

陈 义, 陈 健, 吕文静, 等. 硒通过调控小白菜幼苗根内 NO 与 H<sub>2</sub>S 信号诱导 *BrRbohG1/BrRbohG2* 表达[J]. 江苏农业学报, 2015, 31(1): 149-157.

doi: 10.3969/j.issn.1000-4440.2015.01.024

## 硒通过调控小白菜幼苗根内 NO 与 H<sub>2</sub>S 信号诱导 *BrRbohG1/BrRbohG2* 表达

陈 义<sup>1,2</sup>, 陈 健<sup>2</sup>, 吕文静<sup>1,2</sup>, 李丽娜<sup>1,2</sup>, 杨立飞<sup>1</sup>

(1. 南京农业大学园艺学院, 江苏 南京 210095; 2. 江苏省农业科学院食品质量安全与检测研究所, 江苏 南京 210014)

**摘要:** 为了研究硒对农作物胁迫的机理, 本试验以小白菜 (*Brassica rapa chinensis*) 幼苗为材料, 研究了亚硒酸钠 (Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub>) 处理下, 根中内源信号分子一氧化氮 (NO) 和硫化氢 (H<sub>2</sub>S) 的变化与 *BrRbohG1* 和 *BrRbohG2* 表达的关系。结果表明: 0.03 ~ 0.46 mmol/L 的 Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub> 显著抑制根的生长, 并呈现浓度效应; 随着 Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub> 处理浓度的升高, 内源 NO 含量逐渐上升, 而内源 H<sub>2</sub>S 逐渐下降, 两者呈显著负相关; 添加 NO 合成抑制剂 (L-NMMA 和 Tungstate) 或 NO 清除剂 (cPTIO) 能够显著抑制 Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub> 对内源 H<sub>2</sub>S 的诱导作用; Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub> 处理能够显著诱导根内 *BrRbohG1* 和 *BrRbohG2* 的表达, 分别添加 L-NMMA、Tungstate、cPTIO、H<sub>2</sub>S 供体 NaHS 均能显著抑制 Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub> 对上述两基因表达的诱导作用。说明 Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub> 处理下, 内源 NO 介导了 Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub> 对 *BrRbohG1* 和 *BrRbohG2* 的诱导表达, 而 H<sub>2</sub>S 则可能抑制了两个基因的表达; NO 也可能作用于 H<sub>2</sub>S 信号的上游。

**关键词:** 小白菜; 亚硒酸钠; 硫化氢; 一氧化氮; *BrRbohG1/BrRbohG2*

**中图分类号:** S634.3 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4440(2015)01-0149-09

## Selenium-induced expression of *BrRbohG1/BrRbohG2* in *Brassica rapa* root through nitric oxide and hydrogen sulfide signalling

CHEN Yi<sup>1,2</sup>, CHEN Jian<sup>2</sup>, LÜ Wen-jing<sup>1,2</sup>, LI Li-na<sup>1,2</sup>, YANG Li-fei<sup>1</sup>

(1. College of Horticulture, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China; 2. Institute of Food Quality Safety and Detection, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Nanjing 210014, China)

**Abstract:** Selenium (Se) has been becoming an emergent pollutant in the agricultural environment. In order to explore the mechanism of Se-induced stress responses in crops, the present study investigated the effect of Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub> treatment on two important endogenous signalling molecules, hydrogen sulfide (H<sub>2</sub>S) and nitric oxide (NO), on the roots of *Brassica rapa* and the regulation of the expression of *BrRbohG1* and *BrRbohG2* by H<sub>2</sub>S and NO. Results were achieved as follows. The root growth was significantly inhibited by Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub> varying from 0.03 mmol/L to 0.46

mmol/L in a dose-dependent manner. Compared to the control group, the root elongation was decreased by almost 60% in the treatment of Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub> at 0.06 mmol/L. Treatment with Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub> resulted in the increase in endogenous NO content and the decrease in endogenous H<sub>2</sub>S content in root in dose-dependent manners. The correlation analysis suggested that there was a

收稿日期: 2014-08-14

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31401857); 江苏省农业科技创新基金项目 [CX(13)5052]

作者简介: 陈 义 (1990-), 男, 安徽六安人, 硕士研究生, 研究方向为蔬菜生理与生物技术。 (E-mail) 2012104082@njau.edu.cn

通讯作者: 杨立飞, (E-mail) lfy@njau.edu.cn

significantly negative correlation between NO and H<sub>2</sub>S in root with Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub> treatment. The inhibition of H<sub>2</sub>S induced by 0.06 mmol/L Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub> could be significantly attenuated by the addition of both NO synthesized inhibitors (L-NMMA and Tungstate) and NO scavenger (cPTIO). The expressions of *BrRbohG1* and *BrRbohG2* could be induced significantly by Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub> at 0.06 mmol/L, which could be inhibited by the addition of L-NMMA, Tungstate, cPTIO, and H<sub>2</sub>S donor sodium hydrosulfide (NaHS), respectively. In conclusion, both endogenous NO and H<sub>2</sub>S are probably involved in the regulation of the expressions of *BrRbohG1* and *BrRbohG2* in the root of *B. rapa* under Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub> stress. The endogenous NO mediated Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub>-induced expressions of *BrRbohG1* and *BrRbohG2* while the endogenous H<sub>2</sub>S might inhibit the expressions of *BrRbohG1* and *BrRbohG2* in the roots of *B. rapa* under Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub> stress. And NO might have functioned the upstream of H<sub>2</sub>S in the above process.

**Key words:** *Brassica rapa*; selenium; hydrogen sulfide; nitric oxide; BrRbohG1/BrRbohG2

硒是动植物必需的微量元素之一,兼具营养、毒性、解毒三重生物学功能,是许多重要生物酶的主要成分<sup>[14]</sup>。研究发现通过对施硒浓度的调整,选择蔬菜作为生物载体可以保证安全的有机硒摄入量<sup>[5-6]</sup>。因此近年来,通过施用富硒肥提高农作物中的硒含量已成为重要的农事操作之一。但这亦导致了大量硒在农业环境中的过量累积,成为一种新的重金属污染源<sup>[7-8]</sup>。硒在动植物中的营养剂量和毒性剂量范围非常狭窄<sup>[9]</sup>。低浓度的硒对植物的生长发育具有保护和促进作用,但是过量的硒会对植物产生胁迫作用,致使产量和品质下降<sup>[10]</sup>。目前为止,硒对植物产生胁迫的机理主要集中于其通过诱导活性氧(Reactive oxygen species, ROS)的过量产生,进而诱发氧化胁迫反应。但植物硒毒害深入的生化机理尚不明晰。已有研究结果显示,由 *Rboh* (*Respiratory burst oxidase homologues*) 基因编码的膜蛋白 NADPH 氧化酶是植物在多数非生物胁迫下产生 ROS 的主要来源<sup>[11-13]</sup>。但硒通过何种途径诱导 *Rboh* 的表达还不清楚。

一氧化氮(Nitric oxide, NO)是调控植物响应环境胁迫的重要气体信号分子<sup>[14]</sup>。最近的研究结果显示,植物体内 NO 既能通过启动防卫反应帮助植物抵抗重金属胁迫<sup>[15]</sup>,亦能通过促进 ROS 的过量产生进而介导重金属的毒害效应<sup>[16-17]</sup>。已有研究结果显示,过量硒在抑制拟南芥幼苗生长的同时,能够诱导根内 NO 的过量产生<sup>[18]</sup>。但这些过量产生的 NO 在调控植物硒毒害反应中发挥何种作用尚不明确。硫化氢(Hydrogen sulfide, H<sub>2</sub>S)是最近被鉴定出的调控植物多种生理过程的一种全新气体信号分子<sup>[19]</sup>。H<sub>2</sub>S可通过减少植物体内 ROS 的过量产

生缓解植物的重金属毒害反应<sup>[19]</sup>。另外,最近的研究结果显示,H<sub>2</sub>S 与 NO 的互作参与植物对镉胁迫的响应和调控侧根发育<sup>[20-21]</sup>。因此,明确硒通过调控 H<sub>2</sub>S 与 NO 互作的下游靶标将有助于进一步揭示硒毒害诱导植物产生过量 ROS 的分子机理。

小白菜属十字花科芸薹属常见蔬菜,在实际生产中常作为富硒载体,但是外源添加无机硒易造成小白菜硒中毒。本试验以小白菜幼苗根为材料,研究小白菜幼苗硒处理后根内源 NO 和 H<sub>2</sub>S 的变化情况,以及这种变化与小白菜体内 2 个 *Rboh* 基因(*BrRbohG1* 和 *BrRbohG2*)表达的相关性。以期为进一步阐明植物硒毒害的分子机理提供部分理论基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

供试小白菜品种为南京绿领种业生产的五月慢。总 NOS 抑制剂 L-NMMA、NO 清除剂 cPTIO、NO 荧光染料 DAF-DA 均购自海门碧云天生物科技有限公司; NR 抑制剂 Na<sub>2</sub>WO<sub>4</sub>、H<sub>2</sub>S 供体硫氢化钠(NaHS)购自 Sigma 公司; TaKaRa Prime Script RT reagent 购自 TaKaRa 公司; Trizol Reagent 购自 Invitrogen 公司; H<sub>2</sub>S 荧光染料 WPS-1 [3'-methoxy-3-oxo-3H-spiro (isobenzofuran-1, 9'-xanthen)-6'-yl-2-(pyridin-2-yl)disulfanyl] benzoate], 由美国华盛顿大学生化系 Prof. Ming Xian 惠赠。其余试剂均购自国药集团。

### 1.2 试验方法

1.2.1 幼苗培养和处理 种子经过 1% NaClO 消毒 10 min 后,用蒸馏水冲洗 3 次,在 25 °C 条件下避光催芽 12 h,然后转入 1/2 Hoagland 营养液,在

光照培养箱(RDN-300B-3)中培养,培养条件为 25 ℃/22 ℃(昼/夜),光照周期 14 h/10 h(光/暗),相对湿度 75%。当幼苗根长至 0.3 cm 时开始处理。挑选生长健壮的幼苗到 1/2 Hoagland 营养液中。设置营养液中 Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub> 最终浓度分别为:0 mmol/L、0.03 mmol/L、0.06 mmol/L、0.12 mmol/L、0.23 mmol/L、0.46 mmol/L,处理 48 h 时检测根尖中内源 NO、H<sub>2</sub>S;处理 72 h 后统计根长,每个处理 10 棵苗,3 次重复,选取抑制率为 50% 左右的处理浓度作为后续试验条件。为探讨内源 NO 与内源 H<sub>2</sub>S 上下游关系设置以下处理:Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub> (0 mmol/L)、Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub> (0.06 mmol/L)、Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub> + L-NMMA (200 μmol/L)、Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub> + Tungstate (30 μmol/L)、Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub> + cPTIO (100 μmol/L),处理 48 h 后检测根尖中 H<sub>2</sub>S 含量。然后探讨内源 NO 和内源 H<sub>2</sub>S 与 *BrRbohG1/BrRbohG2* 表达量关系,设计以下处理:Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub> (0 mmol/L)、Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub> (0.06 mmol/L)、Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub> + L-NMMA (200 μmol/L)、Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub> + Tungstate (30 μmol/L)、Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub> + cPTIO (100 μmol/L)、Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub> + NaHS (0.5 mmol/L)、NaHS (0.5 mmol/L) 处理 48 h 后,取下根部保存于液氮中供后续试验使用。

**1.2.2 H<sub>2</sub>S 组织荧光检测与分析** 根内 H<sub>2</sub>S 采用特异性荧光探针 WSP-1 进行原位检测<sup>[21]</sup>。将不同处理的小白菜幼苗根部用蒸馏水冲洗 3 次,再吸干表面水分,将根系浸入到 20 μmol/L WSP-1 探针溶液中,在 25 ℃、避光条件下装载 40 min。探针装载完后用蒸馏水冲洗 3 次,通过在荧光显微镜 (ECLIPSE, TE2000-S, Nikon) 下以 465 nm 为激发波长、515 nm 为发射波长,并结合使用 Image-Pro Plus 6.0 软件统计根尖中 WSP-1 荧光密度,以此来反映 H<sub>2</sub>S 的相对含量。

**1.2.3 NO 组织荧光检测与分析** 根内 NO 采用特异性荧光探针 DAF-DA 进行原位检测<sup>[22]</sup>。将不同处理的小白菜幼苗根部用蒸馏水冲洗 3 次,再吸干表面水分,将根系浸入到 15 μmol/L DAF-DA 探针溶液中,在 25 ℃、避光条件下装载 15 min。探针装载完后用蒸馏水冲洗 3 次,通过在荧光显微镜 (ECLIPSE, TE2000-S, Nikon) 下以 490 nm 为激发波长、525 nm 为发射波长,并结合使用 Image-Pro Plus 6.0 软件统计根尖中 DAF-DA 荧光密度,以此来反映 NO 的相对含量。

**1.2.4 *BrRbohG1/BrRbohG2* 表达分析** 首先以 NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 中拟南芥的 *RbohG* 序列在小白菜基因组 *Brassica database* (BRAD) (<http://brassicadb.org/brad/index.php>) 中进行 BLAST 检索,获得相似性较高的小白菜 *BrRbohG* 类似基因。然后通过同源比对和序列结构分析进行确认。多重比对采用 DNAMAN 5.2.2;蛋白质氨基酸序列结构分析采用 SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de/>)<sup>[23]</sup>;蛋白质亚细胞定位预测采用 WoLF PSORT (<http://wolfpsort.org/>)<sup>[24]</sup>;启动子调控区域分析采用 PLACE (<http://www.dna.affrc.go.jp/PLACE/signalscan.html>)<sup>[25]</sup>。

基因表达分析采用 RT-PCR。采用 Trizol 法提取根总 RNA。使用 TaKaRa PrimeScript™ RT reagent 试剂盒合成 cDNA 模板,保存于 4 ℃ 条件下。分别以 *BrRbohG1* (Bra019189)、*BrRbohG2* (Bra19191)、*Actin* 序列设计特异性引物,引物序列分别为:*BrRbohG1*-F: 5'-CATGACGGCTATCTGAGCGT-3', *BrRbohG1*-R: 5'-CGTGCTGCGATTTTCGTTTCAT-3'; *BrRbohG2*-F: 5'-TTGGCTTGCGATTTTCCACG-3', *BrRbohG2*-R: 5'-GGATAAACCGCAGCGTTTCAC-3'; *Actin*-F: 5'-GTGACAATGGAAGTGAATG-3', *Actin*-R: 5'-AGACGGAGGATAGCGTGAGG-3'。PCR 反应体系:模板 1 μl,前后引物各 1 μl,PCR Mix 12 μl,超纯水 10 μl。PCR 反应条件:94 ℃ 5 min;94 ℃ 30 s, *BrRbohG1/BrRbohG2* (50 ℃ 30 s), *Actin* (58 ℃ 30 s);72 ℃ 1 min,28 个循环;72 ℃ 10 min。PCR 产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳进行检测,使用凝胶成像系统 (Tanon-3500, 上海天能) 观察拍照。

### 1.3 统计分析

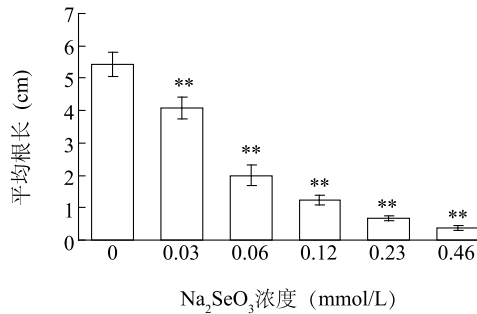
每个结果采用 3 次重复的平均值 ± 标准差表示,首先采用 SPSS 2.0 对试验数据进行单因素方差分析 (ANOVA),然后进行 *F* 检验检测不同处理之间的差异显著性。

## 2 结果与分析

### 2.1 Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub> 对小白菜幼苗根长的影响

Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub> 处理显著抑制了小白菜根的生长 (图 1)。在 Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub> 浓度为 0.06 mmol/L 处理时平均根长约为对照组的 36.9%,随着 Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub> 增加,根长逐渐变短,当 Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub> 浓度为 0.46 mmol/L 时根长最短,抑制率达到 93.0%,小白菜根部几乎停滞

生长,说明,在一定范围内, $\text{Na}_2\text{SeO}_3$ 对小白菜幼苗根部生长有抑制作用,且抑制率与 $\text{Na}_2\text{SeO}_3$ 浓度呈正相关。



\*\* 表示不同处理与对照在 0.01 水平上差异显著。

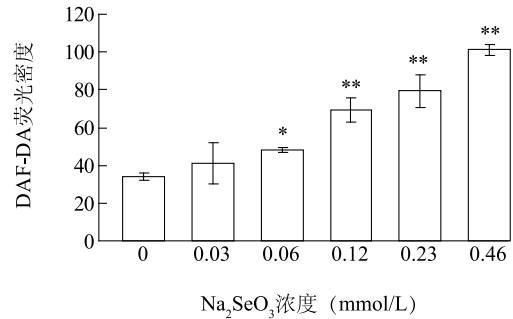
图 1 不同浓度  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$  对小白菜根生长的影响

Fig. 1 Effects of  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$  concentrations on the growth of *Brassica rapa* root

## 2.2 $\text{Na}_2\text{SeO}_3$ 对小白菜幼苗根尖内源 NO 和 $\text{H}_2\text{S}$ 含量的影响

图 2 为 DAF-DA 荧光密度统计图。随着  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$  浓度增加,小白菜根尖中 DAF-DA 荧光密度逐渐增加(图 2)。低浓度  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$  (0.03 mmol/L) 处理时,DAF-DA 荧光密度与对照组差异不显著;在 0.06 mmol/L 处理时 DAF-DA 荧光密度显著高于对照组,比对照组增加 42.9%。 $\text{Na}_2\text{SeO}_3$  浓度为 0.12 mmol/L、0.23 mmol/L、0.46 mmol/L 处理时 DAF-DA 荧光密度分别为对照组的 2.18 倍、2.34 倍、2.89 倍,与对照组均有极显著差异。说明  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$  处理下小白菜根尖内源 NO 含量增加,且随着  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$  浓度增加 NO 含量逐渐增加。

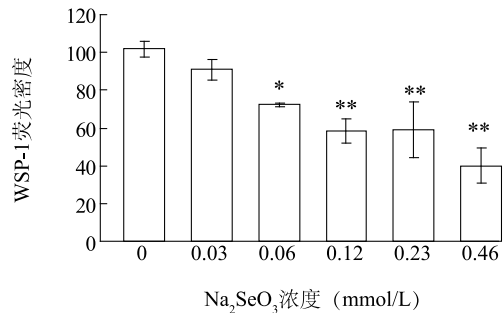
图 3 为 WSP-1 荧光密度统计。随着  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$  浓度增加,WSP-1 荧光密度逐渐降低(图 3)。0.03 mmol/L 的  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$  处理时,根尖 WSP-1 荧光密度与对照差异不显著;当  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$  为 0.06 mmol/L 时,WSP-1 荧光密度显著低于对照组,为对照的 71.1%。当  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$  浓度分别为 0.12 mmol/L、0.23 mmol/L、0.46 mmol/L 处理时,WSP-1 荧光密度分别为对照组的 57.5%、58.1%、39.4%,差异达到极显著。由此发现  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$  处理后小白菜根尖内源  $\text{H}_2\text{S}$  含量下降,且随着  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$  浓度增加  $\text{H}_2\text{S}$  含量逐渐下降。



\* 和 \*\* 分别表示不同处理与对照在 0.05 和 0.01 水平上差异显著。

图 2 不同浓度  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$  处理下小白菜幼苗根尖内源 NO 含量

Fig. 2 Effects of  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$  concentrations on the content of endogenous NO in *B. rapa* root



\* 和 \*\* 分别表示不同处理与对照在 0.05 和 0.01 水平上差异显著。

图 3 不同浓度  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$  处理下小白菜根尖内源  $\text{H}_2\text{S}$  含量

Fig. 3 Effects of  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$  concentrations on the content of endogenous  $\text{H}_2\text{S}$  in *B. rapa* root

## 2.3 $\text{Na}_2\text{SeO}_3$ 胁迫下小白菜根内源 NO 与 $\text{H}_2\text{S}$ 的互作

相关性分析结果显示,不同浓度  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$  处理过程中,根内源 NO 与  $\text{H}_2\text{S}$  含量变化成显著负相关,即:随着 NO 含量的上升, $\text{H}_2\text{S}$  逐渐下降(图 4)。我们的前期研究结果显示, $\text{H}_2\text{S}$  可作为 NO 的下游信号调控侧根发育<sup>[21]</sup>。为了进一步探究 NO 与  $\text{H}_2\text{S}$  在介导  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$  对小白菜幼苗氧化损伤过程中的上下游关系,本试验外源添加 NO 产生抑制剂( $\text{L-NMMA}$  和 Tungstate)与 NO 清除剂(cPTIO),再检测根尖中内源  $\text{H}_2\text{S}$  含量。由图 5 可知, $\text{Na}_2\text{SeO}_3$  处理后根尖 WSP-1 荧光密度与对照组相比显著下降,为对照的 43.7%;但是加入 NO 抑制



剂( $\gamma$ -NMMA 和 Tungstate)和清除剂(cPTIO)后,根尖中 WSP-1 荧光密度分别为 Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub> 处理组的 1.43 倍、1.37 倍、1.78 倍,差异均达到显著水平。由此发现,通过抑制或清除根尖中 NO,能够增加根尖内源 H<sub>2</sub>S 含量,即外源硒处理条件下,根尖中内源 NO 抑制 H<sub>2</sub>S 产生。

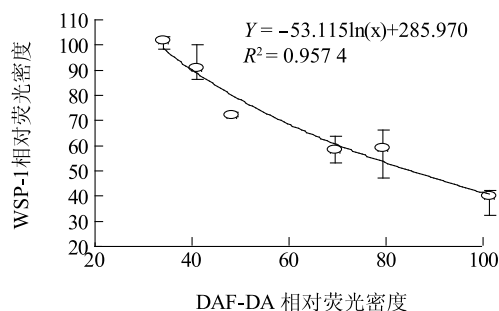
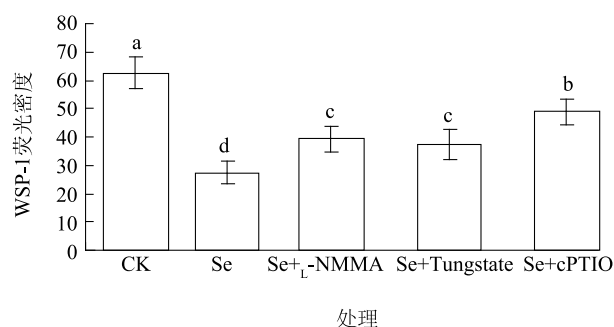


图4 不同浓度 Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub> 处理下小白菜根尖内源 H<sub>2</sub>S 含量 (WSP-1 荧光强度) 与内源 NO (DAF-DA 荧光强度) 相关性分析

Fig. 4 The correlation analysis between H<sub>2</sub>S content (WSP-1 fluorescent density) and NO content (DAF-DA fluorescent density) in *B. rapa* root under the stress of different concentration of Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub>



不同小写字母表示差异达到 0.05 显著水平。

图5 不同 NO 抑制剂和清除剂对小白菜幼苗根尖内源 H<sub>2</sub>S 的影响

Fig. 5 Effects of NO inhibitors and scavenger on the endogenous H<sub>2</sub>S in *B. rapa* root

## 2.4 Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub>胁迫下小白菜根内源 NO 与 H<sub>2</sub>S 互作对 *BrRbohG1/BrRbohG2* 基因表达的影响

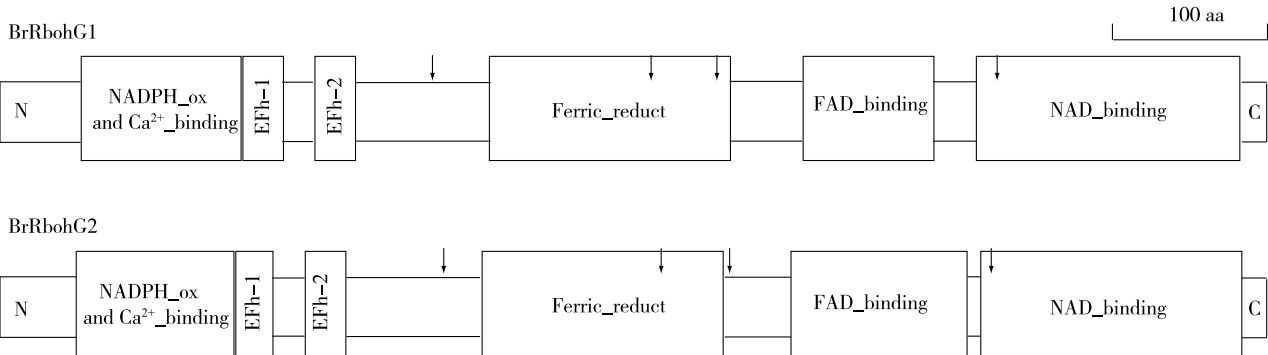
目前植物中报道的 *Rboh* 基因家族主要包含 11 个成员 (*RbohA-J*)。相比较其他成员,*RbohG* 的研究相对较少,其参与调控生理过程的报道也相

对缺乏。因此,我们以拟南芥中的 *AtRbohG* 基因序列在小白菜基因组中进行 BLAST,检索到两条同源序列: Bra019189 (*BrRbohG1*) 和 Bra019191 (*BrRbohG2*)。亚细胞定位预测结果显示,他们均定位于质膜或类囊体膜,属于膜蛋白。根据已报道的植物氧化酶结构<sup>[26]</sup>,我们进行了进一步的组成结构分析,结果表明:*BrRbohG1* 和 *BrRbohG2* 中含有植物 NADPH 氧化酶典型的保守结构特征,如在 EF-1 和 EF-2 手型结构域、在 EF-1 上游 N 端方向的 Ca<sup>2+</sup> 互作结构域、Fe<sup>3+</sup> 还原结构域、FAD 结合域、NAD 结合域 (图 6)。多重比对结果显示,上述特征性区域的关键作用位点在 *BrRbohG1*、*BrRbohG2* 和 *AtRbohG* 中相对保守一致 (图 7)。

图 8 显示为不同处理对 *BrRbohG* 基因表达量的影响。与对照相比,经 Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub> 处理的小白菜根系中 *BrRbohG1*、*BrRbohG2* 基因表达量均显著上调,分别为对照的 4.33 倍和 1.63 倍。由于 Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub> 处理能够诱导内源 NO 的产生,因此我们在 Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub> 处理时外源添加 NO 合成抑制剂  $\gamma$ -NMMA、Tungstate,或 NO 清除剂 cPTIO 后,*BrRbohG1* 和 *BrRbohG2* 的表达量分别比 Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub> 单独处理时下降了 46.7% ~ 61.7% 和 47.9% ~ 83.6%。另外,由于 Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub> 处理能够抑制内源 H<sub>2</sub>S 的产生,因此在 Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub> 处理时通过外源添加 H<sub>2</sub>S 供体 NaHS 来增加内源 H<sub>2</sub>S 含量。结果显示,*BrRbohG1* 和 *BrRbohG2* 的表达量分别比 Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub> 单独处理时下降了 57.4% 和 78.8%。由此发现,在 Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub> 处理条件下,减少根中的 NO 或增加 H<sub>2</sub>S 均能降低 *BrRbohG1* 和 *BrRbohG2* 的表达量。

## 2.5 *BrRbohG1* 和 *BrRbohG2* 基因启动子区域分析

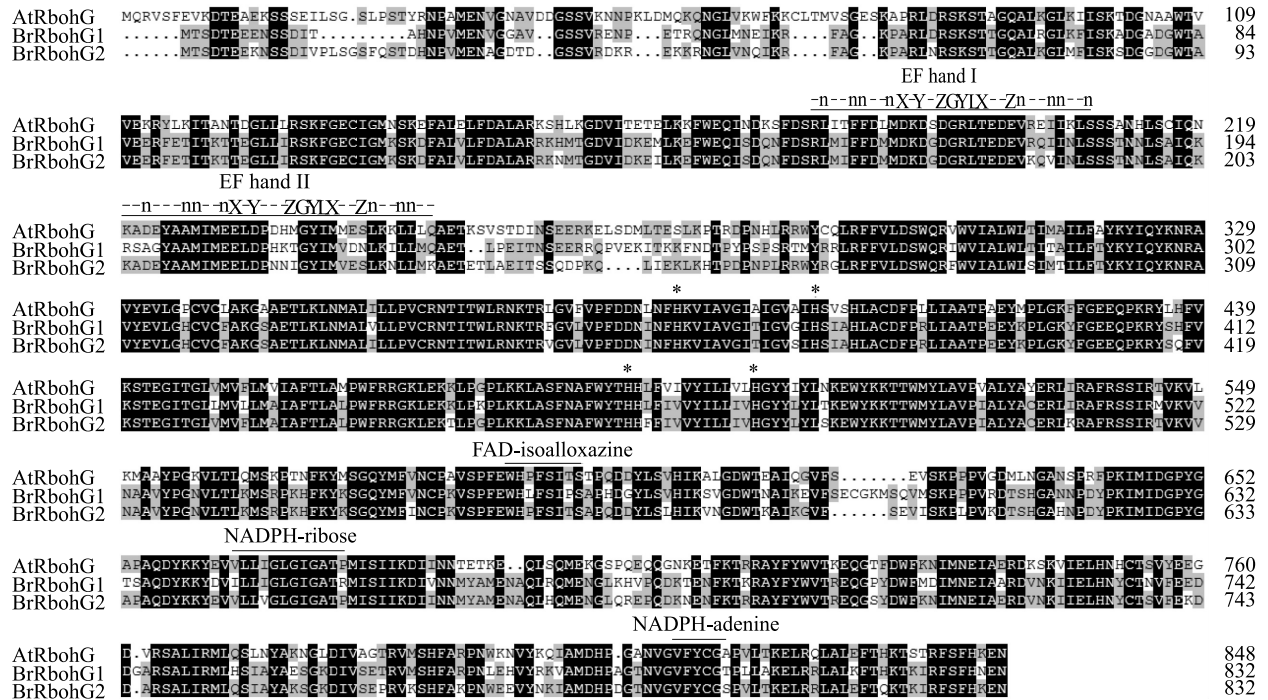
在 BRAD 中定位 *BrRbohG1* 和 *BrRbohG2* 基因,下载起始密码子上游 2 000 bp 序列并通过 PLACE (<http://www.dna.affrc.go.jp/PLACE/>) 进行启动子区域预测分析。结果 (表 1) 显示,*BrRbohG1* 和 *BrRbohG2* 的上游启动子区域包含响应金属离子调控元件 MRE (TGCACAC) 响应 NO 调控元件,如与 bZIP 转录因子结合的 ACGT 框 (ACGT) 等;响应生长素调控元件,如生长素响应因子 ARFAT (TGTCTC) 等。启动子区域的不同响应元件说明在 Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub> 胁迫下,*BrRbohG1* 和 *BrRbohG2* 基因可能受金属离子、NO、生长素等调控。



从左到右为从 N 端到 C 端;右上端标尺指示长度为 100 个氨基酸;条形框部分表示各个保守功能域的分布与功能;黑色箭头表示跨膜区域。

图 6 小白菜中 BrRbohG1 和 BrRbohG2 蛋白质序列保守域 SMART 分析

Fig. 6 SMART analysis for the conserved domains in BrRbohG1 and BrRbohG2 protein sequence



黑色和灰色区域分别表示 100% 与 60% 的相似性;EF hand I 和 EF hand II 分别表示两个保守的 EF 手型结构,其中短线表示任意氨基酸,X、Y、Z 通常为支链含氧的氨基酸;FAD-isoalloxazine、NADPH-ribose、NADPH-adenine 为保守的催化功能位点;星号 \* 表示保守的用于结合血红素的组氨酸位点。

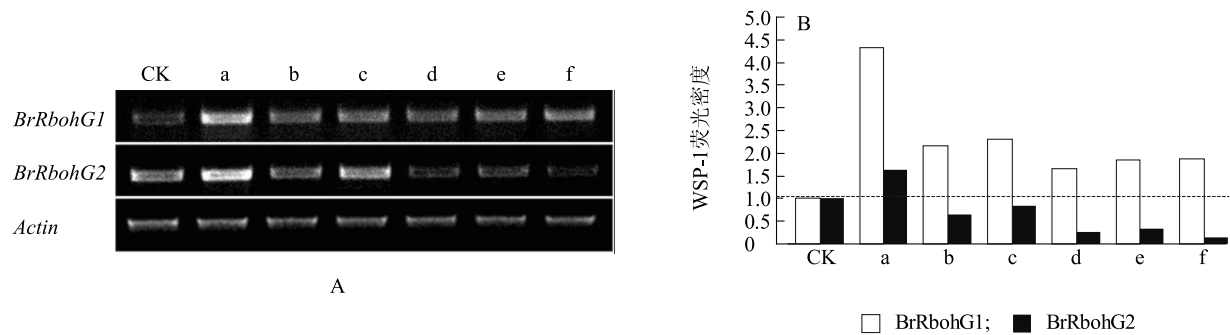
图 7 拟南芥中 AtRbohG 与小白菜中 BrRbohG1 和 BrRbohG2 的多重比对分析

Fig. 7 The multi-alignment of AtRbohG in Arabidopsis and BrRbohG1 and BrRbohG2 in B. rapa

3 讨论

目前关于硒在植物上的研究大多集中于硒在植物体受到外界胁迫时起到保护作用<sup>[27-28]</sup>,而本试验

则关注在一定浓度时硒会导致植物生长受到抑制。植物遭受多数外界胁迫都会导致 ROS 积累,打破原有氧化与抗氧化系统的平衡<sup>[29]</sup>,造成植物体细胞膜损伤、蛋白质合成受阻和含金属的酶失活等,抑制



A:抑制清除 NO 对小白菜幼苗根部 *BrRbohG1* 和 *BrRbohG2* 表达量变化的影响;B:外源添加 H<sub>2</sub>S 对小白菜幼苗根部 *BrRbohG1* 和 *BrRbohG2* 表达量变化的影响;a:Se;b:Se+L-NMMA;c:Se+Tungstate;d:Se+cPTIO;e:Se+NaHS;f:NaHS。

图 8 抑制、清除 NO 或外源添加 H<sub>2</sub>S 对小白菜幼苗根部 *BrRbohG1* 和 *BrRbohG2* 表达量变化的影响

Fig. 8 Expression levels of *BrRbohG1* and *BrRbohG2* in *B. rapa* root treated with NO inhibitors, scavenger and H<sub>2</sub>S donor

表 1 *BrRbohG1* 与 *BrRbohG2* 基因上游启动子区域不同信号响应元件

Table 1 Signal responsive elements in the promoters of *BrRbohG1* and *BrRbohG2*

	响应元件	响应元件序列	位点
<i>BrRbohG1</i> (Bra019189)	MRE	TGCACAC	159 (-)
			861 (+)
			921 (+)
			861 (-)
			921 (-)
	AUXIN	TGTCTC	429 (+)
			648 (+)
			236 (+)
			430 (+)
<i>BrRbohG2</i> (Bra019191)	MER	TGCACTC	323(+)
			264 (+)
			53 (+)
	AUXIN	ACGT	264 (-)
			353 (-)
		TGACG	59 (-)

植物生长。目前在拟南芥和水稻中分别发现 10 条和 9 条 *Rboh* 基因,它们都与 ROS 产生有关。前期试验发现在小白菜中有 12 条具有 NADPH 氧化酶功能的基因,并发现在硒胁迫下根中 *BrRbohG1* 和 *BrRbohG2* 的表达量明显上调。通过对 *BrRbohG1* 和 *BrRbohG2* 两基因的启动子区域分析得出二者启动子区域包含 NO、生长素和金属离子响应元件,结合

本试验中硒抑制小白菜根生长并导致 *BrRbohG1* 和 *BrRbohG2* 基因表达上调,说明硒可能通过直接或间接的方式使小白菜中 *Rboh* 基因的表达量上调,继而导致 ROS 积累。

NO 和 H<sub>2</sub>S 是当下植物生理学的研究热点。经过近 20 年的研究,发现 NO 几乎在植物生长过程中的各个时期、部位都有调节作用<sup>[30]</sup>。NO 在植物中有信号和毒害双重作用,大部分文献阐述了 NO 作为信号分子对植物受逆境胁迫时的保护作用。有文献从 NO 与 ROS 互作方面解释了 NO 存在的毒害作用<sup>[31]</sup>。在本试验中发现硒处理后内源 NO 含量明显上升,继而通过一系列信号传递调节下游的 *Rboh* 基因最终导致植物受到胁迫作用,这一发现可能是内源 NO 对植物产生毒害的又一个新的途径。相比于 NO,H<sub>2</sub>S 作为气体信号分子在植物中的研究时间较短,通过外源添加或清除 H<sub>2</sub>S 证明了 H<sub>2</sub>S 参与了植物气孔运动、光合作用、衰老以及对生物和非生物胁迫的调节作用<sup>[32-33]</sup>。对于 H<sub>2</sub>S 的研究也大都集中于其正面效应,在本试验中外源硒导致小白菜根中内源 H<sub>2</sub>S 含量下降,当外源补充 H<sub>2</sub>S 时,*BrRbohG1* 和 *BrRbohG2* 表达量相比硒处理有明显下降,说明低浓度的 H<sub>2</sub>S 可能介导了硒诱导植物 *Rboh* 基因表达造成植物受到抑制。已有研究发现 NO 与 H<sub>2</sub>S 有上下游关系,Lisjak<sup>[34]</sup>发现 H<sub>2</sub>S 在调节拟南芥气孔张开过程中使 NO 含量下降;而 Li<sup>[35]</sup>发现 NO 能够诱导下游 H<sub>2</sub>S 产生提高玉米幼苗耐热性,说明在不同物种或不同处理条件下 NO 的上下游关系不是固定的。本试验中降低内源 NO 含量能够缓解 Na<sub>2</sub>

SeO<sub>3</sub>对H<sub>2</sub>S产生的抑制作用,且增加内源NO或降低内源H<sub>2</sub>S均能诱导*BrRbohG1/G2*表达上调,说明H<sub>2</sub>S的产生受上游NO含量调控,而H<sub>2</sub>S能够直接或间接的调控*BrRbohG1/BrRbohG2*表达。

至于植物中NO与H<sub>2</sub>S间的相互调控机理还不是很清晰。研究发现在人体中发现NO和H<sub>2</sub>S能够发生生物化学反应,形成RSNO类化合物<sup>[36]</sup>;而且在大鼠中外源添加NO能够改变CBS(Cystathionine-β-lyase)活性和H<sub>2</sub>S水平<sup>[37]</sup>。那么植物中NO与H<sub>2</sub>S也可能有类似的生化反应和调节机制,即过量的NO可能与H<sub>2</sub>S反应降低了内源H<sub>2</sub>S水平,也有可能抑制*LCD*或*DCD*基因表达,使内源H<sub>2</sub>S含量保持较低水平。因此NO与H<sub>2</sub>S在植物中的相互作用还需要更深入研究。

总之,本研究结果表明,Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub>处理下,小白菜根尖产生过量的内源NO可能抑制下游内源H<sub>2</sub>S产生,且低浓度的H<sub>2</sub>S能够诱导*BrRbohG1*和*BrRbohG2*的表达。

## 参考文献:

- [1] ZHU Y G, PILON SMITS, ZHAO F J, et al. Selenium in higher plants: understanding mechanisms for biofortification and phytoremediation[J]. Trends in Plant Science, 2009, 14(8):436-442.
- [2] 方勇,陈曦,陈悦,等. 外源硒对水稻籽粒营养品质和重金属含量的影响[J]. 江苏农业学报, 2013, 29(4):760-765.
- [3] 陈剑侠. 葡萄叶片和果实对硒的吸收和累积特性[J]. 江苏农业科学, 2013, 41(7):154-156.
- [4] 吴丽军,孙小凤,张荣,等. 硒对不同品种春油菜含硒量、生物量及产量的影响[J]. 江苏农业科学, 2013, 41(4):77-79.
- [5] 张现伟,郑家奎,张涛,等. 富硒水稻的研究意义与进展[J]. 杂交水稻, 2009, 24(2):5-9.
- [6] DE T L, WAEGENEERS N, TACK F, et al. Selenium content of belgian cultivated soils and its uptake by field crops and vegetables[J]. Science of the Total Environment, 2014, 468:77-82.
- [7] HUANG S, HUA M, FENG J, et al. Assessment of selenium pollution in agricultural soils in the Xuzhou District, Northwest Jiangsu[J]. China J Environ Sci, 2009, 21: 481-487.
- [8] NAVARRO-ALARCON M, CABRERA-VIQUE C. Selenium in food and the human body: a review[J]. Sci Total Environ, 2008, 400: 115-141.
- [9] MACFARQUHAR J K, BROUSSARD D L, MELSTROM P, et al. Acute selenium toxicity associated with a dietary supplement[J]. Archives of Internal Medicine, 2010, 170(3):256-261.
- [10] MROCEK-ZDYRSKA M, WÓJCIK M. The influence of selenium on root growth and oxidative stress induced by lead in *Vicia faba L.* minor plants[J]. Biological Trace Element Research, 2012, 147(1-3):320-328.
- [11] 李秀,巩彪,徐坤. 外源NO对高温胁迫下姜叶片活性氧代谢的影响[J]. 园艺学报, 2014, 41(2):277-284.
- [12] 魏志琴,陈志勇,秦蓉,等. Cu<sup>2+</sup>对拟南芥根的局部毒性及诱导DNA损伤和细胞死亡[J]. 植物学报, 2013, 48(3):303-312.
- [13] 伏毅,戴媛,谭晓荣,等. 干旱对小麦幼苗脂类和蛋白质氧化损伤的影响[J]. 作物杂志, 2010(3):45-50.
- [14] BESSON-BARD A, PUGIN A, WENDEHENNE D. New insights into nitric oxide signaling in plants[J]. Annual Review of Plant Biology, 2008, 59: 21-39.
- [15] GALLEGOS M, PENA L B, BARCIA R A, et al. Unravelling cadmium toxicity and tolerance in plants: Insight into regulatory mechanisms[J]. Environ Exp Bot, 2012, 83: 33-46.
- [16] BESSON-BARD A, GRAVOT A, RICHAUD P, et al. Nitric oxide contributes to cadmium toxicity in *Arabidopsis* by promoting cadmium accumulation in roots and by up-regulating genes related to iron uptake[J]. Plant Physiol, 2009, 149: 1302-1315.
- [17] CHEN M, CUI W, ZHU K, et al. Hydrogen-rich water alleviates aluminum-induced inhibition of root elongation in alfalfa via decreasing nitric oxide production[J]. J Hazard Mater, 2014, 267: 40-47.
- [18] LEHOTAI N, PETÖ A, ERDEI L, et al. The effect of selenium (Se) on development and nitric oxide levels in *Arabidopsis thaliana* seedlings[J]. Acta Biologica Szegediensis, 2011, 55: 105-107.
- [19] LISJAK M, TEKLIĆ T, WILSON I D, et al. Hydrogen sulfide: environmental factor or signalling molecule? [J]. Plant Cell Environ, 2013, 36: 1607-1616.
- [20] SHI H, YE T, CHAN Z. Nitric oxide-activated hydrogen sulfide is essential for cadmium stress response in bermudagrass [*Cynodon dactylon* (L.) Pers.] [J]. Plant Physiology and Biochemistry, 2014, 74: 99-107.
- [21] LI Y J, CHEN J, XIAN M, et al. In site bioimaging of hydrogen sulfide uncovers its pivotal role in regulating nitric oxide-induced lateral root formation[J]. PLoS ONE, 2014, 9: e90340.
- [22] GUO K, XIA K, YANG Z M. Regulation of tomato lateral root development by carbon monoxide and involvement in auxin and nitric oxide[J]. Journal of Experimental Botany, 2008, 59:3443-3452.
- [23] LETUNIC I, DOERKS T, BORK P. SMART 7: recent updates to the protein domain annotation resource[J]. Nucleic Acids Res, 2012, 40:302-305.
- [24] HORTON P, PARK K J, OBAYASHI T, et al. WoLF PSORT: protein localization predictor[J]. Nucleic Acids Res, 2007, 35: 585-587.
- [25] HIGO K, UGAWA Y, IWAMOTO M, et al. Plant cis-acting regulatory DNA elements (PLACE) database[J]. Nucleic Acids Res, 1999, 27:297-300.
- [26] D MAARINO, C DUNAND, A PUPPO, et al. A burst of plant NADPH oxidase[J]. Trends in Plant Science, 2012, 17(1):9-



- 15.
- [27] SOLEIMANZADEH H. Response of sunflower (*Helianthus annuus* L. ) to selenium application under water stress[J]. World Applied Sciences Journal, 2012, 17(9):1115-1119.
- [28] DJANAGUIRAMAN M, PRASAD P, SEPPANEN M. Selenium protects sorghum leaves from oxidative damage under high temperature stress by enhancing antioxidant defense system[J]. Plant Physiology and Biochemistry, 2010, 48(12):999-1007.
- [29] 王东明,贾 媛,崔继哲. 盐胁迫对植物的影响及植物盐适应性研究进展[J]. 中国农学通报, 2009, 25(4):124-128.
- [30] 史庆华,赖齐贤,朱祝军,等. 一氧化氮在植物中的生理功能[J]. 细胞生物学杂志, 2005, 27(1):39-42.
- [31] WENDEHENNE D, PUGIN A, KLESSIG D F, et al. Nitric oxide: comparative synthesis and signaling in animal and plant cells[J]. Trends in Plant Science, 2001, 6(4):177-183.
- [32] 崔为体,沈文飏. 植物中硫化氢的生理功能及其分子机理[J]. 生命的化学, 2012, 32(4):385-389.
- [33] LI L, WANG Y, SHEN W. Roles of hydrogen sulfide and nitric oxide in the alleviation of cadmium-induced oxidative damage in alfalfa seedling roots[J]. Biometals, 2012, 25(3):617-631.
- [34] LISJAK M, SRIVASTAVA N, TEKLIĆ T, et al. A novel hydrogen sulfide donor causes stomatal opening and reduces nitric oxide accumulation[J]. Plant Physiology and Biochemistry, 2010, 48(12):931-935.
- [35] LI Z G, YANG S Z, LONG W B, et al. Hydrogen sulphide may be a novel downstream signal molecule in nitric oxide-induced heat tolerance of maize (*Zea mays* L. ) seedlings[J]. Plant, Cell & Environment, 2013, 36(8):1564-1572.
- [36] WHITEMAN M, LI L, KOSTETSKI I, et al. Evidence for the formation of a novel nitrosothiol from the gaseous mediators nitric oxide and hydrogen sulphide[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2006, 343(1):303-310.
- [37] MOK Y Y P, ATAN M, BIN M S, et al. Role of hydrogen sulphide in haemorrhagic shock in the rat; protective effect of inhibitors of hydrogen sulphide biosynthesis[J]. British Journal of Pharmacology, 2004, 143(7):881-889.

(责任编辑:陈海霞)