

文章编号: 1001-1498(2007)01-0125-05

# 机械损伤对复叶槭叶片过氧化氢含量的影响

张雯, 沈应柏\*, 沈媛媛

(1 北京林业大学生命科学与技术学院, 北京 100083)

摘要: 以复叶槭为实验材料, 采用 DAB 组织染色和分光光度法, 定性定量地检测了人为机械损伤和外源茉莉酸甲酯处理 Q 15、30、60、120、240 min 后损伤叶片, 系统叶片以及诱导叶片内  $H_2O_2$  含量的变化情况。结果显示, 机械损伤可诱导  $H_2O_2$  系统性产生, 无论是受伤叶片、系统叶片还是诱导叶片, 在伤害处理 60 min 内,  $H_2O_2$  含量一直增加, 240 min 后含量达最大值后开始下降。用  $1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  茉莉酸甲酯熏蒸健康植株后, 叶片  $H_2O_2$  含量显著增加。证明茉莉酸甲酯作为植株体内伤信号的报警信号分子, 能代替机械损伤等外界刺激启动相似的信号防御系统, 起到防御外界伤害的作用。

关键词: 复叶槭; 机械损伤; 茉莉酸甲酯; 诱导抗性

中图分类号: S718.43

文献标识码: A

## Effect of Mechanical Wounding on the Content of Hydrogen Peroxide in Ashleaf Maple Seedlings

ZHANG Wen, SHEN Ying-bai\*, SHEN Yuan-yuan

(1 College of Biological Science and Biotechnology, Beijing Forestry University, Beijing 100083)

**Abstract** Using ashleaf maple (*Acer negundo*) seedlings as materials, DAB tissue coloration and spectrophotometry as methods, the authors examined and compared the dynamic concentrations of  $H_2O_2$  in different leaves: the damaged leaves, the intact leaves of the identical damaged plant and signal induced leaves of the neighboring plants damaged by Q 15, 30, 60, 120, 240 minutes. The results showed that the mechanical wounding could induce the systemic concentrations of  $H_2O_2$ , the contents sustaining increased in 60 minutes, and reached the max point at 240 minutes. After using the MeJA ( $1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) to treat the healthy plants, the concentrations of  $H_2O_2$  increased distinctly. It could be concluded that MeJA induced the similar defensive systems instead of mechanical wounding by way of initial signals in plants, and reached the effects of defending environment wound.

**Key words** *Acer negundo*, mechanical wounding, methyl jasmonate, signal translation, induced defense

植物的一生面临各种逆境胁迫, 其中伤害是植物所面临的最为普遍的胁迫之一。为了维持自身的生命活动, 植物体必需对其做出快速而适当的反应, 同遭受其它逆境一样, 植物对机械胁迫也有其适应性

机制, 通过启动体内防御反应信号系统应答外界的伤害, 产生相应的防御反应, 这些防御反应一方面有助于受伤部位愈合, 另一方面诱导全身反应进一步阻止伤害的发生<sup>[1]</sup>。在对 1 年生草本植物进行的研究中

收稿日期: 2006-03-10

基金项目: 国家自然科学基金资助 (30170764); 北京林业大学研究生自选课题基金资助 (05jj033)

作者简介: 张雯 (1981-), 女, 河北石家庄人, 北京林业大学硕士研究生, 主要从事植物生理生态方面的研究工作, Tel 010-62338841,

E-mail mosquitowen@yahoo.com.cn

\* 通讯作者: 沈应柏, 男, 副教授, 主要从事气体信号介导的植株间信息传递机理和植物生理生态方面的研究, Tel 010-62338129, E-mail ybsher@bjfu.edu.cn

E-mail ybsher@bjfu.edu.cn

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. <http://www.cnki.net>

发现<sup>[2]</sup>, 植株在受到伤害后不仅在受伤部位产生防御反应, 在伤口远端的组织中也迅速产生类似的反应, 这种作用甚至快速传递到邻近的植物。

茉莉酸及其甲酯 (methyl jasmonate, MeJA) 对植物的生理作用是多方面的, 特别是作为创伤信号分子的研究备受关注。在烟草 (*Nicotiana tabacum* L.)<sup>[3]</sup>、蚕豆 (*Vicia faba* L.)<sup>[4]</sup>、马铃薯 (*Solanum tuberosum* L.)<sup>[5]</sup>、番茄 (*Lycopersicon esculentum* Mill.)<sup>[6]</sup> 等多种作物中的研究表明, MeJA 可以将创伤信息传递到植物体内的其它部位, 进而激发植物防御基因表达。活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 作为植物抗性信号分子已经为大量研究结果所证实, 生物和非生物胁迫均可以激活早期防御基因, 不同程度的影响植物细胞氧化还原状态, 导致大量 ROS 产生并积累。Channongpol 等<sup>[7]</sup> 用含一个反义过氧化氢酶基因的转基因烟草进行了一系列试验, 证明了局部活性氧的积累在植物系统获得性抗性 (systemic acquired resistance, SAR) 的系统信号传导中具有一定的作用。H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 作为第二信使将侵染信号传入细胞内, 使依赖于氧化还原的转录因子被激活, 启动防卫反应基因表达, 从而使植物产生抗病反应。由于活性氧的寿命十分短, 反应活性特别强, 为活性氧检测带来了很大难度。有关活性氧在植物局部获得性抗性 (local acquired resistance, LAR) 和系统获得性抗性 (SAR) 中的作用仍存在很多争论<sup>[8]</sup>。本文以复叶槭 (*Acer negundo* L.) 为实验材料, 采用组织化学原位定位等方法, 研究人为机械损伤与茉莉酸甲酯熏蒸复叶槭后, 复叶槭叶片中 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 含量变化的规律, 旨在了解 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 在树木个体间伤害防御反应中的作用, 并为进一步揭示 MeJA 作为伤信号分子的作用机制提供理论依据。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

1 年生复叶槭 (*Acer negundo* L.) 扦插苗。2005 年 3 月扦插于 25 cm 直径的塑料盆中, 定期浇水, 以避免产生干旱胁迫影响实验结果; 缓苗后每月定期供给 50 g·kg<sup>-1</sup> Hongland 营养液, 经常挪动花盆以免根长出盆外对根系造成损伤。

### 1.2 损伤处理

实验所用密闭气室 (100 cm × 50 cm × 150 cm) 体积为 750 L, 空气通过底部开口进入气室, 开口处装有经过高温活化的活性炭以过滤空气中的杂质, 内部放置小风扇以保证气室内空气的循环, 避免产

生 CO<sub>2</sub> 胁迫而影响试验结果。密闭玻璃气室放置于 25 ℃、通气良好光线充足的实验室内。用止血钳快速夹伤 1 年生复叶槭扦插苗 (苗高 90 cm) 功能叶叶片, 伤及中脉, 损伤面积达总叶面积 (3 cm × 5 cm) 的 30%; 迅速与另一长势相同的健康植株放入同一密闭玻璃器室内, 在玻璃器室外放置一盆长势相同的复叶槭作对照, 15 min 后采样; 再将另一损伤植株与另一健康植株同时放入密闭气室, 30 min 后采样; 依次进行损伤 60, 120, 240 min 的采样。分别采集诱导处理了 15, 30, 60, 120, 240, 360, 480 min 受损伤植株的损伤叶、同株未受伤害叶片, 邻近健康植株的叶片和对照叶片。采样完毕迅速将叶片投入液氮中, -80℃ 保存备用。每个处理重复 3 次, 计算平均值和标准差。实验设计如图 1。

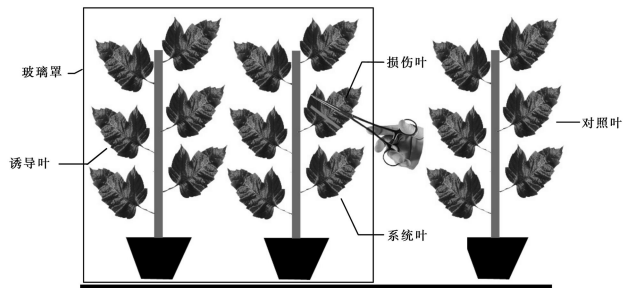


图 1 损伤处理实验设计图

### 1.3 MeJA 熏蒸处理

预先以二氯甲烷为溶剂配制 1 mmol·L<sup>-1</sup> 的茉莉酸甲酯。将用无水乙醇消毒过的蒸发皿放在气室中, 吸取适量的浓度为 1 mmol·L<sup>-1</sup> 的茉莉酸甲酯放在培养皿中, 使其在气室中的终浓度为 1 μmol·L<sup>-1</sup>。立即密封气室开始计时, 熏蒸 15 min 后采集气室内熏蒸叶片; 再将另一株健康植株放入气室内熏蒸 30 min 后采样, 依次进行 60, 120, 240 min 的采样工作。对照实验是分别以扣除了茉莉酸甲酯后所对应的一定浓度的二氯甲烷熏蒸复叶槭植株的样品。采样完毕迅速将叶片投入液氮中, -80℃ 保存备用。对照植株与熏蒸植株同期取样。每个处理重复 3 次, 计算平均值和标准差。

### 1.4 过氧化氢含量测定

准确称取 0.5 g 复叶槭叶片, 加入少量 PVPP 在液氮下充分研磨, 按 1/10 (w/v) 加入预冷的 5% TCA 5 mL, 4℃ 下 10 000 g 离心 20 min, 取 1 mL 上清, 加入 1 mL pH 7.0 的磷酸钾缓冲液, 1 mL 1 mmol·L<sup>-1</sup> 的 KI 溶液, 混合充分, 在 390 nm 处测定其吸光值。结果以 μmol·g<sup>-1</sup> Fw 表示, 测定重复 3 次取平均值。

## 1.5 过氧化氢原位定位

参照 M. C. ROMERO-PUERTAS 方法并加以改进<sup>[9]</sup>。取人为机械损伤处理和茉莉酸甲酯熏蒸处理的完整植株叶片, 迅速浸入 pH 值 6.5 浓度为  $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  的 MES 缓冲液 (含 1% 的 DAB) 中, 放入真空干燥器真空渗透抽滤植物叶片 30 min, 保证植物叶片沉入缓冲液液面以下, 再将浸有叶片的溶液在室温下避光孵育 8 h 直至叶片出现褐色斑点, 光照射溶液后用 95% 的乙醇对叶片进行脱色, 使褐色斑点更加明显, 然后将叶片浸泡在蒸馏水中。为了检验  $\text{H}_2\text{O}_2$  反应的专一性, 将处理叶片先浸泡在  $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  抗坏血酸溶液中 2 h, 然后将其浸泡到含 1% DAB 的 MES 缓冲液中, 真空渗透、孵育、乙醇脱色。目测叶片中红褐色沉淀量并照相。

## 1.6 数据分析

用 STATISTICA 6.0 软件对数据作 Students' *t* 检验、方差分析和相关性分析, 并对同一机械损伤处理时间内的损伤叶、系统叶和诱导叶中  $\text{H}_2\text{O}_2$  的含量进行差异显著性检验。

## 2 结果与分析

### 2.1 不同处理后叶片 $\text{H}_2\text{O}_2$ 含量的变化

#### 2.1.1 机械损伤对叶片过氧化氢含量变化的影响

从图 2 可以看出, 对复叶槭叶片进行人为伤害后, 其损伤叶、系统叶及诱导叶中过氧化氢含量与对照叶 ( $0.17 \mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1}$ ) 相比均有显著的增加。15 min 时损伤叶中的  $\text{H}_2\text{O}_2$  含量便迅速增加, 达到  $0.85 \mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1}$ , 表明植株在短期内即可对伤害做出反应, 30 min 时叶片过氧化氢含量仍在持续增加, 损伤 60 min 达到一个峰值 ( $2.13 \mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1}$ ), 随后在 120 min 时有所下降, 直至伤害 240 min 时, 叶片过氧化氢含量出现最大值  $2.48 \mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1}$ , 此后含量一直呈下降的趋势。系统叶片  $\text{H}_2\text{O}_2$  含量在 60 min 内也略有增加, 说明植株对伤害的反应是由伤口部位向远处传递的, 所以未受损伤叶片的反应相对于损伤叶有所滞后, 在 240 min 时  $\text{H}_2\text{O}_2$  含量达到最大值  $1.66 \mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1}$ , 低于损伤叶  $\text{H}_2\text{O}_2$  含量峰值, 之后随着时间的增长含量逐渐下降。远端诱导叶片  $\text{H}_2\text{O}_2$  含量变化趋势与系统叶片相同, 但峰值出现的时间明显较损伤叶片和系统叶片滞后; 损伤叶  $\text{H}_2\text{O}_2$  含量一直高于同株的系统叶和不同株的诱导叶。这说明, 机械损伤不仅可以使受伤叶片迅速产生  $\text{H}_2\text{O}_2$ , 防止进一步伤害, 受伤植株还可以释放某种挥发性物质充当报警信号的作用<sup>[10]</sup>,

作为移动的信号分子诱导未感染叶片中相关抗性基因的转录与表达, 从而影响  $\text{H}_2\text{O}_2$  的含量。

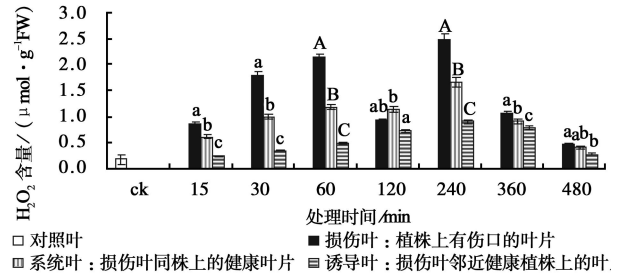


图 2 机械损伤不同时间叶片过氧化氢含量变化 (图中同一处理时间内三种不同叶片以 A, B, C 标记者差异极显著 ( $P < 0.01$ ), a b c 标记者差异显著 ( $P < 0.05$ ), 相同字母标记者差异不显著 ( $P > 0.05$ ))

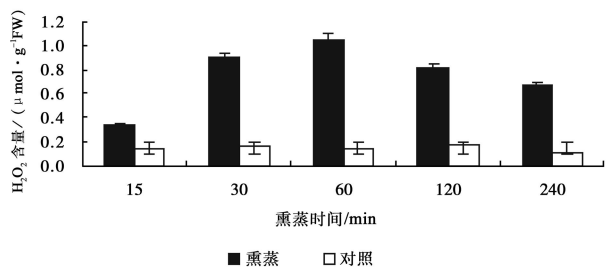
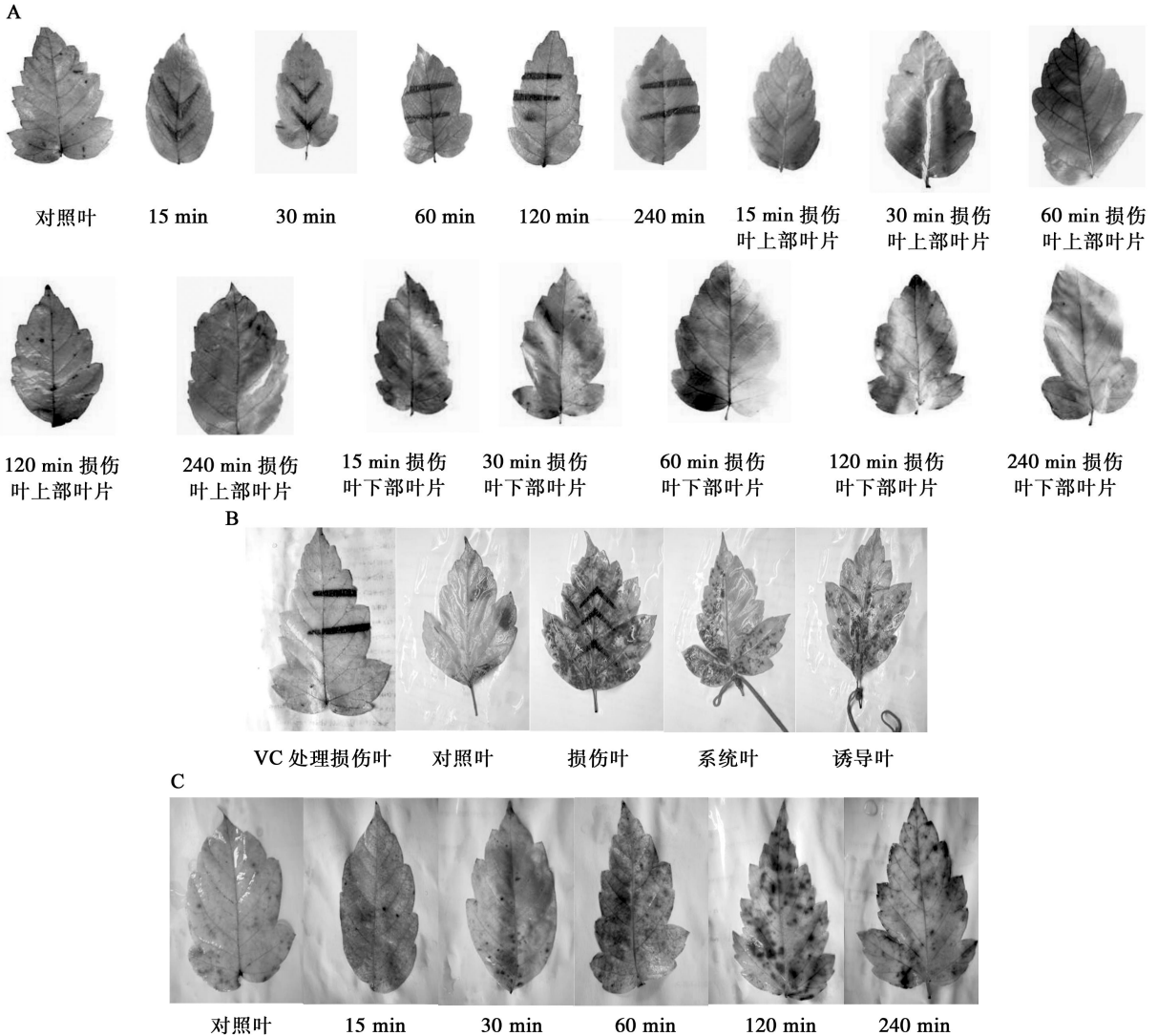


图 3 茉莉酸甲酯熏蒸不同时间后叶片过氧化氢含量变化

2.1.2 外源茉莉酸对叶片过氧化氢含量变化的影响 用茉莉酸甲酯熏蒸健康植株后, 叶片也产生与机械损伤相类似的反应。由图 3 可以看出, 熏蒸叶片的  $\text{H}_2\text{O}_2$  含量在 60 min 内呈一个逐渐上升的趋势, 在此时达到峰值, 含量为  $1.05 \mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1}$ , 随后便开始有所下降, 但熏蒸叶片  $\text{H}_2\text{O}_2$  含量一直明显高于对照叶片。这说明, 茉莉酸甲酯能代替机械损伤等外界刺激启动相似的信号防御系统, 作为植株体内伤信号的报警信号分子, 诱导健康植株叶片中间信号物质  $\text{H}_2\text{O}_2$  含量的增高, 从而启动植物体内一系列的抗病基因的表达, 起到防御外界伤害的作用。

### 2.2 不同处理后叶片 $\text{H}_2\text{O}_2$ 原位定位照片

为了检验机械损伤和外源茉莉酸甲酯对复叶槭叶片过氧化氢产生情况的影响, 参照 M. C. Romero-Puertas 方法并加以改进<sup>[9]</sup>。用 1% 的 DAB 溶液对叶片进行组织化学原位检测, 由于 DAB 可以与过氧化氢在产生处发生反应, 并且有红褐色斑点产生, 而预先经抗坏血酸 (Vc) 溶液浸泡 2 h 处理的叶片上几乎无斑点, 说明  $\text{H}_2\text{O}_2$  的产生具有专一性, 通过观察产生的斑点便可观察过氧化氢聚集的情况。运用这种方法, 可以更加直观地对  $\text{H}_2\text{O}_2$  的产生进行定性分析。



将不同条件处理过的复叶槭叶片在避光条件下浸于 1% DAB 溶液中 8 h 直至斑点产生,再用无水乙醇煮至叶片颜色褪去。VC 处理损伤叶是为了检验 DAB 对  $H_2O_2$  的特异性,将人为机械损伤 30 min 的叶片在其浸入 DAB 溶液中染色前,先在  $1\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  抗坏血酸溶液中浸泡 2 h。A. 机械损伤不同时间复叶槭叶片过氧化氢原位定位照片; B. 机械损伤 30 min 叶片与诱导叶片过氧化氢原位定位照片;

C. 茉莉酸甲酯熏蒸不同时间复叶槭叶片过氧化氢原位定位照片。

图 4 不同处理后复叶槭叶片  $H_2O_2$  原位定位照片

从图 4A 中可以看出,在复叶槭叶片受到人为的机械伤害后,叶片会迅速在受伤部位累积  $H_2O_2$ ,产生红褐色斑点的聚集,并且随着伤害时间的延长,叶片上红褐色斑点的数量逐渐增多,斑点主要集中分布在叶片受伤部位以及主叶脉周围,损伤叶上下邻近叶片上也有红褐色斑点的产生。与损伤叶同株的系统叶片及不同株的诱导叶片上都不同程度的出现了红褐色斑点(见图 4B)。

用茉莉酸甲酯对健康植株进行熏蒸后,其不同熏蒸时间点的叶片进行染色后,未熏蒸叶片上几乎没有斑点出现;熏蒸 15 min 叶片上开始有少量的细小斑点出现;熏蒸 60 min 及 120 min 后,满叶均布满

了斑点(图 4C)。用此方法目测了机械损伤及茉莉酸甲酯熏蒸后复叶槭叶片过氧化氢产生的情况。

### 3 讨论

#### 3.1 $H_2O_2$ 在植株间的信号转导作用

植株在遭受逆境时,组织体内会发生许多生理生化变化,既在受伤叶片发生局部反应,又在位于受伤位点的末端未受伤叶片发生整体反应,因而引发了受伤信号的产生、运转、感知接收和传导等以激活受伤诱导基因的表达<sup>[11]</sup>,大多数的受伤诱导反应发生在受伤后几分钟到几小时之间。植物首先会在受伤部位产生大量的活性氧,包括在损伤组织的超氧

化<sup>[12]</sup>, 局部的、系统的产生<sup>[13]</sup>。高浓度的活性氧对植物细胞有毒害作用, 而低浓度时, 由于植物体内的清除系统将其不断清除, 并不表现出机体的损伤, 而且还可以充当信号分子参与植物的某些反应过程。其防御系统被激活, 促使过氧化氢含量增加以起到传递伤信号的作用。“氧化迸发”产生的活性氧是植物防御反应的标志。H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 是植物体内一种最稳定的活性氧, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 在细胞壁蛋白的交联、信号传导中作为 PR 基因表达的调节因子以及在植物细胞的死亡过程中都有作用。

研究表明: 复叶槭在受到机械伤害后 15 min 便出现“氧化迸发”现象, 受伤叶片过氧化氢含量在处理后的 60 min 出现了一个峰值, 至 120 min 时有所下降, 此后含量又开始有所增加, 4 h 左右 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 达最大量, 然后随着时间的推移下降。分析其原因为病原菌或其激发子诱导过氧化氢的产生分为两个阶段, 第一阶段产生的过氧化氢量很少, 出现时间早, 持续时间也很短, 亲合性与非亲合性反应都可以诱导这一阶段过氧化氢的产生。而第二阶段产生的过氧化氢最多, 持续时间也长, 同时出现时间晚, 并且这一阶段过氧化氢的产生只有在非亲合性反应中才会产生。

实验发现人为损伤复叶槭叶片后, 其同株未受损叶片中 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 的含量在一定的时间内也有所提高, 但其叶片的反应滞后于损伤叶片。这表明植株整体的抗性反应, 即对于受伤刺激, 植物会合成一类信号分子, 这种信号分子可以长距离运输到植物全身的各个部位, 包括未受伤的叶片, 从而诱导抗性相关基因的表达。同时还发现与损伤复叶槭邻近的健康植株叶片中 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 的含量受损伤植物的影响也有升高, 说明复叶槭损伤后释放出了某种物质, 这种物质充当了报警信号的作用, 由它通知邻近的植株进入警戒状态。H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 的迸发作为叶片细胞内应答伤信号的信号分子, 先于其他抗性反应起作用, 可以作为一种重要的早期诱导抗性信号分子, 起到保护健康植株免受伤害的预先报警作用。

### 3.2 MeJA 在植株间信号传递中的作用

茉莉酸甲酯可诱导植物体蛋白酶抑制剂、营养贮存蛋白、病程相关蛋白的合成及防御基因的表达, 从而调控着植物的一系列连锁防御反应。近来对烟草和拟南芥 (*Arabidopsis thaliana* (L.) Heyn) 等草本植物的研究发现, 伤诱导使草本植物体释放大量的茉莉酸甲酯, 由它“通知”未受伤部位和邻近植物进入“警戒状态”以抗御害虫和致病菌的入侵。茉莉酸甲酯作为抗病信号的传递体之一, 在植物抗病中参与了局部和系统的抗性<sup>[13, 14]</sup>。作者用 1 μmol

• L<sup>-1</sup> 外源茉莉酸甲酯对健康复叶槭植株进行处理后, 发现其可以提高健康复叶槭叶片中 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 的含量, 代替机械损伤等外界刺激启动相似的信号防御系统, 作为植株体内伤信号的报警信号分子, 这可为 MeJA 在木本植物系统抗性中作为进行长距离运输的信号分子提供有力的证据。

### 参考文献:

- [1] León J, Rojo E, Sanchez-Serrano J J. Wound signalling in plants [J]. *Journal of Experimental Botany*, 2001, 354 (52): 1~9
- [2] Wierstra I, Kloppstech K. Differential effects of methyl jasmonate on the expression of the early light inducible proteins and other light regulated genes in barley [J]. *Plant Physiology* 2000 124: 833~844
- [3] Bakwin IT, Zhang Z P, Diab N. Quantification, correlations and manipulations of wound-induced changes in jasmonic acid and nicotine in *Nicotiana sylvestris* [J]. *Planta* 1997, 201: 397~404
- [4] Liu X, Zhang SQ, Lou CH, et al. Effect of localized scorch on the transport and distribution of exogenous jasmonic acid in *Vicia faba* [J]. *Acta Botanica Sinica*, 2002, 44(2): 164~167 (in Chinese)
- [5] Cohen Y, Gisi U, Nideman T. Local and systemic protection against phytophthora infections induced in potato and tomato plants by jasmonic acid and jasmonic methyl ester [J]. *Phytopathology*, 1993, 83: 1054~1062
- [6] Orozco-Cardenas M L, Narvaez-Vasquez J, Ryan C A. Hydrogen peroxide acts as a second messenger for the induction of defense genes in tomato plants in response to wounding, systemin and methyl jasmonate [J]. *Plant Cell* 2001, 13: 179~191
- [7] Channongpol. Defense activation and enhanced pathogen tolerance induced by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in transgenic tobacco [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, 95: 5818~5823
- [8] 江静. 植物胁迫信号转导过程中活性氧和促细胞分裂原活化蛋白激酶的调节作用 [J]. *植物生理与分子生物学学报*, 2005, 31(1): 1~10
- [9] Romero-Puertas M C, Rodriguez-Semanó M. Cadmium-induced subcellular accumulation of O<sub>2</sub><sup>-</sup> and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in pea leaves [J]. *Plant Cell and Environment* 2004, 27: 1122~1134
- [10] Aminura G-I, Ozawa R, Horiuchi F-I et al. Plant-plant interactions mediated by volatiles emitted from plants infested by spider mites [J]. *Biochemical Systematics and Ecology*, 2001, 29(10): 1049~1061
- [11] 刘丽艳. 番茄受伤信号传导及诱导抗性的研究进展 [J]. *黑龙江农业科技*, 2004(6): 38~41
- [12] 孔垂华, 胡飞. 植物化学通讯研究进展 [J]. *植物生态学报*, 2003, 27(4): 561~566
- [13] Döken N, Miura Y, Chai H-B. Involvement of active oxygen in induction of plant defense response against infection and injury [A]. In: Pelle, Steffen K. *Active Oxygen/Oxidative Stress and Plant Metabolism* [M]. *American Society of Plant Physiologists*, 1991, 184~196
- [14] Orozco-Cardenas M, Ryan C. A. Hydrogen peroxide is generated systemically in plant leaves by wounding and systemin via the octadecanoic pathway [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 1999, 96: 6553~6557