

引用格式:

曾佳, 刘玲, 周天顺, 荣秀琴, 袁定阳, 段美娟. 水稻 *OsSSRP* 的生物信息学分析及耐盐性研究[J]. 湖南农业大学学报(自然科学版), 2022, 48(2): 151–159.

ZENG J, LIU L, ZHOU T S, RONG X Q, YUAN D Y, DUAN M J. Bioinformatics analysis and salt tolerance studies on the *OsSSRP* of rice[J]. Journal of Hunan Agricultural University(Natural Sciences), 2022, 48(2): 151–159.

投稿网址: <http://xb.hunau.edu.cn>



## 水稻 *OsSSRP* 的生物信息学分析及耐盐性研究

曾佳<sup>1</sup>, 刘玲<sup>2</sup>, 周天顺<sup>3</sup>, 荣秀琴<sup>2</sup>, 袁定阳<sup>4</sup>, 段美娟<sup>1,2\*</sup>

(1.湖南农业大学生物科学技术学院, 湖南长沙 410128; 2.湖南农业大学农学院, 湖南长沙 410128; 3.湖南大学研究生院隆平分院, 湖南长沙 410125; 4.湖南杂交水稻研究中心, 湖南长沙 410125)

**摘要:** 为鉴定水稻 RR(response regulators)家族成员 *OsSSRP*(salt-sensitive RR protein, LOC\_Os08g35670)是否响应盐胁迫, 以日本晴为背景材料, 采用 Blast 比对、结构域预测和启动子元件分析等方法, 分析发现 *OsSSRP* 仅含 REC 结构域基序, 其启动子元件中含有大量脱落酸和茉莉酸响应元件; 诱导表达谱分析发现, *OsSSRP* 响应盐和干旱逆境胁迫及细胞分裂素、脱落酸和茉莉酸诱导; 利用 CRISPR/Cas9 技术定向敲除后获得纯合突变体 *ssrp*, 通过 0、40、100 mmol/L NaCl 进行种子萌发期盐胁迫处理和 150 mmol/L NaCl 的苗期耐盐性鉴定, 发现纯合突变体 *ssrp* 对盐胁迫更为敏感, 盐胁迫后纯合突变体 *ssrp* 存活率远远低于野生型植株。说明 *OsSSRP* 与非生物胁迫、激素响应密切相关, 可为水稻非生物胁迫抗性育种提供基因资源。

**关键词:** 水稻; 激素响应; RR 家族基因; 生物信息学; 耐盐性

中图分类号: S511.01

文献标志码: A

文章编号: 1007-1032(2022)02-0151-09

### Bioinformatics analysis and salt tolerance studies on the *OsSSRP* of rice

ZENG Jia<sup>1</sup>, LIU Ling<sup>2</sup>, ZHOU Tianshun<sup>3</sup>, RONG Xiuqin<sup>2</sup>, YUAN Dingyang<sup>4</sup>, DUAN Meijuan<sup>1,2\*</sup>

(1.College of Bioscience and Biotechnology, Hunan Agricultural University, Changsha, Hunan 410128, China; 2.College of Agronomy, Hunan Agricultural University, Changsha, Hunan 410128, China; 3.Long Ping Branch, Graduate School of Hunan University, Changsha, Hunan 410125, China; 4.Hunan Hybrid Rice Research Center, Changsha, Hunan 410125, China)

**Abstract:** To identify whether the RR family member *OsSSRP*(salt-sensitive RR Protein, LOC\_Os08g35670) of rice was response to salt stress, using the nipponbare as the material, we employed bioinformatics analysis including gene blast, domain prediction and promoter analysis of their sequences. It showed that *OsSSRP* contained only REC domain motif, and its promoter elements possessed large number of abscisic and jasmonic acid responsive elements. Induced expression profile analysis found that *OsSSRP* responded to salt and drought stress and induction of cytokinin, abscisic acid, and jasmonic acid. After seedling stage identification under 0, 40, 100 mmol/L NaCl and seed germination stage identification under 150 mmol/L NaCl, it was found that the homozygous mutant *ssrp* targeted knockout using CRISPR / Cas9 technology was more sensitive to salt stress. The mutant survival rate of salt stress was much lower than that of the wild type. *OsSSRP* was closely related to abiotic stress and hormone response, providing potential gene resources for abiotic stress resistance breeding in the rice.

**Keywords:** rice; hormone response; response regulators family genes; bioinformatic; salt-tolerance

收稿日期: 2021-06-15

修回日期: 2022-03-28

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(31771767); 湖南省科技人才托举工程项目(2019TJ-Q08); 湖南省科技重大专项(2018NK1010)

作者简介: 曾佳(1996—), 男, 湖南邵阳人, 硕士研究生, 主要从事植物遗传学研究, 610792369@qq.com; \*通信作者, 段美娟, 博士, 研究员, 主要从事水稻育种研究, duanmeijuan@163.com

干旱地区土壤盐碱化带来的问题会对环境和社会造成一定的影响<sup>[1]</sup>。土壤盐分会引起离子(主要是  $\text{Na}^+$ )毒性和高渗压力,抑制或延迟种子发芽以及芽和根的生长<sup>[2]</sup>。植物体内存在避盐和耐盐 2 种减轻盐危害机制。植物感受外界盐胁迫信号的级联反应始于根部,通过质外体移动到芽<sup>[3]</sup>,在此过程中  $\text{Na}^+$ 转运蛋白、转录因子和渗透调节相关基因参与植物耐盐响应<sup>[4]</sup>。目前已发现多个 RR(response regulators)家族基因(属于双组分信号转导系统)在此过程中响应盐胁迫<sup>[5]</sup>。

研究<sup>[6]</sup>表明,双组分信号转导系统能使细菌感应、响应并适应各种环境、压力源和生长条件。在植物中,双组分信号系统基因在干旱胁迫环境下的表达具有明显的时空特异性<sup>[7]</sup>。研究人员已克隆了许多真核生物组氨酸激酶(双组分信号转导系统的早期响应基因),并表明其参与了渗透压调节、植物生长发育和响应激素反应<sup>[8]</sup>。拟南芥响应调节器 (ARR)家族是在植物中最先发现的双组分信号转导家族,根据结构域序列,拟南芥 ARR 可以分为 A 型和 B 型 2 个不同的亚家族<sup>[9]</sup>。A 型响应调节器相对较小,包含 RR 家族 REC(receiver)保守结构域以及较短的 N 和 C 端扩展;B 型响应调节器在 REC 结构域后均具有较大的 C 端延伸,C 端含有 DNA-binding 结构域,起转录结合的作用<sup>[10]</sup>。在水稻双组分系统的反应调节子 RR 成员中,大部分成员已被克隆报道,其功能主要包括细胞分裂素响应、作为核心转录因子与其他激素交叉调节、光周期调控(昼夜节律)、生育期(主要为抽穗期)调控、抗逆性(主要为盐和干旱胁迫)调控等<sup>[11-13]</sup>。细胞分裂素信号途径负调节子 A 型 ARR5 是 ABA 信号通路正调控因子<sup>[14]</sup>。水稻幼苗处于盐、脱水和低温胁迫时,*OsRR6* 的表达会增强,表明它可在非生物胁迫和细胞分裂素信号的交互中发挥作用<sup>[15]</sup>。RR 家族内 PRR 成员是参与调控植物非生物胁迫应答的关键基因<sup>[16]</sup>。高盐环境下功能缺失突变体 *OsPRR73* 表现出钠离子和活性氧高度积累,籽粒大小和产量显著降低,耐盐性下降<sup>[17]</sup>。*OsSSRP*(salt-sensitive RR protein, LOC\_Os08g35670)作为反应调节子 RR 中的一员,目前未被克隆,且其功能也未被报道。

本研究中,采用生物信息学方法初步分析了 *OsSSRP* 的诱导表达谱,并运用 CRISPR/Cas9 技术

对 *OsSSRP* 定向敲除后,挑选纯系突变体进行盐胁迫鉴定,旨在为水稻耐盐基因资源与育种资源的筛选提供依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 供试材料

以粳稻品种日本晴(Nip, *Oryza. sativa* L. spp. japonica)作为遗传转化受体及野生型对照,培养于湖南省杂交水稻研究中心的人工气候温室。

### 1.2 水稻 RR 家族成员的鉴定

从 RGAP 数据库(<http://rice.plantbiology.msu.edu/>)下载水稻基因组序列;从 UniProtKB(<https://www.uniprot.org/>)、NCBI(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)、EnsemblPlants (<https://plants.ensembl.org/>)等网站查询下载已鉴定的 RR 家族成员;从 Pfam 在线数据库(<http://pfam.xfam.org/>)下载 RR 家族特有的 REC 结构域(Pfam 登录号 PF0072)的 Stockholm 文件。运用 HMMBuild 工具构建 RR 家族的隐马尔科夫模型,利用 HMMSearch 程序(默认设置)筛选水稻基因最长转录本蛋白数据库,获得第一部分的 RR 候选蛋白;通过上述网站查询汇总获得第二部分 RR 候选蛋白;将第一部分和第二部分所有 RR 候选蛋白整理合并,运用 Pfam 数据库、NCBI-CDD 在线网站(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/cdd/>)和 Smart 网站(<http://smart.embl-heidelberg.de/>)对各家族成员的结构域进行鉴定,剔除不含完整 REC 结构域的蛋白,确定最终的水稻 RR 家族成员,并参照文献[18-19]进行命名。在 RGAP 中,利用 Locus search 得到各家族成员的基因组序列、CDS 序列及蛋白质序列,以便后续进行分析。

### 1.3 多序列比对及保守基序分析

将得到的 REC 结构域家族蛋白质序列以 FASTA 格式在 MEGAX 软件中进行序列比对,利用 ClustalW 程序的邻近法(即 NJ 法)<sup>[20]</sup>构建进化树,Bootstrap 值设置为 1000,其他参数为默认参数。在 MEME(<https://meme-suite.org/meme/tools/meme>)在线工具上预测 RR 家族成员的保守基序,motif 出现频率设置为每种 motif 仅出现 0 次或 1 次,motif 个数设置为 10。

1.4 启动子元件的预测

找到基因起始密码子 ATG，截取上游 2000 bp 作为启动子序列。在 Plant CARE(http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/)在线工具中进行顺式作用元件的功能分析。

1.5 诱导表达谱的鉴定

激素处理：三叶期，将配制好的 100 μmol/L 脱落酸、1 mmol/L 茉莉酸、100 μmol/L 的细胞分裂素溶液使用喷壶喷洒在幼苗叶片上。盐胁迫处理：三叶期，将幼苗从正常水培营养液中转移至 200 mmol/L 盐浓度的营养液中。干旱处理：三叶期，将幼苗从正常水培营养液取出，擦干根部残余水分，置于不含水的空盆中培养。分别取诱导开始前和诱导开始后 0.5、1、2、3、6、12 h 的叶片保存在-80 °C 冰箱，采用 Trizol 法提取 RNA，反转录为 cDNA 后进行实时荧光定量 PCR(RT-qPCR)，测定 *OsSSRP* 的表达量。以 *UBQ5* 为内参基因。

1.6 CRISPR/Cas9 敲除 *OsSSRP* 获得纯合突变体

利用 CRISPR direct(http:// crispr.dbcls.jp/)设计 *OsSSRP* 的双靶点，靶点设计在靠近起始密码子区域或下游关键结构域的外显子区，利用刘耀光惠赠的 CRISPR/Cas9 表达载体和 pYLgRNA-U3/U6a 载体，参照常用的单子叶植物敲除载体的方法<sup>[21]</sup>构建载体。将构建好的载体农杆菌转化日本晴，挑选含潮霉素抗性的阳性植株，设计 *OsSSRP*-F/R(F:ACTTCCAAGACTCAGAAATGCC/R:CACC

GACCATGTATGCAGGA)引物扩增阳性植株并测序，以明确序列突变情况。种植后得到下一代种子，筛选不含载体骨架的纯合等位突变植株，测序并分析蛋白变异程度。

1.7 耐盐性表型的鉴定

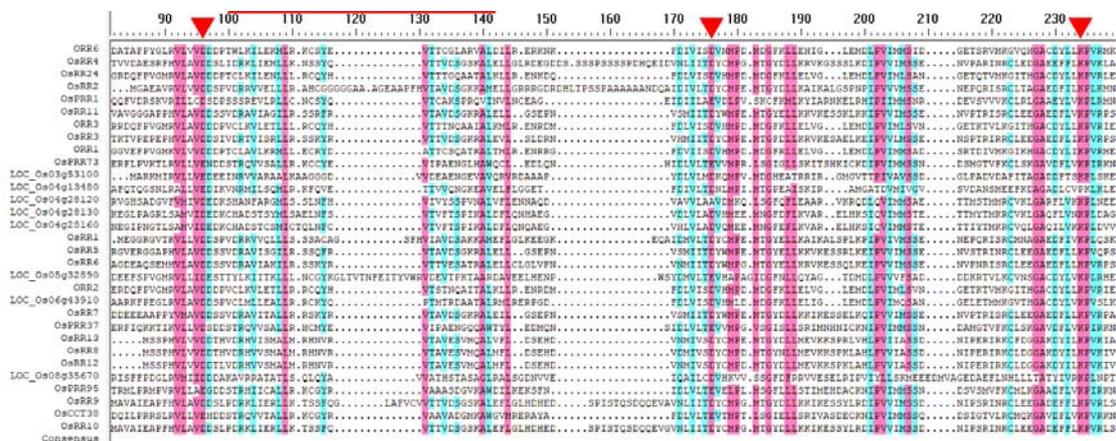
种子萌发期耐盐性的鉴定：设 3 个盐胁迫(0、40、100 mmol/L NaCl 培养基)处理，即在 10.35 g 水稻培养液粉末中分别加入 0、0.585、1.463 g NaCl，用纯水定容至 250 mL，pH 调至 5.8，灭菌后倒入平板。将野生型和纯合突变株种子消毒灭菌后剥壳，在无菌环境下分别接种于 3 种含盐培养基，置于光培室竖立生长 7 d 后，拍照并测量不同浓度下 2 组种子的根长。

苗期耐盐性的鉴定：采用含 150 mmol/L NaCl 的营养液培养三叶期幼苗，每 2 d 更换 1 次盐溶液，出现显著表型差异后拍照并计算突变株及野生型植株的存活率。

2 结果与分析

2.1 序列比对同源性分析

鉴定并剔除不含完整 REC 结构域的蛋白后，得到包含 *OsSSRP*(LOC\_Os08g35670)在内的 31 个非冗余 RR 家族成员。蛋白结构分析比对发现，所有家族成员氨基酸 4-186 区段均含有 REC 保守结构域区(图 1)，该结构域在 N 端(包含了 REC 结构域)中部具有 1 个保守的天冬氨酸残基，该残基可能是磷酸化位点。位于受体结构域 N 末端附近的天冬氨酸 Asp 和 C 末端附近的赖氨酸 Lys 中的几



种酸性氨基酸也在 31 个 RR 家族成员中保守。以往研究中通常把这几个保守氨基酸残基统称为 DDK。但家族内成员的分类无法在该图中体现,因此,构建了进化树并根据保守基序进行分析。

## 2.2 保守基序分析

家族进化树的构建及保守基序分析表明,RR 家族大致可以分为 3 类:A 型、B 型和 C(PRR)型(图 2)。基序大小为 12~44 aa。A 型家族成员含有 4 个保守基序;B 型家族成员含有 7 个保守基序,其作为转录因子含有特有的 2 个基序(motif5 和 motif8);C 型家族成员含有 5 个保守基序,motif6 为 C 型家族成员的独有基序。LOC\_Os06g43910 与 B 型家族成员基序完全一致,可以归类为 B 型家族成员;LOC\_Os05g32890 与 B 型家族成员相比少了 1 个 motif1,但其他基序完全一致,也可以归类于 B 型家族成员;除了 LOC\_Os04g28130 和

LOC\_Os04g28160,其他家族成员都含有 motif2,暗示 motif2 可能与 REC 结构域有关。LOC\_Os04g28130 和 LOC\_Os04g28160 的 REC 结构域与其他家族成员的 REC 结构域起作用的途径或结合位点可能有很大差别,其与 B 型家族成员相比,缺少了 motif3,但由于其拥有 B 型家族成员特有的转录激活区基序,猜测 LOC\_Os04g28130 和 LOC\_Os04g28160 可能也行使转录因子的功能,但结合方式与 B 型家族成员有所不同。LOC\_Os03g53100 和 LOC\_Os04g13480 也有着 B 型家族成员的一部分基序,但缺少了 B 型家族成员关键基序 motif5 和 motif8;OsSSRP 则只含有 REC 结构域相关基序,作为反应调节子可能不单独起作用,而是与其他基因或反应调节子共同起作用。

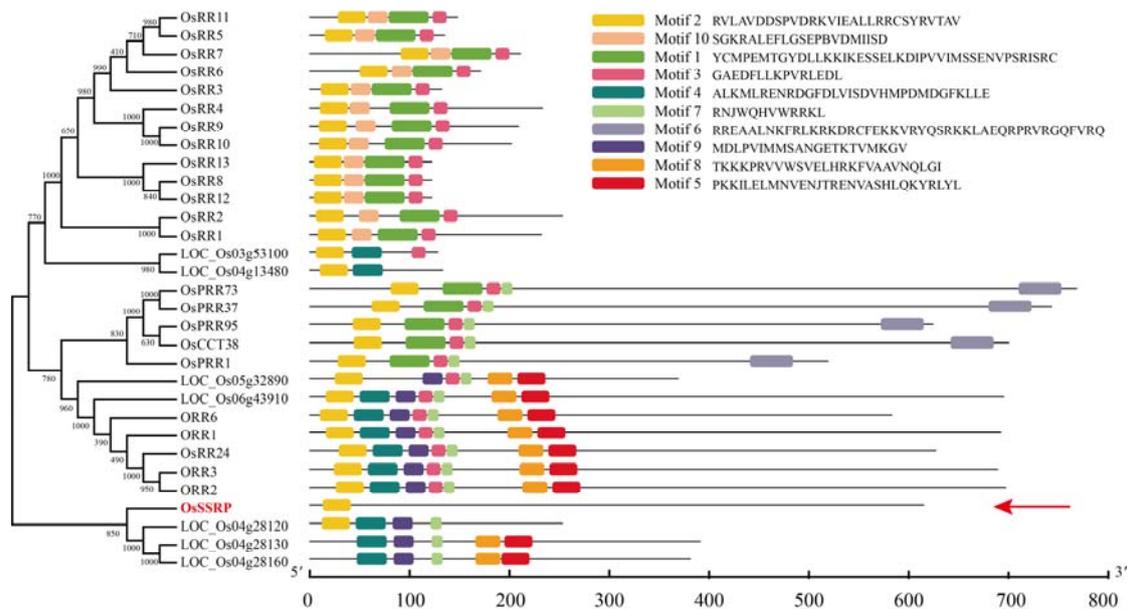


图 2 水稻基因组中 RR 家族蛋白保守基序分析结果

Fig.2 Analysis results of conservative motif of RR family proteins in rice genome

## 2.3 顺式作用元件分析

从 A、B 及 C(PRR)型中各挑选出 1 个报道最多的基因(*OsRR6*、*ORR6*、*OsPRR95*)与 *OsSSRP* 进行启动子元件分析,结果如图 3 所示。除 A-box、CAAT-box 和 TATA-box 中主要的核心元件(占比为 66.38%)外,其他的元件按功能大致可分为 4 类:胁迫响应、激素响应、光响应及其他复杂独特的功能。激素响应元件占 13.49%(63/467),主要为脱落酸响应元件、赤霉素响应元件、茉莉酸响

应元件、水杨酸响应元件及生长素响应元件。3 类家族成员和 *OsSSRP* 均含有较多的脱落酸响应元件(ABRE);*OsSSRP* 还拥有较多茉莉酸响应元件(CGTC-motif 和 TGACG-motif),可能在生物胁迫和开花诱导中发挥一定的作用;C(PRR)型家族成员含有的光响应元件最多。推断 *OsSSRP* 的启动子元件可能参与了 ABA 信号通路调控的非生物胁迫以及光和激素响应。

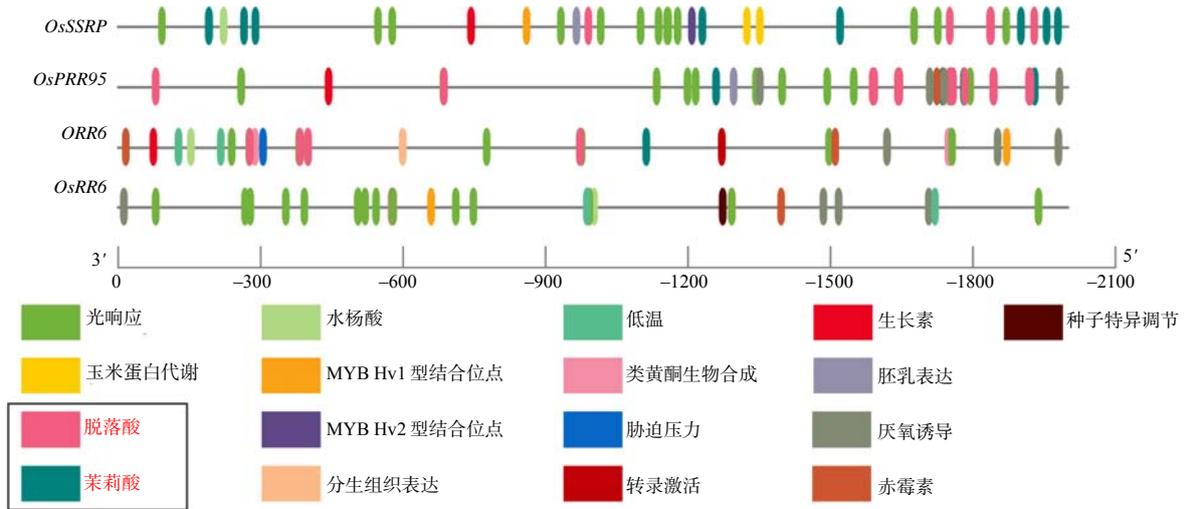


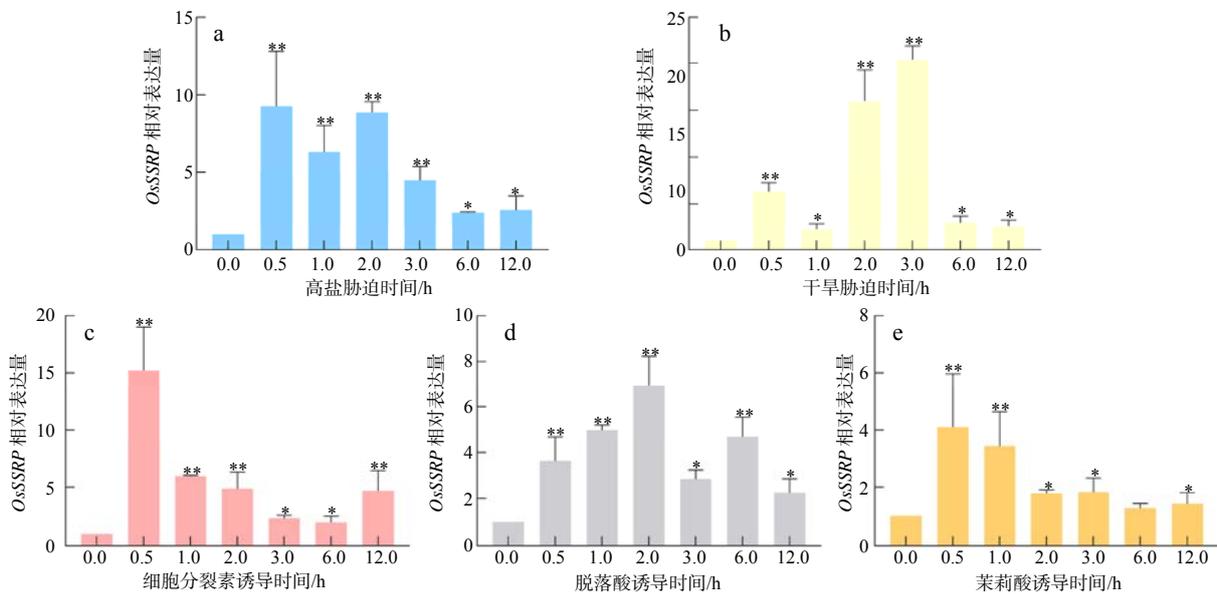
图 3 *OsSSRP*和其他 3 类家族成员的启动子顺式作用元件

Fig.3 Promoter cis-acting elements of *OsSSRP* and three other family members

### 2.4 诱导表达谱的检测

从图 4 可以看出, 干旱胁迫至 3 h, *OsSSRP* 相对表达量最高, 相较 0 h, 相对表达量上调了 20.39 倍; 脱落酸诱导 2 h 时表达量最高, 相较 0 h, 相对表达量上调了 6.87 倍; 高盐、细胞分裂素以及茉莉酸的胁迫诱导, *OsSSRP* 表达量均在 0.5 h

时上升至最高, 相较 0 h, 此时细胞分裂素诱导表达上调了 14.93 倍, 盐胁迫诱导表达上调了 8.88 倍, 茉莉酸诱导表达上调了 3.76 倍。以上结果表明, 高盐、干旱胁迫及激素均可以诱导 *OsSSRP* 相对表达量显著增加, *OsSSRP* 可能在盐胁迫调控中起重要作用。



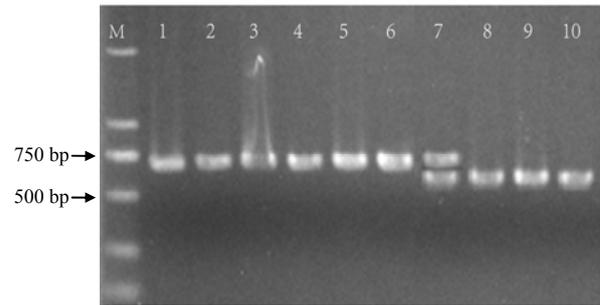
“\*”“\*\*”分别示差异显著( $P<0.05$ )和极显著( $P<0.01$ )。

图 4 胁迫和激素诱导下 *OsSSRP* 的相对表达量

Fig.4 Relative expression level of *OsSSRP* under stress and hormone induced

## 2.5 纯合突变株的获得

敲除载体转化日本晴后进行潮霉素抗性检测,得到了9个阳性株系。为了明确9株阳性株系的突变类型,使用目的片段包含靶位点在内共计731 bp的OsSSRP-F/R,分别扩增野生型日本晴和阳性植株,结果如图5所示。泳道1为野生型日本晴,为731 bp;泳道2、3、4、5、6与野生型条带大小基本一致,猜测可能未发生突变或只存在小片段突变;泳道7、8、9、10相较野生型日本晴有明显差异,可能存在几十个碱基的缺失,其中泳道7出现2条条带,可能在2个等位基因上发生了碱基数量差异较大的双等位突变。



M为DL2000 Marker;泳道1为WT对照;泳道2~10为9个阳性株系。

图5 T0代突变株系DNA扩增条带

Fig.5 DNA amplification bands of T0 mutant lines

T0代测序结果(表1)表明,除了株系4未发生突变,其余株系均发生了不同类型的突变。

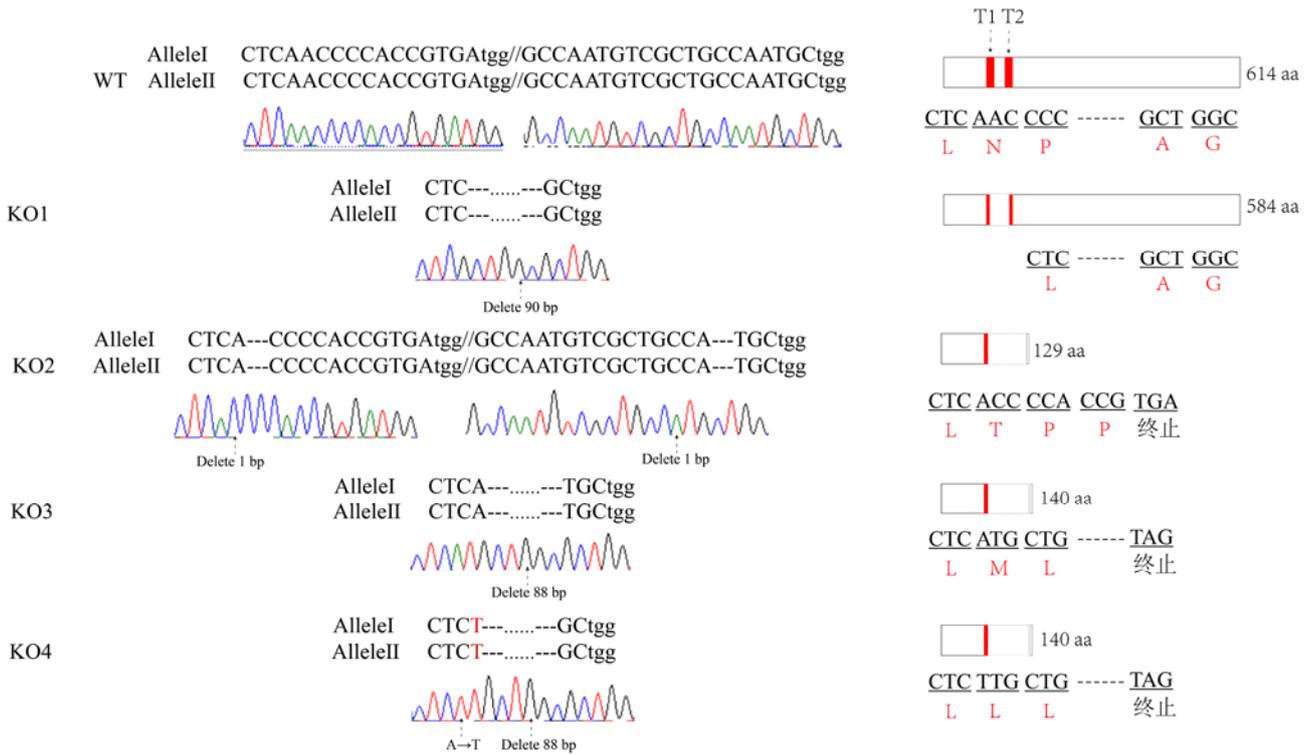
表1 T0代等位突变类型

株系	靶点序列(5'-3')	突变类型
WT	GCCGCTCAACCCACCGTGA <b>TGG</b> //GCCAATGTCGCTGCCAATGCT <b>TGG</b>	\
1	GCCGCTCAACCCACCGTGA <b>TGG</b> //GCCAATGTCGCTGCC--TGCT <b>TGG</b> GCCGCTCAACCCACCGTGA <b>TGG</b> //GCCAA <b>A</b> GTCGCTGCCA-TGCT <b>TGG</b>	WT,2d/WT,1d1s
2	GCCGCTCAACCCACCGTGA <b>TGG</b> //GCCAATGTCGCTGCCAA <b>ATGCTGG</b> GCCGCTCAACCCACCGTGA <b>TGG</b> //GCCAATGTCGCTGCCAA <b>ATGCTGG</b>	WT,i1/WT,i1
3	GCCGCTCAACCCACCGTGA <b>TGG</b> //GCCAATGTCGCTGCC--TGCT <b>TGG</b> GCCGCTCAACCCACCGTGA <b>TGG</b> //GCCAA <b>A</b> GTCGCTGCCA-TGCT <b>TGG</b>	WT,2d/WT,1d1s
4	GCCGCTCAACCCACCGTGA <b>TGG</b> //GCCAATGTCGCTGCCAATGCT <b>TGG</b> GCCGCTCAACCCACCGTGA <b>TGG</b> //GCCAATGTCGCTGCCAATGCT <b>TGG</b>	\
5	GCCGCTCAACCCACCGTGA <b>TGG</b> //GCCAATGT-----TGCT <b>TGG</b> GCCGCTCAACCCACCGTGA <b>TGG</b> //GCCAATGT-----TGCT <b>TGG</b>	WT,9d/WT,9d
6	GCCGCTC-----//-----GCT <b>TGG</b> GCCGCTCAA-----//-----GCT <b>TGG</b>	90d/88d
7	GCCGCTC-----//-----ATGCT <b>TGG</b> GCCGCTCAACCCACCGTGA <b>TGG</b> //GCCAATGTCGCTGCCAA <b>ATGCTGG</b>	88d/WT,i1
8	GCCGCTC-----//-----GCT <b>TGG</b> GCCGCTCAA-----//-----GCT <b>TGG</b>	90d/88d
9	GCCGCTC <b>T</b> -----//-----GCT <b>TGG</b> GCCGCTC <b>T</b> -----//--- <b>TCAACTCTGCGCTGG</b>	88d,1s/70d,12s

两靶点用“//”隔开;绿色字体表示PAM结构;红色字体表示替换碱基;蓝色字体表示插入碱基;“\”表示未突变;“d”表示缺失;“i”表示插入;“s”表示替换。

通过OsSSRP-F/R引物扩增,未检测到外源标记基因的T1代株系DNA。测序分析发现,双靶点均为纯合突变的4个株系KO1、KO2、KO3、KO4(knockout)。对该突变DNA序列进行蛋白翻译(图6),发现野生型中该基因编码含614个氨基酸的蛋白序列;KO1在双靶点之间缺失90 bp,导致30个氨基酸缺失,但不影响后续核苷酸编码;KO2的2个靶点分别在PAM结构上游的第12、4个碱基处缺失了1个碱基A,导致了移码突变,提

前编码TGA终止子,使靶点之间部分蛋白序列及靶点T2以后的蛋白序列全部消失,最终蛋白长度为129个氨基酸;KO3则在2个靶点之间缺失了88 bp,导致移码突变,提前编码TAG终止子,最终编码140个氨基酸;KO4除了在靶点T1的PAM结构上游第13个碱基处发生了A→T的突变,导致1个氨基酸的改变外,其余情况与KO3一致,也编码了140个氨基酸。



左边为双靶点在同源染色体上的碱基变化及测序峰图，右边为氨基酸变化情况，方框为蛋白质示意图。

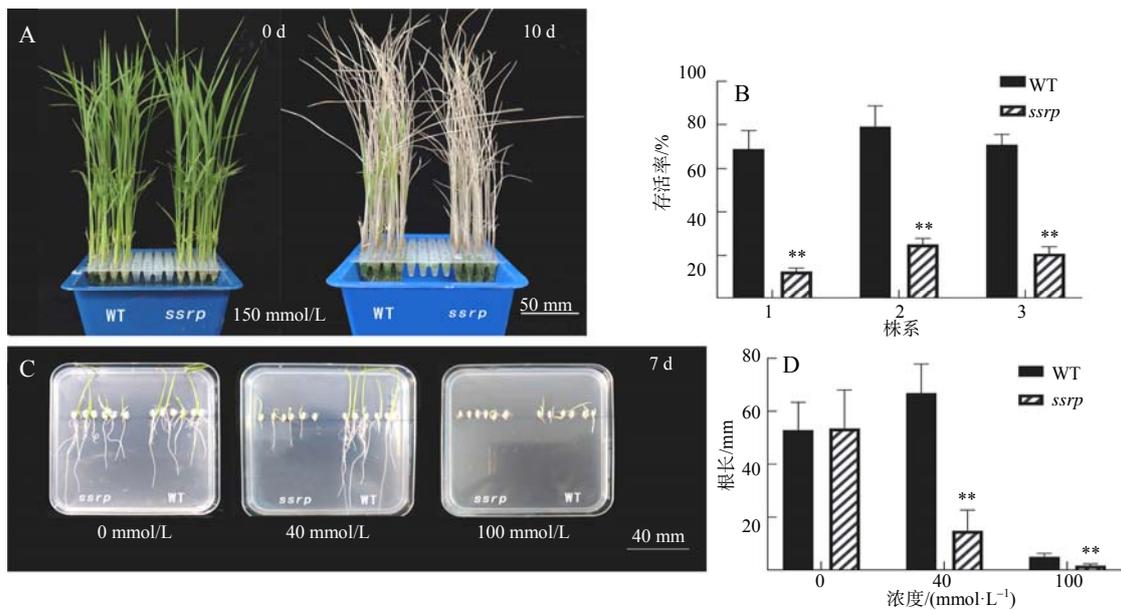
图 6 T1 代不含外源基因的纯合突变株系蛋白变异类型

Fig.6 Protein variation types of homozygous mutant lines without exogenous genes in T1 generation

## 2.6 盐胁迫的鉴定

为进一步验证 *OsSSRP* 是否参与水稻盐胁迫的调控，利用 CRISPR/Cas9 基因编辑技术成功创建了 *ssrp* 敲除纯合突变株系，并对其耐盐性进行鉴

定。苗期耐盐性鉴定结果表明，150 mmol/L NaCl 处理 10 d 后的纯合突变株相对野生型枯萎程度更高(图 7-A)，突变株存活率(12.5%)远远低于野生型的存活率 68.75%(图 7-B，存活率统计了 3 个株系，



A 三叶期 150 mmol/L NaCl 处理前与处理 10 d 后的水稻幼苗；B 150 mmol/L NaCl 处理 10 d 后的幼苗存活率；C 在 0、40、100 mmol/L NaCl 的培养基中培养 7 d 的纯合突变株和野生型种子的根；D 在 0、40、100 mmol/L NaCl 的培养基中培养 7 d 的纯合突变株和野生型种子的根长。“\*\*”表示同一株系或相同 NaCl 浓度处理下纯合突变株和野生型种子的存活率或根长差异极显著( $P < 0.01$ )。

图 7 野生型与 *OsSSRP* 敲除突变体盐胁迫下的生长情况

Fig.7 Growth of salt stress resistance of Japonica rice variety nipponbare and its *OsSSRP* knockout mutant

图 7-A 只记录了第 1 个株系)。种子萌发期耐盐性胁迫结果(图 7-C, 图 7-D)表明, 在 0 mmol/L NaCl 浓度下, 野生型和纯合突变株种子的根长无显著差异; 40 mmol/L NaCl 浓度下, 相较于野生型, 纯合突变株的根长显著变短, 纯合突变株的平均根长为 14.90 mm, 野生型日本晴平均根长为 66.93 mm; 在 100 mmol/L NaCl 浓度下, 纯合突变株和野生型日本晴的根生长均受到严重抑制, 根长分别为 1.65、5.05 mm。以上结果表明, *OsSSRP* 基因正调控水稻的耐盐性。

### 3 结论与讨论

在水稻反应调节子 RR 家族中, A、B、C 型都具有响应细胞分裂素及非生物胁迫的能力<sup>[22]</sup>, 但以往报道中都未把 *OsSSRP* 明确归类为其中任何一类。本研究中, 通过家族序列比对和 Smart、NCBI-CDD 在线工具分析发现, RR 家族保守结构域为 REC 结构域, *OsSSRP* 与 A 型家族成员一致, 其蛋白只含 N 端的 REC 结构域。保守基序分析发现, *OsSSRP* 在所有家族成员中独树一帜, 除含 REC 结构域特征基序外不含任何其他基序, 为以后研究 REC 结构域是否为 RR 家族关键功能结构域提供了良好材料。已有研究<sup>[23]</sup>表明, 许多非生物胁迫诱导基因在其启动子区域包含 2 个顺式作用元件, 即脱水反应元件 DRE(TACCGACAT)和 ABA 反应元件 ABRE(ACGTGG/TC)。 *OsSSRP* 和 RR 家族成员启动子区均含有大量 ABRE 元件, 在盐、干旱等条件诱导下, ABRE 结合蛋白 (AREBs/ABFs) 通过与启动子区的 ABRE 元件结合, 诱导下游基因表达。 *OsSSRP* 同源蛋白多序列比对构建的进化树中的亚家族分类与保守基序预测分类基本一致, 这 2 种蛋白预测方法已成为蛋白生物信息分析中最基本的步骤<sup>[24]</sup>。

植物对盐胁迫的响应受植物激素的调节<sup>[25]</sup>。盐胁迫期间增加的 ABA 浓度促进了抗胁迫蛋白的产生并引起渗透调节, 提高了对盐的耐受性<sup>[2]</sup>; 因此, 盐胁迫的表型通常与 ABA 处理和干旱胁迫同时出现且趋势一致。本研究结果发现, *OsSSRP* 的相对表达量变化在盐胁迫、干旱胁迫下和 ABA 诱导处理的趋势相似。 *OsSSRP* 与 A 型 RRs 发挥着相似功能, 如 *OsRR6* 在干旱和盐胁迫刺激后转录水

平迅速升高而负调控细胞分裂素, 进而降低细胞分裂素水平, 以达到耐盐的目的<sup>[15]</sup>。推测植株在接收到包括盐胁迫在内的外界信号后, 质膜上的信号受体组氨酸激酶 HK 将组氨酸磷酸化, 磷酸化信号通过植物特有的组氨酸-磷酸蛋白 HPs 传递至细胞核, 到达响应调节子 RRs<sup>[26]</sup>, *OsSSRP* 作为转录因子 RR 中的一员, 激活下游盐胁迫相关基因表达, 正向调控植物耐盐能力。在盐胁迫后一些已知的胁迫诱导基因如 *DREB1A*、*RD29A*、*KIN1*、*KIN2* 和 *ERD10* 的转录水平理应上升<sup>[27]</sup>, 但本研究未对其耐盐机制作详细研究。种子萌发期和幼苗生长早期是对盐胁迫最敏感的阶段, 大多数盐胁迫试验通常选择在这 2 个时期进行。种子萌发期, 由于盐对根的抑制作用相对芽更明显, 选用根长作为判定耐盐能力指标更为准确<sup>[28]</sup>。若有条件, 补充生殖生长期的大田盐处理试验会更有说服力。

综上所述, 本研究在细胞分裂素信号转导通路中鉴定了一个未被克隆的反应调节子 RR 家族成员 *OsSSRP*, 通过生物信息学分析和表达谱分析进一步发现 *OsSSRP* 与非生物胁迫、激素响应有密切关系。利用 CRISPR /Cas9 技术创制了 *ssrp* 敲除纯系突变体, 发现 *ssrp* 突变体对盐胁迫更敏感, 这为水稻耐盐育种提供了新的基因资源。

### 参考文献:

- [1] 于宝勒. 盐碱地修复利用措施研究进展[J]. 中国农学通报, 2021, 37(7): 81-87.
- [2] ZHU J K. Salt and drought stress signal transduction in plants[J]. Annual Review of Plant Biology, 2002, 53: 247-273.
- [3] SHARP R G, DAVIES W J. Variability among species in the apoplastic pH signalling response to drying soils[J]. Journal of Experimental Botany, 2009, 60(15): 4363-4370.
- [4] 鄂志国, 张丽靖. 水稻盐胁迫应答的分子机制[J]. 杂交水稻, 2010, 25(2): 1-5.
- [5] ZWACK P J, RASHOTTE A M. Interactions between cytokinin signalling and abiotic stress responses[J]. Journal of Experimental Botany, 2015, 66(16): 4863-4871.
- [6] SKERKER J M, PRASOL M S, PERCHUK B S, et al. Two-component signal transduction pathways regulating growth and cell cycle progression in a bacterium: a

- system-level analysis[J]. *PLoS Biology*, 2005, 3(10): e334.
- [7] 潘雅姣, 王迪, 朱苓华, 等. 水稻双组分系统基因干旱胁迫表达谱分析[J]. *作物学报*, 2009, 35(9): 1628–1636.
- [8] URAO T, YAKUBOV B, YAMAGUCHI-SHINOZAKI K, et al. Stress-responsive expression of genes for two-component response regulator-like proteins in *Arabidopsis thaliana*[J]. *FEBS Letters*, 1998, 427(2): 175–178.
- [9] IMAMURA A, HANAKI N, NAKAMURA A, et al. Compilation and characterization of *Arabidopsis thaliana* response regulators implicated in his-asp phosphorelay signal transduction[J]. *Plant and Cell Physiology*, 1999, 40(7): 733–742.
- [10] HOSODA K, IMAMURA A, KATOH E, et al. Molecular structure of the GARP family of plant myb-related DNA binding motifs of the *Arabidopsis* response regulators[J]. *The Plant Cell*, 2002, 14(9): 2015–2029.
- [11] YAN Z W, LIU X, LJUNG K, et al. Type B response regulators act as central integrators in transcriptional control of the auxin biosynthesis enzyme TAA1[J]. *Plant Physiology*, 2017, 175(3): 1438–1454.
- [12] XIE M T, CHEN H Y, HUANG L, et al. A B-ARR-mediated cytokinin transcriptional network directs hormone cross-regulation and shoot development[J]. *Nature Communications*, 2018, 9: 1604.
- [13] FRANK M, CORTLEVEN A, NOVÁK O, et al. Root-derived *trans*-zeatin cytokinin protects *Arabidopsis* plants against photoperiod stress[J]. *Plant, Cell & Environment*, 2020, 43(11): 2637–2649.
- [14] 黄小珍. 细胞分裂素与脱落酸信号通路拮抗调控拟南芥逆境应答的分子机制[D]. 北京: 中国农业大学, 2017.
- [15] JAIN M, TYAGI A K, KHURANA J P. Molecular characterization and differential expression of cytokinin-responsive type-A response regulators in rice(*Oryza sativa*)[J]. *BMC Plant Biology*, 2006, 6: 1.
- [16] 刘璇, 张丽, 巩楠, 等. 生物钟对植物非生物胁迫应答调控的进展[J]. *基因组学与应用生物学*, 2019, 38(9): 4160–4166.
- [17] WEI H, WANG X L, HE Y Q, et al. Clock component OsPRR73 positively regulates rice salt tolerance by modulating *OsHKT2;1*-mediated sodium homeostasis[J]. *The EMBO Journal*, 2021, 40(3): e105086.
- [18] PAREEK A, SINGH A, KUMAR M, et al. Whole-genome analysis of *Oryza sativa* reveals similar architecture of two-component signaling machinery with *Arabidopsis*[J]. *Plant Physiology*, 2006, 142(2): 380–397.
- [19] SCHALLER G E, DOI K, HWANG I, et al. Nomenclature for two-component signaling elements of rice[J]. *Plant Physiology*, 2007, 143(2): 555–557.
- [20] TAMURA K, PETERSON D, PETERSON N, et al. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods[J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2011, 28(10): 2731–2739.
- [21] WANG W C, LIN T C, KIEBER J, et al. Response regulators 9 and 10 negatively regulate salinity tolerance in rice[J]. *Plant and Cell Physiology*, 2019, 60(11): 2549–2563.
- [22] MA X L, ZHANG Q Y, ZHU Q L, et al. A robust CRISPR/Cas9 system for convenient, high-efficiency multiplex genome editing in monocot and dicot plants[J]. *Molecular Plant*, 2015, 8(8): 1274–1284.
- [23] NARUSAKA Y, NAKASHIMA K, SHINWARI Z K, et al. Interaction between two *cis*-acting elements, ABRE and DRE, in ABA-dependent expression of *Arabidopsis rd29A* gene in response to dehydration and high-salinity stresses[J]. *The Plant Journal*, 2003, 34(2): 137–148.
- [24] 吕亮杰, 陈希勇, 张业伦, 等. 小麦 GASA 基因家族生物信息学分析[J]. *作物杂志*, 2018(6): 58–67.
- [25] SINGH N K, LAROSA P C, HANDA A K, et al. Hormonal regulation of protein synthesis associated with salt tolerance in plant cells[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1987, 84(3): 739–743.
- [26] 罗超, 黄世文, 王茜, 等. 细胞分裂素的生物合成、受体和信号转导的研究进展[J]. *特产研究*, 2011, 33(2): 71–75.
- [27] BHASKAR A, PAUL L K, SHARMA E, et al. OsRR6, a type-A response regulator in rice, mediates cytokinin, light and stress responses when over-expressed in *Arabidopsis*[J]. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2021, 161: 98–112.
- [28] 魏征, 邹燕, 陈澎军, 等. 不同类型水稻芽期的耐盐性差异[J]. *湖南农业大学学报(自然科学版)*, 2021, 47(3): 254–261.

责任编辑: 毛友纯  
英文编辑: 柳正