

油菜素内酯对低氧胁迫黄瓜幼苗根系有氧呼吸同工酶表达的影响*

陆晓民^{1,2} 孙 锦¹ 郭世荣^{1**} 何立中¹ 王丽萍¹ 阳燕娟¹

(¹南京农业大学园艺学院, 农业部南方蔬菜遗传改良重点开放实验室, 南京 210095; ²安徽科技学院, 安徽凤阳 233100)

摘要 探讨了 24-表油菜素内酯(EBR)对低氧胁迫黄瓜幼苗根系有氧呼吸同工酶表达的影响。结果表明:低氧胁迫增强了异柠檬酸脱氢酶(IDH)、琥珀酸脱氢酶(SDH)、苹果酸脱氢酶(MDH)及苹果酸酶(ME)同工酶的表达,并产生了一些新的条带;低氧下施用 10^{-3} mg · L⁻¹ 的外源 EBR 处理后 6、9 d 时 IDH、MDH 同工酶的表达分别比单纯低氧处理提高了 52.8%、13.6% 及 39.1%、11.3%, ME 同工酶的表达在处理 3 d 时比单纯低氧处理提高了 11.6%, SDH 同工酶表达 6、9 d 时则分别比单纯低氧处理下降了 42.9% 和 36.1%。可见,低氧胁迫下营养液添加 EBR 可调节黄瓜根系 IDH、SDH、MDH 及 ME 同工酶的表达,进而有利于缓解低氧胁迫对黄瓜幼苗根系的伤害。

关键词 黄瓜; 低氧胁迫; 24-表油菜素内酯; 有氧呼吸; 同工酶

中图分类号 S 642.2 **文献标识码** A **文章编号** 1000-4890(2012)12-3070-05

Effects of brassinolide on the isozyme expressions of aerobic respiration enzymes in cucumber seedling roots under hypoxia stress. LU Xiao-min^{1,2}, SUN Jin¹, GUO Shi-rong^{1**}, HE Li-zhong¹, WANG Li-ping¹, YANG Yan-juan¹ (¹Key Laboratory of Southern Vegetable Crop Genetic Improvement, Ministry of Agriculture, College of Horticulture, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China; ²Anhui Science and Technology University, Fengyang 233100, Anhui, China). *Chinese Journal of Ecology*, 2012, 31(12): 3070–3074.

Abstract: A hydroponic experiment was conducted to study the effects of 24-epibrassinolide (EBR) on the isozyme expressions of aerobic respiration enzymes in cucumber seedling roots under hypoxia stress. Hypoxia stress promoted the isozyme expressions of root isocitrate dehydrogenase (IDH), succinate dehydrogenase (SDH), malate dehydrogenase (MDH), and malic enzyme (ME), and produced several new bands. Applying 10^{-3} mg · L⁻¹ of EBR under hypoxia stress increased the isozyme expressions of IDH and MDH on day 6 and day 9 by 52.8% and 13.6%, and 39.1% and 11.3%, respectively and the isozyme expressions of ME on day 3 by 11.6%, but decreased the isozyme expressions of SDH on day 6 and day 9 by 42.9% and 36.1%, respectively, as compared with those under hypoxia stress alone. These results indicated that applying EBR under hypoxia stress could regulate the isozyme expressions of IDH, SDH, MDH, and ME in cucumber seedling roots, and thereby, alleviate the damage of hypoxia stress on the seedling roots.

Key words: cucumber; hypoxia stress; 24-epibrassinolide; aerobic respiration; isozyme.

近年来,中国设施农业发展迅速,其发展程度已经成为当代农业现代化进程的重要标志。无土栽培

是目前设施农业中正在推广应用的一种新技术,其不仅能够有效克服作物连作障碍,而且有利于实现机械化或自动化操作,是中国现代农业的重要发展方向(郭世荣,2003)。然而,无土栽培生产实践中植物根的呼吸以及“根垫”均易导致植物根系供氧不足,从而限制了无土栽培的进一步发展。低氧胁迫会导致植株根系三羧酸循环和电子传递流受阻、

* 国家自然科学基金项目(30871736)、国家重点基础研究发展计划项目(2009CB119000)、现代农业产业技术体系建设专项(CARS-25-C-03)、江苏省农业三项工程项目(SX(2011)289)和江苏高校优势学科建设工程资助。

** 通讯作者 E-mail: srguo@njau.edu.cn
收稿日期: 2012-06-07 接受日期: 2012-09-07

有氧呼吸减弱、体内正常代谢紊乱、蛋白质合成异常及根系功能下降,进而影响植物的正常生长(Drew, 1997; 刘刚等, 2008; 陆晓民等, 2011a)。

油菜素内酯是广泛存在于植物中的一种天然产物,能有效缓解干旱(Yuan *et al.*, 2010)、盐(Saygideger & Deniz, 2008; 吴雪霞等, 2011)、高温(Singh & Shono, 2005; 张永平等, 2011)、低温(Fariduddin *et al.*, 2011)、重金属(Sharma & Bhardwaj, 2007; Arora *et al.*, 2010; Bajguz, 2011)以及杀虫剂(Xia *et al.*, 2006)等多种逆境胁迫对植物造成的伤害,增强植株对生物和非生物胁迫的抗性(Saygideger & Deniz, 2008; Bajguz & Hayat, 2009; Bajguz, 2010)。本课题组的前期研究表明,低氧下施用表油菜素内酯(EBR)可增强黄瓜体内有氧呼吸酶活性,提高根系可溶性蛋白含量,缓解低氧对植株的伤害(康云艳等, 2008; 陆晓民等, 2011b)。然而,有关 EBR 对低氧胁迫下有氧呼吸酶同工酶表达的影响却未见报道。据此,本文通过开展油菜素内酯对低氧胁迫下黄瓜幼苗根系异柠檬酸脱氢酶(IDH)、琥珀酸脱氢酶(SDH)、苹果酸脱氢酶(MDH)及苹果酸酶(ME)同工酶表达的影响研究,为阐明 EBR 提高植物低氧耐性的生理机制提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 供试材料与处理

试验于 2010 年 3—4 月于南京农业大学试验基地的玻璃温室内进行。选取低氧耐性较弱的“中农 6 号”黄瓜种子浸种、催芽后播于装有石英砂的育苗盘中,子叶展开后浇灌 1/2 Hoagland 营养液,2 叶 1 心时定植于 1/2 Hoagland 营养液水培槽内,缓苗 5 d 后分设 4 个处理:CK、CB、H、HB,其中 CK、CB 处理均维持营养液溶氧浓度(DO)为 8.0 mg·L⁻¹ 左右,H、HB 则进行低氧胁迫,控制营养液 DO 值为 0.9~1.1 mg·L⁻¹,同时向 CB、HB 营养液中添加 24-表油菜素内酯(EBR),终浓度为 10⁻³ mg·L⁻¹。试验期间昼温 25~30 ℃、夜间 15~18 ℃。

1.2 同工酶电泳

1.2.1 样品制备与电泳方法 取 0.2000 g 新鲜根尖,按陆晓民和高青海(2011)方法进行样品制备及电泳,上样量为 10 μL。

1.2.2 凝胶染色 IDH 电泳结束后,取出凝胶,去离子水冲洗 2 次,加入染色溶液[0.1 mol·L⁻¹ pH 8.0 的 Tris-HCl 缓冲液 100 mL, 内含 0.1 mol·L⁻¹

异柠檬酸(三钠盐)3 mL、NADP 20 mg、NBT 10 mg、0.25 mol·L⁻¹ MnCl₂ 0.4 mL]。凝胶在染色液中暗处 37 ℃ 下孵育直至出现深蓝色条带,清水洗染色后的凝胶,用 25% 乙醇固定(Manchenko, 2008)。

SDH 电泳结束后,取出凝胶,去离子水冲洗 2 次,上覆新配置好的染色溶液[0.2 mol·L⁻¹ pH 7.5 的磷酸钾缓冲液 5 mL、0.2 mol·L⁻¹ 琥珀酸 2 mL(用 NaOH 中和)、32.5 mg·L⁻¹ PMS 0.5 mL、5 mg·L⁻¹ MTT 0.5 mL, 2% 琼脂溶液(60 ℃)9.5 mL]。凝胶在暗处 37 ℃ 下孵育直至出现深蓝色的条带,用清水洗染色后的凝胶,用 25% 乙醇固定(Manchenko, 2008)。

MDH 电泳结束后,取出凝胶,去离子水冲洗 2 次,加入染色溶液[0.1 mol·L⁻¹ pH 8.0 的 Tris-HCl 缓冲液 100 mL, 内含 L-苹果酸(二钠)250 mg、NAD 30 mg、NBT 25 mg、PMS 2 mg]。凝胶在染色液中暗处 37 ℃ 下孵育直至出现深蓝色的条带,清洗染色后的凝胶,用 25% 的乙醇固定(Manchenko, 2008)。

ME 电泳结束取出凝胶,去离子水冲洗 2 次,加染色溶液[0.05 mol·L⁻¹ pH 8.0 的 Tris-HCl 缓冲液 50 mL, L-苹果酸(钠)700 mg, NADP 15 mg, NBT 15 mg, PMS 1 mg, 无水 MgCl₂ 50 mg]进行染色。凝胶在染色液中暗处 37 ℃ 下孵育直至出现深蓝色的条带,清洗染色后的凝胶,25% 乙醇固定(Manchenko, 2008)。

1.3 凝胶扫描与分析

凝胶扫描并经凝胶图像分析软件(GIS1D, Ver4.00)进行差异蛋白条带分析。

2 结果与分析

2.1 EBR 对低氧胁迫下黄瓜幼苗根系 IDH 同工酶表达的影响

各处理在正常通气条件下 IDH 仅有 2 条同工酶条带($Rf = 0.423, 0.438$),低氧胁迫下, Rf 为 0.438 的条带明显的加强,而 Rf 为 0.423 的条带明显的减弱,且低氧又诱导了 3 条新的同工酶条带($Rf = 0.392, 0.462, 0.515$),以处理 3 d IDH 同工酶表达量最大,随着胁迫时间的延长,其表达量下降。低氧下施用外源 EBR 处理后,在处理 3 d 时与单纯低氧相比其表达量下降了 16.9%,而处理 6、9 d 时相应比单纯低氧分别提高了 52.8%、39.1%,可见低氧下施用外源 EBR 处理 6、9 d 时增强了 IDH 同工酶的表达,而对照条件下施用 EBR 无显著变化(图 1)。

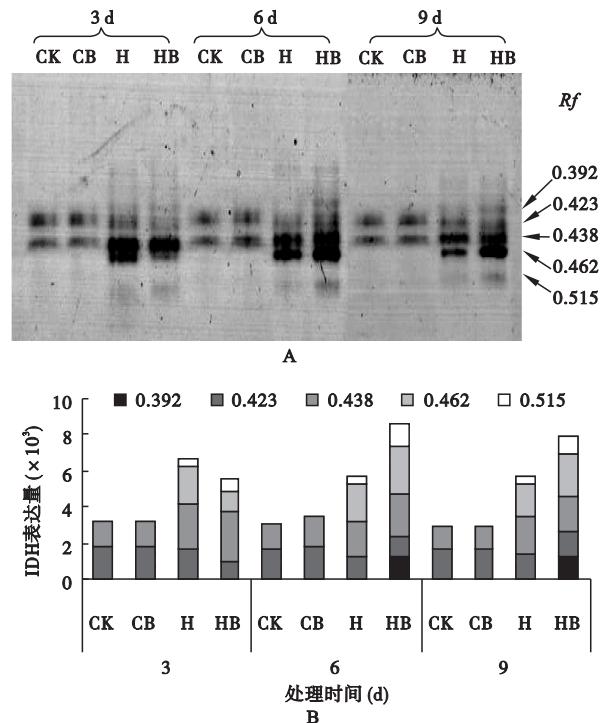


图1 EBR对低氧胁迫下黄瓜幼苗根系IDH同工酶的影响
Fig. 1 Effects of EBR on IDH isozymes in roots of cucumber seedlings under hypoxia stress

CK,对照;CB,对照+24-表油菜素内酯;H,低氧处理;HB,低氧处理+24-表油菜素内酯;A,同工酶电泳图谱;B,同工酶表达量。下同。

2.2 EBR对低氧胁迫下黄瓜幼苗根系SDH同工酶表达的影响

各处理正常通气条件下没有明显的SDH同工酶条带,低氧胁迫下,出现5条($R_f=0.382, 0.506, 0.625, 0.713, 0.742$)SDH同工酶条带,且各条带表达量在6 d时明显的加强,而在9 d时又有所减弱。低氧下施用外源EBR处理后,在3 d与单纯低氧相比其表达量下降了8.6%,而6、9 d时有相应比单纯低氧分别下降了42.9%、36.1%,可见低氧下施用外源EBR处理后6、9 d时明显减弱了SDH同工酶的表达,而对照条件下施用EBR黄瓜幼苗根系SDH同工酶表达无显著变化(图2)。

2.3 EBR对低氧胁迫下黄瓜幼苗根系MDH同工酶表达的影响

各处理正常通气条件下MDH仅有3条同工酶条带($R_f=0.373, 0.455, 0.545$),且对照条件下施用EBR黄瓜幼苗根系MDH同工酶表达在3、6、9 d也比对照分别提高了8.6%、9.7%和16.0%;低氧胁迫下,MDH的表达增强,其表达量在处理3、6、9 d分别比对照提高了14.9%、10.2%和18.4%,并出现了一条 R_f 为0.418的新条带,低氧下施用外源

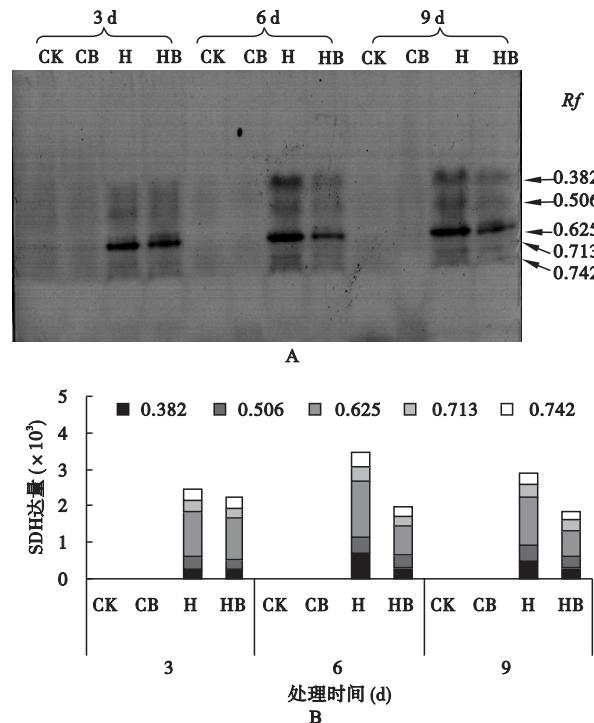


图2 EBR对低氧胁迫下黄瓜幼苗根系SDH同工酶的影响
Fig. 2 Effects of EBR on SDH isozymes in roots of cucumber seedlings under hypoxia stress

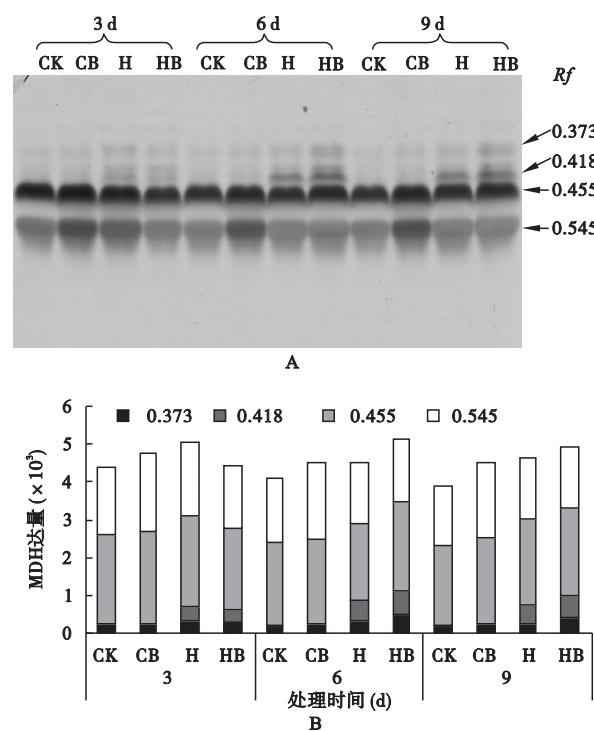


图3 EBR对低氧胁迫下黄瓜幼苗根系MDH同工酶的影响

Fig. 3 Effects of EBR on MDH isozymes in roots of cucumber seedlings under hypoxia stress

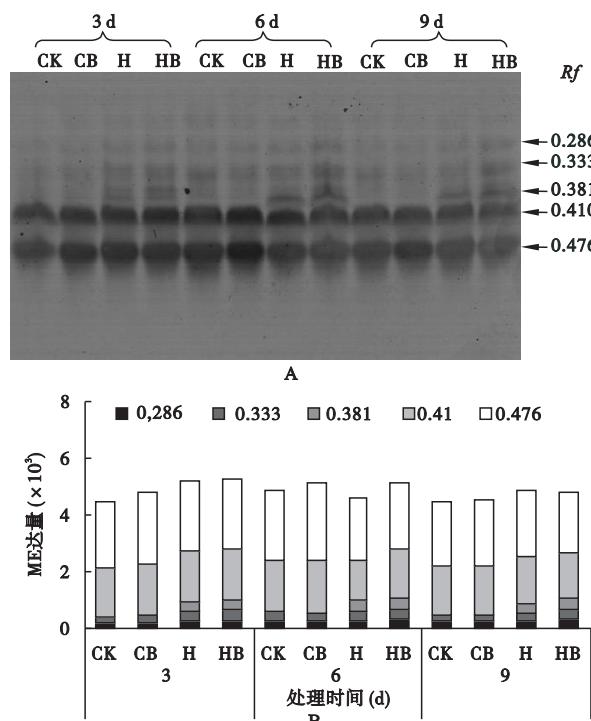


图 4 EBR 对低氧胁迫下黄瓜幼苗根系 ME 同工酶的影响
Fig. 4 Effects of EBR on ME isozymes in roots of cucumber seedlings under hypoxia stress

EBR 处理后,在 3 d 时与单纯低氧相比其表达量下降了 12.7%,而 6、9 d 时有相应比单纯低氧分别提高了 13.6%、11.3%,可见低氧下施用外源 EBR 处理后 6、9 d 时明显增强了 MDH 同工酶的表达(图 3)。

2.4 EBR 对低氧胁迫下黄瓜幼苗根系 ME 同工酶表达的影响

各处理正常通气条件下 ME 至少有 4 条同工酶条带($R_f = 0.286, 0.333, 0.410, 0.476$),低氧胁迫下,4 条带在明显的加强,且出现了一条 R_f 为 0.381 的新条带,以 3 d 时 ME 同工酶表达量最大,随着胁迫时间的延长,其表达量下降。低氧下施用外源 EBR 处理后,在 3、9 d 时与单纯低氧相比其表达量无明显差异,而 6 d 时有相应比单纯低氧提高了 11.6%,可见低氧下施用外源 EBR 处理 6 d 时明显增强了 ME 同工酶的表达,而对照条件下施用 EBR 黄瓜幼苗根系 ME 同工酶表达无显著变化(图 4)。

3 讨论

低氧影响植物生长。生产中,人们除了通过科学排灌、中耕、增氧等栽培管理措施来改善根际的低氧环境外,还可依据作物本身对根际低氧的生理反应,有针对性地选择一些外源物质对栽培作物进行处

理,这是目前提高植物低氧逆境耐性最简便且行之有效的措施(白团辉等,2008;师恺等,2009;王长义等,2010a;Gao *et al.*, 2011)。

研究表明,低氧下黄瓜植株体内 SDH、IDH 等酶活性减弱,有氧呼吸受阻,生长受到明显的抑制(Drew, 1997; 康云艳等, 2006; Jia *et al.*, 2010)。而低氧下使用 EBR 可以增强三羧酸循环中 SDH、IDH 等酶活性,促进低氧下有氧呼吸的进行,缓解低氧所引起的伤害(康云艳等, 2008)。据报道,在低氧条件下,蛋白质合成异常,好气蛋白质的合成被抑制,而丙酮酸脱羧酶(PDC)、丙氨酸氨基转移酶(AlaAT)、乙醇脱氢酶(ADH)等厌氧蛋白(anaerobic protein, ANP)合成被促进(Subbaish & Sachs, 2003; 刘新宇和黄玉碧, 2004; 王长义等, 2010b)。本研究表明,低氧胁迫下, IDH、SDH、MDH、ME 同工酶表达量明显的加强,并产生了一些新的条带;低氧下施用外源 EBR 处理后 6、9 d 时 IDH、MDH 同工酶的表达分别比单纯低氧处理提高了 52.8%、13.6% 及 39.1%、11.3%, ME 在处理 6 d 时比单纯低氧处理提高了 11.6%,但 SDH 同工酶的表达 6、9 d 时分别比单纯低氧处理下降了 42.9% 和 36.1%。可见,在低氧条件下,并非所有好气蛋白质的合成被抑制。

综上所述,在低氧条件下, IDH、SDH、MDH、ME 等蛋白的合成被促进,低氧胁迫下营养液添加 EBR 可通过调节黄瓜根系 IDH、SDH、MDH 及 ME 同工酶的表达,从而有利于缓解低氧胁迫对黄瓜幼苗根系的伤害。

参考文献

- 白团辉, 马峰旺, 李翠英, 等. 2008. 水杨酸对根际低氧胁迫八棱海棠幼苗活性氧代谢的影响. 园艺学报, 35(2): 163-168.
- 郭世荣. 2003. 无土栽培学. 北京: 中国农业出版社.
- 康云艳, 郭世荣, 段九菊. 2006. 24-表油菜素内酯对低氧胁迫下黄瓜根系抗氧化系统及无氧呼吸酶活性的影响. 植物生理与分子生物学学报, 32(5): 535-542.
- 康云艳, 郭世荣, 段九菊. 2008. 根际低氧胁迫对黄瓜幼苗根系呼吸代谢的影响. 应用生态学报, 19(3): 583-587.
- 刘刚, 郭世荣, 康云艳. 2008. 钙对低氧胁迫下黄瓜幼苗生长和可溶性蛋白表达的影响. 江苏农业科学, (6): 135-137, 142.
- 刘新宇, 黄玉碧. 2004. 低氧胁迫对玉米根尖蛋白表达影响的研究. 西南农业学报, 17(3): 318-323.
- 陆晓民, 高青海. 2011. 油菜素内酯对硝酸钙胁迫下黄瓜幼苗生长及其抗氧化酶同工酶表达的影响. 热带作物学

- 报, 32(11): 2104–2108.
- 陆晓民, 孙 锦, 郭世荣, 等. 2011a. 低氧胁迫下 24-表油菜素内酯对黄瓜幼苗根系生长及其无氧呼吸同工酶表达的影响. 生态学杂志, 30(11): 2497–2502.
- 陆晓民, 孙 锦, 郭世荣, 等. 2011b. 外源 24-表油菜素内酯对低氧胁迫下黄瓜幼苗生长和可溶性蛋白表达的影响. 南京农业大学学报, 34(6): 31–35.
- 师 恺, 顾 敏, 于海静, 等. 2009. 腐胺提高黄瓜根际低氧耐性的生理机理. 中国农业科学, 42(5): 1854–1858.
- 王长义, 郭世荣, 程玉静, 等. 2010a. 外源钙对根际低氧胁迫下黄瓜植株钾、钙、镁离子含量和 ATPase 活性的影响. 园艺学报, 37(5): 731–740.
- 王长义, 郭世荣, 杜长霞, 等. 2010b. 外源钙对根际低氧胁迫下黄瓜幼苗 ADH、LDH 活性和同工酶的影响. 生态学杂志, 29(4): 662–668.
- 吴雪霞, 查丁石, 朱宗文, 等. 2011. 外源 24-表油菜素内酯对盐胁迫下茄子种子萌发和幼苗生理特性的影响. 植物生理学报, 47(6): 607–612.
- 张永平, 杨少军, 陈幼源. 2011. 24-表油菜素内酯对高温胁迫下甜瓜幼苗抗氧化酶活性和光合作用的影响. 西北植物学报, 31(7): 1347–1354.
- Manchenko GP(华子春等译). 2008. 酶的凝胶电泳检测手册. 北京: 化学工业出版社.
- Arora P, Bhardwaj R, Kanwar MK. 2010. 24-epibrassinolide induced antioxidative defense system of *Brassica juncea* L. under Zn metal stress. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 16: 285–293.
- Bajguz A, Hayat S. 2009. Effects of brassinosteroids on the plant responses to environmental stresses. *Plant Physiology and Biochemistry*, 47: 1–8.
- Bajguz A. 2010. An enhancing effect of exogenous brassinolide on the growth and antioxidant activity in *Chlorella vulgaris* cultures under heavy metals stress. *Environmental and Experimental Botany*, 68: 175–179.
- Bajguz A. 2011. Suppression of *Chlorella vulgaris* growth by cadmium, lead, and copper stress and its restoration by endogenous brassinolide. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 60: 406–416.
- Drew MC. 1997. Oxygen deficiency and root metabolism: Injury and acclimation under hypoxia and anoxia. *Annual Review of Plant Biology*, 48: 223–250.
- Fariduddin Q, Yusuf M, Chalkoo S, et al. 2011. 28-homobrassinolide improves growth and photosynthesis in *Cucumis sativus* L. through an enhanced antioxidant system in the presence of chilling stress. *Photosynthetica*, 49: 55–64.
- Gao HB, Jia YX, Guo SR, et al. 2011. Exogenous calcium affects nitrogen metabolism in root-zone hypoxia-stressed muskmelon roots and enhances short-term hypoxia tolerance. *Journal of Plant Physiology*, 168: 1217–1225.
- Jia YX, Sun J, Guo SR, et al. 2010. Effect of root-applied spermidine on growth and respiratory metabolism in roots of cucumber (*Cucumis sativus*) seedlings under hypoxia. *Russian Journal of Plant Physiology*, 57: 648–655.
- Saygideger S, Deniz F. 2008. Effect of 24-epibrassinolide on biomass, growth and free proline concentration in *Spirulina platensis* (Cyanophyta) under NaCl stress. *Plant Growth Regulation*, 56: 219–223.
- Sharma P, Bhardwaj R. 2007. Effects of 24-epibrassinolide on growth and metal uptake in *Brassica juncea* L. under copper metal stress. *Acta Physiologiae Plantarum*, 29: 259–263.
- Singh I, Shono M. 2005. Physiological and molecular effects of 24-epibrassinolide, a brassinosteroid on thermotolerance of tomato. *Plant Growth Regulation*, 47: 111–119.
- Subbaish C, Sachs MM. 2003. Molecular and cellular adaptations maize to flooding stress. *Annals of Botany*, 91: 119–127.
- Xia XJ, Huang YY, Wang L, et al. 2006. Pesticides-induced depression of photosynthesis was alleviated by 24-epibrassinolide pretreatment in *Cucumis sativus* L. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 86: 42–48.
- Yuan GF, Jia CG, Zhen L, et al. 2010. Effect of brassinosteroids on drought resistance and abscisic acid concentration in tomato under water stress. *Scientia Horticulturae*, 126: 103–108.

作者简介 陆晓民,男,1969年2月生,博士,副教授,研究方向为设施作物生理生态。E-mail: luxiaomin88@163.com
责任编辑 李凤芹