

NaCl 处理对野大豆生理生化特性的影响

王丽燕

(德州学院生物系,山东 德州 253023)

摘要:为明确 NaCl 处理条件下野大豆叶片抗氧化酶和有机渗透调节物质的变化,以不同浓度 NaCl 处理野大豆幼苗,对其抗氧化酶活性和渗透调节物质含量的变化进行分析。结果显示:随着 NaCl 浓度的升高,野大豆叶片中超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化物酶(POD)活性先升高后降低,而过氧化氢酶(CAT)的活性呈持续下降趋势;丙二醛(MDA)含量在低盐度处理范围内变化不明显,高浓度 NaCl 处理时明显高于对照;随着 NaCl 浓度的升高,渗透调节物质脯氨酸含量增加,可溶性糖(SS)呈现先降低后升高的趋势。研究表明:在 NaCl 处理下野大豆主要通过 SOD、POD 清除活性氧,脯氨酸可能起到主要的渗透调节作用。

关键词:野大豆;NaCl 处理;MDA 含量;抗氧化系统;渗透调节

中图分类号:Q945.78 **文献标识码:**A **文章编号:**1000-9841(2008)06-1067-05

Effects of NaCl Stress on Physiological and Biochemical Characters of *Glycine soja*

WANG Li-yan

(Biology Department, Dezhou College, Dezhou 253023, Shandong, China)

Abstract:The antioxidative system and osmotic regulation are two main factors affecting plant progress under NaCl stress. The effects of NaCl stress on the antioxidative system and osmotic regulation in the seedlings of *Glycine soja* were studied in this paper. The results showed that the activities of superoxide dismutase(SOD), peroxidase(POD) had similar trend, which was increasing firstly, then decreasing with NaCl concentrations from 0 up to 200 mmol · L⁻¹. The catalase(CAT) activity decreased with the increasing of NaCl concentrations; The contents of MDA not varied evidently firstly and then increased evidently(100-200 mmol · L⁻¹ NaCl). The contents of MDA were the highest when the NaCl concentration was 200 mmol L⁻¹. The contents of proline increased with the increasing of NaCl concentrations, and soluble sugar decreased firstly, then increased evidently with the increasing of NaCl concentrations as well. It was thus suggested that POD and SOD and osmotic regulation capacity of proline(Pro) play an important role in *Glycine soja* resistant to NaCl stress.

Key words: *Glycine soja*; NaCl stress; Content of MDA; Antioxidative system; Osmotic

据联合国教科文组织(UNESCO)和粮农组织(FAO)不完全统计,全世界盐渍化土地约占陆地总面积的 1/3,为 $4 \times 10^8 \sim 9 \times 10^8 \text{ hm}^2$ 。我国是受盐渍化面积约 $1 \times 10^6 \text{ hm}^2$,约占耕地面积的 1/10^[1]。在耕地有限、人口不断增长的今天,如何提高植物的耐盐性已经成为人们关注的焦点^[2]。

野大豆是一年生豆科草本植物,在我国各地广泛分布,因其茎叶中营养成分较高,饲用价值潜力较大,是一种优质牧草资源。同时因其与栽培大豆杂交亲和性高,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。近年来,我国野生大豆研究者分别从结构植物学^[3]、分子生物学^[4]、遗传育种、

以及大豆起源进化等学科对其进行了多方面的研究,但对于野生大豆生理学方面的研究较少,为了进一步探讨野大豆对环境的适应,拟通过对盐分处理下野大豆叶片可溶性糖、可溶性蛋白、脯氨酸、丙二醛的含量及 SOD、POD、CAT 的活性进行分析,以期为进一步利用和研究野大豆提供基础生理学依据。

1 材料与方法

1.1 野大豆的培养与处理

野大豆种子采自山东省德州市郊天然盐碱地的单优群落地段。该区位于黄淮海平原,属温带大陆性气候,年降水量 600~700 mm,土壤系由黄河冲积

收稿日期:2008-07-28

基金项目:山东省自然科学基金资助项目(Y2006A01)。

作者简介:王丽燕(1972-),女,副教授,研究方向为植物抗性生理研究。E-mail:wangly72@126.com。

物形成。区内有较大面积的盐碱土,土壤含盐量较高,野大豆自然分布广泛。选取籽粒饱满、大小一致的野大豆种子,种子经划破种皮于0.1% HgCl₂溶液中消毒10 min,自来水冲洗干净后浸种6 h。将种子播种在装有洗净细沙的花盆中置于温室中培养,自然光照,昼夜温度28/22℃,相对湿度85%。每天以Hoagland营养液浇灌。待幼苗长至20 cm高时分别用含有0、50、100和200 mmol·L⁻¹ NaCl的Hoagland营养液处理,为减轻盐冲击效应,采用每天递增50 mmol·L⁻¹ NaCl的方式逐渐提高盐浓度。达到最终浓度后48 h,采样进行各项生理指标测定,每个处理3个重复。

1.2 抗氧化酶活性的测定

粗酶液的制备参考张志良的方法。超氧化物歧化酶(SOD)活性的测定采用NBT法,以能抑制NBT光化学反应的50%为一个酶单位(U)^[5]。过氧化物酶(POD)活性采用愈创木酚比色法测定,酶活性用ΔA₄₇₀·min⁻¹·g⁻¹ FW表示^[6]。过氧化氢酶(CAT)活性采用紫外分光光度法测定,酶活性用ΔA₂₄₀·min⁻¹·g⁻¹ FW表示^[7]。

1.3 丙二醛(MDA)含量的测定

采用李合生的方法^[6],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。

1.4 游离脯氨酸含量的测定

采用酸性茚三酮比色法^[8]。

1.5 可溶性蛋白质含量的测定

采用考马斯亮蓝法^[8]。

1.6 可溶性糖含量的测定

采用比色法^[6]。

2 结果与分析

2.1 盐处理对野大豆叶片中MDA含量及抗氧化酶活性的影响

2.1.1 丙二醛(MDA)含量 盐处理下野大豆叶片中MDA含量变化如图1所示。50 mmol·L⁻¹ NaCl处理时MDA含量与对照差异不显著(P > 0.05); 100~200 mmol·L⁻¹ NaCl处理时,MDA含量随着外界盐浓度的增加而升高,100 mmol·L⁻¹时比对照增加了11.7%,200 mmol·L⁻¹时比对照增加了36.2%。丙二醛(MDA)是植物脂质过氧化的产物,是检测植物膜伤害的一个重要的指标,其含量可以

表示脂膜过氧化的程度^[9]。由结果可知,土壤中NaCl含量100 mmol·L⁻¹是此品种野大豆受到盐处理的转折点。

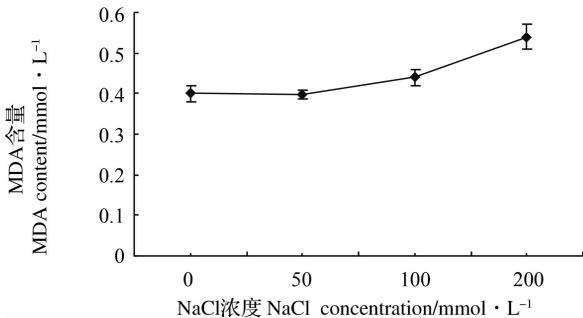


图1 盐处理对野大豆叶片MDA含量的影响
Fig.1 Effect of NaCl stress on MDA content of leaves in *Glycine soja*

2.1.2 超氧化物歧化酶(SOD)活性 SOD能催化细胞内O₂活化的中间产物O₂⁻发生歧化反应生成O₂和H₂O₂,是植物体内清除自由基的关键酶。如图2所示,盐浓度为50 mmol·L⁻¹时,野大豆叶片中SOD活性达到最大值,比对照增加了11.4%。当盐浓度超过50 mmol·L⁻¹时,酶活性又降低,分别为对照的113.7%、84.4%,但100 mmol·L⁻¹ NaCl处理时仍高于对照。这说明一定浓度盐处理下野大豆可以通过提高SOD的活性来有效降低叶片中的O₂⁻的含量。

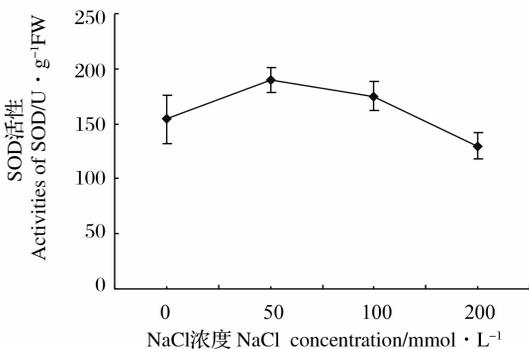


图2 盐处理对野大豆叶片SOD活性的影响
Fig.2 Effect of NaCl stress on the activities of SOD of leaves in *Glycine soja*

2.1.3 过氧化物酶(POD)活性 POD是植物体内抗氧化保护酶系统的重要酶,催化线立体或胞浆中H₂O₂形成O₂和H₂O,有效阻止H₂O₂的积累,限制潜在的氧伤害。如图3所示盐处理下野大豆叶片中POD活性随盐处理浓度的升高表现出先升高后降低的趋势。低浓度时(50 mmol·L⁻¹)野大豆叶片中POD活性高于对照。当盐浓度超过50 mmol·L⁻¹以

后,酶活性又降低。

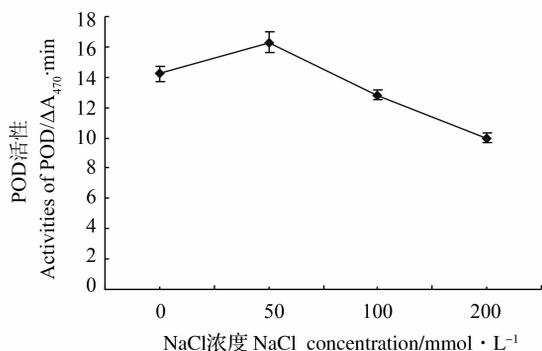


图3 盐处理对野大豆叶片 POD 活性的影响

Fig. 3 Effect of NaCl stress on the activities of POD of leaves in *Glycine soja*

2.1.4 过氧化氢酶 (CAT) 活性 CAT 主要分布在过氧化酶体中,具有催化 H_2O_2 生成 H_2O 和 O_2 的作用,从而使细胞中的 H_2O_2 含量减少。如图 4 所示,通过测定不同浓度 NaCl 盐胁迫下 CAT 活力可以看出,在 NaCl 浓度为 $50\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,NaCl 对野大豆叶中 CAT 活性的影响不大,说明叶片中 CAT 酶对低浓度 NaCl 处理不太敏感,直到 NaCl 浓度为 $200\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时 CAT 活性则显著低于对照。

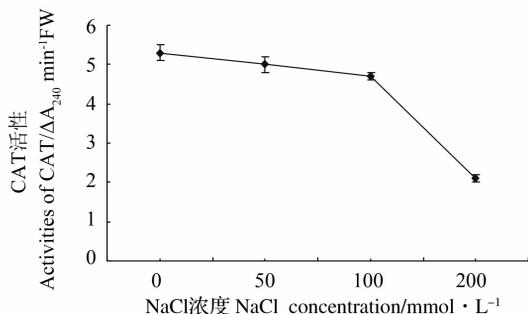


图4 盐处理对野大豆叶片 CAT 活性的影响

Fig. 4 Effect of NaCl stress on the activities of CAT of leaves in *Glycine soja*

2.2 盐处理对野大豆叶片中渗透调节物质含量的影响

2.2.1 可溶性糖含量 由图 5 可见,野大豆叶片中可溶性糖含量随盐度的增加呈先下降后上升趋势,在 $50\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时比对照降低了 7.9% ,随后开始上升,在 $100\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时比对照增加了 16.6% ,在 $200\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时比对照增加了 33.3% 。

2.2.2 游离脯氨酸含量 植物在盐分处理下,脯氨酸含量的迅速增加是植物适应盐渍环境的显著特征之一。盐处理下野大豆叶片中游离脯氨酸含量的变化如图 6,脯氨酸含量随着盐处理浓度的升高而

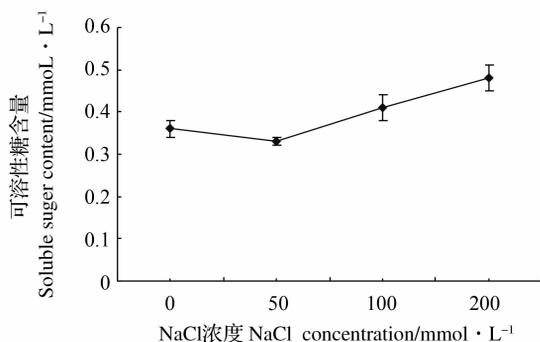


图5 盐处理对野大豆叶片可溶性糖含量的影响

Fig. 5 Effect of NaCl stress on the soluble sugar content of leaves in *Glycine soja*

升高,在 100 、 $200\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl 处理时均明显高于对照。

2.2.3 可溶性蛋白质含量 盐处理下野大豆叶片中可溶性蛋白质含量的变化如图 7。低浓度时可溶性蛋白质含量平缓上升,在 $50\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时比对照升高了 12.8% 。随后开始急剧下降,在 $200\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时达到最小值,为对照的 86.3% 。可能在盐分处理条件下,野大豆体内蛋白质合成受到抑制而分解被促进。

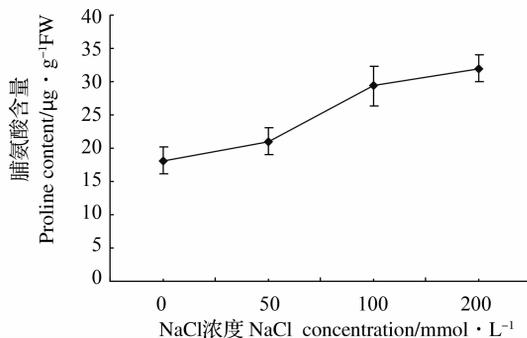


图6 盐处理对野大豆叶片游离脯氨酸含量的影响

Fig. 6 Effect of NaCl stress on the proline content of leaves in *Glycine soja*

3 讨论

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。活性氧能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^[10],破坏生物膜结构的稳定性,引起植物伤害。有研究表明,盐处理下,植物细胞内 MDA 含量逐渐增加,耐盐性较强的植物比耐盐性弱的植物增幅小^[11]。结果表明,在轻度盐处理下,野大豆脂质过氧化可以被保护酶防御系统抑制,表现为丙二醛含

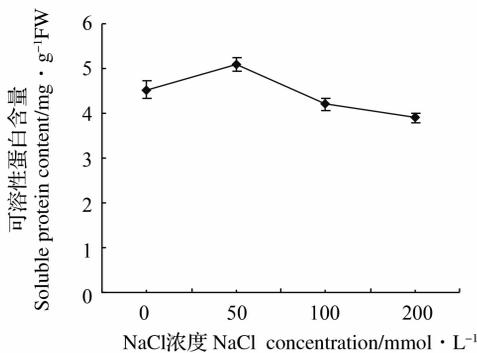


图7 盐处理对野大豆叶片可溶性蛋白质含量的影响

Fig. 7 Effect of NaCl stress on the proline content of leaves in *Glycine soja*

量维持在一个较低水平。当外界盐浓度超过 $100 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,丙二醛含量逐渐升高,说明细胞膜受到了一定程度的破坏。

为了防御活性氧的伤害及维持活性氧生成和清除的动态平衡,植物在进化过程中形成了一套行之有效的活性氧清除系统。超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化物酶(POD)和过氧化氢酶(CAT)都是细胞膜系统的保护酶,具有维持活性氧代谢平衡,保护膜系统的功能,是植物能忍耐体内高浓度盐的机理之一。许多研究表明不同植物三种酶对外界盐处理的响应特点不同,用不同浓度 NaCl 溶液处理玉米幼苗,超氧化物歧化酶和过氧化氢酶活性增加^[12];随 NaCl 处理时间的延长,棉花 SOD 活性先下降后上升,POD、CAT 活性先上升后下降^[13];Cavalcanti 等发现,在不同浓度的盐处理下,豇豆叶片和根内 SOD 的活性并未升高^[14]。研究表明,随着土壤含盐量的增加,SOD、POD 活性均呈现先升高后下降的趋势,在 NaCl 浓度达到 $50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,SOD、POD 活性达到最高值;低盐度处理时,CAT 活性变化不明显,高盐度处理时 CAT 呈现下降趋势,MDA 含量的结果同时表明低盐度时生物膜没有受到活性氧伤害,综上所述,在低浓度 NaCl 处理下,野大豆可以通过提高体内保护酶活性来维持活性氧代谢平衡,保护膜系统的稳定,起主要作用的抗氧化酶可能是 SOD 和 POD,POD 在清除 H_2O_2 过程中起主要作用。在土壤含盐量超过 $100 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,SOD、POD 活性下降,MDA 的含量升高,膜质过氧化系统作用加强。

在盐处理下,植物要维持正常的生理代谢,就必须通过渗透调节降低细胞水势,以适应外界盐渍环境。许多植物在盐处理下积累可溶性有机渗透调节物质如脯氨酸和可溶性糖等作为渗透调节剂。前人

的研究表明,随着 NaCl 浓度的升高,无花果等植物叶片可溶性糖含量增加^[15-16],而苦楝等植物盐处理下可溶性糖含量下降^[17]。结果显示,低盐处理时,可溶性糖含量降低,高浓度 NaCl 处理时,野大豆叶片中可溶性糖的含量迅速升高。结合抗氧化酶活性的变化,试验结果支持 Logan 的观点,即活性氧可以引起酶失活和膜伤害,进而抑制细胞生长,导致糖的含量增加^[18],但可溶性糖能否作为植物耐盐性鉴定指标还有待于进一步研究。盐处理时脯氨酸含量也明显增加。脯氨酸是植物体内重要的渗透调节物质,被认为是一种渗透保护剂,有助于细胞和组织保水,同时还可作为碳水化合物的来源、酶和细胞结构的保护剂,从而在处理环境下起着很重要的作用^[19]。大量的研究表明,盐处理下植物都会发生游离脯氨酸的累积^[17,20]。有人认为脯氨酸的积累是耐盐的原因,而不是盐处理下的偶然结果^[21]。也有人认为脯氨酸的积累与植物的耐盐性成负相关^[22],结果表明,正是由于植物受到盐处理才产生脯氨酸,脯氨酸的积累是植物受到逆境伤害的征兆。随 NaCl 处理浓度的升高时,野大豆叶片中脯氨酸含量增加,特别是在高浓度($200 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl)处理下,积累的更多,说明对于野大豆来说,脯氨酸对其起着重要的渗透调节作用。可溶性蛋白也是植物体内重要的渗透调节物质,结果显示,低浓度 NaCl($50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)处理条件下,野大豆叶片中可溶性蛋白质含量升高,盐度高于 $100 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,可溶性蛋白含量降低。

高浓度盐处理伤害了野大豆的细胞膜系统,伤害程度与处理强度紧密相关,土壤中 NaCl 含量 $100 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 是此品种野大豆受到盐处理的转折点。SOD 和 POD 可能在保护膜系统中起主要作用。盐分处理刺激了野大豆体内脯氨酸的合成,脯氨酸与 MDA 变化一致,说明脯氨酸对其细胞膜起不到直接的保护作用,但脯氨酸与酶促防御体系关系密切,它可能通过改变这些物质的量或代谢途径而具有重大意义。随着盐处理浓度的增加,脯氨酸的含量呈上升趋势,可溶性蛋白质含量下降,这可能是盐处理条件下可溶性蛋白质分解加速,分解成各种氨基酸,包括脯氨酸,使得脯氨酸含量升高,以降低叶片的渗透势,促进对水分的吸收,减轻盐害程度。盐处理下可溶性糖在野大豆渗透调节中所起的作用还有待于进一步探讨。

参考文献

- [1] 何文寿. 设施农业中存在的土壤障碍及其对策研究进展[J]. 土壤, 2004, 36(3): 235-242. (He W S. Soil problems and countermeasure in facility agriculture in China[J]. Soil, 2004, 36(3): 235-242.)
- [2] Ward J M, Hirschi K D, Sze H. Plants pass the salt[J]. Trends Plant Science, 2003, 8(5): 200-201.
- [3] 周三, 赵可夫. 关于野大豆盐腺问题的探讨[J]. 植物学报, 2003, 45(5): 574-580. (Zhou S, Zhao K F. Discussion on the problem of salt gland of *Glycine soja* [J]. Acta Botanica Sinica, 2003, 45(5): 574-580.)
- [4] 王洪新, 胡志昂, 钟敏, 等. 盐渍条件下野大豆群体的遗传分化和生理适应: 同工酶和随机扩增多态 DNA [J]. 植物学报, 1997, 39: 34-42. (Wang H X, Hu Z A, Zhong M, et al. Genetic differentiation and physiological adaptation of wild soybean (*Glycine Soja*) populations under saline conditions: Isozymatic and random amplified polymorphic DNA study [J]. Acta Botanica Sinica, 1997, 39: 34-42.)
- [5] 张志良. 植物生理学实验指导[M]. 北京: 高等教育出版社, 2004: 154-156, 268-269. (Zhang Z L. Experimental guidebook to plant physiology[M]. Beijing: Higher Education Press, 2004: 154-156, 268-269.)
- [6] 李合生. 植物生理生化实验原理和技术[M]. 北京: 高等教育出版社, 2000: 164-165, 167-168, 260-261. (Li H S. Principles and techniques of plant physiological biochemical experiment[M]. Beijing: Higher Education Press, 2000: 164-165, 167-168, 260-261.)
- [7] Rao M V, Paliyath G, Ormrod D P. Influence of salicylic acid on H₂O₂ production, oxidative stress, and H₂O₂-metabolizing enzymes [J]. Plant Physiology, 1997, 115: 137-149.
- [8] 邹琦. 植物生理学实验指导[M]. 北京: 中国农业出版社, 2000: 97-99, 161-162. (Zou Q. Experimental guidebook to plant physiology[M]. Beijing: China Agriculture Press, 2000: 97-99, 161-162.)
- [9] 刘爱荣, 张远兵, 陈登科. 盐处理对盐芥 (*Thellungiella halophila*) 生长和抗氧化酶活性的影响[J]. 植物研究, 2006, 26(2): 216-220. (Liu A R, Zhang Y B, Chen D K. Effects of salt stress on the growth and the antioxidant enzyme activity of *Thellungiella halophila* [J]. Bulletin of Botanical Research, 2006, 26(2): 216-220.)
- [10] 於丙军, 刘友良. 盐处理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. (Yu B J, Liu Y L. Effects of salt stress on metabolism of active in seedlings of annual halophyte *Glycine soja* [J]. Acta Botanica Boreali-Ocidentalia Sincia, 2003, 23(1): 18-22.)
- [11] 袁琳, 克里木·伊力, 张利权. NaCl 处理对阿月浑子实生苗活性氧代谢与细胞膜稳定性的影响[J]. 植物生态学报, 2005, 29(6): 985-991. (Yuan L, Karim Ali, Zhang L Q. Effects of NaCl stress on active oxygen mechanism and membrane stability in *Pista-*
- cia vera* seedlings [J]. Acta Phytocologica Sinica, 2005, 29(6): 985-991.)
- [12] 王宝增, 赵可夫. 低浓度 NaCl 对玉米生长的效应[J]. 植物生理学通讯, 2006, 42(4): 628-632. (Wang B Z, Zhao K F. Effect of low NaCl concentration on the growth of *Zea mays* L. [J]. Plant Physiology Communications, 2006, 42(4): 628-632.)
- [13] 刘正鲁, 朱月林, 胡春梅, 等. 氯化钠胁迫对嫁接茄子生长、抗氧化酶活性和活性氧代谢的影响[J]. 应用生态学报, 2007, 18(3): 537-541. (Liu Z L, Zhu Y L, Hu C M, et al. Effects of NaCl stress on the growth, antioxidant enzyme activities and reactive oxygen metabolism of grafted eggplant [J]. Chinese Journal of Applied Ecology, 2007, 18(3): 537-541.)
- [14] Cavalcanti F R, Lima J P, Vieqas R A, et al. Roots and leaves display contrasting oxidative response during salt stress and recovery in cow pea [J]. Plant Physiology, 2007, 164(5): 591-600.
- [15] Friedman R, Altman A. The effect of salt stress on poyamide bioynthesis and content in mung bean plants and in halophytes [J]. Physiologia Plantarum, 1989, 76: 295-302.
- [16] 阮成江, 谢庆良. 盐处理下沙棘的渗透调节效应[J]. 植物资源与环境学报, 2002, 11(2): 45-47. (Ruan C J, Xie Q L. Osmotic adjustment effect of *Hippophae rhamnoides* L. under salt stress [J]. Journal of Plant Resources and Environment, 2002, 11(2): 45-47.)
- [17] 魏海霞, 孙明高, 夏阳, 等. NaCl 处理对苦楝细胞膜透性和有机渗透调节物质含量的影响[J]. 甘肃农业大学学报, 2005, 40(5): 599-603. (Wei H X, Sun M G, Xia Y, et al. Effects of NaCl stress on the membrane permeability and the content of osmotic adjustable organic substances of *Melia azedarach* seedlings [J]. Journal of Gansu Agricultural University, 2005, 40(5): 599-603.)
- [18] Logan B A, Demming-Adams B, Rosenstiel T N, et al. Effect of nitrogen limitation on foliar antioxidants in relationship to other metabolic characteristics [J]. Planta, 1990, 209: 213-220.
- [19] Delauney A J, Hu C A, Kishor P B, et al. Cloning of ornithine δ -amittransferas cDNA from Vigan aconitifolia by transcomplementation in Escherichia coli and tegulation of proline biosynthesis [J]. Journal of Biological Chemistry, 1993, 268(25): 18673-18678.
- [20] 买合木提·卡热, 吾甫尔·巴拉提, 侯江涛, 等. NaCl 处理对扁桃砧木可溶性蛋白质和脯氨酸含量的影响[J]. 新疆农业大学学报, 2005, 28(1): 1-5. (Maihemuti·Kare, Wupuer·Balati, Hou J T, et al. Effects of salt stress on soluble protein and proline content of Almond Rootstocks [J]. Journal of Xinjiang Agricultural University, 2005, 28(1): 1-5.)
- [21] Sawahel W A, Hassan A H. Generation of transgenic wheat plants producing high levels of the osmoprotectant proline [J]. Biotechnology Letters, 2002, 24(9): 721-725.
- [22] 许兴, 杨涓, 郑国琦, 等. 盐处理对枸杞叶片糖代谢及相关酶活性的影响研究[J]. 中国生态农业学报, 2006, 14(2): 46-48. (Xu X, Yang J, Zheng G Q et al. Sugars and sucrose-metabolizing enzymes in leaves of *Lycium barbarum* L. under salt stress [J]. Chinese Journal of Eco-Agriculture, 2006, 14(2): 46-48.)