

· 研究报告 ·

油菜素甾醇调控水稻盐胁迫应答的作用研究

栗露露, 殷文超, 牛梅, 孟文静, 张晓星, 童红宁*

农作物基因资源与基因改良国家重大科学工程/中国农业科学院作物科学研究所, 北京 100081

摘要 油菜素甾醇(BR)作为植物内源激素, 广泛参与植物的生长发育过程及逆境应答。虽然BR调控生长发育的分子机制目前已相对清楚, 但在水稻(*Oryza sativa*)中, BR在逆境反应中的功能还鲜有报道。该研究系统分析了BR在高盐胁迫过程中的作用, 表明盐胁迫和逆境激素脱落酸可抑制BR合成基因*D2*和*D11*的表达, 典型的BR缺陷突变体(如*d2-2*和*d61-1*)则表现出对盐胁迫敏感性增强。此外, 通过对BR核心转录因子OsBZR1的过表达株系进行分析, 发现BR可显著诱导OsBZR1的去磷酸化, 盐胁迫对OsBZR1蛋白的积累水平和磷酸化状态均有调控作用。转录组数据分析表明, BR处理前后差异表达基因中有38.4%同时受到盐胁迫调控, 其中91.5%受到BR和高盐一致调控, 并显著富集在应激反应过程中。研究结果表明, BR正调控水稻的耐盐性, 而盐胁迫通过抑制BR合成来限制水稻的生长。

关键词 油菜素甾醇, 水稻, 盐胁迫, 脱落酸, OsBZR1

栗露露, 殷文超, 牛梅, 孟文静, 张晓星, 童红宁 (2019). 油菜素甾醇调控水稻盐胁迫应答的作用研究. 植物学报 54, 185–193.

逆境包括盐(碱)、干旱和低温等, 极大地限制了作物的可种植面积, 其中土壤盐渍化是制约水稻(*Oryza sativa*)产量的主要因素之一(俞仁培和陈德明, 1999)。我国水稻资源非常丰富, 不同水稻种质的耐盐性差异较大(吴家富等, 2017)。因此, 研究水稻耐盐性的分子机制, 进而利用分子育种培育适合的耐盐品种显得尤为重要。高盐会对植物造成渗透和离子胁迫, 而耐盐性是植物多个生理过程综合作用的体现(Zhu, 2001)。由于植物自身不能移动, 故进化出一套复杂的调控机制来应对不利环境。植物激素作为调控植物生长发育的重要信号分子, 在其中扮演着重要角色: 一方面, 逆境通过调控内源激素控制植物的生长; 另一方面, 植物也通过调控内源激素应对逆境胁迫(Peleg and Blumwald, 2011)。脱落酸(abscisic acid, ABA)在逆境反应中起着重要作用, 非生物胁迫(如盐害和干旱)会诱导ABA的合成来抑制植物的生长, 而ABA也会激活一系列保护机制来对抗胁迫(Nakashima and Yamaguchi-Shinozaki, 2013)。

油菜素甾醇(brassinosteroids, BRs)调控着植物生长发育的各个方面, 包括植物的耐逆性。例如, 在二穗短柄草(*Brachypodium distachyum*)中, 下调BR

受体基因*BRI1*表达可提高其抗旱性(Feng et al., 2015), 而在杨树中过表达BR合成基因可提高杨树的抗旱性(王沛雅等, 2014)。因此, BR被认为在提高植物产量及抗性等方面具有重要的应用潜力(Khripach et al., 2000; Divi and Krishna, 2009)。模式植物拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)中BR合成及信号转导途径的研究已相对清楚(Choe, 2006; Kim and Wang, 2010; Tong and Chu, 2018)。BR由膜受体*BRI1*识别后, 通过一系列磷酸化和去磷酸化事件, 将信号传递给BZR1/BES1转录因子, 进而调控下游基因的表达(Kim and Wang, 2010)。拟南芥中, BZR1或BES1作为BR信号下游的转录因子, 在蛋白水平受到磷酸化、核质穿梭和蛋白降解等多方面调控。因此, 其通常作为BR信号输出的指示蛋白(He et al., 2002; Yin et al., 2002; Ryu et al., 2007; Nolan et al., 2017; Yang et al., 2017)。在水稻中, BR调控着诸多重要农艺性状, 包括株高、叶夹角和籽粒大小等(Hong et al., 2004; Tong and Chu, 2018)。BR合成突变体(如*d2*)以及信号突变体(*d61*等)通常表现出植株矮化、叶片直立和籽粒变小等表型(Yamamuro et al., 2000; Hong et al., 2003)。目前, 在水稻中关于BR的研究主要集中

收稿日期: 2019-01-18; 接受日期: 2019-03-19

基金项目: 国家自然科学基金(No.91735302, No.31871587, No.31722037)

* 通讯作者。E-mail: tonghongning@caas.cn

在对株型和粒型的调控上,而对于其在逆境胁迫过程中的作用报道尚少。

本研究利用荧光定量PCR技术分析了盐胁迫和ABA对BR合成基因表达的影响,构建了BR信号转录因子OsBZR1融合标签过表达株系,并分析了盐胁迫对其蛋白水平的影响,测试了典型的BR合成与受体突变体对盐胁迫的反应,并利用转录组分析了BR与盐胁迫之间的调控关系。

1 材料与方法

1.1 植物材料与培养

植物材料包括粳稻中花11 (ZH11)、日本晴(NIP)、Shiokari (SHI)、Taichung65 (TC65)、突变体 *d2-2* (SHI背景)、*d61-1* (TC65背景)和*OsBZR1*过表达材料*GM-OsBZR1* (融合GFP和MYC双重标签, ZH11背景)。其中,野生型、*d2-2*和*d61-1*均为本实验室保存(Tong et al., 2014)。*GM-OsBZR1*为本实验室创制。选取37°C浸水2天,且萌发一致的水稻(*Oryza sativa* L.)种子,单粒胚向上置于去除底部的96孔PCR板中,使用1/2 MS (Murashige and Skoog medium, Duchefa)液体培养基,于光照培养箱(宁波江南)中培养。白日光照14小时,温度30°C;夜晚10小时,温度28°C。

1.2 RNA提取与基因表达分析

取地上部水稻幼苗,用箔纸包裹于液氮中速冻后直接用于RNA提取或保存于-80°C冰箱。使用Trizol试剂(Invitrogen)提取RNA,按照产品说明书操作。取1 µg提取的RNA,使用反转录试剂盒(Toyobo)反转录成cDNA,使用Lightcycler96荧光定量系统(Roche)进行荧光定量PCR分析。每组实验做3个生物学重复,每个样品3次技术重复。以水稻*Ubiquitin*基因(*UBQ*)为内参,通过Ct值之间的差异计算基因的相对表达量。对盐胁迫及ABA处理后的基因表达进行分析,每个时间点均使用未处理的样品作为对照计算相对比值。引物序列*UBQ-F*: 5'-GAGCCTCTGTTCGTCAAGTA-3'; *UBQ-R*: 5'-ACTCGATGGTCCATTAAACC-3'; *D2-F*: 5'-AGCTGCCTGGCACTAGGCTCTACAGATCAC-3'; *D2-R*: 5'-ATGTTGTCTGGAGATGAGCTCGTCGGTGA-3'; *D11-F*: 5'-TTGGGTCATGGCATGGCAAGAGCAAGGA-3'; *D11-R*: 5'-TTGTTGCTGGAGCCA-

GCATTCCTCCTCT-3'。

1.3 BR、ABA和盐胁迫处理

将油菜素内酯(brassinolide, BL)溶于二甲基亚砜(DMSO)中,以20 mmol·L⁻¹母液形式-20°C保存。将ABA (Sigma)溶解于乙醇中,以1 mol·L⁻¹母液形式-20°C保存。氯化钠(NaCl, 国药)常温固体保存。在处理前一天,将培养1周的水稻幼苗置于新鲜的营养液中,次日等分并置于三角瓶(含100 mL营养液)中。一瓶加入BL (ABA/NaCl),另一瓶加入等体积的空白溶剂(DMSO或乙醇)或不添加作为对照。培养不同时间后,每个样品取6株混合保存用于后续分析。使用150 mmol·L⁻¹ NaCl或100 µmol·L⁻¹ ABA分别处理水稻幼苗0、0.25、0.5、1、2、4、6、8、10、12和24小时进行BR合成基因表达分析;使用1 µmol·L⁻¹ BL,或100 µmol·L⁻¹ ABA,或250 mmol·L⁻¹ NaCl处理24小时进行转录组分析;使用1 µmol·L⁻¹ BL,或250 mmol·L⁻¹ NaCl处理0、0.25、0.5、1、2、4、6、8、10和12小时进行蛋白调控分析。将突变体 *d2-2*和*d61-1*及其各自野生型材料平分种植于96孔板上,用于盐胁迫敏感性分析。每对材料进行3次生物学重复,每个重复包含野生型和突变体各48株。将培养1周的幼苗直接置于含有150 mmol·L⁻¹ NaCl的营养液中继续培养至部分植株死亡,复水后以能否生成新叶为准统计存活率。

1.4 载体构建与转基因植株筛选

以*OsBZR1*-BD载体为模板(Tong et al., 2012),设计引物*GM-OsBZR1-inF*: 5'-AAGAGGACTTGAATTC-GATGACGTCCGGGGCGGC-3'; *GM-OsBZR1-inR*: 5'-CCGGGGTACCGAATTCTCATTTTCGCGCCGACGCC-3',扩增*OsBZR1*全长cDNA。使用序列重组方法(TaKaRa in-fusion)导入到本实验室改造保存的PEZR(K)-35S-GFP-MYC空载体EcoRI酶切位点。测序确认无误后转入根癌农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*) (AGL1)中,侵染ZH11愈伤组织,获得转基因植物。不同株系经过分子检测筛选获得阳性纯合株系后由本实验室长期繁种保存。

1.5 蛋白提取与免疫杂交

将水稻材料在液氮中研磨成粉后,每100 mg加入300

μL 2 \times SDS变性提取液(100 mmol·L⁻¹ Tris-HCl, 4% SDS, 0.2%溴酚蓝, 20%甘油, 2% β -巯基乙醇), 沸水浴10分钟, 转至常温14 600 $\times g$ 离心10分钟, 吸取上清, 每个样品上样10 μL , 制备2块胶同时进行SDS-PAGE电泳。之后, 按照说明书使用快速转膜仪(Bio-Rad)将蛋白转至PVDF膜上, 5%脱脂奶粉封闭1小时后, 分别用含有MYC (康为, 1:2 500)或ACTIN1抗体(康为, 1:5 000, 作为内参)的2%奶粉孵育2小时。洗膜后, 加入通用二抗(Abmart, 1:5 000)孵育1小时。再次洗膜, 然后用辣根过氧化物酶底物发光试剂(Immobilon, Millipore)于配置有冷CCD的暗箱中进行发光检测。

1.6 转录组测序分析

取总RNA样本经检测合格后, 用带有Oligo (dT)的磁珠富集mRNA, 片段化后进行cDNA合成。纯化加接头后进行PCR扩增, 完成文库制备, 并用Illumina Hi-Seq4000进行测序。原始序列处理后得到高质量序列, 采用DEGseq进行基因差异表达分析, 比较处理组与

参考组, 选取fold ≥ 2 和 $P < 0.05$ 的基因作为差异表达基因。使用agriGO (<http://bioinfo.cau.edu.cn/agriGO/>)在线工具进行基因聚类(gene ontology, GO)分析。

2 结果与讨论

2.1 盐胁迫对BR合成基因表达的影响

外源施加NaCl后, *D2*和*D11*两个BR合成基因的表达均受到显著抑制, 并且表现出较为一致的变化趋势(图1A, B)。在处理4小时内, 两基因的表达量均呈逐渐下降的趋势, 并在处理4小时达到最低点, 此时, *D2*的表达量降至未处理样品的15%, *D11*降至6.5%。随后逐渐回升, 两者回升后均达到30%左右, 但仍远低于未处理样品, 说明盐胁迫可显著抑制BR合成基因的表达。

2.2 ABA对BR合成基因表达的影响

ABA作为主要的逆境植物激素, 通常会受到非生物胁迫的大量诱导。本研究中外源施加ABA后, *D2*和*D11*

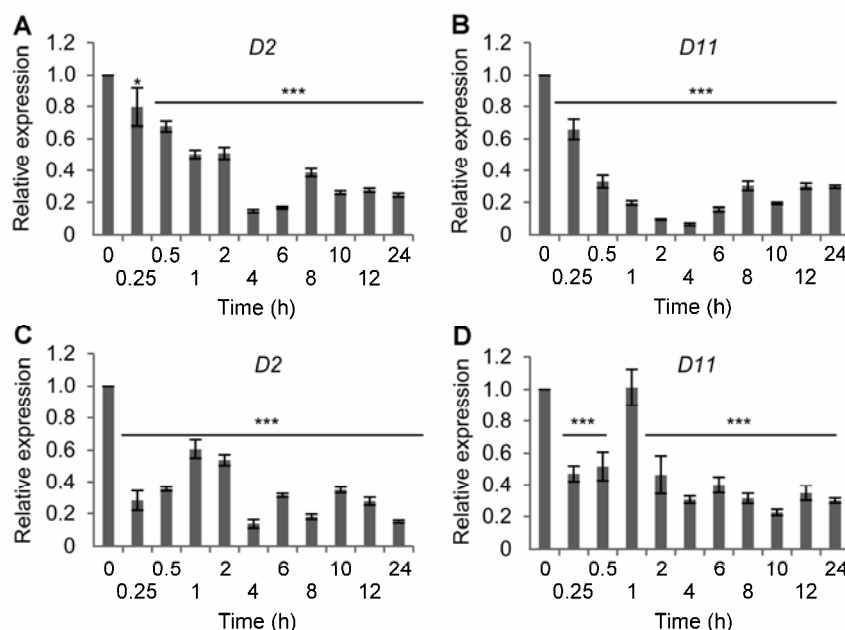


图1 不同时间高盐和ABA处理对水稻BR合成基因表达的影响

(A) 盐处理后*D2*基因的表达; (B) 盐处理后*D11*基因的表达; (C) ABA处理后*D2*基因的表达; (D) ABA处理后*D11*基因的表达。* $P < 0.05$; *** $P < 0.001$

Figure 1 Time-course expression of BR synthetic genes in rice following salt or ABA treatment

(A) *D2* expression after NaCl treatment; (B) *D11* expression after NaCl treatment; (C) *D2* expression after ABA treatment; (D) *D11* expression after ABA treatment. * $P < 0.05$; *** $P < 0.001$

的表达同样均受到明显抑制(图1C, D)。然而, 其变化趋势具有一定的波动性, 说明ABA对BR合成的影响相对复杂。短时期内(0.25–0.5小时), ABA对BR合成的抑制作用非常迅速; 但处理1小时, *D2*和*D11*的表达呈现1个相对峰值, 然后逐渐下降。同样, 两者的表达量在处理4小时达到最低点, 但随后保持相对稳定的受抑制状态。这些结果说明, ABA也抑制BR合成基因的表达。

2.3 BR突变体对盐胁迫的敏感性

使用BR合成突变体*d2-2*和受体突变体*d61-1*, 以其各自野生型背景为对照, 进行盐胁迫处理, 发现*d2-2*和*d61-1*对盐胁迫的敏感性均明显增强(图2)。本实验条件下, 处理前所有材料的存活率均为100%, 而处理

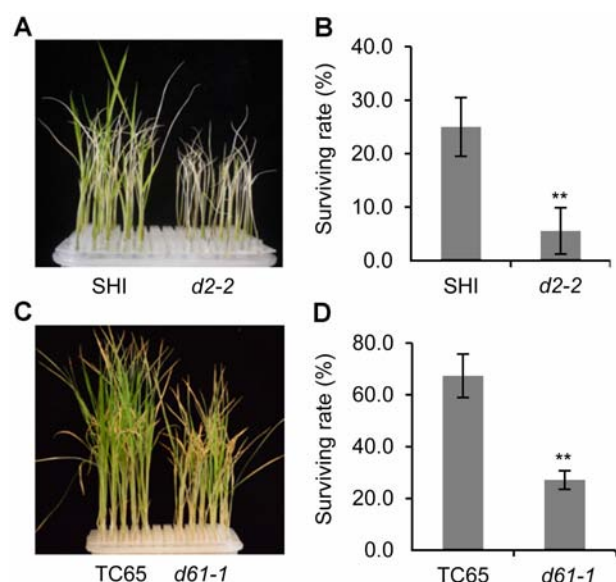


图2 盐胁迫下水稻BR缺陷突变体及其野生型的存活率

(A) 盐处理后*d2-2*突变体及其野生型的生长情况; (B) 盐处理后*d2-2*突变体及其野生型的存活率统计; (C) 盐处理后*d61-1*突变体及其野生型的生长情况; (D) 盐处理后*d61-1*突变体及其野生型的存活率统计。** $P < 0.01$

Figure 2 Survival rate of rice BR defective mutants and the wild type under salt stress

(A) Growth status of *d2-2* mutant and the wild type after salt treatment; (B) Statistic data of the survival rate of *d2-2* and the wild type after salt treatment; (C) Growth status of *d61-1* mutant and the wild type after salt treatment; (D) Statistic data of the survival rate of *d61-1* and the wild type after salt treatment. ** $P < 0.01$

后当*d2-2*突变体的存活率为5.6%时, 其野生型SHI的存活率为25.0%; 当TC65的存活率为67.4%时, *d61-1*的存活率仅为27.1% (图2)。这些结果说明, BR合成或信号的缺陷会削弱植物对盐胁迫的耐受性。

2.4 GM-OsBZR1过表达株系的创制及分子检测

拟南芥中BZR1是BR信号下游的核心转录因子, 常用作BR信号的指示蛋白分析BR的反应强度。为研究水稻中盐胁迫对BR信号的影响, 我们首先构建了Os-BZR1融合标签(GM-OsBZR1)的过表达转基因植物, 并使用烟草花叶病毒35S组成型启动子驱动融合蛋白的表达。采用定量PCR检测了其中10个转基因阳性株系, 我们发现至少6个株系OsBZR1的表达量比野生型上调了18–88倍, 但转基因植物大部分在形态上并无明显的规律性变化。利用标签抗体进行免疫杂交检测, 进一步确认了GM-OsBZR1融合蛋白仅在转基因株系中表达, 并且呈现出明显的多条带形式, 表明Os-BZR1蛋白受到磷酸化调控(图3A)。为了确认该结果,

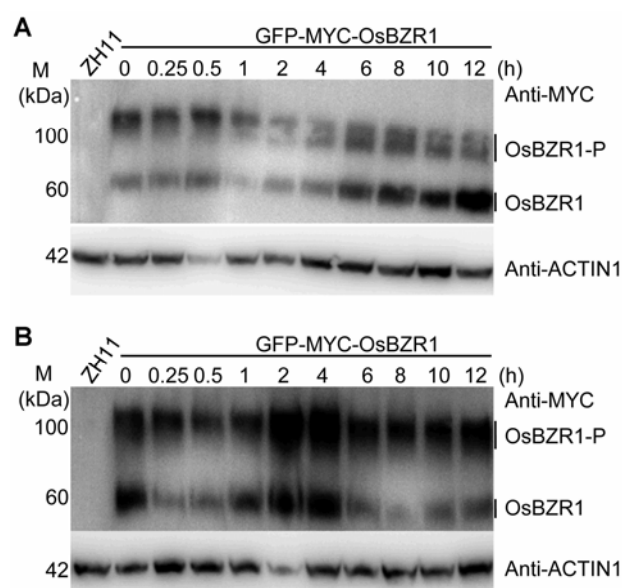


图3 不同时间BR和盐处理对水稻OsBZR1蛋白的影响

(A) BR处理对OsBZR1蛋白的影响; (B) 盐处理对OsBZR1蛋白的影响

Figure 3 Effects of BR and salt stress on OsBZR1 proteins in rice

(A) Effect of BR treatment on OsBZR1 proteins; (B) Effect of salt treatment on OsBZR1 proteins

我们使用外源BR对植物进行处理,发现随着时间的延长,作为内参的ACTIN1蛋白水平并无明显的规律性变化,而BR大量诱导GM-OsBZR1融合蛋白的去磷酸化(图3A),表明该转基因材料适用于对OsBZR1进行蛋白水平的调控分析。

2.5 BR和高盐处理对OsBZR1融合蛋白的影响

利用GM-OsBZR1过表达材料,我们检测了盐胁迫对GM-OsBZR1融合蛋白的影响,发现高盐处理不同时间,作为内参的ACTIN1蛋白水平无明显的差异,而OsBZR1融合蛋白非磷酸化条带与磷酸化条带的变化却明显不同(图3B)。非磷酸化条带呈现更为明显的规律变化,在短时间内(0.25–1小时)被迅速抑制,随后积累到高水平(2–4小时),但继而又被显著抑制(6–12小时)。磷酸化条带在短时间内则相对稳定,2–4小时被显著诱导,6–12小时略有降低,但仍然保持稳定的高水平状态,此时非磷酸化条带被显著抑制,暗示盐胁迫可同时调控OsBZR1的磷酸化状态与蛋白丰度。非磷酸化OsBZR1为具有功能活性的形式,说明盐胁迫对OsBZR1蛋白的调控具有动态变化,同时也暗示其在不同时间对植物生长和高盐胁迫反应具有不同的调控功能。

2.6 BR、ABA及高盐处理下的转录组分析

为进一步研究BR在非生物胁迫下的调控机制,以ZH11和NIP为材料,分别经BR、ABA和高盐处理后,进行转录组测序分析。以未处理的材料作为对照,选取处理后在ZH11和NIP中均发生表达变化的基因($\text{fold} \geq 2$, $P < 0.05$)进行数据分析,获得492个BR调控基因,2 847个盐调控基因,3 511个ABA调控基因(图4)。492个BR调控基因中,有189个同时受到盐调控,占比为38.4%; 287个同时受到ABA调控,占比为58.3% (图4A)。值得注意的是,在189个BR-盐共调控基因中,有173个受到BR和盐一致调控(100个BR-盐共下调基因,73个BR-盐共上调基因),占比为91.5% (图4B),强烈暗示BR介导了盐胁迫对这些基因的调控。另外,GO分析表明,这189个BR-盐共调控基因显著富集在“response to stimulus” ($P = 8.2e-07$),其次在“catalytic activity”生物学途径中($P = 0.00083$) (图5),说明BR参与盐胁迫引起的应激反应及代谢过程。

2.7 讨论

BR作为较晚发现的一类植物激素(Grove et al., 1979),广泛参与调控植物的生长发育以及耐逆性,

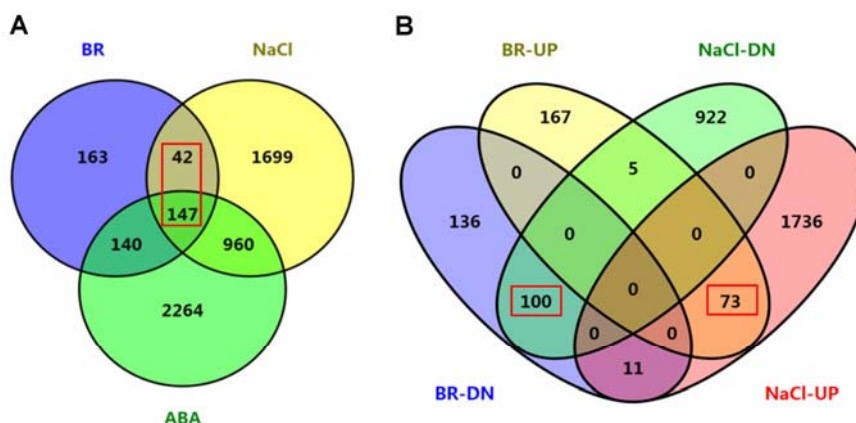


图4 BR、ABA和盐处理后水稻差异基因共调控分析

(A) BR和ABA与盐差异调控基因的共调控分析; (B) BR上调(BR-UP)和下调(BR-DN)以及NaCl上调(NaCl-UP)和下调(NaCl-DN)基因的共调控分析。图中显示差异基因的分布及数目。

Figure 4 Co-regulation analyses of BR-, ABA- and NaCl-regulated genes of rice

(A) Co-regulated gene numbers between BR-, ABA- and NaCl-regulated different expression genes (DEGs); (B) Co-regulation analyses among BR-upregulated (BR-UP), BR-downregulated (BR-DN), NaCl-upregulated (NaCl-UP) and NaCl-downregulated (NaCl-DN) genes. Distribution of the gene numbers was indicated.

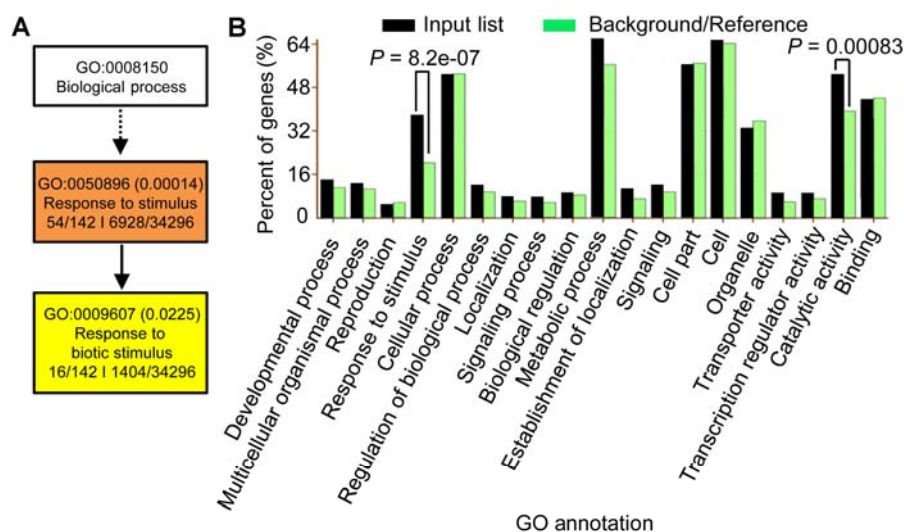


图5 水稻189个BR和盐共调控基因的聚类分析

(A) 生物学途径聚类分析; (B) 生物学途径、细胞组分及分子功能的聚类分析

Figure 5 Gene Ontology analyses of the 189 BR-NaCl co-regulated genes of rice

(A) GO analyses in term of the biological process; (B) GO analyses in terms of biological process, cellular component, and molecular function

在农业生产及农业生物技术上具有重要的应用价值。一方面BR同源类似物可作为植物生长调节剂直接应用于田间生产(Khripach et al., 2000); 另一方面可利用BR的生物功能通过农业生物技术途径对作物进行改良(Tong and Chu, 2018)。例如, 科学家通过降低BR合成(或信号)基因的表达, 对水稻叶夹角进行调节使其更加直立, 从而使得植物适合密植, 增加产量(Morinaka et al., 2006; Sakamoto et al., 2006)。再者也可通过增加BR功能促进水稻灌浆来增加产量(Wu et al., 2008)。然而, 目前尚缺乏水稻中BR对抗逆作用的研究, 这些策略是否可引起水稻耐逆性的改变尚不清楚。因此, 开展水稻BR耐逆性研究对其最终应用十分重要。

越来越多的研究表明, BR在不同物种、器官、组织、浓度以及环境下的功能可能完全不同(Singh and Savaldi-Goldstein, 2015; Tong and Chu, 2018)。例如, 在黑暗条件下BR促进水稻生长, 但却抑制大豆(*Glycine max*)生长(Yin et al., 2018); 低浓度BR促进植物不同组织生长, 而高浓度BR显著抑制水稻株高以及根的生长, 但却促进胚芽鞘生长及叶夹角增大(Tong and Chu, 2016)。此外, BR还可调节植物的耐

逆反应, 且针对不同逆境BR的调控功能不尽相同。例如, 在拟南芥中, BR缺陷突变体对盐更加敏感, 但却更为耐旱(Krishna et al., 2017)。这些结果说明, 需根据不同物种和不同环境具体分析BR的作用。

本研究表明, BR缺陷突变体对高盐处理超敏感, 说明BR参与水稻的耐盐反应并具有正调控作用。转录组分析表明, BR调控的基因很大比例同时受到盐胁迫的调控, 并且绝大部分受到两者一致调控。由于盐胁迫可显著抑制BR合成基因的表达, 这些结果暗示高盐处理对水稻部分基因的调控可能通过抑制BR合成来完成。此外, 我们发现, OsBZR1去磷酸化形式的蛋白水平受到盐胁迫的明显抑制。OsBZR1为BR信号转导过程的核心转录因子, 对拟南芥的研究表明这类转录因子可直接结合下游基因的启动子, 进而调控大量BR下游基因的表达(Sun et al., 2010; Yu et al., 2011)。另外, 作为反馈调控机制, BZR1类转录因子可直接结合BR合成基因, 抑制其表达(Wang et al., 2002; He et al., 2005)。本研究创制了OsBZR1融合双标签的转基因株系, 并通过BR处理证实这一材料非常适用于对OsBZR1进行蛋白水平的研究。我们也发现OsBZR1在盐处理2–4小时显著积累, 而此时D2

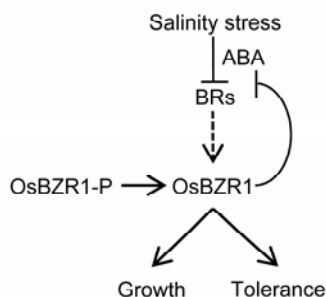


图6 BR在水稻盐胁迫反应中的作用模型

Figure 6 Proposed model for BR function in salt stress responses in rice

和*D11*基因表达也达到最低水平,暗示在盐胁迫过程中植物可对内源激素平衡进行精细调控。

已有研究表明,ABA与BR之间存在多种交叉调控,并且针对不同的性状,其交叉调控机制可能不同(李钱峰等,2018)。例如,气孔发育过程中,BR可通过抑制活性氧来拮抗ABA对气孔关闭的促进作用(Ha et al., 2016);而在种子萌发过程中,BR利用BES1抑制ABA转录因子ABI5的功能促进种子萌发(Zhao et al., 2019)。虽然大部分情况下,ABA与BR之间存在拮抗作用,但在盐胁迫下,ABA和BR均有促进植物耐盐的作用,说明不同胁迫或不同组织器官发育的不同阶段,两种激素之间的关系可能不同。此外,相对于盐胁迫,ABA对BR合成的调控则更加复杂。高盐胁迫也可通过多种机制调控BR的合成或信号,ABA作为逆境胁迫诱导的主要激素,至少部分参与了高盐胁迫对BR合成的抑制作用。不利的生长环境(如高盐)或信号(如ABA)通过抑制植物体内生长促进性激素(如BR)的水平来控制植物的生长,可能是植物应对不利环境的主要响应机制之一。

综上,我们提出了一个模型来说明BR在水稻盐胁迫反应中的作用(图6)。一方面,盐胁迫和逆境信号ABA通过抑制BR合成基因*D2*和*D11*的表达控制水稻生长;另一方面,BR对水稻耐盐性具有促进作用,当BR合成(或信号)缺陷时,水稻耐盐性减弱。BR对耐盐性的调控可能由BR核心转录因子OsBZR1的丰度及磷酸化水平受高盐胁迫的动态调控获得。例如,在盐胁迫早期,OsBZR1可能在短时间内被诱导,从而调控应激反应基因的表达,进而调控水稻的耐盐性。另

外,该模型也说明BR在逆境胁迫不同时间的功能存在差异,但需要进一步实验验证。

参考文献

- 李钱峰, 鲁军, 余佳雯, 张昌泉, 刘巧泉 (2018). 油菜素内酯与脱落酸互作调控植物生长与抗逆的分子机制研究进展. 植物生理学报 54, 370–378.
- 王沛雅, 周剑平, 王治业, 张军, 强维亚, 杨涛, 郭琪, 杨晖 (2014). 油菜素内酯合成酶基因*DAS5*促进杨树生长及提高抗旱性的作用. 植物学报 49, 407–416.
- 吴家富, 杨博文, 向珣朝, 许亮, 颜李梅 (2017). 不同水稻种质在不同生育期耐盐鉴定的差异. 植物学报 52, 77–88.
- 俞仁培, 陈德明 (1999). 我国盐渍土资源及其开发利用. 土壤通报 30, 158–159.
- Choe S (2006). Brassinosteroid biosynthesis and inactivation. *Physiol Plant* 126, 539–548.
- Divi UK, Krishna P (2009). Brassinosteroid: a biotechnological target for enhancing crop yield and stress tolerance. *N Biotechnol* 26, 131–136.
- Feng Y, Yin YH, Fei SZ (2015). Down-regulation of *BdBRI1*, a putative brassinosteroid receptor gene produces a dwarf phenotype with enhanced drought tolerance in *Brachypodium distachyon*. *Plant Sci* 234, 163–173.
- Grove MD, Spencer GF, Rohwedder WK, Mandava N, Worley JF, Warthen JD Jr, Steffens GL, Flippen-Anderson JL, Cook JC Jr (1979). Brassinolide, a plant growth-promoting steroid isolated from *Brassica napus* pollen. *Nature* 281, 216–217.
- Ha YM, Shang Y, Nam KH (2016). Brassinosteroids modulate ABA-induced stomatal closure in Arabidopsis. *J Exp Bot* 67, 6297–6308.
- He JX, Gendron JM, Sun Y, Gampala SSL, Gendron N, Sun CQ, Wang ZY (2005). BZR1 is a transcriptional repressor with dual roles in brassinosteroid homeostasis and growth responses. *Science* 307, 1634–1638.
- He JX, Gendron JM, Yang YL, Li JM, Wang ZY (2002). The GSK3-like kinase BIN2 phosphorylates and destabilizes BZR1, a positive regulator of the brassinosteroid signaling pathway in Arabidopsis. *Proc Natl Acad Sci USA* 99, 10185–10190.
- Hong Z, Ueguchi-Tanaka M, Matsuoka M (2004). Brassinosteroids and rice architecture. *J Pestic Sci* 29, 184–188.
- Hong Z, Ueguchi-Tanaka M, Umemura K, Uozu S, Fujioka S, Takatsuto S, Yoshida S, Ashikari M, Kitano H,

- Matsuoka M** (2003). A rice brassinosteroid-deficient mutant, *ebisu dwarf* (d2), is caused by a loss of function of a new member of cytochrome P450. *Plant Cell* **15**, 2900–2910.
- Khripach V, Zhabinskii V, De Groot A** (2000). Twenty years of brassinosteroids: steroidal plant hormones warrant better crops for the XXI century. *Ann Bot* **86**, 441–447.
- Kim TW, Wang ZY** (2010). Brassinosteroid signal transduction from receptor kinases to transcription factors. *Annu Rev Plant Biol* **61**, 681–704.
- Krishna P, Prasad BD, Rahman T** (2017). Brassinosteroid action in plant abiotic stress tolerance. In: Russinova E, Caño-Delgado AI, eds. Brassinosteroids. New York: Humana Press. pp. 193–202.
- Morinaka Y, Sakamoto T, Inukai Y, Agetsuma M, Kitano H, Ashikari M, Matsuoka M** (2006). Morphological alteration caused by brassinosteroid insensitivity increases the biomass and grain production of rice. *Plant Physiol* **141**, 924–931.
- Nakashima K, Yamaguchi-Shinozaki K** (2013). ABA signaling in stress-response and seed development. *Plant Cell Rep* **32**, 959–970.
- Nolan TM, Brennan B, Yang MR, Chen JN, Zhang MC, Li ZH, Wang XL, Bassham DC, Walley J, Yin YH** (2017). Selective autophagy of BES1 mediated by DSK2 balances plant growth and survival. *Dev Cell* **41**, 33–46. e7.
- Peleg Z, Blumwald E** (2011). Hormone balance and abiotic stress tolerance in crop plants. *Curr Opin Plant Biol* **14**, 290–295.
- Ryu H, Kim K, Cho H, Park J, Choe S, Hwang I** (2007). Nucleocytoplasmic shuttling of BZR1 mediated by phosphorylation is essential in Arabidopsis brassinosteroid signaling. *Plant Cell* **19**, 2749–2762.
- Sakamoto T, Morinaka Y, Ohnishi T, Sunohara H, Fujioka S, Ueguchi-Tanaka M, Mizutani M, Sakata K, Takatsuto S, Yoshida S, Tanaka H, Kitano H, Matsuoka M** (2006). Erect leaves caused by brassinosteroid deficiency increase biomass production and grain yield in rice. *Nat Biotechnol* **24**, 105–109.
- Singh AP, Savaldi-Goldstein S** (2015). Growth control: brassinosteroid activity gets context. *J Exp Bot* **66**, 1123–1132.
- Sun Y, Fan XY, Cao DM, Tang WQ, He K, Zhu JY, He JX, Bai MY, Zhu SW, Oh E, Patil S, Kim TW, Ji HK, Wong WH, Rhee SY, Wang ZY** (2010). Integration of brassinosteroid signal transduction with the transcription network for plant growth regulation in Arabidopsis. *Dev Cell* **19**, 765–777.
- Tong HN, Chu CC** (2016). Reply: brassinosteroid regulates gibberellin synthesis to promote cell elongation in rice: critical comments on ross and quittenden's letter. *Plant Cell* **28**, 833–835.
- Tong HN, Chu CC** (2018). Functional specificities of brassinosteroid and potential utilization for crop improvement. *Trends Plant Sci* **23**, 1016–1028.
- Tong HN, Liu LC, Jin Y, Du L, Yin YH, Qian Q, Zhu LH, Chu CC** (2012). DWARF AND LOW-TILLERING acts as a direct downstream target of a GSK3/SHAGGY-like kinase to mediate brassinosteroid responses in rice. *Plant Cell* **24**, 2562–2577.
- Tong HN, Xiao YH, Liu DP, Gao SP, Liu LC, Yin YH, Jin Y, Qian Q, Chu CC** (2014). Brassinosteroid regulates cell elongation by modulating gibberellin metabolism in rice. *Plant Cell* **26**, 4376–4393.
- Wang ZY, Nakano T, Gendron J, He JX, Chen M, Vafeados D, Yang YL, Fujioka S, Yoshida S, Asami T, Chory J** (2002). Nuclear-localized BZR1 mediates brassinosteroid-induced growth and feedback suppression of brassinosteroid biosynthesis. *Dev Cell* **2**, 505–513.
- Wu CY, Trieu A, Radhakrishnan P, Kwok SF, Harris S, Zhang K, Wang JL, Wan JM, Zhai HQ, Takatsuto S, Matsumoto S, Fujioka S, Feldmann KA, Pennell RI** (2008). Brassinosteroids regulate grain filling in rice. *Plant Cell* **20**, 2130–2145.
- Yamamuro C, Ihara Y, Wu X, Noguchi T, Fujioka S, Takatsuto S, Ashikari M, Kitano H, Matsuoka M** (2000). Loss of function of a rice *brassinosteroid insensitive 1* homolog prevents internode elongation and bending of the lamina joint. *Plant Cell* **12**, 1591–1606.
- Yang MR, Li CX, Cai ZY, Hu YM, Nolan T, Yu FF, Yin YH, Xie Q, Tang GL, Wang XL** (2017). SINAT E3 ligases control the light-mediated stability of the brassinosteroid-activated transcription factor BES1 in Arabidopsis. *Dev Cell* **41**, 47–58. e4.
- Yin WC, Dong NN, Niu M, Zhang XX, Li LL, Liu J, Liu B, Tong HN** (2018). Brassinosteroid-regulated plant growth and development and gene expression in soybean. *Crop J*. DOI: 10.1016/j.cj.2018.10.003.
- Yin YH, Wang ZY, Mora-Garcia S, Li JM, Yoshida S, Asami T, Chory J** (2002). BES1 accumulates in the nucleus in response to brassinosteroids to regulate gene expression and promote stem elongation. *Cell* **109**, 181–191.
- Yu XF, Li L, Zola J, Aluru M, Ye HX, Foudree A, Guo HQ,**

- Anderson S, Aluru S, Liu P, Rodermeil S, Yin YH (2011). A brassinosteroid transcriptional network revealed by genome-wide identification of BES1 target genes in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* **65**, 634–646.
- Zhao X, Dou LR, Gong ZZ, Wang XF, Mao TL (2019). BES1 hinders ABSCISIC ACID INSENSITIVE5 and promotes seed germination in *Arabidopsis*. *New Phytol* **221**, 908–918.
- Zhu JK (2001). Plant salt tolerance. *Trends Plant Sci* **6**, 66–71.

Functional Analysis of Brassinosteroids in Salt Stress Responses in Rice

Lulu Li, Wenchao Yin, Mei Niu, Wenjing Meng, Xiaoxing Zhang, Hongning Tong *

Institute of Crop Sciences, Chinese Academy of Agricultural Sciences/National Key Facility for Crop Gene Resources and Genetic Improvement, Beijing 100081, China

Abstract Brassinosteroids (BRs) are a class of steroid phytohormones that play diverse roles in plant growth and development and stress responses. Rapid progresses have been made in how BRs regulate plant growth and development in recent years. However, the roles of BRs in stress response in *Oryza sativa* remain unclear. Here, we investigated the relation between salinity stress and BR synthesis in rice. Both salt stress and abscisic acid, the well-known stress hormone, strongly inhibited the expression of two BR-synthetic genes, *D2* and *D11*. In addition, both *d2-2*, the BR synthetic mutant, and *d61-1*, the BR receptor mutant, showed impaired tolerance to salt stress. Moreover, by using transgenic plants overexpressing OsBZR1, the key BR signaling transcriptional factor, we found that BRs strongly induced dephosphorylation of OsBZR1, but high concentrations of salt suppressed OsBZR1 protein accumulation as well as its dephosphorylation. Furthermore, transcriptome analyses revealed that 38.4% of BR-regulated genes were also regulated by high concentrations of salt, and importantly, 91.5% of the co-regulated genes are consistently up- or downregulated by both BR and salt. Gene Ontology analyses revealed that these overlapping genes were highly enriched in the biological process “response to stimulus”. Taken together, our results suggest that BRs contribute to salt stress tolerance, and salt stress suppresses BR synthesis to restrict rice growth.

Key words brassinosteroid, rice, salt stress, abscisic acid, OsBZR1

Li LL, Yin WC, Niu M, Meng WJ, Zhang XX, Tong HN (2019). Functional analysis of brassinosteroids in salt stress responses in rice. *Chin Bull Bot* **54**, 185–193.

* Author for correspondence. E-mail: tonghongning@caas.cn

(责任编辑: 孙冬花)