



## 水稻OsPR10A的表达特征及其在干旱胁迫应答过程中的功能

张彤<sup>1</sup>, 郭亚璐<sup>1,2</sup>, 陈悦<sup>1</sup>, 马金姣<sup>1</sup>, 兰金苹<sup>1,3</sup>, 燕高伟<sup>1</sup>, 刘玉晴<sup>1</sup>  
徐珊<sup>1</sup>, 李莉云<sup>1</sup>, 刘国振<sup>1\*</sup>, 窦世娟<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>河北农业大学生命科学学院, 保定 071001; <sup>2</sup>中国农业科学院农业基因组研究所, 深圳 518116

<sup>3</sup>河北北方学院生命科学研究中心, 张家口 075000

**摘要** 利用免疫印迹(WB)分析了水稻(*Oryza sativa*) OsPR10A在其不同生长时期、不同组织部位及多种非生物逆境胁迫下的表达特征, 发现OsPR10A在干旱、盐胁迫以及茉莉酸甲酯(MeJA)和脱落酸(ABA)诱导下表达量明显升高, 表明该蛋白可能在干旱和盐胁迫应答过程中发挥作用。为证明这一推测, 我们构建了OsPR10A超表达载体, 经农杆菌介导转化水稻, 获得超表达OsPR10A的纯合株系。田间表型观察表明, 转基因株系株高变矮、穗长变短、结实率降低。用20% PEG6000在水稻种子萌发过程中进行干旱处理, 结果显示, OsPR10A超表达株系的根长和芽长均显著高于野生型, 证明超表达OsPR10A可增强水稻萌发期耐旱性。该研究有助于增进人们对水稻OsPR10A功能的了解。

**关键词** 水稻, 干旱胁迫, 病程相关蛋白, 免疫印迹, 基于抗体的蛋白质组学

张彤, 郭亚璐, 陈悦, 马金姣, 兰金苹, 燕高伟, 刘玉晴, 徐珊, 李莉云, 刘国振, 窦世娟 (2019). 水稻OsPR10A的表达特征及其在干旱胁迫应答过程中的功能. 植物学报 54, 711–722.

水稻(*Oryza sativa*)是世界上最重要的粮食作物之一, 其高产和稳产对全球尤其是亚洲地区的粮食安全具有重要意义。水稻生长常受到冷害、高温、水淹、干旱和盐碱等恶劣环境的威胁(Thakur et al., 2010)。因此, 了解水稻胁迫应答机理对培育耐逆水稻品种具有重要意义。

为应对多变的自然环境, 植物进化出复杂的抗性机制(Nürnberg et al., 2004; Ausubel, 2005)。例如, 在受到病原菌侵害或其它生物胁迫时, 植物会激活自身的防御体系来应对侵害。病程相关(pathogenesis-related, PR)蛋白是一类受病原物诱导的蛋白质。水稻是单子叶植物遗传研究的模式生物, 其基因组包含900多个PR基因(窦世娟等, 2014)。根据蛋白质的结构, 可将PR蛋白分为17个亚类, 不同亚类的PR蛋白生物学功能也各有不同。探究水稻PR基因的功能有助于深入了解水稻的抗逆机理。大量研究表明, 水稻PR基因在抵抗生物及非生物逆境胁迫中发挥重要作用,

调控特定PR基因的表达会影响水稻的抗逆反应, PR蛋白在抗病反应中也被诱导表达(李雪姣等, 2014)。PR1家族的OsPR1A和OsPR1B的转录水平易受病原菌诱导, 可作为抗病反应发生的分子标记(Ponciano et al., 2006)。在水稻与白叶枯病菌(*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*, Xoo)互作反应中, OsPR1A和OsPR1B蛋白质在Xoo侵染水稻叶片144小时后大量表达(Wu et al., 2011)。在水稻幼苗中, OsPR1A和OsPR1B基因的转录与光处理密切相关(Agrawal et al., 2000b), 且外源施加茉莉酸(jasmonic acid, JA)和乙烯(ethylene, ET)能显著增加OsPR1B基因的转录(Luan and Zhou, 2015)。GNS1属于PR2家族, 具有 $\beta$ -1,3-葡聚糖酶活性, 在真菌诱导下, 水稻中GNS1基因的转录和蛋白质表达水平均明显升高; 在黑暗处理时, GNS1基因表达水平也有所上升(Nishizawa et al., 2003)。转PR3基因的水稻对纹枯病的抗性增强(Datta et al., 2001)。超表达

收稿日期: 2019-02-27; 接受日期: 2019-05-06

基金项目: 国家自然科学基金(No.31400700)

\* 通讯作者。E-mail: gzhliu@hebau.edu.cn; dsj75@126.com

OsPR4A的水稻植株在幼苗期和孕穗期抗旱性明显增强(Wang et al., 2011)。水稻PR1A、PR5、PR8和PR16蛋白质随盐胁迫时间的延长下调表达,而PR2在干旱、高盐及水淹胁迫中均被诱导(高庆华等, 2013)。OsWRKY67与OsPR1A和OsPR10的启动子区结合进而提高对白叶枯病菌的抗性(Liu et al., 2018)。在其它植物中也有大量PR基因的相关报道。拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)受到南方根结线虫(*Meloidogyne incognita*)侵袭后, PR1、PR2和PR5的表达被大量诱导(Hamamouch et al., 2011)。干旱胁迫下, 拟南芥中PR1、PR2和PR5基因表达升高(Seo et al., 2008)。在烟草(*Nicotiana tabacum*)中表达OsGLP1基因可增强其对真菌病原物的抗性(Banerjee et al., 2010)。

PR10蛋白结构保守且功能多样, 在植物抗逆方面的功能也有报道(谢纯政等, 2008)。水稻OsPR10A蛋白分子量约为17 kDa, 经生化验证其具有RNA酶活性, 经GUS染色确定OsPR10A的转录受到多种方式的调控, 如生物胁迫Xoo的侵染、非生物胁迫伤害及缺磷。此外, 在叶片的正常衰老过程中OsPR10A也会被诱导表达(Huang et al., 2016)。PR10A(PBZ1)在细胞衰亡的组织中积累, 可诱导水稻细胞死亡, 也能通过其RNA酶活性诱导拟南芥和烟草细胞死亡(Kim et al., 2011)。蛋白质免疫印迹(western blot, WB)分析发现, OsPR10A在水稻受到Xoo侵染后144小时大量表达, 而且不亲和互作中表达量高于亲和互作反应(Wu et al., 2011)。超表达OsPR10A增强了水稻对白叶枯病菌的抗性(Huang et al., 2016)。OsPR10A的上游有转录因子结合位点, 可能受转录因子OsWRKY6的调控, OsWRKY6与类W-box元件1(WLE1)物理结合, 正向调控OsPR10A的表达(Choi et al., 2015)。序列同源性分析表明, OsPR10A和RSOsPR10高度相似, 具有相似的酶活性与功能(Hashimoto et al., 2004)。RSOsPR10是水稻根部特有的病程相关基因(Hashimoto et al., 2004), 在干旱和高盐胁迫下均可被诱导表达(Takeuchi et al., 2011); 在根皮细胞中超表达RSOsPR10的水稻植株对干旱胁迫具有更强的耐受性, 但对盐胁迫的耐受性较差(Takeuchi et al., 2016)。超表达JIOsPR10增强了水稻对稻瘟病菌的抗性, 证明其在水稻防卫机制中发挥作用; 半定量RT-PCR分析表明, 高盐和干旱胁迫条

件下, 水稻JIOsPR10的表达上调(Wu et al., 2016); WB检测发现, 其在正常组织(如花和根)中都表达, 衰老及伤害条件也能提高其表达水平(Kim et al., 2008)。

蛋白质是生物功能的主要执行者, 了解蛋白质的表达丰度、修饰及其变化是蛋白质组学的主要目标(Pandey and Mann, 2000)。利用蛋白质特异性抗体可对特定的目标蛋白进行靶向研究, 这一理念被称为基于抗体的蛋白质组学(antibody-based proteomics, AbP)(Uhlén et al., 2005)。通过免疫学方法对蛋白质表达特性展开调查, 具有靶向性强、灵敏度高、操作简便和容易对大量样品进行分析等优点。在水稻及其它植物研究中也借鉴这一思路, 水稻抗体资源库和蛋白质样品资源库的构建工作也已经开展(刘国振等, 2011; 张剑硕等, 2018)。

为了挖掘OsPR10A的功能, 本研究首先采用OsPR10A特异性抗体对多种逆境胁迫下的样品进行系统的WB分析筛查。在发现功能线索的基础上, 通过遗传分析, 鉴定和验证其可能的功能, 以期增进人们对OsPR10A功能的了解。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

所用水稻(*Oryza sativa* L.)品种为TP309, 基因克隆用大肠杆菌(*Escherichia coli*)菌株DH5 $\alpha$ , 重组蛋白质表达菌株为BL21 (DE3) pLysS。蛋白质原核表达载体为pET30a和pGST (Liu et al., 2002)。水稻OsPR10A基因全长cDNA质粒购自日本农业生物资源研究所水稻基因组资源中心(Rice Genome Resource Center, National Institute of Agrobiological Sciences)。质粒pUC57-3HA由南京金斯瑞生物科技有限公司合成, pEASY-T1购自上海生工生物技术有限公司, pUBI-C4300由Pamela Ronald博士(UC Davis, USA)提供。茉莉酸甲酯和脱落酸等试剂购自北京博奥拓达科技有限公司。

### 1.2 水稻培养及取材

水稻苗期培养: 种子在30°C浸泡3天后露白, 在蛭石土(土壤:蛭石=1:1, v/v)中播种后于30°C、光周期为12小时光照/12小时黑暗条件下培养(魏健等, 2011)。不

同发育时期取材: 幼苗期取萌发后培养5天的地上部和地下部; 分蘖期、孕穗期和开花期的根、茎、叶及叶枕; 开花期的花药、颖壳、穗和穗轴以及成熟期的旗叶, 均取自大田栽培的水稻。水培为纯水培养, 将种子播种在透水的纱网上, 参照张剑硕(2018)的方法进行。

### 1.3 胁迫处理

水稻苗期干旱处理: 将水培5天的水稻幼苗用20% PEG6000处理, 以不加PEG的幼苗材料为对照, 取材时间点为处理后0小时、1小时、2小时、4小时、8小时、12小时、1天、2天和3天。水稻苗期盐处理: 将水培5天的幼苗用200 mmol·L<sup>-1</sup> NaCl处理, 以不加NaCl的幼苗材料为对照, 取材时间点为0小时、4小时、8小时、12小时、24小时、2天、3天、5天和7天。其它胁迫处理及取材参见张剑硕等(2018)的方法。离体叶片激素处理参考Agrawal等(2000a)的方法。具体方法为: 取培养8周(四叶期)的水稻叶片, 剪成2 cm小段置于培养皿中, 在培养皿中分别加入15 mL 100 μmol·L<sup>-1</sup> MeJA或100 μmol·L<sup>-1</sup> ABA, 光周期为12小时光照/12小时黑暗。取材时间点为0小时、6小时、12小时、1天、2天、3天、4天、5天和6天, 以无菌水浸泡的离体叶片为对照。水稻种子萌发期干旱处理参考Dansana等(2014)的方法。具体方法为: 取饱满的种子, 手工剥去颖壳, 70%乙醇浸泡5分钟, 无菌水冲洗3次, 每次5分钟, 25%次氯酸钠浸泡30分钟, 无菌水冲洗3次。消毒后的种子平铺在有2层滤纸的培养皿中, 加入15 mL 20% PEG6000。在30℃、光周期为12小时光照/12小时黑暗条件下培养7天。测定根长和芽长, 计算平均值和方差并进行统计分析。每项实验至少重复3次。水稻样品取材后用液氮速冻, 保存于-80℃冰箱备用。

### 1.4 载体构建、遗传转化及PCR鉴定

以pUC57质粒为骨架, 合成带3HA和终止子的DNA片段构建质粒pUC57-3HA, 在3HA序列上游引入XbaI和KpnI限制性内切酶位点, 3HA之前有EcoRI酶切位点, 之后是终止密码子, 下游是SpeI和HindIII限制性内切酶位点。利用pEASY-T1质粒构建中间载体, 将pUC57-3HA中的XbaI与HindIII双酶切片段连接到同样双酶切的pEASY-T1质粒中, 所构建的中间载体

称为pEASY-T1-3HA。用正向引物Prim-PR10A-OX-F (5'-GCGGTACCATGGCTCCGGCCTGCGTCTCC-3', 下划线为KpnI酶切位点)和反向引物Prim-PR10A-OX-R (5'-GCGAATTCCTTAGGCGTATTTCGGCAGG-GTG-3', 下划线为EcoRI酶切位点) PCR扩增获得全长OsPR10A基因, 通过电泳检测片段长度。用KpnI和EcoRI双酶切后插入到同样双酶切的中间载体pEASY-T1-3HA中, 测序验证后, 用KpnI和SpeI双酶切出含有目的基因的片段, 插入到同样双酶切的转化载体pUBI-C4300质粒中, 用SphI和SpeI双酶切验证, 通过插入片段大小确定正确的插入, 获得转化质粒。

用农杆菌介导法将质粒DNA转入水稻(Duan et al., 2012)。遗传转化由武汉伯远生物科技有限公司完成。主要步骤为: 从粳稻TP309成熟胚诱导愈伤组织, 愈伤组织与根癌农杆菌共培养, 继而进行愈伤组织的甘露糖抗性筛选及愈伤组织的诱导分化和生根, 将获得的转基因水稻苗进行炼苗和移栽(刘巧泉等, 1998)。

提取水稻叶片基因组DNA并进行PCR扩增。上游引物Prim-PR10A-OX-F: 5'-ATGGCTCCGGCCTG-CGTCTC-3', 下游引物Prim-HA-R: 5'-CTGGAACG-TCATATGGATAGG-3'。扩增条件: 94℃预变性5分钟; 94℃变性30秒, 55℃退火30秒, 72℃延伸1分钟, 共32个循环; 72℃延伸10分钟, 16℃保存。PCR产物用1.0%的琼脂糖凝胶电泳检测。

### 1.5 水稻总蛋白提取及免疫印迹分析

将供试水稻样品在液氮中迅速研磨成粉末, 每0.1 g样品加入1 mL蛋白质提取缓冲液(62.5 mmol·L<sup>-1</sup> Tris-HCl (pH7.4), 10%甘油, 2% SDS, 1 mmol·L<sup>-1</sup> PMSF, 2 mmol·L<sup>-1</sup> EDTA, 5% β-巯基乙醇), 充分混匀后置于冰上10分钟, 期间每隔2分钟涡旋震荡30秒。4℃、13 400 ×g离心20分钟。取上清液(总蛋白)移至新的离心管中。

用Tricine-SDS-PAGE分离提取的水稻总蛋白质, 上样体积为10 μL, 然后转移到PVDF膜上, 蛋白质免疫印迹一抗为Anti-OsPR10A polyclonal抗体(Wu et al., 2011), 二抗为HRP标记的羊抗兔, 具体操作参见白辉等(2010)所述方法。以HSP抗体检测的信号作为内参(Li et al., 2011), 所用抗体购自北京华大蛋白质研发中心有限公司。用化学发光成像仪(MiniChemi610, 北京赛智创业科技有限公司)检测信号。WB实验至少重

复3次。

## 1.6 转录组数据下载及田间表型调查

转录组数据来自Rice Genome Annotation Project 数据库 (<http://rice.plantbiology.msu.edu/>), 根据 *OsPR10A* 基因编号 (*Loc\_Os12g36880*) 和序列下载基于 RNA-seq 的转录组数据。

对大田栽培的野生型及转基因水稻进行农艺性状调查, 测量并统计株高、穗长、小穗数和结实率等指标。每项指标测量5–8个样本, 计算平均值和方差并进行差异显著性分析。

## 2 结果与讨论

### 2.1 *OsPR10A* 在水稻生长发育过程中的表达特征

我们采集了TP309水稻不同生长时期多个组织的样品, 采用WB分析了*OsPR10A*蛋白的表达特征(图1A–D)。结果表明, *OsPR10A*在水稻苗期根和叶中不

表达, 在分蘖期之后的根和叶中表达; 在分蘖期、孕穗期和开花期的水稻茎中均不表达; 在分蘖期和孕穗期叶枕部位表达, 但表达量随生长而下降, 至开花期不表达(图1A)。在萌发期的种子中, 自萌发第2天起, *OsPR10A*表达量增高, 至第5天达到最高, 第6天明显下降(图1B), 这表明*OsPR10A*在萌发过程中被诱导。此外, *OsPR10A*在开花期的穗、花药和颖壳中的表达量较高, 但在穗轴中不表达, 在开花期叶片的不同部位(上、中和下)中, *OsPR10A*的表达丰度接近(图1C)。在旗叶生长的不同阶段检测*OsPR10A*的丰度, 发现其在幼嫩旗叶中的表达丰度较高, 但随着旗叶的生长并进入衰老期, *OsPR10A*的表达丰度也逐渐降低, 在开花期15天的旗叶中已检测不到*OsPR10A*的表达(图1D)。综上可见, *OsPR10A*蛋白在水稻生长的不同时期和部位中丰度变化较大, 总体来看在苗期不表达或表达量低, 而在分蘖期后表达量升高, 表明该蛋白主要在水稻种子萌发阶段和生长后期发挥作用, 在特定组织中的高表达也值得关注。

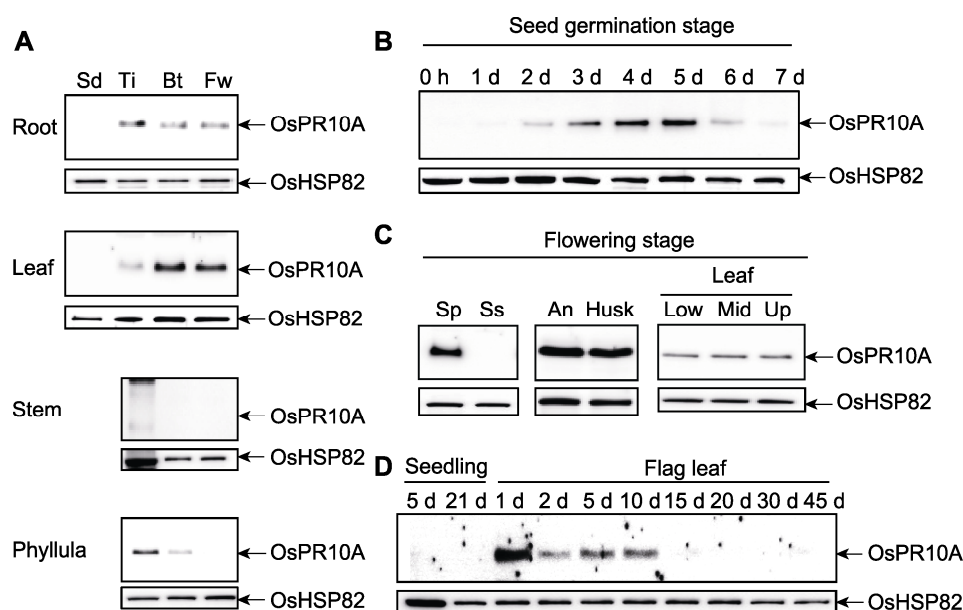


图1 *OsPR10A*在水稻生长发育过程中的表达

(A) *OsPR10A*在水稻不同生长时期和组织部位的表达(Sd: 苗期; Ti: 分蘖期; Bt: 孕穗期; Fw: 开花期); (B) *OsPR10A*在萌发期种子中的表达; (C) *OsPR10A*在开花期组织中的表达(Sp: 穗; Ss: 穗轴; An: 花药; Husk: 颖壳; Low: 叶下部; Mid: 叶中部; Up: 叶上部); (D) *OsPR10A*在幼苗和旗叶中的表达

Figure 1 Expression of *OsPR10A* during rice growth and development

(A) Expression of *OsPR10A* in different growth stages and tissue parts of rice (Sd: Seedling stage; Ti: Tillering stage; Bt: Booting stage; Fw: Flowering stage); (B) Expression of *OsPR10A* in seeds during germination; (C) Expression of *OsPR10A* in tissues during flowering stage (Sp: Spike; Ss: Spike-stalk; An: Anther; Husk: Husk; Low: Lower part of leaf; Mid: Middle part of leaf; Up: Upper part of leaf); (D) Expression of *OsPR10A* in seedling and flag leaf

2.2 OsPR10A基因的转录分析

为探明OsPR10A基因在水稻不同发育时期和器官中的转录水平,从Rice Genome Annotation Project数据库下载基于RNA-seq的水稻OsPR10A基因的转录数据,按FPKM值列表(表1)。结果表明,OsPR10A基因在幼苗期地上部、20天幼苗的叶片、抽穗后的幼穗和授粉后5天的种子等组织中转录水平相对较高;在抽穗前的幼穗、花药、雌蕊、授粉后10天的种子、授粉后25天的幼胚和胚乳中表达量相对较低,在授粉后10天的种子中检测不到转录信号。将不同组织中蛋白质丰度与其转录水平进行大致比较,结果表明OsPR10A基因的转录和翻译水平在不同组织中差别较大,相关性不高,但都有比较明显的组织特异性。而转录和蛋白质表达丰度的不对应现象并不是特例(Li and Xie, 2011)。

2.3 水稻OsPR10A在非生物胁迫过程中的表达特征

本实验室建立了水稻RiceS-A300样品资源库,收集水稻幼苗胁迫处理的蛋白样品和抗体资源(张剑硕等, 2018)。用OsPR10A特异性抗体对RiceS-A300资源

库样品进行WB分析,发现在正常情况下苗期叶片中OsPR10A不表达;干旱处理(20% PEG6000) 2天后OsPR10A的表达量开始明显上升(图2A); OsPR10A

表1 OsPR10A基因的转录分析

Table 1 Transcriptome analysis of the OsPR10A gene

Library description	FPKM
Shoots	50.1661
Leaves-20 day	144.7290
Pre-emergence inflorescence	4.1989
Post-emergence inflorescence	88.9886
Anther	0.5100
Pistil	2.3483
Seed-5 DAP	77.4876
Seed-10 DAP	0.0000
Embryo-25 DAP	1.5052
Endosperm-25 DAP	2.3371

FPKM: 每百万片段中对应该来自某一基因的每千碱基的片段数目; DAP: 授粉后天数

FPKM: Expected number of fragments per kilobase of transcript sequence per millions base pairs sequenced; DAP: Days after pollination

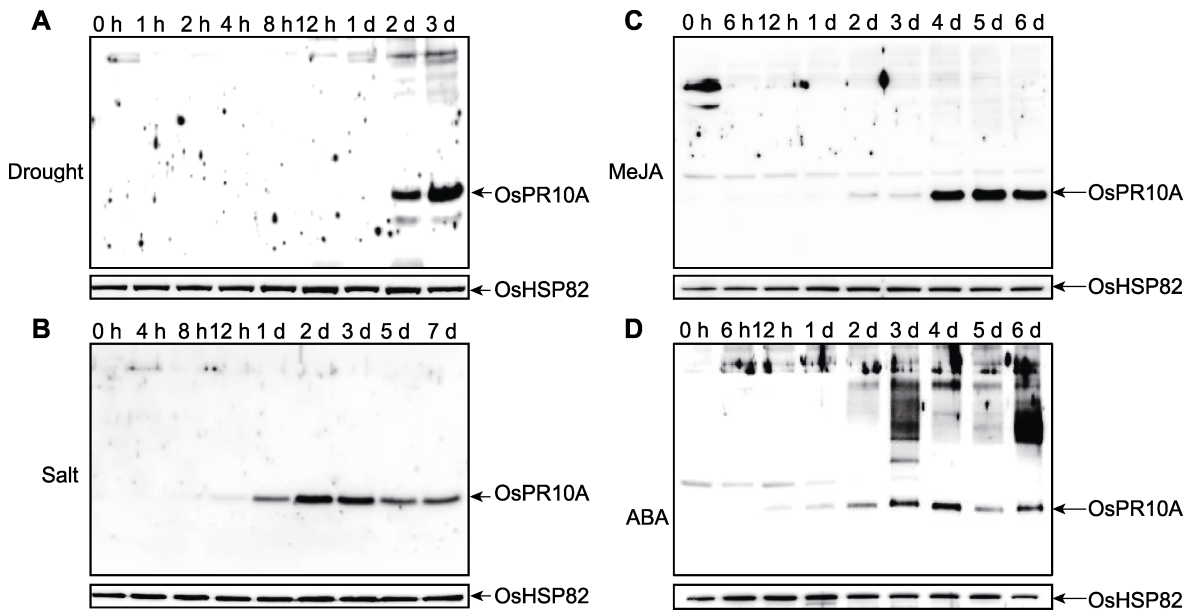


图2 水稻OsPR10A在非生物胁迫下的动态表达 (A) OsPR10A在干旱胁迫下的表达; (B) OsPR10A在盐胁迫下的表达; (C) OsPR10A在外源施加茉莉酸甲酯后的表达; (D) OsPR10A在外源施加脱落酸后的表达。MeJA: 茉莉酸甲酯; ABA: 脱落酸

Figure 2 Dynamic expression of rice OsPR10A under abiotic stress (A) Expression of OsPR10A under drought stress; (B) Expression of OsPR10A under salt stress; (C) Expression of OsPR10A modulated by exogenous MeJA; (D) Expression of OsPR10A modulated by exogenous ABA. MeJA: Methyl jasmonate; ABA: Absciscic acid



的表达丰度从盐处理( $200\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}\text{ NaCl}$ ) 12小时开始上升(图2B)。对水稻离体叶片施加激素处理, 在对照离体叶片中OsPR10A蛋白不表达(数据未显示), 但其表达受MeJA和ABA诱导。OsPR10A的表达量从MeJA处理2天开始上升(图2C), 从ABA处理1天表达量即开始上升(图2D)。OsPR10A表达丰度的变化表明该蛋白可能在干旱和盐胁迫或激素应答过程中发挥作用。对其它逆境(冷害、高温和水淹)处理下的OsPR10A蛋白进行WB分析, 结果未检测到明显的丰度或特征变化(数据未显示)。

## 2.4 超表达OsPR10A转基因水稻的鉴定

通过农杆菌介导法进行水稻转化,  $T_0$ 代获得23个转基因株系, PCR鉴定得到18个阳性株系。收获 $T_0$ 代种子,  $T_1$ 和 $T_2$ 代继续进行PCR鉴定, 取苗期水稻叶片提取基因组DNA, 用含有HA序列的特异性引物进行PCR扩增, 从而判断转基因苗是阴性还是阳性株系。选 $T_1$ 和 $T_2$ 代均不分离的作为纯合株系, 经PCR鉴定阳性

纯合转基因系再进行水稻苗期叶片WB检测(图3)。结果表明, 野生型TP309的PCR和WB结果均为阴性, 4个转基因株系(A721、A726、A728和A730)的PCR和WB检测结果均为阳性, 分别从DNA和蛋白水平证明阳性纯合转基因系的可靠性。WB结果还表明, 苗期超表达植株中OsPR10A表达丰度远高于水稻本底表达。

## 2.5 超表达OsPR10A转基因水稻的表型和农艺性状

对转基因水稻生长发育过程中的农艺性状进行调查(图4A–F)。结果表明, OsPR10A超表达植株的株高(图4C)、穗长(图4D)和结实率(图4E)均低于TP309, 而分蘖数(图4F)与TP309无显著差异。

## 2.6 超表达OsPR10A增强水稻萌发期的耐旱性

在TP309中OsPR10A的表达受干旱和盐胁迫诱导。为了进一步分析其功能, 将OsPR10A超表达植株 $T_3$

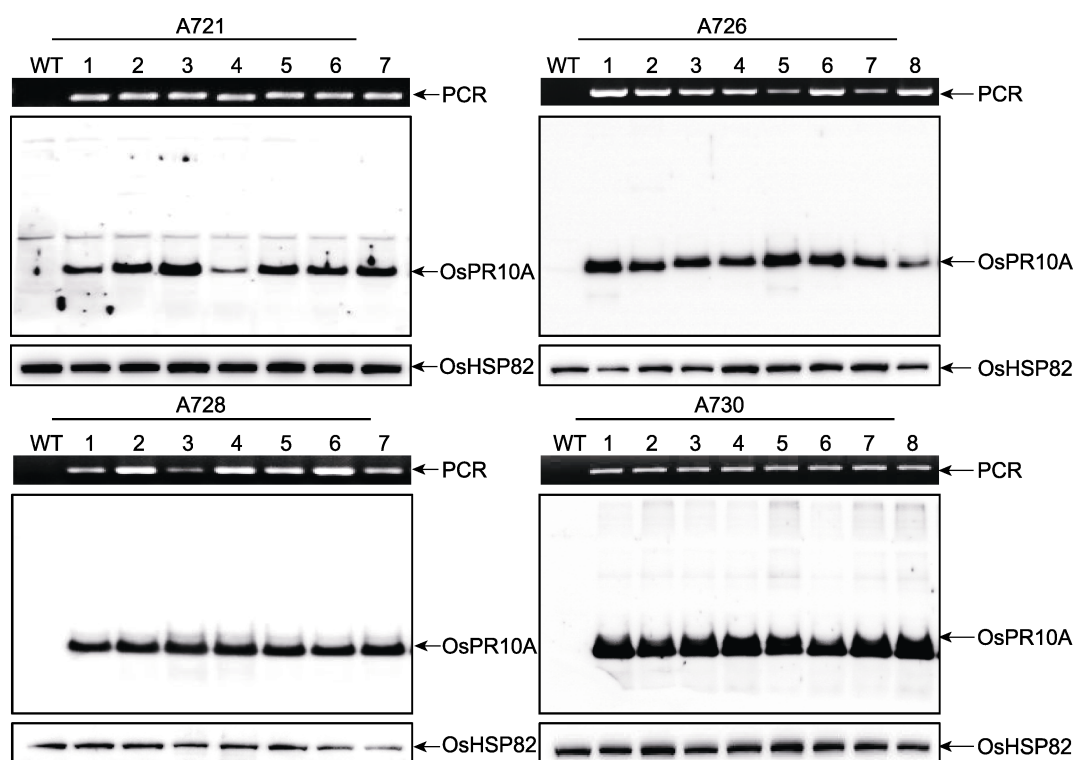


图3 超表达OsPR10A转基因水稻的鉴定

A721、A726、A728和A730分别代表不同转基因株系; 泳道1–7或1–8分别代表同一转基因株系的不同植株; WT: 野生型

Figure 3 Identification of OsPR10A overexpression transgenic rice

A721, A726, A728 and A730 represent different transgenic lines, respectively; Lane 1–7 or 1–8 represent different plants of the same transgenic line, respectively; WT: Wildtype

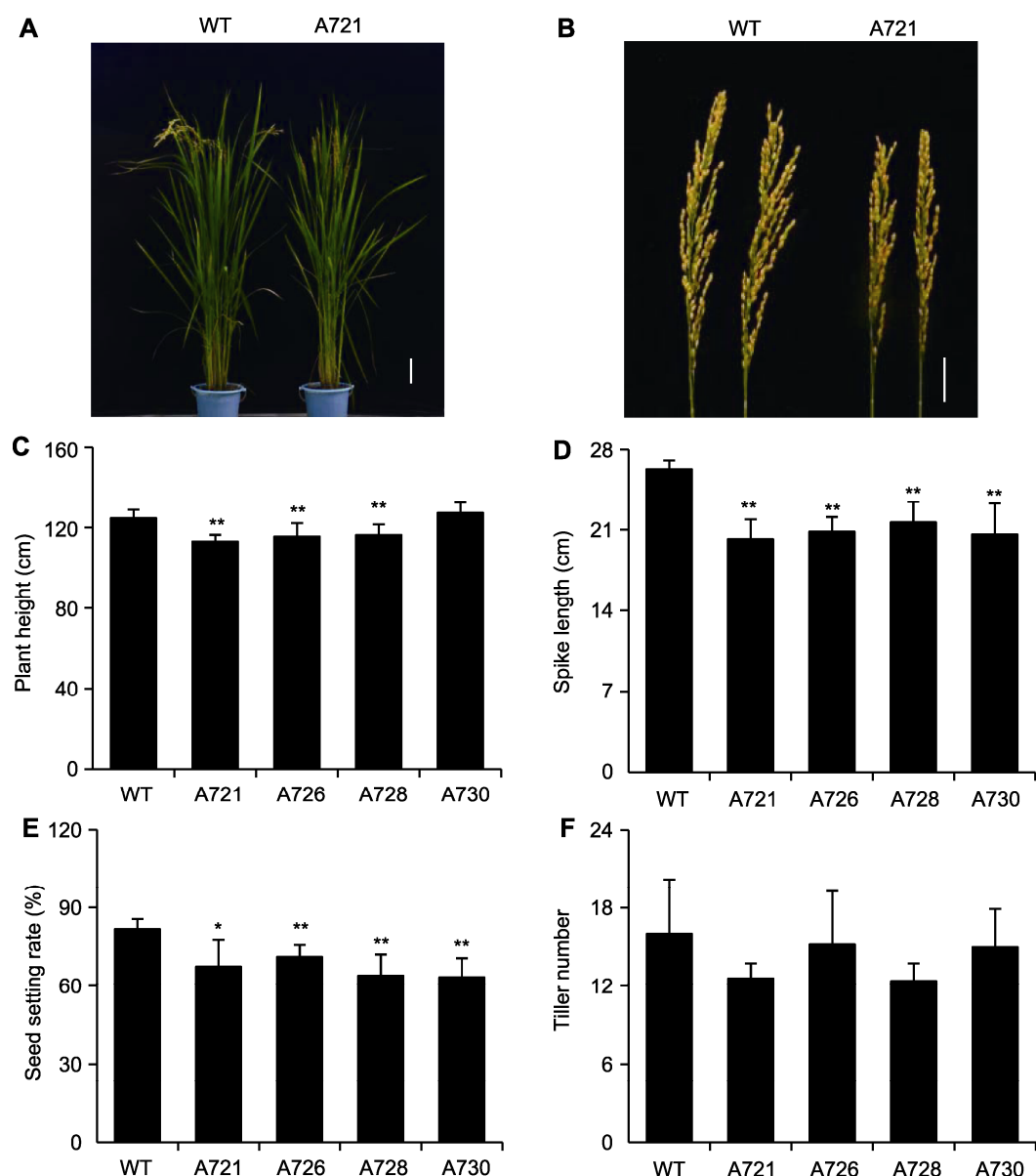


图4 超表达OsPR10A转基因水稻的表型和农艺性状

(A) 成熟期植株(Bar=10 cm); (B) 穗部(Bar=4 cm); (C)–(F) 分别表示株高、穗长、结实率和分蘖数。WT: 野生型。\*  $P<0.05$ ; \*\*  $P<0.01$

Figure 4 Phenotype of OsPR10A overexpression transgenic rice

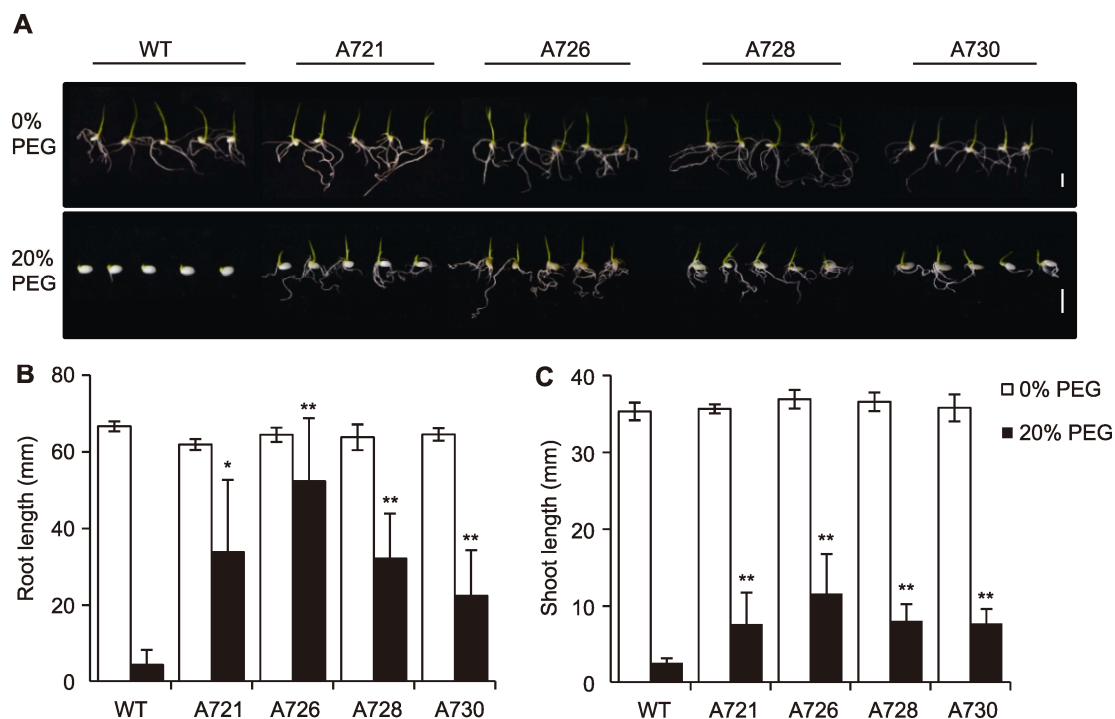
(A) Mature plant (Bar=10 cm); (B) Spike (Bar=4 cm); (C)–(F) Represent plant height, spike length, seed setting rate and tiller number, respectively. WT: Wildtype. \*  $P<0.05$ ; \*\*  $P<0.01$

代和TP309的种子在20% PEG6000处理下进行萌发培养。结果(图5A–C)显示, 20% PEG6000处理下, OsPR10A超表达植株的根长(图5A, B)和芽长(图5A, C)均显著高于野生型, 其生根率也相对较高; 而在对照中, 野生型和超表达株系的根长和芽长差异不大, 表明在种子萌发阶段, 超表达OsPR10A增强了水稻的耐旱性。对超表达OsPR10A的转基因水稻进行苗

期盐胁迫, 未检测到与野生型的明显差异, 可能有更多元件参与对盐胁迫的耐受性, 仅超表达OsPR10A不足以产生明显的效果。

## 2.7 讨论

水稻基因组中有近千个PR基因, 约占水稻注释基因的2% (窦世娟等, 2014), 研究PR基因功能具有重要



**图5** 超表达OsPR10A增强水稻种子萌发期的耐旱性

(A) 干旱处理(20% PEG6000) 7天萌发后的水稻种子(Bar=1 cm); (B) 根长; (C) 芽长。WT: 野生型。\*  $P<0.05$ ; \*\*  $P<0.01$

**Figure 5** Overexpression of OsPR10A enhanced the drought tolerance at rice seed germination stage

(A) The germinated rice seeds at 7 days treated with 20% PEG6000 (Bar=1 cm); (B) Root length; (C) Shoot length. WT: Wild-type. \*  $P<0.05$ ; \*\*  $P<0.01$

意义。本实验室前期研究表明, *OsPR10A*在水稻-白叶枯病菌(*Xoo*)互作过程中发挥作用。本研究采用WB调查了*OsPR10A*蛋白在水稻多种组织中的表达特征,发现*OsPR10A*在干旱、盐胁迫以及MeJA和ABA诱导条件下表达量明显升高,表明其可能在干旱和盐胁迫应答过程中发挥作用。通过转基因获得超表达*OsPR10A*的水稻株系,在水稻种子萌发过程中进行干旱处理,发现*OsPR10A*超表达株系的根长和芽长均显著高于野生型,表明超表达*OsPR10A*可增强水稻种子萌发期的耐旱性。

本研究首先对正常生长和不同逆境处理后的水稻蛋白质表达特征进行系统分析,获得了丰富直观的*OsPR10A*表达信息,发现*OsPR10A*在水稻生长早期通常不表达,而主要在盛株期(分蘖期至衰老期之前)表达。*OsPR10A*在开花期穗、花药和颖壳中的表达量较高(图1C),进一步研究发现超表达*OsPR10A*转基因水稻的结实率相对较低(图5E),表明其表达丰度可能与花药发育及结实率有关。后续可在此基础上开

展更多代表性样品的蛋白质分析,通过逐步积累数据,建立*OsPR10A*蛋白的表达特征数据库。与基因组和转录组信息类似,整合不同蛋白质表达特征形成的数据库将是生物科学领域的又一重要平台,蛋白质的表达部位、丰度及其变化应该是其功能的具体表现形式之一。

通过免疫印迹分析获得表达特征,进而获得功能线索并开展遗传研究,是基于抗体的蛋白质组学的基本思路。与基于质谱的蛋白质组学策略相比,基于抗体的蛋白质组学策略靶向性强、结果直观、灵敏度高、分析过程简便,其基本前提是具备特异性强的抗体。将本研究获得的蛋白表达信息与基于RNA-seq的转录组数据相比,发现二者间的丰度信息有明显的区别。近年来,通过对大量转录组数据和蛋白质组数据进行比较,结果表明二者总体相关性不高(Li and Xie, 2011)。免疫印迹反映蛋白质的表达特征,而转录要通过蛋白质翻译才能发挥作用,因此蛋白质的表达特征与功能的相关性更大。WB研究表明, *OsPR10A*在



干旱和盐胁迫处理过程中表达上调,而在其它逆境胁迫下表达变化不明显,暗示其在干旱和盐胁迫应答过程中发挥正调控作用。对超表达OsPR10A植株进行萌发期干旱胁迫,结果表明超表达植株对干旱胁迫的耐受性增强。后续将对超表达OsPR10A植株进行苗期、分蘖期及成熟期等不同时期的耐旱性鉴定。通过系统的WB分析,明确后续遗传实验的方向。

最初报道的PR基因功能大都与抗病相关,近年来发现PR基因在抵御非生物胁迫中也行使功能。OsPR10A启动子驱动的GUS受磷饥饿、伤害和Xoo侵染的诱导,超表达OsPR10A的水稻和拟南芥在磷饥饿条件下根长明显长于野生型(Huang et al., 2016)。本研究则表明OsPR10A超表达能增强水稻种子萌发期的耐旱性,丰富了人们对OsPR10A功能的认识。

本研究还发现,在离体水稻叶片激素处理过程中,OsPR10A的表达丰度受MeJA和ABA诱导,表明该蛋白功能的发挥与JA和ABA的信号转导途径有关。与野生型相比,OsJAZ1超表达植株对干旱敏感,同时对MeJA和ABA表现更为敏感, RNA-seq分析结果表明,在干旱处理下,JA和ABA信号转导途径中许多基因的表达水平在OsJAZ1超表达植株和野生型之间差异显著,表明JA和ABA介导的途径参与水稻对干旱胁迫的抵御(Fu et al., 2017)。水稻转录因子OsZIP23与耐旱性有关,同时也是ABA信号途径和ABA合成的关键调控子(Zong et al., 2016)。水稻OsASR5与水稻耐旱性有关,超表达OsASR5使种子萌发期和萌发后期内源ABA水平增高,对外源施加的ABA也更为敏感(Li et al., 2017)。水稻ABA8ox3是ABA生物合成的关键基因,其转基因RNAi株系耐旱性更强,而超表达株系对干旱胁迫更为敏感(Cai et al., 2015)。本研究中,OsPR10A分别受干旱胁迫和激素(MeJA和ABA)的诱导,推测该蛋白可能通过JA和ABA相关的信号转导途径增强水稻的耐旱性。

研究表明,OsPR10A可受SA、JA、ET和ABA等激素的诱导(Hwang et al., 2008),且OsPR10A启动子687–637之间的WLE1在SA介导的OsPR10A表达中起重要作用(McGee et al., 2001)。RSOsPR10的表达受生物和非生物逆境诱导,并可能受JA诱导(Hashimoto et al., 2004)。本研究检测了激素处理条件下OsPR10A蛋白的表达丰度变化,后续将深入研究JA和ABA等激素如何发挥功能。

综上,本研究采用基于抗体的蛋白质组学策略,通过系统的免疫印迹分析找到了OsPR10A在水稻耐旱过程中可能发挥作用的线索,并通过遗传实验获得了初步证据。研究结果有助于增进人们对水稻OsPR10A蛋白质功能的了解。

## 参考文献

- 白辉, 王宪云, 曹英豪, 李晓明, 李莉云, 陈浩, 刘丽娟, 朱健辉, 刘国振 (2010). 水稻叶绿体蛋白质在生长发育过程中的表达研究. 生物化学与生物物理进展 37, 988–995.
- 窦世娟, 关明俐, 李莉云, 刘国振 (2014). 水稻的病程相关基因. 科学通报 59, 245–258.
- 高庆华, 曾祥然, 贾霖, 牛东东, 李雪姣, 关明俐, 贾盟, 兰金苹, 窦世娟, 李莉云, 刘丽娟, 刘国振 (2013). 水稻病程相关蛋白质在逆境胁迫下的表达研究. 生物化学与生物物理进展 40, 1140–1147.
- 李雪姣, 范伟, 牛东东, 关明俐, 缪刘杨, 史佳楠, 窦世娟, 魏健, 刘丽娟, 李莉云, 刘国振 (2014). 水稻病程相关PR1家族蛋白质在叶片生长及与白叶枯病菌互作反应中的表达. 植物学报 49, 127–138.
- 刘国振, 刘斯奇, 吴琳, 徐宁志 (2011). 基于抗体的水稻蛋白质组学——开端与展望. 中国科学: 生命科学 41, 173–177.
- 刘巧泉, 张景六, 王宗阳, 洪孟民, 顾铭洪 (1998). 根癌农杆菌介导的水稻高效转化系统的建立. 植物生理学报 24, 259–271.
- 魏健, 李莉云, 曹英豪, 刘雨萌, 巩校东, 刘丽娟, 张园园, 刘国振 (2011). 水稻类Tubby蛋白质在叶片生长和白叶枯病抗性反应中的表达. 植物学报 46, 525–533.
- 谢纯政, 刘海燕, 李玲, 梁炫强 (2008). 植物病程相关蛋白PR10研究进展. 分子植物育种 6, 949–953.
- 张剑硕, 马金姣, 张彤, 陈悦, 魏健, 张柳, 史佳楠, 徐珊, 燕高伟, 杜铁民, 窦世娟, 李莉云, 刘丽娟, 刘国振 (2018). 水稻蛋白质样品资源库RiceS-A300的建立与应用. 中国农业科学 51, 3625–3638.
- Agrawal GK, Jwa NS, Rakwal R (2000a). A novel rice (*Oryza sativa* L.) acidic PR1 gene highly responsive to cut, phytohormones, and protein phosphatase inhibitors. *Biochem Biophys Res Commun* 274, 157–165.
- Agrawal GK, Rakwal R, Jwa NS (2000b). Rice (*Oryza sativa* L.) OsPR1b gene is phytohormonally regulated in close interaction with light signals. *Biochem Biophys Res Commun* 278, 290–298.

- Ausubel FM** (2005). Are innate immune signaling pathways in plants and animals conserved? *Nat Immunol* **6**, 973–979.
- Banerjee J, Das N, Dey P, Maiti MK** (2010). Transgenically expressed rice germin-like protein 1 in tobacco causes hyper-accumulation of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and reinforcement of the cell wall components. *Biochem Biophys Res Commun* **402**, 637–643.
- Cai SL, Jiang GB, Ye NH, Chu ZZ, Xu XZ, Zhang JH, Zhu GH** (2015). A key ABA catabolic gene, *OsABA8ox3*, is involved in drought stress resistance in rice. *PLoS One* **10**, e0116646.
- Choi C, Hwang SH, Fang IR, Kwon SI, Park SR, Ahn I, Kim JB, Hwang DJ** (2015). Molecular characterization of *Oryza sativa* WRKY6, which binds to W-box-like element 1 of the *Oryza sativa* pathogenesis-related (*PR*) 10a promoter and confers reduced susceptibility to pathogens. *New Phytol* **208**, 846–859.
- Dansana PK, Kothari KS, Vij S, Tyagi AK** (2014). *OsiSAP1* overexpression improves water-deficit stress tolerance in transgenic rice by affecting expression of endogenous stress-related genes. *Plant Cell Rep* **33**, 1425–1440.
- Datta K, Tu JM, Oliva N, Ona I, Velazhahan R, Mew TW, Muthukrishnan S, Datta SK** (2001). Enhanced resistance to sheath blight by constitutive expression of infection-related rice chitinase in transgenic elite indica rice cultivars. *Plant Sci* **160**, 405–414.
- Duan YB, Zhai CG, Li H, Li J, Mei WQ, Gui HP, Ni DH, Song FS, Li L, Zhang WG, Yang JB** (2012). An efficient and high-throughput protocol for *Agrobacterium*-mediated transformation based on phosphomannose isomerase positive selection in *Japonica* rice (*Oryza sativa* L.). *Plant Cell Rep* **31**, 1611–1624.
- Fu J, Wu H, Ma SQ, Xiang DH, Liu RY, Xiong LZ** (2017). *OsJAZ1* attenuates drought resistance by regulating JA and ABA signaling in rice. *Front Plant Sci* **8**, 2108.
- Hamamouch N, Li CY, Seo PJ, Park CM, Davis EL** (2011). Expression of *Arabidopsis* pathogenesis-related genes during nematode infection. *Mol Plant Pathol* **12**, 355–364.
- Hashimoto M, Kisseleva L, Sawa S, Furukawa T, Komatsu S, Koshiba T** (2004). A novel rice PR10 protein, RSOsPR10, specifically induced in roots by biotic and abiotic stresses, possibly via the jasmonic acid signaling pathway. *Plant Cell Physiol* **45**, 550–559.
- Huang LF, Lin KH, He SL, Chen JL, Jiang JZ, Chen BH, Hou YS, Chen RS, Hong CY, Ho SL** (2016). Multiple patterns of regulation and overexpression of a ribonuclease-like pathogenesis-related protein gene, *OsPR10a*, conferring disease resistance in rice and *Arabidopsis*. *PLoS One* **11**, e0156414.
- Hwang SH, Lee IA, Yie SW, Hwang DJ** (2008). Identification of an *OsPR10a* promoter region responsive to salicylic acid. *Planta* **227**, 1141–1150.
- Kim SG, Kim ST, Wang YM, Yu S, Choi IS, Kim YC, Kim WT, Agrawal GK, Rakwal R, Kang KY** (2011). The RNase activity of rice probenazole-induced protein1 (PBZ1) plays a key role in cell death in plants. *Mol Cells* **31**, 25–31.
- Kim ST, Yu S, Kang YH, Kim SG, Kim JY, Kim SH, Kang KY** (2008). The rice pathogen-related protein 10 (JIOs-PR10) is induced by abiotic and biotic stresses and exhibits ribonuclease activity. *Plant Cell Rep* **27**, 593–603.
- Li GW, Xie XS** (2011). Central dogma at the single-molecule level in living cells. *Nature* **475**, 308–315.
- Li JJ, Li Y, Yin ZG, Jiang JH, Zhang MH, Guo X, Ye ZJ, Zhao Y, Xiong HY, Zhang ZY, Shao YJ, Jiang CH, Zhang HL, An G, Paek NC, Ali J, Li ZC** (2017). *OsASR5* enhances drought tolerance through a stomatal closure pathway associated with ABA and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> signaling in rice. *Plant Biotechnol J* **15**, 183–196.
- Li XM, Bai H, Wang XY, Li LY, Cao YH, Wei J, Liu YM, Liu LJ, Gong XD, Wu L, Liu SQ, Liu GZ** (2011). Identification and validation of rice reference proteins for western blotting. *J Exp Bot* **62**, 4763–4772.
- Liu GZ, Pi LY, Walker JC, Ronald PC, Song WY** (2002). Biochemical characterization of the kinase domain of the rice disease resistance receptor-like kinase XA21. *J Biol Chem* **277**, 20264–20269.
- Liu Q, Li X, Yan SJ, Yu T, Yang JY, Dong JF, Zhang SH, Zhao JL, Yang TF, Mao XX, Zhu XY, Liu B** (2018). *OsWRKY67* positively regulates blast and bacteria blight resistance by direct activation of *PR* genes in rice. *BMC Plant Biol* **18**, 257.
- Luan ZH, Zhou DW** (2015). Screening of rice (*Oryza sativa* L.) *OsPR1b*-interacting factors and their roles in resisting bacterial blight. *Genet Mol Res* **14**, 1868–1874.
- McGee JD, Hamer JE, Hodges TK** (2001). Characterization of a *PR-10* pathogenesis-related gene family induced in rice during infection with *Magnaporthe grisea*. *Mol Plant Microbe Interact* **14**, 877–886.
- Nishizawa Y, Saruta M, Nakazono K, Nishio Z, Soma M, Yoshida T, Nakajima E, Hibi T** (2003). Characterization of transgenic rice plants over-expressing the stress-inducible  $\beta$ -glucanase gene *Gns1*. *Plant Mol Biol* **51**, 143–

152.

- Nürnberg T, Brunner F, Kemmerling B, Piater L (2004). Innate immunity in plants and animals: striking similarities and obvious differences. *Immunol Rev* **198**, 249–266.
- Pandey A, Mann M (2000). Proteomics to study genes and genomes. *Nature* **405**, 837–846.
- Ponciano G, Yoshikawa M, Lee JL, Ronald PC, Whalen MC (2006). Pathogenesis-related gene expression in rice is correlated with developmentally controlled *Xa21*-mediated resistance against *Xanthomonas oryzae* pv. *Oryzae*. *Physiol Mol Plant Pathol* **69**, 131–139.
- Seo PJ, Lee AK, Xiang FN, Park CM (2008). Molecular and functional profiling of *Arabidopsis* Pathogenesis-related genes: insights into their roles in salt response of seed germination. *Plant Cell Physiol* **49**, 334–344.
- Takeuchi K, Gyohda A, Tominaga M, Kawakatsu M, Hatakeyama A, Ishii N, Shimaya K, Nishimura T, Riemann M, Nick P, Hashimoto M, Komano T, Endo A, Okamoto T, Jikumaru Y, Kamiya Y, Terakawa T, Koshiba T (2011). RSOsPR10 expression in response to environmental stresses is regulated antagonistically by jasmonate/ethylene and salicylic acid signaling pathways in rice roots. *Plant Cell Physiol* **52**, 1686–1696.
- Takeuchi K, Hasegawa H, Gyohda A, Komatsu S, Okamoto T, Okada K, Terakawa T, Koshiba T (2016). Overexpression of *RSOsPR10*, a root-specific rice *PR10* gene, confers tolerance against drought stress in rice and drought and salt stresses in bentgrass. *Plant Cell Tissue Organ Cult* **127**, 35–46.
- Thakur P, Kumar S, Malik JA, Berger JD, Nayyar H (2010). Cold stress effects on reproductive development in grain crops: an overview. *Environ Exp Bot* **67**, 429–443.
- Uhlén M, Björling E, Agaton C, Szigyarto CAK, Amini B, Andersen E, Andersson AC, Angelidou P, Asplund A, Asplund C, Berglund L, Bergström K, Brumer H, Cerjan D, Ekström M, Elobeid A, Eriksson C, Fagerberg L, Falk R, Fall J, Forsberg M, Björklund MG, Gumbel K, Halimi A, Hallin I, Hamsten C, Hansson M, Hedhammar M, Hercules G, Kampf C, Larsson K, Lindskog M, Lodewyckx W, Lund J, Lundeberg J, Magnusson K, Malm E, Nilsson P, Ödler J, Oksvold P, Olsson I, Öster E, Ottosson J, Paavilainen L, Persson A, Rimini R, Rockberg J, Runeson M, Siverthsson Å, Skölleremo A, Steen J, Stenvall M, Sterky F, Strömberg S, Sundberg M, Tegel H, Tourle S, Wahlund E, Waldén A, Wan JH, Wernérus H, Westberg J, Wester K, Wrethagen U, Xu LL, Hober S, Pontén F (2005). A human protein atlas for normal and cancer tissues based on antibody proteomics. *Mol Cell Proteomics* **4**, 1920–1932.
- Wang NL, Xiao BZ, Xiong LZ (2011). Identification of a cluster of *PR4*-like genes involved in stress responses in rice. *J Plant Physiol* **168**, 2212–2224.
- Wu JN, Kim SG, Kang KY, Kim JG, Park SR, Gupta R, Kim YH, Wang YM, Kim ST (2016). Overexpression of a pathogenesis-related protein 10 enhances biotic and abiotic stress tolerance in rice. *Plant Pathol J* **32**, 552–562.
- Wu Q, Hou MM, Li LY, Liu LJ, Hou YX, Liu GZ (2011). Induction of pathogenesis-related proteins in rice bacterial blight resistant gene *XA21*-mediated interactions with *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. *J Plant Pathol* **93**, 455–459.
- Zong W, Tang N, Yang J, Peng L, Ma SQ, Xu Y, Li GL, Xiong LZ (2016). Feedback regulation of ABA signaling and biosynthesis by a bZIP transcription factor targets drought-resistance-related genes. *Plant Physiol* **171**, 2810–2825.

## Expression Characterization of Rice OsPR10A and Its Function in Response to Drought Stress

Tong Zhang<sup>1</sup>, Yalu Guo<sup>1,2</sup>, Yue Chen<sup>1</sup>, Jinjiao Ma<sup>1</sup>, Jinping Lan<sup>1,3</sup>, Gaowei Yan<sup>1</sup>, Yuqing Liu<sup>1</sup>  
Shan Xu<sup>1</sup>, Liyun Li<sup>1</sup>, Guozhen Liu<sup>1\*</sup>, Shijuan Dou<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>College of Life Sciences, Hebei Agricultural University, Baoding 071001, China; <sup>2</sup>Agricultural Genomics Institute at Shenzhen, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Shenzhen 518116, China; <sup>3</sup>Research Center for Life Sciences, Hebei North University, Zhangjiakou 075000, China

**Abstract** In this study, we surveyed the expression patterns of rice OsPR10A protein by using western blot analysis for protein samples extracted from different tissues at different developmental stages and a variety of abiotic stresses. The expression of OsPR10A was upregulated significantly under drought, salt stress and hormone treatments such as methyl jasmonate and abscisic acid, which suggests that OsPR10A protein plays a role in drought and salt stress response. To test this hypothesis, we constructed a vector for overexpression of OsPR10A protein and obtained homozygous transgenic lines via *Agrobacterium*-mediated rice transformation. Phenotypic investigation in field experiments revealed shorter plant height and spike length as well as lower seed setting rate in transgenic lines than controls. At seed germination stage, drought stress treatment was applied by using 20% PEG6000. Root and shoot length was significantly longer in OsPR10A overexpression lines than the wild-type control, which supports that overexpression of OsPR10A protein enhanced the drought tolerance of rice during germination. The study increases our understanding of the function of rice OsPR10A protein.

**Key words** rice, drought stress, pathogenesis-related protein, western blot, antibody-based proteomics

Zhang T, Guo YL, Chen Y, Ma JJ, Lan JP, Yan GW, Liu YQ, Xu S, Li LY, Liu GZ, Dou SJ (2019). Expression characterization of rice OsPR10A and its function in response to drought stress. *Chin Bull Bot* **54**, 711–722.

---

\* Authors for correspondence. E-mail: gzliu@hebau.edu.cn; dsj75@126.com

(责任编辑: 朱亚娜)