

· 研究报告 ·

水稻突变体 $pe-1$ 对弱光胁迫的响应机制

黄佳慧, 杨惠敏, 陈欣雨, 朱超宇, 江亚楠, 胡程翔, 连锦瑾
芦涛, 路梅, 张维林*, 饶玉春*

浙江师范大学生命科学学院, 金华 321004

摘要 以 γ 射线诱变籼稻双科早(*Oryza sativa* subsp. *indica* cv. 'Shuangkezao')获得的早熟鲜绿突变体 $pe-1$ 为实验材料, 在三叶期和分蘖期进行弱光胁迫, 探讨 $pe-1$ 与野生型在形态特征、非生物胁迫相关酶活性及其调控基因表达量、叶绿素含量、叶绿体合成与降解及光形态建成相关基因表达对弱光响应的差异。结果表明, 与野生型相比, 弱光胁迫后, $pe-1$ 叶片黄化程度显著降低, 株高和叶面积显著增加; 三叶期和分蘖期的叶片中不同叶绿素含量变化不同。此外, $pe-1$ 叶绿素含量增加, 且其抗氧化应激反应相关酶过氧化氢酶(CAT)和过氧化物酶(POD)的活性及相关基因的表达量均高于野生型, 表明在弱光胁迫下 $pe-1$ 活性氧清除能力增强, 适应能力更强。 $pe-1$ 的光形态建成相关基因表达量高于野生型, 表明弱光处理下 $pe-1$ 的光接收能力更强。综上, $pe-1$ 突变体具有抵御弱光胁迫的潜力, 该结果有助于耐弱光水稻品种的选育。

关键词 水稻, $pe-1$, 弱光胁迫, 光形态建成, 叶绿素, 叶绿体合成与降解

黄佳慧, 杨惠敏, 陈欣雨, 朱超宇, 江亚楠, 胡程翔, 连锦瑾, 芦涛, 路梅, 张维林, 饶玉春 (2024). 水稻突变体 $pe-1$ 对弱光胁迫的响应机制. 植物学报 59, 574–584.

光照是影响水稻(*Oryza sativa*)形态建成的重要环境因子, 对水稻产量的影响举足轻重(陈小玲和陈清西, 2014)。目前, 我国水稻主产区包括东北、长江中下游及华南地区, 后两者为南方水稻多熟种植的核心区域, 其水稻生产状况对全国水稻总产量影响显著(严如玉等, 2023; 陈宇彬, 2023)。在全球气候变化的背景下, 长江中下游及华南地区呈暖湿化趋势, 日照时数减少, 加之温室种植技术的广泛应用, 使水稻日益面临弱光胁迫(张彩霞, 2016)。

弱光环境对植物光形态建成具有显著影响。例如, 温室培养导致光合有效辐射强度降低、光质改变, 进而影响光合作用, 甚至出现叶片黄化脱落、籽粒发育缓慢等问题(薛伟等, 2011)。为保障作物的品质与产量, 育种专家聚焦水稻在弱光胁迫下植株生理生化响应的相关研究。李学孚等(2015)发现植物对弱光环境的适应可表现在叶绿体的结构变化上, 叶绿体中叶绿素含量及不同叶绿素含量的比值可作为植物耐弱光

能力的重要指标(Nikiforou and Manetas, 2011)。彭琦和杨柳青(2022)发现弱光条件下水稻Chla和Chlb含量均增加, 但Chla/Chlb比值有所下降。陈德良等(2016)研究表明, Chla/Chlb比值能够反馈捕光色素复合体(light-harvesting complex II, LHCII)与其它色素蛋白复合体的相对含量。此外, 弱光胁迫也使植物出现活性氧代谢失衡等细胞损伤。研究发现, 遮荫处理后植株丙二醛(malondialdehyde, MDA)含量及过氧化氢酶(catalase, CAT)和过氧化物酶(peroxidase, POD)活性均有所增高, 而水稻叶片中活性氧清除主要依赖CAT (种培芳, 2003; 刘利等, 2012)。

挖掘水稻耐弱光相关基因, 探究水稻弱光环境下有机物合成相关分子进程对于缓解南方部分地区弱光胁迫造成的水稻品质和产量下降具有重要意义。本研究通过 γ 射线诱变籼稻双科早(*O. sativa* subsp. *indica* cv. 'Shuangkezao')获得1株早熟鲜绿突变体, 将其命名为 $pe-1$ (*precocious emerald-1*), 进一步对

收稿日期: 2024-03-11; 接受日期: 2024-05-07

基金项目: 浙江省自然科学基金重点项目(No.LZ23C130003)、2024年国家级大学生创新创业训练计划和2024年浙江省大学生科技创新活动计划暨新苗人才计划

* 通讯作者。E-mail: wzhangwhu@163.com; ryc@zjnu.cn

野生型和 *pe-1* 进行遮荫处理, 发现 *pe-1* 耐弱光能力增强。在三叶期和分蘖期分别测定野生型和 *pe-1* 叶绿素、MDA 和脯氨酸(proline, Pro)含量以及CAT和POD活性, 揭示 *pe-1* 耐弱光胁迫的机制, 以期为选育适应低光及温室环境的优质水稻品种奠定基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

水稻突变体 *pe-1* 由 γ 射线诱变籼稻双科早(*Oryza sativa* L. subsp. *indica* cv. 'Shuangkezaos')获得, 经连续3代自交, 其早熟鲜绿性状稳定。

1.2 实验方法

1.2.1 主要形态指标测定

分别取10株野生型和突变体 *pe-1* 幼苗, 用精确度为1 mm的直尺测量幼苗株高(从根茎交界处到顶部的距离)、叶片长度和宽度, 计算平均值。

1.2.2 弱光胁迫处理

分别在三叶期和分蘖期设置自然光照和25%遮光处理(采用透光率为75%的遮阳网模拟低光照环境)(王学春等, 2021)。处理7天后, 比较野生型和 *pe-1* 各生理指标变化, 综合判断二者抗弱光胁迫能力。

1.2.3 叶片生理特性分析

叶色表型观察: 取胁迫后的野生型和 *pe-1* 叶片, 观察叶色差异。

叶绿体自发荧光观察: 取胁迫后的野生型和 *pe-1* 叶片, 置于激光共聚焦显微镜下, 在561 nm激发光下观察叶绿体自发荧光。叶绿体自发荧光使用mcherry通道(最大激发光和吸收光分别为587和610 nm)进行观察, 设置pinhole为1 AU, gain值为650。

二氨基联苯胺(diaminobenzidine, DAB)染色: 取胁迫后的野生型和 *pe-1* 相同部位叶片, 浸入0.5 mg·mL⁻¹ DAB溶液中, 抽真空至叶片完全浸入溶液, 室温过夜染色, 弃DAB溶液, 加入95%乙醇, 80℃水浴脱色, 直至叶片绿色完全褪去, 拍照并记录结果。

1.2.4 叶片光合色素含量测定

参考Wang等(2016)的方法测定叶片光合色素含量。称取0.2 g叶片, 放入10 mL离心管中, 加入5 mL无水

乙醇溶液。设置3个重复。在4℃冰箱中避光保存24小时, 浸提光合色素, 直至叶片全部变白, 期间摇晃离心管数次。浸提后, 3 000 ×g离心10分钟, 取上清液, 用酶标仪测定665、649和470 nm处吸光值。利用公式(方希林等, 2017)计算各光合色素含量, 采用t检验进行统计学分析。

叶绿素a (Chla)浓度=(13.95A₆₆₅-6.88A₆₄₉)×V/(W×1 000);

叶绿素b (Chlb)浓度=(24.96A₆₄₉-7.32A₆₆₅)×V/(W×1 000);

类胡萝卜素(Car)浓度=((1 000A₄₇₀-2.05Chla-114Chlb)/245)×V/(W×1 000)。

V为提取液总体积(mL); W为组织鲜重(g)。

1.2.5 抗氧化系统指标测定

丙二醛(MDA)含量测定: 取适量新鲜水稻组织, 采用硫代巴比妥酸(TBA)法测定, 具体步骤参照南京建成植物丙二醛测试盒说明书进行操作。在酶标仪中测定OD₅₃₀。

MDA含量(nmol·g⁻¹)=(A_{测定}-A_{空白})/(A_{标准}-A_{空白})×c_{标准}/W×V_提

c_{标准}为标准品浓度(10 nmol·mL⁻¹); W为组织重量(g); V_提为提取液体积(mL)。

脯氨酸(Pro)含量测定: 取适量新鲜水稻组织, 具体步骤参照索莱宝BC0290脯氨酸含量检测试剂盒说明书进行操作。在酶标仪中测定OD₅₂₀。

Pro含量(μg·g⁻¹)=x×V_提/W

以标准溶液浓度为横坐标, ΔA标准为纵坐标绘制标准曲线, 得到线性回归方程y=kx+b, 将ΔA代入方程得到x (μg·mL⁻¹); V_提为提取液体积(mL); W为组织重量(g)。

过氧化物酶(POD)活性测定: 取适量新鲜水稻组织, 具体步骤参照索莱宝BC0090过氧化物酶活性检测试剂盒说明书进行操作。在酶标仪中测定OD₄₇₀30秒(A₁)和90秒(A₂)的吸光值, ΔA=A₂-A₁。

POD活性(U·g⁻¹)=ΔA×V_{反总}/(W×V_样/V_{样总})/0.01/T=7 133×ΔA

V_{反总}为反应体系总体积(1.07 mL); W为样本质量(g); V_样为样本体积(0.015 mL); V_{样总}为提取液体积(1 mL); T为反应时间(60秒)。

过氧化氢酶(CAT)活性测定: 取适量新鲜水稻组

织,具体步骤参照索莱宝BC0205过氧化氢酶活性检测试剂盒说明书进行操作。在酶标仪中测定OD₂₄₀初始吸光值(A₁)和60秒后吸光值(A₂), ΔA=A₁-A₂。

CAT活性(U·g⁻¹)=(ΔA×V_{反应}/(ε×d)×10⁶)/(W×V_样/V_{样总})/T=459×ΔA/W

V_{反应}为反应体系总体积(2×10⁻⁴ L); ε为H₂O₂摩尔消光系数(43.6 L·mol⁻¹·cm⁻¹); d为比色皿光径(1 cm); W为样本质量(g); V_样为样本体积(0.01 mL); V_{样总}为提取液体积(1 mL); T为反应时间(60秒)。

1.2.6 基因表达量测定

在三叶期和分蘖期,取胁迫后的野生型与*pe-1*叶片,利用植物总RNA提取试剂盒(RNAPrep Pure Plant Kit, TIANGEN)提取植株总RNA,用HiFiScript cDNA Synthesis Kit试剂盒(康为世纪)逆转录为cDNA,并用实时荧光定量PCR (quantitative real-time PCR, qRT-PCR)检测野生型和*pe-1*植株中光形态建成、叶绿体合成与降解以及防御相关基因的表达水平。以*OsActin*为内参基因,每样品设4个生物学重复。PCR反应体系总体积为10 μL,具体见表1,反应程

序见表2,所用引物见表3。采用2^{-ΔΔCT}法(Livak and Schmittgen, 2001)计算基因相对表达量。采用Excel和SPSS 21.0软件进行数据分析,用*t*检验进行数据间差异显著性比较(*P*<0.05表示差异显著, *P*<0.01

表1 PCR反应体系

Table 1 PCR reaction system

Component	Volume (μL)
500 ng·μL ⁻¹ cDNA	1
10 μmol·L ⁻¹ forward primer	1
10 μmol·L ⁻¹ reverse primer	1
ddH ₂ O	2
2× SYBR Mix	5

表2 PCR反应程序

Table 2 PCR reaction procedure

Reaction temperature (°C)	Function	Reaction time	Cycle number
95	Predegeneration	5 min	1
95	Denaturation	5 s	39
55	Annealing	20 s	
72	Extension	20 s	
72	Final extension	10 min	1
15	Hold	Indefinite	1

表3 qRT-PCR所用引物序列

Table 3 Primer sequences for qRT-PCR

Traits	Primer name	Forward primer (5'-3')	Reverse primer (5'-3')
Chloroplast synthesis and degradation	<i>OsActin</i>	TGGCATCTCAGCACATTCC	TGCACAATGGATGGGTCCAGA
	<i>LOC_Os03g20700</i>	GGGAACCTGGCGTTTCATTA	TCAAATGTCTTGCGTTGCTC
	<i>LOC_Os03g59640</i>	AAAGAATGGCTCGAAAAGCA	GCCACCACATGGTAGCTTCT
	<i>LOC_Os08g06630</i>	TGGATCAACAAGCATTTCCA	GACAACCCGAATTGTCTGCT
	<i>LOC_Os03g19510</i>	GACCCGTGGAGGATGATATG	GCTGTATCGCTTCCCTTTTG
	<i>LOC_Os03g27770</i>	ACCGACGTCGCCTATGTTTA	TATAGCCACCCCTCCAGTTG
	<i>LOC_Os05g28200</i>	AAGCAGAATGGATGGATTGG	GAGTGACTGAAGCCCCAGAG
	<i>LOC_Os03g45194</i>	TGGTGCAACGAAGAGAAGTG	ACGAGATAATCCGCAACCAC
Enzyme activity	<i>LOC_Os06g07210</i>	AAGCAAATCTGCTGGAGGAA	AAAAATATCCGCATGCCAAG
	<i>LOC_Os02g02400</i>	GGCGTCAACACCTACACCTT	GTGGAACCTCTCCTCCTCCT
	<i>LOC_Os06g51150</i>	GTGAATGCACCAAAATGTGC	CCAGCCTGTTGAAAATTGTT
	<i>LOC_Os03g03910</i>	CCACCACAACAACCACTACG	AGTGCGTCGATCCATCTCTT
	<i>LOC_Os03g57220</i>	CCTCTGGAGCTGAGGATGAG	CCCTGGCTGTTGCATACTCT
	<i>LOC_Os04g53210</i>	GGCTGAATTGGCTGGTTTTA	GTCCGTCCAAGACAGAGAGC
	<i>LOC_Os07g05820</i>	ATTGCGCTTACGGTGGATAC	GATCACTCCCTTACCAGGA
	<i>LOC_Os01g17260</i>	GGAAGACACCAGCTGAGAGG	CAAGAGACCCAGCCAATGTT
Photomorphogenesis	<i>LOC_Os05g11510</i>	GAGCCACGCGTACTTCTTCT	GGTGGTCGCTCTTGATG
	<i>LOC_Os02g10860</i>	GCCAAAAAGCTCTCATGGTC	GGAAGGAGAAGGGATCGAAG
	<i>LOC_Os03g51030</i>	AAGAGCTTGCCTTGGAATGA	GGGACAGTTGCTGTTTCCAT
	<i>LOC_Os03g19590</i>	CTCGCTACTCCGAGAACAC	AGGATGGCGTAGAAGGGTTT
	<i>LOC_Os02g36380</i>	CGTCTACGTCAGAGGCATCA	CTTCCCAGCCTGTTGTCAAT
	<i>LOC_Os04g37920</i>	GATGAAGCAGCTTGTGTGGA	AACAAGGGGGTAACCAGTCC
	<i>LOC_Os06g40080</i>	TCAAGGAACAGGGTCACACA	TGCCCTCCCATTGTAGAAC

表示差异极显著)。酶活性相关基因包括 *CATA*、*CATB*、*CATC*、*GLO1*、*GLO3*、*GLO4*和*ZIP03*; 叶绿体合成与降解相关基因包括*ChlH*、*ChlD*、*SIG1*、*ClpP5*、*OsHO2*、*YGL1*、*NOL*和*RNRL1*; 光形态建成相关基因包括*BBX14*、*HY5L1*、*PHYA*、*PHYB*、*CRY1a*、*CRY1b*和*Se5*。

2 结果与讨论

2.1 弱光胁迫对水稻叶片生理指标的影响

在正常光照条件下, 出苗7天后 *pe-1* 就出现明显的表型变化, 叶片颜色呈鲜嫩黄色。但经过7天25%遮光处理后, 野生型和 *pe-1* 叶片边缘均出现焦黄色, 野生型叶尖皱缩发卷(图1A)。分蘖期, 弱光胁迫后野生型叶色为淡黄色且略微皱缩(图1B)。

在激光共聚焦显微镜下观察叶绿体自发荧光, 发现经遮光处理后, 三叶期水稻叶片气孔周围部分红色荧光消失(图1E, F), 表明叶绿体死亡, 且野生型叶绿

体死亡范围较 *pe-1* 大。分蘖期野生型叶绿体自发荧光较 *pe-1* 更暗(图1G, H), 说明其叶绿体数量少。

为探明 *pe-1* 突变体响应弱光胁迫的生化机制, 我们评估了弱光条件下野生型和 *pe-1* 突变体的氧化损伤情况。DAB染色结果显示(图1C, D), 在三叶期, 弱光胁迫后野生型较 *pe-1* 积累更多的过氧化氢。而在分蘖期, 弱光胁迫后野生型产生更大且更多的棕色沉淀, 表明在分蘖期受弱光胁迫对植株影响更大。综上, 弱光胁迫下野生型水稻较 *pe-1* 受损伤更严重, 且分蘖期是水稻抗过氧化氢积累的关键时期。

2.2 弱光胁迫对水稻表型的影响

通过对三叶期野生型和 *pe-1* 低光照处理后的表型进行观察, 发现二者的株高、叶长和叶宽存在显著或极显著差异(图2)。野生型和 *pe-1* 的株高分别为21.51 cm和31.63 cm, 叶长分别为20.34 cm和29.6 cm, 叶宽分别为2.05 mm和3.09 mm, 表明 *pe-1* 的株高、叶长和叶宽均高于野生型, 增幅分别为47.08%、45.57%

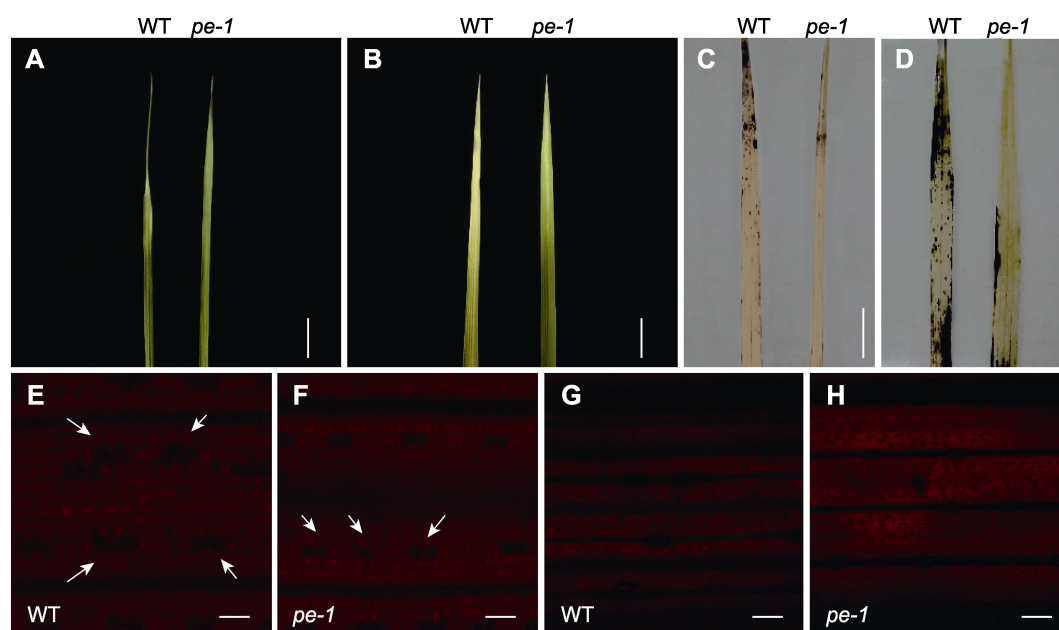


图1 水稻叶片生理表型

(A) 三叶期叶色对比(bar=1.2 cm); (B) 分蘖期叶色对比(bar=2 cm); (C) 三叶期叶片二氨基联苯胺(DAB)染色(bar=1.2 cm); (D) 分蘖期叶片DAB染色(bar=2 cm); (E), (F) 三叶期叶绿体自发荧光(箭头所示) (bars=25 μ m); (G), (H) 分蘖期叶绿体自发荧光 (bars=100 μ m)。WT: 野生型

Figure 1 Physiological phenotype of rice leaves

(A) Comparison of leaf color at the trilobal stage (bar=1.2 cm); (B) Comparison of leaf color at the tillering stage (bar=2 cm); (C) Diaminobenzidine (DAB) staining of leaves at the trilobal stage (bar=1.2 cm); (D) DAB staining of leaves at the tillering stage (bar=2 cm); (E), (F) Arrows indicate chloroplast autofluorescence at the trilobal stage (bars=25 μ m); (G), (H) Chloroplast autofluorescence at the tillering stage (bars=100 μ m). WT: Wild type

和50.24%。但由于遗传效应，分蘖期二者的株高、叶长等农艺性状在正常光照条件下即已不同，难以比较。该表型差异并非由弱光胁迫引起，不在本研究考量范围内。

2.3 弱光胁迫对水稻抗氧化酶活性的影响

对7天弱光胁迫后的野生型水稻和 $pe-1$ 的MDA和Pro含量及POD和CAT活性进行测定，结果表明，在三叶期， $pe-1$ 的MDA含量较野生型低38.05%，Pro含量较野生型高29.06%，POD活性增高37.27%，CAT活

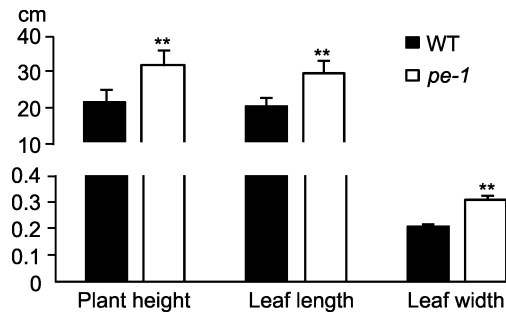


图2 弱光胁迫后三叶期水稻株高、叶长和叶宽

** $P < 0.01$ (Student's t 检验)

Figure 2 Plant height, leaf length and leaf width of rice in the trilobal stage after low light stress

** $P < 0.01$ (Student's t -test)

性降低62% (图3A–D); 在分蘖期， $pe-1$ 除MDA含量与野生型无显著差异(图3E)外，Pro含量及POD和CAT活性均高于野生型，较野生型分别增高44.76%、46.35%和15.94% (图3F–H)。

2.4 弱光胁迫对抗氧化酶相关基因表达的影响

对不同发育时期弱光胁迫7天后的野生型和 $pe-1$ 进行qRT-PCR检测，结果显示，在三叶期， $pe-1$ 的过氧化氢酶调控基因表达量均高于野生型，其中CATA和CATC呈极显著差异。同时发现，在 $pe-1$ 中调控 H_2O_2 产生的备选途径功能酶乙醇酸氧化酶(glycolate oxidase, GLO)基因($GLO1$ 和 $GLO4$)表达量极显著低于野生型，其中 $GLO1$ 和 $GLO4$ 是同工酶且受到协同调控，故二者编码基因的表达量表现出相同趋势(Zhang et al., 2012)。GLO3则呈相反的趋势，在 $pe-1$ 中GLO3表达量极显著高于野生型。此外， $bZIP03$ 编码1个bZIP转录因子，可在盐、高温和干旱胁迫下增强水稻抗氧化酶活性，提高光合参数(Das et al., 2019)。研究表明， $pe-1$ 中 $bZIP03$ 基因的表达量较野生型极显著升高。在分蘖期， $pe-1$ 中CATA、CATB和CATC的表达量极显著高于野生型，但GLO3和ZIP03无显著差异，GLO1和GLO4仍呈降低趋势(图4)。

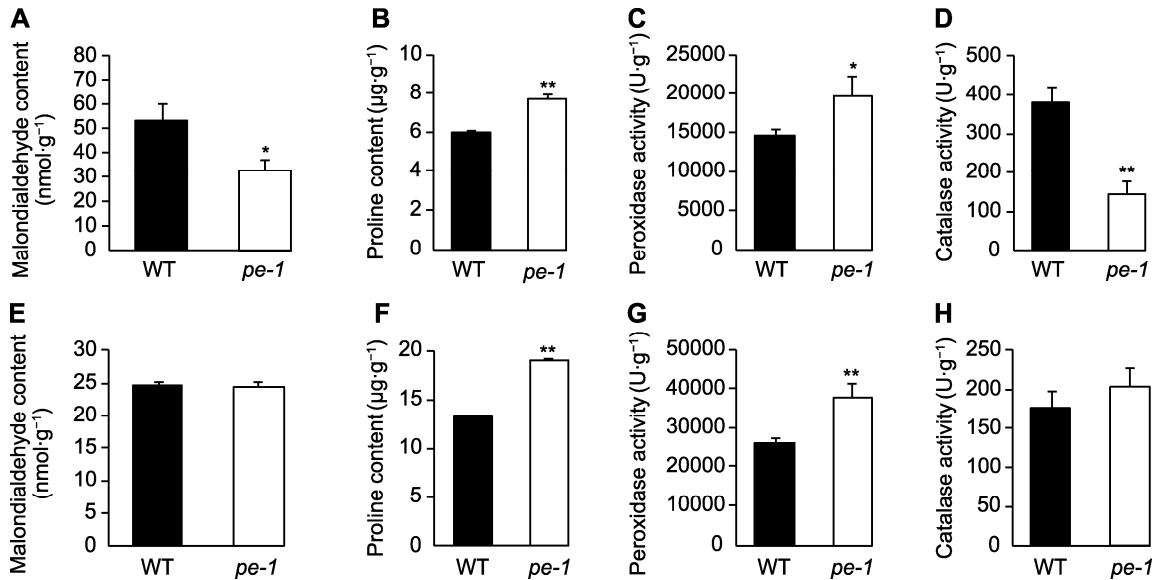


图3 弱光胁迫下水稻叶片抗氧化酶系统

(A)–(D) 三叶期; (E)–(H) 分蘖期。* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$ (Student's t 检验)

Figure 3 Antioxidant enzymes of rice leaves under low light stress

(A)–(D) At the trilobal stage; (E)–(H) At the tillering stage. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$ (Student's t -test)

2.5 弱光胁迫对水稻叶绿素含量的影响

叶绿素含量与水稻光合效率直接相关。为探究 *pe-1* 对弱光胁迫的响应机制, 我们分别测定了 *pe-1* 和野生型在弱光胁迫1、3、5和7天后剑叶的叶绿素含量。结果表明, 在三叶期, 野生型与 *pe-1* 对弱光环境的响应无显著差异, 二者叶绿素 *a*、叶绿素 *b* 和类胡萝卜素含量均呈下降趋势; 弱光胁迫7天后, 野生型和 *pe-1* 的叶绿素 *a* 含量分别下降48.09%和33.24%, 叶绿素 *b* 含量分别下降40.21%和28.91%, 类胡萝卜素含

量分别下降50.59%和47.83%。而在分蘖期, 野生型与 *pe-1* 对弱光环境的响应明显不同; 野生型各叶绿素含量在短时间(1天)胁迫下显著升高, 但在后续胁迫下又持续下降, 弱光胁迫7天后叶绿素含量低于初始值, 即呈现先升后降的趋势; 而 *pe-1* 各叶绿素含量总体呈上升趋势, 表明弱光胁迫下 *pe-1* 的捕光能力更强, 有利于植株长时间应对弱光胁迫。此外, 野生型和 *pe-1* 中叶绿素 *a*/叶绿素 *b* 比值分别下降15.10%和23.02%, 叶绿素 *a* 的增量小于叶绿素 *b* (图5)。

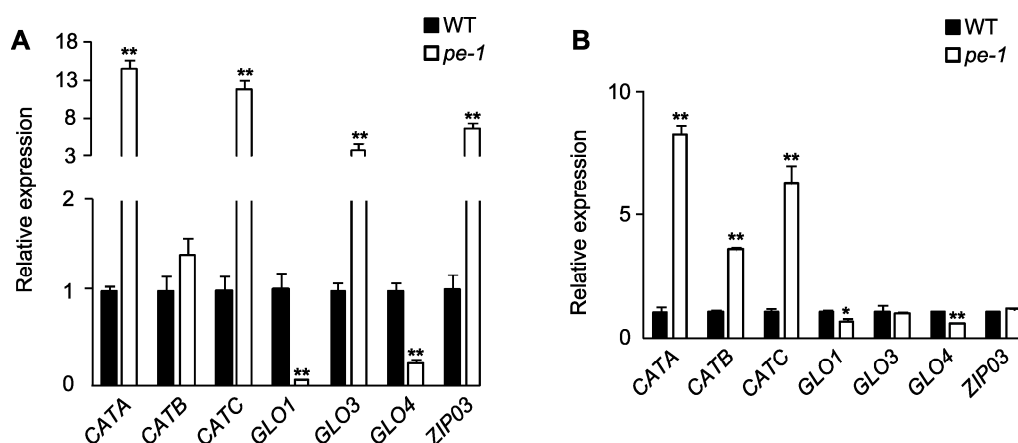


图4 水稻酶活性相关基因表达差异

(A) 三叶期; (B) 分蘖期。* $P<0.05$; ** $P<0.01$ (Student's *t* 检验)

Figure 4 Differences in the expression of enzyme activity related genes in rice

(A) At the trilobal stage; (B) At the tillering stage. * $P<0.05$; ** $P<0.01$ (Student's *t*-test)

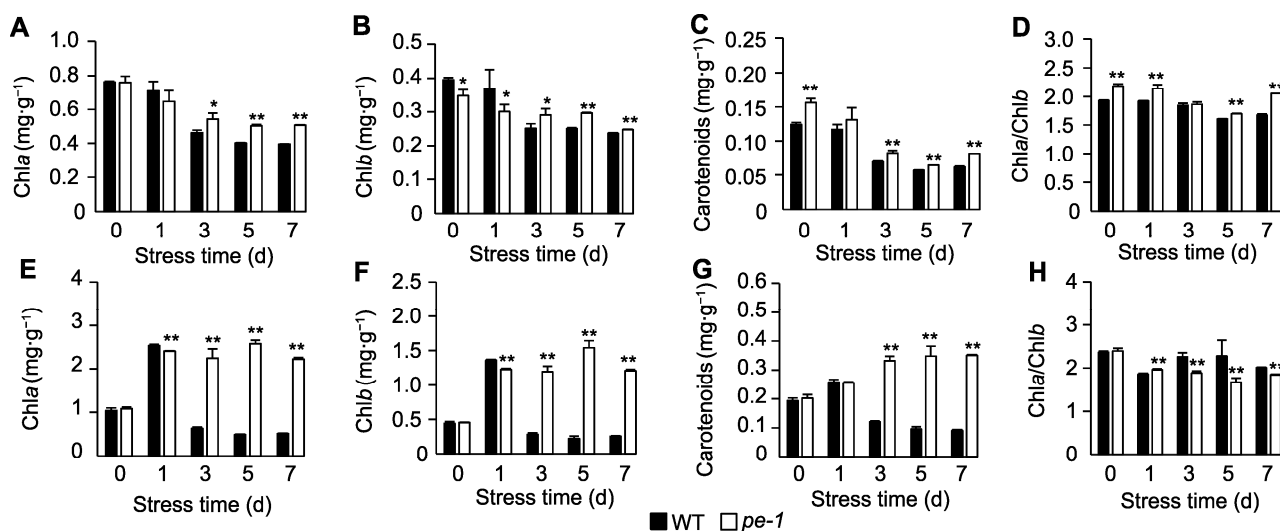


图5 弱光胁迫下水稻叶绿素含量变化

(A)–(D) 三叶期; (E)–(H) 分蘖期。* $P<0.05$; ** $P<0.01$ (Student's *t* 检验)

Figure 5 Changes in chlorophyll content of rice under low light stress

(A)–(D) At the trilobal stage; (E)–(H) At the tillering stage. * $P<0.05$; ** $P<0.01$ (Student's *t*-test)

2.6 弱光胁迫对水稻叶绿体合成相关基因表达的影响

为探明水稻光合系统对弱光胁迫的响应机制,我们分别选取三叶期和分蘖期弱光胁迫后的野生型和*pe-1*剑叶,测定其叶绿体合成相关基因的表达量。qRT-PCR检测结果表明,在三叶期,弱光胁迫后,*pe-1*中叶绿体合成相关基因*ChlH*、*SIG1*、*ClpP5*、*OsHO2*、*YGL1*及*RNRL1*的表达量显著高于野生型,而*ChlD*及*NOL*的表达量较野生型明显降低;在分蘖期,弱光胁迫后,*pe-1*中除*SIG1*基因的表达量显著低于野生型外,其余基因的表达量较野生型均显著升高(图6)。

2.7 弱光胁迫对水稻光形态建成相关基因表达的影响

光形态建成受体包括光敏色素、隐花色素和UV-B受

体。为探究*pe-1*在弱光条件下的光形态建成机制,我们分别对光敏色素和隐花色素相关基因进行qRT-PCR检测。结果显示,在弱光胁迫下,*pe-1*中*BBX14*、*PHYA*、*PHYB*、*CRY1a*及*CRY1b*的表达量极显著高于野生型(图7)。值得注意的是,在三叶期,虽然*HY5L1*在野生型与突变体之间表现出极显著差异,但是在分蘖期该基因均不表达。研究表明,在蓝光下,*BBX14*通过激活*HY5L1*的表达促进水稻的光形态建成(Bai et al., 2019)。而光形态建成是植物依赖光来控制细胞的分化、结构和功能的改变,说明本研究结果与光形态建成的时期有关。

2.8 讨论

2.8.1 弱光胁迫对水稻抗氧化系统的影响

本研究表明,在三叶期和分蘖期*pe-1*中的脯氨酸含量

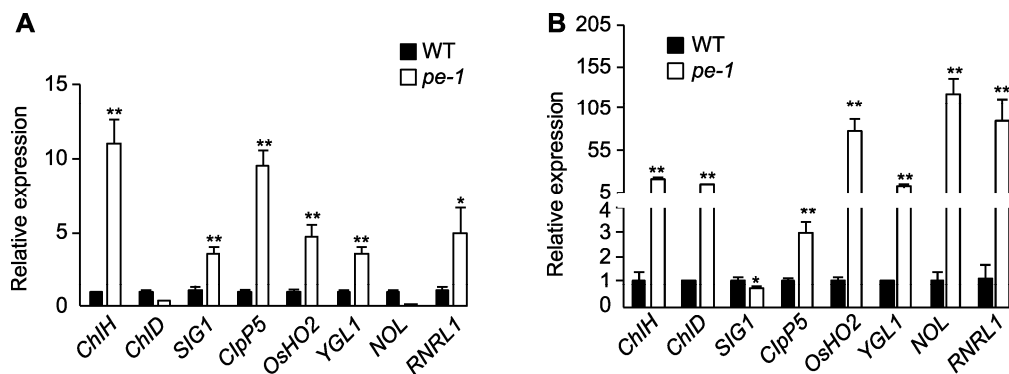


图6 水稻叶绿体合成与降解相关基因表达差异

(A) 三叶期; (B) 分蘖期。* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$ (Student's *t* 检验)

Figure 6 Differences in the expression of genes related to chloroplast synthesis and degradation in rice (A) At the trilobal stage; (B) At the tillering stage. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$ (Student's *t*-test)

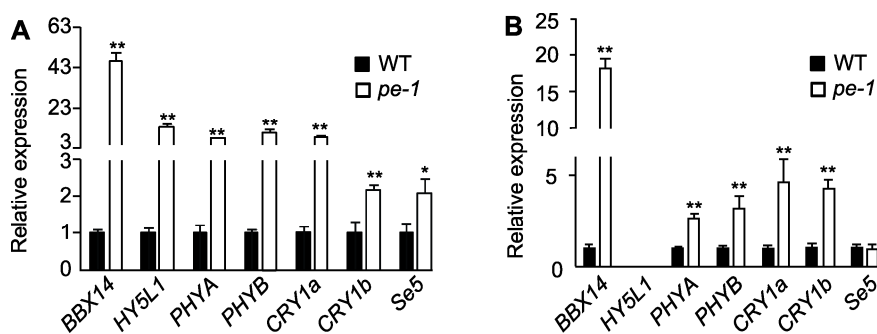


图7 水稻光形态建成相关基因表达差异

(A) 三叶期; (B) 分蘖期。* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$ (Student's *t* 检验)

Figure 7 Differences in the expression of genes related to photomorphogenesis in rice (A) At the trilobal stage; (B) At the tillering stage. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$ (Student's *t*-test)

及过氧化物酶活性均高于野生型, 且DAB染色显示, *pe-1*中的活性氧积累较少, 表明*pe-1*更耐受弱光胁迫。我们还发现, 水稻MDA含量和CAT活性在三叶期和分蘖期表现出不同的变化趋势, 推测是三叶期水稻抗氧化防御系统尚未成熟所致。Zhao等(2018)研究表明, 胁迫条件下植株体内活性氧大量积累, MDA含量增高, 这与*OsCATB*转录显著受抑制导致CAT活性降低密切相关。本研究表明, 三叶期水稻受弱光胁迫后*pe-1*中MDA含量低于野生型, 而CAT活性显著高于野生型, 这与Zhao等(2018)的研究结果一致。本研究表明, 氧化胁迫下, 相较于*pe-1*, 野生型不仅*OsCATB*转录受到强烈抑制, *OsCATA*和*OsCATC*也受到显著抑制。由此推测, 在弱光胁迫导致活性氧积累的同时, *pe-1*产生更多的CAT, 从而分解弱光胁迫产生的过氧化氢, 因此*pe-1*抗氧化胁迫能力更强。

乙醇酸氧化酶(GLO)独立于NADPH氧化酶而发挥作用, 是H₂O₂产生的备选来源。在GLO-CAT复合物中, GLO能够介导产生大量的H₂O₂, 而CAT与H₂O₂亲合度极低, 导致在GLO活性高的植株中过氧化物积累较多, 当H₂O₂突然迸发时会使抗氧化系统崩溃(Zhang et al., 2016)。本研究中GLO编码基因*GLO1*和*GLO4*表现出协同效应, 在不同时期*pe-1*中GLO含量均显著低于野生型, 这与Zhang等(2012)的研究结果一致。由此推测, *pe-1*在弱光胁迫下通过降低GLO基因的表达水平增强CAT与过氧化物及活性氧的亲合力, 进而提高其清除效率, 增强植物的抗氧化能力。

根据基因表达量测定结果, 我们发现在三叶期*pe-1*中*bZIP*转录因子编码基因*OsbZIP03*的表达量相比野生型极显著增高, 分蘖期则无显著差异。Das等(2019)研究表明, 与野生型相比, 过表达*OsHBP1b*的转基因水稻在受到盐、干旱和高温等胁迫时均能保持叶绿素浓度、细胞器结构、光合效率、抗氧化酶活性以及光合作用和胁迫相关基因的表达。但*OsHBP1b*的表达仅在三叶期呈现明显差异, 推测在弱光胁迫下, 该基因主要调控三叶期相关防御系统以提高存活率。

2.8.2 弱光胁迫对水稻叶绿体合成与降解的影响

研究表明, 野生型与*pe-1*的叶绿体合成相关基因表达量对弱光胁迫表现出不同的响应水平, 在不同生育期

表达情况也各不相同。原叶啉IX是叶绿素和血红素生物合成过程最后一步反应的共同前体, 由Mg螯合酶催化Mg²⁺插入原叶啉IX中形成。*ChlH*和*ChlD*分别编码组成Mg螯合酶的2个亚基, 对叶绿体合成具有重要作用。Northern杂交实验表明, 编码Mg螯合酶3个亚基的核基因以及编码LhcbII的核基因在*chl1*突变体中的表达量比野生型高2倍, 表明*ChlD*亚基参与负反馈调节编码叶绿体蛋白的细胞核基因表达(Zhang et al., 2006)。本研究发现, 在三叶期*pe-1*中*ChlD*基因的表达量显著低于野生型, 其它叶绿体合成相关基因表达量则显著升高, 据此推测在弱光条件下植株通过降低*ChlD*表达量正向调节叶绿体蛋白的合成, 进而快速适应弱光胁迫。

*NOL*编码1个叶绿素**b**还原酶, 与捕光复合体和叶绿体基粒的降解密切相关, *nol*突变体的叶绿素**b**降解受到严重抑制, 大部分捕光复合体的异构体被保留下来, 导致叶绿体基粒难以分解(Sato et al., 2009)。研究发现, 三叶期*pe-1*中的*NOL*表达量显著低于野生型, 且通过电镜观察叶绿体自发荧光, 发现三叶期*pe-1*的气孔周围死亡叶绿体数量少于野生型(图1E, F), 推测可能是*pe-1*接受弱光信号后下调*NOL*的表达以抑制叶绿体分解, 从而适应弱光环境。Tsugane等(2006)研究发现, *pyl-stb*突变体在三叶期枯萎死亡, 说明*OsClpP5*是水稻在特定时期发育所必需的叶绿体蛋白酶基因, 且其它*ClpP*基因均不能够替代*OsClpP5*的功能。因此, 该基因在三叶期*pe-1*中对弱光胁迫的响应显著增强。

而分蘖期*pe-1*各叶绿体合成与降解相关基因表达量较野生型均显著增高, 推测可能是分蘖期叶绿体合成与降解机制相对稳定, 但*pe-1*对光信号的响应能力更强, 从而引起基因表达量的大幅变化。综上, 与野生型相比, *pe-1*对弱光胁迫具有不同的响应机制, 有待进一步研究。

2.8.3 弱光胁迫对水稻光形态建成的影响

蓝光和红光是植物生长的最佳光源, 当植物感知更多红光时会释放一种激素阻止叶绿素分解以提高光合转化效率, 而蓝光能够促进植物产生更多叶绿素, 有助于幼苗吸收和利用能量。因此, 红光和远红光受体以及蓝光受体接收光信号的能力与植株的生长状况密切相关。Bai等(2019)研究发现, *OsBBX14*过表达幼

苗对光(特别是蓝光)敏感。本研究中,弱光胁迫下 *pe-1* 植株中 *OsBBX14* 基因表达量较野生型极显著增高,说明其编码蛋白在 *pe-1* 中接受蓝光能力更强,对蓝光更敏感,能够在弱光条件下发挥作用。通常情况下, *OsBBX14* 通过直接或间接调节 *OsHY5L1* 的表达促进水稻光形态建成,二者表达量存在连锁关系(Bai et al., 2019)。这与本研究结果相同。隐花色素(cryptochromes, CRY)也是植物的蓝光受体,介导多种光应答反应。隐花色素基因 *OsCRY1a* 和 *OsCRY1b* 参与蓝光下的光形态建成(Hirose et al., 2012)。本研究表明, *pe-1* 中这2个基因的表达量均高于野生型,这进一步证实蓝光下 *pe-1* 的光接收能力更强。

长期以来,光敏色素一直被认为是植物中感受红光和远红光的唯一受体。光敏色素A基因(*PHYA*)在持续远红光或低辐照条件下影响水稻光形态建成,且 *PHYA* 和 *PHYB* 均介导低辐照度反应诱导的基因表达(Takano et al., 2009)。本研究测定的2种光敏色素基因在 *pe-1* 中的表达量均极显著高于野生型,推测 *pe-1* 的红光和远红光接收利用效率高于野生型,这为其适应弱光逆境奠定了基础。

综上,弱光胁迫下,相较于野生型, *pe-1* 叶绿素合成增加、叶绿体降解滞缓,相关基因表达被激活,抗氧化防御能力增强,且在光感知接收方面表现出显著优势。研究结果为培育耐弱光逆境水稻新品种提供了优异的种质资源并奠定了理论基础。

作者贡献声明

黄佳慧:设计并完成实验,撰写论文;杨惠敏:完成实验;陈欣雨:撰写论文;朱超宇:数据整理与分析;江亚楠,胡程翔:协助完成实验;连锦瑾:数据统计分析;芦涛:技术支持;路梅:修改润色文章;张维林:指导实验设计;饶玉春:审查并修改论文。

参考文献

- 陈德良,陶月良,吴友贵,程瑶,夏家天 (2016). 遮荫对百山祖冷杉光合特性和叶绿素荧光参数的影响. 核农学报 **30**, 2056–2064.
- 陈小玲,陈清西 (2014). 植物弱光逆境生理的研究进展. 北方园艺 (6), 183–187.
- 陈宇彬 (2023). 中国南方水稻复种指数时空演变及驱动机制分析. 硕士论文. 太原:山西财经大学. pp. 19–21.

- 种培芳 (2003). 弱光胁迫对甜瓜(*Cucumis melo* L.)光合特性及生长发育的影响. 硕士论文. 兰州:甘肃农业大学. pp. 20–22.
- 方希林,杨漫,王鑫,黄沆,肖楠,贺治洲,王悦 (2017). 水稻叶色突变体 *ygr* 的遗传分析与基因定位. 核农学报 **31**, 2096–2102.
- 李学孚,倪智敏,吴月燕,李美芹,刘蓉,饶慧云 (2015). 盐胁迫对‘鄞红’葡萄光合特性及叶片细胞结构的影响. 生态学报 **35**, 4436–4444.
- 刘利,王丽,邓飞,黄云,刘代银,任万军,杨文钰 (2012). 遮荫对不同杂交稻组合叶片渗透调节物质含量及保护酶活性的影响. 中国水稻科学 **26**, 569–575.
- 彭琦,杨柳青 (2022). 弱光胁迫对白蟾生理特性的影响. 绿色科技 **24**(15), 179–184, 218.
- 王学春,赵祥,赵长坤,杨国涛,彭友林,胡运高 (2021). 四川常用杂交水稻对弱光胁迫的响应差异及其评价体系构建. 云南大学学报(自然科学版) **43**, 386–394.
- 薛伟,李向义,朱军涛,林丽莎,王迎菊 (2011). 遮荫对疏叶骆驼刺叶形态和光合参数的影响. 植物生态学报 **35**, 82–90.
- 严如玉,甘国渝,赵希梅,殷大聪,李燕丽,金慧芳,朱海,李继福 (2023). 我国水稻优势产区生产格局及施肥现状研究. 中国稻米 **29**(3), 1–8.
- 张彩霞 (2016). 气候变化背景下南方主要种植制度的气候适宜性研究. 硕士论文. 南昌:江西农业大学. pp. 13–18.
- Bai B, Lu NN, Li YP, Guo SL, Yin HB, He YN, Sun W, Li W, Xie XZ (2019). *OsBBX14* promotes photomorphogenesis in rice by activating *OsHY5L1* expression under blue light conditions. *Plant Sci* **284**, 192–202.
- Das P, Lakra N, Nutan KK, Singla-Pareek SL, Pareek A (2019). A unique bZIP transcription factor imparting multiple stress tolerance in rice. *Rice* **12**, 58.
- Hirose F, Inagaki N, Hanada A, Yamaguchi S, Kamiya Y, Miyao A, Hirochika H, Takano M (2012). Cryptochrome and phytochrome cooperatively but independently reduce active gibberellin content in rice seedlings under light irradiation. *Plant Cell Physiol* **53**, 1570–1582.
- Livak KJ, Schmittgen TD (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *Methods* **25**, 402–408.
- Nikiforou C, Manetas Y (2011). Inherent nitrogen deficiency in *Pistacia lentiscus* preferentially affects photosystem I: a seasonal field study. *Funct Plant Biol* **38**, 848–855.
- Sato Y, Morita R, Katsuma S, Nishimura M, Tanaka A, Kusaba M (2009). Two short-chain dehydrogenase/redu-

- ctases, NON-YELLOW COLORING 1 and NYC1-LIKE, are required for chlorophyll *b* and light-harvesting complex II degradation during senescence in rice. *Plant J* **57**, 120–131.
- Takano M, Inagaki N, Xie XZ, Kiyota S, Baba-Kasai A, Tanabata T, Shinomura T** (2009). Phytochromes are the sole photoreceptors for perceiving red/far-red light in rice. *Proc Natl Acad Sci USA* **106**, 14705–14710.
- Tsugane K, Maekawa M, Takagi K, Takahara H, Qian Q, Eun CH, Iida S** (2006). An active DNA transposon *nDart* causing leaf variegation and mutable dwarfism and its related elements in rice. *Plant J* **45**, 46–57.
- Wang YL, Wang CM, Zheng M, Lyu J, Xu Y, Li XH, Niu M, Long WH, Wang D, Wang HY, Terzaghi W, Wang YH, Wan JM** (2016). WHITE PANICLE1, a val-tRNA synthetase regulating chloroplast ribosome biogenesis in rice, is essential for early chloroplast development. *Plant Physiol* **170**, 2110–2123.
- Zhang HT, Li JJ, Yoo JH, Yoo SC, Cho SH, Koh HJ, Seo HS, Paek NC** (2006). Rice *Chlorina-1* and *Chlorina-9* encode ChlD and ChlI subunits of Mg-chelatase, a key enzyme for chlorophyll synthesis and chloroplast development. *Plant Mol Biol* **62**, 325–337.
- Zhang ZS, Lu YS, Zhai LG, Deng RS, Jiang J, Li Y, He ZH, Peng XX** (2012). Glycolate oxidase isozymes are coordinately controlled by *GLO1* and *GLO4* in rice. *PLoS One* **7**, e39658.
- Zhang ZS, Xu YY, Xie ZW, Li XY, He ZH, Peng XX** (2016). Association-dissociation of glycolate oxidase with catalase in rice: a potential switch to modulate intracellular H₂O₂ levels. *Mol Plant* **9**, 737–748.
- Zhao Q, Zhou LJ, Liu JC, Cao ZZ, Du XX, Huang FD, Pan G, Cheng FM** (2018). Involvement of CAT in the detoxification of HT-induced ROS burst in rice anther and its relation to pollen fertility. *Plant Cell Rep* **37**, 741–757.

Response Mechanism of Rice Mutant *pe-1* to Low Light Stress

Jiahui Huang, Huimin Yang, Xinyu Chen, Chaoyu Zhu, Yanan Jiang, Chengxiang Hu
Jinjin Lian, Tao Lu, Mei Lu, Weilin Zhang*, Yuchun Rao*

College of Life Sciences, Zhejiang Normal University, Jinhua 321004, China

Abstract This study utilized the γ -ray-induced early-maturation, fresh-green mutant line *pe-1* from *indica* rice as an experimental material. At the trilobal stage and the tillering stage, we observed differences in morphological characteristics between *pe-1* and wild type. In addition, we measured the activity of antioxidant-related enzymes and their regulatory genes expression, chlorophyll content and chloroplast synthesis and degradation-related gene expression, and photomorphogenesis-related gene expression to detect the differences in the low light response between the *pe-1* and wild type. The results showed that *pe-1* exhibited less leaf yellowing, taller stature, and larger leaf area compared to wild type post-stress. The changes in chlorophyll content differed between leaves at the trilobal stage and the tillering stage. Additionally, *pe-1* resulted in increased chlorophyll content and elevated levels of the stress-responsive enzymes catalase and peroxidase, as well as increased expression of related genes. This indicates enhanced reactive oxygen species scavenging and stronger adaptability to adverse conditions under low light conditions. Moreover, *pe-1* exhibited increased expression levels of genes associated with photomorphogenesis, indicating superior light perception ability under low light intensities. In summary, the *pe-1* mutant shows immense potential for survival under low light stress, contributing to the breeding rice with low light tolerance.

Key words rice, *pe-1*, low light stress, photomorphogenesis, chlorophyll, chloroplast synthesis and degradation

Huang JH, Yang HM, Chen XY, Zhu CY, Jiang YN, Hu CX, Lian JJ, Lu T, Lu M, Zhang WL, Rao YC (2024). Response mechanism of rice mutant *pe-1* to low light stress. *Chin Bull Bot* **59**, 574–584.

* Authors for correspondence. E-mail: wlzhangwhu@163.com; ryc@zjnu.cn

(责任编辑: 白羽红)

通讯作者简介

饶玉春, 博士/博士后, 教授, 博士生导师, “双龙学者”特聘教授, 浙江省“高校领军人才培养计划”高层次拔尖人才(2022年), 金华市青年拔尖人才(2023年), 浙江省发明协会理事、植物遗传专业委员会副主任, 中国作物学会会员, 浙江省遗传学会会员。主要从事水稻等禾谷类作物的分子遗传学研究。以第一作者或通讯作者身份在 *Science Bulletin* 和 *New Phytologist* 等权威期刊上发表论文 80 余篇, 以合作者身份在 *Nature Plants*、*Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 等杂志上发表论文 30 余篇。主持转基因国家重大专项子课题、国家自然科学基金、浙江省自然科学基金等科研项目。授权国家发明专利 25 项(第一完成人)。