

干旱对水稻生物钟基因和干旱胁迫响应基因每日节律性变化的影响

李佳, 刘运华, 张余, 陈晨, 余霞, 余舜武

上海市农业生物基因中心, 上海 201106

摘要: 内源生物钟的节律运动不仅调控植物的生长发育, 而且在调控植物响应和适应环境过程中发挥重要的作用。为了解水稻(*Oryza sativa* L.)干旱胁迫响应基因和生物钟基因在干旱条件下每日表达变化情况, 本文利用实时荧光定量 PCR 方法研究早稻品种 IRAT109 在干旱胁迫下相关基因的表达变化。结果表明, 干旱胁迫导致早晨生物钟基因 *OsPRRs*、*OsLHY* 和 *OsZTL1* 的表达量显著下降, 振幅减弱; 同时导致夜晚生物钟基因 *OsTOC1*、*OsGI* 和 *OsELF3* 整体表达量升高, 振幅增强, 但对 *OsFKF1* 基因影响不大。同样, 大部分水稻干旱胁迫响应基因在干旱胁迫后整体表达量显著升高, 但 *OsDST* 基因表达量下降; 同时大部分抗逆基因周期性表达被扰乱, 但 *OsCIPK12*、*OsCDPK7* 和 *OsDREB1A* 依然保持 24 h 内震荡。本研究结果表明干旱胁迫能影响生物钟元件的基因表达, 这种互相影响改变了部分基因每日的震荡变化。

关键词: 干旱; 水稻; 生物钟基因; 胁迫响应基因

Drought stress modulates diurnal oscillations of circadian clock and drought-responsive genes in *Oryza sativa* L.

Jia Li, Yunhua Liu, Yu Zhang, Chen Chen, Xia Yu, Shunwu Yu

Shanghai Agrobiological Gene Center, Shanghai 201106, China

Abstract: Endogenous circadian rhythms play a key role in regulating plant growth and development, and in allowing plants to respond and adapt to changing environments. To understand how drought regulates upland rice (*Oryza sativa* L.) IRAT109, we examined the expression levels of circadian clock and drought-responsive genes through real-time PCR. The results revealed that, first, drought reduced the relative expression level and amplitude of peak expression of several morning circadian clock components (such as *OsPRRs*, *OsLHY* and *OsZTL1*), increased the relative expression level and amplitude of some evening circadian clock components (such as *OsTOC1*, *OsGI* and *OsELF3*), but did not influence *OsFKF1*. Secondly, the relative expression level of most drought-responsive genes

收稿日期: 2017-03-29; 修回日期: 2017-06-22

基金项目: 国家科技重大专项课题项目(编号: 2016ZX08001-003), 国家自然科学基金面上项目(编号: 31371229)和上海市自然科学基金项目(编号: 17ZR1425400)资助[Supported by the National Science and Technology Major Project of the Ministry of Science and Technology of China(No.2016ZX08001-003), the National Natural Science Foundation of China (No.31371229) and the Natural Science Foundation of Shanghai (No. 17ZR1425400)]

作者简介: 李佳, 硕士研究生, 专业方向: 水稻生物技术。E-mail: lijia2054224@126.com

通讯作者: 余舜武, 博士, 研究员, 硕士生导师, 研究方向: 水稻生物技术。E-mail: ysw@sagc.org.cn

DOI: 10.16288/j.yczs.17-113

网络出版时间: 2017/8/31 16:33:18

URI: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1913.R.20170831.1633.002.html>

was generally increased, except for *OsDST*, a negative regulator. Lastly, expression rhythms of most drought-responsive genes were disturbed, but not that of *OsCIPK12*, *OsCDPK7* and *OsDREB1A*. The results indicate that drought stress modulates the expression of circadian clock components and the interplay regulates diurnal oscillations of relative genes.

Keywords: drought stress; *Oryza sativa* L.; circadian clock genes; stress responsive genes

地球自转引起日照长度和温度的变化, 由此植物形成了生物钟现象, 即以近 24 h 为周期的节律现象(circadian rhythm)。早在 1720 年, De Mairan 等^[1]率先在植物中报道了节律的存在, 将正常生长的含羞草(*Mimosa pudica* Linn.)转移到持续黑暗条件下, 含羞草叶片的开闭仍然保持着如同昼夜周期下的规律性。这种机制受植物内在生物钟控制, 它能以 24 h 为周期调控生物活动, 将植物内在的生理节奏和环境相协调, 不仅能够促进植物生长发育, 也可以增强植物对环境的响应性^[2]。生物钟的研究经历了漫长的发展后, 目前已经建立起了模式植物拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)生物钟研究系统。植物的生物钟系统由 3 部分组成: 第一部分是输入途径(input pathway), 红光受体 PHY (phytochrome)和蓝光受体 CRY (cryptochrome)以及其他可能存在的未知组分将自然界光、温度、非生物胁迫等环境信号的变化传递给第二部分, 即生物钟核心振荡器^[1]。目前, 拟南芥的生物钟基本结构包含多个转录调控模块, 两个含有单 MYB(myeloblastosis)结构域的转录因子——CCA1(circadian clock-associated 1)/LHY(late elongated hypocotyl), 以及属于 PRR(pseudo-response regulator)蛋白的 TOC1(timing of Cab expression 1)组成了最初的核心调控元件^[2,3]。其中 *CCA1/LHY* 在早晨表达, 能够抑制晚间组分 *TOC1* 的表达, 而 *TOC1* 反过来又能抑制 *CCA1/LHY* 的表达^[4,5]。其他 PRR 家族成员(*PRR5*、*PRR7* 和 *PRR9*)能够结合到 *CCA1/LHY* 的启动子上抑制它们的表达^[6], 而 *CCA1/LHY* 反过来以激活的方式通过直接结合在 *PRR7* 和 *PRR9* 的启动子上促进二者的表达^[7]。此外, 晚间复合体(EC)由 *ELF3*(early flowering 3)、*ELF4* 和 *LUX*(Lux-Arhythmo)组成, 会抑制白天生物钟基因 *PRR9* 的表达^[8,9]。上述不同模块间都可以通过 *TOC1* 的抑制功能来实现基因每日周期性变化^[4]。随后发现新的成员 *GI*(gigantea)、*ZTL*(zeitlupe)和 *COP1*(constitutive

photomorphogenesis1)参与或调节生物钟基因回路, 转录抑制或激活、磷酸化、泛素化等转录后修饰等调节方式形成了一个复杂的多回路调控网络^[10,11]。第三部分输出途径(output pathway)则表现为生物钟参与调控植物体一系列生理进程, 包括气孔开度、光合作用、茎干伸长、开花时间、叶片运动以及对非生物胁迫响应, 使植物体近 24 h 节律与外界环境条件(光、温度周期)达到时间和空间的同步。生物钟调节机制能够增强植物对逆境的抵御能力, 并且能及时地给予适当的响应。这种实时调控能够精确计算最大化反应的时间, 为植物代谢效率最大化提供了有效的方式, 增强了植物对环境的适应性^[2,12]。

生物钟基因在植物进化中非常保守, 依据拟南芥已经克隆的生物钟基因, Murakami 等^[13]在水稻(*Oryza sativa* L.)中克隆出拟南芥核心生物钟基因的同源基因。他们发现在水稻幼苗中, *OsCCA1* 的表达存在 24 h 周期震荡性, 在早晨达到峰值。水稻中有 5 个不同的 PRRs 蛋白, 分别对应拟南芥的 PRRs 蛋白(*PRR1/3/5/7/9*), 其中 *OsTOC1/OsPRR1* 与拟南芥中的 *TOC1/PRR1* 高度同源, 在水稻中的表达存在节律性, 在傍晚达到表达高峰。2003 年 Murakami 等^[14]报道了 *OsPRR73*、*OsPRR37*、*OsPRR95*、*OsPRR59* 与 *OsPRR1* 一起, 依次出现转录水平的波峰, 就像音乐会五重奏。拟南芥 *ZTL/LKP2*(lov kelch protein2)蛋白参与降解 *PRR1*, *FKF1*(*ZTL* 的另一同源基因)参与调控开花时间。水稻中有 3 种 *ZTL* 的同源基因——*OsZTL1*、*OsZTL2* 和 *OsFKF1*, 其中 *OsZTL1* 和 *OsZTL2* 在水稻中全天表达, 没有周期波动性, 而 *OsFKF1* 表达存在 24 h 节律性。2002 年 Hayama 等^[15]证明水稻中存在拟南芥 *GI* 基因的同源基因 *OsGI*, *OsGI* 参与水稻开花的光周期调控, 且调控全基因组水平基因的表达节律, 是水稻生物钟的核心组分之一。*OsELF3* 则通过 T-DNA 插入鉴定与拟南芥 *ELF3* 基因同源的基因, 其中 *OsELF3-1* 影

响花期并参与生物钟调控^[16]。

最近的研究表明,生物钟和植物响应逆境胁迫之间存在紧密的联系。Seo等^[2]提出生物钟参与多种逆境胁迫。ABA(abscisic acid)作为重要的植物激素在植物响应渗透胁迫时发挥重要作用,而生物钟基因 *TOC1* 与 ABA 调控基因有很大一部分重叠,*TOC1* 能够结合到 ABA 响应基因启动子上抑制 *ABAR*(*ABA related*)、*CBF*(*C-repeat binding factor*)、*ABI3*(*ABA insensitive3*)等基因表达,但这些基因的表达又能促进 *TOC1* 的表达,这样形成一个调控环来调控 ABA 信号^[17]。另一个生物钟基因 *TIC*(time for coffee)调控植物代谢和胁迫信号通道来优化植物应对周边环境压力^[18]。在盐胁迫下调控花时生物钟蛋白 *GI* 被降解,释放与其互作的 *SOS2*(salt overly sensitive 2)激酶来启动抗盐反应,可以部分解释为什么盐胁迫下常常花期推迟^[19]。而在冷胁迫中,*CCA1/LHY* 作为正调控因子,*PRR9/7/5* 作为负调控因子来共同调控抗冷基因 *CBF* 的表达^[2,20]。Liu等^[21]通过 ChIP-seq 技术发现 *PRR7* 的靶基因很大一部分与抗旱相关,而 *prr* 三突变体影响了 ABA 调控基因表达量的周期变化并增强抗旱性,进一步说明 *PRR7* 负调控植物干旱和 ABA 响应基因。Marcolino-Gomes等^[22]通过定量实验发现干旱胁迫导致部分大豆生物钟基因表达节律的振幅或相位发生变化,表明生物钟基因与干旱胁迫反应之间存在互作。但是,水稻中生物钟与干旱胁迫之间的关系仍鲜有报道。

干旱是影响作物产量的重要因素,水分缺失严重影响植物发育,导致植物发生一系列分子和生理变化。目前,已有大量关于干旱胁迫的信号转导分子链和相关基因克隆的报道,并发现了一些重要的抗旱基因^[23]。干旱胁迫的转录因子包括 *DREB* (dehydration responsive element-binding factor)、*bZIP* (basic leucine zipper)、*锌指蛋白*(zinc-finger proteins)和 *NAC* (*NAM-ATAF-CUC2*),对其功能的研究有望提高作物的抗旱性^[23-25]。许多植物种类中的 *DREBs*/*CBFs* 家族已经被证实能够提高植物耐旱性,水稻 *OsDREB1A* 过表达植株和 *OsDREB2A* 过表达植株都表现出很强的耐旱性^[23]。*DST*(drought and salt tolerance)是一种水稻锌指蛋白,能够负调控气孔关闭,*dst* 突变体能够增强耐旱性。*NAC* 是植物特有的转

录因子家族,有高度保守的 DNA 结合结构域,*NAC* 家族很多成员都参与抗旱。*SNAC1* (stress-responsive *NAC1*)是水稻 *NAC* 家族中的一员,过表达水稻 *SNAC1* 基因能够显著增强水稻在重度干旱胁迫下的抗旱性。水稻 *NAC* 家族其他成员如 *OsNAC10* 也在抗旱中发挥作用。来自于其他转录因子家族的 *OsWRKY30* 也能够参与调控水稻耐旱性^[23]。植物激素 ABA 作为重要的信号传导分子参与了植物抗旱反应的调节,尤其是 ABA 依赖途径的抗旱胁迫反应。ABA 依赖的信号转导通路由 ABA 受体 *PYR/RCAR*(pyrabactin resistance/regulatory component of ABA receptor)、蛋白磷酸酶 *PP2Cs*(type 2C protein-phosphatases)和激酶 *SnRK2*(*SNF1-related protein kinase2*)组成^[26]。而 *SnRK2* 下游靶蛋白又包括慢型阴离子通道 *SLAC1* 和内向型 *K⁺*通道 *KAT1* 等,这两类通道蛋白同时也受到 *Ca²⁺* 依赖型蛋白激酶 *CDPK*(calcium-dependent protein kinase)的调控^[27]。由于一些转录因子要经过磷酸化/去磷酸化或者经过转录后修饰才能被激活,所以一些蛋白激酶参与干旱胁迫信号途径。两种类型的 *Ca²⁺* 信号蛋白激酶 *CIPK*(calcineurin B-like protein interacting protein kinase)和 *CDPK* 就参与逆境胁迫,*OsCDPK7* 和 *OsC-IPK12* 过表达水稻植株能够增强耐旱性^[23]。同时,不同的植物泛素连接酶 *E3* 通过降解靶蛋白正调控或负调控植物的抗旱性,如水稻 *E3* 泛素连接酶 *OsDIR1*(salt-and drought-induced ring finger 1)能够正调控水稻耐旱^[23]。这些已经鉴定的抗旱相关基因涉及植物干旱时不同的形态和生理反应,进行人工模拟胁迫处理时常见基因的表达是波动的,但很少从基因是否存在节律波动的角度进行考虑,以及一天内不同的时间节点开始处理对基因表达的影响。

水稻是我国重要的粮食作物,虽然水稻中一些拟南芥生物钟基因的同源基因已经被克隆,但是关于水稻生物钟震荡特性的信息还很缺乏。目前对拟南芥的研究表明,植物在响应非生物胁迫(如热、冷、干旱)和生物钟之间存在联系^[28,29]。然而水稻作为单子叶植物,其生物钟元件与环境胁迫如干旱胁迫时互作的相关知识仍不明晰。本研究为了揭示干旱环境如何影响生物钟基因表达,采用荧光实时定量 PCR 方法检测在干旱胁迫下,生物钟基因和干旱胁迫

胁迫响应基因的节律性表达变化,发现干旱对水稻不同基因的每日节律性变化产生了不同影响。

1 材料和方法

1.1 材料

旱稻品种 IRAT109 由上海市农业生物基因中心保存。

1.2 方法

1.2.1 水稻植株培养和处理

待水培幼苗长至 2 叶一心时,转移到塑料桶中土培,待生长至 4 叶一心时,试验组开始断水,生长 10 d 左右开始卷叶,继续处理 7 d 后取样;对照组一直保持在正常水分条件下生长。

试验地点在上海闵行区,整个试验过程在 2015 年 8 月内完成,自然光照昼夜处理,温度在 25 ~32 之间。取样是从早上 9 点开始,每 3 h 取一次样,到第二天 9 点,共计 9 次,每次 3 个单株各取最上一片叶,迅速将所取叶片放入液氮中保存,待全部取样结束后,抽提总 RNA,用于实时荧光定量 PCR。

1.2.2 水稻总 RNA 提取和 cDNA 合成

总 RNA 的提取参考植物总 RNA 提取试剂盒(天根生化科技(北京)有限公司)说明书。

第一链 cDNA 合成参考反转录试剂盒(北京全金生物技术有限公司)说明书,在 RNase-free PCR 管中加入 2 μg RNA,1 μL (0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$)Oligo(dT),用 RNase-free ddH₂O 补至 8 μL ,将混合物置于 65 保温 5 min 后迅速冰浴 2 min。随后依次加入 1 μL RT/RI 酶混合液,1 μL gDNA 清除剂,10 μL 反应混合液,混匀,放入 PCR 仪中进行扩增。反转录程序为:42 延伸 15 min,85 失活 5 s。最后加入 80 μL ddH₂O,混匀,-20 保存。

1.2.3 实时荧光定量 PCR

实时荧光定量 PCR 反应体系包含 cDNA 模板 2 μL ,引物(10 $\mu\text{mol}/\text{L}$)各 0.5 μL ,qPCR SuperMix 10 μL ,ddH₂O 7 μL 。每个样品 PCR 检测重复 3 次。PCR 扩增程序:94 30 s;94 5 s,60 32 s,循环 41 次;最后添加荧光 PCR 产物溶解曲线分析。基因表达量用 2^{- ΔCt} 法计算。内参基因为水稻 *Actin1* 基因。

本研究共选择水稻生物钟基因 10 个,胁迫响应基因 9 个,具体基因编号以及引物信息见表 1。对于同一基因同一时间点不同处理下的两个定量结果,采用 *t* 检验-双样本异方差假设进行方差分析。

2 结果与分析

2.1 干旱胁迫影响水稻生物钟基因的表达

表 1 分别列出了 *CCA1/LHY*、*PRR* 类和其他类型的水稻生物钟基因,为了解这些基因是否表现出每日震荡表达特点,本研究在 RiceXPro 水稻数据库(<http://ricexpro.dna.affrc.go.jp/>)中对这些基因进行分析,发现除 *OsZTL1* 表现出弱周期性表达规律,其他均表现出强周期性。进一步运用实时荧光定量 PCR 方法分析这些生物钟基因在 24 h 内基因表达量,发现除 *OsZTL1* 外,*OsTOC1*、*OsCCA1/LHY*、*OsELF3*、*OsGI*、*OsFKF1* 和 *PRR* 类蛋白的水稻同源基因 *OsPRR37*、*OsPRR59*、*OsPRR73*、*OsPRR95* 的表达量在正常条件下的每日波动规律基本上与利用 RiceXPro 水稻数据库分析的结果一致,具有明显的波峰和波谷及类似的趋势(图 1)。

在正常水分条件下,水稻生物钟基因表达模式表现出正常的震荡表达规律(图 1)。但是干旱胁迫后,一些生物钟基因每日表达情况会发生变化。由图 1 可知,*OsGI* 基因无论是正常条件下还是干旱胁迫后,均是在下午 6 点时表达量最高,但是干旱胁迫后,该基因的峰值更高,振幅增强。而 *OsELF3* 基因的转录水平表达存在强烈波动性,在下午 6 点时表达量达到峰值,除去夜间 0 点,其他任何时刻干旱胁迫下的表达量都明显高于正常条件,且峰值增高近一倍。同样,*OsTOC1* 基因与上述两个基因情况相似,只是表达峰提前到下午 3 点,干旱胁迫下的表达量振幅同样增强。总之,*OsTOC1*、*OsGI* 和 *OsELF3* 是傍晚/夜晚表达的生物钟基因,干旱胁迫会导致水稻部分生物钟基因表达量整体升高。

OsLHY 基因是在上午 9 点时表达量达到峰值,只是干旱胁迫后,该基因从早上 3 点到下午 3 点这段时间的表达量明显低于正常条件,整体表达量振幅减弱,这与拟南芥中同源的 *LHY* 基因研究结果一致^[13]。而 *OsPRR73* 基因从整体上看,白天表达量明显高于夜晚表达量,干旱胁迫后表达量明显低于正

表 1 基因及引物信息

Table 1 List of genes and primers

	基因名称	ID	正向引物(5' 3')	反向引物(5' 3')
生物钟基因	<i>OsGI</i>	Os01g0182600	TGCTGACAAGGCCACACCATG	GGAGCAAGCCCCGTATCATGC
	<i>OsELF3</i>	Os01g0566100	GGTTGGAAGCACAGGATAATGC	GCTTTGCACCAATGGCACCAAC
	<i>OsTOC1</i>	Os02g0618200	AACAAGGCCGAGGGTGCAG	CTCTGGAGAAGAAAACCATCTCTAC
	<i>OsLHY</i>	Os08g0157600	GTAACCACGGTGACGGTTGACC	GGTTTAAAACCGGTCTGCGAG
	<i>OsPRR73</i>	Os03g0284100	TCTGTCTTCGTCTTGGCCTGC	CAGACAGAAAACGAAAAGTGAGG
	<i>OsPRR37</i>	Os07g0695100	GTGCGGTACCAGAGCAGAAAAG	TCTGTCCGCTGCCGCTTCGC
	<i>OsZTL1</i>	Os02g0150800	CCTGGGGCCACAGTACCTGTG	GCTTACCAGAGAAAAGCTCATGC
	<i>OsFKF1</i>	Os11g0547000	GGTTGGCGGCACCAGGGTTC	CTCATCTTCGTCGGGCCTGC
	<i>OsPRR59</i>	Os11g0157600	CTCGCCGTGAAGCTGCCTTG	CACTAGTCAGTTTCTGCCTCTG
	<i>OsPRR95</i>	Os09g0532400	GCCAACGAGAGGCTGCACTG	GCTCCCTTGGACACCATGATC
干旱胁迫响应基因	<i>OsCDPK7</i>	Os04g0584600	GATGGGCGCATTGACTATGGAG	CCAGGTGCGTCCCTCATGCTG
	<i>OsCIPK12</i>	Os01g0759400	TGAAGCCAGGAATGCAGCACC	GCTCATGCTGCCTTCTGTTC
	<i>OsWRKY30</i>	Os08g0499300	GCTTGTGCTGCCGAGAGGTG	CATCTGAGGATGCTGCTTTGG
	<i>OsDREB2A</i>	Os01g0165100	AGAGGCTGGATTTGGCTGACC	CATGGAGATTTCCATAAGGGGAAG
	<i>OsABF1</i>	Os01g0867300	CAGGAGGAGCAACATCAGAAAAC	GATCTCGTGCTGACGTTTTC
	<i>OsSDIR1</i>	Os03g0272300	GACTTAACCCACGGAATGAGG	TACTGAACAGGGTACAGGTC
	<i>OsNAC10</i>	Os11g0126900	TTCTCCTCGACGGCTCATCC	ATGGATGGCTCAGCAGATTG
	<i>OsDST</i>	Os03g0786400	TCCCCGGCAAGCACCACCAC	GAGGCTCAAGTTGAGGTCGAG
	<i>OsDREB1A</i>	Os09g0522200	GGGCTGGGACCTGTACTACG	GTAGCTCCAGAGTGGGACGTC
内参基因	<i>Actin1</i>	AY212324	TTCCTCATGCCATCCTGCGTCTG	GTCCCTTACAATTTCCCGTTTCAGC

常条件下的表达量,且干旱胁迫后,表达量振幅减弱,这与拟南芥中 PRR7 负调控干旱胁迫表现一致。同样, *OsPRR59*、*OsPRR95* 和 *OsPRR37* 这 3 个基因,干旱胁迫和正常条件相比,也是相位不变,振幅减弱,但没有出现峰值相位像五重奏一样的现象。*OsZTL1* 基因从下午 6 点到第二天上午 9 点,干旱胁迫下的表达量明显低于正常条件下的表达量,并且整体上干旱胁迫下的表达量周期性表达规律丧失,与前人研究结果一致^[13]。由此可见, *OsLHY* 和 *OsPRR* 为早晨表达生物钟基因,干旱胁迫会抑制这部分生物钟基因表达的波动。

而对于另外一些水稻生物钟基因如 *OsFKF1*, 与 *OsZTL1* 相同,都是与生物钟相关的蓝光受体,受干旱影响较小,与正常条件下的表达差异不大(图 1)。

2.2 干旱胁迫响应基因的表达量存在周期震荡性

运用 RiceXPro 水稻数据库对表 1 中所列的干旱胁迫响应基因进行周期性表达分析,结果表明,在正常

生长条件下,只有 *OsDREB2A* 不存在周期性表达规律,其他均表现出一定的周期性表达规律。

为评估 24 h 内水稻干旱胁迫响应基因表达量的变化,探讨干旱胁迫对这些基因瞬时调控的影响,本研究运用实时荧光定量 PCR 方法分析了 *OsNAC10*、*OsDREB1A*、*OsDREB2A*、*OsDST*、*OsWRKY30*、*OsCDPK7*、*OsCIPK12*、*OsSDIR1* 和 *OsABF1* 这 9 种水稻干旱胁迫响应基因 24 h 内表达量的变化情况。

由图 2 可知,虚线位于实线之上,表明干旱导致大部分胁迫响应基因表达量整体升高。*OsCDPK7* 基因在下午 6 点达到表达量峰值,干旱胁迫后每个时间点的表达量均高于正常条件下的表达量,并且干旱胁迫下 *OsCDPK7* 表达振幅减弱,两种条件下都存在周期性表达现象。而 *OsCIPK12* 基因也是存在周期性表达现象,在下午 3 点达到表达量峰值,整体上也是干旱胁迫后表达量增高,依然保持了很强的周期性表达规律。*OsDREB2A*、*OsWRKY30*、*OsABF1*、*OsSDIR1* 和 *OsNAC10* 这些基因则是干旱

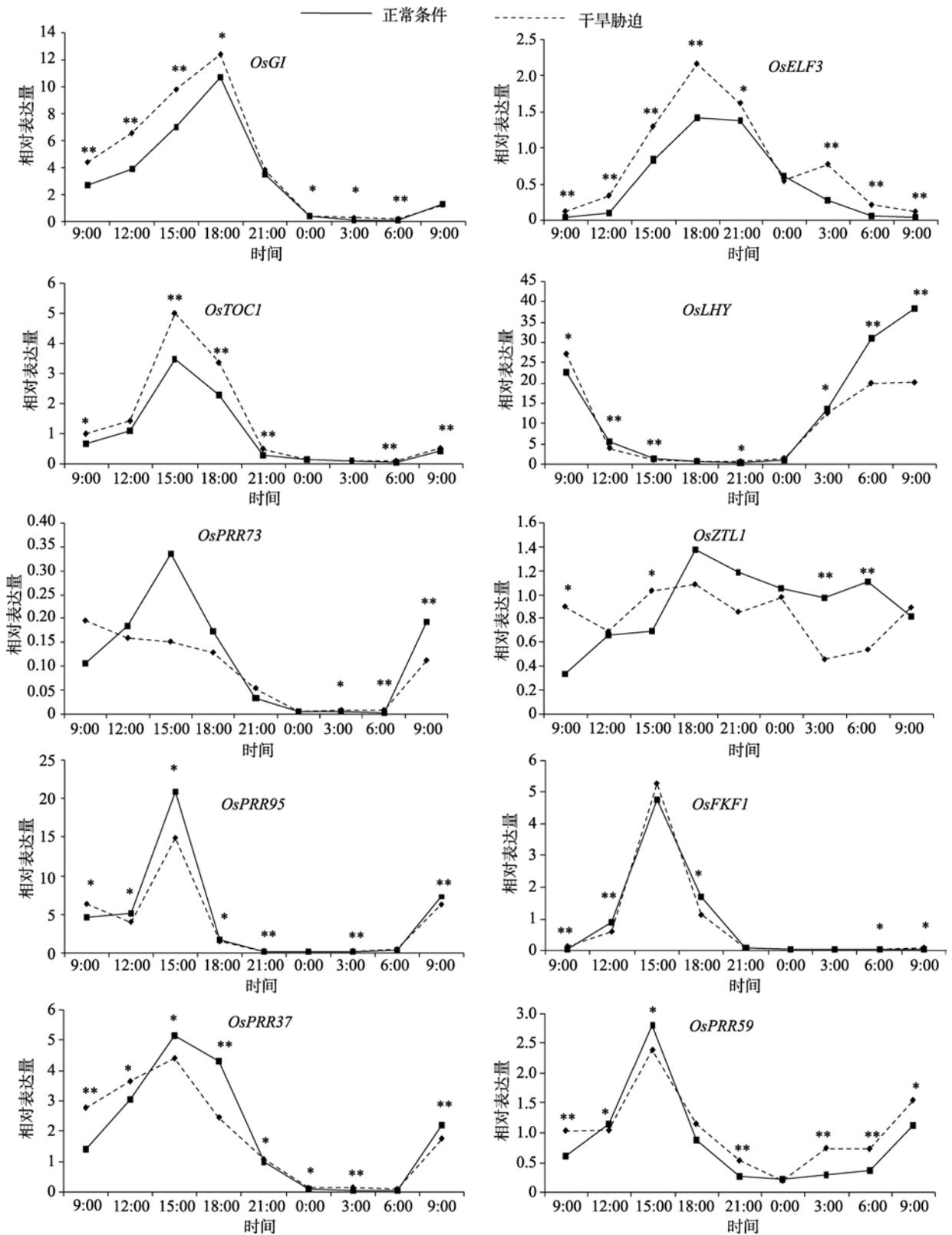


图 1 干旱胁迫影响水稻生物钟基因表达

Fig.1 Drought stress affects the expression of circadian clock genes in rice

*表示两样本之间存在显著差异($P < 0.05$), **表示两样本之间存在极显著差异($P < 0.01$).

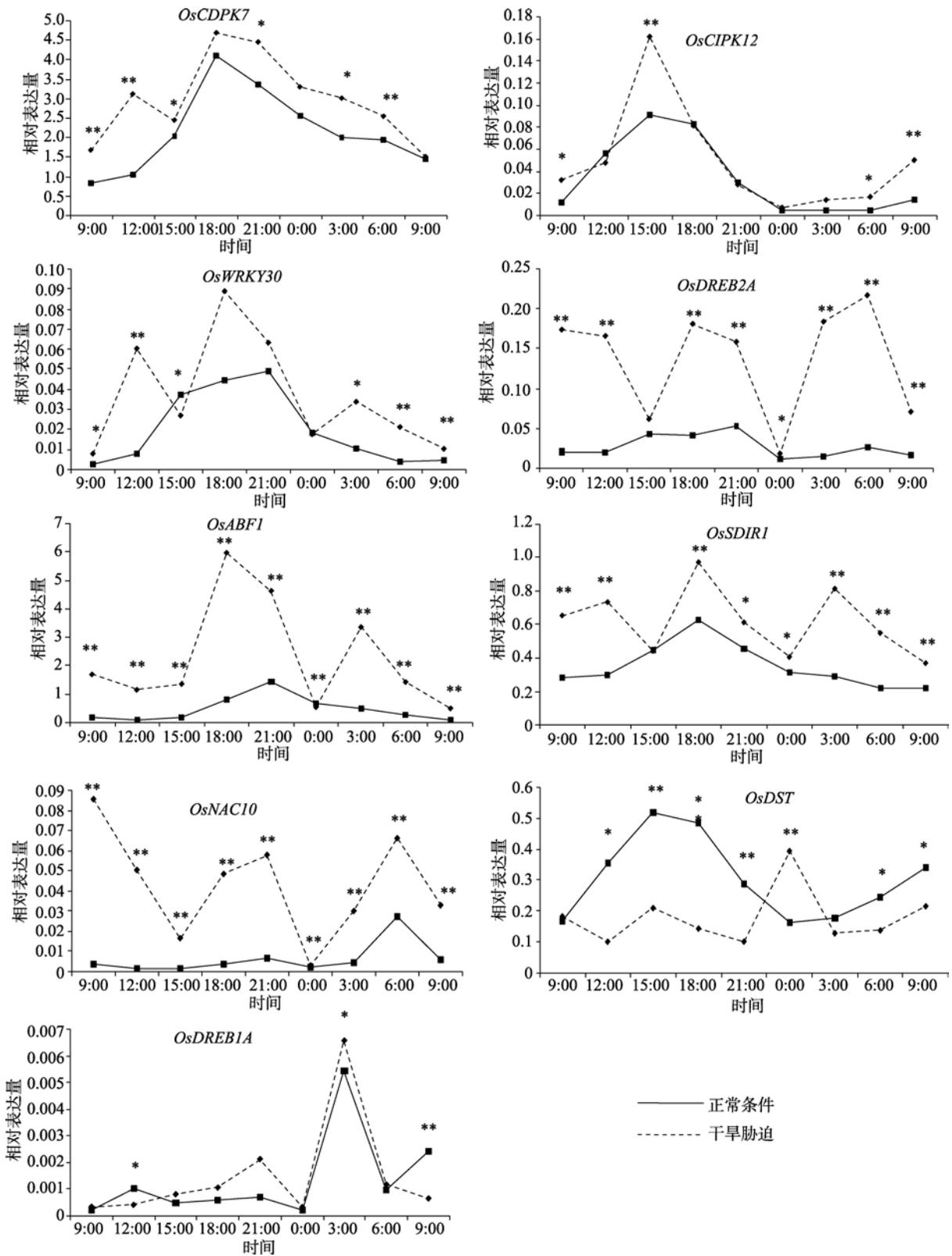


图 2 干旱胁迫影响胁迫响应基因每日表达变化

Fig.2 Drought stress affects the diurnal oscillation of stress responsive genes in rice

*表示两样本之间存在显著差异($P < 0.05$), **表示两样本之间存在极显著差异($P < 0.01$).

胁迫后表达量升高, 振幅也增大, 但标准的周期性 S 波峰消失, 呈现多峰无规律状。

但是, *OsDST* 基因在干旱胁迫后表达量下降, 并且正常条件下是下午 3 点表达量最高, 夜晚 0 点表达量最低, 干旱胁迫后基因总体表达量下降, 由此可见, 该基因负调控干旱胁迫, 与前人研究结果一致^[30]。但有趣的是, 干旱胁迫处理却是晚上 0 点表达量达到最高峰, 与正常波峰正好相反(图 2)。

另外, *OsDREB1A* 基因在干旱胁迫和正常条件下表达情况差异不大, 均是在黎明之前表达量不断升高, 凌晨 3 点达到峰值, 存在周期性表达, 且与大豆(*Glycine max* L.)中 *GmDREB2* 在凌晨表达量最高的结果一致^[22]。综上所述, 干旱胁迫使大部分水稻胁迫响应基因表达量升高, 但也使部分胁迫响应基因的周期性表达紊乱。

3 讨论

本研究结果表明, 干旱胁迫对水稻生物钟基因表达量的影响并不完全相同, 干旱胁迫会导致水稻部分傍晚/夜晚表达的生物钟基因整体表达量升高, 如 *OsGI*、*OsELF3* 和 *OsTOC1*, 并且依然保持周期性表达规律, 而且在很多时间节点下干旱胁迫与正常条件下这些基因的表达量之间存在极显著差异。其中实时荧光定量 PCR 结果显示, *OsTOC1* 基因在下午 3 点达到表达量高峰, 利用 RiceXPro 水稻数据库的研究结果显示 *OsTOC1* 在下午 4 点达到表达量高峰, 但 Murakami 等^[13]比较水稻和拟南芥中 *TOC1* 基因是在入夜时分达到表达高峰, 与本研究结果并不一致。可能原因是: Murakami 等采用光暗处理是瞬时关掉电源, *TOC1* 在白天黑夜转换点表达量最高, 而在自然光照条件下, 其光强是逐渐变化的, 在下午 3~4 点时光线开始变弱, 推测 *TOC1* 基因是在光线变弱开启强表达。对拟南芥 *TOC1* 基因的功能研究发现, ABA 处理能增强 *TOC1* 的表达^[28]。大豆在严重干旱胁迫下几乎所有的生物钟基因的震荡表达受到明显抑制, 在中度干旱胁迫下仅 *GmELF4* 表达量整体增强^[22]。另外, 在干旱胁迫下, 水稻 *OsLHY*、*OsPRR73* 和 *OsZTL1* 这 3 个基因的表达量与正常条件下相比整体降低, 振幅减弱(图 1), 表明干旱胁迫下早晨表达生物钟基因与夜晚表达生物钟基因存在

明显差异。每日不同时间的胁迫反应是通过时钟基因在特定的时间开通的, 如夜晚植物叶片气孔关闭, 随后水杨酸和茉莉酸信号转导相关系统启动, 最后都与中午时分启动抗旱胁迫有关^[2]。水稻 *OsPRR59*、*OsPRR95* 和 *OsPRR37* 这 3 个基因的峰值相位不变, 振幅减弱。而对大豆的研究结果表明, 干旱处理 *PRR3/7/9* 在干旱胁迫下均表达减弱, 仅有 *PRR3* 在中度干旱处理下表达峰值增高^[22]。但是, 另外一些基因如 *OsFKF1*, 仅与光照有关, 干旱胁迫对其表达量影响较小。总之, 干旱胁迫导致大部分早晨生物钟基因表达振幅减弱, 使傍晚和夜晚生物钟基因表达增强, 与胁迫时植物降低光合作用、关闭气孔、增强抗逆相关代谢有关。另一方面, 干旱胁迫使大部分胁迫响应基因表达量升高, 说明这些基因正调控干旱胁迫, 而对于干旱胁迫负调控基因正好相反, 如 *OsDST*(图 2)。干旱使绝大部分抗旱基因全天表达量提高, 但波动幅度变小, 夜晚 0 点表达量最低, 但也不会低于正常时期的表达量, 甚至部分胁迫响应基因的周期性表达特性丧失, 但也有部分基因的节律性增强, 表明部分干旱胁迫响应基因在干旱胁迫下摆脱了生物钟基因的控制。类似的研究结果也在大豆研究中报道过, 干旱胁迫使大豆中部分抗旱响应基因表达量整体增强, 中度干旱胁迫下还有增强振幅效果, 但不同基因之间存在差异^[22]。但生物钟基因表达的变化如何影响这些抗逆基因的表达还需进一步研究。

总之, 干旱胁迫影响水稻生物钟基因的表达。同时, 水稻干旱胁迫响应基因存在全天波动, 在水稻干旱胁迫响应和生物钟基因表达之间可能存在调控关系。有趣的是, 本研究中干旱诱导的水稻胁迫响应基因在夜晚 0 点表达量最低, 因此本研究认为在细胞脱水响应基因的表达和生物钟基因之间存在的调控关系会优化水稻在一天内不同时间段的代谢, 而这种机制在增加水稻在干旱环境中的生存率以及生产效率方面发挥着重要的作用。对这一机制中的元件进行深入研究, 将对遗传育种策略的发展有贡献, 对提高水稻抗旱、增加农业产量也有重大意义。已有研究表明, *PRR5-VP* 蛋白提高了拟南芥生物量、冷、干旱和盐的胁迫抗性^[31]。*PRR37* 多态性提供了水稻高产、株型、抽穗期等性状资源的育种选择^[32]。

OsPRR37 基因序列在自然品种中呈现多态性, 使水稻的种植纬度范围极度扩大, 从热带一直到亚寒带, 生育期变化范围也很大^[33]。由此可见, 生物钟在农业领域对于增强植物的适应性、抗逆性, 改造作物的地域性限和提高生物量等方面均起着至关重要的作用^[1]。虽然前人对于生物钟的研究已有很多, 但是生物钟和逆境信号之间完整复杂的信号网络还没有完全研究清楚。对植物生物钟基因的功能发掘, 尤其是对水稻的相关研究还远远不够。本课题组将要研究鉴定生物钟基因和干旱响应基因之间的互作机制, 探讨提高水稻产量与增强水稻的适应性的可能性。

参考文献(References):

- [1] Xu XD, Xie QG. The circadian clock in plants. *Chin J Nat*, 2013, 35(2): 118–126.
徐小冬, 谢启光. 植物生物钟研究的历史回顾与最新进展. *自然科学*, 2013, 35(2): 118–126. [DOI]
- [2] Seo PJ, Mas P. STRESSing the role of the plant circadian clock. *Trends Plant Sci*, 2015, 20(4): 230–237. [DOI]
- [3] Alabadi D, Oyama T, Yanovsky MJ, Harmon FG, Más P, Kay SA. Reciprocal regulation between TOC1 and LHY/CCA1 within the *Arabidopsis* circadian clock. *Science*, 2001, 293(5531): 880–883. [DOI]
- [4] Huang W, Pérez-García P, Pokhilko A, Millar AJ, Antoshchekin I, Riechmann JL, Mas P. Mapping the core of the *Arabidopsis* circadian clock defines the network structure of the oscillator. *Science*, 2012, 336(6077): 75–79. [DOI]
- [5] Gendron JM, Pruneda-Paz JL, Doherty CJ, Gross AM, Kang SE, Kay SA. *Arabidopsis* circadian clock protein, TOC1, is a DNA-binding transcription factor. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2012, 109(8): 3167–3172. [DOI]
- [6] Nakamichi N, Kiba T, Henriques R, Mizuno T, Chua NH, Sakakibara H. PSEUDO-RESPONSE REGULATORS 9, 7, and 5 are transcriptional repressors in the *Arabidopsis* circadian clock. *Plant Cell*, 2010, 22(3): 594–605. [DOI]
- [7] Farré EM, Harmer SL, Harmon FG, Yanovsky MJ, Kay SA. Overlapping and distinct roles of *PRR7* and *PRR9* in the *Arabidopsis* circadian clock. *Curr Biol*, 2005, 15(1): 47–54. [DOI]
- [8] Helfer A, Nusinow DA, Chow BY, Gehrke AR, Bulyk ML, Kay SA. *LUX ARRHYTHMO* encodes a night time repressor of circadian gene expression in the *Arabidopsis* core clock. *Curr Biol*, 2011, 21(2): 126–133. [DOI]
- [9] Nusinow DA, Helfer A, Hamilton EE, King JJ, Imaizumi T, Schultz TF, Farré EM, Kay SA. The ELF4-ELF3-LUX complex links the circadian clock to diurnal control of hypocotyl growth. *Nature*, 2011, 475(7356): 398–402. [DOI]
- [10] Hsu PY, Harmer SL. Wheels within wheels: the plant circadian system. *Trends Plant Sci*, 2014, 19(4): 240–249. [DOI]
- [11] Millar AJ. The intracellular dynamics of circadian clocks reach for the light of ecology and evolution. *Annu Rev Plant Biol*, 2016, 67(1): 595–618. [DOI]
- [12] Gehan MA, Greenham K, Mockler TC, McClung CR. Transcriptional networks—crops, clocks, and abiotic stress. *Curr Opin Plant Biol*, 2015, 24: 39–46. [DOI]
- [13] Murakami M, Tago Y, Yamashino T, Mizuno T. Comparative overviews of clock-associated genes of *Arabidopsis thaliana* and *Oryza sativa*. *Plant Cell Physiol*, 2007, 48(1): 110–121. [DOI]
- [14] Murakami M, Ashikari M, Miura K, Yamashino T, Mizuno T. The evolutionarily conserved *OsPRR* quintet: rice pseudo-response regulators implicated in circadian rhythm. *Plant Cell Physiol*, 2003, 44(11): 1229–1236. [DOI]
- [15] Izawa T, Mihara M, Suzuki Y, Gupta M, Itoh H, Nagano AJ, Motoyama R, Sawada Y, Yano M, Hirai MY, Makino A, Nagamura Y. *Os-GIGANTEA* confers robust diurnal rhythms on the global transcriptome of rice in the field. *Plant Cell*, 2011, 23(5): 1741–1755. [DOI]
- [16] Zhao JM, Xi H, Ouyang XH, Chen WL, Du AP, Ling Z, Wang SG, Xing WD, Li SG. *OsELF3-1*, an ortholog of *Arabidopsis* early flowering 3, regulates rice circadian rhythm and photoperiodic flowering. *PLoS One*, 2012, 7(8): e43705. [DOI]
- [17] Kurup S, Jones HD, Holdsworth MJ. Interactions of the developmental regulator *ABI3* with proteins identified from developing *Arabidopsis* seeds. *Plant J*, 2000, 21(2): 143–155. [DOI]
- [18] Sanchez-Villarreal A, Shin J, Bujdoso N, Obata T, Neumann U, Du SX, Ding ZJ, Davis AM, Shindo T, Schmelzer E, Sulpice R, Nunes-Nesi A, Stitt M, Fernie AR, Davis SJ. *TIME FOR COFFEE* is an essential component in the maintenance of metabolic homeostasis in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J*, 2013, 76(2): 188–200. [DOI]
- [19] Kim WY, Ali Z, Park HJ, Park SJ, Cha JY, Perez-Hormaeche J, Quintero FJ, Shin G, Kim MR, Qiang Z, Ning L, Park HC, Lee SY, Bressan RA, Pardo JM, Bohnert HJ, Yun DJ. Release of *SOS2* kinase from sequestration with *GIGANTEA* determines salt tolerance in *Arabidopsis*.

- Nat Commun*, 2013, 4: 1352. [DOI]
- [20] Nakamichi N, Kusano M, Fukushima A, Kita M, Ito S, Yamashino T, Saito K, Sakakibara H, Mizuno T. Transcript profiling of an *Arabidopsis* PSEUDO RESPONSE REGULATOR arrhythmic triple mutant reveals a role for the circadian clock in cold stress response. *Plant Cell Physiol*, 2009, 50(3): 447–462. [DOI]
- [21] Liu T, Carlsson J, Takeuchi T, Newton L, Farré EM. Direct regulation of abiotic responses by the *Arabidopsis* circadian clock component PRR7. *Plant J*, 2013, 76(1): 101–114. [DOI]
- [22] Marcolino-Gomes J, Rodrigues FA, Fuganti-Pagliarini R, Bendix C, Nakayama TJ, Celaya B, Molinari HBC, De Oliveira MCN, Harmon FG, Nepomuceno A. Diurnal oscillations of soybean circadian clock and drought responsive genes. *PLoS One*, 2014, 9(1): e86402. [DOI]
- [23] Hu HH, Xiong LZ. Genetic engineering and breeding of drought-resistant crops. *Annu Rev Plant Biol*, 2014, 65(1): 715–741. [DOI]
- [24] Weltmeier F, Rahmani F, Ehlert A, Dietrich K, Schütze K, Wang X, Chaban C, Hanson J, Teige M, Harter K, Vicente-Carbajosa J, Smeekens S, Droge-Laser W. Expression patterns within the *Arabidopsis* C/S1 bZIP transcription factor network: availability of heterodimerization partners controls gene expression during stress response and development. *Plant Mol Biol*, 2009, 69(1–2): 107–119. [DOI]
- [25] Zhang GY, Ming C, Li LC, Xu ZS, Chen X, Guo JM, Ma YZ. Overexpression of the soybean GmERF3 gene, an AP2/ERF type transcription factor for increased tolerances to salt, drought, and diseases in transgenic tobacco. *J Exp Bot*, 2009, 60(13): 3781–3796. [DOI]
- [26] Park SY, Fung P, Nishimura N, Jensen DR, Fujii H, Zhao Y, Lumba S, Santiago J, Rodrigues A, Chow TFF, Alfred SE, Bonetta D, Finkelstein R, Provart NJ, Desveaux D, Rodriguez PL, McCourt P, Zhu JK, Schroeder JI, Volkman BF, Cutler SR. Abscisic acid inhibits type 2C protein phosphatases via the PYR/PYL family of START proteins. *Science*, 2009, 324(5930): 1068–1071. [DOI]
- [27] Geiger D, Scherzer S, Mumm P, Marten I, Ache P, Matschi S, Liese A, Wellmann C, Al-Rasheid KA, Grill E, Romeis T, Hedrich R. Guard cell anion channel SLAC1 is regulated by CDPK protein kinases with distinct Ca²⁺ affinities. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010, 107(17): 8023–8028. [DOI]
- [28] Legnaioli T, Cuevas J, Mas P. TOC1 functions as a molecular switch connecting the circadian clock with plant responses to drought. *EMBO J*, 2009, 28(23): 3745–3757. [DOI]
- [29] Wilkins O, Bräutigam K, Campbell MM. Time of day shapes *Arabidopsis* drought transcriptomes. *Plant J*, 2010, 63(5): 715–727. [DOI]
- [30] Huang XY, Chao DY, Gao JP, Zhu MZ, Shi M, Lin HX. A previously unknown zinc finger protein, DST, regulates drought and salt tolerance in rice via stomatal aperture control. *Genes Dev*, 2009, 23(15): 1805–1817. [DOI]
- [31] Nakamichi N, Takao S, Kudo T, Kiba T, Wang Y, Kinoshita T, Sakakibara H. Improvement of *Arabidopsis* biomass and cold, drought and salinity stress tolerance by modified circadian clock-associated PSEUDO-RESPONSE REGULATORS. *Plant Cell Physiol*, 2016, 57(5): 1085–1097. [DOI]
- [32] Yan WH, Liu HY, Zhou XC, Li QP, Zhang J, Lu L, Liu TM, Liu HJ, Zhang CJ, Zhang ZY, Shen GJ, Yao W, Chen HX, Yu SB, Xie WB, Xing YZ. Natural variation in *Ghd7.1* plays an important role in grain yield and adaptation in rice. *Cell Res*, 2013, 23(7): 969–971. [DOI]
- [33] Koo BH, Yoo SC, Park JW, Kwon CT, Lee BD, An G, Zhang ZY, Li JJ, Li ZC, Paek NC. Natural variation in *OsPRR37* regulates heading date and contributes to rice cultivation at a wide range of latitudes. *Mol Plant*, 2013, 6(6): 1877–1888. [DOI]

(责任编辑: 邢永忠)