

NaCl 胁迫下星星草生理响应及分子机制的研究

王 雷, 吴丽丽, 曲跃军, 吕澈妍, 郑威, 姜廷波

(东北林业大学 林木遗传育种与生物技术教育部重点实验室, 黑龙江 哈尔滨 150040)

摘 要: 研究了星星草在 NaCl 持续胁迫过程中 POD、SOD、MDA、Pro 的变化情况。结果表明: SOD 活性随着胁迫时间的延长呈现先逐渐增强后逐渐减弱的趋势, 峰值出现在持续胁迫的第 6 天。而 POD 活性则呈现平稳增长的趋势, 但在胁迫处理的第 10 天骤然增加。在 NaCl 胁迫过程中, Pro 含量增加; MDA 含量除在持续胁迫的第 4 天高于对照外, 其余胁迫时间变化并不明显。利用 Real-time PCR 方法研究了 NaCl 胁迫下 CAT、DHAR、TRX 基因在转录水平上的表达情况, 结果显示 3 种基因的表达量均高于对照, 有效降低了活性氧对星星草的伤害。

关键词: 星星草; NaCl 胁迫; 生理响应; 基因表达

中图分类号: S 543⁺.9 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0009(2009)07-0023-03

盐胁迫对植物造成的伤害主要表现为渗透胁迫、离子毒害、活性氧的伤害等, 其中 Na^+ 、 Cl^- 的过量积累引起细胞失水, Na^+/K^+ 升高, 使细胞中的酶失活而引起植物代谢紊乱^[1]。耐盐植物通过提高体内渗透调节物质含量, 增强抗氧化酶系统活性抵御盐胁迫带来的伤害; 在分子水平上, 盐胁迫可使植物中一些基因的表达状况发生改变, 合成某些特异蛋白质以提高其抗性。不同的蛋白质发挥的功能不同, 如过氧化氢酶 (Catalase, CAT), 它可将 H_2O_2 迅速分解为 H_2O 和 O_2 , 是抗氧化酶系重要成员, 直接消除活性氧^[2]。脱氢抗坏血酸还原酶 (Dehydroascorbate reductase, DHAR), 可间接降低活性氧, 是抗坏血酸代谢途径的关键酶, 它的主要功能是将氧化型的脱氢抗坏血酸 (Dehydroascorbate, DHA) 转变为还原型的脱氢抗坏血酸 (ascorbate, ASC), 高效重复利用 AsA-GSH 循环, 有效清除 H_2O_2 ^[3]。硫氧还蛋白 (Thioredoxin, TRX) 在多种反应中通过可逆的二硫键和硫醇变化起氧化还原载体的作用, 是重要的酶活力调节蛋白, 间接消除活性氧^[4-5]。

星星草 (*Puccinellia tenuiflora*) 是禾本科碱茅属多年生草本植物, 在我国东北、内蒙古、华北、西北及青海均有分布。星星草具有较强的耐盐碱能力, 是生长在盐碱草地上具有较好饲用价值的草种之一。近年来关于星星草的研究主要集中在生理变化的研究^[6-7]或者是耐盐基因的克隆^[8], 鲜有将生理变化与耐盐基因表达情况

相结合的报道。该试验研究了 NaCl 持续胁迫下, 星星草体内 SOD、POD、Pro、MDA 的变化情况与胁迫时间的关系, 以及 CAT、DHAR、TRX 基因在转录水平上的表达变化; 探讨盐胁迫过程中植物内部各因素的变化规律及联系, 为进一步揭示盐胁迫下植物的内在反应机制提供依据和参考。

1 材料与方法

试验材料为星星草 [*Puccinellia tenuiflora* (Turcz.) Scribn. & Merr.]。星星草幼苗培养是以蛭石作为基质, 使用前将蛭石用自来水浸泡冲洗数次后, 再用蒸馏水浸泡冲洗 2 次, 置于营养钵中。将从温室大棚中取材的星星草 (根系长约 5 cm, 地上部分约为 10 cm) 栽种其中, 于人工气候室培养, 昼/夜温度为 26 °C/22 °C, 光照强度 14 klx, 光照 16 h · d⁻¹, 相对湿度约 75%, 每天浇注 1/2 Hogland 营养液。当星星草地上部分长至 30 cm 时, 将星星草分成对照组与处理组, 对照组浇 1/2 Hogland 营养液, 处理组用 1/2 Hogland 营养液中添加 400 mmol · L⁻¹ 的 NaCl 进行胁迫处理, 每组 6 盆 (6 次重复)。分别在处理的第 0、1、2、4、6、8、10 天取对照组与处理组的星星草叶片。

采用愈创木酚法测定 POD 活性, 氮蓝四唑 (NBT) 光化学还原法测定 SOD 活性, 用硫代巴比妥酸比色法测定丙二醛含量^[9], 利用碘基水杨酸法测定脯氨酸的含量^[10]。用 TRIZOL 法提取星星草总 RNA, 按照 Reverse Transcriptase M-MLV 进行反转录, 从该实验室已构建的星星草 cDNA 文库中得到 TRX、DHAR、CAT 基因序列^[11]并设计引物, 引物序列见表 1。用 SYBR Premix ExTaq 试剂盒 (购于大连宝生物公司) 进行 Real-Time PCR^[12-14]。试验所得数据利用 SPSS 11.0 统计软件进行单因素方差分析^[15]。

第一作者简介: 王雷 (1980-), 女, 博士, 研究方向为基因工程。E-mail: wleileyu@126.com。

通讯作者: 姜廷波 (1965-), 男, 教授, 研究方向为植物遗传育种与基因工程。

基金项目: 黑龙江省重点科技攻关资助项目 (GB06B303-5)。

收稿日期: 2010-01-10

表 1 荧光定量 PCR 引物序列

Table 1 The primer sequences of real time PCR

Gene	Primer sequence (5' to 3')
TRX gene	F: AGGAGGAATGCGTGATCG R: GTATTACTTCGCGATAAC
DHAR gene	F: GATCTTCCTCAACCTTGTGCG R: GCAGTACACACAGCCCTGC
CAT gene	F: CCAGCCTGGGAGAGGC R: GGCCTTGCTCTGAAAGCA
GAPDH gene	F: ATGAAGGACTGGAGAGGTG
(internal control)	R: GAGCTGTAACCCCATTCATTC

2 结果与分析

2.1 NaCl 胁迫对星星草 SOD 和 POD 活性的影响

结果显示(见图 1、2), NaCl 胁迫下, 星星草 SOD、POD 活性均高于对照, 但二者增强的趋势不同。随着胁迫时间的延长, SOD 活性呈现先逐渐增强后逐渐减弱的趋势, 但仍高于对照, 峰值出现在持续胁迫的第 6 天。POD 活性变化趋势与 SOD 不同, 在胁迫的第 1、2、4、6、8 天中, POD 活性变化并不明显, 只是略微高于对照, 但在持续胁迫的第 10 天, POD 活性极显著地高于对照($P<0.01$)。

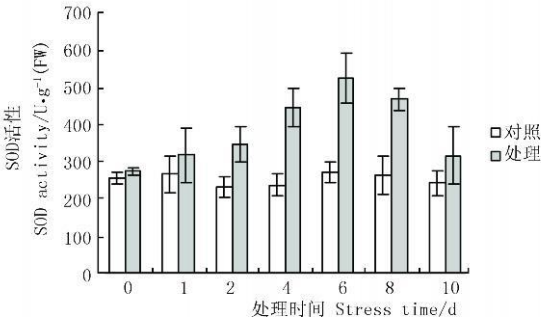


图 1 NaCl 胁迫对星星草 SOD 活性的影响

Fig. 1 SOD activity of *Puccinellia tenuiflora* under NaCl stress

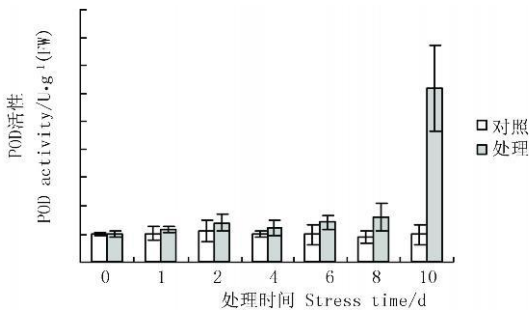


图 2 NaCl 胁迫对星星草 POD 活性的影响

Fig. 2 POD activity of *Puccinellia tenuiflora* under NaCl stress

2.2 NaCl 胁迫对星星草 Pro 和 MDA 含量的影响

由图 3 可见: 在 NaCl 持续胁迫下, 星星草体内 Pro 含量也表现出逐渐增加的趋势, 并且在 NaCl 持续胁迫的第 8 天, 处理组 Pro 含量极显著地高于对照($P<0.01$)。由图 4 可见, 在 NaCl 持续胁迫的第 4 天, MDA 含量极显著高于对照($P<0.01$), 这表明在 NaCl 持续胁迫的第 4 天, 活性氧对膜脂的伤害程度最严重。而在其它处理时间中处理组与对照组变化并不显著, 表明抗氧

化酶系统活性增强以及渗透调节物质含量增加, 有效缓解了活性氧对膜脂的伤害。

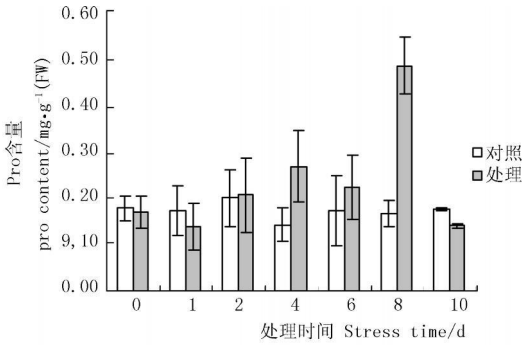


图 3 NaCl 胁迫对星星草 Pro 含量的影响

Fig. 3 Pro content of *Puccinellia tenuiflora* under NaCl stress

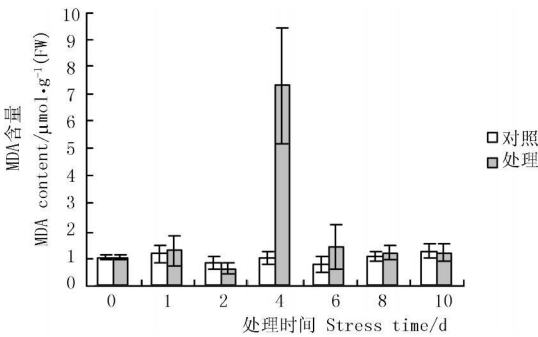


图 4 NaCl 胁迫对星星草 MDA 含量的影响

Fig. 4 MDA content of *Puccinellia tenuiflora* under NaCl stress

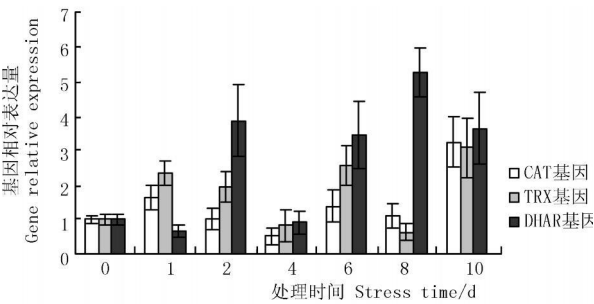


图 5 NaCl 胁迫下星星草 CAT、TRX、DHAR 基因的表达

Fig. 5 The expression of CAT, TRX and DHAR in *Puccinellia tenuiflora* under NaCl stress

2.3 NaCl 胁迫下星星草 CAT、TRX、DHAR 基因表达

由图 5 可见: 在 NaCl 胁迫下, 与抗氧化相关的 CAT、TRX、DHAR 基因表达量增加。其中 CAT 基因表达量的变化趋势与 POD 活性变化趋势类似, 都是在胁迫处理的前 8 天中变化不明显, 在胁迫处理的第 10 天极显著地高于对照($P<0.01$)。TRX 基因在持续胁迫的第 10 天表达量极显著高于对照($P<0.01$), DHAR 基因在持续胁迫的第 2、8、10 天表达量均极显著地高于对照($P<0.01$)。

3 讨论

盐胁迫下, 植物体内积累过多的活性氧(包括 O_2^- 、 H_2O_2 、 $^{\circ}OH$ 、 $^{\circ}O_2$), 耐盐植物抵抗盐胁迫、消除活性氧

的有效途径之一就是抗氧化酶类活性的增强。超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)和过氧化物酶(POD)是机体清除自由基的重要保护酶。NaCl胁迫下, 星星草 SOD、POD 活性均高于对照, 但二者增强的趋势不同。这是由于两种酶所发挥的功能不同。NaCl胁迫造成超氧阴离子自由基($O_2^{\cdot-}$)的积累, SOD 是植物体内第一个清除活性氧的关键酶^[19], 它将超氧阴离子自由基($O_2^{\cdot-}$)歧化为 H_2O_2 , 随着 $O_2^{\cdot-}$ 含量的由高变低, SOD 的活性也从增高逐渐降低。生成的 H_2O_2 通过 POD 分解为 H_2O 和 O_2 , 随着 H_2O_2 含量增加, POD 活性逐渐增强, 在胁迫第 10 天达到最大, 极显著地高于对照($P < 0.01$)。

Pro 是植物体中重要的渗透调节物质。在渗透或干旱胁迫下, 脯氨酸的累积可以增加酶的稳定性, 保护酶的活性, 防止质膜损伤, 保护多核糖体的正常功能, 同时 Pro 也是 $\cdot OH$ 的清除剂^[17-18]。Pro 含量增加对星星草体内渗透调节, 有效抵抗盐胁迫, 具有一定的意义。丙二醛(MDA)是膜脂过氧化最重要的产物之一, 其含量可以反映植物受逆境伤害的程度。在 NaCl 持续胁迫的第 4 天, MDA 含量极显著地高于对照, 此时 CAT、TRX、DHAR 基因表达量均低于对照, 表明在胁迫处理的第 4 天星星草受到胁迫伤害最严重, 同时推测膜脂的过氧化抑制了这 3 个基因的表达。CAT 基因表达量的变化趋势与 POD 活性变化趋势类似, 这是由于 POD 与 CAT 功能相近, 二者均为活性氧 H_2O_2 有效的清除剂, 随着胁迫时间的延长, 星星草体内积累大量的活性氧, POD 活性增强, CAT 基因表达量增加, 有效缓解了活性氧对植物体的伤害。

参考文献

- [1] Serrano R, Rodríguez P L. Plant genes and ions [J]. EMBO reports, 2002, 3(2): 116-119.
- [2] Havir E A, Mchale N A. Enhanced Peroxidative Activity in Specific Catalase Isozymes of Tobacco, Barley, and Maize [J]. Plant Physiology, 1989, 91: 812-815.

- [3] Chen Z, Gallie D R. The ascorbic acid redox state controls guard cell signaling and stomatal movement [J]. Plant Cell, 2004, 16: 1143-1162.
- [4] Santos CVD, Rey P. Plant thioredoxins are key actors in the oxidative stress response [J]. Trends in Plant Sci, 2006, 11(7): 329-334.
- [5] Baumann U, Jüttner J. Plant thioredoxins: the multiplicity conundrum [J]. Cellular and Molecular Life Sciences, 2002, 59: 1042-1057.
- [6] 孙国荣, 关晓, 阎秀峰. 盐胁迫对星星草幼苗保护酶系统的影响 [J]. 草地学报, 2001, 9(1): 34-38.
- [7] 尹尚军, 石德成, 颜宏. 碱胁迫下星星草的主要胁迫反应 [J]. 草业学报, 2003, 12(4): 51-57.
- [8] Wang Y C, Yang C P, Liu G F, et al. Microarray and suppression subtractive hybridization analyses of gene expression in *Puccinellia tenuiflora* after exposure to $NaHCO_3$ [J]. Plant Science, 2007, 173: 309-320.
- [9] 郝建军, 刘延吉. 植物生理学实验技术 [M]. 沈阳: 辽宁农业科学技术出版社, 2001: 71-73, 144-145, 180-181.
- [10] 张志良, 翟伟菁. 植物生理学实验指导 [M]. 北京: 高等教育出版社, 2003: 258-259.
- [11] Wang Y C, Chu Y G, Liu G F, et al. Identification of expressed sequence tags in an alkali grass (*Puccinellia tenuiflora*) cDNA library [J]. J Plant Physiol, 2007, 164: 78-89.
- [12] Marino J H, Cook P, Miller K S. Accurate and statistically verified quantification of relative mRNA abundances using SYBR Green I and real-time RT-PCR [J]. J Immun Methods, 2003, 283: 291-306.
- [13] Wang Y M, Zhu W, Levy D E. Nuclear and cytoplasmic mRNA quantification by SYBR green based real-time RT-PCR [J]. Methods, 2006, 39: 56-362.
- [14] Bustin S A. Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problem [J]. J Mol Endocrinology, 2002, 29: 23-39.
- [15] 林杰斌, 陈湘, 刘明德. SPSS11.0 统计分析实务设计宝典 [M]. 北京: 中国铁道出版社, 2002: 245-248.
- [16] Alscher R G, Erturk N, Heath L S. Role of superoxide dismutase (SODs) in controlling oxidative stress in plants [J]. J Experimental Botany, 2002, 53(372): 1331-1341.
- [17] Silveira J A G, Viegas R A, Rocha I M A, et al. Proline accumulation and glutamine synthetase activity are increased by salt-induced proteolysis in cashew leaves [J]. J Plant Physiol, 2003, 160: 115-123.
- [18] Verbruggen N, Hermans C. Proline accumulation in plants: a review [J]. Amino Acids, 2008, 35: 753-759.

Physiological Response and Molecular Mechanism of *Puccinellia tenuiflora* under NaCl Stress

WANG Lei, WU Li-li, QU Yue-jun, LV Che-yan, ZHENG Wei, JIANG Ting-bo

(Key Laboratory of Forest Tree Genetic Improvement and Biotechnology of Ministry of Education, Northeast Forest University, Harbin, Heilongjiang 150040)

Abstract: The changes of POD, SOD, MDA and Pro in *Puccinellia tenuiflora* were investigated under NaCl stress. The results showed that SOD activity was enhanced gradually, and then weakened. The peak value of SOD was appeared at the 6th day under NaCl stress. The POD activity showed a steady growth trend, but increased rapidly at the 10th day. The proline content was higher than the control. Besides that MDA content at the 4th day was higher than control, MDA content was no significant differences with control during other days. Real-Time PCR demonstrated that the transcript level of CAT, DHAR, TRX was higher than the control. The expression of these genes played an important role in preventing ROS harm to *Puccinellia tenuiflora*.

Key words: *Puccinellia tenuiflora*; NaCl stress; physiological response; gene expression