

盐胁迫下野生大豆叶片中 Na^+ 、 Cl^- 积累 导致活性氧伤害^{*}

杨晓英 刘友良^{**} 罗庆云 刘兆普

(南京农业大学生命科学学院, 农业部作物生长调控重点实验室, 南京 210095)

摘要 以耐盐性强弱不同的野生大豆(JWS 耐盐性强, N23232 耐盐性弱)为材料, 采用砂培试验研究了 NaCl 胁迫下野生大豆叶片中 Na^+ 、 Cl^- 含量及活性氧代谢的变化。结果表明, 盐胁迫下供试两种群野生大豆叶片 Na^+ 、 Cl^- 含量增加, N23232 比 JWS 更明显; 耐盐性弱的 N23232 叶片 O_2^- 产生速率和 H_2O_2 含量上升, 膜脂过氧化产物 MDA 和电导率迅速上升, 其叶片中 Na^+ 、 Cl^- 含量变化与 O_2^- 、 H_2O_2 、MDA 和电导率增加呈极显著或显著正相关, 而 O_2^- 产生速率和 H_2O_2 含量上升与 MDA 和电导率变化呈极显著正相关。表明在 NaCl 胁迫下, 由于 Na^+ 、 Cl^- 在叶片中的积累而导致了活性氧的积累, 活性氧诱发膜脂过氧化、破坏膜结构, 导致膜结合酶 H^+ -ATPase 和 H^+ -PPase 活性降低, 膜透性增加。耐盐种群 JWS 在盐胁迫下 Na^+ 、 Cl^- 积累量少、活性氧水平较低, 对膜系统伤害少, 膜结合酶活性高, 因而能维持液泡膜正常的代谢功能, 可能是其耐盐性强的原因之一。

关键词 野生大豆; 耐盐性; 活性氧代谢; 膜结合酶

中图分类号 S 565.101 文献标识码 A 文章编号 1000-9841(2003)02-0083-05

细胞膜系统是盐胁迫伤害的主要部位。盐胁迫包括渗透胁迫和离子胁迫以及由这两种胁迫产生的次级胁迫即氧化胁迫^[1]。盐胁迫引发活性氧大量积累, 活性氧攻击膜脂多不饱和脂肪酸, 启动膜脂过氧化的自由基链式反应, 损伤蛋白质的结构和功能, 影响膜的流动性, 最终破坏膜结构, 导致膜系统代谢紊乱^[2]。液泡在离子积累和区域化分配上起重要作用, 只有将盐分贮存在液泡中, 才能维持细胞质中较高的 K^+/Na^+ 比, 减少 Na^+ 在细胞质中过多积累所引起的离子毒害及缓解外环境低渗透势引起的渗透胁迫^[3]。液泡膜 H^+ -ATPase 和 H^+ -PPase 是形成跨膜质子电化学梯度的主要酶类, 在维持细胞内离子平衡和盐分区域化分配中占有十分重要的作用。因此液泡膜结构和功能的稳定性在抗逆生理中占据十分重要的地位^[4]。

野生大豆 (*Glycine soja*) 为栽培大豆 (*Glycine max*) 的近缘种, 具有蛋白质含量高、含硫氨基酸含量高的种质, 也具多荚、抗病虫、抗逆性强的种质^[5]。这些优异种质为中国乃至世界大豆育种提

供了丰富的遗传资源。由于野生大豆与栽培大豆染色体数相等, 两个种间遗传物质容易交流^[6]。因此, 在当前栽培大豆的遗传基础已越来越窄的情况下, 利用野生大豆进行大豆种质创新具有良好的应用和发展前景^[7, 8]。而对野生大豆耐盐机理的研究是进行大豆耐盐性改良的基础。於丙军等^[9]已对部分野生大豆和栽培大豆耐盐性进行了鉴定, 发现某些野生大豆耐盐性较强。本文以此耐盐性较强的野生大豆种群和耐盐性弱的典型野生大豆种群为材料, 研究 NaCl 胁迫下活性氧对叶片液泡膜系统的伤害及其造成伤害的原因, 同时, 也研究了膜结合酶 H^+ -ATPase 和 H^+ -PPase 活性的变化, 试图从组织和细胞水平上揭示野生大豆的耐盐机理。

1 材料与方法

1.1 材料及其培养方法

将供试野生大豆种群江苏海滩野大豆(JWS, 耐盐性强)和 N23232(耐盐性弱)种子经消毒、刻皮、浸

^{*} 收稿日期: 2002-11-19

基金项目: 863 海洋生物技术项目(2001A A627040)和高等学校博士学科点专项基金(1999002005)资助。

^{**} 通讯联系人: E-mail: zwslsh@public1.ptt.js.cn

作者简介: 杨晓英(1976-), 女, 硕士, 主要从事植物耐盐生理研究, 现在中国科学院南京土壤研究所工作。

种催芽后,挑选发芽一致的种子播于装有石英砂、下部具孔的塑料杯内,每杯10粒,在装有1/2Hoagland培养液的周转箱中自然光照培养,白天25℃左右,夜间20℃左右,2天更换1次培养液,培养至第一复叶全展时进行如下处理:(1)对照:1/2Hoagland,(2)处理:含130 mmol/L NaCl的1/2Hoagland;分别于处理0、2、4和6天取其第一对叶片测定。

1.2 测定方法

1.2.1 Na^+ 、 Cl^- 含量测定:参照王宝山等^[10]和於丙军等^[9]方法。

1.2.2 O_2^- 产生速率测定参照王爱国等^[11]方法, H_2O_2 含量测定参照林植芳等^[12]方法,MDA测定参

照赵世杰^[13]方法进行。
1.2.3 叶片液泡膜微囊的提取参照陈沁等^[14]方法。 $\text{H}^+ - \text{ATPase}$ 和 $\text{H}^+ - \text{PPase}$ 活性测定参照Wang等^[15]和Nakamura等^[17]的方法。

2 结果与分析

2.1 NaCl胁迫对野生大豆幼苗叶片离子含量的影响

130 mmol/L NaCl胁迫下,随盐胁迫时间延长,野生大豆叶片中 Na^+ 、 Cl^- 含量迅速上升,不同种群之间差异很明显,N23232叶片中 Na^+ 、 Cl^- 含量均明显高于JWS(图1)。

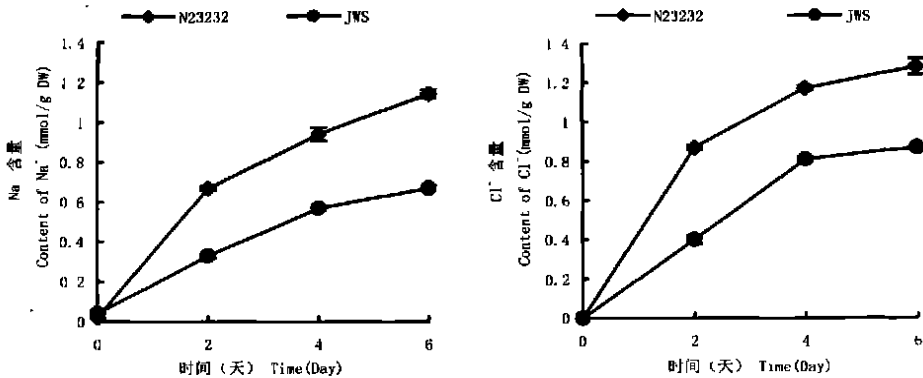


图1 NaCl胁迫对野生大豆幼苗叶片 Na^+ 、 Cl^- 离子含量的影响

Fig. 1 Effects of NaCl stress on Na^+ 、 Cl^- distribution of leaves in wild soybean

2.2 NaCl胁迫下野生大豆幼苗叶片 O_2^- 产生速率和 H_2O_2 含量变化

盐胁迫2天,野生大豆叶片 O_2^- 产生速率变化不明显,胁迫4天,N23232叶片 O_2^- 产生速率略有增加,到第6天时增加到对照的1.84倍,而JWS在

胁迫的6天中,叶片 O_2^- 产生速率与对照没有明显的差异(图2)。

盐胁迫下,野生大豆叶片 H_2O_2 含量上升,胁迫2天, H_2O_2 含量增加不明显,到第4天,N23232叶片 H_2O_2 含量明显增加,为对照的1.41倍,以后呈

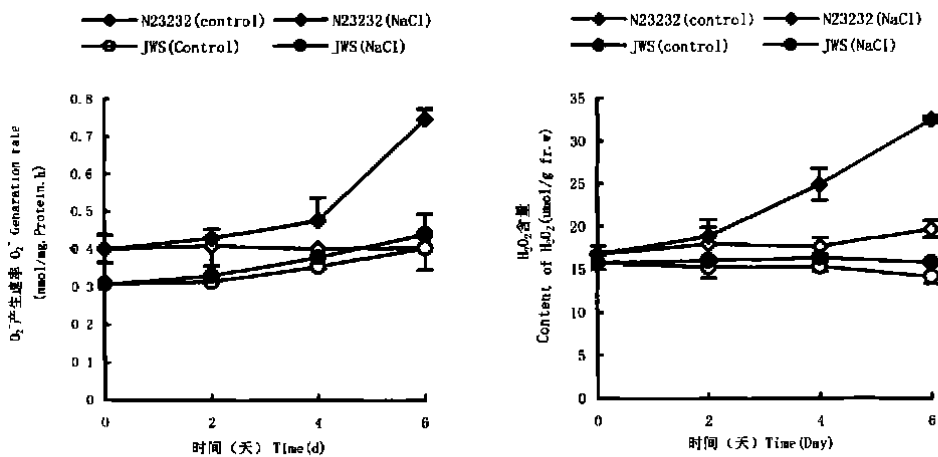


图2 NaCl胁迫下野生大豆幼苗叶片 O_2^- 产生速率和 H_2O_2 含量变化

Fig. 2 Changes in O_2^- generation rate and H_2O_2 content in the leaves of wild soybean seedlings under NaCl stress

不断上升的趋势, 到第 6 天时为对照的 1.65 倍, 而 JWS 叶片 H_2O_2 含量变化到第 6 天时仍与对照没有明显差异(图 2), 到处理第 8 天才有上升趋势, 为对照的 1.33 倍(数据略)。

2.3 NaCl 胁迫下野生大豆幼苗叶片电导率和 MDA 含量变化

盐胁迫下野生大豆叶片 MDA 含量变化与 $\text{O}_2^{\cdot -}$ 产生速率和 H_2O_2 含量变化趋势一致(图 3), 胁迫第

4 天, N23232 叶片 MDA 含量略有增加, 为对照的 1.14 倍, 第 6 天明显上升, 为对照的 2.93 倍; JWS 在胁迫第 6 天 MDA 含量开始表现上升趋势(图 3), 第 8 天上升到对照的 1.37 倍(数据略)。盐敏感种群 N23232 叶片电导率也比耐盐种群 JWS 上升快, 胁迫第 4 天, N23232 为 68.62%, JWS 为 24.06%; 到第 6 天, JWS 叶片电导率只有 26.68%, 而 N23232 叶片电导率已达 82.16%。

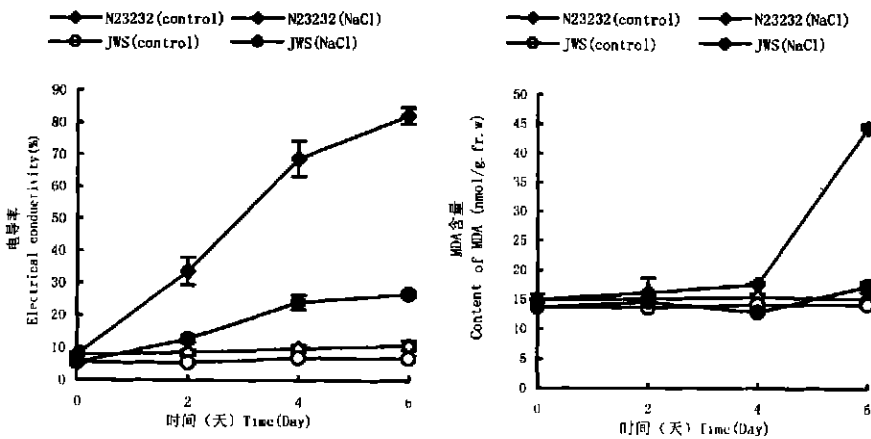


图 3 NaCl 胁迫下野生大豆幼苗叶片电导率和 MDA 含量变化

Fig. 3 Changes in electrical conductivity and MDA content in the leaves of wild soybean seedlings under NaCl stress

2.4 NaCl 胁迫下野生大豆幼苗叶片液泡膜 H^+ -ATPase 和 H^+ -PPase 活性变化

130 mmol/L NaCl 胁迫下耐盐性不同的两个野生大豆叶片液泡膜 H^+ -ATPase 活性变化不一样, 耐盐的 JWS 在胁迫 3 天时 H^+ -ATPase 活性略有

上升, 为对照的 117%, 在胁迫 6 天时 H^+ -ATPase 活性下降, 接近对照水平; 耐盐性弱的 N23232 在盐胁迫下 H^+ -ATPase 活性一直下降, 胁迫 6 天时, 降低到对照的 50%。

在盐胁迫下, 耐盐性不同的野生大豆种群叶片

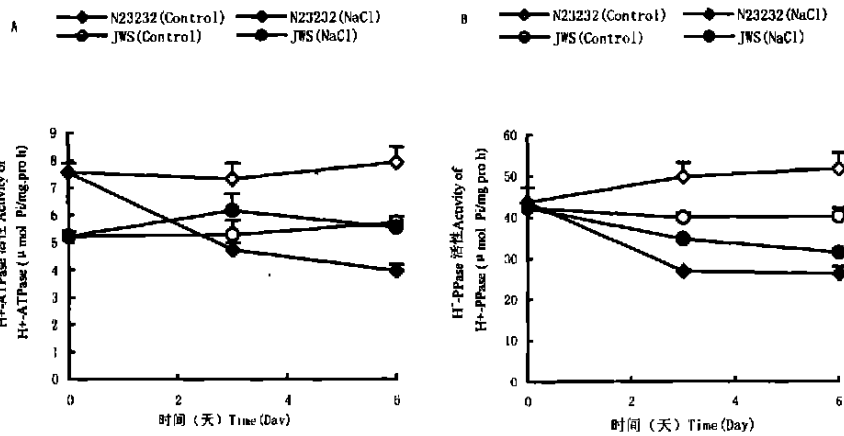


图 4 NaCl 胁迫下野生大豆幼苗叶片液泡膜 H^+ -ATPase(A) 和 H^+ -PPase(B) 活性变化

Fig. 4 Changes in H^+ -ATPase and H^+ -PPase activities of toloplast in wild soybean leaves under NaCl stress

液泡膜 H^+ -PPase 活性下降程度不一样, 胁迫 6 天时耐盐性强的 JWS 叶片液泡膜 H^+ -PPase 活性下降到对照的 78%, 耐盐性弱的 N23232 叶片液泡膜

H^+ -PPase 活性下降到对照的 51%(图 4)。表明 JWS 叶片能为 Na^+ 在液泡中的积累提供较强的质子推动力。

2.5 NaCl胁迫下野生大豆幼苗叶片Na⁺、Cl⁻含量变化与O₂⁻·、H₂O₂、MDA和电导率变化的相关性

统计分析表明,在130mmol/L NaCl胁迫下,N23232叶片Na⁺、Cl⁻含量变化与O₂⁻·、H₂O₂、MDA

和电导率增加呈极显著或显著正相关,而O₂⁻·产生速率和H₂O₂含量上升与MDA和电导率变化呈极显著正相关(表1)。

表1 NaCl胁迫下N23232叶片Na⁺、Cl⁻含量变化与O₂⁻·、H₂O₂、MDA和电导率变化的简单相关分析(n=7)
Table 1 Simple correlativity analysis among Na⁺、Cl⁻、O₂⁻·、H₂O₂、MDA and electrical conductivity in leaves of N23232 under NaCl stress

	Na ⁺	Cl ⁻	O ₂ ⁻ ·	H ₂ O ₂	MDA	电导率
Na ⁺	1					
Cl ⁻	0.997 ^{**}	1				
O ₂ ⁻ ·	0.835 ^{**}	0.794 [*]	1			
H ₂ O ₂	0.877 [*]	0.842 ^{**}	0.970 ^{**}	1		
MDA	0.795 [*]	0.750 [*]	0.995 ^{**}	0.949 ^{**}	1	
电导率	0.981 ^{**}	0.967 ^{**}	0.894 ^{**}	0.941 [*]	0.855 ^{**}	1

3 讨论

活性氧积累是造成植物逆境伤害的主要原因之一。龚明等^[17]研究表明,盐胁迫下大麦和小麦叶片SOD活性下降,活性氧自由基积累,引发膜脂过氧化,造成膜结构破坏。在衰老叶片和叶绿体中H₂O₂的积累造成膜脂过氧化伤害^[12]。我们的研究表明,在130 mmol/L NaCl胁迫下,野生大豆叶片Na⁺、Cl⁻含量增加,耐盐性弱的N23232叶片O₂⁻·产生速率和H₂O₂含量上升,膜脂过氧化产物MDA和电导率迅速上升,其叶片中Na⁺、Cl⁻含量变化与O₂⁻·、H₂O₂、MDA和电导率增加呈极显著或显著正相关,而O₂⁻·产生速率和H₂O₂含量上升与MDA和电导率变化呈极显著正相关。表明在NaCl胁迫下,由于Na⁺、Cl⁻在叶片的积累而导致了活性氧的产生,由于O₂⁻·、H₂O₂这些活性氧的积累,诱发膜脂过氧化,导致MDA含量上升,膜透性增加。在盐胁迫过程中,耐盐性强的JWS叶片Na⁺、Cl⁻积累量少,活性氧水平低,可能与其能维持较高的活性氧清除酶活性有关,其机理有待于进一步研究。

盐胁迫下植物细胞液泡膜结构功能的稳定性在维持细胞的离子平衡中起着十分关键的作用。陈沁等^[4]研究表明,大麦幼苗在盐胁迫下,叶片O₂⁻·和H₂O₂含量的变化与液泡膜H⁺-ATPase活性呈显著负相关。我们在对野生大豆耐盐性筛选的基础上,选用耐盐性不同的典型种群,研究了它们在盐胁迫下液泡膜H⁺-ATPase和H⁺-PPase活性

的动态变化,发现随盐胁迫时间变化,不耐盐野生大豆叶片Na⁺、Cl⁻大量积累,随之叶片O₂⁻·产生速率和H₂O₂含量迅速上升,膜脂过氧化加剧,膜结合酶H⁺-ATPase和H⁺-PPase活性降低,最终膜透性增加,膜结构破坏。耐盐种群在盐胁迫下Na⁺、Cl⁻积累量少、活性氧水平较低,对膜系统伤害少,膜结合酶活性高,因而能维持液泡膜正常的代谢功能,可能是其耐盐性强的主要原因。

参 考 文 献

1 Zhu JK. Genetic analysis of plant salt tolerance using Arabidopsis [J]. Plant Physiology, 2000, 124: 941—948.
2 王爱国. 植物的氧代谢[M]. 见: 余叔文, 汤章城主编. 植物生理与分子生物学. 第二版. 北京: 科学出版社, 1998, 366—389.
3 Greeway H, Munns R. Mechanism of salt tolerance in halophyte[J]. Annual review of plant physiology, 1980, 31: 149—190.
4 陈沁, 刘友良, 陈亚华. 盐胁迫下大麦叶片活性氧伤害与液泡膜H⁺-ATPase活性的关系[J]. 南京农业大学学报, 1998, 21(3): 21—25.
5 杨光宇, 纪锋. 中国野生大豆资源的研究与利用综述[J]. 吉林农业科学, 1999, 24(1): 12—17.
6 邵桂花, 常汝镇, 陈一舞, 等. 大豆耐盐性遗传的研究[J]. 作物学报, 1994, 20(6): 721—726.
7 Pantaloue VR, Kenworthy WJ. Salt tolerance in Glycine max and perennial Glycine [J]. Soybean Genetics Newsletter, 1989, 16: 145—146.
8 於丙军, 刘友良. 大豆耐盐性研究进展[J]. 大豆科学, 2000, 19(2): 154—159.
9 於丙军, 罗庆云, 曹爱忠, 等. 栽培大豆和野生大豆耐盐性及离子效应的比较[J]. 植物资源与环境学报, 2001, 10(1): 25—29.
10 王宝山, 赵可夫. 小麦叶片中Na、K提取方法的比较[J]. 植物生理

学通讯, 1995, 31(1): 50—52.

- 11 王爱国, 罗广华. 植物的超氧物自由基与羟胺反应的定量关系 [J]. 植物生理学通讯, 1990, 26(6): 55—57.
- 12 林植芳, 李双顺, 林桂株, 等. 衰老叶片和叶绿体中 H_2O_2 的累积与膜脂过氧化的关系 [J]. 植物生理学报, 1988, 14(1): 16—22.
- 13 赵士杰, 许长成, 邹琦, 等. 植物组织中丙二醛测定方法的改进 [J]. 植物生理学通讯, 1994, 30(3): 207—210.
- 14 陈沁, 章文华, 刘友良. 提取大麦叶片液泡膜微囊的两相法 [J]. 植物生理学通讯, 2000, 36(6): 541—544.
- 15 Wang YZ, Sze H. Similarities and differences between the toloplast—

type and mitochondrial H^+ —ATPase of oat roots [J]. Journal of Biochemistry, 1985, 260: 10434—10443.

- 16 Nakamura Y, Kasamo K, Shimosato N. Stimulation of the extrusion of protons and H^+ —ATPase activities with the decline in pyrophosphatase activity of the tonoplast in intant mung bean roots under high—NaCl stress and its relation to external levels of Ca^{2+} ions [J]. Plant Cell Physiology, 1992, 33: 139—149.
- 17 龚明, 丁念诚, 贺子义, 等. 盐胁迫下大麦和小麦叶片脂质过氧化伤害与超微结构变化的关系 [J]. 植物学报, 1989, 31(11): 841—846.

ACCUMULATION OF Na^+ 、 Cl^- IN THE LEAVES OF WILD SOYBEAN SEEDLINGS LEAD TO THE OXIDATIVE DAMAGE UNDER SALT STRESS

Yang Xiaoying Liu Youliang Luo Qingyun Liu Zhaopu

(Key Laboratory of Crop Regulation, Ministry of Agriculture, College of Life Science, Nanjing Agriculture University, Nanjing 210095)

Abstract The different salt tolerance of wild soybean (JWS salt—tolerant, N23232 salt—sensitive) were used to study the changes of Na^+ 、 Cl^- contents and active oxygen metabolism in the leaves under NaCl stress by the methods of pot experiment. The results showed that the Na^+ 、 Cl^- contents increased in the leaves of the two population wild soybean under salt stress and the Na^+ 、 Cl^- contents was greater in N23232 than that in JWS. For salt—sensitive wild soybean(N23232), the $\text{O}_2^{\cdot-}$ generation rate and H_2O_2 content increased, product of lipid peroxidation(MDA) and electrical conductivity increased in the leaves under 130 mmol/L NaCl stress. There were some significantly positive correlation among the Na^+ 、 Cl^- 、 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 、 H_2O_2 、MDA and electrical conductivity respectively, and also between $\text{O}_2^{\cdot-}$ 、 H_2O_2 and MDA、electrical conductivity in the salt—sensitive wild soybean (N23232). It suggested that the content of Na^+ 、 Cl^- increased lead to the accumulation of active oxygen and the oxidative damage. This oxidative damage expressed as the increase of MDA, the decrease of membrane—associated enzyme(H^+ —ATPase and H^+ —PPase) activities and the increase of electrical conductivity. However, the Na^+ 、 Cl^- contents in the leaves of salt—tolerant wild soybean were maintained at a lower level, and no changes were detected in $\text{O}_2^{\cdot-}$ 、 H_2O_2 and MDA contents with respect to the control. Therefore, the damage effects of active oxygen species were lower on the salt—tolerant wild soybean than that on the salt—sensitive ones, and the membrane—associated enzyme(H^+ —ATPase and H^+ —PPase) activities maintained at a higher level. The results indicated that the high level of H^+ —ATPase and H^+ —PPase activities in salt—tolerant wild soybean might be one of the factors of salt tolerance.

Key words Wild soybean; Salt tolerance; Active oxygen metabolism; Membrane—associated enzyme