

抗坏血酸-谷胱甘肽循环在紫花苜蓿突变体耐盐性中的作用

马进*, 郑钢, 裴翠明, 张振亚

浙江农林大学风景园林与建筑学院, 浙江临安311300

摘要: 在不同抗氧化途径中AsA-GSH是最重要的循环系统, 为明确抗坏血酸-谷胱甘肽循环(AsA-GSH)在紫花苜蓿耐盐性中的作用。以紫花苜蓿品种'Millennium'及其耐盐突变体为材料, 研究其在200 mmol·L⁻¹胁迫下的活性氧代谢及AsA-GSH循环的变化。结果表明, NaCl胁迫下突变体叶片中的过氧化氢(H₂O₂)含量、超氧阴离子(O₂⁻)产生速率和丙二醛(MDA)含量、氧化型谷胱甘肽(GSSG)含量、脱氢抗坏血酸(DHA)含量显著低于野生型。突变体叶片中GSH/GSSG和AsA/DHA的比值高于野生型。NaCl盐胁迫下突变体叶片中H₂O₂与DHA含量呈显著正相关, 与AsA/DHA和GSH/GSSG比值呈负相关。同野生型相比, 突变体叶片中在胁迫期间能够保持较高且相对协调平衡的抗坏血酸过氧化物酶(APX)、脱氢抗坏血酸还原酶(DHAR)、单脱氢抗坏血酸还原酶(MDHAR)和谷胱甘肽还原酶(GR)活性。说明突变体体内AsA-GSH循环能够快速有效地运转, 维持较强抗氧化物质的再生能力, 从而提高抗氧化胁迫能力。该研究结果表明AsA-GSH循环效率是紫花苜蓿耐盐机制的重要生理基础。

关键词: 抗坏血酸-谷胱甘肽循环; 紫花苜蓿; 盐胁迫; 突变体

The Function of Ascorbate-Glutathione Cycle in Salt Tolerance of Alfalfa Mutant

MA Jin*, ZHENG Gang, PEI Cui-Ming, ZHANG Zhen-Ya

Faculty of Landscape Architecture, Zhejiang Agriculture and Forestry University, Lin'an, Zhejiang 311300, China

Abstract: Among the different antioxidant pathways, the ascorbate-glutathione (AsA-GSH) cycle has been regarded as the most important one in order to the function of AsA-GSH cycle in salt tolerance of alfalfa. In the study, millennium (WT) and a salt tolerant alfalfa mutant (MT) were exposed to 200 mmol·L⁻¹ NaCl to reactive oxygen species (ROS) metabolism and dynamic change of AsA-GSH cycle. The results indicated that H₂O₂ content, O₂⁻ evolution rate, MDA content, GSSG and DHA contents of the leaves were higher in the wild type than in the mutant; both the ratio of GSH to GSSG and the ratio of AsA to DHA were higher in the mutant than in the wild type. The content of H₂O₂ was significantly positively correlated to H₂O₂ and DHA content in the leaves of mutant alfalfa plants under NaCl stress, but negatively correlated to the rate of ASA/DHA and GSH/GSSG ratio. Compared with wild type, mutant could maintain higher activity of APX, DHAR, MDHAR and GR. These concluded that mutant alfalfa had efficient metabolism of ASA-GSH cycle, which scavenged the H₂O₂ rapidly to alleviate the oxidative damage of NaCl stress. The results showed the efficiency of ASA-GSH cycle are the physiological foundation for alfalfa to withstand salt stress tolerance.

Key words: ascorbate-glutathione cycle; alfalfa; salinity stress; mutant

在中国各种盐渍化土地面积约0.1亿hm², 占总耕地面积的1/10。并且, 由于灌溉不当造成的耕地次生盐渍化仍在不断增加。因此, 研究盐胁迫对作物的影响及适应机制是利用我国盐渍化土地的一项紧迫任务。盐胁迫一般包括渗透胁迫和离子毒害(Munns 2002), 盐胁迫能够产生活性氧(ROS)如H₂O₂、O₂⁻、·OH等, 过量的活性氧(reactive oxygen species, ROS)会阻碍叶绿体和线粒体电子传递过程及光呼吸等途径等(Wang和Han 2009), 从而造成植物体内的活性氧代谢平衡被打破。植物在盐胁迫下能产生大量活性氧, 当体内的ROS累积

到一定水平时就会对植株造成伤害。植物在长期进化过程中也相应形成了酶促和非酶促两大类保护系统, 以减轻或避免活性氧对细胞造成伤害。H₂O₂作为活性氧中的一种在植物体内扮演着双重角色, 一是植物正常代谢中的有毒副产物, 导致植物的氧化胁迫; 二是在各种胁迫条件下作为一种信号分子发挥信号转导作用。还原型抗坏血酸

收稿 2015-06-16 修定 2015-09-08

资助 国家自然科学基金(31272494)和浙江省自然科学基金(LY16C170003)。

* 通讯作者(E-mail: majinzjl@163.com; Tel: 13071844269)。

(reduced ascorbic acid, ASA)在抗坏血酸过氧化物酶(ascorbate peroxidase, APX)的作用下与 H_2O_2 反应, H_2O_2 接受还原型辅酶II (triphosphopyridine nucleotide, NADPH)的电子还原成水, 从而清除受到逆境伤害产生过氧化氢的毒性(Smirnoff和Wheeler 2000)。AsA在清除 H_2O_2 的同时被氧化形成单脱氢抗坏血酸(monodehydroascorbate, MDHA)和脱氢抗坏血酸(dehydroascorbate, DHA), MDHA和DHA在脱氢抗坏血酸还原酶(dehydroascorbate reductase, DHAR)和单脱氢抗坏血酸还原酶(monodehydroascorbate reductase, MDHAR)作用下重新还原成AsA, 这种途径也参与AsA水平的调节, 并和其他AsA合成途径一起, 在植物对逆境的响应和适应中发挥重要作用(Yin等2010)。此外, 还原型谷胱甘肽(reduced glutathione, GSH)除参与AsA-GSH循环外还可直接与自由基反应, 并由还原态GSH转变成氧化型谷胱甘肽(oxidized glutathione, GSSG); 谷胱甘肽还原酶(glutathione reductase, GR)是维持抗坏血酸-谷胱甘肽循环(ascorbate-glutathione, AsA-GSH)循环有效运行的关键酶之一, 其作用是利用NADPH的电子将GSSG还原为GSH, 从而使细胞内谷胱甘肽库保持在还原状态(Jin等2003; Smirnoff和Wheeler 2000)。

紫花苜蓿主要分布在温带地区, 是世界上最重要的豆科牧草之一, 因其高营养价值和高产等特性明显优于其他草类, 故有“牧草黄金”之称。紫花苜蓿是对高浓度盐分敏感的甜土植物, 耐盐能力有限, 限制了在盐碱地上种植。前人关于紫花苜蓿耐盐生理主要集中在有机渗透调节(Ehsanpour和Fatahian 2003)、拒 Na^+ 能力(Boughanmi等2005)、抗氧化能力(Wang和Han 2009)和光合方面(范方等2013), 但AsA-GSH循环与紫花苜蓿耐盐性的关系还未见报道。GSH和AsA库的大小以及它们在植物胁迫忍耐力中功能性和调节性的相互关系, 已经成为植物抗性研究中的一个值得关注的热点领域(Talukdar 2011; Grillet等2014)。研究表明, 不同种类的植物以及同种植物的不同品种对盐胁迫的抗性机制不完全相同, 因此选用相同遗传背景的突变体开展研究更有意义。本试验以耐盐突变体和野生型的紫花苜蓿为材料, 探讨盐胁迫下突变体和野生型的耐性差异与AsA-GSH循环应答机制的相互关

系, 以揭示AsA-GSH循环在紫花苜蓿抵御盐胁迫过程中的生理作用。

材料与方法

1 试验材料与处理

试验以南方型紫花苜蓿(*Medicago sativa* L.)品种‘Millennium’野生型(wild type, WT)通过以NaCl为选择因子, 对长期继代培养的紫花苜蓿愈伤组织进行选择, 筛选出耐1.2% NaCl的耐盐细胞系, 经过生理检测为体细胞无性系突变体(mutant, MT) (马进等2011), 经过3代自交, 进行抗盐性鉴定筛选, 发现该突变体耐盐性可以稳定遗传, 以该突变体的 T_4 代为材料进行研究。将突变体和野生型种子置于培养皿中, 于20 °C生长箱内发芽。5 d后, 将种子出苗小苗转移至塑料盆装满细沙和珍珠岩(3:1), 每天浇1/2Hogland营养液。35 d后, 每天浇灌100 mL $200 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl盐溶液, 处理0、2、4、6和8 d后, 取紫花苜蓿的完全展开叶测定相关指标。

2 测定方法

MDA含量测定参照Draper和Hadley (1990)方法; H_2O_2 含量测定参照Patterson等(1984)方法; O_2^- 产生速率测定参照Verma和Mishra (2005)方法; GSH、GSSG和GSH/GSSG测定参照Griffiths (1980)方法; AsA和DHA测定参照Law等(1983)方法; APX、MDHR和DHAR活性测定参照Nakano和Asada (1981)方法; GR活性测定参照Foster和Hess (1980)方法。

3 数据处理

各处理进行3次生物学重复, 采用DPS 10.0统计软件进行方差分析。

实验结果

1 盐胁迫对紫花苜蓿野生型和突变体叶片中 H_2O_2 、MDA含量及 O_2^- 产生速率的影响

H_2O_2 和 O_2^- 是两类重要的活性氧。由图1可以看出, 突变体和野生型叶片 O_2^- 产生速率和 H_2O_2 含量均随NaCl胁迫时间的延长而明显上升, 突变体 O_2^- 产生速率和 H_2O_2 含量较小。200 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl胁迫2、4、6和8 d后, 突变体叶片内 O_2^- 产生速率分别比野生型低11.31%、12.37%、8.77%和14.98%,

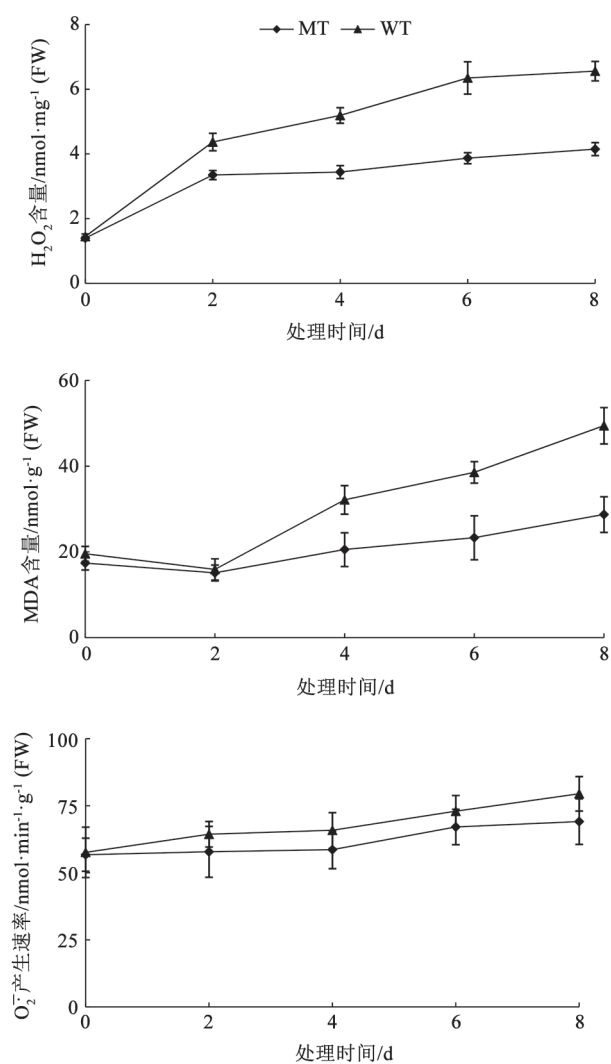


图1 盐胁迫对紫花苜蓿野生型和突变体叶片中H₂O₂、MDA含量及O₂⁻产生速率的影响

Fig.1 Effects of NaCl stress on the H₂O₂ and MDA content and O₂⁻ generation rate in the leaves of wild type (WT) and mutant (MT) alfalfa

在NaCl胁迫4和6 d后, 差异达极显著水平($P < 0.01$)。NaCl胁迫2、4、6和8 d后, 突变体叶片内H₂O₂含量分别比野生型低30.44%、50.87%、64.08%和58.07%, 差异均达极显著水平($P < 0.01$)。MDA是膜脂氧化的产物, 反映了细胞膜的损伤程度。在NaCl胁迫2 d后, 突变体和野生型叶片中的MDA含量没有显著差异, 但胁迫4、6和8 d后, 野生型叶片中的MDA含量分别比突变体高56.42%、65.37%和72.06%, 两者差异达到极显著水平($P < 0.01$)。说明随着NaCl胁迫时间的延长, 突变体膜系统受到的过氧化伤害较小。

2 盐胁迫对紫花苜蓿野生型和突变体叶片中GSH、GSSG含量及GSH/GSSG比值的影响

GSH和AsA是植物体内存在的抗氧化剂, 是非酶促抗氧化系统的重要组成部分。由图2可以看出, 200 mmol·L⁻¹ NaCl胁迫后, 突变体和野生型叶片中GSH含量均呈先上升后下降的趋势。NaCl胁迫4 d后, 野生型和突变体叶片中GSH的含量均明显上升并达到最大值, 分别比处理0 d的升高26.67%和39.38%; 但随着胁迫时间的延长, 野生型和突变体内GSH含量急剧下降。在NaCl胁迫8 d后, 野生型和突变体的GSH含量分别比处理0 d的下降60.53%和26.75%, 野生型下降程度明显高于

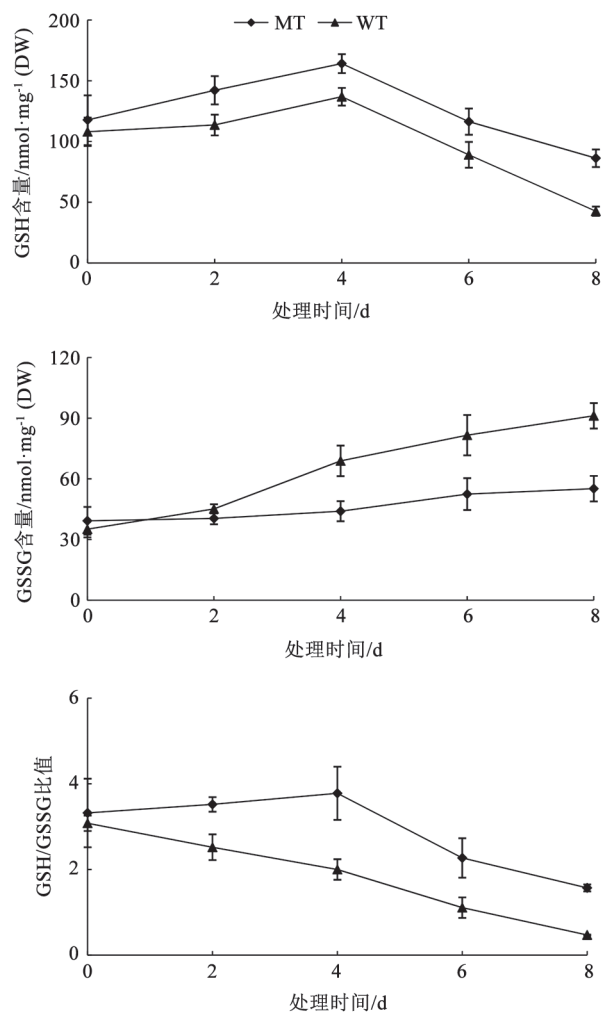


图2 盐胁迫对紫花苜蓿野生型和突变体叶片中GSH、GSSG含量及GSH/GSSG比值的影响

Fig.2 Effects of NaCl stress on the activities of GSH and GSSG content and GSH/GSSG in the leaves of wild type (WT) and mutant (MT) alfalfa

突变体。整个胁迫过程中,突变体叶片中的GSH含量均显著高于野生型。NaCl胁迫后,野生型和突变体中GSSG含量均呈持续上升趋势。NaCl胁迫2、4、6和8 d后,野生型叶片中的GSSG含量分别比处理0 d的增加28.52%、96.04%、132.19%和159.49%;突变体叶片中GSSG则分别增加2.98%、12.02%、33.65%和40.42%;野生型的增幅显著高于突变体(图2)。野生型的GSH/GSSG比值随着时间的延长而逐渐下降,突变体则先上升后下降,在相同胁迫时间下突变体的GSH/GSSG比值均极显著高于野生型($P<0.01$) (图2)。

3 盐胁迫对紫花苜蓿野生型和突变体叶片中的AsA、DHA含量和AsA/DHA比值的影响

AsA是植物中最丰富的抗氧化物之一,它可以直接清除活性氧,在植物抗氧化胁迫中起重要作用。由图3可以看出,NaCl胁迫下野生型叶片中AsA含量随处理时间的延长呈下降趋势,突变体叶片中AsA含量在胁迫初期迅速上升,在处理4 d后达到最大值,随后下降。突变体和野生型叶片中的DHA含量均呈显著升高的趋势。NaCl胁迫2、4、6和8 d后,野生型的DHA含量分别比处理0 d的增加8.83%、52.37%、64.98%和80.13%;突变体比处理0 d的增加7.06%、27.56%、45.23%和58.66%,增幅明显小于野生型(图3)。与GSH/GSSG的变化趋势相同,野生型和突变体叶片中AsA/DHA比值呈现逐渐下降的趋势,并且在相同胁迫时间下两者差异极显著($P<0.01$),且突变体的AsA/DHA比值明显高于野生型(图3)。结果表明,突变体体内较高的GSH/GSSG比值和AsA/DHA比值有助于维持适当的氧化还原环境,减轻NaCl胁迫引起的氧化胁迫。

4 盐胁迫对紫花苜蓿野生型和突变体叶片中的APX、GR、DHAR和MDHAR酶活性的影响

APX是植物体内清除 H_2O_2 的重要抗氧化酶之一。由图4可以看出,200 mmol·L⁻¹ NaCl胁迫下,突变体和野生型叶片中APX酶活性含量均呈先下降后上升的趋势,并且在相同胁迫时间下两者差异极显著($P<0.01$),突变体APX酶活性明显高于野生型。NaCl胁迫后2 d后,突变体和野生型APX酶活性的含量比处理0 d下降17.75%和34.34%,野生型下降程度明显高于突变体。NaCl胁迫后2 d后,突变体和野生型APX酶活性含量均呈急剧上升的趋

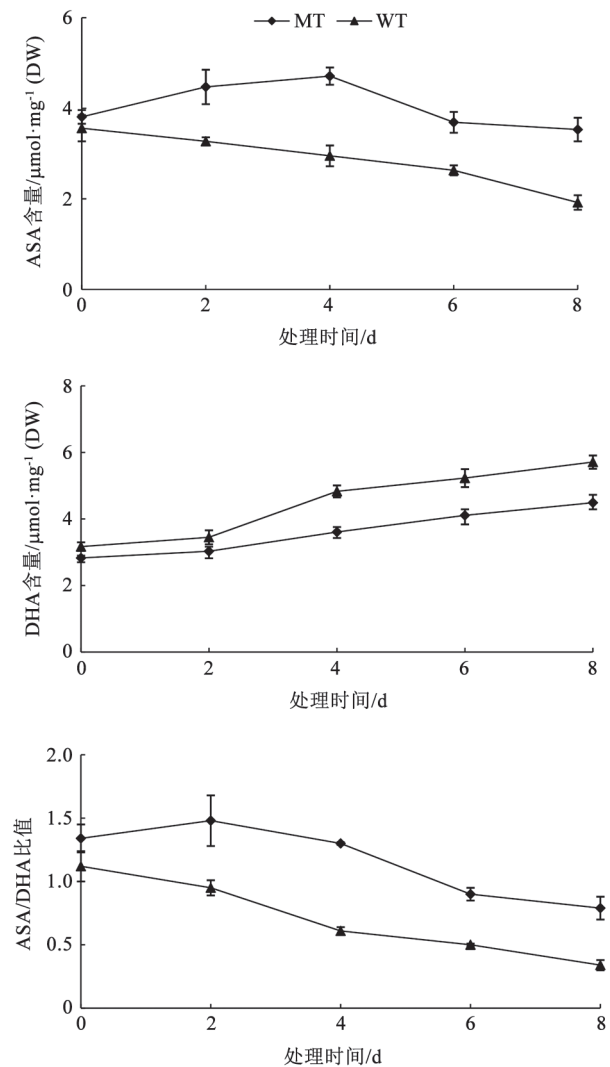


图3 盐胁迫对紫花苜蓿野生型和突变体叶片中ASA、DHA含量活性和ASA/DHA的影响

Fig.3 Effects of NaCl stress on the activities of ASA and DHA content and ASA/DHA ratio in the leaves of wild type (WT) and mutant (MT) alfalfa

势。NaCl胁迫后8 d后,突变体和野生型APX酶活性含量均明显上升并达到最大值,分别比处理0 d的升高71.67%和46.18%。NaCl胁迫后突变体GR酶活性含量呈现先下降后上升的趋势,而野生型呈现下降趋势(图4)。NaCl胁迫4、6和8 d后,突变体GR酶活性含量分别比处理0 d的增加20.73%、41.71%和45.27%,而野生型则分别降低13.98%、30.70%和44.34%。NaCl胁迫4、6和8 d后,突变体GR酶活性含量极显著高于野生型($P<0.01$)。NaCl胁迫下,突变体和野生型DHAR酶活性含量在

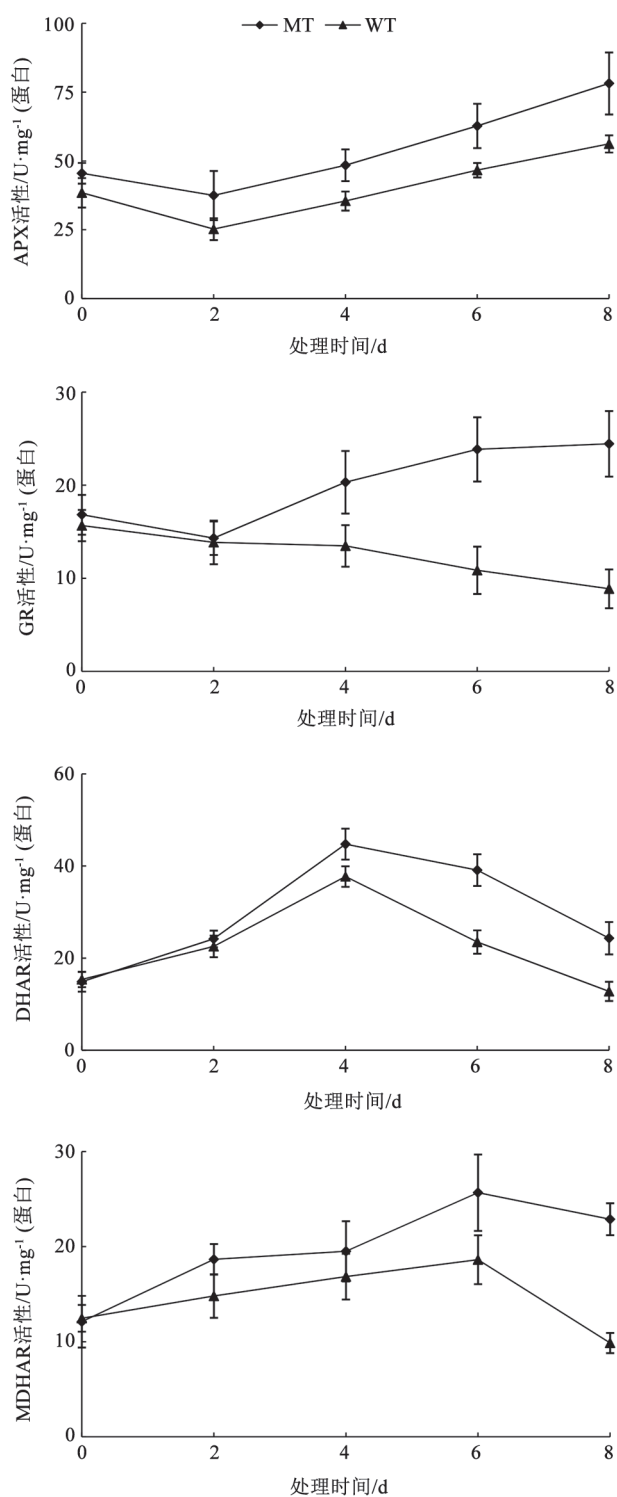


图4 盐胁迫对紫花苜蓿野生型和突变体叶片中APX、GR、DHAR和MDHAR酶活性的影响
Fig.4 Effects of NaCl stress on the activities of APX, GR, DHAR and MDHAR in the leaves of wild type (WT) and mutant (MT) alfalfa

胁迫初期迅速上升, 在处理4 d后达到最大值, 随后下降(图4)。NaCl胁迫下4 d后, 突变体和野生型DHAR酶活性含量分别比处理0 d的升高201.14%和145.41%。但随着胁迫时间的延长, 突变体和野生型DHAR酶活性含量急剧下降, 但NaCl胁迫下6 d和8 d后, 突变体DHAR酶活性含量极显著高于野生型($P<0.01$)。与DHAR的变化相似, 突变体和野生型MDHAR酶活性含量均呈先上升后下降的趋势, NaCl胁迫6 d后, 突变体和野生型MDHAR酶活性含量上升并达到最大值, 分别比处理0 d的升高112.06%和49.40%。NaCl胁迫8 d后, 突变体MDHAR酶活性含量缓慢下降, 而野生型急剧下降(图4)。

5 NaCl胁迫后突变体生理指标的相关性分析

由表1可以看出, H_2O_2 含量与DHA含量呈显著正相关差异显著($P<0.05$), 与AsA/DHA、GSH/GSSG呈显著负相关。O₂⁻产生速率与AsA/DHA和GSH/GSSG呈极显著负相关($P<0.01$)。AsA含量与DHA成负相关。AsA作为AsA-GSH循环的重要成员可以减轻由NaCl胁迫引起的过氧化伤害。

讨论

植物在盐胁迫下, 会造成渗透胁迫、离子毒害、营养失衡等多方面伤害, 同时体内会产生大量的活性氧自由基, 从而引起膜质的氧化伤害。许多研究证实, 盐胁迫可以诱导 H_2O_2 和MDA含量增加(Fatehi等2012; Sorkheh等2012)。本研究发现, NaCl胁迫可导致突变体和野生型叶片中大量积累 H_2O_2 含量, 加快O₂⁻产生速率。野生型 H_2O_2 含量和O₂⁻产生速率显著高于突变体(图1), 突变体叶片中MDA含量较低, 说明突变体体内具有高效的活性氧清除系统, 对NaCl胁迫具有较好的适应性。

GSH是植物体内普遍存在的主要抗氧化物, 可参与AsA-GSH循环清除 H_2O_2 (Pastori和Foyer 2002)。植物细胞内GSH/GSSH比值和GSH含量是评价AsA-GSH循环运行效率高的重要因素。本研究表明, 在200 mmol·L⁻¹ NaCl胁迫后, 突变体和野生型叶片中的GSH含量均呈现先升高后下降的趋势, 但突变体含量始终高于野生型, 同时在胁迫后期, 野生型叶片中GSH下降速度要快于突变体(图2), 这表明GSH含量的升高可能是通过GSH的

表1 NaCl胁迫后突变体各生理指标的相关性

Table 1 Correlation among several physiological indexes of mutant (MT) under NaCl stress

指标	MDA	O ₂ ⁻	GSH	GSSG	GSH/GSSG	AsA	DHA	AsA/DHA
H ₂ O ₂	0.63	0.73	-0.14	0.29	-0.53	-0.04	0.82*	-0.59
MDA		0.91*	-0.66	0.10	-0.87*	-0.61	0.95**	-0.95**
O ₂ ⁻			-0.72	-0.04	-0.95**	-0.69	0.95**	-0.97**
GSH				0.64	0.90*	0.96**	-0.52	0.75
GSSG					0.32	0.52	0.22	-0.01
GSH/GSSG						0.86*	-0.83*	0.94**
AsA							-0.48	0.76
DHA								-0.93**

表中*和**分别代表差异显著($P<0.05$)和差异极显著($P<0.01$)。

合成, 增强抗逆性, 随着胁迫时间的延长, 胁迫程度加深, 自身细胞内大量GSH用于各种解毒过程。两种非酶促抗氧化物质GSH和AsA可参与植物体内清除H₂O₂ (Sorkheh等2012)。Ferreira-Silva等(2012)研究发现盐胁迫腰果(*Anacardium occidentale*)下叶片中GSH/GSSG比值上升。本研究发现在NaCl胁迫初期野生型叶片中GSH含量虽有所上升, 但GSSG含量的上升速度超过GSH, GSH/GSSG始终保持下降趋势, 而突变体GSSG含量的增幅低于野生型, GSH/GSSG呈现下降的趋势(图2), 因此, 可以推测突变体叶片中有较高的GSH/GSSG比值, 利于维持细胞内的还原环境和提高谷胱甘肽循环的效率。

在植物细胞内通过AsA-GSH循环清除H₂O₂, AsA作为APX的电子供体清除H₂O₂, 并被氧化成DHA, DHA经DHAR催化还原(Drazkiewicz等2003)。在AsA-GSH循环中, AsA含量、氧化还原状态(AsA/DHA)比值与抗逆性呈正相关(Gallie 2013)。以前研究表明, 盐胁迫可导致ASA含量的减少(Mittova等2003; Shalata和Neumann 2001), 这可能由于盐胁迫下AsA再生不足或AsA-GSH合成代谢受阻(Amor等2006)而导致。Shalata等(2001)研究结果表明, 盐胁迫下耐盐番茄(*Solanum lycopersicum*)根系中的AsA含量明显升高, DHA含量显著降低, 细胞氧化还原力(AsA/DHA)比值升高, 表现出较强的耐盐性。本研究发现, 突变体和野生型叶片中DHA含量均随着NaCl胁迫程度加深呈升高的趋势, 但野生型叶片中DHA含量的增幅大于突变体(图3)。通过研究AsA/DHA的比值表明, 在相同胁迫时间下, 突变体AsA/DHA比值均显著高于野

生型(图3), 这暗示着突变体叶片内具备较高的AsA周转和再生能力以抵抗NaCl诱导的氧化胁迫。

为了减轻胁迫诱导的氧化伤害, 植物发育了一系列用来清除活性氧的系统, 其中AsA-GSH循环是植株清除活性氧主要的主要机构, 包含了APX、GR、DHAR和MDHAR四种保护酶。APX直接参与清除H₂O₂和O₂⁻ (Maruta等2010)。Ferreira-Silva等(2012)研究发现盐胁迫腰果下叶片会降低APX活性。本研究发现, 盐胁迫处理后突变体和野生型叶片中APX活性先下降后上升的趋势, 并且在相同胁迫时间下两者差异极显著($P<0.01$), 突变体明显高于野生型(图4), 说明突变体产生更多APX活性, 来清除植物体内过多的活性氧。MDHAR是AsA-GSH循环中抵御ROS的氧化损伤的一种防御酶, 它是利用NADPH再生ASA。DHAR也是AsA-GSH循环中抵御另一个重要酶。本研究中发现DHAR和MDHAR的作用是参与AsA的再生, 盐胁迫初期DHAR和MDHAR活性上升, 而随着胁迫时间延长, DHAR和MDHAR活性减低。DHAR活性变化可能和APX活性变化有关, 配合APX在清除H₂O₂过程中所需要的AsA再生, 但突变体叶片中DHAR和MDHAR活性比野生型要高(图4), 推测突变体促进ASA的再生能力要强。已有证据表明, GR是活性氧清除系统中的限速酶, 能够将GSSG转化为GSH, GR活性提高能维持植物体内较高的GSH含量和适合的GSH/GSSG比值(Moradi和Ismail 2007)。研究表明, 抗逆性强的植物往往GR活性高(Sekmen等2007; Aghaei等2009), 本试验结果表明: 在NaCl胁迫4、6和8 d后, 突变体叶片中GR

酶活性含量显著高于野生型(图4), 可以表明, 突变体将GSSG转化成GSH能力强, 清除H₂O₂的能力强。

总之, 同野生型紫花苜蓿相比, 盐胁迫下突变体叶片中在胁迫期间能够保持较高的APX、DHAR、MDHAR和GR活性及非酶抗氧化物质AsA和GSH含量及GSH/GSSG比值, 从而使其AsA-GSH循环能够快速有效地运转, 促进了AsA和GSH的再生, 进而维持了较强的氧化还原力和高水平的抗氧化物质, 本研究结果进一步明确了AsA-GSH循环效率是紫花苜蓿耐盐机制的重要生理基础。

参考文献

- 范方, 张玉霞, 姜健, 杨宝灵, 高明波(2013). 盐胁迫对紫花苜蓿生长及光合生理特性的影响. 中国农学通报, 29 (17): 14~18
- 马进, 刘志高, 郑钢(2011). 南方型紫花苜蓿耐盐细胞系的筛选及生理特性分析. 中国草地学报, 33 (4): 68~72
- Aghaei K, Ehsanpour AA, Komatsu S (2009). Potato responds to salt stress by increased activity of antioxidant enzymes. J Integr Plant Biol, 51 (12): 1095~1103
- Amor NB, Jimenez A, Lundqvist M, Sevilla F, Abdelly C (2006). Response of antioxidant systems to NaCl stress in the halophyte *Cakile maritima*. Physiol Plant, 126 (3): 446~457
- Boughanmi N, Michonneau P, Daghfous D, Fleurat-Lessard P (2005). Adaptation of *Medicago sativa* cv. Gabs to long-term NaCl stress. J Plant Nutr Soil Sci, 168 (2): 262~268
- Draper HH, Hadley M (1990). Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. Method Enzymol, 186 (1): 421~431
- Drazkiewicz M, Skorzynska-Polit E, Krupa Z (2003). Response of the ascorbate-glutathione cycle to excess copper in *Arabidopsis thaliana*. Plant Sci, 164: 195~202
- Ehsanpour AA, Fatahian N (2003). Effects of salt and proline on *Medicago sativa* callus. Plant Cell Tiss Org Cult, 73 (1): 53~56
- Fatehi F, Hosseinzadeh A, Alizadeh H, Brimavandi T, Struik PC (2012). The proteome response of salt-resistant and salt-sensitive barley genotypes to long-term salinity stress. Mol Biol Rep, 39 (5): 6387~6397
- Ferreira-Silva SL, Voigt EL, Silva EN, Maia JM, Aragão TCR, Silveira JAG (2012). Partial oxidative protection by enzymatic and non-enzymatic components in cashew leaves under high salinity. Biol Plant, 56 (1): 172~176
- Foster JG, Hess JL (1980). Responses of superoxide dismutase and glutathione reductase activities in cotton leaf tissue exposed to an atmosphere enriched in oxygen. Plant Physiol, 66 (3): 482~487
- Gallie DR (2013). The role of L-ascorbic acid recycling in responding to environmental stress and in promoting plant growth. J Exp Bot, 64 (2): 433~443
- Griffiths OW (1980). Determination of glutathione and glutathione disulphide using glutathione reductase and 2-vinylpyridine. Anal Biochem, 106 (1): 207~212
- Grillet L, Ouerdane L, Flis P, Hoang MT, Isaure MP, Lobinski R, Curie C, Mari S (2014). Ascorbate efflux as a new strategy for iron reduction and transport in plants. J Biol Chem, 289 (5): 2515~2525
- Jin YH, Tao DL, Hao ZQ, Ye J, Du YJ, Liu HL, Zhou YB (2003). Environmental stresses and redox status of ascorbate. Acta Botanica Sinica, 45 (7): 795~801
- Law MY, Charles SA, Halliwell B (1983). Glutathione and ascorbic acid and spinach (*Spinacea oleracea*) chloroplasts: The effect of hydrogen peroxide and paraquat. Biochem J, 210 (3): 899~903
- Maruta T, Tanouchi A, Tamoi M, Yabuta Y, Yoshimura K, Ishikawa T, Shigeoka S (2010). Arabidopsis chloro-plastic ascorbate peroxidase isoenzymes play a dual role in photoprotection and gene regulation under photooxidative stress. Plant Cell Physiol, 51 (2): 190~200
- Mittova V, Theodoulou FL, Kiddle G, Gómez L, Volokita M, Tal M, Foyer CH, Guy M (2003). Coordinate induction of glutathione biosynthesis and glutathione-metabolizing enzymes is correlated with salt tolerance in tomato. FEBS Lett, 554 (3): 417~421
- Moradi F, Ismail AM (2007). Responses of photosynthesis, chlorophyll fluorescence and ROS-scavenging systems to salt stress during seedling and reproductive stages in rice. Ann Bot, 99 (6): 1161~1173
- Munns R (2002). Comparative physiology of salt and water stress. Plant Cell Environ, 25 (2): 239~250
- Nakano Y, Asada K (1981). Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. Plant Cell Physiol, 22 (5): 867~800
- Pastori GM, Foyer CH (2002). Common components, networks, and pathways of cross-tolerance to stress: The central role of "redox" and abscisic acid-mediated controls. Plant Physiol, 129 (2): 460~468
- Patterson BD, Macrae EA, Ferguson IB (1984). Estimation of hydrogen peroxide in plants extracts using titanium (IV). Anal Biochem, 139 (2): 487~492
- Sekmen AH, Türkan I, Takio S (2007). Differential responses of antioxidant enzymes and lipid peroxidation to salt stress in salt-tolerant *Plantago maritima* and salt-sensitive *Plantago media*. Physiol Plant, 131 (3): 399~411
- Shalata A, Neumann PM (2001). Exogenous ascorbic acid (vitamin C) increases resistance to salt stress and reduces lipid peroxidation. J Exp Bot, 52 (364): 2207~2211
- Shalata A, Mittova V, Volokita M, Guy M, Tal M (2001). Response of the cultivated tomato and its wild salt-tolerant relative *Lycopersicon pennellii* to salt-dependent oxidative stress: the root antioxidative system. Physiol Plant, 112 (4): 487~494
- Smirnoff N, Wheeler GL (2000). Ascorbic acid in plants: biosynthesis

- and function. *Critic Rev Biochem Mol Biol*, 35 (4): 291~314
- Sorkheh K, Shiran B, Rouhi V, Khodambashi M, Sofo A (2012). Salt stress induction of some key antioxidant enzymes and metabolites in eight Iranian wild almond species. *Acta Physiol Plant*, 34: 203~213
- Talukdar D (2011). Isolation and characterization of NaCl-tolerant mutations in two important legumes *Clitoria ternatea* L. and *Lathyrus sativus* L. induced mutagenesis and selection by salt stress. *J Med Plants Res*, 5 (16): 3619~3628
- Verma S, Mishra SN (2005). Putrescine alleviation of growth in salt stressed *Brassica juncea* by inducing antioxidative defence system. *J Plant Physiol*, 162 (6): 669~677
- Wang WB, Kim YH, Lee HS, Kim KY, Deng XP, Kwak SS (2009). Analysis of antioxidant enzyme activity during germination of alfalfa under salt and drought stresses. *Plant Physiol Biochem*, 47 (7): 570~577
- Wang XS, Han JG (2009). Changes of proline content, activity, and active isoforms of antioxidative enzymes in two alfalfa cultivars under salt stress. *Agric Sci China*, 8 (4): 431~440
- Yin L, Wang S, Eltayeb AE, Uddin MI, Yamamoto Y, Tsuji W, Takeuchi Y, Tanaka K (2010). Overexpression of dehydroascorbate reductase, but not monodehydroascorbate reductase, confers tolerance to aluminum stress in transgenic tobacco. *Planta*, 231 (3): 609~621