



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

宋晓敏¹,吕晓杰¹,邱智敏³,邢建宏⁴,陈世品³,谭芳林²,陈伟^{1*}

(1 福建农林大学 生命科学学院,福州 350002;2 福建林业科学研究院,福州 350012;3 福建农林大学 林学院,福州 350002;4 三明学院 资源与化工学院,福建三明 365004)

摘要:以红树植物秋茄为试验材料,设置不同浓度 NaCl(0、200 和 500 mmol·L⁻¹)处理的砂培实验,应用 qRT-PCR 分析秋茄叶片中类黄酮物质合成上游的 4 个关键酶基因——苯丙氨酸解氨酶基因(PAL)、肉桂酸羟化酶基因(C4H)、4-香豆酰辅酶 A 连接酶基因(4CL)和查尔酮合成酶基因(CHS)的转录水平,并对关键酶活性进行了分析,同时测定了幼苗生物量、钾钠离子含量、类黄酮含量及其抗氧化活性,以探讨秋茄耐盐性与类黄酮物质的关系,为揭示木本植物耐盐机制奠定基础。结果显示:(1)在盐处理条件下,秋茄叶片中 PAL、4CL、C4H 和 CHS 4 个关键酶基因的转录水平显著上调, PAL、4CL、C4H 酶活性和 CHS 含量随着盐浓度的增加而明显上升。(2)与对照相比,秋茄根、茎、叶干重在盐处理 3 d 和 15 d 后均无显著变化,而秋茄株高仅在 200 mmol·L⁻¹盐处理 15 d 后显著增加,其余浓度和时间均未发现有显著性变化。(3)随着盐浓度的升高,秋茄叶片类黄酮含量显著增加, K⁺/Na⁺ 明显下降,丙二醛含量显著降低,活性氧自由基清除率显著增加。研究表明,盐处理加强了秋茄叶片中类黄酮代谢过程中相关酶基因的表达,类黄酮物质的累积有助于其抗氧化能力的提高,进而提高秋茄的抗盐性,维持盐胁迫下秋茄的正常生长。

关键词:秋茄;盐胁迫;类黄酮代谢;抗氧化;qRT-PCR

中图分类号:Q945.78

文献标志码:A

Flavonoid Metabolism and Antioxidant Activity in Response to Salt Stress in Mangrove *Kandelia candel*

SONG Xiaomin¹, LÜ Xiaojie¹, QIU Zhimin³, XING Jianhong⁴,
CHEN Shipin³, TAN Fanglin², CHEN Wei^{1*}

(1 College of Life Sciences, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China; 2 Fujian Academy of Forestry, Fuzhou 350012, China; 3 College of Forestry, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China; 4 College of Resources and Chemical Engineering, Sanming University, Sanming, Fujian 365004, China)

Abstract: In the present study, mangrove *Kandelia candel* (L.) Druce were potted in sand and treated with different NaCl concentrations (0, 200 and 500 mmol·L⁻¹). The relative expression of four key genes in the flavonoid metabolism, phenylalanine ammonia lyase (PAL), cinnamic acid hydroxylase (C4H), 4-p-coumaric acyl coenzyme A ligase (4CL) and chalcone synthase (CHS) were analyzed in response to salt stress by quantification Real-time Polymerase Chain Reaction (qRT-PCR). In addition, the biomass, K⁺

收稿日期:2016-07-31;修改稿收到日期:2016-12-12

基金项目:林业公益性行业科研专项经费(201504415);福建省自然科学基金(2014J01137)

作者简介:宋晓敏(1992—),女,硕士,主要从事植物生理与分子生物学研究。E-mail:18750193499@163.com

* 通信作者:陈伟,博士,教授,博士生导师,主要从事植物生理与分子生物学研究。E-mail:weichen909@163.com

and Na^+ contents, the activities of key enzymes, the contents of flavonoid and the antioxidant activity in response to salt of *K. candel* were investigated. Our results showed that: (1) the expression levels of *PAL*, *4CL*, *C4H* and *CHS* were up-regulated significantly under salt conditions; the activities of *PAL*, *4CL* and *C4H* as well as *CHS* content were increased significantly with salt concentration increasing; compared with the control. (2) The plant height as well as the dry weight of leaf, root and stem were not changed significantly in NaCl treatment for 3 d and 15 d except the plant height significantly changed in 200 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl treatment for 15 d. (3) The content of flavonoid, and the scavenging rate of hydroxyl radical and superoxide free radical were increased, the K^+/Na^+ ratio and the content of MDA were decreased significantly. These results indicate that the flavonoid metabolism in *K. candel* under salt conditions can be enhanced and may play an important role in the adaption to the saline environment. Accumulation of flavonoids contributes to oxidation resistance and salt tolerance of *K. candel* in order to maintain plant growth under salt conditions.

Key words: *Kandelia candel*; salt stress; flavonoid metabolism; antioxidant; qRT-PCR

土壤盐碱化是影响全世界农业生产和生态环境最主要的非生物胁迫因子之一。目前,全世界的盐碱土地超过10亿公顷,占陆地总面积的30%;中国大约有3 600 hm^2 的盐渍地,占总耕地面积的6.62%^[1]。土壤中高浓度的盐分对植株的伤害主要表现在离子毒害、渗透胁迫、营养缺乏等方面,受到盐胁迫的作物生长受到限制,甚至会死亡^[2-3]。植物一般通过抗氧化酶和抗氧化物质体系来抵御逆境胁迫,同时,也可通过积累次生代谢物质(如类黄酮、花青素等)来清除活性氧(ROS),起到保护植物体的作用^[4]。类黄酮等次生代谢物质在植物防御逆境过程中起重要作用^[5-6],其中最显著的作用是参与逆境胁迫下植物的解毒抗氧化和ROS清除。高晓辉等^[7]研究表明,梨(*Pyrus bretschneideri* Rehd. cv. Pingguoli)果实在苹果酸处理下,其体内过氧化物酶(POD)、多酚氧化酶(PPO)以及苯丙氨酸解氨酶(PAL)的活性显著增加,同时相关次生代谢产物类黄酮含量也提高。

秋茄[*Kandelia candel* (L.) Druce]属红树科秋茄树属植物,是一种典型的非泌盐红树植物,分布于热带、亚热带陆海交汇处,在中国主要分布于海南、广西、广东、台湾、福建、香港的海湾,对维护海岸生态平衡有重要作用^[8]。此外,秋茄是一种盐生木本植物,生活于海水浸渍的较高盐度的泥滩中,经长期进化形成了一套木本植物特有的耐盐机制,因此秋茄体内蕴含着丰富的抗逆基因资源,挖掘其耐盐基因具有重要的应用价值。目前,前人对植物的盐响应机制的研究主要集中在植株生长和生理特性的变化方面。例如,在盐胁迫处理下,烤烟(*flue-cured tobacco*)叶片中的苯丙氨酸解氨酶活性和类黄酮含量明显增加^[9];紫叶李(*Prunus cerasifera* var. *at-*

ropurea)在盐胁迫下叶色逐渐转绿,叶绿素、花青素、类黄酮含量呈先上升后下降的趋势^[10]。但是,红树植物耐盐性与类黄酮代谢的关系研究还鲜见报道。本实验室(福建农林大学生命科学学院)应用RNA-Seq技术对秋茄转录组进行了研究,结果发现盐胁迫下秋茄叶片中类黄酮代谢途径相关基因表达变化显著^[11]。本研究以此为切入点,应用qRT-PCR技术进一步分析秋茄叶片类黄酮代谢途径中苯丙氨酸解氨酶(*PAL*)、肉桂酸羟化酶(*C4H*)、4-香豆酰辅酶A连接酶(*4CL*)和查尔酮合成酶(*CHS*)4个关键酶基因的转录水平,并测定了类黄酮含量及其抗氧化活性,探讨秋茄耐盐性与类黄酮物质的关系,为进一步揭示木本植物耐盐机制提供有价值信息,同时也为今后应用转基因技术将红树植物耐盐相关基因转入主要作物,培育耐盐植物奠定相关的分子生物学基础。

1 材料和方法

1.1 试验材料

试验所用成熟的秋茄胚轴采自福建泉州洛阳河红树林保护区,经纬度分别为 $24^{\circ}58'N$ 和 $118^{\circ}39'E$,海水盐度为8‰~20‰。选择外观完好、无虫害、大小相近的胚轴培养于洁净的砂子中,每盆(30 cm×42 cm×14 cm)种植10~15株,每隔2 d每盆浇灌1 L Hoagland营养液,平时补充水分。待秋茄幼苗第二对叶片完全展开时,对幼苗进行盐胁迫处理,以Hoagland营养液为基本溶液,添加 NaCl 配制适宜浓度(200 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl)和高浓度(500 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl)盐胁迫处理液,以无添加 NaCl 为对照组,处理3 d后取叶片样品,液氮速冻后保存于-80 ℃冰箱备用。每个处理设3个生物学重复。

表 1 qRT-PCR 分析的引物列表

Table 1 The primers for qRT-PCR analysis

引物 ID	Primer ID	基因 ID	Gene ID	引物序列	Primer sequence(5'→3')
Actin-S				AGCATCAGGCATCCATGAGAC	
Actin-A				TGCTGAGAGATGCCAGAATG	
PAL-S		Unigene20269_ALL		CGAGTAGCCTGGAGAACAGAGTG	
PAL-A				CAGCATGAACAGGGTACAGAC	
C4H-S		Unigene1316_A_L		GGGATTGAGACGGGTGG	
C4H-A				CAACATTGGGTTTGGTGC	
4CL-S		CL8188.Contig1_ALL		GTCAGGAGCGTGCGGAAC	
4CL-A				GTGCCCTCGGGATCATTAA	
CHS-S		CL8403.C2_ALL		TCCAGGGCAGAAAGACCA	
CHS-A				TCCTCGGATTGCGTAGTG	

1.2 秋茄叶片 C4H、4CL、PAL 和 CHS 基因表达的 qRT-PCR 验证

采用 CTAB-LiCl 沉淀法^[12]提取叶片总 RNA 后,参照 TaKaRa 公司 PrimeScriptTM RT Reagent Kit(Perfect Real Time; TaKaRa 公司,日本)产品使用说明书,将秋茄叶片总 RNA 反转录合成 cDNA 第一链。获得的 cDNA 产物于-20 ℃贮藏备用。根据秋茄的转录组数据,应用 PrimerPremier 5.0 软件设计目的基因的 Real-time PCR 引物(表 1)。qRT-PCR 按照荧光定量试剂盒 SYBR Prime-ScriptTM RT-PCR Kit(TaKaRa 公司,日本)说明书在 ABI 7500 PCR 仪进行分析。qRT-PCR 反应体系为:2×SYBR Premix Ex Taq(Tli RNaseH Plus)5.0 μL,Primer-S(10 μmol·L⁻¹)0.2 μL,Primer-A(10 μmol·L⁻¹)0.2 μL,cDNA 模板 0.5 μL, DNase Free ddH₂O 补足至 10 μL。反应程序为:95 ℃预变性 30 s,95 ℃变性 5 s,60 ℃退火 34 s,40 个循环;65 ℃升至 95 ℃,每升高 0.5 ℃,恒温保持 5 s,期间进行荧光信号采集。选择 Actin 作为内参基因。基因相对表达量采用 2^{-ΔΔCt} 法^[13]进行计算。每个试验设 3 个重复。

1.3 生理指标测定

1.3.1 秋茄幼苗生物量

在盐处理 3 和 15 d 后分别采集 10 株幼苗进行生物量的测定,株高采用直尺测定从根部到第一个茎叶分叉端的高度^[14],根、茎、叶干重参照陈颖等^[15]方法。

1.3.2 秋茄叶片 PAL、C4H、4CL 活性及 CHS 含量

PAL 活性参照陈雷等^[16]方法,以每分钟 OD₂₉₀ 值变化 0.01 定义为一个酶活单位(U),酶活性用 U·mg⁻¹ 表示。C4H 活性参照 Lamb 等^[17]方法,以每

分钟 OD₃₄₀ 值变化 0.01 定义为一个酶活单位(U),酶活性用 U·mg⁻¹ 表示。4CL 活性参考范存斐等^[18]方法,以每分钟 OD₃₃₃ 值变化 0.01 定义为一个酶活单位(U),酶活性用 U·mg⁻¹ 表示。CHS 含量测定参考植物 CHS 酶联免疫分析试剂盒(上海酶联生物科技有限公司)操作步骤进行:称取 0.5 g 叶片,加入 3 mL 磷酸缓冲液(pH 7.5),低温下迅速研磨成匀浆,静置 30 min 后 4 ℃、15 000 g 离心 10 min,上清液为 CHS 粗酶液;接着在酶标板中加入 30 μL 样品稀释液和 20 μL CHS 粗酶液,37 ℃温育 30 min,弃去液体,甩干后每孔加满洗涤液,静置 30 s,弃去,重复 5 次,将酶标板倒扣在滤纸上拍干后,加入 50 μL 酶标试剂,37 ℃温育 30 min,每孔加满洗涤液洗涤 5 次后拍干,然后加入显色剂 A、B 各 50 μL,37 ℃避光显色 10 min,最后加入 50 μL 终止液终止反应,在 450 nm 下测定吸光值。先用标准品制作标准曲线,再通过标准曲线计算 CHS 含量。所有酶活性测定均采用蛋白含量进行计算,蛋白含量按照 Bradford 方法^[19]测定,以 BSA 为标准蛋白。

1.3.3 秋茄叶片钾钠离子含量、类黄酮含量及其抗氧化活性

叶片中钾、钠离子含量的测定采用火焰分光光度法^[20]。类黄酮含量参考赵亚婷等^[21]方法,丙二醛(MDA)含量参照李合生^[22]方法,羟自由基清除率参照郭亚力^[23]方法,超氧离子自由基清除率参照贾之慎等^[24]方法。

1.4 数据分析

所有试验数据均以平均值±标准差表示,每个实验均进行 3 次生物学重复,用 SPSS 18.0 软件对试验数据进行统计分析, $P < 0.05$ 为显著差异水平。

2 结果与分析

2.1 盐胁迫下秋茄叶片 **C4H**、**4CL**、**PAL** 和 **CHS** 基因表达分析

C4H、**4CL**、**PAL** 和 **CHS** 是类黄酮代谢途径的关键酶。与对照组相比,秋茄叶片中 **PAL**、**C4H**、**4CL** 和 **CHS** 基因表达水平均随着 NaCl 处理浓度的增加而显著提高($P < 0.05$),且盐处理间大多差异显著(图 1)。其中,秋茄叶片中 **PAL** 基因表达水平在 200 和 500 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl 处理下分别比对照显著提高了 1.5 和 2.3 倍, **C4H** 基因表达水平分别显著提高了 1.0 和 0.8 倍, **4CL** 基因表达水平分别显著提高了 2.0 和 3.0 倍,而 **CHS** 表达水平分别比对照显著提高了 1.0 和 3.25 倍。

2.2 盐胁迫下秋茄叶片 **PAL**、**C4H**、**4CL** 酶活性和 **CHS** 含量分析

在适宜浓度(200 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)和高浓度(500 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)盐胁迫处理下,秋茄叶片中 **PAL**、**C4H**、**4CL** 和 **CHS** 活性均比对照不同程度提高,且除适宜浓度盐处理的 **PAL** 活性外均达到显著水平($P < 0.05$),并以高浓度盐胁迫处理显著高于适宜浓度盐胁迫处理(图 2)。其中,与对照相比较,200 和 500 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 处理秋茄叶片中 **PAL** 活性分别上升了 1% 和 80%(图 2,A), **C4H** 活性分别显著提高了 30% 与 63%(图 2,B), **4CL** 活性分别显著提高了 7% 和 39%(图 2,C),类黄酮物质合成关键酶 **CHS** 含量分别显著提高了 33% 和 92%(图 2,D)。

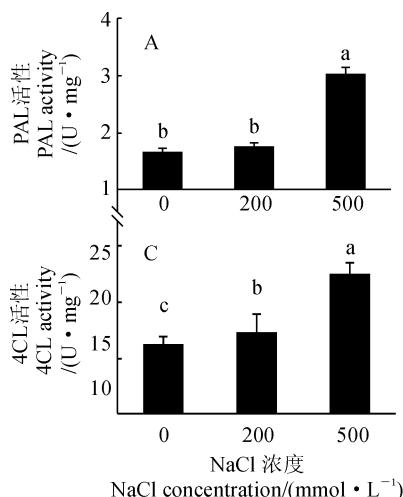
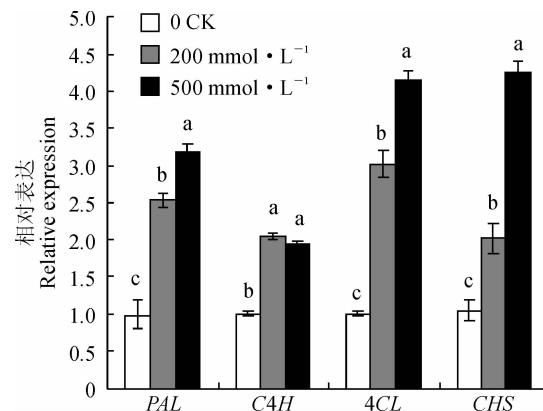


图 2 盐胁迫对秋茄叶片 **PAL**、**C4H**、**4CL** 活性和 **CHS** 含量的影响
The different normal letters mean significant difference among treatments at 0.05 level, the same as Fig. 3

The different normal letters mean significant difference among treatments at 0.05 level, the same as Fig. 3
Fig. 2 Effect of salinity on the activities of **PAL**, **C4H**, **4CL** and **CHS** content in *K. candel* leaves

2.3 盐胁迫下秋茄钾钠离子含量、类黄酮含量及其抗氧化活性分析

与对照相比,秋茄叶片类黄酮含量随着盐胁迫浓度的上升而提高,其在 200 和 500 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl 处理下分别上升了 6% 和 26%,但仅 500 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl 处理达到显著水平(图 3, A)。同时,秋茄叶片 MDA 含量在盐胁迫下比对照显著降低($P < 0.05$),并有随着盐浓度的上升而下降的趋势,200 和 500 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl 处理叶片中 MDA 含量分别比对照显著下降了 38% 和 46%,但两盐胁

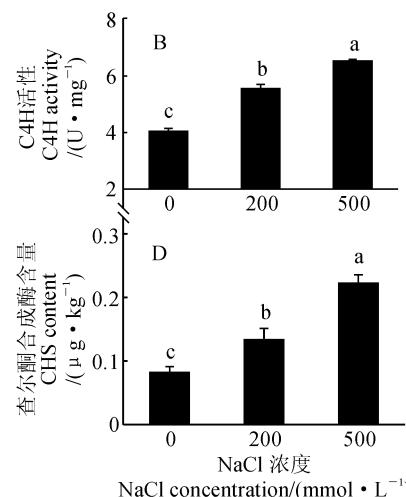


不同小写字母表示同一基因不同处理间差异显著($P < 0.05$)

图 1 盐胁迫下秋茄叶片类黄酮代谢途径相关差异
基因的 qRT-PCR 分析

The different normal letters mean significant difference at different treatments with the same gene ($P < 0.05$)

Fig. 1 qRT-PCR analyses of differential expression genes of flavonoid metabolism in *K. candel* under salt stress



不同小写字母表示不同处理间差异显著($P < 0.05$),下同

The different normal letters mean significant difference among treatments at 0.05 level, the same as Fig. 3

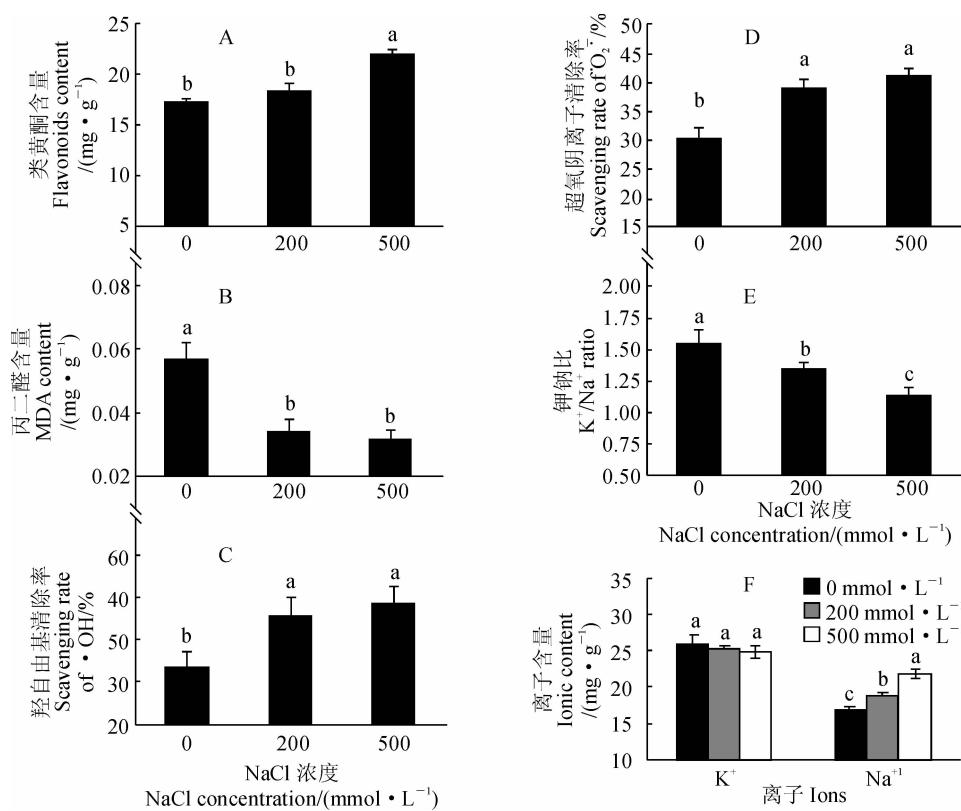


图 3 盐胁迫对秋茄叶片钾钠离子含量、类黄酮含量及其抗氧化活性的影响

Fig. 3 Effect of salinity on the contents of K⁺, Na⁺ and flavonoids and the antioxidant activity in *K. candel* leaves

表 2 盐胁迫对秋茄生物量的影响

Table 2 Effect of salinity on biomass of *K. candel*

培养天数 Cultivation time/d	NaCl 浓度 NaCl concentration / (mmol·L⁻¹)	株高 Height/cm	每株干重 Dry weight/g		
			叶 Leaf	根 Root	茎 Stem
3	0	36.8±2.1 a	0.2506±0.0313 a	0.3272±0.0396 a	0.2186±0.0253 a
	200	38.1±1.9 a	0.2718±0.0320 a	0.3508±0.0309 a	0.2328±0.0237 a
	500	35.9±2.3 a	0.2361±0.0316 a	0.3102±0.0325 a	0.2106±0.0229 a
15	0	40.2±2.2 b	0.2984±0.0274 ab	0.3596±0.0368 ab	0.2502±0.0262 ab
	200	43.9±2.1 a	0.3269±0.0257 a	0.3955±0.0402 a	0.2788±0.0284 a
	500	37.5±2.5 b	0.2804±0.0294 b	0.3318±0.0352 b	0.2214±0.0243 b

注:同列不同字母表示处理间在 0.05 水平上达到显著性差异($P<0.05$)

Note: Different letters in the same column indicate significant differences among treatments at 0.05 level

迫处理间无显著差异(图 3, B)。同叶片 MDA 含量相呼应,与对照组相比,秋茄叶片中羟自由基清除率和超氧阴离子自由基清除率在盐胁迫下均显著上升($P < 0.05$),200 和 500 mmol·L⁻¹ NaCl 处理的羟自由基清除率升幅分别为 39% 和 45%,而它们相应的超氧阴离子自由基清除率升幅分别为 27% 和 37%,但两盐胁迫处理间无显著差异(图 3, C、D)。另外,在盐胁迫条件下,秋茄叶片 K⁺含量与对照组相比没有显著变化($P > 0.05$),而叶片中 Na⁺含量随着盐浓度的提高而显著上升($P < 0.05$),200 和

500 mmol·L⁻¹ NaCl 处理的 Na⁺含量分别比对照组显著上升了 9% 和 31%,从而导致叶片中 K⁺/Na⁺随着盐浓度的升高而显著降低,且高盐处理降低幅度更大(图 3, E、F)。

2.4 盐胁迫下秋茄生物量分析

植物生物量是反映盐胁迫伤害程度的最直观准确指标。表 2 显示,与对照组相比,在各浓度盐胁迫处理 3 d 后,秋茄的株高以及根、茎、叶干重均未发生显著性变化。在盐处理 15 d 后,秋茄的株高在 200 mmol·L⁻¹ NaCl 处理下显著高于对照组($P <$

0.05), 在 500 mmol·L⁻¹ NaCl 处理下则稍低于对照组但差异不显著, 而同期秋茄的根、茎、叶干重在 200 和 500 mmol·L⁻¹ NaCl 处理下均与对照组无显著性差异。可见, 在本实验设置的处理浓度和处理时间下, 秋茄植株生长没有受到盐胁迫显著抑制, 表现出较强的耐盐胁迫能力。

3 讨 论

众所周知, 植物体类黄酮代谢中物质合成起始于苯丙氨酸, 通过 PAL、C4H 和 4CL 3 个关键酶的作用下再由苯丙氨酸生成 4-香豆酰 CoA, 4-香豆酰 CoA 在 CHS 的作用下形成查尔酮, 因此 CHS 也是类黄酮物质合成途径的限速酶^[25]。本研究结果显示, 盐胁迫提高了秋茄叶片中 PAL、C4H、4CL 和 CHS 基因的转录水平, 同时增强了秋茄叶片 PAL、C4H、4CL 活性和增加了 CHS 含量。PAL 存在于植物和微生物中, 能够应答干旱、UV-B 辐射、植物激素和稀土元素等多种胁迫诱导^[25-26]。杨晨等^[14]以姜黄(*Curcuma aromatic*)组培苗为试验材料, 分别以不同浓度 NaCl 进行盐胁迫处理, 发现在 50~100 mmol·L⁻¹ NaCl 胁迫下, PAL 活性显著提高; 陈颖等^[15]发现在 4~8 d 内, 在适度盐浓度处理下, 银杏(*Ginkgo biloba* L.)细胞内 PAL 活性随着盐浓度的提高而增强, 且 NaCl 浓度越高, 酶活性越强。本研究结果与他们相一致。C4H 活性可以影响类黄酮和木质素的合成等多条代谢支路。闫丽等^[27]报道, 高粱[(*Sorghum bicolor* (L.) Moench)]中 C4H 活性直接影响木质素的合成; 陈鸿翰等^[28]发现苦荞(*Fagopyrum tataricum*)在 UV-B 胁迫下类黄酮含量与 *FtC4H* 基因表达量呈正相关关系。4CL 是类黄酮代谢主要途径向分支途径转折的一个关键酶, 在植物与环境相互作用中起到了一个关键作用。有研究表明, UV-B 处理可提高植物 4CL 活性, 促进次生代谢物质的生成, 进一步增强植株的抗氧化能力^[29]。CHS 为类黄酮提供基本的碳架结构, 为类黄酮、花青素合成提供保障。CHS 是合成类黄酮物质的关键酶, 而其本身又在植物的抗胁迫、花色素的积累、类黄酮物质合成以及外源基因的表达等方面起着重要的作用^[30]。本研究发现 CHS 含量随着盐浓度的升高而增加, 这意味着盐处理下

CHS 含量的增加有助于秋茄叶片中类黄酮、花青素等次生代谢物质的合成。

近年来, 大量研究表明由类黄酮代谢途径产生的多种次生代谢物质在植株生长发育、抵抗虫害及构成植物细胞壁等方面具有重要意义^[21]。本研究发现盐胁迫 15 d 后, 500 mmol·L⁻¹ NaCl 处理下的秋茄株高、根茎叶干重与对照组相比均无显著性差异, 这说明高盐胁迫并没有抑制秋茄生长。此外, 植物在适应逆境环境会产生各种次生代谢物, 包括类黄酮物质, 而且生物类黄酮具有极强的抗氧化和抗自由基能力^[31]。在环境胁迫条件下, 植物通过增加植物体内类黄酮化合物来防御环境胁迫, 类黄酮是植物综合防御体系的一部分, 具有一定清除氧自由基的作用, 能降低逆境胁迫对植株细胞的损伤, 对细胞具有防护功能。王改利等^[32]发现适宜干旱胁迫能诱导酸枣[(*Ziziphus jujuba* Mill. var. *spinosa* (Bunge) Hu ex H. F. Chow)]叶片中类黄酮含量显著增加。同时, 红砂(*Reaumuria soongorica*)类黄酮含量在 UV-B 辐射下也显著增加, 抗氧化能力增加, 有效减轻了辐射胁迫对植株造成的氧化损伤^[33]。一般在盐胁迫条件下, 非盐生植物体内离子平衡被打破, K⁺ 含量降低, Na⁺ 含量积累^[20]。而在本研究中, 盐生植物秋茄叶片 K⁺ 含量在盐胁迫下没有显著性变化, Na⁺ 含量升高, K⁺/Na⁺ 降低, 这说明秋茄调节离子平衡的能力较强。MDA 是膜脂过氧化的产物, 其含量的高低反映了细胞膜脂过氧化的程度和植株受逆境伤害的程度。然而, 秋茄叶片膜脂系统在高盐胁迫下并没有遭到破坏, 反而得以加强, 并且抗氧化能力与类黄酮含量呈正相关。这与前人的研究报道相一致^[32,33]。

综上所述, 盐胁迫能诱导秋茄叶片 PAL、C4H、4CL 和 CHS 基因表达水平显著上调, 促进 PAL、C4H、4CL 活性和 CHS 含量显著提高, 引起相关次生代谢产物类黄酮含量的显著增加以及叶片膜脂过氧化程度的降低和 K⁺/Na⁺ 降低, 导致活性氧自由基的清除率显著提高, 从而使得秋茄生物量在盐胁迫下基本没有受到显著抑制。这些结果都说明类黄酮代谢途径的加强与秋茄抗氧化活性和渗透调节的增强密切相关, 红树植物秋茄通过调控类黄酮代谢来适应高盐环境是其耐盐性的一个重要特性。

参考文献:

- [1] 朱金方, 刘京涛, 陆兆华, 等. 盐胁迫对中国柽柳幼苗生理特性的影响[J]. 生态学报, 2015, 35(15): 5 140-5 146.
- ZHU J F, LIU J T, LU Z H, et al. Effects of salt stress on physiological characteristics of *Tamarix chinensis* Lour. seedlings[J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2015, 35(15): 5 140-5 146.
- [2] 王永娟, 周妍, 徐明, 等. 盐胁迫对大豆种子萌发及矿质元素变化的影响[J]. 生态学杂志, 2015, 34(6): 1 565-1 571.
- WANG Y J, ZHOU Y, XU M, et al. Germination parameters and mineral levels in soybean planats under salt stress[J]. *Chinese Journal of Ecology*, 2015, 34(6): 1 565-1 571.
- [3] SONG Y, ZHANG C J, GE W N, et al. Identification of NaCl stress-responsive apoplastic proteins in rice shoot stems by 2D-DIGE[J]. *Journal of Proteomics*, 2011, 7(4): 1 045-1 067.
- [4] 郭伟, 于立河. 盐碱胁迫对小麦幼苗根系活力和苯丙氨酸解氨酶活性的影响[J]. 作物杂志, 2012, 1: 31-34.
- GUO W, YU L H. Effects of salinity-alkalinity stress on root activity and phenylalanine ammonia-lyase activity of wheat seedlings[J]. *Crops*, 2012, 1: 31-34.
- [5] 马杰, 胡文忠, 毕阳, 等. 鲜切果蔬苯丙烷代谢的研究进展[J]. 食品工业科技, 2012, 33(15): 391-393.
- MA J, HU W Z, BI Y, et al. Advances on benzene propane metabolism of fresh-cut fruits and vegetables[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2012, 33(15): 391-393.
- [6] CHEN J Y, HE L H, JIANG Y M, et al. Expression of PAL and HSPs in fresh-cut banana fruit[J]. *Environmental and Experimental Botany*, 2009, 66(1): 31-37.
- [7] 高晓辉, 毕阳, 温晓丽, 等. 采后苹果酸处理对梨果实苯丙烷代谢相关酶活性及终产物积累的诱导[J]. 甘肃农业大学学报, 2009, 44(6): 132-136.
- GAO X H, BI Y, WEN X L, et al. Induction of postharvest malic acid treatment on activity of related enzymes and accumulation of final substances of benzene propane pathway in pears[J]. *Journal of Gansu Agricultural University*, 2009, 44(6): 132-136.
- [8] 唐密, 李昆, 向洪勇, 等. 盐胁迫对两种红树植物生态、生理及解剖结构的影响[J]. 生态科学, 2014, 33(3): 513-519.
- TANG M, LI K, XIANG H Y, et al. Research on ecological, physiological and morphological adaptability of two mangrove species to salt stress[J]. *Ecological Science*, 2014, 33(3): 513-519.
- [9] 胡庆辉, 王程栋, 王树声, 等. NaCl 胁迫下鲜烟叶中多酚物质含量及 PAL 和 PPO 活性变化[J]. 中国烟草科学, 2013, 34(1): 51-55.
- HU Q H, WANG C D, WANG S S, et al. Changes of polyphenols contents, PPO and PAL activities of fresh tobacco leaves under NaCl stress[J]. *Chinese Tobacco Science*, 2013, 34(1): 51-55.
- [10] 胡晓立, 杨建民, 陈东亮, 等. NaCl 胁迫对紫叶李叶片色泽的影响[J]. 林业科学, 2010, 46(12): 64-69.
- HU X L, YANG J M, CHEN D L, et al. Effect of NaCl stress on leaf coloration of *Prunus cerasifera* var. *atropurpurea* [J]. *Scientia Silvae Sinicae*, 2010, 46(12): 64-69.
- [11] 王玲霞. 红树植物秋茄响应盐胁迫的分子生理机制及调控网络研究[D]. 福州: 福建农林大学, 2015.
- [12] 孙美莲, 王云生, 杨冬青, 等. 茶树实时荧光定量 PCR 分析中内参基因的选择[J]. 植物学报, 2010, 45(5): 579-587.
- SUN M L, WANG Y S, YANG D Q, et al. Reference genes for real-time fluorescence quantitative PCR in *Camellia sinensis*[J]. *Chinese Bulletin of Botany*, 2010, 45(5): 579-587.
- [13] LIVAK K J, SCHNUTTGEN T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method[J]. *Methods*, 2001, 25: 402-408.
- [14] 杨晨, 刘建福, 王明元, 等. NaCl 胁迫对姜黄组培苗生理特性的影响[J]. 生态学杂志, 2014, 33(2): 388-393.
- YANG C, LIU J F, WANG M Y, et al. Effect of NaCl stress on physiological characteristics of *in vitro* *Curcuma aromatica* plant-lets[J]. *Chinese Journal of Ecology*, 2014, 33(2): 388-393.
- [15] 陈颖, 罗永亚, 邱娜菲, 等. NaCl 处理对银杏悬浮培养细胞生长、耐盐性和黄酮积累的影响[J]. 南京林业大学学报(自然科学版), 2015, 39(6): 45-50.
- CHEN Y, LUO Y Y, QIU N F, et al. Effects of NaCl treatment on the growth, salt tolerance and flavonoids accumulation in *Ginkgo biloba* suspension cells[J]. *Journal of Nanjing Forestry University (Natural Sciences Edition)*, 2015, 39(6): 45-50.
- [16] 陈雷, 常丽, 曹福亮, 等. 银杏叶黄酮类化合物含量及相关酶活性对温度和干旱胁迫的响应[J]. 西北植物学报, 2013, 33(4): 755-762.
- CHEN L, CHANG L, CAO F L, et al. Effects of temperature and soil water deficit on the flavonoid content and activities of enzymes involved in ginkgo leaves[J]. *Acta Botanica Boreali-Occidentalis Sinica*, 2013, 33(4): 755-762.
- [17] LAMB C J, RUBERY P H. A spectrophotometric assay for trans-cinnamic acid 4-hydroxylase activity[J]. *Analytical Biochemistry*, 1975, 68(2): 554-561.
- [18] 范存斐, 毕阳, 王云飞, 等. 水杨酸对厚皮甜瓜采后病害及苯丙烷代谢的影响[J]. 中国农业科学, 2012, 45(3): 584-589.
- FAN C F, BI Y, WANG Y F, et al. Effect of salicylic acid dipping on postharvest diseases and phenylpropanoid pathway in muskmelon fruits[J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2012, 45(3): 584-589.
- [19] BRADFORD M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding[J]. *Analytical Biochemistry*, 1976, 72(1): 248-254.
- [20] 宋姗姗, 隆小华, 刘玲, 等. 钠钾比对盐胁迫下盛花期长春花离子分布和光合作用的影响[J]. 土壤学报, 2011, 48(4): 883-887.
- SONG S S, LONG X H, LIU L, et al. Effects of Na^+/K^+ ion distribution in various organs and photosynthetic characteristics of *Catharanthus roseus* at the flowering stage under salt stress[J]. *Acta Pedologica Sinica*, 2011, 48(4):

883-887.

- [21] 赵亚婷, 朱璇, 马玄, 等. 采前水杨酸处理对杏果实抗病性及苯丙烷代谢的诱导[J]. 食品科学, 2015, **36**(2): 216-220.
- ZHAO Y T, ZHU X, MA X, *et al.* Induction of disease resistance and phenylpropanoid metabolism in apricot fruits by pre-harvest salicylic acid treatment[J]. *Food Science*, 2015, **36**(2): 216-220.
- [22] 李合生. 植物生理生化实验原理和技术[M]. 北京: 高等教育出版社, 2000.
- [23] 郭亚力, 李聪, 欧灵澄, 等. 3种分光光度法对天然抗氧化物质抗自由基性能的分析检测[J]. 分析试验室, 2004, **23**(10): 43-48.
- GUO Y L, LI C, OU L C, *et al.* Studies on the resistance capability to oxidation of natural antioxidants by three photometric methods[J]. *Chinese Journal of Analysis Laboratory*, 2004, **23**(10): 43-48.
- [24] 贾之慎, 唐孟成, 朱祥瑞. 桑树黄酮类化合物清除超氧离子自由基O₂的研究[J]. 浙江农业大学学报, 1996, **22**(5): 519-523.
- JIA Z S, TANG M C, ZHU X R. Study on effect of scavenging superoxide free radical on mulberry flavonoids[J]. *Journal of Zhejiang Agricultural University*, 1996, **22**(5): 519-523.
- [25] 祖艳群, 孙晶晶, 闵强, 等. 二年生三七中黄酮含量对砷胁迫的响应及其酶学机理[J]. 应用与环境生物学报, 2014, **20**(6): 1 005-1 010.
- ZU Y Q, SUN J J, MIN Q, *et al.* Response of flavonoid content in *Panax notoginseng* to As and its enzymological mechanism[J]. *Chinese Journal of Applied and Environmental Biology*, 2014, **20**(6): 1 005-1 010.
- [26] 邱宗波, 张晋豫, 孙立, 等. 增强UV-B辐射下矮牵牛表型变异生理及RAPD多态性变化[J]. 应用与环境生物学报, 2010, **16**(3): 323-327.
- QIU Z B, ZHANG J Y, SUN L, *et al.* Physiological and RAPD variation of *Petunia hybrida* exposed to enhanced ultraviolet-B radiation [J]. *Chinese Journal of Applied and Environmental Biology*, 2010, **16**(3): 323-327.
- [27] 同丽, 夏光敏, 黄应华, 等. 高粱肉桂酸羟化酶基因SbC4H1降低拟南芥的木质素合成[J]. 植物生理学报, 2013, **49**(12): 1 433-1 441.
- YAN L, XIA G M, HUANG Y H, *et al.* Cinnamic acid 4-hydroxylase of sorghum [*Sorghum bicolor* (L.) Moench] gene SbC4H1 restricts lignin synthesis in *Arabidopsis* [J]. *Plant Physiology Journal*, 2013, **49**(12): 1 433-1 441.
- [28] 陈鸿翰, 袁梦求, 李双江, 等. 苦荞肉桂酸羟化酶基因(*FtC4H*)的克隆及其UV-B胁迫下的组织表达[J]. 农业生物技术学报, 2013, **21**(2): 137-147.
- CHEN H H, YUAN M Q, LI S J, *et al.* Cloning of cinnamate 4-hydroxylase gene (*C4H*) from tartary buckwheat (*Fagopyrum tararicum*) and its tissue-specific expression under UV-B stress during seed germination[J]. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 2013, **21**(2): 137-147.
- [29] 喻譞, 姜璐璐, 王焕宇, 等. UV-C处理对杨梅采后品质及苯丙烷类代谢的影响[J]. 食品科学, 2015, **36**(12): 255-259.
- YU X, JIANG L L, WANG H Y, *et al.* Effects of UV-C treatment on quality and phenylpropanoid metabolism of post-harvest Chinese bayberry fruit[J]. *Food Science*, 2015, **36**(12): 255-259.
- [30] 唐寅, 张威威, 许锋, 等. 植物苯丙氨酸代谢相关酶基因启动子研究进展[J]. 长江大学学报(自然科学版), 2010, **7**(2): 68-71.
- CHEN Y, ZHANG W W, XU F, *et al.* Research progress of genes promoters of related enzymes in phenylalanine metabolism[J]. *Journal of Yangtze University (Natural Science Edition)*, 2010, **7**(2): 68-71.
- [31] 刘安成, 李慧, 王亮生, 等. 石榴类黄酮代谢产物的研究进展[J]. 植物学报, 2011, **46**(2): 129-137.
- LIU A C, LI H, WANG L S, *et al.* Recent advances in metabolic products of flavonoids in *Punica granatum*[J]. *Chinese Bulletin of Botany*, 2011, **46**(2): 129-137.
- [32] 王改利, 魏忠, 贺少轩, 等. 土壤干旱胁迫对酸枣叶片黄酮类代谢及某些生长和生理指标的影响[J]. 植物资源与环境学报, 2011, **20**(3): 1-8.
- WANG G L, WEI Z, HE S S, *et al.* Effects of drought stress in soil on flavonoids metabolism in leaf and some growth and physiological indexes of *Ziziphus jujuba* var. *spinosa* [J]. *Journal of Plant Resources and Environment*, 2011, **20**(3): 1-8.
- [33] 刘美玲, 曹波, 刘玉冰, 等. 红砂黄酮类物质代谢及其抗氧化活性对UV-B辐射的响应[J]. 中国沙漠, 2014, **34**(2): 426-432.
- LIU M L, CAO B, LIU Y B, *et al.* Responses of the flavonoid pathway and antioxidant ability to UV-V radiation stress in *Reaumuria soongorica* [J]. *Journal of Desert Research*, 2014, **34**(2): 426-432.

(编辑:裴阿卫)