

蒋景龙. H_2O_2 与生长素对山黧豆初生根发育的影响[J]. 江苏农业科学, 2016, 44(3): 121–123.

doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2016.03.032

H_2O_2 与生长素对山黧豆初生根发育的影响

蒋景龙

(陕西理工学院生物科学与工程学院, 陕西汉中 723001)

摘要:为揭示 H_2O_2 和生长素在山黧豆 [*Lathyrus quinquenervius* (Miq.) Litv.] 初生根发育中的作用, 外源性施加 H_2O_2 或生长素处理山黧豆初生根, 并分析初生根的形态变化, 检测内源 H_2O_2 和生长素水平变化。结果显示: 施加 H_2O_2 阻止了初生根向地性生长而诱导其发生水平方向弯曲; 施加吲哚-3-丁酸 (IBA)、2,4-二氯苯氧乙酸 (2,4-D) 和 α -萘乙酸 (α -NAA) 能够完全抑制由外源 H_2O_2 引起的初生根水平弯曲; 在施加外源 H_2O_2 条件下, 添加生长素的极性运输抑制剂 2,3,5-三碘苯甲酸 (TIBA) 与 1-萘氨甲酰苯甲酸 (NPA), 不能抑制初生根水平弯曲; 外源 H_2O_2 处理降低了初生根内源的吲哚乙酸 (IAA) 和 H_2O_2 水平。研究结果表明, 外源 H_2O_2 影响内源 H_2O_2 与 IAA 水平, 导致初生根的水平弯曲。

关键词: 过氧化氢 (H_2O_2); 初生根; 弯曲; 生长素; 山黧豆

中图分类号: Q945.78 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2016)03-0121-03

过氧化氢 (H_2O_2) 作为一种信号分子在植物的生长发育过程中参与了许多生理活动, 如气孔的运动、细胞壁的木质化、根的向地性生长、侧根的发育、细胞程序化死亡与花粉和柱头的相互作用等^[1]。此外, 当遭受轻度生物或非生物胁迫时, 植物体内产生的 H_2O_2 能够通过参与各种信号转导, 调节植物的代谢 (如光合作用、呼吸作用、蒸腾作用) 和防卫系统 (如抗氧化胁迫的酶系统与非酶系统), 使植物获得生物或非生物胁迫的抗性^[2-3]。因此, H_2O_2 成为当今细胞与分子生物学研究领域的热点, 但大多数研究主要集中在内源 H_2O_2 参与植物的生长发育及对各种环境刺激的应答方面, 而外源 H_2O_2 如何影响植物生长发育方面的研究却鲜有报道^[4]。前期研究发现, 外源 H_2O_2 处理山黧豆 [*Lathyrus quinquenervius* (Miq.) Litv.] 种子能够抑制初生根向地性生长并诱导发生水平方向弯曲。在胚根突破种皮后, 面对的外部环境比较复杂, 种子萌发的后期, 其生长发育会受到一些环境因子如重力、水分、营养及其他化学物质刺激的影响而发生根形态的变化。很多研究表明, 初生根的向地性弯曲生长与生长素的不对称性分布、水平变化和极性运输有关^[5]。当植物根被水平放置时, 根尖会感受到重力的刺激, 然后将这种信号进行转化与传递, 从而影响生长素的极性运输, 最终在伸长区表现出上侧的细胞中生长素浓度较低, 而下侧细胞内的生长素浓度较高, 出现了生长素的局部不对称性分布, 最终表现出在伸长区发生向重力性的弯曲生长^[6-7]。生长素存在独特的运输机

制, 只能在细胞与细胞之间进行极性运输。而这一极性运输的过程又可被其极性运输抑制剂 2,3,5-三碘苯甲酸 (TIBA) 和 1-萘氨甲酰苯甲酸 (NPA) 所抑制。本研究同时用外源的生长素、 H_2O_2 与生长素的极性运输抑制剂组合处理, 检测 H_2O_2 与生长素含量变化来研究 H_2O_2 诱导的初生根水平弯曲与生长素之间的关系。

1 材料与方法

1.1 试验材料

山黧豆种子均由兰州大学细胞活动与逆境适应教育部重点实验室的细胞研究所 302 实验室提供。挑选籽粒饱满、无损坏的定西山黧豆、阿克苏山黧豆和扁莢山黧豆种子, 用自来水冲洗 3 次, 然后将洗净的山黧豆种子分别用不同浓度的 H_2O_2 处理 60 h。 H_2O_2 的浓度分别为 10、20、40 mmol/L。只加蒸馏水而没有加 H_2O_2 的设为对照组, H_2O_2 处理了 60 h 后重新放入到水中培养 24 h 的为恢复组。以上所有的山黧豆种子均水平放置在培养皿的底部, 即胚根的方向与培养皿的底面相平行。

1.2 试验方法

采用 H_2O_2 与生长素、 H_2O_2 与生长素极性运输抑制剂的组合处理。

吲哚乙酸 (IAA) 在空气中容易氧化, 选择吲哚-3-丁酸 (IBA) 代替 IAA。另外, 2,4-二氯苯氧乙酸 (2,4-D) 和 α -萘乙酸 (α -NAA) 均是生长素的类似物。TIBA、NPA 均为生长素的极性运输抑制剂, 其中只加外源 H_2O_2 的组作为对照。

1.3 H_2O_2 与 IAA 的含量检测方法

H_2O_2 与 IAA 的含量检测分别参照 Jiao 等的方法^[8] 和 Dobrev 等的方法^[9]。

1.4 数据处理

试验数据采用 Origin 7.5 SR1 和 SPSS 16.0 软件进行制图和统计分析。

收稿日期: 2015-08-04

基金项目: 陕西省自然科学基金研究计划 (编号: 2014JQ3113); 陕西省教育厅自然科学研究项目 (编号: 14JK1158); 陕西理工学院科研基金 (编号: SLGKY15-41)。

作者简介: 蒋景龙 (1980—), 男, 山东枣庄人, 博士, 讲师, 硕士生导师, 主要从事逆境植物学方面的研究。E-mail: jiangjinglong511@163.com。

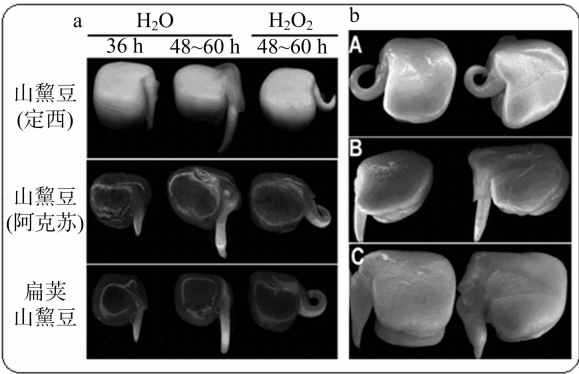
2 结果与分析

2.1 外源 H₂O₂ 抑制向地性生长并诱导初生根的水平弯曲

由图 1-a 所示,将定西山黧豆、阿克苏山黧豆和扁荚山黧豆种子水平放置在盛有少许蒸馏水的培养皿中萌发,36 h 后胚根突破种皮,由于重力的作用,48~60 h 初生根开始沿着重力的方向发生向地性弯曲。将这些种子同样水平放置在盛有不同浓度 H₂O₂ 的培养皿中,它们的初生根则不会发生正常的向地性弯曲,而沿着水平方向发生弯曲(图 1-a)。这种弯曲的方式不同于向地性弯曲,其弯曲的方向与向地性弯曲相互垂直,因此称为水平弯曲。仅施加 H₂O₂ 的初生根会发生水平弯曲(图 1-b-A);当同时施加 IBA 和 H₂O₂ 或 2,4-D 和 H₂O₂ 时,初生根既没有发生水平弯曲也没有发生向地性弯曲(图 1-b-B);当同时施加 α-NAA 和 H₂O₂ 时,水平弯曲生长被完全逆转且在胚轴的部位与对照组相比还明显地发生了加粗生长(图 1-b-C)。

2.2 H₂O₂ 与生长素、H₂O₂ 与生长素抑制剂处理对根水平弯曲的影响

IBA 抑制初生根水平弯曲存在着剂量关系,即 IBA 的浓度越高,抑制水平弯曲的作用就越明显,低于最低浓度阈值,IBA 不能抑制初生根的水平弯曲(表 1)。当 IBA 的浓度为 $1.0 \times 10^{-3} \sim 1.0 \times 10^{-2}$ μmol/L 时,初生根的弯曲率达 79.97% 以上,表明低浓度的 IBA 对初生根的水平弯曲率的抑制效果不明显;但当 IBA 的浓度超过 1.0 μmol/L 时,初生根的水平弯曲率仅为 17.77%。这些数据表明,施加的 IBA 浓度越高,抑制作用越明显。在一些有生长素参与的植物生长发育中,如果用生长素的特异性极性运输抑制剂如 TIBA、NPA 处理,会抑制一些正常的生长发育,例如植物根的向地



a—H₂O、H₂O₂处理;b—H₂O₂与生长素配合处理;
A—H₂O₂处理;B—H₂O₂+IBA处理或H₂O₂+2,4-D处理;
C—H₂O₂+α-NAA处理

图1 外源 H₂O₂、生长素对山黧豆初生根发育的影响

性生长。在本试验中,同时施加 2 种生长素的极性运输抑制剂 TIBA 或 NPA 与 H₂O₂ 进行处理,结果发现用 5~50 μmol/L TIBA 或 NPA 处理,均不能抑制由 H₂O₂ 诱导的初生根的水平弯曲。

2.3 外源 H₂O₂ 处理影响了初生根内源 H₂O₂ 和生长素水平

通过双酶法对初生根内的 H₂O₂ 含量进行检测,结果如图 2 所示。对照组初生根内的 H₂O₂ 含量为 0.85 μmol/g,而经 H₂O₂ 处理后初生根内的 H₂O₂ 含量明显低于对照组,但 10、20、40 mmol/L H₂O₂ 处理组之间并没有显著性的差异。将处理了 60 h 的山黧豆幼苗重新放回水中恢复 24 h 后,内源 H₂O₂ 水平再次升高,但仍低于对照组中的 H₂O₂ 含量(图 3),这表明外源施加 H₂O₂ 处理降低了内源的 H₂O₂ 积累。

表 1 H₂O₂ 与生长素、H₂O₂ 与生长素抑制剂处理对根水平弯曲率的影响

IBA 浓度 (μmol/L)	H ₂ O ₂ 浓度 (mmol/L)	弯曲率 (%)	TIBA 浓度 (μmol/L)	H ₂ O ₂ 浓度 (mmol/L)	弯曲率 (%)	NPA 浓度 (μmol/L)	H ₂ O ₂ 浓度 (mmol/L)	弯曲率 (%)
0	40	95.53 ± 0.2a	0	20	95.42 ± 6.2a	0	20	95.42 ± 6.2a
1.0×10^{-3}	40	95.53 ± 0.2a	5	20	93.77 ± 7.3a	5	20	94.47 ± 7.8a
1.0×10^{-2}	40	79.97 ± 0.7b	10	20	92.12 ± 5.6a	10	20	95.56 ± 8.6a
1.0×10^{-1}	40	42.20 ± 0.60c	25	20	89.97 ± 8.7a	25	20	94.47 ± 8.8a
1.0	40	17.77 ± 0.3d	50	20	94.53 ± 9.2a	50	20	95.56 ± 9.6a
2.5	40	15.56 ± 0.6e						
5.0	40	4.47 ± 0.80f						

注:表中数据为 3 个重复的“平均值±标准误差”。同列数据后不同小写字母表示差异显著 ($P < 0.05$)。

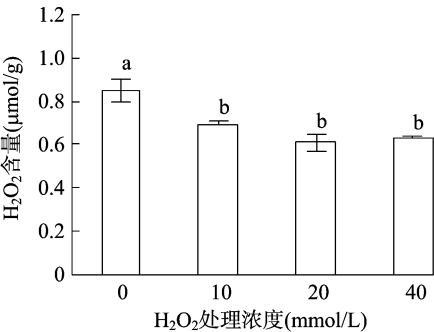


图2 外源 H₂O₂ 处理组的山黧豆初生根内源 H₂O₂ 鲜质量含量

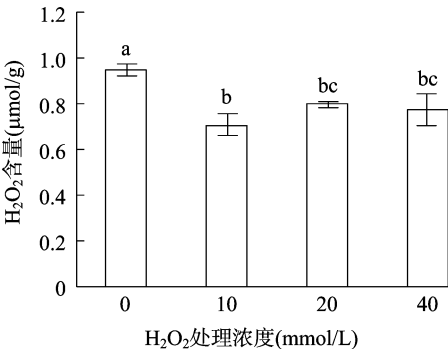


图3 外源 H₂O₂ 处理后恢复 24 h 的山黧豆初生根中内源 H₂O₂ 鲜质量含量

同时通过高效液相色谱方法检测初生根内的 IAA 水平。结果显示,对照组初生根的生长素鲜质量含量达到了 $1.6 \mu\text{g/g}$,而 $20 \text{ mmol/L H}_2\text{O}_2$ 处理 60 h 的初生根中的生长素含量不足 $1.2 \mu\text{g/g}$,降低了大约 25% (图 4),这表明施加外源 H_2O_2 后,初生根内源的生长素水平显著降低。

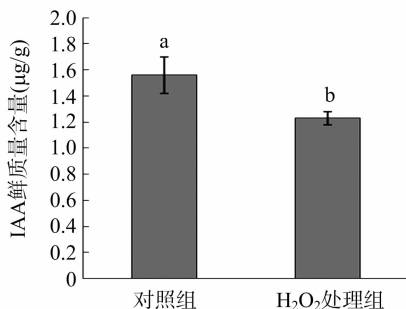


图4 外源 H_2O_2 处理对初生根内源 IAA 水平的影响

3 结论与讨论

过氧化氢作为一种信号分子在植物体内发挥了许多重要作用,近几年越来越多的研究者开始选择通过施加外源性的 H_2O_2 处理植物的方法来研究其对植物生长发育的影响^[10-11]。外源 H_2O_2 能够促进大麦、百日草、菠菜、豌豆、樟脑等种子的萌发^[12]。外部环境因子能影响植物根的形态和结构,而植物的根也能在最初感受刺激后作出相应的应答^[13]。在面对各种环境刺激后,植物的根系能够表现出一种不对称的生长模式,例如卷曲、弯曲、螺旋、波浪、倾斜等^[14]。Li 等的研究表明,施加外源 H_2O_2 能与生长素相互作用诱导黄瓜、绿豆的不定根生长^[15-16]。Joo 等在玉米初生根的向地性生长研究中发现,活性氧(主要是 H_2O_2) 在生长素的下游参与了向地性应答的信号转导^[17]。本研究结果显示,外源性施加 H_2O_2 不仅阻止了山豆初生根的向地性生长,还引起了初生根在水平方向上发生形态学的弯曲现象。初生根的弯曲一般由根两侧的细胞伸长速率差异引起,而这种差异又往往与生长素的分布和极性运输有关。当同时施加一定浓度的 H_2O_2 、生长素的类似物如 IBA, 2,4-D 或 α -NAA 时,这种水平弯曲明显地被抑制,而且随着生长素类似物浓度的提高,几乎可以完全抑制这种由 H_2O_2 引起的水平弯曲。外源的 H_2O_2 降低了内源生长素的水平,而这可能更有利于植物根细胞两侧形成不对称的生长素分布,从而导致水平弯曲的发生。至于是否促进了生长素的不对称性分布,如何促进根两侧细胞形成生长素的不对称性分布等问题,还需要通过对初生根局部区域生长素进行定位研究。

参考文献:

[1] Jiang J L, Su M, Wang L Y, et al. Exogenous Hydrogen peroxide reversibly inhibits root gravitropism and induces horizontal curvature of

primary root during grass pea germination[J]. Plant Physiology and Biochemistry, 2012, 53(4): 84-93.

[2] 李师翁, 薛林贵, 冯虎元, 等. 植物中的 H_2O_2 信号及其功能[J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2007, 23(10): 804-810.

[3] 林植芳, 刘楠. 活性氧调控植物生长发育的研究进展[J]. 植物学报, 2012, 47(1): 74-86.

[4] 刘会杰, 李胜, 马绍英, 等. H_2O_2 胁迫下豌豆初生根及抗氧化酶系统对外源 Ca^{2+} 的响应[J]. 草业学报, 2014, 23(6): 189-197.

[5] Santisree P, Nongmaithem S, Vasuki H, et al. Tomato root penetration in soil requires a coaction between ethylene and auxin signaling[J]. Plant Physiology, 2011, 156(3): 1424-1438.

[6] 李俊华, 种康. 植物生长素极性运输调控机理的研究进展[J]. 植物学通报, 2006, 23(5): 466-477.

[7] 翟开恩, 潘伟槐, 叶晓帆, 等. 高等植物局部生长素合成的生物学功能及其调控机制[J]. 植物学报, 2015, 50(2): 149-158.

[8] Jiao C J, Jiang J L, Li C, et al. β -ODAP accumulation could be related to low levels of superoxide anion and hydrogen peroxide in lathyrus sativus L[J]. Food and Chemical Toxicology, 2011, 49(3): 556-562.

[9] Dobrev P I, Kamínek M. Fast and efficient separation of cytokinins from auxin and abscisic acid and their purification using mixed-mode solid-phase extraction[J]. Journal of Chromatography A, 2002, 950(1/2): 21-29.

[10] Ishibashi Y, Yamaguchi H, Yuasa T A, et al. Hydrogen peroxide spraying alleviates drought stress in soybean plants[J]. Journal of Plant Physiology, 2011, 168(13): 1562-1567.

[11] Zhang X L, Jia X F, Yu B, et al. Exogenous hydrogen peroxide influences antioxidant enzyme activity and lipid peroxidation in cucumber leaves at low light[J]. Scientia Horticulturae, 2011, 129(4): 656-662.

[12] Barba-Espin G, Diaz-Vivancos P, Clemente-Moreno M J, et al. Interaction between hydrogen peroxide and plant hormones during germination and the early growth of pea seedlings[J]. Plant, Cell & Environment, 2010, 33(6): 981-994.

[13] Malamy J E. Intrinsic and environmental response pathways that regulate root system architecture[J]. Plant, Cell & Environment, 2005, 28(1): 67-77.

[14] Noriega A, Cervantes E, Tocino A. Ethylene responses in *Arabidopsis* seedlings include the reduction of curvature values in the root cap[J]. Journal of Plant Physiology, 2008, 165(9): 960-966.

[15] 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.

[16] 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.

[17] Joo J H, Bae Y S, Lee J S. Role of auxin-induced reactive oxygen species in root gravitropism[J]. Plant Physiology, 2001, 126(3): 1055-1060.