

盐胁迫对野生和栽培大豆中抗氧化酶活性的影响

付 畅,关 畅,徐 娜

(哈尔滨师范大学生物学系,哈尔滨 150025)

摘要 盐胁迫会对植物产生次级的氧化胁迫,抗氧化酶对自由基的清除具有重要意义。通过对盐胁迫下耐盐性强的野生大豆 Antisalt 和耐盐性弱的栽培大豆 HN40 中的抗氧化酶活性的测定与分析,探讨了大豆的耐盐性机理。结果表明:盐胁迫下 Antisalt 通过快速的应答反应,较高的维持抗氧化酶活性水平的能力,表现出比 HN40 更强的耐盐性。

关键词 野生大豆;栽培大豆;盐胁迫;抗氧化酶;耐盐

中图分类号 S565.1 **文献标识码** A **文章编号** 1000-9841(2007)02-0144-05

EFFECT OF SALT STRESS ON THE ACTIVITY OF ANTIOXIDATIVE ENZYMES OF *GLYCINE SOJA* AND *GLYCINE MAX*

FU Chang, GUAN Yang, XU Na

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

Abstract Salt stress produces secondary oxidant stress on plants. Antioxidative enzymes play an important role in removing reactive oxygen species. The effects of salt stress on activity of antioxidative enzymes in *Glycine soja* (the highly salt tolerant Antisalt) and *Glycine max* (the salt tolerant HN40) were determined and analyzed to discuss the salt tolerant mechanism of soybean. The results indicated that the *Glycine soja* exhibit stronger salt tolerance than *Glycine max* through rapid responds and higher level of antioxidative enzymes activities.

Key words *Glycine soja*; *Glycine max*; Salt stress; Antioxidative enzymes; Salt tolerant

土壤盐渍化是影响农作物产量的重要因素之一。培育耐盐植物品种是开发和利用盐碱地的有效途径,但其前提是了解植物的耐盐机制。大量研究表明,盐胁迫对植物细胞的胁迫作用包括两方面,一方面是产生离子胁迫,在细胞内积累 Na^+ , 另一方面是产生渗透胁迫,使质膜的跨膜渗透压降低而导致细胞膨压的丧失,这两种初级胁迫还会产生次级的氧化胁迫^[1,2]。活性氧自由基攻击膜脂多不饱和脂肪酸,引起膜脂过氧化,破坏膜系统。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^[3]。活性氧清除系统由酶系统和非酶系统组成。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,以减轻逆境盐分胁迫对植物细胞的伤害^[4]。SOD 已被确认为 O_2^-

收稿日期:2006-12-11

基金项目:哈尔滨师范大学博士启动基金资助。

作者简介:付畅(1974-),女,博士,讲师,主要从事生化与分子生物学研究。E-mail: fuchanghnu@yahoo.com.cn

的净化剂,通过消除 $O_2^{\cdot-}$ ($2O_2^{\cdot-} + 2H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2$),以及降低 $O_2^{\cdot-}$ 所产生的其它活性氧对细胞起保护作用。细胞中 H_2O_2 的积累能降低 CO_2 的固定效率,尤其是 H_2O_2 和 $O_2^{\cdot-}$ 通过 Haber-Weiss 反应会产生更多的活性氧,所以及时清除 H_2O_2 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_2O_2 清除。POD 可清除线粒体或胞浆中产生的低浓度的 H_2O_2 。抗坏血酸过氧化物酶 (APX) 被认为叶绿体中清除 H_2O_2 的关键酶^[5]。因此,抗氧化酶对自由基的清除有着十分重要的意义。

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。本文以此耐盐性较强的野生大豆 Antisalt(以下简称 AS)和耐盐性弱的栽培大豆黑农 40(以下简称 HN40)为材料,研究 NaCl 胁迫下三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 °C 浸种约 12 h,然后于温室土培 26 d,培养两片真叶后移至 25 °C 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⁻¹ NaCl) 的 1/2 Hoagland 溶液处理;第三组幼苗用高盐 (130 mmol · L⁻¹ NaCl) 的 1/2 Hoagland 溶液处理。每 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 °C 11 000 r/min 离心 15 min,取上清液为酶提取液,用于测定酶活性。

1.2 方法

1.2.1 POD、CAT、SOD 酶活性的测定 SOD 活性测定采用 NBT 光还原法进行^[6]。POD 的活性采用愈伤木酚法^[7]测定。CAT 活性测定采用高锰酸钾滴定的方法来测定^[8]。以上每个样品均重复 3 次,取平均值。

2 结果和分析

2.1 不同盐浓度胁迫下大豆 Antisalt 和 HN40 SOD 酶活性的变化

2.1.1 根部 SOD 酶活性的变化 在低盐 (65 mmol · L⁻¹) 胁迫下 Antisalt 根部 SOD 酶活性变化幅度很小,基本维持在稳定水平。高盐 (130 mmol · L⁻¹) 胁迫下 Antisalt 根部 SOD 酶活性则发生大幅度的变化,呈现出先上升-下降,再上升-下降的应答趋势。HN40 在低盐和高盐胁迫下的根部 SOD 酶活性都呈现出先上升再下降的应答趋势,水平很接近。低盐胁迫下,Antisalt 在 3 ~ 13 d 时的 SOD 酶活性水平与 HN40 很接近,而在胁迫 0 ~ 3 d 与 13 ~ 15 d 时明显高于 HN40。高盐胁迫下,在 0 ~ 5 d 和 9 ~ 15 d 时 Antisalt 的 SOD 酶活性均明显高于 HN40(图 1)。

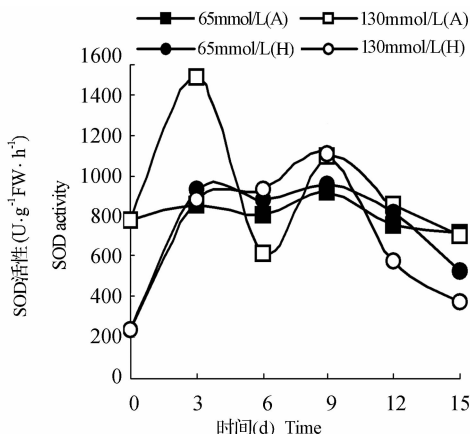


图 1 盐胁迫下 AS 和 HN40 根部 SOD 酶活性的变化

Fig. 1 Changes of SOD activity in roots of AS and HN40 under salt stress

2.1.2 茎部 SOD 酶活性的变化 高盐和低盐胁迫下, Antisalt 茎部的 SOD 酶活性均呈现出先上升-下降,再上升-下降的应答趋势和相近的酶活性水平。高盐和低盐下 HN40 茎部的 SOD 酶活性则均呈现上升后一直下降的应答趋势和相近的酶活性水平(图 2)。

2.1.3 叶部 SOD 酶活性的变化 如图 3 所示,无论在低盐还是高盐胁迫下, Antisalt 和 HN40 在 0 ~ 12 内均呈现出先升高然后维持在较高水平的应答趋势。Antisalt 叶片的 SOD 酶活性总是低于 HN40。

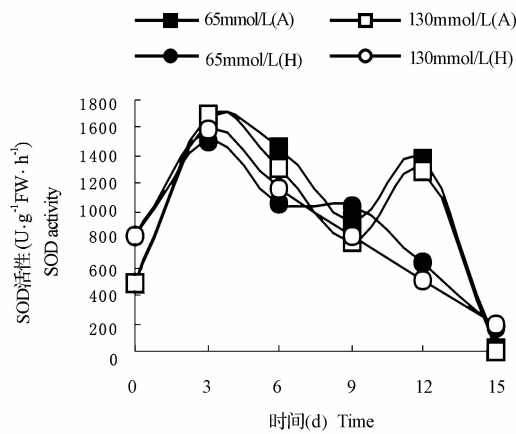


图2 盐胁迫下 AS 和 HN40 茎部 SOD 酶活性的变化
fig. 2 Changes of SOD activity in stems
of AS and HN40 under salt stress

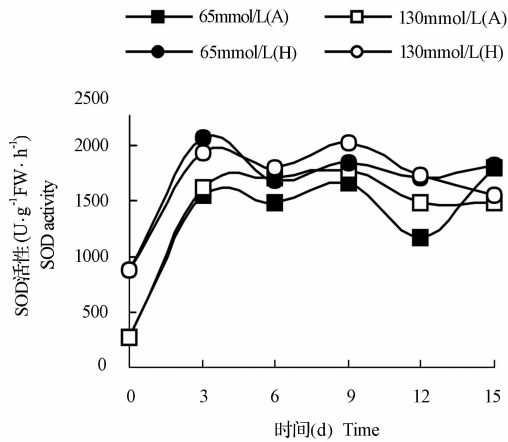


图3 盐胁迫下 AS 和 HN40 叶片 SOD 酶活性的变化
Fig. 3 Changes of SOD activity in leaves of
HN40 under salt stress

2.2 不同盐浓度对大豆 Antisalt 和 HN40 中 POD 酶活性的影响

2.2.1 根部 POD 酶活性的变化 在低盐和高盐浓度胁迫下大豆 Antisalt 和 HN40 根部 POD 酶活性均呈现先降后升再降低的应答趋势。低盐下 Antisalt 根部 POD 酶活性从第 3 d 开始上升, HN40 根部 POD 酶活性从第 6d 开始上升, 两者均在第 9 d 达到最高点。高盐胁迫下 Antisalt 和 HN40 根部 POD 酶活性均从第 6d 开始上升, 前者在第 9 d 达到最高点, 后者在第 12 d 达到最低点。高盐胁迫下 Antisalt 和 HN40 根部的 POD 酶活性峰的峰值均低于在低盐胁迫下的峰值(图 4)。

2.2.2 茎部 POD 酶活性的变化 低盐胁迫下 Antisalt 和 HN40 的酶活性都呈现先降低后升高再降低的

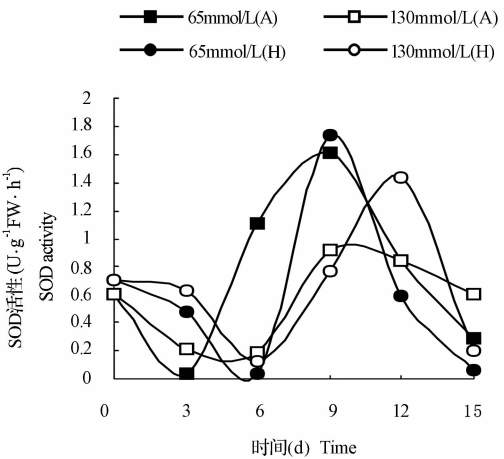


图4 盐胁迫下 AS 和 HN40 根部 POD 活性的变化
Fig. 4 Changes of POD activity in roots of AS
and HN40 under salt stress

应答趋势, 但是 Antisalt 的酶活性始终低于 HN40 的酶活性。高盐胁迫下大豆 Antisalt 和 HN40 茎部 POD 酶活性都呈现先降后升的应答趋势, Antisalt 的酶活性在胁迫初期(0~6 d)低于高于 HN40, 在胁迫后期(6~15 d)始终高于 HN40。高盐胁迫下 Antisalt 和 HN40 的茎部 POD 酶活性都比低盐时有一定幅度的上升, 但 Antisalt 的变化幅度更大(图 5)。

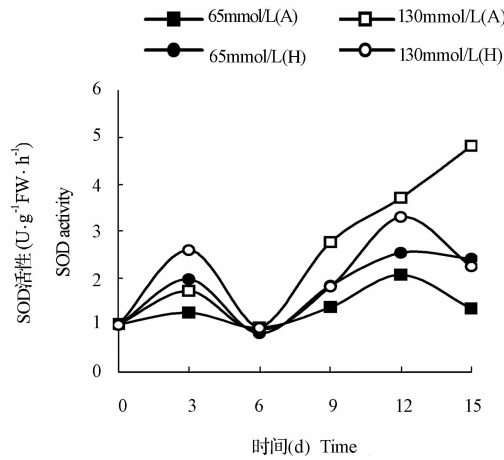


图5 盐胁迫下 AS 和 HN40 茎部 POD 酶活性的变化
Fig. 5 Changes of POD activity in stems
of AS and HN40 under salt stress

2.2.3 叶片 POD 酶活性的变化 无论高盐还是低盐胁迫下, Antisalt 和 HN40 叶片 POD 酶活性在盐胁迫下都呈现先升后降的应答趋势, Antisalt 的酶活性始终低于 HN40。高盐胁迫下 Antisalt 叶片 POD 酶活性峰比 HN40 延迟出现, 而且峰值降低。低盐胁迫下 Antisalt 与 HN40 相比变化幅度较小(图 6)。

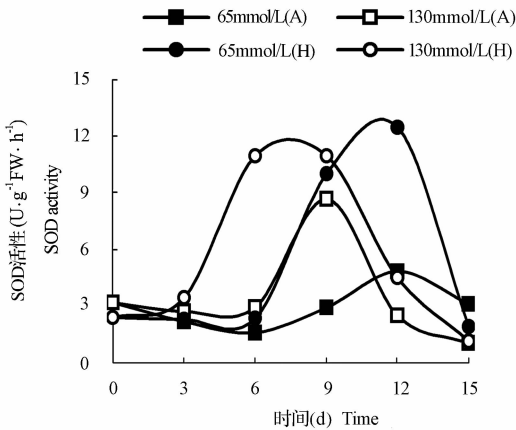


图6 盐胁迫下 AS 和 HN40 叶片 POD 酶活性的变化
Fig. 6 Changes of POD activity in leaves of AS and HN40 under salt stress

2.3 不同盐浓度胁迫下大豆 Antisalt 和 HN40 CAT 酶活性的变化

2.3.1 根部 CAT 酶活性的变化 无论是 65 mmol · L⁻¹ 还是 130 mmol · L⁻¹, Antisalt 和 HN40 根部的 CAT 酶活性在 0 ~ 6 d 之内,呈现先降后升的趋势; 对于 65 mmol · L⁻¹ 盐胁迫下,从 6 d 开始 Antisalt 根部的 CAT 酶活性始终处于一个缓慢下降的趋势, HN40 根部 CAT 酶活性在 6 ~ 12 d 在维持一个较高的水平后,急剧下降,到 15 d 明显比 Antisalt 低。在 130 mmol · L⁻¹ 盐胁迫下,在 6 ~ 15 d 时 Antisalt CAT 酶活性呈下降 - 升高 - 下降的趋势,而 HN40 一直在降低 (图 7)。

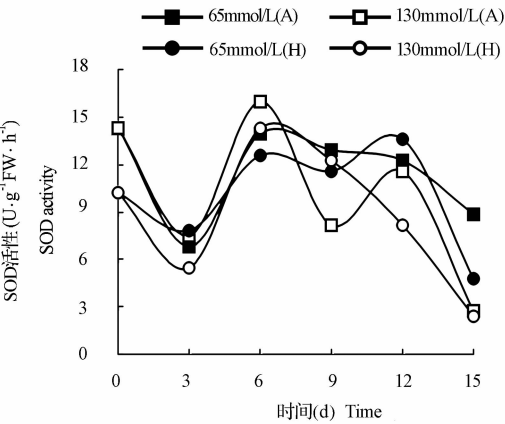


图7 盐胁迫下 AS 和 HN40 根部 CAT 酶活性的变化
Fig. 7 Changes of CAT activity in roots of AS and HN40 under salt stress

2.3.2 茎部 CAT 酶活性的变化 茎部 CAT 酶活性的变化,65 mmol · L⁻¹ 盐胁迫下 Antisalt 和 HN40 CAT 酶活性都呈现在 3d 时略有降低,此后先升高

后有所降低,两者酶活性水平基本很接近;高盐胁迫下,Antisalt 适应盐胁迫先升高,在 6d 时达到最高而后降低,HN40 CAT 酶活性在 12 d 时达到最高而后降低。结果表明,低盐浓度对二者影响不大,高盐胁迫下 Antisalt 茎部的 CAT 酶活性峰比 HN40 更早出现 (图 8)。

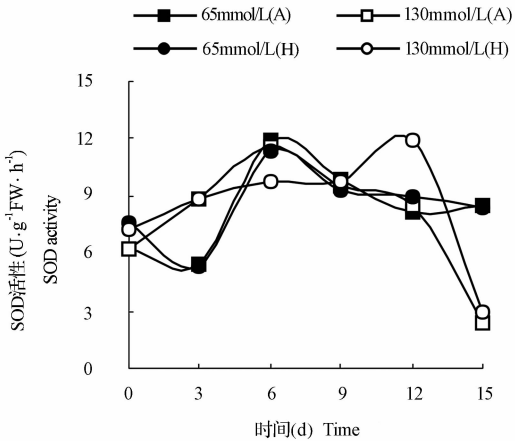


图8 盐胁迫下 AS 和 HN40 茎部 CAT 酶活性的变化
Fig. 8 Changes of CAT activity in stems of AS and HN40 under salt stress

2.3.3 叶片部 CAT 酶活性的变化 在低盐胁迫下,在 0 ~ 9 d 时 Antisalt 和 HN40 叶片 CAT 的活性都是缓慢上升,两者酶活性水平较为接近。在 9 d 后 Antisalt 开始缓慢下降;HN40 则以较大幅度下降。在高盐胁迫下,Antisalt 和 HN40 叶片 CAT 的活性均以上升 - 下降,再上升 - 下降的趋势对盐胁迫产生应答,但 Antisalt 在低谷停留的明显时间短于 HN40 (图 9)。

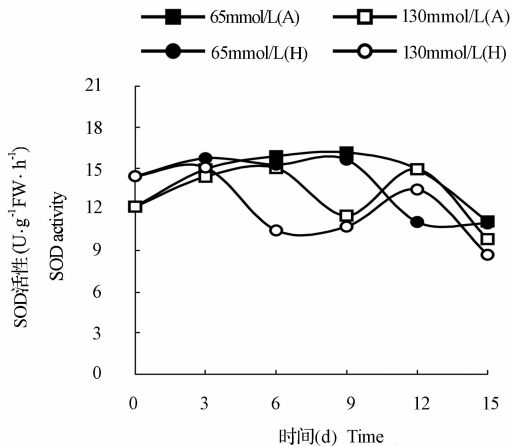


图9 盐胁迫对 AS 和 HN40 叶片 CAT 酶活性的变化
Fig. 9 Changes of CAT activity in leaves of AS and HN40 under salt stress

3 讨论

NaCl 胁迫下, Na^+ 、 Cl^- 的积累导致了活性氧的产生, $\text{O}_2^{\cdot-}$ 、 H_2O_2 等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^[9]。活性氧清除酶的活性和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^[10]。

SOD 是植物体内消除 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 的关键酶。高盐胁迫条件下, 耐盐性较强的野生大豆 Antisalt 根部和茎部 SOD 活性酶以大幅度升高-降低-升高-降低的变化趋势对盐胁迫产生应答。对于 HN40 无论高盐胁迫还是低盐胁迫, 都呈现出上升后持续下降的变化趋势。结果表明, Antisalt 比耐盐性弱的 HN40 更容易在根、茎部维持较高的 SOD 酶活性水平, 低盐胁迫下 Antisalt 根部 SOD 活性酶活性的变化不大, 可能是 $65 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{NaCl}$ 对其未造成太大的影响。於丙军等^[10]的研究表明: 盐胁迫对耐盐性弱的大豆种群的叶片的 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 伤害程度远大于根部。在本研究中, 与根、茎中 SOD 活酶活性的变化相比, 不论低盐还是高盐胁迫下 Antisalt 和 HN40 叶片中 SOD 酶活性在 3d 时已经达到一个很高水平, 并一直持续到 15d, 这说明叶片中的 SOD 活性升高对植物体内 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 的清除起了关键作用。杨晓英等^[9]的研究表明, 在 $130 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{NaCl}$ 胁迫下, 耐盐性强的大豆叶片中 Na^+ 、 Cl^- 积累量少, 活性氧水平低。研究结果表明, 无论低盐还是高盐胁迫下 Antisalt 叶片的 SOD 酶活性始终低于 HN40, 也可能是本文所采用盐胁迫条件对 Antisalt 叶片产生的危害小于对 HN40 叶片产生的伤害, 所以其 SOD 酶活性水平低于 HN40。

在低盐和高盐胁迫下, Antisalt 与 HN40 相比, 根部 POD 均表现出迅速应答; 茎部表现一致, 但 POD 在低盐胁迫下活性持续升高; 而叶中 POD 应答较慢, 并且活性更低。高盐下 Antisalt 根部 POD 应答迅速, 这样能及时清除 H_2O_2 , 茎部 POD 活性又持续升高, 能使其免受伤害, 因此 Antisalt 具有较强的抗性。此外, 由于 Antisalt 根和茎中及时清除了 H_2O_2 , 使其体内含量较低, 叶中应答较慢。低盐胁迫下 Antisalt 根茎叶中 POD 活性变化幅度不大, 这说明低盐对其危害不大, Antisalt 耐盐性较强。

CAT 主要分布于过氧化物酶体中, 可将高浓度

的 H_2O_2 清除。当植物叶片中 H_2O_2 增加时, H_2O_2 可作为底物直接激活或通过基因表达的方式增加 CAT 酶的活力^[11,12], 以适应清除 H_2O_2 的需要。低盐胁迫下 Antisalt 和 HN40 在根、茎、叶中分别呈现相同的应答趋势。Antisalt 与 HN40 在茎中的酶活性水平很相近, Antisalt 的根和叶则在胁迫后期通过比 HN40 缓慢的下降维持了较高的 CAT 活性水平。高盐胁迫下, 在胁迫后期 (6 ~ 15 d) HN40 根中 CAT 酶活性持续下降, 而 Antisalt 则在波动中下降。Antisalt 和 HN40 叶中 CAT 酶活性均呈现出一个低谷, 但 Antisalt 在低谷中停留时间明显短于 HN40。结果表明, Antisalt 的根和叶维持 CAT 酶活性的能力比 HN40 更强。Antisalt 茎部的 CAT 酶活性峰比 HN40 更早出现, 表现出比 HN40 作出更快的应答反应能力。

参 考 文 献

- [1] Parida, A K, Das A B. Salt tolerance and salinity effects on plants [J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2005, 60: 324 ~ 349.
- [2] Apse MP, Blumwald E. Engineering salt tolerance in plants [J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 2002, 13 (2): 146 ~ 150.
- [3] 方允中, 李文杰. 自由基与酶 [M]. 北京: 科学出版社, 1989: 112.
- [4] 赵可夫. 植物抗盐生理 [M]. 北京: 科学技术出版社, 1993: 221 ~ 235.
- [5] 沈文彪, 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.
- [6] 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.
- [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: 123 ~ 124.
- [8] 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.
- [9] 杨晓英, 刘友良, 罗庆云, 等. 盐胁迫下野生大豆叶片中 Na^+ 、 Cl^- 积累导致活性氧伤害 [J]. *大豆科学*, 2003, 22 (2): 83 ~ 87.
- [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] 余叔文, 汤章诚. 植物生理与分子生物学 [M]. 北京: 科学出版社, 1998: 366.
- [12] 曾富华, 吴岳轩, 罗泽民, 等. 活性氧及其清除剂诱导抗病作用与影响膜脂过氧化作用的关系 [J]. *中国农业科学*, 2000, 33 (4): 103 ~ 105.