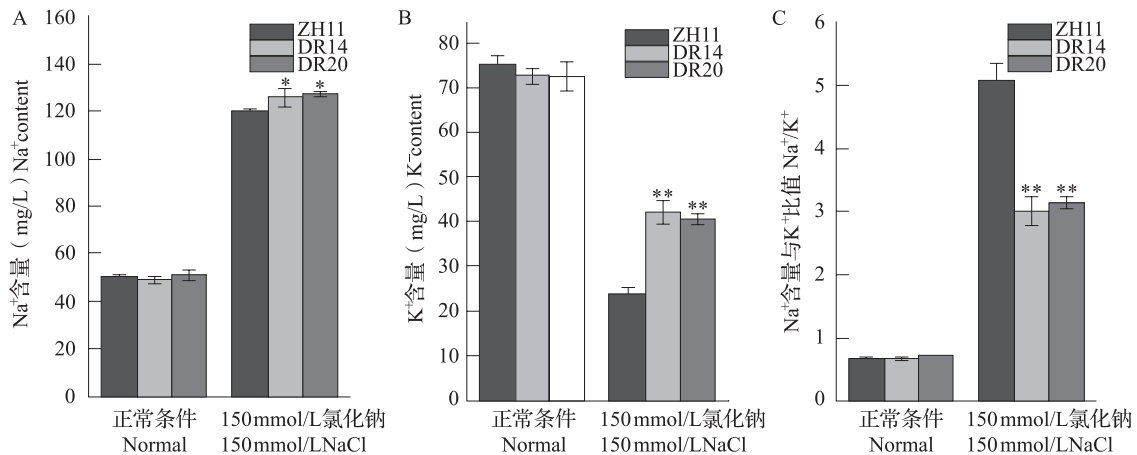
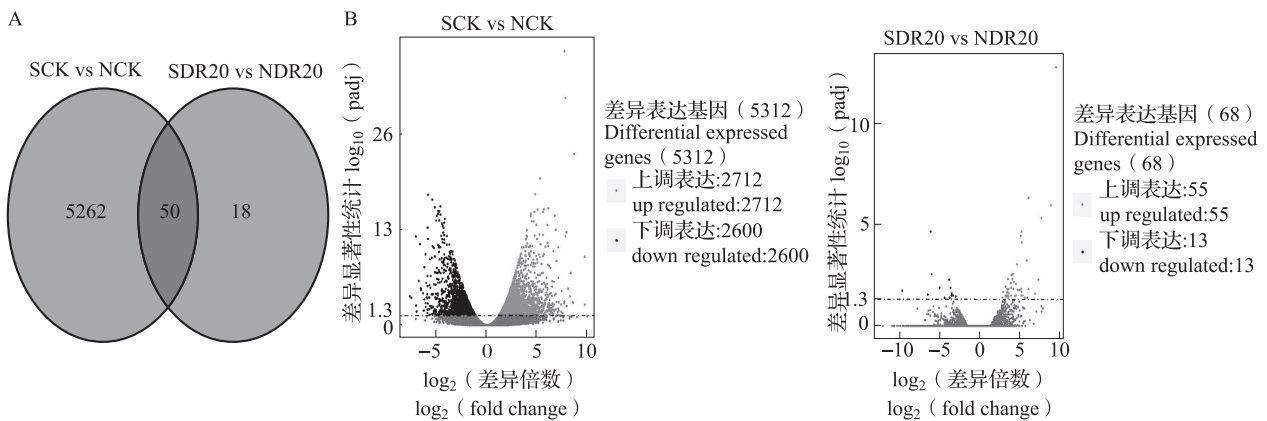
2.5 *OsDSR2* RNAi 植株中 Na^+ 、 K^+ 含量的变化特征

由图 5 和图 6 可知,正常条件下,*OsDSR2* RNAi 转基因植株和 ZH11 植株的根和地上部分中 Na^+ 、 K^+ 含量均无显著性差异。盐胁迫处理后,两种转基因植株的根和地上部分的 Na^+ 含量均增加(图 5A、图 6A), K^+ 含量均降低(图 5B、图 6B), Na^+/K^+ 均增加(图 5C、图 6C)。相比于 ZH11 植株,盐胁迫下 *OsDSR2* RNAi 转基因植株根和地上部分的 Na^+ 、 K^+ 含量显著或极显著增加 ($P<0.05$), Na^+/K^+ 极显著降低 ($P<0.01$),说明盐胁迫下,*OsDSR2* RNAi 转基因植株可能通过调节 Na^+/K^+ 来提高水稻耐

盐性。

2.6 转录组测序结果统计与分析

2.6.1 差异基因的筛选 在差异表达基因分析过程中,一般是将 Fold Change ≥ 2 且 FDR >0.05 作为筛选差异表达基因的标准。由图 7 可知,在本研究的转录组测序结果中,SCK vs NCK 组中共产生 5312 个差异表达基因,其中有 2712 个基因上调表达,2600 个基因下调表达;SDR20 vs NDR20 组中共产生差异表达基因 68 个,其中有 55 个上调表达,13 个基因下调表达,SCK vs NCK 和 SDR20 vs NDR20 两组之间共有 50 个共同差异表达基因。

图5 *OsDSR2* RNAi 转基因植株根中 Na^+ 、 K^+ 含量和 Na^+/K^+ 的变化Fig.5 The contents of Na^+ , K^+ and Na^+/K^+ in root of *OsDSR2* RNAi transgenic plant图6 *OsDSR2* RNAi 转基因植株地上部分 Na^+ 、 K^+ 含量和 Na^+/K^+ 的变化Fig.6 The contents of Na^+ , K^+ and Na^+/K^+ in shoot of *OsDSR2* RNAi transgenic plantA: *OsDSR2* RNAi 转基因植株和 ZH11 盐胁迫前后差异表达基因的韦恩图; B: *OsDSR2* RNAi 转基因植株和 ZH11 盐胁迫前后差异表达基因的火山图; SCK vs NCK: ZH11 盐胁迫前后的比较; SDR20 vs NDR20: *OsDSR2* RNAi 转基因植株盐胁迫前后; 下同

A: Venn of differentially expressed genes in *OsDSR2* RNAi transgenic plan and ZH11 before and after salt stress, B: MA of differentially expressed genes in *OsDSR2* RNAi transgenic plants and ZH11 before and after salt stress, SCK vs NCK: The comparison of ZH11 before and after salt stress, SDR20 vs NDR20: The comparison of *OsDSR2* RNAi transgenic plan before and after salt stress, the same as below

图7 差异表达基因的筛选

Fig.7 Selection of differentially expressed genes

2.6.2 差异表达基因的 GO 功能分析 为揭示盐胁迫下 *OsDSR2*RNAi 转基因植株发生显著性改变的生物学过程,对所有差异表达基因进行显著性富集分析($FDR \leq 0.05$) (图 8),在 SCK vs NCK 组中,差异表达基因显著富集在 8 个生物学过程中,其中细胞蛋白代谢过程 (cellular protein metabolic process) 和大分子修饰 (macromolecule modification) 过程中富集的差异基因较多,而在 SDR20 vs NDR20 组中,差异表达基因富集到 16

个生物学过程中,其中,在胁迫响应 (response to stress) 过程中富集的差异表达基因相对较多,在代谢过程 (catabolic process) 和细胞分解代谢过程 (cellular catabolic process) 中富集的差异表达基因次之,另有个别差异表达基因富集到活性氧响应 (response to reactive oxygen species) 和叶绿素生物合成 (chlorophyll biosynthetic process) 过程中,说明 *OsDSR2* 基因被干扰后,主要通过影响一些逆境相关基因的表达,使水稻做出了对盐胁迫的响应。

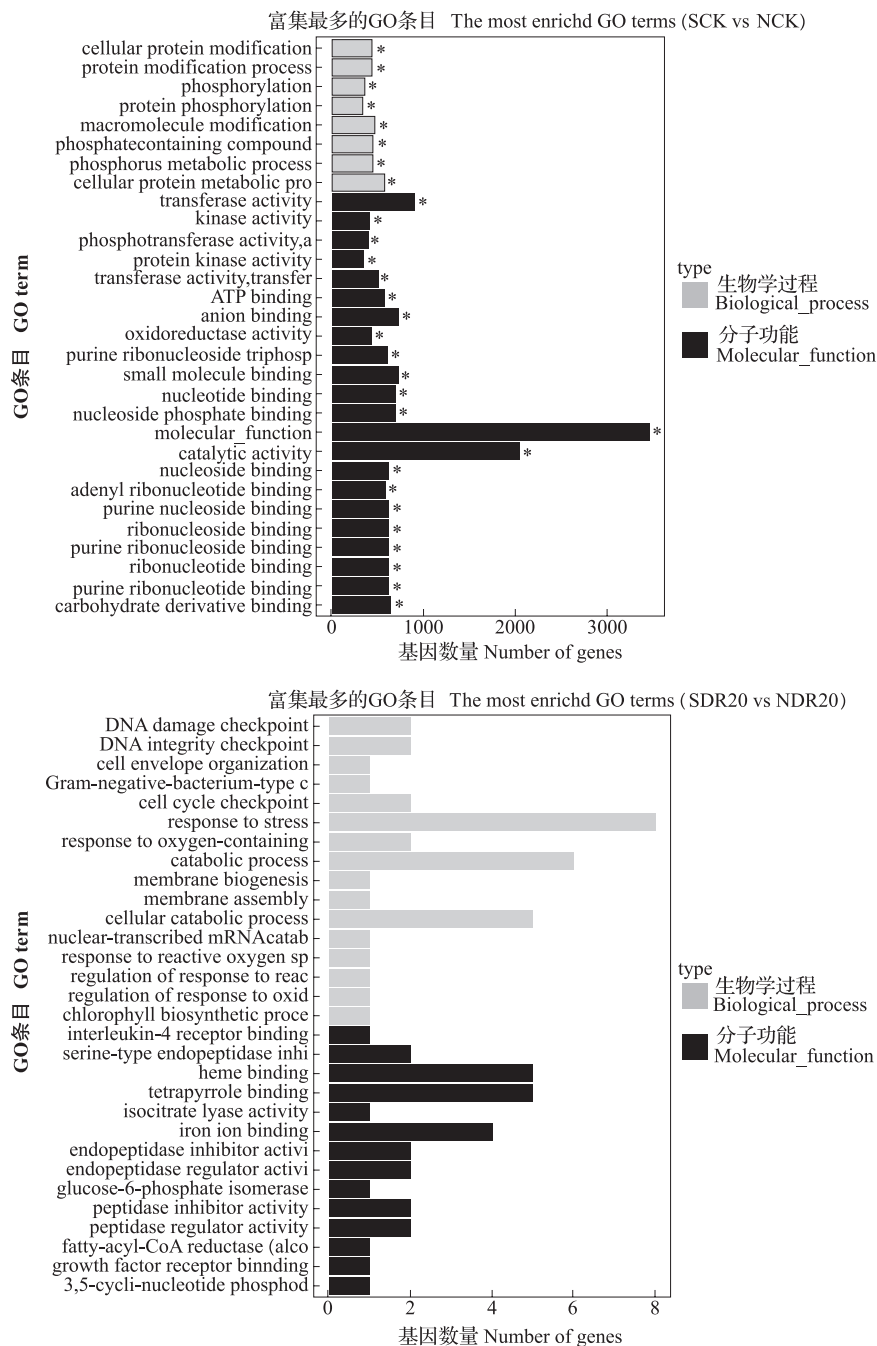
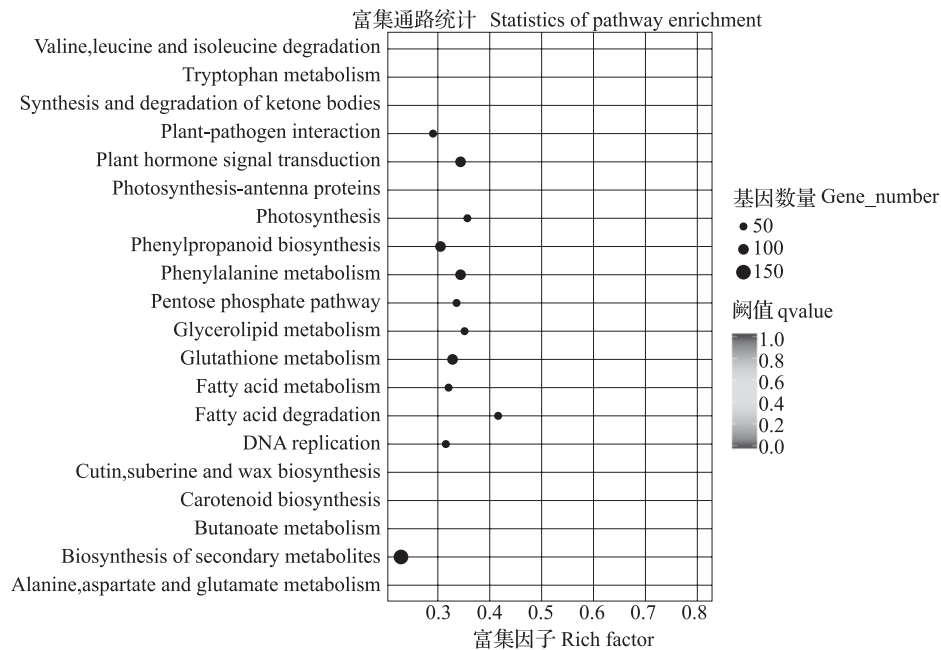


图 8 差异基因的 GO 富集分析

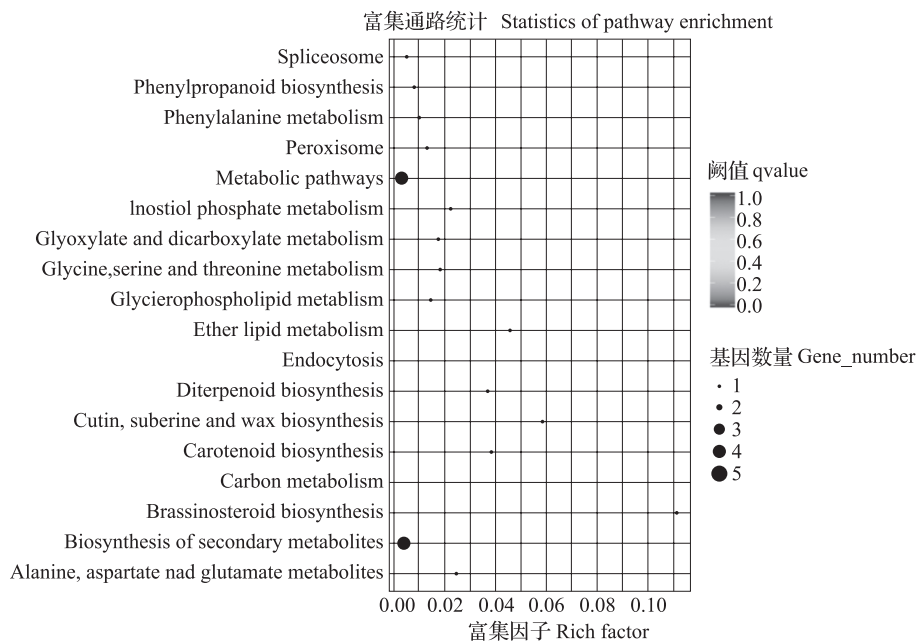
Fig.8 GO enrichment analysis of differentially expressed genes

2.6.3 差异表达基因的 KEGG 代谢通路分析 对 SCK vs NCK 和 SDR20 vs NDR20 两组的差异表达基因进行了 KEGG 代谢通路分析 ($FDR \leq 0.05$) (图 9), 在 SCK vs NCK 中, 差异表达基因在次生代谢物生物合成 (biosynthesis of secondary metabolism)、植物激素信号转导 (plant hormone signal transduction)、光合作用-天线蛋白 (photosynthesis-antenna proteins)、光合作用 (Photosynthesis) 等代谢通路中显著富

集, 而在 SDR20 vs NDR20 中, 差异表达基因除了显著富集在油菜素内酯生物合成 (brassinosteroid biosynthesis)、表皮素、软木脂和蜡质生物合成 (cutin, suberine and wax biosynthesis) 2 种代谢通路中, 也富集到类胡萝卜素生物合成 (carotenoid biosynthesis) 代谢通路中, 说明盐胁迫下 *OsDSR2* 基因可能参与 ABA、BR 信号代谢通路, 也可能参与了植物表皮蜡质合成代谢。



SCK vs NCK



SDR20 vs NDR20

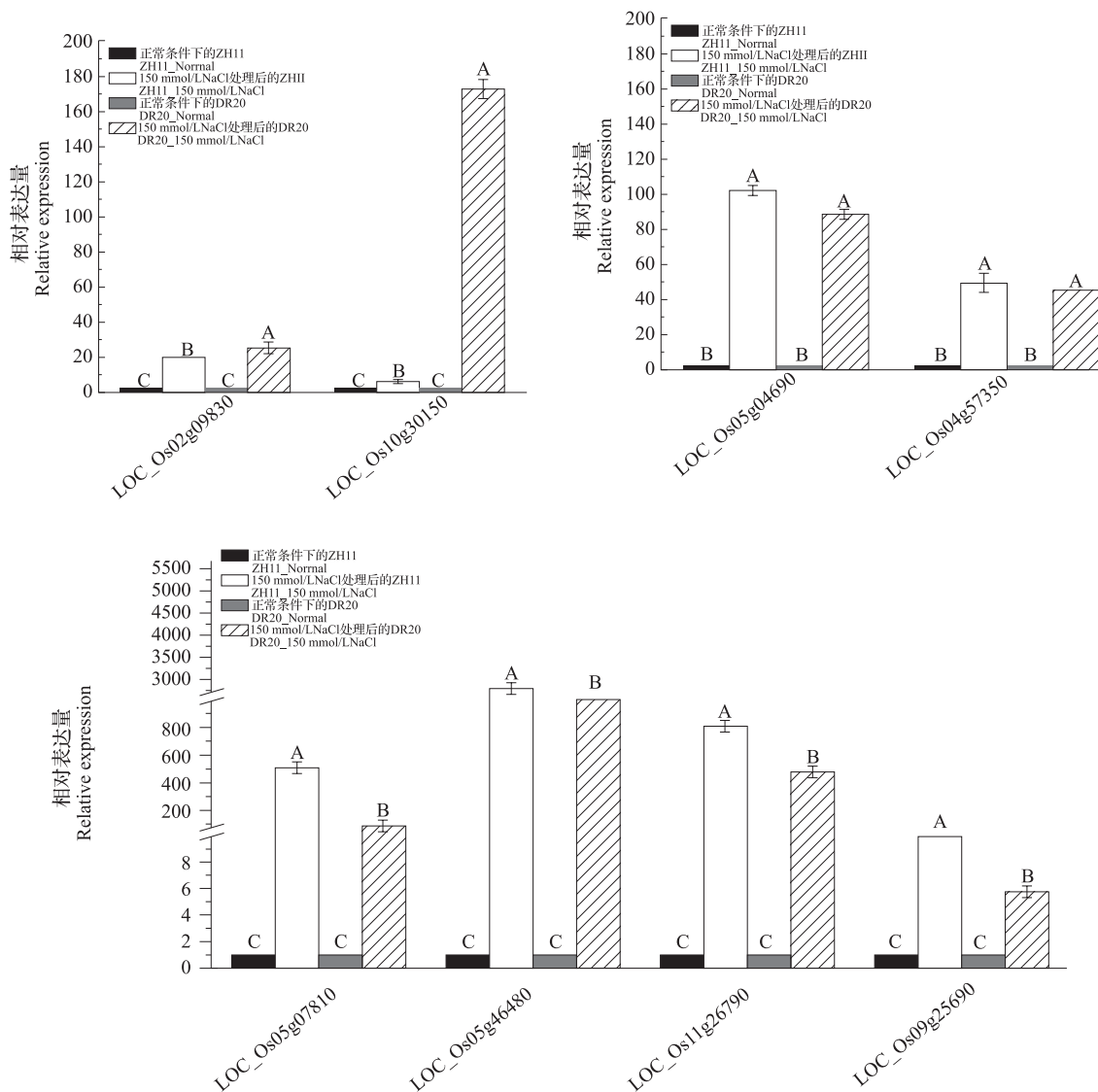
图 9 差异表达基因的 KEGG 富集分析

Fig.9 KEGG enrichment analysis of differentially expressed genes

2.7 差异表达基因的验证分析

本研究从 SDR20 vs NDR20 和 SCK vs NCK 中挑选了共有的 8 个差异表达基因 (LOC_Os05g07810、LOC_Os05g46480 (*OsLEA3*)、LOC_Os11g26790 (*RAB21*)、LOC_Os09g25690、LOC_Os02g09830 (*OsbZIP16*)、LOC_Os10g30150、LOC_Os05g04690 和 LOC_Os04g57350), 这些基因为几个已知的 ABA 合成和逆境胁迫相关基因, 以及几个预测可能是逆境相关的基因。为了验证转录组测序结果的真实性, 对它们的转录水平进行了 RT-qPCR 验证分析。由图 10 可知, 盐胁迫处理前, 这 8 个基因在 *OsDSR2* RNAi 转基因植株与 ZH11 植株

中的表达水平无显著性差异; 盐胁迫处理后, 8 个基因在两种植株间的表达水平均升高, 其中, LOC_Os05g04690 和 LOC_Os04g57350 在两种植株中的表达水平无显著性差异; LOC_Os02g09830 和 LOC_Os10g30150 在转基因植株中的表达水平极显著高于 ZH11 植株 ($P < 0.01$), 而 LOC_Os05g07810、LOC_Os05g46480、LOC_Os11g26790、LOC_Os09g25690 在转基因植株中的表达水平极显著低于 ZH11 植株 ($P < 0.01$); 尽管转录组测序分析与 RT-qPCR 分析获得的基因差异倍数在数值上不完全一致, 但差异表达基因的表达变化趋势基本相同, 说明转录组测序分析获得的差异表达基因结果较为可靠。



标准差为基于 3 次生物学重复, 大写字母表示差异极显著
Error bars represent the SE of three replicates, capital letters indicate a significant difference

图 10 差异表达基因的验证分析

Fig.10 Validation of differentially expressed genes

3 讨论

细胞膜对于维持植物细胞的稳定内环境和正常代谢活动起着至关重要的作用。王爱国等^[12]研究发现植物在逆境条件下膜透性的大小会发生改变,也常常会发生膜脂过氧化并产生 MDA,MDA 数值越大,表示质膜受到的伤害也越大。本研究结果表明,盐胁迫下 *OsDSR2* RNAi 转基因植株的细胞膜透性和 MDA 的含量极显著低于 ZH11 植株,说明 *OsDSR2* RNAi 转基因植株通过降低质膜所受的伤害来提高水稻耐盐性。Pro 和 SS 是很多非盐生植物的主要渗透调节剂,在盐胁迫下这些物质的含量迅速积累,起到维持植物细胞渗透平衡,防止植物脱水死亡的作用^[13-14]。在本研究中,盐胁迫下 *OsDSR2* RNAi 转基因植株中 Pro 含量显著高于 ZH11 植株,说明转基因植株可通过积累 Pro 含量减缓盐胁迫造成的渗透胁迫伤害。

研究表明,叶绿素含量的增加可以延缓叶片衰老,有利于保持较强的光合能力,而盐胁迫会引发水稻叶片叶绿素酶活性增强,加速叶绿素降解^[15]。在本研究中,正常条件下 *OsDSR2* RNAi 转基因植株中的叶绿素含量显著低于 ZH11 植株,而盐胁迫处理后两种材料的叶绿素含量无显著性差异,究其原因可能是盐胁迫更易引发盐敏感品种 ZH11 叶片中叶绿素酶活性增强,加速其叶绿素降解,而转基因植株可能通过积累较多 Pro 以此抑制了叶绿素酶活性的增加,从而降低了叶绿素的降解速度,使得盐胁迫处理后两种材料的叶绿素含量无显著性差异,这与 Rao 等^[16]在研究耐盐水稻抗逆生理变化时所得结论相似。抗氧化酶系统是一个重要的防御体系,可以有效地清除植物体内活性氧(ROS)的过量积累,使植物免受逆境胁迫的伤害^[17]。在本研究结果中,盐胁迫下 *OsDSR2* RNAi 转基因植株相对于 ZH11 植株,其体内的 SOD 和 POD 活性均显著性增加,说明 *OsDSR2* RNAi 转基因植株主要是通过 SOD 和 POD 组成的抗氧化酶系统降低盐胁迫对其造成的伤害,这与盐胁迫下 Gong 等^[14]和李婧男等^[18]的研究结论一致。

维持细胞内离子平衡的稳定是保障各种代谢过程正常进行的必要条件,盐胁迫下植物通常吸收 Na^+ 并同时抑制 K^+ 的吸收,并通过运转维持离子平衡,减小胁迫带来的危害,从而使植物做出对盐渍环境的适应^[19]。本研究中,盐胁迫处理后 *OsDSR2* RNAi 转基因植株和 ZH11 无论是根部还是地上部

分, Na^+ 含量和 Na^+/K^+ 均升高, K^+ 含量均降低,这与 Takahashi 等^[20]和赵佳伟等^[21]的研究结果一致,可能是由于 Na^+ 和 K^+ 有相似的离子半径和水合能,两者相互竞争转运体的同一结合位,从而使高浓度的 Na^+ 进入细胞后阻碍了细胞对 K^+ 的吸收所致^[22]。叶片组织中 Na^+/K^+ 的减少有利于保护其免受过量的 Na^+ 伤害和促进植物的生长发育,是一种重要的耐盐机制^[23],本研究中,盐胁迫下 *OsDSR2* RNAi 转基因植株无论是根还是地上部分,它们的 Na^+/K^+ 均极显著低于 ZH11 植株,说明转基因植株吸收和转运 K^+ 的能力强于吸收和转运 Na^+ 的能力,通过维持细胞内离子的相对平衡来提高耐盐性,这与高奔等^[24]和王波等^[25]的研究结果较为一致。*OsbZIP16* 为 bZIP 转录因子家族基因, Xiang 等^[26]的研究表明 *OsbZIP16* 参与调控了水稻的耐盐性; *OsLEA3* 编码胚胎发育晚期丰富蛋白质,转 *OsLEA3* 基因能够提高水稻的耐盐性^[27]。本研究的转录组学分析表明, *OsbZIP16*、*OsLEA3* 和 *RAB21* 基因被显著富集在胁迫应激反应和细胞分解代谢等生物学过程中,而且盐胁迫显著诱导了这些基因的上调表达,说明通过干扰表达 *OsDSR2* 基因的方式,可以起到诱导 *OsLEA3*、*OsbZIP16* 和 *RAB21* 等逆境相关基因表达的作用,从而使 *OsDSR2* RNAi 转基因植株获得了一定的耐盐性。蜡质是植物表皮与自然界之间的第一道屏障,已有研究报道蜡质在抵抗非生物胁迫发挥着重要的作用^[28]。本研究 KEGG 分析发现, *LOC_Os04g28620* 差异表达基因被富集在表皮素、软木脂和蜡质生物合成代谢通路中,说明通过干扰表达 *OsDSR2* 基因的方式,还可以调控蜡质合成相关基因的表达,起到减少 *OsDSR2* RNAi 转基因植株水分的损失,抵御盐胁迫造成的伤害。

Sakamoto 等^[29]发现 OsCYP734A6 蛋白是 BR 代谢酶,通过催化栗甾酮及其前体的代谢来调控植株体内的 BR 浓度。本研究结果中, *LOC_Os01g29150* (*CYP734A6*) 被显著富集到 BR 生物合成代谢通路中, BR 一类甾醇类激素研究发现它在抑制叶绿素降解,保护植物细胞结构免受破坏等方面起着重要作用^[30-31]。因此,本研究中 *OsDSR2* RNAi 转基因植株叶绿素降解程度低于 ZH11 植株的生理结果,说明了 *OsDSR2* 可能通过调控 BR 代谢通路相关基因 *CYP734A6* 的表达来减弱叶绿素的降解,从而提高植物的耐盐性。ABA 作为受逆境诱导的激素之一,不仅在植物发育的各个阶段发挥重要的调节作用,还能介导植物对一些逆境胁迫的生

理反应,如盐胁迫导致的气孔关闭,以增加植物的抗逆性等^[32-33]。多数高等植物的 ABA 是通过 C40 间接途径由类胡萝卜素合成的,ABA 的生物合成由一系列酶促反应完成,其中 9-顺式环氧类胡萝卜素双加氧酶(NCED, 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase)是其生物合成途径的关键酶之一^[34]。在本研究结果中,LOC_Os12g24800(*OsNCED2*)富集在类胡萝卜素生物合成(carotenoid biosynthesis)代谢通路中,说明通过干扰表达*OsDSR2*基因的方式,能够调控*OsNCED2*基因的表达,进而影响 ABA 合成途径。综合以上分析,本研究认为,*OsDSR2*可能通过依赖 ABA、BR 信号途径调控*OsZIP16*、*OsLEA3*、*RAB21*等逆境相关基因以及蜡质合成相关基因*LOC_Os04g28620*的表达,从而提高水稻的耐盐性。

参考文献

- [1] 余四斌,孙文强,王记林,黎志康. 水稻种质资源及其在功能基因组中的应用. 生命科学, 2016, 28(10): 1122-1128
Yu S B, Sun W Q, Wang J L, Li Z K. Germplasm resources of rice and its application in functional genome. Life Science, 2016, 28(10): 1122-1128
- [2] 胡涛,张鸽香,郑福超,曹钰. 植物盐胁迫响应的研究进展. 分子植物育种, 2018, 16(9): 3006-3015
Hu T, Zhang G X, Zheng F C, Cao Y. Research progress on plant salt stress response. Molecular Plant Breeding, 2008, 16(9): 3006-3015
- [3] Li N, Liu H, Sun J. Transcriptome analysis of two contrasting rice cultivars during alkaline stress. Scientific Reports, 2018, 8(1): 9586
- [4] Garg R, Shankar R, Thakkar B. Transcriptome analyses reveal genotype-and developmental stage-specific molecular responses to drought and salinity stresses in chickpea. Scientific Reports, 2016, 6(1): 19228
- [5] 罗成科,田蕾. 水稻 DUF966 基因家族的生物信息学分析. 分子植物育种, 2018, 15(12): 4791-4796
Luo C K, Tian L. Bioinformatics analysis of rice DUF966 gene family. Molecular Plant Breeding, 2018, 15(12): 4791-4796
- [6] Luo C K, Guo C M, Wang W J, Wang L J, Chen L. Overexpression of a new stress-repressive gene *OsDSR2* encoding a protein with a DUF966 domain increases salt and simulated drought stress sensitivities and reduces ABA sensitivity in rice. Plant Cell Reports, 2014, 33(2): 323-336
- [7] 高俊凤. 植物生理学实验指导. 北京: 高等教育出版社, 2006: 208-228
Gao J F. Experimental guidance of plant physiology. Beijing: Higher Education Press, 2006: 208-228
- [8] 汤章成. 现代植物生理学实验指南. 北京: 科学出版社, 2004: 314-348
Tang Z C. Experimental guidelines for modern plant physiology. Beijing: Science Press, 2004: 314-348
- [9] 王文生. 水稻盐胁迫全基因组表达谱及抗逆 DNA 甲基化时空变化分析. 北京: 中国农业科学院, 2010: 36-37
Wang W S. Genome-wide expression profile of salt stress in rice and analysis of temporal and spatial changes of DNA methylation resistance. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2010: 36-37
- [10] Trapnell C, Williams B A, Pertea G, Mortazavi A, Kwan G, van Baren M J, Salzberg S L, Wold B J, Pachter L. Transcript assembly and quantification by RNA-Seq reveals unannotated transcripts and isoform switching during cell differentiation. Nature Biotechnology, 2010, 28(5): 511-515
- [11] Finn R D, Bateman A, Clements J, Coghill P, Eberhardt R Y, Eddy S R, Heger A, Hetherington K H L, Mistry J, Sonnhammer E L L, Tate J, Punta M. Pfam: the protein families database. Nucleic Acids Research, 2014, 42: 222-230
- [12] 王爱国,邵从本,罗广华. 丙二醛作为植物脂质过氧化指标的探讨. 植物生理学通讯, 1986, 12(2): 55-57
Wang A G, Shao C B, Luo G H. Malondialdehyde as an indicator of lipid peroxidation. Communications in Plant Physiology, 1986, 12(2): 55-57
- [13] Christian Z, Schmitt S, Karl H M. Proteomic changes in maize roots after short-term adjustment to saline growth conditions. Proteomics, 2010, 10(24): 4441-4449
- [14] Gong B, Zhang C, Li X. Identification of NaCl and NaHCO₃ stress responsive proteins in tomato roots using iTRAQ-based analysis. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2014, 446(1): 417-422
- [15] 左海龙,肖珂,张永娟,张俊芝,冯迎军,董彦君. 控制水稻叶片叶绿素含量及其离体叶片叶绿素降解速度相关的 QTL 定位. 分子细胞生物学报, 2007, 40(5): 346-350
Zuo H L, Xiao K, Zhang Y J, Zhang J Z, Gong Y J, Dong Y J. QTL mapping for controlling chlorophyll content in rice leaves and chlorophyll degradation rate in isolated leaves. Acta Cytologica Sinica, 2007, 40(5): 346-350
- [16] Rao G G, Rao G R. Pigment composition and chlorophyllase activity in pigeon pea (*Cajanus indicus* Spreng) and Gingelly (*Sesamum indicum* L.) under NaCl salinity. Indian Journal of Experimental Biology, 1981, 19(8): 768-770
- [17] Gill S S, Tuteja N. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. Plant Physiology and Biochemistry, 2010, 48(12): 909-930
- [18] 李婧男,刘强,贺志宽,王平平. 盐胁迫对沙冬青幼苗生长与生理特性的影响. 植物研究, 2009, 29(5): 533-558
Li J N, Liu Q, Mao Z K, Wang P P. The effects of salt stress on the growth and physiological characteristics of the seedlings of *Ammopiptanthus mongolicus*. Plant Studies, 2009, 29(5): 533-558
- [19] Shi D, Sheng Y. Effect of various salt-alkaline mixed stress conditions on sunflower seedlings and analysis of their stress factors. Environmental and Experimental Botany, 2005, 54(1): 8-21
- [20] Takahashi R, Nishio T, Ichizen N, Takano T. Cloning and functional analysis of the K⁺ transporter, *PhaHAK2*, from salt-sensitive and salt-tolerant reed plants. Biotechnology Letters, 2007, 29(3): 501-506
- [21] 赵佳伟,李清亚,路斌,李艳,朱玉菲,栗浩,路丙社. 不同品种北美豆梨对 NaCl 胁迫的生理响应及耐盐性评价. 植物生理学报, 2019, 55(1): 23-31
Zhao J W, Li Q Y, Lu B, Li Y, Zhu Y F, Li H, Lu B S. Physiological response to NaCl stress and salt tolerance

- evaluation of different varieties of beanstalk pear. *Plant Physiology Journal*, 2019, 55 (1): 23-31
- [22] 王艳青, 蒋湘宁, 李悦, 周晓阳, 曾端香, 周金池. 盐胁迫对刺槐不同组织及细胞离子吸收和分配的变化. *北京林业大学学报*, 2001, 23 (1): 18-23
- Wang Y Q, Jiang X N, Li Y, Zhou X Y, Zeng R X, Zhou J C. The changes of ion absorbing and distribution in different organ and cell of *Robinia pseudoacacia* seedlings for salt stress. *Journal of Beijing Forestry University*, 2001, 23 (1): 18-23
- [23] Tester M, Davenport R. Na^+ tolerance and Na^+ transport in higher plants. *Annals of Botany*, 2003, 91 (5): 503-527
- [24] 高奔, 宋杰, 刘金萍, 隋娜, 范海, 王宝山. 盐胁迫对不同生境盐地碱蓬光合及离子积累的影响. *植物生态学报*, 2010, 34 (6): 671-677
- Gao B, Song J, Liu J P, Sui N, Fan H, Wang B S. Effects of salt stress on photosynthesis and ion accumulation patterns of *Suaeda salsa* under different habitats. *Chinese Journal of Plant Ecology*, 2010, 34 (6): 671-677
- [25] 王波, 张金才, 宋凤斌, 赵敏, 韩希英. 燕麦对盐碱胁迫的生理响应. *水土保持学报*, 2007, 21 (3): 86-89
- Wang B, Zhang J C, Song F B, Zhao M, Han X Y. Physiological response of oats to salinity stress. *Journal of Soil and Water Conservation*, 2007, 21 (3): 86-89
- [26] Xiang Y, Tang N, Du H, Ye H Y, Xiong L Z. Characterization of *OsZIP23* as a key player of the basic leucine zipper transcription factor family for conferring abscisic acid sensitivity and salinity and drought tolerance in rice. *Plant Physiology*, 2008, 148: 1938-1952
- [27] Hu T Z. *OsLEA3*, a late embryogenesis abundant protein gene from rice, confers tolerance to water deficit and salt stress to transgenic rice. *Russian Journal of Plant Physiology*, 2008, 55: 530-537
- [28] Riederer M. Thermodynamics of the water permeability of plant cuticles: characterization of the polar pathway. *Journal of Experimental Botany*, 2006, 57: 2937-2942
- [29] Sakamoto T, Kawabe A, Tokida-Segawa A, Shimizu B, Takatsuto S, Shimada Y, Fujioka S, Mizutani M. Rice *CYP734As* function as multisubstrate and multifunctional enzymes in brassinosteroid catabolism. *The Plant Journal*, 2011, 67 (1): 1-12
- [30] Bajguz A, Hayat S. Effects of brassinosteroids on the plant responses to environmental stresses. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2009, 47: 1-8
- [31] Shahbaz M, Ashraf M, Athar H U R. Does exogenous application of 24-epibrassinolide ameliorate salt induced growth inhibition in wheat (*Triticum aestivum* L.)?. *Plant Growth Regulation*, 2008, 55 (1): 51-64
- [32] Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K. Gene networks involved in drought stress response and tolerance. *Journal of Experimental Botany*, 2007, 58: 221-227
- [33] Nambara E, Marion-Poll A. Absciscic acid biosynthesis and catabolism. *Annual Review of Plant Biology*, 2005, 56: 165-185
- [34] Qin X, Zeevaert J A. The 9-cis-epoxycarotenoid cleavage reaction is the key regulatory step of abscisic acid biosynthesis in water-stressed bean. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1999, 96: 15354-15361