

不同花生品种响应干旱胁迫后叶片内ABA与AhNCED1的分布

胡 博 肖素妮 吕 滢 李 玲*

(广东省植物发育生物工程重点实验室, 华南师范大学生命科学学院, 广州 510631)

摘要 以粤油7号和汕优523两个不同抗旱性品种为材料, 研究响应干旱胁迫后叶片ABA(abscisic acid, 脱落酸)和AhNCED1(*Arachis hypogaea* nine-cis-epoxycarotenoid dioxygenase)的分布以及含量变化。结果表明, 两种花生品种响应干旱胁迫后叶片的维管组织中ABA分布增强且含量增加, AhNCED1蛋白分布也增强; 且在水分胁迫初期粤油7号花生AhNCED1蛋白分布强于汕优523, 其体内ABA分布水平也高于汕优523; 经ABA生物合成抑制剂Naproxen处理后, 两种花生叶片ABA分布减弱, 但粤油7号叶片维管组织中ABA分布水平仍高于汕优523。结果表明维管组织是干旱胁迫下花生叶片中ABA和AhNCED1分布的主要区域, 且粤油7号花生抗旱性强可能与其体内AhNCED1和ABA的分布量较高有关。

关键词 花生; 干旱胁迫; 叶; ABA; AhNCED1; 分布

脱落酸(abscisic acid, ABA)作为一种植物激素, 参与调控植物发育的诸多重要过程, 尤其是作为触发植物对逆境胁迫应答反应的传递体, 参与调控植物对逆境胁迫如干旱、高盐、低温等产生的应答^[1]。植物受到干旱胁迫时, 细胞内ABA含量增加, 促进ABA诱导基因表达, 改变体内激素平衡, 进而调节植物的生长发育和响应干旱的能力^[2]。9-顺式环氧类胡萝卜素双加氧酶(NCED)是调节ABA生物合成的关键限速酶^[3], 其表达水平与内源ABA含量相关。番茄、玉米和菜豆等作物在干旱胁迫条件下NCED表达与ABA的变化一致, 干旱胁迫可诱导NCED基因表达从而增加ABA的积累^[4-6]。本课题组前期从耐旱花生品种粤油7号叶片中克隆AhNCED1(*Arachis hypogaea* nine-cis-epoxycarotenoid dioxygenase)基因, 证明AhNCED1具有NCED基因功能, 并参与水分胁迫时ABA的生物合成^[7], 其对水分胁迫下ABA的生物合成是敏感的早期事件^[8]。水分胁迫引起花生体内AhNCED1蛋白表达快速增强。前期研究表明, ABA生物合成关键酶AtNCED、AtABA2和AAO3在正常拟南芥植株的维管束表达^[9], 所以维管束可能是ABA在非胁迫植株中的主要合成部位, ABA及其前体可能是在维管组织中合成, 然后运输到目的细胞^[10]。然而, 响应水分胁迫后植株体内ABA分布情况仍不清楚, 因此, 研究植株体内ABA分布变化规律对探讨

其在植物应答水分胁迫过程中的作用机制具有重要意义。

本论文以粤油7号和汕优523两个不同抗旱品种花生为材料, 通过免疫酶定位技术、酶联免疫法等方法, 研究花生在响应干旱胁迫以及ABA生物合成的抑制剂(Naproxen)处理后叶片中ABA的分布差异以及含量变化。这些研究有助于深入了解花生在干旱胁迫下植株体内ABA的合成以及分布规律。

1 材料与方法

1.1 材料

花生品种粤油7号、汕优523由广东省农业科学院作物研究所提供。其中粤油7号为抗旱性品种, 汕优523为敏旱性品种。游离ABA单克隆抗体由南京农业大学夏凯教授馈赠。

1.2 方法

1.2.1 花生培养与胁迫处理 选取饱满花生种子浸泡过夜, 播种于盛有浇透的蛭石和珍珠岩(1:1)的直径为10 cm的圆形花盆中, 隔天浇1/4 MS营养液, 培养后取材。随机选取长势相同的两品种花生植株,

收稿日期: 2012-05-17 接受日期: 2012-07-18

国家自然科学基金(No.30971715)、中国博士后科学基金(No.20110490907)和广东省科技计划(No.2011B020301009)资助项目

*通讯作者。Tel: 020-85211378, E-mail: lililing@scnu.edu.cn

进行干旱胁迫和1 mmol/L Naproxen处理。具体方法如下: 将四叶期幼苗分别用30% PEG 6000溶液处理0, 1, 3, 7, 10, 24, 48 h后取材; 另一部分分别用水、PEG、PEG+Naproxen、Naproxen处理24 h后取材。

1.2.2 冰冻切片制备 将植物样品经含3%多聚甲醇、0.5%戊二醇、4%蔗糖、10 mmol/L PBS(pH7.0)的固定液固定后, 切成长2 mm、宽1 mm的样品块, 再经含4%蔗糖的10 mmol/L PBS浸洗1~2 h, 液氮速冻20 s, 移至冰冻切片(LEICA CM3050S, Germany)腔内; 样品短时间置室温, 使其包埋黏附于样品托上LEICA(CM1850)冷冻切片冰冻切片, 将切片黏贴于0.01%多聚赖氨酸处理过的载玻片上, 切片厚度为10~12 μm 。

1.2.3 脱落酸的免疫酶定位 叶片样品切成1 mm \times 3 mm的横纵样品块, 迅速置于固定液(2%碳二亚胺、3%多聚甲醛、0.5%戊二醛、4%蔗糖、10 mmol/L PBS, pH7.0)中, 冰浴抽气预固定1 h后; 新鲜固定液4 $^{\circ}\text{C}$ 固定4~5 h。固定后的样品进行冰冻切片, 厚度为10~12 μm , 制备好切片于37 $^{\circ}\text{C}$ 烘箱内干燥8~12 h, 在含5%脱脂奶粉的10 mmol/L PBS(pH7.0)中温室阻断1 h; ABA单克隆抗体稀释100倍后4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜, TTBS漂洗3次, 经生物素化二抗杂交, TTBS漂洗3次。TBS漂洗1次后NBT-NCIP显色染色、显色, 置于LEICA DMIRB倒置显微镜上观察, 照相。免疫反应的阴性对照用PBS抗体稀释液代替一抗。

1.2.4 AhNCED1蛋白免疫酶定位 将切片黏在载玻片上, 37 $^{\circ}\text{C}$ 干燥8~12 h, 在含5%脱脂奶粉的10 mmol/L PBS(pH7.0)中室温阻断1 h, PBS清洗3次, 10 min/次; AhNCED1单克隆一抗(1:100比例) 4 $^{\circ}\text{C}$ 下孵育过夜; PBS清洗3次, 10 min/次; 辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠二抗(1:500)室温孵育2 h, PBS清洗1次, 10 min/次; 双蒸水清洗3次, 10 min/次; 滴加DAB染色剂避光显色; 适时滴加停显液(100 mmol/L Tris-HCl, 1 mmol/L EDTA, pH8.0)停止显色; 双蒸水清洗3次; 在配置CoolSNAP CCD(Photometrics, USA)的LEICA DMIRB倒置显微镜上观察并照相。免疫反应的阴性对照用PBS抗体稀释液代替一抗。

1.2.5 ABA含量测定 按照Lorena等^[11]采用酶联免疫法(ELISA)测定不同胁迫处理后花生叶片内源ABA含量。100 mg花生样品在液氮中研磨成粉末, 预冷的80%甲醇10 mL提取, 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜, 4 $^{\circ}\text{C}$ 下5 000 r/min离心10 min, 沉淀用5 mL 80%甲醇重复提取, 离心,

合并上清液, 吹干甲醇。用等体积三氯甲烷萃取, 去除色素, 水相用1 mol/L HCl将pH调至2.5~2.8, 再用等体积乙酸乙酯萃取三次, 合并乙酸乙酯相, 吹干乙酸乙酯, 残留物用400 μL 100%甲醇溶解, 最后用于ELISA法分析含量。

2 结果

2.1 不同抗旱品种花生响应水分胁迫后叶片中ABA分布以及含量变化

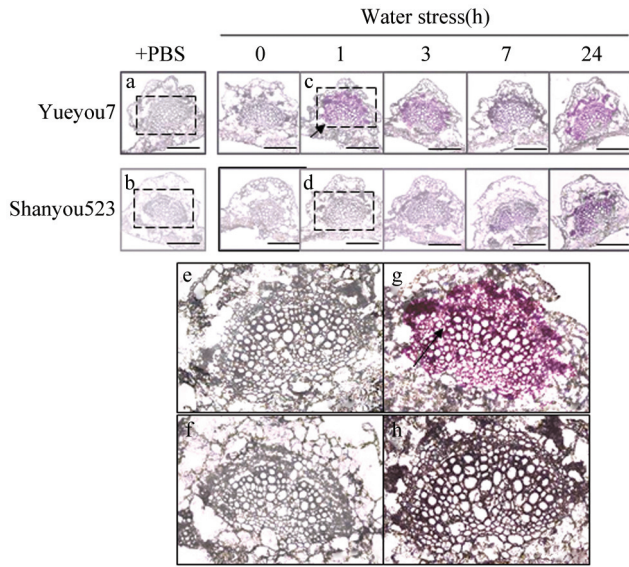
正常条件下(0 h)花生叶片中ABA分布微弱。在胁迫初期(1 h), 粤油7号叶片中ABA特异分布水平明显增强(图1), 随后ABA分布维持较高水平; 而在汕优523叶片中在胁迫后期(24 h)ABA分布水平才出现明显增强。在两种花生品种叶片中ABA特异分布于维管组织区域(图1g和图1h)。

在PEG胁迫1 h时, 粤油7号叶片ABA含量增加约122.2%, 随后ABA含量不断增加, 直至PEG胁迫10 h时ABA含量趋于稳定; 汕优523中叶片ABA含量在响应水分胁迫1 h时变化不大, 直至PEG胁迫7 h, ABA含量才有较明显的增加, 增加约72.0%, 随后含量微弱增加。整个胁迫过程中粤油7号叶片ABA含量比汕优523多, 胁迫48 h时, 粤油7号叶片ABA含量是汕优523的213.8%(图2)。

2.2 Naproxen对不同抗旱品种花生叶片中ABA分布和含量的影响

Naproxen是ABA生物合成的抑制剂, 抑制环氧类胡萝卜素的裂解, 降低ABA生物合成的速率^[12]。图3表明, 粤油7号和汕优523在经过PEG胁迫24 h后叶片维管组织中ABA分布水平明显升高, 其中粤油7号叶片维管组织中ABA的分布量高于汕优523的(图3g和图3h); 在经过Naproxen处理后, 两品种花生叶片维管组织中ABA分布量迅速降低, 几乎检测不到; 经PEG和Naproxen共同处理24 h后, 两品种花生叶片中ABA分布水平降低, 此时粤油7号叶片维管组织中ABA分布水平仍高于汕优523(图3)。

胁迫24 h后, 粤油7号叶片内ABA含量增加约291.0%, 汕优523叶片内ABA含量增加约105.4%; 在经过Naproxen处理后, 两品种花生叶片内ABA含量迅速减少。经过PEG和Naproxen共同处理后, 两品种花生叶片中的ABA含量降低, 与对照相比粤油7号降低46.3%, 汕优523降低64.3%, 此时粤油7号叶片内ABA的含量比汕优523多(图4)。



PBS处理作为空白对照。e-h分别为a-d的5倍放大图。箭头所指为信号区域, a-d的标尺=500 μm。
 PBS treatment as control samples. e-h were magnified 5 times for a-d, respectively. The signal regions are indicated by an arrow. Bar=500 μm for a-d.

图1 水分胁迫下不同品种花生叶片中ABA的分布

Fig.1 Effect of water stress on ABA distribution of leaves in different drought resistant cultivars

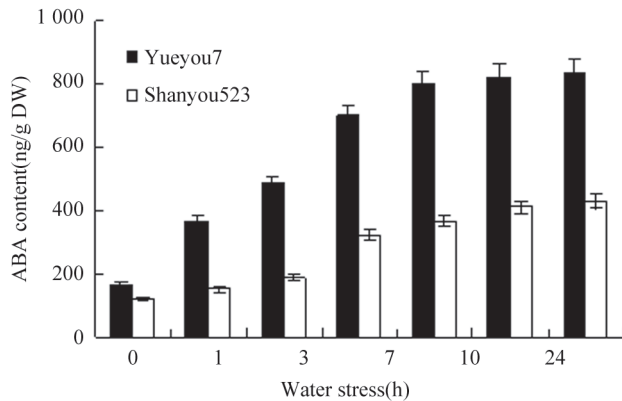
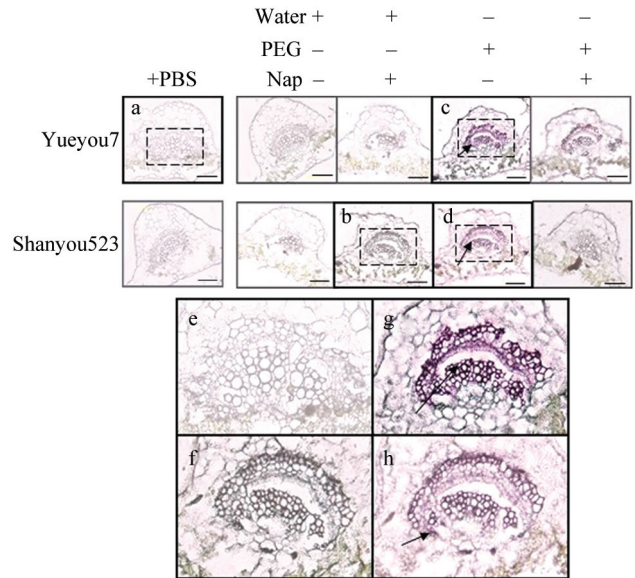


图2 水分胁迫下不同品种花生叶片中ABA的含量变化

Fig.2 Effect of water stress on endogenous ABA levels of leaves in different drought resistant cultivars

2.3 不同抗旱品种花生响应水分胁迫后叶片中AhNCED1的分布

在胁迫初期(1 h), 粤油7号叶片中的AhNCED1分布水平明显升高, 随后AhNCED1分布水平略有降低, 但在胁迫24 h时分布又增强; 而在汕优523中, 胁迫前期叶片AhNCED1分布较微弱, 且变化不大。在胁迫后期(24 h)时叶片中AhNCED1分布才明显增强(图5), 且两种花生品种叶片中AhNCED1特异分布于



PBS处理作为空白对照。e-h为a-d的5倍放大图。箭头所指为信号区域, a-d的标尺=500 μm。
 PBS treatment as control samples. e-h were magnified 5 times for a-d, respectively. The signal regions are indicated by an arrow. Bar=500 μm for a-d.

图3 Naproxen处理对水分胁迫下不同品种花生叶片ABA分布的影响

Fig.3 Effect of Naproxen(Nap) on ABA distribution of leaves in different drought resistant cultivars

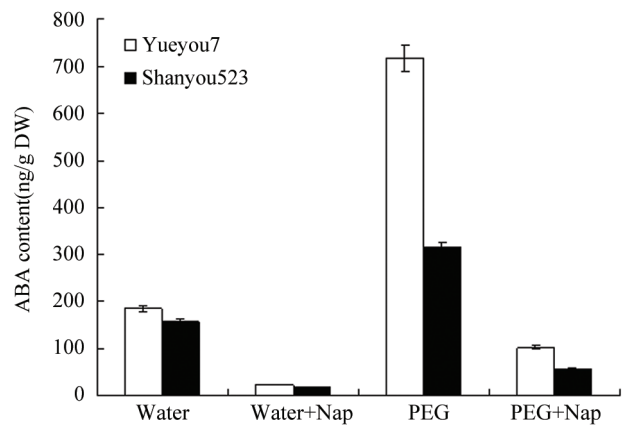


图4 Naproxen处理对水分胁迫下不同品种花生叶片ABA含量的影响

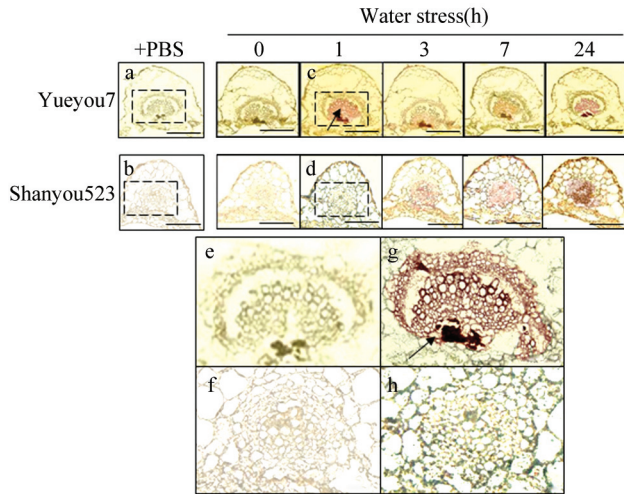
Fig.4 Effect of Naproxen(Nap) on endogenous ABA levels of leaves in different drought resistant cultivars

维管组织区域(图5g)。

2.4 Naproxen对不同抗旱品种花生叶片中AhNCED1分布的影响

粤油7号和汕优523在经过PEG胁迫后叶片维管组织中AhNCED1分布水平明显升高; 经Naproxen处

理后, 两品种花生叶片维管组织中AhNCED1分布水平迅速降低。两品种花生经PEG和Naproxen共同处理后, 叶片维管组织中的AhNCED1分布水平降低, 但粤油7号叶片维管组织中AhNCED1分布水平仍高于汕优523(图6)。

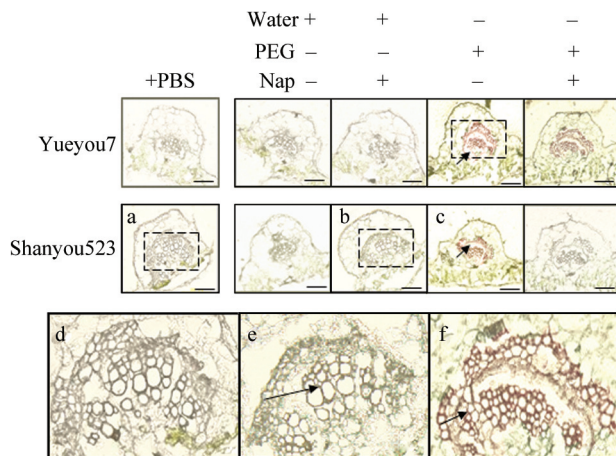


PBS处理作为空白对照。e-h为a-d的5倍放大图。箭头所指为信号区域, a-d的标尺=500 μm 。

PBS treated as control samples. e-h were magnified 5 times for a-d, respectively. The signal regions are indicated by an arrow. Bar=500 μm for a-d.

图5 水分胁迫下不同花生品种AhNCED1分布变化

Fig.5 Effect of water stress on AhNCED1 distribution of leaves in different drought resistant cultivars



PBS处理作为空白对照。d-f为a-c的5倍放大图。箭头所指为信号区域, a-c的标尺=500 μm 。

PBS treated as control samples. d-f were magnified 5 times for a-c, respectively. The signal regions are indicated by an arrow. Bar=500 μm for a-c.

图6 Naproxen处理对水分胁迫下不同品种花生叶片AhNCED1分布的影响

Fig.6 Effect of Naproxen on AhNCED1 distribution of leaves in different drought resistant cultivars

3 讨论

近年来, 关于植株响应水分胁迫后引发ABA合成敏感位点的研究受到广泛关注。用胶体金免疫电镜技术对蚕豆根中ABA的定位结果表明, 维管组织的质外体中发现有大量金颗粒标记^[13], 这说明蚕豆根部内源ABA主要分布在维管组织, 表明维管组织系统在ABA信号中可能处于一定的支配地位。本实验发现水分胁迫下花生叶片ABA主要分布在维管组织区域(图1和图3), 说明在ABA信号控制中处于支配地位的可能是维管组织系统。这一结论也受到AAO3在韧皮部伴胞细胞和木质部薄壁细胞精确定位研究^[9]的支持。Naproxen是ABA生物合成的抑制剂, 抑制环氧类胡萝卜素的裂解, 降低ABA生物合成的速率。花生在经过Naproxen处理后, ABA分布水平明显低于经过PEG处理的花生。两品种花生经Naproxen和PEG共处理后, 叶片维管组织内ABA分布水平降低, 但由于粤油7号响应水分信号时ABA的合成量大于汕优523的合成量, 故粤油7号叶片维管组织中ABA分布水平仍高于汕优523(图3和图6)。说明不同品种花生叶片维管组织中ABA的分布水平可能与其抗旱性相关。

AhNCED1基因是花生体内ABA合成的关键酶基因, 其表达量的高低能反映植物体内ABA水平^[14]。水分胁迫后, 花生叶片AhNCED1蛋白特异分布在维管组织区域(图5和图6), 说明处于物质转运通道上的AhNCED1蛋白在花生ABA合成和积累过程中具有重要作用。前期研究发现花生耐旱品种粤油7号在干旱胁迫下, 叶片AhNCED1 mRNA水平明显高于敏感品种汕优523^[15]。本论文进一步研究花生响应水分胁迫后叶片内AhNCED1的分布变化, 发现水分胁迫下粤油7号花生AhNCED1蛋白分布水平高于汕优523, 其体内ABA含量较多, 并且粤油7号花生叶片在水分胁迫下, 可持续较高水平分布(图5), 而汕优523在水分胁迫AhNCED1蛋白分布微弱, 说明粤油7号比汕优523具有持久的合成ABA的能力, 使ABA在水分胁迫下植株体内起持续作用, 植株整体保水状况好, 水分亏缺对植物体造成伤害较小, 因而抗旱能力较强^[16]。同时也说明不同抗旱品种花生AhNCED1蛋白的表达分布差异使植株体内合成ABA能力不同, 通过判断不同品种花生植株响应水分胁迫的能力, 呈现不同的抗旱能力。水分胁迫下, 粤油7号叶中AhNCED1蛋白分布出现两次增加, 可能AhNCED1

蛋白在胁迫不同阶段发挥不同作用,花生响应水分胁迫初期,首先触发根系*AhNCED1*转录、翻译,促进根源ABA的合成。*AhNCED1*蛋白第二次表达高峰,可能是由于此阶段水分胁迫引起ABA合成,诱导抗氧化酶等特异性蛋白大量表达,保护植物体免受外界伤害;同时*AhNCED1*启动子存在顺式作用元件ABRE区域,水分胁迫和ABA处理均可提高其活性^[17],增强此作用元件与*AhNCED1*启动子的结合,启动*AhNCED1*表达,促进大量合成ABA,合成的ABA正反馈调节*AhNCED1*蛋白持续高表达,内源ABA水平升高,使植物适应胁迫环境。

参考文献 (References)

- Cutler SR, Rodriguez PL, Finkelstein RR, Abrams SR. Abscisic acid: Emergence of a core signaling network. *Annu Rev Plant Biol* 2010; 61: 651-79.
- Jiang F, Hartung W. Long-distance signalling of abscisic acid (ABA): the factors regulating the intensity of the ABA signal. *J Exp Bot* 2008; 59(1): 37-43.
- Nambara E, Marion-poll A. Abscisic acid biosynthesis and catabolism. *Annu Rev Plant Biol* 2005; 56: 165-85.
- Burbidge A, Grieve TM, Jackson A, Thompson A, McCarty DR, Taylor IB. Characterization of the ABA-deficient tomato mutant *notabilis* and its relationship with maize Vp14. *Plant J* 1999; 17(4): 427-31.
- Tan BC, Schwartz SH, Zeevaart JA, McCarty DR. Genetic control of abscisic acid biosynthesis in maize. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94(22): 12235-40.
- Qin X, Zeevaart JA. Overexpression of a 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase gene in *Nicotiana glauca* increases abscisic acid and phaseic acid levels and enhances drought tolerance. *Plant Physiol* 2002; 128(2): 544-51.
- Wan X, Li L. Molecular cloning and characterization of a dehydration-inducible cDNA encoding a putative 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase in *Arachis hypogaea* L. *DNA Seq* 2005; 16(3): 217-23.
- Wan XR, Li L. Regulation of ABA level and water-stress tolerance of *Arabidopsis* by ectopic expression of a peanut 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase gene. *Biochem Biophys Res Commun* 2006; 347(4): 1030-8.
- Endo A, Sawada Y, Takahashi H, Okamoto M, Ikegami K, Koiwai H, *et al.* Drought induction of *Arabidopsis* 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase occurs in vascular parenchyma cells. *Plant Physiol* 2008; 147(4): 1984-93.
- Govind G, Harshavardhan VT, Patricia JK, Dhanalakshmi R, Senthil Kumar M, Sreenivasulu N, *et al.* Identification and functional validation of a unique set of drought induced genes preferentially expressed in response to gradual water stress in peanut. *Mol Genet Genomics* 2009; 281(6): 591-605.
- Perales L, Arbona V, Gómez-Cadenas A, Cornejo MJ, Sanz A. A relationship between tolerance to dehydration of rice cell lines and ability for ABA synthesis under stress. *Plant Physiol Biochem* 2005; 43(8): 786-92.
- Hansen H, Grossmann K. Auxin-induced ethylene triggers abscisic acid biosynthesis and growth inhibition. *Plant Physiol* 2000; 124(3): 1437-48.
- Komatsu K, Nishikawa Y, Ohtsuka T, Taji T, Quatrano RS, Tanaka S, *et al.* Functional analyses of the ABI1-related protein phosphatase type 2C reveal evolutionarily conserved regulation of abscisic acid signaling between *Arabidopsis* and the moss *Physcomitrella patens*. *Plant Mol Biol* 2009; 70(3): 327-40.
- Hu B, Liu X, Hong L, Li L, Luo GY. Expression of *Arachis hypogaea* 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase 1 (*AhNCED1*) in different organs of peanut and localization in *Arabidopsis*. *Biotechnol Bioinform* 2010; 24(1): 1562-8.
- Hu B, Wan XR, Liu X, Guo DL, Li L. Abscisic acid-mediated inhibition of seed germination involves a positive feedback regulation of ABA biosynthesis in *Arachis hypogaea* L. *Afr J Biotechnol* 2010b; 9(3): 1578-86.
- Sauter A, Davies WJ, Hartung W. The long-distance abscisic acid signal in the droughted plant: the fate of the hormone on its way from root to shoot. *J Exp Bot* 2001; 52(363): 1991-7.
- Liang J, Yang L, Chen X, Li L, Guo D, Li H, *et al.* Cloning and characterization of the promoter of the 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase gene in *Arachis hypogaea* L. *Biosci Biotechnol Biochem* 2009; 73(9): 2103-6.

Distribution of ABA and AhNCED1 in Peanut Leaves of Different Drought Resistant Cultivars Subjected to Drought Stress

Hu Bo, Xiao Suni, Lü Yan, Li Ling*

(Guangdong Provincial Key Lab of Biotechnology for Plant Development, College of Life Sciences, South China Normal University, Guangzhou 510631, China)

Abstract In this study, the changes of ABA distribution and ABA content in leaf of two species of the peanut (Yueyou 7 and Shanyou 523) were researched through the immunoenzyme localization and ELISA methods. The results showed that the ABA distribution and ABA content in peanut leaf were increased after drought stress. The synthesis of ABA and AhNCED1 in the leaves of Yueyou 7 appeared more quickly than that in the susceptible cultivar (Shanyou 523). Furthermore, *AhNCED1* transcript and protein in Yueyou 7 were induced more than that in Shanyou 523, coinciding with higher ABA accumulation. After treated with Naproxen, ABA distribution were lower than that treated with PEG. These results showed that the vascular cambium is the main region of leaf in peanut response to drought stress, and the higher drought-resistant of Yueyou 7 peanut may be relate to the more distribution of ABA and AhNCED1 in leaf.

Key words peanut; drought water stress; leaf; ABA; AhNCED1; distribution

Received: May 17, 2012 Accepted: July 18, 2012

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No.30971715), the China Postdoctoral Science Foundation (No.20110490907) and the Science and Technology Planning Project of the Guangdong Province (No.2011B020301009)

*Corresponding author. Tel: 86-20-85211378, E-mail: liling@scnu.edu.cn