

研究报告

DOI: 10.14188/j.ajsh.20240329001

## 外源褪黑素对盐胁迫下盐肤木幼苗生长和生理特性的影响

廖聆孜, 杨冰, 樊静, 梁宏伟, 陈发菊, 刘文\*

(三峡大学 生物与制药学院 三峡区域植物遗传与种质创新重点实验室(三峡大学)/生物技术研究中心,  
湖北 宜昌 443002)

**摘要:** 以3月龄盐肤木幼苗为材料, 采用叶面喷施褪黑素的方法, 设置褪黑素溶液(0  $\mu\text{mol/L}$ 、50  $\mu\text{mol/L}$ 、100  $\mu\text{mol/L}$ 、150  $\mu\text{mol/L}$ )预处理和盐溶液(150 mmol/L NaCl)处理, 研究外源褪黑素预处理对盐胁迫下盐肤木幼苗生长、渗透调节物质含量、抗氧化酶活性等生理指标以及胁迫相关基因表达水平的影响。结果表明: 盐胁迫显著抑制了盐肤木幼苗的生长, 其株高和相对含水量显著下降; 各浓度褪黑素预处理下盐害症状减轻, 叶片相对含水量和株高显著增加; 盐胁迫下叶片积累可溶性糖、可溶性蛋白和脯氨酸, 而100  $\mu\text{mol/L}$ 褪黑素预处理能显著促进可溶性糖和脯氨酸含量的增加; 盐胁迫处理显著提高了丙二醛(malondialdehyde, MDA)和 $\text{H}_2\text{O}_2$ 含量, 而褪黑素预处理显著诱导过氧化氢酶(catalase, CAT)、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)和抗坏血酸过氧化物酶(ascorbate peroxidase, APX)活性的增强, 降低MDA和 $\text{H}_2\text{O}_2$ 含量; 外源褪黑素预处理显著增强了盐胁迫下盐肤木叶片中*RcRBOHF*、*RcABF3*、*RcRD20*和*RcRD22*胁迫响应基因的相对表达水平。该研究表明, 褪黑素预处理能够提高盐肤木对盐胁迫的抗性, 为利用褪黑素提高盐肤木的耐盐性提供了理论依据, 并为选育优良的耐盐品种以及盐渍化土地的开发利用提供了有益的参考。

**关键词:** 盐肤木; 盐胁迫; 褪黑素; 渗透平衡; 抗氧化酶活性

中图分类号: Q94

文献标志码: A

文章编号: 2096-3491(2024)04-0324-10

## Effects of exogenous melatonin on the growth and physiological characteristics of *Rhus chinensis* seedlings under salt stress

LIAO Lingzi, YANG Bing, FAN Jing, LIANG Hongwei, CHEN Faju, LIU Wen\*

(Key Laboratory of Three Gorges Regional Plant Genetics & Germplasm Enhancement (CTGU)/Biotechnology Research Center, College of Biological and Pharmaceutical Sciences, China Three Gorges University, Yichang 443002, Hubei, China)

**Abstract:** Our experiment utilized 3-month-old *Rhus chinensis* seedlings as materials. Exogenous melatonin was applied via foliar spraying, with concentrations of 0  $\mu\text{mol/L}$ , 50  $\mu\text{mol/L}$ , 100  $\mu\text{mol/L}$ , and 150  $\mu\text{mol/L}$ . The seedlings were pretreated with the melatonin solutions before exposure to salt stress induced by a 150 mmol/L NaCl solution. The study investigated the effects of exogenous melatonin pretreatment on the growth, osmotic regulation substance content, antioxidant enzyme activity, and the expression levels of related genes in *R. chinensis* seedlings under salt stress conditions. The results indicated that: salt stress significantly inhibited the growth of *R. chinensis* seedlings, with a notable decrease in plant height and relative water content; under various concentrations of melatonin pre-treatment, salt-induced symptoms were alleviated, and leaf relative water content and plant height showed a significant increase; under salt

收稿日期: 2024-03-29 修回日期: 2024-07-20 接受日期: 2024-08-22

作者简介: 廖聆孜(1999-), 女, 硕士生, 主要从事植物生理学研究。E-mail: llingzi5@163.com

\* 通讯联系人: 刘文(1986-), 男, 博士, 副教授, 主要从事分子植物育种等研究。E-mail: liuwen@ctgu.edu.cn

基金项目: 国家自然科学基金项目(32370393); 湖北省中央引导地方科技发展专项(2022BGE265)

引用格式: 廖聆孜, 杨冰, 樊静, 等. 外源褪黑素对盐胁迫下盐肤木幼苗生长和生理特性的影响[J]. 生物资源, 2024, 46(4): 324-333.

Liao L Z, Yang B, Fan J, et al. Effects of exogenous melatonin on the growth and physiological characteristics of *Rhus chinensis* seedlings under salt stress [J]. Biotic Resources, 2024, 46(4): 324-333.

stress, the leaves accumulated soluble sugars, soluble proteins, and proline, while pre-treatment with 100  $\mu\text{mol/L}$  melatonin could significantly promote the increase in soluble sugar and proline content; salt stress significantly increased the contents of malondialdehyde (MDA) and hydrogen peroxide ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), while melatonin pretreatment significantly induced the activity enhancement of catalase (CAT), superoxide dismutase (SOD), and ascorbate peroxidase (APX), and reduced the contents of MDA and  $\text{H}_2\text{O}_2$ ; exogenous melatonin pre-treatment significantly enhanced the relative expression levels of salt stress-responsive genes *RcRBOHF*, *RcABF3*, *RcRD20*, and *RcRD22* in the leaves of salt-stressed *R. chinensis* seedlings. This study reveals that melatonin pretreatment enhances the salt resistance of *R. chinensis*, providing a theoretical basis for utilizing melatonin to improve its salt tolerance, and providing useful references for breeding excellent salt tolerant varieties and the development and utilization of saline soil.

**Key words:** *Rhus chinensis*; salt stress; melatonin; osmotic balance; antioxidant enzyme activity

## 0 引言

植物的生长发育受到环境胁迫的制约,其中土壤盐碱化是限制作物生产力的主要非生物胁迫因素之一<sup>[1]</sup>。随着盐碱地的蔓延,提高植物尤其是作物的耐盐性越来越被认为是现代植物育种重要的全球问题<sup>[2]</sup>。盐胁迫阻碍种子萌发,抑制植物每个阶段的生长发育,导致渗透胁迫和离子失衡<sup>[3]</sup>。植物在长期进化过程中,逐渐形成了多种适应盐分环境的机制,包括各种信号分子介导的盐分感知和防御调节<sup>[4]</sup>。

褪黑素(melatonin, MT)是一种重要的信号分子,在植物逆境响应和生长发育中具有多种作用<sup>[5]</sup>。研究表明,MT作为一种强抗氧化剂,直接和间接地参与解毒自由基,减轻氧化应激并维持细胞氧化还原稳态。此外,MT通过促进渗透调节物质的积累和调控应激反应基因的表达,改变了各种生理生化和分子反应,进而增强植物对环境胁迫的适应能力。同时,适当浓度的外源MT也能有效地促进植物抗性的提升<sup>[6]</sup>。已有文献报道 150  $\mu\text{mol/L}$  外源MT提高了过氧化氢酶(catalase, CAT)和超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)活性来增强抗氧化系统,进而减轻盐胁迫对燕麦幼苗生长的抑制<sup>[7]</sup>;叶面施用 100  $\mu\text{mol/L}$  MT促进了盐胁迫下甜菜体内脯氨酸(proline, Pro)、可溶性糖(soluble sugars, SS)和甜菜碱的积累,增强了其渗透压调节能力,有效提高了甜菜的耐盐性<sup>[8]</sup>;MT还能激活 *ZAT6*、*CBF/DREB*等转录因子以调节胁迫响应基因的表达,提高植物的抗性<sup>[9]</sup>。

盐肤木(*Rhus chinensis* Mill.)是漆树科(Anacardiaceae)盐肤木属(*Rhus*)的落叶小乔木或灌木,在我国广泛分布且药用价值较高。盐肤木的根、茎、叶和果实皆可入药,尤其是叶片组织受倍蚜虫取食诱导形成的“虫瘿”结构(即中国传统中药“五倍子”),因其富含水解单宁而被广泛应用于化工、医药、印染等行业。此外,盐肤木的果实可榨油作食用和工业使

用。同时,盐肤木也是一种重要的蜜粉源植物<sup>[10]</sup>。不仅如此,盐肤木生存能力强,生长迅速且分蘖能力强,常被用作园林绿化以及生态造林<sup>[11]</sup>。目前对于盐肤木的研究主要集中在其药用成分的提取,对其在盐害、低温、干旱等逆境下的生理表现的研究较为有限,这限制了盐肤木的栽培和推广。因此,有必要深入研究盐肤木在逆境条件下的生理机制和抗逆性,以提升其在不利环境下的生存和生长能力,从而更好地推广和应用这一资源。褪黑素在提高植物抗逆性方面发挥着关键作用,然而在盐肤木中尚未被研究和报道。考虑到外源MT在其他物种应用上已被广泛研究,这为进一步探究盐肤木中褪黑素的作用机制和应用潜力提供了重要依据。本试验以3月龄盐肤木种子苗为材料,研究外源MT预处理对盐胁迫下盐肤木幼苗的生长的影响及其作用机制,旨在为利用褪黑素提高盐肤木耐盐性提供一定的理论基础,为选育优良耐盐品种用于盐渍化土地的开发利用提供参考。

## 1 材料和方法

### 1.1 供试材料与处理条件

盐肤木种子采自湖北省宜昌市五峰土家族自治县长乐坪镇白鹿庄村(30°19'N, 110°75'E)。种子热激并萌发后种植于10 cm方形培养盆,盆中基质按照营养土、蛭石、珍珠棉2:1:1的体积比例混合而成,每小盆放置5株,选取生长3个月长势和高度一致的盐肤木幼苗进行试验。

前人研究发现,当NaCl胁迫浓度超过100 mmol/L时,盐肤木叶片开始出现卷曲和干枯现象<sup>[12]</sup>。本研究显示,当NaCl胁迫浓度达到150 mmol/L时盐肤木幼苗枯萎率为55.95%,胁迫症状明显但不完全致死,因此我们选择该浓度作为盐胁迫试验的浓度。预处理盐肤木的MT浓度分别为50  $\mu\text{mol/L}$ 、100  $\mu\text{mol/L}$ 、150  $\mu\text{mol/L}$ 。预处理方法为使用不同浓度的MT溶液或去离子水喷洒盐肤木

幼苗叶片表面使之湿润至刚滴落,每天处理一次,连续处理3 d。在预处理后,对试验组盐肤木每盆浇灌100 mL浓度为150 mmol/L的NaCl溶液进行盐胁迫处理。以喷去离子水作为预处理且未被盐胁迫的CK组为对照组;喷去离子水作为预处理并进行盐胁迫的幼苗为单独盐胁迫组;分别使用50  $\mu\text{mol/L}$ 、100  $\mu\text{mol/L}$ 、150  $\mu\text{mol/L}$  MT溶液预处理后进行盐胁迫处理的记为50  $\mu\text{mol/L}$ 、100  $\mu\text{mol/L}$ 、150  $\mu\text{mol/L}$  MT处理组,每处理均有3次生物学重复。从盐胁迫处理完毕开始计时,在第10 d进行生理生化指标测定,在0 h、12 h和24 h取对照组、单独盐胁迫组和100  $\mu\text{mol/L}$  MT预处理组叶片用液氮速冻后保存于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,留待基因表达检测。

## 1.2 生理指标的测定方法

### 1.2.1 盐肤木幼苗生长指标、叶绿素a和叶绿素b含量

在试验第0、10 d观察植株表型,拍照记录5种处理下幼苗叶片状态和叶片数量,统计第10 d叶片枯萎率(leaf wilting ratio),并用直尺测量植株高度。取同一位置的相同数量的功能叶测量叶鲜重,80  $^{\circ}\text{C}$ 烘干至恒重,测量干重,计算每片叶鲜重(leaf fresh weight)和叶干重(leaf dry weight)。采用文献[13]的方法进行植物组织相对含水量(relative water content, RWC)的测定:在试验的第10 d取功能叶片测量鲜重,浸入蒸馏水中8 h测量被水充分饱和后的质量,然后80  $^{\circ}\text{C}$ 烘干至恒重,称出干重,最后根据公式计算。采用丙酮比色法<sup>[14]</sup>测量叶绿素a和叶绿素b的含量:取功能叶片用80%丙酮提取后测量波长663 nm和645 nm处吸光值并根据公式计算。以上每处理测量均包括3个生物学重复。

### 1.2.2 丙二醛含量

叶片丙二醛(malondialdehyde, MDA)含量采用硫代巴比妥酸法<sup>[15]</sup>测量,取功能叶片样品用10%三氯乙酸提取后与0.6%硫代巴比妥酸溶液反应,测量450 nm、532 nm和600 nm下的吸光度,并根据双组分分光光度计法公式计算,每处理测量均包括3个生物学重复。

### 1.2.3 可溶性糖、可溶性蛋白、脯氨酸含量

叶片可溶性糖含量采用蒽酮比色法<sup>[16]</sup>测量:叶片组织用蒸馏水研磨成匀浆后与蒽酮溶液反应并测量620 nm处吸光度,根据标准曲线计算可溶性糖含量。可溶性蛋白(soluble proteins, SP)含量采用考马斯亮蓝G-250染色法<sup>[16]</sup>测定。脯氨酸含量利用北京索莱宝科技有限公司的试剂盒(BC0290)测定。以上每处理测量均包括3个生物学重复。

### 1.2.4 抗氧化酶活性和过氧化氢含量

SOD活性测定采用氮蓝四唑光化还原法<sup>[17]</sup>测量。CAT活性、APX活性、过氧化氢( $\text{H}_2\text{O}_2$ )含量利用北京索莱宝科技有限公司的试剂盒(BC0205、BC0220、BC3595)测量。以上每处理测量均包括3个生物学重复。

## 1.3 RNA提取及qRT-PCR

采用文献[18]的方法,使用南京Vazyme公司的通用型植物总RNA提取试剂盒(RC411)进行盐肤木叶片的RNA提取、HiScript III (+gDNA wiper) cDNA第一链合成试剂盒(R312)进行mRNA反转录,使用TaKaRa公司的TB Green Premix Ex Taq<sup>TM</sup>进行qRT-PCR,反应程序如下:样品预变性95  $^{\circ}\text{C}$  30 s;95  $^{\circ}\text{C}$  15 s,58  $^{\circ}\text{C}$  15 s,72  $^{\circ}\text{C}$  30 s,总共进行了40个循环。筛选了8对候选基因,发现*RcPP2A* (*serine/threonine protein phosphatase 2A*)是最适的内参基因。所有样品均进行3个生物学重复及3个技术重复。定量引物序列见表1。

## 1.4 数据处理

本试验数据均有3次生物学重复,结果用(平均值 $\pm$ 标准误)表示,数据采用IBM SPSS Statistics 27.0软件进行单因素方差分析,采用最小显著差异法(least significant difference, LSD)进行多重比较( $P < 0.05$ );表格使用Excel 2021制作;柱状图使用OriginPro 2021完成。

## 2 结果与分析

### 2.1 MT预处理对盐胁迫下盐肤木幼苗生长的影响

盐胁迫对植物的生长发育有显著抑制的影响(见图1)。在试验的第0 d、10 d,对照组生长状况良好(见图1(a)、图1(f));单独盐胁迫处理下盐肤木叶片泛黄且枯萎率达55.95%(见图1(g)、图2(a))。单独盐胁迫处理组的株高、叶鲜重、叶干重和RWC与对照组相比显著降低了16.13%、41.88%、46.64%和59.28%,叶绿素a和叶绿素b的含量也显著下降(见图2(b)~2(f))。在外源施加了50  $\mu\text{mol/L}$ 、100  $\mu\text{mol/L}$ 和150  $\mu\text{mol/L}$  MT处理组中,与单独盐胁迫组相比,盐肤木叶片萎蔫程度明显减轻,叶片相对含水量显著增加。株高、叶鲜重和叶干重均有所提高,其中100  $\mu\text{mol/L}$  MT处理组的株高、叶鲜重和叶干重分别增加了7.85%、44.84%和49.62%。叶绿素a和叶绿素b的含量在50  $\mu\text{mol/L}$  MT处理组中达到最高。这表明150 mmol/L NaCl胁迫明显抑制盐肤木幼苗的生长,50~150  $\mu\text{mol/L}$  MT预处理能够

表1 本文涉及到的qRT-PCR引物序列  
Table 1 The qRT-PCR primer sequences involved in this paper

基因名称	引物序列(5'-3')
<i>RcPP2A</i>	F: 5'-TCCACCGTCCGATCATCAGAAC-3'
<i>RcPP2A</i>	R: 5'-GCACGTTCCATTCTCCACC-3'
<i>RcSNAT1</i>	F: 5'-CACATGGTTAGACGTGCAGG-3'
<i>RcSNAT1</i>	R: 5'-ATCTTTGGCTGAAGGTACAGTATGA-3'
<i>RcCOMT1</i>	F: 5'-TCCATGTGGTTTGCTCTGCTT-3'
<i>RcCOMT1</i>	R: 5'-AGTCAACAGCACTAAGCACTC-3'
<i>RcASMT1</i>	F: 5'-TTGGCTACAGGGAAAGAGCG-3'
<i>RcASMT1</i>	R: 5'-TGGACCTCTCAAGGATAAACCTC-3'
<i>RcCAND2</i>	F: 5'-GGATTCTGGTTGTATGGTGCC-3'
<i>RcCAND2</i>	R: 5'-GCTTCCGCATCATTCCCAGT-3'
<i>RcRBOHF</i>	F: 5'-CCAGACCAACAAATCATCGACG-3'
<i>RcRBOHF</i>	R: 5'-GTTGGTGAGTAGCTGCGAGG-3'
<i>RcRD20</i>	F: 5'-CGAGCTACGCAGAGTGAAG-3'
<i>RcRD20</i>	R: 5'-TGCTAGTGGATTTACGCTTTCTTGTT-3'
<i>RcRD22</i>	F: 5'-GGTTCCCAACAAGAAGCCTG-3'
<i>RcRD22</i>	R: 5'-GAGTACATGCACAACGAAGGTG-3'
<i>RcABF3</i>	F: 5'-CAAGCAGAAATCATGGAAGTGC-3'
<i>RcABF3</i>	R: 5'-ATCCCACTCCTCGCTTTACC-3'

缓解盐胁迫对盐肤木幼苗带来的伤害。

2.2 MT预处理对盐胁迫下盐肤木幼苗叶片渗透调节物质含量的影响

单独盐胁迫下,盐肤木叶片中SS、SP和Pro的含量上升,与对照组的相比均有显著提高,分别上升了97.01%、30.98%和38.85%(见图3)。对比单独盐胁迫组,不同浓度MT处理下SS和Pro含量大幅提升,其中100 μmol/L MT组分别提升了39.74%和21.29%。50 μmol/L MT处理下,SP含

量比单独盐胁迫组上升了13.82%。综上所述,外源MT预处理可以提高盐肤木幼苗叶片中渗透调节物质SP、SS和Pro在盐胁迫下的积累,从而提高盐胁迫耐受。

2.3 MT预处理对盐胁迫下盐肤木幼苗MDA含量、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>含量及抗氧化酶活性的影响

MDA是脂质过氧化的产物,反映了细胞膜脂过氧化程度即植物细胞膜系统破坏程度,是衡量盐胁迫的重要生理指标之一<sup>[13]</sup>。盐胁迫处理后盐肤木幼

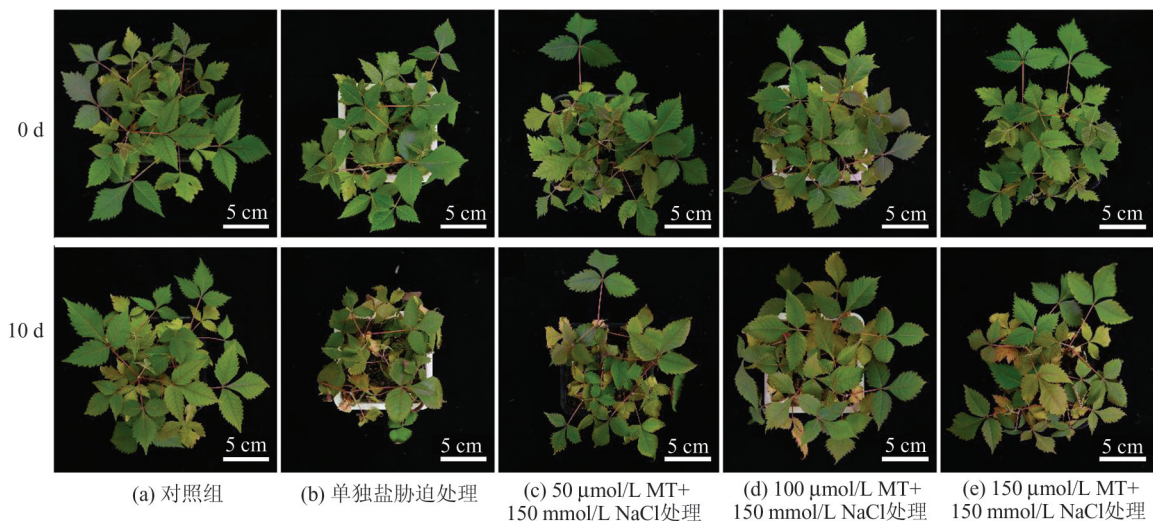


图1 盐胁迫和外源褪黑素处理对盐肤木叶片形态的变化

Fig. 1 Morphology changes of *Rhus chinensis* leaves under salt stress and exogenous melatonin (MT) treatment

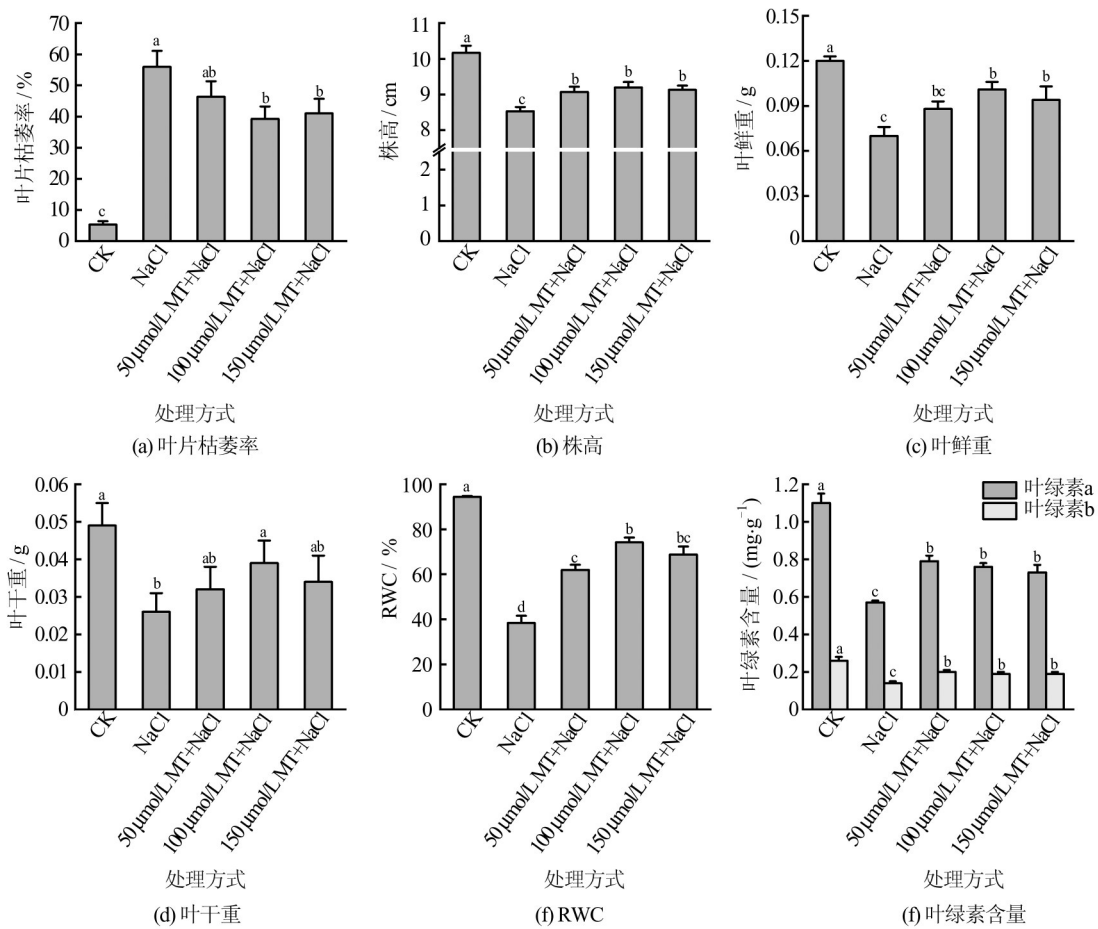


图2 外源褪黑素对盐胁迫下盐肤木幼苗生长的影响

Fig. 2 Effect of melatonin pre-treatment on the growth of *Rhus chinensis* seedlings under salt stress

注:不同小写字母表示处理间具有显著差异(最小显著差异法,  $P < 0.05$ )

Note: the lowercase letters indicate significant differences between treatments (least significant difference method,  $P < 0.05$ )

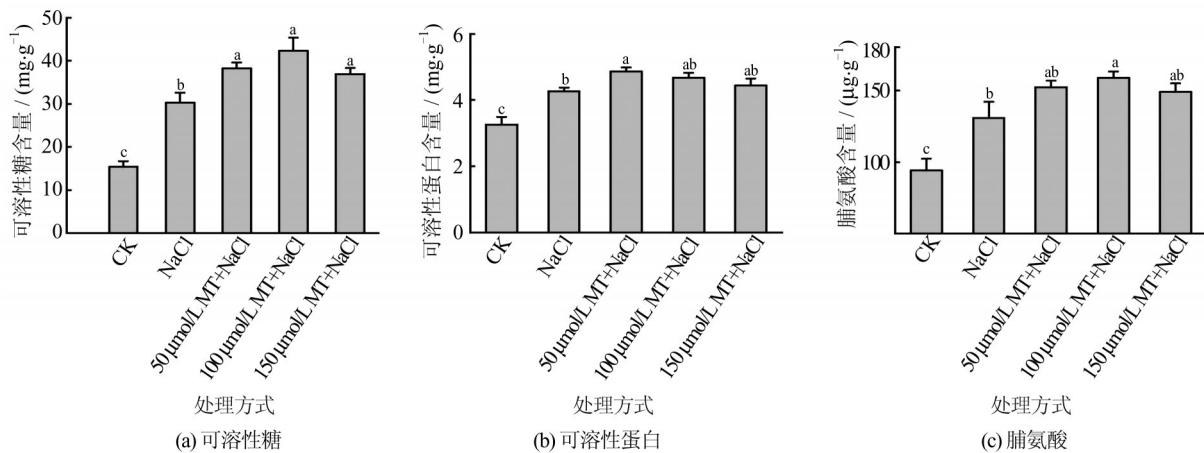


图3 外源褪黑素对盐胁迫下盐肤木幼苗叶片渗透调节物质含量的影响

Fig. 3 Effect of exogenous melatonin on the content of osmotic regulatory substances in leaves of *Rhus chinensis* seedlings under salt stress

注:不同小写字母表示处理间具有显著差异(最小显著差异法,  $P < 0.05$ )

Note: the lowercase letters indicate significant differences between treatments (least significant difference method,  $P < 0.05$ )

苗叶片MDA含量显著增加,与对照组相比增加了87.24%(见图4(a))。经过MT预处理的盐肤木叶

片中MDA含量与单独盐胁迫中的相比均显著下降,其中50 μmol/L MT处理组比单独盐胁迫组的

MDA 含量降低了 16.25%，在 100  $\mu\text{mol/L}$  MT 处理组中进一步降低。因此,MT 预处理可以降低盐胁迫下细胞膜脂过氧化导致的 MDA 积累,其中,100  $\mu\text{mol/L}$  的 MT 预处理的效果较好。

$\text{H}_2\text{O}_2$  是一种植物细胞活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 物质,逆境下为了抵抗 ROS 对细胞的氧化损伤,各种抗氧化酶活性被诱导增强。为了评估盐胁迫下外源 MT 对盐肤木幼苗叶片 ROS 含量和抗氧化酶活性的影响,测定了叶片中  $\text{H}_2\text{O}_2$  的含量及 CAT、SOD 和 APX 的活性 (见图 4(b)、图 5)。结果发现单独盐胁迫组的  $\text{H}_2\text{O}_2$  含量比对照组升高了 1.31 倍 (见图 4(b)),而 MT 预处理的  $\text{H}_2\text{O}_2$  含量与单独盐胁迫相比均显著降低,但组内并无显

著差异。

与对照组相比,盐胁迫处理提高了盐肤木叶片中 CAT、SOD 和 APX 的酶活性 (见图 5)。单独盐胁迫中 CAT、SOD 和 APX 酶活性与对照组相比分别提高了 30.43%、57.29% 和 62.94%,其中 CAT 酶活性的提升相比于对照组并没有达到显著水平。不同浓度 MT 预处理下这三种抗氧化酶活性对比单独盐胁迫均进一步增强,其中 CAT、APX 酶活性在 100  $\mu\text{mol/L}$  MT 组中均为最高,分别为单独盐胁迫组酶活性的 1.66、1.47 倍且具有显著差异。这些结果表明外源 MT 处理可能通过提升 CAT、SOD 和 APX 酶活性来抑制 ROS 的积聚,帮助维持细胞氧化还原稳态。

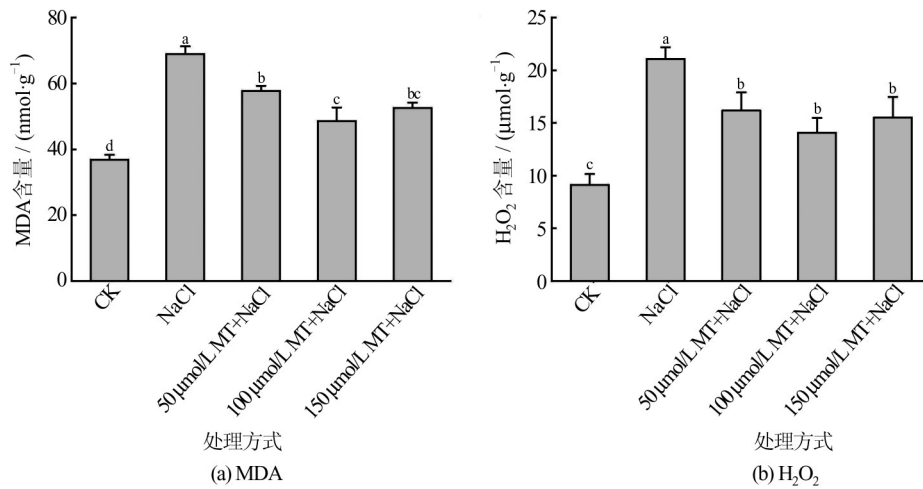


图 4 外源褪黑素对盐胁迫下盐肤木幼苗 MDA、 $\text{H}_2\text{O}_2$  含量的影响

Fig. 4 Effects of exogenous melatonin on MDA and  $\text{H}_2\text{O}_2$  contents of *Rhus chinensis* seedlings under salt stress

注:不同小写字母表示处理间具有显著差异(最小显著差异法,  $P < 0.05$ )

Note: the lowercase letters indicate significant differences between treatments (least significant difference method,  $P < 0.05$ )

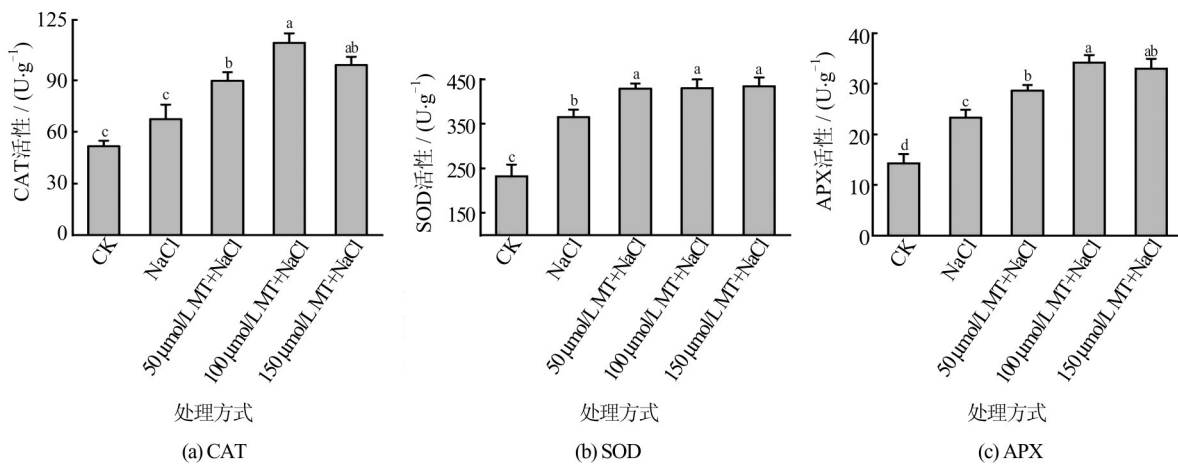


图 5 外源褪黑素对盐胁迫下盐肤木幼苗叶片抗氧化酶活性的影响

Fig. 5 Effect of exogenous melatonin on antioxidant enzyme activities in leaves of *Rhus chinensis* seedlings under salt stress

注:不同小写字母表示处理间具有显著差异(最小显著差异法,  $P < 0.05$ )

Note: the lowercase letters indicate significant differences between treatments (least significant difference method,  $P < 0.05$ )

2.4 盐胁迫下盐肤木幼苗褪黑素相关基因表达水平的变化

为了探究盐胁迫对盐肤木幼苗内源MT的影响,利用qRT-PCR方法检测了盐胁迫下盐肤木叶片中MT关键合成酶基因(*RcCOMT1*、*RcASMT1*和*RcSNAT1*)和MT受体基因(*RcCAND2*)在0、12和24 h时的表达水平,结果如图6所示。*RcSNAT1*和*RcASMT1*基因在盐胁迫12 h和24 h时表达显著下调,*RcCOMT1*基因在盐胁迫24 h时表达显著下调,*RcCAND2*基因表达变化不显著。这表明盐胁迫可能会通过抑制MT合成基因的表达降低内源MT含量。

2.5 MT预处理对盐胁迫下盐肤木幼苗胁迫相关基因表达水平的影响

根据3种浓度外源MT对盐胁迫下盐肤木幼苗的形态变化以及生理生化水平影响的结果,发现100 μmol/L MT组的表现出最佳的缓解效果(图1~图5)。因此,为了探索外源MT对盐胁迫下盐肤木幼苗盐胁迫相关基因(*RcRBOHF*、*RcABF3*、

*RcRD20*、*RcRD22*)的调控影响,利用qRT-PCR方法检测了100 μmol/L外源MT处理对盐胁迫下叶片中这4个基因在12 h和24 h时的相对表达水平(图7)。

盐胁迫显著上调了*RcRBOHF*、*RcABF3*、*RcRD20*和*RcRD22*基因的表达,在12 h时上调幅度较大(图7)。而外源MT处理均能进一步提升*RcRBOHF*、*RcABF3*、*RcRD20*和*RcRD22*基因的表达。这表明外源MT可能通过调节这些基因的表达,参与盐胁迫下盐肤木幼苗的逆境响应。

3 讨论

盐胁迫对植物产生不利影响是由Na<sup>+</sup>在土壤中积累导致的渗透失水,Na<sup>+</sup>和Cl<sup>-</sup>对植物的毒性作用引起的<sup>[19]</sup>。而植物遭受盐害后外观上出现生长缓慢,叶片枯黄萎蔫甚至死亡等变化,且植物老叶最早出现症状<sup>[20]</sup>。试验中盐肤木幼苗在经过150 mmol/L NaCl处理后,叶片泛黄枯萎,株高、叶鲜重和叶干重被显著抑制,而50 μmol/L、100 μmol/L和150 μmol/L MT处理后叶片枯萎率下降,株高、叶鲜重和叶干重部分恢复(见图2),这表明外源MT处理能够部分缓

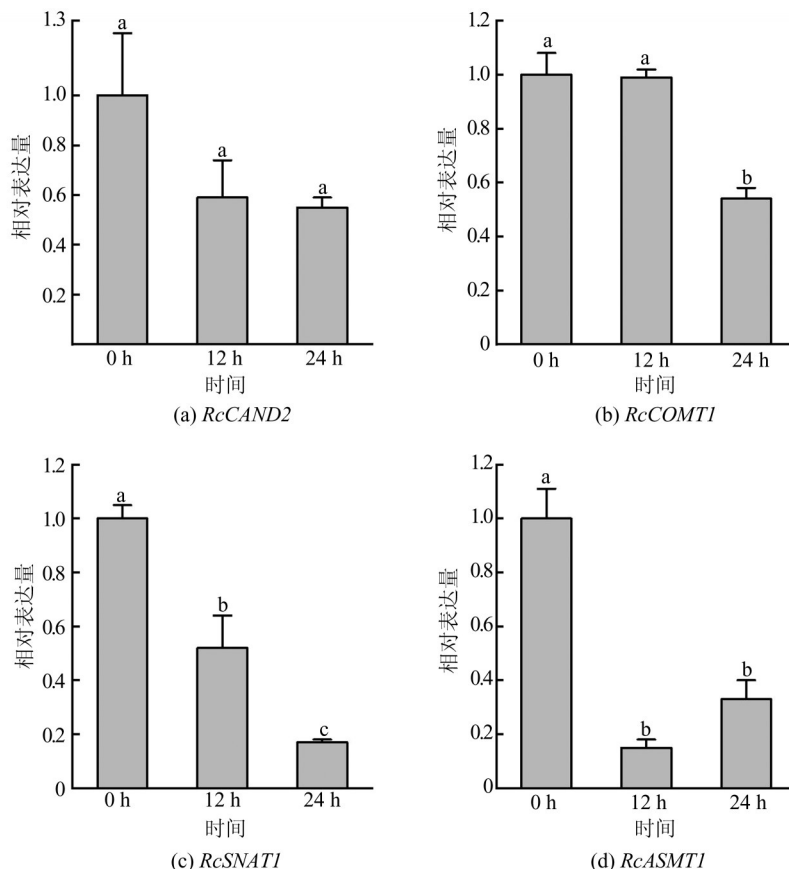


图6 盐胁迫下盐肤木叶片中褪黑素相关基因在0 h、12 h和24 h的相对表达水平

Fig. 6 Relative expression levels of melatonin-related genes in *Rhus chinensis* leaves under salt stress at 12 and 24 h

注:不同小写字母表示处理间具有显著差异(最小显著差异法,  $P < 0.05$ )

Note: the lowercase letters indicate significant differences between treatments (least significant difference method,  $P < 0.05$ )

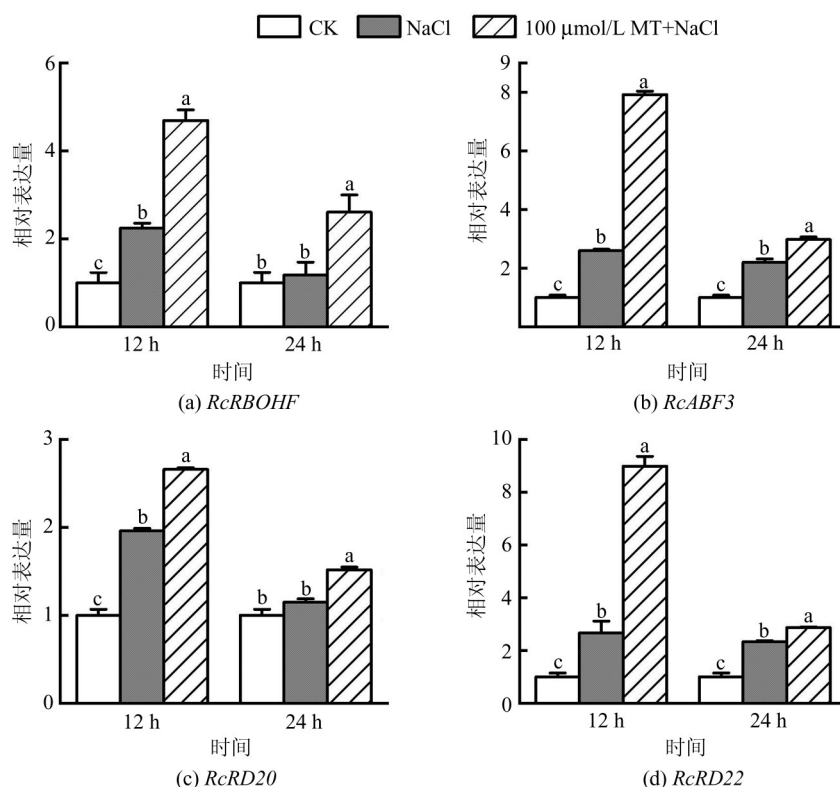


图7 外源褪黑素对盐胁迫下盐肤木幼苗叶片胁迫响应基因相对表达水平的影响

Fig. 7 Effect of exogenous melatonin on the relative expression level of stress-responsive genes in *Rhus chinensis* seedling leaves under salt stress

注:不同小写字母表示处理间具有显著差异(最小显著差异法,  $P < 0.05$ )

Note: the lowercase letters indicate significant differences between treatments (least significant difference method,  $P < 0.05$ )

解盐胁迫的抑制作用。有学者也报道了类似的结果<sup>[7]</sup>,这表明外源褪黑素在不同植物中的应用具有类似的提高植物耐盐性的作用。

盐胁迫会导致植物细胞渗透失水,细胞相对含水量降低,为了维持细胞内渗透压平衡,植物会积累渗透调节物质,如SS、SP和Pro等<sup>[19]</sup>。有研究显示,100 μmol/L MT显著增加了盐胁迫下甜菜幼苗中Pro和SS含量,提高了不利环境下甜菜的RWC<sup>[8]</sup>。本试验显示盐胁迫下叶片RWC显著降低,外源褪黑素预处理后促进了盐肤木叶片SS、Pro和SP含量以及RWC的增加,其中SS和Pro含量提升幅度较大(图3)。不同的是,有研究表明,200 mmol/L盐胁迫下外施MT能显著促进Pro、SS和SP含量增加,其中20 μmol/L MT显著提升了Pro含量,100 μmol/L MT主要增加了SS和SP含量<sup>[21]</sup>。这表明不同种类植物应对盐胁迫的渗透调节反应模式有差异,同时说明了褪黑素调节渗透压的有效方式可能与调节可溶性糖含量相关。

盐胁迫造成生物膜系统损伤,MDA含量会显著增加。适当浓度的MT处理可显著降低盐胁迫后香椿幼苗的MDA含量,缓解膜系统损伤<sup>[22]</sup>。类似地,

本试验发现150 mmol/L盐处理后,盐肤木幼苗叶片MDA含量显著增加,而经过外源MT预处理后可以显著降低增幅(见图4(a))。不仅如此,盐胁迫造成细胞内ROS过量积累,诱导氧化损伤,随之激活SOD、CAT、APX等抗氧化酶活性增强来抵御<sup>[23]</sup>。在本试验中盐胁迫下H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>含量显著上升,而MT预处理后H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>水平显著降低(见图4(b)),这与有些研究的结果相似<sup>[24]</sup>。同时,本试验中MT预处理组的抗氧化酶CAT、SOD和APX活性均显著增加(见图5)。对橄榄幼苗的研究发现,在中等盐胁迫下,100 μmol/L、200 μmol/L MT喷施后可以显著提高SOD、CAT和APX的酶活性,其中100 μmol/L MT对CAT和APX酶活性的提升效果较好<sup>[25]</sup>。本试验数据表明外源MT可能通过诱导抗氧化酶活性增强,降低MDA和H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>含量来提高盐肤木幼苗的耐盐性,推测MT参与盐肤木细胞ROS的产生和清除,可能是作为强抗氧化剂直接与ROS相互作用来清除自由基,同时也可能作为信号分子激活抗氧化酶活性来减轻氧化损伤,帮助维持细胞内ROS代谢平衡稳态<sup>[26]</sup>。

当面临非生物胁迫时,植物通过体内复杂的信

号传导网络来调节生理过程和基因表达<sup>[4]</sup>。拟南芥幼苗在渗透胁迫5 d后,SNAT1、COMT1和ASMT1的表达被诱导,表明MT生物合成参与植物对渗透胁迫的反应,同时拟南芥中CAND2的转录水平也被上调<sup>[27]</sup>。但是,本试验发现在盐胁迫处理早期,MT合成基因RcCOMT1、RcSNAT1和RcASMT1的表达均被下调(图6),推测盐肤木中盐胁迫可能抑制内源MT的合成和积累;而外源MT处理能显著提高盐肤木对盐胁迫的抗性(图1),表明MT可能在盐肤木抗盐的过程中起到重要作用。ABF编码脱落酸信号通路末端的转录因子,RD20和RD22是响应脱水逆境的基因,它们都是脱落酸依赖的,参与逆境应答<sup>[28,29]</sup>。有研究表明MT介导RBOH依赖性ROS信号来增加K<sup>+</sup>吸收转运蛋白的表达进而提高水稻的耐盐性<sup>[30]</sup>。而本实验中外源MT显著上调了盐胁迫下盐肤木幼苗叶片中RcRBOHF、RcABF3、RcRD20和RcRD22胁迫响应基因的表达(图7),推测MT可能是通过调节这些胁迫响应基因的表达参与提高盐肤木对盐胁迫的应答和适应能力。

#### 4 结 论

外源褪黑素预处理可能通过促进盐胁迫下可溶性糖、脯氨酸和可溶性蛋白含量的积累,提高盐肤木幼苗叶片细胞的相对含水量来提升盐肤木幼苗的渗透调节能力。100 μmol/L褪黑素预处理对可溶性糖和脯氨酸含量的影响较大。外源褪黑素预处理显著提升了盐胁迫下CAT、SOD和APX的酶活性,显著降低了MDA和H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>含量,可能有助于缓解盐胁迫下氧化损伤和ROS过量积累。100 μmol/L褪黑素预处理组的CAT、APX酶活性最高,是单独盐胁迫下酶活性的1.66、1.47倍且具有显著差异。外源褪黑素预处理显著上调了盐胁迫下盐肤木叶片中RcRBOHF、RcABF3、RcRD20和RcRD22胁迫响应基因的表达。综合来看,外源褪黑素预处理可能通过提高渗透调节物质含量和抗氧化酶活性,减轻了ROS对细胞的氧化损伤,同时外源褪黑素处理可能通过调控相关胁迫基因的表达,影响了盐肤木体内逆境信号通路,从而增强了盐肤木幼苗的耐盐胁迫能力。

#### 参考文献

- [1] Yu Z P, Duan X B, Luo L, *et al.* How plant hormones mediate salt stress responses [J]. Trends Plant Sci, 2020, 25(11): 1117-1130.
- [2] Khan T A, Saleem M, Fariduddin Q. Recent advances and mechanistic insights on melatonin-mediated salt stress signaling in plants [J]. Plant Physiol Biochem, 2022, 188: 97-107.
- [3] Lu Y Y, Fricke W. Salt stress-regulation of root water uptake in a whole-plant and diurnal context[J]. Int J Mol Sci, 2023, 24(9): 8070.
- [4] Ribba T, Garrido-Vargas F, O'Brien J A. Auxin-mediated responses under salt stress: from developmental regulation to biotechnological applications [J]. J Exp Bot, 2020, 71(13): 3843-3853.
- [5] Gao Y Y, Chen H M, Chen D Y, *et al.* Genetic and evolutionary dissection of melatonin response signaling facilitates the regulation of plant growth and stress responses [J]. J Pineal Res, 2023, 74(2): e12850.
- [6] Sun C L, Liu L J, Wang L X, *et al.* Melatonin: a master regulator of plant development and stress responses [J]. J Integr Plant Biol, 2021, 63(1): 126-145.
- [7] 李嘉文, 麻冬梅, 苏立娜, 等. 外源褪黑素对盐胁迫下燕麦幼苗生长及抗氧化系统的影响[J]. 草地学报, 2023, 31(2): 396-403.  
Li J W, Ma D M, Su L N, *et al.* Effects of exogenous melatonin on oat seedling growth and antioxidant system under salt stress [J]. Acta Agrestia Sinica, 2023, 31(2): 396-403.
- [8] Zhang P F, Liu L, Wang X, *et al.* Beneficial effects of exogenous melatonin on overcoming salt stress in sugar beets (*Beta vulgaris* L.) [J]. Plants, 2021, 10(5): 886.
- [9] Li J P, Liu J, Zhu T T, *et al.* The role of melatonin in salt stress responses [J]. Int J Mol Sci, 2019, 20(7): 1735.
- [10] 高洁莹, 龚力民, 刘平安, 等. 盐肤木属植物研究进展 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2015, 21(8): 215-218.  
Gao J Y, Gong L M, Liu P A, *et al.* Research progress in *Rhus* [J]. Chin J Exp Tradit Med Formulae, 2015, 21(8): 215-218.
- [11] Suo C F, Sun Z Y, Wang Y M, *et al.* Active components in leaves of *Rhus chinensis* Mill. [J]. Therm Sci, 2020, 24(3 Part A): 1729-1735.
- [12] 丁理成, 王尧, 李景刚, 等. 盐肤木与泰山盐肤木幼苗对盐胁迫的生理响应[J]. 植物生理学报, 2022, 58(7): 1335-1345.  
Ding L C, Wang Y, Li J G, *et al.* Physiological response of *Rhus chinensis* and *R. taisanensis* seedlings to salt stress [J]. Plant Physiol J, 2022, 58(7): 1335-1345.
- [13] Safari F, Akramian M, Salehi-Arjmand H, *et al.* Physiological and molecular mechanisms underlying salicylic acid-mitigated mercury toxicity in lemon balm (*Melissa officinalis* L.) [J]. Ecotoxicol Environ Saf, 2019, 183: 109542.
- [14] Guo J K, Zhou R, Ren X H, *et al.* Effects of salicylic acid, Epi-brassinolide and calcium on stress alleviation

- and Cd accumulation in tomato plants [J]. *Ecotoxicol Environ Saf*, 2018, 157: 491-496.
- [15] 储玉檀, 李颜, 黄益宗, 等. 外源褪黑素对镉胁迫下水稻幼苗生长和抗氧化系统的影响[J]. *环境科学*, 2023, 44(4): 2356-2364.
- Chu Y T, Li Y, Huang Y Z, *et al.* Effects of exogenous melatonin treatment on the growth and antioxidant system of rice seedlings under antimony stress [J]. *Environ Sci*, 2023, 44(4): 2356-2364.
- [16] 后有丽, 苏世平, 李毅, 等. 外源脱落酸对红砂叶片渗透调节物质含量及抗氧化酶活性的影响[J]. *草业科学*, 2020, 37(2): 245-255.
- Hou Y L, Su S P, Li Y, *et al.* Effects of exogenous abscisic acid on the content of osmotic adjustment substances and antioxidant enzyme activity in the leaves of *Reaumuria soongorica* [J]. *Pratacultural Sci*, 2020, 37(2): 245-255.
- [17] 杨姝蕾, 项明, 王泽, 等. 两个不同抗性株系华木莲种子层积过程中生理特性变化[J]. *分子植物育种*, 2023, 21(10): 3418-3423.
- Yang S L, Xiang M, Wang Z, *et al.* Physiological characteristics of two resistant *Sinomanglietia glauca* seeds in stratification [J]. *Mol Plant Breed*, 2023, 21(10): 3418-3423.
- [18] 杨洋, 国少旭, 尹飞飞, 等. 盐肤木实时荧光定量PCR内参基因筛选与验证[J]. *分子植物育种*, 2022: 1-9.
- Yang Y, Guo S X, Yin F F, *et al.* Selection and validation of reference genes for quantitative real-time PCR analysis in *Rhus chinensis* [J]. *Mol Plant Breed*, 2022:1-9.
- [19] van Zelm E, Zhang Y X, Testerink C. Salt tolerance mechanisms of plants [J]. *Annu Rev Plant Biol*, 2020, 71: 403-433.
- [20] 赵秀婷, 王延双, 段劼, 等. 盐胁迫对红花玉兰嫁接苗生长和光合特性的影响[J]. *林业科学*, 2021, 57(4): 43-53.
- Zhao X T, Wang Y S, Duan J, *et al.* Effects of salt stress on growth and photosynthetic characteristics of *Magnolia wufengensis* grafted seedlings [J]. *Sci Silvae Sin*, 2021, 57(4): 43-53.
- [21] 周丹, 李海燕, 王秀军, 等. 外源褪黑素对盐胁迫下银杏幼苗渗透调节和抗氧化能力的影响[J]. *应用生态学报*, 2024, 35(02): 431-438.
- Zhou D, Li H Y, Wang X J, *et al.* Effects of exogenous melatonin on the osmotic regulation and antioxidant capacity of *Ginkgo biloba* seedlings under salt stress [J]. *Chin J Appl Ecol*, 2024, 35(02): 431-438.
- [22] 偶春, 张敏, 姚侠妹, 等. 褪黑素对盐胁迫下香椿幼苗生长及离子吸收和光合作用的影响[J]. *西北植物学报*, 2019, 39(12): 2226-2234.
- Ou C, Zhang M, Yao X M, *et al.* Effect of melatonin on growth, ion absorption and photosynthesis of *Toona sinensis* seedlings under salt stress [J]. *Acta Bot Boreali Occidentalia Sin*, 2019, 39(12): 2226-2234.
- [23] Zhao S S, Zhang Q K, Liu M Y, *et al.* Regulation of plant responses to salt stress[J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(9): 4609.
- [24] Duan W J, Lu B, Liu L T, *et al.* Effects of exogenous melatonin on root physiology, transcriptome and metabolome of cotton seedlings under salt stress [J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(16): 9456.
- [25] Zahedi S M, Hosseini M S, Fahadi Hoveizeh N, *et al.* Exogenous melatonin mitigates salinity-induced damage in olive seedlings by modulating ion homeostasis, antioxidant defense, and phytohormone balance [J]. *Physiol Plant*, 2021, 173(4): 1682-1694.
- [26] Zhan H S, Nie X J, Zhang T, *et al.* Melatonin: a small molecule but important for salt stress tolerance in plants [J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(3): 709.
- [27] Wang L F, Li T T, Zhang Y, *et al.* CAND2/PMTR1 is required for melatonin-conferred osmotic stress tolerance in *Arabidopsis* [J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(8): 4014.
- [28] Yoshida T, Fujita Y, Sayama H, *et al.* AREB1, AREB2, and ABF<sub>3</sub> are master transcription factors that cooperatively regulate ABRE-dependent ABA signaling involved in drought stress tolerance and require ABA for full activation [J]. *Plant J*, 2010, 61(4): 672-685.
- [29] Aubert Y, Vile D, Pervent M, *et al.* RD20, a stress-inducible caleosin, participates in stomatal control, transpiration and drought tolerance in *Arabidopsis thaliana* [J]. *Plant Cell Physiol*, 2010, 51(12): 1975-1987.
- [30] Liu J, Shabala S, Zhang J, *et al.* Melatonin improves rice salinity stress tolerance by NADPH oxidase-dependent control of the plasma membrane K<sup>+</sup> transporters and K<sup>+</sup> homeostasis [J]. *Plant Cell Environ*, 2020, 43(11): 2591-2605.

□

(编辑: 杨晓翠 张丽红)