

低钾胁迫对水稻 (*Oryza sativa* L.) 化感潜力变化的影响

王海斌^{1,2}, 何海斌^{1,2}, 熊 君², 邱 龙², 方长旬², 曾聪明², 严 琳², 林文雄^{1,2,*}

(1. 生物农药与化学生物学教育部重点实验室; 2. 福建农林大学农业生态研究所, 福州 350002)

摘要: 研究以国际公认的化感水稻 PI312777 和非化感水稻 Lemont 为供体, 稗草 (*Echinochloa crus-galli* L.) 为受体, 采用稻/稗共培体系, 研究低钾胁迫对水稻化感潜力变化的影响及其机制。受体稗草的形态指标分析结果表明, 低钾胁迫促使化感水稻 PI312777 对共培稗草的根长、株高和干重的抑制率均升高, 增幅远大于非化感水稻 Lemont。受体稗草生理生化指标分析结果表明, 低钾胁迫下化感与非化感水稻对受体稗草保护酶系 (SOD、POD、CAT) 及根系活力的抑制作用增强, 但化感水稻 PI312777 比非化感水稻 Lemont 的抑制程度大, 且达极显著差异。实时荧光定量 PCR 分析结果表明, 低钾胁迫下, 化感水稻 PI312777 根部与叶部中酚类代谢的关键酶——苯丙氨酸解氨酶、肉桂酸 4-羟化酶、羟化酶、O-甲基转移酶的基因均上调表达, 而非化感水稻根部相应酶均下调表达, 叶部除苯丙氨酸解氨酶上调, 其余酶也下调表达。而萜类代谢途径关键酶——HMG-CoA 还原酶、角鲨烯合酶、单萜烯环化酶、倍半萜烯环化酶、二萜烯环化酶的基因, 在两种水稻根部中呈现出相同或相似的表达方式 (上调或下调), 即 HMG-CoA 还原酶上调表达, 角鲨烯合酶、单萜烯环化酶、倍半萜烯环化酶、二萜烯环化酶下调表达; 而在水稻叶部, 非化感水稻 Lemont 相应酶基因表达方式仍然不变, 化感水稻 PI312777 除了角鲨烯合酶下调表达, 其余 4 个酶均上调表达。水稻根系分泌物中酚类物质的 HPLC 分析结果表明, 低钾胁迫下, 化感水稻 PI312777 根系分泌物中, 所检出的酚酸类物质总量是正常营养条件下的 2.30 倍, 而非化感水稻 Lemont 则是正常营养条件下的 0.91 倍。综合分析认为低钾胁迫下, 化感水稻 PI312777 抑草能力增强主要是由于酚类代谢途径关键酶基因表达上调, 导致酚类代谢途径旺盛, 分泌出更多的酚类物质, 进而破坏受体稗草保护酶系统, 抑制了稗草的正常生长。

关键词: 水稻; 化感作用; 低钾胁迫; 基因表达; 酚酸

文章编号: 1000-0933 (2008) 12-6219-09 中图分类号: Q948 文献标识码: A

Effects of potassium stress on allelopathic potential of rice (*Oryza sativa* L.)

WANG Hai-Bin^{1,2}, HE Hai-Bin^{1,2}, XIONG Jun², QIU Long², FANG Chang-Xun², ZENG Cong-Ming², YAN Lin², LIN Wen-Xiong^{1,2,*}

1 Key Laboratory for Biopesticide and Chemical Biology, Ministry of Education

2 School of Life Sciences, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China

Acta Ecologica Sinica, 2008, 28 (12): 6219 ~ 6227.

Abstract: In order to explore the changing mechanism of rice allelopathic potential under potassium deficiency, allelopathic

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30471028, 30671220); 福建省自然科学基金重大资助项目 (2002F012)

收稿日期: 2007-08-12; **修订日期:** 2008-03-25

作者简介: 王海斌 (1983 ~), 男, 福建人, 硕士生, 主要从事植物化感作用及其分子生物学研究. E-mail: w13599084845@sina.com.

* 通讯作者 Corresponding author. E-mail: wenxiong181@163.com

致谢: 福建农林大学生物技术中心的甘纯玢教授和谢苗老师在实时定量 RT-PCR 技术方面给予了大力帮助, 在此谨表谢忱; 感谢澳大利亚学者吴汉文教授对文章写作的帮助。

Foundation item: The project was financially supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 30471028, 30671220), Scientific and Technological Program of Fujian (No. 2002F012)

Received date: 2007-08-12; **Accepted date:** 2008-03-25

Biography: WANG Hai-Bin, Master, mainly engaged in plant allelopathy and molecular ecology. E-mail: w13599084845@sina.com

rice PI312777 and non-allelopathic rice Lemont were employed as donor plants and the morphological and physiobiochemical characteristics of receiver plant barnyardgrass (*Echinochloa crus galli*) mediated by the two donor plants were investigated under low potassium stress ($5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{K}$, denoted as K⁻) and normal potassium ($40 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{K}$, denoted as K⁺). The result showed that, under K⁻ condition, the two rice accessions inhibited the growth of barnyardgrass to different extents. The inhibitory effect (IR, %) of allelopathic rice PI312777 on barnyardgrass was greatly higher than that of non-allelopathic rice Lemont, showing 56.19% (IR, the same below) VS 14.67% in the suppression of root length of barnyardgrass, 35.78% VS 9.27% in plant height, and 46.24% VS 9.47% in dry weight. Under K⁻ condition, the activities of superoxide dismutase (SOD), peroxidase (POD), catalase (CAT), and the root activity of barnyardgrass were descended at a higher rate when the target plants were co-cultured with allelopathic rice PI312777 than those with non-allelopathic rice Lemont. Furthermore, analysis of Real time Fluorescent Quantitative PCR (FQ-PCR) showed that, under K⁻ condition, phenylalanine ammonia-lyase, cinnamate-4-hydroxylase, hydroxylase, and O-methyltransferases, which are the key enzymes in phenolic metabolic pathway, were all up-regulated in root and leaves of allelopathic rice PI312777. But all these enzymes were down-regulated in non-allelopathic rice Lemont except phenylalanine ammonia-lyase in leave. HMG-CoA reductase, squalene synthase, monoterpene cyclase, sesquiterpene cyclase, and diterpene cyclase, which are the key enzymes in isoprenoid metabolic pathway, performed the same expression pattern in roots of the two rice accessions, and it was also found that in leaves of non-allelopathic rice Lemont, HMG-CoA reductase was up-regulated and the other four enzyme genes were down-regulated. But in allelopathic rice PI312777, only squalene synthase showed down-regulated, the reverse was true in the other enzyme genes. The result from the analysis of phenolic acids in two rice root exudates by using HPLC showed that, the total amount of ten phenolic acids concerned in allelopathic rice PI312777 under K⁻ condition, was 2.30 times as those as under the K⁺ condition. However it was only 0.91 times in non-allelopathic rice Lemont under the same condition. It is therefore suggested that enhancement of rice allelopathic potential in the suppression of the target weeds under K deficiency might be attributed to the up-regulation of the key enzymes involved in phenolic metabolism, which led to the activation of phenolic metabolism, and increased phenolic allelochemicals, consequently inhibited growth of barnyardgrass.

Key Words: rice (*Oryza sativa* L.); allelopathy; potassium deficiency; gene expression; phenolic acid

利用水稻化感作用(allelopathy)控制农田杂草是21世纪发展可持续农业的生物工程技术之一^[1,2]。植物化感作用是指一种活体植物(供体 donor)产生并以挥发(volatilization)、淋溶(leaching)、分泌(excretion)和分解(decomposition)等方式向环境释放次生代谢物而影响邻近伴生植物(杂草等受体, receptor)生长发育的化学生态学现象^[3]。利用水稻自身化感作用来防治农田杂草,可减少化学除草剂的依赖,降低生产成本、保护生态环境和生物多样性,使作物栽培向高产、优质、生态、安全生产发展。因此水稻化感作用已成为当前世界各国研究的热点^[4~6]。

化感作用是受多基因控制的数量遗传性状,其易受环境因子的影响^[1,7]。Wu等^[5]研究表明,植物化感物质的产生与释放受外部环境条件的影响,逆境胁迫调节基因表达,增强化感物质的合成,并促进化感物质从植物内部释放到外部环境中。孔垂华在对胜红蓼化感作用的研究中发现,缺肥条件下胜红蓼的化感作用明显增强^[8]。林文雄等^[1,6]研究发现,低氮胁迫下,植物化感抑草能力增强,并从蛋白质组学、转录组学等角度证明其与酚类代谢途径增强,酚类物质含量增加有关。可见环境影响化感作用,是一个极其复杂的化学生态学过程,特别是在营养胁迫下。然而当前研究营养胁迫影响水稻化感作用大部分集中在氮和磷,对于低钾胁迫下水稻化感潜力的响应机制,目前尚无较为系统的研究。钾是植物必需的大量元素之一,其对植物的生长发育起着重要的作用^[9]。随着复种指数的提高和肥料的不平衡施用,目前我国土壤缺钾面积呈日益扩大的趋势^[10~12]。因此研究低钾胁迫水稻化感潜力变化具有重要的现实意义。为此,本研究以国际上公认的化感水

稻品种 PI312777 和非化感水稻品种 Lemont 为材料^[14~16],考查低钾胁迫对水稻化感潜力变化的影响,以期阐明低钾胁迫下植物化感潜力的变化机制,为最终揭示和充分利用水稻化感作用机制与潜力提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 实验设计

将催芽后的 PI312777 (引自美国,简称 PI)、Lemont (引自美国,简称 LE)及稗草种子分别播在秧盘中,至二叶期,选择均匀的秧苗移至盛有 10L 完全培养液(Hoagland 配方)的塑料盆(长 45 cm×宽 35 cm×高 15 cm),塑料盆中悬浮厚为 1.5cm 的塑料泡沫板,泡沫板上均匀分布直径 1.5cm 的小孔 40 个,单独恢复 7d。更换营养液,营养成分除 K 元素外其它保持不变,K 分两个水平:5 mg 钾·L⁻¹(低钾胁迫水平,标为 K-)和 40 mg 钾·L⁻¹(正常钾水平,标为 K+)并分别标记为 K-和 K+,每个水平设 3 个重复。同时将水稻与稗草移植到同一塑料盆中,每孔 1 株,水稻和稗草的数量分别为 35 株和 5 株,株行距为 5cm×5cm,稗草集中在一排,并位于水稻植株的中央,其中以不同钾素条件下的清种稗草(40 株)为对照,培养 7d 后,进行相关项目的测定,所获数据采用 SPSS 软件进行统计分析。

1.2 稗草形态指标分析

采用直接测量法对各处理的稗草根长,株高进行测定。每个处理测量株数为 10 株。测定完毕,取 5 株稗草打包,120℃杀青后,70℃烘干至恒重并称量得其干物质质量。稗草干物质质量抑制率计算按公式:IR=(1-TR/CK)×100%计算,当 IR>0 为抑制作用,IR<0 为促进作用。其中,IR:抑制率(inhibitory rate),TR:处理测量值(treatment),CK:对照测量值(control)。

1.3 共培稗草生理指标测定

受体稗草根系活力测定采用 TTC 法^[17],超氧化物歧化酶(SOD)活性测定采用氮蓝四唑法,过氧化物酶(POD)活性采用愈创木酚法测定,过氧化氢酶(CAT)活性则采用紫外分光光度法测定,具体操作参见文献^[18]。

1.4 酚类和萜类代谢途径中几个关键酶基因的实时荧光定量 PCR 分析

低钾胁迫下,水稻酚类和萜类代谢途径中几个关键酶基因的差异表达分析采用实时荧光定量 PCR 方法进行^[19]。相应基因的引物序列如下表。

表 1 水稻中酚类和萜类代谢途径关键酶基因表达的 FQ-PCR 引物设计及序列

Table 1 Design of the primer sequences used for FQ-PCR analysis on the related gene expression involved in phenolic and isoprenoid metabolic pathway in rice

	关键酶 The key enzyme	登录号 Accession number	来源 Source	引物序列 Primer sequence (5'-3')
酚类代谢途径 Phenolic metabolic pathway	苯丙氨酸解氨酶 Phenylalanine ammonia-lyase	AK068993	<i>Oryza sativa</i>	S-CCGTGCTCTTTGAGGCTAAC A-GCTTGTGAGTCAGGTGCTCG
	肉桂酸-4-羟化酶 Cinnamate-4-hydroxylase	AAV44089	<i>Oryza sativa</i>	S-ACCGCAGCGTCTCCTTC A-ACCACCCGAGCATCCAG
	羟化酶 Hydroxylase	AK069765	<i>Oryza sativa</i>	S-CCGCCTTCAACGACAA A-CGCCCATACGACGATT
	O-甲基转移酶 O-methyltransferases	ABB90678	<i>Oryza sativa</i>	S-TGGTGGAGTGCCTGCTG A-AGGCCGTTGGCGTAGATG
	异戊二烯代谢途径 Isoprenoid metabolic pathway	HMG 辅酶 A 还原酶 HMG-CoA reductase	AK060545	S-TGTCCTGTGAAATGGGTG A-CCTCGGAACAAGAACTG
	倍半萜环化酶 Sesquiterpene cyclase	BAD19972	<i>Oryza sativa</i>	S-TCGATGGAAGAACGGGCAGAG A-TCGGCGTCGCTAATTCATCC
	单萜烯环化酶 Monoterpenes cyclase	AC090120	<i>Oryza sativa</i>	S-AGCAGGTCCCTTGCGTCTT A-CTTGTCGTTCCCGTCGTT
	角鲨烯合酶 Squalene synthase	BAA22557	<i>Oryza sativa</i>	S-TGGGAGCAGGAATGGCAAAAT A-TTCCGTCCCACAGCATGAC
	二萜烯环化酶 Diterpene cyclase	BAD17278	<i>Oryza sativa</i>	S-CGACGCTAAGGGCTCCCAGA A-GCCGTGCGAAATGTAGCTGG

1.5 水稻根系分泌物中酚酸类化感物质含量分析

取实验设计与稗草共培 7d 后的两种水稻的培养液(含有水稻根系分泌物)各 1L,将其 pH 值用 HCl 调至 2.6 左右,在 35℃ 旋转蒸发至约 10ml 左右,通风橱中风干后,用 2ml 甲醇(色谱纯)溶解用于 HPLC 分析。根据单个酚酸标样的 HPLC 检测结果,混合酚酸标样浓度设定为:儿茶素 $8 \times 10^{-3} \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$,原儿茶酸 $1.5 \times 10^{-3} \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$,间苯二酚 $8 \times 10^{-3} \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$,咖啡酸 $5 \times 10^{-4} \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$,对羟基苯甲酸 $6 \times 10^{-4} \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$,丁香酸 $1 \times 10^{-3} \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$,香草酸 $8 \times 10^{-4} \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$,水杨酸 $2 \times 10^{-2} \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$,阿魏酸 $6 \times 10^{-3} \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$,肉桂酸 $4 \times 10^{-3} \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。HPLC 分析条件: waters 1525,紫外检测器,色谱柱为 C18 反相柱。流动相 5% 醋酸(A),色谱纯甲醇(B),流速 $1.0 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ 。梯度洗脱方式为:0~2min, A:B 为 1:1, 2~3min, A:B 为 2:3, 3~5min, A:B 为 3:7, 6~20min, A:B 为 2:3。

2 结果与分析

2.1 低钾胁迫下不同化感潜力水稻对稗草形态的影响

图 1、2 结果表明,与正常营养条件相比低钾胁迫下,化感水稻 PI312777 与非化感水稻 Lemont 对共培稗草根长、株高和干重均有抑制作用。正常营养条件下,化感水稻对共培稗草根长、株高、干重的抑制率在 37.51%~46.11%,非化感水稻 Lemont 为 8.73%~11.77%。低钾胁迫下,化感水稻 PI312777 对共培稗草根长、株高、干重的抑制率为 46.24%~56.19%,非化感水稻 Lemont 为 9.47%~14.67%。可见两种水稻在抑草效应上存在显著差异,特别是在营养胁迫下,差异更加明显。

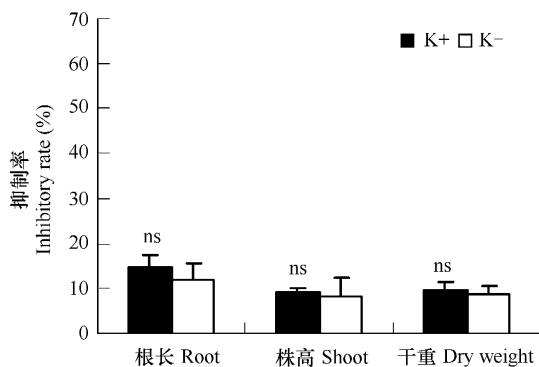


图 1 不同钾素条件下非化感水稻 Lemont 对稗草根长、株高和干重的抑制率

Fig. 1 The root, plant height, and dry weight inhibitory rates of barnyardgrass mediated by non-allopathic rice accession Lemont under different potassium supplies

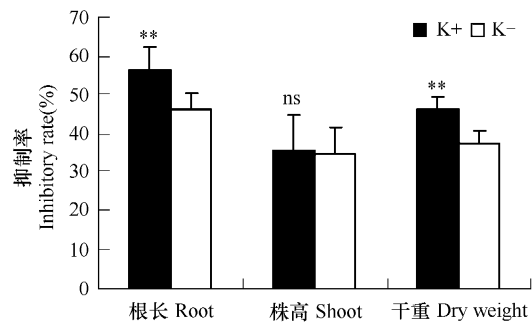


图 2 不同钾素条件下化感水稻 PI312777 对稗草根长、株高和干重的抑制率

Fig. 2 The root, plant height, and dry weight inhibitory rate of barnyardgrass mediated by allelopathic rice accession PI312777 under different potassium supplies

2.2 低钾胁迫下与不同化感潜力水稻共培稗草的生理指标分析

图 3 结果表明,与正常营养条件相比,低钾胁迫下,两种水稻对共培稗草的超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)、过氧化物酶(POD)、根系活力等的抑制作用加大,表现在抑制率升高。在正常营养条件下,化感水稻 PI312777 对共培稗草的根系活力抑制作用最强,对 POD 活性的抑制作用最弱,抑制率分别为 40.08%, 9.54%。而非化感水稻 Lemont 对共培稗草生理指标影响较小,表现为其所考察的指标中抑制作用最强的仅达 7.84%,甚至对 CAT 活性和稗草的根系活力有促进作用。而在低钾胁迫下,非化感水稻 Lemont 对共培稗草的生理生化指标的抑制作用均有一定程度的上升,但上升幅度远低于化感水稻 PI312777 且达极显著水平。可见营养胁迫下,化感水稻 PI312777 对共培稗草生理系统的破坏性比非化感水稻 Lemont 强,进而有利于其在营养匮乏的情况下获得生存优势。

2.3 实时荧光定量 PCR 扩增的重复性检验以及引物二聚体的检测

为了检验 PCR 扩增的重复性,用一定稀释浓度的样品 cDNA 作 6 次重复。由图 4 可以看出,荧光定量动

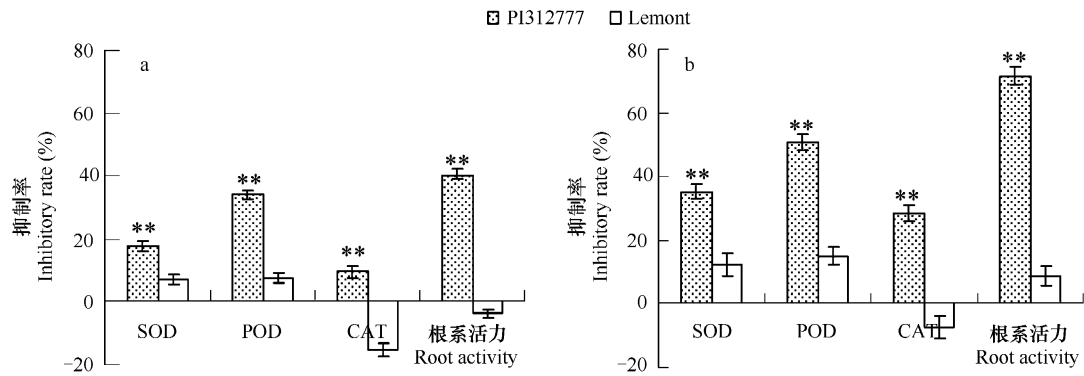


图3 同钾素条件下水稻对共培稗草生理指标的影响

Fig. 3 Effect on physiological characteristics of different allelopathic potential rice accessions accompany by barnyardgrass under different potassium conditions

a. 正常营养条件下 normal nutrition condition, b. 低钾胁迫下 potassium deficiency

力学曲线基线平整,是理想的扩增曲线。6个样品重复性较好,特别是循环域值(cycle threshold,简称Ct)附近扩增曲线基本重叠,在平台期由于dNTP浓度的减少,聚合酶活性的降低等多种因素的影响,导致曲线稍有分离,但不影响定量的结果。融解曲线分析结果表明,在融解温度(T_m)处只有一个尖峰,可见没有非特异性产物扩增及引物二聚体。

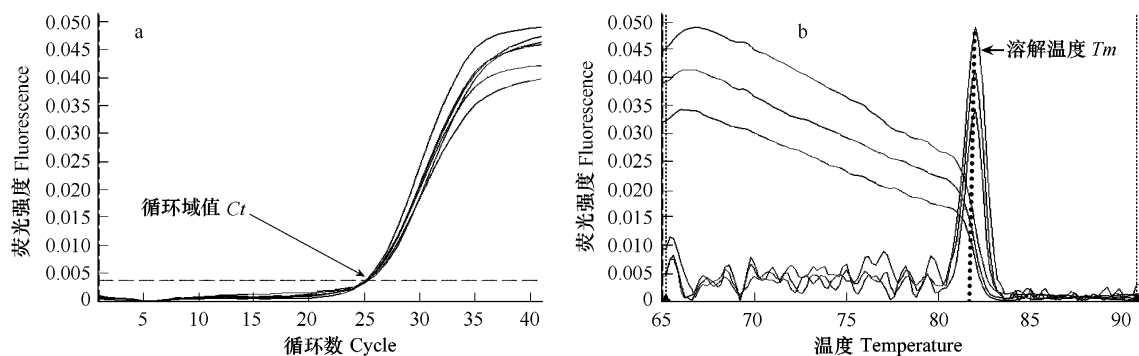


图4 实时荧光定量PCR扩增的重复性检验及引物二聚体的检测

Fig. 4 The repetition verifications for real time fluorescence quantitative amplification and the examination of primer dimer

a. 扩增曲线 amplification curves, b. 融解曲线 melting curves

2.4 低钾下水稻酚类和萜类代谢途径中关键酶基因的差异表达分析

运用实时荧光定量PCR技术(FQ-PCR)分析低钾条件下,水稻酚类代谢途径中关键酶基因的相对表达差异。结果表明(表2),低钾条件下,化感水稻PI312777根部和叶部中,肉桂酸、香豆酸、咖啡酸、阿魏酸、5-羟基阿魏酸、芥子酸等代谢的关键酶苯丙氨酸解氨酶、肉桂酸-4-羟化酶、羟化酶、O-甲基转移酶等的基因表达量均上调,且上调倍数分别为2.59、0.61、3.96、1.13倍和2.74、1.35、2.87、2.35倍。而非化感水稻Lemont根部相应酶的基因表达量反而下调,下调倍数分别为1.94、2.98、0.77、0.86倍,叶部只有苯丙氨酸解氨酶基因表达量上调了0.45倍,其余3个酶的表达量则分别下调了1.42、0.21、0.15倍。可见,低钾胁迫下,化感水稻PI312777酚类代谢途径中关键酶的基因表达量均上调,而非化感水稻Lemont则表现为下降趋势,进而表明在低钾胁迫下,化感水稻PI312777酚类代谢途径比非化感水稻Lemont旺盛。

由表2还可看出,低钾胁迫下,水稻萜类代谢途径中的关键酶——HMG-CoA还原酶及单萜、倍半萜、二萜和三萜合成的关键酶——单萜烯环化酶、倍半萜烯环化酶、二萜烯环化酶和角鲨烯合酶的基因表达差异。结果表明,低钾胁迫下,化感水稻与非化感水稻根部与叶部,HMG-CoA还原酶的基因均上调表达,其中化感水稻

PI312777 上调 1.52 与 1.97 倍,非化感水稻 Lemont 上调 1.55 与 1.14 倍。进一步分析两种水稻中单萜烯环化酶、倍半萜烯环化酶、二萜烯环化酶和角鲨烯合酶的基因表达量。非化感水稻 Lemont 根部和叶部中 4 个酶的基因表达量均下调,下调倍数分别为 1.73、3.89、1.67、1.91 倍和 1.21、0.34、0.16、1.64 倍。而化感水稻 PI312777 根部单萜烯环化酶、倍半萜烯环化酶、二萜烯环化酶和角鲨烯合酶的基因分别下调表达 1.36、1.60、0.34、1.37 倍。但在化感水稻叶部,角鲨烯合酶基因下调表达 0.46 倍,单萜烯环化酶、倍半萜烯环化酶、二萜烯环化酶均上调表达,分别为 0.26、0.58 倍和 0.23 倍。可见两水稻品种根部的萜类合成关键酶在响应低钾胁迫的分子行为是相同或相似的,这与上述所说的酚类代谢响应明显不同。而叶部涉及到植物光合作用及激素合成等多方面的因素,因此两种水稻之间存在着一定的差异。

表 2 不同钾素条件下化感与非化感水稻根部和叶部酚类和萜类代谢途径中关键酶基因的差异表达分析

Table 2 Differential gene expression of the key enzymes involved in phenolic and isoprenoid metabolic pathways in allelopathic and non-allelopathic rice root and leaves under different potassium supplies

代谢途径 Metabolism pathway	关键酶 The key Enzyme	Lemont 基因表达倍数 Gene expression folds of Lemont		PI312777 基因表达倍数 Gene expression folds of PI312777	
		叶 Leave	根 Root	叶 Leave	根 Root
酚类代谢途径 The pathway of phenolic metabolic	苯丙氨酸解氨酶 Phenylalanine ammonia-lyase	↑, 0.45	↓, 1.94	↑, 2.74	↑, 2.59
	肉桂酸-4-羟化酶 Cinnamate-4-hydroxylase	↓, 1.42	↓, 2.98	↑, 1.35	↑, 0.61
	羟化酶 Hydroxylase	↓, 0.21	↓, 0.77	↑, 2.87	↑, 3.96
	O-甲基转移酶 O-methyltransferases	↓, 0.15	↓, 0.86	↑, 2.35	↑, 1.13
异戊二烯代谢途径 The pathway of isoprenoid metabolic	HMG-CoA 还原酶 HMG-CoA reductase	↑, 1.14	↑, 1.55	↑, 1.97	↑, 1.52
	单萜烯环化酶 Monoterpenes cyclase	↓, 1.21	↓, 1.73	↑, 0.26	↓, 1.36
	倍半萜烯环化酶 Sesquiterpene cyclase	↓, 0.34	↓, 3.89	↑, 0.58	↓, 1.60
	二萜烯环化酶 Diterpene cyclase	↓, 0.16	↓, 1.67	↑, 0.23	↓, 0.34
	角鲨烯合酶 Squalene synthase	↓, 1.64	↓, 1.91	↓, 0.46	↓, 1.37

2.5 水稻根系分泌物中酚类物质含量分析

由图 5 可以看出,10 种酚酸混合液标样在所选择的 HPLC 条件下基本可以得到分离。由表 3 可见,化感与非化感水稻在正常营养条件下或低钾胁迫下,其根系分泌物中酚酸种类基本相似,但含量上存在差异。由表 3 还可看出,低钾胁迫下,化感水稻 PI312777 中酚酸类物质总量是正常营养条件下的 2.30 倍,而非化感水

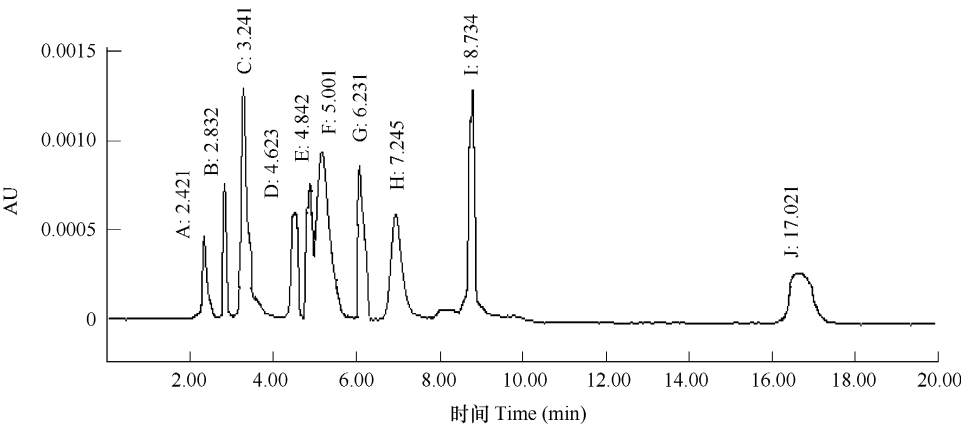


图 5 10 种酚酸混合物的 HPLC 图谱

Fig. 5 Chromatogram of the ten phenolic acids in mixture

A. 儿茶素, Catechins; B. 原儿茶酸, Protocatechuic acid; C. 间苯二酚, m-dihydroxybenzene; D. 咖啡酸, Caffeic acid; E. 对羟基苯甲酸, 4-Hydroxybenzoic acid; F. 丁香酸, Syringic acid; G. 香草酸, Vanillic acid; H. 水杨酸, Salicylic acid; I. 阿魏酸, Ferulic acid; J. 肉桂酸, Cinnamic acid

稻 Lemont 反而降低,是正常营养条件下的 0.91 倍。进一步分析发现低钾胁迫下,化感水稻 PI312777 根系分泌物中总酚酸含量的增加,主要是由其所含的各酚酸单物质的增加所引起。低钾胁迫下,其各单物质含量与正常营养条件下相比其上升倍数的大小趋势为,丁香酸>对羟基苯甲酸>咖啡酸>水杨酸>间苯二酚>阿魏酸>肉桂酸>原儿茶酸>儿茶素>香草酸(由表 3 中化感水稻 PI312777 的 K -:K + 获得)。同时由表 3 中相同营养条件下化感水稻与非化感水稻酚酸类物质总量的比值可看出,正常钾营养条件下,化感水稻 PI312777 根系分泌物中酚酸类物质总量是非化感水稻 Lemont 的 1.32 倍,而低钾胁迫下则为 3.34 倍。可见低钾胁迫诱导化感水稻 PI312777 分泌出更多的酚酸类物质,进而提高其抑草潜力。

3 讨论

研究环境条件调控植物化感作用潜力变化的分子机制,对于深入揭示和充分利用化感作用机制具有极其重要的理论和现实意义,因而成为当前研究的热点问题之一^[1,6]。本研究结果表明,低钾胁迫导致水稻化感抑草能力增强,特别是化感水稻 PI312777。进一步分析受体稗草的生理指标发现,不同营养条件下,受体稗草的保护酶系及根系活力发生显著变化。前人研究表明,膜质过氧化是由于活性氧攻击类脂中不饱和脂肪酸的结果。活性氧具有很强的氧化能力,对生物分子具有破坏作用。但由于植物在长期进化过程中建立了活性氧清除系统即保护酶系统(SOD、POD、CAT 等)和非酶保护系统也就抗氧化物质(Car、Fla 和 Pas 等),因此在正常条件下植物细胞内自由基的产生和清除处于一种动态平衡状态^[20]。本研究结果显示低钾胁迫下,与两种水稻共培的稗草的保护酶系(SOD、POD、CAT)活性及根系活力都下降,但化感水稻 PI312777 对共培稗草的抑制程度明显高于非化感水稻 Lemont。Shen^[21]等研究低磷胁迫下,稗草的生理响应也得到类似的结果。林文雄等^[22]、何华勤等^[23]研究认为酚类化合物会影响稗草的保护酶系统,使其活性降低,自由基含量增多,膜质过氧化加剧,进而导致靶标稗草的生长发育不良。Mckey 等^[13]研究表明,营养匮乏下森林中的大多数树种和草本植物分泌的酚类物质显著提高。Koeppel 发现向日葵在缺磷条件下会促使根系分泌更多的酚类物质^[24]。可见低钾胁迫下,化感水稻化感抑草能力增强可能与其根系分泌更多的酚类物质有关。

本研究运用实时荧光定量 PCR 技术(FQ-PCR)检测了供试水稻根部、叶部酚类和萜类代谢途径关键酶基因的差异表达。结果表明,低钾胁迫下,化感水稻 PI312777 根部与叶部中酚类代谢的 4 个关键酶基因均上调表达,而非化感水稻 Lemont 中相应酶基因反而下调,除叶部苯丙氨酸解氨酶上调表达。萜类代谢途径上,两种水稻根部萜类代谢途径中关键酶的基因表达方式相同或相似。而叶部中非化感水稻相应酶的基因表达方式与根部相同,化感水稻除倍半萜烯环化酶、二萜烯环化酶表达方式相反外,另外两个酶的表达方式仍然不变。王海斌等^[19]研究发现低氮条件下,化感与非化感水稻品种根部萜类代谢途径相应基因的表达行为相同或相似,并认为低氮下化感水稻化感抑草能力增强可能与萜类关系不大。本研究也支持了上述观点,即低钾胁迫下化感水稻抑草能力增强,与其酚类代谢途径关键酶的基因表达上调,进而产生更多的酚类物质有关^[25]。这可从本研究运用 HPLC 技术,对不同化感潜力的水稻根系分泌物进行分析所获得的结果中得到证实。正常营养条件下,化感水稻 PI312777 根系分泌的酚酸总量是非化感水稻 Lemont 的 1.32 倍,而低钾胁迫下则为 3.34 倍。进一步分析发现,低钾胁迫下,化感水稻 PI312777 根系分泌的酚酸总量是正常营养条件下的 2.30 倍。而低钾胁迫下,非化感水稻 Lemont 根系分泌的酚酸总量相比与正常营养条件反而降低是其 0.91

表 3 不同钾素条件下化感与非化感水稻根系分泌物酚酸类物质相对含量比(峰面积比)

Fig. 3 The relative content ratio of phenolic compounds in the root exudation of allelopathic and non allelopathic rice accessions under different potassium supplies (the ratio of peak area)

编号 Code	PI312777	Lemont	PI312777; Lemont (面积 area)	
	K -:K + (面积 area)	K -:K + (面积 area)	K +	K -
A	1.01	1.00	1.29	1.31
B	1.04	0.96	1.47	1.59
C	1.87	0.88	0.97	2.05
D	1.99	0.90	1.50	3.34
E	2.48	0.93	1.16	3.08
F	3.15	0.87	1.05	3.80
G	ND	ND	ND	ND
H	1.99	0.91	2.05	4.49
I	1.83	0.94	2.15	4.17
J	1.70	0.93	1.13	2.07
Total 总计	2.30	0.91	1.32	3.34

ND 为未检测到 No detective

倍。可见低钾胁迫下,诱导化感水稻 PI312777 分泌出更多的酚酸类物质。

综合以上分析,低钾胁迫下化感水稻 PI312777 的化感抑草能力明显增强。低钾胁迫下,化感水稻 PI312777 的化感抑草能力增强与其酚类代谢途径关键酶的增强表达,进而导致其代谢途径更加旺盛,从而分泌出更多的酚类物质有关。

References:

- [1] Lin W X, He H B, Xiong J, *et al.* Advance in the investigation of rice allelopathy and its molecular ecology. *Acta Ecologica Sinica*, 2006, 26 (8): 2687—2694.
- [2] He H Q, Dong Z H, Liang Y Y, *et al.* New advance of research on allelopathy in rice (*Oryza sativa* L.). *Research of Agricultural Modernization*, 2002, 23 (2): 140—143.
- [3] Rice E L. *Allelopathy* (2nd ed). New York: Academic Press Inc, 1984. 1—50.
- [4] Olofsdotter M, Jensen L B, Courtois B. Improving crop competitive ability using allelopathy—an example from rice. *Plant Breeding*, 2002, 121: 1—9.
- [5] Wu H, Pratley J, Lemerle D, *et al.* Crop Cultivars with Allelopathy Capability. *Weed Research*, 1999, 39: 171—180.
- [6] Lin W X. *Allelopathy in rice*. Xiamen: Xiamen University Press, 2005.
- [7] Louise B J, Olofsdotter M. Genetic control of allelopathy in rice. *Research*. In: K. U. Kim ed. *Rice Allelopathy*. Taegu: Taegu Ililsa Press, 1998. 27—40.
- [8] Kong C H, Hu F, Lu S M. Allelopathy of *Ageratum conyzoides*. *Scientia Agricultura Sinica*, 1997, 30 (5): 95.
- [9] Bob B Buchanan, Wilhelm Gruissem, Russell L Jones. *Biochemistry & Molecular Biology of Plants*. American Society of Plant Physiologists, 2002, 988—1023.
- [10] Clark R B. Plant response to mineral element toxicity and deficiency. In: Christiansen M. N, Lewis John Wiley C. F, eds. *Breeding Plants for less Favorable Environments*. New York: John Wiley & Sons Inc., 1982. 137—141.
- [11] Jiang C C, Wang Y H, Lu J W, *et al.* Advances of study on the K-Efficiency in different plant Genotypes. *Journal of Huangzhong Agricultural University*, 2004, 23 (4): 483—487.
- [12] Gao X Z, Ma W Q, Cui Y, *et al.* Changes of soil nutrient contents and input on nutrition in arable of China. *Plant Nutrition and Fertilizer Science*, 2000, 6 (4): 363—369.
- [13] Mckey D, Waterman P G, Mbi C N, *et al.* Phenolic content of vegetation in two African rain forests: Ecological applications. *Science*, 1978, 202: 61—63.
- [14] Kim K U, Shin D H, eds. *Rice Allelopathy*. Taegu (Korea): Kyungpook National University Press, 2000. 109—124.
- [15] Dilday R H, Lin J, Yan M. Identification of allelopathy in the USDA-ARS rice germplasm collection. *Australian J of Experimental Agriculture*, 1994, 34: 907—910.
- [16] Wang D L. The review of rice allelopathy. *Acta Ecologica Sinica*, 1998, 18 (3): 326—334.
- [17] Zhang Z L, Qun W Q. *Plant Physiology Experimentation*. Beijing: Higher Education Press, 2003. 39—41.
- [18] Wang X K. *Principles and techniques of plant physiological Biochemical experiment*. Beijing: Higher Education Press, 2006. 165—174.
- [19] Wang H B, Xiong J, Fang C X, *et al.* FQ-PCR Analysis on the differential expression of the key enzyme genes involved in isoprenoid metabolic pathway in allelopathic and weak allelopathic rice accessions (*Oryza sativa* L.) under nitrogen stress condition. *Acta Agronomica Sinica*, 2007, 33 (8): 1316—1321.
- [20] Boeler W, Montagu V, Ince D. Superoxide dismutase and stress tolerance. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol Biol*, 1992, 43: 83—116.
- [21] Shen L H, Lin W X. Allelopathy properties in rice co-cultured with barnyardgrass exposed to different phosphorus supplies. *Allelopathy J*, 2007, 19 (2): 393—402.
- [22] Lin W X, He H Q, Guo Y C, *et al.* Rice allelopathy and its physiobiochemical characteristics. *Chin J Appl Ecol*, 2001, 9 (6): 871—875.
- [23] He H Q, Lin W X. Studies on allelopathic physiobiochemical characteristics of rice. *Chin J Eco Agric*, 2001, 9 (6): 56—57.
- [24] Koppe E D E, Southwick L M, Bittell J E. The relationship of tissue chlorogenic acid concentrations and leaching of phenolics from sunflowers grown under varying phosphates nutrient conditions. *Can J Bot*, 1976, 54: 593—599.
- [25] Xiong J, Wang H B, Fang C X, *et al.* The differential expression of the genes of the key enzymes involved in phenolic compound metabolism in rice (*Oryza sativa* L.) under different different nitrogen supply. *J Plant Physiology Molecular Biology*, 2007, 33 (5): 387—394.

参考文献:

- [1] 林文雄,何海斌,熊君,等.水稻化感作用及其分子生态学研究进展. *生态学报*, 2006, 26 (8): 2687—2694.

- [2] 何华勤,董章杭,梁义元,等. 水稻化感作用的研究新进展. 农业现代化研究, 2002,23(2):140~143.
- [6] 林文雄. 水稻化感作用. 厦门:厦门大学出版社, 2005.
- [8] 孔垂华,胡飞,骆世明. 胜红蓟对作物的化感作用. 中国农业科学, 1997,30(5):95.
- [11] 姜存仓,王运华,鲁剑巍,等. 植物钾效率基因型差异机理的研究进展. 华中农业大学学报, 2004, 23(4):483~487.
- [12] 高祥照,马文奇,崔勇,等. 我国耕地土壤养分变化与肥料投入状况. 植物营养与肥料学报, 2000,6(4):363~369.
- [16] 王大力. 水稻化感作用研究. 生态学报, 1998, 18(3):326~334.
- [17] 张志良,瞿伟箐. 植物生理学实验指导. 北京:高等教育出版社, 2003.39~41.
- [18] 王学奎. 植物生理生化实验原理和技术. 北京:高等教育出版社, 2006.165~174.
- [19] 王海斌,熊君,方长甸,等. 氮素胁迫下强、弱化感水稻萜类代谢途径中关键酶基因差异表达的 FQ-PCR 分析. 作物学报, 2007, 33(8):1316~1321.
- [22] 林文雄,何华勤,郭玉春,等. 水稻化感作用及其生理生化特性的研究. 应用生态学报, 2001,9(6):871~875.
- [23] 何华勤,林文雄. 水稻化感作用生理生化特性研究. 中国生态农业学报, 2001,9(6):56~57.
- [25] 熊君,王海斌,方长甸,等. 不同氮素供应下水稻酚类物质代谢关键酶基因差异表达. 植物生理与分子生物学报, 2007,33(5):387~394.