

蔡凤香,陈豆豆,杨 飞,等. H_2O_2 对水稻幼苗生长和生理的调节[J]. 江苏农业科学,2016,44(3):74-77.

doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2016.03.019

H_2O_2 对水稻幼苗生长和生理的调节

蔡凤香,陈豆豆,杨 飞,郑 欣,张思韬,赵风云

(山东理工大学生命科学院,山东淄博 255049)

摘要:用水稻 (*Oryza sativa* L.) 中花 11 号分析了 0.06%、0.006%、0.000 6% H_2O_2 处理 5 d 对水稻幼苗生长、 H_2O_2 产生、细胞死亡及生长素积累分布的影响。结果表明,高浓度 H_2O_2 (0.06%) 抑制地上部分和不定根的伸长及不定根上侧根的形成和生长,但对初生根上的侧根生长无明显影响。低浓度 (0.000 6%) H_2O_2 促进初生根和不定根的伸长及其侧根数量增多和长度增加。根尖 H_2O_2 积累和细胞死亡随着 H_2O_2 浓度的增大而增加。利用 DR5-GUS 转基因水稻分析显示高浓度 H_2O_2 促进生长素在根尖的过量积累,本试验条件下 H_2O_2 对生长素积累和分布的调节与其激活转录有关。由此可见,高浓度 H_2O_2 对水稻幼苗生长的抑制作用与其诱导细胞死亡及生长素过度积累有密切关系。

关键词:过氧化氢 (H_2O_2); 生长素; 水稻; 幼苗; 生理调节; 侧根数量; 侧根长度; 根尖细胞

中图分类号:S511.01 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2016)03-0074-04

H_2O_2 是植物体内重要的信号分子,参与调节众多细胞应答过程,包括生长发育、向地性生长和激素信号等^[1]。对 H_2O_2 与根系生长发育的关系研究发现,在正常和胁迫条件下 H_2O_2 都参与根系形态建成的调节。如用不同胁迫处理拟南芥,产生的表型非常相似,暗示有共同的分子-生理系统调节胁迫下的形态应答,推测 H_2O_2 在控制形态建成变化中可能起关键作用^[2]。非胁迫条件下,清除 H_2O_2 促进拟南芥根的伸长但抑制根毛的形成^[3-4]。研究还发现, H_2O_2 既是玉米根细胞壁松弛和伸长生长所必需的^[5],也是水稻根生长所必需的^[6]。 H_2O_2 是黄瓜^[7]和绿豆 [*Mucuna pruriens* (Linn.) DC. var. *utilis*]^[8] 不定根形成和发育的信号分子。这些结果表明, H_2O_2 对调节根系的生长发育可能起关键作用。众所周知,生长素是调节根系生长发育不可缺少的信号分子,它们是根细胞分裂、伸长生长、向地性应答和侧根发育必需的^[9]。研究显示, H_2O_2 与生长素的相互作用对根系的生长发育产生影响。在正常生长条件下,生长素诱导 H_2O_2 的产生是玉米根向地性生长所必需的^[10]。用绿豆研究发现,外源生长素 IBA

诱导 H_2O_2 的过量产生,从而促进不定根的形成^[8]。生长素促进番茄根尖 H_2O_2 积累但抑制根的生长^[11]。对拟南芥研究表明, H_2O_2 代谢的变化可能通过影响生长素的平衡而控制胁迫诱导的形态生长应答^[2]。氧化胁迫抑制拟南芥主根的伸长,但是能促进侧根的形成。在胁迫诱导的生长重新定向过程中, H_2O_2 可能促进生长素驱动的细胞分裂^[2]。这些研究表明, H_2O_2 和生长素之间的相互作用参与了根系生长发育的调节。笔者前期研究发现,Cd 胁迫诱导水稻根系生长的变化与 H_2O_2 的积累有关^[12]。Zn 对 Cd 胁迫水稻根系生长的调节与其减少 H_2O_2 产生并诱导生长素积累和分布的变化有密切关系^[13]。本试验旨在研究非胁迫条件下外源 H_2O_2 调节水稻幼苗生长的生理机制。

1 材料与方法

1.1 材料与处理

挑选籽粒饱满的水稻种子 (品种为中花 11 号),去壳后消毒:75% 乙醇 (30 s)、0.1% 氯化汞 (15 min)、2% 次氯酸钠 (20 min),用无菌水冲洗干净,再将种子植入 MS 培养基上,放入培养箱内 [光周期为 14 h 光照,光照强度为 200 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$,温度 26 $^{\circ}\text{C}$,夜间 10 h,温度 20 $^{\circ}\text{C}$;相对湿度约为 50%~60%] 培养 6 d 后转到 Hoagland 营养液,使其适应 12 h 后进行 H_2O_2 处理:在 Hoagland 营养液中分别添加 0.06%、0.006%、0.000 6% 的 H_2O_2 处理 5 d。每天更换 1 次培养液,每种处理重复 3 次,每次至少 3 个重复,每个重复约 50 株。

收稿日期:2015-01-19

基金项目:山东省自然科学基金 (编号:ZR2014DM010、ZR2015CL009); 山东省淄博市科技发展计划 (编号:111089、113106)。

作者简介:蔡凤香 (1989—),女,山东菏泽人,硕士研究生,主要从事分子生物学研究。

通信作者:赵风云,博士,教授,主要从事分子生物学研究。E-mail: zfy1226@126.com。

[2] 郭景伦,赵久然,王风格,等. 玉米杂交种纯度室内与田间鉴定结果比较研究[J]. 种子世界,2004(7):22-24.

[3] 孟庆长,陈艳萍,杨兴华,等. 利用 SSR 技术鉴定苏玉 20 的纯度[J]. 江苏农业学报,2009,25(3):508-512.

[4] 王建华,田宝华,杨丽维,等. 玉米单粒播种种子质量评价与检测技术手册[M]. 北京:中国农业大学种子科学与技术研究中心,

46-52.

[5] 刘宏魁,闫洪朗,原亚萍. 应用盐溶蛋白电泳和 SSR 分子标记鉴定玉米种子纯度的研究[J]. 安徽农业科学,2011,39(19):11396-11398.

[6] 赵久然. 玉米种子真实性和品种纯度鉴定新方法[J]. 北京农业科学,1999(3):25-40.

1.2 根系生长指标统计

初生根的长度:用尺子测量;初生根上侧根的数量:只统计大于 1 mm 的;初生根上侧根的长度:只测量 5 条最长的。每次重复测 20 株,每种处理统计 60 株。

不定根的数量:只计算大于 1 cm 的;不定根的长度:每株只测量 5 条最长的;不定根上侧根的长度:每株只测量 5 条最长的不定根上的侧根,每条不定根上只测量 5 条最长的侧根;每条不定根上侧根的数量:只统计大于 1 mm 的。每次重复测 20 株,每种处理统计 60 株。

1.3 H_2O_2 的定性和定位测定

利用 DAB 染色法对根尖 H_2O_2 进行定性和定位分析^[14],每种处理至少用 20 株染色。

1.4 细胞完整性的测定

通过 Evans blue 染色法对细胞完整性进行定性测定^[15],每种处理至少染色 20 株。

1.5 根尖生长素分布和积累的测定

以转 *DR5-GUS* 基因水稻为材料,通过 GUS 染色法对根尖生长素的分布和积累进行测定,GUS 染色参考 Petersson 等的方法^[16]进行。转基因水稻种子在 MS 培养基萌发生长 6 d 后转入 Hoagland 营养液使其适应 12 h 后添加 0.06% 的 H_2O_2 ,在上述同样条件下处理 3 h,该处理至少重复 3 次,每次重复至少用 20 株进行 GUS 染色和活性测定。

1.6 H_2O_2 在 RNA 水平对水稻根系生长素分布的影响

将在 MS 固体培养基中培养 6 d 的水稻幼苗转入 Hoagland's 营养液中适应 12 h。在 Hoagland's 营养液中加入 DRB (5,6-dichlorobenzimidazole 1- β -D-ribofuranoside, RNA 合成抑制剂,浓度为 65 μ mol/L) 预处理 2 h 后取出,转入含 0.06% H_2O_2 的 Hoagland's 营养液中,在上述同样条件下处理 3 h。该处理至少重复 3 次,每次重复至少用 20 株进行 GUS 染色和活性测定。

1.7 数据处理

用 SPSS 软件对试验数据进行处理,求出 3 次重复试验的平均值和标准误差。利用单因子方差分析各种处理与对照之间以及 3 种不同处理之间的差异, $P < 0.05$ 代表差异显著。

2 结果与分析

2.1 H_2O_2 对水稻幼苗生长的影响

2.1.1 H_2O_2 对水稻幼苗株高和初生根长度的影响 图 1-A 显示,高浓度 H_2O_2 抑制植株生长,低浓度(0.000 6%) H_2O_2 对植株生长无显著作用。0.06% H_2O_2 处理 5 d 时其幼苗的株高比 CK 的低 24.3%,差异显著($P < 0.05$)。低浓度(0.000 6%) H_2O_2 处理稍微促进初生根的伸长生长,但各浓度 H_2O_2 处理与对照组之间差异不显著($P > 0.05$) (图 1-B)。

2.1.2 H_2O_2 对水稻幼苗初生根上侧根数量和长度的影响 与 CK 相比,低浓度(0.000 6%) H_2O_2 促进初生根上侧根数量的增多和长度的增加($P < 0.05$);高浓度(0.06%) H_2O_2 处理幼苗初生根上侧根的数量和长度与对照组差异不显著(图 2)。

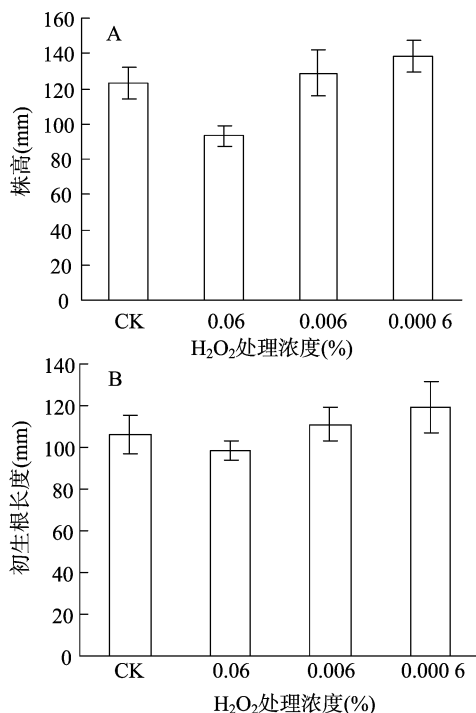


图1 H_2O_2 对水稻幼苗株高(A)和初生根长度(B)的影响

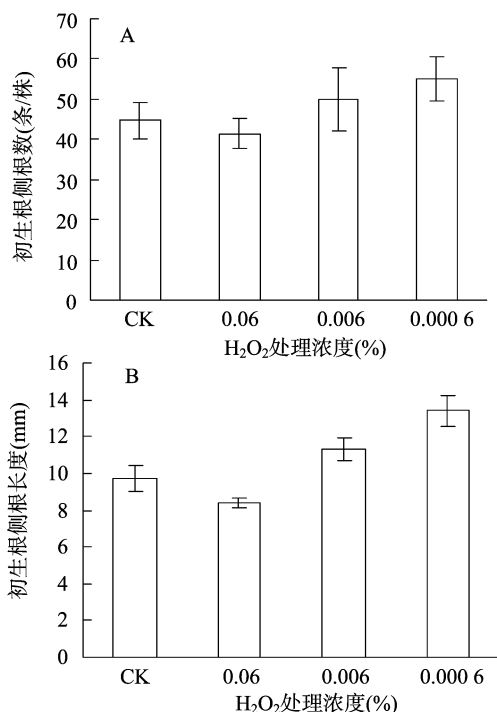


图2 H_2O_2 对水稻幼苗初生根上侧根数量(A)和长度(B)的影响

2.1.3 H_2O_2 对水稻幼苗不定根数量和长度的影响 由图 3-A 可见,3 种浓度的 H_2O_2 处理幼苗的不定根数量与对照组之间无明显差异($P > 0.05$)。高浓度(0.06%) H_2O_2 处理抑制不定根的伸长生长,而低浓度 H_2O_2 则促进不定根的伸长生长,0.000 6% H_2O_2 处理的幼苗不定根比 CK 的长 32% ($P < 0.05$),差异显著(图 3-B)。

2.1.4 H_2O_2 对水稻幼苗不定根上侧根数量和长度的影响

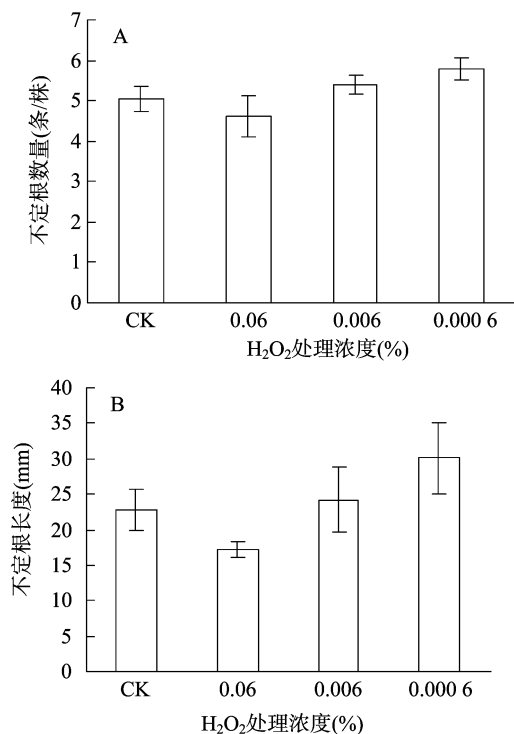


图3 H_2O_2 对水稻幼苗不定根数量(A)和长度(B)的影响

与对照组相比,低浓度(0.000 6%) H_2O_2 促进不定根上侧根数量的增多和长度的增加 ($P < 0.05$);高浓度(0.06%) H_2O_2 处理显著抑制不定根上侧根的形成和生长(图4),该处理条件下不定根上的侧根数比对照组的少 44.1%,差异极显著 ($P < 0.01$)。

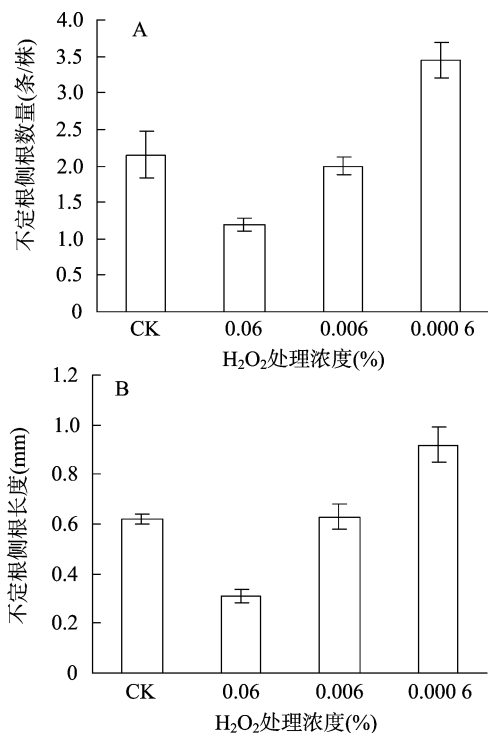


图4 H_2O_2 对水稻幼苗不定根上侧根数量(A)和长度(B)的影响

2.2 H_2O_2 处理对水稻幼苗根系 H_2O_2 积累和分布的影响

如图5所示,不同处理条件下初生根根尖上 H_2O_2 的积累

量存在差异, H_2O_2 产生量由少到多的顺序为 CK < 0.000 6% H_2O_2 < 0.006% H_2O_2 < 0.06% H_2O_2 。 H_2O_2 主要集中在成熟区前端和伸长区,外源 H_2O_2 浓度越高积累面积越大。 H_2O_2 在不定根根尖中的积累变化情况与初生根的类似(数据略)。

2.3 H_2O_2 处理对水稻幼苗根系细胞完整性的影响

细胞完整性是检测氧化胁迫程度的重要指标之一,它与 H_2O_2 的积累有密切关系。为进一步了解外源 H_2O_2 对细胞完整性的影响,试验利用 Evans blue 染色法定性测定了细胞完整性的变化。图6显示,不同浓度 H_2O_2 处理条件下初生根上染色程度和分布面积存在差异,染色由浅到深和面积从小到大的顺序为 CK < 0.000 6% H_2O_2 < 0.006% H_2O_2 < 0.06% H_2O_2 。各种处理中染色深度与 H_2O_2 的积累(图5)基本一致。在不定根根尖中的染色变化情况与初生根的类似(数据略)。

2.4 H_2O_2 对水稻幼苗根系生长素积累和分布的调节

生长素是调节根系生长的重要信号分子之一。为了解 H_2O_2 对水稻幼苗根系生长的调节是否与生长素有关,本试验利用转 DR5 - GUS 转基因水稻对 0.06% H_2O_2 处理幼苗根系生长素的分布和积累进行了测定(图7)。与对照相比, H_2O_2 诱导生长素在整个初生根根尖的积累明显增加,同样条件下不定根中生长素的积累和分布与初生根的类似(数据略)。为了进一步分析 H_2O_2 调节生长素积累分布的机制,对根系分别进行了 DRB (RNA 合成抑制剂)、BFA (蛋白运输抑制剂)、CHX (蛋白合成抑制剂) 和 MG132 (蛋白降解抑制剂) 处理,结果显示 H_2O_2 + DRB 处理的初生根根尖生长素的积累比单一 H_2O_2 处理的明显减少。该处理条件下不定根中生长素积累也显著减少(数据略),但是在 H_2O_2 + BFA/CHX/MG132 处理条件下根尖生长素的积累与单一 H_2O_2 处理的无明显差异,说明本试验条件下 0.06% H_2O_2 诱导生长素的增加与其激活转录有密切关系。

3 讨论

H_2O_2 是植物体内重要的信号分子之一,参与植物生长发育的众多过程^[1-8]。本研究结果表明,高浓度 H_2O_2 抑制水稻幼苗地上部分及不定根的生长,特别对不定根上侧根的形成和生长具有显著的抑制作用,但低浓度的 H_2O_2 促进植物的生长。在本试验中,高浓度 H_2O_2 对水稻幼苗生长的抑制作用可能与其诱导细胞的死亡增加有关。生长素在调节植物根系生长过程中发挥重要作用,但是生长素的过度积累则抑制植物的生长。大量研究显示, H_2O_2 与生长素的相互作用对根系的生长发育产生影响^[2,8,11]。如生长素促进番茄根尖 H_2O_2 的积累但抑制根的生长^[11]。笔者前期研究发现,Cd 胁迫下水稻根系生长的变化与 H_2O_2 的产生和生长素的积累分布有关^[12]。Zn 对 Cd 胁迫水稻根系生长的调节也与其减少 H_2O_2 产生并诱导生长素积累和分布的变化有密切关系^[13]。本试验条件下高浓度(0.06%)的外源 H_2O_2 对水稻幼苗生长的抑制作用可能是由其诱导生长素的过度积累造成的。试验结果表明, H_2O_2 导致的生长素过度积累可能是通过激活转录途径调节的。由此可见, H_2O_2 和生长素互为因果关系,二者的平衡对调节植物的生长具有重要作用。综上所述,适量 H_2O_2 是调节植物生长所必须的。高浓度 H_2O_2 引起细胞死亡和生长素在根尖的过度增加从而抑制植物生长。

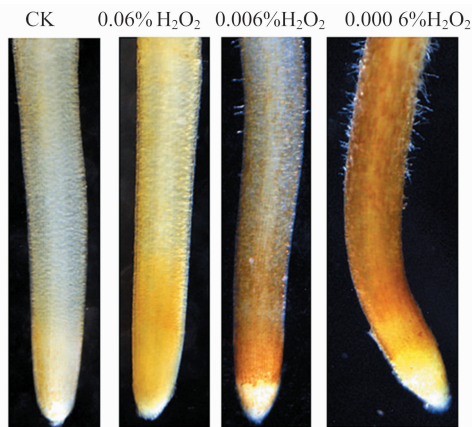


图5 H_2O_2 处理对水稻幼苗初生根根尖 H_2O_2 积累和分布的影响

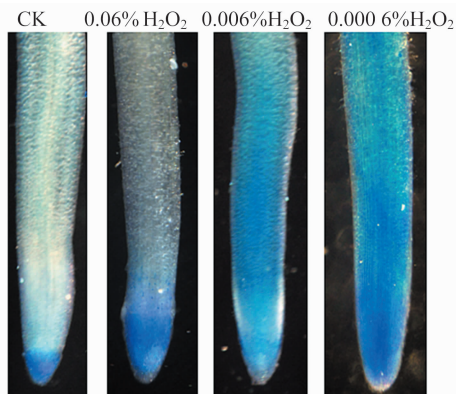


图6 H_2O_2 处理对水稻幼苗初生根根尖细胞死亡的影响

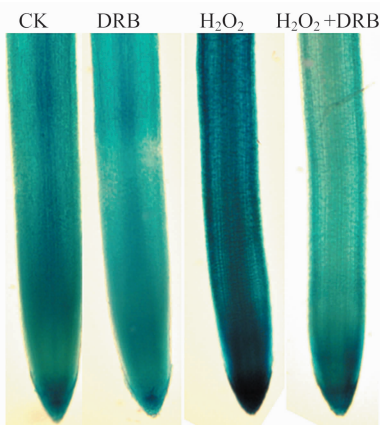


图7 H_2O_2 和 DRB 对初生根根尖生长素积累和分布的影响

参考文献:

- [1] Pasternak T, Potters G, Caubergs R, et al. Complementary interactions between oxidative stress and auxins control plant growth responses at plant, organ, and cellular level[J]. Journal of Experimental Botany, 2005, 56(418): 1991 – 2001.
- [2] Pasternak T, Rudas V, Potters G, et al. Morphogenic effects of abiotic stress; reorientation of growth in *Arabidopsis thaliana* seedlings[J]. Environmental and Experimental Botany, 2005, 53(3): 299 – 314.
- [3] Dunand C, Crèvecoeur M, Penel C. Distribution of superoxide and Hydrogen peroxide in *Arabidopsis* root and their influence on root development; possible interaction with peroxidases[J]. The New Phytologist, 2007, 174(2): 332 – 341.
- [4] Foreman J, Demidchik V, Bothwell J H, et al. Reactive oxygen species produced by NADPH oxidase regulate plant cell growth[J]. Nature, 2003, 422(6930): 442 – 446.
- [5] Liszkay A, Van Der Zalm E, Schopfer P. Production of reactive oxygen intermediates $\text{O}_2^{\cdot-}$, H_2O_2 , and $\cdot\text{OH}$ by maize Roots and their role in wall loosening and elongation growth[J]. Plant Physiology, 2004, 136(2): 3114 – 3123; discussion 3001.
- [6] Kim S G, Kim S T, Kang S Y, et al. Proteomic analysis of reactive oxygen species (ROS) – related proteins in rice Roots[J]. Plant Cell Reports, 2008, 27(2): 363 – 375.
- [7] Li S W, Xue L, Xu S J, et al. Hydrogen peroxide involvement in formation and development of adventitious Roots in cucumber[J]. Plant Growth Regulation, 2007, 52(2): 173 – 180.
- [8] Li S W, Xue L, Xu S J, et al. Hydrogen peroxide acts as a signal molecule in the adventitious root formation of mung bean seedlings[J]. Environmental and Experimental Botany, 2009, 65(1): 63 – 71.
- [9] Joanovic M, Lefebvre V R, Laporte P, et al. How the environment regulates root architecture in dicots[J]. Advances in Botanical Research, 2008, 46: 36 – 74.
- [10] Joo J H, Yoo H J, Hwang I, et al. Auxin – induced reactive oxygen species production requires the activation of phosphatidylinositol 3 – kinase[J]. FEBS Letters, 2005, 579(5): 1243 – 1248.
- [11] Ivanchenko M G, Den Os D, Monshausen G B, et al. Auxin increases the hydrogen peroxide (H_2O_2) concentration in tomato (*Solanum lycopersicum*) root tips while inhibiting root growth[J]. Annals of Botany, 2013, 112(6): 1107 – 1116.
- [12] Zhao F Y, Han M M, Zhang S Y, et al. Hydrogen peroxide – mediated growth of the root system occurs via auxin signaling modification and variations in the expression of cell – cycle genes in rice seedlings exposed to cadmium stress[J]. Journal of Integrative Plant Biology, 2012, 54(12): 991 – 1006.
- [13] 高华健, 王玉祯, 侯丹, 等. 锌调节镉胁迫水稻幼苗根系生长的生理机制[J]. 江苏农业科学, 2013, 41(12): 49 – 52.
- [14] Chen Z H, Feng T T, Liu L Y, et al. Effect of glucose on zinc – induced growth of root system in rice[J]. Agricultural Science and Technology, 2011, 12(9): 1334 – 1337.
- [15] Zhao F Y, Hu F, Zhang S Y, et al. MAPKs regulate root growth by influencing auxin signaling and cell cycle – related gene expression in cadmium – stressed rice[J]. Environmental Science and Pollution Research International, 2013, 20(8): 5449 – 5460.
- [16] Petersson S V, Johansson A I, Kowalczyk M, et al. An auxin gradient and maximum in the *Arabidopsis* root apex shown by high – resolution cell – specific analysis of IAA distribution and synthesis[J]. The Plant Cell, 2009, 21(6): 1659 – 1668.