

研究报告 Original Papers

铝胁迫下质膜H⁺-ATPase对水稻硝态氮吸收的影响周小华^{1,2}, 徐慧妮¹, 谷照虎¹, 陈丽梅¹, 李昆志^{1,*}¹昆明理工大学生命科学与技术学院生物工程技术研究中心, 昆明650500; ²云南商务信息工程学校, 昆明650204

摘要: 为了研究铝胁迫下水稻质膜H⁺-ATPase对硝态氮吸收影响, 以‘滇优35号’(粳稻)为试验材料, 采用溶液培养法研究50 μmol·L⁻¹ Al³⁺胁迫下添加质膜H⁺-ATPase的激活剂壳梭孢素(FC)和抑制剂腺苷-5'-单磷酸(AMP)对质膜H⁺-ATPase水解活性和H⁺-泵活性, 质膜H⁺-ATPase和14-3-3蛋白的相互作用对水稻NO₃⁻-N吸收的影响。结果表明, AMP处理使铝胁迫下水稻质膜H⁺-ATPase水解活性、H⁺-泵的活性, 质膜H⁺-ATPase和14-3-3蛋白的相互作用下降, H₂O₂和MDA含量增加, 从而导致水稻NO₃⁻-N吸收降低。FC处理可使铝胁迫下水稻质膜H⁺-ATPase水解活性、H⁺-泵的活性以及质膜H⁺-ATPase和14-3-3蛋白的相互作用增加, H₂O₂和MDA含量下降, 从而使水稻NO₃⁻-N吸收增加。这些研究结果表明铝胁迫通过影响质膜H⁺-ATPase与14-3-3蛋白互作来影响质膜H⁺-ATPase水解活性和氢泵活性以及H₂O₂和MDA含量, 进而影响对硝态氮的吸收。

关键词: 铝胁迫; 水稻; 质膜H⁺-ATPase; 硝态氮; FC; AMP

近年来, 随着酸雨的增加和化肥的大量使用, 使酸性耕地面积不断扩大, 土壤酸化趋于严重(Guo等2010)。土壤酸化会导致活性铝(Al³⁺)的释放, 对植物造成毒害作用(Liu等2014)。Al³⁺胁迫现已成为酸性土壤中制约作物生产的主要障碍因子, 成为酸性旱地和酸性硫酸盐水田限制水稻生长和产量的一个主要胁迫因子(Poschenrieder等2008), 影响植物对矿质元素和水的吸收, 进而导致植物地上部分生长受阻, 造成作物减产。

细胞质膜H⁺-ATPase(PM H⁺-ATPase)是细胞膜上最丰富的蛋白质, 被誉为高等植物生命活动过程中的“主宰酶”(Shen 2011), 在维持细胞质pH、代谢物稳态及逆境适应方面处于中心地位, 调控许多重要生理过程。FC是由扁桃壳梭孢菌(*Fusicoccum amygdali* Del.)产生的一种碳三环双萜的糖苷类毒素, 它在许多方面具有与生长素类似的作用(Babakov等1995)。FC还是PM H⁺-ATPase特异性激活剂, 植物经FC处理后, 能增加PM H⁺-ATPase的活性(杨颖丽等2006)。而抑制剂腺苷-5'-单磷酸AMP是PM H⁺-ATPase特异性抑制剂, 能够抑制PM H⁺-ATPase的活性。14-3-3蛋白是在真核细胞中发现的一类高保守的调控蛋白, 对其在植物质膜上的主要结合靶点PM H⁺-ATPase的活性有重要的调控作用。14-3-3蛋白可通过与磷酸化的PM H⁺-ATPase相互作用而调节PM H⁺-ATPase活性(Bunney等2002), 所以PM H⁺-ATPase的活性与其磷酸化水平有关。14-3-3蛋白与PM H⁺-ATPase的C末端自抑制区内倒数

第2个Thr的磷酸化序列结合时, 形成14-3-3/H⁺-ATPase复合体从而活化PM H⁺-ATPase (Sondergaard等2004)。FC能够使14-3-3/H⁺-ATPase这个复合体结合得更加牢固, 显著增强PM H⁺-ATPase活性(Jahn等1997)。而AMP能够抑制14-3-3蛋白与PM H⁺-ATPase磷酸化结合从而降低PM H⁺-ATPase的活性。

植物自土壤吸收的氮源主要是硝态氮(NO₃⁻-N)和铵态氮(NH₄⁺-N) (Chapman和Miller 2011), 吸收的氮源必须通过植物细胞膜的离子通道、转运蛋白以及载体等媒介才能被植物吸收, 这种跨膜转运的过程与PM H⁺-ATPase有密切的联系。在水稻根系细胞膜上存在着高亲合性与低亲合性的硝酸盐转运系统(Palmgren 1991), 这两种NO₃⁻-N的吸收形式是一个耗能的逆浓度梯度和电化学梯度的主动运输过程, 需要通过细胞膜上转运蛋白以2H⁺/1NO₃⁻协同转运的运输方式完成植物对NO₃⁻-N的吸收, 需要细胞质膜上的H⁺-ATPase提供能量与质子(McClure 1997)。而PM H⁺-ATPase通过水解ATP产生能量, 将细胞质中的H⁺泵出细胞从而在细胞膜两侧产生H⁺浓度梯度和电化学势, 以质子驱动力的形式推动各种离子和小分子代谢产物进行跨膜运输(Zhang等2011; Elmore和Coaker 2011)。产生的电化学梯度为多种营养物质的吸收提供驱动的

收稿 2016-01-29 修定 2016-05-18

资助 国家自然科学基金(31260297和31560351)和云南省九湖水专项治理项目(KKK0201126044)。

* 通讯作者(E-mail: likunzhi63@126.com)。

能量,从而激活一系列次级离子及代谢产物的运载蛋白,完成物质的吸收和转运,并调节细胞质中的pH,其泵 H^+ 作用能使促进植物 NO_3^- -N吸收(Michelet和Boutry 1995; Palmgren 1998)。

然而,有关铝胁迫下水稻PM H^+ -ATPase对水稻 NO_3^- -N吸收的影响,特别是从PM H^+ -ATPase的特异性激活剂(FC)和抑制剂(AMP)方面分析水稻 NO_3^- -N吸收与根系PM H^+ -ATPase关系及相互影响至今还未见报道。因此,本实验着重研究了添加激活剂(FC)和抑制剂(AMP)的水稻 NO_3^- -N的吸收、根系PM H^+ -ATPase的水解活性、泵 H^+ 能力及其蛋白质水平上的表达差异,旨在揭示水稻根系PM H^+ -ATPase与 NO_3^- -N吸收之间的关系。从分子水平研究水稻对 NO_3^- -N的吸收及其调控机制,能够为提高氮素利用效率,培育高效利用氮肥的作物新品种提供理论基础。

材料与方法

1 材料培养与处理

供试水稻(*Oryza sativa* L.)为‘滇优35号’(杂交稻,粳稻)(云南农业大学水稻研究所提供)。选用饱满的种子以10% H_2O_2 溶液消毒,用蒸馏水浸泡24 h后,置于25°C培养箱中黑暗催芽,将露白发芽的种子转移0.5 mmol·L⁻¹ $CaCl_2$ 溶液培养。待幼苗1叶龄时,用含1/4浓度pH 4.5的水稻营养液(IRRI,国际水稻所)培养1周,再转移至pH 4.5的水稻营养液[含 NH_4NO_3 2.86 mmol·L⁻¹、 KH_2PO_4 0.3 mmol·L⁻¹、 K_2SO_4 0.35 mmol·L⁻¹、 $CaCl_2$ 1.0 mmol·L⁻¹、 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 1.0 mmol·L⁻¹、 $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ 9.0×10⁻³ mmol·L⁻¹、 H_3BO_3 2.0×10⁻² mmol·L⁻¹、 $(NH_4)_6Mo_7O_{24} \cdot 4H_2O$ 0.39×10⁻⁴ mmol·L⁻¹、 $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ 3.2×10⁻⁴ mmol·L⁻¹、 $Na_2SiO_3 \cdot 9H_2O$ 5.0×10⁻⁴ mmol·L⁻¹、 $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 7.7×10⁻⁴ mmol·L⁻¹和 $Na_2EDTA \cdot Fe(II)$ 2.0×10⁻² mmol·L⁻¹]培养,每天光照(1 200 $\mu mol \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$) 12 h的培养室中进行漂浮培养,每隔1 d更换一次培养液,待水稻长至四叶一心时进行实验。前期我们的研究结果(周小华等2015)表明,50 $\mu mol \cdot L^{-1}$ $AlCl_3$ 为‘滇优35号’水稻的最佳铝胁迫浓度,1 $\mu mol \cdot L^{-1}$ FC和100 mmol·L⁻¹ AMP处理对铝胁迫下水稻吸收 NO_3^- -N有着明显的缓解和抑制效果。因此,将水稻分别置于含1 $\mu mol \cdot L^{-1}$ FC或100 mmol·L⁻¹ AMP的

50 $\mu mol \cdot L^{-1}$ $AlCl_3$ (pH 4.5)的水稻营养液处理24 h,以不添加铝、FC和AMP处理作为对照。收集根尖材料(0~20 mm),用液氮速冻后于-80°C保存备用。

2 测定指标及方法

2.1 MDA和 H_2O_2 含量的测定

丙二醛(MDA)含量采用硫代巴比妥法(张志良和瞿伟菁2003)测定。硫代巴比妥(TBA)和MDA在高温及酸性环境下会反应生成红棕色物质3,5,5-三甲基恶唑2,4-二酮,在532 nm的波长下有最大吸收峰。 H_2O_2 含量测定参照(Gay和Gebicki 2003)的方法,采用二甲酚橙作指示剂,用分光光度计测定560 nm处的吸光度值。

2.2 NO_3^- -N吸收的测定

溶液中 NO_3^- -N的含量测定参照中华人名共和国环境保护行业标准(HJ/T 346-2007)中的紫外分光光度法。以去离子水为对照,分别检测OD₂₂₀和OD₂₇₅,根据标准曲线计算 NO_3^- -N浓度。每天定时更换相同体积的含不同浓度 Al^{3+} 的水稻营养液,定时取0.5 mL各处理液测定处理液中的 NO_3^- -N含量,以处理液中 NO_3^- -N的浓度减少量来表征水稻每天 NO_3^- -N吸收量。

2.3 质膜蛋白的提取、PM H^+ -ATPase活性及 H^+ -泵活性测定

参照Shen等(2005)的方法提取水稻根的质膜蛋白,使用Bradford比色法测定质膜蛋白的浓度,然后参照Guo等(2013)的方法检测质膜蛋白的纯度并测定PM H^+ -ATPase的活性。称取根组织0.5 g,放入液氮中速冻后研磨,研磨成粉末状加入1.5 mL的反应匀浆液,反应体系中包含1 mmol·L⁻¹ EDTA、1 mmol·L⁻¹ $MgSO_4$ 以及10 mmol·L⁻¹ Tris-HCl、0.25 mmol·L⁻¹山梨醇,溶解后将研磨液转移到2 mL EP管中,4°C,11 000×g转离心20 min后取上清,于分光光度计OD₅₉₅测蛋白浓度,之后取500 μg 质膜蛋白在0.5 mL的反应体系中以启动反应,反应体系包含0.02% Brij、50 mmol·L⁻¹ KCl、4 mmol·L⁻¹ ATP- Na_2 、1 mmol·L⁻¹ $(NH_4)_2MoO_4$ 、50 mmol·L⁻¹ KNO_3 、50 mmol·L⁻¹ BTP/MES和1 mmol·L⁻¹ NaN_2 混合而成。之后将反应混合物于30°C水浴30 min,立即加入1 mL反应终止液[含5% SDS (W/V)、2% H_2SO_4 (V/V)和0.7% $(NH_4)_2MoO_4$ (W/V)]后再加入0.5 mL显色液,于室温放置20 min后,用分光光度计测定波

长为660 nm处的吸光值。根据标准曲线可得到质膜H⁺-ATPase的活性。将1单位的质膜H⁺-ATPase活性定义为: 30°C的反应条件下,在1 min内每mg蛋白催化ATP分解释放无机磷酸的 μmol 数。质膜H⁺-泵活性的测定参照Yan等(2002)吡啶橙(AO)方法,用分光光度计于 A_{492} 处测定吸光值猝灭的方法测定。取50 μg 质膜蛋白于2 mL的EP管中,添加反应体系至1.5 mL后且混匀后,置于室温15~30 min,再向反应液中加入5 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的ATP/BTP,最后在 A_{492} 处测吸光度,每20秒记录1次,测15~20 min(反应体系配方: 250 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 蔗糖、1 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ Na_2MoO_4 、0.5 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ EGTA、5 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ BTP/MES、50 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ KCl、12 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ AO、0.05% Brij58、0.5 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ EGTA和1 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaN_3)。

2.4 Western blot和质膜H⁺-ATPase磷酸化与14-3-3蛋白互作分析

质膜H⁺-ATPase的磷酸化及与14-3-3蛋白互作方法以及所用抗体参照Guo等(2013)的方法,在质膜H⁺-ATPase磷酸化与14-3-3蛋白互作分析中,先用SDS-PAGE(4%浓缩胶和10%分离胶)分离提取的质膜,电泳后,经G250(考马斯亮蓝250)染色,最后经脱色液脱色后,观察提取的质膜蛋白中是否有质膜H⁺-ATPase蛋白(质膜H⁺-ATPase大小为97 kDa)和14-3-3蛋白(14-3-3蛋白大小为28~30 kDa左右)的条带。同时取50 μg 的质膜蛋白经10% SDS-PAGE分离后,经半干式转膜仪将胶上蛋白转移到PVDF膜上后,然后再分别加入AHA3(拟南芥质膜H⁺-ATPase)的C端抗体和14-3-3蛋白抗体作为一抗,常温孵育2~3 h,接着用偶联过氧化物酶的羊抗兔IgG的抗体常温孵育2 h,最后加入产生荧光的反应底物,通过凝胶成像仪观察结果。通过质膜H⁺-ATPase磷酸化与14-3-3蛋白互作的方法确定14-3-3蛋白与磷酸化质膜H⁺-ATPase结合,200 μg 的质膜蛋白中加入有磷酸化修饰的大豆质膜H⁺-ATPase(GHA2)C末端多肽[N¹-ESVVKLKGLDTIQHYT(p)V-C¹]制备的多克隆抗体(兔抗)GHA2p与质膜H⁺-ATPase结合的蛋白,4°C孵育振摇1 h,然后加入30 μL 的蛋白A/G plus-agarose(Santa Cruz Biotech, Santa Cruz, CA),于4°C孵育振摇过夜。蛋白样品3 500 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心5 min得到沉淀蛋白,沉淀蛋白用预冷的PBS(磷酸盐缓冲液)清洗几次。清洗后的沉淀用32 μL 预冷PBS及8 μL 1 \times loading buffer溶解,取30 μL 经

4%浓缩胶和10%分离胶做SDS-PAGE电泳分离沉淀下来的蛋白后,分离蛋白经半干式电转仪将蛋白转移至PVDF膜上,使用大豆14-3-3蛋白(兔抗)或VHA2p抗体(一抗)进行Western blot分析,然后再用偶联过氧化物酶的羊抗兔IgG的抗体(二抗)常温孵育2 h,最后用ECL试剂盒显影并通过凝胶成像仪观察结果。用图像分析软件Image J对Western blot的信号进行相对定量分析。

3 数据处理

本实验所有数据均采用Microsoft Excel 2003软件进行处理,应用软件对数据进行单因素方差分析(One-Way ANOVA),图中标示相同字母表示处理间差异不显著,不相同字母则表示处理间差异显著,平均值用Duncan法进行比较, $P<0.05$ 表示显著差异。

实验结果

1 FC和AMP对Al³⁺胁迫下水稻根尖MDA及H₂O₂含量的影响

H₂O₂是植物体内强氧化剂,通过Haber-Weiss反应产生攻击力更强的 $\cdot\text{OH}$,启动膜脂过氧化,造成线粒体脂膜过氧化产物的增加(钱琼秋等2006),植物在逆境中受到伤害与活性氧积累诱发脂膜过氧化作用密切相关,而MDA是膜脂过氧化的终产物之一,主要损伤细胞质膜结构,使得细胞膜结构和功能上受到损伤,从而影响一系列生理生化反应的正常进行。MDA含量能够反映植物经胁迫后质膜的氧化程度,其含量高低可以作为考察细胞受到胁迫严重程度的指标之一,通常作为胞内发生氧化胁迫水平的重要生理指标。

如图1所示,铝胁迫的水稻根中MDA和H₂O₂含量都显著增加,根尖的H₂O₂含量(图1-A)和MDA含量(图1-B)都约为对照的2.33倍和1.78倍。FC处理Al³⁺胁迫的水稻24 h,根中H₂O₂和MDA含量都显著降低,分别为单铝处理的0.79倍和0.74倍。而AMP处理Al³⁺胁迫的水稻根中H₂O₂和MDA含量都显著提高,分别为单铝处理的1.25倍和1.37倍。这些结果说明FC处理在一定程度上可缓解铝胁迫下水稻氧化损伤,而AMP则加剧了植物氧化伤害。

2 FC和AMP对Al³⁺胁迫下水稻NO₃⁻-N吸收的影响

从图2可知,铝胁迫与对照相比,水稻吸收NO₃⁻-N的量显著减少,只有对照NO₃⁻-N的量的0.79

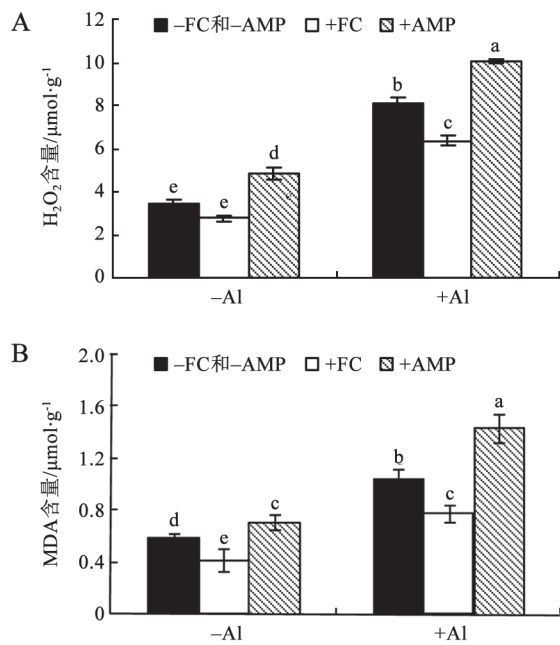


图1 FC和AMP对铝胁迫水稻根尖的H₂O₂和MDA含量的影响
Fig.1 Effects of FC and AMP on H₂O₂ and MDA contents in rice root tips under Al stress

不同小写字母表示差异显著($P < 0.05$)。下图同此。

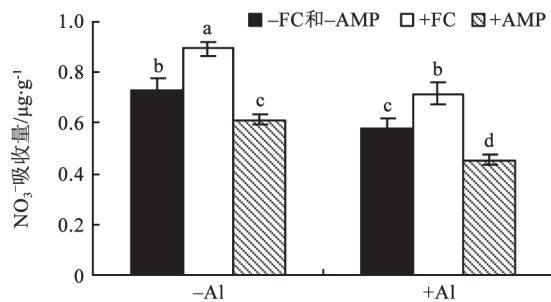


图2 FC和AMP对铝胁迫水稻吸收NO₃⁻-N的影响
Fig.2 Effects of FC and AMP on the uptake of NO₃⁻-N in rice under Al stress

倍。FC处理无铝水稻与对照相比,水稻NO₃⁻-N的吸收量增加,是对照NO₃⁻-N吸收量的1.28倍;FC处理铝胁迫水稻与单铝胁迫处理相比,水稻NO₃⁻-N的吸收量增加,是单铝胁迫处理水稻的1.24倍,几乎接近对照水稻吸收NO₃⁻-N的水平。而AMP处理铝胁迫水稻与单铝胁迫处理相比,水稻NO₃⁻-N的吸收量下降,是单铝胁迫处理水稻的0.78倍,只有对照吸收NO₃⁻-N的0.62倍。AMP处理无铝水稻与对照相比,水稻NO₃⁻-N的吸收量也降低,只有对照吸收的0.84倍。

3 FC和AMP对Al³⁺胁迫下水稻根尖质膜H⁺-ATPase水解活性(Pi)及H⁺-泵活性的影响

很多研究表明,植物体内物质的跨膜运输与质膜H⁺-ATPase的水解活性相关,由图2证实FC处理可以提高水稻吸收NO₃⁻-N,而AMP处理降低了水稻吸收硝态氮的能力,为进一步了解水稻吸收NO₃⁻-N的效率是否与根部PM H⁺-ATPase活性有关,本研究检测了FC和AMP处理水稻根中PM H⁺-ATPase的活性变化及质膜泵H⁺活性分析。结果如图3-A可知,Al³⁺胁迫水稻PM H⁺-ATPase活性比对照显著减少,为对照PM H⁺-ATPase活性的0.74倍,FC处理无铝水稻与对照相比,水稻PM H⁺-ATPase活性增加,是对照PM H⁺-ATPase活性的1.35倍;FC处理铝胁迫水稻与单铝胁迫处理相比,水稻PM H⁺-ATPase活性也增加,是单铝胁迫处理水稻的1.11倍,是对照的0.81倍。而AMP处理铝胁迫水稻与单铝胁迫处理相比,水稻根尖PM H⁺-ATPase活性下降,是单铝胁迫处理水稻的0.65倍,只有对照根尖PM H⁺-ATPase活性的量的0.93倍。PM H⁺-ATPase活性的升高或降低最直观明显的作用效果就是激活或抑制H⁺-泵活性,促进或抑制H⁺从胞内分泌到细胞外,由此能够产生跨膜pH梯度和跨膜电势梯度,此电化学梯度为物质跨膜转运提供驱动力,促进各种营养物质、离子等的跨膜转运。为了解FC和AMP处理对水稻根部质膜H⁺-泵活性的影响,实验进一步分析了水稻根中H⁺-泵活性。结果如图3-B所示,FC和AMP处理水稻根尖H⁺-泵活性的变化趋势与PM H⁺-ATPase活性的变化一致,说明FC和AMP处理能显著增加或减少了水稻根部PM H⁺-ATPase的水解活性和H⁺-泵活性。

4 FC和AMP处理对水稻根尖PM H⁺-ATPase与14-3-3蛋白互作水平的影响

PM H⁺-ATPase与14-3-3蛋白的结合可以激活质膜H⁺-ATPase的活性,为了明确铝胁迫下FC和AMP处理水稻吸收NO₃⁻-N是否与PM H⁺-ATPase与14-3-3蛋白互作有关,实验提取了FC和AMP处理根尖质膜蛋白,做了PM H⁺-ATPase磷酸化及与14-3-3蛋白互作分析(图4-A和B)。根尖PM H⁺-ATPase的磷酸化水平与14-3-3蛋白结合趋势基本一致。

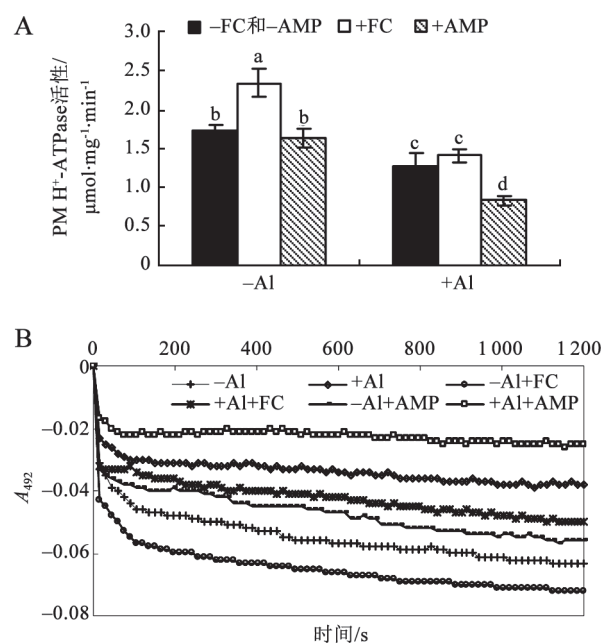


图3 FC和AMP对铝胁迫下水稻质膜H⁺-ATPase水解活性和H⁺-泵活性的影响

Fig.3 Effects of FC and AMP on the hydrolysis activity of H⁺-ATPase and H⁺-pump activity in the plasma membrane of rice under Al stress

A: 质膜H⁺-ATPase活性; B: H⁺-泵活性。

通过软件对PM H⁺-ATPase蛋白和14-3-3蛋白的相对表达量进行分析。由图4-C结果表明, FC处理无铝与铝胁迫的水稻, Al³⁺胁迫处理的水稻与对照相比, 根尖PM H⁺-ATPase的相对含量是对照的0.91倍, 14-3-3蛋白的相对含量是对照的0.88倍; FC处理无铝水稻与对照相比, 水稻根尖PM H⁺-ATPase的相对含量增加, 是对照的1.89倍, 14-3-3蛋白相对含量是对照的1.94倍; FC处理铝胁迫水稻与单铝胁迫处理相比, 水稻根尖PM H⁺-ATPase的相对含量增加, 是单铝胁迫处理水稻的1.39倍, 为对照的1.26倍, 14-3-3蛋白相对含量则是对照的1.08倍, 是单铝胁迫处理水稻的1.23倍。而图4-D结果表明AMP处理无铝水稻与对照相比, 水稻PM H⁺-ATPase和14-3-3蛋白的相对含量只有对照的0.79倍和0.74倍。AMP处理铝胁迫水稻与单铝胁迫处理水稻相比, 水稻根尖PM H⁺-ATPase的相对含量下降, 是单铝胁迫处理水稻的0.71倍, 只有对照的0.46倍, 14-3-3蛋白相对含量则是对照的0.52倍, 是单铝胁迫处理水稻的0.73倍; 说明FC处理增强了水稻根部质膜H⁺-ATPase与14-3-3蛋白的相互作用, AMP

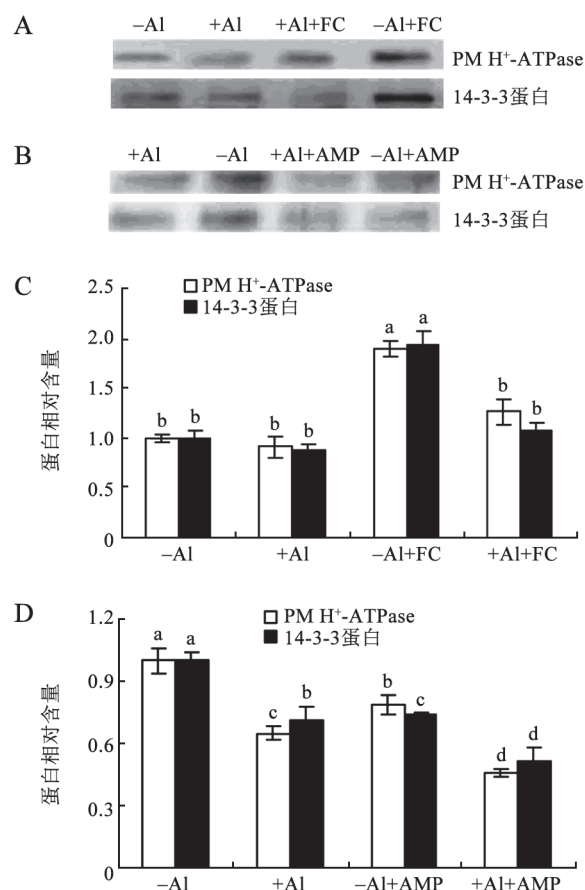


图4 FC和AMP对水稻根尖质膜H⁺-ATPase和14-3-3蛋白的相互作用水平以及相对含量的影响

Fig.4 Effects of FC and AMP on the interaction and relative quantification between H⁺-ATPase and 14-3-3 protein in the apical plasma membrane of rice

A、B: H⁺-ATPase和14-3-3蛋白的相互作用水平; C、D: 蛋白相对含量。

处理削弱了水稻根部质膜H⁺-ATPase与14-3-3蛋白的相互作用。

讨 论

已有研究表明, 植物吸收NO₃⁻-N是由硝酸转运蛋白(NRT)负责的主动运输过程, 这个过程需要PM H⁺-ATPase提供质子和能量。NRT为质子同向转运蛋白, 转运1个NO₃⁻-N的同时需要将2个H⁺泵入细胞膜的共转运是目前公认的NO₃⁻-N跨膜运输方式(Mcclure等1990)。对PM H⁺-ATPase调控氮素营养吸收机理的研究结果表明在PM H⁺-ATPase的作用下, 将ATP水解释放出能量供H⁺泵出胞外(H⁺分泌和释放), 在H⁺形成的电势梯度, 伴随H⁺的同向运输NO₃⁻-N通过通道蛋白逆浓度梯度进入胞内,

使质外体空间碱化。在磷酸激酶的作用下PM H⁺-ATPase磷酸化PM H⁺-ATPase, 然后再与14-3-3蛋白互作形成14-3-3蛋白和磷酸化PM H⁺-ATPase蛋白复合体, 激活H⁺-ATPase活性, 水解ATP产生的能量将细胞质膜内侧的H⁺泵出到质膜外侧, 由此能够产生跨膜pH梯度和跨膜电势梯度(Kronzucker等1999), 此电化学梯度为NO₃⁻-N跨膜转运提供驱动力, 促进NO₃⁻-N的跨膜转运, 促进根细胞对硝态氮的吸收。

铝胁迫诱导了活性氧增加, 而活性氧产生是胁迫条件下破坏膜结构功能稳定性的主要原因之一。如前所述, PM H⁺-ATPase是质膜上最丰富的蛋白, 而质膜又是细胞中对环境胁迫及其敏感的部位, 因此活性氧会对PM H⁺-ATPase造成影响。盐胁迫使枸杞愈伤组织发现H₂O₂与O₂^{-·}、HO·的含量与PM H⁺-ATPase活性在重度胁迫下呈显著负相关(毛桂莲等2003)。我们的研究结果(图4)与这些报道相一致, 铝胁迫水稻削弱了根尖PM H⁺-ATPase活性及与14-3-3蛋白的结合。

在磷缺乏条件下, 添加FC处理时使白羽扇豆的羽根柠檬酸分泌量增加, 是因为FC的存在增加了PM H⁺-ATPase与14-3-3蛋白的结合, 从而增强PM H⁺-ATPase的活性和质子的外排作用使柠檬酸分泌增加(Tomasi等2006)。与这些报道相一致, 本研究结果也证实FC处理‘滇优35号’水稻显著增强了根尖PM H⁺-ATPase与14-3-3蛋白的结合而使其活性提高, 在铝胁迫下添加FC也能增强水稻根尖PM H⁺-ATPase的活性, 增强水稻根尖H⁺-泵活性和质子的分泌作用, 硝态氮的吸收量也相应增加(图2)。AMP抑制14-3-3蛋白与质膜H⁺-ATPase C末端的结合, 虽然还没有研究报道AMP处理是否抑制植物细胞对硝态氮的吸收, 但在转基因烟草中PM H⁺-ATPase的共抑制表达影响转基因植物的生长, 光合作用水平下降, 生长受抑制, 植株矮小(Zhao等2000), 因此不难理解本研究观察到AMP处理水稻吸收硝态氮下降。在铝胁迫下添加AMP进一步减少了二者的结合, 降低铝对PM H⁺-ATPase与14-3-3蛋白互作的诱导作用, 减少PM H⁺-ATPase的活性和质子的外排作用, 从而抑制水稻吸收硝态氮, 影响水稻的生长, 从而水稻抗铝能力减弱。

综上所述, 铝胁迫诱导水稻氧化胁迫的同时, 也降低铝对PM H⁺-ATPase与14-3-3蛋白互作水平;

激活剂FC能增加PM H⁺-ATPase与14-3-3蛋白互作及泵H⁺能力, 为NO₃⁻-N的吸收提供大量H⁺和能量, 提高水稻吸收NO₃⁻-N的能力, 而抑制剂AMP能削弱PM H⁺-ATPase与14-3-3蛋白互作及泵H⁺能力, 使水稻吸收NO₃⁻-N的能力下降, 说明水稻根系PM H⁺-ATPase活性的大小直接影响到水稻对NO₃⁻-N的吸收, 在水稻吸收NO₃⁻-N的跨膜次级转运过程中发挥着重要的作用。

参考文献

- Babakov AV, Bartova LM, Dridze IL, Maisuryan AN, Margulis GU, Oganian RR, Voblikova VD, Muromtsev GS (1995). Culture of transformed horseradish roots as a source of Fusicoccin-like ligands. *J Plant Growth Regul*, 14: 163–167
- Bunney TB, Wijngaard PWJ, Boer AH (2002). 14-3-3 protein regulation of proton pumps and channels. *Plant Mol Biol*, 50: 1041–1051
- Chapman N, Miller T (2011). Nitrate transporters and root architecture. In: Geisler M, Venema K (eds). *Transporters and Pumps in Plant Signaling, Signaling and Communication in Plants*. Berlin Heidelberg: Springer, 165–190
- Elmore JM, Coaker G (2011). The role of the plasma membrane H⁺-ATPase in plant–microbe interactions. *Mol Plant*, 4 (3): 416–427
- Gay CA, Gebicki JM (2003). Measurement of protein and lipid hydroperoxides in biological systems by the ferric-xylenol orange method. *Anal Biochem*, 315 (1): 29–35
- Guo CL, Chen Q, Zhao XL, Chen XQ, Zhao Y, Wang L, Li KZ, Yu YX, Chen LM (2013). Al-enhanced expression and interaction of 14-3-3 protein and plasma membrane H⁺-ATPase is related to Al-induced citrate secretion in an Al-resistant black soybean. *Plant Mol Bio Rep*, 31 (4): 1012–1024
- Guo JH, Liu XJ, Zhang Y, Shen JL, Han XW, Zhang WF, Christie P, Goulding KWT, Vitousek PM, Zhang FS (2010). Significant acidification in major chinese croplands. *Science*, 327 (5968): 1008–1010
- Jahn T, Fuglsang AT, Olsson A, Bruntrup IM, Collinge DB, Volkman D, Sommarin M, Palmgren MG, Larsson C (1997). The 14-3-3 protein interacts directly with the C-terminal region of the plant plasma membrane H⁺-ATPase. *Plant Cell*, 9 (10): 1805–1814
- Kronzucker HJ, Siddiqi MY, Glass ADM, Kirk GJD (1999). Nitrate ammonium synergism in rice: a subcellular flux analysis. *Plant Physiol*, 119 (3): 1041–1045
- Liu J, Pineros MA, Kochian LV (2014). The role of aluminum sensing and signaling in plant aluminum resistance. *J Integr Plant Biol*, 56 (3): 221–230
- Mao GL, Xu X, Mi HL, Gong HM, Zheng GQ, Zhang Y, Xu ZZ, Wei YQ (2003). Relationship between active oxygen production and plasma membrane H⁺-ATPase activity in calli of *Lycium Barbarum* under salt stress. *Agric Res Arid Areas*, 21 (3): 110–113 (in Chinese with English abstract) [毛桂莲, 许兴, 米海莉, 龚红梅, 郑国琦, 张渊, 徐兆楨, 魏玉清(2003). NaCl胁迫下枸杞愈伤组

- 织活性氧产生与质膜H⁺-ATPase活性的关系. 干旱地区农业研究, 21 (3): 110–113]
- McClure PR, Kochian LV, Spanswick RM, Shaff J (1990). Evidence for cotransport of nitrate and protons in maize roots. II. Measurement of NO₃⁻ and H⁺ fluxes with ion-selective microelectrodes. *Plant Physiol*, 93 (1): 290–294
- Michelet B, Boutry M (1995). The plasma membrane H⁺-ATPase: a highly regulated enzyme with multiple physiological functions. *Plant Physiol*, 108 (1): 1–6
- Palmgren MG (1991). Regulation of plant plasma membrane H⁺-ATPase activity. *Plant Physiol*, 83: 314–323
- Palmgren MG (1998). Proton gradients and plant growth: role of the plasma membrane H⁺-ATPase. *Adv Bot Res*, 28 (1): 1–70
- Poschenrieder C, Gunse B, Corrales I, Barcelo J (2008). A glance into aluminum toxicity and resistance in plants. *Sci Total Environ*, 400 (1/3): 356–368
- Qian QQ, Zai WS, Zhu ZJ, Yu JQ (2006). Effects of exogenous silicon on active oxygen scavenging systems in chloroplasts of cucumber (*Cucumis sativus* L.) seedlings under salt stress. *J Plant Physiol Mol Biol*, 32 (1): 107–112 (in Chinese with English abstract) [钱琼秋, 宰文珊, 朱祝军, 喻景权(2006). 外源硅对盐胁迫下黄瓜幼苗叶绿体活性氧清除系统的影响. *植物生理与分子生物学学报*, 32 (1): 107–112]
- Shen H, He LF, Sasaki T, Yamamoto Y, Zheng SJ, Ligaba A, Yan XL, Ahn SJ, Matsumoto H (2005). Citrate secretion coupled with the modulation of soybean root tip under aluminum stress. Upregulation of transcription, translation, and threonine-oriented phosphorylation of plasma membrane H⁺-ATPase. *Plant Physiol*, 138 (1): 287–296
- Shen P, Wang R, Jing W, Zhang WH (2011). Rice phospholipase da is involved in salt tolerance by the mediation of H⁺-ATPase activity and transcription. *J Intrag Plant Biol*, 53 (4): 289–299
- Sondergaard TE, Schulz A, Palmgren MG (2004). Energization of transport processes in plants. Roles of the plasma membrane H⁺-ATPase. *Plant Physiol*, 136 (1): 2475–2482
- Tomasi N, Kretzschmar T, Espen L, Weisskopf L, Fuglsang AT, Palmgren M, Varanini Z, Pinton R, Martinoia E, Cesco S (2009). Plasma membrane H⁺-ATPase-dependent citrate exudation from cluster roots of phosphate-deficient white lupin. *Plant Cell Environ*, 32 (5): 465–475
- Yan F, Zhu Y, Muller C, Zorb C, Schubert S (2002). Adaptation of H⁺-pumping and plasma membrane H⁺-ATPase activity in proteoid roots of white lupin under phosphate deficiency. *Plant Physiol*, 129 (1): 50–63
- Yang YL, Yang N, An LZ, Zhang X (2006). Research advances about plasmalemma H⁺-ATPase in plants. *Acta Bot Boreal-Occident Sin*, 26 (11): 2388–2396 (in Chinese with English abstract) [杨颖丽, 杨宁, 安黎哲, 张立新(2006). 植物质膜H⁺-ATPase的研究进展. *西北植物学报*, 26 (11): 2388–2396]
- Zhang R, Liu G, Wu N, Gu M, Zeng HQ, Zhu YY, Xu GH (2011). Adaptation of plasma membrane H⁺-ATPase and H⁺-pump to P deficiency in rice roots. *Plant Soil*, 349 (1): 3–11
- Zhang ZL, Qu WJ (2003). *Plant Physiology Experiment Guidance*. 3rd ed. Beijing: Higher Education Press, 274–276 (in Chinese) [张志良, 瞿伟菁(2003). *植物生理学实验指导*. 第3版. 北京: 高等教育出版社, 274–276
- Zhao R, Dielen V, Kinet JM, Boutry M (2000). Cosuppression of a plasma membrane H⁺-ATPase isoform impairs sucrose translocation, stomatal opening, plant growth, and male fertility. *Plant Cell*, 12 (4): 535–546
- Zhou XH, Gu ZH, Xu HN, Chen LM, Li KZ (2015). The effects of exogenous ascorbic acid on photosynthetic characteristics in *Oryza sativa* L. under aluminum stress. *J Yangzhou Uni (Agric Life Sci)*, 36 (3): 68–73 [周小华, 谷照虎, 徐慧妮, 陈丽梅, 李昆志(2015). 外源抗坏血酸AsA对铝胁迫下水稻光合特性的影响. *扬州大学学报(农业与生命科学版)*, 36 (3): 68–73]

Effects of PM H⁺-ATPase on the nitrate uptake of rice under aluminum stress

ZHOU Xiao-Hua^{1,2}, XU Hui-Ni¹, GU Zhao-Hu¹, CHEN Li-Mei¹, LI Kun-Zhi^{1,*}

¹Biotechnology Research Centre, Faculty of Life Science and Biotechnology, Kunming University of Science and Technology, Kunming 650500, China; ²Yunnan Business Information Engineering School, Kunming 650204, China

Abstract: The aim of the experiment was to study the effects of the plasma membrane (PM) H⁺-ATPase on the nitrate (NO₃⁻-N) uptake of rice under aluminum (Al) stress. A hydroponic experiment was conducted with the rice hybrid 'Dian superior 35' (Hybrid, Japonica) to study the effects of activator Fusicoccin (FC) and inhibitor Adenosine-5'-Monophosphate (AMP) of PM H⁺-ATPase on the activities of PM H⁺-ATPase hydrolysis and H⁺-pump and the interaction of PM H⁺-ATPase and 14-3-3 protein on the uptake of NO₃⁻-N in root of the rice under 50 μmol·L⁻¹ Al stress. The results showed that Al combining with AMP treatment could decrease the activities of PM H⁺-ATPase hydrolytic and H⁺-pump and the interaction of PM H⁺-ATPase and 14-3-3 protein and enhanced the contents of H₂O₂ and malondialdehyde (MDA), which decreased the NO₃⁻-N uptake; Al combining with FC treatment could increase the activities of both PM H⁺-ATPase hydrolysis and H⁺-pump, decreased the contents of H₂O₂ and MDA, which promoted the NO₃⁻-N uptake of rice compared with single Al treatment. These results indicated that Al stress affects the activities of PM H⁺-ATPase hydrolytic and H⁺-pump as well as the contents of H₂O₂ and MDA by influencing the interaction of PM H⁺-ATPase and 14-3-3 protein, thereby affecting the absorption of nitrate.

Key words: aluminum (Al) stress; rice; plasma membrane H⁺-ATPase; NO₃⁻-N; FC; AMP

Received 2016-01-29 Accepted 2016-05-18

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant Nos. 31260297 and 31560351) and Yunnan Special Treatment Project of Nine Lake (Grant No. KKK0201126044).

*Corresponding author (E-mail: likunzhi63@126.com).