

Cu²⁺ 作用下辣椒膜脂过氧化及倍半萜环化酶基因转录

何水林, 陈如凯, 郑金贵

(福建农业大学, 福建 福州 350002)

摘要: 分析了在 CuCl₂ 作用下辣椒叶片倍半萜环化酶活性、倍半萜环化酶 mRNA 表达、细胞 GSH 和 GSSG 代谢及膜脂过氧化。结果表明, Cu²⁺ 能诱导辣椒叶片表达倍半萜环化酶活性, 酶活性的表达与相应的基因转录有关。辣椒叶片在 CuCl₂ 作用下合成了含 -SH 的螯合肽, 相应地 GSH 含量下降, GSSG 的含量有所上升, 细胞膜脂过氧化作用加剧。推测细胞膜脂过氧化产物或 GSH 氧化产物可能参与了 CuCl₂ 诱导辣椒倍半萜环化酶基因表达的信号传递作用。

关键词: 辣椒; 倍半萜环化酶; CuCl₂

中图分类号: Q946.5

文献标识码: A

文章编号: 1005-3395(2001)01-0063-06

THE EXPRESSION OF SESQUITERPENE CYCLASE GENE AND LIPID PEROXIDATION UNDER THE TREATMENT OF Cu²⁺ IN DETACHED LEAVES OF *CAPSICUM ANNUUM*

HE Shui-lin, CHEN Ru-kai, ZHENG Jin-gui

(Fujian Agricultural University, Fuzhou 350002, China)

Abstract: An analysis was made on expression of sesquiterpene cyclase gene, glutathione reduced and oxidized forms (GSH, GSSG), and lipid peroxidation and their corelationship in the detached leaves of *Capsicum annuum* treated with CuCl₂. The results showed that sesquiterpene cyclase gene was induced to express by elicitation of CuCl₂. The content of phytochaletin and GSSG increased, whereas GSH decreased in leaves under the elicitation of CuCl₂, and accumulation of lipid peroxidation products increased accordingly. It is speculated that some kind of lipid peroxidation products or oxidation products of GSH might involved in the signal cascades in the elicitation of sesquiterpene cyclase gene expression under CuCl₂ treatment.

Key words: *Capsicum annuum*; Sesquiterpene cyclase; CuCl₂

Cu²⁺ 是波尔多液中的主要成分, 在植物病害防治上有很多应用, 例如, Cu²⁺ 能诱导植物提高对病害的抗性水平^[1], CuSO₄ 处理辣椒果实能诱导其合成 Capsidiol 等一类倍半萜植保素^[2]; 另一方面, Cu²⁺ 又往往构成植物逆境, Cu²⁺ 胁迫常常导致植物活性氧的产生与清除之间平衡的失调而积累活性氧, 并进一步引发植物细胞膜脂过氧化作用。一些研究结果指出 Cu²⁺ 胁迫下植

收稿日期: 2000-04-10

基金项目: 福建省教委留学回国人员基金资助项目

物活性氧产生和清除的失调与植物螯合肽的产生、还原型谷胱甘肽(GSH)的减少有一定的关系^[3-5]。

倍半萜环化酶是茄科植物烟草的 Capsidiol 等倍半萜植保素的生物合成途径中催化 FPP 环化成 5-epi-aristolochene, 将碳从异戊二烯代谢途径引入倍半萜代谢支路关键步骤的调节酶^[6]。我们已分离和克隆了辣椒倍半萜环化酶两个 cDNA^[7]。本研究进一步分析 Cu²⁺ 作用下倍半萜环化酶基因表达和辣椒叶片 GSH、氧化型谷胱甘肽(GSSG)、膜脂过氧化情况, 并探讨活性氧代谢、膜脂过氧化作用与辣椒倍半萜环化酶基因表达之间的可能关系。

1 材料与方 法

材料 所用辣椒品种为韩国主栽品种之一的 Subiche, 由韩国庆尚北道辣椒研究中心惠赠, CuCl₂ 及其它试剂或药品分别为 Sigma、Asham 等公司产品, 随机引物标记试剂盒 Prime-It kit 是 Stratagene 产品(Stratagene, San Diego, CA)。

辣椒的栽培 辣椒种子经次氯酸钠(1%)消毒 1 h, 蒸馏水浸泡 1 d(25℃下)后, 播种于盛有经消毒的稻田土壤塑料盘中, 待幼苗长到 5 叶左右, 移栽到直径 20 cm、深 30 cm 的盛有消毒水稻土的盆钵中, 置于 25℃, 16 h 光/8 h 暗温室中, 待植株长到 10 片子叶时, 取倒 3-4 功能叶用于各种诱导处理和分析, 每个样品 3 片叶子。

CuCl₂ 及外源 GSH 和抗坏血酸处理 配置一定浓度梯度 CuCl₂ 溶液, 用消毒的手术剪剪下辣椒叶片, 蒸馏水冲洗, 将切口浸于上述 CuCl₂ 溶液中, 借助叶片的蒸腾吸水作用, 使溶剂分子随水进入叶片。用 2 mmol/L 的 GSH/Vitc 溶液预处理离体辣椒叶片 4 h, 再用 4 mmol/L CuCl₂ 处理 5 h 后置于蒸馏水中, 处理的叶片在培养皿中于 25℃ 遮光培养到规定的时刻取样, 用液氮固定放入 -70℃ 冰箱待用。

倍半萜环化酶活性测定 按 Vogeli 的方法进行^[8]。

蛋白质含量的测定 按 Bradford 的方法进行^[9]。

RNA 的提取及 Northern Blot 分析 RNA 的提取按苯酚/氯仿法进行^[10]; 用 SACCC#1 (辣椒倍半萜环化酶 cDNA) 为探针, 用随机引物试剂盒按厂家的说明书进行 ³²P 标记; 分别取 5 μg 总 RNA, 高速离心干燥, 加入 4 μl 消毒双蒸水, 10 μl 甲酰胺, 3.4 μl 甲醛, 2 μl 10×MOPS 缓冲液(200 mmol/L MOPS, 50 mmol/L NaAC, 10 mmol/L EDTA), 样品 60℃ 加热, 冷却, 加入 5 μl 染料(0.2% 溴酚蓝, 0.25% Xylene Cyanol, 30% 甘油)待用。混合 6.25 ml 10×MOPS, 0.6 g 琼脂和 43.75 ml dH₂O, 并在微波炉上加热溶解琼脂, 加入 1 μl EtBr (10 mg ml⁻¹) 和 12.5 ml 甲醛, 混匀, 倒入预先准备的胶盒中冷却 30 min 备用。RNA 样品按常规方法点样、电泳到染料颜色快到终点时, 停止电泳, 用 10×SSC 作转移液, 通过毛细雨管吸水作用, 将 RNA 从胶上转移到尼龙膜(Bio-RAD), 用紫外线自动交联固定。用磷酸缓冲杂交液(7% SDS, 1 mmol/L EDTA, 0.263 mmol/L 磷酸缓冲液, 1% BSA) 60℃ 预杂交 4 h 后, 将已标记的探针加入到杂交袋中, 60℃ 杂交 16 h, 用 2×SSC(含 1% SDS) 在 55℃ 下洗膜 2×10 min, 再用 0.1×SSC(含 0.1% SDS) 洗膜 2×10 min, 晾干, X 感光片于 -70℃ 放射自显影 72 h。

非蛋白质硫醇的提取和分析 非蛋白质硫醇的提取和分析按 C. H. Ric. De Vos 的方法进行^[5]。GSH 和 GSSG 按 Anderson 的 GSSG 循环法测定^[11], 用 GSSG 作标准。在测 GSH+GSSG 总量时, 谷胱甘肽还原酶(Sigma type III from bakers yeast) 用量为 0.5 U ml⁻¹,

在测定 GSSG 时, 用 1 U ml^{-1} Phytochelatin-SH 含量用总酸溶性巯基化合物减去 GSH 计算。

2 结果与分析

2.1 CuCl_2 作用下的倍半萜环化酶活性

在 2 mmol/L 的 CuCl_2 的作用下, 辣椒叶片在 12 h 以后就能检测出倍半萜环化酶的活性, 并随着时间的推移逐步升高, 在 36 h 达最高值, 以后下降 (图 1)。 CuCl_2 对辣椒倍半萜环化酶的诱导作用与 CuCl_2 的浓度及辣椒植株的生育进程有关, 开花以前 10 叶期辣椒植株的主要功能叶随 CuCl_2 浓度的逐渐增加, 被诱导的倍半萜环化酶活性也逐渐增加。而开花结果期辣椒植株的主要功能叶片却在较低的 CuCl_2 浓度下有较高的倍半萜环化酶活性 (图 2)。

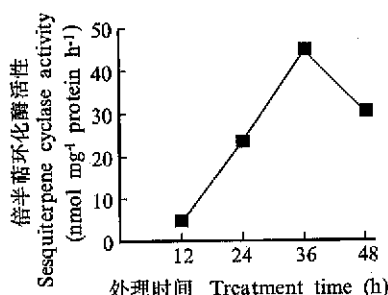


图 1 CuCl_2 (2 mmol/L) 处理下倍半萜环化酶活性
Fig. 1 Activity of sesquiterpene cyclase under CuCl_2 treatment

辣椒叶片为开花以前的主要功能叶 *Capsicum annuum* leaves used were main functional leaves at 10 leaves stage.

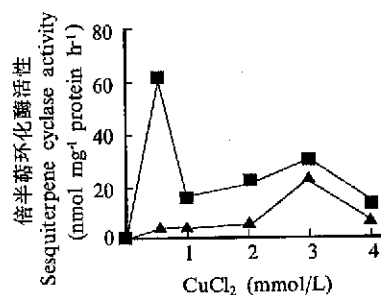


图 2 不同浓度 CuCl_2 处理下不同生育期辣椒叶片倍半萜环化酶活性
Fig. 2 Sesquiterpene cyclase activity in *Capsicum annuum* leaves at different stages under different concentrations of CuCl_2 treatment
—▲— 开花前辣椒主要功能叶片 Main functional leaves at 10 leaves stage;
—■— 开花以后主要功能叶 Main functional leaves after flowering.

2.2 CuCl_2 胁迫下倍半萜环化酶 mRNA 的积累

用 SACCC#1 (辣椒倍半萜环化酶 cDNA) 为探针进行 Northern Blot 分析的结果表明, 在 CuCl_2 作用下, 辣椒叶片中发生了倍半萜环化酶基因转录, 出现了较高的倍半萜环化酶 mRNA 积累, 而在对照中没有发现倍半萜环化酶基因转录产物的积累 (图 3)。

2.3 CuCl_2 作用下膜脂过氧化作用

从图 4,5 可以看出, 在 CuCl_2 作用下, 辣椒叶片发生了膜脂过氧化作用, 在 CuCl_2 处理 6-42 h 之间, 各时刻 MDA 的含量均显著高于对照, 4 mmol/L CuCl_2 处理的辣椒叶片 MDA 含量显著高于 2 mmol/L CuCl_2 处理; GSH 含量较对照显著减少, 而 GSSG(%) 含量增加, Phytochelatin 含量较对照显著增加。 4 mmol/L CuCl_2 处理的辣椒叶片的 GSH 低于 2 mmol/L 处理的, 4 mmol/L CuCl_2 处理的辣椒叶片的 GSSG、含 -SH 植物螯合物含量高于 2 mmol/L 处理的。

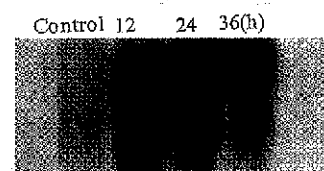


图 3 CuCl_2 处理下倍半萜环化酶基因 mRNA 的积累
Fig. 3 Accumulation of mRNA of sesquiterpene cyclase genes in *Capsicum annuum* leaves
The leaves were collected at indicated time points for mRNA, sample ($5 \mu\text{g}$) were size fractionated by electrophoresis and transferred to nylon membranes, then probed with radiolabeled SACCC#1.

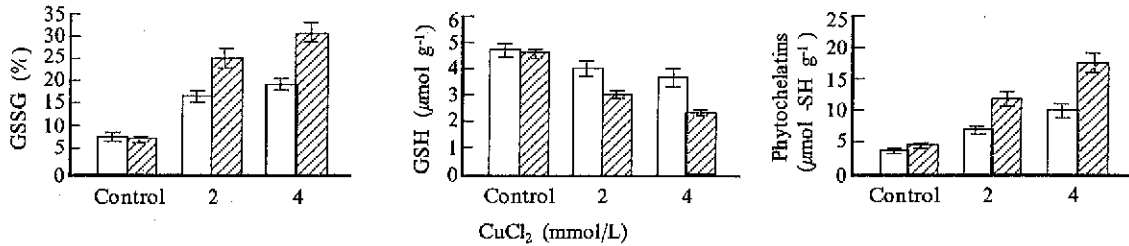


图4 CuCl₂处理辣椒叶片6 h和12 h后GSH、GSSG和Phytochelatin的含量
Fig. 4 The Content of GSH, GSSG and phytochelatin in the *Capsicum annuum* leaves after 6 or 12 hours of CuCl₂ treatment

□ 6 hours ▨ 12 hours

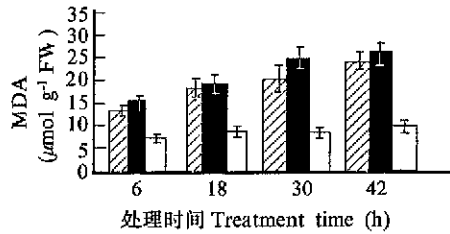


图5 CuCl₂处理辣椒叶片不同时间后的MDA含量
Fig. 5 The content of MDA in *Capsicum annuum* leaves after different time of CuCl₂ treatment

▨ 2 mmol/L ■ 4 mmol/L □ Control

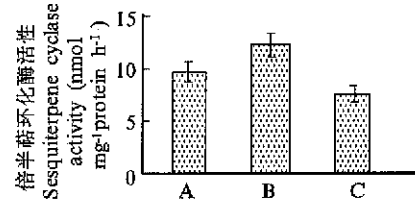


图6 外源自由基清除剂对CuCl₂诱导辣椒叶倍半萜环化酶的活性
Fig. 6 Pretreated effects of exogenous GSH or ascorbic acid on CuCl₂-induced sesquiterpene cyclase activity in leaves of *Capsicum annuum*. Treatment with CuCl₂ only (A), with CuCl₂+GSH (B) and CuCl₂+ascorbic acid (C).

2.4 外源自由基清除剂对CuCl₂处理诱导辣椒倍半萜环化酶基因表达效应

用外源GSH预处理(图6B)略微增强了CuCl₂(图6A)对辣椒叶片倍半萜环化酶活性的诱导作用; 而用外源抗坏血酸预处理(图6C)却一定程度地削弱了CuCl₂对辣椒叶片倍半萜环化酶活性的诱导作用。

3 讨论

用CuCl₂处理离体辣椒叶片,能诱导辣椒叶片表达倍半萜环化酶活性。由于茄科植物中倍半萜环化酶是倍半萜植保素在外界诱发因子作用下诱导合成代谢途径中的关键调节酶,外界各种诱发因子对植物中的植保素的诱导合成大都是通过对植保素合成代谢途径中的关键调节酶的诱导作用而实现的^[6]。因此,倍半萜环化酶在Cu²⁺诱导作用下导致辣椒合成倍半萜植保素。Waston等研究也表明Cu²⁺能诱导辣椒果实产生倍半萜植保素Capsidiol^[2],推测Cu²⁺诱导植物合成植保素的作用与Cu²⁺诱导植物提高对各种病菌的抗性^[1]而在生产中作为农药应用有关。

Cu²⁺作用下辣椒叶片膜脂过氧化作用显著高于对照,与此相对应的是GSH含量显著降低、GSSG所占的百分比升高、含SH-的植物螯合物的含量升高。Cu²⁺是重金属离子,植物重金属元素在谷氨酰半胱氨酸合成酶的催化作用下合成富含SH-的螯合物即(γ-谷氨酰-半胱氨酸)_n-甘氨酸(n=2-10),GSH是合成上述螯合物的底物^[4,12]。因此,推测本研究中辣椒叶片在Cu²⁺作用下合成螯合物而使游离GSH的含量降低。众所周知,GSH是植物体内的重要抗氧化剂,在清除植物体内自由基的防卫反应中起重要的作用^[13],GSH的降低使植物细胞内自由基的产生和清除之间的平衡遭到破坏,导致细胞膜脂过氧化作用加剧;另一方面,Cu²⁺本身能催化

GSH 的氧化^[5,14], 从而造成部分 GSH 氧化增加, 而使 GSSG 的含量升高。

Cu^{2+} 作用下辣椒叶片倍半萜环化酶基因表达与膜脂过氧化作用及 GSH 的氧化产物有一定的关系。已有相当多的研究表明活性氧或细胞膜脂过氧化产物参与了植物防御反应的信号传递过程^[15], 但茄科植物在生物诱发因子(病菌等)的诱导作用下倍半萜植保素代谢途径中关键调节酶基因被诱导表达的过程中, H_2O_2 等活性氧自由基可能不是信使物质^[16], 信使系统的启用可能因诱发因子而异, 并可能也与特定的防御反应基因有关。用外源 GSH 预处理能增强 CuCl_2 对辣椒叶片倍半萜环化酶活性的诱导作用, 这与 Wingate 等人用外源 GSH 处理豆悬浮细胞诱导苯丙氨酸解氨酶(PAL)和查尔酮合成酶(CHS)基因转录^[17]、Edwards 等用 GSH 和 GSSG 处理诱导 PAL 和植保素的合成的结果^[18]类似。推测 Cu^{2+} 对辣椒倍半萜环化酶活性的诱导作用与辣椒叶片的膜脂过氧化作用及 GSH 的氧化产物有关。外源 GSH 预处理虽然在一定的程度上平衡了 GSH 的亏缺, 减轻 Cu^{2+} 作用下的活性氧的积累和膜脂过氧化作用, 但增加了在 Cu^{2+} 催化下 GSH 氧化产物。Degousee 等也认为 GSH 在细胞中的反应产物可能参与了诱导植物防御反应的有关信使作用^[19]。外源抗坏血酸则起到一定程度清除活性氧自由基的作用, 从而可削弱 Cu^{2+} 对辣椒倍半萜环化酶活性的诱导作用。

参考文献:

- [1] Sinha A K. Possible role of phytoalexin inducer chemicals in plant disease control [A]. In: Daniel M, Purkayastha P. Handbook of Phytoalexin Metabolism and Action [M]. New York: Marcel Dekker, Inc., 1995, 555-592.
- [2] Watson D G, Brook C J W. Formation of capsidiol in *Capsicum annuum* fruits in response to non-specific elicitors [J]. Plant Pathol, 1984, 24:331-337.
- [3] Grill E, Winnacker E L, Zenk M H. Phytochelatins: the principal heavy-metal complexing peptides of higher plants [J]. Science, 1985, 230:674-676.
- [4] Grill E, Löffler S, Winnacker E L, et al. Phytochelatins, the heavy-metal binding peptides of plants, are synthesized from glutathione by a specific γ -glutamylcysteine dipeptidyl transpeptidase (phytochelatase) [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1989, 86:6838-6842.
- [5] De Vos C H R, Vonk M J, Vooijs R, et al. Glutathione depletion due to copper-induced phytochelatase synthesis cause oxidative stress in *Silene cucubalus* [J]. Plant Physiol, 1992, 98:853-858.
- [6] Vogeli U, Chappell J. Regulation of a sesquiterpene cyclase in cellulase treated tobacco cell suspension cultures [J]. Plant Physiol, 1990, 94:1860-1866.
- [7] 何水林. 辣椒倍半萜环化酶 cDNA 克隆及其在不同逆境下表达研究 [D]. 福建农业大学博士学位论文, 福州, 1998.
- [8] Vogeli U, Chappell J. Induction of sesquiterpene cyclase and suppression of suspension culture by fungal elicitor [J]. Plant Physiol, 1988, 85:469-473.
- [9] Bradford M M. A rapid and sensitive methods for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding [J]. Anal Biochem, 1976, 72:248-254.
- [10] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual [M]. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Lab., 1989.
- [11] Aderson M E. Tissue glutathione [A]. In: Greenwald R A. Handbook of Methods for Oxygen Radical Research [M]. Boca, Raton, FL: CRC Press, 1985, 317-323.

- [12] Steffen J C. The heavy metal-binding peptides of plants [J]. *Ann Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 1990, 41:553-575.
- [13] Alscher R G. Biosynthesis and antioxidant function of glutathione in plants [J]. *Physiol Plant*, 1989, 77:457-464.
- [14] Hochstein P, Kumar K S, Forman S J. Lipid peroxidation and the cytotoxicity of copper [J]. *Ann NY Acad Sci*, 1980, 355:240-257.
- [15] Mehdy M C. Active oxygen species in plant defense against pathogens [J]. *Plant Physiol*, 1994, 105:467-472.
- [16] Chappell J, Levine A, Tenhaken R, et al. Characterization of a diffusible signal capable of inducing defense gene expression in tobacco [J]. *Plant Physiol*, 1997, 113:621-629.
- [17] Wingate V P M, Lawton M A, Lamb C J. Glutathione causes a massive and selective induction of plant defense gene expression [J]. *Plant Physiol*, 1988, 87:206-210.
- [18] Edwards R, Blount J W, Dixon R A. Glutathione and elicitation of the phytoalexin response in legume cell cultures [J]. *Planta*, 1991, 184:403-409.
- [19] Degousee N, Triantaphylides C, Montillet J L. Involvement of oxidative processes in the signaling mechanisms leading to the activation of glyceollin synthesis in soybean [J]. *Plant Physiol*, 1994, 104:945-952.