

中文摘要

OsWRKY95 调控水稻抗旱性的功能研究

水稻作为最重要的粮食作物之一，在整个生育期对水分的需求量极大。然而，目前全球的农业可使用水资源是普遍匮乏的。在这种背景下，水稻的生长和发育以及高产稳产受到了严峻的挑战，干旱已经成为其主要的制约因素。因此，挖掘抗旱新基因，深入探究抗旱分子机制，对于水稻的育种研究意义深远。植物 WRKY 转录因子在植物抗逆过程中起着非常重要的作用。本研究以水稻中的一个转录因子 OsWRKY95 为研究对象，对其在水稻抗旱性方面的功能进行了探究，主要结果如下：

1. 对 OsWRKY95 进行生物信息学分析及单倍型分析，结果表明 OsWRKY95 属于 WRKY 转录因子家族 III 类家族成员，OsWRKY95 蛋白由 260 个氨基酸组成，包含一个保守的 WRKY 域。OsWRKY95 基因启动子中含有多个顺式作用元件，其中许多都与植物的逆境胁迫相关。利用 3 K 水稻 SNP 数据集对 OsWRKY95 的单倍型进行分析，结果表明，OsWRKY95 有 6 个单倍型并且在不同的水稻亚种间存在明显的籼粳分化。其中，Hap 1 主要分布在粳稻当中，其余几个单倍型则主要分布在籼稻当中。

2. 为了探究 OsWRKY95 是否与植物逆境胁迫功能相关，通过荧光定量 PCR 分析发现 OsWRKY95 的表达量受多种非生物胁迫和激素处理诱导。OsWRKY95 不仅能响应干旱、冷和盐胁迫诱导，而且还受 ABA、JA、IAA 等激素诱导。在干旱、冷、IAA 和 ABA 处理条件下，OsWRKY95 基因在水稻中的表达量表现为先上升后下降。在盐胁迫和 JA 处理条件下，植物细胞可以有效地抵御外界环境的胁迫，从而维持正常的生理功能。盐胁迫可以抑制植物细胞内膜的渗透性，从而减少膜系统中的水分流失；而 JA 处理可以抑制植物细胞内膜的渗透性，从而降低细胞内的水分流失。此外，JA 处理还可以抑制植物细胞内膜系统中的离子吸收，从而减少离子流失。其表达量在 24 h 之内持续升高，推测 OsWRKY95 可能通过 ABA、JA 信号通路参与调控水稻的生长发育、生物胁迫和非生物胁迫。同时，OsWRKY95 基因在水稻中呈组成型表达，即在幼年及成年主要组织中均

有表达，并且在穗中表达量最高。

3. 进一步对 *OsWRKY95* 的过表达和敲除植株进行苗期抗旱功能鉴定，在用 20% 的 PEG6000 模拟干旱胁迫再使用木村 B 营养液恢复以后，对幼苗的生长状态和存活率进行生物统计分析，结合离体叶片的失水速率分析结果，显示 *OsWRKY95* 表现出正调控水稻抗旱性的功能。亚细胞定位结果显示，*OsWRKY95* 定位于细胞核。酵母自激活实验结果显示，*OsWRKY95* 存在自激活现象，表明 *OsWRKY95* 为转录激活子。

4. 为了探究 *OsWRKY95* 调控水稻抗旱的分子机制，以 *OsWRKY95* 的突变体植株和中花 11 号野生型植株为材料，进行转录组测序分析。结果显示，与野生型植株相比，其中 91 条基因在根部表达明显上调，51 条表达下降。而在地上部组织中，有 114 个基因显著上调，25 个基因显著下调。多个具有 W-box 基序的基因在突变体中显著下调，推测其可能为 *OsWRKY95* 潜在的靶基因，qPCR 结果证实其在 *OsWRKY95* 的突变体中表达量降低。GO 集分析显示，突变体中显著下调的基因在分子功能类别中的水解酶活性以及几丁质酶活性等功能上显著富集，KEGG 通路富集分析显示，突变体中显著下调的基因在半乳糖代谢和 MAPK 通路上显著富集，推测 *OsWRKY95* 可能参与相关的信号通路，且可能与植物生物胁迫功能相关。

5. 酵母 cDNA 文库筛选互作蛋白试验结果显示，*OsWRKY95* 转录因子与水稻磷饥饿应答 4 (*OsPHR4*) 以及 *Os01g0974100* 蛋白互作。qPCR 结果表明 *OsPHR4* 和 *Os01g0974100* 均受干旱胁迫诱导，表明 *OsWRKY95* 可能协同 *OsPHR4* 和 *Os01g0974100* 参与水稻的干旱调控。

关键词：

水稻，抗旱性，转录因子，*OsWRKY95*，基因功能

英文缩写词表

| 英文缩写 | 中文全称 | 英文名称 |
|---------------|-------------------|----------------------------|
| DMSO | 二甲基亚砷 | Dimethyl sulfoxide |
| LB | LB 培养基 | Luria-Bertani medium |
| GFP | 绿色荧光蛋白 | Green fluorescent protein |
| μM | 微摩尔 | Micromole |
| WT | 野生型 | Wild type |
| mL | 毫升 | Milliliter |
| mM | 毫摩尔 | Millimole |
| PCR | 聚合酶链式反应 | Polymerase chain reaction |
| qRT-PCR | 实时荧光定量聚合酶链式反 应 | Quantitative real-time PCR |
| ABA | 脱落酸 | Abscisic acid |
| CDS | 蛋白质编码区 | Coding sequence |
| OE | 过表达 | Overexpression |
| RFP | 红色荧光蛋白 | Red fluorescent protein |
| Co-IP | 免疫共沉淀 | Co-Immunoprecipitation |
| PEG | 聚乙二醇 | Polyethylene glycol |
| min | 分钟 | Minute |
| sec | 秒 | Second |

目 录

| | |
|---|----|
| 第 1 章 绪论..... | 1 |
| 1.1 植物抗旱性研究进展..... | 1 |
| 1.1.1 植物形态结构与变化干旱胁迫..... | 1 |
| 1.1.2 渗透调节与干旱胁迫..... | 2 |
| 1.1.3 抗氧化系统与干旱胁迫..... | 3 |
| 1.1.4 植物内源激素与干旱胁迫..... | 3 |
| 1.1.5 植物抗旱基因..... | 4 |
| 1.2 WRKY 转录因子家族的研究进展..... | 5 |
| 1.2.1 植物 WRKY 转录因子的氨基酸结构特征..... | 6 |
| 1.2.2 WRKY 结构域的特征..... | 8 |
| 1.2.3 WRKY 转录因子的功能..... | 8 |
| 1.3 立题依据与意义..... | 12 |
| 第 2 章 <i>OsWRKY95</i> 基因生物信息学分析..... | 13 |
| 2.1 试验方法..... | 13 |
| 2.1.1 <i>OsWRKY95</i> 基因相关生物信息学分析..... | 13 |
| 2.1.2 水稻 WRKY 家族的进化树分析..... | 13 |
| 2.1.3 <i>OsWRKY95</i> 单倍型分析..... | 13 |
| 2.2 结果与分析..... | 14 |
| 2.2.1 <i>OsWRKY95</i> 基因生物信息学分析..... | 14 |
| 2.2.2 <i>OsWRKY95</i> 在多个水稻品种中的单倍型分析..... | 16 |

| | |
|---|----|
| 2.4 讨论 | 18 |
| 第 3 章 <i>OsWRKY95</i> 的抗旱功能鉴定 | 20 |
| 3.1 试验材料 | 20 |
| 3.1.1 植物材料 | 20 |
| 3.1.2 菌株与载体 | 20 |
| 3.1.3 主要试剂及配制 | 21 |
| 3.1.4 主要仪器 | 25 |
| 3.2 试验方法 | 26 |
| 3.2.1 水稻基因组 DNA 提取 (CTAB 法) | 26 |
| 3.2.2 引物设计与 PCR 扩增 | 26 |
| 3.2.3 载体的构建与转化 | 27 |
| 3.2.4 水稻总 RNA 的提取 (Trizol 方法)、逆转录与 qPCR | 28 |
| 3.2.5 水稻原生质体的制备与转化 | 29 |
| 3.2.6 亚细胞定位 | 29 |
| 3.2.7 酵母感受态细胞的制备与转化 | 30 |
| 3.2.8 通过酵母双杂对蛋白质互作进行验证 | 30 |
| 3.3 结果与分析 | 31 |
| 3.3.1 <i>OsWRKY95</i> 的表达模式 | 31 |
| 3.3.1 <i>OsWRKY95</i> 转基因水稻植株阳性鉴定及后代筛选 | 32 |
| 3.3.2 <i>OsWRKY95</i> 过表达和敲除植株苗期抗旱性鉴定 | 34 |
| 3.3.3 <i>OsWRKY95</i> 的亚细胞定位和转录活性分析 | 37 |
| 3.3.4 <i>OsWRKY95</i> 互作蛋白的筛选与验证 | 38 |

| | |
|--|----|
| 3.4 讨论 | 41 |
| 第 4 章 <i>OsWRKY95</i> 敲除植株的转录组分析 | 43 |
| 4.1 试验材料 | 43 |
| 4.1.1 水稻材料 | 43 |
| 4.2 试验方法 | 43 |
| 4.2.1 转录组测序 | 43 |
| 4.2.2 转录组数据分析 | 44 |
| 4.2.3 qRT-PCR 对基因的表达量进行定量检测 | 44 |
| 4.3 结果与分析 | 44 |
| 4.3.1 转录组学数据的质量评估与统计分析 | 44 |
| 4.3.2 转录组数据样本间相关性分析 | 46 |
| 4.3.3 差异基因表达分析 | 47 |
| 4.3.4 差异表达基因的 GO 富集分析 | 48 |
| 4.3.5 差异表达基因的 KEGG 分析 | 48 |
| 4.3.6 <i>OsWRKY95</i> 下游基因的筛选与验证 | 49 |
| 4.4 讨论 | 52 |
| 第 5 章 结论 | 54 |
| 参考文献 | 55 |
| 附录 引物列表 | 64 |
| 作者简介 | 67 |
| 作者在学期间主要科研成果 | 68 |
| 致 谢 | 69 |

第1章 绪论

水稻是世界上最重要的粮食作物之一，约占世界人口主食的一半^[1]。水稻在整个生育期对水分的需求量极大而且随着城市化的进程日益加快，人口数量急剧增加，使可以用于农业的水资源更加紧缺。与其他谷类作物相比，水稻更容易受到干旱胁迫。因此，非生物胁迫尤其是干旱已经成为制约水稻生长发育以及高产稳产的主要因素之一。因此，挖掘新的耐旱基因并解析其耐旱分子机理具有重要意义^[2]。对于水稻的育种研究具有重要的意义。

1.1 植物抗旱性研究进展

植物的生长发育是遗传因素与环境因素共同作用的结果。当植物的生活环境处于不利条件时，植物就会受到胁迫。就水稻而言，干旱胁迫会明显地干扰其正常叶、根系形态等表型的建成，并危害其细胞正常的生理生化进程^[3]。在应对环境胁迫的进化过程中，水稻发展出一套反应机制，例如均衡细胞之间的水分供应，避免缺水。增强根系的吸水能力等^[3]。植物面对干旱环境，通过内外的生理活动来启动应对策略以适应和抵御干旱环境的威胁，这种能力被称为抗旱性。抗旱性是一个包含多种多种机制的复杂性状，其抗旱机理大致可分为避旱性、高水势下的耐旱性（延迟脱水）、低水势下的耐旱性（忍耐脱水）三类^[4]。培育抗干旱的水稻品种是抵御干旱的根本途径之一。现代分子育种通过分子生物学和功能基因组学来挖掘并利用抗旱基因资源，已成为提高植物抗旱性的有效手段。此外，将克隆的抗旱基因引入水稻，通过标记辅助选育新的抗旱水稻品种，成为提高水稻品种抗旱性的重要策略。

1.1.1 植物形态结构与变化干旱胁迫

在干旱胁迫下，植物能够通过形态构造的变化来保持其正常的生长和发育。如根系形态改变以增强吸水、关闭气孔、增加叶片角质层厚度，以此来减小蒸腾面积，从而使蒸腾作用减弱。还可以通过调节根冠比，将更多的有机物用于根的生长，这样的植物往往更加矮化并具有较大的根冠比，可以有效地减少水分散失并增强根的吸水能力^[5-8]。当植株感受到严重的水分缺乏时，叶片就会下

垂，枯萎，卷曲，这是因为失去了细胞的膨压，以此来降低相对表面积，从而阻止水分的过度消耗^[9]。另外，气孔在调节植物的生长发育与抗旱性的平衡之间起到了至关重要的作用。作为植物与环境进行水分和气体交换的重要器官，气孔一方面影响着 CO₂ 的吸收速率，从而影响植物光合作用的效能。另一方面，它还是植物蒸腾作用的器官之一，控制着水分的散失。这对植物平衡生长与抗逆至关重要。植物叶片上的气孔随着保卫细胞的膨胀而开启或闭合，并受细胞壁结构、质膜、液泡膜特征以及细胞骨架动力学的调控^[10]。Hamanishi 等^[11] 研究表明，在干旱环境下，杨叶气孔数目较少，从而减少了蒸腾耗水。因此，气孔的开闭是植物应对干旱胁迫的一种重要策略。

植物根系是植物直接吸收土壤水分的重要器官。当植物缺水时，根系对土壤湿度的变化有响应^[12]。同时，根的分生组织和维管系统互相协调以应对干旱胁迫^[13]。根在水分缺乏时的形态变化以加强吸收水分。一般来说，对于水分比较匮乏的土壤，植物的侧根伸长受到抑制而更倾向于直根伸长来获取土壤深层的水分。而这种改变可溯源至细胞分裂、伸长和分化的基因表达的动态调节。在土壤水分分布不均匀的情况下，植物的侧根和根尖在高水分条件下的生长是植物对环境的适应能力^[12]。

1.1.2 渗透调节与干旱胁迫

在干旱、高温、盐碱、低温等逆境条件下，一些植物会通过主动累积有机质和无机物质，增加细胞液浓度，从而减少其渗透电位。因此，在干旱条件下，提高了植物对水分的吸收和持水能力。渗透物质可以分为两大类：有机溶质和无机离子。有机溶质来自植物自身的细胞合成，如甜菜碱、脯氨酸、甘油、某些可溶性糖类及其衍生物等，而无机离子主要是通过从环境中吸收而来^[14]。研究发现，与脯氨酸和甜菜碱合成相关的酶，如脯氨酸-5-羧基合酶（P5CS）、脯氨酸-5-羧酸还原酶（P5CR）与甜菜碱醛脱氢酶（BADH）在植物抵御干旱胁迫的过程中发挥着重要的作用^[15]。在植物中，P5CS 首先催化谷氨酸转化为中间产物吡咯啉-5-羧酸（P5C），最终被 P5CR 还原为不能脯氨酸^[16]。BADH 可以通过甜菜碱醛的氧化作用产生甘氨酸甜菜碱。因此，BADH 被认为是甘氨酸甜菜碱形成的关键调节剂^[17]。可溶性糖是一种小分子溶质，主要有葡萄糖、蔗糖和海藻糖等。其中，海藻糖是一种还原性双糖，在外加压力下，能阻止胞内磷脂

由液晶态向固态态转变，维持蛋白质结构的稳定性。从而提高植物抵御干旱的能力^[18]。在水稻中，海藻糖磷酸合酶基因 *TREHALOSE-6-PHOSPHATE SYNTHASE 1 (TPS1)* 可催化葡萄糖-6-磷酸和尿苷-5-二磷酸葡萄糖 (UDP-G) 转化成海藻糖-6-磷酸，并在干旱、盐、冷等非生物胁迫下起到应激保护剂的作用^[19]。在玉米中，过量表达 *TPS1* 基因促进了干旱胁迫条件下的花青素积累从而提高了玉米植株的抗旱性^[20]。

1.1.3 抗氧化系统与干旱胁迫

植物在受到干旱胁迫时，会大量产生活性氧 (reactive oxygen species, ROS)。当其积累到一定阈值时，会对细胞产生渐进性的氧化损伤，打破细胞氧化还原的稳态。细胞的膜蛋白或酶的空间构型被打乱，会导致膜通透性和离子渗透增高、叶绿素破坏、代谢紊乱或更严重的损伤甚至导致植物死亡^[21]。生物体经过长期进化形成了完善且复杂的抗氧化保护系统来清除 ROS，从而确保植物细胞的正常功能^[22]。蚕豆中，SOD 活性整体上随着干旱程度的加剧呈现出先升高后下降的趋势，并且 SOD 活性在抗旱性强的蚕豆品种中维持了较高的水平^[23]。干旱胁迫下，毛竹叶片超氧阴离子 ($O_2^{\cdot-}$) 和过氧化氢 (H_2O_2) 质量摩尔浓度显著增加，同时抗氧化酶活性随干旱处理程度的增加而升高^[24]。高温和干旱协同胁迫下，毛竹体内的 ROS 进一步增加，致使膜脂过氧化程度增强，以及 CAT 活性的稳定性最强^[24]。另外，在高温干旱及协同胁迫下，毛竹幼苗可以通过调节抗氧化酶系统和非酶系统 AsA-GSH 循环协同作用来清除氧化物质，提高抗旱胁迫能力^[24]。

1.1.4 植物内源激素与干旱胁迫

在干旱胁迫下，植物激素的合成、配比和运输均发生显著变化，来调节某些生理过程，以达到适应干旱环境的效果^[25]。脱落酸 (Abscisic acid, ABA) 是一种多功能植物激素，植物在遭遇干旱胁迫时，会促进 ABA 的生物合成，进而产生应对胁迫的信号级联，激活下游基因的表达，增强植物的抗旱性^[26]。在拟南芥中，植物暴露在缺水环境下 2.5 - 6 小时后，9-顺式-环氧类胡萝卜素双加氧酶 3 (9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase 3, NED3) 会催化 ABA 从头合成的限速步骤，继而内源性 ABA 浓度逐渐升高。此外，在转录水平上，拟南芥

NAC 转录因子 *Arabidopsis thaliana* activating factor1 (ATAF1) 可以调节 *NED3* 的表达, 以促进 ABA 的积累。同样地, *NCED3* 在叶绿体中的翻译后处理也能够调节 ABA 的积累。因此, 渗透胁迫触发了拟南芥叶片和气孔中 ABA 的生物合成^[27]。油菜素甾醇 (Brassinosteroids, BRs) 在植株响应干旱胁迫过程中发挥着重要的功能^[28, 29]。研究表明, BRs 与 ABA 在植物干旱胁迫应答方面发挥协同作用, 共同调节植物的抗旱性^[30]。ABA 通过 ABA 受体抑制 ABA INSENSITIVE1 (ABI1) 和 ABA INSENSITIVE2 (ABI) 的活性来抑制其对 BRASSINOSTEROID-INSENSITIVE 2 (BIN2) 的去磷酸化作用, 因此 BIN2 被活化, 被激活的 BIN2 激酶磷酸化 ABA 途径中的正调控因子蔗糖非发酵-1-相关蛋白激酶 2 (Sucrose non-fermenting-1-related protein kinase 2, SnRK2s)^[31], 进一步激活了 ABA 信号途径^[28]。此外, BIN2 激酶以及 BRs 信号转导的核心转录因子 BRI1-EMS-SUPPRESSOR 1 (BES1) 还可以与其它转录因子发生相互作用, 共同调节植物对于干旱胁迫的应答反应^[30]^[29, 32, 33]。生长素 (Auxin, IAA) 是另一种在植物响应逆境胁迫的重要激素。在干旱胁迫下, GH3 家族成员 WES1 (Auxin-responsive GH3 family protein) 是 IAA 合成酶, 它通过与生长素的相互作用, 抑制生长素的活性, 减少内源生长素的含量, 进而激活逆境相关基因 *pathogenesis related protein* (PRI) 和 *C-repeat binding transcription factor* (CBF) 的表达^[34]。此外, CBF 还受 IAA 的直接调控, 综合以上结果证明生长素在植物适应逆境胁迫中发挥着重要作用^[35]。此外, 赤霉素 (Gibberellins, GAs)^[36, 37]、茉莉酸 (Jasmonic acid, JA)^[38] 以及水杨酸 (Salicylic acid, SA)^[39, 40] 等植物激素也在植物响应逆境胁迫中发挥重要的作用。

1.1.5 植物抗旱基因

植物的抗旱性是由许多基因共同决定的。根据功能的不同, 可以将其分为两大类: 第一类是功能基因, 它们编码产生功能蛋白质的基因; 第二种是调控基因, 它所编码的蛋白因子参与了信号传递以及抗逆相关基因的表达。主要包括一些植物转录因子基因, 如 DREB、MYC/MYB、WRKY、bZIP 和 NAC 家族基因。目前, 水稻中的许多干旱胁迫相关基因已经被成功鉴定及克隆, 如表 1.1。

以上内容仅为本文档的试下载部分，为可阅读页数的一半内容。如要下载或阅读全文，请访问：<https://d.book118.com/928046075110006141>