

ABA、H₂O₂ 与 NO 供体硝普钠对 基因表达以及枣果发育的影响

杨卫民, 杜京旗, 赵 君, 褚盼盼, 刘宝琦

(吕梁学院 生命科学系, 山西 吕梁 033001)

摘 要:枣在成熟期间遇到连阴雨天气会发生严重的裂果现象,这种基于基因表达的生理病害的发生与非生物或生物胁迫有关。以吕梁当地木枣为试材,在木枣成熟期,采用改良 CTAB 法检测组织中 DNA 纯度及含量的变化,研究 ABA、H₂O₂ 与 NO 供体硝普钠(SNP)在枣果发育中对基因表达的影响。结果表明:ABA、H₂O₂ 与 NO 供体硝普钠(SNP)对枣果发育中 DNA 纯度及含量的影响不一,差异较为明显。其中不同浓度的 ABA 处理枣果组织中 DNA 的 OD₂₆₀/OD₂₈₀ 比值基本不在 1.700~1.900 范围内,DNA 纯度差异明显。但样品 DNA 含量较高,其值在 1 200 ng/ μ L 左右;H₂O₂ 和 SNP 处理样品 DNA 的 OD₂₆₀/OD₂₈₀ 比值基本上在 1.700~1.900 之间,DNA 纯度较高。样品 DNA 含量基本上小于或在 1 000 ng/ μ L 左右。外源 ABA 较为明显地干扰了基因表达,诱导了新蛋白质、RNA 和酚类物质等的生物合成,有促进木枣果发育的趋势;而 H₂O₂ 和 NO 供体硝普钠(SNP)对基因表达或枣果发育的影响不十分明显。

关键词:木枣;ABA;H₂O₂;NO 供体硝普钠(SNP);DNA;基因表达

中图分类号:S 665.1 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2015)07-0090-04

枣果实在成熟期遇阴雨天气会发生严重的裂果现象。这一问题严重地制约了我国枣业的发展,而这一重大的技术难题已经引起了国内学者的广泛关注。程国媛等^[1]报道枣在半红期至全红期果实果皮细胞已经开始凋亡或死亡。杨卫民等^[2]认为枣裂果的发生是一种

基于基因表达的生理病害,是枣果组织细胞程序性衰亡的结果。同时发现 ABA 信号刺激可能促进了细胞的程序性衰亡,是诱发枣裂果发生的内因。周运刚等^[3]认为枣裂果的发生是由于外界信号刺激引起枣果实组织内部生理失调与代谢紊乱所致。基于前人在枣裂果发生的生理基础和调控机制方面的研究,该试验在木枣青果期,用不同浓度的 ABA、H₂O₂、NO 供体硝普钠(SNP)进行处理,用改良的 CTAB 法检测 DNA 纯度及含量的变化,通过对组织中蛋白质、RNA、多糖以及酚类化合物对基因表达的干扰进行分析,研究枣裂果发生与非生物或生物胁迫的关系。

第一作者简介:杨卫民(1960-),男,山西文水人,本科,教授,现主要从事枣裂果调控机制等研究工作。E-mail:yangweimin0318@sina.com.

基金项目:山西省自然科学基金资助项目(2013011029-1);吕梁学院自然科学校内基金资助项目(ZRXN201203)。

收稿日期:2014-11-12

Abstract: Taking single-cell clone *Scutellaria baicalensis* callus as material, using the polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) method, through the analysis of esterase isozyme (EST) and peroxidase isozyme (POD) enzyme band, *Radix scutellariae* single-cell clone callus and the genetic characteristics of callus and strain differences in parents were studied. The results showed that three bands were characteristics in EST and four bands were characteristics in POD in single-cell clone *Scutellaria baicalensis* callus of different strains, four bands were the most and three bands were the least in EST in different strains, the first, the second and the third bands were the characteristic band; while the first, the third and the seventh bands were the characteristics bands in POD; differences were found in the presence or absence the number, width, color depth, the relative mobility of the same bands of EST and POD. There exist both genetic characteristics and strains difference in the single-cell clones *Scutellaria* callus and the parental cells, and these characteristics provide a theoretical reference in genetic characteristics and strains identification of the single-cell clone *Scutellaria baicalensis* (HQSC) callus.

Keywords: baicalin; single-cell clone; callus; esterase isozymes; peroxidase isozymes; enzyme spectrum

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试木枣采集于山西柳林孟门镇小垣则村黄河滩地。

试剂:3% CTAB 缓冲液(100 mmol/L Tris-HCl pH 8.0, 25 mmol/L EDTA, 1.5 mol/L NaCl, 用时加 2% β -巯基乙醇);液氮;4%的 PVP(聚乙基吡咯烷酮);氯仿:异戊醇=24:1;CTAB/NaCl(10% CTAB, 1 mol/L NaCl);异戊醇;NaCl;无水乙醇;10 mg/mL RNaseA 100 μ L TE 缓冲液(10 mmol/L Tris · HCl, 1 mmol/L EDTA, pH 8.0);3 mol/L NaAc, pH 5.2。

仪器:TU-1901 双光束紫外可见分光光度计(北京普析);Z36HK 高速冷冻离心机(德国哈默)。

1.2 试验方法

1.2.1 枣果处理 2013 年在山西柳林孟门镇小垣则村黄河滩地,选择树龄均一,大小适度的木枣树 18 株,分成 3 组,每组 6 株。在木枣青果期(通常为 8 月 20 日左右),分别按表 1 喷洒不同浓度的 ABA、 H_2O_2 与 SNP,于 20~30 d 后(枣果半红至全红)采摘。冰冻保存。

表 1 外施 ABA、 H_2O_2 和 SNP 试验方案

Table 1 Test plan of the application of ABA, H_2O_2 and SNP

处理	浓度					
Treatment	Concentration/(mg · L ⁻¹)					
ABA 浓度 Absciscic acid	0(CK)	2.00	4.00	6.00	8.00	10.00
SNP 浓度 Sodium nitroprusside	0(CK)	0.25	0.50	0.75	1.00	1.25
H_2O_2 浓度 Hydrogen peroxide	0(CK)	0.25	0.50	0.75	1.00	1.25

1.2.2 改良 CTAB 法提取枣果组织中 DNA 于 50 mL 离心管中加入 30 mL 3%CTAB 提取缓冲液,65℃ 条件下预热。将冰冻的枣果置于烧杯中用纯水浸泡 20 min,用纯水冲洗,滤纸吸干水分。快速切碎后称取 4 g 枣果组织置于预先加入液氮和 4%PVP 的研钵中,迅速研磨成细粉末状后转入到预热的 3%提取缓冲液中,轻轻摇匀,65℃ 温浴 30 min,期间轻轻摇匀 5~7 次。其它步骤参照李登科等^[4]和陈碧华^[5]的提取方法,待样品自然干燥后溶于 50~100 μ L 双蒸水中,-20℃ 保存备用。

1.2.3 样品 DNA 的纯度和浓度检测 每次取 DNA 样品 2 μ L,稀释 50 倍,分别在波长 260 nm 和 280 nm 吸光度值下测 5 次,求其平均值。所提 DNA 样品的纯度可用 OD_{260} 和 OD_{280} 的比值来评判^[6]: $OD_{260}/OD_{280} \approx 1.8$,表示为纯的 DNA; $OD_{260}/OD_{280} > 1.9$,表示有 RNA 的污染; $OD_{260}/OD_{280} < 1.7$,表示有蛋白质、多酚类杂质的污染。DNA 样品的含量^[7] (μ g/ μ L)= $OD_{260} \times$ 稀释倍数 \times 50/1 000。

1.2.4 ABA、 H_2O_2 、SNP 对基因表达的影响 根据 1.2.3 中样品 DNA 的纯度评判和浓度检测方法,在相同条件下,对不同处理采用同一种方法测定枣果组织中

DNA 纯度和含量,可判断蛋白质、RNA、糖类和酚类物质对 DNA 生物合成和对基因表达的干扰情况。

2 结果与分析

2.1 枣果中 DNA 纯度与干扰

2.1.1 ABA 处理枣果组织中 DNA 纯度与干扰 从表 2 可以看出,用不同浓度的 ABA 处理的木枣经改良 CTAB 法所提取的 DNA 样品纯度有差别。2、3、4 号样品的 OD_{260}/OD_{280} 比值均低于 1.700,说明此 3 组所提取的 DNA 样品有蛋白质、多酚类物质的干扰;1、5、6 号样品的 OD_{260}/OD_{280} 比值在 1.700~1.900 范围内,纯度较高,无其它物质干扰。

表 2 不同浓度 ABA 处理枣果中 DNA 样品纯度和产量

Table 2 The purity of DNA by different concentration ABA treatments

编号 Number	ABA 浓度 Absciscic acid concentration /(mg · L ⁻¹)	OD_{260} Absorbance	OD_{280} Absorbance	OD_{260}/OD_{280} Absorbance
1	0	0.486	0.269	1.861
2	2.00	0.714	0.442	1.615
3	4.00	0.495	0.314	1.576
4	6.00	0.525	0.324	1.620
5	8.00	0.486	0.256	1.897
6	10.00	0.785	0.420	1.870

2.1.2 H_2O_2 处理枣果组织中 DNA 纯度与干扰 由表 3 可知,不同浓度 H_2O_2 处理枣果组织中 DNA 的 OD_{260} 和 OD_{280} 比值,2、6 号均大于 1.900,分别为 2.024 和 1.964,说明所提取 DNA 不纯,有 RNA 污染;其它 4 组均在 1.700~1.900 范围内,相对来说较纯,没有其它物质干扰。

表 3 不同浓度 H_2O_2 处理枣 DNA 样品纯度和产量

Table 3 The purity of DNA by different concentration H_2O_2 treatments

编号 Number	H_2O_2 浓度 Hydrogen peroxide concentration /(mg · L ⁻¹)	OD_{260} Absorbance	OD_{280} Absorbance	OD_{260}/OD_{280} Absorbance
1	0	0.179	0.096	1.865
2	0.25	0.336	0.166	2.024
3	0.50	0.257	0.151	1.702
4	0.75	0.245	0.132	1.856
5	1.00	0.251	0.134	1.873
6	1.25	0.434	0.221	1.964

2.1.3 SNP 处理枣果组织中 DNA 纯度与干扰 从表 4 可以看出,不同浓度 SNP 枣果组织中 DNA 的 OD_{260} 和 OD_{280} 比值均在 1.700~1.900 范围内,说明所提 DNA 样品较纯,基本无蛋白质、多糖或者是 RNA 的干扰。

表 4 不同浓度 SNP 处理枣品中 DNA 样品纯度和产量

Table 4 The purity of DNA by different concentration SNP treatments

编号 Number	SNP 浓度 Sodium nitroprusside concentration /(mg · L ⁻¹)	OD ₂₆₀ Absorbance	OD ₂₈₀ Absorbance	OD ₂₆₀ /OD ₂₈₀ Absorbance
1	0	0.486	0.269	1.861
2	0.25	0.444	0.243	1.827
3	0.50	0.138	0.080	1.725
4	0.75	0.528	0.292	1.808
5	1.00	0.448	0.258	1.736
6	1.25	0.414	0.233	1.777

2.2 枣果中 DNA 含量

2.2.1 ABA 处理枣果组织中 DNA 含量 由图 1 可以看出,随着 ABA 处理浓度的增加,所提 DNA 样品含量呈现先升高后降低再升高又降低的变化规律。ABA 介导环境胁迫和植物抗逆反应,调控着植物生长发育以及响应环境信号,普遍存在于高等植物中^[8]。当植物受到环境胁迫后,ABA 能够快速积累并调控胁迫反应。植物受到生物和非生物胁迫后,内源 ABA 含量增加,并诱导多种抗逆基因的表达,从而增强植物的抗性,而这些基因的表达也能被外源 ABA 所诱导。

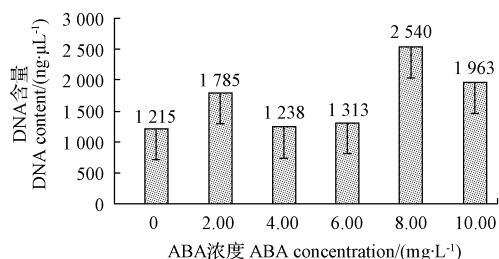


图 1 不同浓度 ABA 处理枣果组织中 DNA 样品含量

Fig. 1 DNA content of fruit organization in jujube by different concentrations ABA treatments

2.2.2 H₂O₂ 处理枣果组织中 DNA 含量 由图 2 可知,枣果组织中 DNA 含量随 H₂O₂ 浓度的增加呈现先升高后下降再升高的趋势;与对照组含量小于 500 ng/μL 相比,当 H₂O₂ 浓度为 0.25 mg/L 时,DNA 含量骤增,升到 840 ng/μL,随后持续下降到最低,H₂O₂ 浓度为 0.50 mg/L 时,DNA 含量较低,但仍超过对照组 DNA 含量;当 H₂O₂ 浓度为 1.25 mg/L 时,DNA 含量又呈骤增趋势,含量为 1 085 ng/μL,为最高。H₂O₂ 是植物抵抗胁迫环境的重要信号分子^[9]。大量 H₂O₂ 的存在对细胞具毒害作用,当植物受到外界环境胁迫时,植物细胞体内会积累大量活性氧,从而导致细胞内蛋白质、膜脂、DNA 及其它细胞组分严重损伤。当 H₂O₂ 浓度为 0.25 mg/L 时,DNA 含量骤增是枣果对外界 H₂O₂ 胁迫作用的应激性应答,短期内 DNA 含量增加,产生胁迫蛋白,抵御外界环境;但随着 H₂O₂ 浓度的逐渐加大,抵御

作用减弱,枣果细胞内蛋白质、膜脂和 DNA 等细胞组分受损,故 DNA 含量呈减少趋势;但当 H₂O₂ 浓度增加到一定程度时,植物体内有效清除活性氧的保护机制便发挥作用。试验中,当 H₂O₂ 浓度增加到 1.25 mg/L 时,DNA 含量骤增,超过 1 000 ng/μL,可能使枣果细胞内酶促类活性氧清除系统酶类的大量表达。

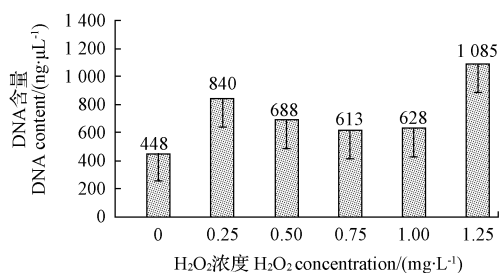


图 2 不同浓度 H₂O₂ 处理枣果组织中 DNA 含量

Fig. 2 DNA content of fruit organization in jujube by different concentrations H₂O₂ treatments

2.2.3 SNP 处理枣果组织中 DNA 含量 由图 3 可知,随着 SNP 浓度的增加,提取 DNA 样品含量呈先下降后升高又缓慢下降的变化规律。SNP 浓度为 0.50 mg/L 时,样品含量最低,含量为 345 ng/μL,0.75 mg/L 浓度时,样品浓度最高,达 1 320 ng/μL。NO 作为植物生长和发育的调节分子,能够对生物和非生物的逆境作出敏感反应,在植物体的抗病防御反应中是一种很重要的信号物质^[10-11]。NO 作为一个重要的信号分子,与其它信号分子如 ROS、cGMP、Ca²⁺ 等可能构成了一个复杂的 ABA 信号转导网络。对比图 2 和图 3 可看出,NO 对枣果组织中 DNA 的影响与 ABA 有相似之处,这从一个方面也证实了 ABA 与 NO 间的网络关系。

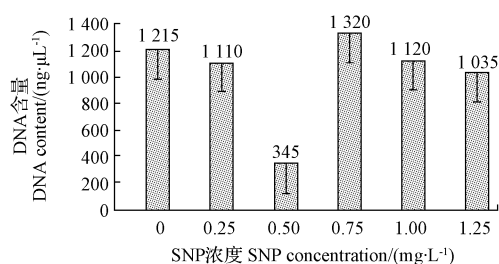


图 3 不同浓度 SNP 处理过的 DNA 样品产量

Fig. 3 DNA content of fruit organization in jujube by different concentrations SNP treatments

3 结论与讨论

不同浓度的 ABA 处理枣果组织中 DNA 的 OD₂₆₀/OD₂₈₀ 比值基本不在 1.700~1.900 范围内,DNA 纯度差异明显。但样品 DNA 含量较高,其值在 1 200 ng/μL 左右;H₂O₂ 和 SNP 处理样品 DNA 的 OD₂₆₀/OD₂₈₀ 比值基本上在 1.700~1.900 之间,DNA 纯度较高。样品 DNA

含量基本上小于或在 1 000 ng/ μ L 左右。

在相同条件下,对不同处理采用同一种方法测定枣果发育中 DNA 纯度,可判断蛋白质、RNA、糖类和酚类物质对 DNA 生物合成和对基因表达的干扰情况。外源 ABA 较为明显地干扰了基因表达,诱导了新蛋白质、RNA 和酚类物质等的生物合成,有促进木枣果发育的趋势;而 H_2O_2 和 NO 供体硝普钠对基因表达或枣果发育的影响不十分明显。

核酸在波长 260 nm 处有最高吸收峰是因嘌呤环和嘧啶环的共轭双键系统所致,所以嘌呤和嘧啶以及一切含有它们的物质,不论是核苷、核苷酸或核酸都有吸收紫外光的特性。紫外法能用来鉴定核酸的纯度和含量。蛋白质有紫外吸收是由于含有芳香氨基酸,通常蛋白质的吸收高峰在 280 nm 波长处,DNA 样品中有蛋白质、RNA、糖类和酚类物质时对 DNA 纯度有一定的影响,但含量较低时对核酸的紫外测定影响不大。一般情况下同时检测同一样品的 OD_{260} 、 OD_{280} 的比值可衡量样品的纯度。纯 DNA: $OD_{260}/OD_{280} = 1.700 \sim 1.900$; (>1.900 , 表明有 RNA 污染; <1.600 , 表明有蛋白质、酚等污染)。反过来讲,同时检测同一样品的 OD_{260} 、 OD_{280} 比值,其大小可被看作是其它物质对 DNA 的生物合成产生了影响,由此可认为,ABA、NO 供体硝普钠和 H_2O_2 作为信

号因子,干扰了基因表达,诱导了新蛋白质、RNA 和酚类物质等的生物合成,最终对枣果发育产生影响。

参考文献

- [1] 程国媛,程春生. 山西红枣防裂果技术取得突破[N]. 中国绿色时报, 2013-05-16.
- [2] 杨卫民,杜京旗,赵君,等. ABA 与 NO,GA 在枣果实发育期的网络关系与拮抗效应探讨[J]. 山西农业科学,2014,42(2):195-198,202.
- [3] 周运刚,张静,郑新疆. 红枣裂果的研究进展[J]. 江西农业学报, 2012,24(7):25-27.
- [4] 李登科,黄丛林,田建保,等. 高质量枣树基因组 DNA 提取方法的研究[J]. 分子植物育种,2005,3(4):579-583.
- [5] 陈碧华. 一种改良的 CTAB 法提取马尾松基因组 DNA[J]. 广东林业科技,2009,25(2):26-29.
- [6] 罗志勇,周钢,陈湘晖,等. 高质量植物基因组 DNA 的分离[J]. 湖南医科大学学报,2001,26(2):178-180.
- [7] 周延清. DNA 分子标记技术在植物研究中的应用[M]. 北京:化学工业出版社,2005:43-44.
- [8] 易文凯,王佳,杨辉,等. 植物 ABA 受体及其介导的信号转导通路[J]. 植物学报,2012,47(5):515-524.
- [9] Thomas S G, Franklin-Tong V E. Self-incompatibility triggers programmed cell death in Papaver pollen[J]. Nature,2004,429:305-309.
- [10] Lin A, Wang Y Q, Tang J Y, et al. Nitric oxide and protein S-nitrosylation are integral to hydrogen peroxide-induced leaf cell death in rice[J]. Plant Physiol, 2012,158:451-464.
- [11] Torres M A, Jones J D G, Dangl J L. Reactive oxygen species signaling in response to pathogens[J]. Plant Physiol, 2006,141:373-378.

Effect of ABA, H_2O_2 and NO Donor SNP on the Gene Expression and Development of Jujube Fruit

YANG Wei-min, DU Jing-qi, ZHAO Jun, CHU Pan-pan, LIU Bao-qi
(Department of Life Science, Lyuliang University, Lyuliang, Shanxi 033001)

Abstract: The jujube encounter overcast and rainy weather occurs the phenomenon serious in the mature period, the physiological disease gene expression associated with abiotic or biotic stress based on. Taking Lyuliang local Mu jujube as test material, in the jujube mature period, detection for change of DNA purity and content by of tissue by the modified CTAB method, gene expression of ABA, H_2O_2 and NO in fruit development were studied. The results showed that effect of ABA, H_2O_2 and NO donor sodium nitroprusside (SNP) on purity and content of DNA in fruit development had significant difference. Treated with different concentrations of ABA in jujube fruit, the DNA OD_{260}/OD_{280} ratio was not exactly in the range of 1.700—1.900, the purity of DNA was obvious difference. But the content of DNA was higher, its value at 1 200 ng/ μ L; the DNA OD_{260}/OD_{280} ratio was basically in between 1.700—1.900 with H_2O_2 and SNP treated, DNA with high purity. The content of DNA in the sample basically or less than or at 1 000 ng/ μ L. The gene expression were obviously interfered with exogenous ABA, and induced biosynthesis of new proteins, RNA, and the phenolic compounds, had a tendency to promote the development of jujube fruit; While effect of H_2O_2 and NO on gene expression or in fruit development was not very obvious.

Keywords: Mu jujube; ABA; H_2O_2 ; NO donor SNP; DNA; gene expression