

H₂O₂ 位于 ABA 的上游参与葡萄对低温的应答

刘 新¹, 车永梅¹, 卢 江²

(1. 青岛农业大学 生命科学学院 山东 青岛 266109; 2. 中国农业大学 食品与科学学院, 北京 100093)

摘 要:以抗寒性较强的葡萄品种(砧木)贝达 1 a 生枝条叶片为材料, 研究低温胁迫下贝达叶片中 H₂O₂ 与 ABA 含量的变化及外源 H₂O₂ 和抗坏血酸(AsA)对贝达叶片中 ABA 含量的影响。结果表明:低温胁迫下贝达叶片中 H₂O₂ 与 ABA 含量先增加后降低, 具有猝发现象, H₂O₂ 猝发时间早于 ABA; 外施一定浓度的 H₂O₂ 可以促进贝达内源 ABA 的积累, 缓解 5℃ 低温对膜的伤害; 而外施 H₂O₂ 的清除剂 AsA 显著降低内源 ABA 的含量。表明 H₂O₂ 与 ABA 参与了贝达对低温胁迫的应答, H₂O₂ 可能位于 ABA 的上游。

关键词:脱落酸; 过氧化氢; 低温; 葡萄

中图分类号: S 663.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0009(2010)23-0008-04

低温是影响植物生命活动的重要非生物逆境, 不仅影响植物生长, 导致植物产量降低, 严重时甚至造成植物死亡。因此, 植物抗冷性研究一直备受关注^[1]。葡萄是具有优良食用品质和酿酒特性的藤本落叶果树, 在世界范围内种植广泛, 但葡萄对低温敏感, 低温给葡萄产业带来了极大危害, 研究葡萄对低温的响应机制具有重要意义。

对低温信息的感受和传递是植物响应低温的关键步骤, 也是目前受到广泛关注和研究的课题。作为植物体内重要的逆境响应信号分子脱落酸(Abscicic acid, ABA)参与了植物对低温信息的传递过程。Pagter^[2]研究表明, 伴随着绣球(*Hydrangea macrophylla*)抗冷性的增强, 其木质部中 ABA 发生积累, 认为 ABA 参与了植物对低温的适应; 小麦 ABA 超敏感突变体抗寒性显著增强^[3]; 抗寒性强的东农冬麦 1 号各器官中 ABA 含量均高于抗寒性弱的济麦 22 ABA 对冬小麦安全越冬起重要作用^[4]。H₂O₂ 是近几年被确认的信号分子, 参与植物体内许多生理过程特别是逆境适应过程的信号转导, 有研究表明 H₂O₂ 也参与了植物对低温的适应过程。郝晶等^[5]研究表明, 低温下(6℃)大豆幼苗 H₂O₂ 含量呈

上升趋势, 胁迫初期低浓度 H₂O₂ 诱导了过氧化氢酶(Catalase, CAT)和过氧化物酶(Peroxidase, POD)等保护酶活性的提高; 抑制内源 H₂O₂ 后进行水杨酸处理, 黄瓜果皮细胞丙二醛(Malondialdehyde, MDA)含量和细胞膜渗透率增加, CAT 和抗坏血酸过氧化物酶(Ascorbic acid oxidase, APX)活性受到抑制^[6]。但有关 H₂O₂ 在植物抗寒性中的调控功能及模式仍有待深入探讨。

作为植物体内重要的信号分子, H₂O₂ 和 ABA 在某些生理过程的调节中存在相互作用。如, 转 9-顺式-环氧胡萝卜素双加氧酶基因烟草 ABA 含量增加, ABA 通过 H₂O₂ 诱导超氧化物歧化酶(Superoxide dismutase, SOD)和 CAT 等抗氧化酶活性, 提高植株的抗旱性和抗盐性^[7]; Zong 等从玉米中分离到一分裂原活化蛋白激酶(Mitogen-activated protein kinase, MAPK)-ZmMPK7, ABA 通过 H₂O₂ 诱导 ZmMPK7 基因的表达^[8]; H₂O₂ 参与 ABA 诱导拟南芥气孔关闭的生理过程^[9]; H₂O₂ 在 ABA 诱导 cat1 基因表达过程中起中介作用^[10]等等。在葡萄应答低温的信号转导过程中二者是否存在相互作用及其作用关系, 目前尚未见报道。该试验以抗寒性较强的葡萄品种贝达 1 a 生枝条叶片为材料, 研究低温下其 H₂O₂ 和 ABA 含量的变化及外源 H₂O₂ 和 H₂O₂ 清除剂抗坏血酸(Ascorbate, AsA)对内源 ABA 含量的影响, 以期探究 H₂O₂ 和 ABA 在葡萄抗寒性中的作用及其相互作用机理, 为植物的抗寒性研究提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试材料为抗寒性较强的葡萄品种(砧木)贝达(Beta), 取自常规管理的青岛农业大学葡萄试验田。将

第一作者简介: 刘新(1966-), 女, 博士, 教授, 现主要从事植物逆境信号转导研究工作。E-mail: liuxin6080@yahoo.com.cn.

通讯作者: 卢江(1962-), 男, 博士, 教授, 现主要从事葡萄遗传育种研究工作。E-mail: jiang.lu.cau@gmail.com.

基金项目: 农业部“948”资助项目(2006-G26)。

收稿日期: 2010-10-08

贝达 1 a 生枝条分别进行 5℃和 25℃(于植物生长箱 BWDER)暗处理, 在处理 0、0.5、1、3、6 h, 测定其 H₂O₂ 和 ABA 含量。

贝达 1 a 生枝条叶片分别喷施 0、0.001%、0.01%、0.1% H₂O₂ 后, 置于不同温度(5、25℃)下暗处理, 在处理后的 0、15、30、60、120 min 时, 测定其膜相对透性。

贝达 1 a 生枝条叶片分别喷施 H₂O₂ (0.01%)、AsA (2.0 mol/L)24 h 后, 置于不同温度(5、25℃)下暗处理, 在处理后的 0、0.5、1、3、6 h, 测定其 ABA 含量。

以上生理指标测定均取 1 a 生枝条第 6 叶位刚充分展开的叶片, 3 次重复。

1.2 试验方法

1.2.1 H₂O₂ 含量及膜相对透性的测定 参照郝再彬等的方法测定 H₂O₂ 含量及膜相对透性^[11]。

1.2.2 ABA 含量的测定 采用陈康等的方法并加以改进^[12], 用 80% 甲醇(内含 BHT 1 mmol/L)提取材料中的 ABA, 间接酶联免疫法测定 ABA 含量。试剂盒购自中国农业大学作物化控研究室。

1.3 数据处理

测定结果用 DPS 数据处理系统作方差分析。

2 结果与分析

2.1 不同温度对贝达叶片中 H₂O₂ 含量的影响

图 1 表明, 正常温度(25℃)条件下, 贝达叶片中 H₂O₂ 含量无显著变化, 5℃低温处理后, H₂O₂ 含量先升高后下降, 有猝发现象($P<0.05$), H₂O₂ 含量在处理 30 min 时达最高水平。

2.2 不同浓度 H₂O₂ 对贝达 1 a 生枝条叶片细胞膜透性的影响

为进一步探明 H₂O₂ 是否作为抵御低温的信号分子, 研究了外源 H₂O₂ 对低温胁迫下贝达叶片细胞膜透

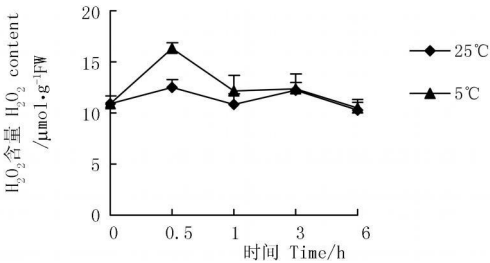


图 1 不同温度对贝达 1 a 生枝条叶片中 H₂O₂ 含量的影响

Fig. 1 The H₂O₂ content in leaves from annual branch of Beta under different temperature

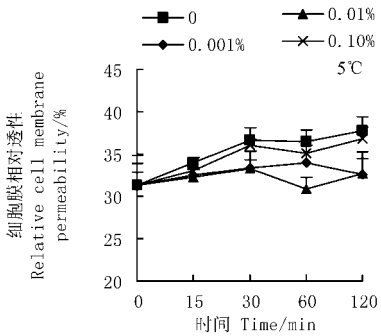
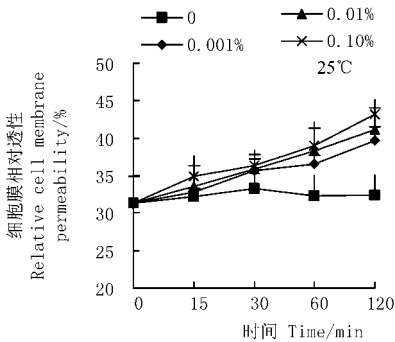


图 2 不同浓度 H₂O₂ 对低温下贝达 1 a 生枝条叶片细胞膜相对透性的影响

Fig. 2 Effects of different concentrations of H₂O₂ on the relative cell membrane permeability of leaves from annual branch of Beta under different temperature

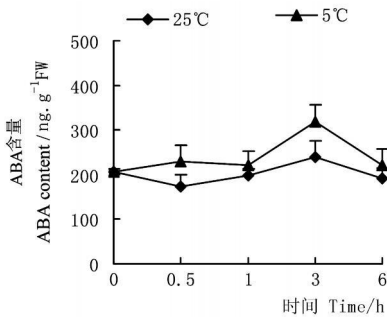


图 3 不同温度对贝达 1 a 生枝条叶片中 ABA 含量的影响

Fig. 3 The ABA content in leaves from annual branch of Beta under different temperature

性的影响。结果表明 正常温度条件(25℃)下, 外源 H₂O₂ 对膜具有一定伤害作用, 在 5℃低温胁迫下, 外源 H₂O₂ 可减轻低温对膜的伤害(图 2), 其中 0.01% H₂O₂ 作用最显著。结合图 1、2 的结果, 推断 H₂O₂ 参与了贝达对低温的应答过程。

2.3 不同温度对贝达 1 a 生枝条叶片中 ABA 含量影响

ABA 是植物响应逆境信息的重要信号分子, 由图 3 可知, 正常温度(25℃)条件下, 贝达叶片中 ABA 含量变化不显著($P>0.05$)。5℃低温胁迫下, 贝达叶片中 ABA 含量先升高再降低, 在低温处理 3 h 达到最大值($P<0.05$)(图 3), 表明 ABA 也是贝达传导低温信息的信号

分子,与 Pagter 等^[2]、Kobayashi 等^[3]及王兴等^[4]的研究结果较一致。

综合图 1~3 的试验结果可以推断出,ABA 和 H_2O_2 均参与了贝达对低温信息的传导过程。已有研究表明, H_2O_2 与 ABA 在诱导气孔关闭等生理过程^[9,13]中存在相互作用,那么在低温响应的信息传递中二者相互作用关系方面,由图 1、2 结果显示 H_2O_2 猝发早于 ABA。而对于 H_2O_2 是否位于 ABA 上游参与贝达对低温的应答,为此进一步研究了外源 H_2O_2 和 H_2O_2 清除剂 ASA 对低温胁迫下贝达内源 ABA 含量的影响。

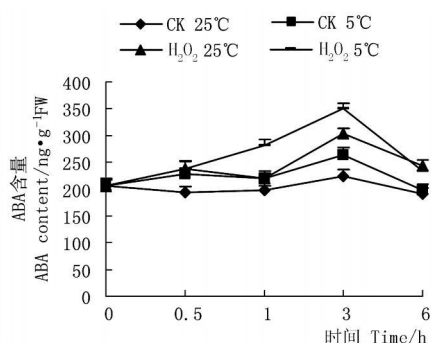


图 4 外源 0.01% H_2O_2 对不同温度下贝达 1 a 生枝条叶片中 ABA 含量的影响

Fig. 4 The effect of exogenous 0.01% H_2O_2 on ABA content in leaves from annual branch of Beta under different temperature

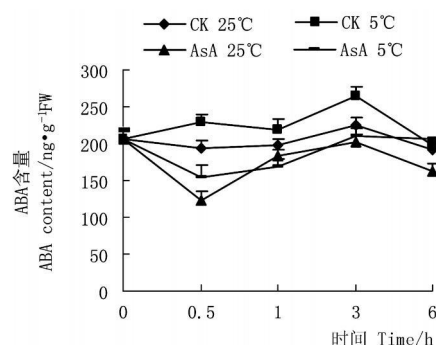


图 5 外源 2.0 mol/L AsA 对不同温度下贝达 1 a 生枝条叶片中 ABA 含量的影响

Fig. 5 The effect of exogenous 2.0 mol \cdot L⁻¹ AsA on ABA content in leaves from annual branch of Beta under different temperature

3 讨论

作为植物体内主要的活性氧, H_2O_2 长期被认为是植物细胞具有毒害作用的代谢产物,然而近年来许多研究表明 H_2O_2 可以作为信号分子参与植物对多种逆境响应过程^[14-16]。该试验以抗寒性较强的葡萄品种(砧木)贝达 1 a 生枝条叶片为材料的研究表明, 5℃低温条件下贝达叶片有 H_2O_2 含量的猝发(图 1),且一定浓度的外源 H_2O_2 能够减轻低温对贝达叶片细胞膜的伤害(图 2),表明 H_2O_2 参与了贝达对低温的响应过程。

试验同时研究表明, 5℃低温胁迫下贝达叶片中 ABA 含量也呈现先增加后降低的变化趋势,具有猝发现象,ABA 猝发时间晚于 H_2O_2 (图 3); 2.0 mol/L AsA 可清除内源 H_2O_2 ,贝达叶片中 ABA 含量显著降低(图 5)。综合以上研究结果,可以推断 H_2O_2 可能位于 ABA 上游参与贝达对低温胁迫的应答,这与 Zhang 等^[7]和 Zong 等^[8]在干旱和盐胁迫上的研究结果有所不同, Zhang 等研究认为 ABA 通过 H_2O_2 ,调控 SOD 和 CAT 等抗氧化酶活性,提高植株的抗旱性和抗盐性; Zong 等发现 ABA 通过 H_2O_2 诱导 *ZmMPK7* 基因的表达,ABA 位于 H_2O_2

2.4 外施 H_2O_2 对贝达叶片中 ABA 含量的影响

图 4 表明,正常温度条件(25℃)下和 5℃低温胁迫下 0.01% H_2O_2 处理均可促进贝达叶片中 ABA 的积累,25 及 5℃下贝达叶片中 ABA 含量最大增幅分别为 11.9%、12.5%。

2.5 外源 AsA 对贝达叶片中 ABA 含量的影响

AsA 是 H_2O_2 的清除剂,图 5 表明,利用 2.0 mol/L AsA 清除内源 H_2O_2 ,贝达叶片中 ABA 含量显著降低($P < 0.05$)。综合图 4、5 的试验结果,推断 H_2O_2 可能位于 ABA 的上游参与贝达对低温的应答,这与 H_2O_2 猝发时间早于 ABA 的结果一致。

的上游。而不同的生理过程中 H_2O_2 与 ABA 间是否存在不同的相互作用,或 H_2O_2 -ABA 信号传递链的其它信号组分是什么以及 H_2O_2 与 ABA 通过什么方式最终影响了植株的抗寒性,这些问题都有待于进一步研究。

参考文献

- [1] 刘零怡,赵丹莹,郑杨等.植物在低温胁迫下的过氧化氢代谢及信号转导[J].园艺学报,2009,36(11):1701-1708.
- [2] Pagter M, Jensen C R, Petersen K K, et al. Changes in carbohydrates, ABA and bark proteins during seasonal cold acclimation and deacclimation in Hydrangea species differing in cold hardiness [J]. Physiol Plant. 2008, 134 (3): 473-485.
- [3] Kobayashi F, Takumi S, Nakamura C. Increased freezing tolerance in an ABA-hypersensitive mutant of common wheat [J]. J Plant Physiol. 2008, 165 (2): 224-232.
- [4] 王兴,于晶,杨阳等.低温条件下不同抗寒性冬小麦内源激素的变化[J].麦类作物学报,2009,29(5):827-831.
- [5] 郝晶,张立军,谢甫锦.低温对大豆不同耐冷性中萌发期保护酶活性的影响[J].大豆科学,2007,26(2):171-175.
- [6] 代晓霞,生吉萍,申琳.外源水杨酸和内源 H_2O_2 对黄瓜抗冷性的影响[J].中国农业大学学报,2007,12(1):68-72.
- [7] Zhang Y, Tan J, Guo Z, et al. Increased abscisic acid levels in transgenic

tobacco over-expressing 9 cis-epoxycarotenoid dioxygenase influence H₂O₂ and NO production and antioxidant defences [J] . Plant Cell Environ, 2009, 32 (5): 509-519.

[8] Zong X J, Li D P, Gu L K, et al. Absciscic acid and hydrogen peroxide induce a novel maize group C MAP kinase gene ZmMPK7, which is responsible for the removal of reactive oxygen species [J] . Planta, 2009 229(3): 485-495.

[9] Pei Z M, Murata Y, Benning G, et al. Calcium channels activated by hydrogen peroxide mediate abscisic acid signalling in guard cells [J] . Nature, 2000, 406: 731-734.

[10] Guan L M, Zhao J, Scandalios J G. Cis-elements and trans-factors that regulate expression of the maize Cat1 antioxidant gene in response to ABA and osmotic stress H₂O₂ is the likely intermediary signaling molecule for the response [J] . Plant J, 2000 22: 87-95.

[11] 郝再彬, 苍晶, 徐仲. 植物生理学理论与技术(B 册). 植物生理实验技术[M] . 哈尔滨: 哈尔滨出版社, 2002: 198-200, 185-188.

[12] 陈康, 李杰, 唐静, 等. 一氧化氮参与调节盐胁迫下玉米幼苗脱落酸的积累[J] . 植物生理与分子生物学报, 2006 32(5): 577-582.

[13] Kwak J M, Mori I G, Pei Z M, et al. NADPH Oxidase AtrobohD and AtrobohF genes function in ROS-dependent ABA signaling in Arabidopsis[J] . EMBO J, 2003, 22(11): 2623-2633.

[14] 段小华, 邓泽元, 宾金华. 茉莉酸甲酯对水稻幼苗抗冷性的影响[J] . 植物生理学通讯, 2009 45(5): 881-884.

[15] Hernandez M, Fernandez-Garcia N, Diaz-Vivancos P, et al. A different role for hydrogen peroxide and the antioxidative system under short and long salt stress in Brassica oleracea roots [J] . J Exp Bot, 2010, 61(2): 521-535.

[16] Zhang Y, Xi D, Wang J, et al. Functional analysis reveals effects of tobacco alternative oxidase gene (NtAOX1a) on regulation of defence responses against abiotic and biotic stresses [J] . Biosci. Rep, 2009, 29: 375-383.

H₂O₂ Production was Upstream of the Rise
of ABA in Response of Grape to Low Temperature

LIU Xin¹, CHE Yong-mei¹, LU Jiang²

(1. College of Life Sciences, Qingdao Agricultural University, Qingdao, Shandong 266109; 2. College of Food and Science, China Agricultural University, Beijing 100093)

Abstract: Using leaves from annual branches of grape cultivar Beta as material, the change in hydrogen peroxide (H₂O₂) and abscisic acid (ABA) content in leaves of Beta under low temperature were measured, the effects of exogenous H₂O₂ and ascorbic acid (AsA) on endogenous ABA content were studied meanwhile. The results showed that the H₂O₂ and ABA content in leaves of Beta under low temperature increased firstly then decreased, H₂O₂ and ABA burst can be seen, the burst of H₂O₂ was more early than ABA. Exogenous H₂O₂ promoted the increase of ABA content, on the other hand, AsA had inhibitory effect on the increase of ABA content, these results indicated that H₂O₂ and ABA all participated in the response of Beta to low temperature and H₂O₂ lies in the upstream of ABA.

Key words: abscisic acid; hydrogen peroxide; low temperature; grape

作物叶面喷肥的常用浓度

作物叶面喷肥(根外追肥)可快速补充养分,解除作物因缺乏营养元素出现的生理病害,促进作物健壮生长,提高产量。下面介绍叶面肥的使用浓度。

磷酸二氢钾:常用浓度 0.3%,即用 300 g 磷酸二氢钾加水 100 kg,充分溶解后喷雾;尿素:常用浓度 1%~2%。使用时千万注意,尿素中缩二尿的含量如超过 1.5%就对作物有毒害作用。所以不能进行叶面喷雾;草木灰:常用浓度 5%~7%。必须用于草木灰加水配制,加水静置 15 h 过滤后喷施;过磷酸钙:浓度 2%。把过磷酸钙加水后充分搅拌,再静置 24 h 过滤后,取清液喷施;硼砂(或硼酸)常用浓度 0.2%~0.3%,先用少量 45℃热水溶化硼砂,再兑水稀释;多效唑:果树用 1 000~1 500 mg/kg 溶液喷施,农作物用 50 mg/kg 溶液喷施;硫酸铜:常用浓度 0.02%~0.05%,用时在溶液中加入少量石灰液,能免除毒害;硫酸锰:常用浓度为 0.05%~0.1%;硫酸锌:常用浓度为 0.1%~0.2%,在溶液中加入少量石灰液后喷施;钼酸铵:按常用浓度为 0.05%~0.1%。喷施豆科作物。