

OsWRKY45影响水稻抗旱性

孔 丽

浙江师范大学生命科学学院, 浙江 金华

收稿日期: 2024年3月18日; 录用日期: 2024年4月16日; 发布日期: 2024年4月24日

摘 要

本文以野生型水稻石豸白毛 (SSBM) 和 *OsWRKY45* 过表达 (35S-*WRKY45-Flag*) 为实验材料, 使用 PEG6000 模拟干旱处理, 研究其在干旱条件下表达模式及生理指标。结果表明, PEG 处理诱导了 *WRKY45* 的表达, 35S-*WRKY45-Flag* 的光合速率、气孔导度及蒸腾速率与野生型相比显著降低, 且 35S-*WRKY45-Flag* 增加了水稻的耐旱性; PEG 处理两天后, SSBM 的 SPAD 值、地上部鲜重与根鲜重都显著降低, 而 35S-*WRKY45-Flag* 处理后 SPAD 值与根鲜重无显著变化, 地上部鲜重显著降低, 且处理后 35S-*WRKY45-Flag* 的 SPAD 值、地上部鲜重与根鲜重都显著高于处理后的 SSBM。总之, 35S-*WRKY45-Flag* 在一定程度上增加了水稻耐旱性。

关键词

OsWRKY45, 耐旱性, SPAD

OsWRKY45 Affects the Drought Resistance of Rice

Li Kong

College of Life Sciences, Zhejiang Normal University, Jinhua Zhejiang

Received: Mar. 18th, 2024; accepted: Apr. 16th, 2024; published: Apr. 24th, 2024

Abstract

This article uses wild-type rice variety SSBM and *OsWRKY45* over expression (35S-*WRKY45-Flag*) as experimental materials, and uses PEG6000 to simulate drought treatment to study their expression patterns and physiological indicators under drought conditions. The results showed that PEG treatment induced the expression of *WRKY45*, and the photosynthetic rate, stomatal conductance, and transpiration rate of 35S-*WRKY45-Flag* were significantly reduced compared to the wild

type. Moreover, 35S-WRKY45-Flag increased the drought resistance of rice; after two days of PEG treatment, the SPAD value, fresh aboveground weight, and fresh root weight of SSBM significantly decreased, while there was no significant change in SPAD value and fresh root weight after treatment with 35S-WRKY45-Flags. The fresh aboveground weight significantly decreased, and the SPAD value, fresh aboveground weight, and fresh root weight of 35S-WRKY45-Flags were significantly higher than those of SSBM after treatment. In summary, 35S-WRKY45-Flag has to some extent increased the drought tolerance of rice.

Keywords

OsWRKY45, Drought Tolerance, SPAD

Copyright © 2024 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

水稻(*Oryza sativa* L.)是一种重要的谷类作物,世界上将近一半的人口将其作为主食,其中亚洲国家贡献了超过50%的水稻产量[1][2],而在水稻的生长发育过程中会受到一系列的非生物胁迫,例如:干旱、土壤盐渍化、寒冷、高温以及营养元素的缺失等。这些非生物胁迫对于作物的生长发育以及生产力的发展具有极大的负面影响。随着全球气候变化加剧和人口的不断增长,农业用水需求的增加以及可利用淡水量的降低,干旱胁迫已经成为影响植物产量的一个重要因素,据估计,世界上约三分之一的农田遭受干旱胁迫;且干旱的强度和严重程度很难预测,因为它取决于多种因素,如降雨频率、蒸发速率和土壤水分[3][4][5]。长期干旱胁迫会抑制水稻的根系生长和养分吸收,从而影响水稻生长以及产量[6][7],在所有非生物因素中,干旱胁迫每年会降低近50%的水稻产量[8],因此,干旱胁迫已成为农业生产中的一个重要逆境,预计在2050年全球农业需水量将增加一倍,然而淡水供应量可能减少40%~60%[9][10]。因此,提高作物抗旱能力对于农业可持续发展尤为重要,这也要求我们在了解植物干旱胁迫耐受机制的基础上,进一步培育耐旱品种,提高水稻耐旱能力。

WRKY 基因家族是高等植物中最大的转录因子家族之一,在整个植物谱系中均有发现,在调控植物许多生物过程信号网络过程中发挥着重要作用。WRKY 转录因子具有多种生物学功能,在植物的生长发育和衰老、非生物和生物胁迫等过程中发挥着重要的作用。WRKY 转录因子可与靶基因启动子中的 W-box TTGAC (C/T)结合,通过自调节或交叉调节激活或抑制下游基因的表达来调控植物对各种胁迫的反应。在蛋白水平上,WRKY 转录因子可以与多种蛋白相互作用,包括 MAP 激酶、组蛋白去乙酰化酶、抗性 R 蛋白、多种转录因子等,调节植物的生长发育或各种应激反应。

OsWRKY45,它属于 WRKY 家族的第 III 组,包含一个保守的 WRKY 结构域,其在植物应对生物胁迫和非生物胁迫中发挥着重要作用。在水稻(*Oryza sativa*)中,*OsWRKY13*、*OsWRKY45*、*OsWRKY53* 和 *OsWRKY89* 调节植物病原抗性,机械损伤、茉莉酸(jasmonic acid, JA)、水杨酸(salicylic acid, SA)处理均能诱导 *OsWRKY45* 表达。*OsWRKY45* 定位于细胞核,并在褐飞虱(*Nilaparvata lugens* (Stal), BPH)诱导的抗病性中发挥关键作用[11][12]。粳稻的 *OsWRKY45-1* 和来自籼稻的 *OsWRKY45-2* 是位于水稻 5 号染色体上的等位基因[13]。二者都参与了水稻对非生物胁迫的调控和适应,正调控或负调控水稻对脱落酸信号和盐胁迫的反应,但都负调控水稻对寒冷和干旱胁迫的反应,已有研究表明, *OsWRKY45* 突变体对盐和 PEG 的耐受性较差,在盐和

PEG 处理后, *OsWRKY45* 突变体的 H_2O_2 水平低于野生型, 气孔导度高于野生型[14]。

本文选择了水稻野生型石狩白毛以及相应的 *OsWRKY45* 转基因材料, 探讨其在干旱处理下的基因表达模式及各项生理指标, 为进一步揭示 *OsWRKY45* 在水稻耐旱机制中的作用打下了基础, 对于研究水稻应对干旱胁迫, 提高水稻产量有一定意义。

2. 实验材料与方法

2.1. 实验材料

本文所用材料为水稻石狩白毛野生型以及相应的 *OsWRKY45* (LOC_Os05g25770)转基因材料。

2.2. 过表达载体的构建以及转基因植株表达量分析

本实验构建了一个 35S-*OsWRKY45-Flag* 表达载体进行后续实验, 本实验用野生型水稻 SSBM 的 cDNA 扩增出 *OsWRKY45* 基因的编码区(见表 1), 利用限制性核酸内切酶 *Kpn1*、*Sal1* 对其进行双酶切, 然后连入用相同酶切后的 35S-1300-Flag 载体中, 通过转基因获得材料植株, 用于接下来分析鉴定。

Table 1. cDNA sequence primers

表 1. cDNA 序列引物

35S- <i>OsWRKY45-Flag-F</i>	GGGGTACCATGACGTCATCGATGTCGCC
35S- <i>OsWRKY45-Flag-R</i>	ACGCGTCGACAGTTTTTCGAGTTTGGGTATT

2.3. 鉴定转基因阳性苗

获得转基因苗后, 提取其水稻基因组 DNA, 用 *OsWRKY45* 鉴定引物进行 PCR 扩增, 野生型 SSBM 作为阴性对照, 重组质粒作为阳性对照。鉴定阳性的转基因苗提取总 RNA, 进行逆转录及定量 RT-PCR, 测定其增强倍数。

2.4. 实验材料的培养

选取近期收取的种子, 放入 37℃烘箱中烘干, 一周后挑选颗粒饱满、大小相仿的水稻种子, 剥去颖壳, 将其放在水中完全浸泡, 37℃催芽, 每 12 小时左后更换一次种子水, 培养 2~3 天, 直至种子露白。

在 10 L 的培养桶中加入水稻全营养液, 桶中放入尼龙纱网, 将露白的种子均匀地播种在纱网上, 放入温室中培养 7 天左右, 培养箱条件设置为夜间 22℃, 白天 30℃, 光照时间 12 小时。7 天后将水稻幼苗从纱网上移至泡沫板上, 在全营养液中继续培养 7 天。

22.5% PEG-6000 处理: 7 天后选取 8~10 颗生长状况相似的水稻, 其中 4~5 颗放入全营养液继续培养, 作为对照组; 另外 4~5 颗放入含有 22.5% PEG-6000 的全营养液中培养 48 h, 该组为实验组, 两组实验条件保持不变。

2.5. SPAD 值测定方法

将材料处理两天后, 使用 SPAD 叶绿素仪, 选取差异显著的叶片进行测量, 本实验选取野生型和转基因苗的第五片叶(L5)。

2.6. 数据处理

采用 Excel 软件进行数据处理, 用 Graphpad primer9 进行统计分析并作图, 显著性水平为 $P < 0.05$ 。

3. 结果与分析

3.1. PEG 处理诱导 *OsWRKY45* 的表达

为了明确 PEG 处理对 *WRKY45* 表达的影响, 我们构建了 *OsWRKY45*-GUS 载体, 并鉴定了转基因植株, 获得 GUS 阳性苗。将正常生长两周的 GUS 阳性苗一部分用 22.5% 的 PEG-6000 处理, 一部分仍在全营养液中生长。处理两天后, 分别剪下对照和处理的 GUS 苗根部和倒二叶的叶中部分(将根部洗净并吸干水分, 叶片切成 2~3 mm 宽的小段), 完全浸入 GUS 染液中, 出现蓝色时去除染液, 将叶片放入 70% 的乙醇中终止染色, 并每 24 小时更换一次乙醇, 直至叶片表面颜色褪去, 将根部进行扫描, 叶片使用 Lecia 显微镜进行观察记录。

观察结果显示, PEG-6000 模拟干旱处理诱导了 *OsWRKY45* 在根中的表达水平, 在地上部, 该基因在维管束中的表达在干旱之后更加强烈(图 1)。



注: 图 a: 左侧为水稻正常营养液培养, 右侧为 22.5% PEG 处理 48 h; 图 b: 水稻正常营养液培养叶片; 图 c: 22.5% PEG 处理 48 h 叶片。

Figure 1. Expression pattern of *OsWRKY45* in response to drought stress
图 1. *OsWRKY45* 在干旱胁迫响应下的表达模式变化

为了进一步验证干旱处理会诱导 *OsWRKY45* 的表达, 对水稻野生型植株进行 22.5% 的 PEG-6000 处理, 取处理不同时间的样品进行 qRT-PCR, 结果表明处理不同时间后, *OsWRKY45* 的表达均被显著诱导, 处理 12 h、24 h、36 h 后, *OsWRKY45* 的表达分别被诱导了 15 倍、7.5 倍和 5 倍, 这也进一步表明, PEG 处理会诱导 *OsWRKY45* 的表达(图 2)。

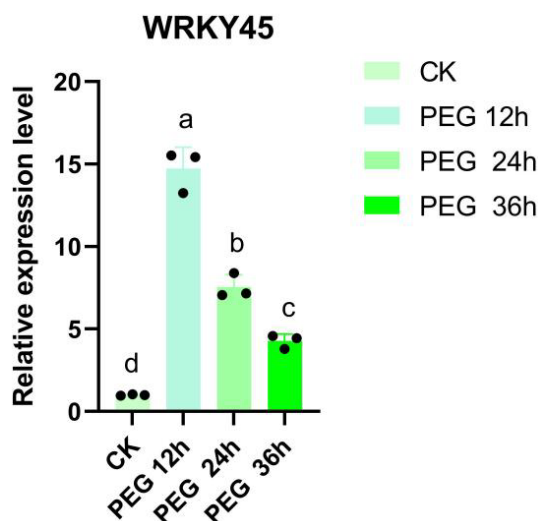


Figure 2. Relative expression level of *OsWRKY45* in wild-type rice before and after PEG treatment

图 2. 水稻野生型 PEG 处理前后 *OsWRKY45* 的相对表达量变化

3.2. *OsWRKY45* 过表达增强倍数测定

获得转基因苗后, 提取其基因组 DNA, 用 *OsWRKY45* 鉴定引物进行 PCR 扩增, 鉴定阳性的转基因苗提取总 RNA, 进行逆转录及定量 PT-PCR 后, 发现 35S-*WRKY45-Flag* 较野生型相比增强 11 倍左右(图 3)。

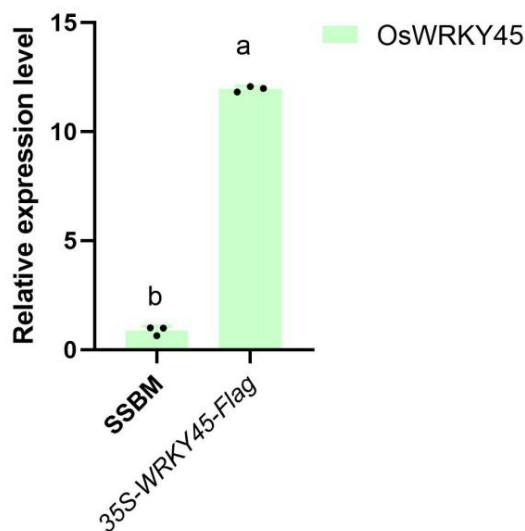


Figure 3. 35S-*WRKY45-Flag* enhancement factor

图 3. 35S-*WRKY45-Flag* 增强倍数

3.3. SSBM 与 *OsWRKY45* 过表达光合速率、蒸腾速率及气孔导度的测定

已有研究表明, 在盐和 PEG 处理后, *OsWRKY45* 突变体的气孔导度高于野生型[14]。因此在获得 *OsWRKY45* 过表达阳性苗后, 我们将野生型水稻 SSBM 与 35S-*WRKY45-Flag* 在全营养液中培养 4 周, 对野生型和转基因苗的倒二叶叶中进行测量, 并使用 Graphpad prism 软件进行数据分析并作图。由图可知, 正常生长 4 周后, 35S-*WRKY45-Flag* 的光合速率较野生型降低 5 倍, 气孔导度与蒸腾速率较野生型均显

著降低, 与之前的结果一致(图 4)。

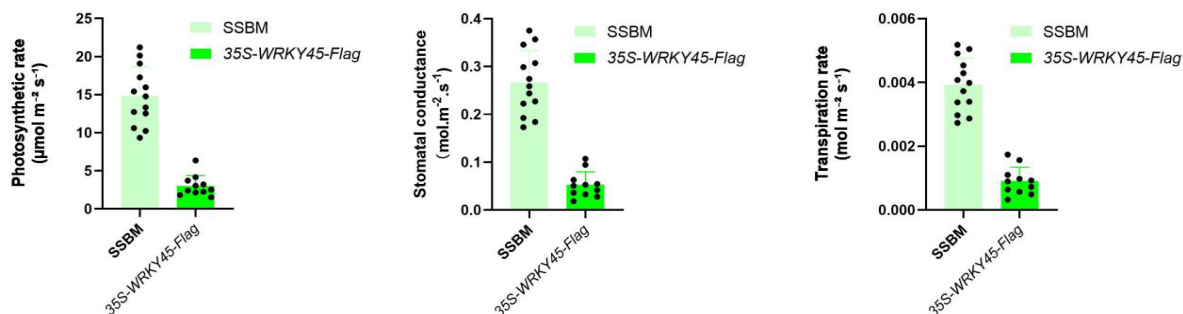
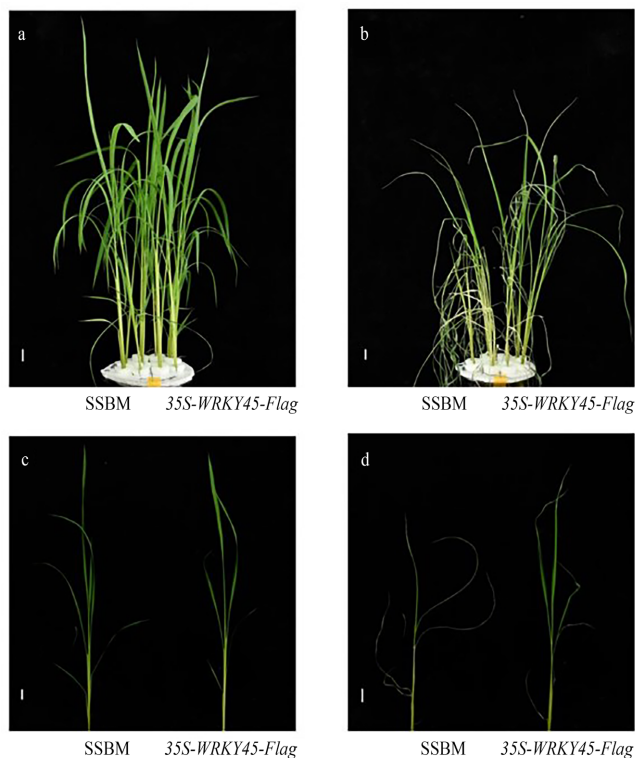


Figure 4. Determination of photosynthetic rate, stomatal conductance, and transpiration rate of SSBM and 35S-WRKY45-Flag
图 4. SSBM、35S-WRKY45-Flag 光合速率、气孔导度、蒸腾速率测定

3.4. *OsWRKY45* 过表达增强了水稻耐旱性

为了明确 *WRKY45* 对水稻耐旱性的影响, 我们构建了 *WRKY45* 过表达载体, 并鉴定了转基因植株, 获得 *WRKY45* 过表达的转基因苗。我们将正常生长两周的野生型(SSBM)与转基因苗用 22.5%的 PEG-6000 进行处理, 处理三天后发现, *WRKY45* 过表达表现出更耐旱的表型, PEG 处理三天后, 野生型大部分叶片出现干枯、卷曲和弯折等现象, 过表达株系叶片卷曲和弯折现象较轻, 耐旱性较强(图 5)。



注: 图 a、c 正常状态下 SSBM 和 35S-WRKY45-Flag 生长状态;
 图 b、d 干旱处理后 SSBM 和 35S-WRKY45-Flag 生长状态。

Figure 5. Survival status of SSBM and 35S-WRKY45-Flag before and after drought treatment

图 5. 干旱处理前后 SSBM 和 35S-WRKY45-Flag 存活状态

3.5. SSBM 与 *OsWRKY45* 过表达干旱胁迫下生物量测定

我们将正常生长两周的野生型(SSBM)与转基因苗用 22.5%的 PEG-6000 进行处理, 处理三天后, 使用 SPAD-502 叶绿素仪对野生型和转基因苗的第五片叶叶中进行测量, 并使用 Graphpad prism 软件进行数据分析并作图。由图可知, 在 PEG 处理三天后, 野生型 SSBM 的 SPAD 值较对照相比显著减少, *WRKY45* 过表达的 SPAD 值经过处理后无明显变化, 且其 SPAD 值显著大于处理后的野生型。之后对野生型和过表达的地上部及根的新鲜重进行了测量, 结果发现, 经过处理后, SSBM 和 *45-Flag* 的地上部鲜重与对照相比都显著减少, 且处理后, *45-Flag* 地上部鲜重显著高于 SSBM。经过处理后, SSBM 的根部鲜重与对照相比显著降低, *45-Flag* 处理后与对照无显著差异(图 6)。

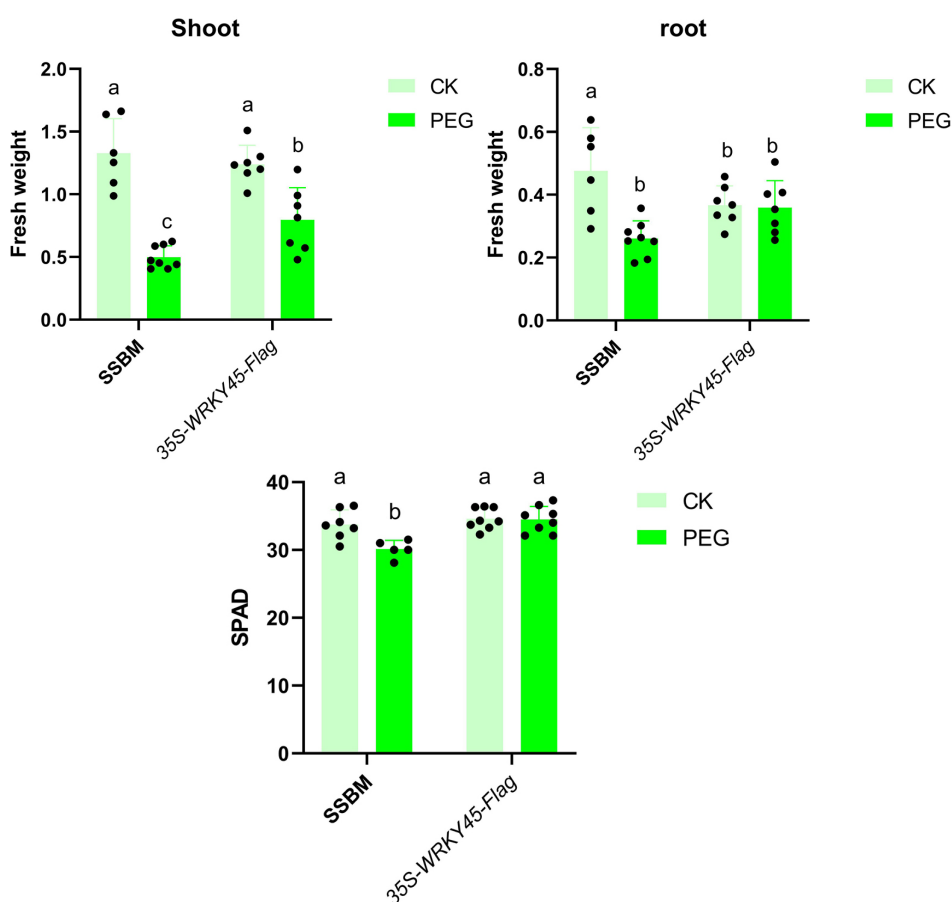


Figure 6. Biomass measurement under drought treatment
图 6. 干旱处理下生物量测定

4. 结论

快速变化的气候条件以及土壤情况影响了正常的农业生产力, 并威胁到全球粮食安全[15]。干旱胁迫下的水稻, 由于其形态生理、生化和分子反应发生变化, 从而表现出生长发育不良, 产量降低的性状[16] [17] [18]。在所有非生物胁迫中, 干旱胁迫每年会降低近 50%的水稻产量[8], 因此, 干旱胁迫已成为农业生产中的一个重要逆境。为了应对干旱胁迫, 植物也进化出了相互关联的调节机制。在水稻中, *WRKY* 转录因子具有多种生物学功能, 参与调控了植物的生长发育和衰老、非生物和生物胁迫等许多生物学过程。本文所研究的 *OsWRKY45*, 它属于 *WRKY* 家族, 在植物应对生物胁迫和非生物胁迫中发挥着重要作

用。先前研究表明, *OsWRKY45* 突变体对盐和 PEG 的耐受性较差, 在盐和 PEG 处理后, *OsWRKY45* 突变体的 H_2O_2 水平低于野生型, 气孔导度高于野生型, 说明 *OsWRKY45* 在水稻应对干旱胁迫方面发挥作用。

为了探究干旱胁迫对 *OsWRKY45* 表达量的影响, 我们构建了 *OsWRKY45-GUS* 表达载体, 获得了 GUS 阳性苗, 我们使用 PEG-6000 模拟干旱胁迫处理 *OSWRKY45-GUS* 阳性苗, 染色发现该基因被干旱诱导, 同时我们取处理不同时间的样品进行 qRT-PCR, 进一步证明该基因被干旱诱导。因此我们构建了 *WRKY45* 过表达载体, 我们发现 *35S-WRKY45-Flag* 的光合速率、蒸腾速率及气孔导度较野生型均显著降低。之后对转基因苗进行 PEG 处理三天后, *WRKY45* 过表达表现出更耐旱的表型, 其叶片卷曲和弯折程度比野生型较轻; 我们对二者的 SPAD 值、地上部鲜重和根鲜重进行测量发现, 处理后的 *WRKY45* 过表达株系生物量要显著高于野生型, *WRKY45* 过表达株系较野生型更耐旱。

迄今为止, 非生物胁迫仍是阻碍我国农作物产量的关键因素之一, 本文发现 *OsWRKY45* 会影响水稻抗旱性, 其过表达后会增强水稻在干旱条件下的生存能力。在植物应对干旱胁迫的复杂机制中, *OsWRKY45* 发挥了怎样的作用, 以及其作用机制仍需进一步研究。之后我们也将继续研究 *OsWRKY45* 的作用机制, 期望为水稻耐旱研究提供理论基础。

参考文献

- [1] FAO (2015) Statistical Pocketbook. Food and Agriculture Organization of the United Nations.
- [2] Donde, R., *et al.* (2019) Computational Characterization of Structural and Functional Roles of DREB1A, DREB1B and DREB1C in Enhancing Cold Tolerance in Rice Plant. *Amino Acids*, **51**, 839-853. <https://doi.org/10.1007/s00726-019-02727-0>
- [3] Rijsberman, F.R. (2006) Water Scarcity: Fact or Fiction? *Agricultural Water Management*, **80**, 5-22. <https://doi.org/10.1016/j.agwat.2005.07.001>
- [4] Hao, Z., Singh, V.P. and Xia, Y. (2018) Seasonal Drought Prediction: Advances, Challenges, and Future Prospects. *Reviews of Geophysics*, **56**, 108-141. <https://doi.org/10.1002/2016RG000549>
- [5] Oladosu, Y., *et al.* (2019) Drought Resistance in Rice from Conventional to Molecular Breeding: A Review. *International Journal of Molecular Sciences*, **20**, 3519. <https://doi.org/10.3390/ijms20143519>
- [6] Blum, A. (2011) Plant Breeding for Water-Limited Environments. *Plant Breed. Water Limited Environments*, 1-255. <https://doi.org/10.1007/978-1-4419-7491-4>
- [7] Todaka, D., *et al.* (2017) Temporal and Spatial Changes in Gene Expression, Metabolite Accumulation and Phytohormone Content in Rice Seedlings Grown under Drought Stress Conditions. *The Plant Journal*, **90**, 61-78. <https://doi.org/10.1111/tpj.13468>
- [8] Hassan, M.A., *et al.* (2023) Drought Stress in Rice: Morpho-Physiological and Molecular Responses and Marker-Assisted Breeding. *Frontiers in Plant Science*, **14**, Article ID: 1215371. <https://doi.org/10.3389/fpls.2023.1215371>
- [9] Kummu, M. *et al.* (2016) The World's Road to Water Scarcity: Shortage and Stress in the 20th Century and Pathways towards Sustainability. *Scientific Reports*, **6**, Article Number: 38495. <https://doi.org/10.1038/srep38495>
- [10] Santini, M., Noce, S., Antonelli, M. and Caporaso, L. (2022) Complex Drought Patterns Robustly Explain Global Yield Loss for Major Crops. *Scientific Reports*, **12**, Article Number: 5792. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-09611-0>
- [11] Inoue, H., *et al.* (2013) Blast Resistance of CC-NB-LRR Protein Pb1 Is Mediated by WRKY45 through Protein-Protein Interaction. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **110**, 9577-9582. <https://doi.org/10.1073/pnas.1222155110>
- [12] Shimono, M., *et al.* (2007) Rice WRKY45 Plays a Crucial Role in Benzothiadiazole-Inducible Blast Resistance. *The Plant Cell*, **19**, 2064-2076. <https://doi.org/10.1105/tpc.106.046250>
- [13] Tao, Z., *et al.* (2009) A Pair of Allelic WRKY Genes Play Opposite Roles in Rice-Bacteria Interactions. *Plant Physiology*, **151**, 936-948. <https://doi.org/10.1104/pp.109.145623>
- [14] Xu, L., *et al.* (2023) AIM1-Dependent High Basal Salicylic Acid Accumulation Modulates Stomatal Aperture in Rice. *New Phytologist*, **238**, 1420-1430. <https://doi.org/10.1111/nph.18842>
- [15] Food and Agricultural Organization (2020) Food Outlook—Biannual Report on Global Food Markets. FAO, Rome.

- [16] Nahar, S., Kalita, J., Sahoo, L. and Tanti, B. (2016) Morphophysiological and Molecular Effects of Drought Stress in Rice. *Annals of Plant Sciences*, **5**, No. 9. <https://doi.org/10.21746/aps.2016.09.001>
- [17] Kadam, N.N., *et al.* (2017) Genetic Control of Plasticity in Root Morphology and Anatomy of Rice in Response to Water Deficit. *Plant Physiology*, **174**, 2302-2315. <https://doi.org/10.1104/pp.17.00500>
- [18] Quinones, C., Mattes, N., Faronilo, J., Sudhir, Y. and Jagadish, K.S.V. (2017) Drought Stress Reduces Grain Yield by Altering Floral Meristem Development and Sink Size under Dry-Seeded Rice Cultivation. *Crop Science*, **57**, 2098-2108. <https://doi.org/10.2135/cropsci2016.09.0736>