

水稻二氢吡啶二羧酸还原酶 OsDHDPR 的 抗虫功能分析



陈林^{1,2} 吕静² 蒯鹏² 娄永根^{2*}

(1. 扬州大学植物保护学院, 江苏扬州 225007; 2. 浙江大学昆虫科学研究所, 杭州 310058)

摘要: 为明确水稻二氢吡啶二羧酸还原酶 (*Oryza sativa* dihydrodipicolinate reductase, OsDHDPR) 在诱导抗虫性中的作用, 利用实时荧光定量 PCR 技术测定 OsDHDPR 基因在水稻不同组织以及机械损伤、激素和虫害处理前后的表达情况, 分析取食 OsDHDPR 过表达株系和沉默株系后对二化螟 *Chilo suppressalis* 虫重和褐飞虱 *Nilaparvata lugens* 卵孵化率的影响。结果显示: OsDHDPR 基因在水稻不同组织中均有表达, 其中在叶和外叶鞘中的相对表达量较高, 在内叶鞘和根中的相对表达量较低。机械损伤以及褐飞虱为害后期均能显著诱导水稻叶鞘中 OsDHDPR 基因的表达; 茉莉酸处理 0.5 h 和 48 h 显著诱导水稻叶鞘中 OsDHDPR 基因的表达, 而在处理 6 h 则显著抑制其表达; 水杨酸处理不影响水稻叶鞘中 OsDHDPR 基因的表达; 二化螟为害后 0.5~12 h 显著抑制水稻叶鞘中 OsDHDPR 基因的表达。与野生型水稻相比, OsDHDPR 过表达株系中 OsDHDPR 基因表达量显著升高, 而 OsDHDPR 沉默株系中 OsDHDPR 基因的表达被显著抑制; 过表达 OsDHDPR 显著抑制了二化螟虫重, 但不影响褐飞虱的卵孵化率, 与之相反, 沉默 OsDHDPR 不影响二化螟虫重但显著降低了褐飞虱卵孵化率。表明 OsDHDPR 参与调控了水稻对二化螟和褐飞虱的抗性。

关键词: 水稻; 二氢吡啶二羧酸还原酶; 二化螟; 褐飞虱; 组织表达分析; 诱导表达分析; 抗虫性

Functional analysis of the *Oryza sativa* dihydrodipicolinate reductase in rice resistance against insect pests

Chen Lin^{1,2} Lü Jing² Kuai Peng² Lou Yonggen^{2*}

(1. College of Plant Protection, Yangzhou University, Yangzhou 225007, Jiangsu Province, China;

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

Abstract: To investigate the role of *Oryza sativa* dihydrodipicolinate reductase (OsDHDPR) in induced resistance against insect pests, the relative expression patterns of OsDHDPR in different rice tissues and under mechanical wounding, hormones treatments and insect infestation were analyzed using real-time quantitative PCR (RT-qPCR). The effects of OsDHDPR overexpressing and silencing on the larval weight of the striped stem borer *Chilo suppressalis* and the egg hatching rate of the brown planthopper *Nilaparvata lugens* were also investigated. The results demonstrated that OsDHDPR was expressed in all rice tissues, with relatively higher expression levels in leaves and outer leaf sheaths, and lower levels in inner leaf sheaths and roots. Mechanical wounding and infestation by *N. lugens* at later stages significantly induced OsDHDPR expression in rice leaf sheaths. Jasmonic acid treatment significantly induced OsDHDPR expression at 0.5 and 48 hours but significantly suppressed it at 6 hours, whereas salicylic acid treatment had no significant effect. In contrast, *C. suppressalis* infestation significantly suppressed

OsDHDPR expression within 0.5–12 h in rice leaf sheaths. Compared to wild-type rice, *OsDHDPR* expression was significantly upregulated in *OsDHDPR*-overexpression lines and significantly downregulated in *OsDHDPR*-silenced lines. Overexpression of *OsDHDPR* significantly reduced the larval weight of *C. suppressalis* but had no effect on the egg hatching rate of *N. lugens*. In contrast, silencing *OsDHDPR* had no effect on *C. suppressalis* larval weight but significantly reduced the egg hatching rate of *N. lugens*. These findings highlight the involvement of *OsDHDPR* in regulating rice resistance to *C. suppressalis* and *N. lugens*.

Key words: rice; dihydrodipicolinate reductase; *Chilo suppressalis*; *Nilaparvata lugens*; tissue expression analysis; induced expression analysis; resistance to insect pests

水稻 *Oryza sativa* 是我国主要粮食作物之一, 全国有一半以上人口以稻米为主食, 每年稻谷总产量占粮食作物总产量的近一半。因此, 保证稻米产量对保障我国粮食产量和维护社会稳定具有重要意义 (Chen RZ et al., 2022)。褐飞虱 *Nilaparvata lugens* 和二化螟 *Chilo suppressalis* 作为水稻上重要的常发性害虫, 主要通过刺吸水稻韧皮部汁液、传播病毒及在叶鞘和茎秆内钻蛀为害, 严重影响水稻的产量和品质 (程家安, 1996; Cheng et al., 2013)。培育和推广抗虫水稻品种是害虫绿色防控最经济有效和环境友好的可持续策略之一, 因此深入挖掘水稻抗虫基因并阐明其作用机制对抗虫水稻的创制具有重要意义。

氨基酸是植物初级代谢产物的重要组成部分, 不仅是影响植食性昆虫生长的营养物质, 同时还是许多与防御相关的植物代谢产物的前体, 在植物和植食性昆虫互作中起着核心作用 (Huang et al., 2011; Zeier, 2013)。因此, 通过调控植物氨基酸生物合成可以防御植食性昆虫 (Steinbrenner et al., 2011; Zhou et al., 2015)。赖氨酸是昆虫的必需氨基酸之一, 植食性昆虫必须从植物中获取赖氨酸。天冬氨酸衍生的氨基酸代谢途径是植物赖氨酸生物合成的主要途径, 其中二氢二吡啶酸合酶 (dihydrodipicolinate synthase, DHDPS) 和二氢吡啶二羧酸还原酶 (dihydrodipicolinate reductase, DHDPR) 是催化赖氨酸合成起始 2 个步骤的重要限速酶 (Griffin et al., 2012)。DHDPS 催化天冬氨酸半醛与丙酮酸缩合形成二氢二吡啶酸, 随后被 DHDPR 还原成四氢吡啶二羧酸 (Christensen et al., 2016; Watkin et al., 2018)。目前, 已经从拟南芥 *Arabidopsis thaliana*、水稻、玉米 *Zea mays*、烟草 *Nicotiana tabacum* 和小麦 *Triticum aestivum* 等植物中分离并鉴定到了 DHDPS, 其在赖氨酸合成中的作用也有研究 (Liu et al., 2016; Gupta et al., 2018; Yang et al., 2021)。例如, 在拟南芥 T-DNA 插入突变体中赖氨酸合成水平低于对照 (Craciun et

al., 2000); 水稻过表达 *DHDPS* 基因能够显著增加稻谷中赖氨酸的含量, 该基因是以胚乳特异性表达的启动子驱动 (Yang et al., 2021)。然而, 目前关于植物 DHDPR 的研究较少, 仅有关于拟南芥 DHDPR 以及玉米 DHDPR 的研究报道 (Tyagi et al., 1983; Griffin et al., 2012)。关于水稻 *DHDPR* 基因的分离和鉴定及其在水稻抗虫中的作用仍不清楚。

为探究 DHDPR 在水稻抗虫中的作用, 本研究根据水稻基因组数据库中序列, 通过实时荧光定量 PCR (real-time quantitative PCR, RT-qPCR) 技术分析 *OsDHDPR* 基因在水稻不同组织中的表达情况, 以及机械损伤、茉莉酸和水杨酸处理、二化螟和褐飞虱为害处理对水稻 *OsDHDPR* 基因表达水平的影响, 并初步探究取食水稻 *OsDHDPR* 过表达和沉默株系对二化螟虫重和褐飞虱卵孵化率的影响, 以期为深入解析 *OsDHDPR* 在调控水稻防御反应中的作用和机制提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

供试植物: 水稻品种为秀水 110 (Xiushui 110, XS110) 和 TN1 (Taichung Native 1), 由中国水稻研究所提供。转基因水稻为本实验室以 XS110 为亲本构建的 *OsDHDPR* 过表达株系 oe5 和 oe16 以及 *OsDHDPR* 沉默株系 ir35 和 ir49。将水稻各株系的种子置于直径 90 mm 的塑料培养皿中, 用清水浸泡 2 d 后洗净, 置于温度为 (28±2) °C、相对湿度为 60%、光周期为 14 L: 10 D 的人工气候室中催芽 8 d, 再转移到含有水稻营养液的 25 L 水培筐中于相同条件的人工气候室中继续生长; 25 d 后单株移植到直径 8.4 cm、高 11.4 cm 的 500 mL 塑料杯中, 适应 3 d 后供试。TN1 水稻种子用清水浸泡 2 d 后洗净, 置于上述相同条件的人工气候室中催芽, 待水稻幼苗长至 8~10 cm 时饲喂供试昆虫。

供试昆虫: 褐飞虱种群采自浙江大学紫金港校区试验田, 使用TN1水稻苗饲养于浙江大学昆虫科学研究所人工气候室中, 饲养温度为(28±2)℃、相对湿度为60%、光周期为14 L:10 D, 目前繁殖已超过60代, 取褐飞虱怀卵雌成虫供试。二化螟虫卵由江苏省农业科学院植物保护研究所提供, 利用TN1水稻苗饲养于上述相同条件的人工气候室中, 取初孵幼虫和3龄幼虫供试。

试剂和仪器: MiniBEST Plant RNA Extraction Kit、PrimeScript™ RT Master Mix、Premix Ex Taq™ (Probe qPCR), 宝日医生物技术(北京)有限公司; 茉莉酸和水杨酸, 美国Sigma-Aldrich公司; 其余试剂均为国产分析纯。柏精BioDrop Touch紫外分光光度计, 英国BioDrop公司; CFX96 Real-Time System定量PCR仪, 美国Bio-Rad公司; SMZ445显微镜, 日本Nikon公司。

1.2 方法

1.2.1 水稻不同组织中OsDHDPR基因表达量测定

选取生长状态一致、35 d苗龄的XS110, 分别收集其叶片、外叶鞘、内叶鞘和根以及种子, 立即放入液氮中速冻, 于-80℃保存备用, 每个组织设6个生物学重复, 每个重复0.1 g。按照MiniBEST Plant RNA Extraction Kit说明书提取水稻各组织的总RNA。每个组织样品的RNA各取1 μg, 利用PrimeScript™ RT Master Mix反转录试剂盒合成cDNA。根据水稻基因组数据库(<http://rice.plantbiology.msu.edu/>)报道的OsDHDPR基因序列(LOC_Os02g24020)设计定量引物OsDHDPR-F1(5'-CACGCATTTCACATGTACCA-3')/OsDHDPR-R1(5'-CACAGTTCCTCTGCGTAAA-3'), 探针为OsDHDPR-P1(5'-FAM-TCAACACAATGTATGTGGCCGTTC A-BHQ1-3'); 以水稻OsACTIN基因(TIGRID LOC_Os03g50885)为内参基因, 引物为OsACTIN-F(5'-TGGACAGGTATCACCATTGGT-3')/OsACTIN-R(5'-CCGCAGCTTCCATTCTATG-3'), 探针为OsACTIN-P(5'-HEX-CGTTTCCGCTGCCCTGAGGTCC-BHQ1-3'), 所有引物均由南京金斯瑞生物科技有限公司合成。20 μL RT-qPCR反应体系: cDNA 1 μL、2×Premix Ex Taq (Probe qPCR) 10 μL、OsDHDPR-F1/OsDHDPR-R1各0.7 μL、OsACTIN-F/OsACTIN-R各0.7 μL、OsDHDPR-P1/OsACTIN-P各0.5 μL、ddH₂O 5.2 μL; RT-qPCR反应程序: 95℃预变性30 s; 95℃变性20 s, 60℃延伸20 s, 40个循环。根据获得的循环阈值, 采用标准曲线法计算OsDHDPR基因的相对表达量

(陈林等, 2020)。

1.2.2 机械损伤和激素处理下OsDHDPR基因表达量测定

机械损伤: 选取生长状态一致、35 d苗龄的XS110, 用直径0.32 mm的昆虫针在其茎秆基部均匀刺200下, 以相同条件下未针刺处理的水稻作为对照; 在针刺处理后0、0.5、1.5、3、6、12、24和48 h分别收取处理组和对照组水稻基部叶鞘, 立即放入液氮中速冻, 于-80℃保存备用。每个处理6次生物学重复。采用RT-qPCR技术测定样品中OsDHDPR基因的表达量, 方法同1.2.1。

激素处理: 用50 mmol/L磷酸缓冲液(pH 8.0)分别配制终浓度为100 μg/mL的茉莉酸和70 μg/mL的水杨酸溶液, 并分别加入终体积为0.01%(体积比)的吐温-20。选取生长状态一致、35 d苗龄的XS110, 分别在每株叶片上喷洒2 mL茉莉酸甲酯或者水杨酸溶液, 以相同条件下喷洒2 mL 50 mmol/L磷酸缓冲液(pH 8.0)水稻作为对照。处理后0、0.5、1.5、3、6、12、24和48 h分别收取处理组和对照组水稻基部叶鞘, 立即放入液氮中速冻, 于-80℃保存备用。每个处理6个生物学重复。采用RT-qPCR技术测定样品中OsDHDPR基因的表达量, 方法同1.2.1。

1.2.3 害虫为害后OsDHDPR基因表达量测定

二化螟为害: 选取生长状态一致、35 d苗龄的XS110, 在其基部接入1头二化螟3龄幼虫, 以相同条件下未接二化螟3龄幼虫的水稻为对照。自取食开始计时, 于取食0、0.5、1.5、3、6、12、24和48 h分别收取处理组和对照组水稻基部叶鞘, 立即放入液氮中速冻, 于-80℃保存备用。每个处理6个生物学重复。采用RT-qPCR技术测定样品中OsDHDPR基因的表达量, 方法同1.2.1。

褐飞虱为害: 选取生长状态一致、35 d苗龄的XS110, 在其基部放置1个直径4 cm、高8 cm、壁上均匀分布48个直径为0.8 mm透气小孔的圆柱形玻璃罩, 每个玻璃罩中分别接入15头褐飞虱怀卵雌成虫, 以相同条件下在玻璃罩中未接入褐飞虱怀卵雌成虫的水稻为对照。自褐飞虱取食开始计时, 于取食0、0.5、1.5、3、6、12、24和48 h分别收取处理组和对照组水稻基部叶鞘, 立即放入液氮中速冻, 于-80℃保存备用。每个处理6个生物学重复。采用RT-qPCR技术测定样品中OsDHDPR基因的表达量, 方法同1.2.1。

1.2.4 过表达和沉默OsDHDPR基因水稻株系鉴定

为检测过表达和沉默OsDHDPR基因水稻株系中OsDHDPR的表达水平, 分别选取生长状态一致、

35 d苗龄的 *OsDHDPR* 基因过表达株系 oe5、oe16 和对应的野生型水稻 XS110, 以及 *OsDHDPR* 基因沉默株系 ir35、ir49 和对应的野生型水稻 XS110, 按照 1.2.3 方法每株水稻接入 15 头褐飞虱怀卵雌成虫为 1 个生物学重复, 每个处理设 6 个生物学重复。于处理后 0 h 和 12 h 分别收取各株系水稻被褐飞虱为害的部位叶鞘, 立即放入液氮中速冻, 于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存备用。采用 RT-qPCR 技术测定样品中 *OsDHDPR* 基因的表达量, 方法同 1.2.1。

1.2.5 取食突变株系水稻对二化螟虫重的影响测定

分别选取生长状态一致、35 d 苗龄的 *OsDHDPR* 基因过表达株系 oe5、oe16 和 *OsDHDPR* 基因沉默株系 ir35、ir49 以及野生型水稻 XS110, 按照 1.2.3 方法在每株水稻基部接入 3 头二化螟初孵幼虫为 1 个生物学重复, 每个株系设 20 个生物学重复。12 d 后剥出二化螟幼虫并称量, 记录其生长量。

1.2.6 取食突变株系水稻对褐飞虱卵孵化率的影响测定

分别选取生长状态一致、35 d 苗龄的 *OsDHDPR* 基因过表达株系 oe5、oe16 和对应的野生型水稻 XS110, 以及 *OsDHDPR* 基因沉默株系 ir35、ir49 和对应的野生型水稻 XS110, 按照 1.2.3 方法在每株水稻基部接入 10 头褐飞虱怀卵雌成虫为 1 个生物学重复, 每个株系设 10 个生物学重复。当其产卵 24 h 后移除所接成虫, 6~7 d 后待有初孵若虫出现时逐日统计新孵化若虫数。当连续 3 d 未有新孵化若虫时, 剪取褐飞虱产卵叶鞘, 在显微镜下检查未孵化卵数, 计算每株水稻上的褐飞虱卵孵化率。

1.3 数据分析

利用 SPSS 23 软件对试验数据进行统计分析。*OsDHDPR* 基因在水稻各组织中的表达量、*OsDHDPR* 转基因水稻中的表达量及其对二化螟虫重和褐飞虱卵孵化率的影响数据先进行单因素方差分析, 再应用 Duncan 氏新复极差法进行差异显著性检验; 机械损伤、激素处理和害虫为害后水稻 *OsDHDPR* 基因的表达量应用 *t* 测验法进行差异显著性检验。

2 结果与分析

2.1 水稻不同组织中 *OsDHDPR* 基因的表达量

OsDHDPR 基因在水稻各个组织中均有表达, 其中在水稻叶片中的相对表达量最高, 为 6.12, 其次是在外叶鞘中的相对表达量, 为 4.80, 二者显著高于该基因在种子、内叶鞘和根中的相对表达量; 而 *OsDHDPR* 基因在种子中的相对表达量显著高于内叶鞘和根中的相对表达量(图 1)。

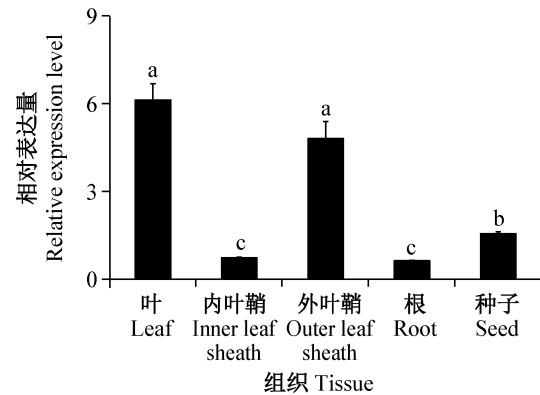


图 1 *OsDHDPR* 基因在水稻不同组织中的相对表达量

Fig. 1 Relative expression levels of *OsDHDPR* in different rice tissues

图中数据为平均数 \pm 标准误。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 \pm SE. Different lowercase letters indicate significant difference by Duncan's new multiple range test ($P < 0.05$).

2.2 机械损伤对 *OsDHDPR* 基因表达的影响

机械损伤处理后 1.5 h, 水稻叶鞘中 *OsDHDPR* 基因的相对表达量显著被抑制, 为对照组的 77.2%, 但机械损伤处理后 3、6、12 和 24 h 均能显著诱导水稻叶鞘中 *OsDHDPR* 基因的表达, 其相对表达量分别为对照组的 1.49 倍、1.32 倍、1.53 倍和 1.61 倍(图 2)。

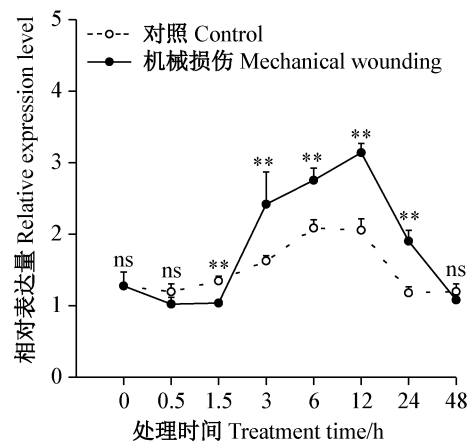


图 2 机械损伤后水稻叶鞘中 *OsDHDPR* 基因的相对表达量

Fig. 2 Relative expression levels of *OsDHDPR* in rice leaf sheaths after mechanical wounding

图中数据为平均数 \pm 标准误。**表示经 *t* 测验法检验对照与处理之间差异极显著 ($P < 0.01$), ns 表示无显著差异。Data are mean \pm SE. ** indicates significant difference between control and treatment by *t* test ($P < 0.01$), ns indicates no significant difference.

2.3 茉莉酸和水杨酸对 *OsDHDPR* 基因表达的影响

茉莉酸处理后 0.5 h 和 48 h 显著诱导水稻叶鞘中 *OsDHDPR* 基因的表达, 其相对表达量分别为对

照组的1.59倍和2.86倍,但茉莉酸处理后6 h显著抑制水稻叶鞘中 *OsDHDPR* 基因的表达,其相对表达量为对照组的56.47% (图3-A)。虽然水杨酸处理

1.5、6、12和24 h时,水稻叶鞘中 *OsDHDPR* 基因的相对表达量高于对照组,但与对照组均无显著差异 (图3-B)。

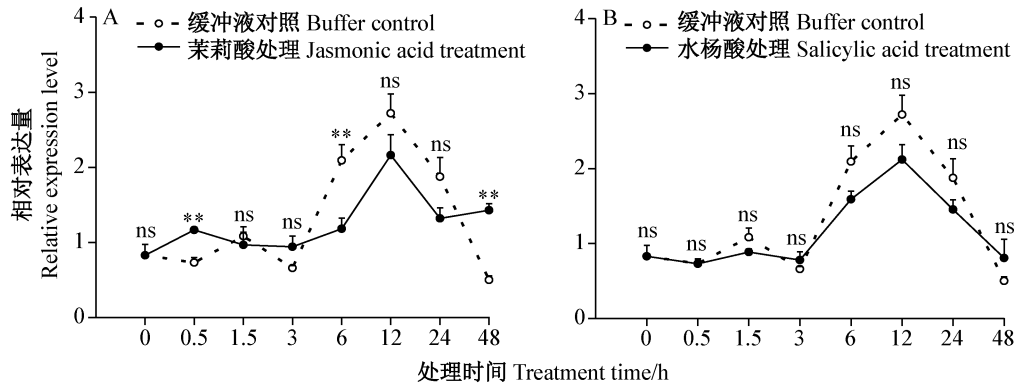


图3 茉莉酸(A)和水杨酸(B)处理后水稻叶鞘中 *OsDHDPR* 基因的相对表达量

Fig. 3 Relative expression levels of *OsDHDPR* in rice leaf sheaths after jasmonic acid (A) and salicylic acid (B) treatments

图中数据为平均数±标准误。**表示 *t* 测验法检验对照与处理之间差异极显著 ($P < 0.01$), ns 表示无显著差异。Data are mean±SE. ** indicates significant difference between control and treatment by *t* test ($P < 0.01$), ns indicates no significant difference.

2.4 二化螟和褐飞虱对 *OsDHDPR* 基因表达的影响

二化螟为害能够显著抑制水稻叶鞘中 *OsDHDPR* 基因的表达,为害0.5 h时 *OsDHDPR* 基因的表达量即被显著抑制,且抑制作用一直持续到12 h, *OsDHDPR* 基因的相对表达量仍显著低于对照 (图4-A)。褐飞虱为害后期能诱导水稻叶鞘中 *OsDHDPR*

基因的表达,为害12、24和48 h时水稻叶鞘中 *OsDHDPR* 基因的相对表达量显著高于对照,分别为对照的1.71倍、2.36倍和2.16倍 (图4-B),表明 *OsDHDPR* 基因可能参与调控水稻对褐飞虱和二化螟的防御反应。

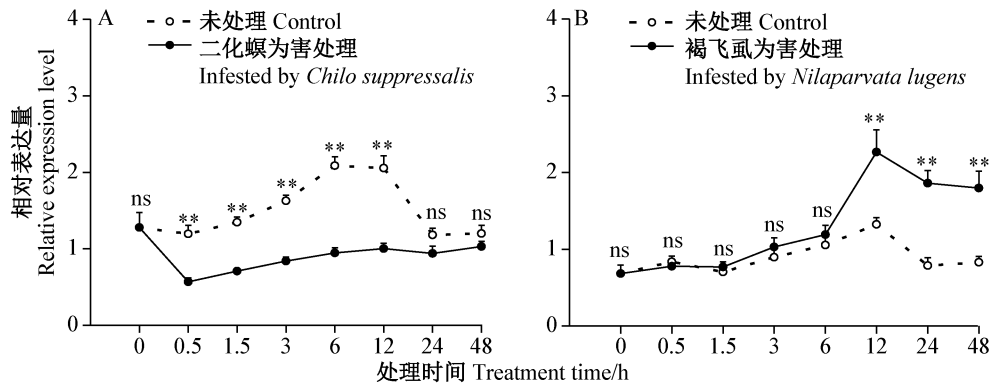


图4 二化螟(A)和褐飞虱怀卵雌成虫(B)为害后水稻叶鞘中 *OsDHDPR* 基因的相对表达量

Fig. 4 Relative expression levels of *OsDHDPR* in rice leaf sheaths after infestation by *Chilo suppressalis* (A) and gravid *Nilaparvata lugens* females (B)

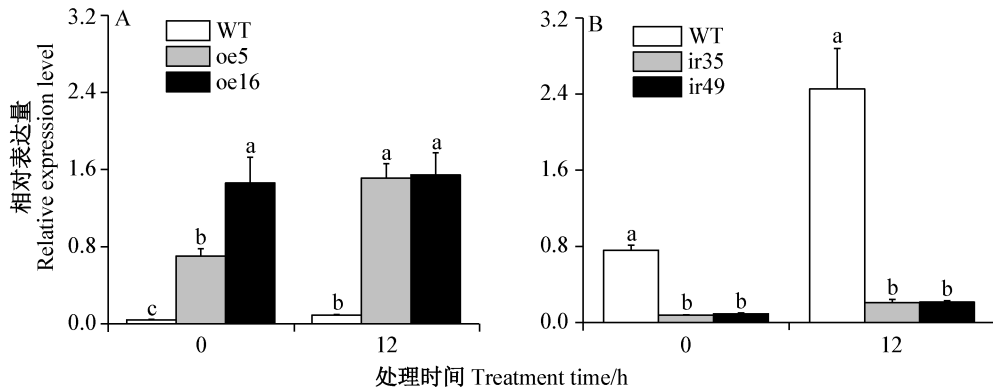
图中数据为平均数±标准误。**表示经 *t* 测验法检验对照与处理之间差异极显著 ($P < 0.01$), ns 表示无显著差异。Data are mean±SE. ** indicates significant difference between control and treatment by *t* test ($P < 0.01$), ns indicates no significant difference.

2.5 过表达和沉默 *OsDHDPR* 水稻株系的鉴定

OsDHDPR 基因过表达株系 oe5 和 oe16 中 *OsDHDPR* 基因的本底表达量显著增加,分别为野生型水稻中 *OsDHDPR* 基因表达量的16.84倍和35.04倍;褐飞虱为害处理后12 h,过表达株系 oe5 和 oe16 中 *OsDHDPR* 基因的相对表达量分别为野生型水稻的

16.35倍和16.71倍 (图5-A)。 *OsDHDPR* 基因沉默株系 ir35 和 ir49 中 *OsDHDPR* 基因的本底表达量显著降低,分别为野生型水稻的10.31%和11.95%;褐飞虱为害处理后12 h,沉默株系 ir35 和 ir49 中 *OsDHDPR* 基因的相对表达量分别为野生型水稻的8.58%和8.70% (图5-B),表明 *OsDHDPR* 基因过表

达株系 oe5 和 oe16 以及沉默株系 ir35 和 ir49 可用于 抗虫功能分析。



WT: 野生型水稻株系; oe5 和 oe16: *OsDHDPR* 基因过表达水稻株系; ir35 和 ir49: *OsDHDPR* 基因沉默水稻株系。
WT: Wide-type rice plants; oe5 and oe16: *OsDHDPR* overexpression rice lines; ir35 and ir49: *OsDHDPR* silenced rice lines.

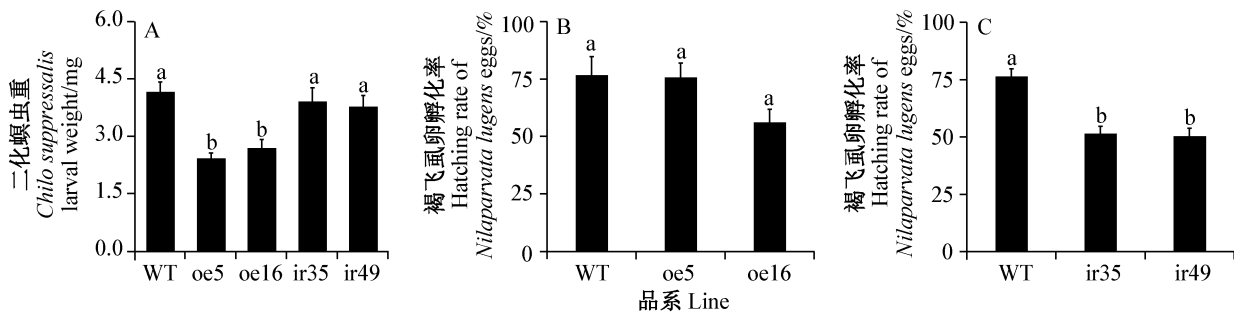
图5 *OsDHDPR* 基因过表达(A)和沉默(B)水稻株系中 *OsDHDPR* 基因的相对表达量

Fig. 5 Relative expression levels of *OsDHDPR* in rice leaf sheaths of *OsDHDPR* overexpression (A) and silenced (B) lines 图中数据为平均数±标准误。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. Different lowercase letters indicate significant difference by Duncan's new multiple range test ($P < 0.05$).

2.6 过表达和沉默 *OsDHDPR* 对水稻抗虫性的影响

取食 *OsDHDPR* 基因过表达株系 oe5 和 oe16 会显著降低二化螟的虫重,与取食野生型水稻的二化螟相比,虫重分别下降了 41.83% 和 35.30%,但取食 *OsDHDPR* 基因沉默株系对二化螟的虫重无显著影响(图 6-A)。过表达 *OsDHDPR* 基因不影响褐飞虱

的卵孵化率(图 6-B),但沉默 *OsDHDPR* 基因显著降低了褐飞虱的卵孵化率,取食 *OsDHDPR* 基因沉默株系 ir35 和 ir49 褐飞虱的卵孵化率分别较取食野生型水稻时的卵孵化率下降了 32.64% 和 34.05%(图 6-C),表明 *OsDHDPR* 基因参与调控了水稻对二化螟和褐飞虱的抗性。



WT: 野生型水稻株系; oe5 和 oe16: *OsDHDPR* 基因过表达水稻株系; ir35 和 ir49: *OsDHDPR* 基因沉默水稻株系。
WT: Wide-type rice plants; oe5 and oe16: *OsDHDPR* overexpression rice lines; ir35 and ir49: *OsDHDPR* silenced rice lines.

图6 取食 *OsDHDPR* 基因过表达或沉默水稻株系对二化螟虫重(A)和褐飞虱卵孵化率(B~C)的影响

Fig. 6 Influence of *OsDHDPR* overexpressing and silencing on *Chilo suppressalis* larval weight (A) and the hatching rate of *Nilaparvata lugens* eggs (B~C)

图中数据为平均数±标准误。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. Different lowercase letters indicate significant difference by Duncan's new multiple range test ($P < 0.05$).

3 讨论

植物组织中氨基酸的含量对植食性昆虫的生长发育至关重要,通过减少或者去除植食性昆虫食物中的必需氨基酸是防治植食性害虫的另外一种策略(Erb et al., 2013; Zhou et al., 2015)。其中,赖氨酸不仅是许多植物抗性物质的合成前体,例如 N-羟基哌

啉酸和哌啉酸(Zeier, 2013; Hartmann & Zeier, 2018);同时,酵母氨酸途径介导的赖氨酸代谢与许多生物胁迫反应存在交叉作用(Arruda & Barreto, 2020; Yang et al., 2020)。因此,为明确赖氨酸合成在水稻抗虫反应中的作用,本研究从水稻基因组数据库中分离和鉴定了赖氨酸合成途径第 2 个关键酶

DHDPR的编码基因*OsDHDPR*,该基因在水稻各组织中均有表达,且在叶片和叶鞘等光合组织中的相对表达量最高,这可能与赖氨酸在叶绿体中合成有关(Galili et al., 2016; Hall et al., 2021);与之类似的是,拟南芥中*DHDPR*基因在叶和根中均有表达,与各组织对赖氨酸的需求相一致(Shimizu & Shikanai, 2007)。同时,本研究还发现机械损伤、茉莉酸处理、二化螟和褐飞虱为害影响了*OsDHDPR*基因的表达,进一步证明*OsDHDPR*基因可能参与调控水稻对害虫的防御反应。

当植物遭受植食性昆虫为害时,会针对昆虫的不同取食方式采取不同的防御策略(Howe & Jander, 2008; Aljibory & Chen, 2018)。本研究发现二化螟为害后0.5~12 h显著抑制了水稻中*OsDHDPR*基因的表达水平,而褐飞虱为害后12~48 h则显著诱导了*OsDHDPR*基因的表达水平,表明*OsDHDPR*基因在水稻防御不同取食方式害虫过程中发挥着不同作用。因此,本研究进一步构建了*OsDHDPR*基因过表达水稻株系oe5和oe16以及沉默水稻株系ir35和ir49,并比较了其对二化螟虫重以及褐飞虱卵孵化率的影响,发现*OsDHDPR*基因过表达株系增加了自身对二化螟的抗性,但其对褐飞虱的抗性无显著变化;*OsDHDPR*基因沉默株系对二化螟的抗性无显著变化,但增加了自身对褐飞虱的抗性。这进一步证实了*OsDHDPR*基因在水稻抵御咀嚼式口器害虫和刺吸式口器害虫过程中发挥的功能不同,表明*OsDHDPR*基因通过不同抗虫机制调控水稻对二化螟和褐飞虱的抗性。

植物体内氨基酸含量的变化能影响植物对植食性昆虫的抗性(Zhou et al., 2015; Cai & Aharoni, 2022)。例如, Li et al. (2020) 研究结果表明茶树 *Camellia sinensis* 受到茶尺蠖 *Ectropis obliqua* 为害后,其氨基酸的代谢和重新分配与防御性次生代谢过程的激活密切相关。此外,赖氨酸作为植物防御病原微生物的关键信号分子前体,其代谢产物哌啶酸是植物系统获得性抗性的关键调节因子(Moormann et al., 2022)。因此,过表达或者沉默*OsDHDPR*是否通过影响水稻抗虫次生代谢产物调控水稻对二化螟和褐飞虱的抗性需要进一步研究。Yang et al. (2018)发现水稻游离赖氨酸的大量积累能够激活茉莉酸信号途径,进而诱导血清素的合成。茉莉酸信号途径主要介导水稻防御咀嚼式口器昆虫取食且正调控水稻对二化螟的抗性(Zhou et al., 2009; 杜波等, 2016),因此过表达*OsDHDPR*基因水稻对二化

螟的抗性增强可能是由于过表达植株增加了赖氨酸的含量,从而激活了茉莉酸信号途径,进而抑制了二化螟的生长;Chen L et al. (2022)研究发现血清素负调控水稻对褐飞虱的抗性,因此沉默*OsDHDPR*基因可能降低了水稻中赖氨酸的含量,导致血清素合成减少,从而增强了水稻对褐飞虱的抗性。后续仍需要进一步解析*OsDHDPR*基因在调控水稻防御不同取食方式害虫过程中的作用机制,通过测定其对防御信号分子、防御蛋白以及次生代谢产物的影响进行进一步研究验证。

参 考 文 献 (References)

- Aljibory Z, Chen MS. 2018. Indirect plant defense against insect herbivores: a review. *Insect Science*, 25(1): 2–23
- Arruda P, Barreto P. 2020. Lysine catabolism through the saccharopine pathway: enzymes and intermediates involved in plant responses to abiotic and biotic stress. *Frontiers in Plant Science*, 11: 587
- Cai JH, Aharoni A. 2022. Amino acids and their derivatives mediating defense priming and growth tradeoff. *Current Opinion in Plant Biology*, 69: 102288
- Chen L, Feng L, Liang XY, Li JT, Liao GR, Zhu L, Fu K, Fan WY, Wang S, Liu JL. 2022. Characterizing the mechanism of serotonin alleviates rice resistance to brown planthopper *Nilaparvata lugens* (Homoptera: Delphacidae) nymphs. *Agronomy*, 12(12): 3191
- Chen L, Lü J, Li CY, Zhou SX, Lou YG. 2020. Cloning, subcellular localization and expression patterns of the phosphoribulokinase gene *OsPRK* in the rice plant. *Journal of Plant Protection*, 47(2): 283–291 (in Chinese) [陈林, 吕静, 李晨羊, 周书行, 娄永根. 2020. 水稻磷酸核酮糖激酶基因*OsPRK*克隆、亚细胞定位与诱导表达分析. *植物保护学报*, 47(2): 283–291]
- Chen RZ, Deng YW, Ding YL, Guo JX, Qiu J, Wang B, Wang CS, Xie YY, Zhang ZH, Chen JX, et al. 2022. Rice functional genomics: decades' efforts and roads ahead. *Science China: Life Sciences*, 65(1): 33–92
- Cheng JA. 1996. Rice pests. Beijing: China Agriculture Press, pp. 39–88 (in Chinese) [程家安. 1996. 水稻害虫. 北京: 中国农业出版社, pp. 39–88]
- Cheng XY, Zhu LL, He GC. 2013. Towards understanding of molecular interactions between rice and the brown planthopper. *Molecular Plant*, 6(3): 621–634
- Christensen JB, Soares da Costa TP, Faou P, Pearce FG, Panjekar S, Perugini MA. 2016. Structure and function of cyanobacterial DHDPS and DHDPR. *Scientific Reports*, 6: 37111
- Craciun A, Jacobs M, Vauterin M. 2000. *Arabidopsis* loss-of-function mutant in the lysine pathway points out complex regulation mechanisms. *FEBS Letters*, 487(2): 234–238
- Du B, Chen RZ, He GC. 2016. The progress of functional genomics research of rice resistance to insect. *Chinese Bulletin of Life Sciences*, 28(10): 1200–1215 (in Chinese) [杜波, 陈荣智, 何光存.

2016. 水稻抗虫功能基因组研究进展. 生命科学, 28(10): 1200–1215]
- Erb M, Huber M, Robert CAM, Ferrieri AP, Machado RAR, Arce CCM. 2013. The role of plant primary and secondary metabolites in root-herbivore behaviour, nutrition and physiology//Johnson SN, Hiltbold I, Turlings TCJ. Behaviour and physiology of root herbivores. Amsterdam: Elsevier, pp. 53–95
- Galili G, Amir R, Fernie AR. 2016. The regulation of essential amino acid synthesis and accumulation in plants. Annual Review of Plant Biology, 67: 153–178
- Griffin MDW, Billakanti JM, Wason A, Keller S, Mertens HDT, Atkinson SC, Dobson RCJ, Perugini MA, Gerrard JA, Pearce FG. 2012. Characterisation of the first enzymes committed to lysine biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. PLoS ONE, 7(7): e40318
- Gupta R, Hogan CJ, Perugini MA, Soares da Costa TP. 2018. Characterization of recombinant dihydrodipicolinate synthase from the bread wheat *Triticum aestivum*. Planta, 248(2): 381–391
- Hall CJ, Lee M, Boarder MP, Mangion AM, Gendall AR, Panjikar S, Perugini MA, Soares da Costa TP. 2021. Differential lysine-mediated allosteric regulation of plant dihydrodipicolinate synthase isoforms. FEBS Journal, 288(16): 4973–4986
- Hartmann M, Zeier J. 2018. L-lysine metabolism to N-hydroxypicolinic acid: an integral immune-activating pathway in plants. The Plant Journal, 96(1): 5–21
- Howe GA, Jander G. 2008. Plant immunity to insect herbivores. Annual Review of Plant Biology, 59: 41–66
- Huang TF, Jander G, de Vos M. 2011. Non-protein amino acids in plant defense against insect herbivores: representative cases and opportunities for further functional analysis. Phytochemistry, 72(13): 1531–1537
- Li LB, Li TT, Jiang YY, Yang YQ, Zhang L, Jiang ZD, Wei CL, Wan XC, Yang H. 2020. Alteration of local and systemic amino acids metabolism for the inducible defense in tea plant (*Camellia sinensis*) in response to leaf herbivory by *Ectropis oblique*. Archives of Biochemistry and Biophysics, 683: 108301
- Liu YW, Xie SJ, Yu JJ. 2016. Genome-wide analysis of the lysine biosynthesis pathway network during maize seed development. PLoS ONE, 11(2): e0148287
- Moormann J, Heinemann B, Hildebrandt TM. 2022. News about amino acid metabolism in plant-microbe interactions. Trends in Biochemical Sciences, 47(10): 839–850
- Shimizu H, Shikanai T. 2007. Dihydrodipicolinate reductase-like protein, CRR1, is essential for chloroplast NAD(P)H dehydrogenase in *Arabidopsis*. Plant Journal, 52(3): 539–547
- Steinbrenner AD, Gómez S, Osorio S, Fernie AR, Orians CM. 2011. Herbivore-induced changes in tomato (*Solanum lycopersicum*) primary metabolism: a whole plant perspective. Journal of Chemical Ecology, 37(12): 1294–1303
- Tyagi VV, Henke RR, Farkas WR. 1983. Partial purification and characterization of dihydrodipicolinic acid reductase from maize. Plant Physiology, 73(3): 687–691
- Watkin SAJ, Keown JR, Richards E, Goldstone DC, Devenish SRA, Grant Pearce F. 2018. Plant DH DPR forms a dimer with unique secondary structure features that preclude higher-order assembly. Biochemical Journal, 475(1): 137–150
- Yang QQ, Yu WH, Wu HY, Zhang CQ, Sun SSM, Liu QQ. 2021. Lysine biofortification in rice by modulating feedback inhibition of aspartate kinase and dihydrodipicolinate synthase. Plant Biotechnology Journal, 19(3): 490–501
- Yang QQ, Zhao DS, Liu QQ. 2020. Connections between amino acid metabolisms in plants: lysine as an example. Frontiers in Plant Science, 11: 928
- Yang QQ, Zhao DS, Zhang CQ, Wu HY, Li QF, Gu MH, Sun SSM, Liu QQ. 2018. A connection between lysine and serotonin metabolism in rice endosperm. Plant Physiology, 176(3): 1965–1980
- Zeier J. 2013. New insights into the regulation of plant immunity by amino acid metabolic pathways. Plant, Cell & Environment, 36(12): 2085–2103
- Zhou GX, Qi JF, Ren N, Cheng JA, Erb M, Mao BZ, Lou YG. 2009. Silencing OsHI-LOX makes rice more susceptible to chewing herbivores, but enhances resistance to a phloem feeder. Plant Journal, 60(4): 638–648
- Zhou SQ, Lou YR, Tzin V, Jander G. 2015. Alteration of plant primary metabolism in response to insect herbivory. Plant physiology, 169(3): 1488–1498

(责任编辑:李美娟)