

练旺民, 徐薇, 孟卓玲, 等. 表油菜素内酯在缓解水稻砷毒害中的作用[J]. 江苏农业学报, 2018, 34(6): 1267-1275.  
doi: 10.3969/j.issn.1000-4440.2018.06.010

## 表油菜素内酯在缓解水稻砷毒害中的作用

练旺民, 徐薇, 孟卓玲, 陶之欢, 金珂, 郑晶, 张佳艺, 刘庆坡  
(浙江农林大学农业与食品科学学院, 浙江 临安 311300)

**摘要:** 以砷耐受性中等的籼稻品种 93-11 为材料, 通过营养液水培, 生理指标测定和基因表达分析等方法, 研究了表油菜素内酯在缓解水稻亚砷酸盐毒害中的作用。结果表明, 外施表油菜素内酯能有效促进受砷毒害水稻幼苗的生长, 降低水稻根系的砷积累量, 减少砷胁迫对根系细胞膜透性的影响, 降低脯氨酸和非蛋白巯基化合物含量以及叶片中  $H_2O_2$  和  $O_2^{\cdot-}$  等活性氧自由基的含量。通过定量表达分析发现, 外施表油菜素内酯可降低水稻根系中亚砷酸盐和砷酸盐吸收相关基因的表达, 但显著提高了砷还原酶基因的表达。说明外施表油菜素内酯可在一定程度上缓解砷对水稻的毒害作用。

**关键词:** 水稻; 砷; 表油菜素内酯; 基因表达

**中图分类号:** S511.01

**文献标识码:** A

**文章编号:** 1000-4440(2018)06-1267-09

## Effects of supplementation of epibrassinolide on alleviation of arsenic stress in rice

LIAN Wang-min, XU Wei, MENG Zhuo-ling, TAO Zhi-huan, JIN Ke, ZHENG Jing, ZHANG Jia-yi, LIU Qing-po

(School of Agriculture and Food Science, Zhejiang A&F University, Lin'an 311300, China)

**Abstract:** Using 93-11, an indica rice cultivar with moderate arsenite ( $As^{III}$ ) tolerance as material, the potential role of external epibrassinolide (EBR) in regulation of  $As^{III}$  tolerance in rice was investigated, using combinations of hydroponic culture, physiological indices measurements, and gene expression analysis. The results showed that compared with the addition of  $As^{III}$  alone, supplementation of external EBR when seedlings being exposed to  $As^{III}$ , the growth and cell membrane permeability of seedlings were extensively recovered, in the meantime, the accumulation of arsenic in rice seedlings was decreased. In addition, it was observed that after addition of EBR, the contents of proline, non-thiol protein, reactive oxygen species including  $H_2O_2$  and  $O_2^{\cdot-}$  were extensively decreased. Real-time RT-PCR revealed that after supplementation of external EBR under  $As^{III}$  stress, the expression level of genes involved in arsenite and arsenate uptake and translocation were strongly repressed, while the expression of arsenate reductase was markedly induced. In conclusion, the

supplementation of external EBR plays a positive role in alleviating  $As^{III}$  stress in rice.

**Key words:** rice; arsenic; epibrassinolide; gene expression

收稿日期: 2018-08-09

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(31471431); 国家级大学生创新创业训练计划项目(2013200068); 浙江省自然科学基金重点项目(LZ19B070001); 浙江农林大学学生科研训练项目(2013200037)

作者简介: 练旺民(1996-), 男, 浙江丽水人, 本科, 研究方向为作物逆境生物学。(E-mail) 979363065@qq.com。徐薇为共同第一作者。

通讯作者: 刘庆坡, (E-mail) liuqp@zafu.edu.cn

砷是重要的环境污染物, 为表土污染五大有害元素之一<sup>[1]</sup>, 对动、植物具有强烈毒害作用。长期以来, 由于自然地质条件以及含砷农用化学品的大量使用以及砷矿开采等人类作业活动, 造成土壤中的砷过量

积累。特别是近年来,随着现代工农业的迅速发展,受砷污染的土壤面积逐年增加,污染程度呈进一步恶化趋势,严重影响到“菜篮子”的质量安全。据统计,全球目前有超过  $1.5 \times 10^8$  人正遭受慢性砷毒害,其中约  $1.0 \times 10^8$  人口分布在南亚和东南亚地区<sup>[2]</sup>。其中,中国是受砷毒害最严重的国家之一。

相比于小麦、玉米等旱粮作物,水稻对砷的吸收与富集能力更强<sup>[3-4]</sup>。水稻是世界约  $3.0 \times 10^9$  人口的主粮。在中国,约 60% 的人口以稻米为主食。所以,食用稻米已成为人体砷暴露危害的一个重要途径<sup>[5-6]</sup>。另外,砷易在植物的根系、地上部茎叶中积累,而很多作物的茎叶部分常被作为家畜的饲料使用,这很容易使砷通过食物链进行“生物放大”<sup>[7]</sup>,进一步危害人类健康。因此,水稻砷污染已成为关系人类健康的世界性环境、卫生与食品安全重大问题,亟待解决。

自然界中,砷主要以无机砷[砷酸盐( $\text{As}^{\text{V}}$ )和亚砷酸盐( $\text{As}^{\text{III}}$ )]和有机砷(甲基化砷)等赋存形态存在,其中无机砷的毒性大于有机砷,而无机砷中  $\text{As}^{\text{III}}$  的毒性高于  $\text{As}^{\text{V}}$ <sup>[2,5]</sup>。在淹水条件下,稻田土壤中砷的溶解度和生物有效性大幅增加, $\text{As}^{\text{III}}$  是主要的存在形态<sup>[2,5]</sup>。当土壤 pH 值为 2~9 时, $\text{As}^{\text{III}}$  常以中性分子形式存在,其化学性质与硅酸盐相似,因而可通过硅酸盐转运蛋白进入根系,进而向维管束迁移<sup>[8-10]</sup>。近年来,有关水稻对砷吸收、转运、积累等代谢重要功能基因的鉴定及作用机理研究等取得重要进展<sup>[2,7,11-13]</sup>; $\text{As}^{\text{III}}$  可通过水通道蛋白超家族中 NIP 和 PIP 亚家族成员被根系吸收<sup>[14-15]</sup>;吸收的部分  $\text{As}^{\text{III}}$  与谷胱甘肽(GSH)和/或植物螯合肽(PC)形成  $\text{As}^{\text{III}}$ -GSH 和/或  $\text{As}^{\text{III}}$ -PC 复合物,被转入液泡中隔离;另有部分  $\text{As}^{\text{III}}$  通过 Lsi1 外排到土壤溶液或培养介质中<sup>[16]</sup>;剩余  $\text{As}^{\text{III}}$  则通过硅转运蛋白 Lsi2 卸载到木质部,进而向地上部茎叶和籽粒中转运并积累<sup>[17]</sup>。

油菜素内酯(Brassinosteroid, BR),又称芸薹素内酯,是植物中最早发现的一类甾醇类激素<sup>[18]</sup>,它广泛存在于植物的花粉、种子、茎秆和叶片等组织器官中,参与调控植物多方面的生长发育过程<sup>[19]</sup>,尤其在促进种子萌发、幼苗生长,提高光合作用效率,延迟器官衰老和提高抗逆性等方面具有重要作用<sup>[20-21]</sup>。表油菜素内酯(Epibrassinosteroid, EBR)是一种人工合成的高活性油菜素内酯类似物,具有促进植物生长,促进细胞伸长和分裂,促进植物光合作用,提高植物

抗逆性等多种生理功能<sup>[22-25]</sup>。尚宏芹等<sup>[26]</sup>研究发现,外源 EBR 可缓解汞胁迫对小麦幼苗的伤害,这可能与 EBR 能提高逆境条件下小麦中的抗氧化酶活性及抗氧化物质含量,降低丙二醛(Malondialdehyde, MDA)和  $\text{H}_2\text{O}_2$  含量等有关。但是,外源 EBR 能否缓解亚砷酸盐对水稻的毒害作用尚不清楚。

因为  $\text{As}^{\text{III}}$  是厌氧条件下土壤溶液中砷的主要存在形式,而且  $\text{As}^{\text{III}}$  对水稻的毒性高于  $\text{As}^{\text{V}}$ ,所以本研究在采用营养液水培条件下,选择亚砷酸钠进行砷胁迫处理,分析表油菜素内酯对砷胁迫的缓解作用。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料处理

选用砷耐受性中等的籼稻品种 93-11 为试验材料。挑选饱满种子若干,0.5%次氯酸钠消毒 15 min 后用蒸馏水冲洗 3~5 次,然后在蒸馏水中浸泡过夜。将种子置于铺有润湿发芽纸的发芽盒中发芽,待幼苗长至 5 cm 左右时,选取长势均匀一致的水稻幼苗转移到培养器皿中。每个培养器皿中固定 8 株幼苗并在其中加入 2 L Kimura 营养液(配方见表 1),在培养箱继续培养,培养条件为 30 ℃ 光照 16 h 和 25 ℃ 黑暗 8 h。15 d 后,选择长势均匀的水稻植株分成 3 组,分别进行以下处理:①普通营养液(CK)培养+蒸馏水喷施;②含  $30 \mu\text{mol/L}$   $\text{As}^{\text{III}}$  ( $\text{NaAsO}_2$ ) 的营养液培养+蒸馏水喷施;③含  $30 \mu\text{mol/L}$   $\text{As}^{\text{III}}$  ( $\text{NaAsO}_2$ ) 的营养液培养+  $0.1 \mu\text{mol/L}$  2,4-表油菜素内酯(2,4-Epibrassinosteroid)喷施。每个处理设 6 个重复,每个重复 8 株。处理 3 d,每天更换营养液。培养环境与处理前一致,于黑暗与光照交替时喷施 EBR,每盆 8 株苗共喷 80 ml,全株均匀喷施。

### 1.2 生理指标测定

1.2.1 株高和根长相对增量及生物量测定 分别在处理第 0 d 和第 3 d 测定水稻幼苗的株高、根长和鲜质量,计算相对生长量。同时用烘箱杀青后测定地上部生物量的干质量。

1.2.2 砷含量测定 将干燥后的根系和茎秆(不含叶片)分别研磨成粉末。在各处理粉末样品(0.3 g)中分别加入 2 ml  $\text{HNO}_3$  和 0.5 ml  $\text{H}_2\text{O}_2$ , 120 ℃ 条件下硝化反应 24 h。反应结束后冷却,将硝化溶液用去离子水补成 20 ml。用电感耦合等离子体质谱仪(ICP-MS, Agilent 7500a)测定样品中的总砷含量。

表 1 水稻水培营养液配方

Table 1 Nutrient composition for hydroponic culture of rice plants

成分	名称	浓度
大量元素	硝酸钾 (mmol/L)	0.091
	磷酸二氢钾 (mmol/L)	0.100
	硫酸铵 (mmol/L)	0.183
	硫酸镁 (mmol/L)	0.274
	硝酸钙 (mmol/L)	0.183
微量元素	氯化锰 ( $\mu\text{mol/L}$ )	0.5
	硼酸 ( $\mu\text{mol/L}$ )	3.0
	钼酸铵 ( $\mu\text{mol/L}$ )	0.1
	硫酸铜 ( $\mu\text{mol/L}$ )	0.2
	硫酸锌 ( $\mu\text{mol/L}$ )	0.4
	乙二胺四乙酸铁钠 ( $\mu\text{mol/L}$ )	40.0

营养液 pH 调至 5.5。

1.2.3 砷吸收能力与转移能力测定 采用植株地上部和根系中的总砷含量与根干质量的比值来表示水稻根部吸收砷的能力,即作为砷吸收能力的指标。 $SAU = [(C_{\text{根-砷}} \times M_{\text{根}}) + (C_{\text{地上部-砷}} \times M_{\text{地上部}})] / M_{\text{根}}$ ,式中, $SAU$  (Specific arsenic uptake) 为水稻对砷的吸收能力, $C_{\text{根-砷}}$ 和 $C_{\text{地上部-砷}}$ 分别为根系和地上部中总砷含量, $M_{\text{根}}$ 和 $M_{\text{地上部}}$ 分别为根系和地上部的干质量。砷转移速率 (Translocation factor, TF) 为评价砷从地下部根系转移到地上部能力的指标,用地上部中总砷含量与根系中总砷含量的比值来表示。

1.2.4 伊文思蓝染色 挑选长势一致的幼苗,将其最长的2~3条根剪下,在0.5 mmol/L  $\text{CaCl}_2$  溶液 (pH=4.5) 中浸泡5 min,用纯水洗涤,吸干水分后,用伊文思蓝溶液 (0.025%) 浸泡0.5~1.0 h,用水清洗15 min,吸干。取1.5 cm左右根尖在体视显微镜 (型号为SZX10, OLYMPUS公司产品) 下观察染色情况。

1.2.5 二氨基联苯胺 (3,3-diaminobenzidine, DAB) 和氮蓝四唑 (Nitrobluetetrazolium, NBT) 染色 选取水稻幼苗同一部位的叶片 (约1.5 cm长), 分别浸没在1 mg/mL的DAB和NBT溶液中。避光条件下用DAB染液静置染色24 h,再在强光下用NBT染液染色,直至出现明显表型,然后将样品浸没在无水乙醇中,于70℃水浴中脱色至黄白色。脱色完成后,将样品冷却并浸入70%乙醇中。使用体视显微镜观察染色情况。

1.2.6 相对电导率测定 使用数字电导率仪检测

根系的电解质渗漏。用蒸馏水冲洗幼苗根系,取鲜样0.1 g,置于装有10 ml去离子水的试管中室温下浸泡处理12 h,测定浸出液电导率( $R_1$ ),然后沸水浴加热30 min,冷却至室温后测定电导率( $R_2$ ),同时设置一组纯水对照,煮沸前测定电导率( $R_3$ ),煮沸后测定电导率( $R_4$ ),计算相对电导率。相对电导率= $(R_1 - R_3) / (R_2 - R_4) \times 100\%$ 。

1.2.7 脯氨酸含量测定 将新鲜根系剪碎,加入5 ml 3%磺基水杨酸溶液,沸水浴中浸提10 min,冷却至室温,吸取2 ml上清液,加入2 ml冰醋酸、4 ml 2.5%酸性茚三酮溶液,再次置于沸水浴中显色60 min,冷却后加入4 ml甲苯,涡旋振荡,萃取红色物质,静止后取甲苯层用分光光度计测定520 nm处的吸光值。

1.2.8 非蛋白质巯基化合物 (Non-protein thiols, NPT) 含量测定 取鲜样的全部叶片和根系,液氮研磨,加入4 ml预冷的5%磺基水杨酸溶液,在12 000 g、4℃条件下离心15 min,取上清液1 ml,依次加入1.85 ml 0.2 mol/L Tris-HCl 缓冲液 (pH=8.2) 和0.15 ml 10 mmol/L DTNB [5,5'-Dithiobis-(2-nitrobenzoic acid)],静置20 min后用分光光度计测定412 nm处的吸光值。

1.2.9 砷吸收、转运和积累等相关基因的表达分析

在亚砷酸盐处理后1 h、3 h、6 h、12 h和24 h等不同时间点分别取水稻根系,采用孙德权等<sup>[27]</sup>方法提取总RNA。根据设计的基因特异引物 (表2),利用定量RT-PCR对6个功能已知的水稻砷吸收、转运和积累等相关基因的表达进行分析。采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算基因的相对表达量。

### 1.3 统计分析

所有数据均来自多次 ( $\geq 3$  次) 重复试验。采用Rv3.4.0软件绘图,并对不同处理数据进行单因素方差分析 (ANOVA),在0.05水平上分析其差异显著性。

## 2 结果与分析

### 2.1 表油菜素内酯对砷处理下水稻株高、根长和生物量的影响

从图1可以看出,As<sup>III</sup>胁迫处理可显著抑制水稻幼苗的生长。与CK相比,As<sup>III</sup>处理后水稻株高和根长分别下降了95.2%和94.9%。但是,与单独As<sup>III</sup>处理相比,外施表油菜素内酯后幼苗的株高和

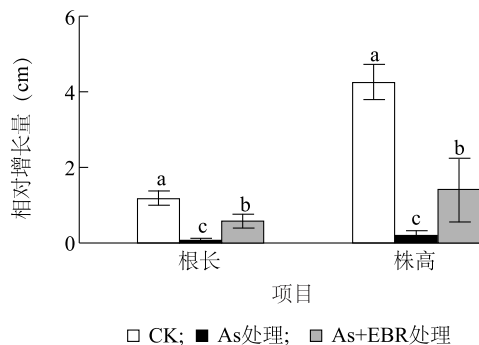
根长得到明显恢复,分别提高了 865%和 759%。此外, $As^{III}$ 胁迫对水稻幼苗地上部生物量也有显著抑制作用(图 2 和图 3)。与 CK 相比, $As^{III}$ 处理后单株鲜质量和干质量分别下降了 70.2%和 25.9%;而与

单独  $As^{III}$ 处理相比,外施油菜素内酯后单株鲜质量和干质量分别提高了 161.0%和 13.6%,差异达到显著水平。

表 2 定量 RT-PCR 扩增所使用的引物序列

Table 2 Primer sequences used for quantitative RT-PCR amplification

基因名称	正向引物(5'→3')	反向引物(5'→3')	作用 <sup>[7,12]</sup>	登录号
<i>Actin</i>	ATCATGAAGTCCGACGTGG	AATGCCAGGGAACATAGTGGT	内参基因	XM_015774830
<i>OsLsi1</i>	ATCTACTTCCTGGGCCCACT	AGGAGAGCTTCTGGGAGGAG	亚硝酸盐吸收	XM_015770687
<i>OsLsi2</i>	ATCACCTTCCCAAGTTCC	CAGCTCCCTCCAGTACATGC	亚硝酸盐向木质部卸载	XM_015776731
<i>OsPIP2;4</i>	TGGGCTCTTTCTCCTTCAG	GCAGGGCTTCTCACTTAAAC	亚硝酸盐吸收	XM_015789100
<i>OsNIP2;2</i>	GGACCAACTCTCGGCTGAAC	CACGTCACGAACACAAGCAG	亚硝酸盐吸收	XM_015788648
<i>OsPT8</i>	AGAAGGC AAAA GAAATGTGTGTTAAAT	AAAATGTATTCTGCGCAAAATTGCT	硝酸盐吸收	XM_015758636
<i>OsHAC4</i>	TGGCTTCACTCTTCGGCAA	CATTCTGAATCCCGCGTCCA	硝酸还原酶	XM_026023318



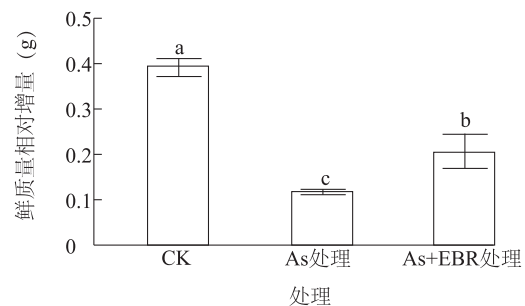
不同小写字母表示不同处理间差异达到显著水平( $P<0.05$ )。

图 1 表油菜素内酯对砷抑制水稻幼苗株高和根长相对增长量的缓解作用

Fig.1 Effects of epibrassinolide on alleviation of inhibition of relative growth of plant height and root elongation of rice seedlings under arsenic stress

## 2.2 表油菜素内酯对砷处理下水稻砷积累和转移能力的影响

$As^{III}$ 处理后水稻根系和地上部总砷含量分别为  $(14.34\pm 3.85)$  mg/kg 和  $(5.96\pm 3.59)$  mg/kg,外施油菜素内酯后总砷含量分别降至  $(13.07\pm 2.43)$  mg/kg 和  $(5.70\pm 0.53)$  mg/kg,但差异不显著。此外,与单独  $As^{III}$ 处理相比,外施表油菜素内酯可降低根系对砷的吸收能力[SAU 值从  $(22.23\pm 9.21)$  mg/kg 降至  $(18.74\pm 5.78)$  mg/kg],但却增加了砷向地上部转移的能力(TF 值从  $0.399\pm 0.087$  升至  $0.459\pm 0.121$ )。



不同小写字母表示不同处理间差异达到显著水平( $P<0.05$ )。

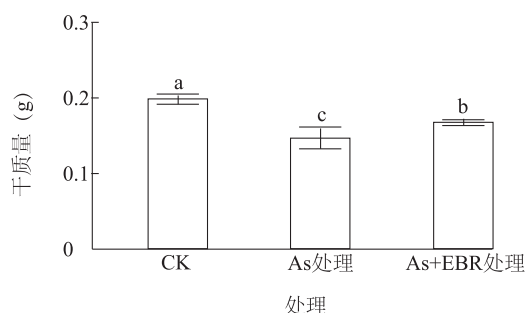
图 2 表油菜素内酯对砷抑制水稻幼苗地上部相对增长量的缓解作用

Fig.2 Effects of epibrassinolide on alleviation of inhibition of relative growth of aerial part of rice seedlings under arsenic stress

## 2.3 表油菜素内酯对砷处理下水稻根系细胞膜透性的影响

根系细胞膜透性可通过伊文思蓝染色来定性比较,未受损的完整细胞膜不会吸收伊文思蓝,但当细胞膜受损后,伊文思蓝就会进入细胞并与蛋白质结合。因此,染色颜色越深表明细胞膜透性越大,细胞受损越严重。从图 4 可见,与 CK 相比, $As^{III}$ 处理的幼苗根尖有明显被染色的现象,呈现蓝色的区域多且染色深,而  $As^{III}$ +外施 EBR 处理的根系染色较浅并且染色区域较少。这表明  $As^{III}$ 胁迫处理可导致幼苗根系细胞膜受损进而透性增大,但喷施外源 EBR 后可有效缓解亚硝酸盐对根系的损伤。此外,与 CK





不同小写字母表示不同处理间差异达到显著水平 ( $P < 0.05$ )。

图3 表油菜素内酯对砷抑制水稻幼苗地上部干质量的缓解作用

Fig.3 Effects of epibrassinolide on alleviation of inhibition of dry weight of aerial part of rice seedlings under arsenic stress

相比,  $As^{III}$  处理后水稻根系的相对电导率显著增加, 提高了 59.4%, 但外施表油菜素内酯后相对电导率显著下降 (比单独  $As^{III}$  处理降低了 55.4%) (图 5)。因此,  $As^{III}$  处理可致使水稻根系细胞的膜系统受到严重损伤, 但外施表油菜素内酯可在一定程度上减轻  $As^{III}$  胁迫对根系的伤害。

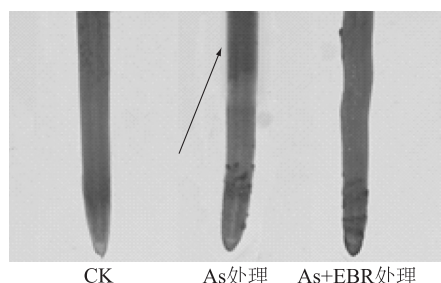
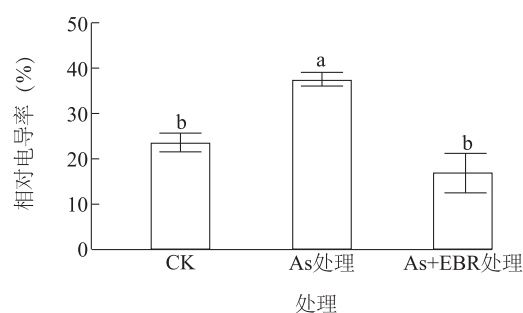


图4 砷与表油菜素内酯处理下水稻幼苗根系的伊文思蓝染色

Fig.4 Evans blue staining of rice seedling roots under arsenic and epibrassinolide treatments

## 2.4 表油菜素内酯对砷处理下水稻叶片活性氧含量的影响

从图 6 可以看出, 与 CK 相比,  $As^{III}$  处理的叶片上具有明显的棕色条带, 且叶脉上染色更明显, 说明组织中  $H_2O_2$  含量较高, 而外施 EBR 后叶片上几乎没有棕色染色条带, 与对照相近。NBT 染色可直观呈现叶片中集聚超氧阴离子的部位, 从而推测叶片的过氧化损伤程度。与 CK 相比,  $As^{III}$  处理的叶片上有大范围的蓝色沉淀, 而外施 EBR 后叶片上的蓝色沉淀显著减少, 且颜色较浅 (图 7)。



不同小写字母表示不同处理间差异达到显著水平 ( $P < 0.05$ )。

图5 砷与表油菜素内酯处理下水稻幼苗根系的相对电导率

Fig.5 Relative electrical conductivity in roots of rice seedlings under arsenic and epibrassinolide treatments

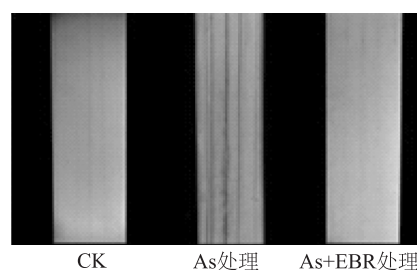


图6 砷与表油菜素内酯处理下水稻幼苗叶片的DAB染色

Fig.6 DAB staining of leaves of rice seedlings under arsenic and epibrassinolide treatments

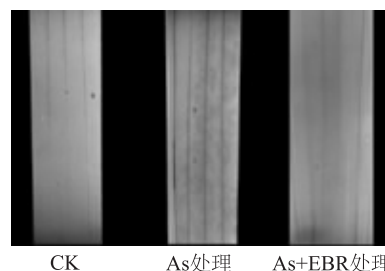


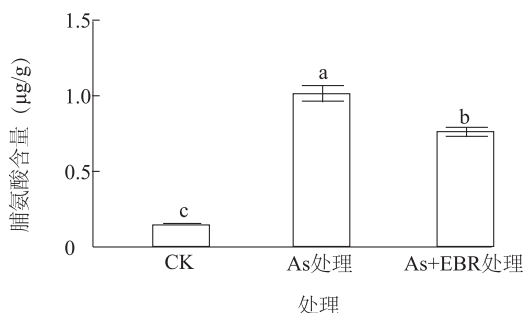
图7 砷与表油菜素内酯处理下水稻幼苗叶片的NBT染色

Fig.7 NBT staining of leaves of rice seedlings under arsenic and epibrassinolide treatments

## 2.5 表油菜素内酯对砷处理下水稻根系脯氨酸和NPT含量的影响

亚砷酸盐处理导致根系中脯氨酸含量极显著上升, 与 CK 相比提高了 587.7%, 但外施表油菜素内酯后脯氨酸含量显著下降, 比单独  $As^{III}$  处理降低了 24.0%, 但仍然高于 CK (图 8)。从图 9 可知, 与 CK 相比,  $As^{III}$  处理后根系中 NPT 含量显著上升, 提高了 108.9%, 但外施 EBR 后根系中 NPT 含量显著下降,

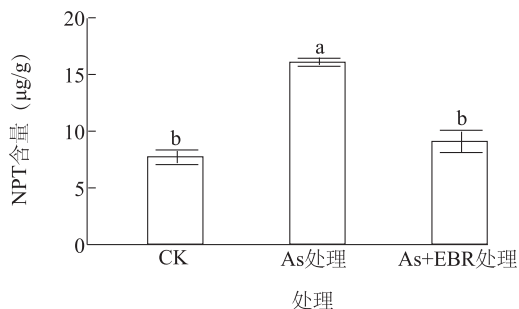
比  $\text{As}^{\text{III}}$  处理降低了 43.7%, 几乎恢复到 CK 水平。



不同小写字母表示不同处理间差异达到显著水平 ( $P < 0.05$ )。

图 8 砷与表油菜素内酯处理下水稻幼苗根系中脯氨酸含量的比较

Fig.8 Comparison of proline contents in roots of rice seedlings under arsenic and epibrassinolide treatments



不同小写字母表示不同处理间差异达到显著水平 ( $P < 0.05$ )。

图 9 砷与表油菜素内酯处理下水稻幼苗根系中 NPT 含量

Fig.9 NPT content in roots of rice seedlings under arsenic and epibrassinolide treatments

## 2.6 表油菜素内酯对砷处理下水稻根系中砷吸收转运等相关基因表达的影响

*OsLsi1*、*OsPIP2;4*、*OsNIP2;2*、*OsPT8* 是水稻中负责亚砷酸盐和砷酸盐吸收的主要基因, *OsLsi2* 主要将吸收的砷卸载到木质部进而向地上部转运, *OsHAC4* 可将砷酸盐还原为亚砷酸盐<sup>[16-17]</sup>。从图 10 可以看出, 喷施外源表油菜素内酯后, *OsLsi1*、*OsPIP2;4* 和 *OsPT8* 的表达量在砷胁迫处理后 12 h 出现显著下调表达, 而 *OsLsi2* 和 *OsHAC4* 的表达量却一直高于单独  $\text{As}^{\text{III}}$  处理。因此, 喷施 EBR 降低了水稻幼苗根系对砷的吸收和转运, 同时增加了幼苗自身的解毒能力, 但却增加了砷在地上部中的积累。

## 3 讨论

油菜素内酯除参与调控植物生长发育外, 还在

植物响应外界逆境胁迫中发挥着重要作用<sup>[28-29]</sup>。李钱峰等<sup>[30]</sup>报道, 施用外源油菜素内酯不仅可促进植物生长, 而且在高盐和干旱等逆境条件下可有效缓解逆境胁迫造成的植物损伤。砷是类金属元素, 高浓度砷可导致植物叶片黄化、卷曲甚至地上部死亡等<sup>[31]</sup>。本研究结果表明, 砷处理下水稻的生长发育受到明显抑制, 但是喷施  $0.1 \mu\text{mol/L}$  表油菜素内酯有效促进了亚砷酸盐胁迫下水稻幼苗的生长, 且在一定程度上增加了地上部干物质的积累, 这表明喷施外源表油菜素内酯可提高水稻幼苗对砷毒害的耐受能力。

砷对植物细胞的毒害作用往往表现在对膜系统的氧化损伤等方面, 因此根系细胞膜系统是防御外界污染物的重要屏障<sup>[32-33]</sup>。大量研究结果证明, 根系相对电导率的高低是判断植物是否处于逆境伤害的一个重要生理指标, 被广泛应用于植物抗性生理研究中。在重金属胁迫下, 植物细胞膜透性增大, 电解质大量外渗, 从而影响细胞膜内外的物质交换, 引起离子平衡失调, 生理代谢紊乱, 严重时导致细胞膜的解体 and 细胞死亡<sup>[34]</sup>。另外, 伊文思蓝染色能定性比较不同外界逆境胁迫下植物幼苗根系细胞的受损程度<sup>[35]</sup>。本研究发现, 使用亚砷酸盐处理一定时间后, 水稻幼苗根尖细胞膜系统严重受损, 且伴随细胞外渗物增多, 导致相对电导率显著上升。这与郭晖等<sup>[36]</sup>的研究结果相一致。同时, 我们也发现, 施加外源表油菜素内酯可显著减轻砷胁迫下水稻幼苗根系细胞膜系统的受损状况。由此可见, 喷施外源表油菜素内酯对砷胁迫下的水稻幼苗根系膜系统具有保护作用。

在逆境胁迫下, 植物体内会产生大量  $\text{O}_2^-$ 、 $\text{H}_2\text{O}_2$  等活性氧自由基<sup>[37]</sup>。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, 进而对植物造成伤害<sup>[38-39]</sup>。DAB 染色和 NBT 染色结果表明, 砷胁迫可导致水稻幼苗叶片发生过氧化损伤, 影响水稻幼苗的正常生长, 而外施表油菜素内酯会明显减轻砷胁迫下水稻叶片中活性氧自由基的产生和积累。油菜素内酯之所以具有提高植物抵抗逆境的能力, 可能是由于其可激活植物中的抗氧化酶保护系统, 从而尽快消除植物体内由于逆境而产生的过多有害自由基<sup>[40]</sup>。

脯氨酸是公认的植物应答逆境胁迫的重要可溶性有机渗透调节物质, 在保护生物膜完整性和维持

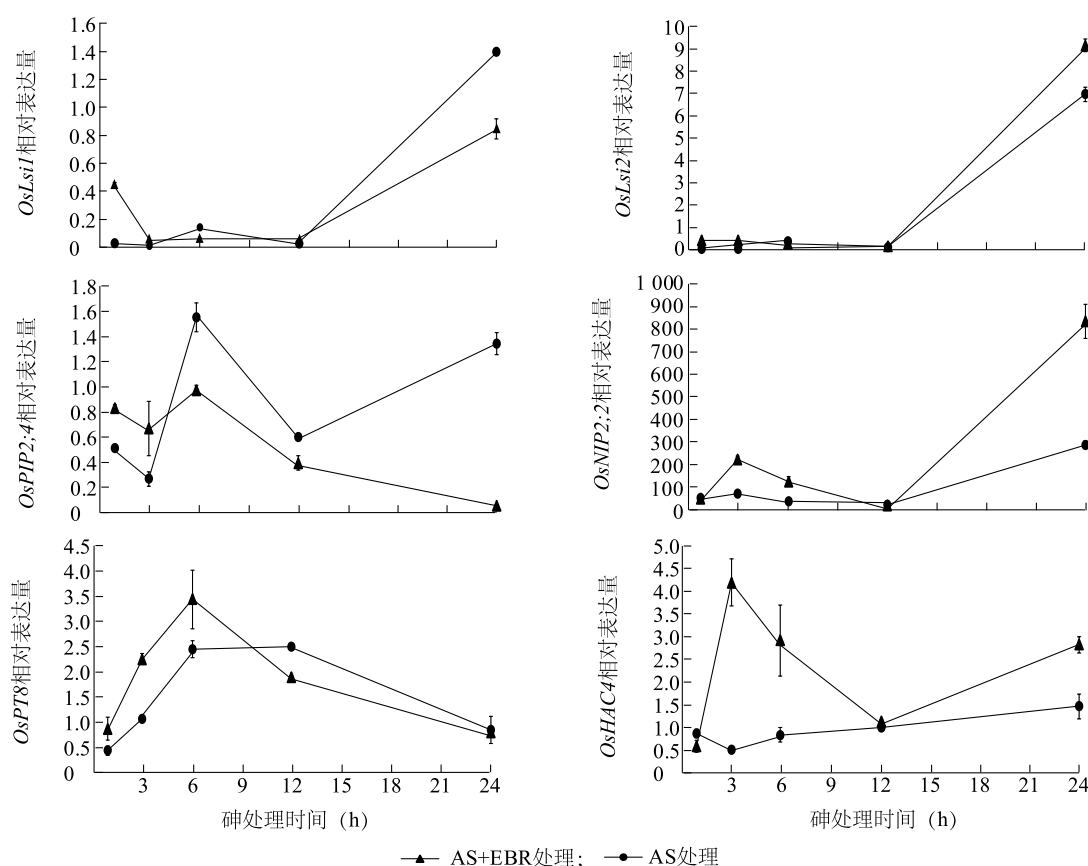


图 10 砷与表油菜素内酯处理下水稻幼苗根系中砷吸收转运等相关基因的相对表达量

Fig.10 The expression level of genes involved in arsenic uptake and translocation in roots of rice seedlings under arsenic and epibrassinolide treatments

生物膜透性以及细胞正常膨胀状态方面具有重要作用<sup>[41-42]</sup>。在逆境条件下,大量游离脯氨酸会在植物体内积累,且其积累指数与植物的抗逆性相关。本研究发现,当受砷胁迫时,水稻根系中脯氨酸大量积累,而砷处理结合外施表油菜素内酯处理下根系中脯氨酸含量降至对照水平,这表明外施表油菜素内酯会影响逆境条件下水稻根系组织中氨基酸代谢水平。

大量研究结果显示,NPT在植物重金属解毒方面具有重要作用。NPT能络合亚砷酸盐(三价砷)并通过离子泵将其储存在液泡中,限制其向地上部运输,致使其在水稻体内的移动性下降,降低其毒性<sup>[43-44]</sup>。三价砷对多肽上的巯基(-SH)具有高亲和力,一旦与蛋白质上的-SH结合后,会影响其正常结构与功能,这是亚砷酸盐导致水稻植株毒害的主要原因<sup>[45]</sup>。本研究发现,水稻幼苗受到亚砷酸盐胁迫后其根系中NPT含量显著增加,但施用亚砷酸盐

后结合表油菜素内酯处理的水稻根系中NPT含量与对照差异不明显,但其机理尚待进一步研究。

通过分析水稻根系中负责亚砷酸盐和砷酸盐吸收及向地上部转移和积累相关基因的表达水平,发现不同处理条件下*OsLsi1*、*OsPIP2;4*、*OsNIP2;2*、*OsPT8*等基因的表达模式截然不同,尤其在表油菜素内酯处理后12h,*OsLsi1*、*OsPIP2;4*、*OsPT8*的表达显著下调,表明外施油菜素内酯会降低水稻根系对培养介质中砷的吸收。*OsLsi2*是控制砷向木质部卸载和籽粒积累的重要基因。我们发现,在亚砷酸盐与表油菜素内酯组合处理下,*OsLsi2*的表达量要高于单独砷处理,表明外施表油菜素内酯会促进砷向地上部转移。*OsHAC4*是砷酸还原酶基因,可将砷酸盐还原为亚砷酸盐<sup>[7,12]</sup>。我们发现,*OsHAC4*的表达量可被外施表油菜素内酯显著诱导表达,说明砷处理下外施表油菜素内酯可能促进水稻根系中 $As^V$ 还原为 $As^{III}$ ,而后者与NPT等结合储存在液泡中从而减

轻砷对水稻的毒害。

## 参考文献:

- [1] JOHNSON B L, DEROSA C T. Chemical mixtures released from hazardous waste sites: Implications for health risk assessment[J]. *Toxicology*, 1995, 105: 145-156.
- [2] LINDSAY E R, MAATHUIS F J M. New molecular mechanisms to reduce arsenic in crops[J]. *Trends in Plant Science*, 2017, 22(12): 1016-1026.
- [3] LIU W J, ZHU Y G, HU Y, et al. Arsenic sequestration in iron plaque, its accumulation and speciation in mature rice plants (*Oryza sativa* L.) [J]. *Environmental Science and Technology*, 2006, 40: 5730-5736.
- [4] LIU W J, ZHU Y G, SMITH F A, et al. Do iron plaque and genotypes affect arsenate uptake and translocation by rice seedlings (*Oryza sativa* L.) grown in solution culture[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2004, 55: 1707-1713.
- [5] ABEDIN M D J, CRESSER M S, MEHARG A A, et al. Arsenic accumulation and metabolism in rice (*Oryza sativa* L.) [J]. *Environmental Science and Technology*, 2002, 36: 962-968.
- [6] SMITH E, JUHASZ A L, WEBER J. Arsenic uptake and speciation in vegetables grown under greenhouse conditions[J]. *Environmental Geochemistry and Health*, 2009, 31: 125-132.
- [7] ARSLAN B, DJAMGOZ M B A, AKÜN E. ARSENIC: a review on exposure pathways, accumulation, mobility and transmission into the human food chain[J]. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, 2017, 243: 27-51.
- [8] 王 钊, 崔江慧, 陈 正, 等. 淹水-控温模式下砷污染水稻土溶液中砷形态的变化[J]. *应用生态学报*, 2013, 24(5): 1415-1422.
- [9] MA J F, YAMAJI N, MITANI N, et al. Transporters of arsenite in rice and their role in arsenic accumulation in rice grain[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2008, 105(29): 9931-9935.
- [10] GUO W, HOU Y L, WANG S G, et al. Effect of silicate on the growth and arsenate uptake by rice (*Oryza sativa* L.) seedlings in solution culture[J]. *Plant and Soil*, 2005, 272: 173-181.
- [11] CHEN Y, HAN Y H, CAO Y, et al. Arsenic transport in rice and biological solutions to reduce arsenic risk from rice[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2017, 8: 268.
- [12] ABBAS G, MURTAZA B, BIBI I, et al. Arsenic uptake, toxicity, detoxification, and speciation in plants: physiological, biochemical, and molecular aspects[J]. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 2018, 15: 59.
- [13] LI N, WANG J, SONG W Y. Arsenic uptake and translocation in plants[J]. *Plant Cell and Physiology*, 2016, 57(1): 4-13.
- [14] CHEN Y, SUN S K, TANG Z, et al. The Nodulin 26-like intrinsic membrane protein OsNIP3;2 is involved in arsenite uptake by lateral roots in rice[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2017, 68(11): 3007-3016.
- [15] MOSA K A, KUMAR K, CHHIKARA S, et al. Members of rice plasma membrane intrinsic proteins subfamily are involved in arsenite permeability and tolerance in plants [J]. *Transgenic Research*, 2012, 21(6): 1265-1277.
- [16] ZHAO F J, AGO Y, MITANI N, et al. The role of the rice aquaporin Lsi1 in arsenite efflux from roots [J]. *New Phytologist*, 2010, 186: 392-399.
- [17] AWASTHI S, CHAUHAN R, SRIVASTAVA S, et al. The journey of arsenic from soil to grain in rice[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2017, 8: 1007.
- [18] 祁永斌, 杨卫兵, 叶胜海, 等. 水稻双剑叶突变体的表型、遗传分析及BR应答[J]. *核农学报*, 2012, 26(6): 847-852.
- [19] 郑 洁, 工 磊. 油菜素内酯在植物生长发育中的作用机制研究进展[J]. *中国农业科技导报*, 2014, 16(1): 52-58.
- [20] ALI B, HASAN S A, HAYAT S, et al. A role for brassinosteroids in the amelioration of aluminium stress through antioxidant system in mung bean (*Vigna radiata* L. Wilczek) [J]. *Environmental and Experimental Botany*, 2008, 62(2): 153-159.
- [21] BAJGUZ A. An enhancing effect of exogenous brassinolide on the growth and antioxidant activity in *Chlorella vulgaris* cultures under heavy metals stress[J]. *Environmental and Experimental Botany*, 2010, 68(2): 175-179.
- [22] HWANG O J, BACK K. Melatonin is involved in skotomorphogenesis by regulating brassinosteroid biosynthesis in rice plants [J]. *Journal of Pineal Research*, 2018, 65(2): e12495.
- [23] KANG Y Y, GUO S R, LI J, et al. Effect of root applied 24-epibrassinolide on carbohydrate status and fermentative enzyme activities in cucumber (*Cucumis sativus* L.) seedlings under hypoxia [J]. *Plant Growth Regulation*, 2009, 57: 259-269.
- [24] HAUBRICK L L, ASSMANN S M. Brassinosteroids and plant function: some clues, more puzzles[J]. *Plant Cell and Environment*, 2006, 29: 446-457.
- [25] 华智锐, 李小玲. 油菜素内酯对小麦幼苗抗旱性的诱导效应[J]. *江苏农业科学*, 2017, 45(1): 62-65.
- [26] 尚宏芹, 刘兴坦. 表油菜素内酯对汞胁迫下小麦幼苗抗氧化系统的影响[J]. *核农学报*, 2016, 11(30): 2258-2264.
- [27] 孙德权, 郭启高, 胡玉林, 等. 改良 Trizol 法提取香蕉叶片总RNA[J]. *广东农业科学*, 2009(5): 162-164.
- [28] 李元元, 曹清河. 油菜素内酯参与调控植物生长发育与抗逆性的机制及其育种应用研究[J]. *中国农业科技导报*, 2015, 17(2): 25-32.
- [29] 李 程, 梁宝魁, 王晓峰. 油菜素内酯提高蔬菜作物抗逆性的研究进展[J]. *中国蔬菜*, 2015(11): 12-18.
- [30] 李钱峰, 鲁 军, 余佳雯, 等. 油菜素内酯与脱落酸互作调控植物生长与抗逆的分子机制研究进展[J]. *植物生理学报*, 2018, 54(3): 370-378.
- [31] 赵方杰. 水稻砷的吸收机理及阻控对策[J]. *植物生理学报*, 2014, 50(5): 569-576.
- [32] 徐 鼎, 刘艳丽, 杜克兵, 等. 砷对植物生长的影响及抗氧化系



- 统响应机制研究进展[J]. 湖北林业科技, 2014, 43(1): 8-15.
- [33] 刘锦嫦,熊双莲,马 烁,等. 硒砷交互作用对水稻幼苗生理特性及砷硒累积的影响[J]. 农业环境科学学报,2018, 37(3): 423-430.
- [34] 向地英,邸 葆,张 钢,等. 镉胁迫对黄栌叶片电阻抗参数及相对电导率的影响[J]. 河北农业大学学报, 2014, 37(2): 58-64.
- [35] 彭 玲,贾 芬,田小平,等. 硒对油菜根尖镉胁迫的缓解作用[J]. 环境科学学报,2015, 35(8): 2597-2604.
- [36] 郭 晖,王 姐,张家洋. 土壤重金属胁迫下3种观赏植物生理抗性[J]. 西北林学院学报, 2017, 32(3): 62-66, 70.
- [37] 史梦梦,王玉泉,郑兴卫. 禾本科响应非生物胁迫研究进展[J]. 山西农业科学, 2018, 46(2): 309-312.
- [38] 赵天宏,孙加伟,付 宇. 逆境胁迫下植物活性氧代谢及外源调控机理的研究进展[J]. 作物杂志, 2008(3): 10-13.
- [39] 王嘉玥,刘欣萍,吴航枫,等. 镉胁迫对旱柳植株活性氧含量的影响[J]. 现代农业科技, 2016(15): 191-193.
- [40] 王凤茹,王志勇. 油菜素内酯信号转导的研究进展[J]. 华北农学报, 2008, 23(S2): 29-39.
- [41] 朱 虹,祖元刚,王文杰,等. 逆境胁迫条件下脯氨酸对植物生长的影响[J]. 东北林业大学学报, 2009, 37(4): 86-89.
- [42] 张述义,邵嘉鸣,李新风,等. 水分胁迫对小麦芽和根中脯氨酸含量及电导率的影响[J]. 干旱地区农业研究, 2013, 31(3): 150-154.
- [43] 胡朝华,张 蕾,朱端卫. 植物螯合肽的生物合成与解毒机制及在重金属修复中的应用前景[J]. 华中农业大学学报, 2006, 25(5): 575-580.
- [44] ABEDIN M J, FEIDMANN J, MEHARG A A. Uptake kinetics of arsenic species in rice plants[J]. Plant Physiology, 2002, 128(3): 1120-1128.
- [45] 耿安静,李汉敏,王 旭,等. 水稻砷吸收代谢的相关研究进展[J]. 江西农业学报, 2017, 29(7): 18-24.

(责任编辑:张震林)