



乙烯对大豆幼苗盐胁迫响应的调控机制研究

王玉斌, 刘 薇, 张彦威, 李 伟, 王彩洁, 戴海英, 徐 冉, 张礼凤

(山东省农业科学院 作物研究所/山东省特色作物工程实验室, 山东 济南 250100)

摘 要:为研究乙烯对大豆盐胁迫响应的调控作用,促进乙烯在大豆高效栽培中的应用,以耐盐大豆品种齐黄 34 为材料,采用水培的方法,外源添加乙烯合成前体 1-氨基环丙烷-1-羧酸(1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid, ACC)后进行 NaCl 胁迫处理,设置 4 种不同处理,测定盐处理对乙烯合成关键限速酶基因表达的影响,乙烯对盐胁迫下大豆幼苗形态建成、渗透调节系统和氧化还原系统的影响,分析乙烯对大豆抗盐的调控效应。结果显示:NaCl 处理显著提高不同时间点乙烯合成关键限速酶基因 *GmACS1*、*GmACS2* 和 *GmACS6* 的表达,促进乙烯的释放;外源添加 ACC 可加速盐胁迫下大豆叶片衰老,降低地上部和地下部干物质和叶片叶绿素含量;提高植株地上部和地下部 Na^+ 、 K^+ 含量、地上部 Na^+/K^+ 和 MDA 含量,降低脯氨酸含量;此外,外源添加 ACC 显著提高盐胁迫下大豆叶片 $\text{O}_2\cdot^-$ 释放和 NADPH 氧化酶 *GmRbohA* 和 *GmRbohB* 基因的表达,降低 POD 酶活性。研究结果表明乙烯通过调控 ROS 稳态以及 Na^+/K^+ 平衡负调控大豆耐盐性。

关键词:大豆;盐胁迫;1-氨基环丙烷-1-羧酸(ACC);ROS 积累; Na^+/K^+ 平衡

Regulation Mechanism in Soybean Seedling Response to Salt Stress of Ethylene

WANG Yu-bin, LIU Wei, ZHANG Yan-wei, LI Wei, WANG Cai-jie, DAI Hai-ying, XU Ran, ZHANG Li-feng

(Crop Research Institute, Shandong Academy of Agricultural Sciences/Shandong Engineering Laboratory of Featured Crops, Jinan 250100, China)

Abstract: In order to study the regulatory effects of ethylene on the salt stress response of soybean and promote the application of ethylene in high-efficiency soybean cultivation, the salt-tolerant soybean variety Qihuang 34 was used as experimental materials. We used the method of hydroponics, exogenous added of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC) and then set NaCl stress treatment. The effects of salt treatment on the gene expression of key rate-limiting enzymes of ethylene synthesis, ethylene on the seedling morphogenesis, osmotic regulation system and oxidation-reduction system were measured to analyse the regulatory effect of ethylene on soybean salt resistance. The results showed that NaCl treatment significantly increased the expression of *GmACS1*, *GmACS2* and *GmACS6*, the key rate-limiting enzymes of ethylene synthesis at different time points, promoted the evolution of ethylene. Under salt stress, exogenous ACC treatment accelerated the senescence of soybean leaves, decreased dry matter accumulation of shoots and roots, leaf chlorophyll content. Exogenous addition of ACC significantly increased the content of Na^+ , K^+ , Na^+/K^+ and MDA content, and decreased the content of proline under salt stress. In addition, exogenous addition of ACC significantly increased $\text{O}_2\cdot^-$ release and the expression of NADPH oxidase *GmRbohA* and *GmRbohB* genes in soybean leaves, but decreased POD enzyme activity under NaCl stress. The results showed that ethylene negatively regulated soybean salt tolerance by regulating ROS homeostasis and Na^+/K^+ equilibrium.

Keywords: soybean; salt stress; 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC); ROS accumulation; Na^+/K^+ equilibrium

大豆(*Glycine max* L. Merr.)作为重要的豆科作物之一,为人类提供了高达 69% 的蛋白质和 30% 的脂肪。随世界人口的迅速增长,全球大豆产量需求大幅增加。由于全球气候的变化及不合理的灌溉方式,我国盐碱地面积不断增加,盐胁迫已成为造成大豆产量降低和品质下降的主要非生物胁迫^[1]。大豆对盐胁迫比较敏感,开展大豆耐盐机制的研究,对于提高大豆产量,扩大适种范围,保障国家粮食安全具有重要的意义。

正常生长的植物遭遇盐胁迫时首先受到渗透胁迫,造成吸水困难,随着胁迫时间的延长, Na^+ 在细胞中积累,破坏 Na^+/K^+ 平衡,引发氧化胁迫等,

对细胞产生长久的毒害作用^[2-3]。在长期的演化过程中,为应对盐胁迫引起的离子毒害和渗透胁迫,植物进化出了包括渗透调节、活性氧清除、离子区域化和植物激素调控等不同的胁迫反应和耐受性调控途径^[4-6]。植物主要通过两个途径实现渗透调节:其一是通过无机离子的吸收;其二是在细胞中合成有机渗透调节物质,提高溶质浓度,从而增加吸水能力^[7]。研究表明,植物激素通过其信号转导途径调控下游逆境响应基因的表达,广泛参与到渗透调节、ROS 稳态、 Na^+ 转运等植物耐盐调控过程^[7]。乙烯是一种重要的植物激素,在调控植物生长发育以及作物株型塑造方面发挥重要作用,并且

收稿日期:2022-02-03

基金项目:山东省农业良种工程(2019LZGC004);山东省农业科学院科技创新工程(CXGC2021B08)。

第一作者:王玉斌(1988—),博士,助理研究员,主要从事大豆耐逆基因功能研究。E-mail: wangyb_221@163.com。

通讯作者:张礼凤(1972—),女,研究员,主要从事大豆耐逆基因挖掘研究。E-mail: zhanglifeng9639@sina.com。

植株在响应逆境胁迫过程中乙烯信号也受到了调节^[8]。乙烯合成过程中有两个关键限速酶,ACC 合酶(ACS)和 ACC 氧化酶(ACO),ACC 合酶转录水平对乙烯的合成具有重要的调控作用,ACC 合酶基因的表达受到诱导会显著提高乙烯的合成^[9]。

ROS 在逆境胁迫反应中既可以作为毒害物造成植物细胞的损伤,也可以起到信号传导的作用激活下游信号通路^[10],植物呼吸爆发氧化酶(RBOH)又称 NADPH 氧化酶,是 ROS 的主要产生者^[11]。目前已有关于乙烯调控拟南芥和水稻盐胁迫响应的报道。乙烯通过调控 ROS 稳态介导拟南芥耐盐性,乙烯信号阻断会降低拟南芥耐盐性,*ein3eill* 双突变体和其它乙烯信号突变体盐敏感性增加^[12-13];相反,乙烯负调控水稻耐盐性,*OsEIL1* 和 *OsEIL2* RNAi 转基因水稻盐敏感性增加^[14]。但目前关于乙烯在大豆抗盐调控机制方面的研究相对空缺,限制了其在大豆抗逆栽培中的应用。

氨基环丙烷-1-羧酸(1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid, ACC)作为乙烯合成前体,在乙烯调控盐胁迫等逆境反应中得到广泛应用^[15]。本研究以前期筛选的耐盐大豆品种齐黄 34 为材料,盐胁迫下外源添加 ACC,分析乙烯合成关键限速酶基因表达、大豆幼苗形态建成、渗透调节系统和氧化还原平衡系统的变化情况,进而分析乙烯对大豆耐盐性的调控机制,旨在为构建大豆抗逆高效栽培技术与发掘遗传改良有效靶点提供参考,促进作物抗逆高效栽培理论的发展。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 植物材料 供试材料为耐盐大豆品种齐黄 34^[16]。

1.1.2 主要试剂 RNA 提取试剂盒(EASY Spin Plant RNA Kit)购自艾德莱生物科技有限公司。反转录试剂盒(PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser)和实时荧光定量染料(TB green premix Ex taq)均购自宝生物科技有限公司(Takara)。过氧化物酶活性检测试剂盒,超氧阴离子、丙二醛和脯氨酸含量检测试剂盒购自索莱宝科技有限公司。乙烯合成前体 1-氨基环丙烷-1-羧酸(1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid, ACC)购自索莱宝科技有限公司。其他试剂为进口或国产的分析纯。

1.2 试验设计

挑选大小一致的大豆种子,利用 10% 次氯酸钠(V/V)消毒 20 min 后用去离子水冲洗 5 遍,用湿润

的滤纸卷种后放置黑暗处,并保持滤纸一定的湿度。于山东省农业科学院作物研究所光照培养室中进行水培,培养温度为 25/22 ℃,光照时间为 16 h,湿度为 50% ~ 60%。3 d 后挑选生长一致的大豆幼苗转移至底部有网眼的塑料筐中,塑料筐放置于盛有 1/2 改良 Hogland 营养液的塑料盆中,保持大豆根能够充分浸入营养液中,并用通气泵通气。待真叶展开,挑选地上部和地下部生长一致的大豆幼苗,转移至盛有 5 L 改良 Hogland 营养液^[17]的塑料盒中进行培养,通气泵保持 24 h 通气,营养液每隔 3 d 更换 1 次。将 ACC 提前配成 1 000 倍母液,待幼苗二展叶时添加到水培液中,ACC 浓度为 0 和 10 μmol·L⁻¹。ACC 处理 3 d 后重新换营养液进行 NaCl 处理,NaCl 处理浓度设 0 和 0.15 mol·L⁻¹两个水平,NaCl 处理时不再进行 ACC 处理。设置 4 个处理,以未经 ACC 和 NaCl 处理的样品作为对照(CK),其他 3 种为 ACC 处理(CK + ACC)、NaCl 处理(NaCl)、ACC 和 NaCl 处理(NaCl + ACC)。

对盐胁迫下乙烯合成关键限速酶基因表达情况进行分析。取 NaCl 处理 0, 3, 6, 9 和 12 h 的大豆叶片样品,对照为处理 0 h 样品,每个处理 3 个重复。检测乙烯合成关键酶基因 *GmACS1*、*GmACS2* 和 *GmACS6* 的表达情况。

乙烯对盐胁迫下大豆幼苗形态建成影响的分析。拍照记录处理 3 d 各处理植株,对比地上部和地下部植株生长情况并测量干重,取处理 3 d 的大豆叶片,对照为未经 ACC 和 NaCl 处理的样品(CK),每个处理 4 次重复,检测大豆幼苗叶绿素含量。

乙烯对盐胁迫处理下大豆幼苗渗透调节系统影响的分析。取处理 3 d 的大豆幼苗,对照为未经 ACC 和 NaCl 处理的样品(CK),每个处理 4 次重复,检测大豆幼苗地上和地下部 Na⁺ 和 K⁺ 含量、地上部脯氨酸和丙二醛(MDA)含量。

乙烯对盐胁迫处理下大豆幼苗氧化还原平衡系统影响的分析。取处理 3 d 的大豆叶片,对照为未经 ACC 和 NaCl 处理的样品(CK),每个处理 4 个重复,检测 O₂·⁻ 生成速率和 POD 活性。取 ACC 和 NaCl 处理 1, 3, 6 和 12 h 的大豆叶片样品,对照为未经 ACC 和 NaCl 处理的样品(CK),每个处理 3 次重复,检测 NADPH 氧化酶基因 *GmRbohA* 和 *GmRbohB* 的表达情况。

1.3 测定项目及方法

1.3.1 基因表达情况 采用实时荧光定量 PCR(RT-qPCR)方法检测基因的表达量,在 SoyBase(<https://www.soybase.org/sitemap.php>)网站查询

基因全长序列,利用 NCBI 在线软件(https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/index.cgi?LINK_LOC=BlastHome)设计引物(表1),检测 NaCl 处理不同时间后乙烯合成及盐胁迫响应相关基因的表达量。使用试剂盒提取 RNA 并反转录成 cDNA,以稀释 10 倍的 cDNA 为模板,利用 TB green

premix Ex taq 染料(Takara)配制反应体系,采用罗氏 480 荧光定量 PCR 仪进行 Real-time PCR 反应。以 *GmActin* 为内参,测定相关基因的表达量。反应程序为:95 ℃ 30 S;95 ℃ 5 s,60 ℃ 30 s,40 个循环。运用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法^[17]计算基因相对表达量。

表 1 RT-qPCR 引物序列
Table 1 RT-qPCR primer sequence

引物名称 Primer name	正向序列 Forward sequence (5'-3')	反向引物 Reverse sequence (5'-3')
<i>GmActin</i>	CGGTGCTTCTATCTTGGCATC	GTCTTTTCGCTTCAATAACCCTA
<i>GmACSI</i>	TCATGGTGCCTAACAAGAAACAT	ATTGTGCGCTTTAACCAGAGGT
<i>GmACS2</i>	TGTAAGCGTTGCCGAAGTGA	AACCCTGAAGCCAGGAAACC
<i>GmACS6</i>	GGAACGAAACGACGTCACTG	TCGGAGTAAATAGCGCCGAC
<i>GmRbohA</i>	ACTCCGTGCGTTTAGGTCTG	ACATGCCTTGCGGAAAACAC
<i>GmRbohB</i>	CCCTGTGGCTTTCCATTTCG	AAGGCCACCACCTTGTGAAA

1.3.2 植株干重 取处理 3 d 后不同处理的幼苗,用去离子冲洗干净并用吸水纸吸干。将植株分为地上部和地下部后置于用鼓风干燥箱(WGL-230B,天津泰斯特)中 120 ℃杀青 1 h,80 ℃烘干至恒重烘干后测定植株干重。

1.3.3 叶绿素含量 取处理 3 d 后的大豆叶片,剪碎后混匀,用天平准确称取 0.2 g 后放入液氮中。用提前预冷的 95%乙醇进行研磨,用滤纸过滤到 50 mL 离心管中。95%乙醇冲洗研钵并定容至 25 mL。取过滤后的溶液用紫外/可见光分光光度计(UV-1100,上海美析)的双波长(665 nm、649 nm)测量模式测定。根据测量的吸光值计算叶绿素浓度。叶绿素 a 浓度($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$): $\text{Ca} = 13.95 \times A_{665} - 6.80 \times A_{649}$;叶绿素 b 浓度($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$): $\text{Cb} = 24.96 \times A_{649} - 7.32 \times A_{665}$;叶绿素总浓度($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$): $\text{C} = \text{Ca} + \text{Cb}$ 。

1.3.4 Na^+ 和 K^+ 含量 取盐处理 3 d 后的大豆地上部和地下部样品,置于 120 ℃烘箱中杀青 1 h,80 ℃烘干至恒重,称量并记录干重后用研钵将样品研磨至粉末状。称取 0.1 g 置 10 mL 离心管中,加入 5 ml $1\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ HCl 后放置 200 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 摇床中室温浸提 24 h。用无磷滤纸过滤至新的离心管中,利用火焰原子吸收分光光度计(FP6450,上海忻一)测定浸提液中的 Na^+ 和 K^+ 含量。

1.3.5 丙二醛和脯氨酸含量及 POD 活性 取盐处理 3 d 后的大豆叶片,用液氮研磨后称取 0.1 g 于 1.5 mL 离心管中,加入提取液进行提取,使用索莱宝科技有限公司试剂盒进行测定。

1.3.6 $\text{O}_2\cdot^-$ 生成速率 采用 NBT 染色方法分析植株的 $\text{O}_2\cdot^-$ 积累情况。取盐处理 3 d 后的大豆叶片浸没于装有 1.5 mL NBT 染液的容器中,将容器放置于真空泵中,真空渗透 30 min。室温避光放置 4 h 后,光照处理 1 h,用脱色液(75%乙醇,5%甘油)70 ℃加热脱色至叶片透明并拍照。

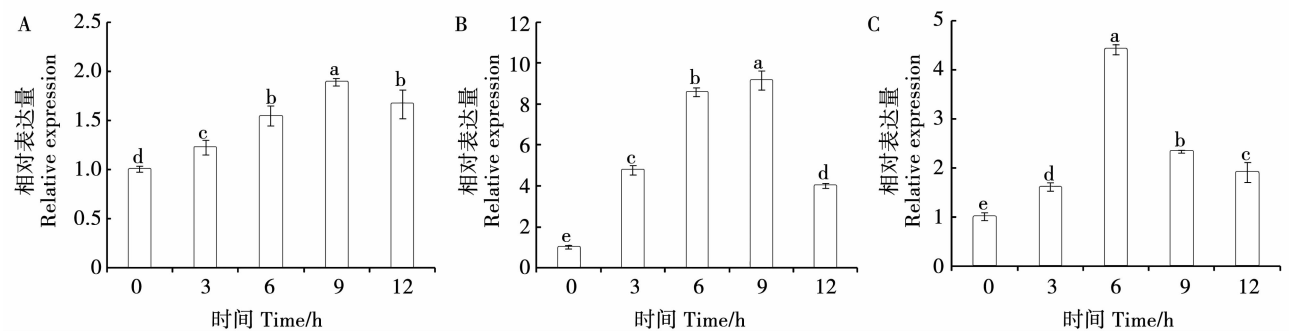
1.4 数据分析

采用 Excel 2010 进行数据分析,并绘制图表;利用 SAS 9.0(SAS Institute Ltd., USA)进行显著性统计分析;利用 Fisher's LSD($P < 0.05$)进行差异显著性检验。

2 结果与分析

2.1 盐胁迫下乙烯合成关键限速酶基因表达分析

如图 1 所示,盐胁迫处理可以显著诱导 3,6,9 和 12 h 叶片中乙烯合成关键限速酶基因 *GmACSI*、*GmACS2* 和 *GmACS6* 的表达,且 3 个基因随盐处理时间延长的表达规律接近,均呈现先升高后降低的趋势。结果表明乙烯参与调控大豆盐胁迫响应。



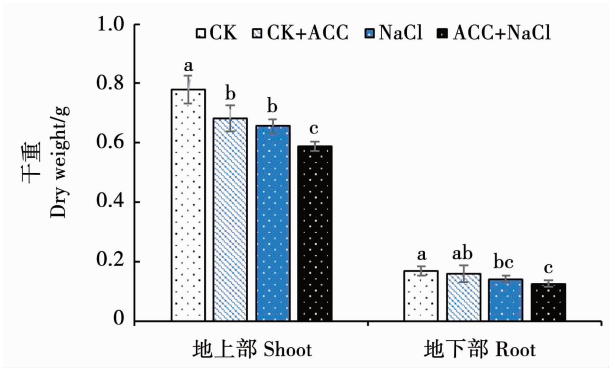
注:A. *GmACS1*; B. *GmACS2*; C. *GmACS6*. 不同小写字母表示处理间差异显著 ($P < 0.05$). 下同。
Note: A. *GmACS1*; B. *GmACS2*; C. *GmACS6*. Different lowercase indicate there is significant difference between treatments ($P < 0.05$). The same below.

图1 盐处理不同时间乙烯合成限速酶基因表达量分析

Fig.1 Gene expression analysis of ethylene synthesis rate-limiting enzymes treated with salt for different times

2.2 乙烯对盐胁迫下大豆幼苗形态建成的影响

2.2.1 植株生长 如图2所示,正常培养条件下,外源添加ACC显著抑制大豆主根伸长生长,而对株高和叶片衰老无显著影响(图2A)。盐胁迫条件下外源添加ACC显著抑制主根伸长,处理间株高无显著差异,但大豆叶片衰老程度加深(图2B)。



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

图3 盐胁迫条件下ACC处理对大豆幼苗干重的影响
Fig.3 Effects of ACC treatment on dry weight of soybean seedlings under salt stress

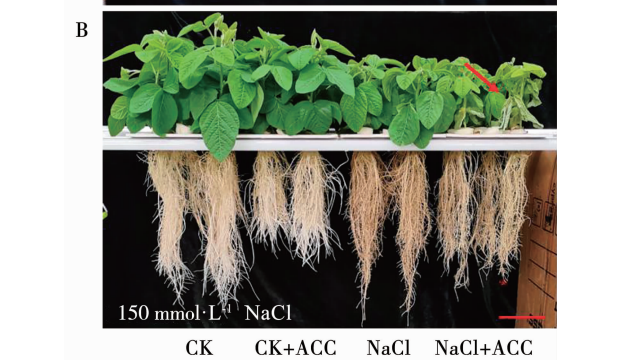


图2 盐胁迫条件下ACC处理对大豆幼苗生长的影响
Fig.2 Effects of ACC treatment on the growth of soybean seedlings under salt stress

2.2.2 植株干重 如图3所示,ACC处理显著抑制正常条件与盐胁迫条件下大豆地上部和地下部干物质的积累,与地下部相比,ACC处理对正常条件与盐胁迫条件下地上部干物质积累的抑制作用更为显著。

2.2.3 叶绿素含量 如图4所示,正常培养条件下,ACC处理不影响大豆叶片叶绿素含量,但ACC处理显著降低盐胁迫下叶片叶绿素含量,结果表明乙烯负调控大豆耐盐性。

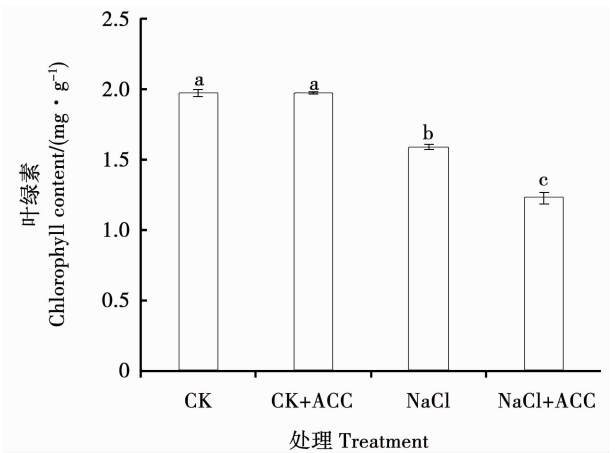
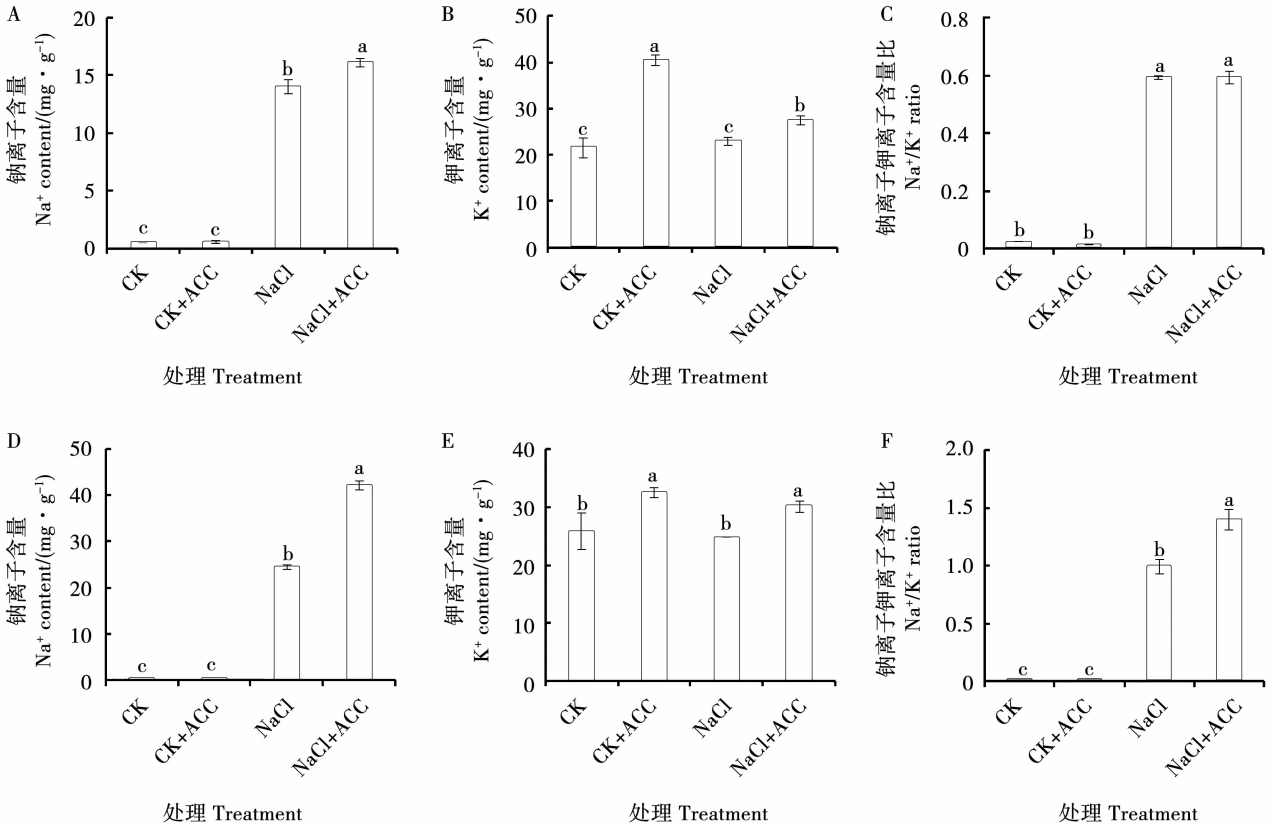


图4 盐胁迫条件下ACC处理对大豆幼苗叶绿素含量的影响
Fig.4 Effects of ACC treatment on chlorophyll content of soybean seedlings under salt stress

2.3 乙烯对盐胁迫下大豆幼苗渗透调节的影响

2.3.1 Na^+ 和 K^+ 含量 与对照相比,盐胁迫处理显著提高大豆地下部和地上部 Na^+ 含量。在正常培养条件下,ACC 处理不影响大豆地上部和地下部 Na^+ 的积累,但 ACC 处理显著提高了盐胁迫下地下部和地上部 Na^+ 含量(图 5A 和 D)。与对照相比,

盐胁迫处理不影响地上部和地下部 K^+ 含量,但 ACC 处理显著提高正常条件及盐胁迫条件下地下部和地上部 K^+ 含量(图 5 B 和 E)。在正常培养条件下,ACC 处理不影响地上部和地下部 Na^+/K^+ 比值;盐胁迫条件下,ACC 处理对地下部 Na^+/K^+ 比值影响较小,显著提高地上部 Na^+/K^+ 比值(图 5C 和 F)。



注:A. 地下部钠离子含量;B. 地下部钾离子含量;C. 地下部钠离子和钾离子含量比值;D. 地上部钠离子含量;E. 地上部钾离子含量;F. 地上部钠离子和钾离子含量比值。
Note: A. Na^+ content in root; B. K^+ content in root; C. Na^+/K^+ in root; D. Na^+ content in shoot; E. K^+ content in shoot; F. Na^+/K^+ in shoot.

图5 盐胁迫条件下 ACC 处理对大豆幼苗地上部和地下部 Na^+ 和 K^+ 含量的影响

Fig.5 Effects of ACC treatment on Na^+ and K^+ contents of soybean seedlings under salt stress

2.3.2 脯氨酸和丙二醛含量 如图 6 所示,在正常培养条件下,ACC 处理不影响脯氨酸和丙二醛在叶片中的积累;盐胁迫处理使大豆叶片脯氨酸

和丙二醛含量显著提高,而 ACC 处理显著降低大豆叶片脯氨酸含量,显著促进盐大豆叶片丙二醛的积累。

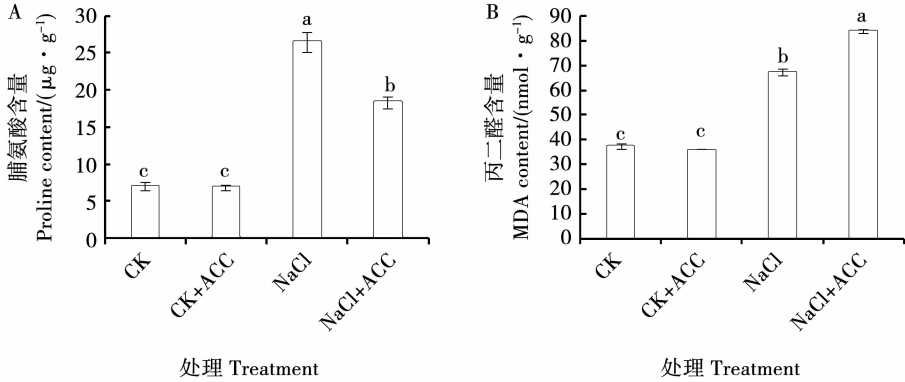


图6 盐胁迫条件下 ACC 处理对大豆叶片脯氨酸和丙二醛含量的影响

Fig.6 Effects of ACC treatment on proline and MDA content of soybean seedlings under salt stress

2.4 乙烯对盐胁迫处理下大豆叶片氧化还原平衡系统的影响

2.4.1 $O_2\cdot^-$ 生成速率 在正常培养条件下,盐胁迫处理的大豆叶片与对照相比染色无显著差异,盐胁迫条件下,ACC 处理后的大豆叶片表现出更深的

NBT 染色强度(图 7A)。叶片 $O_2\cdot^-$ 产生速率测定结果与 NBT 染色结果一致。盐胁迫处理显著促进大豆叶片 $O_2\cdot^-$ 释放,正常培养条件下,ACC 处理不影响大豆叶片 $O_2\cdot^-$ 释放,但盐胁迫条件下,ACC 处理显著提高大豆叶片 $O_2\cdot^-$ 释放速率(图 7B)。

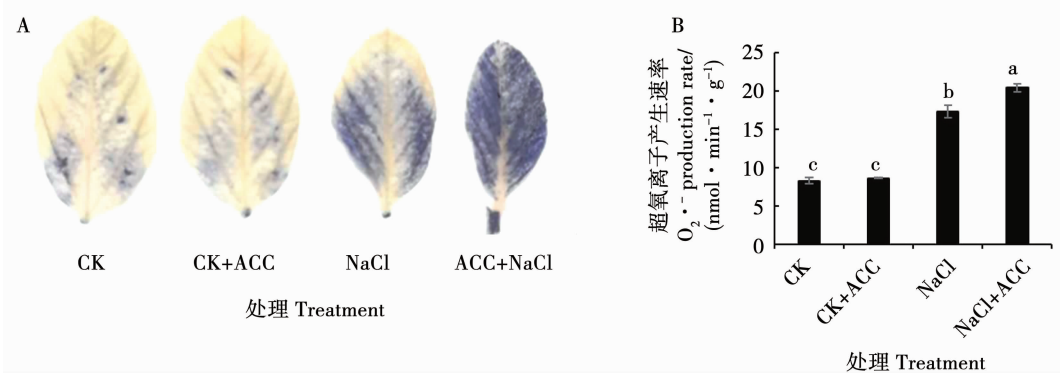


图 7 盐胁迫条件下 ACC 处理对大豆幼苗叶片 $O_2\cdot^-$ 积累的影响

Fig. 7 Effects of ACC treatment on $O_2\cdot^-$ accumulation of soybean seedlings under salt stress

2.4.2 POD 活性 如图 8 所示,在正常培养条件下,外源添加 ACC 不影响 POD 的活性;盐胁迫处理

下,大豆叶片 POD 活性显著提高,外源添加 ACC 可以显著降低叶片 POD 活性。

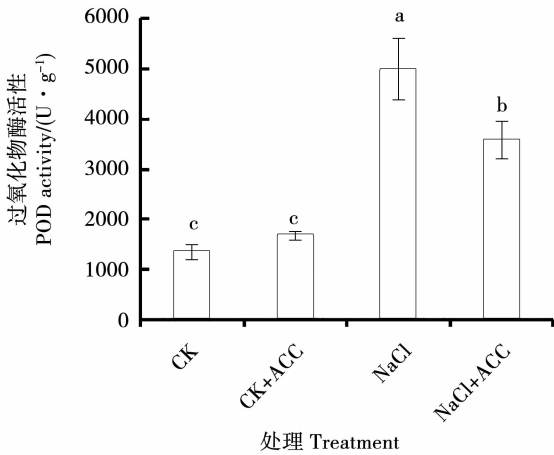
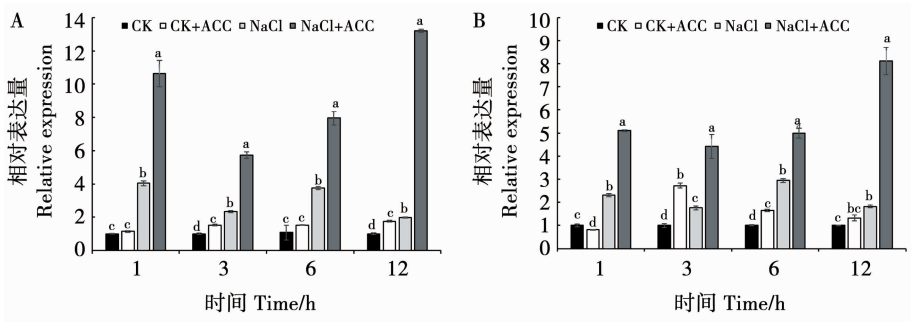


图 8 盐胁迫条件下 ACC 处理对大豆叶片 POD 活性的影响

Fig. 8 Effects of ACC treatment on the POD activity of soybean under salt stress

2.4.3 NADPH 氧化酶主要基因表达情况 如图 9 所示,盐胁迫处理可以显著诱导 *GmRbohA* 和 *GmRbohB* 的表达。与对照相比,ACC 处理显著提高

盐处理 1,3,6 和 12 h 后 *GmRbohA* 与 *GmRbohB* 的表达,处理 12 h 诱导幅度最大。



注:A. *GmRbohA*;B. *GmRbohB*。
Note: A. *GmRbohA*; B. *GmRbohB*。

图 9 盐胁迫条件下 ACC 处理对大豆幼苗 NADPH 氧化酶基因表达量的影响

Fig. 9 Effects of ACC treatment on the expression of NADPH oxidase genes of soybean seedlings under salt stress

3 讨论

盐胁迫会抑制植物的生长,从而影响作物的产量^[2]。当植物遭受非生物胁迫时,体内的乙烯含量会发生变化,一般情况下,各种胁迫条件均会使植物体内乙烯的含量增加^[18]。已有研究报道,非生物胁迫处理可以调控拟南芥乙烯合成关键限速酶 ACC 合成酶(*AtACSs*) 基因的表达,进而影响体内乙烯含量的变化^[19-20]。而且,当植物遭受盐胁迫时,会迅速通过调控植株形态和生物量的分配来影响植株生长发育以适应盐胁迫环境^[21]。本研究中,盐胁迫处理条件下 *GmACS1*、*GmACS2* 和 *GmACS6* 基因的表达量显著提高,从而盐胁迫下大豆地上和地下部的生长受到抑制。此外,与对照相比,外源添加 ACC 促进盐胁迫下大豆叶片的早衰,降低叶片叶绿素含量,增强盐敏感性。这些结果表明,盐胁迫处理可以诱导乙烯的产生,乙烯通过响应信号转导途径调控下游基因表达,从而负调控大豆抗盐性。该结果与外源添加乙烯降低水稻抗盐性结果相一致^[14],但外源添加乙烯提高拟南芥的抗盐性^[12],由此可见,乙烯对不同植物抗盐性的调控作用可能存在不同的机制。

盐胁迫条件下,植物可以通过在细胞内产生渗透调节物质等降低胞内的渗透势。研究表明,过表达渗透调节物质能提升植物对非生物胁迫的耐受性^[7]。当植物遭受盐胁迫时,脯氨酸通常作为渗透调节物质在特定部位迅速积累,脯氨酸可以清除 ROS,缓解盐胁迫成的细胞脱水,保持细胞内外的水势平衡,增加植物的耐盐性^[22-24]。本研究中,ACC 处理显著降低盐胁迫下叶片脯氨酸的含量。土壤盐分是影响作物生长和产量的主要胁迫因子^[2],盐离子对植物细胞造成的毒害很大程度上都是 Na⁺ 引起的,维持细胞内的 Na⁺/K⁺ 平衡对植物抗盐性起到关键的作用^[3]。Na⁺/K⁺ 比值可以反映出植物受到离子毒害的情况,比值越高表明植株受到的离子毒害越严重。细胞质中 Na⁺ 浓度过高对植物有害,而细胞中 Na⁺ 的清除是植物耐盐的关键。本研究中,ACC 处理后大豆植株对盐的敏感性增加,ACC 处理显著提高了盐胁迫下地上部和地下部 Na⁺ 和 K⁺ 含量。ACC 处理对正常培养条件及盐胁迫条件下地下部 Na⁺/K⁺ 比值影响较小,但显著提高地上部 Na⁺/K⁺ 比值,这些研究结果表明,ACC 处理通过改变地上部叶片 Na⁺/K⁺ 比值参与调控大豆抗盐性。

ROS 在盐胁迫过程中起双重作用,既可以作为毒害物造成植物细胞的损伤,也可以作为主要信号分子激活下游信号通路^[10]。当植物遭受盐胁迫时,

ROS(包括 H₂O₂、O₂^{·-} 和羟基自由基)大量积累,从而引起细胞膜发生氧化反应,破坏膜的结构,导致电解渗透物质增加,丙二醛含量的升高^[22]。因此,体内 O₂^{·-} 的含量可以用来直接反映活性氧在植物中的积累,而丙二醛含量可以作为膜损伤轻重程度的指标,两者均能反映植物遭受逆境胁迫时受到损伤的程度。本研究中,ACC 处理显著提高盐胁迫下叶片丙二醛的含量及 O₂^{·-} 的产生速率,而且,ACC 处理加强大豆盐敏感性,可以显著提高盐胁迫下 *GmRbohA* 和 *GmRbohB* 的表达。该结果表明 ACC 加快盐胁迫下大豆叶片的损伤。抗氧化酶系统如过氧化物酶(POD)可以有效清除逆境胁迫造成的 ROS 积累,缓解膜系统的损伤。与 O₂^{·-} 的产生速率结果相反,ACC 处理显著降低盐胁迫下大豆叶片 POD 活性。此外,已有文献报道,通过 *Rboh*s 调控拟南芥 ROS 爆发对维持 Na⁺/K⁺ 平衡至关重要^[11]。本研究中,ACC 处理显著提高地上部叶片中 *GmRbohA*、*GmRbohB* 表达和 Na⁺/K⁺,因此可以推测,盐胁迫下,乙烯通过转录调控大豆 NADPH 氧化酶基因的表达及渗透调节系统,从而影响 ROS 产生及叶片 Na⁺/K⁺ 平衡,负调控大豆抗盐性。

4 结论

本研究以耐盐大豆品种齐黄 34 为试验材料,外源添加 ACC 处理,研究了乙烯对大豆幼苗响应盐胁迫的生理及分子机制。盐胁迫处理显著诱导乙烯合成酶基因 *GmACS1*、*GmACS2* 和 *GmACS6* 的表达。ACC 处理通过提高盐胁迫下 NADPH 氧化酶基因 *GmRbohA* 和 *GmRbohB* 表达,降低叶片 POD 活性和脯氨酸含量,从而促进叶片中 O₂^{·-} 的产生速率,影响体内 ROS 平衡,提高叶片 Na⁺/K⁺ 比值,增加大豆的盐敏感性。

参考文献

[1] XU Z L, ALI Z, XU L, et al. The nuclear protein GmbZIP110 has transcription activation activity and plays important roles in the response to salinity stress in soybean[J]. Scientific Reports, 2016, 6: 20366.

[2] MUNNS R, TESTER M. Mechanisms of salinity tolerance[J]. Annual Review of Plant Biology, 2008, 59: 651-681.

[3] YANG Y Q, GUO Y. Elucidating the molecular mechanisms mediating plant salt-stress responses[J]. New Phytologist, 2018, 217: 523-539.

[4] 张红,董树亨. 玉米对盐胁迫的生理响应及抗盐策略研究进展[J]. 玉米科学, 2011, 19(1): 64-69. (ZHANG H, DONG S T. Research progress on the physiological and biochemistry responses of salt tolerance and strategies of salt resistance in maize [J]. Maize Science, 2011, 19(1): 64-69.)

[5] SHABALA S. Learning from halophytes: Physiological basis and strategies to improve abiotic stress tolerance in crops[J]. *Annals of Botany*, 2013, 112(7): 1209-1221.

[6] VAN Z E, ZHANG Y X, TESTERINK C. Salt tolerance mechanisms of plants[J]. *Annual Review of Plant Biology*, 2020, 71: 403-433.

[7] ZHU J K. Abiotic stress signaling and responses in plants[J]. *Cell*, 2016, 167(2): 313-324.

[8] CAO W H, LIU J, HE X J, et al. Modulation of ethylene responses affects plant salt-stress responses[J]. *Plant Physiology*, 2007, 143(2): 707-719.

[9] OLSON D C, WHITE J A, EDELMAN L, et al. Differential expression of two genes for 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase in tomato fruits[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1991, 88(12): 5340-5344.

[10] QI J S, SONG C P, WANG B S, et al. Reactive oxygen species signaling and stomatal movement in plant responses to drought stress and pathogen attack [J]. *Journal of Integrative Plant Biology*, 2018, 60(9): 805-826.

[11] MA L Y, ZHANG H, SUN L R, et al. NADPH oxidase AtrbohD and AtrbohF function in ROS-dependent regulation of Na⁺/K⁺ homeostasis in *Arabidopsis* under salt stress [J]. *Journal of Experiment Botany*, 2012, 63(1): 305-317.

[12] PENG J Y, LI Z H, WEN X, et al. Salt induced stabilization of EIN3/EIL1 confers salinity tolerance by deterring ROS accumulation in *Arabidopsis* [J]. *PLoS Genetics*, 2014, 10(10): e1004664.

[13] JIANG C F, BELFIELD E J, CAO Y, et al. An *Arabidopsis* soil-salinity-tolerance mutation confers ethylene-mediated enhancement of sodium/potassium homeostasis[J]. *Plant Cell*, 2013, 25(9): 3535-3552.

[14] LI C H, WANG G, ZHAO J H, et al. The receptor-like kinase SIT1 mediates salt sensitivity by activating MAPK3/6 and regulating ethylene homeostasis in rice[J]. *Plant Cell*, 2014, 26(6): 2538-2553.

[15] CHANG C S, Wang B L, SHI L, et al. Alleviation of salt stress-induced inhibition of seed germination in cucumber (*Cucumis sativus* L.) by ethylene and glutamate [J]. *Journal of Plant Physiology*, 2010, 167(14): 1152-1156.

[16] 张彦威, 刘国峰, 李伟, 等. 黄淮海地区大豆种质资源耐盐性鉴定[J]. *山东农业科学*, 2018, 50(11): 33-36. (ZHAO Y W, LIU G F, LI W, et al. Identification on salt tolerance of soybean germplasms in Huang-Huai-Hai region [J]. *Shandong Agricultural Sciences*, 2018, 50(11): 33-36.)

[17] 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(4): 402-408.

[18] 赵赫, 陈受宜, 张劲松. 乙烯信号转导与植物非生物胁迫反应调控研究进展[J]. *生物技术通报*, 2016, 32(10): 1-10. (ZHAO H, CHEN S Y, ZHANG J S. Ethylene signaling pathway in regulating plant response to abiotic stress [J]. *Biotechnology Bulletin*, 2016, 32(10): 1-10.)

[19] YANG C, MA B, HE S J, et al. MAOHUI6/ETHYLENE INSENSITIVE3-LIKE1 and ETHYLENE INSENSITIVE3-LIKE2 regulate ethylene response of roots and coleoptiles and negatively affect salt tolerance in rice[J]. *Plant Physiology*, 2015, 169(1): 148-165.

[20] LIANG X, ABEL S, KELLER J A, et al. The 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase gene family of *Arabidopsis thaliana* [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1992, 89(22): 11046-11050.

[21] 刘友良, 毛才良, 汪良驹. 植物耐盐性研究进展[J]. *植物生理学通讯*, 1987, 38(4): 1-7. (LIU Y L, MAO C L, WANG L J. Recent progress in studies on salinity tolerance in plants [J]. *Plant Physiology Communications*, 1987, 38(4): 1-7.)

[22] 谢崇波, 金谷雷, 徐海明, 等. 拟南芥在盐胁迫环境下 SOS 转录调控网络的构建及分析[J]. *遗传*, 2010, 32(6): 639-646. (XIE C B, JIN G L, XU H M, et al. Construction and analysis of SOS pathway-related transcriptional regulatory network underlying salt stress response in *Arabidopsis* [J]. *Hereditas*, 2010, 32(6): 639-646.)

[23] SZABADOS L, SAVOURE A. Proline; A multifunctional amino acid[J]. *Trends in Plant Science*, 2010, 15(2): 89-97.

[24] REJEB K B, ABDELLY C, SAVOURE A. How reactive oxygen species and proline face stress together [J]. *Plant Physiology*, 2014, 80: 278-284.