

外源 NO 对铜胁迫下番茄幼苗生长及其抗氧化酶编码基因 mRNA 转录水平的影响

王丽娜¹, 杨凤娟¹, 王秀峰^{*}, 史庆华¹, 魏 珉¹, 胡向阳²

(¹山东农业大学园艺科学与工程学院, 作物生物学国家重点实验室, 园艺作物生物学农业部重点开放实验室, 山东泰安 271018; ²中国科学院昆明植物研究所, 昆明 650204)

摘 要: 研究了水培条件下外源一氧化氮 (NO) 对 Cu 胁迫后番茄幼苗生长及抗氧化酶编码基因 mRNA 表达的影响。结果表明, 0.15 mmol L⁻¹ Cu²⁺ 处理使番茄幼苗株高、茎粗、鲜样质量、干样质量明显下降, 抑制了幼苗生长, 外施 0.3 mmol L⁻¹ SNP (NO 供体) 能够缓解 Cu²⁺ 对番茄幼苗生长的抑制, 显著增加叶片编码过氧化物酶 (POD)、抗坏血酸过氧化物酶 (APX)、超氧化物歧化酶 (SOD)、过氧化氢酶 (CAT) 基因 mRNA 的表达量, 而 0.1 mmol L⁻¹ L-NAME [N^G-nitro-L-arginine methyl ester, 一氧化氮合成酶 (NOS) 抑制剂] 处理的表达量与 Cu 胁迫处理相比有所减少, 幼苗生长受到更加明显抑制, 表明外源 NO 可以通过提高抗氧化酶的表达水平而缓解 Cu 胁迫对番茄幼苗的伤害。

关键词: Cu 胁迫; 番茄; RT-PCR

中图分类号: S 641.12 文献标识码: A 文章编号: 0513-2353X (2010) 01-0047-06

Effects of Exogenous Nitric Oxide on Growth and Transcriptional Expression of Antioxidant Enzyme mRNA in Tomato Seedlings under Copper Stress

WANG Lina¹, YANG Fengjuan¹, WANG Xiufeng^{*}, SHI Qinghua¹, WEI Min¹, and HU Xiangyang²

(¹College of Horticulture Science and Engineering, Shandong Agricultural University, State Key Laboratory of Crop Biology, The Key and Open Laboratory of Horticultural Crop Biology, Ministry of Agriculture, Tai'an, Shandong 271018, China; ²Kunming Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences, Kunming 650204, China)

Abstract Heavy metal stress badly affect the crop growth and development, assuaging heavy metal stress to crop show important for crop yield. Here we investigated the effect of SNP (sodium nitroprusside, an exogenous nitric oxide donor) on alleviating copper stress and regulating antioxidant gene transcriptional level in liquid culture tomato seedlings. Our results showed that copper at 0.15 mmol L⁻¹ significantly suppressed the tomato seedlings growth including plant height, stem thickness, plant fresh weight and plant dry weight, as well as improved the transcriptional levels of antioxidant genes encoding peroxidase (POD), ascorbate peroxidase (APX), superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT). Exogenous application of 0.3 mmol L⁻¹ SNP remarkably alleviated copper-induced inhibition to tomato growth and further enhanced these antioxidant genes transcription, however, additional L-NAME (N^G-nitro-L-arginine methyl ester), the special inhibitor of nitric oxide synthase (NOS) obviously aggravated copper-induced inhibitory effect on tomato growth and reduced antioxidant enzyme gene transcriptional level. Basing on these results we propose that tomato NOS enzyme mediated NO is necessary for tomato responding to copper stress and NO application lessen copper stress to tomato growth via enhancing antioxidant enzyme gene transcriptional levels.

Key words: copper stress; tomato; RT-PCR

收稿日期: 2009-07-09; 修回日期: 2009-12-17

基金项目: 国家自然科学基金项目 (30871705, 30871704); 山东省农业重大应用技术创新项目

* 通讯作者 Author for correspondence (E-mail: xfwang@sdaul.edu.cn)

铜既是植物生长发育必需的微量营养元素, 又是环境污染的重金属元素, 污水灌溉, 施用污泥和含 Cu 杀菌剂、农药, 开矿等使土壤中的 Cu 含量过高会对植物造成危害, 甚至会通过食物链危害人体健康。

NO 是生物体中一种重要的氧化还原信号分子和毒性分子, 也是一种活性氮 (reactive nitrogen species, RNS)。研究表明, NO 广泛存在于植物组织中, 并参与植物呼吸作用、光形态建成、种子萌发、衰老、对胁迫的响应以及抗病防御反应等过程, 而且还能够调控植物对生物和非生物胁迫下的应激反应 (Magdalena & Lorenzo 2007)。NO 缓解植物逆境胁迫的作用是近年来的研究热点 (韩小娇等, 2008)。但到目前为止, 人们对 NO 在 Cu 胁迫生理过程中的作用机理还了解不多, 在园艺作物上的研究报道甚少。本试验中以番茄为试材, 采用水培方法, 研究外源 NO 对 Cu 胁迫番茄幼苗生长及转录水平上编码抗氧化酶基因 mRNA 的表达情况的影响, 为了解外源 NO 缓解 Cu 胁迫的作用机理提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 供试材料与试验设计

试验于 2008 年 2) 5 月在山东农业大学玻璃温室进行。供试番茄 (*Lycopersicon esculentum* Mill.) 品种为 -中蔬 4 号。按常规方法催芽育苗, 待幼苗长到 3 叶 1 心时选取生长一致的健壮幼苗移栽于装有 8 L 营养液的方盒中, 每盒栽培 6 株。营养液参照日本山崎配方, 每 4 d 更换一次。每天用气泵充气 2 次, 每次 2 h。

当植株长到 6~7 片真叶时进行以下营养液处理: (1) 加入 $0.15 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{Cu}^{2+}$; (2) 加入 $0.15 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{Cu}^{2+} + 0.13 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{SNP}$; (3) 加入 $0.15 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{Cu}^{2+} + 0.11 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{LNAME}$; 正常营养液为对照。每处理 6 株, 3 次重复。处理期间每天更换营养液。分别于处理后 6、12、24、48、72、96 和 120 h 取第 2 片功能叶, 液氮速冻后保存于 -70 e 备用。处理结束后测定株高、茎粗, 然后收集根和地上部, 自来水冲洗 3 遍, 蒸馏水洗净吸干, 称鲜样质量后放入烘箱中 110 e 下杀青 5 min, 再在 80 e 下烘干, 称其干样质量。

用 SPSS 统计软件对平均数用 Duncan 新复极差法进行多重比较。

1.2 RNA 的分离与 cDNA 第一链的合成

番茄叶片总 RNA 的提取采用异硫氰酸胍法 (Han et al., 1987)。反转录按宝生物工程 (大连) 有限公司 RNA PCR Kit (AMV) Ver1.310 的说明书, 取 500 ng 总 RNA 合成第一链 cDNA, 用作 RT-PCR 模版。

1.3 引物

根据 NCBI GenBank 登录的基因序列设计特异性引物 (表 1), 参照 Magdalena 和 Lorenzo (2007) 的引物 ActinF: AAGAGYTAYGARYTNCWGATGG, ActinR: TTRATCTTCATGCTRICTIWGGAGC 作为内参对照, 由上海生工生物工程技术有限公司合成。

1.4 RT-PCR 反应体系

25 μL PCR 反应体系中加 cDNA 1 μL , 上游和下游引物 ($10 \text{ pmol} \cdot \text{L}^{-1}$) 各 1 μL , MgCl_2 ($25 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) 2 μL , 缓冲液 ($10 \times$) 2.5 μL , dNTP ($2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) 2 μL , Taq 酶 ($1 \text{ U} \cdot \mu\text{L}^{-1}$) 1 μL (TAKARA 公司产品)。反应条件为: 94 e 变性 2 min, 94 e 20 s, 退火温度 30 s, 72 e 30 s, 30 个循环; 72 e 延伸 10 min, 反应结束后取 10 μL 产物进行琼脂糖凝胶电泳, 紫外凝胶成像系统对结果进行鉴定拍照。

表 1 用于特异性表达片段鉴定的引物序列

Table 1 Primer sequences used for identification of special expression of mRNA

序列号 NCBI	引物 Primers	序列 Sequence (5'-3')	扩增片段长度 /bp Product size	退火温度 /e Annealing temperature
X7159311	L2POD2F	GGTCCAACA TGGCAAGTTCT	250	5115
	L2POD2R	ACATCTTGCCTTCCAAATG		
DQ09942011	APX12F	GGCTCTCCITTTGIGATCTTG	250	5110
	APX12R	CAGCAAAAACAACAGCTCCA		
AF527880	SOD2F	AATTCATCATTTGTGGCAGCA	250	5115
	SOD2R	GCCCTTAAAGGACAGCAACAG		
X1404111	Cu, ZnSOD2F	CTGGACTTCACGGGTTTCAT	250	5210
	Cu, ZnSOD2R	TTTGGACCGGTCAA TGGTAT		
M9371911	CAT12F	AGAAGCTCGCGACATTTGAT	250	5018
	CAT12R	CITGACAGCAAAACCACGAA		
AF11236811	CAT22F	TGCTCCAAAAGTGTGCTCATC	250	5310
	CAT22R	AGCGGTACCTTTCTCCTGGT		

2 结果与分析

2.1 外源 NO 对 Cu胁迫下番茄幼苗生长势的影响

由表 2可知, 在 $0.15 \text{ mmol L}^{-1} \text{ Cu}^{2+}$ 胁迫条件下 5 d后, 番茄幼苗的株高、茎粗、鲜样质量、干样质量较正常生长的分别降低 12.10%、9.19%、9.19%和 9.10%, 说明 Cu处理明显抑制了番茄幼苗的生长。而在施 Cu的同时加入 $0.13 \text{ mmol L}^{-1} \text{ SNP}$ 能够缓解 Cu对番茄幼苗生长的抑制作用, 株高、茎粗、鲜样质量、干样质量均显著增加。Cu加 L2NAME处理比单纯 Cu处理株高、茎粗、鲜样质量、干样质量分别降低 12.19%、1.610%、6.152%和 5.143%。

表 2 外源 NO供体 SNP及 NOS抑制剂 L2NAME对 Cu胁迫下番茄幼苗生长势的影响

Table 2 Effects of exogenous nitric oxide and L2NAME on the plant growth of tomato seedlings under Cu stress

处理 / (mmol L^{-1}) Treatment			株高 /cm Plant height	茎粗 /mm Stem thickness	单株鲜样质量 /g Plant fresh weight	单株干样质量 /g Plant dry weight
Cu^{2+}	SNP	L2NAME				
0	0	0	41.183 ± 0.175a	4.191 ± 0.109a	68.142 ± 1.104a	4.186 ± 0.108a
0.15	0	0	36.177 ± 0.197c	4.142 ± 0.114c	62.112 ± 1.144c	4.142 ± 0.114c
0.15	0.13	0	39.199 ± 0.185b	4.171 ± 0.117b	66.103 ± 1.132b	4.170 ± 0.111b
0.15	0	0.1	32.103 ± 0.178d	3.171 ± 0.113d	58.107 ± 1.119d	4.118 ± 0.115d

注: 不同小写字母为差异达显著水平 ($P < 0.05$)。

Note: The different small letters indicated significant difference at 0.05 level

2.1.2 外源 NO对 Cu胁迫下番茄叶片 POD编码基因 mRNA表达的影响

由图 1可知, 随 Cu处理时间延长, 转录水平上编码 L2POD (lignin peroxidase) 基因 mRNA的表达量逐渐增加, 在同一处理阶段, 显著高于对照, 加入 SNP处理后表达量更高, 而加入 L2NAME后抑制了表达, 但在同一处理时期仍然高于对照。对照中其表达没有随时间表现出明显变化。

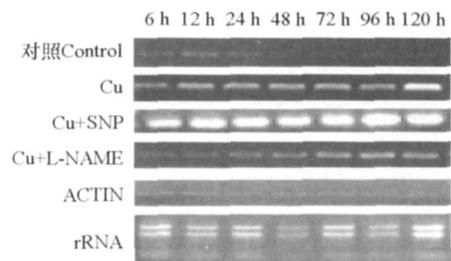


图 1 番茄叶片 lignin POD 编码基因 RT2PCR 扩增图
Fig. 1 RT2PCR amplified products for the detection of lignin POD in tomato leaves

213 外源 NO 对 Cu胁迫下番茄叶片 APX1 编码基因 mRNA 表达的影响

由图 2 可知, Cu 处理下编码 APX1 基因 mRNA 的表达量明显高于对照, 且随时间延长表达量逐渐增加, 72 h 时表达量达到最高。加入 SNP 的处理表达量明显高于单独 Cu 处理, 在处理 12 h 时表达量就达到最高, 随后维持在较高水平。加入 LNAME 的处理表达量明显低于单独 Cu 处理, 24 h 前表达量较少, 48 h 后表达量略有增加, 96 h 时达到最高值。对照中的表达量随时间延长无明显变化。

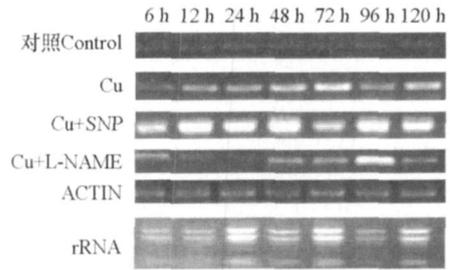


图 2 番茄叶片 APX1 编码基因 RT2PCR 扩增图
Fig 2 RT2PCR amplified products for the detection of APX1 in tomato leaves

214 外源 NO 对 Cu胁迫下番茄叶片 SOD 及同工酶编码基因 mRNA 表达的影响

由图 3 可知, 编码基因 SOD 和同工酶 Cu₂ZnSOD mRNA 表达量的变化趋势基本一致, 都随时间延长呈增加的趋势。Cu 处理下 SOD 在 12 h 时达到并维持在较高水平, Cu₂ZnSOD 在 48 h 时达到并维持在较高水平。外加 SNP 处理明显提高了 Cu 胁迫下编码 SOD 和 Cu₂ZnSOD mRNA 的表达量, 使 SOD 的表达量在 6 h 时就达到并维持在较高水平; Cu₂ZnSOD 在 72 h 后达到并维持在较高水平。LNAME 处理的表达量较少。

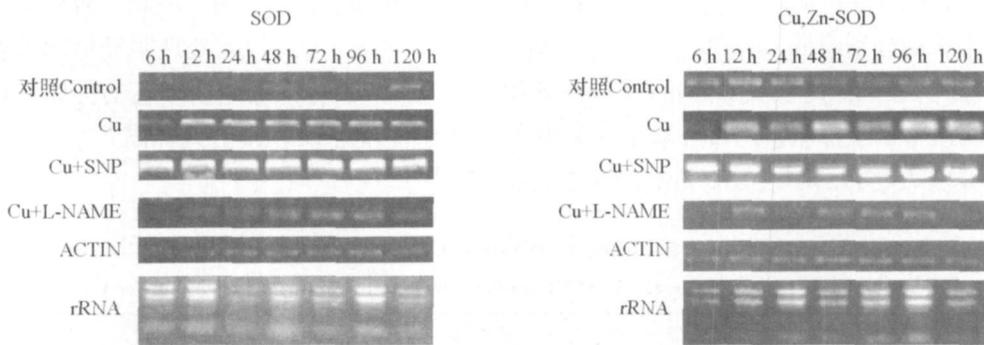


图 3 番茄叶片 SOD 编码基因 RT2PCR 扩增图
Fig 3 RT2PCR amplified products for the detection of SOD in tomato leaves

215 外源 NO 对 Cu胁迫下番茄叶片 CAT 及同工酶编码基因 mRNA 表达的影响

由图 4 可知, 各处理转录水平上同工酶 CAT1 和 CAT2 都有明显的表达, 可以看出表达量是 Cu+

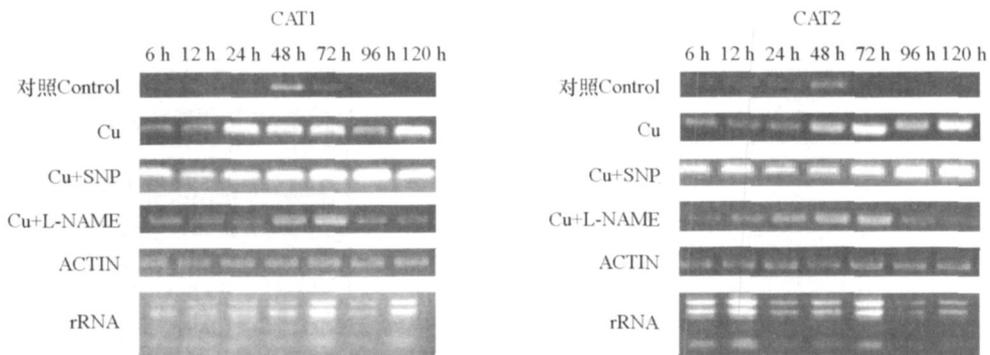


图 4 番茄叶片 CAT 编码基因 RT2PCR 扩增图
Fig 4 RT2PCR amplified products for the detection of CAT in tomato leaves

SNP处理 > Cu处理 > Cu+ LNAME处理 > 对照。加 SNP的处理在 6 h时就达到较高的水平, CAT1在处理 48 h时表达量达到最高, CAT2在处理 96 h时表达量达到最高。Cu处理 CAT1的表达量在 24 h时达到较高水平, 而 CAT2则在 48 h达到较高水平。加 LNAME的处理表达量在 48 h和 72 h时有所增加, 但随时间延长又呈减少趋势。

3 讨论

植物受 Cu胁迫常出现的症状为生长受到抑制, 植株出现萎蔫、皱叶、失绿等 (甄泉等, 2006)。本试验中 Cu处理的番茄植株矮小, 叶片瘦弱且失绿, 而外源 NO缓解了 Cu胁迫对番茄幼苗生长的抑制作用, Cu毒害症状消失, 株高、茎粗、鲜样质量和干样质量与单独 Cu胁迫均差异显著。在 NO缓解小麦 (王松华等, 2007)、辣椒 (陈世军等, 2009) 等重金属胁迫研究中均得到相似的结果。这与 NO可通过质外体直接作用于细胞壁组分, 使细胞壁松弛, 以及作用于膜的磷脂双分子层, 增强膜的流动性, 从而促进细胞扩展、植株生长有关 (Lesham & Haramaty 1996)。

当植物受到重金属等胁迫时, 活性氧平衡受到破坏, 其清除系统尤其是抗氧化酶类则会表现出相应的应激反应 (Lidon & Teixeira 2000)。Lombardi和 Sebastiani (2005) 认为, 过量的 Cu明显提高抗氧化酶在转录水平上的表达, 诱导同工酶的表达, 以及对酶蛋白结构进行加工与修饰, 提高酶的总活性, 这与本试验的研究结果一致。NO是一种重要的信使分子, 适当浓度的 NO可减轻盐害、干旱、重金属等胁迫对植物的伤害, 其生理效应往往与其对 ROS代谢的调控有关, 并涉及有关的信号转导 (Lamattina et al, 2001); SOD、POD、CAT和 APX是植物细胞中抗氧化胁迫的关键酶, 也是植物体内清除 H₂O₂的重要酶类。段凯旋等 (2007) 研究发现 NO可提高铜、镉胁迫下平邑甜茶根和叶 POD、SOD的活性。Bartosz (1997) 研究表明 NO还可提高镉胁迫下向日葵 CAT、APX、GR的活性, 从而可清除过量的过氧化氢。本试验中, 外源 NO显著提高了 Cu胁迫下番茄幼苗叶片保护酶 POD、SOD、CAT、APX编码基因 mRNA 的表达量, 诱导同工酶 Cu、ZnSOD和 CAT1、CAT2的表达, 提高了植株抵御 Cu毒害的能力。吴雪霞等 (2009) 和 Zhang等 (2009) 的研究表明外源 NO提高了 NaCl和铜胁迫下番茄幼苗叶片保护酶 SOD、POD、CAT、APX的活性, 提高了植株抵御逆境胁迫的能力, 这与本试验的结果一致。在黄瓜逆境胁迫的研究中也有类似的结果 (樊怀福等, 2008)。但是 NO对抗氧化酶的影响亦有相反的报道, 如 Clark等 (2000) 发现, NO能与血红素中的 Fe结合而可逆抑制烟草叶片 CAT、APX和 POD等血红素酶活性。这可能与 NO的浓度及处理方式不同有关。LNAME作为 NOS专一性的抑制剂, 可以阻断部分内源 NO的产生 (Vito et al, 2002)。Massimo等 (1998) 的研究表明 LNAME抑制了逆境胁迫下植株内源 NO的产生, 降低了抗氧化酶和 NADPH2d的活性。本试验进一步印证了此研究结果, LNAME处理消除了内源 NO的调节作用, 抑制了转录水平上编码抗氧化酶基因的表达, 加重了 Cu对植株的伤害。以上结果说明 NO参与了对植物生长发育的调节, 促进了编码抗氧化酶基因的表达, 但 NO如何通过信号转导对相关基因的表达进行调控, 尚需进一步研究。

References

- Bartosz G. 1997. Oxidative stress in plants. *Acta Physiol Plant* 19: 47-64
- Chen Shizun, Zhang Mingsheng, Wei Meiyu. 2009. Physiological response of *Capsium frutescens* L. var. *longum* bailey seedling with SNP to Cd²⁺ stress. *Plant Physiology Communications* 45 (3): 229-232 (in Chinese)
- 陈世军, 张明生, 韦美玉. 2009. SNP处理的辣椒幼苗对 Cd²⁺胁迫的生理响应. *植物生理学通讯*, 45 (3): 229-232
- Clark D, Dumer J, Navarre D A. 2000. Nitric oxide inhibition of tobacco catalase and ascorbate peroxidase. *Mol Plant Microbe Interact* 13 (12): 1380-1384
- Duan Kaiquan, Yang Hongqiang, Ran Kun, Jiang Qianqian, You Shuzhen. 2007. Effect of nitric oxide on reactive oxygen metabolism of *Malus*

- huphensis Rhd. seedlings under copper and cadmium stress. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 23 (10): 104- 109. (in Chinese)
段凯旋, 杨洪强, 冉 昆, 姜倩倩, 由淑贞. 2007. 一氧化氮对铜、镉胁迫下平邑甜茶幼苗活性氧代谢的影响. *中国农学通报*, 23 (10): 104- 109.
- Fan Huaifú, Guo Shurong, Duan Jiujie, Du Changxia, Sun Jin. 2008. Effects of nitric oxide on the growth and glutathione dependent antioxidant system in cucumber (*Cucumis sativus* L.) seedlings under NaCl stress. *Acta Ecologica Sinica*, 28 (6): 2511- 2517. (in Chinese)
樊怀福, 郭世荣, 段九菊, 杜长霞, 孙 锦. 2008. 外源 NO 对 NaCl 胁迫下黄瓜 (*Cucumis sativus* L.) 幼苗生长和谷胱甘肽抗氧化酶系统的影响. *生态学报*, 28 (6): 2511- 2517.
- Han JH, Stratova C, Rutter W J. 1987. Isolation of full-length putative rat lysophosphatase cDNA using improved methods for mRNA isolation and cDNA cloning. *Biochemistry*, 26: 1617- 1625.
- Han Xiaojiao, Yang Hongqiang, You Shuzhen, Duan Kaixuan, Zhang Xinrong, Zhao Haizhou. 2008. Adventitious shoot regeneration from leaves of *Malus huphensis* and effects of nitric oxide. *Acta Horticulturae Sinica*, 35 (3): 419- 422. (in Chinese)
韩小娇, 杨洪强, 由淑贞, 段凯旋, 张鑫荣, 赵海洲. 2008. 平邑甜茶叶片不定芽再生及 NO 的效应. *园艺学报*, 35 (3): 419- 422.
- Lamattina L, Beligni M V, Garcia M C. 2001. Method of enhancing the metabolic function and the growing conditions of plants and seeds. United State Patent 6: 242- 384.
- Leshon Y Y, Haramaty E. 1996. The characterization and contrasting effects of the nitric oxide free radical in vegetative stress and senescence of *Pisum sativum* Linn foliage. *Plant Physiology*, 148: 258- 263.
- Lidon F C, Teixeira M G. 2000. Oxy radicals production and control in the chloroplast of Mn²⁺ treated rice. *Plant Science*, 152: 7- 15.
- Lombardi L, Sebastiani L. 2005. Copper toxicity in *Pinus cerasifera*: Growth and antioxidant enzymes responses of in vitro grown plants. *Plant Sci*, 168: 797- 802.
- Magdalena Graziano, Lorenzo Lamattina. 2007. Nitric oxide accumulation is required for molecular and physiological responses to iron deficiency in tomato roots. *The Plant Journal*, 52: 949- 960.
- Massimo D, Xia Y, Dixon R A, Chris L. 1998. Nitric oxide functions as a signal in plant disease resistance. *Nature*, 394: 585- 588.
- Vito De G C, Giuseppe R, Antonello E R, Sara B, Barbara M, Ferruccio B, Eugenio E M. 2002. Endothelin and quinapril improve endothelial vasodilator function and aortic NOS gene expression in L-NAME treated rats. *European Journal of Pharmacology*, 450: 61- 66.
- Wang Songhua, Zhou Zhengyi, He Qingyuan, Wang Xiaoping, Song Lihong, Lu Xiaoming. 2007. Nitric oxide alleviates the nickel toxicity in wheat seedlings. *Acta Botanica Yunnanica*, 29 (1): 115- 121. (in Chinese)
王松华, 周正义, 何庆元, 王晓鹏, 宋李红, 陆晓明. 2007. 一氧化氮对小麦叶片镍毒害的缓解作用. *云南植物研究*, 29 (1): 115- 121.
- Wu Xuexia, Chen Jianlin, Zhang Dingsheng, Zhu Weimin. 2009. Effects of exogenous nitric oxide on reactive oxygen metabolism in tomato seedlings under NaCl stress. *Plant Nutrition and Fertilizer Science*, 15 (2): 422- 428. (in Chinese)
吴雪霞, 陈建林, 查丁石, 朱为民. 2009. 外源一氧化氮对 NaCl 胁迫下番茄幼苗活性氧代谢的影响. *植物营养与肥料学报*, 15 (2): 422- 428.
- Zhang Yujia, Han Xiaojiao, Chen Xiuling, Jin Hong, Cui Xiumin. 2009. Exogenous nitric oxide on antioxidant system and ATPase activities from tomato seedlings under copper stress. *Scientia Horticulturae*, 123 (2): 217- 223.
- Zhen Quan, Yan Mijiang, Yang Hongfei, Liu Dengyi, Wang Youbao. 2006. Coercion and damage of Cu pollution on *Artemisia lavandulifolia* growth. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 17 (8): 1505- 1510. (in Chinese)
甄 泉, 严 密, 杨红飞, 刘登义, 王友保. 2006. 铜污染对野艾蒿生长发育的胁迫及伤害. *应用生态学报*, 17 (8): 1505- 1510.