

一氧化氮对绿豆侧根发生的影响

曹 冰, 余小平

(陕西师范大学 生命科学学院, 陕西 西安 710062)

【摘要】【目的】研究一氧化氮(NO)对绿豆侧根发生的影响。【方法】以绿豆为材料,用硝普钠(SNP)、NO 特异清除剂 c-PTIO 和动物 NOS 抑制剂 L-NAME 单独处理绿豆侧根或与 IBA、NAA 混合处理,分析内源性 NO 对绿豆侧根发生的作用。【结果】SNP 能显著促进绿豆侧根发生,其中以 50 $\mu\text{mol/L}$ SNP 处理 24 h 效果最佳,平均单株生根数为 18;IBA 或 NAA 与 SNP 混合处理的生根效果优于各自单独处理。L-NAME 和 c-PTIO 单独处理或分别与 IBA 和 NAA 混合处理,均能抑制或延缓 IBA 和 NAA 诱导的侧根发生。【结论】内源 NO 在侧根发生及其形成中可能起着重要作用。

【关键词】 硝普钠(SNP);一氧化氮;IBA;NAA;绿豆;侧根发生

【中图分类号】 Q945

【文献标识码】 A

【文章编号】 1671-9387(2009)12-0119-04

Effect of nitric oxide on the lateral root's generation of mung bean

CAO Bing, SHE Xiao-ping

(College of Life Science, Shaanxi Normal University, Xi'an, Shaanxi 710062, China)

Abstract: 【Objective】Effect of nitric oxide(NO)on lateral rooting of mung bean was investigated. 【Method】With mung bean as study material, the radicles were treated with sodicem nitroprusside(SNP), c-PTIO of NO specific scavenger and NOS inhibitor L-NAME alone or plus IBA or NAA to analyze the effect of endogenous NO on lateral rooting of mung bean. 【Result】The results showed that SNP could significantly enhance the lateral rooting and the effects of IBA or NAA in stimulating rooting, 50 $\mu\text{mol/L}$ SNP for 24 h being the best, average lateral roots per plant 18. c-PTIO of NO specific scavenger, or NOS inhibitor L-NAME treated alone or plus IBA or NAA resulted in an inhibitory effect. 【Conclusion】It's indicated that endogenous NO appears to play a key role in the generation and development of lateral roots.

Key words: sodium nitroprusside; nitric oxide; IBA; NAA; mung bean; lateral root generation

一氧化氮(Nitric Oxide, NO)作为一种新型的细胞间和细胞内信使分子,已被证明在人体与动物的神经、心血管和免疫等系统中具有重要的生理作用,且广泛存在于生物界包括植物和微生物中。但直到 1996 年,关于 NO 植物功能的研究才引起了全球植物学界的密切关注。近年来的研究表明,NO 也是植物的重要生物活性分子,参与许多植物生长发育过程,如种子萌发^[1-2],侧根形成^[3],根和叶的生长发育^[4-5],光合磷酸化^[6],光形态建成^[1],果实组织

的成熟和衰老^[7-8],病原体防御反应^[9],细胞凋亡^[10-11]以及植物抗逆反应^[12]等。

NO 在常温下为气体,在水中溶解度很小,极易透过细胞膜扩散,半衰期为 3~5 s。硝普钠(SNP)是一种有效的外源 NO 供体,被植物体吸收后可在细胞内降解并释放 NO^[13],用 SNP 作外源处理探求 NO 效应,是目前研究中常用的方法。Natalia 等^[14]研究证明,外源 NO 能够明显诱导番茄侧根发生,且呈浓度依赖效应,在 NAA 诱导的侧根发生过程中,

* [收稿日期] 2009-09-14

[基金项目] 陕西省自然科学研究计划项目(99SM20)

[作者简介] 曹 冰(1979—),女,陕西西安人,硕士,主要从事植物发育及细胞信号转导研究。

[通信作者] 余小平(1955—),男,陕西西安人,教授,博士生导师,主要从事植物发育、抗性生理及细胞信号转导研究。

有内源 NO 水平的短暂上升,其很可能是作为 NAA 信号传递途径中的下游分子起作用。以上研究表明,NO 与番茄侧根的形成有关,但对其他植物侧根发生的影响尚未见报道。

绿豆是研究侧根发生的良好试验系统。为此,本试验以绿豆为材料,研究了 SNP 在绿豆侧根发生中的作用,并对 IBA、NAA 等生长调节物质促进侧根发生的机制及其与 NO 的关系进行了探讨,以期了解侧根发生机制,以及进一步探索 NO 在植物生长发育中的作用提供理论依据。

1 材料与方 法

1.1 材 料

绿豆 (*Phaseolus radiatus* L.) 品种为‘中绿 6 号’,购自西安市雁塔区种子公司。

试验用水均为双蒸水;SNP 和 L-NAME (N^ω-nitro-L-arginine methyl ester, 动物 NOS 抑制剂) 购自 Sigma 公司。c-PTIO (Carboxy-2-phenyl-4,4,5,5-tetramethylimidazoline, NO 特异清除剂) 购自 Merck 公司,IBA 和 NAA 购自北京鼎国生物技术有限公司。其他试剂均为国产分析纯。所有试剂均用双蒸水配制成适宜浓度母液,使用时稀释。

1.2 试验材料的培养

选取饱满、大小一致的绿豆种子,用 0.1% 的 HgCl₂ 表面灭菌 5 min,自来水冲洗干净,(28±2) °C、以双蒸水于黑暗中浸种 24 h,催芽 12 h,此时胚根长约 0.5 cm 左右。

1.3 试验设计

1.3.1 处理溶液 在不同浓度 SNP 对绿豆侧根发生影响的试验中,设置 SNP 处理浓度为 0,1,10,50,100,200,300,400 μmol/L,其中 0 为对照组(双蒸水处理)。

在 SNP 与 IBA 和 NAA 混合使用对绿豆侧根发生影响的试验中,根据预备试验结果,选取最适浓度 SNP(50 μmol/L)、IBA(50 μmol/L)、NAA(20 μmol/L) 单独或混合使用,比较其生根促进效应。

在 L-NAME 和 c-PTIO 对绿豆侧根发生影响的试验中,根据预备试验结果,选取最适浓度 c-PTIO(200 μmol/L) 和 L-NAME(20 mmol/L,可抑制 NOS 途径的 NO 生成) 对胚根进行单独外源处理,或与 IBA(50 μmol/L)、NAA(20 μmol/L) 混合使用,比较其生根效应。

1.3.2 试验材料的处理 0.5 mL Eppendorf 管剪去管盖,加入 0.8 mL 处理溶液,将催芽后的绿豆放

置管中,每管 1 株,以双蒸水处理为对照。处理时,除子叶外胚根全部浸入处理溶液液面以下,每处理 3 个重复,每重复 10 株苗,置于光照培养箱(每天光照 14 h,光强 200 μmol/(m²·s),温度(25±2) °C) 中。在 SNP 处理时间对侧根发生影响的试验中,设置处理时间分别为 12,24,48 和 72 h,其他试验中材料处理时间均为 24 h。试验共进行 4 d,从试验开始,每隔 24 h 以其对应浓度的新鲜溶液更换 1 次;处理结束后,将处理溶液更换为双蒸水;此后双蒸水也 24 h 更换 1 次,直到第 4 天统计生根为止。

1.4 生根统计及数据处理

处理第 4 天统计长出胚根表面 1 mm 以上的根数,测量根长。切取侧根,用滤纸吸干表面水分后称质量,记为鲜质量。再将鲜样于 80 °C 烘干至恒质量,记为干质量。每处理随机选取 10 株苗测量,取平均值,所得数据用 Microsoft Excel 2003 统计分析。

2 结果与分析

2.1 不同浓度 SNP 对绿豆侧根发生的影响

由图 1 可见,与对照相比,一定浓度 SNP 均能显著促进绿豆侧根的发生,且表现出明显的浓度效应。当 SNP 浓度低于 50 μmol/L 时,随浓度增加,单株生根数明显增加;超过 50 μmol/L 以后,单株生根数则逐渐下降,观察发现,胚根因受高浓度 SNP 的毒害,逐渐表现出失水萎蔫等外观受害症状,生根部位也逐渐移到液面以上。因此,以 50 μmol/L SNP 作为促进绿豆侧根发生的最适浓度,其单株生根数较对照增加了 71.84%。

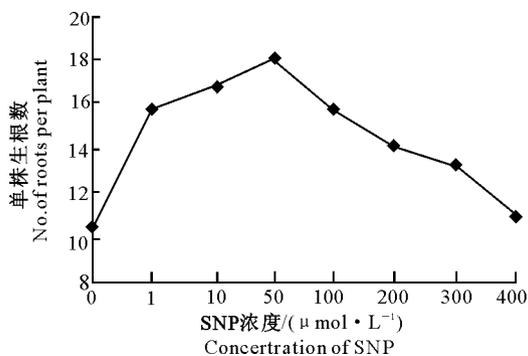


图 1 不同浓度 SNP 对绿豆侧根发生的影响

Fig. 1 Effect of different concentrations of SNP on the lateral roots development of mung bean

2.2 不同处理时间对绿豆侧根发生的影响

由图 2 可见,以最适浓度 SNP(50 μmol/L) 处理绿豆胚根不同时间,其生根效应明显不同,且以 24 h 最佳,单株生根数平均为 18;处理 12,48,72 h,单

株生根数分别较 24 h 降低了 22.22%, 41.53%, 61.11%; 处理 72 h 后, 胚根根尖出现明显的失水萎蔫症状。因此, 处理 24 h 是 SNP 促进生根的最佳时长(效果好, 时间短)。超过这一时间, NO 浓度可能过大, 对胚根造成一定程度伤害, 导致生根数下降。

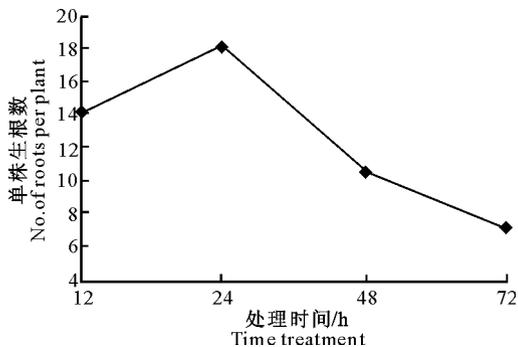


图 2 处理时间对绿豆侧根发生的影响(50 $\mu\text{mol/L}$ SNP)

Fig. 2 Effect of treatment time on the lateral roots development of mung bean (50 $\mu\text{mol/L}$ SNP)

2.3 SNP 与 IBA、NAA 混合处理对绿豆侧根发生的影响

由表 1 可以看出, 与对照相比, SNP、IBA 和 NAA 单独处理均可明显促进绿豆侧根的发生; SNP 与 IBA 或 NAA 混合处理, 可强烈刺激绿豆侧

根发生, 即混合处理的生根效果(包括单株生根数、根长、根鲜质量和干质量)均较其单独处理好。而且通过形态观察发现, SNP 与 IBA 单独处理诱导形成的侧根形态基本一致, 较细长, 说明 NO 与 IBA 诱导生根的内部机制有一定相关性。IBA 为植物体内内源生长素类物质, 而 NAA 为生长素类似物, 具有内源生长素吲哚乙酸(IAA)的作用和生理功能, 能促进细胞的分裂与扩大, 与 IBA 和 SNP 不同的是, 其诱导的侧根较粗、短。

2.4 L-NAME 和 c-PTIO 对绿豆侧根发生的影响

由表 2 可见, 与对照相比, 20 mmol/L L-NAME 和 200 $\mu\text{mol/L}$ c-PTIO 单独处理, 延缓或抑制了侧根发生, 表现为单株生根数减少, 根鲜质量和干质量明显降低。L-NAME、c-PTIO 分别与 IBA、NAA 混合处理, 极显著地抑制或延缓了 IBA 和 NAA 诱导的侧根发生。但 L-NAME 对生根的抑制效果没有 c-PTIO 显著, 这可能是由于 L-NAME 为 NO 合成底物 L-Arg 的类似物, 与 L-Arg 竞争 NOS 的催化部位, 进而抑制 NOS 活性, 而 L-Arg 作为一种代谢物在植物体中含量较高, 所以需要较高的 L-NAME 浓度^[15]。

表 1 SNP 与 IBA、NAA 混合处理对绿豆侧根发生及根长的影响

Table 1 Effects of different concentrations of IBA/NAA together with SNP on the lateral roots development of mung bean

处理 Treatment	单株生根数 Root number per plant	根长/mm Root length	根鲜质量/mg Root fresh weight	根干质量/mg Root dry weight
对照 Control	12.70 \pm 0.65	6.02 \pm 0.62	65.75 \pm 6.00	3.25 \pm 0.12
SNP(50 $\mu\text{mol/L}$)	16.70 \pm 0.89**	9.00 \pm 0.12**	99.14 \pm 3.30**	4.29 \pm 0.94**
IBA(50 $\mu\text{mol/L}$)	27.30 \pm 0.47**	13.20 \pm 0.23**	146.40 \pm 5.80**	6.78 \pm 0.15**
IBA(50 $\mu\text{mol/L}$)+SNP(50 $\mu\text{mol/L}$)	38.50 \pm 1.43**	14.73 \pm 0.23**	195.60 \pm 11.20**	8.93 \pm 0.23**
NAA(20 $\mu\text{mol/L}$)	30.55 \pm 1.41**	9.26 \pm 0.15**	170.67 \pm 9.60**	7.44 \pm 0.71**
NAA(20 $\mu\text{mol/L}$)+SNP(50 $\mu\text{mol/L}$)	34.80 \pm 1.85**	11.67 \pm 0.17**	202.20 \pm 12.60**	9.70 \pm 0.14**

注: * 为显著($P < 0.05$); ** 为极显著($P < 0.01$)。下表同。

Notes: * means significant($P < 0.05$); ** means highly significant($P < 0.01$). The same as follows.

表 2 L-NAME 和 c-PTIO 处理对绿豆侧根发生及根长的影响

Table 2 Effects of L-NAME and c-PTIO on the lateral roots development of mung bean

处理 Treatment	单株生根数 Root number per plant	根长/mm Root length	根鲜质量/mg Root fresh weight	根干质量/mg Root dry weight
对照 Control	12.87 \pm 0.85	5.94 \pm 0.23	85.80 \pm 1.34	6.00 \pm 0.13
c-PTIO(200 $\mu\text{mol/L}$)	10.50 \pm 0.56*	5.72 \pm 0.19*	71.02 \pm 1.80*	3.70 \pm 0.08**
L-NAME(20 mmol/L)	11.85 \pm 0.59*	5.49 \pm 0.08*	72.00 \pm 2.10*	4.70 \pm 0.10**
IBA(50 $\mu\text{mol/L}$)	28.25 \pm 1.48**	12.0 \pm 0.22**	157.00 \pm 4.21**	6.57 \pm 0.25**
IBA(50 $\mu\text{mol/L}$)+c-PTIO(200 $\mu\text{mol/L}$)	20.50 \pm 1.00**	9.98 \pm 0.20**	112.40 \pm 3.73**	4.66 \pm 0.12**
IBA(50 $\mu\text{mol/L}$)+L-NAME(20 mmol/L)	22.66 \pm 1.20**	9.77 \pm 0.21**	117.75 \pm 1.43**	6.00 \pm 0.11
NAA(20 $\mu\text{mol/L}$)	34.40 \pm 3.35**	8.47 \pm 0.15**	261.20 \pm 1.86**	9.40 \pm 0.16**
NAA(20 $\mu\text{mol/L}$)+c-PTIO(200 $\mu\text{mol/L}$)	17.28 \pm 0.89**	7.68 \pm 0.16**	114.40 \pm 0.68**	6.50 \pm 0.12**
NAA(20 $\mu\text{mol/L}$)+L-NAME(20 mmol/L)	21.37 \pm 0.59**	7.04 \pm 0.14**	129.50 \pm 0.74**	6.25 \pm 0.65**

3 讨 论

本试验研究发现, SNP 对绿豆侧根发生的影响具有明显的浓度依赖效应, 促进生根的 SNP 最适浓度为 50 $\mu\text{mol/L}$, 超过此浓度, 单株生根数逐渐下降, 同时胚根根尖出现失水萎蔫等外观受害症状。这与 NO 本身是一种自由基, 低浓度时有生物效应, 高浓度时则表现细胞毒性作用的观点^[16]一致。该观点同样可以解释 SNP 处理时间对侧根发生的影响, 用 50 $\mu\text{mol/L}$ SNP 处理 24 h 生根效果最佳, 处理 12, 48 或 72 h, 侧根发生均下降。Gouvêa 等^[17]认为, SNP 等 NO 供体有诱导玉米根尖伸长的效应, 这与本研究结果一致。

生长素和 SNP 对生根均有促进作用。本研究结果显示, SNP 与 NAA 或 IBA 混合处理, 其生根效果优于各自单独处理, 表现出一定的促进效应, 这可能与生长素类物质具有诱导 NO 生成的效应有关^[3, 14, 18]。

IBA 和 NAA 均能有效促进绿豆侧根发生, 但二者所诱导的侧根形态有所不同, 前者细、长, 后者粗、短。SNP 与 IBA 诱导形成的侧根形态相似, 说明 SNP 对侧根形态、结构的影响更近似于吡啶类生长素(如 IAA、IBA), 而与萘类生长素(如 NAA)明显不同。

为进一步探讨内源 NO 在侧根形成中的作用, 以及生长素类物质 IBA、NAA 诱导生根与 NO 的关系, 本研究用 c-PTIO 和 L-NAME 对绿豆胚根进行外源处理, 结果发现, 外源 NO 可以显著促进绿豆侧根的发生, c-PTIO 和 L-NAME 却明显抑制生根, 表明内源 NO 在侧根发生及其形成中可能起着重要作用, 二者与 IBA、NAA 混合处理能够极显著抑制或延缓 IBA 和 NAA 诱导的侧根发生, 这说明 NO 很可能在 IBA 和 NAA 诱导生根过程中起信号传递作用, 这与前人^[3, 14, 18]的研究结果类似。但侧根发生过程中内源性 NO 的来源及其具体作用途径, 还有待于进一步深入研究。

[参考文献]

[1] Beligni M V, Lamattina L. Nitric oxide stimulates seed germination and de-etiolation, and inhibits hypocotyl elongation, three light-inducible responses in plants [J]. *Planta*, 2000, 210: 215-221.

[2] Giba Z, Grubišić D, Todorović S, et al. Effect of nitric oxide-releasing compounds on phytochrome-controlled germination of

empress tree seeds [J]. *Plant Growth Reg*, 1998, 26: 175-181.

[3] Pagnussat G C, Simontacchi M, Puntarulo S, et al. Nitric oxide is required for root organogenesis [J]. *Plant Physiol*, 2002, 129: 954-956.

[4] Leshem Y Y. Nitric oxide in biological systems [J]. *Plant Growth Reg*, 1996, 18: 155-159.

[5] Ribeiro E, Cunha F Q, Tamashiro W M, et al. Growth phase-dependent subcellular localization of nitric oxide synthase in maize cells [J]. *FEBS Lett*, 1999, 445: 283-286.

[6] Takahashi S, Yamasaki H. Reversible inhibition of photophosphorylation in chloroplasts by nitric oxide [J]. *FEBS Lett*, 2002, 512: 145-148.

[7] Leshem Y Y, Wills R B I, Veng-Va K V. Evidence for the function of the free radical gas-nitric oxide (NO)-as an endogenous maturation and senescence regulating factor in higher plants [J]. *Plant Physiol Biochem*, 1998, 36: 825-833.

[8] Leshem Y Y, Haramaty E. Plant aging; the emission of NO and ethylene and the effect of NO-releasing compounds on growth of pea (*Pisum sativum*) foliage [J]. *J Plant Physiol*, 1996, 148: 258-263.

[9] Delledonne M, Xia Y J, Dixon R A, et al. Nitric oxide functions as a signal in plant disease resistance [J]. *Nature*, 1998, 394: 585-588.

[10] Pedrosa M C, Magalhaes J R, Durzan A. A nitric oxide burst precedes apoptosis in angiosperm and gymnosperm callus cells and foliar tissues [J]. *J Exp Bot*, 2000, 51: 1027-1036.

[11] Clark A, Desikan R, Hurst R D, et al. NO way back: nitric oxide and programmed cell death in *Arabidopsis thaliana* suspension cultures [J]. *The Plant J*, 2000, 24: 667-677.

[12] Mata C G, Lamattina L. Nitric oxide induces stomatal closure and enhances the adaptive plant response against drought stress [J]. *Plant Physiol*, 2001, 126: 1196-1204.

[13] Brune B, Lapetina E G. Activation of a cytosolic ADP-ribosyl transferase by nitric oxide-generating agents [J]. *The J of Biol Chem*, 1989, 264: 8455-8458.

[14] Natalia C, Magdalena, Lorenzo. Nitric oxide plays a central role in determining lateral root development in tomato [J]. *Planta*, 2004, 218: 900-905.

[15] Lum H K, Butt Y K, Lo S C. Hydrogen peroxide induces a rapid production of nitric oxide in mung bean (*Phaseolus aureus*) [J]. *Nitric Oxide*, 2002, 6(2): 205-213.

[16] Beligni M V, Lamattina L. Is nitric oxide toxic or protective [J]. *Trends Plant Sci*, 1999, 4: 299-300.

[17] Gouvêa C M C P, Souza J F, Magalhães A C N, et al. NO-releasing substances that induce growth elongation in maize root segments [J]. *Plant Growth Reg*, 1997, 21: 183-187.

[18] Pagnussat G C, Lanteri M L, Lamattina L. Nitric oxide and cyclic GMP are messengers in the indole acetic acid-induced adventitious rooting process [J]. *Plant Physiol*, 2003, 132: 1241-1248.