

# 高温胁迫下黄嘌呤脱氢酶基因超表达对水稻幼苗的保护作用

韩瑞才<sup>1</sup> 苏如奇<sup>1</sup> 万建林<sup>2</sup> 龙启樟<sup>2</sup> 曾勇军<sup>1</sup> 潘晓华<sup>1</sup> 石庆华<sup>1</sup> 吴自明<sup>1,\*</sup>

(<sup>1</sup> 江西农业大学, 作物生理生态与遗传育种教育部重点实验室/双季稻现代化生产协同中心, 南昌 330045; <sup>2</sup> 江西省农业科学院 水稻研究所, 南昌 330200; \*通讯联系人, E-mail: wuzmjxau@163.com)

## Protective Roles of Over-expression of *OsXDH* in Rice Seedlings Under High Temperature Stress

HAN Ruicai<sup>1</sup>, SU Ruqi<sup>1</sup>, WAN Jianlin<sup>2</sup>, LONG Qizhang<sup>2</sup>, ZENG Yongjun<sup>1</sup>, PAN Xiaohua<sup>1</sup>, SHI Qinghua<sup>1</sup>, WU Ziming<sup>1,\*</sup>

(<sup>1</sup> Key Laboratory of Crop Physiology, Ecology and Genetic Breeding, Ministry of Education/Collaboration Center for Double-season Rice Modernization Production, Jiangxi Agricultural University, Nanchang 330045, China; <sup>2</sup> Rice Research Institute, Jiangxi Academy of Agricultural Sciences, Nanchang 330200, China; \*Corresponding author, E-mail: wuzmjxau@163.com)

**Abstract:** 【Objective】Xanthine dehydrogenase (XDH) is considered as a key enzyme in purine metabolism. This paper aims to reveal the physiological mechanism of XDH to relieve high temperature stress by analyzing the physiological indexes of rice seedling leaves differed in expression level of *OsXDH* under high temperature stress. 【Method】In this work, chlorophyll content, relative water content, soluble protein content, reactive oxygen metabolism, antioxidant enzyme activities, XDH activity, allantoin and allantoate contents were measured under high temperature stress in *OsXDH* over-expressed transgenic lines and wild type during seedling stage. 【Result】The results revealed that there were no significant difference between wild type and transgenic lines in all tested physiological parameters except XDH activity and ureides (allantoin and allantoate) content before high temperature stress. After high temperature stress for 5 days, compared with the transgenic lines, seedlings of wild type showed significantly decreased chlorophyll content, relative water content, soluble protein content, and antioxidant enzyme activities, but significantly increased contents of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and Malondialdehyde(MDA). As we know that chlorophyll content, relative water content, and soluble protein content all increased in transgenic lines and wild type after post-stress recovery, especially in transgenic lines. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and MDA content all decreased. For transgenic lines, these indexes were lower than those in wild type. The XDH enzyme activity and purine metabolites allantoin and allantoate contents in the wild type and transgenic lines were induced by high temperature. *OsXDH* over-expressed transgenic lines had significantly higher XDH enzyme activity and allantoin and allantoate contents compared with wild type throughout the process. 【Conclusion】XDH can effectively improve the tolerance of rice seedlings to high temperature stress by regulating the synthesis of ureides, compensating their antioxidant capacity and enhancing the activities of antioxidant enzymes.

**Key words:** rice; xanthine dehydrogenase; high temperature stress; physiological mechanism

**摘 要:** 【目的】黄嘌呤脱氢酶(xanthine dehydrogenase, XDH)是嘌呤代谢的关键酶。通过分析高温胁迫对 *OsXDH* 超表达转基因水稻株系幼苗叶片生理指标的影响, 探究 XDH 缓解水稻高温胁迫的生理机制。【方法】以 *OsXDH* 超表达转基因株系(*xdh1* 和 *xdh5*)及受体品种日本晴(WT)为材料, 研究了高温胁迫对水稻幼苗叶片叶绿素含量、相对含水量、可溶性蛋白含量、活性氧代谢、抗氧化酶活性、XDH 活性及嘌呤代谢产物尿囊素(allantoin)和尿囊酸(allantoate)含量等生理指标的影响。【结果】高温胁迫处理前, 超表达株系的叶绿素含量、相对含水量、可溶性蛋白含量、活性氧代谢及抗氧化酶活性等生理指标均与野生型无显著差异; 高温胁迫 5 d, 超表达株系的叶绿素、相对含水量、可溶性蛋白含量及抗氧化酶活性均高于野生型, 而过氧化氢(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)及丙二醛(MDA)的含量显著低于野生型; 适温恢复生长 5 d, 野生型和超表达株系的叶绿素含量、相对含水量及可溶性蛋白含量均有所提高, 超表达株系均高于野生型, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 和 MDA 的含量降低, 超表达株系均低于野生型; 受高温诱导超表达株系与野生型

收稿日期: 2017-10-27; 修改稿收到日期: 2018-03-04。

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(31560350,31760350); 江西省重点研发计划资助项目(20171ACF60018); 国家重点研发计划资助项目(2017FD0301605)。

中 XDH 酶活性及尿囊素和尿囊酸的含量均提高,且在整个处理过程中超表达转基因株系均高于野生型。【结论】XDH 通过调控酰胺类物质的合成,补偿自身的抗氧化能力并增强抗氧化酶系统的活性,从而有效提高水稻幼苗对高温胁迫的耐受能力。

关键词:水稻;黄嘌呤脱氢酶;高温胁迫;生理机制

中图分类号:Q948.112<sup>+</sup>.2;S511.01

文献标志码:A

文章编号:1001-7216(2018)04-0365-09

水稻起源于低纬度的热带地区,虽然形成了适应高温和短日照生态环境的特性,但水稻生长发育具有一定的适宜温度范围。近年来,全球气候显著变化,极端高温天气频繁出现,高温已成为威胁水稻安全生产的重要气候因子<sup>[1,2]</sup>。高温通过影响水稻的光合作用、抗逆系统、渗透调节物质含量、关键酶类活性、内源激素及部分代谢产物,阻碍水稻的生长发育及产量的形成<sup>[3]</sup>。高温发生在水稻营养生长期会抑制地上部和地下部的生长,发生叶鞘变白和失绿等症状,分蘖量降低,株高增速减缓<sup>[4,5]</sup>。抽穗扬花期高温胁迫极易导致花粉败育和子房受精受阻,严重影响结实率<sup>[6]</sup>。灌浆期则缩短灌浆时间,降低同化产物积累量,秕谷增多,粒重降低,导致产量损失及品质降低<sup>[7]</sup>。农业生产上主要通过调整栽培管理技术及利用化学调控等措施增强水稻抵御高温的能力。随着基因组学、分子生物学等基础学科的发展,发掘作物抗高温基因资源,利用常规育种及分子标记育种培育耐高温水稻品种成为目前的热点研究方向。

黄嘌呤脱氢酶(xanthine dehydrogenase, XDH)是调控嘌呤代谢的关键酶,能够催化黄嘌呤(xanthine)和次黄嘌呤(hypoxanthine)生成尿酸,后经一系列代谢反应,形成尿囊素和尿囊酸<sup>[8]</sup>。研究表明,XDH 参与调控植物对非生物胁迫的响应。近年来,有学者对拟南芥<sup>[9]</sup>、豌豆<sup>[10]</sup>、玉米<sup>[11]</sup>、葡萄<sup>[12]</sup>等多种植物 XDH 参与调控非生物胁迫的生理机制进行了研究,调控机理涉及活性氧代谢<sup>[13]</sup>、氮代谢<sup>[14]</sup>和激素代谢<sup>[15]</sup>等多项代谢进程。然而,关于水稻 XDH 耐热性的研究较少。本研究以 *OsXDH* 超表达转基因株系及受体品种日本晴(*Oryza sativa* L.)为材料,研究高温胁迫对叶绿素含量、相对含水量、可溶性蛋白含量、活性氧代谢、抗氧化酶活性、XDH 酶活性及酰胺类物质含量等生理指标的影响,探索 XDH 缓解水稻苗期高温胁迫的生理机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料种植

以来源于不同愈伤组织的 *OsXDH* 超表达转基因株系(*xdh1* 和 *xdh5*)及其受体品种日本晴(WT)为

供试材料,载体的构建和遗传转化均在中国农业科学院作物科学研究所万建民院士实验室完成。

试验在江西农业大学作物生理生态与遗传育种教育部重点实验室进行。采用土培法,在人工光照培养箱中进行。人工培养箱参数设置如下:28℃/25℃(白天/夜晚),光照周期为 12 h 光照/12 h 黑暗,光照强度 22 000 lx/0 lx(白天/夜晚),相对湿度 75%。将野生型及转基因株系浸种催芽,播种于盆钵内(盆钵内径 8 cm×高 10 cm),每盆 10 粒,重复 3 次,每个材料共种植 90 盆,每个重复 30 盆。高温处理前每盆精选 5 株生长一致的幼苗进行后续试验。水稻幼苗第 3 片叶完全展开时进行高温处理,将培养箱温度调至 42℃/42℃(白天/夜晚),胁迫处理 5 d,随后恢复正常温度生长 5 d。于高温处理前、高温处理 5 d 时及适温恢复生长 5 d,取最上部完全展开叶片测定各项生理指标。

### 1.2 测定项目与方法

#### 1.2.1 PCR 及 qPCR 检测

提取水稻基因组 DNA,利用载体中的潮霉素抗性基因(*Hyg*)对转基因植株进行 PCR 阳性鉴定,所用引物为 *Hyg*-F(5'-CTATTTCTTTGCCCTCGGAC-3')和 *Hyg*-R(5'-ATGCCTGAACTCACCGCGAC-3')。

采用 qPCR 的方法检测超表达转基因植株中 *OsXDH* 基因的表达量。按照植物总 RNA 提取试剂盒(天根)说明提取水稻叶片总 RNA,利用 NanoDrop ND2000 超微量核酸蛋白分析仪对其浓度和质量进行检测,利用 1%琼脂糖凝胶电泳检测其完整性。以提取的总 RNA 为模板,按照第一链 cDNA 合成试剂盒(天根)说明反转录合成 cDNA 第 1 链。利用染料法荧光定量试剂盒(Takara)在 CFX96 实时 PCR 系统上进行 qPCR 检测,目的基因引物为 *XDH*-qF(5'-ATGGGGTTCGCTCACCAGGGC-3')和 *XDH*-qR(5'-TCCTGTTGAAGGGCGATAGGTCGG-3'),内参引物为 *Ubi*-qF(5'-GCTCCGTGGCGGTATCAT-3')和 *Ubi*-qR(5'-CGGCAGTTGACAGCCC TAG-3')。

#### 1.2.2 叶绿素、相对含水量及可溶性蛋白含量测定

用 80%丙酮溶液提取叶绿素,采用分光光度法进行测定<sup>[16]</sup>;叶片相对含水量的测定按照张志良<sup>[17]</sup>的方法进行;用 50 mmol/L 磷酸缓冲液(pH=7.0)提取可溶性蛋白,利用考马斯亮蓝比色法进行测定<sup>[18]</sup>。

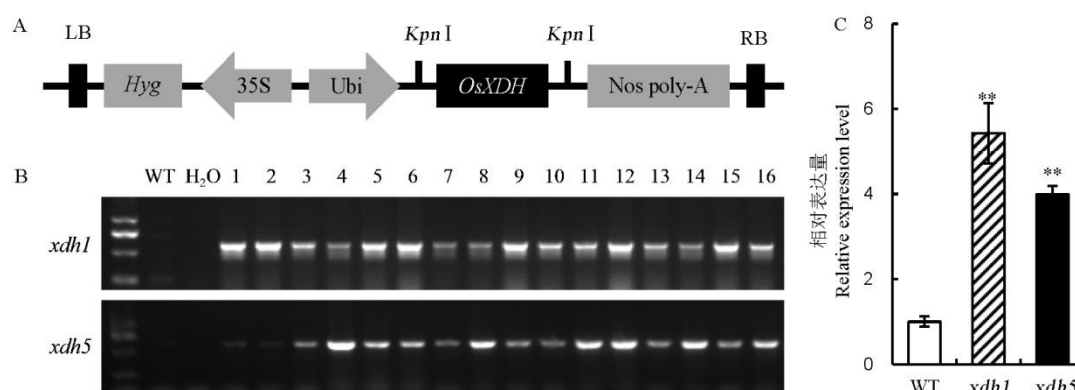


图1 *OsXDH* 超表达载体的构建、转基因植株的鉴定和目的基因表达量检测  
**Fig. 1. Construction of *OsXDH* over-expression vector, PCR analysis of *OsXDH* gene in  $T_2$  transgenic plants and expression analysis of *OsXDH* in over-expressed lines.**

### 1.2.3 $H_2O_2$ 和 MDA 含量的测定

按 Lin 等<sup>[19]</sup>的方法测定  $H_2O_2$  含量; MDA 含量采用硫代巴比妥酸比色法<sup>[17]</sup>进行测定。

### 1.2.4 抗氧化酶活性的测定

超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化物酶(POD)及过氧化氢酶(CAT)活性的测定均采用李合生等<sup>[18]</sup>的方法进行。

### 1.2.5 XDH 酶活性的测定

XDH 酶活性的测定参照 Sagi 等<sup>[20]</sup>的方法。可溶性蛋白浓度采用考马斯亮蓝比色法进行测定,而后进行非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳,上样量均为 50 $\mu$ g。以次黄嘌呤为底物、氮蓝四唑为显色剂将凝胶染色成像。利用灰度分析软件 ImageJ2x 计算 XDH 酶的相对活性。

### 1.2.6 尿囊酸和尿囊素的测定

用 80%乙醇提取尿囊酸和尿囊素,并参照 Sagi 等<sup>[20]</sup>的方法进行测定。

## 1.3 统计分析

试验数据利用 Microsoft Excel 2007 求得平均值、标准误差及作图,利用 SPSS 进行统计分析,用最小显著极差法(LSD)进行处理间显著性检验,显著水平设定为显著( $P<0.05$ )与极显著( $P<0.01$ )。

## 2 结果与分析

### 2.1 *OsXDH* 超表达转基因株系的获得和目的基因的表达分析

用 RT-PCR 扩增 *OsXDH* 基因完整编码阅读框,

经测序与 NCBI 网站上公布的基因序列完全一致。

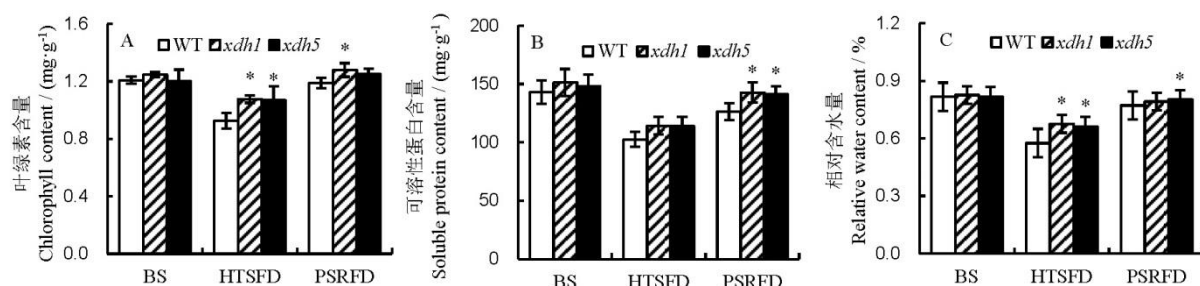
采用 In-fusion 技术将目的基因片段连入 pCUbi1390 载体,获得 *OsXDH* 超表达载体(图 1-A)。后经遗传转化及  $T_0$ ~ $T_2$  代 PCR 阳性验证,获得纯合的超表达转基因株系(图 1-B, C)。

### 2.2 高温胁迫对 *OsXDH* 超表达株系相对含水量、叶绿素含量和可溶性蛋白含量的影响

高温通过影响类囊体的物理化学性质和结构组织,导致细胞组分叶绿体的降解,进而影响叶片的光合作用<sup>[21]</sup>。由图 2-A 可知,在高温胁迫处理前,超表达株系叶片的叶绿素含量与野生型无显著差异;高温胁迫使两者的叶绿素含量降低,超表达株系显著高于野生型;恢复适温后,两者叶片中的叶绿素含量回升,过表达株系高于野生型且 *xdh1* 仍处于显著水平。

可溶性蛋白是重要的渗透调节物质和营养物质,能提高细胞的保水能力,对细胞的生命物质及生物膜起保护作用<sup>[22]</sup>。由图 2-B 可知,适温条件下,超表达株系叶片的可溶性蛋白含量与野生型无显著差异;高温胁迫降低了两者叶片中的可溶性蛋白含量,过表达株系高于野生型但差异不显著;当恢复适温时,两者的可溶性蛋白含量均升高且过表达株系显著高于野生型。

温度升高时,叶片的蒸腾作用加强,根系吸水能力降低,造成生理性缺水。由图 2-C 可知,适温时超表达株系的相对含水量与野生型无显著差异;高温降低了两者的相对含水量,超表达株系的相对含水量显著高于野生型;恢复适温时两者的相对含

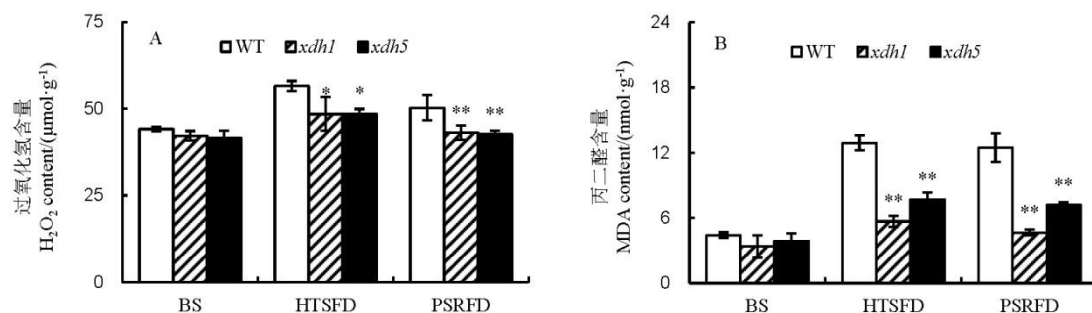


A—叶绿素含量; B—可溶性蛋白含量; C—相对含水量。BS 为高温处理前, HTSFD 为高温处理 5 d, PSRFD 为高温处理后适温恢复生长 5 d。WT 为野生型, *xdh1* 为 *OsXDH* 超表达株系 1, *xdh5* 为 *OsXDH* 超表达株系 5。数据用平均数±标准差表示(n=3), \*表示在 0.05 水平上差异显著(LSD)。

A, Chlorophyll content; B, Soluble protein content; C, Relative water content. BS, Before high temperature stress; HTSFD, High temperature stress for 5 days; PSRFD, Post-stress recovery for 5 days. WT, Wild type; *xdh1*, *OsXDH* over-expressed transgenic line 1; *xdh5*, *OsXDH* over-expressed transgenic line 5. Values are shown as mean±SD (n=3). \*, Significant difference at P<0.05 level by LSD.

图 2 高温胁迫对水稻叶片叶绿素含量、可溶性蛋白含量和相对含水量的影响

Fig. 2. Effects of high temperature stress on chlorophyll content, soluble protein content and relative water content in rice leaves.



A—过氧化氢含量; B—丙二醛含量。BS 为高温处理前; HTSFD 为高温处理 5 d; PSRFD 为适温恢复生长 5 d。WT 为野生型; *xdh1* 为 *OsXDH* 超表达株系 1; *xdh5* 为 *OsXDH* 超表达株系 5。数据用平均数±标准差表示(n=3)。\*和\*\*分别表示在 0.05 和 0.01 水平上显著差异(LSD)。

A, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> content; B, MDA content. BS, Before high temperature stress; HTSFD, High temperature stress for 5 days; PSRFD, Post-stress recovery for 5 days. WT, Wild type; *xdh1*, *OsXDH* over-expressed transgenic line 1; *xdh5*, *OsXDH* over-expressed transgenic line 5. Values are shown as mean±SD (n=3). \* and \*\* Significant difference at P<0.05 and P<0.01 levels by LSD, respectively.

图 3 高温胁迫对水稻叶片过氧化氢含量和丙二醛含量的影响

Fig. 3. Effects of high temperature stress on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and Malondialdehyde(MDA) content in rice leaves.

水量提高, 过表达株系高于野生型且 *xdh5* 仍处于显著水平。

### 2.3 高温胁迫对 *OsXDH* 超表达株系 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 和 MDA 含量的影响

高温胁迫使植物体内产生过多的活性氧自由基(reactive oxygen species, ROS), 促进膜脂过氧化产生 MDA, 抑制保护酶活性并降低抗氧化物含量, 加剧细胞损伤。由图 3 可知, 适温时 *OsXDH* 超表达株系和野生型叶片中的 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 和 MDA 的含量无显著差异; 高温胁迫 5 d 后, 野生型 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 和 MDA 的含量显著增加, 过表达株系增量较小, 两者分别呈显著和极显著差异; 恢复适温后, 超表达株系及野生型的 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 和 MDA 含量均降低, 野生型仍极显著高于超表达株系。

### 2.4 高温胁迫对 *OsXDH* 超表达株系抗氧化酶活性的影响

SOD 可降低超氧阴离子和过氧化氢对植物自

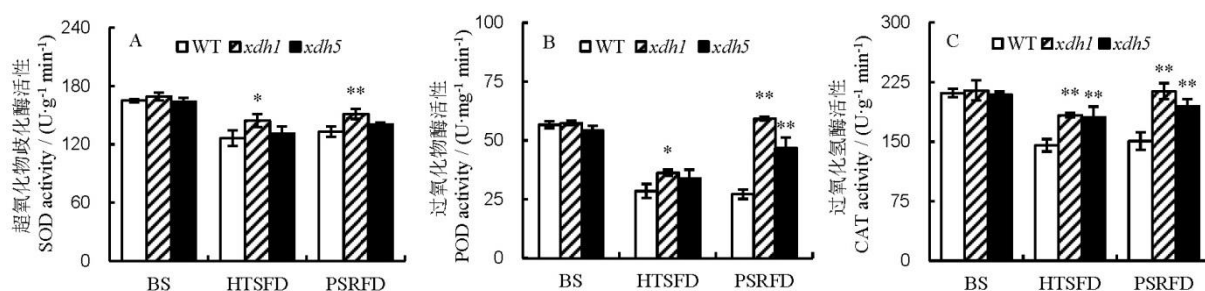
身膜系统的损伤。由图 4-A 可知, 高温胁迫处理前, 超表达株系与野生型中的 SOD 活性无显著差异; 高温胁迫 5 d, *xdh1* 显著高于野生型; 适温恢复 5 d 后, 超表达株系 *xdh1* 的 SOD 活性极显著高于野生型。

由图 4-B 可知, 高温胁迫处理前, 超表达株系与野生型中的 POD 活性无显著差异; 高温胁迫 5 d, 超表达株系 *xdh1* 显著高于野生型; 适温恢复 5 d 后, 超表达株系 POD 活性均极显著高于野生型。

如图 4-C 所示, 适温时超表达株系与野生型中的 CAT 无显著差异; 高温胁迫 5 d, 两者的 CAT 活性均降低且超表达株系极显著高于野生型; 适温恢复 5 d, 超表达株系与野生型间的差距持续增加, 两者仍存在极显著差异。

### 2.5 高温胁迫对 *OsXDH* 超表达株系 XDH 酶活性的影响

随着对 *OsXDH* 基因表达水平的调控及受高温

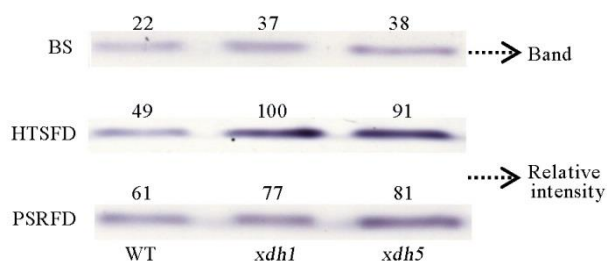


A—超氧化物歧化酶活性; B—过氧化物酶活性; C—过氧化氢酶活性。BS 为高温处理前; HTSFD 为高温处理 5 d; PSRFD 为适温恢复生长 5 d。WT 为野生型; *xdh1* 为 *OsXDH* 超表达株系 1; *xdh5* 为 *OsXDH* 超表达株系 5。数据用平均数±标准差表示( $n=3$ )。\*, \*\*分别表示在 0.05 和 0.01 水平上显著差异(LSD)。

A, SOD activity; B, POD activity; C, CAT activity. BS, Before high temperature stress; HTSFD, High temperature stress for 5 days; PSRFD, Post-stress recovery for 5 days. WT, Wild type; *xdh1*, *OsXDH* over-expressed transgenic line 1; *xdh5*, *OsXDH* over-expressed transgenic line 5. Values are shown as mean  $\pm$  SD ( $n=3$ ). \* and \*\*, Significant difference at  $P<0.05$  and  $P<0.01$  level by LSD, respectively.

图 4 高温胁迫对水稻叶片超氧化物歧化酶、过氧化物酶和过氧化氢酶活性的影响

Fig. 4. Effects of high temperature stress on activities of superoxide dismutase(SOD), peroxidase(POD) and catalase(CAT) in rice leaves.



BS 为高温处理前; HTSFD 为高温处理 5 d; PSRFD 为适温恢复生长 5 d。WT 为野生型; *xdh1* 为 *OsXDH* 超表达株系 1; *xdh5* 为 *OsXDH* 超表达株系 5。每条通道可溶性蛋白的上样量均为 50 $\mu$ g。以次黄嘌呤作为底物, 条带亮度为 XDH 酶相对活性。用软件 ImageJ2x 分析条带亮度, 显示酶活相对值。

BS, Before high temperature stress; HTSFD, High temperature stress for 5 days; PSRFD, Post-stress recovery for 5 days. WT, Wild type; *xdh1*, *OsXDH* over-expressed transgenic line 1; *xdh5*, *OsXDH* over-expressed transgenic line 5. Each lane in the gel was loaded with equal content soluble protein. XDH activity was detected in gel with hypoxanthine as substrate. Numbers above the lanes indicate relative intensity obtained by scanning the formazan bands with a computing laser densitometer using ImageJ2x software.

图 5 高温胁迫对水稻叶片黄嘌呤脱氢酶活性的影响

Fig. 5. Effects of high temperature stress on xanthine dehydrogenase(XDH) activity in rice leaves.

胁迫的诱导, 超表达转基因株系中的 XDH 酶活性也发生了相应的变化(图 5)。高温胁迫处理前, 超表达株系和野生型 XDH 酶活性存在明显的差异, 超表达株系高于野生型; 高温胁迫 5 d, 超表达株系和野生型 XDH 酶活性均明显提高, 超表达株系的升幅高于野生型; 适温恢复生长 5 d 后, 超表达株系的酶活性降低, 而野生型株系仍持续升高, 且恢复生长后的 XDH 酶活性仍高于高温胁迫处理前;

在整个处理过程中, *OsXDH* 超表达株系的 XDH 酶活性始终高于野生型。

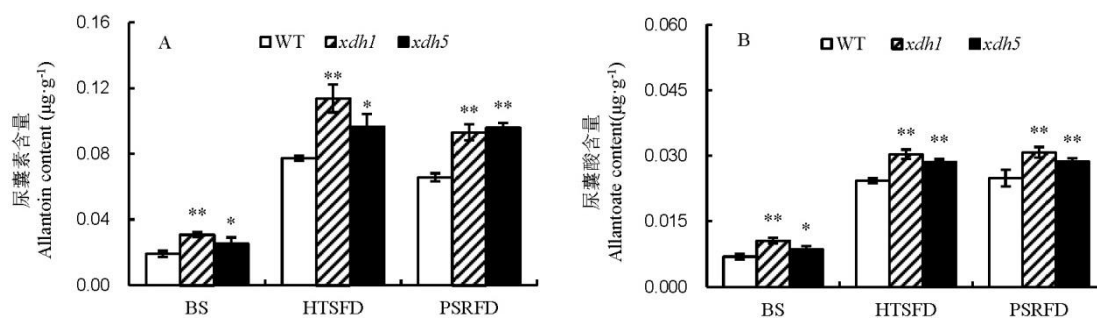
## 2.6 高温胁迫对 *OsXDH* 超表达株系嘌呤代谢产物尿囊素和尿囊酸含量的影响

由图 6 可知, 高温胁迫处理前, 野生型和超表达株系的尿囊素和尿囊酸含量均较低且超表达株系显著高于野生型; 高温胁迫 5 d 后, 野生型和超表达株系的尿囊素和尿囊酸含量均显著上升且两者间的差异进一步扩大; 适温恢复生长 5 d 后, 野生型和超表达株系的尿囊素和尿囊酸的含量均降低且超表达株系仍显著高于野生型。

## 3 讨论

温度是影响水稻生长的重要环境因子, 温度过高或过低均不利于水稻的生长。叶绿素是光合作用中能量转化的物质基础, 其含量是反映作物衰老状况的一个重要指标, 对高温适应性强的水稻品种的叶绿素含量的下降幅度小于适应差的品种<sup>[23]</sup>。可溶性蛋白容易受到逆境胁迫因子的影响, 是一种重要的渗透调节物质, 其含量可以作为植物抗逆性的指标<sup>[24]</sup>。水分是植物生存的先决条件, 高温造成的生理性缺水严重影响植物的正常生长。本研究表明高温胁迫及适温恢复后 *OsXDH* 超表达转基因株系能够保持较多的渗透调节物质, 细胞具有较强的保水性, 能够维持膜结构及功能的相对稳定, 减轻高温对细胞组分的损伤, 提高水稻对高温逆境的耐受能力。

根据生物自由基伤害学说<sup>[25]</sup>, 外界逆境条件下



A—尿囊素含量; B—尿囊酸含量。BS 为高温处理前, HTSFD 为高温处理 5 d, PSRFD 为适温恢复生长 5 d。WT 为野生型, *xdh1* 为 *OsXDH* 超表达株系 1, *xdh5* 为 *OsXDH* 超表达株系 5。数据用平均数±标准差表示( $n=3$ )。\*, \*\*分别表示在 0.05 和 0.01 水平上差异显著(LSD)。

A, Allantoin content. B, Allantoate content. BS, Before high temperature stress; HTSFD, High temperature stress for 5 days; PSRFD, Post-stress recovery for 5 days. WT, Wild type; *xdh1*, *OsXDH* over-expressed transgenic line 1; *xdh5*, *OsXDH* over-expressed transgenic line 5. Values are shown as mean±SD ( $n=3$ ).

\*, and \*\*, Significant difference at  $P < 0.05$  and  $P < 0.01$  levels by LSD, respectively.

图 6 高温胁迫对水稻叶片尿囊素和尿囊酸含量的影响

Fig. 6. Effects of high temperature stress on allantoin and allantoate contents in rice leaves.

造成的伤害就是细胞内 ROS 的产生与清除的不平衡所致,从而产生膜脂过氧化作用或膜脂脱脂化作用,形成丙二醛(MDA)<sup>[26]</sup>。本研究发现受高温胁迫影响,  $\text{H}_2\text{O}_2$  含量增加,过多的活性氧加剧了膜脂过氧化。与野生型相比,高温下超表达株系由于积累的 MDA 含量较少,能够更好地维持膜的结构及功能,保证水稻幼苗正常的生理功能。同时  $\text{H}_2\text{O}_2$  作为重要的抗性诱导因子,能够触发植物细胞启动自我保护机制,产生过氧化保护酶来清除体内的 ROS,减少它们对膜脂的损伤,保持细胞正常的新陈代谢活动<sup>[27]</sup>。当遭遇严重胁迫时,体内自由基含量增加,活性氧消除系统活性下降,植物自由基的“产生-消除”平衡受到破坏,进而损害植物细胞和组织<sup>[28,29]</sup>。本研究表明高温胁迫及适温恢复后 *OsXDH* 过表达株系保持了较高的抗氧化能力,减轻了  $\text{H}_2\text{O}_2$  的积累和膜脂过氧化程度。

研究表明, *XDH* 基因沉默引起嘌呤代谢水平改变,产生嘌呤代谢产物的缺陷可导致植株生长延缓或其他不利表型的出现,而不是由于嘌呤本身的累积<sup>[30]</sup>。反之,若通过提高水稻 *OsXDH* 基因的表达水平来增强 *XDH* 的酶活性,促进嘌呤代谢下游产物的产生,是否有利于水稻植株的生长? 本研究表明,正常生长条件下,虽然 *OsXDH* 超表达株系和野生型苗期的 *XDH* 酶活性及其下游代谢产物的含量存在显著差异,但并未在叶绿素含量、相对含水量、可溶性蛋白含量及氧化还原系统等生理指标上有所表现,但当处于高温环境时,超表达株系与野生型的各生理指标呈现显著差异。Brychkova 等<sup>[31]</sup>和 Watanabe 等<sup>[32]</sup>在研究拟南芥 *AtXDH1* 基因的作用时也发现,在正常生长条件下野生型和 *AtXDH1*

干扰株系在表型及生理指标上均无明显差异;相较于野生型,暗胁迫和干旱胁迫加剧了干扰株系细胞的死亡和叶片的损伤。由此我们可知正常生长条件下野生型水稻幼苗中的嘌呤代谢产物可满足自身的需求,代谢产物的过多积累对幼苗的生长无明显作用;当受到高温胁迫时, *XDH* 酶活性的提高及嘌呤产物的积累可缓解高温胁迫对水稻幼苗的损伤。

另有研究指出,嘌呤代谢的下游产物酰胺类物质是一种有效的活性氧清除剂<sup>[33,34]</sup>,增加尿囊素和尿囊酸含量,能抵偿 ROS 伤害和减少幼苗死亡<sup>[35]</sup>。水稻幼苗处于高温环境时,会造成活性氧自由基的过度积累和 *XDH* 酶活性上调以及嘌呤代谢下游产物积累,而此时超表达株系表现出了较强的抗氧化及耐高温的能力。说明随着氧化还原系统平衡的打破, *XDH* 酶活性的上调以及酰胺类物质的产生降低了活性氧自由基的积累,缓解了高温对膜系统的损伤。同时有研究表明,高温胁迫下水稻叶片中的抗氧化酶 POD、SOD 及 CAT 活性升高,但随着胁迫时间的延长则活性下降<sup>[36]</sup>。高温下 *OsXDH* 超表达株系具有较高的抗氧化酶活性,说明在应对严重高温胁迫的调节过程中 *XDH* 酶活性的提高延缓了氧化保护酶类活性的降低。联系嘌呤代谢产物具有清除活性氧的作用,说明通过增强 *XDH* 酶活性,提高嘌呤代谢水平,适当补偿自身的抗氧化能力,缓解高温胁迫对抗氧化酶系统的损伤,降低活性氧积累和膜脂的过氧化程度,是 *OsXDH* 基因超表达增强水稻苗期耐受高温胁迫的原因之一。

前人研究指出, *XDH* 除参与调控活性氧代谢外,还与嘌呤代谢、氮代谢和激素代谢等过程相关。嘌呤代谢是氮代谢的组成部分,调控嘌呤代谢可缓



解非生物胁迫的侵扰<sup>[37]</sup>。Brychkova 等<sup>[31]</sup>研究表明, 拟南芥中 XDH 可通过调节氮代谢和活性氧代谢来缓解暗胁迫带来的损伤。XDH 与 CTK<sup>[38]</sup>、ABA<sup>[39-41]</sup> 及 IAA<sup>[42]</sup> 等植物激素的新陈代谢有关, 参与应对不良环境的调控过程。本研究从活性氧调控方面对 XDH 缓解水稻苗期高温胁迫的生理机制进行相关研究, 缺乏对调控 *OsXDH* 基因表达信号途径的深入研究, 这也将成为本实验室未来研究的主要方向。

## 4 结论

*OsXDH* 超表达水稻株系在高温胁迫和恢复生长后其耐高温的生理特性明显优于野生型。这主要是因为 *OsXDH* 基因的超量表达增强了水稻幼苗 XDH 酶的活性, 提高了嘌呤代谢产物尿囊素和尿囊酸的含量, 适当补偿自身的抗氧化能力, 同时缓解高温胁迫对抗氧化酶系统的损伤, 降低活性氧自由基的积累, 减轻对膜系统的损伤, 提高叶片的叶绿素含量、相对含水量及可溶性蛋白含量。说明 *OsXDH* 表达水平的提高能够增强水稻抵御高温胁迫的能力。

谢辞: 感谢中国农业科学院作物科学研究所万建民院士实验室为本研究提供载体构建及水稻遗传转化平台!

## 参考文献:

- [1] Challinor A J, Ewert F, Arnold S, Simelton E, Fraser E. Crops and climate change: Progress, trends, and challenges in simulating impacts and informing adaptation. *J Exp Bot*, 2009, 60(10): 2775-2789.
- [2] Maestri E, Klueva N, Perrotta C, Gulli M, Nguyen H T, Marmiroli N. Molecular genetics of heat tolerance and heat shock proteins in cereals. *Plant Mol Biol*, 2002, 48(5-6): 667-681.
- [3] 段骅, 杨建昌. 高温对水稻的影响及其机制的研究进展. *中国水稻科学*, 2012, 26(4): 393-400.  
Duan Y, Yang J C. Research advances in the effect of high temperature on rice and its mechanism. *Chin J Rice Sci*, 2012, 26(4): 393-400. (in Chinese with English abstract)
- [4] 曹云英, 赵华. 高温胁迫下油菜素内酯对水稻幼苗的保护作用. *中国水稻科学*, 2007, 21(5): 525-529.  
Cao Y Y, Zhao H. Protective Roles of brassinolide in rice seedlings under heat stress. *Chin J Rice Sci*, 2007, 21(5): 525-529. (in Chinese with English abstract)
- [5] 周伟辉, 薛大伟, 张国平. 高温胁迫下水稻叶片的蛋白响应及其基因型和生育期差异. *作物学报*, 2011, 37(5): 820-831.  
Zhou W Hui, Xue D W, Zhang G P. Protein response of rice leaves to high temperature stress and its difference of genotypes at different growth stage. *Acta Agron Sin*, 2011, 37(5): 820-831. (in Chinese with English abstract)
- [6] 曹云英, 段骅, 杨立年, 王志琴, 周少川, 杨建昌. 减数分裂期高温胁迫对耐热性不同水稻品种产量的影响及其生理原因. *作物学报*, 2008, 34(12): 2134-2142.  
Cao Y Y, Duan H, Yang L N, Wang Z Q, Zhou S C, Yang J C. Effect of heat-stress during meiosis on grain yield of rice cultivars differing in heat-tolerance and its physiological mechanism. *Acta Agron Sin*, 2008, 34(12): 2134-2142. (in Chinese with English abstract)
- [7] 张桂莲, 张顺堂, 王力, 肖应辉, 唐文帮, 陈光辉, 陈立云. 抽穗结实期不同时段高温对稻米品质的影响. *中国农业科学*, 2013, 46(14): 2869-2879.  
Zhang G L, Zhang S T, Wang L, Xiao Y H, Tang W B, Chen G H, Chen L Y. Effects of high temperature at different times during the heading and filling periods on rice quality. *Sci Agric Sin*, 2013, 46(14): 2869-2879. (in Chinese with English abstract)
- [8] Werner A K, Witte C P. The biochemistry of nitrogen mobilization: purine ring catabolism. *Trends Plant Sci*, 2011, 16(7): 381-387.
- [9] Yesbergenova Z, Yang G H, Oron E, Soffer D, Fluhr R, Sagi M. The plant Mo-hydroxylases aldehyde oxidase and xanthine dehydrogenase have distinct reactive oxygen species signatures and are induced by drought and abscisic acid. *Plant J*, 2005, 42(6): 862-876.
- [10] Zdunek-Zastocka E, Lips H S. Is xanthine dehydrogenase involved in response of pea plants (*Pisum sativum* L.) to salinity or ammonium treatment? *Acta Physiol Plant*, 2003, 25(4): 395-401.
- [11] Barabás N K, Omarov R T, Erdei L, Lips S H. Distribution of the Mo-enzymes aldehyde oxidase, xanthine dehydrogenase and nitrate reductase in maize (*Zea mays* L.) nodal roots as affected by nitrogen and salinity. *Plant Sci*, 2000, 155(1): 49-58.
- [12] You S H, Zhu B, Wang F B, Han H J, Sun M, Zhu H W, Peng R H, Yao Q H. A *Vitis vinifera* xanthine dehydrogenase gene, *VvXDH*, enhances salinity tolerance in transgenic *Arabidopsis*. *Plant Biotechnol Rep*, 2017, 11(4): 247.
- [13] Hofmann N R. Opposing functions for plant xanthine dehydrogenase in response to powdery mildew infection: production and scavenging of reactive oxygen species. *Plant Cell*, 2016, 28(5): 1001.
- [14] 孙学成, 胡承孝. 高等植物含钼酶与钼营养. *植物生理学通讯*, 2005, 6(3): 395-399.  
Sun X C, Hu C X. Molybdoenzymes and Molybdenum

- Nutrition in Higher Plants. *Plant Physiol Commun*, 2005, 6(3): 395-399. (in Chinese with English abstract)
- [15] Taylor N J, Cowan A K. Xanthine dehydrogenase and aldehyde oxidase impact plant hormone homeostasis and affect fruit size in 'Hass' avocado. *J Plant Res*, 2004, 117(2): 121-130.
- [16] Lichtenthaler H K, Wellbuen A R. Determinations of total carotenoids and chlorophylls a and b leaf extracts in different solvents. *Biochem Soc Trans*, 1983, 11(5): 591-592.
- [17] 张志良. 植物生理学实验指导. 2版. 北京: 高等教育出版社, 1991: 183-184.  
Zhang Z L. Experimental Guidance on Plant Physiology. 2nd ed. Beijing: Higher Education Press, 1991: 183-184. (in Chinese)
- [18] 李合生, 孙群, 赵世杰, 章文华. 植物生理生化实验原理与技术. 北京: 高等教育出版社, 2000.  
Li H S, Sun Q, Zhao S J, Zhang W H. The Experiment Principle and Technique on Plant Physiology and Biochemistry. Beijing: Higher Education Press, 2000. (in Chinese)
- [19] Lin C C, Kao C H. Absciscic acid induced changes in cell wall peroxidase activity and hydrogen peroxide level in roots of rice seedlings. *Plant Sci*, 2001, 160: 323-329.
- [20] Sagi M, Omarov R T, Lips S H. The Mo-hydroxylases xanthine dehydrogenase and aldehyde oxidase in ryegrass as affected by nitrogen and salinity. *Plant Sci*, 1998, 135(2): 125-135.
- [21] 张桂莲, 陈立云, 雷东阳, 张顺堂. 水稻耐热性研究进展. 杂交水稻, 2005, 20(1): 1-5.  
Zhang G L, Chen L Y, Lei D Y, Zhang S T. Research progress on heat resistance of rice. *Hybrid Rice*, 2005, 20(1): 1-5. (in Chinese)
- [22] 李轶冰, 杨顺强, 任广鑫, 冯永忠, 张强, 李鹏. 低温处理下不同禾本科牧草的生理变化及其抗寒性比较. 生态学报, 2009, 29(3): 1341-1347.  
Li T B, Yang S Q, Ren G X, Feng Y Z, Zhang Q, Li P. Changes analysis in physiological properties of several graminaceous grass species and cold-resistance comparison on under cold stress. *Acta Ecol Sin*, 2009, 29(3): 1341-1347. (in Chinese with English abstract)
- [23] 张顺堂, 张桂莲, 陈立云, 肖应辉. 高温胁迫对水稻剑叶净光合速率和叶绿素荧光参数的影响. 中国水稻科学, 2011, 25(3): 335-338.  
Zhang S T, Zhang G L, Chen L Y, Xiao Y H. Effects of high temperature stress on net photosynthetic rate and chlorophyll fluorescence parameters of flag leaf in rice. *Chin J Rice Sci*, 2011, 25(3): 335-338. (in Chinese with English abstract)
- [24] Rang Z W, Jagadish S V K, Zhou Q M, Craufurd P Q, Heuer S. Effect of high temperature and water stress on pollen germination and spikelet fertility in rice. *Environ Exp Bot*, 2011, 70(1): 60-65.
- [25] Mehdy M C. Active oxygen species in plant defense against pathogens. *Plant Physiol*, 1994, 105(2): 467-472.
- [26] Gill S S, Tuteja N. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiol Bioch*, 2010, 48(12): 909-930.
- [27] 王贺正, 马均, 李旭毅, 李艳, 张荣萍, 汪仁全. 水分胁迫对水稻结实期活性氧产生和保护系统的影响. 中国农业科学, 2007, 40(7): 1379-1387.  
Wang H Z, Ma J, Li X Y, Li Y, Zhang R P, Wang R Q. Effects of Water Stress on Active Oxygen Generation and Protection System in Rice During Grain Filling Stage. *Sci Agric Sin*, 2007, 40(7): 1379-1387. (in Chinese with English abstract)
- [28] 杨淑慎, 高俊凤. 活性氧、自由基与植物的衰老. 西北植物学报, 2001, 21(2): 215-220.  
Yang S S, Gao J F. Influence of active oxygen and free radicals on plant senescence. *Acta Bot Boreal*, 2001, 21(2): 215-220. (in Chinese with English abstract)
- [29] Hung K T, Kao C H. Nitric oxide counteracts the senescence of rice leaves induced by abscisic acid. *J Plant Physiol*, 2003, 160(8): 871-879.
- [30] Nakagawa A, Sakamoto S, Takahashi M, Morikawa H, Sakamoto A. The RNAi-mediated silencing of xanthine dehydrogenase impairs growth and fertility and accelerates leaf senescence in transgenic *Arabidopsis* Plants. *Plant Cell Physiol*, 2007, 48(10): 1484-1495.
- [31] Brychkova G, Alikulov Z, Fluhr R, Sagi M. A critical role for ureides in dark and senescence-induced purine remobilization is unmasked in the *Atxdh1 Arabidopsis* mutant. *Plant J*, 2008, 54(3): 496-509.
- [32] Watanabe S, Nakagawa A, Izumi S, Shimada H, Sakamoto A. RNA interference-mediated suppression of xanthine dehydrogenase reveals the role of purine metabolism in drought tolerance in *Arabidopsis*. *FEBS Lett*, 2010, 584(6): 1181-1186.
- [33] Pastori G M, del Rio L A. Natural senescence of pea leaves: an activated oxygen-mediated function for peroxisomes. *Plant Physiol*, 1997, 113(2): 411-418.
- [34] Yobi A, Wone B W, Xu W X, Alexander D C, Guo L N, Ryals J A, Oliver M J, Cushman J C. Metabolomic profiling in *Selaginella lepidophylla* at various hydration states provides new insights into the mechanistic basis of desiccation tolerance. *Mol Plant*, 2013, 6(2): 369-385.
- [35] Brychkova G, Fluhr R, Sagi M. Formation of xanthine and the use of purine metabolites as a nitrogen source in *Arabidopsis* plants. *Plant Signal & Behav*, 2008, 3(11): 999-1001.
- [36] 郭培国, 李荣华. 夜间高温胁迫对水稻叶片光合机构的影响. 植物学报, 2000, 42(7): 673-678.  
Guo P G, Li R H. Effects of high nocturnal temperature on photosynthetic organization in rice leaves. *Acta Bot*



- Sin*, 2000, 42(7): 673-678. (in Chinese with English abstract)
- [37] Ma X F, Wang W M, Bittner F, Schmidt N, Berkey R, Zhang L L, King H, Zhang Y, Feng J Y, Wen Y Q, Tan L Q, Li Y, Zhang Q, Deng Z N, Xiong X Y, Xiao S Y. Dual and opposing roles of xanthine dehydrogenase in defense-associated reactive oxygen species metabolism in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 2016, 28(5): 1108-1126.
- [38] Smith P M C, Atkins C A. Purine biosynthesis, big in cell division, even bigger in nitrogen assimilation. *Plant Physiol*, 2004, 128(3): 793-802.
- [39] Bittner F, Oreb M, Mendel R R. ABA3 is a molybdenum cofactor sulfuryase required for activation of aldehyde oxidase and xanthine dehydrogenase in *Arabidopsis thaliana*. *J Biol Chem*, 2001, 276(44): 40381-40384.
- [40] Watanabe S, Kounosu Y, Shimada H, Sakamoto A. Arabidopsis xanthine dehydrogenase mutants defective in purine degradation show a compromised protective response to drought and oxidative stress. *Plant Biotechnol*, 2014, 31(2): 173-178.
- [41] Leydecker M T, Moureaux T, Kraepiel Y, Caboche M. Molybdenum cofactor mutants, specifically impaired in xanthine dehydrogenase activity and abscisic acid biosynthesis, simultaneously overexpress nitrate reductase. *Plant Physiol*, 1995, 107(4): 1427-1431.
- [42] Taylor N, Cowan K. Plant hormone homeostasis and the control of avocado fruit size. *Plant Growth Regul*, 2001, 35(3): 247-255.