

DOI: 10.11766/trxb202102070085

孙黎明, 马建锋, 沈仁芳. 硝酸还原酶合成的 NO 通过诱导酸敏感水稻根尖 ROS 积累引起酸毒[J]. 土壤学报, 2023, 60 (1): 201–211.
SUN Liming, MA Jianfeng, SHEN Renfang. Low pH Stress Induces the Accumulation of ROS By Increasing Production of Nitrate Reductase-Dependent NO in Rice Root Tips[J]. Acta Pedologica Sinica, 2023, 60 (1): 201–211.

硝酸还原酶合成的 NO 通过诱导酸敏感水稻根尖 ROS 积累引起酸毒*

孙黎明^{1, 2}, 马建锋³, 沈仁芳^{1, 2†}

(1. 土壤与农业可持续发展国家重点实验室(中国科学院南京土壤研究所), 南京 210008; 2. 中国科学院大学, 北京 100049; 3. 冈山大学植物科学与资源研究所, 日本冈山 710-0046)

摘要: 酸毒是酸性土壤中限制作物生长的重要因子之一, 但酸毒通常与金属离子毒性共存, 难以在土壤中直接研究, 目前关于水稻酸毒机制的报道较少。选用前期筛选的酸耐性不同的两个水稻品种 Kasalath (酸耐性) 和 Jinguoyin (酸敏感), 研究水稻的酸敏感性与活性氧 (ROS) 积累及氧化还原代谢相关酶的关系, 并试图探讨酸毒害中一氧化氮 (NO) 信号与活性氧信号的调控关系。结果显示, 低 pH 引起酸敏感水稻品种 Jinguoyin 中根尖 NO 和 ROS 的富集, 但酸耐性水稻品种 Kasalath 中无显著变化。NO 清除剂 2-(4-羧基苯基)-4,4,5,5-四甲基咪唑啉-1-氧基-3-氧化物钾盐 (cPTIO) 可清除 Jinguoyin 根尖富集的 NO 和 ROS。硝酸还原酶反馈抑制剂谷氨酰胺 (Gln) 可明显降低 Jinguoyin 在低 pH 下的根尖 NO 信号, 而一氧化氮合酶抑制剂 N'-硝基-L-精氨酸甲酯盐酸盐 (L-NAME) 对根尖 NO 信号无影响。低 pH 显著提高了 Jinguoyin 中硝酸还原酶基因 *NIA1*、*NIA2* 和 *NIA3* 的表达, 同时也提高了硝酸还原酶活性。可见, 低 pH 下 Jinguoyin 受到的酸毒与 NO 介导的 ROS 富集有关, 酸毒下产生的 NO 信号主要由硝酸还原酶合成, 其硝酸还原酶基因 *NIA1* 和 *NIA2* 的表达调控硝酸还原酶活性的提高。
关键词: 酸耐性; 水稻; 硝酸还原酶基因; 一氧化氮 (NO); 活性氧 (ROS)

中图分类号: Q945 文献标志码: A

Low pH Stress Induces the Accumulation of ROS by Increasing Production of Nitrate Reductase-Dependent NO in Rice Root Tips

SUN Liming^{1, 2}, MA Jianfeng³, SHEN Renfang^{1, 2†}

(1. State Key Laboratory of Soil and Sustainable Agriculture, Institute of Soil Science, Chinese Academy of Sciences, Nanjing 210008, China; 2. University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China; 3. Institute of Plant Science and Resources, Okayama University, Okayama 710-0046, Japan)

Abstract: 【Objective】 Low pH stress is one of the major factors limiting crop production on acidic soils. It often coexists with metal ion toxicity and this makes it difficult to explore directly the effect of pH in acidic soils. So far, the mechanisms of low pH stress in rice is poorly understood. 【Method】 Two rice varieties with different low pH tolerance, Kasalath (low pH-tolerant) and

* 国家自然科学基金项目 (42020104004) 资助 Supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 42020104004)

† 通讯作者 Corresponding author, Email: rfshen@issas.ac.cn

作者简介: 孙黎明 (1990—), 男, 湖北仙桃人, 博士研究生, 主要从事水稻逆境生理研究。Email: lmsun@issas.ac.cn

收稿日期: 2021-02-07; 收到修改稿日期: 2021-04-20; 网络首发日期 (www.cnki.net): 2021-06-16

Jinguoyin (low pH-sensitive), were selected to (i) study the relationship between low pH stress and the accumulation of nitric oxide (NO) and reactive oxygen species (ROS), and (ii) explore the regulatory relationship between NO and ROS under low pH stress. 【Result】 Low pH caused the accumulation of NO and ROS in the root tips of Jinguoyin, but there was no significant change in Kasalath. The NO scavenger cPTIO reduced NO and ROS accumulation in root tips of Jinguoyin. Feedback inhibitor of nitrate reductase Gln significantly reduced NO content in the root tips of Jinguoyin under low pH, while L-NAME, a nitric oxide synthase inhibitor, did not affect NO content in the root tips of Jinguoyin. Low pH significantly increased the expression of nitrate reductase genes *NIA1*, *NIA2* and *NIA3* in Jinguoyin, and also increased the activity of nitrate reductase. 【Conclusion】 Low pH stress of Jinguoyin was related to the NO-mediated ROS accumulation. The NO signal generated under low pH stress is mainly synthesized by nitrate reductase through increasing the expression of *NIA1* and *NIA2*.

Key words: Low pH tolerance; Rice; Nitrate reductase gene; Nitric oxide; Reactive oxygen species

酸性土壤 (pH<5.5) 约占世界耕地面积的 40%、潜在可耕作土地的 70%^[1]。酸毒或氢离子毒害是酸性土壤中重要胁迫因子之一, 严重限制土壤生产潜力的发挥。而且由于近几十年氨态氮肥的过量施用, 不断加速土壤酸化速率, 土壤酸化成为我国集约化农业体系中的主要问题之一^[2]。特别需要注意的是, 我国南方红壤区作为稻米的重要产区, 也呈现明显酸化趋势。水稻作为约世界一半人口的主食^[3], 是我国南方居民的主要口粮, 阐明酸毒的生理和分子机制, 从而培育耐酸水稻品种以提高其在酸性土壤上的产量, 是应对日益紧迫的粮食安全问题的必要措施。

低 pH 下, 土壤中的氢离子浓度较高, 常常引起土壤中金属离子如铝、铁和锰等的活化而间接造成植物伤害^[4-6], 因此, 酸毒通常与金属离子胁迫共存, 难以对其直接作用进行研究。关于酸性土壤中铝毒的研究已有大量报道^[7-12], 但关于酸毒或氢离子毒性本身的研究较少。酸毒严重抑制根系的生长发育, 然而其重要性通常被低估^[6, 13-14]。与铝毒一样, 酸毒可严重抑制根伸长^[6], 植物对酸毒最敏感的反应部位是伸长区和根毛^[15]。低 pH 通过抑制根系的 H⁺分泌^[16], 削弱细胞壁的完整性, 导致根系生长受阻^[17-19]。另外一个重要的酸毒机制是诱导产生活性氧 (ROS)^[20-22]。各种生物和非生物胁迫因素, 如盐害、紫外线辐射、干旱、重金属、极端温度、营养缺乏和病虫害均会引起植物产生 ROS 而遭受氧化胁迫^[23]。有研究报道, 低 pH 削弱柑橘抗坏血酸代谢和谷胱甘肽代谢而诱导 ROS 积累^[21], 低 pH 会引起水稻 1 318 个基因发生差异表达, 其中 83% 下调表达, 这些基因最主要与氧化还原代谢和氧胁迫

胁迫相关^[24]。在分子机制方面, 目前已在拟南芥中找到一些酸耐性基因, 例如 *STOPI*^[4, 6], 但在水稻中尚无相关报道。

一氧化氮 (NO) 是植物体中的一种重要气体信号分子, 在植物生长发育和逆境响应中发挥重要作用^[25-27], 如促进种子萌发、参与诱导细胞程序性死亡、延缓叶片衰老、参与根系重力感应, 以及参与乙烯释放和脱落酸信号转导等。植物中的 NO 合成可分为还原途径和氧化途径两种^[28]。其中关于硝酸还原酶途径的研究最为透彻, 主要发生在线粒体和细胞膜。目前 NO 在水稻酸毒中的角色尚不清楚。一般认为 NO 是植物次级抗氧化剂, 可诱导激活抗氧化系统而清除 ROS, 亦可直接与 ROS 反应而清除 ROS^[29], 在铝胁迫下 NO 可通过清除 ROS 而缓解铝毒^[7-11], 但它在植物酸毒中是否会发挥同样的作用值得探究。本研究选用前期筛选的酸耐性不同的两个水稻品种, 分析了水稻的酸敏感性与 ROS 积累及氧化还原代谢相关酶的关系, 并试图探讨酸毒下 NO 信号与 ROS 信号的调控关系, 为阐明酸害的生理和分子机制奠定基础, 从而为培育耐酸水稻品种提供理论指导。

1 材料与方法

1.1 植物材料与生长条件

本研究选用酸耐性不同的两个籼稻品种 Kasalath (酸耐性) 和 Jinguoyin (酸敏感)。水稻种子用 10% H₂O₂ 消毒 10 min, 用去离子水洗净后在 30℃ 恒温箱中避光浸泡催芽 2 d。随后将刚露白的水稻种子转移至 0.5 mmol·L⁻¹ CaCl₂ (pH 5.6) 溶液

的浮板上, 26℃暗培养, CaCl₂ 溶液每两天更换一次。

1.2 水稻酸耐性鉴定

选择生长约 5 d、整齐一致的水稻幼苗, 分别在 pH 为 4.2、4.5 和 4.8 的含有 0.5 mmol·L⁻¹ CaCl₂ 水溶液中处理 24 h, 每个处理 10 株。用直尺测定处理前后根长, 相减即为根伸长。

1.3 根系细胞膜完整性、丙二醛 (MDA)、超氧阴离子和过氧化氢含量的测定

根尖细胞膜的完整性采用伊文思蓝 (Evans blue) 吸收量的方法^[30]测定。丙二醛的测定采用丙二醛 (MDA) 检测试剂盒 (S0131S, 碧云天, 上海)。超氧阴离子的测定采用超氧阴离子检测试剂盒 (BC1290, 索莱宝, 北京)。过氧化氢的测定采用过氧化氢检测试剂盒 (BC3590, 碧云天, 上海)。蛋白浓度使用 Bradford 法^[31]测定。

1.4 酶活性测定

抗氧化酶包括抗坏血酸过氧化物酶 (APX, BC0220)、过氧化氢酶 (CAT, BC0200)、过氧化物酶 (POD, BC0090) 和超氧化物歧化酶 (SOD, BC0170) 的活性均采用索莱宝的试剂盒进行测定。还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸 (NADPH) 氧化酶活性的测定采用植物 NADPH 氧化酶 (NADPH-OX) ELISA 试剂盒 (MB-10702A, 酶标生物, 江苏)。根尖蛋白质的提取根据 Tian 等^[12]的方法略有修改。硝酸还原酶 (NR) 活性的测定采用植物硝酸还原酶活性检测试剂盒 (索莱宝, 北京)。一氧化氮合成酶 (NOS) 的活性采用一氧化氮合成酶检测试剂盒 (碧云天, 上海) 测定。

1.5 ROS 和 NO 含量测定

根尖 ROS 的测定采用二氢乙噻 (Dihydroethidium, DHE) 荧光染料法。将处理 24 h 后的水稻根尖切下, 置于 1 mL 10 μmol·L⁻¹ DHE 的水溶液中避光 37℃ 孵育 30 min, 蒸馏水冲洗 3 次后, 用荧光显微镜 (Nikon, Minato, Tokyo, 日本) 拍照, 使用的滤光片为 EX 540/25、DM565、BA605/55。根系 NO 含量的测定采用 3-氨基-4-甲氨基-2'-7'-二氟荧光素 (DAF-FM DA) 进行测定。将水稻根尖 1 cm 剪下, 在 20 mmol·L⁻¹ 的 4-羟乙基哌嗪乙磺酸 (HEPES) 缓冲液 (pH7.4) 中清洗 20 min, 然后将根尖置于含 10 μmol·L⁻¹ 荧光染料的 1.5 mL 离心管中避光

染色 30 min, 然后在 20 mmol·L⁻¹ 的 HEPES 缓冲液 (pH7.4) 避光清洗三次, 每次 15 min, 制片, 在荧光显微镜 (Nikon, Minato, Tokyo, 日本) 下观察拍片, 使用的滤光片为 EX 465-495、DM 505 和 BA 512-558。

1.6 NIA1、NIA2 和 NIA3 基因表达测定

每个处理取处理后的 15~20 条根尖 (0~1 cm), 利用液氮研磨粉碎, 重复 4 次。RNA 的提取使用 TGuide Cells/Tissue/Plant RNA Kit (天根, 北京)。获得的 RNA 用 Nanodrop 2000C (Thermo Fisher, 美国) 测定浓度和质量, 并在 1% 琼脂糖上电泳检查完整性。用 PrimeScript RT 试剂盒 (Takara, 日本) 反转录合成 cDNA。使用 SYBR Premix Ex Taq (Takara, 日本) 在 Roche LightCycler 480 II 上进行实时荧光定量 PCR。以水稻 *Histone3* 为内参基因, 正向引物 GGTC AACTTGTTGATTCCCCTCT, 反向引物 AACCGCAAATCCAAAGAACG。NIA1 (Os08g0468100) 和 NIA2 (Os08g0468700) 因其序列高度相似^[32], 用同一个定量引物, 正向 CGTGT CGTGCCAATTAGAAA, 反向 GGAATCAACCG CTAGCCTCT, NIA3 (Os02g0770800) 的定量引物是正向 GAGTTCGGTACATCGGAGT, 反向 TGCACAACCATCCATCAATC。基因的相对表达量采用 Ct 法计算。

1.7 统计分析及作图

文中使用最小显著差异法 (LSD) 进行方差分析, SigmaPlot 14.0 软件进行作图。

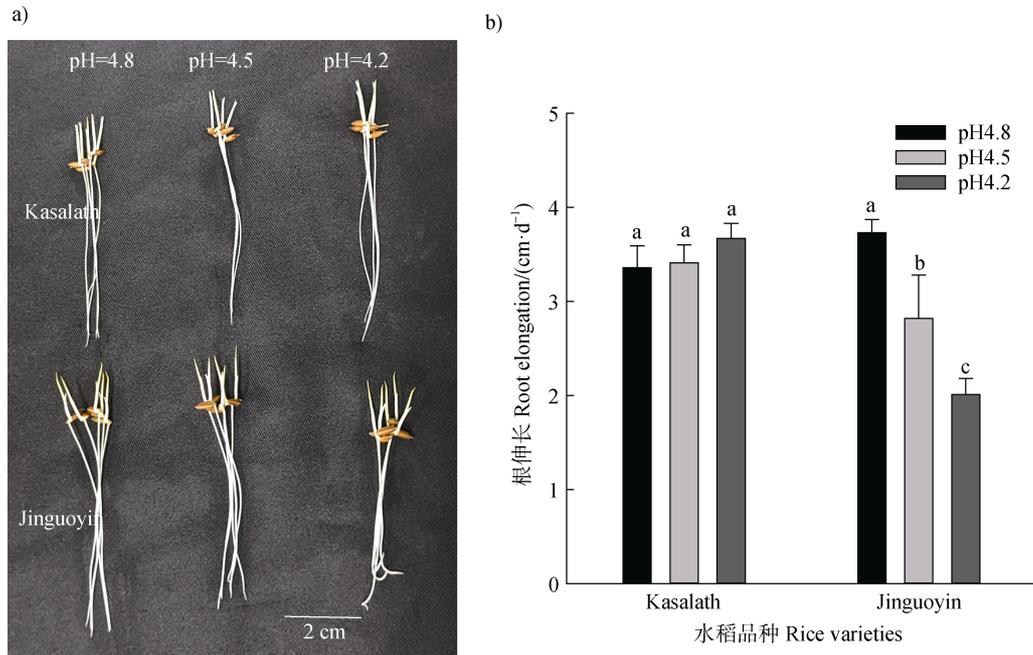
2 结 果

2.1 水稻品种 Kasalath 和 Jinguoyin 的酸敏感性差异

培养液 pH 从 4.8 降至 4.2, 酸敏感水稻品种 Jinguoyin 的根伸长显著降低, 根尖出现卷曲, 而酸耐性品种 Kasalath 的根伸长并未受到明显影响 (图 1a, 图 1b)。说明 Jinguoyin 是酸敏感水稻品种, 而 Kasalath 为酸耐性品种。

2.2 低 pH 对根尖细胞膜完整性和过氧化的影响

MDA 是膜脂过氧化最重要的产物之一, pH 从 4.8 下降至 4.2, Jinguoyin 根尖 MDA 浓度和伊文思



注：不同字母表示某个品种的根伸长在不同 pH 下的差异达显著水平 ($n=10$, $P<0.05$)。Note: Different letters indicate that the root elongation of a variety varies significantly at different pH values ($n=10$, $P<0.05$).

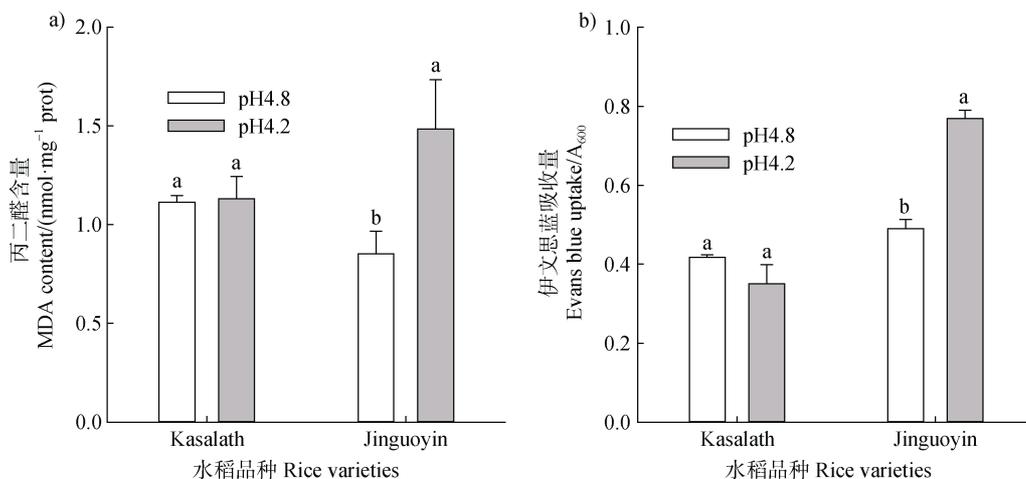
图 1 pH 对 Kasalath 和 Jinguoyin 根伸长的影响

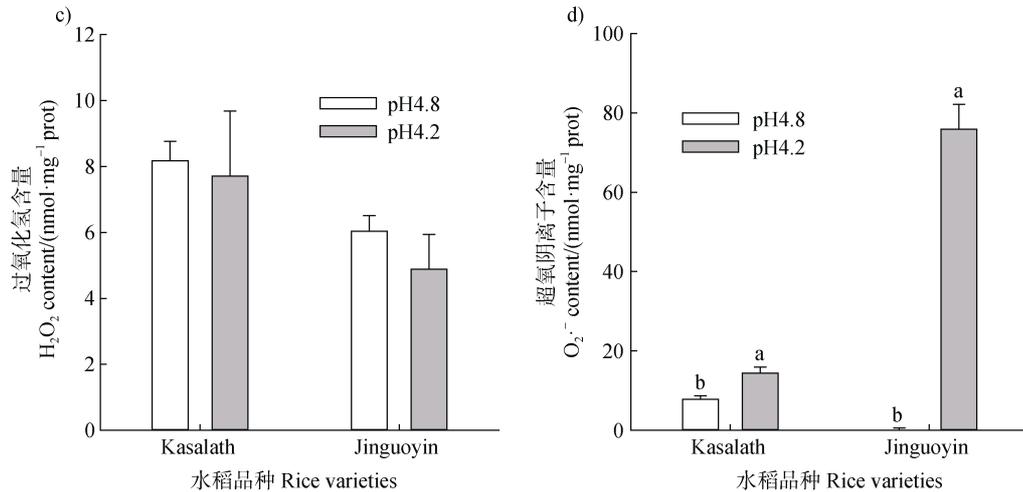
Fig. 1 Effect of pH on the root elongation in Kasalath and Jinguoyin

蓝吸收量显著升高 (图 2a, 图 2b), 表明 Jinguoyin 细胞膜完整性受到伤害。而 Kasalath 根尖 MDA 和伊文思蓝吸收量并未受到 pH 变化的显著影响。随着 pH 降低, Kasalath 和 Jinguoyin 的根尖 H_2O_2 含量均未出现显著变化, 而根尖 $O_2^{\cdot-}$ 含量均显著升高, 且 Jinguoyin 中 $O_2^{\cdot-}$ 含量的增加幅度更大 (图 2c, 图 2d), 因此, 低 pH 引起的氧化胁迫可能是导致品种 Jinguoyin 酸毒的一个重要原因。

2.3 根尖抗氧化酶系统和 NADPH 氧化酶对低 pH 的响应

pH 从 4.8 下降至 4.2, Kasalath 和 Jinguoyin 根尖 SOD 和 APX 活性均显著增加, 且 Jinguoyin 的增加幅度更大 (图 3a, 图 3b)。抗氧化酶 POD 在 Kasalath 根尖未受到 pH 的显著影响, 但在 Jinguoyin 中显著增加了 106% (图 3c)。Kasalath 和 Jinguoyin 根尖的 CAT 活性在低 pH 下均有增加的趋势, 但是并不





注：不同字母表示某个品种当前指标在不同 pH 下的差异达显著水平 ($n=3$, $P<0.05$)。下同。Note: Different letters indicate a significant difference in the current parameter of a variety at different pH values ($n=3$, $P<0.05$).

图 2 pH 对 Kasalath 和 Jinguoyin 根尖细胞膜完整性和过氧化的影响

Fig. 2 Effect of pH on cell membrane integrity and peroxide in the root tips of Kasalath and Jinguoyin

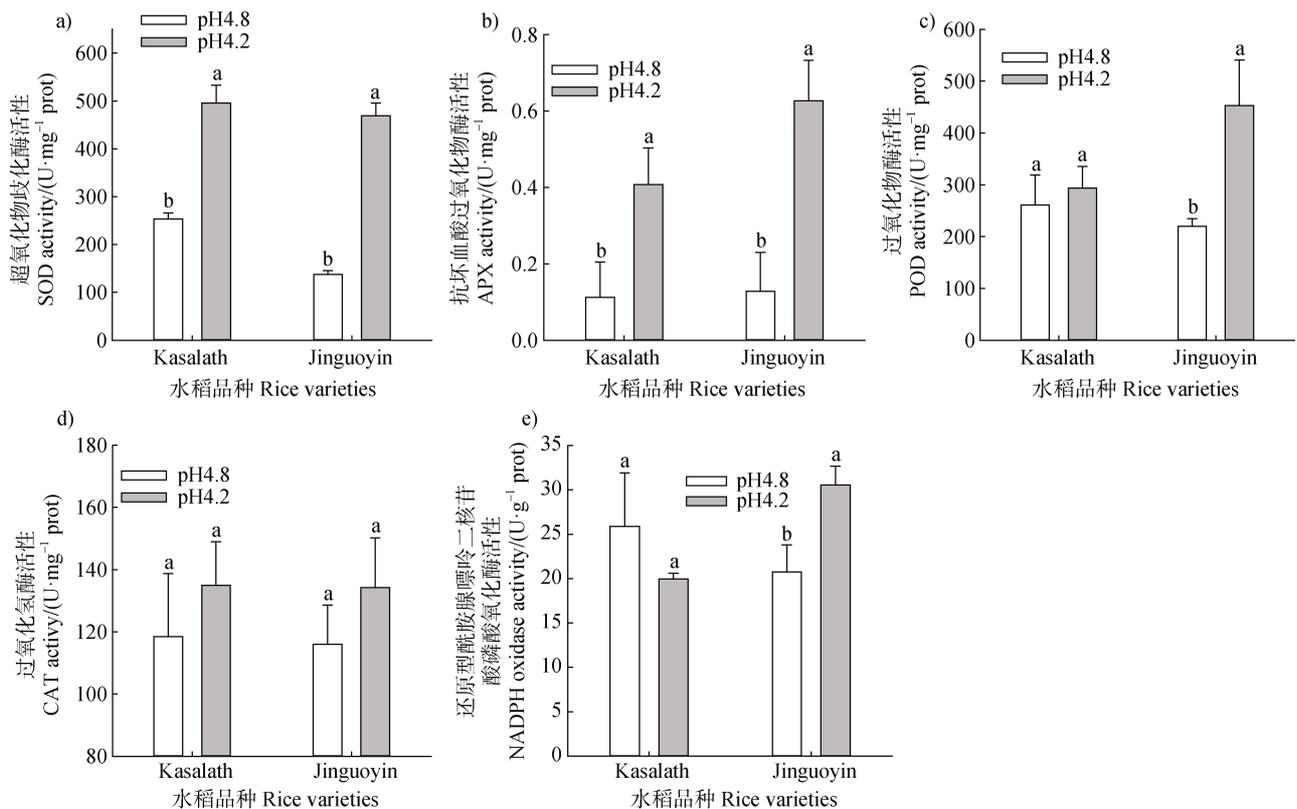


图 3 pH 对 Kasalath 和 Jinguoyin 根尖抗氧化酶系统和还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸氧化酶活性的影响

Fig. 3 Effect of pH on the activity of antioxidant enzymes and NADPH oxidase in the root tips of Kasalath and Jinguoyin

显著 (图 3d)。NADPH 氧化酶是根尖 $O_2^{\cdot-}$ 的主要来源之一, pH 从 4.8 下降至 4.2, Kasalath 根尖的 NADPH 氧化酶未发生显著变化, 而 Jinguoyin 根尖

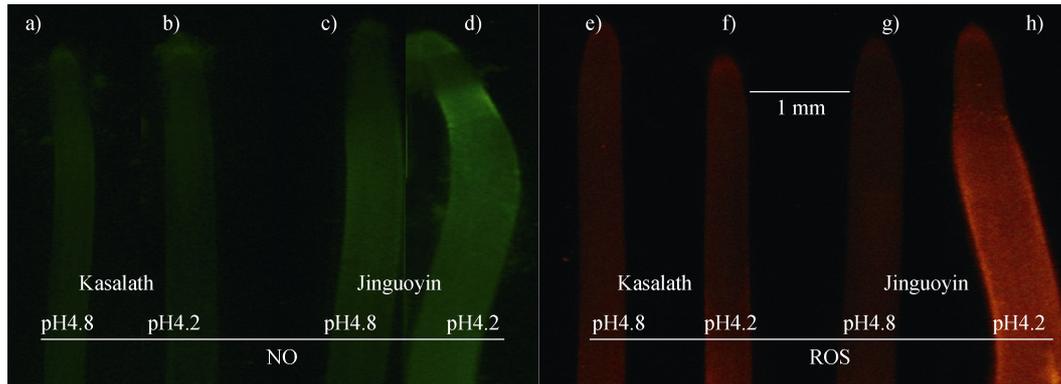
NADPH 氧化酶活性显著增加了 47.2% (图 3e)。

2.4 酸毒中根尖 NO 信号与 ROS 的上下游关系
培养液 pH 从 4.8 下降至 4.2, 酸敏感品种

Jinguoyin 根尖 NO 和 ROS 信号均明显增强,而酸耐性品种 Kasalath 根尖 NO 和 ROS 信号并未明显变化(图 4),表明 NO 和 ROS 可能参与酸毒害反应。Jinguoyin 受酸毒后,NO 信号主要集中在根冠和伸长区,而 ROS 信号在整个根尖均有分布。

为了探明酸毒诱导的 NO 和 ROS 信号的上下游

调控关系,通过清除根尖 NO 来确定 NO 对 ROS 和根伸长的影响。添加 NO 清除剂 2-(4-羧基苯基)-4,4,5,5-四甲基咪唑啉-1-氧基-3-氧化物钾盐(cPTIO)可以显著提高 Jinguoyin 在低 pH 下的根生长(图 5a,图 5b),同时显著降低低 pH 下根尖的 NO 和 ROS 信号(图 5c,图 5d)。



注 Note: pH 4.8 (a, c, e, g); pH 4.2 (b, d, f, h); Kasalath (a, b, e, f); Jinguoyin (c, d, g, h); NO (a, b, c, d); ROS (e, f, g, h).

图 4 pH 对 Kasalath 和 Jinguoyin 根尖 NO 和 ROS 信号的影响

Fig. 4 Effect of pH on NO and ROS in the root tips of Kasalath and Jinguoyin

2.5 酸毒诱导的 NO 信号的主要来源

植物中的 NO 主要由硝酸还原酶和一氧化氮合酶合成,为了确定 Jinguoyin 中酸毒诱导的 NO 主要是哪个酶在发挥作用,观察外源添加这两个酶的抑制剂 Gln(硝酸还原酶反馈抑制剂)和 L-NAME(一氧化氮合酶抑制剂)对根伸长和 NO 信号的影响。硝酸还原酶反馈抑制剂 Gln 可显著提高根系在低 pH 下的生长,而一氧化氮合酶抑制剂 L-NAME 未表现出显著的缓解作用(图 6a,图 6b)。同时, Gln 明显降低 Jinguoyin 在低 pH 下的根尖 NO 信号,而 L-NAME 对根尖 NO 信号无影响(图 6c)。

低 pH 显著提高 Kasalath 和 Jinguoyin 根尖硝酸还原酶活性,而 Jinguoyin 中的增加幅度显著高于 Kasalath (210.3% vs 47.5%) (图 7a)。低 pH 诱导 Jinguoyin 的一氧化氮合酶活性增加 17.3%,而对 Kasalath 无显著影响(图 7b)。可见,硝酸还原酶是 Jinguoyin 在酸毒胁迫下 NO 合成的主要来源。

2.7 低 pH 对硝酸还原酶基因 *NIA1*、*NIA2* 和 *NIA3* 的影响

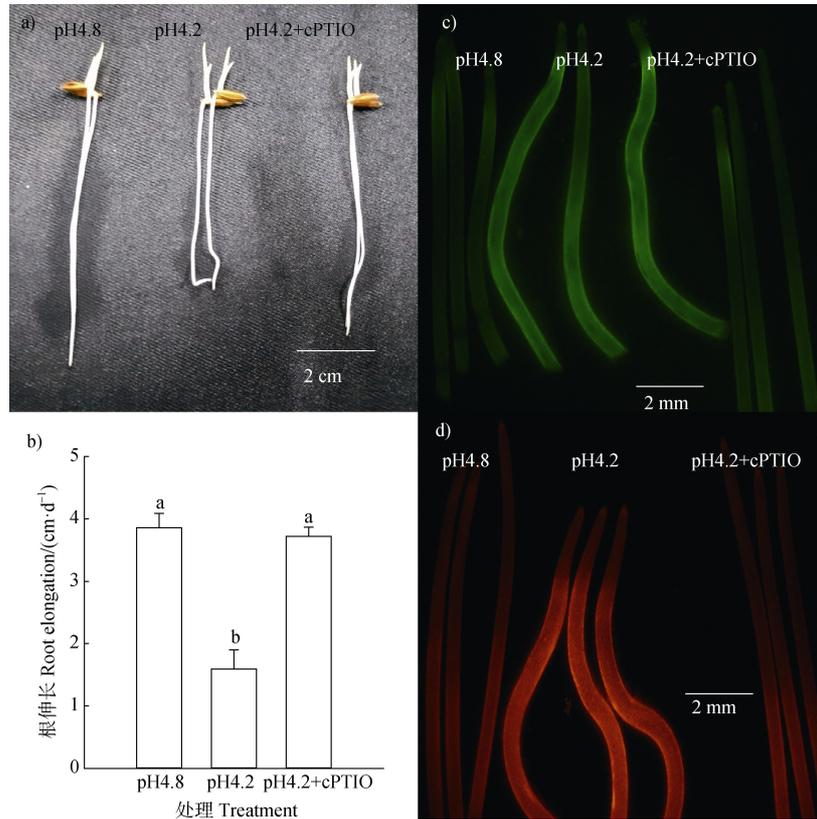
水稻基因组含有 3 个编码硝酸还原酶的基因, *NIA1* (Os08g0468100)、*NIA2* (Os08g0468700) 和

NIA3 (Os02g0770800)。低 pH 显著提高了 Jinguoyin 中 *NIA1* 和 *NIA2* 的表达,其表达量提高了 1.29 倍,但对 Kasalath 中 *NIA1* 和 *NIA2* 的表达无显著影响(图 8a)。Kasalath 和 Jinguoyin 中 *NIA3* 的表达均受到低 pH 的诱导,但 Jinguoyin 中的变化幅度更大(图 8b)。

3 讨论

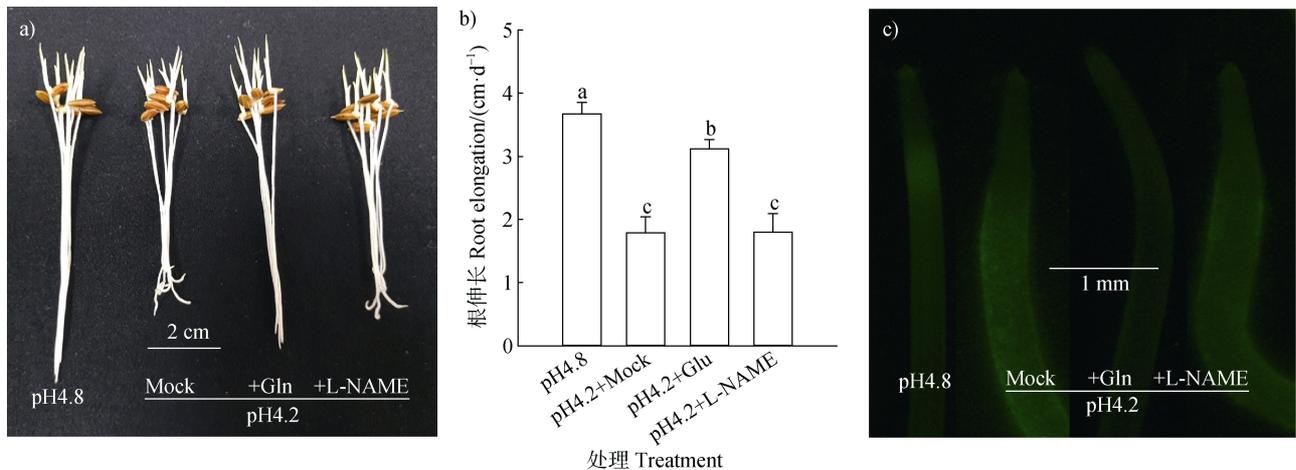
3.1 酸毒诱导水稻 ROS 积累

低 pH 降低根系的 H^+ 分泌^[16],削弱细胞壁的完整性^[17-19]以及诱导 ROS 产生^[20-22],从而抑制根系生长。本研究中,低 pH 通过诱导以 $O_2^{\cdot-}$ 为主的 ROS 积累,对水稻品种 Jinguoyin 产生酸毒(图 2h,图 3c,图 3d)。NADPH 氧化酶是植物遭遇生物和非生物逆境胁迫时产生 $O_2^{\cdot-}$ 的主要来源^[33-34],本研究中低 pH 显著提高了 Jinguoyin 中 NADPH 氧化酶的活性(图 3e),因此推测 Jinguoyin 中升高的 $O_2^{\cdot-}$ 含量是由提高的 NADPH 氧化酶活性产生的。SOD 能够催化 $O_2^{\cdot-}$ 歧化生成氧和过氧化氢, Jinguoyin 中 SOD 活性虽然也显著提高(图 3a),但却未发挥应有的作用。可能原因是 Jinguoyin 中 NADPH 氧化酶



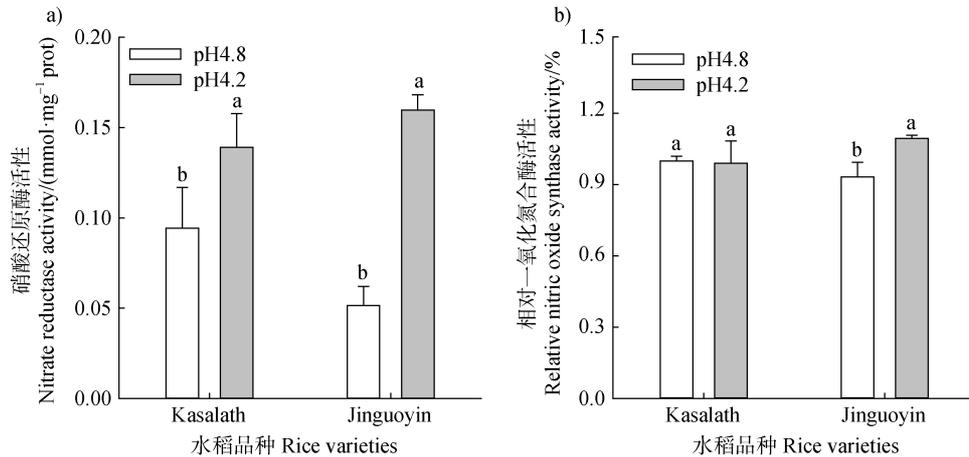
注：不同字母表示当前指标在不同处理下的差异达显著水平 ($n = 10, P < 0.05$)。cPTIO 为 2-(4-羧基苯基)-4,4,5,5-四甲基咪啉-1-氧基-3-氧化物钾盐。Note: Different letters indicate a significant difference on the current parameter of a variety at different pH values ($n = 10, P < 0.05$). cPTIO is 2-(4-Carboxyphenyl)-4,4,5,5-tetramethylimidazoline-1-oxyl-3-oxide potassium salt.

图 5 NO 清除剂 cPTIO 对 Jinguoyin 根生长 (a, b)、根尖 NO 信号 (c) 和 ROS 信号 (d) 的影响
Fig. 5 Effect of NO scavenger cPTIO on root growth (a, b), NO (c) and ROS (d) in the root tips of Jinguoyin



注：不同字母表示当前指标在不同处理下的差异达显著水平 ($n = 10, P < 0.05$)。Mock 为空白对照, Gln 为谷氨酰胺, L-NAME 为 N'-硝基-L-精氨酸甲酯盐酸盐。Note: Different letters indicate a significant difference in the current parameter of a variety at different pH values ($n = 10, P < 0.05$). Mock is the control, Gln is glutamine, and L-NAME is N^G-Nitro-L-arginine Methyl Ester, Hydrochloride.

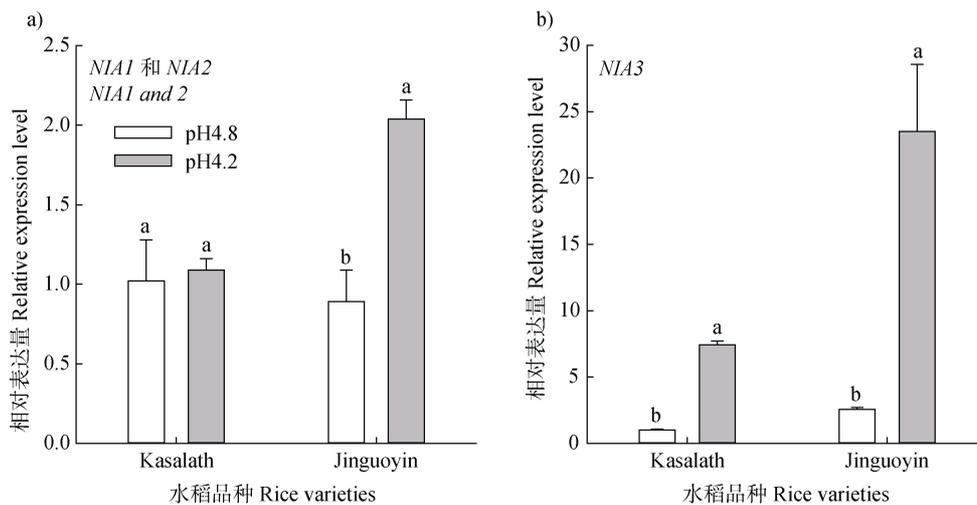
图 6 酶抑制剂 Gln 和 L-NAME 对 Jinguoyin 根生长 (a, b) 和根尖 NO 信号 (c) 的影响
Fig. 6 Effect of enzyme inhibitor Gln and L-NAME on root growth (a, b) and NO (c) in the root tips of Jinguoyin



注：不同字母表示某个品种当前指标在不同 pH 下的差异达显著水平 ($n=3, P<0.05$)。下同。Note: Different letters indicate a significant difference in the current parameter of a variety at different pH values ($n=3, P<0.05$). The same below.

图 7 pH 对 Kasalath 和 Jinguoyin 根尖硝酸还原酶活性 (a) 和一氧化氮合成酶活性 (b) 的影响

Fig. 7 Effect of pH on the activity of nitrate reductase (a) and nitric oxide synthase (b) in the root tips of Kasalath and Jinguoyin



注：不同字母表示某个品种当前指标在不同 pH 下的差异达显著水平 ($n=3, P<0.05$)。Note: Different letters indicate a significant difference in the current parameter of a variety at different pH values ($n=3, P<0.05$).

图 8 pH 对 Kasalath 和 Jinguoyin 根尖 *NIA1* 和 *NIA2* (a) 及 *NIA3* (b) 的影响

Fig. 8 Effect of pH on the expression of *NIA1* and 2 (a) and *NIA3* (b) in the root tips of Kasalath and Jinguoyin

催化产生 $O_2^{\cdot-}$ 速率要高于 SOD 消耗 $O_2^{\cdot-}$ 的速率, 或者 Jinguoyin 中提高的 SOD 活性与 NADPH 氧化酶催化产生的 $O_2^{\cdot-}$ 所在位置并不一致, 或者兼而有之。NADPH 氧化酶催化产生 $O_2^{\cdot-}$ 主要位于质外体^[35-36], 在此部位负责清除 $O_2^{\cdot-}$ 的是铜锌-SOD (以铜或锌离子为辅基的 SOD), 但一般质外体的 ROS 清除机制并不高效^[37], 因此导致 Jinguoyin 积累 $O_2^{\cdot-}$ 而产生酸毒。

3.2 NO 诱导根尖 ROS 积累

在植物体内, NO 作为气体信号分子通过激活抗氧化系统而间接清除 ROS, 亦可直接与 ROS 反应而清除 ROS, 因此它被称为次级抗氧化剂^[29]。例如, 水稻一氧化氮合酶介导的早期 NO 爆发, 通过增强根系抗氧化能力, 缓解水分胁迫诱导的氧化损伤^[38]。大豆硝酸还原酶合成的 NO 通过调节根系抗坏血酸-谷胱甘肽循环, 可以消除铝诱导的氧化胁迫^[7]。NO

也可提高红芸豆、大豆和小麦等植物的铝耐性^[8-11]。本研究中,添加 NO 清除剂 cPTIO 同时清除酸敏感品种 Jinguoyin 根尖的 NO 和 ROS (图 5b, 图 5c), 显著提高 Jinguoyin 在低 pH 下的根生长 (图 5a), 这表明低 pH 对酸敏感品种 Jinguoyin 的毒害作用与低 pH 诱导产生的 NO 有关。而且酸毒诱导的 NO 信号处于 ROS 信号的上游, 可通过降低酸敏感品种 Jinguoyin 中 NO 信号而降低氧化胁迫来缓解酸毒。但是, NO 在酸毒中诱导酸敏感品种 Jinguoyin ROS 积累的机制尚不清楚。有研究发现, 在大豆铝胁迫中, NO 通过促进细胞质葡萄糖-6-磷酸脱氢酶活性, 进而提高 NADPH 氧化酶的活性, 从而导致 ROS 积累, 以产生氧化胁迫^[39]。本研究中, 酸敏感品种 Jinguoyin 根尖的 NADPH 氧化酶活性在低 pH 下大幅提高 (图 3e), 且 NO 含量也有显著提高 (图 5c), 但是否通过 NO 促进葡萄糖-6-磷酸脱氢酶活性而引起 NADPH 氧化酶活性升高, 从而导致 ROS 积累, 尚需进一步的验证。

3.3 硝酸还原酶合成 NO

目前, 已知植物 NO 的生物合成途径至少有硝酸还原酶途径和一氧化氮合酶途径等 7 种^[27]。本研究中, 低 pH 导致 Jinguoyin 的硝酸还原酶活性的增加幅度远高于一氧化氮合酶 (图 7), 且外源添加硝酸还原酶反馈抑制剂 Gln 明显抑制低 pH 下 Jinguoyin 根尖 NO 信号的产生, 而外源添加一氧化氮合酶抑制剂 L-NAME 对低 pH 下 Jinguoyin 根尖 NO 信号并无影响 (图 6b), 因此, 低 pH 下 Jinguoyin 中 NO 的合成是通过硝酸还原酶途径。水稻品种 Jinguoyin 根尖硝酸还原酶活性的提高, 一方面是由于低 pH 可直接激活硝酸还原酶^[40], 另一方面低 pH 会抑制亚硝酸还原酶活性, 导致底物亚硝酸浓度提高, 从而进一步促进硝酸还原酶合成 NO^[41]。此外, 通过转录合成新的硝酸还原酶也可促进 Jinguoyin 根尖硝酸还原酶活性的提高。水稻中有两种硝酸还原酶, 一种是 NADH 依赖的硝酸还原酶, 由 *NIA1* 和 *NIA2* 编码; 一种是 NADPH 依赖的硝酸还原酶, 由 *NIA3* 编码。一般水稻硝酸还原酶的活性以 NADH 依赖的硝酸还原酶为主^[32]。在酸敏感水稻 Jinguoyin 中, 低 pH 使 *NIA1*、*NIA2* 和 *NIA3* 的表达均大幅升高 (图 8), 引起硝酸还原酶的活性升高, 促进根尖 NO 信号的富集 (图 5c)。而在酸耐性水稻 Kasalath

中 *NIA3* 的表达受到低 pH 诱导 (图 8b), 但 *NIA3* 编码的 NADPH 依赖的硝酸还原酶对硝酸还原酶活性的贡献并不高^[32], 它的上调引起硝酸还原酶活性升高但增加程度不高 (图 7a), 并未引起根尖 NO 信号发生明显变化。

4 结 论

本研究利用耐酸性不同的两个籼稻品种 Kasalath 和 Jinguoyin, 发现在酸敏感水稻 Jinguoyin 中低 pH 引起的酸毒与 NO 介导的 ROS 富集相关, 酸毒引起的 NO 信号主要与硝酸还原酶活性的提高有关, 而硝酸还原酶活性的提高与硝酸还原酶基因 *NIA1* 和 *NIA2* 的表达上调有关。

参考文献 (References)

- [1] von Uexküll H R, Mutert E. Global extent, development and economic impact of acid soils[J]. *Plant and Soil*, 1995, 171 (1): 1—15.
- [2] Guo J H, Liu X J, Zhang Y, et al. Significant acidification in major Chinese croplands[J]. *Science*, 2010, 327 (5968): 1008—1010
- [3] Food and Agriculture Organization (FAO). World agriculture: Towards 2015/2030 summary report[R]. Rome, 2002.
- [4] Iuchi S, Koyama H, Iuchi A, et al. Zinc finger protein STOP₁ is critical for proton tolerance in *Arabidopsis* and coregulates a key gene in aluminum tolerance[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2007, 104 (23): 9900—9905.
- [5] Kochian L V, Piñeros M A, Liu J P, et al. Plant adaptation to acid soils: The molecular basis for crop aluminum resistance[J]. *Annual Review of Plant Biology*, 2015, 66: 571—598.
- [6] Kobayashi Y, Kobayashi Y, Watanabe T, et al. Molecular and physiological analysis of Al³⁺ and H⁺ rhizotoxicities at moderately acidic conditions[J]. *Plant Physiology*, 2013, 163 (1): 180—192.
- [7] Wang H H, Li Y, Hou J J, et al. Nitrate reductase-mediated nitric oxide production alleviates Al-induced inhibition of root elongation by regulating the ascorbate-glutathione cycle in soybean roots[J]. *Plant and Soil*, 2017, 410 (1/2): 453—465.
- [8] Cai M Z, Zhang S N, Wang F M, et al. Protective effect of exogenously applied nitric oxide on aluminum-induced oxidative stress in soybean plants[J]. *Russian Journal of Plant Physiology*, 2011, 58 (5): 791—798.

- [9] Sun C L, Lu L L, Liu L J, et al. Nitrate reductase-mediated early nitric oxide burst alleviates oxidative damage induced by aluminum through enhancement of antioxidant defenses in roots of wheat (*Triticum aestivum*) [J]. *New Phytologist*, 2014, 201 (4): 1240—1250.
- [10] Wang H, Huang J, Bi Y. Nitrate reductase-dependent nitric oxide production is involved in aluminum tolerance in red kidney bean roots[J]. *Plant Science*, 2010, 179(3): 281—288.
- [11] Zhang H, Li Y H, Hu L Y, et al. Effects of exogenous nitric oxide donor on antioxidant metabolism in wheat leaves under aluminum stress[J]. *Russian Journal of Plant Physiology*, 2008, 55 (4): 469—474.
- [12] Tian Q Y, Sun D H, Zhao M G, et al. Inhibition of nitric oxide synthase (NOS) underlies aluminum-induced inhibition of root elongation in *Hibiscus moscheutos*[J]. *New Phytologist*, 2010, 174 (2): 322—331.
- [13] Bose J, Babourina O, Shabala S, et al. Aluminum-dependent dynamics of ion transport in *Arabidopsis*: Specificity of low pH and aluminum responses[J]. *Physiologia Plantarum*, 2010, 139 (4): 401—412.
- [14] Lager I, Andréasson O, Dunbar T L, et al. Changes in external pH rapidly alter plant gene expression and modulate auxin and elicitor responses[J]. *Plant, Cell & Environment*, 2010, 33 (9): 1513—1528.
- [15] Tsang D L, Edmond C, Harrington J L, et al. Cell wall integrity controls root elongation via a general 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid-dependent, ethylene-independent pathway[J]. *Plant Physiology*, 2011, 156 (2): 596—604.
- [16] Yan F, Schubert S, Mengel K. Effect of Low Root Medium pH on Net Proton Release, Root Respiration, and Root Growth of Corn (*Zea mays* L.) and Broad Bean (*Vicia faba* L.) [J]. *Plant Physiology*, 1992, 99 (2): 415—421.
- [17] Monshausen G B, Bibikova T N, Messerli M A, et al. Oscillations in extracellular pH and reactive oxygen species modulate tip growth of *Arabidopsis* root hairs[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2007, 104(52): 20996—21001.
- [18] Tanimoto E, Fujii S, Yamamoto R, et al. Measurement of viscoelastic properties of root cell walls affected by low pH in lateral roots of *Pisum sativum* L[J]. *Plant and Soil*, 2000, 226 (1): 21—28.
- [19] Koyama H, Toda T, Hara T. Brief exposure to low-pH stress causes irreversible damage to the growing root in *Arabidopsis thaliana*: Pectin-Ca interaction may play an important role in proton rhizotoxicity[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2001, 52 (355): 361—368.
- [20] Chen H F, Zhang Q, Zhang Z H. Comparative transcriptome combined with metabolomic and physiological analyses revealed ROS-mediated redox signaling affecting rice growth and cellular iron homeostasis under varying pH conditions[J]. *Plant and Soil*, 2019, 434 (1/2): 343—361.
- [21] Long A, Huang W L, Qi Y P, et al. Low pH effects on reactive oxygen species and methylglyoxal metabolisms in *Citrus* roots and leaves[J]. *BMC Plant Biology*, 2019, 19 (1): 477.
- [22] Yang T Y, Huang W T, Zhang J, et al. Raised pH conferred the ability to maintain a balance between production and detoxification of reactive oxygen species and methylglyoxal in aluminum-toxic *Citrus sinensis* leaves and roots[J]. *Environmental Pollution*, 2021, 268, : 115676.
- [23] Gill S S, Tuteja N. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants[J]. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2010, 48 (12): 909—930.
- [24] Chen H F, Zhang Q, Zhang Z H. Comparative transcriptome combined with metabolomic and physiological analyses revealed ROS-mediated redox signaling affecting rice growth and cellular iron homeostasis under varying pH conditions[J]. *Plant and Soil*, 2019, 434 (1/2): 343—361.
- [25] Zhang Y Y, Zhang W H, Xue L, et al. Advance on NO function in plant growth, development and abiotic stress tolerance[J]. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*, 2012, 32 (4): 835—842. [张艳艳, 章文华, 薛丽, 等. 一氧化氮在植物生长发育和抗逆过程中的作用研究进展[J]. *西北植物学报*, 2012, 32 (4): 835—842.]
- [26] Xia H W, Shi G X, Huang M, et al. Advances on effects of nitric oxide on resistances of plants to heavy metal stress[J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2015, 35 (10): 3139—3147. [夏海威, 施国新, 黄敏, 等. 一氧化氮对植物重金属胁迫抗性的影响研究进展[J]. *生态学报*, 2015, 35 (10): 3139—3147.]
- [27] Xiong J, Fu G F, Yang Y J, et al. Roles of nitric oxide in growth of plant root[J]. *Journal of Huazhong Agricultural University*, 2011, 30 (3): 375—383. [熊杰, 符冠富, 杨永杰, 等. 一氧化氮在植物根系生长发育过程中的作用研究进展[J]. *华中农业大学学报*, 2011, 30 (3): 375—383.]
- [28] Gupta K J, Fernie A R, Kaiser W M, et al. On the origins of nitric oxide[J]. *Trends in Plant Science*, 2011, 16(3): 160—168.
- [29] Sahay S, Gupta M. An update on nitric oxide and its benign role in plant responses under metal stress[J]. *Nitric Oxide*, 2017, 67: 39—52.
- [30] Yamamoto Y, Kobayashi Y, Matsumoto H. Lipid Peroxidation Is an Early Symptom Triggered by Aluminum, But Not the Primary Cause of Elongation Inhibition in Pea Roots[J]. *Plant Physiology*, 2001, 125

- (1): 199—208.
- [31] Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding[J]. Analytical Biochemistry, 1976, 72 (1/2): 248—254.
- [32] Araki R , Kousaka K , Namba K , et al. 2' - Deoxymugineic acid promotes growth of rice (*Oryza sativa* L.) by orchestrating iron and nitrate uptake processes under high pH conditions[J]. Plant Journal, 2015, 81 (2): 233—246.
- [33] Hao F, Wang X, Chen J. Involvement of plasma-membrane NADPH oxidase in nickel-induced oxidative stress in roots of wheat seedlings[J]. Plant Science, 2006, 170 (1): 151—158.
- [34] Scharte J, Schön H, Tjaden Z, et al. Isoenzyme replacement of glucose-6-phosphate dehydrogenase in the cytosol improves stress tolerance in plants[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2009, 106 (19): 8061—8066.
- [35] Gilroy S, Suzuki N, Miller G, et al. A tidal wave of signals: calcium and ROS at the forefront of rapid systemic signaling[J]. Trends in Plant Science, 2014, 19 (10): 623—630.
- [36] Gilroy S, Bialasek M, Suzuki N, et al. ROS, calcium, and electric signals: Key mediators of rapid systemic signaling in plants[J]. Plant Physiology, 2016, 171 (3): 1606—1615.
- [37] Choudhury F K, Rivero R M, Blumwald E, et al. Reactive oxygen species, abiotic stress and stress combination[J]. Plant Journal, 2017, 90 (5): 856—867.
- [38] Cao X C, Zhu C Q, Zhong C, et al. Nitric oxide synthase-mediated early nitric oxide burst alleviates water stress-induced oxidative damage in ammonium-supplied rice roots[J]. BMC Plant Biology, 2019, 19(1): 108.
- [39] Wang H H, Hou J J, Li Y, et al. Nitric oxide-mediated cytosolic glucose-6-phosphate dehydrogenase is involved in aluminum toxicity of soybean under high aluminum concentration[J]. Plant and Soil, 2017, 416(1/2): 39—52.
- [40] Kaiser W M, Brendle-Behnisch E. Acid-base-modulation of nitrate reductase in leaf tissues[J]. Planta, 1995, 196(1): 1—6.
- [41] Ferrari T E, Varner J E. Intact tissue assay for nitrite reductase in barley aleurone layers[J]. Plant Physiology, 1971, 47 (6): 790—794.

(责任编辑：陈荣府)