

低温、乙烯逆境下的番茄 NR 基因表达及相关反应

杨静慧¹ 张伟玉¹ 刘艳军¹ 罗云波² 柳树梧¹

(1. 天津农学院园艺系, 天津 300384; 2. 中国农业大学 食品与营养工程学院, 北京 100083)

摘要 通过低温和乙烯逆境下番茄植株的生长表现和抗性生理指标的变化及乙烯受体蛋白基因 NR 的表达,研究了 NR 基因与低温和乙烯的关系。结果显示:低温(5℃)抑制了 NR 基因的表达,维持了细胞膜的完整性,并减轻和延缓番茄实生苗因乙烯胁迫所产生的黄化、衰老等症状;外源乙烯增加植株细胞膜透性,处理的时间越长,细胞膜透性增加得越多,但低温可以推迟这一进程;低温和乙烯都可显著增加植株叶片蒸腾作用、呼吸作用和气孔导度;在有和无外源乙烯时,低温和乙烯抑制剂 Ag⁺ 均抑制番茄 NR 基因的表达。因此认为低温抑制了 NR 基因的表达,降低了植物对乙烯的敏感性,减轻和延缓了因胁迫乙烯的产生而造成的伤害;而抑制 NR 基因的表达,能提高植物的抗逆性;NR 基因是乙烯和低温胁迫症状的正调节因子。

关键词 低温; 乙烯; NR 基因; 基因表达; 生理反应

中图分类号 Q 945.32

文章编号 1007-4333(2003)03-0015-04

文献标识码 A

Expression of NR gene and related responses under ethylene and chill in tomato

Yang Jinghui¹, Zhang Weiyu¹, Liu Yanjun¹, Luo Yunbo², Liu Shuwu¹

(1. Tianjin Agricultural College, Tianjin 300384, China; 2. College of Food Science and Nutritional Engineering, China Agricultural University, Beijing 100083, China)

Abstract The relations of NR gene, ethylene and low temperature were studied by the changes of growth, physiology and expression of NR gene of tomato seedlings under chill and stress of ethylene. The result showed that chilling temperature (5℃) restrained expression of NR gene, maintained intact cytomembrane, lessened and delayed symptom of chlorosis and senescence in tomato seedling. Exogenous ethylene increased plant cytomembrane permeability and the longer ethylene treated, the more permeability was, but chill postponed the process. The result also showed that ethylene and chilling treatment significantly enhanced the transpiration rate, respiration and stomatal conductance of plant leaves. Chill and Ag⁺ restrained expression of NR gene either with or without ethylene. Hence, restraint of NR expression in low temperature (5℃) may be the reason that plant reduced both its sensibility to ethylene and its damage caused by stress ethylene. Restraining expression of NR may improve plant resistance. NR gene demonstrated as a positive factor regulating plant in a stress condition.

Key words chill; ethylene; NR gene; gene expression; physiological reaction

许多报道认为低温诱导乙烯(胁迫乙烯)的产生。如在冷敏感种类的植物营养生产时期,当温度降低时,乙烯的生物合成途径为正调节(向上调节)^[1];玉米在 5℃ 低温和干燥的气候(65%RH)下处理一段时间后,ACC 含量增加^[2];5℃ 的低温胁迫可刺激 6 个豆类品种产生乙烯^[3];Collins 等用绿豆

(*Vigna radiata* (L.) Wilczek) 的实生苗试验发现,下胚轴的冷害处理伴随着 ACC 氧化酶活性的增高和乙烯的产生^[4]。虽然有许多研究结果与之相反:如 Wang 等发现下胚轴茎段的热处理(40℃, 4 h)减轻了 2.5℃ 冷害,在受热组织的冷害处理期间 ACC 氧化酶活性降低到较低的水平^[5],但这也从另一方面

收稿日期: 2002-11-20

基金项目: 国家杰出青年科学基金资助项目(39825118);国家自然科学基金资助项目(39570500);天津教委资助项目(2001)

作者简介: 杨静慧,博士,教授,主要从事园艺、生理和生物技术研究, E-mail: dhtjac@public.tpt.tj.cn

表明植株对胁迫的反应与乙烯的生物合成有关。

由于乙烯的合成及植物对乙烯的反应还受 *NR* (never ripe) 和 *CTR1* 等乙烯受体蛋白基因的调节,特别是 *NR* 基因^[6]位于乙烯信号转导的前端,它不仅调节果实的成熟^[7,8],还与植物的抗病性有密切的关系^[9]。但是 *NR* 基因与植物的抗逆性的关系及乙烯的产生对植物适应环境的意义还不清楚^[5]。乙烯在植物学中具有“遇激而增,信息应变”的性质^[10],所以逆境乙烯在植物与环境的相互作用中可能扮演一个中间媒介的角色^[11]。乙烯合成途径中 *ACC* 合成酶和 *ACC* 氧化酶与逆境的关系研究得较多,但乙烯信号转导中各乙烯受体蛋白基因与逆境的关系的研究未见报道。而 *NR* 基因与低温关系的研究对揭示逆境乙烯的代谢机制有重要的理论意义,对抗性育种也有重要的实践意义。

本文首次在分子水平上报导了乙烯信号转导中受体蛋白 *NR* 基因与低温的关系,并结合植株生长和生理反应分析低温和乙烯逆境下 *NR* 基因的作用。

1 材料和方法

1.1 材料

丽春番茄 (*Lycopersicon esculentum* cv. Lichun) 购于中国农科院蔬菜研究所。

1.2 方法

1) 植株生长和生理指标 乙烯处理是分别将乙烯利 $0.1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 AgNO_3 (乙烯抑制剂) $50 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 加入生长 1 周的水培苗营养液中,并以加水为对照。低温处理是分别将生长 1 周的水培幼苗放入 5℃ 下处理,对照为 25℃,1~3 周后观察植株外观。幼苗用塑料泡沫片固定,每瓶 10 株,4 次重复。

将生长 1 周的番茄苗放入低温冰箱中(5℃,室内自然光照),分别在处理 1 d、1 周、2 周后测定各生理指标;乙烯处理是将 $0.1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 乙烯利加入水培苗营养液;每处理 10 株,3 次重复。电导仪测定叶片细胞膜透性,光合系统自动分析仪测定叶蒸腾比率、气孔导度、呼吸速率和细胞间 CO_2 浓度。

2) *NR* 基因表达 (RNA 杂交) 分别将乙烯利 $0.1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 AgNO_3 $50 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 加入到生长 2 周的水培苗营养液中,置于 25℃ 和 5℃ 下,2 周后叶片提取总 RNA。RNA 用 SDS/苯酚提取、 LiCl 沉淀,探针的合成(随机引物法,以 715 bp 的 *NR* 基因片段标记探针)和点杂交参照《分子克隆手册》^[11],用紫外分光光度计定量,点样 $10 \mu\text{g}$ 。

2 结果与分析

2.1 低温和乙烯处理下的番茄植株生长(表 1)

5℃ 低温使所有的症状都推迟出现,而且延迟乙烯的作用,使植株对乙烯不敏感。

表 1 低温和乙烯处理下的番茄植株生长观察

Table 1 Growth of tomato seedling under ethylene and chilling tolerance

| 胁迫时间 | 25 | | | 5 | | |
|------|----------------|----------------|------------------|--------------------------|-----------------------------|---------------------------|
| | CK | 乙烯处理 | Ag^+ 处理 | CK | 乙烯处理 | Ag^+ 处理 |
| 1 周 | 叶片轻微黄化 | 叶片黄化明显,有褐色斑块 | 生长正常、叶片绿色 | 生长正常、叶片绿色 | 生长正常、叶片绿色 | 生长正常、叶片绿色 |
| 2 周 | 40% 叶片黄化、有部分褐斑 | 70% 叶片黄化、有大量褐斑 | 30% 叶片黄化、有部分褐斑 | 10% 叶片轻度黄化,少数叶片萎蔫、有水浸状斑点 | 30% 叶片轻度黄化,少数叶片萎蔫、有水浸状斑点 | 10% 的叶片轻度黄化,少数叶片萎蔫、有水浸状斑点 |
| 3 周 | 70% 叶片黄化、有部分褐斑 | 全部叶片黄化、有大量褐斑 | 70% 叶片黄化、有部分褐斑 | 40% 叶片轻度黄化、部分叶片有水浸状斑点 | 60% 叶片轻度或中度黄化,较多叶片萎蔫、有水浸状斑点 | 40% 叶片轻度黄化、部分叶片有水浸状斑点 |

2.2 低温、乙烯对番茄叶片细胞膜透性的影响

各种不良环境因素对细胞的影响首先作用于细胞膜,使质膜受到损伤、透性增高^[12]。外渗率越高,表示植株受害越重。图 1 显示,无论有无乙烯,各处理前 7 d 叶片电解质外渗率变化不大;14 d 时常温组的显著增高,加乙烯的增高得更多,低温组都无明显变化;21 d 时,常温组的继续增高,低温组的也开

始显著增高,且低温加乙烯处理的显著高于对照。

表明外源乙烯处理增加植株细胞膜透性使植株受害,时间越长受害越重。而低温可以抑制、延缓或推迟这一进程,表明低温降低了植物对乙烯的敏感性,维持了细胞膜的完整性。

2.3 低温、乙烯对番茄植株生理指标的影响(图 2)

低温和乙烯处理 24 h 后,植株叶片蒸腾作用、

呼吸作用、气孔导度均显著增加,表明低温处理的各项指标变化与乙烯的有相同趋势,证明了低温诱导了乙烯的产生^[6,9]。

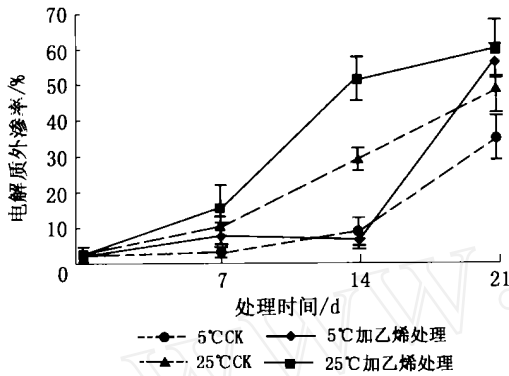


图 1 低温和乙烯对番茄叶片细胞膜透性的影响
Fig. 1 Effect of chilling tolerance and ethylene on the cytomembrane permeability of tomato leaves

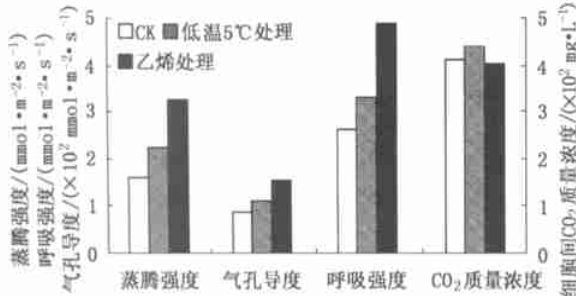


图 2 低温、乙烯对番茄植株 4 项生理指标的影响
Fig. 2 The relationship of chilling tolerance and ethylene with some physiological indexes in tomato

2.4 低温与乙烯介导的番茄 NR 基因的表达 (图 3)

从图 3 中各处理植株叶片中 NR 基因的 mRNA 含量的变化得出结论:常温 25 °C 下生长 14 d 的番茄植株叶片中 Northern 杂交信号较强,表明 NR 基因转录的 mRNA 量增加, NR 基因部分表达;而 5 °C 低温处理无杂交信号,明显低于对照(25 °C)。说明低温抑制了 NR 基因的表达。

常温下乙烯处理的叶片中 Northern 杂交信号也较强与常温下的对照相同;乙烯和 5 °C 低温处理的杂交信号不明显,抑制了 NR 基因的表达,与仅用低

温处理的一致。表明在有、无乙烯时,低温处理 2 周后完全抑制 NR 基因的表达,但 0.1 μmol 外源乙烯未能明显诱导 NR 基因的表达。

常温下 Ag⁺ 处理的叶片中 Northern 杂交信号较弱、明显低于对照;5 °C 低温和 Ag⁺ 处理的无杂交信号,完全抑制了 NR 基因的表达。说明乙烯抑制剂 Ag⁺ 抑制 NR 基因的表达。

2.5 综合分析(表 2)

低温、低温并乙烯处理 2 周后, NR 基因均未表达,此时植株叶片细胞膜透性较低,植株仅轻度受害;而常温乙烯处理使 NR 基因部分表达,植株叶片细胞膜透性高达 51%,且 70% 的叶片黄化和叶片上有大量褐色斑块,植株受害严重;常温对照也与常温下乙烯的处理有相同表现,只是受害较轻;这与本实验处理方法有关:生长在密闭水培液中的植株根系会出现缺氧状态,进一步刺激和提高了 ACC 合成酶的活性,从而增加了瓶内胁迫乙烯的含量^[13]。所以,各处理都使胁迫乙烯增加,但低温均降低了乙烯的产生及作用,减轻对植株的伤害。

常温下乙烯处理 1 d 后植株的蒸腾作用、气孔导度、呼吸作用均升高,而低温也同样,说明低温也诱导了植株内源乙烯的产生,这与 Page 等人研究的低温诱导乙烯的产生的结果一致^[1~4]。乙烯是直接还是间接如通过其他激素(如 ABA 等)调节参与气孔行为还有争议^[14],但是本实验 5 °C 低温下乙烯的产生并未诱导 NR 基因的表达,说明低温抑制乙烯综合症的出现是因为降低了植物对乙烯的敏感性。

NR 是乙烯受体蛋白基因,位于乙烯信号转导的上游^[15],是受乙烯诱导表达的,并同样遵守“抑制模式”规则^[6]:即无乙烯时, NR 基因的活性处于很低的水平;反之 NR 也抑制乙烯的产生。但当有乙烯时,诱导 NR 基因^[6]。根据这一理论,上述现象可以解释为:5 °C 的低温诱导了番茄实生苗 ACC 酶的活性,并诱导了胁迫乙烯的产生(胁迫乙烯的产生是植物对逆境反应的一个生理过程);但低温抑制了 NR

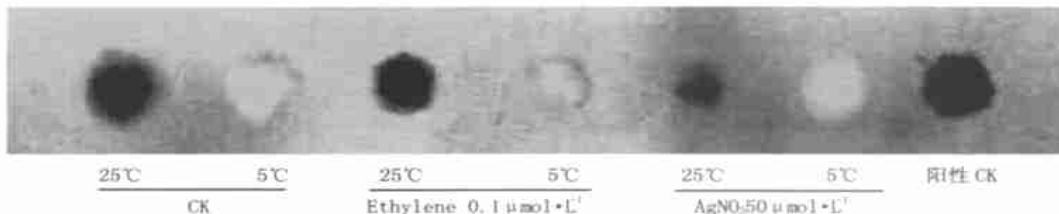


图 3 低温和乙烯逆境下番茄 NR 基因 mRNA 的 Northern 杂交
Fig. 3 Northern blot of NR mRNA on tomato under stress of chill and ethylene

表 2 番茄对乙烯、低温逆境反应的综合分析

Table 2 Effect of ethylene and chilling tolerance on tomato seedling

| 胁迫处理 | 处理 1 d 后 | | | | 处理 2 周后 | | |
|---------|--|--|--|--|--------------------------|--------------|--------------|
| | 蒸腾强度/ (mmol m ⁻² s ⁻¹) | 气孔导度/ (mmol m ⁻² s ⁻¹) | 呼吸强度/ (mmol m ⁻² s ⁻¹) | 细胞间 CO ₂ 质量 浓度/(mg L ⁻¹) | 受害症状 | NR 基因 的表达 | 细胞膜透 性/ % |
| 25 ,CK | 1.59 | 84 | 2.61 | 411 | 40 % 叶片黄化和有部 分褐色斑块 | 部分表达 | 28.676 |
| 25 + 乙烯 | 3.25 * | 153 ** | 4.85 ** | 401 | 70 % 叶片黄化和有大 量褐色斑块 | 部分表达 | 51.214 ** |
| 5 ,CK | 2.24 * | 109 * | 3.3 * | 437 | 10 % 的叶片轻度黄 化,少量水浸状斑点 | 未表达 | 8.481 ** |
| 5 + 乙烯 | | | | | 30 % 的叶片轻度黄 化,少量水浸状斑块 | 未表达 | 6.525 ** |

基因的活性,使产生的乙烯不能诱导 NR 基因的表达;NR 基因的抑制,反过来又抑制乙烯的产生,并使乙烯信号在该途径的上游被阻截,不能向下转导,从而减轻了乙烯综合症的出现(由于乙烯的增高而引起的植株受害症状和生理表现^[11])。从这一点来看, NR 基因是乙烯作用的正调节基因。

通过上述分析可以得出结论:低温诱导乙烯的产生,但抑制 NR 基因的表达,因而降低了植物对乙烯的敏感性,减轻产生胁迫乙烯造成的伤害。

由于几乎所有的环境胁迫都可以诱导胁迫乙烯的产生^[1],抑制乙烯受体蛋白 NR 基因的表达可以抑制乙烯的作用,减轻环境胁迫造成的伤害。因此,在抗逆性育种中,可以通过基因工程如反义 DNA 技术抑制 NR 基因的表达,培育抗性强、耐贮藏^[15]的新品种。

参 考 文 献

- [1] Morgan P W, Malcolm M C. Ethylene and plant responses to stress [J]. *Physiol Plant*, 1997, (100): 620 ~ 630
- [2] Janowiak R. Chilling - induced changes in the content of 1 - aminocyclopropane - 1 - Icarboxylic acid (ACC) and its N - malonyl conjugate (MACC) in seedlings of two maize inbreds differing in chilling tolerance [J]. *J Plant Physiol*, 1995, (147): 257 ~ 262
- [3] Guye M G, Vigh L, Wilson L M. Chilling - induced ethylene production in relation to chill - sensitivity in *Phaseolus* spp. [J]. *Exp Boi*, 1987, 38: 680 ~ 690
- [4] Collins G G. Heat shock increases chilling tolerance of mung bean hypocotyls tissue [J]. *Physiol Plant*, 1993, (89): 117 ~ 124
- [5] Wang C Y. Changes on polyamines and ethylene in cucumber seedling in response to chilling stress [J]. *Physiol Plant*, 1987, (69): 253 ~ 257
- [6] Rachel M H, Chin - Wen Ho, Zhefeng L. Antisense inhibition of the NR Gene restores normal ripening to the tomato Never - ripe mutant consistent with the ethylene receptor - inhibition model [J]. *Plant Physiol*, 2000, (127): 1079 ~ 1085
- [7] Lashbrook C, Tieman D, Klee H. Differential regulation of the tomato ETR gene family throughout plant development [J]. *Plant J*, 1998, 15(2): 243 ~ 252
- [8] Tieman D, Klee H. Differential expression of two novel members of the tomato ethylene - receptor family [J]. *Plant Physiol*, 1999, (120): 165 ~ 170
- [9] Joseph A C, Dentise M T, Steven T L. Response to *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* in tomato involves regulation of ethylene receptor gene expression [J]. *Plant Physiol*, 2000, (123): 81 ~ 92
- [10] 孙大业. 细胞信号转导 [M]. 北京: 科学出版社, 1999. 234 ~ 235
- [11] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T 著. 分子克隆实验指南 [M]. 金冬燕, 黎孟枫, 等译. 北京: 科学出版社, 1992. 108 ~ 123
- [12] 汤章城. 现代植物生理学实验指南. 北京: 科学出版社, 1999. 302 ~ 304
- [13] He C J, Drew M C, Morgan P W. Induction of enzymes associated with lysigenous aerenchyma formation in roots of *Zea mays* during hypoxia or nitrogen starvation [J]. *Plant Physiol*, 1994, (105): 861 ~ 865
- [14] 辛国荣, 董美玲. 水分胁迫下植物乙烯、脯氨酸积累、气孔反应的研究现状 [J]. *草业科学*, 1997, (2): 62 ~ 66
- [15] Wilkinson J, Lanahan M, Yen H, et al. An ethylene - inducible component of signal transduction encoded by Never - ripe [J]. *Science*, 1995, 270(5243): 1807 ~ 1808