

OsST2 调控水稻苗期耐盐性的功能研究

付瑶^{1, #} 李娜^{1, #} 徐静茹¹ 覃奕琰¹ 程笑然¹ 孙浩峰¹ 张琪¹ 崔志波¹ 杨新宇^{2, *}
赵明辉^{1, *}

(¹ 沈阳农业大学 水稻研究所/东北粳稻遗传改良与优质高效生产省部共建协同创新中心, 沈阳 110866; ² 包头市农牧科学技术研究所, 包头 014010;

[#]共同第一作者; ^{*}通信联系人, email: yangxinyugyg@163.com; mhzhao@syau.edu.cn)

Function Study of *OsST2* in Regulating Salt Tolerance in Rice Seedlings

FU Yao^{1, #}, LI Na^{1, #}, XU Jingru¹, QIN Yiyan¹, CHENG Xiaoran¹, SUN Haofeng¹, ZHANG Qi¹, CUI Zhibo¹,
YANG Xinyu^{2, *}, ZHAO Minghui^{1, *}

(¹ Rice Research Institute/ Collaborative Innovation Center for Genetic Improvement and High Quality and Efficiency Production of Northeast Japonica Rice in China, Shenyang Agricultural University, Shenyang 110866, China; ² Baotou Research Institute of Agricultural and Animal Husbandry Science and Technology, Baotou 014010, China; [#]These authors contributed equally to the work; ^{*}Corresponding author, email: yangxinyugyg@163.com; mhzhao@syau.edu.cn)

Abstract: 【Objective】To investigate the function of *OsST2*, a candidate gene associated with seedling-stage salt tolerance, and to elucidate its molecular mechanism in regulating salt tolerance in rice, an analysis under salt stress conditions was conducted. 【Method】The CRISPR-Cas9 gene editing technology was used to generate *OsST2* knockout mutants, and the phenotypic and physiological characteristics of these mutants under salt stress were analyzed. 【Result】Under salt stress, the *OsST2* gene knockout mutants exhibited significant changes in traits such as seedling height, dead leaf rate, root traits, and leaf SPAD value compared to the wild type. Moreover, the *OsST2* knockout mutants demonstrated stronger salt tolerance than the wild type. qRT-PCR analysis revealed that the relative expression levels of known genes positively regulating rice salt tolerance, such as *SKC1*, *OsMYB84*, *OsNAC3*, *OsMsr9*, and ROS-related genes, were significantly higher in the *OsST2* knockout mutants compared to the wild type. After salt stress, the levels of malondialdehyde, hydrogen peroxide, and superoxide anion in the *OsST2* knockout mutants were significantly lower than those in the wild type. Conversely, the activities of peroxidase and superoxide dismutase, as well as glutathione content, were significantly higher in the mutants compared to the wild type. These findings suggest that the knockout of *OsST2* enhances the rice plant's ability to scavenge reactive oxygen species, thereby improving its salt tolerance. 【Conclusion】*OsST2* negatively regulates salt tolerance in rice. Loss of *OsST2* function enhanced the scavenging capacity of ROS in rice, thereby improving salt tolerance in rice, confirming that *OsST2* plays an important role in the regulation of salt tolerance in rice.

Keywords: salt stress; rice; *OsST2* knockout mutants; physiological mechanism; gene function

摘要: 【目的】探究苗期耐盐相关候选基因 *OsST2* 在盐胁迫下的功能, 为解析其调控水稻耐盐性的分子机制奠定基础。【方法】利用 CRISPR-Cas9 基因编辑技术, 构建 *OsST2* 基因敲除突变体, 并分析盐胁迫下突变体表型和生理特性。【结果】盐胁迫下, *OsST2* 基因敲除突变体苗高、死叶率、根系、叶片 SPAD 值等性状相较于野生型都发生显著的变化, 且更耐盐。qRT-PCR 分析表明, 已知的正向调控水稻耐盐性的基因 *SKC1*、*OsMYB84*、*OsNAC3*、*OsMsr9* 及 ROS 相关基因在 *OsST2* 敲除突变体中的相对表达量都显著高于野生型。盐胁迫处理后, *OsST2* 基因敲除突变体的丙二醛含量、过氧化氢含量、超氧阴离子含量均显著低于野生型, 而过氧化物酶和超氧化物歧化酶的活性、谷胱甘肽含量等指标均显著高于野生型, 说明 *OsST2* 敲除增强了水稻清除活性氧的能力, 提高了水稻耐盐性。【结论】说明 *OsST2* 负向调控水稻耐盐性, 且 *OsST2* 基因敲除增强了水稻清除活性氧的能力, 进而提高了水稻耐盐性, 证实 *OsST2* 在水稻耐盐调控中发挥重要作用。

关键词: 盐胁迫; 水稻; *OsST2* 敲除突变体; 生理机制; 基因功能

收稿日期: 2025-04-29; 修改稿收到日期: 2025-06-03。

基金项目: 国家重点研发计划资助项目 (2024YFD1501505)。

水稻(*Oryza sativa* L.)是最重要的禾本科粮食作物之一,对世界一半以上人口的粮食安全至关重要^[1, 2]。随着全球气候变化和不合理灌溉的加剧,盐渍土面积逐年增加,预计全球土壤盐碱化的扩展速度将会进一步加快^[3, 4]。盐胁迫是一种严重影响作物生长和产量的不利环境胁迫^[5],在高盐度条件下水稻无法完成正常的生命周期。当水稻植株内的盐浓度达到一定水平,叶片会失绿、卷曲,株高、根系等均会被抑制^[6],高盐条件下水稻体内代谢过程受抑^[7, 8],对水稻生长、产量与品质造成影响。有研究表明,水稻在盐胁迫条件下会积累过量活性氧(Reactive oxygen species, ROS)^[9],而抗氧化酶系统通过调节细胞 ROS 水平和氧化还原状态来起到保护作用^[10]。提高水稻耐盐性,种植耐盐水稻和在盐碱地耕种是确保粮食安全的有效策略^[11]。因此,深入探究盐胁迫对水稻生长过程的影响,挖掘水稻在逆境下的适应机制,对于提高水稻的耐盐性具有重要意义。

水稻耐盐性是一种复杂的数量性状,涉及各种生物学过程和分子机制^[12],筛选、定位耐盐相关基因,明确基因功能及其调控水稻耐盐性的分子机制是一个活跃但具有挑战性的研究领域^[13]。随着现代科学技术的发展,已鉴定出许多与水稻耐盐性相关的基因^[14]。*sts* 是丝裂原活化蛋白激酶激酶 4(*OsMKK4*)的新型突变等位基因,有研究表明,*OsSTS* 功能的丧失提高了水稻幼苗的活性氧(ROS)清除率,增强了水稻幼苗的耐盐性。一种新型 MYB 相关转录因子 *Osmbyb48-1* 过表达,使水稻在盐胁迫条件下的水分流失率降低,丙二醛含量降低,进而增强了水稻耐盐性^[15]。本课题组前期通过全基因组关联分析将 *OsST2* 基因(*Os01g0604600*)定位于水稻 1 号染色体上,基因序列全长为 1417 bp,仅有一个外显子,编码序列(Coding sequence, CDS)长度为 459 bp^[16-17]。*OsST2* 基因编码一个含有 159 个氨基酸的未知功能蛋白。前期研究结果表明,在短时高浓度盐处理下,*OsST2* 基因在盐敏感品种 S87 中的表达量均不同程度高于耐盐品种 S125,且在 S87 和 S125 中的基因序列与日本晴相比,存在碱基替换,导致氨基酸序列不同。此外, TENOR 数据库(Transcriptome ENcyclopedia Of Rice, <http://tenor.dna.affrc.go.jp>)中的公共表达谱也证明了该基因在高盐条件下的表达量最高,以上结果表明该基因可能参与水稻盐胁迫响应。本研究利用 CRISPR/Cas9 基因编辑技术构建 *OsST2* 基因敲除

突变体,对其盐胁迫下的表型和生理特性进行研究,探究 *OsST2* 基因功能,为解析 *OsST2* 调控水稻耐盐性的分子机制奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

以日本晴为野生型(后续命名为野生型/WT)作为试材。大肠杆菌感受态 DH5 α 、载体 pRGEB32 保存在沈阳农业大学水稻研究所。DNA 标记及植物 RNA 提取试剂盒购买于生工生物工程(上海)股份有限公司,反转录及 qPCR 试剂(Evo M-MLV 和 SYBR Green Pro Taq HS qPCR)购自艾科瑞生物公司。

1.2 *OsST2* 基因敲除突变体制制

用单酶 *Bsa* I 对 CRISPR-Cas9 编辑系统骨架载体 pRGEB32 进行酶切。利用 T4 DNA 连接酶,将回收后的 pRGEB32 大片段与 *OsST2* 的 sgRNA 靶位点的退火产物进行连接。将重组产物转入大肠杆菌感受态 DH5 α ,挑取单菌落,振荡培养过夜,提取质粒进行序列比对,以验证是否成功构建载体。在成功构建载体后,进行水稻遗传转化。经检测后,对靶点发生编辑的 T₀ 代植株继续培养。

1.3 纯合鉴定

使用 CTAB 法提取叶片 DNA,参照李荣华等^[18]的方法进行。在 Primer 3.0 网站(<https://primer3.ut.ee/>),设计目的基因靶点前后 400~800 bp 的特异性引物(F: TTTACAGTGGTCTAAAAGC GAAAT, R: CCGAC ATCTTCATCGAGCAG),对目的片段进行 PCR 扩增,使用 2% 琼脂糖凝胶电泳对扩增序列进行检测,对与目的条带大小符合的条带进行测序,将测序得到的 DNA 序列与野生型基因组序列利用 DNAMAN 软件进行 BLAST 比对,同时观察峰图,筛选靶点序列处为单峰的突变体,即为纯合突变体。

1.4 表型鉴定

从材料中选取大小均衡、米粒饱满的种子于 30 °C 培养箱中浸种 48 h,催芽 24 h,选取露白一致的种子,摆入装有蒸馏水的 96 孔定制培养盒。培养条件为 28 °C,光照 2500 lux、12 h 光照/12 h 黑暗。蒸馏水培养 7 d 后换成 1/2 倍国际水稻所标准营养液培养 7 d,每 3 d 更换一次营养液。14 d 后换成全营养液进行培养,每 2 d 更换一次营养液,期间保持 pH 值在 5.5~6.0 之间。待水稻幼苗长至三叶一心期即可进行处理。处理组以全营养

表 1 本研究相关基因 qRT-PCR 所用引物

Table 1. Primers for qRT-PCR of the genes involved in this study

登录号 Gene ID	基因 Gene	前引物 (5'-3') Forward primer (5'-3')	后引物 (5'-3') Reverse primer (5'-3')
	<i>OsST2</i>	CAAAGAAGCGGGAGGGGA	GAGGATGCGAGAGATGTGGT
	<i>Actin</i>	CCACACCCTGCTATGTACG	CATCACCAGAGTCCAACACAA
<i>Os01g0307500</i>	<i>SKC1</i>	TTCTGGCTCCAACGTGCTGTA	TGGTGAAGTAGAGGCCAAGG
<i>Os03g0771100</i>	<i>OsMYB84</i>	CGAGGCTCAAGAAGAAGCT	AACAGAAGCTTCCGGATCGA
<i>Os07g0225300</i>	<i>OsNAC3</i>	CGCGAGTGGTACTTCTTCAC	TGCATGATCCACTCCGTCTT
<i>Os07g0561300</i>	<i>OsMsr9</i>	GCTCGAATCACTGCCTCAAG	CCGTTGCTTCGCTAACTTGT
<i>Os07g0665200</i>	<i>OssodCc1</i>	CGACGCCGAGGAATTTCTAG	AGGTGGTGTAAGTGTCTCTCATGC
<i>Os03g0351500</i>	<i>OssodCc2</i>	TGTGCGCATGGTTTTTGGTG	CATAGTTTCATTGGGCGCCA
<i>Os01g0263300</i>	<i>OsPOX1</i>	CAGCTGTCTCAAGGTGAAGCTC	AGATTTGCTTCAGCAACGAA
<i>Os01g0734200</i>	<i>OsrbohA</i>	CAGCACTCATCACCATGCT	TTCGTTGTGCATTTCCTGTT

液配制成 100 mmol/L NaCl 溶液进行盐胁迫处理，对照组则是继续在营养液中进行培养，各设置三组重复。盐胁迫处理 48 h 后取样，进行各项生理指标测定，盐胁迫处理 7 d 后，测定苗高(茎基部到最长叶叶尖的高度)和死叶率(枯叶数/叶片总数×100%)，并进行根系形态测量。取长势一致、健康茁壮的处理组和对照组幼苗鲜样各 15 株，剪取根系平铺在根系扫描仪(Expression1100 XL)中，要求各须根之间不交叠，根系扫描仪测量幼苗总根长、根表面积、根体积。3 次重复，每个重复选择 5 株进行测量。

1.5 生理指标测定

(1)SPAD(Soil and Plant Analyzer Development): 使用便携式叶绿素检测仪(SPAD-502 Plus 仪)进行测定。(2)丙二醛(MDA)含量测定：在酸性加热条件下，硫代巴比妥酸与 MDA 反应，生成红棕色的 3, 5, 5-三甲基恶唑-2, 4-二酮。实验步骤参考施海涛等的方法^[19]。(3)过氧化氢(H₂O₂)含量测定：H₂O₂ 与硫酸钛反应生成过氧化物-钛黄色沉淀复合物，生成的复合物被硫酸溶解后，测定其 410 nm 下的吸光度值^[19]。利用 Servicebio 植物过氧化氢染色液(DAB 法)进一步分析。(4)超氧阴离子含量测定：采用生工超氧阴离子含量检测试剂盒-微量法进行测定。利用 Servicebio 植物超氧阴离子染色液(NBT 法)进一步分析。(5)超氧化物歧化酶(SOD)活性、过氧化物酶(POD)活性、谷胱甘肽(GSH)含量均利用 Solarbio 公司出产的检测试剂盒进行测定，实验方法参照说明书。

1.6 基因表达量分析

在国家水稻数据中心(<https://www.ricedata.cn/gene/>)查询四个已知耐盐相关基因的 DNA 编码序列(CDS)，利用 Primer 3.0 网站 (<https://primer3>

[ut.ee/](https://primer3))进行引物设计。提取 RNA，反转录为 cDNA，设置 qRT-PCR 程序为 94 °C 30 s，94 °C 5 s，60 °C 30 s，40 个循环。以 *Actin* 为内参基因，用 2^{-ΔΔCT} 计算基因相对表达量。

2 结果与分析

2.1 *OsST2* 基因表达量分析

为了研究 *OsST2* 基因在水稻中的表达模式，分别对苗期、分蘖期、孕穗期、灌浆期和成熟期的根、茎、叶、穗进行取样，提取 RNA 后进行反转录，利用反转录得到的 cDNA 进行 qRT-PCR 分析，检测 *OsST2* 基因在水稻不同时期不同部位的表达量，结果如图 1 所示。*OsST2* 基因在不同时期均有表达，其中苗期的茎，分蘖期的根、茎表达量最低，在苗期的叶片，孕穗期的根、茎、叶、穗、

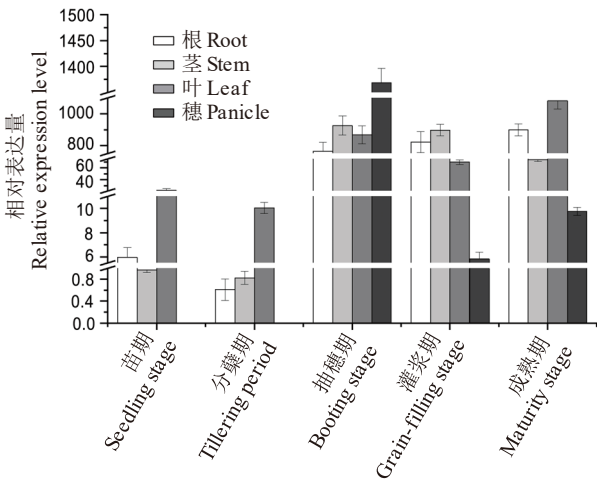


图 1 耐盐候选基因 *OsST2* 在 WT 不同组织中的表达量分析

Fig. 1. Expression analysis of candidate gene *OsST2* for salt tolerance in different tissues of WT

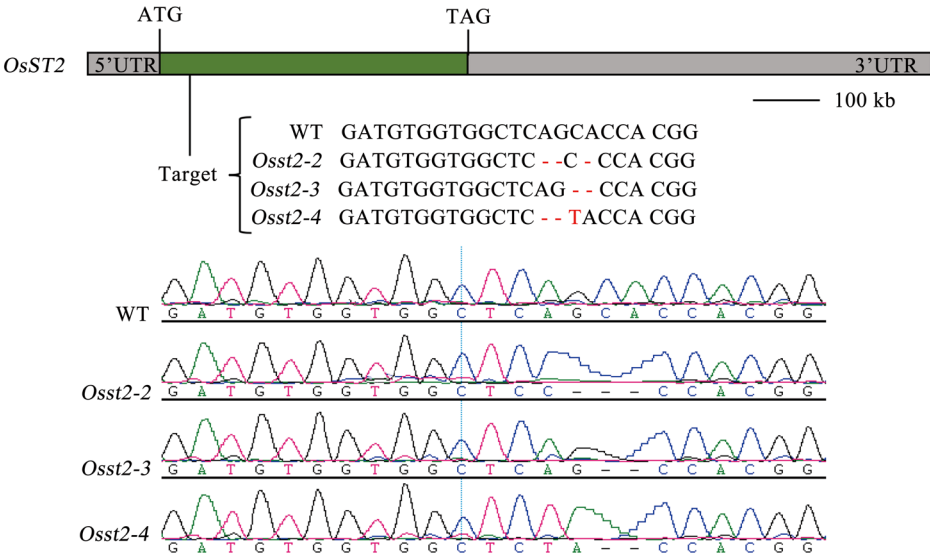


图2 日本晴与 *OsST2* 突变体靶标位点序列

Fig. 2. Sequences of target sites of wild-type Nipponbare and *osst2*

灌浆期和成熟期的根、茎、叶表达量均比较高。

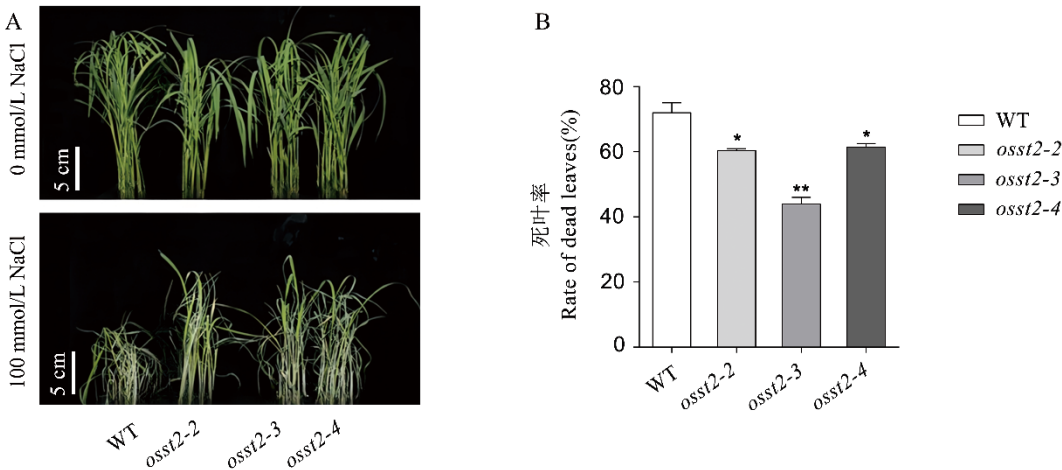
2.2 *OsST2* 基因敲除突变体创制

为了进一步研究 *OsST2* 基因的功能, 利用 CRISPR/Cas9 基因编辑技术, 以日本晴为受体, 对靶序列进行基因编辑, 获得三种类型突变体。其中, *osst2-2* 在 *OsST2* 基因 CDS 的 87 bp 处发生一个碱基 T 的缺失, 89 bp 处发生两个碱基 CT 缺失, 导致氨基酸序列变化; *osst2-3* 在 *OsST2* 基因 CDS 的 87 bp 处发生两个碱基 TG 缺失, 导致在 87 bp 处提前出现终止密码; *osst2-4* 在 *OsST2* 基因 CDS 的 88 bp 处的“G”替换成“A”, 89 bp 缺失

两个碱基 CT, 同样导致后续氨基酸序列发生改变, 在 153 bp 处出现终止密码。以 *osst2-2*、*osst2-3*、*osst2-4* 三种突变体为后续实验材料。

2.3 敲除 *OsST2* 基因增强水稻的盐胁迫耐受性

为了鉴定 *OsST2* 基因对水稻苗期耐盐性的影响, 将野生型日本晴与 *OsST2* 基因敲除突变体 *osst2-2*、*osst2-3*、*osst2-4* 培养至三叶一心期, 用 100 mmol/L NaCl 溶液处理 7 d, 统计死叶率。如图 3-A、B 所示, 在盐胁迫下野生型与 *OsST2* 基因敲除突变体均有不同程度的叶片失绿与卷曲, 且 3 种 *OsST2* 基因敲除突变体的死叶率均显著低于野



A: 盐处理后突变体 *osst2* 表型观察; B: 死叶率统计 ($n=6$)。标尺=5 cm。*表示 P 值小于 0.05, 差异显著; **表示 P 值小于 0.01, 差异极显著。下同。

A, Observation of *osst2* mutant phenotype after salt treatment; B, Dead leaf rate ($n=6$); Scale bar=5 cm. * indicates significant difference at the 0.05 probability level; ** indicates extremely significant difference at the 0.01 probability level. The same below.

图3 *OsST2* 敲除突变体植株苗期耐盐表型分析

Fig. 3. Salt tolerance analysis of *OsST2*-knockout mutants at seedling stage

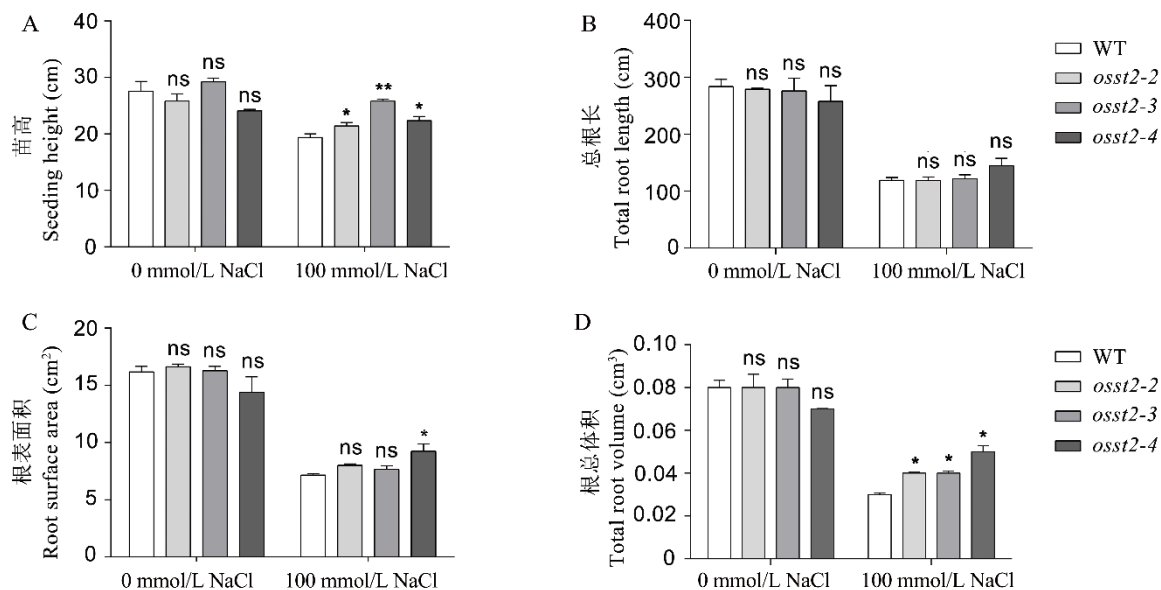


图 4 盐胁迫 7 d 后 *OsST2* 敲除突变体及野生型植株苗期苗高及根系形态测定 ($n=15$)

Fig. 4. Seedling height and root morphology of *OsST2* knockout mutant and wild type after 7 days of salt stress ($n=15$)

生型。

盐处理前, 野生型和突变体的苗高和根系指标没有显著差异, 盐胁迫处理 7 d 后, 野生型苗高较对照降低 29.75%(图 4-A), 突变体 *osst2-2*、*osst2-3*、*osst2-4* 的苗高分别比对照组降低 17.08%、11.72%、7.21%, 降幅明显小于野生型。由图 4-B~D 可知, 盐处理后, 野生型和突变体的根系都受到抑制, 但突变体的根长、根表面积和根体积受抑制程度均小于野生型。

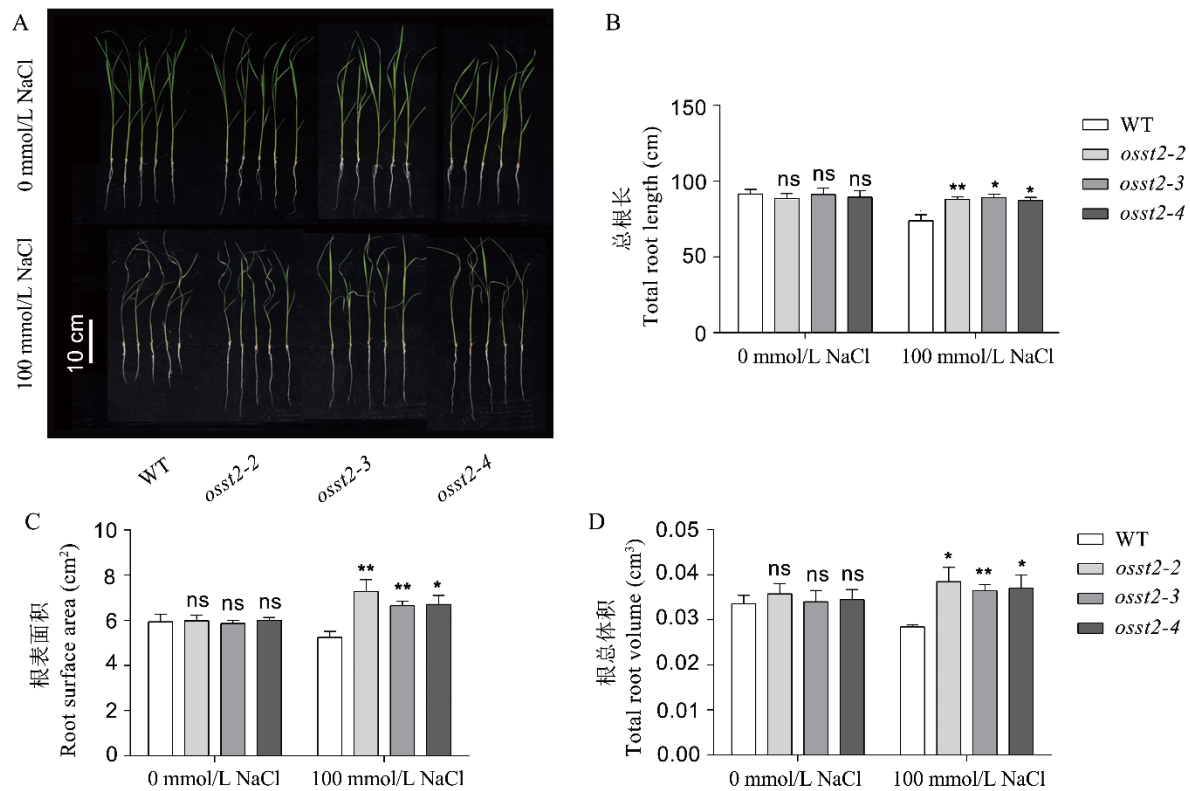
盐胁迫处理 14 d 后, 野生型根长、根表面积和根体积相比对照组分别减少 19.36%、11.58%和 15.43%, 突变体 *osst2-2*、*osst2-3*、*osst2-4* 的根长相比对照组分别长 0.41%、2.35%和 2.46%(图 5-B), 根表面积相比对照组分别大 17.87%、11.81%和 10.35%(图 5-C), 根体积相比对照组分别高 7.03%、6.57%和 6.90%(图 5-D), 说明 *OsST2* 基因敲除可以降低盐胁迫对水稻根系的影响。

叶片 SPAD 值指叶片中当前叶绿素的相对含量, 是衡量植株对环境胁迫适应能力的重要指标。盐处理前, 野生型和突变体中的 SPAD 值不存在显著差异, 盐处理后, 野生型叶片中的 SPAD 值降低了 27.73%, 突变体 *osst2-2*、*osst2-3*、*osst2-4* 叶片中的 SPAD 值分别减少了 12.71%、6.97%、0.03%, 降幅明显低于野生型(图 6-B)。叶片离体实验结果同样表明盐处理后突变体 *osst2-2*、*osst2-3*、*osst2-4* 叶片变黄程度明显小于野生型(图 6-A、C), 说明 *OsST2* 基因敲除可以降低盐胁迫对水稻叶片 SPAD 值的影响。

综上所述, 在盐胁迫后, *OsST2* 基因敲除突变体的死叶率显著低于野生型, 且苗高、根系等其他表型指标同样与野生型存在显著差异, 叶片中 SPAD 值均极显著高于野生型, 表明 *OsST2* 基因敲除后显著增强了水稻苗期耐盐性, 即 *OsST2* 负调控水稻耐盐性。

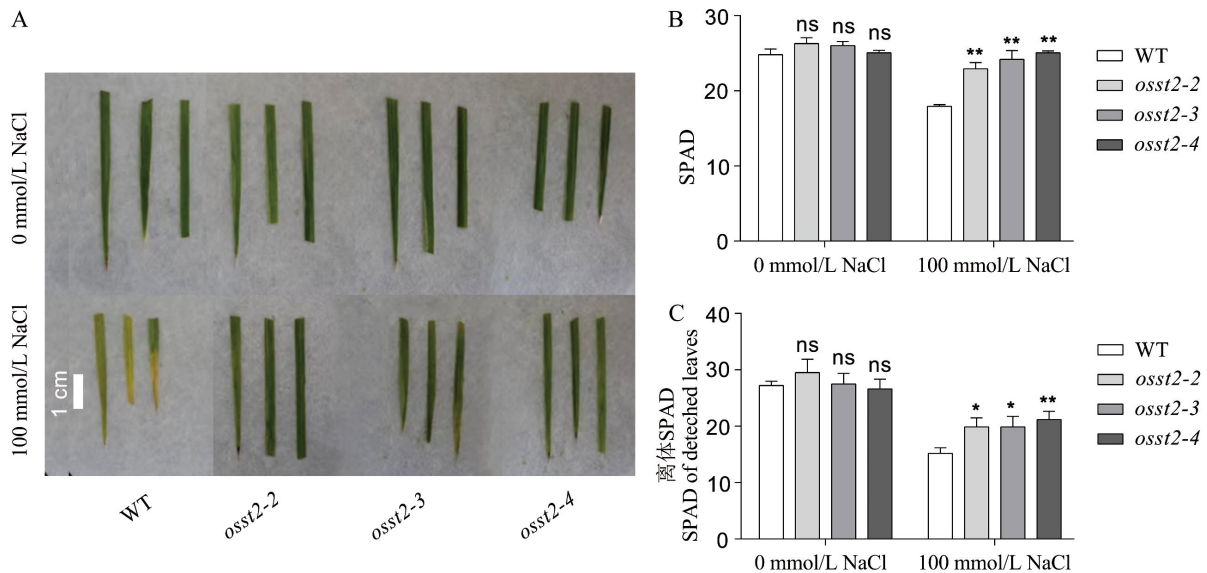
2.4 *OsST2* 调控耐盐关键基因的表达

为进一步研究 *OsST2* 基因对水稻盐胁迫的响应, 本研究分析了 4 个已知与水稻盐胁迫相关的关键调控基因 *SKC1*、*OsMYB84*、*OsNAC3*、*OsMsr9* 以及 4 个 ROS 相关基因在野生型和突变体中的表达水平变化(图 6)。实时荧光定量(qRT-PCR)分析表明, 编码钠离子转运蛋白基因 *SKC1*, 盐处理 12 h, 在突变体中的表达量显著高于野生型中的表达量。*MYB* 型转录因子 *OsMYB84* 参与水稻盐胁迫应答反应, 正调控水稻的耐盐性, 随着盐处理时间延长, 其在野生型和突变体中的表达量均上调, 在盐处理 12 h 后, 突变体中的表达量显著高于野生型。*NAC* 转录因子 *OsNAC3* 正向调控水稻 ABA 信号响应, 增强水稻耐盐性, 在突变体 *osst2* 中随着盐处理时间的延长, 该基因的表达量呈上升趋势, 在盐处理 12 h 时表达量最高。在盐处理 12 h 时突变体中 *OsNAC3* 表达量是野生型中的 4 倍。*OsMsr9* 是多逆境响应基因, F-box 蛋白, 植物耐盐性的正调节因子, 突变体 *osst2* 在盐处理 0、3、6、12 h 时, 该基因的表达量呈明显上升趋势, 在盐处理 12 h 表达量达到最高。在盐处理 3、6、12 h, 突变体中 *OsMsr9* 的表达量均显



A: 盐处理后突变体 *osst2* 根系表型观察; B: 总根长; C: 根表面积; D: 根总体积。
A, Observation of *osst2* mutant phenotype of root morphology after salt treatment; B, Total root length; C, Root surface area; D, Total root volume.
图 5 盐胁迫 14 d 后 *OsST2* 敲除突变体及野生型植株苗期根系形态测定 ($n=15$)

Fig. 5. Seedling root morphology of *OsST2* knockout mutant and wild type after 14 days of salt stress ($n=15$)



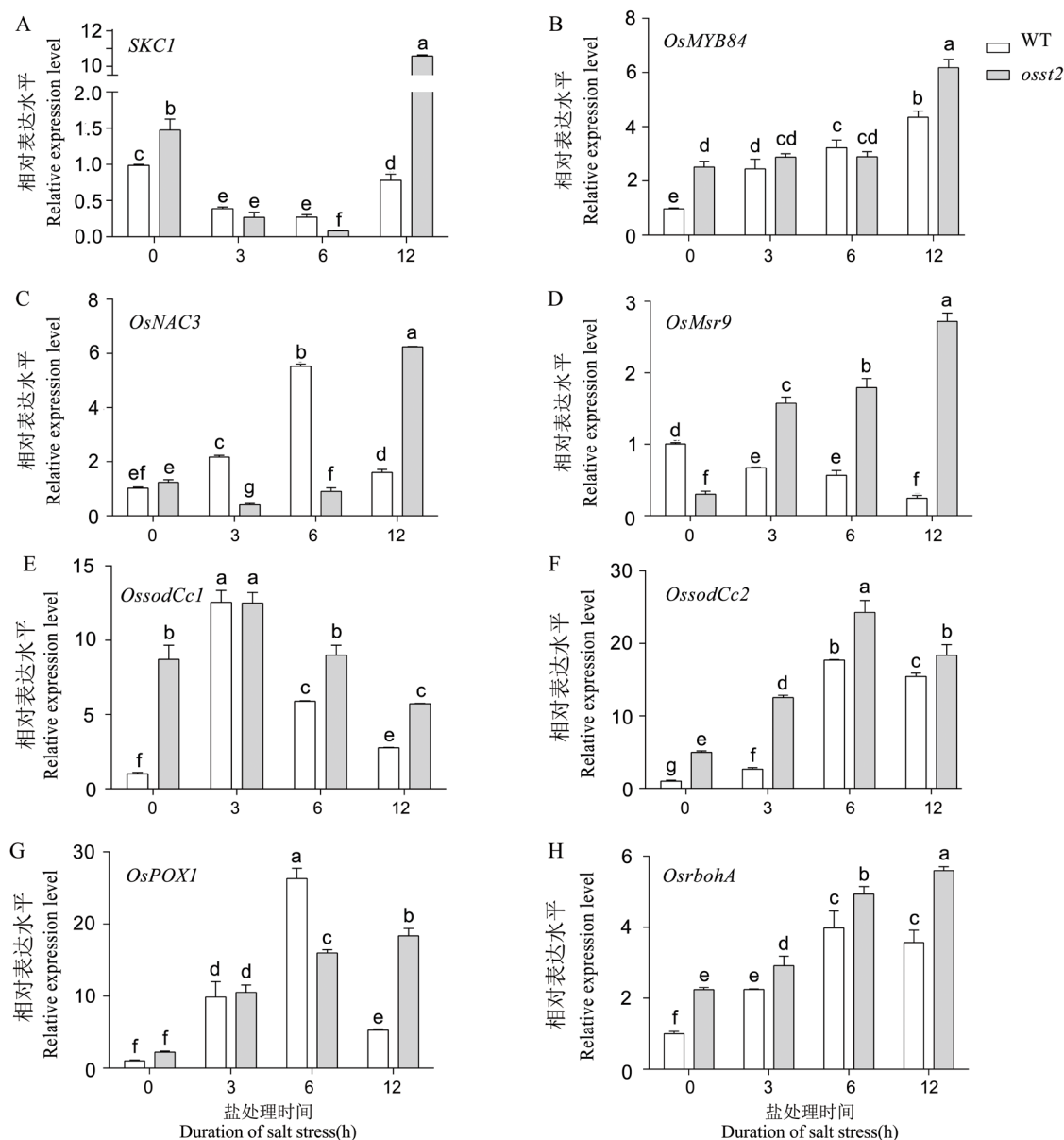
A: 盐处理后突变体 *osst2* 离体叶片表型观察; B: 盐处理后离体叶片 SPAD 值 ($n=15$); C: 盐处理后离体叶片 SPAD 值 ($n=15$)。标尺=1 cm。
A, Phenotypic observation of *osst2* leaves *in vitro* after salt treatment; B, SPAD values of leaves after salt treatment($n=15$); C, SPAD values of detached leaves after salt treatment($n=15$). Scale bar=1 cm.

图 6 盐胁迫对 *OsST2* 敲除突变体及野生型植株苗期叶片 SPAD 值的影响

Fig. 6. Effects of salt stress on SPAD of leaves of *OsST2*-knockout mutants and wild type at seedling stage

著高于野生型。*OssodCc1* 和 *OssodCc2* 是超氧化物歧化酶相关基因, 两者在盐处理 0、3、6、12 h 的

表达趋势均为先上升后下降, 在突变体中的表达量均显著高于野生型。*OsPOX1* 是过氧化物酶相关

图 7 已知耐盐相关基因表达水平分析 ($n=3$)Fig. 7. Analysis of expression levels of known genes related to salt tolerance ($n=3$)

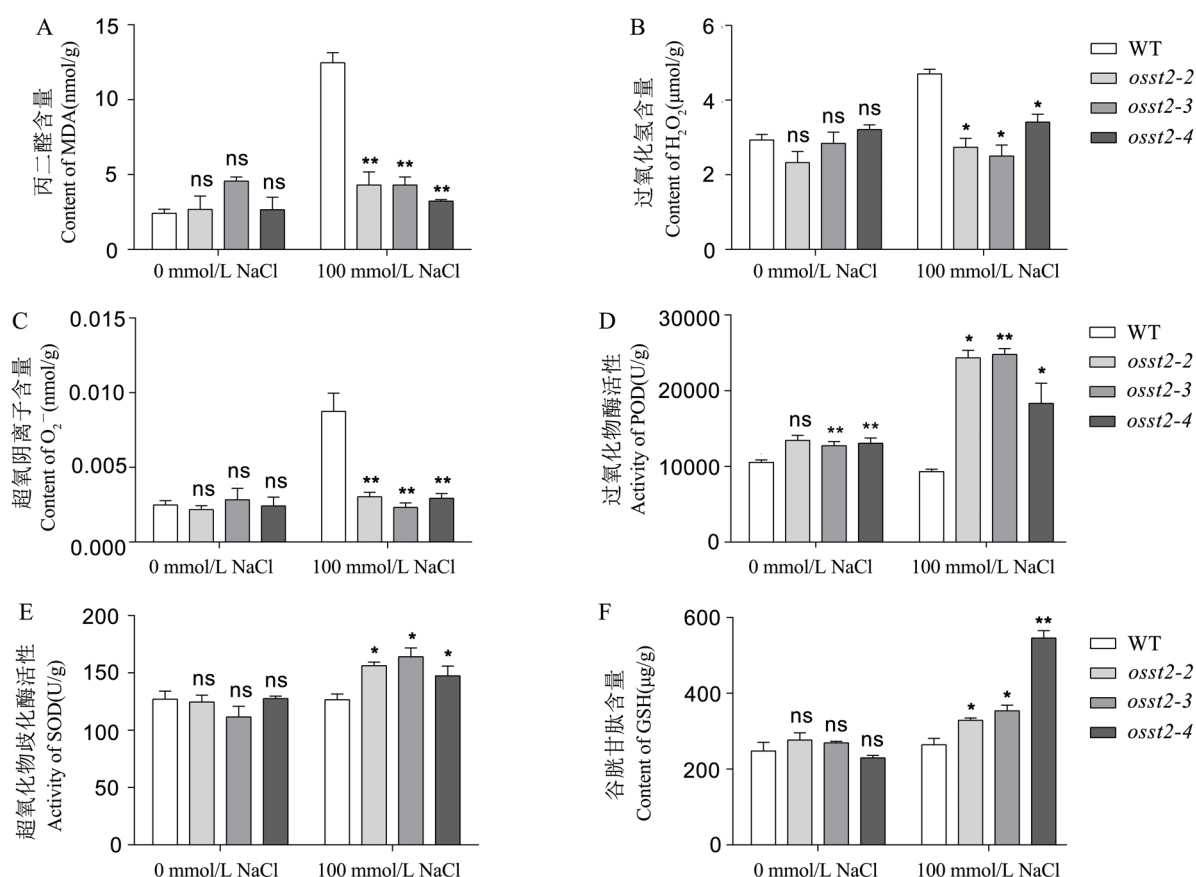
基因, 在突变体中的表达量呈上升趋势, 在盐处理 12 h, 突变体中的表达量显著高于野生型。NADPH 氧化酶 *OsrbohA* 在活性氧的产生过程中发挥作用, 已被证实正向调控水稻耐盐性, 该基因经盐胁迫诱导在野生型和突变体中均呈上升趋势, 在突变体中的表达量显著高于野生型。

2.5 *OsST2* 通过影响活性氧的清除能力调控水稻盐胁迫耐受性

盐处理前, 丙二醛(MDA)含量、过氧化氢(H_2O_2)含量和超氧阴离子含量在野生型和突变体中不存在显著差异。盐处理后, 如图 8-A~C 所示, 野生型叶片中 MDA 含量、 H_2O_2 含量和超氧阴离子含量与处理前相比分别增加了 80.60%、

37.66%、71.68%, 突变体 *osst2-2* 叶片中 MDA 含量、 H_2O_2 含量和超氧阴离子含量与处理前相比分别增加了 37.57%、14.98%、28.52%; 突变体 *osst2-3* 叶片中 MDA 含量、 H_2O_2 含量和超氧阴离子含量与处理前相比分别减少了 5.91%、11.96%、18.19%; 突变体 *osst2-4* 叶片中 MDA 含量、 H_2O_2 含量和超氧阴离子含量与处理前相比分别增加了 17.85%、5.80%、17.36%。

盐处理前, 野生型和突变体中的超氧化物歧化酶(SOD)活性和谷胱甘肽(GSH)含量没有显著差异, 突变体中的过氧化物酶(POD)活性显著高于野生型。在盐处理后, 野生型叶片中 POD 和 SOD 活性与处理前相比分别减少了 11.51%、0.41%, GSH

图8 盐胁迫下水稻幼苗叶片的生理与抗氧化指标 ($n=3$)Fig. 8. Physiological and antioxidant parameters in leaves of rice seedlings under salt stress($n=3$)

含量与处理前相比增加了 6.36%，突变体 *osst2-2*、*osst2-3*、*osst2-4* 的 POD 活性相比对照组分别提高 44.81%、48.58%和 28.82%(图 8-D)，SOD 活性相比对照组分别提高 20.25%、31.98%和 13.42%(图 8-E)，GSH 含量相比对照组分别提高 15.86%、23.84%和 57.94%(图 8-F)。

取盐处理前后野生型和突变体植株的叶片进行 DAB 染色和 NBT 染色，结果如图 9-A 和 9-B 所示。盐处理后，突变体 *osst2-2*、*osst2-3*、*osst2-4* 叶片染色面积明显小于野生型，进一步证明 *OsST2* 基因敲除可以使水稻清除 H_2O_2 和超氧阴离子的能力增强。

综上所述，*OsST2* 基因敲除突变体在盐胁迫下的 MDA 含量、 H_2O_2 含量、超氧阴离子含量均极显著或显著低于野生型，而 POD 活性、SOD 活性、GSH 含量等均极显著或显著高于野生型。

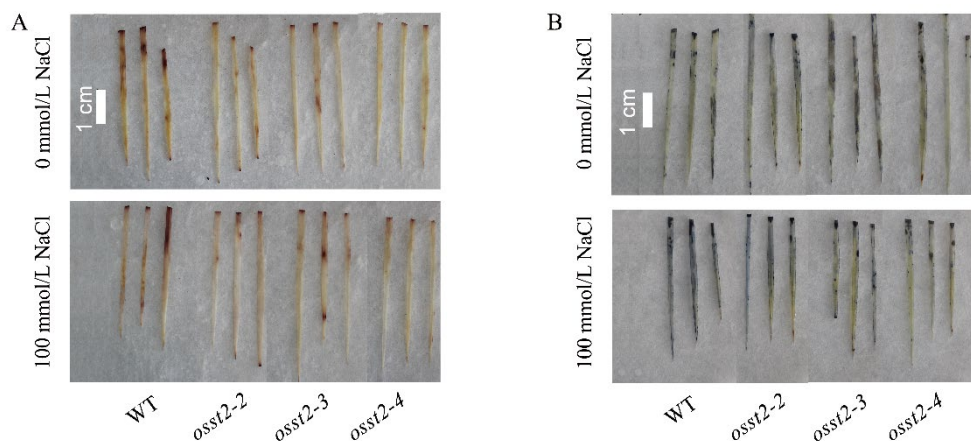
3 讨论

3.1 *OsST2* 基因负向调控水稻耐盐性

盐胁迫条件下，水稻会表现出一定程度的受

害症状，可表现为叶片枯黄，生长发育迟缓，严重时会导致死亡^[20]。张治振等^[21]统计了盐胁迫下不同水稻品种的形态特征，强耐盐材料盐丰 47 的死叶率明显低于其他品种。孙健等^[22]的实验结果表明，盐胁迫会抑制水稻苗高，盐胁迫下耐盐品种长白 10 的苗高降幅小于东农 425。谷娇娇等^[23]的研究表明，盐胁迫下，水稻根系生长同样会受到抑制，根长、根表面积、根体积均显著下降，且相比于盐敏感材料，耐盐材料受影响较小。本研究中，野生型日本晴与 *OsST2* 基因敲除突变体在盐胁迫处理后均有不同程度的叶片失绿与卷曲，这与前人研究结果一致。但 *OsST2* 基因敲除突变体的死叶率显著低于野生型，苗高显著高于野生型。盐胁迫条件下，*OsST2* 基因敲除突变体的总根长、根表面积和根总体积均显著高于野生型，且与对照组相比降幅均小于野生型，说明盐胁迫对 *OsST2* 基因敲除突变体的根系影响更小。

周振玲等^[24]对比了不同耐盐性水稻品种在盐胁迫后 SPAD 值的变化，结果发现，盐胁迫条件下盐敏感水稻品种的 SPAD 值降幅显著高于耐盐品



A: 叶片 DAB 染色结果; B: 叶片 NBT 染色结果。

A, DAB staining results of leaves; B, NBT staining results of leaves.

图 9 盐胁迫下水稻幼苗叶片的 DAB 和 NBT 染色结果 ($n=3$)

Fig. 9. DAB and NBT staining results of leaves of rice seedlings under salt stress ($n=3$)

种, 在本研究中, 盐处理后, 敲除突变体叶片中的 SPAD 值显著高于野生型。同时, 叶片离体实验中敲除突变体叶片黄化程度明显轻于野生型, 该结果进一步证明了 *OsST2* 基因敲除可以减少盐胁迫对水稻叶片 SPAD 值的影响。

综上所述, 盐胁迫下, *OsST2* 基因敲除突变体在苗高、死叶率、根系、叶片 SPAD 等形态指标相较于野生型都发生显著的变化, 且均显著优于野生型, 表明 *OsST2* 基因在水稻耐盐调控中发挥重要作用, 且负向调控水稻耐盐性。

3.2 *OsST2* 基因敲除改变了耐盐相关基因在盐胁迫下的表达量

Ren 等^[25]研究结果表明, 钠离子转运蛋白 *SKC1* 使盐胁迫下茎中 K^+ 含量较高, Na^+ 含量较低, 且该基因编码一个 HKT 型转运体, 因此 *SKC1* 可通过维稳 K^+/Na^+ 比值从而调控植株耐盐性。*OsMYB84* 是一种 MYB 型转录因子, 吕波等^[26]克隆了基因 *OsMYB84* 研究其表达特性, 结果发现, 在盐胁迫下, *OsMYB84* 依赖 ABA 信号通路参与水稻盐胁迫应答反应, 显著提高了转基因水稻的耐盐特性。*OsNAC3* 是 ABA 信号响应和耐盐性的重要调控因子。Zhang 等^[27]构建了 *OsNAC3* 敲除突变体和过表达突变体, 结果发现敲除突变体中 Na^+ 在地上部积累, 导致其对盐胁迫更敏感, 而过表达表现相反, 因此证实 *OsNAC3* 正向调节水稻的耐盐性。*OsMSR9* 是 F-box 蛋白, Xu 等^[28]发现其在盐胁迫下快速表达, 且过表达该基因减轻了 ROS 变化带来的损害, 使植株对盐胁迫的耐受性增强, 因此证实 *OsMSR9* 是水稻耐盐性的正调节因子。在本研究

中, 上述已知的正向调控耐盐基因编码钠离子转运蛋白的基因 *SKC1*(*Os01g0307500*)、MYB 型转录因子 *OsMYB84*(*Os03g0771100*)、*OsNAC3*(*Os07g0225300*)、*OsMSR9*(*Os07g0561300*)经盐胁迫诱导后, 在 *OsST2* 敲除突变体中的相对表达量都显著高于野生型, 且呈上调趋势, 由此推测 *OsST2* 可能通过调控以上基因的表达负向调控水稻耐盐性。需要注意的是盐处理后 *OsNAC3* 基因的表达在 *OsST2* 突变体中先下调后上调, 表明其可能在盐胁迫后期起关键作用。

当水稻处于胁迫条件下, ROS 清除相关的超氧化物歧化酶基因 *OssodCcl*、*OssodCc2* 和过氧化物酶基因 *OsPOX1*, 其表达量会上调, 清除过多的 ROS^[29]。NADPH 氧化酶 *OsrbohA* 被证实通过影响 H_2O_2 的积累来调节 K^+ 的稳态, 从而正向调节水稻植株对盐胁迫的耐受性^[30]。在本研究中, 上述已知的与 ROS 相关基因在突变体中的表达趋势显著优于野生型, 进一步证实 *OsST2* 基因可能通过调节盐胁迫下的活性氧稳态调控水稻耐盐性。

3.3 *OsST2* 基因调控耐盐性的生理机制

盐胁迫下, 水稻体内活性氧大量积累, 易发生氧化损伤, 丙二醛水平同样反映了水稻膜的损伤程度, 黄洁等^[31]通过实验证实, 高盐浓度下, 耐盐品种津原 85 和金穗 26 的 MDA 含量明显低于盐敏感品种隆粳 27 和辽粳 763。Yuan 等^[32]研究发现 *MYB3R* 过表达植株表现出强耐盐性, 相比于野生型, 其在盐胁迫下的过氧化氢积累量更低。本研究结果表明, 盐处理后, *OsST2* 基因敲除突变体的 MDA 含量、 H_2O_2 含量、超氧阴离子含量均极显著或显著低于野生型, 说明 *OsST2* 基因敲除减

轻了水稻因盐胁迫产生的氧化损伤,提高了水稻耐盐性。李宛鸿等^[33]对野生型和耐盐转基因水稻叶片进行 DAB 染色和 NBT 染色,结果发现转基因材料染色斑点更浅,本研究中敲除突变体植株的叶片颜色明显比野生型浅,进一步证明 *OsST2* 基因敲除可以使水稻清除活性氧能力增强。以上结果均说明 *OsST2* 基因敲除减轻了水稻因盐胁迫产生的氧化损伤,提高了水稻耐盐性。

抗氧化酶系统可以通过调节细胞 ROS 水平和氧化还原状态来起到保护作用,减轻水稻因盐胁迫产生的氧化损伤^[34],因此 *OsST2* 基因敲除突变体抗氧化系统等指标在盐胁迫下的变化值得深入研究。才晓溪等^[35]验证耐盐碱 ERF 转录因子 *GsERF6* 过表达水稻植株在盐胁迫下 POD、SOD 等抗氧化酶活性显著高于对照组。在本研究中,盐处理后, *OsST2* 基因敲除突变体的 SOD、POD 活性均极显著或显著高于野生型,这与前人研究结果是一致的,也说明 *OsST2* 基因敲除突变体通过提高水稻叶片中抗氧化酶活性来提高水稻耐盐性。抗坏血酸-谷胱甘肽(ASA-GSH)循环对于盐胁迫下水稻幼苗保持较高的抗氧化酶活性发挥着重要作用^[36],本研究中,盐处理后, *OsST2* 基因敲除突变体叶片中谷胱甘肽含量显著高于野生型,说明 *OsST2* 基因可能参与调控 ASA-GSH 循环进而调控水稻耐盐性。

4 结论

本研究结果表明 *OsST2* 基因负向调控水稻耐盐性,且敲除 *OsST2* 基因提高了盐胁迫下水稻叶片中 SOD 和 POD 等抗氧化酶的活性,增强了水稻清除活性氧的能力,进而提高水稻耐盐性。*OsST2* 基因可能通过参与水稻氧化胁迫反应在调控水稻耐盐性中发挥重要作用。

参考文献:

- [1] Muthayya S, Sugimoto J D, Montgomery S, Maberly G F. An overview of global rice production, supply, trade, and consumption [M]. Technical Considerations for Rice Fortification in Public Health, 2014: 7-14.
- [2] Mohidem N A, Hashim N, Shamsudin R, Che Man H. Rice for food security: Revisiting its production, diversity, rice milling process and nutrient content[J]. *Agriculture*, 2022, 12(6): 741.
- [3] Hassani A, Azapagic A, Shokri N. Global predictions of primary soil salinization under changing climate in the 21st Century[J]. *Nature Communications*, 2021, 12(1): 6663.
- [4] Singh A. Soil salinization management for sustainable development: A review[J]. *Journal of Environmental Management*, 2021, 277: 111383.
- [5] Amin I, Rasool S, Mir M A, Wani W, Masoodi K Z, Ahmad P. Ion homeostasis for salinity tolerance in plants: A molecular approach [J]. *Physiologia Plantarum*, 2021, 171(4): 578-594.
- [6] 王洋, 张瑞, 刘永昊, 李荣凯, 葛建飞, 邓仕文, 张徐彬, 陈英龙, 韦还和, 戴其根. 水稻对盐胁迫的响应及耐盐机理研究进展[J]. *中国水稻科学*, 2022, 36(2): 105-117.
- [7] Wang Y, Zhang R, Liu Y H, Li R K, Ge J F, Deng S W, Zhang X B, Chen Y L, Wei H H, Dai Q G. Rice response to salt stress and research progress in salt tolerance mechanism[J]. *Chinese Journal of Rice Science*, 2022, 36(2): 105-117. (in Chinese with English abstract)
- [8] 王亚新, 冯乃杰, 赵黎明, 郑殿峰, 沈雪峰, 刘美玲, 杜有为. 植物生长调节剂与氮肥对盐胁迫下水稻幼苗生理特性的影响[J]. *核农学报*, 2024, 38(3): 561-573.
- [9] Wang Y X, Feng N J, Zhao L M, Zheng D F, Shen X F, Liu M L, Du Y W. Effects of plant growth regulators and nitrogen fertilizer on the physiological characteristics of rice seedlings under salt stress[J]. *Journal of Nuclear Agricultural Sciences*, 2024, 38(3): 561-573. (in Chinese)
- [10] 徐晨, 凌风楼, 徐克章, 武志海, 刘晓龙, 安久海, 赵兰坡. 盐胁迫对不同水稻品种光合特性和生理生化特性的影响[J]. *中国水稻科学*, 2013, 27(3): 280-286.
- [11] Xu C, Ling F L, Xu K Z, Wu Z H, Liu X L, An J H, Zhao L P. Effect of salt stress on photosynthetic characteristics and physiological and biochemical traits of different rice varieties[J]. *Chinese Journal of Rice Science*, 2013, 27(3): 280-286. (in Chinese)
- [12] Billah M, Aktar S, Brestic M, Zivcak M, Khaldun A B M, Uddin M S, Bagum S A, Yang X, Skalicky M, Mehari T G, Maitra S, Hossain A. Progressive genomic approaches to explore drought- and salt-induced oxidative stress responses in plants under changing climate[J]. *Plants*, 2021, 10(9): 1910.
- [13] Tian Y, Zeng H, Wu J C, Dai G X, Zheng H P, Liu C, Wang Y, Zhou Z K, Tang D Y, Deng G F, Tang W B, Liu X M, Lin J Z. The zinc finger protein DHHC9 S-acylates the kinase STRK1 to regulate H₂O₂ homeostasis and promote salt tolerance in rice[J]. *The Plant Cell*, 2024, 36(4): 919-940.
- [14] Liu C, Mao B, Yuan D, Chu C, Duan M. Salt tolerance in rice: Physiological responses and molecular mechanisms[J]. *The Crop Journal*, 2022, 10(1): 13-25.
- [15] Yang Y, Guo Y. Elucidating the molecular mechanisms mediating plant salt-stress responses[J]. *New Phytologist*, 2018, 217(2): 523-539.
- [16] Alam M S, Kong J, Tao R, Ahmed T, Alamin M, Alotaibi S S, Abdelsalam N R, Xu J H. CRISPR/Cas9 mediated knockout of the OsBHLH024 transcription factor improves salt stress resistance in rice (*Oryza sativa* L.)[J]. *Plants*, 2022, 11(9): 1184.
- [17] Ma A, Nan N, Shi Y, Wang J, Guo P, Liu W, Zhou G, Yu J, Zhou D, Yun D J, Li Y, Xu Z Y. Autophagy receptor OsNBR1 modulates salt stress tolerance in rice[J]. *Plant Cell Reports*, 2023, 43(1): 17.
- [18] Xiong H, Li J, Liu P, Duan J, Zhao Y, Guo X, Li Y, Zhang H, Ali J, Li Z. Overexpression of OsMYB48-1, a novel MYB-related transcription factor, enhances drought and salinity tolerance in rice[J]. *PLoS One*, 2014, 9(3): e92913.
- [19] 王晓亮. 利用全基因组关联分析挖掘和鉴定水稻苗期耐盐候选基因 [D]. 沈阳: 沈阳农业大学, 2022.
- [20] Wang X L. Mining and identification of salt tolerance candidate genes in rice seedling stage by

- genome-wide association analysis [D]. Shenyang: Shenyang Agricultural University, 2022. (in Chinese)
- [17] Wang X, Li J, Sun J, Gu S, Wang J, Su C, Li Y, Ma D, Zhao M, Chen W. Mining beneficial genes for salt tolerance from a core collection of rice landraces at the seedling stage through genome-wide association mapping[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2022, 13: 847863.
- [18] 李荣华, 夏岩石, 刘顺枝, 孙莉丽, 郭培国, 缪绅裕, 陈健辉. 改进的 CTAB 提取植物 DNA 方法[J]. 实验室研究与探索, 2009, 28(9): 14-16.
- Li R H, Xia Y S, Liu S Z, Sun L L, Guo P G, Miao S Y, Chen J H. CTAB-improved method of DNA extraction in plant[J]. *Research and Exploration in Laboratory*, 2009, 28(9): 14-16. (in Chinese)
- [19] 施海涛. 植物逆境生理学实验指导[M]. 北京: 科学出版社, 2016.
- Shi H T. Experimental Guidance of Plant Stress Physiology[M]. Beijing: Science Press, 2016. (in Chinese)
- [20] Dai L, Li P, Li Q, Leng Y, Zeng D, Qian Q. Integrated multi-omics perspective to strengthen the understanding of salt tolerance in rice[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2022, 23(9): 5236.
- [21] 张治振, 李稳, 周起先, 孙伟, 郑崇珂, 谢先芝. 不同水稻品种幼苗期耐盐性评价[J]. 作物杂志, 2020(3): 92-101.
- Zhang Z Z, Li W, Zhou Q X, Sun W, Zheng C K, Xie X Z. Salt tolerance evaluation of different rice varieties at seedling stage[J]. *Crops*, 2020(3): 92-101. (in Chinese with English abstract)
- [22] 孙健, 王敬国, 刘化龙, 谢冬微, 郑洪亮, 赵宏伟, 邹德堂, 栾非时. 盐胁迫下水稻苗高和分蘖数的发育动态 QTL 分析[J]. 核农学报, 2015, 29(2): 235-237, 239-243.
- Sun J, Wang J G, Liu H L, Xie D W, Zheng H L, Zhao H W, Zou D T, Luan F S. Dynamic QTL analysis of rice seedling height and tiller number under salt stress[J]. *Journal of Nuclear Agricultural Sciences*, 2015, 29(2): 235-237, 239-243. (in Chinese with English abstract)
- [23] 谷娇娇, 胡博文, 贾琰, 沙汉景, 李经纬, 马超, 赵宏伟. 盐胁迫对水稻根系相关性状及产量的影响[J]. 作物杂志, 2019(4): 176-182.
- Gu J J, Hu B W, Jia Y, Sha H J, Li J W, Ma C, Zhao H W. Effects of salt stress on root related traits and yield of rice[J]. *Crops*, 2019(4): 176-182. (in Chinese with English abstract)
- [24] 周振玲, 林兵, 周群, 杨波, 刘艳, 周天阳, 王宝祥, 顾骏飞, 徐大勇, 杨建昌. 耐盐性不同水稻品种对盐胁迫的响应及其生理机制[J]. 中国水稻科学, 2023, 37(2): 153-165.
- Zhou Z L, Lin B, Zhou Q, Yang B, Liu Y, Zhou T Y, Wang B X, Gu J F, Xu D Y, Yang J C. Responses of rice varieties differing in salt tolerance to salt stress and their physiological mechanisms[J]. *Chinese Journal of Rice Science*, 2023, 37(2): 153-165. (in Chinese with English abstract)
- [25] Ren Z H, Gao J P, Li L G, Cai X L, Huang W, Chao D Y, Zhu M Z, Wang Z Y, Luan S, Lin H X. A rice quantitative trait locus for salt tolerance encodes a sodium transporter[J]. *Nature Genetics*, 2005, 37(10): 1141-1146.
- [26] 吕波, 张文政, 李春雨, 明凤. MYB 家族转录因子 OsMYB84 通过 ABA 信号通路参与盐胁迫响应[J]. 复旦学报: 自然科学版, 2015, 54(5): 591-600.
- Lü B, Zhang W Z, Li C Y, Ming F. The MYB family transcription factor OsMYB84 confers salt stress response through the ABA pathway[J]. *Journal of Fudan University: Natural Science*, 2015, 54(5): 591-600. (in Chinese with English abstract)
- [27] Zhang X, Long Y, Chen X, Zhang B, Xin Y, Li L, Cao S, Liu F, Wang Z, Huang H, Zhou D, Xia J. A NAC transcription factor OsNAC3 positively regulates ABA response and salt tolerance in rice[J]. *BMC Plant Biology*, 2021, 21(1): 546.
- [28] Xu G, Cui Y, Wang M, Li M, Yin X, Xia X. OsMSR9, a novel putative rice F-box containing protein, confers enhanced salt tolerance in transgenic rice and *Arabidopsis*[J]. *Molecular Breeding*, 2014, 34(3): 1055-1064.
- [29] Rossatto T, do Amaral M N, Benitez L C, Vighi I L, Braga E J B, de Magalhães Júnior A M, Maia M A C, da Silva Pinto L. Gene expression and activity of antioxidant enzymes in rice plants, cv. BRS AG under saline stress[J]. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 2017, 23(4): 865-875.
- [30] Wang Q, Ni L, Cui Z, Jiang J, Chen C, Jiang M. The NADPH oxidase OsRbohA increases salt tolerance by modulating K⁺ homeostasis in rice[J]. *The Crop Journal*, 2022, 10(6): 1611-1622.
- [31] 黄洁, 黄晶, 梁青铎, 金千瑜, 朱练峰, 曹小闯, 朱春权, 孔亚丽, 张均华. 盐胁迫对粳稻品种生长和生理特性的影响[J]. 中国稻米, 2021, 27(3): 37-40.
- Huang J, Huang J, Liang Q D, Jin Q Y, Zhu L F, Cao X C, Zhu C Q, Kong Y L, Zhang J H. Effects of salt stress on elements absorption and stress resistance of japonica rice varieties[J]. *China Rice*, 2021, 27(3): 37-40. (in Chinese)
- [32] Yuan H, Cheng M, Wang R, Wang Z, Fan F, Wang W, Si F, Gao F, Li S. miR396b/GRF6 module contributes to salt tolerance in rice[J]. *Plant Biotechnology Journal*, 2024, 22(8): 2079-2092.
- [33] 李宛鸿, 胡冰霜, 孙晓丽, 才晓溪, 孙明哲. 过表达野生大豆耐盐碱基因 *GsGSTU13* 提高了水稻苗期耐盐碱性[J]. 作物学报, 2024, 50(10): 2458-2467.
- Li W H, Hu B S, Sun X L, Cai X X, Sun M Z. Overexpression of wild soybean salt-alkali tolerance gene *GsGSTU13* increases salt-alkaline tolerance in rice seedlings[J]. *Acta Agronomica Sinica*, 2024, 50(10): 2458-2467. (in Chinese with English abstract)
- [34] Lee M H, Cho E J, Wi S G, Bae H, Kim J E, Cho J Y, Lee S, Kim J H, Chung B Y. Divergences in morphological changes and antioxidant responses in salt-tolerant and salt-sensitive rice seedlings after salt stress[J]. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2013, 70: 325-335.
- [35] 才晓溪, 胡冰霜, 沈阳, 王研, 陈悦, 孙明哲, 贾博为, 孙晓丽. *GsERF6* 基因过表达对水稻耐盐碱性的影响[J]. 作物学报, 2023, 49(2): 561-569.
- Cai X X, Hu B S, Shen Y, Wang Y, Chen Y, Sun M Z, Jia B W, Sun X L. Effects of *GsERF6* overexpression on salt-alkaline tolerance in rice[J]. *Acta Agronomica Sinica*, 2023, 49(2): 561-569. (in Chinese)
- [36] Zhang J, Xu T, Liu Y, Chen T, Zhang Q, Li W, Zhou H, Zhang Y, Zhang Z. Molecular insights into salinity responsiveness in contrasting genotypes of rice at the seedling stage[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2022, 23(3): 1624.