



ABA 对盐胁迫下侧柏活性氧代谢及其 相关基因表达的研究

姚侠妹^{1,2}, 纪 敬¹, 岳剑云¹, 谢田田¹,
邓 楠¹, 史胜青¹, 江泽平¹, 常二梅^{1*}

(1 中国林业科学研究院林业研究所 国家林业局林木培育重点实验室, 北京 100091; 2 阜阳师范学院 生物与食品工程学院, 安徽 阜阳 236037)

摘 要:以侧柏幼苗为试验材料, 采用水培方式, 研究不同浓度 NaCl(0、100、200、300 和 400 mmol · L⁻¹) 以及 ABA (0、0.5、1、10、100 和 200 μmol · L⁻¹) 处理对盐胁迫下侧柏幼苗活性氧代谢的影响。结果显示: (1) 随着 NaCl 处理浓度增加, 侧柏幼苗叶片过氧化氢(H₂O₂)、丙二醛(MDA)、谷胱甘肽(GSH)和脯氨酸含量, 以及抗氧化酶(SOD、POD 和 CAT)活性呈上升趋势, 而可溶性蛋白含量降低。 (2) 于 300 mmol · L⁻¹ NaCl 胁迫处理 48 h 后进行 ABA (1 和 10 μmol · L⁻¹) 处理, 分析发现侧柏幼苗叶片的 SOD、POD 和 CAT 活性提高, GSH、脯氨酸和可溶性蛋白含量增加, H₂O₂ 和 MDA 的积累减少。 (3) NaCl 胁迫后, 侧柏幼苗叶片活性氧代谢相关基因(*Cu/Zn-SOD*、*CAT*、*GR*、*APX*、*MDAR* 和 *GST*) 的表达水平随 ABA 浓度增加呈先升后降的趋势, 并于 10 μmol · L⁻¹ ABA 处理 48 h 时达到峰值。研究表明, 适宜浓度 ABA 通过促进盐胁迫下侧柏幼苗叶片的抗氧化酶活性, 提高渗透调节能力, 增加 GSH 含量, 降低 H₂O₂ 和 MDA 积累, 从而有效降低活性氧对侧柏叶片的伤害, 保护细胞膜结构的完整, 增强其抗盐性。

关键词:侧柏; 盐胁迫; ABA; 活性氧代谢; 基因表达

中图分类号: Q945.78; S718.43 **文献标志码:** A

Reactive Oxygen Metabolism and Related Gene Expression in *Platycladus orientalis* under Salt Stress

YAO Xiamei^{1,2}, JI Jing¹, YUE Jianyun¹, XIE Tiantian¹, DENG Nan¹,
SHI Shengqing¹, JIANG Zeping¹, CHANG Ermei^{1*}

(1 Key Laboratory of Tree Breeding and Cultivation of State Forestry Administration, Research Institute of Forestry, Chinese Academy of Forestry, Beijing 100091, China; 2 School of Biological Science and Food Engineering, Fuyang Normal University, Fuyang, Anhui 236037, China)

Abstract: The reactive oxygen metabolism under different salt levels and the alleviative effects of exogenous abscisic acid (ABA) on plants against salt stress were assessed in *Platycladus orientalis* seedlings treated with different concentrations of NaCl and ABA. *P. orientalis* seedlings were cultured by 1/4 Hoagland solution with different levels of NaCl (100, 200, 300 and 400 mmol · L⁻¹), and 1/4 Hoagland solution was

收稿日期: 2016-11-23; 修改稿收到日期: 2017-01-05

基金项目: 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金(CAFYBB2014QB004); 国家自然科学基金(31300555); 安徽省哲学社会科学规划项目(AHSKQ2016D110)

作者简介: 姚侠妹(1981—), 女, 在读博士研究生, 讲师, 主要从事树木衰老方向研究。E-mail: yaoxiamei@126.com

* 通信作者: 常二梅, 博士, 助理研究员, 主要从事林木抗逆生理与分子机制研究。E-mail: changem@caf.ac.cn

used as control. Furthermore, seedlings exposed to $300 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl were treated with different concentrations ($0, 0.5, 1, 10, 100$ and $200 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) of ABA, and physiological indexes and expression levels of genes related to reactive oxygen metabolism were studied. The results showed that: (1) With the increase of NaCl level, the contents of hydrogen peroxide (H_2O_2), malondialdehyde (MDA), glutathione (GSH) and proline and activities of antioxidant enzymes (SOD, POD, CAT) in *P. orientalis* leaves increased, while soluble protein content decreased. (2) Salinity-treated plants exposed to ABA at 1 and $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ for 48 h significantly enhanced the activities of SOD, POD and CAT, and increased the contents of GSH, proline and soluble protein, accompanied by decreased accumulation of H_2O_2 and MDA. (3) NaCl stress caused the variation of the expression levels of genes related to reactive oxygen metabolism in *P. orientalis*, and the presence of $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ABA maximally induced expression levels of *Cu/Zn-SOD*, *CAT*, *GR*, *APX*, *MDAR* and *GST* genes in $300\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl-treated seedlings. These results suggested that exogenous ABA could promote antioxidant enzyme activities, increase osmotic adjustment ability and GSH content, decrease the accumulation of MDA and H_2O_2 in leaves of *P. orientalis* under salt stress, thereby effectively reduce the damage of reactive oxygen species to *P. orientalis* leaves and enhance its salt resistance.

Key words: *Platycladus orientalis*; NaCl stress; ABA; reactive oxygen metabolism; gene expression

盐渍化是导致土壤退化的重要因素之一。世界近 6.5% 的面积和约 20% 的耕地都已经受到盐渍化的影响^[1]。由于自然因素和人类活动的影响,土壤盐渍化面积正在逐年递增。大多数植物长期暴露于盐渍环境中,其生长受到抑制,致使植物衰老和死亡。生长受到抑制是植物盐胁迫的初始症状,但是在高盐环境中植物也可能发生细胞程序化死亡。此外,盐渍环境引起植物体渗透胁迫,抑制细胞扩增和分裂,影响气孔闭合,通过降低水势致使细胞膨胀,改变细胞正常的内稳态^[2]。高盐环境中,由于水分关系受损引起渗透胁迫,植物体会产生过多的活性氧(ROS),从而引起氧化应激。另一方面,盐胁迫也会诱导植物脱落酸(ABA)的合成,导致气孔关闭,减少光合作用和光抑制;也就是说,盐胁迫环境通过合成 ABA 抑制细胞生长,进而影响植物的生长发育。

ABA 是调控植物非生物胁迫耐受性的一种功能性激素,它作为胁迫响应激素,能够对胁迫环境产生快速应答;它也是植物胁迫响应中的重要信使,能够调节与有机渗透压物质、脱水蛋白以及包括抗氧化酶在内的保护性蛋白相关的胁迫响应基因的表达^[3]。植物适应非生物胁迫的过程主要由 ABA 调节,不仅通过它的生物合成,还通过其分解代谢^[4]。许多研究表明,外施 ABA 可以提高不同环境胁迫下植物抗氧化酶(SOD、POD、CAT 和 APX)活性,诱导 ROS 清除系统等相关基因表达,有效地降低 ROS 积累引起的伤害。同时,ABA 延缓膜脂过氧化产物丙二醛(MDA)的积累,降低质膜透性,增加植物中 ATP 含量,保证了植物正常代谢所需的能量,从而提高对不利环境的适应性^[5-7]。然而外源物

的调控作用取决于施用的方法、时间、浓度以及植物种类^[8-9]。盐胁迫促使植物体内 ABA 含量增加,通过其信号转导,诱导相关基因表达,从而提高植物抗性^[10-11]。侧柏(*Platycladus orientalis*)为中国特色树种,其资源丰富,广泛分布于我国各地区,目前关于外源 ABA 与侧柏盐胁迫交互作用的研究尚无报道。本实验研究了不同程度盐胁迫下侧柏活性氧代谢以及施加外源 ABA 对其产生的作用,旨在探讨外源 ABA 调控盐胁迫侧柏活性氧代谢的响应机制。

1 材料和方法

1.1 材料及处理

侧柏种子收集于中国林业科学研究院院内,浸泡 12 h 后种植于温室中,待生长至 4 个月,选择长势良好、规格基本一致的幼苗转移至含有 $1/4$ Hoagland 溶液(pH 6.0)塑料容器(10 L, 60 棵/容器)中培育 14 d。待幼苗恢复正常生长,对侧柏进行单一 NaCl 胁迫实验,将幼苗分配到含有 $100, 200, 300$ 和 $400 \text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl 的 $1/4$ Hoagland 溶液的离心管(50 mL, 5 棵/管)中, $1/4$ Hoagland 溶液作对照(CK),NaCl 处理 48 h 后采样,分析盐胁迫对侧柏活性氧代谢的影响,且选择 $300 \text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl 作为后续实验盐胁迫浓度。此外,侧柏在 NaCl 胁迫下,施加不同浓度 ABA 处理,具体如下:CK($1/4$ Hoagland 溶液)、NaCl($300 \text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl + $1/4$ Hoagland 溶液)、NaCl + ABA_{0.5}($0.5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ABA + $300 \text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl + $1/4$ Hoagland 溶液)、NaCl + ABA₁($1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ABA + $300 \text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl + $1/4$ Hoagland 溶液)、NaCl + ABA₁₀

(10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ABA+300 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl +1/4 Hoagland 溶液)、NaCl + ABA₁₀₀ (100 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ABA+300 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl +1/4 Hoagland 溶液)、NaCl + ABA₂₀₀ (200 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ABA+300 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl +1/4 Hoagland 溶液),并分别于处理 6 h 和 48 h 后取样,所有样品进行液氮快速冷冻并存储在-80 $^{\circ}\text{C}$,用于 RNA 提取和生理指标测定分析。以上实验每处理 3 个生物学重复,每个生物学重复 20 棵。

1.2 生理指标测定

H₂O₂ 含量测定方法参照 Gay 等^[12];MDA 含量测定方法参照 Heath 等^[13];SOD 活性测定方法参照 Prochazkova 等^[14];POD 活性测定方法参照 Cakmak 等^[15];CAT 活性测定方法参照 Jablonski 等方法^[16];GSH 含量测定方法参照 Anderson^[17];脯氨酸含量测定方法参照 Bates 等方法^[18];可溶性蛋白含量测定采用 Bradford 方法^[19]。

1.3 基因表达 qRT-PCR 分析

采用柱状植物 RNA 提取试剂盒 (Tiandz、北京、中国)提取侧柏叶片的总 RNA,并使用 Prime-Script RT reagent Kit(Takara)试剂盒进行反转录。使用 Roche LightCycler 480(罗氏,曼海姆,德国)测定基因表达水平。实时荧光定量 PCR(qRT-PCR)的测定使用 SYBR Premix *Ex Taq* II (Tli RNaseH Plus;Takara)试剂盒进行 20 μL 体系 PCR 反应。20 μL 体系含有 10 μL SYBR primer *Ex Taq* (2 $\times$),每条引物 0.8 μL (10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$),cDNA 稀释 13 倍,取 2.0 和 6.4 μL 蒸馏水。qRT-PCR 程序如下:95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 10 s;95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 15 s,60 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s,40 个循环。反应结束后对扩增产物荧光值变化和熔解曲线进行分析。活性氧代谢相关基因引物(表 1)是根据侧柏转录组的注释 Unigene,采用 Primer

Premier 3.0 软件设计完成, αTUB 为侧柏内参基因^[20],相对表达量使用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 方法^[21],3 个生物学重复。

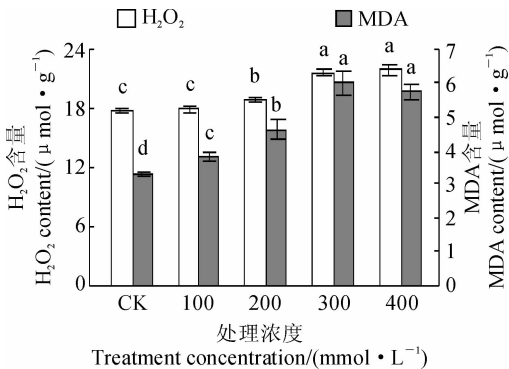
1.4 数据处理

利用 Microsoft Excel 2013 软件进行数据处理及作图,所有统计分析采用 SPSS19.0 软件,采用 One-Way ANOVA 进行差分析和差异显著性检测。各处理之间的显著性差异检验水平为 0.05。

2 结果与分析

2.1 活性氧代谢水平对不同盐胁迫程度的生理响应

2.1.1 H₂O₂ 和 MDA 含量 图 1 显示,不同 NaCl 处理 48 h 后侧柏叶片的 H₂O₂ 和 MDA 含量均高于对照(CK)。随着 NaCl 处理浓度逐渐增大,H₂O₂ 和 MDA 含量呈上升趋势,于 300 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时达



不同小写字母代表处理间 0.05 水平显著性差异;数值为平均値±标准差;下同

图 1 NaCl 胁迫对侧柏叶片 H₂O₂ 和 MDA 含量的影响
Different normal letters mean significant difference among treatments at 0.05 level; Data are mean±SD (n=3); The same as below

Fig. 1 Effects of NaCl stress on MDA and H₂O₂ contents in leaves of *P. orientalis*

表 1 活性氧代谢相关基因引物

Table 1 The primers of genes related to reactive oxygen metabolism used for qRT-PCR in this study

基因 Gene	基因名称 Gene name	引物 Primer sequence (5'→3')
Cu/Zn-SOD-F Cu/Zn-SOD-R	Cu-Zn 超氧化物歧化酶 Superoxide dismutase, Cu-Zn family	TTGAGGGCGTTGTGAGTCTC ACCTGTTGACATGCACCCAT
CAT-F CAT-R	过氧化氢酶 Catalase	TTGTGAAACGTTGGGTGGGA CTTCTGGCCGAGGGATTGT
APX-F APX-R	抗坏血酸过氧化物酶 L-ascorbate peroxidase	GGGCTAACAGTGGCTTGGAT ACCTCAACAGCCACAACCTCC
GR-F GR-R	谷胱甘肽还原酶 Glutathione reductase	TTGGAGCAGTGGGAGTTGAC GTTACACTCACCGACTGCCCA
MDAR-F MDAR-R	单脱氢抗坏血酸还原酶 Monodehydroascorbate reductase	TGGGGAGCTTGCCATCATTT TGGAAACCTGGTAGTCGTGC
GST-F GST-R	谷胱甘肽 S-转移酶 Glutathionine S-transferase	TTTTGGCCTTGCAACCCTTT GACAAGTCCCTTTTCCCCA

到峰值,与 400 mmol · L⁻¹处理差异不显著,两者分别为 21.66 和 6.00 μmol · g⁻¹,显著高于其余处理。由此可见,NaCl 胁迫加剧了侧柏幼苗叶片活性氧的产生以及膜脂过氧化程度。

2.1.2 抗氧化酶活性和 GSH 含量 在 0~400 mmol · L⁻¹ NaCl 处理 48 h 时,SOD、POD 和 CAT 活性随着 NaCl 浓度的增加而升高(图 2),其值在 NaCl 浓度为 300 mmol · L⁻¹时开始平稳,分别较 CK 提高了32.67%、23.41%和 71.93%,表明侧柏幼苗对 48 h 短期胁迫具有一定的适应性。另外,与 CK 相比,不同 NaCl 浓度处理提高了 GSH 含量,并随着浓度增加呈上升趋势,其中 100、200、300 和 400 mmol · L⁻¹ NaCl 处理分别较 CK 提高了 13.50%、25.15%、40.22%和 49.89%,且不同处理间差异显著(*P*<0.05)。可见,短时间 NaCl 胁迫激活了抗氧化酶活性和 GSH 含量的增加。

2.1.3 渗透调节物质 作为渗透调节物质,脯氨酸

和可溶性蛋白的积累与植物抗性相关。图 3 显示,侧柏叶片脯氨酸含量被不同水平 NaCl 诱导增强,4 个浓度处理 48 h 后均与 CK 差异显著,且随着浓度增加,整体呈升高趋势。可溶性蛋白的变化趋势与脯氨酸相反,其含量随 NaCl 浓度增加逐渐降低。脯氨酸和可溶性蛋白含量于 300 mmol · L⁻¹ NaCl 时达到平稳状态,其值分别为 268.23 μg · g⁻¹和 9.72 mg · g⁻¹,与 CK 有显著差异(*P*<0.05)。由此可见,NaCl 胁迫使得叶片脯氨酸含量增加,同时也抑制了可溶性蛋白合成。

2.2 激素 ABA 对盐胁迫下侧柏活性氧代谢水平的调控作用

2.2.1 H₂O₂ 和 MDA 含量 图 4 显示,侧柏幼苗相应 300 mmol · L⁻¹ NaCl 胁迫,其叶片 H₂O₂ 含量在处理 6 h 和 48 h 分别较 CK 显著提高 18.40%和 25.82%,且在 0~48 h 内,随着胁迫时间延长,其含量逐步增加。另外,300 mmol · L⁻¹ NaCl 胁迫下施加不同浓度 ABA 对叶片 H₂O₂ 积累产生不同的效应,其中 1 和 10 μmol · L⁻¹ ABA 处理 6 h 时分别降低盐胁迫叶片 H₂O₂ 水平的 18.33%和 22.24%,这种趋势持续到 48 h 时分别降低 33.93%和 36.14%。MDA 含量为膜脂质过氧化指标,可反映 NaCl 胁迫引起的氧化胁迫程度。图 4 显示,经 300 mmol · L⁻¹ NaCl 胁迫后的侧柏幼苗在 6 h 和 48 h 时,叶片 MDA 含量较 CK 分别提高了 69.43%和 90.21%;MDA 含量随胁迫时间延长而增加,且 6 h 和 48 h 处理间叶片 MDA 含量差异显著(*P*<0.05);外施 1 和 10 μmol · L⁻¹ ABA 处理的侧柏幼苗在处理 6 h 后显著降低了 MDA 含量,降幅分别为 NaCl 胁迫的 13.13%和 17.66%,但不同浓度 ABA

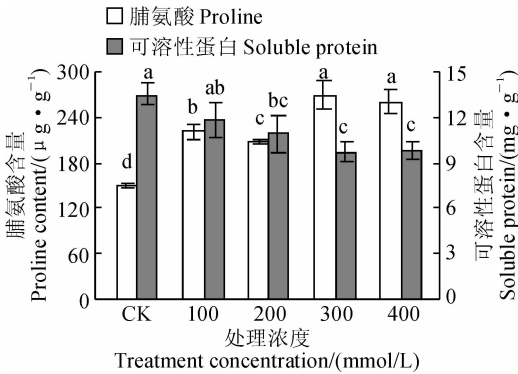


图 3 NaCl 胁迫对侧柏叶片脯氨酸和可溶性蛋白含量的影响

Fig. 3 Effects of NaCl stress on proline and soluble protein contents in leaves of *P. orientalis*

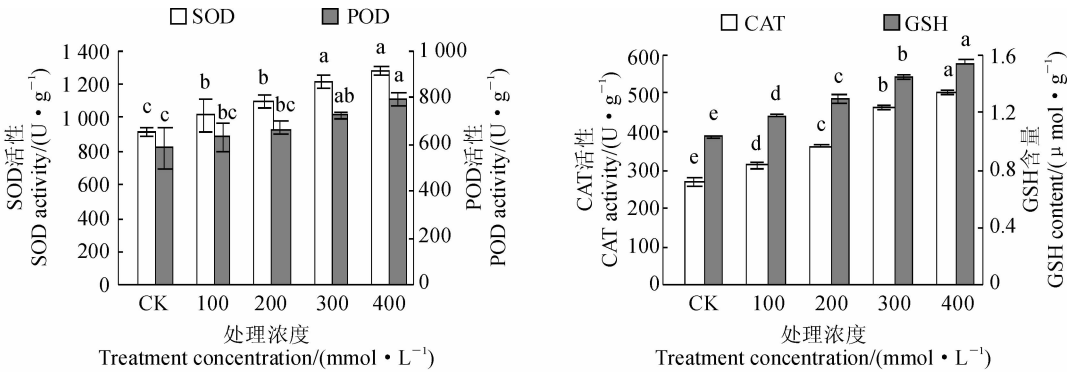


图 2 NaCl 胁迫对侧柏叶片抗氧化酶活性和 GSH 含量的影响

Fig. 2 Effects of NaCl stress on superoxide (SOD), peroxidase (POD) and catalase (CAT) activities and GSH content in leaves of *P. orientalis*

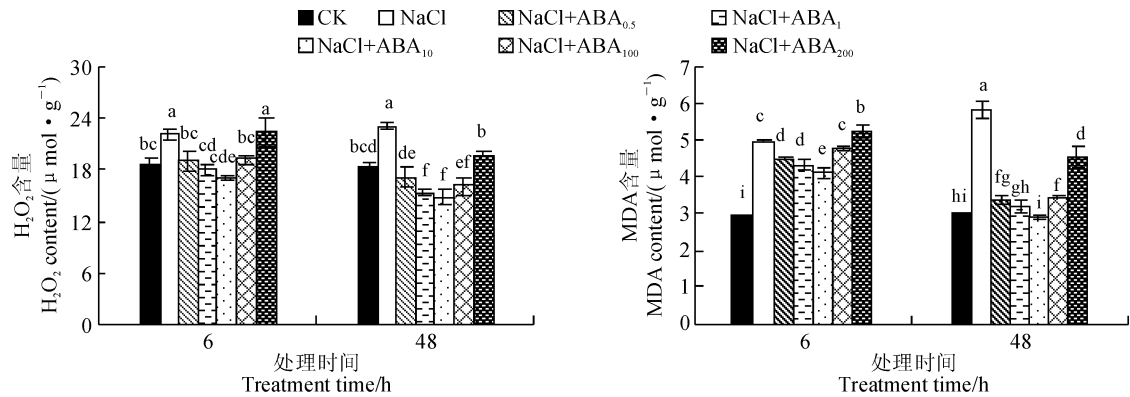


图 4 ABA 对 NaCl 胁迫下侧柏叶片 H_2O_2 和 MDA 含量的影响

Fig. 4 Effects of ABA on H_2O_2 and MDA contents in leaves of *P. orientalis* under NaCl stress

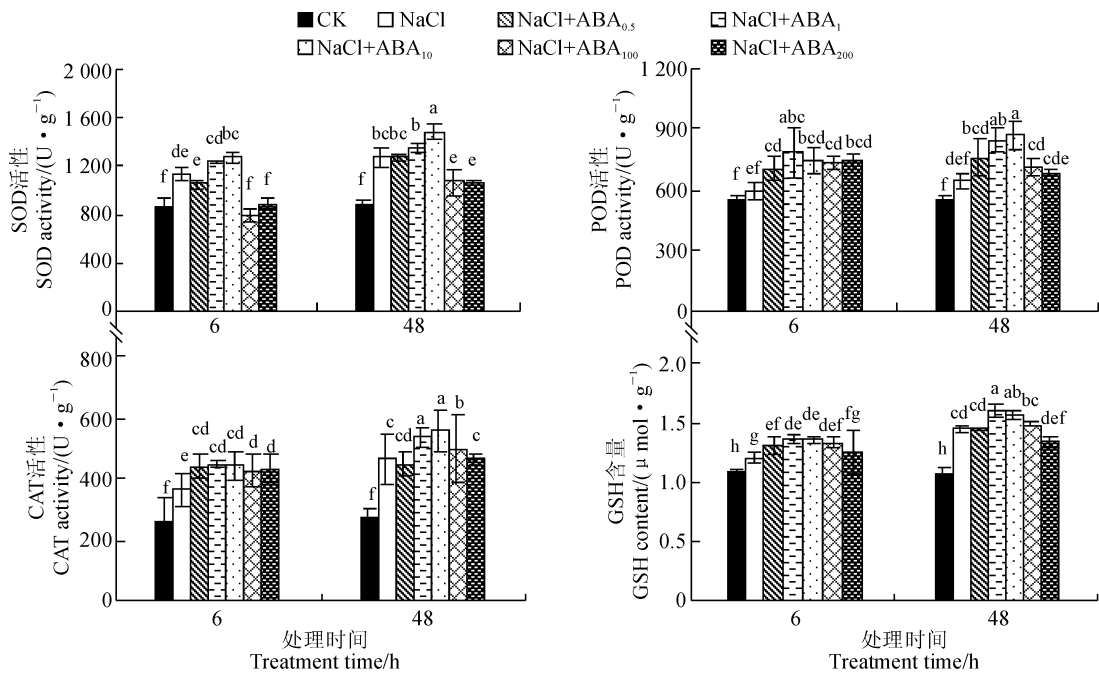


图 5 ABA 对 NaCl 胁迫下侧柏叶片抗氧化酶活性和 GSH 含量的影响

Fig. 5 Effects of ABA on superoxide (SOD), peroxidase (POD) and catalase (CAT) activities and GSH content in leaves of *P. orientalis* under NaCl stress

处理 48 h 后均能显著降低盐胁迫侧柏叶片的 MDA 含量,其中 1 和 10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ABA 的缓解效应最为明显,降幅分别为 NaCl 胁迫的 45.08% 和 50.14% ($P < 0.05$)。以上表明,适宜浓度的 ABA 缓解了 NaCl 胁迫对侧柏幼苗叶片细胞膜的伤害。

2.2.2 抗氧化酶活性和 GSH 含量 为了评估 ABA 对盐胁迫下侧柏幼苗的抗氧化酶活性的作用,测定其叶片 SOD、POD 和 CAT 活性。由图 5 可以看出,300 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl 胁迫处理 6 h 时,SOD、POD 和 CAT 活性相较于 CK 分别提高 33.26%、7.40% 和 40.89%;48 h 时,分别提高 42.10%、18.00% 和 68.97%,且侧柏在 0~48 h 胁迫过程中,

其 SOD、POD 和 CAT 逐步上升。施加 ABA 处理后,盐胁迫侧柏叶片的 SOD、POD 和 CAT 活性产生变化,其中以 1 和 10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ABA 处理效果最为明显。处理 48 h 时,施加 1 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ABA 时 SOD、POD 和 CAT 活性分别为 1358.78、847.73 和 539.66 $\text{U} \cdot \text{g}^{-1}$;10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ABA 处理分别较单独 NaCl 处理显著提高 17.55%、35.00% 和 19.89%。以上结果表明,1 和 10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ABA 对侧柏叶片抗氧化酶活性的影响尤为显著。

GSH 是活性氧清除系统中重要的非酶促抗氧化剂。由图 5 可知,300 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl 胁迫 6 h 和 48 h 后侧柏幼苗叶片 GSH 含量比 CK 分别提高

9.92%和33.27%。外源 ABA 的施加在一定程度上诱使 GSH 含量产生变化,随其浓度的增加表现出先升后降的趋势。在不同浓度 ABA 与 NaCl 的组合处理中,1 和 10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ABA 于处理 48 h 分别较 NaCl 胁迫叶片 GSH 含量提高 10.55%和 8.79%。

2.2.3 渗透调节物质 图 6 显示,盐胁迫下侧柏幼苗脯氨酸含量因施加不同浓度 ABA 而产生变化。NaCl 胁迫处理至 6 和 48 h,脯氨酸含量较 CK 分别显著提高了 33.73%和 54.83%,且随着胁迫时间的延长,其含量也在增加。同时,随着外源施加 ABA

浓度的增加,盐胁迫侧柏叶片的脯氨酸含量先上升后下降。其中处理 48 h 后,0.5、1 和 10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ABA 均能进一步提高胁迫叶片脯氨酸含量,分别较 NaCl 胁迫提高 19.03%、25.23%和 21.05%。同样,侧柏叶片 NaCl 胁迫处理 6 h,盐胁迫叶片可溶性蛋白含量较 CK 差异不显著;处理 48 h,可溶性蛋白含量较 CK 显著降低了 28.59%;可溶性蛋白含量随着胁迫时间延长逐步下降,盐分抑制了可溶性蛋白的合成,加速其水解,导致含量下降。施加不同浓度 ABA 处理 48 h 均能显著提高盐胁迫叶片的可溶性蛋白含量,其中在 10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ABA 时达到

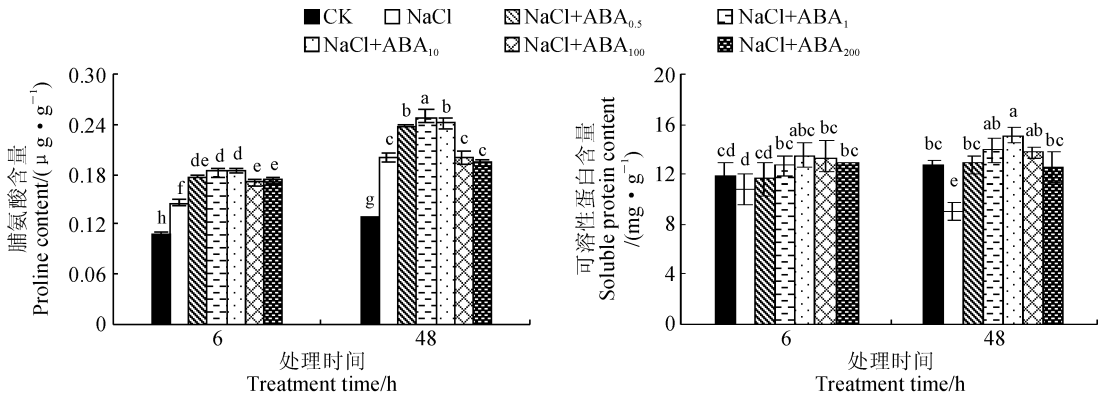


图 6 ABA 对 NaCl 胁迫下侧柏叶片脯氨酸和可溶性蛋白含量的影响

Fig. 6 Effects of ABA on proline and soluble protein contents in leaves of *P. orientalis* under NaCl stress

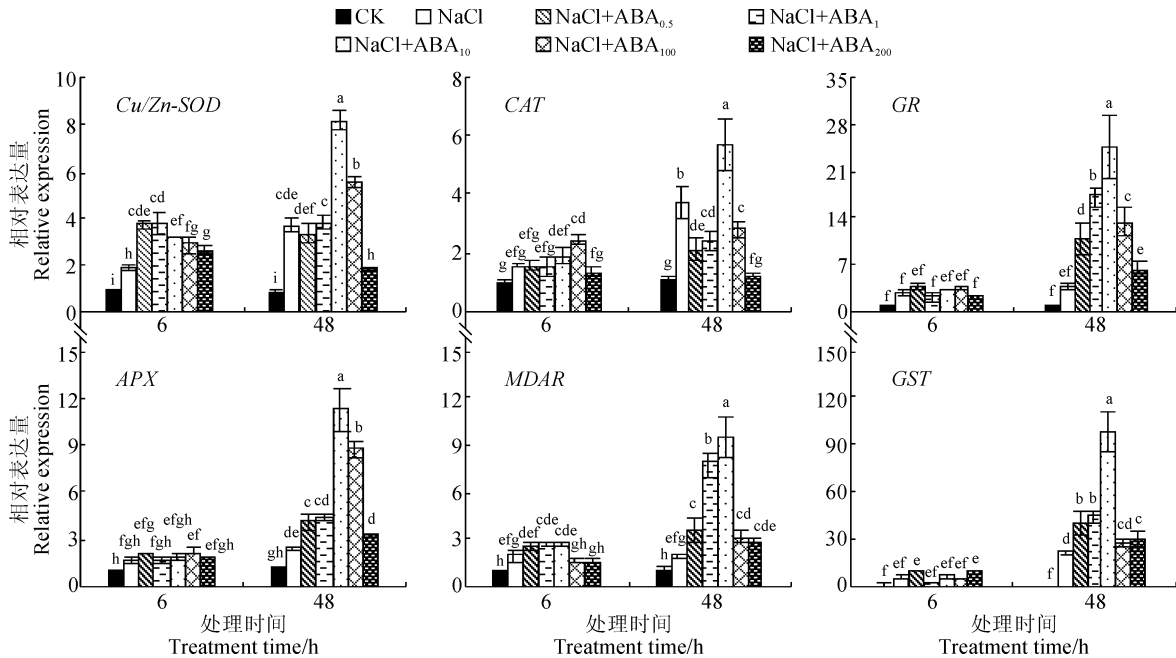


图 7 ABA 对 NaCl 胁迫下侧柏叶片 Cu/Zn-SOD、CAT、GR、APX、MDAR 和 GST 基因表达的影响

Fig. 7 Effects of ABA on the expression levels of Cu/Zn-SOD, CAT, GR, APX, MDAR and GST of *P. orientalis* under NaCl stress

最大值($15.12 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$),较CK提高了19.81%(图6)。由此可见,适宜浓度ABA对NaCl胁迫下侧柏幼苗叶片脯氨酸积累和可溶性蛋白含量的增加具有促进作用。

2.2.4 活性氧代谢相关基因表达分析 由图7可以看出,300 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl胁迫6h和48h后侧柏幼苗叶片的活性氧代谢相关基因*Cu/Zn-SOD*、*CAT*、*GR*、*APX*、*MDAR*和*GST*表达水平均较CK有不同程度的提高。其中,处理6h时分别提高了0.92、0.55、1.78、0.52、1.09和4.18倍,处理48h时分别提高了2.95、2.52、2.63、1.21、1.11和20.95倍。随着NaCl胁迫时间(0~48h)延长,*Cu/Zn-SOD*、*CAT*、*APX*和*GST*基因表达水平显著提高($P < 0.05$)。外施ABA在一定程度上可使以上基因表达水平产生变化。处理48h时,*Cu/Zn-SOD*、*CAT*、*GR*、*APX*、*MDAR*和*GST*基因的表达水平随ABA浓度的增加,整体呈先升后降的趋势,均于10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ABA处理48h时达到峰值,与盐胁迫叶片相比,分别提高1.17、0.54、5.19、3.56、3.71和3.70倍。以上说明,外施10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ABA处理48h能够最大程度地上调NaCl胁迫下侧柏叶片活性氧代谢相关基因的表达水平。

3 讨论

植物衰老是由基因控制,同时受到许多内部发育和外部环境因素的影响,导致植物随着年龄的增加逐步衰退的过程^[22-23],其中高盐则是抑制植物的生长发育的典型因素。目前,土壤盐渍化是世界范围内限制作物产量的重要问题。盐胁迫能够诱导植物衰老的发生,而抗氧化酶类物质则能抑制植物衰老的发生^[24]。研究发现,植物在正常条件下,ROS不断地产生并被不同的抗氧化机制清除,并维持在一个平稳的水平,因此植物不会受到损伤^[20]。当植物在高盐环境中生长,细胞内活性氧产生与清除之间的平衡遭到破坏,积累起来的活性氧会对细胞造成伤害,从而加速叶片的衰老^[25]。植物的氧化还原稳态是由抗氧化系统调控维持,即酶和非酶组分。抗氧化酶包括SOD、POD、CAT、APX、GST等;非酶类低分子化合物如AsA、GSH、脯氨酸、酚类、类胡萝卜素和类黄酮^[26]。抗氧化系统的这两个组分能够清除过多ROS,是保证细胞存活必要条件^[26, 36]。

目前大量的研究表明,抗氧化酶系统响应盐胁迫的研究结果并不一致。ROS能够响应各种胁迫

环境,参与到细胞各种生理过程^[27],而胁迫条件下植物体内的ROS水平使抗氧化酶系统调控下的动态平衡状态被打破,如小麦经盐胁迫处理4d,叶片中的SOD、POD和CAT活性被抑制^[28];然而短期或低浓度的 H_2O_2 能够激活植株活性氧酶促清除系统,从而缓解氧化胁迫^[29]。Kamiab等^[30]研究认为,盐胁迫下豌豆叶片中的SOD、POD和CAT活性随着NaCl浓度(0~150 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)增加而增加;而莧菜和莴苣叶片的抗氧化酶活性随着盐胁迫浓度的增加整体呈相反趋势,由此说明酶活性的增加或降低与植物种类相关^[31]。此外,植物抗氧化酶活性也与胁迫浓度和时间有关^[32]。本研究中,侧柏叶片中SOD、POD和CAT活性随NaCl胁迫水平的提高而显著增加,表明侧柏幼苗对48h短期胁迫具有一定的适应性,且300 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl处理提高了侧柏幼苗叶片活性氧代谢相关基因(*Cu/Zn-SOD*、*CAT*、*GR*、*APX*、*MDAR*和*GST*)表达水平;NaCl胁迫下侧柏幼苗外施1和10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ABA进一步增加抗氧化酶SOD、POD和CAT活性,且外施10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ABA能最大程度地诱导这些基因的表达,进而增强植株的耐盐性。Nounjan等^[33]指出,盐胁迫促使水稻叶片*Cu/ZnSOD*、*MnSOD*、*APX*和*CAT*基因转录水平上调;*OsAPX8*基因表达水平增强应对NaCl胁迫响应^[34];75 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl胁迫诱导*EcMDAR*基因表达^[35];300 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl胁迫下芦苇叶片与根部的*PhaGRC*基因表达量上升^[36],本实验结果均与以上研究相符合。由此说明,NaCl短期胁迫激发了侧柏叶片抗氧化酶活性,这可能与活性氧水平大幅度上升相关,诱导了活性氧清除相关酶基因的转录水平^[37]。Zhang等^[38]不仅发现了盐胁迫在一定程度地上调了白三叶草*Cu/Zn-SOD*、*CAT*、*GR*、*APX*和*MDAR*基因转录水平,而且ABA处理也能诱导这些基因表达。外源ABA可以有效地提高活性氧酶促清除系统活性,降低活性氧积累和细胞膜脂质过氧化程度,保护膜的完整性,从而缓解由高盐引起的植物损伤^[5-6]。GSH通过AsA-GSH循环直接清除体内ROS,减轻高盐对植物的伤害。本实验中盐胁迫促进了侧柏叶片中GSH含量的提高,并随着盐浓度增加而增加;施加1和10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ABA可显著提高侧柏叶片中GSH含量,提高其抗氧化能力。

NaCl处理使杨树^[39]、水稻^[40]和番茄^[41]叶片中 H_2O_2 和MDA含量增加,导致电解质外渗率增加。在本实验中,盐胁迫处理48h诱导侧柏幼苗叶片

H₂O₂ 水平增加,引发膜质过氧化作用,导致 MDA 含量升高并激发相关抗氧化酶活性增加;侧柏叶片中 H₂O₂ 和 MDA 含量随着 NaCl 浓度的增加而逐步增加,于 300 mmol · L⁻¹ NaCl 处理时达到峰值。另外,外施 1 和 10 μmol · L⁻¹ ABA 使得 NaCl 处理下的侧柏幼苗 H₂O₂ 和 MDA 含量相较于 0.5、100 和 200 μmol · L⁻¹ ABA 处理减少。这说明 NaCl 胁迫下侧柏的活性氧清除能力降低,致使膜脂过氧化程度加剧,造成膜系统损伤,然而适宜浓度的 ABA 可通过提高抗氧化酶的活性和抗氧化能力来减轻膜脂过氧化作用且保护膜结构,进而有效地缓解盐胁迫对侧柏的氧化伤害。

脯氨酸和可溶性蛋白为渗透调节物质,其积累与植物抗性相关,但是脯氨酸在抗逆性方面的作用存在争议。许多研究显示,脯氨酸积累可以提高植物的渗透调节功能^[42]。本研究中,NaCl 胁迫诱导侧柏叶片脯氨酸含量增加,这与芦苇脯氨酸^[36]的研究结果一致;脯氨酸含量随着 NaCl 浓度的增加而增加,可能与其细胞渗透调节机制有关^[42-43];施加 0.5~10 μmol · L⁻¹ ABA 能够进一步提高盐胁迫

下侧柏叶片脯氨酸水平,说明适宜浓度 ABA 促进了脯氨酸生物合成中相关酶的活性,延缓其降解,因此,侧柏叶片脯氨酸的积累使其渗透调节能力增强。盐分可以加速蛋白质水解,另一方面也可抑制其合成,导致植物的可溶性蛋白含量下降。这一情况在唐古特白刺^[44]和薄壳山核桃^[45]的研究中得到验证。此外,可溶性蛋白含量也能体现出植物的光合性能。本试验中,300 mmol · L⁻¹ NaCl 处理 48 h 的侧柏叶片可溶性蛋白含量较 CK 显著下降;施加 10 μmol · L⁻¹ ABA 后可显著提高侧柏叶片中可溶性蛋白含量,表明适宜浓度的 ABA 能促进侧柏盐胁迫蛋白合成,维持植株水分运输和叶片光合功能。

综上所述,随着 NaCl 处理浓度增加,侧柏幼苗叶片 H₂O₂、MDA、GSH 和脯氨酸含量和抗氧化酶活性均呈上升趋势,而可溶性蛋白含量逐渐降低;适宜浓度 ABA 可促进盐胁迫下侧柏幼苗叶片的抗氧化酶活性和相关基因的表达水平,提高渗透调节能力和 GSH 含量,降低 H₂O₂ 和 MDA 积累,从而有效降低活性氧对侧柏叶片的伤害,保护细胞膜结构的完整,增强其抗盐性。

参考文献:

- [1] HAKIM M A, JURAIMI A, HANAFI M M. The effect of salinity on growth, ion accumulation and yield of rice varieties [J]. *Journal of Animal and Plant Sciences*, 2014, **24**(3): 874-885.
- [2] MILLER G, SUZUKI N, CIFTCI-YILMAZ S, *et al.* Reactive oxygen species homeostasis and signalling during drought and salinity stresses[J]. *Plant Cell and Environment*, 2010, **33**(4): 453-467.
- [3] CHAVES M M, MAROCO J P, PEREIRA J S. Understanding plant responses to drought-from genes to the whole plant [J]. *Functional Plant Biology*, 2003, **30**(3): 239-264.
- [4] SAWADA Y, AOKI M, NAKAMINAMI K, *et al.* Phytochrome- and gibberellin-mediated regulation of abscisic acid metabolism during germination of photoblastic lettuce seeds[J]. *Plant Physiology*, 2008, **146**(3): 1 86-1 396.
- [5] KAUR M, GUPTA A K, ZHAWAR V K. Antioxidant response and *Lea* genes expression under exogenous ABA and water deficit stress in wheat cultivars contrasting in drought tolerance[J]. *Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology*, 2012, **23**(1): 18-30.
- [6] KAUR L, ZHAWAR V K. Phenolic parameters under exogenous ABA, water stress, salt stress in two wheat cultivars varying in drought tolerance[J]. *Indian Journal of Plant Physiology*, 2015, **20**(2): 151-156.
- [7] 王 允, 张 逸, 刘灿玉, 等. 干旱胁迫下外源 ABA 对姜叶片活性氧代谢的影响[J]. *园艺学报*, 2016, **43**(3): 587-594. WANG Y, ZHANG Y, LIU C Y, *et al.* Effects of exogenous abscisic acid on active oxygen metabolism in ginger leaves under drought stress[J]. *Acta Horticulturae Sinica*, 2016, **43**(3): 587-594.
- [8] TENG K, LI J, LIU L, *et al.* Exogenous ABA induces drought tolerance in upland rice: the role of chloroplast and ABA biosynthesis-related gene expression on photosystem II during PEG stress[J]. *Acta Physiologiae Plantarum*, 2014, **36**(8): 2 219-2 227.
- [9] 郭美丽, 王佳婉, 王 珂, 等. 外源 ABA 对低温不同光周期下四季秋海棠叶片花色苷的诱导机理[J]. *西北植物学报*, 2016, **36**(10): 1 999-2 007. GUO M L, WANG J W, WANG K, *et al.* Mechanism of ABA-induced anthocyanin biosynthesis in *Begonia semperflorens* under different photoperiods and low temperatures[J]. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*, 2016, **36**(10): 1 999-2 007.

- [10] AMBROSONE A, BATELLI G, NURCATO R, *et al.* The *Arabidopsis* RNA-binding protein AtRGA regulates tolerance to salt and drought stress[J]. *Plant Physiology. American Society of Plant Biologists*, 2015, **168**(1): 292-306.
- [11] JIA H, WANG C, WANG F, *et al.* GhWRKY68 reduces resistance to salt and drought in transgenic *Nicotiana benthamiana*[J]. *PLoS ONE*, 2015, **10**(3): e0120646.
- [12] GAY C, GEBICKI J M. A critical evaluation of the effect of sorbitol on the ferric-xylenol orange hydroperoxide assay[J]. *Analytical Biochemistry*, 2000, **284**(2): 217-220.
- [13] HEATH R L, PACKER L. Photoperoxidation in isolated chloroplasts[J]. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 1968, **125**(1): 189-198.
- [14] PROCHAZKOVA D, SAIRAM R H, SRIVASTAVA G C, *et al.* Oxidative stress and antioxidant activity as the basis of senescence in maize leaves[J]. *Plant Science*, 2001, **161**(4): 765-771.
- [15] CAKRNAK I, MARSCHNER H. Magnesium deficiency and high light intensity enhance activities of superoxide dismutase, ascorbate peroxidase, and glutathione reductase in bean leaves[J]. *Plant Physiology*, 1992, **98**(4): 1 222-1 227.
- [16] JABLONSKI P P, ANDERSON J W. Light-dependent reduction of dehydroascorbate by ruptured pea chloroplasts[J]. *Plant Physiology*, 1981, **67**(6): 1 239-1 244.
- [17] ANDERSON J V, CHEVONE B I, HESS J L. Seasonal variation in the antioxidant system of eastern white pine needles[J]. *Plant Physiology*, 1992, **98**(2): 501-508.
- [18] BATES L S, WALDEEN R P, TEARE I D. Rapid determination of free proline for water-stress studies[J]. *Plant and Soil*, 1973, **39**(1): 205-207.
- [19] BRADFORD 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**(1-2): 248-254.
- [20] CHANG E, SHI S, LIU J, *et al.* Selection of reference genes for quantitative gene expression studies in *Platycladus orientalis* (Cupressaceae) using real-time PCR[J]. *PloS One*, 2012, **7**(3): e33278.
- [21] LIVAK K J, SCHMITTGEN T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method[J]. *Methods*, 2001, **25**(4): 402-408.
- [22] NOODEN L D, GUIAMET J J, JOHN I. Senescence mechanisms[J]. *Physiologia Plantarum*, 1997, **101**(4): 746-753.
- [23] GAN S, AMASINO R M. Making sense of senescence (molecular genetic regulation and manipulation of leaf senescence)[J]. *Plant Physiology*, 1997, **113**(2): 313-319.
- [24] SMART C M. Gene expression during leaf senescence[J]. *New Phytologist*, 1994, **126**(3): 419-448.
- [25] MCCORD J M, FRIDOVICH I. Superoxide dismutase: The first twenty years (1968-1988) [J]. *Free Radical Biology and Medicine*, 1988, **5**(5-6): 363-369.
- [26] GILL S S, TUTEJA N. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants[J]. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2010, **48** (12): 909-930.
- [27] PETROV V, HILLE J, MUELLER-ROEBER B, *et al.* ROS-mediated abiotic stress-induced programmed cell death in plants[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2015, 6: 69.
- [28] QIU Z, GUO J, ZHU A, *et al.* Exogenous jasmonic acid can enhance tolerance of wheat seedlings to salt stress[J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2014, **104** (1): 202-208.
- [29] HOSSAIN M A, BHATTACHARJEE S, ARMIN S M, *et al.* Hydrogen peroxide priming modulates abiotic oxidative stress tolerance: insights from ROS detoxification and scavenging[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2015, 6: 420.
- [30] KAMIAB F, TALAIE A, KHEZRI M, *et al.* Exogenous application of free polyamines enhance salt tolerance of pistachio (*Pistacia vera* L.) seedlings[J]. *Plant Growth Regulation*, 2013, **72**(3): 257-268.
- [31] QIN L, GUO S, AI W, *et al.* Effect of salt stress on growth and physiology in amaranth and lettuce: implications for bioregenerative life support system [J]. *Advances in Space Research*, 2013, **51**(3): 476-482.
- [32] 刘灿玉, 夏 杰, 韩 敏, 等. 镉对姜叶片活性氧代谢影响的时间和剂量效应[J]. *园艺学报*, 2016, **43**(5): 927-934.
LIU C Y, XIA J, HAN M, *et al.* Time and does effects of cadmium on active oxygen metabolism in ginger leaves[J]. *Acta Horticulturae Sinica*, 2016, **43**(5): 927-934.
- [33] NOUNJAN N, NGHIA P T, THEERAKULPISUT P. Exogenous proline and trehalose promote recovery of rice seedlings from salt-stress and differentially modulate antioxidant enzymes and expression of related genes[J]. *Journal of Plant Physiology*, 2012, **169**(6): 596-604.
- [34] HONG C Y, HSUY Y T, TSAI Y C, *et al.* Expression of ascorbate peroxidase 8 in roots of rice (*Oryza sativa* L.) seedlings in response to NaCl[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2007, **58**(12): 3 273-3 283.
- [35] SUDAN J, NEGI B, ARORA S. Oxidative stress induced

expression of monodehydroascorbate reductase gene in *Eleusine coracana* [J]. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 2015, **21**(4): 551-558.

[36] ZHANG X, QUAN G, WANG J, *et al.* Functional validation of *Phragmites communis* glutathione reductase (PhaGR) as an essential enzyme in salt tolerance[J]. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2015, **175**(7): 3 418-3 430.

[37] CUYPERS A, PLUSQUIN M, REMANS T, *et al.* Cadmium stress: an oxidative challenge[J]. *BioMetals*, 2010, **23**(5): 927-940.

[38] ZHANG Y, LI Z, PENG Y, *et al.* Clones of *FeSOD*, *MDHAR*, *DHAR* genes from white clover and gene expression analysis of ROS-scavenging enzymes during abiotic stress and hormone treatments[J]. *Molecules*, 2015, **20**(12): 20 939-20 954.

[39] ZHENG L, MENG Y, MA J, *et al.* Transcriptomic analysis reveals importance of ROS and phytohormones in response to short-term salinity stress in *Populus tomentosa* [J]. *Frontiers in Plant Science*, 2015, 6: 678.

[40] ROYCHOUDHURY A, BASU S, SENGUPTA D N. Amelioration of salinity stress by exogenously applied spermidine or spermine in three varieties of indica rice differing in their level of salt tolerance[J]. *Journal of Plant Physiology*, 2011, **168**(4): 317-328.

[41] 周 艳, 刘慧英, 王 松, 等. 外源 GSH 对盐胁迫下番茄幼苗生长及抗逆生理指标的影响[J]. 西北植物学报, 2016, **36**(3): 515-520.

ZHOU Y, LIU H Y, WANG S, *et al.* Effect of exogenous GSH on tomato seedlings growth and physiological indexes of resistance stress under salt stress[J]. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*, 2016, **36**(3): 515-520.

[42] 汤章城. 逆境条件下植物脯氨酸的累积及其可能的意义[J]. 植物生理学通讯, 1984, (1): 15-21.

TANG Z C. Accumulation of plant proline in adversity and its possible significance[J]. *Plant Physiology Communications*, 1984, (1): 15-21.

[43] 高彩婷, 刘景辉, 徐寿军, 等. 燕麦盐胁迫响应基因的差异表达与生理响应的关系[J]. 西北植物学报, 2015, **35**(7): 1 385-1 393.

GAO C T, LIU J H, XU S J, *et al.* Exploring the relationship of differentially expressed genes and physiological of oats in response to salt stress[J]. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*, 2015, **35**(7): 1 385-1 393.

[44] 张艳艳, 刘 威, 宣亚楠, 等. 水杨酸对盐胁迫下唐古特白刺活性氧代谢和细胞膜透性抑制的缓解效应[J]. 东北林业大学学报, 2012, **41**(12): 56-59.

ZHANG Y Y, LIU W, XUAN Y N, *et al.* Effects of salicylic acid mitigating under salt stress on active oxygen metabolism and membrane stability in *Nitraria tangutorum* [J]. *Journal of Northeast Forestry University*, 2012, **41**(12): 56-59.

[45] 生静雅, 张普娟, 朱海军, 等. 外施 ALA 对薄壳山核桃幼苗盐胁迫下的生长发育影响[J]. 扬州大学学报(农业与生命科学版), 2013, **34**(4): 66-70.

SHENG J Y, ZHANG P J, ZHU H J, *et al.* Effects of application of ALA on growth and development of pecan seedlings under salt stress[J]. *Journal of Yangzhou University (Agricultural and Life Science Edition)*, 2013, **34**(4): 66-70.

(编辑: 宋亚珍)