崔桂彩,付童童,孙川惠,等. 谷胱甘肽调节水稻幼苗根系生长的分子机制[J]. 江苏农业科学,2019,47(2):69 – 72.
doi:10.15889/j.issn.1002 – 1302.2019.02.015

谷胱甘肽调节水稻幼苗根系生长的分子机制

崔桂彩, 付童童, 孙川惠, 宋新华, 蔡瑞涛, 赵凤云
(山东理工大学生命科学学院,山东淄博 255049)

摘要:拟用中花 11 水稻(*Oryza sativa* L.)分析谷胱甘肽(glutathione,简称 GSH)及其合成抑制剂丁硫氨酸 – 亚砜亚胺(buthionine sulfoximine,简称 BSO)处理对水稻幼苗根系生长及生长素和细胞周期基因表达的影响。结果表明,在处理后 5 ~ 9 d 时,GSH 促进了水稻根系,特别是侧根的形成和生长,而 BSO 则显著抑制了根系的生长。对用 GSH、BSO 处理 6 d 时的 *DR5* – GUS[GUS(β – glucuronidase)是 β – 葡萄糖苷酸酶]转基因水稻(以中花 11 号为背景)分析发现,GSH 加快了生长素在根系的梯度分布,而 BSO 则延缓了生长素的梯度分布,引起生长素在初生根根尖的过度积累。从分子水平分析显示,GSH、BSO 处理后 6 d 时,水稻幼苗根系中分别有 23 个生长素基因(如 *OsYUCCA7*、*OsPIN1c*、*OsARF1* 和 *OsIAA7* 等)和 19 个细胞周期基因(如 *Oryza*;*CycA3*;*1*、*Oryza*;*CycD4*;*2*、*Oryza*;*CDKC*;*2* 和 *Oryza*;*KRP*;*1* 等)的表达有明显差异。以上试验结果表明,GSH 是调节水稻幼苗根系生长的重要信号分子,它可能通过影响这些生长素和细胞周期基因的表达及生长素的分布而参与水稻根系生长的调节。

关键词:谷胱甘肽;生长素基因;水稻根系;细胞周期基因
中图分类号: S511.01　　**文献标志码**: A　　**文章编号**:1002 – 1302(2019)02 – 0069 – 04

谷胱甘肽(glutathione,简称 GSH)是植物细胞内的主要抗氧化剂和信号分子之一,在植物的生长发育和抗逆过程中有重要的调节作用[1]。研究表明,GSH 可以促进番茄再生根的形成,但是会抑制其伸长生长,此外,GSH 合成抑制剂丁硫氨酸 – 亚砜亚胺(buthionine sulfoximine,简称 BSO)也会抑制再生根的伸长生长,而对再生根的数量没有明显影响[2]。进一步的研究发现,在培养基中添加生长素会明显提高再生根中的 GSH 水平,从而抑制根的生长,说明在器官形成过程中生长素和 GSH 之间存在一定的联系。BSO 阻滞拟南芥初生根的生长,抑制其生长素运输基因 *PIN1*、*PIN2*、*PIN7* 的表达和生长素在根尖的积累[1],但是对不定根的 *PIN1* 表达无影

收稿日期:2017 – 09 – 13
基金项目:山东省自然科学基金(编号:ZR2015CL009、ZR2014DM010);山东省淄博市科技发展计划(编号:111089、113106)。
作者简介:崔桂彩(1997—),女,山东临沂人,研究方向为植物分子生物学。E – mail:1795320202@qq.com。
通信作者:赵凤云,博士,教授,主要从事分子生物学研究。E – mail:zfy1226@126.com。

显提高。本试验由于田间沟系密布,排水畅通,管理精细,因此各试验小区倒伏相对较轻,镇麦 12 号在大面积应用时,在追求高产的同时应充分考虑倒伏的风险,选择适合的播量和施肥量。建议苏州北部沿长江沙土地区在播量为 228.15 kg/hm^2 的条件下施氮 300 kg/hm^2 或在播量为 202.80 kg/hm^2 的条件下施氮 360 kg/hm^2,南部环太湖黏土地区在播量为 202.80 kg/hm^2 的条件下施氮 300 kg/hm^2 或在播量为 177.45 kg/hm^2 的条件下施氮 360 kg/hm^2。由于 2017 年小麦生长中后期的特殊气候条件,小麦千粒质量较常年偏高,需要对气候正常年份镇麦 12 号千粒质量位于正常范围内不同处理因素之间的差异情况进行进一步验证,计划下一正季在张家港、常熟、太仓沿长江沙土和昆山、吴中、吴江环太湖黏土地区选择播量和施肥量的优良组合对镇麦 12 号进行扩大示范种植和技术优化,以促进镇麦 12 号在全市的推广应用。

致谢:感谢林一波推广研究员对本文的指导!

参考文献:

[1]陆成彬,程顺和,张伯桥,等. 高产抗倒弱筋小麦扬麦 15 选育与高产栽培技术研究[J]. 农业科技通讯,2006(12):23 – 24.
[2]乐　冬. 强筋小麦的崛起之路[J]. 新农业,2016(20):49.
[3]陆成彬,程顺和,张伯桥,等. 优质中筋小麦新品种扬麦 16 特征特性与高产栽培技术[J]. 江苏农业科学,2006(3):112.
[4]缪金国. 扬麦 16 号在张家港市的种植表现及高产栽培技术[J]. 农业科技通讯,2007(5):26.
[5]徐才丰,吴福观,林忠成,等. “扬麦 16 号”在吴江地区的种植表现及高产栽培技术[J]. 上海农业科技,2014(2):57.
[6]冷苏凤,李　燕,许　明,等. 江苏省小麦育种现状及建议[J]. 农业科技通讯,2011(5):5 – 8.
[7]王成雨,代兴龙,石玉华,等. 氮肥水平和种植密度对冬小麦茎秆抗倒性能的影响[J]. 作物学报,2012,38(1):121 – 128.
[8]朱云集,郭天财,王晨阳,等. 两种穗型冬小麦品种产量形成特点及超高产关键栽培技术研究[J]. 麦类作物学报,2006,26(1):82 – 86.
[9]王志芬,吴　科,宋良增,等. 山东省不同穗型超高产小麦产量构成因素分析与选择思路[J]. 山东农业科学,2001(4):6 – 8.
[10]崔金梅,朱旭彤,高瑞玲. 不同栽培条件下小麦小花分化动态及提高结实率的研究[J]. 河南农业大学学报,1979(2):69 – 73.
[11]朱云集,郭汝礼,郭天财,等. 两种穗型冬小麦品种分蘖成穗与内源激素之间关系的研究[J]. 作物学报,2002,28(6):783 – 788.
[12]朱云集,郭汝礼,郭天财,等. 行距配置与密度对兰考 906 群体质量及产量的影响[J]. 麦类作物学报,2001,21(2):62 – 66.

响。Cheng 等的报道表明,增加 GSH 含量,会提高拟南芥对干旱和高盐等逆境的抗性,激活生长素合成基因(如 *YUC2*)的表达,调节细胞分裂相关基因的表达[3]。在拟南芥阻断根生长突变体 *rootmeristemless1* 中,GSH 的合成强烈减少,该突变体的表型与 BSO 引起的生长阻滞类似[4]。GSH 是维持拟南芥根分生组织细胞分裂必需的信号分子,添加外源谷胱甘肽会促进细胞分裂,相反,添加 BSO 会抑制细胞分裂[5]。在植物细胞早期分裂过程中,GSH 和 DNA 共存于细胞核内,从 G1 期到 S 期,GSH 对维持核内氧化还原状态平衡和基因表达起着重要的调节作用[6]。GSH 调节拟南芥细胞周期相关基因如 *RCK* 和 *SAP* 的表达[3]。这些研究表明,GSH 在对植物生长发育的调节与生长素和细胞分裂之间有密切关系。本试验旨在通过分析 GSH 和 BSO 对水稻幼苗根系生长、生长素分布及生长素和细胞周期基因表达的影响,探讨 GSH 调节水稻幼苗根系生长的机制。

1　材料与方法

1.1　材料与处理

采用中花 11 号水稻(*Oryza sativa* L.)种子(由山东理工大学植物逆境实验室保存),去壳后依次用 75% 乙醇(处理 30 s)、0.1% 氯化汞(处理 15 min)、2% 次氯酸钠(处理 20 min)消毒,再用灭菌水冲洗干净。将种子分别植入含有 5 mmol/L GSH 与 0.1 mmol/L 谷胱甘肽合成抑制剂 BSO 的 MS 培养基上,于光—暗周期为 14 h—10 h、光照度为 200 μmol/(m^2 · s)、昼—夜温度周期为 26 ℃—20 ℃、相对湿度约为 50% ~60% 的培养箱内培养,培养 3 ~9 d 后进行数据统计与分析。每个处理独立重复 3 次,每次设 3 个平行处理。

1.2　根系生长指标的统计

根系生长指标的统计包括所有根(初生根、不定根和侧根)的数量和长度,每个独立重复至少统计 20 株,统计数据用每株的平均值来表示。

1.3　根系生长素分布的测定

将 *DR5* - GUS 转基因水稻(以水稻中花 11 号为背景)种子灭菌消毒后,分别植入含有 5 mmol/L GSH 和 0.1 mnol/L BSO 的 MS 培养基上,在上述同样条件下培养 6 d,然后进行 GUS(β - glucuronidase,即 β - 葡萄糖苷酸酶)活性测定,分析根系生长素的分布和积累变化[7]。每个处理至少设 20 株。

1.4　根系生长素和细胞周期基因转录活性的分析

将中花 11 号水稻种子消毒后,分别植入含有 5 mmol/L GSH 和 0.1 mmol/L BSO 的 MS 培养基上培养 6 d(培养条件同"1.1"节),用 TRIzol 试剂提取总 RNA,取 1 μg RNA,用 TaKaRa 公司的 RNA PCR Kit(AMV)Ver. 3.0 反转录为 cDNA。所有处理用等量 cDNA 进行 PCR 反应,以 *Osactin1* 基因作内标,采用 Gel - Pro Analyzer 软件对基因转录活性进行半定量分析。将对照的转录活性设置为 1,基因表达水平≥1.3 为上调,≤0.7 为下调。每种处理的 PCR 反应在相同条件下独立重复 3 次。

1.5　数据处理

试验数据用 SPSS 软件进行统计分析,数据用平均值 ± 标准误差表示,用单因素方差分析不同处理之间的差异,$P < 0.05$ 表示差异显著。

1.6　试验时间和地点

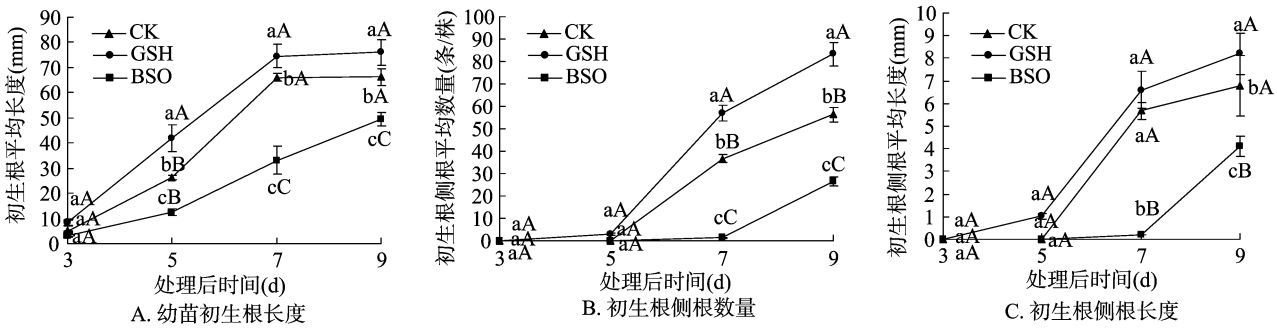
本研究所有试验均于 2015 年 9 月至 2017 年 3 月进行,在山东理工大学生命科学学院植物分子生物学等相关实验室完成。

2　结果与分析

2.1　GSH、BSO 对水稻幼苗根系生长的影响

2.1.1　GSH、BSO 对水稻幼苗初生根长度及其侧根数量和长度的影响　与对照组相比,水稻幼苗在处理后 5 ~9 d 期间,BSO 显著抑制了初生根的伸长生长,而 GSH 则促进了其生长(图 1 - A)。如试验后 7 d 时,BSO 处理的初生根长度比对照降低了 49.7%($P < 0.01$),试验后 5 d 时,GSH 处理的初生根长度比对照增加了 37.6%($P < 0.01$)。由图 1 - B 可见,GSH 处理 7 ~9 d 时,初生根上侧根的数量比对照显著增加;相反,在相同的时间内,BSO 处理的初生根上的侧根数量明显比对照的少。如试验后 9 d 时,GSH 处理的初生根上的侧根数量比对照增加了 32.6%($P < 0.01$),而 BSO 处理的初生根上的侧根数量比对照减少了 52.5%($P < 0.01$)。与对照相比,BSO 极显著抑制了初生根上侧根的伸长生长($P < 0.01$),GSH 则在一定程度上促进了其生长(图 1 - C)。

2.1.2　GSH、BSO 对水稻幼苗不定根数量和长度的影响　由图 2 可以看出,在试验后 3 ~9 d 期间,水稻幼苗不定根的数量(图 2 - A)和长度(图 2 - B)有与图 1 类似的变化趋势,其中 BSO 处理的不定根数量和长度明显不及对照。试验后 9 d 时,BSO 处理的不定根的数量、长度分别比对照减少了 52.5%、52.6%,且与其他处理差异极显著($P < 0.01$),但是 GSH 处理的不定根数量和长度与对照之间差异不显著。



同一时间的不同处理间标有不同小写、大写字母分别表示差异显著($P<0.05$)、极显著($P<0.01$)。下图同

图1　GS 和 BSO 对水稻幼苗初生根长度及其侧根数量、长度的影响

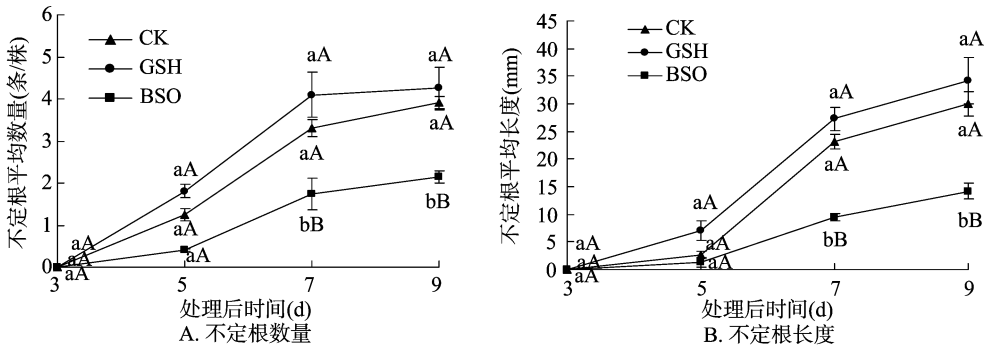


图2　GSH 和 BSO 对水稻幼苗不定根数量和长度的影响

2.1.3　GSH、BSO 对水稻幼苗不定根上侧根数量和长度的影响　用 GSH 处理 7 ~ 9 d 时，水稻幼苗不定根上的侧根数量（图 3 - A）、长度（图 3 - B）都比对照的显著增加。可见 GSH 加快了不定根上侧根的形成和生长。如 GSH 处理 9 d 时，不定根上侧根的数量比对照的增加了 3.4 倍（$P < 0.01$）。相反，在整个试验期间 BSO 处理完全抑制了水稻幼苗不定根上侧根的形成（$P < 0.01$）。

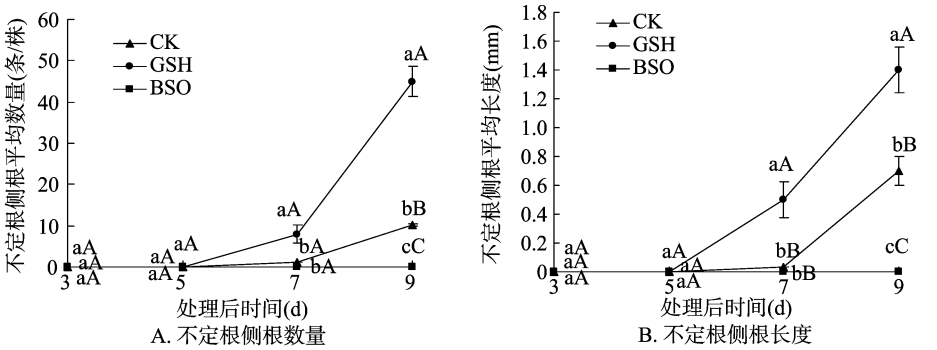


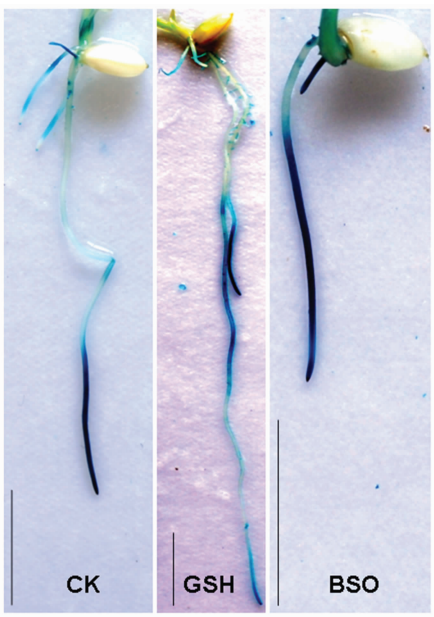
图3　GSH 和 BSO 对水稻幼苗不定根侧根数量和长度的影响

2.2　GSH、BSO 对水稻幼苗根系生长素积累和分布的影响

生长素的积累和梯度分布对水稻幼苗根系的生长和发育有重要的调节作用。为进一步了解 GSH、BSO 处理对水稻根系生长的影响与生长素积累和分布之间的关系，本试验用 *DR5* - GUS 转基因水稻分析了 GSH、BSO 处理 6 d 的根系生长素变化。由图 4 可见，与对照组相比，GSH 加快了生长素在整个根系的梯度分布，减少了生长素在初生根根尖的过度积累，促进了侧根的形成和发育。相反，BSO 则延迟了生长素的梯度分布，引起生长素在根尖的过量积累，阻滞了侧根的形成。

2.3　GSH、BSO 对水稻幼苗根系生长素基因表达的影响

生长素在根系的积累和分布与生长素信号途径上关键基因家族 *OsYUCCAs*（生长素合成）、*OsPINs*（生长素极性运输）和 *OsARFs*/*OsIAAs*（生长素应答）基因的表达有关。本试验比较分析了 GSH、BSO 处理 6 d 的水稻幼苗根系中 62 个生长素基因表达的变化。结果显示，与对照相比，GSH、BSO 处理引起表达变化的基因有 23 个（图 5），其中 GSH 处理后表达上调的基因有 6 个，分别是 *OsYUCCA7*、*OsPIN1c*、*OsPIN10b*、*OsARF7*、*OsARF8*、*OsARF25*；BSO 处理后表达上调的基因有 15 个，包括 *OsYUCCA3*、*OsYUCCA6*、*OsYUCCA7*、*OsPIN1a*、*OsARF1*、*OsARF2*、*OsARF6*、*OsARF19*、*OsARF21*、*OsIAA7*、*OsIAA17*、*OsIAA21*、*OsIAA23*、*OsIAA24* 和 *OsIAA27*，表达下调的基因有 6 个，包括 *OsPIN1c*、*OsARF7*、*OsARF8*、*OsARF15*、*OsARF17* 和 *OsIAA19*。以上结果表明，GSH、BSO 处理对根系生长素积累和分布的影响可能与生长素基因的差异表达有密切关系。



种子萌发生长时间为 6 d；标尺为 1 cm

图4　GSH 和 BSO 对水稻幼苗根系生长素积累和分布的影响

2.4　GSH、BSO 对水稻幼苗根系细胞周期基因表达的影响

细胞周期调控是控制水稻根系生长发育的重要因素之一。为进一步分析 GSH、BSO 处理对根系生长的影响与细胞周期之间的关系，本试验检测了 GSH、BSO 处理 6 d 的水稻幼苗根系中56个细胞周期核心基因表达的变化情况。由图6

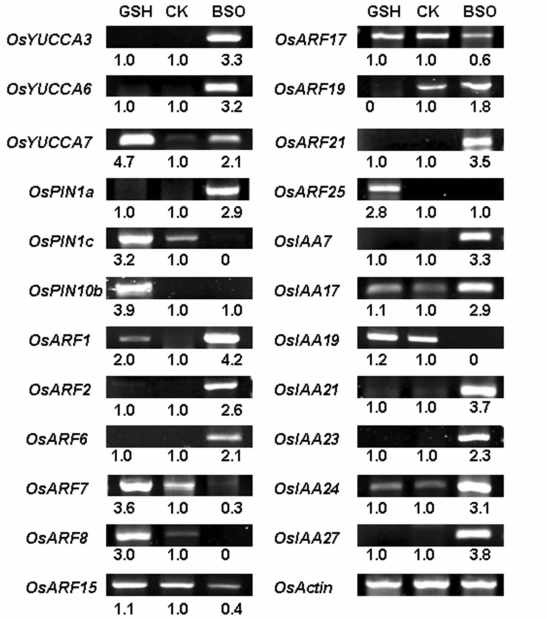


图5　GSH 和 BSO 对水稻幼苗根系生长素基因表达的影响

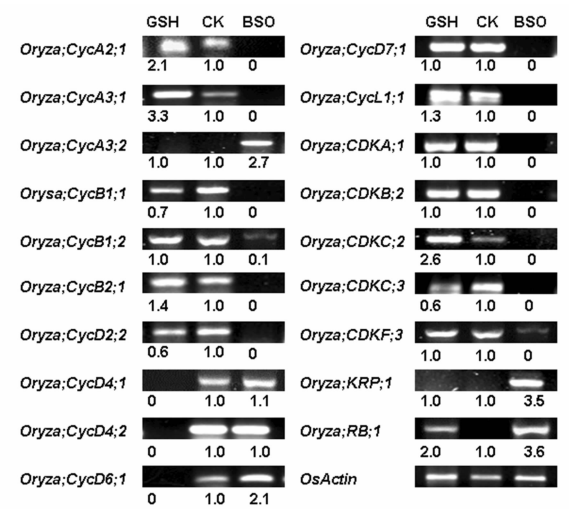


图6　GSH 和 BSO 对水稻幼苗根系细胞周期基因表达的影响

可见，与对照相比，GSH、BSO 处理后有 19 个基因的表达发生了明显变化，其中 GSH 激活表达的基因有 6 个，分别是 *Oryza*;*CycA2*;*1*、*Oryza*;*CycA3*;*1*、*Oryza*;*CycB2*;*1*、*Oryza*;*CycL1*;*1*、*Oryza*;*CDKC*;*2* 和 *Oryza*;*RB*;*1*，抑制表达的基因也有 6 个，包括 *Orysa*;*CycB1*;*1*、*Oryza*;*CycD2*;*2*、*Oryza*;*CycD4*;*1*、*Oryza*;*CycD4*;*2*、*Oryza*;*CycD6*;*1* 和 *Oryza*;*CDKC*;*3*。BSO 上调表达的基因有 4 个，分别是 *Oryza*;*CycA3*;*2*、*Oryza*;*CycD6*;*1*、*Oryza*;*KRP*;*1* 和 *Oryza*;*RB*;*1*，下调表达的基因有 13 个，包括 *Oryza*;*CycA2*;*1*、*Oryza*;*CycA3*;*1*、*Orysa*;*CycB1*;*1*、*Oryza*;*CycB1*;*2*、*Oryza*;*CycB2*;*1*、*Oryza*;*CycD2*;*2*、*Oryza*;*CycD7*;*1*、*Oryza*;*CycL1*;*1*、*Oryza*;*CDKA*;*1*、*Oryza*;*CDKB*;*2*、*Oryza*;*CDKC*;*2*、*Oryza*;*CDKC*;*3* 和 *Oryza*;*CDKF*;*3*。值得注意的是，本试验中的 BSO 抑制了 *Oryza*;*CycA2*;*1* 等多数细胞周期进程中的正调控基因的表达，而促进了负调控基因 *Oryza*;*KRP*;*1*、*Oryza*;*RB*;*1* 的表达，因此 BSO 对水稻幼苗根系，特别是侧根的形成和发育的抑制作用与其阻滞细胞分裂有很大关系。

3　讨论

有研究表明，在根系形成过程中，生长素和 GSH 之间存在一定联系，适量的 GSH 有利于根系的生长，而 GSH 含量过高或过低都会抑制根的生长[2]，BSO 会抑制拟南芥初生根的生长[1]。本试验得到类似的结果，即 GSH 促进了水稻幼苗特别是侧根的形成和发育，而 BSO 则显著抑制了初生根、不定根和侧根的生长。Koprivova 等研究发现，BSO 抑制生长素运输基因 *PIN1*、*PIN2* 和 *PIN7* 的表达和生长素在根尖的积累[1]。Cheng 等报道，外源 GSH 激活了生长素合成基因（如 *YUC2*）的表达[3]。本试验结果也表明，GSH、BSO 对生长素信号途径上某些关键基因（如 *OsYUCCA7*、*OsPIN1c*、*OsARF1* 和 *OsIAA7* 等）的表达调节存在明显差异，它们可能通过调节这些基因的表达来影响生长素在根系的梯度分布，进而调控根系的生长和发育。细胞周期是调控植物生长发育的关键因素之一。GSH 是维持拟南芥根分生组织细胞分裂必需的信号分子。添加外源 GSH 可促进细胞分裂，调节拟南芥细胞周期相关基因如（*RCK* 和 *SAP*）的表达[3]。相反，添加 BSO 会抑制细胞分裂[5]。在本试验中，在 GSH、BSO 处理条件下有 19 个细胞周期基因（如 *Oryza*;*CycA3*;*1*、*Oryza*;*CycD4*;*2*、*Oryza*;*CDKC*;*2* 和 *Oryza*;*KRP*;*1* 等）的表达差异显著。特别值得注意的是，BSO 抑制了多数细胞周期正调控基因如 *Oryza*;*CycA3*;*1* 的表达，而激活了负调控基因如 *Oryza*;*KRP*;*1* 的表达，推测 BSO 对根系生长的抑制作用可能与其延缓细胞分裂进程有密切关系。本试验结果表明，GSH 是调节水稻幼苗根系生长的重要信号分子，它可能通过影响生长素和细胞周期基因表达及生长素分布而参与水稻根系生长的调节。

参考文献：

[1] Koprivova A, Mugford S T, Kopriva S. *Arabidopsis* root growth dependence on glutathione is linked to auxin transport[J]. Plant Cell Rep, 2010, 29: 1157 – 1167.

[2] Tyburski J, Tretyn A. Glutathione and glutathione disulfide affect adventitious root formation and growth in tomato seedling cuttings[J]. Acta Physiol Plant, 2010, 32(2): 411 – 417.

[3] Cheng M C, Ko K, Chang W L, et al. Increased glutathione contributes to stress tolerance and global translational changes in *Arabidopsis*[J]. The Plant Journal, 2015, 83(5): 926 – 939.

[4] Reichheld J P, Khafif M, Riondet C, et al. Inactivation of thioredoxin reductases reveals a complex interplay between thioredoxin and glutathione pathways in *Arabidopsis* development[J]. The Plant Cell, 2007, 19(6): 1851 – 1865.

[5] Sánchez – Fernández R, Fricker M, Corben L B, et al. Cell proliferation and hair tip growth in the *Arabidopsis* root are under mechanistically different forms of redox control[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1997, 94(6): 2745 – 2750.

[6] Diaz V P, Wolff T, Markovic J, et al. A nuclear glutathione cycle within the cell cycle[J]. Biochem J, 2010, 431(2): 169 – 178.

[7] Petersson S V, Johansson A I, Kowalczyk M, et al. An auxin gradient and maximum in the *Arabidopsis* root apex shown by high – resolution cell – specific analysis of IAA distribution and synthesis[J]. Plant Cell, 2009, 21(6): 1659 – 1668.