

TSA对花生响应干旱及相关基因表达的影响

李丽梅, 钟钰婷, 苏良辰, 刘帅, 邓斌, 李玲*

广东省植物发育生物工程重点实验室, 华南师范大学生命科学学院, 广州510631

摘要: 研究组蛋白去乙酰化酶抑制剂曲古抑菌素A (trichostatin A, TSA)处理四叶期花生后对花生抗旱性和相关基因表达的影响。结果发现, 用 $1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的TSA处理的花生, 在干旱胁迫下, 叶片水分含量保持较高, 加速气孔关闭, 促进叶片*AhP5CS*表达, 增加叶片脯氨酸含量; 经TSA处理的花生在干旱处理下, 体内*AhHDA1*表达提高, 促进*AhNCED1*、*AhAREB1*和*AhNAC2*迅速表达。表明TSA通过影响组蛋白乙酰化水平参与花生幼苗对干旱胁迫的响应, 结果为认识组蛋白乙酰化影响花生的抗旱提供依据。

关键词: TSA; 花生; 干旱胁迫; 脯氨酸含量

Effect of TSA on Responses and Related Genes Expression of Peanut under Drought Stress

LI Li-Mei, ZHONG Yu-Ting, SU Liang-Chen, LIU Shuai, DENG Bin, LI Ling*

Guangdong Provincial Key Laboratory of Biotechnology for Plant Development, School of Life Sciences, South China Normal University, Guangzhou 510631, China

Abstract: This paper reveals the influences of trichostatin A (TSA), the histone deacetylase inhibitor, on drought resistance and related genes expression of peanut. The results showed that under drought stress, stomata closed in leaf of peanut treated with $1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ TSA to keep water content higher than the contrast and *AhP5CS* is up-regulated so that the proline contents of leaf increased. Furthermore, the expression level of *AhHDA1* increased to promote *AhNCED1*, *AhAREB1* and *AhNAC2* expressed rapidly. This study indicates that histone acetylation influences the response of peanut seedling to drought stress, providing the basis for a further understanding of histone acetylation on drought mechanism of peanut.

Key words: TSA; peanut; drought stress; proline content

花生(*Arachis hypogaea*)是我国重要的经济作物和油料作物之一, 干旱是导致花生减产的重要原因(张智猛等2011)。表观遗传修饰在植物逆境环境的响应机制过程中发挥重要作用。组蛋白H2A、H2B、H3和H4与包裹在外的DNA构成染色质的基本结构单位——核小体。组蛋白乙酰化修饰是一种重要的组蛋白修饰方式, 它可通过改变组蛋白与DNA的结合状态从而调节靶基因的转录水平(钟理等2014)。由组蛋白乙酰基转移酶(histone acetyltransferase, HATs)和组蛋白去乙酰基转移酶(histone deacetylases, HDACs)协调组蛋白乙酰化(Kuo和Allis 1998)。有报道指出水稻在干旱胁迫下, 组蛋白乙酰基转移酶基因*OsHAC703*、*OsHAG703*、*OsHAF701*和*OsHAM701*表达上升; H3K9、H3K18、H3K27和H4K5的乙酰化水平增强, 推断组蛋白乙酰基转移酶参与水稻对干旱胁迫的应激反应(Fang等2014)。

我们课题组前期研究发现, 花生在水分胁迫下, H3K9和H3K14乙酰化均增加, 组蛋白去乙酰化酶抑制剂曲古抑菌素A (trichostatin A, TSA)处理引起其H3高度乙酰化及相关抗旱基因表达, 并克隆花生*HDA1* (*AhHDA1*), 初步证明组蛋白乙酰化影响花生响应干旱过程(Su等2015)。9-顺式-环氧类胡萝卜素双加氧酶(9-*cis*-epoxycarotenoid dioxygenase, NCED)是花生合成ABA的关键限速酶(Wan和Li 2005)。AREB/ABF (ABA responsive element, ABRE)是与ABRE结合的bZIP类转录因子, 可激活干旱胁迫下的ABA依赖基因的表达(Choi等2000)。异源过表达花生*AREB1* (*AhAREB1*)能提高转基因拟南芥的耐旱性及ABA敏感性(Li等

收稿 2015-11-02 修定 2015-11-24

资助 国家自然科学基金(31471422)。

* 通讯作者(E-mail: liling@scnu.edu.cn; Tel: 020-85211378)。

2013)。AhNAC2在控水条件及外源ABA处理后表达上调,可能参与植物对逆境胁迫的应答机制(刘旭和李玲2009)。本文探讨TSA对花生响应干旱胁迫过程中对AhHDA1和相关抗旱基因表达的作用,为认识组蛋白乙酰化影响花生的抗旱作用提供依据。

材料与方法

1 植物材料与培养

花生(*Arachis hypogaea* L.)品种‘粤油7号’由广东省农业科学院作物研究所梁炫强研究员提供。选取饱满花生种子浸泡过夜,转移至蒸馏水浸湿滤纸的培养皿上。在光照培养箱中继续培养,待萌发后,将其种植于盛有泥炭土和蛭石(8:1)的塑料花盆中,28 °C培养至四叶期。

2 材料处理

2.1 TSA+PEG处理

挑选长势相同的四叶期花生幼苗,将花生带根部取出,自来水洗净土壤,浸泡于 $1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ TSA溶液中,分别按时间点为1、2、5、8和12 h取叶片材料保存,然后将剩余花生浸泡于30% PEG溶液中,分别按时间点为1、2、5和8 h取叶片材料保存。以蒸馏水处理为对照。

2.2 PEG模拟干旱处理

使用30%的聚乙二醇(PEG 6000)溶液模拟土壤干旱。将花生取出洗净后在蒸馏水中浸泡12 h,转移至30% PEG溶液中,按照1、2、5和8 h取叶片材料保存。以蒸馏水处理为对照。

3 叶片相对含水量测定

按照Fukao等(2011)的方法测定叶片相对含水量。

4 叶片气孔开度测量

用镊子撕取花生叶片下表皮,即刻用无水乙醇浸泡脱色,置于载玻片上,用BX51TF系统显微镜 10×20 倍观察拍照,运用Image-Pro Plus 6.0软件测量气孔的长度和宽度。按照徐萍等(2014)和Wise等(2000)方法计算气孔开度。

5 叶片游离脯氨酸含量测定

按照Chen等(2014)和Yue等(2012)的方法测定叶片游离脯氨酸含量。

6 基因表达量检测

用实时定量PCR检测叶片中AhP5CS、AhHDA1、AhNCED1、AhAREB1和AhNAC2的表达量,

所用引物见表1。利用TRIzol RNA试剂盒提取总RNA, TaKaRa反转录试剂盒进行cDNA合成。使用ABI 7500荧光实时定量PCR仪进行表达量检测。扩增程序为95 °C预变性30 s; 95 °C变性5 s, 60 °C退火延伸34 s, 40个循环。

表1 花生内参基因和目的基因对应引物

Table 1 Primers for reference genes and target genes

基因	引物序列(5'→3')
<i>Actin</i>	F: GATTGGAATGGAAGCTGCTG R: CGGTCAGCAATACCAGGGAA
<i>AhP5CS</i>	F: TTGTTTTGAATCTCGCCCT R: CTTAGCCTCCTTGCCCTCCT
<i>AhHDA1</i>	F: GAGAGTGATGGGGATAGAAG R: GGAGTAGTGAACGATGAGGT
<i>AhNCED1</i>	F: TTACCTGTGGGATTGTTTGC R: ACATGAGCCTCTACTTCTGC
<i>AhAREB1</i>	F: ACAAGGGCAACCAGCATTAGG R: TCACCACCACCATACCAACCA
<i>AhNAC2</i>	F: CCTCTTTGTCCCTTCAGTGTGC R: TTGGTTTGAGAATGCTTGTGTG

7 数据处理

使用SPSS18.0统计软件,所有数据用均数±标准差表示,多组均数之间进行方差齐性检验后,进行方差分析(ANOVA), $P<0.05$ 表示差异有显著性。使用Microcal Origin 7.5软件作图。

实验结果

1 TSA影响花生幼苗响应干旱胁迫

图1表明,干旱胁迫10 h的花生幼苗叶片含水量下降9.6%,经TSA处理的花生幼苗在干旱处理10 h后,叶片含水量下降7.6%。表明TSA处理后的花生幼苗在PEG模拟干旱的条件下叶片的保水能力有所提高。

花生幼苗在PEG胁迫后,叶片的气孔开度不断降低(图2)。未经TSA处理的花生幼苗PEG胁迫4 h,叶片气孔开度降低8.4%;经TSA预处理12 h的花生幼苗PEG处理4 h,叶片气孔开度降低7.3%。表明TSA使花生幼苗叶片在干旱条件下保水能力提高,与其降低气孔开度相关。

与对照(H_2O 处理)相比, TSA处理和PEG胁迫皆能使花生幼苗叶片游离脯氨酸含量增加(表2)。PEG胁迫10 h,叶片游离脯氨酸含量增加2.6倍;

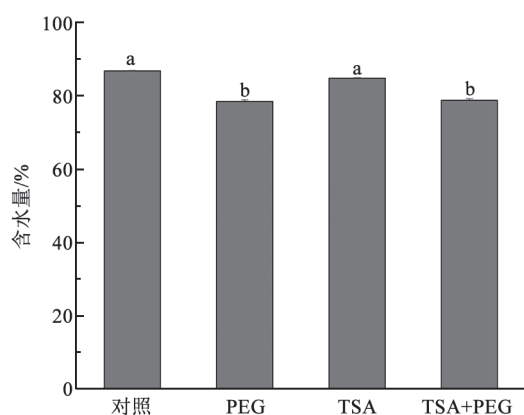


图1 TSA对花生幼苗在干旱胁迫下叶片相对含水量的影响
Fig.1 Effect of TSA on the relative water content in leaves of peanut seedling under drought stress

PEG: PEG处理10 h; TSA: TSA预处理12 h; TSA+PEG: TSA预处理12 h后PEG处理10 h。各柱形上不同小写字母表示显著差异 ($P<0.05$)。下图同。

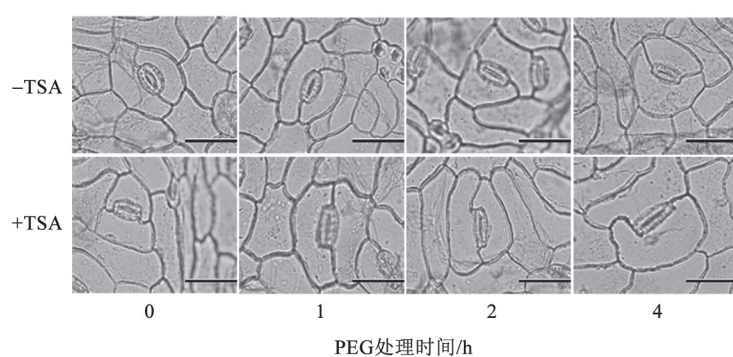
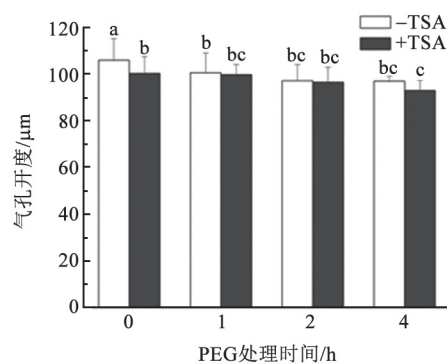


图2 TSA对花生幼苗在干旱胁迫下叶片气孔开度的影响

Fig.2 Effect of TSA on the stomata aperture in leaves of peanut seedling under drought stress
比例尺=50.0 μm。



TSA预处理12 h后的花生叶片游离脯氨酸含量增加2.2倍, TSA处理12 h后再用PEG处理10 h的脯氨酸含量增加至4.6倍。表明TSA处理促进叶片游离脯氨酸含量增加。

Δ^1 -吡咯啉-5-羧酸合成酶(Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate synthetase, P5CS)是脯氨酸合成限速酶。花生脯氨酸合成酶基因*AhP5CS*表达变化的结果表明(图3), 对照花生幼苗在PEG条件下脯氨酸合成酶基因*AhP5CS*的表达在8 h达到峰值(图3-A); TSA处理1 h, 叶片*AhP5CS*表达增加2.5倍; TSA预处理12 h后的花生幼苗在PEG条件下2 h, 叶片*AhP5CS*的表达急剧上调, 增加50.4倍, 且表达量达到高峰(图3-B)。

2 TSA对花生响应干旱胁迫过程中*AhHDA1*表达的影响

*AhHDA1*是花生去乙酰基转移酶基因, TSA抑

表2 TSA对花生幼苗在干旱胁迫下脯氨酸含量的影响

Table 2 Effect of TSA on the proline contents in leaves of peanut seedling under drought stress

处理	脯氨酸含量/ $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ (DW)
对照	0.29±0.056 ^c
PEG	0.76±0.130 ^b
TSA	0.64±0.049 ^b
TSA+PEG	1.32±0.091 ^a

PEG: PEG处理10 h; TSA: TSA预处理12 h; TSA+PEG: TSA预处理12 h后PEG处理10 h。同列数据旁不同小写字母表示显著差异 ($P<0.05$)。

制花生体内去乙酰基转移酶活性, 增加组蛋白乙酰化程度(Su等2015)。对照花生幼苗在PEG胁迫

下, *AhHDA1*的表达逐渐增加, 8 h上调3.3倍(图4-A)。TSA处理花生1 h, 使*AhHDA1*表达上调3.6倍, 以后表达量变化不明显, 直至12 h上调6.0倍, TSA处理12 h后的花生幼苗干旱条件下1 h, 其叶片*AhHDA1*表达量上调7.9倍, 随后上调24.6倍达到峰值。图4-A与图4-B相比可知, TSA预处理后的花生叶片在干旱胁迫后*AhHDA1*表达上调迅速, 表达量明显增加。表明TSA能够影响花生在干旱胁迫下*AhHDA1*的表达。

3 TSA对花生响应干旱胁迫过程中相关抗旱基因表达的影响

图5表明未经过TSA处理的花生幼苗在PEG条件下*AhNCED1*、*AhAREB1*和*AhNAC2*基因均上

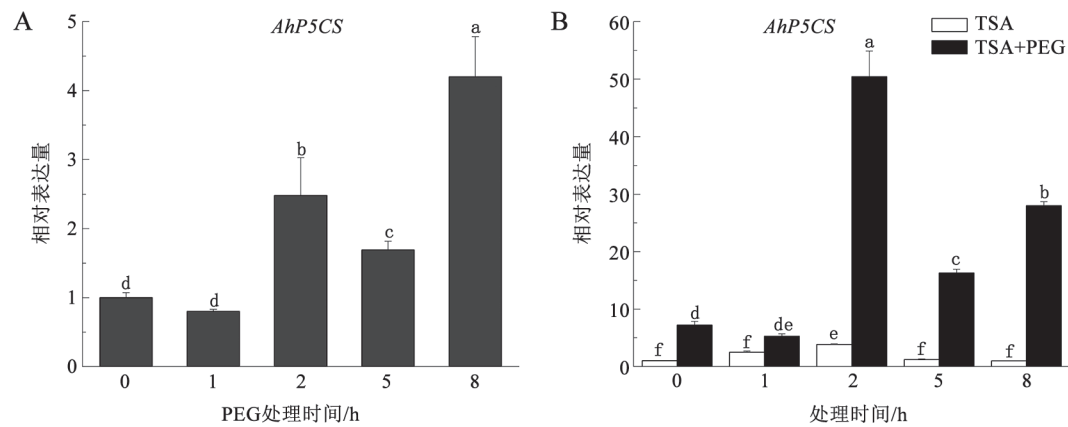


图3 TSA对花生幼苗在干旱胁迫下叶片*AhP5CS*表达的影响

Fig.3 Effect of TSA on the expression level of *AhP5CS* in leaves of peanut seedling under drought stress

TSA: TSA处理0、1、2、5、8 h的基因表达量; TSA+PEG: TSA预处理12 h后PEG处理0、1、2、5、8 h的基因表达量。图4、6同。

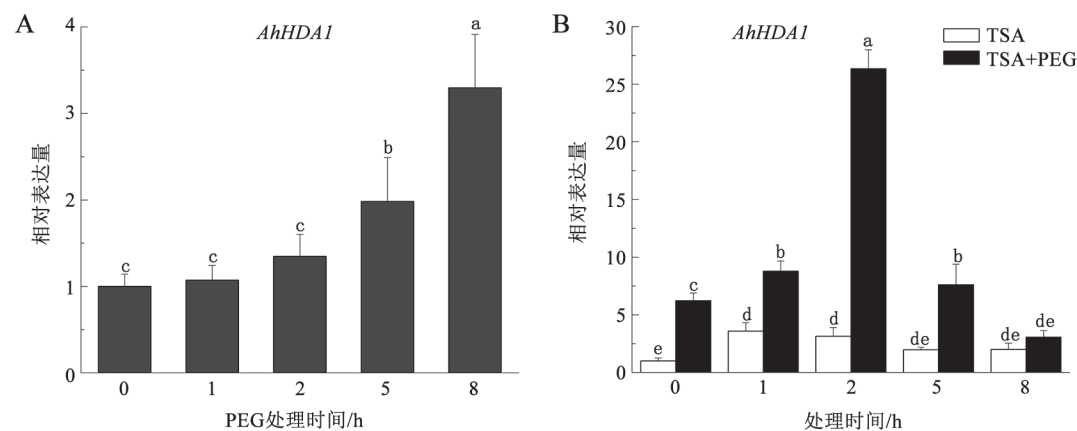


图4 TSA对花生幼苗在干旱胁迫下叶片*AhHDA1*表达的影响

Fig.4 Effect of TSA on the expression level of *AhHDA1* in leaves of peanut seedling under drought stress

调,分别在PEG处理2、8、2 h的表达达到峰值。

由图6可知, TSA预处理12 h的花生幼苗在干旱条件下,叶片中相关基因的表达增加。TSA处理1 h的花生叶片ABA合成关键酶*AhNCED1*表达上调9.2倍,其叶片在PEG条件下,表达迅速上调1 252.0倍;其叶片转录因子*AhAREB1*和*AhNAC2*表达较低;在TSA预处理的花生在PEG条件下,叶片中2个转录因子的表达量分别上调13.9倍和124.2倍。

讨 论

前期工作表明,组蛋白乙酰化在花生响应干旱胁迫过程中发挥作用(Su等2015)。本实验结果表明, TSA处理叶片气孔开度下降。关于TSA使气孔关闭的机制尚不清楚。TSA预处理的花生叶片

在干旱胁迫下气孔开度进一步减少,使植株保水能力提高。植物在受到干旱胁迫积累ABA,经由木质部运至保卫细胞,调节气孔关闭,减少水分散失(Hayashi和Kinoshita 2011)。而TSA是否通过影响ABA进而引发气孔关闭还不清楚。

TSA预处理12 h的花生幼苗叶片,组蛋白乙酰化程度增加,植株的抗旱能力提高,可能与脯氨酸含量提高,增加渗透作用有关。脯氨酸是可溶性渗透物质,可作为渗透平衡物质和亚细胞结构的保护物质。植物在受到胁迫时,体内脯氨酸累积,脯氨酸可以与胁迫条件下急剧增加的氧自由基发生反应,清除活性氧的危害。已知*AtP5CS*的表达受干旱、盐及ABA诱导(Strizhov等1997)。在水分胁迫下,*P5CS*的转录水平迅速提高,以合成更多的

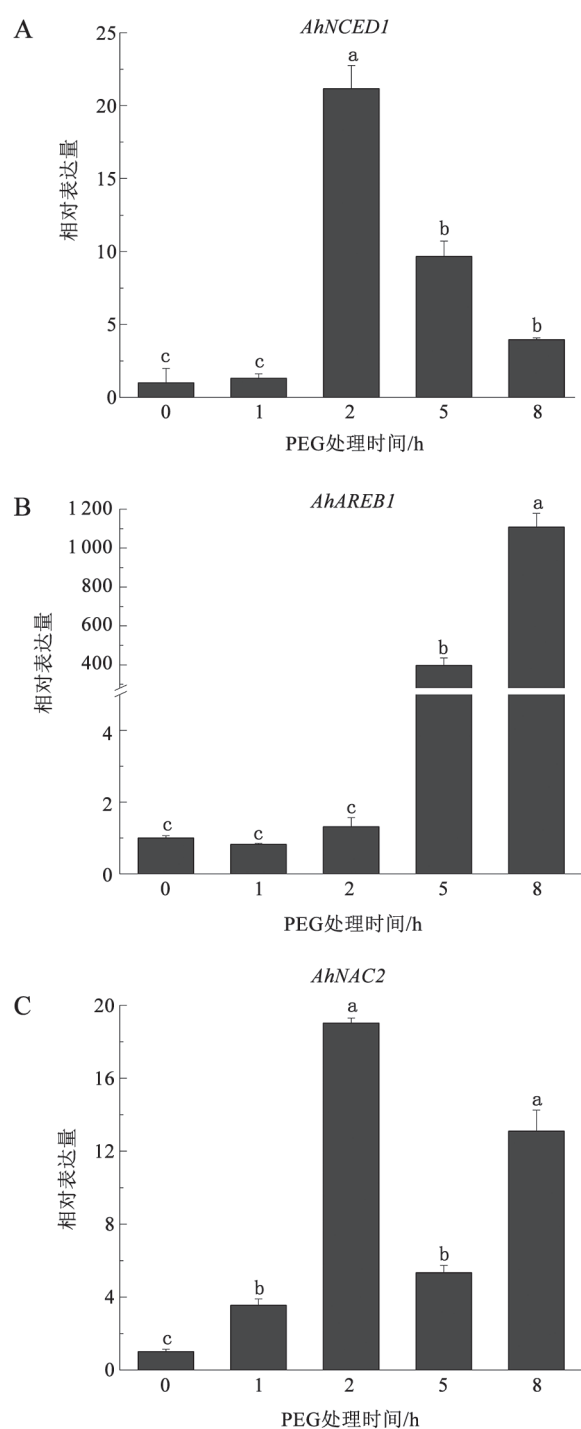


图5 干旱胁迫对花生叶片*AhNCED1*、*AhAREB1*和*AhNAC2*表达的影响

Fig.5 The expression level of *AhNCED1*, *AhAREB1*, and *AhNAC2* in leaves of peanut seedling under drought stress

脯氨酸。与对照比较,经TSA预处理的花生叶片*AhP5CS*表达增强,表明TSA促进花生叶片脯氨酸合成增加其游离脯氨酸含量,当花生受到干旱胁迫

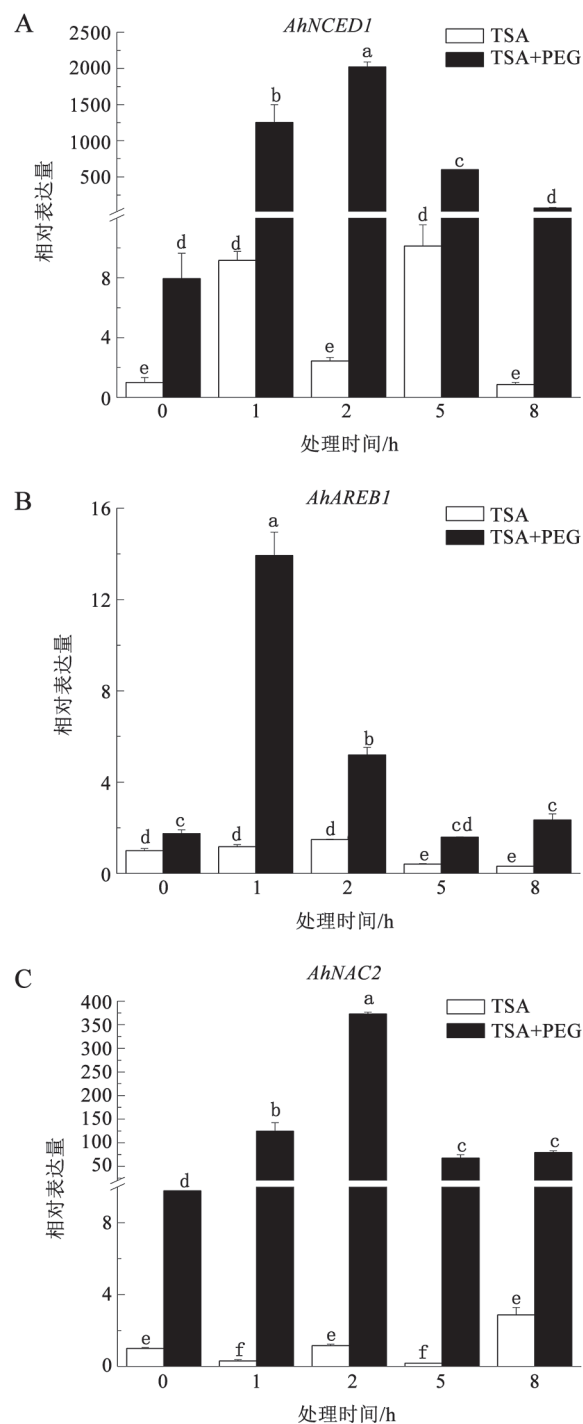


图6 TSA对花生在干旱胁迫下叶片*AhNCED1*、*AhAREB1*和*AhNAC2*表达的影响

Fig.6 Effect of TSA on the expression level of *AhNCED1*, *AhAREB1*, and *AhNAC2* in leaves of peanut seedling under drought stress

后,*AhP5CS*表达更强烈,游离脯氨酸含量更高。Savoure等(1997)提出脯氨酸的累积与ABA密切相

关, 外源施加ABA可增加*AtP5CS1*和*AtP5CS2*的转录水平。脯氨酸累积可能是由两条途径共同介导的, 包括ABA依赖和ABA非依赖的信号转导途径 (Zhu 2001, 2002)。此外, Zhang等(1997)发现*AtP5CS2*上游区有一个ABA顺式效应元件。TSA是否通过影响ABA进而影响脯氨酸含量还有待深入研究。

组蛋白乙酰化影响植物抗旱下游基因表达。TSA预处理12 h的花生叶片在PEG条件1 h下, *AhNCED1*、*AhAREB1*和*AhNAC2*表达急剧上调, 分别上调815.7%、12.9%和123.2%。我们的前期工作发现TSA能够引起花生体内H3的高度乙酰化, 促进*AhHDA1*表达; 在非生物胁迫环境下, 花生叶片中组蛋白乙酰化水平增加, 转录因子被激活, 功能基因表达, 保护植物细胞抵御胁迫(Su等2015)。TSA处理花生1 h, 叶片中*AhNCED1*上调; 而*AhAREB1*在TSA处理前期无明显变化, 5 h表达下调; *AhNAC2*则在1 h表达下调, 这很可能显示*AhAREB1*与*AhNAC2*在ABA合成途径中有负调控作用。TSA预处理后, 组蛋白乙酰化程度增加, 花生受到干旱胁迫, 相关基因的表达更强烈, 引发系列生理反应, 如气孔关闭, 脯氨酸含量增加等, 使植株能够迅速响应干旱胁迫。但TSA影响抗旱下游基因表达的机制还不清楚。

组蛋白乙酰化是染色体常见的修饰, 对基因的转录非常重要, 并与植株对干旱胁迫及ABA响应机制密切相关。ABA能够诱导大麦GNAT-MYST家族中的*HAT*基因的表达(Papeafthimiou等2010)。水稻在干旱胁迫下能够诱导*HAT*基因的表达, 包括*OsHAC703*、*OsHAG703*、*OsHAF701*及*OsHAM701* (Fang等2014)。HD2是HDACs中的一员, *AtHD2C*过表达拟南芥表现出对ABA的不敏感, 耐旱能力提高(Sridha和Wu 2006), 表明HD2在植株响应胁迫过程中发挥重要作用。Kim等(2008)报道了水分胁迫下拟南芥响应干旱相关基因的启动子区域的H3K9ac的富集, 抗旱相关基因如*RD20*、*RD29A*表达上调。而我们前期工作也发现干旱胁迫和ABA信号下花生叶片中H3K9和H3K14乙酰化水平增加(Su等2015)。组蛋白去乙酰化酶抑制剂TSA抑制HDACs, 并引起H3的高度乙酰化, 在PEG处理*AhHDA1*和抗旱相关基因2~5 h达到峰值

(Su等2015)。本文结果显示, TSA预处理后干旱处理*AhHDA1*和抗旱相关基因的表达上调提前, *AhHDA1*在1 h表达上调, 2 h达到高峰; 相关基因*AhNCED1*、*AhAREB1*和*AhNAC2*的表达在1~2 h达到峰值。TSA可能引起下游基因表达提高, 增加植物细胞在干旱条件下的防御能力。

参考文献

- 刘旭, 李玲(2009). 花生NAC转录因子*AhNAC2*和*AhNAC3*的克隆及转录特征. 作物学报, 35 (3): 541~545
- 徐萍, 李进, 吕海英, 李永洁, 张侠(2014). 干旱胁迫下水杨酸对银沙槐子叶表皮气孔开度的影响. 植物生理学报, 50 (4): 510~518
- 张智猛, 万书波, 戴良香, 宋文武, 陈静, 石运庆(2011). 不同花生品种对干旱胁迫的响应. 中国生态农业学报, 19 (3): 631~638
- 钟理, 杨春燕, 吴佳海(2014). 组蛋白去乙酰化酶(HDACs)及其调控的研究进展. 中国农学通报, 30 (21): 1~8
- Chen YP, Li L, Hu PW, He JL, Ru ZW, Hu B, Su LC (2014). Relationship between drought resistance and *AhNCED1* expression in peanut varieties from four provinces in China. J Food Agric Environ, 12 (2): 509~514
- Choi H, Hong J, Ha J, Kang J, Kim SY (2000). ABFs, a family of ABA-responsive element binding factors. J Biol Chem, 275: 1723~1730
- Fang H, Liu X, Thorn G, Duan J, Tian LN (2014). Expression analysis of histone acetyltransferases in rice under drought stress. Biochem Biophys Res Commun, 443: 400~405
- Fukao T, Yeung E, Bailey-Serres J (2011). The submergence tolerance regulator SUB1A mediates crosstalk between submergence and drought tolerance in rice. Plant Cell, 23: 412~427
- Hayashi M, Kinoshita T (2011). Crosstalk between blue-light and ABA-signaling pathways in stomatal guard cells. Plant Signal Behav, 6: 1662~1664
- Kim JM, To TK, Ishida J, Morosawa T, Kawashima M, Matsui A, Toyoda T, Kimura H, Shinozaki K, Seki M (2008). Alterations of lysine modifications on the histone H3 N-tail under drought stress conditions in *Arabidopsis thaliana*. Plant Cell Physiol, 49 (10): 1580~1588
- Kuo MH, Allis CD (1998). Roles of histone acetyltransferases and deacetylases in gene regulation. BioEssays, 20: 615~626
- Li XL, Liu X, Yao Y, Li YH, Liu S, He CY, Li JM, Lin YY, Li L (2013). Overexpression of *Arachis hypogaea AREB1* gene enhances drought tolerance by modulating ROS scavenging and maintaining endogenous ABA content. Int J Mol Sci, 14: 12827~12842
- Papeafthimiou D, Likotrafiti E, Kapazoglou A, Bladenopoulos K, Tsaftaris A (2010). Epigenetic chromatin modifiers in barley: III. Isolation and characterization of the barley GNAT-MYST family of histone acetyltransferases and responses to exogenous ABA. Plant Physiol Biochem, 48: 98~107
- Savoure A, Hua XJ, Bertauche N, Van Montagu M, Verbruggen N

- (1997). Abscisic acid-independent and abscisic acid-dependent regulation of proline biosynthesis following cold and osmotic stresses in *Arabidopsis thaliana*. *Mol Gen Genet*, 254 (1): 104~109
- Sridha S, Wu K (2006). Identification of *AtHD2C* as a novel regulator of abscisic acid responses in *Arabidopsis*. *Plant J*, 46: 124~133
- Strizhov N, Abraham E, Okresz L, Blickling S, Zilberstein A, Schell J, Koncz C, Szabados L (1997). Differential expression of two *P5CS* genes controlling proline accumulation during salt-stress requires ABA and is regulated by *ABAI*, *ABII* and *AXR2* in *Arabidopsis*. *Plant J*, 12 (3): 557~569
- Su LC, Deng B, Liu S, Li LM, Hu B, Zhong YT, Li L (2015). Isolation and characterization of an osmotic stress and ABA induced histone deacetylase in *Arachis hypogaea*. *Front Plant Sci*, 6: 512~522
- Wan XR, Li L (2005). Molecular cloning and characterization of a dehydration-inducible cDNA encoding a putative 9-*cis*-epoxycarotenoid dioxygenase in *Arachis hypogaea* L. *DNA Seq*, 16 (3): 217~223
- Wise RR, Gretchen F, Sassenrath C, Percy RG (2000). A comparison of leaf anatomy in field-grown *Gossypium hirsutum* and *G. barbadense*. *Ann Bot*, 86: 731~738
- Yue Y, Zhang MC, Zhang JZ, Tian XL, Duan LS, Li ZH (2012). Overexpression of the *AtLOS5* gene increased abscisic acid level and drought tolerance in transgenic cotton. *J Exp Bot*, 63 (10): 3741~3748
- Zhang CS, Lu Q, Verma DPS (1997). Characterization of Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate synthetase gene promoter in transgenic *Arabidopsis thaliana* subjected to water stress. *Plant Sci*, 129: 81~89
- Zhu JK (2001). Cell signaling under salt, water and cold stresses. *Curr Opin Plant Biol*, 4 (5): 401~406
- Zhu JK (2002). Salt and drought stress signal transduction in plants. *Annu Rev Plant Biol*, 53: 247~273