

外源褪黑素对低温胁迫下油菜幼苗抗寒性的影响

史中飞,梁娟红,张小花,成宏斌,郑 晟,王 娟,张腾国

(西北师范大学生命科学学院,甘肃 兰州 730070)

摘 要:为了研究褪黑素(MT)对低温胁迫下油菜幼苗抗性的影响,以白菜型油菜“陇油 6 号”为试验材料,研究了外源 MT 对低温胁迫下黄瓜幼苗丙二醛(MDA)含量、相对电导率、叶绿素含量、活性氧(ROS)含量、抗氧化酶活性和 *MAPK3*、*MAPK4*、*MAPK6* 基因表达的影响。结果显示:与单独的 4℃ 胁迫处理相比,100 μmol · L⁻¹ 褪黑素预处理后再进行低温胁迫处理不同的时间(12、24、36、48 h),油菜幼苗 MDA 含量、相对电导率和 ROS 含量均显著降低,其中 MDA 和相对电导率分别降低了 14.3%、15.0%、17.2%、20.0% 和 11.5%、12.8%、16.2%、15.1%,而叶绿素含量、三种抗氧化酶活性(CAT、POD、SOD)和 *MAPK3*、*MAPK4*、*MAPK6* 基因表达均增加,其中 CAT 的活性分别增加 28.5%、23.1%、7.6%、13.1%,POD 和 SOD 的活性分别增加 36.0%、25.3%、5.9%、18.7% 和 14.6%、18.6%、9.1%、13.6%。表明低温胁迫下,100 μmol · L⁻¹ 外源 MT 预处理可以显著降低油菜幼苗 MDA 含量、ROS 水平和电解质的渗漏,增加叶绿素含量和抗氧化酶系统的活性,诱导 *MAPK3*、*MAPK4*、*MAPK6* 基因表达,降低质膜过氧化水平,保持细胞膜的完整性,增强油菜幼苗对低温的适应性。

关键词:白菜型油菜;褪黑素;低温胁迫;抗氧化酶;*MAPKs* 基因表达

中图分类号:S565.4 **文献标志码:**A

Effect of exogenous melatonin on cold resistance of *Brassica rapa* seedlings under low temperature stress

SHI Zhong-fei, LIANG Juan-hong, ZHANG Xiao-hua, CHENG Hong-bing,
ZHENG Sheng, WANG Juan, ZHANG Teng-guo

(School of Life Sciences, Northwest Normal University, Lanzhou, Gansu 730070, China)

Abstract: The objective of this study was to investigate the effects of melatonin (MT) on the resistance of *Brassica rapa* seedlings under low temperature stress. In this study, *Brassica rapa* “Longyou 6” was used as experimental material. The effects of exogenous MT on the relative conductivity, chlorophyll content, ROS content, antioxidant enzyme activity, and the expression of *MAPK3*, *MAPK4*, and *MAPK6* genes of leaves in *Brassica rapa* under low temperature stress were investigated. The results showed that compared with 4 °C stress treatment alone, under 100 μmol · L⁻¹ MT pretreatment then treated with low temperature stress for different time (12, 24, 36, 48 h), the MDA content, relative conductivity and ROS content in *Brassica rapa* seedlings significantly decreased, MDA and relative conductivity were reduced by 14.3%, 15.0%, 17.2%, 20.0% and 11.5%, 12.8%, 16.2%, 15.1%, respectively, but chlorophyll content, three antioxidant enzyme activities (CAT, POD, SOD) and *MAPK3*, *MAPK4*, *MAPK6* genes expression all increased by low temperature stress, the activity of CAT increased by 28.5%, 23.1%, 7.6%, and 13.1%, respectively, and the activities of POD and SOD increased by 36.0%, 25.3%, 5.9%, 18.7%, and 14.6%, 18.6%, 9.1%, 13.6%, respectively. So, we concluded that 100 μmol · L⁻¹ exogenous MT pretreatment could significantly decreased the MDA content, reactive oxygen species (ROS) level, and electrolyte leakage, but increased chlorophyll content and activities of antioxidant system enzymes (CAT, POD and SOD), as induced *MAPK3*, *MAPK4*, and *MAPK6* gene expression, decreased the membrane lipid peroxida-

tion, maintained membrane integrity, and improved the adaptability of *Brassica rape* seedlings under low temperature stress.

Keywords: *Brassica rapa*; melatonin; low temperature stress; antioxidant enzyme; *MAPKs* gene expression

植物在自然环境中生长会受到各种非生物胁迫的影响。在植物应对低温胁迫的过程中可以发生多种生理代谢和生化分子的变化,如过氧化氢、超氧阴离子和羟自由基等活性氧(ROS)的大量积累,而 ROS 的积累能够导致脂质的过氧化和细胞内蛋白质的氧化,抑制植物的正常生长发育^[1]。因此,植物为了防止 ROS 引起的氧化损伤,进化出一系列复杂的抗氧化系统,包括超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化物酶(POD)、过氧化氢酶(CAT)等抗氧化酶系统和谷胱甘肽、脯氨酸等非酶抗氧化剂,它们可以直接参与 ROS 的反应,也可作为酶的反应底物,参与 ROS 信号诱导的其他反应^[2]。

植物为了应对各种非生物胁迫,也进化出了一系列复杂的调控机制,包括蛋白磷酸化激酶的激活,如丝裂原活化蛋白激酶(Mitogen-activated protein kinase, MAPKs)和钙依赖性蛋白激酶(CDPKs)的磷酸化激活,参与植物对各种非生物胁迫的响应。MAPK 级联途径由三种连续作用的蛋白激酶组成:即 MAPKK 激酶(MAPKKK)、MAPK 激酶(MAPKK)和 MAPK。当细胞外刺激被胞膜受体识别,MAPKKK 首先被磷酸化激活,然后 MAPKKK 磷酸化激活 MAPKK,MAPKK 进一步使 MAPK 磷酸化激活,活化的 MAPK 可以与其他信号分子相互作用并激活特定的下游靶标,例如转录因子和其他功能性蛋白质,导致信号的响应^[3]。越来越多的研究表明,MAPK 级联途径在植物响应干旱、盐、低温等非生物胁迫方面起不可或缺的调节作用。在拟南芥中,研究最多的 *MAPKs* 包括 *AtMAPK3*、*AtMAPK4* 和 *AtMAPK6*,受低温、盐和机械损伤的诱导^[4]。水稻中,OsMKK6 和 OsMPK3 能构成中度低温信号传导途径并调节水稻对冷胁迫的耐受性;过表达 *OsMAPK5* 株系表现出 OsMAPK5 激酶活性和对干旱、盐、冷胁迫的耐受性增加,表明 *OsMAPK5* 基因可以正向调节水稻对干旱、盐和低温的耐受性^[6]。棉花的研究表明, GhMPK2 的过表达降低了 ABA 的敏感性,增强了转基因烟草植株对盐和干旱胁迫的耐受性^[7]。

褪黑素(N-乙酰基-5-甲氧基色胺, Melatonin, MT)是一种吲哚类色胺,是由松果体合成的一种小分子激素,广泛存在于动物和人体内,1993 年首次在日本牵牛花(*Pharbitis nil*)中被发现^[8],随着人们不断地研究表明,褪黑素也普遍存在于其它高等植

物之中,并在植物生长、发育中具有多种生理功能,如调节昼夜节律、花形态发育、促进叶绿素合成和提高植物的光合作用等^[9]。植物中褪黑素的另一主要功能是充当活性氧(ROS)清除剂,作为抵御植物内部和环境氧化应激的第一道防线^[10],研究表明,外源施用或内源诱导的褪黑激素能够增强植物对盐、寒冷、干旱等非生物胁迫的抗性,并能延缓叶片衰老^[11]。赵小红^[12]等对黄瓜的研究表明,在低温胁迫下,适宜浓度的外源 MT 处理能够提高 SOD、POD、CAT 的活性和脯氨酸的含量,降低相对电导率和 MDA 的含量,增强黄瓜幼苗的抗性,缓解低温给黄瓜幼苗带来的伤害。吴雪霞^[13]等研究发现,外源 MT 能够增强低温胁迫下茄子幼苗的光合作用以及清除活性氧的能力,减缓低温胁迫的危害,提高茄子幼苗对低温胁迫的耐性;此外,对玉米^[14]、苕蓝^[15]的研究也表明褪黑素具有缓解低温冷害的作用,而在油菜(*Brassica rapa*)方面的研究鲜见报道。

我国北方寒旱区地域辽阔广袤,但冬春低温严寒,冬茬农作物越冬十分困难,油菜作为我国重要的油料作物,在北方地区推广冬油菜种植不但可以增产油料,也可以增加北方冬季土地覆盖率、改善生态环境等。本研究以白菜型冬油菜品种陇油 6 号为试验材料,用 $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ MT 预处理后再进行 4°C 低温处理不同的时间,研究其对丙二醛含量、相对电导率、叶绿素含量、ROS 含量、抗氧化酶活性和 *MAPK3*、*MAPK4*、*MAPK6* 基因表达的影响,分析外源 MT 对低温胁迫下油菜幼苗抗性的影响,为深入研究 MT 在植物中的生物学功能提供理论参考。

1 材料与方法

1.1 材料培养与处理

白菜型冬油菜陇油 6 号种子由甘肃农业大学提供,将购自上海森科农业生物技术公司的进口丹麦品氏草炭土与蛭石按 2:1 的比例搅拌均匀,装入小四方花盆中,用含有 $0.05 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 艾美乐杀虫剂的 1/8 MS 营养液完全浸透,挑选颗粒饱满且经 1% NaClO 消毒的陇油 6 号种子,播种到花盆中,每盆 6~8 粒,置于 25°C 恒温、14 h/10 h(光照/黑暗)、 $250 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 的光照培养室培养,培养 30 d 左右后进行以下实验处理:(1) 4°C 低温处理:挑选生长良好的油菜幼苗浇灌 1/8 MS 营养液预处理 24 h

后,转入 4℃ 低温培养箱培养,并于不同时间点(0、12、24、36、48 h)取样,测定相关生理指标,并取胁迫处理 24 h 的幼苗叶片提取总 RNA,用于基因的表达分析;(2)褪黑素预处理后再低温处理:用含有 100 μmol · L⁻¹ MT 的 1/8 MS 营养液预处理生长良好的油菜幼苗 24 h 后,在 4℃ 低温培养箱培养处理不同时间段(0、12、24、36 h 和 48 h)后测定生理指标,并取胁迫处理 24 h 的幼苗叶片提取总 RNA,用于基因的表达分析;(3)对照(CK):油菜幼苗浇灌等量 1/8 MS 营养液,25℃ 恒温培养,单独的 MT 处理:油菜幼苗浇灌等量含有 100 μmol · L⁻¹ MT 的 1/8 MS 营养液,25℃ 恒温培养。

1.2 试验方法

1.2.1 生理指标的测定 丙二醛、相对电导率、超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化物酶(POD)、过氧化氢酶(CAT)的测定均参照李合生^[16]的方法,叶绿素含量采用直接浸提法^[17]测定,每个指标做 3 个生物学重复。

1.2.2 DAB 和 NBT 组织染色 用 NBT 染色和 DAB 染色分别检测待测叶片中的 O₂⁻ 和 H₂O₂。DAB 染色^[18](方法稍作修改):将 DAB-4HCl 溶于 10 mmol · L⁻¹ phosphate buffer(pH 7.0)中,最终浓度为 1 mg · mL⁻¹;将叶片浸泡其中过夜后,将其放入 25℃ 光照培养箱中,光照 1~3 h,染色结束后进行脱绿。NBT 染色^[19]:将 NBT 溶于 ddH₂O 中,最终浓度为

0.5 mg · mL⁻¹,将叶片浸泡其中过夜染色。脱绿:将叶片放入乳酸:甘油:乙醇=1:1:3 的混合溶液中水浴,煮沸 10 min 脱去叶绿素,煮沸脱绿后的叶片放入乳酸:甘油:乙醇=1:1:3 的混合溶液中保存并用体视显微镜拍照,Image J 软件计算染色面积分数和相对灰度分析。

1.2.3 实时荧光定量 PCR 分析 *MAPK3*、*MAPK4*、*MAPK6* 基因表达 提取实验处理后陇油 6 号叶片的总 RNA,反转录成 cDNA 后,以 ActinF、ActinR 为管家基因引物,MAPK3-F、MAPK3-R 为 MAPK3 引物,MAPK4-F、MAPK4-R 为 MAPK4 引物,MAPK5-F、MAPK5-R 为 MAPK5 引物(表 1),依据 TaKaRa 公司 SYBR Premix Ex TaqTM 试剂盒用 25 μL 反应体系进行定量检测,每个样品做 3 个重复。定量反应体系为:SYBR Premix Ex TaqTM 12.5 μL,上、下游引物各 1 μL,cDNA 模板 2 μL,ddH₂O 8.5 μL。反应程序为:95℃ 预变性 30 s;95℃ 变性 5 s,60℃ 退火 20 s,40 次循环;55℃~95℃ 每 30 s 升高 0.5℃,81 个循环。每个样品均重复 3 次,采用 2^{-ΔCt}法分析基因的相对表达量。

1.3 数据处理与分析

用 SPSS 20.0 软件进行统计分析,Image J 软件计算染色面积分数和相对灰度分析,Oringin 9.0 软件作图。

表 1 实时荧光定量 PCR 引物

Table 1 Quantitative real-time PCR sequences

基因 Gene	引物 Primer	碱基序列 Sequence(5' to 3')	注释 Note
<i>Actin</i>	Actin-F	TGTGCCAATCTACGAGGGTTT	实时荧光定量 PCR 引物 Quantitative real-time PCR
	Actin-R	TTTCCCGCTCTGCTGTGT	实时荧光定量 PCR 引物 Quantitative real-time PCR
<i>BrMPK3</i>	MPK3-F	CACGGAGGACAGTTCATAAGCTAC	实时荧光定量 PCR 引物 Quantitative real-time PCR
	MPK3-R	TCCAACACAGAGCAAACGATG	实时荧光定量 PCR 引物 Quantitative real-time PCR
<i>BrMPK4</i>	MPK4-F	AGCAGACGCATCACTGTTGA	实时荧光定量 PCR 引物 Quantitative real-time PCR
	MPK4-R	ATTGAACGGCTCACACACA	实时荧光定量 PCR 引物 Quantitative real-time PCR
<i>BrMPK6</i>	MPK6-F	TCATACGCTCTAACCAAGGCTTATC	实时荧光定量 PCR 引物 Quantitative real-time PCR
	MPK6-R	AAGAGGAGGTTGCTCGGTTTC	实时荧光定量 PCR 引物 Quantitative real-time PCR

2 结果与分析

2.1 外源褪黑素对低温胁迫下油菜幼苗 MDA 含量的影响

由图 1 可以看出,与对照(0 h)相比,单独的低温胁迫处理油菜幼苗不同时间(12、24、36、48 h),油菜幼苗 MDA 含量呈先上升后下将的趋势,但均高于对照;用褪黑素预处理后再进行低温处理 12、24、36、48 h,与单独的低温胁迫处理相比,MDA 含量分别降低了14.3%、15.0%、17.2%和 20.0%,表明褪黑素预处理能够降低油菜幼苗 MDA 的含量,缓解低温胁迫下油菜幼苗的膜脂过氧化作用。

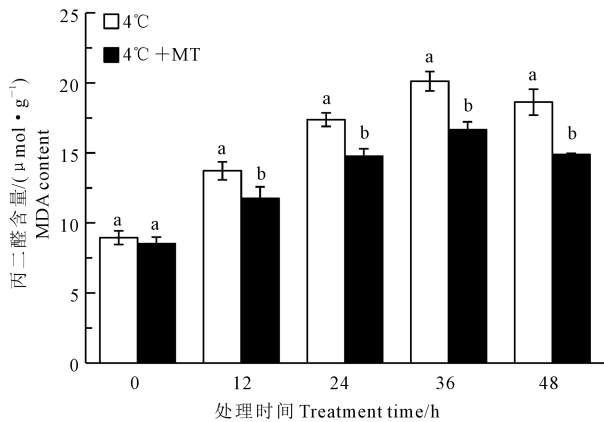
2.2 外源褪黑素对低温胁迫下油菜幼苗相对电导率的影响

如图 2 所示,低温胁迫处理不同的时间,油菜幼苗相对电导率与对照(0 h)相比,呈先上升后下将的趋势,但均高于对照;与单独的 4℃ 处理相比,用褪黑素预处理后再进行低温处理(12、24、36、48 h),油菜幼苗相对电导率分别降低 11.5%、12.8%、16.2%、15.1%,且差异达到显著水平,表明褪黑素预处理能够抑制低温胁迫下油菜幼苗相对电解质的渗漏。

2.3 外源褪黑素对低温胁迫下油菜幼苗叶绿素的影响

由图 3 可以看出,与对照(0 h)相比,单独的低

温胁迫处理下油菜幼苗的叶绿素 a、叶绿素 b 和总叶绿素含量均随处理时间的增长呈下降趋势;与单独的 4℃ 处理相比,用褪黑素预处理后再进行低温处理 (12、24、36、48 h),其中叶绿素 a 分别增长 5.2%、9.0%、18.7%、20.7%,叶绿素 b 分别增长 4.6%、11.0%、15.5%、19.1%,总叶绿素分别增长 5.0%、9.5%、17.6%、20.3%,表明外源褪黑素可以缓解低温胁迫下叶绿素的降解。



注:同一处理时间不同字母表示两种不同处理 (4℃、4℃ + MT) 之间差异显著 ($P<0.05$),下同。
Note: Different letters at the same processing time indicate significant difference ($P<0.05$) between the two different treatments (4℃, 4℃ + MT), the same below.

图 1 外源褪黑素对低温胁迫下油菜 MDA 含量的影响
Fig.1 Effects of exogenous melatonin on MDA content in *Brassica rapa* under low temperature stress

2.4 外源褪黑素对低温胁迫下油菜幼苗活性氧 (ROS) 的影响

低温胁迫处理不同时间,油菜幼苗体内的 H_2O_2 和 O_2^- 含量都呈上升趋势;与单独的 4℃ 处理相比,用褪黑素预处理后再进行低温胁迫处理 (12、24、36、48 h),油菜幼苗体内的 O_2^- 含量面积分数分别下降 37.4%、47.4%、23.9%、40.1%, H_2O_2 含量相对灰度分别下降 51.3%、45.0%、43.3%、25.0% (图 4),表明外源褪黑素能够抑制低温胁迫下 H_2O_2 和 O_2^- 的积累,缓解低温胁迫下油菜幼苗的氧化损伤。

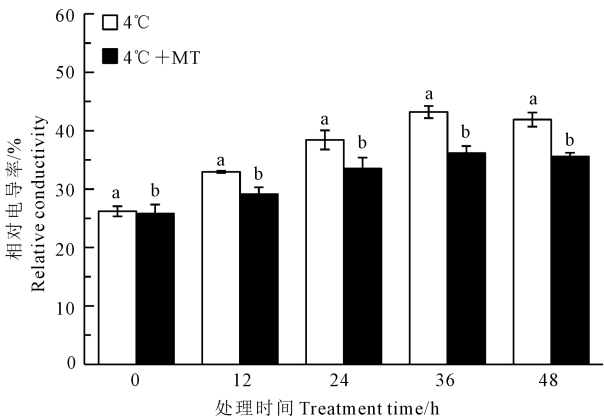


图 2 外源褪黑素对低温胁迫下油菜相对电导率的影响

Fig.2 Effects of exogenous melatonin on relative conductivity in *Brassica rapa* under low temperature stress

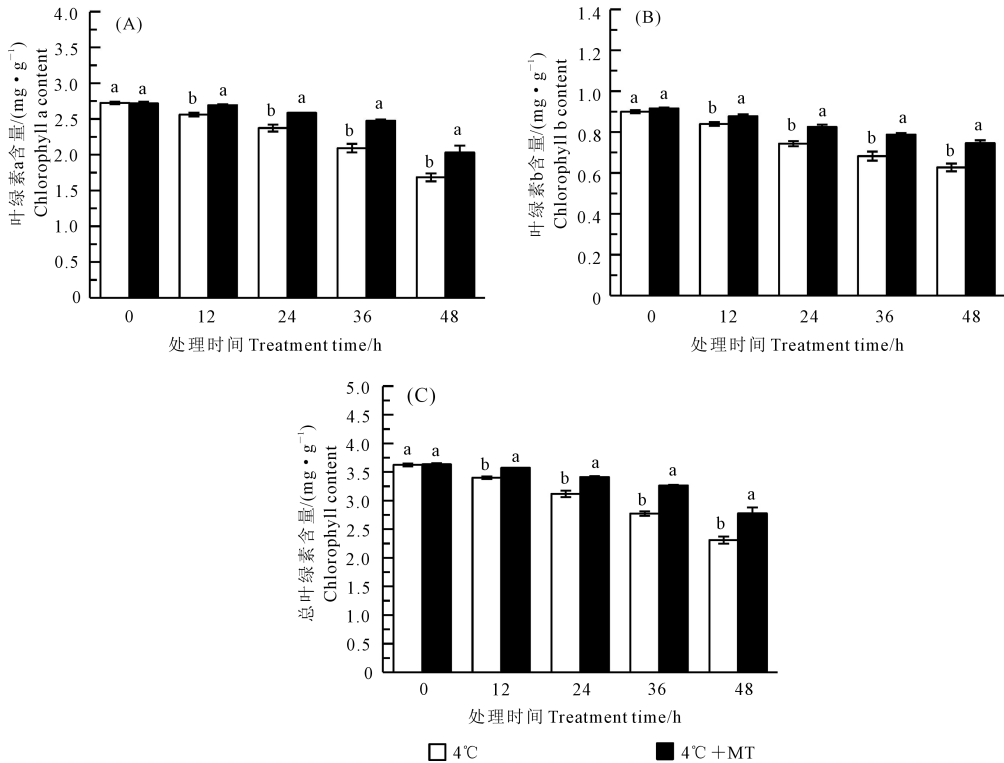
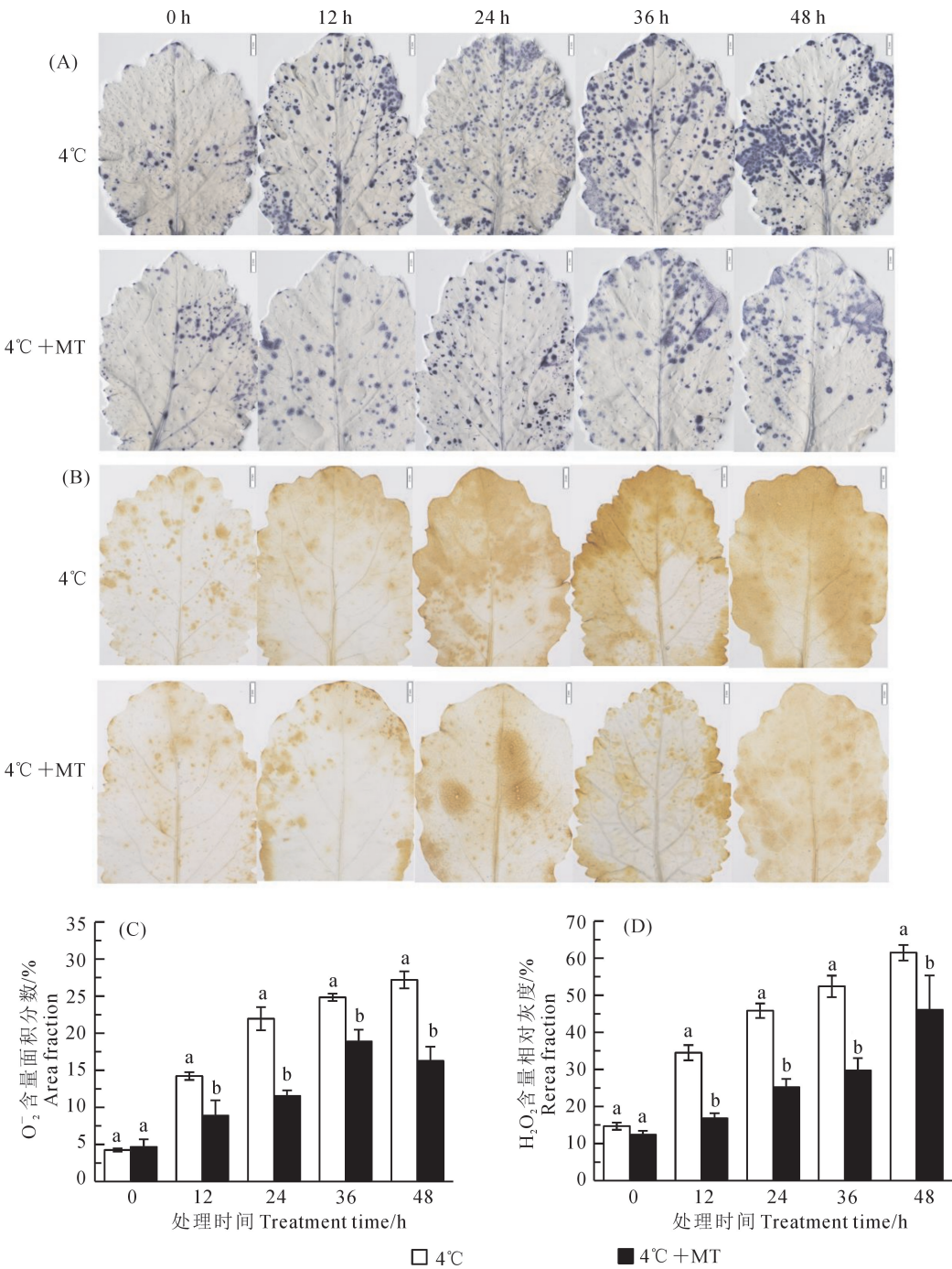


图 3 外源褪黑素对低温胁迫下油菜叶绿素含量的影响

Fig.3 Effects of exogenous melatonin on chorophyll content in *Brassica rapa* under low temperature stress



A: NBT 染色;B: DAB 染色;C: NBT 染色面积分数;D: DAB 染色相对灰度
A: NBT staining;B: DAB staining;C: NBT staining area fraction;D: DAB staining relativegray
图 4 外源褪黑素对低温胁迫下油菜活性养(ROS)的影响
Fig.4 Effects of exogenous melatonin on ROS in *Brassica rapa* under low temperature stress

2.5 外源褪黑素对低温胁迫下油菜幼苗抗氧化酶活性的影响

由图 5 可以看出,与对照相比,单独的低温胁迫处理不同的时间,油菜幼苗体内 CAT、POD、SOD 酶活性均呈先增加后降低的趋势;与单独的 4℃胁迫处理相比,用褪黑素预处理后再进行不同时间的低温胁迫处理(12、24、36、48 h),CAT 的活性分别增加

28.5%、23.1%、7.6%、13.1%,POD 的活性分别增加 36.0%、25.3%、5.9%、18.7%,SOD 的活性分别增加 14.6%、18.6%、9.1%、13.6%,表明褪黑素预处理能够增强低温胁迫下油菜幼苗 CAT、POD、SOD 酶的活性。
2.6 外源褪黑素对低温胁迫下油菜 MAPK3、MAPK4、MAPK6 基因表达的影响
MAPK 激酶级联途径在植物抵御非生物胁迫信

号传导过程中发挥着重要的作用,拟南芥中 *At-MAPK3*、*AtMAPK4* 和 *AtMAPK6* 基因表达受到逆境胁迫的诱导。为了探讨 MAP 激酶级联途径是否参与油菜中褪黑素诱导的耐寒性过程,对油菜 *MAPK3*、*MAPK4*、*MAPK6* 在 4℃、MT、4℃+MT 处理 24 h 后的表达情况进行了分析,结果表明(图 6),与照相比,低温胁迫能够诱导 *MAPK3*、*MAPK4*、*MAPK6* 基因表达上调,且 *MAPK3*、*MAPK6* 基因达到显著水平,用褪

黑素预处理后再进行低温胁迫处理, *MAPK3*、*MAPK4*、*MAPK6* 基因表达均高于单独的低温胁迫,表明 *MAPK3*、*MAPK4*、*MAPK6* 基因均能响应低温胁迫,但 *MAPK3*、*MAPK6* 基因比 *MAPK4* 基因对低温胁迫更敏感,外源使用褪黑素能够诱导低温胁迫下 *MAPK3*、*MAPK4*、*MAPK6* 基因表达上调,且不同基因的响应程度存在差异。

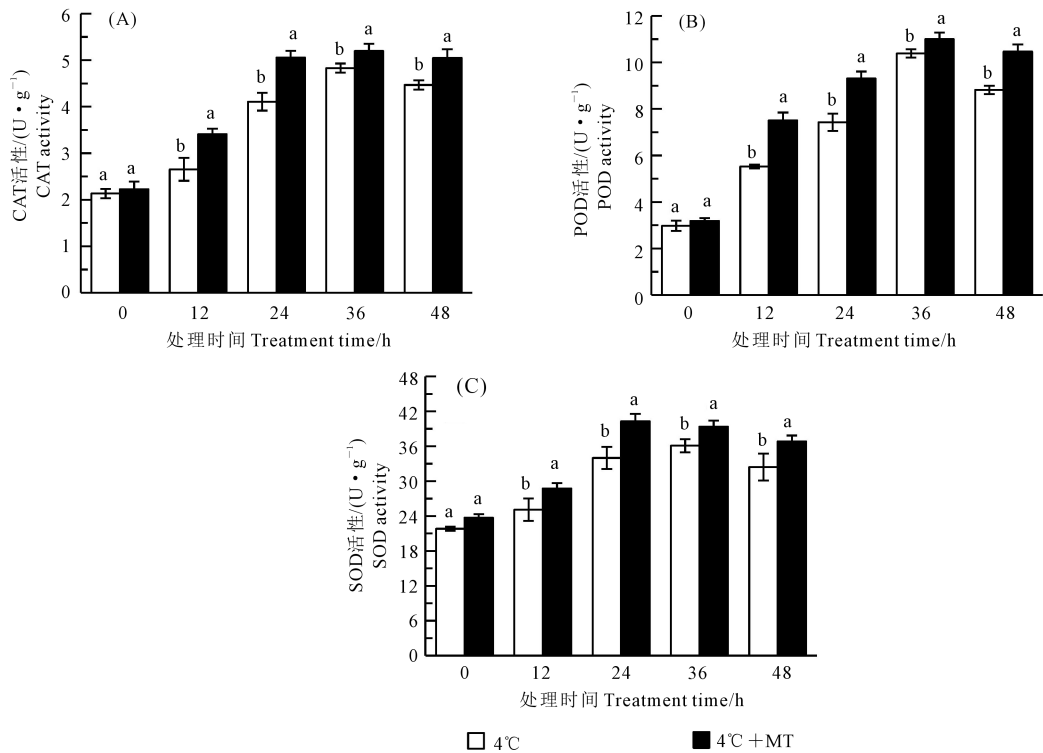


图 5 外源褪黑素对低温胁迫下油菜抗氧化酶活性的影响

Fig.5 Effects of exogenous melatonin on antioxidant enzyme activity in *Brassica rapa* under low temperature stress

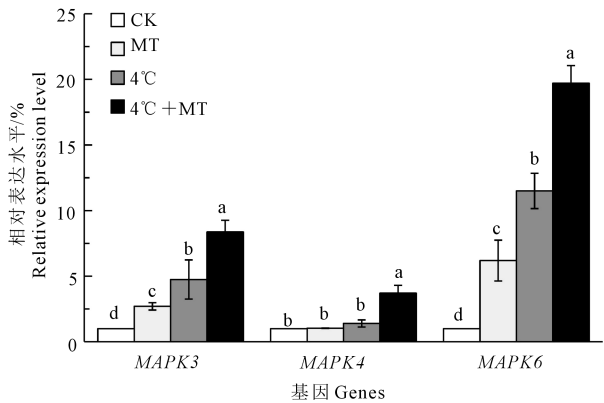


图 6 外源褪黑素对低温胁迫下油菜 *MAPK3*、*MAPK4* 和 *MAPK6* 基因表达的影响

Fig.6 Effects of exogenous melatonin on the expression of *MAPK3*, *MAPK4* and *MAPK6* genes in *Brassica rapa* under low temperature stress

3 讨论

植物在逆境条件下生长,会导致膜脂过氧化和细胞膜结构完整性的损伤^[20]。低温胁迫下植物的防御机制包括生理反应、适应代谢和基因表达变化。有研究表明,白曼陀罗幼嫩花芽^[21]和芦荟^[22]在 4℃低温胁迫下褪黑素含量增加,表明褪黑素可能参与植物对低温胁迫的调节。丙二醛(MDA)是一种最主要的膜脂过氧化反应生成物,其含量的变化能反映出环境对于植物损害程度的大小及植物应对外界环境刺激的剧烈程度,受低温胁迫的植物经常遭受膜损伤,因此可以通过电解质渗漏和 MDA 含量来反应植物受到的损害程度。潘红艳等^[15]的研究表明用适当浓度外源褪黑素处理的菘蓝幼苗 MDA 含量显著降低,减轻了植株膜脂过氧化程度。

Garcia 等^[23]的研究显示,褪黑素能够对细胞质膜的流动性起到稳定效果,同时保持磷脂和蛋白质功能的完整性,在一定程度上增强了细胞的抵御能力。同时也有研究表明外源褪黑素处理的黄瓜胚轴中膜脂过氧化水平显著降低^[24]。此外,对甜瓜的研究表明外源褪黑素处理能提高低温胁迫下甜瓜幼苗叶片叶绿素含量,减缓光合速率的迅速下降^[25]。本研究中,用褪黑素预处理后再进行 4℃ 低温处理,油菜幼苗体内 MDA 含量、离子渗漏率的增加和叶绿素的含量均显著低于单独的低温胁迫处理,这些结果表明,适宜浓度的外源褪黑素可以缓解低温胁迫引起的细胞膜损伤和叶绿素的分解,增加油菜幼苗的抗寒性。

植物在正常条件下生长,能够维持 ROS 的平衡,低温、干旱等非生物胁迫可以破坏细胞稳态并导致 ROS 过量积累,造成氧化损伤^[26],因此,植物已经进化出多种 ROS 清除机制,通过它们响应氧化应激,这些机制包括产生非酶抗氧化剂和酶抗氧化剂,如抗坏血酸、谷胱甘肽和 CAT、POD、SOD,来保护细胞免受氧化损伤^[27]。有研究已经证实,植物体内抗氧化系统中 POD、CAT 和 SOD 三者间联系紧密,是植物体内抗氧化防御系统的重要组成部分,对于维持 ROS 水平起到重要作用^[28]。越来越多的证据表明,MT 作为一种有效的抗氧化剂和自由基清除剂,它能够直接清除自由基,刺激抗氧化酶使抗氧化酶活性上调,提高线粒体氧化磷酸化效率,减少线粒体氧化磷酸化过程中的电子泄露,增加其它抗氧化物质的效率,进而调节植物生长、发育和防御各种环境胁迫^[29]。高温及紫外线处理能够诱导甜樱桃中 ROS 大量积累,尤其是 H_2O_2 ,而外源褪黑素的使用,能明显减少超氧阴离子和 H_2O_2 的产生,并增加抗氧化酶及其他抗氧化物质的活性^[30]。本研究中低温胁迫处理油菜幼苗不同的时间,油菜幼苗体内 H_2O_2 、 O_2^- 的含量和 CAT、POD、SOD 活性随着胁迫时间的增长不断积累和增加,但用褪黑素预处理后再进行低温胁迫处理,油菜幼苗体内 H_2O_2 、 O_2^- 的含量虽然都随胁迫时间的增加呈上升趋势,但均明显低于单独的低温胁迫处理,而与单独的胁迫处理相比,CAT、POD、SOD 的活性均显著增加,表明外源褪黑素可以增加抗氧化酶的活性,清除低温胁迫下积累的 ROS,缓解低温对油菜幼苗造成的氧化损伤。

MAPK 级联途径是将细胞外刺激信号在细胞内级联放大的重要信号传导途径,据报道其参与拟南芥、水稻和番茄等多种植物对生物和非生物胁迫的

反应^[31]。有研究表明 *AtMAPK6* 能被低温、干旱等多种非生物胁迫迅速激活^[32]; H_2S 可以调节 *AtMPK4* 基因的表达,增加拟南芥对低温胁迫的耐受性,从而更好地适应环境^[3];外源 H_2O_2 也能够激活 *AtMPK3*、*AtMPK6* 基因的表达^[33],此外,褪黑素也能够上调低温应答基因 *COR15a*、低温环境耐受转录因子 CAMTA1 以及抗氧化基因 *ZAT10/ZAT12* 的表达^[34],证实了褪黑素的保护作用可能与 MAPK 级联途径相关。本研究中低温胁迫下油菜幼苗 *MAPK3*、*MAPK4*、*MAPK6* 基因表达上调,且 *MAPK3*、*MAPK6* 基因达到显著水平,而用褪黑素预处理后再进行低温胁迫处理,*MAPK3*、*MAPK4*、*MAPK6* 基因表达均高于单独的低温胁迫,但不同基因的上调程度存在差异,表明低温胁迫下, *MAPK3*、*MAPK4*、*MAPK6* 基因均能响应低温胁迫,但 *MAPK3*、*MAPK6* 基因比 *MAPK4* 基因对低温胁迫更敏感;而使用褪黑素能够诱导低温胁迫下 *MAPK3*、*MAPK4*、*MAPK6* 基因表达上调,且不同基因对褪黑素诱导的响应程度存在差异,表明褪黑素缓解低温胁迫对油菜幼苗损伤的过程与 MAP 激酶级联信号途径有关,但是具体的调节机制还有待进一步研究。

4 结 论

本研究中,与单独的 4℃ 低温胁迫处理相比, $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 外源褪黑素预处理后进行 4℃ 低温胁迫处理,油菜幼苗 MDA 含量、相对电导率和 ROS 含量均显著低于单独的低温胁迫处理,叶绿素含量、过氧化氢酶(CAT)、过氧化物酶(POD)、超氧化物歧化酶(SOD)活性均增加,且 *MAPK3*、*MAPK4*、*MAPK6* 基因表达上调,表明使用 $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 外源 MT 预处油菜幼苗,可以有效降低低温胁迫下 MDA 含量、电解质的渗漏和 ROS 积累,抑制叶绿素的降解,诱导 *MAPK3*、*MAPK4*、*MAPK6* 基因表达上调,进而增强油菜幼苗的抗寒性,缓解低温胁迫造成的氧化损伤。

参 考 文 献:

- [1] Nahar K, Hasanuzzaman M, Alam M M, et al. Roles of exogenous glutathione in antioxidant defense system and methylglyoxal detoxification during salt stress in mung bean[J]. *Biologia Plantarum*, 2015, 59(4): 745-756.
- [2] Erdal S, Genisel M, Turk H, et al. Modulation of alternative oxidase to enhance tolerance against cold stress of chickpea by chemical treatments[J]. *Journal of Plant Physiology*, 2015, 175:95-101.
- [3] Du X, Jin Z, Liu D, et al. Hydrogen sulfide alleviates the cold stress through MPK4 in *Arabidopsis thaliana*[J]. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2017, 120:112-119.

[4] Wang L, Zhao R, Li R, et al. Enhanced drought tolerance in tomato plants by overexpression of SIMAPK1[J]. Plant Cell Tissue & Organ Culture, 2018, 133(1):1-12.

[5] Wang J, Ding H, Zhang A, et al. A novel mitogen-activated protein kinase gene in maize (*Zea mays*), *ZmMPK3*, is involved in response to diverse environmental cues[J]. Journal of integrative plant biology, 2010, 52(5):442-452.

[6] Xiong L, Yang Y. Disease resistance and abiotic stress tolerance in rice are inversely modulated by an abscisic acid-inducible mitogen-activated protein kinase[J]. Plant Cell, 2003, 15(3):745-759.

[7] Jing S, Liang Z, An H, et al. *GhMPK16*, a novel stress-responsive group *DMPK* gene from cotton, is involved in disease resistance and drought sensitivity[J]. Bmc Molecular Biology, 2011, 12(1):22-22.

[8] Van Tassel D L, Roberts N, Lewy A, et al. Melatonin in plant organs [J]. Journal of pineal research, 2001, 31(1):8-15.

[9] Arnao M B, Hernándezruiz J. Protective effect of melatonin against chlorophyll degradation during the senescence of barley leaves [J]. Journal of Pineal Research, 2010, 46(1):58-63.

[10] Arnao M B, Hernández-Ruiz J. Functions of melatonin in plants: a review[J]. Journal of Pineal Research, 2015, 59(2):133-150.

[11] Ke Q, Ye J, Wang B, et al. Melatonin mitigates salt stress in wheat seedlings by modulating polyamine metabolism[J]. Frontiers in plant science, 2018, 9:914.

[12] 赵小红, 罗庆熙, 饶玲. 外源褪黑素在低温胁迫下对黄瓜幼苗抗冷性的影响[J]. 北方园艺, 2017, (14): 55-59.

[13] 吴雪霞, 朱宗文, 张爱冬, 等. 外源褪黑素对低温胁迫下茄子幼苗生长及其光合作用和抗氧化系统的影响[J]. 西北植物学报, 2017, 37(12): 2427-2434.

[14] Kołodziejczyk I, Dzitko K, Szewczyk R, et al. Exogenous melatonin improves corn (*Zea mays* L.) embryo proteome in seeds subjected to chilling stress[J]. Journal of Plant Physiology, 2016, 193:47-56.

[15] 潘红艳, 张晓庆, 李婕, 等. 褪黑素对低温胁迫后松蓝种子苗抗氧化性影响[J]. 西北大学学报(自然科学版), 2013, 43(2): 238-242.

[16] 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.

[17] 高俊凤. 植物生理学实验指导[M]. 北京:高等教育出版社, 2006.

[18] Gao X, Chen X, Lin W, et al. Bifurcation of Arabidopsis NLR immune signaling via Ca²⁺-dependent protein kinases[J]. PLoS pathogens, 2013, 9(1):e1003127.

[19] Hobang K, Hyoungseok L, Changjae O, et al. Postembryonic seedling lethality in the sterol-deficient Arabidopsis cyp51A2 mutant is partially mediated by the composite action of ethylene and reactive oxygen species[J]. Plant Physiology, 2010, 152(1):192-205.

[20] Demmig-Adams B, Adams Iii W W. Photoprotection and other responses of plants to high light stress[J]. Annual review of plant biology, 1992, 43(1):599-626.

[21] Murch S J, Alan A R, Cao J, et al. Melatonin and serotonin in flowers and fruits of *Datura metel* L[J]. Journal of Pineal Research, 2010, 47(3):277-283.

[22] Tan D X, Manchester L C, Reiter R J, et al. Significance of Melatonin in Antioxidative Defense System: Reactions and Products[J]. Biological Signals & Receptors, 2000, 9(3-4):137-159.

[23] García J J, Reiter R J, Guerrero J M, et al. Melatonin prevents changes in microsomal membrane fluidity during induced lipid peroxidation[J]. Febs Letters, 1997, 408(3):297-300.

[24] Posmyk M M, Bałabusta M, Wieczorek M, et al. Melatonin applied to cucumber (*Cucumis sativus* L.) seeds improves germination during chilling stress[J]. Journal of Pineal Research, 2010, 46(2):214-223.

[25] Zhang Y P, Yang S J, Chen Y Y. Effects of melatonin on photosynthetic performance and antioxidants in melon during cold and recovery [J]. Biologia Plantarum, 2017, 61(3):1-8.

[26] Ma X, Wang G, Zhao W, et al. SICOR413IM1: A novel cold-regulation gene from tomato, enhances drought stress tolerance in tobacco [J]. Journal of Plant Physiology, 2017, 216:88.

[27] Talbi S, Romero-Puertas M C, Hernández A, et al. Drought tolerance in a Saharian plant *Oudneya africana*: Role of antioxidant defences [J]. Environmental & Experimental Botany, 2015, 111: 114-126.

[28] 付晴晴, 谭雅中, 翟衡, 等. NaCl 胁迫对耐盐性不同葡萄株系叶片活性氧代谢及清除系统的影响[J]. 园艺学报, 2018, 45(1):30-40.

[29] Zhang N, Zhao B, Zhang H J, et al. Melatonin promotes water-stress tolerance, lateral root formation, and seed germination in cucumber (*Cucumis sativus* L.) [J]. Journal of Pineal Research, 2012, 54(1): 15-23.

[30] Li C, Wang P, Wei Z, et al. The mitigation effects of exogenous melatonin on salinity-induced stress in *Malus hupehensis* [J]. Journal of Pineal Research, 2012, 53(3):298-306.

[31] Raja V, Majeed U, Kang H, et al. Abiotic stress: Interplay between ROS, hormones and MAPKs[J]. Environmental & Experimental Botany, 2017, 137:142-157.

[32] Colcombet J, Hirt H. Arabidopsis MAPKs: a complex signalling network involved in multiple biological processes[J]. Biochemical Journal, 2008, 413(2):217-226.

[33] Kovtun Y, Chiu W L, Tena G, et al. Functional analysis of oxidative stress-activated mitogen-activated protein kinase cascade in plants [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2000, 97(6):2940-2945.

[34] Bajwa V S, Shukla M R, Sherif S M, et al. Role of melatonin in alleviating cold stress in *Arabidopsis thaliana* [J]. Journal of Pineal Research, 2014, 56(3):238-245.