

# 盐胁迫下栽培大豆黑农 40 不同器官中抗氧化酶活性的变化

付 畅<sup>1</sup>, 关 旻<sup>1</sup>

(哈尔滨师范大学生物学系, 哈尔滨 150025)

**摘要** 通过对盐胁迫下栽培大豆黑农 40 的根、茎、叶等不同器官中主要的抗氧化酶活性的测定与分析,探讨了大豆耐盐性的机理。结果表明,黑农 40 叶片中的 SOD、POD 和 APX 活性水平明显高于根部和茎部。叶片中的 POD 和 APX 在高盐胁迫下的应答反应都比在低盐时快速。盐胁迫时间的延长引起根、茎、叶中的 SOD 和 POD 活性发生明显的下降,在高盐胁迫下这种下降比在低盐时更为急剧。

**关键词** 盐胁迫;抗氧化酶;栽培大豆;黑农 40;器官

**中图分类号** S565.1 **文献标识码** A **文章编号** 1000-9841(2007)03-0343-04

## CHANGES OF SALT STRESS ON THE ACTIVITY OF ANTIOXIDATIVE ENZYMES IN DIFFERENT ORGANS OF *GLYCINE MAX* HEINONG 40

FU Chang, GUAN Yang

(1. Department of Biology, Harbin Normal University, Harbin 150080)

**Abstract** Salt stress produces secondary oxidant stress on plants. Antioxidative enzymes play important role in removing activated oxygen species. The effects of salt stress on activity of antioxidative enzymes in root, stem and leaves of *Glycine max* (the salt tolerant Heinong 40) were determined and analyzed to discuss the salt tolerant mechanism of soybean. The results indicated that SOD, POD and APX activity were higher in leaves of Heinong 40 than those in stems and roots. POD and APX in leaves respond more rapidly to high salt stress than to low salt stress. With the increase of salt stress time, SOD and POD activity decreased obviously in leaves, stems and roots, and more dramatically under high salt stress than under high salt stress.

**Key words** Salt stress; Antioxidative enzymes; *Glycine max*; Heinong 40; Organ

日益严重的土壤盐渍化是影响农业生产的非生物胁迫因子之一。盐胁迫会对植物产生初级的渗透胁迫和离子胁迫。初级胁迫下植物叶绿体和线粒体代谢导致大量的活性氧分子 (reactive oxygen species, ROS) 的积累, 又会进一步对植物产生次级的氧

化胁迫。活性氧分子主要包括超氧阴离子、过氧化氢、氢氧根离子、羟自由基、, 通过对脂、蛋白质和核酸等细胞组分的氧化损伤改变正常的细胞代谢。为了减轻 ROS 引起的氧化损伤, 植物进化出由低分子量抗氧化物和抗氧化酶组成的复杂的活性氧防御系

统<sup>[1,2]</sup>。超氧化物歧化酶(SOD)与过氧化氢酶(CAT)、过氧化物酶(POD)以及 B2 胡萝卜素等物质协同作用,可防御活性氧或其他过氧化物自由基对细胞膜系统的伤害,以减轻逆境盐胁迫对植物细胞的伤害<sup>[3]</sup>。SOD 是主要的为 O 的清除酶,通过消除 O(  $2O + 2H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2$  ),以及降低 O 所产生的其它活性氧对细胞起保护作用。细胞中 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 的积累会降低 CO<sub>2</sub> 的固定效率,尤其是 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 和 O 通过 Haber - Weiss 反应会产生更多的活性氧,所以及时清除 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 对防止活性氧十分重要。CAT 主要分布于过氧化物酶体中,可将高浓度的 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 清除。POD 可清除线粒体或胞浆中产生的低浓度的 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>。抗坏血酸过氧化物酶(APX)被认为叶绿体中清除 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 的关键酶<sup>[4]</sup>。因此,抗氧化酶对自由基的清除有着十分重要的意义。

正常情况下,植物在生命活动中产生的活性氧自由基中存在着产生和消除的动态平衡状态。当植物处于盐胁迫等逆境时,活性氧的动态平衡被打破,产生的大量活性氧会给植物体造成严重的损伤<sup>[5]</sup>。各种活性氧清除酶的活性和非酶系统中各种还原性物质或抗氧化物质含量的高低,可基本反映出植物体内活性氧清除或抗氧化能力的强弱。

大豆(*Glycine max* L.)是重要的油料作物和粮食作物,是世界上食用油和植物蛋白的主要来源。为了适应现代农业的发展要求,增强大豆抗逆性是大豆育种发展方向之一<sup>[6]</sup>。本文以栽培大豆黑农 40 为材料,研究 NaCl 胁迫下四种抗氧化酶活性的变化,为揭示大豆的耐盐机理,改良栽培大豆耐盐性提供理论依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 材 料

选取耐盐性较强的大豆品种 AS 的种子,于 25℃ 浸种约 12 h,然后于温室土培 26 d,培养两片真叶后移至 25℃ 培养室中培养,自然光照。将大豆苗分成 3 组:第一组大豆幼苗为对照,用新配的 1/2 Hoagland 营养液(不含 NaCl)处理;第二组幼苗含低盐(65 mmol · L<sup>-1</sup> NaCl)的 1/2 Hoagland 溶液处理;第三组幼苗用高盐(130 mmol · L<sup>-1</sup> NaCl)的 1/2 Hoagland 溶液处理。每天 24 h 持续 15 d,分别取不同处理的大豆幼苗茎段 0.5 g,加入 0.05 mol/L 磷酸缓冲液(pH7.8)5 mL,冰浴研磨,4℃ 11 000 r/

min 离心 15 min,取上清液为酶提取液,用于测定酶活性。每个样品均重复 3 次,取平均值。

### 1.2 方 法

1.2.1 SOD 活性的测定 SOD 活性测定 NBT 光还原法进行<sup>[7]</sup>。用氯化硝基四氮唑蓝(NBT)光化还原法测定 SOD 活性,以抑制 NBT 光化还原 50% 做为一个活力单位。SOD 酶活力按下式计算:

$$\text{SOD 酶活} = \frac{(D_1 - D_2) \times V \times 1000 \times 60}{D_1 \times B \times W \times T \times 50\%}$$

A:为酶活力(酶活力单位:U/g(FW) · h);D1:为不加酶液空白对照的光密度平均值;D2:测定样品酶液的光密度;V:酶提取液总体积(mL);B:一个酶活力单位的酶液量(μL);W:样品鲜重(g);T:反应时间(min);1 000: 1 mL = 1 000 μL;60: 1 h = 60 min。

1.2.2 POD 活性的测定 POD 的活性采用愈伤木酚法<sup>[8]</sup>测定 POD 活性。3 mL 反应液含:磷酸缓冲液(pH6.0)0.2 mmol/L,H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>0.5 mmol/L 愈伤木酚,加适量酶液反应 5 min,测 A470。以每分钟光密度变化(以每分钟 OD470 nm 变化 0.01 为 1 个活力单位)表示酶活性大小,即:

$$\text{POD 酶活力} = \frac{\Delta OD_{470\text{nm}}}{\text{min} \cdot \text{mg}(FW)}$$

1.2.3 CAT 活性的测定 CAT 活性测定采用高锰酸钾滴定法<sup>[9]</sup>来测定。取 50 mL 三角瓶 4 个(两个测定两个对照),测定瓶中加入酶液 250 μL,对照瓶中加入磷酸缓冲液 250 μL,再加入 2.5 mL 0.1 mol/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>,同时计时,于 30℃ 恒温水浴中保温 10 min,立即加入 10% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2.5 mL。用 0.1 mol/L KMnO<sub>4</sub> 标准溶液滴定 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>,至出现粉红色(在 30 min 内不消失)为终点。酶活性用每克鲜重样品 1 min 内分解 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 的毫克数表示:

$$\text{CAT 酶活}(\text{mgH}_2\text{O}_2/\text{gFW} \cdot \text{min}) = \frac{(A - B) \times V_T \times 1.7}{FW \times V_1 \times t}$$

式中 A—对照 KMnO<sub>4</sub> 滴定毫升数

B—酶反应后 KMnO<sub>4</sub> 滴定毫升数

VT—酶液总量(mL)

V1—反应所用酶液量(mL)

W—样品鲜重(g)

1.7—1 mL 0.1 mol/L 的 KMnO<sub>4</sub> 相当于 1.7 mg H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

1.2.4 APX 活性的测定 按照沈文彪等<sup>[3]</sup>的方法略加改动。3 mL 反应混合液中含:50 mmol/L K<sub>2</sub>

$\text{HPO}_4 - \text{KH}_2\text{PO}_4$  缓冲液 (pH7.0), 0.1 mmol/L EDTA2Na, 0.3 mmol/L AsA, 0.06 mmol/L  $\text{H}_2\text{O}_2$  和 0.1 mL 酶液。加入  $\text{H}_2\text{O}_2$  后立即在 25 °C 下测定 10 ~ 30 s 内 OD290 值变化, 根据单位时间内 A290 减少值, 计算 AsA - POD 活性, 酶活性可用  $\mu\text{molAsA}/(\text{g FW} \cdot \text{h})$  表示。

## 2 结果和分析

### 2.1 NaCl 胁迫下黑农 40 不同器官中 SOD 酶活性的变化

无论低盐还是高盐胁迫下叶片中 SOD 酶活性始终高于茎部和根部, 茎部则是先高于根部后又低于根部。根部和茎部 SOD 酶活性的相对的变化在高盐胁迫下的出现的时间要早于低盐胁迫时。

无论高盐还是低盐胁迫的早期, 黑农 40 根、茎、叶中 SOD 活性都表现为上升。在低盐胁迫的中期和后期以及高盐胁迫的中期, 叶片 SOD 活性基本维持在较为稳定的水平。在高盐胁迫的后期叶片 SOD 活性发生轻微的下降。从低盐胁迫的中期到后期茎部 SOD 活性开始缓慢下降, 而从高盐胁迫的中期到后期茎部 SOD 活性表现为急剧下降。在低盐胁迫的后期根部 SOD 活性缓慢下降, 而在高盐胁迫的后期根部 SOD 活性则急剧下降。

图 1 低盐胁迫下不同器官 SOD 酶活性的变化

Fig. 1 Changes of SOD activity in different organs of under low salt stress

### 2.2 NaCl 胁迫下黑农 40 不同器官中 POD 酶活性的变化

无论高盐还是低盐胁迫下, 在整个盐胁迫过程中叶片 POD 活性始终高于茎部, 茎部 SOD 酶活性始终高于根部。叶片 POD 酶的活性峰远远高于茎部和根部。茎部和根部 POD 活性的水平始终比较稳定。高盐胁迫下叶片 POD 酶的活性的上升要早于低盐胁迫时。

### 2.3 NaCl 胁迫下黑农 40 不同器官中 CAT 酶活性的变化

图 2 高盐胁迫下不同器官 SOD 酶活性的变化

Fig. 2 Changes of activity in different organs under high salt stress

图 3 低盐胁迫下不同器官 POD 酶活性的变化

Fig. 3 Changes of POD activity in different organs under low salt stress

图 4 高盐胁迫条件下不同器官 POD 酶活性的变化

Fig. 4 Changes of POD activity in different organs under high salt stress

### 的变化

在低盐和高盐胁迫下黑农 40 的叶片中 CAT 酶活性始终高于茎部, 而根部 CAT 酶活性的变化幅度则较大。低盐胁迫下根部 CAT 酶活性在胁迫早期和中期介于叶片和根部之间, 在胁迫的后期开始急剧下降, 最终低于叶片和茎部。在高盐胁迫下根部 CAT 酶活性在胁迫中期即开始急剧下降, 最终低于叶片和茎部。

### 2.4 NaCl 胁迫下黑农 40 不同器官中 APX 酶活性的变化

无论高盐还是低盐胁迫下, 叶片 APX 的酶活性始终高于茎部和根部。叶片 APX 酶的活性峰远远高于茎部和根部。根部 APX 的酶活性都是先高于茎部, 后又下降, 最终低于叶片和茎部。高盐胁迫下

叶片 APX 活性上升的应答反应比低盐胁迫早。

图 5 低盐胁迫下大豆不同器官中 CAT 酶活性的变化

Fig. 5 Changes of CAT activity in different organs of under low salt stress

SOD、POD、APX 活性基本上始终明显高于茎部和根部的酶活性。表明盐胁迫下叶片所受的氧化胁迫比根、茎部严重,因此通过活性氧防御系统来清除活性氧,以减轻氧化胁迫的危害,SOD、POD、APX 在大豆黑农 40 叶片的活性氧清除中起了重要作用。於丙军等<sup>[10]</sup>的研究表明,盐胁迫对耐盐性弱的大豆种群的叶片的 O<sub>2</sub> 伤害程度远大于根部。本研究结果与於丙军等的研究结果是一致的。叶片 CAT 酶活性在低盐胁迫的后期低于根、茎部,在高盐胁迫的中期低于根部,表明盐胁迫对叶片 CAT 酶活性的影响较大,同 SOD、POD、APX 相比,CAT 在盐胁迫下对叶片活性氧的清除作用有限。

Scandalios<sup>[11]</sup>与 Seel<sup>[12]</sup>等的研究表明,轻度或短期水分胁迫下植物 SOD 活性呈上升趋势,而在严重或长期胁迫条件下出现下降走向。在 NaCl 胁迫条件下,黑农 40 茎部和根部的 SOD 随着盐胁迫时间的延长也呈现出明显相似的变化趋势。此外,在高盐胁迫下茎部和根部 SOD 活性的下降都比在低盐胁迫时提早且更为急剧。在低盐胁迫的中期和后期以及高盐胁迫的中期,叶片 SOD 活性基本维持在较为稳定的高于根部和茎部的水平;在高盐胁迫的后期叶片 SOD 活性只发生轻微的下降,表明叶片 SOD 清除活性氧的能力比根和茎部都强。

王茅雁等<sup>[13]</sup>的研究表明,受轻度水分胁迫的植物其 CAT 活性基本不变或上升,严重胁迫时却下降。在 NaCl 胁迫条件下,黑农 40 根、茎、叶的 CAT 活性也呈现出基本相似的变化趋势。根、茎、叶的 CAT 活性在高盐胁迫后期的下降都比在低盐胁迫时急剧。高盐胁迫下根部 CAT 活性的下降明显早于低盐胁迫时的下降。在高盐和低盐胁迫下黑农 40 的叶片中 CAT 酶活性始终高于茎部,表明叶片 CAT 酶清除活性氧的能力大于茎部。

无论高盐还是低盐胁迫下,茎部和根部 POD 活性水平始终较为稳定,表明黑农 40 茎部和根部 POD 对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 的清除起到较为稳定的作用。高盐胁迫时叶片 POD 活性峰比低盐胁迫时提前出现,表明其高盐胁迫下比在低盐胁迫时的应答反应迅速。高盐胁迫下叶片 APX 活性上升的应答反应也比低盐胁迫早,表明高盐胁迫时 APX 通过快速的应答反应清除活性氧。

(下转 354 页)

图 6 高盐胁迫下不同器官 CAT 酶活性的变化

Fig. 6 Changes of CAT activity in different organs of under high salt stress

图 7 低盐胁迫下不同器官中 APX 酶活性的变化

Fig. 7 Changes of APX activity in different organs of under low salt stress

图 8 高盐胁迫条件下不同器官 APX 酶活性的变化

Fig. 8 Changes of APX activity in different organs under high salt stress

### 3 讨论

无论低盐还是高盐胁迫条件下,黑农 40 叶片中

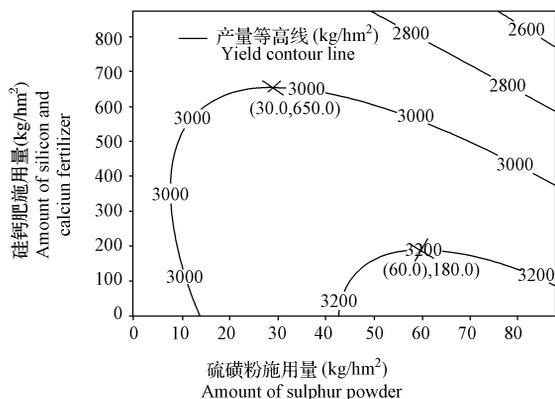


图3 硅钙肥和硫磺粉对大豆产量的互作效应

Fig. 3 Interaction effect between calcium and silicon fertilizer and sulphur powder on soybean yields

钙肥居中。硫磺粉的产量灵敏度峰值最高, 硅钙肥次之, 生石灰最低; 硅钙肥和硫磺粉的互作对产量作用极显著, 其他互作因素不显著。

综合以上三个因素对产量的作用, 硫肥对产量作用相对较大, 硅钙肥和生石灰对产量贡献相对较小, 这表明在 pH 值为中性的土壤不必施用生石灰。在本试验条件下, 硫肥和硅钙肥配合施用, 虽然表现为增产, 但硅钙肥成本较高; 如果将产量水平定位在  $3000.0 \text{ kg/hm}^2$  ( $200.0 \text{ kg}/667\text{m}^2$ ), 则硫磺粉施量

为  $14.0 \text{ kg/hm}^2$ , 硅钙肥免施; 产量水平为  $3200 \text{ kg/hm}^2$ , 硫磺粉  $43.0 \text{ kg/hm}^2$ , 硅钙肥免施, 为本试验的最佳选择方案。李玉颖<sup>[7]</sup>的研究表明, 薄层黑土施硫的适宜用量为  $17.0 - 33.9 \text{ kg/hm}^2$ , 本试验结果与之接近。

## 参 考 文 献

- [1] 张学军, 冯卫东, 宋德印, 等. 施用硅钙磷肥对水稻生长、产量及品质的研究初报[J]. 宁夏农林科技, 2001, (1): 37-38.
- [2] 兰雨锋. 水稻施用硅钙肥效果试验[J]. 垦殖与稻作, 2006 (增刊): 99
- [3] 张金盛, 赵振达, 蒋德勤, 等. 水稻施用硅钙复混肥效应研究[J]. 天津农业科学, 1999, 5(2): 15-17.
- [4] 肖德全, 孙继文, 邵振海. 玉米施硅钙肥效果分析[J]. 植保技术, 2005, (6): 8-9.
- [5] 贺立源, 江世文. 小麦施用硅钙肥效应的研究[J]. 土壤肥料 1999(3): 8-11.
- [6] 娄春荣, 刘慧颖, 华利民, 等. 大豆施用硅钙复混肥及硅钙肥效果研究[J]. 杂粮作物, 2002, 22(2): 102-104
- [7] 李玉颖. 黑龙江省黑土大豆施硫效果的研究[J]. 土壤肥料. 1997, (3): 23-25
- [8] E. F. Caires, G. Barth, F. J. Carbuio. Lime application in the establishment of a no-till system for grain crop production in Southern[J]. Brazil. Soil & Tillage Research, 2006, 89 (1): 3-12.

(上接 346 页)

## 参 考 文 献

- [1] JianKang Zhu. Genetic analysis of plant salt tolerance using Arabidopsis [J]. Plant Physiology, 2000, 124(33): 941-948.
- [2] Azevedo Neto AD, Prisco JT, Enéas Filho 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]. Environ. Exp. Bot, 2006, 56(1): 87-94
- [3] 沈文飏, 徐朗莱, 叶茂炳, 等. 抗坏血酸过氧化物酶活性测定的探讨[J]. 植物生理学通讯, 1996, 32(3): 203-205
- [4] 赵可夫. 植物抗盐生理[M]. 北京: 科学技术出版社, 1993, 221-235.
- [5] 方允中, 李文杰. 自由基与酶[M]. 北京: 科学出版社, 1989, 112.
- [6] 王升吉, 尚佑芬, 杨崇良, 等. 基因转化技术在大豆育种上的应用现状[J]. 山东农业科学, 2000, 2: 41-43.
- [7] 张志良, 瞿伟菁. 植物生理学实验指导[M]. 北京: 高等教育出版社, 2003, 268-269.
- [8] 张志良, 瞿伟菁. 植物生理学实验指导[M]. 北京: 高等教育出版社, 2003, 123-124.
- [9] 白宝璋, 汤学军主编. 植物生理学测试技术[M]. 北京: 中国科技出版社, 1993, 82-83.
- [10] 於丙军, 刘友良. 盐胁迫对一年生盐生野大豆幼苗活性氧代谢的影响[J]. 西北植物学报, 2003, 23(1): 18-22.
- [11] Scandalios J G. Oxygen stress and superoxide dismutases [J]. Plant Physiology, 1993, 101: 7-12.
- [12] Seel W E, Hendry G A F, Lee J A. The combined effects desiccation and irradiance on mosses from xeric and hydric habitats[J]. Journal of Experimental Botany, 1992, 43: 103.
- [13] 王茅雁, 邵世勤, 张建华, 等. 水分胁迫对玉米保护酶活力及膜系统结构的影响[J]. 华北农学报, 1995, 10(2): 43-49.