

抗旱性不同的苹果属植物水分胁迫下核酸代谢及自由基变化

曹 慧 韩振海* 许雪峰

(中国农业大学园艺植物研究所, 北京 100094)

摘 要: 水分胁迫引起苹果属植物中抗旱性较弱的平邑甜茶和抗旱性较强的新疆野苹果幼苗叶片相对含水量 (RWC)、DNA、RNA 含量下降, $O_2^{\cdot-}$ 、 H_2O_2 含量增高, DNase、RNase 活性上升; 其中 DNA 含量下降的幅度小于 RNA, DNase 活性上升的幅度小于 RNase。抗旱性较强的新疆野苹果在水分胁迫下幼苗叶片的 RWC、DNA、RNA 含量下降的幅度以及 $O_2^{\cdot-}$ 、 H_2O_2 含量增高、DNase、RNase 活性上升的幅度均小于抗旱性较弱的平邑甜茶。水分胁迫下平邑甜茶和新疆野苹果幼苗叶片的 DNA、RNA 含量与 RWC、 $O_2^{\cdot-}$ 、 H_2O_2 含量和 DNase、RNase 活性间均呈显著相关。

关键词: 苹果属; 水分胁迫; 核酸代谢; 自由基

中图分类号: S 661 文献标识码: A 文章编号: 0513-353X (2002) 06-0505-05

水分不足是许多地区农业发展的瓶颈^[1]。水分胁迫可破坏植物体内的水分代谢, 导致形态及生理生化代谢的变化。关于水分胁迫期间植物核酸代谢变化的报道多集中于小麦、玉米、高粱等大田作物^[2,3], 木本果树方面报道较少^[4]。水分胁迫可破坏植物体内的活性氧代谢^[5~7], 但水分胁迫下核酸代谢和自由基活性氧代谢间的关系尚未见报道。本试验选用抗旱性较强的新疆野苹果和抗旱性较弱的平邑甜茶营养液水培苗为试材, 研究了水分胁迫下核酸代谢及与自由基变化的关系, 以探讨水分胁迫下不同类型苹果属植物的抗旱生理机制, 为果树抗旱育种和高优栽培提供理论依据。

1 材料与方法

抗旱性较弱的平邑甜茶 (*Malus hupehensis* pamp Reld.) 与抗旱性较强的新疆野苹果 [*M. sieversii* (Ledeb) Roem.]^[8~10] 种子经 4 层积处理发芽后播入蛭石中, 温室内培养。待幼苗长到 4 片真叶移至 1/2 Hoagland 营养液培养 1 周, 然后以 Hoagland 营养液培养, 营养液初始 pH 用 KOH 调至 6.0。每周更换 1 次营养液, 每天定时通气, 日光灯恒定光源, 光照 14 h, 光照强度 $400 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, 温度为白天 22~28℃, 夜间 17~21℃。选取生长一致的 10 周龄幼苗移入含有 20% PEG 6 000 的营养液中进行水分胁迫处理, 对照为正常营养液水培, 重复 6 次。从胁迫处理第 1 天开始, 每 2 d 取样 1 次 (早晨 8 时取样), 叶片取自幼苗顶端第 3~5 片叶。

叶片相对含水量 RWC 测定按文献 [11] 的方法。 $O_2^{\cdot-}$ 含量的测定按王爱国等^[12]的方法: 称取 2 g 叶片, 加入 $65 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ PBS (pH 7.8), 冰浴研磨成匀浆, 4 层纱布过滤, $5000 \times g$ (4℃) 离心 10 min。取 1 mL 上清液加入 0.9 mL 上述缓冲液和 0.1 mL $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 盐酸羟胺, 25℃ 温育 20 min, 取 0.5 mL 温育液加入 0.5 mL $17 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 对氨基苯磺酸, 再加入 0.5 mL α -萘胺, 于 25℃ 下反应 20 min, 最后加入同体积乙醚充分摇动, $1500 \times g$ 离心 5 min, 取粉红色水相测 530 nm 的 OD 值。同时做 NO_2^- 标准曲线, 将 $[\text{NO}_2^-]$ 乘以 2 得 $[\text{O}_2^{\cdot-}]$, 结果以 $\text{O}_2^{\cdot-} \text{ nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1} \text{ protein}$ 表示。样品提取液的蛋白含量按 Bradford^[13] 的方法测定, 用牛血清蛋白 (BAS) 作标准曲线。 H_2O_2 含量的测定按林

收稿日期: 2002-04-09; 修回日期: 2002-06-19

基金项目: 北京市重点实验室“果树逆境生理与分子生物学实验室”资助项目; 教育部优秀教师教科奖励基金资助项目

* 通讯作者。

植芳等^[14]的方法:称 2 g 叶片加入预冷的丙酮研磨提取后,取 1 mL 提取液加入 0.1 mL 含 20 % TiCl_4 的浓盐酸溶液,再加入 0.2 mL 浓氨水,3 000 $\times g$ 离心 10 min,用丙酮洗过氧化物—Ti 复合物 5 次,以减少色素干扰。沉淀溶于 3 mL 1 mol L^{-1} 的 H_2SO_4 中,测定 410 nm 处的 OD 值。同时做 H_2O_2 标准曲线,结果以 H_2O_2 $\mu\text{mol g}^{-1}\text{DM}$ 表示。核酸水解酶活性的测定:称取 0.5 g 叶片在液氮中研磨成粉末,加入 0.1 mol L^{-1} 醋酸—醋酸钠缓冲液 (pH 5.5) 及少量 PVP 匀浆,27 000 $\times g$ 离心 (4 $^{\circ}\text{C}$) 20 min,取 100 μL 上清液加入 20 μL 酵母 RNA 溶液 (10 mg mL^{-1} ,用前透析除去小分子量核苷及寡核苷酸)用于 RNase 测定;或小牛胸腺 DNA 溶液 (1 mg mL^{-1} ,使用前 100 $^{\circ}\text{C}$ 加热 10 min 后迅速冷却至室温进行变性处理)做 DNase 测定。混匀后水浴 (37 $^{\circ}\text{C}$) 1 h,加入 95 % 乙醇 800 μL ,混匀后立即置于 -20 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱终止反应,12 h 后 20 000 $\times g$ (4 $^{\circ}\text{C}$) 离心,沉淀未酶解的 RNA 和 DNA。上清液稀释 20 倍分别在 260 nm 下比色。根据与对照样品间 OD_{260} 差值计算酶活力,以每毫克蛋白每小时变化 1.0 OD_{260} (37 $^{\circ}\text{C}$) 定义为 1 个酶活力单位。样品提取液的蛋白含量按 Bradford^[13]的方法测定。用紫外分光光度法 ($\lambda = 260$ nm) 测定核酸总量,作 DNA 标准曲线,对样品液再进行二苯胺反应,测定 595 nm 处的 OD 值,从标准曲线上查出相应的 DNA 浓度,计算 DNA 的含量^[15]。依据 $\text{RNA} = \text{核酸总量} - \text{DNA}$,计算 RNA 含量。

2 结果与分析

2.1 水分胁迫下平邑甜茶和新疆野苹果叶片 RWC 的变化

从图 1 可知,在正常营养液中,两个苹果属植物之间 RWC 的变化差异不显著;但随着胁迫时间的增加,RWC 均呈下降趋势,抗旱性较强的新疆野苹果 RWC 的下降幅度显著低于抗旱性较弱的平邑甜茶。胁迫第 5 天平邑甜茶比对照降低了 29.9 %,第 11 天比对照降低了 46.6 %;新疆野苹果胁迫第 5 天比对照降低了 22.4 %,胁迫第 11 天比对照降低了 33.4 %。

2.2 水分胁迫下平邑甜茶和新疆野苹果叶片 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 含量的变化

在正常营养液培养条件下,两个苹果属植物叶片之间 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 的含量差异不显著 (图 2)。水分胁迫下抗旱性较弱的平邑甜茶叶片内 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 含量随着胁迫时间的延长呈现上升趋势,胁迫第 5 天叶片 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 含量比对照提高 58.8 %,胁迫第 11 天比对照提高 160.3 %;抗旱性较强的新疆野苹果 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 含量的上升幅度较缓慢,胁迫后第 5 天叶片 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 含量才显著上升,比对照提高了 20.6 %,胁迫第 11 天比对照提高了 104.8 %。

2.3 水分胁迫下平邑甜茶和新疆野苹果叶片 H_2O_2 含量的变化

在正常营养液培养条件下,两种植物叶片之间 H_2O_2 的含量差异不显著 (图 3)。水分胁迫下抗旱性较弱的平邑甜茶叶片内 H_2O_2 含量在胁迫 3 d 后大幅度上升,胁迫第 5 天比对照提高了 48.3 %,胁迫第 11 天比对照提高了 128.7 %;抗旱性较强的新疆野苹果 H_2O_2 含量的上升幅度较缓慢,到胁迫第 5 天叶片 H_2O_2 含量才明显上升,比对照提高了 27.3 %,胁迫第 11 天比对照提高了 99.8 %。

2.4 水分胁迫下平邑甜茶和新疆野苹果叶片核酸酶活性的变化

水分胁迫下,两种植物叶片内的 DNase 和 RNase 活性均呈上升趋势 (图 4)。胁迫第 5 天平邑甜

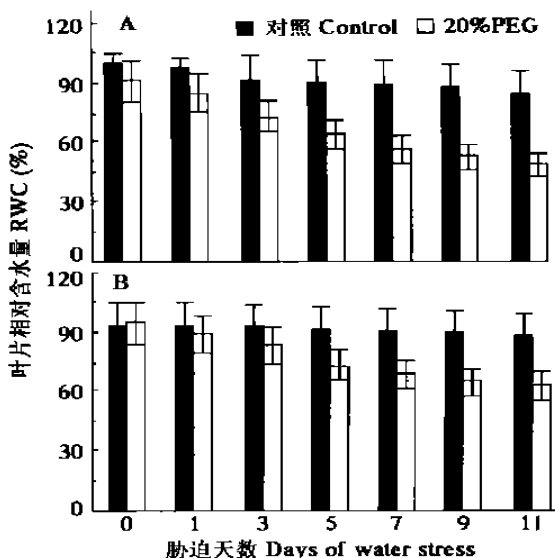


图 1 水分胁迫对平邑甜茶 (A) 和新疆野苹果 (B) 幼苗叶片 RWC 的影响

Fig. 1 Effects of water stress on leaf RWC in *M. hupehensis* (A) and *M. sieversii* (B) seedlings

茶、新疆野苹果叶片 DNase 活性分别为对照的 1.5 倍和 1.2 倍, RNase 活性分别为对照的 2.6 倍和 2.1 倍, 胁迫第 11 天 DNase 活性分别为对照的 2.2 倍和 1.7 倍; RNase 活性分别为对照的 4.3 倍和 3.3 倍。从图中还可以看出, 两种植物叶片内 DNase 和 RNase 活性变化差异明显, 抗旱性较强的新疆野苹果上升的幅度明显低于抗旱性较弱的平邑甜茶, 其中 RNase 活性上升的幅度显著高于 DNase 活性上升的幅度, 说明 RNase 比 DNase 更易受到水分胁迫的影响。

2.5 水分胁迫下平邑甜茶和新疆野苹果叶片核酸含量的变化

由图 5 可知, 水分胁迫下, 两种植物叶片内 DNA 和 RNA 含量均呈下降趋势, DNA 含量在整个水分胁迫期间的变化幅度比 RNA 含量的变化幅度小, 其中抗旱性较强的新疆野苹果 DNA、RNA 含量的下降幅度均低于抗旱性较弱的平邑甜茶。胁迫第 5 天平邑甜茶、新疆野苹果叶片 DNA 含量分别比对照降低了 14.2 % 和 10.5 %, RNA 含量分别比对照降低了 28.3 % 和 16.3 %, 胁迫第 11 天 DNA 分别比对照降低了 59.4 % 和 48.6 %; RNA 分别比对照降低了 81.3 % 和 58.2 %。

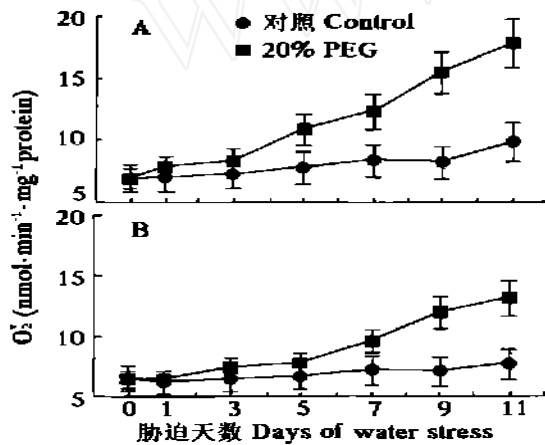


图 2 水分胁迫对平邑甜茶 (A) 和新疆野苹果 (B) 幼苗叶片 $O_2^{\cdot-}$ 含量的影响

Fig. 2 Effects of water stress on $O_2^{\cdot-}$ contents in leaves of *M. hupehensis* (A) and *M. sieversii* (B) seedlings

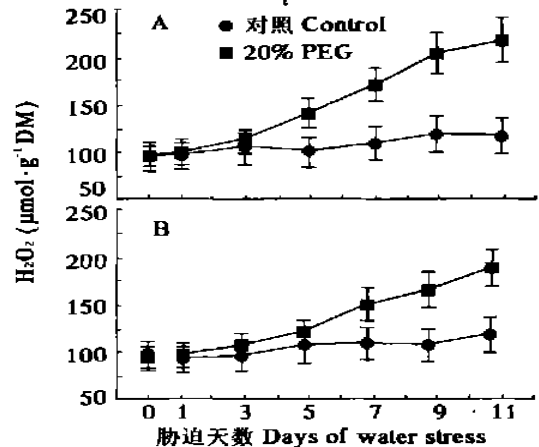


图 3 水分胁迫对平邑甜茶 (A) 和新疆野苹果 (B) 幼苗叶片 H_2O_2 含量的影响

Fig. 3 Effects of water stress on H_2O_2 contents in leaves of *M. hupehensis* (A) and *M. sieversii* (B) seedlings

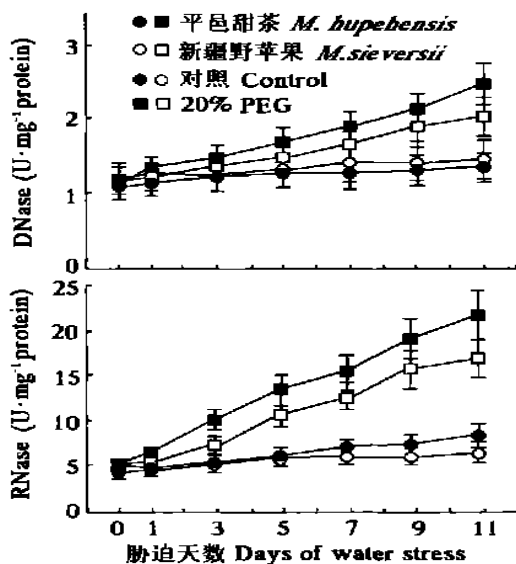


图 4 水分胁迫对平邑甜茶和新疆野苹果幼苗叶片 DNase 和 RNase 活性的影响

Fig. 4 Effects of water stress on DNase and RNase activities in leaves of *M. hupehensis* and *M. sieversii* seedlings

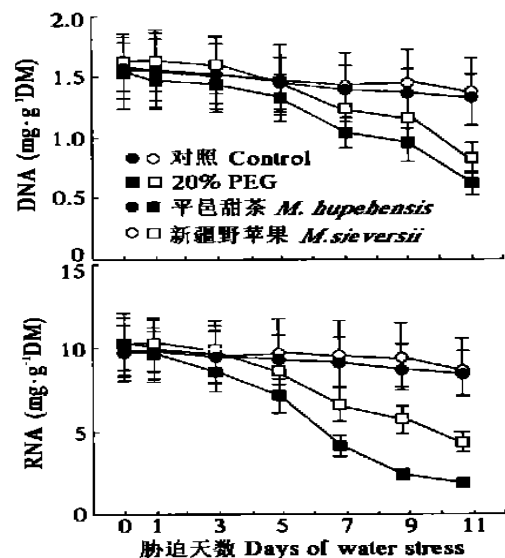


图 5 水分胁迫对平邑甜茶和新疆野苹果幼苗叶片核酸含量的影响

Fig. 5 Effects of water stress on nucleic acid content in leaves of *M. hupehensis* and *M. sieversii* seedlings

2.6 水分胁迫下平邑甜茶和新疆野苹果叶片核酸代谢的相关回归分析

通过分析水分胁迫下平邑甜茶和新疆野苹果叶片核酸代谢的相关性可以看出(表1),水分胁迫下DNA、RNA含量与叶片RWC、 $O_2^{\cdot-}$ 、 H_2O_2 及DNase、RNase间均呈显著相关。说明水分胁迫下苹果属植物叶片DNA、RNA含量的下降可能有以下3方面的原因:(1)DNase和RNase活性提高,DNA、RNA分解加剧;(2)活性氧增加,膜脂过氧化加剧,DNA、RNA合成受抑;(3)增加的活性氧可直接损伤核DNA,活性氧剪切破坏DNA双螺旋结构,导致DNA降解,活性氧对DNA还有降解和修饰作用。

表1 水分胁迫下平邑甜茶和新疆野苹果叶片核酸代谢的相关回归分析表

相关因素 Correlation factor	平邑甜茶 <i>M. hupehensis</i>		新疆野苹果 <i>M. sieversii</i>	
	回归方程 Linear regression	相关系数 Correlation coefficient	回归方程 Linear regression	相关系数 Correlation coefficient
RWC _{DNA}	$Y = 0.079 + 0.017X$	0.8024 *	$Y = -0.176 + 0.0203X$	0.8211 **
RWC _{RNA}	$Y = -6.725 + 0.192X$	0.8432 **	$Y = -6.465 + 0.1875X$	0.8341 **
$O_2^{\cdot-}$ _{DNA}	$Y = 2.027 - 0.072X$	-0.7817 *	$Y = 2.058 - 0.073X$	-0.7566 *
$O_2^{\cdot-}$ _{RNA}	$Y = 14.555 - 0.752X$	-0.8684 **	$Y = 14.082 - 0.6549X$	-0.8526 **
H_2O_2 _{DNA}	$Y = 2.098 - 0.039X$	-0.7652 *	$Y = 2.192 - 0.040X$	-0.7640 *
H_2O_2 _{RNA}	$Y = 15.491 - 0.421X$	-0.8634 **	$Y = 15.242 - 0.361X$	-0.8485 **
DNase _{DNA}	$Y = 2.315 - 0.636X$	-0.8413 **	$Y = 2.644 - 0.825X$	-0.8338 **
RNase _{RNA}	$Y = 13.147 - 0.564X$	-0.8231 **	$Y = 13.249 - 0.514X$	-0.8124 **

3 讨论

本试验结果表明,水分胁迫引起抗旱性不同的苹果属植物叶片内DNA含量、RNA含量下降,抗旱性较强的新疆野苹果下降的幅度低于抗旱性较弱的平邑甜茶。水分胁迫下平邑甜茶、新疆野苹果叶片中的RWC与DNA含量、RNA含量均呈显著正相关。

自然衰老和环境胁迫都可导致水解酶活性逐步升高。DNase、RNase分别是DNA、RNA代谢的关键酶^[16],水分胁迫促进了RNase的重新合成,胁迫引起膜结构破坏,促使RNase从细胞器的区隔中释出,增强了酶活力,而RNase活力的增加是植物组织趋向衰老的一个重要指标^[16]。本试验结果表明,无论是抗旱性较弱的平邑甜茶还是抗旱性较强的新疆野苹果,其地上部叶片的DNA、RNA含量均与DNase、RNase活性呈显著负相关。从而说明水分胁迫下DNA、RNA含量的下降与DNase、RNase活性提高有直接关系。

许多研究表明,干旱胁迫下植物细胞膜系统受到破坏而引起膜透性增加,愈是抗旱性弱的品种增加的幅度愈大,即膜系统受到的破坏愈大,膜系统的破坏引起某些物质从细胞区隔中释放出来,可能是激活DNase、RNase活性的直接或间接原因之一^[17]。水分胁迫下增加的活性氧导致膜脂过氧化,甚至直接损伤核DNA,剪切破坏DNA双螺旋结构,导致DNA的降解,对DNA分子发生剪切、降解和修饰,从而使DNA分子发生断裂、损伤和破坏^[18,19]。本试验结果表明,水分胁迫下抗旱性较弱的平邑甜茶及抗旱性较强的新疆野苹果叶片的 $O_2^{\cdot-}$ 和 H_2O_2 含量增加,其中平邑甜茶 $O_2^{\cdot-}$ 、 H_2O_2 含量的增加幅度明显高于新疆野苹果。且不论是抗旱性较弱的平邑甜茶还是抗旱性较强的新疆野苹果其叶片内的 $O_2^{\cdot-}$ 、 H_2O_2 含量与其叶片内的DNA、RNA含量间均呈高度负相关。由此看来,水分胁迫下活性氧自由基累积,使膜结构遭到破坏,引起植物组织衰老的启动。衰老启动后核酸水解酶活性迅速上升,DNA、RNA各组分有序降解,核酸含量下降。不同抗旱性的苹果属植物对水分胁迫敏感程度的不同,表现于其DNA、RNA含量的不同变化幅度和包括其他测定指标出现显著变化的胁迫时间的差别。抗旱性较强的新疆野苹果的RWC下降、DNase、RNase活性的增高均滞后于抗旱性较弱的平邑甜茶。因此,水分胁迫下DNase、RNase活性的变化与DNA、RNA含量的变化可作为衡量苹果属植物对水分胁迫敏感程度强弱的生理生化指标,也可作为反映苹果属植物抗旱性的参考指标。

参考文献：

- 1 McKersie B D, Leshem Y Y. Stress and stress coping in cultivated plants. Dordrecht : Kluwer Academic Publishers , 1994. 148 ~ 180
- 2 冯彩平, 薛 崧, 张殿忠. 水分胁迫与植物氮代谢的关系. 干旱地区农业研究, 1995, 13 (2) : 88 ~ 92
- 3 王万里, 章秀英, 林芝萍. 水分胁迫对高粱等作物叶片中核糖核酸酶活力的影响. 植物生理学报, 1986, 12 (1) : 16 ~ 25
- 4 陈立松, 刘星辉. 水分胁迫对荔枝叶片氮和核酸代谢的影响及其与抗旱性的关系. 植物生理学报, 1999, 25 (1) : 49 ~ 56
- 5 陈立松, 刘星辉. 水分胁迫对荔枝叶片活性氧代谢的影响. 园艺学报, 1998, 25 (3) : 241 ~ 246
- 6 曹 慧, 兰彦平, 王孝威, 等. 水分胁迫下新红星苹果超氧化物自由基累积和膜脂过氧化作用. 果树学报, 2001, 18 (2) : 196 ~ 199
- 7 曹 慧, 王孝威, 曹 琴, 等. 果树水分胁迫研究进展. 果树学报, 2001, 18 (2) : 110 ~ 114
- 8 龙兴桂. 现代中国果树栽培. 北京: 中国林业出版社, 2002. 183
- 9 韩振海. 落叶果树种质资源学. 北京: 中国农业大学出版社, 1994, 232 ~ 233
- 10 郝荣庭, 韩其谦. 主要果树砧木. 北京: 中国林业出版社, 1996. 76
- 11 华东师范大学植物生理教研组主编. 植物生理学实验指导. 北京: 人民教育出版社, 1980. 2 ~ 3
- 12 王爱国, 罗广华. 植物的超氧自由基与羟胺反应的定量关系. 植物生理学通讯, 1990, (6) : 55 ~ 57
- 13 Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. , 1976, 72 : 248 ~ 254
- 14 林植芳, 李双顺, 林桂珠, 等. 衰老叶片和叶绿体中 H_2O_2 累积与膜脂过氧化的关系. 植物生理学报, 1988, 14 : 16 ~ 22
- 15 朱广廉, 钟海文, 张爱琴. 植物生理学实验. 北京: 北京大学出版社, 1990. 134 ~ 138
- 16 Thomas H, Stoddart J L. Leaf senescence. Ann. Rev. Plant Physiol. , 1980, 31 : 83 ~ 111
- 17 郭蔼光, 张 慧, 王保莉, 等. 干旱胁迫对小麦叶片核糖核酸酶活力及合成的影响. 核农学报, 1994, 8 (2) : 75 ~ 79
- 18 Adam A L, Bestwick C S, Barna B, et al. Enzymes regulating the accumulation of active oxygen species duration the hypersensitive reaction of bean to *Pseudomonas syrianea* pv. *Phaseolicola*. Planta, 1995, 197 : 240 ~ 249
- 19 余叔文, 汤章城. 植物生理与分子生物学. 第 2 版. 北京: 科学出版社, 1998. 379

Effects of Water Stress on Nucleic Acid Metabolisms and Changes of Free Radicals in *Malus*

Cao Hui, Han Zhenhai, and Xu Xuefeng

(Institute for Horticultural Plants, China Agricultural University, Beijing 100094, China)

Abstract : Effects of water stress on nucleic acid metabolisms and changes of free radicals in *Malus hupehensis* pamp Reld. and *Malus sieversii* (Ledeb) Roem. seedlings were studied with polyethylene glycol (PEG 6000) treatment. Under water stress, the contents of RWC, DNA and RNA in leaves decreased, while the content of $O_2^{\cdot-}$ and H_2O_2 , the activities of DNase and RNase increased. Compared with RNA, the less decrement of DNA content was accompanied with higher activity of DNase. The changing extents in RWC, active oxygen, DNA, RNA, DNase and RNase in the drought tolerant variety *M. sieversii* were lower than the drought resistant variety *M. hupehensis*. Under water stress, there are high significant correlation between DNA, RNA content and DNase, RNase, RWC, $O_2^{\cdot-}$, H_2O_2 in *M. hupehensis* pamp Reld. and *M. sieversii* (Ledeb) Roem. seedlings.

Key words : *Malus*; Water stress; Nucleic acid metabolism; Free radicals

新书推荐

《汉英生物学词汇》

本书是一部汉英对照的中型工具书。收有动物学、植物学、人体解剖学、组织胚胎学、微生物学、遗传学、细胞学、生物化学、生物物理学、时间生物学、生物工程、分子生物学、生态学等学科以及医学、农学的名词, 共约 14 万条。定价: 106 元 (含邮费)

购书者请汇款至北京中关村南大街 12 号中国农科院蔬菜花卉所《园艺学报》编辑部, 邮编 100081。