

不同水平的亚硒酸盐对盐胁迫下水稻的影响

陈 颜

浙江师范大学生命科学学院, 浙江 金华

收稿日期: 2024年2月28日; 录用日期: 2024年3月27日; 发布日期: 2024年4月1日

摘 要

本文通过水培试验, 研究不同浓度亚硒酸盐对盐胁迫下水稻生长、谷胱甘肽含量、过氧化氢含量及抗氧化酶表达量的影响, 以期亚硒酸盐在农业生产中的推广应用提供科学依据。结果表明: 施加低浓度亚硒酸盐能促进水稻的生长, 高浓度亚硒酸盐抑制水稻生长。适宜浓度亚硒酸盐提高水稻体内谷胱甘肽含量以及降低过氧化氢含量。两种水稻的抗氧化酶基因水稻均随着亚硒酸盐水平的增加呈现先上升后下降趋势。施加适宜浓度的亚硒酸盐能有效提高水稻抗氧化能力, 提高抗盐性。其中对于转基因水稻的效果更好。

关键词

水稻, 盐胁迫, 亚硒酸盐, 抗氧化能力

Effects of Different Levels of Selenite on Rice under Salt Stress

Yan Chen

College of Life Sciences, Zhejiang Normal University, Jinhua Zhejiang

Received: Feb. 28th, 2024; accepted: Mar. 27th, 2024; published: Apr. 1st, 2024

Abstract

In this paper, the effects of different concentrations of selenite on the growth, glutathione content, hydrogen peroxide content and antioxidant enzyme expression of rice under salt stress were investigated by hydroponics test, with a view to providing scientific basis for the popularization and application of selenite in agricultural production. The results showed that the application of low concentration of selenite promoted the growth of rice and high concentration of selenite inhibited

the growth of rice. Appropriate concentration of selenite increased the glutathione content and decreased the hydrogen peroxide content in rice. The antioxidant enzyme genes of both rice species showed an increasing and then decreasing trend with increasing levels of selenite. The application of appropriate concentration of selenite can effectively improve the antioxidant capacity and salt resistance of rice. Among them, it was more effective for transgenic rice.

Keywords

Rice, Salt Stress, Selenite, Antioxidant Capacity

Copyright © 2024 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

土壤盐度被认为是限制粮食产量的主要因素之一，全球约 20%的可耕地面积受到盐胁迫的影响，且这一比例还在快速上升[1]。盐胁迫会对水稻生长发育产生影响，如种子萌发、光合作用、呼吸作用及能量代谢、蛋白质的合成等[2]。水稻是我国第一大粮食作物，约占粮食总产量的 40%，全国有 60%以上的人口以大米为主食，水稻产量与国家粮食安全问题密切相关。

硒是环境中一种重要的生命元素，为动植物必需的营养元素，是动植物和人体谷胱甘肽过氧化物酶 (GSH-Px) 的组成成分。在逆境胁迫下，硒可以稳定膜结构，调节生物大分子合成，提高抗氧化酶活性，清除活性氧，对提高植物逆境下的抗性起重要作用[3]。当外源施用亚硒酸盐浓度超过植物耐受性的阈值时，不仅无法起到缓解作用，还会对植物造成进一步的胁迫损伤[4] [5]。研究发现，草莓在 60 mg/L 浓度亚硒酸盐处理下，虽然各类酶的含量均有所提高，但总体低于 30 mg/L 浓度下的处理结果，这可能是由于过量的硒会导致植物中毒，进而影响植物生理机能，并在一定程度上对酶的活性产生抑制作用造成的[6]。因此，就植物而言，只有施加合适浓度的亚硒酸盐才是有益的，从而提高植物的抗盐胁迫能力。

本研究通过水培试验，采用氯化钠胁迫处理模拟盐胁迫，施加不同浓度亚硒酸盐对水稻进行培养七天，进行测定水稻的苗长、谷胱甘肽含量、过氧化氢含量和抗氧化酶基因表达水平，进而加以分析，揭示不同浓度亚硒酸盐对水稻幼苗的影响，为采用氯化钠模拟盐胁迫研究水稻的抗盐分子机制提供理论参考。

2. 材料与方法

2.1. 实验材料

供试材料为日本晴水稻和转基因水稻(过表达 SAC 蛋白)，用氯化钠模拟盐胁迫。

2.2. 试剂与仪器

试剂：氯化钠，次氯酸钠，还原型谷胱甘肽含量检测试剂盒，过氧化氢含量检测试剂盒，柱式植物总 RNA 抽提纯化试剂盒，生工生物工程股份有限公司；EasyQuick RT MasterMix，康为试剂公司；亚硒酸钠，Sigma-Aldrich 公司。

仪器：Nano Drop 2000 精密紫外分光光度计，实时荧光定量 PCR 仪，恒温培养箱，Thermo Fisher Scientific；pH 计，上海精密科学仪器公司；Milli-Q 超纯水仪，Millipore；制冰机，日本三洋；电子分析

天平, METTLER TOLEDO; 光照培养箱, 宁波江南仪器厂。

2.3. 实验方法

2.3.1. 材料处理

取出饱满的日本晴水稻和 SHC-10 水稻分别放入烧杯中, 加入 5% (v/v) 浓度次氯酸钠 50 mL, 进行处理 30 min, 随后用 ddH₂O 对种子进行冲洗三次, 并放入 37℃ 的培养箱中培养催芽。取出已经露白的种子放入 96 孔板中, 分装在不同的亚硒酸盐的培养液中, 培养液亚硒酸盐浓度设置为 0 mg/L、0.5 mg/L、1 mg/L、1.5 mg/L、2 mg/L。将培养容器放置在光照培养箱中进行培养, 温度设为白天 28℃, 时间 12 h, 夜晚 26℃, 处理时间为 12 h。处理七天后收集水稻, 进行后续测定。

2.3.2. 水稻苗长测量

处理 7 d 后, 采集两个品种的幼苗, 随机取 30 株幼苗, 用直尺测量苗长, 计算平均长度。

2.3.3. 谷胱甘肽含量测定

- (1) 组织处理: 新鲜组织首先用 PBS 冲洗 2 次, 然后称取水稻组织 0.1 g, 加入用试剂一润洗过的匀浆器中(匀浆器提前放冰上预冷); 然后加入 1 mL 试剂一(组织/试剂一比例保持不变即可), 迅速冰上充分研磨(使用液氮研磨效果更好); 8000 g 4℃ 离心 10 min; 取上清液放置于 4℃ 待测。
- (2) 酶标仪预热 30 min 以上, 调节波长至 412 nm, 蒸馏水调零。
- (3) 试剂二放置在 25℃ 水浴中保温 30 min。
- (4) 标准液稀释: 用蒸馏水稀释 10 mg/mL 的标准溶液至浓度为 300 μg/mL、200 μg/mL、100 μg/mL、50 μg/mL、25 μg/mL。
- (5) 按操作表依次加入各试剂, 详细信息如表 1。

Table 1. Glutathione content measurement table
表 1. 谷胱甘肽含量测定操作表

试剂名称(μL)	测定管	标准管	空白管
样品	20	-	-
标准品	-	20	-
蒸馏水	-	-	20
试剂二	140	140	140
试剂三	40	40	40

注: 混匀后静置 2 min 检测 412 nm 处吸光值, 记为 A 测定管、A 标准管、A 空白管, 计算 ΔA 测定= A 测定管 - A 空白管, ΔA 标准 = A 标准管 - A 空白管。

- (6) 标准曲线的建立: 以 ΔA 标准为 x 轴, 标准液浓度为 y 轴, 根据吸光度(x)和浓度(y, μg/mL)做出标准曲线。根据标准曲线, 将 ΔA 测定带入公式中(x), 计算出样品浓度 y (μg/mL)。
- (7) 计算公式: $GSH (\mu g/g \text{ 质量}) = y \times V \text{ 样} \div (V \text{ 样} \div V \text{ 样总} \times W) = y \div W$

2.3.4. 过氧化氢含量测定

- (1) 组织样品的制备: 称取约 0.1 g 水稻组织, 加入 1 mL 试剂一进行冰浴匀浆; 8000 g 4℃ 离心 10 min, 取上清, 置冰上待测。
- (2) 酶标仪预热 30 min 以上, 调节波长至 415 nm, 蒸馏水调零。

- (3) 将试剂二、三和四 25℃水浴 10 min 以上。
- (4) 用丙酮将 1 mmol/mL 标准液稀释 2 μmol/mL 的标准溶液。
- (5) 按操作表依次加入各试剂，详细信息如表 2。

Table 2. Hydrogen peroxide content measurement table
表 2. 过氧化氢含量测定操作表

试剂名称(μL)	测定管	标准管	空白管
样品	250	-	-
标准溶液	-	250	-
试剂一	-	-	250
试剂二	25	25	25
试剂三	50	50	50
试剂四	250	250	250

注：加入试剂三后，4000 g，常温离心 10 min，弃上清，留沉淀。加入试剂四溶解沉淀，室温静置 5 min，取 200 μL 转移至 96 孔板中测定 415 nm 处吸光值(空白管只要做 1~2 次即可)。计算 $\Delta A_{测定} = A_{测定管} - A_{空白管}$ ， $\Delta A_{标准} = A_{标准管} - A_{空白管}$ 。

(6) 计算公式：

$$H_2O_2 \text{ 含量}(\mu\text{mol/g 质量}) = \Delta A_{测定} \div (\Delta A_{标准} \div C_{标液}) \times V_{样本} \div (V_{样本} \div V_{提取} \times W) = 2 \times \Delta A_{测定} \div \Delta A_{标准} \div W。$$

2.3.5. 抗氧化酶相关基因表达水平的测定

(1) 水稻植株总 RNA 提取和反转录

采用柱式植物总 RNA 抽提纯化试剂盒提取水稻植株总 RNA，得到 RNA 溶液，测定 OD 值以检测所提 RNA 质量。

按照 EasyQuick RT MasterMix 的操作说明书，完成反转录，并稀释合适倍数，于-20℃保存，用于后续荧光定量 PCR。

(2) 引物设计

Table 3. Antioxidant enzyme gene primer sequences
表 3. 抗氧化酶基因引物序列

基因名称前后引物(5'-3'-)	
超氧化物歧化酶基因 SOD	F: CCACCTCCACGAGTTTGCGAT
	R: CTCAGCTACACCTTCAGCATTGGC
过氧化物酶 1 基因 POX1	F: ACTCGTGCCCCAAGGCGAAGGA
	R: GCTGTTGTCCAGGAGCACAGACG
过氧化氢酶 A 基因 CATA	F: GAGGAGGCAGAAGGCGACGATA
	R: CCCCCAACGACTCATCACA CTG
抗坏血酸过氧化物酶基因 APX	F: CTGCCGTCCCCTTCCACCCA
	R: CCGCCAGAGAGGGCAACAAT

续表

谷胱甘肽还原酶基因 GR	F: TTCCTCCAAAGCCTGCTGTTCACT R: GCCAGCCAACTAAACCTGATTACA
内参基因, 肌动蛋白基因	F: AGTGTCTGGATTGGAGGAT R: TCTTGGCTTAGCATTCTTG

从 NCBI 数据库中下载相关基因序列, GanBank 编号具体如下: 过氧化氢酶 A 基因 CATA, 过氧化物酶 1 基因 POX1, 质体铜/锌超氧化物歧化酶基因 plastidic Cu/Zn-SOD, 抗坏血酸过氧化物酶基因 APX, 谷胱甘肽还原酶基因 GR, 内参基因, 肌动蛋白基因。采用 NCBI 网站设计相关引物, 详细信息如表 3。

(3) 逆转录聚合酶链反应

选择水稻肌动蛋白基因 Actin150 为内参基因, 进行荧光定量 PCR, 体系如表 4 所示每个反应做三个复孔, 重复三次实验。使用 Applied Biosystems QuantStudio 1PCR 仪进行实验, 反应结束后进行熔解曲线分析, 导出相关数据, 并采用 Graphpad Prism 进行作图分析。

Table 4. Real-time fluorescence quantitative PCR reaction system

表 4. 实时荧光定量 PCR 反应体系

2 × SYBR Mix	5 μl
Forward Primer, 10 μM	0.4 μl
Reverse Primer, 10 μM	0.4 μl
Nuclease-Free Water	0.2 μl
cDNA	4 μl
Total	10 μl

在实时荧光定量 PCR 仪上按照如下反应程序进行反应:

50°C	2 min	} 40 个循环
95°C	10 min	
95°C	15 s	
60°C	1 min	

结束扩增后, 分析熔解曲线, 观察溶解曲线是否为单一峰, 采用 2-ΔΔCT 法分析实验结果。

2.4. 数据分析

Tip 与 SHC 分别表示日本晴水稻和转基因水稻。图表中数据用平均值±标准差表示, 用 Dunnett 法进行差异显著性检验(n.s.: not significant; *p < 0.05; **p < 0.01, ***p < 0.001; ****p < 0.0001), 用绘图软件 GraphPad 8 进行作图。

3. 结果与分析

3.1. 不同浓度亚硒酸盐处理对水稻苗长的影响

由图 1(a)可知, Nip 水稻胚芽长度随着亚硒酸盐浓度的升高呈现先上升后下降的趋势, 且在亚硒酸盐浓度为 1 mg/L 时, 长度最长。由图 1(b)可知, SHC 水稻也呈现先上升后下降的趋势, 在亚硒酸盐浓度为 1 mg/L 时, 长度最长, 1、1.5、2 mg/L 处理没有显著性差异。

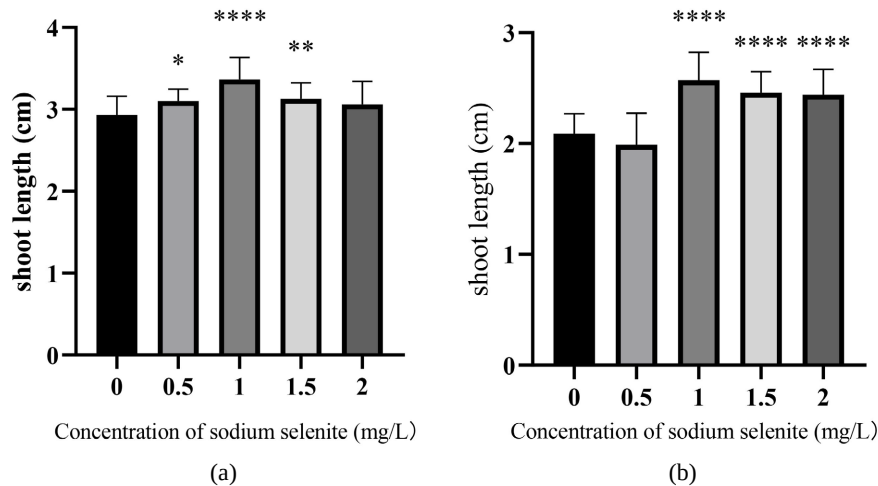


Figure 1. Effects of different concentrations of selenite on seedling length in rice. (a) Nipponbare Nip; (b) Transgenic rice SHC

图 1. 不同浓度亚硒酸盐对水稻苗长的影响。(a) 日本晴水稻 Nip; (b) 转基因水稻 SHC

3.2. 不同浓度亚硒酸盐对水稻谷胱甘肽含量的影响

由图 2(a)可知, Nip 水稻不同处理组谷胱甘肽(GSH)含量均小于对照组, 由图 2(b)可知, SHC 水稻不同处理组之间有先上升后下降的趋势, 在 1 mg/L 处理时含量最高, 且有显著性差异($p < 0.05$)。

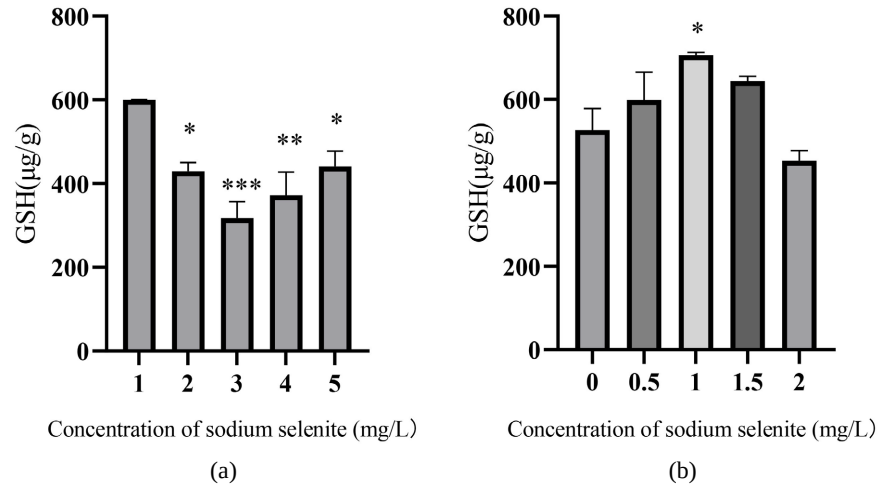


Figure 2. Effect of different concentrations of selenite on glutathione content in rice. (a) Nipponbare Nip; (b) Transgenic rice SHC

图 2. 不同浓度亚硒酸盐对水稻谷胱甘肽含量的影响。(a) 日本晴水稻 Nip; (b) 转基因水稻 SHC

3.3. 不同浓度亚硒酸盐对水稻过氧化氢含量的影响

活性氧导致氧化应激并破坏植物的各种细胞结构, 活性氧的产生也是硒毒性的原因, 我们注意到水稻中 ROS 的生成与 Se (IV)浓度有关。它们引起活性氧含量的增加, 从而导致细胞膜的氧化损伤。如图 3(a)所示, Nip 水稻受高浓度硒的胁迫比较敏感, 相比于对照组, 0.5、1、1.5、2 mg/L 处理组过氧化氢含量分别增加 5%、33.7%、42.5%、18.1%。而 SHC 水稻不同处理组过氧化氢含量增加 9.6%、0.4%、6%, 如图 3(b)所示。

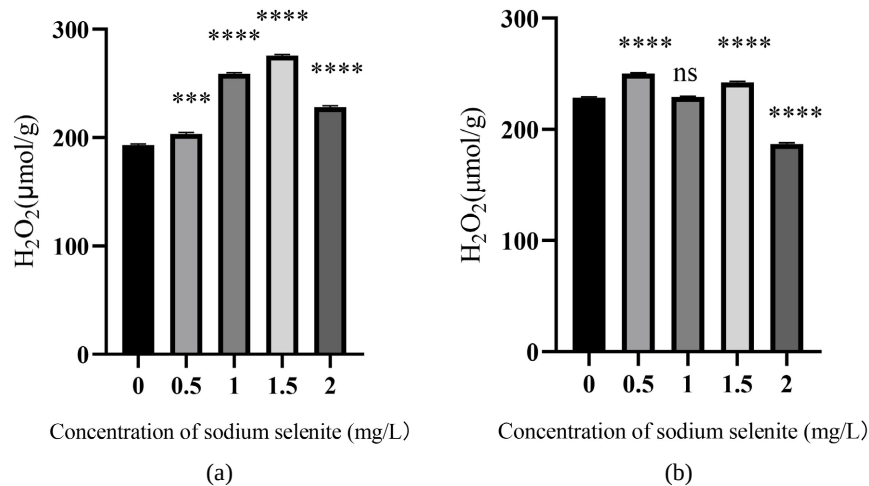


Figure 3. Effect of different concentrations of selenite on hydrogen peroxide content in rice. (a) Nipponbare Nip; (b) Transgenic rice SHC

图 3. 不同浓度亚硒酸盐对水稻过氧化氢含量的影响。(a) 日本晴水稻 Nip; (b) 转基因水稻 SHC

3.4. 不同浓度亚硒酸盐对水稻抗氧化酶基因表达水平的影响

3.4.1. 超氧化物歧化酶基因的表达水平分析

如图 4(a)所示, Nip 水稻经过不同浓度亚硒酸盐处理后, 呈现先上升后下降的趋势, 在 0.5 mg/L 处理下与对照组相比具有显著性差异($p < 0.0001$)。1, 1.5, 2 mg/L 亚硒酸盐处理的超氧化物歧化酶(SOD)基因相对表达量均比对照组提高。如图 4(b)所示, SHC 水稻经过不同浓度亚硒酸盐处理后, 也呈现先上升后下降的趋势, 在 1.5 mg/L 处理后相对表达量最高, 且与对照组相比具有显著性差异($p < 0.001$), 0.5, 1, 2 mg/L 亚硒酸盐处理的 SOD 酶基因相对表达量分别比对照组提高。

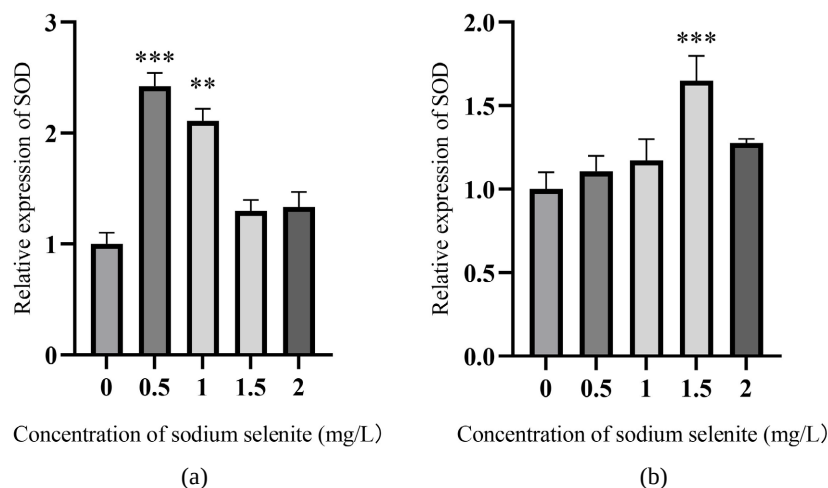


Figure 4. Expression level analysis of superoxide dismutase gene. (a) Nipponbare Nip; (b) Transgenic rice SHC

图 4. 超氧化物歧化酶基因的表达水平分析。(a) 日本晴水稻 Nip; (b) 转基因水稻 SHC

3.4.2. 过氧化物酶基因的表达水平分析

如图 5(a)所示, Nip 水稻随着亚硒酸盐浓度的增加, 过氧化物酶(POD)基因相对表达量先升后降, 在

2 mg/L 时升高, 浓度为 1 mg/L 时基因相对表达量最高, 0.5、1 mg/L 亚硒酸盐处理均极显著地提高了 POD 酶基因相对表达量($p < 0.0001$)。可见, 1 mg/L 亚硒酸盐能最有效地提高非转基因水稻 POD 酶基因相对表达量。

如图 5(b)所示, SHC 水稻随着亚硒酸盐浓度的增加, POD 酶基因相对表达量先升后降, 浓度为 1.5 mg/L 时基因相对表达量最高, 极显著地提高了 POD 酶基因相对表达量($p < 0.0001$), 其他处理组相比于对照组表达量均提高。可见, 1.5 mg/L 亚硒酸盐能最有效地提高 POD 酶基因相对表达量。

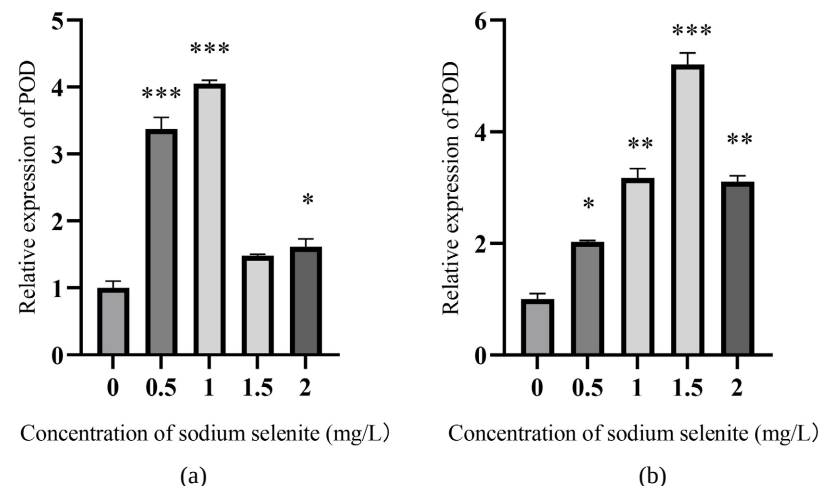


Figure 5. Expression level analysis of peroxidase. (a) Nipponbare Nip; (b) Transgenic rice SHC
图 5. 过氧化物酶基因的表达水平分析。(a) 日本晴水稻 Nip; (b) 转基因水稻 SHC

3.4.3. 过氧化氢酶基因的表达水平分析

如图 6(a)所示, Nip 水稻过氧化氢基因(CAT)的表达水平呈现先升高后降低趋势, 在 2 mg/L 时升高。在处理浓度为 1 mg/L 时, 体内的 CAT 表达水平最高。如图 6(b)所示, SHC 水稻 CAT 逐渐升高呈现先升高后降低的趋势, 在 1.5 mg/L 时, 体内的过氧化氢基因的表达水平最高。说明用 1、1.5、2 mg/L 的 Se 处理对 SHC 水稻的 CAT 活性有明显的促进作用, 可降低活性氧的危害, 缓解盐胁迫对水稻生长的抑制作用。

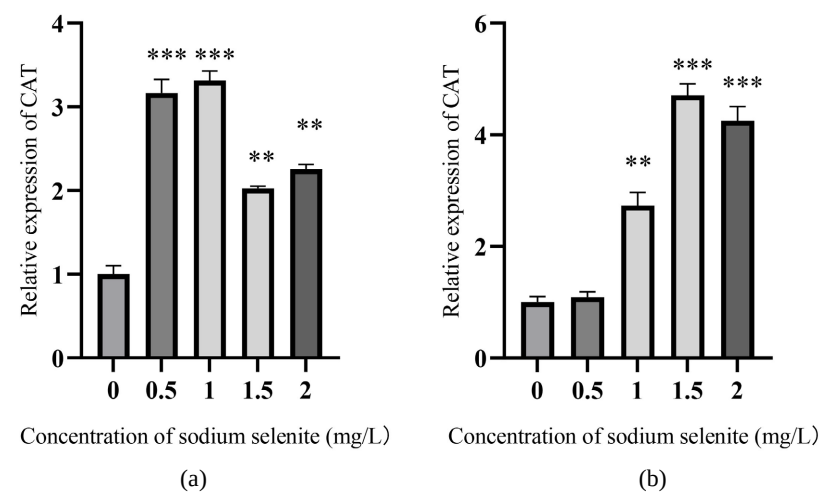


Figure 6. Expression level analysis of catalase. (a) Nipponbare Nip; (b) Transgenic rice SHC
图 6. 过氧化氢酶基因的表达水平分析。(a) 日本晴水稻 Nip; (b) 转基因水稻 SHC

3.4.4. 抗坏血酸过氧化物酶基因的表达水平分析

在盐胁迫条件下, Nip 水稻以 1 mg/L 和 2 mg/L 2 个处理浓度的抗坏血酸过氧化物酶(CAT)基因表达水平显著高于对照组, 分别提高了 13.1%、54.3%, 见图 7(a)。SHC 水稻 CAT 表达量逐渐升高呈现先升高后降低的趋势, 以 1.5 mg/L 亚硒酸盐浓度处理的 CAT 表达量最大, 提高了 47%, 见图 7(b)。

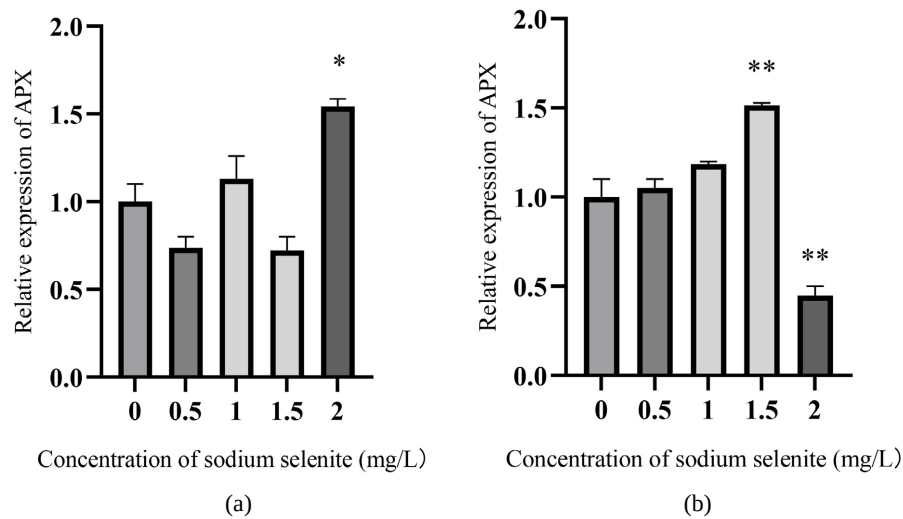


Figure 7. Analysis of the expression level of ascorbate peroxidase gene. (a) Nipponbare Nip; (b) Transgenic rice SHC

图 7. 抗坏血酸过氧化物酶基因的表达水平分析。(a) 日本晴水稻 Nip; (b) 转基因水稻 SHC

3.4.5. 谷胱甘肽还原酶基因的表达水平分析

Nip 水稻的谷胱甘肽还原酶(GR)基因随着亚硒酸盐浓度的增加表达量逐渐上升, 在 2 mg/L 时最高, 相比于对照增加 109.7%, 见图 8(a)。SHC 水稻 GR 表达量逐渐升高呈现先升高后降低的趋势, 在 1.5 mg/L 最高, 相比于对照增加 110.4%, 见图 8(b)。

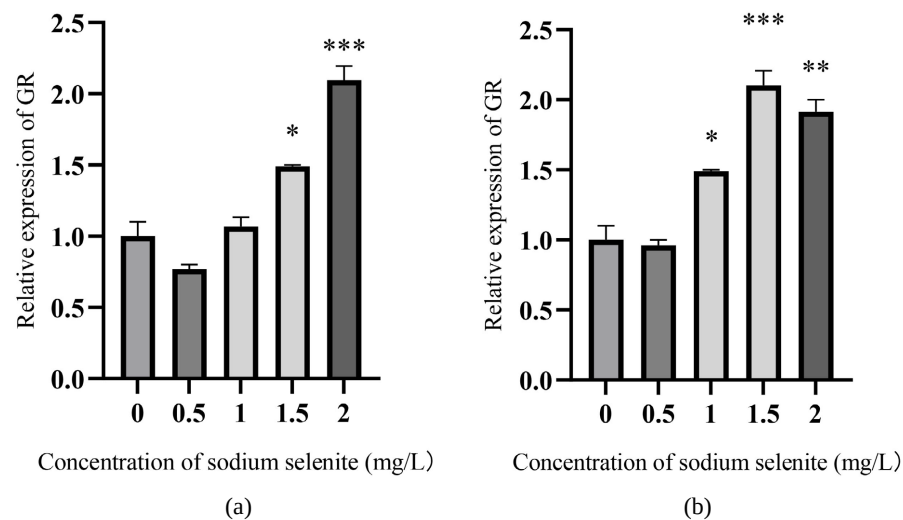


Figure 8. Analysis of the expression level of glutathione reductase gene. (a) Nipponbare Nip; (b) Transgenic rice SHC

图 8. 谷胱甘肽还原酶基因的表达水平分析。(a) 日本晴水稻; (b) 转基因水稻 SHC

4. 讨论与结论

本研究表明,当水稻经过不同水平亚硒酸盐处理后,水稻对盐胁迫的承受能力受到了影响。适宜浓度的亚硒酸盐使盐胁迫下水稻的苗高有一定的提高,减少体内过氧化氢含量,增加谷胱甘肽含量,对 SOD、POD、CAT、APX、GR 的基因表达具有明显的促进作用,提高水稻抗氧化能力。特别是 SHC 水稻,当硒浓度达到 1.5 mg/L 时促进作用最大,但浓度过大则抑制水稻的生长。这表明用 Se 处理可通过提高逆境胁迫下水稻体内抗氧化酶的表达来增强对活性氧的清除能力,提高抗逆性,从而缓解受到的氧化损伤,维持细胞膜结构和功能的稳定。

参考文献

- [1] Liu, Y., Cao, X., Yue, L., *et al.* (2022) Foliar-Applied Cerium Oxide Nanomaterials Improve Maize Yield under Salinity Stress: Reactive Oxygen Species Homeostasis and Rhizobacteria Regulation. *Environmental Pollution*, **299**, Article ID: 118900. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2022.118900>
- [2] 南楠. 盐胁迫对水稻粮食安全影响的研究进展[J]. 粮食问题研究, 2022(5): 9-11+43.
- [3] 韩广泉, 李俊, 宋曼曼, 等. 硒对盐胁迫下加工番茄种子萌发及抗氧化酶系统的影响[J]. 石河子大学学报(自然科学版), 2010, 28(4): 422-426.
- [4] Golubkina, N., Kekina, H. and Caruso, G. (2018) Yield, Quality and Antioxidant Properties of Indian Mustard (*Brassica juncea* L.) in Response to Foliar Biofortification with Selenium and Iodine. *Plants*, **7**, 80. <https://doi.org/10.3390/plants7040080>
- [5] Czech, A., Szmigielski, M. and Sembratowicz, I. (2022) Nutritional Value and Antioxidant Capacity of Organic and Conventional Vegetables of the Genus *Allium*. *Scientific Reports*, **12**, Article ID: 18713. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-23497-y>
- [6] 蔡莉萍, 高尚, 单长卷. 亚硒酸钠对草莓抗坏血酸含量及其相关代谢酶的影响[J]. 东北农业科学, 2023, 48(2): 114-116.