

干旱胁迫对赤芍生理特性影响 及相关基因的克隆表达

王丹丹,王 鹏,韩智阳,刘丹梅

(辽东学院农学院,辽宁 丹东 118000)

摘 要:为探究不同干旱程度对赤芍生长发育的影响及其抗旱机制,采用盆栽控水法,设置对照组、轻度干旱和重度干旱 3 个处理,测定赤芍叶片相对含水量、可溶性糖、可溶性蛋白、脱落酸、叶绿素、类胡萝卜素、类黄酮、丙二醛、游离脯氨酸含量、光合参数及超氧化物酶活性等生理指标,评价赤芍抗旱性;采用 RT-PCR 结合 RACE 技术克隆抗旱相关基因(*DREB*、*Psb27*、*PsaK*、*MDHAR*、*SOD* 和 *GR*),探究不同干旱程度对赤芍相关基因表达水平的影响。结果表明,重度干旱胁迫下,赤芍可溶性糖、可溶性蛋白、类胡萝卜素、类黄酮、脯氨酸、丙二醛、抗坏血酸及谷胱甘肽的含量均呈上升趋势,如在重度干旱和轻度干旱 24 d 后,赤芍叶片可溶性糖含量分别为对照的 2.50 倍和 1.66 倍,重度干旱胁迫第 16 天时,可溶性蛋白含量为对照的 2.43 倍,类胡萝卜素与类黄酮的含量分别约为对照的 1.8 倍和 1.4 倍,约为轻度干旱的 1.4 倍和 1.2 倍;而叶片相对含水量、蒸腾速率、气孔导度、净光合速率与叶绿素含量均降低,如重度干旱胁迫下赤芍叶片含水量不足 20%,而轻度干旱和对照组叶片含水量均高于 55%,叶绿素含量在第 16 天降到最低值,约为对照的 26%,为轻度干旱的 33%;干旱胁迫下,光合作用相关基因 *Psb27*、*PsaK* 的表达量上调,且重度干旱上调水平更高;多个抗氧化基因的表达量(*SOD*、*GR*)、ABA 含量以及胞间 CO₂ 浓度呈先升后降趋势,如 *SOD* 在重度干旱第 16 天表达水平达到峰值,分别为轻度干旱与对照组的 1.58 倍和 1.86 倍,而后剧烈下降,到第 24 天时表达水平降到对照组的 1.43 倍,其中 *MDHAR* 的表达量呈下降趋势,重度干旱第 24 天时表达水平降到对照组的 5.53 倍。

关键词:赤芍;干旱胁迫;抗性生理;*DREB* 基因;克隆;基因表达水平

中图分类号:S682.1⁺2;Q945.78 **文献标志码:**A

Effects of drought stress on physiology characteristics of *Radix paeoniae Rubra* and clonal expression of related genes

WANG Dandan, WANG Peng, HAN Zhiyang, LIU Danmei

(College of Agriculture, Eastern Liaoning University, Dandong, Liaoning 118000, China)

Abstract: This study used potted water control method to explore the effects of different drought stresses on growth and drought resistance mechanism of *Radix paeoniae*. Three treatments of control, mild drought, and severe drought were used to test the leaf relative water content, soluble sugar, soluble protein, net photosynthetic rate, transpiration rate, stomatal conductance, intracellular CO₂ concentration, ascorbic acid, chlorophyll, carotenoids, flavonoids, maltaraldehyde, free proline, and superoxidase dismutase to evaluate the drought resistance of *Radix paeoniae*. Six drought-related genes (*DREB*、*Psb27*、*PsaK*、*MDHAR*、*SOD* and *GR*) were cloned by RT-PCR with RACE to explore the effects of different drought levels on gene expression levels of *Radix paeoniae*. The results showed that, under severe drought stress, the soluble sugar, soluble protein, carotenoids, flavonoids, proline, maltaraldehyde, ascorbic acid and glutathione all increased, for example, after 24 d of severe and mild drought, the soluble sugar content of *Radix paeoniae* was about 2.50 times and 1.66 times that of the control group, respectively. After 16 day of severe drought, the soluble protein content was about 2.43 times that of the control group, and the contents of carotenoid and flavonoid were separately about 1.8 times and 1.4 times that of the control group, and about 1.4 times and 1.2 times that of mild drought; while the leaf relative water content, the transpiration rate, stomatal conductivity, net photosynthetic rate and chlorophyll content all decreased. For example, the leaf relative

water content of *Radix paeoniae* was less than 20% under severe drought stress, while both mild drought and control groups were above 55%, and the chlorophyll content fell to the lowest value at the 16th day, about 26% of the control group and 33% of mild drought. Under severe drought stress, the expression of photosynthesis associated gene *Psb27*, *PsaK* was upregulated, and the severe drought upregulated level was higher than mild drought and control. The expression of most of antioxidant genes (*SOD*, *GR*), ABA content, and intracellular CO₂ concentration all increased first then decreased, such as *SOD* expression levels peaked at the 16th day under severe drought, about 1.58 times and 1.86 times in the mild drought and the control group, respectively, and then the expression level decreased to 1.43 times by the 24th day of the control group. The expression level of *MDHAR* decreased, and at the 24th day under severe drought, its expression level decreased to 5.53 times that of the control group.

Keywords: *Radix paeoniae* Rubra; drought stress; resistance physiology; *DREB* gene; clone; gene expression level

赤芍(*Radix paeoniae* Rubra),又名毛果赤芍、木芍药或红芍药,隶属于毛茛科(Ranunculaceae)芍药(*Paeonia lactiflora* Pall)或川赤芍(*Paeonia veitchii* Lynch),为多年生草本植物,外表黑褐色无毛,根肥大、纺锤形或圆柱形;味苦、性微寒,归肝、脾经,有清热凉血、活血祛瘀的功效。赤芍为我国传统名花,素有“花相”的美誉,因其花型多样、花色多彩及气质典雅而有较高的园林观赏价值,广泛用于园林造景;主要分布于东北、华北、陕西及甘肃等地。赤芍喜光、湿润之地,对水分缺乏较敏感,而北方地区为赤芍主产区,多为干旱或半干旱地区,春季干燥、降水少,夏季炎热、干旱少雨造成水资源短缺,显著影响了赤芍的生长发育及产量^[1],可见,干旱是影响北方地区赤芍栽培的主要逆境胁迫因子^[2]。

干旱抑制植物生长发育和细胞有丝分裂,降低细胞膨压,减弱细胞伸长和扩张能力,导致植物生长速度降低、植株矮细小、抽芽量减少、叶片枯黄皱缩且表面积减小以及根系发育不良等不可逆的生理损伤^[3]。根系是吸收水分的主要器官,干旱胁迫下根系首先接收水分亏缺信号,通过根系肉质化、根皮变厚,增加侧根数量及根向下深扎程度及提高根冠比广泛吸收土壤深层水分等方式响应干旱胁迫,之后信号传递到其他器官^[4];干旱胁迫会影响植物的渗透调节、营养代谢、呼吸作用与光合作用等,尤其是叶片形态及部分生理特性,如细胞壁变厚、叶片皱缩变小、气孔下陷以及栅栏组织与海绵组织比值降低等;生殖阶段干旱胁迫影响种子数量、大小和成分,而且花数、结荚率、结实率等指标均显著下降,严重影响植株生殖。此外,植物体内很多基因直接参与对干旱胁迫的抵御,通过该类基因的表达调控减缓胁迫伤害以维持细胞的正常生理代谢,主要包括编码脱水反应元件结合蛋白(*DREB*)、*MYB* 转录因子、*WRKY* 转录因子、信号转

导相关蛋白、抗氧化酶、渗透调节因子合成酶以及保护细胞结构的功能蛋白基因等^[5-8]。

干旱胁迫是影响赤芍生长发育的主要逆境因子之一,涉及赤芍的每个生长发育阶段,并在发育完成后会继续影响赤芍的营养运输、吸收、光合作用与呼吸作用等生理代谢过程。我国约 50% 的土地为干旱或半干旱地区,南方由于偶发雨量不均或时空分布等原因也会引发季节性干旱^[9]。部分药用植物在适度干旱胁迫下,不但能形成优良理化性质,还能固水防沙、保护生态,因此,探究药用植物抗旱性对了解、保护干旱地区生态系统和药用植物资源具有实践意义。目前全球水资源短缺,构建节水型绿化园林以及培育耐旱赤芍栽培种已是大势所趋^[10]。有关赤芍干旱应答的抗旱生理指标动态变化报道较少,且对抗旱相关基因的表达调控及赤芍抗旱机制的研究亦相对薄弱。因此,为了阐明赤芍抗旱机制,本研究探讨了不同程度干旱胁迫下赤芍光合特性、叶绿素荧光参数等生理指标,以及相关基因(*DREB*、*Psb27*、*PsaK*、*MDHAR*、*SOD*、*GR*)的表达特征,旨在为赤芍抗旱品种选育及其在干旱、半干旱地区的栽培实践提供理论基础。

1 材料与amp;方法

1.1 试验材料

采用盆栽控水法,2021 年 6 月以 5 a 生赤芍盆栽苗(壤土:粗砂:泥炭=1:1:1)为试验材料,处理前将赤芍浇透水,后分为 3 组:轻度干旱(土壤相对含水量约为田间持水量的 50%)、重度干旱(土壤相对含水量约占田间持水量的 15%);对照组(土壤相对含水量约为田间持水量的 80%)。土壤田间持水量测定采用环刀法。每 24 h 采用称重法补充各盆栽的水分,盆栽混合土壤田间持水为 100%时,土壤净含水量约为 70%。分别在处理后的第 0、4、

8、12、16、20、24 天取样检测生理指标;选择第 15 天的赤芍进行基因表达分析,每个试验均做 3 次生物学重复。

1.2 试验方法

1.2.1 生理指标检测 采用烘干称重法测定叶片相对含水量,取适量赤芍新鲜叶片,采用天平(0.0001 g, 美国 OHAUS CP214)称鲜质量(FW),100℃烘箱处理 7 min,后 65℃处理 3 h,烘干直至恒重记为干质量(DW),叶片相对含水量(%)=(FW-DW)/FW×100%。可溶性糖和可溶性蛋白检测分别采用可溶性糖试剂盒与可溶性蛋白试剂盒(生工生物工程(上海)股份有限公司,中国);每天上午 9:00 采用便携式光合荧光测量系统(LI-6800, LI-COR 公司,美国)内置光源(光照强度为 1 500 μmol·m⁻²·s⁻¹)对赤芍从下往上的第 5 片成熟叶片(每个处理采用相同部位叶片)测定光合速率(P_n),蒸腾速率(T_r)、气孔导度(G_s)、胞间 CO₂ 浓度(C_i)值;采用叶绿素试剂盒和胡萝卜素试剂盒(合肥莱尔生物科技有限公司)测定色素含量;采用植物激素脱落酸 ELISA 检测试剂盒(合肥莱尔生物科技有限公司)测定脱落酸(Abscisic acid, ABA)含量;采用磺基水杨酸法提取、测定赤芍叶片脯氨酸的含量^[11-12];采用硫代巴比妥酸(TAB)法提取、测定赤芍叶片丙二醛含量;采用 GSH 检测试剂盒和 AsA 检测试剂盒(北京索莱宝科技有限公司)测定 AsA-GSH 循环系统酶活性^[13-14],每个处理重复 3 次取平均值。

1.2.2 RpDREB 基因 RACE 克隆 以罗勒(*Ocimum basilicum* L.) ObDREB 基因序列(GenBank: KR136344.1)设计引物(表 1)。取赤芍根、叶组织液氮研磨,按 RNA 提取试剂盒(EZ-10 Total RNA Mini-Preps Kit)说明书提取赤芍总 RNA,采用分光光度计(UV 751GD)检测其纯度,1%琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 完整性;以赤芍总 RNA 为模板,按 AMV 第一链 cDNA 合成试剂盒(AMV first strand cDNA synthesis kit)合成赤芍 cDNA 第一链,-20℃保存用于后续 RpDREB 克隆模板。以赤芍 cDNA 第一链为模板,DREB-coreF/DREB-coreR 为引物,克隆 RpDREB 核心序列^[15]。反应体系 20 μL,包含 1 μL cDNA,0.6 μL dNTP Mix,0.8 μL 10 μmol·L⁻¹上下游引物,(10×) Advantage® PCR 缓冲液 2.0 μL,(50×) Advantage® 聚合酶混合液 0.8 μL,加 ddH₂O 至 20 μL;反应程序:95℃预变性 4 min;94℃变性 45 s,55℃退火 45 s,72℃延伸 50 s,30 个循环;72℃延伸 10 min;采用 1%琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物。采用 DiaSpin 柱式 DNA 胶回收试剂盒(DiaSpin DNA

gel extraction kit)回收 PCR 产物,连接 pGM-T vector 载体,转化感受态大肠杆菌 DH5α,将筛选的阳性克隆送至生工生物工程(上海)公司测序。采用 5'-RACE 试剂盒和 3'-RACE 试剂盒(SMARTer RACE cDNA amplification kit 试剂盒)快速扩增克隆 RpDREB 核心序列的 5'端和 3'端,将获得的 5'端和 3'端赤芍 RpDREB 片段电泳、切胶纯化与测序,后采用 DNASTar 的 SeqMan 程序拼接 5'-RACE、核心序列与 3'-RACE 序列,并以赤芍 cDNA 为模板,采用跨赤芍 RpDREB 基因开放阅读框(ORF)的 RpDREB-F/ RpDREB-R 为引物,扩增 RpDREB 基因,并测序验证是否与拼接序列一致。本研究共克隆 6 个赤芍干旱胁迫相关基因,以 RpDREB 克隆为例^[16]。

1.2.3 基因表达分析 选择赤芍干旱应答元件结合蛋白 DREB,光合作用相关蛋白 Psb27(光系统 II Psb27 蛋白)和 PsaK(光系统 I 亚基 X 蛋白),抗氧化响应相关基因单脱氢抗坏血酸还原酶(Monodehydroascorbate reductase, MDHAR)、超氧化物歧化酶(Superoxide Dismutase, SOD)、谷胱甘肽还原酶(Glutathione reductase, GR)进行实时荧光定量 PCR(qRT-PCR)检测上述蛋白干旱胁迫下的表达情况(引物见表 1)。25 μL qRT-PCR 反应体系,SYBR Premix Ex Taq II (2×)5.5 μL,10 μmol·L⁻¹上下游引物各 1.5 μL,ROX 参比染料(50×)0.8 μL,cDNA 模板 1.8 μL,加 ddH₂O 至 25 μL;反应程序:95℃预变性 2 min;95℃变性 50 s,60℃退火 45 s,72℃延伸 50 s,40 个循环;每个样品 3 次生物学重复取平均值,采用 2^{-ΔΔCt}法进行上述基因表达水平的分析计算^[17]。

表 1 引物信息

Table 1 Information of primers

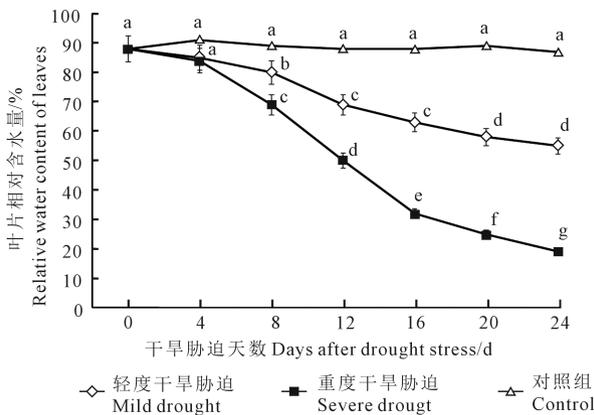
引物名称 Primer name	引物序列 Sequence (5'→3')	备注 Note
DREB-coreF DREB-coreR	AGCAAACCTTGTATTTGGCGC GGAAGGAGGAGTAGGCGCTTC	克隆引物 Cloning primer
DREB-F DREB-R	CGCCCCACAATACCAATTTCC ATACACCCCGTCGTTGCAG	验证引物 Tested primer
DREB-qF DREB-qR Psb27-qR Psb27B-qR PsaK-F PsaK-R SOD-qR SOD-qR GR-qR GR-qR	CGAACTCGTCTATGGCTCGG AACACGAAGCAGTCGGTGAG AAAAGGCCACGCACAATGAC ACAGCATTCACGCCGAGTA CCCAGGTCACITTTACCCAAA AGCGAATTTGTCGGAGGAATAA AAGCACTFGAGGTGGACCC GGCGTGCTCCCAAACATCTA TCCCTACTTCATCTCTGGCA ATCCAGACTTTGGCGCTTGA	基因表达分析 Expression analysis
GAPDH-F GAPDH-R	TGCATGGAGTCGAGCAACTT GGCAGGTTTCTCAAGACGGA	内参基因 Reference gene

1.2.4 数据统计与分析 采用 Excel 2016 和 DPS 7.05 软件进行试验数据与差异显著性分析,采用 SPASS 21.0 与 SAS/STAT 进行方差分析,采用 Duncan 多重极差法进行检验($P < 0.05$)^[18]。所有试验均采用完全随机设计生物学重复 3 次,取平均值。

2 结果与分析

2.1 干旱胁迫对赤芍叶片相对含水量的影响

叶片是对干旱胁迫反应最敏感的器官(图 1),轻度干旱与重度干旱胁迫 4 d 时赤芍叶片含水量保持一致,8 d 后轻度干旱胁迫叶片含水量下降不明显,而重度干旱植株叶片含水量继续下降,12 d 后,重度干旱植株叶片含水量显著低于轻度干旱胁迫植株和对照组,到第 24 天时,重度干旱胁迫下赤芍叶片含水量不足 20%,而轻度干旱和对照组叶片含水量均高于 55%。



注:数值为均值±标准差(SD),小写字母表示同一时间不同处理间差异显著($P < 0.05$),下同。

Note: The values is mean ± standard deviation (SD), and lowercase letters indicate significant differences among different treatments at the same time ($P < 0.05$), the same below.

图 1 干旱胁迫对赤芍叶片相对含水量的影响

Fig.1 Effects of drought stress on relative water content of *Radix paeoniae* leaves

2.2 干旱胁迫对赤芍叶片可溶性糖和可溶性蛋白含量的影响

可溶性糖与可溶性蛋白属于渗透调节物质,在持续干旱胁迫下,赤芍可通过提高二者含量来调控自身的含水量,达到维持植株正常生长发育的目的。结果显示(图 2),干旱胁迫促使赤芍叶片可溶性糖含量增加,重度干旱可溶性糖含量显著高于轻度干旱和对照组,在第 16 天重度干旱可溶性糖含量显著增加,而轻度干旱初期与对照组差异不显著,第 12 天后显著高于对照组;至于干旱胁迫 24 d,重度

干旱和轻度干旱下赤芍叶片可溶性糖含量分别为对照的 2.50 倍和 1.66 倍。

干旱胁迫下,赤芍叶片可溶性蛋白含量在干旱胁迫初期呈现明显的上升趋势,而后逐渐下降,但重度干旱和轻度干旱可溶性蛋白的含量均高于同期对照组。重度干旱胁迫第 16 天时,赤芍叶片可溶性蛋白含量显著上升达到峰值,为对照组的 2.43 倍,第 20 天时呈急剧下降趋势,而轻度干旱与重度干旱曲线趋势基本一致。

2.3 干旱胁迫对赤芍叶片光合参数的影响

与对照组相比,持续干旱胁迫抑制了赤芍叶片的净光合速率(P_n)、蒸腾速率(T_r)和气孔导度(G_s),3 个指标随胁迫时间的延长均呈下降趋势(图 3)。轻度干旱胁迫下,赤芍叶片 P_n 、 T_r 和 G_s 均显著高于重度干旱胁迫;重度干旱胁迫下, P_n 、 T_r 和 G_s 在初期与轻度干旱无明显差异,第 8 天后显著下降,第 16 天后,上述 3 个指标均已趋近于零;而细胞间隙 CO_2 浓度(C_i)变化趋势与上述 3 项指标有显著差异,轻度干旱初期 C_i 与重度干旱和对照组无明显差异,第 8 天后逐渐上升,第 12 天下降,可能由于在第 7 天浇水的缘故,但 C_i 值始终低于重度干旱,而赤芍叶片在重度干旱下,其 C_i 值在第 8 天开始升高,在第 12 天呈直线上升趋势,第 20 天时 C_i 值显著高于轻度干旱胁迫(约 2.21 倍)和对照组(约 2.76 倍)。

2.4 干旱胁迫对赤芍叶片色素含量的影响

干旱胁迫对植物光合作用影响较大,由于干旱胁迫促使植物进行光合作用时叶片的气孔导度(G_s)下降, CO_2 进入叶片受阻,致使光合效率下降,加之叶绿体中类囊体膜及其超微结构均受损伤,最终致使赤芍光合色素合成亦发生改变。如图 4A 所示,干旱胁迫条件下,赤芍叶片的叶绿素含量下降,明显低于对照组,其中重度干旱胁迫下叶绿素含量呈现先下降后升高的趋势,第 16 天降低到最低值,约为对照组的 26%,为轻度干旱的 33%,而后呈上升趋势;而干旱胁迫下,类胡萝卜素与类黄酮的含量均有不同程度的升高(图 4B、图 4C),且显著高于对照组,其中重度干旱 24 d 时,赤芍叶片类胡萝卜素与类黄酮的含量分别约为对照组的 1.8 倍和 1.4 倍,约为轻度干旱的 1.4 倍和 1.2 倍。

2.5 干旱胁迫对赤芍叶片脱落酸(ABA)含量的影响

如图 4D 所示,持续干旱胁迫下,赤芍叶片 ABA 含量呈现先上升后下降的趋势,第 14 天时 ABA 含量达到峰值,14~20 d 缓慢下降,20~24 d 呈剧烈下

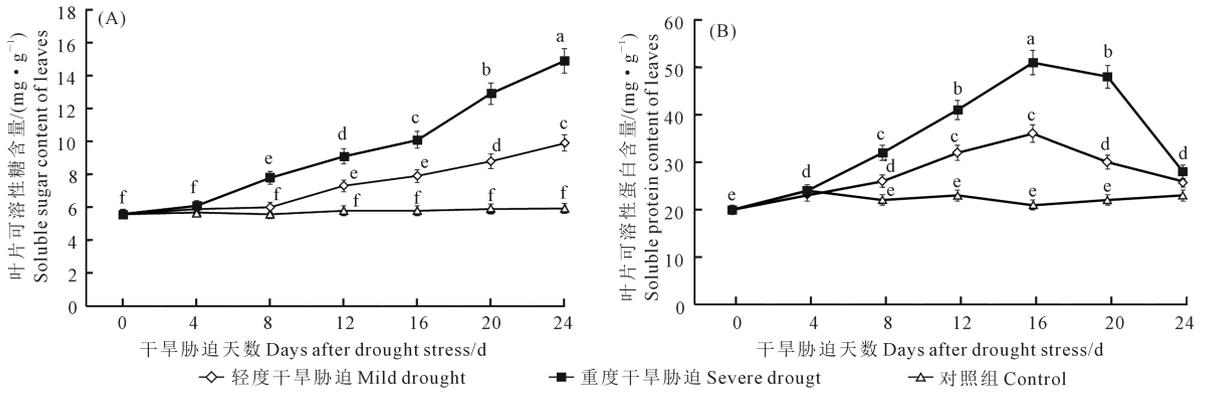


图 2 干旱胁迫对赤芍叶片可溶性糖 (A) 和可溶性蛋白 (B) 含量的影响

Fig.2 Effects of drought stress on soluble sugar (A) and soluble protein (B) content of *Radix paeoniae* leaves

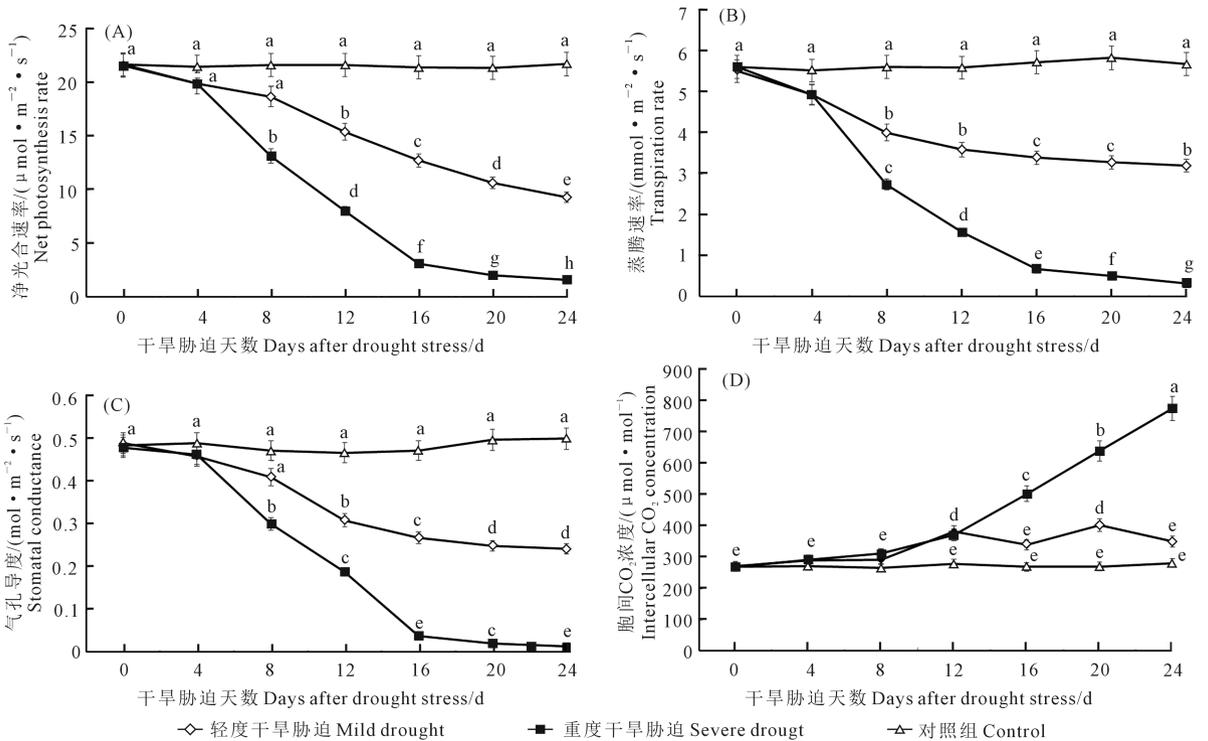


图 3 干旱胁迫对赤芍叶片光合特性的影响

Fig.3 Effects of drought stress on photosynthetic characteristics of *Radix paeoniae* leaves

降趋势,且略低于轻度干旱胁迫第 24 天的 ABA 含量;而轻度干旱胁迫下,赤芍叶片 ABA 含量初期与重度干旱与对照组无明显差异,第 8 天后呈缓慢而稳定上升趋势,但始终高于对照组 ABA 含量。

2.6 干旱胁迫对赤芍根系脯氨酸与丙二醛含量的影响

脯氨酸(Pro)作为渗透调节物质在植物抵御干旱胁迫过程中发挥重要作用,与植物的水分吸收密切相关,而丙二醛(MDA)是植物在逆境条件下发生膜脂过氧化的重要产物之一,能够反映细胞膜的过氧化程度大小与植物抗逆能力,如图 5 所示,干旱胁迫下 Pro 和 MDA 在赤芍体内会大量积累,呈稳定上升趋势,重度干旱第 24 天时,Pro 含量分别为轻度干旱与对照组的 1.34 倍和 1.19 倍;而 MDA 含量在干旱胁迫第 16 天时剧烈上升,到第 20 天时,分别为轻度干旱和对照组的 1.7 倍和 2.98 倍。

迫下 Pro 和 MDA 在赤芍体内会大量积累,呈稳定上升趋势,重度干旱第 24 天时,Pro 含量分别为轻度干旱与对照组的 1.34 倍和 1.19 倍;而 MDA 含量在干旱胁迫第 16 天时剧烈上升,到第 20 天时,分别为轻度干旱和对照组的 1.7 倍和 2.98 倍。

2.7 干旱胁迫对赤芍根系 AsA 和 GSH 含量的影响

AsA-GSH 循环系统是植物体内清除活性氧自由基(ROS)的主要途径之一,逆境胁迫下,植物通过增加抗氧化剂含量和相关酶活性来提高 AsA-GSH 循环系统的效率以抵御不良环境。由图 6 可知,干旱胁迫下赤芍 AsA 和 GSH 含量均呈先升后降

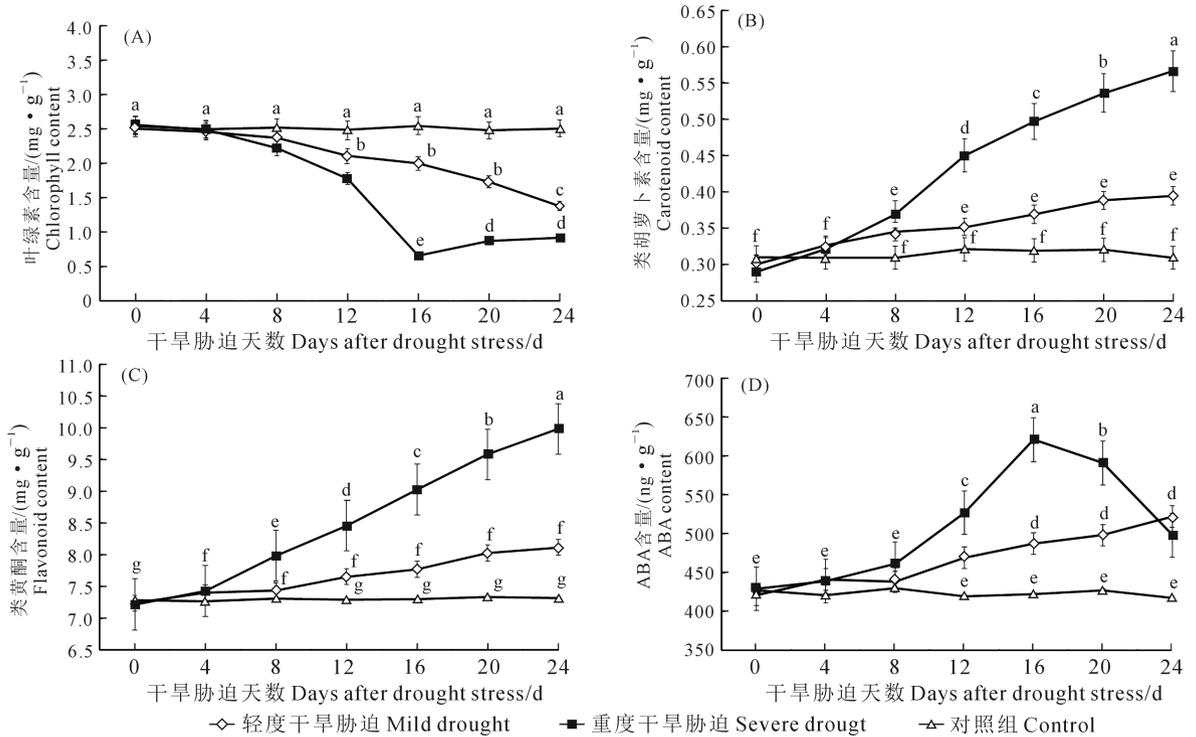


图 4 干旱胁迫对赤芍叶片色素与 ABA 含量的影响

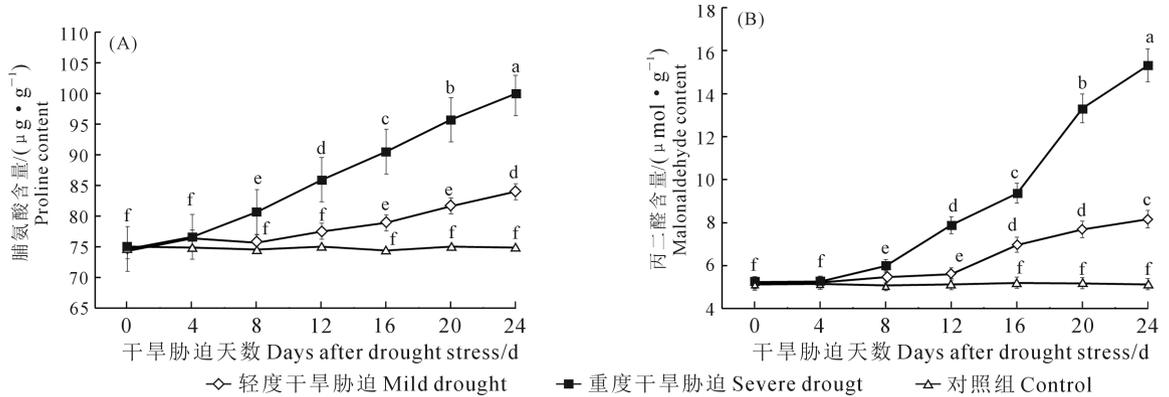
Fig.4 Effects of drought stress on pigment and ABA content of *Radix paeoniae* leaves

图 5 干旱胁迫对赤芍根系脯氨酸与丙二醛含量的影响

Fig.5 Effects of drought stress on proline and malonaldehyde content of *Radix paeoniae* roots

趋势,始终高于对照组。重度干旱胁迫第 16 天,抗坏血酸(AsA)含量达到峰值,分别是轻度干旱与对照组的 1.14 倍和 1.21 倍,而后 AsA 含量显著下降,到第 24 天,约为对照组的 1.11 倍;与重度干旱相比,轻度干旱胁迫下,AsA 变化相对较平缓(图 6A)。谷胱甘肽(GSH)在重度干旱胁迫下呈先上升后下降趋势,但与 AsA 相比,GSH 下降趋势较为平缓,第 16 天达到峰值,分别为轻度干旱与对照组的 1.41 倍和 1.61 倍,到第 24 天,约为对照组的 1.49 倍;而轻度干旱胁迫下的 GSH 始终处于缓慢上升趋势,到第 24 天,约为对照组的 1.49 倍(图 6B)。

2.8 赤芍 *RpDREB* 基因的克隆与编码蛋白理化性质

通过 RT-PCR 与 RACE 技术结合扩增赤芍 *RpDREB* 基因,cDNA 全长 1189 bp,编码 299 个氨基酸(图 7),采用 Blastx 比对赤芍此片段编码的氨基酸,结果与较多植物 *DREBs* 基因具有较高的相似性,可达 87%~98%,可见,试验成功获得赤芍 *DREB* 全长 cDNA 序列,即 *RpDREB* 基因。ProtParam 预测 *RpDREB* 蛋白质分子式为 C₁₄₁₉H₂₂₀₈N₃₈₄O₄₂₇S₁₂,分子量约 33.86 kD,等电点 7.64,不稳定指数 49.81,无信号肽,表明 *RpDREB* 为不稳定的分泌蛋白质。ProtScale 分析 *RpDREB* 的平均亲水性为-0.519,疏

水性氨基酸少于亲水性氨基酸,表明 RpDREB 蛋白为亲水蛋白。SOPMA 预测赤芍 RpDREB 蛋白质二级结构具有丰富的无规则卷曲(64.44%)、 α -螺旋(22.54%)、延伸链(11.27%)和 β -转角(1.76%)。

2.9 干旱胁迫对赤芍叶片相关基因表达的影响

植物抗旱性是多信号转导途径以及多基因偶联控制的复杂反应,在分子水平上探究抗旱相关基因表达调控方式可更加明确赤芍的抗旱机制。本试验对赤芍进行轻度和重度干旱胁迫处理,分析赤芍干旱应答、光合、抗氧化响应基因表达水平的变化(图 8)。干旱应答元件结合蛋白 RpDREB 基因表达量升高,重度干旱表达水平明显高于轻度干旱,

第 20 天时,分别是轻度干旱与对照组的 1.93 倍和 4.69 倍;干旱胁迫后,光合相关基因 *Psb27* 和 *PsaK* 表达水平上调,其中重度干旱下光合基因的表达水平显著上调;干旱胁迫抑制了抗氧化响应基因 *MDHAR* 表达,在干旱处理后其表达水平明显下降,但重度干旱和轻度干旱下基因的表达水平差异不大,而抗氧化基因 *SOD* 和 *GR* 在重度干旱胁迫后的表达水平明显上调后下降,其中 *SOD* 较显著,第 16 天表达水平达到峰值,分别是轻度干旱与对照组的 1.58 倍和 1.86 倍,而后剧烈下降,到第 24 天时表达水平降到对照组的 1.43 倍,轻度干旱胁迫下 *SOD* 和 *GR* 基因表达水平呈稳定上升趋势。

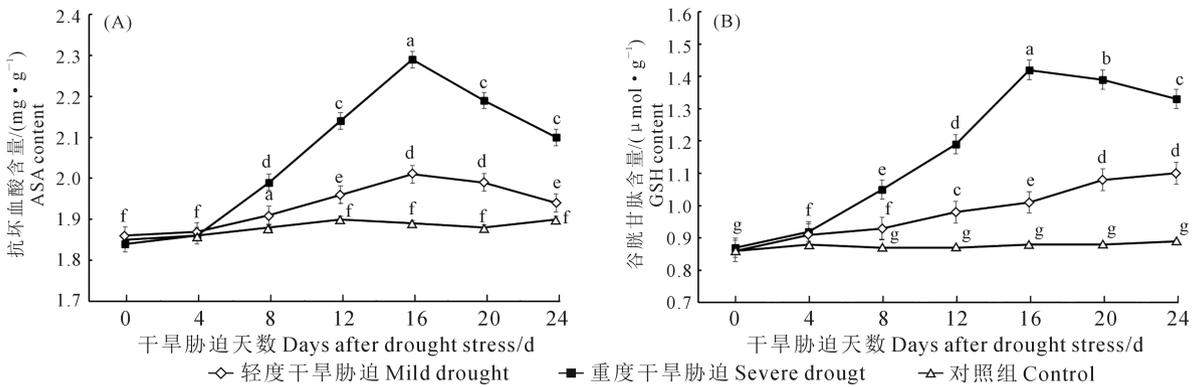


图 6 干旱胁迫对赤芍根系抗坏血酸与谷胱甘肽含量的影响

Fig.6 Effects of drought stress on AsA and GSH content of *Radix paeoniae* roots

```

1      ACATGGGGAGAGAAATTTCAGTGGGCGATCAGTAAAAAAGAGTGCTTTTTTATTTTCTTGCCCGACAATACCAA
76     TTTCCTTCCTGCCCTCATCAACGTTTAACTTGAACCTGATCCTCTTGCTTCATCCCACTCTTGCTTTACAAT
151    ACATATTTAGCTTATTACCAGGAATAATTATCAGAAACTTATGGCTGGAGCAATAGATACATATAGTAGCTGAA
1      M A G A I D T Y S E
226    ACAACAATCCCCTTGTTTTAGATCCTCTAAGTGAGGAGCTAAAGAGAGCATTTGAACCTTTCATCCCTTCAC
11     N N N P L V L D P L S E E L K R A F E P P F I P A S
301    CACCACAAACCACCTTTATACCACCTCTTCAAATAACAATCTTTACATGTTTTCTCAAGTTTTGATTTTGGTAT
36     P P T N P P L Y H S S N N N L Y M F S Q V L I L V
376    TAGAAACAGGTCGGTTTTCCCCCTTTTATCTGAATCTAAAGCTTTATGTTTAAAGAAAACCATCGTTTCCTTT
61     L E T G P F P P S L S E S K A L C L K N H R F L
451    CCCCTAAACTAGCAGTAATGAAACAAAACAAACCCACAGAATTATATAGAGGAGTAAGGCAGAGACATTGGGGGA
86     S P K L A V M K Q N K P T E L Y R G V R Q R H W G
526    AATGGGTGGCTGAGATTAGATTGCCTAAGAATCGAACTCGTCTATGGCTCGGAACATTCAAAACCTGCTGAAGAG
111    K W V A E I R L P K N R T R L W L G T F Q T A E E
601    CTGCCCTTAGCCTATGACAAAGCAGCATATAAATCTCGAGGACACTTTGCTCGTCTCAATTTCCCACATATGAAGC
136    A A L A Y D K A A Y K L R G H F A R L N F P H M K
676    ATAATGGATCTCATGTGACCCACCAATTTGGTCTCTACAAGCCTTTCATCTTCTGTTGGATTGCTAAAGTGAAG
161    H N G S H V T T Q F G L Y K P L H S S V D A K L E
751    CCATTTGCCAAAGCTTGGACATTCCTCAAGAACAGGGGAAAACAGAGTACCCTGTTTCTCCTCTGTTTGTGATT
186    A I C Q S L D I P Q E Q G K T E Y P C F S S V C D
826    CTGATTCATATCCTGTTTTGGATACAGTTTCACCAACTACTGAGGAGGTTTTAATTCGTAAACCCCAAGGTTCCCA
211    S D S Y P V L D T V S P T T E E V L I R K P K V P
901    CCGTTGCAGACGACTCACCGACTGCTTCGTGTTTACCGGAACTGGACTTAAAGTTGTTGGATTTCATAAATCTT
236    T V A D D S P T A S C S P E S G L K L L D F T K S
976    GTTGAATGAATCTGATATTTCTCCTTGGATAAGCTCCCTTCCCCACCTCTGCCGCGACTCACGCGCTCCA
261    C W N E S D I S S L D K L P S P T S A A T P R R S
1051  ATCCTCCGTCGACGCGAAGCTTCAAGCGATCTTTGGCTTAGTTCTGTTTGGGTTTUGATGTCCTCGCAAATTGG
286   N P P S T R S F K R S L A *
1126  TATTTTTGACATGCAACGAGGGGTGTATATTAGGATGCATATCCTTGTTAATATTACTAT
    
```

图 7 RpDREB 基因的 cDNA 序列与编码氨基酸序列

Fig.7 cDNA sequence of RpDREB gene and encoded amino acid sequence

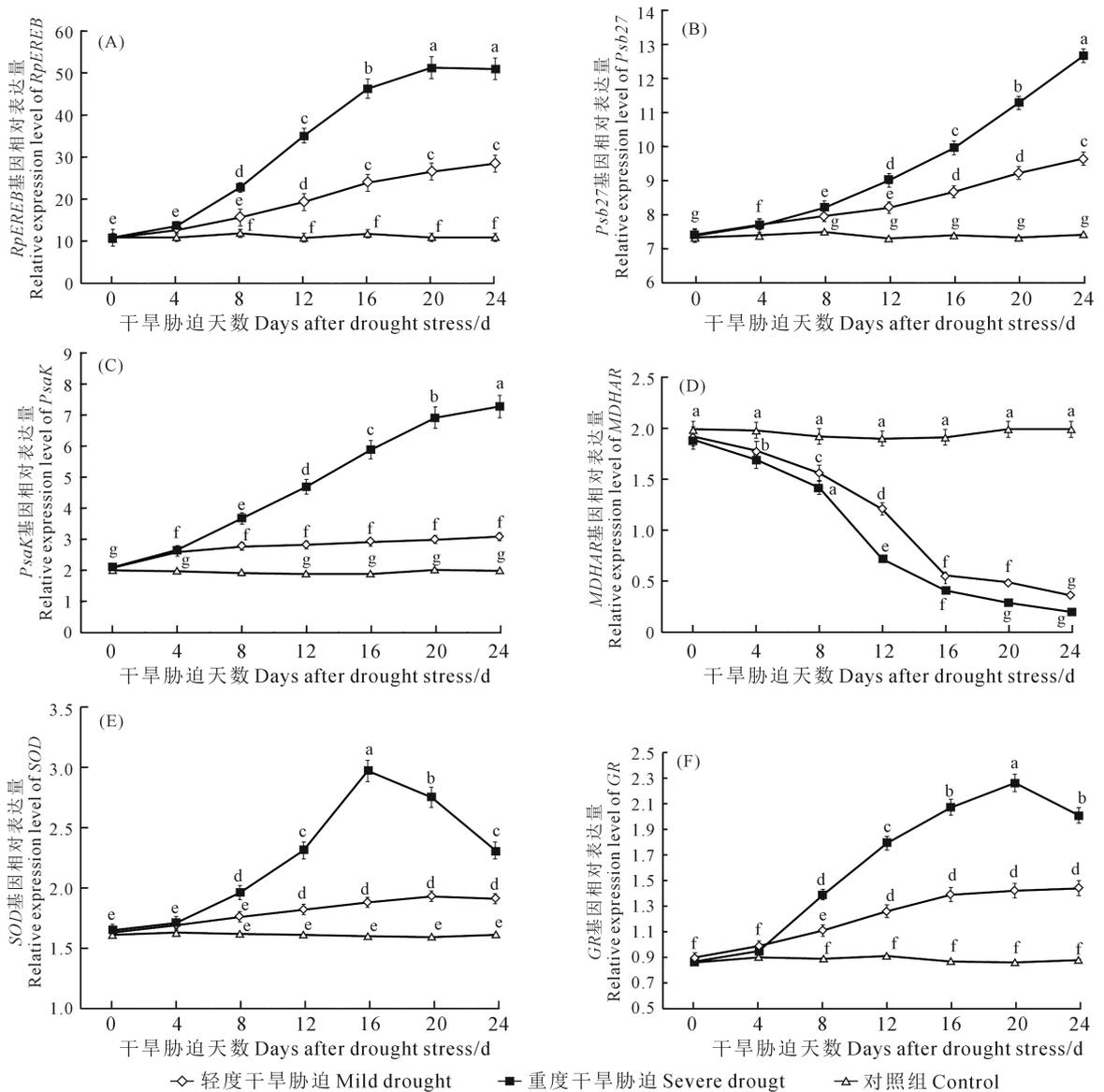


图 8 干旱胁迫对赤芍叶片基因表达水平的影响

Fig.8 Effects of drought stress on gene expression level of *Radix paeoniae* leaves

3 讨论

人类活动、全球持续变暖、土壤干旱与荒漠化加剧了非生物胁迫的发生率及程度,严重影响药用植物的生长发育,给农业生产造成损失。干旱胁迫下植物的形态与组织结构、干旱相关基因的表达等均有不同程度改变。本研究表明,干旱胁迫下赤芍叶片含水量降低,且重度干旱明显低于轻度干旱和对照组,这与卡德尔^[19]报道的马铃薯、三叶草、西瓜、玉米研究结果一致。作为渗透调节物质,可溶性糖与可溶性蛋白含量受干旱胁迫的影响也较大,赤芍可溶性糖含量持续增加,加强了赤芍的渗透调节作用,可消除或修复赤芍植株由于环境干旱引起

的应激损伤,这与干旱胁迫下马铃薯^[20]、花棒^[21]等植物可溶性糖积累趋势一致,而赤芍叶片可溶性蛋白呈先增后降的趋势,可能由于可溶性蛋白多为生物代谢的酶类,干旱胁迫初期,由于赤芍产生应激反应而使体内代谢酶的含量增加、酶活提高,致使赤芍叶片可溶性蛋白含量增加,后期由于持续干旱胁迫,第 20 天时呈急剧下降趋势,抑制了赤芍体内相关蛋白质合成,加之酶快速降解等因素导致赤芍可溶性蛋白含量先增加后显著降低,细胞内渗透物质增加是引起渗透势下降的一个关键因素,体内积累渗透调节物质以维持细胞含水量和膨压,以保证细胞生长、气孔开放和光合等生理过程的进行。除可溶性糖与可溶性蛋白外,脯氨酸(Pro)作为赤芍

细胞质的主要渗透物质,干旱胁迫下其含量显著增加,脯氨酸亲水性极强,能稳定原生质胶体及细胞内的代谢过程,干旱胁迫下蛋白质合成减慢,导致 Pro 参与蛋白质合成量减少,Pro 积累直线上升,保持胞质内溶胶与环境的渗透平衡,防止细胞失水,增强蛋白质的可溶性并减少可溶性蛋白的沉淀,保护这些生物大分子结构和功能的稳定,干旱胁迫产生的氨亦可形成 Pro,起到解毒作用;而 MDA 具有很强的毒性,是膜脂过氧化物作用的主要产物之一,是膜系统受伤害的重要标志,干旱胁迫下它能与膜上的蛋白质氨基酸残基或核酸反应生成 Schiff 碱,增加膜透性。

植物光合参数会由于干旱胁迫生物量分配的变化而变化,如干旱胁迫初期,赤芍叶片的光合速率(P_n)、蒸腾速率(T_r)、细胞间隙 CO_2 浓度(C_i)和气孔导度(G_s)整体变化趋势一致,而持续干旱胁迫导致赤芍叶片的光合速率(P_n)、蒸腾速率(T_r)和气孔导度(G_s)均呈下降趋势,可见赤芍叶片 G_s 降低,偶联 P_n 和 T_r 均降低来抵御干旱胁迫, G_s 和 T_r 仅在重度干旱胁迫初期出现急剧下降后缓慢上升的趋势,可能是前期重度干旱胁迫至 16 d 导致赤芍叶片气孔结构严重受损,后期干旱胁迫持续增强也无法做出应答反应;ABA 对植物气孔运动和基因表达均具调控作用,干旱胁迫下赤芍 ABA 含量先增加后降低,这与王得运等^[22]研究结果一致,可能赤芍为响应干旱胁迫,ABA 含量迅速提高以调节气孔开度缓解干旱胁迫给赤芍带来的损害,但持续干旱 ABA 抵御重度干旱的调节机制降低,导致赤芍 ABA 含量减少; C_i 值在重度干旱初期升高不明显,与对照组、轻度干旱处理差异不显著,在第 12 天呈直线上升趋势,其原因可能是干旱胁迫初期气孔开度降低但仍可消耗 CO_2 进行光合作用,而持续胁迫致使气孔关闭,光合作用停止,赤芍叶片中 CO_2 含量则剧烈积累增加,这与宋学贵等^[23]研究的竹柳 C_i 变化趋势一致;干旱胁迫下赤芍叶片光合作用相关的基因 *Psb27* 和 *PsaK* 表达量均显著上升,表明干旱胁迫损伤了赤芍叶片叶绿体,减弱了光合作用。植株通过提高光合作用相关基因的表达水平以维持正常生长发育;此外,光合色素含量亦可直接影响赤芍的光合能力,干旱胁迫下由于活性氧(ROS)代谢失衡,叶绿素分解加速导致叶绿素含量呈线性下降,而赤芍叶片类胡萝卜素和类黄酮含量增加,可降低干旱胁迫叶绿素的伤害,增加赤芍叶片的抗性;为

防止 ROS 积累造成的细胞损害,植物进化出保护酶系统(SOD)和 AsA-GSH 酶循环系统(GR)等有效抗氧化防御系统,赤芍通过增加酶活性来清除体内积累的 ROS。干旱胁迫下,赤芍 AsA-GSH 循环系统酶活性和 SOD 以及 GR 基因表达水平均呈先升后降趋势,可能是由于干旱初期 SOD 正常合成,但持续干旱胁迫破坏了 SOD 合成酶的结构,造成 SOD 基因表达水平降低,这与董守坤等^[24]和 Wada 等^[25]研究结果一致。综上所述,干旱胁迫对赤芍植株的表型特征、生理特性、光合特性以及相关基因的表达水平等影响较为显著,且随着干旱胁迫程度不同,赤芍植株抗旱响应度亦存在较大差异。

参考文献:

- [1] 司仕英,孟秦语,孙道阳,等.关中地区引种芍药品种的综合性状评价[J].西北林学院学报,2021,36(6):134-139.
SI S Y, MENG Q Y, SUN D Y, et al. Evaluation on comprehensive characteristics of herbaceous peonies introduced in Guanzhong [J]. Journal of Northwest Forestry University, 2021, 36(6): 134-139.
- [2] 赵佳琛,翁倩倩,张悦,等.经典名方中芍药类药材的本草考证[J].中国中药杂志,2019,44(24):5496-5502.
ZHAO J C, WENG Q Q, ZHANG Y, et al. Textual research on Chinese herbaceous peony in Chinese classical prescriptions [J]. China Journal of Chinese Materia Medica, 2019, 44(24): 5496-5502.
- [3] 李学才,常瑜,白静,等.外源 ABA 和钨酸钠对干旱胁迫下白菜型冬油菜 ZEP 表达的影响[J].干旱地区农业研究,2021,39(2):47-54.
LI X C, CHANG Y, BAI J, et al. Effects of exogenous ABA and sodium tungstate on ZEP expression in winter Brassica rapa under drought stress [J]. Agricultural Research in the Arid Areas, 2021, 39(2): 47-54.
- [4] HORIGUCHI G, FUSE T, KAWAKAMI N, et al. Temperature-dependent translational regulation of the ER ω -3 fatty acid desaturase gene in wheat root tips [J]. The Plant Journal, 2000, 24(6): 805-813.
- [5] TEIXEIRA M C, CARVALHO I S, BRODELIUS M. Omega-3 fatty acid desaturase genes isolated from purslane (*Portulaca oleracea* L.): expression in different tissues and response to cold and wound stress [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2010, 58(3): 1870-1877.
- [6] BEGKY K, WALIA H. Drought stress delays endosperm development and misregulates genes associated with cytoskeleton organization and grain quality proteins in developing wheat seeds [J]. Plant Science, 2015, 240: 109-119.
- [7] AHAMMED G J, LI X, WAN H J, et al. SIWRKY81 reduces drought tolerance by attenuating proline biosynthesis in tomato [J]. Scientia Horticulturae, 2020, 270: 109444.
- [8] 黄文莉,马杰,江敏,等.干旱胁迫对马铃薯抗旱生理影响及相关基因的表达[J].分子植物育种,2021,19(21):7213-7221.
HUANG W L, MA J, JIANG M, et al. Drought resistance physiology and related gene expression of potato upon drought stresses [J]. Molec-

- ular Plant Breeding, 2021, 19(21): 7213-7221.
- [9] 孙柏林, 马骊, 曾秀存, 等. 低温胁迫下白菜型冬油菜脂肪酸组分及 FAD3 的差异表达分析[J]. 干旱地区农业研究, 2021, 39(1): 65-74.
SUN B L, MA L, ZENG X C, et al. Fatty acid components and differential expression of FAD3 in winter *Brassica rapa* L. under low temperature stress[J]. Agricultural Research in the Arid Areas, 2021, 39(1): 65-74.
- [10] ZHANG J P, WU Y, LI D Q, et al. Transcriptomic analysis of the underground renewal buds during dormancy transition and release in 'Hangbaishao' peony (*Paeonia lactiflora*) [J]. PLoS One, 2015, 10(3): e0119118.
- [11] 刘凤刚, 巨鹏飞, 王福政, 等. 三唑酮对大豆花期干旱胁迫下根系 AsA-GSH 循环的影响[J]. 大豆科学, 2019, 38(5): 740-746.
LIU F G, JU P F, WANG F Z, et al. Effect of triadimefon on AsA-GSH cycle of soybean roots under drought stress at flowering stage [J]. Soybean Science, 2019, 38(5): 740-746.
- [12] DI IORIO A, MONTAGNOLI A, SCIPPA G S, et al. Fine root growth of *Quercus pubescens* seedlings after drought stress and fire disturbance [J]. Environmental and Experimental Botany, 2011, 74: 272-279.
- [13] 韩永亮, 李世云, 路正营, 等. 62 份陆地棉种质资源苗期抗旱性综合评价及耐旱种质筛选[J]. 干旱地区农业研究, 2021, 39(6): 28-38.
HAN Y L, LI S Y, LU Z Y, et al. Comprehensive identification and selection of drought resistance of 62 cotton varieties (lines) at cotton seedling stage [J]. Agricultural Research in the Arid Areas, 2021, 39(6): 28-38.
- [14] 梁丽娜, 刘雪, 唐勋, 等. 干旱胁迫对马铃薯叶片生理生化指标的影响[J]. 基因组学与应用生物学, 2018, 37(3): 1343-1348.
LIANG L N, LIU X, TANG X, et al. Effect of drought stress on physiological and biochemical indexes of potato leaves [J]. Genomics and Applied Biology, 2018, 37(3): 1343-1348.
- [15] LU Z Q, YE Y X, LIU Y C, et al. Aqueous extract of *Paeoniae Radix Rubra* prevents deep vein thrombosis by ameliorating inflammation through inhibiting GSK3 β activity [J]. Phytomedicine, 2021, 92: 153767.
- [16] 丁彤彤, 李朴芳, 曹丽, 等. 干旱胁迫下不同基因型小麦干物质转运对产量形成的影响[J]. 干旱地区农业研究, 2021, 39(6): 62-72.
DING T T, LI P F, CAO L, et al. Effects of dry matter translocation on yield formation of wheat with different genotypes under drought stress [J]. Agricultural Research in the Arid Areas, 2021, 39(6): 62-72.
- [17] 黄姗, 王伟旗, 侯文胜. 大豆 Usp1 基因的克隆和表达分析[J]. 大豆科学, 2012, 31(4): 546-551.
HUANG S, WANG W Q, HOU W S. Cloning and expression analysis of Usp1 gene from soybean [J]. Soybean Science, 2012, 31(4): 546-551.
- [18] ZHANG T B, LO C Y, XIAO M J, et al. Anti-influenza virus phytochemicals from *Radix Paeoniae Alba* and characterization of their neuraminidase inhibitory activities [J]. Journal of Ethnopharmacology, 2020, 253: 112671.
- [19] 卡德尔·阿不都热西提. 干旱胁迫下不同作物品种叶片含水量的测定[J]. 喀什师范学院学报, 2009, 30(6): 50-53.
KADIR ABDURAXIT. The drought coeres of different crops variety leaves determination of water content [J]. Journal of Kashgar Teachers College, 2009, 30(6): 50-53.
- [20] 于国红, 刘朋程, 李磊, 等. 不同基因型马铃薯对干旱胁迫的生理响应[J]. 生物技术通报, 2022, 38(5): 56-63.
YU G H, LIU P C, LI L, et al. Physiological responses of potato in different genotypes to drought stress [J]. Biotechnology Bulletin, 2022, 38(5): 56-63.
- [21] 韩刚, 党青, 赵忠. 干旱胁迫下沙生灌木花棒的抗氧化保护响应研究[J]. 西北植物学报, 2008, 28(5): 1007-1013.
HAN G, DANG Q, ZHAO Z. Response of antioxidation protection system of *Hedysarum scoparium* to drought stress [J]. Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica, 2008, 28(5): 1007-1013.
- [22] 王得运, 刘培培, 陈云婷, 等. 干旱胁迫对梔子内源激素含量的影响[J]. 中国农业科技导报, 2021, 23(4): 58-63.
WANG D Y, LIU P P, CHEN Y T, et al. Effect of drought stress on endogenous hormone content of *Gardenia jasminoides* Ellis [J]. Journal of Agricultural Science and Technology, 2021, 23(4): 58-63.
- [23] 宋学贵, 王彬, 周光良, 等. 干旱胁迫对竹柳光合特性的影响[J]. 四川林业科技, 2014, 35(5): 40-44.
SONG X G, WANG B, ZHOU G L, et al. Influences of drought stress on photosynthetic characteristics of fragile willow [J]. Journal of Sichuan Forestry Science and Technology, 2014, 35(5): 40-44.
- [24] 董守坤, 马玉玲, 李爽, 等. 干旱胁迫及复水对大豆抗坏血酸-谷胱甘肽循环的影响[J]. 东北农业大学学报, 2018, 49(1): 10-18.
DONG S K, MA Y L, LI S, et al. Effect of drought stress and re-watering on ascorbate-glutathione cycle of soybean [J]. Journal of Northeast Agricultural University, 2018, 49(1): 10-18.
- [25] WADA S, TAKAGI D, MIYAKE C, et al. Responses of the photosynthetic electron transport reactions stimulate the oxidation of the reaction center chlorophyll of photosystem I, P700, under drought and high temperatures in rice [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2019, 20(9): 2068.