

# 混合盐碱胁迫对苗期紫花苜蓿抗氧化酶活性及丙二醛含量的影响

张永峰<sup>1,2,3</sup>, 殷波<sup>2</sup>

(1. 中国科学院东北地理与农业生态研究所, 吉林 长春 130012; 2. 吉林省农业科学院, 吉林 长春 130124; 3. 中国科学院研究生院, 北京 100039)

**摘要:**用不同浓度混合盐碱(NaCl/Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>)对苗期紫花苜蓿进行胁迫处理,测定其对抗氧化酶系统和丙二醛含量的影响。结果表明,随着混合盐碱处理浓度的增大,经处理的苗期紫花苜蓿叶片的超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化物酶(POD)、过氧化氢酶(CAT)活性及丙二醛(MDA)的含量呈增加趋势,并且均高于对照。

**关键词:**混合盐碱胁迫; 苗期; 紫花苜蓿; 抗氧化酶; 丙二醛

**中图分类号:**S551<sup>+</sup>.703.4; Q945.78 **文献标识码:**A **文章编号:**1004-5759(2009)01-0046-05

\* 一般认为,在盐胁迫条件下,植物通过吸收、积累无机盐和合成有机物质作为渗透剂进行渗透调节,以适应盐渍环境<sup>[1]</sup>。其耐盐性主要依赖膜系统的稳定性,即盐胁迫下仍能保持膜系统的完整性,以维持对离子的选择性吸收和其他功能<sup>[2]</sup>。研究表明,耐盐植物细胞内,膜系统的稳定性较高,再加上区域化和一系列的代谢调节使植物得以生存,而不耐盐植物的膜系统盐稳定性较差,高浓度的盐离子存在时膜系统被破坏,无法进行其他的调节<sup>[3]</sup>。丙二醛(MDA)是具有细胞毒性的物质,能与膜结构上的蛋白质和酶结合、交联而使之失去活性,从而破坏膜结构。而过氧化物酶(POD)、过氧化氢酶(CAT)、超氧化物歧化酶(SOD)则是植物对膜脂过氧化的酶促防御系统的保护酶。迄今为止有关植物抗盐生理的研究仍然以 NaCl 为主要对象的盐胁迫为主,而自然环境对植物的危害不单是盐胁迫,同时也有碱胁迫,为此,笔者对混合盐碱胁迫条件下苗期紫花苜蓿(*Medicago sativa*)的各种保护酶活性的变化及丙二醛积累进行了研究与探索。

## 1 材料与方 法

### 1.1 试验材料

供试品种为公农 1 号紫花苜蓿(*M. sativa* cv. Gongnong No. 1)。

### 1.2 试验地概况

本试验于 2008 年 5—9 月,在吉林省公主岭市吉林省农业科学院试验地进行,地处北纬 43°11',东经 124°02',属温带湿润大陆性季风气候,冬冷夏热,四季分明,年平均气温 5.6℃,年平均降水量 594.8 mm,无霜期 144 d。

### 1.3 盐碱浓度及处理方法

混合盐碱为 NaCl 和 Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>,配制如表 1。

选取成熟饱满的苜蓿种子,用 0.05% HgCl 溶液消毒 2 min,6 月 14 日撒播于花土中,待其长至真叶期,6 月 24 日移至花钵中,待其生长 4 周后,于 7 月 24 日进行盐处理。设对照组和处理组,并设 3 个重复。以不添加盐碱为对照组(CK),处理组添加不同浓度的 NaCl 和 Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 溶液(表 1),每次用漏斗均匀加 50 mL 溶液于培养钵中,7 月 24 日起每隔 1 d 下午 4 点进行盐处理,7 月 25 号起每隔 1 d 下午 4 点取样,到 7 月 31 日结束取样。

表 1 混合盐碱配制及浓度

Table 1 Concentrations of salt and alkali mixed

处理 Treatment	NaCl/Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> (mmol/L)	盐浓度 Concentrations of salt (mmol/L)
CK	0	0
A	50/50	100
B	100/50	150
C	100/100	200
D	200/100	300
E	400/100	500

\* 收稿日期:2008-10-24;改回日期:2008-11-17

作者简介:张永峰(1965-),男,吉林榆树人,研究员。E-mail: nkyzhyf@126.com

## 1.4 测定方法

**1.4.1 初酶液的制备** 称鲜叶 3 g, 加入约 15 mL 酶提取液[以 50 mmol/L pH 值 7.8 的磷酸缓冲液(PBS)配制, 含有 0.1 mmol/L 乙二胺四乙酸(EDTA)、质量浓度为 0.3% Triton X-100 和质量浓度为 4% 聚乙烯吡咯烷酮(PVP), 冰浴充分研磨, 冷冻离心(14 000 r/min, 20 min), 取上清液冷藏备用。

**1.4.2 SOD 活性的测定** 按照张志良<sup>[4]</sup>的方法, 计算按照邹琦<sup>[5]</sup>的方法。取直径相同的试管, 分别加入 3 mL 的反应混合液[在 54 mL 14.5 mmol/L dl-甲硫氨酸中分别加入 3  $\mu$ mol/L EDTA、2.25 mmol/L 氯化硝基四氮唑蓝(NBT)、60  $\mu$ mol/L 核黄素溶液各 2 mL]和粗酶液提取液 0.02 mL, 混合后放在透明试管架上, 在光照培养箱内照光(8 000 lx), 10 min 后立即避光, 迅速测定  $A_{560}$ (560 nm 下的吸光度)值, 以不加酶液的照光管为对照, 计算反应被抑制的百分比, 以能抑制 NBT 光化学反应的 50% 为一个酶单位。

**1.4.3 POD 活性的测定** 按照张志良<sup>[4]</sup>的方法, 采用愈创木酚法。在试管中加入 3 mL 反应混合液[50 mmol/L 磷酸缓冲液(pH 值 7.8)0.05 mL, 0.2% 愈创木酚 0.95 mL, 0.2% 过氧化氢 2 mL]和磷酸缓冲液 0.05 mL, 作为校零对照; 另取试管加入反应混合液 3 mL 和粗酶液 0.05 mL, 迅速摇匀, 立即测定  $A_{470}$  值, 于 0, 30, 60, 90, 120, 150 和 180 s 读数 1 次。以每分钟每克鲜重的吸光度变化值表示酶活力单位, 为  $\Delta A_{470}/(\text{min} \cdot \text{g})$ 。

**1.4.4 CAT 活性的测定** 参照克热木·伊力等<sup>[6]</sup>的方法。取 2.9 mL 反应混合液[0.2% 双氧水(用 pH 值 7.8 磷酸缓冲液配置)1 mL, 蒸馏水 1.9 mL]加 0.1 mL 酶液迅速颠倒 2~3 次混匀, 加入石英比色皿中, 立即测定 0, 30, 60, 90, 120 和 180 s 时的  $A_{240}$  值。以每分钟每毫克鲜重的吸光度变化值( $\Delta A_{240}/\text{min} \cdot \text{mg}$ )来表示。计算方法为:

$$\text{过氧化氢酶活性}(\text{U}/\text{min} \cdot \text{mg}) = E_{240} \times 3 / (0.0436 \times Fw)$$

式中,  $E_{240}$  为 240 nm 处每分钟吸光度的降低值;  $Fw$  为每 0.01 mL 所用酶液中含样品的鲜重量(mg); 0.0436 为 240 nm 处 1  $\mu$ mol 过氧化氢的吸光度。

**1.4.5 MDA 含量的测定** 按照张志良<sup>[4]</sup>的方法。取 3 mL 粗酶液和 3 mL 0.6% 硫代巴比妥酸(先用 NaOH 溶解), 混匀后在试管上加盖, 于沸水浴上反应 15 min, 迅速冷却后离心 10 min(4 000 r/min), 取上清液测定  $A_{532}$  和  $A_{450}$ 。计算公式:

$$\begin{aligned} \text{MDA}(\mu\text{mol}/\text{L}) &= 6.45A_{532} - 0.56A_{450} \\ \text{MDA}(\mu\text{mol}/\text{g}) &= \text{MDA}(\mu\text{mol}/\text{L}) \times V/W \end{aligned}$$

式中,  $V$  为酶提取液使用量(mL),  $W$  为样品鲜重(g)。

## 2 结果与分析

### 2.1 超氧化物歧化酶(SOD)活性测定

处理第 1 天 SOD 活性增加最大(图 1)。处理第 3, 5 和 7 天 SOD 活性有所下降, 但均高于同期对照。处理组与对照组 SOD 活性差异显著( $P < 0.05$ ), C、D 和 E 组与对照组差异极显著( $P < 0.01$ ), 其中 C 组 SOD 活性值较对照组平均升高了 146.98%。

### 2.2 过氧化物酶(POD)活性测定

处理第 1 天苗期苜蓿 POD 活性较低, 处理第 3 天 POD 活性达到最高, 第 5 和 7 天 POD 活性下降, 但均高于第 1 天(图 2)。其中 C 组与对照组差异极显著( $P < 0.01$ ), POD 活性增加最大, 平均升高了 73.43%。B、D 和 E 组与对照组差异显著( $P < 0.05$ ), 而 A 组与对照差异不显著。

### 2.3 过氧化氢酶(CAT)活性测定

不同时间苗期苜蓿 CAT 活性变化比较复杂, 没有明显的规律性(图 3)。随着 NaCl/Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 浓度升高, 苗期苜蓿 CAT 活性显著升高, CAT 活性值均较对照高出几倍, 且 A 和 B 组与对照组 CAT 活性差异显著( $P < 0.05$ ), C、D 和 E 组与对照组 CAT 活性差异极显著( $P < 0.01$ )。

### 2.4 丙二醛(MDA)含量测定

处理第 1 天苗期苜蓿 MDA 含量较低, 处理第 3 天 MDA 含量最高, 第 5 和 7 天 MDA 含量略有下降且高于第 1 天(图 4)。随着 NaCl/Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 浓度升高, 对照组与处理组丙二醛含量均差异显著( $P < 0.05$ ), 其中 D 组 MDA 含量较对照组平均升高了 61.38%。

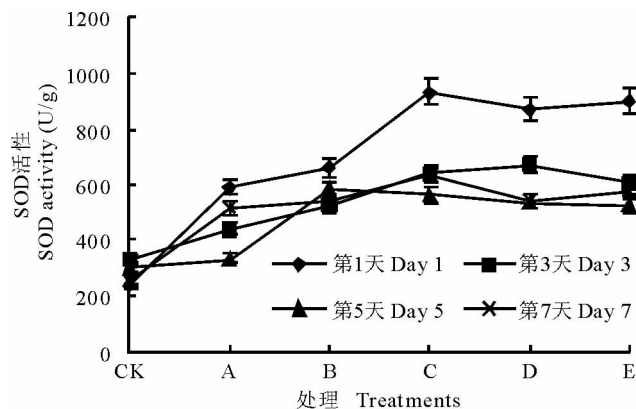


图 1 混合盐碱胁迫对苗期苜蓿超氧化物歧化酶(SOD)活性的影响

Fig. 1 Effects of salt and alkali mixed stresses on the SOD of *M. sativa* seedlings

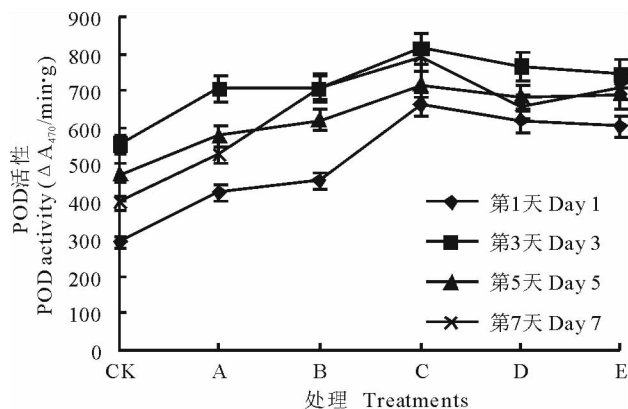


图 2 混合盐碱胁迫对苗期苜蓿过氧化物酶(POD)活性的影响

Fig. 2 Effects of salt and alkali mixed stresses on the POD of *M. sativa* seedlings

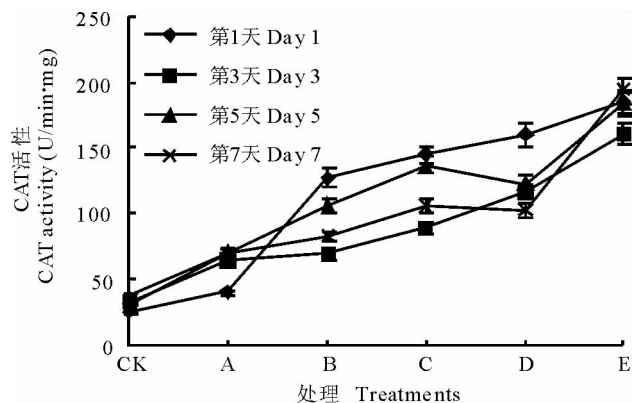


图 3 混合盐碱胁迫对苗期苜蓿过氧化氢酶(CAT)活性的影响

Fig. 3 Effects of salt and alkali mixed stresses on the CAT of *M. sativa* seedlings

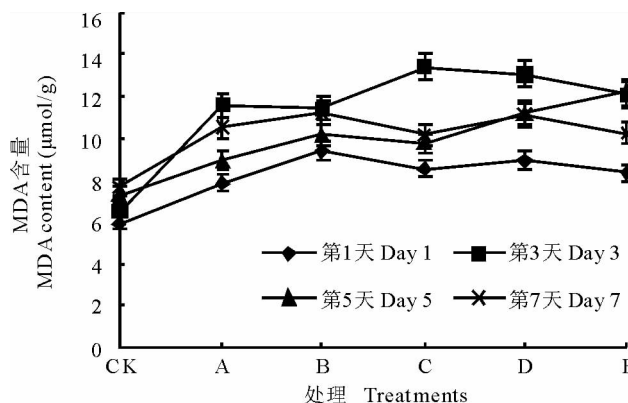


图 4 混合盐碱胁迫对苗期苜蓿丙二醛(MDA)含量的影响

Fig. 4 Effects of salt and alkali mixed stresses on the MDA content of *M. sativa* seedlings

### 3 讨论

逆境条件下植物体同时存在膜保护系统,能够清除体内多余的自由基,其活性氧自由基代谢是一个动态的变化过程,这一保护酶系统实际上是一个抗氧化系统,它是由许多酶和还原型物质组成,其中 SOD、POD、CAT 是主要的抗氧化酶,可清除体内有害的活性氧,从而保护植物膜系统<sup>[7,8]</sup>。

SOD 在植物抵抗盐害过程中,防止、中断膜脂过氧化,对细胞膜系统损伤起保护作用<sup>[9,10]</sup>。在本试验条件下,处理第 1 天 SOD 活性随着盐浓度的提高而增加,之后几天逐渐下降,因为植物在遭受逆境胁迫时,产生的氧自由基数量增多,为了抵抗逆境对植物造成的伤害,超氧化物歧化酶的活性增加,以便清除氧自由基,减少膜脂过氧化,并随着时间的推移逐渐消耗 SOD,使其酶活性降低。

POD 是活性较高的适应性酶,能够反映植物生长发育的特性、体内代谢状况以及对外界环境的适应性,同时也是植物体内抗氧化酶系统的重要组成部分,它能催化有毒物质的分解,其活性高低能反映植物受害的程度。本研究发现,处理组的 POD 活性值先增加后略有下降的趋势,说明 POD 活性是逐渐适应环境而变化的<sup>[11~13]</sup>。

CAT 是生物演化过程中建立起来的生物防御系统的关键酶之一,其生物学功能是催化细胞内过氧化氢的分解防止过氧化。本试验随着 NaCl/Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 浓度升高,苗期苜蓿 CAT 活性显著升高,说明抗氧化酶系统能够增强苜蓿幼苗清除活性氧的能力,保证了膜结构的完整和功能的实现<sup>[12]</sup>。

MDA 是膜脂过氧化的产物之一,与膜中蛋白结合引起蛋白质分子内和分子间交联,蛋白质分子发生聚合<sup>[14]</sup>,类囊体膨胀变形、排列顺序改变,造成基粒消失等叶绿体超微结构变化。MDA 还能使叶绿素降解<sup>[15]</sup>,从而降低光合作用。MDA 含量可以反映植物遭受逆境伤害的程度<sup>[16]</sup>。本试验处理组 MDA 含量均高于对照组,其主要的原因可能是混合盐碱胁迫下,虽然酶系统的功能加强,但其调节能力有限,因而体内还是积累了过剩的氧自由基,这些氧自由基又引起膜的过氧化,产生了大量的 MDA,使 MDA 含量上升<sup>[17,18]</sup>。

苜蓿对盐碱胁迫的适应性反应是一个非常复杂的生理生化过程,其生理指标的变化与形态结构的变化等都是紧密联系在一起,是综合性的反应,其确切的耐盐碱机理还有待于进一步的研究。而且苜蓿是一种多年生牧草,应进一步证实对苜蓿耐盐碱持久性的影响。本试验只从生理指标方面探讨了盐碱对苗期苜蓿的影响,还应进一步探讨盐碱对苜蓿不同生长时期的生理指标和形态结构的影响。

#### 4 结论

本研究探讨了混合盐碱不同浓度处理苗期苜蓿的抗氧化酶系统和丙二醛含量随时间的变化情况,作为内源活性氧清除剂的 SOD、POD 和 CAT 能够在一定程度下清除体内过剩的活性氧,维持活性氧代谢平衡,保护膜结构,使苜蓿具有一定忍耐或抵抗盐碱的能力。但这种维持有一定的限度,当胁迫超过苜蓿的承受极限时,SOD、POD 和 CAT 活性下降或被破坏,膜脂质过氧化作用加剧,MDA 积累增加,细胞的正常代谢被破坏,植物生长受到抑制。

#### 参考文献:

- [1] 赵可夫. 植物抗盐生理[M]. 北京:中国科学技术出版社,1993. 157-159.
- [2] Greenway H, Munne R. Mechanisms of salt tolerance in non-halophytes[J]. Annual Review of Plant Physiology, 1980, 31: 149-190.
- [3] Munns R, Termaat A. Whole plant responses to salinity[J]. Australian Journal of Plant Physiology, 1986, (13): 143-160.
- [4] 张志良. 植物生理学实验指导(第三版)[M]. 北京:高等教育出版社,1990. 123-124,268-269,274-276.
- [5] 邹琦. 植物生理实验指导[M]. 北京:中国农业出版社,1995.
- [6] 克热木·伊力,袁琳,齐曼·尤努斯,等. 盐胁迫对阿月浑子 SOD,CAT,POD 活性的影响[J]. 新疆农业科学,2004,41(3):129-134.
- [7] Fridovich I. Free Radical in Biology[M]. New York: New York Academic Press, 1976. 239.
- [8] 翁笑燕,张木清,阮妙鸿. 水分胁迫下钙对甘蔗幼苗抗氧化酶活性的影响[J]. 中国农学通报,2007,23(7):273-279.
- [9] 陈一舞,邵桂花,常汝镇. 盐胁迫下大豆子叶细胞器超氧化物歧化酶的影响[J]. 作物学报,1997,2:214-219.
- [10] 廖祥儒,朱新产. 活性氧代谢和植物抗盐性[J]. 生命的化学,1996,16(6):19-23.
- [11] 刘晓静,柳小妮. 多效唑和烯效唑对草地早熟禾一些生化指标及其抗性的影响[J]. 草业学报,2006,15(2):48-53.
- [12] 刘建新,胡浩斌,赵国林. 多裂骆驼蓬中生物碱类物质对玉米幼苗生长及某些生理特性的影响[J]. 草业学报,2007,16(2):75-80.
- [13] 张新虎,何静,沈惠敏. 苍耳提取物对番茄灰霉病菌的抑制作用及抑菌机理初探[J]. 草业学报,2008,17(6):99-104.
- [14] Huff A. Peroxides-catalysed oxidation of chlorophyll by hydrogen peroxide[J]. Phytochemistry, 1982, 21: 261-265.
- [15] Uphem B L. Photooxidative reactions in chloroplast thylakoids: Evidence for a Fenton-type reaction promoted by superoxide or ascorbate[J]. Photo Synthesis Research, 1986, 8: 235-247.
- [16] 王爱国,罗广华. 植物的超氧化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):51-57.
- [17] 张远冰,刘爱荣,方蓉. 外源一氧化氮对镉胁迫下黑麦草生长和抗氧化酶活性的影响[J]. 草业学报,2008,17(4):57-64.
- [18] 王罗霞,赵志光,王锁民. 一氧化氮对水分胁迫下小麦叶片活性氧代谢及膜脂过氧化的影响[J]. 草业学报,2006,15(4):104-108.

**Influences of salt and alkali mixed stresses on antioxidative activity and  
MDA content of *Medicago sativa* at seedling stage**

ZHANG Yong-feng<sup>1,2,3</sup>, YIN Bo<sup>2</sup>

(1. Northeast Institute of Geography and Agricultural Ecology, Chinese Academy of Sciences, Changchun 130012, China; 2. Jilin Academy of Agricultural Sciences, Changchun 130124, China; 3. Graduate School of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100039, China)

**Abstract:** The *Medicago sativa* cv. Gongnong No. 1 were stressed by different concentrations salt-alkali (NaCl/Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) at seedling stage. Activities of SOD, POD, CAT and MDA of *M. sativa* leaf were determined at seedling stage. Activities of SOD, POD, CAT and MDA were increased with increasing salt concentrations, and higher than CK.

**Key words:** salt-alkali stress; seedling stage; *Medicago sativa*; antioxidative; MDA

## 《草业学报》2008 年承蒙以下专家审稿, 特此表示感谢 (以姓氏拼音为序)

蔡庆生	曹成有	曹小平	崔国文	陈全功	杜国祯	董宽虎
多立安	樊明寿	樊小林	冯虎元	傅 华	高洪文	高清祥
郭继勋	郭振飞	郭正刚	韩建国	韩烈保	韩清芳	郝敦元
郝明德	郝正里	侯扶江	胡跃高	胡自治	江海东	蒋明义
金 樑	李春杰	李辉信	李建东	李建龙	李向林	李镇清
李志坚	林慧龙	刘保林	刘公社	刘建秀	刘迺发	刘照辉
刘志民	龙瑞军	卢欣石	毛培胜	闵庆文	穆春生	南志标
庞保平	蒲 训	强 胜	戎郁萍	商鸿生	邵 涛	沈益新
沈禹颖	施大钊	苏永中	孙继周	唐延林	汪诗平	王崇英
王 刚	王 堃	王德利	王锁民	王晓娟	王新宇	王彦荣
王赞文	王正文	魏春雁	魏晓红	邢 福	徐秉良	杨爱芳
杨惠敏	杨允菲	杨中艺	于应文	于 卓	玉 柱	曾福礼
张 荣	张金屯	张世挺	张卫建	张新全	张堰铭	张英俊
赵桂琴	赵长明	赵国先	赵哈林	赵志光	周道玮	周广胜
周 禾	朱伟云	朱永官				