

梯度碱胁迫对蚕豆幼苗 生理生化指标影响的研究

乔枫¹ 耿贵工² 罗桂花^{1*}

(1. 青海师范大学 青藏高原环境与资源教育部重点实验室, 青海 西宁 810008; 2. 青海农林科学院 作物育种栽培研究所, 青海 西宁 810016)

摘要: 研究蚕豆幼苗在梯度碱胁迫(0, 50, 100, 150, 200, 250 mmol/L NaHCO₃) 下, 分别分析处理 4, 8, 12, 16 d 后蚕豆幼苗的叶片脯氨酸含量、MDA 含量、抗氧化酶活性生理指标的变化情况。结果表明: 随 NaHCO₃ 胁迫时间和强度的增加, 蚕豆幼苗叶片脯氨酸和 MDA 含量显著增加($P < 0.01$)。随着胁迫时间的延长, 50 mmol/L NaHCO₃ 处理的 SOD 活性呈先增加($P < 0.01$) 后下降($P < 0.01$) 趋势, 100 ~ 250 mmol/L NaHCO₃ 处理的 SOD 活性呈下降趋势($P < 0.01$); 50 mmol/L NaHCO₃ 处理的 CAT 活性呈增加趋势($P < 0.01$), 100 ~ 250 mmol/L NaHCO₃ 处理的 CAT 活性呈先增加($P < 0.01$) 后降低趋势($P < 0.01$); 50 ~ 150 mmol/L NaHCO₃ 处理的 POD 活性呈先增加($P < 0.01$) 后降低趋势($P < 0.01$), 200 ~ 250 mmol/L NaHCO₃ 处理的 POD 活性呈下降趋势($P < 0.01$)。结论是蚕豆具有一定程度的抗碱性。

关键词: 蚕豆 (*Vicia faba* L.); NaHCO₃ 胁迫; 生理特性

中图分类号: S643.6 文献标志码: A 文章编号: 1000-2286(2011)04-0655-05

A Study on Physiological and Biochemical Characteristics of *Vicia faba* L. Seedlings under Alkali Stress

QIAO Feng¹, GENG Gui-gong², LUO Gui-hua^{1*}

(1. Educational emphasis Lab of Environment and Resource in Qinghai-Tibet Plateau, Qinghai Normal University, Xining 810008, China; 2. Institute of Crop Breeding Cultivation, Qinghai Academy of Agriculture and Forestry, Xining 810016, China)

Abstract: An analysis of free proline and malondialdehyde (MDA) contents, resist oxidases activity in *Vicia faba* L. leaves after 4, 8, 12, 16 days treatment with NaHCO₃ (0, 50, 100, 150, 200, 250 mmol/L NaHCO₃) was conducted. It was indicated that with extension of NaHCO₃ stress time and increment of NaHCO₃ concentration, free proline and malondialdehyde (MDA) contents increased significantly. With extension of stress time, the activity of superoxide dismutase (SOD) treated with 50 mmol/L NaHCO₃ first increased and then declined significantly, and the activity treated with 100-250 mmol/L NaHCO₃ declined. The activity of catalase (CAT) treated by 50 mmol/L NaHCO₃ increased, and the activity treated with 100-250 mmol/L NaHCO₃ first increased and then declined significantly. The activity of peroxidase (POD) treated with 50-150 mmol/L NaHCO₃ first increased and then declined significantly, and the activity treated with 200-250 mmol/L NaHCO₃ declined. In a word, *Vicia faba* L. resists alkali stress in a certain degree.

收稿日期: 2011-03-25 修回日期: 2011-05-05

基金项目: 青海省重点科技攻关项目(2007-N-139)

作者简介: 乔枫(1973-) 女, 副教授, 博士, 主要从事生物化学与分子生物学研究, E-mail: qiaofnm@163.com; * 通讯作者: 罗桂花, 教授, E-mail: luoguihua@qhnu.edu.cn.

Key words: *Vicia faba* L.; NaHCO₃ stress; physiological characteristics

盐碱胁迫是一种重要的环境逆境因子,造成土地荒漠化和耕地退化,严重抑制植物的生长,降低植物的生产力。人们对植物抗盐、碱生理生态学等研究工作格外重视且不断深入^[1-7]。使用混合盐(NaCl, Na₂SO₄, NaHCO₃, Na₂CO₃)和30种盐碱混合物(盐摩尔浓度为24~120 mmol/L, pH 7.03~10.32)胁迫水稻幼苗,结果显示盐和碱明显影响了幼苗的生物产量,盐碱交叉胁迫改变根活性,碱胁迫比盐胁迫更能影响幼苗的生活力,而且高盐碱的交互作用比单独盐或碱胁迫更严重,导致对植物生态和生理特征较敏感^[4]。蚕豆(*Vicia faba* L.)是重要的粮、菜、肥兼用型作物,是我国重要的农作物之一,蚕豆具有一定程度的抗盐碱性^[8-11]。一定浓度的Na₂CO₃促进了蚕豆幼苗鲜干重、肉质化程度、叶绿素含量的增加;100 mmol/L Na₂CO₃处理明显抑制了蚕豆幼苗的生长;Na₂CO₃浓度超过75 mmol/L时,蚕豆幼苗MDA含量急剧上升,质膜透性也明显增加,脯氨酸含量增加明显;随Na₂CO₃浓度的升高,蚕豆幼苗叶绿素a、叶绿素b、叶绿素a+b的含量先升高后降低^[8-9]。利用不同pH值的酸碱溶液处理蚕豆,处理5 h的蚕豆叶片SOD活性远大于处理12 h的SOD活性;较长时间处理下的CAT活性基本上高于短时间处理的CAT活性;短时间处理下(10 min、5 h)POD活性均显著低于对照值,较长时间处理(30 min、12 h)下POD活性变化的规律性不强,且变化幅度较小;pH 5.5处理5 h的叶片脯氨酸含量最高,处理12 h脯氨酸含量的变化不大;处理5 h时丙二醛含量的变化随pH的降低略有下降,但处理12 h丙二醛含量的变化不大^[10-11]。本研究不同浓度NaHCO₃胁迫下研究蚕豆生长和几种抗氧化酶活性的影响,进一步探讨蚕豆的抗NaHCO₃能力,为蚕豆的栽培生理和种植提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料培养

选成熟饱满的蚕豆(*Vicia faba* L.)籽粒,用自来水冲洗3次,用 $\varphi=3\%$ 的次氯酸钠溶液处理消毒20 min,蒸馏水冲洗3~5次。将种子置于铺有白毛巾的铁盘子里,28℃培养箱中发芽催芽4 d,其间及时补充清水,保持湿润。种子露白后播种于装有基质(草炭:蛭石为2:1)直径20 cm有孔的塑料钵中,每钵定苗2株。同时浇灌适量的1/2 Hoagland营养液(每钵营养液用量相同)。播种后于自然环境中生长。幼苗长至三叶一心期时,进行胁迫处理。

1.2 碱胁迫

NaHCO₃(分析纯)处理浓度为0,50,100,150,200,250 mmol/L。选取长势均匀的蚕豆幼苗,分别用不同质量浓度的NaHCO₃的1/2 Hoagland溶液处理,每天浇灌2次,早晚各1次,浇灌量为蛭石持水量的2倍,从而将以前的积余盐冲洗掉,以保持各个处理液浓度的恒定,同时以1/2 Hoagland营养液浇灌作为对照,共处理20 d。每个处理均为3盆(3个重复)。

1.3 叶片脯氨酸和丙二醛(MDA)含量的测定

脯氨酸含量测定采用酸性茚三酮法显色法,丙二醛(MDA)含量采用硫代巴比妥酸比色法测定^[12]。

1.4 酶液的制备和测定

称鲜叶3 g,加入约15 mL酶提取液(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% TritonX-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。用于超氧化物歧化酶(SOD)活性、过氧化物酶(POD)活性、过氧化氢酶(CAT)活性的测定。按照张志良等^[13]的方法测定SOD、CAT和POD的活性。

所有数据处理、绘图及标准差、方差等统计学计算用Excel程序,DPS 7.55统计分析差异显著性。

2 结果

2.1 梯度碱胁迫对蚕豆叶片脯氨酸和丙二醛(MDA)含量的影响

使用不同浓度NaHCO₃处理蚕豆,在处理的第4,8,12,16天分别测定蚕豆叶片脯氨酸和丙二醛含量(表1和表2)。150~250 mmol/L NaHCO₃处理16 d,蚕豆根部变黑、枯萎而死。不同处理下蚕豆叶片中的脯氨酸含量显著增加(表1, $P < 0.01$),当250 mmol/L NaHCO₃处理第4,8,12天时,脯氨酸含量

分别是原来的 9 倍、8.30 倍和 5.94 倍。不同处理下蚕豆叶片中的丙二醛含量显著增加(表 2 $P < 0.01$) 当 250 mmol/L NaHCO_3 处理第 4、8、12 天时, 丙二醛含量分别是原来的 4.45 倍、5.22 倍和 7.06 倍。

表 1 NaHCO_3 胁迫对蚕豆叶片脯氨酸含量的影响

Tab.1 Effects of free proline contents of *Vicia faba* L. leaves under NaHCO_3 stress

处理/(mmol · L ⁻¹) Treatment	脯氨酸质量分数(Fw)/(μg · g ⁻¹) Contents of proline			
	胁迫时间/d Days under NaHCO_3 stress			
	4	8	12	16
0	1.39 ± 0.56	1.76 ± 0.62	2.75 ± 0.60	2.98 ± 0.22
50	3.50 ± 0.78	4.55 ± 0.83	5.48 ± 0.67	7.52 ± 0.53
100	5.45 ± 0.83	6.92 ± 0.33	9.54 ± 0.76	11.63 ± 1.12
150	6.63 ± 0.50	8.54 ± 0.79	10.45 ± 0.75	—
200	9.44 ± 0.90	11.48 ± 0.73	13.48 ± 0.74	—
250	12.51 ± 0.78	14.61 ± 0.85	16.36 ± 0.80	—

数据为平均值 ± 标准差。The values are means average ± SE of three replicase.

表 2 NaHCO_3 胁迫对蚕豆叶片丙二醛含量的影响

Tab.2 Effects of free malondialdehyde contents of *Vicia faba* L. leaves under NaHCO_3 stress

处理/(mmol · L ⁻¹) Treatment	MDA 质量摩尔浓度分数(Fw)/(μmol · g ⁻¹) Contents of MDA			
	胁迫时间/d Days under NaHCO_3 stress			
	4	8	12	16
0	3.46 ± 0.93	4.12 ± 0.87	4.56 ± 0.92	4.33 ± 0.64
50	4.51 ± 0.66	7.38 ± 0.86	11.48 ± 0.73	16.49 ± 0.66
100	6.51 ± 1.09	10.54 ± 0.83	15.65 ± 0.94	23.57 ± 1.00
150	8.38 ± 0.65	13.57 ± 0.86	19.61 ± 0.83	—
200	11.47 ± 1.00	16.48 ± 0.85	26.54 ± 0.73	—
250	15.41 ± 0.73	21.52 ± 0.75	32.19 ± 1.75	—

数据为平均值 ± 标准差。The values are means average ± SE of three replicase.

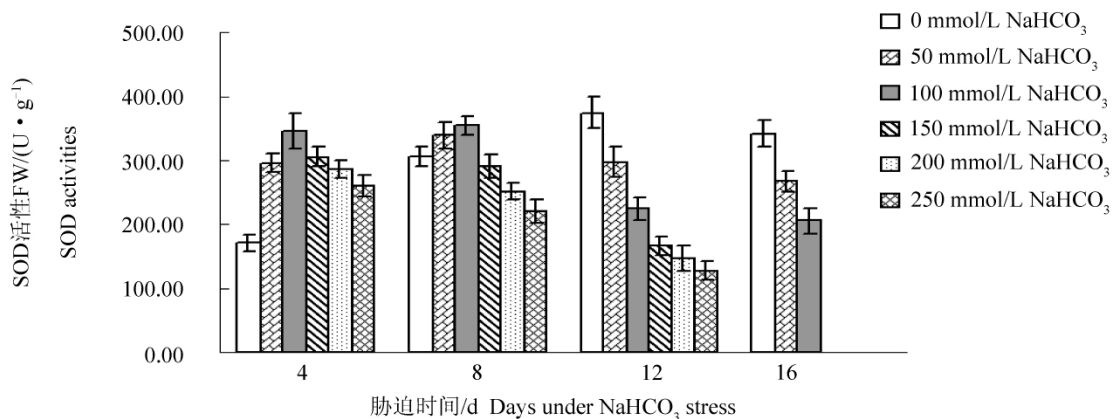


图 1 NaHCO_3 对蚕豆叶片 SOD 活性的影响

Fig.1 Effects of SOD activities of *Vicia faba* L. leaves under NaHCO_3 stress

2.2 梯度碱胁迫对蚕豆叶片 SOD 活性的影响

SOD 在植物抵抗逆境过程中, 防止膜脂过氧化, 对细胞膜系统损伤起保护作用^[14]。由图 1 可以看出, 不同浓度 NaHCO_3 胁迫处理第 4 天的 SOD 活性显著升高 ($P < 0.01$)。50 ~ 100 mmol/L NaHCO_3 处理第 8 天的 SOD 活性显著增加 ($P < 0.01$), 150 ~ 250 mmol/L NaHCO_3 处理的 SOD 活性显著下降 ($P < 0.01$)。 NaHCO_3 胁迫第 12、16 天的 SOD 活性显著下降 ($P < 0.01$)。当 250 mmol/L NaHCO_3 处理第 4、8、12 天时, SOD 活性分别是原来的 1.52 倍、0.72 倍和 0.34 倍。

随着胁迫时间的延长 50 mmol/L NaHCO_3 处理的 SOD 活性呈先增加 ($P < 0.01$) 后下降 ($P < 0.01$) 的趋势, 100 ~ 250 mmol/L NaHCO_3 处理的 SOD 活性呈显著下降趋势 ($P < 0.01$)。

2.3 梯度碱胁迫对蚕豆叶片过氧化氢酶活性的影响

除 250 mmol/L NaHCO_3 处理第 12 天的 CAT 活性不显著降低 ($P > 0.01$) 外, 其它浓度 NaHCO_3 胁迫下, 蚕豆叶片 CAT 活性显著增加 ($P < 0.01$, 图 2)。随着胁迫强度的增加, 第 4 ~ 8 天的 CAT 活性呈增加趋势 ($P < 0.01$), 第 12, 16 天时的 CAT 活性呈先升高后下降的趋势。随着胁迫时间的延长, 50 mmol/L NaHCO_3 处理的 CAT 活性呈增加趋势 ($P < 0.01$), 100 ~ 250 mmol/L NaHCO_3 处理的 CAT 活性呈先增加 ($P < 0.01$) 后降低的趋势 ($P < 0.01$)。

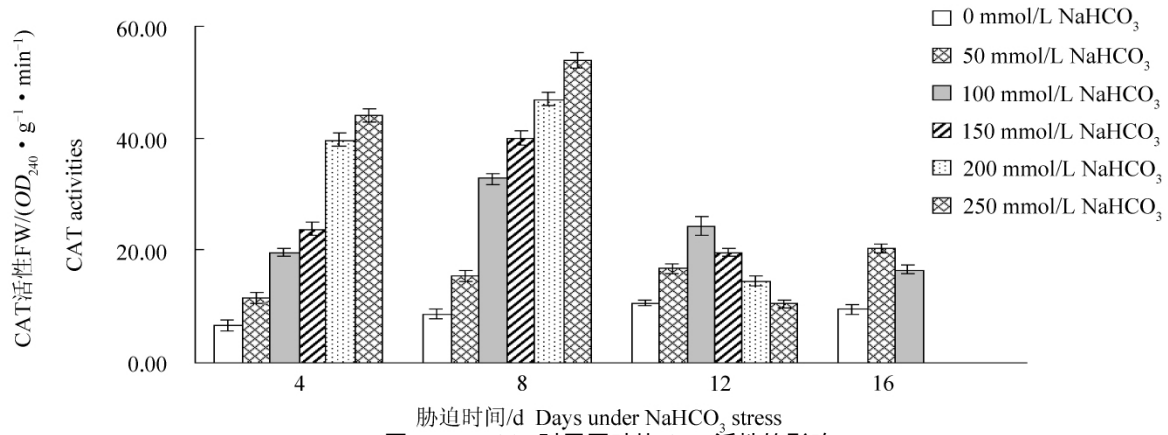


图 2 NaHCO_3 对蚕豆叶片 CAT 活性的影响

Fig. 2 Effects of CAT activities of *Vicia faba* L. leaves under NaHCO_3 stress

2.4 梯度碱胁迫对蚕豆叶片过氧化物酶活性的影响

如图 3 所示, 随着 NaHCO_3 胁迫强度的增加, 第 4 天的 CAT 活性呈增加趋势 ($P < 0.01$), 第 8 天时的 CAT 活性呈先升高 ($P < 0.01$) 后下降 ($P < 0.01$) 的趋势, 第 12, 16 天时的 CAT 活性呈下降趋势。100 mmol/L NaHCO_3 胁迫第 8 天的 POD 活性是未胁迫的 1.95 倍, 250 mmol/L NaHCO_3 处理第 12 天的 POD 活性是未胁迫的 0.20 倍。随着胁迫时间的延长, 50 ~ 150 mmol/L NaHCO_3 处理的 POD 活性呈先增加 ($P < 0.01$) 后降低的趋势 ($P < 0.01$), 200 ~ 250 mmol/L NaHCO_3 处理的 POD 活性呈下降趋势 ($P < 0.01$)。

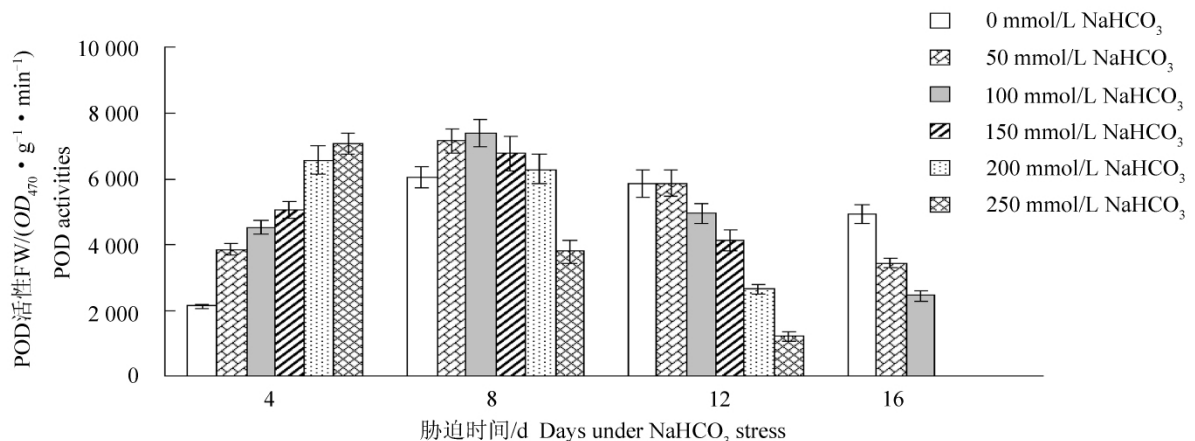


图 3 NaHCO_3 对蚕豆叶片 POD 活性的影响

Fig. 3 Effects of POD activities of *Vicia faba* L. leaves under NaHCO_3 stress

3 讨论

脯氨酸是植物体内的一种重要渗透调节物质, 其含量的变化是植物对逆境条件的一种适应性变化或者自卫反应, 植物体内脯氨酸含量在一定程度上反映了植物的抗逆性^[8, 15]。在碱胁迫下, 植物往往会积累大量渗透调节物质(如脯氨酸、可溶性糖)等以应答水分亏缺。本试验中 5 种 NaHCO_3 处理下蚕豆叶片脯氨酸含量显著上升(表 1)。

MDA 被认为是逆境胁迫下膜脂氧化的最终产物,对植物细胞有毒害作用,它的含量可以反应植物遭受逆境伤害的程度,MDA 含量与细胞膜透性有关^[11]。本研究中 5 种 NaHCO₃ 处理下蚕豆叶片 MDA 含量显著上升(表 2),这些结果说明 NaHCO₃ 胁迫下造成了细胞膜损伤和胞内电解质渗漏加剧。5 种不同浓度 NaHCO₃ 胁迫下蚕豆叶片的脯氨酸和 MDA 含量均随着胁迫时间延长而显著增大(P < 0.01)。由此可见,随着 NaHCO₃ 胁迫程度的增加,细胞膜透性和膜脂过氧化程度逐渐加剧,膜脂过氧化程度加剧使细胞膜伤害加重,从而导致细胞膜透性增加,离子外渗增多。

植物在逆境胁迫下会产生大量的活性氧,POD 是植物体内抗氧化酶系统的重要组成部分,它是清除超氧化物自由基的重要保护酶,使机体免受过氧化氢的毒害作用^[16],其活性高低能反映植物受害的程度,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。由 SOD、POD 和 CAT 构成的保护酶系统可清除体内有害的活性氧,从而保护植物的膜系统,但植物体内的活性氧自由基产生速度超过了植物清除活性氧的能力,便会引起细胞伤害,导致其活性明显下降^[16]。本研究表明,随着 NaHCO₃ 胁迫时间的延长和程度的加剧,SOD、CAT、POD 活性随时间的延长基本呈先升高后降低或下降的变化趋势^[17-18]。

由此可推测,在持续 NaHCO₃ 胁迫下,蚕豆内源抗氧化酶 SOD、POD 和 CAT 的防御和清除活性氧的能力只在一定的范围内有效,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,使蚕豆具有一定忍耐或抵抗盐碱的能力。当胁迫超过蚕豆的承受极限时,活性氧的生成量超过了抗氧化酶的清除能力,抗氧化酶活性下降或被破坏,膜脂质过氧化作用加剧,导致 MDA 和脯氨酸过量增加,影响和破坏了细胞的正常代谢,植物生长受到抑制甚至枯萎而死。这可能是蚕豆能适应一定程度碱胁迫的重要生理基础。

参考文献:

- [1] Flowers T J, Yeo A R. Breeding for salinity resistance in crop plants[J]. *Plant Physiol*, 1995, 22: 875-884.
- [2] Munns R. Comparative physiology of salt and water stress[J]. *Plant Cell and Environment*, 2002, 25: 239-250.
- [3] Shi D, Wang D. Effects of various salt - alkali mixed stresses on *A neurolepi dium chinense* (Trin.) Kitag[J]. *Plant and Soil*, 2005, 271: 15-26.
- [4] Peng Y L, Gao Z W, Gao Y, et al. Eco - physiological characteristics of alfalfa seedlings in response to various mixed salt - alkaline stresses[J]. *J Integr Plant Biol*, 2008, 50(1): 29-39.
- [5] Younis M E, Hasaneen M N A, Kazamel Protoplasma A M S. Plant growth, metabolism and adaptation in relation to stress conditions. XXVII. Can ascorbic acid modify the adverse effects of NaCl and mannitol on amino acids, nucleic acids and protein patterns in *Vicia faba* seedlings? [J]. *Protoplasma*, 2009, 235: 37-47.
- [6] Widodo, John H P, Ed N, et al. Metabolic responses to salt stress of barley (*Hordeum vulgare* L.) cultivars, Sahara and Clipper, which differ in salinity tolerance[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2009, 60(14): 1-15.
- [7] 景欣, 张旻, 李玉花. 植物耐盐研究进展[J]. *生物技术通讯*, 2010, 12(2): 290-294.
- [8] 刘霞. Na₂CO₃ 胁迫对蚕豆幼苗几种生理生化指标的影响[J]. *枣庄学院学报*, 2008, 25(2): 98-101.
- [9] 刘霞. Na₂CO₃ 胁迫对蚕豆幼苗生长及叶绿素含量的影响[J]. *长江学报*, 2010, 10(12): 30-32.
- [10] 武永军, 曹让, 王爱连, 等. 不同 pH 缓冲液处理下蚕豆幼苗叶片 SOD、POD 和 CAT 活性的变化[J]. *西北农业学报*, 2009, 18(6): 170-173.
- [11] 武永军, 何国强, 史艳茹, 等. 不同 pH 值缓冲液处理下蚕豆叶片相对含水量、脯氨酸及丙二醛含量的变化[J]. *干旱地区农业研究*, 2009, 27(6): 169-172.
- [12] 郝再彬, 苍晶, 徐仲. *植物生理学实验* [M]. 哈尔滨: 哈尔滨工业大学出版社, 2004: 94-98.
- [13] 张志良, 瞿伟菁. *植物生理学实验指导* [M]. 3 版. 北京: 高等教育出版社, 2005: 113-115.
- [14] 魏志刚, 杨传平, 王艳敏, 等. NaHCO₃ 处理对西伯利亚蓼叶细胞膜脂过氧化和活性氧清除酶活性的影响[J]. *植物研究*, 2007, 27(6): 670-674.
- [15] 宋玉伟, 刘宗才, 杨建伟. 干旱条件下蚕豆光合和生理特性变化研究[J]. *河南师范大学学报: 自然科学版*, 2009, 37(4): 109-113.
- [16] Zhang L P, Wang X F, Shi Q H, et al. Differences of physiological responses of cucumber seedlings to NaCl and NaHCO₃ stress[J]. *Ying Yong Sheng Tai Xue Bao*, 2008, 19(8): 1854-1859.
- [17] Wang Cheng - yun, Wang Xiao - yong, Tian Yuan, et al. Oxidative stress, defence response and early biomarkers for lead - contaminated soil in *vicia faba* seedlings[J]. *Environ Toxicol Chem*, 2008, 27(4): 970-977.
- [18] 张玉东, 姜中珠, 马蕾对. 不同浓度 NaHCO₃ 胁迫的生理响应[J]. *植物研究*, 2009, 29(1): 49-53.