

文章编号:1674-2974(2016)12-0110-08

水稻 *OsDHHCl3* 基因参与氧化胁迫响应的初步研究*

刘选明^{1†}, 王文文¹, 杨远柱², 夏妙林¹, 李夏¹, 左栋梁¹, 林建中^{1†}

(1. 湖南大学 生物学院 植物功能基因组学与发育调控湖南省重点实验室, 湖南 长沙 410082;

2. 湖南亚华种业科学研究院, 湖南 长沙 410001)

摘要: DHHC型锌指蛋白参与细胞内蛋白质的棕榈酰化修饰, 对细胞和个体的生长发育起着重要的调控作用. *OsDHHCl3* 是典型的 DHHC型锌指蛋白基因. 生物信息学分析发现, *OsDHHCl3* 的启动子区域含有胁迫及光响应元件, 而且其编码蛋白是具有4个跨膜结构域的典型膜蛋白. 对 *OsDHHCl3* 过表达株系进行 H_2O_2 的氧化胁迫处理发现, 过表达株系幼苗的根显著长于野生型, 说明 *OsDHHCl3* 能解除 H_2O_2 对根生长的抑制, 提高了抗氧化胁迫的能力. 随后 H_2O_2 含量测定发现, *OsDHHCl3* 过表达株系幼苗根部的 H_2O_2 含量显著低于野生型. 进一步的 qRT-PCR 分析发现, 与清除 H_2O_2 相关的酶基因的转录水平在过表达株系中显著升高, 说明 *OsDHHCl3* 能促进清除 H_2O_2 的相关酶基因的表达, 调节内源性 H_2O_2 的动态平衡. 总之, 本研究结果初步证明锌指蛋白基因 *OsDHHCl3* 正调控水稻的抗氧化胁迫能力.

关键词: *OsDHHCl3* 基因; H_2O_2 含量; 根长; 锌指蛋白

中图分类号: Q943

文献标识码: A

Preliminary Study on a Rice *OsDHHCl3* Gene Involving in the Response to Oxidative Stress

LIU Xuan-ming^{1†}, WANG Wen-Wen¹, YANG Yuan-zhu²,
XIA Miao-lin¹, LI Xia¹, ZUO Dong-liang¹, LIN Jian-zhong^{1†}

(1. Hunan Province Key Laboratory of Plant Function Genomics and Developmental Regulation, College of Biology, Hunan Univ, Changsha, Hunan 410082, China; 2. Academy of Seed Industry of Hunan Yahua, Changsha, Hunan 410001, China)

Abstract: DHHC-type zinc finger proteins are involved in the palmitoylated modification of intracellular proteins and play important roles in the growth and development of cells and individuals. *OsDHHCl3* is a typical DHHC-type zinc finger gene. Bioinformatics analysis showed that the *OsDHHCl3* promoter region contains some stress and light response elements, and its encoded protein is a typical membrane protein with four transmembrane domains. When the *OsDHHCl3* overexpressing lines were suffered from oxidative stress with H_2O_2 , the roots of overexpressing seedlings were significantly longer than those of wild-type, indicating that *OsDHHCl3* can remove the inhibition of root growth by H_2O_2 and improve the ability

* 收稿日期: 2016-03-21

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(31170172, 31571635), National Natural Science Foundation of China(31170172, 31571635); 湖南省自然科学基金资助项目(12JJ3024); 湖南省生物发育工程与新产品研发协同创新中心项目(20134486); 湖南省科技计划项目(2012FJ4262, 2014WK2005)

作者简介: 刘选明(1963-), 男, 湖南邵阳人, 湖南大学教授, 博士生导师

† 通讯联系人, E-mail: sw_xml@hnu.edu.cn; jianzhlin@163.com

of resistance to oxidative stress. Subsequently, analysis of H_2O_2 contents found that the H_2O_2 contents in the roots of overexpressing seedlings were markedly lower than that in wild type. qRT-PCR analysis further revealed that the transcriptional levels of enzyme genes related to H_2O_2 elimination increased significantly, suggesting that *OsDHHCl3* can promote the expression of enzyme genes related to H_2O_2 elimination and regulate the homeostasis of endogenous H_2O_2 in plants. In a whole, present study preliminarily proved that the zinc finger protein gene *OsDHHCl3* positively regulates the ability of resistance to oxidative stress.

Key words: *OsDHHCl3* gene; H_2O_2 content; root length; zinc finger protein

DHHC 型锌指蛋白是一类富含 DHHC (Asp-His-His-Cys) 型锌指结构域的蛋白质. DHHC 型锌指结构域是一种富含半胱氨酸高度保守的锌指结构域,是一种常见的 DNA 结合结构单元. DHHC 型锌指蛋白一般具有的通用结构,至少存在 4 段跨膜结构域、DHHC-CRD 结构域以及 DPG 功能元件^[1]. DHHC 型锌指蛋白的主要功能是棕榈酰化其下游蛋白,从而影响其下游蛋白的定位、转运,最终影响其生理功能^[2]. DHHC 型锌指蛋白的棕榈酰化是生物体一种常见的修饰方式,它包括 3 种方式^[3-4],最主要是 PAT 介导的硫酰基转移,其次是硫酰基辅酶 A 介导的转移和以硫酰基辅酶 A 为辅酶的蛋白质介导转移.

以往对 DHHC 型锌指蛋白的研究主要集中在动物和酵母的研究. Pedram 等^[5]发现动物体内 DHHC-7 与 DHHC-21 蛋白能够作为新靶点选择性地抑制膜性类固醇受体定位并影响其功能. Fukata 等^[6]在人和鼠基因库筛选时,筛选出 23 个能够编码不同 DHHC 型蛋白的 DHHC 基因. 在植物中 DHHC 基因的功能研究相对甚少,目前只有 *OsDHHCl1*, *AtTIP1* (TIP GROWTH DEFECTIVE1) 和 *At5g04270* 这 3 个基因的功能是研究的比较清楚的. 研究发现 *OsDHHCl1* 基因主要与水稻株型构建及产量相关^[7], *AtTIP1* 主要影响拟南芥的根毛的生长^[2].

活性氧 ROS (Reactive oxygen species) 是植物体内普遍存在的一种代谢产物,主要包括超氧根离子、过氧化氢和羟自由基等^[8-10]. 在正常情况下细胞内 ROS 的产生与清除处于动态平衡中,ROS 浓度相对较低. 但是当植物受到非生物胁迫时,植物体内这种动态平衡就会受到破坏,导致细胞内积累过多的 ROS^[11-12],从而影响植物的各种生理功能. 其中 H_2O_2 是研究最多的 ROS,研究发现过量的 H_2O_2 会对植物造成损伤,而适量的 H_2O_2 可作为细胞内一种信号分子,参与并调控植物的生长发育和对各种生物和非生物刺激的应答反应^[13]. 近年的研究揭

示, H_2O_2 通过在信号传导途径的上游抑制或激活相关激酶的活性来启动或增强信号的作用从而影响植物的氧化胁迫反应、细胞凋亡、气孔的关闭、发育以及组织的形态建成^[10,14-16]. Ivanchenko 等^[17]发现 H_2O_2 能够影响西红柿根的发育,在 IAA 或 H_2O_2 处理下会导致 *dgt1-1* 突变体根部内源性 H_2O_2 增加,从而抑制西红柿根的发育. Zhang 等^[18]发现 H_2O_2 可作为信号分子介导 *OsRACK1* 基因调控水稻种子的萌发.

在本研究中,我们克隆了 *OsDHHCl3* 基因,构建了该基因过表达的转基因株系,并对 *OsDHHCl3* 过表达株系的 H_2O_2 胁迫响应进行了初步研究,发现锌指蛋白 *OsDHHCl3* 正调控水稻的抗氧化胁迫响应.

1 材料与方 法

1.1 实验材料

粳稻品种日本晴用于 *OsDHHCl3* 基因的克隆和组织特异性表达分析. 粳稻品种 Kitaake 用于作为转化受体,其转基因植株用于后续的分 子及表型分析.

1.2 实验方法

1.2.1 生物信息学分析

OsDHHCl3 基因全长 CDS 序列与氨基酸序列通过 TIGR (<http://tigrblast.tigr.org/tgi>, Rice Genome Annotation Project) 和 NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>, National Center for Biotechnology information) 数据库获得. 利用植物启动子顺式作用元件分析网站 plantCARE (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>) 对 *OsDHHCl3* 基因启动子进行分析. 采用丹麦科技大学生物序列分析中心 (CBS) 的蛋白跨膜结构域预测程序 TMHMM (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>) 进行跨膜结构域预测.

1.2.2 载体构建与水稻转化

利用 Premier 5.0 软件设计克隆正向引物 5'-

CCC AAGCTT ATGCTCTTCGTCATATGTGG TG-3' (下划线为 *Hind* III 酶切位点) 和反向引物 5'-CGGGATCCAAGAAGTTTTGAAC TCGAAT TGTC-3' (下划线为 *Bam*H I 酶切位点), 然后以日本晴的 cDNA 为模板, 用 prime STAR 高保真酶 (TaKaRa), 通过 PCR 反应获得目的片段. PCR 反应条件为: 98 °C, 5 min; 98 °C, 10 s; 56 °C, 15 s; 72 °C, 1 min; 共 35 个循环. 然后将 PCR 产物连接至 pGEM-T Easy Vector (Promega), 送至铂尚生物技术公司测序. 最后将测序正确的 *OsDHHCl3* 的 CDS 片段通过酶切连接到 pHB 载体^[19]. 在 pHB-*OsDHHCl3* 载体中, 目标基因 *OsDHHCl3* 由 2 × 35S 启动子驱动表达, 植物中的筛选标记基因为潮霉素抗性基因 *Hpt* (主要用于转化过程的抗性愈伤组织筛选) 和除草剂 Basta 抗性基因 *bar* (主要用于苗期筛选).

根据林建中等^[20-21]的水稻转化方法, 将重组的质粒 pHB-*OsDHHCl3* 经电击法转入农杆菌, 通过农杆菌侵染水稻粳稻品种 Kitaake 的愈伤组织以获取过表达转基因株系.

1.2.3 转基因水稻的鉴定及实时定量 PCR (qRT-PCR) 分析

采用经典的 CTAB (十六烷基三甲基溴化铵) 法^[20] 从再生的转基因水稻株系中提取 DNA. 然后以特异性引物 (F: 5'-ATCTCGTGCTTTCAGCT-TCG-3'; R: 5'-ACATCGCCTCGCTCCAGT-3') 进行 PCR 鉴定 T-DNA 区域的潮霉素抗性基因 *Hpt*. 同时, 采用 Trizol 试剂盒 (Invitrogen) 提取各转基因株系叶片的总 RNA, 然后再利用 Maxima First Strand cDNA Synthesis Kit 试剂盒 (TaKaRa) 逆转录成 cDNA, 并以此为模板进行 qRT-PCR 鉴定 *OsDHHCl3* 的转录水平. PCR 反应程序为: 95 °C, 2 min; 95 °C, 10 min; 95 °C, 30 s; 55 °C, 30 s; 72 °C, 30 s; 45 个循环, 重复 3 次, 以持家基因 *OsActin1* 为内参, 然后使用 Mx3000P 软件对相关基因的相对表达水平进行分析 (qRT-PCR 引物见表 1). 未转化的 Kitaake 野生型 (WT) 作为对照.

为了检测 *OsDHHCl3* 的表达对 H₂O₂ 的响应, 将野生型 Kitaake 幼苗水培培养至三叶期, 然后用 5 mmol/L 的 H₂O₂ 分别处理幼苗 1 h, 3 h, 6 h, 9 h, 12 h 和 24 h, 选取水稻幼苗根部用于提取总 RNA 并逆转录为 cDNA. 采用 qRT-PCR 鉴定 *OsDHHCl3* 在 H₂O₂ 处理的不同时间点的转录水平. 另外, 提取营养生长期 (20 d 的幼苗) 和生殖生长期 (抽穗期) 野生型的各组织器官的总 RNA 并逆转录为 cDNA, 然后采用 qRT-PCR 分析 *OsDHHCl3* 在水稻不同生长时期和不同组

织器官中的转录水平.

为了检测转基因株系中与 H₂O₂ 清除相关的基因 *OsCATb*, *OsSOD1*, *OsAPX1* 和 *OsAPX2* 的转录水平^[14-17], 将转基因株系和野生型幼苗水培培养至三叶期, 然后用 5 mmol/L 的 H₂O₂ 处理幼苗 12 h, 然后提取幼苗总 RNA 并逆转录为 cDNA. 采用 qRT-PCR 鉴定 4 个基因的转录水平 (qRT-PCR 引物见表 1).

表 1 定量 PCR 相关引物
Tab. 1 Quantitative PCR primers

引物名称	引物序列 (5'-3')
<i>OsDHHCl3</i> -F	AACCGTTTAAGTTCGCTGAATGTC
<i>OsDHHCl3</i> -R	ACTTGCCAGTGTTTGAGTAGCC
<i>OsSOD1</i> -F	TGTCCAAGAGGGAGATGGTC
<i>OsSOD1</i> -R	ATCTTCTGGTGCTCCATGCT
<i>OsAPX1</i> -F	CCAAGGGTTCTGACCACCTA
<i>OsAPX1</i> -R	CAAGGTCCCTCAAAACCAGA
<i>OsAPX2</i> -F	AAGTGACAAAGCCCTCATGG
<i>OsAPX2</i> -R	TCCTCAGCAAATCCCAGTTC
<i>OsCATb</i> -F	GGCAAGATCGTTTTCTCCAG
<i>OsCATb</i> -R	TGGTTTCAGGTTGAGACGTG
<i>OsActin1</i> -F	CAATCGTGAGAAGATGACCC
<i>OsActin1</i> -R	GTCCATCAGGAAGCTCGTAGC

1.2.4 水稻幼苗的处理及根长的测定

挑选 *OsDHHCl3* 转基因株系及野生型的饱满种子, 用 10% NaClO 消毒 30 min, 再用去离子水 (ddH₂O) 漂洗 4~5 次, 然后放置于室温吸胀处理 48 h, 接着转移至 28 °C 恒温培养箱催芽 48 h. 待种子露白后, 再转入添加和未添加 H₂O₂ (5 mmol/L) 的 1/2 MS 培养液的试管里. 种子用棉花作为支撑让其位于试管上部, 置于恒温培养室 (28 °C, 光照 16 h/黑暗 8 h) 培养 10 d. 然后观察幼苗表型, 并测量和统计根长.

1.2.5 水稻根部 H₂O₂ 含量的测定

将水培至三叶期的 *OsDHHCl3* 转基因株系及野生型幼苗用浓度为 5 mmol/L H₂O₂ 处理 5 d, 然后用碧云天生物技术公司的 H₂O₂ 检测试剂盒提取并测定水稻根部 H₂O₂ 含量.

2 结果

2.1 *OsDHHCl3* 基因启动子调控元件分析

通过相关网站 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 的 sequence viewer 工具找到 *OsDHHCl3* 基因起始密码子上游 1 500 bp 的片段, 然后把这段核苷酸序列输入植物专用的启动子分析网站在线分析

工具中,对 *OsDHHCl3* 基因上游启动子进行预测分析(如图 1 所示)。结果发现,*OsDHHCl3* 基因启动子存在大量的 AE-box, Box 4, G-box 和 I-box 等光响应元件,同时也存在一些与激素相关的 AuxRR-core 和 P-box 等元件。有趣的是,在启动子区域还发现了 TC-rich repeats 和 MBS 等与抗旱以及胁迫响应密切相关的元件。该分析结果表明,*OsDHHCl3* 基因可能被光信号、激素以及其他非生物胁迫诱导表达,并且其编码蛋白有可能参与植物的光信号转导、激素转导以及非生物胁迫响应。

2.2 *OsDHHCl3* 蛋白的跨膜结构域预测

将 *OsDHHCl3* 的氨基酸全长序列输入跨膜结

构域预测程序 TMHMM (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>), 结果显示 *OsDHHCl3* 蛋白可能存在 4 个跨膜结构域(图 2)。在跨膜结构域的预测结果中,其跨膜分值越高,则表明该段序列跨膜的可能性越大。在 *OsDHHCl3* 可能存在的 4 个跨膜结构域中,3 个分值较高,而另 1 个分值则稍低,但是其分值仍大于 0.8。因此,该结果表明,*OsDHHCl3* 可能是一个具有 4 个跨膜结构域的典型膜蛋白。(图中断裂双线表示该段氨基酸序列处于质膜的胞外侧;断裂单线表示该段氨基酸序列处于质膜的胞内侧;连续线表示该段氨基酸序列为跨膜结构域)

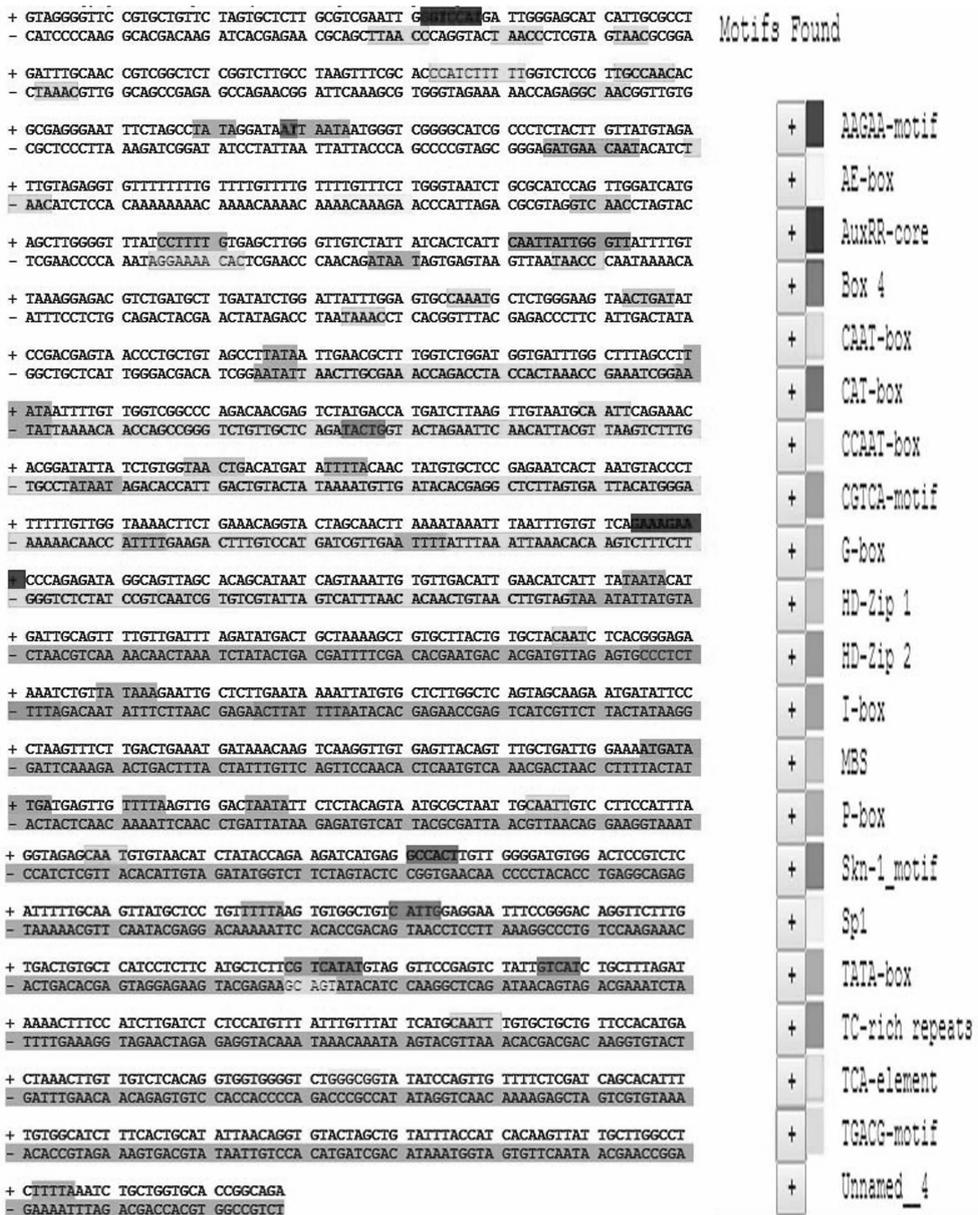
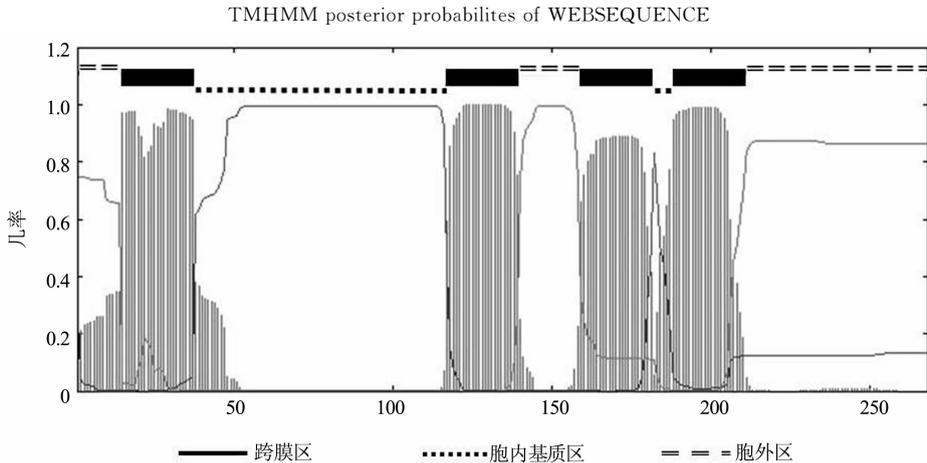


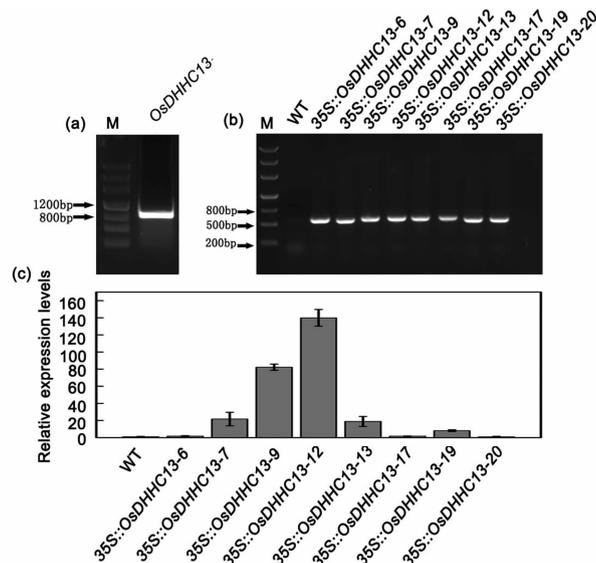
图 1 *OsDHHCl3* 启动子元件分析
Fig. 1 Analysis of *OsDHHCl3* promoter elements

图2 *OsDHHHC13* 蛋白跨膜结构域分析Fig. 2 Analysis of *OsDHHHC13* transmembrane domains

2.3 *OsDHHHC13* 基因的克隆与转基因植株的鉴定

通过 NCBI 以及 TIGR 等数据库查找到 *OsDHHHC13* 的基因组序列及其 CDS 序列,利用特异性的克隆引物,从水稻品种日本晴的 cDNA 中克隆了 *OsDHHHC13* 的 CDS 序列(如图 3(a)所示)。通过酶切连接的方式将 *OsDHHHC13* 连接至终载体 pHB。最后转入农杆菌浸染水稻愈伤组织,再经组织培养及田间栽培后,共收获 8 个独立的 *OsDHHHC13* 过表达转基因株系的种子。随后,对 T₁ 代幼苗分别进行了 DNA 与 RNA 水平的鉴定(如图 3(b)(c)所

示)。从图 3(b)可以看出,8 个转基因株系均能检测到潮霉素抗性基因 *hpt*,说明 T-DNA 已经成功整合到转基因株系的基因组中。*OsDHHHC13* 的转录水平检测发现,5 个株系中的转录水平显著高于野生型(WT; 图 3(c)),说明 *OsDHHHC13* 已成功过表达于转基因株系。随后我们选取了 3 个过表达株系: 35S::*OsDHHHC13-9*, 35S::*OsDHHHC13-12* 和 35S::*OsDHHHC13-19* 的 T₂ 代纯合子用于后续的表现型鉴定。

(a) *OsDHHHC13* 的克隆; (b) 转基因株系 DNA 水平的 PCR 鉴定; (c) 转基因株系 RNA 水平的 qRT-PCR 鉴定图3 *OsDHHHC13* 基因的克隆与过表达株系的鉴定Fig. 3 Cloning of *OsDHHHC13* and identification of overexpressing transgenic lines

2.4 *OsDHHHC13* 基因的时空表达分析

基因的时空表达模式可为预测和研究其生物学功能提供参考依据。于是,我们采用 qRT-PCR 方法分析了营养生长期和生殖生长期 *OsDHHHC13* 在水

稻不同组织器官中的相对表达量(如图 4 所示)。结果发现,在营养生长的苗期 *OsDHHHC13* 在根、茎和叶中均有表达,尤其在叶片中的表达量相对较高,而根中的相对较低(如图 4(a)所示)。在生殖生长的抽

穗期, *OsDHHCl3* 在各组织器官中均有表达, 其中叶片中的表达量最高, 根中的表达量仅次于叶片, 而

节间的表达量最低(如图 4(b)所示).

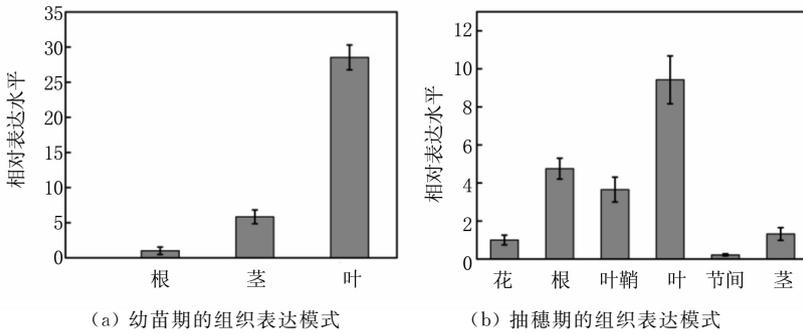


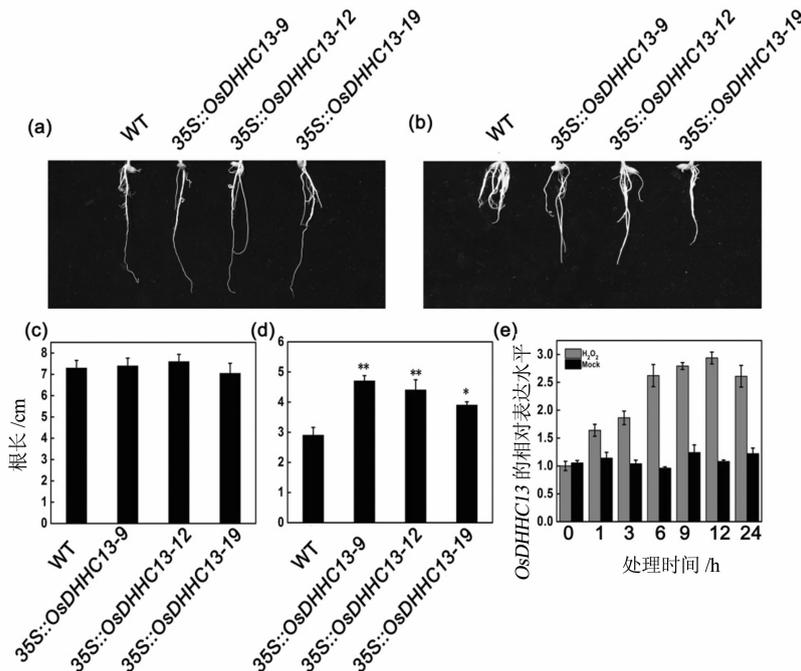
图 4 *OsDHHCl3* 的时空表达分析

Fig. 4 Analysis of *OsDHHCl3* spatiotemporal expression patterns

2.5 *OsDHHCl3* 转基因株系对 H₂O₂ 的响应

启动子分析发现, *OsDHHCl3* 基因的启动子存在 TC-rich repeats 和 MBS 等与抗旱以及胁迫响应密切相关的元件(如图 1 所示), 说明该基因可能参与了非生物胁迫响应. 为了验证该假设, 我们用 5 mmol/L 的 H₂O₂ 处理刚发芽的 *OsDHHCl3* 转基因株系种子 10 d, 然后观察表型并统计根长. 结果发现, 在正常水培条件(未含 H₂O₂)下转基因株系的根长与野生型没有差别(如图 5(a)(c)所示), 而在 H₂O₂ 处理条件下转基因株系的根显著长于野生型

(如图 5(b)(d)所示). 该结果说明, *OsDHHCl3* 转基因植株提高了对 H₂O₂ 胁迫的抗性, 锌指蛋白 *OsDHHCl3* 可能正调控植物的抗氧化胁迫. 随后, 我们检测了 H₂O₂ 对野生型幼苗根部 *OsDHHCl3* 转录水平的影响, 发现 *OsDHHCl3* 的转录水平随着 H₂O₂ 处理时间的延长而升高, 在 12 h 时达到最大值, 随后稍有下降(如图 5(e)所示). 该结果说明 H₂O₂ 能够诱导 *OsDHHCl3* 基因的表达, 意味着 *OsDHHCl3* 基因可能参与胁迫条件下水稻根部生长和发育的调控.



(a) 正常生长 10 d 的幼苗根长; (b) H₂O₂ 处理 10 d 后的幼苗根长; (c) 正常生长 10 d 的幼苗根长统计; (d) H₂O₂ 处理 10 d 后的幼苗根长统计; (e) 不同 H₂O₂ 处理时间对 *OsDHHCl3* 转录水平的影响. 所有 H₂O₂ 的浓度均为 5 mmol/L.

图 5 转基因株系和野生型植株的根以及 *OsDHHCl3* 对 H₂O₂ 的响应

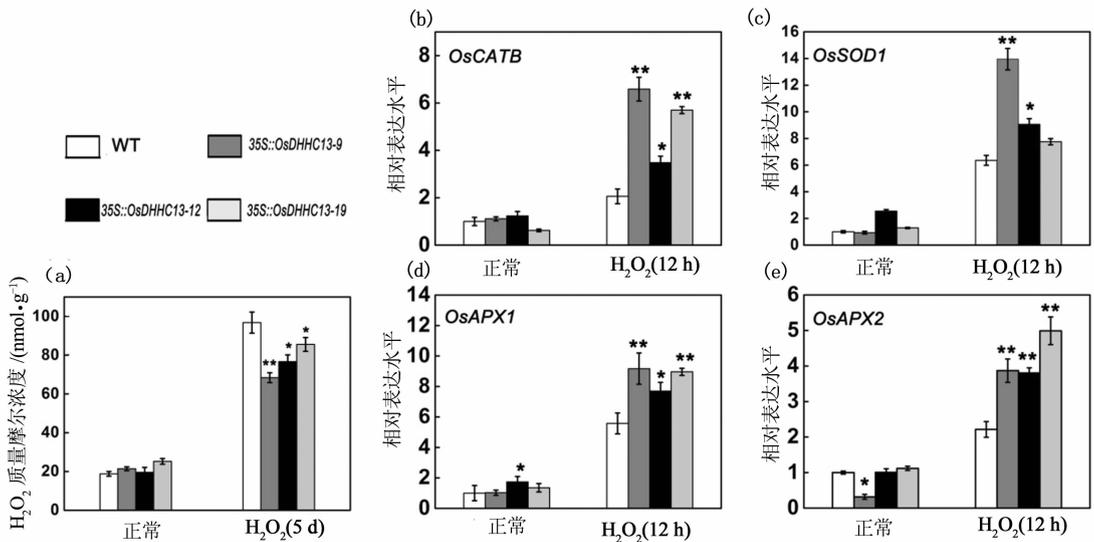
Fig. 5 The response of transgenic and wild type plants roots and *OsDHHCl3* to H₂O₂

2.6 根部内源性 H_2O_2 含量变化及相关基因测定

为了进一步探究在外源性 H_2O_2 处理下 *OsDHHC13* 基因如何影响水稻幼苗根部生长与发育, 我们进一步对幼苗根部内源性 H_2O_2 含量进行了测定. 如图 6(a) 所示, 当 *OsDHHC13* 转基因株系幼苗经 5 mmol/L H_2O_2 处理 5 d 后, 其水稻根部 H_2O_2 含量比野生型显著降低, 而在未经 H_2O_2 处理的幼苗根中转基因株系与野生型间没有明显的差别. 该结果说明, *OsDHHC13* 可能正调控氧化胁迫条件下体内 H_2O_2 的降解, 从而解除氧化胁迫对植株的伤害.

为了进一步验证以上推测, 我们检测了 5 mmol/

L H_2O_2 处理 12 h 的转基因株系幼苗中与 H_2O_2 清除相关的酶基因 *OsCATB*, *OsSOD1*, *OsAPX1* 和 *OsAPX2* 等的转录水平 (如图 6 所示). 结果发现, 在正常条件下 *OsCATB*, *OsSOD1*, *OsAPX1* 和 *OsAPX2* 等 4 个酶基因的转录水平在转基因株系和野生型 (WT) 间没有明显差异, 但是在 H_2O_2 处理条件下转基因株系中 4 个酶基因的转录水平显著高于野生型 (如图 6(b)~(e) 所示). 该结果表明, 在氧化胁迫条件下 *OsDHHC13* 确实能促进清除 H_2O_2 的相关酶基因表达, 从而调节内源性 H_2O_2 含量的动态平衡, 最终解除 H_2O_2 对根的生长与发育的抑制.



(a) 幼苗根部 H_2O_2 的含量; (b) *OsCATB* 表达量检测; (c) *OsSOD1* 表达量检测; (d) *OsAPX1* 表达量检测; (e) *OsAPX2* 表达量检测

图 6 H_2O_2 处理或未处理条件下的根部 H_2O_2 含量及与 H_2O_2 清除相关酶基因的表达分析

Fig. 6 H_2O_2 contents at roots and expression analysis of enzyme genes related to H_2O_2 elimination under the treatment with or without H_2O_2

3 讨论

DHHC 蛋白是一类典型的膜蛋白, 一般具有多段跨膜结构域, 包含了 DHHC-CRD 结构域. 它的主要功能是棕榈酰化其下游蛋白, 从而影响其转运与定位, 最终调控植物的各种生理功能^[2]. 通过生物信息学的预测发现, *OsDHHC13* 蛋白具有 4 段跨膜结构域 (如图 1 所示), 并且发现其启动子含有多个与光调控、激素和胁迫响应相关的元件 (如图 2 所示), 为研究该基因与激素、光调控相关功能提供了重要线索.

通过对基因在植物不同组织器官中的表达分析, 可以对该基因的功能进行预测^[22]. 我们对 *OsDHHC13* 在水稻不同时期和不同组织器官的表达特异性进行了分析, 发现 *OsDHHC13* 主要在水稻叶片、

根以及茎表达 (如图 4 所示), 暗示该基因可能参与水稻根、茎和叶的生长与发育调控. 随后, 通过 H_2O_2 处理发现转基因株系的根要显著长于野生型, 相反正常条件下的根长则没有明显变化, 说明该基因参与逆境下根的生长与发育调控. 同时, 我们发现转基因株系与野生型间在叶片形态及株高等方面没有明显变化 (结果未列出), 因此 *OsDHHC13* 在叶和茎中的功能还有待进一步研究.

ROS 的稳态在植物中发挥重要功能^[13]. H_2O_2 是最主要的一种 ROS, 在植物中参与信号转导、植物的生长发育以及非生物胁迫响应的作用^[22-23]. H_2O_2 在植物抗病反应中的作用已经得到了广泛的研究, 而在非生物胁迫条件下, 同样扮演了关键的调控作用, 参与多种生理生化过程, 包括光合作用、光呼吸、气孔运动与细胞程序性死亡等. 前人已有活性氧代谢以及 H_2O_2 信号转导方面的综述报

道^[24], Ivanchenko 等^[17]发现 H_2O_2 积累能够抑制西红柿根部的生长与发育,但具体机制尚不清楚. 本研究通过 H_2O_2 处理野生型与转基因幼苗,发现转基因株系根显著长于野生型(如图 5 所示). 通过测定根部 H_2O_2 含量以及 H_2O_2 清除相关的酶基因表达分析,过表达株系 H_2O_2 含量以及相关基因表达量显著高于野生型(如图 6 所示). 这些结果说明,在氧化胁迫等逆境下 *OsDHHC13* 确实能促进清除 H_2O_2 的相关酶基因表达,从而解除 H_2O_2 对根的生长与发育的抑制. 至于作为锌指蛋白的 *OsDHHC13* 如何棕榈酰化其下游蛋白,最终如何调控水稻根部 H_2O_2 的动态平衡的分子机制尚且未知,还有待进一步研究.

综上所述,本研究初步发现,水稻锌指蛋白基因 *OsDHHC13* 能促进清除 H_2O_2 的相关酶基因表达,调节内源性 H_2O_2 的动态平衡,从而正调控水稻的抗氧化胁迫能力.

参考文献

- [1] MITCHELL D A, VASUDEVAN A, LINDER M E, *et al.* Thematic review series: lipid posttranslational modifications. Protein palmitoylation by a family of DHHC protein S-acyltransferases [J]. *Journal of Lipid Research*, 2006, 47(6): 1118–1127.
- [2] HEMSLEY P A, KEMP A C, GRIERSON C S. The TIP GROWTH DEFECTIVE1 S-acyl transferase regulates plant cell growth in Arabidopsis [J]. *Plant Cell*, 2005, 17(9): 2554–2563.
- [3] RESH M D. Use of analogs and inhibitors to study the functional significance of protein palmitoylation [J]. *Methods*, 2006, 40(2): 191–197.
- [4] GREAVES J, CHAMBERLAIN L H. S-acylation by the DHHC protein family [J]. *Biochemical Society Transactions*, 2010, 38(2): 522–524.
- [5] PEDRAM A, RAZANDI M, DESCHENES R J, *et al.* DHHC-7 and-21 are palmitoylacyltransferases for sex steroid receptors [J]. *Molecular Biology of the Cell*, 2012, 23(1): 188–199.
- [6] FUKATA Y, IWANAGA T, FUKATA M. Systematic screening for palmitoyl transferase activity of the DHHC protein family in mammalian cells [J]. *Methods*, 2006, 40(2): 177–182.
- [7] ZHOU B, LIN J Z, PENG D, *et al.* Plant architecture and grain yield are regulated by the novel DHHC-type zinc finger protein genes in rice (*Oryza sativa* L.) [J]. *Plant Science*, 2016.
- [8] INZÉ D, VAN MONTAGU M. Oxidative stress in plants [J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 1995, 6(2): 153–158.
- [9] DAT J, VANDENABEELE S, VRANOVA E, *et al.* Dual action of the active oxygen species during plant stress responses [J]. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*, 2000, 57(5): 779–795.
- [10] HALLIWELL B. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life [J]. *Plant Physiol*, 2006, 141(8): 312–322.
- [11] SONG X H, WANG K, GUO L L, *et al.* Effects of catalase and ascorbate peroxidase on the root growth of rice under cadmium stress [J]. *Agricultural Science & Technology*, 2011, 12(9): 1256–1259.
- [12] JIANG S J, YU H, ZHANG G Q, *et al.* Research on oxidative stress induced by tenuazonic acid from *Alternaria augustinovoides* and changes in antioxidant enzyme activities in leaves of *Echinochloa crus-galli* [J]. *Agricultural Science & Technology*, 2011, 12(6): 792–794.
- [13] DRÖGE W. Free radicals in the physiological control of cell function [J]. *Physiological Reviews*, 2002, 82(1): 47–95.
- [14] GAPPER C, DOLAN L. Control of plant development by reactive oxygen species [J]. *Plant Physiology*, 2006, 141(2): 341–345.
- [15] GECHEV T S, HILLE J. Hydrogen peroxide as a signal controlling plant programmed cell death [J]. *The Journal of Cell Biology*, 2005, 168(1): 17–20.
- [16] MITTLER R, VANDERAUWERA S, GOLLERY M, *et al.* Reactive oxygen gene network of plants [J]. *Trends in Plant Science*, 2004, 9(10): 490–498.
- [17] IVANCHENKO M G, OS D D, MONSHAUSEN G B, *et al.* Auxin increases the hydrogen peroxide (H_2O_2) concentration in tomato (*Solanum lycopersicum*) root tips while inhibiting root growth [J]. *Annals of Botany*, 2013, 112(6): 1107–1116.
- [18] ZHANG D, CHEN L, LI D, *et al.* OsRACK1 is involved in abscisic acid- and H_2O_2 -mediated signaling to regulate seed germination in rice (*Oryza sativa*, L.) [J]. *Plos One*, 2014, 9(5): e97120.
- [19] REN Z H, GAO J P, LI L G, *et al.* A rice quantitative trait locus for salt tolerance encodes a sodium transporter [J]. *Nature Genetics*, 2005, 37(10): 1141–1146.
- [20] LIN J Z, ZHOU B, YANG Y Z, *et al.* Piercing and vacuum infiltration of the mature embryo: a simplified method for agrobacterium mediated transformation of *Indica* rice [J]. *Plant Cell Reports*, 2009, 28: 1065–1074.
- [21] 林建中, 杨远柱, 周波, 等. 一种简单高效的水稻体细胞诱变育种新方法 [J]. *湖南大学学报: 自然科学版*, 2013, 40(9): 79–85.
- [22] LIN J Z, YANG Y Z, ZHOU B, *et al.* A simple and effective novel somatic mutagenesis breeding method for rice [J]. *Journal of Hunan University: Natural Sciences*, 2013, 40(9): 79–85. (In Chinese)
- [23] ZHANG Y K, ZHU D F, ZHANG Y P, *et al.* Low pH-induced changes of antioxidant enzyme and ATPase activities in the roots of rice (*Oryza sativa* L.) seedlings [J]. *Plos One*, 2015, 10(2): e0116971.
- [24] MILLER G, SUZUKI N, CIFTCI-YILMAZ S, *et al.* Reactive oxygen species homeostasis and signaling during drought and salinity stresses [J]. *Plant Cell and Environment*, 2010, 33(4): 453–467.
- [25] CHENG Y, SONG C. Hydrogen peroxide homeostasis and signaling in plant cells [J]. *Science in China, Series C: Life Sciences*, 2006, 49(1): 1–11.