

外源 ABA 对短期 H₂O₂ 胁迫下侧柏幼苗活性氧代谢及相关基因的影响

姚侠妹^{1,2}, 常二梅¹, 纪敬¹, 岳剑云¹, 谢田田¹, 邓楠¹,
史胜青¹, 江泽平^{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: [目的] 研究外源 ABA 处理对 H₂O₂ 胁迫下侧柏幼苗活性氧代谢系统的影响,探讨 ABA 调控侧柏氧化胁迫的可能作用机制。[方法] 以侧柏幼苗为试验材料,采用水培方式,研究外施低浓度 (0.5 μmol · L⁻¹) 和高浓度 (200 μmol · L⁻¹) ABA 对 100 mmol · L⁻¹ H₂O₂ 胁迫下侧柏幼苗活性氧代谢的影响。[结果] (1) 100 mmol · L⁻¹ H₂O₂ 胁迫 48 h 显著增加了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、抗氧化物酶 (SOD 和 CAT) 活性,而可溶性蛋白含量降低。(2) 相较于高浓度 200 μmol · L⁻¹ ABA,施加 0.5 μmol · L⁻¹ ABA 显著减少了 H₂O₂ 胁迫下侧柏幼苗 H₂O₂ 和 MDA 的积累,进一步提高了侧柏幼苗叶片 SOD、POD 和 CAT 活性,同时促进 GSH、脯氨酸和可溶性蛋白的合成。(3) 100 mmol · L⁻¹ H₂O₂ 胁迫处理 48 h,侧柏幼苗叶片活性氧代谢相关基因 *Cu/Zn-SOD*、*CAT*、*GR*、*APX*、*MDAR* 和 *GST* 表达水平较对照 CK 均有显著性提高;正常和 H₂O₂ 胁迫下侧柏幼苗外施 0.5 μmol · L⁻¹ ABA 相较于 200 μmol · L⁻¹ 更有利于提高侧柏叶片活性氧代谢相关基因 *Cu/Zn-SOD*、*CAT*、*GR*、*APX*、*MDAR* 和 *GST* 的表达量。[结论] 低浓度 0.5 μmol · L⁻¹ ABA 有效地增强抗氧化系统的防御能力,减弱幼苗的氧化胁迫和膜脂过氧化水平,从而降低活性氧对侧柏的伤害。

关键词: 侧柏; H₂O₂ 胁迫; ABA; 活性氧代谢; 基因表达

中图分类号: S718.43

文献标识码: A

文章编号: 1001-1498(2017)04-0624-09

Reactive Oxygen Metabolism and Its Related Gene Expression in *Platycladus orientalis* under H₂O₂ Stress and Regulated by ABA

YAO Xia-mei^{1,2}, CHANG Er-mei¹, JI Jing¹, YUE Jian-yun¹, XIE Tian-tian¹, DENG Nan¹,
SHI Sheng-qing¹, JIANG Ze-ping¹

(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 236037, Anhui, China)

Abstract: [Objective] To investigate the mechanism of *exogenous abscisic acid* (ABA) on regulating oxidative stress of *Platycladus orientalis*, the effects of reactive oxygen metabolism were studied in the leaves of *P. orientalis* exposed to hydrogen peroxide (H₂O₂) stress with the application of different concentrations of ABA. [Method] *P. orientalis* seedlings were exposed to 100 μmol · L⁻¹ H₂O₂ were treated with 0.5 and 200 μmol · L⁻¹ ABA, and physiologi-

收稿日期: 2016-07-14

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项目 (CAFYBB2014QB004); 国家自然科学基金项目 (31300555); 安徽省哲学社会科学规划项目 (AHSKQ2016D110); 安徽省高校质量工程项目 (2014jyxm231); 国家级大学生创新训练项目 (201710371036、201710371037)

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

* 通讯作者: 江泽平, 研究员, 主要从事林木引种与植物地理、逆境生物学研究。E-mail: jiangzp@caf.ac.cn

cal indexes and expression levels of genes related to reactive oxygen metabolism were studied. [**Result**] (1) 100 mmol · L⁻¹ H₂O₂ significantly increased the contents of H₂O₂, malondialdehyde (MDA), glutathione (GSH) and proline and activities of antioxidant enzymes SOD and CAT in *P. orientalis* leaves, while soluble protein content decreased at 48 h. (2) Compared with 200 μmol · L⁻¹ ABA, 0.5 μmol · L⁻¹ ABA significantly enhanced the activities of SOD, POD and CAT, and increased the contents of GSH, proline and soluble protein in H₂O₂-treated seedlings, accompanied by the reduction of H₂O₂ and MDA contents. (3) 100 mmol · L⁻¹ H₂O₂ up-regulated the expression levels of *Cu/Zn-SOD*, *CAT*, *APX*, *MDAR* 和 *GST* genes in *P. orientalis* at 48 h, and moreover, the presence of 0.5 μmol · L⁻¹ ABA further prompted the expression levels of *Cu/Zn-SOD*, *CAT*, *GR*, *APX*, *MDAR* and *GST* genes, compared with 200 μmol · L⁻¹ ABA under normal and H₂O₂ conditions. [**Conclusion**] Low concentration of 0.5 μmol · L⁻¹ ABA effectively enhanced antioxidant defense, reduced oxidative stress and membrane lipid peroxidation in leaves of *P. orientalis* under H₂O₂ stress, which lowered the damage of reactive oxygen species to *P. orientalis* leaves and improved its resistance.

Keywords: *Platycladus orientalis*; H₂O₂ stress; ABA; reactive oxygen metabolism; gene expression

植物经常暴露于各种环境(如干旱、盐碱、重金属等)胁迫中,严重影响了它们的酶和非酶成分,还对它们的相关基因构成威胁,且减缓了同化系统建成速度,影响生长进程。活性氧(ROS)在调节各种生物现象中起着重要的作用,包括激活细胞因子信号转导通路以及由此引起的基因表达。持续暴露于 ROS 中会引起植物的氧化胁迫,影响细胞内氧化还原平衡。非生物胁迫可导致细胞 ROS 浓度增加,随后转化为 H₂O₂,它能够跨膜自由扩散,当其在细胞中的浓度积累到一定程度时,就会造成细胞损伤。同样,H₂O₂也可作为信号分子参与到胁迫信号转导途径中^[1]。此外,活性氧不足可以引起细胞氧化胁迫,影响基因组的稳定性^[2],因此氧化胁迫是细胞损伤的重要原因。蒋景龙等^[3]施加不同浓度 H₂O₂ 处理 7 d 苗龄的山黧豆幼苗 24 h,分析山黧豆根系受氧化胁迫的程度与抗氧化系统的响应机制,结果表明,H₂O₂ 的积累与其受氧化胁迫程度呈正相关,且低浓度处理可以提高山黧豆抗氧化性能。Wan 等^[4]通过对 12 d 苗龄的水稻进行不同梯度 H₂O₂ 处理 6 h,分析叶片生理生化响应,并结合蛋白质组学揭示了水稻叶片生理特征变化与其胁迫响应蛋白之间的关系。

脱落酸(ABA)在植物非生物胁迫中起关键作用,它是激发植物应对不利环境条件的重要信号^[5-6],并且能够协同调节胁迫反应中多种生理功能,包括气孔闭合,积累渗透调节物质和诱导胁迫相关蛋白的合成,如热休克蛋白,ROS 清除剂等。然而,虽然许多非生物胁迫诱导基因受 ABA 控制,但有一些不是,这表明 ABA 依赖和非依赖性途径共同

参与胁迫信号的传导^[7-8]。ABA 也是长距离信号分子,当环境条件发生变化时,它能够从成熟叶片持续地传输到发育叶片^[9]。胁迫引起 H₂O₂ 含量增加,造成氧化胁迫,而施加外源 ABA,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]。Desikan 等^[12]研究发现,施加外源 ABA 有利于氧化胁迫下植物的适应生长,增加抗氧化酶的活性并诱导 ROS 清除系统等相关基因表达。王允等^[13]研究表明,ABA 可通过提高姜叶片 ROS 抗氧化系统的酶和非酶成分以抵御干旱引起的氧化胁迫。另外,研究显示外源物的调控效果与植物种类以及施用的方法、时间和浓度关系紧密^[14,15]。侧柏(*Platycladus orientalis* (Linn.) Franca)资源丰富,是生态环境修复的主要造林树种,具有一定的耐寒、耐旱、抗盐碱等特性,广泛分布于我国各地区,是我国特色树种,目前关于外源 ABA 与侧柏氧化胁迫交互作用的研究尚无报道。本试验研究了氧化胁迫下侧柏活性氧代谢以及施加外源 ABA 对其产生的作用,以期从生理生化和分子方面探讨侧柏的抗氧化胁迫和 ABA 的调控机制,为其更好地推广利用提供理论依据。

1 材料与方 法

1.1 材料及处理

试验是在预备试验的基础上,于 2016 年在中国林业科学研究院温室大棚内进行。以侧柏幼苗为试材,其种子采集于中国林业科学研究院院内,经浸种处理后,于 2016 年 1 月播种于塑料穴盆中,待生长至 4 月下旬,选择生长一致的植株,将其冲洗干净,转移至含有 1/4 Hoagland 溶液(pH 6.0)容器(10 L,

60 株/容器)中培育两周,待幼苗恢复正常生长,对侧柏进行试验处理。根据前期预实验结果,选择 $100 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{H}_2\text{O}_2$ 为胁迫处理浓度。试验处理具体如下:CK(1/4 Hoagland 溶液)、CK + ABA0.5 ($0.5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ABA + 1/4 Hoagland 溶液)、CK + ABA200 ($200 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ABA + 1/4 Hoagland 溶液)、 H_2O_2 ($100 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{H}_2\text{O}_2$ + 1/4 Hoagland 溶液)、 H_2O_2 + ABA0.5 ($0.5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ABA + $100 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{H}_2\text{O}_2$ + 1/4 Hoagland 溶液)、 H_2O_2 + ABA200 ($200 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ABA + $100 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{H}_2\text{O}_2$ + 1/4 Hoagland 溶液)。以上实验每处理 3 个生物学重复,每个生物学重复 20 株。所有植株处理 6 和 48 h 后取样,且进行液氮快速冷冻并存储在 -80°C ,为后续 RNA 提取和生理指标测定分析做准备。

1.2 生理指标测定

H_2O_2 含量测定采用四氯化钛沉淀法^[16];MDA 含量测定采用硫代巴比妥酸显色法^[17];SOD 活性测定采用氮蓝四唑(NBT)法^[18];POD 活性测定方法参照 Cakmak 和 Marschner^[19];CAT 活性测定方法参照 Jablonski 和 Anderson^[20]方法;GSH 含量测定方法参照 Anderson^[21];Proline 含量测定采用茚三酮比色法^[22];可溶性蛋白测定采用考马斯亮蓝法^[23]。

1.3 实时荧光定量 qRT-PCR 检测活性氧相关基因的表达量

采用植物 RNA 提取试剂盒 (Tiandz) 提取侧柏叶片的总 RNA,并使用 PrimeScript™ RT reagent Kit (Takara) 试剂盒反转录合成 cDNA。根据侧柏转录组的注释 Unigene,采用 Primer Premier 3.0 软件进行侧柏活性氧代谢相关基因定量引物设计,引物扩增效率均在 95% ~ 105%,PCR 扩增产物均在 100 ~ 150 bp,引物序列见表 1, αTUB 为侧柏内参基因^[24],相对表达量使用 $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ 方法^[25],3 个生物学重复。实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 测定在 Roche Light-Cycler® 480 进行,使用 SYBR® Premix Ex Taq™ II (Takara) 试剂盒。PCR 反应体系 ($20 \mu\text{L}$) 含有 $10 \mu\text{L}$ SYBR® primer Ex Taq ($2 \times$),每条引物 $0.8 \mu\text{L}$ ($10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$),cDNA 稀释 13 倍,取 $2.0 \mu\text{L}$ 和 $6.4 \mu\text{L}$ 蒸馏水。qRT-PCR 反应程序为: 95°C 预变性 10 s; 95°C 变性 15 s; 60°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。

1.4 数据处理

利用 Microsoft Excel 2013 软件进行数据处理及

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

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

作图,所有统计分析采用 SPSS19.0 软件,采用 One-Way ANOVA 进行比较。各处理之间的显著性差异检验水平为 $P < 0.05$ 。

2 结果与分析

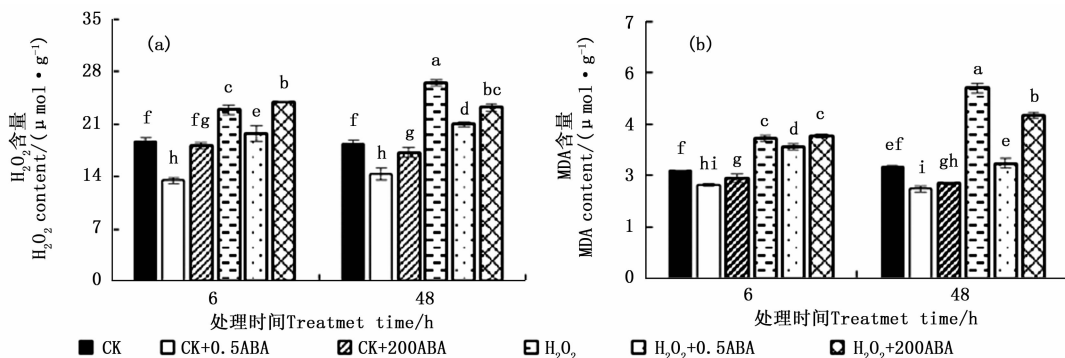
2.1 外源 ABA 对侧柏叶片 H_2O_2 和 MDA 含量的影响

图 1a 显示,正常条件下侧柏外施 0.5 和 $200 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 浓度的 ABA,其叶片 H_2O_2 含量于 6 h 分别较对照 CK 降低 27.73% 和 2.91%,处理 48 h,分别降低 22.16% 和 6.74%;侧柏幼苗响应 $100 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{H}_2\text{O}_2$ 胁迫,其叶片 H_2O_2 含量于 6 和 48 h 分别较对照 CK 显著提高 22.85% 和 43.78%,且在 0 ~ 48 h 内,随着胁迫时间延长,其含量逐步增加。施加不同浓度 ABA 对叶片 H_2O_2 积累产生不同的效应。 H_2O_2 + 0.5 ABA 处理于 6 h 降低胁迫叶片 H_2O_2 水平的 13.61%,而 H_2O_2 + 200 ABA 则是提高了 4.68% 且与 H_2O_2 处理差异显著 ($P < 0.05$),处理至 48 h, H_2O_2 + 0.5 ABA 和 H_2O_2 + 200 ABA 分别降低 20.81% 和 12.37%。由此可知,相较于施加高浓度 $200 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ABA, H_2O_2 胁迫外施低浓度 $0.5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ABA 更有利于降低 H_2O_2 的快速生成。

MDA 含量反映胁迫引起的氧化胁迫程度。正常条件下侧柏外施 0.5 和 $200 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ABA 处理 6 和 48 h,其叶片 MDA 含量较对照 CK 均显著降低 ($P < 0.05$);侧柏小苗 H_2O_2 胁迫 6 和 48 h,叶片

MDA 含量相较于 CK 分别提高了 30.41 % 和 69.84 % (图 1b), 6 和 48 h 处理间叶片 MDA 含量差异显著 ($P < 0.05$)。H₂O₂ + 0.5 ABA 和 H₂O₂ + 200 ABA 处理侧柏幼苗 6 h, 前者显著降低了 MDA 含量, 幅度为 H₂O₂ 胁迫的 6.02 %, 而后者与 H₂O₂ 处理差异

不显著 ($P > 0.05$)。随着处理时间延长至 48 h, H₂O₂ + 0.5 ABA 和 H₂O₂ + 200 ABA 处理均能显著降低胁迫侧柏叶片 MDA 含量, 前者的缓解效果明显高于后者, 降幅分别为 H₂O₂ 胁迫的 39.51 % 和 14.34 % ($P < 0.05$) (图 1b)。



注:不同小写字母代表各处理间在 0.05 水平存在显著性差异;数值为平均值 ± 标准差;下同。

Different small letters mean significant difference among treatments ($P < 0.05$); Data are mean ± SD ($n = 3$); The same as below.

图 1 ABA 对 H₂O₂ 胁迫下侧柏叶片 H₂O₂ 和 MDA 含量的影响

Fig. 1 Effects of ABA on H₂O₂ and MDA contents of *P. orientalis* under H₂O₂ stress

2.2 外源 ABA 对侧柏叶片抗氧化酶和 GSH 含量的影响

通过测定侧柏幼苗叶片 SOD、POD 和 CAT 活性,从而评估 ABA 对侧柏幼苗的抗氧化酶活性的影响,结果见图 2a ~ c。100 mmol·L⁻¹ H₂O₂ 胁迫处理 6 h 提高了 SOD 活性,相较于 CK 提高 10.01 %,但差异不显著 ($P > 0.05$);之后这种上升趋势持续到 48 h,显著提高了 36.80 %,由此可知,侧柏在 0 ~ 48 h 胁迫过程中,其 SOD 活性是逐步升高的。正常条件下,0.5 和 200 μmol·L⁻¹ ABA 处理侧柏 6 和 48 h 均可显著提高 SOD 活性;而在 H₂O₂ 胁迫条件下施加不同浓度 ABA 处理 48 h,侧柏叶片 SOD 活性产生不同的响应。H₂O₂ + 0.5 ABA 处理显著提高了胁迫叶片的 SOD 活性,幅度为 12.30 %,而 H₂O₂ + 200 ABA 处理相较于 H₂O₂ 胁迫叶片降低了 28.57 %。100 mmol·L⁻¹ H₂O₂ 处理 6 和 48 h 导致侧柏叶片 POD 活性较对照 CK 下降,且 6 h 时两者之间差异显著 ($P < 0.05$)。正常条件外施 ABA 对 POD 活性的影响与 SOD 活性类似。H₂O₂ + 0.5 ABA 和 H₂O₂ + 200 ABA 处理 48 h 均显著增加了胁迫叶片的 POD 活性 ($P < 0.05$),但两者之间差异显著,低浓度 (0.5 μmol·L⁻¹) ABA 提高了 97.49 %,而高浓度 (200 μmol·L⁻¹) 则增加了 25.60 %。CAT 活性在 100 mmol·L⁻¹ H₂O₂ 处理 6 和 48 h 后分别较对照 CK 上升了 17.04 % 和 30.78 %,H₂O₂ + 0.5 ABA 处

理较 H₂O₂ + 200 ABA 能明显提高叶片 CAT 活性,6 和 48 h 后分别较对照 CK 上升了 29.40 % 和 8.80 %。通过以上分析说明,低浓度 0.5 μmol·L⁻¹ ABA 明显提高胁迫条件下侧柏叶片抗氧化酶活性,更有利于维持叶片活性氧产生和清除之间的动态平衡。

图 2d 显示,侧柏在正常条件下外施 0.5 和 200 μmol·L⁻¹ ABA,其 GSH 含量于 6 h 分别较对照 CK 显著增加了 16.10 % 和 9.59 %,之后这种趋势继续,至 48 h,分别显著提高 26.67 % 和 16.05 %;侧柏叶片 GSH 含量经单一 100 mmol·L⁻¹ H₂O₂ 处理后增加,分别较对照 CK 提高了 46.94 % 和 35.27 %,且 6 h 高于 48 h,随时间的延长有降低的趋势。而外施 0.5 和 200 μmol·L⁻¹ ABA 处理 48 h 在一定程度上致使 H₂O₂ 胁迫的侧柏叶片 GSH 含量产生不同响应,H₂O₂ + 0.5 ABA 处理进一步提高了胁迫叶片 GSH 含量,H₂O₂ + 200 ABA 处理相较于 H₂O₂ 胁迫则抑制了 GSH 的合成。

2.3 外源 ABA 对侧柏叶片渗透调节物质的影响

H₂O₂ 胁迫下侧柏幼苗外施不同浓度 ABA 的脯氨酸含量变化趋势见图 3a。正常条件下外施不同浓度 ABA 处理 6 h 后,此时脯氨酸含量与对照 CK 之间差异不显著;48 h 后,低浓度 0.5 μmol·L⁻¹ 显

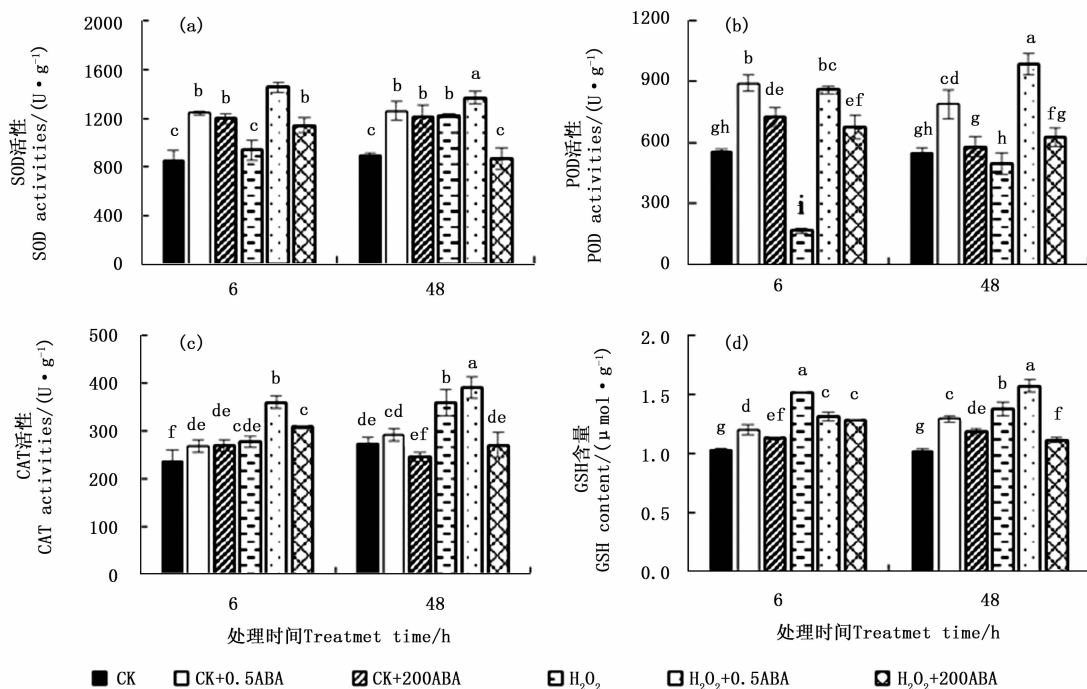


图2 ABA对 H_2O_2 胁迫下侧柏叶片抗氧化酶活性和GSH的影响

Fig. 2 Effects of ABA on superoxide (SOD), peroxidase (POD) and catalase (CAT) activities and GSH contents of *P. orientalis* under H_2O_2 stress

著提高了脯氨酸含量($P < 0.05$)。单一 H_2O_2 处理0~48 h,脯氨酸含量随着时间延长而逐步增加;48 h时, H_2O_2 胁迫与对照CK处理之间差异显著,提高了24.66%。 H_2O_2 +0.5ABA处理48 h提高胁迫叶片脯氨酸含量12.01%, H_2O_2 +200ABA处理则降低了10.95%,两者均与 $100\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ H_2O_2 胁迫处理间差异显著($P < 0.05$)。

图3b显示,侧柏叶片 $100\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ H_2O_2 处理6 h,胁迫叶片可溶性蛋白含量较对照CK差异不显著($P > 0.05$);处理48 h,可溶性蛋白含量较对照CK显著降低了26.53%;可溶性蛋白含量随着胁迫

时间(0~48 h)延长逐步下降, H_2O_2 抑制了可溶性蛋白的合成,加速其水解,导致含量下降。正常条件外施0.5和 $200\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ABA 6 h均可显著提高侧柏叶片的可溶性蛋白含量,48 h后, $200\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ABA处理的叶片可溶性蛋白含量有降低的趋势,与对照CK差异不显著($P > 0.05$)。0.5和 $200\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ABA处理6和48 h均能提高胁迫叶片可溶性蛋白含量,48 h后前者显著性提高了69.48%,后者与 H_2O_2 胁迫处理间差异不显著($P > 0.05$)。

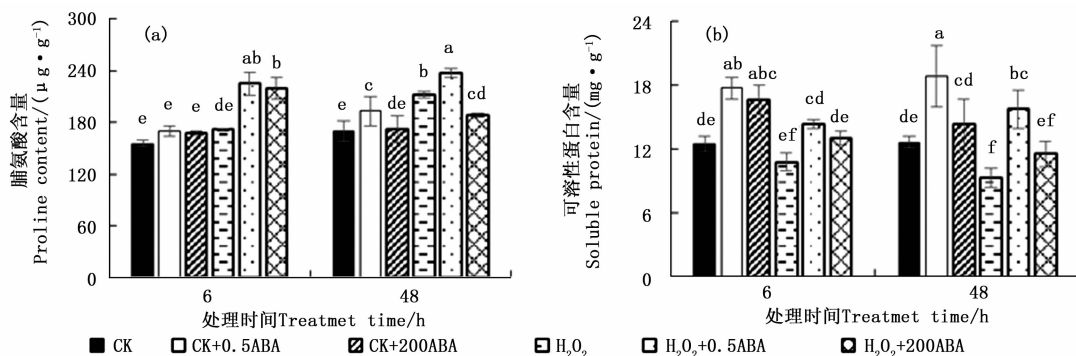


图3 ABA对 H_2O_2 胁迫下侧柏叶片 H_2O_2 和MDA含量的影响

Fig. 3 Effects of ABA on H_2O_2 and MDA contents of *P. orientalis* under H_2O_2 stress

2.4 外源 ABA 对侧柏叶片活性氧代谢相关基因表达的影响

图4显示,正常和100 mmol·L⁻¹ H₂O₂胁迫下外施0.5和200 μmol·L⁻¹的ABA致使侧柏幼苗叶片活性氧代谢相关基因 *Cu/Zn-SOD*、*CAT*、*GR*、*APX*、*MDAR* 和 *GST* 表达水平产生变化。正常条件下0.5 μmol·L⁻¹ ABA 处理的侧柏叶片中 *Cu/Zn-SOD*、*CAT*、*GR*、*APX*、*MDAR* 和 *GST* 表达水平相较于200 μmol·L⁻¹ ABA 处理有显著性提高($P < 0.05$),于6 h 分别较对照 CK 显著增加了2.87、0.98、1.15、1.00、0.98和2.96倍;处理48 h,分别提高3.82、1.98、3.84、2.03、3.68和5.94倍;侧柏幼苗响应

100 mmol·L⁻¹ H₂O₂ 胁迫,于48 h 其叶片活性氧代谢相关基因表达水平较对照 CK 均有显著性提高,且在0~48 h内,随着胁迫时间延长,活性氧代谢相关基因表达水平逐步增加。此外,由图4可知,相较于200 μmol·L⁻¹ ABA,0.5 μmol·L⁻¹ ABA 处理6和48 h 更有利于提高 H₂O₂ 胁迫条件下侧柏叶片活性氧代谢相关基因 *Cu/Zn-SOD*、*CAT*、*GR*、*APX*、*MDAR* 和 *GST* 的表达量。其中6 h 处理分别提高了0.79、1.34、0.98、0.07、0.30和-0.10倍;48 h 处理提高了0.69、0.24、0.83、0.11、0.32和0.18倍,且随着 H₂O₂ 胁迫时间(0~48 h)延长,这六个活性氧代谢相关基因表达水平显著提高($P < 0.05$)。

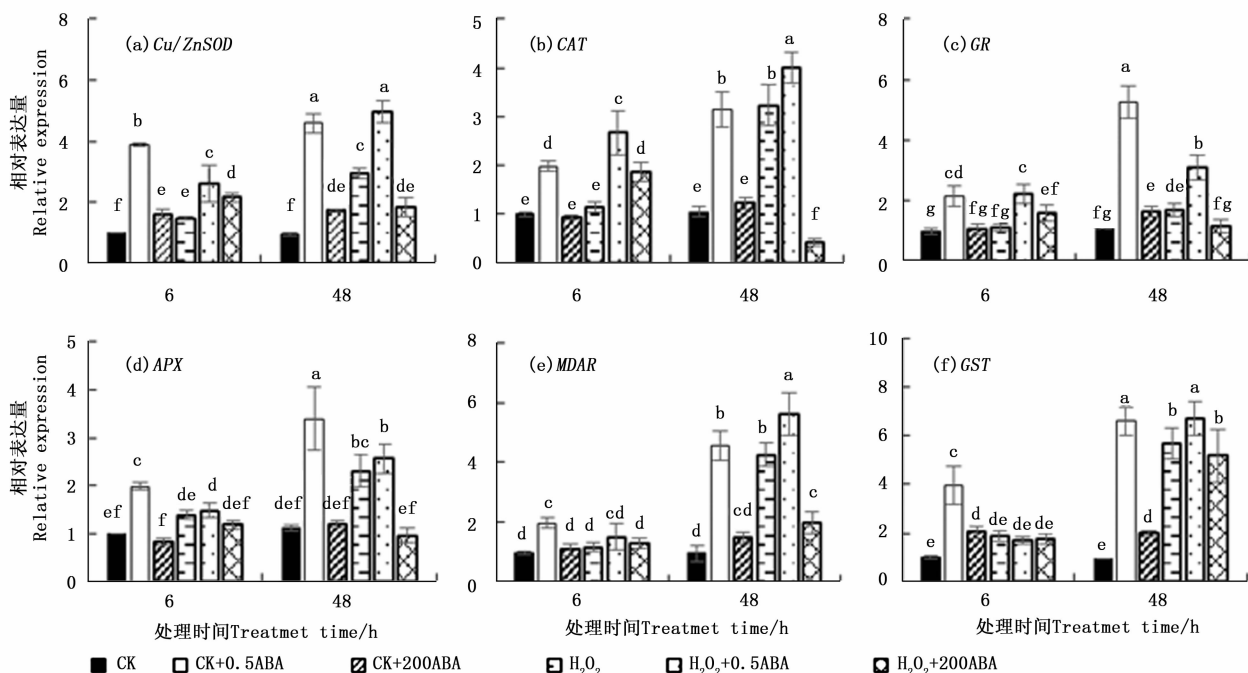


图4 ABA 对 H₂O₂ 胁迫下侧柏叶片 *Cu/Zn-SOD*、*CAT*、*GR*、*APX*、*MDAR* 和 *GST* 表达水平的影响

Fig. 4 Effects of ABA on expression levels of *Cu/Zn-SOD*、*CAT*、*GR*、*APX*、*MDAR* and *GST* of *P. orientalis* under H₂O₂ stress

3 讨论

3.1 高、低浓度 ABA 对侧柏叶片活性氧和膜脂过氧化的影响

许多植物已经发展了复杂的胁迫响应机制,改变它们的表型或生理特性来适应环境变化,但持续不利的环境状况均能诱使植物连续地产生 ROS,使得 ROS 的产生和清除之间的平衡关系被打破,从而引起了植物的氧化胁迫。高盐诱导氧化胁迫引起杨树^[26]和 水稻^[27]叶片中 H₂O₂ 增加,膜脂过氧化程度加剧,致使 MDA 含量增加;镉胁迫下姜叶片中 H₂O₂

和 MDA 增加^[28]。外源 ABA 可以有效地提高活性氧酶促清除系统活性,降低 ROS 积累和细胞膜脂质过氧化程度,保护膜完整性,从而缓解由氧化胁迫引起的植物损伤^[7,8]。外施 ABA 能够明显提高高粱^[29]和柑橘^[30]的耐盐性以及姜^[13]的抗旱性等。然而,所需的 ABA 浓度因植物种类的不同有很大差异。在本实验中,H₂O₂ 胁迫处理6和48 h 引起侧柏幼苗叶片 H₂O₂ 水平显著增加,致使膜脂过氧化作用,导致 MDA 含量明显升高;侧柏叶片中 H₂O₂ 和 MDA 含量随着胁迫时间(0~48 h)的延长而逐步增加;相较于200 μmol·L⁻¹ ABA,H₂O₂ 胁迫下侧柏幼

苗外施 $0.5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ABA 更有利于降低 H_2O_2 和 MDA 的积累(图 1)。

3.2 高、低浓度 ABA 对侧柏叶片抗氧化酶活性及其相关基因表达的影响

植物对短期氧化胁迫具有一定的适应性,短时间胁迫可诱导其抗氧化酶活性及相关基因表达上调。如豌豆^[31]和姜^[13]的 SOD、POD 和 CAT 活性;水稻叶片 *Cu/ZnSOD*、*MnSOD*、*APX* 和 *CAT* 基因^[32]、水稻 *OsAPX8*^[33]、穆子 *EcMDAR*^[34]、芦苇 *PhaGRC*^[35]。盐诱导氧化胁迫以及 ABA 处理均可引起白三叶草 *Cu/Zn-SOD*、*CAT*、*GR*、*APX* 和 *MDAR* 基因转录水平上调^[36]。本研究中,侧柏叶片中 SOD 和 CAT 活性经 H_2O_2 胁迫处理 48 h 后显著增加(图 2),表明侧柏幼苗对 48 h 短期胁迫具有一定的适应性,可能和 ROS 水平上升诱导活性氧清除酶基因的表达水平有关^[37]。而 POD 活性在 6 h 胁迫处理后相较于对照 CK 显著降低,随着胁迫时间延长至 48 h,其活性缓慢上升,与对照 CK 处理间差异不显著,; $100 \text{mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{H}_2\text{O}_2$ 处理 48 h 上调侧柏幼苗叶片 *Cu/Zn-SOD*、*CAT*、*GR*、*APX*、*MDAR* 和 *GST* 基因的表达水平(图 4)。目前研究表明,ABA 作为植物胁迫响应中的重要信使,能够通过提高 ROS 清除酶活性以及相关基因的表达来提高植物的抗氧化胁迫能力^[38-41],还能通过增加 GSH 含量来增强植物的抗氧化胁迫能力^[13]。如黄麻干旱胁迫 45 d,叶片中的 SOD 和 CAT 活性被抑制,外施 ABA 能够降低 H_2O_2 含量,提高植株活性氧清除酶 SOD 和 CAT 活性,缓解氧化胁迫^[42]。编码 ROS 清除酶基因的过量表达,如 *SOD*^[43]、*CAT*^[44]、*APX*^[45]、*MDAR*^[46]、*GR*^[47] 和 *GPX*^[48],能够通过降低氧化损伤提高植物对不同非生物胁迫抗逆性。本研究中,正常和 $100 \text{mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{H}_2\text{O}_2$ 侧柏幼苗外施 $0.5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ABA 均能进一步增加抗氧化酶 SOD、POD 和 CAT 活性(图 2);相较于 $200 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ABA,外施 $0.5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ABA 更能诱导这些基因的表达水平显著提高。胁迫条件下,随 $0.5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ABA 处理时间(0 ~ 48 h)的延长,*Cu/Zn-SOD*、*CAT*、*GR*、*APX*、*MDAR* 和 *GST* 基因的表达水平呈升高趋势,较 H_2O_2 胁迫均有不同程度上升(图 4)。

3.3 高、低浓度 ABA 对侧柏叶片渗透调节物质的影响

脯氨酸是在环境胁迫条件下积累在许多生物体中的一种重要的有机分子^[49]。一些研究人员认为

脯氨酸积累可能与胁迫程度^[50,51]或渗透调节^[52]有关;相反地,也有一些专家则认为这是胁迫损伤的症状而不是抗性指标^[53]。本研究中, H_2O_2 胁迫诱导侧柏叶片脯氨酸含量增加(图 3a),处理 48 h 的脯氨酸含量高于 6 h,随着胁迫时间的延长而增加,可能与其细胞渗透调节机制有关^[54],这与燕麦脯氨酸的研究趋势一致^[55]。 $100 \text{mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{H}_2\text{O}_2$ 胁迫下侧柏幼苗外施 $0.5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ABA 处理 48 h 相较于 $200 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$,脯氨酸水平显著性提高(图 3a),可能是因为低浓度 $0.5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ABA 更利于促进脯氨酸生物合成中相关酶的活性,延缓其降解,致使侧柏叶片脯氨酸的积累从而增强植株的渗透调节能力。这一情况同样出现在豆芽的研究中,即 Khadri 等^[56]指出低浓度的 ABA($1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)增加了普通豆芽中的脯氨酸积累,提高了对氧化胁迫的耐受性。另外,在研究中, H_2O_2 处理 0 ~ 48 h,侧柏叶片可溶性蛋白含量逐步下降;施加 $0.5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ABA 后明显提高侧柏叶片中可溶性蛋白含量, $200 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ABA 与胁迫处理差异不显著(图 3b),表明 $0.5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ABA 浓度更利于促进 H_2O_2 胁迫下侧柏蛋白合成。

4 结 论

H_2O_2 胁迫引起侧柏叶片 H_2O_2 水平显著增加,致使 MDA 含量明显升高;而侧柏叶片中 SOD 和 CAT 活性经 H_2O_2 胁迫处理 48 h 后显著增加,表明侧柏幼苗对短期胁迫具有一定的适应性,短期胁迫诱导抗氧化酶相关基因表达上调。正常和 H_2O_2 胁迫条件下的侧柏幼苗,相较于 $200 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ABA,外施低浓度 $0.5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ABA 均有利于维持叶片较高的抗氧化酶(SOD、POD 和 CAT)活性和抗氧化物 GSH 含量,降低 H_2O_2 和 MDA 积累,增强渗透调节能力,同时更能诱导抗氧化酶相关基因表达水平显著提高,表明外施 ABA 有利于提高抗氧化系统的防御能力,减弱幼苗的氧化胁迫和膜脂过氧化水平,保护细胞膜结构的完整,从而有效地缓解逆境胁迫对植物造成的氧化伤害。

参 考 文 献:

- [1] Møller I M, Jensen P E, Hansson A. Oxidative modifications to cellular components in plants [J]. *Annu Rev Plant Biol*, 2007, 58: 459 - 481.
- [2] Urao N, Ushio-Fukai M. Redox regulation of stem/progenitor cells and bone marrow niche [J]. *Free Radical Biology and Medicine*,

- 2013, 54: 26–39.
- [3] 蒋景龙, 李 丽, 徐 皓, 等. 山豆根系对 H₂O₂ 诱导氧化胁迫的生理应答[J]. 西北植物学报, 2014, 34(9): 1795–1800.
- [4] Wan X Y, Liu J Y. Comparative proteomics analysis reveals an intimate protein network provoked by hydrogen peroxide stress in rice seedling leaves [J]. *Molecular & Cellular Proteomics*. American Society for Biochemistry & Molecular Biology, 2008, 7:1469–1488.
- [5] Leung J, Giraudat J. Abscisic acid signal transduction [J]. *Annu Rev Plant Physiol*, 1998, 49: 199–222.
- [6] Nambara E, Marion-Poll A. Abscisic acid biosynthesis and catabolism [J]. *Annu Rev Plant Biol*, 2005, 56: 165–185.
- [7] Bray E A, Bailey-Serres J, Weretilnyk E. Responses to abiotic stresses [M]//Buchanan B, Gruissem W, Jones R (Eds.), *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*. American Society of Plant Physiologists, Rockville, 2000: 1158–1203.
- [8] Zhu J K. Salt and drought stress signaltransduction in plants [J]. *Annu Rev Plant Biol*, 2002, 53: 247–273.
- [9] Chater C C C, Oliver J, Casson S, *et al.* Putting the brakes on: abscisic acid as a central environmental regulator of stomatal development [J]. *New Phytol*, 2014, 202: 376–391.
- [10] 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, 23:18–30.
- [11] 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: 151–6.
- [12] Desikan R, Cheung M K, Bright J, *et al.* ABA, hydrogen peroxide and nitric oxide signalling in stomatal guard cells [J]. *J Exp Bot*, 2004, 55: 205–212.
- [13] 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.
- [14] 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): 2219–2227.
- [15] Aroca R, Vernieri P, Ruiz-Lozano J M. Mycorrhizal and non-mycorrhizal *Lactuca sativa* plants exhibit contrasting responses to exogenous ABA during drought stress and recovery [J]. *Journal of Experimental Botany*, 2008, 59: 2029–2041.
- [16] 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: 217–220.
- [17] Heath R L, Packer L. Photoperoxidation in isolated chloroplasts [J]. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 1968, 125: 189–198.
- [18] 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: 765–771.
- [19] 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: 1222–1227.
- [20] Jablonski P P, Anderson J W. Light-dependent reduction of dehydroascorbate by ruptured pea chloroplasts [J]. *Plant Physiol*, 1981, 67: 1239–1244.
- [21] Anderson J V, Chevone B I, HESS J L. Seasonal variation in the antioxidant system of eastern white pine needles [J]. *Plant Physiology*, 1992, 98:501–508.
- [22] Bates L S, Waldeen R P, TEARE I D. Rapid determination of free proline for water-stress studies [J]. *Plant and Soil*, 1973, 39:205–207.
- [23] 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: 248–254.
- [24] 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: e33278.
- [25] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-ΔΔCT} method [J]. *Methods*, 2001, 25: 402–408.
- [26] 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]. *Front Plant Sci*, 2015, 6. doi: 10.3389/fpls.2015.00678.
- [27] 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: 317–28.
- [28] 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.
- [29] Amzallag G N, Lerner H R, Poljakoff-Mayber A. Exogenous ABA as a modulator of the response of Sorghum to high salinity [J]. *J Exp Bot*, 1990, 41: 1529–1534.
- [30] Gómez-Cardenas A, Arbona V, Jacas J, *et al.* Abscisic acid reduces leaf abscission and increases salt tolerance in citrus plants [J]. *J Plant Growth Regul*, 2003, 21: 234–240.
- [31] 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: 257–268.
- [32] 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: 596–604.
- [33] 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]. *J Exp Bot*, 2007, 58: 3273–3283.
- [34] 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: 551–558.
- [35] Zhang X, Quan G, Wang J, *et al.* Functional validation of *Phrag-*

- mites communis* glutathione reductase (PhaGR) as an essential enzyme in salt tolerance [J]. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2015, 175: 3418 – 3430.
- [36] 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: 20939 – 20954.
- [37] Cuypers A, Plusquin M, Remans T, *et al.* Cadmium stress: an oxidative challenge [J]. *BioMetals*, 2010, 23: 927 – 940.
- [38] Bueno P, Piqueras A, Kurepa J, *et al.* Expression of antioxidant enzymes in response to abscisic acid and high osmoticum in tobacco BY 2 cell-cultures [J]. *Plant Sci*, 1998, 138: 27 – 34.
- [39] Gong M, Li Y J, Chen S Z. Abscisic acid-induced thermotolerance in maize seedlings is mediated by calcium and associated with antioxidant systems [J]. *J Plant Physiol*, 1998, 153: 488 – 496.
- [40] Guan L, Scandalios J G. Effects of the plant growth regulator abscisic acid and high osmoticum on the developmental expression of the maize catalase genes [J]. *Physiol Plant*, 1998b, 104: 413 – 422.
- [41] Guan L, Scandalios J G. Two structurally similar maize cytosolic superoxide dismutase genes, *Sod4* and *Sod4A*, respond differentially to abscisic acid and high osmoticum [J]. *Plant Physiol*, 1998a, 117: 217 – 224.
- [42] Chowdhury S R, Choudhuri M A. Effects of CaCl_2 and ABA on changes in H_2O_2 , metabolism in two jute species under water deficit stress [J]. *Journal of Plant Physiology*, 1989, 135: 179 – 183.
- [43] Prashanth S R, Sadhasivam V, Parida A. Overexpression of cytosolic copper/zinc superoxide dismutase from a mangrove plant *Avicennia marina* in indica Rice var Pusa Basmati-1 confers abiotic stress tolerance [J]. *Transgenic Res*, 2008, 17: 281 – 291.
- [44] Al-Taweel K, Iwaki T, Yabuta Y, *et al.* A bacterial transgene for catalase protects translation of dI protein during exposure of salt-stressed tobacco leaves to strong light [J]. *Plant Physiol*, 2007, 145: 258 – 265.
- [45] Kim Y H, Kim C Y, Song W K, *et al.* Overexpression of sweetpotato swpa4 peroxidase results in increased hydrogen peroxide production and enhances stress tolerance in tobacco [J]. *Planta*, 2008, 227: 867 – 881.
- [46] Etrayeb A E, Kawano N, Badawi G H, *et al.* Overexpression of monodehydroascorbate reductase in transgenic tobacco confers enhanced tolerance to ozone, salt and polyethylene glycol stresses [J]. *Planta*, 2007, 225: 1255 – 1264.
- [47] Kornyevev D, Logan B A, Payton P, *et al.* Elevated chloroplastic glutathione reductase activities decrease chilling-induced photoinhibition by increasing rates of photochemistry, but not thermal energy dissipation, in transgenic cotton [J]. *Funct Plant Biol*, 2003, 30: 101 – 110.
- [48] Gaber A, Yoshimura K, Yamamoto T, *et al.* Glutathione peroxidase-like protein of *Synechocystis* PCC 6803 confers tolerance to oxidative and environmental stresses in transgenic *Arabidopsis* [J]. *Physiol Plant*, 2006, 128: 251 – 262.
- [49] Sawahel W A, Hassan A H. Generation of transgenic wheat plants producing high levels of the osmoprotectant proline [J]. *Biotechnol Lett*, 2002, 24: 721 – 725.
- [50] Demiral T, Türkan I. Exogenous glycinebetaine affects growth and proline accumulation and retards senescence in two rice cultivars under NaCl stress [J]. *Environ Exp Bot*, 2006, 56: 72 – 79.
- [51] 相 昆, 徐 颖, 李国田, 等. 外源 NO 对低温胁迫下核桃幼苗活性氧代谢的影响 [J]. *林业科学*, 2016, 52 (1): 143 – 149.
- [52] Hien D T, Jacobs M, Angenon G, *et al.* Proline accumulation and 1-pyrroline-5-carboxylate synthetase gene properties in three rice cultivars differing in salinity and drought tolerance [J]. *Plant Sci*, 2003, 165: 1059 – 1068.
- [53] Bangyeekhun T, Chadchawan S, Boon-Long P. Salt tolerance induction in Thai soybean (*Glycine max* (L.) Merrill) by NaCl pretreatment [J]. *Thai J Agric Sci*, 2004, 37: 25 – 32.
- [54] 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.
- [55] 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): 1385 – 1393.
- [56] Khadri M, Tejera N A, Lluç C. Sodium chloride-ABA interaction in two common bean (*Phaseolus vulgaris*) cultivars differing in salinity tolerance [J]. *Environ Exp Bot*, 2007, 60: 211 – 218.

(责任编辑:张 研)