

· 研究报告 ·

水稻响应缺铁的韧皮部汁液蛋白质组学分析

陈琳, 林焱, 陈鹏飞, 王绍华, 丁艳锋*

南京农业大学农学院, 南京 210095

摘要 为鉴定水稻(*Oryza sativa*)响应缺铁的根冠长距离信号转导物质, 采用TMT标记技术分析不同浓度铁处理下水稻韧皮部汁液的蛋白质组学变化, 共鉴定出206个差异蛋白, 其中54个蛋白表达丰度上调, 152个蛋白表达丰度下调。差异蛋白的KEGG通路分类主要包括激素信号代谢、谷胱甘肽代谢、碳代谢以及mRNA转运等代谢途径。此外, 对差异蛋白对应的生理指标进行测定, 发现激素、蔗糖、谷胱甘肽和转运蛋白等在缺铁条件下变化显著, 后续对这些差异蛋白的功能研究有助于揭示水稻响应铁素营养的长距离信号途径。

关键词 水稻, 缺铁, 韧皮部, 长距离信号, TMT

陈琳, 林焱, 陈鹏飞, 王绍华, 丁艳锋 (2019). 水稻响应缺铁的韧皮部汁液蛋白质组学分析. 植物学报 54, 194–207.

铁是植物生长必需的矿质营养。为适应低铁环境, 植物进化出2种不同的吸收机制: 还原途径(机理I)和螯合途径(机理II)。通过机理I吸收铁的植物(以下简称机理I植物)包括双子叶植物和非禾本科单子叶植物; 通过机理II吸收铁的植物(以下简称机理II植物)主要是禾本科植物。东京大学Nishizawa的研究发现, 机理II植物水稻(*Oryza sativa*)也能通过机理I的方式吸收铁(Ishimaru et al., 2006), 即水稻兼具2条途径进行铁的吸收, 该结论后经吴平教授实验室用突变体证实(Cheng et al., 2007)。

在感受到缺铁信号时, 机理I植物根部表皮会诱导产生3种反应: (1) H^+ -ATPase大量表达, 酸化根际土壤环境, 从而提高根际铁的有效性; (2) 铁还原酶FRO (ferric reductase oxidase)基因表达上调, 催化根表皮的三价铁($Fe(III)$)还原成二价铁($Fe(II)$); (3) $Fe(II)$ 的转运体IRT (iron-regulated transporter)表达上调, 将被FRO还原成的 $Fe(II)$ 转运入根部细胞(吴慧兰等, 2007)。该过程中的关键基因FRO (Robinson et al., 1999)和IRT (Eide et al., 1996)最早于20世纪90年代在拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)中克隆得到, 之后相继报道了它们在多种植物中的同源基因(Connolly et al., 2003; Ishimaru et al., 2007)。

与机理I方式不同, 水稻根部的铁还原酶活性较

低, 推测水稻可能直接通过OsIRT1转运吸收 $Fe(II)$ 。缺铁环境下, 水稻根中OsIRT1与OsIRT2高度表达(Ishimaru et al., 2006), 但并未发现FRO还原类基因或 $Fe(III)$ 还原酶活性增强, 可能是水稻处于淹水还原状态, 补偿了还原酶的作用, 使得 $Fe(II)$ 吸收途径成为水稻铁吸收的优势方式。

水稻的另一种铁吸收方式为螯合方式, 该吸收途径通过合成一种高亲和的与三价铁结合的物质——植物铁载体PS (phytosiderophore), 分泌到根际土壤环境中, 之后与 $Fe(III)$ 结合生成 $Fe(III)$ -PS复合体(Negishi et al., 2002)。同时, 植物表皮细胞质膜上的一种多肽转运体OPT (oligo-peptide transporter)家族成员YS (Yellow Stripe)转运体(Curie et al., 2001)可将上述根表皮细胞附近的 $Fe(III)$ -PS复合体跨膜转运到植物体内。OsYSL15是水稻吸收铁过程中 $Fe(III)$ -PS的主要转运体(Inoue et al., 2009; Lee et al., 2009), 其受缺铁诱导上调表达。

铁进入水稻根系后, 主要通过蒸腾作用和主动转运由地下向地上运输。铁在植物体内的运输一般以复合体的形式进行, 主要与柠檬酸(citrate) (Tiffin, 1966; Brown and Chaney, 1971)、尼克酰胺(NA) (Hell and Stephan, 2003; Takahashi et al., 2003)和麦根酸(MAs) (Aoyama et al., 2009; Kakei et al.,

收稿日期: 2018-08-28; 接受日期: 2019-01-11

基金项目: 江苏省自然科学基金(No.BK20160716)和江苏省现代作物生产协同创新中心

* 通讯作者。E-mail: dingyf@njau.edu.cn

2009)等结合。在木质部中, Fe(III)-柠檬酸是主要的运输形式。FRD3属于MATE家族成员, 定位于根质膜(Green and Rogers, 2004), 其主要功能是将根部的柠檬酸转运到地上木质部。水稻中有6个FRD3的同源基因, 敲除OsFRDL1会导致叶片失绿(Yokosho et al., 2009)。韧皮部中铁的螯合体主要是NA, NA不仅能够与Fe(II)络合, 也可以络合Fe(III) (von Wirén et al., 1999)。在韧皮部中, Fe-NA由YSL家族成员转运(Haydon and Cobbett, 2007; Curie et al., 2009)。水稻的YSL表达模式分析表明, 有些成员同时在地上部和地下部表达(如OsYSL6、OsYSL14和OsYSL16)。OsYSL2和OsYSL15受缺铁响应调控, OsYSL2转运Fe-NA, 而OsYSL15转运Fe-PS (Inoue et al., 2009)。

地上部到地下部的信号传递会影响植物对养分的吸收利用效率(Forde, 2002; Enomoto et al., 2007)。冠-根和根-冠组成长距离信号传递通道, 当根系感受到养分状况变化时, 会产生相应信号并通过木质部传输到地上部, 进而激发地上部产生信号并通过韧皮部传输到根系, 从而对植物根系生长进行反馈调节, 使植物对养分的吸收与地上部代谢相平衡(Vert et al., 2003; 熊长明等, 2014)。

Vert等(2003)在拟南芥中提出了2种与铁吸收相关的模型: 促进模型和抑制模型。促进模型指地上部产生的信号传到地下部, 诱导缺铁根系铁吸收相关基因的表达, 而在正常供铁情况下, 地上部并无信号传到地下部。与之相反的抑制模型是在铁正常供给情况下, 地上部会产生抑制信号并传输到地下部, 进而抑制根系对铁的吸收, 而缺铁时地上部则不产生信号。由此可见, 地上部长距离信号对植物缺铁响应有重要调控作用(Vert et al., 2003; Enomoto et al., 2007; García et al., 2013)。韧皮部是连接地上和地下部的重要维管组织, 不仅可以传递植物生长发育相关信息, 还可以运输相关同化产物。韧皮部汁液成分包括大分子糖、氨基酸、有机复合物、蛋白质、矿质元素以及一些信号分子, 如激素、系统伤流信号和小RNA等(Lucas et al., 2001, 2013), 这些物质参与多种胁迫(包括矿质元素缺乏)响应。

定量蛋白质组学主要是针对不同状态下蛋白质的表达丰度进行精确定量, 目前已成为常用的蛋白质研究方法。TMT (Tandem Mass Tags)是目前定量蛋

白质组学最常用的体外化学标记法之一。该技术采用10种同位素标签标记多肽的氨基基团, 经过液相-二级质谱联用分析, 可同时比较10组不同样品中蛋白质的相对含量。该技术标记效率高, 可有效节省标记分析所需的时间和成本。本研究通过EDTA法收集不同浓度铁处理的水稻韧皮部汁液, 采用TMT技术分析了韧皮部汁液蛋白质组差异, 初步鉴定出可能参与长距离信号转导的蛋白, 旨在为水稻植株缺铁长距离信号研究提供理论参考。

1 材料与方法

1.1 材料

实验于2016年在南京农业大学网室内进行, 设3次独立重复实验。供试材料为常规水稻(*Oryza sativa* L.)品种扬稻6号(Yangdao 6)。培养液采用国际水稻研究所吉田昌一的配方: 10 mg·L⁻¹ NaH₂PO₄·2H₂O、40 mg·L⁻¹ K₂SO₄、40 mg·L⁻¹ CaCl₂、40 mg·L⁻¹ MgSO₄·7H₂O、0.5 mg·L⁻¹ MnCl₂·4H₂O、0.05 mg·L⁻¹ (NH₄)₆Mo₇O₂₄·2H₂O、0.2 mg·L⁻¹ H₃BO₃、0.01 mg·L⁻¹ ZnSO₄·7H₂O、0.01 mg·L⁻¹ CuSO₄·5H₂O和5.8 mg·L⁻¹ FeCl₃, 用NH₄NO₃调节培养液中氮的浓度。

水稻幼苗培养3周后进行缺铁处理。设置正常供铁和缺铁处理(培养液中不加铁), 每3天更换1次营养液, 每天用1 mol·L⁻¹ HCl调节溶液pH至5.0±0.2。每个处理重复3次。缺铁处理3天后收集处理植株和对照植株的韧皮部汁液。

1.2 方法

1.2.1 韧皮部汁液提取

分别取缺铁处理和对照水稻幼苗500株作为1个生物学重复。剪去根系后于20 mmol·L⁻¹ EDTA溶液中震荡摇晃, 以除去破碎细胞的糖分; 然后用海绵将幼苗固定直立, 切口处浸没于盛有15 mL 20 mmol·L⁻¹ EDTA溶液的小烧杯中, 避光浸提10小时。获得水稻幼苗韧皮部浸出液, 于-70℃保存备用。

1.2.2 蛋白样品质检

对水稻蛋白浸出液进行超滤浓缩并使用蛋白裂解液进行溶液置换。然后使用BCA (bicinchoninic acid)定

量试剂盒,按照说明书配制BSA (Bovine Serum Albumin)标准蛋白溶液,浓度梯度依次为2.0、1.5、1.0、0.75、0.5、0.25、0.125、0.025和0 $\mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ 。将蛋白待测样品稀释不同倍数,使样品浓度分布于0.125–1.5 $\mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ 之间,用于定量检测。配制Reagent A和B的混合液(A:B=50:1,现用现配),避光保存。分别取不同浓度梯度的BSA标准蛋白溶液及不同稀释倍数的待测样品溶液加入96孔板中,每孔10 μL ,每个样品2孔,再分别加入200 μL Reagent A和B的混合液,轻轻混匀,37°C下避光孵育30分钟。然后晾至室温,562 nm波长条件下检测吸光度。计算标准品及样品两孔平均数值并减去各自的背景值,得到标准品及样品的校正值。以标准品校正值对浓度绘制标准曲线,代入标准曲线的拟合公式计算待测样品的蛋白浓度。取蛋白待测样品进行8%–17% SDS-PAGE梯度凝胶电泳。浓缩胶电压为80 V,电泳40分钟;分离胶电压为120 V,电泳120分钟。然后进行考马斯亮蓝R-250染色,脱色至条带清晰。

1.2.3 TMT标记全蛋白

各取100 μg 蛋白样品,加入终浓度为4 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的尿素、0.1% SDS (sodium dodecyl sulfate) 和45 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ TEAB (triethylammonium bicarbonate),用LC-MS级超纯水补足至100 μL 后置于冰上。加入5 μL 200 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ TCEP (Tris (2-carboxyethyl) phosphine),于55°C恒温金属浴中振荡,每分钟700转,反应1小时。反应结束后立即调节温度至25°C,加入5 μL 375 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 碘乙酰胺,于25°C金属浴中恒温振荡,每分钟700转,避光反应30分钟。反应结束后加入660 μL 丙酮(–20°C预冷),–20°C下沉淀过夜。4°C、10 000 $\times g$ 离心15分钟,移去丙酮,加入0.8 mL 90%丙酮(–20°C预冷)后涡旋振荡洗涤沉淀。4°C、10 000 $\times g$ 离心10分钟,移去丙酮,室温条件下沉淀风干。取100 μL 100 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ TEAB溶解沉淀蛋白,加入2.5 μL 1 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 胰酶,于37°C摇床中振荡酶切过夜。取41 μL 乙腈加至0.8 mg TMT10标记试剂中,涡旋振荡充分溶解。将过夜酶切样品于室温下10 000 $\times g$ 离心3分钟后取上清,加入41 μL TMT10标记试剂,于25°C金属浴中恒温振荡,每分钟700转,反应2小时。然后加入8 μL 5%羟氨,于25°C金属浴中恒温振荡,每分钟700转,反应15分钟,以终止标记反应。混

合标记后的样品用于C18色谱柱分级。

1.2.4 C18色谱柱样品分级

配制C18色谱缓冲液A液(2%乙腈, 98%水, pH10)和B液(90%乙腈, 10%水, pH10)。用A液平衡C18色谱柱25分钟,然后运行多肽测试品以确认高效液相系统和色谱柱状态良好。将合并的TMT标记后样品进行真空浓缩抽干,加入A液溶解,使用5% MS级氨水调pH值至10。室温下10 000 $\times g$ 离心5分钟,取上清进样。收集2–15分钟的流出液以及24–63分钟的分级组分,用1.5 mL eppendorf离心管每分钟收集1管组分。根据色谱图各时间收样的峰面积进行双收样合并,共形成20个峰面积近似的分级组分,然后将合并样品真空浓缩抽干。

1.2.5 质谱相对定量检测

配制液相色谱A液(99.9%水, 0.1%甲酸)和B液(99.9%乙腈, 0.1%甲酸)。分别取分级后的抽干样品加入上样缓冲液(95.9%水, 4%乙腈, 0.1%甲酸)充分溶解,室温下10 000 $\times g$ 离心5分钟,取约含1 μg 蛋白的上清进样到液质联用仪(NCS3500高效液相系统和Q Exactive质谱仪)进行样品检测。质谱全扫描范围 m/z 350–1 600;一级质谱分辨率为70 000 (200 m/z 处);二级质谱分辨率为35 000 (200 m/z 处);选择全扫描中离子强度TOP 20的母离子,采用HCD (Higher-energy Collision Dissociation)碎裂进行二级质谱序列测定,raw (原文件)生成质谱检测原始数据。

1.2.6 质谱数据分析

从NCBI (National Center for Biotechnology Information)数据库下载日本晴水稻(*Oryza sativa Japonica* Group)蛋白数据(RefSeq)用于质谱分析。将生成的质谱检测原始数据,用Proteome Discoverer软件(简称PD软件)在上述数据库中通过Sequest算法进行搜库计算。选用胰酶特异性酶切,最多允许2个漏切位点;设定Cys碘乙酰化和TMT修饰为固定修饰参数;设定甲硫氨酸氧化和磷酸化为可变修饰参数;母离子质量允许误差为15 ppm,子离子质量允许误差为0.02 Da。选择低于1% FDR (false discovery rate)条件下高度可信的多肽作为蛋白质定性鉴定的过滤参数,选择特异性多肽用于不同样品间蛋白质的相

对定量分析。

1.2.7 激素测定

称取0.5 g新鲜组织于预冷的研钵中, 加入5 mL预冷的50%色谱甲醇(v/v), 冰浴研磨至匀浆, 于4°C下浸提12小时, 4°C下8 000 ×g离心10分钟, 收集上清液并于4°C保存, 残渣中加入2 mL预冷的80%色谱甲醇, 于4°C下提取12小时, 离心后收集上清液, 再加2 mL 100%色谱甲醇重复提取2次, 合并全部上清液。在上清液中加入0.15 g PVPP (polyvinylpolypyrrolidone), 4°C下涡旋振荡60分钟, 使PVPP充分吸附色素和酚类物质, 同上离心。将上清液缓慢过Sep-Pak C18柱除杂, 再加入1 mL 40%色谱甲醇梯度洗脱, 收集洗脱液并用冷冻干燥机完全冻干, 取纯化后的激素样品用3 mL 100%色谱甲醇溶解, 过0.22 μm有机相超微滤膜后进样高效液相色谱仪进行测定。

1.3 数据分析

实验结果为3次独立实验的平均值。用Stata 12.0软件进行数据处理和统计分析。采用OriginPro 9.0软件绘图。

2 结果与讨论

2.1 缺铁对韧皮部汁液蛋白质组的影响

水稻植株缺铁处理3天后, 采用EDTA法从500株水稻幼苗中浸提韧皮部汁液, 最终浓缩为5 g·L⁻¹。采用TMT技术对缺铁和对照水稻植株韧皮部汁液的蛋白表达丰度进行分析, 共鉴定到5 652个蛋白, 其中可定量蛋白数量为5 476个。以差异倍数1.2倍以上且P-value<0.05为筛选条件, 缺铁和对照水稻植株相比共鉴定出206个差异蛋白, 其中54个蛋白丰度上调, 152个蛋白丰度下调。将差异蛋白对应基因进行GO功能分类, 其中191个差异蛋白被成功分类, 剩余15个差异蛋白未能匹配到GO数据库中, 功能未知。

差异蛋白功能主要可分为3个大类, 16个小类(图1)。其中, 参与生物学过程(biological process)、细胞组分(cellular component)、分子功能(molecular function)和未知功能(unknown function)的蛋白分别占6.3%、80.6%、5.8%和7.3%。在细胞组分相关蛋白质中, 占比最多的是与细胞器(organelle)、细胞(cell)

和细胞区域(cell part)功能相关的蛋白(数量均为53个)。

我们的前期研究表明, 水稻根系的缺铁响应受到地上部衍生的长距离信号调控(Chen et al., 2018a), 而长距离信号正是通过韧皮部传递至根系。因此, 有必要深入挖掘差异表达蛋白参与的代谢途径。依据差异蛋白对应基因所参与的代谢途径进行KEGG通路分析, 27个差异蛋白对应的基因被成功分类(表1)。其中4个蛋白参与激素信号转导, 3个参与碳代谢, 10个参与逆境与防御代谢, 1个参与氨基酸合成, 6个参与核糖体代谢, 3个参与mRNA转运和蛋白合成途径。

2.2 缺铁韧皮部汁液差异蛋白参与生理代谢途径分析

2.2.1 激素信号转导相关代谢

生长素原初响应基因主要分为3类: *Aux/IAAs*、*GH3s* (*Gretchen Hagen 3*)和*SAURs* (*Small Auxin Up RNAs*)。植物主要通过*GH3*调控体内生长素的动态平衡, *GH3*基因与植物响应环境胁迫密切相关(Hagen et al., 1988; Bao and Li, 2002), 且*GH3*基因的表达受植株体内生长素水平的影响。本研究中, 缺铁条件下水稻韧皮部中参与生长素信号转导的吲哚乙酸酰胺合成酶(indole-3-acetic acid-amido synthetase GH3.6)表达丰度下调(图2), 表明植株韧皮部中的生长素含量偏低。生长素主要在幼嫩组织(叶片)中合成, 然后转运至根系调控植物生长发育。缺铁条件下, 韧皮部中生长素含量降低, 导致从地上部向地下部转运的生长素减少。另外, 参与色氨酸生物合成的色氨酸合成酶(tryptophan synthase alpha chain)也下调表达。生长素的合成需要色氨酸参与, 其合成酶下调表达也表明生长素合成有所减弱。

蛋白激酶和蛋白磷酸酶(PPs)介导的可逆磷酸化是普遍存在于生物体内的信号转导机制。蛋白磷酸酶包括PP1、PP2A、PP2B和PP2C, PP2Cs是植物中最大的蛋白磷酸酶家族(Kerk et al., 2002)。在高等植物中, PP2C参与多种信号转导途径, 包括ABA、环境胁迫以及生长发育等(Tougane et al., 2010)。ABA信号转导途径主要有PP2Cs和SnRK2两种家族蛋白参与。ABA含量较高时, 其受体能够与PYR/PYL家族蛋白结合, 进而结合PP2Cs蛋白的催化位点, 抑制其活性; 相应地, SnRK2家族蛋白的活性得以激活, 从而

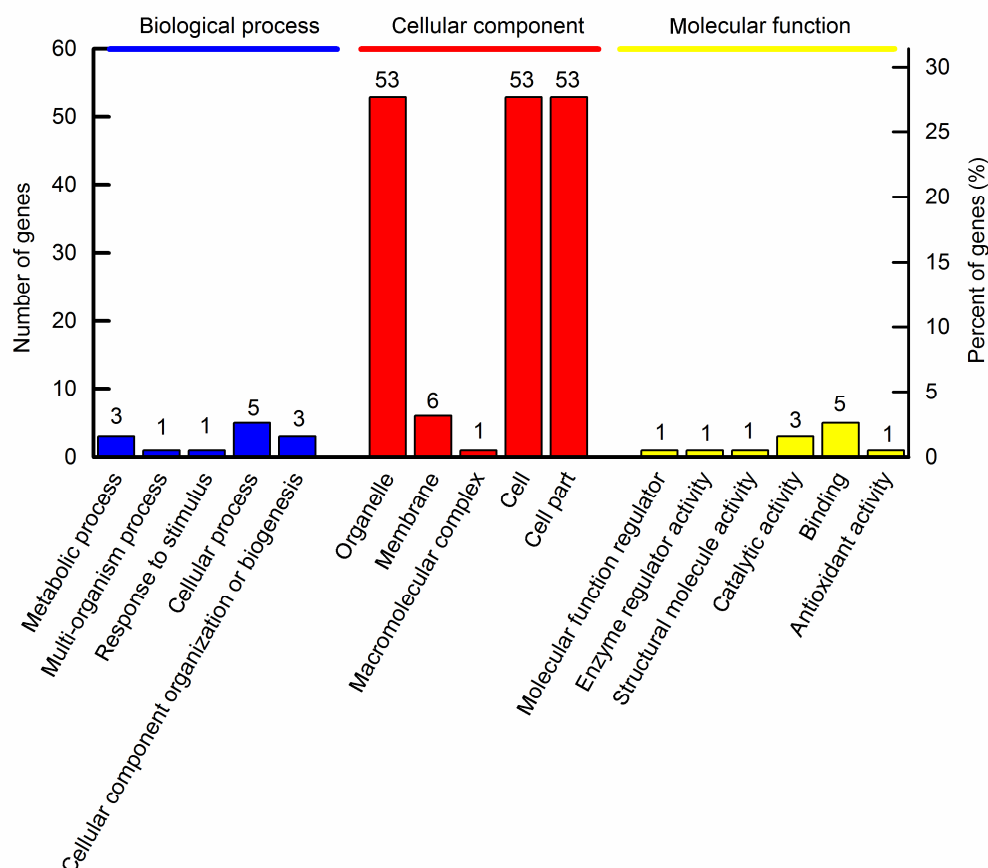


图1 水稻韧皮部汁液差异表达蛋白GO功能分类

Figure 1 Functional classification of the differentially expressed proteins of rice phloem sap via the Gene Ontology (GO) database

激活ABA信号途径(Soon et al., 2012)。本研究中, 缺铁条件下水稻韧皮部中参与脱落酸信号转导的蛋白磷酸酶(protein phosphatase 2C 30)表达丰度下调(图2), 表明韧皮部中ABA的含量可能增多, 且转运增强。ABA在植物面临高温和干旱等逆境时会被显著诱导, 是植物遭受逆境胁迫的重要标志之一。同样, 在植物面临缺铁胁迫时, 其内源ABA含量也可能激增。

植物体内的水杨酸主要受病害等逆境诱导。本研究中, 缺铁条件下参与水杨酸信号转导的蛋白NPR3表达丰度上调(图2), 表明缺铁激活了植株体内的防御系统。同时, 本研究表明水杨酸可能在调控水稻缺铁响应中也发挥作用, 但目前关于水杨酸参与植物缺铁响应的研究很少, 尚未形成结论。

赤霉素在调控植物茎秆伸长以及应对环境胁迫

等方面发挥重要作用。本研究中, 缺铁条件下水稻韧皮部汁液中受赤霉素调控的蛋白(gibberellin-regulated protein 5)表达丰度上调, 暗示赤霉素可能参与缺铁的根冠通讯过程。

图2表明, 缺铁条件下, 与激素相关的蛋白表达丰度发生了变化。我们进一步测定了缺铁后植株体内的相关激素含量(图3), 结果表明, 缺铁后地上部IAA含量增加(图3A), 根系的IAA含量减少(图3B); ABA含量在在地上部无明显变化(图3A), 在根系中增加, 但与对照相比差异不显著(图3B), GA₃在在地上部与根系中的含量均下降(图3A, B)。

2.2.2 碳代谢

碳代谢是植物体内重要的生理代谢过程, 与植株体内的能量供应密切相关。本研究中, 缺铁处理后在水稻

表1 缺铁处理下水稻韧皮部汁液差异表达蛋白KEGG通路分类

Table 1 Differentially expressed proteins in phloem exudates of rice under iron deficiency in KEGG pathway

Gene ID	Protein name	Unique peptides	FC (-Fe/+Fe)	P value
Plant hormone signal transduction				
4332374	Probable protein phosphatase 2C 30	1	0.81	0.01
4333666	Regulatory protein NPR3 isoform X2	1	1.45	0.01
4337780	Probable indole-3-acetic acid-amido synthetase GH3.6	1	0.83	0.03
4340712	Gibberellin-regulated protein 5	1	1.22	0.00
Carbon metabolism				
9268154	Malate synthase	12	0.77	0.03
4349723	Phosphoglycerate mutase-like protein 4	2	0.75	0.01
4345814	Alpha-amylase isozyme 3D	14	0.72	0.00
Stress and defense				
4332474	L-ascorbate peroxidase 1, cytosolic	10	0.64	0.00
4336627	Probable phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase	2	0.75	0.00
4330235	Probable phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase	2	0.82	0.00
4349585	Cationic peroxidase 1	2	0.52	0.00
4347962	Peroxidase A2 isoform X2	8	0.80	0.00
4337232	Peroxidase 4	2	0.68	0.02
4332928	Peroxidase 2	1	0.58	0.00
4332175	Peroxidase A2	2	0.76	0.01
4344277	Peroxidase 2-like	5	0.82	0.00
4328425	4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase	5	0.82	0.02
Biosynthesis of amino acids				
4342571	Tryptophan synthase alpha chain	1	0.79	0.05
Ribosome				
4325555	50S ribosomal protein L13, chloroplastic	2	1.26	0.00
4324671	40S ribosomal protein S24-1	1	1.21	0.04
4334651	50S ribosomal protein L18, chloroplastic	2	1.21	0.04
3131445	Ribosomal protein S7 (plastid)	2	1.21	0.00
4342697	40S ribosomal protein S15a-1	1	1.28	0.02
3131440	Ribosomal protein S18 (plastid)	1	0.74	0.01
mRNA surveillance pathway				
4347878	Polyadenylation and cleavage factor homolog 4	2	0.77	0.01
RNA transport				
4329091	Eukaryotic translation initiation factor 1A	3	0.79	0.01
4345498	ABC transporter A family member 7	1	1.40	0.00

韧皮部汁液中鉴定出3个参与碳代谢的差异表达蛋白, 分别是二羧酸代谢和丙酮酸代谢中的苹果酸合酶(malate synthase)、参与糖酵解和糖质新生的磷酸甘油酸变位酶(phosphoglycerate mutase-like protein 4), 以及参与淀粉和蔗糖代谢的 α -淀粉酶(alpha-amylase isozyme 3D), 这3个蛋白的表达丰度均下调(图4A), 表明碳代谢在水稻缺铁响应过程中起重要调控作用。

苹果酸合酶主要参与乙醛酸循环, 将植物细胞内

脂肪酸氧化分解生成的乙酰CoA进一步合成苹果酸、琥珀酸和乙醛酸。琥珀酸参与蔗糖的合成, 苹果酸合酶表达丰度下调表明苹果酸和琥珀酸等合成下降, 对蔗糖的合成可能也有一定的抑制作用。磷酸甘油酸变位酶是糖酵解过程中的关键酶, 催化3-磷酸甘油酸和2-磷酸甘油酸的相互转换, 与碳水化合物转运、新陈代谢、催化活性及生长发育密切相关。 α -淀粉酶是水解淀粉的关键酶, 可将淀粉水解为糊精, 其表达丰度下调可能暗示着淀粉积累。

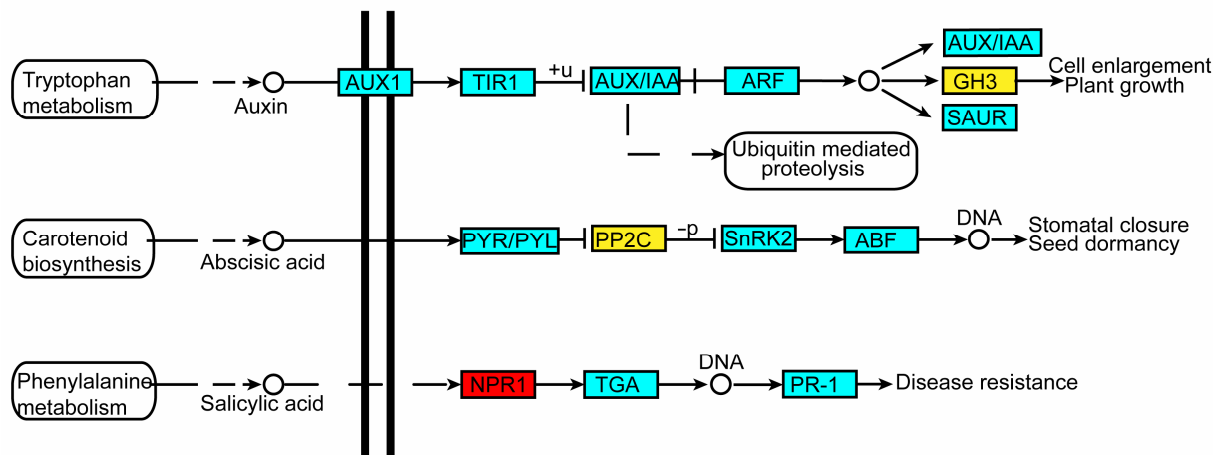


图2 缺铁条件下水稻韧皮部激素信号转导变化示意图
红色表示蛋白丰度上调, 黄色表示蛋白丰度下调。实线表示直接作用, 虚线表示中间有省略过程。箭头表示促进作用(正效应), 短竖线表示抑制作用(负效应)。

Figure 2 Schematic representation of plant hormone signal transduction in phloem of rice under iron deficiency
Red represents an increase of protein expression abundance, and yellow represents a decrease. The solid lines indicate direct action and the dotted lines indicate omission process. The arrows mean a positive effect and the short vertical lines mean inhibited effect.

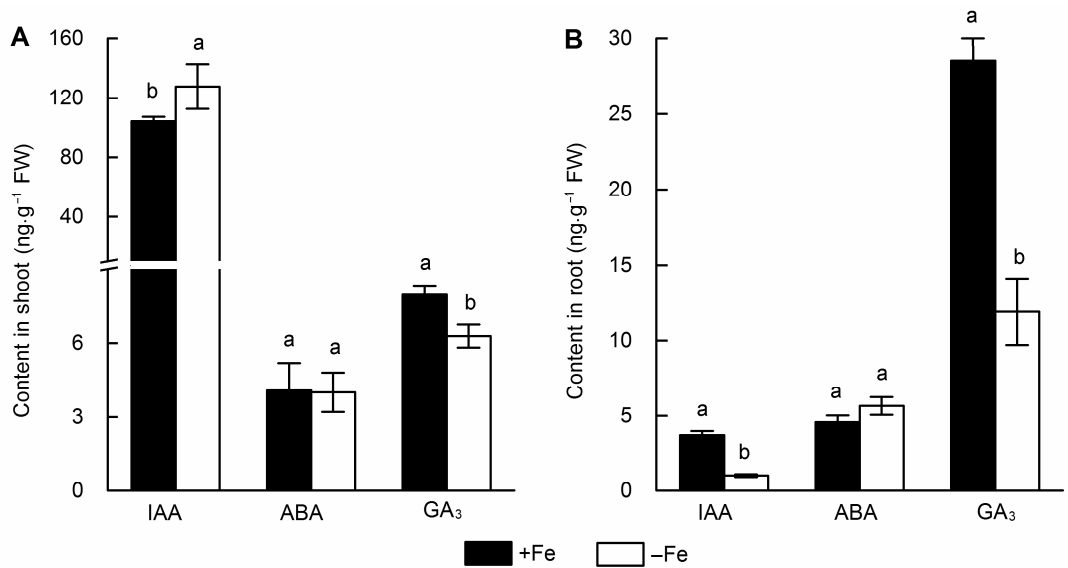


图3 缺铁处理3天后水稻地上部(A)和根系(B)激素含量变化
不同小写字母表示缺铁(-Fe)和对照(+Fe)之间差异显著。

Figure 3 The hormone content in rice shoots (A) and roots (B) after three days of iron deficiency treatment
Different lowercase letters indicate significant differences between iron deficiency (-Fe) and the control (+Fe).

2.2.3 逆境与防卫相关代谢

植物在遭受逆境胁迫时, 体内的氧化还原系统会被破坏, 从而积累大量的自由基, 不利于植物正常的生长发育。ASA-GSH循环(抗坏血酸-谷胱甘肽循环)则能有效清除体内过量的自由基, 维持细胞内环境氧化还

原稳态。本研究中, 缺铁条件下, 水稻韧皮部中参与谷胱甘肽代谢的谷胱甘肽过氧化物酶(phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase)和抗坏血酸过氧化物酶(L-ascorbate peroxidase 1, cytosolic)均下调表达(图4B), 这暗示还原型谷胱甘肽(GSH)和抗

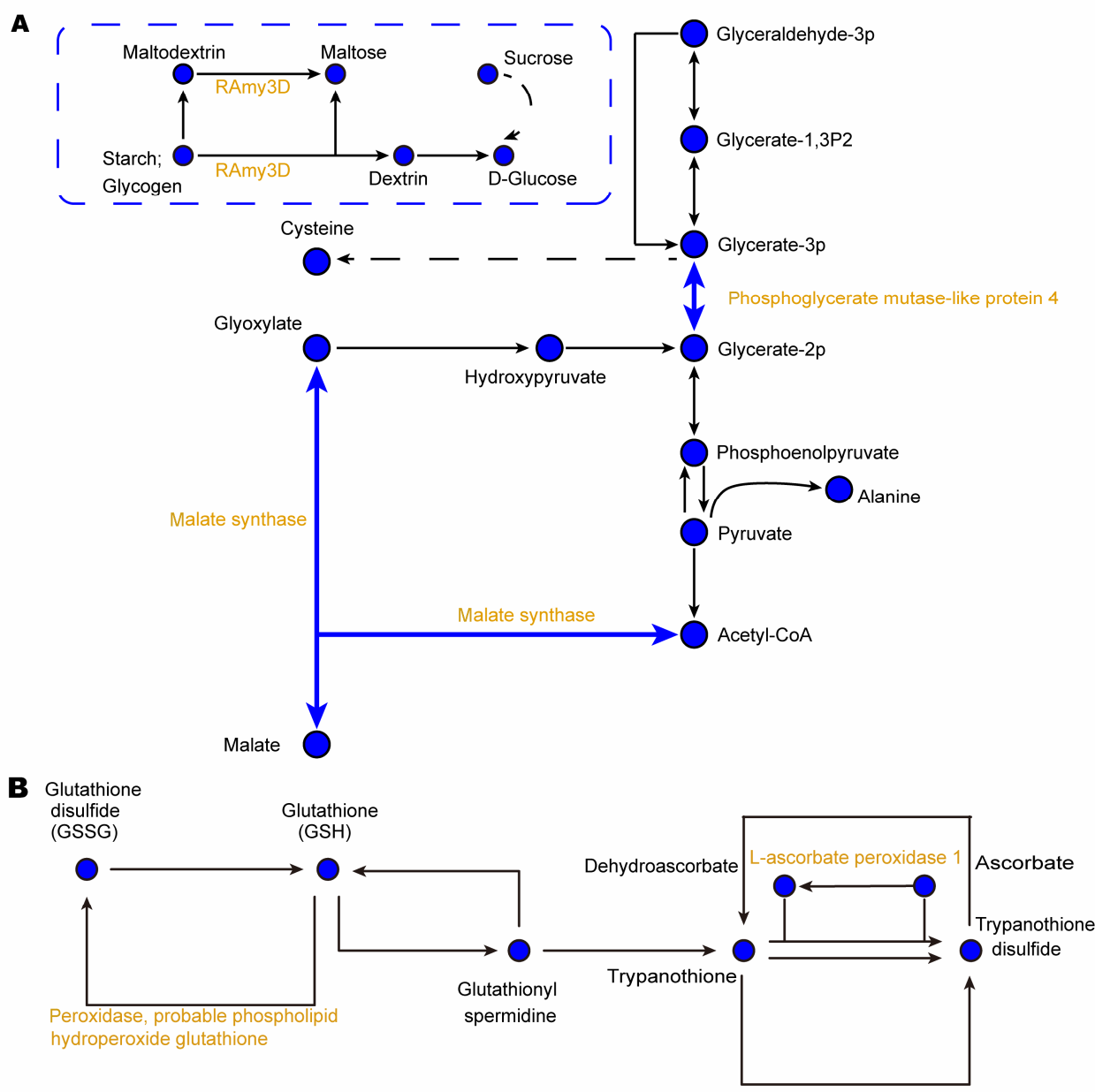


图4 缺铁条件下水稻韧皮部汁液碳代谢(A)和谷胱甘肽代谢(B)相关蛋白质丰度变化示意图
黄色表示蛋白丰度下调。实线表示直接作用，虚线表示中间有省略过程。箭头表示促进作用(正效应)。

Figure 4 Metabolic pathways of carbon (A) and glutathione (B) related proteins in phloem exudates of rice under iron deficiency
Yellow represents a decrease of protein expression abundance. The solid lines indicate direct action and the dotted lines indicate omission process. The arrows mean a positive effect.

坏血酸积累。铁是过氧化物酶的重要组分，缺铁会导致谷胱甘肽过氧化物酶和抗坏血酸过氧化物酶表达丰度下调。

此外，缺铁条件下，水稻韧皮部中过氧化物酶相关蛋白(cationic peroxidase 1、peroxidase A2 isoform

X2、peroxidase 2、peroxidase 4、peroxidase A2和 peroxidase 2-like)表达丰度均下调。过氧化物酶活性可作为衡量植物铁营养状况的指标(Agarwala et al., 1961)。邹春琴等(1998)认为，禾本科单子叶植物的过氧化物酶活性与全铁含量显著相关，且地上部POD活

性与铁营养状况之间相关性很强(傅友强等, 2011)。

质体醌和维生素E生物合成途径的关键步骤由4-羟基苯基丙酮酸双加氧酶(4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase, HPPD)催化, 目前已在胡萝卜(*Daucus carota*)、拟南芥和大麦(*Hordeum vulgare*)等植物中鉴定出HPPD基因(Falka et al., 2003)。研究表明, 在拟南芥中过表达hppd基因使其种子和叶片中的生育酚含量增加(Yoseph et al., 2002)。质体醌参与光合作用过程中光反应的电子传递。缺铁水稻植株韧皮部汁液中, 4-羟基苯基丙酮酸双加氧酶蛋白丰度下调, 水稻维生素E的含量也减少, 光合系统被破坏。前期的研究表明, 缺铁后水稻植株的光合速率显著下降(Chen et al., 2018b), 推测可能是缺铁使光反应效率降低, 最终导致光合速率下降。

2.2.4 转运合成相关代谢

ATP结合盒式蛋白(ATP-binding cassette transporter, ABC)是以ATP水解释放的能量为能源进行主动转运的载体蛋白家族。ABCA7 (ABC transporter A family member 7)是ABC转运蛋白基因超家族成员, 利用ATP水解的能量在细胞脂质膜和细胞内细胞器膜上主动运输一系列底物(Dean et al., 2001; Vasiliou et al., 2009; Tanaka et al., 2010)。本研究中, ABCA7蛋白表达丰度上调, 表明铁离子的转运增强。对缺铁处理3天后铁吸收转运相关基因的表达水平进行测定, 发现参与还原途径的基因OsIRT1几乎不被诱导, 而参与螯合途径的OsYSL5、OsNAS1和OsNAS2基因表达被显著诱导(图5A), 地上部铁转运相关基因(OsYSL2和OsNAS1)的表达也被显著诱导(图5B), 表明铁的转运增加。此外, 参与蛋白质合成和核糖体代谢的相关蛋白表达丰度也发生变化(表1), 表明缺铁会影响水稻植株mRNA的转录及翻译过程, 但该结论有待进一步实验验证。

2.3 讨论

长距离调节一直是植物营养学的研究热点, 但是其长距离反馈调控机制并不清楚。嫁接和分根实验是研究长距离信号的常用手段。已有研究显示, 将拟南芥根分开, 一部分放入NO₃⁻饥饿处理, 另一部分正常供氮, 发现正常供氮的根系中AtNRT2.1转录水平上调(Mol et al., 1994), 表明植物营养的长距离运输是客

观存在的。但信号物质如何进行调控, 以及与地上部是否相关目前还不清楚。前期我们通过分根和去除地上部实验验证了水稻缺铁后, 长距离运输信号客观存在, 并且该信号强度与地上部功能叶相关。缺铁条件下, 水稻地上部会产生信号物质并通过韧皮部传输到根系, 进一步调控与铁吸收相关的标志基因, 从而调节铁的代谢平衡(Chen et al., 2018a)。

植物韧皮部中的物质转运是地上部与根系之间物质运输的重要通道。本研究通过对水稻缺铁条件下韧皮部汁液中差异蛋白参与的代谢途径进行分析, 提出了多种物质作为调控水稻缺铁长距离信号分子的可能性, 包括生长素、脱落酸、赤霉素、蔗糖、谷胱甘肽和转运蛋白等, 研究结果将为揭示植物响应缺铁的调控机制提供更多信息。

2.3.1 激素作为水稻缺铁长距离信号的可能性

2.3.1.1 生长素

生长素(IAA)作为调控植物生长的重要激素, 对植物形态的塑造有重要作用。当水稻面临缺铁胁迫时, 植株根系伸长、根毛增多, 以增强对环境中铁的吸收, 而地上部生长则减慢以降低植株自身对铁的需求, 这些变化都需要生长素参与。已在拟南芥中证实缺铁会导致生长素含量升高, 并诱导拟南芥铁吸收相关基因(FRO2)表达上调(Hindt and Gueriot, 2012)。此外, 生长素也被报道参与水稻缺铁响应, 生长素响应因子OsARF12参与水稻缺铁信号转导(Qi et al., 2012); 外源生长素处理会上调水稻植株地上部缺铁响应基因的表达, 而外源施用生长素抑制剂则会有相反的效果(Liu et al., 2015)。本研究表明, 缺铁处理后地上部生长素积累增多而根系积累减少(图3), 推测可能是缺铁后水稻植株生长素的转运受到抑制, 即从地上部向地下部转运减少, 从而诱导根系响应缺铁。

2.3.1.2 脱落酸

脱落酸(ABA)在植物胁迫响应中扮演重要角色。研究表明, 铁毒害下, ABA参与水稻铁蛋白合成, 但外源ABA并不影响缺铁条件下水稻铁蛋白的积累(Majerus et al., 2009)。此外, 在拟南芥中, ABA可通过促进铁从根系向地上部转运和再分配来激活缺铁响应。具体表现为缺铁会诱导拟南芥根系ABA的积累, 外源ABA也会促进铁向地上部转运, 从而减缓叶片萎黄症

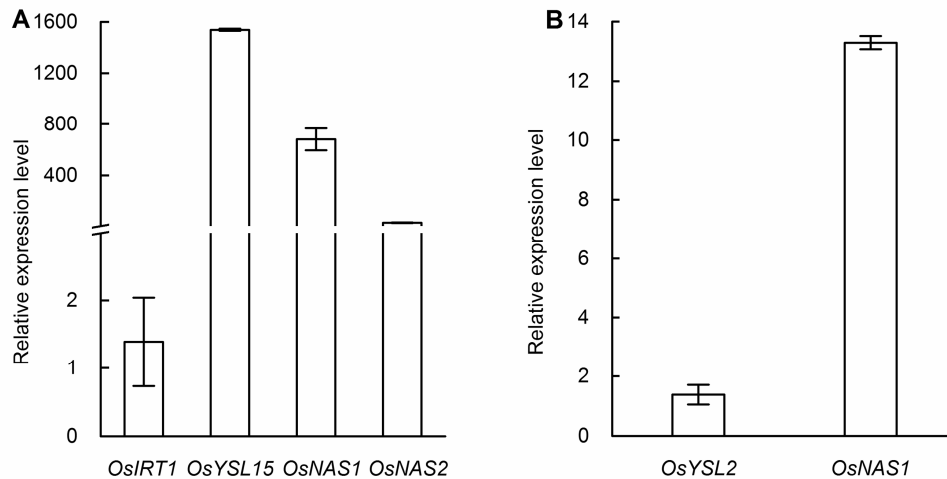


图5 水稻缺铁处理3天后根系*OsIRT1*、*OsYSL15*、*OsNAS1*和*OsNAS2* (**A**)以及地上部*OsYSL2*和*OsNAS1* (**B**)相对表达水平。柱形图代表缺铁与对照基因相对表达量的比值。

Figure 5 The relative expression levels of *OsIRT1*, *OsYSL15*, *OsNAS1* and *OsNAS2* in root (**A**) and the relative expression levels of *OsYSL2* and *OsNAS1* in shoot (**B**) after three days of iron deficiency treatment.

The column diagram represents the relative gene expression level ratio of iron deficiency induced to the control.

状(Lei et al., 2014)。本研究表明, 缺铁会促进水稻根系ABA的积累(图3), 而韧皮部中与ABA信号转导相关的蛋白表达水平发生变化也进一步支持了我们的推测。将根系或老叶中的养分再分配是植物应对养分胁迫的一种策略, 尤其对于易移动的营养元素, 如氮、磷、钾。铁在植物体内转移性较差, 因此, 根系铁的积累远高于地上部。缺铁时, 植物将根系中的铁转移到地上部进行再分配对调控水稻籽粒中铁的富集具有一定意义, 而ABA在水稻中是否也促进铁转运尚待深入研究。

2.3.1.3 赤霉素

赤霉素是一种多功能的植物激素, 不仅参与拟南芥的缺磷响应(Jiang et al., 2007), 而且在缺铁响应中也扮演重要角色。例如, 缺铁条件下, 对赤霉素缺失的拟南芥突变体进行外源赤霉素处理后, 参与缺铁响应的基因上调表达(Matsuoka et al., 2014)。在水稻中, 赤霉素通过调控*OsYSL2*的表达抑制铁向地上部转运和再分配过程。缺铁会导致水稻植株体内赤霉素含量和活性降低, 外源喷施赤霉素抑制铁向地上部转运(Wang et al., 2017)。本研究中, 缺铁水稻植株地上与地下部赤霉素含量均下降, 与前人研究结果一致。同时, 水稻韧皮部中赤霉素调控的蛋白表达丰度发生变化, 表明赤霉素信号可能参与水稻响应缺铁过程。

2.3.2 蔗糖作为水稻缺铁长距离信号的可能性

α -淀粉酶蛋白RAmy3D主要参与淀粉分解过程。缺铁条件下, 水稻韧皮部汁液中的淀粉分解蛋白表达丰度下调, 表明缺铁时淀粉分解能力下降, 而植株体内的淀粉积累。苹果酸合酶主要参与乙醛酸循环, 可将植物细胞内脂肪酸氧化分解生成的乙酰辅酶A进一步合成苹果酸、琥珀酸和乙醛酸。其中, 琥珀酸可用于糖的合成过程。苹果酸合酶表达丰度下调意味着苹果酸和琥珀酸等合成下降, 同时, 对蔗糖的合成可能也有一定的抑制作用。我们前期研究表明, 缺铁水稻植株韧皮部和地下部蔗糖含量减少, 地上部叶片蔗糖积累, 暗示蔗糖向根系的转运能力下降, 且叶片的叶绿素含量降低滞后于蔗糖含量变化, 因此, 蔗糖可能作为长距离信号调控水稻植株对缺铁响应(Chen et al., 2018b)。本研究中, 缺铁条件下水稻叶片蔗糖积累, 反馈抑制光合作用, 且与蔗糖合成相关的蛋白丰度出现下调, 表明蔗糖向地下部运输受到抑制。

2.3.3 谷胱甘肽作为水稻缺铁长距离信号的可能性

谷胱甘肽的积累受到多种生物和非生物胁迫的诱导。拟南芥谷胱甘肽缺失突变体的根系缺铁响应受到抑制, 铁从地下部向地上部转运也减弱(Shanmugam et al., 2015)。禾本科作物中谷胱甘肽还原酶(GR, 催

化氧化型谷胱甘肽成还原型谷胱甘肽)的表达量和活性也会被缺铁进一步诱导(Bashir et al., 2007)。NO作为调控机理I植物缺铁响应的关键信号分子,它的合成依赖谷胱甘肽。研究表明,拟南芥中NO调控缺铁响应需要植株体内谷胱甘肽达到特定水平,这也暗示谷胱甘肽在缺铁响应中的重要性。同时,谷胱甘肽可以维持NO的稳定性并促进其积累,使其更高效地发挥作用。本研究表明,缺铁后参与谷胱甘肽代谢的一些关键酶活性发生变化,暗示谷胱甘肽可能作为调控水稻缺铁响应的长距离信号。谷胱甘肽和NO协同调控拟南芥缺铁响应,但是否也同样参与调控水稻的缺铁响应?以及是否是调控水稻缺铁响应的长距离信号之一?这些问题都亟待进一步的实验验证。

2.3.4 转运蛋白作为水稻缺铁长距离信号的可能性

ABC转运体参与植物的多种生理代谢过程,主要利用ATP水解的能量转运金属离子等相关物质,以及参与非生物胁迫反应和矿质元素缺乏等生理过程。前人研究表明,ABC转运体的转运底物包括无机离子、金属离子、肽、疏水化合物、核苷和糖(Vasiliou et al., 2009)。水稻中ABC家族的16个基因在矿质营养(包括镉和铁)缺乏情况下上调或下调表达(Nguyen et al., 2014)。我们前期研究表明,缺铁水稻叶片和根系中,与能量相关的蛋白代谢(如ATP合成、糖酵解和三羧酸循环)有所上调(Chen et al., 2015)。这与拟南芥和甜菜(*Beta vulgaris*)缺铁处理后的组学研究结果一致,缺铁的甜菜中ATP含量是对照根系的5倍(López-Millán et al., 2000; Thimm et al., 2001);同样在番茄(*Lycopersicon esculentum*)根中,其ATP合成酶在缺铁时表达丰度显著上调(Li et al., 2008)。在黄瓜(*Cucumis sativus*)中,缺铁会诱导储存的碳水化合物分解生成NADPH、ATP和磷酸丙酮酸等能量物质(Espen et al., 2000)。产生的能量物质将被卡尔文循环和糖酵解途径利用来补偿因光合下降而减少的能量物质。本研究中,缺铁水稻韧皮部汁液中的ABCA7蛋白丰度上调,可能是由于缺铁后水稻ATP含量增加,为ABCA7蛋白提供了充分的能量转运底物,最终导致铁离子的转运增强。缺铁条件下,植株从环境中吸收的铁减少,可能通过增加植株内储存的铁再分配来维持其正常生理代谢功能。缺铁后,水稻地上部与地下部铁吸收转运相关的基因显著上调表达,也进

一步验证了地上部铁转运再分配能力增强。近期,也有研究表明,拟南芥中ABC转运体可以通过调控根系铁的富集来调节缺磷响应(Dong et al., 2017),而ABC转运体在缺铁水稻植株中的功能还有待进一步探索。

参考文献

- 傅友强, 梁建平, 于智卫, 吴道铭, 蔡昆争, 沈宏 (2011). 不同铁形态对水稻根表铁膜及铁吸收的影响. 植物营养与肥料学报 17, 1050–1057.
- 吴慧兰, 王宁, 凌宏清 (2007). 植物铁吸收、转运和调控的分子机制研究进展. 植物学通报 24, 779–788.
- 熊长明, 王晔, 田晓莉 (2014). 植物矿质养分吸收的长距离反馈调节研究进展. 植物营养与肥料学报 20, 737–746.
- 邹春琴, 陈新平, 张福锁, 毛达如 (1998). 活性铁作为植物铁营养状况诊断指标的相关研究. 植物营养与肥料学报 4, 399–406.
- Agarwala SC, Sharma CP (1961). The relation of iron supply to the tissue concentration of iron, chlorophyll and catalase in barley plants grown in sand culture. *Physiol Plant* 14, 275–283.
- Aoyama T, Kobayashi T, Takahashi M, Nagasaka S, Usuda K, Kakei Y, Ishimaru Y, Nakanishi H, Mori S, Nishizawa NK (2009). OsYSL18 is a rice iron(III)-deoxymugineic acid transporter specifically expressed in reproductive organs and phloem of lamina joints. *Plant Mol Biol* 70, 681–692.
- Bao F, Li JY (2002). Evidence that the auxin signaling pathway interacts with plant stress response. *Acta Bot Sin* 44, 532–536.
- Bashir K, Nagasaka S, Itai RN, Kobayashi T, Takahashi M, Nakanishi H, Mori S, Nishizawa NK (2007). Expression and enzyme activity of glutathione reductase is upregulated by Fe-deficiency in graminaceous plants. *Plant Mol Biol* 65, 277–284.
- Brown JC, Chaney RL (1971). Effect of iron on the transport of citrate into the xylem of soybeans and tomatoes. *Plant Physiol* 47, 836–840.
- Chen L, Ding CQ, Zhao XF, Xu JX, Mohammad AA, Wang SH, Ding YF (2015). Differential regulation of proteins in rice (*Oryza sativa* L.) under iron deficiency. *Plant Cell Rep* 34, 83–96.
- Chen L, Wang GP, Chen PF, Zhu HL, Wang SH, Ding YF (2018a). Shoot-root communication plays a key role in physiological alterations of rice (*Oryza sativa*) under iron

- deficiency. *Front Plant Sci* **9**, 757.
- Chen PF, Chen L, Jiang ZR, Wang GP, Wang SH, Ding YF** (2018b). Sucrose is involved in the regulation of iron deficiency responses in rice (*Oryza sativa* L.). *Plant Cell Rep* **37**, 789–798.
- Cheng LJ, Wang F, Shou HX, Huang FL, Zheng LQ, He F, Li JH, Zhao FJ, Ueno D, Ma JF, Wu P** (2007). Mutation in nicotianamine aminotransferase stimulated the Fe(II) acquisition system and led to iron accumulation in rice. *Plant Physiol* **145**, 1647–1657.
- Connolly EL, Campbell N, Grotz N, Prichard CL, Guerinot ML** (2003). Overexpression of the FRO2 iron reductase confers tolerance to growth on low iron and uncovers post-transcriptional control. *Plant Physiol* **133**, 1102–1110.
- Curie C, Cassin G, Couch D, Divol F, Higuchi K, Jean ML, Misson J, Schikora A, Czernic P, Mari S** (2009). Metal movement within the plant: contribution of nicotianamine and yellow stripe 1-like transporters. *Ann Bot* **103**, 1–11.
- Curie C, Panaviene Z, Loulergue C, Dellaporta SL, Briat JF, Walker EL** (2001). Maize *yellow stripe1* encodes a membrane protein directly involved in Fe(III) uptake. *Nature* **409**, 346–349.
- Dean M, Hamon Y, Chimini G** (2001). The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily. *J Lipid Res* **42**, 1007–1017.
- Dong J, Piñeros MA, Li X, Yang H, Liu Y, Murphy AS, Kochian LV, Liu D** (2017). An Arabidopsis ABC transporter mediates phosphate deficiency-induced remodeling of root architecture by modulating iron homeostasis in roots. *Mol Plant* **10**, 244–259.
- Eide D, Broderius M, Fett J, Guerinot ML** (1996). A novel iron-regulated metal transporter from plants identified by functional expression in yeast. *Proc Natl Acad Sci USA* **93**, 5624–5628.
- Enomoto Y, Hodoshima H, Shimada H, Shoji K, Yoshihara T, Goto F** (2007). Long-distance signals positively regulate the expression of iron uptake genes in tobacco roots. *Planta* **227**, 81–89.
- Espen L, Dell'Orto M, Nisi PD, Zocchi G** (2000). Metabolic responses in cucumber (*Cucumis sativus* L.) roots under Fe-deficiency: a ³¹P-nuclear magnetic resonance *in-vivo* study. *Planta* **210**, 985–992.
- Falka J, Andersena G, Kernebeck B, Krupinskaa K** (2003). Constitutive overexpression of barley 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase in tobacco results in elevation of the vitamin E content in seeds but not in leaves. *FEBS Lett* **540**, 35–40.
- Forde BG** (2002). The role of long-distance signaling in plant responses to nitrate and other nutrients. *J Exp Bot* **53**, 39–43.
- García MJ, Romera FJ, Stacey MG, Stacey G, Villar E, Alcántara E, Pérez-Vicente R** (2013). Shoot to root communication is necessary to control the expression of iron-acquisition genes in Strategy I plants. *Planta* **237**, 65–75.
- Green LS, Rogers EE** (2004). *FRD3* controls iron localization in Arabidopsis. *Plant Physiol* **136**, 2523–2531.
- Hagen G, Uhrhammer N, Guilfoyle TJ** (1988). Regulation of expression of an auxin-induced soybean sequence by cadmium. *J Biol Chem* **263**, 6442–6446.
- Haydon MJ, Cobbett CS** (2007). Transporters of ligands for essential metal ions in plants. *New Phytol* **174**, 499–506.
- Hell R, Stephan UW** (2003). Iron uptake, trafficking and homeostasis in plants. *Planta* **216**, 541–551.
- Hindt MN, Guerinot ML** (2012). Getting a sense for signals: regulation of the plant iron deficiency response. *Biochim Biophys Acta* **1823**, 1521–1530.
- Inoue H, Kobayashi T, Nozoye T, Takahashi M, Kakei Y, Suzuki K, Nakazono M, Nakanishi H, Mori S, Nishizawa NK** (2009). Rice OsYSL15 is an iron-regulated iron(III)-deoxymugineic acid transporter expressed in the roots and is essential for iron uptake in early growth of the seedlings. *J Biol Chem* **284**, 3470–3479.
- Ishimaru Y, Kim SA, Tsukamoto T, Oki H, Kobayashi T, Watanabe S, Matsuhashi S, Takahashi M, Nakanishi H, Mori S, Nishizawa NK** (2007). Mutational reconstructed ferric chelate reductase confers enhanced tolerance in rice to iron deficiency in calcareous soil. *Proc Natl Acad Sci USA* **104**, 7373–7378.
- Ishimaru Y, Suzuki M, Tsukamoto T, Suzuki K, Nakazono M, Kobayashi T, Wada Y, Watanabe S, Matsuhashi S, Takahashi M, Nakanishi H, Mori S, Nishizawa NK** (2006). Rice plants take up iron as an Fe³⁺-phytosiderophore and as Fe²⁺. *Plant J* **45**, 335–346.
- Jiang CF, Gao XH, Liao LL, Harberd NP, Fu XD** (2007). Phosphate starvation root architecture and anthocyanin accumulation responses are modulated by the gibberellin-DELLA signaling pathway in Arabidopsis. *Plant Physiol* **145**, 1460–1470.
- Kakei Y, Yamaguchi I, Kobayashi T, Takahashi M, Nakanishi H, Yamakawa T, Nishizawa NK** (2009). A highly sensitive, quick and simple quantification method for nicotianamine and 2'-deoxymugineic acid from minimum samples using LC/ESI-TOF-MS achieves functional analysis of

- these components in plants. *Plant Cell Physiol* **50**, 1988–1993.
- Kerk D, Bulgrien J, Smith DW, Barsam B, Veretnik S, Gribskov M (2002). The complement of protein phosphatase catalytic subunits encoded in the genome of Arabidopsis. *Plant Physiol* **129**, 908–925.
- Lee S, Chiecko JC, Kim SA, Walker EL, Lee Y, Guerinot ML, An G (2009). Disruption of OsYSL15 leads to iron inefficiency in rice plants. *Plant Physiol* **150**, 786–800.
- Lei GJ, Zhu XF, Wang ZW, Dong F, Dong NY, Zheng SJ (2014). Absciscic acid alleviates iron deficiency by promoting root iron reutilization and transport from root to shoot in Arabidopsis. *Plant Cell Environ* **37**, 852–863.
- Li J, Wu XD, Hao ST, Wang XJ, Ling HQ (2008). Proteomic response to iron deficiency in tomato root. *Proteomics* **8**, 2299–2311.
- Liu KD, Yue RQ, Yuan CC, Liu JX, Zhang L, Sun T, Yang YJ, Tie SG, Shen CJ (2015). Auxin signaling is involved in iron deficiency-induced photosynthetic inhibition and shoot growth defect in rice (*Oryza sativa* L.). *J Plant Biol* **58**, 391–401.
- López-Millán AF, Morales F, Andaluz S, Gogorcena Y, Abadía A, De Las Rivas J, Abadía J (2000). Responses of sugar beet roots to iron deficiency. Changes in carbon assimilation and oxygen use. *Plant Physiol* **124**, 885–897.
- Lucas WJ, Groover A, Lichtenberger R, Furuta K, Yadav SR, Helariutta Y, He XQ, Fukuda H, Kang JL, Brady SM, Patrick JW, Sperry J, Yoshida A, López-Millán AF, Grusak MA, Kachroo P (2013). The plant vascular system: evolution, development and functions. *J Integr Plant Biol* **55**, 294–388.
- Lucas WJ, Yoo BC, Kragler F (2001). RNA as a long-distance information macromolecule in plants. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2**, 849–857.
- Majerus V, Bertin P, Lutts S (2009). Absciscic acid and oxidative stress implications in overall ferritin synthesis by African rice (*Oryza glaberrima* Steud.) seedlings exposed to short term iron toxicity. *Plant Soil* **324**, 253–265.
- Matsuoka K, Furukawa J, Bidadi H, Asahina M, Yamaguchi S, Satoh S (2014). Gibberellin-induced expression of Fe uptake-related genes in Arabidopsis. *Plant Cell Physiol* **55**, 87–98.
- Mol PC, Park HM, Mullins JT, Cabib E (1994). A GTP-binding protein regulates the activity of (1→3)- β -glucan synthase, an enzyme directly involved in yeast cell wall morphogenesis. *J Biol Chem* **269**, 31267–31274.
- Negishi T, Nakanishi H, Yazaki J, Kishimoto N, Fujii F, Shimbo K, Yamamoto K, Sakata K, Sasaki T, Kikuchi S, Mori S, Nishizawa NK (2002). cDNA microarray analysis of gene expression during Fe-deficiency stress in barley suggests that polar transport of vesicles is implicated in phytosiderophore secretion in Fe-deficient barley roots. *Plant J* **30**, 83–94.
- Nguyen VNT, Moon S, Jung KH (2014). Genome-wide expression analysis of rice ABC transporter family across spatio-temporal samples and in response to abiotic stresses. *J Plant Physiol* **171**, 1276–1288.
- Qi YH, Wang SK, Shen CJ, Zhang SN, Chen Y, Xu YX, Liu Y, Wu YR, Jiang DA (2012). OsARF12, a transcription activator on auxin response gene, regulates root elongation and affects iron accumulation in rice (*Oryza sativa*). *New Phytol* **193**, 109–120.
- Robinson NJ, Procter CM, Connolly EL, Guerinot ML (1999). A ferric-chelate reductase for iron uptake from soils. *Nature* **397**, 694–697.
- Shanmugam V, Wang YW, Tsednee M, Karunakaran K, Yeh KC (2015). Glutathione plays an essential role in nitric oxide-mediated iron-deficiency signaling and iron-deficiency tolerance in Arabidopsis. *Plant J* **84**, 464–477.
- Soon FF, Ng LM, Zhou XE, West GM, Kovach A, Tan MHE, Suino-Powell KM, He YZ, Xu Y, Chalmers MJ, Brunzelle JS, Zhang HM, Yang HY, Jiang HL, Li J, Yong EL, Cutler S, Zhu JK, Griffin PR, Melcher K, Xu HE (2012). Molecular mimicry regulates ABA signaling by SnRK2 kinases and PP2C phosphatases. *Science* **335**, 85–88.
- Takahashi M, Terada Y, Nakai I, Nakanishi H, Yoshimura E, Mori S, Nishizawa NK (2003). Role of nicotianamine in the intracellular delivery of metals and plant reproductive development. *Plant Cell* **15**, 1263–1280.
- Tanaka N, Abe-Dohmae S, Iwamoto N, Fitzgerald ML, Yokoyama S (2010). Helical apolipoproteins of high-density lipoprotein enhance phagocytosis by stabilizing ATP-binding cassette transporter A7. *J Lipid Res* **51**, 2591–2599.
- Thimm O, Essigmann B, Kloska S, Altmann T, Buckhout TJ (2001). Response of Arabidopsis to iron deficiency stress as revealed by microarray analysis. *Plant Physiol* **127**, 1030–1043.
- Tiffin LO (1966). Iron translocation II. Citrate/iron ratios in plant stem exudates. *Plant Physiol* **41**, 515–518.
- Tougane K, Komatsu K, Bhyan SB, Sakata Y, Ishizaki K, Yamato KT, Kohchi T, Takezawa D (2010). Evolutionarily conserved regulatory mechanisms of absciscic acid signaling in land plants: characterization of *ABSCISIC ACID*

- INSENSITIVE1*-like type 2C protein phosphatase in the liverwort *Marchantia polymorpha*. *Plant Physiol* **152**, 1529–1543.
- Vasiliou V, Vasiliou K, Nebert DW** (2009). Human ATP-binding cassette (ABC) transporter family. *Hum Genomics* **3**, 281–290.
- Vert GA, Briat JF, Curie C** (2003). Dual regulation of the Arabidopsis high-affinity root iron uptake system by local and long-distance signals. *Plant Physiol* **132**, 796–804.
- von Wirén N, Klair S, Bansal S, Briat JF, Khodr H, Shioiri T, Leigh RA, Hider RC** (1999). Nicotianamine chelates both Fe^{III} and Fe^{II}. Implications for metal transport in plants. *Plant Physiol* **119**, 1107–1114.
- Wang BL, Wei HF, Xue Z, Zhang WH** (2017). Gibberellins regulate iron deficiency-response by influencing iron transport and translocation in rice seedlings (*Oryza sativa*). *Ann Bot* **119**, 945–956.
- Yokosho K, Yamaji N, Ueno D, Mitani N, Ma JF** (2009). OsFRDL1 is a citrate transporter required for efficient translocation of iron in rice. *Plant Physiol* **149**, 297–305.
- Yoseph T, David KS, Dean DP** (2002). Overexpression of the enzyme *p*-hydroxyphenolpyruvate dioxygenase in Arabidopsis and its relation to tocopherol biosynthesis. *Plant Physiol Biochem* **40**, 913–920.

Effect of Iron Deficiency on the Protein Profile of Rice (*Oryza sativa*) Phloem Sap

Lin Chen, Yan Lin, Pengfei Chen, Shaohua Wang, Yanfeng Ding*

College of Agronomy, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China

Abstract In order to identify long-distance signals under iron (Fe) deficiency in rice (*Oryza sativa*), TMT label technique was used to study the protein profile of phloem sap under different iron concentrations. A total of 206 differentially expressed proteins were identified: 54 were upregulated and 152 were downregulated. Most of these proteins are involved in hormone signal transduction, carbon metabolism, glutathione metabolism and mRNA transport. In addition, we measured the physiological indicators according to the differentially expressed proteins. It was found that phytohormones, sucrose, glutathione and transporters were significantly changed under iron deficiency. To further study the function of these proteins can help to reveal the long distance signaling pathway of rice in response to Fe deficiency.

Key words rice (*Oryza sativa*), iron deficiency, phloem, long-distance signal, TMT

Chen L, Lin Y, Chen PF, Wang SH, Ding YF (2019). Effect of iron deficiency on the protein profile of rice (*Oryza sativa*) phloem sap. *Chin Bull Bot* **54**, 194–207.

* Author for correspondence. E-mail: dingyf@njau.edu.cn