

学校编码：10384 密级

学号：33120141151667

廈門大學

硕士学位论文

一氧化氮通过调节磷酸盐吸收与转运促进
水稻磷营养

Nitric oxide enhances phosphate nutrition in rice seedlings
by regulating phosphate uptake and translocation

李鹏飞

指导教师姓名：郑海雷教授

专业名称：生态学

论文提交日期：2017年 04月

论文答辩时间：2017年 05月

2017年 06月

厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下，独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果，均在文中以适当方式明确标明，并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范（试行）》。

另外，该学位论文为（环境植物学与植物分子生物学）课题（组）的研究成果，获得（国家自然科学基金项目（31570586,30930076））课题（组）经费或实验室的资助，在（郑海雷教授）实验室完成。（请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称，未有此项声明内容的，可以不作特别声明。）

声明人（签名）：

年月

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

() 1. 经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，于 年 月 日解密，解密后适用上述授权。

() 2. 不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：

年月

目录

摘要.....	I
Abstract.....	III
缩略词表.....	V
第一章前言.....	1
1.1 植物磷营养研究进展.....	1
1.1.1 磷的生物学作用.....	1
1.1.2 植物缺磷的原因及其严重程度.....	1
1.1.3 缺磷对植物造成的危害.....	2
1.1.4 植物响应低磷胁迫的机制.....	2
1.2 一氧化氮 (NO) 在植物中功能的研究进展.....	6
1.2.1 NO 理化性质及研究历程.....	6
1.2.2 NO 在植物体内的合成机制.....	6
1.2.3 NO 的生物学作用.....	8
1.3 本论文的立题依据及研究意义.....	13
第二章材料和方法.....	14
2.1 试验材料的培养及处理.....	14
2.1.1 试验材料的培养.....	15
2.1.2 试验材料的处理.....	15
2.2 主要仪器与试剂.....	15
2.2.1 主要仪器.....	14
2.2.2 主要试剂.....	14
2.3 磷含量的测定.....	16
2.3.1 标准曲线制作.....	16
2.3.2 总磷含量的测定.....	16
2.4 实时荧光定量 PCR 分析.....	17

2.4.1 总 RNA 提取	17
2.4.2 RNA 质量检测与定量	17
2.4.3 cDNA 的合成	18
2.4.4 引物设计	18
2.4.5 实时荧光定量 PCR	21
第三章结果	23
3.1 SNP 对水稻植株中磷含量的影响	23
3.2 SNP 及 NO 清除剂处理后水稻根内源 NO 与磷含量的变化	24
3.3 SNP 对磷酸转运子基因表达的影响	27
3.4 SNP 对磷代谢通路调节基因表达的影响	29
第四章讨论	34
4.1 NO 对水稻磷元素积累的促进作用具有浓度效应	34
4.2 NO 清除剂 cPTIO 处理后内源 NO 和磷含量	35
4.3 L-NNA 和 Tungstate 对磷积累的抑制作用不同	36
4.4 NO 对磷酸转运子基因表达的调控	36
4.5 NO 对磷代谢通路调节基因表达的调控	38
第五章结论与展望	41
5.1 结论	41
5.2 展望	42
参考文献	43
致谢	56

Content

Chinese abstract.....	I
English abstract.....	III
Abbreviations.....	V
Chapter 1 Introduction.....	1
1.1 Research progresses on phosphate nutrient.....	1
1.1.1 Physiological function of phosphate.....	1
1.1.2 Reasons and degree of phosphate deficiency.....	1
1.1.3 The effects of phosphate deficiency on plants.....	2
1.1.4 Response of plants to phosphate deficiency.....	2
1.2 Biological functions of nitric oxide in plants.....	6
1.2.1 Chemical properties and research progress of nitric oxide.....	6
1.2.2 Nitric oxide biosynthesis in plants.....	6
1.2.3 Biological functions of nitric oxide.....	8
1.3 Purpose and scientific significance of the present study.....	13
Chapter 2 Materials and methods.....	14
2.1 Plant culture and treatment.....	14
2.1.1 Plant culture.....	14
2.1.2 Plant treatment.....	14
2.2 Main reagents, instruments and equipments.....	15
2.2.1 Main instruments and equipments.....	15
2.2.2 Main reagents.....	15
2.3 Measurement of phosphorus content.....	16
2.3.1 Standard curve establishment.....	16
2.3.2 Methods of phosphorus measurement.....	16
2.4 Real-time fluorescent quantitative PCR analysis.....	17
2.4.1 Total RNA extraction.....	17
2.4.2 RNA quality analysis and detection.....	17

2.4.3 cDNA synthesis.....	18
2.4.4 Primer design	18
2.4.5 Quantitative realtime PCR	21
Chapter 3 Results	23
3.1 Effects of SNP on total phosphate content in rice seedlings.....	23
3.2 Endogenous nitric oxide and phosphate content treated by SNP, NO inhibitor and scavenger.....	24
3.3 Effects of SNP on the expression of phosphate transporter	27
3.4 Effects of SNP on phosphorus metabolism-regulated genes.....	29
Chapter 4 Discussion.....	34
4.1 Dose-dependent promotion of SNP to phosphate accumulation	34
4.2 Limitation of nitric oxide scavenger	35
4.3 Different inhibition of L-NNA and Tungstate on phosphate accumulation....	36
4.4 Nitric oxide regulates gene expression of phosphate transporters.....	36
4.5 Nitric oxide regulates expression of phosphorus metabolism-regulated genes	38
Chapter 5 Conclusions and prospects	41
5.1 Conclusions	41
5.2 Propects	42
References.....	43
Acknowledgements	56

摘要

磷是生物体所必需的大量元素之一，其参与构成的化合物、生物大分子广泛参与到各种生命活动当中，有重要的生理功能。但是土壤中可供植物直接利用的磷含量十分的有限，致使磷成为植物生长和粮食产量的主要限制因素。因此，研究植物磷积累的分子机制，寻找促进植物磷营养的方法有重要的意义。

一氧化氮（NO）作为一种气体信号分子，参与调节植物多种代谢活动。虽然一氧化氮参与植物非生物胁迫的调节作用已经得到证实，但是其对磷吸收的调节机制尚不明确。本试验以水稻为材料，通过施加 NO 供体硝普钠（sodium nitroprusside, SNP）、一氧化氮合成酶（nitric oxide synthetase）抑制剂（N^W-nitro-L-arginine, L-NNA）、硝酸盐还原酶（nitrate reductase, NR）抑制剂（Tungstate）和一氧化氮清除剂（2-(4-carboxy-phenyl)-4,4,5,5-tetra methylimidazadine-1-oxyl-3-oxide cysteine synthase, cPTIO），借助激光共聚焦、实时荧光定量 PCR（quantitative real-time PCR, qRT-PCR）等实验手段，验证了 NO 对水稻磷元素吸收和转运的调控作用，取得了以下主要成果：

（1）SNP 可以促进水稻对磷元素的积累，该促进作用具有浓度依赖性。SNP 处理浓度低于 30 μM 时，对水稻根中磷含量的积累都有较强的促进作用；而 30 μM SNP 时，对地上部分磷含量积累的促进能力较 10 μM SNP 处理时有所降低；SNP 浓度继续升高至 50 μM 时，对根中磷浓度的积累的促进作用也开始下降，而此时地上部分磷含量已和 CK 无差别。

（2）NO 可以调控水稻磷酸盐转运子的表达来调控磷的吸收和转运。随着 SNP 浓度的升高，参与磷吸收的转运子基因 *OsPT10*, *OsPT6* 和 *OsPT8* 的表达量，分别在 5、10 和 30 μM 处理下达到最高；*OsPT4* 的表达量出现了先抑制后增强的现象；编码行使磷酸盐转运功能的 *OsPT2* 基因，其表达量在 SNP 存在的情况下会显著的提高。

（3）NO 参与水稻磷酸盐吸收及转运机制的调控过程。高浓度的 NO 可以显著促进 *OsMYB2P-1* 和 *OsPHR2* 的表达，并由此激活磷饥饿调节机制，上调多个磷酸盐转运子和酸性磷酸酶基因 *OsPAP10* 的表达，增强水稻的磷吸收及转运

能力。SNP 的存在对 *OsPHO2*, *OsPHR1* 的表达则有显著的抑制作用, 但对 *OsPHR1* 抑制程度与 SNP 的浓度有明显的相关性, SNP 可以促进 *OsmiR399k* 的表达, 但是会抑制其他剪切位点成体 miRNA 的表达。

综上所述, NO 可以激活水稻磷酸盐吸收及转运机制, 通过提高磷酸盐转运子的表达, 来提高水稻植株中的磷元素积累。此研究结果, 可以为研究植物磷酸盐高效利用机制提供理论支持。

关键词: 一氧化氮; 水稻; 磷元素; 磷酸盐转运子; 吸收; 转运; 机制

Abstract

As one of the most important macro nutrient for biology, phosphorus composes many materials showed a widely biological function in metabolism. In the soil, only phosphate can be used by plants directly and exists in a shortage, leaving phosphate one of the limits for plant growth and yield. Therefore, it is very important to study the molecular mechanism of phosphate uptake and having scientific significance to find a measure to promote the uptake and translocation.

Nitric oxide (NO) is a gaseous signal molecule and involves many cellular processes. Although its functions in abiotic stress have been proved, it is still unclear when it comes to mineral nutrients. In this study, NO donor (sodium nitroprusside, SNP), nitric oxide synthetase inhibitor (N^w -nitro-L-arginine, L-NNA), nitrate reductase inhibitor (Tungstate) and nitric oxide scavenger (2-(4-carboxy-phenyl)-4,4,5,5-tetra methylimidazadine-1-oxyl-3-oxide, cPTIO) are used. Depending on laser scanning confocal microscope and quantitative real-time PCR (qRT-PCR), the promotion of NO on phosphate uptake and translocation has been proved. The results are as follows:

1. SNP has a concentration dependent promotion on phosphate accumulation in rice seedlings. Phosphate content both in the root and shoot showed a significant increasing when treated by SNP under the concentration less than 30 μM . When treated by 30 μM , the promotion stayed at same level in the root while dropped in the shoot compared with 10 μM treatment. Increasing the SNP concentration to 50 μM , promotion declined in the root while gone in the shoot.

2. Nitric oxide enhances phosphate uptake and translocation by phosphate transporters, which showed a various responses. As SNP concentration increased, relative expression level of *OsPT10*, *OsPT6* and *OsPT8* reached the highest at the concentration of 5, 10 and 30 μM respectively. The expression level of *OsPT4* was down-regulated before 10 μM treatment and up-regulated after that. *OsPT2*, a

phosphate transporter gene related to translocation, was up-regulated by SNP at all treatments.

3. Nitric oxide plays a role in the phosphate uptake and translocation mechanism. Nitric oxide up regulated the expression of *OsMYB2P-1* and *OsPHR2*, then activated the expression of phosphorus starvation induced genes, finally up regulated the expression of several phosphate transporters as well as an acid phosphatase gene (*OsPAP10*), enhanced the uptake and translocation. SNP repressed the expression of *OsPHO2* and *OsPHR1*. A negative correlation showed between SNP concentration and *OsPHR1*. SNP also up-regulated the expression level of *OsmiR399k*, while repressed the rest of mature *OsmiR399*.

All above, nitric oxide can activate phosphate uptake and translocation in rice seedlings, and promote the accumulation of phosphate by up-regulating phosphate transporters. This result can provide a theoretical support for research on mechanism of phosphate utilize efficiency.

Keywords: nitric oxide, rice, phosphate, phosphate transporter, uptake, transport, mechanism

缩略词

ANF	auranofin	金诺芬
ATP	Adenosine triphosphate	腺嘌呤核苷三磷酸
cPTIO	2-(4-carboxy-phenyl)-4,4,5,5-tetramethylimidazadine-1-oxyl-3-oxide cysteine synthase	2-(4-羧基)四甲基咪唑烷-1-氧-3-氧化物半胱氨酸合酶
DAF-FM DA	3-Amino,4-aminomethyl-2',7'-difluorescein, diacetate	3-氨基 4-氨基甲基-2',7'-二荧光素, 二乙酸
DDH ₂ O	double distilled water	双蒸水
DEPC	diethyl pyrocarbonate	焦磷酸二乙酯
DNCB	1-chloro-2,4-dinitrobenzene	1-氯-2,4-二硝基苯
dNTP	deoxy-ribonucleoside triphosphate	脱氧核糖核苷三磷酸
H ₂ O ₂	hydrogen peroxide	过氧化氢
<i>HY1</i>	<i>haem oxygenase 1</i>	血红素加氧酶基因
L-NNA	N ^w -nitro-L-arginine	N ^w -硝基-L-精氨酸
LSCM	laser scanning confocal microscopy	激光扫描共聚焦显微镜
M-MLV	Moloney murine leukemia virus	莫洛尼氏小鼠白血病病毒
NADPH	nicotinamide adenine dinucleotide phosphate	烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸
NiNOR	nitrite: NO reductase	亚硝酸盐还原酶
NOS	nitric oxide synthetase	一氧化氮合成酶
NR	nitrate reductase	硝酸盐还原酶
NTR	thioredoxin reductase	硫氧还蛋白还原酶
PAL	phenylalanine ammonia lyase	苯丙氨酸裂解酶
PCD	programmed cell death	细胞程序性死亡
<i>PR-1</i>	<i>pathogenesis related 1</i>	病原相关基因
qRT-PCR	real-time quantitative PCR	实时荧光定量 PCR

RSNOs	<i>S</i> -nitrosothiols	亚硝基硫醇
SNP	sodium nitroprusside	硝普钠
SOD	superoxide dismutases	超氧化物歧化酶
TAE	TAE Buffer	核酸电泳缓冲液
TMV	tobacco mosaic virus	烟草花叶病毒
XDH	xanthine dehydrogenase	黄嘌呤氧化还原酶

厦门大学博硕士论文摘要库

第一章前言

1.1 植物磷营养研究进展

1.1.1 磷在植物中的作用

磷元素是组成生命体所必须的大量元素之一，构成了多种生命活性物质，并行使着各种生物学功能。磷参与构成的三磷酸腺苷（ATP），作为生物体能量转运的基本单元，为各种生命活动提供可直接利用的能量；细胞膜为细胞代谢提供了一个相对稳定的环境，是各种生命活动的基本保障，而细胞膜的形成同样需要磷的参与；另外磷还参与到了核酸骨架的形成，参与到生物遗传信息的贮存^[1]，无论是 ATP、细胞膜还是和核酸，这些都是生命或生命活动得以存在和发生的前提。对于植物而言缺磷会显著的影响到其正常的生长、结实率^[2]；光照充足的情况下，磷缺乏会降低 70%的净光合速率^[3]；而且磷缺乏会影响到植物根际微生物群落结构，并进一步对植物的免疫力造成影响^[4]。此外磷元素还参与构成了多种酶、信号分子，使磷元素的生物学功能也拓展到了物质代谢、转录调控和信息传递等多个领域，比如：影响几丁质代谢的海藻糖六磷酸合酶^[5]；参与光合相关蛋白磷酸化的蛋白激酶^[6]；参与细胞信号转导的磷脂酶^[7, 8]等。

1.1.2 植物缺磷的原因

土壤中的总磷含量是巨大的，但是大部分的磷不能被植物直接利用。土壤中的有机磷含量可以占到 20%-80%，这部分磷所占的比例在各种类型的土壤中都是较高的^[9]。无机态存在的磷非常稳定难溶，土壤溶液中只有少量磷，其浓度只有 1-5 μM ^[10]。处于溶解态的磷又容易受到 pH、金属离子浓度及土壤颗粒表面积的影响。在酸性土壤中，磷容易被铁、铝螯合；在中性和碱性土壤中，又会被钙、镁螯合，甚至被一些碳酸盐吸附^[11]。正是由于这些原因，致使磷是最容易缺乏的大量元素^[12]。全球范围内大约 57 亿公顷的土地处于缺磷状态^[13]，50%的稻田需要额外的施加磷肥才能满足粮食需求^[14]，在中国缺磷的耕地面积高达 67%^[15]。

1.1.3 缺磷对植物的危害

磷作为生命体所必须的大量元素，广泛参与到新陈代谢、生长发育等各种生命活动中。Wissuwa 通过测定不同磷供给状态下水稻的光合作用，发现当光照充足时，磷缺乏可以降低 70% 的净光合速率^[3]，另外 Yao 等通过蛋白质组学技术，对比了低磷耐受和低磷敏感的两种植物在遭受低磷胁迫下的蛋白质表达情况，结果显示低磷胁迫会抑制与根和叶片生长相关蛋白的表达^[16]。对水稻和黄豆而言，外界磷含量的不足将会显著影响其生物量^[17]。

1.1.4 植物响应低磷胁迫的机制

植物在长期的进化过程中已经形成了多种机制来应对缺磷胁迫，主要包括改变根的构型、碳代谢机制和膜结构特征、分泌小分子有机酸，还可以增强相关基因的表达，有部分植物还会利用和真菌共生的机制来应对缺磷胁迫^[18]。下面将从以下几方面做简单的介绍：

A 改变根的构型

磷作为植物所必须的矿质元素，自然情况下通过根吸收，进入植物体，参与到各种生命过程中，植物根的构型和对磷的感知能力直接影响到了植物体获取磷的多少，对其的生长状况起着至关重要的作用，这一点已经在多种植物中得到了验证^[19-21]。磷在土壤中的移动性比较差，各种动植物的掉落物往往会驻留在土壤的表层，由此导致在缺磷的情况下，植物的主根会变短，侧根及根毛的生长将会加强，提高植物对磷的探测能力^[9, 20, 22, 23]。通过研究拟南芥根毛突变体 (*rhd6* 和 *rhd2*) 与野生型对低磷的响应证明了根毛可以帮助拟南芥在低磷情况下吸收更多的磷^[24]，作为根吸收矿质营养的主要部位，在低磷情况下，根毛的长度和密度都会发生显著的变化^[25]。另外磷利用效率高的大豆相比利用效率低的大豆具有较为庞大的根系，且根系活力往往相对较高^[26]。这些都说明根结构特征可以显著影响到磷的吸收。

B 提高磷的利用效率

叶片作为植物光合作用的主要部位,其营养的供给状况直接决定了植物同化能力的强弱。在低磷情况下,植物将会增加与磷循环相关酶的活性,将植物体内磷库中的磷转移到新生部位,以保证代谢高效的进行^[27, 28]。酸性磷酸酶是植物体中广泛存在的一种重要的诱导酶和水解酶,可以降解有机含磷化合物释放无机磷^[29],提高磷在植物细胞中的分解代谢强度,有利于上部叶光合产物的合成及叶片组织构建过程对磷的需求^[30, 31]。Li 等人通过构建水稻 *OsPT8* 基因的 RNA 干扰系发现,在外界可利用磷含量比较低的时候,干扰系老叶与新叶中磷含量的比是野生型水稻的 2-3 倍^[32]。由此可见,在低磷情况下,水稻会自发的将代谢活力较低的叶片中的磷转移到活力较高的叶片中,以保证磷元素的高效利用。在缺磷状况下,不但衰老叶片中的磷含量会降低,植物细胞存储状态的无机磷也会向代谢态无机磷转化,为植物生长发育提供磷源^[33-36]。Wieneke 发现磷利用效率高的高粱品种可以降低不溶性和难溶性磷组分的含量,提高可溶性无机磷的比例,增加磷在植物中的移动性^[37]。总之,在遭受低磷胁迫的情况下,植物会通过一系列生理及代谢活动的共同调节来提高磷的利用效率。

C 分泌有机酸及酶

土壤中总磷的含量是非常大的,但是可以供植物体直接利用的 HPO_4^{2-} 和 H_2PO_4^- 的含量却是非常低的,当这部分磷被植物消耗之后,就需要从其他磷库中获取,来满足植物的正常需求^[38]。为了获取足够的磷,植物在生长过程中,会以各种形式向植物体外分泌酶或有机酸,它们将持续地分解土壤颗粒或者植物体周围的腐殖质,为植物的生长提供多种包含磷在内的营养元素^[39]。酸性磷酸酶是一种非特异性的酶类,主要功能是水解、动员单磷酸酯中的磷元素,为植物生长提供营养^[40]。通过对水稻酸性磷酸酶基因的研究发现,在低磷情况下其表达会得到强烈的诱导,人为高表达 *OsPHR2*、敲除 *OsPHO2* 或者干扰 *OsSPX1* 的表达能达到相同的效果,因此酸性磷酸酶的分泌是植物应对低磷响应的一种内在机制^[41]。生长较快的杨树相比生长较慢的杨树,其根部酸性磷酸酶的活性和苹果酸脱氢酶的活性比较高,正是由于这些酶参与到了磷元素的动员,才保证了杨树的快速生长^[42]。当土壤中的磷被其他金属离子螯合,不能被植物直接利用时,

Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.

厦门大学博硕士学位论文摘要库