

外源 ATP 对盐胁迫下油菜种子 萌发及幼苗生长的影响

梁娟红,李巧丽,赖 晶,张小花,张腾国

(西北师范大学生命科学学院,甘肃 兰州 730070)

摘 要:以‘陇油 8 号’油菜为试验材料,研究了不同浓度(1、10、25、50、100 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)外源 ATP 预处理对盐胁迫下油菜种子萌发及幼苗生物量、 H_2O_2 和 $\cdot\text{OH}$ 含量、抗氧化酶活性、膜损伤程度、渗透调节物质及相关基因表达的影响。结果表明,与对照(不用 ATP 或 NaCl 处理)相比,用不同浓度的外源 ATP 处理,可不同程度地提高油菜种子的发芽率和发芽势,25 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 ATP 处理表现较为显著,发芽率和发芽势分别提高了 26.9% 和 17.2%。25 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 ATP+NaCl 处理相比较于单独 NaCl 胁迫处理,油菜种子的发芽率和发芽势分别提高了 13.7% 和 15.0%,油菜幼苗的生物量(根长、株高、鲜重)、2 种抗氧化酶活性(CAT、POD)、可溶性糖和脯氨酸含量及相关基因(MAPK3 和 MAPK6、SOS1 和 NHX1)的表达量均显著增加,其中根长、株高、鲜重分别增加了 23.6%、27.3%、28.6%,CAT、POD 活性、可溶性糖和脯氨酸含量分别增加了 10.3%、27.0%、15.9%、41.0%;而 H_2O_2 和 $\cdot\text{OH}$ 含量、丙二醛(MDA)含量及相对电导率分别显著降低了 13.6%、6.3%、27.6%、20.5%。以上结果表明,外源 ATP 浸种能够促进 NaCl 胁迫处理下油菜的种子萌发,显著提高幼苗的生物量、抗氧化能力及相关基因的表达,降低其膜损伤,增强油菜幼苗的耐盐性。

关键词:油菜;外源 ATP 浸种;NaCl 胁迫;种子萌发;抗逆生理;基因表达

中图分类号:S634.3;Q945.7 **文献标志码:**A

Effects of exogenous ATP on seed germination and seedling growth of *Brassica campestris* under salt stress

LIANG Juanhong, LI Qiaoli, LAI Jing, ZHANG Xiaohua, ZHANG tengguo

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

Abstract: Using *Brassica campestris* “Longyou 8” as test material, effects of exogenous ATP pretreatment on the seed germination and seedling biomass, H_2O_2 and $\cdot\text{OH}$ content, antioxidant enzymes (CAT and POD) activities, membrane damage, osmoregulatory substances and expression of related genes (MAPK3 and MAPK6, SOS1 and NHX1) of *Brassica campestris* were studied. The results showed that compared with the control (without ATP or NaCl treatment), the germination rate and germination energy of *Brassica campestris* seeds were increased to different degrees with different concentrations (1, 10, 25, 50 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ and 100 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) of exogenous ATP. The exogenous ATP treatment of 25 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ was particularly significant, and the germination rate and germination potential increased by 26.9% and 17.2%, respectively. Compared with NaCl stress treatment, 25 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ exogenous ATP + NaCl treatment increased the germination rate and germination energy of *Brassica campestris* seeds by 13.7% and 15.0%, respectively; significantly increased the biomass (root length, plant height and fresh weight) of *Brassica campestris* seedling, two antioxidant enzyme activities (CAT, POD), soluble sugar and proline content and related gene (MAPK3 and MAPK6, SOS1 and NHX1) amount of express; increased root length, plant height, and fresh weight by 23.6%, 27.3% and 28.6%, respectively. Also, the activities of CAT, POD, soluble sugar, and proline increased by 10.3%, 27.0%, 15.9%, and 41.0%, respectively, while the contents of H_2O_2 and $\cdot\text{OH}$, malondialdehyde (MDA), and relative conductivity significantly decreased by 13.6%, 6.3%, 27.6%, and 20.5%,

respectively. The results indicated that exogenous ATP soaking promoted the seed germination of *Brassica campestris* under NaCl stress, significantly increased the biomass, antioxidant capacity and expression of related salt-tolerant genes, reduced its membrane damage and enhanced the salt tolerance of *Brassica campestris* seedlings.

Keywords: *Brassica campestris*; seed soaking with exogenous ATP; NaCl stress; seed germination; stress resistance physiology; gene expression

5'-三磷酸腺苷(adenosine-5'-triphosphate, ATP)作为一种高能化合物,是生物体内进行正常物质代谢和能量代谢的直接能量来源。已有研究发现,细胞外基质中也存在 ATP,即胞外 ATP (extracellular ATP, eATP),它可以作为一种重要的信使分子,通过特定的细胞信号转导机制参与植物对生物、非生物胁迫的响应过程^[1]。Luattge 等^[2]研究发现施加 ATP 能够促进燕麦叶片维管束鞘细胞对 K⁺ 的吸收。此外施加 ATP 还增强了核酸内切酶的活性^[3]。也有研究表明:增加细胞外 ATP 浓度会抑制拟南芥根的向重力性,跨膜 ATP 浓度会破坏生长素极性运输^[4],导致花粉不萌发以及抑制花粉管生长^[5]。另外,外源 ATP 还参与次生代谢物的积累^[6]、细胞凋亡^[7]、胁迫抗性^[8]等生理过程。但关于外源 ATP 对种子萌发及抗盐性的影响鲜见报道。

盐胁迫作为非生物逆境因子,对植物生存和生长非常不利。种子萌发是植物生长的关键阶段之一,此时遭受盐胁迫直接影响植物生长发育。种子萌发过程中对盐浓度非常敏感,其发芽指数和活力指数均随着盐浓度升高而降低^[9]。盐胁迫对种子萌发的影响主要体现在渗透胁迫影响种子吸收水分和有毒离子积累影响胚或幼苗的发育^[10]。在盐胁迫过程中,油菜幼苗产生了大量的活性氧(ROS),如过氧化氢(H₂O₂)、羟自由基(·OH)、超氧阴离子(O₂⁻)等自由基,当生成量超过植物自身的清除能力时,会破坏生物膜结构、细胞结构、蛋白质、DNA 和脂质等成分^[11]。而施加适量浓度的外源 ATP 可以触发植物体对生物和非生物胁迫的响应,例如外源 ATP 对膜电位反应、基因表达及叶绿素荧光有调控作用,还可以增强植物对疾病、低渗和冷胁迫的抗性^[7]。

植物液泡为储存 Na⁺ 提供了一个比较大的空间,液泡膜中的钠-氢交换蛋白(NHX)可以将细胞质中的 Na⁺ 螯合到液泡中,降低细胞质中 Na⁺ 浓度,减少过量 Na⁺ 对植物的毒害^[12]。第一个 NHX 转运体基因是在拟南芥中克隆并命名为 *AtNHX1*^[13]。研究发现,NHX 也会影响植物体内 K⁺ 的区室化。过表达 *AtNHX1* 基因的番茄在盐胁迫条件下促进了 K⁺ 从地下向地上运输,液泡中 K⁺ 浓度上升,细胞间

Na⁺/K⁺降低,从而有效降低盐胁迫对过表达番茄的盐害作用^[14]。Zhao 等^[15]在两种耐盐性不同的杨树中研究发现,外源 ATP 的施用显著降低了两种杨树中盐诱导的 K⁺ 外流,触发盐敏感植株中的 SOS(盐超敏感信号转导途径)信号级联反应,并有助于盐度下 Na⁺ 稳态的控制。除此之外,在植物响应盐胁迫过程中 SOS 信号途径也发挥着重要的作用,其中 *SOS1* 是参与 Na⁺ 从细胞质向质外体转运的关键基因^[16],在细胞膜上编码 Na⁺/H⁺ 逆向转运蛋白,在种子萌发过程中起重要作用,处于盐胁迫条件下也能帮助植物更好地生长发育^[17]。Jeter 等^[18]研究发现,在拟南芥中,ATP 的外源处理可以激活 MAP 激酶途径以及参与乙烯生物合成和信号转导蛋白的转录物水平。同时,MAP 激酶级联途径也参与抗盐调控过程。有研究表明,MEKK1-MKK2-MPK4/MPK6 级联途径可以参与盐胁迫下拟南芥的信号响应过程^[19],而 MKK9-MPK3/MPK6 级联途径参与调节乙烯的合成并在拟南芥对盐胁迫的响应中发挥作用^[20]。

随着冬油菜北移技术的成功示范,白菜型冬油菜(*Brassica campestris*)已成为北方寒旱区主要的油料作物和生态作物^[21]。但北方土壤广泛存在不同程度的盐渍化,严重影响了冬油菜的生长发育和高产潜力的发挥^[22]。因此,本文以白菜型冬油菜‘陇油 8 号’为材料,研究外源 ATP 浸种对 NaCl 胁迫处理下油菜种子萌发、幼苗生理及相关基因表达(*MAPK3* 和 *MAPK6*、*SOS1* 和 *NHX1*)的影响,为提高油菜抗盐性提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料处理及培养

挑选籽粒饱满、大小均一的‘陇油 8 号’种子(由甘肃农业大学农学院提供)用自来水反复冲洗,室温下浸泡 2 h,再进行以下处理。(1)不同浓度的外源 ATP 溶液浸种处理:将种子分别置于浓度为 0、1、10、25、50、100 μmol · L⁻¹ 的外源 ATP 溶液中,于 (25±1)℃ 培养箱黑暗浸种 12 h;浸种后的种子用 0.5% 的次氯酸钠消毒 5 min,无菌水冲洗 5~6 次后接种到 1/2 MS 固体培养基中,每个培养皿中放置

30 粒种子,置于(25±1)℃、光照强度为 250 μmol·(m²·s)⁻¹、光照周期 16 h/8 h(光照/黑暗)的培养箱(RDN 型人工气候箱)中培养。每个处理 5 个重复。(2)CK:将油菜种子置于 1/2 MS 固体培养基中,培养条件与(1)处理相同。(3) NaCl 单独处理:将油菜种子置于含 200 mmol·L⁻¹ NaCl 的 1/2 MS 固体培养基中,培养条件与(1)处理相同。(4) ATP +NaCl 复合处理:用 25 μmol·L⁻¹外源 ATP 溶液,按照(1)处理的方法浸种。用上述方法接种于含 200 mmol·L⁻¹ NaCl 的 1/2 MS 固体培养基中,培养条件与(1)处理相同。

1.2 种子萌发相关指标的测定

培养 3 d 后观察种子萌发情况,以胚根凸出种皮长度大于等于种子长度作为发芽标志,计算发芽势。处理 7 d 后观察种子发芽情况,再以上述方法观察种子的萌发情况,计算发芽率。

1.3 生理指标的测定

取培养 7 d 的油菜幼苗地上部分进行后续试验。幼苗根长与株高测定参照田梦雨^[23]的方法;过氧化氢(H₂O₂)含量测定参照 Yin 等^[24]的方法;羟自由基(·OH)含量测定参照 Halliwell^[25]的方法;丙二醛(MDA)含量测定参照硫代巴比妥酸法^[26];相对电导率测定参照电导率仪法^[27];游离脯氨酸含量测定参照茚基水杨酸法^[28];可溶性糖含量测定参照蒽酮显色法^[29]。

1.4 活性胶电泳及染色

活性胶制备参照 Lamml^[30]的方法。采用 5% 的浓缩胶和 12% 的分离胶。CAT 上样量为 6 μL, POD 上样量为 9 μL。浓缩胶电压为 80 V,分离胶电压为 120 V,冰浴中稳压电泳约 5~6 h。

CAT 活性染色参照 Woodbury 等^[31]的方法;POD 同工酶活性胶染色参照黄永芬等^[32]的醋酸联苯胺方法。

1.5 实时荧光定量 PCR

油菜幼苗总 RNA 的提取采用 TaKaRa MiniBEST Plant RNA Extraction Kit 试剂盒,参照试剂盒实验步骤操作。以提取的总 RNA 为模板,参照反转录试剂盒合成 cDNA。以 Actin-F、Actin-R 为管家基因引物,MAPK3-F 和 MAPK3-R 为 MAPK3 引物,MAPK6-F 和 MAPK6-R 为 MAPK6 引物,SOS1-F 和 SOS1-R 为 SOS1 引物,NHX1-F 和 NHX1-R 为 NHX1 引物(表 1),按照荧光定量 PCR 试剂盒 SYBR Premix Ex TaqTM(购自 TaKaRa 公司)的操作步骤用 25 μL 体系进行扩增检测。采用 2^{-ΔΔCt}方法分析数据,计算基因的相对表达量。

1.6 数据处理

试验数据使用 SPSS 20.0 软件进行统计分析,用 Excel 2010 软件作图。

2 结果与分析

2.1 不同浓度外源 ATP 浸种对油菜种子发芽率和发芽势的影响

由表 2 可知,与 CK 相比较,发芽势和发芽率均随外源 ATP 浓度增大呈先升后降的趋势。当外源 ATP 浓度为 25 μmol·L⁻¹时,发芽势和发芽率达到最大值,分别比 CK 提高 26.9% 和 17.2%。结果表明,外源 ATP 浓度在一定范围内对种子萌发具有促进作用,而 25 μmol·L⁻¹的外源 ATP 处理效果最明显。

2.2 外源 ATP 浸种对 NaCl 胁迫处理下油菜种子发芽率和发芽势的影响

如表 3 所示,与 CK 相比,200 mmol·L⁻¹ NaCl 胁迫处理显著抑制了油菜种子萌发,发芽率、发芽势

表 1 PCR 引物序列
Table 1 Sequences of PCR primers

基因号 Gene number	引物 Primer	碱基序列 Sequence(5' to 3')
NM_001316289.1	MAPK3-F	CACGGAGGACAGTTCATAAGCTAC
	MAPK3-R	TCCAACACAGAGCAAACGATG
XM_022716025.1	MAPK6-F	TCATACGCTCTAACCAAGGCTTATC
	MAPK6-R	AAGAGGAGGTTGCTCGGTTTC
XM_013807628.2	SOS1-F	AGACACCTATTGCCAGGCGAC
	SOS1-R	AGAGACGTATGCCATCCCT
XM_022705685.1	NHX1-F	AGTGTGAACTGCCTTCGT
	NHX1-R	AAGGCGGTGATGCATTCGTT
XM_013830703.2	Actin-F	TGTGCCAATCTACGAGGTTT
	Actin-R	TTTCCCGCTCTGCTGTGTTG

注:F 为正向引物,R 为反向引物。
Note: F is the forward primer and R is the reverse primer.

表 2 不同浓度外源 ATP 对油菜种子发芽率和发芽势的影响

Table 2 Effects of exogenous ATP in different concentrations on germination rate and germination energy of *Brassica campestris*

外源 ATP 浓度/(μmol·L ⁻¹) Concentration of exogenous ATP	发芽率/% Germination rate	发芽势/% Germination energy
0 (CK)	71.00±0.01c	57.17±0.02ab
1	74.73±0.03c	57.78±0.05ab
10	80.98±0.04abc	61.93±0.01ab
25	90.14±0.02a	67.03±0.03a
50	87.92±0.04ab	59.79±0.01ab
100	76.99±0.04bc	54.95±0.08b

注:同列不同小写字母表示处理间差异显著(P<0.05)。下同。
Note: Different lowercase letters indicate significant difference among treatments (P<0.05). The same below.

分别下降了 13.5%、4.7%；ATP+NaCl 复合处理下的种子萌发情况显著优于 NaCl 单独处理,其发芽率、发芽势分别提高了 13.7%和 15.0%。结果表明,NaCl 胁迫处理显著抑制了油菜种子萌发,而 ATP 浸种能显著缓解 NaCl 胁迫对油菜种子萌发的抑制作用。

2.3 外源 ATP 浸种对 NaCl 胁迫处理下油菜幼苗生物量的影响

如表 4 所示,200 mmol · L⁻¹ NaCl 胁迫处理下的油菜幼苗根长、株高及鲜重均低于 CK 且鲜重显著下降;ATP+NaCl 复合处理下的油菜幼苗根长、株高及鲜重相较于 NaCl 单独处理分别升高了 23.6%、27.3%、28.6%。结果表明,NaCl 胁迫处理能抑制油菜幼苗生长和生物量积累,外源 ATP 浸种能够缓解 NaCl 胁迫处理对油菜幼苗的抑制作用。

2.4 外源 ATP 浸种对 NaCl 胁迫处理下油菜幼苗生理特性的影响

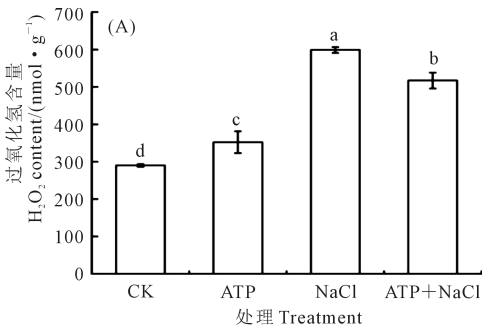
2.4.1 外源 ATP 浸种对 NaCl 胁迫处理下油菜幼苗 H₂O₂和 · OH 含量的影响 如图 1 显示,与 CK 相比,外源 ATP 浸种、NaCl 胁迫处理均显著诱导油菜

幼苗中 H₂O₂(图 1A)和 · OH(图 1B)的产生;ATP+NaCl 复合处理与 NaCl 单独胁迫处理相比,H₂O₂和 · OH 的含量分别降低了 13.6%和 6.3%。结果表明,NaCl 胁迫处理显著促进了油菜幼苗中 ROS 的积累,而外源 ATP 浸种能够降低 NaCl 胁迫处理下油菜中活性氧(ROS)含量,缓解盐胁迫对油菜幼苗的损伤。

2.4.2 外源 ATP 浸种对 NaCl 胁迫处理下油菜幼苗 CAT 和 POD 活性的影响 由图 2A 可知,不同处理下 CAT 同工酶条带数相同,有且仅有一条带,在外源 ATP 浸种、NaCl 单独胁迫处理下,油菜幼苗 CAT 酶带相对灰度比 CK 分别高 3.0%和 16.0%;ATP+NaCl 处理下的 CAT 酶带相对灰度比 NaCl 单独胁迫处理高 10.3%。如图 2B 所示,4 个处理下的 POD 有 5 条同工酶带,但同一酶带在不同处理下有差异。NaCl 胁迫处理下油菜幼苗 POD 酶带相对灰度比 CK 高 89.0%;ATP+NaCl 处理下 POD 同工酶条带相对灰度比 NaCl 单独处理高 27.0%。结果表明,外源 ATP 浸种、NaCl 胁迫处理都会提高 CAT、POD 酶活性水平;外源 ATP 浸种进一步提高了 NaCl 胁迫下油菜幼苗中的 CAT、POD 酶活性,增强了油菜幼苗对体内过量 ROS 的清除能力。

表 3 外源 ATP 浸种对 NaCl 胁迫处理下油菜种子萌发的影响

Table 3 Effects of seed soaking with exogenous ATP on germination rate and germination energy of <i>Brassica campestris</i> under NaCl stress		
处理 Treatment	发芽率/% Germination rate	发芽势/% Germination energy
CK	65.56±1.11b	70.00±3.85b
ATP	77.78±2.94a	84.44±1.11a
NaCl	56.67±8.39c	66.67±8.82c
ATP+NaCl	64.44±5.56b	76.67±5.09b



注:不同小写字母表示处理间差异显著(P<0.05)。下同。

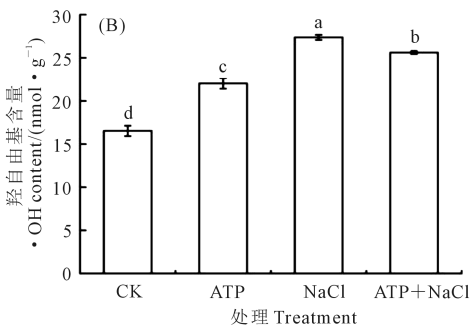
Note: Different lowercase letters in the figure indicate significant differences among treatments (P<0.05). The same below.

图 1 NaCl 胁迫处理下外源 ATP 浸种的油菜幼苗中 H₂O₂(A)和 · OH (B) 含量

Fig.1 H₂O₂(A) and · OH (B) accumulation of *Brassica campestris* seedling exposed under NaCl stress by exogenous ATP seed soaking

表 4 外源 ATP 浸种对 NaCl 胁迫处理下油菜幼苗生物量的影响

Table 4 Effects of seed soaking with exogenous ATP on seedling biomass of <i>Brassica campestris</i> under NaCl stress			
处理 Treatment	根长/cm Root length	株高/cm Plant height	5 株鲜重/g Fresh weight of 5 plants
CK	5.61±0.43b	2.88±0.13b	0.54±0.04ab
ATP	8.13±0.61a	5.30±0.46a	0.60±0.02a
NaCl	4.95±0.39b	2.42±0.17b	0.35±0.05c
ATP+NaCl	6.12±0.47b	3.08±0.20b	0.45±0.01bc



2.4.3 外源 ATP 浸种对 NaCl 胁迫处理下油菜幼苗膜损伤程度的影响 逆境条件下,MDA 和相对电导率能够作为细胞损伤程度的指标。从图 3 可以看出,与 CK 相比,NaCl 胁迫显著增加了油菜中的 MDA 含量(图 3A)和相对电导率(图 3B),表明 NaCl 胁迫可以加剧油菜幼苗的膜脂过氧化程度。外源 ATP 浸种显著降低了 NaCl 胁迫处理下的 MDA 含量和相对电导率,MDA 含量降低了 27.6%,相对电导率降低了 20.5%。结果表明,外源 ATP 浸种可以降低 NaCl 胁迫处理下油菜中的 MDA 含量和相对电导率,减少膜脂过氧化程度和电解质的渗漏,保护细胞膜的完整性,减轻盐胁迫对油菜的损伤。

2.4.4 外源 ATP 浸种对 NaCl 胁迫处理下油菜渗透调节物质的影响 可溶性糖和脯氨酸是细胞内重要的渗透调节物质,可保护细胞内蛋白分子,稳定生物大分子结构。如图 4 可见,NaCl 胁迫处理、ATP+NaCl 复合处理都显著增加了油菜幼苗中可溶性糖(图 4A)和脯氨酸(图 4B)含量,NaCl 胁迫处理下可溶性糖、脯氨酸含量分别达到 CK 的 187.8%和 459.5%;ATP+NaCl 复合处理下油菜幼苗中可溶性糖和脯氨酸含量分别达到 NaCl 胁迫处理的 15.9%

和 41.0%。结果表明,NaCl 胁迫处理下外源 ATP 浸种能显著增加油菜幼苗中渗透调节物质积累,增强细胞的持水能力,维持细胞的正常生理代谢,从而增强油菜幼苗的耐盐性。

2.5 外源 ATP 浸种对 NaCl 胁迫处理下油菜幼苗相关基因表达的影响

2.5.1 外源 ATP 浸种对 NaCl 胁迫处理下油菜幼苗 MAPK3/MAPK6 基因表达的影响 如图 5 所示,外源 ATP 处理下的油菜幼苗中 MAPK3(图 5A)和 MAPK6(图 5B)基因表达量分别较 CK 增加 16.0%、7.0%。在 NaCl 单独胁迫处理下的 MAPK3 和 MAPK6 基因表达量分别较 CK 增加 86.0%和 69.0%。ATP+NaCl 处理下的 MAPK3 和 MAPK6 基因表达量分别较 NaCl 单独胁迫处理增加 75.3%、146.2%。结果表明,油菜幼苗中 MAPK3 和 MAPK6 基因的表达水平受到 NaCl 胁迫处理的诱导,外源 ATP 浸种增强了 NaCl 胁迫处理下油菜幼苗中 MAPK3 和 MAPK6 基因的表达。

2.5.2 外源 ATP 浸种对 NaCl 胁迫处理下油菜幼苗 SOS1/NHX1 基因表达的影响 如图 6 所示,NaCl 胁迫处理下的油菜幼苗中 NHX1(图 6A)和 SOS1(图 6B)

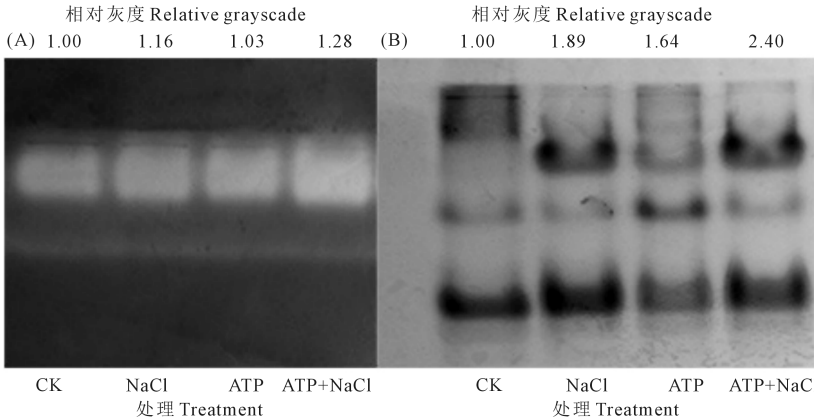


图 2 盐胁迫处理下外源 ATP 浸种的油菜幼苗 CAT(A)和 POD(B)电泳图及相对灰度分析
Fig. 2 Electrophoresis and relative grayscale analysis of antioxidant enzymes in *Brassica campestris* seedling under NaCl stress by exogenous ATP seed soaking

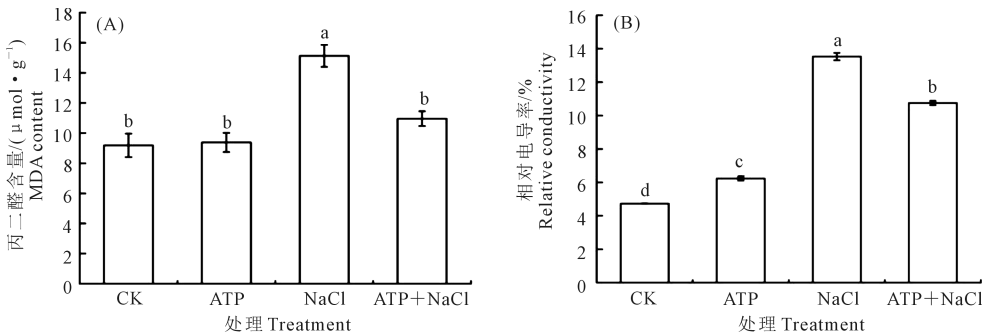


图 3 外源 ATP 浸种对 NaCl 胁迫处理下油菜幼苗中丙二醛(A)和相对电导率(B)的影响
Fig.3 Effects of seed soaking with exogenous ATP on malondialdehyde (A) and relative conductivity (B) of *Brassica campestris* seedling under NaCl stress

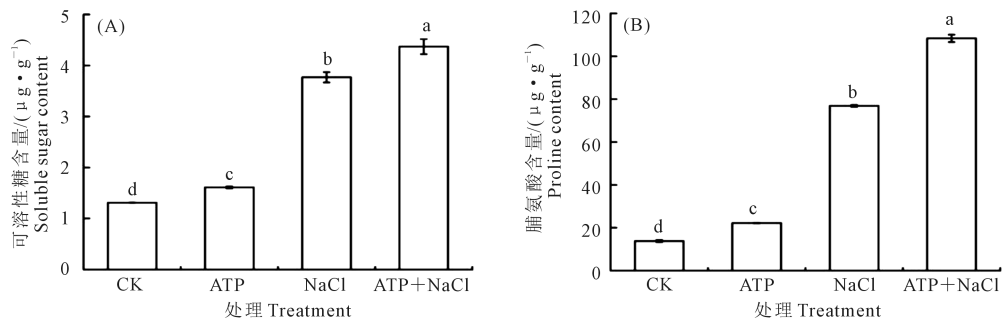


图 4 外源 ATP 浸种对 NaCl 胁迫处理下油菜幼苗中可溶性糖 (A) 和脯氨酸 (B) 的影响
Fig.4 Effects of seed soaking with exogenous ATP on soluble sugar (A) and proline (B) content of *Brassica campestris* seedling under NaCl stress

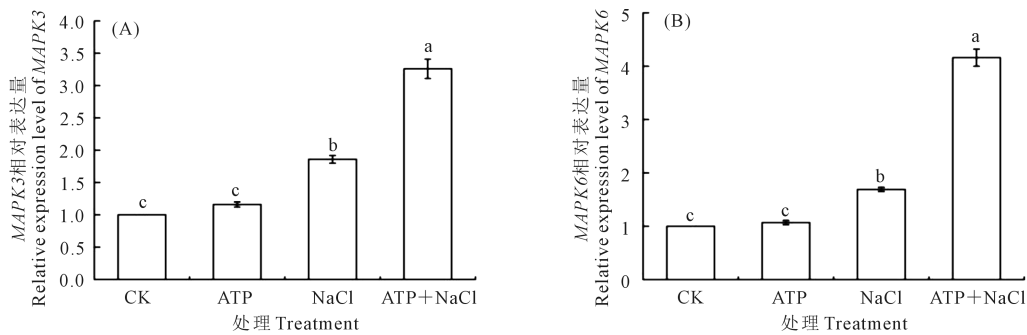


图 5 外源 ATP 浸种对 NaCl 胁迫处理下油菜幼苗中 MAPK3 (A) 和 MAPK6 (B) 基因表达的影响
Fig.5 Effects of seed soaking with exogenous ATP on the expression of MAPK3 (A) and MAPK6 (B) genes in *Brassica campestris* seedling under NaCl stress

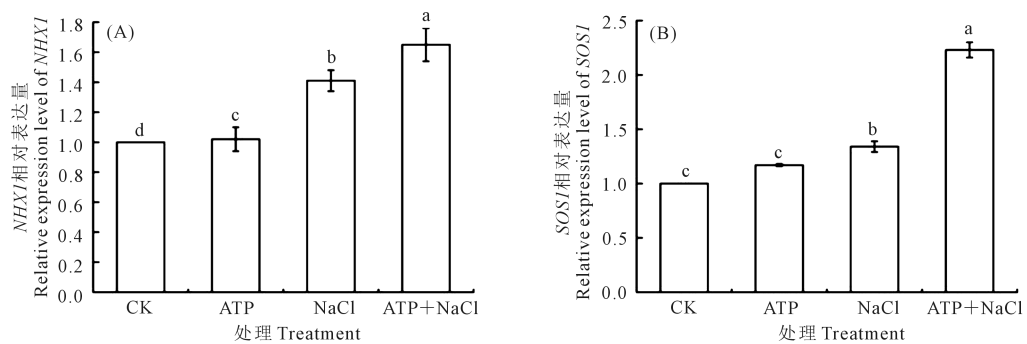


图 6 外源 ATP 浸种对 NaCl 胁迫处理下油菜幼苗 NHX1 (A) 和 SOS1 (B) 基因表达的影响
Fig.6 Effects of seed soaking with exogenous ATP on the expression of NHX1 (A) and SOS1 (B) genes in *Brassica campestris* seedling under NaCl stress

基因表达量上调,分别是 CK 的 1.41 倍和 1.34 倍。与 NaCl 单独胁迫处理相比,ATP+NaCl 处理下的油菜幼苗中 *NHX1* 和 *SOS1* 基因表达量分别上升了 17.0%和 66.4%。结果表明:油菜幼苗中 *NHX1* 和 *SOS1* 基因的表达受到 NaCl 胁迫处理的诱导,外源 ATP 浸种进一步提高了 NaCl 胁迫处理下油菜幼苗中 *NHX1* 和 *SOS1* 基因的表达。

3 讨论与结论

盐胁迫对植物的危害包含离子胁迫和渗透胁迫。

斯琴巴特尔等^[33]研究玉米 (*Zea mays*) 种子萌发时发现盐胁迫抑制了玉米种子的发芽。孙君艳等^[34]研究盐胁迫对小麦种子萌发及幼苗生长的影响,发现高浓度盐处理对小麦种子萌发和幼苗生长起抑制作用。Chivasa 等^[35]研究结果表明:细胞外 ATP 可能通过直接或间接的方式与细胞膜外的某种蛋白质结合,从而在胁迫条件下提高细胞生存率。本试验结果发现,200 mmol · L⁻¹ NaCl 处理对油菜种子萌发有抑制作用,而 25 μmol · L⁻¹ 的外源 ATP 对油菜种子萌发有显著的促进作用,并能够提

高油菜幼苗的生物量积累,外源 ATP 浸种能缓解 NaCl 处理对油菜种子萌发的抑制作用。

当植物未遭受到胁迫时,体内 ROS 的产生和清除处于动态平衡状态。当植物处于逆境环境时,这种动态平衡会被打破,体内将积累大量的 H_2O_2 、 $\cdot\text{OH}$ 、 O_2^- 等活性氧自由基。自由基会造成植物膜脂过氧化,增大膜透性,破坏膜结构的完整性,引起蛋白质变性, DNA 损伤,严重时引起细胞死亡^[36]。已有研究显示,用外源 ATP 预处理 4 h,可以显著提高干旱胁迫下玉米酶促防御系统中 SOD、CAT 和 APX 活性,以及可溶性蛋白和游离脯氨酸的含量,而使得膜脂过氧化产物丙二醛含量显著下降^[37]。本研究结果表明,外源 ATP、NaCl 胁迫处理都能促进油菜幼苗中 H_2O_2 和 $\cdot\text{OH}$ 的积累,提高了 CAT、POD 抗氧化酶活性。NaCl 胁迫处理下油菜幼苗中 MDA 含量和相对电导率增加,严重影响了细胞膜完整性,同时脯氨酸和可溶性糖含量增加,提高了油菜幼苗的吸水能力。外源 ATP+NaCl 处理降低了油菜幼苗中 H_2O_2 和 $\cdot\text{OH}$ 的积累以及 MDA 含量和相对电导率,进一步提高了脯氨酸和可溶性糖含量、CAT 和 POD 抗氧化酶活性,降低了油菜生物膜损伤程度,增强了油菜幼苗膜稳定性及吸水能力,提高幼苗的抗盐性。

植物在遭受盐胁迫时会触发一系列抗盐相关基因的表达,如 *NHX* 和 *SOS* 基因的表达。液泡型 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白 (*NHX1*) 可以将细胞质中的 Na^+ 逆 Na^+ 浓度梯度转运到液泡中进行区室化,质膜型 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白 (*SOS1*) 也可以将 Na^+ 排到胞外,防止细胞质中的细胞器受到 Na^+ 的危害。过表达 *OsNHX1* 转基因水稻细胞在盐条件下存活较好,生长速度和总 Na^+ 含量显著高于野生型^[38]。本研究发现,油菜幼苗中 *NHX1*、*SOS1* 基因的表达受到盐胁迫的诱导,而外源 ATP 浸种提高了盐胁迫处理下油菜幼苗中 *NHX1*、*SOS1* 基因的表达,*NHX1* 和 *SOS1* 转录水平的提高,预示着外源 ATP 处理触发了 *NHX* 基因家族和 *SOS* 途径介导的 Na^+ 外排。MAPK 信号级联途径在植物应对盐、干旱、寒冷、炎热和受伤等信号过程中发挥着十分重要的作用,主要是 *MAPK3*、*MAPK4* 和 *MAPK6* 被快速激活^[39]。Teige 等^[20] 研究发现,冷和盐胁迫激活拟南芥的 MKK2,控制冷应答基因 (*COR*) 的表达,调控植物耐冷和耐盐能力。而且, MKK2 上游的 MEKK1 和下游的 MPK4 和 MPK6 都能被各种胁迫所激活。在本研究结果中,油菜幼苗中 *MAPK3*、*MAPK6* 基因的表达受到盐胁迫的诱导,而外源 ATP 浸种提高了盐胁迫

处理下油菜幼苗中 *MAPK3*、*MAPK6* 基因的表达。以上这些研究结果表明,外源 ATP 在调节植物响应盐胁迫的过程中,盐超敏感 (*SOS*) 通路以及 MAPK 激酶途径等多种信号传导途径之间可能存在交叉对话。

综上所述,外源 ATP 浸种通过激活 ROS 清除系统来有效地清除过量的 ROS,降低 NaCl 胁迫处理下油菜幼苗膜脂过氧化程度,促进渗透调节物质的积累及抗盐胁迫相关基因的表达,有效保证油菜幼苗代谢活动的正常进行,从而提高油菜幼苗的抗盐性。

参考文献:

- [1] Tanaka K, Gilroy S, Jones A M, et al. Extracellular ATP signaling in plants [J]. Trends in cell biology, 2010, 20(10):601-608.
- [2] Lüttge U, Schoch E V, Ball E, et al. Can externally applied ATP supply energy to active ion uptake mechanisms of intact plant cells? [J]. Functional Plant Biology, 1974, 1(2):211-220.
- [3] Udvardy J, Farkas G L. ATP stimulates the formation of nucleases in excised Avena leaves [J]. Zeitschrift Für Pflanzenphysiologie, 1973, 69(5):394-401.
- [4] Tang W, Brady S R, Sun Y, et al. Extracellular ATP inhibits root gravitropism at concentrations that inhibit polar auxin transport [J]. Plant Physiology, 2003, 131(1):147-154.
- [5] Wu J, Sun Y, Roux S J. Disruption of apyrases inhibits pollen germination in Arabidopsis [J]. Plant Physiology, 2003, 131(4):1638-1647.
- [6] Wu S J, Wu J Y. Extracellular ATP-induced NO production and its dependence on membrane Ca^{2+} flux in *Salvia Miltiorrhiza* hairy roots [J]. Journal of Experimental Botany, 2008, 59(14):4007-4016.
- [7] Sun J, Zhang X, Deng S H, et al. Extracellular ATP signaling is mediated by H_2O_2 and cytosolic Ca^{2+} in the salt response of populus euphratica cells [J]. Plos One, 2012, 7(12):e53136.
- [8] Torred J, Rivera A, Clark G, et al. Participation of extracellular nucleotides in the wound response of *dasycladus vermicularis* and *acetabularia acetabulum* (dasycladales, chlorophyta) [J]. Journal of Phycology, 2008, 44(6):1504-1511.
- [9] Liu D M, Han C X, Deng X, et al. Integrated physiological and proteomic analysis of embryo and endosperm reveals central salt stress response proteins during seed germination of winter wheat cultivar Zhengmai 366 [J]. BMC Plant Biology, 2019, 19(1):1-15.
- [10] 卡恩. 种子萌发的生理生化[M].北京:农业出版社,1990:78-82.
- [11] Impa S M, Nadarajan S, Jagadish S V K. Drought stress induced reactive oxygen species and anti-oxidants in plants[C]//Ahmad P, Prasad M N V. Abiotic Stress Responses in Plants. New York: Springer Science+Business Media, LLC, 2012:131-148.
- [12] Zhu J K. Regulation of ion homeostasis under salt stress [J]. Current Opinion in Plant Biology, 2003, 6(5):441-445.
- [13] Gaxiola R A, Rao R, Sherman A, et al. The *Arabidopsis thaliana* proton transporters, AtNHX1 and AVP1, can function in cation detoxification in yeast [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1999, 96(4):1480-1485.
- [14] Rodríguez-Rosales M P, Jiang X, Gálvez F J, et al. Overexpression of the tomato K^+/H^+ antiporter LeNHX2 confers salt tolerance by improving potassium compartmentalization[J]. New Phytologist, 2008,

179(2): 366-377.

[15] Zhao N, Wang S J, Ma X J, et al. Extracellular ATP mediates cellular K^+/Na^+ homeostasis in two contrasting poplar species under NaCl stress[J]. *Trees*, 2016, 30(3):825-837.

[16] Mansouri S, Mehrabi A, Kahrizi D. Phylogenetic analysis of *SOS1* gene in different species based on coding sequences [J]. *Middle East Journal Science*, 2013, 14(19):1226-1229.

[17] Jarvis D E, Ryu C H, Beilstein M A, et al. Distinct roles for *SOS1* in the convergent evolution of salt tolerance in *Eutrema salsugineum* and *Schrenkiella parvula*[J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2014, 31(8):2094-2107.

[18] Jeter C R, Tang W, Henaff E, et al. Evidence of a novel cell signaling role for extracellular adenosine triphosphates and diphosphates in *Arabidopsis*[J]. *The Plant Cell*, 2004, 16(10):2652-2664.

[19] Teige M. The MKK2 pathway mediates cold and salt stress signaling in *Arabidopsis*[J]. *Molecular Cell*, 2004, 15:141-152.

[20] Xu J, Li Y, Wang Y, et al. Activation of MAPK kinase 9 induces ethylene and camalexin biosynthesis and enhances sensitivity to salt stress in *Arabidopsis*[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2008, 283:26996-27006.

[21] 孙万仓, 马卫国, 雷建民, 等. 冬油菜在西北旱寒区的适应性和北移的可行性研究[J]. *中国农业科学*, 2007, 40(12):2716-2726.

[22] 刘自刚, 王志江, 方圆, 等. NaCl 胁迫对白菜型冬油菜种子萌发和幼苗生理的影响[J]. *中国油料作物学报*, 2017, 39(3):351-359.

[23] 田梦雨. 干旱胁迫对小麦苗期生长的影响及其生理机制[D]. 南京:南京农业大学, 2009.

[24] Yin L N, Mano J, Wang S W, et al. The involvement of lipid peroxide-derived aldehydes in aluminum toxicity of Tobacco roots [J]. *Plant Physiology*, 2010, 152(3):1406-1417.

[25] Halliwell B, Gutteridge J M, Aruoma O I. The deoxyribose method: a simple “test-tube” assay for determination of rate constants for reactions of hydroxyl radicals [J]. *Analytical Biochemistry*, 1987, 165(1):215-219.

[26] 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, 2000:260-261.

[27] 郝建军, 康宗利, 于洋. 植物生理学实验技术[M]. 北京:化学工业出版社, 2007:138-140.

[28] Bates L S, Waldren R P, TEARE I D. Rapid determination of free proline for water-stress studies [J]. *Plant and Soil*, 1973, 39(1):205-207.

[29] 邹琦. 植物生理生化实验指导[M]. 北京:中国农业出版社, 1995:53-56.

[30] Laemmli U K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of Bacteriophage T4 [J]. *Nature*, 1970, 227(5259):680-685.

[31] Woodbury W, Spencer A K, Stahman M A. An improved procedure using ferricyanide for detecting catalase isozymes [J]. *Analytical Biochemistry*, 1971, 44(1):301-305.

[32] 黄永芬, 汪清胤. 植物过氧化物酶同工酶分析方法[J]. *北方园艺*, 1982, (1):33-38.

[33] 斯琴巴特尔, 吴红英. 盐胁迫对玉米种子萌发及幼苗生长的影响[J]. *干旱区资源与环境*, 2000, 14(4):76-80.

[34] 孙君艳, 程琴, 李淑梅. 盐胁迫对小麦种子萌发及幼苗生长的影响[J]. *分子植物育种*, 2017, 15(6):324-328.

[35] Chivasa S, Ndimba B K, Simon W J, et al. Extracellular ATP functions as an endogenous external metabolite regulating plant cell viability [J]. *Plant Cell*, 2005, 17(11):3019-3034.

[36] Zhu J K. Salt and drought stress signal transduction in plants [J]. *Annual Review of Plant Biology*, 2002, 53:247-273.

[37] 杜勇. 胞外 ATP 介导玉米抗旱性的信号分子机制[D]. 陕西杨凌:西北农林科技大学, 2011.

[38] Fukuda A, Nakamura A, Tagiri A, et al. Function, intracellular localization and the importance in salt tolerance of a vacuolar Na^+/H^+ antiporter from rice [J]. *Plant and cell physiology*, 2004, 45(2):146-159.

[39] Zelicourt A D, Colcombet J, Hirt H. The Role of MAPK modules and ABA during abiotic stress signaling [J]. *Trends in Plant Science*, 2016, 21(8):677-685.

(上接第 54 页)

参考文献:

[1] 中华人民共和国水利部.土壤墒情监测规范(SL364-2015)[S]. 北京:中国水利水电出版社, 2015.

[2] 章树安, 王爱平. 旱情监测与评价进展研究与思考[J]. *水文*, 2010, 30(3): 15-21.

[3] Gallagher J N, Biscoe P V, Hunter B. Effects of drought on grain growth [J]. *Nature*, 1976, 264(5586):541-542.

[4] Piao S L, Ciais P, Huang Y, et al. The impacts of climate change on water resources and agriculture in China [J]. *Nature*, 2010, 467(7311):43-51.

[5] 张和喜, 杨静, 方小宇, 等. 时间序列分析在土壤墒情预测中的应用研究[J]. *水土保持研究*, 2008, 15(4): 82-84.

[6] 侯彦林, 李敬亚, 米长虹, 等. 土壤墒情诊断理论和方法, *生态学杂志*, 2017, 36(12):3329-3335.

[7] 米长虹, 郑宏艳, 侯显达, 等. 综合模型法土壤墒情诊断模型[J]. *生态学杂志*, 2017, 36(12): 3381-3391.

[8] 丁健, 米长虹, 侯显达, 等. 移动统计法土壤墒情诊断模型[J]. *生态学杂志*, 2017, 36(12): 3372-3380.

[9] 尚松浩. 土壤水分模拟与墒情预报模型研究进展[J]. *沈阳农业大学学报*, 2004, 35(5): 455-458.

[10] 冀荣华, 张舒蕾, 郑立华, 等. 基于多值神经元复数神经网络的土壤墒情预测[J]. *农业工程学报*, 2017, 33(S1): 126-131.

[11] 侯琼, 郝文俊. 内蒙古地区玉米农田土壤墒情动态预测模式[J]. *干旱地区农业研究*, 2000, 18(4): 50-56.

[12] 白冬妹, 郭满才, 郭忠升, 等. 时间序列自回归模型在土壤水分预测中的应用研究[J]. *中国水土保持*, 2014, (2): 42-45.

[13] 刘书田, 郑宏艳, 王铄今, 等. 差减统计法土壤墒情诊断模型[J]. *生态学杂志*, 2017, 36(12): 3352-3358.

[14] 孙圣, 张劲松, 孟平, 等. 基于无人机热红外图像的核桃园土壤水分预测模型建立与应用[J]. *农业工程学报*, 2018, 34(16): 89-95.

[15] 陈天华, 唐海涛. 基于 ARM 和 GPRS 的远程土壤墒情监测预报系统[J]. *农业工程学报*, 2012, 28(3): 162-166.

[16] 顾李华. 退潮曲线在墒情数据过滤及预报方面的应用[J]. *水文*, 2016, 36(1): 80-83.

[17] 徐宗学. 水文模型[M]. 北京:科学出版社, 2009.