

外源 SA 诱导黑大豆根系柠檬酸分泌缓解 Al 毒害

王闻闻,陈宣钦,陈 奇,陈丽梅,李昆志

(昆明理工大学 生物工程技术研究中心,云南 昆明 650500)

摘要:采用溶液培养的方法,以 Al 敏感型黑大豆(SB)为材料,研究外源添加水杨酸(SA)对 Al 胁迫下 SB 根生理生化指标和 Al 胁迫相关基因表达的影响,探讨外源 SA 缓解黑大豆 Al 毒害的分子机理。结果表明:低浓度(10, 20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)SA 缓解了 Al 毒引起的根伸长抑制,其中 20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ SA 的缓解效果更明显;而高浓度 SA 和 SA 合成抑制剂多效唑(PAC)处理加重了 Al 毒引起的根伸长抑制;外源添加 20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ SA 使 Al 胁迫下 SB 根尖 MDA 和 H_2O_2 含量下降,根系分泌物中柠檬酸的含量约是单独 Al 处理的 2 倍;基因表达分析表明外源添加 20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ SA 促进 Al 胁迫下 SB 根中 12 个 14-3-3 亚型、质膜 H^+ -ATP 酶和柠檬酸通道蛋白(MATE)基因的表达;免疫共沉淀的结果表明外源添加 20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ SA 提高了 Al 胁迫下质膜 H^+ -ATP 酶蛋白磷酸化水平及其与 14-3-3 蛋白结合能力;外源添加 PAC 的效果与外源添加 SA 的相反。外源 SA 可能通过诱导 Al 胁迫下 MATE 表达,提高 14-3-3 蛋白和质膜 H^+ -ATP 酶基因蛋白水平和互作,增加柠檬酸的分泌,增强黑大豆对 Al 毒害的耐受性。

关键词:黑大豆;Al 胁迫;水杨酸;柠檬酸;14-3-3; H^+ -ATP 酶

中图分类号:S565.1;Q945 文献标识码:A DOI:10.11861/j.issn.1000-9841.2014.04.0507

Exogenous SA Alleviated Al Toxicity by Inducing Citric Acid Exudation in Black Soybean Roots

WANG Wen-wen, CHEN Xuan-qin, CHEN Qi, CHEN Li-mei, LI Kun-zhi

(Biotechnology Research Center, Kunming University of Science and Technology, Kunming 650500, Yunnan)

Abstract: A method of solution culture to Al-sensitive black soybean(SB) was used to study the effects of exogenous salicylic acid(SA) on the physiological parameters and Al stress-related gene expression in SB root under Al stress. The aim of the study is to explore the molecular mechanisms of exogenous SA alleviating Al toxicity in SB. The results showed that a low concentration(10 and 20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) of SA alleviated inhibition of root elongation caused by Al toxicity, wherein the alleviation effect of 20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ SA more significant. However, high concentration of SA and SA synthesis inhibitors paclobutrazol(PAC) increased inhibition of root elongation caused by Al toxicity. Exogenous 20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ decreased the MDA and H_2O_2 content in SB under Al stress, and the citric acid content in root exudates was about twice as higher as that of single Al treatment. Expression analysis showed that exogenous 20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ SA enhanced the expression of the 12 subtype of 14-3-3 isoforms, plasma membrane H^+ -ATPase and multidrug and toxic compound extrusion transporter(MATE) gene in SB under Al stress. The results of the co-immunoprecipitation showed that exogenous 20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ SA improved the levels of protein phosphorylation for plasma membrane H^+ -ATPase and its binding capacity with 14-3-3 protein under Al stress. The effect of exogenous PAC treatment was opposite with SA. It was suggested that exogenous SA may enhance the SB tolerance to Al stress by inducing MATE expression and enhancing 14-3-3 and plasma membrane H^+ -ATPase protein levels and interaction between them to increase citric acid exudation.

Key words: Black beans; Al stress; Salicylic acid; Citric acid; 14-3-3; H^+ -ATPase

在全世界范围内,大约 30% 的可耕种土壤为酸性土壤,主要分布在对粮食需求量最大的发展中国家及地区,包括南非、中亚和东南亚等^[1]。在我国,酸性土壤主要分布在长江以南的亚热带、热带地区及云贵川等地,遍及 14 个省区,约占全国耕地面积的 21%^[2]。在酸性土壤上,Al 毒害是限制作物生长的主要因子之一^[3]。对于很多植物而言,微量的 Al 就可以抑制植物根的生长和发育,从而影响植物根系对养分和水分的吸收,最终影响植物的生长及其

产量。减轻或消除酸性土壤的 Al 毒害是全世界农业生产中迫切需要解决的重要难题。

在植物的进化过程中,植物进化出了多种耐 Al 和抗 Al 方式。植物耐 Al 毒的生理学机制通常被分为两类,即内部耐受机制和外部排斥机制^[4],这两种机制的主要区别在于解毒位点不同。内部耐受机制是通过细胞内解毒作用将植物根系已吸收的 Al 转化为毒性较小或无毒性的结合形态,来缓解体内 Al 对植物的毒害作用,包括胞内有机配体对 Al

收稿日期:2014-03-13

基金项目:国家自然科学基金(31260297);云南省自然科学基金(KKSA201126058)。

第一作者简介:王闻闻(1988-),女,硕士,主要从事植物营养基因工程研究。E-mail:wangwenwen01@sina.cn。

通讯作者:李昆志(1963-),男,教授,主要从事植物生理学方面的研究。E-mail:likunzhi63@126.com。

的螯合和液泡的区室化等。与内部耐受机制不同,外部排斥机制是限制 Al 进入植物细胞,在细胞外螯合并排除,包括能螯合 Al 的配体如有机酸及磷酸盐的分泌、细胞壁对 Al 的固定、诱导产生的根际 pH 屏障、 Al^{3+} 被主动输出细胞外等^[5]。在植物的抗 Al 机制中,Al 诱导有机酸的分泌起到了重要作用,被认为是植物抗 Al 的主要机制。

水杨酸(salicylic acid, SA)是植物体内普遍存在的一种小分子酚类物质,化学名称为邻羟基苯甲酸。作为新型植物激素和信号分子 SA 广泛参与植物生长和发育的各个过程,介导植物体对生物和非生物逆境胁迫的应答^[6]。SA 不仅能诱导植物抵抗真菌、细菌和病毒的侵染,而且还能诱导植物对臭氧、紫外辐射、低温、热激、干旱、盐害、金属离子等非生物胁迫产生一定的抗性^[7]。虽然近几年来 SA 在抗逆性中研究比较多,但 SA 作为缓解植物 Al 胁迫的研究却不多见。

有机酸分泌是植物缓解 Al 毒害的最重要机理之一,最近的研究结果表明 H^+ -ATP 酶和 14-3-3 蛋白对 Al 毒害下植物有机酸的分泌起着重要的调控作用。 H^+ -ATP 酶是普遍存在于各种生物中的功能蛋白,它主要参与植物的离子运输、细胞信号转导、细胞膜形态建成等,与植物的离子养分吸收运输、逆境抗性等密切相关^[8]。在 Al 毒和缺磷胁迫下,植物根尖质膜 H^+ -ATP 酶活性与根系柠檬酸的分泌有关。白羽扇豆在低磷条件下释放大量柠檬酸,与质膜 H^+ -ATP 酶通过增强 H^+ 输出参与柠檬酸的释放有关^[9]。大豆的抗 Al 性与根尖柠檬酸的分泌和质膜 H^+ -ATP 酶的基因表达上调、翻译后调节及活性提高有关^[10]。14-3-3 蛋白是一类广泛存在于真核生物中的调控蛋白。植物 14-3-3 蛋白通过参与代谢及信号转导途径来调控植物的生长发育及胁迫应答^[11-12]。14-3-3 对 H^+ -ATP 酶活性也具有正调控效应;14-3-3 结合到磷酸化的 H^+ -ATP 酶 C 末端自抑制域上,泵活性受到激发。低磷胁迫下白羽扇豆根质膜 H^+ -ATP 酶和 14-3-3 蛋白的表达水平均表现为增加的趋势^[13]。Al 胁迫下蚕豆中二者的表达水平及互作水平也表现增加的趋势,从而提高质膜 H^+ -ATP 酶和 H^+ 泵的活性,驱动柠檬酸通道蛋白对柠檬酸的分泌作用^[14]。SA 作为一种植物缓解逆境胁迫的重要信号分子,其对 14-3-3 和 H^+ -ATP 酶的调控也有报道。马铃薯中 14-3-3 基因 16R 启动子中有一种独特的元件对 SA 处理的响应很强烈^[15];适宜浓度的 SA 预处理能减轻镉胁迫对葡萄质膜 ATP 酶的损伤^[16]。由于 SA 与 14-3-3 蛋白及质膜 H^+ -ATP 酶均参与信号转导,响应胁迫应答,且两者之间有一定的联系,因此,推测 SA 可能通过调控 14-3-3 和 H^+ -ATP 酶,诱导有机酸的分泌响应 Al 胁迫。

多效唑(PAC)是一种植物生长延缓剂,PAC 作为 SA 生物合成抑制剂,其主要抑制 SA 生物合成过程中苯甲酸羟化酶的活性^[17]。本文从 SA 和 PAC 对 Al 胁迫下黑大豆的相对根伸长率、MDA 和 H_2O_2 含量、根系分泌物柠檬酸含量、14-3-3 蛋白与质膜 H^+ -ATP 酶的基因表达及蛋白互作的影响进行研究,旨在探讨外源施加 SA 能否增强黑大豆对 Al 的抗性,为进一步研究 SA 在参与 Al 胁迫应答调控中的作用机制奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料培养与处理

以 Al 敏感型黑大豆(SB)为试验材料,SB 是云南本地栽培品种,其种子由本实验室培养并保存。用常温去离子水清洗健康饱满的种子后,将种子平铺于垫有湿润滤纸的培养皿内,在黑暗培养箱中恒温(25℃)催芽。待种子发芽后,挑选发芽一致的种子播于有网眼的泡沫板上,置于温室内(光照时间为 $12\text{ h}\cdot\text{d}^{-1}$,光照强度为 $1200\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$,昼/夜温度为 30℃/25℃)盛有 Hoagland 营养液^[18]的黑色塑料盆中培养,使用人工养鱼通气装置作为通气设施,2 d 更换 1 次营养液。

幼苗生长 3 d 后,将大小一致的 SB 幼苗用 $0.5\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}\text{ CaCl}_2$ 溶液(pH4.5)预处理 12 h。处理前用记号笔在幼苗根基处轻轻作一标记,将标记好的幼苗置于含有 $\text{AlCl}_3\ 50\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 SA (10, 20, 40, $60\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 或 PAC $100\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的营养液($0.5\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}\text{ CaCl}_2$, pH4.5)中,以营养液($0.5\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}\text{ CaCl}_2$, pH4.5)处理为对照,处理 24 h 后,用于测定根的伸长量。

幼苗水培 14 d 后,将大小一致的 SB 幼苗用 $0.5\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}\text{ CaCl}_2$ 溶液(pH4.5)预处理 12 h。将预处理后的 SB 幼苗置于含有 $\text{AlCl}_3\ 50\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 SA $20\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 或 PAC $100\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的营养液($0.5\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}\text{ CaCl}_2$, pH4.5)中,以营养液($0.5\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}\text{ CaCl}_2$, pH4.5)处理为对照,处理 24 h 后,取植物的根,用液氮速冻后 -80℃ 保存,用于生理生化指标测定、基因表达分析和免疫共沉淀分析。

1.2 测定指标与方法

1.2.1 相对根伸长率 处理植物前用油性记号笔在植物根基部位进行标记,小心用直尺测量处理前后从根尖顶端到标记点的距离,处理前后测量值之差为根伸长量,按照下式计算不同处理根的相对伸长率:

相对伸长率(%) = 处理组植物的根伸长量/对照组植物的根伸长量 $\times 100$ 。

1.2.2 MDA 和 H_2O_2 含量 取 -80℃ 冷冻保存的根尖样品测定 MDA 和 H_2O_2 含量。采用硫代巴比妥法^[19]测定 MDA 含量,采用二甲基酚橙法^[20]测定

H₂O₂ 含量。

1.2.3 根系分泌物柠檬酸收集和含量分析 取 5 只 50 mL 的开口试管,每只试管中分别加入 40 mL H₂O,20 μmol·L⁻¹ SA,50 μmol·L⁻¹ Al,20 μmol·L⁻¹ SA + 50 μmol·L⁻¹ Al,100 μmol·L⁻¹ PAC + 50 μmol·L⁻¹ Al 和 10 株长势一致的 SB 幼苗,处理 24 h 后,收集处理液低温浓缩干燥,得到根系分泌残留物。将残留物用 1 mL 的去离子水溶解并过滤,用 HPLC 法进行柠檬酸含量分析。HPLC 的条件:紫外检测波长 214 nm,流动相为 0.5% (NH₄)H₂PO₄ 缓冲

液(H₃PO₄调节 pH 至 2.75),流速 0.8 mL·min⁻¹,柱温 27℃,进样量 50 μL。以柠檬酸标准品为对照,用峰面积进行定量。

1.2.4 基因表达分析 取 -80℃冻存的根尖样品,按照 Trozol 试剂说明书上的方法提取根尖总 RNA。按照 M-MLV Reverse Transcriptase 试剂盒说明书上的方法将总 RNA 反转录合成 cDNA。以 28S rRNA 作为内参,合成的 cDNA 作为模板进行 RT-PCR 扩增。在表 1 中列出了 PCR 反应中使用的引物序列及其扩增产物的长度。

表 1 RT-PCR 分析所用引物序列

Table 1 Primer sequences for PT-PCR analysis

基因(登陆号) Gene(Accession No.)	正向引物/反向引物(5'→3') Forward/Reverse(5'→3')	扩增产物长度 Product size/bp
<i>GHA2</i> (AF091303)	CTTGGGATAATCTTTTGGAGAAC CTCGGCACGTCTCTTAG	250
<i>MATE</i> (Gma. 8768. 1)	AGTAAGCGTAGCCACAGAA CTGAGATAGAGCCAAGGTC	144
<i>SGF14a</i> (HM004359)	GCGTTACGAGGAGATGGTTG GGATGGGATGAGGTTGGACT	286
<i>SGF14b</i> (AK285530)	TTGAAGATGAAGGGCGATTA CAGAAGTCCAAAGGGTGAGG	337
<i>SGF14c</i> (HM004361)	GTGACCGTGAAGAGGATAAA AGAAGTCCACAGGGTGAGAT	471
<i>SGF14d</i> (AK285774/U70536)	TCGTTCTACATCGCCAAATC GCATTCAAATCGTTCCCTTT	217
<i>SGF14e</i> (HM004360)	TCCGTTCTGGACTTGCACCTC CTCAGGCTCAGAAGGTTTGG	260
<i>SGF14f</i> (HM004358)	AGAGTCTAAGGGAAATGAGC CACCTCCATCCTCTGGTAAAT	512
<i>SGF14g</i> (BT096871)	CTACAAAGCCGCTCAGGACA CAGAGGGTAAGGTTATCACGAAG	239
<i>SGF14h</i> (HM004357)	GCCTCATTCCTCCGCTTCC TCCTGTTTCGGTGCTGCTTC	433
<i>SGF14i</i> (AK286671)	CGAGGAACCTACCGTGAGG GAGGAAGCGGATGGAATGAG	240
<i>SGF14j</i> (AK285891)	CCCTCGTGAAGCACTACAGA GGATTCTTCTCCCAAGGTGT	401
<i>SGF14k</i> (AK286798)	CTGACCGTGAGGAGCGTAA GAGCAAGACCCAGCCTGATAG	415
<i>SGF14l</i> (AK286414)	CTGTCGGTAGGTTACAAGAA AGAAGTCCACAGGGTGAGAT	567
<i>SGF14m</i> (AK286318)	TGGAGGTTGAGGAGTTGACG CGGCCTGGTTGTTGCTTAGAT	663
<i>SGF14n</i> (HM004356)	GATGAAATGCTGGATGCC GACCCAAACGAATAGGATGT	457
<i>SGF14o</i> (AK286943/AK244317)	AACGAGTTGAATGCCAAGCG GGTTGTCCCTGAGAAGTTGC	460
<i>SGF14p</i> (AF228501)	TGAACGCTATGATGAAATG ACTGTGGACTCCGCAATA	306
28S rRNA(L36615. 1)	CCCAATCGGGCGGTAAT CGTCTCCACGAGCATATCAA	267

1.2.5 免疫共沉淀 按照 Chen 等^[14]的提取方法,取冻存的根尖样品提取质膜蛋白。为了检测与质膜 H⁺-ATP 酶结合的 14-3-3 蛋白,将 2 μg C 末端磷酸化的质膜 H⁺-ATP 酶(VA2P)的兔抗加到 200 μg

质膜蛋白中,在 4℃下 40 r·min⁻¹振荡 1 h 后,再加入蛋白 A/G 琼脂糖(Santa Cruz Biotech, Santa Cruz, CA)20 μL 在 4℃下 40 r·min⁻¹振荡过夜,琼脂糖在 4℃下 1 000 g 离心 5 min 后沉淀,再用预冷的 10

$\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ PBS 缓冲液 1 mL 洗 3 次, 每次均在 4°C 下 $1\,000\text{ g}$ 离心 5 min 沉淀。最后加入电泳缓冲液 $40\text{ }\mu\text{L}$, 加热煮沸后, 用 $20\text{ }\mu\text{L}$ 进行 SDS-PAGE, 然后用 Bio-Rad 半干式转膜仪将电泳得到的蛋白转到 PVDF 膜上。然后用 5% 的脱脂奶粉封闭 1 h 后, 先使用大豆 14-3-3 蛋白或 VA2P 的兔抗在 4°C 下孵育过夜, 再使用羊抗兔的二抗室温孵育 1 h, 最后用底物化学发光 ELC 显示法显影观察结果。

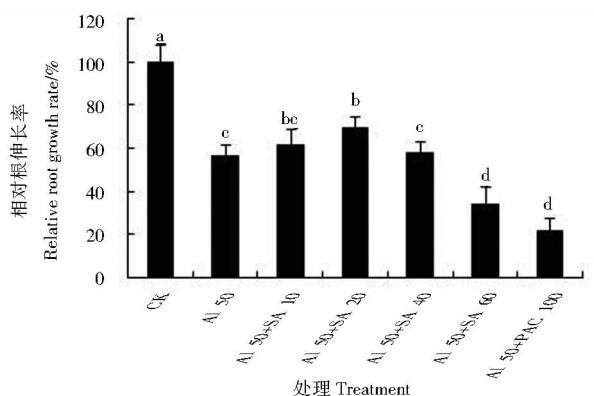
1.3 数据统计分析

采用 Excel 2003 和 DPS 7.05 软件进行统计分析和图表绘制, 用 LSD 法检测统计显著性差异。

2 结果与分析

2.1 外源 SA 对 Al 胁迫下 SB 相对根伸长率的影响

Al 对植物的毒害作用最典型的症状表现在对根伸长的抑制作用, 根的相对伸长率能够直接反应植物受 Al 毒害的程度^[21]。如图 1 所示, 与对照相比, $50\text{ }\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Al 处理显著抑制 SB 的根伸长。在 Al 处理条件下, 加入外源 SA ($10, 20\text{ }\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 逐渐缓解 Al 对 SB 根生长的抑制作用, 但随 SA 浓度的进一步增加 ($40, 60\text{ }\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 缓解作用并没有继续增强, 反而加重抑制作用; 加入外源 PAC 也加重了 Al 对根伸长的抑制作用。这表明 SA 对 Al 胁迫下根伸长抑制的影响具有浓度依赖。与单独 Al 处理相比, 外源添加 $20\text{ }\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ SA 时对 Al 抑制根伸长的缓解效果最明显, 所以本试验中选择 $20\text{ }\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ SA 作为其他试验的处理浓度。



CK: $0.5\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ CaCl_2 ; Al 50: $50\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ CaCl_3 ; Al 50 + SA10: $50\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ CaCl_3 + $10\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ SA; Al 50 + SA20: $50\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ CaCl_3 + $20\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ SA; Al 50 + SA40: $50\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ CaCl_3 + $40\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ SA; Al 50 + SA60: $50\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ CaCl_3 + $60\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ SA; Al 50 + PAC100: $50\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ AlCl_3 + $100\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ PAC; 处理间不同字母代表 0.05 水平差异显著。下同。

Different small letters indicate significant difference at 0.05 level. The same below.

图 1 胁迫下不同浓度 SA 对 SB 相对根伸长率的影响

Fig. 1 Effect of different concentration SA on relative root growth in SB under Al stress

2.2 外源 SA 对 Al 胁迫下 SB 根尖 MDA 和 H_2O_2 含量的影响

活性氧迸发是 Al 胁迫诱导产生的早期反应之一, 积累的活性氧会对植物细胞造成严重氧化伤害。质膜过氧化的主要产物是 MDA, 其含量高低体现质膜过氧化的损伤程度。如图 2 所示, 单独 Al 处理使 SB 根中 MDA 含量显著增高, 添加外源 SA 使 MDA 含量降低, 缓解了质膜过氧化损伤; 但添加外源 PAC 与单独 Al 处理相同, 造成了 MDA 含量增高, 对质膜造成伤害。植物体内最主要的活性氧是 H_2O_2 , 其含量变化体现植物体内遭受氧化胁迫程度。如图 3 所示, H_2O_2 含量也有与 MDA 含量相似的变化, 外源 SA 使 Al 胁迫下 H_2O_2 含量降低, 氧化胁迫程度明显减轻。

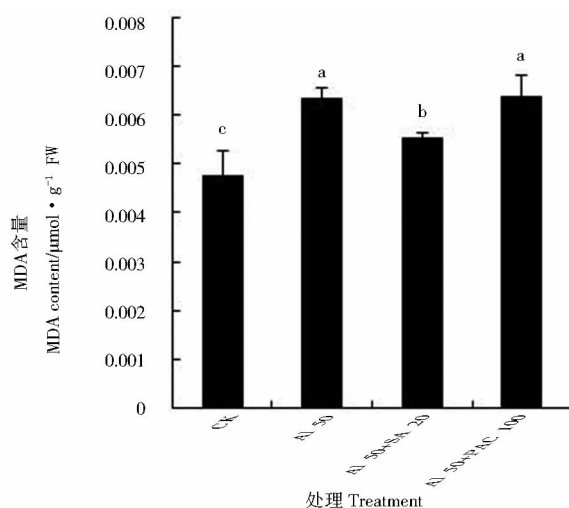


图 2 外源 SA 对 Al 胁迫下 SB 根中 MDA 含量的影响

Fig. 2 Effect of exogenous SA on MDA content in SB root under Al stress

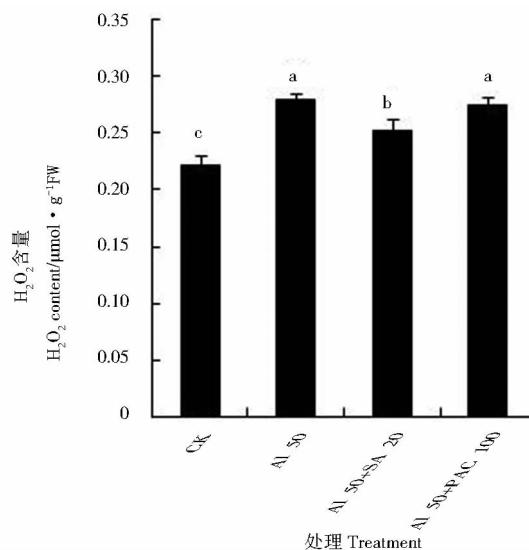


图 3 外源 SA 对 Al 胁迫下 SB 根中 H_2O_2 含量的影响

Fig. 3 Effect of exogenous SA on H_2O_2 content in SB root under Al stress

2.3 外源 SA 对 Al 胁迫下 SB 根系柠檬酸分泌的影响

如图 4 所示,未经 Al 处理和单独 SA 处理后,在根系分泌物中并没有检测到柠檬酸,并不能诱导 SB 根柠檬酸的分泌。用 $50 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Al 胁迫处理后,根系分泌物中柠檬酸的含量为 $0.37 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1} \text{FW}$,而在 $50 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Al 和 $20 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ SA 共同处理 SB 后,根系分泌物中柠檬酸的含量达到了 $0.78 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1} \text{FW}$,约是单独 Al 处理的 2 倍。用 PAC 和 Al 共同处理 SB 后,柠檬酸的含量显著低于单独 Al 处理。

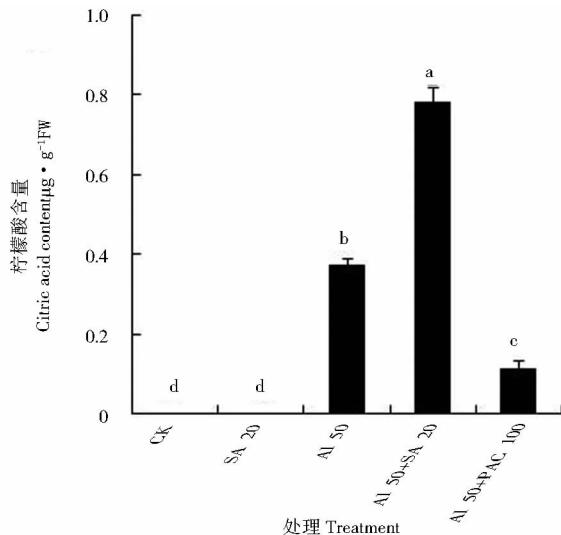


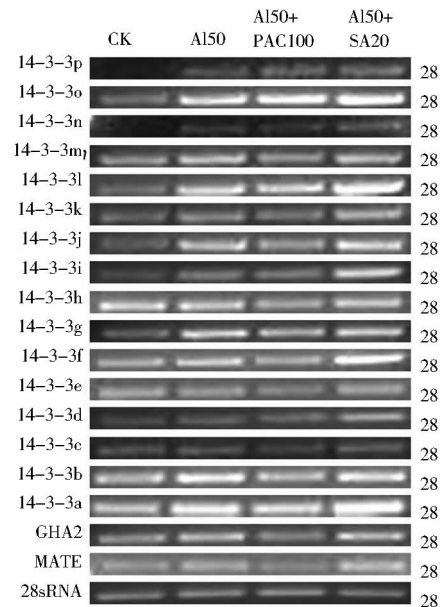
图 4 外源 SA 对 Al 胁迫下 SB 根系分泌物柠檬酸含量的影响

Fig. 4 Effect of exogenous SA on the citric acid content in SB root exudates under Al stress

2.4 外源 SA 对 Al 胁迫下 SB 根中 14-3-3 蛋白、质膜 H^+ -ATP 酶和柠檬酸通道蛋白 (MATE) 基因表达的影响

大豆基因组中有 18 个 14-3-3 基因,它们分别位于 12 个不同的染色体上。其中,只有 16 个 (*SGF14a* ~ *SGF14p*) 有转录产物^[22]。因此,本试验中扩增这 16 个 14-3-3 基因,结果如图 5 所示。对照组中,只有基因 14-3-3p 和 14-3-3n 没有检测到基因表达,其他基因均检测到不同程度的表达;但是,基因 14-3-3p 和 14-3-3n 在其他实验组中可以检测到。这可能是 14-3-3p 和 14-3-3n 的组成表达较弱,因此在对照组中没有检测到。除了 14-3-3c、14-3-3e 和 14-3-3h 基因外,Al 胁迫下 SB 根中 14-3-3 基因的表达水平明显高于未经 Al 处理的对照组;除了 14-3-3b、14-3-3c、14-3-3g 和 14-3-3h 基因外,单独 Al 处理下 SB 根中 14-3-3 基因的表达水平明显低于加入外源 SA 的植株;除了 14-3-3o 和 14-3-3p 基因外,单独 Al 处理下 SB 根中 14-3-3 基因的表达水平平均高于加入外源 PAC 的植株。同时,用 RT-PCR 分析了不同处理下 SB 根中质膜 H^+ -ATP 酶和柠檬酸通道蛋白基因 (*GHA2* 和 *MATE*) 的表达情况,结果表明:单独

Al 处理下 SB 根中 *GHA2* 和 *MATE* 基因的表达水平高于未经 Al 处理的对照组和加入外源 PAC 的植株,但低于加入外源 SA 的植株。基因表达的结果表明:Al 胁迫能诱导 SB 根中 14-3-3 蛋白、质膜 H^+ -ATP 酶和柠檬酸通道蛋白基因的表达;Al 胁迫下加入外源 SA 能进一步诱导这些基因的表达,但是加入外源 PAC 对 Al 胁迫的诱导有不同程度的抑制。



14-3-3a ~ 14-3-3p 表示大豆中的 14-3-3 基因 (*SGF14a* ~ *SGF14p*)。

14-3-3a - 14-3-3p are soybean 14-3-3 genes (*SGF14a* - *SGF14p*)。

图 5 外源 SA 对 Al 胁迫下 SB 根中柠檬酸通道蛋白 (MATE)、14-3-3 蛋白和质膜 H^+ -ATP 酶基因表达的影响

Fig. 5 Effect of exogenous SA on the gene expression of multidrug and toxic compound extrusion transporter (MATE), 14-3-3 protein and plasma membrane H^+ -ATPase in SB root under Al stress

2.5 外源 SA 对 Al 胁迫下 SB 根中质膜 H^+ -ATP 酶蛋白磷酸化水平及其与 14-3-3 蛋白互作的影响

免疫共沉淀分析结果如图 6 所示,SB 经单独 Al 处理后,根中质膜 H^+ -ATP 酶的磷酸化水平高于未经 Al 处理的对照组植株;Al 处理下,加入外源 SA 使 SB 根中质膜 H^+ -ATP 酶的磷酸化水平高于单独 Al 处理植株,而加入外源 PAC 后,质膜 H^+ -ATP 酶的磷酸化水平则低于单独 Al 处理。与磷酸化质膜 H^+ -ATP 酶结合的 14-3-3 蛋白表现出相似的趋势,外源 SA 促进了 Al 胁迫下 14-3-3 蛋白与磷酸化质膜 H^+ -ATP 酶的结合。外源 PAC 抑制了 Al 胁迫下 14-3-3 蛋白与磷酸化质膜 H^+ -ATP 酶的结合。

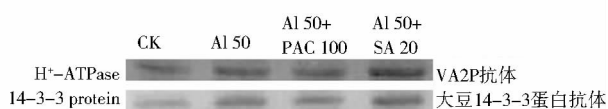


图6 外源SA对Al胁迫下SB根中质膜H⁺-ATP酶蛋白磷酸化水平及其与14-3-3蛋白互作的影响

Fig. 6 Effect of exogenous SA on the levels of protein phosphorylation for plasma membrane H⁺-ATPase and its binding capacity with 14-3-3 protein in SB root under Al stress

3 讨论

SA作为新型植物激素和信号物质,广泛参与植物的生物和非生物胁迫响应。有研究发现,Al胁迫刺激大豆^[17]、决明子^[23]内源SA含量改变。但内源SA在缓解Al胁迫中的具体作用尚不清楚。本试验结果表明:外源低浓度SA(10, 20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)可以缓解Al对SB根伸长的抑制作用,而高浓度SA(40, 60 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)和PAC则进一步加重了Al胁迫引起的根伸长抑制,研究发现20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ SA对缓解SB的Al毒害效果最明显。

在Al胁迫下植物体内活性氧产生并累积从而破坏植物组织结构与功能,造成氧化损伤,甚至导致植物死亡。近几年的研究表明,SA能缓解Al胁迫对决明子^[24]、栝楼^[25]等植物造成的氧化胁迫伤害。本试验的结果也表明,SB植株在Al胁迫下,外源SA能改善Al对质膜的伤害,表现为SB根尖MDA和H₂O₂含量也下降。但对SA缓解Al胁迫造成的氧化胁迫的具体机制,可能是通过激活抗氧化防御系统来缓解Al毒害,也可能是通过其他机制,有待进一步深入研究。

已有大量研究发现,植物在Al胁迫下可通过根系分泌有机酸来抵御Al毒害,且植物抗Al性同有机酸分泌之间为显著正相关的关系^[26]。在Al胁迫下,外源SA能促进刺激大豆^[17]、决明子^[23]分泌更多的柠檬酸,增加对Al的耐性。在本试验中,SB在Al胁迫下分泌柠檬酸,加入外源SA柠檬酸的分泌量约是单独Al处理的2倍。最近有研究显示,与植物耐Al能力相关的柠檬酸通道蛋白归属MATE家族;MATE是一类广泛存在于微生物、植物及哺乳动物细胞中的蛋白家族,是多药及毒性复合物的排出转运蛋白。有研究发现,在盐胁迫条件下,外源SA能显著降低小麦根系Na⁺,提高根系K⁺的向上运输选择性,显著提高植物体的抗盐性^[27];减少菊花根系Na⁺含量并增加根系K⁺、Ca²⁺、Mg²⁺的含量,缓解盐胁迫对菊花植株的伤害^[28];外源SA可能通过对胁迫下物质的运输进行一定的调控,缓解胁迫对植物的伤害。从基因表达分析的结果,可以看出Al胁迫诱导MATE基因的表达,外源SA可能通过

调控MATE的表达刺激SB分泌柠檬酸,增加对Al的耐性。

植物有大量的14-3-3基因家族及多种的14-3-3亚型,它们对某些靶蛋白有不同的亲和力。这些14-3-3亚型表现出很高的细胞和组织特异性,包括表达特异性和亚细胞定位特异性^[29]。最近的研究发现,Al胁迫下蚕豆通过增加质膜H⁺-ATP酶和14-3-3b基因的表达水平、质膜H⁺-ATP酶的磷酸化水平及其与14-3-3的结合,从而提高质膜H⁺-ATP酶和H⁺泵活性,驱动柠檬酸通道蛋白对柠檬酸的分泌作用^[14]。在本研究中,Al胁迫下SB质膜H⁺-ATP酶和14-3-3基因的表达水平、质膜H⁺-ATP酶的磷酸化水平及其与14-3-3的结合能力提高;外源SA处理进一步增加了质膜H⁺-ATP酶和14-3-3基因的表达水平、质膜H⁺-ATP酶的磷酸化水平及其与14-3-3的结合能力。有文献报道,外源SA对质膜ATP酶活性有一定的影响,如盐胁迫下,外源SA可以缓解盐胁迫引起的质膜ATP酶、液泡膜ATP酶和PPase活性降低,提高菊花根系对K⁺、Ca²⁺、Mg²⁺的吸收,减少对Na⁺的吸收,从而缓解盐胁迫对菊花植株的伤害程度^[28]。在本研究中,外源SA可能通过调控14-3-3和质膜H⁺-ATP酶的基因和蛋白水平,从而提高质膜H⁺-ATP酶和H⁺泵的活性,驱动柠檬酸通道蛋白对柠檬酸的分泌作用,最终缓解Al胁迫对SB的毒害。

有机酸分泌是目前为止发现的植物缓解Al毒害最重要机制。综上所述,Al胁迫下,外源SA增加SB根系柠檬酸的分泌,增加对Al的耐性。一方面,外源SA可能通过诱导MATE的基因表达,增加柠檬酸分泌;另一方面,外源SA可能通过诱导14-3-3蛋白和H⁺-ATP酶的基因表达,提高H⁺-ATP酶磷酸化水平及其与14-3-3蛋白的结合能力,增加H⁺泵活性,使根系柠檬酸分泌量增加。但是,是SA诱导Al胁迫下MATE的表达增加,还是14-3-3蛋白与H⁺-ATP酶互作增强对柠檬酸分泌起主导作用,还不清楚,有待进一步研究。

参考文献

- [1] Sasaki T, Yamamoto Y, Ezaki B, et al. A wheat gene encoding an aluminum-activated malate transporter [J]. The Plant Journal, 2004, 37(5): 645-653.
- [2] 熊毅, 李庆远. 中国土壤[M]. 北京: 科学出版社, 1987: 39. (Xiong Y, Li Q K. Chinese soil[M]. Beijing: Science Press, 1987: 39.)
- [3] von Uexküll H R, Mutert E. Global extent development and economic impact of acid soils [J]. Plant and Soil, 1995, 171(1): 1-15.
- [4] Matsumoto H. Cell biology of aluminum toxicity and tolerance in higher plants [J]. International Review Cytology, 2000, 200: 1-46.
- [5] Scott R, Hoddinott J, Taylor G J, et al. The influence of aluminum on growth, carbohydrate and organic acid content of an Al-tolerant

- and Al-sensitive cultivar of wheat[J]. Canadian Journal of Botany, 1991, 69(4):711-716.
- [6] 郝林. 水杨酸参与生物学过程的交谈机制[J]. 沈阳师范大学学报(自然科学版), 2010, 28(4):449-457. (Hao L. The conversation mechanisms of salicylic acid involved in biological processes [J]. Journal of Shenyang Normal University (Natural Science), 2010, 28(4):449-457.)
- [7] 李国靖, 周燮. 水杨酸与植物抗非生物胁迫[J]. 植物学通报, 2001, 18(3):295-302. (Li G J, Zhou X. Salicylic acid and abiotic stress resistance in plants[J]. Chinese Bulletin of Botany, 2001, 18(3):295-302.)
- [8] 彭陈, 何冰, 郭士伟. 植物中的 P-ATP 酶[J]. 植物生理学通讯, 2010, 46(7):637-641. (Peng C, He B, Guo S W. P-ATPases in plants [J]. Plant Physiology Communications, 2010, 46(7):637-641.)
- [9] Yan F, Zhu Y, Müller C, et al. Adaptation of H⁺-Pumping and plasma membrane H⁺-ATPase activity in proteoid roots of white lupin under phosphate deficiency[J]. Plant Physiology, 2002, 129(1):50-63.
- [10] Shen H, He L F, Sasaki T, et al. Citrate secretion coupled with the modulation of soybean root tip under aluminum stress up-regulation of transcription, translation, and threonine-oriented phosphorylation of plasma membrane H⁺-ATPase[J]. Plant Physiology, 2005, 138(1):287-296.
- [11] Chung H J, Sehnke P C, Ferl R J. The 14-3-3 proteins: cellular regulators of plant metabolism[J]. Trends in Plant Science, 1999, 4(9):367-371.
- [12] Sehnke P C, Rosenquist M, Alsterfjord M, et al. Evolution and isoform specificity of plant 14-3-3 proteins[J]. Plant Molecular Biology, 2002, 50(6):1011-1018.
- [13] Tomasi N, Kretzschmar T, Espen L, et al. Plasma membrane H⁺-ATPase-dependent citrate exudation from cluster roots of phosphate-deficient white lupin[J]. Plant, Cell & Environment, 2009, 32(5):465-475.
- [14] Chen Q, Wu K H, Zhang Y N, et al. Physiological and molecular responses of broad bean (*Vicia faba* L.) to aluminum stress[J]. Acta Physiologiae Plantarum, 2012, 34(6):2251-2263.
- [15] Aksamit A, Korobczak A, Skala J, et al. The 14-3-3 gene expression specificity in response to stress is promoter-dependent[J]. Plant & Cell Physiology, 2005, 46(10):1635-1645.
- [16] 邵小杰, 杨洪强, 冉昆, 等. 水杨酸对镉胁迫下葡萄根系质膜 ATPase 和自由基的影响[J]. 中国农业科学, 2010, 43(7):1441-1447. (Shao X J, Yang H Q, Ran K, et al. Effects of salicylic acid on plasma membrane ATPase and free radical of grape root under cadmium stress [J]. Scientia Agricultura Sinica, 2010, 43(7):1441-1447.)
- [17] Liu N, You J, Shi W, et al. Salicylic acid involved in the process of aluminum induced citrate exudation in *Glycine max* L. [J]. Plant and Soil, 2012, 352(1-2):85-97.
- [18] Neto A D, Prisco J T, Filho J E, et al. Hydrogen peroxide pre-treatment induces salt-stress acclimation in maize plants[J]. Journal of Plant Physiology, 2005, 162(10):1114-1122.
- [19] 张志良, 瞿伟菁. 植物生理学实验指导[M]. 3 版. 北京: 高等教育出版社, 2003:274-277. (Zhang Z L, Qu W J. The experimental guide for plant physiology [M]. 3rd ed. Beijing: Higher Education Press, 2003:274-277.)
- [20] 李忠光, 宋玉泉, 龚明. 二甲酚橙法用于测定植物组织中的过氧化氢[J]. 云南师范大学学报, 2007, 27(3):50-54. (Li Z G, Song Y Q, Gong M. Xylenol orange method used for the measurement of hydrogen peroxide in plant tissue [J]. Journal of Yunnan Normal University, 2010, 43(7):1441-1447.)
- [21] Foy C D, Carter T E, Duke J A, et al. Correlation of shoot and root growth and its role in selecting for aluminum tolerance in soybean [J]. Journal of Plant Nutrition, 1993, 16(2):305-325.
- [22] Li X, Dhaubhadel S. Soybean 14-3-3 gene family: identification and molecular characterization[J]. Planta, 2011, 233(3):569-582.
- [23] Yang Z Y, Wang J, Wang S H, et al. Salicylic acid-induced aluminum tolerance by modulation of citrate efflux from roots of *Cassia tora* L. [J]. Planta, 2003, 217(1):168-174.
- [24] Wang Y S, Wang J, Yang Z M, et al. Salicylic acid modulates aluminum-induced oxidative stress in roots of *Cassia tora* [J]. Acta Botanica Sinica, 2004, 46(7):819-828.
- [25] 高培培, 章艺, 吴玉环, 等. 外源水杨酸对 Al 胁迫下柞楼光合特性及耐 Al 性的影响[J]. 水土保持学报, 2012, 26(6):268-273. (Gao P P, Zhang Y, Wu Y H, et al. Effect of exogenous SA on photosynthesis and Al tolerance of *Tichosanthes kirilowii* Maxim under aluminum stress [J]. Journal of Soil and Water Conservation, 2012, 26(6):268-273.)
- [26] Zhao Z, Ma J F, Sato K, et al. Differential Al resistance and citrate secretion in barley (*Hordeum vulgare* L.) [J]. Planta, 2003, 217(5):794-800.
- [27] 张士功, 高吉寅, 宋景芝. 水杨酸和阿斯匹林对小麦盐害的缓解作用[J]. 植物生理学报, 1999, 25(2):159-164. (Zhang S G, Gao J Y, Song J Z. Mitigative effects of salicylic acid and aspirin on salt stress-induced injuries in wheat (*Triticum aestivum* L.) [J]. Acta Phytobiologica Sinica, 1999, 25(2):159-164.)
- [28] 郭春晓, 郑成淑, 谢红英, 等. 盐胁迫下外源水杨酸对菊花根系离子含量和 ATPase 和 PPase 活性的影响[J]. 园艺学报, 2011, 38(6):1167-1172. (Guo C X, Zheng C S, Xie H Y, et al. Effect of exogenous salicylic acid on ion content, activities of ATPase and PPase of the roots in chrysanthemum under salt stress [J]. Acta Horticulturae Sinica, 2011, 38(6):1167-1172.)
- [29] Chen F, Li Q, Sun L, et al. The rice 14-3-3 gene family and its involvement in responses to biotic and abiotic stress[J]. DNA Research, 2006, 13(2):53-63.