

花色素苷对拟南芥耐盐性的影响

张晓红, 孙蓓育, 张泰劼, 彭长连*

(广东省植物发育生物工程重点实验室, 华南师范大学生命科学学院, 广州 510006)

摘要: 为探讨花色素苷在盐胁迫中的防御作用及其机制, 以模式植物拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)花色素苷合成途径相关基因缺失突变体(*DFR* 基因缺失突变体 *tt3*, *CHS* 基因缺失突变体 *tt4*, *CHS*、*DFR* 基因双缺失突变体 *tt3tt4*)及其野生型(WT)为材料, 采用叶绿素荧光和超氧阴离子($O_2^{\cdot-}$)组织定位等方法, 分析了 *tt3*, *tt4*, *tt3tt4* 和 WT 对盐胁迫处理的生理响应。结果表明, 盐胁迫下 3 种缺失突变体叶片花色素苷含量的增加显著低于野生型, 与 WT 相比, 叶绿素荧光参数 Fv/Fm、Yield、ETR、qP 和 NPQ 下降较快, 膜渗漏率升高显著, 叶片 $O_2^{\cdot-}$ 积累程度为 *tt3tt4* > *tt3/tt4* > WT。这表明花色素苷在植物抵御盐胁迫过程中起着重要作用, 它可能是作为渗透调节剂及抗氧化剂来增强植物的耐盐性。因此, 花色素苷含量可以作为筛选耐盐作物的指标。

关键词: 花色素苷; 盐胁迫; 叶绿素荧光; 抗氧化

doi: 10.11926/j.issn.1005-3395.2016.06.012

Effect of Anthocyanins on Salt Tolerance in *Arabidopsis thaliana*

ZHANG Xiao-hong, SUN Bei-yu, ZHANG Tai-jie, PENG Chang-lian*

(Guangdong Provincial Key Laboratory of Biotechnology for Plant Development, School of Life Science, South China Normal University, Guangzhou 510006, China)

Abstract: To reveal the defense mechanism of anthocyanins under salt stress, the physiological responses to NaCl stress in three *Arabidopsis* mutants (*tt3*, *tt4* and *tt3tt4*) deficient in anthocyanin biosynthesis and wild type (WT) plants were studied. The mutants *tt3*, *tt4* and *tt3tt4* are deficient in dihydroflavonol 4-reductase gene (*DFR*), chalcone synthase gene (*CHS*) and both *DFR* and *CHS*, respectively, these genes encode enzymes that act in the anthocyanin biosynthesis pathway. The results showed that, under salinity stress, the three mutants with lower anthocyanin accumulation exhibited greater reductions in PSII maximum quantum yield (Fv/Fm), effective quantum yield (Yield), electron transport rate (ETR), photochemical quenching (qP) and non-photochemical quenching (NPQ) and greater increases in lipid peroxidation, than the WT. Histochemical stains with nitroblue tetrazolium (NBT) showed that superoxide anion free radical ($O_2^{\cdot-}$) in *tt3tt4* was the highest, followed by *tt3* or *tt4*, and then by WT. These suggest that anthocyanins play an important role in plant adaptations to salinity stress, possibly via serving as a kind of osmo-regulator and antioxidant. Therefore, anthocyanin contents can be used as an indicator for screening of salt-tolerant crops.

Key words: Anthocyanin; Salt stress; Chlorophyll fluorescence; Antioxidant

盐胁迫是影响作物产量的主要非生物逆境之一, 全世界约有 20%的土地或 50%的灌溉地遭受盐害影响^[1], 中国的次生盐渍化土壤约占耕地面积的 1/10^[2], 缓解盐胁迫对作物的损害以提高作物产量

收稿日期: 2016-03-04 接受日期: 2016-04-17

基金项目: 国家自然科学基金项目(31570398, 31270287); 广东省自然科学基金项目(2015A030311023)资助

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No. 31570398, 31270287), and the Natural Science Foundation of Guangdong (Grant No. 2015A030311023).

作者简介: 张晓红(1991~), 女, 硕士研究生, 研究方向为植物生理生态。E-mail: 549882648@qq.com

* 通信作者 Corresponding author. E-mail: pengchl@scib.ac.cn

已受到广泛关注。研究表明盐胁迫将对植物造成渗透胁迫和离子毒害,使植物生长受到抑制,加速叶片老化以及体内活性氧(ROS)积累^[3],活性氧一方面具有胁迫信号转导功能,另一方面其过量积累又会导致植物细胞遭受氧化胁迫,导致蛋白质、膜脂、DNA 及其它细胞组分的严重损伤^[4-5]。

植物体内常见的水溶性天然色素花色素苷(Anthocyanins)在植物的抗氧化胁迫中有重要作用^[6]。目前已知花色素苷具有以下主要功能: (1) 拦截和吸收光能,避免非生物环境胁迫下光能过剩对植物叶片造成光损伤; (2) 保护抗氧化酶; (3) 直接清除自由基; (4) 与其他信号通路中的其他分子相互作用从而间接清除活性氧自由基^[7]。此外,花色素苷还有一项与抗氧化无关的功能,即作为一种保护色或警戒色,使植物免受食草动物的侵害^[8]。花色素苷能够防御环境因素造成的氧化胁迫,据此可以推测花色素苷能够改善植物对盐胁迫的耐受性。一些植物耐盐性与花色素苷的积累有关, Oswin 等^[9]的研究表明, 10 到 11 月的 8 种红树林植物中,生长在海洋栖息地的物种中常绿叶片含有更高的花色素苷,这可能是 10 至 11 月是季风来临前的月份,海洋里的盐度升高导致叶片的花色素苷积累。但花色素苷增强植物抗盐能力的具体机制仍不清楚,有待进一步系统研究。

查尔酮合成酶(Chalconesynthase, CHS)和二羟黄酮醇还原酶(Dihydroflavonol 4-reductase, DFR)是花色素苷生物合成途径中的关键酶,分别催化丙二酰 CoA 和香豆酰 CoA 形成黄色的查尔酮及无色的二氢黄酮醇还原成无色花色素苷。本文通过研究拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)野生型及花色素苷合成基因 *CHS* 和 *DFR* 的缺失突变体植株 *tt3*、*tt4* 及双突变体植株 *tt3tt4* 在 200 mmol L⁻¹ NaCl 胁迫下的生理响应,探讨花色素苷在盐胁迫下的保护功能,为进一步阐明花色素苷在植物中的耐盐机理奠定理论基础,为农业生产中耐盐作物的筛选提供指导。

1 材料和方法

1.1 材料

以购自美国拟南芥生物资源中心(*Arabidopsis* Biological Resource Center, USA)的拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)花色素苷突变体(*tt3*、*tt4* 和 *tt3tt4*)及其野生型 WT (Landsbergerecta 生态型)为试验材料。其中突变体 *tt3* 缺失 *DFR* (二氢黄酮醇还原酶)基因, *tt4*

缺失 *CHS* (苯基苯乙烯酮合成酶)基因, *tt3tt4* 同时缺失 *DFR* 和 *CHS* 基因。

1.2 拟南芥的培养和处理

拟南芥种子于 4℃ 避光春化 3 d,经 10%次氯酸钠消毒 10 min 后,加入 75%酒精消毒 30 s,无菌水冲洗 3~5 次,均匀播种于 MS 培养基上。10~12 d 后,将幼苗转移至泥炭土(购自 Jiffy Group, Netherlands)与蛭石混合物体积比为 3:1 的土壤中培养,培养室光强 100 μmol m⁻²s⁻¹、光周期 16 h/8 h (光/暗)、温度 22℃。将培养 15 d 后的拟南芥(WT、*tt3*、*tt4*、*tt3tt4*)进行盐胁迫处理,以 200 mmol L⁻¹ NaCl 水溶液浇灌营养土作为处理组(经 0~500 mmol L⁻¹ NaCl 的预试验处理,确定此浓度处理表型差异明显),在温室中处理至第 6 天,进行相关生理指标的测定。对照(Control)为纯水浇灌组。

1.3 方法

突变体的鉴定 参照 RNA Plant Isolation Mini Kit (Sangon Biotech)试剂盒说明书提取总 RNA。紫外分光光度法测定浓度后,按照 Prime Script RT Reagent Kit (TaKaRa Inc., China)说明书合成 cDNA 第一条链,作为实时荧光定量 qPCR (qRT-PCR)的模板。qRT-PCR 按照 SYBR[®] Premix EX TapTM II (Tli RNaseH Plus)(Takara)试剂盒说明书进行。所有检测均采用 3 个生物样本重复,每个生物样品进行 3 次重复检测反应。采用微管蛋白基因(*Tub*)作为内参基因,利用 $\Delta\Delta C_T$ 算法进行数据处理。获得的结果用仪器配套的软件分析,并结合 Excel 2013 软件计算标记的相对表达量。qRT-PCR 的引物^[10]分别为 *CHS*-qPCR-F: 5'-ACATCGTGGTGGTCGA-AGTC-3', *CHS*-qPCR-R: 5'-CCGGAGGTAGTGCA-GAAGAC-3', *DFR*-qPCR-F: 5'-ATGCCGCC TAGC-CTTATCAC-3', *DFR*-qPCR-R: 5'-AGCGTTGCATA-AGTCGTCCA-3', *ANS*-qPCR-F: 5'-AAGGCTCTCT-CTGTCGGTCT-3', *ANS*-qPCR-R: 5'-AACCCGGA-ACCATGTTGTGT-3', *TUB*-F: 5'-CCAGCTTTGGT-GATTGAAC-3', *TUB*-R: 5'-CAAGCTTTCGGAG-GTCAGAG-3'。

花色素苷特征吸收光谱及含量测定 称取 0.05 g 莲座叶片,用 2 mL 1% HCl-甲醇(V/V)浸泡,置于暗下 4℃ 6 h,取上清液于紫外-可见分光光度计(Lambda 25, Perkin-Elmer Inst, USA)可见光波

长 400~700 nm 处进行光谱吸收扫描。总花色素苷含量以 $\Delta_{530\text{ nm}-600\text{ nm}}$ 值及标准的花青素-3 葡萄糖苷的消光系数 $[(31.6\text{ mmol L}^{-1})^{-1}\text{ cm}^{-1}]$ 计算^[11]。

叶绿素荧光参数的测定 采用 PAM-2100 仪 (Walz, Germany)测定,测定前叶片暗适应 20 min,测定初始荧光 F_0 和最大荧光 F_m 。开启光化光后,测定光下最大荧光 F_m' 、最小荧光 F_0' 和稳态荧光 F_s , 光化光强度为 $200\text{ mol m}^{-2}\text{ s}^{-1}$ 。

细胞膜渗透率的测定 用相对电导率表示。称取一定质量的叶片,超纯水冲洗 2~3 次,吸水纸吸干多余水分,置于干净的小烧杯中。加入 20 mL 超纯水,让材料完全浸在水中,室温下(25℃)浸泡 3 h。用 PDS-11A 电导仪测定电导率 R_1 。煮沸 30 min,冷却后再测定其电导率 R_2 。相对电导率(%)= $R_1/R_2 \times 100\%$ 。

叶片中 O_2^- 活体组织化学定位 离体叶片真空渗入含 0.1%硝基四氮唑蓝(NBT)和 10 mmol L^{-1} 叠氮化钠的磷酸钾缓冲液(50 mmol L^{-1} , pH 6.4)。当叶片出现特异的靛蓝色沉淀物时,取出叶片用煮沸的甲醇溶液(75%, V/V)漂白去除叶绿素。然后用数码相机拍照^[12]。

总酚和类黄酮含量测定 取 0.05 g 叶片,加 5 mL 1% HCl-甲醇(V/V)暗下 4℃浸提。在 280 nm 和 325 nm 波长下分别测定提取液的光度值(A),采用 $A_{280\text{ nm}}\text{ g}^{-1}\text{ DW}$ 和 $A_{325\text{ nm}}\text{ g}^{-1}\text{ DW}$ 表示总酚和类黄酮的相对水平^[13]。

1.4 数据分析

所得数据采用 Microsoft Excel 2013 软件和 SPSS 19.0 软件进行处理,采用最小显著差法(LSD)检验不同处理之间的差异显著性及处理效应。采用 SigmaPlot 12.0 软件完成作图。

2 结果和分析

2.1 拟南芥花色素苷突变体的鉴定

通过实时荧光定量 qPCR 分析表明, *DFR* 基因缺失突变体(*tt3*)的 *DFR* 基因几乎不表达, *CHS* 基因缺失突变体(*tt4*)的 *CHS* 基因表达量只有野生型(WT)的一半左右, *CHS*、*DFR* 基因双缺失突变体(*tt3tt4*)的 *CHS* 基因表达量只有 WT 的 1/5, *DFR* 基因几乎不表达(图 1: A~C),证明所购买的 *tt3* 是 *DFR* 基因的缺失突变体, *tt4* 是 *CHS* 基因的缺失突变体, *tt3tt4*

是 *CHS*、*DFR* 基因的双缺失突变体。由于花色素苷合成途径相关基因的缺失, *tt3*、*tt4*、*tt3tt4* 叶片的花色素苷含量均极显著下降,只有 WT 的一半左右(图 1: D)。

2.2 盐胁迫下叶片表型的变化

对照(Control)为纯水浇灌组,在盐胁迫持续 4 d 时,拟南芥第 3~4 叶位的幼叶较对照出现了明显的失水萎蔫和氧化漂白现象(图 2)。其中,野生型 WT 较突变体萎蔫及氧化漂白程度轻,双突变体 *tt3tt4* 萎蔫最严重。叶片表型变化显示野生型较突变体对盐的耐受能力更高,而突变体中,双突变体较单突变体对盐胁迫更为敏感,更易受伤害。

2.3 花色素苷吸收光谱及含量的变化

对照组的拟南芥野生型及突变体叶片的甲醇-盐酸提取液光谱扫描结果表明, WT 的吸收光谱与 3 种突变体有显著差异(图 3: A),在 530 nm 处有明显的花色素苷特征吸收峰,而 3 个突变体均无明显的吸收峰。WT 叶片花色素苷含量约为 3 种突变体的 2 倍,单突变体(*tt3* 和 *tt4*)与双突变体(*tt3tt4*)在 530 nm 的吸收及花色素苷含量未表现出明显的差异。经盐胁迫 6 d 后, WT 与突变体在 530 nm 处的吸收(图 3: B)及花色素苷含量均显著增加,且 WT 叶片花色素苷含量与 3 种突变体间差异极显著,分别为 *tt3* 和 *tt4* 的 1.6 倍, *tt3tt4* 的 1.8 倍(图 3: C)。

2.4 盐胁迫后叶片叶绿素荧光参数的变化

盐胁迫导致拟南芥 WT 和突变体叶片的 PSII 原初光能转化效率(F_v/F_m)、光合量子产额(Yield)、表观电子传递速率(ETR)和光化学猝灭系数(qP)都呈下降的趋势(图 4),随处理时间的延长, WT 的下降速度显著低于各突变体。其中双突变体 *tt3tt4* 对盐胁迫最敏感,6 d 后 F_v/F_m 仅为对照的 17%,低于野生型(47%)和突变体 *tt3* (31%)、*tt4* (29%),两个单突变体之间无差异,但与野生型和双突变体的差异均显著。盐胁迫 6 d 后,野生型的 Yield、ETR 和 qP 分别降至对照的 30%、29%和 58%,均高于突变体 *tt3* (12%、17%和 46%)、*tt4* (10%、11%和 37%)和双突变体 *tt3tt4* (5%、7%和 31%)(图 4: B、D、E)。从图 4: C 可见,野生型的非光化学猝灭光化学效率(NPQ)在胁迫初始 2 d 下降速率较快,第 3、4 天减速减缓,于第 5、6 天迅速上升,而突变体在 6 d 的

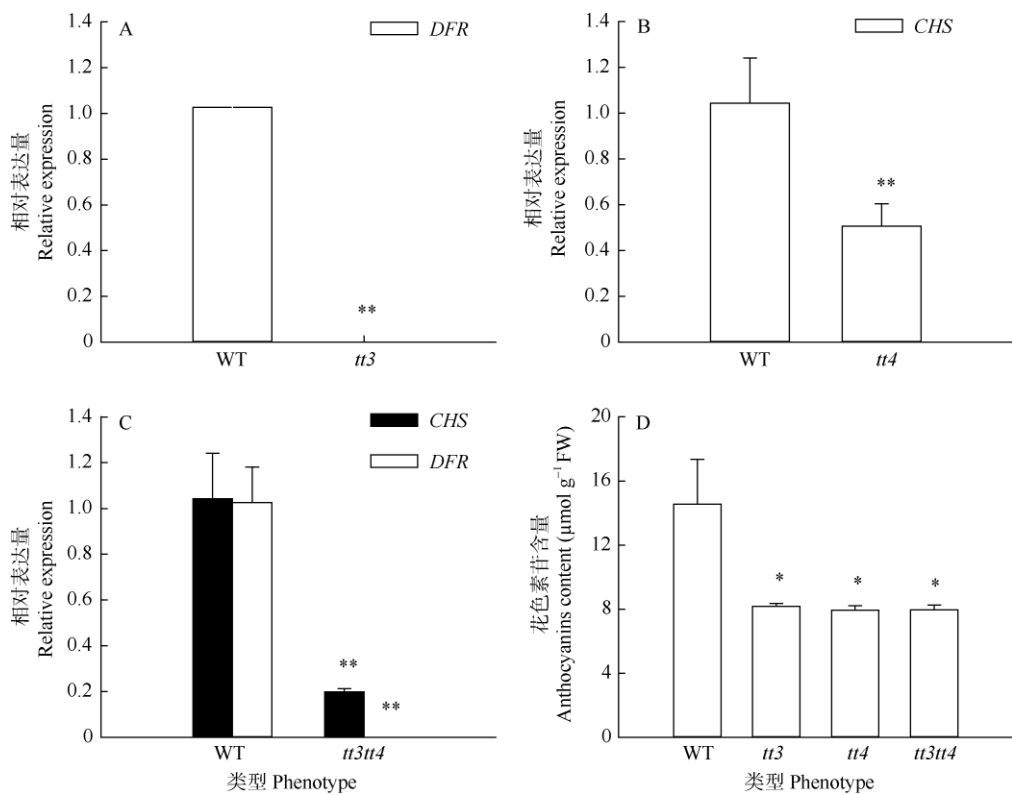


图 1 拟南芥突变体 *DFR*、*CHS* 基因的表达(A~C)和花色素苷含量(D)。*: $P<0.05$; **: $P<0.01$ 。下同。
Fig. 1 Relative expression of *CHS* and *DFR* genes (A~C) and anthocyanins content (D) in leaves of mutants of *Arabidopsis thaliana*. *: $P<0.05$; **: $P<0.01$. The same is following Figures.

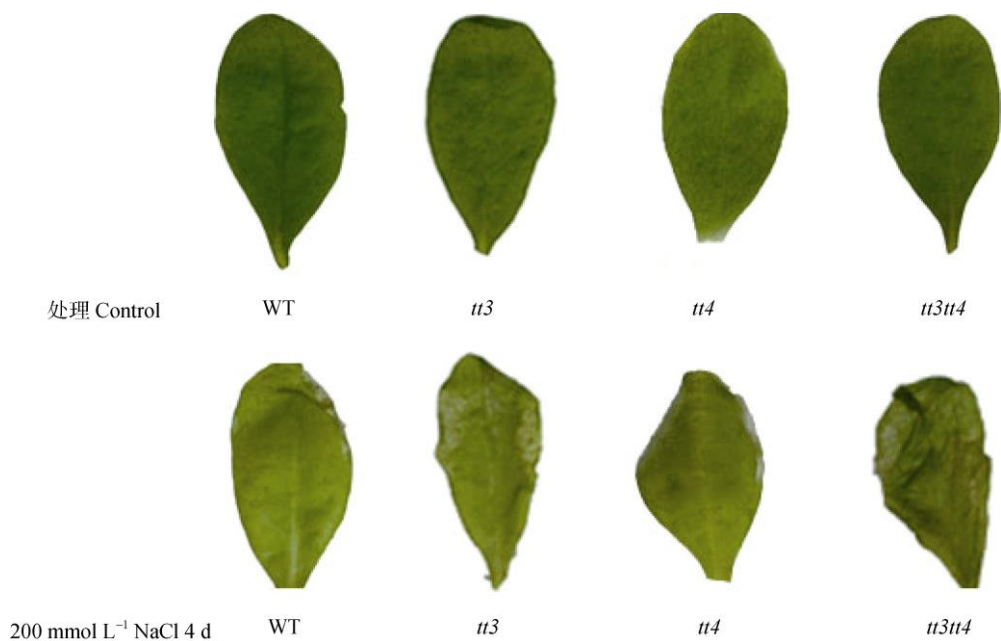


图 2 盐胁迫处理拟南芥突变体和野生型叶片的表型变化
Fig. 2 Phenotype changes in mutants and wild type leaves of *Arabidopsis thaliana* under salt stress

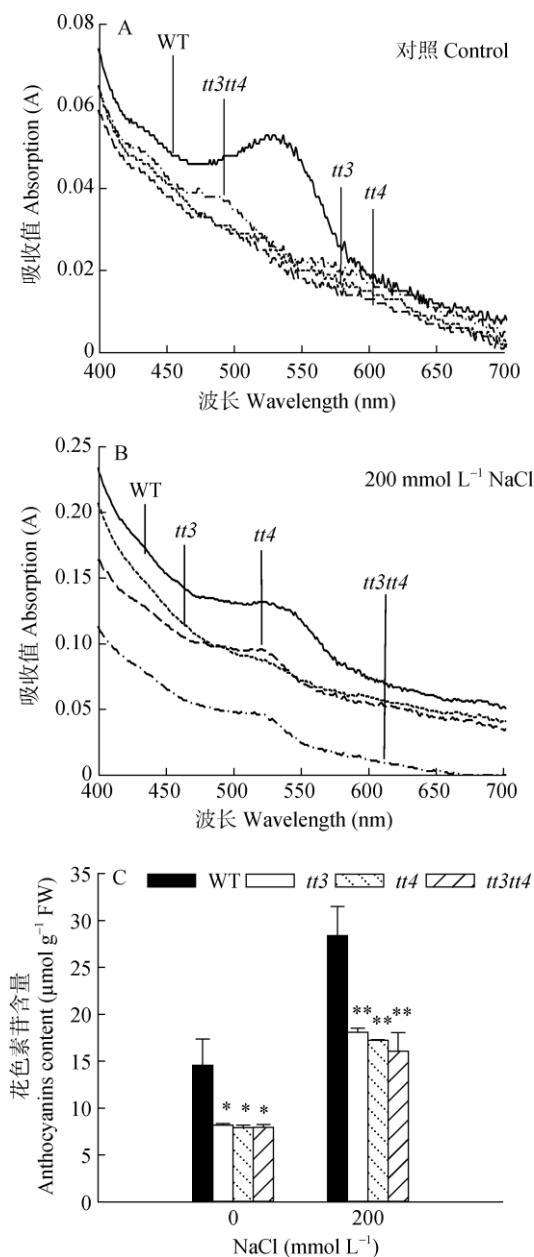


图 3 盐胁迫 6 d 后拟南芥突变体和野生型叶片盐酸-甲醇提取液的吸收光谱(A, B)及花色素苷含量(C)。

Fig. 3 Absorption spectra of methanol-HCl extracts (A, B) and anthocyanin contents (C) of mutants and wild type leaves of *Arabidopsis thaliana* after salt stress for 6 days.

胁迫过程中, NPQ 持续下降。盐胁迫 6 d 后, 野生型的 NPQ 下降为对照的 74%, 显著高于突变体 *tt3* (33%)、*tt4* (38%)和双突变体 *tt3tt4* (24%)。

2.5 盐胁迫对叶片细胞膜渗漏率的影响

盐胁迫处理 6 d 后, 拟南芥叶片细胞膜渗漏率

显著增加, 显示细胞膜受到破坏, 其中, 野生型与突变体均呈显著差异, *tt3* 和 *tt4* 间无显著差异, 单突变体 *tt3*, *tt4* 与双突变体 *tt3tt4* 差异显著, 表现为 WT 的膜渗漏率(75%)均小于突变体 *tt3* (84%)、*tt4* (86%)和双突变体 *tt3tt4* (96%) (图 5)。结果表明花色素苷的缺失显著降低了拟南芥叶片细胞的耐盐性, 使细胞膜更容易受到盐胁迫的伤害。

2.6 O₂⁻ 活体组织化学检测和定位

当植物遭受环境胁迫时, 体内会大量积累活性氧自由基。利用 NBT 染色可观察叶片 O₂⁻ 的积累情况(图 6)。靛蓝色是 NBT 与 O₂⁻ 反应产物的特征颜色, 对照的叶片没有明显的 O₂⁻ 积累, 且野生型与各突变体无差异。盐胁迫 6 d 后, 野生型与各突变体均出现 O₂⁻ 积累, 以野生型最少, 单突变体(*tt3* 和 *tt4*)较多, 双突变体(*tt3tt4*)最为明显。这表明盐处理导致了拟南芥叶片的 O₂⁻ 大量积累, 积累程度为 *tt3tt4* > *tt3* > *tt4* > WT。

2.7 盐胁迫下叶片类黄酮和总酚含量变化

植物细胞内的类黄酮与总酚是抗氧化剂, 能有效的清除氧自由基。对照的 WT 与各突变体叶片类黄酮及总酚含量均无显著差异, 盐胁迫 6 d 后, 双突变体 *tt3tt4* 叶片类黄酮及总酚含量高于 WT 与单突变体, 差异极显著, WT 的类黄酮含量无明显增加, 总酚含量显著升高; 双突变体 *tt3tt4* 类黄酮和总酚含量均显著增加(图 7)。

3 讨论

花色素苷主要分布于植物细胞的液泡中, 是由莽草酸途径合成的多酚类黄酮化合物^[14]。其中, CHS 和 DFR 是两个重要且研究较为深入的花色素苷合成关键酶, 两个酶基因都位于拟南芥第 5 号染色体上^[15]。两个单突变体 *tt3*、*tt4* 及双突变体 *tt3tt4* 的种皮都呈黄色; 叶片与茎都缺乏花色素苷, 通过实时荧光定量 qPCR 鉴定 3 种突变体, 花色素苷合成相关的基因表达有显著性下调, 这与花色素苷含量下降一致(图 1)。Włodzimierz 等证实天竺葵 (*Pelargonium hortorum*)花色素苷可以作为一种渗透调节剂抵抗高盐环境的离子毒害^[16]。本文选择 200 mmol L⁻¹ NaCl^[17]水溶液通过浇灌营养土处理 4 种拟南芥材料, 4 d 后, 双突变体 *tt3tt4* 幼叶叶片明

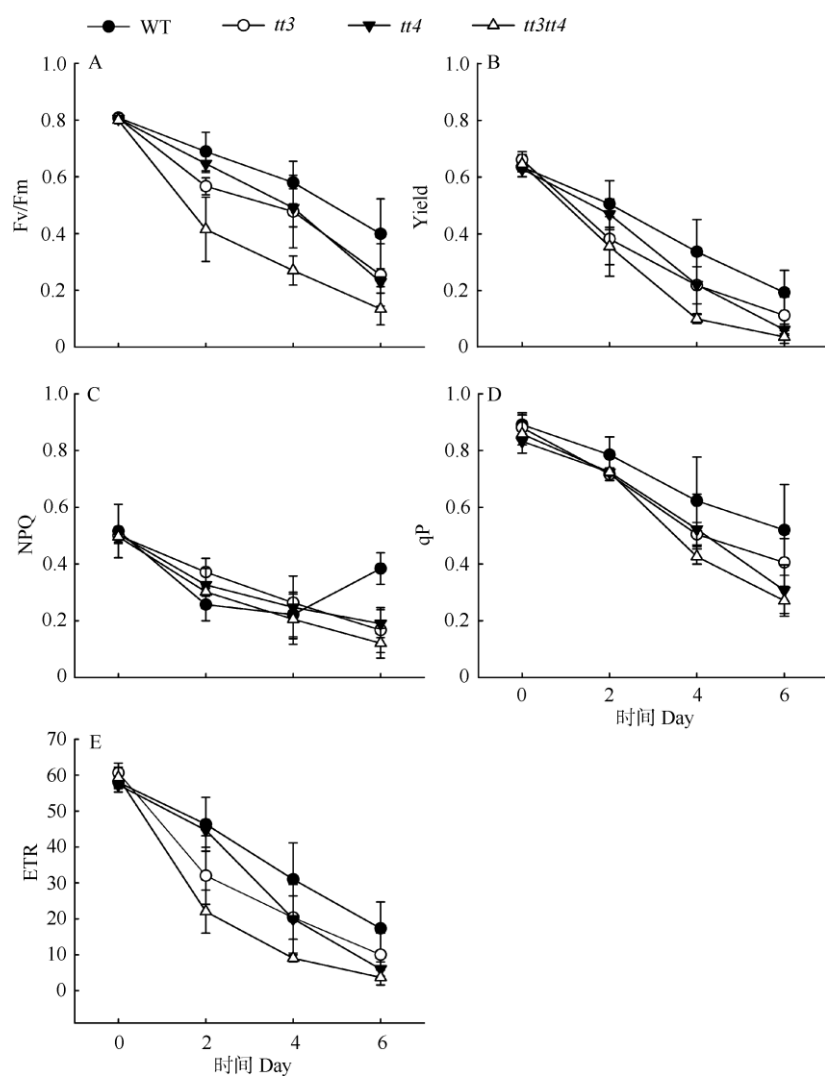


图 4 盐胁迫下拟南芥花色素苷突变体和野生型叶片叶绿素荧光参数的变化

Fig. 4 Changes in chlorophyll fluorescence parameters in mutants and wild type leaves of *Arabidopsis thaliana* under salt stress

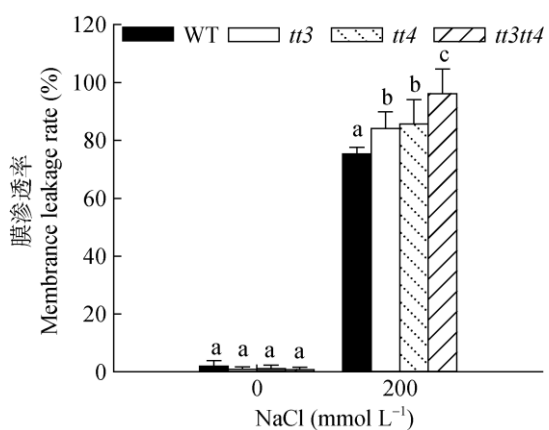


图 5 盐胁迫对拟南芥花色素苷突变体和野生型叶片膜渗透率的影响

Fig. 5 Effect of salt stress on membrane leakage rate in mutants and wild type leaves of *Arabidopsis thaliana*

显失水萎蔫且叶片边缘呈现氧化漂白症状,单突变体的叶片也有明显的氧化漂白及萎蔫现象(图 2)。从叶片表型来看,拟南芥花色素苷突变体对盐的耐受力明显弱于野生型。盐胁迫处理 6 d 后,突变体的花色素苷含量与野生型的差异达极显著水平(图 3),表明拟南芥叶片花色素苷的含量差异是其抗盐性不同的主要原因,花色素苷含量越高,失水萎蔫及氧化漂白的程度越低,抗盐胁迫能力越强。

叶绿素荧光分析技术被称为测定叶片光合功能快速、无损伤的探针^[18-19],目前已广泛应用于光合作用机理、植物抗逆生理和作物增产潜力预测等方面,是评价植物耐盐性的重要指标之一。Bongi 等^[20]报道盐胁迫使橄榄(*Olea europaea*)叶片的 Fm 大幅下降,且 Fv 下降与盐剂量呈正相关。但是,盐

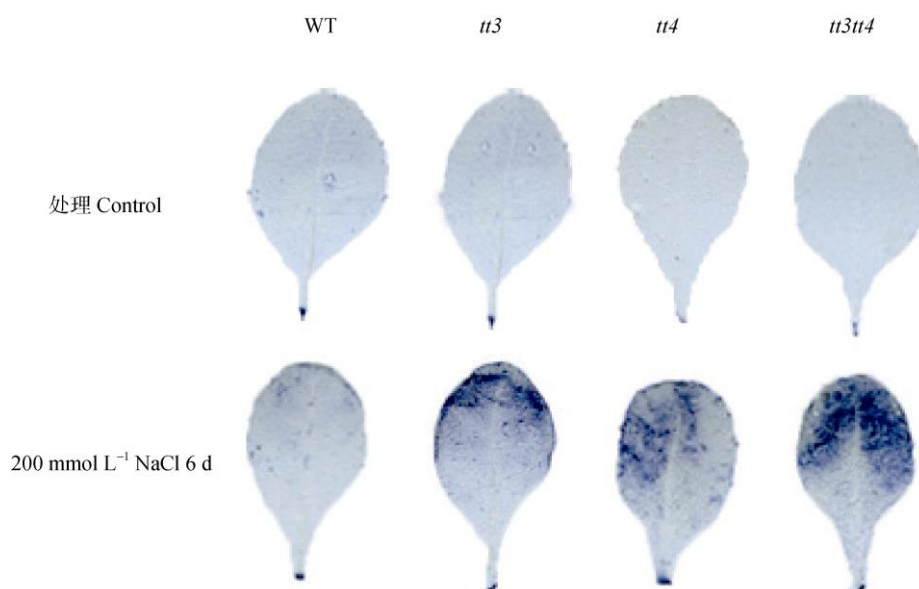


图 6 盐胁迫 6 d 后拟南芥花色素苷突变体和野生型叶片的 $O_2^{\cdot-}$ 组织定位

Fig. 6 $O_2^{\cdot-}$ localization in leaves of mutants and wild type of *Arabidopsis thaliana* after salt stress treatment for 6 days

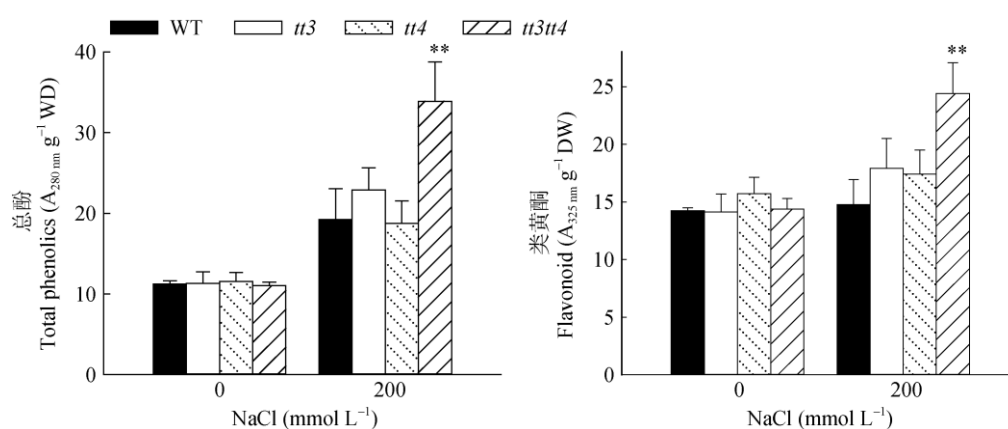


图 7 盐胁迫对拟南芥花色素苷突变体和野生型叶片总酚及类黄酮含量的影响

Fig. 7 Effect of salt stress on contents of flavonoid and total phenolics in leaves of mutants and wild type of *Arabidopsis thaliana*

处理的不同植物的荧光响应存在差异^[21]。盐胁迫 6 d 后, 拟南芥野生型及花色素苷各突变体的荧光参数 F_v/F_m 、Yield、ETR、 qP 均显著降低(图 4), 这与梁海永等^[22]观察到欧洲黑杨(*Populus nigra*)对盐胁迫的叶绿素荧光响应一致, 揭示拟南芥突变体及野生型的光合机构均受到了一定程度的损害, 其损害程度为 $tt3tt4 > tt3/tt4 > WT$, 表明随着盐胁迫的持续, 拟南芥花色素苷野生型保持较高的 PS II 反应中心开放比例和较大的 PS II 电子传递活性, 而突变体的 PS II 电子传递活性丧失较多, 光合活性下降, 其中双突变体表现更为明显。拟南芥野生型和突变体

的 NPQ 在盐胁迫 1~4 d 都呈相同的下降趋势, 而第 4 天后只有 WT 开始明显升高, 显示 WT 能通过热耗散的机制保护其光合机构免受进一步的盐害, 而缺少花色素苷的突变体的热耗散机制受到了不可逆转的破坏, 高盐逆境下花色素苷可以减轻叶片光合机构的破坏程度。

活性氧(Reactive oxygen species, ROS)是植物生长发育过程中不可避免的产物, 正常生长条件下 ROS 的产生与清除处于一种动态平衡的过程中, 不会导致 ROS 的积累, 但环境胁迫下植物细胞器(如叶绿体、线粒体、过氧化物酶体)中会产生大量的

ROS 而清除能力又不足, 导致 ROS 的大量积累, 造成叶绿素、膜质、蛋白质和核酸的氧化伤害从而破坏正常的生理代谢^[23]。在盐胁迫下, 拟南芥叶片内 Na^+ 大量积累, 光合电子传递发生紊乱, 超氧阴离子 O_2^- 产生速率显著提高, 膜脂过氧化严重, 引起膜损伤, 膜透性加大^[24]。盐胁迫 6 d 后, 拟南芥都呈现了 O_2^- 明显积累, 但野生型体内积累的 O_2^- 明显少于 3 个突变体(图 6), 花色素苷的积累可以及时清除活性氧自由基, 降低 O_2^- 的积累, 降低膜脂过氧化的危害, 维持细胞膜结构和功能的稳定性(图 5)。除花色素苷外, 植物体内还存在其他类似抗氧化类物质, 如类黄酮、总酚, 化学结构上富含双键和芳香环, 属于花色素苷合成的中间产物, 也是有效的自由基清除剂和抗氧化剂, 并可在防止脂质过氧化中起重要作用^[25]。盐胁迫后处理组的野生型的类黄酮含量与对照组相比并无显著差异, 总酚含量则有显著增加, 且双突变体 *tt3tt4* 与 WT 有极显著差异(图 7), 因为双突变体由于两个基因的缺失而造成花色素苷合成不足, 中间产物类黄酮及类酚物质能部分起到替补花色素苷的抗氧化功能。

总之, 盐胁迫下, 植物叶片可以通过大量积累花色素苷, 一方面其作为细胞内的渗透调节物质, 减少叶片水分丧失, 减轻叶片萎焉程度。另一方面, 因为其抗氧化功能, 可以及时清除因盐胁迫产生的 ROS, 减少 ROS 的积累, 保护细胞膜少受 ROS 的攻击, 维持光合机构功能的正常运转。因此花色素苷的渗透调节和清除 ROS 功能可能是花色素苷含量高的植物抗盐胁迫能力强的重要机理, 在生产及育种实践中, 建议利用花色素苷的这个功能, 有目的地筛选一些自然界花色素苷含量高的植物品种来提高其抗盐能力。

参考文献

- [1] FLOWERS T J, YEO A R. Breeding for salinity resistance in crop plants: Where next? [J]. *Funct Plant Biol*, 1995, 22(6): 875–884. doi: 10.1071/PP9950875.
- [2] WANG B S, ZHAO K F, ZOU Q. Advances in mechanism of crop salt tolerance and strategies for raising crop salt tolerance [J]. *Chin Bull Bot*, 1997, 14(S1): 26–31.
王宝山, 赵可夫, 邹琦. 作物耐盐机理研究进展及提高作物抗盐性的对策 [J]. *植物学报*, 1997, 14(S1): 26–31.
- [3] VILJOVIC-JOVANOVIC S D, PIGNOCCHI C, NOCTOR G, et al. Low ascorbic acid in the *vtc-1* mutant of *Arabidopsis* is associated with decreased growth and intracellular redistribution of the antioxidant system [J]. *Plant Physiol*, 2001, 127(2): 426–435. doi: 10.1104/pp.010141.
- [4] BECANA M, MORAN J F, ITURBE-ORMAETXE I. Iron dependent oxygen free radical generation in plants subjected to environmental stress: Toxicity and antioxidant protection [J]. *Plant Soil*, 1998, 201(1): 137–147. doi: 10.1023/A:1004375732137.
- [5] NOCTOR G, FOYER C H. Ascorbic and glutathione: Keeping active oxygen under control [J]. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 1998, 49(1): 249–279. doi: 10.1146/annurev.arplant.49.1.249.
- [6] ZENG X Q, CHOW W S, SU L J, et al. Protective effect of supplemental anthocyanins on *Arabidopsis* leaves under high light [J]. *Physiol Plant*, 2010, 138(2): 215–225. doi: 10.1111/j.1399-3054.2009.01316.x.
- [7] HATIER J H B, GOULD K S. Foliar anthocyanins as modulators of stress signals [J]. *J Theor Biol*, 2008, 253(3): 625–627. doi: 10.1016/j.jtbi.2008.04.018.
- [8] HAMILTON W D, BROWN S P. Autumn tree colours as a handicap signal [J]. *Proc Roy Soc B Biol Sci*, 2001, 268(1475): 1489–1493. doi: 10.1098/rspb.2001.1672.
- [9] OSWIN S D, KATHIERESAN K, DEIVA-OSWIN S. Pigments in mangrove species of *Pichavaram* [J]. *Ind J Mar Sci*, 1994, 23(1): 64–66.
- [10] SEARLE I, HE Y H, TURCK F, et al. The transcription factor FLC confers a flowering response to vernalization by repressing meristem competence and systemic signaling in *Arabidopsis* [J]. *Gene Dev*, 2006, 20(7): 898–912. doi: 10.1101/gad.373506.
- [11] REDDY V S, DASH S, REDDY A R. Anthocyanin pathway in rice (*Oryza sativa* L.): Identification of a mutant showing dominant inhibition of anthocyanins in leaf and accumulation of proanthocyanidins in pericarp [J]. *Theor Appl Genet*, 1995, 91(2): 301–312. doi: 10.1007/BF00220892.
- [12] ROMERO-PUERTAS M C, RODRÍGUEZ-SERRANO M, CORPAS F J, et al. Cadmium-induced subcellular accumulation of O_2^- and H_2O_2 in pea leaves [J]. *Plant Cell Environ*, 2004, 27(9): 1122–1134. doi: 10.1111/j.1365-3040.2004.01217.x.
- [13] TUKUMOTO L R, MAZZA G. Assessing antioxidant and prooxidant activities of phenolic compounds [J]. *J Agric Food Chem*, 2000, 48(8): 3597–3604. doi: 10.1021/jf000220w.
- [14] SHIRLEY B W. Flavonoid biosynthesis: “New” functions for an “old” pathway [J]. *Trends Plant Sci*, 1996, 1(11): 377–382. doi: 10.1016/S1360-1385(96)80312-8.
- [15] SHIRLEY B W, KUBASEK W L, STORZ G, et al. Analysis of

- Arabidopsis* mutants deficient in flavonoid biosynthesis [J]. Plant J, 1995, 8(5): 659–671. doi: 10.1046/j.1365-3113X.1995.08050659.x.
- [16] BREŠ W, BANDURSKA H, KUPSKA A, et al. Responses of pelargonium (*Pelargonium × hortorum* L. H. Bailey) to long-term salinity stress induced by treatment with different NaCl doses [J]. Acta Physiol Plant, 2016, 38: 26. doi: 10.1007/s11738-015-2048-8.
- [17] YANG L, ZHAO H T, WANG Z J, et al. Functional analysis of *DAI-related Protein 2* in *Arabidopsis* under salt stress [J]. Chin J Eco-Agri, 2014, 22(1): 63–71. doi: 10.3724/SP.J.1011.2014.30396.
- 杨磊, 赵红桃, 王志娟, 等. 拟南芥 *DAI-related Protein 2* 基因参与调控植物对盐胁迫的响应 [J]. 中国生态农业学报, 2014, 22(1): 63–71. doi: 10.3724/SP.J.1011.2014.30396.
- [18] GENTY B, BRIANTAIS J M, BAKER N R. The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence [J]. Biochim Biophys Acta Gen Subj, 1989, 990(1): 87–92. doi: 10.1016/S0304-4165(89)80016-9.
- [19] SCHREIBER U, BILGER W, NEUBAUER C. Chlorophyll fluorescence as a noninvasive indicator for rapid assessment of *in vivo* photosynthesis [J]. Ecol Studies Anal Synth, 1995, 100: 49–70. doi: 10.1007/978-3-642-79354-7_3.
- [20] BONGI G, LORETO F. Gas exchange properties of salt-stressed olive (*Olea europea* L.) leaves [J]. Plant Physiol, 1989, 90(4): 1408–1416. doi: 10.1104/pp.90.4.1408.
- [21] SIMILLIE R M, NOTT R. Salt tolerance in crop plants monitored by chlorophyll fluorescence *in vivo* [J]. Plant Physiol, 1982, 70(4): 1049–1054. doi: 10.1104/pp.70.4.1049.
- [22] LIANG H Y, LI H P, ZHENG J B, et al. Effect of NaCl stress on photosystem II functions in *Populus nigra* leaves [J]. Hebei J For Orch Res, 2000, 15(2): 101–104. doi: 10.3969/j.issn.1007-4961.2000.02.001.
- 梁海永, 李会平, 郑均宝, 等. NaCl 胁迫对欧洲黑杨组植株叶片光系统 II 功能的影响 [J]. 河北林果研究, 2000, 15(2): 101–104. doi: 10.3969/j.issn.1007-4961.2000.02.001.
- [23] MITTOVA V, TAL M, VOLOKITA M, et al. Salt stress induces up-regulation of an efficient chloroplast antioxidant system in the salt-tolerant wild tomato species *Lycopersicon pennellii* but not in the cultivated species [J]. Physiol Plant, 2002, 115(3): 393–400. doi: 10.1034/j.1399-3054.2002.1150309.x.
- [24] YAN F. Studies on physiological regulation mechanism of exogenous ALA to cucumber seedlings under salt stress [D]. Yangling: Northwest Agricultural and Forestry University, 2014: 29–36.
- 燕飞. 外源 5-氨基乙酰丙酸(ALA)对盐胁迫下黄瓜幼苗生理调控效应研究 [D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2014: 29–36.
- [25] CHALKER-SCOTT L. Environmental significance of anthocyanin in plant stress responses [J]. Photochem Photobiol, 1999, 70(1): 1–9. doi: 10.1111/j.1751-1097.1999.tb01944.x.