

NaCl胁迫对甜高粱幼苗抗性酶活性的影响

吴发远,葛江丽

(黑龙江农业职业技术学院,黑龙江佳木斯 154007)

摘要:研究了不同浓度盐胁迫下甜高粱幼苗的抗性酶的活性及MDA和可溶性蛋白的含量。甜高粱幼苗采用水培的方法,设3个盐梯度,1个对照。随着NaCl胁迫的加剧(当NaCl浓度大于50 mmol/L时)甜高粱幼苗膜脂过氧化程度不断加大,膜系统受到破坏;膜保护酶(POD, SOD, CAT, APX)活性降低,200 mmol/L NaCl处理的酶活下降最大,100 mmol/L NaCl处理次之,使体内酶促和非酶促防御系统均遭到破坏,活性氧含量增加对幼苗产生毒害。其中,100 mmol/L NaCl处理后膜脂过氧化程度较轻,膜系统受害程度也轻于200 mmol/L NaCl处理。轻度盐胁迫(当NaCl浓度是50 mmol/L)时,由于抗性酶的作用,活性氧对膜系统没有产生破坏作用。随着盐浓度的增加,抗性酶的活性降低,活性氧的含量不断增加,膜系统受破坏程度也不断加大。

关键词:NaCl胁迫;抗性酶;甜高粱

中图分类号:S311 **文献标识码:**A

The Effect of NaCl-stressed on Resistance Enzymes Activity in Sweet Sorghum Seedlings

Wu Fayuan, Ge Jiangli

(Heilongjiang Agricultural College of Vocational Technology, Jiamusi Heilongjiang 154007)

Abstract: The resistance enzymes activity, MDA and soluble protein contents effects of different degree salt-stressed on sweet sorghum seedlings was discussed in the paper. Sweet sorghum seedlings were cultured in the water, we set up three salt degrees, and one CK. Above 50 mmol/L NaCl resulted in membrane lipid per-oxidation, and membrane system is destroys, the action of POD, SOD, CAT and APX declined. Enzyme action of 200 mmol/L NaCl treatments has the largest descendance. 100 mmol/L NaCl treatments are less than 200 mmol/L NaCl treatments. In the light salt-stressed (when NaCl concentration was 50 mmol/L), active oxygen did not destroy the membrane system, as a result of resistance enzymes. By the increasing of salt concentration, resistance enzymes activity declined, active oxygen content arose, and the destroy degree of membrane system increased too.

Key words: NaCl-stress, resistance enzymes, sweet sorghum

甜高粱(*Sorghum bicolor* L.Moench)属于C₄途径(C₄)植物,具有很高的净光合速率,作为绿色能源作物越来越引起人们的关注。甜高粱具有抗旱、耐涝、耐盐碱等优良特性,对土壤的适应能力较强^[1]。在中国北方及西北不少地方因轻度和中度盐渍化,土地处于抛荒状态,因此种植甜高粱对有效利用盐渍化土地和缓解能源危机有重大的意义。

国内外学者在植物抗盐性研究的方面做了很大努力,也取得了巨大成就,在小麦、水稻方面通过组织培养也已经获得了耐盐品系,但是对高能作物甜高粱的耐盐性研究比较少。有报道盐胁迫下植物光能利用和CO₂同化受抑制,促进了活性氧的生成和脂质过氧化,并对蛋白质和核酸等造成伤害。一般来讲,在盐分胁迫下,植物体内的SOD等酶活性与植物的抗氧化胁迫

第一作者简介: 吴发远,男,1968年出生,安徽濉溪人,在读硕士,副教授,在国家级或省级学术刊物上发表过10篇文章,主编或参编过8本教材,主持过省级科研课题2项,参与主持国家级课题1项。通信地址:154007 黑龙江省佳木斯市前进区胜利路52号,黑龙江农业职业技术学院, Tel: 0454-8322241, E-mail: hnzywfy@126.com。

收稿日期:2008-12-16,修回日期:2009-02-20。

能力呈正相关,而且在盐分胁迫下,盐生植物与非盐生植物相比,其SOD, CAT, POD活性更高,因而更能有效地清除活性氧,阻抑膜质过氧化^[2-6]。实验表明,轻度盐胁迫不会对甜高粱幼苗的光合作用造成影响^[7]。因此,笔者将进一步探讨盐胁迫对甜高粱幼苗抗性酶活性的影响,为研究甜高粱在盐胁迫下的生理生化反应打下基础。

1 材料与方法

1.1 试验时间与地点

试验于2008年5月在黑龙江农业职业技术学院分析检测中心的温室内进行。室内的光强1200 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2\text{s})$;温度24 $^{\circ}\text{C}$;相对湿度20%。

1.2 材料

以甜高粱品种哈妮格林 *Sorghum bicolor* (L.) Moench为试验材料。

1.3 试验设计

将甜高粱种在蛭石中,发芽期正常浇水。当幼苗长到2叶期时,每周浇2次营养液。待小苗长出3片叶子后移至盛有Hoagland营养液的(30 cm \times 50 cm)塑料桶中水培。每桶1株,每3天更换1次营养液,移栽缓苗1周后开始盐胁迫。

设4个处理,NaCl浓度分别为0、50(轻度盐胁迫)、100 mmol/L(中度盐胁迫)、200 mmol/L(重度盐胁迫)。盐胁迫2周后分别选取刚刚完全展开的叶片进行各项生理指标的测量,每个处理至少3个重复。

1.4 方法

1.4.1 丙二醛的含量测定 参考赵世杰的方法^[8],称取0.5 g叶片,在研钵中用10%的三氯乙酸研磨至匀浆。然后混合液在沸水浴中显色30 min,冷却至室温后,4000 r/min离心10 min,取上清液用分光光度计(UV-4800 USA)分别在600 nm、532 nm及450 nm测定OD值,计算MDA含量。

1.4.2 过氧化物酶(POD)活性测定 POD活性测定按照Omran的愈创木酚法,酶活测定的反应体系包括2.9 ml 0.05 mol/L磷酸缓冲液、1.0 ml 2% H_2O_2 , 1.0 ml 0.05 mol/L愈创木酚和0.1 ml酶液。于37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中保温15 min,然后迅速转入冰浴中并加入2.0 ml 20%三氯乙酸终止反应,用分光光度计在470 nm波长下测定反应体系的吸光度。以每分钟内 A_{470} 变化为1个过氧化物酶活力单位(U)计算酶活力。

1.4.3 超氧化物歧化酶(SOD)活性测定 采用Health的氮蓝四唑(NBT)法测定SOD含量。3 ml反应液内含有0.05 ml/L磷酸缓冲液(pH 7.8),75 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 氯化硝基四氮唑蓝(NBT)、0.02 mol/L甲硫氨(Met),1.0 $\mu\text{mol}/\text{L}$

EDTA及2 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 核黄素和适量酶液。在4500 lx下照光20 min,然后立即遮光,于560 nm下测光密度。以抑制NBT光还原的50%作为一个酶活单位(U)。

1.4.4 过氧化氢酶(CAT)活性测定 取1.5 ml、pH 7.8磷酸缓冲溶液加1.0 ml蒸馏水,0.3 ml、0.1 mol/L H_2O_2 再加0.1 ml酶液,混合均匀后用石英比色皿在分光光度计上测定波长240 nm下的吸光值,每隔1 min读一次。对照杯用0.05 mol/L, pH 7.8的磷酸缓冲溶液代替。每1 min解1 μmol 的过氧化氢即为1个酶活力单位(U)。

1.4.5 抗坏血酸过氧化酶(APX)活性测定 2.9 ml APX反应混合液(取10 μl 、0.6 mol/L的 H_2O_2 ;1 ml、1 $\mu\text{mol}/\text{L}$ EDTA- Na_2 ;1 ml、3 $\mu\text{mol}/\text{L}$ AsA,混入0.05 mol/L, pH 7.0的磷酸缓冲溶液中,定容至100 ml)和0.1 ml酶液,加入 H_2O_2 后立即在20 $^{\circ}\text{C}$ 下测定。每隔1 min测一次 A_{290} 的变化,计算单位时间内AsA减少量计算酶活。每分钟内 A_{240} 减少0.1为1个酶活力单位(U)。

1.4.6 考马斯亮蓝测定可溶性蛋白的含量 取蛋白提取液1 ml加5 ml考马斯亮蓝显色剂于比色皿中,摇匀,2 min后在595 nm下测吸光值。

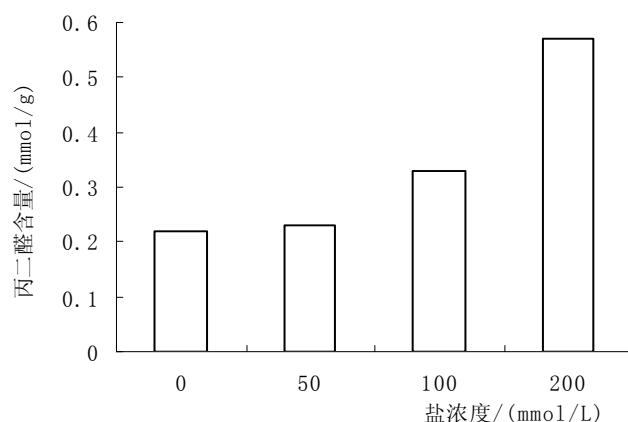


图1 NaCl处理对甜高粱丙二醛含量的影响

2 结果与分析

2.1 膜脂过氧化与甜高粱的耐盐性

丙二醛(MDA)是膜脂过氧化的分解产物,它从膜上产生部位释放出来,与蛋白质、核酸起反应修饰其特性,或抑制蛋白质的合成;它还可以与酶反应,使酶丧失活性,甚至成为一种催化错误代谢的分子。MDA的积累能对膜和细胞造成进一步的伤害,它本身对植物细胞具有明显的毒害作用。通常用它作为膜脂过氧化的指标,表示细胞膜脂过氧化程度和植物对逆境条件反应的强弱^[9]。从图1可以看到对照和50 mmol/L NaCl处理后的MDA含量相差很小,而100 mmol/L NaCl和200 mmol/L NaCl处理后则高于其它处理。其

中 100 mmol/L NaCl 处理的 MDA 含量增加较少, 仅为对照 1.5 倍, 而 200 mmol/L NaCl 处理的 MDA 含量增加较多, 为对照的 2.6 倍。这表明 200 mmol/L NaCl 处理的幼苗的膜脂过氧化程度较大, 膜伤害最严重。

2.2 膜保护酶活性与甜高粱的耐盐性

POD 作为自由基清除剂, 其活性提高可以减轻自由基对膜的伤害。SOD 是膜保护系统的一种关键酶, 在植物抗氧化胁迫中起重要作用, 具有维持活性氧代谢平衡、保护膜结构的功能。CAT 是膜保护系统的另一种酶, 能够在逆境胁迫中清除植物体内的过氧化氢,

减少了 -OH 的形成, 维持体内的活性氧代谢平衡、保护膜结构, 减轻有毒物质对生活细胞的毒害, 延迟或阻碍细胞结构的破坏, 使组织保持活力^[10]。从图 2~图 5 可见, 50 mmol/L NaCl 处理后 4 种酶的活性都升高, 而 100 mmol/L NaCl 和 200 mmol/L NaCl 处理后的酶活则下降。其中 100 mmol/L NaCl 处理后的酶活性较对照下降不多, 而 200 mmol/L NaCl 处理则下降较大。这可能是因为当盐浓度较高时产生了较多的活性氧从而抑制了酶的活性。

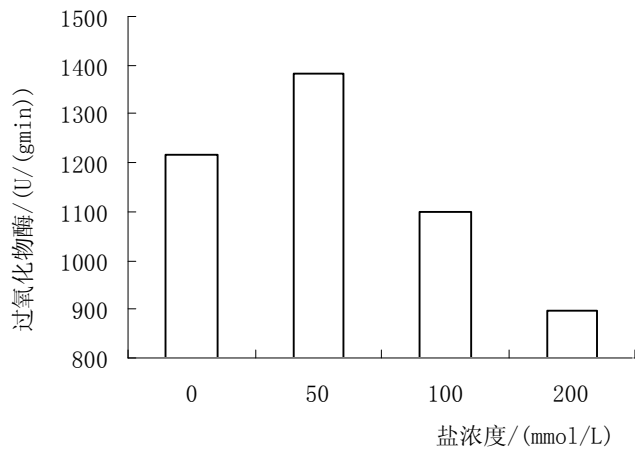


图 2 NaCl 处理对甜高粱过氧化物酶活性的影响

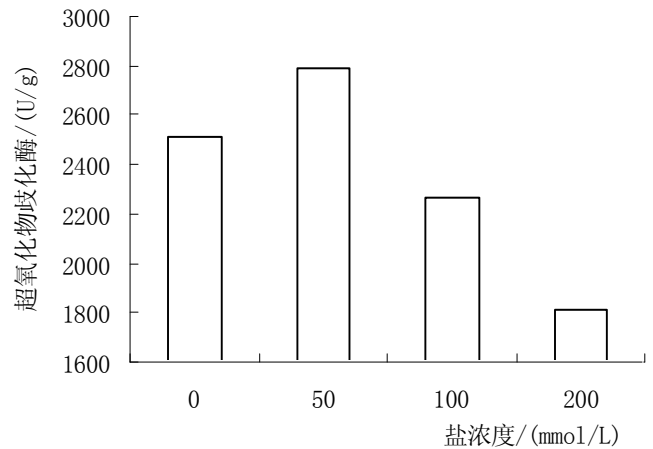


图 3 NaCl 处理对甜高粱超氧化物歧化酶活性的影响

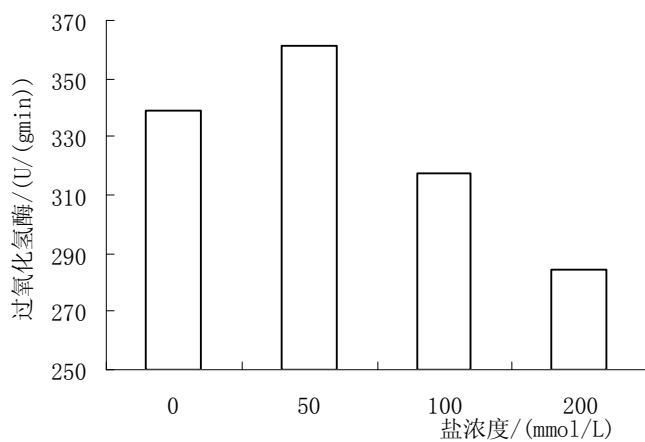


图 4 NaCl 处理对甜高粱过氧化氢酶活性的影响

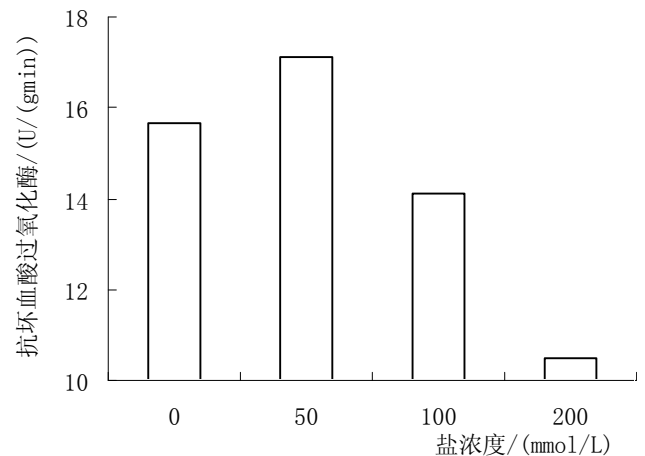


图 5 NaCl 处理对甜高粱抗坏血酸过氧化酶活性的影响

2.3 NaCl 胁迫对甜高粱可溶性蛋白含量的影响

50 mmol/L NaCl 处理可溶性蛋白的含量增加, 而 100 mmol/L NaCl 和 200 mmol/L NaCl 处理则下降(图 6)。100 mmol/L NaCl 处理后可溶性蛋白的含量下降较少, 为对照的 89.67%; 200 mmol/L NaCl 处理后可溶性蛋白的含量下降较多, 是对照的 61.5%。渗透调节物质含量增加可以减少盐离子对细胞的伤害, 因此可以减少盐胁迫的损害。200 mmol/L NaCl 处理后甜高粱幼苗可溶性蛋白的含量最低, 所以所受的损害也最

严重。

3 讨论

自从 1968 年 Mcord 与 Fridovich 发现了清除超氧化物自由基的超氧化物歧化酶(SOD)以后, 人们发现, 氧的某些代谢产物及其衍生物的活性物质尚有损伤需氧生物机体的不利一面。但在正常条件下, 由于细胞内自由基水平很低, 所以不会引起伤害。在正常条件下, 细胞内自由基的产生与清除处于一种动态平衡状态, 一旦这种平衡受到破坏, 自由基产生积累, 膜

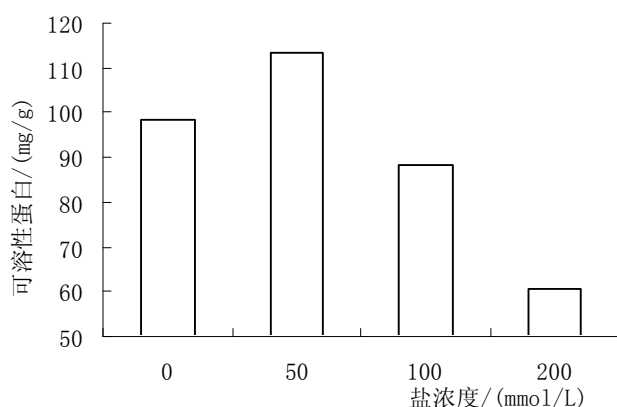


图6 NaCl处理对甜高粱可溶性蛋白含量的影响

内磷脂双分子层中含有的不饱和脂肪酸链就易于被过氧化分解而造成膜整体的破坏。POD、CAT、APX和SOD均为植物内源的自由基清除剂,属保护酶系统,盐胁迫下只有保护酶活性增强或维持较高水平,才能清除活性氧自由基使之保持较低水平,从而防止其对生物膜结构和功能的破坏,保持一定的耐盐性。这与试验的结论一致。50 mmol/L NaCl处理酶活性增加,MDA的含量几乎没有变化;100 mmol/L NaCl处理酶活性有少量的降低,MDA的含量有所上升;而200 mmol/L NaCl处理后酶活性下降较大,MDA的含量也大量增加。50 mmol/L NaCl胁迫使幼苗体内的渗透调节物质——可溶性蛋白的含量增加,而100 mmol/L NaCl和200 mmol/L NaCl处理的可溶性蛋白的含量减少。渗透调节物质可以增加细胞的渗透调节能力,减少盐离子对细胞造成的伤害。其中,100 mmol/L NaCl处理的渗透调节物质在盐胁迫后的含量要高于

200 mmol/L NaCl处理,并且所受盐害较轻。

4 结论

从甜高粱幼苗的MDA含量,保护酶活性的变化及可溶性蛋白含量的变化可以看出,在轻度盐胁迫下,甜高粱可通过提高保护酶活性和渗透调节物质的含量而表现出较强的耐盐伤害能力,但这种能力是很有限的。当NaCl含量超过100 mmol/L以后,甜高粱幼苗的膜脂就会受到活性氧的破坏。因此,设法增加甜高粱自身的耐盐性,对盐碱地种植甜高粱是非常重要的。

参考文献

- [1] 黎大爵,廖馥荪.甜高粱及其利用.北京:科学出版社,1992:17.
- [2] 刘婉,胡文玉.NaCl胁迫下离体小麦叶片内抗坏血酸与几种生理生化指标变化的关系.植物生理学通讯,1997,33(6):423-424.
- [3] 刘友良,汪良驹.植物对盐胁迫的反应和耐盐性.植物生理与分子生物学.北京:科学出版社,1999:752-767.
- [4] 吕芝香,乙引.NaCl对小麦苗叶片脯氨酸氧化酶活性和游离脯氨酸累积的影响.植物生理学报,1992,18(4):376-380.
- [5] 钮福祥,郭景禹,郭小丁.NaCl胁迫对甘薯某些生理性状的影响.江苏农业学报,1992,8(3):14-19.
- [6] 钱黔,刘友良.盐胁迫下钙对大麦根系质膜和液泡膜功能的保护效应(简报).植物生理学通讯,1995,31(2):102-104.
- [7] 葛江丽,石雷,姜闯道,等.盐胁迫条件下甜高粱幼苗的光合特性及光系统II功能调节.作物学报,2007,33(8):1272-1278.
- [8] 赵世杰,许长城,邹琦,等.通过改良方法测定植物细胞中丙二醛含量.植物生理学通讯,1994,30(3):207-210.
- [9] 龚明,丁念诚,贺子义,等.盐胁迫下大麦和小麦叶片脂质过氧化伤害与超微结构变化的关系.植物学报,1989,31(11):841-846.
- [10] 李景生,黄韵珠.浅述植物的耐盐机理.植物学通报,1995,12(3):15-18.