

花生响应水分胁迫过程中叶片AhCYP707A1蛋白和ABA分布的变化

曹家佳, 吕滢, 胡博*, 李玲

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

摘要: CYP707A蛋白是高等植物内源ABA代谢主要途径的关键酶, 在水分胁迫过程中花生植株AhCYP707A1蛋白和ABA分布与水平的变化并不清楚。研究表明, 水分胁迫初期, 花生叶片AhCYP707A1蛋白表达均先被强烈抑制, 促进ABA积累, 随后蛋白表达回升, 参与调节ABA稳态; 叶片AhCYP707A1蛋白以及ABA主要分布在叶片维管组织中。水分胁迫下, 经CYP707A蛋白抑制剂处理后, 花生叶片ABA分布和含量均有提高。抗旱花生品种‘粤油7’在水分胁迫下, AhCYP707A1蛋白的表达以及分布均强于敏旱品种‘汕优523’, 表明ABA代谢更为活跃。

关键词: 花生; 水分胁迫; AhCYP707A1蛋白; ABA分布

花生是重要的油料和经济作物, 主要分布于干旱和半干旱地区, 降雨量少或季节性干旱是花生产量和品质的主要制约因素之一(顾峰玮等2010)。脱落酸(abscisic acid, ABA)作为植物激素, 调控许多重要的生理和发育过程。ABA作为胁迫激素参与了植物对逆境胁迫的适应(Boneh等2012)。植物受到水分胁迫时ABA会快速且大量的积累(Zheng等2013)。ABA稳态水平受合成酶基因和代谢酶基因表达的协同控制, 多因素共同参与内源ABA信号水平的动态调控(Suttle等2013)。

高等植物9-顺式环氧类胡萝卜素双加氧酶(nine-cis-epoxycarotenoid dioxygenase, NCED)是调节ABA生物合成的关键限速酶(Burbidge等1999; Nambara和Marion-Poll 2005)。在烟草中, 干旱胁迫诱导NCED3基因的表达以及内源ABA的积累(牛志强等2015)。干旱胁迫下, ABA水平和花生NCED1基因的丰富度呈正相关(Hu等2012), NCED基因高度表达是干旱下促进ABA生物合成的重要原因之一。

ABA代谢包括氧化降解途径和结合失活途径。ABA结合失活途径是指ABA或其分解代谢产物与葡萄糖结合的过程。ABA 8'-羟基化酶是ABA代谢的关键酶, 它属于细胞色素P450 (CYP)单加氧酶超家族, 被命名为CYP707A (Nambara-Poll和Marion 2005), 为高等植物内源ABA代谢的主要途径之一(Zheng等2012)。Diniconazole (DCN)可以抑制CYP707A蛋白的酶活性, 降低ABA代谢的速率(Suttle等2012)。我们前期工作已从花生中克隆了CYP707A基因(命名AhCYP707A), 发现AhCYP707A1与AhCYP707A2基因在干旱胁迫下与花生叶片中ABA的合成密切相关(Liu等2014)。本文将通过

Western blot以及免疫酶荧光定位技术, 分析花生响应水分胁迫过程中植株叶片维管组织中AhCYP707A1蛋白分布及内源ABA分布变化, 为认识水分胁迫下ABA稳态水平变化与调节对花生响应抗旱性的机制提供基础。

材料与方法

1 实验材料

花生(*Arachis hypogaea* L.) ‘粤油7’ (耐旱品种)和‘汕优523’ (敏旱品种)种子由广东省农业科学院作物研究所梁炫强研究员馈赠。选取饱满的‘汕优523’以及‘粤油7’花生种子浸泡过夜, 播种于盛有浇透泥炭土的圆形花盆中, 于28°C, 光照/黑暗为16 h/8 h培养箱中培养, 培养至四叶期(2周)。用30% PEG6000溶液处理四叶期花生根, 分别在0、0.5、1、2、3、4、5、6、8、10、12和24 h取叶片。

用100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ DCN处理四叶期的花生根2 h后, 再用30% PEG6000溶液处理花生根2和8 h。

2 AhCYP707A1蛋白提取

使用凯基植物蛋白提取试剂盒(KGP750)提取AhCYP707A1蛋白, 由原核表达产物制备的抗血清作为第一抗体, 第二抗体为Sigma公司的碱性磷酸酶标记羊抗兔IgG (IgG-AP), 采用Dupont公司的Polyscreen PVDF膜, NBT/BCIP显色。按照Hu等(2010b)的方法分CYP707A1蛋白表达, 2个品种蛋白上样量都为50 μg 。

收稿 2015-11-12 修定 2016-03-03

资助 国家自然科学基金(31301247和31471422)和教育部高等学校博士学科点专项科研基金(20124407120008)。

* 通讯作者(E-mail: hubo0610@126.com)。

3 冰冻切片制备

参照胡博等(2012)的方法制备叶片切片。

4 AhCYP707A1蛋白免疫荧光定位

冰冻切片在室温下自然干燥, 用移液枪在切片上轻柔滴加含5%牛血清蛋白(BSA)的 $10\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ PBS (pH 7.0), 室温孵育20 min, PBS清洗3次, 每次10 min; 滴加AhCYP707A1多克隆兔抗(1:100, PBS稀释)室温下放置2 h; PBS清洗3次, 每次10 min; 生物素化羊抗兔二抗(1:100, PBS稀释)室温孵育30 min, PBS清洗3次, 每次10 min。滴加荧光染色剂(Avidin-FITC, 1:64, PBS稀释)避光显色; 超纯水清洗3次; 在荧光显微镜上观察并照相。

5 ABA免疫荧光定位

参考胡博等(2012)方法对叶片ABA进行免疫荧

光定位, 用荧光倒置相差显微镜(Leica, DMI 3000B)观察。

6 ABA含量测定

参照Yue等(2012)的方法测定叶片内源ABA含量。

实验结果

1 花生响应水分胁迫过程中叶片AhCYP707A1蛋白表达和分布

花生品种‘粤油7’和‘汕优523’在PEG胁迫下, 其叶片AhCYP707A1蛋白在胁迫早期(1~5 h)逐渐下降, 胁迫10 h时表达回升。其中‘粤油7’叶片的AhCYP707A1蛋白表达量皆高于‘汕优523’, 胁迫1~5 h下降幅度小, 10 h时表达明显增加(图1)。

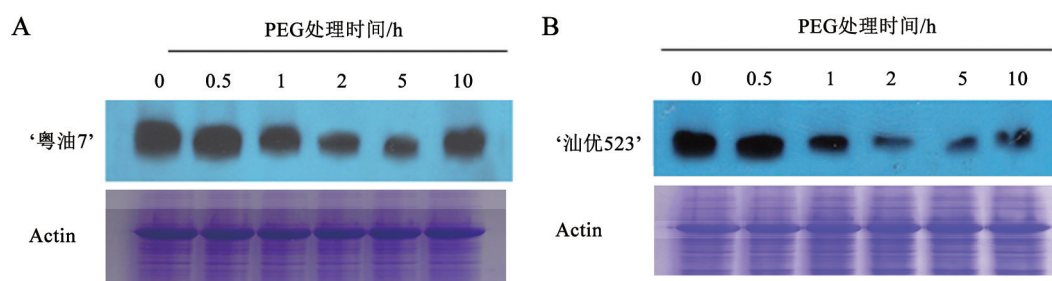


图1 PEG处理对不同抗旱品种花生叶片AhCYP707A1表达的影响

Fig.1 Effect of PEG on AhCYP707A1 protein expression of peanut leaves in different drought resistant cultivars

AhCYP707A1蛋白主要分布在叶片维管束中。‘粤油7’叶片AhCYP707A1分布水平在胁迫初期(1 h)下降微弱, 2 h时明显减弱, 胁迫后期(8~24 h)时其分布水平持续增强(图2)。‘汕优523’叶片AhCYP707A1分布水平在1 h时即有明显降低, 随后维持较低的分布水平, 8 h时其分布水平回升, 但仍低于正常处理叶片水平(图2)。

2 花生响应水分胁迫过程中叶片内源ABA分布变化

2.1 水分胁迫下花生植株叶片ABA分布

图3显示, 正常情况下(0 h)‘汕优523’叶片中ABA分布微弱, 在整个胁迫过程中, ABA分布水平呈现增强, 胁迫早期(1和2 h)分布水平变化平稳, 胁迫中期(4 h)时有明显增强。ABA特异分布于维管束中。同样, 在整个水分胁迫过程中, ‘粤油7’叶片ABA分布水平呈现增强。与‘汕优523’相比, ‘粤油7’在胁迫早期分布水平即有明显增强(1 h), 随后ABA

分布维持较高水平, ABA特异分布于维管束中。

2.2 水分胁迫下花生植株叶片AhNCED1基因表达变化

水分胁迫下, ‘粤油7’以及‘汕优523’叶片中AhNCED1表达均大幅度上调。处理2 h时, 两者表达皆有显著增加, 与处理0 h相比, ‘粤油7’叶片中AhNCED1表达增加了73.5倍, ‘汕优523’增加了26.3倍。‘粤油7’在5 h时表达量达到高峰, ‘汕优523’在10 h时才达到。两者相比, ‘粤油7’叶片中的AhNCED1表达量较高(图4)。

2.3 水分胁迫下花生植株叶片ABA含量变化

花生在胁迫下其叶片内ABA含量呈现上升趋势。两者相比, ‘粤油7’在早期胁迫时有较明显增加, 含量增加159.1% (图5); ‘汕优523’在胁迫早期变化不显著, 胁迫中期(4和8 h)增加较明显, 含量增加138.1%。

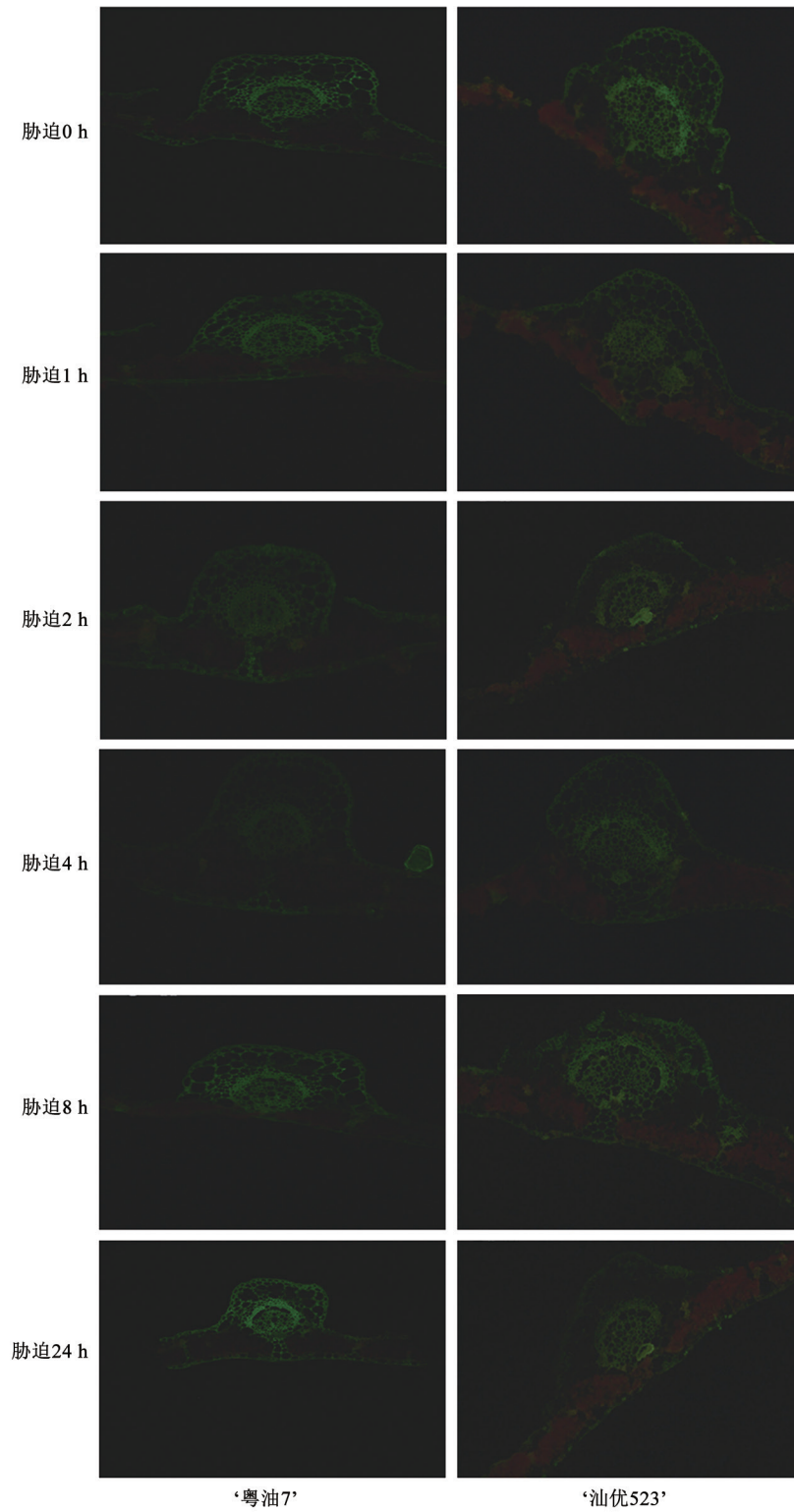


图2 PEG处理下不同抗旱品种花生叶片中AhCYP707A1分布

Fig.2 The distribution of AhCYP707A1 protein in different drought resistant cultivars leaves under PEG treatment
箭头所指为信号区域; 标尺100 μm 。

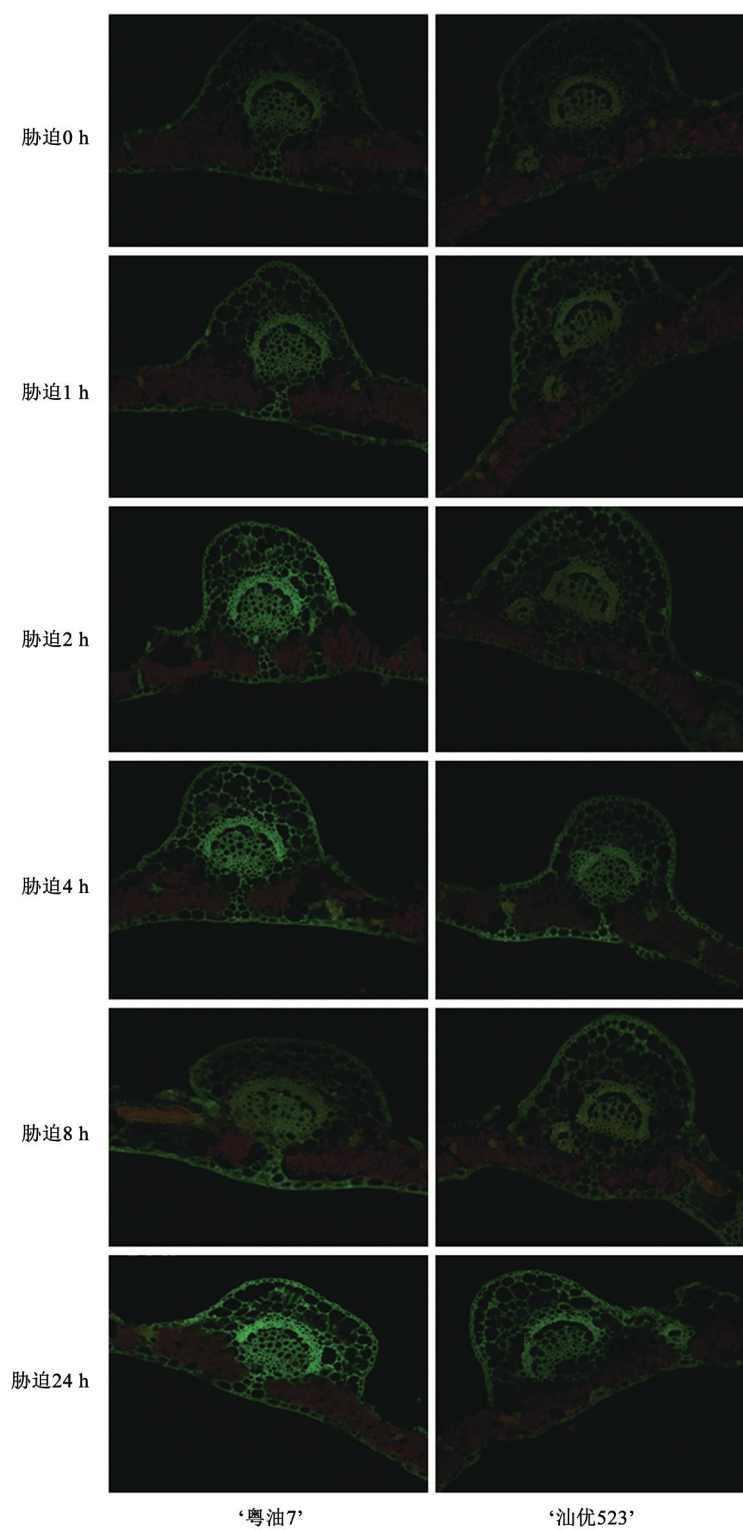


图3 PEG处理下不同抗旱品种花生叶片中ABA分布

Fig.3 The ABA distribution of leaves in different drought resistant cultivars under PEG treatments
箭头所指为信号区域; 标尺100 μm 。

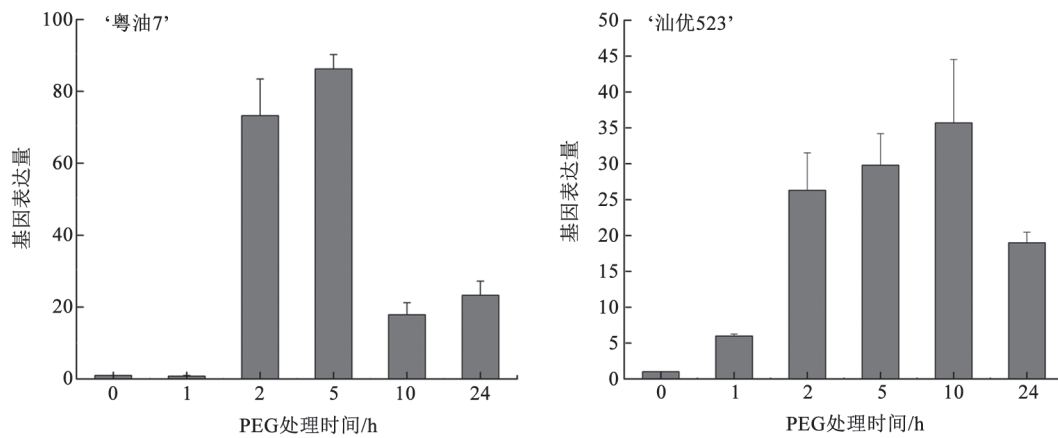


图4 PEG处理下不同抗旱品种花生叶片*AhNCED1*基因的表达

Fig.4 The *AhNCED1* gene expression of peanut leaves in different drought resistant cultivars under PEG treatments

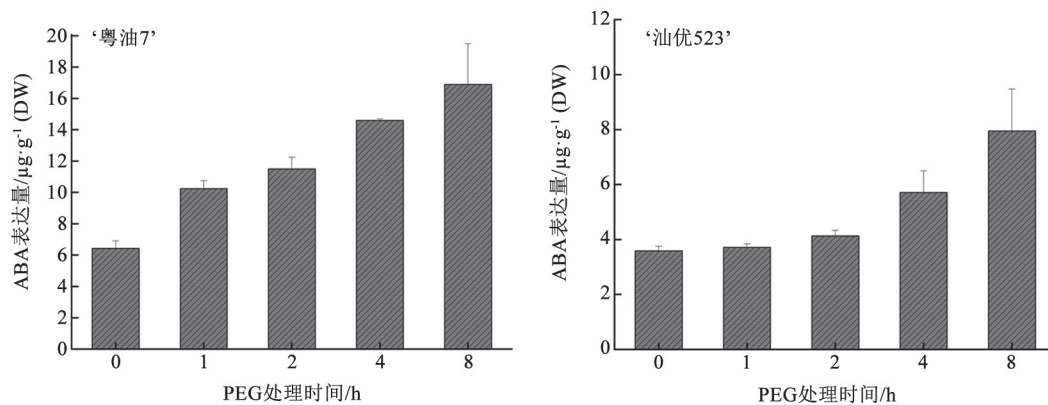


图5 PEG处理下不同抗旱品种花生叶片ABA的含量

Fig.5 The ABA content of peanut leaves in different drought resistant cultivars under PEG treatments

2.4 CYP707A蛋白抑制剂处理对抗旱花生叶片中ABA分布和含量的影响

水分胁迫下叶片ABA分布水平较高,用 $100\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ DCN处理的叶片ABA分布水平增强明显高于未处理(图6-A);同时,ABA含量明显增加,在处理2和8 h时含量分别增加223.0%和237.2% (图6-B),表明CYP707A与ABA的代谢相关。

讨 论

1 AhCYP707A1蛋白在花生响应干旱中的作用

植物内源ABA稳态的调控取决于内部或者外部的信号(如不同发育时期或是水分胁迫)。ABA合成以及代谢的动态平衡是决定植物内源ABA含量的主要因素。ABA通过氧化或结合被催化成为不活跃的形式。CYP707A蛋白是ABA关键代谢酶

(Kushiro等2004)。CYP707A蛋白家族在不同植物中高度保守。

不同花生抗旱品种在干旱胁迫下,内源ABA含量与抗旱性呈正相关(刘吉升和李玲2006)。植物体内ABA含量的增加,能诱导植株叶片气孔关闭,并且诱导一系列相关基因表达,在植物干旱适应中至关重要(张荣萍2014)。抗旱品种‘粤油7’叶片ABA含量较高(图3),干旱胁迫下,‘粤油7’叶片中CYP707As的表达均下降再上升;‘汕优523’叶片中CYP707As均被强烈抑制,在胁迫中后期回升,但依然比未处理表达低(图2)。AhCYP707A1蛋白表达情况与基因表达情况一致,两品种胁迫处理早中期蛋白表达均呈下降趋势(图2)。除此,CYP707A1蛋白活性抑制剂DCN处理下,花生叶片ABA的含量以及分布都增强(图6)。这些结果表明,CY-

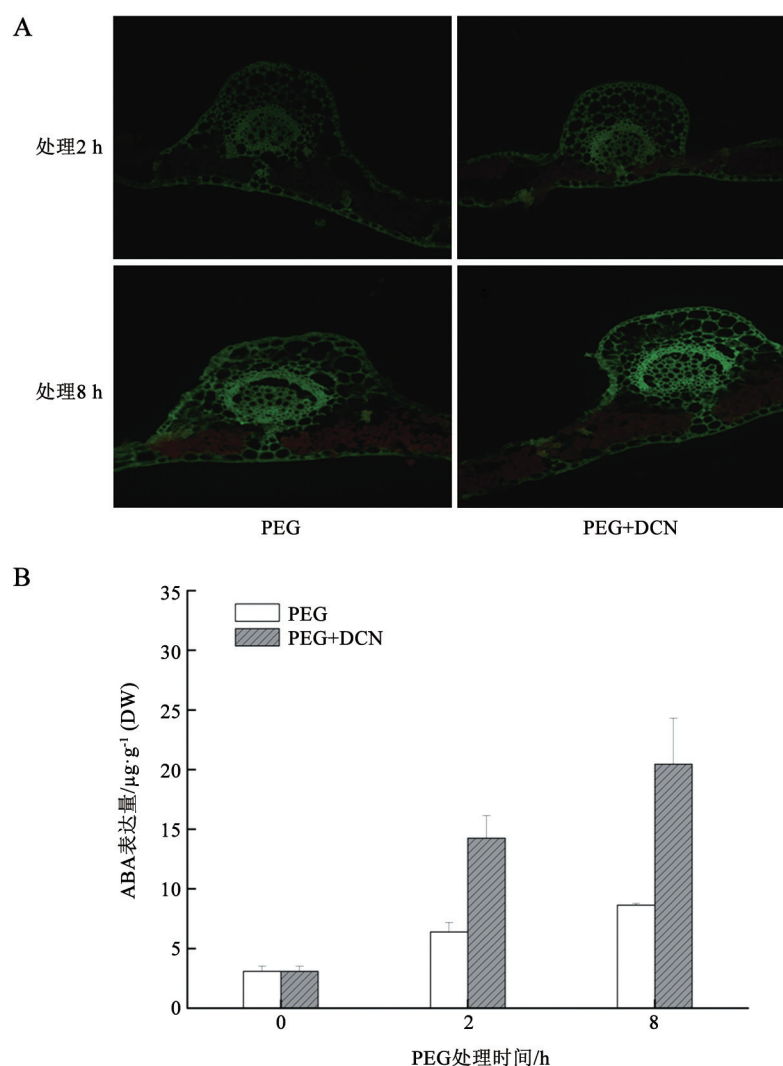


图6 PEG以及DCN处理对‘粤油7’花生植株叶片ABA分布(A)和含量(B)的影响

Fig.6 Effects of PEG and DCN on endogenous ABA distribution (A) and content (B) of leaves in ‘Yueyou 7’

P707A1蛋白能降解ABA, 使得ABA含量减少, CYP707A蛋白表达减弱, 促进花生植株在干旱胁迫下ABA的积累。干旱胁迫后期CYP707A蛋白表达回升, 推测是为植物移除胁迫处理后ABA含量的急剧下降做准备。总体而言, 抗旱品种‘粤油7’花生叶片的AhCYP707A1表达更强(图1)。

2 AhCYP707A1蛋白在调节ABA稳态变化中的作用

拟南芥响应干旱胁迫过程中, AtCYP707A3和AtNCED3分别在ABA代谢以及合成中扮演重要的角色(Iuchi等2001)。实验室前期研究发现花生植株在受到干旱胁迫时, AhNCED1表达会显著上升。AhNCED1的表达在干旱胁迫引起的ABA合成过程中起着非常重要的作用(Wan和Li 2006)。

ABA水平的维持是通过合成和代谢的平衡来实现的, 而不是仅仅依赖于合成。本文结果显示, 干旱胁迫下花生的CYP707A1基因的表达受到了一定的诱导(图1), 虽然它们比起AhNCED1基因表达变化的幅度较为轻微(图4), 但是它们也参与了花生响应干旱胁迫过程中ABA稳态维持的过程。这种诱导表达的差异可能决定了胁迫诱导下ABA的积累。植物响应干旱胁迫过程中ABA合成与代谢之间的平衡可以解释如下: 干旱胁迫诱导的CYP707A的变化不仅是为了将自身内源ABA维持在一个适度的水平内, 也是为后续胁迫移除后ABA的降解做准备。ABA的生物合成以及代谢均与干旱胁迫下植株内源ABA水平有关。

有报道指出, *AtNCED*、*AtABA2*和*AAO3*在拟南芥的维管束表达(Cheng等2002; Tan等2003; Endo等2008)。实验室前期研究中发现,花生植株在干旱胁迫下,叶片中的ABA以及AhNCED1主要分布在维管组织中(胡博等2012)。维管束是植株ABA主要合成与分布的部位。本文结果显示花生叶片ABA以及AhCYP707A1蛋白主要分布在维管组织中(图2和3),暗示位于物质转运通道上的AhCYP707A1与AhNCED1蛋白在调控内源ABA动态平衡上的重要性。干旱胁迫下,花生叶片中ABA相关合成蛋白酶AhNCED1以及代谢蛋白酶AhCYP707A1均主要在维管组织中表达,这可能与ABA可以通过维管组织进行组织间的运输有关(Kanno等2012),说明维管组织在ABA积累中的重要性。AhNCED1与AhCYP707A1可能通过不同的合成速率和代谢速率调控ABA含量,部分ABA可以通过维管组织长途运输到不同组织的质外体,现在已经在拟南芥中发现3个ABA转运载体,分别是AtABCG25、AtABCG40以及NRT1.2,其中NRT1.2和ABCG40将ABA运输进胞质内,AtABCG25反之,ABA通过ABA载体进行跨膜运输(Boursiac等2013),除此,ABA-GE也参与ABA的长途运输,它被认为是一个长途运输的理想的复合体(Zheng等2013),这些过程共同维持植株体内ABA稳态。

在ABA代谢中,NCED为合成关键酶,而CYP707A1为分解关键酶,一起调控着ABA的表达(Leng等2014)。干旱胁迫下,抗旱能力强的花生品种,其ABA增加幅度大;抗旱能力弱的花生品种,其ABA增加幅度小(刘吉升和李玲2006)。干旱胁迫下,叶片*AhNCED1*的表达量与其抗旱性呈正相关,*AhNCED1*基因可以作为筛选抗旱花生品种的分子指标(陈艳萍等2013)。与敏旱品种‘汕优523’相比,抗旱品种‘粤油7’叶片ABA在响应胁迫过程中反应量大且迅速(图3和5);*AhNCED1*的表达量也较大(图4)。*AhNCED1*表达较强,ABA合成速率较高,植株内源ABA能维持在较高水平,抗旱能力较强。干旱胁迫下,玉米籽粒ABA含量增加,ABA代谢速率也同步增加(Ren等2007)。*粤油7*叶片AhCYP707A1蛋白的表达以及分布均较强(图1和2),说明抗旱品种花生ABA代谢更为活跃。植株内源ABA含量由代谢速率以及合成速率的相对变化实现精细调控。

参考文献

- Boneh U, Biton I, Schwartz A (2012). Characterization of the ABA signal transduction pathway in *Vitis vinifera*. *Plant Sci*, 187: 89–96
- Boursiac Y, L eran S, Corratg e-Faillie C, Gojon A, Krouk G, Lacombe B (2013). ABA transport and transporters. *Trends Plant Sci*, 18 (6): 325–333
- Burbidge A, Grieve TM, Jackson A, Thompson A, McCarty DR, Taylor IB (1999). Characterization of the ABA-deficient tomato mutant *notabilis* and its relationship with maize Vp14. *Plant J*, 17: 427–431
- Chen YP, He JL, Li LM, Li L (2013). The relationship between the expression of *AhNCED1* and drought resistance physiology of different peanut varieties. *Plant Physiol J*, 49 (04): 369–374 (in Chinese with English abstract) [陈艳萍, 何金丽, 李丽梅, 李玲 (2013). 不同花生品种抗旱生理与*AhNCED1*基因表达的关系. *植物生理学报*, 49 (4): 369–374].
- Cheng WH, Endo A, Zhou L, Penney J, Chen HC, Arroyo A, Leun P, Nambara E, Asami T, Seo M (2002). A unique short-chain dehydrogenase/reductase in *Arabidopsis* glucose signaling and abscisic acid biosynthesis and functions. *Plant Cell*, 14: 2723–2743
- Endo A, Sawada Y, Takahashi H, Okamoto M, Ikegami K, Koizumi H, Seo M, Toyomasu T, Mitsuhashi W, Shinozaki K, et al (2008). Drought induction of *Arabidopsis* 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase occurs in vascular parenchyma cells. *Plant Physiol*, 147: 1984–1993
- Gu FW, Hu ZC, Peng BJ, Xie HX, Hu LL (2010). General situation and mechanization development strategy of peanut production in China. *Chin Agric Mechann*, (3): 8–10 (in Chinese with English abstract) [顾峰玮, 胡志超, 彭宝良, 谢焕雄, 胡良龙(2010). 国内花生种植概况与生产机械化发展对策. *中国农机化*, (3): 8–11]
- Hu B, Liu X, Hong L, Li L, Luo GY (2010). Expression of arachis hypogaea 9-cis epoxycarotenoid dioxygenase 1 (AhNCED1) in different organs of peanut and localization in *Arabidopsis*. *Biotechnol Biotechnol EQ*, 24 (1): 1562–1568
- Hu B, Xiao S, L u Y, Li L (2012). Distribution of ABA and AhNCED1 in peanut leaves of different drought resistant cultivars subjected to drought stress. *Chin J Cell Biol*, 34 (10): 992–997 (in Chinese with English abstract) [胡博, 肖素妮, 吕艳, 李玲(2012). 同花生品种响应干旱胁迫后叶片内ABA与AhNCED1的分布. *中国细胞生物学学报*, 34 (10): 992–997]
- Iuchi S, Kobayashi M, Taji T, Naramoto M, Seki M, Kato T, Tabata S, Kakubari Y, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K (2001). Regulation of drought tolerance by gene manipulation of 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase, a key enzyme in abscisic acid biosynthesis in *Arabidopsis*. *Plant J*, 27: 325–333
- Kanno Y, Hanada A, Chiba Y, Ichikawa T, Nakazawa M, Matsui M, Koshiba T, Kamiya Y, Seo M (2012). Identification of an abscisic acid transporter by functional screening using the receptor com-

- plex as a sensor. Proc Natl Acad Sci USA, 109 (24): 9653–9658
- Kushiro T, Okamoto M, Nakabayashi K, Yamagishi K, Kitamura S (2004). The *Arabidopsis* cytochrome P450 CYP707A encodes ABA 8'-hydroxylases: key enzymes in ABA catabolism. EMBO J, 23: 647–656
- Leng P, Yuan B, Guo Y, Chen P (2014). The role of abscisic acid in fruit ripening and responses to abiotic stress. J Exp Bot, 65 (16): 4577–4588
- Liu J, Li L (2006). The capacity of drought resistance and its relationship with endogenous ABA in different kind of peanut. Plant Physiology Commun, 42 (6): 1115–1116 (in Chinese with English abstract) [刘吉升, 李玲(2006). 不同品种花生的抗旱能力及其与内源ABA的关系. 植物生理学通讯, 42 (6): 1115–1116]
- Liu S, Lü Y, Wan XR, Li LM, Hu B, Li L (2014). Cloning and expression analysis of cDNAs encoding ABA 8'-hydroxylase in peanut plants in response to osmotic stress. PLoS ONE, 9 (5): e97025
- Nambara E, Marion-Poll A (2005). Abscisic acid biosynthesis and catabolism. Ann Rev Plant Biol, 56: 165–185
- Niu ZQ, Liu GS, Shi TG, Zhang ST, Jia HF, Zhang HY, Cui H, Yang YX (2015). Cloning of *NCED3* gene in *Nicotiana tabacum* and analysis of its drought stress-induced expression. Chinatobacco, 458: 100–106 (in Chinese with English abstract) [牛志强, 刘国顺, 师婷婷, 张松涛, 贾红昉, 张洪映, 崔红, 杨永霞(2015). 烟草*NCED3*基因的克隆以及干旱胁迫表达分析. 中国烟草学报, 458: 100–106]
- Ren HB, Gao ZH, Chen L (2007). Dynamic analysis of ABA accumulation in relation to the rate of ABA catabolism in maize tissues under water deficit. J Exp Bot, 58: 211–219
- Suttle JC, Abrams SR, De Stefano-Beltrán L, Huckle LL (2012). Chemical inhibition of potato ABA-8'-hydroxylase activity alters *in vitro* and *in vivo* ABA metabolism and endogenous ABA levels but does not affect potato microtuber dormancy duration. J Exp Bot, 63 (15): 5717–5725
- Suttle JC, Lulai EC, Huckle LL (2013). Wounding of potato tubers induces increases in ABA biosynthesis and catabolism and alters expression of ABA metabolic genes. J Plant Physiol, 170 (6): 560–566
- Tan BC, Joseph LM, Deng WT, Liu L, Cline K, McCarty DR (2003). Molecular characterization of the *Arabidopsis* 9-*cis*-epoxycarotenoid dioxygenase gene family. Plant J, 35: 44–56
- Wan X, Li L (2006). Regulation of ABA level and water-stress tolerance of *Arabidopsis* by ectopic expression of a peanut 9-*cis*-epoxycarotenoid dioxygenase gene. Biochem Biophys Res Commun, 347: 1030–1038
- 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 RP (2014). Progress on the relationship between ABA and plant desiccation. Beijing Agric, 27: 242–243 (in Chinese with English abstract) [张荣萍(2014). ABA与植物抗旱关系的研究进展. 北京农业, 27: 242–243]
- Zheng Y, Huang Y, Xian W, Wang J, Liao H (2013). Identification and expression analysis of the *Glycine max* CYP707A gene family in response to drought and salt stresses. Ann Bot, 110: 743–756

Changers of AhCYP707A1 proteins and ABA distribution in peanut leaves under water stress

CAO Jia-Jia, LÜ Yan, HU Bo*, LI Ling

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

Abstract: CYP707A protein is the key enzyme in the major ABA catabolic pathway. It remains unclear that the change of AhCYP707A1 proteins and ABA distribution and level in leaves under water stress in peanut. The results revealed, the expression of AhCYP707A1 protein was decreased, which regulated the accumulation of ABA in peanut leaves under water stress. After that the expression of AhCYP707A1 protein was increased, and it was involved in regulation of ABA homeostasis. ABA and AhCYP707A1 were mainly distributed in the vascular cambium of peanut leaves. Under water stress, the distribution and content of ABA in peanut leaves were increased after the treatment with protein inhibitors of AhCYP707A. Drought-tolerant peanut cultivars showed higher levels of AhCYP707A1 expression and a stronger distribution in the vascular cambia with water stress treatment and which indicated that ABA metabolism of drought-tolerant peanut cultivars were more active.

Key words: peanut; water stress; AhCYP707A1; ABA distribution

Received 2015-11-12 Accepted 2016-03-03

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant Nos. 31301247 and 31471422), Research Fund for the Doctoral Program of Higher Education of China (Grant No. 20124407120008).

*Corresponding author (E-mail: hubo0610@126.com).