

PBJ 兰大万东石: NMT 发现盐胁迫 OSIC1 正调控根排 Na⁺ 速率为揭示其调控渗透胁迫诱导气孔关闭的机制提供证据



Research Article | Open Access |

The C₂H₂-type zinc finger transcription factor OSIC1 positively regulates stomatal closure under osmotic stress in poplar

Qiuxian Bai, Zhimin Niu, Qingyuan Chen, Chengyu Gao, Mingjia Zhu, Jiexian Bai, Meijun Liu, Ling He, Jianquan Liu, Yuanzhong Jiang , Dongshi Wan

First published: 12 January 2023 | <https://doi.org/10.1111/pbi.14007>

一、基本信息

研究使用平台: NMT 盐碱胁迫创新平台

期刊: Plant Biotechnology Journal

主题: NMT 发现 C₂H₂-ZFP 转录因子编码基因 OSIC1 在胁迫诱导气孔关闭中的相关机制

标题: The C₂H₂-type zinc finger transcription factor OSIC1 positively regulates stomatal closure under osmotic stress in poplar

影响因子: 13.263

作者: 兰州大学万东石, 白秋仙, 牛智敏, 四川大学姜渊忠

二、检测离子 / 分子指标

Na⁺

三、样品信息

新疆杨根 (距根尖顶点 300 μm 根表上的点)

四、中文摘要

盐和干旱会损害植物的渗透稳态, 并极大地限制植物的生长和发育植物减少气孔开度以减少水分损失并保持渗透稳态, 导致提高应激耐受性。此研究确定了新疆杨中被盐、干旱、聚乙二醇 6000 (PEG6000) 和脱落酸 (ABA) 诱导的 C₂H₂ 转录因子基因 *OSMOTIC STRESS INDUCED C₂H₂ 1 (OSIC1)*。OSIC1 过表达转基因杨树通过减少气孔孔径来对高盐、干旱和 PEG6000 处理具有更强的耐受性, 而由 CRISPR/Cas9 系统介导产生的突变体表现出相反的表型。此外, OSIC1 在体外和体内直接上调

收稿日期: 2023-3-9

编辑作者 E-mail: yanhan@nmtia.org.cn

PalCuAOζ (编码含铜多胺氧化酶) 的表达, 以增强 H_2O_2 在保卫细胞中的积累, 从而在胁迫时调节气孔关闭发生。此外, ABA、干旱和盐诱导的 *PalMPK3* 磷酸化 *OSIC1* 增加其对 *PalCuAOζ* 的转录活性。在转录和蛋白质水平上, *OSIC1* 的这一调控保证杨树气孔快速关闭来对渗透压力做出反应。研究结果揭示了一种由 *OSIC1-PalCuAOζ* 介导的保卫细胞中 H_2O_2 产生的新的转录调控机制。这些发现加深了研究者对像杨树一样的多年生木本植物在应对盐和干旱引起的渗透胁迫做出反应时的了解, 并提供育种的潜力目标。

五、离子 / 分子流实验处理方法

100 mM NaCl 瞬时处理 4 周龄新疆杨幼苗根尖 30 min

六、离子 / 分子流实验结果

通过非损伤微测技术 (NMT) 检测根系 Na^+ 流速发现, 在盐胁迫下, 植物会通过重建离子稳态来维持细胞的正常代谢, 减轻盐胁迫造成的伤害。为了探究 *OSIC1* 是否参与了离子稳态的重建, 作者检测了 WT、*OSIC1-OE* 和 *osic1-ko* 新疆杨根尖在 100 mM NaCl 瞬时刺激下的 Na^+ 外排情况。正常条件下, WT、*OSIC1-OE* 和 *osic1-ko* 杨树根系 Na^+ 通量在 $\pm 200 \text{ pmol cm}^{-2} \text{ s}^{-1}$ 之间稳定波动, 将其作为对照组 (图 1A)。与对照组相比, NMT 实验分析表明盐处理导致这些杨树根系 Na^+ 通量的增加, 但 *OSIC1-OE* 中 Na^+ 的外排变化最大, WT 次之, 而 *osic1-ko* 中的 Na^+ 外排变化最小 (图 1B), 表明 *OSIC1-OE* 可以通过向外排更多的 Na^+ 来提高根部对盐胁迫的耐受性。

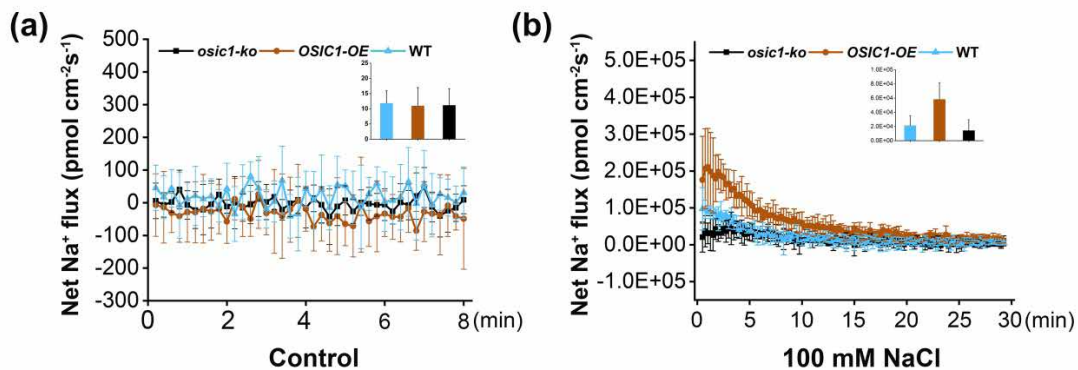


图 1. *OSIC1* 基因参与维持新疆杨根中 Na^+ 平衡。正值代表 Na^+ 外排, 负值代表 Na^+ 内流。

七、其它实验结果

● *OSIC1* 正调控杨树盐胁迫的耐受性

作者通过农杆菌介导的杨树遗传转化体系, 获得 *OSIC1* 过量表达 (*OSIC1-OE*) 和 CRISPR-Cas9 敲低 (*osic1-ko*) 的转基因新疆杨。正常生长条件下, 与野生型新疆杨 (WT) 和 *osic1-ko* 株系相比, *OSIC1-OE* 株系表现出多分枝多根系 (图 2), 且在盐处理下, *osic1-ko* 株系的盐胁迫耐受性受到极大损伤, 而 *OSIC1-OE* 株系则表现出更强的盐耐受能力。因此, *OSIC1-OE* 是杨树盐害耐受性的正调控基因。进一步发现, 在盐胁迫下, *OSIC1* 在气孔关闭中起积极作用 (图 3)。

● *OSIC1* 正调控杨树干旱胁迫的耐受性

此外, 作者还追踪了干旱处理后杨树的表型、气孔导度、叶片蒸腾和净光合速率等气孔相关参数。结果表明, 在干旱胁迫下, *OSIC1* 通过正向调控气孔关闭来响应干旱胁迫 (图 4)。

● *OSIC1* 正调控 ABA 介导的气孔关闭

由于 ABA 诱导的 *OSIC1* 调控盐胁迫和干旱胁迫下的气孔关闭, 作者提出 *OSIC1* 诱导气孔关闭与 ABA 信号通路有关。为了证明这一假设, 作者对 ABA 处理的 *OSIC1-OE*、*osic1-ko* 和 WT 杨树的气孔孔径进行了观察和测量。当叶片浸泡在开放溶液 (OS) 中, 气孔的长度、宽度和面积没有显著差异。但在 ABA 处理 1.5 h 后, 过表达叶片的气孔宽度和面积减小最大, 3 h 后进一步减小, 且突变体叶片的气孔面积最大 (图 5)。这些结果表明, *OSIC1* 在 ABA 介导的气孔关闭中发挥了积极作用。

● 在盐、干旱和 ABA 处理下, *OSIC1* 促进了保卫细胞中 H_2O_2 的积累

保卫细胞中 H_2O_2 的积累对气孔关闭至关重要。作者使用 H_2O_2 敏感的荧光染料检测了正常条件以及盐、PEG6000 (模拟干旱) 和 ABA 处理下的保卫细胞中内源性 H_2O_2 含量。在正常条件下, *OSIC1-OE* 株系的荧光强度最高。经过盐、PEG6000 (模拟干旱) 和 ABA 处理后, 过表达系的荧光强度明显增加, WT 次之, *OSIC1-ko* 系的荧光强度最弱 (图 6)。因此, *OSIC1* 正向调控胁迫诱导的保卫细胞中 H_2O_2 积累, 来参与 ABA 信号传导。

● *OSIC1* 靶定在 *PalCuAOζ* 的启动子上

为了确定 *OSIC1* 异位表达对杨树基因的影响, 作者使用野生杨树、盐胁迫的野生杨树和非胁迫的 *OSIC1-OE* 杨树株系进行了 RNA-seq 分析。作者从异位表达 *OSIC1* 株系和盐胁迫野生杨树中均上调了的 584 个 DEGs 中发现了催化底物产生 H_2O_2 的铜胺氧化酶基因 *PalCuAOζ*, 推测其可能是导致 H_2O_2 积累的 *OSIC1* 转录因子的靶点。随后, 作者通过酵母单杂交 (Y1H) 和凝胶迁移率实验 (EMSA) 技术证实 *OSIC1* 通过结合 *PalCuAOζ* 启动子上的 OBE1 和 OBE3 结合元件, 直接激活 *PalCuAOζ* 的表达 (图 7)。因此, 作者认为 *PalCuAOζ* 介导 *OSIC1* 增加保卫细胞中 H_2O_2 含量。为了确定这一点, 作者通过 CRISPR-Cas9 系统分别在 WT (*pacuaoζ-ko*) 和 *OSIC1-OE* 杨树株系 (*pacuaoζ-ko/OSIC1-OE*) 下生成了 *PalCuAOζ* 敲除杨树。与 WT 相比, 即使不使用 ABA, *pacuaoζ-ko* 和 *pacuaoζ-ko/OSIC1-OE* 杨树的气孔宽度和面积都有所增

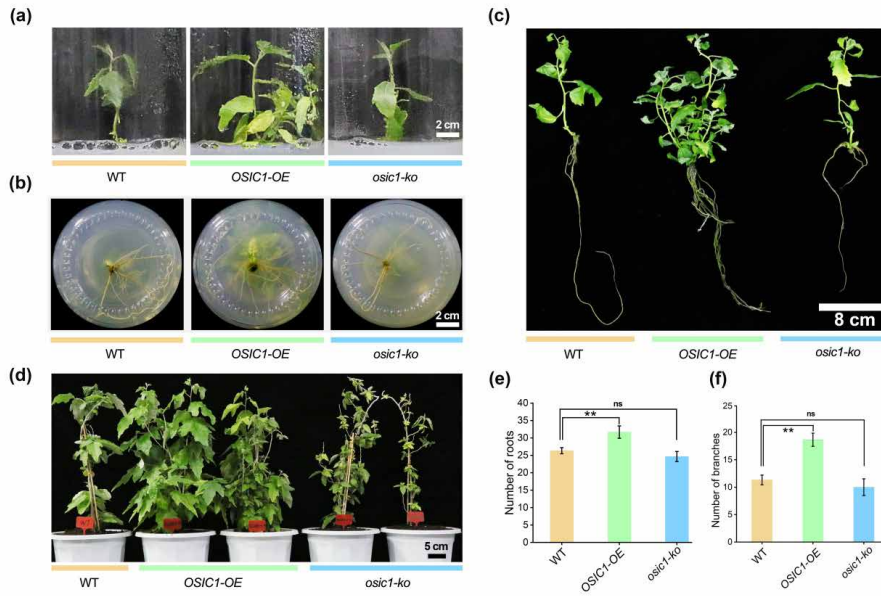


图 2. OSIC1-OE 和 osic1-ko 杨树的生长状态

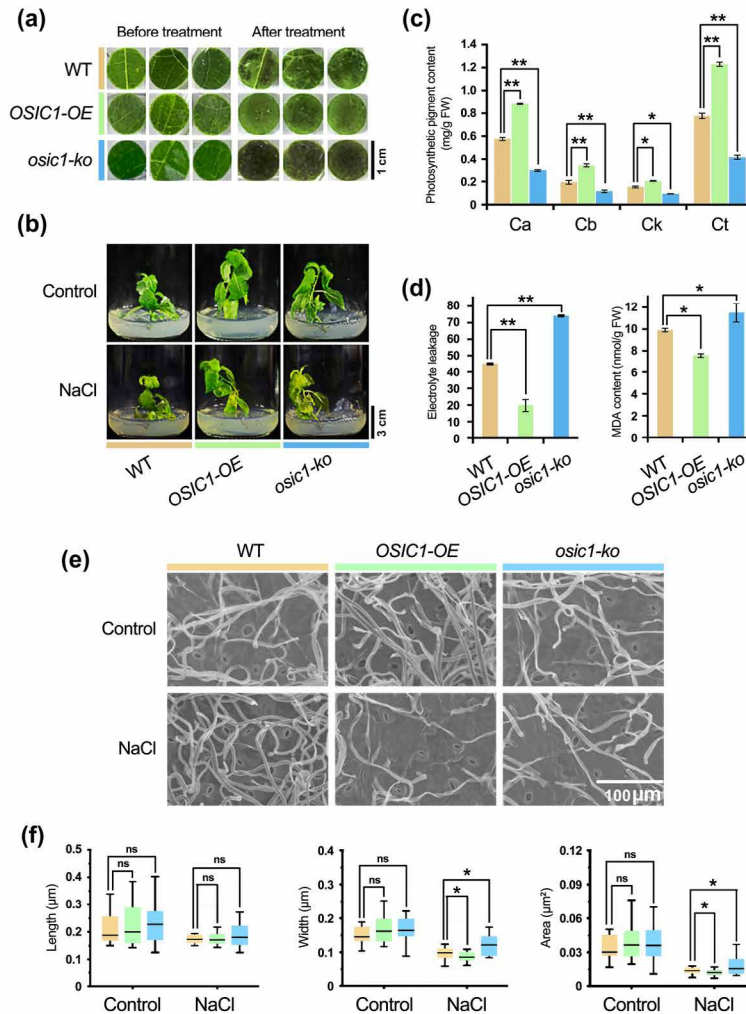


图 3. OSIC1 正调控杨树对盐胁迫的耐受性

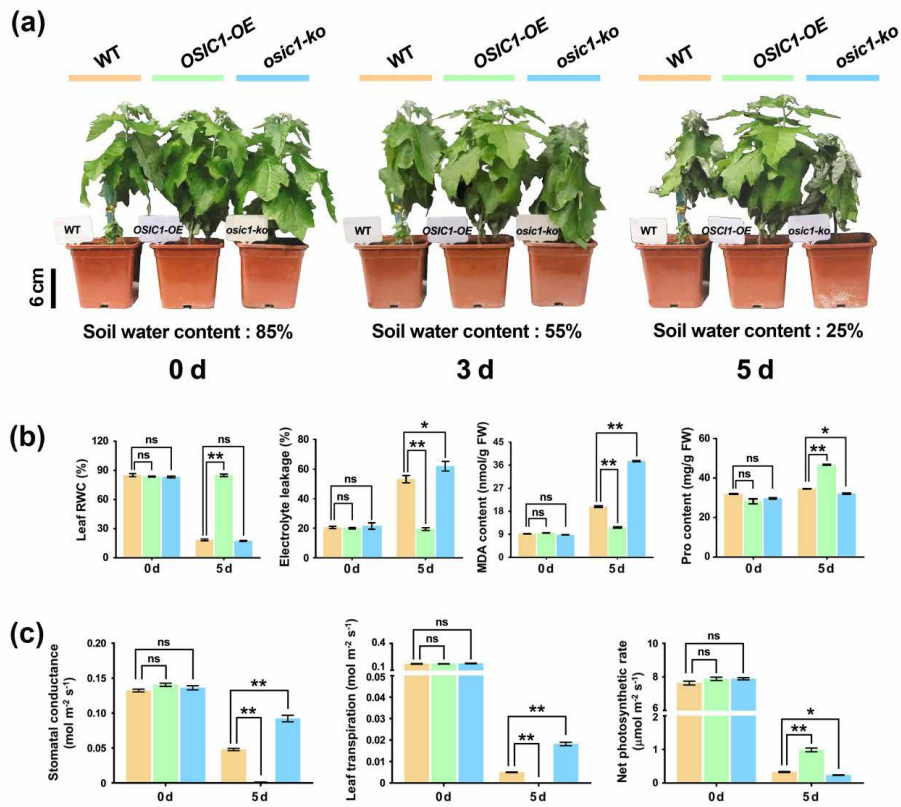


图 4. OSIC1 正调控杨树对于干旱胁迫的耐受性

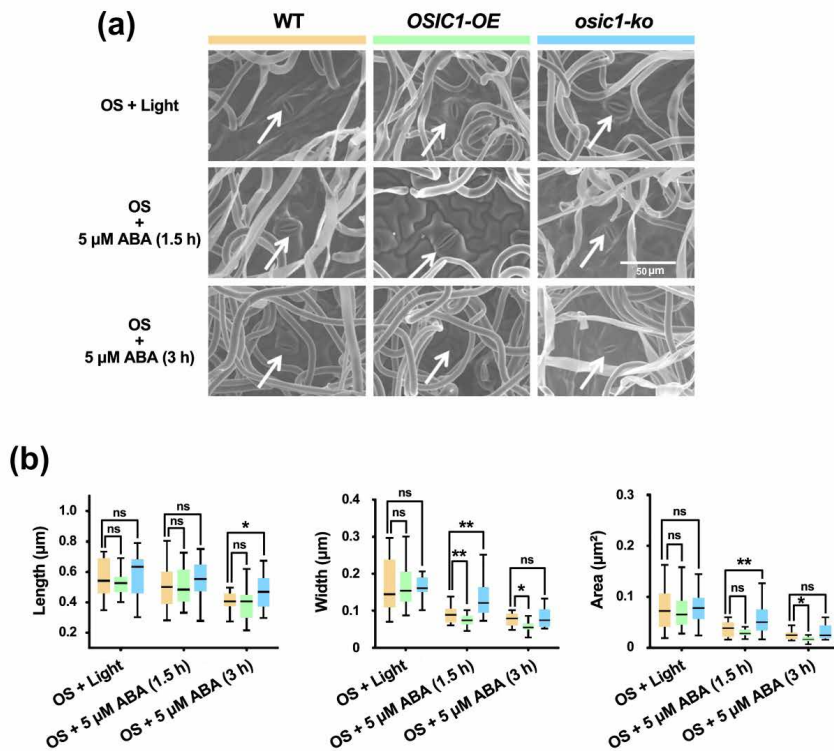


图 5. OSIC1 促进 ABA 诱导的气孔关闭

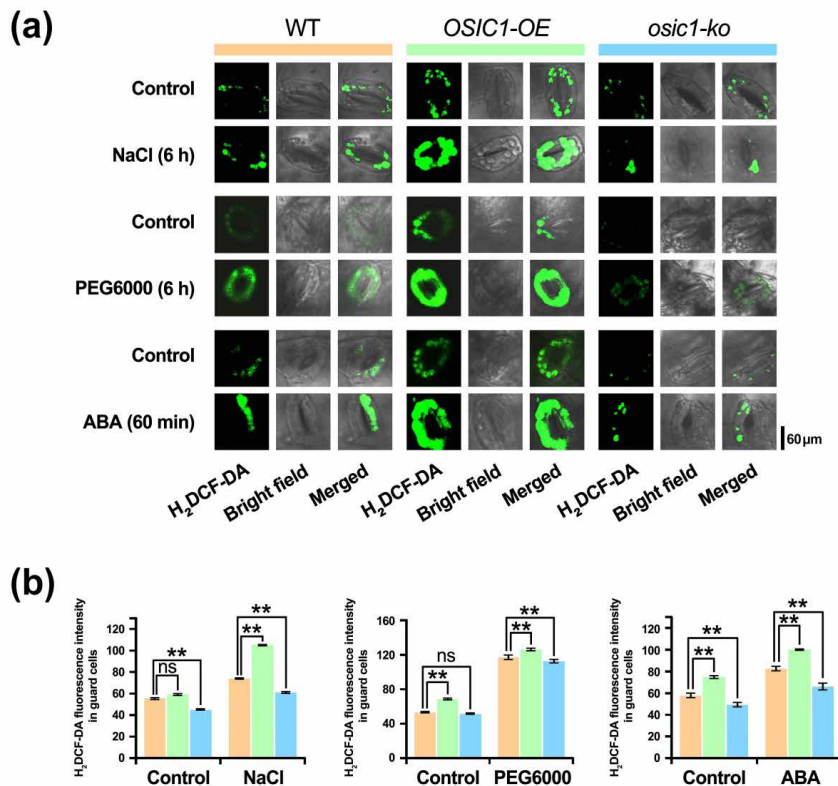


图 6. 不同处理下保卫细胞中 H₂O₂ 含量检测

加。此外，ABA 处理后气孔宽度和面积的减小幅度显著小于 WT。这说明 OSIC1 通过调节 *PalCuAOζ* 的表达来调控 ABA 诱导的气孔关闭。此外，作者还检测了突变体杨树保护细胞中 H₂O₂ 的含量。敲除 *PalCuAOζ* 后，即使提供 ABA，H₂O₂ 含量也明显下降，过表达 OSIC1 也无法恢复（图 8）。因此，诱导的 H₂O₂ 的 *PalCuAOζ* 是 OSIC1 调控气孔关闭的必要条件，且 *PalCuAOζ* 是 OSIC1 的遗传上位。

● 磷酸化 OSIC1 可增强其转录激活活性

为了进一步阐明 OSIC1 的转录调控机制，通过酵母双杂交 (Y2H) 筛库鉴定 OSIC1 的相互作用蛋白。在候选蛋白中，作者发现了拟南芥丝裂原激活蛋白激酶 (MPK3) 的同

源物，因此被命名为 PalMPK3。点对点酵母双杂试验 (Y2H) 和免疫共沉淀试验 (Co-IP) 进一步确定了 OSIC1 和 PalMPK3 之间的相互作用。此外，磷酸化试验结果表明，PalMPK3 在体外和体内均能磷酸化 OSIC1（图 9）。为了研究磷酸化的 OSIC1 对其转录活性的影响，作者使用双荧光素酶实验 (LUC) 证明磷酸化可以增强 OSIC1 的转录激活活性。此外，另一项 LUC 实验表明，共表达 *PalMPK3* 和 *PalMKK5^{DD}* 的 *OSIC1* 确实显著增加了 LUC 强度；且随着 NaCl 浓度的增加，LUC 强度进一步升高（图 10）。这些结果表明，OSIC1 具有其他的磷酸化位点，这些位点被其他盐胁迫诱导的蛋白激酶磷酸化。

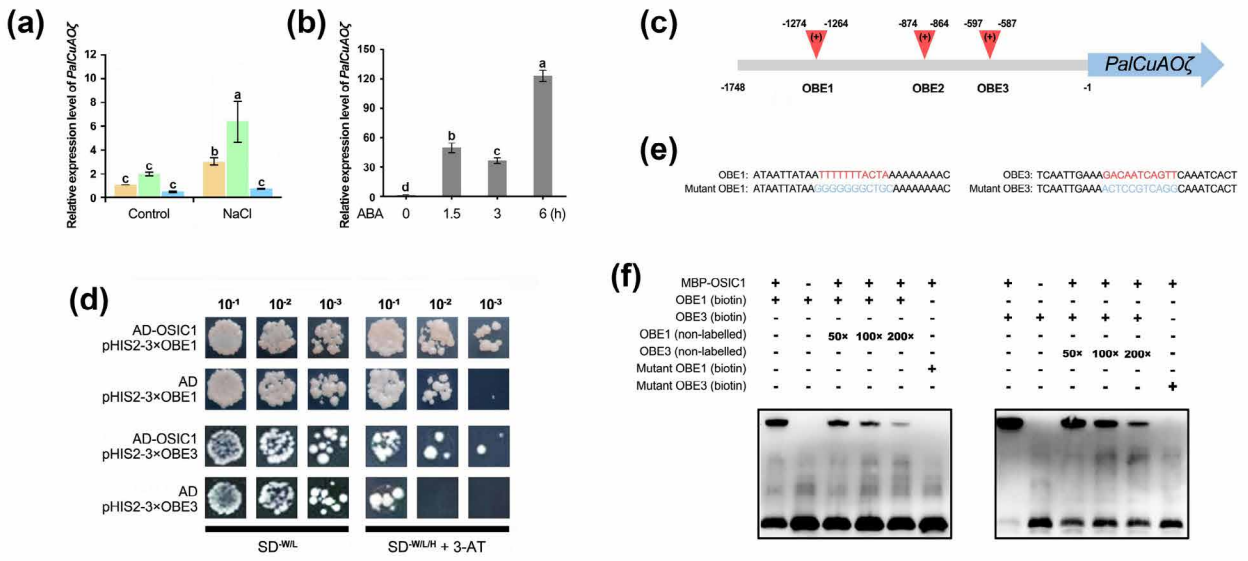


图 7. OSIC1 通过结合到 *PalCuAOζ* 启动子的顺式作用元件上直接调控其表达

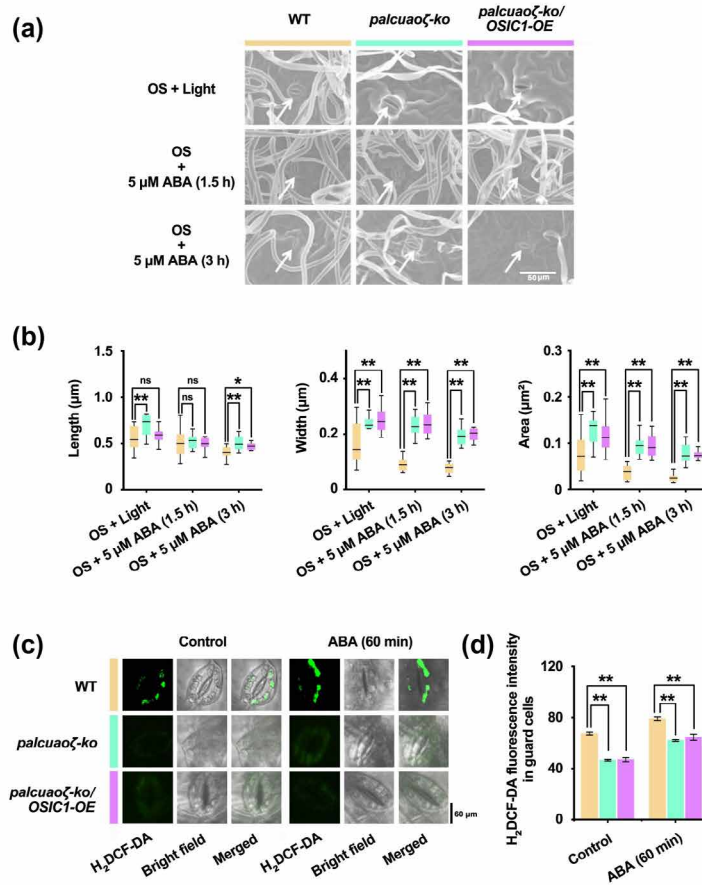


图 8. OSIC1 依赖 *PalCuAOζ* 介导气孔关闭和保卫细胞中 H_2O_2 的积累

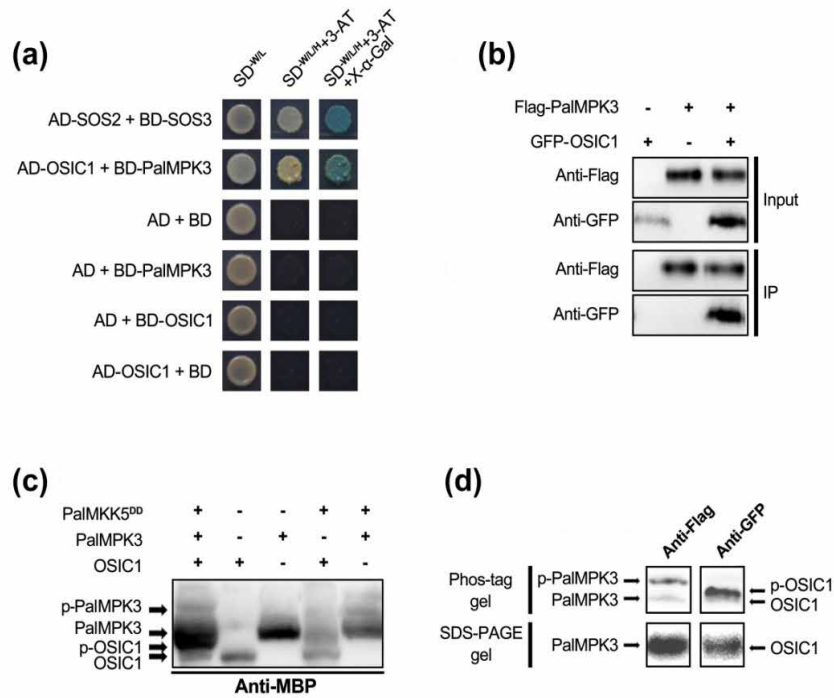


图 9. PalMPK3 在体内或体外与 OSIC1 相互作用，并使其磷酸化

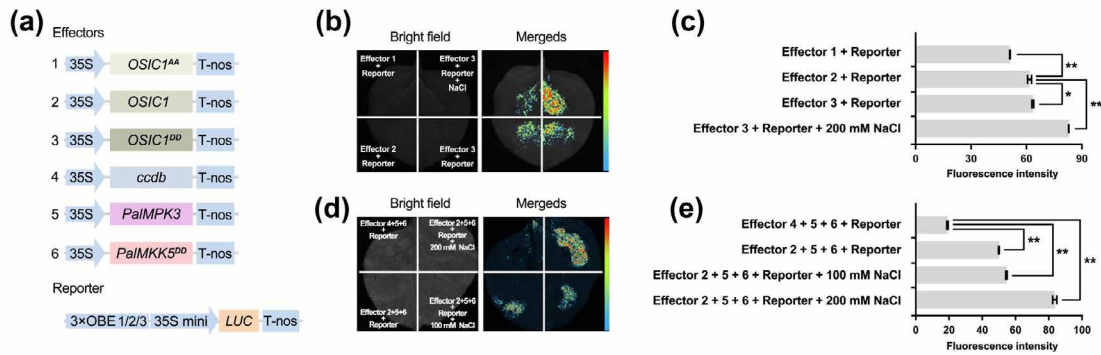


图 10. PalMPK3 在体内或体外与 OSIC1 相互作用，并使其磷酸化

八、结论

总之，该论文报道了杨树 C₂H₂-ZFP 转录因子编码基因 *OSIC1* 在胁迫诱导气孔关闭中的生物功能。首先，*OSIC1* 主要在叶片和木质部表达，且受盐、干旱、PEG6000 和 ABA 诱导显著；第二，在转基因杨树中，*OSIC1* 在杨树耐盐和干旱胁迫中发挥积极作用，并引起全面的转录组重排；第三，

OSIC1 通过上调 *PalCuAOζ* 的表达加速 H₂O₂ 积累，导致气孔关闭。最后，*OSIC1* 可以被 *PalMPK3* 磷酸化以增强其转录活性。因此，作者提出了一种新的杨树对渗透胁迫响应的工作模型：正常情况下，*PalMPK3* 和 *OSIC1* 的 mRNA 丰度维持在较低水平，其编码产物失活；因此，*PalCuAOζ* 的转录没有被大量激活。因此，H₂O₂ 含量不足以促

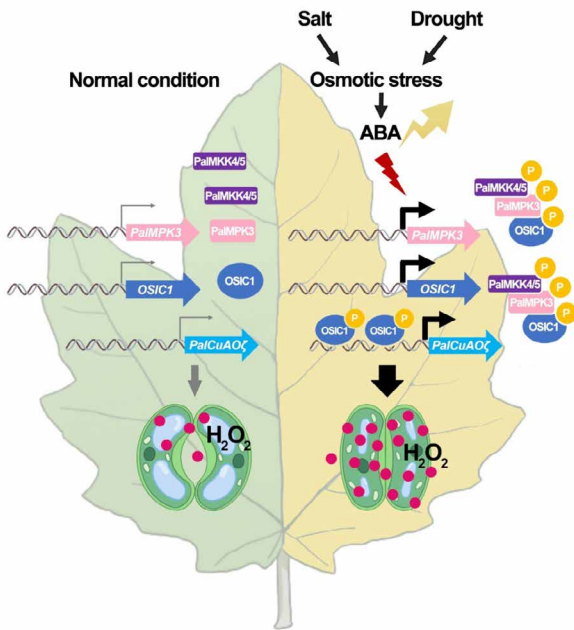
使气孔关闭。当杨树遭受到盐或干旱造成的渗透胁迫时，ABA 会积累。积累的 ABA 诱导 *PalMPK3* 和 *OSIC1* 的表达，并激活 *PalMKK4/5*，进一步磷酸化 *PalMPK3*。随后，*OSIC1* 被激活的 *PalMPK3* 磷酸化。磷酸化的 *OSIC1* 结合到 *PalCuAOζ* 的启动子上并上调其表达。*PalCuAOζ* 催化生成更多 H_2O_2 ，从而介导气孔关闭，减少水分流失（图 11）。这些研究成果不仅加深了木本植物对渗透胁迫响应调控机制的理解，也为逆境胁迫下杨树种质的筛选和培育提供了新思路 and 理论依据。

九、测试液

0.1 mM KCl, 0.1 mM CaCl₂, 0.1 mM MgCl₂·6H₂O, 0.5 mM NaCl, 0.3 mM MES, 0.2 mM Na₂SO₄, pH=6.5

关键词：OSIC1；C₂H₂；ABA；干旱胁迫；盐胁迫；新疆杨；气孔；植物类

文献信息：Qiuxian Bai, et al. The C₂H₂-type zinc finger transcription factor OSIC1 positively regulates stomatal closure under osmotic stress in poplar. PLANT BIOTECHNOL J. doi: 10.1111/pbi.14007



（责任编辑：李雪霏）

图 11. 在盐和干旱胁迫下 OSIC1 调控气孔关闭的工作模型