

壳梭孢素对铝敏感型黑大豆铝耐受性的影响

易 嘉, 郭传龙, 武孔焕, 王 琳, 赵秀玲, 李昆志, 陈丽梅

(昆明理工大学 生物工程技术研究中心, 云南 昆明 650500)

摘 要:以铝敏感型黑大豆(简称SB)为材料,研究铝胁迫下壳梭孢素(FC)对SB根铝耐受性的影响。结果表明:在 $50\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 铝胁迫下,添加 $1\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ FC处理8h能够显著缓解铝胁迫对SB根生长的抑制作用,使其根的相对生长率(RRG)增加36.4%。免疫共沉淀分析结果表明 $50\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 铝胁迫下添加 $1\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ FC增强SB根中14-3-3蛋白与磷酸化质膜 H^{+} -ATPase的结合,使根尖质膜 H^{+} -ATPase活性提高约1倍,根氢泵活性和质子外排氢离子能力显著增强,根尖柠檬酸的分泌量增加显著,增加约2倍。这些结果证实铝胁迫下FC用于增强SB根中14-3-3蛋白和质膜 H^{+} -ATPase的相互作用和质膜 H^{+} -ATPase的活性,从而增加SB根柠檬酸的分泌作用及其对铝胁迫的耐受性。

关键词:黑大豆;14-3-3蛋白;质膜 H^{+} -ATPase;壳梭孢素;铝胁迫

中图分类号:S565.1

文献标识码:A

DOI:10.11861/j.issn.1000-9841.2014.03.0389

Effects of Fusicoccin on Aluminum Tolerance in Al-sensitive Black Soybean

YI Jia, GUO Chuan-long, WU Kong-huan, WANG Lin, ZHAO Xiu-ling, LI Kui-zhi, CHEN Li-mei

(Biotechnology Research Centre, Kunming University of Science and Technology, Kunming 650500, China)

Abstract: Effect of FC on aluminum tolerance of Al-sensitive black soybean (SB) roots under Al stress were investigated in this research. The results showed that adding $1\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ FC for 8 h, it could significantly release the inhibition of $50\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Al stress on the root growth of SB, and increase its relative root growth (RRG) by 36.4%. Co-Immunoprecipitation (Co-IP) analysis showed that adding $1\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ FC could enhance the interaction between 14-3-3 proteins and phosphorylated PM H^{+} -ATPase, which increased PM H^{+} -ATPase activity to approximately 1-fold, significantly increasing proton efflux and citrate secretion to approximately 2-fold in SB roots under $50\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Al stress. These results confirmed FC was used for enhancing interaction of the 14-3-3 protein and PM H^{+} -ATPase and the activity of PM H^{+} -ATPase, thereby increasing citrate secretion and Al-tolerance in SB roots under Al stress.

Key words: Black soybean; 14-3-3 proteins; Plasma membrane H^{+} -ATPase; Fusicoccin; Al stress

铝的毒害是酸性土壤中限制作物生长的主要因子,主要通过危害作物根的生长,从而影响营养元素和水分的吸收来影响植物的生长和发育^[1]。在进化过程中植物形成了两种耐铝机制,即外部排斥机制和内部耐受机制。其中铝胁迫下植物根系分泌有机酸被认为是植物重要的外部耐铝机制之一,柠檬酸是植物根尖分泌有机酸的一种^[2]。

壳梭孢素(fusicoccin, FC)是由扁桃壳梭孢菌(*Fusicoccina amygdale* L.)产生的一种碳三环双萜的糖苷类毒素^[3]。它在许多方面具有与生长素类似的作用^[4]。FC还是质膜 H^{+} -ATPase特异性激活剂,植物经FC处理后,能增加质膜 H^{+} -ATPase的活性^[5]。最近的研究结果显示,生长在磷酸铝培养基上的胡萝卜突变体柠檬酸的分泌量和质膜 H^{+} -ATPase活性的增加有关,质膜 H^{+} -ATPase可能通过一个柠檬酸-质子转运体系参与到柠檬酸分泌过程的调控^[6]。14-3-3蛋白是普遍存在于真核生物中的一种调控蛋白^[7],它与质膜 H^{+} -ATPase的C末端自抑

制区内磷酸化序列结合时,形成14-3-3/ H^{+} -ATPase复合体从而活化质膜 H^{+} -ATPase^[8],而FC能够使14-3-3/ H^{+} -ATPase这个复合体结合得更加牢固,显著增强其活性^[9]。对普通大豆的研究发现,在铝胁迫下FC的存在使质膜 H^{+} -ATPase活性和柠檬酸的分泌量增加^[10]。

云南属于典型的酸性红壤区域,云南小黑豆是云南当地一个重要的大豆栽培种,我们之前的研究结果显示云南小黑豆属于铝敏感型黑大豆(Al-sensitive black soybeans, SB)^[11],铝胁迫抑制SB根尖质膜 H^{+} -ATPase的磷酸化及与14-3-3蛋白的结合,降低SB根尖质膜 H^{+} -ATPase活性和柠檬酸分泌作用^[12]。本研究以SB为实验材料通过考察在铝胁迫下添加FC对SB根的相对伸长率、14-3-3蛋白和质膜 H^{+} -ATPase的相互作用、根尖质膜 H^{+} -ATPase的活性、柠檬酸分泌作用等来分析FC对SB根的铝胁迫耐受性的影响。

收稿日期:2013-11-06

基金项目:国家重点基础研究发展计划“973计划”(2007CB108901)。

第一作者简介:易嘉(1985-),男,硕士,主要从事植物代谢途径基因工程方面的研究。E-mail:yijia013@163.com。

通讯作者:陈丽梅(1963-),女,教授,主要从事植物代谢途径基因工程方面的研究。E-mail:chenlimeikm@126.com。

1 材料与方法

1.1 材料

供试材料云南小黑豆(铝敏感型黑大豆简称SB)^[11]为云南本地的栽培品种。

1.2 试验方法

1.2.1 大豆的培养 SB种子平铺于垫有湿润滤纸的培养皿中,在恒温(25℃)黑暗的培养箱中进行催芽、浸种。待种子长出2~3 cm根后播在有无针眼的薄泡沫板上,置于盛有完全营养液^[11]的黑色塑料盆中培养,于白天25℃和晚上30℃,每天光照(1 200 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$)12 h的培养室中进行漂浮培养,每隔一天更换一次培养液。

1.2.2 试验材料的处理 选取生长14 d的SB幼苗,先用pH4.3的0.5 mmol·L⁻¹ CaCl₂预处理过夜,分两组处理,其中一组用0,1和2 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的FC分别处理0,2,4,8,12和24 h,作为单独的FC处理组;另一组在50 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的铝处理液中添加0,1和2 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的FC分别处理0,2,4,8,12和24 h,作为Al+FC处理组,以不添加铝和FC处理作为对照(CK)。每个不同处理时间点做6个重复,记录经0.5 mmol·L⁻¹ CaCl₂预处理过夜后处理前的根长,然后再分别记录每个处理时间点处理后的根长度,相对根伸长率计算参照Howeler和Cadavid的方法^[13]。

1.2.3 质膜的分离与纯化 将完全营养液中培养14 d的SB幼苗预处理后,置于含有1 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的FC和50 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ AlCl₃的溶液100 mL(含有0.5 mmol·L⁻¹ CaCl₂, pH4.3)中处理8 h,收集0.3 g的1~2 cm根尖样品,速用液氮冻存用于质膜的分离。质膜的分离与纯化采用Shen等^[10]描述的方法。

1.2.4 质膜纯度的检测和质膜H⁺-ATPase活性的测定 H⁺-ATPase活性测定参照Rabotti等^[14]方法。质膜蛋白纯度的测定参考Guo等^[12]的方法。

1.2.5 免疫共沉淀(Co-IP)和Western Blot分析

免疫共沉淀和Western Blot方法以及所用抗体参照Guo等^[12]的方法。

1.2.6 质膜H⁺泵活性测定 质子从膜内向外的泵出根据吖啶橙(AO)A₄₉₂处吸光值淬灭的方法测定^[15]。

1.2.7 根柠檬酸分泌量的测定 水培2周的SB幼苗,预处理过夜后,然后分别置于100 mL含有50 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的AlCl₃溶液,只加1 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ FC溶液,1 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ FC+50 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ AlCl₃溶液(含有0.5 mmol·L⁻¹ CaCl₂, pH4.3)以及预处理液中(CK),处理8 h后,收集SB的根尖分泌液,真空抽干后溶于1 mL蒸馏水中,用HPLC测定柠檬酸分泌量^[12]。

1.2.8 根尖分泌H⁺的测定 采用Tomasi等^[16]的溴甲酚酯染色法测定根尖H⁺的分泌。

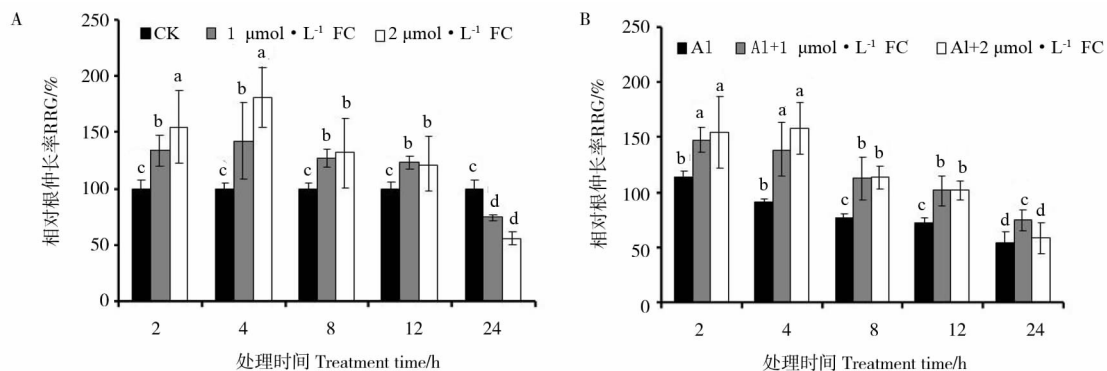
1.3 数据分析

各项生理指标的检测均进行3次重复,采用统计学分析软件SPSS16.0进行单因素方差分析(one-way ANOVA),进行统计学分析($P<0.05$)。

2 结果与分析

2.1 FC对铝胁迫条件下SB根生长的影响

如图1所示,无铝胁迫下,随着FC处理时间的延长,SB的相对根伸长率(RRG)呈现先上升而后下降的趋势(图1A),在处理4 h时FC对SB根生长的刺激效果达到最佳,此时,与对照(CK)相比,2 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 比1 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的FC处理对SB的根生长的影响更明显。当在50 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 铝胁迫下,以及铝胁迫下添加1和2 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的FC(图1B),随着铝处理时间的延长,铝胁迫对SB根生长的抑制作用越来越大;在铝胁迫下添加FC,随着处理时间



(A)不同浓度FC处理对RRG的影响;(B)在铝胁迫下添加不同浓度FC对RRG的影响;图中标有不同字母表示差异显著。下同。

(A) Effects of different concentration FC on the RRG of SB; (B) Effects of different concentration FC on the RRG of SB under Al stress;

Figure marked with the different letters indicates difference is significant. The same below.

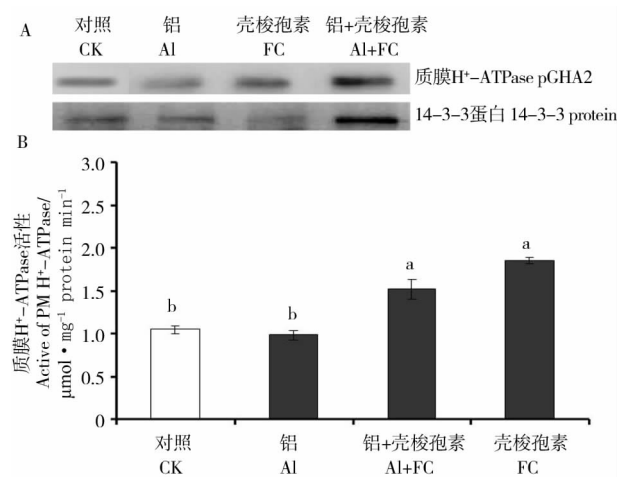
图1 铝胁迫下激活剂FC处理SB对其根相对生长量的影响

Fig.1 Effects of FC on the relative root growth (RRG) of SB under 50 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Al stress

延长,SB 的 RRG 呈现出先上升而后下降的趋势,在 FC 处理 4 h 后,与对照相比,SB 的 RRG 最大,说明 FC 可以缓解铝胁迫对 SB 根生长的抑制作用;在处理 8 h 后 FC 的作用效果减弱,此时不同浓度的 FC 处理效果没有显著差异。由于铝胁迫处理 8 h 后对 SB 根生长的抑制作用显著,而铝胁迫下添加 $1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ FC 处理 8 h 后缓解作用也较显著。故在后续实验中在 $50 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 铝胁迫下 FC 的使用浓度为 $1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$,处理时间为 8 h。

2.2 FC 对铝胁迫条件下 SB 根尖质膜 H^{+} -ATPase 与 14-3-3 蛋白互作及其活性的影响

如图 2A 所示,结果表明 SB 经 $50 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 铝胁迫处理 8 h 后与对照(CK)相比,质膜 H^{+} -ATPase 的磷酸化水平及其结合的 14-3-3 蛋白量都显著下降; $1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ FC 单独处理 SB 根 8 h 后与 CK 相比质膜 H^{+} -ATPase 的磷酸化水平及与之结合的 14-3-3 蛋白量显著增加(大约 1 倍);在铝胁迫处理同时添加 FC (Al + FC) 处理,SB 根尖质膜 H^{+} -ATPase 的磷酸化水平及与之结合的 14-3-3 蛋白量恢复至比对照(CK)更高的水平。分析 $50 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 铝胁迫下添加 $1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ FC 处理 SB 根 8 h 后根尖质膜 H^{+} -ATPase 的活性(图 2B),结果表明与 CK 相比铝胁迫单独处理使 SB 根尖质膜 H^{+} -ATPase 活性下降(约 30%),FC 单独处理使 SB 根尖质膜 H^{+} -ATPase 活性显著增加(约 70%),在铝胁迫的同时添加 FC 处理使 SB 根尖质膜 H^{+} -ATPase 活性恢复至对照的 147.6%。以上结果表明 FC 能够逆转由于铝胁迫而导致质膜 H^{+} -ATPase 磷酸化水平和活性的下降作用,增加其与 14-3-3 蛋白的相互作用。



(A) Co-IP 分析 SB 根尖质膜 H^{+} -ATPase 与 14-3-3 蛋白的互作; (B) SB 根尖质膜 H^{+} -ATPase 活性。

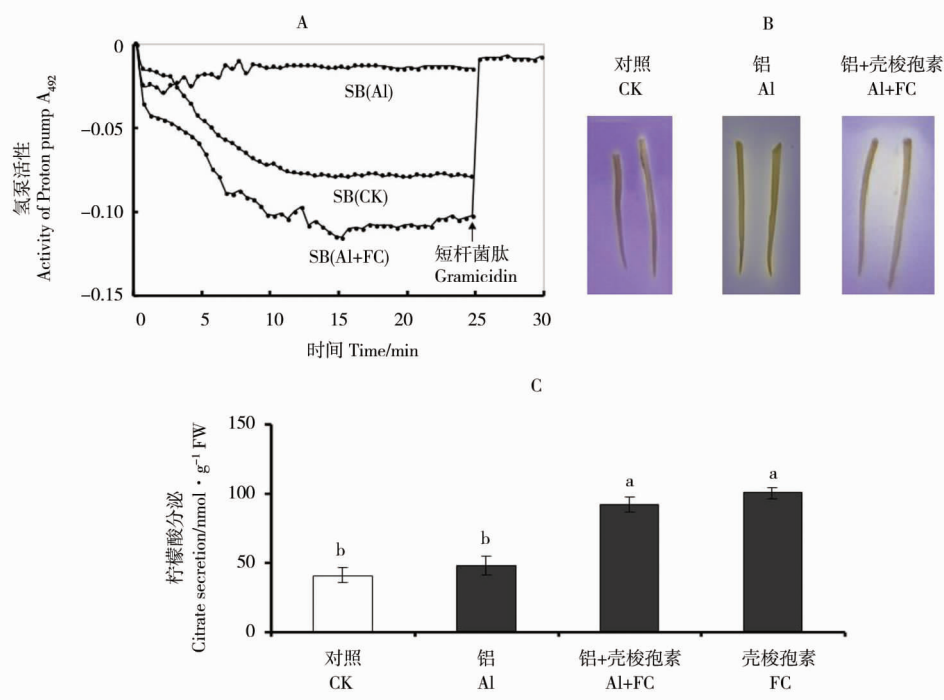
(A) Interaction of PM H^{+} -ATPase and 14-3-3 protein in SB roots with Co-IP analysis; (B) Activity of PM H^{+} -ATPase in SB roots.

图 2 质膜 H^{+} -ATPase 与 14-3-3 蛋白的相互作用及其活性的分析

Fig. 2 Analysis of interaction of PM H^{+} -ATPase and 14-3-3 protein as well as its activity

2.3 FC 对铝胁迫条件下 SB 根尖质膜 H^{+} 泵活性和柠檬酸分泌的影响

如图 3 所示,在 $50 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 铝胁迫下添加 $1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ FC 处理 SB 根 8 h 后,结果表明与对照(CK)相比,铝胁迫处理(Al)使 SB 根尖的 H^{+} 泵活性显著降低至对照的 17.6%,在 Al + FC 处理后使 SB 根尖的 H^{+} 泵活性增加至对照的 132.4% (图



(A) SB 根尖 H^{+} 泵活性; (B) SB 根尖 H^{+} 外排作用; (C) SB 根尖柠檬酸分泌。

(A) H^{+} pump activity in SB roots; (B) H^{+} efflux in SB roots; (C) citrate secretion in SB roots.

图 3 SB 根的 H^{+} 泵活性、 H^{+} 的外排及其柠檬酸分泌

Fig. 3 H^{+} pump activity, H^{+} efflux and citrate secretion in SB roots

3A),在质膜提取液中加入短杆菌肽后显著消除了 H^+ 泵的活性,这证实所提取的质膜纯度比较高。溴甲酚酞染色实验中(图3B),在铝胁迫SB根周围黄色较浅,范围也小,说明 H^+ 分泌作用较弱。Al+FC处理使SB根周围黄色较重,范围增大,说明铝胁迫下添加FC刺激了质膜 H^+ -ATPase的活性增加SB根尖 H^+ 的外排作用。SB根柠檬酸分泌量的变化趋势与其质膜 H^+ -ATPase活性的变化一致,与CK相比,Al处理使SB根尖柠檬酸分泌水平上升不显著,而单独FC处理使SB根柠檬酸分泌水平增加1.5倍,在Al+FC处理使SB根尖柠檬酸分泌水平增加1.3倍(图3C)。这些结果表明铝胁迫下FC增加了SB根尖的质膜 H^+ -ATPase活性和 H^+ 泵活性且可以提高SB根柠檬酸分泌作用。

3 讨论

本研究发现在 $50\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 铝胁迫下抑制了SB的根生长,在24 h时抑制达到50%。天然的植物激素IAA(吲哚乙酸)能缓解植物的重金属胁迫,明显促进根的生长^[17]。Takahashi等也证实IAA诱导拟南芥黄化苗上胚轴早期的伸长作用是通过IAA诱导质膜 H^+ -ATPase的磷酸化作用使其与14-3-3蛋白的结合增强、活性增加,分泌更多的质子酸化细胞质外体空间而实现^[19]。本研究发现在正常情况下,用极低浓度的FC($1\sim 2\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)处理SB,在较短时间内有促进SB根伸长的作用,增加SB根对铝的耐受性,说明早期的FC处理和IAA引起的细胞和下胚轴伸长的作用效果和机理一致,是因为FC刺激质膜 H^+ -ATPase的活性使质子大量分泌到质外体中引起细胞壁松弛,细胞伸长使SB根的相对根伸长率增加。在铝胁迫下FC在短时期内也可以拮抗铝抑制SB根的伸长作用,增加SB对铝胁迫的耐受性。随着FC处理时间的延长,SB的相对根伸长率减少,FC对根的生长表现为抑制作用,可能随着FC处理时间的延长使SB根内部细胞死亡,从而影响根的生长。这可能也是在铝胁迫下FC使用时间延长后其缓解铝抑制SB根伸长作用下降的原因。

Tomasi等^[16]研究结果说明在磷缺乏条件下添加FC处理时使白羽扇豆的羽根柠檬酸分泌量增加,是因为FC的存在增加了质膜 H^+ -ATPase与14-3-3的结合,从而增强质膜 H^+ -ATPase的活性和质子的外排作用使柠檬酸分泌增加。与这些报道相一致,本研究结果也证实FC处理SB显著增强根质膜 H^+ -ATPase与14-3-3蛋白的结合使其活性提高,增强SB根氢泵活性和质子的分泌作用,柠檬酸分泌量也相应增加。在铝胁迫下添加FC也增强SB根质膜 H^+ -ATPase的活性和柠檬酸分泌从而增强了SB根对铝胁迫的耐受性。

参考文献

[1] Matsumoto H. Cell biology of aluminum toxicity and tolerance in

- higher plants[J]. International Review of Cytology, 2000, 200: 1-46.
- [2] 尤江峰,杨振明. 铝胁迫下植物根系的有机酸分泌及其解毒机理[J]. 植物生理与分子生物学学报, 2005, 31(2): 111-118. (You J F, Yang Z M. Organic acid secretion and its detoxification mechanism in plant roots under aluminum stress[J]. Journal of Plant Physiology and Molecular Biology, 2005, 31(2): 111-118.)
- [3] Ballio A, Chain E B, de Leo P, et al. Fusaric acid: a new wilting toxin produced by *Fusarium oxysporum* Del [J]. Nature, 1964, 203: 297.
- [4] Marre E. Fusaric acid: a tool in plant physiology[J]. Annual Review of Plant Physiology, 1979, 30(1): 273-288.
- [5] 杨颖丽,杨宁,安黎哲,等. 植物质膜 H^+ -ATPase的研究进展[J]. 西北植物学报, 2006, 26(11): 2388-2396. (Yang Y L, Yang N, An L Z, et al. Research advances about plasmalemma H^+ -ATPase in plants[J]. Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica, 2006, 26(11): 2388-2396.)
- [6] Ohno T, Koyama H, Hara T. Characterization of citrate transport through the plasma membrane in a carrot mutant cell line with enhanced citrate excretion[J]. Plant and Cell Physiology, 2003, 44(2): 156-162.
- [7] Tzivion G, Avruch J. 14-3-3 proteins: Active cofactors in cellular regulation by serine/threonine phosphorylation[J]. Journal of Biological Chemistry, 2002, 277(5): 3061-3064.
- [8] Sondergaard T E, Schulz A, Palmgren M G. Energization of transport processes in plants. Roles of the plasma membrane H^+ -ATPase[J]. Plant Physiology, 2004, 136(1): 2475-2482.
- [9] Jahn T, Fuglsang A T, Olsson A, et al. The 14-3-3 protein interacts directly with the C-terminal region of the plant plasma membrane H^+ -ATPase[J]. Plant Cell, 1997, 9: 1805-1814.
- [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] Wu K, Xiao S, Chen Q, et al. Changes in the activity and transcription of antioxidant enzymes in response to Al stress in black soybeans[J]. Plant Molecular Biology Reporter, 2013, 31(1): 141-150.
- [12] Guo C L, Chen Q, Zhao X L, et al. Al-enhanced expression and interaction of 14-3-3 protein and plasma membrane H^+ -ATPase is related to Al-induced citrate secretion in an Al-resistant black soybean[J]. Plant Molecular Biology Reporter, 2013: 1-13.
- [13] Howeler R H, Cadavid L F. Screening of rice cultivars for tolerance to Al-toxicity in nutrient solutions as compared with a field screening method[J]. Agronomy Journal, 1976, 68(4): 551-555.
- [14] Rabotti G, Zocchi G. Plasma membrane-bound H^+ -ATPase and reductase activities in Fe-deficient cucumber roots[J]. Physiologia Plantarum, 1994, 90(4): 779-785.
- [15] 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.
- [16] Tomasi N, Kretschmar T, Espen L, et al. Plasma membrane H^+ -ATPase-dependent citrate exudation from cluster roots of phosphate-deficient white lupin[J]. Plant, Cell and Environment, 2009, 32(5): 465-475.
- [17] 周建民,党志,陈能场,等. 3-吲哚乙酸协同螯合剂强化植物提取重金属的研究[J]. 环境科学, 2007, 28(9): 2085-2088. (Zhou J M, Dang Z, Chen N C, et al. Enhanced phytoextraction of heavy metal contaminated soil by chelating agents and Auxin Indole-3-Acetic acid[J]. Environmental Science, 2007, 28(9): 2085-2088.)
- [18] Takahashi K, Hayashi K, Kinoshita T. Auxin activates the plasma membrane H^+ -ATPase by phosphorylation during hypocotyl elongation in *Arabidopsis* [J]. Plant Physiology, 2012, 159(2): 632-641.