

NaCl 胁迫下紫花苜蓿幼苗抗氧化酶活性的研究

龙明秀¹, 许岳飞¹, 何学青¹, 廖允成^{2*}

(1. 西北农林科技大学动物科技学院, 陕西 杨凌 712100;

2. 西北农林科技大学农学院, 陕西 杨凌 712100)

摘要:以紫花苜蓿品种金皇后(*Medicago sativa* L. 'Golden Empress')为试验材料,用不同浓度 NaCl(0,40,80,120 和 160 mmol · L⁻¹)对其幼苗进行胁迫处理,分别对叶片和根部的超氧阴离子自由基(O₂⁻)、丙二醛(MDA)、过氧化物酶(POD)、超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)、抗坏血酸(Vc)和总抗氧化能力(T-AOC)等指标进行测定,旨在揭示紫花苜蓿幼苗地上、地下部分对盐胁迫的反应及抗氧化防御机制,为苜蓿耐盐性评价及新品种选育提供理论依据。结果表明:随着 NaCl 盐浓度增加,苜蓿根中 O₂⁻ 和 Vc 先增加后减少,MDA 含量和 POD 活性增加, SOD, CAT 和 T-AOC 活性减少;苜蓿叶片中 O₂⁻ 先增加后减少,MDA, Vc 含量和 SOD 活性增加,POD, CAT 和 T-AOC 活性减少。综合表明,相对于地上部分来说,盐对苜蓿幼苗根系的伤害更大。

关键词:紫花苜蓿;盐胁迫;抗氧化作用;调节机制

中图分类号:Q945.78

文献标识码:A

文章编号:1007-0435(2012)01-0083-05

Antioxidant Enzymes Activities of *Medicago sativa* L. Seedling under Salt Stress

LONG Ming-xiu¹, XU Yue-fei¹, HE Xue-qing¹, LIAO Yun-cheng^{2*}

(1. College of Animal Science and Technology, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi Province 712100, China;

2. College of Agronomy, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi Province 712100, China)

Abstract: To explore the responses of alfalfa (*Medicago sativa* L. 'Golden Empress') to salt stress, provide the scientific evaluation of alfalfa salt tolerance, antioxidant defense mechanisms of alfalfa seedling were treated. The antioxidant enzymes activities (Superoxide, MDA, POD, SOD, CAT, Vc and T-AOC) in alfalfa leaves and roots under different NaCl stress (0, 40, 80, 120 and 160 mmol · L⁻¹) were measured. Results showed that both superoxide and Vc levels initially increased then decreased while MDA and POD increased but SOD, CAT and T-AOC decreased in alfalfa root. However, superoxide levels initially increased then decreased, MDA, Vc and SOD increased, POD, CAT and T-AOC decreased in leaves of alfalfa under different NaCl stress. Comprehensive analysis showed that the roots of alfalfa seedlings experienced more serious salt damage compared to aboveground parts.

Key words: Alfalfa; Salt stress; Antioxidant; Regulation mechanism

紫花苜蓿(*Medicago sativa* L.)以“牧草之王”著称,不仅产量高,且富含蛋白质,是“三聚氰胺事件”后我国畜牧业特别是奶业发展的重要饲料蛋白来源。优质牧草品种的抗逆性是决定一个品种在某个地方能否成功生存和发挥优势生产潜力的重要评价指标^[1],一般包括品种的抗旱、抗寒、耐盐碱、抗病虫害等能力。王榕楷等^[3]认为,植物的耐盐性随个体的发育阶段而变化,在萌发及幼苗期耐盐性最差,其次是生殖期,而其他发育阶段对盐胁迫相对不敏

感^[4~6]。可见,研究盐胁迫对紫花苜蓿萌发早期幼苗生长的影响,以及其幼苗期的抗盐性,为建植优良的人工草地提供重要指导作用。

本研究在紫花苜蓿幼苗期进行不同浓度 NaCl 处理,分别测定盐胁迫下地上部分和地下部分的各项生理生化指标,旨在揭示紫花苜蓿幼苗地上和地下各器官生理指标对盐胁迫的反应及抗氧化防御机制,为更好地开发利用苜蓿资源提供科学依据,同时为苜蓿耐盐性评价及新品种选育提供理论依据。

收稿日期:2011-08-09;修回日期:2011-11-11

基金项目:国家科技支撑计划项目(2011BAD17B05);国家公益性行业(农业)科技项目(200903060);西北农林科技大学唐仲英育种基金(A212020901);陕西省农业攻关项目(2011K01-06)资助

作者简介:龙明秀(1971-),女,陕西宁强人,副教授,博士研究生,主要从事牧草栽培生理研究, E-mail: longmingxiu@nwsuaf.edu.cn; * 通信作者 Author for correspondence, E-mail: yunchengliao@163.com

1 材料与方 法

1.1 试验材料及处理

供试材料为紫花苜蓿品种金皇后 (*Medicago sativa* L. 'Golden Empress'), 引自美国, 初始发芽率为 90%, 由陕西杨凌金道种子公司提供。苜蓿种子用 98% 浓硫酸处理 1 h, 5% NaClO 溶液消毒 5 min, 去离子水清洗 5 次后, 选取 100 粒籽粒饱满的种子置于铺有双层滤纸的直径 9 cm 培养皿中, 在人工气候箱内 (20 ± 2) °C 条件下暗培养 3 d, 期间根据种子吸胀情况适当补加蒸馏水。

在营养钵(底内径 7 cm, 高 9 cm)内装满细沙, 浇透水后将发芽好的幼苗用镊子小心取出栽于营养钵中(3 株/盆), 隔天浇一次 1/4 Hoagland 营养液, 培养 50 d 后将其分为 5 组, 分别用 0(CK), 40, 80, 120 和 160 mmol · L⁻¹ 的 NaCl(分析纯)溶液进行处理, 每处理重复 5 次。依据前人研究方法, 分别于 NaCl 处理 10 h 后小心取出幼苗^[7], 冲洗残留泥沙, 分离叶片和根, 准确称取 0.5 g, 存放于 -80 °C 冰箱中保存备用。

1.2 苜蓿叶片和根测定指标及方法

膜质过氧化产物丙二醛(MDA)采用硫代巴比妥酸法测定, 称取剪碎的植物组织 0.5 g, 加入 2 mL 10% 三氯乙酸(TCA)和少量石英砂, 研磨至匀浆, 再加 8 mL TCA 进一步研磨, 匀浆离心(4000 × g) 10 min, 上清液为样品提取液。吸取离心的上清液 2 mL(对照加 2 mL 蒸馏水), 加入 2 mL 0.5% 硫代巴比妥酸(TBA)溶液, 混匀物于水浴锅的沸水浴中反应 30 min, 迅速冷却。在 4 °C, 3000 × g 再离心 10 min。然后, 取上清液测定 532 nm, 600 nm 和 450 nm 波长下的吸光值^[8]。

超氧阴离子自由基(O₂·⁻)产生速率采用 Elstner 等^[9]的方法测定, 取 1.0 g 植物叶片置入冰浴的研钵中, 加入 50 mmol · L⁻¹ 磷酸缓冲液(pH7.8)5 mL, 研磨成匀浆, 在 1000 × g, 4 °C 下离心 10 min, 取上清液再以 15000 × g, 4 °C 下离心 20 min, 第 2 次上清液即为样品提取液。取提取液 0.5 mL, 然后加入 50 mmol · L⁻¹ 磷酸缓冲液 0.5 mL, 1 mmol · L⁻¹ 盐酸羟胺 1 mL, 混匀, 置于 25 °C 下 1 h 后, 各管再加入 17 mmol · L⁻¹ 对氨基苯磺酸 1 mL 和 7 mmol · L⁻¹ α-萘胺 1 mL, 混匀, 置于 25 °C 显色 20 min, 在 530 nm

波长处测定吸光度值。

取 1.0 g 植物组织, 在 4 °C 用 5 mL 预冷的磷酸缓冲液(50 mmol · L⁻¹, pH7.8, 含 1 mmol · L⁻¹ EDTA, 0.1% 苯 PMSF, 1% PVP)在研钵中研磨至匀浆, 匀浆液于 4 °C, 15000 × g 离心 20 min。取上清液用于测定抗氧化酶粗提液, 样品的蛋白质按照 Bradford^[10]的方法测定, 以牛血清蛋白(BSA)为标准蛋白。总抗氧化能力(T-AOC)测定采用 FRAP 法测定^[11]; 抗坏血酸(Vc)采用二氯靛酚法测定^[12]; 过氧化物酶(POD)活性采用愈创木酚法测定^[13]; 超氧化物歧化酶(SOD)活性采用氮蓝四唑法测定^[14]; 过氧化氢酶(CAT)活性采用紫外分光光度法测定^[15]。

1.3 数据分析

本试验的测定指标值均以 5 次重复的平均值 ± SE 表示; 数据使用 SPSS 15.0 统计软件处理, 采用 one-way ANOVA 进行单因素方差分析, 应用 Duncan 法对平均值进行多重比较, 用 Sigmaplot 10.0 软件作图。

2 结果与分析

2.1 不同浓度 NaCl 胁迫下苜蓿植株体内 O₂·⁻ 和 MDA 含量的变化

超氧阴离子属于活性氧的一种, 有强氧化作用和细胞毒害作用, 植物体内大量聚集会对植物生长发育产生伤害作用, 严重时会导致植物死亡。由图 1 可知, 苜蓿叶片中的 O₂·⁻ 水平随着盐胁迫浓度的增加呈现先增加后减少的变化, 80, 120 和 160 mmol · L⁻¹ 处理与对照相比均达到显著水平 ($P < 0.05$), 其中 80 mmol · L⁻¹ 盐浓度处理下较对照高, 40 mmol · L⁻¹ 盐浓度与对照差异不显著 ($P > 0.05$)。根和叶中 O₂·⁻ 变化趋势相似, 与对照相比均达显著水平 ($P < 0.05$), 但叶片中含量明显低于根中。

植物器官衰老或在逆境下遭受伤害, 往往发生膜脂过氧化作用, MDA 是膜脂过氧化的最终分解产物, 其含量可以反映植物遭受逆境伤害的程度。盐胁迫下, 苜蓿叶片和根中的 MDA 含量随着盐浓度的增加而增加, 40, 80, 120 和 160 mmol · L⁻¹ 处理下叶中含量分别比对照增加 13.32%, 30.43%, 33.42% 和 42.39% ($P < 0.05$)。但叶片中 MDA 含量较低, 而根中水平较高, 与超氧阴离子变化趋势一致。

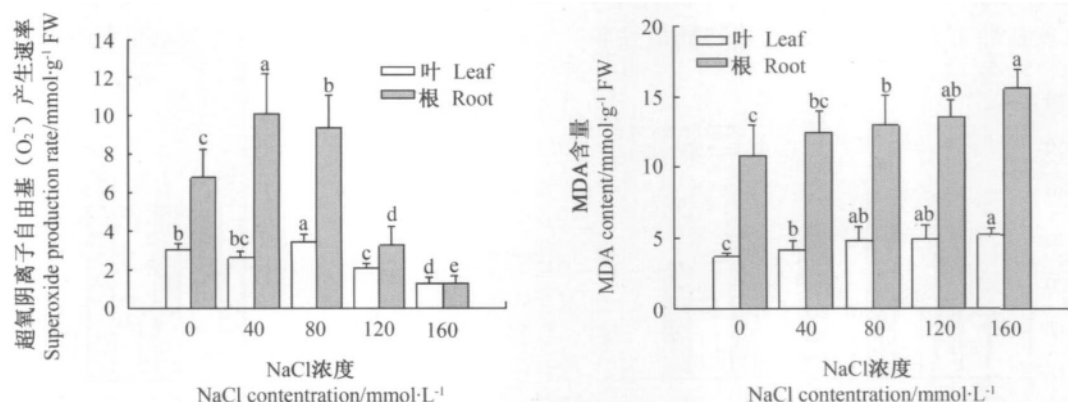


图 1 不同盐浓度下苜蓿叶片和根系中超氧阴离子产生速率和 MDA 含量变化

Fig. 1 Superoxide production rate and MDA content of alfalfa leaves and roots under salt stress treatments

2.2 不同浓度 NaCl 胁迫下苜蓿植株体内 POD, CAT 和 SOD 活性的变化

由图 2 可知, 0~160 mmol·L⁻¹ 盐胁迫下, 苜蓿叶片中 SOD 活性随着盐浓度的增加而增加, 与对照相比差异显著 ($P < 0.05$), 160 mmol·L⁻¹ 处理下比对照增加了 27.0%。而根中的 SOD 活性随着盐浓度增加反而减少, 与对照相比差异达到显著水平 ($P < 0.05$), 盐浓度达到 160 mmol·L⁻¹ 时, 根中 SOD 的活性比对照下降了 38.94%, 且叶片中 SOD 活性明显低于根系中。

随着盐浓度的增加, 苜蓿幼苗叶片中的 CAT 活性变化, 除了 160 mmol·L⁻¹ 处理与对照相比达显著水平外 ($P < 0.05$), 其余均不显著。而根中的 CAT 活性随着盐浓度增加反而减少, 与 SOD 下降趋势相同, 表明盐对苜蓿幼苗根系的伤害较大。同样, 苜蓿地上部叶片中的 CAT 活性低于地下根中的活性 (图 2)。

过氧化物酶 (POD) 的主要作用是与 SOD, CAT 和 APX 协同清除细胞中产生的活性氧, 提高植物的抗性。由图 2 可知, 盐胁迫下苜蓿叶片中的 POD 活性随着盐浓度的增加而增加, 40, 80, 120 和 160 mmol·L⁻¹ 处理分别比对照增加 33.34%, 53.8%, 77.4% 和 78.12% ($P < 0.05$)。与此不同的是, 盐胁迫下苜蓿根中 POD 的活性变化不显著, 除 160 mmol·L⁻¹ 处理与对照相比活性降低 32.94% 外 ($P < 0.05$), 其余 3 个处理与对照相比差异不显著。

2.3 不同浓度 NaCl 胁迫下苜蓿植株体内 Vc 和 T-AOC 活性的变化

本试验结果表明 (图 3), 苜蓿幼苗叶片中的 Vc

含量随着盐浓度的增加而增加, 其中处理 120 和 160 mmol·L⁻¹ 与对照相比分别增加 69.39% 和 86.86% ($P < 0.05$), 而 40 和 80 mmol·L⁻¹ 盐浓度处理与对照相比差异不显著; 4 种盐胁迫下, 苜蓿幼苗根中的 Vc 含量随着盐浓度的增加变化规律不尽相同, 但与对照相比变化均达到显著水平 ($P < 0.05$); 80 mmol·L⁻¹ 处理下 Vc 含量比对照增加 193.08%, 120 和 160 mmol·L⁻¹ 处理下反而减少。

总抗氧化能力 (total antioxidant capacity, T-AOC) 是有机体内所有抗氧化物质抗氧化能力的总和, 植物在正常代谢过程中不同的抗氧化体系之间相互起到协同作用、代谢补偿作用以及依赖作用。盐胁迫下, 叶片中的 T-AOC 活性随着盐浓度的增加而减少, 处理 120 和 160 mmol·L⁻¹ 分别比对照减少 19.83% 和 42.24% ($P < 0.05$)。根中的 T-AOC 活性随着盐浓度的增加也呈显著下降趋势 ($P < 0.05$) (图 3)。

3 讨论与结论

钠盐是影响植物生长和产量的主要环境因子之一, 在盐胁迫下, 植物的生长以及生理生化反应, 诸如光合作用、蛋白合成及降解、能量和脂类代谢等都会受到抑制。活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 包括过氧化氢 (H₂O₂), 超氧阴离子 (O₂⁻), 单线氧 (O₂¹) 等, 这些活性氧不能被及时清除, 就会破坏细胞的完整性, 造成细胞内大量 MDA 积累, MDA 是膜脂氧化的最终分解产物, 其含量可以反映植物遭受逆境伤害的程度^[16]。本研究发现, 苜蓿叶片中的超氧阴离子水平随着盐浓度的增加而减少, 而且

MDA 积累随着盐浓度增加而不断增加,可能原因是当处于低浓度盐胁迫时,苜蓿的抗氧化酶活性较

强,当盐浓度超过 $40 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时植物抗性减弱,MDA 含量上升,这与前人研究结果相吻合^[7]。

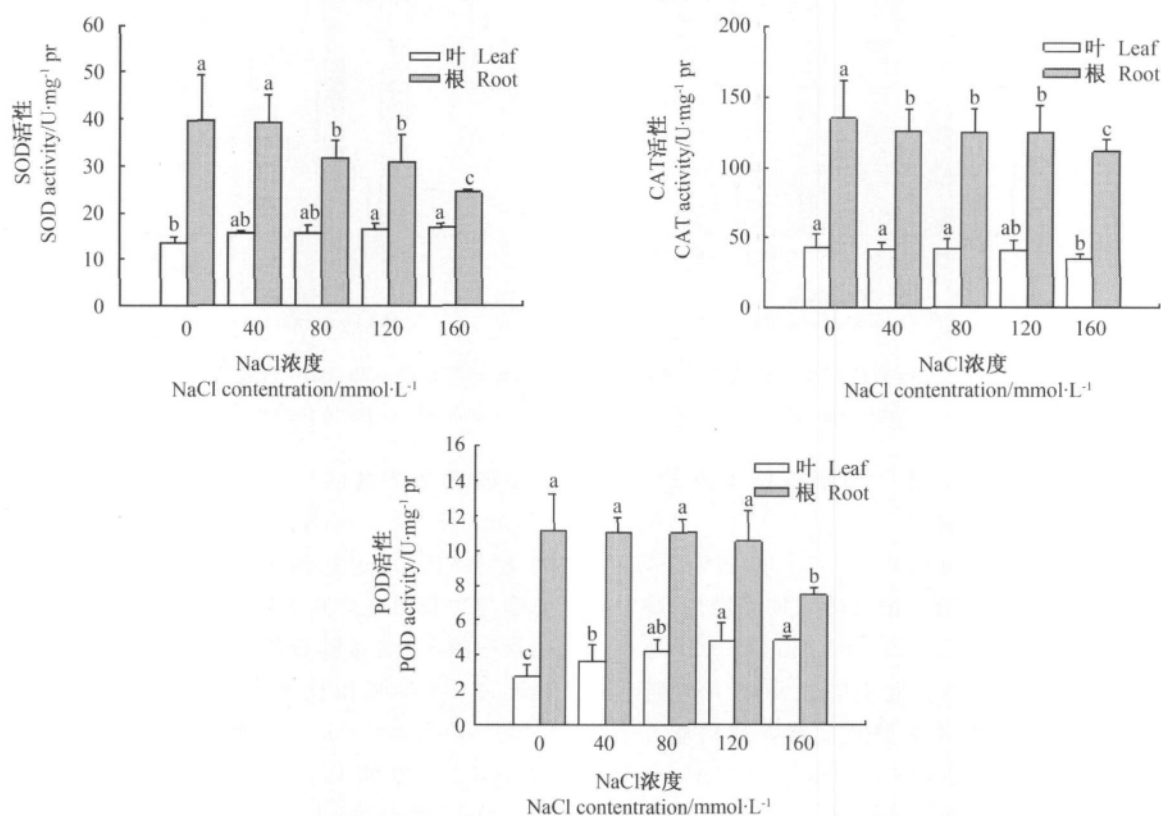


图2 不同盐浓度下苜蓿叶片和根系中 SOD, CAT 和 POD 活性的变化

Fig. 2 SOD, CAT and POD activities of alfalfa leaves and roots under salt stress

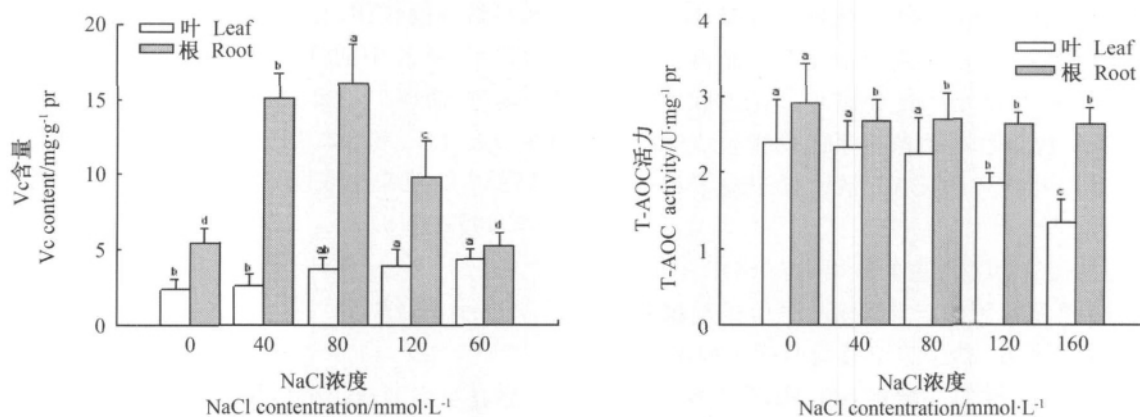


图3 不同盐浓度下苜蓿 Vc 含量和总抗氧化能力的变化

Fig. 3 Changes of Vc and T-AOC in alfalfa leaves and roots under salt stress

植物在长期进化过程中,逆境适应机制比较完善,主要包括植物体内 POD, SOD 和 CAT 等抗氧化酶类和抗氧化物质抗坏血酸、谷胱甘肽等物质。而不同植物对致死盐浓度的耐受水平和生长降低率不同。在同一浓度 NaCl 处理下,盐不敏感谷子 (*Setaria italica*) 幼苗中 SOD 酶的活性随盐浓度的

升高而升高,而盐敏感谷子幼苗中总 SOD 的活性逐渐下降^[17]。当植物生长的环境盐分超过植物所能忍受的含量时,盐可能对植物生长和发育产生抑制,甚至毒害或死亡。盐胁迫常导致植物体内大量氧自由基积累,导致膜结构完整性被破坏、叶绿素降解、蛋白变性甚至细胞死亡^[18,19]。植物对盐胁迫的抗

逆表现为激活抗氧化酶的活性,及时清除活性氧,保护细胞膜的完整性^[20,21]。

SOD 是一种诱导酶,受底物的诱导,盐胁迫促进 $O_2^{\cdot-}$ 产生,诱导 SOD 活性显著升高。盐胁迫后,紫花苜蓿抗氧化酶 POD, SOD 和 CAT 等清除和分解活性氧的酶活性显著增加,提高清除活性氧防御系统的防御能力,从而缓解了盐胁迫对紫花苜蓿的氧化伤害作用。本研究发现,盐胁迫下,苜蓿幼苗叶片中 SOD 活性随着盐浓度增加而增加,而根中的 SOD 活性则逐渐降低。可能的原因是,叶片当中猝灭活性氧的能力强,而根中受盐胁迫较重,自由基产生速率超过系统清除能力,细胞受到伤害较重,引起根中 SOD 活性下降^[22]。植物中 CAT 是清除 H_2O_2 的关键酶,能催化 H_2O_2 转变为 H_2O 。本试验结果表明,叶片中 CAT 活性伴随盐浓度增加而降低,可能原因是,虽然 CAT 是一种清除过氧化氢的酶,但是对过氧化氢的亲合力较低,且容易失活或分解^[23,24]。POD 在植物体内对清除活性氧有重要的作用。紫花苜蓿受到逆境胁迫后,叶片当中 POD 活性增加,可清除活性氧,保护细胞的完整性,减少细胞损伤,也有一些研究认为 POD 活性与植物抗盐性无关^[25]。

总之,盐胁迫下,紫花苜蓿叶片和根中超氧阴离子水平和膜质过氧化产物 MDA 增加,抗氧化酶 POD, SOD 和 CAT 活性和抗氧化物质 Vc 的含量也随之增加。另外,紫花苜蓿叶片总抗氧化能力在低浓度盐胁迫下变化不显著,根中的抗氧化能力随着盐浓度的升高而下降。

参考文献

- [1] 吕林有,何跃,赵立仁. 不同苜蓿品种生产性能研究[J]. 草地学报, 2010, 18(3): 365-371
- [2] 赵丽英,邓西平,山仑. 活性氧清除系统对于干旱胁迫的响应机制[J]. 西北植物学报, 2005, 25(2): 413-418
- [3] 王榕楷,丁小球. 三种草坪草的耐寒性及其与超氧化物歧化酶作用关系初步研究[J]. 中国草地, 2001, 23(1): 46-50
- [4] 龚明,刘友良,丁念诚. 小麦不同生育期的耐盐性研究[J]. 西北植物学报, 1994, 14(1): 1-7
- [5] Smith T, Denson M, Heyward L, *et al.* Salinity effects on early life stages of southern flounder *Paralichthys lethostigma* [J]. Journal of the World Aquaculture Society, 1999, 30(2): 236-244
- [6] 王文斌,金润熙,邓西平,等. 苜蓿幼苗芽、根器官对盐胁迫的生理生化响应[J]. 西北农林科技大学学报, 2009, 37(5): 217-223
- [7] 孙伟泽,韩博,胡晓宁,等. 不同浓度盐胁迫下苜蓿丙二醛含量变化[J]. 安徽农业科学, 2009, 37(5): 1905-1906
- [8] Buege J A, Aust S D. Microsomal lipid peroxidation [J]. Methods in Enzymology, 1978, 52: 302-310
- [9] Elstner E F, Heupel A. Inhibition of nitrite formation from hydroxylammoniumchloride; a simple assay for superoxide dismutase [J]. Analytical Biochemistry, 1976, 70: 616-620
- [10] Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding [J]. Analytical Biochemistry, 1976, 72: 248-254
- [11] Wang C B, Yao R Y, Liu Z T, *et al.* Protective effect of polypeptide from *Chlamys farreri* on hairless mice damaged by ultraviolet [J]. Acta Pharmacologica Sinica, 2002, 23(9): 813-818
- [12] Huberty A F, Denno R F. Plant water stress and its consequences for herbivorous insects; a new synthesis [J]. Ecology, 2004, 85: 1383-1398
- [13] Hammerschmidt R, Nuckles E M, Kuc J. Association of enhanced peroxidase activity with induced systemic resistance of cucumber to *Colletotrichum lagenarium* [J]. Physiological and Molecular Plant Pathology, 1982, 20: 73-82
- [14] Beauchamp C, Fridovich I. Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels [J]. Analytical Biochemistry, 1971, 44: 276-287
- [15] Aebi H. Catalase in vitro [J]. Methods in Enzymology, 1984, 105: 121-126
- [16] 谭伊文,许岳飞,周禾. 盐胁迫下一氧化氮对高羊茅种子萌发和幼苗生长的影响[J]. 草地学报, 2010, 18(3): 394-398
- [17] Sreenivasulu N, Grimm B, Wobus U, *et al.* Differential response of antioxidant compounds to salinity stress in salt tolerant and salt sensitive seedlings of foxtail millet [J]. Physiologia Plantarum, 2000, 109: 435-442
- [18] Shi Q H, Ding F, Wang X F, *et al.* Exogenous nitric oxide protect cucumber roots against oxidative stress induced by salt stress [J]. Plant Physiology and Biochemistry, 2007, 45: 542-550
- [19] Watanabe K, Tanaka T, Kuramochi Y. Improving salt tolerance of cotton seedlings with 5-aminolevulinic acid [J]. Plant Growth Regulation, 2000, 32: 99-103
- [20] Uchida A, Jagendorf A T, Hibino T, *et al.* Effects of hydrogen peroxide and nitric oxide on both salt and heat stress tolerance in rice [J]. Plant Science, 2002, 163: 515-523
- [21] Zhao M G, Tian Q Y, Zhang W H. Nitric oxide synthase-dependent nitric oxide production is associated with salt tolerance in *Arabidopsis* [J]. Plant Physiology, 2007, 144: 206-217
- [22] Neto A D, Prieto J T, Filho-Eneas J, *et al.* Effect of salt stress on antioxidative enzymes and lipid peroxidation in leaves and roots of salt-tolerant and salt-sensitive maize genotypes [J]. Environmental and Experimental Botany, 2006, 56: 87-94
- [23] Lee D H, Kim Y S, Lee C B. The inductive response of the antioxidant enzymes by salt stress in the rice (*Oryza sativa* L.) [J]. Journal Plant Physiology, 2001, 158: 737-745
- [24] Parida A K, Das A B, Mohanty W, *et al.* Response of antioxidant systems to NaCl stress in the mangrove, *Bruguiera parviflora*: differential regulations of isoforms of some antioxidative enzymes [J]. Plant Growth Regulation, 2004, 42: 213-226
- [25] Amor N B, Jimenez, Megdiche W, *et al.* Response of antioxidant systems to NaCl stress in the halophyte *Cakile maritima* [J]. Physiologia Plantarum, 2006, 126: 446-457

(责任编辑 李美娟)