

doi: 10.3969/j.issn.0490-6756.2017.04.031

甘蓝型油菜 *BnDHAR* 基因的克隆及表达分析

宋验红, 冯刚, 王浩杰, 张璐, 王茂林

(四川大学 生命科学学院, 成都 610064)

摘要: 在甘蓝型油菜矮化突变体与其高秆亲本构建的消减杂交文库中, 得到一长约 230bp 与编码脱氢抗坏血酸还原酶的 *DHAR* 基因核苷酸序列相似的 DNA 片段. 采用同源克隆技术, 在甘蓝型油菜中获得该基因的全长 cDNA 序列, 命名为 *BnDHAR*. *BnDHAR* 与已公布的甘蓝型油菜基因组中的该基因核苷酸序列完全一致. 对 *BnDHAR* 基因不同发育时期组织的表达分析的结果显示, *BnDHAR* 基因在高秆油菜苗期的叶中表达量最高, 是矮化突变体的 5 倍, 在根、茎中表达极低, 具有组织特异性. 非生物胁迫显著影响 *BnDHAR* 表达, 高温胁迫使其表达升高, 盐胁迫处理 9h 时达最高, 而干旱胁迫时表达量在处理 12h 时才达最高.

关键词: 甘蓝型油菜; *DHAR*; 基因克隆; 非生物胁迫; 表达分析

中图分类号: Q785; Q786 **文献标识码:** A **文章编号:** 0490-6756(2017)04-0851-06

Molecular cloning and expression analysis of *BnDHAR* in *Brassica napus* L.

SONG Yan-Hong, FENG Gang, WANG Hao-Jie, ZHANG Lu, WANG Mao-Lin

(College of Life Science, Sichuan University, Chengdu 610064, China)

Abstract: A 230bp partial *DHAR*-like DNA segments was obtained from a Subtractive hybridization library of a dwarf mutant vs its wild-type parent in *Brassica napus* L.. A full-length cDNA sequence of the gene, namely *BnDHAR*, was cloned by homologous cloning from *Brassica napus*. *BnDHAR* was fully consistent with nucleotide sequence of the gene in the published *Brassica napus* genome. The *BnDHAR* gene expression in different organizations at different developmental stages of *Brassica napus* was analyzed by qRT-PCR technology. The results showed that *BnDHAR* gene expression in the wild-type leaves was the highest, almost 5-fold that in the dwarfing mutant, and extremely low expression in roots and stems. High temperature stress elevated the expression of *BnDHAR*. Under salt stress, *BnDHAR* reached its highest expression after treatment in 9h, whereas, the highest expression was detected after 12 hours treated with drought stress. In summary, the *BnDHAR* gene expression exhibited tissue specificity and probably played a role in response to abiotic stress in *Brassica napus*.

Keywords: *Brassica napus*; *DHAR*; gene cloning; abiotic stress; expression analysis

1 引言

抗坏血酸(ascorbic acid, ASA), 又称维生素 C(Vitamin C), 是植物体内主要的抗氧化物质, 具

有清除植物体内活性氧, 维持光合作用正常进行的重要功能^[1,2]. 有研究报道, 其在植物的细胞分裂、生长发育、细胞分化等多种生命活动中, 也发挥着重要的作用^[3-5]. 同时, 抗坏血酸也是维持人体生命

收稿日期: 2016-03-25

基金项目: 国家科技支撑计划(2013BAD01B03); 四川省十二五油菜育种攻关项目(SN2011yzgg05); 国家“863”计划(2011AA10A10401)

作者简介: 宋验红(1990-), 女, 山东临沂人, 硕士研究生, 主要从事植物分子遗传学与基因工程研究. E-mail: songyanhonglyt@163.com

通讯作者: 王茂林. E-mail: mlwang@scu.edu.cn

活动必需的一类微量营养物质,在人体生长、代谢、发育过程中具有必不可少的作用。

脱氢抗坏血酸还原酶(dehydroascorbate reductase, DHAR)在植物体各组织内广泛存在,是抗坏血酸再生循环途径的关键酶,在抗坏血酸-谷胱甘肽循环途径中可以把氧化态的脱氢抗坏血酸还原为抗坏血酸,对于维持植物体内抗坏血酸含量的稳定具有重要意义^[6-8]。有研究表明,DHAR最早从菠菜的叶片细胞中提取出来,是一种单体硫醇酶,在植物的叶绿体中具有较高的活性,研究发现DHAR在许多物种中都存在^[9]。

甘蓝型油菜(*Brassica napus*)是世界上重要的油料作物^[10],然而非生物逆境胁迫却是造成油菜减产的一个重要因素。目前,DHAR已经从菠菜、甘蓝、番茄、水稻、棉花^[11]等植物中克隆出来,并对其参与的抵抗外界非生物胁迫进行了研究。但是,DHAR在甘蓝型油菜中的功能还有待分析。本研究根据GenBank中已经公布的甘蓝(*Brassica oleracea*)的DHAR基因序列信息,利用同源克隆技术克隆得到了*BnDHAR*基因序列的完整开放阅读框,并对DHAR基因在不同时期、不同组织以及不同逆境环境胁迫条件下进行了qRT-PCR表达分析研究,为进一步研究DHAR基因的功能提供参考基础。

2 材料与方法

2.1 材料

甘蓝型油菜(*Brassica napus*)高秆野生型(3529),矮化突变体(NDF-1)由四川大学生命科学学院油菜课题组提供,2种材料均种植于四川大学实验地。分别取高秆野生型、矮化突变体两叶一心期、四叶一心期、抽薹期、花期的根、茎、叶,取样后立即将样品放入液氮中,-80℃冰箱保存备用,每次实验重复3次,实验结果由3次重复实验结果的平均值得到。

2.2 方法

2.2.1 RNA提取和cDNA合成 总RNA的提取参照植物总RNA提取试剂盒(购自美国OMEGA公司),反转录参照一步反转录试剂盒(购自全式金生物公司)。

2.2.2 甘蓝型油菜*BnDHAR*基因全长cDNA的克隆 以GenBank中已经公布的甘蓝(*Brassica oleracea*)的DHAR基因序列(登录号AB125638),设计特异性引物L₁、L₂(表1)。PCR

反应采用Trans Start KD Plus DNA Polymerase(购自全式金生物公司),反应体系25μL,扩增程序为94℃预变性5min,94℃变性30s,52℃退火40s,68℃延伸1min,35个循环后,68℃延伸10min。PCR扩增产物电泳后用凝胶成像仪拍照,并送华大基因公司测序。

2.2.3 *BnDHAR*基因序列及其编码的蛋白质的生物信息学分析 基因序列在GenBank中进行BLAST比对,在DNAMAN中完成氨基酸序列的比对以及蛋白质的推测,蛋白质的各种理化性质的分析利用<http://www.expasy.org/>和<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>在线网站完成,利用SignalP(<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>)预测蛋白质的信号肽。利用SMART(<http://smart.embl-heidelberg.de/>)在线软件进行保守性结构域分析。通过在线软件TM-pred(<http://www.ch.embnet.org/software/TMPRED-form.html>)对蛋白质进行跨膜分析。利用MEGA 6.06软件构建进化树。

2.2.4 *BnDHAR*基因的荧光定量PCR表达分析

取二叶一心期、四叶一心期、抽薹期、花期的根、茎、叶进行qRT-PCR检测。据*BnDHAR*基因序列的保守区域利用Oligo7软件设计荧光定量引物L₃、L₄(表1),内参基因为βactin基因(GenBank登录号AF111812),设计内参引物P₃、P₄(表1)。对取样的材料分别进行总RNA的提取(OMEGA Plant RNA Kit)和cDNA第一链合成(EasyScript One-Step gDNA Removal and cDNA Synthesis Super Mix),荧光定量PCR仪为美国Bio-Rad CFX96。荧光定量试剂盒采用TransStart Tip Green qPCR Super Mix(购自全式金生物公司)。PCR的反应体系为2×TransStart Tip Green qPCR Super Mix 10μL,上下游引物(10μmol/L)各0.4μL,模板各1μL,加双蒸水至20μL。采用两步法进行荧光定量PCR反应,反应条件为94℃预变性30s,40个循环(94℃ 5s,及55℃ 30s),同时进行溶解曲线的绘制(65℃上升至95℃,每个循环上升0.5℃)。反应结束后,采用ΔΔC_t方法计算*BnDHAR*基因的相对表达量,实验重复3次。

2.2.5 *BnDHAR*基因在非生物胁迫下的表达分析 油菜幼苗长至四叶一心期后,放入盛有1/2Hoagland营养液的培养盆中,光照培养箱中(24℃,16h光照,8小时黑暗,相对湿度保持60%~70%)缓苗处理24h后,40℃高温胁迫处理,0、2、

4、6、8h 取样. 分别以 200mmol/L NaCl 和 20% (m/v) PEG-6000 的 1/2 Hoagland 营养液胁迫处理, 0、3、6、9、12、24、48h 取样. 取样后立即放入液氮罐中, 随后 -80℃ 冰箱保存, RNA 反转成 cDNA 后, 荧光定量引物为 L₃、L₄ 进行定量 PCR, 每次实验重复 3 次. 用 Bio-Rad CFX96 PCR 仪自带分析软件进行定量分析, 用 Origin 8.5 绘制图表.

表 1 *BnDHAR* 基因克隆及 qRT-PCR 引物

Tab. 1 Primers for cloning and qRT-PCR of *BnDHAR* gene

引物名称	引物序列(5'-3')	长度/bp
L ₁ <i>BnDHAR</i> -F	ATGATAAGCCTTGGATTCAACC	23
L ₂ <i>BnDHAR</i> -R	TTAACCCATCACCTTTGGTCTC	22
L ₃ <i>BnDHAR</i> -qF	TTTATCGGTTTTCTCAAGAGC	21
L ₄ <i>BnDHAR</i> -qR	CAAGTGCAATCTTTGTGGT	19
P ₃ β-actin-qF	TCTTCCTCACGCTATCCTCCG	21
P ₄ β-actin-qR	AGCCGTCTCCAGCTCTTGC	19

3 结果与分析

3.1 *BnDHAR* 基因全长 cDNA 克隆与序列分析

根据 GenBank 中已经公布的甘蓝 (*Brassica oleracea*) 的 *DHAR* 基因 (AB125638) 的开放阅读框设计引物, 以甘蓝型油菜 RNA 反转得到的 cDNA 为模板进行 PCR 扩增, 得到略大于 750bp 的片段 (图 1). 产物纯化连接后挑选 6 个重组子送往华大基因测序, 测序结果用 DNAMAN 软件进行分析显示, 矮秆突变体与其野生型亲本 *DHAR* 全长 cDNA 核苷酸序列并无差异, 命名为 *BnDHAR*, 所含片段大小为 774bp, 将所得到的 *BnDHAR* 基因序列与已公布的甘蓝型油菜基因组中的该基因核苷酸序列完全一致; 将 *BnDHAR* 基因序列与甘蓝 *DHAR* 基因序列 (AB125638) 比对发现 96.51% 相似; *BnDHAR* 基因序列与拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*) *DHAR* 基因序列 (NM121676) 比对发现, 核酸序列相似性为 88.29%.

3.2 *BnDHAR* 蛋白质的生物信息学分析和系统进化树分析

通过软件对 *BnDHAR* 基因序列进行生物信息学分析, 推测该基因编码 257 个氨基酸, 等电点为 8.28, 带正电荷的氨基酸有 33 个, 带负电荷的氨基酸 31 个, 不稳定系数为 35.25, 其编码的蛋白质为亲水性蛋白, 无信号肽, 无跨膜结构, 具有叶绿体转运肽, 位于叶绿体中. 采用 DNAMAN 分析甘蓝型油菜氨基酸序列与已知其它植物的蛋白的同源关系, 蛋白氨基酸序列分析结果 (图 2) 表明,

BnDHAR 氨基酸序列与甘蓝的一致性为 94.94%, 与拟南芥的一致性为 88.76%, 和芥菜 (*Brassica juncea*) 的相似性为 83.33%. *BnDHAR* 氨基酸序列保守域分析结果显示, 其具有典型的功能结构域, 包括 GST-N 端和 GST-C-端家族的功能结构域, 属于谷胱甘肽-S-转移酶家族.

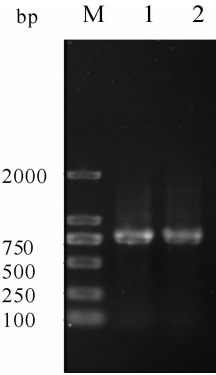


图 1 *BnDHAR* 基因全长 CDS 的扩增

M. DL2000; 1. 以野生型植株为模板的扩增 2. 以矮化突变体植株为模板的扩增产物

Fig. 1 Amplification of the full-length CDS of *BnDHAR* gene

M. DL2000; 1. PCR products with cDNA of wild-type plants as template

2. PCR products with cDNA of dwarf mutant plants as template

为了解 *BnDHAR* 基因序列在进化过程中的亲缘关系, 对已经公布的 17 个 *DHAR* 基因的编码序列进行分子进化分析, 构建系统进化树 (图 3). 结果显示, *BnDHAR* 与甘蓝、芥菜、拟南芥之间亲缘关系较近, 甘蓝型油菜与甘蓝、芥菜都属于双子叶植物, 十字花科, 芸薹属植物, 在进化过程可能来自同一祖先. 而小麦、高粱、玉米、水稻等植物属于单子叶植物, *BnDHAR* 与它们之间的亲缘关系较远.

3.3 *BnDHAR* 在不同生长时期不同组织中表达分析

利用荧光定量 PCR 的方法检测 *BnDHAR* 在野生型甘蓝型油菜和矮化突变体油菜的二叶一心期、四叶一心期、抽薹期、花期不同组织中的表达情况 (图 4). 由图 4. A 可以看出, 根中 *BnDHAR* 在四叶一心期、抽薹期、花期的表达量都很低, 并没有明显的表达差异, 在二叶一心期的表达量略高于其它三个时期, 野生型油菜和矮化突变体该基因在根中的表达差异不明显. 由图 4. B 可以看出, 茎中 *BnDHAR* 的表达情况和根中类似, 四个时期表达量都很低, 花期的表达略低于前三个时期, 野生型油菜和矮化突变体的表达没有明显的差异. 图 4. C

可以看出,叶中 *BnDHAR* 的表达呈现出不断降低的趋势,*BnDHAR* 基因在野生型甘蓝型油菜二叶一心期的叶中表达量最高,接近矮化突变体的 5 倍,花期表达量最低,二叶一心期、四叶一心期这两

个时期野生型甘蓝型油菜中的表达量明显的高于矮化突变体油菜,而在抽薹期和花期表达量都明显低于前 2 个时期,并且野生型油菜和矮化突变体的表达差异不大.

AtDHAR3	R	ST	SVS	F	RC	ST	G	VG	FV	M	T	S		K	N	80			
BJDHAR2	R	.S	PVG	L	GF	LT	R	TV	LG	V	M	A		R	H	79			
OcDHAR	R	.S	PIS	F	RC	LI	R	TV	LG	V	M	A		R	H	79			
BnDHAR	G	.S	SVN	F	RS	LT	R	TA	FG	M	M	S		R	H	79			
Consensus mi sl fqp tagvl sa rag ik g kp r r t a aa pleicvkasittpnklgdcpcfqc vlltmeek																			
AtDHAR3														Q	EK	V	V	160	
BJDHAR2														H	DK	V	I	159	
OcDHAR														Q	DE	A	I	159	
BnDHAR														Q	DK	V	I	159	
Consensus vpydmkmvdl snkpewflki egkvpvkvfdekwpvdsdvit ale ypepplattppekas gskifstf gflkskd																			
AtDHAR3	SG		T	I	D	PF								Y		V		T	240
BJDHAR2	PK		S	L	E	PY								F		L		K	239
OcDHAR	PK		S	L	E	PY								F		L		K	239
BnDHAR	PK		S	L	E	TY								F		L		K	239
Consensus dgteqvll del tfndy k ng ingekisaadslapkl yhm kialgh knwsvpds lpf ksmenvfsresf n																			
AtDHAR3	R	E													258			
BJDHAR2	E	Q	RAKGLDVGLIAQVKASIIIFSLAFFYNVKTSNLLQML													293			
OcDHAR	E	Q													257			
BnDHAR	E	Q													257			
Consensus t a tedviagwrpkvmg																			

图 2 甘蓝型油菜与其他物种 DHAR 氨基酸序列比对

AtDHAR3、*BJDHAR2*、*OcDHAR*、*BnDHAR* 分别为拟南芥、芥菜、甘蓝和甘蓝型油菜中的 DHAR 蛋白

Fig. 2 Alignment of DHAR protein from *Brassica napus* and other plant species

AtDHAR3、*BJDHAR2*、*OcDHAR*、*BnDHAR* stand for the protein from *A. thaliana*, *Brassica juncea*, *B. oleracea*, *B. napus*, respectively.

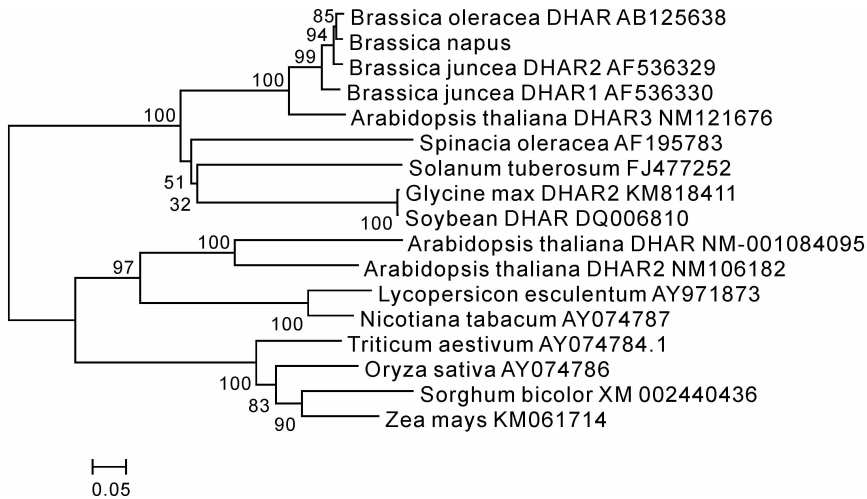


图 3 *BnDHAR* 的系统进化树分析

标尺上数字代表碱基的替换率;分支上的数字代表 Bootstrap 验证中基于 1000 次的重复该节点可信度

Fig. 3 Phylogenetic tree analysis of *BnDHAR*

The numbers in the ruler indicated the substitution rate of base;

The numbers on the branches mean the reliability percent of bootstraps value based on 1000 replications

3.4 *BnDHAR* 在胁迫条件下表达分析

利用荧光定量 PCR 的方法检测 *BnDHAR* 在各种非生物胁迫条件下的表达情况(图 5),由图 5. A 可以看出,在盐胁迫条件下,*BnDHAR* 的表达量在胁迫处理 9h 时其表达量最高,然后呈现下降的

趋势;PEG 胁迫条件下(图 5. B),*BnDHAR* 的表达也呈现出先上升后下降的趋势,在胁迫处理 12h 时表达量最高,24h、48h 的表达量都较低. 高温胁迫条件下(图 5. C),*BnDHAR* 的表达具有升高的趋势,胁迫处理 4h 时,表达量最高.

4 讨 论

抗坏血酸(ASA)是抗坏血酸-谷胱甘肽循环途径的重要组成部分,是植物体内重要的抗氧化剂.具有清除活性氧、维持细胞正常代谢、促进生长发育、对逆境进行应激反应的重要作用^[12-14].脱氢抗坏血酸还原酶(DHAR)是抗坏血酸再生的关键酶.目前已经有多种植物的DHAR基因被克隆并进行特征分析,但是甘蓝型油菜中的DHAR基因

尚未被克隆研究.本实验以野生型甘蓝型油菜和矮化突变体油菜为材料,利用同源克隆技术克隆了甘蓝型油菜的DHAR基因,两种材料克隆所得到的基因序列并无差异,开放阅读框均为774bp,编码257个氨基酸,命名为*BnDHAR*,基因序列与其它物种具有很高的同源性;具有DHAR基因家族的GST-N端和GST-C端家族功能域,属于谷胱甘肽-S-转移酶家族.

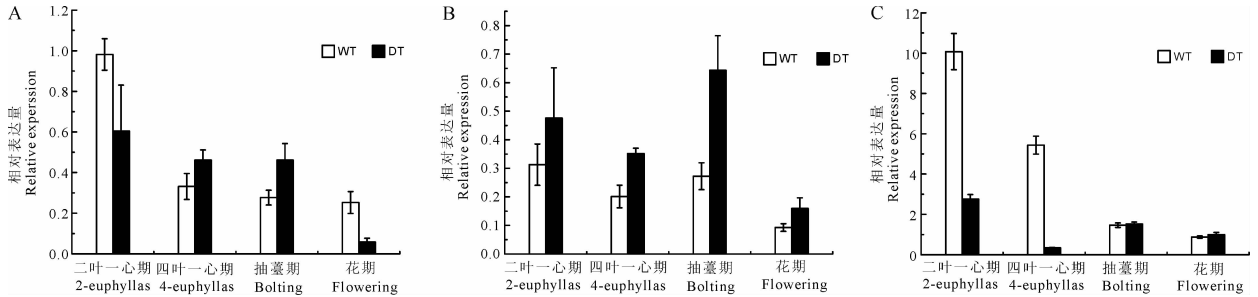


图 4 *BnDHAR* 基因在野生型、矮化突变体油菜根、茎、叶不同时期的荧光定量表达情况
A. 根 B. 茎 C. 叶

Fig. 4 *BnDHAR* expression in wild type, dwarf mutant of roots, stems and leaves during the different developmental stages with qRT-PCR

A. Roots; B. Stems; C. Leaves

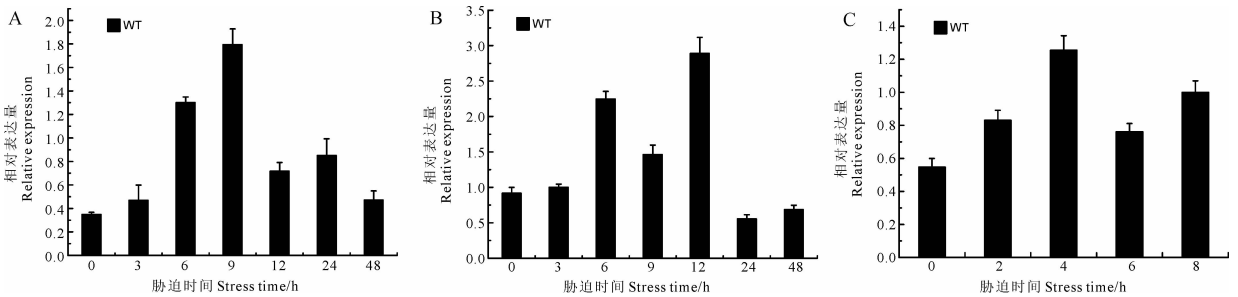


图 5 *BnDHAR* 在不同非生物胁迫下的表达模式分析

A. 盐胁迫 B. 干旱胁迫 C. 高温胁迫

Fig. 5 *BnDHAR* expression under different abiotic stress with qRT-PCR

A. Salt stress; B. Drought stress; C. High temperature stress

BnDHAR 基因在野生型甘蓝型油菜和矮化突变体油菜的各个生长时期和各组织中均表达,二叶一心期、四叶一心期这两个时期野生型甘蓝型油菜叶中的表达量明显的高于矮化突变体油菜,这与 *BnDHAR* 主要在幼苗时期表达,参与调控叶生长发育的研究结果一致^[15-16],其表达量的差异也有可能是导致矮化突变体油菜比正常野生型油菜植株矮的原因,但是具体是如何调控的还需要进一步的研究.

DHAR 可以利用还原型谷胱甘肽(GSH)作为还原剂,将脱氢抗坏血酸(DHA)重新再生成抗坏血酸(ASA).

DHA/ASA(抗坏血酸氧化还原状态)在逆境

胁迫研究中越来越受到关注, DHAR 和 DHA/ASA 直接相关,因此, DHAR 和植物的逆境胁迫具有密切关系.越来越多的研究表明,干旱、高温、盐、重金属等诱发活性氧产生的逆境条件下, DHAR 的活性都会增强^[17-20];研究表明拟南芥转入水稻的 DHAR 基因后,拟南芥耐盐性明显提高^[21].本实验中,在高温、盐、干旱胁迫条件下,甘蓝型油菜 DHAR 基因的表达活性明显增强,来应对逆境胁迫对自身的伤害.这一结果与其它植物在逆境胁迫环境中 DHAR 的表达活性增强相似.

总之, *BnDHAR* 基因的表达在甘蓝型油菜的各时期生长发育以及抵御逆境的分子机制中具有

重要作用,但是,其表达降低是否导致植株矮化和抗坏血酸含量的减少,还需要对 *BnDHAR* 的表达调控途径进行更深入的研究分析。

参考文献:

- [1] Zhen Z, Gallie D R. Dehydroascorbate Reductase Affects Leaf Growth, Development, and Function [J]. *Plant Physiol*, 2006, 142: 775.
- [2] Bhattacharjee S. Reactive oxygen species and oxidative burst: roles in stress, senescence and signal transduction in plant [J]. *Curr Sci*, 2005, 89: 1113.
- [3] Garcia V, Stevens R, Gil L, *et al.* An integrative genomics approach for deciphering the complex interactions between ascorbate metabolism and fruit growth and composition in tomato [J]. *C R Bio*, 2009, 332: 1007.
- [4] Kato N, Esaka M. Changes in ascorbate oxidase gene expression and ascorbate levels in cell division and cell elongation in tobacco cell [J]. *Physiologia Plantarum*, 1999, 105: 321.
- [5] Smirnoff N. The function and metabolism of Ascorbic Acid in plants [J]. *Ann Bot*, 1996, 78 (6): 661.
- [6] Qin A, Shi Q, Yu X. Ascorbic acid contents in transgenic potato plants overexpressing two dehydroascorbate reductase genes [J]. *Mol Biol Rep*, 2011, 38: 1557.
- [7] Shao H B, Chu L Y, Lu Z H, *et al.* Primary antioxidant free radical scavenging and redox signaling pathways in higher plant cells [J]. *Inter J Biol Sci*, 2008, 4: 8.
- [8] Miranda V A, Dandimopoulos A E, Pedrajas J R, *et al.* Human mitochondrial thioredoxin reductase cDNA cloning, expressing and genomic Organization [J]. *Eur J Biochem*, 1999, 261: 405.
- [9] Tais S, Chikahiro M, Akiho Y. Mechanism of the reaction catalyzed by dehydroascorbate reductase from spinach chloroplasts [J]. *Eur J Biochem*, 2003, 270: 921.
- [10] 李晓晨, 李华鹏, 邓喜, 等. *BnGID1* 基因过量表达对甘蓝型油菜矮化突变体 NDF-1 植株株高的恢复 [J]. *应用与环境微生物学报*, 2010, 16: 192.
- [11] 田大鹏, 葛娟, 石峰, 等. 棉花 *GhDHAR2* 基因克隆、功能序列分析及原核表达 [J]. *生物技术通报*, 2012, 7: 65.
- [12] Apel K, Hirt H. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction [J]. *Annu Rev Plant Biol*, 2004, 55: 373.
- [13] Pastori G M, Kiddle G, Antoniw J, *et al.* Leaf vitamin C contents modulate plant defense transcripts and regulate genes that control development through hormone signaling [J]. *Plant Cell*, 2003, 15: 939.
- [14] Smirnoff N. Ascorbate biosynthesis and function in photoprotection [J]. *PhilTrans Royal Soc London B*, 2000, 355: 1455.
- [15] Arrigoni O, De Tullio M C. Ascorbic acid: much more than just an antioxidant [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2002, 1569: 1.
- [16] Chen Z, Gallie D R. Increasing tolerance to ozone by elevating foliar ascorbic acid confers greater protection against ozone than increasing avoidance [J]. *Plant Physiol*, 2005, 138: 1673.
- [17] Aravind P, Prasad M N. Modulation of cadmium-induced oxidative stress in *Ceratophyllum demersum* by zinc involves ascorbate - glutathione cycle and glutathione metabolism [J]. *Plant Physiol Biochem*, 2005, 43: 107.
- [18] Lu P, Sang W G, Ma K P. Differential responses of the activities of antioxidant enzymes to thermal stresses between two invasive *Eupatorium* species in China [J]. *J Integr Plant Biol*, 2008, 50: 393.
- [19] Saruhan N, Terzi R, Saglam A, Kadioglu A. The relationship between leaf rolling and ascorbate-glutathione cycle enzymes in apoplastic and symplastic areas of *Ctenanthe setosa* subjected to drought stress [J]. *Biol Res*, 2009, 42: 315.
- [20] Zhu Z, Wei G, Li J. Silicon alleviates salt stress and increases antioxidant enzymes activity in leaves of salt stressed cucumber (*Cucumis sativus* L) [J]. *Plant Sci*, 2004, 167: 527.
- [21] Gallie D R. The role of L-ascorbic acid recycling in responding to environmental stress and in promoting plant growth [J]. *J Exp Bot*, 2013, 64: 433.