作物学报 ACTA AGRONOMICA SINICA 2026, 52(6): 1728−1742 http://zwxb.chinacrops.org/
ISSN 0496-3490; CN 11-1809/S; CODEN TSHPA9 E-mail: zwxb301@caas.cn

DOI: 10.3724/SP.J.1006.2026.52036

两系不育系水稻幼苗根系响应盐胁迫的转录因子调控网络鉴定

邹仪妹[1,2] 徐 敏[1] 汪海洋[1] 姚 辉[1] 王加峰[3] 刘 浩[2,*] 任代胜[1,*]

[1] 安徽袁粮水稻产业有限公司, 安徽合肥 231131; [2] 广东省农作物遗传改良重点实验室 / 广东省农业科学院作物研究所, 广东广州 510640; [3] 国家植物航天育种工程技术研究中心 / 华南农业大学, 广东广州 510642

摘 要: 为全面解析水稻幼苗根系响应盐胁迫的转录因子调控网络, 本研究以经 3 个不同浓度 NaCl 溶液(0、0.25%、0.50%)处理 1 周的水稻不育系华兴 166S 幼苗根系为研究对象, 开展了表型数据测定。通过转录组测序技术分析基因表达特征, 共检测到 30,378 个基因, 其中, 26,315 个为显著差异表达基因。对差异基因的生物学代谢通路富集分析发现, 在 3 个 NaCl 处理浓度下, 差异基因均显著富集于次生代谢分支通路。基于差异基因谱, 本研究进一步筛选出 326 个差异表达转录因子, 构建了包含 88 个转录因子的核心互作网络。功能富集分析表明, 核心网络涉及植物激素信号转导、植物 MAPK 信号通路、植物昼夜节律等途径。此外, 荧光定量 PCR 鉴定发现, 盐胁迫后, WRKY 转录因子家族中的 10 个基因在水稻根系中表现特异高表达。本研究基于 3 个不同浓度 NaCl 胁迫处理的转录组测序数据, 构建了水稻幼苗根系的基因表达谱与转录因子核心互作网络, 为探究水稻幼苗根系响应盐胁迫的分子调控机制提供了理论参考。

关键词: 水稻; 根; 盐胁迫; 转录组测序; 转录因子

Analysis of transcription factor regulatory networks in two-line male sterile rice seedling roots in response to salt stress

Zou Yi-Mei[1,2], Xu Min[1], Wang Hai-Yang[1], Yao Hui[1], Wang Jia-Feng[3], Liu Hao[2,*], and Ren Dai-Sheng[1,*]

[1] Anhui Yuanliang Rice Industry Co., Ltd., Hefei 231131, Anhui, China; [2] Guangdong Key Laboratory of Crop Genetic Improvement / Institute of Crop Science, Guangdong Academy of Agricultural Sciences, Guangzhou 510640, Guangdong, China; [3] National Engineering Research Center of Plant Space Breeding / South China Agricultural University, Guangzhou 510642, Guangdong, China

Abstract: To comprehensively elucidate the transcription factor regulatory network underlying salt-stress responses in rice seedling roots, we used the rice male sterile line Huaxing 166S as material, treated seedling roots with three NaCl concentrations (0, 0.25%, and 0.50%) for one week and recorded phenotypic data. RNA-seq was then used to characterize gene expression patterns, detecting 30,378 genes, of which 26,315 were identified as significantly differentially expressed genes (DEGs). Pathway enrichment analysis showed that, across all three NaCl treatments, DEGs were significantly enriched in secondary metabolism-related pathways. Based on the DEG dataset, we further identified 326 differentially expressed transcription factors and constructed a core interaction network comprising 88 transcription factors. Functional enrichment analysis indicated that this core network was mainly involved in plant hormone signal transduction, the plant MAPK signaling pathway, and the plant circadian rhythm pathway. In addition, quantitative real-time PCR (qPCR) validation showed that, following salt stress, 10 WRKY family genes were specifically highly expressed in rice roots. Together, these transcriptome data across three NaCl concentrations define the gene expression landscape and a core transcription factor interaction network in rice seedling roots, providing a basis for dissecting the molecular regulatory mechanisms of rice root responses to salt stress.

Keywords: rice; root; salt stress; transcriptome sequencing; transcription factor

本研究由安徽袁粮水稻产业有限公司资助。

This study was supported by the Anhui Yuanliang Rice Industry Co., Ltd.

* 通信作者(Corresponding authors): 刘浩, E-mail: liuhao2054@stu.scau.edu.cn; 任代胜, E-mail: rendaisheng@163.com

第一作者联系方式: E-mail: zouyimei1106@163.com

Received (收稿日期): 2025-09-22; Accepted (接受日期): 2026-03-16; Published online (网络出版日期): 2026-03-27.

URL: https://link.cnki.net/urlid/11.1809.S.20260327.1040.008

This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/).

水稻(*Oryza sativa* L.)作为全球最重要的粮食作物之一, 为近半数人口提供基本热量来源[1]。然而, 全球约 6%的耕地受盐渍化影响, 且该比例每年以 1%~2%的速率递增。在亚洲, 超过 2000 万公顷的水稻田遭受高盐胁迫, 严重威胁水稻生产的可持续性[2]。盐胁迫会导致植物生长发育过程面临渗透胁迫, 降低植株对水分的有效吸收效率, 同时引发活性氧(reactive oxygen species, ROS)过度积累, 进而抑制植物生长[3]。水稻幼苗建立阶段对盐胁迫高度敏感, 此阶段的盐胁迫会升高根系所处土壤溶液的渗透压, 导致细胞水分流失甚至植株死亡, 最终显著影响作物产量[4-6]。

近年来, 植物耐盐碱领域通过模式植物与作物研究的深度融合, 构建了从基础理论解析、基因资源发掘到育种技术转化的整合研究体系。拟南芥作为模式植物, 为耐盐碱机制研究提供了核心基础框架。已有研究证实, 过表达编码质膜 Na^+/H^+逆向转运蛋白的 *SOS1* 基因可显著增强拟南芥耐盐性[7]; 光活化的 phyA 与 phyB 则通过促进 SOS2 介导的磷酸化及 PIF1、PIF3 的降解来提升拟南芥的耐盐能力[8]。这一保守的 SOS 信号通路在水稻中同样发挥核心调控作用, 其中 *OsSOS1* 编码质膜 Na^+/H^+反向转运蛋白, 通过 SOS 信号通路降低胞内 Na^+浓度, 维持细胞离子平衡与渗透稳态, 从而提高水稻耐盐性[9]。拟南芥研究揭示的盐胁迫响应保守机制, 为水稻耐盐碱基因挖掘提供了重要理论模型。

在水稻耐盐相关基因研究中, OsWRKY54 可直接激活关键钠离子转运蛋白基因 *OsHKT1;5* 的表达, 该基因通过调控水稻体内钠离子的转运与分配来提升耐盐性[10]; 液泡 Na^+/K^+区隔化相关基因 *OsNHX2/3/5* 的发现, 为离子平衡调控提供了新靶点[11]; Chen 等[12]研究证实, OsGRF7 通过调节熊果苷代谢来增强水稻耐盐性; 转录组学研究表明, *MYB3R* 是响应耐盐性的 miR396b/GRF6 模块的下游靶标, 且 *MYB3R* 过表达可显著增强水稻耐盐性[13]; OsWRKY53 作为盐胁迫负调控因子, 可结合 *OsMKK10.2/OsHKT1.5* 启动子抑制其转录以调控耐盐过程, 而 OsWRKY28 则通过直接结合并激活关键盐响应基因 *OsDREB1B* 的表达, 正向调控水稻耐盐性[14-15]; ERF 家族成员同样发挥重要作用, 其中, OsERF104 可正向调控水稻对盐胁迫的耐受性[16]。此外, 植物 bZIP 转录因子对非生物胁迫应答以及碳氮代谢等过程具有重要调控作用[17], 进一步丰富了耐盐转录调控网络的层级。除转录因子外, 激酶基因也参与耐盐调控, 如 *OsRPK1* 基因表达量升高时, 水稻幼苗耐盐性显著下降[18]。值得注意的是, 水稻耐盐性由多个染色体上的基因协同调控, 其过程涉及植株对胁迫信号的感知、分子信号的产生、识别与传导等复杂环节, 水稻耐盐碱基因在感知盐碱胁迫信号后会启动特异性表达程序[19]。上述研究凸显了转录因子在胁迫应答中的枢纽作用, 但其动态调控网络及基因间协同机制仍需系统解析。

RNA 测序技术的革新为解析胁迫响应调控网络提供了高效技术工具。基于二代测序的转录组分析(RNA-Seq)可精准捕获全转录组动态变化, 结合参考基因组可实现 SNP 鉴定、可变剪切分析及关键调控因子挖掘[20]。研究表明, 转录调控通过时空特异性来激活胁迫响应基因赋予植物抗逆能力: SOS 通路中 SOS3-SOS2 复合物可激活 SOS1 以维持离子稳态[21]。DREB 类转录因子(如 DREB2A)可特异性结合靶基因启动子的干旱响应元件(DRE), 增强植物对不同非生物胁迫的抗性[22]。这些调控网络的解析不仅揭示了植物抗逆的分子基础, 也为作物抗逆遗传改良提供了关键靶点。

为深入探究水稻幼苗根系在盐胁迫处理后的基因表达情况, 本研究以水稻不育系华兴 166S 为试验材料, 通过模拟盐胁迫环境(梯度浓度 NaCl 处理), 系统解析幼苗根系在胁迫响应中的基因表达动态。结合盐胁迫处理 1 周后的根系表型特征与转录组测序数据, 重点挖掘参与盐胁迫应答的核心转录因子及其调控网络, 旨在揭示水稻根系对盐胁迫适应的分子机制, 为后续抗逆基因功能解析及遗传改良提供理论依据。

1　材料与方法

1.1　试验材料

以籼型两系杂交稻不育系华兴 166S 为试验材料。采用培养皿方式种植水稻植株, 露白后对植株进行不同浓度的 NaCl 溶液处理 1 周, 编号分别为 CK (H_2O 处理)、NCL1 (0.25% NaCl)、NCL2 (0.50% NaCl), 进行 3 次独立的生物学重复。处理 1 周后, 挑选生长状况良好且长势均匀的幼苗, 测量主根长、侧根长、叶鞘长、地上部分长度、叶宽。

1.2　RNA 提取、文库构建和测序

取 50~100 mg 液氮冻存的水稻根系, 置于预冷研钵中, 加入液氮迅速研磨至细粉状。将粉末转移

至 1.5 mL 离心管, 立即加入 1 mL TRIzol, 涡旋混匀, 室温静置 5 min。加入 200 μL 氯仿, 剧烈振荡 15 s, 室温静置 5 min。4℃、15,000×*g* 离心 15 min, 吸取上层水相(约 400 μL)至新离心管, 避免吸入中层蛋白。加入等体积异丙醇(约 400 μL), 轻柔颠倒混匀, 室温静置 10 min。15,000×*g* 离心 10 min, 弃上清液, 管底可见白色 RNA 沉淀。通过 Agilent 2100 生物分析仪(Agilent Technologies, 美国)检测 RNA 质量, 并经琼脂糖凝胶电泳验证。通过常规试剂盒去除 rRNA, 将 mRNA 富集。提取得到的 mRNA, 利用 mRNA Capture Beads 磁珠进行富集; 磁珠纯化处理后, 利用高温将 mRNA 进行片段化; 以片段化后的 mRNA 作为模板, 在逆转录酶混合体系中合成 cDNA 第 1 链; 在合成 cDNA 第 2 链的同时, 完成末端修复和加 A 尾; 接着, 连接接头, 利用 Hieff NGS DNA Selection Beads 磁珠进行纯化选择目标片段; 然后进行 PCR 文库扩增。采用 Illumina Hiseq2500 平台对反应产物进行测序。

1.3 数据分析与参考基因组比对

采用 fastp [23]对转录组测序原始数据进行质量控制, 首先剔除含有接头序列的 reads; 其次排除 N 碱基占比超过 10%的异常序列; 然后去除全聚腺苷酸(poly-A tail artifacts)干扰序列; 最后过滤低质量 reads (质量值 Q ≤ 20 的碱基占比≥ 50%), 通过四重质控体系确保后续分析数据的可靠性。为消除核糖体 RNA 残留对转录组数据分析的干扰, 采用 bowtie2 [24]有效识别并移除 rRNA 相关序列, 保留具有生物学意义的 unmapped reads 构建高质量分析数据集, 参考基因组为已发表的水稻基因组 Os-Nipponbare-Reference-IRGSP-1.0_Release_7, 利用 HISAT2 [25]软件的层次化索引技术将净化数据与参考基因组进行高效比对。基于高精度比对结果, 利用 Stringtie [26]重构转录本(参数为-f, 0.3), 采用 RSEM [27]计算每个样本中所有基因的表达量。

1.4 差异表达基因鉴定

基于 R 语言平台对基因表达数据进行主成分分析(principal component analysis, PCA)以评估样本间的总体差异。在差异表达分析环节, 运用 DESeq2 软件[28]对原始 read count 数据进行标准化处理, 基于负二项分布模型进行差异基因的统计学检验并计算 *P* 值, 进行多重假设检验校正, 获得错误发现率(false discovery rate, FDR)。差异基因的筛选标准设定为$|\log_2(\text{Fold change})| \geqslant 1$ 且 FDR < 0.05。针对筛选获得的差异基因, 通过 Gene Ontology (GO)数据库进行基因功能注释, 解析其参与的生物学过程、分子功能及细胞组分。同时利用 KEGG (kyoto encyclopedia of genes and genomes)数据库开展全基因组水平的通路富集分析, 系统揭示差异基因涉及的信号通路与代谢网络。为进一步探究差异基因的相互作用关系, 基于 STRING [29]数据库中的蛋白质相互作用信息构建互作网络, 并应用 cytoscape [30]进行网络可视化与核心模块挖掘, 从而解析差异基因在蛋白质互作层面的调控机制。

1.5 荧光定量 PCR 验证差异转录因子表达量

用 H_2O、0.25% NaCl、0.50% NaCl 溶液对华兴 166S 水稻幼苗进行处理, 采集处理 1 周的新鲜样本, 各取 100 mg 幼苗样品, 加入液氮迅速冷冻研磨成粉末, 采用 TRIzol 试剂裂解, 氯仿分层后异丙醇沉淀 RNA, 75%乙醇洗涤, DEPC 水溶解。使用 DNase I 37℃处理 30 min, 消除基因组 DNA 污染, 并用 NanoDrop 检测纯化 RNA 的浓度。取 1 μg 总 RNA, 使用 First Strand cDNA Synthesis Kit 反转录试剂盒(TOYOBO, FSK-100)合成 cDNA, 采用 ABI StepOne Plus 系统, 使用 SYBR Premix ExTaq (TaKaRa)进行 PCR 反应, Real time PCR 反应体系为 20 μL, 包含 SYBR preMix 反应液 10 μL、上下游引物各 0.5 μL、水稻幼苗 cDNA 模板 2 μL (反应总量 100 ng)、无菌水 7 μL。用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算目标基因各组织的相对表达量, 以 H_2O 处理的水稻幼苗作为对照样品。

2 结果与分析

2.1 水稻幼苗根系表型结果鉴定

盐胁迫对水稻幼苗形态发育产生显著抑制, 且随 NaCl 浓度升高抑制效果更明显。CK 植株根系发达、地上部健壮, NCL1 和 NCL2 处理后, 植株整体矮小, 根系(主根、侧根)和地上部分生长明显受抑制, 且 NCL2 的抑制程度强于 NCL1 (图 1-A)。量化指标(图 1-B)进一步揭示, 主根长在 NCL1、NCL2 处理后显著缩短, 二者之间无显著差异; 侧根长、地上部长度均呈 CK > NCL1 > NCL2 趋势, 且各处理间差异显著, 体现盐浓度越高, 对侧根和地上部伸长的抑制越强。叶鞘长方面, 低浓度 NCL1 的影响较小, 高浓度 NCL2 则显著抑制; 叶宽在 NCL2 处理后显著变窄, NCL1 处理叶宽虽略有增加但无显著统计学差异; 而叶长在各处理间均未表现出显著差异, 表明盐胁迫

对叶长的影响相对不明显。整体而言, 盐胁迫通过渗透胁迫与离子毒害, 显著抑制水稻主根、侧根、地上部长度、叶鞘长及叶宽的生长, 且浓度越高抑制越强, 其中根和地上部对盐胁迫更敏感, 叶长受影响最小, 其调控或涉及更复杂的补偿机制。通过测定水稻幼苗不同浓度 NaCl 溶液处理 1 周后的表型数据, 明确了水稻材料华兴 166S 的生长特性, 为后续进行基因表达量与表型相关性分析奠定了数据基础。

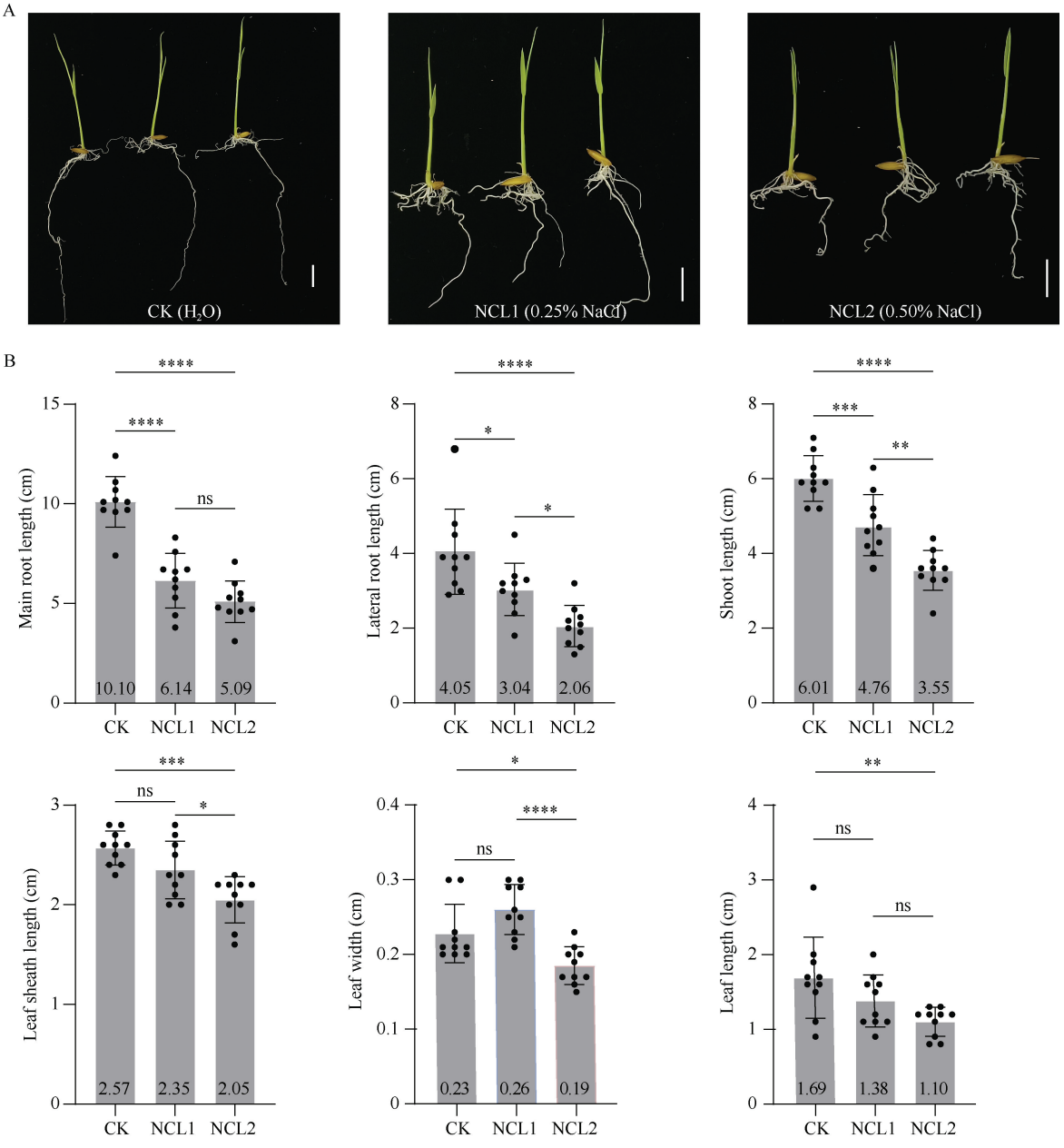


图 1　水稻华兴 166S 经不同 NaCl 溶液处理 1 周的表型数据统计

Fig. 1　Phenotypic characterization of Huaxing 166S after one week of NaCl treatment

A: 水稻华兴 166S 经 3 种浓度 NaCl 溶液处理 1 周的表型图; B: 水稻的表型数据图, 包括主根长、侧根长、地上部长度、叶鞘长、叶宽以及叶长。数字代表平均数, 不同圆点代表独立观察的样本数值。星号表示通过单因素方差分析与其他处理相比具有显著性; ns 表示差异不显著; *、**、***、****分别表示在 0.05、0.01、0.001 和 0.0001 水平差异显著。CK: H_2O 处理; NCL1: 0.25% NaCl 处理; NCL2: 0.50% NaCl 处理。比例尺: 1 cm。

A: representative phenotypes of Huaxing 166S after one week of treatment with three NaCl concentrations; B: quantification of phenotypic traits, including primary root length, lateral root length, shoot length, leaf sheath length, leaf width, and leaf length. Values are means, different circles indicate independent observed sample data points. Significance was assessed by one-way ANOVA; ns, no significant difference; *, **, ***, and **** indicate $P < 0.05$, $P < 0.01$, $P < 0.001$, and $P < 0.0001$, respectively. CK: H_2O control; NCL1: 0.25% NaCl; NCL2: 0.50% NaCl. Scale bar = 1 cm.

2.2 原始数据质控

在提取样本的总 RNA 后, 采用常规试剂盒去除 rRNA 以富集 mRNA。为保证数据质量并减少无效数据的分析干扰, 对原始数据进行了过滤处理。9 个水稻华兴 166S 样本的转录组数据质量控制结果(表 1)与样本皮尔逊系数统计(表 2)显示, 对照组(CK)过滤后有效数据量超过 4.3×10^7 个碱基数, 处理组(NCL1、NCL2)均超过 4.7×10^7 个碱基数。样本平均 Q20 大于 98.3%, 平均 Q30 大于 95.7%。所有样本的 N 碱基比例均≤ 0.01%, GC 含量介于 45.95%~47.96%之间。基因组比对分析显示, CK 的总比对率为 37.06%, 单一比对率为 36.21%; NCL1 的总比对率高达 67.80%, 单一比对率为 66.16%; NCL2 的总比对率为 42.24%, 单一比对率为 41.27%。此外, 所有样本的高质量 reads 占比均大于 99%, 接头(adapter)污染比例极低(< 0.1%), 低质量 reads 占比均< 0.03%, 含 N reads 比例在 0.01%~0.06%之间, 且未检出 PolyA reads, 表明数据质量极优, 均达到转录组分析标准。样本的核糖体 RNA (rRNA)比对率介于 0.15%~0.27%之间(即比对到 rRNA 的比例极低, 高于 99.73%的 reads 未被比对到 rRNA), 表明 rRNA 去除效果显著。后续分析将基于去除核糖体 reads 后保留的未比对(unmapped) reads 进行。

表 1 测序原始数据质量统计分析
Table 1 Quality metrics of raw sequencing data

样本 Sample	原始数据 Raw date	有效数据 Clean date	≥ Q20 (%)	≥ Q30 (%)	总基因组比对 Total mapped (%)	单基因组比对 Unique mapped (%)
CK	43,275,807	43,243,773	6,377,082,790 (98.74%)	6,254,517,192 (96.84%)	16,002,536 (37.06%)	15,636,570 (36.21%)
NCL1	48,472,627	48,406,191	7,075,855,425 (98.36%)	6,886,617,516 (95.73%)	32,750,575 (67.80%)	31,956,882 (66.16%)
NCL2	48,042,298	47,985,791	7,016,035,857 (98.37%)	6,834,873,942 (95.83%)	20,215,178 (42.24%)	19,754,634 (41.27%)

CK: 清水对照样本; NCL1: 0.25% NaCl 处理样本; NCL2: 0.50% NaCl 处理样本。
CK: H_2O control sample; NCL1: 0.25% NaCl-treated sample; NCL2: 0.50% NaCl-treated sample.

表 2 样本皮尔逊系数统计
Table 2 Pearson correlation coefficients among samples

样本 Sample	CK1	CK2	CK3	NCL1-1	NCL1-2	NCL1-3	NCL2-1	NCL2-2	NCL2-3
CK1	1.0000	0.9988	0.9966	0.9571	0.9563	0.9589	0.8132	0.8361	0.8439
CK2	0.9988	1.0000	0.9980	0.9563	0.9554	0.9580	0.8140	0.8365	0.8442
CK3	0.9966	0.9980	1.0000	0.9534	0.9525	0.9544	0.8092	0.8307	0.8375
NCL1-1	0.9571	0.9563	0.9534	1.0000	0.9975	0.9980	0.8794	0.9069	0.9114
NCL1-2	0.9563	0.9554	0.9525	0.9975	1.0000	0.9989	0.8756	0.9012	0.9064
NCL1-3	0.9589	0.9580	0.9544	0.9980	0.9989	1.0000	0.8765	0.9033	0.9092
NCL2-1	0.8132	0.8140	0.8092	0.8794	0.8756	0.8765	1.0000	0.9868	0.9883
NCL2-2	0.8361	0.8365	0.8307	0.9069	0.9012	0.9033	0.9868	1.0000	0.9962
NCL2-3	0.8439	0.8442	0.8375	0.9114	0.9064	0.9092	0.9883	0.9962	1.0000

CK: 清水对照样本; NCL1: 0.25% NaCl 处理样本; NCL2: 0.50% NaCl 处理样本。
CK: H_2O control sample; NCL1: 0.25% NaCl-treated sample; NCL2: 0.50% NaCl-treated sample.

2.3 不同浓度 NaCl 处理水稻样本转录组数据质量与相关性分析

将富集得到的 mRNA 反转录合成双链 cDNA, 经末端修复后连接接头, 通过 PCR 扩增构建上机文库(图 2-A)。序列匹配结果显示, 88%以上序列成功比对至水稻基因组外显子区域, 内含子与基因间区占比分别为 5.15%~7.05%和 3.32%~4.08% (图 2-B), 该结果说明建库过程中 RNA 片段有效富集。FPKM 值分布显示, $\log_{10}$(FPKM) ≈ 1 (FPKM ≈ 10)处存在显著密度峰值, 且随表达量升高($\log_{10}$ (FPKM) > 1), 密度值逐渐下降。主成分分析(PCA)显示, PC1 与 PC2 累计贡献率达 89.8%, 能有效区分不同浓度 NaCl 处理样本的转录组差异: 同处理组内生物学重复紧密聚集, 而不同处理组间距离较远, 表明数据质量可靠(图 2-C)。小提琴图进一步表明, 表达量主体分布集中于 $\log_{10}$ (FPKM) ≈ 1, 而高表达基因

($\log_{10}$ (FPKM) > 2)占比极低。上述特征符合转录组数据典型的右偏态分布规律，且所有样本呈现单峰近似对称分布，印证了组间重复性良好(图 2-D)。样本相关性分析进一步支持上述结论：组内相关系数为 1.00，NCL1 组与 CK 组相关系数为 0.96，而 NCL2 组与 CK 组相关性显著降低至 0.83，表明 NCL2 处理对水稻转录组影响更为显著，NCL1 效应相对较弱(图 2-E)。

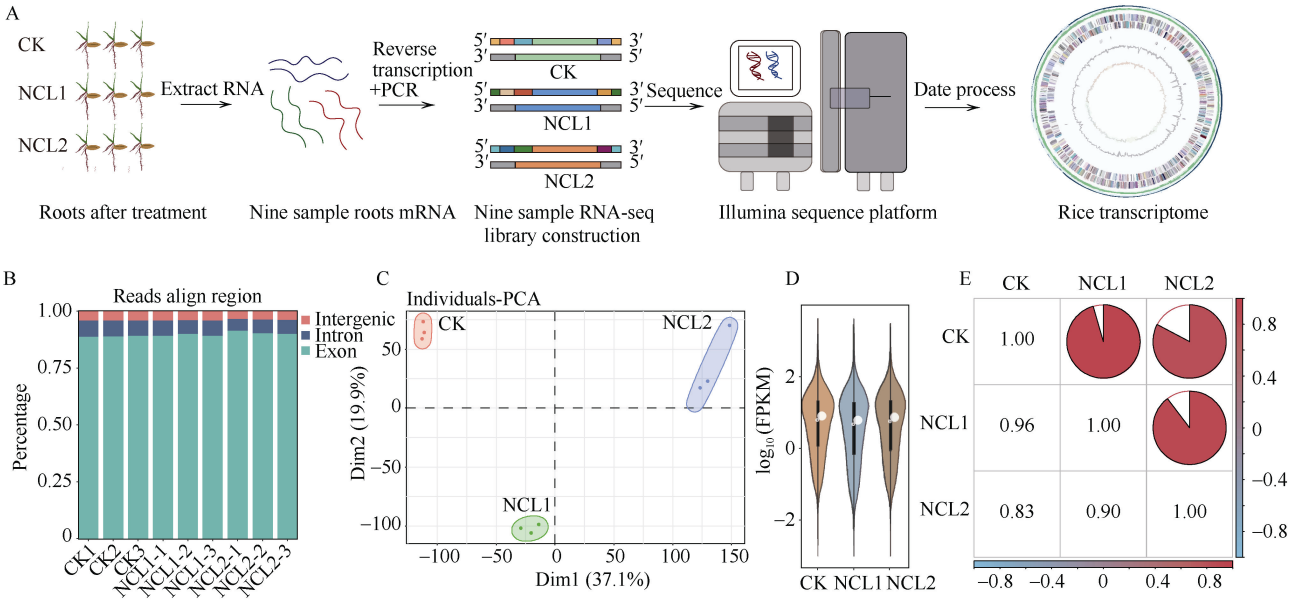


图 2　华兴 166S 经不同浓度 NaCl 溶液处理后样本转录组数据相关性系数鉴定

Fig. 2　Assessment of transcriptome data quality for Huaxing 166S under different NaCl treatments

A: 转录组测序程序流程图; B: 比对参考区域统计图; C: 样本主成分分析; D: 基因表达量小提琴图; E: 样本相关性热图。CK: 清水对照样本; NCL1: 0.25% NaCl 处理样本; NCL2: 0.50% NaCl 处理样本。

A: RNA-seq workflow; B: summary of read mapping to the reference genome; C: principal component analysis (PCA) of samples; D: violin plots of gene expression levels; E: heatmap of sample-to-sample correlations. CK: H_2O control sample; NCL1: 0.25% NaCl-treated sample; NCL2: 0.50% NaCl-treated sample.

2.4　基因表达谱及表达模式聚类

水稻参考基因组包含 56,926 个预测表达基因。本研究通过对水稻幼根组织进行转录组测序，成功鉴定出其中 30,378 个基因的表达量不为零。为深入解析基因表达的空间分布特征，本研究将全部检测到表达的基因按其表达丰度定位在水稻基因组的 12 条染色体上，据此构建了基因转录表达图谱(图 3-A)。该图谱直观地展示了在设定的 3 种不同 NaCl 浓度处理条件下(CK、NCL1、NCL2)，基因在 12 条染色体上的表达分布模式。分析该图谱发现，所有表达基因均呈现出相似的染色体位置依赖性的表达谱特征，即在染色体两臂末端区域表达水平相对较高，而在靠近着丝粒的区域则表达水平相对较低。进一步对这 30,378 个表达基因进行 K-means 聚类分析，并聚焦数量最多的前 8 个簇(cluster)进行分析，发现簇内基因数量的多少与其表达量变化趋势的复杂性存在一定关联：基因数量较少的簇，其表达趋势通常较为单一；而基因数量较多的簇，则呈现出更为复杂的表达动态。其中，最大的簇 Class 4 共有 8499 个基因(图 3-B)，其表达量峰值较高，表达趋势从逐渐上升到逐渐下降；最小的簇 Class 3 则包含 1651 个基因，其表达趋势表现为下降后缓慢上升。此外，特异性表达基因分析显示，在 CK 中特异表达的基因有 26,769 个，在 NCL1 中特异表达的基因有 28,419 个，在 NCL2 中特异表达的基因有 26,489 个。

2.5　功能富集分析揭示了水稻幼根在 NaCl 胁迫时的关键生物学途径

本研究在水稻幼根样本中鉴定出 26,315 个显著差异基因，对 26,315 个显著差异基因进行表达量分析(图 4-B)，发现 CK 和 NCL1 处理组之间存在高表达基因重叠现象，表明二者之间的差异相对较小；相比之下，NCL2 处理组与 CK 之间仅有极少数高表达量基因存在交叉表达，表明 NCL2 与 CK 之间的表达差异更为显著；此外，NCL1 与 NCL2 之间也有一

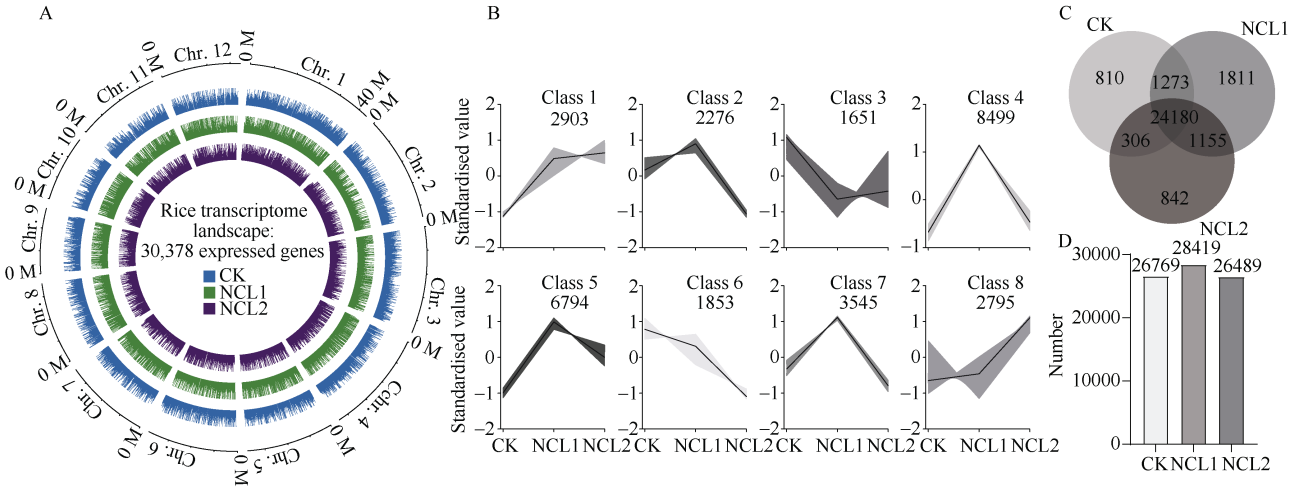


图 3 水稻华兴 166S 幼根总体表达基因的分析和鉴定

Fig. 3 Analysis and identification of the total expressed genes in the young roots of rice Huaxing 166S

A: 全体基因表达量圈图; B: 全体基因 K-means 聚类图; C: 全部基因绘制的韦恩图; D: 各组别基因表达量。CK: 清水对照样本; NCL1: 0.25% NaCl 处理样本; NCL2: 0.50% NaCl 处理样本。

A: circular plot of expression levels for all expressed genes; B: K-means clustering of all expressed genes; C: Venn diagram of expressed genes across groups; D: expression levels by group. CK: H_2O control sample; NCL1: 0.25% NaCl-treated sample; NCL2: 0.50% NaCl-treated sample.

定程度的基因重叠表达现象, 进一步佐证了 NCL1 处理与对照组的低差异性, 以及 NCL2 处理对基因表达模式的显著扰动效应。本研究以|$\log_2$ (Fold change)| ≥ 1 且 FDR < 0.05 为严格筛选阈值, 对不同浓度 NaCl 溶液处理下的水稻幼根差异基因进行系统分析。在 CK 与 NCL1 的差异表达谱中, 共鉴定出 1785 个显著上调基因和 394 个显著下调基因, 表明低浓度 NaCl 处理对基因表达的扰动相对温和; 而 CK 与 NCL2 组则呈现更显著的表达变化, 包含 2218 个上调基因与 2785 个下调基因, 表明高浓度 NaCl 对基因表达网络具有更强的调控作用。值得注意的是, NCL1 与 NCL2 组间的差异分析显示, 存在 1041 个上调基因与 3301 个下调基因(图 4-A)。此外, CK vs NCL1 中有 447 个特有基因, CK vs NCL2 中有 1407 个特有基因, NCL1 vs NCL2 中有 1007 个特有基因, 这些特有差异基因可能在应对盐胁迫时特异性发挥调控作用。共有与特异性表达的差异基因鉴定为了解水稻幼根吸收 NaCl 的基因表达特征提供了基础数据。通过韦恩图可视化分析 3 组差异基因的重叠关系(图 4-B), 发现 CK vs NCL1、CK vs NCL2 及 NCL1 vs NCL2 三组差异表达谱中, 共有 521 个基因呈现一致性差异表达特征。这些核心差异基因在不同浓度 NaCl 处理下均被激活或抑制, 提示其可能构成水稻幼根响应盐胁迫的基础调控模块。基于 521 个共有基因的表达量热图分析进一步表明(图 4-C), 多数基因在中、高浓度 NaCl 处理中呈现更高表达水平, 表明这些基因可能在水稻根系早期感知和吸收 NaCl 的过程中发挥关键作用, 其表达模式的一致性变化可能是根系适应盐环境的重要分子基础。

对这 3 组差异基因进行 KEGG 通路富集分析(图 4-F)发现, 在 CK vs NCL1 的差异基因中, 显著富集到 8 个通路, 分别为精氨酸/脯氨酸代谢(渗透调节)、亚油酸代谢(信号分子合成)、苯丙氨酸代谢(次生代谢)、运动蛋白、色氨酸代谢、甜菜素生物合成、角质层/栓质和蜡的生物合成、ABC 转运蛋白(离子跨膜运输)。CK vs NCL2 的差异基因显著富集到新陈代谢的 3 个通路, 分别为苯丙氨酸/酪氨酸和色氨酸的生物合成、吲哚类生物碱合成、苯丙氨酸代谢。NCL1 vs NCL2 的差异基因显著富集到 4 个通路, 分别为糖鞘脂生物合成-神经节系列、谷胱甘肽代谢、牛磺酸和低牛磺酸代谢、萜类骨架生物合成。CK vs NCL2 与 NCL1 vs NCL2 2 个时期对比的差异基因显著富集的通路明显少于 CK vs NCL1 时期, 表明低浓度 NaCl 诱导更广泛的代谢和调节通路, 高浓度处理下反应更集中于关键生存通路。此外, 3 组差异基因均显著富集在了次生代谢分支, 表明在 NaCl 胁迫下, 水稻幼根进行的次生代谢活动是保证水稻正常发育必不可少的通路。

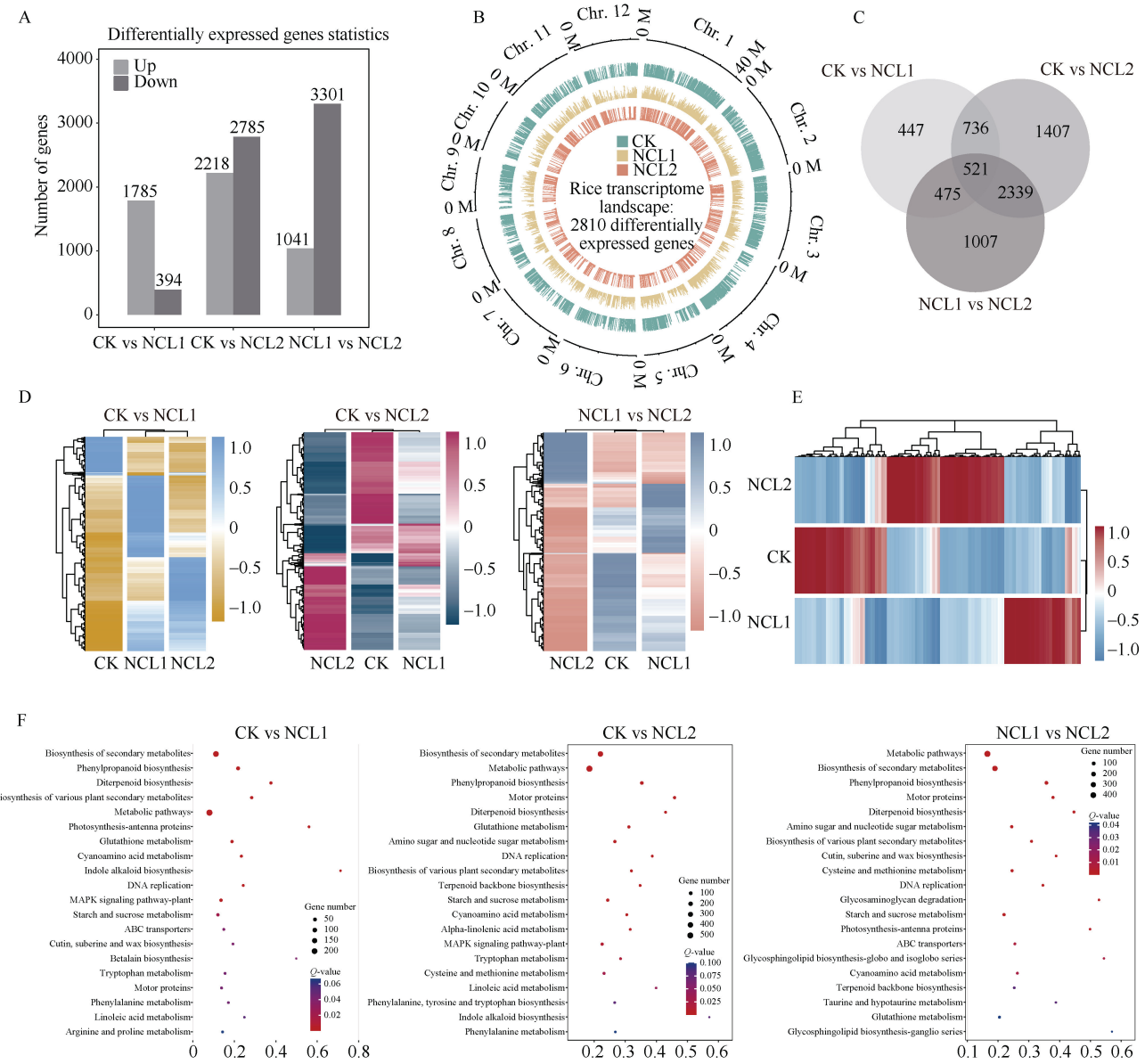


图 4　水稻华兴 166S 经不同浓度 NaCl 溶液处理幼根差异基因的鉴定

Fig. 4　Identification of differential genes in young roots of rice Huaxing 166S treated with NaCl solutions of different concentrations

A: 差异基因统计图; B: 差异基因表达量圈图; C: 筛选出关键基因的韦恩图; D: 各组别特异基因的表达热量图; E: 关键 521 个基因的表达量热图; F: 3 个不同浓度的 KEGG 通路富集气泡图。CK: 清水对照样本; NCL1: 0.25% NaCl 处理样本; NCL2: 0.50% NaCl 处理样本。A: summary of differentially expressed genes (DEGs); B: circular plot of DEG expression levels; C: Venn diagram of key genes identified across comparisons; D: heatmap of group-specific genes; E: expression heatmap of 521 key genes; F: KEGG pathway enrichment bubble plot for the three NaCl concentrations. CK: H_2O control sample; NCL1: 0.25% NaCl-treated sample; NCL2: 0.50% NaCl-treated sample.

2.6　WGCNA 分析

通过动态剪切聚类树将基因聚类为彩色共表达模块，并结合软阈值筛选保证网络的无标度特性，为后续分析奠定基因集合基础(图 5-B)。应用 WGCNA 分析，计算模块特征基因与样品类型的 Pearson 相关系数，从 2860 个过滤后的基因中成功识别出 33 个不同的基因表达模块，模块的相关系数从–1.00 至 0.97；其中相关系数> 0.80 的基因表达模块有 5 个，包括 MEyellow-CK (r = 0.92, P = 4e-04)、MEturquoise-NCL2 (r = 0.94, P = 1e-24)、MEgreen-NCL2 (r = 0.88, P = 0.002)、MEbrown-NCL2 (r = 0.97, P = 1e-05)、MEblack-NCL2 (r = 0.82, P = 0.007)。其中，MEyellow-CK、MEturquoise-NCL2、MEbrown-NCL2 与对应样品表现为强正相关，为后续聚焦核心模块提供依据(图 5-A)。通过表达量热图可视化模块基因在不同处理中的表达差异发现，在 NCL2 中

高表达的基因，在 CK 中呈低表达水平，而 NCL1 中的表达量处于中间状态，其中 MEturquoise 模块对应的基因在 NCL2 中高表达、在 CK 中低表达，进一步验证了该模块与 NCL2 的强关联(图 5-C)。对相关系数> 0.90 的关键模块开展 KEGG 通路富集分析，以解析模块基因的生物学功能：富集到核糖体相关通路的基因占比达 87%，且$-\log_{10}P$ 为 5.91，是基因占比最高且富集显著性最强的通路，说明核糖体相关通路参与重要生命活动的调控；剪接体途径基因占比为 43%，$-\log_{10}P$ 为 2.78，基因占比和富集显著性均较高，表明剪接体相关通路也具有重要作用；核质运输途径基因占比为 30%，$-\log_{10}P$ 为 3.47，同样是富集较为显著且基因占比不低的通路，提示核质运输过程在研究体系中具有重要意义(图 5-D)。

对关键转录因子的表达量进行分析显示，CK 组箱体覆盖的表达量区间约 7~9，箱内中位数线约为 8；NCL1 组箱体覆盖的表达量区间约 8~10，中位数线约为 9，较 CK 组略高；NCL2 组箱体覆盖的表达量区间约 7.5~9.5，中位数线约为 8.5，与 CK 组接近。3 组箱体长度差异较小，说明组内基因表达水平的离散程度相似。其中，NCL1 组箱体中位数高于 CK 组和 NCL2 组，表明 NCL1 处理可能使转录因子的核心群体表达水平呈上调趋势；而 NCL2 组的核心表达水平略高于 CK，低于 NCL1，表明 NCL2 处理对关键转录因子的中间表达水平影响较弱(图 5-E)。关键转录因子的分子互作网络以 bZIP 为核心节点，整合了多种功能的调控因子，包括参与生长素信号的 ARF 家族(ARF25、ARF18)、参与胁迫应答的

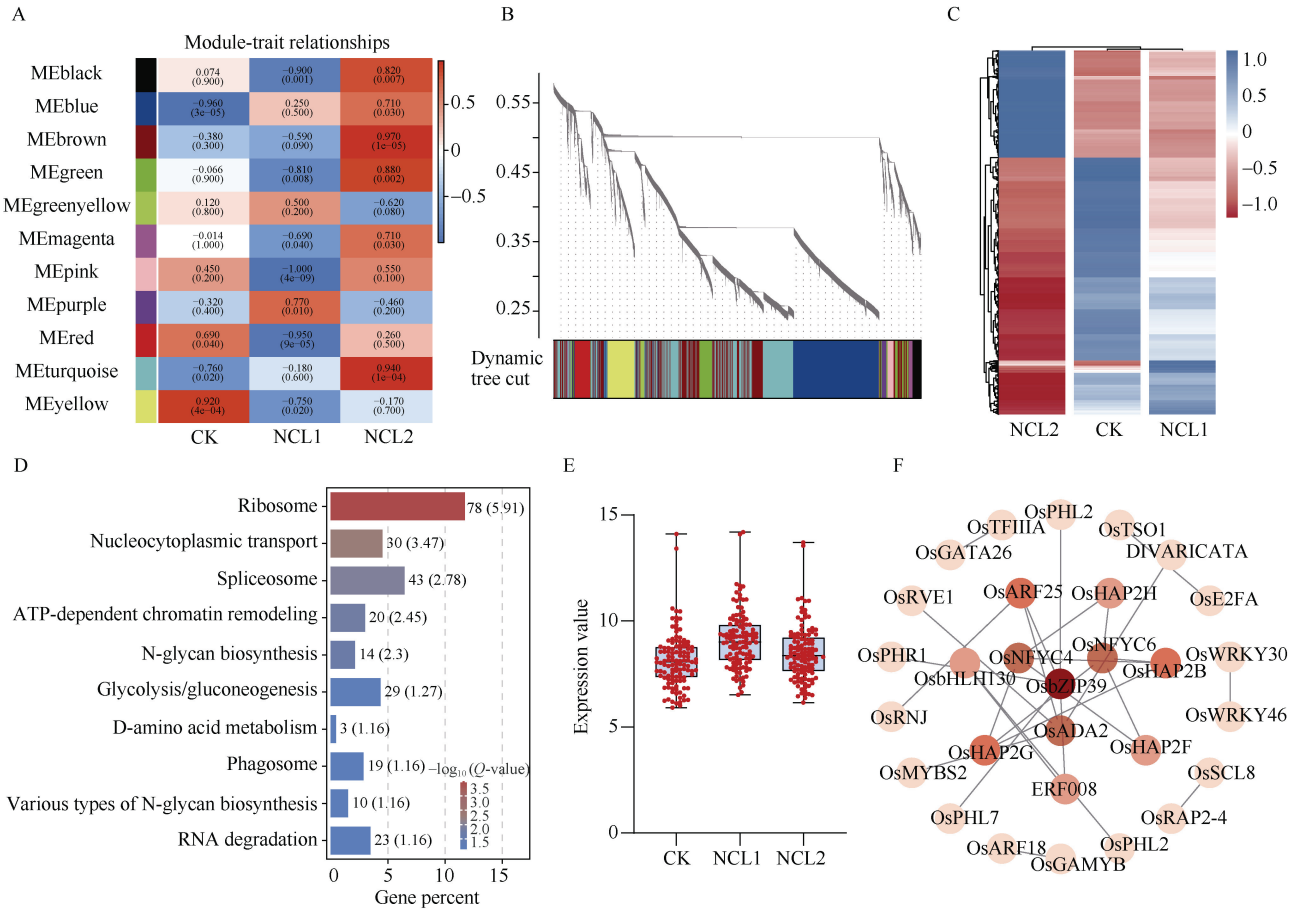


图 5 WGCNA 分析

Fig. 5 WGCNA analysis

A: 基因聚类树与模块构建; B: 基因共表达模块与样品类型的相关性分析; C: WGCNA 筛选的模块基因的表达量热图; D: KEGG 富集条形图(前 10 条); E: 关键转录因子的表达量箱线图; F: WGCNA 筛选的模块基因转录因子 PPI 网络图。CK: 清水对照样本; NCL1: 0.25% NaCl 处理样本; NCL2: 0.50% NaCl 处理样本。

A: gene dendrogram and module detection; B: correlations between co-expression modules and sample groups; C: heatmap of module genes expression from WGCNA; D: KEGG enrichment bar plot (top 10 pathways); E: box plots showing expression of key transcription factors; F: protein-protein interaction (PPI) network of transcription factors identified from WGCNA modules. CK: H_2O control sample; NCL1: 0.25% NaCl-treated sample; NCL2: 0.50% NaCl-treated sample.

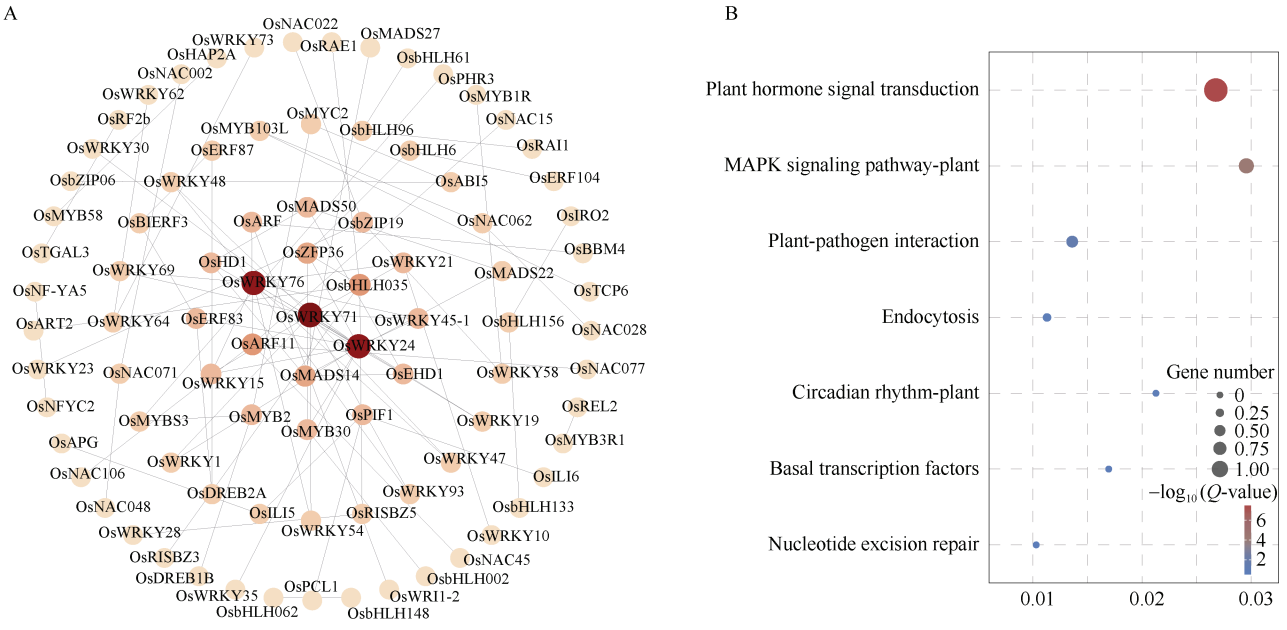
WRKY 家族(WRKY30、WRKY46)、CCAAT 盒结合因子 NFYC 家族(NFYC4、NFYC6)、乙烯响应因子 ERF008、bHLH 家族的 bHLH130 等, 介导多通路的分子互作与信息整合(图 5-F)。

2.7　转录因子的鉴定与功能富集分析

本研究在水稻幼苗根系不同浓度处理的差异基因表达谱中, 通过提高筛选阈值鉴定转录因子, 共获得 512 个差异表达的转录因子, 去除重复, 最终得到 326 个转录因子。将全部差异表达转录因子与水稻数据库比对后, 利用 STRING 网站构建转录因子互作网络。结果显示, 326 个差异表达转录因子中仅有 88 个转录因子可以构建出核心互作网络(图 6-A), 其中核心转录因子包括 WRKY71、WRKY76、WRKY24、bHLH035、ZFP36、WRKY45-1、MADS14、ARF11、ZFP36、WRKY21、WRKY15 等(表 3)。随后, 对筛选得到的转录因子开展 KEGG 富集通路分析与表达量分析发现, 转录因子功能富集在植物激素信号转导、植物中的 MAPK 信号通路、植物-病原体相互作用、内吞作用、植物的昼夜节律、基础转录因子以及核苷酸切除修复共 7 条功能通路(图 6-B), 其中多数通路涉及信号转导与外界环境互作过程。根据转录因子表达量热图聚类分析结果(图 6-C), NCL2 高表达的基因和 CK 与 NCL1 高表达的基因基本不重复, 而 CK 高表达基因与 NCL1 存在重复现象, 表明相比于 NCL2, NCL1 与 CK 的基因表达模式更为相似, 水稻幼苗根系进行的生命活动可能更为相近。

为深入探究核心转录因子的调控关系, 选择 6 个 WRKY 家族的核心转录因子, 对其进行共表达基因分析(图 6-D): 以 WRKY71 为核心, 关联 WRKY28、WRKY53、WRKY7、bHLH148 等, 呈现共表达网络关系; 以 WRKY76 为核心, 关联 WRKY62、WRKY45、WRKY64、WRKY19 等, 呈现共表达网络关系; 以 WRKY15 为核心, 关联 WRKY93、HSFA4D 等, 呈现共表达网络关系; 以 WRKY24 为核心, 关联 WRKY28、WRKY69、WRKY7 等, 呈现共表达网络关系; 以 WRKY45-1 为核心, 关联 WRKY76、RH1、RH2、NPR3 等, 呈现共表达网络关系; 以 WRKY21 为核心, 关联 WRKY86、MYB4 等, 呈现共表达网络关系。

水稻根系的单细胞转录组(single-cell RNA-seq)基因表达图谱已经公布[31], 为了明确本研究鉴定的关键转录因子在根的细胞类型中的表达量, 本研究以 Rice-SCMR (http://www.elabcaas.cn/scmr)数据库为基础, 开展关键转录因子在水稻根系不同细胞类型中的表达量分析(图 6-E)。该结果表明, *WRKY71* 在根系多个细胞类型(cell-types)中均有表达, 无明显细胞类型特性; *WRKY45-1* 在部分细胞类型中高表达, 同时伴随低表达分布, 提示其在特定细胞类型中优先高表达, 具有细胞类型偏好性; *WRKY76* 在大部分根细胞类型中表达微弱, 仅在极少数细胞类型中有表达, 调控作用的空间范围有限; *WRKY21*、



(图 6)

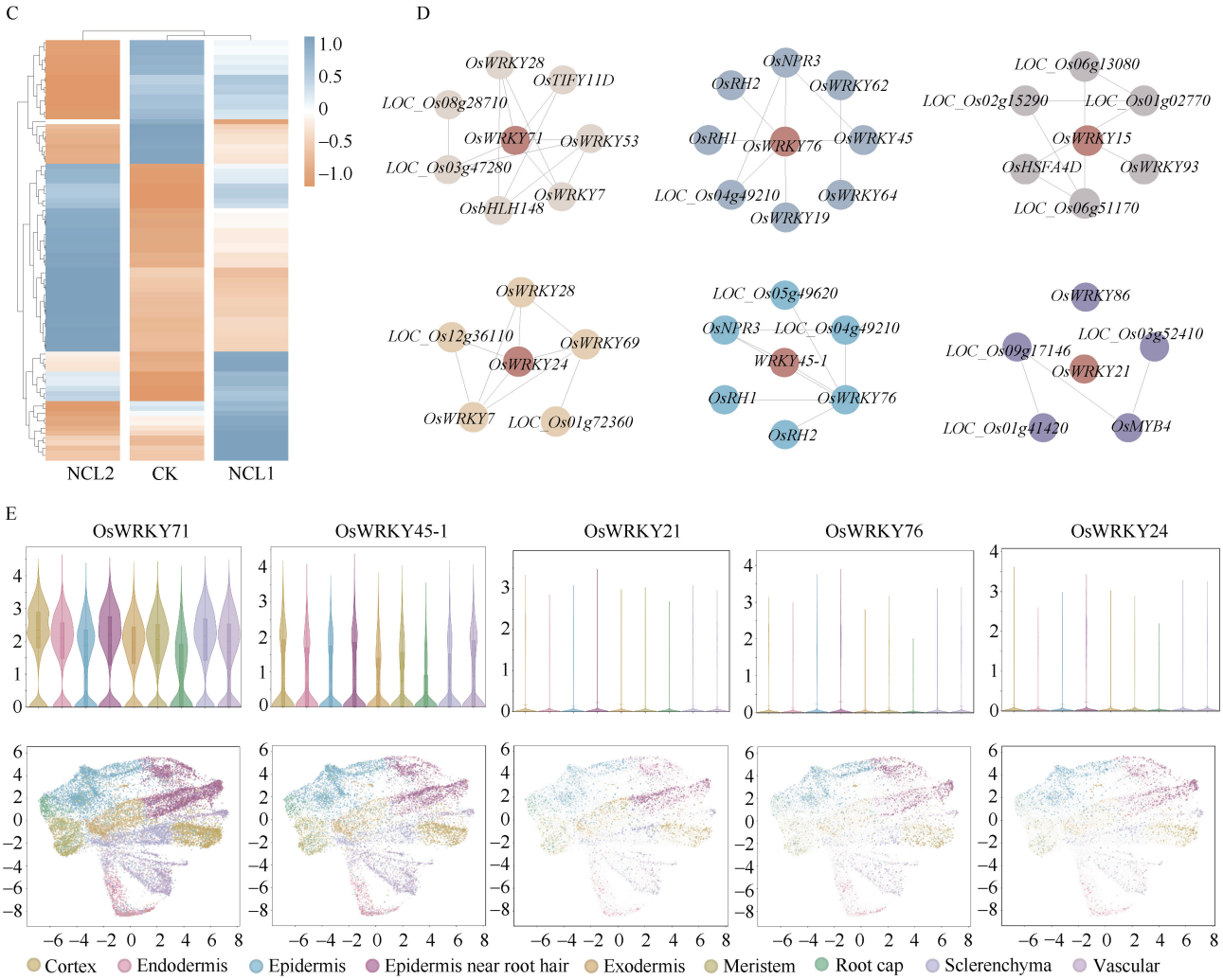


图 6 筛选出水稻华兴 166S 不同 NaCl 浓度的关键转录因子

Fig. 6 Identification of key transcription factors under different NaCl concentrations in Huaxing 166S

A: 关键转录因子 PPI 网络图; B: KEGG 显著性气泡图; C: 转录因子表达量热图; D: 关键转录因子的共表达基因网络; E: 关键转录因子在根系中的表达量小提琴图和 UMAP 图。CK: 清水对照样本; NCL1: 0.25% NaCl 处理样本; NCL2: 0.50% NaCl 处理样本。

A: PPI network of key transcription factors; B: KEGG enrichment bubble plot; C: heatmap of transcription factor expression; D: co-expression network of key transcription factors; E: violin plots and UMAP visualization of key transcription factor expression in roots. CK: H_2O control sample; NCL1: 0.25% NaCl-treated sample; NCL2: 0.50% NaCl-treated sample.

表 3 差异表达转录因子的表达倍数变化表

Table 3 Fold changes of differentially expressed transcription factors

基因名称 Gene name	基因号 Gene ID	CK vs NCL1	CK vs NCL2
OsWRKY10	*LOC_Os01g09100*	2.892,349,507,717,20	4.208,186,410,507,11
OsWRKY15	*LOC_Os01g46800*	2.077,620,897,122,47	2.906,407,199,711,59
OsWRKY21	*LOC_Os01g60640*	3.271,167,936,121,78	2.830,158,795,789,49
OsWRKY24	*LOC_Os01g61080*	3.716,990,240,352,99	2.224,369,246,044,20
OsWRKY71	*LOC_Os02g08440*	2.163,577,774,072,10	2.068,959,346,932,18
OsMYB30	*LOC_Os02g41510*	2.209,477,903,971,47	2.379,157,503,205,14
OsBIERF3	*LOC_Os02g43790*	2.452,243,431,892,17	2.290,418,257,659,48
OsZFP36	*LOC_Os03g32230*	3.214,718,493,451,03	3.741,474,139,238,18
OsBHLH6	*LOC_Os04g23550*	4.113,290,984,177,07	3.541,721,650,326,90
OsWRKY48	*LOC_Os05g40060*	3.468,591,617,922,77	2.346,527,848,519,60

(续表 3)

基因名称 Gene name	基因号 Gene ID	CK vs NCL1	CK vs NCL2
OsWRKY58	*LOC_Os05g45230*	9.736,401,931,318,29	9.389,452,089,084,37
OsWRKY19	*LOC_Os05g49620*	2.896,985,368,520,98	3.927,360,850,031,74
OsAPG	*LOC_Os06g05550*	2.465,663,572,348,81	–7.392,317,423,000,00
OsWRKY28	*LOC_Os06g44010*	3.796,956,052,941,55	3.897,143,066,085,37
OsNF-YA5	*LOC_Os07g06470*	–2.415,012,809,000,00	–3.507,174,423,000,00
OsERF87	*LOC_Os09g39850*	5.181,501,872,682,66	2.867,639,779,526,03
OsWRKY64	*LOC_Os12g02450*	2.926,988,648,318,06	2.971,751,818,621,09

CK: 清水对照样本; NCL1: 0.25% NaCl 处理样本; NCL2: 0.50% NaCl 处理样本。

CK: H_2O control sample; NCL1: 0.25% NaCl-treated sample; NCL2: 0.50% NaCl-treated sample.

WRKY24 与 *WRKY76* 类似, 表达的细胞覆盖度与丰度均有限, 仅参与少数特定细胞功能调控。转录因子调控网络的构建为后续鉴定影响水稻幼苗根系生长及盐胁迫响应的关键基因提供了重要的基因资源。

2.8　WRKY 转录因子的荧光定量验证

为验证转录组数据的可靠性, 本研究在核心转录因子互作网络中挑选 10 个关键 WRKY 转录因子的编码基因进行荧光定量验证, 包括 *LOC_Os02g08440* (*WRKY71*)、*LOC_Os05g25770* (*WRKY45-1*)、*LOC_Os09g25060* (*WRKY76*)、*LOC_Os01g61080* (*WRKY24*)、*LOC_Os01g60640* (*WRKY21*)、*LOC_Os01g46800* (*WRKY15*)、*LOC_Os05g49620* (*WRKY19*)、*LOC_Os01g14440* (*WRKY1*)、*LOC_Os12g02450* (*WRKY64*)、*LOC_Os06g06360* (*WRKY93*)。荧光定量 PCR 结果表明(图 7), 华兴 166S 根系中 *WRKY45-1*、*WRKY76*、*WRKY15*、*WRKY64*、*WRKY19*、*WRKY1* 这 6 个基因的表达量随盐浓度升高呈持续上调趋势; *WRKY71*、*WRKY24*、*WRKY21*、*WRKY93* 这 4 个基因的表达量在 0.25% NaCl 处理后升高, 但随着盐离子浓度进一步上升, 表达水平随之下降。上述结果显示, 不同浓度 NaCl 处理下这些 *WRKY* 基因的表达模式与转录组测序结果趋势一致, 既验证了 RNA-seq 数据的可靠性, 也明确了盐胁迫下 WRKY 转录因子编码基因的表达模式变化。

3　讨论

在水稻整个生命周期中, 幼苗期是其对盐胁迫最为敏感的关键阶段, 而根系作为直接感知并响应土壤盐信号的首要器官, 其应对盐胁迫的能力直接决定了幼苗的存活率、定苗成功率乃至后期的生长发育与最终产量。因此, 系统解析水稻幼苗根系响应盐胁迫过程中的转录调控网络, 并深入阐明其内在分子机制, 对水稻耐盐研究具有十分重要的意义。本研究以水稻品种华兴 166S 为研究材料, 通过设置一系列梯度浓度的盐胁迫处理其幼苗, 利用转录组测序技术系统鉴定出不同盐浓度胁迫下水稻幼苗根系中的差异表达基因, 并对其进行了 KEGG 富集分析, 以揭示其显著富集的生物学通路及代谢调控途径。进一步基于差异表达基因的功能注释与表达模式分析, 从中筛选出在盐胁迫响应转录调控网络中可能发挥核心作用的关键调控基因。通过研究这些差异基因的功能和转录调控网络, 能对水稻幼苗根系耐盐机制有一个更清晰的认知。

随着水稻全基因组序列草图的首次成功绘制与发布[32], 转录组测序技术的成熟和功能基因组学研究的系统开展, 为解析水稻复杂农艺性状的分子调控机制、挖掘关键功能基因提供了强有力的技术支撑, 极大地推动了水稻基础研究与分子育种的进程。在水稻非生物胁迫响应研究领域, 转录组测序已成为筛选差异表达基因的核心手段。Li 等[33]利用转录组测序技术对盐胁迫处理后的水稻材料进行深度测序与分析, 在全基因组水平上共鉴定出 70 个与耐盐碱相关的基因, 其中, GATA19 转录因子通过抑制 *SAT1* 的表达来增强 ROS 清除能力, 从而提高水稻耐盐碱性; Cui 等[34]成功鉴定出 2427 个和 2898 个在正常及盐胁迫下受 PAV (presence-absence variation)影响的基因, 其中, 1206 个基因在盐胁迫下表现出特异性响应。此外, 功能基因组学的研究也揭示了特定基因在水稻盐胁迫响应中的关键作用, OsLHY 通过调节 Na^+/K^+离子平衡和 ABA 信号通路来增强水稻的耐盐性[35]。这些发现为后续解析水稻耐盐性的品种特异性分子基础、筛选耐盐候选基因提供了重要线索。

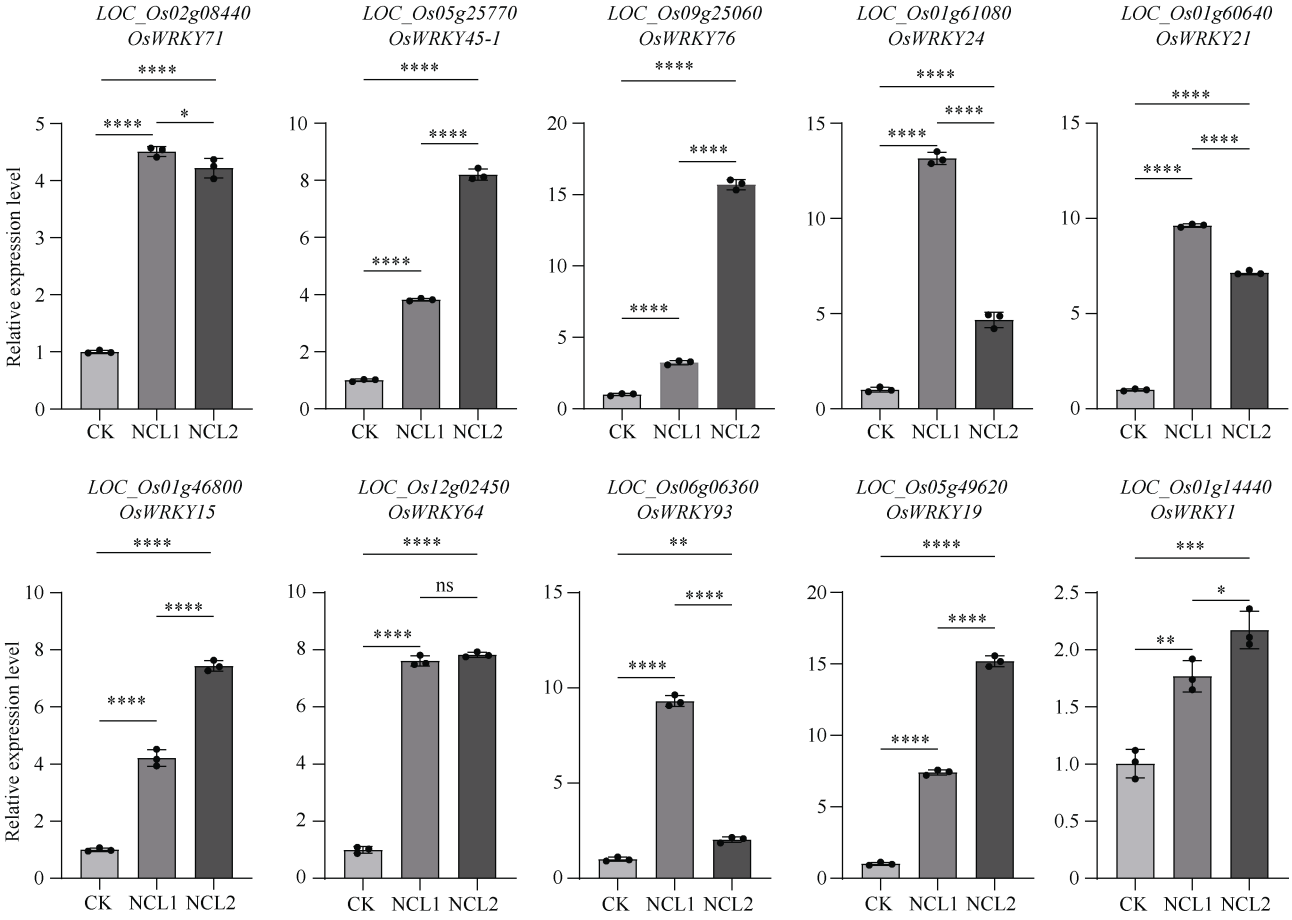


图 7 关键转录因子编码基因的 qPCR 验证

Fig. 7 qPCR validation of genes encoding key transcription factors

星号表示通过单因素方差分析与其他处理相比具有显著性。ns: 差异不显著; *、**、***、****分别表示在 0.05、0.01、0.001 和 0.0001 水平差异显著。CK: 清水对照样本; NCL1: 0.25% NaCl 处理样本; NCL2: 0.50% NaCl 处理样本。

Asterisks indicate significant differences compared with other treatments as determined by one-way ANOVA. ns: no significant difference; *, **, ***, **** indicate $P < 0.05$, $P < 0.01$, $P < 0.001$, and $P < 0.0001$, respectively. CK: H_2O control sample; NCL1: 0.25% NaCl-treated sample; NCL2: 0.50% NaCl-treated sample.

本研究对差异基因的 KEGG 功能富集分析显示, 其主要集中于植物激素信号转导、植物 MAPK 信号通路、植物-病原体相互作用等 7 条通路, 且多数通路与信号转导及植物对外界环境的互作过程密切相关。表达模式分析进一步表明, 相较于 NCL2 处理组, NCL1 处理组与对照组(CK)的基因表达模式更为相似, 表明水稻幼苗根系的生命活动状态可能更相近。这一分子水平的差异在表型上得到了验证。CK 植株根系发达、地上部生长健壮; 而经 NCL1 和 NCL2 处理后, 植株整体表现为矮小, 其根系(主根、侧根)及地上部分的生长均受到明显抑制, 且 NCL2 处理对植株生长的抑制程度显著强于 NCL1 处理。转录因子在调节植物生长发育和对非生物胁迫条件的响应中至关重要, 转录因子家族基因的差异表达调控水稻耐盐性[36]。本研究通过差异转录因子构建出核心互作网络, 其核心转录因子包括 WRKY71、WRKY76、WRKY24、bHLH035、ZFP36、WRKY45-1、MADS14、ARF11、WRKY21 及 WRKY15, 且这些核心转录因子以 WRKY 家族为主。已有研究证实, WRKY71 可特异性抑制受赤霉素(gibberellin, GA)诱导的 α-淀粉酶基因 *Amy32b* 的表达, 并且在水稻抗病中发挥重要作用[37]; 而本研究发现, *WRKY71* 在盐胁迫处理条件下的表达水平显著上调, 这一结果为进一步拓展 *WRKY71* 的功能研究范围提供了新的方向, 也为解析其在盐胁迫响应中的调控机制奠定了基础。对于 WRKY76, 已有研究明确其可与 bHLH148 形成调控复合体, 通过直接结合脱水响应元件结合蛋白基因 *DREB1E* 的启动子区域, 在干旱胁迫条件下显著激活 *DREB1E* 的表达, 进而增强水稻的耐旱能力[38], 本研究中关于 *WRKY76* 的表达模

式及调控趋势与上述前人研究结果高度一致, 进一步验证了 *WRKY76* 在水稻胁迫响应中的调控功能。已有研究表明, WRKY24 正向调节水稻的稻瘟病抗性, 抑制 WRKY24 功能大大增加了植株对稻瘟病菌的易感性[39]。本研究对核心转录因子表达模式的分析发现, *WRKY24* 在盐胁迫下表达量上调, 这一发现打破了此前 *WRKY24* 功能研究多集中于生物胁迫领域的局限性, 为进一步拓展 *WRKY24* 的功能研究范围, 探究其在盐胁迫响应中的具体调控机制, 提供了新见解。此前已有研究报道, WRKY 家族的其他成员, 如 OsWRKY53、OsWRKY18、OsWRKY8、OsWRKY28、OsWRKY71 等, 同样是调控水稻耐盐性的关键因子, 在水稻应对盐胁迫的生理代谢与分子调控过程中发挥核心作用[14,40-41]。结合本研究筛选出的以 WRKY 家族为主的核心转录因子及其在盐胁迫下的表达特征, 分析认为 WRKY 家族转录因子在水稻幼苗根系响应盐胁迫的分子调控网络中扮演着至关重要的角色。

4　结论

为解析水稻幼苗根系响应盐胁迫的分子机制, 本研究以水稻品种华兴 166S 为材料, 采用转录组测序技术开展研究。首先对水稻幼苗根系进行了 3 个浓度梯度的 NaCl 胁迫处理, 处理持续 1 周后, 基于转录组数据筛选出响应盐胁迫的差异表达基因, 并在此基础上初步构建了转录调控网络, 筛选出以 WRKY 家族为主的 10 个核心转录因子, 结合 WRKY 家族其他成员调控水稻耐盐性的研究, 表明 WRKY 家族转录因子在水稻幼苗根系响应盐胁迫的分子调控中起关键作用。本研究通过对响应盐胁迫的差异功能基因及关键转录因子进行系统分析, 可为深入理解水稻幼苗根系生长发育及其应对盐胁迫的分子机制提供更为清晰的理论依据。

References

[1] Qiu R H, Yang J, Hou J Q, et al. Brassinosteroid signaling mediated by the OsIAA7-OsGSK2-OsBZR1 module regulates seed size in rice. Plant Cell, 2025, 37: koaf165.

[2] Anumalla M, Catolos M, Ramos J, et al. Salinity-tolerant rice: a sustainable solution for food security and greenhouse gas mitigation. Curr Plant Biol, 2025, 43: 100518.

[3] Liu C T, Mao B G, Yuan D Y, et al. Salt tolerance in rice: physiological responses and molecular mechanisms. Crop J, 2022, 10: 13–25.

[4] Ashraf M, Foolad M R. Pre-sowing seed treatment—a shotgun approach to improve germination, plant growth, and crop yield under saline and non-saline conditions. In: Advances in Agronomy. Amsterdam: Elsevier, 2005. pp 223–271.

[5] Krishnamurthy S L, Gautam R K, Sharma P C, et al. Effect of different salt stresses on agro-morphological traits and utilisation of salt stress indices for reproductive stage salt tolerance in rice. Field Crops Res, 2016, 190: 26–33.

[6] 谷娇娇, 胡博文, 贾琰, 等. 盐胁迫对水稻根系相关性状及产量的影响. 作物杂志, 2019(4): 176–182.
Gu J J, Hu B W, Jia Y, et al. Effects of salt stress on root related traits and yield of rice. Crops, 2019(4): 176–182 (in Chinese with English abstract).

[7] Shi H Z, Lee B H, Wu S J, et al. Overexpression of a plasma membrane Na^+/H^+ antiporter gene improves salt tolerance in *Arabidopsis thaliana*. Nat Biotechnol, 2003, 21: 81–85.

[8] Ma L, Han R, Yang Y Q, et al. Phytochromes enhance SOS2-mediated PIF1 and PIF3 phosphorylation and degradation to promote *Arabidopsis* salt tolerance. Plant Cell, 2023, 35: 2997–3020.

[9] Martínez-Atienza J, Jiang X Y, Garciadeblas B, et al. Conservation of the salt overly sensitive pathway in rice. Plant Physiol, 2007, 143: 1001–1012.

[10] Huang J J, Liu F H, Chao D, et al. The WRKY transcription factor OsWRKY54 is involved in salt tolerance in rice. Int J Mol Sci, 2022, 23: 11999.

[11] Fukuda A, Nakamura A, Hara N, et al. Molecular and functional analyses of rice NHX-type Na^+/H^+ antiporter genes. Planta, 2011, 233: 175–188.

[12] Chen Y P, Dan Z W, Li S Q. Growth regulating factor 7-mediated arbutin metabolism enhances rice salt tolerance. Plant Cell, 2024, 36: 2834–2850.

[13] Yuan H R, Cheng M X, Wang R H, et al. miR396b/GRF6 module contributes to salt tolerance in rice. Plant Biotechnol J, 2024, 22: 2079–2092.

[14] Yu J, Zhu C S, Xuan W, et al. Genome-wide association studies identify OsWRKY53 as a key regulator of salt tolerance in rice. Nat Commun, 2023, 14: 3550.

[15] Zhang M X, Zhao R R, Wang H T, et al. OsWRKY28 positively regulates salinity tolerance by directly activating *OsDREB1B* expression in rice. Plant Cell Rep, 2023, 42: 223–234.

[16] 潘炬忠, 韦萍, 朱德平, 等. 水稻转录因子 OsERF104 的克隆和功能研究. 作物学报, 2025, 51: 900–913.
Pan J Z, Wei P, Zhu D P, et al. Cloning and functional analysis of OsERF104 transcription factor in rice. Acta Agron Sin, 2025, 51: 900–913 (in Chinese with English abstract).

[17] 刘宝玲, 张莉, 孙岩, 等. 谷子 bZIP 转录因子的全基因组鉴定及其在干旱和盐胁迫下的表达分析. 植物学报, 2016, 51: 473–487.
Liu B L, Zhang L, Sun Y, et al. Genome-wide characterization of bZIP transcription factors in foxtail millet and their expression profiles in response to drought and salt stresses. Chin Bull Bot, 2016, 51: 473–487 (in Chinese with English abstract).

[18] 李晶岚, 陈鑫欣, 石翠翠, 等. *OsRPK1* 基因过表达和 RNA 干涉对水稻苗期耐盐性的影响. 作物学报, 2020, 46: 1217–1224.
Li J L, Chen X X, Shi C C, et al. Effects of *OsRPK1* gene overexpression and RNAi on the salt-tolerance at seedling stage in rice. Acta Agron Sin, 2020, 46: 1217–1224 (in Chinese with Eng-

lish abstract).

[19] 祁栋灵, 郭桂珍, 李明哲, 等. 水稻耐盐碱性生理和遗传研究进展. 植物遗传资源学报, 2007, 8: 486–493.
Qi D L, Guo G Z, Li M Z, et al. Progress of physiology and genetic research on saline-alkaline tolerance in rice. J Plant Genet Resour, 2007, 8: 486–493 (in Chinese with English abstract).

[20] 朱梅, 栗昕羽, 胡晨帆, 等. 基于转录组测序的远红光辐照下水稻幼苗差异表达基因分析. 植物生理学报, 2024, 60: 561–572.
Zhu M, Li X Y, Hu C F, et al. Analysis of differentially expressed genes in rice seedlings under far-red light irradiation based on transcriptome sequencing. Plant Physiol J, 2024, 60: 561–572 (in Chinese with English abstract).

[21] Ji H T, Pardo J M, Batelli G, et al. The salt overly sensitive (SOS) pathway: established and emerging roles. Mol Plant, 2013, 6: 275–286.

[22] Li X S, Liang Y Q, Gao B, et al. *ScDREB10*, an A-5c type of *DREB* gene of the desert moss Syntrichia caninervis, confers osmotic and salt tolerances to *Arabidopsis*. Genes, 2019, 10: 146.

[23] Chen S F, Zhou Y Q, Chen Y R, et al. Fastp: an ultra-fast all-in-one FASTQ preprocessor. Bioinformatics, 2018, 34: i884–i890.

[24] Langmead B, Salzberg S L. Fast gapped-read alignment with bowtie 2. Nat Methods, 2012, 9: 357–359.

[25] Kim D, Langmead B, Salzberg S L. HISAT: a fast spliced aligner with low memory requirements. Nat Methods, 2015, 12: 357–360.

[26] Pertea M, Pertea G M, Antonescu C M, et al. StringTie enables improved reconstruction of a transcriptome from RNA-seq reads. Nat Biotechnol, 2015, 33: 290–295.

[27] Li B, Dewey C N. RSEM: accurate transcript quantification from RNA-seq data with or without a reference genome. BMC Bioinform, 2011, 12: 323.

[28] Love M I, Huber W, Anders S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. Genome Biol, 2014, 15: 550.

[29] Szklarczyk D, Franceschini A, Wyder S, et al. STRING v10: protein-protein interaction networks, integrated over the tree of life. Nucleic Acids Res, 2015, 43: D447–D452.

[30] Shannon P, Markiel A, Ozier O, et al. Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks. Genome Res, 2003, 13: 2498–2504.

[31] Wang X Y, Huang H W, Jiang S J, et al. A single-cell multi-omics atlas of rice. Nature, 2025, 644: 722–730.

[32] Goff S A, Ricke D, Lan T H, et al. A draft sequence of the rice genome (*Oryza sativa* L. ssp. *japonica*). Science, 2002, 296: 92–100.

[33] Li J, Xu C, Tian Y L, et al. Genome-wide association and selection studies reveal genomic insight into saline-alkali tolerance in rice. Plant J, 2025, 121: e70056.

[34] Cui Y C, Lin Y R, Wei H, et al. Identification of salt tolerance-associated presence-absence variations in the *OsMADS56* gene through the integration of DEGs dataset and eQTL analysis. New Phytol, 2024, 243: 833–838.

[35] Li C, He Y Q, Yu J, et al. The rice late elongated hypocotyl enhances salt tolerance by regulating Na^+/K^+ homeostasis and ABA signalling. Plant Cell Environ, 2024, 47: 1625–1639.

[36] Zhou Y, Yang P, Cui F L, et al. Transcriptome analysis of salt stress responsiveness in the seedlings of Dongxiang wild rice (*Oryza rufipogon* Griff.). PLoS One, 2016, 11: e0146242.

[37] Zhang Z L, Xie Z, Zou X L, et al. A rice *WRKY* gene encodes a transcriptional repressor of the gibberellin signaling pathway in aleurone cells. Plant Physiol, 2004, 134: 1500–1513.

[38] Zhang M X, Zhao R R, Huang K, et al. OsWRKY76 positively regulates drought stress via OsbHLH148-mediated jasmonate signaling in rice. Front Plant Sci, 2023, 14: 1168723.

[39] Jang S, Li H Y. Overexpression of *OsAP2* and *OsWRKY24* in *Arabidopsis* results in reduction of plant size. Plant Biotechnol, 2018, 35: 273–279.

[40] Peng L Y, Chao D, Sun X Q, et al. OsWRKY18, a WRKY transcription factor, is involved in rice salt tolerance. Plant Cell Physiol, 2025, 66: 1169–1183.

[41] Yang L, Fang S Y, Liu L, et al. WRKY transcription factors: hubs for regulating plant growth and stress responses. J Integr Plant Biol, 2025, 67: 488–509.