

24-表油菜素内酯对干旱胁迫下辣椒幼苗叶片抗氧化酶系统及耐旱相关基因表达的影响

胡文海^{1*} 詹秀花² 闫小红¹ 王旭明¹ 黄黎锋³

(1. 井冈山大学生命科学学院 江西省生物多样性与生态工程重点实验室 吉安 343009 ;2. 江西省茶叶学校 婺源 333200 ;3. 杭州师范大学衰老研究所 杭州 310036)

摘 要 报道了干旱胁迫下外源 24-表油菜素内酯(EBR)对辣椒幼苗叶片 H₂O₂ 和 MDA 含量 抗氧化酶活性 以及耐旱相关基因表达的影响。结果表明 0.1 μmol · L⁻¹ EBR 处理诱导了辣椒幼苗叶片 H₂O₂ 含量的增加 并提高了 SOD、APX、CAT、DHAR、MDAR 和 GR 活性 ;干旱胁迫下 EBR 处理显著诱导了辣椒叶片抗氧化酶活性的增加 , 并抑制了 H₂O₂ 和 MDA 含量的上升 ;EBR 处理也促进了 *cAPX* 和 *MDAR* 等抗氧化酶基因的表达 以及 *WRKY3*、*WRKY6* 和 *MYB* 等转录因子的表达。由此认为 适宜浓度的外源 EBR 可能是通过信号分子 H₂O₂ 调控辣椒叶片中 *WRKY* 和 *MYB* 等转录因子的表达以调控相关耐旱基因表达 增强细胞的抗氧化酶活性 减轻干旱造成的膜质过氧化伤害 从而增强了辣椒幼苗的耐旱性。

关键词 辣椒 ;干旱 24-表油菜素内酯 抗氧化酶系统 转录因子

中图分类号 S641.3 文献标志码 A doi :10.7525/j.issn.1673-5102.2015.06.019

Effects of 24-Epibrassinolide on Antioxidant System and Expression of Drought-tolerance Relative Genes in Pepper Seedlings under Drought Stress

HU Wen-Hai^{1*} ZAN Xiu-Hua² YAN Xiao-Hong¹ WAN Xu-Ming¹ HUANG Li-Feng³

(1. School of Life Sciences ,Key Laboratory for Biodiversity Science and Ecological Engineering ,Jinggangshan University ,Ji 'an 343009 ;2. Jiangxi Tea School ,Wuyuan 333200 ;3. Institute of Ageing Research Hangzhou Normal University ,Hangzhou 310036)

Abstract We studied the effects of exogenous 24-epibrassinolide(EBR) on H₂O₂ and MDA content , antioxidant enzymes activities , and the expression of drought-tolerance relative genes in pepper(*Capsicum annuum* L.) under drought stress. The results showed that 0.1 μmol · L⁻¹ EBR induced H₂O₂ producing slightly , and significantly promoted the activities of SOD , APX , CAT , DHAR , MDAR and GR in leaves of pepper. While EBR significantly increased antioxidant enzymes activities , and alleviated H₂O₂ and MDA content in leaves of pepper under drought stress. EBR also induced the expression of antioxidant enzymes(*cAPX* and *MDAR*) and transcription factors(*WRKY3* , *WRKY6* and *MYB*) genes. It was considered that the suitable exogenous EBR(0.1 μmol · L⁻¹) enhanced drought tolerance in pepper seedling maybe through induction of drought-tolerance relative genes expression and activations of antioxidative enzymes , and H₂O₂ signal was involved in EBR-induced drought-tolerance relative genes expression.

Key words pepper(*Capsicum annuum* L.) ;drought stress 24-epibrassinolide ;antioxidant system ;transcription factors

我国南方地区属于亚热带季风气候区 ,虽然水资源丰富 但降水季节性分布不均 季节性干旱严重影响到当地农业生产^[1]。辣椒(*Capsicum annuum* L.)是我国南方重要夏季蔬菜作物 ,在栽培过程中常遭遇季节性干旱 ,严重影响到辣椒的生产与品质 因此 提高辣椒耐旱性对于夏季辣椒生

基金项目 :国家自然科学基金项目(31460513 ,30860175)
第一作者简介 :胡文海(1973—) 男 教授 ,博士 主要从事园艺植物生理生态方面的研究。
* 通信作者 E-mail :huwenhai@jgsu.edu.cn
收稿日期 2015 - 01 - 13

产至关重要。

油菜素内酯(brassinolide ,BR)作为一种新型的植物激素,其增强作物抗性的研究已受到广泛关注。研究表明 BR 可通过诱导细胞抗氧化能力提高作物对干旱、低温、高温、盐害等环境逆境的广谱抗性^[2-6]。干旱胁迫下, BR 处理诱导了文冠果(*Xanthoceras sorbifolia* Bunde)、番茄(*Lycopersicon esculentum* Mill.)等植物 SOD、APX、CAT 等抗氧化酶活性,增强了作物的耐旱性^[7-8],我们的前期研究也表明 BR 处理能诱导辣椒抗氧化酶活性的增加以增强其耐旱性^[9],但是 BR 调控植物耐旱性的信号转导机理研究还不够系统。有研究表明 BR 可通过细胞膜上 NADPH 氧化酶介导的 H_2O_2 途径诱导黄瓜(*Cucumis sativus* L.)叶片 MAPK 级联反应,进而调控抗氧化酶相关基因的表达^[10-11]。*WRKY* 和 *MYB* 等转录因子也可调控植物对干旱胁迫的反应及其信号转导途径的建立,诱导相关抗性基因的表达,从而对作物耐旱性起到关键作用^[12]。虽然 BR 诱导作物抗氧化酶活性以促进抗旱性增强已有较多报道,但 BR 对干旱胁迫下辣椒叶片抗氧化酶相关基因及转录因子表达的影响鲜见报道。为此,本试验以辣椒为材料,采用 24-表油菜素内酯(EBR)处理,研究干旱胁迫下 BR 对辣椒幼苗叶片氧化胁迫及相关抗性基因表达的影响,探讨 BR 增强辣椒幼苗耐旱性的调节作用,为采用 EBR 缓解干旱胁迫对辣椒幼苗产生的危害提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料和处理

供试辣椒材料为弄口早椒(*Capsicum annuum* L. cv Longkouzaojiao)。24-表油菜素内酯(EBR)购自 Sigma 公司,用少量酒精溶解,然后用蒸馏水配成 $0.1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 浓度进行试验。

将辣椒种子播种于蛭石中,置于连栋大棚中培养,平均昼夜温度为 $25/17^\circ\text{C}$,自然光照和光周期。待植株长到 2 叶时,每 6 株移栽到 10 L 的塑料盆中,日本园试营养液^[13]培养,植株长至 5 叶时开始处理。试验分为两部分进行:

试验 1(EBR 预处理对干旱胁迫下辣椒活性氧代谢的影响)将辣椒幼苗分成两部分,一部分植株叶片上下均匀地喷施 $0.1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 EBR 处理(EBR),另一部分植株叶片上下均匀喷施清水处理(Water);处理 1 d 后,在营养液中加入

PEG6000 至 20% 浓度模拟干旱处理 3 d。分别于处理前、处理 1 d、干旱胁迫 1~3 d 时,选择自下向上数的第 3、4 叶测定叶片的含水量、 H_2O_2 含量、MDA 含量和抗氧化酶活性。实验共 5 次重复,每次重复分别在不同植株上单独取样。

试验 2(EBR 和干旱处理对辣椒叶片相关耐旱基因表达的影响)将辣椒幼苗分成四部分,分别进行(1)对照处理(Water)辣椒叶片喷施清水,并培养在园试营养液中,不添加 PEG6000 (2) EBR 处理(EBR)辣椒叶片喷施 $0.1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 EBR (3) EBR 和干旱协同处理(EBR + Drought):辣椒叶片喷施 $0.1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 EBR,并培养在 PEG6000 浓度为 20% 的园试营养液中 (4)模拟干旱处理(Drought)辣椒叶片喷施清水,并培养在 PEG6000 浓度为 20% 的园试营养液中。处理 1 d 后取各处理植株自下向上数的第 3、4 叶片进行相关抗性基因表达分析。实验共 3 次重复,每次重复分别在不同植株上单独取样。

1.2 测定项目和方法

1.2.1 叶片含水量测定

植株叶片含水量(LWC)的测定:先将叶片称取其鲜重(W_1),然后将叶片置于烘箱中于 110°C 杀青 1 h 后再于 80°C 下 24 h 烘干至恒重后称取其干重(W_2),并计算叶片含水量:

$$LWC(\%) = (W_1 - W_2) / W_1 \times 100 \quad (1)$$

1.2.2 H_2O_2 和 MDA 含量测定

H_2O_2 含量的测定参照 Brennan 和 Frenkel 的方法^[14];MDA 含量的测定参照 Hodges 等的方法^[15]。

1.2.3 抗氧化酶活性测定

超氧化物歧化酶(SOD)活性的测定参照 Stewart 和 Bewley 的方法^[16];抗坏血酸过氧化物酶(APX)和脱氢抗坏血酸还原酶(DHAR)活性参照 Nakano 和 Asada 的方法^[17];过氧化氢酶(CAT)活性参照 Cakmak 和 Marschner 的方法^[18];单脱氢抗坏血酸还原酶(MDAR)活性的测定参照 Hossain 等的方法^[19];谷胱甘肽还原酶(GR)活性的测定参照 Foyer 和 Halliwell 的方法^[20]。

1.2.4 相关耐旱基因表达的实时荧光定量 PCR

采用 Trizol 试剂盒提取辣椒叶片总 RNA,并对总 RNA 进行电泳检测其完整性,采用 RNA 纯化试剂盒(Qiagen 公司)进行纯化,取 $2 \mu\text{g}$ 总 RNA 用于 cDNA 第一链的合成(RevertAid™ first Strand cDNA Synthesis kit, Fermentas)。

通过 NCBI 搜索拟南芥 *cAPX*、*MDAR*、*MRKY3*、*WRKY6* 和 *MYB* 等耐旱相关基因 ;利用 NCBI-BLAST 对相关基因进行比对 ,根据比对结果下载若干不同物种该基因的同源序列 ,并用 MEGA 软件进行同源性比对 ,确定合适的保守区域 ;根据保守区域扩增用的简并引物 ,扩增片段控制在 800 bp 以内 ,将扩增片段进行测序 ,将测序结果在 NCBI 数据库中进行同源性比对 ,分析是否为上述相关基因 ,确定序列正确无误后 ,利用 DNAMAN 软件设计 qRT-PCR 引物(表 1)。

表 1 耐旱相关基因的 qRT-PCR 引物序列
Table 1 Drought-tolerance relative genes and primers used in real-time qPCR analysis

基因 Gene	正向引物 Forward primer	反向引物 Reverse primer
<i>cAPX</i>	TTGCTGACTATGCTGAGGCT	TCCAACAACCTCCAGTGAGGTT
<i>MDAR</i>	GTTGACCGATGCTAACCGT	CTTCCGAACCTGAACCTGGATT
<i>WRKY3</i>	GAAAGGTCTGTTCACAAGAAA	AACTGTCCTACTCCCAAGTGC
<i>WRKY6</i>	GGACACACAACCATCCGTT	GAAGAGCAAGGGAGGAGAGTT
<i>MYB</i>	TTATCGCCATCATCAACCA	ACTTGTTTGGAACCTGAGGCA

实时荧光定量 PCR(qRT-PCR)采用安捷伦 MX400 荧光定量 PCR 仪 ,并使用 SYBR Green RT-PCR Kit 荧光染料试剂盒(Takara)。在 20 μ L 反应体系中包含 10 μ L iQTM SYBR Green Supermix , 0.1 μ L 正义及反义端的引物(10 μ mol $\cdot$ L⁻¹) ,1 μ L cDNA 模板(大约为 5 ~ 15 ng)以及 ddH₂O。PCR 反应条件为 95 $^{\circ}$ C 3 min ,95 $^{\circ}$ C 变性 10 s ,58 $^{\circ}$ C 退火 45 s ,40 个循环。荧光数据在每个循环的退火末期采集。在 PCR 循环反应完成之后 ,溶解曲线表明生成的 PCR 产物均为单一物质。基因相对表达量采用 Livak 和 Schmittgen 的方法^[21]计算。试验均为 3 次重复的结果。

2 实验与分析

2.1 EBR 与干旱胁迫对辣椒幼苗叶片含水量、H₂O₂ 和 MDA 含量的影响

由图 1 可知 ,在未受干旱胁迫的情况下 EBR 处理 1 d 未引起辣椒叶片含水量和 MDA 含量的变化 ,但诱导了 H₂O₂ 含量的轻微上升。随着 PEG6000 模拟干旱处理 ,辣椒叶片含水量持续下降 ,H₂O₂ 和 MDA 含量持续增加 ,EBR 处理未能减轻干旱胁迫下辣椒叶片含水量的下降 ,但减缓了干旱胁迫所诱导的 H₂O₂ 和 MDA 含量的增加。

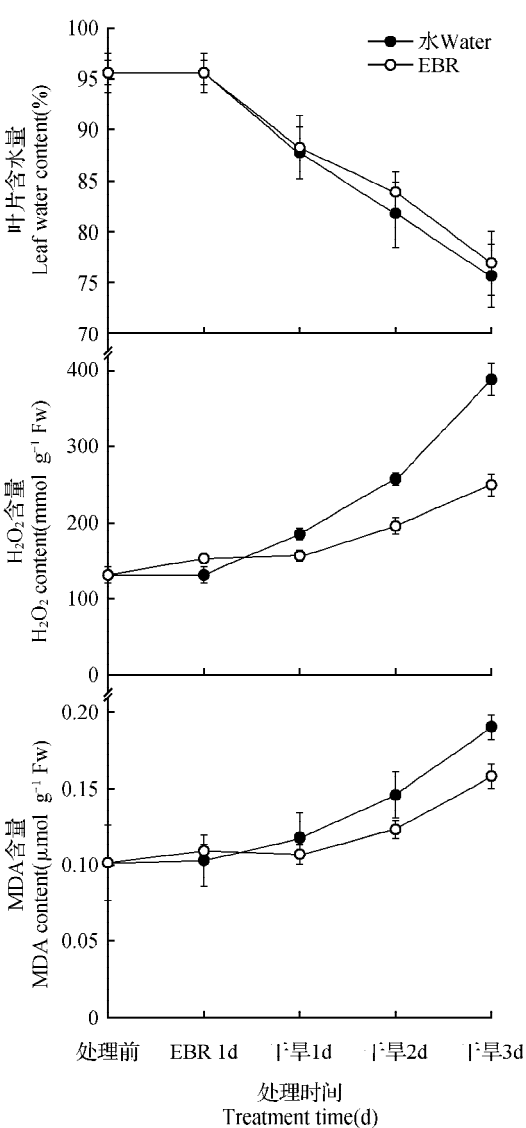


图 1 EBR 对干旱胁迫下辣椒幼苗叶片含水量、H₂O₂ 和 MDA 含量的影响
Fig.1 Effects of EBR on water content H₂O₂ and MDA content in pepper seedling leaves under drought tress

2.2 EBR 与干旱胁迫对辣椒幼苗叶片抗氧化酶活性的影响

由图 2 可知 ,在未受干旱胁迫处理时 ,EBR 处理 1 d 诱导了辣椒叶片 SOD、APX、CAT、DHAR、MDAR 和 GR 活性的增强。干旱胁迫也诱导了除 GR 外其他抗氧化酶活性的增强 ,其中 SOD、APX、CAT 和 DHAR 酶活性的增加幅度相对较大 ;另外 ,干旱胁迫诱导抗氧化酶活性增加的时间效应也各不相同 ,表现为 APX、DHAR 和 MDAR 酶活性在干旱胁迫的第 2 d 开始下降 ,SOD 和 CAT 则从干旱胁迫第 3 d 开始下降。EBR 处理则显著地促进了干旱胁迫下辣椒叶片各抗氧化酶活性的增强。

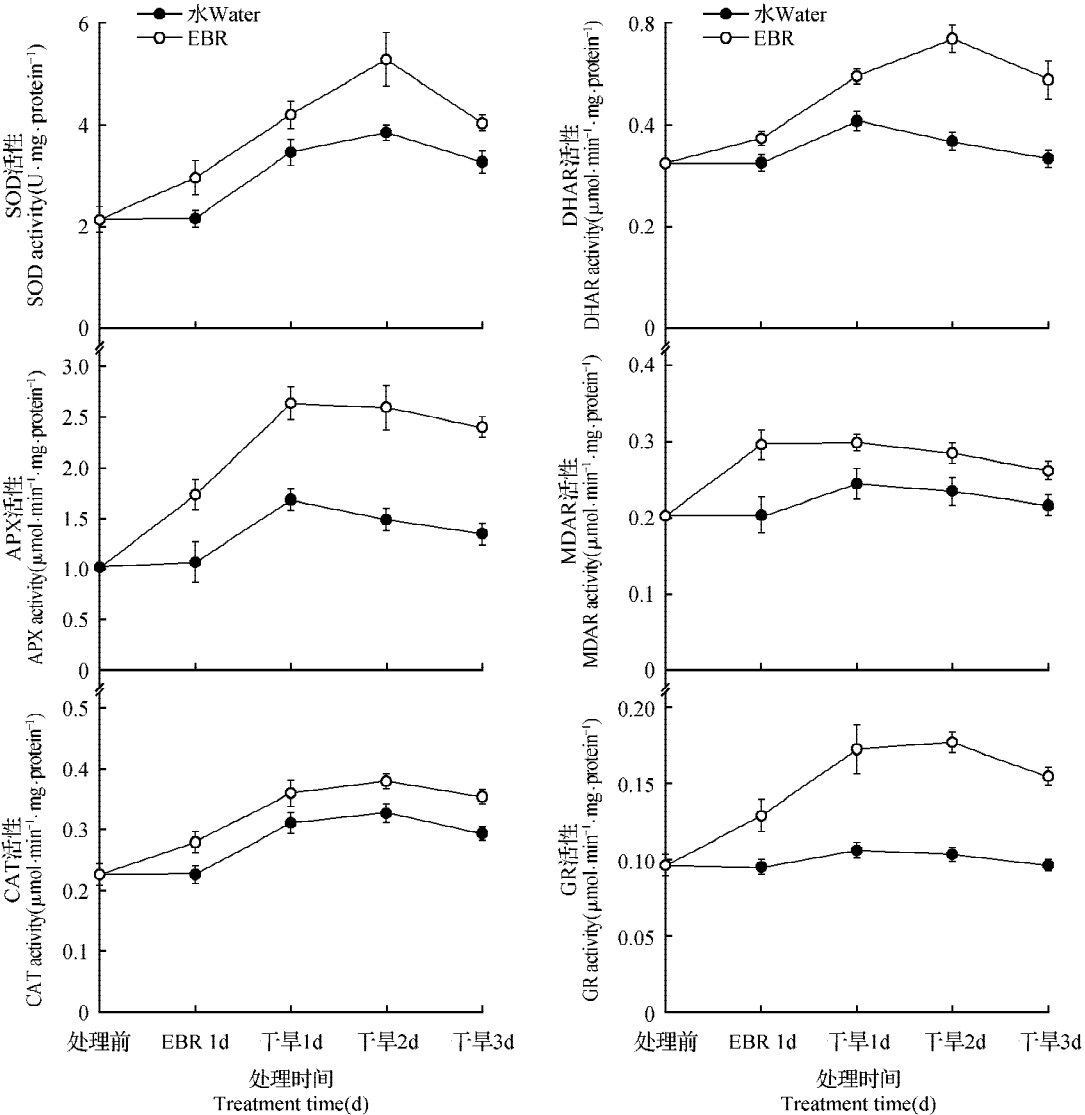


图2 EBR对干旱胁迫下辣椒叶片抗氧化酶活性的影响

Fig.2 Effects of EBR on the activities of antioxidant enzymes system in pepper seedling leaves under drought stress

2.3 EBR与干旱胁迫对辣椒幼苗叶片抗性基因表达的影响

由图3可知,EBR处理1 d诱导了*cAPX*和*MDAR*两个抗氧化酶的表达,其表达量分别为对照的2.3和2.5倍,也显著地诱导了转录因子*WRKY3*、*WRKY6*和*MYB*的表达,其表达量分别为对照的6.8、16.9和10.5倍。干旱胁迫1 d并未引起*MDAR*基因表达的明显变化,并使*cAPX*基因表达降低为对照的0.3倍,但诱导了*WRKY3*、*WRKY6*和*MYB*等转录因子的表达,表达量分别为对照的2.3、2.3和3.7倍。与对照相比,EBR和干旱协同处理1 d时*cAPX*基因表达未有明显变化,*WRKY3*和*WRKY6*表达略有增加,分别为对照的1.6倍;*MDAR*和*MYB*基因表达则显著增强,分别为对照的3.4和7.8倍。

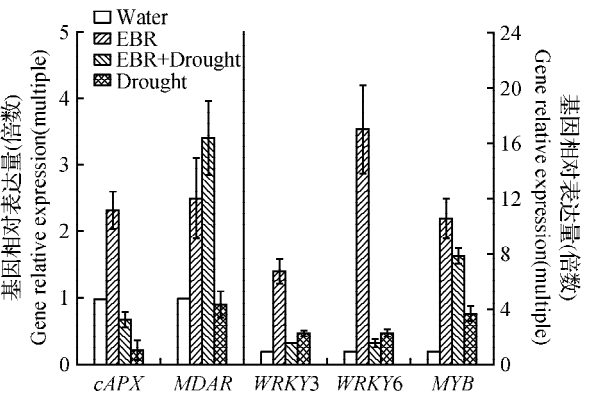


图3 BR和干旱胁迫对辣椒叶片耐旱相关基因表达的影响

Fig.3 Effects of EBR and drought on the expression of drought-tolerance relative genes in pepper seedling leaves

3 讨论

作物在遭受干旱胁迫时,细胞内活性氧的产生与清除失去平衡,导致了活性氧的大量产生,对作物造成氧化伤害^[22~23],BRs 可通过诱导抗氧化酶活性提高以增强作物的耐旱性^[24]。研究表明,BRs 诱导了文冠果^[7]、番茄^[8]、大豆(*Glycine max* (L.) Merr.)^[25]中 SOD、APX 和 CAT 等抗氧化酶活性的增加;而在花椰菜(*Brassica oleracea* L.)中的研究结果表明 BRs 处理促进了 SOD 活性,但降低了 POD 活性^[26]。由此可见,BRs 虽然可在整体上诱导作物抗氧化酶系统活性的增强,但对于不同的作物和不同抗氧化酶的作用并不一致。本试验结果表明,正常条件下 EBR 处理 1d 即可诱导辣椒叶片 SOD、APX、CAT、DHAR、MDAR 和 GR 等抗氧化酶活性的增强;在随后模拟干旱胁迫下,EBR 仍可继续诱导辣椒叶片中这些抗氧化酶活性的增加,并显著高于未经 EBR 处理的植株;而模拟干旱 1d 虽然诱导了未经 EBR 处理的辣椒植株叶片 SOD、APX、CAT、DHAR 和 MDAR 等抗氧化酶活性的增强,但随着干旱处理时间的延长这些抗氧化酶的活性却开始下降(图 2)。同时,本试验还表明模拟干旱处理促进了辣椒叶片 H_2O_2 和 MDA 含量的明显增加,而 EBR 处理降低了叶片 H_2O_2 和 MDA 的含量,但 EBR 处理并未减轻干旱胁迫下叶片含水量的下降(图 1)。由此可见,EBR 并非通过维持叶片含水量来增强辣椒耐旱能力,而是通过诱导辣椒叶片抗氧化酶活性的增强以清除过量的活性氧,防御氧化胁迫的伤害。

H_2O_2 作为细胞有氧代谢产物,在逆境胁迫下其产率增加会对细胞产生伤害,然而, H_2O_2 也是植物体内重要的信号分子,广泛参与了植物的生理过程,并在植物对逆境的响应中起着重要作用^[27]。Xia 等研究表明,细胞膜上 NADPH 氧化酶介导的 H_2O_2 途径在 BR 诱导黄瓜抗逆性中起着关键作用,BRs 可能是通过 H_2O_2 途径诱导了 MAPK 级联反应,进而调控 SOD 等抗氧化酶基因的表达,并促进了相关抗氧化酶活性的增强^[11]。丁海东等的研究也表明 BRs 通过 NADPH 氧化酶调控质外体 H_2O_2 的产生,进而调控抗氧化酶 SOD 和 CAT^[10]。在我们的研究结果中,EBR 处理 1d 即可诱导辣椒叶片中 H_2O_2 含量的轻微上升(图 1)并伴随着抗氧化酶活性的增强(图 2),以及 *cAPX* 和 *MDAR* 基因表达的上调(图 3),由此可见

EBR 可通过诱导辣椒叶片细胞内 H_2O_2 的产生并作为信号分子诱导了相关抗氧化酶基因的表达。同时,我们还发现模拟干旱胁迫降低了 *cAPX* 的表达但对 *MDAR* 没有影响,而 EBR 处理则有利于维持干旱胁迫下 *cAPX* 和 *MDAR* 的表达(图 3)。这可能是由于干旱胁迫下叶片内 H_2O_2 积累含量过高而抑制了 *cAPX* 和 *MDAR* 的表达,而 EBR 处理减轻了干旱胁迫下辣椒叶片内 H_2O_2 含量的上升所致。这进一步证实了 H_2O_2 作为信号分子在一定的含量范围内可诱导了相关抗氧化酶基因的表达,从而增强作物抗逆性。

转录调控是真核生物基因表达调控的重要机制,当植物受到干旱、高温等逆境胁迫时会激发转录因子以调控下游抗性基因的表达,增强植物的抗逆能力^[28]。*WRKY* 和 *MYB* 是与植物逆境反应密切相关的转录因子家族,对植物抗逆性具有一定的调控作用,并参与了激素信号转导途径^[29~31]。灌丛植物 *Larrea tridentata* 的 *LtWRKY21* 蛋白质作为植物激素 ABA 信号转导途径的激活因子参与 ABA 介导的灌丛抗旱性建立^[32],*OsWRKY45*^[33]和 *WRKY57*^[34]的超表达均可上调体内 ABA 水平以增强拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)的耐旱性,并有研究表明 *WRKY* 基因家族中的一些成员受到活性氧的诱导表达^[35,36]。*TaMYB33* 的超表达提高了拟南芥的耐旱能力^[37],拟南芥的 *AtMYB2* 被证实参与了植物的耐旱胁迫过程,水稻(*Oryza sativa* L.)超表达 *OsMYB2* 也可促进抗氧化酶活性的增强以提高耐盐性^[38]。并且 *MYB* 转录因子是干旱胁迫下调控 ABA 响应基因的关键因子^[39]。Xia 等研究表明,EBR 处理诱导黄瓜叶片 *WRKY30*、*WRKY6* 和 *MYB* 基因的表达^[11]。我们的研究结果也表明,在正常生长条件下 EBR 处理 1d 显著地诱导了辣椒叶片中 *WRKY3*、*WRKY6* 和 *MYB* 等转录因子的表达,并且这些转录因子表达也受到干旱胁迫的诱导(图 3);与此相对应的是,EBR 预处理和干旱胁迫单独处理均促进了细胞内 H_2O_2 含量的增加(图 1)。研究表明 H_2O_2 作为植物响应逆境的重要信号分子,参与了交叉抗性过程,在 BR 和 ABA 诱导植物抗性的信号转导中起着第二信使作用^[11,40~41]。

综上所述,我们推测 EBR 预处理提高辣椒耐旱性的可能作用机制为:EBR 首先是促进细胞内 H_2O_2 的产生与积累, H_2O_2 作为信号分子诱导辣椒叶片 *WRKY* 和 *MYB* 等转录因子表达以调控下游

其他抗性基因表达,从而增强辣椒的耐旱性,并且 BR 诱导辣椒耐旱性的作用机制可能还涉及到 ABA 信号途径。同时我们也注意到,在 EBR 和干旱共同作用下,除了 *MYB* 表达显著增强外,*WRKY3* 和 *WRKY6* 的表达虽有上调,但低于 EBR 或干旱单独处理(图 3)。由此可见,辣椒叶片对 EBR 与干旱协同作用的响应机制及其信号途径还较为复杂,有待于进一步深入研究。

参 考 文 献

1. 黄晚华,隋月,杨晓光等.气候变化背景下中国南方地区季节性干旱特征与适应.Ⅲ基于降水量距平百分率的南方地区季节性干旱时空特征[J].应用生态学报,2013,24(2):397-406.
2. Hu W H, Yan X H, Xiao Y A, et al. 24-epibrassinosteroid alleviate drought-induced inhibition of photosynthesis in *Capsicum annuum*[J]. Sci Hortic, 2013, 150: 232-237.
3. Karlidag H, Yildirim E, Turan M. Role of 24-epibrassinolide in mitigating the adverse effects of salt stress on stomatal conductance, membrane permeability, and leaf water content, ionic composition in salt stressed strawberry (*Fragaria × ananassa*) [J]. Sci Hortic, 2011, 130: 133-140.
4. Ogwenio J O, Song X S, Shi K, et al. Brassinosteroids alleviate heat-induced inhibition of photosynthesis by increasing carboxylation efficiency and enhancing antioxidant systems in *Lycopersicon esculentum* [J]. J Plant Growth Regul, 2008, 27(1): 49-57.
5. Xia X J, Zhou Y H, Ding J, et al. Induction of systemic stress tolerance by brassinosteroid in *Cucumis sativus* [J]. New Phytol, 2011, 191(3): 706-720.
6. 刘德兵,魏军亚,李绍鹏等.油菜素内酯提高香蕉幼苗抗冷性的效应[J].植物研究,2008,28(2):195-198.
7. 冯朝红,李凯荣,张鹏文等.干旱胁迫下油菜素内酯对文冠果苗木抗氧化酶活性和抗氧化剂含量的影响[J].干旱地区农业研究,2008,26(4):152-155.
8. Yuan G F, Jia C G, Li Z, et al. Effect of brassinosteroids on drought resistance and abscisic acid concentration in tomato under water stress [J]. Sci Hortic, 2010, 126: 103-108.
9. 胡文海,闫小红,詹秀花等.油菜素内酯对干旱胁迫下辣椒叶片活性氧代谢的影响[J].井冈山大学学报:自然科学版,2012,33(6):36-39.
10. 丁海东,刘慧,陈一,等. H_2O_2 和 MAPK 介导油菜素内酯诱导番茄抗氧化防护酶 SOD 和 CAT 的信号途径[J].植物生理学报,2011,47(10):1010-1016.
11. Xia X J, Wang Y J, Zhou Y H, et al. Reactive oxygen species are involved in brassinosteroids-induced stress tolerance in cucumber [J]. Plant Physiol, 2009, 150(2): 801-814.
12. Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K. Gene networks involved in drought stress response and tolerance [J]. J Exp Bot, 2007, 58(2): 221-227.
13. Yu J Q, Matsui Y. Phytotoxic substances in root exudates of *Cucumis sativus* [J]. J Chem Ecol, 1994, 20(1): 21-31.
14. Brennan T, Frenkel C. Involvement of hydrogen peroxide in the regulation of senescence in pear [J]. Plant Physiol, 1977, 59(3): 411-416.
15. Hodges D M, Delong J M, Forney C F, et al. Improving the thiobarbituric acid-reactive-substances assay for estimating lipid peroxidation in plant tissues containing anthocyanin and other interfering compounds [J]. Planta, 1999, 207(4): 604-611.
16. Stewart R R C, Bewley J D. Lipid peroxidation associated with accelerated aging of soybean axes [J]. Plant Physiol, 1980, 65(2): 245-248.
17. Nakano Y, Asada K. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts [J]. Plant Cell Physiol, 1981, 22(5): 867-880.
18. Cakmak I, Marschner H. Magnesium deficiency and high light intensity enhance activities of superoxide dismutase, ascorbate peroxidase, and glutathione reductase in bean leaves [J]. Plant Physiol, 1992, 98(4): 1222-1227.
19. Hossain M A, Nakano Y, Asada K. Monodehydroascorbate reductase in spinach chloroplast and its participation in regeneration of ascorbate for scavenging hydrogen peroxide [J]. Plant Cell Physiol, 1984, 25(3): 385-395.
20. Foyer C H, Halliwell B. The presence of glutathione and glutathione reductase in chloroplasts: a proposed role in ascorbic acid metabolism [J]. Planta, 1976, 133(1): 21-25.
21. Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method [J]. Methods, 2001, 25(4): 402-408.
22. De Carvalho M H C. Drought stress and reactive oxygen species. Production, scavenging and signaling [J]. Plant Signal Behav, 2008, 3(3): 156-165.
23. Gill S S, Tuteja N. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants [J]. Plant Physiol Bioch, 2010, 48(12): 909-930.
24. Zhu Y, Zou M X, Liang Y L, et al. MAP65-1a positively regulates H_2O_2 amplification and enhances brassinosteroid-induced antioxidant defence in maize [J]. J Exp Bot, 2013, 64(12): 3787-3802.
25. 阮英慧,董守坤,刘丽君等.干旱胁迫下油菜素内酯对大豆花期生理特性的影响[J].作物杂志,2011(6):33

- 37.

26. 吴晓丽 罗立津 黄丽岚 等. 水杨酸和油菜素内酯对花椰菜幼苗生长及抗旱性的影响[J]. 干旱地区农业研究 2011 29(2) :168 - 172.

27. Quan L J Zhang B Shi W W ,et al. Hydrogen peroxide in plants a versatile molecule of the reactive oxygen species network[J]. J Integr Plant Biol 2008 50(1) 2 - 18.

28. 李红霞 汪好 张战凤 等. 植物转录因子与作物抗逆胁迫关系的研究进展[J]. 麦类作物学报 2013 33(3) : 613 - 618.

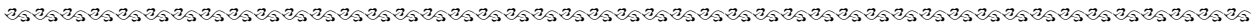
29. Chinnusamy V ,Schumaker K ,Zhu J K. Molecular genetic perspectives on cross-talk and specificity in abiotic stress signaling in plants[J]. J Exp Bot 2004 55(395) 225 - 236.

30. 刘蕾 杜海 唐晓凤 等. MYB 转录因子在植物抗逆胁迫中的作用及其分子机理[J]. 遗传 2008 30(10) :1265 - 1271.

31. 李冉 娄永根. 植物中逆境反应相关的 WRKY 转录因子研究进展[J]. 生态学报 2011 31(11) 3223 - 3231.

32. Zou X L Seemann J R ,Neuman D ,et al. A WRKY gene from creosote bush encodes an activator of the abscisic acid signaling pathway[J]. J Biol Chem 2004 279(53) 55770 - 55779.

33. Qiu Y P ,Yu D Q. Over-expression of the stress-induced *Os-WRKY45* enhances disease resistance and drought tolerance in *Arabidopsis*[J]. Environ Exp Bot 2008 65(1) 35 - 47.



(上接 907 页)

4. 刘玉喜 陆志华 张培杲. 杨树花粉植株的育性研究[J]. 东北林业大学学报 1986 14(1) 20 - 25 128.

5. 郝贵霞 朱祯. 毛白杨遗传转化系统优化的研究[J]. 植物学报 英文版 1999 41(9) 936 - 940.

6. Murashige T ,Skoog F. A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue cultures[J]. Physiol Plant 1962 15(3) 473 - 497.

7. Lloyd G ,McCown B. Commercially-feasible micropropagation of mountain laurel *Kalmia latifolia* by use of shoot-tip culture[J]. Intl Plant Prop Soc Proc 1980 30 421 - 427.

8. 曲冠证. 小黑杨单倍体耐盐基因(*Bet-A*)遗传转化的研究[D]. 哈尔滨 东北林业大学 2002.

9. 陆志华 李家儒 刘玉喜. 小黑杨细胞培养及植株再生[J]. 东北林业大学学报 1991(S2) :197 - 203.

10. 赵鑫 詹立平 刘桂丰. 杨树基因工程抗性育种研究进

34. Jiang Y J ,Liang G ,Yu D Q. Activated expression of *WRKY57* confers drought tolerance in *Arabidopsis*[J]. Mol Plant 2012 5(6) :1375 - 1388.

35. Gadjev I ,Vanderauwera S ,Gechev T S ,et al. Transcriptomic footprints disclose specificity of reactive oxygen species signaling in *Arabidopsis*[J]. Plant Physiol 2006 141(2) : 436 - 445.

36. 张南南 陈朝银 季博 等. 漾濞大泡核桃 *WRKY* 转录因子基因 *JsWRKY1* 的克隆及表达特性分析[J]. 植物生理学报 2014 50(7) 960 - 966.

37. Qin Y X ,Wang M C ,Tian Y C ,et al. Over-expression of *TaMYB33* encoding a novel wheat MYB transcription factor increases salt and drought tolerance in *Arabidopsis*[J]. Mol Biol Rep 2012 39(6) 7183 - 7192.

38. Yang A ,Dai X Y ,Zhang W H. A R2R3-type MYB gene , *OsMYB2* ,is involved in salt cold and dehydration tolerance in rice[J]. J Exp Bot 2012 63(7) 2541 - 2556.

39. Abe H ,Shinozaki K Y ,Ura T ,et al. Role of Arabidopsis MYC and MYB homologs in drought- and abscisic acid-regulated gene expression[J]. Plant Cell 1997 9(10) : 1859 - 1868.

40. Zhang X ,Zhang L ,Dong F ,et al. Hydrogen peroxide is involved in abscisic acid-induced stomatal closure in *Vicia faba*[J]. Plant Physiol 2001 126(4) :1438 - 1448.

41. Neill S ,Desikan R ,Hancock J. Hydrogen peroxide signaling[J]. Curr Opin Plant Biol 2002 5(5) 388 - 395.

展[J]. 东北林业大学学报 2004 32(6) 76 - 78.

11. 程贵兰 蔡智军 姜静 等. 农杆菌介导小黑杨花粉植株转化体系的建立[J]. 广东农业科学 2009(9) :196 - 199 210.

12. 朱大保. 国外杨树组培微繁技术的进展[J]. 北京林业大学学报 1990 12(1) 84 - 91.

13. 王娜 窦恺 王志英 等. 山新杨树组培苗生根移栽方法[J]. 植物研究 2014 34(3) 380 - 385.

14. 程云清 刘剑锋 王占武 等. 鞍杂杨树组培快繁技术[J]. 东北林业大学学报 2011 39(2) :11 - 12 20.

15. 吴双秀 祖元刚. 廊坊杨 3 号快繁和转基因的再生系统[J]. 植物研究 2006 26(2) 201 - 205.

16. 程贵兰 蔡智军. 卡那霉素对小黑杨花粉植株叶片分化及试管苗生根的影响[J]. 辽宁农业职业技术学院学报 2010 12(2) 3 - 4.