



干旱胁迫下表观遗传机制对转C₄型PEPC基因水稻种子萌发的影响

宋凝曦^{1,2}, 谢寅峰², 李霞^{1,2,3*}

¹江苏省农业科学院粮食作物研究所/江苏省优质水稻工程技术研究中心/国家水稻改良中心南京分中心, 南京 210014

²南京林业大学生物与环境学院, 南京 210037; ³扬州大学农学院, 江苏省粮食作物现代产业技术协同创新中心, 扬州 225009

摘要 为探究干旱胁迫下表观遗传机制对高表达玉米(*Zea mays*) C₄型PEPC转基因水稻(*Oryza sativa*)种子萌发的影响, 以转C₄型PEPC水稻(PC)和野生型水稻Kitaake (WT)为试材, 采用10% (m/v)聚乙二醇6000 (PEG6000)模拟干旱条件, 通过单独和联合施用PEG6000、DNA甲基化抑制剂5-氮杂胞苷(5azaC)和可变剪接抑制剂大环内酯类(PB)进行种子发芽实验, 测定种子活力、萌发过程中可溶性糖和可溶性蛋白含量、 α -淀粉酶活性以及PEPC、糖信号相关基因和部分剪接因子基因的表达。结果表明, 0.25 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ PB处理对2种供试水稻在干旱条件下种子萌发均表现出显著抑制作用, 使干旱条件下种子萌发过程中可溶性总糖、蔗糖、葡萄糖和果糖含量以及可溶性蛋白含量均有所下降, PB也抑制糖信号-蔗糖非发酵1 (SNF1)相关蛋白激酶(SnRKs)家族和剪接因子丝氨酸/精氨酸富集蛋白家族(SR proteins)相关基因的表达以及 α -淀粉酶的活性, 但对PC的抑制作用小于WT。5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 5azaC处理对干旱条件下种子萌发的效果与可变剪接抑制剂相反。5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 5azaC联合PEG6000干旱处理部分减缓了干旱对水稻种子发芽率的抑制作用, 使供试材料发芽率升高, 表明DNA甲基化和可变剪接机制参与了水稻芽期干旱耐性, 其中对PC的作用更大。

关键词 可变剪接, DNA甲基化, 干旱逆境, 萌发, PEPC基因, 水稻

宋凝曦, 谢寅峰, 李霞 (2020). 干旱胁迫下表观遗传机制对转C₄型PEPC基因水稻种子萌发的影响. 植物学报 55, 677–692.

近年来, 在全球气候变化背景下, 干旱频繁发生且日趋严峻, 严重影响作物的生长, 甚至造成减产(Prasad et al., 2011)。在高光强、高温和干旱等逆境条件下, C₄植物的光合效率和水分利用率高于C₃植物, 进而获得较高的生物学产量(Lebouteiller et al., 2007)。磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶(phosphoenolpyruvate carboxylase, PEPC)是重要的胞质代谢酶, 也是C₄植物光合作用的关键酶, 在种子发芽和生长发育中发挥重要作用(O'Leary et al., 2011)。Ku等(1999)首次运用农杆菌介导法, 将完整的玉米(*Zea mays*) C₄-PEPC基因(含自身启动子)成功导入水稻(*Oryza sativa*), 获得高表达玉米C₄-PEPC的转基因水稻植株(简称PC), 该材料不仅光合效率显著提高, 而且籽粒产量显著增加。进一步研究发现, PC水稻在

逆境如高光强(焦德茂等, 2001)、高温(焦德茂等, 2003)、干旱(Qian et al., 2015; Zhang et al., 2017)和低氮(Tang et al., 2018)条件下比原种表现出更大的优势。深入研究表明, 磷脂酸(Li et al., 2011)、H₂O₂ (Ren et al., 2014)、NO (Chen et al., 2014)和钙离子(Qian et al., 2015; 刘小龙等, 2015)等第二信使分子均参与了PC水稻C₄-PEPC基因的表达和酶活性的发挥, 这些调节过程与其内源糖水平的差异密切相关(Li and Wang, 2013), 而且在干旱条件下PC内源糖代谢加强(Zhang et al., 2017)。张金飞等(2018)研究表明, 糖信号-蔗糖非发酵1 (sucrose nonfermenting-1, SNF1)相关蛋白激酶(sucrose nonfermenting-1-related protein kinase, SnRKs)家族中, SnRK3s家族基因可与钙调B类磷酸酶(calcineu-

收稿日期: 2020-03-21; 接受日期: 2020-08-26

基金项目: 国家自然科学基金(No.31571585)和国家重点研发计划(No.2016YFD0300501-03)

* 通讯作者。E-mail: jsplix@jaas.ac.cn

rin-B-like, CBL)作用, 诱导NO参与叶片气孔调节, 从而增强保水能力, 保持其光合能力稳定, 最终表现为耐旱。He等(2020)研究发现, SnRK2也参与PC的干旱响应。Liu等(2017)研究表明, PC水稻在响应干旱逆境时C₄-PEPC会发生去甲基化现象, 有利于C₄-PEPC的高表达, 同时也伴随着PEPC的磷酸化以及相关基因的表达, 表明表观遗传机制可能也参与该材料对干旱的响应, 但尚缺乏系统研究。

可变剪接(alternative splicing, AS)是一种生物体基因转录后调控的方式, 植物中的许多基因存在AS, 其在植物生长发育中具有重要作用(曲瑞莲等, 2014)。已有研究表明, AS广泛参与高等植物对非生物胁迫的转录调控, 为植物提供了一种迅速应对环境变化的有效方案(Syed et al., 2012), 在水稻中也已有相关研究(Cao and Ma, 2019)。PEPC的磷酸化在调控高等植物中枢纽代谢中起重要作用, 磷酸烯醇丙酮酸羧化酶激酶(phosphoenolpyruvate carboxylase kinases, PPCK)在PEPC磷酸化过程中起关键作用。已有研究在番茄(*Lycopersicon esculentum*)中鉴定了2个PPCK基因(*LePPCK1*和*LePPCK2*)。其中, *LePPCK2*还含有一种新的第二内含子, 具有可选择的剪接作用。在果实成熟期间, *LePPCK2*的表达显著增加, 而在成熟后子房和种子中仅包含正确剪接的*LePPCK2*转录物。此外, 在马铃薯(*Solanum tuberosum*)、茄子(*S. melonge*)和烟草(*Nicotiana tabacum*)中均存在这种组织特异性调节, 而且剪接的内含子序列在所报告的4个物种间高度保守(Marsh et al., 2003)。Ling等(2017)研究表明, 大环内酯类(pladienolide B, PB)抑制拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)中的AS; 转录组测序数据显示, 采用PB模拟非生物胁迫信号(包括盐、干旱和脱落酸(abscisic acid, ABA))可激活拟南芥中非生物胁迫和ABA响应基因(*RD29A*和*MAPK18*), 并可模拟ABA对气孔孔径的影响。Lev Maor等(2015)研究表明, DNA甲基化也调节可变剪接, 然而高表达玉米C₄-PEPC转基因水稻植株在干旱响应过程中发生的DNA甲基化差异, 是否会诱导可变剪接的变化值得深入探究。

本研究以PC及非转基因野生型水稻(WT)为试材, 在芽期用PEG6000模拟干旱处理, 加入PB和DNA甲基化抑制剂5-氮杂胞苷(5-azacytidine, 5azaC), 进行不同程度的联合处理, 然后观察其对

PC和WT种子发芽的影响。通过测定不同萌发时间内源可溶性糖和可溶性蛋白含量、 α -淀粉酶活性以及相关基因、PEPC、糖信号以及部分剪接因子相关基因的表达, 分析不同处理下PC和WT种子萌发过程中主要相关酶活性、基因表达差异以及对PEPC基因表达的影响, 旨在揭示干旱条件下表观遗传途径对PC水稻种子萌发的影响, 为阐明PC在芽期的耐旱机制提供新线索。

1 材料与方法

1.1 供试材料

本研究所用的转基因水稻(*Oryza sativa* L.)是由Ku等(1999)以日本粳稻Kitaake为受体, 将完整的玉米C₄-PEPC基因导入, 产生的高表达玉米C₄-PEPC转基因水稻(PC), 以野生型水稻Kitaake (WT)为对照。选择同年收获的大小一致、颗粒饱满的供试种子, 先用75%乙醇消毒15分钟, 然后用无菌水冲洗干净。将种子置于含40 mL无菌水的培养皿中, 然后放入黑暗条件下的30°C培养箱中, 1天后对供试材料进行处理。

1.2 干旱、DNA甲基化抑制剂以及可变剪接抑制剂处理

对照(CK)用无菌水处理, 再用10% (w/v) PEG6000进行模拟干旱处理。将浸泡后的水稻种子分别移至无菌水、10% PEG6000溶液、10% PEG6000+0.25 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ PB溶液、10% PEG6000+5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 5azaC溶液以及10% PEG6000+0.25 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ PB+5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 5azaC溶液中。取不同处理材料进行发芽实验, 待测样品按不同处理天数取样, 经液氮速冻后, 置于-80°C储存备用, 生理指标统一测定。测定基因表达水平的水稻种子处理方法: 均匀涂抹抑制剂后在黑暗中预处理10小时, 再转入上述溶液中处理2小时。

1.3 种子活力测定

参照标准发芽试验法(陈蕾太等, 2016)测定种子活力。取不同浓度处理材料, 于处理第4天按照如下公式计算发芽势, 于第8天计算发芽率。取正常生长的幼苗经105°C杀青30分钟, 80°C烘干至恒量后, 称量苗干重和根干重。以标准发芽试验所测定的种子活力

相关指标为对照。

发芽势=(4天内正常幼苗数/供试种子数)×100%;
发芽率=(8天内正常幼苗数/供试种子数)×100%;
发芽指数(GI)= $\sum G_t/D_t$ (G_t 为时间 t 的发芽数, D_t 为相应的发芽天数); 活力指数= $G \times S$ (S 为单株幼苗干重质量(g))。

1.4 可溶性总糖测定

参考蒽酮比色法(Somani et al., 1987)测定可溶性总糖含量。将种子在10℃烘箱中烘干15分钟后调至70℃过夜。将种子磨碎后称取50 mg样品, 转入10 mL刻度离心管内, 加入4 mL 80%乙醇。水浴搅拌40分钟后离心收上清, 残渣用80%乙醇重复提取2次, 合并上清。在上清液中加入10 mg活性炭, 80℃脱色30分钟, 然后用80%乙醇定容至10 mL, 过滤后取滤液进行测定。吸取1 mL上述糖提取液, 转入干净的试管中, 加入5 mL蒽酮试剂混合, 沸水浴加热10分钟, 取出冷却, 然后采用分光光度计测定(波长为625 nm)吸光值(OD值)。根据标准曲线计算得出滤液中的糖含量, 并进一步计算样品中的含糖量。

1.5 糖组分含量测定

蔗糖、葡萄糖和果糖含量参照文献(Ambavaram et al., 2014)进行测定。将蔗糖标准液用80%乙醇进行梯度(0、10、20、40、60、80和100 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)稀释。分别取0.4 mL溶液加200 μL 2 mol·L⁻¹ NaOH, 100℃煮沸5分钟, 冷却后加2.8 mL 30%盐酸和0.8 mL 0.1%间苯二酚, 摇匀后于80℃水浴10分钟, 冷却后在480 nm处测定OD值, 然后计算样品中的蔗糖含量。将葡萄糖标准液用80%乙醇进行梯度(0、15、30、50、75、100、150和200 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)稀释。取8支试管分别加入4 mL酶制剂, 置于30℃水浴, 待管中酶液温度上升达到平衡后, 分别加入2 mL梯度稀释后的葡萄糖溶液, 摇匀后保温5分钟, 再各加入8 mL 10 mol·L⁻¹硫酸终止反应。当酶液温度与室温平衡后, 测定460 nm处OD值, 然后计算样品中的葡萄糖含量。将果糖溶液用80%乙醇进行梯度(0、15、30、50、75、100、150和200 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)稀释。取8支试管, 分别加入1 mL梯度稀释后的果糖溶液, 然后分别加入2 mL 30%盐酸、1 mL 0.1%间苯二酚及1 mL H₂O, 摇匀。在80℃水浴中反应10分钟, 然后冷却至室温, 480 nm处测OD值, 然后计算样品中的果糖含量。

1.6 可溶性蛋白含量测定

采用考马斯亮蓝G-250法(Bradford, 1976)测定可溶性蛋白含量。以标准牛血清蛋白浓度作标准曲线, 分别加入2 mL染料试剂立即混匀, 用分光光度计测定波长595 nm处OD值, 以2 mL蒸馏水加2 mL染料试剂作为比色空白对照。通过标准曲线计算得出蛋白质质量浓度。

1.7 α -淀粉酶活性测定

参考3,5-二硝基水杨酸(DNS)法(李合生, 2000)测定 α -淀粉酶活性。取0.1 g萌发种子研磨至匀浆, 离心20分钟后取上清液备用。在对照和测定管中各加1 mL酶提取液, 70℃水浴15分钟后迅速冷却。在试管中各加入1 mL柠檬酸缓冲液, 对照管中各加入4 mL 0.4 mol·L⁻¹ NaOH钝化酶活, 然后测定560 nm处OD值。

1.8 总RNA提取和qRT-PCR

采用TaKaRa Mini BEST Plant RNA Extraction Kit (TaKaRa, Cat No.9769)试剂盒提取总RNA。采用TaKaRa Prime Script RT Master Mix Perfect Real Time (TaKaRa, Cat No.RR036A)试剂盒进行反转录。Real Time PCR采用TB Green Premix Ex Taq Tli RNaseH Plus (TaKaRa, Cat No.RR82LR)试剂盒进行。SR基因引物序列来自Dong等(2018)的研究, 其它引物采用Primer premier 5.0进行设计(表1)。

1.9 数据处理

采用SPSS 25.0软件(SPSS, 芝加哥, IL)进行数据统计分析, 采用Microsoft Excel 2016软件作图。使用2^{- $\Delta\Delta\text{Ct}$} 方法(Livak and Schmittgen, 2001)分析qRT-PCR数据, 采用SPSS 25.0软件进行单因素方差分析和最小显著性差异多重比较检验($P < 0.05$)。

2 结果与讨论

2.1 不同处理对PC和WT种子活力的影响

PEG处理可降低PC和WT的发芽势(图1A)、发芽率(图1B)、活力指数(图1C)和发芽指数(图1D)。图1E显示不同处理天数下各处理的种子发芽情况。PEG+PB处理可显著抑制种子发芽; PEG+5azaC处理可减弱干

表1 引物序列

Table 1 Primers used in this study

Gene	Forward primer (5'–3')	Reverse primer (5'–3')
<i>Actin</i>	CCCTCAAACATCGGTATGGA	TTGATCTTCATGCTGCTTGG
<i>OsK1a</i>	AACCAGAGGTAACAGGCAGG	AACCAGAGGTAACAGGCAGG
<i>OsK24</i>	CGTGTTGGCTTCAGTGAAT	CCTTCTCTATCTAAGGGCCG
<i>OsK35</i>	TTGTGTTGGCTTCAGTGAAA	CCTTCGCTGTCTAAGGACTG
<i>C₄-PEPC</i>	CCCACTATCCTTCGCAAGAC	CTAGCCAGTGTCTGCATGCCGG
<i>Osppc2a</i>	CTGGTTGAGATGGTTTTCGC	GGTGTGAATTCAGGCACTTC
<i>SAPK8</i>	ATAGATGATAATGTCCAGCG	GTTCTACAGTGGATTTTGG
<i>SAPK9</i>	CACAGCAACGCCGTCTCC	CACACTTCCACCGCTACCAA
<i>SAPK10</i>	TGCTGATGTGTGGTCGTGTG	TGCTGGTATGGTCGCCTCT
<i>SR40</i>	CAATCTGGGGACTGCTTTC	TCCTGCTTGGGCTTTTACT
<i>SR33</i>	ATATTGCCTGCTACCCGAAAG	CAGAGCAGCACCCAGTTTATTAC
<i>OsAmy1A</i>	TTTCGGTCCTCATCGTCCTCC	TCCACGACTCCCAGTTGAATC
<i>OsAmy1C</i>	TGGTATCGATCAGAAACCGGC	GTCCGACCTTCGTGATGACC
<i>OsAmy3C</i>	AAGCATTCCACCACAATGAGC	AGGAAGTTGTACCACCCACC
<i>OsAmy3E</i>	TCACCCTGTGTTGTGTCGTT	AAAGTTGTACCACCCGCCTT

Actin: 肌动蛋白; *OsK1a*/*OsK24*/*OsK35*: 丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶; *C₄-PEPC*: *C₄*型磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶; *Osppc2a*: *C₃*型磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶; *SAPK8–10*: 丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶8–10; *SR40*/*SR33*: 丝氨酸/精氨酸丰富蛋白; *OsAmy1A*/*OsAmy1C*/*OsAmy3C*/*OsAmy3E*: α-淀粉酶基因

Actin: Actin; *OsK1a*/*OsK24*/*OsK35*: Serine/threonine protein kinase; *C₄-PEPC*: *C₄* phosphoenolpyruvate carboxylase; *Osppc2a*: *C₃* phosphoenolpyruvate carboxylase; *SAPK8–10*: Serine/threonine protein kinase 8–10; *SR40*/*SR33*: Serine/arginine-rich protein; *OsAmy1A*/*OsAmy1C*/*OsAmy3C*/*OsAmy3E*: α-amylase gene

旱对PC和WT发芽势的抑制作用, 其中对PC的作用更为显著; PEG+PB+5azaC处理可减弱干旱对供试材料种子发芽率的抑制, 比PEG+PB处理对发芽的恢复作用更大。PB对PC的抑制作用小于WT, DNA甲基化抑制剂对PC发芽恢复作用更大, PC的发芽势、发芽指数和活力指数表现与其发芽率类似。

2.2 不同处理对PC和WT种子根长和芽长的影响

不同处理下WT和PC种子根长(图2A)、芽长(图2B)和根芽比(图2C)的变化差异显著。与PC CK相比, PC PEG单独处理使PC根长增加, WT根长变短, 抑制了PC和WT芽的生长, 且两材料的根芽比更大。PC PEG+PB和WT PEG+PB处理可明显抑制PC和WT的根长、芽长和根芽比, 且与WT相比, 对PC的抑制作用较小。PC PEG+5azaC处理对PC生根影响不大, 但抑制WT生根, 均抑制PC和WT发芽, 但对PC的抑制作用小于WT, 且与PEG单独处理相比, 该处理对PC芽生长有缓解作用, PC和WT的根芽比更大。PC PEG+PB+5azaC和WT PEG+PB+5azaC处理抑制

PC和WT的根长和芽长, 但对PC的抑制作用较小, 该处理与干旱联合PB处理相比, 可促进PC芽生长, 降低PC和WT的根芽比, 根在处理第4天之后才明显生长。上述结果表明, 可变剪接抑制剂显著抑制了供试材料根和芽长, 而甲基化抑制剂则发挥促进作用。从根芽比看, 处理后期根的伸长部分恢复, 但是两者并没有缓解可变剪接抑制剂对其根和芽生长的影响。

2.3 不同处理对PC和WT种子萌发过程中可溶性总糖和可溶性蛋白含量的影响

渗透调节物质(主要包括可溶性糖和可溶性蛋白)的积累是植物抵御逆境的有效方式。PEG、PEG+PB和PEG+PB+5azaC处理降低了种子萌发过程中的可溶性总糖含量(图3A); 而PEG+5azaC处理使PC种子萌发过程中可溶性总糖含量增加, 表明PEG+PB处理显著降低了可溶性总糖的含量, PEG+5azaC处理则提高了种子内可溶性总糖的含量。值得关注的是, DNA甲基化抑制剂和可变剪接抑制剂联合干旱处理均加大了两材料可溶性糖含量的差异, PC可溶性糖含量

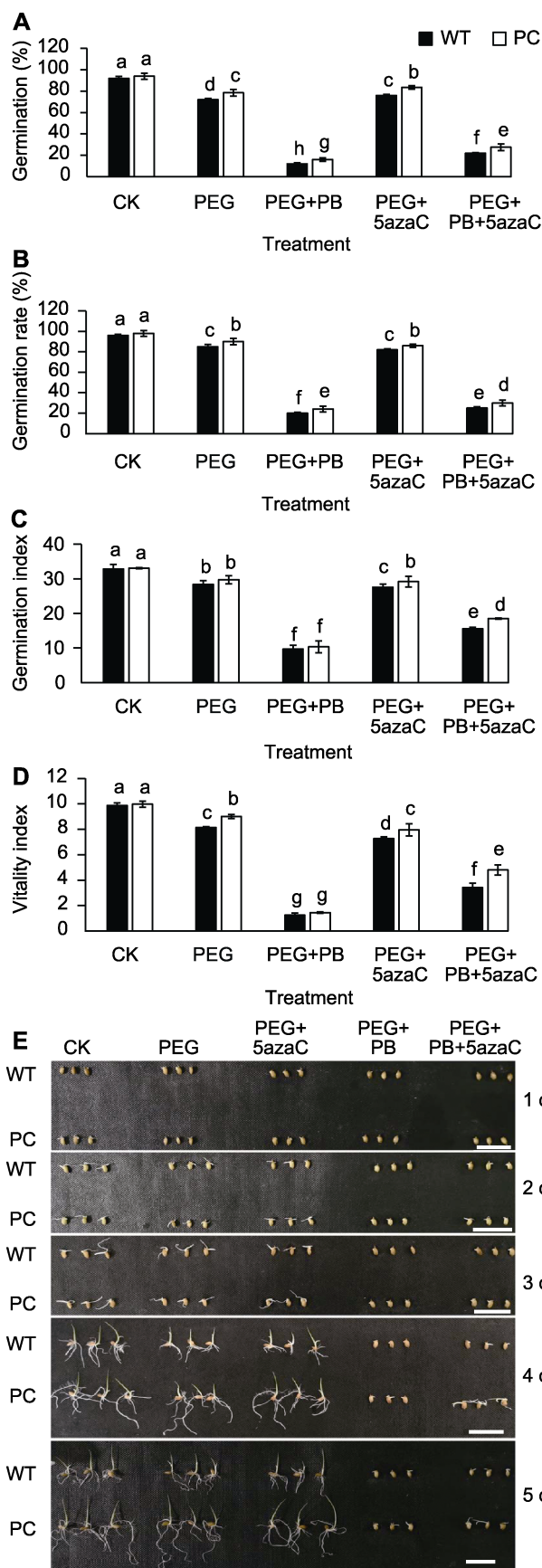


图1 不同处理对转基因水稻(PC)和野生型水稻(WT)种子活力的影响

(A) 发芽势; (B) 发芽率; (C) 发芽指数; (D) 活力指数; (E) 种子发芽图片。不同小写字母表示差异显著($P<0.05$)。Bars=0.5 cm

Figure 1 Effects of different treatments on seed vigor of transgenic rice (PC) and wild type rice (WT)

(A) Germination; (B) Germination rate; (C) Germination index; (D) Vigor index; (E) Images of germinating seeds at different time. Different lowercase letters indicate significant differences ($P<0.05$). Bars=0.5 cm

高于WT。PEG处理延缓了PC和WT可溶性蛋白含量的降低(图3B); PEG+PB处理加速PC与WT可溶性蛋白含量的下降; PEG+5azaC处理延缓了PC和WT可溶性蛋白降低的过程。表明PEG+PB处理显著降低了可溶性蛋白含量, PEG+5azaC处理则提高了种子可溶性蛋白含量, 可变剪接抑制剂联合干旱处理加大了转基因和野生型水稻可溶性蛋白含量的差异, 种子萌发过程中可溶性蛋白含量PC比WT下降缓慢。

2.4 不同处理对PC和WT种子萌发过程中糖组分含量的影响

可溶性总糖在萌发24和48小时出现显著差异, 我们进一步分析了主要糖组分在同期的变化。图4A–C显示PC和WT种子在不同处理24小时糖组分含量的差异。其中, PEG处理使PC和WT种子蔗糖和果糖含量降低; PEG+PB处理使两材料蔗糖、葡萄糖和果糖含量降低; PEG+5azaC处理使两材料中蔗糖、葡萄糖与果糖的含量增加; PEG+PB+5azaC处理使两材料蔗糖、葡萄糖和果糖含量降低。图4D–F显示PC和WT种子在不同处理48小时糖组分含量的差异, 其中PEG处理使PC和WT种子蔗糖和葡萄糖的含量降低; PEG+PB处理使两材料蔗糖、葡萄糖和果糖的含量降低; PEG+5azaC处理使两材料中蔗糖、葡萄糖与果糖的含量增加。此外, 用可变剪接抑制剂处理24小时后, PC的蔗糖和葡萄糖含量高于WT; 处理48小时PC的蔗糖、葡萄糖和果糖含量高于WT。

2.5 不同处理对PC和WT种子萌发过程中SnRK家族相关基因表达的影响

在不同处理条件下, PC和WT糖组分的差异反映糖和能量水平的变化。为验证这种变化是否与糖信号SnRK家族相关基因有关, 我们选取与能量水平密切

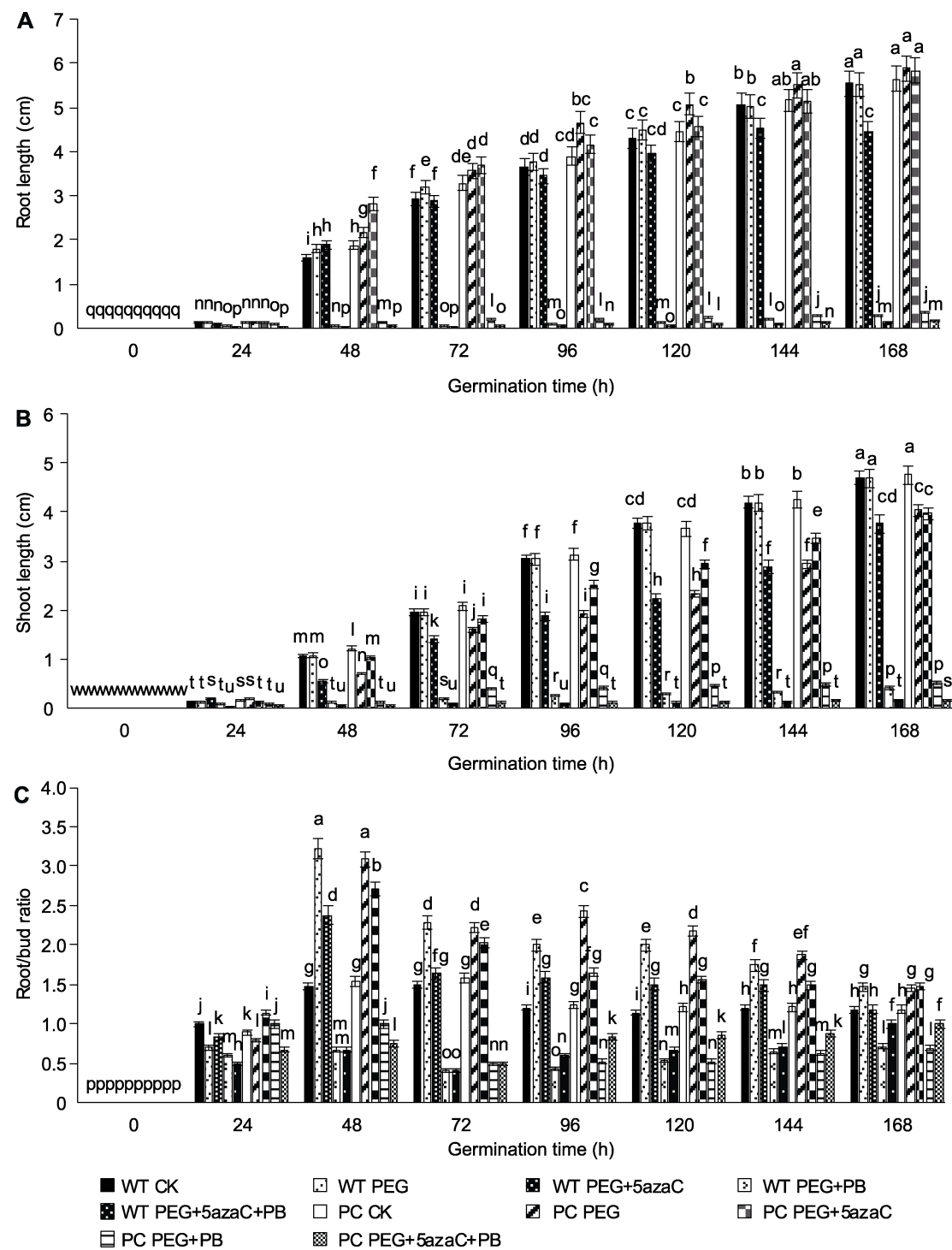


图2 不同处理下转基因水稻(PC)和野生型水稻(WT)萌发种子根长(A)、芽长(B)和根芽比(C)的变化
不同小写字母表示差异显著($P<0.05$)。

Figure 2 Effects of different treatments on root length (A), shoot length (B) and root/bud ratio (C) of transgenic rice (PC) and wild type rice (WT) germinating seeds
Different lowercase letters indicate significant differences ($P<0.05$).

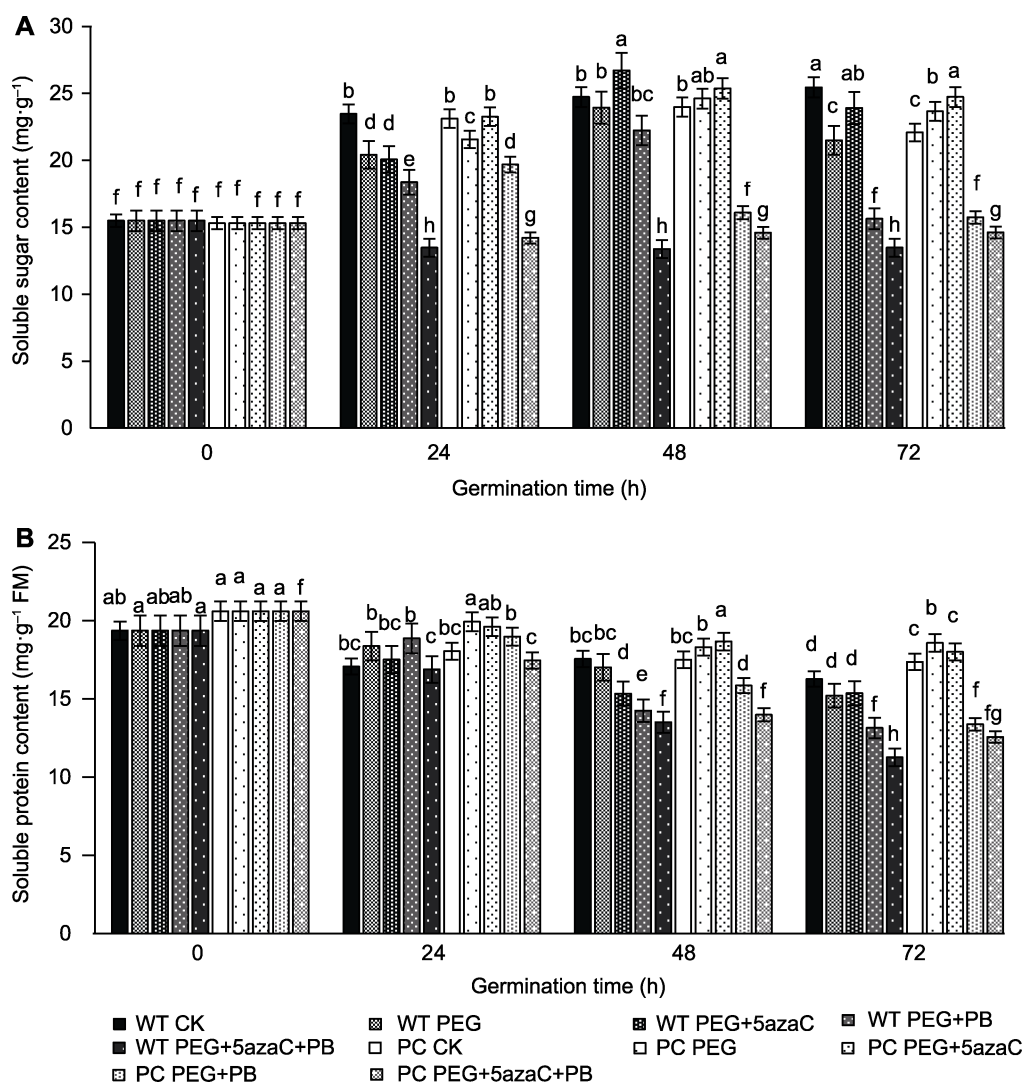


图3 不同处理对转基因水稻(PC)和野生型水稻(WT)种子萌发过程中可溶性总糖含量(A)和可溶性蛋白含量(B)的影响。不同小写字母表示差异显著($P<0.05$)。

Figure 3 Effects of different treatments on total soluble sugar content (A) and soluble protein content (B) of transgenic rice (PC) and wild type rice (WT) germinating seeds. Different lowercase letters indicate significant differences ($P<0.05$).

相关的3个SnRK1家族基因(*OsK1a*、*OsK24*和*OsK35*)以及与逆境相关的ABA依赖的3个SnRK2家族基因(*SAPK8*、*SAPK9*和*SAPK10*),分析其基因表达响应干旱的变化。图5A–C显示,PEG+PB处理抑制供试材料SnRK1相关基因的表达,PEG+5azaC处理显著提高SnRK1相关基因的表达水平,表明两种表观遗传机制的确影响了SnRK1基因的表达,而且与蔗糖的含量呈现同步。图5D–F显示,PEG+PB处理下调SnRK2相关基因的表达,而且与葡萄糖的含量同

步;PEG+5azaC处理使SnRK2相关基因的表达量增加。值得关注的是,PC可溶性糖的降幅始终小于WT,因此,PC的糖类相关基因表达仍高于WT。

2.6 不同处理对PC和WT种子萌发过程中剪接因子相关基因表达的影响

丝氨酸/精氨酸丰富蛋白家族(arginine/serine-rich proteins, SR proteins)是真核生物中的一类剪接因子,在前体mRNA的组成性和选择性剪接中起作用

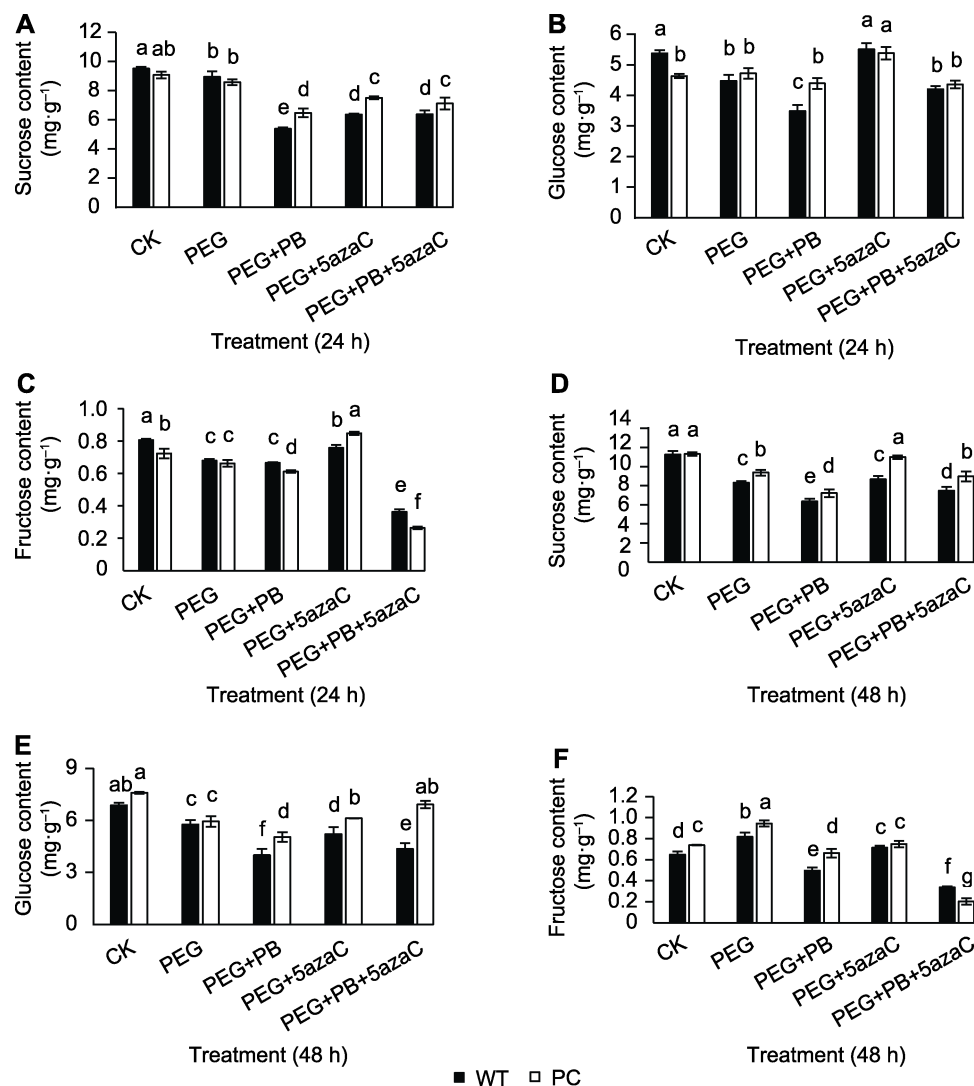


图4 不同处理对转基因水稻(PC)和野生型水稻(WT)种子萌发过程中糖组分含量的影响

(A), (D) 分别为发芽24和48小时的蔗糖含量; (B), (E) 分别为发芽24和48小时的葡萄糖含量; (C), (F) 分别为发芽24和48小时的果糖含量。不同小写字母表示差异显著($P < 0.05$)。

Figure 4 Effects of different treatments on sugar content of transgenic rice (PC) and wild type rice (WT) germinating seeds (A), (D) Sucrose content at 24 h and 48 h after germination, respectively; (B), (E) Glucose content at 24 h and 48 h after germination, respectively; (C), (F) Fructose content at 24 h and 48 h after germination, respectively. Different lowercase letters indicate significant differences ($P < 0.05$).

(Reddy and Shad, 2011)。其中SR为植物所特有,在植物响应环境胁迫中起重要作用(Staiger and Brown, 2013)。拟南芥*SR40*的突变体比野生型对脱落酸更敏感(Cruz et al., 2014),在矿质元素缺乏条件下*SR33*具有调节水稻中磷元素分布的作用(Dong et al., 2018)。PEG处理上调PC和WT中*SR33*基因的表达;PEG+PB和PEG+5azaC处理均下调*SR40*和*SR33*基因的表达,其中PC中*SR40*和*SR33*的表达比WT更高

(图6A, B)。以上结果表明,可变剪接抑制剂对不同剪接因子基因表达的影响与其糖信号的表现类似。

2.7 不同处理对PC和WT种子萌发过程中PEPC相关基因表达的影响

剪接因子基因的变化是否改变了PC的*PEPC*基因的变化值得关注。PC不仅包括内源C₃型*PEPC*基因(*Osppc2a*),还包括外源导入的玉米C₄-*PEPC*基因

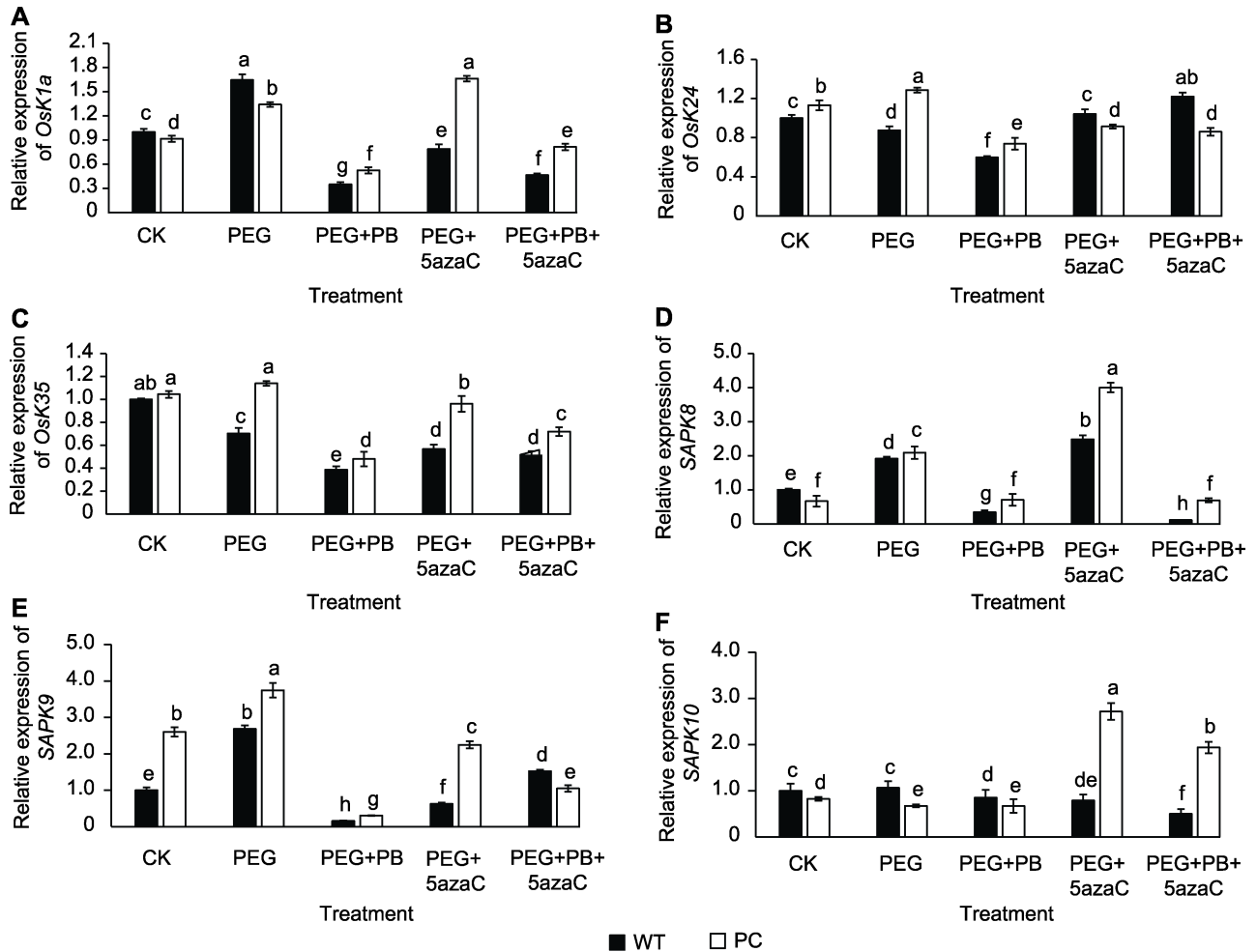


图5 不同处理对转基因水稻(PC)和野生型水稻(WT)种子萌发过程中SnRK相关基因表达的影响
不同小写字母表示差异显著($P < 0.05$)。

Figure 5 Effects of different treatments on the expression of SnRK related genes in transgenic rice (PC) and wild type rice (WT) germinating seeds
Different lowercase letters indicate significant differences ($P < 0.05$).

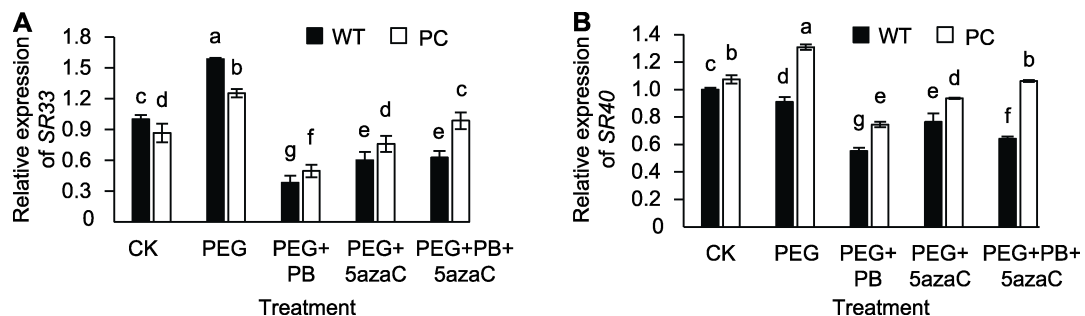


图6 不同处理对转基因水稻(PC)和野生型水稻(WT)种子萌发过程中剪接因子相关基因表达的影响
不同小写字母表示差异显著($P < 0.05$)。

Figure 6 Effects of different treatments on expression of splicing factor related genes in transgenic rice (PC) and wild type rice (WT) germinating seeds
Different lowercase letters indicate significant differences ($P < 0.05$).

(*C₄-PEPC*)。本研究检测了*C₄-PEPC*和*Osppc2a*基因表达水平。结果表明,PEG单独处理可上调PC中*C₄-PEPC*的表达;PEG+PB处理则下调PC中*C₄-PEPC*的表达;PEG+PB+5azaC处理可上调PC中*C₄-PEPC*的表达(图7A)。图7B显示,PEG处理均上调供试材料*Osppc2a*基因的表达;PEG+PB处理下调了*Osppc2a*基因的表达;PEG+5azaC处理也上调两供试材料*Osppc2a*基因的表达;PEG+PB+5azaC处理上调两供试材料*Osppc2a*基因表达。以上结果表明,两种表观遗传抑制剂确实影响了*C₄-PEPC*和*Osppc2a*的表达,但并未完全抑制,暗示可能还存在其它机制参与其对干旱的响应。

2.8 不同处理对PC和WT种子萌发过程中 α -淀粉酶相关基因表达的影响

图8A–D显示,PEG单独处理上调了PC和WT *OsAmy3C* 基因的表达;PEG+PB处理促进了PC种子

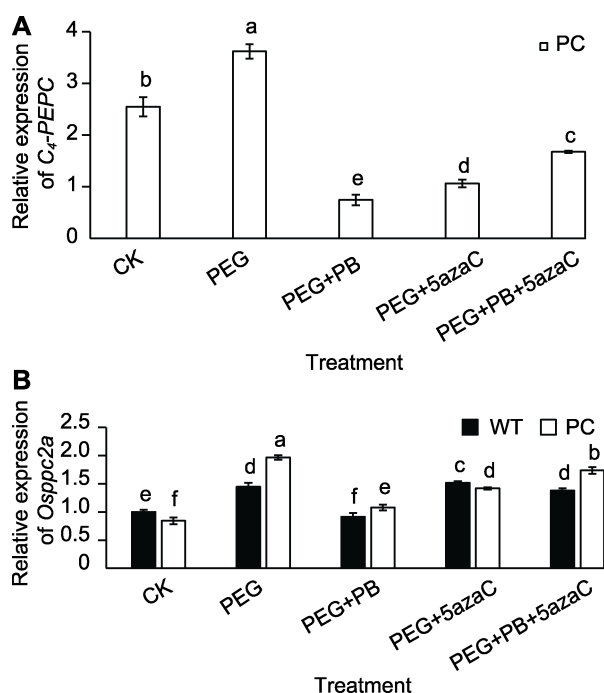


图7 不同处理对转基因水稻(PC)和野生型水稻(WT)种子萌发过程中PEPC相关基因表达的影响
不同小写字母表示差异显著($P < 0.05$)。

Figure 7 Effects of different treatments on expression of PEPC-related genes in transgenic rice (PC) and wild type rice (WT) germinating seeds
Different lowercase letters indicate significant differences ($P < 0.05$).

OsAmy1A、*OsAmy1C*和*OsAmy3C*的表达,对其中*OsAmy3C*的影响与单独干旱处理类似,表现为诱导增加,而对*OsAmy3E*则显著抑制;PEG+5azaC处理均下调了*OsAmy1A*和*OsAmy1C*的表达,上调了*OsAmy3E*的表达;PEG+PB+5azaC处理均下调*OsAmy1A*、*OsAmy1C*和*OsAmy3E*的表达。其中,两种表观遗传抑制剂处理下PC的*OsAmy1A*和*OsAmy3C*的表达均显著高于WT,与PC的发芽率与发芽势的表现一致。

2.9 不同处理对PC和WT种子萌发过程中 α -淀粉酶活性的影响

图9显示在萌发24小时后,PEG单独处理下,PC和WT的 α -淀粉酶活性均高于对照,且PC高于WT;PEG+PB处理下WT和PC表现不同,PC的表现高于其对照CK,而WT则表现低于其对照;PEG+5azaC和PEG+PB+5azaC处理下,PC和WT均低于对照;在萌发后48–72小时,各处理条件下PC和WT的 α -淀粉酶活性均逐渐下降至低于对照,但PC下降程度仍小于WT。

2.10 表观遗传抑制剂处理下PC和WT种子萌发过程各指标相关性分析

相关性分析显示,本研究中PC发芽势分别与*SAPK10*和*C₄-PEPC*基因表达显著相关($P < 0.05$);发芽率分别与 α -淀粉酶活性、*OsK1a*、*OsAmy1A*以及*SR40*基因表达显著相关;发芽指数分别与种子中蔗糖和葡萄糖含量显著相关($P < 0.05$);可溶性蛋白与*OsAmy1A*基因表达量相关, α -淀粉酶活性与*OsAmy1A*基因表达水平呈极显著相关($P < 0.01$)。*OsK1a*表达分别与*SR40*、*C₄-PEPC*基因表达显著相关;*SAPK8*表达分别与*OsAmy1A*、*SR40*基因表达显著相关($P < 0.05$)。*OsAmy1A*表达与*SR33*基因表达呈极显著相关($P < 0.01$);*SR40*表达与*C₄-PEPC*基因表达相关;WT发芽势与*OsAmy1A*基因表达显著相关($P < 0.05$);发芽率与*SAPK8*表达显著相关($P < 0.05$);可溶性糖含量分别与*OsK35*、*Osppc2a*基因表达显著相关($P < 0.05$);葡萄糖含量与*SAPK8*基因表达呈极显著相关($P < 0.01$); α -淀粉酶活性与*OsAmy1A*基因表达相关;*OsK35*表达与*Osppc2a*基因表达显著相关($P < 0.05$);*SAPK9*表达与*SAPK10*、*OsAmy3E*基因表达相关(附表1)。

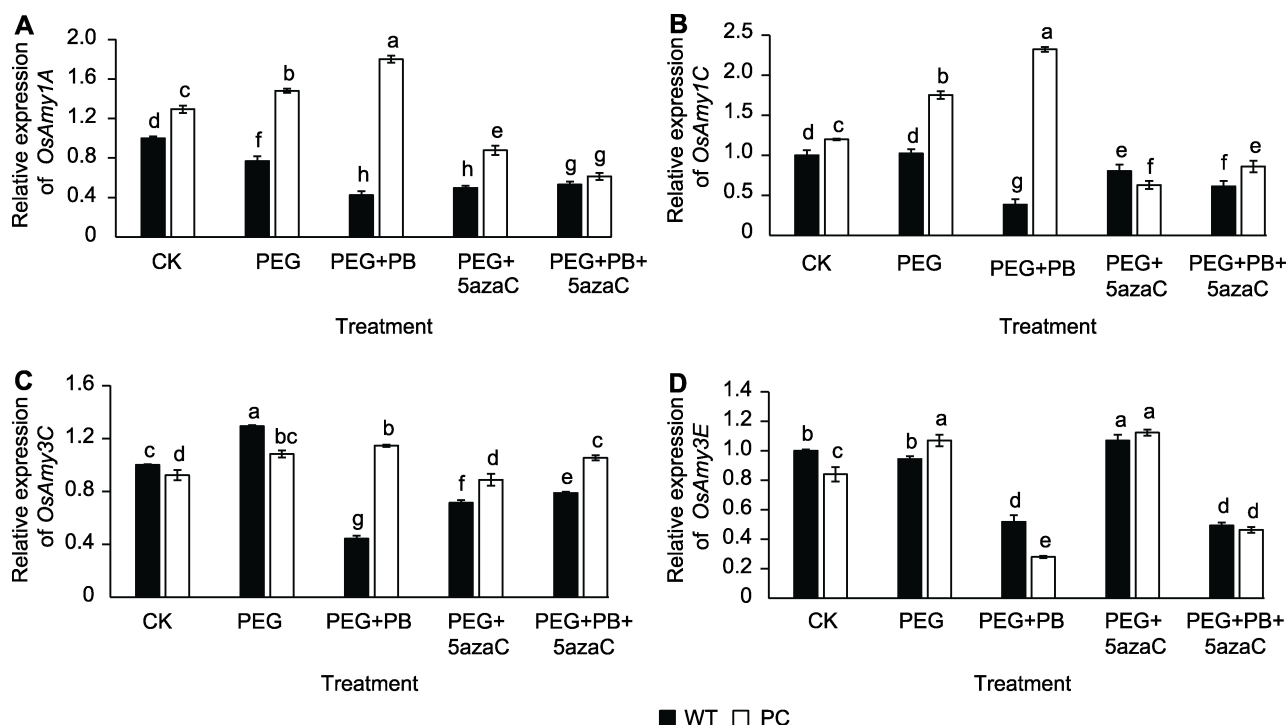


图8 不同处理对转基因水稻(PC)和野生型水稻(WT)种子萌发过程中 α -淀粉酶相关基因表达的影响
不同小写字母表示差异显著($P < 0.05$)。

Figure 8 Effects of different treatments on expression of α -amylase related genes in transgenic rice (PC) and type wild rice (WT) germinating seeds
Different lowercase letters indicate significant differences ($P < 0.05$).

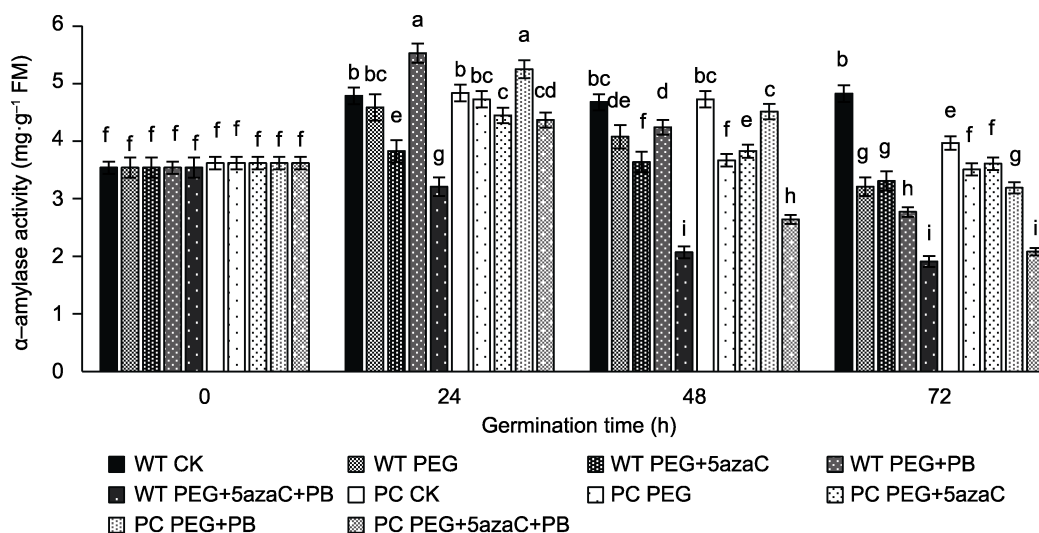


图9 不同处理对转基因水稻(PC)和野生型水稻(WT)种子萌发过程中 α -淀粉酶活性的影响
不同小写字母表示差异显著($P < 0.05$)。

Figure 9 Effects of different treatments on α -amylase activity in transgenic rice (PC) and wild type rice (WT) germinating seeds
Different lowercase letters indicate significant differences ($P < 0.05$).

2.11 讨论

C₄植物的磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶可将二氧化碳输送至核酮糖-1,5-二磷酸羧化酶(Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase, Rubisco), 在高光强和高温下也能更快地进行光合作用, 因此C₄植物光合作用效率高, 并具有更好的水分利用率(Lata et al., 2013; Muthamilarasan et al., 2014)。高表达转玉米C₄型PEPC基因水稻的耐逆表现为丰富植物耐旱机理提供了很好的研究材料。本研究从供试种子的发芽情况、萌发过程中可溶性糖及可溶性蛋白含量、相关基因表达以及 α -淀粉酶活性的变化进行分析, 结果表明, 表观遗传机制-DNA甲基化和可变剪接参与了供试材料芽期的干旱响应, 其中对PC的作用更明显, 与其相关的糖信号SnRK1s和SnRK2s基因的表达有关。

有效的种子发芽使幼苗健壮地生长, 并具有抵御生物或非生物胁迫的能力, 从而最终发展成为高产作物(Foolad et al., 2007)。种子发芽需要有利的的环境条件, 包括水、氧气和温度, 以及多种细胞过程如合成、转运和信号转导的结合(Miransari and Simith, 2014)。干种子在吸水后需通过DNA修复、mRNA的转录及翻译迅速恢复代谢活性(Dinkova et al., 2011)。水稻种子萌发过程中, α -淀粉酶起主导作用(Damaris et al., 2019)。种子田间萌发出苗过程中常遇干旱胁迫, 因此研究不同基因型水稻种子逆境萌发过程中主要相关酶活性和基因表达差异, 对进一步认识种子活力的生化和分子基础具有重要参考价值(李美玲等, 2017)。 α -淀粉酶基因Amy1A、Amy1C、Amy3C和Amy3E是种子萌发过程中的重要基因(Nanjo et al., 2004; Hakata et al., 2012; Hu et al., 2016; Nakata et al., 2017)。本研究表明, 在PB联合PEG处理后, PC的 α -淀粉酶活性高于WT, PC的OsAmy1A、OsAmy1C和OsAmy3C表达水平更高, 可能与PC耐旱有关; 5azaC联合PEG处理后, PC的 α -淀粉酶活性高于WT, PC的OsAmy1A和OsAmy3C表达量也较高, 表明DNA甲基化和可变剪接这2种表观遗传途径参与水稻种子萌发过程中的干旱响应。

为了能够在胁迫条件下生存, 植物进化出复杂的机制来感知外部信号, 从而对环境变化做出最佳反应, 其中表观遗传机制调控植物应答外界胁迫是近年来发现的重要机制之一, DNA甲基化和可变剪接均是其中的重要途径(杜康兮等, 2018)。已有研究表明, 水

稻干旱响应基因的甲基化水平显著增高(Yan et al., 2010)。在植物中包含内含子的基因有可变剪接现象, 其中拟南芥和水稻中分别有61%和33%含有内含子的基因存在可变剪接(Wang and Brendel, 2006; Marquez et al., 2012)。AS在植物发育和环境应答中的作用已受到越来越多研究者的重视, 已报道在烟草、小麦(*Triticum aestivum*)、水稻和拟南芥中与生物和非生物胁迫相关的基因包括HsfA2、INH2、sad1/lsm5、Wdreb2、RPS4、SR(SR32和SR33a)、TNL和CNL等(Dinesh and Baker, 2000; Egawa et al., 2006; Zhang and Gassmann, 2007; Gassmann, 2008; Brummell et al., 2011; Golisz et al., 2013; Liu et al., 2013; Zhang et al., 2013; 宋凝曦等, 2020)。研究还发现, 包括水稻在内的许多作物在响应非生物胁迫中发生了AS, 受干旱程度影响会导致可变剪接的数目上升(Filichkin et al., 2014)。PB作为植物中AS的抑制剂, 以浓度依赖性方式对植物生长和发育表现出显著的抑制作用(Ling et al., 2017)。本研究也发现, 0.25 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ PB可显著抑制供试材料的种子萌发能力, 加入5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 5azaC并未缓解PB对种子萌发的抑制, 从供试水稻发芽率抑制程度看, AS起的作用大于DNA甲基化的作用。

丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶是一个相对较大的蛋白激酶家族, 其中AMPK (AMP-activated kinase)/SnRKs是高度保守的丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶家族的重要成员。SnRKs可以细分成3个亚家族(SnRK1、SnRK2和SnRK3)。SnRK1主要在调节植株生长发育、维持能量平衡以及响应生物逆境方面发挥重要作用; SnRK2则在响应干旱以及盐碱等非生物胁迫中发挥重要作用; SnRK3更多地参与胞内离子浓度的平衡, 通过调节离子浓度迅速启动植株响应非生物胁迫(张金飞等, 2017)。本研究中, PB联合干旱处理后抑制了蔗糖相关的SnRK1亚家族基因和葡萄糖相关的依赖ABA的SnRK2亚家族基因表达, 而加入5azaC联合干旱处理则对SnRK1亚家族基因OsK1a、OsK24及SnRK2亚家族基因SAPK9有上调作用。研究表明, 5% PEG6000模拟干旱处理1小时后, 表达PC的C₄-PEPC启动子-1 095至-416区域中出现去甲基化现象(Liu et al., 2017)。本研究进一步表明, PEG联合DNA甲基化抑制剂处理可上调PC的SnRK1和SnRK2相关基因表达, 可能有利于其C₄-PEPC基因

的表达从而响应干旱。丝氨酸/精氨酸丰富蛋白家族 (arginine/serine-rich proteins, SR proteins) 是在真核生物前体 mRNA 选择性剪接中起作用的一类剪接因子, 在植物发育以及对环境的响应中具有关键作用 (Reddy and Shad, 2011)。本研究发现在 PB 联合干旱处理后, 供试材料种子中剪接因子相关基因 *SR33* 和 *SR40* 的表达下降, 证实 PB 通过调节剪接子相关基因的表达而下调 AS, 从而抑制种子萌发, 调控其干旱耐受性。

本研究阐明了表观遗传机制对于干旱条件下 PC 种子萌发的效应。结果表明, $0.25 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ PB 联合干旱处理对供试水稻种子萌发均表现出显著的抑制作用。添加 PB 后, 种子萌发过程中可溶性总糖、蔗糖、葡萄糖、果糖含量以及可溶性蛋白含量下降, 该处理还抑制蔗糖相关的 SnRK1 亚家族基因和葡萄糖相关的 SnRK2 亚家族基因表达, α -淀粉酶相关基因以及剪接因子 SR 相关基因表达也被抑制, 但对 PC 的抑制作用小于 WT。 $5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 5azaC 联合干旱处理则与可变剪接抑制剂的效果相反。用 5azaC 联合 PB 处理可部分缓解干旱对供试水稻种子萌发的抑制效果。

综上, 水稻种子萌发时如遇到干旱胁迫, 会通过 DNA 去甲基化或者增加可变剪接来响应干旱胁迫, 而且两供试材料抑制程度的差异与其糖信号相关基因的差异表达有关。本研究阐明了 DNA 甲基化和可变剪接途径对供试水稻芽期干旱的影响, 但是两种途径如何互动尚未探讨, 糖如何诱导 PC 的表观遗传途径还需后续深入研究。

参考文献

陈蕾太, 孙爱清, 杨敏, 陈路路, 马雪丽, 李美玲, 尹燕桦 (2016). 基于小麦种子发芽逆境抗逆指数的种子活力评价. 应用生态学报 **27**, 2968–2974.

杜康兮, 沈文辉, 董爱武 (2018). 表观遗传调控植物响应非生物胁迫的研究进展. 植物学报 **53**, 581–593.

焦德茂, 匡廷云, 李霞, 戈巧英, 黄雪清, 郝乃斌, 白克智 (2003). 转 *PEPC* 基因水稻具有初级 CO₂ 浓缩机制的生理特点. 中国科学(C辑) **33**, 33–39.

焦德茂, 李霞, 黄雪清, 迟伟, 匡廷云, 古森本 (2001). 转 *PEPC* 基因水稻的光合 CO₂ 同化和叶绿素荧光特性. 科学通报 **46**, 414–418.

李合生 (2000). 植物生理生化实验原理和技术. 北京: 高等教育出版社. pp. 123–124.

李美玲, 孙爱清, 杨敏, 张杰道, 王振林, 陈蕾太, 陈路路, 马雪丽, 尹燕桦 (2017). 小麦热风抗性鉴定及热胁迫相关基因 *TaHSPs* 的表达分析. 麦类作物学报 **37**, 162–174.

刘小龙, 李霞, 钱宝云 (2015). 外源 Ca²⁺ 对 PEG 处理下转 C₄ 型 *PEPC* 基因水稻光合生理的调节. 植物学报 **50**, 206–216.

曲瑞莲, 吴春霞, 冯献忠 (2014). mRNA 选择性剪接在植物发育中的作用. 植物生理学报 **50**, 717–724.

宋凝曦, 张晓敬, 陆佳岚, 李霞, 谢寅峰 (2020). 可变剪接在植物响应胁迫中的作用. 植物生理学报 **56**, 1201–1211.

张金飞, 李霞, 何亚飞, 谢寅峰 (2018). 外源葡萄糖增强高表达转玉米 C₄ 型 *PEPC* 水稻耐旱性的生理机制. 作物学报 **44**, 82–94.

张金飞, 李霞, 谢寅峰 (2017). 植物 SnRKs 家族在胁迫信号通路中的调节作用. 植物学报 **52**, 346–357.

Ambavaram MMR, Basu S, Krishnan A, Ramegowda V, Batlang U, Rahman L, Baisakh N, Pereira A (2014). Coordinated regulation of photosynthesis in rice increases yield and tolerance to environmental stress. *Nat Commun* **5**, 5302.

Bradford MM (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**, 248–254.

Brummell DA, Chen RKY, Harris JC, Zhang HB, Hamiaux C, Kralicek AV, McKenzie MJ (2011). Induction of vacuolar invertase inhibitor mRNA in potato tubers contributes to cold-induced sweetening resistance and includes spliced hybrid mRNA variants. *J Exp Bot* **62**, 3519–3534.

Cao Y, Ma LG (2019). To splice or to transcribe: SKIP-mediated environmental fitness and development in plants. *Front Plant Sci* **10**, 1222.

Chen PB, Li X, Huo K, Wei XD, Dai CC, Lv CG (2014). Promotion of photosynthesis in transgenic rice over-expressing of maize C₄ phosphoenolpyruvate carboxylase gene by nitric oxide donors. *J Plant Physiol* **6**, 458–466.

Cruz TMD, Carvalho RF, Richardson DN, Duque P (2014). Abscisic acid (ABA) regulation of *Arabidopsis* SR protein gene expression. *Int J Mol Sci* **15**, 17541–17564.

Damaris RN, Lin ZY, Yang PF, He DL (2019). The rice α -amylase, conserved regulator of seed maturation and germination. *Int J Mol Sci* **20**, 450.

Dinesh SP, Baker BJ (2000). Alternatively spliced *N* resistance gene transcripts: their possible role in tobacco mo-

- saic virus resistance. *Proc Nat Acad Sci USA* **97**, 1908–1913.
- Dinkova TD, Márquez-Velázquez NA, Aguilar R, Lázaro-Mixteco PE, de Jiménez ES** (2011). Tight translational control by the initiation factors eIF4E and eIF(iso)4E is required for maize seed germination. *Seed Sci Res* **21**, 85–93.
- Dong CL, He F, Berkowitz O, Liu JX, Cao PF, Tang M, Shi HC, Wang WJ, Li QL, Shen ZG, Whelan J, Zheng LQ** (2018). Alternative splicing plays a critical role in maintaining mineral nutrient homeostasis in rice (*Oryza sativa*). *Plant Cell* **30**, 2267–2285.
- Egawa C, Kobayashi F, Ishibashi M, Nakamura T, Nakamura C, Takumi S** (2006). Differential regulation of transcript accumulation and alternative splicing of a DREB2 homolog under abiotic stress conditions in common wheat. *Genes Genet Syst* **81**, 77–91.
- Filichkin SA, Cumbie JS, Dharmawardhana P, Jaiswal P, Chang JH, Palusa SG, Reddy ASN, Megraw M, Mockler TC** (2015). Environmental stresses modulate abundance and timing of alternatively spliced circadian transcripts in *Arabidopsis*. *Mol Plant* **8**, 207–227.
- Foolad MR, Subbiah P, Zhang LP** (2007). Common QTL affect the rate of tomato seed germination under different stress and nonstress conditions. *Int J Plant Genomics* **2007**, 97386.
- Gassmann W** (2008). Alternative splicing in plant defense. In: Reddy ASN, Golovkin M, eds. *Nuclear Pre-mRNA Processing in Plants*. Berlin: Springer. pp. 219–233.
- Golisz A, Sikorski PJ, Kruszk K, Kufel J** (2013). *Arabidopsis thaliana* LSM proteins function in mRNA splicing and degradation. *Nucleic Acids Res* **41**, 6232–6249.
- Hakata M, Kuroda M, Miyashita T, Yamaguchi T, Kojima M, Sakakibara H, Mitsui T, Yamakawa H** (2012). Suppression of α -amylase genes improves quality of rice grain ripened under high temperature. *Plant Biotechnol J* **10**, 1110–1117.
- He YF, Xie YF, Li X, Yang J** (2020). Drought tolerance of transgenic rice overexpressing maize *C₄-PEPC* gene related to increased anthocyanin synthesis regulated by sucrose and calcium. *Biologia Plantarum* **64**, 136–149.
- Hu QJ, Fu YY, Guan YJ, Lin C, Cao DD, Hu WM, Sheteiwy M, Hu J** (2016). Inhibitory effect of chemical combinations on seed germination and pre-harvest sprouting in hybrid rice. *Plant Growth Regul* **80**, 281–289.
- Ku MSB, Agarie S, Nomura M, Fukayama H, Tsuchida H, Ono K, Hirose S, Toki S, Miyao M, Matsuoka M** (1999). High-level expression of maize phosphoenolpyruvate carboxylase in transgenic rice plants. *Nat Biotechnol* **17**, 76–80.
- Lata C, Gupta S, Prasad M** (2013). Foxtail millet: a model crop for genetic and genomic studies in bioenergy grasses. *Crit Rev Biotechnol* **33**, 328–343.
- Lebouteiller B, Gousset-Dupont A, Pierre JN, Bleton J, Tchaplal A, Maucourt M, Moing A, Rolin D, Vidal J** (2007). Physiological impacts of modulating phosphoenolpyruvate carboxylase levels in leaves and seeds of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Sci* **172**, 265–272.
- Lev Maor G, Yearim A, Ast G** (2015). The alternative role of DNA methylation in splicing regulation. *Trends Genet* **31**, 274–280.
- Li X, Wang C** (2013). Physiological and metabolic enzymes activity changes in transgenic rice plants with increased phosphoenolpyruvate carboxylase activity during the flowering stage. *Acta Physiol Plant* **35**, 1503–1512.
- Li X, Wang C, Ren CG** (2011). Effects of 1-butanol, neomycin and calcium on the photosynthetic characteristics of *pepc* transgenic rice. *Afr J Biotechnol* **10**, 17466–17476.
- Ling Y, Alshareef S, Butt H, Lozano-Juste J, Li LX, Galal AA, Moustafa A, Momin AA, Tashkandi M, Richardson DN, Fujii H, Arold S, Rodriguez PL, Duque P, Mahfouz MM** (2017). Pre-mRNA splicing repression triggers abiotic stress signaling in plants. *Plant J* **89**, 291–309.
- Liu JJ, Sun N, Liu M, Liu JC, Du BJ, Wang XJ, Qi XT** (2013). An autoregulatory loop controlling *Arabidopsis HsfA2* expression: role of heat shock-induced alternative splicing. *Plant Physiol* **162**, 512–521.
- Liu XL, Li X, Zhang C, Dai CC, Zhou JY, Ren CG, Zhang JF** (2017). Phosphoenolpyruvate carboxylase regulation in *C₄-PEPC*-expressing transgenic rice during early responses to drought stress. *Physiol Plant* **159**, 178–200.
- Livak KJ, Schmittgen TD** (2001). Analysis of relative gene expression data using realtime quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method. *Methods* **25**, 402–408.
- Marquez Y, Brown JWS, Simpson C, Barta A, Kalyna M** (2012). Transcriptome survey reveals increased complexity of the alternative splicing landscape in *Arabidopsis*. *Genome Res* **22**, 1184–1195.
- Marsh JT, Sullivan S, Hartwell J, Nimmo HG** (2003). Structure and expression of phosphoenolpyruvate carboxylase kinase genes in solanaceae. A novel gene exhibits alternative splicing. *Plant Physiol* **133**, 2021–2028.
- Miransari M, Smith DL** (2014). Plant hormones and seed germination. *Environ Exp Bot* **99**, 110–121.

- Muthamilarasan M, Khandelwal R, Yadav CB, Bonthala VS, Khan Y, Prasad M** (2014). Identification and molecular characterization of MYB transcription factor superfamily in *C₄* model plant foxtail millet (*Setaria italica* L.). *PLoS One* **9**, e109920.
- Nakata M, Fukamatsu Y, Miyashita T, Hakata M, Kimura R, Nakata Y, Kuroda M, Yamaguchi T, Yamakawa H** (2017). High temperature-induced expression of rice α -amylases in developing endosperm produces chalky grains. *Front Plant Sci* **8**, 2089.
- Nanjo Y, Asatsuma S, Itoh K, Hori H, Mitsui T** (2004). Proteomic identification of α -amylase isoforms encoded by *RAmy3B/3C* from germinating rice seeds. *Biosci Biotechnol Biochem* **68**, 112–118.
- O’Leary B, Park J, Plaxton WC** (2011). The remarkable diversity of plant PEPC (phosphoenolpyruvate carboxylase): recent insights into the physiological functions and post-translational controls of non-photosynthetic PEPCs. *Biochem J* **436**, 15–34.
- Prasad PVV, Pisipati SR, Momčilović I, Ristic Z** (2011). Independent and combined effects of high temperature and drought stress during grain filling on plant yield and chloroplast EF-Tu expression in spring wheat. *J Agron Crop Sci* **197**, 430–441.
- Qian BY, Li X, Liu XL, Wang M** (2015). Improved oxidative tolerance in suspension-cultured cells of *C₄-pepc* transgenic rice by H_2O_2 and Ca^{2+} under PEG-6000. *J Integr Plant Biol* **57**, 534–549.
- Reddy ASN, Shad Ali G** (2011). Plant serine/arginine-rich proteins: roles in precursor messenger RNA splicing, plant development, and stress responses. *Wiley Interdiscip Rev RNA* **2**, 875–889.
- Ren CG, Li X, Liu XL, Wei XD, Dai CC** (2014). Hydrogen peroxide regulated photosynthesis in *C₄-pepc* transgenic rice. *Plant Physiol Biochem* **74**, 218–229.
- Somani BL, Khanade J, Sinha R** (1987). A modified anthrone-sulfuric acid method for the determination of fructose in the presence of certain proteins. *Anal Biochem* **167**, 327–330.
- Staiger D, Brown JWS** (2013). Alternative splicing at the intersection of biological timing, development, and stress responses. *Plant Cell* **25**, 3640–3656.
- Syed NH, Kalyna M, Marquez Y, Barta A, Brown JWS** (2012). Alternative splicing in plants-coming of age. *Trends Plant Sci* **17**, 616–623.
- Tang YT, Li X, Lu W, Wei XD, Zhang QJ, Lv CG, Song NX** (2018). Transgenic rice over-expressing maize *C₄* phosphoenolpyruvate carboxylase gene contributes to alleviating low nitrogen stress. *Plant Physiol Biochem* **130**, 577–588.
- Wang BB, Brendel V** (2006). Genomewide comparative analysis of alternative splicing in plants. *Proc Natl Acad Sci USA* **103**, 7175–7180.
- Yan HH, Kikuchi S, Neumann P, Zhang WL, Wu YF, Chen F, Jiang JM** (2010). Genome-wide mapping of cytosine methylation revealed dynamic DNA methylation patterns associated with genes and centromeres in rice. *Plant J* **63**, 353–365.
- Zhang C, Li X, He YF, Zhang JF, Yan T, Liu XL** (2017). Physiological investigation of *C₄*-phosphoenolpyruvate-carboxylase-introduced rice line shows that sucrose metabolism is involved in the improved drought tolerance. *Plant Physiol Biochem* **115**, 328–342.
- Zhang P, Deng H, Xiao FM, Liu YS** (2013). Alterations of alternative splicing patterns of Ser/Arg-rich (*SR*) genes in response to hormones and stresses treatments in different ecotypes of rice (*Oryza sativa*). *J Integr Agric* **12**, 737–748.
- Zhang XC, Gassmann W** (2007). Alternative splicing and mRNA levels of the disease resistance gene *RPS4* are induced during defense responses. *Plant Physiol* **145**, 1577–1587.

Effects of Epigenetic Mechanisms on *C₄ Phosphoenolpyruvate Carboxylase* Transgenic Rice (*Oryza sativa*) Seed Germination Under Drought Stress

Ningxi Song^{1,2}, Yingfeng Xie², Xia Li^{1,2,3*}

¹Nanjing Branch of China National Center for Rice Improvement/Jiangsu High Quality Rice Engineering Technology Research Center/Institute of Food Crops, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Nanjing 210014, China; ²College of Biology and Environment, Nanjing Forestry University, Nanjing 210037, China; ³Collaborative Innovation Center for Modern Production Technology of Grain Crops of Jiangsu Province, Agricultural College, Yangzhou University, Yangzhou 225009, China

Abstract In order to reveal the effect of epigenetic mechanism under drought stress toward seed germination of transgenic rice within high maize *C₄*-type *PEPC* gene expressing, *C₄-PEPC* transgenic rice (PC) and wild type rice Kitaake (WT) were used in this study. By introducing DNA methylation inhibitor (5-azacytidine, 5azaC) and alternative splicing inhibitors (macrolides pladienolide B, PB), the drought simulation treatments with 10% (m/v) polyethylene glycol-6000 (PEG6000) alone or combining with the inhibitors were used for seed germination experiments. Seed vigor, soluble sugar and soluble protein content, α -amylase activity and the expression levels of related genes, *PEPC*-related genes, sugar signal-related genes, and some splicing factor genes during germination were measured. In the results, when treated with $0.25 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, PB had showed a significant inhibitory effect on the seed germination of the two tested rice lines under drought conditions. The content of total soluble sugar, sucrose, glucose, fructose and soluble protein during seed germination after PB addition was reduced to a certain extent under drought conditions. PB treatment also inhibited the gene expression of sucrose nonfermenting-1 (SNF1)-related protein kinase SnRKs family and the splicing factor arginine/serine-rich proteins (SR proteins), and the activity of α -amylase as well, but the inhibitory effect on PC is less than those on WT. $5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 5azaC treatment had an opposite effect with alternative splicing inhibitors. The combination treatment with 5azaC and PEG6000 partially alleviated the inhibitory effect of drought stress on rice seed germination, and the germination rate of the tested materials increased. It can be seen that the mechanism of DNA methylation and alternative splicing are involved in drought tolerance at the bud stage of rice lines, with a larger effect on PC.

Key words alternative splicing, DNA methylation, drought stress, germination, *PEPC* gene, rice (*Oryza sativa*)

Song NX, Xie YF, Li X (2020). Effects of epigenetic mechanisms on *C₄ phosphoenolpyruvate carboxylase* transgenic rice (*Oryza sativa*) seed germination under drought stress. *Chin Bull Bot* **55**, 677–692.

* Author for correspondence. E-mail: jspplx@jaas.ac.cn

(责任编辑: 朱亚娜)

附表1 表观遗传抑制剂处理下转基因水稻(PC)和野生型水稻(WT)种子萌发过程各指标相关性分析

Appendix table 1 Correlation of parameters of transgenic rice (PC) and wild type rice (WT) seeds germination process under epigenetic inhibitor treatment

<http://www.chinbullbotany.com/fileup/1674-3466/PDF/t20-048.pdf>