

外源 ABA 提高星油藤幼苗抗冷害能力的探讨*

罗银玲¹, 苏志龙¹, 崔现亮¹, 李孙洋¹, 兰芹英²

(1. 普洱学院 生命科学系, 云南 普洱 665000;

2. 中国科学院 西双版纳热带植物园 热带森林生态重点实验室, 云南 勐腊 666303)

摘要: 星油藤是热带经济作物, 对冷害比较敏感. 研究通过不同浓度 ABA 叶面喷施探讨外源 ABA 能否提高星油藤幼苗的抗冷害能力. 在幼苗叶面喷施水或 2、5、10 $\mu\text{mol/L}$ 和 50 $\mu\text{mol/L}$ 的 ABA 溶液后, 放在 4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下 2 d 进行冷害处理. 冷害处理导致喷施水的幼苗冷害等级提高, 而 2~50 $\mu\text{mol/L}$ ABA 溶液处理的幼苗冷害等级相对较低. 冷害导致幼苗叶片中的脂质过氧化水平、超氧阴离子的生成速率及过氧化氢含量提高; 而 ABA 处理降低了它们提高的水平. 冷害导致叶片中抗氧化酶活性降低, ABA 处理可增强超氧化物歧化酶、过氧化氢酶、和愈创木酚过氧化物酶、谷胱甘肽还原酶与脱氢抗坏血酸还原酶的活性; 抗坏血酸过氧化物酶活性在 ABA 预处理后无显著变化. 这些结果表明 ABA 可通过诱导星油藤的抗氧化酶活性来提高星油藤幼苗的冷害抗性. 10 $\mu\text{mol/L}$ 以下的 ABA 溶液处理能达到提高抗冷害能力的目的.

关键词: 脱落酸; 冷害; 抗氧化系统; 星油藤

中图分类号: S 565 **文献标志码:** A **文章编号:** 0258-7971(2014)06-0936-06

很多环境因子如光照、降水、温度、养分等影响甚至决定植物的生存与繁殖. 合适的生长条件有利于植物生存, 但由于多种原因, 植物常面临多种胁迫, 如干旱、低温、盐胁迫、热胁迫等, 其中低温胁迫可进一步分为冷害与冻害. 冷害是零上低温导致的, 冻害是零下低温引起的. 对热带与亚热带起源的植物来说, 冷害是它们正常生长的一个潜在威胁^[1]. 当植物遭遇冷害时, 会表现出诸如花青素积累、矮化、萎蔫及叶片畸形等特征^[2-4]. 如果在生殖繁殖阶段发生严重冷害最终会导致减产^[5]. 为了减少冷害胁迫, 很多化学试剂通过多种方式应用于植物, 如叶片喷施、浸种等. 脱落酸(abscisic acid, ABA)被认为在植物逆境胁迫中起重要作用^[6-7].

星油藤(*Plukenetia volubilis* L.) 是大戟科(Euphorbiaceae) 南美油藤属(*Plukenetia*) 植物. 种子富含多种营养, 包括亚油酸($\omega-6$) 和亚麻酸($\omega-3$). 这些 $\omega-6$ 与 $\omega-3$ 的脂肪酸有益于人类健康, 可提高抗心血管疾病的能力^[8]. 星油藤在 2006 年被引进到中国

科学院西双版纳热带植物园. 由于应用前景广泛, 西双版纳州政府决定大力发展星油藤产业. 但星油藤原产于秘鲁亚马逊雨林, 而在西双版纳地区, 很多年份冬天的最低气温低于 10 $^{\circ}\text{C}$ ^[9], 如 1963—1965, 1999—2000 等. 因此提高星油藤植株、特别是幼苗的冷害抗性对发展星油藤产业非常重要.

由于 ABA 对抗氧化系统的影响^[6-7], 我们认为 ABA 处理可能通过诱导抗氧化能力的增强来提高星油藤幼苗的冷害抗性. 因此本文主要研究叶面喷施不同浓度 ABA 溶液对星油藤幼苗抗冷害的影响, 测定了星油藤幼苗冷害胁迫后 2 种活性氧的产生情况、丙二醛(MDA) 含量以及 6 种抗氧化酶的活性, 期望为 ABA 处理提高星油藤的冷害抗性提供理论依据.

1 材料与方法

1.1 供试材料 供试材料星油藤的种子于 2012 年 9 月采自中国科学院西双版纳热带植物园, 清洗晾干后运输到普洱学院, 种在装满腐殖土的盆内

* 收稿日期: 2014-02-17

基金资助: 中国科学院知识创新工程重要方向项目(KSCX2-EW-Z-15); 国家自然科学基金(31360059).

作者简介: 罗银玲(1978-), 女, 河南人, 博士, 副教授, 主要从事植物生理生态学与种子生物学研究. E-mail: luoyl1978@foxmail.com.

通信作者: 兰芹英(1966-), 女, 云南人, 主要从事种子生物学研究. E-mail: lqy@xtbg.org.cn.

(直径 15 cm×高度 15 cm). 种子萌发后,每盆留 1 株幼苗,放置在相对湿度 71.1%±4.1% 的温室内,室内最高气温、平均气温与最低气温分别为(26.32±1.71)、(21.65±3.76)℃和(17.98±0.87)℃. 每隔 1 d 用喷壶给每株星油藤幼苗浇水 500 mL. 当幼苗长至 5~6 对叶子时,开始对幼苗进行处理,处理方式见表 1. 用水(对照)或不同浓度的 ABA 溶液(2.5、10 μmol/L 与 50 μmol/L)叶面喷施星油藤幼苗,每个浓度处理 6 株幼苗. 早上 8 点第 1 次喷施后,于次日早上 8 点进行第 2 次叶面喷施,并在第 2 次喷施后给幼苗浇水. 第 3 天开始把植株放入 4℃光照培养箱中进行冷害处理. 处理 2 d 后,剪取 3 株幼苗的第 3 对叶子,在-20℃冰箱保存用来测定各种生理生化参数;其他 3 株幼苗移到温室内,常规浇水,1 周后通过记录叶片与茎尖的特征来评价冷害等级. 喷施水但未进行冷害处理的幼苗记作对照 1(CK1),喷施水且进行冷害处理的幼苗记作对照 2(CK2).

表 1 ABA 处理对星油藤幼苗抗冷害的实验设计

Fig. 1 The experiment design of exogenous abscisic acid on improving chilling reference of sachal inchi seedling

处理	因素		幼苗株数
	因素 1 冷害	因素 2 ABA 浓度/(μmol/L)	
CK1	无	0	6
CK2	4℃ 2 d	0	6
1	4℃ 2 d	2	6
2	4℃ 2 d	5	6
3	4℃ 2 d	10	6
4	4℃ 2 d	50	6

1.2 外部形态观察及冷害分级 在温室恢复 1 周后观察植株的冷害情况,记录外部形态的变化及受害叶片数,冷害分级参照 Korkmaz 等^[10]的标准进行. 1 级:叶片正常,未受伤害;2 级:仅少数叶片有轻度坏死斑点,面积小于叶面总面积的 5%;3 级:25% 以下的叶片萎蔫,茎上有坏死斑点;4 级:半数以上的叶片萎蔫死亡;5 级:植株全部死亡.

1.3 生理指标测定 $\cdot O_2^-$ 生成速率按照李忠光与龚明的方法进行^[11]. 过氧化氢的测定按照 Patterson 等^[12]的方法进行. 丙二醛(malondialde-

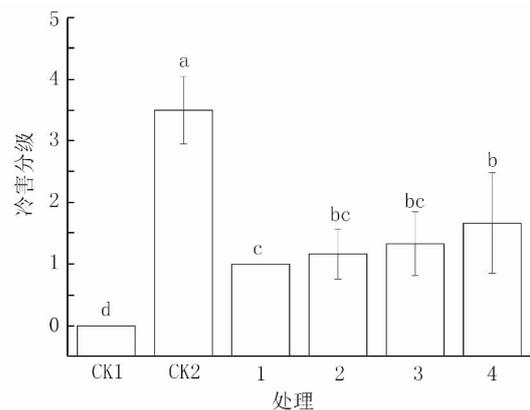
hyde, MDA) 含量的测定按照 Luo 等^[13]的方法进行. $\cdot O_2^-$ 生成速率, H_2O_2 与 MDA 含量均以干重为基础表示.

超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、过氧化氢酶(catalase, CAT)、抗坏血酸过氧化物酶(ascorbate peroxidase, APX)、谷胱甘肽还原酶(glutathione reductase, GR)与脱氢抗坏血酸还原酶(dehydroascorbate reductase, DHAR)按照 Luo 等^[13]的方法进行. 愈创木酚过氧化物酶(guaiacol peroxidase, GPOX)的测定按照 Cia 等^[14]的方法进行. 酶活性以蛋白含量为基础表示,蛋白含量参照 Bradford^[15]的方法进行测定.

1.4 数据处理与分析 数据统计分析用 R 软件(R i386 3.0.1)进行. 采用方差分析来检验不同浓度 ABA 处理对各种参数的差异显著性,并用 HSD 检验进行了多重比较分析.

2 结果

2.1 ABA 对低温胁迫下星油藤幼苗外部形态变化的影响 由图 1 可见,CK1 的冷害程度显著低于其它处理,CK2 的冷害程度显著高于其它处理,喷施 ABA 的冷害程度介于 CK1 与 CK2 之间. 其中,处理 1 的冷害程度显著低于处理 4,处理 2、处理 3 的冷害程度与处理 1、处理 4 差异不显著. 由此表明低温(4℃)导致星油藤幼苗冷害,而喷施 ABA 可减轻冷害,浓度以 10 μmol/L 以下效果最好.



具体处理情况见表 1, 下图同.

图 1 ABA 预处理对星油藤幼苗冷害的影响(不同字母表示在不同处理之间差异显著)

Fig. 1 Effect of ABA pretreatment on injury value of sachal inchi seedlings subjected to chilling stress (Different letters on graph showed significant different between two treatments)

2.2 ABA对低温胁迫下星油藤幼苗中 $\cdot\text{O}_2^-$ 生成速率与 H_2O_2 含量的影响 由图2A可见,CK1的 $\cdot\text{O}_2^-$ 生成速率显著低于CK2,CK2的 $\cdot\text{O}_2^-$ 生成速率显著高于其它处理,喷施ABA后, $\cdot\text{O}_2^-$ 生成速率显著低于CK2.其中,处理1,2,3与4之间, $\cdot\text{O}_2^-$ 生成速率存在显著差异,处理4的最高,处理2的次之,处理3与处理1的最低,处理3的 $\cdot\text{O}_2^-$ 生成速率与CK1无显著差异,而处理1显著低于CK1.由此表明低温导致星油藤幼苗的 $\cdot\text{O}_2^-$ 生成速率增加,而喷施ABA可降低 $\cdot\text{O}_2^-$ 生成速率,浓度以 $2\ \mu\text{mol/L}$ 最好.

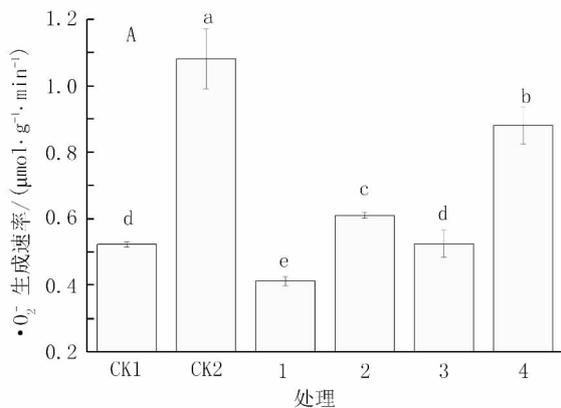


图2 ABA对冷害胁迫的星油藤幼苗的 $\cdot\text{O}_2^-$ 生成速率与 H_2O_2 含量的影响(不同字母表示在不同处理之间差异显著)

Fig. 2 Effect of ABA on production rate of $\cdot\text{O}_2^-$ and H_2O_2 content of sachalin seedlings subjected to chilling stress(Different letters on graph showed significant different between two treatments)

ABA后,MDA含量显著低于CK2,但与CK1差异不显著.不同浓度ABA处理之间,MDA含量差异不显著.由此表明低温导致星油藤幼苗的MDA含量显著增加,而喷施ABA可降低MDA含量.

2.4 ABA对低温胁迫下星油藤幼苗抗氧化酶活性的影响 从图4可见,CK1的6种抗氧化酶(SOD、GPOX、CAT、APX、GR与DHAR)的活性均显著高于CK2,但不同浓度ABA处理引起的酶的活性变化不同.SOD的活性在ABA处理后显著高于CK2,且各个浓度之间有显著差异,处理2的活性最高,处理4次之,处理1活性最低.ABA处理后GPOX的活性介于CK1与CK2之间,其中处理1活性最高,处理2与处理3显著低于处理1,处理4的活性最低.处理1与处理2的CAT活性显著高于CK2,而处理3与处理4的CAT活性显著低于CK2.ABA处理后,APX的活性与CK2的无显著差异.处理3的GR活性显著高于处理1、处理2、处理

由图2B可见CK1的 H_2O_2 含量显著低于CK2,CK2的 H_2O_2 含量显著高于其它处理(处理4例外).喷施ABA后, H_2O_2 含量除处理4外均显著低于CK2.其中,处理1与处理2的 H_2O_2 含量显著低于处理4,处理3的 H_2O_2 含量与处理1、处理2、处理4的差异不显著.由此表明低温导致星油藤幼苗的 H_2O_2 含量增加,而喷施ABA可降低 H_2O_2 含量,浓度以 $10\ \mu\text{mol/L}$ 以下最好.

2.3 ABA对低温胁迫下星油藤幼苗MDA的影响 由图3可以看出CK1的MDA含量显著低于CK2,CK2的MDA含量显著高于其它处理.喷施

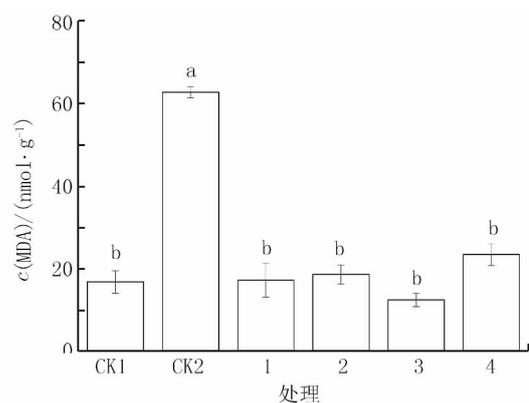
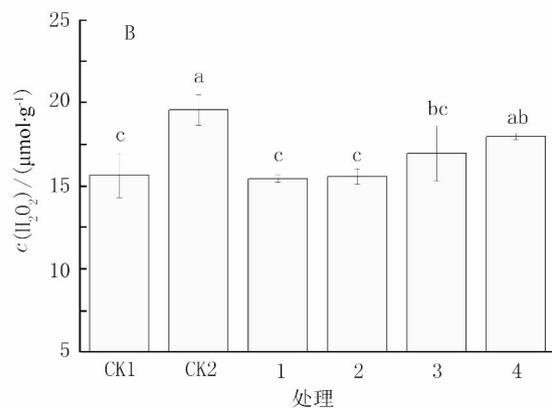


图3 ABA对冷害胁迫的星油藤幼苗的MDA含量的影响(不同字母表示在不同处理之间差异显著)

Fig. 3 Effect of ABA on MDA content of sachalin seedlings subjected to chilling stress(Different letters on graph showed significant different between two treatments)

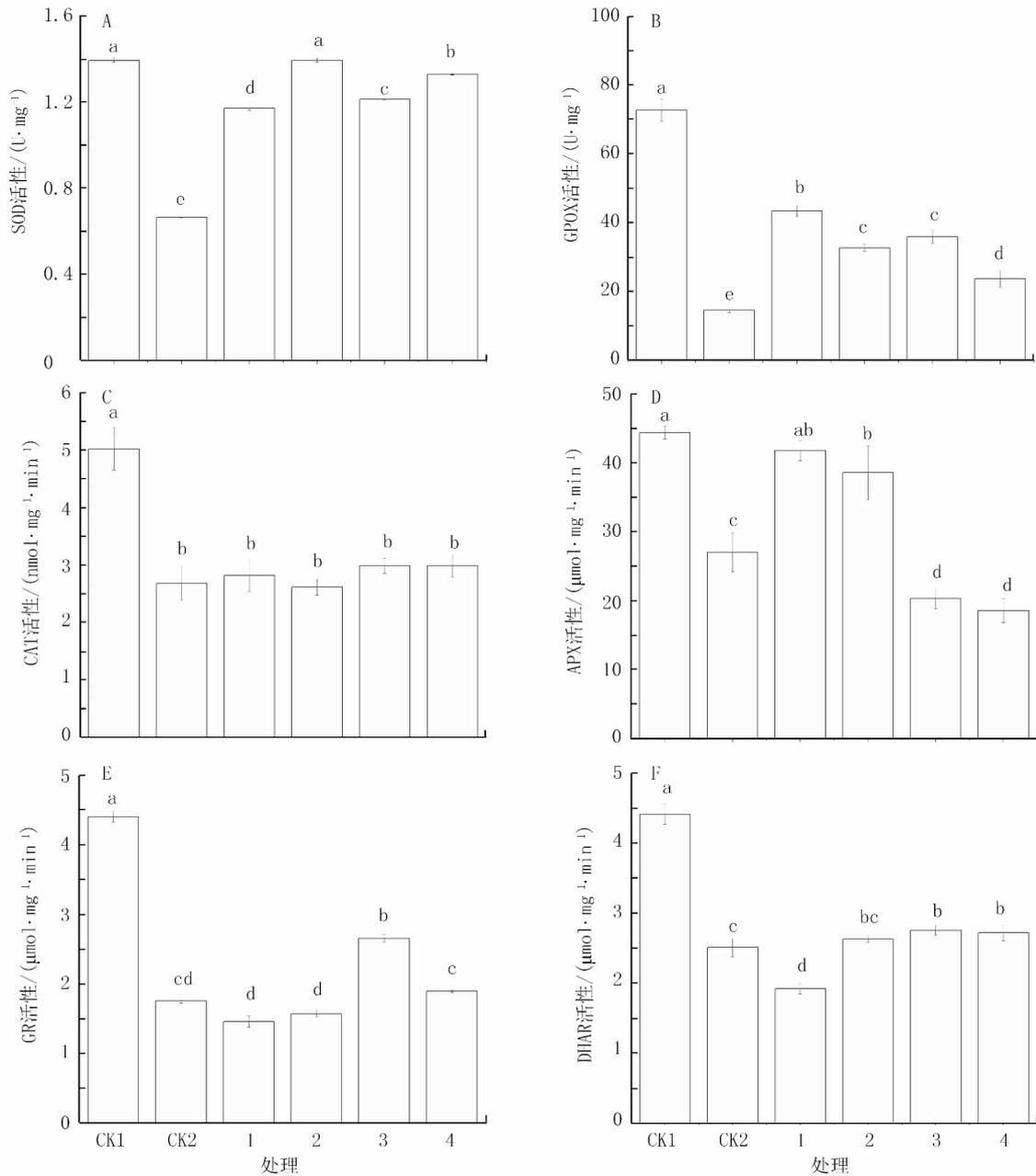


图 4 ABA 对冷害胁迫的星油藤幼苗的抗氧化酶活性的影响(不同字母表示在不同处理之间差异显著)

Fig. 4 Effect of ABA on activities of antioxidant enzymes of sacha inchi seedlings subjected to chilling stress(Different letters on graph showed significant different between two treatments)

4 与 CK2, 而 CK2 与处理 1、2、4 之间无显著差异. DHAR 的活性在处理 1 中最低, 显著低于其他 3 个浓度处理与 CK2; 处理 3 与处理 4 的 DHAR 活性显著高于 CK2, 但与处理 2 无显著差异. 可见, 冷害降低了星油藤的抗氧化酶活性, ABA 处理后酶的活性可以增强, 但导致不同的酶活性增强的浓度并不一致.

3 讨论

植物在遭遇冷害胁迫后, 生理生化活动在一定程度上受到影响, 从而导致外部形态发生变化. 从星油藤的研究结果可以看出, 冷害胁迫可引起其叶片部分坏死, 而 ABA 预处理可显著减轻冷害导致的形态伤害. 其他学者的研究结果也表明 ABA 预处理可以提高植株的冷害抗性^[2-3, 16-17]. 香蕉、茶树

幼苗在 ABA 处理后冷害,植株冷害症状较未用 ABA 处理的轻^[2-3]。

ABA 预处理引起的这种冷害抗性的增加,与植株的抗氧化能力增强有关。ABA 叶面喷施咖啡幼苗后,幼苗中的 MDA 含量降低^[2,7,16-17],这表明 ABA 导致幼苗的脂质过氧化程度降低,从而使细胞膜的完整性在 ABA 处理的材料中较高,表现在 ABA 处理降低了植株的电导率^[3,7,16-17]。星油藤幼苗在冷害胁迫后, $\cdot O_2^-$ 生成速率增加、 H_2O_2 含量增高,从而导致 MDA 含量提高;而 ABA 处理降低了 $\cdot O_2^-$ 生成速率与 H_2O_2 含量,从而减少了这些活性氧对细胞质膜的伤害,降低了脂质过氧化水平,因此可有效提高幼苗的冷害抗性。

在逆境条件下,植株内产生的活性氧可作为信号诱导抗氧化能力的增强^[18]。星油藤幼苗在冷害胁迫后, $\cdot O_2^-$ 与 H_2O_2 都增加,但是在测定的 6 种抗氧化酶中,酶的活性都因冷害降低。这些抗氧化酶活性的降低一方面说明酶在低温胁迫下结构受到破坏,另一方面也说明活性氧的积累并未诱导大量的抗氧化酶表达,也从一个侧面反应了星油藤不耐低温的原因。ABA 预处理后,各种抗氧化酶活性增强,说明 ABA 诱导了抗氧化酶的表达,从而能提高星油藤的抗冷害能力。此外,在 ABA 处理后,参与抗坏血酸-谷胱甘肽循环的 3 种抗氧化酶 (APX, GR 与 DHAR) 相对于直接清除活性氧的 3 种酶 (SOD、CAT、GPOX) 活性的增加幅度较小,因此,抗坏血酸-谷胱甘肽循环在 ABA 引起的冷害抗性增加中,可能起的作用较小。

星油藤作为一种有较大经济潜力的植物,在中国的种植与相关产业的发展刚开始起步。如何提高它适应不同逆境条件的能力,是亟待解决的问题。TIAN 等^[19]发现接种丛枝菌根真菌可以提高星油藤幼苗的耐旱性,我们的研究发现,ABA 预处理可提高它的冷害抗性,但是其他更经济、更快捷、更易操作的能提高它的抗逆性的方法需要更多研究去发现。

致谢:感谢中国科学院西双版纳热带植物园范永立博士帮助进行统计分析。感谢潘耕耘老师和李加瑞、周学、白海龙、常绍贵、罗娘中同学对实验提供的帮助。

参考文献:

[1] THAKUR P, KUMAR S, MALIK J A, et al. Cold stress

effects on reproductive development in grain crops: an overview [J]. *Environmental and Experimental Botany*, 2010, 67(3): 429-443.

[2] 刘德兵, 魏军亚, 崔百明, 等. 脱落酸对香蕉幼苗抗寒性的影响 [J]. *热带作物学报* 2007, 28(2): 1-4.

LIU D B, WEI J Y, CUI B M, et al. Effects of ABA on cold resistance of banana seedlings [J]. *Chinese Journal of Tropical Crops* 2007, 28(2): 1-4.

[3] 张楠, 洪永聪, 王玉, 等. 脱落酸和水杨酸对越冬期茶树叶片抗寒生理指标的影响 [J]. *北方园艺*, 2010, 22: 21-24.

ZHANG N, HONG Y C, WANG Y, et al. Effects of abscisic acid and salicylic acid on several physiological indexes related to cold resistance of tea leaf during wintering period [J]. *Northern Horticulture*, 2010, 22: 21-24.

[4] RYMEN B, FIORANI F, KARTAL F, et al. Cold nights impair leaf growth and cell cycle progression in maize through transcriptional changes of cell cycle genes [J]. *Plant Physiology* 2007, 143(3): 1429-1438.

[5] KUMAR S, MALIK J, THAKUR P, et al. Growth and metabolic responses of contrasting chickpea (*Cicer arietinum* L.) genotypes to chilling stress at reproductive phase [J]. *Acta Physiologiae Plantarum* 2011, 33(3): 779-787.

[6] 田育天, 郑焕娣, 陈善娜, 等. 不同生长调节剂提高香荚兰抗逆能力的研究 [J]. *云南大学学报: 自然科学版* 2002, 24(1): 66-69.

TIAN Y T, ZHENG H T, CHEN S N, et al. Studies on different growth-regulators in increasing the stress-resistance of vanilla [J]. *Journal of Yunnan University: Natural Sciences Edition* 2002, 24(1): 66-69.

[7] ZHOU B, GUO Z, LIU Z. Effects of abscisic acid on antioxidant systems of *Stylosanthes guianensis* (Aublet) Sw. under chilling stress [J]. *Crop Science*, 2005, 45(2): 599-605.

[8] GUILLÉN M D, RUIZ A, CABO N, et al. Characterization of sacha inchi (*Plukenetia volubilis* L.) oil by FTIR spectroscopy and ¹H NMR comparison with linseed oil [J]. *Journal of the American Oil Chemists Society*, 2003, 80(8): 755-762.

[9] 喻彦, 蒙桂云, 张利才. 西双版纳地区近 45 年来气候变化特征 [J]. *气象科技* 2008, 36(4): 410-413.

YU Y, MENG G Y, ZHANG L C. Characteristics of climate change in recent 45 years in Xishuanbanna [J]. *Meteorological Science and Technology*, 2008, 36(4): 410-413.

- [10] KORKMAZ A. Amelioration of chilling injuries in watermelon seedlings by abscisic acid [J]. Turkish Journal of Agriculture and Forestry 2002 26(1): 17-20.
- [11] 李忠光, 龚明. 植物中超氧阴离子自由基测定方法的改进 [J]. 云南植物研究 2005 27(2): 211-216.
LI Z G, GONG M. Improvement of measurement method for superoxide anion radical in plant [J]. Acta Bot Yunnan 2005 27(2): 211-216.
- [12] PATTERSON B D, MACRAE E A, FERGUSON I B. Estimation of hydrogen peroxide in plant extracts using titanium (IV) [J]. Analytical Biochemistry, 1984, 139(2): 487-492.
- [13] LUO Y L, LAN Q Y, LU X, et al. Storage behaviour and antioxidant activities of *Mimusops elengi* L seed subjected to different drying rates [J]. Seed Science and Technology 2012 40(3): 354-364.
- [14] CIA M C, GUIMARÃES A C R, MEDICI L O, et al. Antioxidant responses to water deficit by drought-tolerant and -sensitive sugarcane varieties [J]. Annals of Applied Biology 2012 161: 313-324.
- [15] BRADFORD M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding [J]. Analytical Biochemistry, 1976, 72(1): 248-254.
- [16] 蔡世英, 周倩苹, 潘秋红. 脱落酸对咖啡幼苗抗冷性的效应 [J]. 热带作物学报, 1990, 11(2): 69-78.
CAI S Y, ZHOU Q P, PAN Q H. Effects of ABA on regulation on resistance of coffee seedlings to chilling injury [J]. Chinese Journal of Tropical Crops, 1990, 11(2): 69-78.
- [17] 罗立津, 徐福乐, 翁华钦, 等. 脱落酸对甜椒幼苗抗寒性的诱导效应及其机理研究 [J]. 西北植物学报, 2011, 31(1): 94-100.
LUO L J, XU F L, WENG H Q, et al. Inducing effects and its biological mechanisms of ABA on the chilling resistance of sweet pepper seedlings [J]. Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica 2011 31(1): 94-100.
- [18] SCHELER C, DURNER J, ASTIER J. Nitric oxide and reactive oxygen species in plant biotic interactions [J]. Current Opinion in Plant Biology, 2013, 16(4): 534-539.
- [19] TIAN Y, LEI Y, ZHENG Y, et al. Synergistic effect of colonization with arbuscular mycorrhizal fungi improves growth and drought tolerance of *Plukenetia volubilis* seedlings [J]. Acta Physiologiae Plantarum, 2013, 35: 687-696.

An investigation of exogenous abscisic acid on improving chilling tolerance of the seedlings of sacha inchi (*Plukenetia volubilis*)

LUO Yin-ling¹, SU Zhi-long¹, CUI Xian-liang¹, LI Sun-yang¹, LAN Qin-ying²

(1. College of Life Science, Pu'er University, Pu'er 665000, China;

2. Key Lab of Tropical Forest Ecology, Xishuangbanna Tropical Botanical Garden, the Chinese Academy of Science, Mengla 666303, China)

Abstract: Sacha inchi (*Plukenetia volubilis*) is a commercial tropical crop, which is sensitive to chilling. The exogenous ABA was applied on the seedlings by foliage spray and the chilling tolerance was studied. The chilling treatment was done at 4 °C for 2 days after the seedlings were sprayed by water or ABA solutions at 2, 5, 10 μmol/L and 50 μmol/L. Chilling increased the injury grades of the seedlings sprayed by water, meanwhile the seedlings sprayed with ABA solution had a lower injury grade. Chilling led to a higher level of lipid peroxidation, production rate of super anion, and content of H₂O₂, and ABA application was helpful in reducing the injury grades. Chilling decreases the activities of antioxidant enzymes in sacha inchi leaves, and ABA can enhance the activity of superoxide dismutase, catalase, guaiacol peroxidase, glutathione reductase, and dehydroascorbate reductase; the activity of ascorbate peroxidase has no significant difference after ABA treatment. These results indicate that exogenous ABA can increase the chilling tolerance of sacha inchi seedlings by enhancing activities of antioxidant enzymes. ABA solution at 10 μmol/L (and <10 μmol/L) can increase the chilling tolerance.

Key words: abscisic acid; chilling; antioxidant system; sacha inchi