

ABA 对拟南芥 *AtHsfA1a* 在冷胁迫响应中 生理指标的影响

姚丽媛¹, 戴利利¹, 陈子牛^{1,2}, 郭丽红^{2,3,*}

(1. 昆明学院 农学与生命科学学院, 云南 昆明 650214;

2. 云南省高校特色生物资源开发与利用重点实验室, 云南 昆明 650214;

3. 昆明学院 研究生处, 云南 昆明 650214)

摘要: 为从生理水平探讨低温下脱落酸 (ABA) 与拟南芥热激因子 *AtHsfA1a* 的关系, 以拟南芥热激因子 *AtHsfA1a* 基因 T-DNA 插入突变型 (MT) 和野生型 (WT) 拟南芥为实验材料, 研究外源 ABA 对 *AtHsfA1a* 不同基因型拟南芥在低温下的生理指标的影响。结果表明, 低温可使幼苗中 MDA 和 H_2O_2 增加, *AtHsfA1a* 基因突变型增加较明显, 加入外源 ABA 后 MDA 和 H_2O_2 有所降低, *AtHsfA1a* 基因突变型降低较少。而抗氧化酶变化趋势正好相反, 突变型拟南芥的 SOD、CAT、GR 和 APX 活性在低温中比野生型升高小, ABA 对冷胁迫中突变型拟南芥抗氧化酶 SOD、CAT、GR 和 APX 活性影响较小。说明外源 ABA 在 *AtHsfA1a* 提高抗冷性过程中有调控作用。

关键词: 脱落酸; 拟南芥热激因子 *AtHsfA1a*; 冷胁迫; 生理指标

中图分类号: Q943.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1674 - 5639 (2020) 06 - 0059 - 05

DOI: 10.14091/j.cnki.kmxyxb.2020.06.013

Effects of ABA on Physiological Indexes of Arabidopsis *AtHsfA1a* in Response to Cold Stress

YAO Liyuan¹, DAI Lili¹, CHEN Ziniu^{1,2}, GUO Lihong^{2,3,*}

(1. College of Agriculture and Life Sciences, Kunming University, Kunming, Yunnan, China 650214;

2. Key Laboratory of Special Biological Resource Development and Utilization of Universities in Province, Kunming University, Kunming, Yunnan, China 650214;

3. Postgraduate Department, Kunming University, Kunming, Yunnan, China 650214)

Abstract: In order to study the relationship between abscisic acid (ABA) and Arabidopsis heat shock factor *AtHsfA1a* at low temperature, Arabidopsis heat shock factor *AtHsfA1a* gene Mutant of T-DNA insertion (MT) and wild type (WT) of Arabidopsis were used as experimental materials to study the effect of Exogenous ABA on the physiological indexes of different *AtHsfA1a* genotypes of Arabidopsis seedlings at low temperature. The results showed that the content of MDA and H_2O_2 in the Arabidopsis mutant increased significantly. The content of MDA and H_2O_2 decreased after the addition of Exogenous ABA, while that of MDA and H_2O_2 decreased less in *AtHsfA1a* gene mutation, but the change trend of antioxidant enzymes was the opposite. The SOD, CAT, GR and APX of Arabidopsis mutant increased less; ABA had little effect on the activity of SOD, CAT, GR and APX of Arabidopsis mutant under cold stress. It is suggested that exogenous ABA can regulate on the process of improving the cold resistance of *AtHsfA1a*.

收稿日期: 2020 - 02 - 13

基金项目: 国家自然科学基金资助项目“拟南芥热激因子 *AtHsfA1a* 对抗氧化酶的调控”(31060039); 国家自然科学基金资助项目“拟南芥热激因子 *AtHsfA1a* 对细胞程序性死亡的调控”(31260061); 云南省高校特色生物资源开发与利用重点实验室资助项目“拟南芥 *AtHsfA1a* 调控抗逆性的作用机制研究”(GXZD201601)。

作者简介: 姚丽媛 (1981—), 女, 云南丽江人, 讲师, 硕士, 主要从事农业生理生态研究。

*** 通讯作者:** 郭丽红 (1971—), 女, 云南大理人, 教授, 博士, 主要从事植物逆境生理生化与分子生物学研究,
E-mail: guolihong7122@163.com.

Key words: ABA; Arabidopsis heat shock factor AtHsfA1a; cold stress; physiological index

近年来,植物激素脱落酸(Absciscic acid, ABA)作为环境胁迫中的重要信号分子,其研究范围越来越深入广泛.研究^[1-5]表明,植物在高温、低温、干旱、盐胁迫等逆境中体内ABA迅速积累而增强抗逆性.热激因子(Heat shock transcription factor, HSF)是真核生物中相对保守的一个转录因子家族^[6].作为逆境信号传导通路中的重要成员,它能直接启动下游抗逆境基因的表达,从而提高抗逆境的能力^[7-10].有资料显示:拟南芥热激因子HsfA6b作为ABA信号通路下游的一个正调节器,调节盐和干旱胁迫的响应,是耐热性建立所必需的^[11];小麦热激因子TaHsfC2a通过ABA介导的调控途径构建了耐热机制^[12];并且外源ABA能通过H₂O₂上调水稻叶片中热激因子OsHsfA4a和OsHsfA2a的表达^[13].尽管研究显示,在逆境中ABA能调控部分热激转录因子HSF的表达,但关于ABA与转录因子HSF如何从生理水平协同提高抗逆性的研究相对较少.众所周知,在自然界中植物往往通过自身的生理防御系统保护自己免受逆境的伤害.已知植物在逆境中会产生大量的活性氧(AOS),活性氧会导致细胞膜系统的氧化损伤^[14-16].而植物细胞存在抗氧化酶系统,包括SOD(EC,1.15.1.1),CAT(EC,1.11.1.6),GR(EC,1.6.4.2)和APX(EC,1.11.1.7),在逆境中它们的活性可得到不同程度的增强,能将活性氧控制在细胞可以忍耐的水平^[17-23].大量研究^[2-5]发现,外源ABA在逆境中会提高抗氧化酶的活性而降低氧化胁迫的伤害.本课题组前期研究也发现,过量表达拟南芥热激因子AtHsfA1a植株中的抗氧化酶SOD、CAT和APX活性会明显增强^[17]而降低渗透胁迫.哪ABA与拟南芥热激因子AtHsfA1a是否会影响逆境生理指标存在协调效应,值得进一步研究.

为了研究外源ABA对拟南芥热激因子AtHsfA1a在低温响应中生理指标的影响,采用AtHsfA1a基因T-DNA插入的突变体及野生型的拟南芥幼苗为材料,在冷胁迫下分析AtHsfA1a突变体及野生型植株的逆境生理生化指标MDA、H₂O₂、SOD、CAT、GR和APX变化,以及拟南芥热激因子AtHsfA1a在响应热胁迫中ABA的生理调控作用,以期为进一步研究植物耐逆境机理奠定生理基础.

1 材料与方法

1.1 材料

采用拟南芥哥仑比亚种(Arabidopsis thaliana, Ecotype Columbia)的T-DNA插入AtHsfA1a基因突变型(SALK-068042,简称MT)为实验材料,以野生型(简称WT)为实验对照.实验材料购于美国生物资源中心ABRC.

1.2 方法

1.2.1 材料栽培及低温处理

两种基因型(MT和WT)种子依次用0.1%的HgCl₂和体积分数为70%的乙醇进行灭菌处理,在无菌条件下播种于1/2MS固体培养基中,置于光照培养箱中,培养条件为:温度22℃、光照12 000 lx 16 h/d.取4周的拟南芥幼苗浸没在SIB Buffer(0.5 mmol/L K₂HPO₄, 0.5 mmol/L KH₂PO₄, 1%蔗糖, pH6.0)中,低温4℃处理2 d.以22℃为对照实验的处理温度.

1.2.2 MDA测定

取低温处理过的小苗500 mg在液氮中研碎,悬浮于5 mL 10%的三氯乙酸中.采用TBA法对植物叶片的MDA进行测定,测定450, 532, 600 nm波长下的吸光度值,根据 $C = 6.45(A_{532} - A_{600}) - 0.56A_{450}$ 计算MDA浓度^[18].

1.2.3 H₂O₂测定

取低温处理过的小苗500 mg在液氮中研碎,悬浮于1.5 mL 100 mmol/L磷酸盐缓冲液中(pH6.8).H₂O₂浓度分析按照Gay and Gebicki 2000年的方法^[19].

1.2.4 抗氧化酶活性测定

1) 酶的提取.取低温处理过的小苗500 mg,加入5 mL 50 mmol/L的Tris-HCl(pH7.0),内含20%甘油,1 mmol/L ASA, 1 mmol/L DTT, 1 mmol/L EDTA, 1 mmol/L GSH及5 mmol/L MgCl₂,在冰上研磨后,提取液在4℃下,经过20 000 × g离心30 min,上清液用来测定酶活性.

2) 酶活性测定. SOD活性的测定方法参照Zhang等^[20]的方法,以加入邻苯三酚来启动反应,同时每30 s记录1次319.5 nm处的吸光值,共测

4 min; CAT 活性的测定方法参照 Aebi^[21] 的方法, 在 240 nm 下测定; APX 活性的测定方法参照 Rao 等^[22] 的方法, 在 290 nm 下测定; GR 的测定参照 Knörzer 等^[23] 方法, 以基于 NADPH 的氧化作用在 340 nm 下的吸光度的减少来衡量; 蛋白质含量的测定以牛血清蛋白为标准, 采用 Bradford^[24] 的方法.

上述所有实验重复 3 次, 每次实验有 2 个取样重复, 重复 3 次测定. 数据均表示为 ($\bar{x} \pm s$).

2 实验结果

2.1 ABA 对 *AtHsfA1a* 突变型幼苗在冷胁迫下 MDA 的影响

MDA 是膜脂过氧化后最重要的产物之一, 其浓度可以反映植物细胞膜遭受逆境伤害的程度. 从图 1 可看出, 在低温下不同基因型拟南芥幼苗中 MDA 浓度均升高, 但突变型拟南芥 (MT) MDA 的浓度较野生型 (WT) 高, 在加入外源 ABA 处理后, 无论突变型还是野生型 MDA 的浓度都有所下降, 但突变型下降幅度较小, 表明外源 ABA 抑制 MDA 的形成与热激因子 *AtHsfA1a* 呈正相关, 说明外源 ABA 和 *AtHsfA1a* 协同降低 MDA 浓度, 从而降低低温对细胞膜伤害.

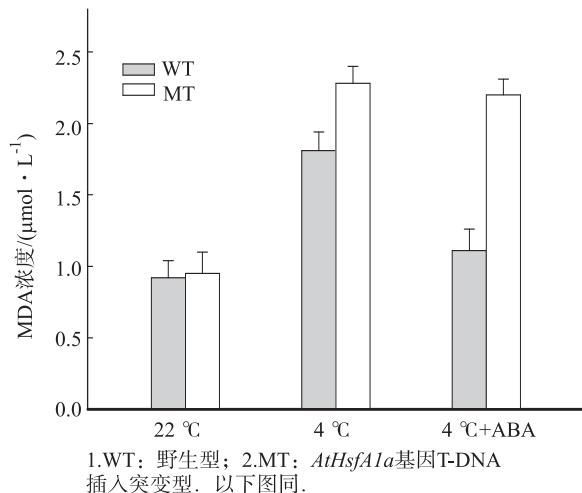


图1 ABA对*AtHsfA1a*在响应冷胁迫中MDA浓度的影响

2.2 ABA 对 *AtHsfA1a* 突变型幼苗在冷胁迫下 H_2O_2 的影响

过氧化氢 (H_2O_2) 作为一类重要的活性氧和信号分子, 其浓度的高低可以有效衡量细胞的受伤程度. 从图 2 可看出, 在常温下 2 种基因型的 H_2O_2 浓度差异不大, 而在低温胁迫下, 突变型拟

南芥所含的 H_2O_2 浓度升高较野生型明显, 加入外源 ABA 处理后不同基因型在低温下拟南芥所含 H_2O_2 都有一定程度降低, 但突变型拟南芥所含的 H_2O_2 浓度降低较野生型小, 说明外源 ABA 在低温下对 H_2O_2 浓度影响与热激因子 *AtHsfA1a* 有关, 在低温下外源 ABA 和 *AtHsfA1a* 协同降低了 H_2O_2 浓度, 从而降低低温产生活性氧的伤害.

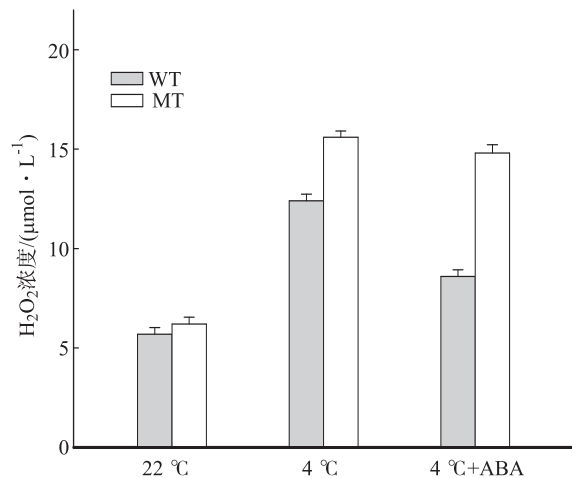


图2 ABA对*AtHsfA1a*在响应冷胁迫中 H_2O_2 浓度的影响

2.3 ABA 对 *AtHsfA1a* 突变型幼苗在冷胁迫下抗氧化酶的影响

大量研究^[17-23]发现, 抗氧化酶系统活性的增强与提高植物的抗逆性密切相关. 本研究发现, 冷胁迫处理可以使突变型和野生型植株 SOD, CAT, GR 和 APX 的活性不同程度升高 (图 3), 野生型植株的抗氧化酶活性升高均明显大于突变型植株的抗氧化酶活性. 外源 ABA 处理后对野生型植株的抗氧化酶活性升高影响较大, 而对突变型植株的抗氧化酶活性影响较小 (图 3a, 3b, 3c, 3d), 表明外源 ABA 提高抗氧化酶活性是与热激因子 *AtHsfA1a* 有协同效应, 低温下外源 ABA 和 *AtHsfA1a* 协同提高抗氧化酶活性而降低活性氧对植物的伤害, 从而提高植物的抗冷性.

3 结果与讨论

近年来, 植物激素脱落酸 (Abscisic acid, ABA) 作为环境胁迫中的重要信号分子, 能调控一些热激转录因子的表达和活性^[11-13], 但 ABA 调控热激转录因子后的生理生化过程尚有待于进一步地探讨. 热激因子 (Heat shock transcription factor, HSF) 作为逆境信号传导通路中的重要成员, 它能

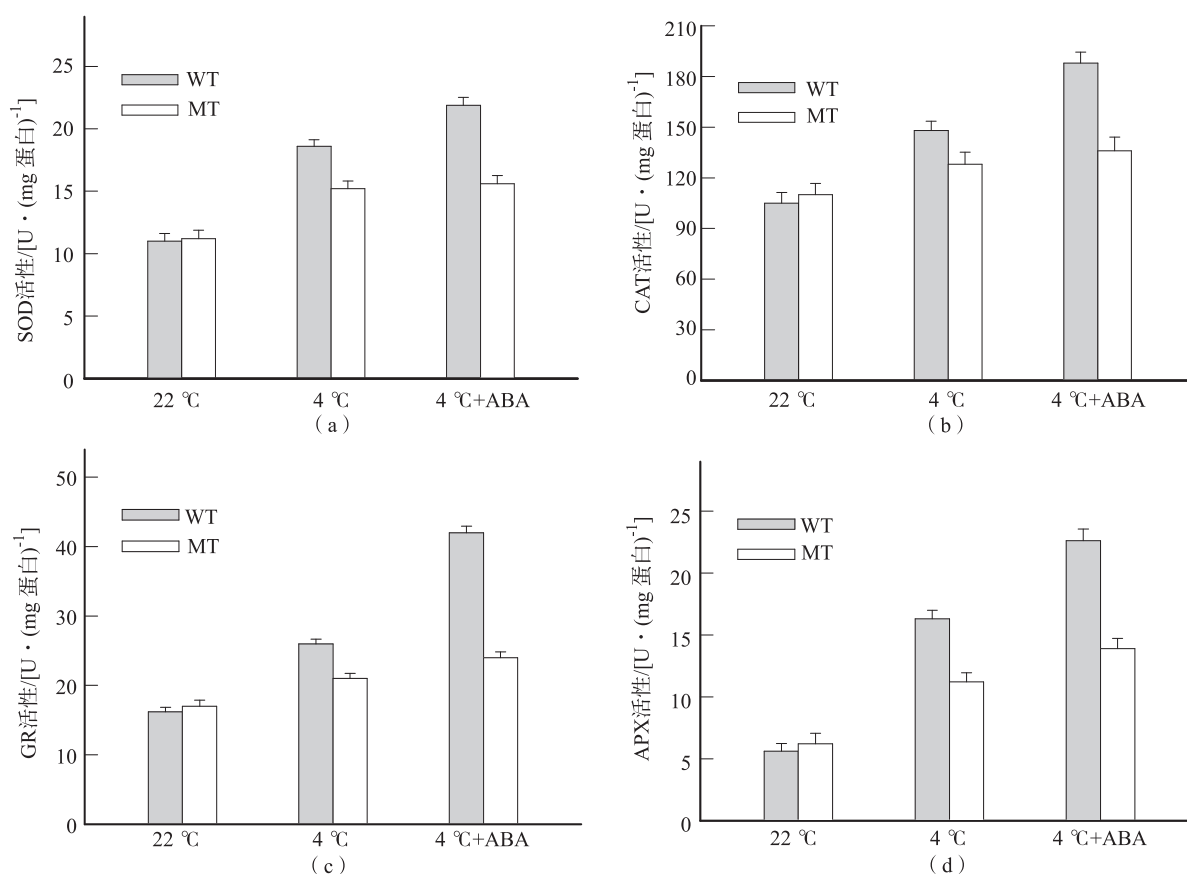


图3 ABA对AtHsfA1a在响应冷胁迫中抗氧化酶活性的影响

直接启动下游防御基因（如热激蛋白基因 *HSP*、抗坏血酸过氧化物酶 *APX* 等）的转录表达，从而提高抗逆境的能力^[6-9]。虽然，目前有研究^[7-10]显示，逆境诱导拟南芥热激因子 *AtHsfA1a* 在防御反应中发挥重要作用^[7-10]。然而，不清楚热激因子 *AtHsfA1a* 在逆境应答途径上游感应哪些逆境信号，而进一步鉴定热激因子响应逆境的本质与机理是研究的趋势。大量研究^[14-16]表明，植物细胞在逆境中反应活性氧伤害程度的生理指标丙二醛（MDA）和过氧化氢（ H_2O_2 ）等浓度会发生变化，而降低逆境伤害的抗氧化酶系统也会积极参与，SOD、CAT、GR 和 *APX* 等作为抗氧化酶系统的重要成员，在逆境中通过活性的增加来执行降低活性氧的生理功能使植物细胞受伤程度降到最低，从而提高植物抗逆性。但植物逆境中 ABA 与热激因子 *AtHsfA1a* 协同对逆境生理指标的影响研究较少。

为了研究 ABA 对拟南芥热激因子 *AtHsfA1a* 在冷胁迫响应中生理指标的影响，本研究采用 *AtHsfA1a* 基因 T-DNA 插入的突变体及野生型的拟南芥幼苗为材料，在冷胁迫下分析 ABA 突变体及野生型植株的逆境生理生化指标 MDA、 H_2O_2 、SOD、

CAT、GR 和 *APX* 变化，同时探讨拟南芥热激因子 *AtHsfA1a* 在响应冷胁迫中 ABA 的生理调控作用。结果发现，在低温下外源 ABA 和 *AtHsfA1a* 协同降低了 MDA 和 H_2O_2 浓度。进一步研究还发现，低温下外源 ABA 和 *AtHsfA1a* 协同提高抗氧化酶活性降低低温产生活性氧对细胞膜系统的伤害而提高植物的抗冷性。研究^[25]发现，在逆境中抗氧化酶活性高低与抗氧化酶的基因表达密切相关。此外，本项目申请者^[26]也研究了在热胁迫下 *AtHsfA1a* 对 *APX* 的表达调控作用。研究^[11-13]显示，在逆境中 ABA 能调控部分热激转录因子 HSF 的表达，但关于 ABA 与转录因子 HSF 如何从生理水平协同提高抗逆性研究较少，抗氧化酶基因的表达是否受 ABA 和 *AtHsfA1a* 协同调控尚需进一步证实。

[参考文献]

- [1] KUNDUA S, GANTAITB S. Abscisic acid signal crosstalk during abiotic stress response [J]. *Plant Gene*, 2017, 11: 61-69.
- [2] DARN A, AMIN I, WANI W, et al. Abscisic acid: A key regulator of abiotic stress tolerance in plants [J].

- Plant Gene, 2017, 11: 106–111.
- [3] ZHU J K. Abiotic stress signaling and responses in plants [J]. Cell, 2016, 167 (2): 313–324.
- [4] ISLAM M D, REZAU L, FENG B, et al. Role of abscisic acid in thermal acclimation of plants [J]. Journal of Plant Biology, 2018, 61 (5): 255–264.
- [5] FUJITA Y, FUJITA M, SHINOZAKI K, et al. ABA-mediated transcription regulation in response to osmotic stress in plants [J]. J Plant Res, 2011, 124: 509–525.
- [6] SCHARF K D, BERBERICH T, EBERSBERGER I, et al. The plant heat stress transcription factor (Hsf) family: structure, function and evolution [J]. Biochim Biophys Acta, 2012, 1819 (1): 104–119.
- [7] ROCIO G P, EILEEN T B, DENNIS J T. Regulation of heat shock transcription factors and their roles in physiology and disease [J]. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 2018, 19: 4–19.
- [8] VON KOSKULL-DÖRING P, SCHARF K, NOVER L. The diversity of plant heat stress transcription factors [J]. Trends Plant Sci, 2007, 12 (10): 452–457.
- [9] QIAN J, CHEN J, LIU Y F, et al. Overexpression of Arabidopsis *HsfA1a* enhances diverse stress tolerance by promoting stress-induced Hsp expression [J]. Genet Mol Res, 2014, 13 (1): 1233–1243.
- [10] WUNDERLICH M, DOLL J, BUSCH W, et al. Heat shock factors: regulators of early and late functions in plant stress response [J]. Plant Stress, 2007, 1 (1): 16–22.
- [11] HUANG Y C, NIU C Y, YANG C R, et al. The heat stress factor HSFA6b connects ABA signaling and ABA-Mediated heat responses [J]. Plant Physiol, 2016, 172 (2): 1182–1199.
- [12] HU X J, CHEN D, MCLNTYRE C L, et al. Heat shock factor C2a serves as a proactive mechanism for heat protection in developing grains in wheat via an ABA-mediated regulatory pathway [J]. Plant, Cell & Environment, 2018, 41 (1): 79–98.
- [13] DANG J, JIANG M Y, LIN F. ABA up-regulates the expression of OsHsf genes in leaves of rice plants [J]. Journal of Nanjing Agricultural University, 2010, 33 (1): 11–15.
- [14] IMLAY J A. Pathway of oxidative damage [J]. Annu Rev Microbiol, 2003, 57: 395–418.
- [15] TORRES M A, JONES J D G, DANGL J L. Reactive oxygen species signaling in response to pathogens [J]. Plant Physiol, 2006, 141: 373–378.
- [16] FOYER C H, NOCTOR G. Oxidant and antioxidant signaling in plants: a reevaluation of the concept of oxidative stress in a physiological context [J]. Plant Cell Environ, 2005, 28: 1056–1071.
- [17] 宋敏, 闫军, 郭丽红. 热激转录因子 *AtHsfA1a* 对拟南芥幼苗在渗透胁迫中抗氧化酶活性的影响 [J]. 昆明学院学报, 2013, 35 (6): 54–56.
- [18] 谭越, 何承忠, 郭丽红. *AtHsfA1a* 对拟南芥幼苗在干旱中生理指标的影响 [J]. 昆明学院学报, 2015, 37 (3): 64–68.
- [19] GAY C, GEBICKI J M. A critical evaluation of the effect of sorbitol on the ferric-xylene orange hydroperoxide assay [J]. Anal Biochem, 2000, 284: 217–220.
- [20] ZHANG B K, ZHENG R L. An improved spectrophotometric assay for superoxide dismutase based on the autoxidation of pyrogallol [J]. Journal of Lanzhou University, 1990, 26 (3): 99–102.
- [21] AEBI H. Catalase in vitro [J]. Methods Enzymol, 1984, 105: 121–126.
- [22] RAO M V, HALE B A, ORMOND D P. Amelioration of ozone-induced oxidative damage in wheat plants grown under high carbon dioxide [J]. Plant Physiol, 1995, 109: 421–432.
- [23] KNÖRZER O C, DURNER J, BÖGER P. Alterations in the antioxidative system of suspension-cultured soybean cells (*Glycine max*) induced by oxidative stress [J]. Physiologia Plantarum, 1996, 97: 388–396.
- [24] BRADFORD M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye-binding [J]. Anal Biochem, 1976, 72: 248–254.
- [25] STOROZHENKO S. The heat-shock element is a functional component of the Arabidopsis APX. I gene promoter [J]. Plant Physiol, 1998, 118: 1005–1014.
- [26] GUO L H, TAN Y, YANG X H. Regulation of heat shock factor *AtHsfA1a* on ascorbate peroxidase under heat stress in Arabidopsis thaliana [J]. Agricultural Science and Technology, 2016, 17 (8): 1786–1789.