

一个水稻铜锌 SOD 酶基因在应答亚砷酸盐胁迫中的作用

窦玲玲 胡海超 马龙 柯笑楠 刘明月 练旺民 金珂 谢玲娟 刘庆坡*

(浙江农林大学 农业与食品科学学院, 杭州 311300; *通讯联系人, E-mail: liuqp@zafu.edu.cn)

Functional Analysis of a Copper/Zinc SOD Encoding Gene in Response to Arsenite Stress in Rice

DOU Lingling, HU Haichao, MA Long, KE Xiaonan, LIU Mingyue, LIAN Wangmin, JIN Ke, XIE Lingjuan, LIU Qingpo*

(School of Agriculture and Food Science, Zhejiang A & F University, Hangzhou 311300, China; *Corresponding author, E-mail: liuqp@zafu.edu.cn)

Abstract: 【Objective】*Os08g44770.1* encodes a Cu/Zn-SOD protein in rice, but its biological function in response to arsenite [As(III)] remains unclear. The results presented here would be intriguing for further investigating the molecular mechanisms of *Os08g44770.1*-mediated arsenic tolerance in rice, and also providing useful new idea for rice stress resistance breeding. 【Methods】Using wild type(WT) Nipponbare and two transgenic rice lines overexpressing *Os08g44770.1* as materials, we investigated the phenotypes of WT and transgenic plants after exposure to As(III), and further uncovered its physiological and molecular mechanisms in regulation of As(III) tolerance in rice through stress treatment, physiological index measurement, and gene expression analysis, etc. 【Result】The results showed that, compared with WT, transgenic rice plants were more sensitive to As(III) stress; Under As(III) exposure, transgenic plants showed shorter relative root elongation, lower biomass (dry weight) and chlorophyll content, as well as lower root cell membrane integrity and antioxidant abilities in leaves. Moreover, *Os08g44770.1* exhibited slightly different expression patterns but both showing expression peak at 24 h after As(III) treatment in leaves of WT and transgenic plants. 【Conclusion】Strong overexpression of *Os08g44770.1* in rice would result in its hypersensitivity to arsenite stress.

Key words: rice; Cu/Zn SOD; arsenite; transgenic; physiological mechanism; gene expression

摘 要: 【目的】水稻 *Os08g44770.1* 基因编码一个铜锌 SOD 酶, 但其在响应亚砷酸盐[As(III)]胁迫中的生物学功能未知。本研究旨在深入揭示由该基因调控水稻砷耐性改变的分子机理并为水稻抗逆育种提供理论参考。

【方法】以野生型日本晴(WT)和 2 个 *Os08g44770.1* 过表达转基因株系为试材, 通过胁迫处理、生理指标测定和基因表达分析等, 系统探究了转基因植株对 As(III)的耐受性表现, 并初步揭示了其调控水稻砷耐性的生理和分子机理。【结果】与 WT 相比, 过表达转基因株系对 As(III)更加敏感; 转基因植株在砷胁迫下的根系相对伸长量、生物量(干质量)、叶绿素含量、根系细胞质膜完整性、叶片抗氧化程度等均显著低于 WT; *Os08g44770.1* 在砷处理后的 WT 和转基因植株叶片中的表达模式略有不同, 但均表现为处理 24 h 时被显著诱导表达。【结论】过度表达 *Os08g44770.1* 基因可导致水稻的砷耐受性极显著下降。

关键词: 水稻; 铜锌 SOD; 亚砷酸盐; 转基因; 生理机理; 基因表达

中图分类号: Q786; Q945.78; S511.034

文献标识码: A

文章编号: 1001-7216(2018)05-0437-08

砷在自然界分布广泛, 对动植物和人类具有强烈毒害作用^[1]。长期以来, 由于含砷农药和化肥等的大量施用, 导致受砷污染土壤面积不断增加, 污染程度逐年加剧, 严重威胁动植物生产和人类健康。据报道, 目前全世界范围内有近 1.5 亿人正

遭受慢性砷中毒危害, 其中, 南亚和东南亚地区包括中国是受砷毒害最为严重的区域之一^[2]。水稻是世界约一半人口, 尤其东南亚国家的主要粮食作物, 但相比于其他旱作禾谷类作物, 水稻对砷的吸收与富集能力更强^[3]。因此, 水稻砷污染已成

收稿日期: 2017-12-25; 修改稿收到日期: 2018-02-01。

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(31471431); 浙江农林大学“青年拔尖人才”计划资助项目; 浙江农林大学学生科研训练项目(2013200014, 2013200037, 2013200056)。

为世界性环境与卫生问题。

环境中的砷主要以砷酸盐[As(V)]的形态进入植物体内,并在砷酸还原酶的催化下还原为亚砷酸盐[As(III)],而 As(III)再进一步被甲基化或螯合化,其产物随后被转移到液泡中或排出体外,从而达到解毒作用^[4]。目前,从水稻基因组中已经克隆到两个砷酸还原酶基因 *OsACR2;1* 和 *OsACR2;2*,其中 *OsACR2;2* 主要在根系中表达,而 *OsACR2;1* 在根系和地上部均有表达^[5]。Dhankher 等^[6]发现,拟南芥 *Atacr2* 基因敲除的突变体植株对 As(V)更加敏感。水稻中,As(V)主要通过磷转运通道蛋白被吸收,而 As(III)则主要通过水通道蛋白超家族中的类 Nod26 内在膜蛋白,如 *OsNIP2;1*、*OsNIP2;2*、*OsNIP1;1* 和 *OsNIP3;2* 等被吸收和向地上部转移^[7-9],其中 *OsNIP2;1* 在 As(III)进入和排出根部细胞过程中起主导作用^[9]。Zhao 等^[9]发现与对照相比, *Osnip2;1* 功能缺失突变体的根系对 As(III)的吸收可减少 57%。另外,As(III)可通过硅转运蛋白 *Lsi2* 向地上部转移和在籽粒中累积^[10]。研究发现,水稻 *lsi2* 突变体植株地上部的砷富集量比野生型约减少 70%^[10]。

提高水稻对砷的耐受性是解决水稻砷污染的有效途径之一。Mosa 等^[11]和 Tiwari 等^[12]在蛙卵细胞和酵母等异源体系中,分别表达水稻基因 *OsPIP2;4*、*OsPIP2;6*、*OsPIP2;7* 和 *OsNRAMP1* 后发现,这些基因编码的蛋白均可转运 As(III),而且在拟南芥中过量表达相关基因后均显著增强了转基因植株对砷的耐受性。近年来,不同研究组利用过表达和/或敲除基因功能等转基因技术发现, *OsPT4*^[13]、*OsPT8*^[14] 和 *OsHAC4*^[15] 在水稻 As(V)吸收、积累和耐受性方面发挥着重要作用。此外,过表达 *miR528* 和 *miR3979* 可显著改变水稻对 As(III)的耐受性^[16,17]。这表明 miRNA 同蛋白编码基因一样在水稻应答砷胁迫中起着重要的调控作用。

植物基因组中编码多个抗氧化酶基因,其中,超氧化物歧化酶(SOD)负责清除逆境胁迫下产生的超氧自由基,进而在植物应答逆境胁迫和衰老过程中发挥作用^[18]。水稻 *Os08g44770.1* 基因编码一个铜锌 SOD 酶,1997 年已克隆^[19]。1999 年, Kaminaka 等^[20]进一步研究发现,在光照条件下水稻铜锌 SOD 酶可对盐害胁迫做出快速响应。但该基因是否参与水稻砷胁迫应答尚不清楚。因此,本研究获得了 *Os08g44770.1* 基因的过表达转基因植株,通过分析其在正常和 As(III)处理后的表

型、生理生化指标变化及其时空表达模式等,明确了该基因在水稻应答 As(III)胁迫中的作用。这对于深入阐明水稻砷耐受性的内在分子机理具有重要意义,同时也可作为水稻抗逆育种或品种改良提供理论参考。

1 材料与方法

1.1 实验材料与处理

以粳稻品种日本晴(WT)和 *Os08g44770.1* 过表达转基因株系(OE-44770-4、OE-44770-13;日本晴为背景材料)为试材。分别选取一定数量健康饱满的种子,先用 0.5%次氯酸钠溶液消毒 15 min 后,用纯净水漂洗 3~5 次,并在蒸馏水中浸泡 24 h。然后,将浸泡好的种子转移到覆有滤纸的发芽盒中,添加适量 0.5%氯化钙溶液,置于光照培养箱中催芽。培养条件设置为 30℃光照 16 h/25℃黑暗 8 h。待苗长 4 cm 时,挑选长势一致的幼苗移植到培养器皿中进行水培[营养液配方如下:0.091 mmol/L KNO₃、0.183 mmol/L Ca(NO₃)₂、0.274 mmol/L MgSO₄、0.1 mmol/L KH₂PO₄、0.183 mmol/L (NH₄)₂SO₄、0.5 μmol/L MnCl₂、3 μmol/L H₃BO₃、0.1 μmol/L (NH₄)₆Mo₇O₂₄、0.4 μmol/L ZnSO₄、0.2 μmol/L CuSO₄、40 μmol/L NaFe(III)-EDTA 和 2 mmol/L 2-吗啉磺酸,调节 pH 至 5.5],期间每 3 d 更换一次营养液。每皿 8 株。实验设对照(CK)和 As(III)胁迫两种处理,每个处理设置 3 次重复。待苗龄 21 d 时,利用 25 μmol/L 亚砷酸钠进行胁迫处理。

1.2 转基因植株的获得及阳性检测

利用正向(5'-ATGCAAGCCATCCTCGCCGCTG-3')和反向引物(5'-CTACAACGGGGTCAGCCC AACAA-3')从日本晴基因组中扩增出 *Os08g44770.1* 基因的编码区序列(CDS)。PCR 扩增产物经 *Bam*H I 和 *Spe* I 双酶切后,连接至同样经过上述双酶切的 pCambia1300-UBI 载体上,然后采用热激法将连接产物转化到大肠杆菌 DH5α。最后,将目的基因经农杆菌介导侵染日本晴愈伤组织,经潮霉素抗性筛选后获得转基因植株。

采用十六烷基三甲基溴化铵(CTAB)法^[21]提取水稻基因组 DNA,然后利用基因特异引物(5'-GCT TCCACCTCCACGAGTTT-3' 和 5'-AGACCGGCA ACAGGATTCAATC-3')进行转基因植株的阳性检测。PCR 程序如下 94℃下预变性 5 min; 94℃下变

表 1 定量 RT-PCR 所需引物

Table 1. The real-time RT-PCR primer sequences.

| 基因名称 Gene symbol | 正向引物 Forward primer (5'-3') | 反向引物 Reverse primer (5'-3') |
|---------------------|--------------------------------|--------------------------------|
| <i>Os08g44770.1</i> | GCTTCCACCTCCACGAGTTT | GCCACCCTTCCCCAAATCAT |
| <i>β-actin</i> | TGTGGATTGCCAAGGCTGAG | ACGGCGATAACAGCTCCTC |

性 30 s, 60℃下退火 30 s, 72℃下延伸 30 s, 35 个循环; 72℃下延伸 7 min。

1.3 生理指标的测定

1.3.1 根系相对伸长量

在 As(III)处理前, 对各供试水稻幼苗的根长进行测定, 同时做好标记。在处理 6 d 时, 再次测定根长, 并根据标记计算其根系的相对伸长量。

1.3.2 生物量(干质量)

在胁迫处理 6 d 时, 将处理后的水稻幼苗放到解析液中浸泡 10 min, 将残留水分擦干后置于烘箱中先 105℃下杀青 30 min, 后 75℃下干燥 48 h。使用分析天平测定各供试植株的干质量。

1.3.3 叶绿素含量

胁迫处理 6 d 时, 称取各供试材料的叶片 0.1 g, 剪成 1 cm 大小后加入体积比为 1:1 的乙醇、丙酮混合液, 避光萃取保存 24 h。期间每隔 3~4 h 摇晃一次, 直至叶片完全失色。然后用分光光度计分别测定 663、645、470 nm 处的吸光值。

1.3.4 根尖细胞质膜的完整性

亚砷酸盐处理 6 d 后, 收获各供试材料的根系, 将其置于 0.5 mmol/L CaCl₂ 溶液(pH 4.5)中浸泡 5 min。用纯水洗涤、吸干后, 将其浸没在 4 mL 的伊文思蓝溶液[0.025%(w/v)的伊文思蓝溶于 100 μmol/L CaCl₂ 中, 调节 pH 至 5.6]中染色 1 h。用蒸馏水冲洗 15 min 后观察染色情况并拍照。

1.3.5 氯化硝基四氮唑蓝液(NBT)染色

选取 As(III)处理 6 d 后的各个材料相同部位的叶片若干($n \geq 3$), 将叶片浸没在 1 mg/mL 氯化硝基四氮唑蓝(NBT)染液中于光下染色, 直至有明显的

表型出现。然后将叶片转移至乙醇中, 70℃水浴处理直到叶片脱色至黄白色结束。脱色完成后的叶片保存于 70%酒精中, 然后放置于体式显微镜(型号为 SZX10, OLYMPUS 公司)下观察染色情况并拍照。

1.4 基因表达分析

采用 Trizol 法提取水稻叶片总 RNA, 使用 Invitrogen 反转录试剂盒(Invitrogen Superscript III first-strand synthesis system)将 RNA 反转录成 cDNA, 然后在 Bio-Rad 公司的 CFX-connect 荧光定量 PCR 仪上进行扩增, 反应体系包括 2.0 μL cDNA, 正反向引物各 1.0 μL(表 1), 12.5 μL SYBR Premix Ex Taq II 和 12.5 μL ddH₂O。PCR 程序如下: 先 95℃下预变性 5 s, 95℃下变性 5 s, 然后 60℃下复性 30 s, 40 个循环。以 *β-actin* 基因作内参, 采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法计算基因的相对表达量。

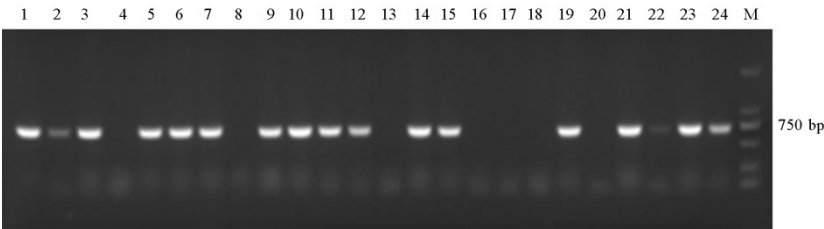
1.5 统计分析

所有数据均为 ≥ 3 次或 8 次重复的平均值 \pm 标准误。利用 SPSS 22.0 进行统计分析。采用最小显著性差异法(LSD)进行方差分析, 在 5%水平上分析不同材料及不同处理间的差异显著水平。

2 结果与分析

2.1 转基因植株的阳性检测

采用农杆菌介导法获得 13 个 *Os08g44770.1* 基因的过表达转基因株系, 随后利用基因特异引物对 T₁ 代 650 个转基因植株进行 PCR 检测, 共鉴定到 520 个阳性植株, 阳性率为 80%(图 1)。



M—DNA 标记 2000; 1—阳性对照; 2, 3, 5~7, 9~12, 14, 15, 19, 21, 23, 24 为转基因阳性植株; 4, 8, 13, 16~18, 20, 22 为转基因阴性植株。

M—DNA marker 2000; 1, Positive control; 2, 3, 5-7, 9-12, 14, 15, 19, 21, 23, 24 are transformed plants; The others are untransformed plants.

图 1 部分转基因水稻的 PCR 检测

Fig. 1. PCR analysis of transgenic rice plants carrying overexpressed *Os08g44770.1*.

2.2 *Os08g44770.1* 在各转基因株系中的表达分析

采用定量 RT-PCR 分析了 *Os08g44770.1* 基因在 WT 及各转基因株系(OE-44770)的 15 d 龄水稻幼苗叶片中的表达情况。从图 2 可以看出,在正常生长条件下,与 WT 相比,*Os08g44770.1* 在各个过表达转基因株系叶片中的表达量均显著升高(>20 倍)。综合考虑目标基因在各转基因株系中的表达水平以及收获的各株系的种子量,选择 OE-44770-4 和 OE-44770-13 株系用于下一步研究。

2.3 转基因水稻的砷耐受性分析

从图 3 可以看出,与 WT 相比,在 25 $\mu\text{mol/L}$ As(III)处理 3 d 时,OE-44770 转基因植株的叶片出现了明显的卷曲现象,而且较低叶位的叶片已经开始逐渐黄化(图 3-A)。随着 As(III)处理时间的延长(6 d),其叶片卷曲程度明显加剧,黄化叶片数量也逐渐增多,同时较高叶位的叶片也开始出现黄化(图 3-B)。这表明 *Os08g44770.1* 基因过量表达后显著增加了转基因水稻对亚砷酸盐的敏感性。

2.4 亚砷酸盐对供试材料各生理指标的影响

2.4.1 对生物量(干质量)的影响

与各供试材料的对照相比,在 As(III)处理 6 d

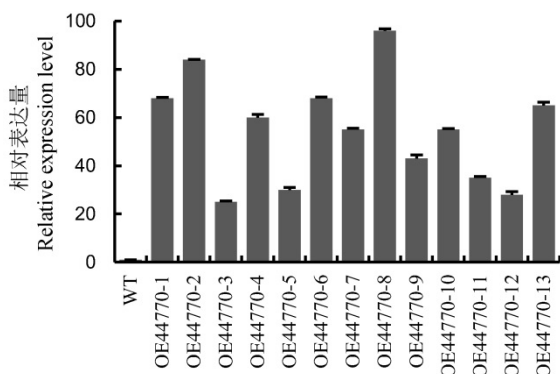


图 2 WT 和各转基因株系叶片中 *Os08g44770.1* 的表达量
Fig. 2. Expression level of *Os08g44770.1* gene in the leaves of wild type(WT) and transgenic rice lines.

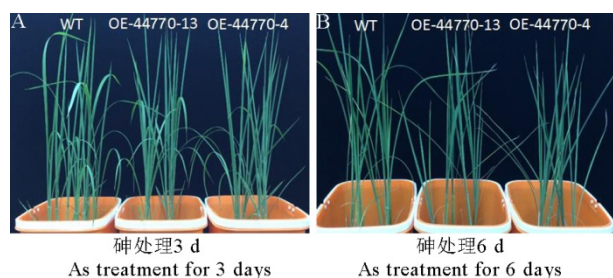


图 3 亚砷酸盐处理 3 d 和 6 d 后野生型(WT)和两个转基因株系的表型

Fig. 3. Comparison of phenotypes of WT and transgenic rice plants after As(III) treatment for 3 and 6 days.

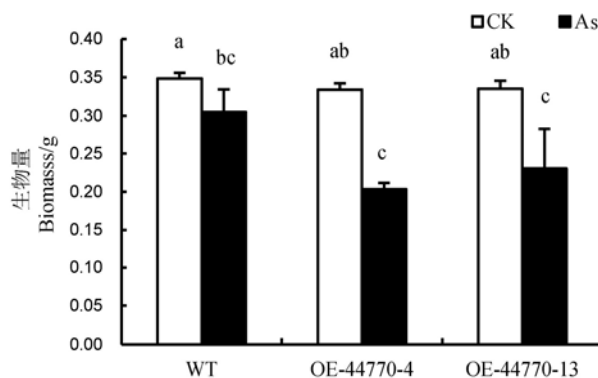
时,WT 和各转基因株系的干质量均显著下降(图 4)。OE-44770-4 和 OE-44770-13 株系的平均降幅(分别减少 39.15%和 31.21%)远大于 WT(12.53%)。

2.4.2 对根系相对伸长量的影响

从图 5 可以看出,在 25 $\mu\text{mol/L}$ 亚砷酸盐胁迫处理 6 d 时,各供试水稻根系的伸长量均受到不同程度的抑制。但是,WT 的受抑制程度(47.08%)明显小于 2 个转基因株系 OE-44770-4 和 OE-44770-13(71.75%和 65.4%)。因为砷胁迫下根系的相对伸长量是衡量水稻砷耐受性的重要指标,所以 *Os08g44770.1* 过表达后确实显著降低了转基因水稻对亚砷酸盐的耐受性。

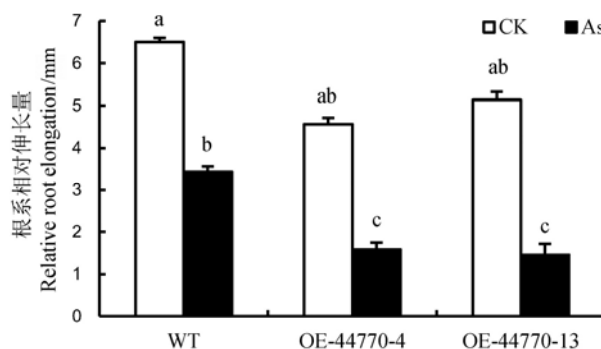
2.4.3 对叶绿素含量的影响

亚砷酸盐对植物的毒害作用主要表现为叶片



相同小写字母表示不同材料不同处理间差异未达0.05显著水平。
Common lowercase letters above the bars indicate no significant difference among treatments or materials ($P \leq 0.05$).

图 4 亚砷酸盐处理 6 d 后 WT 和各转基因株系的生物量
Fig. 4. Comparison of biomass of WT and transgenic rice plants after 6-day As(III) treatment($n=8$).



相同小写字母表示不同材料不同处理间差异未达0.05显著水平。
Common lowercase letters above the bars indicate no significant difference among treatments or materials ($P \leq 0.05$).

图 5 亚砷酸盐处理 6 d 后 WT 和各转基因株系根系相对伸长量的比较($n=8$)

Fig. 5. Comparison of relative root elongation of WT and transgenic rice plants under As(III) stress for 6 days ($n=8$).

表 2 亚硝酸盐对 WT 和各转基因材料叶绿素含量的影响

Table 2. Effects of As(III) stress on chlorophyll contents of wild type(WT) and transgenic rice plants ($n=3$).

| 处理 Treatment | 供试材料 Tested material | 叶绿素 a 含量 Chlorophyll a content / (mg·g ⁻¹) | 叶绿素 b 含量 Chlorophyll b content / (mg·g ⁻¹) | 总叶绿素含量 Chlorophyll a+b content / (mg·g ⁻¹) | 类胡萝卜素含量 Carotenoid content / (mg·g ⁻¹) | 叶绿素 a /叶绿素 b Chlorophyll a/ Chlorophyll b | 类胡萝卜素 /总叶绿素 Carotenoid/ Chlorophyll a+b |
|------------------|----------------------------|---|---|---|--|--|--|
| 对照 CK | WT | 24.25±1.16 a | 8.14±1.16 a | 32.39±1.79 a | 4.69±0.30 abc | 2.98±0.35 a | 0.14±0.02 b |
| | OE-44770-4 | 22.90±1.30 b | 6.20±1.30 ab | 29.21±2.68 ab | 4.94±0.25 ab | 3.67±0.50 a | 0.17±0.01 ab |
| | OE-44770-13 | 23.90±1.34 a | 7.27±1.34 ab | 31.20±2.44 a | 5.20±0.07 a | 3.30±0.49 a | 0.17±0.01 ab |
| 亚硝酸处理 As(III) | WT | 23.83±0.44 a | 7.03±0.20 ab | 30.86±0.59 a | 4.23±0.07 cd | 3.38±0.07 a | 0.14±0.00 b |
| | OE-44770-4 | 22.05±0.89 b | 5.41±0.07 b | 25.13±0.77 b | 3.78±0.07 d | 3.64±0.16 a | 0.15±0.00 ab |
| | OE-44770-13 | 23.00±0.30 b | 5.33±0.16 b | 24.81±0.48 b | 4.50±0.29 bc | 3.65±0.17 a | 0.18±0.00 a |

同列数据后跟相同小写字母者表示不同材料不同处理间差异未达0.05显著水平。

Data followed by the common letters within a column indicate no significant difference among the treatments or the materials ($P\leq 0.05$).

卷曲、黄化并逐渐死亡，而叶片的黄化主要因为绿色素含量发生改变所致^[22]。从表 2 可以看出，与 CK 相比，As(III)处理下，各供试水稻的叶绿素 a、叶绿素 b、总叶绿素以及类胡萝卜素的含量均出现不同程度的降低，但多数指标的含量均与 CK 未达显著差异。不过在砷处理下，OE-44770 转基因株系的叶绿素 a 以及总叶绿素含量显著低于

WT(表 2)。

2.4.4 对根尖细胞质膜透性的影响

植物在逆境条件下细胞会受到不同程度损伤，但受伤害程度会因植株自身抗性和逆境条件而产生差异^[23]。我们采用伊文思蓝染色法鉴定各供试材料根系细胞在 As(III)胁迫下的受损程度，因为正常的细胞膜不会吸收或吸收很少的伊文思蓝，但当细胞膜受损后，伊文思蓝会进入细胞，使它呈现蓝色。细胞膜受到损伤越大，伊文思蓝进入细胞越多，染色程度越深。从图 6 可见，在 As(III)处理 6 d 后，2 个转基因株系根系染色程度远深于 WT，表明其根系细胞的受损程度较大。

2.4.5 对叶片活性氧平衡变化的影响

在逆境胁迫条件下，植物体内会产生大量的 O₂⁻、·OH、H₂O₂ 等活性氧自由基。这些自由基具有很强的氧化活性，能够破坏植物体内的氧化还原平衡，从而对植物造成伤害^[24]。NBT 会被超氧阴离子氧化而还原成蓝色沉淀。因此，通过 NBT 染色可推断出各供试材料所受的氧化胁迫程度。从图 7 可以看出，在 As(III)胁迫处理下，各供试水稻的叶片均存在不同程度的蓝色沉淀。但是 WT 叶片出现的沉淀较少，而 OE-44770 的颜色程度较深且染色范围较广，表明在亚硝酸盐处理后转基因材料比 WT 受到了更强的过氧化胁迫。

2.4 各供试水稻中 Os08g44770.1 基因的表达模式

在亚硝酸盐处理的不同时间点(0、6、24、72、144 h)，Os08g44770.1 在 WT 和转基因植株叶片中的表达模式略有差异：其在 WT 中的表达量呈现先上升(0~24 h)后下降再上升的趋势，而且在胁迫 24 h 时表达量达到最高，但随着处理时间的延长，其表达量出现下降(72 h)，但在胁迫 144 h 时又出现上调；而在转基因材料中，Os08g44770.1

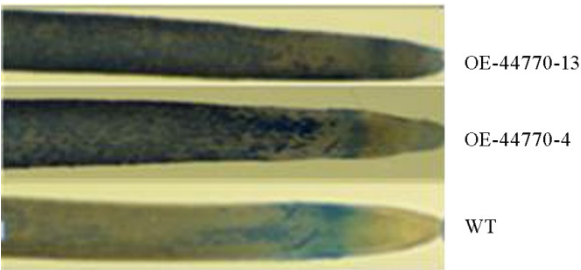


图 6 亚硝酸盐处理后 WT 和各转基因株系根尖细胞质膜透性比较

Fig. 6. Comparison of plasma membrane integrity of WT and transgenic rice plants after As(III) treatment.

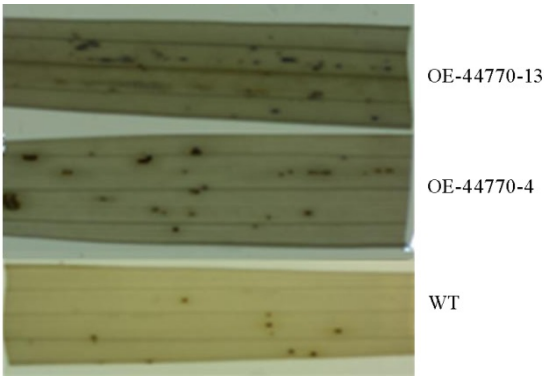


图 7 亚硝酸盐处理后 WT 和各转基因株系叶片活性氧平衡变化的比较

Fig. 7. Comparison of reactive oxygen balance in the leaves of WT and transgenic rice plants under As(III) stress.

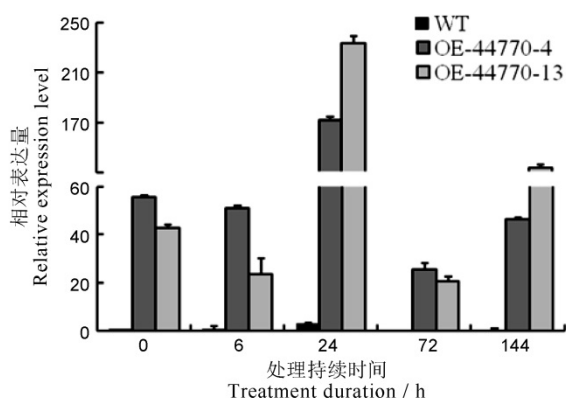


图 8 亚砷酸盐处理后 *Os08g44770.1* 在 WT 和转基因植株叶片中的表达变化

Fig. 8. Temporal expression profiles of *Os08g44770.1* in the leaves of As(III)-treated WT and transgenic rice plants.

的表达趋势表现为处理 6 h 时下降,但在胁迫 24 h 时达到最大值,随后在 72 h 时表达水平急剧下降,不过在处理 6 d 时其表达量又出现反弹(图 8)。另外,我们发现,在转基因植株根系中该基因具有与其在叶片中相似的表达模式(数据未提供)。

3 讨论

目前,有关水稻砷耐性相关蛋白编码基因和调控性 miRNA 的鉴定及其应答 As(V)或 As(III)胁迫的分子机制研究等方面取得了一定进展^[11-17]。Liu 等^[16]发现,miR528 可负调控水稻对 As(III)的耐受性。生物信息学和烟草叶片转染等进一步表明,*Os08g44770.1* 是 miR528 的靶基因。那么,miR528 是否通过与 *Os08g44770.1* 基因互作进而调控水稻对 As(III)胁迫做出应答呢?我们采用过表达转基因策略证明 *Os08g44770.1* 也负向调控水稻的砷耐受性(图 3)。miR528 与 *Os08g44770.1* 在调控水稻砷耐受性改变方面的作用机理有待进一步深入探究。

植物在进化过程中,衍生出通过调节抗氧化酶系活性等机制以响应外界逆境胁迫^[25]。在抗氧化酶系统中,超氧化物歧化酶(SOD)可有效清除植物在逆境胁迫下细胞内产生的自由基,将其转化成过氧化氢,而后进一步在 CAT、APX 等作用下将其分解成分子氧和水,使得植物免受或减少胁迫伤害^[26]。Tripathi 等^[27]和张丽清等^[17]发现,耐砷水稻在砷胁迫下其植株内 SOD 等抗氧化酶活性明显上调,而在砷敏感材料中的活性显著下降,表明该酶的活性与植物的抗逆能力呈现一定正相

关。本研究发现,*Os08g44770.1* 基因在 WT(耐砷品种)砷胁迫 24 h 时被显著诱导表达;该基因在过表达转基因植株砷处理不同时间也强烈上调表达(远高于其在 WT 中的表达水平),但转基因植株却表现为对砷耐性显著减弱。因此,推测当 SOD 酶活性达到一定水平时,植物通过启动其抗氧化防御系统以应对逆境胁迫^[28],但当 SOD 酶基因被过度超量表达后,可能会破坏植物抗氧化防御系统平衡,从而产生相反效应而使植物受到毒害。

根系是植物感受外界逆境胁迫的初始部位,其生理状况直接影响到植物的生长发育及其耐受性^[29]。重金属胁迫下,植物通过根系吸收污染物并向地上部运输、转运,当污染物积累到一定程度时,植物就会出现中毒症状。研究发现,植物的根系相对伸长量可直接反映其抗逆能力。在高浓度砷胁迫下,彩叶草幼苗的根系相对伸长量明显低于对照^[30]。在逆境胁迫下,植物体内的活性氧自由基含量会增加,导致根系膜质过氧化程度加剧以及叶片活性氧代谢失衡^[31]。本研究发现,*Os08g44770.1* 过表达转基因株系对亚砷酸盐的耐受性下降,而且其根系的相对伸长量、根系细胞膜完整性、叶片抗氧化程度等均显著弱于 WT。表明亚砷酸盐胁迫会破坏转基因植株的根系细胞结构,进而影响植株的生长发育进程,致使叶片发黄,植株长势变弱,甚至死亡。这与常思敏等^[32]的研究结果一致。

生物量是植物响应逆境胁迫的综合反应。在逆境胁迫下,植物所受胁迫程度越高,受抑制现象越明显,植物生长发育越缓慢^[33]。本研究发现,随着砷处理时间延长,各供试材料的生物量(干质量)均显著低于 CK,而且转基因植株的生物量明显低于 WT,表明 *Os08g44770.1* 基因被过表达后,水稻对亚砷酸盐的敏感程度加剧。另外,植物叶片中叶绿素的含量直接影响其光合作用效率^[34]。研究发现,在逆境胁迫下,叶绿素含量越低,相应植株的耐受性越低^[35]。本研究中,砷胁迫下,*Os08g44770.1* 过表达转基因株系的叶绿素含量降低,而且其叶片的黄化程度也比 CK 严重。因此,可以推测 *Os08g44770.1* 被超量表达后可能导致植株内产生严重过氧化胁迫而致使细胞质膜通透性增大并伴随大分子物质损失^[27],进而造成转基因植株的砷耐受性变弱。

参考文献:

- [1] 刘雪琴,全瑞建,宋睿.植物的砷污染研究进展.湖北农业科学,2014,53(15):3477-3481.

- Liu X Q, Tong R J, Song R. Arsenic contamination of plant. *Hubei Agric Sci*, 2014, 53(15): 3477-3481. (in Chinese with English abstract)
- [2] Brammer H, Ravenscroft P. Arsenic in groundwater: A threat to sustainable agriculture in South and South-east Asia. *Environ Int*, 2009, 35(3): 647-654.
- [3] Su Y H, Mcgrath S P, Zhao F J. Rice is more efficient in arsenite uptake and translocation than wheat and barley. *Plant Soil*, 2010, 328(1-2): 27-34.
- [4] 段桂兰. 植物体内砷酸盐还原的生物化学与分子生物学研究. 北京: 中国科学院生态环境研究中心, 2006.
Duan G L. The biochemical and biomolecular mechanisms of arsenate reduction in plants. Beijing: Research Center for Eco-Environmental Sciences, Chinese Academy of Sciences, 2006. (in Chinese with English abstract)
- [5] Duan G L, Zhou Y, Tong Y R, Mukhopadhyay R, Rosen B P, Zhu Y G. A CDC25 homologue from rice functions as an arsenate reductase. *New Phytol*, 2007, 174(2): 311-321.
- [6] Dhankher O P, Rosen B P, Mckinney E C, Meagher R B. Hyperaccumulation of arsenic in the shoots of *Arabidopsis* silenced for arsenate reductase (ACR2). *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103(14): 5413-5418.
- [7] Zhao F J, Ma J F, Ma J F, Meharg A A, Mcgrath S P. Arsenic uptake and metabolism in plants. *New Phytol*, 2009, 181(4): 777-794.
- [8] Chen Y, Sun S K, Tang Z, Liu G, Moore K L, Maathuis F J M, Miller A J, Mcgrath S P, Zhao F J. The Nodulin 26-like intrinsic membrane protein OsNIP3;2 is involved in arsenite uptake by lateral roots in rice. *J Exp Bot*, 2017, 68(11): 3007-3016.
- [9] Zhao X Q, Mitani N, Yamaji N, Shen R F, Ma J F. Involvement of silicon influx transporter OsNIP2;1 in selenite uptake in rice. *Plant Physiol*, 2010, 153(4): 1871-1877.
- [10] Ma J F, Yamaji N, Mitani N, Tamai K, Saeko K, Fujiwara T, Katsuhara M, Yano M. An efflux transporter of silicon in rice. *Nature*, 2007, 448(7150): 209-212.
- [11] Mosa K A, Kumar K, Chhikara S, Mcdermott J, Liu Z, Musante C, White J C, Dhankher O P. Members of rice plasma membrane intrinsic proteins subfamily are involved in arsenite permeability and tolerance in plants. *Transg Res*, 2012, 21(6): 1265-1277.
- [12] Tiwari M, Sharma D, Dwivedi S, Singh M, Tripathi R D, Trivedi P K. Expression in *Arabidopsis* and cellular localization reveal involvement of rice NRAMP, *OsNRAMP1*, in arsenic transport and tolerance. *Plant Cell Environ*, 2014, 37(1): 140-152.
- [13] Cao Y, Sun D, Ai H, Mei H, Liu X, Sun S, Xu G, Liu Y, Chen Y, Ma L Q. Knocking out *OsPT4* gene decreases arsenate uptake by rice plants and inorganic arsenic accumulation in rice grains. *Environ Sci Technol*, 2017, 51(21): 12131-12138.
- [14] Wang P, Zhang W, Mao C, Xu G, Zhao F J. The role of *OsPT8* in arsenate uptake and varietal difference in arsenate tolerance in rice. *J Exp Bot*, 2016, 67(21): 6051-6059.
- [15] Xu J, Shi S, Wang L, Tang Z, Lü T, Zhu X L, Ding X M, Wang Y F, Zhao F J, Wu Z C. *OsHAC4* is critical for arsenate tolerance and regulates arsenic accumulation in rice. *New Phytol*, 2017, 215(3): 1090-1101.
- [16] Liu Q, Hu H, Zhu L, Li R, Feng Y, Zhang L, Yang Y, Liu X, Zhang H. Involvement of miR528 in the regulation of arsenite tolerance in rice (*Oryza sativa* L.). *J Agric Food Chem*, 2015, 63(40): 8849-8861.
- [17] 张丽清, 陈霞, 胡海超, 张俊艇, 官慧谦, 刘庆坡. miR3979 在水稻砷耐受性中的作用. 浙江农林大学学报, 2016, 33(4): 571-580.
Zhang L Q, Chen X, Hu H C, Zhang J T, Liu Q P. miR3979-mediated arsenite tolerance in rice. *J Zhejiang A & F Univ*, 2016, 33(4): 571-580. (in Chinese with English abstract)
- [18] 王建华, 刘鸿先, 徐同. 超氧化物歧化酶(SOD)在植物逆境和衰老生理中的作用. 植物生理学报, 1989(1): 1-7.
Wang J H, Liu H X, Xu T. The role of superoxide dismutase (SOD) in stress physiology and senescence physiology of plant. *Plant Physiol Commun*, 1989(1): 1-7. (in Chinese)
- [19] Kaminaka H, Morita S, Yokoi H, Masumura T, Tanaka K. Molecular cloning and characterization of a cDNA for plastidic copper/zinc-superoxide dismutase in rice (*Oryza sativa* L.). *Plant Cell Physiol*, 1997, 38(1): 65-69.
- [20] Kaminaka H, Morita S, Tokumoto M, Masumura T, Tanaka K. Differential gene expressions of rice superoxide dismutase isoforms to oxidative and environmental stresses. *Free Radic Res*, 1999, 31: S219-S225.
- [21] Murray M G, Thompson W F. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucl Acids Res*, 1980, 8 (19): 4321-4325.
- [22] 刘全吉, 孙学成, 胡承孝. 砷对小麦生长和光合作用特性的影响. 生态学报, 2009, 29(2): 854-859.
Liu Q J, Sun X C, Hu C X. Growth and photosynthesis characteristics of wheat (*Triticum aestivum* L.) under arsenic stress condition. *Acta Ecol Sin*, 2009, 29(2): 854-859. (in Chinese with English abstract)
- [23] 詹洁, 余永昌, 何龙飞. 逆境条件下的植物细胞程序性死亡. 南方农业学报, 2006, 37(1): 13-16.
Zhan J, Yu Y C, He L F. Programmed cell death of plant in adversity conditions. *J Southern Agric*, 2006, 37(1): 13-16. (in Chinese with English abstract)
- [24] 桑子阳, 马履一, 陈发菊. 干旱胁迫对红花玉兰幼苗生长和生理特性的影响. 西北植物学报, 2011, 31(1): 109-115.
Sang Z Y, Ma L Y, Chen F J. Growth and physiological characteristics of *Magnolia wufengensis* seedlings under drought stress. *Acta Bot Bor-Occid Sin*, 2011, 31(1): 109-115. (in Chinese with English abstract)
- [25] Srivastava M, Ma L Q, Rathinasabapathi B, Srivastava P. Effects of selenium on arsenic uptake in arsenic

- hyperaccumulator *Pteris vittata* L. *Bioresour Technol*, 2009, 100(3): 1115-1121.
- [26] 谢亚军, 王兵, 梁新华, 韩招迪. 干旱胁迫对甘草幼苗活性氧代谢及保护酶活性的影响. *农业科学研究*, 2008, 29(4): 19-22.
Xie Y J, Wang B, Liang X H, Han Z D. Effect of drought stress on active oxygen metabolism and activities of protective enzymes of licorice seedlings. *J Agric Sci*, 2008, 29(4): 19-22. (in Chinese with English abstract)
- [27] Tripathi P, Tripathi R D, Singh R P, Dwivedi S, Chakrabarty D, Trivedi P K, Adhikari B. Arsenite tolerance in rice (*Oryza sativa* L.) involves coordinated role of metabolic pathways of thiols and amino acids. *Environ Sci Pollut Res*, 2013, 20(2): 884-896.
- [28] 李黎, 宋帅杰, 方小梅. 高温干旱及复水对毛竹实生苗保护酶和脂质过氧化的影响. *浙江农林大学学报*, 2017, 34(2): 268-275.
Li L, Song S J, Fang X M. Protection enzymes and lipid peroxidation in *Phyllostachys edulis* seedlings with temperature and water stresses. *J Zhejiang A&F Univ*, 2017, 34(2): 268-275. (in Chinese with English abstract)
- [29] 汪攀, 陈奶莲, 邹显花. 植物根系解剖结构对逆境胁迫响应的研究进展. *生态学杂志*, 2015, 34(2): 550-556.
Wang P, Chen N L, Zou X H. Research progress on adaptive responses of anatomical structure of plant roots to stress. *Chin J Ecol*, 2015, 34(2): 550-556. (in Chinese with English abstract)
- [30] 袁菊红, 胡绵好. 彩叶草根系对亚硒酸钠胁迫的适应机制研究. *西南农业学报*, 2015, 28(5): 2009-2015.
Yuan J H, Hu M H. Study on adaptive mechanisms of *Coleus blumei* roots to Na_2SeO_3 stress. *Southwest China J Agric Sci*, 2015, 28(5): 2009-2015. (in Chinese with English abstract)
- [31] Zgallai H, Steppe K, Lemeur R. Effects of different levels of water stress on leaf water potential, stomatal, stomatal resistance, protein and chlorophyll content and certain anti-oxidative enzymes in tomato plants. *J Integr Plant Biol*, 2006, 48(6): 679-685.
- [32] 常思敏, 马新明, 蒋媛媛, 贺德先, 张贵龙. 土壤砷污染及其对作物的毒害研究进展. *河南农业大学学报*, 2005, 39(2): 161-186.
Chang S M, Ma X M, Jiang Y Y, He D L, Zhang G L. Research progress on arsenic contamination in soils and arsenic toxicity in crops. *J Henan Agric Univ*, 2005, 39(2): 161-186. (in Chinese with English abstract)
- [33] 蒋明义, 郭绍川. 水分亏缺诱导的氧化胁迫和植物的抗氧化作用. *植物生理学报*, 1996, 32(2): 144-150.
Jiang M Y, Guo S C. Oxidative stress and antioxidation induced by water deficiency in plants. *Acta Phytophysiol Sin*, 1996, 32(2): 144-150. (in Chinese with English abstract)
- [34] 林阳, 王世忠. 4 种油松混交灌木树种的耐阴性研究. *河北林果研究*, 2014, 29(3): 258-262.
Lin Y, Wang S Z. Research on the shade tolerance of 4 shrub tree species mixed with *Chinese pine*. *Hebei J For Orch Res*, 2014, 29(3): 258-262. (in Chinese with English abstract)
- [35] 肖姣娣. 3 种刺篱植物对干旱胁迫的生理生化响. *西北农林科技大学学报*, 2015, 43(7): 155-160.
Xiao J D. Physiological and biochemical responses of three spiny plants to drought stress. *J Northwest A & F Univ*, 2015, 43(7): 155-160. (in Chinese with English abstract)