

苯丙氨酸解氨酶在诱导黄瓜幼苗抗寒性中的作用*

董春娟 李 亮 曹 宁 尚庆茂** 张志刚

(中国农业科学院蔬菜花卉研究所/农业部园艺作物生物学与种质创制重点实验室, 北京 100081)

摘 要 为了探讨苯丙氨酸解氨酶(PAL)在诱导黄瓜幼苗抗寒性中的作用,采用喷施特异抑制剂(AOPP)的方法控制 PAL 活性,测定幼苗抗寒性的变化.结果表明:低温可以诱导黄瓜幼苗叶片中 PAL 的基因表达和活性升高;喷施 AOPP 显著抑制了叶片中 PAL 活性,减少了酚类和类黄酮物质的积累.低温对黄瓜幼苗造成显著伤害,AOPP 预处理加剧了低温对幼苗的损伤,幼苗抗寒性降低.与对照相比,幼苗叶片中相对电解质渗漏率和丙二醛(MDA)含量显著升高,PSII 最大光化学效率(F_v/F_m)降低,光化学猝灭参数 $Y(NO)$ 升高,胁迫相关基因(*PR1-1a*、*COR47*、*P5CS*、*HSP70*)的诱导表达受到抑制.低温导致黄瓜幼苗叶片中 H_2O_2 积累,还原型抗坏血酸(AsA)含量降低,脱氢抗坏血酸(DHA)含量升高,AsA:DHA 减小;喷施 AOPP 的幼苗中抗氧化酶(过氧化氢酶 CAT、抗坏血酸过氧化物酶 APX)活性显著低于对照, H_2O_2 过量积累,AsA:DHA 更低.施用 H_2O_2 清除剂可以有效缓解喷施 AOPP 引起的低温损伤加剧,而施用 CAT 抑制剂的幼苗对低温胁迫更敏感.表明低温诱导了 PAL 活性升高,促进了苯丙烷类次生代谢产物的合成,提高了胞内抗氧化酶活性,可有效清除活性氧分子,维持 AsA 氧化还原状态,缓解低温引起的光损伤和氧化损伤.

关键词 黄瓜; 苯丙氨酸解氨酶; 抑制剂; 低温胁迫; 抗性

文章编号 1001-9332(2015)07-2041-09 中图分类号 S152.7, S512.1 文献标识码 A

Roles of phenylalanine ammonia-lyase in low temperature tolerance in cucumber seedlings.
DONG Chun-juan, LI Liang, CAO Ning, SHANG Qing-mao, ZHANG Zhi-gang (*Institute of Vegetables and Flowers, Chinese Academy of Agricultural Sciences/Key Laboratory of Biology and Genetic Improvement of Horticultural Crops, Ministry of Agriculture, Beijing 100081, China*). -*Chin. J. Appl. Ecol.*, 2015, 26(7): 2041–2049.

Abstract: To reveal the roles of phenylalanine ammonia-lyase (PAL) in low temperature tolerance in cucumber seedlings, a specific PAL inhibitor (AOPP) was sprayed to the seedlings, and then the stress tolerance was determined. The results suggested that both gene expression and enzymatic activity of PAL in cucumber leaves were induced under low temperature. The seedlings pretreated with AOPP showed lower PAL activity and less accumulation of phenolics and flavonoids. Low temperature caused damages in cucumber seedlings, and pretreatment of AOPP aggravated these damages. Compared to the control, the seedlings pretreated with AOPP showed significantly higher relative electrolyte leakage and MDA production, lower maximum photochemical efficiency of PSII (F_v/F_m) but higher photo-chemical quenching coefficient $Y(NO)$, and reduced expression of low temperature-responsive genes (*PR1-1a*, *COR47*, *P5CS* and *HSP70*). In cucumber seedlings, low temperature stress induced the accumulation of H_2O_2 , increased the contents of ascorbate (AsA) but decreased the contents of dehydroascorbate (DHA), and thus reduced the value of AsA:DHA. In the AOPP-pretreated seedlings, the activities of antioxidant enzymes (CAT and APX) were significantly repressed, and excess H_2O_2 accumulated. The value of AsA:DHA was also lower than the control. Furthermore, co-application of H_2O_2 scavenger alleviated the low temperature-induced damages in the AOPP-pretreated seedlings, while co-application of a CAT inhibitor made the seedlings more sensitive to low temperature stress. These results indicated that under low temperature

* 国家自然科学基金项目(31101548)、现代农业产业技术体系建设专项(CARS-25)和公益性行业(农业)科研专项(201303014)资助.

** 通讯作者. E-mail: shangqingmao@caas.cn

2014-07-15 收稿, 2015-05-20 接受.

stress, the enhanced activities of PAL could increase the biosynthesis of phenylpropanoid compounds and activate the cellular antioxidant enzymes, which could scavenge the excess ROS and maintain the cellular redox status, and thereby reduce the photo- and oxidative damages caused by low temperature stress.

Key words: cucumber; phenylalanine ammonia-lyase (PAL); inhibitor; low temperature stress; tolerance.

低温是限制作物生长和物种分布的一个重要环境因子.低温可破坏细胞膜结构,导致植物光合作用受阻、胞内电解质渗漏、产生毒性物质和活性氧(reactive oxygen species, ROS)等,最终导致植物生长停滞甚至死亡^[1].植物通过调节自身一系列的代谢反应对低温胁迫作出适应性响应,维持细胞膜稳定性和胞内渗透平衡,激活抗坏血酸过氧化物酶(APX)、过氧化氢酶(CAT)等抗氧化酶类,积累抗坏血酸(AsA)、还原型谷胱甘肽(GSH)等抗氧化物质,清除胞内 ROS,保护细胞免受伤害^[2].植物为应对低温逆境还逐渐演化形成了多种次生代谢途径,并生成相应的次生代谢产物以缓解逆境胁迫.苯丙烷类代谢途径是植物次生物质代谢的一条重要途径,其中间产物,如香豆酸、咖啡酸、阿魏酸等,及其进一步转化生成的物质,如木质素、花青素及类黄酮等,在植物的生长发育、着色及对生物和非生物胁迫逆境的抗性等生理活动中具有重要作用^[3-4].

苯丙氨酸解氨酶(phenylalanine ammonia-lyase, PAL)催化 L-苯丙氨酸解氨生成反式肉桂酸,是苯丙烷类次生代谢途径的限速酶和关键酶^[4].早期对 PAL 的研究主要集中于其与植物抗病性关系的研究.小麦、烟草、黄瓜等植物感染病原菌后, PAL 活性升高,同时在侵染部位积累酚类、异黄酮类和木质素等次生代谢产物^[3,5];且对于不同抗病性的小麦和烟草,在接种病原菌后,抗病品种中 PAL 活性峰较感病品种高,持续时间长,植株中总酚含量和类黄酮含量显著高于感病品种^[3,6].随后的研究发现, PAL 与植物的非生物逆境抗性密切相关.植物在遭受机械伤害^[7-8]、干旱^[9-10]、低温^[7,10-11]、高温^[12]等逆境时, PAL 活性升高,同时体内积累大量酚酸、类黄酮、木质素等苯丙烷类代谢产物. Pietrini 等^[13]发现,低温处理可以显著提高玉米幼苗中 PAL 的活性,幼苗向光面的叶片中积累大量的花色素苷. Leyva 等^[14]研究表明,拟南芥幼苗经 4℃ 低温处理后,叶片中 PAL 和查尔酮合成酶(CHS)活性迅速升高,花青素大量合成,幼苗表现出耐冷性.类似的结果在红叶芥中也有报道^[15].

黄瓜(*Cucumis sativus*)是我国主栽蔬菜作物之一,其生长过程对低温极为敏感.通常 10~12℃ 以下的低温会引起植株生理活动失调,生长缓慢,发育停止,温度低于 5℃ 时植株难以生存^[16-17].研究发现,黄瓜中存在至少 7 个 PAL 基因,低温可以诱导黄瓜幼苗中多个 PAL 基因的表达^[18].本研究以黄瓜幼苗为材料,采用 PAL 的竞争性抑制剂——L-2-氨基氧-3-苯基丙酸(AOPP)^[19-20]控制幼苗中 PAL 的活性,通过比较低温条件下幼苗膜脂过氧化水平、光合荧光参数、胁迫相关基因的表达水平以及细胞抗氧化能力等方面的指标,明确 PAL 在诱导黄瓜幼苗抗寒性中的作用,进而探讨 PAL 在植物低温抗性反应中的作用机理.

1 材料与方法

1.1 黄瓜材料的培养与处理

供试黄瓜品种为‘中农 203’,购自中国农业科学院蔬菜花卉研究所,该品种为密刺型、强雌性早熟品种,是我国北方地区主栽黄瓜品种,为低温较敏感型^[21].试验于 2013 年 4—5 月在中国农业科学院蔬菜花卉研究所玻璃连栋温室进行,挑选籽粒饱满的黄瓜种子,用 5% 次氯酸钠消毒 10 min,清水冲洗 5 遍后,播种于育苗基质(蛭石:珍珠岩=1:1, V/V)中.待幼苗子叶平展时,选取长势一致的幼苗移入塑料盒(40 cm×25 cm×10 cm)中,在植物培养箱中进行营养液培养,营养液选用 1/2 Hoagland 营养液(pH 6.5),培养条件为:昼夜温度为 28℃/18℃,光周期为 10 h/14 h,光照强度为 600 μmol·m⁻²·s⁻¹,相对湿度为 80%~85%.

当黄瓜幼苗培养至一叶一心时进行如下处理:1)对照处理(Control):对幼苗叶面喷施去离子水(含 0.1% Tween-20),每株幼苗每次喷施量为 1 mL,共喷施 3 次,预处理 24 h 后进行低温胁迫处理;2)AOPP 处理(AOPP):用 100 μmol·L⁻¹ AOPP 水溶液代替去离子水,对幼苗进行喷施,其余同对照处理;3)AOPP 与 DMTU 复合处理(AOPP+DMTU):对喷施 AOPP 的幼苗在低温处理前 2 h,叶面喷施 DM-

TU(5 mmol · L⁻¹),每株幼苗喷施 1 mL,2 h 后进行低温处理;4)3-AT 处理(3-AT):对照处理的幼苗在低温处理前 2 h,叶面喷施 3-AT(50 mmol · L⁻¹),每株幼苗喷施 1 mL,2 h 后进行低温处理;5) AOPP 与 3-AT 复合处理(AOPP+3-AT):对喷施 AOPP 的幼苗在低温处理前 2 h,叶面喷施 50 mmol · L⁻¹ 3-AT,其余同处理(4).低温胁迫处理条件为:温度 10 ℃,光照强度 200 μmol · m⁻² · s⁻¹,相对湿度 50% ~ 60%.于低温处理的不同时间点取样,进行各项指标的测定.

1.2 生理指标及测定方法

H₂O₂ 的测定参考 Kawai-Yamada 等^[22] 的方法.称取 0.05 g 黄瓜叶片,加入 3 mL 磷酸钠缓冲液(50 mmol · L⁻¹,pH 6.5)在冰浴中研磨成匀浆,4 ℃ 12000 ×g 离心 10 min.取上清液 2 mL 与 1 mL 硫酸钛溶液(溶于 20%硫酸中)混合,震荡混匀后,室温 6000 ×g 离心 15 min,将所得的上清液在 410 nm 比色.通过制作 H₂O₂ 标准曲线计算样品中 H₂O₂ 的含量(μmol · g⁻¹FM).

抗坏血酸含量的测定参照张国斌等^[23] 的方法.用还原型抗坏血酸(AsA)做标准曲线,通过标准曲线计算样品中 AsA 的含量(μmol · g⁻¹FM).脱氢抗坏血酸(DHA)的含量为总抗坏血酸含量与 AsA 含量的差值.

叶片中总酚的提取和测定参照 Meyers 等^[24] 的方法.以没食子酸(GA,生工)作总酚含量的标准曲线,并计算样品中总酚的含量(mg GA · g⁻¹FM).类黄酮的含量测定参照 Jia 等^[25] 的方法,以芦丁(生工)为标样,类黄酮含量表示为 nmol rutin · g⁻¹FM.电解质渗漏率的测定参照李合生^[26] 的方法;丙二醛(MDA)含量采用硫代巴比妥酸比色法^[27] 测定.

叶绿素荧光参数采用饱和脉冲分析法(Junior-

PAM,Walz,德国)测定,测定过程和计算方法参照李亮等^[27] 的方法.

1.3 酶活性测定

PAL 活性测定参照 Shang 等^[18] 的方法.抗氧化酶 APX 和 CAT 活性测定:称取 0.3 g 黄瓜叶片,加入 5 mL 提取缓冲液(50 mmol · L⁻¹ 磷酸钠缓冲液,pH 7.8、0.1 mmol · L⁻¹ EDTA、5 mmol · L⁻¹ 抗坏血酸、1% PVP-40),冰浴研磨,匀浆转移至干净离心管中,4 ℃ 下 10000 ×g 离心 10 min,取上清液用于 APX 和 CAT^[27] 活性测定,测定方法参照 Xia 等^[28] 的方法.提取液中蛋白质浓度采用考马斯亮蓝法(BioRad,美国)^[29] 测定.

1.4 基因转录水平测定

黄瓜叶片中总 RNA 采用 TRIzol 试剂(Invitrogen)提取,以 Oligo dT 为引物,使用 Reverse Transcription System(Promega,美国)进行反转录和 cDNA 第一链的合成.所得 cDNA 用于 Real-time PCR 定量分析,试剂盒为 Transstart Top Green qPCR Kit(全式金),仪器为 iCycler iQTM5(BioRad,美国).以持家基因 *Actin* 作为 Real-time PCR 反应的内参,PCR 反应所需的引物如表 1 所示.待测基因的相对表达水平采用 ΔΔC_T法计算^[27].每组样品做 3 次重复.

1.5 数据处理

试验结果用 3 次重复的平均值±标准误(mean±SD)表示,采用 Microsoft Excel 软件处理数据和作图,用 DPS 2000 软件对数据进行方差分析,运用 Duncan 新复极差法进行差异显著性(P<0.05)检验.

2 结果与分析

2.1 低温胁迫下黄瓜幼苗中 PAL 活性和基因表达水平的变化

由图 1 可知,10 ℃ 低温可以诱导黄瓜幼苗叶片

表 1 Real-time PCR 反应引物序列
Table 1 Primer sequence for real-time PCR

基因 Gene	ICuGI 基因序列号 * ICuGI accession No. *	引物序列 Primer sequences
苯丙氨酸解氨酶 Phenylalanine ammonia-lyase (PAL)	Csa6M446290	PAL-F: 5'-ATGGCTTCATATTGCTCTGAG-3' PAL-R: 5'-ATGCCTCAAGTCAATTGCTTG-3'
病程相关蛋白 1-1a Pathogenesis-related 1-1a (PR1-1a)	DQ641122 **	PR-F: 5'-AACTCTGGCGGACCTTAC-3' PR-R: 5'-TCAATATGGCCTTTGGTATAAG-3'
冷相关基因 47 Cold-related 47 (COR47)	Csa6M358710	COR-F: 5'-GACAACAAGAAGGTCGAGGA-3' COR-R: 5'-GAGTTTCTCCAAGACTAGC-3'
吡咯啉-5-羧酸合成酶 Pyrroline-5-carboxylate synthetase (P5CS)	Csa3M733920	P5CS-F: 5'-CTCCATATGAGGATTCTTCTGG-3' P5CS-R: 5'-GCACAAGAAGCATAAACAGC-3'
热激蛋白 70 Heat-shock protein 70 (HSP70)	Csa5M149330	HSP-F: 5'-GAGAAGATCACCATCACCAAC-3' HSP-R: 5'-CTGGTTCTTCATGTTGTAGGTG-3'
肌动蛋白 Actin	Csa6M484600	Act-F: 5'-TGGATTCGTGATGCTGT-3' Act-R: 5'-GCTCTTGCAGTCTCCAG-3'

* ICuGI: 葫芦科植物基因组数据库 International Cucurbit Genomics Initiative, <http://www.icugi.org/> ** 该基因序列号来自 NCBI 数据库 National Center for Biotechnology Information, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

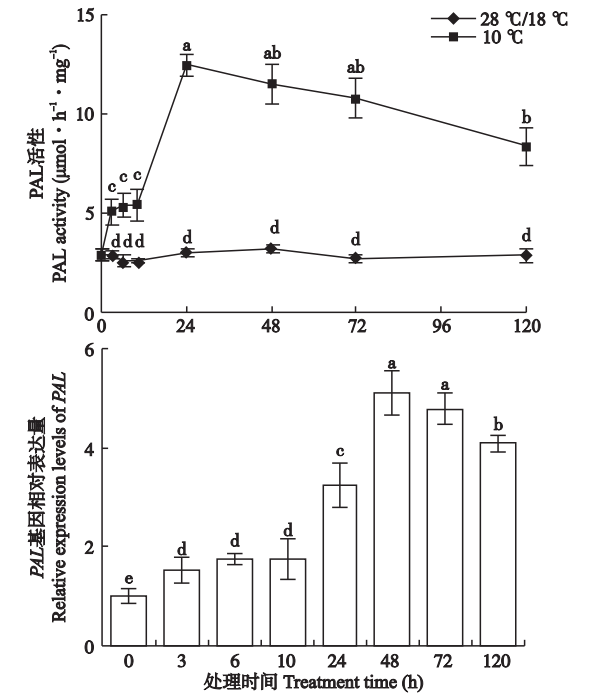


图1 低温胁迫下黄瓜幼苗叶片中 PAL 活性和 PAL 基因表达水平的变化

Fig.1 Changes of enzymatic activity and expression level of PAL in cucumber leaves under low temperature stress. 不同小写字母表示不同处理间差异显著 ($P<0.05$) Different letters indicated significant difference among treatments at 0.05 level. 下同 The same below.

中 PAL 活性升高,而在常温(28 °C/18 °C)培养条件下,PAL 活性没有显著差异.与对照相比,在低温处理 24 和 48 h 时,PAL 活性分别升高了 3.17 和 3.62 倍,之后随着低温处理时间的延长,PAL 活性有所降低,至 120 h 时,PAL 活性为对照的 2.92 倍.低温可以显著诱导黄瓜幼苗叶片中 PAL 基因的表达.随着低温处理时间的延长,PAL 表达水平逐渐升高,至 48 h 时,表达水平最高,是未经低温处理幼苗的 5.10 倍,之后,PAL 表达水平略有降低,PAL 基因表达水平的变化趋势与 PAL 活性基本一致.表明低温可以诱导

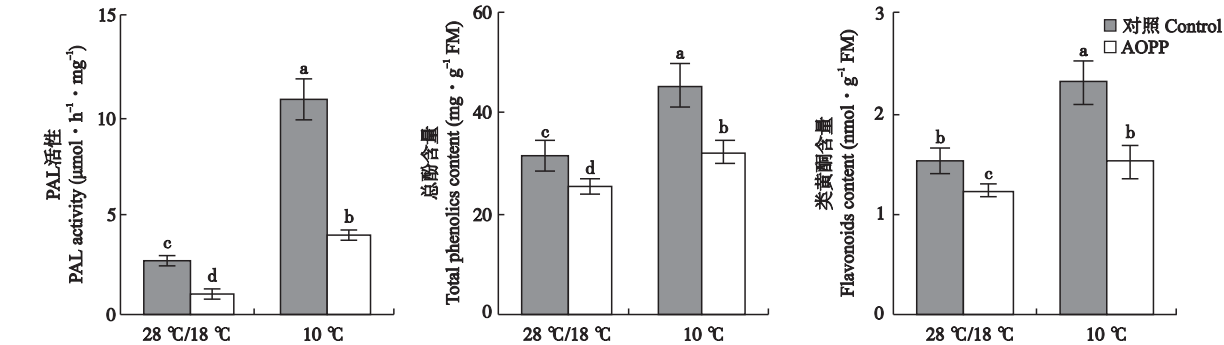


图2 AOPP 预处理对黄瓜幼苗叶片中 PAL 活性、总酚和类黄酮含量的影响

Fig.2 Effects of AOPP pretreatment on PAL activity, contents of total phenolics and flavonoids in cucumber leaves.

黄瓜幼苗中 PAL 基因的表达,从而提高 PAL 活性.

2.2 抑制剂预处理对黄瓜幼苗 PAL 活性及总酚和类黄酮含量的影响

由图 2 可知,喷施 AOPP 的黄瓜幼苗叶片中 PAL 活性在常温(28 °C/18 °C)和低温(10 °C)条件下均被显著抑制,仅为对照 PAL 活性的 35%.表明喷施抑制剂 AOPP 可以显著抑制 PAL 的活性.低温可以促进黄瓜幼苗叶片中总酚和类黄酮的积累,AOPP 预处理后,幼苗叶片中总酚和类黄酮的积累受到抑制.常温条件下,总酚和类黄酮含量分别为对照的 80.6%和 79.7%;低温处理 72 h 时,总酚和类黄酮含量只有对照的 70.6%和 65.8%.

2.3 PAL 抑制剂预处理对黄瓜幼苗抗寒性的影响

10 °C 低温处理 72 h 会对黄瓜幼苗造成损伤,表现为幼苗叶片中电解质渗漏率和 MDA 含量显著升高, F_v/F_m 显著降低,光损伤参数 $Y(NO)$ 显著升高(图 3).与对照相比,喷施 AOPP 黄瓜幼苗的受损伤程度加剧,电解质渗漏率和 MDA 含量显著大于对照幼苗, F_v/F_m 的降低幅度更大,为对照植株的 86.2%, $Y(NO)$ 显著高于对照植株(图 3),这些结果表明,AOPP 预处理的黄瓜幼苗对低温胁迫的抗性降低,对低温更加敏感.

2.4 PAL 抑制剂预处理对低温胁迫下黄瓜幼苗相关基因表达的影响

如图 4 所示,低温可以诱导胁迫相关基因(如 *PR1-1a*、*COR47*、*P5CS*、*HSP70* 等)的表达,对照植株中这些基因的表达水平分别提高了 6.05、13.64、5.93 和 4.35 倍.喷施 AOPP 的黄瓜幼苗中,常温条件下,与对照相比,*COR47* 和 *P5CS* 的表达水平没有明显差异,*PR1-1a* 和 *HSP70* 的表达分别略有下降和上调;而在低温胁迫下,这些基因的表达水平显著低于对照植株,分别只有对照的 42.0%、54.8%、60.2%和 64.7%.这些结果表明,AOPP 预处理可以

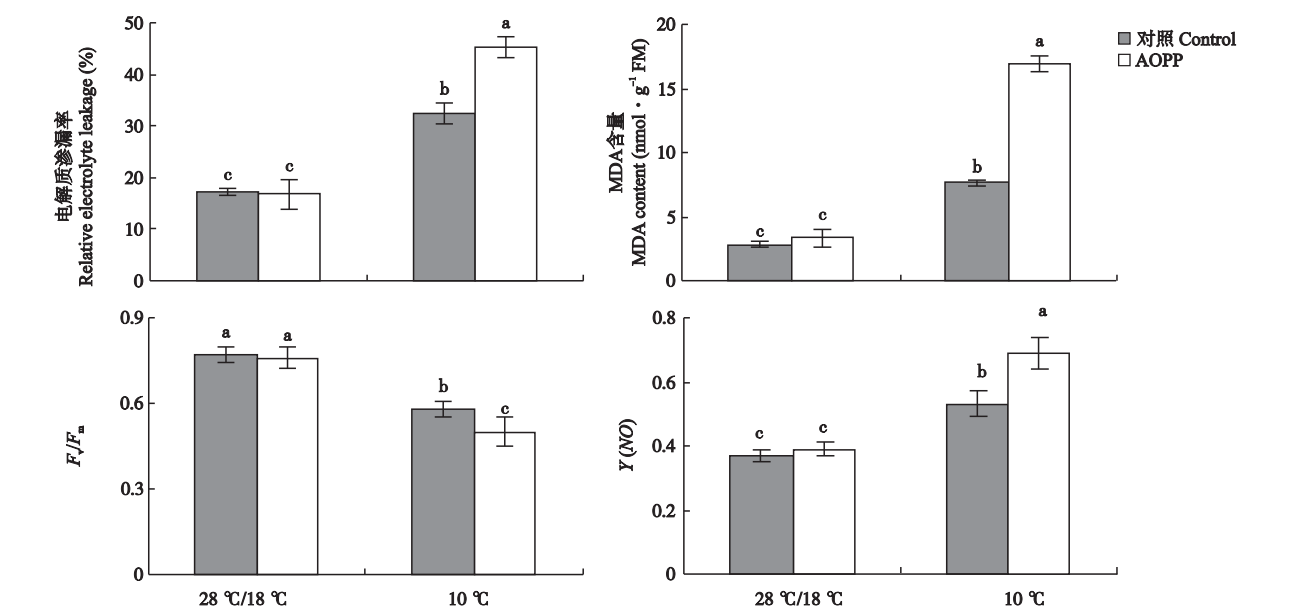


图 3 AOPP 预处理对黄瓜幼苗抗寒性的影响

Fig.3 Effects of AOPP pretreatment on low temperature tolerance of cucumber seedlings.

表 2 AOPP 预处理对低温胁迫下黄瓜幼苗叶片中 H₂O₂ 和抗坏血酸含量及 AsA : DHA 的影响

Table 2 Effects of AOPP pretreatment on H₂O₂ and ascorbate contents and the ratio of AsA to DHA in cucumber leaves under low temperature stress

处理 Treatment	温度 Temperature (°C)	H ₂ O ₂ (μmol · g ⁻¹ FM)	总抗坏血酸 Total ascorbate (μmol · g ⁻¹ FM)	AsA (μmol · g ⁻¹ FM)	DHA (μmol · g ⁻¹ FM)	AsA : DHA
对照	28/18	0.16±0.002c	1.58±0.043a	1.43±0.032a	0.15±0.011c	9.53±0.658a
Control	10	0.26±0.011b	1.57±0.051a	1.31±0.024b	0.26±0.027b	5.04±0.469c
AOPP	28/18	0.19±0.014c	1.49±0.069a	1.29±0.033b	0.20±0.036b	6.45±0.337b
	10	0.32±0.016a	1.47±0.062a	1.14±0.036c	0.33±0.026a	3.45±0.317d

不同小写字母表示不同处理间差异显著 (P<0.05) Different letters indicated significant difference among treatments at 0.05 level.

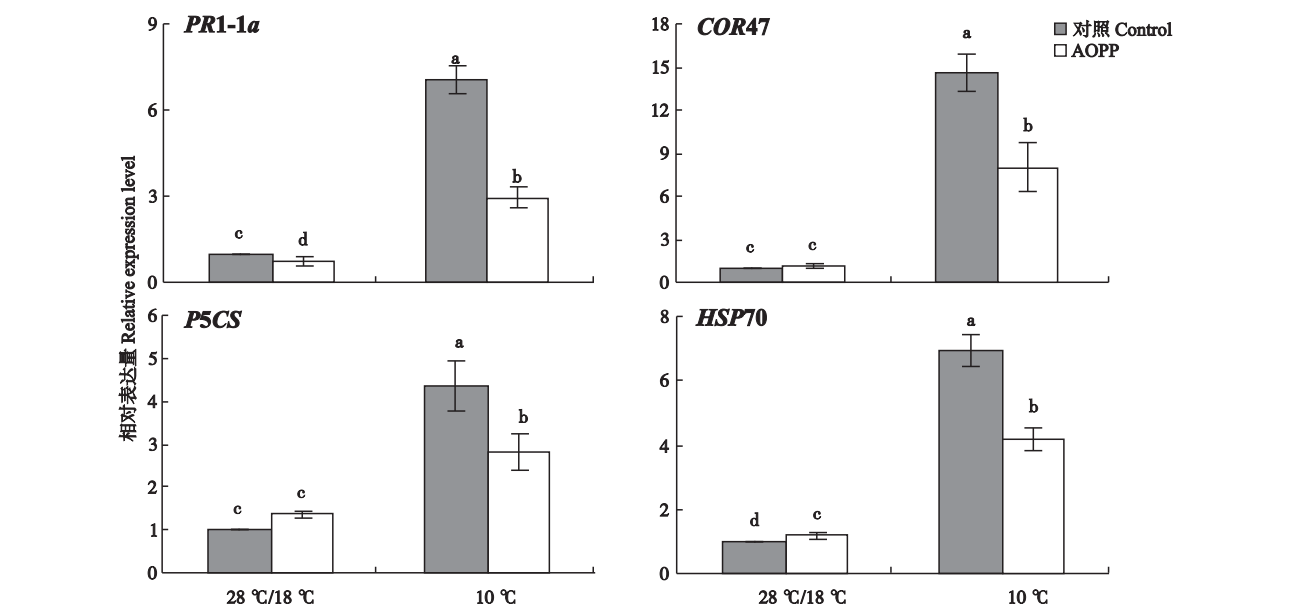


图 4 AOPP 预处理对低温胁迫下黄瓜幼苗叶片中 PR1-1a、COR47、P5CS 和 HSP70 基因表达水平的影响

Fig.4 Effects of AOPP pretreatment on the expression levels of PR1-1a, COR47, P5CS and HSP70 genes in cucumber leaves under low temperature stress.

抑制低温下胁迫相关基因的诱导表达.

2.5 PAL 抑制剂预处理对低温胁迫下黄瓜幼苗 H₂O₂ 和抗坏血酸含量及抗氧化酶活性的影响

由表 2 可知,常温下,喷施 AOPP 对黄瓜幼苗叶片中 H₂O₂ 含量没有显著影响;低温胁迫 72 h 后,叶片中 H₂O₂ 含量显著升高,且喷施 AOPP 的叶片中 H₂O₂ 含量显著高于对照.

低温胁迫对黄瓜幼苗叶片中总抗坏血酸含量没有显著影响;喷施 AOPP 后,总抗坏血酸含量略有降低,但差异不显著(表 2).进一步分析还原型抗坏血酸(AsA)和脱氢抗坏血酸(DHA)含量,低温胁迫引起 AsA 含量降低,DHA 含量升高.在对照幼苗中,低温处理 72 h 时,AsA 含量降低了 0.12 μmol · g⁻¹ FM,DHA 含量升高了 0.11 μmol · g⁻¹ FM;喷施 AOPP 的幼苗中,AsA 含量降低了 0.15 μmol · g⁻¹ FM,DHA 含量升高了 0.13 μmol · g⁻¹ FM.低温胁迫引起的 AsA 含量降低和 DHA 含量升高导致 AsA : DHA 下降,且喷施 AOPP 的幼苗中 AsA : DHA (3.45) 显著低于对照(5.04).

低温可以诱导黄瓜幼苗中抗氧化酶 CAT 和 APX 活性的升高.如图 5 所示,低温下,黄瓜幼苗叶片中 CAT 和 APX 活性分别是常温培养幼苗的 1.43 倍和 1.80 倍.而 AOPP 预处理的幼苗低温处理 72 h 后,CAT 和 APX 活性均显著低于对照,分别只有对

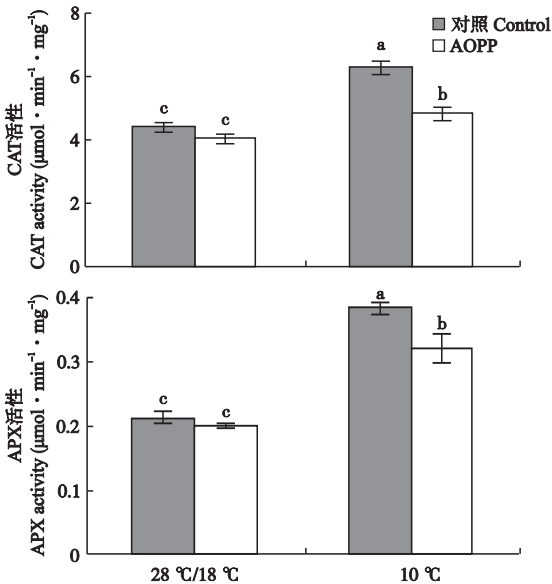


图 5 AOPP 预处理对低温胁迫下黄瓜幼苗叶片中 CAT 和 APX 活性的影响
Fig.5 Effects of AOPP pretreatment on activities of CAT and APX in cucumber leaves under low temperature stress.

照幼苗的 76.6%和 84.2%.

2.6 PAL 清除 H₂O₂ 在诱导黄瓜幼苗抗寒性中的作用

DMTU 是一种有效的 H₂O₂ 清除剂^[28].对 AOPP 预处理的幼苗喷施 DMTU 后(AOPP+DMTU)再进行低温处理,结果(图6)表明,低温下,AOPP+DMTU

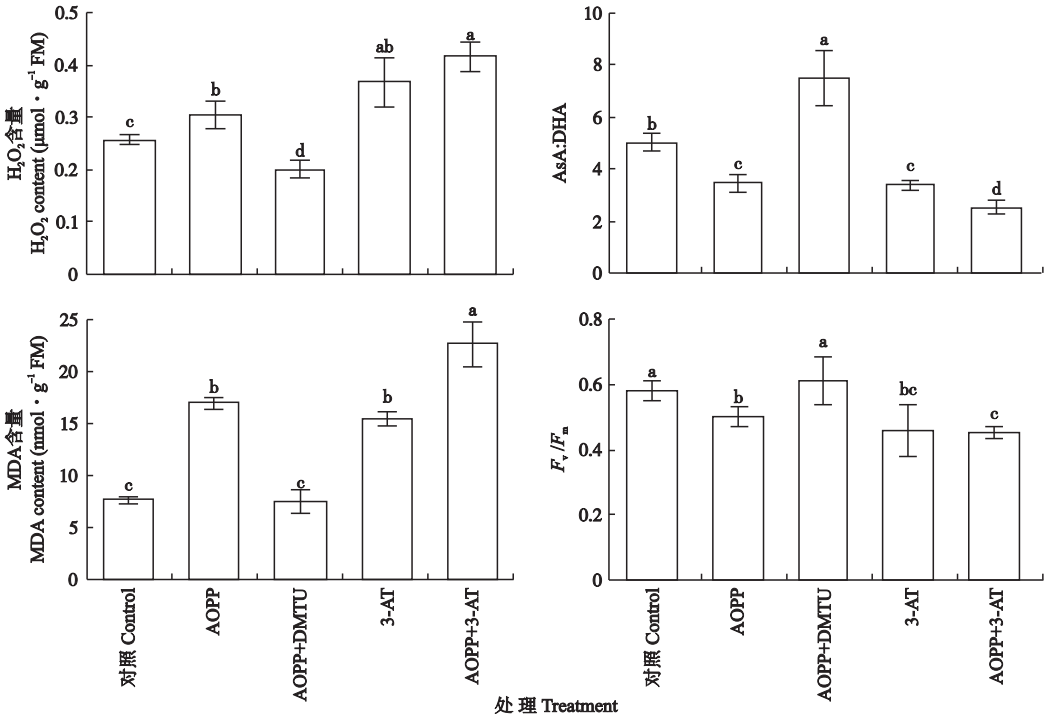


图 6 DMTU 和 3-AT 与 AOPP 复合处理对低温胁迫下黄瓜幼苗中 H₂O₂ 含量、AsA : DHA、MDA 含量和 F_v/F_m 的影响
Fig.6 Effects of co-application with AOPP and DMTU or 3-AT on cellular H₂O₂ content, AsA : DHA ratio, MDA content and F_v/F_m in cucumber seedlings under low temperature stress.

处理的幼苗中 H_2O_2 积累显著降低, 仅为单独喷施 AOPP 的幼苗中 H_2O_2 含量的 65.9%, 相应地 AsA : DHA 升高, 幼苗的 F_v/F_m 升高, MDA 合成减少, 幼苗对低温胁迫的抗性增强。

对黄瓜幼苗喷施 CAT 抑制剂 3-AT^[30], 低温胁迫时, 幼苗表现出与喷施 AOPP 类似的效果, H_2O_2 含量升高, AsA : DHA 降低; 对 AOPP 预处理的黄瓜幼苗喷施 3-AT(AOPP+3-AT), 低温时叶片中 H_2O_2 含量进一步升高, AsA : DHA 进一步降低, 幼苗受到的低温损伤加剧。上述结果表明, PAL 清除 H_2O_2 在诱导黄瓜幼苗抗寒性中具有重要作用。

3 讨 论

PAL 是连接初级代谢和苯丙烷类次生代谢的枢纽, 对植物生长发育和抵御环境胁迫有重要的生理意义^[3], 多种生物或非生物胁迫和外源激素均能诱导 PAL 活性升高, 且这种诱导主要发生在转录水平上^[4]。在本试验中, 10 °C 低温可以诱导黄瓜幼苗中 PAL 基因表达和酶活性升高(图 1), 说明 PAL 参与黄瓜幼苗对低温胁迫的响应。黄瓜中 PAL 以基因家族形式存在, 至少存在 7 个成员, 每个 PAL 基因的表达均受到不同程度的低温诱导^[18], 表明各 PAL 成员之间在低温响应中存在高度的功能冗余, 因此, 难以采用常规的遗传突变方法对 PAL 进行功能分析。本试验中, 对黄瓜幼苗喷施 100 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的抑制剂 AOPP, 可以显著抑制 PAL 活性, 抑制酚类和异黄酮类物质的积累(图 2), 表明这一生化手段可以有效地用于 PAL 的功能研究。

PAL 活性升高是植物应对环境胁迫的普遍反应。当 PAL 活性受到抑制, 低温下黄瓜幼苗叶片受伤害程度加剧, MDA 合成和电解质渗漏率增大, 光损伤程度加剧(图 3), 胁迫相关基因的诱导表达受阻(图 4), 表明抑制 PAL 活性会导致幼苗对低温胁迫的抗性降低。类似的结果在油菜中也有报道, 在 2 °C 低温条件下, 经 PAL 抑制剂氨基萆磷酸(AIP)处理的油菜叶片中, PAL 活性降低了约 90%, 叶片中物质积累变缓, F_v/F_m 降低, 叶片抵抗随后 -5 °C 低温的能力显著降低^[31]。上述结果表明, PAL 活性升高对植物抵抗低温逆境是必需的。

PAL 是苯丙烷类代谢途径的关键酶。在植物中苯丙烷类途径的代谢产物包括多酚、类黄酮、异类黄酮、花色苷等物质, 低温可以诱导这些化合物的大

量合成积累^[3-4]。低温胁迫时, 由于基因突变或施用抑制剂引起的 PAL 活性抑制, 会引起植物体内酚类、类黄酮、木质素和花色苷等苯丙烷类次生代谢产物的合成受阻, 含量降低, 这已在大豆^[32]、拟南芥^[33]等植物中得到了验证, 在黄瓜幼苗中也得到了类似的结果(图 2)。苯丙烷类次生代谢物质的积累对植物抵抗逆境胁迫具有重要作用。首先, 这些化合物分布于植物表层或细胞液泡中, 对低温引起的光损伤具有屏蔽和保护作用^[34]。因此, 在黄瓜幼苗中抑制 PAL 活性加剧了低温引起的光损伤(图 3)。其次, 这些次生代谢物质可以作为 ROS 清除剂, 直接防御和清除 ROS^[34]。 H_2O_2 是细胞中最主要的 ROS 之一^[35]。本研究发现, 随着 PAL 活性降低, 黄瓜幼苗叶片中 H_2O_2 过量积累, 细胞内还原状态的 AsA 含量降低, 氧化状态的 DHA 含量升高, AsA : DHA 降低(表 2), 幼苗抗寒性显著降低(图 3, 图 4); 对 AOPP 预处理的幼苗增施 DMTU 后, 低温胁迫引起的 H_2O_2 得以清除, 幼苗对低温胁迫的抗性得以恢复(图 6)。可见, 低温诱导 PAL 活性升高, 引起苯丙烷类代谢产物大量合成, 可以减轻低温对幼苗的光损伤, 并作为 ROS 清除剂缓解低温引起的次级氧化损伤, 植物获得抗寒性。

在植物中, PAL 除了参与合成多酚、类黄酮等次生代谢产物外, 还介导水杨酸(SA)等重要激素的生物合成^[36], 抑制 PAL 活性可以显著降低内源 SA 积累^[12]。SA 可以诱导低温下黄瓜幼苗中抗氧化酶活性升高^[36-37]。低温胁迫下, AOPP 预处理可以导致黄瓜幼苗中 CAT 和 APX 活性显著降低(图 5); 对幼苗喷施 CAT 抑制剂 3-AT, 加剧了低温胁迫引起的 H_2O_2 积累, 进而加剧了细胞氧化损伤(图 6), 表明低温诱导 PAL 活性升高, 还可以通过促进 SA 等激素的合成, 激活细胞内抗氧化酶体系, 清除 H_2O_2 等 ROS 分子, 维持胞内氧化还原状态的平衡。

综上所述, 低温诱导黄瓜幼苗中 PAL 的基因表达和活性升高, PAL 在低温响应中的作用是多方面的。一方面, PAL 可以促进多酚类、类黄酮类、花色苷等苯丙烷类次生代谢产物的合成和积累, 另一方面, PAL 可以介导 SA 等激素的合成, 提高 CAT、APX 等抗氧化酶的活性, 最终减少 H_2O_2 等 ROS 的积累, 维持胞内氧化还原平衡, 减轻低温引起的光损伤和氧化损伤, 介导幼苗表现出抗寒性。

参考文献

- [1] Yu J (于 晶), Zhang L (张 林), Cang J (苍 晶), *et al.* Comparison of low temperature-induced proteins in tillering node of winter wheat cultivars with different cold resistance. *Chinese Journal of Applied Ecology* (应用生态学报), 2009, **20**(5): 1092–1098 (in Chinese)
- [2] Wang W, Vinocur B, Altman A. Plant responses to drought, salinity and extreme temperatures: Towards genetic engineering for stress tolerance. *Planta*, 2003, **218**: 1–14
- [3] Dixon RA, Achnine L, Kota P, *et al.* The phenylpropanoid pathway and plant defense: A genomics perspective. *Molecular Plant Pathology*, 2002, **3**: 371–390
- [4] Vogt T. Phenylpropanoid biosynthesis. *Molecular Plant*, 2010, **3**: 2–20
- [5] Dixon RA, Paiva NL. Stress-induced phenylpropanoid metabolism. *The Plant Cell*, 1995, **7**: 1085–1097
- [6] Weisshaar B, Jenkins GI. Phenylpropanoid biosynthesis and its regulation. *Current Opinion in Plant Biology*, 1998, **1**: 251–257
- [7] Zhang B-X (张必弦), Hu X-M (胡小梅), Zhu Y-M (朱延明), *et al.* Response of phenylalanine ammonia-lyase (PAL) to different inducing conditions in wild soybean (*Glycine soja*). *Soybean Science* (大豆科学), 2011, **30**(4): 703–709 (in Chinese)
- [8] Pina A, Errea P. Differential induction of phenylalanine ammonia-lyase gene expression in response to *in vitro* callus unions of *Prunus* spp. *Journal of Plant Physiology*, 2008, **165**: 705–714
- [9] Guo J, Wang MH. Characterization of the phenylalanine ammonia-lyase gene (*SIPAL5*) from tomato (*Solanum lycopersicum* L.). *Molecular Biology Report*, 2009, **36**: 1579–1585
- [10] Song X-P (宋修鹏), Huang X (黄 杏), Mo F-L (莫凤连), *et al.* Cloning and expression analysis of sugarcane phenylalanine ammonia-lyase (*PAL*) gene. *Sicentia Agricultura Sinica* (中国农业科学), 2013, **46**(14): 2856–2868 (in Chinese)
- [11] Olsen KM, Lea US, Slimestad R, *et al.* Differential expression of four *Arabidopsis* PAL genes; *PAL1* and *PAL2* have functional specialization in abiotic environmental-triggered flavonoid synthesis. *Journal of Plant Physiology*, 2008, **165**: 1491–1499
- [12] Pan Q, Zhan J, Liu H, *et al.* Salicylic acid synthesized by benzoic acid 2-hydroxylase participates in the development of thermotolerance in pea plants. *Plant Science*, 2006, **171**: 226–233
- [13] Pietrini F, Iannelli MA, Massacci A. Anthocyanin accumulation in the illuminated surface of maize leaves enhances protection from photo-inhibitory risks at low temperature, without further limitation to photosynthesis. *Plant, Cell and Environment*, 2002, **25**: 1250–1260
- [14] Leyva A, Jarillo JA, Salinas J, *et al.* Low temperature induced the accumulation of Phenylalanine ammonia-lyase and Chalcone synthase mRNAs of *Arabidopsis thaliana* in a light-dependent manner. *Plant Physiology*, 1995, **108**: 39–46
- [15] Sun Z-J (孙梓健), Tang Q-L (汤青林), Song M (宋明), *et al.* Cloning and expression of PAL gene and PAL activity assay in red-leaf mustard (*Brassica juncea* var. *garrhiza* Tsen et Lee) under low temperature stress. *Journal of Southwest University (Natural Science)* (西南大学学报: 自然科学版), 2010, **32**(2): 90–94 (in Chinese)
- [16] Lu M-H (逯明辉), Lou Q-F (娄群峰), Chen J-F (陈劲枫). A review on chilling injury and cold tolerance in *Cucumis sativus* L. *Chinese Bulletin of Botany* (植物学通报), 2004, **21**(5): 578–586 (in Chinese)
- [17] Zhou Y-H (周艳虹), Huang L-F (黄黎锋), Yu J-Q (喻景权). Effects of sustained chilling and low light on gas exchange, chlorophyll II fluorescence quenching and absorbed light allocation in cucumber leaves. *Journal of Plant Physiology and Molecular Biology* (植物生理与分子生物学学报), 2004, **30**(2): 153–160 (in Chinese)
- [18] Shang QM, Li L, Dong CJ. Multiple tandem duplication of the phenylalanine ammonia-lyase genes in *Cucumis sativus* L. *Planta*, 2012, **236**: 1093–1105
- [19] Shirasu K, Nakajima H, Rajasekhar VK, *et al.* Salicylic acid potentiates an agonist-dependent gain control that amplifies pathogen signals in the activation of defense mechanisms. *The Plant Cell*, 1997, **9**: 261–270
- [20] Kruger WM, Carver TLW, Zeyen RJ. Effects of inhibiting phenolic biosynthesis on penetration resistance of barley isolines containing seven powdery mildew resistance gene or alleles. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 2002, **61**: 41–51
- [21] Liu X-M (刘雪梅), Shang Q-M (尚庆茂), Wang X-L (王晓黎), *et al.* Studies on low temperature tolerance evaluation method of different cucumber varieties at early stage. *Journal of Inner Mongolia Agricultural University* (内蒙古农业大学学报), 2010, **31**(2): 154–160 (in Chinese)
- [22] Kawai-Yamada M, Ohori Y, Uchimiya H. Dissection of *Arabidopsis* Bax Inhibitor-1 suppressing bax-, hydrogen peroxide-, and salicylic acid-induced cell death. *The Plant Cell*, 2004, **16**: 21–32
- [23] Zhang G-B (张国斌), Yu J-H (郁继华), Feng Z (冯致), *et al.* Physiological and biochemical mechanisms of nitric oxide and abscisic acid on alleviation to auto-toxicity in pepper seedlings. *Acta Horticulturae Sinica* (园艺学报), 2013, **40**(3): 458–466 (in Chinese)
- [24] Meyers KJ, Watkin CB, Pritts MP, *et al.* Antioxidant and antiproliferative activities of strawberries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2003, **51**: 6887–6892
- [25] Jia ZS, Tang MC, Wu JM. The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *Food Chemistry*, 1999, **64**: 555–559
- [26] Li H-S (李合生). Experimental Principle and Technique for Plant Physiology and Biochemistry. Beijing: Higher Education Press, 2000: 260–263 (in Chinese)

- [27] Li L (李 亮), Dong C-J (董春娟), Shang Q-M (尚庆茂). Role of endogenous salicylic acid in responding of cucumber leaf photosynthetic systems to low temperature stress. *Acta Horticulturae Sinica* (园艺学报), 2013, **40**(3): 487–497 (in Chinese)
- [28] Xia XJ, Wang YJ, Zhou YH, *et al.* Reactive oxygen species are involved in Brassinosteroid-induced stress tolerance in cucumber. *Plant Physiology*, 2009, **150**: 801–814
- [29] Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Analytical Biochemistry*, 1976, **72**: 248–254
- [30] Yuasa T, Ichimura K, Mizoguchi T, *et al.* Oxidative stress activates ATMPK6, an Arabidopsis homologue of MAP kinase. *Plant and Cell Physiology*, 2001, **42**: 1012–1016
- [31] Solecka D, Kacperska A. Phenylpropanoid deficiency affects the course of plant acclimation to cold. *Physiologia Plantarum*, 2003, **119**: 253–262
- [32] Janas KM, Cvikiova M, Palagiewicz A, *et al.* Constitutive elevated accumulation of phenylpropanoids in soybean roots at low temperature. *Plant Science*, 2002, **163**: 369–373
- [33] Huang J, Gu M, Lai Z, *et al.* Functional analysis of the Arabidopsis *PAL* gene family in plant growth, development, and response to environmental stress. *Plant Physiology*, 2010, **153**: 1526–1538
- [34] Heim KE, Tagliaferro AR, Bobilya DJ. Flavonoid antioxidants: Chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 2002, **13**: 572–584
- [35] Neill S, Desikan R, Hancock J. Hydrogen peroxide signaling. *Current Opinion in Plant Biology*, 2002, **5**: 388–395
- [36] Vlot AC, Dempsey DA, Klessig DF. Salicylic acid, a multifaceted hormone to combat disease. *Annual Review Phytopathology*, 2009, **47**: 177–206
- [37] Liu W (刘 伟), Ai X-Z (艾希珍), Liang W-J (梁文娟), *et al.* Effects of salicylic acid on the leaf photosynthesis and antioxidant enzyme activities of cucumber seedlings under low temperature and light intensity. *Chinese Journal of Applied Ecology* (应用生态学报), 2009, **20**(2): 441–445 (in Chinese)

作者简介 董春娟, 女, 1983 年生, 博士, 副研究员. 主要从事蔬菜苗期栽培生理研究. E-mail: dongchunjuan@caas.cn

责任编辑 张凤丽
