

水分胁迫对向水性突变体 *rhe2* 根生长与响应的影响^①

李 佳¹, 黄梦静², 任 艳³, 吕 冰^{1*}, 丁国昌³, 施卫明², 许卫锋^{2*}

(1 扬州大学, 江苏扬州 225000; 2 中国科学院南京土壤研究所, 南京 210008; 3 福建农林大学, 福州 350000)

摘 要: 利用非损伤测定技术对拟南芥强向水性突变体 *rhe2*(根毛乙烯突变体) 的根系进行离子组学的初步探究。发现在水分胁迫下, 与野生型拟南芥 WT 相比, 该突变体能够保持相对稳定的根部质子(H⁺)流向与流速; 在植物向水性反应的过程中, 过氧化氢(H₂O₂)和生长素(IAA)可能在根生长的维持及其相关信号转导过程中扮演重要的角色。

关键词: 水分胁迫; 拟南芥; 根; 向水性; 非损伤微测

中图分类号: Q945.17

水资源匮乏已经成为全球性危机之一, 在 20 世纪, 这一百年世界人口增加了将近 4 倍, 工业生产总值增加了约 50 倍, 水资源的消耗更是增长了 100 多倍, 全球用水量已经达到水资源总量的 20%, 逼近水资源开发最大潜力的事实已经成为全球最重大的问题之一^[1-2], 尤其进入 21 世纪, 全球面临的水资源危机大大加深, 日益短缺的水资源越发成为全球关注的热点。就我国国情而言, 农业作为用水大户, 占到了全国用水总量的大约 70%, 而干旱问题尤为突出, 旱地面积约占全国总土地面积的 52.5%, 旱灾频发, 持续时间较长, 受灾地区范围不断扩大, 给农业生产带来极大的影响。据统计, 目前全国正常年份缺水量达 400 亿 m³, 其中农业用水缺口占其 75%, 每年因干旱原因直接减收的粮食约为 100 亿 kg 以上^[3]。由此可见, 利用作物本身的抗旱能力来缓解水资源的缺乏, 对保证农业的可持续发展具有重大的战略意义。

根际环境是土壤与植物互相作用的主要界面, 一方面根际环境为植物的生长发育提供所必须的养分, 另一方面植物在应对根际环境的微弱变化也有其适应机制^[4], 如: 根系通过分泌分泌物的方法来改变根际养分和有害物质的溶解度和移动性, 如改变 pH、改变氧化还原、通过螯合作用和还原作用, 从而达到调节植物吸收和利用根际养分及有益、有害物质的目的, 这一系列的生理途径在克服和缓解逆境胁迫的过

程中具有相当重要的意义^[5]。通常情况下, 在土壤中植物趋向于向有水的地方生长, 这种特性称为植物的向水性, 这种水分供给位置的变化对植物根系统的发育以及形态学上的结构会产生极大的影响。因此, 植物根系的向水性在根系统的发育过程中具有十分重要的作用^[6]。

非损伤微测技术(NMT)是一项利用特异性离子与分子的选择电极, 在不接触被测试样品的情况下所获得的样品中进出的各种离子/分子浓度、流速及运动方向动态信息的尖端特异离子/分子检测技术, 其特点在于方便、快捷、三维、实时以及保持测样品完整和近乎实际生理状态。目前, NMT 可以测量多种离子以及多种分子, 为基础生物学、生理学、病理学、农林学及药物机理研究等领域提供了更好的实验方法与平台^[7-8], 开创了离子组学的研究。本研究利用 NMT 对拟南芥向水性突变体 *rhe2* 进行根部的非损伤测定, 以对其向水性的机理进行探究。

1 材料与方法

1.1 试验材料

选取春化 3 天的拟南芥 WT、突变体 *rhe2* 种子(香港中文大学张建华教授课题组提供的 T-DNA 插入拟南芥突变体材料)分别播种于普通培养基 NM(表 1、表 2), 待长出幼苗 5 天后移苗于水分胁迫培养基以进行短期(4 h)和长期(16 h)水分胁迫处理,

基金项目: 国家自然科学基金项目(31422047; 31272229), 国家“973”计划项目(2014CB954500; 2013CB127402)和中国科学院战略性先导科技专项 B 类(XDB15030201)资助。

* 通讯作者(lubing@yzu.edu.cn; wfxu@issas.ac.cn)

作者简介: 李佳(1990—), 女, 江苏泰州人, 硕士研究生, 主要从事植物营养与分子生物学研究。E-mail: 872563796@qq.com

待测质子、分子流。甘油海藻酸型水分胁迫培养基 WSM 配方：1/2 改良 Hoagland 培养基配方 + 2.5% [v/v]甘油 + 0.5% [w/v]海藻酸。

表 1 普通培养基配方
Table 1 Normal medium component

| 试剂 | 培养液终浓度 |
|--|------------|
| Ca(NO ₃) ₂ ·4H ₂ O | 475.5 mg/L |
| KNO ₃ | 253 mg/L |
| KH ₂ PO ₄ | 68 mg/L |
| MgSO ₄ ·7H ₂ O | 246.5 mg/L |
| NH ₄ NO ₃ | 40 mg/L |
| 铁盐溶液 | 5.56 mg/L |
| 微量元素液(表 2) | 2 ml |

表 2 微量元素液配方
Table 2 Microelement liquid component

| 试剂 | 培养液终浓度(mg/L) |
|---|--------------|
| KI | 0.83 |
| H ₃ BO ₃ | 6.2 |
| MnSO ₄ ·H ₂ O | 22.3 |
| ZnSO ₄ | 8.6 |
| Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O | 0.25 |
| CuSO ₄ ·5H ₂ O | 0.025 |
| CoCl ₂ ·6H ₂ O | 0.025 |

1.2 电极材料

H⁺微电极制备(表 3)：使用电极拉制仪(p-97, Sutter Instrument Co.)对直径 1.5 mm 的玻璃毛细管(TW150-4, World Precision Instruments, Inc., Florida, USA)进行四步拉制,得到尖端直径 2~4 μm 的玻璃微管,对拉得的玻璃微管在 250℃条件下使用二甲基二氯(D3879, Sigma, St Louis, MO, USA)进行硅烷化处理 50 min,处理好的电极从后部灌充相应的电解液(H:40 mmol/L KH₂PO₄+15 mmol/L NaCl, pH 7.0),接着在尖端灌充液态离子交换剂(liquid ion exchanger, LIX)。分子测试微电极为金属电极,不需要进行电解液、液态离子交换剂的灌充。

表 3 微电极型号、规格
Table 3 Microelectrode models and specifications

| 离子/分子 | 型号 | 厂家 | 备注 |
|-------------------------------|------------------------|-------------|--------------|
| H ⁺ | Φ5±1 μm, XY-DJ-01 | Younger USA | 离子测试组织样品使用 |
| H ₂ O ₂ | 尖端直径 2~4 μm, XY-DJ-502 | Younger USA | 极化电压: 600 mV |
| IAA | 尖端直径 2~4 μm, XY-DJ-600 | Younger USA | 极化电压: 700 mV |

1.3 试验方法

1.3.1 电极的标准液校正 对准备好的微电极进行标准液的校正：H⁺：pH 5.0、6.0、7.0；H₂O₂：2、4、6、8、10 μmol/L；IAA：2、4、6、8、10 μmol/L。H⁺的电极只有符合曲线斜率(Nernst slope)才可以用于接下来的测量。将电极固定器(EHB-1)上的 Ag/AgCl 丝从符合要求的电极后面插入,使其与电解液接触。接地参比电极(DRIREF-2)为固体电极。

1.3.2 拟南芥根部 H⁺、H₂O₂、IAA 离子/分子流的测定 将正常生长 5 天的野生型拟南芥 WT、突变体 *rhe2* 幼苗移苗至甘油海藻酸向水性筛选系统板分别进行 4、16 h 短时间和长时间处理,普通培养板作为对照,各处理设置 3 次重复,每次重复 2 株苗。所有样品置于基本测试液中平衡 10 min,固定于培养皿。利用 NMT(NMT-YG-100, Younger USA)进行非损伤测定分析,主要测定拟南芥根部 H⁺、H₂O₂ 和 IAA 离子/分子流的变化。H⁺ 电极平行移动距离为 20 μm, H₂O₂ 电极平行移动距离为 30 μm, IAA 电极平行移动距离为 30 μm。利用相应的离子选择微电极由根冠向上沿着根轴测量根尖的离子流变化。静止中心标记为 0,每个测试位置实时记录离子流时间为 3~5 min,直至获得稳定的离子流速,数据表示为每个测试位置的离子流速的平均值。

1.3.3 数据处理 离子流速根据北京旭月科技有限公司开发的 NMT 流速换算表(JCal V3.2 版)进行计算,用 SPSS13.0 Duncan's Multiple Range Test 进行统计分析, P<0.05 为显著性差异, Sigma Plot 2000 绘制图表。

2 结果与分析

2.1 拟南芥根部 H⁺离子流的测定结果

4 h 短期水分胁迫处理后,拟南芥 WT 与 *rhe2* 距离静止中心 0~150 μm 的 H⁺ 离子流由正常条件下的吸收转变为外排,其他部位 H⁺ 离子流流速减小,吸收的趋势不变,总体上能够保持正常条件下的 H⁺ 离子流平衡(图 1)。距离静止中心 300 μm 和 500 μm (过渡区)的 H⁺ 离子流吸收速率随时间逐渐减小(图 2)。

2.2 拟南芥根部 H₂O₂ 分子流的测定结果

4 h 水分胁迫处理后,拟南芥 WT 与 *rhe2* 距离静止中心 0~150 μm H₂O₂ 分子流由正常条件下的外排转变为吸收, *rhe2* 距离静止中心 500~800 μm H₂O₂ 分子流由正常条件下的外排转变为吸收,其他部位 H₂O₂ 分子流流速减小,吸收的趋势不变,总体上能够保持正常条件下的 H₂O₂ 分子流的平衡(图 3)。

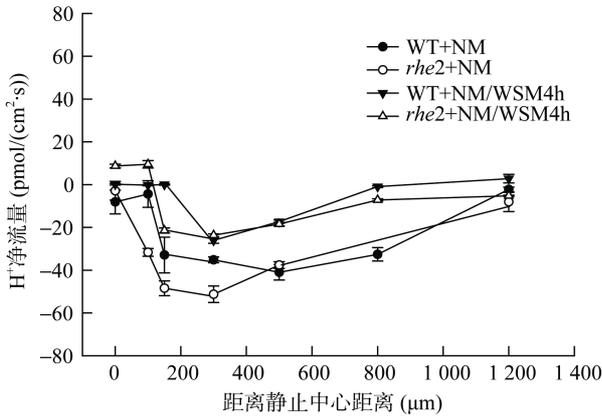


图 1 水分胁迫处理 4 h, 拟南芥 WT、*rhe2* 的根部 H⁺ 离子流变化

Fig. 1 H⁺ flux in the root of WT and *rhe2* after 4h water stress

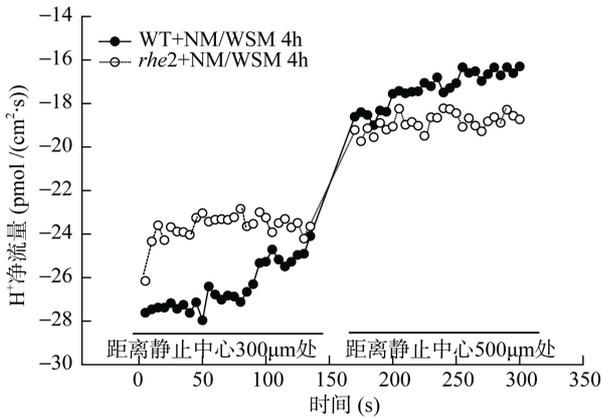


图 2 水分胁迫处理 4 h, 拟南芥 WT、*rhe2* 的根部过渡区 H⁺ 离子流实时变化

Fig. 2 H⁺ flux in the root transition region of WT and *rhe2* after 4h water stress

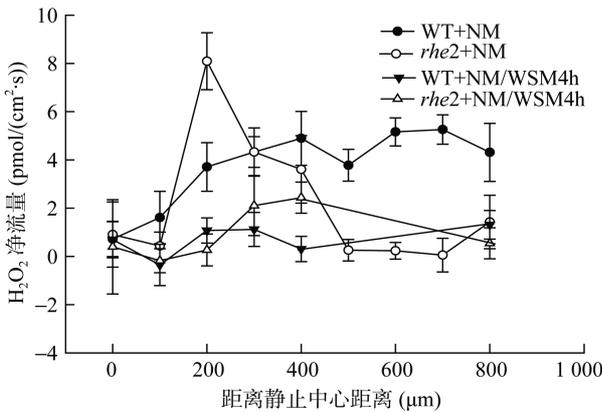


图 3 水分胁迫处理 4 h, 拟南芥 WT、*rhe2* 的根部 H₂O₂ 分子流变化

Fig. 3 H₂O₂ fluxes in root of WT and *rhe2* after 4h water stress

16 h 长期水分胁迫处理后, 突变体 *rhe2* 的 H₂O₂ 分子流与正常条件下相比, 仅 H₂O₂ 分子流流速减小, 外排趋势不变, 而 WT 的 H₂O₂ 分子流在根部的各个部位均由外排转变吸收(图 4)。

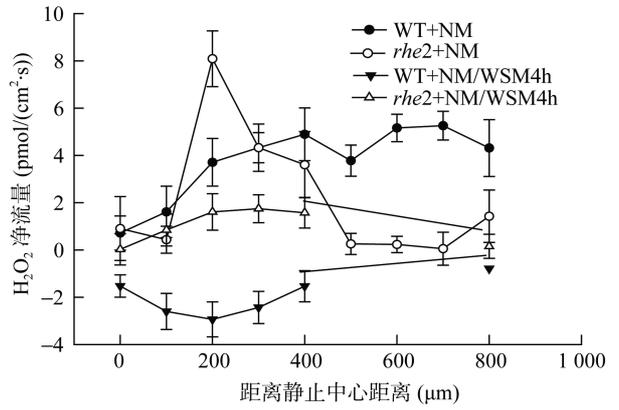


图 4 水分胁迫处理 16 h, 拟南芥 WT、*rhe2* 的根部 H₂O₂ 分子流变化

Fig. 4 H₂O₂ fluxes in root of WT and *rhe2* after 16h water stress

2.3 拟南芥根部 IAA 分子流的测定结果

4 h 水分胁迫处理后, WT 距离静止中心 300 ~ 500 μm 的 IAA 分子流由正常条件下的外排转变为吸收, 其他部位外排流速下降; *rhe2* 静止中心处 IAA 分子流由正常条件下的外排转变为吸收, 800 μm 处 IAA 分子外排流速上升, 其他部位 IAA 分子流外排流速大幅减小(图 5)。

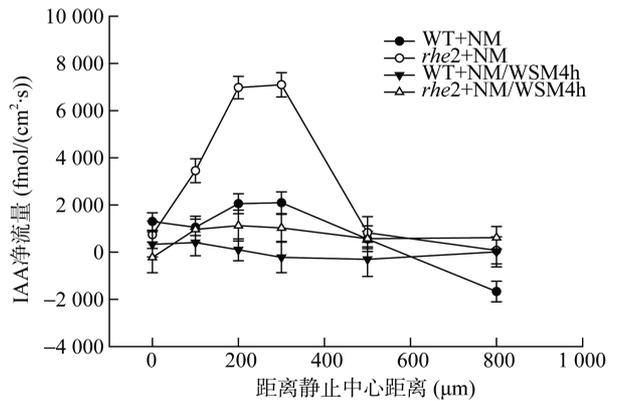


图 5 水分胁迫处理 4 h, 拟南芥 WT、*rhe2* 的根部 IAA 分子流变化

Fig. 5 IAA fluxes in root of WT and *rhe2* after 4h water stress

16 h 长期水分胁迫处理后, WT 的 IAA 分子流与正常条件下相比, 距离静止中心 300 ~ 500 μm IAA 分子流由外排转变为吸收, 800 μm 处 IAA 分子流由吸收转变为外排, 而 *rhe2* 的 IAA 分子流在距离静止中心 0 ~ 300 μm 部位外排流速下降, 300 ~ 500 μm 处外排速率上升(图 6)。

3 讨论与结论

在植物生长发育过程中, 植物根系不仅是吸收和代谢器官, 而且是强大的分泌器官, 根系周围土壤微域更是植物与土壤进行无声“交流”的重要界面。根

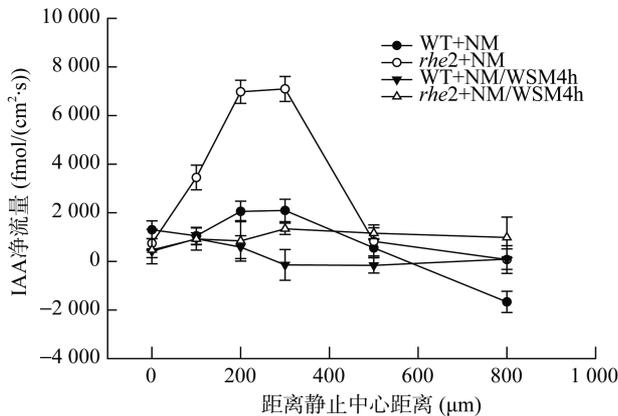


图 6 水分胁迫处理 16 h, 拟南芥 WT、*rhe2* 的根部 IAA 分子流变化

Fig. 6 IAA fluxes in root of WT and *rhe2* after 16h water stress

系一方面从生长介质中吸收养分,另一方面也向生长介质中分泌出大量不同的质子、离子以及分子等^[9]。陆文龙和曹一平^[10]研究结果显示:在营养胁迫条件下,植物根系所分泌的有机酸能够将土壤微量元素进行活化进而吸收,还能缓解铝元素毒害。本试验所采用的是强向水性拟南芥突变体株系 *rhe2*,该突变体在甘露醇向水性突变体水分胁迫培养基中表现出良好的耐水分胁迫能力,在优化型甘油海藻酸向水性培养基中凭借强的向水性克服了水分胁迫,而野生型拟南芥 WT 在生长至甘油海藻酸水分胁迫培养基与正常培养基截面分界处就停止了生长,没能克服培养板上半部分的水分胁迫,其离子、分子机制并不清楚。本试验利用 NMT,对于在水分胁迫下野生型拟南芥 WT 与向水性突变体 *rhe2* 的离子组学进行了初步探讨,主要分析了拟南芥根部 H^+ 离子流、 H_2O_2 以及 IAA 分子流的变化。在感知外界环境变化时,拟南芥根系 H^+ 的外排与内流发生了变化,进行短期水分胁迫处理下,WT 与 *rhe2* 距离静止中心 0 ~ 150 μm 的 H^+ 离子流由正常条件下的吸收转变为外排,其他部位 H^+ 离子流流速减小,吸收的趋势不变,总体上能够保持正常条件下的 H^+ 离子流平衡,距离静止中心 300 ~ 500 μm (过渡区)的 H^+ 离子流吸收趋势不变,吸收速率随时间逐渐减小,这可能与植物抗逆环境条件下通过分泌大量分泌物来维持细胞伸长过程有密切关系^[11]。过渡区是根尖较活跃的区域,位于顶端分裂和基部伸长区域之间。因此,过渡区在营养元素的感受和信号转导中起着非常重要的作用。本研究结果表明:在水分胁迫条件下,突变体 *rhe2* 在距离根尖静止生长中心 >300 μm 区域 H_2O_2 流速随时间的变化而逐渐减小,但仍然显著高于野生型 WT,这可能为根系感受水分胁迫的形态建成和信号转导提供了有利

的条件。前人研究表明: H_2O_2 参与了根毛的形成^[12], H_2O_2 可能是一种不定根发生的信号分子,参与不定根发生的信号转导过程^[13],从而响应水分胁迫应答;根应答 H_2O_2 信号而激活 *OXI 1*(oxidative signal inducible 1) 基因表达,它翻译一种丝氨酸/苏氨酸激酶,这种激酶是根毛生长必需的^[14]。生长素 IAA 在植物根系的生长发育过程中起到关键作用^[15],在正常生长条件和水分胁迫条件下,与野生型拟南芥 WT 相比,突变体 *rhe2* 能维持较高的生长素外排,这在 *rhe2* 的根部可能促进生长素的外排,减少生长素在植物根尖的累积,维持植物体内合适的生长素浓度,从而有利于其主根的伸长。

参考文献:

- [1] Brown LR, Halweil B. China's water shortage could shake world food security[J]. World watch, 1998, 11(4): 10-21
- [2] Seckler D, Barker R, Amarasinghe U. Water scarcity in the twenty-first century[J]. International Journal of Water Resources Development, 1999, 15(1/2): 29-42
- [3] 张正斌. 作物抗旱节水的生理遗传育种基础[M]. 北京: 科学出版社, 2003: 5-6
- [4] 张福锁, 申建波. 根际微生态系统理论框架的初步构建[J]. 中国农业科技导报, 1999, 1(4): 15-20
- [5] 郜红建, 蒋新, 常江, 王代长, 赵振华, 卞永荣. 根分泌物在污染土壤生物修复中的作用[J]. 生态学杂志, 2004, 23(4): 135-139
- [6] Tsutsumi D, Kosugi K, Mizuyama T. Effect of hydrotropism on root system development in soybean (*Glycine max*): growth experiments and a model simulation[J]. Journal of plant growth regulation, 2002, 21(4): 441-458
- [7] 印莉萍, 上官宇, 许越. 非损伤性扫描离子选择电极技术及其在高等植物研究中的应用[J]. 自然科学进展, 2006, 16(3): 262-266
- [8] 丁亚男, 许越. 非损伤微测技术及其在生物医学研究中的应用[J]. 物理, 2007, 36(7): 548-558
- [9] 曹享云. 营养胁迫与根系分泌物[J]. 土壤学进展, 1994, 22(3): 27-33
- [10] 陆文龙, 曹一平. 低分子量有机酸对不同磷酸盐的活化作用[J]. 华北农学报, 2001, 16(1): 99-104
- [11] Xu WF, Jia L, Shi W, Zhou F, Li Q, Liang JS, Zhang JH. Abscisic acid accumulation modulates auxin transport in the root tip to enhance proton secretion for maintaining root growth under moderate water stress. New Phytologist, 2013, 197: 139-50
- [12] Foreman J, Demidchik V, Bothwell JH, Mylona P, Miedema H, Torres MA, Linstead P, Costa S, Brownlee C, Jones JD, Davies JM, Dolan L. Reactive oxygen species produced by NADPH oxidase regulate plant cell growth. Nature, 2003, 422(6930): 442-446
- [13] Li SW, Xu LG, Xu SJ, Feng HY, An LZ. Hydrogen peroxide acts as a signal molecule in the adventitious root

- formation of mung bean seedlings. *Environmental and Experimental Botany*, 2007, 65(1): 173–180
- [14] Rentel MC, Lecourieux D, Ouaked F, Usher SL, Petersen L, Okamoto H, Knight H, Peck SC, Grierson CS, Hirt H, Knight MR. OX11 kinase is necessary for oxidative burst mediated signaling in *Arabidopsis*. *Nature*, 2004, 427 (6977): 858–861
- [15] Xu WF, Jia L, Baluška F, Ding G, Shi WM, Ye N, Zhang JH. PIN2 is required for the adaptation of *Arabidopsis* root to alkaline stress by modulating proton secretion. *Journal of Experimental Botany*, 2012, 63: 6 105–6 114

Influence of Water Stress on Root Growth and Response of Hydrotropism Mutant *rhe2* Root

LI Jia¹, HUANG Meng-jing², REN Yan³, LV Bing^{1*}, DING Guo-chang³, SHI Wei-ming², XU Wei-feng^{2*}
(1 *Yangzhou University, Yangzhou, Jiangsu 225000, China*; 2 *Institute of Soil Science, Chinese Academic of Sciences, Nanjing 210008, China*; 3 *Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350000, China*)

Abstract: The increased hydrotropic responses in the root of *rhe2* were studied by using NMT. Results showed that the roots of *rhe2* could keep the relatively stable flow direction and rate of H⁺ (proton). During the physiological process of root hydrotropism, hydrogen peroxide (H₂O₂) and auxin (IAA) maybe play important roles in maintaining root growth and its signal transduction.

Key words: Water stress; *Arabidopsis thaliana*; Root; Hydrotropism; NMT