

苜蓿幼苗芽、根器官对盐胁迫的生理生化响应

王文斌^{1a,1b,2}, 金润熙², 邓西平^{1a,1b}, 郭尚洙², 王征宏^{1a,1b}, 赵紫平^{1b}

(1 西北农林科技大学 a. 生命科学院, b. 黄土高原土壤侵蚀与旱地农业国家重点实验室, 陕西 杨凌 712100;

2 韩国生命工学研究院 环境生物技术研究中心, 韩国 大田 305-806)

[摘要] **【目的】**探讨盐胁迫对苜蓿幼苗不同器官生长及抗氧化酶系统的影响,为苜蓿植被恢复技术的研发提供理论参考。**【方法】**以新牧一号(盐忍耐品种)和北极星(盐敏感品种)2个苜蓿品种为材料,以 0 mmol/L NaCl 处理为对照,用 200 mmol/L NaCl 胁迫处理,测定萌发 7 d 苜蓿幼苗芽、根生长及其 H_2O_2 、丙二醛(MDA)含量,相对质膜透性、抗氧化保护酶活性及其同功酶的变化。**【结果】**200 mmol/L NaCl 胁迫抑制了苜蓿幼苗的生长,并导致芽、根 H_2O_2 、MDA 含量及相对质膜透性升高,但新牧一号芽、根器官均表现出比北极星较低程度的生长抑制或质膜损伤。盐胁迫后超氧化物歧化酶(SOD)、抗坏血酸过氧化物酶(APX)、过氧化氢酶(CAT)、过氧化物酶(POD)的活性均明显增加。CAT 和 POD 对活性氧的清除具有器官差异性,CAT 活性在芽中较强,POD 则与之相反。SOD-Ⅱ、APX-I、POD-Ⅲ及 POD-Ⅳ为芽、根中盐胁迫敏感的同功酶谱带。**【结论】**苜蓿盐忍耐品种通过更强的抗氧化保护能力,降低了盐胁迫对其幼苗的损伤。

[关键词] 紫花苜蓿;盐胁迫;植被恢复;活性氧;抗氧化酶;同功酶

[中图分类号] Q945.17;S551⁺.7

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2009)05-0217-07

Physiological and biological responses of alfalfa shoots and roots to salt stress

WANG Wen-bin^{1a,1b,2}, KIM Yun-hee², DENG Xi-ping^{1a,1b}, KWAK Sang-soo²,

WANG Zheng-hong^{1a,1b}, ZHAO Zi-ping^{1b}

(1 a. College of Life Science, b. State Key Laboratory of Soil Erosion and Dryland Farming on Loess Plateau, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China; 2 Environmental Biotechnology Research Center, Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology, Daejeon, 305-806, Korea)

Abstract: **【Objective】** The study was carried out to reveal the changes of growth and antioxidant system in different organs of alfalfa seedling under salt stress and to provide some support for the study on alfalfa vegetation resumption. **【Method】** Two alfalfa cultivars, Xinmu No. 1 (tolerant cultivar) and Northstar (sensitive cultivar) were used as the plant materials, and 0, 200 mmol/L NaCl was used as control and stress treatment respectively. The study analyzed the seedling growth, H_2O_2 contents, MDA contents, membrane damage, activity and isozymes of antioxidant enzymes of alfalfa shoots and roots treated 7 days by 200 mmol/L NaCl. **【Result】** NaCl stress inhibited the growth of alfalfa shoots and roots, and resulted in the increase of H_2O_2 , MDA contents and membrane damage. Lower degree of growth restraint effect and membrane damage of shoot and root organs were exhibited in Xinmu No. 1 than Northstar. Under salt stress, antioxidant enzyme activity including superoxide dismutase (SOD), ascorbate peroxidase (APX), catalase (CAT) and peroxidase (POD) significantly increased. The capability of scavenging reactive oxygen

* [收稿日期] 2009-02-11

[基金项目] 国家自然科学基金项目(50779063);国家重点基础研究(973)发展计划项目(2009CB118604);西北农林科技大学拔尖人才支持计划项目

[作者简介] 王文斌(1975—),男,山西襄汾人,在读博士,主要从事水分生理与抗逆分子生物学研究。E-mail: sxndwwb@126.com

[通信作者] 邓西平(1959—),男,陕西西安人,研究员,博士生导师,主要从事植物生理生态研究。E-mail: dengxp@ms.iswc.ac.cn

species (ROS) took on organ difference in CAT and POD. The CAT activity in shoot was higher than that in root, but reversed in POD. SOD-Ⅱ, APX-Ⅰ, POD-Ⅲ and POD-Ⅳ were identified as sensitive isozyme bands to salt stress. 【Conclusion】 Tolerant alfalfa cultivar can reduce the damage by enhanced antioxidant protective ability under salt stress.

Key words: alfalfa (*Medicago sativa* L.); salt stress; vegetation restoration; ROS; antioxidant enzyme; isozyme

苜蓿是世界上种植面积最大、应用最为广泛的豆科牧草, 不仅由于其富含蛋白质、多种维生素和矿物质, 成为多种家畜喜食的优质饲草饲料, 而且由于其发达的根系, 还具有防风固沙及水土保持等重要的生态功能^[1-2]。此外, 苜蓿还具有中强度抗盐特性, 叶片具有排盐能力, 是改良盐碱地的理想材料。目前, 苜蓿地面临不同程度的退化及盐碱化, 提高苜蓿耐盐性成为苜蓿植被恢复的关键问题之一。

随着全球工业污染加剧, 灌溉农业的发展及滥用化肥等, 土壤次生盐碱化有不断加剧的趋势。全世界盐渍土面积为 $9.54 \times 10^8 \text{ hm}^2$, 我国各类盐渍土总面积约 $0.99 \times 10^8 \text{ hm}^2$ ^[3], 主要分布在西北、华北、东北及沿海地区, 盐胁迫对农业、森林和牧草等生产活动造成了很大影响。研究盐胁迫下植物的生理生化变化, 对抗盐植物的筛选和培育具有重要理论意义。盐胁迫条件下, 植物细胞由于代谢受阻产生大量的活性氧 (Reactive oxygen species, ROS), 如 O_2^- 、 H_2O_2 、 $\cdot\text{OH}$ 等, 当活性氧产生与清除之间的动态平衡被破坏时, 引起细胞膜脂过氧化作用加强, 导致膜系统损伤及细胞伤害。植物在长期进化中, 形成了包括超氧化物歧化酶 (SOD)、抗坏血酸过氧化物酶 (APX)、过氧化氢酶 (CAT)、过氧化物酶 (POD)、谷胱甘肽还原酶 (GR) 等的抗氧化保护酶系统, 及抗坏血酸、谷胱甘肽等小分子非酶类活性氧清除物质, 以适应各种逆境胁迫对植物造成的氧化损伤^[4-5]。作为基因的标志, 同功酶携带着机体的遗传信息, 抗氧化同功酶数目的增减及活性强弱, 一定程度上可以反映植物的抗盐性, 同功酶的差异表达也是植物细胞代谢的主要调控机制^[6-7]。

种子萌发和幼苗生长阶段, 是一个植物种群能否在盐渍环境下定植的关键时期^[8-9], 研究盐胁迫对植物萌发早期幼苗生长的影响, 具有重要的生物学和生态学意义。近年来, 有关盐胁迫条件对植物抗氧化保护酶系统的研究较多^[6, 10-11], 但是关于苜蓿萌发早期幼苗不同器官中, 抗氧化保护酶系统的协同响应机制及其同功酶变化的研究报道较少。本试验以 2 种对盐胁迫忍耐和敏感的苜蓿为材料, 研究 200 mmol/L NaCl 对苜蓿萌发早期幼苗芽、根器官

的生长, 质膜损伤及抗氧化保护酶系统 (SOD、APX、CAT、POD) 及其同功酶的影响, 旨在明确苜蓿不同器官耐盐生长生理及抗氧化防御机制, 从蛋白质水平上探讨苜蓿盐胁迫忍耐性的机理, 旨在为苜蓿植被恢复技术的研发提供理论参考。

1 材料与方法

1.1 材料培养及处理

供试材料为盐忍耐品种新牧一号 (Xinmu No. 1) 和盐敏感品种北极星 (Northstar)。

选取籽粒饱满的种子在流水下冲洗 30 min, 转入无菌离心管, 5 g/L NaClO 消毒 5 min, 无菌水冲洗 7~8 次, 4 ℃ 催芽 3 d 后, 接种于 1/2 MS 培养基 (4 405 mg/L MS 盐及维生素, Sigma 公司; 7 g/L 植物琼脂, pH 5.7), 其中添加 200 mmol/L NaCl 作为盐胁迫处理, 并以添加 0 mmol/L NaCl 作为对照, (25±2) ℃ 暗培养 3 d, 再于 (25±2) ℃、光强 350 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ 、16 h 光周期条件下培养 4 d, 相对湿度 65%, 取生长 7 d 的幼苗进行相关指标测定, 每处理重复 3 次。

1.2 测定指标及方法

1.2.1 芽、根长及其鲜质量 小心取出幼苗, 用重蒸水洗去残留培养基, 再用两硬质透明塑料片轻夹住幼苗至平展, 与带刻度标准直尺一起拍照。芽、根长分别取 120 个幼苗, 用 Image J 软件分析^[12]。拍照结束后, 迅速将幼苗切分为芽、根, 用于测定鲜质量, 之后液氮速冻, -70 ℃ 超低温保存, 用于 H_2O_2 、MDA 及抗氧化酶等相关指标的分析。

1.2.2 H_2O_2 含量 参照修改的 Bindschedler 等^[13]的方法测定, 称取约 40 mg 样品于 1.5 mL 离心管, 在液氮中充分研磨, 加入 200 μL 50 mmol/L 磷酸钾缓冲液 (pH 7.0), 4 ℃、13 000 r/min 离心 30 min, 取 100 μL 上清液立即与 900 μL 125 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 二甲酚橙反应液 (含 100 mmol/L 山梨醇、250 $\mu\text{mol}/\text{L}$ FeSO_4 、250 $\mu\text{mol}/\text{L}$ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、25 mmol/L H_2SO_4) 混合, 室温孵育 30 min, 以加 100 μL 50 mmol/L 磷酸钾缓冲液的二甲酚橙反应液为空白对照, 测定 560 nm 处的吸光度值, H_2O_2 含量

用 $\mu\text{mol/g}$ 表示。

1.2.3 丙二醛(MDA)含量 MDA 作为膜脂过氧化最重要的产物之一,间接反应膜系统受损程度及植物的抗逆性。MDA 含量测定参照修改的硫代巴比妥酸(TBA)方法^[14-15]。称取约 40 mg 样品于 1.5 mL 离心管,在液氮中充分研磨,加入 100 μL 三氯乙酸(TCA)提取缓冲液,4 $^{\circ}\text{C}$ 、12 000 r/min 离心 5 min,取 67 μL 上清液与 933 μL 5 g/L TBA 反应液(用体积分数 20% TCA 配制)混合,95 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 30 min 后,冰浴冷却,4 $^{\circ}\text{C}$ 、12 000 r/min 离心 15 min,上清液转移到新的 1.5 mL 离心管,以 1 mL TBA 反应液为空白对照,测定 532,600 和 450 nm 处的吸光度值,MDA 含量用 mmol/g 表示。

1.2.4 相对质膜透性 采用电导仪法测定^[16]。取适量材料于 15 mL 试管中,加入 10 mL 去离子水,用 455C 型电导仪(Isteck Co., Seoul, Korea)测定电导值,然后于 121 $^{\circ}\text{C}$ 高压灭菌 15 min,使叶片释放所有的电解质,再次测定外渗液电导值,计算相对质膜透性。相对质膜透性/%=叶片杀死前外渗液电导值/叶片杀死后外渗液电导值 $\times 100\%$ 。

1.2.5 抗氧化酶活性 称取约 0.1 g 样品于 1.5 mL 离心管,在液氮中充分研磨,然后用 200 μL 50 mmol/L 磷酸钾缓冲液悬浮,4 $^{\circ}\text{C}$ 、13 000 r/min 离心 15 min,上清液转移至新离心管,置于冰浴,立即测定抗氧化酶活性。可溶性蛋白含量用 Bradford 方法^[17]测定。

(1)SOD 活性。采用 McCord 等^[18]的细胞色素 c 还原法,以抑制细胞色素 c 在 2.5 min 还原 50% 的酶量为 1 个 SOD 活性单位。

(2)APX 活性。采用 Nakano 等^[19]的方法,以抗坏血酸为反应底物。取 20 μL 酶提取液,加入 850 μL 50 mmol/L HEPES 缓冲液(含 0.1 mmol/L EDTA, pH 7.0; 用于空白调零)及 50 μL 0.6 mmol/L 抗坏血酸和 100 μL 1.0 mmol/L H_2O_2 , 在 290 nm 处测定 1.5 min 内吸光度的降低值,定义每 min 氧化 1 μmol 抗坏血酸的酶量为 1 个 APX 活性单位。

(3)CAT 活性。采用 Aebi^[20]的紫外吸收法。取 20 μL 酶提取液,加入 650 μL 50 mmol/L 磷酸钾缓冲液(pH 7.0, 用于空白调零)及 330 μL H_2O_2 , 240 nm 处测定 1 min 内由 H_2O_2 消耗引起的吸光度的降低值,以每 mg 蛋白每 min 分解的 H_2O_2 量为 1 个 CAT 活性单位。

(4)POD 活性。采用愈创木酚法^[21-22]。取 20 μL

酶提取液,加入 400 μL 100 mmol/L 磷酸钾缓冲液(pH 6.0, 用于空白调零)、320 μL 50 g/L 愈创木酚、2.1 mL H_2O 、160 μL H_2O_2 开始计时,在 420 nm 处测定 20 s 内吸光度的增加值。定义在 20 s 内由愈创木酚形成 1 mg 红紫精为 1 个 POD 活性单位。

1.2.6 抗氧化酶同功酶的聚丙烯酰胺凝胶电泳酶液提取及可溶性蛋白含量分析同 1.2.5。

电泳采用垂直板聚丙烯酰胺凝胶电泳法。凝胶厚度 3 mm,面积 100 mm $\times$ 150 mm,分离胶浓度为 75 g/L,浓缩胶浓度 40 g/L。APX 电泳时,缓冲液中添加抗坏血酸使其含量为 0.8 g/L。上样量:SOD、APX 为 50 μg 蛋白/孔,POD 为 20 μg 蛋白/孔。0~4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下,先通 15 mA 电流,待溴酚兰条带至分离胶时,电流加倍(均指单板),电泳 2~3 h,电泳结束后用去离子水冲洗 3 次,进行染色、拍照。各抗氧化酶染色程序如下:

(1)SOD。参照 Beauchamp 等^[23]的方法,将凝胶浸入 50 mL 染色液(含 250 $\mu\text{mol/L}$ NBT、25 $\mu\text{mol/L}$ 核黄素、100 μL TEMED 的 50 mmol/L 磷酸钾缓冲液, pH 7.8)中,60 r/min 摇床暗孵育 30 min 后,光照直至显出清晰无色条带。

(2)APX。参照 Mittler 等^[24]的方法,凝胶先分 3 次浸入 150 mL 50 mmol/L 磷酸缓冲液(含 2 mmol/L 抗坏血酸, pH 7.0)中,60 r/min 摇床暗孵育,每次 10 min,再浸入 50 mL 50 mmol/L 磷酸钾缓冲液(含 4 mmol/L 抗坏血酸、2 mmol/L H_2O_2 , pH 7.0)中,60 r/min 摇床暗孵育 20 min,50 mL 50 mmol/L 磷酸缓冲液(pH 7.8)暗孵育 1 min,最后浸入 50 mL 50 mmol/L 磷酸缓冲液(含 28 mmol/L TEMED、2.45 mmol/L NBT, pH 7.8)中,光照条件下不断摇动,直至出现清晰谱带。

(3)POD。参照 Kim 等^[25]的方法,将凝胶浸入 50 mL 染色液(由 100 mmol/L 联苯胺和 0.88 mmol/L H_2O_2 使用前等体积混合),光照直至显出清晰谱带。

1.3 数据处理

所有数据用“平均值 $\pm$ 标准差(Mean $\pm$ SD)”表示,采用软件 SPSS13.0 进行显著性差异分析。

2 结果与分析

2.1 盐胁迫对苜蓿芽、根长及鲜质量的影响

从表 1 可以看出,正常生长条件下,北极星芽、根长及鲜质量均高于新牧一号。与对照相比,200 mmol/L NaCl 处理明显抑制了苜蓿幼苗的生长,2

个苜蓿品种芽、根长显著降低($P<0.05$),芽、根鲜质量极显著降低($P<0.01$)。NaCl 胁迫条件下,新牧一号的芽、根长及鲜质量均高于北极星。

表 1 200 mmol/L NaCl 胁迫对苜蓿芽、根长及鲜质量的影响
Table 1 Effect of 200 mmol/L NaCl on length and fresh weight of alfalfa shoots and roots

品 种 Cultivar	NaCl/(mmol · L ⁻¹)	长度/mm Length		鲜质量/(mg · 株 ⁻¹) Fresh weight	
		芽 Shoot	根 Root	芽 Shoot	根 Root
新牧一号 Xinmu No. 1	0	18.9±4.0	40.7±9.3	20.3±2.4	9.7±2.5
	200	9.3±1.5*	16.8±5.9*	8.9±1.1**	3.6±0.7**
北极星 Northstar	0	20.7±3.8	49.5±10.1	23.9±2.3	11.9±2.5
	200	7.5±1.5*	12.3±4.9*	8.1±0.9**	2.6±0.4**

注:数据为测定 3 次的平均值; * 表示与对照相比差异显著($P<0.05$), ** 表示与对照相比差异极显著($P<0.01$)。下表同。
Note: Data are expressed as the mean of three replicates; * indicates significant difference compared to control ($P<0.05$); ** indicates highly significant difference compared to control ($P<0.01$). It's the same with below.

2.2 盐胁迫对苜蓿芽、根 H₂O₂、MDA 含量及相对质膜透性的影响

表 2 显示,正常生长条件下,2 个苜蓿品种间芽、根各指标差异不显著。200 mmol/L NaCl 胁迫条件下,芽 H₂O₂、MDA 含量及相对质膜透性均明显高于对照,其中 NaCl 处理组与对照组间 H₂O₂ 含量存在显著差异,MDA 含量及相对质膜透性存在极显著差异,但新牧一号各指标均低于盐敏感品种

北极星。200 mmol/L NaCl 胁迫条件下,新牧一号根器官 H₂O₂、MDA 含量与对照间无显著差异,相对质膜透性显著升高;北极星根中各指标值均显著或极显著高于对照,并高于盐忍耐品种新牧一号。表明 200 mmol/L NaCl 处理产生了过量的活性氧,导致细胞膜损伤,新牧一号受损伤程度低于盐敏感品种北极星,且根的损伤程度低于芽。

表 2 200 mmol/L NaCl 胁迫对苜蓿芽、根 H₂O₂、MDA 含量及相对质膜透性的影响
Table 2 Effect of 200 mmol/L NaCl on H₂O₂, MDA contents and relative membrane permeability of alfalfa shoots and roots

品 种 Cultivar	NaCl/(mmol · L ⁻¹)	H ₂ O ₂ /(μmol · g ⁻¹)		MDA/(mmol · g ⁻¹)		相对质膜透性/% Relative membrane permeability	
		芽 Shoot	根 Root	芽 Shoot	根 Root	芽 Shoot	根 Root
新牧一号 Xinmu No. 1	0	0.352±0.060	0.310±0.027	0.017±0.002	0.016±0.003	10.41±1.33	8.19±0.85
	200	0.509±0.029*	0.316±0.048	0.053±0.006**	0.021±0.002	29.77±2.08**	14.76±1.14*
北极星 Northstar	0	0.289±0.110	0.284±0.065	0.015±0.001	0.012±0.001	11.74±1.98	7.90±0.75
	200	0.653±0.103*	0.424±0.059*	0.069±0.014**	0.026±0.003*	40.66±1.06**	22.58±2.02**

2.3 盐胁迫下苜蓿芽、根 SOD 活性及其同功酶的变化

表 3 显示,在正常生长条件下,北极星幼苗芽、根的 SOD 活性均高于新牧一号,200 mmol/L NaCl 胁迫导致 SOD 活性明显升高,但新牧一号芽、根器官中的 SOD 活性均明显大于北极星。图 1A 中的 SOD 同功酶谱显示,2 种苜蓿的芽、根中均检测到 4 种 SOD 同功酶,但根中 SOD-Ⅲ和 SOD-Ⅳ活性均较弱,说明芽、根中的 SOD 同功酶存在差异。200 mol/L NaCl 胁迫条件下,新牧一号芽中 SOD-Ⅱ、SOD-Ⅲ、SPD-Ⅳ活性高于对照,推测这是芽中 SOD 活性升高的原因;而北极星芽中只有 SOD-Ⅱ活性高于对照。2 种苜蓿根中仅 SOD-Ⅱ活性比对照略有升高。

2.4 盐胁迫下苜蓿芽、根 APX 活性及其同功酶的变化

从表 3 可以看出,正常生长条件下,无论芽还是

根,两品种 APX 活性均未表现出显著差异。200 mmol/L NaCl 胁迫,导致芽中 APX 活性显著升高;新牧一号根中 APX 活性显著高于对照,而北极星根中 APX 活性与对照差异较小。新牧一号根、芽中的 APX 活性均基本高于北极星。APX 同功酶谱(图 1B)表明,芽、根中的同功酶类型不同,其中芽中未检测到 APX-Ⅱ。NaCl 胁迫影响最为明显的同功酶为 APX-Ⅰ,新牧一号芽、根中的 APX-Ⅰ活性均高于对照,而北极星则与之相反。另外,北极星芽、根中的 APX-Ⅳ活性略高于对照。

2.5 盐胁迫下苜蓿芽、根 CAT 活性的变化

表 3 显示,芽中 CAT 的活性变化与 SOD、APX 相似。200 mmol/L NaCl 胁迫条件下,CAT 活性显著高于对照组,且新牧一号强于北极星,但根中 CAT 活性无显著变化,两品种间 CAT 活性也无显著差异($P>0.05$)。同时,芽中的 CAT 活性明显高于根,表明芽中 CAT 对活性氧的清除贡献可能更大。

表 3 200 mmol/L NaCl 胁迫对苜蓿芽、根中 SOD、APX、CAT、POD 活性的影响
Table 3 Effect of 200 mmol/L NaCl on SOD, APX, CAT and POD activity of alfalfa shoots and roots

品种 Cultivar	NaCl/(mmol · L ⁻¹)	SOD 活性/(U · mg ⁻¹) SOD activity		APX 活性/(U · mg ⁻¹) APX activity	
		芽 Shoot	根 Root	芽 Shoot	根 Root
新牧一号 Xinmu No. 1	0	12.27±1.05	16.04±1.97	2.28±0.23	3.27±0.69
	200	53.26±8.36**	32.72±4.17**	7.95±0.59**	5.75±1.15*
北极星 Northstar	0	15.15±1.11	18.78±2.62	2.18±0.91	3.55±0.62
	200	24.37±6.90	26.11±1.61*	4.99±1.05*	3.89±1.09

品种 Cultivars	NaCl/(mmol · L ⁻¹)	CAT 活性/(U · mg ⁻¹) CAT activity		POD 活性/(U · mg ⁻¹) POD activity	
		芽 Shoot	根 Root	芽 Shoot	根 Root
新牧一号 Xinmu No. 1	0	2.15±0.37	0.88±0.12	54.14±12.58	298.10±13.12
	200	7.54±1.96**	0.77±0.30	41.59±7.84	265.09±17.72
北极星 Northstar	0	1.76±0.12	0.72±0.14	49.10±9.37	427.39±29.65
	200	4.74±0.48**	0.66±0.26	54.39±1.22	185.79±37.97**

2.6 盐胁迫下苜蓿芽、根 POD 活性及其同功酶的变化

表 3 还显示,与 CAT 相反,芽中 POD 活性在 NaCl 胁迫前后无显著变化,且明显低于根,说明其具有器官差异性,POD 在根中比在芽中可能发挥着更为重要的作用。NaCl 胁迫后,新牧一号根中的 POD 活性与对照无显著差异,而对于盐敏感品种北极星而言,虽然正常生长条件下其 POD 活性高于新牧一号,但由于受盐胁迫的影响,其 POD 活性降低的幅度较大且低于新牧一号。与其他抗氧化酶不同,POD 同功酶数目较多,其变化也最为复杂(图 1C)。

芽中同功酶谱带少于根,各同功酶活性也较弱,由此导致芽中的 POD 活性明显低于根。盐胁迫条件下,2 个苜蓿品种芽中的 POD-Ⅲ活性升高,但 POD-Ⅳ活性降低,并出现同功酶谱带消失的现象(新牧一号 POD-Ⅶ、POD-Ⅷ;北极星 POD-V)。盐胁迫后,2 个苜蓿品种根中 POD-Ⅲ活性均增强;POD-Ⅳ活性在新牧一号根中也明显增强,但在北极星根中明显降低,这种变化可能对 POD 活性的影响相对较大。综合 POD 同功酶的变化可以看出,POD-Ⅲ、POD-Ⅳ存在于芽、根两种器官,且胁迫后其活性均表现出明显的变化,是芽、根器官中共同的盐敏感性 POD 同功酶。

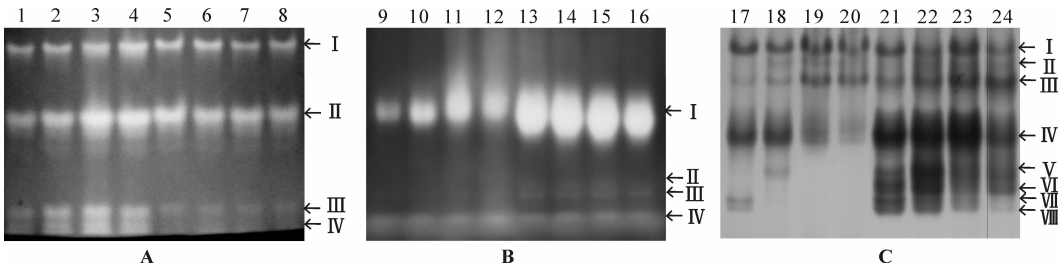


图 1 200 mmol/L NaCl 胁迫下苜蓿芽、根 SOD (A)、APX (B)及 POD (C)同功酶的变化

1,9,17 和 3,11,19 泳道分别为 0,200 mmol/L NaCl 胁迫条件下新牧一号的芽;2,10,18 和 4,12,20 泳道分别为 0,200 mmol/L NaCl 胁迫条件下北极星的芽;5,13,21 和 7,15,23 泳道分别为 0,200 mmol/L NaCl 胁迫条件下新牧一号的根;
6,14,22 和 8,16,24 泳道分别为 0,200 mmol/L NaCl 胁迫条件下北极星的根

Fig. 1 Isozyme changes of SOD, APX and POD of alfalfa shoots and roots under 200 mmol/L NaCl stress

Lane 1,9,17 and 3,11,19 indicate the isozymes anlysis of Xinmu No. 1 shoots under 0 and 200 mmol/L NaCl condition, respectively;
Lane 2,10,18 and 4,12,20 indicate the isozymes anlysis of Northstar shoots under 0 and 200 mmol/L NaCl condition, respectively;
Lane 5,13,21 and 7,15,23 indicate the isozyme anlysis of Xinmu No. 1 roots under 0 and 200 mmol/L NaCl condition, respectively;
Lane 6,14,22 and 8,16,24 indicate the isozyme anlysis of Northstar roots under 0 and 200 mmol/L NaCl condition, respectively

3 讨论

植物在遭受盐渍、干旱等逆境胁迫时,产生过量的活性氧会引起细胞膜脂过氧化反应,影响细胞膜的完整性,进而抑制植物的生长,严重时甚至导致植物死亡^[4]。本研究中,200 mmol/L NaCl 抑制了苜蓿

芽、根的伸长及鲜质量的增加,但新牧一号的生长状况要优于北极星,这种萌发早期幼苗的生长与苜蓿的耐盐性相关。作为一种重要的活性氧,H₂O₂ 含量在盐胁迫条件下会升高,部分说明盐胁迫导致了氧化迸发的发生。作为检测植物细胞膜受损伤程度的指标,MDA 含量和相对质膜透性经常被用于各种逆境胁迫

的抗性分析^[15]。本研究结果表明,NaCl 胁迫条件下,2 个苜蓿品种芽、根中的 MDA 含量和相对质膜透性均增加,并且 MDA 含量变化与相对质膜透性呈正相关性,说明盐胁迫诱发了细胞质膜的过氧化损伤,但新牧一号的膜脂过氧化及细胞受损伤程度要低于北极星,同时根的损伤要低于芽。这种细胞膜的损伤程度及 H₂O₂ 含量又与植物各器官的生长呈负相关关系,说明作为一种重要的活性氧分子,H₂O₂ 是导致膜脂过氧化的重要原因之一,细胞膜相对完整性的破坏进一步抑制了幼苗的生长。

关于植物的耐盐机制,自由基引起的膜伤害日益受到人们的重视。活性氧清除能力是决定细胞耐胁迫的关键因素,而作为抗氧化保护的一个重要组成部分,整个抗氧化保护酶系统防御能力的变化,又取决于 SOD、APX、CAT、POD 等多种酶彼此协调的综合结果。已有研究表明,在各种环境胁迫条件下,抗氧化酶活性增加,且忍耐性品种的酶活性高于敏感性品种^[10,26-27]。作为活性氧伤害的第一道防线,SOD 可以将 O₂⁻ 歧化为 H₂O₂。本研究中,200 mmol/L NaCl 胁迫后,苜蓿芽、根中的 SOD 活性均增加,且新牧一号 SOD 活性的升高幅度高于北极星,表明盐忍耐品种具有比盐敏感品种更强的 O₂⁻ 清除能力,可更大程度地减少 O₂⁻ 对细胞的伤害作用。这与前人对不同盐胁迫忍耐性豌豆^[28]、甘蔗^[27]、番茄^[11]等 SOD 活性的研究结果相一致。多种同功酶的应用及差异表达,是植物细胞代谢的主要调控机制^[6]。本研究中,SOD 活性与其各同功酶活性相关,尽管不同器官中 SOD 同功酶活性略有不同,盐胁迫条件下也并未合成新的同功酶,但胁迫条件增加了部分已合成的同功酶活性,这一结果与前人对扁豆^[29]、车前草^[6]的研究结果相同。盐胁迫后新牧一号和北极星芽、根中的 SOD-Ⅱ 活性均升高,为盐胁迫敏感谱带。

H₂O₂ 作为一种活性氧,也是 SOD 在歧化 O₂⁻ 过程中的副产物,可进一步导致细胞损伤,因此必须在随后的反应中通过 APX、CAT、POD 等共同作用将其转化成 H₂O 而清除。APX 是抗坏血酸-谷胱甘肽循环的一种重要成分,在清除 H₂O₂ 的过程中起着关键作用。本研究结果表明,盐胁迫引起 APX 活性升高,且盐忍耐品种具有更强的 APX 活性。Demiral 等^[10]对水稻的研究及 Bor 等^[27]对甘蔗的研究中,也观察到相似的结果。APX-Ⅰ 对 APX 活性贡献最大,在 4 种同功酶中对盐胁迫也最为敏感。CAT 可以将 H₂O₂ 直接分解成 O₂ 和 H₂O,不需要

还原力且具有较高的反应速率,但与 APX 相比,其对 H₂O₂ 的亲合力较弱,细胞中的 CAT 仅能清除高浓度的 H₂O₂^[30]。与 APX 活性相似,盐忍耐品种新牧一号芽器官中 CAT 活性高于盐敏感品种北极星,CAT 与 APX 共同清除芽器官中的 H₂O₂,降低对细胞的损伤,但根中的 CAT 活性明显低于芽。POD 也可以清除 H₂O₂,同时还参与细胞的生长、分化及木质化等过程^[31]。200 mol/L NaCl 胁迫条件下,根中的 POD 活性明显高于芽,这表明根中 POD 对 H₂O₂ 的清除贡献可能更大。同时,忍耐品种新牧一号也通过根中较高的 POD 活性,加强了对活性氧的清除,这与对盐忍耐品种番茄^[32]和车前草^[6]的研究结果相一致。本试验在芽、根中共检测到 8 种 POD 同功酶,盐胁迫条件下部分 POD 同功酶谱带消失或其活性降低,但盐胁迫均诱导 2 个苜蓿品种芽、根中 POD-Ⅲ 活性增强,说明 POD-Ⅲ 为盐敏感性同功酶类型。盐胁迫后,新牧一号根中 POD-Ⅳ 活性增强,且在所有同功酶中表现最强;而在北极星根中,尽管 POD-Ⅲ 活性略有增强,但其他同功酶活性降低或者谱带消失,最终导致其 POD 活性低于新牧一号。

综上所述,盐忍耐品种新牧一号和盐敏感品种北极星芽、根器官中的抗氧化酶及其同功酶,对盐胁迫表现出不同的响应模式。较低的膜脂过氧化水平,也说明了新牧一号较强的自由基清除能力及保护机制。忍耐性品种的耐盐性与芽/根中被诱导的较强 SOD、APX、CAT/POD 活性密切相关,并导致较低含量的 H₂O₂ 及膜脂过氧化水平,进一步降低了盐胁迫对幼苗的伤害。

[参考文献]

- [1] 陈文新. 豆科植物根瘤菌-固氮体系在西部大开发中的作用[J]. 草地学报,2004,12(1):1-2.
Chen W X. The role of legumes-root nodule bacteria nitrogen fixing system in development of west area of China [J]. Acta Agrestia Sinica,2004,12(1):1-2. (in Chinese)
- [2] 石元春. 走出治沙与退耕中的误区 [J]. 草地学报,2004,12(2):83-86.
Shi Y C. Extricate ourselves from the dilemma of desertification control and return of reclaimed farmland (to afforested area) [J]. Acta Agrestia Sinica,2004,12(2):83-86. (in Chinese)
- [3] 王遵亲,祝寿泉,俞仁培,等. 中国盐渍土 [M]. 北京:科学出版社,1993:1-4, 322-375.
Wang Z Q,Zhu S Q,Yu R P, et al. Chinese salt-affected soils [M]. Beijing: Science Press,1993:1-4, 322-375. (in Chinese)
- [4] Foyer C H, Noctor G. Oxidant and antioxidant signalling in

- plants; A re-evaluation of the concept of oxidative stress in a physiological context [J]. *Plant Cell Environment*, 2005, 28: 1056-1071.
- [5] Mittler R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance [J]. *Trends in Plant Science*, 2002, 7(9): 405-410.
- [6] Sekmen A H, Türkan I, Takio S. Differential responses of antioxidant enzymes and lipid peroxidation to salt stress in salt-tolerant *Plantago maritima* and salt-sensitive *Plantago media* [J]. *Physiologia Plantarum*, 2007, 131: 399-411.
- [7] 王中仁. 植物遗传多样性和系统学研究中的等位酶分析 [J]. *生物多样性*, 1994(2): 91-95.
Wang Z R. Allozyme analysis in studies of plant genetic diversity and systematics [J]. *Chinese Biodiversity*, 1994(2): 91-95. (in Chinese)
- [8] Perez T, Moreno C, Seffino G L, et al. Salinity effects on the early development stages of *Panicum coloratum*; Cultivar differences [J]. *Grass and Forage Science*, 1998, 53(3): 270-278.
- [9] Khan M A, Gulzar S. Germination responses of *Sporobolus ioclados*; a saline desert grass [J]. *Journal of Arid Environments*, 2003, 53: 387-394.
- [10] Demiral T, Türkan I. Comparative lipid peroxidation, antioxidant systems and proline content in roots of two rice cultivars differing in salt tolerance [J]. *Environmental and Experimental Botany*, 2005, 53(3): 247-257.
- [11] Koca H, Ozdemir F, Turkan I. Effect of salt stress on lipid peroxidation and superoxide dismutase and peroxidase activities of *Lycopersicon esculentum* and *L. pennellii* [J]. *Biologia Plantarum*, 2006, 50(4): 745-748.
- [12] Verslues P E, Agarwal M, Katiyar-Agarwal S, et al. Methods and concepts in quantifying resistance to drought, salt and freezing, abiotic stresses that affect plant water status [J]. *The Plant Journal*, 2006, 45(4): 523-539.
- [13] Bindschedler L V, Minibayeva F, Gardner S L, et al. Early signalling events in the apoplastic oxidative burst in suspension cultured French bean cells involve cAMP and Ca^{2+} [J]. *New Phytologist*, 2001, 151(1): 185-194.
- [14] Peever T L, Higgins V J. Electrolyte leakage, lipoxygenase, and lipid peroxidation induced in tomato leaf tissue by specific and nonspecific elicitors from *Cladosporium fulvum* [J]. *Plant Physiology*, 1989, 90(3): 867-875.
- [15] Puckette M C, Weng H, Mahalingam R. Physiological and biochemical responses to acute ozone-induced oxidative stress in *Medicago truncatula* [J]. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2007, 45(1): 70-79.
- [16] Kwon S Y, Jeong Y J, Lee H S, et al. Enhanced tolerances of transgenic tobacco plants expressing both superoxide dismutase and ascorbate peroxidase in chloroplasts against methyl viologen-mediated oxidative stress [J]. *Plant, Cell and Environment*, 2002, 25(7): 873-882.
- [17] 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(1/2): 248-254.
- [18] Mc Cord J M, Fridovich I. Superoxide dismutase; An enzymic function for erythrocyte (hemocytin) [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1969, 244(22): 6049-6055.
- [19] Nakano Y, Asada K. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts [J]. *Plant and Cell Physiology*, 1981, 22(5): 867-880.
- [20] Aebi H. Catalase *in vitro* [J]. *Methods Enzymol*, 1984, 105: 121-126.
- [21] Kwak S S, Kim S K, Lee M S, et al. Acidic peroxidases from suspension-cultures of sweet potato [J]. *Phytochemistry*, 1995, 39(5): 981-984.
- [22] Jang I C, Park S Y, Kim K Y, et al. Differential expression of 10 sweetpotato peroxidase genes in response to bacterial pathogen, *Pectobacterium chrysanthemi* [J]. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2004, 42(5): 451-455.
- [23] Beauchamp C, Fridovich I. Superoxide dismutase: Improved assays and an assay applicable to acrylamide gels [J]. *Analytical Biochemistry*, 1971, 44(1): 276-287.
- [24] Mittler R, Zilinskas B A. Regulation of pea cytosolic ascorbate peroxidase and other antioxidant enzymes during the progression of drought stress and following recovery from drought [J]. *The Plant Journal*, 1994, 5(3): 397-405.
- [25] Kim S K, Kwak S S, Jung K H, et al. Selection of plant cell lines for high yields of peroxidase [J]. *Korean Biochemical Journal*, 1994, 27: 132-136.
- [26] Türkan, Bor M, Zdemir F, et al. Differential responses of lipid peroxidation and antioxidants in the leaves of drought-tolerant *P. acutifolius* Gray and drought-sensitive *P. vulgaris* L. subjected to polyethylene glycol mediated water stress [J]. *Plant Science*, 2005, 168(1): 223-231.
- [27] Bor M, Zdemir F, Türkan I. The effect of salt stress on lipid peroxidation and antioxidants in leaves of sugar beet *Beta vulgaris* L. and wild beet *Beta maritima* L. [J]. *Plant science (Limerick)*, 2003, 164(1): 77-84.
- [28] Hernandez J A, Almansa M S. Short-term effects of salt stress on antioxidant systems and leaf water relations of pea leaves [J]. *Physiologia Plantarum*, 2002, 115(2): 251-257.
- [29] Bandeoglu E, Eyidogan F, Yucel M, et al. Antioxidant responses of shoots and roots of lentil to NaCl-salinity stress [J]. *Plant Growth Regulation*, 2004, 42: 67-99.
- [30] Willekens H, Chamnongpol S, Davey M, et al. Catalase is a sink for H_2O_2 and is indispensable for stress defence in C_3 plants [J]. *EMBO J*, 1997, 16: 4806-4816.
- [31] Passardi F, Cosio C, Penel C, et al. Peroxidases have more functions than a Swiss army knife [J]. *Plant Cell Report*, 2005, 24: 255-265.
- [32] Shalata A, Tal M. The effect of salt stress on lipid peroxidation and antioxidants in the leaf of the cultivated tomato and its wild salt-tolerant relative *Lycopersicon pennellii* [J]. *Physiologia Plantarum*, 1998, 104: 169-174.