

沉默干旱应答元件结合蛋白基因 *OsDREB1A* 对高温下水稻中褐飞虱卵孵化的影响Silencing the dehydration responsive element binding protein gene *OsDREB1A* influences the hatching of brown planthopper *Nilaparvata lugens* eggs in rice under the high temperature

周书行 吕静 李建彩 娄永根*

(浙江大学昆虫科学研究所, 杭州 310058)

ZHOU Shuxing LÜ Jing LI Jiancai LOU Yonggen*

(Institute of Insect Sciences, Zhejiang University, Hangzhou 310058, Zhejiang Province, China)

干旱应答元件结合蛋白(dehydration responsive element binding protein, DREB)广泛参与调控植物抗非生物胁迫反应,如低温、高温等逆境(文锦芬等, 2019),但是否参与植物抗虫反应目前尚无报道。水稻中该家族基因成员 *OsDREB1A* 在低温下被诱导表达,能增加水稻在低温、高盐和干旱胁迫下的存活率(Ito et al., 2006);本课题组前期研究发现水稻中 *OsDREB1A* 基因在害虫为害后会被诱导表达。本试验拟研究沉默 *OsDREB1A* 基因对高温下水稻中褐飞虱 *Nilaparvata lugens* 卵孵化的影响,以期明确 *OsDREB1A* 基因在水稻抗褐飞虱反应中的作用。

1 材料与方法

1.1 材料

供试水稻及褐飞虱:水稻品种为秀水110和TN1,种子由中国水稻研究所提供,浸种催芽后生长8~9 d供试,其中秀水110需移栽至20 L水培箱中培养25 d,再挑取生长状况良好且大小一致的稻株,恢复3 d供试,培养条件为温度28℃、光照14 h、相对湿度60%。利用秀水110水稻构建的沉默 *OsDREB1A* 基因的纯合水稻品系 irDREB1A-4 和 irDREB1A-8 由浙江大学娄永根教授实验室提供。褐飞虱采自浙江大学紫金港校区农田,带回室内以TN1水稻幼苗饲养续代,将初羽化雌、雄成虫按2:1的比例于养虫笼中以TN1幼苗饲养,交配4 d后取产卵雌成虫供试。

试剂和仪器:Plant RNA Extraction Kit试剂盒和Premix Ex Taq™(Probe qPCR)预混液,日本TaKaRa公司。SMZ445显微镜,日本Nikon公司;CFX96 Real-Time System定量PCR仪,美国Bio-Rad公司。

1.2 方法

高温和机械损伤条件下水稻中 *OsDREB1A* 表达谱的分析:将秀水110稻株于光照14 h、相对湿度60%、

高温32℃条件下生长0、3、8和24 h后剪取稻株根生长处1.5 cm以上基部2 cm长的外部叶鞘,以28℃处理为对照;用直径0.32 mm昆虫针在秀水110稻株叶鞘2 cm范围(部位同上)均匀刺200下,分别于0、1、2、4、8、24 h后剪取损伤部位叶鞘,以未损伤叶鞘为对照;样品均于液氮中保存。将各处理样品在液氮中磨碎后分别称取0.1 g,参照Plant RNA Extraction Kit试剂盒说明书提取RNA并反转录合成cDNA。以合成的cDNA为模板,利用内参基因 *OsACT* 和目的基因 *OsDREB1A* 的正反向引物(ACT-F: 5'-TGGACAGGTTATCACC-ATTGGT-3'/ACT-R: 5'-CCGCAGCTTCCATTCCTA-TG-3'; DREB1A-F: 5'-GACGACTCGCCGCTCATC-3'/DREB1A-R: 5'-TCAGGAGCAAGCAGAAACAC-A-3')和探针(DREB1A-P: 5'-CCTGCTTGATCCCG-CACATCTTCG-3'; ACT-P: 5'-CGTTTCCGCTGCCC-TGAGGTCC-3')进行实时荧光定量PCR。引物和探针均由南京金斯瑞生物科技有限公司合成。20 μL反应体系: Premix Ex Taq™预混液10 μL、DREB1A-F/R各0.7 μL、ACT-F/R各0.7 μL、探针各0.5 μL、ddH₂O 5.2 μL、cDNA 1 μL。反应程序:95℃预变性30 s;95℃变性5 s,60℃退火延伸15 s,40个循环。每个时间点6次重复。根据5倍梯度稀释的cDNA制作标准曲线,计算各样品中 *OsDREB1A* 的相对表达量。

沉默 *OsDREB1A* 基因水稻品系的鉴定:以秀水110稻株为野生型对照,测定2个转基因纯合水稻品系在机械损伤0、1、2 h后 *OsDREB1A* 基因的相对表达量,以明确 *OsDREB1A* 的沉默效果。方法同上。

高温下褐飞虱卵孵化率的测定:在秀水110和2个水稻品系单株上接15头褐飞虱产卵雌成虫,于28℃、光照12 h、相对湿度60%条件下产卵12 h后去除雌成虫;将带有卵粒的稻株分别在高温32、33、34℃下培养,光照

14 h、相对湿度 60%，逐日统计新孵化若虫数。连续 3 d 无若虫孵化时剪取产卵叶鞘，显微镜下统计未孵化卵数，计算卵孵化率和卵发育历期。每个品系 10 次重复。

1.3 数据分析

使用 SPSS 18.0 进行数据统计分析，两个样本间采用 *t* 测验法，3 个样本间采用单因素方差分析，应用 Duncan 氏新复极差法进行差异显著性检验。

2 结果与分析

2.1 高温和机械损伤对 *OsDREB1A* 相对表达量的影响

32℃处理 3 h 后，*OsDREB1A* 基因的相对表达量显著上升且达最高，为 28℃下的 2.46 倍；处理 8、24 h 后其相对表达量与 28℃处理无显著差异（图 1-A）；机械损伤后 1 h，*OsDREB1A* 基因即被诱导表达，且一

直持续到 8 h 仍与对照差异显著（图 1-B）。表明 *OsDREB1A* 能被高温和机械损伤诱导表达。

2.2 沉默 *OsDREB1A* 水稻品系的鉴定

机械损伤后 1 h，irDREB1A-4 和 irDREB1A-8 水稻品系中 *OsDREB1A* 基因的相对表达量分别较野生型对照显著下降了 52.03% 和 61.69%，2 h 后较野生型对照显著下降了 42.17% 和 43.98%（图 1-C）。

2.3 沉默 *OsDREB1A* 对高温下褐飞虱卵的影响

32、33、34℃下，水稻品系 irDREB1A-4 和 irDREB1A-8 中褐飞虱卵孵化率较野生型对照分别降低 22.39% 和 42.39%、55.84% 和 25.33%、52.47% 和 25.74%（表 1），表明沉默 *OsDREB1A* 能够降低高温下水稻中褐飞虱卵的孵化率，但基本不影响其卵的发育历期。

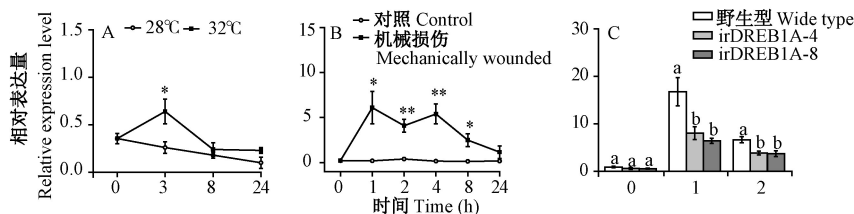


图 1 高温处理(A)及机械损伤(B)水稻和沉默 *OsDREB1A* 水稻品系(C)中 *OsDREB1A* 的相对表达量

Fig. 1 Expression levels of *OsDREB1A* in rice with different temperatures (A), mechanical wound (B) and *OsDREB1A* silencing (C)

图中数据为平均数±标准误。*和**表示经 *t* 测验法检验在 $P<0.05$ 和 $P<0.01$ 水平差异显著，相同时间下不同小写字母表示经 Duncan 氏新复极差法检验差异显著 ($P<0.05$)。Data are mean±SE. * or ** indicates significant difference at $P<0.05$ or $P<0.01$ level by *t* test, different lowercase letters at the same time indicate significant difference Duncan's new multiple range test ($P<0.05$).

表 1 沉默 *OsDREB1A* 对高温下水稻中褐飞虱卵孵化率和发育历期的影响

Table 1 Effect of silencing *OsDREB1A* on hatching rate and developmental duration of *N. lugens* eggs in rice under high temperatures

水稻品系 Rice variety	卵孵化率 Hatching rate/%			卵发育历期 Developmental duration/d		
	32℃	33℃	34℃	32℃	33℃	34℃
野生型 Wild type	38.00±4.93 a	28.15±3.10 a	25.29±4.91 a	7.45±0.07 a	7.41±0.05 a	8.11±0.11 a
irDREB1A-4	29.49±4.05 ab	12.43±1.24 c	12.02±1.18 b	7.94±0.26 a	7.59±0.08 a	8.03±0.10 a
irDREB1A-8	21.89±2.85 b	21.02±2.16 b	18.78±1.18 a	8.06±0.30 a	7.46±0.06 a	7.70±0.09 b

表中数据为平均数±标准误。同列不同字母表示经 Duncan 氏新复极差法检验差异显著 ($P<0.05$)。Data are mean±SE. Different letters indicate significant difference by Duncan's new multiple range test ($P<0.05$).

3 讨论

本研究结果表明，温度响应基因 *OsDREB1A* 在水稻防御褐飞虱中发挥着重要作用，说明水稻的抗温度胁迫与抗虫反应之间存在某种内在的关联性。高温下，沉默 *OsDREB1A* 水稻品系中褐飞虱孵化率明显低于正常水稻，可能由于 *OsDREB1A* 激活了植物抗高温反应，减缓植物体内温度的快速上升，并维持植物体内的温度低于环境温度，这可以使产于水稻组织内的褐飞虱卵受到一定保护。另外，也可能与 *OsDREB1A* 介导的植物抗高温反应对褐飞虱卵的直接影响有关。如高温能诱导菊花中 *CmDREB6* 的表达，通过调控活性氧途径提高其在高温下的存活率 (Du et al., 2018)；而活性氧途径也参与调控植物的抗虫反应。具体作用机理有待进一步深入研究。

参考文献 (References)

- DU XP, LI WY, SHENG LP, DENG Y, WANG YJ, ZHANG WW, YU KL, JIANG JF, FANG WM, GUAN ZY, et al. 2018. Over-expression of chrysanthemum *CmDREB6* enhanced tolerance of chrysanthemum to heat stress. *BMC Plant Biology*, 18(1): 178
- ITO Y, KATSURA K, MARUYAMA K, TAJI T, KOBAYASHI M, SEKI M, SHINOZAKI K, YAMAGUCHI-SHINOZAKI K. 2006. Functional analysis of rice DREB1/CBF-type transcription factors involved in cold-responsive gene expression in transgenic rice. *Plant and Cell Physiology*, 47(1): 141–153
- WEN JF, ZHAO K, DENG MH. 2019. Roles of transcription factors DREB, ERF and NAC in mediating plant responses to biotic and abiotic stresses. *Journal of Hunan Ecological Science*, 6(3): 51–59 (in Chinese) [文锦芬, 赵凯, 邓明华. 2019. 转录因子 DREB、ERF 和 NAC 在介导植物响应生物和非生物胁迫中的作用. 湖南生态科学学报, 6(3): 51–59]

(责任编辑:李美娟)