广西植物 Guihaia Jun. 2017, 37(6):734-741
http://journal.gxzw.gxib.cn
http://www.guihaia-journal.com

DOI: 10.11931/guihaia.gxzw201607036
引文格式: 江晓洁, 李芳, 王闻闻, 等. 外源绿原酸缓解黑大豆 SB 铝毒害的机理研究 [J]. 广西植物, 2017, 37(6):734-741
JIANG XJ, LI F, WANG WW, et al. Alleviation of Al toxicity by exogenous chlorogenic acid in black soybean [J]. Guihaia, 2017, 37(6):734-741

外源绿原酸缓解黑大豆 SB 铝毒害的机理研究

江晓洁, 李　芳, 王闻闻, 陈宣钦*
(昆明理工大学 生物工程技术研究中心, 昆明 650500)

摘　要: 该文研究了外源绿原酸(CGA)对 Al 胁迫下铝敏感型黑大豆 SB 根生理生化指标以及根中胁迫相关基因表达的变化,探讨外源 CGA 缓解 SB 根铝毒害的效果及分子机理。以不同浓度 Al 和 CGA 处理 SB,筛选出 CGA 缓解 Al 毒害的最佳浓度,测定 Al 含量、抗氧化系统酶活性、14-3-3 蛋白与 H^+-ATP 酶的表达、H^+泵活性。结果表明:低浓度 CGA 能缓解 Al 胁迫下黑大豆 SB 根伸长抑制,并促进侧根数目增加,而高浓度 CGA 的缓解效果下降;0.01 g·L^{-1} CGA 使 Al 胁迫下 SB 根尖 Al 含量与 MDA 含量下降,促进根系柠檬酸的分泌。RT-PCR 和 Western Bloting 分析表明 0.01 g·L^{-1} CGA 促进 Al 胁迫下 SB 根中 14-3-3*b*、14-3-3*m*、14-3-3*k* 和 *GHA*2 基因(质膜 H^+-ATP 酶)的表达,抑制 *MATE* 基因的表达。同时,0.01 g·L^{-1} CGA 能促进 Al 胁迫下质膜 H^+-ATP 酶蛋白磷酸化水平以及其与 14-3-3 蛋白结合,且能提高质膜 H^+-ATP 酶和 H^+泵活性。因此推测外源 CGA 可能通过增加侧根数,增强 14-3-3 蛋白和质膜 H^+-ATP 酶基因蛋白表达水平和互作,弥补 Al 胁迫下 *MATE* 表达的抑制,增加柠檬酸的分泌,增强 SB 对铝毒害的耐受性。

关键词: 黑大豆 SB, 绿原酸, 柠檬酸, 14-3-3 蛋白, H^+-ATPase, Al 胁迫
中图分类号: Q945.78　　**文献标识码:** A　　**文章编号:** 1000-3142(2017)06-0734-09

Alleviation of Al toxicity by exogenous chlorogenic acid in black soybean

JIANG Xiao-Jie, LI Fang, WANG Wen-Wen, CHEN Xuan-Qin*
(*Biotechnology Research Center*, *Kunming University of Science and Technology*, Kunming 650500, China)

Abstract: We investigated the influences of exogenous chlorogenic acid (CGA) on the physiological parameters and Al stress-related gene expression of SB (Al-sensitive black soybean) root under Al stress. A major goal of this report was to explore the alleviating molecular mechanism of exogenous CGA on Al toxicity in SB. SB seedings were cultured in water solution and treated with 50 μmol·L^{-1} Al or CGA plus 50 μmol·L^{-1} Al. The optimal concentration of CGA alleviating Al toxicity was screened. And we study the effects of optimal exogenous CGA on root tip Al content, the activities of antioxidant enzyme, the expressions of 14-3-3 protein and H^+-ATPase, and the activity of H^+ pump under 50 μmol·L^{-1} Al stress. Low concentrations of CGA alleviated inhibition of root elongation caused by Al toxicity and promoted the increase of lateral root numbers under Al stress. However, the CGA-alleviated effect was weaken with high concentration of CGA treatment. It was founded that the alleviation effect of 0.01 g·L^{-1} CGA was the most significant. Exogenous 0.01 g·L^{-1} CGA decreased the Al in root tips and MDA contents. And the citric acid content in root exudates of SB under Al stress was significantly increased due to the addition of exogenous 0.01 g·L^{-1} CGA. Expression analysis showed that exogenous

收稿日期: 2016-09-06　　**修回日期:** 2016-10-21
基金项目: 国家自然科学基金(31460058) [Supported by the National Natural Science Foundation of China(31460058)]。
作者简介: 江晓洁(1991-),女,福建福州人,硕士研究生,主要研究方向为植物营养基因工程,(E-mail)465295727@qq.com。
*通信作者: 陈宣钦,博士,副教授,从事植物生理学方面的研究,(E-mail)569256786@qq.com。

0.01 g · L^{-1} CGA enhanced the expression of three 14-3-3 isoforms (14-3-3*b*, 14-3-3*m*, and 14-3-3*k*) and increased the expression of *GHA*2 (plasma membrane H^+-ATPase) gene, but inhibited the gene expression of *MATE* in SB under Al stress. The results of immunoprecipitation(IP) showed that the phosphorylation of the PM H^+-ATPase was up regulated by the exogenous 0.01 g · L^{-1} CGA, which could bind with 14-3-3 protein under Al stress. Meanwhile, plasma membrane H^+-ATPase and H^+ pump activities were both enhanced by exogenous 0.01 g · L^{-1} CGA under Al stress. It was suggested that exogenous CGA may enhance the SB tolerance to Al stress by increasing the lateral roots number, compensating inhibition of MATE expression and interaction between them to increase citric acid exudation.

Key words: black soybean, chlorogenic acid, citric acid; 14-3-3, H^+-ATPase; Al stress

酸性土壤主要分布在热带、亚热带地区和对食物要求量大的发展中国家,约占世界可耕种土壤的30%(Sasaki et al,2004)。酸性土壤中的铝毒害严重抑制农作物生长与产量。铝在土壤 pH>7 时基本以沉淀形式存在(硅酸盐或氧化物),对植物无毒。当土壤 pH<5 时,铝则会由沉淀形式转化成为可溶的离子状态,被植物吸收,造成伤害(Delhaize & Ryanp,1995)。氧自由基引起的膜脂氧化损伤几乎是各种逆境胁迫对植物损伤的共同途径和特征。植物体内存在清除氧自由基的酶和非酶抗氧化系统。低浓度 Al 胁迫下,小麦(孔繁翔和桑伟莲,2004)、水稻(马宝慧,2007)、八仙花(彭尽晖等,2013)、栝楼(周媛,2012)等植物中抗氧化酶活性随着 Al^{3+} 浓度的增加而升高。耐铝豇豆品种 T6 SOD, POD 和 CAT 活性显著高于铝敏感豇豆品种 S3(于力等,2012)。在1 000 mg · L^{-1}的高铝毒环境下,抗氧化酶会受到不同程度的抑制,抑制作用与植物种类有关。大豆根系中 SOD 与 CAT 活性在高浓度 Al 胁迫下显著下降(刘鹏等,2004);而同样在1 000 mg · L^{-1} Al 胁迫下,荞麦根系中 SOD 活性显著降低,CAT 活性有所升高(王保义等,2006)。植物体内存在非酶类抗氧化系统,主要包括各种还原性物质,如还原型谷胱甘肽(GSH)、a-生育酚(a-TOC)、抗坏血酸(AsA)与类胡萝卜素(CAR)等 (马宝慧,2007)。

铝诱导的有机酸分泌是植物缓解 Al 毒的最重要途径。在铝毒胁迫下,植物根系有机酸的分泌受 H^+-ATPase、多药耐药毒性物外排转运蛋白(MATE)和 14-3-3 蛋白等的调控。MATE 转运蛋白广泛存在于植物中(梁锋等,2011)。Al 胁迫下,高粱与拟南芥根表皮 *MATE* 高表达(Chen et al,2012;Liu et al,2009),促进柠檬酸的外转运,缓解 Al 毒害。质膜 H^+-ATPase 与柠檬酸的分泌量也有关。Al 胁迫下大豆质膜 H^+-ATPase 基因表达上调,根尖柠檬酸的分泌增加,加入钒酸盐(VA, H^+-ATPase 抑制剂)后,H^+-ATPase 活性与柠檬酸分泌量显著下降(Shen et al,2005)。14-3-3 蛋白普遍存在于植物中,能与 H^+-ATPase 特异结合,促进 H^+-ATPase 磷酸化。Al 胁迫下,蚕豆根系质膜 H^+-ATPase 与 14-3-3 蛋白的表达上调,H^+-ATPase 磷酸化水平增加,质膜 H^+-ATPase 与 H^+泵活性显著增强,柠檬酸分泌量增加(郭传龙等,2015;Chung et al,1999)。

绿原酸(CGA),又名 3-*O*-咖啡酰奎尼酸,是一种广泛存在于植物体内酚性成分,是植物有氧呼吸过程产生的一种苯丙氨酸代谢物(林学政等,2005;陈绍华等,2009)。当植物受到生物胁迫时,一方面 CGA 作为植保素,破坏病原菌细胞壁,直接制剂抑制病原菌的生长(周志娥等,2014);另一方面,CGA 也可转变成为木质素与软木脂,使被入侵的伤口迅速木质化,防止病菌进一步入侵。当植物受到非生物胁迫时,植物体内的 CGA 含量急剧增加,参与胁迫响应(林学政等,2005)。此外,绿原酸本身作为一种还原剂,对羟基自由基具有清除作用,对植物组织的氧化损伤具有缓解作用(陈绍华等,2008)。目前未见有关绿原酸对 Al 胁迫下的植物生理生化,生长发育和逆境相关基因表达的影响。

本研究使用水培法,以黑大豆 SB(Al 敏感型)为材料,研究外源绿原酸对 Al 胁迫下 SB 根系相关生理生化指标的影响,探讨 SB 根中胁迫相关基因表达的变化,揭示外源 CGA 缓解 SB 根系铝毒害的生理及其分子机理。

1　材料与方法

1.1 材料培养与处理

参照王闻闻等(2014)的方法培养黑大豆 SB,3 d 后,用含有 $AlCl_3$ 和 CGA + $AlCl_3$ 的营养液(0.5 mmol.L^{-1} $CaCl_2$, pH 4.5)处理幼苗,$AlCl_3$ 浓度为 50 μmol · L^{-1},CGA 浓度为 0.004 g · L^{-1}, 0.01 g · L^{-1},

0.02 g·L^{-1},0.04 g·L^{-1},并以营养液处理的幼苗为对照,处理 24 h、3 d、7 d 后,测量根伸长以及侧根数目测定。

将培养的 SB 幼苗置于处理液(分别含有 50 μmol·L^{-1} $AlCl_3$和 0.01 g·L^{-1} CGA+50 μmol·L^{-1} $AlCl_3$的营养液)中,以营养液处理为对照。分别处理 0、2、4、6、8、12、18、24 h 后,取植物的根称重后用于根尖 Al 含量测定;用液氮处理剩余的植物根后放置超低温冰箱(-80 ℃)保存,用于其它检测分析。

1.2 测定指标与方法

1.2.1 相对根伸长率及侧根数目的测定 处理植物前,对根基部进行标记,并测量比较处理前后从根尖顶端到标记点距离的差异,处理前后测量值之差为根伸长量(周志娥等,2014)。侧根数目的测定:分别计数不同处理前后长度大于 1 mm 的侧根数目,求其平均值 (王闻闻等,2014)。

1.2.2 根系分泌物柠檬酸收集及含量测定 取 6 只 50 mL 的开口试管,分别加入 10 株长势一致的 SB 幼苗及 $AlCl_3$ 50 μmol·L^{-1}和 CGA(0.004,0.01,0.02,0.04 g·L^{-1})的营养液(0.5 mmol·L^{-1} $CaCl_2$,pH 4.5)中,以营养液(0.5 mmol·L^{-1} $CaCl_2$,pH 4.5)处理为对照。处理 24 h 后,将样品用真空干燥仪常温下干燥后加入 4 mL 蒸馏水溶解样品。溶解的样品过阳离子交换树脂提纯,用梯度的硫酸铵洗脱。将洗脱液浓缩回收后 1 mL 50%的甲醇溶解过滤,再用 HPLC 法进行样品柠檬酸含量分析。检测器波长为 210 nm,流速 0.8 mL·min^{-1},柱温 30 ℃,根据峰面积确定样品中的柠檬酸含量 (王闻闻等,2014)。

1.2.3 根尖 Al 含量的测定 将处理过的根用蒸馏水清洗 3 次,洗净根表面附着的 Al,将根表面的水分吸干,装入信封中,再放入 70 ℃的烘箱 2~3 d 后烘干直至恒重。烘干的样品经 500 ℃ 高温灰化后,加入 1 mL 优级纯硝酸浸提过夜得到提取液,提取液用蒸馏水定容至 50 mL。用 ICP-AES 测定根中金属 Al 含量(Lan et al,2016)。

1.2.4 MDA 和 H_2O_2含量的测定 使用硫代巴比妥法(TBA 法)(张志良和瞿伟菁,2003)测定 MDA 含量。H_2O_2含量测定使用二甲基酚橙法(李忠光等,2007)。

1.2.5 根尖抗氧化系统酶活性的测定 取冷冻保存的样品参照 Chen et al(2012)的方法测量根尖抗氧化系统酶(SOD、POD 与 CAT)活性。

1.2.6 基因表达分析 取置于-80 ℃冰箱冻存的 SB 根尖,于液氮中研磨呈粉末后,加入适量 Trizol 试剂(Invitrogen)提取 RNA,使用 M-MuLV 反转录试剂盒合成第一链 cDNA。根据质膜中 H^+-ATPase 的编码基因 *vha*2 和 *sb*14-3-3 保守区的 cDNA 序列,设计合适的引物,以 28sRNA 为内参(王杰等,2015),参考王闻闻等(2014)所用的引物序列进行 RT-PCR 分析。

1.2.7 免疫共沉淀分析 按照 Yan et al(2002)的方法提取质膜蛋白,参照 Jahn et al(1997)的方法检测 SB 根系中质膜 14-3-3 蛋白与 H^+-ATPase 的相互作用。20 μg 的膜蛋白在 10%PAGE 上分离后,用半干转膜法将分离的膜蛋白转至 PVDF 膜上。电转完毕后,使用质膜 H^+-ATPase 和 14-3-3 蛋白抗体做一抗进行 Western 分析,加入二抗观察结果。

1.2.8 质膜 H^+-ATPase 活性和 H^+泵活性的测定 参照 Yan et al(2002)的方法提取质膜蛋白,紫外分光光度计法测定 H^+泵的活性。

1.3 数据统计分析

使用 Prism-5 和 DPS 7.05 对数据进行统计分析,并比较显著性差异。

2 结果与分析

2.1 外源 CGA 对 Al 胁迫下 SB 根伸长和侧根数的影响

根伸长抑制是 Al 毒对植物根伤害的最直接表现。根伸长抑制通常通过根相对伸长率(RRG)这一指标反应。本研究在 50 μmol·L^{-1} Al 溶液中分别加入添加 0.004、0.01、0.02、0.04 g·L^{-1}的 CGA 处理 SB 幼苗 24 h 后,测定根长,并与正常的营养液和单独 Al 处理作为对照,计算根的相对伸长率。图 1 结果显示,50 μmol·L^{-1} Al 处理后,会一定程度抑制了 SB 根伸长,与正常营养液处理相比,Al 处理下 SB 根相对伸长率(RRG)有所降低。0.01 g·L^{-1} CGA 处理下 SB 的 RRG 显著高于单独 Al 处理,甚至高于正常营养液处理,提示 0.01 g·L^{-1} CGA 处理能缓解 Al 胁迫诱导的根伸长抑制。其它浓度的 CGA 处理下根相对伸长率虽然高于单独 Al 处理,但二者之间并无显著差异。侧根数统计结果表明,处理 3 d 后,Al 胁迫下侧根数显著低于正常对照,Al 胁迫除抑制根伸长,还可抑制侧根生长发育。而外源添加0.004、0.01、0.02、0.04 g·L^{-1} CGA 处理的 SB 侧根数目显著高于单独 Al 处理。除 0.04 g·L^{-1} CGA 处理外,50 μmol·L^{-1}Al 溶液中分别添加 0.004、

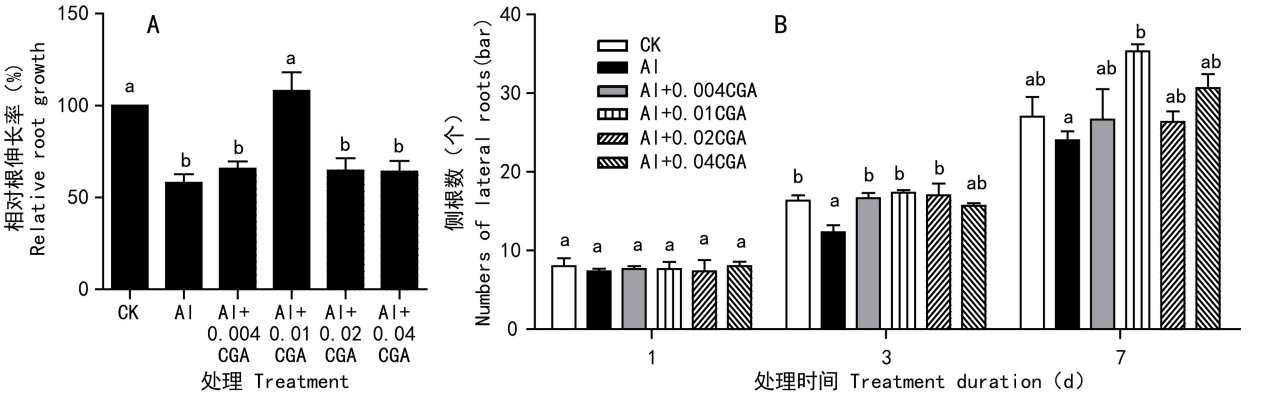

图 1　不同浓度 CGA 对 Al 胁迫 SB 的相对根伸长率(RRG)(**A**)和侧根数目(**B**)的影响

文中所有图横坐标的数字均表示浓度,Al 和 CGA 的单位分别是 μmol · L^{-1} 与 g · L^{-1},$^{a}P<0.05$,$^{b}P<0.01$。下同。

Fig. 1　Effects of different concentration of CGA on relative root growth(**A**) and lateral root number(**B**) in SB under Al stress

The numbers of the horizontal axis in the figures were defined as the concentration of agents unless specified. the units of Al and CGA were μmol · L^{-1} and g · L^{-1}, respectively. $^{a}P<0.05$, $^{b}P<0.01$. The same below.

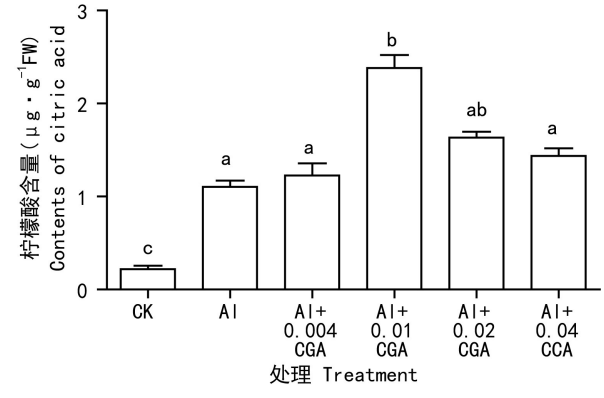

图 2　不同浓度 CGA 对 Al 胁迫 SB 根系分泌物柠檬酸含量的影响

Fig. 2　Effects of different concentrations of CGA on citric acid content in SB root exudates under Al stress

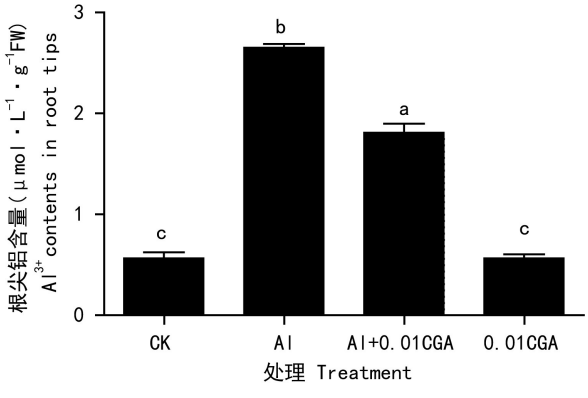

图 3　外源 CGA 对 Al 胁迫 SB 根尖 Al 含量的影响

Fig. 3　Effects of exogenous CGA on Al content in SB root apices under Al stress

0.01、0.02 g · L^{-1} CGA 处理下侧根数与正常对照水平相当。处理 7 d 后,外源添加 0.004、0.01、0.02、0.04 g · L^{-1} CGA 处理下的侧根数目仍高于单独 Al 处理,且 0.01 g · L^{-1} CGA 处理侧根数目高于其它浓度 CGA 处理。

2.2 外源 CGA 对 Al 胁迫 SB 根尖柠檬酸分泌量的影响

植物根系有机酸分泌外排是植物抗铝毒害的最重要机理。Al 处理与对照相比 SB 根系分泌物中柠檬酸含量显著增加。Al 处理下外源添加 CGA 不同程度增加了 Al 胁迫下 SB 根系柠檬酸分泌量。SB 根系柠檬酸分泌随着 CGA 浓度的增加首先呈现先升高的趋势,达到最适的浓度后,就呈现下降的趋势,根据 CGA 对 SB 根分泌柠檬酸影响的变化特点,外源 0.01 g · L^{-1} CGA 处理下柠檬酸分泌量最高,证实该浓度对缓解 Al 胁迫的效果可能优于其它浓度(图 2)。同时,在外源 0.01g · L^{-1}CGA 处理 Al 胁迫下的大豆根的不管是根伸长长度还是侧根数目均显著高于其他浓度,说明在外源 0.01 g · L^{-1} CGA 浓度缓解 Al 对 SB 胁迫的效果最明显。因此,选择 0.01 g · L^{-1} CGA 作为其它实验的处理浓度。

2.3 外源 CGA 对 Al 胁迫下 SB 根尖 Al 含量的影响

0.01 g · L^{-1} CGA 单独处理与对照相比,SB 根尖

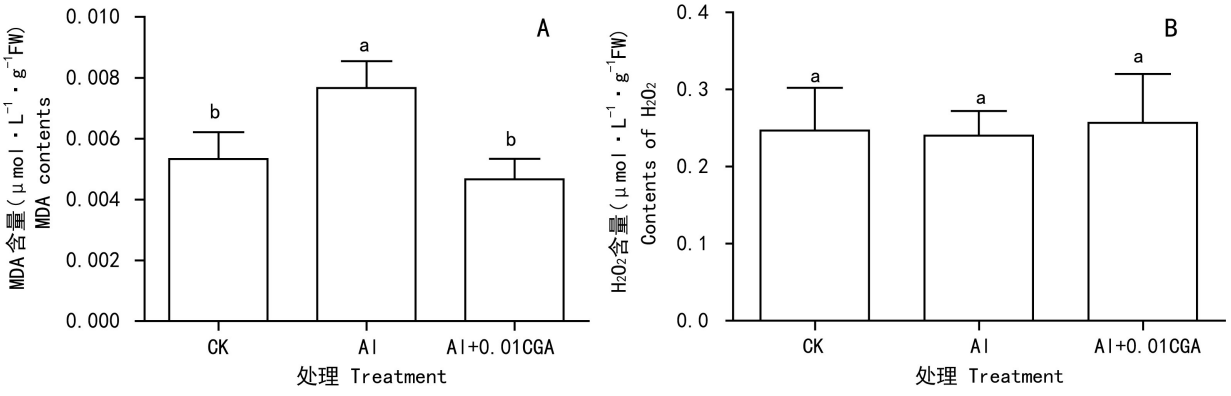

图 4 外源 CGA 对 Al 胁迫 SB 根中 MDA (A)和 H_2O_2(B)含量的影响

Fig. 4 Effects of exogenous CGA on MDA(A) and H_2O_2(B) content in SB root under Al stress

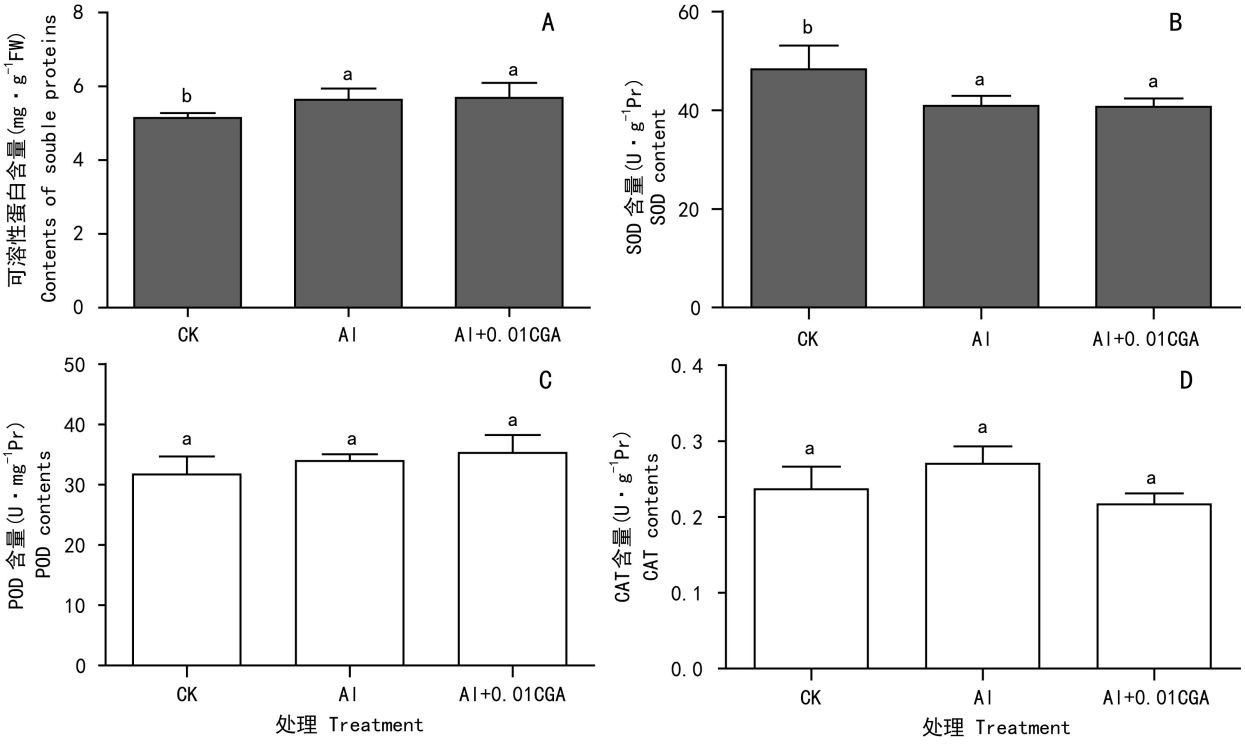

图 5 外源 CGA 对 Al 胁迫 SB 根中可溶性蛋白含量(A)和抗氧化酶 SOD(B)、POD(C)、CAT(D)活性的影响

Fig. 5 Effects of exogenous CGA on soluble protein content(A) and antioxidant enzyme [SOD (B), POD (C), CAT (D)] activities in SB root under Al stress

Al 含量无显著差异。由此可见,CGA 本身对根尖 Al 含量并无显著的影响。50 μmol · L^{-1} Al 胁迫下 SB 根尖铝含量显著高于 CGA 单独处理和对照。50 μmol · L^{-1} Al 胁迫下添加 0.01 g · L^{-1} CGA 后,根尖铝含量显著低于单独 Al 处理,说明 CGA 能显著减少 Al 胁迫下 SB 根尖铝的积累(图 3)。

2.4 外源 CGA 对 Al 胁迫下 SB 根尖 MDA 和 H_2O_2 含量的影响

Al 单独处理使 SB 根中 MDA 含量明显提高。外源添加 CGA 后,Al 诱导的 MDA 含量的升高显著降低,恢复到对照水平,提示 CGA 对 Al 胁迫诱导的膜脂过氧化损伤具有缓解作用(图 4:A)。Al 胁迫

和 CGA 处理，H_2O_2 含量与对照无显著差异，Al 胁迫引起的膜脂过氧化，MDA 含量增加，并不通过 H_2O_2 积累（图 4：B）。

2.5 外源 CGA 对 Al 胁迫下 SB 根尖抗氧化酶活性的影响

Al 处理后，SB 根系可溶性蛋白含量要显著高于对照，推测 Al 胁迫会促使一些基因过表达；然而在 Al 胁迫下外源施加 CGA 后，可溶性蛋白含量虽略高于 Al 单独处理，但二者之间并无显著差异，CGA 并不增加 Al 胁迫下可溶性蛋白含量（图 5：A）。与对照相比，Al 处理下 SB 根中 SOD 活性显著降低，CAT 和 POD 活性无显著差异；外源 CGA 对 Al 胁迫下 SOD、POD、CAT 活性没有显著影响（图 5）。

2.6 外源 CGA 对 Al 胁迫下 SB 根中 14-3-3 蛋白、质膜 H^+-ATPase 和 MATE 基因表达的影响

由图 6 可知，与对照相比，Al 胁迫下 SB 根 14-3-3 基因表达水平不同程度增强。外源添加 CGA 后，14-3-3*b*、14-3-3*m* 和 14-3-3*k* 表达水平略高于 Al 单独处理的植株；而 14-3-3*c*、14-3-3*e*、14-3-3*f*、14-3-3*g*、14-3-3*i*、14-3-3*j* 和 14-3-3*n* 表达水平低于 Al 单独处理。Al 处理下，*GHA2mRNA* 表达水平高于对照，外源添加 CGA 后，*GHA2mRNA* 表达水平进一步增加，Al 胁迫下，*MATE* 基因 *mRNA* 水平显著高于对照，与单独 Al 处理相比，外源添加 CGA 后 *MATE* 基因的表达水平略有下降，但仍高于对照（图 6）。

2.7 外源 CGA 对 Al 胁迫下 SB 根中质膜 H^+-ATPase蛋白磷酸化水平及其与 14-3-3 蛋白互作、H^+-ATPase 活性及 H^+泵活性的影响

Al 处理下，SB 根中质膜 H^+-ATPase 的磷酸化水平高于对照，外源添加 CGA 后，SB 根中质膜 H^+-ATPase 的磷酸化水平进一步增加（图 7）。与质膜 H^+-ATPase 的磷酸化水平结果相似，Al 处理下 14-3-3 蛋白与磷酸化质膜 H^+-ATPase 的结合能力高于对照，添加外源 0.01 g · L^{-1} CGA 后 14-3-3 蛋白与磷酸化质膜 H^+-ATPase 的结合水平增加，高于单独 Al 处理和对照。CGA 促进了 Al 胁迫下 14-3-3 蛋白与磷酸化质膜 H^+-ATPase 的结合。

添加外源 CGA 后，Al 处理下 SB 根中质膜 H^+-ATPase 的活性高低依次为 Al+0.01 CGA>Al>CK。H^+泵活性的结果与质膜 H^+-ATPase 活性的结果基本一致，50 μmol · L^{-1} Al 溶液添加 0.01 g · L^{-1}CGA 处理能增强 H^+泵的活性，单独 Al 处理下的 H^+泵活性位于对照组与 CGA 处理二者之间（图 8）。

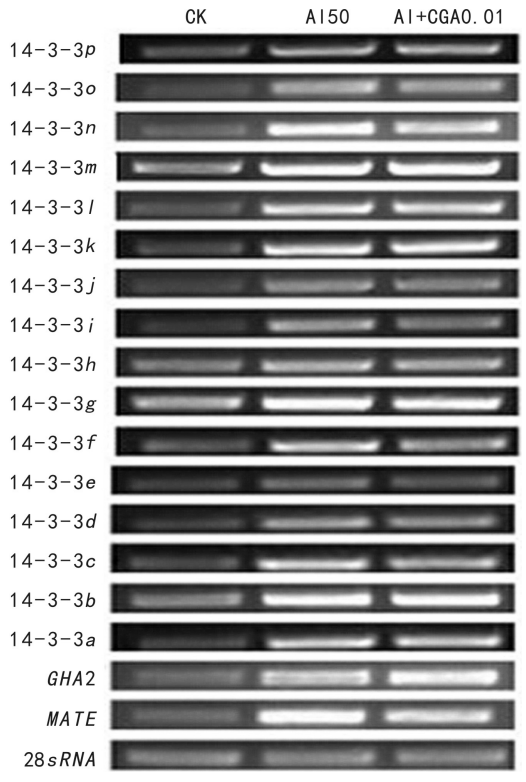

图 6　外源 CGA 对 Al 胁迫 SB 根中 MATE 蛋白、14-3-3 蛋白和质膜 H^+-ATPase 基因表达的影响

Fig. 6　Effects of exogenous CGA on the gene expression of MATE protein, 14-3-3 protein and plasma membrane H^+-ATPase in SB root under Al stress

3　讨论

激素在植物应答缓解环境胁迫中起着重要的调节作用，如水杨酸、脱落酸、茉莉酸、乙烯、多肽激素等（徐伟和严善春，2005）。Al 胁迫下紫花苜蓿 IAA 含量显著下降（任晓燕，2013）。CGA 是 IAA 的保护剂，抑制 IAA 氧化反应，缓解 Al 胁迫对根系伸长的抑制作用（Paul et al，1964）。本研究中，外源低浓度 CGA（0.004 和 0.01 g · L^{-1}）缓解 Al 对 SB 根伸长具有抑制作用的同时，对侧根的生长发育具有促进作用，而高浓度 0.02 和 0.04 g · L^{-1}CGA 的缓解和促进效果下降。有机酸分泌是植物抗铝毒害的最重要途径。Al 胁迫下，0.01 g · L^{-1} CGA 处理后，SB 根系柠檬酸的分泌量显著提高，而其它浓度的 CGA 处理下，柠檬酸分泌量变化并不明显，可见，Al 胁迫下，0.01 g · L^{-1}CGA 对 SB 根系具有最显著的缓解作用。此外，我们注意到高浓度 0.02 和 0.04 g · L^{-1} CGA 缓

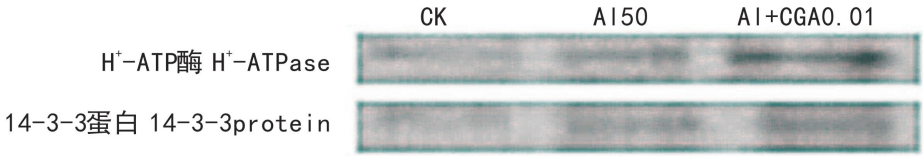

图 7 外源 CGA 对 Al 胁迫 SB 根中质膜 H^+-ATPase 蛋白磷酸化水平及其与 14-3-3 蛋白互作的影响

Fig. 7 Effects of exogenous CGA on the levels of protein phosphorylation for plasma membrane H^+-ATPase and its binding capacity with 14-3-3 protein in SB root under Al stress

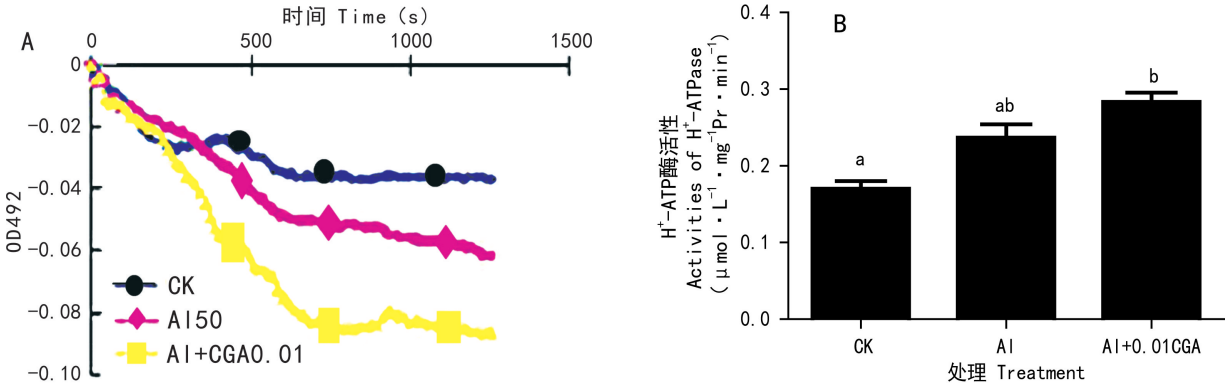

图 8 外源 CGA 对 Al 胁迫 SB 根中质膜 H^+-ATPase 活性(A)和 H^+泵活性(B)的影响

Fig. 8 Effects of exogenous CGA on plasma membrane H^+-ATPase(A)and H^+ pump (B) activity in SB root under Al stress

解 Al 毒害的效果下降,推测其可能的原因是被细胞吸收后,糖苷键水解,生成了 3,4-二羟基苯丙烯酸,其羟基和羧基能电离出 H^+离子;高浓度 CGA 被植物细胞吸收后,破坏细胞内环境的酸碱稳态,造成细胞代谢紊乱,因而缓解作用下降。

Al^{3+}诱导植物产生和积累大量的活性氧,破坏正常组织的结构与功能,甚至导致死亡。本研究中,Al 胁迫下 MDA 含量显著增加,暗示 Al 胁迫引起膜脂过氧化。添加外源 CGA 后,MDA 含量显著下降,CGA 能够缓解 Al 胁迫引起的脂质过氧化。外源 CGA 和单独铝处理下 H_2O_2的含量与对照无明显差异,Al 胁迫引起的膜脂过氧化,MDA 含量增加,并不是 H_2O_2的积累氧化造成的。外源 CGA 和单独铝处理与对照相比,SOD 活性显著下降,POD 和 CAT 活性与对照相比无显著差异,CGA 对 Al 胁迫下抗氧化酶活性并无显著的影响和调控作用。CGA 分子中具有氢自由基结构,能够清除植物体内的活性氧,减轻自由基对组织的氧化胁迫(胡宗福等,2006)。因此我们推测 CGA 通过其还原用,清除 Al 胁迫产生的除 H_2O_2外的其它活性氧,缓解膜脂过氧化,减少 MDA 的产生。

植物受到 Al^{3+}刺激时,根系分泌大量有机酸,如柠檬酸、苹果酸等,这些有机酸能与细胞外的 Al^{3+}结合,防止 Al^{3+}进入细胞内造成对植物的损害(郭传龙,2013)。柠檬酸通道蛋白属于 MATE 家族,能转运柠檬酸至胞外,螯合细胞外的 Al^{3+}(谢小东等,2011)。本研究中,SB 在 Al 胁迫下,加入 0.01 g·L^{-1}CGA 后,柠檬酸的分泌量虽然显著增加,但 MATE 表达量却较单独 Al 胁迫处理略有下降,绿原酸对 MATE 表达具有一定的抑制效应。可见,绿原酸并不通过上调 MATE 的表达,增加 Al 胁迫下 SB 根系柠檬酸的分泌。结合根伸长抑制试验,0.01 g·L^{-1}CGA 能显著增加 Al 胁迫下 SB 侧根数目。因此,我们推测可能是侧根数目的增多,生物量增加,弥补了 MATE 的基因表达水平的下降造成的差异,最终使柠檬酸分泌量增加从而缓解 Al 胁迫。

植物中 14-3-3 基因家族至少有十五种亚型,这些 14-3-3 蛋白能与靶细胞不同程度结合,调控植物生长发育和胁迫响应。在酸性土壤中,Al^{3+}进入细胞内,激活 14-3-3 蛋白,并与 H^+-ATPase 特异性结

合，使其磷酸化和 H^+ 泵活性增加，增强柠檬酸的分泌作用（周志娥等，2014）。与单独 Al 胁迫相比，CGA 处理后的 14-3-3 蛋白表达各有不同，其中三种 14-3-3 蛋白（14-3-3*b*、14-3-3*k* 和 14-3-3*m*）的表达水平均略微上调，而 14-3-3*c*、14-3-3*e*、14-3-3*f*、14-3-3*g*、14-3-3*i*、14-3-3*j* 和 14-3-3*n* 基因表达水平下降。同时与单独 Al 处理相比，CGA 处理后，质膜 H^+-ATPase 的磷酸化水平，其与 14-3-3 的结合能力，H^+ 泵活性均增加。因此，推测 CGA 还可能通过调控 14-3-3 蛋白的表达，增加质膜 H^+-ATP 酶的磷酸化水平，增强 H^+ 泵的活性使柠檬酸分泌量增加，缓解 Al 对 SB 的毒害。至于 CGA 如果具体调控哪种 14-3-3 蛋白亚型，需要进一步研究和验证。

参考文献：

CHEN Q, WUK H, ZHANGY N, et al, 2012. Physiological and molecular responses of broad bean (*Viciafaba* L.) to aluminum stress [J]. Acta Physiol Plant, 34(6): 2 251-2 263.

CHEN SH, WANG YQ, LUO XL, 2008. Advances in research on chlorogenic acid [J]. Food Sci Technol, 2: 195-199. [陈绍华，王亚琴，罗立新，2008. 天然产物绿原酸的研究进展 [J]. 食品科技，2: 195-199].

CHUNG HJ, SEHNKE PC, FERL RJ, 1999. The 14-3-3 proteins: cellular regulators of plant metabolism [J]. Trends Plant Sci, 4(9): 367-371.

DELHAIZE E, RYANP R, 1995. Aluminum toxicity and tolerance in plants [J]. Plant Physiol, 107(2): 315-321.

GUO CL, 2013. Study on the express in and interaction of 14-3-3 proteins and plasma membrane H^+-ATPase of black soybean in response mechanism to aluminum stress [D]. Kunming University of Science and Technology. [郭传龙，2013. 黑大豆 14-3-3 蛋白和质膜 H^+-ATPase 的表达与互作应答铝胁迫的机理研究 [D]. 昆明理工大学.]

GUO CL, ZHAO Y, WU KH, et al, 2015. Effects of AMP on the Al-induced citrate exudation and al-resistance of Tamba Black Soybean [J]. Soyb Sci, 34(1): 82-86. [郭传龙，赵艳，武孔焕，等，2015. AMP 对铝胁迫诱导丹波黑大豆柠檬酸分泌及其铝耐受性的影响 [J]. 大豆科学，34(1): 82-86.]

HU ZF, YU WL, ZHAO YP, 2006. Study on the scavenging of ROS and anti-lipid peroxidation by chlorogenic acid [J]. Food Sci, 27(2): 128-130. [胡宗福，于文利，赵亚平，2006. 绿原酸清除活性氧和抗脂质过氧化的研究 [J]. 食品科学，27(2): 128-130.]

JAHN T, FUGLSANG AT, OLSSON A, et al, 1997. The 14-3-3 protein interacts directly with the C-terminal region of the plant plasma membrane H^+-ATPase [J]. Plant Cell, 9(10): 1805-1814.

KONG FX, SAN WL, 2004. Physiologica land biochemical response of Al-sensitive and Al-tolerant wheat to aluminum [D]. Chin J Appl Environ Biol, 10(5): 559-562. [孔繁翔，桑伟莲. 2004，小麦铝抗性和敏感品系对铝胁迫的生理生化反应 [J]. 应用与环境生物学报，10(5): 559-562].

LAN T, YOU J, KONG L, et al, 2016. The interaction of salicylic acid and Ca^{2+} alleviates aluminum toxicity in soybean (*Glycine max* L.) [J]. Plant Physiol Biochem, 98: 146-154.

LIANG F, LUO YY, CHEN LM, et al, 2011. Advances in research of malate and citrate transporter genes in plants [J]. Chin Bull Life Sci, 23(3): 299-305. [梁锋，罗义勇，陈丽梅，等，2011. 植物苹果酸和柠檬酸通道蛋白基因的研究进展 [J]. 生命科学，23(3): 299-305]

LIN XZ, LIU CY, HE PQ, et al, 2005. Study on the inhibitory effects of chlorogenic acid originated from the leaves of *Arctium-lappa* L. on pathogenic fungi [J]. Plant Prot, 31(3): 35-38 [林学政，柳春燕，何培青，等，2005. 牛蒡叶内绿原酸抑制植物病原真菌的研究 [J]. 植物保护，31(3): 35-38.]

LIU J, MAGALHAES JV, SHAFF J, et al, 2009. Aluminum-activated citrate and malate transporters from the MATE and ALMT families function independently to confer *Arabidopsis* aluminum tolerance [J]. Plant J, 57(3): 389-399.

LIU P, XU GD, JIANG XM, et al, 2004. Effects of aluminum on membrane lipid peroxidation and endogenous protective systems of soybean seedling [J]. J Agro-Environ Sci, 23(1): 51-54. [刘鹏，徐根娣，姜雪梅，等，2004. 铝对大豆幼苗膜脂过氧化和体内保护系统的影响 [J]. 农业环境科学学报，23(1): 51-54.]

MA BH, 2007. The mechanisms of aluminum toxicity and tolerance in rice (*Oryza satica* L.) [D]. Nanjing Agricultural University. [马宝慧. 2007. 水稻（*Oryza sativa* L.）铝毒害及耐性机理 [D]. 南京农业大学.]

PAUL EP, 1964. Effec of chlorogenic acid on the auxin catabolism and th eauxin content of root tissues [J]. Phytochemistry, 3(5): 617-621.

PENG JH, CHEN HX, GONGW, et al, 2013. Effects on plasma membrane permeability of antioxidant enzyme of *Hydrangea macrophylla in vitro* under Al stress [J]. J Hunan Agric Univ (Nat Sci Ed), 39(1): 42-44. [彭尽晖，陈海霞，龚雯，等. 2013，铝胁迫对八仙花离体植株质膜透性与抗氧化系统的影响 [J]. 湖南农业大学学报（自然科学版），39(1): 42-44.]

REN XY, 2013. Effect of aluminum toxicity on the growth and IAA distribution Alfalfa [D]. Shanghai Jiaotong University. [任晓燕，2013. 铝毒对紫花苜蓿幼苗生长和 IAA 分布的影响 [D]. 上海：上海交通大学.]

SASAKI T, YAMAMOTO Y, EZAKI B, et al, 2004. A wheat gene encoding an aluminum-activated malate transporter [J]. Plant J, 37(5): 645-653.

SHEN H, HEL F, SASAKI T, et al, 2005. Citrate secretion coupled with the modulation of soybean root tip under aluminum stress up-regulation of transcription, translation, and threonine-oriented phosphorylation of plasma membrane H^+-ATPase [J]. Plant Physiol, 138(1): 287-296.

Wang BY, Li CS, Liu P, et al, 2006. The responces of antioxidant enzyme systems on *Fagopyrum esculentum* Moenchunder Al stress [J]. Ecol Environ, 15(4): 816-821. [王保义，李朝苏，刘鹏，等，2006. 荞麦叶内抗氧化系统对铝胁迫的响应 [J]. 生态环境，15(4): 816-821.]

WANG J, WANG Q, TIAN N, et al, 2015. Comparison and analysis of RNA extracting method from different plant tissues [J]. J Beijing Univ, 30(1): 76-80. [王杰，王全，田娜，王瑜，等，2015. 不同植物组织 RNA 提取方法的比较分析

（下转第 805 页 Continue on page 805）