胁迫相关蛋白激酶 OsSAPK9 调控水稻对铝胁迫的反应

陈腾君^{1,2},曾 丹²,张 帆²,周永力²,石英尧¹,黎志康² (¹安徽农业大学农学院,合肥 230036;²中国农业科学院作物科学研究所,北京 100081)

摘要:水稻胁迫相关蛋白激酶(OsSAPKs, stress-activated protein kinase genes in rice) 在调控水稻非生物胁迫信号传导中起 着重要作用。本研究对 OsSAPK9 在水稻耐铝(Al) 胁迫中的功能进行了初步研究。结果表明 10 mmol/L Al 处理 12 h 以上, OsSAPK9 过表达转基因水稻植株根部 Al 的吸收量显著低于野生型植株; Al 胁迫处理 20 d, OsSAPK9 过表达转基因植株株高降 低百分比显著低于野生型植株。进一步分析发现 OsSAPK9 过表达转基因水稻植株根部超氧化歧化酶(SOD, Superoxide Dismutase)和过氧化物酶(POD, Peroxidase)的活性高于野生型, 而根上部的 SOD、POD 和过氧化氢酶(CAT, Catalase)的活性则低 于野生型植株。上述结果为政良水稻的耐铝性以及进一步揭示 OsSAPK9 调控水稻耐铝胁迫反应的分子机制提供了信息。

关键词:水稻;OsSAPK9;过表达;Al 胁迫

Stress-activated Protein Kinase *OsSAPK9* Is Involved in Regulating Tolerant Response to Al Stress in Rice

CHEN Teng-jun^{1,2}, ZENG Dan², ZHANG Fan², ZHOU Yong-li², SHI Ying-yao¹, LI Zhi-kang² (¹College of Agronomy, Anhui Agricultural University, Hefei 230036; ² Institute of Crop Science, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081)

Abstract: Stress-activated protein kinase in rice (*OsSAPKs*) plays an important role in signal transduction. In this study, we analyzed the function of *OsSAPK9* in response to Al stress in rice. The results indicated that absorptive capacity for aluminum in the roots of *OsSAPK9* over-expressing transgenic rice was significantly lower than that of non-transgenic plants at 6 h, 2 d, 6 d and 10 d after 10 mmol/L Al stress. Compared with the wild control, the reduction percent of plant height of *OsSAPK9* over-expressing transgenic plants was significantly lower than that in non-transgenic plants 20 d after treatment using 10 mmol/L Al. Moreover, the activities of Superoxide Dismutase (SOD) and Peroxidase (POD) in the roots of *OsSAPK9* over-expressing transgenic plants were higher than that in non-transgenic plants. While, the activities of SOD, POD and Catalase (CAT) in the parts above root of overexpression transgenic plants lower than that in non-transgenic plants. These results indicate that OsSAPK9 might be involved in the regulation of tolerant resistance response to Al stress in rice.

Key words: Oryza sativa; OsSAPK9; overexpression; Al stress

铝(Al)毒害是酸性(pH < 5.0)土壤环境中限 有毒性。但是在酸性条件下,低浓度 Al 离子就会对制作物生长的重要因素之一^[1]。在自然条件下,Al 多数植物产生毒害作用^[2]。Al 不仅直接毒害植物 通常以难溶的硅酸盐或氧化铝形式存在,对植物没 根尖,影响根部对水分和营养的吸收,也干扰细胞骨

收稿日期:2018-03-08 修回日期:2018-04-08 网络出版日期:2018-08-20

URL: http://kns. cnki. net/kcms/detail/11.4996. s. 20180817.1633.001. html

基金项目:国家重点研发计划课题(2016YFD0100101);比尔盖茨基金(OPPGD9313);中国农业科学院科技创新工程

第一作者研究方向为水稻抗逆基因功能研究。E-mail:chentengjun1991@163.com

通信作者:石英尧,研究方向为水稻分子育种。E-mail:shiyy123@163.com

周永力,研究方向为水稻分子育种与抗病分子生物学。E-mail:zhouylcaas@126.com

架,破坏胞内信号传导^[3-4],限制植株生长^[5-6]。

植物受 Al 胁迫后应激产生高毒性的活性氧簇 (ROS, reactive oxygen species)可以导致脂质过氧 化、蛋白质氧化、核酸损伤以及酶失活^[7-10]。植物抗 酶氧化系统在调节 ROS 浓度方面起着重要作用。 过氧化歧化酶(SOD, Superoxide Dismutase)将 O²⁻转 变为 $H_2O_2 n O_2$, 过氧化氢酶(CAT, Catalase)和过氧 化物酶(POD, Peroxidase)可以去除 H_2O_2 , 进而减轻 ROS 对植物细胞的伤害^[11-12]。

水稻在 Al 胁迫下,植株根部和根上部的生长均 受抑制。受高浓度 Al 胁迫时,植株体内 SOD、POD 和抗坏血酸过氧化酶(APX, Aseorbateperoxidase)活 性较受低浓度 Al 胁迫显著提高^[13];耐铝水稻品种 受 Al 胁迫后,SOD、APX、谷胱甘肽还原酶和谷胱甘 肽过氧化物酶的活性显著高于 Al 敏感品种^[14]。

近年来,我国土壤酸化程度日趋严重,培育耐铝 毒水稻品种具有重要的应用价值。迄今,水稻耐铝 相关基因尚鲜有报道。胁迫相关蛋白激酶 (OsSAPKs, stress-activated protein kinase genes)在调 控水稻非生物胁迫信号传导中起着重要作用^[15-16]。 本研究初步明确了 OsSAPK9 参与调控水稻耐 A1 胁 迫反应的功能及其过表达转基因植株的生理变化。

1 材料与方法

1.1 供试材料和 AI 胁迫处理

供试材料包括 OsSAPK9 过表达转基因转化体 OE-1 和 OE-2 的 T₃纯合转基因水稻株系及其转基 因受体品种 9804。试验所用的过表达载体 pMDC43 来自中国农业科学院作物科学研究所傅永 福实验室,采用农杆菌介导法进行载体转化;通过 PCR、荧光定量 PCR 和 Western blot 技术鉴定、筛选 获得 OsSAPK9 显著上调表达的 T₃纯合转基因水稻 株系^[17]。

水稻种子经5% H₂O₂消毒 10 min,用无菌蒸馏 水冲洗2~3 遍后浸泡于蒸馏水中,置于 30℃恒温 培养箱中催芽。挑选露白程度一致的种子播于粘有 纱网的泡沫塑料孔板中,每孔播2粒种子,每份材料 播3列,每列 10 孔;每块塑料板播同等数量的野生 型 9804 种子,置于 30℃恒温培养箱中,水培至2 叶 1 心,转至 Yoshida 营养液中继续培养^[18]。

待水稻幼苗长至 3 叶 1 心,将水稻植株分成对 照组和处理组,处理组添加 10 mmol/L AlCl₃,对照 组不添加 AlCl₃。每个处理 3 次重复。在昼夜光照 12 h/12 h、温度 28 ℃/ 26℃、湿度 70% ~80%、光照 强度 150 pmol/m・s 的恒温培养箱中培养。每隔 4 d 换1 次营养液。

1.2 根部 AI 含量的测定

采用苏木精染色法^[19-20]测定根部 Al 含量。 10 mmol/L AlCl₃处理后 6 h、12 h、2 d、6 d 和 10 d 分 别剪取水稻根部,每份材料每个时间点取 3 株,将整 个根用蒸馏水浸洗 15 min,然后放置于 10 mL 含有 0.02% 碘酸钾的 0.2% 苏木精混合液,于 26 ℃浸染 1 h,再用蒸馏水浸洗 5 min,重复 3~4 次,吸尽残留 的蒸馏水。最后,加入 10 mL 1 mol/L 的 HCl,浸泡 1 h后,13500 r/min 离心 5 min。取上清液,测定 A490 的吸光值(OD),以每克鲜样的 OD 值作为评 价水稻根部 Al 含量的指标。

1.3 株高和根长降低比值的测量

OsSAPK9 过表达转基因植株以及 9804 经 10 mmol/L AlCl,处理 20d 后,每个处理每份材料取 10 株幼苗测定株高和根长,计算根长和株高降低比 值。根长降低比值=(对照组根长 - 处理组根长)/ 对照组根长;株高降低比值=(对照组株高 - 处理 组株高)/对照组株高,株高为根基部到最高叶片叶 尖的距离。

1.4 植株根部和根上部抗氧化酶活性测定

OsSAPK9 过表达转基因植株以及 9804 经 10 mmol/L AlCl₃处理 0 d、4 d、8 d、12 d、16 d 时,分 别剪取植株的根部和根上部,每个时间点取 3 次重 复,保存于 - 80 ℃。SOD 酶活性测定采用氮蓝四唑 (NBT, Nitro Blue Tetrazolium)光化还原法^[21],以 NBT 被抑制 50% 为 1 个酶活性单位;POD 活性测定 采用愈创木酚法^[22],在470 nm 下以 1 min 内吸光度 的变化值来表示 POD 酶活性的大小;CAT 活性测定 采用紫外吸收法^[23],在 240 nm 下以 1 min 内吸光度 变化值来表示 CAT 酶活性的大小。

1.5 统计分析方法

采用 T 检验进行显著性分析,利用 Excel 软件 对数据做图。

2 结果与分析

2.1 水稻根部 AI 含量

10 mmol/L AlCl₃处理6h时, OsSAPK9过表达转 基因植株根部Al吸收量低于野生型9804,处理12h 时, OsSAPK9过表达转基因植株Al吸收量显著高于 野生型9804。Al胁迫2d以上时, OsSAPK9过表达转 基因植株根部Al含量显著低于野生型9804(表1), 表明 OsSAPK9过表达可以抑制水稻对Al的吸收。

Table 1 The absorptive capacity for aluminum in the roots of OsSAPK9 over-expressing transgenic rice and control lines					
品种(系) Variety(Strain)	根部 Al 吸收量(A490/g・FW)Root Al uptake				
	6 h	12 h	2 d	6 d	10 d
WT	7.46 ± 0.08	11. 51 ± 0. 44	20. 90 ± 0. 18	24. 10 ± 0. 63	38.75 ± 1.38
OE-1	5.64 ± 1.26 *	14.86 ± 0.58 *	16. 31 ± 0. 52 *	22. 14 ± 0. 41 *	32. 57 ± 0. 55 *
OE-2	4.72 ± 0.48 *	13.77 ± 0.38 *	17. 20 ± 0. 15 *	18.94 ± 0.57 *	24. 20 ± 0. 27 *

表 1 OsSAPK9 过表达转基因植株经 AI 胁迫不同时间后根部 AI 的含量

WT:野生型水稻品系 9804;0E-1/0E-2:OsSAPK9 过表达转基因水稻 0E-1/0E-2;*表示差异显著(P<0.05);下同

WT: wild type 9804; OE-1 and OE-2: OsSAPK9 over-expression transgenic lines. * represent significant difference at P < 0.05, the same as below

2.2 AI 胁迫对植株根长和株高的影响

经 10 mmol/L Al 胁迫处理 20d 后,野生型 9804 植株、OsSAPK9 过表达转基因植株 OE-1 和 OE-2 的 根长降低比分别为 10.81%、10.21% 和 10.41%,转 基因植株与对照无显著差异(图 1A)。相比之下, OE-1 和 OE-2 的株高降低比值分别为 9.79% 和 7.64%, 而野生型 9804 水稻株高降低比为 13.88%, OsSAPK9 过表达转基因植株的株高降低比 值显著低于野生型植株(图1B)。此外, Al 胁迫 20 d后, OE-1和OE-2叶片的衰老程度明显轻于野 生型9804(图2), 上述结果表明 OsSAPK9 可以提高 水稻对 Al 毒害的耐性。



Fig. 1 The reduction percent of root length and plant height of OsSAPK9 over-expressing transgenic rice and control lines under Al stress



WT-C WT-T OE-1-C OE-1-T WT-C WT-T OE-2-C OE-2-T

WT-C:未处理的野生型对照;WT-T:AI处理的野生型对照;OE-1-C/OE-2-C:未处理的 OsSAPK9 过表达转基因株系 OE-1/OE-2; OE-2-T/OE-2-T:AI 处理的 OsSAPK9 过表达转基因株系 OE-1/OE-2

WT-C: wild type control non-treated by Al, WT-T: wild type control treated by Al, OE-1-C/OE-2-C: OE-1/OE-2 non-treated by Al,

OE-1-T/OE-2-T:OE-1/OE-2 treated by Al

图 2 OsSAPK9 过表达转基因水稻和对照经 Al 胁迫下 20 d 的表型

Fig. 2 The phenotype of OsSAPK9 over-expressing transgenic rice and control lines at 20 d after Al stress

2.3 AI 胁迫对植株根部抗氧化酶活性的影响

随着 Al 胁迫处理时间增加,野生型对照 9804 和 OsSAPK9 过表达植株 OE-1、OE-2 根部总 SOD 酶 活性先升高后降低,分别在第 4 天或第 8 天达到最 大值。OsSAPK9 过表达植株的 SOD 酶活性显著高 于野生型 9804(图 3A)。POD 酶活性变化规律如图 3B,野生型 9804 水稻植株先降低后升高再降低, OsSAPK9 过表达植株逐渐降低并且始终高于野生型 9804;野生型 9804 和 OsSAPK9 过表达植株 CAT 酶 活性也是随着胁迫时间增加,酶活性先升高后降低, 分别在第8天、第4天、第8天达到最大值,转基因 植株与野生型植株的酶活性差异达到显著水平(图 3C)。上述结果表明 OsSAPK9 过表达转基因植株根 部的抗氧化性高于野生型 9804。





2.4 AI 胁迫对植株根上部抗氧化酶活性的影响

野生型9804的 SOD 酶活性在0 d 高于 OsSAPK9 过表达植株,随着胁迫处理时间增加,野生型9804 和 OsSAPK9 过表达转基因植株的总 SOD 酶活性先 升高后降低,均在第4天达到最大值(图4A)。野 生型和过表达植株的 POD 酶活性也随着时间的 增加,酶活性先升高后降低,胁迫处理后8 d 和 12 d时,野生型植株的 POD 的酶活性显著高于 过表达植株(图4B)。此外,CAT 酶活性在野生 型植株中随时间的增加逐渐降低,而在 OsSAPK9 过表达植株随着时间的增加逐渐降低,仅在胁迫 后 16 d略有升高(图4C)。推测可能由于 Os-SAPK9 过表达植株根部抗氧化活性较高,致使其 根上部抗氧化酶活性低于野生型植株。





3 讨论

Al 胁迫毒害植物主要表现在抑制植株主根伸长、侧根生长^[4,14],引起气孔开度减少、降低光合作

用而导致叶片萎黄和坏死^[24]。本研究发现 Al 胁迫 对 OsSAPK9 过表达转基因植株和野生型植株的根 系和根上部生长均产生抑制作用, OsSAPK9 过表达 转基因植株根长受抑制的程度与野生型植株无显著 差异,但其根上部受抑制程度显著轻于野生型,植株 叶片衰老的程度也明显轻于野生型植株。上述结果 表明过表达 OsSAPK9 基因可以提高水稻的耐铝性, 具有潜在的应用价值。

目前,有关水稻耐铝的分子机理研究较少。 已有研究表明耐铝水稻品种根部 Al 离子吸收量低 于铝敏感品种^[14]。OsALSI 基因可以将 Al 离子转运 到液泡中蛰合而提高水稻的耐铝性。OsSAPK9 过 表达转基因植株叶片衰老程度轻于野生型对照可 能与其 SOD 和 POD 等抗氧化酶活性较高有关。 Al 胁迫12 h 以上时,OsSAPK9 过表达转基因植株 根部 Al 含量显著低于野生型 9804,但是 OsSAPK9 提高水稻耐铝性的分子机理以及 OsALSI 是否参 与 OsSAPK9 调控的水稻耐铝反应途径都有待于进 一步研究。

参考文献

- [1] Zhu J, Zhang X Y, Li C S, Xu G D, Liu P. Effects of physiological characteristics of silvery bean seedling under aluminum stress. Journal of Agro-Environment Science, 2006, 25(1):39-42
- Delhaize E, Craig S, Beaton C D, Bennet R J, Jagadish V C, Randall P J. Aluminum tolerance in wheat (*Triticum aestivum* L.):
 I. Uptake and distribution of aluminum in root apices. Plant Physiology, 1993, 103;685-693
- [3] 陈泰林,钱春梅,张建军,徐建,彭新湘. 植物铝胁迫响应机制的研究进展. 热带农业科学,2010,30(2):37-48
- [4] Wang J W, Kao C H. Aluminum-inhibited root growth of rice seedlings is mediated through putrescine accumulation. Plant Soil,2006,288;373-381
- [5] Sharma P, Dubey R S. Involvement of oxidative stress and role of antioxidative defense system in growing rice seedlings exposed to toxic concentrations of aluminum. Plant Cell Report, 2007, 26: 2027-2038
- [6] Cakmak I, Horst W J. Effect of aluminium on lipid peroxidation, superoxide dismutase, catalase, and peroxidase activities in root tips of soybean (*Glycine max*). Physiologia Plantarum, 1991, 83: 463-468
- [7] Panda S K, Patra H K. Does chromium (Ⅲ) produce oxidative damage in excised wheat leaves. Journal of Plant Biology, 2000, 27:105-110
- [8] Jones D L, Blancaflor E B, Kochian L V, Gilroy S. Spatial coordination of aluminium uptake, production of reactive oxygen species, callose production and wall rigidification in maize roots. Plant Cell and Environment, 2006, 29:1309-1318
- [9] 张梦如,杨玉梅,成蕴秀,周滔,段晓艳,龚明,邹竹荣.植物活 性氧的产生及其作用和危害.西北植物学报,2014,34(9): 1916-1926
- [10] Tahara K, Yamanoshita T, Norisada M, Hasegawa I, Kashima H, Sasaki S, Kojima K. Aluminum distribution and reactive oxygen species accumulation in root tips of two Melaleuca trees differing

in aluminum resistance. Plant Soil,2008,307:167-178

- [11] Giannakoula A, Moustakas M, Syros T, Yupsanis T. Aluminum stress induces up-regulation of an efficient antioxidant system in the Al-tolerant maize line but not in the Al-sensitive line. Environmental and Experimental Botany, 2010, 67:487-494
- [12] Sharma P, Dubey R S. Involvement of oxidative stress and role of antioxidative defense system in growing rice seedlings exposed to toxic concentrations of aluminum. Plant Cell Report, 2007, 26: 2027-2038
- [13] Ma B H, Gao L, Zhang H G, Cui J, Shen Z G. Aluminum-induced oxidative stress and changes in antioxidant defenses in the roots of rice varieties differing in Al tolerance. Plant Cell Report, 2012, 31;687-696
- [14] Kobayashi Y, Yamamoto S, Minami H, Kagay Y, Hattori T. Differential activation of the rice sucrose nonfermenting1-related protein kinase 2 family by hyperosmotic stress and abscisic acid. Plant Cell, 2004, 16:1163-1177
- [15] Xu M R, Huang L Y, Zhang F, Zhu L H, Zhou Y L, Li Z K. Genome-wide phylogenetic analysis of the stress-activated protein kinase genes in rice (OsSAPKs) and expression profiling in response to Xanthomonas oryzae pv. oryzicola infection. Plant Molecular Biology Reporter, 2013, DOI: 10.1007/s11105-013-0559-2
- [16] 张帆.水稻广谱白叶枯抗病基因鉴定及其抗病机理初析与胁迫应激蛋白激酶 OsSAPK9 功能验证.北京:中国农业科学院,2017
- [17] Yoshida S, Forno D A, Cock J H, Gomez K A. Laboratory manual for physiological studies of rice. Manila, Philippines: International Rice Research Institute, 1976;61-64
- [18] Ownby J D. Mechanism of reaction of hematoxylin with aluminum-treated wheat roots. Physiology Plantarum, 1993, 87: 371-380
- [19] Tamas L, Marta S, Jana H, Igor M. Aluminum stimulated hydrogen peroxide production of germinating barely seeds. Environmental and Experimental Botany, 2004, 51:281-288
- [20] Abbott A C, Anins C C, Flavell R B. Characterization of anther differentiation in cytoplasmic male sterile maize using a specific isozyme system (esterase). Theory and Applied Genetics, 1984, 67;469-473
- [21] Kochba J, Lavee S, Spiegel R P. Differences in peroxidase activity and isoenzymes in embryogenic and nonembrygenic Shamouti orange ovular callus lines. Plant Cell Physiology, 1977, 18: 463-467
- [22] Kraus T E, Fletcher R A. Wheat Seeding from heat and paraquat injury is detoxification of active oxygen involved. Plant Cell Physiology, 1994, 35(1):45-52
- [23] 官丽莉,刘菊秀,周小勇. 土壤条件与植物响应. 生态环境, 2003,12(4):478-481
- [24] Rincon M R A, Gonzales R. Aluminum partitioning in intact roots of aluminum-tolerant and aluminum-sensitive wheat (*Triticum aestivum* L.) cultivars. Plant Physiology, 1992, 99:1021-1028
- [25] Awasthi J P, Saha B, Regon P, Sahoo S, Chowra U, Pradhan A, Roy A, Panda S K. Morpho-physiological analysis of tolerance to aluminum toxicity in rice varieties of North East India. PLoS One, 2017, 12(4):e0176357
- [26] Huang C F, Yamaji N, Chen Z C, Ma J F. A tonoplast-localized half-size ABC transporter is required for internal detoxification of aluminum in rice. Plant Cell, 2012, 21:655-667