植物生理学报 *Plant Physiology Journal* 2026, 62 (7): 758–768
doi: 10.13592/j.cnki.ppj.100962

*OsSCYL2*基因的突变增强水稻耐旱性

胡启琰[1,2], 程灿[2], 张建明[2], 周继华[2], 牛付安[2], 孙滨[2], 张安鹏[2], 代雨婷[2], 谢开珍[2,3], 邱越[2,4], 丁晓瑞[2,4], 李红玉[1,2], 冯智尊[2], 曹黎明[2], 赵志鹏[5,*], 储黄伟[2,*]

[1]上海海洋大学水产与生命学院, 上海201306
[2]上海市农业科学院农业农村部粮油作物种质创新与遗传改良重点实验室(部省共建), 上海201403
[3]江西农业大学农学院, 南昌330045
[4]上海师范大学生命科学学院, 上海201418
[5]上海市农业科技服务中心, 上海200335
[*]共同通信作者: 储黄伟(chuhuangwei@saas.sh.cn)、赵志鹏(13916276261@163.com)

摘要: *OsSCYL2*基因是水稻中*SCY1-LIKE*基因家族的一个成员, 其编码的蛋白定位于网格蛋白包被的囊泡上, 与网格蛋白重链CHC1 (Clathrin Heavy Chain 1)存在互作。本研究以*OsSCYL2*基因突变体*scyl2-1*和*scyl2-2*为材料, 分析其对干旱胁迫的耐受性。结果表明与野生型‘秀水134’相比, *scyl2*突变体叶片表面气孔的关闭程度较高, 离体叶片的失水率相对较低, 并且在干旱胁迫条件下, 突变体叶片具有较高的含水量, *scyl2*突变体的耐旱性显著高于野生型。*scyl2*突变体对ABA处理的响应与野生型相比没有明显的差异, 并且突变体中内源ABA的含量与野生型相比显著减少, 说明突变体耐旱性增强不依赖ABA信号。*scyl2*突变体叶片中H_2O_2的含量增加, 尤其是气孔保卫细胞中H_2O_2的含量较高。突变体中活性氧清除系统并没有出现异常缺陷, 相反多个编码NADPH氧化酶的*Osrboh*基因表达量上升, 说明*OsSCYL2*基因介导的信号途径通过负调控*Osrboh*基因的表达来调控水稻的干旱胁迫响应。这些研究结果为水稻应对干旱胁迫的分子调控机制提供了新的信息。

关键词: 水稻; 耐旱; *OsSCYL2*; 非生物胁迫; 干旱胁迫

Mutation of the *OsSCYL2* gene enhances drought tolerance in rice

HU Qiyan[1,2], CHENG Can[2], ZHANG Jianming[2], ZHOU Jihua[2], NIU Fu'an [2], SUN Bin[2], ZHANG Anpeng[2], DAI Yuting[2], XIE Kaizhen[2,3], QIU Yue[2,4], DING Xiaorui[2,4], LI Hongyu[1,2], FENG Zhizun[2], CAO Liming[2], ZHAO Zhipeng[5,*], CHU Huangwei[2,*]

[1]College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China
[2]Key Laboratory of Germplasm Innovation and Genetic Improvement of Grain and Oil Crops (Co-Construction by Ministry and Province), Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Shanghai Academy of Agricultural Sciences, Shanghai 201403, China
[3]College of Agronomy, Jiangxi Agricultural University, Nanchang 330045, China
[4]College of Life Sciences, Shanghai Normal University, Shanghai 201418, China
[5]Shanghai Agricultural Science and Technology Service Center, Shanghai 200335, China.
[*]Co-corresponding authors: Chu HW (chuhuangwei@saas.sh.cn), Zhao ZP (13916276261@163.com)

收稿 2024-03-22 **修定** 2024-10-11
资助 上海市科技创新行动计划项目(23N61900100)和上海市水稻产业技术体系建设项目[沪农科产字(2024)第3号]。

Abstract: *OsSCYL2* gene, a member of the *SCY1-LIKE* gene family in rice, encodes a protein that interacts with clathrin heavy chain 1 (CHC1) and localizes to the clathrin-coated vesicles. In this study, the drought tolerance of *OsSCYL2* mutants, *scyl2-1* and *scyl2-2*, was analyzed. The results showed that compared with the wild-type 'Xiushui 134', the mutant plants had a higher degree of stomatal closure on leaf surfaces, lower water loss rate in detached leaves, and higher water content under drought stress conditions. The drought tolerance of the *scyl2* mutants was significantly enhanced as compared with the wild-type. The response to ABA treatment in the *scyl2* mutants was not significantly different from the wild-type, and the endogenous ABA content in the mutants was significantly decreased compared with the wild-type, indicating that the enhanced drought tolerance in the mutants is not dependent on ABA signaling. The H_2O_2 content in the leaves of *scyl2* increased, especially in the guard cells of stomata. The expression levels of multiple *Osrboh* genes encoding NADPH oxidases increased, indicating that the *OsSCYL2* gene-mediated signaling pathway regulates rice drought stress response by negatively regulating the expression of *Osrboh* genes. These findings provide new insights into the molecular regulatory mechanisms of rice in response to drought stress.

Key words: rice; drought tolerance; *OsSCYL2*; abiotic stress; drought stress

干旱是植物生长过程面临的最主要的非生物胁迫之一, 也是影响粮食生产的主要因素之一(Gupta等2020)。在进化的过程中, 植物体内形成了一套复杂的机制来应对干旱胁迫, 以最大限度地减少其有害影响(Tardieu等2018), 在过去的几十年中, 对于干旱胁迫如何对植物造成不利影响以及植物如何通过调整自身生理状态来应对干旱胁迫的机制方面取得了一些重要进展(Zu等2021)。

植物在遭受干旱胁迫时最主要的快速响应机制之一是通过气孔的关闭, 以减少通过蒸腾作用损失的水分(Schroeder等2001)。在缺水的环境下, 植物的根最先受到胁迫, 导致脱落酸(abscisic acid, ABA)合成的增加(Zhang和Davies 1987)。根部合成的ABA通过木质部运输到叶片后, 促进叶片中活性氧(reactive oxygen species, ROS)的合成增加, 最后通过一系列的信号传导过程促使气孔的关闭(Sierla等2016)。因此, ROS被认为是干旱胁迫响应的次级信号因子(Cruz de Carvalho 2008)。ROS是指未完全还原, 并且化学性质活泼, 含氧的一类物质, 包括单线态氧($^1O_2$)、超氧阴离子($O_2^{\cdot-}$)、过氧化氢(H_2O_2)和羟基自由基(·OH)等(Camejo等2016)。其中H_2O_2是相对比较稳定的一类ROS物质, 具有相对较长的半衰期。因此在植物的干旱胁迫响应过程中, H_2O_2是细胞和细胞之间, 或细胞内不同细胞器之间信号传递的主要次级信号分子 (Wrzaczek等2013; Baxter等2014)。在遭受胁迫时, 细胞内的ROS主要在叶绿体、过氧化物酶体和线粒体等细胞器中合成, 而细胞外的ROS主要由定位在细胞膜上的NADPH氧化酶、细胞壁上的过氧化物酶和胺氧化酶合成(Zhang等2010; Kadota等2015)。

植物会根据胞内ROS稳态水平来监测其所受的胁迫水平, 从而对胁迫做出适当的响应(Mittler 2002)。然而, 当ROS水平过高, 超出ROS清除系统的承受极限时, 会导致体内蛋白质和脂类的氧化, 从而抑制植物正常的生长, 甚至引起细胞的死亡(Miller等2010)。因此植物进化出了一套ROS清除系统, 以减少或防止活性氧对细胞的氧化损伤。植物体内主要的ROS清除酶类包括超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)、谷胱甘肽还原酶和过氧化物酶(POD) (You等 2014)。

SCYL2 (*SCY1-LIKE2*)基因是*SCY1-LIKE*基因家族的一个成员, 其编码的蛋白定位于网格蛋白包被的囊泡上(Conner和Schmid 2005)。*SCYL2*在拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)中有两个拷贝, 分别命名为*AtSCYL2A*和*AtSCYL2B*, 参与调节拟南芥的生长发育(Jung等2017)。我们在前期的研究中发现水稻(*Oryza sativa*)中*OsSCYL2*只有一个拷贝, *OsSCYL2*基因的突变导致叶片中H_2O_2含量增加, 水

稻叶片出现类病斑的表型, 并且对白叶枯病菌的抗性显著增强。OsSCYL2与网格蛋白重链CHC1 (Clathrin Heavy Chain 1)存在互作(Yao等2022)。水稻*scyl2*突变体与之前报道的*spl28*突变体具有相似的类病斑和白叶枯病抗性增强的表型(Qiao等2010)。SPL28蛋白与OsSCYL2一样, 也和网格蛋白重链CHC1存在相互作用(Qiao等2010; Yao等2022), 这些研究结果表明水稻中OsSCYL2- CHC1-SPL28介导的囊泡运输途径参与水稻生物胁迫条件下的信号传导过程。

本研究中对*scyl2*突变体进行干旱胁迫处理, 结果发现*scyl2*突变体的耐旱性比野生型显著增强, 表明OsSCYL2介导的囊泡运输途径除了参与水稻生物胁迫条件下的信号传导过程外, 还有可能参与干旱胁迫响应过程, 本研究还对OsSCYL2在干旱胁迫响应中的作用机理进行了研究。

1 材料与方法

1.1 实验材料

本研究野生型水稻(*Oryza sativa* L.)为常规粳稻品种‘秀水134’。突变体*scyl2-1*是一个通过甲磺酸乙酯(ethyl methanesulfonate)诱变获得的单基因突变体, 并用‘秀水134’回交了两代。*scyl2-1*突变体中*OsSCYL2*基因的第4外显子发生了12个碱基的缺失(Yao等2022)。突变体*scyl2-2*是一个通过CRISPR-Cas9基因编辑获得的突变体, 在*OsSCYL2*基因第1外显子插入一个单碱基A (Yao等2022)。新收获的水稻种子在42℃的恒温烘箱中放置5 d破休眠, 然后放入密封袋中, 在4℃的冰箱中冷藏备用。

1.2 干旱胁迫处理

将种子在28℃的蒸馏水中浸泡2 d, 然后用自来水清洗。保持湿润, 在28℃培养箱中催芽1 d。将发芽最均匀的种子播种在水培盒96孔板中, 每个小孔放1粒种子, 水培盒中加满Yoshida水稻水培液(Yoshida 1976), 然后移至26℃、60%相对湿度的人工气候室中生长。人工气候室光周期为14 h光照, 10 h黑暗。每4 d更换一次水培液。将20日龄的幼苗移植到装有土壤的盒中, 停止浇水, 进行土壤干旱胁迫处理。或者转移到含18% PEG4000的Yoshida水稻营养液中, 进行模拟干旱胁迫处理。

1.3 失水率测定

用水培条件下生长20 d的幼苗, 剪取5片第4完全叶为一个样品, 立即称重作为初始重量, 并在室温(25℃)下放置在工作台上。每隔0.5 h (0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0、3.5、4.0和4.5 h)记录样品重量。每个材料取3个重复。失水率计算公式如下:

$$\mathrm{WL}=\frac{WT_0-WT_n}{WT_0}\times 100\% \quad (1)$$

其中, WL表示失水率; WT_0表示样品初始重量; WT_n表示干燥n h后样品重量。

1.4 相对含水量的测定

将水培条件下生长20 d的幼苗, 转移到18% PEG4000的Yoshida水稻营养液中, 在处理0、12、24、48、72 h后, 剪取5片第4完全叶为一个样品。叶片剪下后立即称重, 得到叶片的鲜重(Wf); 然后将叶片浸泡在双蒸水中室温过夜, 进行复水, 将浸泡后的叶片取出用吸水纸吸干表面水分称重获得膨胀叶重(Wt); 然后在65℃烘箱中干燥过夜, 将干燥后的样品称重获得干重(Wd)。每个样品3次重复。相对含水量RWC的计算公式如下:

$$\mathrm{RWC}=\frac{Wf-Wd}{Wt-Wd}\times 100\% \quad (2)$$

1.5 气孔成像

取生长20 d的幼苗的第4片叶, 剪成1 cm左右的小段, 快速放入FAA固定液(无水乙醇: 50%; 冰醋酸: 5%; 38%甲醛: 10%; 双蒸水: 35%), 真空渗透。放入4℃冰箱固定样品12 h以上。然后通过乙醇梯度(70%、80%、95%和100%)脱水, 每个浓度脱水30 min, 然后用临界点干燥器进行干燥。将干燥好的样品用导电胶固定于铜台上, 进行喷金, 并将样品调整至适于观察的位置, 通过扫描电子显微镜(TM4000Plus, 日立高新技术株式会社)观察并拍摄气孔状态。每个样品拍摄10个随机区域(480 μm×640 μm)。

1.6 ABA含量测定

采用植物脱落酸(ABA) ELISA试剂盒(MM-1185O1, 江苏酶免实业有限公司)进行水稻叶片ABA含量的测定, 每个样品3次重复。按照产品说明书, 采用双抗体夹心法进行测定。

1.7 ABA敏感性分析

去壳的水稻种子用75%乙醇洗涤1 min后, 接着用15%的安替福民消毒15 min, 然后用灭菌水洗涤8次, 最后用灭菌纱布吸干水分。将种子整齐摆放在1/2MS (Murashige & Skoog)培养基平板上生长。1/2MS培养基中含1%蔗糖、0.35%植物凝胶和0.05%吗啉乙磺酸。ABA处理时, 将在1/2MS培养基平板上萌发3 d的种子转移到含3 μmol·L^{-1} ABA的1/2MS培养基平板上继续生长。摆放种子后的培养皿竖立放置在26℃、60%相对湿度的人工气候室中。人工气候室光周期为14 h光照, 10 h黑暗。

1.8 qRT-PCR分析

使用通用型植物RNA提取试剂盒(RC411-01, 南京诺唯赞生物科技有限公司)从14 d水稻幼苗的叶片中提取总RNA。使用cDNA合成试剂盒(FSQ-301, 东洋纺上海生物科技有限公司)合成第一链cDNA。用ChamQ Universal SYBR qPCR Master Mix荧光定量专用预混液(Q711-02, 南京诺唯赞生物科技有限公司)进行扩增。在实时定量聚合酶链式反应系统上进行qRT-PCR。水稻*OsACTIN*用作计算相对表达的内参基因。使用$2^{-\Delta\Delta Ct}$方法计算相对表达水平。每个样品3次重复。使用的引物列于表1。

1.9 过氧化氢(H_2O_2)含量分析

野生型和*scyl2-1*突变体14 d的幼苗, 取0.1 g左右的叶片, 加入丙酮, 用匀浆器充分匀浆, 然后用过氧化氢(H_2O_2)含量检测试剂盒(BC3595, 北京索莱宝科技有限公司)进行水稻叶片H_2O_2含量的测定, 测定过程按照产品说明书, 采用微量法进行测定。每个样品重复3次。

1.10 H2DCFDA染色

取21 d水稻幼苗叶片浸泡在0.01%的Tween-20中, 抽真空5 min。用蒸馏水冲洗两次后, 将叶片放入2%的纤维素酶RS (Yakult Honsha)中, 40℃孵育5 h。剥离叶片表皮。用上样缓冲液(10 mmol·L^{-1} Tris-HCl, 50 mmol·L^{-1} KCl, pH 7.2)洗涤后, 将表皮条在染色缓冲液(含有50 μmol·L^{-1} H_2DCFDA的上样缓冲液)中室温条件下避光孵育20 min。用蒸馏水洗涤表皮条以去除多余的染料。使用共聚焦激光扫描显微镜(Carl Zeiss, LAM510)检测荧光, 激发光为488 nm, 发射光为525 nm。所有共聚焦图像均在相同条件下拍摄。对于野生型和突变体植株, 每个实验中随机选择10个气孔进行分析。

1.11 数据分析

所有数据表示为3个独立重复实验的均数±标

表1 qRT-PCR分析使用的引物序列

Table 1 Primer sequences used in qRT-PCR analysis

基因	正向引物序列(5′→3′)	反向引物序列(5′→3′)
OsACTIN	CCAAGGCCAATCGTGAGAAGA	AATCAGTGAGATCACGCCCAG
OsCATA	TCAACTACCTCTCCCAGTGTGATG	GCTTCACGTTGAGCCTATTCGC
OsCATB	TCCTACTGGTCGCAGTGTGATG	TTTCAGGTTGAGACGTGAAGCC
OsCATC	AGGTGGTGATTGCCAAGGAGAAC	TTGATGAACCGGTCTTGCCTTGC
OsSOD	TGGCTGGGTTTGGCTTGTCTTG	CAAGTGCAAGTGGACTGATGGC
OsAPX8	ATCATCGCCAGCGGATGACAAC	TCGAGTCCGACAGCTCCTTCTTTC
OsPOD	AACCCATCCTACGCCAGATTCC	ACCACCGTCGAGTTGTCGTTTG
OsrbohA	AGCAGTGTCTCCCTTTGAATGGC	TCGTGTCCAATCACCAAGTTGTCG
OsrbohB	TCGGTTGTTTAGGAGCCATGATGC	TTCCCGGGATACACTGCAACCTTC
OsrbohC	CAGCTGTTTCACCCTTTGAATGGC	TCTTGTCCAGTCACCAAGTTGCC
OsrbohD	GCTTCGCCAAATGCATCGGTATG	TCGCCAATGCCACAAACACCTC
OsrbohE	TTGGTGCTACTCCTTTCATCAGC	ACCATGTATGCTTTCCACCTCTTC
OsrbohF	GGGCCTTCAGATCCAAGGCTTATG	TACCCGGTAGAAGACACACCTTC
OsrbohG	AGCTAGCTGAAGAGCTGATGGAC	CACACTGAAGCTGTTGGCACTG
OsrbohH	CCATGGAGCACCATTCAAGGTTCC	TCCTTGACGATGCTGATGAGAGG
OsrbohI	GTCTCCAAACCTTCTTCGACATGG	TCCTCTTCTGTGATCCTGCCATC

准差, 所得数据用*t*检验进行差异性显著分析, *表示差异显著(P<0.05), **表示差异极显著(P<0.01)。

2 实验结果

2.1 *scyl2*突变体的耐旱性增强

本研究中对2个等位的突变体*scyl2-1*和*scyl2-2*进行了干旱胁迫处理, 结果发现突变体*scyl2-1*和*scyl2-2*的抗旱能力强于野生型WT。干旱胁迫25 d后复水，并于复水10 d后统计存活率, *scyl2-1*和*scyl2-2*的存活率可接近80%, 而WT的存活率则不足40% (图1-A)。此外, 在水培条件下, 用18% PEG4000处理来模拟干旱胁迫, 结果得到了与土壤干旱胁迫一致的结果(图1-B)。

2.2 *scyl2*突变体叶片保持水分的能力增强

为了研究*OsSCYL2*基因参与抗旱性的潜在机制, 对*scyl2-1*突变体进行了生理分析。测定离体叶片在室温条件下的失水率, 结果发现, 在离体1 h后*scyl2-1*突变体叶片的失水率显著低于野生型WT的叶片(图2-A)。与此相一致的是, *scyl2-1*突变体叶片无论是在正常条件下, 或者是18% PEG4000模拟干旱胁迫处理条件下, 其相对含水量均高于WT叶片(图2-B)。这些结果表明, *scyl2-1*突变体叶片保持水分的能力增强可能是导致其抗旱性增强的原因。

2.3 *OsSCYL2*基因通过独立于ABA信号的途径参与气孔的调节

植物叶片表面的气孔是植物水分蒸腾作用的主要门户, 通过调节气孔的关闭程度减少水分的蒸腾作用是植物应对干旱胁迫的一个重要策略(Schroeder等2001)。水稻叶片气孔可分为完全开放、部分开放和完全关闭三种典型的状态(Yao等2018)(图3-A)。通过扫描电镜比较*scyl2-1*突变体和野生型‘秀水134’叶片表面气孔的状态, 结果发现*scyl2-1*突变体中有46.99%的气孔完全关闭, 而在野生型中, 只有29.49%的气孔处于完全关闭状态。反之, 在*scyl2-1*突变体中, 只有14.46%的气孔处于完全开放, 而在野生型中完全开放的气孔比例达到了29.49% (图3-B)。这些结果表明, *OsSCYL2*基因可能通过调控水稻气孔的运动, 协调水稻对干旱胁迫的响应。

植物激素ABA是诱导气孔关闭的关键信号(Schroeder等2001; Zhu 2002), 然而对叶片中ABA

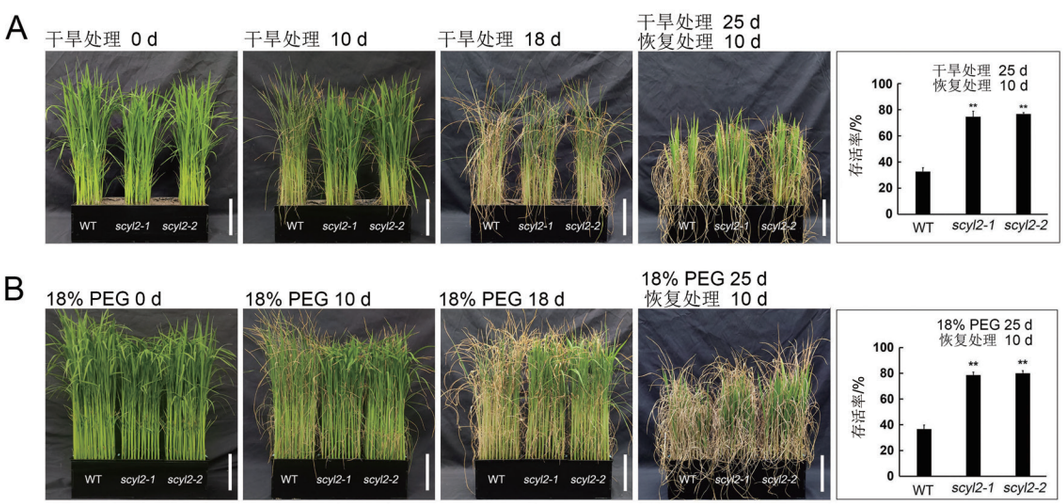


图1 干旱胁迫处理下野生型WT、突变体*scyl2-1*和*scyl2-2*的表型比较

Fig. 1 Phenotypic comparison of wild-type (WT), *scyl2-1* and *scyl2-2* mutants under drought stress treatment

A: 萌发后20 d幼苗在干旱处理前、干旱处理10和18 d以及干旱处理25 d然后复水10 d后的表型; B: 萌发后20 d幼苗在18% PEG4000处理前、18% PEG4000处理10和18 d以及18% PEG4000处理25 d然后复水10 d后的表型。标尺=10 cm。通过*t*检验确定与WT相比的显著性差异(**: P<0.01)。

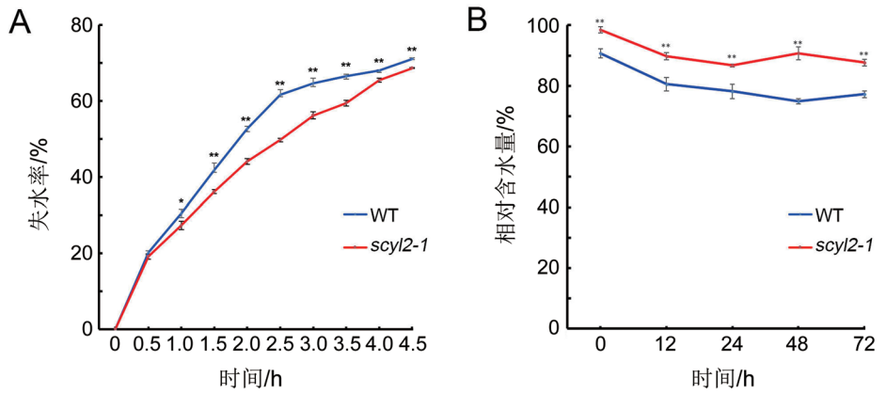


图2 野生型WT和突变体*scyl2-1*的生理分析

Fig. 2 Physiological analysis of the wild-type (WT) and mutant *scyl2-1*

A: WT和*scyl2-1*叶片的失水率; B: WT和*scyl2-1*叶片的相对含水量。通过*t*检验确定*scyl2-1*和WT之间的显著性差异(*: $P<0.05$, **: $P<0.01$)。

含量的测定发现, *scyl2-1*突变体中ABA的含量与野生型相比并未升高, 反而出现了显著的下降(图3-C)。通过ABA处理实验发现, *scyl2*突变体的生长与野生型一样受到了明显的抑制, 且抑制的程度与野生型相比并没有明显的差别(图3-D), 说明*OsSCYL2*基因的突变并没有影响ABA的信号传导途径, 因此推测*scyl2*突变体叶片表面气孔关闭程度的增加并不依赖ABA信号。

2.4 *OsSCYL2*基因负调控H_2O_2的合成

前期研究发现, *scyl2-1*突变体在分蘖期开始, 出现类病斑表型, DAB (3,3'-diaminobenzidine)染色显示, *scyl2-1*突变体叶片中出现H_2O_2的累积(Yao等2022), H_2O_2是植物的干旱胁迫响应过程中导致气孔关闭的最主要信号分子(Wrzaczek等2013; Baxter等2014), 因此推测*scyl2*突变体中气孔关闭程度的增加可能是由于H_2O_2的含量增加引起的。在前期的研究中, 我们对*scyl2-1*和野生型'秀水134'的叶片进行了转录组测序(Yao等2022), 对转录组数据中过氧化氢酶基因*OsCATA* (*Os02g0115700*)、*OsCATB* (*Os06g0727200*)和*OsCATC* (*Os03g0131200*), 超氧化物歧化酶基因*OsSOD* (*Os06g0143000*), 抗坏血酸过氧化物酶基因*OsAPX8* (*Os02g0553200*), 过氧化物酶基因*OsPOD* (*Os01g0378100*)等ROS清除系统基因的分析发现, 大多数ROS清除系统基因的表达出现了上升, 其中*OsCATA*和*OsPOD*基因的表达量在*scyl2-1*突变体中显著的升高($P<0.05$) (图4-A)。为了进一步确定这些基因在*scyl2-1*突变体中表达量的变化情况, 我们用qRT-PCR比较了这些基因在野生型和*scyl2-1*突变体中表达量的变化, 结果发现所有与ROS清除系统相关基因在*scyl2-1*突变体中均出现了显著的上升(图4-B)。这些结果表明*scyl2*突变体中H_2O_2的清除机制并没有出现异常, 突变体中H_2O_2的升高可能是由于H_2O_2的合成升高引起的。

植物在面临生物或非生物胁迫过程中, 由NADPH氧化酶RBOH合成的H_2O_2是应对胁迫的主要信号分子(Kwak等2003)。在水稻基因组中有9个编码rboh酶的基因(Wong等2007), 通过转录组数据分析发现其中*OsrbohD*和*OsrbohH*基因的表达量显著上升($P<0.05$) (图4-A)。同样的, 我们通过qRT-PCR比较了*Osrboh*基因在野生型和*scyl2-1*突变体中表达量的变化, 结果发现, 9个*Osrboh*基因中, 有6个在*scyl2-1*突变体中的表达量显著上升(图4-B)。qRT-PCR与转录组结果存在一些差异, 这些差异可能是由于取样时期不同造成的, 转录组测序材料用的是分蘖期的叶片(Yao等2022), 而qRT-PCR用的是14 d的幼苗叶片, 然而ROS相关基因的表达在转录组数据和qRT-PCR分析中表现出相似

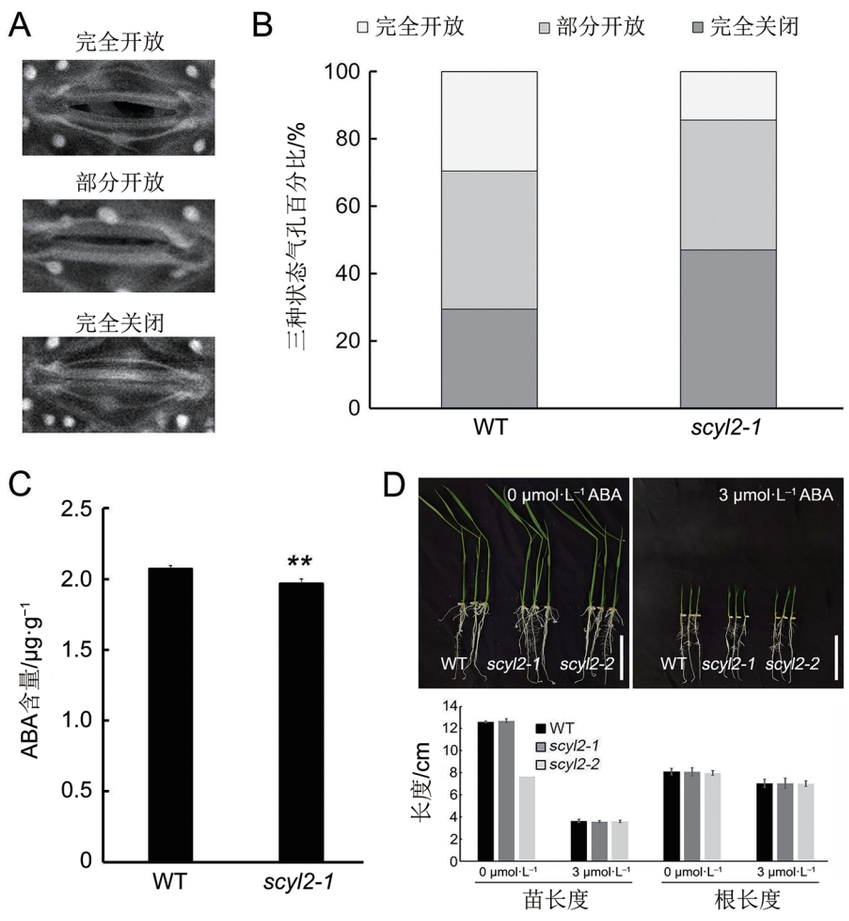


图3 *OsSCYL2*基因通过独立于ABA信号的途径参与气孔的调节

Fig. 3 The *OsSCYL2* gene is involved in the regulation of stomatal aperture through a pathway independent of ABA signaling

A: 3种状态气孔的扫描电子显微镜图; B: WT和*scyl2-1*突变体中3种状态气孔的百分比(WT: n=78; *scyl2-1*: n=83); C: WT和*scyl2-1*突变体叶片中ABA含量测定; D: WT、*scyl2-1*和*scyl2-2*的幼苗ABA处理后的表型。标尺=5 cm。

的变化趋势。这些结果表明*scyl2*突变体中H_2O_2的过量积累很可能是由于*rboh*基因的表达量上升引起的, *OsSCYL2*基因通过一个未知的信号通路负调控H_2O_2的合成。

为了进一步确定*scyl2-1*突变体气孔关闭程度的增加是由于H_2O_2的增加造成的, 我们测定了野生型和*scyl2-1*突变体幼苗叶片中的H_2O_2含量, 结果发现*scyl2-1*突变体中H_2O_2含量显著增加(图4-C)。为了观察组织水平H_2O_2的含量的变化, 我们用活性氧探针H_2DCFDA对WT和*scyl2-1*叶片进行染色, 结果发现*scyl2-1*叶片中, 荧光强度显著的高于野生型对照。尤其值得注意的是, 与野生型相比, *scyl2-1*气孔的保卫细胞中具有很高的荧光强度(图4-D)。这些结果表明, H_2O_2含量的增加可能是导致*scyl2-1*气孔关闭程度增加的直接原因。

3 讨论

植物在生长发育过程中经常面临各种生物性和非生物性的胁迫。在进化过程中, 植物逐步演化出一套复杂的机制来应对这些胁迫, 以确保自身

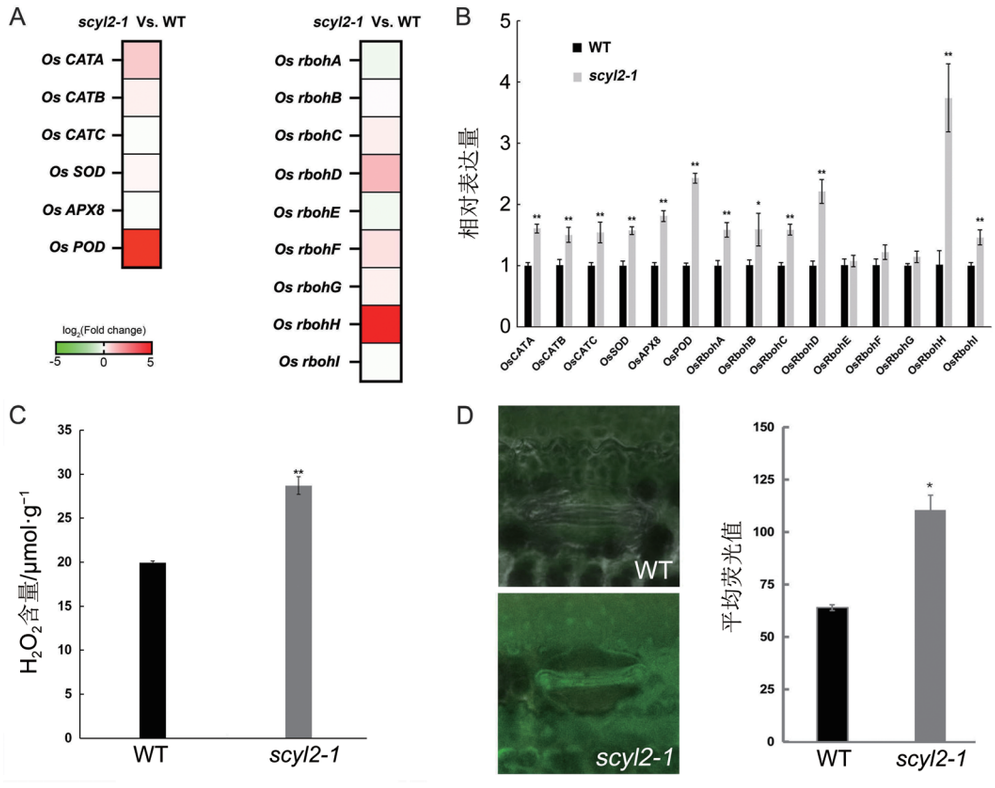


图4 *scyl2-1*突变体中ROS的动态平衡异常

Fig. 4 The homeostasis of ROS is disrupted in the *scyl2-1* mutant

A: ROS清除系统相关基因和*rboh*基因在转录组数据中的表达变化; B: ROS清除系统相关基因和*rboh*基因的qRT-PCR分析; C: WT和*scyl2-1*突变体幼苗叶片中H_2O_2含量的测定; D: H_2DCFDA染色显示WT和*scyl2-1*突变体气孔保卫细胞中H_2O_2含量变化, 保卫细胞中H_2O_2含量的定量分析用ImageJ软件完成(n=10)。

的存活。当植物暴露于某种类型的胁迫时, 可以激活一些共同的信号因子, 从而增强对其他不同类型胁迫的耐受性, 这一现象被称为交叉耐受(cross-tolerance) (Bowler和Fluhr 2000; Capiati等2006; Ramegowda等2013)。植物中应对大多数非生物胁迫具有相似的信号通路(Zhu 2016), 因此植物对某种非生物胁迫的耐受性提高时, 往往对其他不同类型的非生物胁迫的耐受性也会提高(Priyanka等2010; Qin等2015)。在应对不同类型的生物胁迫时也同样存在交叉耐受的现象(Mitchell-Olds等1995; Cao等1998; Krattinger等2009)。越来越多的研究表明, 生物胁迫和非生物胁迫之间也存在着交叉耐受的现象(Atkinson和Urwin 2012; Joshi等2016)。活性氧(ROS)的产生被认为是非生物和生物胁迫反应之间共享的一个关键过程(Locato等2018)。

网格蛋白包被囊泡CCV (Clathrin-coated vesicles, CCV)在生物胁迫反应中扮演重要角色(Ekanayake等2019)。多项研究发现, 与CCV运输途径相关的基因突变会改变对病原体的抗性(Ben Khaled等2015; Underwood 2016; Gu等2017; LaMontagne和Heese 2017; Claus等2018)。在水稻中, *OsSCYL2*和*SPL28*基因编码的蛋白与网格蛋白重链OsCHC1发生相互作用(Yao等2022)。*OsSCYL2*和*SPL28*基因突变导致水稻叶片中H_2O_2积累增加, 叶片产生类病斑表型, 并使水稻对白叶枯病的抗性提高(Qiao等2010; Yao等2022), 表明水稻CCV运输途径参与生物胁迫响应, 并且在这个响应过程中, H_2O_2是一个重要的信号分子。在本研究中发现, *OsSCYL2*基

因的突变可以显著增强水稻对干旱胁迫的耐受性(图1-A和B), 说明与水稻中生物胁迫和非生物胁迫交叉耐受可能受到OsSCYL2介导的CCV运输途径的调节。

在本研究中发现*scyl2-1*突变体对干旱胁迫的耐受性显著增强(图1)。在正常生长条件下, 与野生型相比, *scyl2-1*突变体叶片表面的气孔关闭程度增加(图3-A和B), 生理实验发现突变体离体叶片的失水率明显低于野生型(图2)。这些结果表明OsSCYL2介导的CCV运输途径很可能是水稻干旱胁迫响应的一个负调节机制, *OsSCYL2*基因的突变导致水稻的干旱胁迫响应机制处于打开或者部分打开的状态。

ABA是植物响应干旱胁迫的关键信号因子, 在受到干旱胁迫时, 植物体内ABA的含量会迅速的升高, 然后通过改变一系列基因的表达, 促进气孔的关闭, 以减少体内水分的流失, 使植物更好地适应缺水的环境(Schroeder等2001; Chen等2021)。而H_2O_2是干旱胁迫条件下引起气孔关闭的重要二级信号分子, ABA信号能够迅速诱导H_2O_2含量的上升(Hamilton等2000; Pei等2000; Ni等2019)。与野生型相比, *scyl2-1*突变体中ABA的含量并没增加, 反而出现了显著的下降(图3-C), 并且*scyl2-1*突变体对ABA处理的反应与野生型相比, 也没有明显的变化, 说明突变体中ABA信号传导途径并没有出现异常(图3-D), 这些结果表明OsSCYL2介导的CCV运输途径对水稻干旱胁迫响应的调节似乎并不依赖ABA信号。

在*scyl2-1*突变体的分蘖期, 叶片开始出现类病斑的表型, 并且对白叶枯病菌的抗性增强, DAB染色显示叶片中累积了过量的H_2O_2 (Yao等2022)。本研究中H_2O_2含量测定也发现, *scyl2-1*突变体幼苗的叶片中, H_2O_2含量也显著高于野生型, 虽然这时突变体还未表现出类病斑的表型(图4-C)。并且用ROS探针H_2DCFDA染色发现, 与野生型相比, 在*scyl2-1*突变体叶片气孔的保卫细胞中, 出现了较强的荧光信号, 说明突变体气孔关闭程度的增加可能是由于保卫细胞中H_2O_2含量的上升引起的(图4-D)。

为了探究*scyl2-1*突变体叶片中H_2O_2含量上升的原因, 我们比较了野生型和*scyl2-1*突变体叶片中ROS清除系统关键基因和负责H_2O_2合成的*Osrboh*基因的表达量。分蘖期叶片转录组数据显示ROS清除系统关键基因中*OsCATA*和*OsPOD*的表达量显著上升(Yao等2022), 而14 d幼苗叶片的qRT-PCR分析6个ROS清除系统关键基因的表达量均出现了显著的上升(图4-A和B), 说明*OsSCYL2*基因的突变并不会引起ROS清除系统的缺陷。分蘖期叶片转录组数据显示在9个*Osrboh*基因中, *OsrbohD*和*OsrbohH*基因的表达量显著上升(Yao等2022), 而14 d幼苗叶片的qRT-PCR分析则显示9个*Osrboh*基因中有6个基因的表达量出现了显著的上升(图4-A和B)。这些结果表明, *OsSCYL2*基因突变导致了*Osrboh*基因表达量的上调, 导致叶片气孔保卫细胞中H_2O_2含量的增加, 从而引起气孔的关闭。

综上所述, 水稻中OsSCYL2介导的CCV运输途径可能是水稻响应干旱胁迫的一个负调控机制, 这种机制不依赖ABA信号。干旱胁迫的次级信号因子H_2O_2可能是OsSCYL2介导的信号途径和ABA信号途径的一个关键连接点。在干旱胁迫条件下, ABA信号通过诱导H_2O_2的产生, 使水稻产生一系列的反应以适应缺水的环境。而OsSCYL2介导的信号途径则是在正常生长条件下, 通过一个目前还未知的途径控制*Osrboh*基因的表达, 使胁迫响应系统处于关闭状态, 保持植物正常的生长(图5)。

本研究通过对*scyl2*突变体耐旱性状的分析, 为CCV运输途径对水稻耐旱性的调控机制提供了新的认识, 同时也为进一步深入研究生物胁迫和非生物胁迫之间的交叉耐受现象奠定了良好的基础。

参考文献(References)

Atkinson NJ, Urwin PE (2012). The interaction of plant biotic and abiotic stresses: from genes to the field. J Exp Bot, 63 (10): 3523–3543

Baxter A, Mittler R, Suzuki N (2014). ROS as key players in plant stress signalling. J Exp Bot, 65 (5): 1229–1240

Ben Khaled S, Postma J, Robatzek S (2015). A moving view: subcellular trafficking processes in pattern recognition receptor–triggered plant immunity. Ann Rev Phytopathol, 53: 379–402

Bowler C, Fluhr R (2000). The role of calcium and activated oxygens as signals for controlling cross-tolerance. Trend

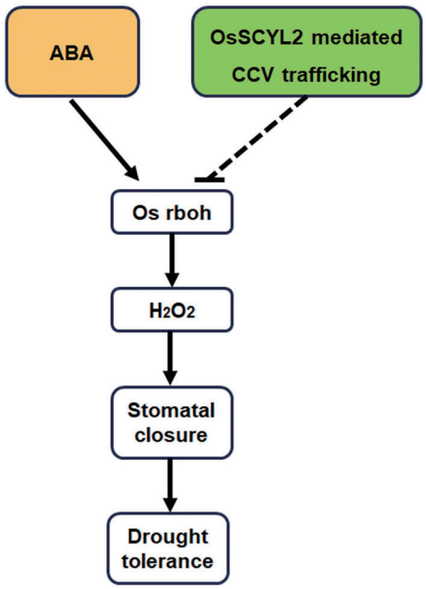


图5 OsSCYL2介导的CCV (Clathrin-coated vesicles)运输途径在干旱胁迫响应中的工作模型

Fig. 5 Working model of the role of OsSCYL2-mediated CCV (Clathrin-coated vesicles) transport pathway in response to drought stress

虚线表示未知信号途径。

Plant Sci, 5 (6): 241–246

Camejo D, Guzmán-Cedeño Á, Moreno A (2016). Reactive oxygen species, essential molecules, during plant–pathogen interactions. Plant Physiol Biochem, 103: 10–23

Cao H, Li X, Dong X (1998). Generation of broad-spectrum disease resistance by overexpression of an essential regulatory gene in systemic acquired resistance. Proc Natl Acad Sci USA, 95 (11): 6531–6536

Capiati DA, País SM, Téllez-Iñón MT (2006). Wounding increases salt tolerance in tomato plants: evidence on the participation of calmodulin-like activities in cross-tolerance signalling. J Exp Bot, 57 (10): 2391–2400

Chen K, Du K, Shi Y, et al (2021). H3K36 methyltransferase SDG708 enhances drought tolerance by promoting abscisic acid biosynthesis in rice. New Phytol, 230 (5): 1967–1984

Claus LAN, Savatin DV, Russinova E (2018). The crossroads of receptor-mediated signaling and endocytosis in plants. J Integr Plant Biol, 60 (9): 827–840

Conner SD, Schmid SL (2005). VAK104 is a novel poly-L-lysine-stimulated kinase that targets the beta2-subunit of AP2. J Biol Chem, 280 (22): 21539–21544

Cruz de Carvalho MH (2008). Drought stress and reactive oxygen species. Plant Signal Behav, 3 (3): 156–165

Ekanayake G, LaMontagne ED, Heese A (2019). Never walk alone: clathrin-coated vesicle (CCV) components in plant immunity. Ann Rev Phytopathol, 57: 387–409

Gu Y, Zavaliev R, Dong X (2017). Membrane trafficking in plant immunity. Mol Plant, 10 (8): 1026–1034

Gupta A, Rico-Medina A, Caño-Delgado AI (2020). The physiology of plant responses to drought. Science, 368 (6488): 266–269

Hamilton DWA, Hills A, Köhler B, et al (2000). Ca^{2+} channels at the plasma membrane of stomatal guard cells are activated by hyperpolarization and abscisic acid. Proc Natl Acad Sci USA, 97 (9): 4967–4972

Joshi R, Wani SH, Singh B, et al (2016). Transcription factors and plants response to drought stress: current understanding and future directions. Front Plant Sci, 7: 1029

Jung J-Y, Lee DW, Ryu SB, et al (2017). *SCYL2* genes are involved in clathrin-mediated vesicle trafficking and essential for plant growth. Plant Physiol, 175 (1): 194–209

Kadota Y, Shirasu K, Zipfel C (2015). Regulation of the NADPH Oxidase RBOHD during plant immunity. Plant Cell Physiol, 56 (8): 1472–1480

Krattinger SG, Lagudah ES, Spielmeyer W, et al (2009). A Putative ABC transporter confers durable resistance to multiple fungal pathogens in wheat. Science, 323 (5919): 1360–1363

Kwak JM, Mori IC, Pei ZM, et al (2003). NADPH oxidase *AtrbohD* and *AtrbohF* genes function in ROS-dependent ABA signaling in *Arabidopsis*. EMBO J, 22 (11): 2623–2633

LaMontagne ED, Heese A (2017). Trans-Golgi network/early endosome: a central sorting station for cargo proteins in plant immunity. Cur Opin Plant Biol, 40: 114–121

Locato V, Cimini S, De Gara L (2018). ROS and redox balance as multifaceted players of cross-tolerance: epigenetic and retrograde control of gene expression. J Exp Bot, 69 (14): 3373–3391

Miller GAD, Suzuki N, Ciftci-Yilmaz S, et al (2010). Reactive oxygen species homeostasis and signalling during drought and salinity stresses. Plant Cell Environ, 33 (4): 453–467

Mitchell-Olds T, James RV, Palmer MJ, et al (1995). Genetics of *Brassica rapa* (syn. *campestris*). 2. multiple disease resistance to three fungal pathogens: *Peronospora parasitica*, *Albugo Candida* and *Leptosphaeria maculans*. Heredity, 75: 362–369

Mittler R (2002). Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. Trends Plant Sci, 7 (9): 405–410

Ni L, Fu X, Zhang H, et al (2019). Abscisic acid inhibits rice

protein phosphatase PP45 via H_2O_2 and relieves repression of the Ca^{2+}/CaM-dependent protein kinase DMI3. Plant Cell, 31 (1): 128–152

Pei Z-M, Murata Y, Benning G, et al (2000). Calcium channels activated by hydrogen peroxide mediate abscisic acid signalling in guard cells. Nature, 406 (6797): 731–734

Priyanka B, Sekhar K, Reddy VD, et al (2010). Expression of pigeonpea hybrid-proline-rich protein encoding gene (CcHyPRP) in yeast and *Arabidopsis* affords multiple abiotic stress tolerance. Plant Biotechnol J, 8 (1): 76–87

Qiao Y, Jiang W, Lee J, et al (2010). SPL28 encodes a clathrin-associated adaptor protein complex 1, medium subunit μ1 (AP1M1) and is responsible for spotted leaf and early senescence in rice (*Oryza sativa*). New Phytol, 185 (1): 258–274

Qin Y, Tian Y, Liu X (2015). A wheat salinity-induced WRKY transcription factor TaWRKY93 confers multiple abiotic stress tolerance in *Arabidopsis thaliana*. Biochem Biophys Res Commun, 464 (2): 428–433

Ramegowda V, Senthil-Kumar M, Ishiga Y, et al (2013). Drought stress acclimation imparts tolerance to *Sclerotinia sclerotiorum* and *Pseudomonas syringae* in *Nicotiana benthamiana*. Int J Mol Sci, 14 (5): 9497–9513

Schroeder JI, Kwak JM, Allen GJ (2001). Guard cell abscisic acid signalling and engineering drought hardiness in plants. Nature, 410 (6826): 327–330

Sierla M, Waszczak C, Vahisalu T, et al (2016). Reactive oxygen species in the regulation of stomatal movements. Plant Physiol, 171 (3): 1569–1580

Tardieu F, Simonneau T, Muller B (2018). The physiological basis of drought tolerance in crop plants: a scenario-dependent probabilistic approach. Annu Rev Plant Biol, 69: 733–759

Underwood W (2016). Contributions of host cellular trafficking and organization to the outcomes of plant-pathogen interactions. Semin Cell Dev Biol, 56: 163–173

Wong HL, Pinontoan R, Hayashi K, et al (2007). Regulation of rice NADPH oxidase by binding of Rac GTPase to its n-terminal extension. Plant Cell, 19 (12): 4022–4034

Wrzaczek M, Brosché M, Kangasjärvi J (2013). ROS signaling loops-production, perception, regulation. Curr Opin Plant Biol, 16 (5): 575–582

Yao L, Cheng X, Gu Z, et al (2018). The AWPM-19 family protein OsPM1 mediates abscisic acid influx and drought response in rice. Plant Cell, 30 (6): 1258–1276

Yao Y, Zhou J, Cheng C, et al (2022). A conserved clathrin-coated vesicle component, OsSCYL2, regulates plant innate immunity in rice. Plant Cell Environ, 45 (2): 542–555

Yoshida S, Fomo DA, Cock J, et al (1976). Routine procedure for growing rice plants in culture solution. In: Yoshida S, Forno DA, Cock JH. Laboratory Manual for Physiological Studies of Rice. Los Baños: International Rice Research Institute, 57–63

You J, Zong W, Hu H, et al (2014). A STRESS-RESPONSIVE NAC1-regulated protein phosphatase gene rice protein phosphatase18 modulates drought and oxidative stress tolerance through abscisic acid-independent reactive oxygen species scavenging in rice. Plant Physiol, 166 (4): 2100–2114

Zhang A, Zhang J, Ye N, et al (2010). ZmMPK5 is required for the NADPH oxidase-mediated self-propagation of apoplastic H_2O_2 in brassinosteroid-induced antioxidant defence in leaves of maize. J Exp Bot, 61 (15): 4399–4411

Zhang J, Davies WJ (1987). Increased synthesis of ABA in partially dehydrated root tips and ABA transport from roots to leaves. J Exp Bot, 38 (12): 2015–2023

Zhu JK (2002). Salt and drought stress signal transduction in plants. Annu Rev Plant Biol, 53: 247–273

Zhu JK (2016). Abiotic stress signaling and responses in plants. Cell, 167 (2): 313–324

Zu X, Lu Y, Wang Q, et al (2021) Increased drought resistance 1 mutation increases drought tolerance of upland rice by altering physiological and morphological traits and limiting ROS levels. Plant Cell Physiol, 62 (7): 1168–1184