

# H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 与葡萄 *VvIPK2* 基因表达及其低温胁迫响应的关系

李希东<sup>1</sup>, 侯丽霞<sup>1</sup>, 刘新<sup>1,\*</sup>, 卢江<sup>2</sup>

(<sup>1</sup>青岛农业大学生命科学学院, 山东青岛 266109; <sup>2</sup>中国农业大学食品科学与营养工程学院, 北京 100093)

**摘要:** 以葡萄砧木品种 ‘F-242’ 试管苗为材料, 克隆了葡萄 (*Vitis* L.) 的多磷酸肌醇激酶 (inositol polyphosphate kinase, IPK2) 基因 *VvIPK2*, 并对其进行了生物信息学分析; 利用实时定量 PCR 和植物生理学技术, 结合药理学实验探究了 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 在葡萄响应低温胁迫中的作用及其与 *VvIPK2* 的关系。结果表明, 克隆的 *VvIPK2* 其推导的翻译产物 (*VvIPK2*) 与数据库中推测的氨基酸序列一致; 与栽培亚麻和拟南芥多磷酸肌醇激酶高度同源。在低温胁迫下, 叶片 *VvIPK2* 表达与 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 水平均明显升高; 外源 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 能提高 *VvIPK2* 表达水平, 而 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 清除剂抗坏血酸 (ascorbic acid, AsA) 降低 *VvIPK2* 表达水平。外施一定浓度的 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 可提高超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD) 活性, 上调 *Cu/Zn SOD* 基因表达, 降低丙二醛 (malondialdehyde, MDA) 含量和细胞膜相对透性; 但 IPK2 抑制剂 LY-294002 对内源 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 却无明显影响; LY-294002 和 AsA 均能降低 SOD 活性, 下调 *Cu/Zn SOD* 基因表达, 提高 MDA 含量和细胞膜相对透性。推测 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 调节 *VvIPK2* 的表达, 参与葡萄响应低温胁迫过程。

**关键词:** 葡萄; 过氧化氢; *VvIPK2*; 低温

**中图分类号:** S 663.1

**文献标识码:** A

**文章编号:** 0513-353X (2011) 06-1052-11

## Involvement of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in Regulating the Expression of *VvIPK2* in Response to Low Temperature Stress in Leaves of *Vitis*

LI Xi-dong<sup>1</sup>, HOU Li-xia<sup>1</sup>, LIU Xin<sup>1,\*</sup>, and LU Jiang<sup>2</sup>

(<sup>1</sup>College of Life Science, Qingdao Agriculture University, Qingdao, Shandong 266109, China; <sup>2</sup>College of Food Science and Nutritional Engineering, China Agriculture University, Beijing 100093, China)

**Abstract:** An inositol polyphosphate kinase gene named *VvIPK2* from *Vitis vinifera* was cloned and its biomatics was analyzed, the role of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and the interaction between H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and *VvIPK2* in response to cold stress of ‘F-242’ leaves were investigated by real-time PCR, combined with physiological and pharmacological methods. The results showed that the deduced translation product (*VvIPK2*) was completely the same with the sequence in database which shares 64% and 62% identity with the inositol polyphosphate kinase (*LuIPK2*) in *Linum usitatissimum* and that in *Arabidopsis* (*AtIPK2*). Low temperature induced H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> accumulation and enhanced *VvIPK2* transcription level. Exogenous H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> could enhance expression of *VvIPK2* and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> cleaner (ascorbic acid, AsA) could reduce its expression. At the

收稿日期: 2011-02-17; 修回日期: 2011-04-27

基金项目: 农业部 ‘948’ 项目 (2006-G26)

\* 通信作者 Author for correspondence (E-mail: liuxin6080@yahoo.com.cn)



same time, exogenous  $\text{H}_2\text{O}_2$  could enhance the activities of superoxide dismutase (SOD) and *Cu/Zn SOD* expression, reduce the content of malondialdehyde (MDA) and the relative permeability of cell membrane under cold stress. But LY-294002 had no effect on cold-induced  $\text{H}_2\text{O}_2$  production. Moreover, LY-294002 and AsA reversed the changes of SOD, MDA and the relative permeability of cell membrane, implying that *VvIPK2* was assumed to be the downstream of  $\text{H}_2\text{O}_2$  in grape response to low temperature stress.

**Key words:** *Vitis vinifera*; hydrogen peroxide; *VvIPK2*; low temperature stress

葡萄 (*Vitis vinifera* L.) 是低温敏感型多年生落叶果树, 中国北方种植的葡萄每年因低温寒害和倒春寒造成巨大的经济损失。有研究表明, 低温驯化过程中, 植物体内经常伴随着  $\text{Ca}^{2+}$  水平的迅速升高 (张国增 等, 2009), 逆境激素水平的变化 (王三根, 2000; 曲凌慧 等, 2009), 活性氧的积累和保护酶系统活性的提高。但是, 植物响应低温胁迫及低温驯化的信号转导机制研究还刚起步。

多磷酸肌醇激酶/三磷酸肌醇 3 激酶 (inositol polyphosphate kinase/inositol 1,4,5-trisphosphate 3-kinase, IPK2/IP3K) 磷酸化  $\text{IP}_3$  成为 1,3,4,5 - 四磷酸肌醇 (inositol 1,3,4,5-tetrakisphosphate,  $\text{IP}_4$ ) 和 1,3,4,5,6 - 五磷酸肌醇 (1,3,4,5,6-pentakisphosphate,  $\text{IP}_5$ ),  $\text{IP}_4$  能够与  $\text{IP}_3$  协同作用调节胞外钙离子入膜和维持细胞内钙离子平衡 (Xia et al., 2005)。因此, IPK2 在协调  $\text{IP}_3$  和  $\text{IP}_4$  水平维持钙离子稳态过程中起关键作用, 参与了多种生理过程的调控。如 Zhang 等 (2007) 研究发现 *AtIPK2* 参与生长素介导的拟南芥分支过程。最近有研究报道, *IPK2* 与植物对盐胁迫等非生物逆境的应答有关, 在盐胁迫下转盐芥 *ThIPK2* 植株的各种胁迫响应标记基因转录水平平均上升 (Yang et al., 2008), 证明 *ThIPK2* 具有提高植物抗干旱和耐低温胁迫的能力 (Zhu et al., 2009)。

过氧化氢 (hydrogen peroxide,  $\text{H}_2\text{O}_2$ ) 是生物细胞代谢过程中产生的一种活性氧, 又可作为一种重要的第二信使参与对生物和非生物胁迫的响应及细胞程序性死亡等过程 (Neill et al., 2002; Laloi et al., 2004; Cheng & Song, 2006; 刘国华 等, 2009)。近期, Yun 等 (2010) 的研究表明  $\text{H}_2\text{O}_2$  参与水稻应答低温胁迫信号过程。那么,  $\text{H}_2\text{O}_2$  和葡萄的多磷酸肌醇激酶基因 *VvIPK2* 是否参与低温信号转导过程, 两者关系如何有待研究。

作者以抗性葡萄砧木品种 ‘F-242’ 试管苗为试验材料, 克隆葡萄的多磷酸肌醇激酶基因 *VvIPK2*, 并分析了其在低温条件下的表达模式, 测定了低温胁迫下葡萄叶片内源  $\text{H}_2\text{O}_2$  含量的变化, 并运用药理学和分子生物学手段分析了两者在葡萄响应低温胁迫信号转导途径中的上下游关系。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料及处理

葡萄砧木品种 ‘F-242’ 3 ~ 4 周龄的试管苗, 由青岛农业大学生命科学学院植物逆境生理与分子生物学实验室培养并保存。‘F-242’ 试管苗于培养室中 ( $25 \pm 1$ )  $^{\circ}\text{C}$ , 12 h 光照/12 h 黑暗, 光照强度  $200 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  培养。每 3 ~ 4 周将试管苗继代到新鲜的生根培养基 ( $\text{MS} + 0.05 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{ NAA}$ ) 上继代繁殖培养。

取生长健壮的 3 ~ 4 周龄试管苗,  $15^{\circ}\text{C}$  预处理 24 h,  $4^{\circ}\text{C}$  分别处理 0、1.5、3、6、12、24 h ( $25^{\circ}\text{C}$  培养作为对照), 取葡萄叶片液氮速冻后, 直接用于总 RNA 的提取或保存于  $-80^{\circ}\text{C}$  冰箱备用;  $4^{\circ}\text{C}$  分别处理 0、3、6、9、12 h ( $25^{\circ}\text{C}$  培养作为对照), 测定叶片  $\text{H}_2\text{O}_2$  含量变化。

对 ‘F-242’ 试管苗外施 IPK2 抑制剂 LY-294002 ( $1.4 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 1 h 后 (试剂对照为  $\text{H}_2\text{O}$ ), 分别置于  $4^{\circ}\text{C}$  和  $25^{\circ}\text{C}$  下, 在 0、1.5、3、6、12、24 h 取其叶片, 测定 *VvIPK2* 和 *Cu/ZnSOD* 的相对表

达量; 分别在上述处理 0、3、6、9、12、24 h 时测定叶片超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD) 活性、丙二醛 (malondialdehyde, MDA) 含量和细胞膜相对透性, 于 12 h 检测叶片中  $H_2O_2$  含量。

对 ‘F-242’ 试管苗外施  $H_2O_2$  (0.1%)、抗坏血酸 (ascorbic acid, AsA) ( $2.0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 1 h 后 (试剂对照为  $H_2O$ ), 分别置于 4 °C 和 25 °C 下培养, 在 0、3、6、9、12、24 h 取叶片测定 SOD 活性、MDA 含量和细胞膜相对透性; 分别在上述处理 0、1.5、3、6、12、24 h 时检测 *Cu/ZnSOD* 的相对表达量, 并于 9 h 检测 *VvIPK2* 的相对表达量。

对 ‘F-242’ 试管苗外施 DPI ( $10 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 1 h 后 (试剂对照为  $H_2O$ ), 分别置于 4 °C 和 25 °C 下培养, 在 0、3、6、9、12、24 h 取叶片, 测定 NADPH 氧化酶活性。

以上试验至少重复 3 次。

## 1.2 CTAB 法提取葡萄总 RNA

样品置于液氮预冷的离心管中, 液氮充分研磨, 加入 650  $\mu\text{L}$  提取液, 65 °C 温浴 15 min, 加入等体积的氯仿: 异戊醇 (24:1), 混匀后, 冰浴 2 min,  $12\,000 \times g$  离心 15 min, 取上清液转入离心管中, 再加入等体积的氯仿: 异戊醇 (24:1), 混匀后, 冰浴 2 min,  $12\,000 \times g$  低温离心 15 min, 转上清液于新离心管中, 加入 1/3 体积  $8 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  LiCl, -20 °C 静置 20 min,  $12\,000 \times g$  低温离心 15 min。70%乙醇洗涤沉淀, 超净工作台将残留的痕量乙醇吹干, 用 RNase-free 水溶解 RNA, -80 °C 保存。

## 1.3 *VvIPK2* 基因克隆及序列分析

采用同源克隆的方法, 以拟南芥多磷酸肌醇激酶基因 *AtIPK2 $\beta$*  (AT5G61760) CDS 进行 WU-BLAST 序列比对, 检索到葡萄中多磷酸肌醇激酶基因同源序列, DNASTAR 软件包分析其开放阅读框 (open reading frame, ORF), 并以之为模板设计特异性引物 *VvIPK2*-CDS-sense: 5'-ATGCTTAAGGTCCCGGATCATC-3' 和 *VvIPK2*-CDS-antisense: 5'-GCGTTATTTCAGTGGTACCATTCTCC-3', 由上海生工生物工程有限公司合成。CTAB 法提取葡萄基因组总 RNA, 大连宝生物公司 RNA LA PCR<sup>TM</sup> Kit (AMV) Ver.1.1 试剂盒反转录 PCR。PCR 条件为: 94 °C 5 min; 94 °C 30 s, 58 °C 30 s, 72 °C 1 min, 30 个循环; 72 °C 延伸 10 min, 4 °C 保存。北京博迈德试剂盒回收目的片段, 与 pMD18-T 载体连接, 阳性克隆交由上海英潍捷基生物技术有限公司测序。

借助 DNASTAR 软件包分析基因序列并推导其编码的氨基酸序列, 蛋白分析专家 (<http://www.expasy.ch/tools/protparam.html>) 网站分析编码蛋白的氨基酸数量、分子量、等电点及稳定性。MEGA4 软件采用邻位法 (NJ) 分析并构建系统发生和分子进化树。

## 1.4 实时定量 PCR 分析

按照 M-MLV 反转录试剂盒说明书合成 cDNA 第一条链, 作为模板, 同时设立负对照。每次加样, 每个模板重复 3 次。Real-time PCR 的程序为: 95 °C 60 s, 95 °C 10 s, 58 °C 20 s, 72 °C 15 s, 40 个循环; 溶解曲线从 72 °C 至 99 °C, 第 1 步维持 45 s, 以后每升高 1 °C 维持 5 s。每个样品进行 3 次重复。Real-time PCR 使用的仪器为 MiniOpticon DNA Engine Opticon 2 Chromo4 IQ 5。以 *actin* 为内参基因进行相对定量, real-time PCR 引物: *VvIPK2* Sense, 5'-AGCCCACCCAAGAAGTTA T-3', *VvIPK2* Anti-sense, 5'-AGGAGGCGATATTGAAAGG-3', *VvCu/Zn SOD* sense, 5'- GTTAACACGC TACTCTCCACTGC-3', *VvCu/Zn SOD* Anti-sense, 5'-GGTAATCCGAACAGAGACAGTC-3', *actin* Sense, 5'-AATGAGAGATGGCTGGAAGAG-3', *actin* Anti-sense, 5'-TACGAGCAAGAGCTGGAAA-3'。*VvIPK2* 的相对表达量以试验组目的基因的表达相对于对照组的变化倍数, 按  $2^{-\Delta\Delta CT}$  方法计算 (Livak & Schmittgen, 2001), 每个处理至少重复 3 次。

### 1.5 葡萄叶片 $H_2O_2$ 含量及抗寒生理指标的测定

$H_2O_2$  含量测定参照张小莉等 (2009) 和夏金婵等 (2005) 的方法稍作修改, 利用紫外分光光度计测定 240 nm 波长处的吸光度值。NADPH 氧化酶活性测定采用分光光度法, 测 470 nm 波长处的吸光度值 (Sagi & Fluhr, 2001)。细胞膜相对透性的测定, 用 DDS-II 型电导仪测定外渗液的电导率, SOD 酶活性测定、MDA 含量测定, 参照《植物生理学实验》(朱广廉 等, 1990) 的方法。每个试验重复 3 次。对照和处理都是 3 次处理的平均值和标准误差。差异显著性分析采用 Duncan's 新复极差法。

## 2 结果与讨论

### 2.1 *VvIPK2* 基因克隆及序列分析

琼脂糖电泳检测结果表明扩增得到的片段大小在 1 000 bp 左右 (图 1, A), 符合数据库中预测大小。连接 pMD18-T 载体, 碱裂解法提取质粒 DNA, *Hind*III 酶切鉴定, 因基因内部存在两个 *Hind*III 酶切位点 (53, 464), 酶切电泳图谱分析得到 500 bp 大小条带, 结果为阳性 (图 1, B), 命名为: pMD18-T-*VvIPK2*, 并提交测序。

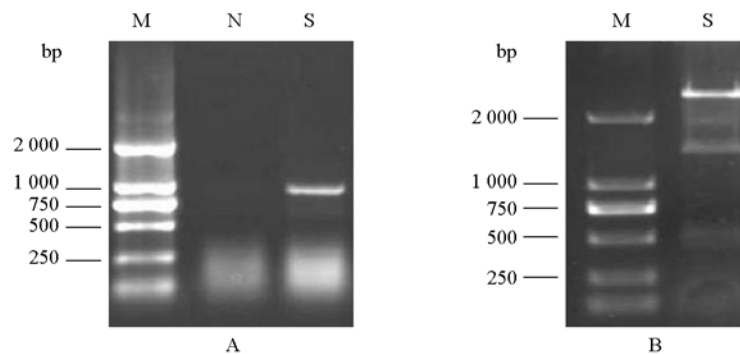


图 1 *VvIPK2* 的 PCR 扩增 (A) 及酶切鉴定 (B)

M: DL2000 DNA marker; N: 阴性对照; S: 试验样品。

Fig. 1 The PCR proliferation (A) and enzyme digestion analysis (B) of *VvIPK2*

M: DL2000 DNA marker; N: Negative control; S: Sample.

DNAstar 软件包分析测序结果表明, 扩增片段大小为 918 bp, 编码 305 个氨基酸, 与数据库中提交的序列编码氨基酸序列一致, 分子量为 34.08 kD, 等电点 5.30, 不稳定系数为 43.37。

ClustalW2 软件 (<http://www.eb.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html>) 分析比较, 结果表明 *VvIPK2* 编码产物与多种植物中多磷酸肌醇激酶高度同源, 与亚麻、拟南芥和盐芥多磷酸肌醇激酶高度同源, 其中与亚麻的相似性为 80% (图 2)。

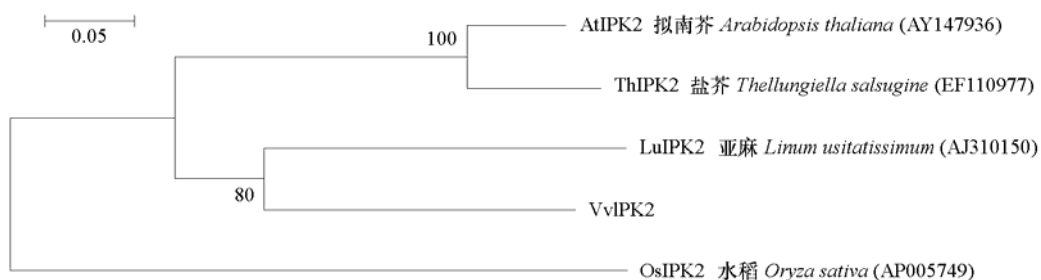


图 2 葡萄 *VvIPK2* 氨基酸序列与其他物种 IPK2 氨基酸序列的系统进化树

Fig. 2 Phylogenetic tree of a sequence of *VvIPK2* in *Vitis* L. with others species

*VvIPK2* 含有与已知的植物多磷酸肌醇激酶相似的催化区域, 包括高度保守的  $IP_3$  结合结构域和  $ATP/Mg^{2+}$  结合结构域 (图 3), 对应的基序分别为  $P\times\times P\times K\times G$  (Shears et al., 2004)、 $(L/M)(I/V)D(F/L)(A/G)(H/K)$  (Saiardi et al., 2001)。但是软件分析并未检测到跨膜结构域和细胞膜结合结构域, 这与 Zhu 等 (2009) 的结论一致。

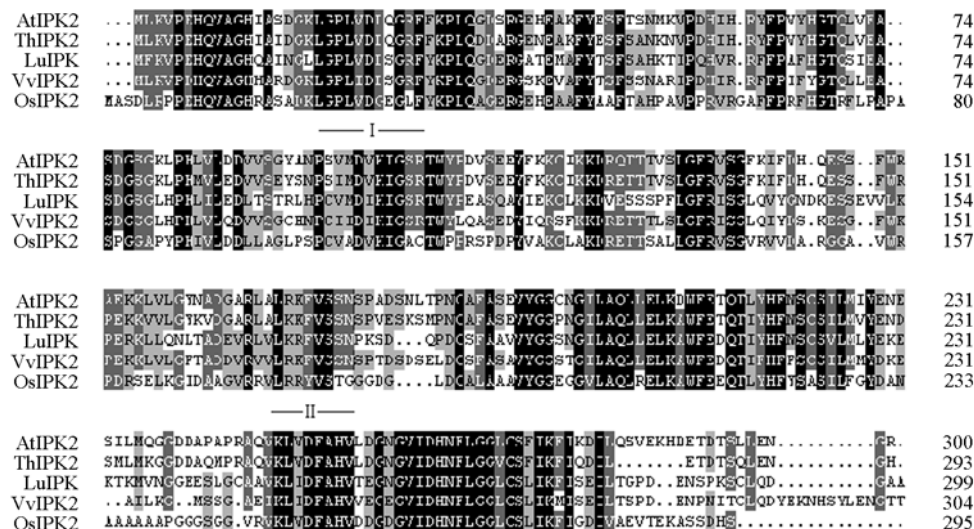


图 3 葡萄 *VvIPK2* 与其他物种 IPK2 序列同源分析

黑色表示完全相同的氨基酸残基, 灰色程度越浅氨基酸残基保守性越低。拟南芥 *AtIPK2* (Arabidopsis thaliana, GenBank accession No.

AY147936); 盐芥 *ThIPK2* (Thellungiella salsugine, GenBank accession No. EF110977); 亚麻 *LuIPK* (Linum usitatissimum,

EMBL accession No. AJ310150); 水稻 *OsIPK2* (Oryza sativa, DDBJ accession No. AP005749)

I 和 II 分别指示高度保守的  $IP_3$  结合结构域和  $ATP/Mg^{2+}$  结合结构域。

Fig. 3 Alignment of the predicted amino acid sequences of *VvIPK2* and other IPK2s

Residues are highlighted in black, dark gray and light gray according to the level of conservation. *AtIPK2* (Arabidopsis thaliana, GenBank accession

No. AY147936); *ThIPK2* (Thellungiella salsugine, GenBank accession No. EF110977); *LuIPK* (Linum usitatissimum,

EMBL accession No. AJ310150); *OsIPK2* (Oryza sativa, DDBJ accession No. AP005749);

The conserved motifs for  $IP_3$  binding and  $ATP/Mg^{2+}$  binding are indicated by I and II.

## 2.2 *VvIPK2* 参与葡萄对低温胁迫的响应

### 2.2.1 低温对叶片中 *VvIPK2* 相对表达量的影响

由图 4 可看出, 在低温条件下, 无论  $H_2O$  还是 IPK2 酶抑制剂 LY-294002 处理, ‘F-242’ 叶片 *VvIPK2* 相对表达量在 12 h 达到峰值 ( $P < 0.05$ )。这初步表明 *VvIPK2* 参与葡萄砧木品种 ‘F-242’ 对低温胁迫的应答。但 IPK2 酶的抑制剂 LY-294002 并不能够在转录水平上抑制 *VvIPK2* 基因的表达, 可能在蛋白合成水平上起抑制作用。

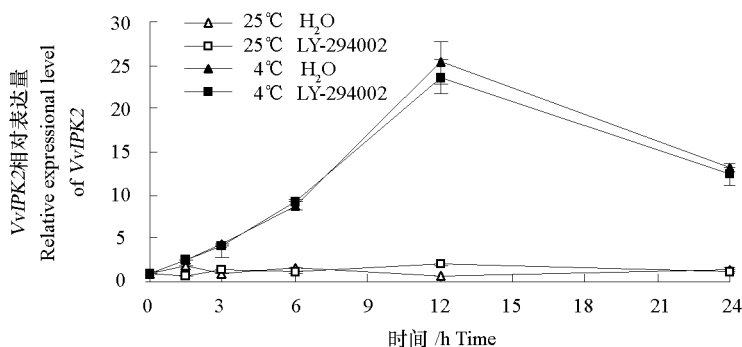


图 4 低温对葡萄砧木品种 ‘F-242’ 叶片中 *VvIPK2* 相对表达量的影响

Fig. 4 Effects of low temperature on the expression of *VvIPK2* in the leaves of grape rootstock ‘F-242’

### 2.2.2 IPK2 酶抑制剂对低温条件下叶片中 SOD 活性及其基因表达的影响

由图 5, A 和 B 可知, 常温下外施 IPK2 酶的抑制剂 LY-294002 后, SOD 活性略有下降; 在低温胁迫下, SOD 活性略有上升。LY-294002 虽不能够在转录水平上抑制 *VvIPK2* 基因的表达 (图 4), 但是能够在一定程度上抑制低温诱导的 *Cu/Zn SOD* 基因表达水平的升高, 并能阻断 SOD 活性增加, 并且引起 SOD 活性的显著下降 ( $P < 0.05$ ) (图 5)。推测, 葡萄多磷酸肌醇激酶 *VvIPK2* 通过调节 SOD 活性参与了 ‘F-242’ 响应低温胁迫过程。

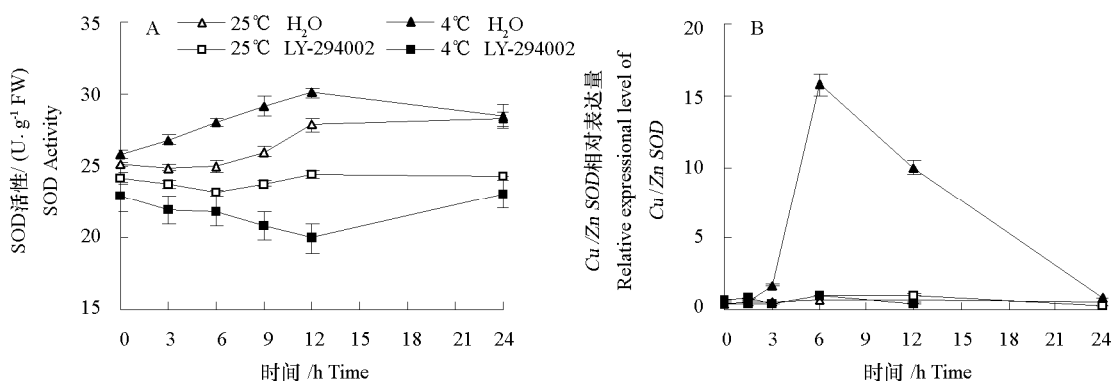


图 5 LY-294002 对葡萄砧木品种 ‘F-242’ 叶片 SOD 活性 (A) 以及 *Cu/Zn SOD* (B) 基因表达的影响

Fig. 5 Effects of LY-294002 on the activity of SOD (A), the expression of *Cu/Zn SOD* (B) in the leaves of grape rootstock ‘F-242’

### 2.2.3 IPK2 酶抑制剂对叶片 MDA 含量和细胞膜相对透性的影响

由图 6, A 可以看出, 25 °C 正常条件下, 一定浓度的 IPK2 酶抑制剂 LY-294002 对葡萄叶片的 MDA 含量没有影响。在 4 °C 低温条件下, 外施 LY-294002 后 MDA 含量缓慢上升, 在 12 h 达到最大值, 后又缓慢下降至初始水平, 这可能是由于 12 h 之后植物自身调节机制减少了对细胞膜的损害。

如图 6, B 所示, 低温引起葡萄叶片的细胞膜相对透性逐渐增大, 在 12 h 达到最大值 ( $P < 0.05$ ); IPK2 酶抑制剂 LY-294002 本身对细胞膜相对透性没有明显影响, 但在低温下外施 LY-294002 引起细胞膜相对透性增大。

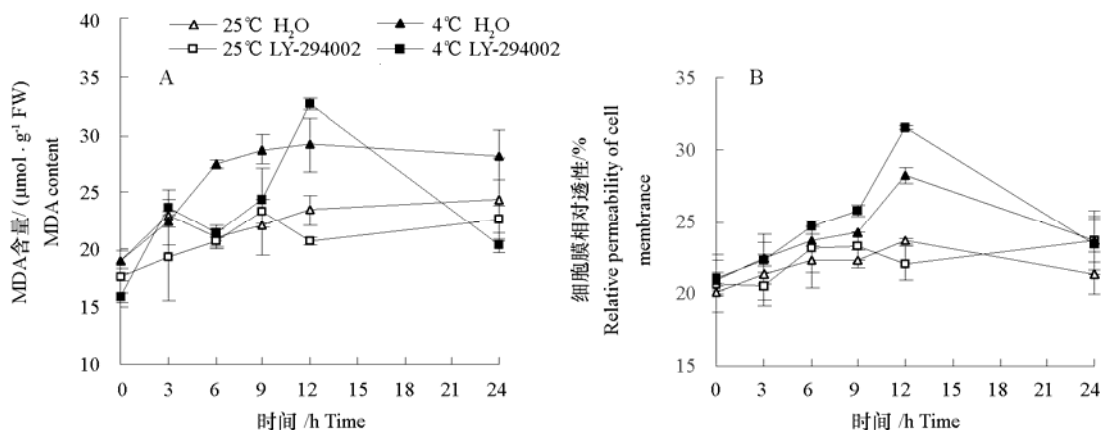


图 6 LY-294002 对低温条件下葡萄砧木品种 ‘F-242’ 叶片 MDA 含量 (A) 和细胞膜相对透性 (B) 的影响

Fig. 6 Effects of LY-294002 on the content of MDA (A) and the relative permeability of cell membrane (B) in the leaves of grape rootstock ‘F-242’ under low temperature

## 2.3 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 参与葡萄对低温胁迫的响应

### 2.3.1 低温胁迫对叶片中 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 含量的影响

由图 7 得知, 4 °C 低温处理能够引起叶片中 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 在 9 h 时猝发 ( $P < 0.05$ ), 之后含量逐步下降恢复至对照水平。初步说明 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 参与了葡萄砧木品种 ‘F-242’ 响应低温胁迫过程。

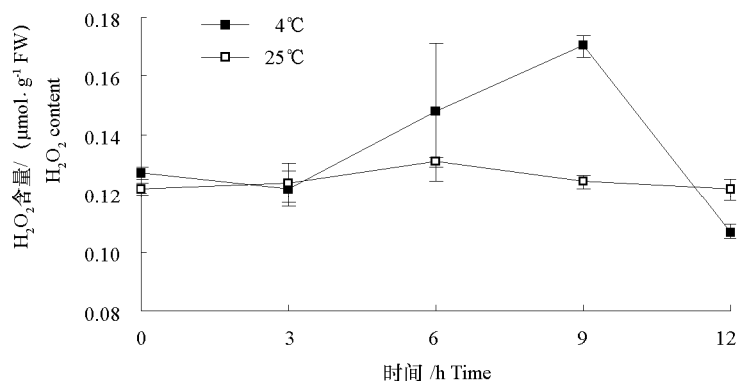


图 7 低温胁迫对葡萄砧木品种 ‘F-242’ 叶片 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 含量的影响

Fig. 7 Effects of low temperature on the content of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in the leaves of grape rootstock ‘F-242’

### 2.3.2 外源 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 和 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 清除剂对叶片中 SOD 活性和 Cu/Zn SOD 基因表达的影响

4 °C 低温处理引起对照叶片中 SOD 活性略有升高, 外源 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 能够增加 SOD 活性, 在处理 9 h 达到最大值 ( $P < 0.05$ )。H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 清除剂 AsA 可显著抑制 SOD 活性, SOD 活性在处理 9 h 开始明显下降 (图 8, A)。Real time-PCR 的结果 (图 8, B) 表明 Cu/Zn SOD 基因受低温和外源 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 的诱导, 且外施 AsA 能够减弱低温和外源 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导的 Cu/Zn SOD 基因转录水平的升高。由此可表明 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 能够通过影响 SOD 活性的上升参与葡萄砧木 ‘F-242’ 响应低温胁迫的过程。

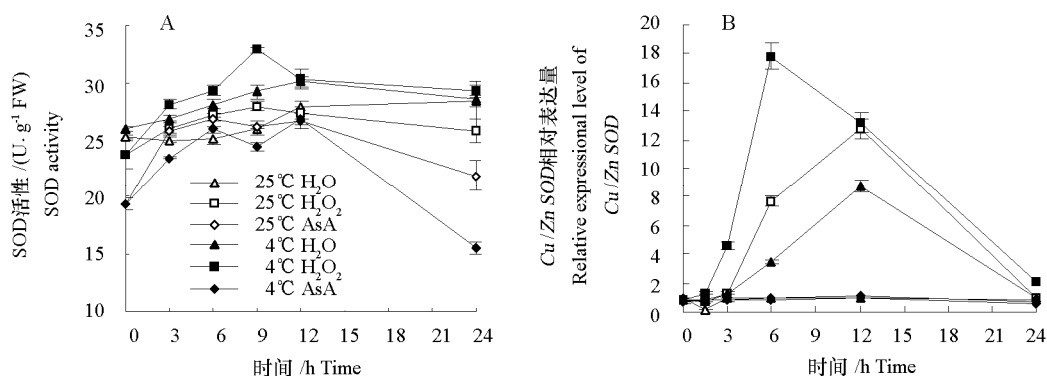


图 8 低温下 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 和 AsA 对葡萄砧木品种 ‘F-242’ 叶片 SOD 活性 (A) 及其基因表达 (B) 的影响

Fig. 8 Effects of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and AsA on the activity (A) and the expression level of SOD (B) in the leaves of grape rootstock ‘F-242’ under low temperature

### 2.3.3 外源 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 和 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 清除剂对低温条件下 MDA 含量和细胞膜相对透性的影响

4 °C 处理下对照叶片中 MDA 含量在 0 ~ 12 h 内不断升高, 然后缓慢降低。25 °C, 加入 0.1% 的 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 处理后, MDA 含量没有明显变化, 而在低温条件下加入 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 处理的叶片中 MDA 含量呈先上升趋势, 12 h 达到最大值, 随后下降, 但均低于对照水平, 差异极显著 ( $P < 0.05$ ) (图 9, A)。在



25 °C 条件下  $2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  AsA 处理的叶片中 MDA 含量变化不显著, 低温胁迫下 AsA 处理的叶片中 MDA 含量先缓慢上升, 12 h 时显著下降 ( $P < 0.05$ ), 且均比对照高。低温下外源  $\text{H}_2\text{O}_2$  引起 MDA 含量的降低, 且外施 AsA 可引起 MDA 含量的上升, 由此可表明  $\text{H}_2\text{O}_2$  参与了葡萄砧木 ‘F-242’ 响应低温胁迫的过程。

如图 9 得知, 25 °C 处理, 对照叶片中细胞膜相对透性在 0 ~ 24 h 无明显变化, 4 °C 处理时在 0 ~ 12 h 内叶片中细胞膜相对透性不断升高, 在 12 h 上升到最大值, 差异达到了显著水平 ( $P < 0.05$ )。0.1% 的  $\text{H}_2\text{O}_2$  处理后常温下叶片细胞膜相对透性有略微下降, 并可显著降低低温引起的细胞膜相对透性的升高 (图 9, B)。25 °C  $2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  AsA 对叶片的细胞膜相对透性没有明显作用, 但 4 °C 低温的细胞膜相对透性增大, 在处理 12 h 其作用最为显著 ( $P < 0.05$ )。这进一步表明  $\text{H}_2\text{O}_2$  参与了 ‘F-242’ 响应低温胁迫过程。

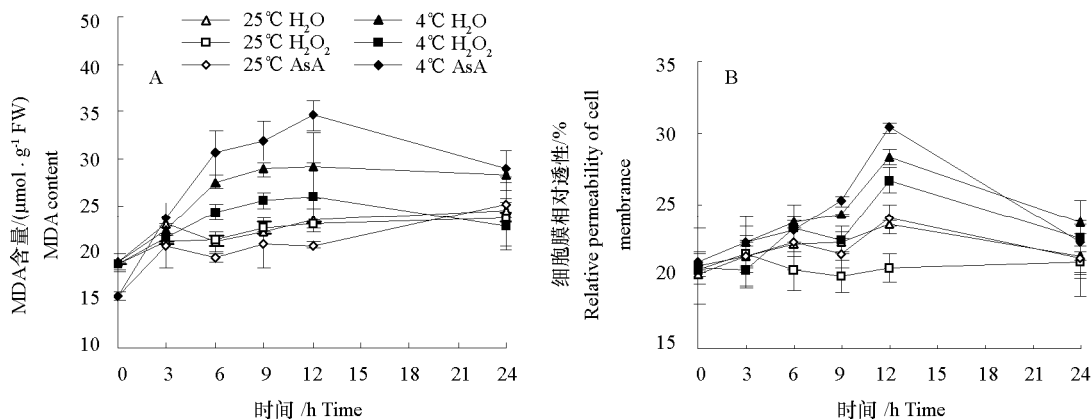


图 9 低温下  $\text{H}_2\text{O}_2$  和 AsA 对葡萄砧木品种 ‘F-242’ 叶片中 MDA 含量和细胞膜相对透性的影响

Fig. 9 Effects of  $\text{H}_2\text{O}_2$  and AsA on the content of MDA and the relative permeability of cell membrane in the leaves of grape rootstock ‘F-242’ under low temperature

#### 2.3.4 参与葡萄响应低温胁迫的 $\text{H}_2\text{O}_2$ 来源

NADPH 氧化酶是细胞内  $\text{H}_2\text{O}_2$  合成的关键酶, 图 10 说明低温处理 6 h 后 NADPH 氧化酶活性迅速升高, 12 h 时达到最高, 随后开始降低。NADPH 氧化酶的抑制剂 DPI (diphenylene iodonium, DPI) 处理后其活性降到较低水平, 说明 NADPH 氧化酶途径是葡萄响应低温胁迫过程中  $\text{H}_2\text{O}_2$  信号分子的主要来源。

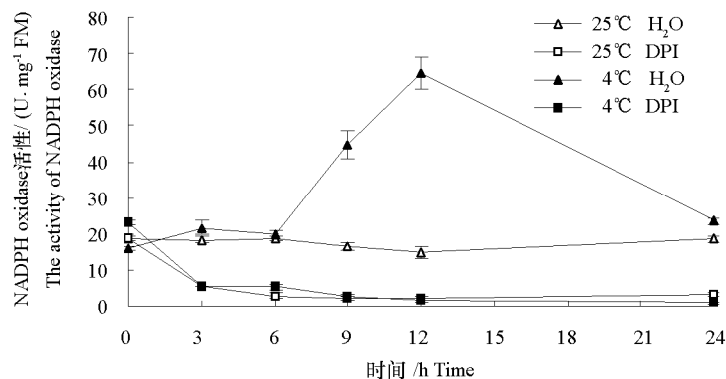


图 10 低温下 NADPH 氧化酶活性的变化

Fig. 10 The activity of NADPH oxidase under low temperature

## 2.4 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 与 VvIPK2 在响应低温胁迫时的上下游关系

### 2.4.1 低温下 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 清除剂 AsA 和 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 对 VvIPK2 相对表达量的影响

从图 11 可以看出, 4 °C 处理 12 h 后, 外施 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 可以提高 VvIPK2 相对表达量 ( $P < 0.05$ ), 而 AsA 处理后 VvIPK2 相对表达量有一定的下降。表明 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 可能位于 VvIPK2 上游参与 ‘F-242’ 响应 4 °C 低温胁迫。

### 2.4.2 低温下 IPK2 酶抑制剂对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 含量的影响

常温和低温条件下, 1.4 mmol · L<sup>-1</sup> IPK2 酶抑制剂 LY-294002 处理后 9 h 葡萄叶片 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 含量并无明显影响 (图 12)。推测 VvIPK2 位于 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 下游参与 ‘F-242’ 响应低温胁迫。

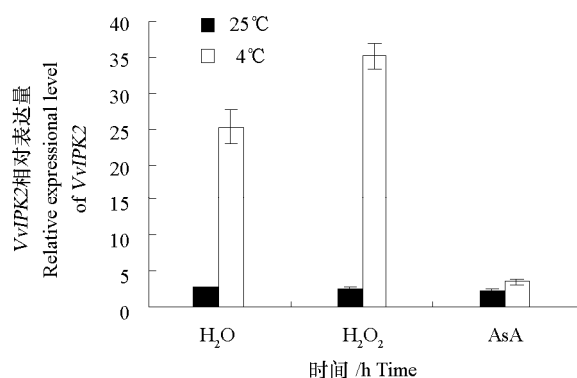


图 11 低温下 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 和 AsA 对葡萄砧木品种 ‘F-242’ 叶片 VvIPK2 相对表达量的影响

Fig. 11 Effects of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and AsA on the expression of VvIPK2 in the leaves of grape rootstock ‘F-242’ under low temperature

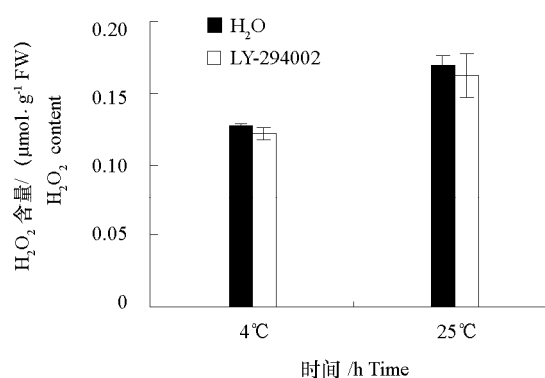


图 12 低温下 LY-294002 对葡萄砧木品种 ‘F-242’ 叶片 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 含量的影响

Fig. 12 Effects of LY-294002 on the content of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in the leaves of grape rootstock ‘F-242’ under low temperature

## 3 讨论

低温是植物生长过程中的主要环境胁迫因子之一, 植物对低温的应激是一个复杂的过程, 包括低温信号的感知、信号转导、转录调控和转录后调控等阶段。植物体可以通过质膜流动性的改变、质膜上的钙离子通透性通道、受体激酶和磷酸酯酶等感知低温。

钙信使介导的信号途径是低温应答过程中重要的信号途径。在此途径中, 因低温增加的胞质钙离子能被钙离子依赖的蛋白激酶 (calcium ion-dependent protein kinase, CDPK)、磷酸酶和有丝分裂原激活的蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinase, MAPK) 识别并传导, 最终启动 C 重复结合转录因子 (C-repeat binding transcription factors, CBF) 等抗寒基因的表达, 提高植物的抗低温能力 (Chinnusamy et al., 2006; Jan et al., 2009)。抗寒基因主要包括两类, 调节基因和功能基因, 其中本试验中克隆的 VvIPK2 属于调节基因。VvIPK2 编码产物 305 个氨基酸, 与多种植物中多磷酸肌醇激酶高度同源, 与亚麻、拟南芥、盐芥多磷酸肌醇激酶的同源性分别为 64%、62% 和 61%, 其中与亚麻的相似性为 80% (图 2)。

Yang 等 (2008) 的研究表明 IPK2 具有增强转基因烟草耐受高盐胁迫和渗透胁迫的能力。本试验中低温能够诱导 VvIPK2 的表达量升高, 而且 IPK2 的抑制剂 LY-294002 能够使葡萄的 SOD 活性减弱, Cu/Zn SOD 基因表达量降低, MDA 含量增加, 细胞膜相对透性升高, 证明 VvIPK2 参与葡萄响应低温胁迫过程 (图 4 ~ 图 6)。但是 VvIPK2 受到哪些信号物质的调节, 从而参与低温胁迫过程,

值得进一步探讨。

目前低温信号的研究主要集中在钙信使浓度的变化和低温信号转导途径中间组分的寻找,以及低温调控的冷响应基因的表达调控方面(Chinnusamy et al., 2007)。此外,刘零怡等(2009)报道  $\text{H}_2\text{O}_2$  也参与了低温胁迫过程。Mori 和 Schroeder (2004) 报道钙离子是位于过氧化氢下游的信号分子。Rentel 等(2004)和 Harper 等(2004)进一步证明了钙离子是过氧化氢含量提升后引起变化的最早期信号分子,  $\text{H}_2\text{O}_2$  作为信号引起植物器官中钙离子含量的增加(Evans et al., 2005)等。  $\text{H}_2\text{O}_2$  能够激活水稻应答低温胁迫早期的转录调节网络,  $\text{H}_2\text{O}_2$  浓度的瞬时变化能够诱导 bZIP、ERF 和 MYB 等转录因子基因表达的变化,从而在转录水平调节水稻对低温胁迫的应答(Yun et al., 2010)。本研究结果表明,低温胁迫下,葡萄叶片组织中存在  $\text{H}_2\text{O}_2$  浓度的变化,将其清除后,葡萄的抗寒能力明显下降,证明  $\text{H}_2\text{O}_2$  参与葡萄对低温胁迫的应答响应过程(图 7 ~ 图 9)。并且,低温可以诱导 NADPH 氧化酶活性升高,推测 NADPH 氧化酶途径是葡萄相应低温胁迫过程中  $\text{H}_2\text{O}_2$  信号分子的主要来源(图 10)。

在植物应答低温胁迫信号转导途径中,  $\text{H}_2\text{O}_2$  和 *VvIPK2* 两者之间的具体关系以及他们在该途径中的作用机制还知之甚少,本试验借助于药理学实验证明  $\text{H}_2\text{O}_2$  可能位于 *VvIPK2* 上游发挥作用(图 11, 图 12)。今后可以借助于分子生物学、生物信息学及蛋白质组学研究两种信号元件对冷调节基因表达的影响、转录谱的变化及蛋白水平的变化,对于深入探究植物响应低温胁迫信号转导机制具有重要指导意义。

## References

- Cheng Y, Song C P. 2006. Hydrogen peroxide homeostasis and signaling in plant cells. *Science China C: Life Science*, 49: 1 - 11.
- Chinnusamy V, Zhu J H, Zhu J K. 2006. Gene regulation during cold acclimation in plants. *Physiologia Plantarum*, 126: 52 - 61.
- Chinnusamy V, Zhu J H, Zhu J K. 2007. Cold stress regulation of gene expression in plants. *Trends in Plant Science*, 12: 445 - 451.
- Evans N H, McAinsh M R, Hetherington A M, Knight M R. 2005. ROS perception in *Arabidopsis thaliana*: The ozone-induced calcium response. *The Plant Journal*, 41: 615 - 626.
- Harper J E, Breton G, Harmon A. 2004. Decoding  $\text{Ca}^{2+}$  signals through plant protein kinases. *Annual Review Plant Biology*, 55: 263 - 288.
- Jan N, Hussain M U, Andrabi K I. 2009. Cold resistance in plants: A mystery unresolved. *Electronic Journal of Biotechnology*[online], <http://www.ejbiotechnology.cl/content/vol12/issue3/full/3/index.html>.
- Laloi C, Apel K, Danon A. 2004. Reactive oxygen signaling: The latest news. *Current Opinion Plant Biology*, 7: 323 - 328.
- Liu Gong-hua, Hou Li-xia, Liu Jing, Liu Xin, Wang Xue-chen. 2009.  $\text{H}_2\text{O}_2$  and NO are involved in ethylene regulated stomatal closure in *Arabidopsis thaliana*. *Progress in Natural Science*, 19: 841 - 851. (in Chinese)
- 刘国华, 侯丽霞, 刘 菁, 刘 新, 王学臣. 2009.  $\text{H}_2\text{O}_2$  介导 NO 合成参与乙烯诱导的拟南芥叶片气孔关闭. *自然科学进展*, 19: 841 - 851.
- Liu Ling-yi, Zhao Dan-ying, Zheng Yang, Shen Lin, Sheng Ji-ping. 2009. Hydrogen peroxide metabolism and signal transduction under cold stress in plants. *Acta Horticulturae Sinica*, 36: 1701 - 1708. (in Chinese)
- 刘零怡, 赵丹莹, 郑 杨, 申 琳, 生吉萍. 2009. 植物在低温胁迫下的过氧化氢代谢及信号转导. *园艺学报*, 37: 1701 - 1708.
- Livak K J, Schmittgen T D. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$  method. *Methods*, 25: 402 - 408.
- Mori I C, Schroeder J I. 2004. Reactive oxygen species activation of plant  $\text{Ca}^{2+}$  channels. A signaling mechanism in polar growth, hormone transduction, stress signaling, and hypothetically mechanotransduction. *Plant Physiology*, 2: 702 - 708.
- Neill S, Desikan R, Hancock J. 2002. Hydrogen peroxide signaling. *Current Opinion Plant Biology*, 5: 388 - 395.
- Qu Ling-hui, Lin Zhi-qiang, Che Yong-mei, Xie Peng, Liu Xin. 2009. Study on relationship of hormone changes and chilling resistance in leaves from one-year-old twigs of grape cultivars. *Northern Horticulture*, (6): 1 - 5. (in Chinese)

- 曲凌慧, 林志强, 车永梅, 谢 鹏, 刘 新. 2009. 三个葡萄品种叶片中激素变化与抗寒性关系的研究. 北方园艺, (6): 1 - 5.
- Rentel M C, Lecourieux D, Ouaked F, Usher S L, Petersen L. 2004. OXI1 kinase is necessary for oxidative burst-mediated signalling in *Arabidopsis*. Nature, 427: 858 - 861.
- Saiardi A, Nagata E, Luo H R, Sawa A, Luo X J, Snowman A M, Snyder S H. 2001. Mammalian inositol polyphosphate multikinase synthesizes inositol 1,4,5-trisphosphate and an inositol pyrophosphate. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 98: 2306 - 2311.
- Sagi M, Fluhr R. 2001. Superoxide production by plant homologues of the gp91 (phox) NADPH oxidase. Modulation of activity by calcium and by tobacco mosaic virus infection. Plant Physiology, 126: 1281 - 1290.
- Shears S B. 2004. How versatile are inositolphosphate kinase? Biochemistry Journal, 377: 265 - 280.
- Wang San-gen. 2000. Roles of cytokinin on stress-resistance and delaying senescence in plants. Chinese Bulletin of Botany, 17: 121 - 126. (in Chinese)
- 王三根. 2000. 细胞分裂素在植物抗逆和延衰中的作用. 植物学通报, 17: 121 - 126.
- Xia Jing-chan, Miao Yun-chen, Song Chun-peng, Miao Chen. 2005. A new method about determining  $H_2O_2$  content in plant cells by spectrophotometry. Journal of Sichuan University: Natural Science Edition, 42: 1263 - 1265. (in Chinese)
- 夏金婵, 苗雨晨, 宋纯鹏, 苗 琛. 2005. 紫外分光光度技术测定植物细胞中  $H_2O_2$  的含量. 四川大学学报: 自然科学版, 42: 1263 - 1265.
- Yang L, Tang R, Zhu J, Liu H, Mueller-Roeber B, Xia H, Zhang H. 2008. Enhancement of stress tolerance in transgenic tobacco plants constitutively expressing AtIpk2 $\beta$ , an inositol polyphosphate 6-/3-kinase from *Arabidopsis thaliana*. Plant Molecular Biology, 66: 329 - 343.
- Yun K Y, Park M R, Mohanty B, Herath V, Xu F, Mauleon R, Wijaya E, Bajic V B, Bruskewich R, de Los Reyes B G. 2010. Transcriptional regulatory network triggered by oxidative signals configures the early response mechanisms of japonica rice to chilling stress. Bioinformatics Plant Biology, 10: 16 - 20.
- Zhang Guo-zeng, Bai Ling, Song Chun-peng. 2009. Intracellular  $Ca^{2+}$  changes during cold stress in CBF1-overexpress *Arabidopsis*. Chinese Bulletin of Botany, 44: 283 - 289. (in Chinese)
- 张国增, 白 玲, 宋纯鹏. 2009. 低温胁迫下拟南芥 CBF1 超表达突变体胞质中  $Ca^{2+}$  浓度的变化. 植物学报, 44: 283 - 289.
- Zhang Xiao-li, Wang Peng-cheng, Song Chun-peng. 2009. Methods of detecting hydrogen peroxide in plant cells. Chinese Bulletin of Botany, 44: 103 - 106. (in Chinese)
- 张小莉, 王鹏程, 宋纯鹏. 2009. 植物细胞过氧化氢的测定方法. 植物学报, 44: 103 - 106.
- Zhang Z B, Yang G, Arana F, Chen Z, Li Y, Xia H J. 2007. *Arabidopsis* inositol polyphosphate 6-/3-kinase (*AtIpk2 $\beta$* ) is involved in axillary shoot branching via auxin signaling. Plant Physiology, 144: 942 - 951.
- Zhu Guang-lian, Zhong Hui-wen, Zhang Ai-qin. 1990. Plant physiology experiment. Beijing: Peking University Press. (in Chinese)
- 朱广廉, 钟海文, 张爱琴. 1990. 植物生理学实验. 北京: 北京大学出版社.
- Zhu J Q, Zhang J T, Tang R J, Lv Q D, Wang Q Q, Yang L, Zhang H X. 2009. Molecular characterization of *ThIPK2*, an inositol polyphosphate kinase gene homolog from *Thellungiella halophila*, and its heterologous expression to improve abiotic stress tolerance in *Brassica napus*. Physiology Plant, 136: 407 - 425.