

邻羟基苯甲酸胁迫对不同杉木无性系叶片 核酸和蛋白质合成的影响

杨 梅¹, 林思祖², 曹光球²

(¹ 广西大学林学院, 南宁 530004; ² 福建农林大学林学院, 福州 350002)

摘要: 以对邻羟基苯甲酸胁迫具有不同抗性 2 个杉木无性系 (即忍耐型和敏感型) 为对象, 分析胁迫对叶片遗传物质合成的影响。结果表明: 邻羟基苯甲酸胁迫对忍耐型的 DNA 合成多表现为抑制效应, RNA 合成多表现为促进效应, 而对敏感型的 DNA 合成多表现为促进效应, RNA 合成表现为抑制效应; 在胁迫初期时各胁迫浓度对敏感型的蛋白质含量的促进效应大于忍耐型, 但在胁迫中后期, 而对敏感型的促进效应呈下降趋势, 而对忍耐型的促进效应随胁迫浓度加大而不断增大, 蛋白质合成能力不断提高。表明不同抗性杉木无性系基因表达调控模式存在较大差别, 随着胁迫强度增大, 忍耐型 RNA 和蛋白质的合成量增加, 使更多的蛋白质参与了对此种胁迫的响应, 而使其有更好的抗逆性。

关键词: 杉木; 无性系; 核酸; 蛋白质; 邻羟基苯甲酸

中图分类号: Q945.78 文献标识码: A

The Effects of Salicylic Acid Stress on the Leaves Nucleic Acid and Protein Synthesis Between Two Chinese Fir with Different Resistance

Yang Mei¹, Lin Sizhu², Cao Guangqiu²

(¹ College of Forestry, Guangxi University, Nanning, 530004;

² College of Forestry, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002)

Abstract: The responses of nucleic acid and protein in leaf were analyzed objecting to two Chinese fir clones with different resistance to salicylic acid stress. The results showed that, in most situations, salicylic acid stress inhibited the DNA synthesis of endurance type clone and promoted its RNA synthesis and the effect characteristics on the sensitivity type was opposite to the endurance type. At the initial period all concentration levels had higher stimulatory effects on the protein content of the sensitivity type than that of endurance type. At the intermediate and later periods, the stimulatory effect on sensitivity type appeared decreasing trend, while the stimulatory effect on endurance type increased continuously with the increasing concentration. Those evidences hinted there were different genetic expression modulations between the two resistance types. The RNA and protein contents of endurance type increased with the increasing stress intensity, which indicated that it aroused more protein to participate in the stress response to enhance its resistance.

Key words: Chinese fir, clones, nucleic acid, protein, salicylic acid

酚酸类物质是引起农林作物连作障碍的重要原因之一, 当这些物质的积累量到一定浓度, 就会导致逆境胁迫, 抑制植株的生长^[1,2]。杉木 (*Cunninghaimia lance-*

olata) 是中国南方重要的用材林树种, 多代连栽导致一些酚酸类物质的积累而产生自毒作用, 引起林地生产力的下降^[3]。目前有关杉木的酚酸类物质作用机理方面

基金项目: 中国高校博士点专项科研基金“邻羟基苯甲酸胁迫下不同杉木优良无性系蛋白表达差异研究”(20060389010); 福建省自然科学基金“自毒物质胁迫下不同杉木优良无性系差异蛋白组分析”(B0610002); 福建农林大学森林培育重点学科资助。

第一作者简介: 杨梅, 女, 1970 年出生, 吉林省长春市人, 副教授, 博士, 主要从事森林培育等领域的教学与研究。通信地址: 530004 南宁市大学东路 100 号广西大学林学院, Tel: 0771-3271428, E-mail: fjiangmei@126.com。

收稿日期: 2008-09-02, 修回日期: 2008-09-20。

已经在对杉木种子发芽、幼苗光合作用、根系活力、养分吸收、酶活性、氨基酸变化等方面取得一定成果^[4-11],但对遗传物质的影响尚未见报道。对大豆、豌豆等农作物自毒作用的研究中发现,酚酸类物质参与了核酸及蛋白质合成过程,是其影响植物生长的主要机制之一^[12-14]。笔者在前期研究的工作基础上,分析邻羟基苯甲酸胁迫下2个不同抗性杉木无性系的响应差异,为开展酚酸类物质对杉木的分子作用机制的研究奠定理论基础。

1 材料与方法

1.1 供试材料

选用对邻羟基苯甲酸胁迫不同抗性的2个杉木无性系(忍耐型和敏感型,分别标记为01号和02号)组培苗作为试验材料,由福建省鑫闽种业有限公司提供。邻羟基苯甲酸由福建师范大学化学工程学院提供。

1.2 试验设计

将取回的杉木组培苗转移至新配制的改良MS培养基上进行适应性培养,每15d更换1次培养基,更换3次后,切取2cm长的组培苗上部茎段作为实验材料,以向MS培养基添加外源邻羟基苯甲酸作为胁迫条

件,胁迫浓度分别为40、80、120mg/L,每个处理3个重复,每瓶5株,以不添加邻羟基苯甲酸为对照。培养室环境条件设置为:温度为(25±2)℃,日光灯光强为1500~2000lx,光周期为12h/d。胁迫处理后第10、20、30d取样进行各项指标测定。

1.3 测定方法

采用考马斯亮兰G-250(Bradford)法测定杉木叶片蛋白含量^[15]。核酸提取按照^[16]方法并加以改进,采用二苯胺法^[17]测定DNA含量,RNA含量根据总核酸及DNA含量差值计算。

1.4 效应指数计算

效应指数采用Williamson^[18]方法计算: $RI=R/C-1$,R值分别为邻羟基苯甲酸胁迫浓度40、80、120mg/L时的测定值(即处理值),C为未添加酚酸的测定值(即对照值)。当 $RI>0$ 时表示邻羟基苯甲酸胁迫对所测定的相关指标存在促进效应,当 $RI<0$ 时表示存在抑制效应,当 $RI=0$ 时表示无自毒化感效应的存在。 RI 的绝对值大小表示自毒效应强度,绝对值越大,表明邻羟基苯甲酸的效应强度(促进效应或抑制效应强度)越大。

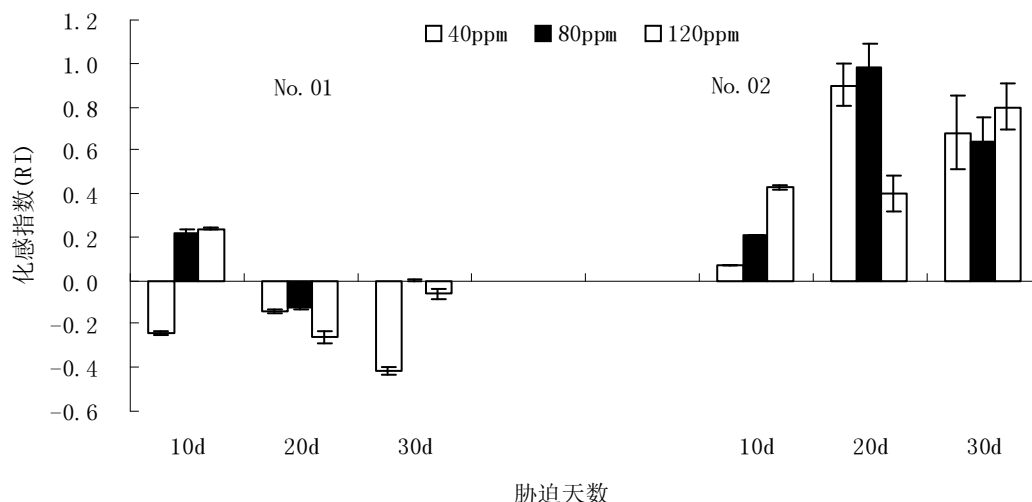


图1 邻羟基苯甲酸胁迫对不同杉木无性系叶片DNA含量的化感效应

2 结果与分析

2.1 邻羟基苯甲酸胁迫对不同杉木无性系叶片DNA合成的影响

从图1可以看出,在同一胁迫时间,对2个无性系叶片DNA含量化感效应随胁迫浓度变化而表现不同的变化特征。胁迫第10天时,01号无性系在40mg/L胁迫浓度下表现为抑制效应,80mg/L、120mg/L胁迫浓度下转为促进效应;对02号的促进效应随着胁迫浓度的增大而持续增强,80mg/L、120mg/L胁迫浓度下的RI值分别是40mg/L胁迫浓度的3倍、6倍。胁迫第20天时,01号无性系在各胁迫浓度下均表现为抑制效

应,40、80mg/L胁迫浓度间的RI值相差不大,在120mg/L胁迫浓度抑制效应最高;02号在各胁迫浓度下均表现为促进效应,在40、80mg/L胁迫浓度间的RI值分别为0.90、0.98,而在120mg/L胁迫浓度下,促进效应下降幅度很大,比40mg/L胁迫浓度时的RI值下降了50%。胁迫第30天时,对01号DNA含量的抑制效应随胁迫浓度加大而逐渐下降,有转变为促进效应的趋势;而02号表现为促进效应,随胁迫浓度加大,促进效应有增大的趋势。从以上分析来看,2个杉木无性系叶片DNA合成对邻羟基苯甲酸胁迫的响应有明显差别,01号多表现为抑制效应,02号则全部表现为促进效应。

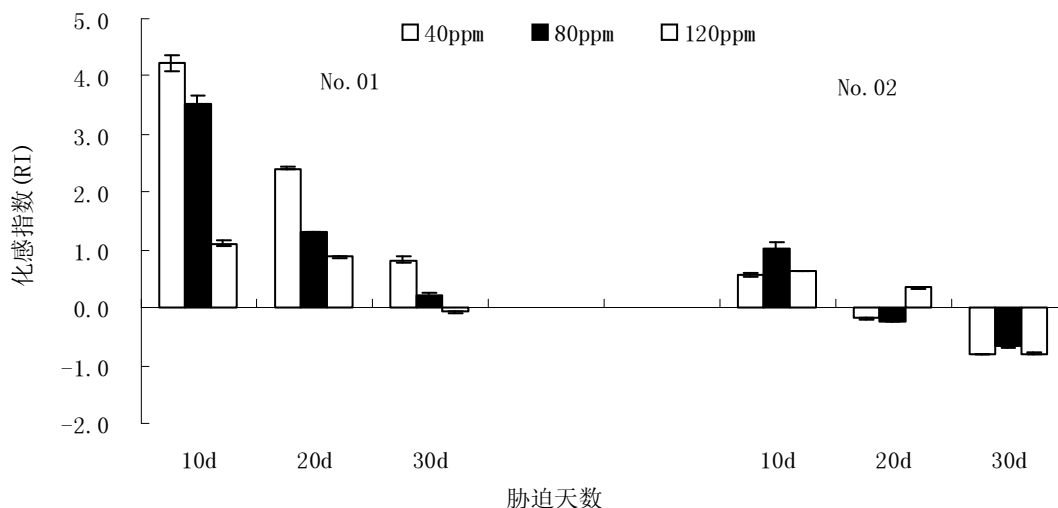


图2 邻羟基苯甲酸胁迫对不同杉木无性系叶片RNA含量的化感效应

2.2 邻羟基苯甲酸胁迫对不同杉木无性系叶片RNA合成的影响

从图2可以看出,邻羟基苯甲酸胁迫对2个无性系叶片RNA含量的影响具有一定的规律性。在同一胁迫时间,随着胁迫浓度的加大,对01号无性系叶片RNA含量的化感效应有逐渐减小的趋势,而02号呈现波动性变化。在胁迫第10天,01号在各胁迫浓度下均表现为促进效应,40mg/L、80mg/L胁迫浓度下的RI值达到4.22、3.51,化感作用强烈,120mg/L胁迫浓度时下降幅度较大,RI值为1.10,比40mg/L胁迫浓度下降了73%;02号在80mg/L胁迫浓度下的RI最大,比40、120mg/L胁迫浓度分别高45%、38%。胁迫第20天时,01号无性系随胁迫浓度增大,促进效应逐渐减小,与40mg/L胁迫浓度相比,80mg/L、120mg/L分别下降了46%、63%,胁迫浓度越大,下降幅度越大;02号在40、80mg/L胁迫浓度下表现为抑制效应,二者作用强

度相差不大,在120mg/L胁迫浓度下转为促进效应。胁迫第30天时,01号无性系的促进效应随胁迫浓度增大而逐渐减小,并在120mg/L时表现出微弱的抑制效应(RI值为-0.08);而02号在这一时期均表现为抑制作用,在40、80、120mg/L浓度胁迫下的RI值分别为-0.80、-0.68、-0.79,变化幅度不大。

2.3 邻羟基苯甲酸胁迫对不同杉木无性系叶片蛋白质合成的影响

蛋白质是生物体中参与一系列生理生化活动所必须的物质,外界环境的变化会影响蛋白质的代谢。邻羟基苯甲酸胁迫对2个杉木无性系叶片蛋白质合成多表现为促进效应,仅在40mg/L胁迫下01号第10天表现为轻微抑制作用,而在120mg/L胁迫浓度下02号第30天时表现出较强的抑制作用,效应指数为-0.34。图3显示,在杉木自毒物质邻羟基苯甲酸胁迫下,不同杉木无性系可溶性蛋白含量发生明显变化。

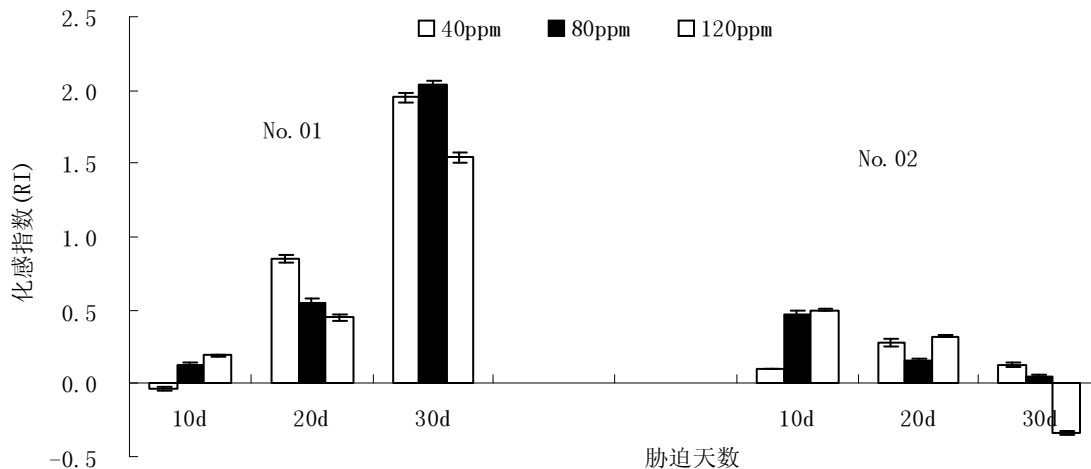


图3 邻羟基苯甲酸胁迫对不同杉木无性系叶片蛋白质含量的化感效应

在各胁迫时期,随着胁迫浓度的变化,对2个无性系叶片可溶性蛋白质含量变化特征较为复杂。在胁迫第10天,2个无性系表现出相同的变化趋势,邻羟基苯甲酸对蛋白质含量促进效应逐渐增强,02号效应强度较大,尤其在80mg/L胁迫浓度下的 RI 值比40mg/L胁迫浓度增加了4倍多,而01号仅增加1倍,而且01号在40mg/L胁迫浓度下表现为轻微的抑制作用,01号各胁迫浓度之间效应值的变化较小。胁迫第20天,2个无性系均表现为促进效应,但变化趋势不同,01号随着胁迫浓度的增大,促进效应逐渐下降,80、120mg/L胁迫浓度下的 RI 值与40mg/L胁迫浓度相比,分别降低了35%、54%,而02号则表现为先升高后降低再升高,与40mg/L胁迫浓度相比,80mg/L胁迫浓度下的 RI 值下降了46%,120mg/L与40mg/L胁迫浓度相差不大,差异不显著。胁迫第30天时,2个无性系的 RI 值均表现为下降趋势,01号在40、80mg/L胁迫浓度间的 RI 值差别不大,分别为1.95、2.04,差异不显著,120mg/L胁迫浓度下的 RI 值为1.54,比40mg/L胁迫浓度的 RI 值下降了21%;02号的化感效应随着胁迫浓度的增大促进效应逐渐下降,120mg/L胁迫浓度下的 RI 值比40mg/L下降了61%,并在120mg/L胁迫浓度时转为抑制效应。可见,在各胁迫时期内,化感效应随胁迫浓度的变化较为复杂,胁迫浓度的变化对02号无性系叶片蛋白质含量的影响更大,表明在胁迫初期,邻羟基苯甲酸诱导的02号叶片蛋白质合成能力随胁迫浓度升高而上升的幅度比01号强,而在胁迫后期,其下降的幅度也比01号大,从这一角度来讲,02号比01号对胁迫的响应更为敏感。

3 结论与讨论

植物在逆境中并非完全被动的衰减生命,而是积极地进行核酸和蛋白质等生命物质的代谢^[19-21],植物体内数以千万计的基因在不同的外界条件影响下,一部分基因启动,一部分基因关闭,当抗性基因被启动,转录水平提高,RNA含量增加,从而翻译合成较多的蛋白质,细胞液浓度增大,抗性增强。在胁迫下植物核酸可通过高级修饰保护和抗氧化保护下保持稳定^[21,22]。在邻羟基苯甲酸胁迫下,不同抗性的2个杉木无性系叶片DNA和RNA的含量发生了不同的变化,邻羟基苯甲酸胁迫对忍耐型(01号)DNA合成多表现为抑制效应,RNA合成多表现为促进效应,而敏感型(02号)则相反,DNA合成多表现为促进效应,RNA合成多表现为抑制效应。DNA含量的增加有利于细胞进行旺盛的有丝分裂,使细胞数增加;RNA的增加表明邻羟基苯

甲酸可促进DNA的复制与转录,并有利于RNA的翻译,最终的结果是忍耐型无性系蛋白质的合成效应越高,参与生命活动的蛋白增多,最终的结果是忍耐型无性系蛋白质的合成效应越高,参与生命活动的蛋白增多,促进机体的新陈代谢与生长发育,有利于增强植株对胁迫的抗逆能力。邻羟基苯甲酸胁迫对2个杉木无性系叶片蛋白质含量的影响也说明了这一点,胁迫强度较小时邻羟基苯甲酸对敏感型杉木无性系叶片蛋白质合成的促进作用大于忍耐型,当胁迫强度较大时,对忍耐型的促进作用则高于敏感型,忍耐型杉木无性系有更多的蛋白质参与了对此种胁迫的响应,从而提高了抗逆性。

笔者通过分析邻羟基苯甲酸胁迫对杉木叶片遗传物质合成的影响,初步推断不同抗性杉木无性系基因表达调控模式存在较大差别,课题组将通过分子生物学的研究手段,探讨2个无性系在邻羟基苯甲酸胁迫下产生的差异基因和差异蛋白质,从而进一步揭示杉木抵御酚酸致毒作用的分子机制。

参考文献

- [1] Yu J Q, Matsui Y. Effects of root exudates of cucumber (*cucumis sativus*) and allelochemicals on ion uptake by cucumber seedlings [J]. *Chemical Ecology*, 1996, 20(4):817-834.
- [2] Rice E L. Allelopathy (2nd ed) [M]. Academic press Inc, 1984: 1-5,309-315.
- [3] 林思祖,黄世国,曹光球,等.杉木自毒作用的研究[J].应用生态学报, 1999,10(6):661-664.
- [4] 马越强,廖利平,杨跃军.香草醛对杉木生长的影响[J].应用生态学报,1998,9(2):128-132.
- [5] 陈龙池,廖利平,汪思龙,等.香草醛和对羟基苯甲酸对杉木幼苗生理特性的影响[J].应用生态学报,2002,13(10):1291-1294.
- [6] 陈龙池,廖利平,汪思龙,等.酚类物质对杉木幼苗185N养分吸收、分配的影响[J].植物生态学报,2002,26(5):525-532.
- [7] 汪思龙,陈龙池,廖利平,等.几种化感物质对杉木幼苗生长的影响[J].应用与环境生物学报,2002,8(6):588-591.
- [8] 曹光球,林思祖,黄世国.阿魏酸和肉桂酸对杉木种子发芽的效应[J].植物资源与环境学报,2001,10(2):63-64.
- [9] 林思祖,曹光球,黄世国,等.杉木经几种源植物水浸液处理后叶绿素、质膜透性及气孔的变化研究[J].中国生态农业学报,2003,11(3): 29-31.
- [10] 杨梅,林思祖,黄燕华,等.邻羟基苯甲酸胁迫对不同杉木无性系叶片膜质过氧化及渗透调节物质的化感效应 [J]. 西北植物学报, 2006,26(10):2088-2093.
- [11] 杨梅,林思祖,黄燕华,等.邻羟基苯甲酸胁迫下杉木叶片游离氨基酸的变化特征[J].东北林业大学学报,2006,35(2):40-41,63.
- [12] Baziramakenga R R, Leroux G D, Simard R R. Effects of benzoic and cinnamic acids on membrane permeability of soybean roots [J]. *Chem. Ecol.* 1995, 1:1271-1285.

- [13] Baziramakenga R, Leroux G D, Simard R R, et al. Allelopathic effects of phenolic acids on nucleic acid and protein levels in soybean seedlings[J]. *Can J Bot*, 1997, 75:445-450.
- [14] Vaughan D, Ord B G. Extraction of potential allelochemicals and their effects on root morphology and nutrient content [M]. In: Atkinson D. *Plant Root Growth*. London: Blackwell Scientific Publications, 1991:399-421.
- [15] 汪家政, 范明. 蛋白质技术手册[M]. 北京: 科学出版社, 2005:42-47.
- [16] 杨莉, 郭嵩光, 汪沛洪. 小麦返白系叶片核酸含量及核酸酶活性研究[J]. *西北农业学报*, 2001, 10(2):32-35.
- [17] 李合生. 植物生理生化实验原理和技术[M]. 北京: 高等教育出版社, 2004:260-261.
- [18] Williamson G B, Weidenhamer D. Bioassays for allelopathy: Measuring treatment responses with independent control [J]. *Journal of Chemical Ecology*, 1988, 14(1):181-187.
- [19] 陈坤明, 张承烈. 干旱期间春小麦叶片多胺含量与作物抗旱性的关系[J]. *植物生理学报*, 2000, 26(5):381-386.
- [20] Halliwell B. Toxic effects of oxygen on plant tissue [M]. In: *Chloroplasts Metabolism*. Clarendon Press Oxford, 1981: 179-185.
- [21] Votyakova T V, Wallace H M. The covalent attachment of polyamines to proteins in plant mitochondria [M]. *Europ J Biochem*, 1999, 260(1):250-257.
- [22] Ocirk L F, Steighrer R J. Oxidized apurine/apycinidme site formed in DNA by oxidative mutagens [M]. *Mut Res*, 1989, 214:13-22.