

# 水杨酸对水稻幼苗生长的影响及其调控机制研究

刘慧娟, 齐慧敏, 刘康, 陈亚东, 赵风云, 韩秀丽\*

山东理工大学生命科学学院, 山东 淄博  
Email: \*152811130@qq.com

收稿日期: 2020年11月23日; 录用日期: 2020年12月31日; 发布日期: 2021年1月12日

## 摘要

为了探究不同浓度的水杨酸(salicylic acid, SA)对水稻幼苗生长的影响及其调控机制, 本研究采用DR5::GUS转基因水稻(*Oryza sativa* L., 中花11)为研究材料, 观察不同浓度SA对水稻生长的影响, 同时检测其中生长素的时空分布变化, 以及检测生长素合成运输基因表达水平的变化。研究结果显示, 低浓度SA (10  $\mu$ M)促进水稻幼苗生长, 高浓度SA (1 mM)抑制水稻幼苗的生长。低浓度SA和高浓度SA的处理影响了水稻幼苗根中生长素的时空分布状态, 并且影响了生长素合成和运输基因的表达水平。因此, 不同浓度的SA可能通过调控了生长素的时空分布参与调控了水稻幼苗的生长调节过程。

## 关键词

水杨酸, 水稻幼苗, 生长素, DR5::GUS

# Effects of Salicylic Acid on the Growth of Rice Seedlings and Its Regulation Mechanism

Huijuan Liu, Huimin Qi, Kang Liu, Yadong Chen, Fengyun Zhao, Xiuli Han\*

College of Life Sciences, Shandong University of Technology, Zibo Shandong  
Email: \*152811130@qq.com

Received: Nov. 23<sup>rd</sup>, 2020; accepted: Dec. 31<sup>st</sup>, 2020; published: Jan. 12<sup>th</sup>, 2021

## Abstract

In order to investigate the different concentration of salicylic acid (SA) on rice seedling growth and its regulatory mechanism, this study used DR5::GUS transgenic rice (*Oryza sativa* L., Zhonghua 11) as

\*通讯作者。

文章引用: 刘慧娟, 齐慧敏, 刘康, 陈亚东, 赵风云, 韩秀丽. 水杨酸对水稻幼苗生长的影响及其调控机制研究[J]. 植物学研究, 2021, 10(1): 27-34. DOI: 10.12677/br.2021.101005

material to observe the effect of different concentrations of SA on rice growth, on auxin spatial and temporal distribution, and on expression level of auxin synthesis and transport genes. The results show that low concentration of SA (10  $\mu\text{M}$ ) promotes the growth of rice seedlings, and high concentration of SA (1 mM) inhibits the growth of rice seedlings. The treatment of low concentration of SA and high concentration of SA affects the spatial and temporal distribution of auxin in the roots of rice seedlings, and affects the expression level of the auxin synthesis and transport genes. Therefore, different concentrations of SA may be involved in the regulation of rice seedling growth by regulating the spatial and temporal distribution of auxin.

## Keywords

Salicylic Acid, Rice Seedling, Auxin, DR5::GUS

Copyright © 2021 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

## 1. 引言

水杨酸(salicylic acid, SA)是植物体内一种小分子酚类有机物质,作为内源激素参与调控植物内许多重要生理活动。SA参与水稻、番茄、大豆等多种植物的抗病防御的生物胁迫过程,在植物的系统获得性免疫过程中起着关键调控作用[1] [2]。外源添加SA可以增加植物的抗病能力,SA在植物内的合成、感知及信号传导也得到了广泛研究,例如NPR1/3/4、TGA2/5/6等蛋白均参与SA的信号传导过程[2]。SA参与植物的多种非生物胁迫响应过程,例如植物在热胁迫时,细胞内钙离子浓度增加,促进了SA的合成,SA进一步调控*NRPI*等基因的表达,正调控植物的热胁迫响应过程[3] [4];SA还参与植物对镉胁迫响应过程[5] [6],以及参与植物的避光反应过程[7]。此外,SA还参与种子萌发、营养生长,以及生殖生长等植物生长发育过程[8] [9]。

生长素是植物体内非常重要的一种吲哚类激素,参与植物整个生长发育过程的调控,例如种子萌发、营养生长,及生殖生长。生长素合成、运输,以及信号传导均参与生长素对植物生理活动的调控过程,这些在植物对植物的调控过程被广泛研究,例如,YUC家族蛋白参与生长素的合成过程,水稻中OsYUC3、OsYUC5、OsYUC6等基因的过表达导致根生长形态异常[10] [11];PIN家族蛋白参与生长素的极性运输过程,水稻中OsPIN2通过调节生长素的分布参与水稻根的伸长生长及侧根的发育过程[12] [13]。

在拟南芥中的研究发现,外源施加低浓度的SA (<50  $\mu\text{M}$ )和高浓度的SA (>50  $\mu\text{M}$ )调控了生长素和合成和运输过程,以两种不同的pathogenesis-related 1 (PR1)方式调控了拟南芥根的分生组织的生长发育[8]。本研究旨在采用DR5启动子驱动GUS报告基因的转基因水稻为研究材料,通过监测水稻幼苗生长的变化,及其中生长素的积累和分布变化,探究不同浓度的水杨酸对水稻幼苗生长的影响及其调控机制。

## 2. 材料与方法

### 2.1. 实验材料与处理设计

选取籽粒饱满的DR5-GUS转基因水稻种子,采用消毒液(75%的乙醇、2%次氯酸钠)消毒20 min,然后无菌水冲洗干净后,置于无菌水中避光浸种48小时。浸种后的种子置于培养箱中(光周期:14 h光/8 h暗;光照强度:200  $\mu\text{mol}\cdot(\text{m}^2\cdot\text{s})^{-1}$ ,温度:26 $^{\circ}\text{C}$ )催芽,至胚根长约0.5 cm时,转入水稻培养盒中(黑色,

96 孔, 孔径 6.3 mm), 适应 24 h 后, 分别采用 Hoagland 培养液, 以及 Hoagland 培养液加不同浓度的 SA (10  $\mu$ M, 1 mM) 进行处理。

## 2.2. 生长指标统计

株高、初生根长度、不定根长度采用直尺进行测量。初生根上侧根数目和长度在解剖镜下进行统计完成。每个处理的统计至少 60 株幼苗。

## 2.3. GUS 染色

依据文献所述方法进行 GUS 染色, 测定根系生长素的分布和积累[14]。每个处理至少测定 20 株水稻幼苗的 GUS 活性。

## 2.4. RT-PCR

采用 Trizol 试剂盒(Invitrogen)提取总 RNA, 采用反转录试剂盒(Promega)得到 cDNA, 以 OsActin 基因为内参基因, 分析目的基因表达水平的变化。采用 Gel-Pro Analyzer 软件对基因的转录水平进行半定量分析, 对照设置为 1, 相对于对照数值 $\geq 1.3$  为表达上调, 相对于对照数值 $\leq 0.7$  为表达下调[15]。

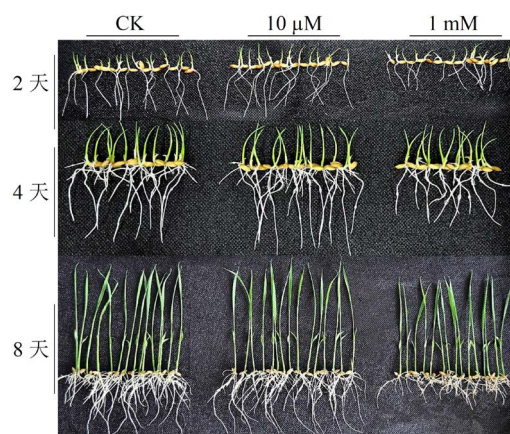
## 2.5. 数据处理

采用 SPSS 软件对实验数据进行分析, 实验结果采用至少三次独立重复的平均值和标准误差表示。采用 *t* 检测分析水稻幼苗 SA 处理组与对照组之间的差异,  $p < 0.05$  代表差异显著。

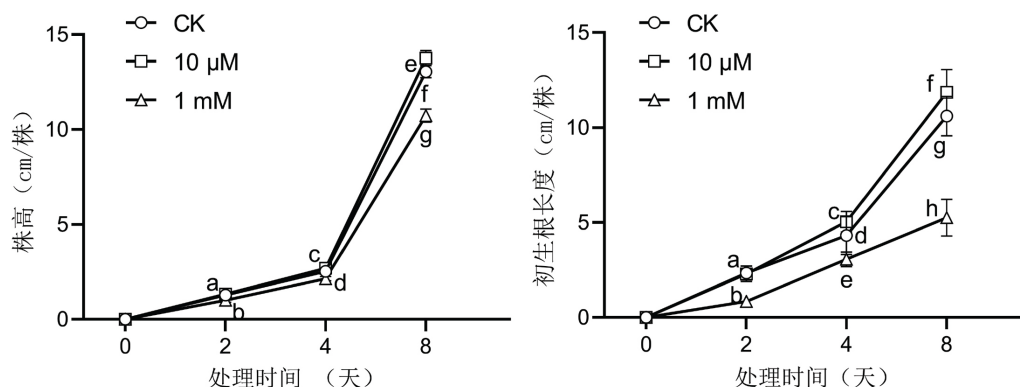
## 3. 实验结果

### 3.1. 不同浓度水杨酸处理对水稻幼苗生长的影响

水杨酸调控植物内许多重要的生理活动, 为了探究不同浓度水杨酸对水稻幼苗生长的影响, 我们通过观察不同浓度 SA 对水稻幼苗株高和初生根根长的影响发现, 相对于对照不处理, 低浓度的 SA (10  $\mu$ M) 处理 2 天对水稻幼苗生长无明显影响, 处理 4 天显著促进水稻幼苗的初生根根长, 处理 8 天同时促进了水稻幼苗的株高和初生根根长(图 1, 图 2); 而高浓度的 SA (1 mM) 处理 2 天、4 天和 8 天均明显抑制水稻幼苗的株高和初生根根长(图 1, 图 2)。以上结果表明, 低浓度 10  $\mu$ M SA 处理水稻幼苗, 促进了水稻幼苗的生长, 高浓度 1 mM SA 处理水稻幼苗, 抑制了水稻幼苗的生长。

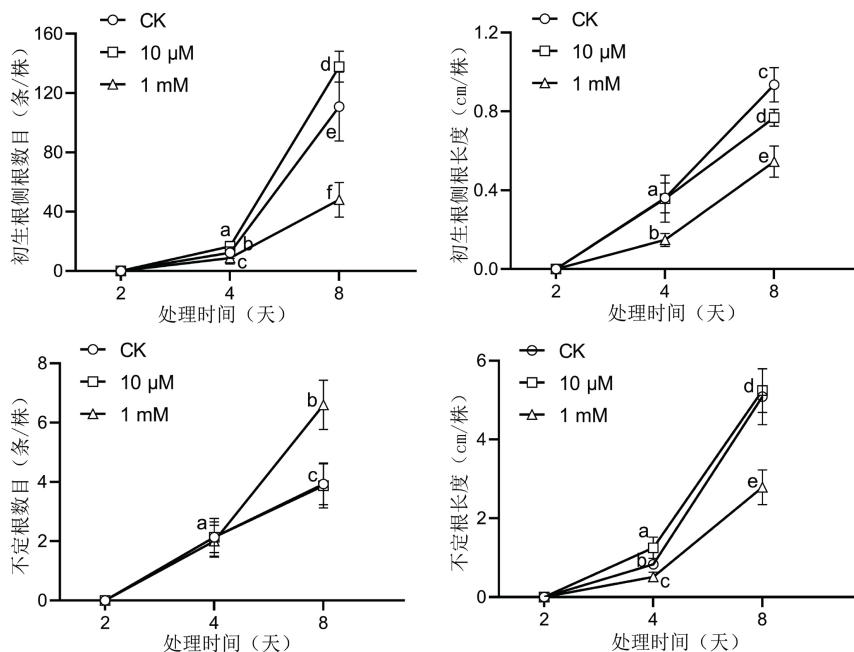


**Figure 1.** The changes in rice morphology on different days of different concentrations of SA treatment  
**图 1.** 不同浓度 SA 处理不同天数水稻形态的变化



**Figure 2.** The changes in rice plant height and primary root length on different days of different concentrations of SA treatment  
**图 2.** 不同浓度 SA 处理不同天数水稻株高和初生根长度的变化

为了进一步探究低浓度 SA 和高浓度 SA 处理对水稻幼苗生长的影响,我们进一步观察了 SA 处理对水稻幼苗初生根上侧根数目和侧根长度,以及不定根数目和不定根长度的影响。低浓度 SA 处理的实验结果显示,相对于对照不处理,低浓度的 SA 处理 4 天和 8 日均促进了初生根上侧根数目(图 3);处理 4 天对初生根上侧根的长度无明显影响,处理 8 天抑制了初生根上侧根长度(图 3);处理 4 天和 8 天对不定根数目无明显影响(图 3);处理 4 天促进了不定根的长度,处理 8 天时,与对照相比,无明显差别(图 3)。高浓度 SA 处理的实验结果显示,相对于对照不处理,高浓度的 SA 处理 4 天和 8 日均抑制了水稻幼苗初生根上侧根数目和侧根长度,以及不定根长度(图 3);处理 4 天对不定根数目无明显影响,处理 8 天促进了不定根数目(图 3)。以上结果表明,低浓度 10 μM SA 和高浓度 1 mM SA 调控了水稻幼苗初生根上侧根数目和长度,以及不定根的数目和长度,并且调控作用随处理的时间不同而不同。

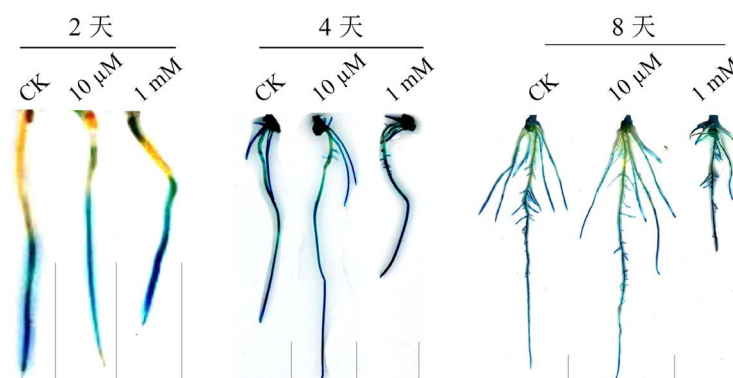


**Figure 3.** The changes in rice lateral root number and length, adventitious root number and length on different days of different concentrations of SA treatment

**图 3.** 不同浓度 SA 处理不同天数水稻初生根侧根数目、初生根侧根长度、不定根数目、不定根长度的变化

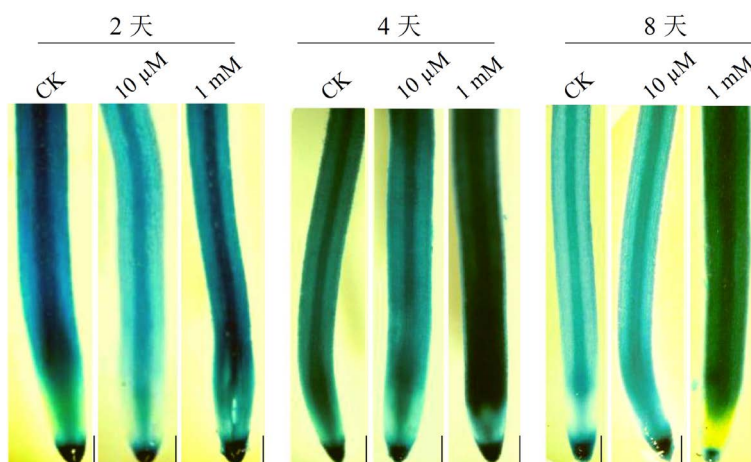
### 3.2. 不同浓度水杨酸处理对水稻幼苗中生长素积累分布的影响

生长素在植物内的含量和分布直接调节了植物的生长过程,为了探究低浓度  $10\ \mu\text{M}$  SA 和高浓度  $1\ \text{mM}$  SA 如何调控了水稻幼苗的生长,我们采用 GUS 染色观察了水稻幼苗根部生长素的积累分布变化。实验结果显示,低浓度  $10\ \mu\text{M}$  SA 处理 2 天后,初生根的生长素积累明显低于不处理对照组(图 4);处理 4 天后,初生根的生长素积累相对于对照组的降低趋势有缓解(图 4);处理 8 天后,初生根的生长素积累与对照组相比无明显差别(图 4)。高浓度  $1\ \text{mM}$  SA 处理 2 天后,初生根的生长素积累与对照组相比无明显差别(图 4);处理 4 天后,初生根的生长素与对照组相比呈现过度积累现象(图 4);处理 8 天后,初生根的生长素与对照组相比过度积累现象更加明显(图 4)。



**Figure 4.** The changes in auxin accumulation and distribution in rice on different days of different concentrations of SA treatment  
**图 4.** 不同浓度 SA 处理不同天数水稻中生长素积累分布的变化

进一步观察了不同浓度 SA 处理后,水稻初生根根尖的生长素积累分布的影响。实验结果显示,低浓度  $10\ \mu\text{M}$  SA 处理 2 天和 4 天,水稻根尖生长素积累都明显低于不处理对照组,但是处理 4 天降低趋势有缓解(图 5);处理 8 天后,初生根的生长素积累与对照组相比无明显差别(图 5)。高浓度  $1\ \text{mM}$  SA 处理 2 天后,初生根的生长素积累与对照组相比无明显差别(图 5);处理 4 天后,初生根根尖成熟区的生长素与对照组相比呈现过度积累现象(图 5);处理 8 天后,初生根根尖成熟区的生长素与对照组相比呈现过度积累现象,但是分生区和伸长区生长素积累明显降低(图 5)。



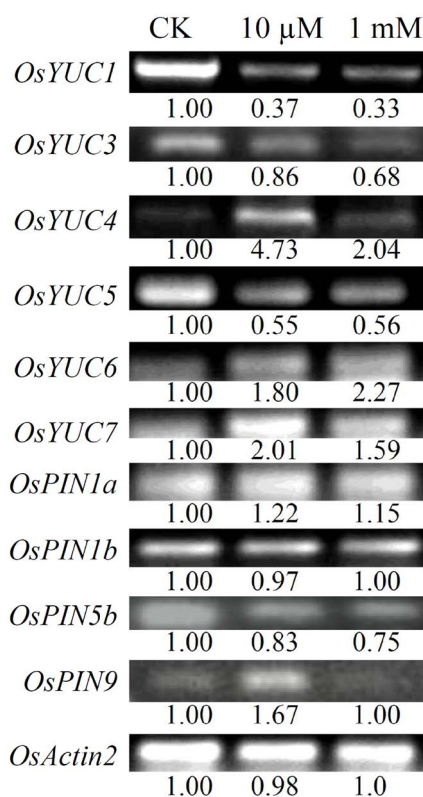
**Figure 5.** The changes in auxin accumulation and distribution in the root tip of rice primary roots on different days of different concentrations of SA treatment

**图 5.** 不同浓度 SA 处理不同天数水稻初生根根尖生长素积累分布的变化

以上结果表明, 低浓度 10  $\mu\text{M}$  SA 和高浓度 1 mM SA 对水稻幼苗的生长调控作用, 可能通过调控生长素的含量分布实现的。

### 3.3. 不同浓度水杨酸处理对水稻幼苗中生长素合成和运输基因的影响

生长素在植物内的合成和运输过程参与调控生长素在植物内的含量和分布, 为了进一步探究生长素的合成和运输是否参与 SA 对水稻幼苗的生长调控过程, 我们采用半定量的 RT-PCR 实验发现(引物见表 1), 相对于对照不处理组, 低浓度 10  $\mu\text{M}$  SA 促进了 *OsYUC4*、*OsYUC6*、*OsYUC7*、*OsPIN9* 的基因表达, 抑制了 *OsYUC1*、*OsYUC5* 的基因表达; 而高浓度 1 mM SA 促进了 *OsYUC4*、*OsYUC6*、*OsYUC7* 的基因表达, 抑制了 *OsYUC1*、*OsYUC3*、*OsYUC5* 的基因表达(图 6)。这些结果表明, 生长素合成与运输基因通过介导了生长素的含量和分布, 参与低浓度 SA 和高浓度 SA 对水稻幼苗的生长调控作用。



**Figure 6.** The changes in the expression of auxin synthesis and transport genes in rice primary roots after the treatment of different concentrations of SA for 8 days

**图 6.** 不同浓度 SA 处理 8 天时水稻初生根中生长素合成运输基因表达的变化

**Table 1.** Primers used in this study

**表 1.** 本研究所用的引物

引物名称	引物序列(5'→3')
OsYUC1-F	TCATCGGACGCCCTCAACGTCGC
OSYUC1-R	GGCAGAGCAAGATTATCAGTC
OSYUC3-F	GTGAGAACGGGCTCTACTCGGTGC
OSYUC3-R	GCTTATGCATGACCGATGAACACG
OSYUC4-F	GCAGAATGGCCTGTACGCTGTTGG

## Continued

OSYUC4-R	CAGACCAGCACATGACGTGTCTAC
OSYUC5-F	ACCTCCTACGACGCCCATGATC
OSYUC5-R	CTCCCAACACAGCGACGACAGAAC
OSYUC6-F	CCATTCCCAGATGGTTGGAAGG
OSYUC6-R	CATGTTGCGCCTCAAGATATTTG
OSYUC7-F	CACTGCTGTGTCTACAATATCAC
OSYUC7-R	GGAGGTGCATCTCCGTCATCTTC
OsPIN1a-F	TCATCTGGTTCGCTCGTCTGC
OsPIN1a-R	CGAACGTCGCCACCTTGTTTC
OsPIN1b-F	TGCACCCTAGCATTCTCAGCA
OsPIN1b-R	CCCTCCTCCCAAATTCTACTTC
OsPIN5b-F	GGGCAGCAGGAGAGGGTGATAG
OsPIN5b-R	GAATCGGCAGAGAGATCAATGT
OsPIN9-F	GATACAAGATAGCGTCGTTCTC
OsPIN9-R	ATGATGTCTGCGTGGACCT
OsActin2-F	GGAGCGTGGTTACTCATTC
OsActin2-R	ACCTCAGGGCAGCGGAAA

变性温度：94℃；退火温度：56℃；延伸温度：72℃。

#### 4. 讨论

SA 参与植物生理活动的调控具有普遍性,例如,在水稻中,外源施加 SA 调节了水稻的根系发育[16];在草莓中,外源施加 SA 可能通过调控了 SnRK1 的活性调节了草莓的生长[17];在玉米中,外源施加 SA 可以提高玉米种子萌发早期的抗旱性[18];在直根系植物拟南芥中,外源施加低浓度 SA (<50  $\mu\text{M}$ )促进了不定根的生长,而高浓度 SA (>50  $\mu\text{M}$ )抑制了拟南芥不定根的生长,进而影响了拟南芥的根形态。在本实验中,外源施加 SA 调控了水稻幼苗的生长状态,并且呈现低浓度(10  $\mu\text{M}$ )促进高浓度(1 mM)抑制的趋势。本实验中,外源施加 SA 对水稻的调控浓度与之前报道中对拟南芥的调控浓度类似,说明外源施加 SA 对不同植物的调控浓度可能相近。在本实验中,外源施加 SA 对水稻根系的发育和生长的调节与拟南芥中有很大差别,这说明,虽然 SA 在不同植物中的调控浓度接近,但是在不同的植物中,调控的机制可能有差别,因此,对植物形态影响的结果也会有不同。

生长素的合成和运输影响了生长素在植物体内的积累和分布。例如水稻中过表达 *OsPIN2* 基因,引起生长素的过度积累,从而增加了水稻的分蘖数和降低了株高等,最终影响了水稻的形态[19]。本实验中,采用 DR5::GUS 生长素报告基因显示,低浓度的 SA 处理水稻幼苗 2 天和 4 天降低了初生根的生长素积累,而高浓度的 SA 处理水稻幼苗引起初生根中生长素的过度积累,从而调控了初生根的根长、不定根的数目和根长,以及侧根数目和侧根根长,最终影响了水稻根的形态。低浓度 SA 和高浓度 SA 处理对不定根的影响及侧根的影响,也与生长素的积累和分布有关,需要进一步实验探究。本实验进一步分析了生长素合成和运输基因在低浓度 SA 和高浓度 SA 处理时转录水平的变化,部分基因随处理发生不同程度的改变,具体调节机制需要进一步探究。

总之,本实验发现外源添加不同浓度的 SA 调节了水稻的生长状态,其影响与 SA 的浓度,以及处理时间相关。DR5::GUS 生长素报告基因表明,SA 对水稻生长的调节是通过调节生长素在植物内的积累和分布实现的。

## 参考文献

- [1] An, C.F., and Mou, Z.L. (2011) Salicylic Acid and Its Function in Plant Immunity. *Journal of Integrative Plant Biology*, **53**, 412-428.
- [2] Zhang, Y.L. and Li, X. (2019) Salicylic Acid: Biosynthesis, Perception, and Contributions to Plant Immunity. *Current Opinion in Plant Biology*, **50**, 29-36. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2019.02.004>
- [3] Dinler, B.S., Demir, E. and Kompe, Y.O. (2014) Regulation of Auxin, Abscisic Acid and Salicylic Acid Levels by Ascorbate Application under Heat Stress in Sensitive and Tolerant Maize Leaves. *Acta Biologica Hungarica*, **65**, 469-480. <https://doi.org/10.1556/abiol.65.2014.4.10>
- [4] Rai, K.K., Pandey, N. and Rai, S.P. (2020) Salicylic Acid and Nitric Oxide Signaling in Plant Heat Stress. *Physiologia Plantarum*, **168**, 241-255. <https://doi.org/10.1111/ppl.12958>
- [5] Guo, B., Liu, C., Liang, Y.C., Li, N.Y. and Fu, Q.L. (2019) Salicylic Acid Signals Plant Defence against Cadmium Toxicity. *International Journal of Molecular Sciences*, **20**, 2960. <https://doi.org/10.3390/ijms20122960>
- [6] Liu, Z.P., Ding, Y.F., Wang, F.J., Ye, Y.Y. and Zhu, C. (2016) Role of Salicylic Acid in Resistance to Cadmium Stress in Plants. *Plant Cell Reports*, **35**, 719-731. <https://doi.org/10.1007/s00299-015-1925-3>
- [7] Nozue, K., Devisetty, U.K., Lekkala, S., Mueller-Moule, P., Bak, A., Casteel, C.L. and Maloof, J.N. (2018) Network Analysis Reveals a Role for Salicylic Acid Pathway Components in Shade Avoidance. *Plant Physiology*, **178**, 1720-1732. <https://doi.org/10.1104/pp.18.00920>
- [8] Pasternak, T., Groot, E.P., Kazantsev, F.V., Teale, W., Omelyanchuk, N., Kovrizhnykh, V., Palme, K. and Mironova, V.V. (2019) Salicylic Acid Affects Root Meristem Patterning via Auxin Distribution in a Concentration-Dependent Manner. *Plant Physiology*, **180**, 1725-1739. <https://doi.org/10.1104/pp.19.00130>
- [9] Rivas-San Vicente, M. and Plasencia, J. (2011) Salicylic Acid beyond Defence: Its Role in Plant Growth and Development. *Journal of Experimental Botany*, **62**, 3321-3338. <https://doi.org/10.1093/jxb/err031>
- [10] Cao, X., Yang, H.L., Shang, C.Q., Ma, S., Liu, L. and Cheng, J.L. (2019) The Roles of Auxin Biosynthesis YUCCA Gene Family in Plants. *International Journal of Molecular Sciences*, **20**, 6343. <https://doi.org/10.3390/ijms20246343>
- [11] Zhang, T., Li, R., Xing, J., Yan, L., Wang, R. and Zhao, Y. (2018) The YUCCA-auxin-wox11 Module Controls Crown Root Development in Rice. *Frontiers in Plant Science*, **9**, 523. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.00523>
- [12] Adamowski, M. and Friml, J. (2015) PIN-Dependent Auxin Transport: Action, Regulation, and Evolution. *Plant Cell*, **27**, 20-32. <https://doi.org/10.1105/tpc.114.134874>
- [13] Inahashi, H., Shelley, I.J., Yamauchi, T., Nishiuchi, S., Takahashi-Nosaka, M., Matsunami, M., Ogawa, A., Noda, Y., and Inukai, Y. (2018) OsPIN2, Which Encodes a Member of the Auxin Efflux Carrier Proteins, Is Involved in Root Elongation Growth and Lateral Root Formation Patterns via the Regulation of Auxin Distribution in Rice. *Physiologia Plantarum*, **164**, 216-225. <https://doi.org/10.1111/ppl.12707>
- [14] Petersson, S.V., Johansson, A.I., Kowalczyk, M., Makoveychuk, A., Wang, J.Y., Moritz, T., Grebe, M., Benfey, P.N., Sandberg, G. and Ljung, K. (2009). An Auxin Gradient and Maximum in the Arabidopsis Root Apex Shown by High-Resolution Cell-Specific Analysis of IAA Distribution and Synthesis. *Plant Cell*, **21**, 1659-1668. <https://doi.org/10.1105/tpc.109.066480>
- [15] Zhao, F.Y., Wang, K., Zhang, S.Y., Ren, J., Liu, T. and Wang, X. (2014) Crosstalk between ABA, Auxin, MAPK Signaling, and the Cell Cycle in Cadmium-Stressed Rice Seedlings. *Acta Physiologiae Plantarum*, **36**, 1879-1892. <https://doi.org/10.1007/s11738-014-1564-2>
- [16] 赵宜婷, 武丽霞, 詹晓平, 等. 水杨酸抑制生长素运输而调节 Acuce 水稻根的生长[J]. 西南农业学报, 2019, 32(4): 770-775.
- [17] 罗静静, 张亚飞, 赵永飞, 等. 水杨酸对草莓 SnRK1 活性及植株生长的影响[J]. 植物生理学报, 2018, 54(1): 113-120.
- [18] 黄婷婷, 牛志浩, 丁振山, 等. 水杨酸对玉米种子萌发早期耐旱性的影响[J]. 种子, 2017, 36(2): 33-37.
- [19] Chen, Y.N., Fan, X.R., Song, W.J., Zhang, Y.L. and Xu, G.H. (2012) Over-Expression of *OsPIN2* Leads to Increased Tiller Numbers, Angle and Shorter Plant Height through Suppression of *OsLAZY1*. *Plant Biotechnology Journal*, **10**, 139-149. <https://doi.org/10.1111/j.1467-7652.2011.00637.x>