

盐胁迫下添加外源硅提高水稻抗氧化酶活性 与钠钾平衡相关基因表达

闫国超, 樊小平, 谭礼, 尹昌, 梁永超*

(浙江大学环境与资源学院/污染环境修复与生态健康教育部重点实验室, 浙江杭州 310058)

摘要: 【目的】盐胁迫是影响全球作物生长的主要非生物胁迫之一, 添加外源硅可有效提高植物对盐胁迫的抗性。本研究通过水培试验, 分析硅对盐胁迫下水稻生长、光合系统、钠钾含量、抗氧化酶活性和钠钾平衡关键基因表达量的影响, 以探究硅缓解水稻盐胁迫的机制。【方法】供试材料为日本晴水稻 (*Oryza sativa* L. cv. Nipponbare), 设置 NaCl 0 (CK)、50 (Na1) 和 100 mmol/L (Na2) 3 个盐胁迫浓度与 Na_2SiO_3 0 (Si0)、0.5 (Si1) 和 1.5 mmol/L (Si2) 3 个硅浓度, 共 9 个处理。处理 5 天后, 测定水稻长度与生物量、光合与蒸腾速率、氧化伤害、钠钾含量。结果表明, 在 100 mmol/L NaCl 与 1.5 mmol/L 硅处理下, 硅盐互作效果最显著, 据此进一步测定了该处理下水稻的抗氧化酶活性与钠钾转运关键基因表达量。【结果】盐胁迫显著降低了水稻地上部与地下部的长度与干重, 同时显著降低了光合速率、蒸腾速率和叶绿素含量, 并明显促进丙二醛的累积。盐胁迫下, 外源硅显著增加了水稻地上部高度与干重, 但对地下部长度与干重无显著影响; 盐胁迫下添加硅显著提高了叶片光合速率和叶绿素含量, 显著降低了丙二醛含量, 但对蒸腾速率无显著影响。盐胁迫均引起地上部与地下部钠含量显著上升与钾含量显著下降, 盐胁迫下添加外源硅可显著降低地上部钠含量, 但是对钾含量没有显著影响, 并且硅对根系钠钾含量均无显著影响。总体而言, 100 mmol/L NaCl 处理在水稻中造成的生长抑制、氧化伤害与钠钾失衡等胁迫伤害比 50 mmol/L NaCl 处理更为严重, 而添加 1.5 mmol/L 的硅对盐胁迫的缓解效果优于添加 0.5 mmol/L 的硅。在 100 mmol/L NaCl 处理下, 添加 1.5 mmol/L 的硅显著提高了 SOD、CAT、APX 的活性, 但是对 POD 的活性无显著影响; 同时, 添加 1.5 mmol/L 硅显著提高了盐胁迫下水稻钾吸收基因 (*OsHAK1*、*OsHAK7*、*OsHAK11* 与 *OsHAK12*)、钠外排基因 (*OsSOS1*) 与钠区隔化基因 (*OsNHX1*、*OsNHX3* 与 *OsNHX5*) 的表达。【结论】营养液中添加 1.5 mmol/L 的硅比 0.5 mmol/L 的硅对盐胁迫下水稻的生长、光合系统和离子平衡调控效果更好, 能更有效地缓解水稻盐胁迫。硅可通过调控 SOD、CAT、APX 等抗氧化酶活性与钾吸收、钠外排和钠区隔化等钠钾平衡关键基因的表达, 从而缓解水稻盐胁迫。

关键词: 硅; 盐胁迫; 水稻; 抗氧化酶; 钠钾平衡; 基因表达

Exogenous silicon effectively enhances salt stress resistance of rice by upregulating antioxidant enzymes activities and expression of genes related to Na/K homeostasis

YAN Guo-chao, FAN Xiao-ping, TAN Li, YIN Chang, LIANG Yong-chao*

(College of Environmental & Resource Sciences, Zhejiang University/Key Laboratory of Environment Remediation and Ecological Health, Ministry of Education, Hangzhou 310058, China)

Abstract: 【Objectives】Salt stress is one of the global abiotic obstacles severely limiting crop growth. Exogenous silicon (Si) has been proven to effectively enhance salt stress resistance in many plant species. To investigate the mechanisms of Si-induced salt stress resistance, we assessed the effects of Si on the activities of antioxidant enzymes and the expression of Na/K homeostasis related genes in rice. 【Methods】Rice (*Oryza sativa* L. cv. Nipponbare) was grown hydroponically with both NaCl (0, 50 and 100 mmol/L) and Na_2SiO_3 levels

收稿日期: 2020-04-04 接受日期: 2020-07-24

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31572191)。

联系方式: 闫国超 E-mail: yanguocho@zju.edu.cn; * 通信作者 梁永超 E-mail: ycliang@zju.edu.cn

(0, 0.5, 1.5 mmol/L). After five days of treatment, plant length and biomass, photosynthesis and transpiration rates, chlorophyll and malondialdehyde concentrations, and Na/K concentrations were measured. Then, the activities of antioxidant enzymes and the expression of Na/K homeostasis related genes in rice grown with 0 and 100 mmol/L NaCl with or without the addition of 1.5 mmol/L Si were measured. **【 Results 】** Salt stress significantly inhibited the growth of both shoot and root, while Si addition enhanced the length and dry weight of shoot but not those of root in rice under salt stress. In addition, exogenous Si addition alleviated salt stress-induced decline in photosynthesis rate and chlorophyll concentration and accumulation of MDA, with no significant impact on transpiration rate. As for Na/K homeostasis, salt stress caused an increment in Na concentration and a decrement in K concentration in both shoot and root. Si decreased Na concentration in shoot but not in root. The concentration of K was not affected by Si in both shoot and root. In general, treatment with salt at a higher level (100 mmol/L NaCl) affected rice growth, photosynthesis system, membrane stabilization and Na/K homeostasis more negatively than at a lower level (50 mmol/L NaCl), while salt stress was more effectively alleviated by Si added at a higher level of Si (1.5 mmol/L Si) than at a lower level (0.5 mmol/L Si). Under 100 mmol/L NaCl salt stress, addition of 1.5 mmol/L Si improved SOD, CAT and APX activity but not POD activity. The expression of K uptake genes (*OsHAK1*, *OsHAK7*, *OsHAK11* and *OsHAK12*), Na exclusion gene (*OsSOS1*) and Na compartmentation genes (*OsNHX1*, *OsNHX3* and *OsNHX5*) was improved by the addition of 1.5 mmol/L Si under 100 mmol/L NaCl. **【 Conclusions 】** Si can regulate antioxidant enzymes activities and Na/K homeostasis related genes expression, thereby alleviating salt stress in rice. 1.5 mmol/L of Si is more effective than 0.5 mmol/L in alleviating salt stress in rice.

Key words: silicon (Si); salt stress; rice (*Oryza sativa* L.); antioxidant enzyme; Na/K homeostasis; gene expression

盐胁迫是影响全球作物生长的主要非生物胁迫之一^[1]。据报道,目前世界上大约四分之一的耕地存在盐渍化问题,而且由于全球气候变暖和化学肥料的过量施用,受盐胁迫影响的耕地面积正在逐渐扩大^[2]。在盐胁迫下,外界高浓度的盐离子会通过渗透胁迫作用导致植物生理性缺水;同时,过量的盐离子被植物吸收后会破坏植物的离子平衡,引起膜脂过氧化、光合系统破坏等胁迫伤害,从而影响植物的生长,并在农业生产中造成严重的产量降低和经济损失^[3]。因此,提高作物的耐盐性对于提高粮食产量、确保粮食安全具有重要意义。

硅是土壤中第二丰富的元素,其含量仅次于氧。由于硅在植物生长环境中的广泛分布,几乎所有的植物中都含有硅。虽然,硅仍未被证明是植物生长的必需元素,但作为一种有益元素,硅对植物生长的促进作用,特别是缓解植物多种非生物和生物胁迫的作用已得到广泛认可^[2,4]。业已证明,硅在水稻^[5-6]、玉米^[7]、大麦^[8-9]、小麦^[10-11]等多种作物中具有显著的盐胁迫缓解作用。这表明,硅肥施用是一种有效提高盐渍土中作物生长和产量的农业技术手段。但是,硅缓解盐胁迫的最适添加浓度及硅缓解

植物盐胁迫的机制还不明确,这在一定程度上限制了硅肥的广泛应用。

因此,参考此前研究中硅浓度的设置^[12-17],对比研究高浓度硅添加(1.5 mmol/L)与低浓度硅添加(0.5 mmol/L)对不同程度盐胁迫(50与100 mmol/L NaCl)下水稻生长、光合系统、氧化伤害、离子平衡的影响;在此基础上,选择最适硅盐互作浓度,测定抗氧化酶活性与钠钾平衡关键基因的表达量,探究硅缓解水稻盐胁迫的机制,以期为农业生产中硅肥推广提供理论基础和技术支撑。

1 材料与方法

1.1 水稻种植与处理设置

供试材料为水稻,品种为日本晴(*Oryza sativa* L. cv. Nipponbare),挑选饱满的种子用10% H₂O₂消毒并用去离子水清洗3次后,在30℃黑暗条件下催芽。种子发芽后移至浸水的石英砂上继续生长3天,然后移植到黑色塑料小桶中。每个小桶中装有3 L的1/2强度的木村B营养液^[12],营养液配方为:0.18 mmol/L (NH₄)₂SO₄, 0.28 mmol/L MgSO₄·7H₂O, 0.09 mmol/L KNO₃, 0.18 mmol/L Ca

(NO₃)₂·4H₂O, 0.11 mmol/L KH₂PO₄, 20 μmol/L NaEDTAFe·H₂O, 6.7 μmol/L MnCl₂·4H₂O, 0.015 μmol/L (NH₄)₆Mo₇O₂₄·4H₂O, 0.15 μmol/L ZnSO₄·7H₂O, 0.16 μmol/L CuSO₄·5H₂O, 9.4 μmol/L HBO₃, 营养液 pH 为 5.6。每个桶中种植 10 棵水稻苗, 营养液每 3 天更换一次。实验在温湿可控的人工气候室中进行, 湿度为 50% ± 5%, 温度为 26℃ ± 5℃, 光照/黑暗时间分别为 14 h/10 h。

选择长势一致、苗龄为 28 天的水稻苗进行处理。试验设置 0 (CK)、50 (Na1) 和 100 mmol/L (Na2) 3 个盐胁迫 (NaCl) 浓度与 0 (Si0)、0.5 (Si1) 和 1.5 mmol/L (Si2) 3 个外源硅 (Na₂SiO₃) 添加浓度, 共计 9 个处理, 每个处理 3 次重复。不同处理营养液 pH 用 1 mmol/L HCl 或 NaOH 调至 5.6, 以保持处理间一致。处理时间为 5 天, 在第 3 天更换一次营养液。处理完成后, 采样测定水稻植株长度、生物量、光合与蒸腾速率、叶绿素与丙二醛含量、钠钾含量等指标, 部分样品液氮冷冻后保存于 -80℃ 冰箱。通过比较不同硅处理对盐胁迫下水稻上述各项生长指标的影响, 结果表明在 100 mmol/L NaCl 与 1.5 mmol/L 硅处理下, 硅盐互作效果最显著, 使用该处理冻存样品测定分析硅对抗氧化酶活性与钠钾平衡关键基因表达量的影响。

1.2 测定指标与测定方法

长度与生物量: 使用直尺测定根茎 (根与茎连结部位) 到地上部顶点与地下部顶点处的距离作为地上部高度与地下部长度并记录; 水稻样品在烘箱中 105℃ 下杀青 30 min, 然后 70℃ 下烘干至恒重后称重。

光合速率、蒸腾速率与叶绿素含量: 选用完全展开的水稻倒二叶, 使用 Licor 6400 便携式光合测定仪进行测定, 光合速率与蒸腾速率依据测定仪叶室中的叶片面积换算得出。利用 95% 乙醇溶液提取叶绿素, 使用分光光度计 (Evolution 201, Thermofisher) 测定提取液在 665 与 649 nm 波段的吸光度, 叶绿素含量根据 Porra 等^[18]提出的公式进行计算, $C_{\text{叶绿素}} = 6.63 A_{665} + 18.08 A_{649}$ 。

丙二醛含量: 利用 0.1% 三氯乙酸溶液将样品研磨匀浆后, 4℃ 条件下 10000 r/m 离心 10 min。取上清液与等量 0.5% 硫代巴比妥酸溶液混合, 在水浴锅中 100℃ 条件下孵育 10 min, 冷却后 10000 r/min 离心 10 min。取上清液测定 600、532 与 450 nm 波段吸光度, 丙二醛含量按照 Heath 等^[19]提出的公式进行

计算, $C_{\text{丙二醛}} = 6.45 (A_{532} - A_{600}) - 0.56 A_{450}$ 。

钠、钾含量: 水稻地上部与地下部干样分别研磨成粉末后, 采用 5 mL HNO₃ 和 1 mL H₂O₂ 作为消解体系在微波消解仪 (Jupiter, Sineo) 上进行微波消解, 然后利用火焰光度计 (FP640, 上海精科) 测定钠、钾含量。钠、钾选择性转运系数为地上部钠钾比与地下部钠钾比的比值。

抗氧化酶活性: 将水稻鲜样加入磷酸缓冲液 (50 mmol/L, pH 7.8, 含 1 mmol/L EDTA 和 2% 聚乙烯吡咯烷酮) 研磨成匀浆, 在 4℃ 条件下 10000 r/min 离心 20 min, 上清液用于抗氧化酶活性测定。超氧化物歧化酶 (SOD) 活性参照 Giannopolitis 等^[20]的方法测定, 取 50 μL 酶提取液与 3 mL 磷酸缓冲液 (50 mmol/L, pH 7.8, 含 13 mmol/L 甲硫氨酸, 63 μmol/L NBT, 1.3 μmol/L 核黄素, 100 μmol/L EDTA) 混匀, 于 25℃ 光照条件下反应 3 min, 测定反应液在 560 nm 波段的吸光度; 每单位 SOD 活性 (1U) 定义为对 NBT 光化学反应 50% 的抑制。过氧化氢酶 (CAT) 活性参照 Cakmak 等^[21]的方法测定, 取 100 μL 酶提取液与 1.7 mL 磷酸缓冲液 (25 mmol/L, pH 7.0, 含 100 μmol/L EDTA) 和 200 μL 过氧化氢溶液 (10 mmol/L) 混合均匀后, 测定样品在 240 nm 波段吸光度随时间的变化; CAT 活性用单位时间过氧化氢的降解量表示。抗坏血酸过氧化物酶 (APX) 活性参照 Nakano 等^[22]的方法测定, 取 100 μL 酶提取液与 1.7 mL 磷酸缓冲液 (25 mmol/L, pH 7.0, 含 100 μmol/L EDTA)、100 μL 抗坏血酸溶液 (5 mmol/L) 和 100 μL 过氧化氢溶液 (20 mmol/L) 混合均匀后, 测定样品在 290 nm 波段吸光度随时间的变化; APX 活性使用单位时间减少的抗坏血酸的量表示。过氧化物酶 (POD) 活性参照 Liang 等^[23]的方法测定, 取 100 μL 酶提取液与 1.7 mL 磷酸缓冲液 (25 mmol/L, pH 7.0, 含 100 μmol/L EDTA)、100 μL 愈创木酚溶液 (1%, m/v) 和 100 μL 过氧化氢溶液 (20 mmol/L) 混合均匀后, 测定样品在 470 nm 波段吸光度随时间的变化; POD 活性使用单位时间被氧化的愈创木酚的量表示。

基因表达量: 用植物 RNA 提取试剂盒 (Minibest, Takara) 提取水稻根部总 RNA, 去除基因组 DNA 后, 使用反转录试剂盒 (PrimeScript RT reagent kit, Takara) 将 RNA 反转录为 cDNA。使用 TBGreen premix Ex Taq (Takara) 在荧光定量 PCR 仪 (LightCycler 480II, Roche) 上进行实时定量 PCR, 以 *OsActin* 为参照基因, 测定 *OsHAK1*、*OsHAK7*、*OsHAK11*、*OsHAK12*、*OsSOS1*、*OsNHX1*、

OsNHX3、*OsNHX5* 基因的表达量。引物序列与相关信息见表 1。

表 1 引物序列与相关信息
Table 1 Sequences and related information of primers used in this study

基因名	引物序列 (5'—3')
<i>OsHAK1</i> ^[24]	F: GTTGTATGATGCTGATGTTGGAAG R: CCAACACTTTCAGCTGAAAC
<i>OsHAK7</i> ^[24]	F: TGAATCTTCTGTTGGTCATCCTCA R: CTCGGCAACTACATTACATG
<i>OsHAK11</i> ^[24]	F: GTGTAGGAGTAGGGCTCCATG R: GATCCATTCAATTTGTCATATGC
<i>OsHAK12</i> ^[24]	F: GTTTCTGATTCAGAGAGTGAGCAG R: CTACAGCATCATTCATACTGACAG
<i>OsSOS1</i> ^[25]	F: CTGGGCCTTGCTTTTGAAT R: ATTCCAGTGTCATGACGGT
<i>OsNHX1</i> ^[25]	F: CATTGATCAGGCTGCTGCTA R: CTTGCATGCTTGTCAGGAGA
<i>OsNHX3</i> ^[25]	F: ACCGGTGGGTCAATGAATCC R: CCACCACTGACGAGCAGAAT
<i>OsNHX5</i> ^[25]	F: TCACTGCCCTTGACAGGAAC R: GTCAGGTGGCAACTCATCCA
<i>OsActin</i> ^[26]	F: TTATGGTTGGGATGGGACA R: AGCACGGCTTGAATAGCG

1.3 数据统计与分析

指标测定相关数据使用 Microsoft Excel 进行统计, 使用 SPSS 22.0 软件进行方差分析和差异显著性分析, 使用 Prism 8.0 软件作图。

2 结果与分析

2.1 不同硅添加浓度对盐胁迫下水稻生长、光合系统和氧化伤害的影响

总体来说, 50 mmol/L (Na1) 与 100 mmol/L (Na2) 盐胁迫处理显著抑制了水稻的生长, 而添加 0.5 (Si1) 与 1.5 mmol/L (Si2) 的硅均有效地改善了盐胁迫下水稻的生长 (表 2)。在水稻地上部中, Na1 与 Na2 处理显著降低了地上部高度与干重, Na2 处理对水稻生长的抑制作用比 Na1 处理更为严重。在 Na1 处理下, Si1 处理对地上部高度无显著影响, 而 Si2 处理显著提高了地上部高度。而在 Na2 处理下,

Si1 与 Si2 处理均提高了地上部高度, 但没有达到显著水平。同时, 在 Na1 与 Na2 两个盐胁迫处理下, Si1 和 Si2 两个水平的硅处理平均显著提高了地上部干重。在地下部中, 虽然盐胁迫引起了显著的长度与干重下降, 但添加硅对盐胁迫下地下部的长度与干重多无显著影响, 仅 Si2 处理在 Na2 盐胁迫处理下提高了地下部长度。

在抑制水稻生长的同时, Na1 与 Na2 盐胁迫处理显著降低了水稻的光合速率、蒸腾速率和叶绿素含量, 同时引起了严重的丙二醛积累 (表 2)。在光合速率方面, Si1 和 Si2 处理在 Na1 处理下均能显著提高光合速率, 但是在 Na2 处理下仅有 Si2 处理能显著提高光合速率。不同于光合速率, 外源加硅在 Na1 和 Na2 盐胁迫下均未能显著影响蒸腾速率。在 Na1 处理下, Si1 和 Si2 处理提高了叶绿素含量, 但未能达到显著水平; 而在 Na2 处理下, Si1 和 Si2 处理显著提高了叶绿素含量。此外, Si1 和 Si2 处理在 Na1 和 Na2 两个浓度的盐胁迫处理下均显著缓解了盐胁迫造成的丙二醛积累。

2.2 不同硅添加浓度对盐胁迫下水稻钠钾平衡的影响

表 3 显示, 50 mmol/L (Na1) 与 100 mmol/L (Na2) 盐胁迫处理下水稻地上部和地下部钠含量明显上升, 而钾含量显著下降。在地上部, Si1 和 Si2 两个硅处理下在 Na1 盐胁迫处理下对钠含量和钠钾比无显著影响, 但在 Na2 盐胁迫处理下均显著降低了钠含量和钠钾比。同时, 硅添加虽然有提高地上部钾含量的趋势, 但未达到显著水平。在地下部, 硅添加对钠钾含量均无显著影响。此外, 在 Na1 与 Na2 盐胁迫处理下, Si1 处理虽然降低了钠钾选择性转运系数 (STI), 但未达到显著水平, 而 Si2 处理显著降低了 Na2 处理下钠钾选择性转运系数。

2.3 硅对盐胁迫下水稻抗氧化酶活性的影响

根据上述结果, 我们选择了互作效果最显著的 100 mmol/L 盐胁迫处理和 1.5 mmol/L 硅添加处理, 进一步测定分析了硅对盐胁迫下水稻抗氧化酶活性的影响 (图 1)。在正常生长条件下, 添加 1.5 mmol/L Si (Si2) 对抗氧化酶活性无显著影响。在 100 mmol/L 盐胁迫下 (Na2), SOD 活性显著下降, 而外源添加硅显著提高了 SOD 活性; 与 SOD 不同, 盐胁迫对于 CAT 与 APX 的活性没有显著的影响, 而盐胁迫下外源添加硅显著提高了 CAT 与 APX 活性。与此同时, 盐胁迫与硅添加处理对于 POD 活性均无显著影响。

表 2 不同硅添加浓度对盐胁迫下水稻生长、光合系统和氧化损伤的影响
 Table 2 Effects of different levels of Si addition on growth, photosynthesis system and oxidative damage in rice under salt stress

指标Index	CK			Na1			Na2		
	Si0	Si1	Si2	Si0	Si1	Si2	Si0	Si1	Si2
地上部高度 (mm) Shoot height	247 ± 13 a	244 ± 10 a	259 ± 7 a	192 ± 13 bc	205 ± 7 b	237 ± 7 a	178 ± 8 c	189 ± 9 bc	201 ± 10 bc
地下部长度 (mm) Root length	164 ± 11 ab	166 ± 10 a	167 ± 8 a	142 ± 6 bc	139 ± 9 ab	146 ± 7 bc	138 ± 6 c	137 ± 7 c	146 ± 11 ab
地上部干重 (mg) Shoot dry weight	39.2 ± 1.9 ab	39.6 ± 1.3 ab	40.5 ± 2.1 a	31.3 ± 1.4 cd	37.8 ± 0.8 ab	39.8 ± 1.4 ab	29.9 ± 1.7 d	35.7 ± 1.3 bc	37.1 ± 1.5 ab
地下部干重 (mg) Root dry weight	10.0 ± 0.50 a	9.76 ± 0.71 a	9.94 ± 0.39 a	7.14 ± 0.38 bc	7.76 ± 0.63 b	7.97 ± 0.45 b	5.74 ± 0.67 c	6.10 ± 0.35 c	6.70 ± 0.64 bc
光合速率 [CO ₂ μmol/(m ² ·s)] Photosynthetic rate	10.5 ± 0.90 a	9.85 ± 0.91 ab	10.2 ± 0.60 a	5.82 ± 0.68 de	7.81 ± 0.48 c	8.10 ± 0.61 bc	4.90 ± 0.35 e	5.62 ± 0.53 de	7.29 ± 0.85 d
蒸腾速率 [H ₂ O mmol/(m ² ·h)] Transpiration rate	2.51 ± 0.25 a	2.55 ± 0.21 a	2.57 ± 0.30 a	1.47 ± 0.11 b	1.66 ± 0.11 b	1.72 ± 0.12 b	1.34 ± 0.10 b	1.36 ± 0.13 b	1.67 ± 0.10 b
叶绿素含量 (mg/g, FW) Chlorophyll content	3.61 ± 0.07 a	3.67 ± 0.18 a	3.62 ± 0.09 a	3.11 ± 0.19 b	3.40 ± 0.11 ab	3.46 ± 0.15 ab	2.56 ± 0.16 c	3.12 ± 0.10 b	3.42 ± 0.13 ab
丙二醛含量 (nmol/g, FW) MAD content	9.83 ± 1.10 d	9.02 ± 1.11 d	9.39 ± 0.67 d	16.7 ± 1.30 ab	9.13 ± 0.91 d	9.90 ± 1.12 d	19.8 ± 1.80 a	14.1 ± 0.90 bc	10.4 ± 1.20 cd

注 (Note): CK, Na1, Na2 表示 NaCl 胁迫水平为 0、50、100 mmol/L, Si0, Si1, Si2 表示 Na₂SiO₃ 添加水平分别为 0、0.5、1.5 mmol/L; CK, Na1 and Na2 represent NaCl stress level of 0, 50 and 100 mmol/L, Si0, Si1 and Si2 represent Na₂SiO₃ adding concentrations of 0, 0.5 and 1.5 mmol/L in the nutrient solution; 同行数据后不同字母表示处理间差异显著 Values followed by different letters indicate significant difference among treatments (Turkey test, $P < 0.05$).

表 3 不同硅添加浓度对盐胁迫下水稻钠、钾离子浓度 ($\mu\text{mol/g}$, DW) 和钠钾比的影响

Table 3 Effects of different levels of Si addition on Na and K ion concentrations and Na/K ratio of rice under salt stress

指标 Index	CK			Na1			Na2		
	Si0	Si1	Si2	Si0	Si1	Si2	Si0	Si1	Si2
地上部 Shoot									
Na	36 ± 7 c	152 ± 23 c	226 ± 20 c	1058 ± 63 ab	877 ± 52 b	980 ± 292 ab	1229 ± 52 a	886 ± 87 b	788 ± 54 b
K	490 ± 15 a	481 ± 21 a	478 ± 20 a	384 ± 12 bc	390 ± 17 b	401 ± 22 b	317 ± 31 d	329 ± 16 cd	344 ± 16 cd
Na/K	0.073 ± 0.015 c	0.319 ± 0.061 c	0.472 ± 0.030 c	2.75 ± 0.16 b	2.26 ± 0.23 b	2.46 ± 0.81 b	3.90 ± 0.22 a	2.69 ± 0.20 b	2.29 ± 0.05 b
地下部 Root									
Na	90 ± 19 b	214 ± 25 b	300 ± 12 b	1075 ± 138 a	1066 ± 136 a	1106 ± 86 a	1180 ± 73 a	1105 ± 113 a	1088 ± 138 a
K	356 ± 16 a	335 ± 15 a	346 ± 14 a	286 ± 18 b	281 ± 23 b	290 ± 20 b	275 ± 24 b	290 ± 7 b	303 ± 14 b
Na/K	0.252 ± 0.055 b	0.641 ± 0.100 b	0.868 ± 0.057 b	3.75 ± 0.27 a	3.80 ± 0.37 a	3.82 ± 0.33 a	4.33 ± 0.66 a	3.81 ± 0.32 a	3.62 ± 0.53 a
STI	0.31 ± 0.11 c	0.50 ± 0.08 bc	0.55 ± 0.07 bc	0.74 ± 0.05 ab	0.60 ± 0.08 b	0.64 ± 0.18 b	0.92 ± 0.18 a	0.71 ± 0.06 ab	0.65 ± 0.11 b

注 (Note) : CK、Na1、Na2 表示 NaCl 胁迫水平为 0、50、100 mmol/L, Si0、Si1、Si2 表示 Na_2SiO_3 添加水平为 0、0.5、1.5 mmol/L; CK, Na1 and Na2 represent NaCl stress level of 0, 50 and 100 mmol/L, Si0, Si1 and Si2 represent Na_2SiO_3 adding concentrations of 0, 0.5 and 1.5 mmol/L in the nutrient solution; STI—钠钾选择性转运系数 Selective transport index of Na and K; 同行数据后不同字母表示处理间差异显著 (Turkey 法, $P < 0.05$) Values followed by different letters indicate significant difference among treatments (Turkey test, $P < 0.05$).

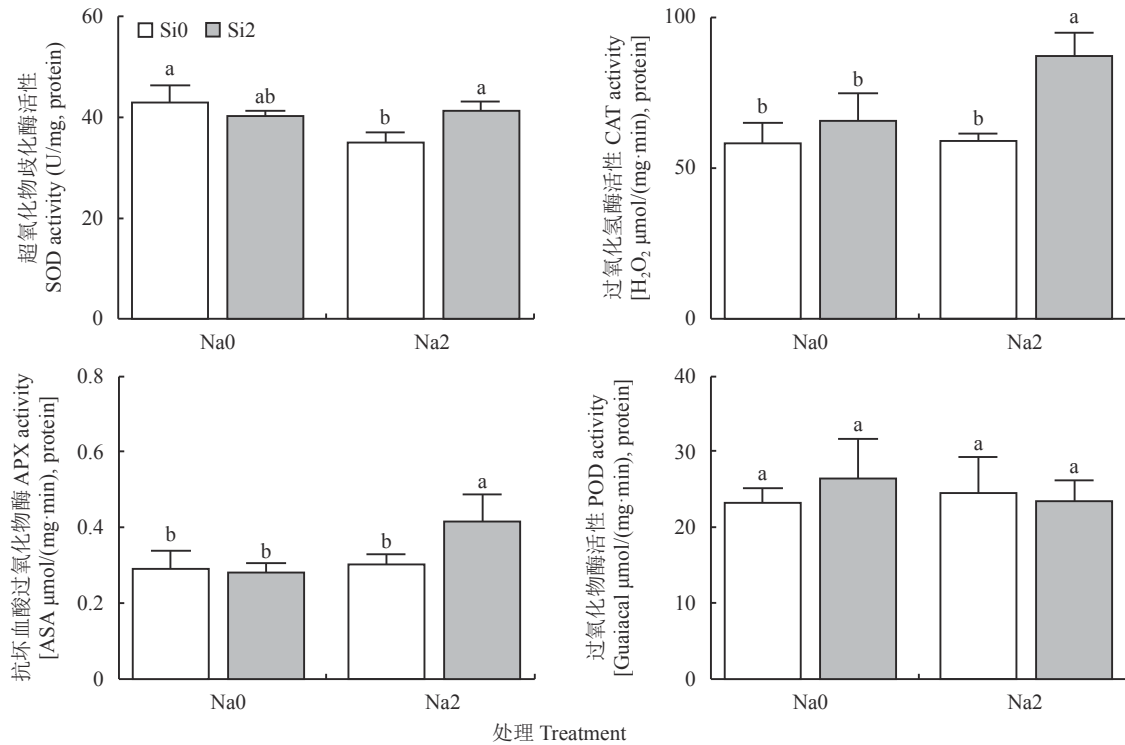


图 1 添加外源硅后盐胁迫水稻叶片中的抗氧化酶活性

Fig. 1 Activities of antioxidant enzymes in rice leaves under salt stress and exogenous Si addition

[注 (Note) : Na2—NaCl 100 mmol/L; Si2—1.5 mmol/L Na_2SiO_3 ; 方柱上不同字母表示处理间差异显著 (Turkey 法, $P < 0.05$) Different letters above the bars indicate significant difference among treatments (Turkey test, $P < 0.05$).]

2.4 硅对盐胁迫下水稻钠钾平衡关键基因表达的影响

试验选用了互作效果最显著的 100 mmol/L 盐胁迫

处理, 测定了水稻根系钾吸收基因 (包括 *OsHAK1*、*OsHAK7*、*OsHAK11* 与 *OsHAK12*)、钠外排基因 (*OsSOS1*) 与钠区隔化基因

(包括 *OsNHX1*、*OsNHX3* 与 *OsNHX5*) 的表达量 (图 2)。在正常生长条件下, 添加 1.5 mmol/L 硅 (Si2) 对基因表达无显著影响。100 mmol/L 盐胁迫处理 (Na2) 显著降低了钾吸收基因 *OsHAK1* 与 *OsHAK11* 的表达, 而外源添加硅显著提高了 *OsHAK1* 与 *OsHAK11* 的表达量。同时, 盐胁迫处理提高了 *OsHAK7* 的表达量, 但对 *OsHAK12* 表达量无显著影响, 而盐胁迫下添加外源硅显著提高了 *OsHAK7* 与 *OsHAK12* 的表达量。在钠外排基因方面, 盐胁迫对于 *OsSOS1* 表达量无显著影响, 硅添加显著提高了盐胁迫下 *OsSOS1* 的表达。在钠区隔化基因方面, 盐胁迫显著降低了 *OsNHX1* 和 *OsNHX5* 的表达, 但对 *OsNHX3* 表达无显著影响, 外源添加硅则显著提高了盐胁迫下 *OsNHX1*、*OsNHX3* 与 *OsNHX5* 的表达。

3 讨论

硅可以显著提高水稻的盐胁迫抗性, 改善盐胁迫下水稻的生长, 并提高水稻产量^[5,6,27]。盐胁迫来源于环境中高浓度的盐分离子, 盐胁迫会在植物中引起生理缺水、离子毒害、氧化伤害等胁迫伤害, 从而严重影响植物生长^[1,28-29]。在本研究中, 我们首先

通过测定水稻生长、光合系统、氧化伤害与离子平衡等方面指标, 比较了高浓度 (1.5 mmol/L) 与低浓度 (0.5 mmol/L) 的外源硅添加对水稻不同程度盐胁迫 (50 mmol/L 与 100 mmol/L NaCl) 的缓解效果。相对于对照处理, 盐胁迫能够显著降低水稻植株的长度和干重, 造成光合系统损伤、膜脂过氧化、钠钾失衡等胁迫伤害, 而且盐胁迫在水稻中造成的生长抑制和胁迫伤害随 NaCl 浓度的增加而逐渐加重。在盐胁迫下, 外源硅添加则能够显著提高水稻地上部的长度和生物量, 缓解盐胁迫引起的丙二醛积累, 并显著提高叶绿素含量与光合速率 (表 2)。除了缓解盐胁迫造成的生长抑制与氧化伤害以外, 外源硅添加显著降低盐胁迫下水稻地上部钠含量, 增加水稻地上部钾含量, 同时降低水稻地上部钠钾比和钠钾选择性转运系数 (表 3)。通过比较两个浓度的外源硅添加对盐胁迫下水稻生长、光合系统、氧化伤害和离子平衡的影响, 本研究结果表明添加高浓度外源硅 (1.5 mmol/L) 对盐胁迫的缓解效果优于低浓度外源硅 (0.5 mmol/L)。

盐胁迫引起的植物膜脂过氧化伤害, 会严重影响包括光合系统在内的植物生理代谢功能^[1]。在盐胁迫

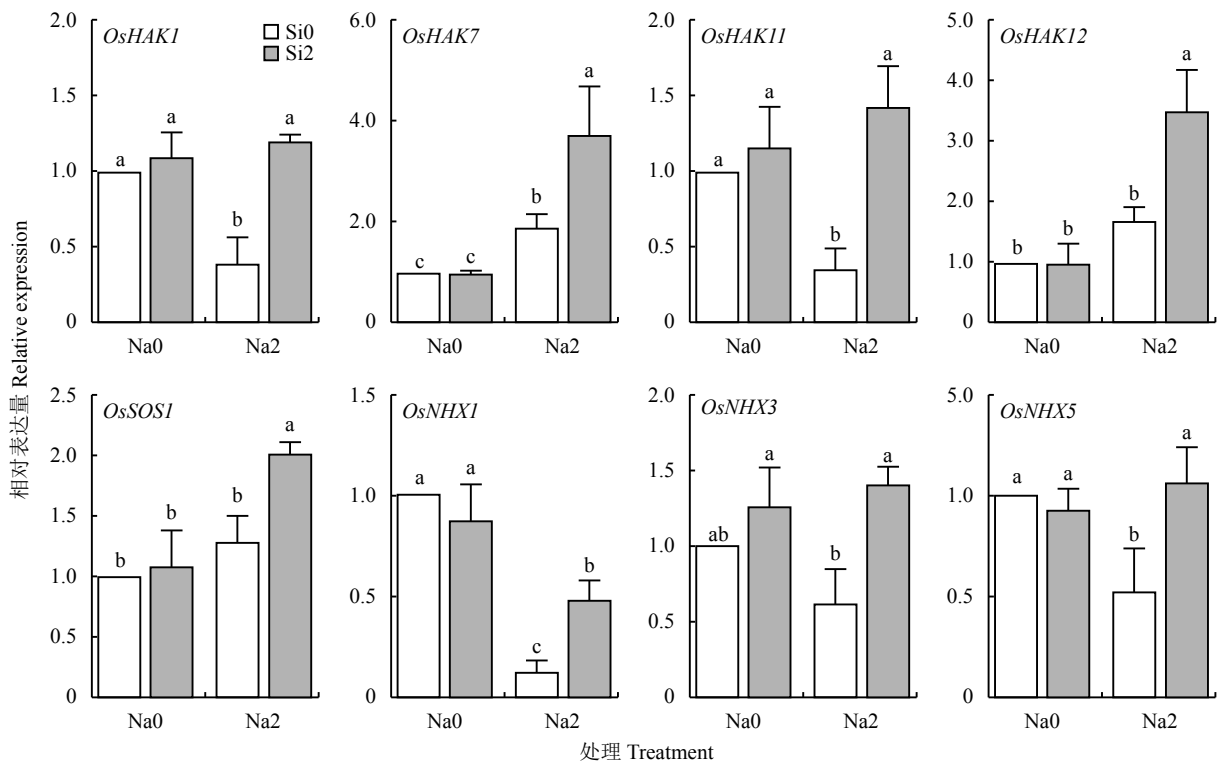


图 2 添加外源硅后盐胁迫水稻钠钾平衡关键基因的表达

Fig. 2 Expression of genes related to Na/K homeostasis in rice under salt stress and exogenous Si addition

[注 (Note): Na2—NaCl 100 mmol/L; Si2—1.5 mmol/L Na₂SiO₃; 方柱上不同字母表示处理间差异显著 (Turkey 法, $P < 0.05$)
Different letters above the bars indicate significant difference among treatments (Turkey test, $P < 0.05$).]

胁迫下,植物的抗氧化酶系统对于缓解盐胁迫造成的氧化伤害具有重要作用^[2,4,30-31]。在本研究中,我们发现外源硅添加能够显著提高盐胁迫下水稻 SOD、CAT 和 APX 的活性,但是对 POD 的活性没有显著影响(图 1)。结合本研究中硅对丙二醛积累、叶绿素降解和光合速率的调控(表 2、表 3)表明,硅可以通过调控盐胁迫下水稻抗氧化酶活性,缓解盐胁迫引起的氧化与光合系统伤害。Yan 等^[32]在中花 11 水稻品种中发现,硅在盐胁迫下可以提高水稻 SOD、CAT、POD 的活性,但对 APX 的活性没有影响。这些结果表明,硅对盐胁迫下水稻抗氧化酶的调控效果会随着水稻品种有所变化。在大麦^[23]和黄瓜^[33]上的研究也曾表明,在盐胁迫下硅对不同品种大麦与不同品种黄瓜中抗氧化酶活性的调控也会随品种不同而有所区别。

钠钾平衡对盐胁迫下植物的生长至关重要,盐胁迫下植物可以通过调控钾吸收、钠外排和钠区隔化等策略维持正常的钠钾平衡^[34-36]。*OsHAK* 家族基因在水稻正常与胁迫条件下的钾吸收中扮演着重要角色^[24,37]。此前研究表明,*OsHAK* 基因缺失的水稻突变体对盐胁迫十分敏感,而通过转基因等技术手段提高水稻 *OsHAK* 活性可以有效提高水稻对于钾的吸收^[24,26,38-40]。本研究结果表明,硅在水稻盐胁迫下能够提高包括 *OsHAK1*、*OsHAK7*、*OsHAK11* 与 *OsHAK12* 在内的 *OsHAK* 家族钾吸收基因的表达(图 2),这对于维持水稻在盐胁迫下吸收钾的能力具有重要意义。同时,硅提高了盐胁迫下水稻钠外排(*OsSOS1*)与钠区隔化(*OsNHX1*、*OsNHX3*与*OsNHX5*)基因的表达。盐胁迫条件下,硅能够通过提高 *OsSOS1* 基因的表达增加水稻地下部钠的外排,从而减少钠向地上部的转运,Bosnic 等^[7]曾报道硅在盐胁迫下的玉米中也具有类似的作用。Liang 等^[9]曾发现,硅在大麦中可以提高 H^+ -ATPase 与 H^+ -PPase 的活性进而增加钠的液泡区隔化,从而缓解钠毒害,本研究中硅对钠区隔化基因的影响从分子层面解释了硅对钠区隔化的作用。结合硅对盐胁迫下水稻钠钾含量与选择性转运系数的影响,本研究结果表明硅能够通过调控钠钾平衡相关基因的表达进而调控钠钾的选择性转运,降低地上部钠离子含量和钠钾比,从而在水稻中缓解盐胁迫引起的离子毒害。

4 结论

硅可以改善盐胁迫下水稻光合系统与离子平衡,从而促进盐胁迫下水稻的生长,添加 1.5 mmol/L

的硅比添加 0.5 mmol/L 的硅在水稻中能够更有效地缓解盐胁迫;硅可以通过提高盐胁迫下水稻抗氧化酶活性,缓解盐胁迫造成的过氧化伤害与叶绿素降解,从而保护水稻的光合系统;硅可以通过提高盐胁迫下水稻钾吸收、钠外排以及与钠区隔化相关基因的表达,调控钠、钾吸收与转运,改善地上部钠、钾离子平衡,缓解盐胁迫造成的离子毒害。

参 考 文 献:

- [1] Munns R, Tester M. Mechanisms of salinity tolerance[J]. *Annual Review of Plant Biology*, 2008, 59: 651–681.
- [2] Zhu Y X, Gong H J. Beneficial effects of silicon on salt and drought tolerance in plants[J]. *Agronomy for Sustainable Development*, 2014, 34(2): 455–472.
- [3] Munns R, Gilliam M. Salinity tolerance of crops – what is the cost?[J]. *New Phytologist*, 2015, 208(3): 668–673.
- [4] Liang Y C, Sun W C, Zhu Y G, et al. Mechanisms of silicon-mediated alleviation of abiotic stresses in higher plants: A review[J]. *Environmental Pollution*, 2007, 147(2): 422–428.
- [5] Shi Y, Wang Y C, Flowers T J, et al. Silicon decreases chloride transport in rice (*Oryza sativa* L.) in saline conditions[J]. *Journal of Plant Physiology*, 2013, 170(9): 847–853.
- [6] Gong H J, Randall D P, Flowers T J. Silicon deposition in the root reduces sodium uptake in rice (*Oryza sativa* L.) seedlings by reducing bypass flow[J]. *Plant, Cell & Environment*, 2006, 29(10): 1970–1979.
- [7] Bosnic P, Bosnic D, Jasnic J, et al. Silicon mediates sodium transport and partitioning in maize under moderate salt stress[J]. *Environmental and Experimental Botany*, 2018, 155: 681–687.
- [8] Liang Y C. Effects of silicon on enzyme activity and sodium, potassium and calcium concentration in barley under salt stress[J]. *Plant and Soil*, 1999, 209(2): 217–224.
- [9] Liang Y C, Zhang W H, Chen Q, et al. Effects of silicon on H^+ -ATPase and H^+ -PPase activity, fatty acid composition and fluidity of tonoplast vesicles from roots of salt-stressed barley (*Hordeum vulgare* L.)[J]. *Environmental and Experimental Botany*, 2005, 53(1): 29–37.
- [10] Tuna A L, Kaya C, Higgs D, et al. Silicon improves salinity tolerance in wheat plants[J]. *Environmental and Experimental Botany*, 2008, 62(1): 10–16.
- [11] Saqib M, Zorb C, Schubert S. Silicon-mediated improvement in the salt resistance of wheat (*Triticum aestivum*) results from increased sodium exclusion and resistance to oxidative stress[J]. *Functional Plant Biology*, 2008, 35(7): 633–639.
- [12] Liang Y C, Hua H X, Zhu Y G, et al. Importance of plant species and external silicon concentration to active silicon uptake and transport [J]. *New Phytologist*, 2006, 172(1): 63–72.
- [13] Liu P, Yin L N, Deng X P, et al. Aquaporin-mediated increase in root hydraulic conductance is involved in silicon-induced improved root water uptake under osmotic stress in *Sorghum bicolor* L.[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2014, 65(17): 4747–4756.
- [14] Ma J F, Tamai K, Yamaji N, et al. A silicon transporter in rice[J].

- Nature*, 2006, 440(7084): 688–691.
- [15] Wang H S, Yu C, Fan P P, *et al.* Identification of two cucumber putative silicon transporter genes in *Cucumis sativus*[J]. *Journal of Plant Growth Regulation*, 2015, 34(2): 332–338.
- [16] Wu J W, Guo J, Hu Y H, *et al.* Distinct physiological responses of tomato and cucumber plants in silicon-mediated alleviation of cadmium stress[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2015, 6: 453.
- [17] Wu X Y, Yu Y G, Baerson S R, *et al.* Interactions between nitrogen and silicon in rice and their effects on resistance toward the brown planthopper *Nilaparvata lugens*[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2017, 8: 28.
- [18] Porra R J, Thompson W A, Kriedemann P E. Determination of accurate extinction coefficients and simultaneous-equations for assaying chlorophyll-a and chlorophyll-b extracted with 4 different solvents-verification of the concentration of chlorophyll standards by atomic-absorption spectroscopy[J]. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1989, 975(3): 384–394.
- [19] Heath R L, Packer L. Photoperoxidation in isolated chloroplasts. I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation[J]. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 1968, 125(1): 189–198.
- [20] Giannopolitis C N, Ries S K. Superoxide dismutases. 1. Occurrence in higher plants[J]. *Plant Physiology*, 1977, 59(2): 309–314.
- [21] Cakmak I, Marschner H. Magnesium deficiency and high light intensity enhance activities of superoxide dismutase, ascorbate peroxidase, and glutathione reductase in bean leaves[J]. *Plant Physiology*, 1992, 98(4): 1222–1227.
- [22] Nakano Y, Asada K. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts[J]. *Plant & Cell Physiology*, 1981, 22(5): 867–880.
- [23] Liang Y C, Chen Q, Liu Q, *et al.* Exogenous silicon (Si) increases antioxidant enzyme activity and reduces lipid peroxidation in roots of salt-stressed barley (*Hordeum vulgare* L.)[J]. *Journal of Plant Physiology*, 2003, 160(10): 1157–1164.
- [24] Okada T, Nakayama H, Shinmyo A, *et al.* Expression of *OsHAK* genes encoding potassium ion transporters in rice[J]. *Plant Biotechnology*, 2008, 25(3): 241–245.
- [25] Porcel R, Aroca R, Azcon R, *et al.* Regulation of cation transporter genes by the arbuscular mycorrhizal symbiosis in rice plants subjected to salinity suggests improved salt tolerance due to reduced Na^+ root-to-shoot distribution[J]. *Mycorrhiza*, 2016, 26(7): 673–684.
- [26] Yang T, Zhang S, Hu Y, *et al.* The role of a potassium transporter *OsHAK5* in potassium acquisition and transport from roots to shoots in rice at low potassium supply levels[J]. *Plant Physiology*, 2014, 166(2): 945–959.
- [27] Yan G C, Nikolic M, Ye M J, *et al.* Silicon acquisition and accumulation in plant and its significance for agriculture[J]. *Journal of Integrative Agriculture*, 2018, 17(10): 2138–2150.
- [28] Byrt C S, Munns R. Living with salinity[J]. *New Phytologist*, 2008, 179(4): 903–905.
- [29] Munns R. Comparative physiology of salt and water stress[J]. *Plant, Cell & Environment*, 2002, 25(2): 239–250.
- [30] Ma J F. Role of silicon in enhancing the resistance of plants to biotic and abiotic stresses[J]. *Soil Science and Plant Nutrition*, 2004, 50(1): 11–18.
- [31] Zhu Y X, Gong H J, Yin J L. Role of silicon in mediating salt tolerance in plants: A review[J]. *Plants*, 2019, 8: 147.
- [32] Yan G, Fan X, Peng M, *et al.* Silicon improves rice salinity resistance by alleviating ionic toxicity and osmotic constraint in an organ-specific pattern[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2020, 11: 260.
- [33] Zhu Z J, Wei G Q, Li J, *et al.* Silicon alleviates salt stress and increases antioxidant enzymes activity in leaves of salt-stressed cucumber (*Cucumis sativus* L.)[J]. *Plant Science*, 2004, 167(3): 527–533.
- [34] Zhu J K. Regulation of ion homeostasis under salt stress[J]. *Current Opinion in Plant Biology*, 2003, 6(5): 441–445.
- [35] Zhu J K. Plant salt tolerance[J]. *Trends in Plant Science*, 2001, 6(2): 66–71.
- [36] Kronzucker H J, Britto D T. Sodium transport in plants: A critical review[J]. *New Phytologist*, 2011, 189(1): 54–81.
- [37] Chen G, Hu Q D, Luo L, *et al.* Rice potassium transporter *OsHAK1* is essential for maintaining potassium-mediated growth and functions in salt tolerance over low and high potassium concentration ranges[J]. *Plant, Cell & Environment*, 2015, 38(12): 2747–2765.
- [38] Banuelos M A, Garciadeblas B, Cubero B, *et al.* Inventory and functional characterization of the *HAK* potassium transporters of rice[J]. *Plant Physiology*, 2002, 130(2): 784–795.
- [39] Obata T, Kitamoto H K, Nakamura A, *et al.* Rice Shaker potassium channel *OsKAT1* confers tolerance to salinity stress on yeast and rice cells[J]. *Plant Physiology*, 2007, 144(4): 1978–1985.
- [40] Shen Y, Shen L, Shen Z, *et al.* The potassium transporter *OsHAK21* functions in the maintenance of ion homeostasis and tolerance to salt stress in rice[J]. *Plant Cell and Environment*, 2015, 38(12): 2766–2779.