

2种非生物胁迫和7种激素对水稻 *OsAQP* 基因表达的影响

张 静, 梁卫红

(河南师范大学 生命科学学院, 河南 新乡 453007)

摘 要: *OsAQP* 是从 cDNA 文库中分离的一种新的水稻水通道蛋白基因, 本实验室前期利用半定量 RT-PCR 技术发现该基因的表达与非生物胁迫、植物激素有关. 本文采用 qRT-PCR 方法, 检测了干旱、高盐胁迫以及 ABA 等 7 种植物激素对 *OsAQP* 在幼苗期水稻根和叶中表达的影响, 结果显示干旱、高盐以及 7 种植物激素 MeJA, SA, 6-BA, GA, IAA, ABA, BR 均能不同程度诱导 *OsAQP* 基因上调表达, 在根中的诱导上调水平显著高于叶, 提示该基因功能涉及生长发育、抗逆应答等多种生物学过程, 且与水稻的根的关系更为密切.

关键词: 水稻; *OsAQP*; 非生物胁迫; 植物激素; 表达模式

中图分类号: Q945.78

文献标志码: A

水通道蛋白(Aquaporin, AQP), 又名水孔蛋白, 是分子量为 23~30 kd 的小分子量膜蛋白, 构成水分快速跨膜转运的通道, 参与生物水代谢的相关过程. 水通道蛋白属于内在膜蛋白(Membrane intrinsic proteins, MIPs)大家族, 自 Agre 从人类红细胞膜上分离到第一个水通道蛋白 AQP1 以来^[1], 在细菌、酵母、动物和植物中都相继发现了水通道蛋白基因. 第一个植物水通道蛋白基因是从大豆中分离的^[2], 到目前为止, 已发现了 100 多种植物水通道蛋白, 分为 PIPs, TIPs, NIPs, SIPs 和 GIPs 等类型, 其功能涉及植物生长发育^[3]、细胞增殖^[4]、花粉发育^[5]、种子萌发^[6]、非生物胁迫应答^[7-9]、激素应答^[10]等过程.

作为主要粮食作物之一, 水稻与其它农作物相比, 对水分不足更加敏感, 因此对水稻水通道蛋白基因与水分代谢, 生长发育联系的研究值得深入. 本实验室已克隆了水稻水通道蛋白基因 *OsAQP*^[11], 后续 RT-PCR 研究证明, *OsAQP* 基因的表达受到非生物胁迫、光、光敏色素光受体和植物激素等多种因素的影响^[12], 但目前对该基因表达和功能的系统性研究尚未见报道, 为此本文采用实时荧光定量 PCR(real-time quantitative PCR)方法检测干旱和高盐等非生物胁迫, 以及脱落酸(Abscisic acid, ABA)等 7 种植物激素对该基因在幼苗期水稻中表达的影响, 旨在为鉴定该基因在水稻生长发育和抗逆应答中的功能, 探索其生产应用潜在价值提供依据.

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 植物材料

水稻粳稻栽培品种‘日本晴’(*Oryza sativa* L. ssp. *japonica* cv. Nipponbare).

1.1.2 主要试剂

本文使用的 7 种植物激素分别为: 生长素(indole-3-acetic acid, IAA)、赤霉素(gibberellin, GA)、ABA、水杨酸(salicylic acid, SA)、6-苄氨基嘌呤(6-benzyla-minopurine, 6-BA)、茉莉酸甲酯(methyl jasmonate, MeJA)、油菜素内酯(brassinolide, BR), 均购自鼎国生物有限公司, 植物总 RNA 提取试剂 TRIzol、实时荧光定量 PCR 试剂盒 SYBR Prime Script RT-PCR Kit 等购自大连宝生物公司. 模拟干旱处理采用 15%

收稿日期:2015-07-06; 修回日期:2015-12-16.

基金项目:国家自然科学基金项目(31171182); 河南省高校科技创新团队(15IRTSTHN020).

第 1 作者简介:张 静(1989—), 女, 河南郑州人, 河南师范大学硕士研究生, 研究方向:植物发育分子生物学.

通信作者:梁卫红(1968—), 女, 河南师范大学教授, 博士, 研究方向:植物发育分子生物学, E-mail:liangwh@htu.edu.cn.

PEG6000,模拟高盐处理采用 200 mM NaCl.

1.1.3 引物

qRT-PCR 所用引物均采用 Primer 5 软件设计,并委托北京金唯智公司合成(表 1).

表 1 实时定量 PCR 引物

基因	引物	序列(5'→3')	扩增长度/bp
OsAQP	P1-F	GCATCAGTGCATCATCAAAC	78
	P2-R	CCAAAGGTCCACACTTACAG	
	P3-F	CATGCTATCCCTCGTCTCGACCT	
OsAct 1	P4-R	CGCACTTCATGATGGAGTTGTAT	83

1.2 实验方法

1.2.1 水稻的处理

参照林群婷等^[15]方法进行水稻种子消毒和水培,2周后进行非生物胁迫和植物激素处理.干旱和高盐处理分别采用含 15%PEG、200 mM NaCl 的 yoshida 培养液^[13]进行,分别取对照和处理后 0.5 h、5 h、10 h、24 h 根和叶,液氮冷冻后并于 -80 °C 保存备用.15%PEG 处理参照汪磊等^[14]方法进行.植物激素处理分别采用含 100 μM ABA,IAA,SA,GAs,6-BA,MeJA 以及 BRs 的 yoshida 培养液^[13]进行,分别取对照和处理后 5 h 的根和叶,液氮冷冻后并于 -80 °C 保存备用.激素母液(100 mM)配制时,先加微量乙醇使其溶解,然后加水定容到终体积.ABA,IAA,SA,GAs,6-BA,MeJA 6 种激素处理浓度参照林群婷等^[15]的报道,BRs 的处理浓度参照张磊^[16]的报道.

1.2.2 实时荧光定量 PCR 及统计学分析

分别按照宝生物 TRIzol 试剂说明书和 SYBR Prime Script RT-PCR Kit 试剂说明书进行总 RNA 提取和反转录,然后以水稻 *OsAct1* 基因作为内参,进行 qRT-PCR 反应,以 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法^[17]分析 *OsAQP* 基因表达水平.

2 实验结果

2.1 干旱和高盐均能诱导 *OsAQP* 在幼苗期水稻根和叶中不同程度的表达

经干旱、高盐胁迫处理后,*OsAQP* 的表达水平都表现出不同程度的提高,但是呈现不同的变化规律(图 1),干旱对该基因在根中的诱导显著高于叶中的,在干旱处理 5 h 后,*OsAQP* 在根中的表达量达到最高值,为处理前的 12.87 倍,并且在 10 h 和 24 h 也维持在处理前的 9.6~10.6 倍.而该基因在叶中的表达水平尽管都有上调,但是幅度较小,4 个时间点都不超过处理前的 3 倍,峰值出现在处理 0.5 h 后,上调幅度仅为处理前的 2.39 倍(图 1A).高盐处理的检测结果与干旱处理大体类似,该基因在根中表达水平的最高值出现在处理后的 5 h 和 10 h,上调了 9.68 倍,在处理 24 h 时依然维持 6.7 倍的高表达水平.该基因在叶中的表达量变化也没有在根中的显著,尽管都表现为上调,但是最大表达量出现在处理后 10 h,仅上调 3.15 倍(图 1B).

2.2 *OsAQP* 在幼苗期水稻根和叶中的表达对 7 种植物激素有不同响应模式

由于先前的研究^[12]发现,激素处理 5 h 前后该基因表达量变化较为显著,因此本文在水稻幼苗经 7 种不同的植物激素处理 5 h 后取材.qRT-PCR 结果显示,*OsAQP* 基因在水稻根和叶中的表达均呈现不同程度的提高,但是呈现不同的表达变化规律(图 2),与非生物胁迫处理结果类似的是,在根中变化显著,而叶中无显著变化.在根中变化显著的有 MeJA(21.08 倍)、6-BA(7.63 倍)、IAA(6.41 倍)、ABA(7.44 倍)、BR(9.94 倍),其中 MeJA 处理使 *OsAQP* 在根中的表达量上调最为显著,为处理前的 21.08 倍,而 GA 使该基因在根中的表达量上调不太显著,仅为处理前的 2.77 倍.相比之下,该基因在叶中的表达水平尽管也都有上调,但是幅度较小,其中相对变化显著的有 6-BA(2.44 倍)、GA(5.84 倍)、MeJA(1.8 倍)、SA(2.93 倍),而 GA 处理使该基因在叶中表达量上调最显著,为处理前的 5.84 倍,BR 处理对该基因在叶中的表达无显著影响,为处理前的 1.05 倍.

3 讨论

干旱、高盐等非生物胁迫是导致农作物减产的重要因素之一.目前研究已鉴定出许多与植物非生物胁迫

相关的基因,如 MAPK(mitogen-activated protein kinase)基因家族^[18]、CDPK(calcium-dependent protein kinase)基因家族^[19]、ABC1(activity of bcl complex)基因家族^[20]、水通道蛋白基因家族^[21,22]等.本文对水稻水通道蛋白 *OsAQP* 基因表达与非生物胁迫关系的研究显示,在干旱和高盐情况下,*OsAQP* 基因在根和叶中的表达量都有上调,而且根部作用明显高于叶中的,说明该基因可能参与根的非生物胁迫应答过程.有文献报道,模拟干旱处理水稻幼苗时,水通道基因 *OsTIP1;1*, *OsTIP1;2* 和 *OsTIP4;2* 在水稻叶中转录水平在 4~8 h 提高了 3~14 倍,*OsTIP2;2* 和 *OsTIP4;1* 在处理 8 h 时达到峰值,在干旱处理早期阶段 *OsTIP4;3* 上调程度不明显;在根中这些基因的表达量也出现不同程度的上调^[23],模拟高盐处理水稻幼苗时,水稻根和叶中的这些基因表达变化趋势与干旱胁迫变化趋势有类似之处^[23].而本文则发现 *OsAQP* 在根中被干旱诱导的效果比叶显著,这与李嵘等对水通道基因 *OsPIP2;6* 的研究结果相符^[24].有研究认为干旱条件下,水稻根部水通道蛋白有助于整个植物水分的流通^[25].这些结果都可以证明水稻水通道蛋白基因与非生物胁迫密切相关.同时也证明不同类型的水通道蛋白基因在非生物胁迫条件下的表达变化规律既有相似之处,也存在差异,提示这些基因可能具有不同的生物学功能.

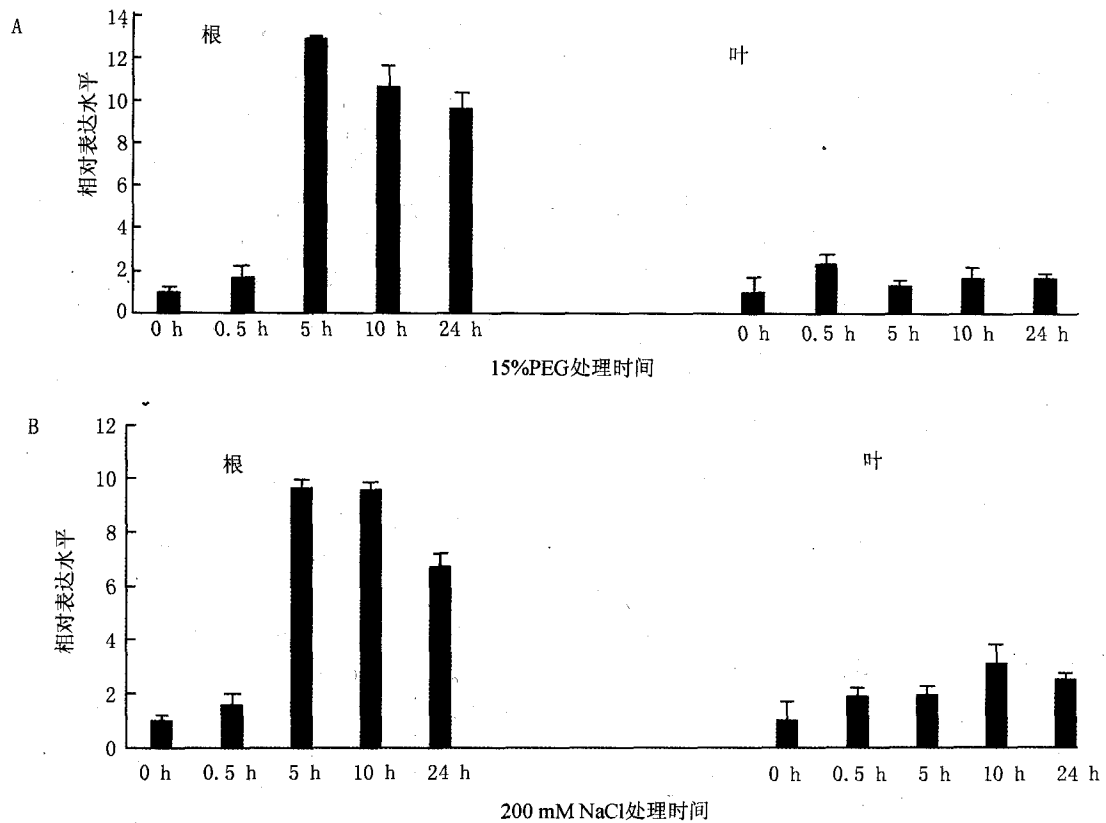


图1 干旱(A)和高盐(B)对*OsAQP*表达的影响

现有研究已证明调控水通道蛋白表达的激素种类众多,包括脱落酸、生长素、水杨酸和赤霉素等.例如:水稻 *OsPIP2;6* 的表达受到 GA, IAA, ABA 的诱导^[24],但是目前尚未见激素对水稻水通道蛋白基因表达的系统检测.本文对包括 ABA, IAA, SA 在内的 7 种植物激素对 *OsAQP* 基因表达影响的检测显示,这 7 种激素都能在不同程度上上调 *OsAQP* 基因的表达,其中在根中能上调该基因的表达 5 倍以上的有 6-BA, MeJA, ABA, BR, IAA, 在叶中上调 5 倍以上的只有 GA.说明 *OsAQP* 基因受到多种激素的调控,且表达有明显的组织差异性.先前半定量分析发现,500 μ M SA 处理水稻幼苗,在 5 h 时 *OsAQP* 的表达量比对照低^[12],而本文用 100 μ M SA 处理水稻幼苗,5 h 时 *OsAQP* 的表达量比对照高,这一结果说明激素不同浓度对基因表达水平的改变有显著影响.有研究发现 MeJA 能响应菌根共生和干旱应答,可能是因为调节了根部 IAA 和 SA 的含量以及改变了水通道蛋白磷酸化状态^[26],外源 ABA 处理可增强向日葵、大麦、高粱和玉米等许多植物根

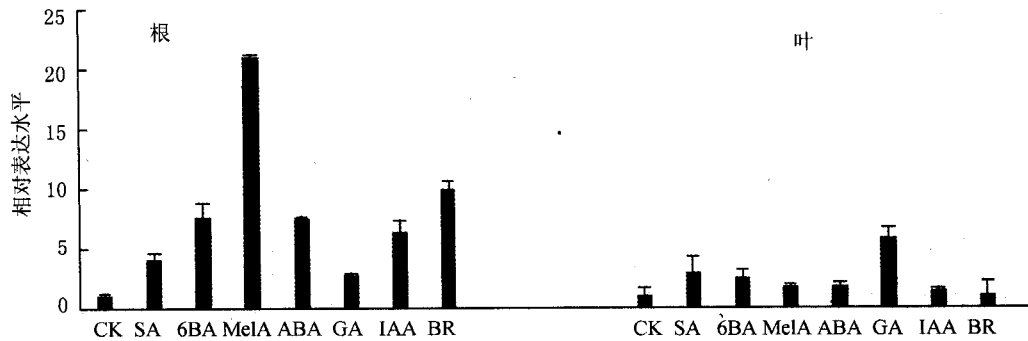


图2 7种植物激素对OsAQP表达的影响

的水分输导能力^[27],这些研究都提示水通道蛋白基因是多种激素应答的靶基因之一,涉及多种生物学过程。

值得注意的是,本文发现 *OsAQP* 基因在根中的表达量变化明显高于叶,一方面可能与本文采用水培法的处理方式有关,另一方面基于本文的检测,也有可能是 *OsAQP* 基因在根中的作用更为优势,提示该基因与水稻根的功能关系更为密切,这也是下一步研究将要关注的重点问题之一.已有一些报道显示,水通道蛋白基因在叶中对水运输的贡献远小于根部的^[28-30].异源转基因实验显示,麻风树(*Jatropha carcas* L.)两种水通道蛋白基因(*JcPIP2;7* 和 *JcTIP1;3*) 在拟南芥中过表达后,在干旱和高盐胁迫条件下,转基因植株种子萌发率和种子产量远高于野生型^[21].对香蕉水通道基因的研究发现,*MusaPIP2;6* 过表达可以提高香蕉对盐的耐受性^[22].这些研究结果说明无论内源还是外源水通道蛋白基因在过表达时,均能增强植物对非生物胁迫的抵抗力,提示在分子设计育种研究中,保守的水通道蛋白基因的应用前景广泛.目前本实验室已通过转基因技术开展对水稻 *OsAQP* 基因的功能鉴定,本文对 *OsAQP* 基因的表达与非生物胁迫、植物激素关系的研究,为后续以转基因水稻为材料鉴定该基因在水稻生长发育、抗逆应答中的功能奠定了基础,也为筛选水稻多效抗逆基因,进行分子设计育种的探索提供了潜在的候选基因。

参 考 文 献

- [1] Denker B M, Smith B L, Kuhajda F P, et al. Identification, purification, and partial characterization of a novel Mr 28000 integral membrane protein from erythrocytes and renal tubules[J]. *J Biol Chem*, 1988, 263(30): 15634-15642.
- [2] Fortin M G, Morrison N A, Verma D P. Nodulin-26, a peribacteroid membrane nodulin is expressed independently of the development of the peribacteroid compartment[J]. *Nucleic Acids Res*, 1987, 15(2): 813-824.
- [3] Aharon R, Shahak Y, Wininger S, et al. Overexpression of a plasma membrane aquaporin in transgenic tobacco improves plant vigor under favorable growth conditions but not under drought or salt stress[J]. *Plant Cell*, 2003, 15(2): 439-447.
- [4] Ludevid D, Hofte H, Himelblau E, et al. The expression pattern of the tonoplast intrinsic protein gamma-TIP in *Arabidopsis thaliana* is correlated with cell enlargement[J]. *Plant Physiol*, 1992, 100(4): 1633-1639.
- [5] Soto G, Alleva K, Mazzella M A, et al. *AtTIP1;3* and *AtTIP5;1*, the only highly expressed *Arabidopsis* pollen-specific aquaporins, transport water and urea[J]. *FEBS Lett*, 2008, 582(29): 4077-4082.
- [6] Liu H Y, Yu X, Cui D Y, et al. The role of water channel proteins and nitric oxide signaling in rice seed germination[J]. *Cell Res*, 2007, 17(7): 638-649.
- [7] Hu W, Yuan Q, Wang Y, et al. Overexpression of a wheat aquaporin gene, *TaAQP8*, enhances salt stress tolerance in transgenic tobacco[J]. *Plant Cell Physiol*, 2012, 53(12): 2127-2141.
- [8] Zhang J, Li D, Zou D, et al. A cotton gene encoding a plasma membrane aquaporin is involved in seedling development and in response to drought stress[J]. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*, 2013, 45(2): 104-114.
- [9] Sreedharan S, Shekhawat U K, Ganapathi T R. Constitutive and stress-inducible overexpression of a native aquaporin gene (*MusaPIP2;6*) in transgenic banana plants signals its pivotal role in salt tolerance[J]. *Plant Mol Biol*, 2015, 88(1/2): 41-52.
- [10] Tungngoen K, Viboonjun U, Kongsawadworakul P, et al. Hormonal treatment of the bark of rubber trees (*Hevea brasiliensis*) increases latex yield through latex dilution in relation with the differential expression of two aquaporin genes[J]. *J Plant Physiol*, 2011, 168(3): 253-262.
- [11] 刘悦霞, 梁卫红. 水稻 *OsAQP* 基因的生物信息学分析[J]. 河南师范大学学报: 自然科学版, 2008, 36(02): 117-119.
- [12] Liang W H, Li L, Zhang F, et al. Effects of abiotic stress, light, phytochromes and phytohormones on the expression of *OsAQP*, a rice

- aquaporin gene[J]. *Plant Growth Regulation*, 2013, 69(1): 21-27.
- [13] Yoshida S, Forno DA, Cook JH, Gomez KA. Laboratory manual for physiological studies of rice[M]. Manila: International Rice Research Institute, 1976.
- [14] 汪 磊, 谭美莲, 严明芳, 等. PEG 模拟干旱对胡麻种子萌发及幼苗生长的影响[J]. 干旱地区农业研究, 2011, 29(6): 227-232.
- [15] 林群婷, 梁卫红, 李 辉, 等. 水稻 *Rop* 基因 *OsRac5* 的表达特性[J]. 植物生理学报, 2013, 49(12): 1400-1406.
- [16] 张 磊. 茉莉酸甲酯和水杨酸对水稻不同抗稻瘟病品种 *OsCPK9* 和 *PR* 基因表达影响[D]. 湖北, 华中科技大学, 2011.
- [17] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method[J]. *Methods*, 2001, 25(4): 402-8.
- [18] 毕佳佳, 梁卫红. 水稻促分裂原活化蛋白激酶家族的研究进展[J]. 热带亚热带植物学报, 2009, 17(5): 514-518.
- [19] 刘亚茹, 吕丽莎, 程 瑾, 等. CDPKs 在植物适应非生物胁迫过程中的调节作用[J]. 植物生理学报, 2015(9): 1387-1394.
- [20] 高清松, 张 丹, 徐 亮, 等. 水稻 *ABC1* 基因家族的鉴定及在非生物胁迫下的表达分析[J]. 中国水稻科学, 2011, 25(1): 1-10.
- [21] Khan K, Agarwal P, Shanware A, et al. Heterologous expression of two *Jatropha* aquaporins imparts drought and salt tolerance and improves seed viability in transgenic *Arabidopsis thaliana*[J]. *PLoS One*, 2015, 10(6): e128866.
- [22] Sreedharan S, Shekhawati U K, Ganapathi T R. Constitutive and stress-inducible overexpression of a native aquaporin gene (*MusaPIP2; 6*) in transgenic banana plants signals its pivotal role in salt tolerance[J]. *Plant Mol Biol*, 2015, 88(1/2): 41-52.
- [23] Li G W, Peng Y H, Yu X, et al. Transport functions and expression analysis of vacuolar membrane aquaporins in response to various stresses in rice[J]. *J Plant Physiol*, 2008, 165(18): 1879-1888.
- [24] 李 嵘, 牛向丽, 苗雁文, 等. 水通道蛋白基因 *OsPIP2;6* 的功能分析[J]. 中国农业科学, 2013, 46(15): 3079-3086.
- [25] Grondin A, Mauleon R, Vadez V, et al. Root aquaporins contribute to whole plant water fluxes under drought stress in rice (*Oryza sativa* L.)[J]. *Plant Cell Environ*, 2015, doi:10.1111/pce.12616.
- [26] Sanchez-Romera B, Ruiz-Lozano J M, Zamarreno A M, et al. Arbuscular mycorrhizal symbiosis and methyl jasmonate avoid the inhibition of root hydraulic conductivity caused by drought[J]. *Mycorrhiza*, 2015, doi:10.1007/s00572-015-0650-7.
- [27] Shao H B, Chu L Y, Shao M A, et al. Advances in functional regulation mechanisms of plant aquaporins: their diversity, gene expression, localization, structure and roles in plant soil-water relations (Review)[J]. *Mol Membr Biol*, 2008, 25(3): 179-191.
- [28] Sutka M, Li G, Boudet J, et al. Natural variation of root hydraulics in *Arabidopsis* grown in normal and salt-stressed conditions[J]. *Plant Physiol*, 2011, 155(3): 1264-1276.
- [29] Postaire O, Tournaire-Roux C, Grondin A, et al. A *PIP1* aquaporin contributes to hydrostatic pressure-induced water transport in both the root and rosette of *Arabidopsis*[J]. *Plant Physiol*, 2010, 152(3): 1418-1430.
- [30] Tournaire-Roux C, Sutka M, Javot H, et al. Cytosolic pH regulates root water transport during anoxic stress through gating of aquaporins[J]. *Nature*, 2003, 425(6956): 393-397.

Effects of Seven Phytohormones and Two Abiotic Stresses on the Expression of Rice *OsAQP* Gene

ZHANG Jing, LIANG Weihong

(College of Life Science, Henan Normal University, Xinxiang 453007, China)

Abstract: *OsAQP* is a rice aquaporin gene isolated from cDNA library. Using semi-quantitative RT-PCR, it had been identified as a putative response gene for abiotic stresses and plant hormones. In this study, real-time quantitative PCR method was performed to detect the expression pattern of *OsAQP* in rice seedlings under two abiotic stresses and seven plant hormones treatments. The results show that abiotic stresses, such as drought, high salt and phytohormones, such as MeJA, SA, 6-BA, GA, IAA, ABA, BR can induce its expression in leaves and roots, especially in leaves. It can be deduced that *OsAQP* may involved in rice growth and development, and also abiotic responses which under the regulation of several phytohormones, the function of the gene may relate with the biological functions of rice roots.

Keywords: rice; *OsAQP*; abiotic stress; plant hormones; expression pattern