

# 盐胁迫下宁夏枸杞苯丙烷代谢相关 基因差异表达分析

宋 繁, 胡进红, 梁旺利, 梁文裕, 王玲霞\*

(宁夏大学 生命科学学院, 银川 750021)

**摘 要:**为探究盐胁迫条件下宁夏枸杞苯丙烷代谢相关基因差异表达规律,以不同浓度 NaCl(0, 100, 200, 300 mmol/L)处理的水培宁夏枸杞幼苗为研究材料,利用高通量测序技术和 qRT-PCR 对盐胁迫下宁夏枸杞苯丙烷代谢相关基因差异表达进行分析,同时对该途径中关键酶活性及产物含量进行测定。结果表明,(1)宁夏枸杞在不同浓度 NaCl 处理下共有 58 个苯丙烷代谢相关基因差异表达,且随着盐胁迫程度的增加大部分基因表达水平上调或不变;(2)随着 NaCl 浓度的增加,宁夏枸杞叶片抗氧化酶 SOD、POD、CAT 的活性均下降,而酚类物质、类黄酮和木质素的含量在 100 mmol/L NaCl 处理下均显著积累。研究发现,宁夏枸杞可能通过调控苯丙烷代谢相关基因上调表达,增加酚类物质、类黄酮和木质素的合成,来清除过多活性氧和提升细胞壁强度以适应盐胁迫;宁夏枸杞可耐受的 NaCl 浓度在 100~200 mmol/L 之间。

**关键词:**宁夏枸杞;盐胁迫;苯丙烷代谢途径;差异表达基因

中图分类号:Q786; S567.19

文献标志码:A

## Differential Expression Analysis of Genes Related to Phenylpropane Metabolism in *Lycium barbarum* under Salt Stress

SONG Fan, HU Jinhong, LIANG Wangli, LIANG Wenyu, WANG Lingxia\*

(College of Life Sciences, Ningxia University, Yinchuan 750021, China)

**Abstract:** In order to investigate the differential expression of the genes related to phenylpropanoid metabolism under salt stress, *Lycium barbarum* treated with different concentrations of NaCl (0, 100, 200, 300 mmol/L NaCl) was used as the research material. High-throughput sequencing technology and qRT-PCR were used to detect the differential expression genes related to phenylpropanoid metabolism in *L. barbarum* under salt stress. Meanwhile, the activities of key enzymes and the contents of products in this pathway were determined. The results showed as follows: (1) A total of 58 genes related to phenylpropanoid metabolism was differentially expressed under different concentrations of NaCl, and most of the genes were up-regulated or unchanged with the increase of salt stress. (2) With the increased NaCl concentration, the activities of antioxidant enzymes SOD, POD and CAT in the leaves of *L. barbarum* were decreased, while the contents of phenols, flavonoids and lignin were significantly accumulated under 100 mmol/L NaCl treatment. The results showed that *L. barbarum* could regulate the up-regulated expression

收稿日期:2022-11-30;修改稿收到日期:2023-05-12

基金项目:宁夏自然科学基金项目(2022AAC03083);宁夏回族自治区科技创新团队建设项目(NXKJT2019002)

作者简介:宋 繁(1998-),女,在读硕士研究生,主要从事植物资源保护与利用研究。E-mail:2727601531@qq.com

\* 通信作者:王玲霞,博士,副教授,主要从事植物分子生物学研究。E-mail:lxwang@nxu.edu.cn

of the genes related to phenylpropanoid metabolism, increase the synthesis of phenols, flavonoids and lignin to adapt to salt stress by scavenging excessive ROS and improving cell wall strength. The concentration of NaCl tolerated by *L. barbarum* ranged from 100 mmol/L to 200 mmol/L.

**Key words:** *Lycium barbarum* L.; salt stress; phenylpropanoid metabolism; differentially expressed genes

宁夏枸杞 (*Lycium barbarum* L.) 是主要分布于宁夏、内蒙古、新疆等干旱或半干旱地区的多年生灌木,其果实具有很高的药用和营养价值,是当地重要的栽培药用植物资源。同时,宁夏枸杞适宜在盐碱、干旱和沙荒地种植,具有较强的耐盐性。长期的盐生环境使宁夏枸杞进化出了一系列适应盐胁迫的机制,包括离子选择性吸收<sup>[1]</sup>、渗透调节物质积累<sup>[2]</sup>、活性氧自由基(ROS)清除<sup>[3]</sup>和叶片超微结构改变等<sup>[4]</sup>。目前越来越多的研究表明宁夏枸杞可通过形态结构、生理生化及分子水平等方面的变化协同适应盐胁迫。

植物苯丙烷代谢途径是合成酚类、类黄酮和木质素等次生代谢物的主要途径。这些次生代谢物构成植物体内重要的非酶抗氧化防御系统,可以清除过多的 ROS,减缓植物在逆境胁迫下的膜脂过氧化和其他氧化损伤。研究发现通过改变苯丙烷代谢途径中相关基因的表达水平,进而调控酶活性及代谢物质积累是植物应对非生物胁迫的一种重要防御机制<sup>[5]</sup>。

盐胁迫下草莓<sup>[6]</sup>、红果龙葵<sup>[7]</sup>、刺柏<sup>[8]</sup>、鼠尾草<sup>[9]</sup>和秋茄<sup>[10]</sup>通过上调苯丙氨酸解氨酶(PAL)、肉桂酸-4-羟化酶(C4H)、类黄酮-3-羟化酶(F3H)、二氢黄酮醇-4-还原酶(DFR)、黄酮醇合酶(FLS)和查耳酮合成酶(CHS)等苯丙烷代谢途径相关基因的表达,促进酚类、类黄酮物质的积累,使得这些植物的耐盐性提高。

此外,盐胁迫可通过诱导类黄酮合成相关基因 F3H 和查耳酮异构酶基因(CHI)的表达来提高胡萝卜对盐的耐受性<sup>[11]</sup>。拟南芥盐驯化过程中与木质素合成相关的 7 个基因表达上调,促进木质素的合成,使拟南芥细胞壁木质化、减少水分蒸腾,维持正常的膨压<sup>[12]</sup>。

由此可见植物酚类、类黄酮和木质素等的合成与植物耐盐性具有明显的相关性,研究其合成相关基因的差异表达有利于阐明植物耐盐机制。但是目前对于宁夏枸杞酚类、类黄酮、木质素这类化合物合成相关基因如何表达以适应盐胁迫还鲜见报道。因此,本研究利用高通量测序技术和实时荧光定量技术对盐胁迫下宁夏枸杞苯丙烷代谢途径中相关基因

的表达规律进行分析,并对该途径中关键酶的活性及产物含量进行测定,为进一步研究宁夏枸杞耐盐机制提供理论参考。

## 1 材料和方法

### 1.1 材 料

试验所用品种‘枸杞 1 号’种子由宁夏农林科学院枸杞工程技术研究所惠赠。枸杞种子经萌发 1 d 后种植于花盆(6.5 cm×7.5 cm)中,以珍珠岩、蛭石与基质按 1:1:1 比例混合作为培养基质,用 Hoagland 营养液进行浇灌。在温度(25±2)℃、湿度 42%、光强 60 μmol/(m<sup>2</sup>·s)、光照时间 12 h 的条件下进行培养。1 个月,选择长势一致且健康的幼苗移栽水培,继续培养 2 个月,进行 100, 200, 300 mmol/L NaCl 盐胁迫处理,以不加 NaCl 的 Hoagland 营养液为对照。每个处理设 3 个重复。在盐处理后第 7 天采集枸杞叶片,液氮处理后,保存于-80℃冰箱备用<sup>[13]</sup>。

### 1.2 方 法

#### 1.2.1 RNA 提取及 cDNA 测序文库构建

采用天根生化科技有限公司(中国,北京)生产的 RNAPrep Pure 多糖多酚植物总 RNA 提取试剂盒提取宁夏枸杞叶片中的总 RNA,构建 cDNA 测序文库。

#### 1.2.2 Illumina HiSeq 测序及差异基因筛选

通过高通量 Illumina HiSeq PE150 测序平台对已构建好的文库进行测序并获得原始数据。去除接头序列、过滤掉低质(low quality, 碱基质量值小于等于 25 的碱基数占整个 reads 60%以上)和 N(N 表示无法确定碱基信息)比例大于 5%的 reads,获得可用于后续分析的参考序列。将参考序列在 Nr、Pfam、Swiss-prot、KEGG、GO 数据库进行 blastx 比对获得基因功能注释。采用 DESeq2 进行基因的差异表达分析,以  $|\log_2(\alpha_{FC})| > 1$ , 且  $P < 0.05$  作为标准筛选苯丙烷代谢途径相关的差异表达基因。

#### 1.2.3 苯丙烷代谢途径相关基因 qRT-PCR 分析

为了进一步验证转录组数据的准确性,对苯丙烷代谢途径相关重要基因进行 qRT-PCR 分析。参考宁夏枸杞转录组测序结果,运用 Primer Premier

5.0 设计引物(表 1),使用诺唯赞生物科技有限公司(中国,南京)生产的试剂盒 ChamQ Universal SYBR qPCR Master Mix (Q711-02) 进行荧光定量检测。

PCR 反应条件:预变性 95 °C 孵育 10 min,95 °C 变性 30 s,60 °C 退火 1 min,PCR 循环数为 40 个,每个样品重复 3 次,采用  $2^{-\Delta\Delta C_T}$  法计算基因相对表达量。

表 1 基因功能注释及引物序列

Table 1 Gene function annotation and primer sequences

基因名称 Gene name	功能注释 Functional annotation	引物名称 Primer name	引物序列 The sequence of primer(5'→3')
<i>Actin</i>	内参基因 Reference gene	<i>actin-F</i>	GTCCTGCTCACTGAAGCACCTCTCA
		<i>actin-R</i>	TGTGACTCACGCCATCACCAGAGTC
<i>PAL</i>	苯丙氨酸解氨酶 Phenylalanine ammonia-lyase	<i>PAL-F</i>	ACACTCTCCTTCAAGGCTACTCTGG
		<i>PAL-R</i>	AGTGAGCAAACCAGCAATGTAGGAC
<i>C4H</i>	肉桂酸-4-羟化酶 Cinnamate-4-hydroxylase	<i>C4H-F</i>	GAGTAGATTAGCTCAGAGCTTCGAG
		<i>C4H-R</i>	TGCTTCCAAGCTTCTTGCGTTCATC
<i>4CL</i>	4-香豆酸-CoA 连接酶 4-coumarate-CoA ligase	<i>4CL-F</i>	GGCTGCAATTCTGATTATGCAGAAG
		<i>4CL-R</i>	CACCAGACATCATCGTCTTATGGA
<i>POD12</i>	过氧化物酶 12 Peroxidase12	<i>POD12-F</i>	CACATTCAACTGTCCCATCTTGATC
		<i>POD12-R</i>	ACACGGTTAACATGGACATTCGGAG
<i>CCoAOMT</i>	咖啡酰辅酶 A 氧甲基转移酶 Caffeoyl-CoA 3-O-methyltransferase	<i>CCoAOMT-F</i>	GGTAATACCATCTCCAATAGGAAGC
		<i>CCoAOMT-R</i>	GATCGGATATGACAACACCTTGTGG

### 1.2.4 盐胁迫下宁夏枸杞苯丙烷代谢途径关键酶活性测定

采用苏州梦犀生物医药科技有限公司生产的试剂盒(中国,江苏)对宁夏枸杞叶片苯丙氨酸解氨酶(PAL)、肉桂酸-4-羟化酶(C4H)、4-香豆酸 CoA 羧化酶(4CL)、二氢黄酮还原酶(DFR)和肉桂醇脱氢酶(CAD)的活性进行测定。

### 1.2.5 盐胁迫下宁夏枸杞抗氧化酶活性鉴定

采用苏州科铭生物技术有限公司生产的试剂盒(中国,江苏)对宁夏枸杞叶片超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化物酶(POD)和过氧化氢酶(CAT)的活性进行测定。

### 1.2.6 酚、类黄酮及木质素含量测定

采用苏州梦犀生物医药科技有限公司生产的试剂盒(中国,江苏)对宁夏枸杞叶片酚类、类黄酮和木质素含量进行测定。

## 1.3 数据处理

使用 SPSS Statistics 26.0、Origin 以及 Excel 对数据进行分析并作图。

## 2 结果与分析

### 2.1 盐胁迫对宁夏枸杞幼苗的生长形态的影响

宁夏枸杞生长形态在盐胁迫处理下发生明显变

化(图 1)。其中,随着 NaCl 浓度的增加,宁夏枸杞幼苗株高呈先增加后下降趋势,在 100,200 mmol/L NaCl 处理下明显高于对照组,在 300 mmol/L NaCl 处理下比对照组显著下降。同时,与 0~200 mmol/L NaCl 处理相比,宁夏枸杞幼苗在 300 mmol/L NaCl 处理下叶片数量减少,主根长度明显降低,叶片萎蔫,部分叶片脱落。以上结果表明,宁夏枸杞生长的最适盐浓度在 100~200 mmol/L NaCl 之间,300 mmol/L NaCl 明显抑制其生长。



I~IV 分别为 0,100,200,300 mmol/L NaCl 处理。下同。

图 1 盐胁迫处理 7 d 后的枸杞幼苗

I-IV are 0, 100, 200, 300 mmol/L NaCl treatments, respectively. The same as below.

Fig. 1 The samples of *L. barbarum* seedlings under salt stress for 7 days

## 2.2 盐胁迫下宁夏枸杞苯丙烷代谢途径相关基因差异表达分析

通过 KEGG Pathway 显著性富集分析对盐胁迫下宁夏枸杞叶片中所有差异表达基因进行分析,共有 58 个基因被显著富集于苯丙烷代谢途径( $P < 0.05$ );与对照相比,100,200,300 mmol/L NaCl 胁迫处理下宁夏枸杞叶片中分别有 30,32,29 个苯丙烷代谢相关基因差异表达,其中 3 个处理组共有显著差异表达基因 7 个(图 2),进一步分析表明 100 mmol/L NaCl 处理组中上调基因 20 个,下调基因 10 个;200 mmol/L NaCl 处理组中上调基因 17 个,下调基因 15 个;300 mmol/L NaCl 处理组中上调基因 11 个,下调基因 18 个。本研究重点对苯丙烷代谢途径相关的 15 个关键基因的差异表达及其参与宁夏枸杞对盐胁迫的响应进行讨论(表 2)。

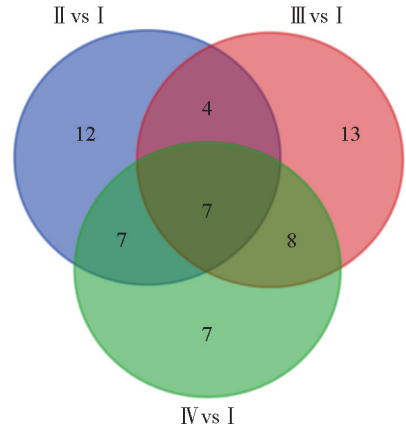


图 2 盐胁迫下宁夏枸杞叶片苯丙烷代谢途径相关差异表达基因

Fig. 2 Differentially expressed genes related to phenylpropane metabolic pathway in *L. barbarum* leaves under salt stress

表 2 盐胁迫下宁夏枸杞叶片苯丙烷代谢途径主要差异表达基因

Table 2 The main differentially expressed genes related to phenylpropane metabolism pathway in *L. barbarum* leaves under salt stress

基因 ID Gene ID	基因名称 Gene name	II vs I		III vs I		IV vs I		基因注释 Gene description
		差异倍数 $\log_2 \alpha_{FC}$	P 值 P value	差异倍数 $\log_2 \alpha_{FC}$	P 值 P value	差异倍数 $\log_2 \alpha_{FC}$	P 值 P value	
AOK32733.1	<i>PAL</i>	-0.636 6	0	-2.157 8	0	-2.386 7	0	苯丙氨酸解氨酶 Phenylalanine ammonia-lyase
AGE10592.1	<i>C4H</i>	0.108 9	0.872 46	2.019 3	<0.001	0.230 0	0.701 86	肉桂酸-4-羟化酶 Cinnamate-4-hydroxylase
AGE10594.1	<i>4CL</i>	-1.266 7	0.039 23	1.229 3	0.001 25	-0.837 3	0.096 63	4-香豆酸-CoA 连接酶 4-coumarate-CoA ligase
AHH55328.1	<i>CHS1</i>	4.597 5	<0.001	0.148 8	0.781 06	0.613 9	0.188 85	查尔酮合酶 Chalcone synthase
AID50182.1	<i>F3H</i>	5.079 0	0	1.480 9	<0.001	2.094 5	<0.001	黄酮酮-3-羟化酶 Flavanone 3-hydroxylase
AGT57962.1	<i>F3'5'H</i>	7.087 4	<0.001	2.440 2	0.002 41	1.864 3	0.025 73	类黄酮 3'5'-羟化酶 Flavonoid 3'5'-hydroxylase
ATB56299.1	<i>DFR</i>	6.884 3	<0.001	3.092 0	<0.001	3.865 6	<0.001	二氢黄酮醇-4-还原酶 Dihydroflavonol-4-reductase
AHH55331.1	<i>ANS</i>	4.824 0	<0.001	0.981 0	0.005 85	1.357 3	<0.001	花色素合成酶 Anthocyanin synthase, partial
GAV83798.1	<i>CCoAOMT</i>	1.704 4	<0.001	-0.659 2	0.306 89	-0.610 5	0.295 93	咖啡酰辅酶 A 氧甲基转移酶 Caffeoyl-CoA 3-O-methyltransferase
LOC102579562	<i>CAD</i>	-1.372 2	<0.001	-1.787 0	<0.001	-1.635 7	<0.001	肉桂醇脱氢酶 6 Cinnamyl alcohol dehydrogenase 6
LOC102601606	<i>POD1</i>	4.153 5	<0.001	0.820 2	0.730 04	3.004 1	0.016 40	过氧化物酶 1 Cationic peroxidase 1-like
LOC107867619	<i>POD12</i>	3.336 9	0	2.249 8	<0.001	2.286 5	<0.001	过氧化物酶 12 Peroxidase 12-like
LOC107011357	<i>POD19</i>	-1.396 0	<0.001	-0.578 1	<0.001	-0.959 5	<0.001	过氧化物酶 19 Peroxidase 19
LOC7483472	<i>POD41</i>	5.425 9	<0.001	3.334 7	0.218 02	3.397 7	0.112 38	过氧化物酶 41 Peroxidase 41
LOC104097756	<i>POD48</i>	2.269 5	<0.001	0.440 6	0.441 12	0.743 2	0.141 53	过氧化物酶 48 Peroxidase 48

### 2.3 盐胁迫下宁夏枸杞叶片苯丙烷代谢途径相关基因 qRT-PCR 分析

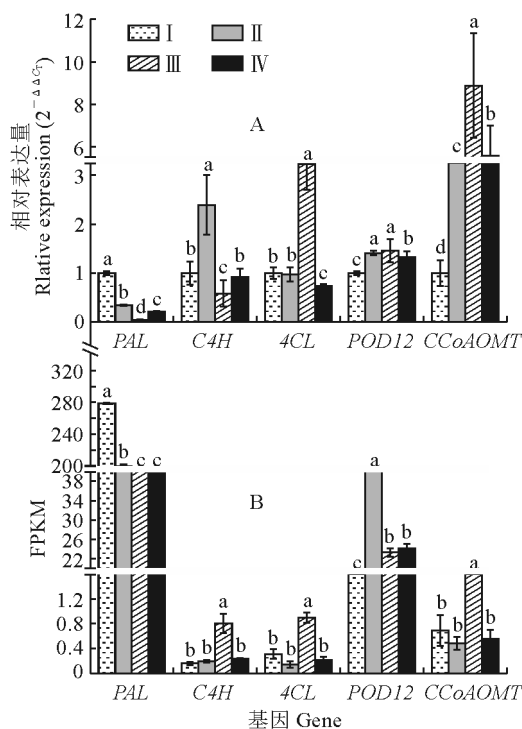
运用 qRT-PCR 对宁夏枸杞叶片中酚类、类黄酮和木质素合成相关的 5 个基因 (*PAL*、*C4H*、*4CL*、*CCoAOMT* 和 *POD12*) 在不同浓度盐胁迫下的表达模式进行分析。结果表明:随着盐浓度的增加,*PAL* 表达量与对照相比均呈下降趋势,且差异均达到显著水平;*C4H* 和 *4CL* 表达量呈先升后降的趋势,但 *C4H* 和 *4CL* 表达量分别以 100 mmol/L 和 200 mmol/L 最高,且均显著高于对照,其余处理均低于对照;*POD12* 和 *CCoAOMT* 的表达量均随盐浓度的增加而先升后降,且各浓度处理均比对照显著上调,并均在 200 mmol/L NaCl 处理下表达量最高(图 3,A)。

和转录组测序的结果基本一致(图 3,B),说明转录组测序结果可靠。

### 2.4 盐胁迫下宁夏枸杞叶片相关酶活性及酚、类黄酮和木质素含量分析

盐胁迫下宁夏枸杞叶片抗氧化酶活性测定结果(图 4)显示,与对照组相比,叶片 SOD 和 POD 活性在各处理组均显著下调,但随着盐胁迫浓度升高,SOD 活性逐渐上升,而 POD 活性逐渐下降,且处理间多差异显著;同时,叶片 CAT 活性在 200 mmol/L NaCl 处理下无显著变化,在 100, 300 mmol/L NaCl 处理下均显著低于对照。

同时,对不同浓度盐胁迫下宁夏枸杞叶片苯丙烷代谢途径中相关酶的活性进行测定。结果(图 5)显示,与对照组相比,叶片 *PAL* 和 *CAD* 活性在 100 mmol/L NaCl 处理下均显著上调,在 200 和 300 mmol/L NaCl 处理下均无显著变化;叶片 *C4H* 活性在各浓度 NaCl 处理下均与对照无显著差异,但 100 mmol/L NaCl 处理显著高于 200 mmol/L NaCl 处理,而与 300 mmol/L NaCl 处理无显著差异;叶片 *4CL* 和 *DFR* 活性均在 100, 200 mmol/L NaCl 处理下均比对照显著上调,而在 300 mmol/L NaCl 处理下均无显著变化。



A. qRT-PCR 分析; B. FPKM 分析; 数据以 3 次生物学重复的平均值 ± 标准差表示。图中组间标注不同小写字母表示差异显著 ( $P < 0.05$ )。下同。

图 3 盐胁迫下宁夏枸杞叶片苯丙烷代谢途径关键基因的 qRT-PCR 及转录组 FPKM 分析

A. qRT-PCR analysis; B. FPKM analysis; The data are presented as the means ± SD of three biological replicates. The different lowercase letters between groups indicate significant difference ( $P < 0.05$ ). The same as below.

Fig. 3 qRT-PCR and transcriptome FPKM analysis of key genes for phenylpropane metabolic pathway in *L. barbarum* leaves under salt stress

进一步与转录组测序得到的 FPKM 值进行比较,发现上述 5 个基因在不同盐浓度下的表达水平

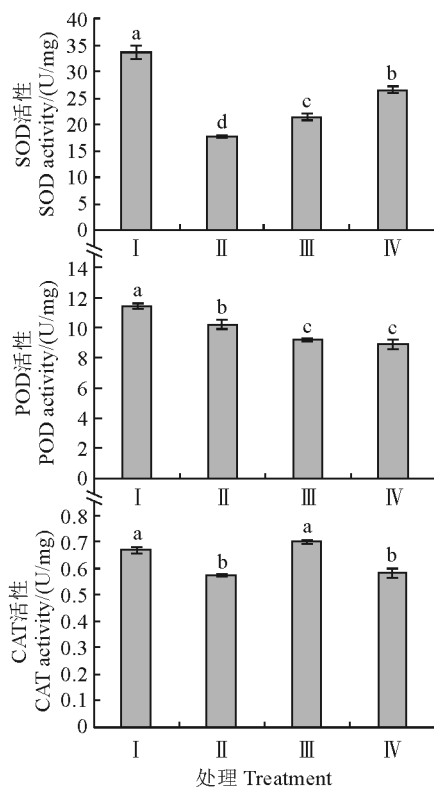


图 4 盐胁迫下宁夏枸杞叶片 SOD、POD 和 CAT 活性变化  
Fig. 4 Variations of SOD, POD and CAT activities in *L. barbarum* leaves under salt stress

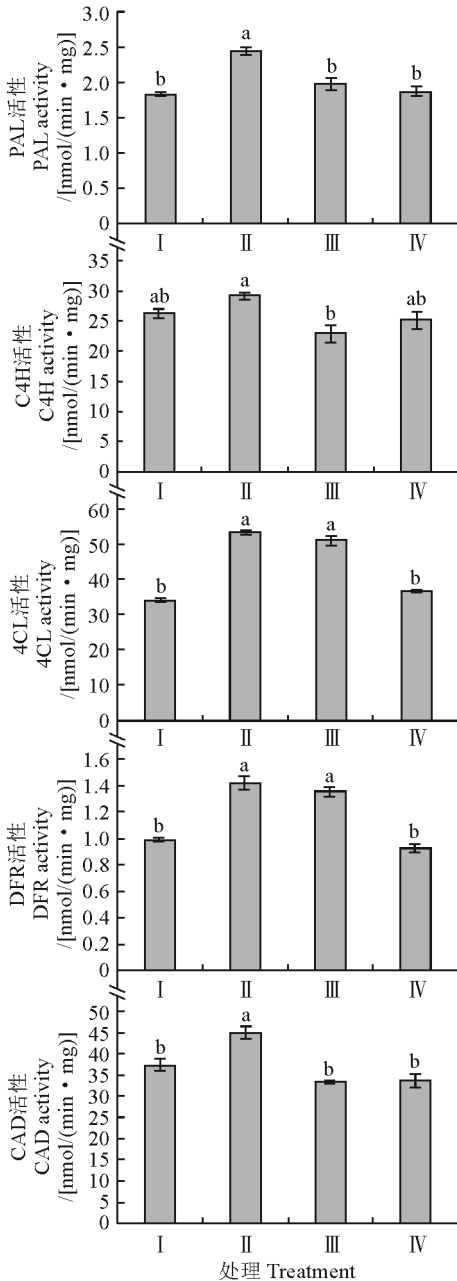


图5 盐胁迫下宁夏枸杞叶片 PAL、C4H、4CL、DFR 和 CAD 活性变化

Fig. 5 Variations of PAL, C4H, 4CL, DFR and CAD activities in *L. barbarum* leaves under salt stress

另外,对不同浓度盐胁迫下宁夏枸杞叶片中酚类物质、类黄酮和木质素的含量进行测定。结果(图6)显示,宁夏枸杞叶片中酚类物质含量在100, 300 mmol/L NaCl 处理下均显著高于对照,在200 mmol/L NaCl 处理下显著低于对照;而叶片类黄酮的含量在各处理组均显著高于对照,并以100 mmol/L NaCl 处理最高,且与其余处理差异显著;叶片木质素含量在100 mmol/L NaCl 处理下达到8.56 mg/g,并显著高于对照,而在200和300 mmol/L NaCl 处理下与对照组相比未发生显著变化。

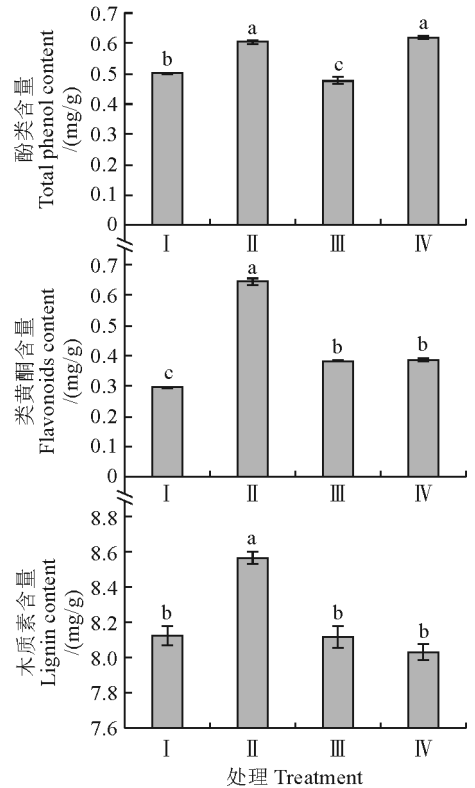


图6 盐胁迫下宁夏枸杞叶片酚、类黄酮和木质素含量  
Fig. 6 Contents of phenolic compounds, flavonoids and lignin in *L. barbarum* leaves under salt stress

### 3 讨论

本研究通过 KEGG pathway 显著性富集分析发现100~300 mmol/L NaCl 胁迫下宁夏枸杞叶片中共有58个苯丙烷代谢相关基因差异表达。该途径合成的酚类、类黄酮和木质素等在植物适应环境胁迫中扮演着重要的角色,酚类和类黄酮可通过清除 ROS 避免膜质过氧化从而减少环境胁迫对植物造成的损伤<sup>[14]</sup>,而木质素可通过提高细胞壁强度使植物适应环境胁迫<sup>[15]</sup>。

#### 3.1 宁夏枸杞通过提高酚类和类黄酮含量清除过量 ROS 适应盐胁迫

酚类物质是重要的抗氧化物质<sup>[16]</sup>,与植物耐盐性密切相关。盐胁迫下植物中 PAL、C4H 和 4CL 等基因的表达水平与酚类化合物积累相关<sup>[17-19]</sup>。本研究发现,宁夏枸杞叶片 PAL 基因表达量在盐胁迫下与对照相比显著下调,但 PAL 活性在100 mmol/L NaCl 胁迫下显著上调,这可能是由于 PAL 属于多基因家族,不同物种中 PAL 基因种类和数目各有不同,因此对胁迫的响应也有所不同<sup>[20]</sup>。例如水稻中有8个 PAL 基因在盐胁迫下显著下调表

达,而只有 *OsPAL3* 上调表达<sup>[21]</sup>。因此,宁夏枸杞中 *PAL* 家族可能也是由多个 *PAL* 基因构成的,所以在盐胁迫下的表达模式也不同,*PAL* 活性的提高可能是由其他 *PAL* 基因控制的。*C4H* 是细胞色素 P450 的一种,催化反式肉桂酸生成对香豆酸。盐胁迫下该基因的过表达有利于更多酚类物质的合成<sup>[22]</sup>。本研究中 *C4H* 表达量随 NaCl 浓度的增加呈现先升后降的变化趋势,与相应酶活性变化趋势一致,均在 100 mmol/L NaCl 处理下达到最高,该基因可能是促进宁夏枸杞叶片酚类物质积累的重要基因。*4CL* 可以催化香豆酸和 CoA 合成香豆酰 CoA。在烟草中过表达 *4CL* 提高了其酚类物质的含量及抗旱性<sup>[23]</sup>。本研究发现宁夏枸杞叶片中该基因转录水平在盐胁迫下呈先升后降的表达趋势,相应酶活性也在 100,200 mmol/L NaCl 胁迫下显著高于对照。值得注意的是,本研究中宁夏枸杞叶片酚类物质含量在 100 mmol/L NaCl 胁迫下显著高于对照。以上结果表明在适度盐胁迫下(100 mmol/L NaCl)宁夏枸杞可能通过调控苯丙烷代谢通路酚类合成关键酶基因的表达,积累酚类物质来清除过量 ROS 以适应盐胁迫。

类黄酮可作为植物体内二级抗氧化系统,当减少 ROS 产生的第一道防线抗氧化酶系统发生变化时,类黄酮的生物合成会被触发<sup>[24]</sup>。其通过提供电子或氢原子清除 ROS<sup>[25]</sup>,进而减少氧化胁迫对植物的伤害。在秋茄盐胁迫研究中发现 *CHS* 基因的表达有利于类黄酮物质的积累<sup>[10]</sup>。在植物中过表达 *CHS*、*F3H* 和 *F3'5'H*、*DFR* 显著提高了类黄酮的含量,增强了植物对盐、干旱和氧化胁迫的耐受性<sup>[26-30]</sup>。本研究发现在 100 mmol/L NaCl 胁迫下宁夏枸杞叶片中抗氧化酶 SOD、POD 和 CAT 的活性均显著下调,表明此时它们清除 ROS 的能力下降;此时宁夏枸杞 *CHS*、*F3H*、*F3'5'H*、*DFR* 基因转录水平均呈上调表达的趋势,*DFR* 活性也显著增加,类黄酮的含量明显升高,这一结果表明在适度盐胁迫下(100 mmol/L NaCl)宁夏枸杞叶片中的二级抗氧化系统类黄酮生物合成途径被激活,提高了其抗氧化胁迫的能力。而在中高度盐胁迫(200,300 mmol/L NaCl)下 SOD 和 CAT 的活性逐渐上调,类黄酮物质的含量相应减少,此时抗氧化酶系统和类黄酮物质一起协同清除 ROS 以适应盐胁迫。

### 3.2 宁夏枸杞通过木质素积累增加细胞壁强度适应盐胁迫

木质素是植物细胞次生壁的重要成分之一,在植物生长发育及抗逆性方面发挥重要作用<sup>[31]</sup>,植物可通过调节细胞壁组分增加细胞壁强度来应对胁迫环境<sup>[32]</sup>。本研究发现在盐胁迫下宁夏枸杞叶片中与木质素合成相关的基因表达显著上调。*CCoAOMT* 是木质素合成过程中的关键酶,参与木质素单体合成的甲基化反应,其基因表达水平与植物木质素含量密切相关<sup>[33]</sup>。逆境胁迫下该基因表达量的提高可能诱导木质素的迅速合成<sup>[34]</sup>。生姜 *CCoAOMT* 转录水平在中度 NaCl 胁迫下明显升高,但在较高 NaCl 浓度下降低,与其木质素含量变化趋势相同<sup>[35]</sup>。在本研究中,宁夏枸杞叶片中 *CCoAOMT* 基因也在 100 mmol/L NaCl 胁迫下显著上调,此时木质素含量明显上升,而随 NaCl 浓度的增加该基因表达及木质素含量与对照组相比未发生显著变化。*CAD* 是催化各种肉桂醛生成木质素单体的关键酶。在非生物胁迫下 *CAD* 基因表达水平的增加可促进细胞壁木质化过程<sup>[36]</sup>。本研究发现盐胁迫下宁夏枸杞叶片中 *CAD* 基因下调表达,但其酶活性在 100 mmol/L NaCl 处理下显著上调,而且木质素含量较对照显著升高。这可能是由于盐胁迫导致基因发生翻译后蛋白修饰,使酶活性与基因表达量不同步<sup>[37]</sup>。表明宁夏枸杞可能通过木质素合成途径中关键基因差异表达以及酶蛋白翻译后修饰等多种调控方式应答盐胁迫。

综上所述,在 100 mmol/L 适度盐胁迫下,宁夏枸杞通过调控苯丙烷代谢途径中相关基因的表达来增加酚类物质、类黄酮和木质素等次生代谢物质的积累,从而启动非酶促抗氧化系统减缓 ROS 造成的伤害,并通过合成木质素增加细胞壁强度来协同适应盐胁迫,这可能是宁夏枸杞适应盐胁迫环境的一种重要特征。但在 200,300 mmol/L 的中高度盐胁迫下,以上 3 类化合物的合成均明显减弱,植株耐盐性降低和生长受到抑制,因此认为宁夏枸杞生长最适盐浓度在 100~200 mmol/L NaCl 之间,这与盐胁迫下宁夏枸杞生长形态变化相一致。本研究结果为阐明苯丙烷代谢途径相关基因、酶以及产物参与提高宁夏枸杞耐盐性提供了理论依据,同时对宁夏枸杞的栽培生产具有重要指导意义。

## 参考文献:

- [1] 朱志明,毛桂莲,许 兴,等. 盐胁迫下宁夏枸杞根系  $\text{Na}^+$ 、 $\text{K}^+$  平衡及抑制剂对其影响的研究[J]. 干旱地区农业研究, 2017, **35**(6): 140-145.
- ZHU Z M, MAO G L, XU X, *et al.* Effect of salt stress and inhibitor on uptake and transportation of  $\text{Na}^+$  and  $\text{K}^+$  in root of *Lycium barbarum* L. [J]. *Agricultural Research in the Arid Areas*, 2017, **35**(6): 140-145.
- [2] 梁 敏. 盐胁迫下宁夏枸杞差异蛋白的筛选及离子转运相关基因的表达[D]. 银川:宁夏大学, 2019.
- [3] 陆 瑛,鲁延芳,占玉芳,等. 盐胁迫对“宁杞 1 号”生长表现和生理指标的影响[J]. 林业科技通讯, 2018(5): 70-75.
- LU Y, LU Y F, ZHAN Y F, *et al.* Effects of salt stress on growth performance and physiological indexes of ‘Ningqi No. 1’[J]. *Practical Forestry Technology*, 2018(5): 70-75.
- [4] 毛桂莲,梁文裕,王 盛,等. 碱性盐胁迫对宁夏枸杞生长、结构及光合参数的影响[J]. 干旱地区农业研究, 2017, **35**(4): 236-242.
- MAO G L, LIANG W Y, WANG S, *et al.* Effects of alkali stress on growth, structure and photosynthetic parameters of *Lycium barbarum* L. [J]. *Agricultural Research in the Arid Areas*, 2017, **35**(4): 236-242.
- [5] ISAH T. Stress and defense responses in plant secondary metabolites production[J]. *Biological Research*, 2019, **52**(1): 1-25.
- [6] PERIN E, MESSIAS R, BOROWSKI J, *et al.* ABA-dependent salt and drought stress improve strawberry fruit quality [J]. *Food Chemistry*, 2019, **271**: 516-526.
- [7] BEN-ABDALLAH S, ZORRIG W, AMYOT L, *et al.* Potential production of polyphenols, carotenoids and glycoalkaloids in *Solanum villosum* Mill. under salt stress[J]. *Biologia*, 2019, **74**(3): 309-324.
- [8] TAVARES L, PIMPÃO R, MCDougALL G, *et al.* Elucidating phytochemical production in *Juniperus* sp.: Seasonality and response to stress situations[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2013, **61**(17): 4 044-4 052.
- [9] VALIFARD M, MOHSENZADEH S, NIAZI A, *et al.* Phenylalanine ammonia lyase isolation and functional analysis of phenylpropanoid pathway under salinity stress in *Salvia* species[J]. *Australian Journal of Crop Science*, 2015, **9**(7): 656-665.
- [10] 宋晓敏,吕晓杰,邱智敏,等. 红树植物秋茄类黄酮代谢及其抗氧化活性对高盐胁迫的响应[J]. 西北植物学报, 2016, **36**(12): 2 461-2 468.
- SONG X M, LÜ X J, QIU Z M, *et al.* Flavonoid metabolism and antioxidant activity in response to salt stress in mangrove *Kandelia candel*[J]. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*, 2016, **36**(12): 2 461-2 468.
- [11] KLIMEK-CHODACKA M, SADŁOWSKA K, KAMIŃSKA I, *et al.* Expression of the flavonoid pathway genes in carrot plants tolerant to salt stress[J]. *New Biotechnology*, 2016, **33**: S166.
- [12] SHEN X Y, WANG Z L, SONG X F, *et al.* Transcriptomic profiling revealed an important role of cell wall remodeling and ethylene signaling pathway during salt acclimation in *Arabidopsis* [J]. *Plant Molecular Biology*, 2014, **86**(3): 303-317.
- [13] 马晓蓉,杨淑娟,姚 宁,等. NaCl 胁迫对宁夏枸杞叶和幼根显微及超微结构的影响[J]. 西北植物学报, 2021, **41**(12): 2 087-2 095.
- MA X R, YANG S J, YAO N, *et al.* Effect of NaCl stress on the microstructure and ultrastructure of leaves and young roots in *Lycium barbarum*[J]. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*, 2021, **41**(12): 2 087-2 095.
- [14] 王旭航. 额济纳多枝桧柳体内抗氧化酶和植物多酚含量的生态意义研究[D]. 北京:北京林业大学, 2007.
- [15] 李 威. 木质素与甘蓝型油菜耐旱抗折的关系及相关分子机理研究[D]. 重庆:西南大学, 2018.
- [16] 邵郅胜,杨 波,朱 成,等. 不同生长阶段欧李叶片酚类物质含量及其抗氧化性[J]. 西北植物学报, 2022, **42**(10): 1 720-1 727.
- SHAO Z S, YANG B, ZHU C, *et al.* Phenolic content and antioxidant activity in leaves of *Cerasus humilis* at different growth stages[J]. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*, 2022, **42**(10): 1 720-1 727.
- [17] 王 鹏. 盐胁迫下黑果枸杞木质素的代谢研究[D]. 兰州:兰州大学, 2013.
- [18] MOHAMMADKHANI N, HEIDARI R, ABBASPOUR N, *et al.* Salinity effects on expression of some important genes in sensitive and tolerant grape genotypes[J]. *Turkish Journal of Biology*, 2015, **40**(1): 95-108.
- [19] AL-GHAMDI A, ELANSARY H. Synergetic effects of 5-aminolevulinic acid and *Ascoephyllum nodosum* seaweed extracts on *Asparagus* phenolics and stress related genes under saline irrigation[J]. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2018, **129**: 273-284.
- [20] 熊 飞,卢秦华,房婉萍,等. 基于全基因组的茶树 PAL 家族基因鉴定及其在生物与非生物胁迫下的表达分析[J]. 园艺学报, 2020, **47**(3): 517-528.
- XIONG F, LU Q H, FANG W P, *et al.* Genome-wide identification and expression analyses of PAL genes under biotic and abiotic stress in *Camellia sinensis*[J]. *Acta Horticulturae Sinica*, 2020, **47**(3): 517-528.
- [21] 曾嘉丽,欧阳林娟,刘家林,等. 水稻 PAL 基因的全基因组分析及胁迫表达研究[J]. 基因组学与应用生物学, 2018, **37**(9): 3 881-3 888.
- ZENG J L, OUYANG L J, LIU J L, *et al.* Whole genome analysis and stress expression research of PAL gene in rice



- [J]. *Genomics and Applied Biology*, 2018, **37**(9): 3 881-3 888.
- [22] YANG Y H, YANG H, LI R F, *et al.* A *Rehmannia glutinosa* cinnamate 4-hydroxylase promotes phenolic accumulation and enhances tolerance to oxidative stress[J]. *Plant Cell Reports*, 2021, **40**(2): 375-391.
- [23] CHEN X H, WANG H T, LI X Y, *et al.* Molecular cloning and functional analysis of 4-coumarate: CoA ligase 4 (*4CL-like 1*) from *Fraxinus mandshurica* and its role in abiotic stress tolerance and cell wall synthesis[J]. *BMC Plant Biology*, 2019, **19**(1): 1-16.
- [24] FINI A, BRUNETTI C, DI FERDINANDO M, *et al.* Stress-induced flavonoid biosynthesis and the antioxidant machinery of plants[J]. *Plant Signaling & Behavior*, 2011, **6**(5): 709-711.
- [25] WOLFE K, WU X Z, LIU R H. Antioxidant activity of apple peels[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2003, **51**(3): 609-614.
- [26] CHEN L J, GUO H M, LIN Y, *et al.* Chalcone synthase EaCHS1 from *Eupatorium adenophorum* functions in salt stress tolerance in tobacco[J]. *Plant Cell Reports*, 2015, **34**(5): 885-894.
- [27] LI C C, LIU S H, YAO X H, *et al.* *PnF3H*, a flavanone 3-hydroxylase from the Antarctic moss *Pohlia nutans*, confers tolerance to salt stress and ABA treatment in transgenic *Arabidopsis* [J]. *Plant Growth Regulation*, 2017, **83**(3): 489-500.
- [28] CHEN S, WU F Y, LI Y T, *et al.* *NtMYB4* and *NtCHS1* are critical factors in the regulation of flavonoid biosynthesis and are involved in salinity responsiveness[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2019, **10**: 178.
- [29] LAN NGUYEN T N, HOANG T T H, NGUYEN H Q, *et al.* *Agrobacterium tumefaciens*-mediated genetic transformation and overexpression of the flavonoid 3'-5'-hydroxylase gene increases the flavonoid content of the transgenic *Aconitum carmichaelii* Debx. plant[J]. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 2022, **58**(1): 93-102.
- [30] 晏 校. 逆境胁迫对枳实生苗类黄酮组分含量及关键酶基因表达量的影响[D]. 武汉: 华中农业大学, 2011.
- [31] 王 海, 李 童, 周圆圆, 等. 甘菊木质素调控转录因子 *Cl-SND1-like* 的克隆与表达分析[J]. 西北植物学报, 2021, **41**(3): 359-367.
- WANG H, LI T, ZHOU Y Y, *et al.* Cloning and expression analysis of lignin-regulated transcription factor *ClSND1-like* from *Chrysanthemum lavandulifolium* [J]. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*, 2021, **41**(3): 359-367.
- [32] YADAV B, JOGAWAT A, RAHMAN M S, *et al.* Secondary metabolites in the drought stress tolerance of crop plants: A review[J]. *Gene Reports*, 2021, **23**: 101 040.
- [33] ZHONG R Q, MORRISON W H, NEGREL J, *et al.* Dual methylation pathways in lignin biosynthesis[J]. *The Plant Cell*, 1998, **10**(12): 2 033-2 045.
- [34] 吕笑言, 王宇光, 金 英. 甜菜 *BvM14-CCoAOMT* 基因的克隆、表达及生物信息学分析[J]. 黑龙江大学自然科学学报, 2018, **35**(3): 317-323.
- LÜ X Y, WANG Y G, JIN Y. Cloning, expression and bioinformatics analyses of *BvM14-CCoAOMT* gene[J]. *Journal of Natural Science of Heilongjiang University*, 2018, **35**(3): 317-323.
- [35] TANG J M, LIAO Q H, HU T, *et al.* Expression of *CCoAOMT* from *Zingiber officinale* roscoe under NaCl stress and its regulatory role in 6-gingerol biosynthesis[J]. *Russian Journal of Plant Physiology*, 2021, **68**(2): 286-292.
- [36] CHENG H, LI L L, XU F, *et al.* Expression patterns of a cinnamyl alcohol dehydrogenase gene involved in lignin biosynthesis and environmental stress in *Ginkgo biloba* [J]. *Molecular Biology Reports*, 2013, **40**(1): 707-721.
- [37] 王 艳, 高 鹏, 黄 敏, 等. 高温对水稻开花期剑叶抗氧化酶活性及基因表达的影响[J]. 植物科学学报, 2015, **33**(3): 355-361.
- WANG Y, GAO P, HUANG M, *et al.* Effects of high temperature on the activity and expression of antioxidative enzymes in rice flag leaves during the flowering stage[J]. *Plant Science Journal*, 2015, **33**(3): 355-361.

(编辑:裴阿卫)