

应用基因芯片技术研究日本曲霉 (*Aspergillus japonicus*) 化感物质 SAF 抑制植物生长的分子机理

李 明^{1,2}, 曾任森¹, 骆世明¹

(1. 华南农业大学热带亚热带生态研究所; 2 广东药学院)

摘要:利用基因芯片技术研究日本曲霉的化感物质 SAF 化感作用的分子机理,结果表明, SAF 具有浓度效应,能诱导受体植物-拟南芥的多种调控细胞死亡相关基因的上调表达,高浓度处理表达的基因数量和倍数均高于低浓度处理的。此外,SAF 也能诱导与防御反应相关基因的上调表达,高浓度处理表达的基因种类和倍数均低于低浓度处理的。SAF 能诱导生长素响应基因、编码乙烯反应敏感蛋白等基因的上调表达。由实验结果推测,SAF 具有生长素的性质,高浓度处理可以导致受体细胞中乙烯的积累,并引起对维持细胞正常稳态起重要作用的物质-神经酰胺水平的改变,从而产生受体植物叶片的衰老和死亡的结果,这是 SAF 具有化感作用的主要原因。研究对于揭示 SAF 化感作用的分子机理具有重要的意义,对于阐明寄主非选择性毒素作用的分子机理也提供参考依据。

关键词:SAF;基因芯片;细胞死亡;化感作用

文章编号:1000-0933(2008)08-3891-07 中图分类号:Q948 文献标识码:A

The research of molecular mechanism on SAF from *Aspergillus japonicus* in inhibiting plant growth using gene chip technique

LI Ming^{1,2}, ZENG Ren-Sen¹, LUO Shi-Ming¹

1 Institute of Tropical and Subtropical Ecology, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China

2 Guangdong Pharmaceutical College, Guangzhou 510006, China

Acta Ecologica Sinica, 2008, 28(8): 3891 ~ 3897.

Abstract: The investigation was conducted to detect the inhibition effects of secalonic acid F (SAF) produced by *Aspergillus japonicus* on higher plant by using gene chip technique, the effects of SAF depended on its concentration, many genes associated with cell death were up-regulated after treated by SAF, the number and expression levels induced by higher SAF concentration were higher than those induced by lower concentration. Genes associated with defense function were also up-regulated by SAF, however, gene number and expression levels induced by higher SAF concentration were lower than those treated by lower concentration. In addition, results showed that SAF acted as auxin, high concentration of SAF might induce the production of ethylene and affect ceramide content which might result in senescence and death in the leaves of receptor plant. The findings brought some new clues for further studying the action mechanism of SAF and non-host

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30570283);中国博士后科学基金资助项目(4100-C05014);广东省自然科学基金资助项目(05300830);华南农业大学校长基金资助项目(2005K029)

收稿日期:2007-03-28; **修订日期:**2008-04-27

作者简介:李明(1963~),女,黑龙江人,博士,副教授,主要从事植物生理生态、化学生态研究. E-mail:lm862002@yahoo.com.cn

Foundation item: The project was financially supported by National Natural Science Foundation of China(No. 30570283), Chines Postdoctoral Science Foundation(No. 4100-C05014), Natural Science Foundation of Guangdong Province (No. 05300830), Science Foundation of South China Agricultural University(No. 2005K029)

Received date:2007-03-28; **Accepted date:**2008-04-27

Biography: LI Ming, Ph. D., Associate professor, mainly engaged in plant physiological ecology and chemical ecology. E-mail:lm862002@yahoo.com.cn

selection toxin.

Key Words: SAF; gene chip; cell death; allelopathy

基因芯片技术的基本原理是将众多的靶基因序列或寡聚核苷酸片段有序而高密度地排列在玻璃、硅、尼龙膜等固相载体上,用待检测的标记样本分子与之杂交,并利用激光共聚焦显微扫描等技术对芯片上成千上万的杂交信号进行实时、灵敏而准确的检测,辅以计算机统计分析从而得到样本的基因表达信息,被评为 21 世纪最有发展前途的 20 项高新技术之一。自 1992 年美国 Affymetrix 公司制备出世界上第 1 张寡聚核苷酸生物芯片至今,仅短短 10 余年时间,基因芯片技术已广泛运用于生物学与医学的基础研究、疾病诊断、新药开发、环境保护等许多方面^[1]。最近 Bais 等在研究入侵植物矢车菊(*Centaurea maculosa*)的作用机理中利用了该项技术,发现了矢车菊释放的(-)儿茶素可以诱导拟南芥近千个基因发生上调的表达^[2]。该技术最大的优点在于具备高通量平行检测的特点,能在更全面广泛的基因组水平上揭示不同基因之间内在的相互关系,使研究效率明显提高,并极大地降低了基因表达检测的平均成本,这对于继人类基因组计划实施以来呈几何级数增加的基因序列资源的利用有至关重要的意义。该项技术是继 DNA 重组、PCR 技术以后又一项生物科学领域的革命性进展,将对 21 世纪生命科学的研究思维和方式产生重要影响^[3]。

日本曲霉(*Aspergillus japonicus* Saito)是存在于热带亚热带地区土壤中的真菌,也存在于霉腐物和贮存的禾谷类作物种子表面^[4]。曾任森等人从日本曲霉中提取了其具有化感特性的成分,经鉴定为黑麦酮酸 F (secalonic acid F, SAF),研究表明,SAF 对多种植物的生长具有抑制作用^[5]。一些微生物毒素对杂草生长的抑制作用效果显著,包括细菌、真菌、放线菌和一些藻类等,有些已经进行了分离并鉴定了结构,如 bipolaroxin、maculosin 等,这些毒素可以作为生物源除草剂或化学除草剂合成的模板^[6]。研究这些毒素的作用机理不仅对于揭示微生物化感作用机理具有重要意义,对于开发微生物源除草剂也提供重要的科学依据。

本实验利用基因芯片技术研究 SAF 对受体植物——拟南芥作用的分子机理,拟南芥具有一些独特的生物学、遗传学性质而成为植物分子生物学研究中最受欢迎的模式植物。拟南芥基因组中的基因通常也存在于其他作物中,人们通过对拟南芥基因结构的研究,可以增加对其他高等植物的生长和发育过程、植物与环境的相互作用以及植物对逆境胁迫抗性能力等性质的认识和理解,这项研究为揭示 SAF 化感作用的分子机理提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料的培育

将野生型拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)种子置于 70% 的乙醇中表面消毒 30s,用无菌水冲洗 3 次,摆放在培养皿(8cm×8cm)中,置于 4℃ 下春化、萌发,待萌发芽长约 3cm 时,分别转移至含有不同浓度 SAF 的 1/2 Hoagland 营养液培养,培养容器为 50ml 小烧杯,杯底部铺有蛭石,上面覆盖保鲜膜并扎有小孔,保持湿度和通气状态。将培养杯置于 FM-5XX 智能型人工气候箱中,培养条件为:23℃±1℃、光强 120μmol m⁻²s⁻¹(连续光照)、16h/8h(光/暗),湿度为 80%,定期更换营养液,培养 10d,幼苗用作以下实验。

1.2 总 RNA 的提取

称拟南芥叶片 0.3g,在液氮中研磨成粉末,装入 2 ml 离心管中;迅速加入 1ml Trizol 试剂,充分摇匀,在冰浴中静置 8~10min;加入 0.2 ml 氯仿,充分混匀,静置 5min,在 12000 r/min,3~4℃ 下离心 15min;转入上清至 1.5 ml 离心管中;加入 0.5 ml 异丙醇,充分混匀后,室温放置 10 min,沉淀 DNA;12000 r/min,3~4℃ 下离心 10min,弃上清,再用 1ml 75% 乙醇洗涤;7500 r/min,3~4℃ 下离心 15min,弃上清,室温干燥 RNA 10min,用 20μl DEPC H₂O 溶解 RNA, -20℃ 保存,备用。

1.3 定量及检测总 RNA(以下部分由博奥生物有限公司生物芯片北京国家工程研究中心完成)

紫外定量与纯度检测:用紫外分光光度计检测 RNA 的产量,在 260nm 处检测其吸光度。根据在 260 nm

和 280 nm 处的吸光值,检测 RNA 的纯度,纯 RNA 的 OD260/OD280 比值应接近 2.0。

2 结果分析与讨论

2.1 总 RNA 抽提结果

所提的 3 组拟南芥叶片 RNA 的检测结果的 OD260/OD280 均在 1.9 ~ 2.0 之间。琼脂糖凝胶电泳检测的 RNA 样品电泳条带较清晰,28S 比 18S rRNA 条带亮度接近 2:1,质量符合 Affymetrix 表达谱芯片实验要求(图 1)。

2.2 芯片杂交信号强度散点图

实验结果见图 2, 图中红色区域代表测试样与探针杂交时共同表达的基因,黄色区域为测试样与探针杂交时不表达的基因,蓝色区域表示测试样与探针杂交时有差异的基因。图中有 8 条线,由内至外分别表示表达的倍数为 2、3、10 倍和 30 倍。由散点图的结果及表达谱基因的信息得出,0.075 mmol/L SAF 处理的与两种探针杂交时共同表达的基因为 53%,0.3 mmol/L 处理的与两种探针杂交时共同表达的基因为 41%;0.075 mmol/L SAF 处理的与探针杂交时有差异的基因表达为 23%,0.3 mmol/L 的处理与探针杂交时有差异的基因表达为 7%。这些基因的上下调趋势基本一致,但表达的倍数有较大差异,低浓度 SAF 诱导的上下调基因表达的倍数总体高于高浓度处理的。

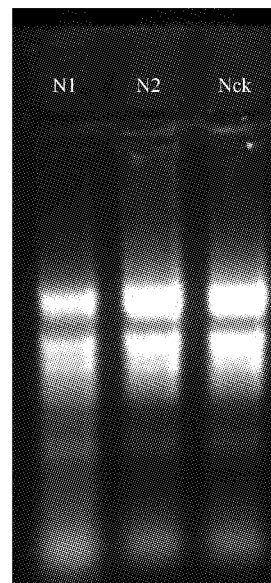


图 1 拟南芥叶片总 RNA 电泳图

Fig. 1 Electrophoretic pattern of total RNA in leaves of *A. thaliana*

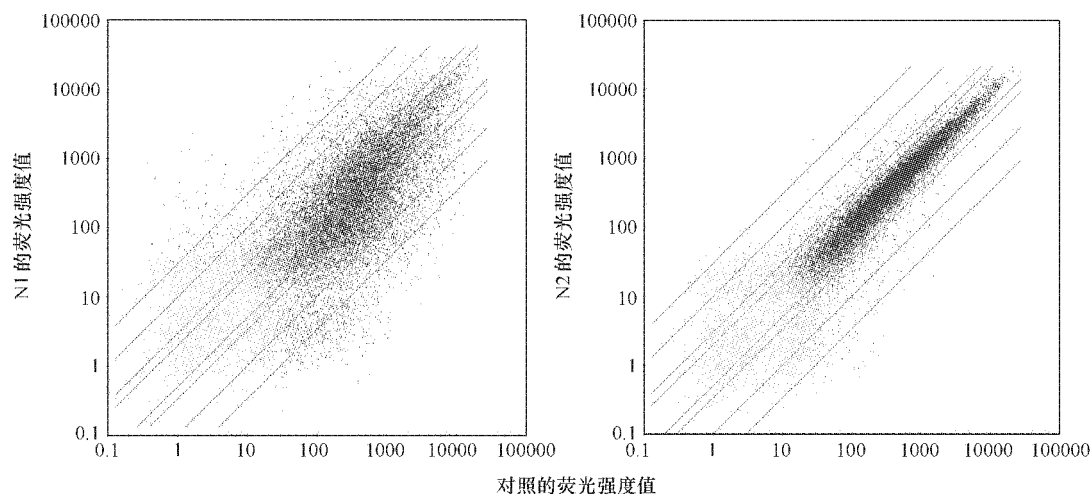


图 2 基因芯片荧光杂交信号强度散点图

Fig. 2 Scatter Graph of fluorescent hybridization signal of gene chip

N1:0.075 mmol/L SAF 处理的拟南芥样品;N2:0.3mmol/L SAF 处理的拟南芥样品

2.3 SAF 对受体细胞死亡相关基因表达的影响

细胞死亡包括程序性细胞死亡(programmed cell death, PCD)和细胞坏死(cell necrosis)现象。PCD 是多细胞生物体在发育过程中或在某些环境因子的作用下发生的受基因调控的主动死亡方式,在这个过程中,涉及到一些与细胞死亡相关基因的表达或一些基因沉默的变化^[7]。在植物对病原菌的过敏反应、植物正常发育过程中以及外界环境胁迫刺激都可导致植物细胞发生 PCD 现象。植物在响应外部环境胁迫的机制中,

PCD 是一种有效的防御措施之一。如植物在受到病原体侵害时,通过 PCD 过程使感病部位的细胞死亡,抑制了病原体的扩散,将真菌毒素直接处理植物细胞,也出现了 PCD 现象,在一定的刺激范围内,产生局部细胞的死亡,但当外界刺激超过一定的阈值时,会产生大范围的细胞死亡,这将使植物器官的功能受到严重破坏而影响到植物的生长、发育,甚至整株植物的死亡。

细胞死亡一般分为 4 个阶段,即刺激信号—信号感应和传递—中心控制和效应—细胞死亡,在中心控制和效应阶段,最重要的事件是发生 caspases 的活化。Caspases 是一个半胱氨酸蛋白酶家族,在细胞凋亡过程中起着重要的作用,在动物细胞凋亡的研究中涉及较多,近些年的研究表明,植物细胞凋亡过程也有类似动物细胞的 caspases 现象。Greenberg 等发现氧化胁迫大豆细胞发生凋亡过程中,产生了一组半胱氨酸蛋白酶,这些半胱氨酸蛋白酶的活化促进了大豆细胞的凋亡^[8]。

此外,已经发现了一些与细胞死亡相关的基因,如 P450 76C2 与一些胁迫反应引起的细胞死亡反应有紧密的关系^[9],植物蛋白酶体途径的不同组分包含在 PCD 的过程中,包括催化蛋白酶体途径亚基和 E3 泛素连接酶的组分^[10]。C3HC4-type zinc finger (RING)在蛋白酶体降解过程中具有重要的作用,具有 E3 酶的活性,而 E3 酶在特异性蛋白被蛋白酶体的降解中具有重要的作用。衰老特异性半胱氨酸蛋白酶(SAG12)是从拟南芥中分离出的一种衰老特异表达的启动子,该启动子指导的基因特异表达随衰老进程而加强,而在未衰老植株中不表达,植物的衰老过程也是细胞发生更大范围的死亡过程。大麦类天冬氨酸蛋白酶的基因(nucellin),起调控株心细胞退化的作用。

神经酰胺(ceramide)及其他的鞘脂类物质(sphingolipid)对于保持细胞的稳态起着重要的调节作用,细胞内神经酰胺的改变对于细胞的生理过程会产生影响,甚至导致细胞死亡^[11]。SAF 处理诱导了两种与神经酰胺代谢途径相关酶,即 ceramidase family protein 和 ceramide kinase-related protein 的表达,且高浓度处理下,表达的倍数分别是低浓度处理的 2.5 倍和 1.7 倍,暗示高浓度 SAF 处理对于拟南芥细胞内神经酰胺水平的改变产生影响,从而破坏了细胞的正常稳态,这种反应是一种破坏性的死亡现象。

表 1 显示,SAF 可以诱导一些与细胞死亡相关基因的表达,且高浓度(0.3 mmol/L)与低浓度(0.075 mmol/L)处理诱导表达的数量和倍数有差异。总体上高浓度处理表达的数量和倍数大于低浓度处理的。低浓度处理诱导了 2 种 C3HC4-type zinc finger (RING)的上调表达,没有 ≥ 1 倍的上调基因表达;高浓度处理诱导了 2 种 RING 上调表达,其中 ≥ 1 倍的 1 种。高浓度 SAF 处理诱导的半胱氨酸蛋白酶基因表达的倍数是低浓度的 1 倍。低浓度处理的没有 P450 76C2 ≥ 1 倍的上调基因表达,高浓度处理诱导的 P450 76C2 较对照上调了 3.8 倍。高浓度 SAF 处理诱导的 SAG12 基因表达的倍数是低浓度的 3.8 倍。高浓度 SAF 处理对于拟南芥细胞内神经酰胺水平的改变也产生影响,从而破坏了细胞的正常稳态,这种反应是一种破坏性的死亡现象。此外,从外部形态特征观测来看,以 SAF 处理拟南芥的根部,4d 后观察,叶片出现了衰老的黄色迹象,随浓度的增加而黄色面积增大,根长及根粗较对照减少,幼苗高度降低的幅度也较对照增大(见图 3)。SAF 是真菌毒素,它也产生了如同病原体侵染类似的效应——PCD 现象,在高浓度下,由于导致细胞出现了大量的死亡现象,而影响到受体植物的生长。

2.4 SAF 作用对拟南芥防御反应相关基因表达的影响

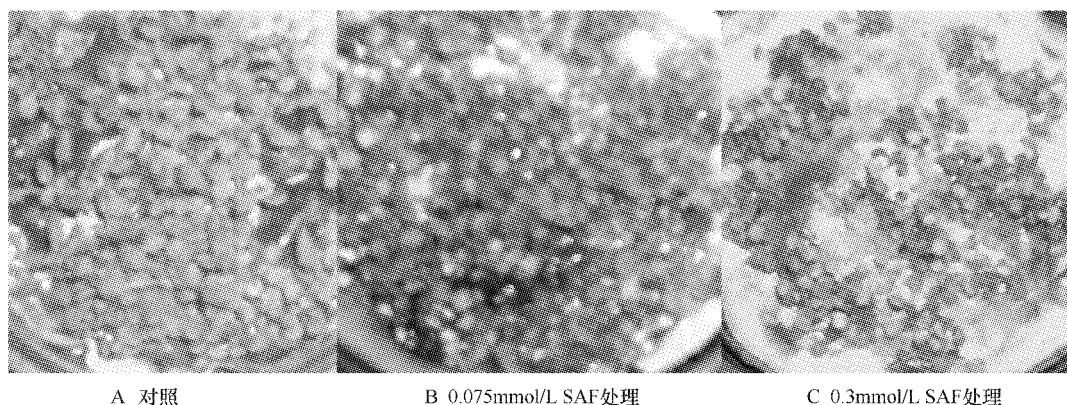
植物在遭受外部的生物或非生物因子胁迫后,可以诱导或启动体内一些具有保护作用物质的产生或积累,一些调节这些物质产生的酶已经被阐明。如:细胞色素 P450 酶系(简称 P450s)在植物中起着重要的防御作用,在催化杀虫剂、除草剂、污染物等的解毒反应,具有防御功能的物质包括甾醇、黄酮类、生物碱和萜类等的合成反应^[12],以及 Oxylin 等与防御反应相关的信号分子的合成反应中起到重要的作用^[13]。植物体内的苯丙氨酸解氨酶(phenylalanine ammonia-lyase, PAL)也属于 P450 酶系,是苯丙烷类代谢途径的关键酶和限速酶,可以转化苯丙氨酸为肉桂酸,而后者是几千种酚类物质的前体,包括单酚类、苯丙酸和黄酮类。肉桂酸在肉桂酸-4 羟化酶(CA4H)的作用下,产生香豆酸,进一步羟基化和甲基化产生咖啡酸、阿魏酸和芥子酸,这些简单的苯丙烷类物质是一些多聚体、木栓质、木质素以及其他一些防御机械损伤和病原菌侵染的多酚类物质

的结构元件^[14]。谷胱甘肽 S-转移酶(Glutathione S-transferase, GST)在细胞遭受包括氧化胁迫等作用的解毒反应中起重要的作用。此外,植物抗病蛋白、植物防御蛋白等在植物抵御逆境胁迫中发挥作用。

本项研究表明(表 1),SAF 也诱导了拟南芥与防御反应相关基因的表达,这种作用也具有浓度效应,与细胞死亡基因表达相反,总体上高浓度处理的表达的数量和倍数低于低浓度处理的。结果显示,低浓度 SAF 处理诱导了多种编码 P450s 的高倍表达,P450 基因上调的基因达 13 种, ≥ 1 倍的有 8 种;主要有:P450 71A13,表达倍数为高浓度的 4.85 倍;P450 71B10,表达倍数为高浓度的 4.2 倍;P450 71B23,表达倍数为高浓度的 3 倍。低浓度 SAF 处理还诱导了 3 种编码 PAL 基因的上调表达,如 PAL2 基因上调表达为高浓度的 5.3 倍。

此外,低浓度的 SAF 处理拟南芥也诱导了其他编码与细胞保护反应相关酶基因的表达,谷胱甘肽 S-转移酶(Glutathione S-transferase, GST)在细胞遭受包括氧化胁迫等作用的解毒反应中起重要的作用。本研究结果表明,低浓度的 SAF 处理诱导了 5 种 GST 基因的上调表达,其中 ≥ 1 倍的 3 种;而高浓度的 SAF 处理诱导了 1 种 GST 基因的上调表达,没有 ≥ 1 倍的基因表达。

实验结果表明,低浓度的 SAF 处理,诱导了拟南芥防御反应基因的上调表达,从而启动了植物与防御反应相关酶的活性,增强了植物的防御反应,因而对植物的损伤程度较低,从外部形态也观测到了这种变化(图 3)。



A 对照

B 0.075mmol/L SAF处理

C 0.3mmol/L SAF处理

图 3 SAF 对拟南芥的影响

Fig 3 The effect of SAF on *A. thaliana*

A: 对照, B: 0.0 75 mmol/L SAF 处理, C: 0.3 mmol/L SAF 处理

2.5 SAF 作用对拟南芥与生长素响应基因表达的影响

研究表明,动植物具有相似的触发细胞死亡因子,如:激素、病菌和细胞毒素类物质^[15]。生长素不仅作为一种植物生长调节剂,也可以作为植物生长的抑制剂而发挥作用。合成具有生长素活性的物质是许多除草剂应用在农业的成功例子,这些具有生长素活性的除草剂可以破坏一些组织或器官,并抑制植物的生长,最终导致植物死亡^[16]。有关生长素抑制植物生长的机理之一,认为生长素可以导致乙烯的积累,乙烯诱导脱落酸(ABA)的产生和积累,并引起气孔关闭,对 CO₂ 的吸收和同化作用受到限制,进而导致活性氧(ROS)的积累^[17]。Aux/IAAs 是一种研究得最清楚的生长素响应基因,在拟南芥中,已鉴定了 25 种此类基因。Aux/IAAs 在生长素信号转导中起作用,并与其它信号转导密切相关^[18]。

本研究表明(表 1),低浓度的处理诱导了 5 种 Aux/IAA 基因的上调表达,其中 ≥ 1 倍的为 1 种,高浓度处理诱导了 7 种 Aux/IAA 基因上调表达,其中 ≥ 1 倍的为 3 种。此外,低浓度的处理诱导了 3 个乙烯反应敏感蛋白,没有 ≥ 1 倍的基因表达;5 个乙烯受体蛋白基因,其中 1 个 ≥ 1 倍的基因。高浓度的处理诱导了 3 个乙烯反应敏感蛋白,其中 2 个 ≥ 1 倍的基因表达,7 个乙烯受体蛋白基因,其中 4 个 ≥ 1 倍的基因。从这些结果推测,SAF 具有生长素的性质,并诱导了乙烯的产生,高浓度处理诱导效应显著。

表 1 SAF 诱导拟南芥基因表达的部分结果 (≥ 1 倍)Table 1 The results of SAF induced genes expression in Arabidopsis (≥ 1 fold)

功能 Function	基因位点 Gene locus	名称 Description	SAF 处理后的表达倍数 Fold change after the SAF treatment	
			0.075 mmol/L	0.3 mmol/L
鞘脂代谢 Sphingolipid Metabolism	At2g38010	神经酰胺氧化酶家族蛋白 Ceramidase family protein	1.0	2.5
	At5g51290	酰基鞘氨醇相关激酶 Ceramide kinase-related	1.3	2.2
蛋白酶 Proteases	At3g45310	半胱氨酸蛋白酶 Cysteine proteinase	1.5	3.0
	At2g27395	编码与半胱氨酸蛋白酶相关的蛋白酶抑制剂基因 Cysteine protease-related protease inhibitor	1.2	2.8
	AT3G22600	种子储藏/脂质转移蛋白 Seed storage/lipid transfer protein	1.8	26.1
	AT5G45890	衰老特异性半胱氨酸蛋白酶 SAG12 Senescence-specific cysteine protease SAG12	1.0	3.8
	AT1G32940	似枯草杆菌丝氨酸蛋白酶 Subtilisin-like serine protease	2.5	27.3
	AT1G44130	大麦类天冬氨酸蛋白酶基因 Nucellin	1.6	39.3
	At5g12310	C3HC4-type zinc finger (RING finger)	0.3	2.8
	At1g66140	C2H2-type zinc finger protein	-0.5	0.9
泛素蛋白酶体途径 Ubiquitin-proteasome pathway	AT3G20630	特异泛素蛋白酶 14ubiquitin-specific protease 14 (UBP14), putative	1.0	3.5
其它细胞死亡相关 Other Cell death-related	AT5G20000	26S 蛋白酶体 AAA-腺苷三磷酸酶亚基 RPT6a 26S proteasome AAA-ATPase subunit RPT6a	1.4	4.7
	At2g45570	细胞色素 P450 76C2 cytochrome P450 76C2	0.2	3.8
	At2g34040	细胞程序性死亡 抑制剂 5 (API5) 家族蛋白 Apoptosis inhibitory 5 (API5) family protein	3.4	1.1
	At4g28720	FMO 家族蛋白 FMO family protein	1.2	9.3
	At4g14550	生长素响应 AUX/IAA 家族蛋白 Auxin-responsive AUX/IAA family protein	2.1	3.8
生长素信号及反应 Auxin signalling and responses	At1g28130	生长素响应家族蛋白 Auxin-responsive family protein	3.0	1.5
	At3g20770	乙烯不敏感蛋白 3 (EIN3) Ethylene-insensitive 3 (EIN3)	5.6	0.2
	At3g20310	乙烯相应元件-结合家族蛋白 Ethylene-responsive element-binding family protein	2.6	0.5
	At1g66340	乙烯受体 3 (EIN3) Ethylene receptor 1 (ETR1)	2.5	1.1
	At2g30770	细胞色素 P450 71A13 Cytochrome P450 71A13	9.7	2.0
防御反应相关 Defence response related	At5g57250	细胞色素 P450 71B10 Cytochrome P450 71B10	15.2	3.6
	At3g26210	细胞色素 P450 71B23 Cytochrome P450 71B23	6.1	2.0
	At3g53260	苯丙氨酸解氨酶 2 Phenylalanine ammonia-lyase 2 (PAL2)	5.3	1.0
	At3g07040	抗病蛋白 RPM1 disease resistance protein RPM1 (CC-NBS-LRR class), putative	10.3	1.0
	At1g12220	抗病蛋白 RPS5 disease resistance protein RPS5 (CC-NBS-LRR class)	7.5	0.4

续表

功能 Function	基因位点 Gene locus	名称 Description	SAF 处理后的表达倍数 Fold change after the SAF treatment	
			0.075 mmol/L	0.3 mmol/L
	AT2G26020	植物防御蛋白 Plant defensin protein, putative (PDF1.2b)	4.5	8.0
	AT3G04720	类橡胶树蛋白前体 PR-4 Hevein-like protein precursor (PR-4)	3.8	2.0
	AT5G17330	谷氨酸脱羧酶 GAD 1 Glutamate decarboxylase 1 (GAD 1)	2.5	8.3

结论:SAF 作用具有浓度效应,低浓度作用可以诱导受体植物发生保护反应,高浓度处理诱导受体植物的细胞死亡。SAF 处理能诱导受体的一些与细胞死亡相关基因、编码神经酰胺代谢途径相关酶基因、植物保护反应相关基因、以及与生长素响应相关基因和编码乙烯受体蛋白等基因的上调表达。从表达的基因种类和表达倍数以及功能分析推测,SAF 具有生长素的性质,可以导致受体细胞乙烯的增加,并导致了对维持细胞正常稳态起重要作用的神经酰胺水平的改变,从而导致细胞的死亡,这是 SAF 抑制受体植物生长的主要原因。SAF 是一种寄主非选择性毒素,此项研究对于揭示此类具有化感功能的微生物毒素的作用机理具有重要意义。

References:

- [1] Xu Z R, Li Y H. Application of gene-chip technology in analysis of plants. *Biotechnol*, 2004, 14(6): 70—72.
- [2] Bais H P, Vepachedu R, Gilroy S. Allelopathy and exotic plant invasion: from molecules and genes to species interactions. *Science*, 2003, 301: 1377—1380.
- [3] Schena M, Shalon D, Davis R W, *et al.* Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science*, 1995, 270(5235): 467—470.
- [4] Tzean S S, Chen J L, *et al.* *Aspergillus* species and relative teleomorphs from Taiwan. *Hsinchu: Food Industry Research and Development Institute*, 1990, 43.
- [5] Zeng R S, Luo S M, Shi Y H, *et al.* Allelopathy of *Aspergillus* on Crops. *Agrono. J.*, 2001, 93: 60—64.
- [6] Saxena S, Pandey A K. Microbial metabolites as eco-friendly agrochemicals for the next millennium. *Appl. Microbiol. Biotechnol*, 2001, 55: 395—403.
- [7] Dangi J L, Jones J D G. Plant pathogens and integrated defence responses to infection. *Nature*, 2001, 411: 826—833.
- [8] Greenberg J T. Programmed cell death: A way of life for plants. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 1996, 93: 12094—12097.
- [9] Godiard L, Sauviac L, Dalbin N, *et al.* CYP 76 C2, an *Arabidopsis thaliana* cytochrome P450 gene expressed during hypersensitive and developmental cell death. *FEBS Lett*, 1998, 438: 245—249.
- [10] Pennell R I, Lamb C. Programmed cell death in plants. *Plant Cell*, 1997, 9: 1157—1168.
- [11] Koga J, Yamaguchi T, *et al.* Cerebrosides A and C, sphingolipid elicitors of hypersensitive cell death and phytoalexin accumulation in rice plants. *J. Biol. Chem*, 1998, 273, 31985—31998.
- [12] Schuler M A, Daniele W R. Functional genomics of P450s. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 2003, 54: 627—629.
- [13] Howe G A, Schilmiller A L. Oxylin metabolism in response to stress. *Curr. Opin. Plant Biol.*, 2002, 5: 230—236.
- [14] Kahn R, Durst F. Function and evolution of plant cytochrome P450. *Rec. Adv. Phytochem.*, 2000, 34: 151—189.
- [15] Vaux D L. Apoptosis and toxicology — what relevance? *Toxicology*, 2002, 173: 181—182.
- [16] Cobb A. Auxin-type herbicides. In: Cobb A, ed. *Herbicides and plant physiology*. London: Chapman, 1992. 82—106.
- [17] Eullaffroy P, Dewez D, Frankart C, Vernet G, Popovic R. Study of polyphasic fluorescence induction in *Lemna minor* in the presence of methyl viologen (MV) and duroquinone (DQ). In: *PS2001 Proceedings 12th International Congress on Photosynthesis*. CSIRO Publishing, 2001, S14—022.
- [18] Reed J. Roles and activities of Aux/IAA proteins in *Arabidopsis*. *Trends Plant Sci.*, 2001, 6: 420—425.

参考文献:

- [1] 许志茹, 李玉花. 基因芯片技术在植物研究中的应用. *生物技术*, 2004, 14(6): 70—72.

和 280 nm 处的吸光值,检测 RNA 的纯度,纯 RNA 的 OD260/OD280 比值应接近 2.0。

2 结果分析与讨论

2.1 总 RNA 抽提结果

所提的 3 组拟南芥叶片 RNA 的检测结果的 OD260/OD280 均在 1.9 ~ 2.0 之间。琼脂糖凝胶电泳检测的 RNA 样品电泳条带较清晰,28S 比 18S rRNA 条带亮度接近 2:1,质量符合 Affymetrix 表达谱芯片实验要求(图 1)。

2.2 芯片杂交信号强度散点图

实验结果见图 2,图中红色区域代表测试样与探针杂交时共同表达的基因,黄色区域为测试样与探针杂交时不表达的基因,蓝色区域表示测试样与探针杂交时有差异的基因。图中有 8 条线,由内至外分别表示表达的倍数为 2、3、10 倍和 30 倍。由散点图的结果及表达谱基因的信息得出,0.075 mmol/L SAF 处理的与两种探针杂交时共同表达的基因为 53%,0.3 mmol/L 处理的与两种探针杂交时共同表达的基因为 41%;0.075 mmol/L SAF 处理的与探针杂交时有差异的基因表达为 23%,0.3 mmol/L 的处理与探针杂交时有差异的基因表达为 7%。这些基因的上下调趋势基本一致,但表达的倍数有较大差异,低浓度 SAF 诱导的上下调基因表达的倍数总体高于高浓度处理的。

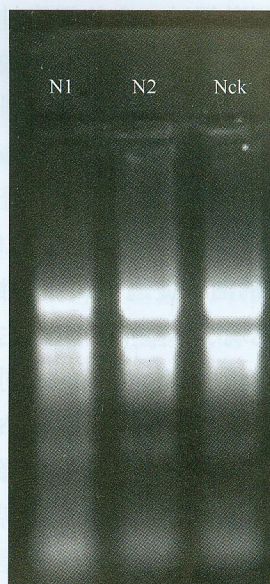


图 1 拟南芥叶片总 RNA 电泳图

Fig. 1 Electrophoretic pattern of total RNA in leaves of *A. thaliana*

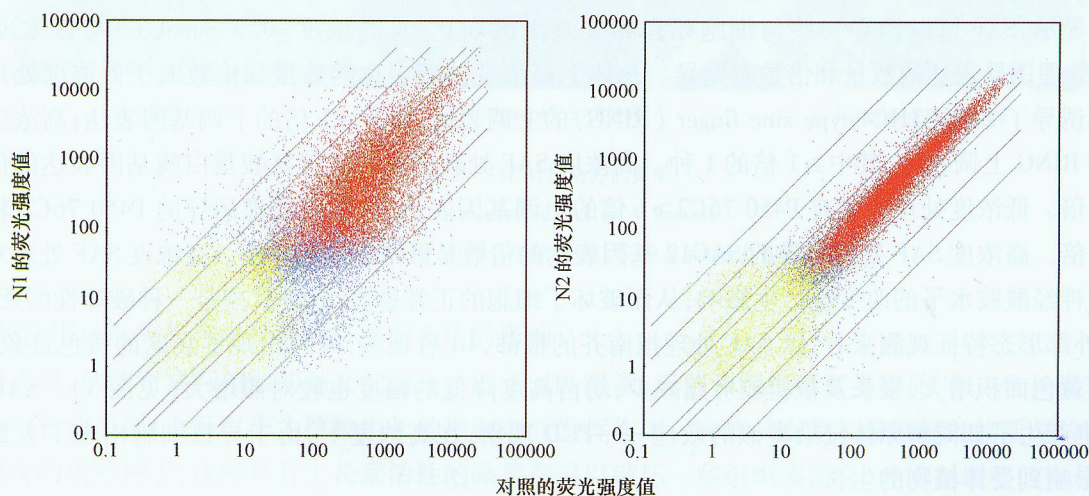


图 2 基因芯片荧光杂交信号强度散点图

Fig. 2 Scatter Graph of fluorescent hybridization signal of gene chip

N1:0.075 mmol/L SAF 处理的拟南芥样品;N2:0.3mmol/L SAF 处理的拟南芥样品

2.3 SAF 对受体细胞死亡相关基因表达的影响

细胞死亡包括程序性细胞死亡(programmed cell death, PCD)和细胞坏死(cell necrosis)现象。PCD 是多细胞生物体在发育过程中或在某些环境因子的作用下发生的受基因调控的主动死亡方式,在这个过程中,涉及到一些与细胞死亡相关基因的表达或一些基因沉默的变化^[7]。在植物对病原菌的过敏反应、植物正常发育过程中以及外界环境胁迫刺激都可导致植物细胞发生 PCD 现象。植物在响应外部环境胁迫的机制中,

的结构元件^[14]。谷胱甘肽 S-转移酶 (Glutathione S-transferase, GST) 在细胞遭受包括氧化胁迫等作用的解毒反应中起重要的作用。此外,植物抗病蛋白、植物防御蛋白等在植物抵御逆境胁迫中发挥作用。

本项研究表明(表 1),SAF 也诱导了拟南芥与防御反应相关基因的表达,这种作用也具有浓度效应,与细胞死亡基因表达相反,总体上高浓度处理的表达的数量和倍数低于低浓度处理的。结果显示,低浓度 SAF 处理诱导了多种编码 P450s 的高倍表达,P450 基因上调的基因达 13 种, ≥ 1 倍的有 8 种;主要有:P450 71A13,表达倍数为高浓度的 4.85 倍;P450 71B10,表达倍数为高浓度的 4.2 倍;P450 71B23,表达倍数为高浓度的 3 倍。低浓度 SAF 处理还诱导了 3 种编码 PAL 基因的上调表达,如 PAL2 基因上调表达为高浓度的 5.3 倍。

此外,低浓度的 SAF 处理拟南芥也诱导了其他编码与细胞保护反应相关酶基因的表达,谷胱甘肽 S-转移酶 (Glutathione S-transferase, GST) 在细胞遭受包括氧化胁迫等作用的解毒反应中起重要的作用。本研究结果表明,低浓度的 SAF 处理诱导了 5 种 GST 基因的上调表达,其中 ≥ 1 倍的 3 种;而高浓度的 SAF 处理诱导了 1 种 GST 基因的上调表达,没有 ≥ 1 倍的基因表达。

实验结果表明,低浓度的 SAF 处理,诱导了拟南芥防御反应基因的上调表达,从而启动了植物与防御反应相关酶的活性,增强了植物的防御反应,因而对植物的损伤程度较低,从外部形态也观测到了这种变化(图 3)。

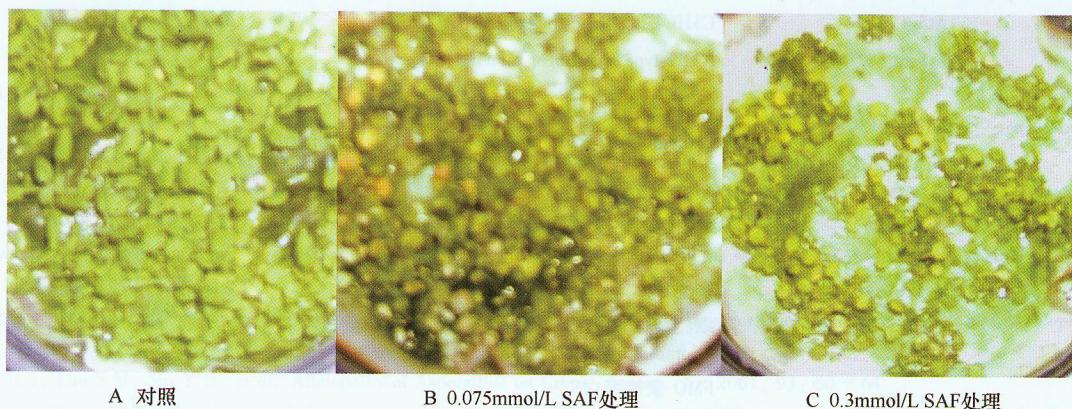


图 3 SAF 对拟南芥的影响

Fig 3 The effect of SAF on *A. thaliana*

A: 对照, B: 0.075 mmol/L SAF 处理, C: 0.3 mmol/L SAF 处理

2.5 SAF 作用对拟南芥与生长素响应基因表达的影响

研究表明,动植物具有相似的触发细胞死亡因子,如:激素、病菌和细胞毒素类物质^[15]。生长素不仅作为一种植物生长调节剂,也可以作为植物生长的抑制剂而发挥作用。合成具有生长素活性的物质是许多除草剂应用在农业的成功例子,这些具有生长素活性的除草剂可以破坏一些组织或器官,并抑制植物的生长,最终导致植物死亡^[16]。有关生长素抑制植物生长的机理之一,认为生长素可以导致乙烯的积累,乙烯诱导脱落酸 (ABA) 的产生和积累,并引起气孔关闭,对 CO_2 的吸收和同化作用受到限制,进而导致活性氧 (ROS) 的积累^[17]。Aux/IAAs 是一种研究得最清楚的生长素响应基因,在拟南芥中,已鉴定了 25 种此类基因。Aux/IAAs 在生长素信号转导中起作用,并与其它信号转导密切相关^[18]。

本研究表明(表 1),低浓度的处理诱导了 5 种 Aux/IAA 基因的上调表达,其中 ≥ 1 倍的为 1 种,高浓度处理诱导了 7 种 Aux/IAA 基因上调表达,其中 ≥ 1 倍的为 3 种。此外,低浓度的处理诱导了 3 个乙烯反应敏感蛋白,没有 ≥ 1 倍的基因表达;5 个乙烯受体蛋白基因,其中 1 个 ≥ 1 倍的基因。高浓度的处理诱导了 3 个乙烯反应敏感蛋白,其中 2 个 ≥ 1 倍的基因表达,7 个乙烯受体蛋白基因,其中 4 个 ≥ 1 倍的基因。从这些结果推测,SAF 具有生长素的性质,并诱导了乙烯的产生,高浓度处理诱导效应显著。