

硅对野生大豆幼苗耐盐性的影响及其机制研究

王丽燕

(德州学院 生命科学学院, 山东 德州 253023)

摘要:为探讨外源硅对野生大豆幼苗耐盐性的影响机制,采用水培的方式测定外源硅(K_2SiO_3)对盐胁迫(NaCl)下野生大豆叶片抗氧化酶活性、叶绿素含量、光合速率和氧自由基(ROS)含量的影响。结果表明:外源硅可以提高盐胁迫条件下野生大豆的生长,降低叶片丙二醛(MDA)、超氧阴离子自由基($O_2^{\cdot-}$)和过氧化氢(H_2O_2)的含量,提高超氧化物歧化酶(SOD)、抗坏血酸过氧化物酶(APX)及过氧化物酶(POD)的活性,提高叶绿素含量和光合速率。进一步证实外源硅对于植物的新陈代谢及生理变化具有重要作用。

关键词:野生大豆;盐胁迫;硅;抗氧化酶

中图分类号:S565.1

文献标识码:A

文章编号:1000-9841(2013)05-0659-05

Effects of Silicon on Salt Tolerance of *Glycine soja* Seedlings and Its Mechanism

WANG Li-yan

(College of Life Science, Dezhou University, Dezhou 253023, China)

Abstract: In order to explore the mechanism of exogenous silicon (Si) on improving salt tolerance, the *Glycine soja* were grown hydroponically to study the effect of exogenous Si on the activities of major antioxidant enzymes, the content of chlorophyll, net photosynthetic rate (P_n), and reactive oxygen species (ROS) in leaves under NaCl stress. The results showed that exogenous Si could enhance growth of salt treatment *Glycine soja* and decreased contents of MDA, $O_2^{\cdot-}$ and H_2O_2 in leaves under salt stress, while content of chlorophyll, net photosynthetic rate and antioxidant enzymes activities including superoxide dismutase (SOD), peroxidase (POD), and ascorbate peroxidase (APX) were increased. Therefore, exogenous Si could enhance salt tolerance of *Glycine soja*. The results of the present experiment coincided with the conclusion that Si may be involved in the metabolic or physiological changes in plants.

Key words: *Glycine soja*; NaCl stress; Silicon; Antioxidant enzymes

硅是地球表面的第二大元素,在 $pH < 9$ 的土壤中,硅元素主要以 $Si(OH)_4$ 形式存在,浓度为 $0.1 \sim 2.0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ [1]。相关研究表明,硅可以促进植物生长、提高产量及抵抗盐胁迫、干旱胁迫、重金属胁迫等生物和非生物胁迫的能力 [2-3],盐胁迫下施用外源硅可以提高大麦 SOD、POD、CAT 活性,降低 MDA 含量及叶片电导率 [4],硅可以提高水稻叶片木质素含量 [5]。虽然硅具有明显的促进植物抵抗胁迫的能力,但尚未被列为高等植物生长的必需元素。自 20 世纪 90 年代以来,越来越多的试验表明硅是植物特别是草本植物生长的有益矿质元素 [4]。

野生大豆是一年生豆科草本植物,在我国各地广泛分布,因其与栽培大豆杂交时具有亲和性高、遗传物质易交流等特性而被广泛应用于栽培大豆育种研究。以往的有关硅对植物抗性影响的研究主要集中在非盐生植物,外源硅对盐生豆类植物抗盐生理的影响鲜见报道。因此,以野生大豆作为对

象,研究盐胁迫及添加外源硅处理对野生大豆叶片有关生理生化指标的影响,以期为我国北方盐碱地的改良和野生大豆的引种驯化提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

野生大豆种子采自山东省垦利县黄河入海口的盐碱滩。选取籽粒饱满、大小一致的野生大豆种子,播种于盛有干净石英砂的苗钵中,于 MGC-300H 型微电脑控制的人工气候箱(上海一恒科学仪器有限公司)中培养。当幼苗长出三出复叶时移栽,进行水培处理,水培适应 5 d 后,进行盐胁迫处理。处理溶液配置参考梁永超等 [6] 的方法,以 K_2SiO_3 作为 Si 处理的试剂,处理溶液以完全 Hoagland 溶液配置,所增加的 K^+ 浓度从 Hoagland 溶液中扣除,以 HNO_3 补齐缺失的 NO_3^{-} 浓度。试验设计 4 个处理水平(表 1)。

收稿日期:2013-05-13

基金项目:德州市科技计划资助项目(20090162-1);山东省高等学校科技计划项目(J13LE12)。

作者简介:王丽燕(1972-),女,博士,副教授,主要从事植物抗性生理研究。E-mail:wangly72@126.com。

表1 各处理溶液成分及浓度
Table 1 The solution composition and concentration of the treatments

处理 Treatment	溶液组成及浓度 Composition and concentration of the solution
A(CK)	完全 Hoagland 溶液处理
B	100 mmol·L ⁻¹ NaCl
C	100 mmol·L ⁻¹ NaCl + 1.0 mmol·L ⁻¹ K ₂ SiO ₃
D	100 mmol·L ⁻¹ NaCl + 3.0 mmol·L ⁻¹ K ₂ SiO ₃

为避免盐冲击效应,采用每天递增 50 mmol·L⁻¹ NaCl 的方式加盐,每天浇灌 1 次。处理 4 d,采取相同部位的成熟叶进行抗氧化酶活性、丙二醛(MDA)、H₂O₂及O₂⁻含量及测定。分别于处理 4,6,8 d 时进行叶绿素含量和光合速率的测定。

1.2 测定项目与方法

1.2.1 抗氧化酶活性的测定 抗坏血酸过氧化物酶(APX)活性测定参照 Mishra 等^[7]的方法,以每分钟氧化 1 μmol AsA 的酶量为一个酶活单位。

超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化物酶(POD)活性参照 Bartoli 等^[8]的方法测定。取 0.5 g 叶片放于预冷的研钵中,加 1 mL 磷酸缓冲液冰浴研磨成浆,加缓冲液至终体积 5 mL。取 2 mL 于 12 000 r·min⁻¹下离心 10 min,上清液即为 SOD 及 POD 粗提液。显色反应后计算其活性。SOD 活性以能抑制 NBT 光化学反应的 50% 为一个酶单位(U),POD 活性用 ΔA₄₇₀·min⁻¹·g⁻¹ FW 表示。

1.2.2 丙二醛(MDA)含量的测定 参照赵世杰等^[9]的方法,分别测定 A₄₅₀、A₅₃₂、A₆₀₀ 值,根据 C (μmol·L⁻¹) = 6.45 (A₅₃₂ - A₆₀₀) - 0.56A₄₅₀ 计算 MDA 的含量。

1.2.3 H₂O₂与O₂⁻染色分析 植物叶片中积累的 H₂O₂与O₂⁻可以通过组织化学染色法直接反应出来。用 Schraudner 等^[10]的方法对正常生长状态和温度处理后的野生大豆叶片进行 H₂O₂与O₂⁻的组织化学染色,照相,根据感色深浅,判断 H₂O₂与O₂⁻产生的量。

H₂O₂的染色:染色溶液为 0.1 mg·mL⁻¹ DAB (Diaminobezidine)。将叶片浸泡在染色液中,25℃ 黑暗培养过夜。放于乙醇:乳酸:甘油(3:1:1)固定液中煮沸 10 min,冷却,将叶片转入新鲜的固定液中。室温下过夜,照相。

O₂⁻检测:将各种处理的叶片直接浸泡在 25 mmol·L⁻¹ 磷酸缓冲液(pH7.6)溶解的 NBT(0.1 mg·mL⁻¹)溶液中,在 25℃ 黑暗培养 16 h。放于乙

醇:乳酸:甘油(3:1:1)固定液中煮沸 10 min,冷却,将叶片转入新鲜的固定液中。室温下过夜,照相。

1.2.4 叶绿素含量测定 叶绿素含量测定参照 Hemavathi 等^[11]的方法。取 0.2 g 叶圆片至 10 mL 离心管中加入 2 mL 80% 丙酮暗处放置,进行充分提取,3 500 g 离心 5 min,取上清液分别测定 663 和 646 nm 吸光值。按以下算式计算叶绿素含量: X(mg·g⁻¹) = 浓度 C₁ (mg·L⁻¹) × 提取液体积 (mL)/叶片质量(g)/1000,其中, C₁ = 6.63A₆₆₃ - 18.08A₆₄₆。

1.2.5 光合速率的测定 采用 LI-6400 便携式光合作用测定仪在室温和大气 CO₂浓度下测定净光合速率(Pn),光照强度为 800 μmol·m⁻²·s⁻¹,叶温 25℃,氧气含量 22%,CO₂浓度 360 μL·L⁻¹。每处理重复 3 次,每重复测定 15 株,结果以平均值 ± 标准误差表示。

1.3 数据分析

应用 Excel 2003 进行方差分析和显著性检验。

2 结果与分析

2.1 外源硅对 NaCl 胁迫下野生大豆幼苗 MDA 含量的影响

丙二醛(MDA)含量反映了膜受损程度。如图 1 所示,NaCl 处理(B)条件下,MDA 含量明显高于对照(A),而添加 1.0 和 3.0 mmol·L⁻¹ (C 和 D)外源 Si 后,MDA 含量分别降低了 13.9% 和 13.7%。

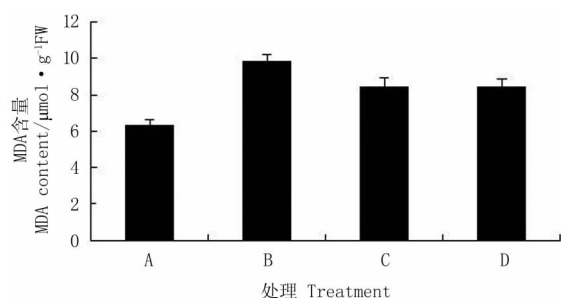


图1 硅对 NaCl 胁迫下野生大豆 MDA 含量的影响

Fig. 1 Effects of silicon on MDA contents of *Glycine soja* under salt stress

2.2 外源硅对 NaCl 胁迫下野生大豆幼苗 H₂O₂、O₂⁻含量的影响

DAB 染色实验可以更直接地表现出 H₂O₂的积累量,与对照相比,NaCl 处理条件下野生大豆叶片颜色明显加深,但添加外源硅后,叶片上的褐色斑点明显比 NaCl 处理减少(图 2a),可见 Si 可以减少 H₂O₂的积累。

同时进行了 O₂⁻染色分析,处理 4 d 后,与对照相比,NaCl 处理的植株积累更多的 O₂⁻,显现出蓝色

斑点,颜色最深,添加外源硅处理条件下,野生大豆叶片蓝色斑点的积累减少(图 2b)。表明 Si 增加了盐胁迫下 ROS 的清除,同时膜脂过氧化程度降低。

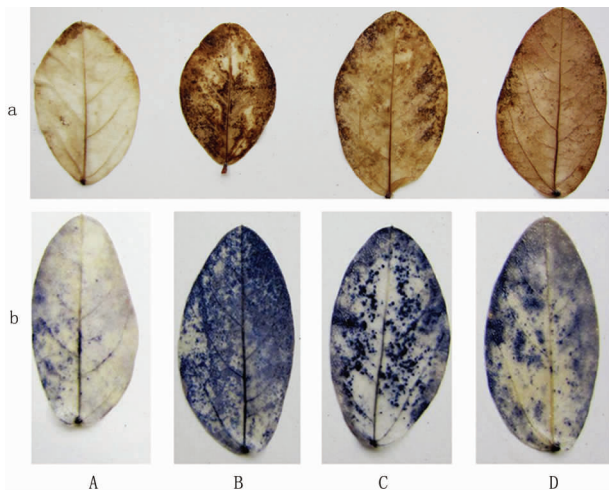


图 2 野生大豆叶片 H_2O_2 (a) 及 O_2^- 染色分析 (b)

Fig. 2 Changes in H_2O_2 staining (a) and O_2^- staining (b) of *Glycine soja* leaves

2.3 外源硅对 NaCl 胁迫下野生大豆幼苗生长量的影响

如图 3 所示,处理 4 d 后野生大豆的株高及复叶数没有变化,而单纯 $100 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl 处理的野生大豆叶片明显小于其他 3 组,表明一定浓度的 Si 可以促进 NaCl 处理条件下野生大豆的生长。

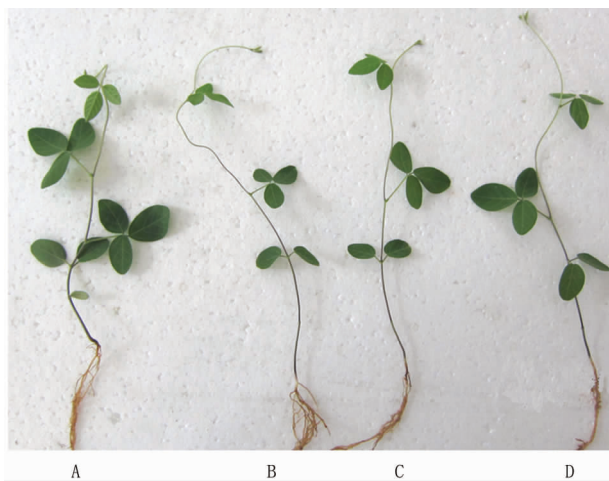


图 3 硅对 NaCl 胁迫下野生大豆生长的影响

Fig. 3 Effects of silicon on plant growth of *Glycine soja* under salt stress

2.4 外源硅对 NaCl 胁迫下野生大豆幼苗 SOD 活性的影响

由图 4 可以看出,NaCl 处理条件下 SOD 活性高于对照 ($P < 0.05$),且随着外源硅浓度的升高,SOD 活性增强,施加 1.0 和 $3.0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Si 后 SOD

活性分别为单纯 NaCl 胁迫的 1.12 和 1.20 倍。可见,加入外源硅后可以提高野生大豆的 SOD 活性。

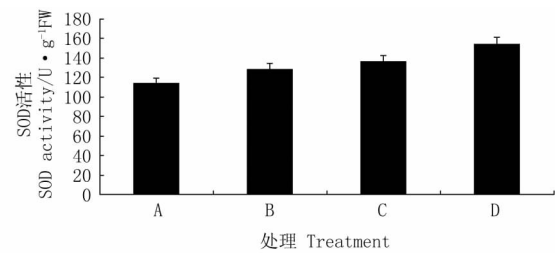


图 4 硅对 NaCl 胁迫下野生大豆叶片 SOD 活性的影响

Fig. 4 Effects of silicon on SOD activities of leaves in *Glycine soja* under salt stress

2.5 外源硅对 NaCl 胁迫下野生大豆幼苗 POD 活性的影响

POD 是植物体内抗氧化保护酶系统的重要酶,可有效阻止 H_2O_2 的积累,限制潜在的氧伤害。单纯 NaCl 处理条件下,POD 活性降低,施加 $1.0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Si 后 POD 活性升高,为前者的 1.14 倍,增加外源 Si 的浓度,POD 活性有所降低,但仍高于单纯 NaCl 胁迫处理(图 5)。添加外源硅虽可提高 NaCl 胁迫下的 POD 活性,但仍低于对照。

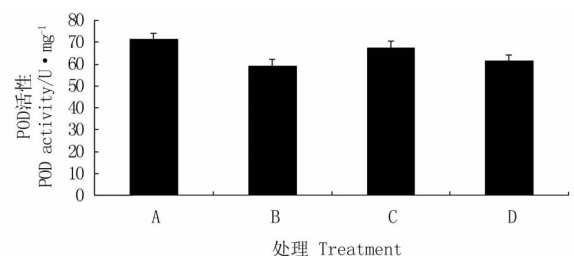


图 5 硅对 NaCl 胁迫下野生大豆叶片 POD 活性的影响

Fig. 5 Effects of silicon on POD activities of leaves in *Glycine soja* under salt stress

2.6 外源硅对 NaCl 胁迫下野生大豆幼苗 APX 活性的影响

APX 可以消除过量的过氧化氢,使过氧化氢维持在一个较低的水平。盐胁迫下 $1.0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 外源硅可以显著提高 APX 活性,其活性为单纯 NaCl 处理的 1.26 倍(图 6)。

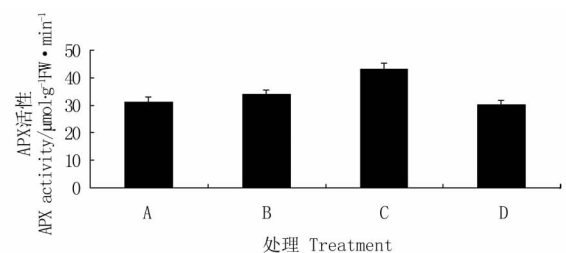


图 6 硅对 NaCl 胁迫下野生大豆幼苗 APX 活性的影响

Fig. 6 Effects of silicon on APX activities of leaves in *Glycine soja* under salt stress

2.7 外源硅对 NaCl 胁迫下野生大豆幼苗叶绿素含量及光合作用的影响

图7表明,NaCl胁迫降低了野生大豆叶片的叶绿素含量,且随时间延长,叶绿素含量降低明显。NaCl胁迫下施加1.0及3.0 mmol·L⁻¹外源硅后,野生大豆叶绿素含量表现出增加趋势,且在处理6 d后叶绿素含量均明显高于盐处理。

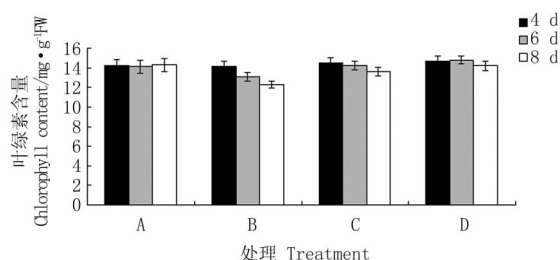


图7 硅对 NaCl 胁迫下野生大豆叶片叶绿素含量的影响

Fig. 7 Effects of silicon on chlorophyll content of leaves in *Glycine soja* under salt stress

由图8可知,盐胁迫降低了野生大豆叶片的光合速率,添加外源硅可以促进野生大豆幼苗的光合速率。NaCl胁迫下添加1.0及3.0 mmol·L⁻¹外源硅,在处理6 d及8 d时,光合速率均高于单纯NaCl胁迫处理。处理8 d时,施加1.0及3.0 mmol·L⁻¹ Si,光合速率比相同处理时间的NaCl处理高30.6%、41.1%,可见,外源硅可以提高NaCl胁迫下的大豆叶片光合速率。

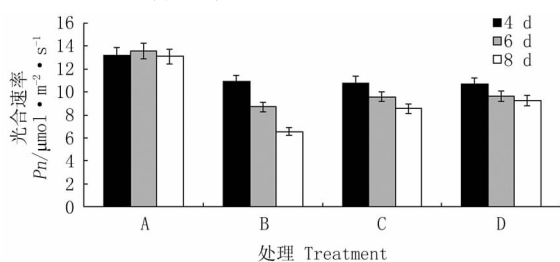


图8 硅对 NaCl 胁迫下野生大豆光合速率的影响

Fig. 8 Effects of silicon on the net photosynthetic rate of leaves in *Glycine soja* under salt stress

3 讨论

施加外源硅可以提高大麦^[4]、水稻^[12]、小麦^[13]及番茄^[14]等的抗盐性,已有的结果也表明,一定浓度的外源硅可以促进盐胁迫条件下野生大豆的萌发^[15]。本试验结果进一步表明,外源硅可以促进NaCl胁迫下野生大豆的生长,在处理4 d后即表现出叶片的明显增大,这与前人的研究结果一致^[16]。

盐胁迫、干旱胁迫等非生物胁迫是影响植物生长发育的重要因素,植物在正常生长条件及逆境胁迫下都不可避免地产生活性氧(reactive oxygen species, ROS)。一定浓度的ROS是植物生长所必需

的,但非生物胁迫会导致ROS的大量产生,若不能及时清除则会引起细胞的氧化损伤,启动膜脂中不饱和脂肪酸的过氧化,导致膜脂和膜蛋白损伤,破坏生物膜结构的稳定性,引起植物伤害。所以植物体内ROS的产生和清除必须受到严格调控。植物体内存在多种活性氧清除机制,包括超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化物酶(POD)参与的酶促方式,以及参与抗坏血酸-谷胱甘肽循环(AsA-Glu cycle)的酶类如抗坏血酸过氧化物酶(APX)。在正常生长条件下,植物细胞中自由基的产生和消除处于动态平衡状态,而盐处理可以打破植物体内活性氧产生和清除的平衡,从而引起活性氧的积累。Diego等^[17]研究认为,盐胁迫下耐盐性强的品种抗氧化酶活性高于耐盐性弱的品种,但MDA含量前者明显低于后者。外源硅可以降低NaCl胁迫下黄瓜幼苗叶片质膜透性,提高了盐胁迫下黄瓜幼苗体内SOD、POD酶活性^[16]。本试验结果表明, Si可能参与了野生大豆的代谢活动,施加外源硅可以降低盐胁迫下野生大豆幼苗的MDA、H₂O₂及O₂⁻含量,增强野生大豆幼苗的SOD、POD、APX活性,可见,NaCl胁迫所诱导的氧化胁迫可以被外源硅所缓解,通过抗氧化酶活性的增强提高了野生大豆的抗盐性。但3种酶的变化趋势不完全一致, SOD活性在添加3.0 mmol·L⁻¹外源硅处理时表现出较高的活性,而POD、APX在添加1.0 mmol·L⁻¹外源硅处理时表现出较高活性,结合MDA含量的变化趋势,认为添加3.0 mmol·L⁻¹外源硅对提高野生大豆抗盐性可能更有效。

施硅肥有利于提高作物的光合作用,作物施硅肥后,可使作物硅细胞硅质化,茎叶挺直,减少遮荫,使叶片光合作用增强。盐胁迫下施硅,可以改善大麦叶绿体超微结构,减轻大麦叶绿体结构的破坏程度,增加其光合速率^[6]。硅元素有降低水稻根系内钠向地上部运输的作用,增加水稻盐胁迫下气孔导度,减少盐分对气体交换及光合速率的抑制^[18]。束良佐和刘英惠^[19]认为硅提高了盐胁迫下玉米幼苗叶片叶绿素含量,增强了玉米叶片的光合速率。本试验结果表明,施硅后可以增加盐胁迫下野生大豆叶片的叶绿素含量,提高光合速率,这同时可能是增加外源硅后野生大豆叶片生长优于盐胁迫处理的原因。早期的研究认为硅进入植物体后,在叶片角质层下面的表皮组织里形成角质-硅质双层结构,抑制蒸腾,减少植株水分蒸发,提高了光合作用效率与水分利用率,李清芳等^[20]认为硅降低了干旱胁迫下玉米的气孔导度,进而降低了水分蒸腾,从而促进了干旱胁迫下玉米的生长。

总之,施加一定浓度的硅肥可以提高野生大豆在盐胁迫下的生长。野生大豆生长过程中,1.0 ~ 3.0 mmol·L⁻¹ 硅可以通过增加野生大豆的抗氧化酶活性,提高叶绿素含量,因而增强野生大豆抵御盐胁迫所导致的氧化胁迫的能力,提高光合速率。本试验结果进一步证明,硅的生物学功能并非只是以往所被人们普遍接受的通过沉积在细胞壁上从而增强植物的机械强度,可能参与了野生大豆的代谢活动。

参考文献

- [1] Bogdan K, Schenk M K. Arsenic in rice (*Oryza sativa* L.) related to dynamics of arsenic and silicic acid in paddy soils[J]. Environmental Science and Technology, 2008, 42: 7885-7890.
- [2] Ma J F, Yamaji N. Silicon uptake and accumulation in higher plants[J]. Trends in Plant Science, 2006, 11: 392-397.
- [3] Rémus-Borel W, Menzies J G, Bélanger R R. Silicon induces antifungal compounds in powdery mildew-infected wheat[J]. Physiological and Molecular Plant Pathology, 2005, 66: 108-115.
- [4] Liang Y C, Chen Q, Liu Q, et al. Exogenous silicon (Si) increases antioxidant enzyme activity and reduces lipid peroxidation in roots of salt-stressed barley (*Hordeum vulgare* L.) [J]. Journal Plant Physiology, 2003, 160: 1157-1164.
- [5] Cai K, Gao D, Luo S, et al. Physiological and cytological mechanisms of silicon-induced resistance in rice against blast disease [J]. Physiologia Plantarum, 2008, 134: 324-333.
- [6] 梁永超, 丁瑞兴, 刘谦. 硅对大麦耐盐性的影响及其机制[J]. 中国农业科学, 1999, 32(6): 75-83. (Liang Y C, Ding R X, Liu Q. Effects of silicon on salt tolerance of barley and its mechanism [J]. Scientia Agricultura Sinica, 1999, 32(6): 75-83.)
- [7] Mishra N P, Mishra P K, Singhal G S. Changes in the activities of antioxidant enzyme during exposure of intact wheat leaves to strong visible light at different temperatures in the presence of protein synthesis inhibitors[J]. Plant Physiology, 1993, 102(3): 903-910.
- [8] Bartoli C G, Pastori G M, Foyer C H. Ascorbate biosynthesis in mitochondria is linked to the electron transport chain between complexes III and IV[J]. Plant Physiology, 2000, 123: 335-343.
- [9] 赵世杰, 史国安, 董新纯. 植物生理学实验指导[M]. 北京: 中国农业科学技术出版社, 2002: 130-131. (Zhao S J, Shi G A, Dong X C. Experimental guidebook to plant physiology[M]. Beijing: China Agriculture Science Technology Press, 2002: 130-131.)
- [10] Schansker G, Srivastava A, Govindjee, et al. Characterization of the 820-nm transmission signal paralleling the chlorophyll a fluorescence rise (OJIP) in pea leaves [J]. Functional Plant Biology, 2003, 30: 785-796.
- [11] Hemavathi, Upadhyaya C P, Akula N, et al. Enhanced ascorbic acid accumulation in transgenic potato confers tolerance to various abiotic stresses[J]. Biotechnology Letters, 2010, 32(2): 321-330.
- [12] Matoh T, Kairismee P, Takahashi E. Salt-induced damage to rice plants and alleviation effect silicate [J]. Soil Science and Plant Nutrition, 1986, 32: 295-304.
- [13] Ahmad R, Zaheer S H, Ismail S. Role of silicon in salt tolerance of wheat (*Triticum aestivum* L.) [J]. Plant Science, 1992, 85: 43-50.
- [14] Al-Aghabary K, Zhu Z J, Shi Q H. Influence of silicon supply on chlorophyll content, chlorophyll fluorescence and antioxidative enzyme activities in tomato plants under salt stress [J]. Journal of Plant Nutrition, 2005, 27: 2101-2115.
- [15] 王丽燕. 硅对 NaCl 胁迫下野生大豆种子萌发的影响[J]. 大豆科学, 2010, 29(5): 906-908. (Wang L Y. Effects of exogenous silicon on germination of *Glycine soja* under salt stress [J]. Soybean Science, 2010, 29(5): 906-908.)
- [16] Zhu Z J, Wei G Q, Li J, et al. Silicon alleviates salt stress and increases antioxidant enzymes activity in leaves of salt-stressed cucumber (*Cucumis sativus* L.) [J]. Plant Science, 2004, 167: 527-533.
- [17] Diego A M, Marco A O, Carlos A M, et al. Photosynthesis and activity of superoxide dismutase, peroxidase and glutathione reductase in cotton under salt stress [J]. Environmental and Experimental Botany, 2003, 49: 69-761.
- [18] Yeo A R, Flowers S A, Rao G, et al. Silicon reduces sodium uptake in rice (*Oryza sativa* L.) in saline conditions and this is accounted for by a reduction in the transpirational bypass flow [J]. Plant, Cell & Environment, 1999, 22(5): 559-565.
- [19] 束良佐, 刘英惠. 硅对盐胁迫下玉米幼苗叶片膜脂过氧化和保护系统的影响[J]. 厦门大学学报(自然科学版), 2001, 40(6): 1295-1300. (Shu L Z, Liu Y H. Effects of silicon on membrane lipid peroxidation and protective systems in the leaves of maize seedlings under salt stress [J]. Journal of Xiamen University (Natural Science), 2001, 40(6): 1295-1300.)
- [20] 李清芳, 马成仓, 季必金. 硅对干旱胁迫下玉米水分代谢的影响[J]. 生态学报, 2009, 29(8): 4163-4168. (Li Q F, Ma C C, Ji B J. Effect of silicon on water metabolism in maize plants under drought stress [J]. Acta Ecologica Sinica, 2009, 29(8): 4163-4168.)