

过氧化氢参与干旱条件下脱落酸诱导黄瓜不定根形成

李雪萍,金鑫,廖伟彪,胡琳莉

(甘肃农业大学园艺学院,甘肃兰州730070)

摘要:以黄瓜(*Cucumis sativus*, L)为试材,采用聚乙二醇(PEG)模拟干旱胁迫,研究过氧化氢(H_2O_2)与脱落酸(ABA)在干旱胁迫下对黄瓜不定根发生的作用及其相互关系。结果表明:0.3% PEG产生了中度干旱胁迫。干旱条件下外源 H_2O_2 和ABA可以显著促进黄瓜外植体不定根的发生,且呈明显的剂量效应,800 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ H_2O_2 和0.5 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ABA促进效果最显著。干旱胁迫下 H_2O_2 和ABA共同处理的根数较 H_2O_2 或ABA单独处理分别高19.3%和31.3%。干旱胁迫下ABA与内源 H_2O_2 清除剂过氧化氢酶(CAT)或内源 H_2O_2 合成抑制剂二苯基碘(DPI)共处理较ABA单独处理,根数分别降低15.2%和30.9%,根长分别降低24.1%和26%。进一步结果表明,与PEG处理相比,PEG+ABA处理的叶片气孔开度百分比、密度和相对电导率分别降低了24.2%、15.4%和14.2%,而相对含水量增加了25%。此外,PEG+ABA处理增加了外植体的渗透调节物质(脯氨酸、可溶性糖和可溶性蛋白)含量和过氧化物酶、多酚氧化酶和吲哚乙酸氧化酶的活性,降低了丙二醛含量。然而,内源 H_2O_2 清除剂CAT逆转了ABA的上述作用。可见, H_2O_2 通过调节水分平衡、细胞膜稳定性、渗透调节物质含量和生根相关酶活性参与干旱条件下ABA促进不定根的发生。

关键词:干旱胁迫;黄瓜不定根;脱落酸(ABA);过氧化氢(H_2O_2);水分平衡;细胞膜稳定性;渗透调节物质

中图分类号:S482.8 **文献标志码:**A

Hydrogen peroxide is involved in abscisic acid-induced adventitious root formation in cucumber under drought stress

LI Xue-ping, JIN Xin, LIAO Wei-biao, HU Lin-li

(College of Horticulture, Gansu Agricultural University, Lanzhou, Gansu 730070)

Abstract: Cucumber (*Cucumis sativus*, L) was used as a test material and we used polyethylene glycol to simulate drought stress to cucumber. The effect of H_2O_2 and ABA on adventitious root development of cucumber (*Cucumis sativus*, L) under drought stress and their interrelationship were studied. The results indicated that 0.3% PEG could simulate moderate drought stress. Exogenous H_2O_2 and ABA had significant positive effect on adventitious root development of cucumber explants under drought stress and the effect was dose-dependent with a maximal biological response at 800 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ H_2O_2 and 0.5 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ABA treatment. The root number developed in H_2O_2 +ABA treatment was 19.3% and 31.3% higher than that in H_2O_2 or ABA single treatment, respectively. Compared with ABA single treatment, the root numbers in ABA + H_2O_2 scavenger (CAT) or ABA + H_2O_2 inhibitor (DPI) treatment decreased by 15.2% and 30.9%, respectively under drought stress. The root length decreased by 24.1% and 26%, respectively. The results showed that PEG + ABA treatment has decreased stomatal aperture, density and relative electric conductivity by 24.2%, 15.4% and 14.2% compared to the PEG treatment; while it has increased the relative water content by 25%. Moreover, PEG + ABA treatment has increased the content of osmotic adjustment substances (proline, water soluble carbohydrate and soluble protein) and the activity of the peroxidase, polyphenol

收稿日期:2017-01-22

修回日期:2018-04-14

基金项目:国家自然科学基金项目(31160398,31560563);中国博士后科学基金项目(20100470887,2012T50828);教育部科学技术研究重点项目(211182);教育部高校博士点新教师基金(201162020005);甘肃省自然科学基金项目(1308RJZA179,1606RJZA073)

作者简介:李雪萍(1990—),女,甘肃白银人,研究生,研究方向为园艺植物栽培与生理。E-mail:1414922695@qq.com。

通信作者:廖伟彪(1976—),教授,主要从事园艺植物生长发育调控与抗逆性研究。E-mail:liaowb@gau.edu.cn。

oxidase and indoleacetate oxidase, while has decreased the content of malondialdehyde. However, CAT treatment significantly reversed the promoting function of ABA in adventitious root formation under drought stress. Therefore, endogenous H_2O_2 might be regulating water balance, cell membrane stability, osmotic adjustment substances and relative enzyme activity, involving in the signaling pathway of ABA-induced adventitious rooting under drought stress.

Keywords: drought stress; adventitious root of cucumber; abscisic acid (ABA); hydrogen peroxide (H_2O_2); water balance; cell membrane stability; osmotic adjustment substances

不定根的发生对植物营养繁殖非常重要,可分为诱导、形成和表达三个连续并相互依赖的阶段,每个阶段均有各自的需要和特点^[1]。不定根发生受诸多因素的影响,如植物激素、光照条件、营养物质和相关的应激反应等^[2]。近年来,众多信号分子被发现参与诱导不定根的发生,如一氧化氮(NO)和过氧化氢(H_2O_2)^[3],钙(Ca^{2+})及钙调蛋白(CaM)^[4],一氧化碳(CO)、硫化氢(H_2S)和甲烷(CH_4)^[5]和氢气(H_2)^[6]等。

脱落酸(ABA)和 H_2O_2 作为典型的信号分子,参与调节植物生长发育的诸多方面,如种子萌发和休眠、胚胎成熟和气孔运动等^[7-8]。ABA和 H_2O_2 作为信号分子参与植物对各种逆境胁迫的响应,如干旱、盐及热应激等^[9]。ABA通过降低棉花叶片蒸腾速率减少植株水分散失增加其种子数和棉绒质量^[10]。干旱条件下 H_2O_2 处理增强小麦抗旱性^[11]并增加豌豆相对含水量缓解植株病症^[12]。廖伟彪等^[13]研究发现,ABA和 H_2O_2 可以诱导3种萱草叶片气孔关闭从而降低水分散失增强植株的抗旱性。 H_2O_2 诱导黄瓜^[8]、万寿菊^[14]、菊花^[15]、大豆和绿豆^[16]不定根发生。ABA促进水稻主根^[17]和各种豆类及非豆类侧根伸长^[18],但过量ABA抑制花生^[19]和水稻^[20]侧根的生长发育。ABA显著促进镉胁迫下绿豆不定根发生和伸长^[21]。

干旱作为一个重要的环境因子调节植物生长发育。随着水匮乏愈加严重,植物对干旱胁迫适应的研究逐渐得到关注并作为植物育种的重要目标。研究表明ABA和 H_2O_2 均参与不定根的发生并响应各种逆境胁迫。已有研究表明 H_2O_2 参与调节拟南芥保卫细胞中的ABA信号^[22]。但 H_2O_2 对ABA在逆境胁迫下诱导不定根发生的作用还不清楚,因此,本研究验证了干旱条件下 H_2O_2 对ABA诱导黄瓜外植体不定根形成的作用及相互关系,以期对 H_2O_2 参与ABA诱导植物生长发育的信号调控研究提供理论参考。

1 材料与方法

1.1 试验材料

选取整齐度一致的“新春四号”黄瓜种子,由甘

肃省农业科学院提供。在蒸馏水中浸种6 h后转至光照培养箱培养5 d [$25^{\circ}C$, 16 h/8 h (昼/夜), $200 \mu mol \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$]。培养5 d后的黄瓜幼苗,在下胚轴基部切掉初生根,即为试验用外植体。

1.2 外植体处理

黄瓜外植体培养在蒸馏水(CK)作为对照组和不同浓度的聚乙二醇(PEG, 0.1, 0.3, 0.6 和 0.9%)处理液中,每个处理3次重复,每天在同一时间更换相应的处理液,处理5 d后,根据生根指标,选出中度干旱胁迫的PEG浓度用于后续试验。试验用化学药剂还包括:ABA (0.01, 0.05, 0.1, 0.5 和 1.0 $\mu mol \cdot L^{-1}$), H_2O_2 (200, 400, 600, 800 和 1000 $\mu mol \cdot L^{-1}$), 100 $\mu mol \cdot L^{-1}$ 过氧化氢酶(CAT, Sigma, USA)和1 $\mu mol \cdot L^{-1}$ 二苯基碘(DPI)^[14]。除注明外,所用试剂均为国产AR级试剂。

1.3 测定指标与方法

1.3.1 生根指标测定 外植体培养5 d后,以每个外植体上形成的不定根的平均根长和根数为生根形态指标。每10株黄瓜外植体为一个试验处理,每个处理独立重复3次。

1.3.2 气孔开度百分比及密度测定 将黄瓜外植体培养在CK、0.3% PEG、0.3% PEG + 0.5 $\mu mol \cdot L^{-1}$ ABA和0.3% PEG + 0.5 $\mu mol \cdot L^{-1}$ ABA + 100 $\mu mol \cdot L^{-1}$ CAT处理液中。处理6 h后,从每个处理的3个重复中各取两片外植体的叶片,用胶带和解剖刀将叶片背面表皮取下,放在载玻片上,使之自然伸展并滴上碘液染色剂,盖上盖玻片,然后在400X光学显微镜下观察。每个处理随机选取5个不重复的视野,统计每个视野下的气孔数并随机测定5个气孔的长度(内横径)和宽度(内纵径),同时测定每个视野的面积。

气孔开度百分比 = (内横径/内纵径) × 100%

气孔密度 = 视野中气孔的个数/视野面积

1.3.3 叶片蒸腾速率、相对含水量、细胞相对电导率和丙二醛含量测定 参照Aroca^[23]等的方法稍作修改,测定叶片蒸腾速率、相对含水量、细胞相对电导率。丙二醛含量根据Han^[24]等方法进行测定。

1.3.4 渗透调节物质含量的测定 参照 Storey 和 Jones^[25]的方法稍作修改,测定脯氨酸、可溶性糖及可溶性蛋白含量。

1.3.5 酶活性测定 酶液制备:称取 0.5 g 鲜样剪碎置于研钵中(冰浴),加 2 ml 磷酸缓冲液,继续研磨成匀浆加入离心管,加 5 ml 磷酸缓冲液浸洗研钵,将洗液加入离心管,5000 g 离心 20 min。吸取上清液用磷酸缓冲液定容至 25 ml 于低温下保存,以供后续试验需要。参照 Wang 等^[26]方法略作改动,测定过氧化物酶(POD)、多酚氧化酶(PPO)和吡哆乙酸氧化酶(IAAO)活性。

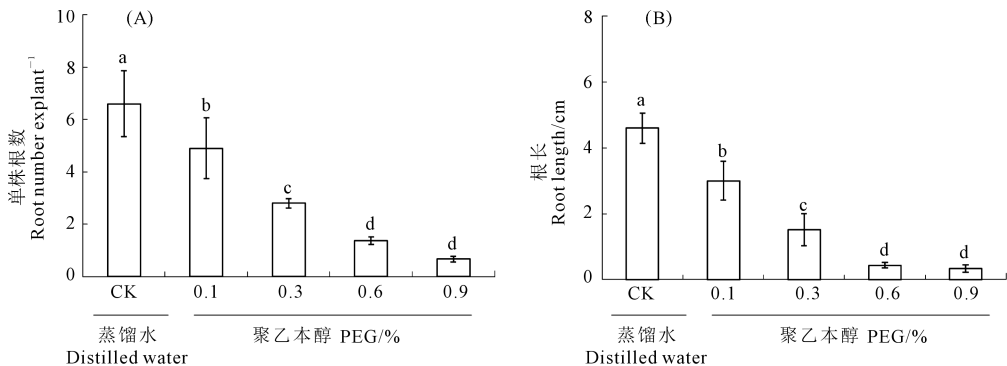
1.4 数据处理

所有试验数据使用 SPSS 19.0 软件进行处理。试验结果用 3 次重复的平均值±标准差(SE)表示。采用 Duncan's 检验对各处理间的差异显著性进行分析($P<0.05$)。用 Excel 软件绘制相关图形。

2 结果与分析

2.1 PEG 模拟干旱胁迫对黄瓜不定根形成的影响

不同浓度(w/v;0.1,0.3,0.6 和 0.9%)PEG 处理显著影响黄瓜外植体不定根根数和根长。随着 PEG 浓度的增大,根数和根长分别从 6.6 个/株和 4.6 cm降低到 0.67 个/株和 0.34 cm。0.1% PEG 处理的外植体根数和根长与 CK 相比分别降低了 25.8%和 34.8%, 0.3% PEG 处理的外植体与 CK 相比根数和根长分别降低了 57.6%和 67.4%,而 0.6%和 0.9% PEG 处理的外植体根数与 CK 比较分别降低了 79.2%和 89.8%,根长分别降低了 90.7%和 92.6%(图 1)。因此,在本试验中 0.1% PEG 为轻度干旱胁迫,0.3% PEG 为中度干旱胁迫,0.6%和0.9% PEG 为重度干旱胁迫。在后面的试验中选用 0.3% 作为模拟干旱胁迫的 PEG 浓度。



注:不同字母表示不同处理间的差异显著($P<0.05$)。下同。
Note: Different letters indicate significant difference in different treatments at $P<0.05$. The same as below.

图 1 不同浓度的 PEG 对黄瓜外植体不定根形成的影响

Fig.1 Effect of different concentrations of PEG on adventitious root development in cucumber explants

2.2 不同浓度 ABA 和 H₂O₂ 对干旱条件下黄瓜不定根形成的影响

在干旱条件下 ABA 和 H₂O₂对黄瓜不定根的形成都有影响,而且呈明显的浓度依赖效应(图 2)。干旱胁迫下 0.01,0.05,0.1,1.0 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ABA 和 200,400,600,1000 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ H₂O₂处理外植体的根数和根长高于 PEG 单独处理,但是显著低于 CK。而干旱胁迫下 0.5 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ABA 和 800 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ H₂O₂处理的外植体根数和根长显著高于 ABA 和 H₂O₂其它浓度处理外植体的根数和根长(图 2)。因此,干旱胁迫下促进黄瓜外植体不定根形成的最适宜 ABA 和 H₂O₂浓度分别为 0.5 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 800 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$,即作为后续试验所用浓度。

2.3 CAT 和 DPI 对干旱胁迫下 ABA 诱导黄瓜不定根形成的影响

从图 3 可以看出,PEG 单独处理外植体不定根的根数和根长与 CK 相比分别降低了 62.5%和 15.7%;CAT 或 DPI 分别与 PEG 共处理时,不定根根数和根长都显著低于 PEG 单独处理;ABA 或 H₂O₂分别与 PEG 共处理外植体时,不定根的根数和根长都显著高于 PEG 且分别高出 109%和 27.9%;而 ABA 和 H₂O₂在干旱条件下共处理时,不定根根数和根长都高于 ABA 或 H₂O₂单独处理,且 ABA 和 H₂O₂共处理较 ABA 或 H₂O₂单独处理的根数分别高出 31.3%和 19.3%;CAT 或 DPI 与 ABA 共处理外植体与 ABA 单独处理的外植体相比,不定根根数分别降低了 15.2%和 30.9%,根长分别降低了 24.1%和 26%。以上结果可以看出干旱胁迫抑制外植体不定根的发生,外源 ABA 或 H₂O₂可以显著促进干旱胁迫下不定根的发生,而 CAT 或 DPI 处理清除内源 H₂O₂后,ABA 促进不定根生长的效果被显著抑制,说明 H₂O₂参与 ABA 诱导黄瓜不定根的发生。

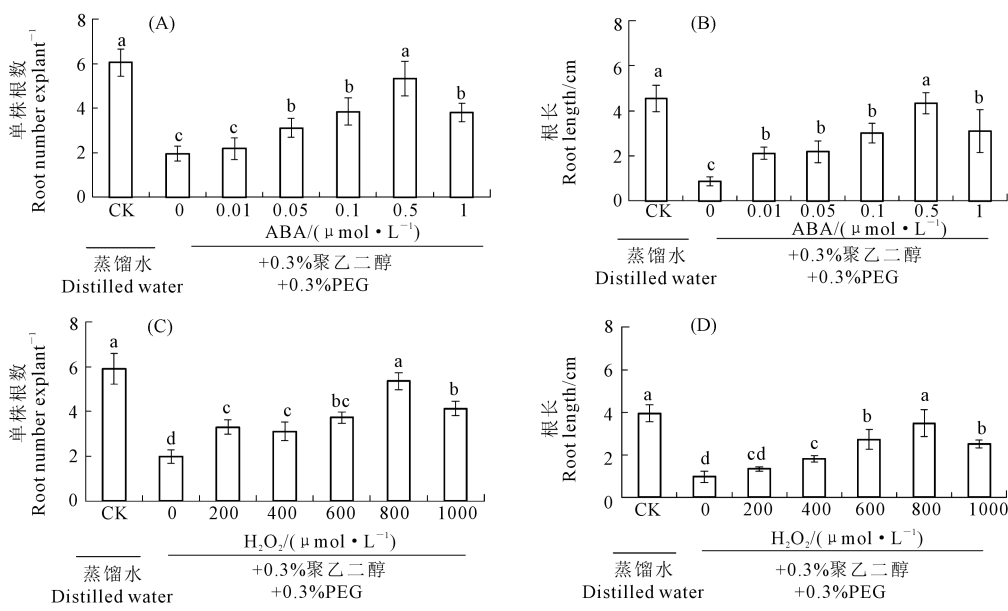


图 2 不同浓度的 ABA 和 H₂O₂ 对干旱胁迫下黄瓜不定根形成的影响

Fig.2 Effects of different concentrations of ABA or H₂O₂ on adventitious root development in cucumber explants under drought stress

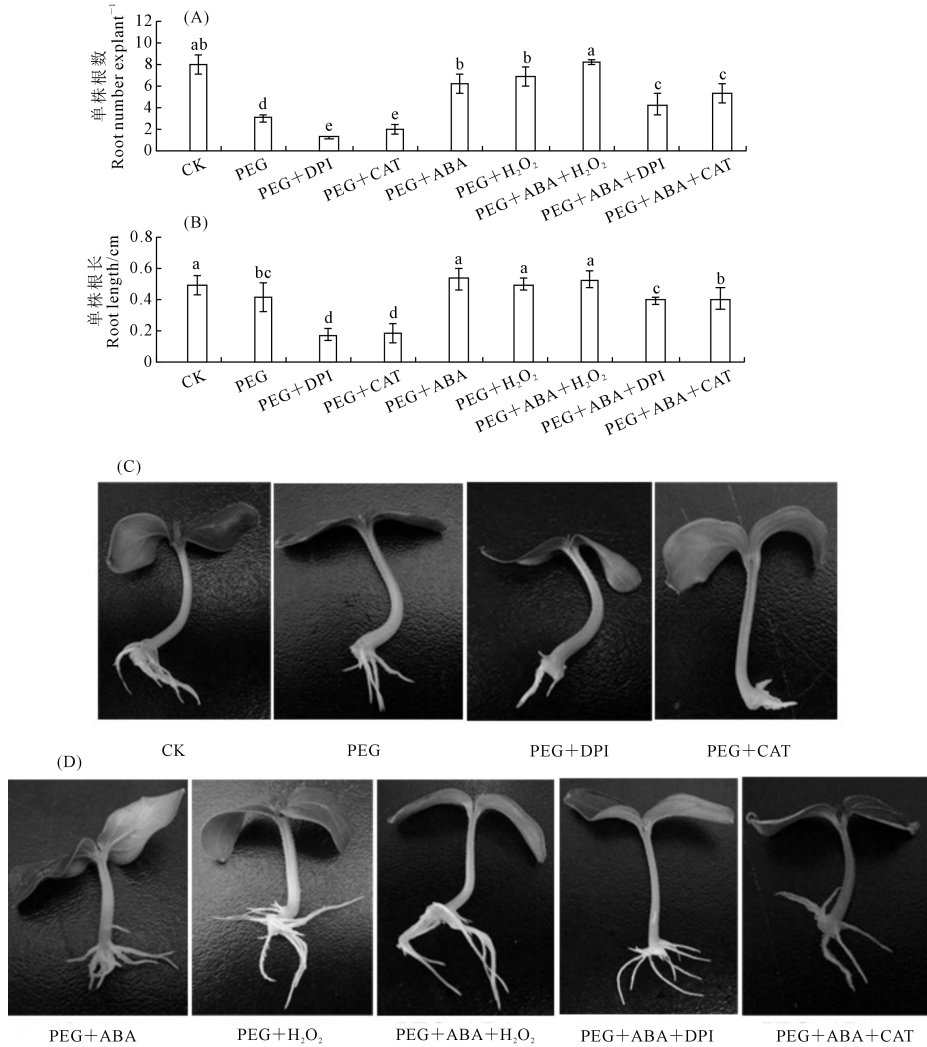


图 3 CAT 和 DPI 对于干旱条件下 ABA 诱导不定根形成的影响

Fig.3 Effects of CAT or DPI on adventitious root development induced by ABA under drought stress

2.4 CAT 对干旱胁迫下 ABA 诱导黄瓜不定根发生中叶片气孔、蒸腾速率及相对含水量的影响

由图 4A 和图 4B 可以看出,PEG 处理后黄瓜外植体叶片的气孔开度的百分比与气孔密度都显著高于 CK,分别高出 13%和 7.2%;PEG 和 ABA 共处理与 PEG 单独处理相比,气孔开度百分比和气孔密度分别降低了 24.2%和 15.4%;而当 CAT 与 PEG 和 ABA 共处理,将内源 H_2O_2 清除,气孔开度百分比和气孔密度增加,而且显著高于 PEG 和 ABA 共处理。CK、PEG、PEG+ABA 和 PEG+ABA+CAT 四个处理之间的蒸腾速率在 30 min 之前没有显著性差异(图 4C);在 60~90 min 之间,PEG+ABA 处理的蒸腾速率呈下降趋势而其它处理呈上升趋势,并且在 90 min 时 PEG+ABA 处理的蒸腾速率显著低于 PEG 单

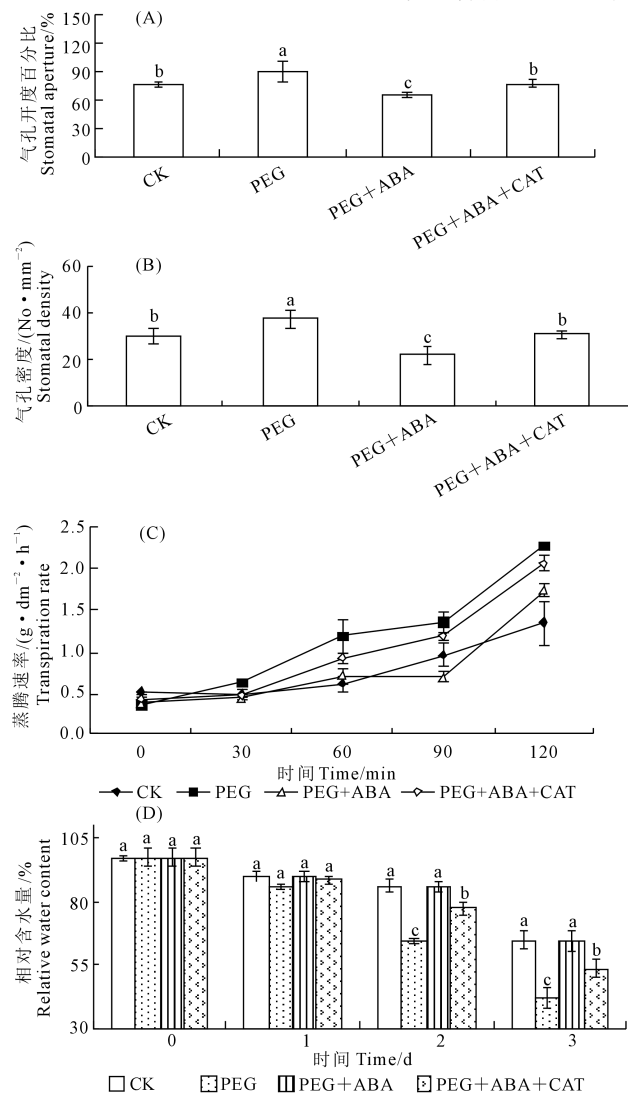


图 4 ABA 和 CAT 对干旱条件下黄瓜外植体在 不定根发生过程中叶片气孔开度、密度、蒸腾速率和相 对含水量的影响

Fig.4 Effects of ABA and CAT on stomatal aperture and density, transpiration rate and relative water content of cucumber explants leaves under drought stress

独处理和 PEG+ABA+CAT 处理;在 90~120 min 时,所有处理的蒸腾速率都上升,但是 PEG+ABA 处理的蒸腾速率还是显著低于 PEG 和 PEG+ABA+CAT 处理(图 4C);以上结果显示 CAT 处理清除内源 H_2O_2 可以显著抑制干旱胁迫下 ABA 对植株叶片蒸腾速率的降低效果。四个处理的相对含水量在 0 d 和 1 d 都没有显著差异(图 4D)。在 2 d 和 3 d 时,与 CK 相比 PEG 处理的相对含水量显著降低,PEG+ABA 处理的相对含水量显著高于 PEG 单独处理,PEG+ABA+CAT 处理的相对含水量显著高于 PEG+ABA 处理。在处理 2 d 时,与 CK 相比 PEG 的相对含水量降低了 26%;与 PEG 相比 PEG+ABA 处理的相对含水量增加了 25%;与 PEG+ABA 处理相比 PEG+ABA+CAT 的相对含水量降低了 9%。这些结果表明,ABA 增加干旱条件下不定根发生过程中相对含水量,而 PEG+ABA+CAT 明显逆转了 ABA 的作用效果。上述结果说明内源 H_2O_2 可能参与 ABA 调节干旱条件下黄瓜外植体在 不定根发生过程中叶片的气孔关闭和水分散失。

2.5 CAT 对干旱胁迫下 ABA 诱导黄瓜不定根发生中细胞膜稳定性的影响

四个处理的相对电导率在 0~12 h 呈上升趋势;但在 0~8 h 各处理的相对电导率无显著差异。在 12 h 时,PEG 单独处理的相对电导率比 CK 升高 14.3%,而 ABA 处理后相对电导率比 PEG 单独处理降低了 14.2%,PEG+ABA+CAT 处理的相对电导率比 PEG+ABA 处理增加 7.8%;12 h 之后,四个处理的相对电导率均呈下降趋势,且 24 h 时 PEG+ABA 处理的相对电导率显著低于 PEG 和 PEG+ABA+CAT 处理(图 5A)。从图 5B 可以看出,不同处理黄瓜外植体的 MDA 含量均呈先缓慢上升后急剧下降的变化趋势。在 0~8 h 四个处理之间没有差异,在 8~24 h 之间 PEG 处理的 MDA 含量显著高于 CK,在 12~24 h 之间 PEG+ABA 处理的 MDA 含量显著低于 PEG 处理,24~48 h 之间四个处理的 MDA 含量均呈下降趋势。上述结果表明,PEG 处理增加相对电导率与 MDA 含量,在干旱胁迫下 ABA 处理可以降低相对电导率与 MDA 含量,而 CAT 处理显著增加了相对电导率,说明 ABA 可以降低由于干旱胁迫造成的相对电导率和 MDA 含量的增加,而 CAT 可以逆转 ABA 的作用效果。

2.6 CAT 对干旱胁迫下 ABA 诱导黄瓜不定根发生中外植体渗透调节物质的影响

图 6A 显示,处理 4 h 前,四个处理均呈下降趋势,4~8 h 之间只有 PEG 处理呈上升趋势,其它处

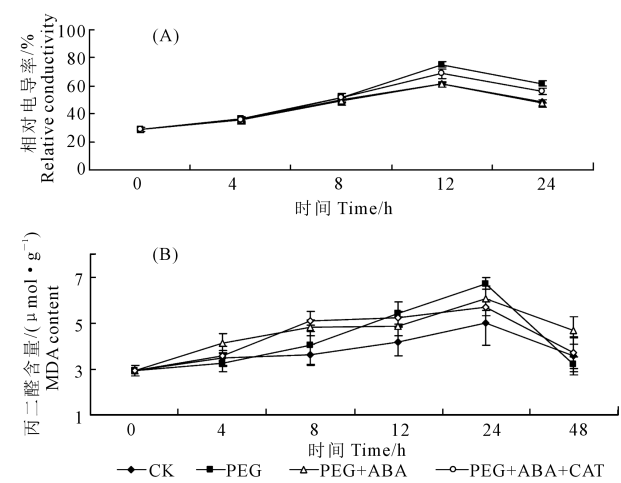


图5 ABA和CAT对干旱胁迫下黄瓜外植体相对电导率和丙二醛含量变化的影响

Fig.5 Effects of ABA and CAT on relative conductivity and MDA content in cucumber explants under drought stress

理均呈下降趋势,8~12 h之间四个处理的可溶性糖含量均大幅上升。CK的可溶性糖含量在0 h时达到峰值,为 $0.32 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$,而其它3个处理的可溶性糖含量峰值在12 h时出现,并且显著高于CK。在12 h之后,四个处理均呈大幅下降趋势,48 h时呈稳定状态。从四个处理的可溶性糖含量变化趋势可以看出,PEG处理后,随着胁迫时间的延长,植株可溶性糖含量逐渐降低;而与PEG单独处理相比,PEG+ABA处理植株的可溶性糖含量增加了;CAT处理将内源 H_2O_2 清除,植株可溶性糖含量在一定时间内低于PEG+ABA处理,说明内源 H_2O_2 和ABA提高干旱胁迫下外植体可溶性糖含量。

除了PEG处理在8~12 h之间可溶性蛋白含量出现下降趋势,其它3个处理均呈先上升后下降的趋势。在24 h时4个处理的可溶性蛋白含量均出现峰值,PEG+ABA的峰值最大,是 $19.4 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$;PEG+ABA+CAT处理为 $18.9 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$;PEG处理含量最低为 $12.7 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 。在24 h之后,四个处理均呈现急剧下降趋势,但是PEG+ABA处理的可溶性蛋白含量仍然最大(图6B)。在整个试验过程中,PEG+ABA处理的可溶性蛋白含量始终高于其它3个处理,说明ABA和内源 H_2O_2 提高了干旱胁迫下黄瓜外植体可溶性蛋白的含量。

从图6C可以看出,四个处理的游离脯氨酸含量的变化趋势基本一致,都是呈先上升后下降的趋势。在0~8 h除了PEG+ABA处理脯氨酸含量下降,其它处理均呈上升趋势;8~12 h四个处理均呈大幅上升趋势,12~24h四个处理均呈下降趋势,且在整个试验中PEG+ABA处理的脯氨酸含量均高于

CK和PEG单独处理。在12 h时,CK、PEG、PEG+ABA和PEG+ABA+CAT四个处理的脯氨酸达到峰值,分别是 159.3 、 102.1 、 171.5 和 $162.3 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 。从四个处理的峰值可以看出,PEG+ABA处理的脯氨酸含量最高,而CAT处理后脯氨酸含量下降,说明CAT将内源 H_2O_2 清除后影响了外植体脯氨酸含量,即内源 H_2O_2 参与ABA增加干旱胁迫下黄瓜外植体脯氨酸含量的过程。

2.7 CAT对干旱胁迫下ABA诱导黄瓜不定根发生中POD、PPO和IAAO酶活性的影响

在0~8 h,四个处理的POD活性显著增加(图7A)。在8~12 h,PEG处理的POD活性显著降低,而其它处理的均保持相对平稳,且PEG+ABA处理的POD活性显著高于PEG和PEG+ABA+CAT处理。在12 h时,PEG+ABA处理比PEG单独处理的POD活性增加了49.1%;PEG+ABA+CAT处理的POD活性比PEG+ABA处理降低了12.3%(图7A)。图7B显示,PEG+ABA和PEG+ABA+CAT处理的PPO活性曲线是双峰曲线,两个峰值分别出现在4h和24 h。在4~8 h和24~48 h,PEG+ABA处理的PPO活性显著高于PEG单独处理。在4 h时,PEG+ABA处理的PPO活性比PEG单独处理高出24.47%。在48 h时,与PEG+ABA处理相比PEG+

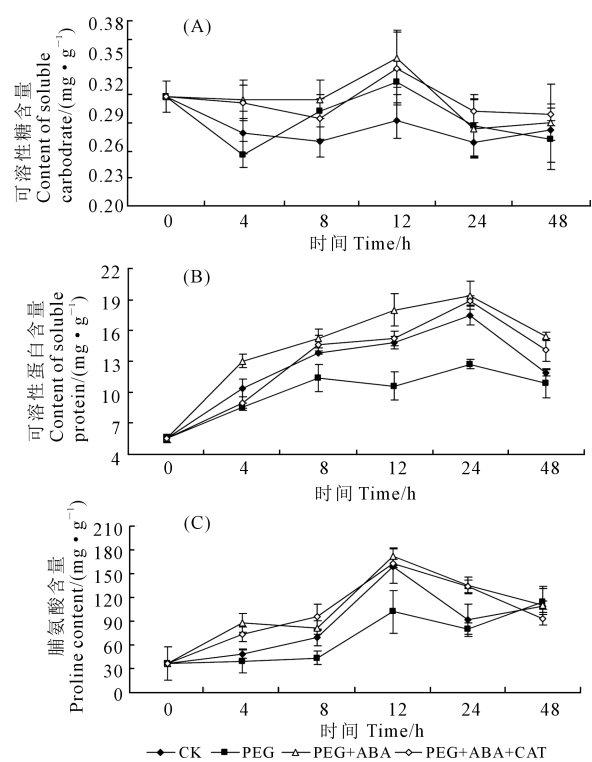


图6 ABA和CAT对干旱胁迫下黄瓜外植体渗透调节物质变化的影响

Fig.6 Effects of ABA and CAT on osmotic regulation substances in cucumber explants under drought stress

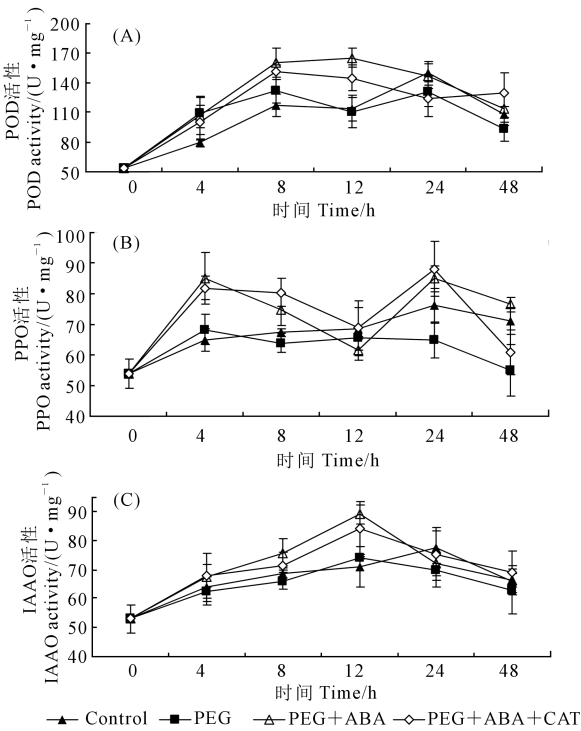


图 7 ABA 和 CAT 对干旱胁迫下黄瓜外植体 POD、PPO 和 IAAO 酶活性变化的影响

Fig.7 Effects of ABA and CAT on POD、PPO and IAAO activity in cucumber explants under drought stress

ABA+CAT 处理的 PPO 活性降低了 31.01%。四个处理的 IAAO 活性在整个试验过程中,呈先上升后下降的趋势(图 7C)。在 4~12 h,PEG+ABA 和 PEG+ABA+CAT 处理的 IAAO 活性显著高于 PEG 单独处理。在 12 h 时,PEG、PEG+ABA 和 PEG+ABA+CAT 处理的 IAAO 活性达到峰值,且 PEG+ABA 处理的 IAAO 活性较 PEG 单独处理高 16.86%,而 PEG+ABA+CAT 处理的 IAAO 活性较 PEG+ABA 处理低 5.38%(图 7C)。

3 讨 论

ABA 预处理促进镉胁迫下绿豆不定根形成和伸长^[21]。本研究中,适宜浓度的 ABA 处理可以显著增加干旱胁迫下不定根根数和根长(图 2A 和 2B),说明 ABA 可以促进干旱条件下不定根的发生。因此,ABA 可能参与逆境胁迫下植物的生长发育。与 ABA 一样,外源 H₂O₂可以缓解干旱胁迫对不定根的抑制效果(图 2C 和 2D)。我们实验室之前的研究结果表明干旱胁迫下 H₂O₂可促进万寿菊不定根发生^[3]。因此,ABA 和 H₂O₂均能促进干旱条件下不定根发生。本研究中,CAT 和 DPI 均能逆转干旱胁迫下 ABA 对不定根发生的促进效果(图 3),说明内源 H₂O₂的减少会减弱干旱胁迫下 ABA

对不定根发生的促进效果。ABA 诱导 H₂O₂产生导致拟南芥气孔关闭^[22],表明 H₂O₂对 ABA 信号转导有中间调节作用。本研究表明,干旱胁迫下 H₂O₂参与 ABA 促进不定根发生,且提出 ABA 降低干旱胁迫对不定根发生抑制作用的信号转导途径需要 H₂O₂参与。

干旱胁迫诱导气孔关闭降低蒸腾速率,蒸腾速率降低有利于保持较高的水分含量与植物抗旱性有关。本研究中,干旱胁迫下 ABA 显著降低黄瓜叶片气孔开度百分比、密度和蒸腾速率同时提高相对含水量(图 4),显著增加了干旱胁迫下不定根根数和根长(图 2A 和 2B)。ABA 降低干旱胁迫下棉花叶片蒸腾速率^[10]、诱导叶表皮的气孔关闭^[11]降低水分散失增强植物的抗旱性,说明 ABA 增强植物的抗旱性通过调节其水分含量。本研究中,CAT 逆转了 ABA 对气孔开度、密度、蒸腾速率和相对含水量的效果(图 4),表明 H₂O₂参与干旱胁迫下黄瓜不定根发生过程中 ABA 对水分平衡的调节。

环境胁迫会对植物细胞质膜造成一定的伤害,生成具有强氧化性的脂质过氧化物和各种小分子的降解物,其中变化最显著的是 MDA,因此 MDA 的浓度是检测植物膜伤害的一个重要指标^[27]。本研究中,干旱胁迫下黄瓜外植体不定根发生过程中的相对电导率和 MDA 含量均升高(图 5),说明干旱胁迫破坏了外植体叶片的膜稳定性。干旱条件下 ABA 处理的相对电导率和 MDA 含量均显著降低,而 CAT 处理清除内源 H₂O₂后逆转了 ABA 的作用效果(图 5),说明内源 H₂O₂参与干旱条件下不定根发生过程中 ABA 对外植体细胞内环境稳定性的维持,进而缓解了干旱胁迫对细胞膜造成的伤害。

干旱胁迫下 H₂O₂通过增加可溶性糖和可溶性蛋白促进万寿菊不定根发生^[3]。本研究中,ABA 处理的脯氨酸、可溶性糖和可溶性蛋白含量显著高于 PEG 单独处理(图 6),说明干旱胁迫下 ABA 促进渗透调节物质的积累。而 CAT 处理逆转了 ABA 的作用效果(图 6),说明在干旱胁迫下内源 H₂O₂有利于 ABA 促进植株体内渗透调节物质的积累。因此,干旱胁迫下 ABA 和 H₂O₂促进不定根发生可能与渗透调节物质脯氨酸、可溶性糖和可溶性蛋白含量的增加有关。POD、PPO 和 IAAO 是分析生根相关的组织形态变化阶段有用的生根相关酶。本研究中 ABA 通过增加 POD、PPO 和 IAAO 活性(图 7)促进干旱条件下不定根发生(图 2A 和 2B),而这些酶活

性被 CAT 抑制(图 7)。 H_2O_2 显著增加菊花插条不定根形成中 POD、PPO 和 IAAO 活性^[15]。 H_2O_2 显著增加低温胁迫下马铃薯的 POD 和 PPO 活性以缓解受到的损伤^[28]。上述结果表明,在逆境条件下 ABA 增加不定根发生中 POD、PPO 和 IAAO 活性。综上所述,在干旱胁迫下不定根发生过程中内源 H_2O_2 可能参与 ABA 增加脯氨酸、可溶性糖和可溶性蛋白含量及 POD、PPO 和 IAAO 活性的增加。

概而言之,本研究提出了内源 H_2O_2 参与干旱条件下 ABA 促进不定根发生的新观点。且内源 H_2O_2 参与 ABA 缓解干旱胁迫对气孔开度和密度、蒸腾速率、相对电导率、MDA、脯氨酸、可溶性糖和可溶性蛋白含量的负作用。因此,干旱条件下不定根形成过程中 ABA 可能通过 H_2O_2 的作用提高自己的信号水平,而关于不定根形成过程中 H_2O_2 参与 ABA 的信号转导网络仍然知之甚少。因此,本研究对了解 H_2O_2 在逆境胁迫下 ABA 的信号途径中的作用有重要意义,但仍需更多的进一步研究去揭示 H_2O_2 参与 ABA 调节植物生长发育的信号调控机理。

参考文献:

- [1] de Klerk G J, van der Krieken W, de Jong J C. The formation of adventitious roots: new concepts, new possibilities[J]. In Vitro Cell Dev-Plant, 1999, 35:189–199.
- [2] Pacurar D I, Perrone I, Bellini C. Auxin is a central player in the hormone cross-talks that control adventitious rooting[J]. Physiol Plantarum, 2014, 151:83–96.
- [3] Liao W B, Huang G B, Yu J H, et al. Nitric oxide and hydrogen peroxide alleviate drought stress in marigold explants and promote its adventitious root development[J]. Plant Physiol Bioch, 2012, 58: 6–15.
- [4] Liao W B, Zhang M L, Huang G B, et al. Ca^{2+} and CaM are involved in NO^- and H_2O_2 -induced adventitious root development in marigold[J]. J Plant Growth Regul, 2012, 31: 253–264.
- [5] Cui W T, Qi F, Zhang Y H, et al. Methane-rich water induces cucumber adventitious rooting through heme oxygenase1/carbon monoxide and Ca^{2+} pathways[J]. Plant Cell Rep, 2015, 34: 435–445.
- [6] Zhu Y C, Liao W B, Wang M, et al. Nitric oxide is required for hydrogen gas-induced adventitious root formation in cucumber[J]. J Plant Physiol, 2016, 195: 50–58.
- [7] Tuteja N. Absciscic acid and abiotic stress signaling[J]. Plant Signal Behav, 2007, 2:135–138.
- [8] Neill S J, Desikan R, Clarke A, et al. Hydrogen peroxide and nitric oxide assignaling in plants[J]. J Exp Bot, 2002, 53:1237–1242.
- [9] Zhu J K, Hasegawa P M, Bressan R A. Molecular aspects of osmotic stress in plants[J]. Crit Rev Plant Sci, 1997, 16:253–277.
- [10] Pandey D M, Goswami C L, Kumar B. Physiological effects of plant hormones in cotton under drought[J]. Biol Plantarum, 2003, 47:535–540.
- [11] Luna C M, Pastori G M, Driscoll S, et al. Drought controls on H_2O_2 accumulation, catalase (CAT) activity and CAT gene expression in

- wheat[J]. J Exp Bot, 2004, 56:417–423.
- [12] Ishibashi Y, Yamaguchi H, Yuasa T, et al. Hydrogen peroxide spraying alleviates drought stress in soybean plants[J]. J Plant Physiol, 2011, 168:1562–1567.
- [13] 廖伟彪, 张美玲. 外源过氧化氢和脱落酸对 3 种萱草抗旱性的影响[J]. 干旱地区农业研究, 2013, 31(3):173–177.
- [14] Liao W B, Xiao H L, Zhang M L. Role and relationship of nitric oxide and hydrogen peroxide in adventitious root development of marigold[J]. Acta Physiol Plant, 2009, 31: 1279–1289.
- [15] Liao W B, Xiao H L, Zhang M L. Effect of nitric oxide and hydrogen peroxide on adventitious root development from cuttings of ground-cover chrysanthemum and associated biochemical changes[J]. J Plant Growth Regul, 2010, 29:338–348.
- [16] Bai X, Todd C D, Desikan R, et al. N–3–oxo–decanoyl–L–homoserine–Lactone activates auxin-induced adventitious root formation via hydrogen peroxide- and nitric oxide-dependent cyclic GMP signaling in mung bean[J]. J Plant Physiol, 2012, 158:725–736.
- [17] Chen C W, Yang Y W, Lur H S, et al. A novel function of abscisic acid in the regulation of rice (*Oryza sativa* L.) root growth and development[J]. Plant Cell Physiol, 2006, 47:1–13.
- [18] Bensmihen S. Hormonal control of lateral root and nodule development in legume[J]. Plants, 2015, 4:523–547.
- [19] Guo D L, Liang J H, Li L. Absciscic acid (ABA) inhibition of lateral root formation involves endogenous ABA biosynthesis in *Arachis hypogaea* L.[J]. J Plant Growth Regul, 2009, 58:173–179.
- [20] Belimov A A., Dodd I C, Safronova V I, et al. Absciscic acid metabolizing rhizobacteria decrease ABA concentrations in planta and alter plant growth[J]. Plant Physiol Bioch, 2014, 74:84–91.
- [21] Li S W, Leng Y, Feng L, et al. Involvement of abscisic acid in regulating antioxidative defense systems and IAA-oxidase activity and improving adventitious rooting in mung bean (*Vigna radiate* (L.) Wilczek) seedlings under cadmium stress[J]. Environ Sci Pollut R, 2013, 21 (1): 525–537.
- [22] Pei Z M, Murata Y, Benning G, et al. Calcium channels activated by hydrogen peroxide mediate abscisic acid signaling in guard cells[J]. Nature, 2000, 406:731–734.
- [23] Aroca R, Vernieri P, Irigoyen J J, et al. Involvement of abscisic acid in leaf and root of maize (*Zea mays* L.) in avoiding chilling-induced water stress[J]. Plant Sci, 2003, 165: 671–679.
- [24] Han Y, Zhang J, Chen X Y, et al. Carbon monoxide alleviates cadmium-induced oxidative damage by modulating glutathione metabolism in the roots of Medicago sativa[J]. New Phytol, 2008, 177 (1): 155–166.
- [25] Storey R, Jones R G W. Betaine and choline levels in plants and their relationship to NaCl stress[J]. Plant Sci Letters, 1975, 4 (3): 161–168.
- [26] Wang S Y, Jiao H J, Faust M. Changes in the activities of catalase, peroxidase, and polyphenol oxidase in apple buds during bud break induced by thidiazuron[J]. J Plant Growth Regul, 1991, 10:33–39.
- [27] 李州, 彭燕, 苏星源. 不同叶型白三叶抗氧化保护及渗透调节生理对干旱胁迫的响应[J]. 草业学报, 2013, 22 (2): 257–263.
- [28] Orabi S A, Dawood M G, Salman S R. Comparative study between the physiological role of hydrogen peroxide and salicylic acid in alleviating the harmful effect of low temperature on tomato plants grown under sand-ponic culture[J]. Sci Agric, 2015, 9:49–59.