

H₂O₂ 和 Ca²⁺ 对受低温胁迫香蕉幼苗抗冷性的影响

康国章¹ 陶 均² 孙谷畴¹ 王正询^{2*}

(¹ 中国科学院华南植物研究所, 广州 510650; ² 广州大学生物系, 广州 510405)

摘 要: 研究表明, 香蕉幼苗喷施 H₂O₂ 或 CaCl₂ 或二者结合使用, 能提高其 POD 活性, 降低膜渗漏率, 增加可溶性糖含量及减缓叶绿素降解, 从而提高抗寒力, 二者结合表现出协同效应。H₂O₂ 对提高 POD 活性, 降低膜渗漏率和减缓 Chl. b 降解的效果优于 CaCl₂; CaCl₂ 则在提高可溶性糖含量和减少 Chl. a 降解方面占优。相关性分析表明, POD 活性与膜渗漏率的负相关性达到显著水平, 高 POD 活性有利于减少低温下膜渗漏。

关键词: H₂O₂; CaCl₂; POD 活性; 膜渗漏率; 可溶性糖; 叶绿素 (Chl.)

中图分类号: S 668.1; Q 946 **文献标识码:** A **文章编号:** 0513-353X (2002) 02-0119-04

研究发现, Ca²⁺ 可明显提高植物冷胁迫期间保护酶 (SOD、POD、CAT 等) 活性和保护剂 (AsA、GSH 等) 含量, 具有一定的抗冷效果^[1]。H₂O₂ 作为一种氧化胁迫因子在细胞中的积累可损伤细胞膜结构, 降低保护酶活性, 破坏细胞正常活动^[2]。但近年的研究表明: 低浓度 H₂O₂ 可作为一种刺激因子, 激活细胞抗氧化系统, 清除低温下积累的活性氧^[3]。香蕉是分布在热带和亚热带地区冷敏感性较强的作物, 末冬和早春的低温寒流是影响香蕉生长和限制香蕉产量的主要原因之一。作者采用 H₂O₂ 和 CaCl₂ 单一或结合使用喷洒香蕉幼苗的方法来研究二者提高香蕉幼苗的抗冷机理。

1 材料与方法

选用抗冷性较弱的高杆巴西蕉 (*Musa acuminata* AAA group) 为材料, 取株高 11 cm 左右、四叶一心、长势均匀的组培苗进行冷胁迫处理。预备试验证明香蕉幼苗心叶在 6 ℃ 低温下处理 24 h 出现冷斑及叶缘萎蔫; 1.5 mmol L⁻¹ H₂O₂ 和 1.2 mmol L⁻¹ CaCl₂ 提高香蕉幼苗的抗冷性效果明显, 二者结合抗冷效果更佳, 故在以下试验中 H₂O₂ 和 CaCl₂ 分别采用此二浓度; 用 7 ℃ 低温对香蕉进行冷胁迫处理, 以利于测定生理指标。对照 1 (CK1): 喷洒蒸馏水, 在自然条件下生长, 不进行冷胁迫处理; 对照 2 (CK2): 喷洒蒸馏水, 在 7 ℃ 胁迫 24 h 后 20 ℃ 恢复 48 h; 处理 1 (H): 均匀喷洒 1.5 mmol L⁻¹ H₂O₂, 冷胁迫与恢复过程同 CK2; 处理 2 (C): 均匀喷洒 1.2 mmol L⁻¹ CaCl₂, 冷胁迫过程同 CK2; 处理 3 (HC): 均匀喷洒 1.5 mmol L⁻¹ H₂O₂ + 1.2 mmol L⁻¹ CaCl₂, 冷胁迫过程同 CK2。处理 1~3 及 CK2 在低温生化培养箱 (DP-200 型) 里进行, 光照条件 12 h/12 h (昼/夜), 光照强度 15 μmol m⁻² s⁻¹, 相对湿度 85 %。分别在 7 ℃ 低温胁迫 24 h 和 20 ℃ 恢复 48 h 后测定有关生理指标。

POD 活性测定采用愈创木酚法^[4]。可溶性糖含量测定采用蒽酮法^[4]。相对电导率参考刘鸿先等^[5]的方法, 用直径 0.5 cm 打孔器在香蕉叶片上取 20 个小圆片, 放入小烧杯中, 用重蒸水洗净后定容至 20 mL, 放置 2.5 h 后测定初始电导率 (R1); 然后煮沸 8 min, 重新定容至 20 mL, 冷却至初始温度测末电导率 (R2)。2 次电导率的比值即为相对电导率 ($R' = R1/R2$)。叶绿素含量采用 80 % 丙酮提取法^[6]。

收稿日期: 2001-08-08; 修回日期: 2002-01-17

基金资助: 广州市重点资助项目 (1999-11)

*通讯作者。

2 结果与分析

2.1 H_2O_2 和 CaCl_2 单一或结合处理对叶绿素含量的影响

7 冷胁迫 24 h 后, CK2 叶片褪色较快, 叶色较浅, CaCl_2 和 H_2O_2 二处理叶片褪色较慢, H_2O_2 + CaCl_2 处理叶色变化小, 与 CK1 差别不大。结果表明: CK2、 CaCl_2 、 H_2O_2 和 H_2O_2 + CaCl_2 等处理在冷胁迫期间叶绿素含量分别比 CK1 下降了 21.1 %、16.6 %、12.8 % 和 1.23 % (表 1); 20 恢复 48 h 后, H_2O_2 和 H_2O_2 + CaCl_2 两处理叶色浓绿, 叶绿素含量甚至高于 CK1, 而 CaCl_2 处理叶色恢复较慢, 叶绿素含量虽高于 CK2, 但低于 CK1 (表 2)。对叶绿素成分进一步分析表明, 在冷胁迫期间, H_2O_2 有减缓 Chl. b 降解的作用 (比 CK2 上升了 30.8 %), 而 CaCl_2 有保护 Chl. a 的作用 (比 CK2 上升了 6.9 %)。在 20 恢复期间, H_2O_2 对 Chl. a 和 Chl. b 均有明显促进作用, 而 Ca^{2+} 仅对 Chl. a 起作用。但 H_2O_2 + CaCl_2 无论在冷胁迫期间或恢复期间对 Chl. a 和 Chl. b 的保护作用均高于单一处理。

表 1 7 冷胁迫下 H_2O_2 和 CaCl_2 对香蕉幼苗叶绿素含量的影响

Table 1 Effects of H_2O_2 and CaCl_2 on contents of chlorophylls during 7 cold stress period

处理 Treatment	Chl. a				Chl. b				Chl. a + Chl. b			
	含量 (mg/g FW)	Contents	\pm (%)	\pm (%)	含量 (mg/g FW)	Contents	\pm (%)	\pm (%)	含量 (mg/g FW)	Contents	\pm (%)	\pm (%)
CK1	4.31a		0		1.79a		0		6.10a		0	
CK2	3.48c		- 19.3	0	1.33b		- 25.7	0	4.81c		- 21.2	0
H	3.58c		- 16.9	+ 2.9	1.74a		+ 2.8	+ 30.8	5.32b		- 12.8	+ 10.6
C	3.27b		- 13.7	+ 6.9	1.37b		- 23.5	+ 3.0	5.09b		- 16.6	+ 5.80
HC	4.08a		- 5.3	+ 17.2	1.87a		+ 4.5	+ 40.6	5.96a		- 1.23	+ 23.9

注: CK1, 自然条件; CK2, 喷施蒸馏水并经 7 低温胁迫; H, 喷施 $1.5 \text{ mmol L}^{-1} \text{H}_2\text{O}_2$ 并经 7 低温胁迫; C, 喷施 $1.2 \text{ mmol L}^{-1} \text{CaCl}_2$ 并经 7 低温胁迫; HC, 喷施 $1.5 \text{ mmol L}^{-1} \text{H}_2\text{O}_2$ + $1.2 \text{ mmol L}^{-1} \text{CaCl}_2$ 并经 7 低温胁迫。重复测定 3 次, 新复极方差检验。不同字母表示处理平均数之间在 $\alpha=0.05$ 水平差异显著。下表、图同。

Note: CK1. banana seedlings in natural condition; CK2. banana seedlings sprayed with distilled water and endured by 7 low temperature stress; H. banana seedlings sprayed with $1.5 \text{ mmol L}^{-1} \text{H}_2\text{O}_2$ and endured by 7 low temperature stress; C. banana seedlings sprayed with $1.2 \text{ mmol L}^{-1} \text{CaCl}_2$ and endured by 7 low temperature stress; HC. banana seedlings sprayed with $1.5 \text{ mmol L}^{-1} \text{H}_2\text{O}_2$ + $1.2 \text{ mmol L}^{-1} \text{CaCl}_2$ and endured by 7 low temperature stress. Data were repeated three times, and results with each column are not significantly different at 5 % level by duncans new multiple range test. The same below.

表 2 20 恢复时期 H_2O_2 和 CaCl_2 对香蕉幼苗叶绿素含量的影响

Table 2 Effects of H_2O_2 and CaCl_2 on contents of chlorophylls during 20 recovery period

处理 Treatment	Chl. a				Chl. b				Chl. a + Chl. b			
	含量 (mg/g FW)	Contents	\pm (%)	\pm (%)	含量 (mg/g FW)	Contents	\pm (%)	\pm (%)	含量 (mg/g FW)	Contents	\pm (%)	\pm (%)
CK1	4.65b		0		1.70b		0		6.35b		0	
CK2	4.37c		- 6.1	0	1.29c		- 24.2	0	5.66c		- 10.9	0
H	5.13a		+ 10.3	+ 17.4	2.14a		+ 25.9	+ 30.8	7.27a		+ 14.5	+ 28.4
C	4.74b		+ 1.9	+ 8.5	1.25c		- 26.5	- 3.1	5.99c		- 5.7	+ 5.8
HC	5.19a		+ 11.6	+ 18.8	2.05a		+ 20.6	+ 40.6	7.24a		+ 14.0	+ 27.9

2.2 H_2O_2 和 CaCl_2 单一或结合处理对细胞膜渗漏率的影响

7 冷胁迫引起香蕉幼苗叶片电解质的渗漏 (图 1)。 CaCl_2 和 H_2O_2 有降低电解质外渗的效应, H_2O_2 效果高于 CaCl_2 , H_2O_2 + CaCl_2 的效果最佳, 表明二者有协同效应。20 恢复 48 h 后, CK2 膜透性仍然较大, H_2O_2 和 CaCl_2 则恢复较快, 已接近 CK1 水平。 H_2O_2 + CaCl_2 的膜渗漏率甚至低于 CK1, 表明膜完整性已得到完全恢复。

2.3 H_2O_2 和 CaCl_2 单一或结合处理对 POD 活性的影响

结果表明(图2),冷胁迫造成各处理 POD 活性下降。施用 H_2O_2 和 CaCl_2 及二者的混合物可一定程度地激活 POD 活性。 $\text{H}_2\text{O}_2 + \text{CaCl}_2$ 激活能力最强,其次为 H_2O_2 和 CaCl_2 。20℃ 恢复 48 h 后,各处理 POD 活性上升。施用 H_2O_2 或 CaCl_2 能加快 POD 活性上升,以 $\text{H}_2\text{O}_2 + \text{CaCl}_2$ 处理上升最快, H_2O_2 次之,二者均超过了正常苗水平(CK1),CK2 则相对恢复较慢。

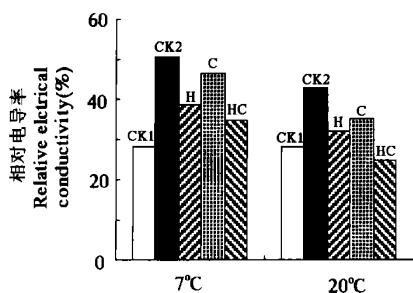


图1 H_2O_2 和 CaCl_2 对香蕉幼苗相对电导率的影响

Fig. 1 Effect of H_2O_2 and CaCl_2 on relative electrical conductivity

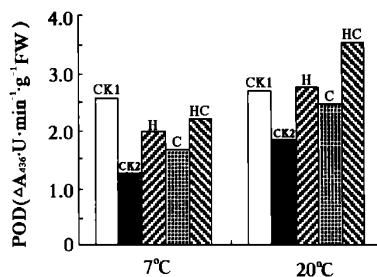


图2 H_2O_2 和 CaCl_2 对香蕉幼苗 POD 活性的影响

Fig. 2 Effect of H_2O_2 and CaCl_2 on POD activity

2.4 H_2O_2 和 CaCl_2 单一或结合处理对可溶性糖含量的影响

由图3可以看出,无论有无药剂处理,冷胁迫均造成细胞内可溶性糖含量上升,且明显高于正常水平。以 $\text{H}_2\text{O}_2 + \text{CaCl}_2$ 处理上升幅度最大。20℃ 恢复 48 h 后,CK2 和 H_2O_2 二处理可溶性糖含量有所下降,与 CK1 差别不大; $\text{H}_2\text{O}_2 + \text{CaCl}_2$ 处理也有较大幅度下降,但仍高于 CK1; CaCl_2 处理的可溶性糖含量则下降幅度较小,一直保持在较高水平。

2.5 POD 活性和可溶性糖含量与膜渗漏率的关系

对冷胁迫和恢复期间香蕉幼苗叶片 POD 活性、可溶性糖含量与膜渗漏率之间的关系进行相关性分析,发现 POD 活性与膜渗漏率之间呈显著负相关 ($r = -0.9123$, $F_{0.01} < F$),即 POD 活性越高,细胞膜渗漏率越小,伤害越轻(图4)。相关系数为 -0.9123 ,两者直线回归方程为: $y = -120.28x + 74.85$ 。可溶性糖含量与膜渗漏率也呈负相关,但相关性未达显著水平。

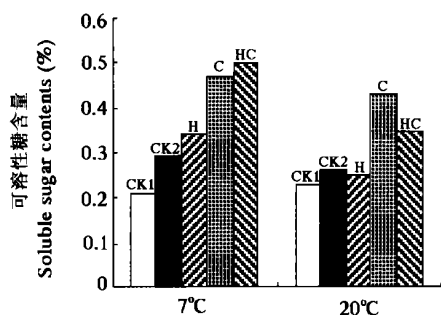


图3 H_2O_2 和 CaCl_2 对香蕉幼苗可溶性糖含量的影响

Fig. 3 Effect of H_2O_2 and CaCl_2 on soluble sugar contents

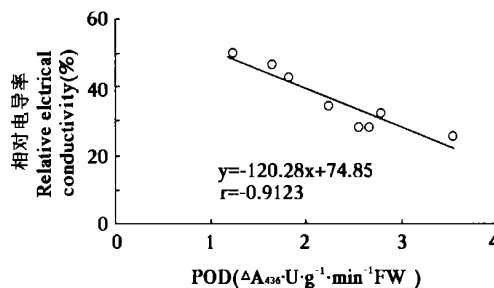


图4 POD 活性和相对电导率之间的关系

Fig. 4 Relation of POD activity and relative electrical conductivity

3 讨论

Ca^{2+} 作为植物细胞内传递低温信号的第二信息,已为大多数研究者所认可。低温可引起细胞内 Ca^{2+} 浓度上升,激活细胞内许多与抗冷有关基因的表达^[7]。外施一定浓度 Ca^{2+} 可提高水稻幼苗保护酶活性,增强细胞抗低温胁迫能力^[8]。最近研究表明, H_2O_2 也参与了植物冷信号传导,诱导保护酶基因的表达,以清除冷胁迫诱导产生的活性氧^[9]。Prasad 等^[10]报道低浓度 H_2O_2 在常温下能诱导保护

酶 POD 和 CAT 基因的表达, 模拟冷驯化, 提高植物抗冷力。本研究表明, H_2O_2 和 CaCl_2 均能提高香蕉幼苗叶片 POD 活性, 降低膜渗漏率, 增加可溶性糖积累, 及减缓叶绿素降解, 表明二者对提高香蕉幼苗的抗冷力有一定效果, 并且二者有协同作用。进一步分析发现, H_2O_2 在提高 POD 活性, 降低膜渗漏率, 减缓 Chl. b 降解方面效果优于 CaCl_2 ; 而 CaCl_2 则在增加可溶性糖积累和减缓 Chl. a 降解方面, 效果高于 H_2O_2 , 表明 H_2O_2 和 Ca^{2+} 的抗冷机理可能有一定差异。最近有研究发现, 可溶性糖的积累并不与植物的抗冷力密切相关^[11]。我们在试验中也发现 CaCl_2 虽然增加可溶性糖含量的效果非常明显, 但抗冷效果(膜渗漏率)却低于 H_2O_2 , 并且未经 H_2O_2 和 CaCl_2 处理的香蕉叶片在冷胁迫过程中可溶性糖含量也有所上升, 可溶性糖含量与膜渗漏率的负相关性差异不显著。据此, 我们推测可溶性糖的积累可能是植物细胞在冷胁迫下的一种应激反应, Ca^{2+} 加强了这种应激程度。 Ca^{2+} 提高可溶性糖含量的抗冷效果值得进一步探讨。

参考文献:

- 1 Monroy A F, Sahan F, Dhindsa R S. Cold-induced changes in freezing tolerance, protein phosphorylation, and gene expression evidence for a role of calcium. *Plant Physiol.*, 1993, 102: 1227 ~ 1234
- 2 林植芳, 李双顺, 林桂株, 等. 衰老叶片和叶绿体中 H_2O_2 的累积与膜脂过氧化的关系. *植物生理学报*, 1988, 14 (1): 16 ~ 22
- 3 李美茹, 刘鸿先, 王以柔. 氧化胁迫对水稻幼苗抗冷力的影响. *热带亚热带植物学报*, 1999, 7 (4): 323 ~ 328
- 4 张志良. *植物生理学实验指导*. 北京: 高等教育出版社, 1980, 143 ~ 144, 151 ~ 157
- 5 刘鸿先, 曾韶西, 王以柔, 等. 低温对不同耐寒力的黄瓜 (*Cucumis sativus*) 幼苗子叶细胞器的超氧化物歧化酶 (SOD) 的影响. *植物生理学报*, 1985, 11: 48 ~ 57
- 6 李合生主编. *植物生理生化实验原理和技术*. 北京: 高等教育出版社, 2001. 134 ~ 137
- 7 Monroy A F, Dhindsa R S. Low temperature signal transduction: induction of cold acclimation-specific genes of alfalfa by calcium at 25 °C. *Plant Cell*, 1995, 7: 321 ~ 331
- 8 梁 颖, 王三根. Ca^{2+} 对低温下水稻幼苗膜的保护作用. *作物学报*, 2001, 27 (1): 59 ~ 63
- 9 Kratsch H A, Wise R R. The ultrastructure of chilling stress. *Plant Cell and Environ.*, 2000, 23: 337 ~ 350
- 10 Prasad T K, Anderson M P, Martin B A. Evidence for chilling induced oxidative stress in maize seedlings and a regulatory role for hydrogen peroxide. *Plant Cell*, 1994, 6: 65 ~ 74
- 11 Rapacz M, Plazek A, Aiemczyk E. Frost de-acclimation of barley (*Hordeum vulgare* L.) and meadow fescue (*Festuca pratensis* Huds). Relationship between soluble carbohydrate content and resistance to frost and the fungal pathogen *bipolaris sorokiniana* (Sacci.) shoem. *Annals of Botany*, 2000, 86 (3): 539 ~ 545

Physiological Effects of H_2O_2 and Ca^{2+} on Cold-stressed Banana Seedlings

Kang Guozhang¹, Tao Jun², Sun Guchou¹, and Wang Zhengxun²

(¹ South China Institute of Botany, The Chinese Academy of Sciences, Guangzhou 510650, China; ²Department of Biology, Guangzhou University, Guangzhou 510405, China)

Abstract: The banana (*Musa acuminata* AAA group) seedlings were sprayed with single or mixed H_2O_2 and CaCl_2 and exposed to 7 °C low temperature for 24 h. The increase of POD activities and soluble sugar contents and alleviation of cell membranes leakage and chlorophylls decomposition in banana seedling leaves were observed during cold stress and recovery periods. The mixed H_2O_2 and CaCl_2 had a synergism on these aspects. The results also showed that H_2O_2 had better effects in increasing peroxidase activities and Chl. b contents than those of CaCl_2 , but CaCl_2 had advantage effects on soluble sugar and Chl. a contents. POD activities had a significant opposite relation with electric leakage and it may suggest that increasing POD activities could help to decrease the leakage of cell membranes during low temperature period.

Key words: H_2O_2 ; CaCl_2 ; Peroxidase activities; Membrane leakage; Soluble sugar; Chlorophylls