DOI: 10.3724/SP.J.1006.2021.02034

OsPAL2;3 对水稻化感抑制稗草能力的调控作用

李兰兰 母丹 严雪 杨陆可 林文雄* 方长旬*

福建农林大学生命科学学院农业生态研究所 / 福建省农业生态过程与安全监控重点实验室, 福建福州 350002

摘要: 苯丙氨酸解氨酶(phenylalanine ammonia-lyase, PAL, EC 4.3.1.5)是调控酚酸类化感物质合成的关键酶。*PAL* 在水稻中为多基因家族, 化感水稻 PI312777 和非化感水稻 Lemont 中, 相同 *PAL* 基因成员的启动子组成序列均存在差异, 并以 *OsPAL2;3*、*OsPAL2;4* 基因启动子序列的差异最大, 且 PI312777 的 *OsPAL2;3* 基因启动子的驱动活性高于 Lemont。过表达 *OsPAL2;3* 基因, 使 PI312777 和 Lemont 的抑草率分别提高 11.11% 和 5.56%。过表达 *OsPAL2;3* 同时增强 *OsPAL2;3*、*OsC4H*、*OsCCA*、*OsCOL*、*OsOMT* 等基因的表达, 增加水稻的原儿茶酸和香草酸含量。Co-IP 结合质谱鉴定结果显示, *OsPAL2;3* 蛋白与转酮醇酶、碳酸酐酶、果糖二磷酸醛缩酶、ATP 合酶 α 亚基、ATP 合酶 β 亚基等相互作用, 调控水稻的苯丙氨酸代谢途径。本研究表明, *OsPAL2;3* 的转录水平高低是 PI312777 和 Lemont 化感抑草能力差异的原因之一; *OsPAL2;3* 与多个蛋白互作共同调控酚酸类化合物合成, 该基因可用于提高水稻化感抑草能力的育种研究。

关键词: 水稻; 化感作用; *PAL* 基因; 启动子; 酚酸; 蛋白互作

Effect of *OsPAL2;3* in regulation of rice allelopathic inhibition on barnyardgrass (*Echinochloa crusgalli* L.)

LI Lan-Lan, MU Dan, YAN Xue, YANG Lu-Ke, LIN Wen-Xiong*, and FANG Chang-Xun*

Institute of Agroecology, School of Life Sciences, Fujian Agriculture and Forestry University / Fujian Provincial Key Laboratory of Agroecological Processing and Safety Monitoring, Fuzhou 350002, Fujian, China

Abstract: Phenylalanine ammonia-lyase (PAL, EC 4.3.1.5) is the key enzyme in regulation of the synthesis of phenolic acid allelochemicals. *PAL* gene in rice belongs to a multigene family. In allelopathic accession rice PI312777 and non-allelopathic rice accession Lemont, the promoter sequences of the same *PAL* gene member were different, and there was the largest difference in *OsPAL2;3* and *OsPAL2;4* gene promoter sequence. Gene promoter of *OsPAL2;3* from PI312777 showed higher activity than the corresponding promoter from Lemont. Overexpression of *OsPAL2;3* in PI312777 and Lemont resulted in increasing allelopathic inhibition on barnyardgrass (*Echinochloa crusgalli* L.), and the inhibitory ratios was increased by 11.11% in PI312777 and 5.56% in Lemont. Gene expression level of *OsPAL2;3*, *OsC4H*, *OsCCA*, *OsCOL*, and *OsOMT* was up-regulated in the *OsPAL2;3*-overexpressed transgenic rice compared with that of wild-type rice, and the contents of protocatechuic acid and vanillic acid were also increased. The results from Co-IP combined with mass spectrometry showed that transketolase, carbonic anhydrase, fructose-bisphosphate aldolase isozyme, ATP synthase subunit alpha and ATP synthase subunit beta were interacted with *OsPAL2;3* protein, resulting in regulating the phenylalanine pathway in rice. Our study indicated that the transcriptional activity of *OsPAL2;3* contributed to the allelopathic activity between PI312777 and Lemont, *OsPAL2;3* was interacted with a couple of proteins to jointly regulate the synthesis of phenolic acids, and *OsPAL2;3* could be considered as a candidate gene to improve the allelopathy of rice in breeding.

Keywords: rice; allelopathy; *PAL* gene; promoter; phenolic acid; protein interaction

本研究由国家自然科学基金项目(31871556), 福建农林大学杰出青年科研人才计划项目(xjq201805)和福建农林大学科技创新专项基金项目(CXZX2018042)资助。

This study was supported by the National Natural Science Foundation of China (31871556), the Outstanding Youth Scientific Fund of Fujian Agriculture and Forestry University (xjq201805), and the Science and Technology Innovation of Fujian Agriculture and Forestry University (CXZX2018042).

* 通信作者(Corresponding authors): 方长旬, E-mail: changfangxingyx@163.com; 林文雄, E-mail: lwx@fafu.edu.cn

第一作者联系方式: E-mail: 1244311185@qq.com

Received (收稿日期): 2020-05-14; Accepted (接受日期): 2020-08-19; Published online (网络出版日期): 2020-09-10.

URL: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1809.S.20200909.1142.006.html>

在稻-稗竞争的自然生态系统中,一些水稻品种具有抑制稗草生长的特性,该特性也称为水稻的化感作用,即水稻通过根系分泌特定的次生化合物抑制邻近杂草生长的化学生态学现象^[1-3]。王海斌等^[4]在田间小区试验结果显示,种植不同化感水稻品种的田间小区内的杂草生物量较种植非化感水稻的小区减少 32%~60%。徐正浩等^[5]研究结果也显示,直播和小苗移栽条件下,化感水稻品种对无芒稗株高、分蘖和干重均有较好的抑制作用,且水稻仍保持一定产量水平。由此可见,种植化感水稻能够控制田间稗草,从而减少化学除草剂的使用。

稗草(*Echinochloa crusgalli* L.)为禾本科植物,其与水稻的生长期、株型等生物学性状极为相似,具有作物拟态特性,为水田中最难防除的恶性杂草^[6]。针对伴生稗草,化感水稻能够通过调控自身的苯丙氨酸解氨酶基因(*OsPAL*)、9 β -海松-7,15-二烯合酶基因(*OsKSL4*)、同向柯巴基二磷酸合酶基因(*OsCPS4*)、momilactone A 合酶基因(*OsMAS*)、类黄酮 3'-羟化酶基因(*CYP75B3*, *CYP75B4*)等次生代谢不同途径上的关键基因的表达,分别合成原儿茶酸、香豆酸、肉桂酸、对羟基苯甲酸等酚酸类化合物,麦黄酮(tricin)、黄酮 O-糖苷等黄酮类化合物,以及二萜化合物 momilactones 等抑制稗草生长的化感物质^[7-10]。其中,酚酸类化合物在水稻化感抑草中的作用已有广泛研究^[11-22]。自然条件下,化感水稻中酚酸类化合物含量显著高于非化感水稻品种^[23];Li 等^[24]测定了化感水稻 PI312777 和非化感水稻 Lemont 培养液中酚酸的含量,结果发现三到七叶期 PI312777 培养液中的酚酸含量均极显著高于 Lemont,其中六叶期最高,达 710 μg 株⁻¹。水稻中酚酸含量与调控酚酸类合成的关键酶——苯丙氨酸解氨酶(PAL)基因的表达水平密切相关;稗草胁迫、氮素胁迫、茉莉酸和水杨酸信号分子诱导等处理下,水稻的 *PAL* 基因表达增强,且 PI312777 增强表达倍数显著高于 Lemont^[13-15,25-28]。

水稻基因组中含有 9 个 *PAL* 基因成员,稗草竞争干扰下化感水稻 PI312777 中 *PAL* 基因家族有 8 个基因成员上调表达,而 Lemont 仅 3 个基因成员上调表达^[29]。基因表达由生物体内反式作用因子(转录因子)作用于顺式作用原件(启动子区域)所决定^[30],通过比较化感水稻和非化感水稻的 *PAL* 基因启动子的活性,从中寻找在化感水稻中转录活性高于非化感水稻的 *PAL* 基因成员及其启动子,有助于深入揭示

特定 *PAL* 基因成员对水稻化感抑草的调控作用。为此,本研究通过比较化感水稻 PI312777 和非化感水稻 Lemont 的 *PAL* 基因成员的启动子组成序列及活性差异,揭示在化感水稻中转录水平高的 *PAL* 基因成员对水稻化感抑草能力的调控作用。

1 材料与方法

1.1 试验材料与种植

以国际上公认的化感水稻品种 PI312777 和非化感水稻品种 Lemont 为供试材料^[12,30]。采用 25%次氯酸钠溶液分别对 PI312777 和 Lemont 种子表面消毒 30 min,然后无菌水清洗 10 次,并置于恒温培养箱中 30℃浸泡过夜,随后保湿催芽。发芽的水稻种子播于表面悬浮聚乙烯网布的种植盆中,盆内添加水稻完全营养液,盆的外表面均匀涂布黑漆以防止营养液中产生绿藻。将种植盆置于人工气候培养箱中培养 10 d,培养条件为 28℃下光照培养 14 h (光照强度 360 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)、22℃下暗培养 10 h,相对湿度保持 85%左右;每周更换新鲜营养液,培养液 pH 5.5~6.0。待水稻长至四叶一心时,取水稻叶片,液氮速冻,用于基因组 DNA 和总 RNA 的提取。

1.2 水稻基因组 DNA 提取及 *PAL* 基因启动子克隆与测序

采用植物基因组 DNA 提取试剂盒(CW0553S,北京康为世纪生物科技有限公司),分别提取 2 个水稻品种叶片的基因组 DNA。分别以 *PAL* 家族各基因成员的 CDS 上游 3000 bp 左右的序列作为该基因启动子的模板序列设计扩增引物(表 1),采用 KOD-Plus (TOYOBO, Japan)高保真酶从 PI312777 和 Lemont 的基因组 DNA 中分别扩增 *PAL* 基因成员的启动子 DNA 片段,测序比较 2 种水稻的同一个 *PAL* 基因成员启动子的序列组成差异。

1.3 水稻 *OsPAL2;3* 启动子活性检测

将启动子与含有报告基因(GFP)的表达载体(pCambia3301)进行融合,构建重组表达载体,采用 PEG4000 介导^[31-32]转化方法将 *OsPAL2;3*、*OsPAL2;4* 基因启动子驱动的重组表达载体转化水稻原生质体细胞,28℃暗培养 36 h,利用激光共聚焦显微镜观察水稻原生质体细胞中绿色荧光蛋白发光情况。

1.4 *OsPAL2;3* 基因克隆及遗传转化水稻

采用 TRIzol 试剂(Invitrogen, USA)提取水稻叶片的总 RNA,逆转录为 cDNA。以 *OsPAL2;3* (*Os02g0626600*)基因的 CDS 序列为模板扩增 *OsPAL2;3*

表 1 本研究中所用到的引物

Table 1 Primers used in this study

功能	基因名称	正向引物	反向引物
Function	Gene name	Forward primer (5'–3')	Reverse primer (5'–3')
启动子克隆 Promoter cloning	<i>OsPAL2;1</i>	GGTAGTGCTAGATATGAAGGGCTGC	CACGAGGAGAAGAGAGGATTTCGAT
	<i>OsPAL2;2</i>	GTTTTCCGAACGGGTAAACCGATGTG	CTCACAGATGCAGTAGTAGCACACG
	<i>OsPAL2;3</i>	GGTACTGGTACCGCCAGTACGCATA	AGTTAGCTAGACGGCCGGAGAGAAC
	<i>OsPAL2;4</i>	GGGTCATATGTGACACGTCATCACA	CAGAAGATGGATCGGTTAACCTAGC
	<i>OsPAL4;1</i>	ATGAGCTGTGAGGCCCAGCAAGCAG	AACAACGACGAGGAGGAGGAGGAGG
	<i>OsPAL4;2</i>	CGTCCCGTAATACAGGGGATTTTGG	GAAGCAGAGGGGAGATCGATGTGTA
	<i>OsPAL11</i>	TAGAAGATCAGTTCGCTCCCAGGCT	TACAGGTCGCCGAGTACGTACGTAT
荧光定量 PCR qRT-PCR	<i>OsPAL2;3</i>	CCGTGCTCTTTGAGGCTAAC	GCTTGTGAGTCAGGTGGTCG
	<i>OsC4H</i>	ACCGCAGCGTCTCCTTC	ACCACCCGAGCATCCAG
	<i>OsCOL</i>	TGGTGGAGTGCGTGCTG	AGGCGTTGGCGTAGATG
	<i>OsOMT</i>	TGTCCTGTGAAATGGGTG	CCTCGGAACAAGAACTG
	<i>OsCAD</i>	TCGGCGTCGCTAATTTTCATCC	TCGATGGAAGAACGGGCAGAG
	<i>β-actin</i>	CTGCGGGTATCCATGAGACT	GCAATGCCAGGGAACATAGT
基因过表达载体 Gene overexpression vector	<i>OsPAL2;3</i>	<i>cgactctagaggatcc</i> ATGGCGTGCGAGA ACGGTCAG	<i>ccatactagtggatcc</i> GCAGATGGGCAGGG GCGCGC
转基因水稻 PCR 鉴定 PCR identification of transgenic rice line	<i>OsPAL2;3-OX</i>	CTGAAGCTCATGTCCTCCACGTTT	GATGTTGCCGTCCTCCTTGAAGTC
双分子荧光互补载体 Bimolecular fluorescent complimentary vector	<i>OsPAL2;3</i>	<i>atggcgcgccactagt</i> ATGGCGTGCGAGA ACGGTCAG	<i>cacctctccactagt</i> GCAGATGGGCAGGGG CGCGC
	ATP synthase subunit alpha	<i>atggcgcgccactagt</i> ATGGCAACCCTTCG AGTCGACGA	<i>cacctctccactagt</i> AAGGGAAAACCGTTC GAGTTGTTCC
	ATP synthase subunit beta	<i>atggcgcgccactagt</i> ATGGCGACTCGCCG GGCCCTCT	<i>cacctctccactagt</i> TGAAGCCGACTCCTTG GCGATC
	Transketolase	<i>atggcgcgccactat</i> ATGGCCGCGCACTCC GTCG	<i>cacctctccactagt</i> CAGGCTCTTTGCTGTT GCGAT
	Carbonic anhydrase	<i>atggcgcgccactagt</i> ATGTCGACCGCCGC CGCCGC	<i>cacctctccactagt</i> GGGCTCCCATAAGTCC AAGTTG
	Fructose-bisphosphate aldolase	<i>atggcgcgccactagt</i> ATGGCGTCTGCTAC TCTCCTCAA	<i>cacctctccactagt</i> GTAGACGTAGTTCTTG ACGAACA

基因, 并通过无缝克隆连接到 pCambia-2300-*eYFP* 质粒载体上, 构建 *OsPAL2;3* 基因融合 *eYFP* 的重组表达载体, 将重组表达载体转化到农杆菌 (EHA105) 感受态细胞中, 分别遗传转化 PI312777 和 Lemont。基因 *OsPAL2;3* 的遗传转化采用农杆菌侵染水稻愈伤组织的方法^[33-34], 通过遗传霉素 G418 筛选抗性愈伤, 经分化和脱分化获得过表达 *OsPAL2;3* 转基因 T_0 代水稻植株, 收获 T_0 代转基因水稻种子进行萌发, 采用 PCR 在 *OsPAL2;3* 过表达的遗传转化水稻的基因组 DNA 中扩增融合 *OsPAL2;3* 基因 CDS 和 *eYFP* 序列的 DNA 片段鉴定重组表达载体的有效转化, 同时采用 Western-blotting 检测 *eYFP* 融合蛋白的表达, 获得 T_1 代阳性转基因水稻幼苗。

1.5 qPCR 检测过表达 *OsPAL2;3* 转基因 PI312777 水稻较其野生型株系的基因表达变化

采用 TRIzol 试剂分别提取过表达 *OsPAL2;3* 转基因 PI312777 及其野生型植株的叶片总 RNA, 采用 EasyScript One-Step gDNA Removal and cDNA Synthesis SuperMix 试剂盒(北京全式金生物技术有限公司)合成 cDNA。qPCR 采用 TransStart Green qPCR SuperMix 试剂盒(北京全式金生物技术有限公司), 利用 realplex⁴ 荧光定量 PCR 仪(Eppendorf, Germany), 检测 *OsPAL2;3* 过表达水稻和野生型 PI312777 的苯丙氨酸代谢途径中 *OsPAL2;3*、*OsC4H*、*OsCOL*、*OsOMT*、*OsCAD* 五个基因的表达, 以 *β -actin* 为内参基因, 采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 计算基因在过表达 *OsPAL2;3* 的转基因 PI312777 水稻较其野生型株系的表达变化^[35]。

1.6 酚酸类化合物含量测定

分别取 1 g 过表达 *OsPAL2;3* 的 PI312777 和 Lemont 转基因水稻及其野生型株系叶片,液氮条件下研磨成粉末,用 50 mL 蒸馏水在 20℃ 下浸提 24 h,浸提液用 0.22 μm 滤膜过滤,并用磷酸将滤液调至 pH 4.0,加入 NaCl 溶液,使浓度达到 8% (w/v) 并超声溶解。取经蒸馏水—甲醇—蒸馏水(8 mL—8 mL—5 mL)活化的 Cleanert PEP 固相萃取小柱(天津博纳艾杰尔科技有限公司)吸附、萃取浸提液中的代谢物,随后加入 3 mL 超纯水洗脱盐分,再用 8 mL 色谱级甲醇洗脱,收集洗脱液,冷冻干燥后用色谱级甲醇溶解至 500 μL ,测试的每种水稻样本均提取 3 个重复。采用高效液相色谱法(HPLC)进行对提取的样本中的酚酸化合物进行定量分析,以对羟基苯甲酸、原儿茶酸、肉桂酸、阿魏酸、香草酸、对香豆酸、丁香酸、水杨酸作为标准酚酸对照样品。HPLC 检测采用 Waters e2695 型高效液相色谱仪,色谱柱为 ZORBAX Sb-C18 (150.0 mm $\times$ 4.6 mm, ID 5 m),紫外检测器,酚醛柱;流动相: B-甲醇(色谱纯)和 C-0.1%磷酸溶液(分析纯)、检测波长为 280 nm、流速 1.3 mL min^{-1} 、进样量 10 μL 、柱温 30℃。

1.7 *OsPAL2;3* 过表达水稻抑草率检测

分别收集过表达 *OsPAL2;3* 的转基因 PI312777 和 Lemont 及其野生型植株的根系分泌液,过滤除杂后加入新鲜配制的水稻完全营养液母液作为不同处理组,每组中溶液的体积为 0.5 L,以新配制的终浓度与处理组一致的水稻完全营养液为对照组,将处理组和对照组溶液的 pH 调至 5.5~6.0 之间,每个处理组以及对照组均设 6 个重复。将生长一致的二叶期稗草种植于上述溶液中,每个种植罐中种植 6 棵,培养 14 d,测量稗草根长和株高;随后将每个罐中的稗草置于 105℃ 杀青 30 min, 80℃ 烘干 3 d 后测定干物质重量,计算不同处理方式较对照组对稗草生长的抑制率,其计算公式为 $\text{IR} = (1 - \text{TR}/\text{CT}) \times 100\%$ 。其中,IR (inhibition ratio) 为抑制率;TR (treatment) 为处理组生长指标;CT (control) 为对照组生长指标。

1.8 *OsPAL2;3* 互作蛋白的分离与鉴定

将三叶一心期的过表达 *OsPAL2;3* 转基因 PI312777 与 Lemont 分别与稗草共培 7 d 后,取完全展开的倒二片叶于液氮中速冻,根据 Fang 等^[36]方法提取水稻叶片的天然活性蛋白,将天然活性蛋白与 GFP-Trap agarose beads (ChromoTek, Germany) 进行孵育,获得 *OsPAL2;3* 的互作蛋白,采用 Thermo

Q-exactive 质谱平台进行蛋白鉴定,并利用 Rice Genome Annotation Project (<http://rice.plantbiology.msu.edu/>) 的水稻蛋白数据库进行同源性比对。

1.9 双分子荧光互补(BiFC)验证 *OsPAL2;3* 的蛋白互作

分别克隆 *OsPAL2;3*、ATP 合酶 α 亚基(ATP synthase subunit alpha)、ATP 合酶 β 亚基(ATP synthase subunit beta)、转酮醇酶(transketolase)、碳酸酐酶(carbonic anhydrase)、果糖 1,6-二磷酸醛缩酶(fructose-bisphosphate aldolase)基因的 CDS,将这些基因分别与含有黄色荧光蛋白 N 端的质载体 pCambia2300-YFPⁿ、含有黄色荧光蛋白 C 端的质载体 pCambia2300-YFP^c 融合,构建重组表达载体用于转化烟草进行瞬时表达,烟草的转化参照 Fang 等^[36]的方法,在转化后 48 h,利用激光共聚焦显微镜(Leica TCS SP8X DLS)观察烟草叶片的黄色荧光蛋白发光情况,验证 *OsPAL2;3* 与 Co-IP 获得的蛋白的有效互作。

1.10 统计分析

数据采用 DPS 软件进行统计分析、相关性分析和回归分析,应用 LSD 算法进行显著性差异分析。

2 结果与分析

2.1 *PAL* 家族基因成员启动子序列组成

分别克隆了 PI312777 和 Lemont 两种水稻的 *PAL* 基因家族中 7 个基因成员(*OsPAL2;1*, *OsPAL2;2*, *OsPAL2;3*, *OsPAL2;4*, *OsPAL4;1*, *OsPAL4;2*, *OsPAL11*) 的 CDS 序列上游 3000 bp 左右的片段(图 1-a),分别回收这些启动子 DNA 片段进行测序,比较 2 个水稻品种的同一种 *PAL* 基因成员的启动子序列组成。结果显示,2 个水稻品种的 *OsPAL2;1*、*OsPAL2;2*、*OsPAL4;1*、*OsPAL4;2*、*OsPAL11* 五个基因成员的启动子序列组成相似度较高,而 *OsPAL2;3*、*OsPAL2;4* 基因启动子序列差异较大(图 1-b)。

2.2 PI312777 和 Lemont 的 *OsPAL2;3*、*OsPAL2;4* 基因启动子活性差异

分别将 PI312777 和 Lemont 的 *OsPAL2;3*、*OsPAL2;4* 基因启动子融合 GFP 的重组表达载体转化水稻原生质体细胞,通过激光共聚焦显微镜观察细胞中绿色荧光蛋白的荧光强度,结果显示 *OsPAL2;3* 基因启动子驱动下的 GFP 的荧光强度 PI312777 明显强于 Lemont,而 *OsPAL2;4* 基因启动子驱动的 GFP 的荧光强度 PI312777 略弱于 Lemont (图 2)。由此可见,*OsPAL2;3* 启动子的启动活性 PI312777 大于 Lemont,而 *OsPAL2;4* 基因启动子的活性 PI312777 略小于 Lemont。

图 1 PI312777 与 Lemont 的 *PAL* 基因成员启动子片段的凝胶电泳检测及部分差异序列

Fig. 1 Agarose gel electrophoresis determination and partially different sequence on the gene promoters of *PAL* gene members from PI312777 and Lemont

(a) *PAL* 基因启动子片段的凝胶电泳检测; (b) PI312777 与 Lemont 的 *OsPAL2;3* 及 *OsPAL2;4* 基因启动子的差异序列。

(a) Agarose gel electrophoresis determination on the fragment of *PAL* gene promoter; (b) Different sequence of *OsPAL2;3* or *OsPAL2;4* gene promoters from PI312777 and Lemont, respectively.

(图 2)

图 2 PI312777 与 Lemont 的 *OsPAL2;3*、*OsPAL2;4* 基因启动子驱动 GFP 荧光强度检测

Fig. 2 Comparative determination on GFP fluorescence transcriptionally regulated by *OsPAL2;3* and *OsPAL2;4* gene promoters from PI312777 and Lemont

2.3 过表达 *OsPAL2;3* 转基因水稻的表现

通过构建 *OsPAL2;3* 的重组表达载体分别遗传转化 PI312777 和 Lemont, 过表达水稻在经 PCR 检测重组载体有效遗传转化后, 利用标签蛋白 eYFP 的抗体, 对转基因水稻进行 Western-blotting 检测, 结果在过量表达 *OsPAL2;3* 的转基因水稻中检测到 *OsPAL2;3* 融合 eYFP 蛋白的表达, 在野生型对照植株中未检测到该融合蛋白(图 3-a); 同时采用激光共聚焦显微镜观察转基因水稻根系中 eYFP 的荧光情

图 3 *OsPAL2;3* 过表达水稻中的 eYFP 融合蛋白的表达以及 eYFP 的荧光检测

Fig. 3 Detection of the protein expression level of eYFP and eYFP fluorescent intensity on *OsPAL2;3* overexpressed transgenic rice

(a) Western-blotting 检测 eYFP 表达丰度; (b) 激光共聚焦显微镜检测 eYFP 荧光强度。

(a) Western-blotting detection of the protein expression level of eYFP; (b) Laser scanning confocal microscope detection of the eYFP fluorescent intensity. WT: wild type.

况, 结果也显示在过量表达 *OsPAL2;3* 的转基因水稻植株中检测到黄色荧光信号, 而在野生型植株中未检测到该荧光信号(图 3-b), 上述结果表明 *OsPAL2;3* 重组载体已成功遗传转化水稻且稳定表达。

2.4 过表达 *OsPAL2;3* 水稻与野生型株系的苯丙氨酸代谢途径主要基因的表达变化

利用 qPCR 检测了苯丙氨酸代谢途径中 *OsPAL2;3*、肉桂酸-4-羟化酶(cinnamate-4-hydroxylase, *OsC4H*)、O-甲基转移酶(O-methyltransferases, *OsOMT*)、辅酶 A 连接酶(CoA-ligases, *OsCOL*)、肉桂醇脱氢酶(cinnamoyl alcohol dehydrogenases, *OsCAD*) 5 个基因在过表达 *OsPAL2;3* 的转基因 PI312777 水稻及其野生型株系中的表达差异, 结果显示过量表达 *OsPAL2;3* 基因后, 转基因水稻苯丙氨酸代谢途径中的 *OsPAL2;3*、*OsC4H*、*OsOMT*、*OsCOL*、*OsCAD* 基因均较其野生型株系上调表达, 分别为野生型株系的 2.44、1.81、1.24、1.36 和 1.64 倍(图 4)。

图 4 *OsPAL2;3* 过表达水稻与野生型株系的 *OsPAL*、*OsOMT*、*OsC4H*、*OsCOL*、*OsCAD* 基因表达差异

Fig. 4 Expression level of *OsPAL*, *OsOMT*, *OsC4H*, *OsCOL*, and *OsCAD* from *OsPAL2;3*-OX transgenic rice line and its wild type

2.5 过表达 *OsPAL2;3* 水稻与野生型株系的酚酸类化合物含量

通过检测过表达 *OsPAL2;3* 的转基因 PI312777 和 Lemont 及野生型 PI312777 和 Lemont 株系叶片中酚酸化合物的含量, 结果显示, 过量表达 *OsPAL2;3* 后, 转基因 PI312777 和 Lemont 中的原儿茶酸和香草酸的含量较其各自的野生型株系中的含量有所增加; 此外, 转基因 PI312777 中的丁香酸、4-香豆酸的含量较野生型 PI312777 中的含量也有所增加, 对羟基苯甲酸、阿魏酸、水杨酸和肉桂酸的含量有所下降。转基因 Lemont 中的水杨酸的含量较其野生型植株有所增加, 对羟基苯甲酸、丁

香酸、4-香豆酸、阿魏酸、肉桂酸在转基因植株中的含量较野生型植株有所降低(表 2)。上述结果表明, 过量表达 *OsPAL2;3* 能提高水稻中部分酚酸类化合物的含量。

2.6 过表达 *OsPAL2;3* 水稻及其野生型株系的抑草率
为研究 *OsPAL2;3* 基因表达水平对水稻化感抑草作用的影响, 进一步比较过表达 *OsPAL2;3* 转基因水稻和野生型株系的抑草率。分别收集过表达 *OsPAL2;3* 转基因水稻及其野生型植株的根系分泌液, 用于培养稗草, 以不含水稻根系分泌液为对照, 测定稗草株高与根系长度, 发现转基因 PI312777 的根系分泌液显著抑制稗草的根长和株高(图 5)。

表 2 *OsPAL2;3* 过表达水稻与野生型植株中的酚酸类化合物的含量
Table 2 Contents of phenolic acids in the *OsPAL2;3*-OX transgenic rice lines and its wild type

水稻株系 Rice lines	酚酸含量 Contents of phenolic acid ($\mu\text{g g}^{-1}$)							
	原儿茶酸	对羟基苯甲酸	香草酸	丁香酸	4-香豆酸	阿魏酸	水杨酸	肉桂酸
	Protocatechuic acid	<i>p</i> -hydroxybenzoic acid	Vanillic acid	Syringic acid	4-coumaric acid	Ferulic acid	Salicylic acid	Cinnamic acid
PI32777 野生型 Wild type of PI312777	161.78±32.74	2.18±0.14	6.98±1.68	3.19±0.71	25.26±1.65	19.65±0.57	15.34±2.43	8.19±0.62
过表达 <i>OsPAL2;3</i> 转基因 PI312777 <i>OsPAL2;3</i> -OX transgenic PI312777	165.11±2.41	1.74±0.41	10.05±0.97	4.77±2.40	31.42±2.30	15.56±0.60	10.64±0.92	8.07±0.20
Lemont 野生型 Wild type of Lemont	18.19±1.38	2.04±0.47	5.47±0.40	6.64±0.35	11.31±0.15	21.07±1.89	15.03±0.13	1.60±0.13
过表达 <i>OsPAL2;3</i> 转基因 Lemont <i>OsPAL2;3</i> -OX transgenic Lemont	26.29±1.81	1.83±0.14	6.45±0.65	3.61±0.37	9.01±4.28	17.64±1.74	17.06±5.61	0.85±0.56

表内数据为 3 次重复的平均值±标准偏差。
Values are expressed as the means ± standard deviation (SD) of three replicates.

图 5 *OsPAL2;3* 过表达水稻及其野生型株系根系分泌液中种植的稗草的生长情况
Fig. 5 Phenotype of barnyardgrass growth in the solution with root exudates from *OsPAL2;3*-OX transgenic rice and the wild type

测算过表达水稻及其野生型株系对稗草的抑制率, 结果显示, 野生型 PI312777 对稗草根长、株高、干重的抑制率分别为 18.73%、14.69%和 33.33%; 过表达 *OsPAL2;3* 的转基因 PI312777 对稗草的根长、株高、干重的抑制率达 39.31%、15.61%和 44.44%。过表达 *OsPAL2;3* 明显提高了 PI312777 对稗草根长和植株干物质重的抑制率。与之相似, 野生型 Lemont 根系分泌物对稗草根长、株高、干

重的抑制率分别为 12.19%、11.57%和 22.22%; 过表达 *OsPAL2;3* 的转基因 Lemont 根系分泌液对稗草的根长、株高、干重的抑制率为 8.48%、16.38%和 27.78%, 过表达 *OsPAL2;3* 也提高了 Lemont 对稗草株高和植株干物质重的抑制率(表 3)。通过对比上述结果可见, 过量表达 *OsPAL2;3* 能够提高水稻对稗草干物质重的抑制作用, 阻碍稗草的正常生长。

表 3 *OsPAL2;3* 转基因水稻及其野生型植株根系分泌液培养的稗草形态指标
Table 3 Root length, plant height and dry weigh of barnyardgrass growth in the solution with root exudates from *OsPAL2;3*-OX transgenic rice and the wild type

处理方式 Treatment	根长 Root length (cm)	根长抑制率 IR of root length (%)	株高 Plant height (cm)	株高抑制率 IR of plant height (%)	干重 Dry weight (g)	干重抑制率 IR of dry weight (g)
PI312777 根系分泌物培养的稗草 Barnyardgrass cultured in the solution with PI312777 root exudates	9.20±1.43 b	18.73	27.84±3.77 b	14.69	0.12±0.02 b	33.33
过表达 <i>OsPAL2;3</i> 转基因 PI312777 根系分泌物培养的稗草 Barnyardgrass cultured in the solution with <i>OsPAL2;3</i> -OX PI312777 root exudates	6.87±2.00 c	39.31	27.57±2.87 b	15.61	0.10±0.02 b	44.44
对照组稗草 Control group of barnyardgrass	11.32±2.11 a	—	32.67±3.18 a	—	0.18±0.01 a	—
Lemont 根系分泌物培养的稗草 Barnyardgrass cultured in the solution with Lemont root exudates	9.94±1.20 b	12.19	28.89±3.19 b	11.57	0.14±0.02 b	22.22
过表达 <i>OsPAL2;3</i> 转基因 Lemont 根系分泌物培养的稗草 Barnyardgrass cultured in the solution with <i>OsPAL2;3</i> -OX Lemont root exudates	10.36±1.28 b	8.48	27.32±3.33 b	16.38	0.13±0.01 b	27.78

表中不同小写字母表示显著性差异水平 $P < 0.05$ 。
Values followed by different lowercase letters indicate significant differences at $P < 0.05$. IR: inhibition ratio.

2.7 *OsPAL2;3* 的互作蛋白检测

为明确 *OsPAL2;3* 在水稻体内的互作蛋白, 利用基于 GFP-Trap 的 Co-IP 体内获得 *OsPAL2;3* 的互作蛋白(图 6), 对 *OsPAL2;3* 的互作蛋白进行质谱鉴定, 结果显示 *OsPAL2;3* 可与多个蛋白相互作用, 对其中丰度高的蛋白进行分析发现, *OsPAL2;3* 与核酮糖二磷酸羧化大链前体(ribulose bisphosphate carboxylase large chain precursor)、ATP 合酶 α 亚基(ATP synthase subunit alpha, ATP-syn α)、碳酸酐酶(carbonic anhydrase, CA)、ATP 合酶 β 亚基(ATP synthase subunit beta, ATP-syn β)、果糖 - 二磷酸醛缩酶(fructose-bisphosphate aldolase isozyme, FBA)、转酮醇酶(transketolase)、磷酸甘油酸激酶(phosphoglycerate kinase protein)和脂肪氧合酶(lipoxygenase)等蛋白可能存在互作(表 4)。

表 4 *OsPAL2;3* 互作蛋白的鉴定结果
Table 4 Identification of the proteins interaction with *OsPAL2;3*

蛋白登录号 Protein accession number	蛋白名称 Protein name	全部肽段 Peptide count	匹配的肽段 Unique peptide count	覆盖率 Coverage (%)	分子量 Molecular weight (kD)	等电点 Isoelectric point
LOC_Os02g41670.1	Phenylalanine ammonia-lyase	31	26	36.19	76.58	5.84
LOC_Os10g21268.1	Ribulose biphosphate carboxylase large chain precursor	29	16	30.99	53.71	6.58
LOC_Os04g16740.1	ATP synthase subunit alpha	15	15	27.22	55.66	5.95
LOC_Os01g45274.3	Carbonic anhydrase, chloroplast precursor	25	14	42.37	28.04	6.99
LOC_Os02g41650.3	Phenylalanine ammonia-lyase	15	13	17.69	77.75	6.04
LOC_Os10g21266.1	ATP synthase subunit beta	14	13	29.92	53.98	5.38
LOC_Os11g07020.1	Fructose-biphosphate aldolase isozyme	11	11	27.06	42.00	6.39
LOC_Os12g10580.1	Ribulose biphosphate carboxylase large chain precursor	18	10	18.94	56.06	9.04
LOC_Os04g38600.2	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	12	10	24.94	43.01	7.61
LOC_Os04g43800.1	Phenylalanine ammonia-lyase	11	10	13.59	76.93	5.93
LOC_Os06g04270.1	Transketolase, chloroplast precursor	11	10	14.67	80.02	6.12
LOC_Os05g41640.2	Phosphoglycerate kinase protein	10	10	21.28	50.13	6.29
LOC_Os12g37260.1	Lipoxygenase 2.1, chloroplast precursor	10	10	9.00	10.46	5.87

2.8 BiFC 验证 *OsPAL2;3* 与互作蛋白的有效互作

进一步利用 BiFC 验证 *OsPAL2;3* 与 Co-IP 获得的蛋白的有效互作, 通过激光共聚焦显微镜进行观察, 结果显示, *OsPAL2;3* 分别与 ATP 合酶 α 亚基 (ATP-syn α)、碳酸酐酶 (CA)、ATP 合酶 β 亚基 (ATP-syn β)、果糖-二磷酸醛缩酶 (FBA) 和转酮醇酶 (transketolase) 共转的烟草叶片中均观察到黄色荧光,

这些荧光主要分布在烟草叶肉细胞的细胞质和内质网上, 细胞核上未观察到明显的黄色荧光, 表明 *OsPAL2;3* 蛋白与 ATP 合酶 α 亚基、碳酸酐酶、ATP 合酶 β 亚基、果糖-二磷酸醛缩酶、转酮醇酶均存在相互作用, 且这种相互作用主要发生在细胞质和内质网上 (图 7), 该结果进一步说明 *OsPAL2;3* 与多个蛋白相互作用共同参与苯丙氨酸代谢过程。

(图 7)

图 7 BiFC 检测 OsPAL2;3 及其互作蛋白的有效互作

Fig. 7 BiFC determination of the interaction between OsPAL2;3 and the interacted proteins

3 讨论

酚酸类化合物是水稻化感抑草中的重要化感物质^[11-22]。水稻中酚酸的含量与 *PAL* 基因的表达水平密切相关, 化感水稻中 *PAL* 基因表达丰度明显高于非化感水稻, 其合成与分泌的酚酸类化合物的总量也高于非化感水稻^[15,24]。当利用 RNAi 技术抑制化感水稻中 *PAL* 基因的表达后, 与酚酸类合成相关的下游 6 个酶对应的编码基因也下调表达, 酚酸类化合物含量减少、化感抑草作用显著降低^[37]。

水稻中的 *PAL* 是一个基因家族, 其基因成员分别位于水稻的 2 号、4 号、5 号、11 号、12 号染色体上^[38]。本研究对化感水稻 PI312777 和非化感水稻 Lemont 的 *PAL* 家族基因成员的启动子进行克隆和测序分析, 结果发现 2 种水稻的 *OsPAL2;3* 和 *OsPAL2;4* 基因启动子序列存在较为明显的差异。启动子序列的组成差异使得启动子的活性不同, PI312777 的 *OsPAL2;3* 基因启动子对绿色荧光蛋白报告基因的转录表达强于 Lemont 的 *OsPAL2;3* 基因启动子, 而 PI312777 的 *OsPAL2;4* 基因启动子活性则较 Lemont 的 *OsPAL2;4* 基因启动子的活性弱。稗草共培下, PI312777 中 *OsPAL2;3* 蛋白的表达水平高于 Lemont 水稻^[36]。PI312777 中 *OsPAL2;3* 的表达丰度高促使其酚酸含量也较高, 其中原儿茶酸和香草酸在 PI312777 中的含量显著高于 Lemont; 增强 *OsPAL2;3* 的表达后, PI312777 和 Lemont 中这 2 种酚酸化合物的含量均有所提高, 转基因 PI312777 和 Lemont 水稻较其各自野生型植株对稗草的抑制作用增强, 表明 *OsPAL2;3* 可能通过调控苯丙氨酸代谢途径中原儿茶酸和香草酸等酚酸类化合物的含量, 提高水稻的化感抑草能力。化感植物通过自身调控、合成并分泌化感物质进入环境, 并与土壤微生物相互作用, 最终决定对靶标植物的化感作用效应^[39-40]。添加不同酚酸至土壤中能显著促进土壤微生物群体数量的增加, 同时土壤中酚酸的浓度逐渐降低, 表明酚酸可与土壤微生物产生相互作用^[41]。PI312777 水稻根际的黄色粘球菌就能与酚酸类化感物质相互作用, 增强抑草能力, 其中阿魏酸与黄色粘球菌相互作用下的稗草抑制率达 64.82%, 远高于阿魏酸和黄色粘球菌单独作用下的抑制率 (34.64% 和 8.26%)^[12]。因此, 过量表达水稻的 *OsPAL2;3* 可能通过提高原儿茶酸和香草酸等酚酸类的含量, 并环境中的相关微生物相互作用, 最终提高抑草能力。抑制 PI312777 的 *PAL* 基因表达后, 水稻的化感抑草

能力下降, 根际微生物数量与多样性降低^[37]。蛋白与蛋白之间通过相互作用参与代谢催化, *PAL* 酶通过催化苯丙氨酸的脱氨反应, 使 NH_3 释放出来形成反式肉桂酸^[42]。已有的研究显示, *OsPAL2;3* 受到丝裂原活化蛋白激酶 11 (mitogen-activated protein kinase 11, MAPK11) 的调控作用^[36]。本研究还发现, *OsPAL2;3* 还与 ATP 合酶 α 、 β 亚基、碳酸酐酶、转酮醇酶以及转氨酶等相互作用, 其中, ATP 酶是生物体中能量合成的关键酶, 该酶广泛存在于线粒体、叶绿体以及光合细菌中, 在细胞内催化能源物质 ATP 的合成, 其 α 亚基的 C 端结构域能与 β 亚基相互作用, 而 β 亚基的 C 端结构域也能与 α 亚基相互作用^[43], 进而合成 ATP, 供 *OsPAL2;3* 的催化反应。转酮醇酶催化卡尔文循环 (calvin cycle) 和氧化戊糖磷酸途径 (OPPP) 的反应, 并产生赤藻糖-4-磷酸, 这也是从莽草酸途径到苯丙烷代谢的前体物质^[44]。碳酸酐酶则催化 CO_2 与 HCO_3^- 之间的可逆反应, 其可为酚酸合成时的羧化作用提供 CO_2 ^[45]。由此可见, *OsPAL2;3* 通过与这些互作蛋白的共同作用, 催化合成酚酸类化合物。

4 结论

化感水稻 PI312777 和非化感水稻 Lemont 的 *PAL* 基因家族的启动子序列组成存在差异, 导致其转录活性不同。PI312777 的 *OsPAL2;3* 基因启动子的活性高于 Lemont 中该基因启动子的活性, 过量表达 *OsPAL2;3* 基因, 水稻的酚酸类物质含量增加, 化感抑草能力增强, 表明 *OsPAL2;3* 能够通过调控水稻的酚酸类化合物合成, 进而调控水稻化感抑草作用。*OsPAL2;3* 与 ATP 合酶 α 亚基、ATP 合酶 β 亚基、转酮醇酶、碳酸酐酶、果糖二磷酸醛缩酶、转氨酶等蛋白相互作用, 共同调控苯丙氨酸代谢。*OsPAL2;3* 可作为利用分子遗传育种提高水稻化感抑草潜力的候选基因。

References

- [1] Rice E L. Allelopathy, 2nd edn. Orlando: Academic Press, 1984. pp 1-50.
- [2] Lin W X, Fang C X, Chen T, Lin R Y, Xiong J, Wang H B. Rice allelopathy and its properties of molecular ecology. *Front Biol*, 2010, 5: 255-262.
- [3] Weston L A, Duke S O. Weed and crop allelopathy. *Crit Rev Plant Sci*, 2003, 22: 367-389.
- [4] 王海斌, 俞振明, 何海斌, 郭徐魁, 黄锦文, 周阳, 徐志斌, 林文雄. 不同化感潜力水稻化感效应与产量的关系. *中国生态农业学报*, 2012, 20: 75-79.

- Wang H B, Yu Z M, He H B, Guo X K, Huang J W, Zhou Y, Xu Z B, Lin W X. Relationship between allelopathic potential and grain yield of different allelopathic rice accessions *Chin J Eco-Agric*, 2012, 20: 75–79 (in Chinese with English abstract).
- [5] 徐正浩, 谢国雄, 周宇杰, 高岫. 三种栽植方式下不同株型和化感特性水稻对无芒稗的干扰控制作用. *作物学报*, 2013, 39: 537–548.
- Xu Z H, Xie G X, Zhou Y J, Gao S. Interference of rice with different morphological types and allelopathy on barnyardgrass under three planting patterns. *Acta Agron Sin*, 2013, 39: 537–548 (in Chinese with English abstract).
- [6] Ye C Y, Tang W, Wu D, Jia L, Qiu J, Chen M, Mao L, Lin F, Xu H, Yu X, Lu Y, Wang Y, Olsen K M, Timko M P, Fan L. Genomic evidence of human selection on Vavilovian mimicry. *Nat Ecol Evol*, 2019, 3: 1474–1482.
- [7] Li L L, Zhao H H, Kong C H. (–)-Loliolide, the most ubiquitous lactone, is involved in barnyardgrass-induced rice allelopathy. *J Exp Bot*, 2020, 71: 1540–1550.
- [8] Kato-Noguchi H, Peters R J. The role of momilactones in rice allelopathy. *J Chem Ecol*, 2013, 39: 175–185.
- [9] Kong C H, Zhao H, Xu X H, Wang P, Gu Y. Activity and allelopathy of soil of flavone O-glycosides from rice. *J Agric Food Chem*, 2007, 55: 6007–6012.
- [10] Rimando A M, Duke S O. Studies on rice allelochemicals. In: Smith C W, Dilday R H, eds. *Rice: Origin, History, Technology and Production*. New York: Wiley, 2003. pp 221–244.
- [11] Zhang Q, Li L, Li J Y, Wang H B, Fang C X, Yang X Y, He H B. Increasing rice allelopathy by induction of barnyardgrass (*Echinochloa crus-galli*) root exudates. *J Plant Growth Regul*, 2018, 37: 745–754.
- [12] Fang C X, Li Y Z, Li C X, Li B L, Ren Y J, Zheng H P, Zeng X M, Shen L H, Lin W X. Identification and comparative analysis of microRNAs in barnyardgrass (*Echinochloa crus-galli*) in response to rice allelopathy. *Plant Cell Environ*, 2015, 38: 1368–1381.
- [13] Fang C X, Yu Y, Chen W S, Jian X, Wang Q S, Zheng H P, Lin W X. Role of allene oxide cyclase in the regulation of rice phenolic acids synthesis and allelopathic inhibition on barnyardgrass. *Plant Growth Regul*, 2016, 79: 265–273.
- [14] He H B, Wang H B, Fang C X, Lin Z H, Yu Z M, Lin W X. Separation of allelopathy from resource competition using rice/barnyardgrass mixed-cultures. *PLoS One*, 2012, 7: e37201.
- [15] He H B, Wang H B, Fang CX, Wu H W, Guo X K, Lin C H, Lin Z H, Lin W X. Barnyardgrass stress up regulates the biosynthesis of phenolic compounds in allelopathic rice. *J Plant Physiol*, 2012, 169: 1747–1753.
- [16] Seal A N, Haig T, Pratley J E. Evaluation of putative allelochemicals in rice roots exudates for their role in the suppression of arrowhead root growth. *J Chem Ecol*, 2004, 30: 1663–1678.
- [17] Seal A N, Pratley J E, Haig T, An M. Identification and quantitation of compounds in a series of allelopathic and non-allelopathic rice root exudates. *J Chem Ecol*, 2004, 30: 1647–1662.
- [18] Kim K W, Kim K U. Searching for rice allelochemicals. In: Kim K U, Shin D H, eds. *Rice Allelopathy*. Korea: Kyungpook National University, 2000. pp 83–95.
- [19] Mattice J, Lavy T, Skulman B, Dilday R. Searching for Allelochemicals in Rice that Control Duckweed. Manila: International Rice Research Institute, 1998. pp 81–98.
- [20] Chou C H, Chiou S J. Autointoxication mechanism of *Oryza sativa*: II. Effects of culture treatments on the chemical nature of paddy soil and on rice productivity. *J Chem Ecol*, 1979, 5: 839–859.
- [21] Chou C H, Lin H J. Autointoxication mechanism of *Oryza sativa*: I. Phytotoxic effects of decomposing rice residues in soil. *J Chem Ecol*, 1976, 2: 353–367.
- [22] Kuwatsuka S, Shindo H. Behavior of phenolic substances in the decaying process of plants: I. Identification and quantitative determination of phenolic acids in rice straw and its decayed product by gas chromatography. *Soil Sci Plant Nutr*, 1973, 19: 219–227.
- [23] Zheng X, Chen S, Li Q, Lin R, Lin W. Determination of phenolic acids in root exudates of allelopathic rice by solid phase extraction-ion chromatography with conductivity detection. *Anal Lett*, 2014, 47: 2156–2164.
- [24] Li J Y, Zhang Q, Yang X Y, Wu H M, Lin R L, He H B. A reappraisal of the content and the differences of phenolic acids between allelopathic and non-allelopathic rice accessions. *Allelopathy J*, 2017, 40: 35–46.
- [25] Bi H H, Zeng R S, Su L M, An M, Luo S M. Rice allelopathy induced by methyl jasmonate and methyl salicylate. *J Chem Ecol*, 2007, 33: 1089–1103.
- [26] Song B Q, Xiong J, Fang C X, Qiu L, Lin R Y, Liang Y Y, Lin W X. Allelopathic enhancement and differential gene expression in rice under low nitrogen treatment. *J Chem Ecol*, 2008, 34: 688–695.
- [27] Fang C X, He H B, Wang Q S, Qiu L, Wang H B, Zhuang Y E, Xiong J, Lin W X. Genomic analysis of allelopathic response to low nitrogen and barnyardgrass competition in rice (*Oryza sativa* L.). *Plant Growth Regul*, 2010, 61: 277–286.
- [28] Fang C X, Xiong J, Qiu L, Wang H B, Song B Q, He H B, Lin R Y, Lin W X. Analysis of gene expressions associated with increased allelopathy in rice induced by exogenous salicylic acid. *Plant Growth Regul*, 2009, 57: 163–172.
- [29] 方长旬, 王清水, 余彦, 罗芙蓉, 黄力坤, 熊君, 沈荔花, 林文雄. 不同胁迫条件下化感与非化感水稻 *PAL* 多基因家族的差异表达. *生态学报*, 2011, 31: 4760–4767.
- Fang C X, Wang Q S, Yu Y, Luo M R, Huang L K, Xiong J, Shen L H, Lin W X. Differential expression of *PAL* multigene family in allelopathic rice and its counterpart exposed to stressful conditions. *Acta Ecol Sin*, 2011, 31: 4760–4767 (in Chinese with English abstract).
- [30] Ayoubi T A, Van De Ven W J. Regulation of gene expression by alternative promoters. *FASEB J*, 1996, 10: 453–460.
- [31] Yoo S D, Cho Y H, Sheen J. *Arabidopsis* mesophyll protoplasts: a versatile cell system for transient gene expression analysis. *Nat Protoc*, 2007, 2: 1565–1572.
- [32] Zhang Y, Su J, Duan S, Ao Y, Dai J R, Liu J, Wang P, Li Y G, Liu B, Feng D R, Wang J F, Wang H B. A highly efficient rice green tissue protoplast system for transient gene expression and studying light/chloroplast-related processes. *Plant Methods*, 2011, 7: 30.
- [33] 陈秋红, 陈太钰, 林拥军, 陈浩. 根瘤农杆菌介导的粳稻遗传转化. 见: 袁猛, 都浩, 李香花主编. *水稻实验手册*. 北京:

- Bio-protocol, 2018. pp 245–254. Bio-101: e1010174. doi: 10.21769/BioProtoc.1010174.
- Chen Q H, Chen T Y, Lin Y J, Chen H. Agrobacterium-mediated genetic transformation of *japonica* rice. In: Yuan M, Du H, Li X H, eds. Rice Protocol eBook. Beijing: Bio-protocol, 2018. pp 245–254. Bio-101: e1010174. doi: 10.21769/BioProtoc.1010174 (in Chinese).
- [34] 刘瑜, 凌飞, 林拥军, 陈浩. 农杆菌介导的籼稻遗传转化. 见: 袁猛, 都浩, 李香花主编. 水稻实验手册. 北京: Bio-protocol, 2018. pp 255–264 Bio-101: e1010175. doi:10.21769/BioProtoc.1010175.
- Liu Y, Ling F, Lin Y J, Chen H. Agrobacterium-mediated transformation of *indica* rice. In: Yuan M, Du H, Li X H, eds. Rice Protocol eBook. Beijing: Bio-protocol, 2018. pp 255–264 Bio-101: e1010175. doi: 10.21769/BioProtoc.1010175 (in Chinese).
- [35] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *Methods*, 2001, 25: 402–408.
- [36] Fang C X, Yang L K, Chen W X, Li L L, Zhang P L, Li Y Z, He H B, Lin W X. MYB57 transcriptionally regulates MAPK11 to interact with PAL2;3 and modulate rice allelopathy. *J Exp Bot*, 2020, 71: 2127–2141.
- [37] Fang C X, Zhuang Y E, Xu T C, Lin Y Z, Li Y, Lin W X. Changes in rice allelopathy and rhizosphere microflora by inhibiting rice phenylalanine ammonia-lyase gene expression. *J Chem Ecol*, 2013, 39: 204–212.
- [38] Zhou X G, Liao H C, Chern M, Yin J J, Chen Y F, Wang J P, Zhu X B, Chen Z X, Yuan C, Zhao W, Wang J, Li W T, He M, Ma B T, Wang J C, Qin P, Chen W L, Wang Y P, Liu J L, Qian Y W, Wang W M, Wu X J, Li P, Zhu L H, Li S G, Ronald P C, Chen X W. Loss of function of a rice TPR-domain RNA-binding protein confers broad-spectrum disease resistance. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2018, 115: 3174–3179.
- [39] Van Dam N M, Bouwmeester H J. Metabolomics in the rhizosphere: tapping into belowground chemical communication. *Trends Plant Sci*, 2016, 21: 256–265.
- [40] Bertin C, Yang X, Weston L A. The role of root exudates and allelochemicals in the rhizosphere. *Plant Soil*, 2003, 256: 67–83.
- [41] Lin R Y, Wang H B, Guo X K, Ye C Y, He H B, Zhou Y, Lin W X. Impact of applied phenolic acids on the microbes, enzymes and available nutrients in paddy soils. *Allelopathy J*, 2011, 28: 225–236.
- [42] MacDonald M J, D’Cunha G B. A modern view of phenylalanine ammonia lyase. *Biochem Cell Biol*, 2007, 85: 273–282.
- [43] Junge W, Lill H, Engelbrecht S. ATP synthase: an electrochemical transducer with rotatory mechanics. *Trends Biochem Sci*, 1997, 22: 420–423.
- [44] Henkes S, Sonnewald U, Badur R, Flachmann R, Stitt M. A small decrease of plastid transketolase activity in antisense tobacco transformants has dramatic effects on photosynthesis and phenylpropanoid metabolism. *Plant Cell*, 2001, 13: 535–551.
- [45] Sasaki H, Hirose T, Watanabe Y, Ohsugi R. Carbonic anhydrase activity and CO₂-transfer resistance in Zn-deficient rice leaves. *Plant Physiol*, 1998, 118: 929–934.