

文章编号:1674-7054(2013)02-0160-05

角果木根系盐胁迫的防御机理

臧剑¹,符秀梅¹,王鹤鸣¹,林道哲¹,吴辉¹,陈健妙¹,陈银华^{1,2}

(1.海南大学 海南省热带生物资源可持续利用重点实验室,海口 570228;

2.海南大学 农学院,海口 570228)

摘要:以强耐盐性红树植物角果木为研究对象,采用不同浓度的 NaCl 溶液(0,150,300,450 mmol · L⁻¹) 对角果木幼苗进行盐胁迫处理,测定角果木根部的 SOD,POD,ASA,MDA 等生理指标。结果表明:角果木在适应盐环境的过程中有新的蛋白产生,在盐胁迫早期(≤9 h)MDA 含量急剧上升,这种信号诱导了抗氧化防御系统的启动,使角果木根部抗氧化酶类及抗氧化物质均有所增加,说明角果木盐胁迫下通过启动抗氧化酶类、抗氧化物质以清除活性氧对根部的损伤,而后开始适应外界盐环境。

关键词:红树;角果木;盐胁迫;抗氧化系统

中图分类号: Q 945.78 **文献标志码:** A

红树植物是生长在热带、亚热带海岸潮间带的木本植物群落,长期受海水的侵蚀,已进化出一套有效的活性氧清除机理。PARIDA 研究发现,盐胁迫引起小花木榄叶片 H₂O₂ 含量增加,同时抗坏血酸过氧化酶(APX)、愈创木酚过氧化酶(GPX)、谷胱甘肽还原酶(GR)和 SOD 活性增加,ASA 含量显著下降^[1]。然而,作为膜脂过氧化产物的丙二醛(MDA)在不同盐浓度处理下,其含量没有变化,表明小花木榄是通过调节特定抗氧化酶活性和抗氧化小分子水平来保护植物免受活性氧伤害的^[2]。笔者以强耐盐性红树植物角果木(*Ceriops tagal* (Perr.) C. B. Rob.)为研究对象,通过测定其幼苗根部在不同盐浓度和不同时间处理后的 SOD,POD 活性及蛋白质,ASA,MDA 的含量,研究红树植物角果木的活性氧清除机理,旨在为进一步了解红树植物的耐盐机理提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验设计 角果木的胎生苗采自海南东寨港红树林自然保护区。选择发育良好,无病虫害,成熟度和长度接近的角果木成熟胚轴,置于 Hoagland 营养液中培养,当幼苗抽生第 2 对叶时,用不同浓度的 NaCl 溶液进行培养,其浓度梯度为:0(CK),150,300,450 mmol · L⁻¹。于处理后第 3,6,9,12,24 h 采样,测定角果木根系氧自由基代谢的生理生化指标,重复 3 次。

1.2 测定方法 蛋白含量的测定采用考马斯亮蓝 G-250 染色法^[3];过氧化物酶(POD)活性的测定采用愈创木酚比色法^[4];超氧化物歧化酶(SOD)活性按文献^[5]的方法测定;丙二醛(MDA)含量的测定采用分光光度法^[6];细胞内的还原型抗坏血酸(ASA)含量的测定采用滴定法^[7]。

2 结果与分析

2.1 盐胁迫对角果木根系总蛋白质含量的影响 从图 1 可以看出,随盐胁迫时间的增加,角果木根系总蛋白含量呈先减后增的趋势,以 6 h 为折点;6 h 内各处理的总蛋白含量均下降,且均低于对照,当处理 6 h 时,3 个处理与对照的差异均达最大值,总蛋白含量比对照分别降低了 10.76%,17.91%,29.83%,之后各处理的总蛋白含量均有所上升;当处理达 24 h 时,3 个盐胁迫处理的总蛋白含量与对照差异不显著,150

收稿日期:2013-04-12

基金项目:国家自然科学基金(31060040,31260345);教育部科学技术重点项目(207092)

作者简介:臧剑(1984-),女,湖南益阳人,海南大学农学院 2010 级硕士研究生。

通信作者:陈银华(1976-),男,海南大学农学院教授,硕士生导师. E-mail: yhchen@hainu.edu.cn

mmol · L⁻¹盐处理的总蛋白含量略高于对照。这表明盐胁迫可以调节角果木蛋白质数量的变化,使大多数蛋白质的合成受阻,还可以造成蛋白质的分解,因此,在盐胁迫初期角果木总蛋白含量下降,而在胁迫后期,总蛋白含量上升,表明有新的蛋白生成。但新蛋白与植物耐盐的关系如何,还有待进一步研究。

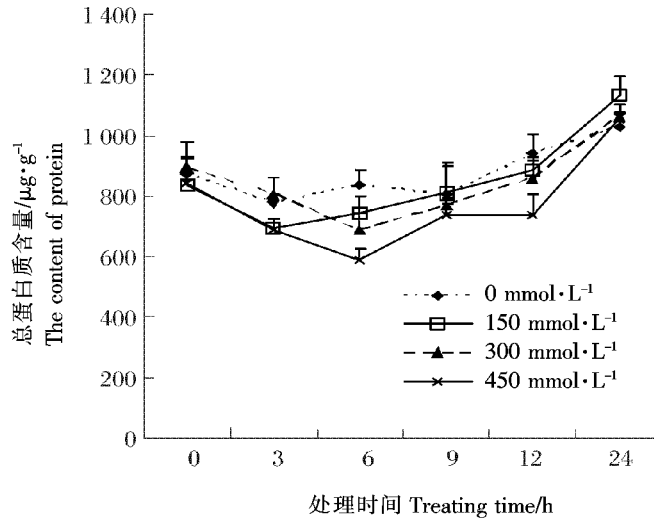


图 1 盐胁迫对角果木根部总蛋白含量的影响

Fig. 1 The effect of salinity on total protein content in root of *Ceriops tagal*

2.2 盐胁迫对抗氧化防御系统的影响

2.2.1 盐胁迫对过氧化物酶(POD)活性的影响

过氧化物酶(POD)可以清除植物体内 H₂O₂, 避免细胞膜被 H₂O₂ 氧化, 因此, POD 活性的增强能有效抵御盐胁迫引起的氧化胁迫, 从而提高植物的耐盐性。从图 2 可以看出, 根部 POD 活性随着盐处理浓度的增加而增强, 就同一浓度处理而言, 24 h 内, 角果木根部 POD 活性呈先增后减的趋势, 较低盐浓度为 150, 300 mmol · L⁻¹ 的处理, 9 h 时 POD 活性达最大值, 分别为 1 357. 323, 1 684. 568 U · g⁻¹ · min⁻¹; 而高盐浓度 (450 mmol · L⁻¹) 的处理, 12 h 时达最大值 (1 729. 012 U · g⁻¹ · min⁻¹); 3 个处理的 POD 活性最大值比对照组分别增加了 79. 08%, 122. 25%, 106. 16%, 差异均达极显著 (P < 0. 01)。由此可见, 24 h 内, 盐胁迫对角果木根部 POD 活性影响较大。在盐胁迫 24 h 时, 3 个盐浓度处理下的角果木根部 POD 活性均明显下降, 且在 150 mmol · L⁻¹ 处理下与对照已无差异。这说明, 角果木受到盐胁迫后启动 POD 活性清除过氧化物, 从而减轻胁迫带来的次级氧化伤害, 适应盐环境后 (24 h), 各处理的 POD 活性则下降。

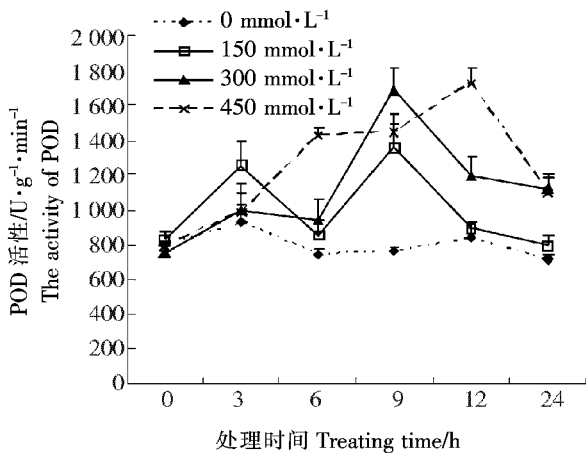


图 2 盐胁迫对角果木根部 POD 活性的影响

Fig. 2 The effect of salinity on POD activity in root of *Ceriops tagal*

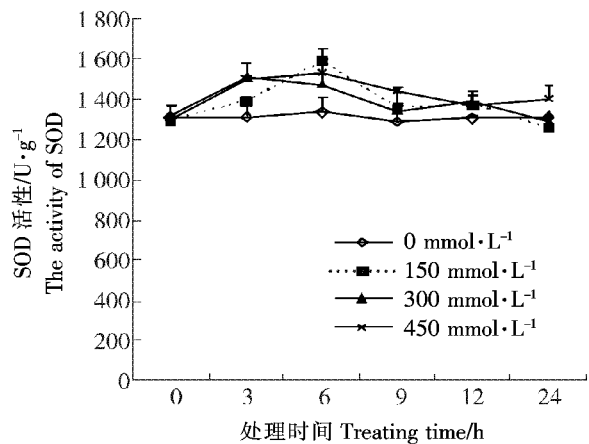


图 3 盐胁迫对角果木根部 SOD 活性的影响

Fig. 3 The effect of salinity on SOD activity in root of *Ceriops tagal*

2.2.2 盐胁迫对超氧化物歧化酶(SOD)活性的影响

超氧化物歧化酶(SOD)催化 2 个超氧自由基发生

歧化反应形成 O_2 和 H_2O_2 , H_2O_2 再被 POD 和 CAT 催化清除,是植物抵抗氧化胁迫首先启动的应答反应。从图 3 可以看出,角果木根部 SOD 活性在同一盐浓度下,随处理时间的增加而呈先增后减的趋势;不同盐浓度处理的最大值折点有所不同, $300\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 盐处理 3 h 时, SOD 活性达最大值,显著高于对照组 ($P < 0.01$),尔后开始下降,而 $150, 450\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 盐处理 6 h 时达最大值,显著高于对照组 ($P < 0.01$),尔后开始下降; 9 h 后,各盐浓度处理下角果木根部 SOD 活性与对照组已无显著差异。由此可见,盐胁迫初期 ($\leq 6\text{ h}$),角果木根部启动 SOD 活性清除盐胁迫产生的超氧自由基,从而减轻氧化胁迫带来的伤害,24 h 后,各处理的角果木根部 SOD 活性已降至对照水平,表明此时的角果木已开始适应外界盐环境。

2.2.3 盐胁迫对抗坏血酸(ASA)含量的影响 抗坏血酸(ASA)作为活性氧清除剂,能清除超氧自由基(O_2^-)、单线态氧(1O_2)和过氧化氢(H_2O_2)等活性氧的伤害,它在植物防御活性氧的毒害中起重要作用。从图 4 可以看出,不同浓度盐胁迫均引起 ASA 的累积,其含量高于对照。24 h 内,各处理均表现出先升后降的变化趋势。盐胁迫初期 ($\leq 9\text{ h}$),ASA 含量急剧增加, $150, 300, 450\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 盐处理分别在 3, 6, 9 h 时达到最大值($1.2616, 1.4967, 1.6270\text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$),均显著高于对照组。随后,ASA 含量逐渐下降,6 h 时, $150\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 盐处理恢复至对照水平,12 h 时, $300\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 盐处理也与对照无显著差异。3 个盐浓度处理,ASA 含量均在处理前期 ($\leq 9\text{ h}$) 达最大值,尔后迅速下降,这是否意味着无论高盐还是低盐胁迫,角果木首先都启动相同的 ASA 反应来减轻氧自由基对植物体的伤害。随着盐浓度的增加或处理时间的延长,当 ASA 无法满足需要时,再启动抗氧化酶系(POD, SOD)进一步增强其抗氧化防御能力,从而提高耐盐能力。

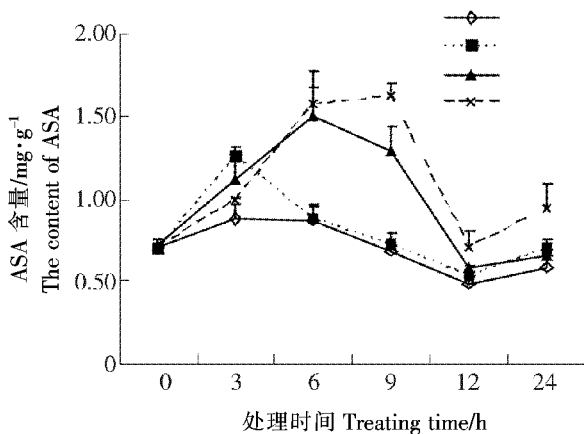


图 4 盐胁迫对角果木根部 ASA 含量的影响

Fig. 4 The effect of salinity on ASA content in root of *Ceriops tagal*

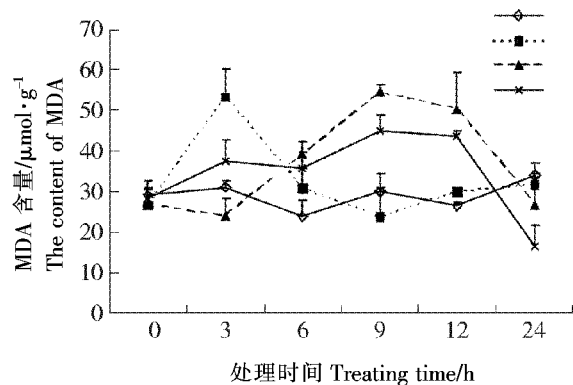


图 5 盐胁迫对角果木根部 MDA 含量的影响

Fig. 5 Effect of salinity on MDA content in the root of *Ceriops tagal*

2.2.4 盐胁迫对丙二醛(MDA)含量的影响 丙二醛(MDA)的含量变化是衡量脂质过氧化作用的一个重要指标,MDA 的含量越高,其代表植物细胞膜氧化程度也越高,植物细胞膜受到的伤害就越大。从图 5 可以看出,不同浓度盐胁迫处理下,角果木根部 MDA 含量总体上呈现先增后减的趋势, $150\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的盐处理 3 h 时,MDA 含量达最大值($53.25565\text{ }\mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1}$), $300, 450\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的盐处理,MDA 含量均在 9 h 时达到最大值(分别为 $56.91386, 45.03527\text{ }\mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1}$),显著高于对照组。随后,各处理的 MDA 含量均开始下降, $150\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的盐处理,在 6 h 时与对照无显著差异,而在 24 h 时,另外 2 个盐处理的 MDA 含量均低于对照。这暗示此时盐胁迫引起的膜脂质过氧化作用已基本清除。低盐浓度 ($150\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) 下,角果木根部 MDA 含量最先(6 h)恢复至对照水平,这表明角果木对低盐浓度环境能较快适应。 $300, 450\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 盐浓度处理下,角果木根部很快受到膜脂质过氧化伤害,因此,9 h 时的 MDA 含量达到最高水平(9 h 和 12 h 差异不显著),而植物抗氧化系统的启动清除了盐胁迫产生的氧自由基,从而降低了细胞膜脂过氧化程度,直至恢复正常水平。

3 讨论

植物的耐盐性是受多基因控制的,盐胁迫可以调节蛋白质数量的变化,使大多数蛋白质的合成受阻,

还可以造成蛋白质的分解,但有些蛋白质合成不受影响,甚至某些蛋白质的合成会得到增强^[8]。因此,蛋白质含量的高低既可作为渗透调节能力的指标,又可作为衡量植物代谢强度的指标。马建华等^[12]的研究结果表明,在盐胁迫 30 d 后,秋茄幼根蛋白质含量随盐度(大于 20)的增加而增加。而笔者的研究结果显示,在同一处理时间点,随着盐浓度的增加角果木根部总蛋白含量下降,可能是盐胁迫时间不同所致,盐生植物的抗盐性与盐分作用的时间有关。此外,随处理时间的延长,各盐处理下的总蛋白含量与对照组的差异逐渐缩小,且在 24 h 后略高于对照组。这表明盐胁迫初期蛋白质的合成受阻或蛋白质分解,使得总蛋白含量下降,而胁迫后期,总蛋白含量上升,说明有某些蛋白质的增加或合成新的蛋白质,其中部分蛋白为 Dehydrins (DHNs),DHNs 在植物适应包括盐害在内的多种生物胁迫中起重要作用^[10-11]。

植物体内抗氧化防御系统是由一些能清除活性氧的酶系和抗氧化物质,如 SOD,POD 和 ASA 等组成,它们协同抵抗盐胁迫诱导的氧化伤害。在整个氧化防御系统中,SOD 是最重要的抗氧化酶^[12]。另外,植物体内的某些抗氧化物质,如 ASA 也有清除体内自由基的生理功能^[13]。提高植物体内抗氧化酶类活性及增强抗氧化代谢水平是增强植物耐盐性的重要途径之一。PENG 等^[14]和 MARTINEZ 等^[15]的研究表明,在细胞壁中的 POD 可催化 NADH 或 NADPH 氧化产生 O^{-2} , O^{-2} 进一步歧化为 H_2O_2 和分子氧。不同生长期,盐芥 POD 活性均随着盐浓度的增加而增强^[16],盐胁迫下梭梭幼苗 SOD,POD 活性随盐浓度的增加和胁迫时间的延长,其活性变化趋势都相似,即盐胁迫前期和中期的活性较后期高^[17]。本研究也获得类似结果,盐胁迫下红树植物角果木根部 SOD 活性随盐浓度的增加而增强,随胁迫时间的增加呈先增后减的趋势,即盐胁迫前期的活性较后期高。盐胁迫下角果木根部 POD 活性也随盐浓度的增加而增强,随胁迫时间的增加也是先增后减的趋势,但 POD 活性的增加趋势滞后于 SOD,说明角果木抵抗氧化胁迫时首先启动 SOD 活性,由 SOD 催化 2 个超氧自由基发生歧化反应形成 O_2 和 H_2O_2 , H_2O_2 再被 POD 催化清除。ASA 作为一种非酶促小分子抗氧化剂,在抵制植物体内活性氧的损伤过程中起着重要作用^[18]。韩志平等^[19]对盐胁迫下西瓜的生理研究表明,西瓜叶片 ASA 含量随盐浓度的增加而增加;盐胁迫下外源 ASA 可以减少水稻叶绿体内 H_2O_2 的含量,降低膜脂的过氧化作用,在番茄体内也有相似结果^[20-21]。本研究中,在盐胁迫前期和中期(≤ 9 h),角果木根部 ASA 含量也随盐浓度的增加而增加,但在处理后期(≥ 12 h)各处理的 ASA 含量均下降至对照水平,表明 ASA 在处理前期可以与抗氧化酶系一起减轻氧自由基对植物体的伤害。随着盐浓度的增加或处理时间的延长,植物更多地依赖抗氧化酶系(POD,SOD)增强其抗氧化防御能力,从而提高耐盐能力。

有研究表明^[22],低温、干旱、高盐、强辐射等条件都可以加剧植物膜脂的过氧化作用,而 MDA 的含量变化是衡量膜脂过氧化作用的一个重要指标。盐胁迫下景天三七幼苗 MDA 含量随盐浓度的增加而显著增加^[23],小麦在盐胁迫下 MDA 含量也随盐浓度的升高而增加^[24],红树植物秋茄根部 MDA 含量在 24 h 内先增后减^[25],而笔者在研究中发现,在不同盐浓度胁迫下,角果木根部 MDA 含量亦呈先增后减趋势,在 24 h 时各盐处理 MDA 含量已经恢复到或低于对照水平。这些研究结果表明,红树植物在受到盐胁迫后启动各种抗氧化酶类系统和抗氧化剂,对盐胁迫产生的活性氧进行清除,从而减轻膜脂过氧化程度。

参考文献:

- [1] PARIDA A K, DAS A B, MOHANTY P. Defense potentials to NaCl in a mangrove, *Bruguiera parviflora*: differential changes of isoforms of some antioxidative enzymes[J]. *Plant Physiology*, 2004, 161(5): 531 - 542.
- [2] BEN A N, JIMENEZ A, MEGDICHE W. Kinetics of antioxidant response to salinity in the halophyte *Cakile maritima*[J]. *Journal of Integration Plant Biology*, 2007, 49(7): 1 - 11.
- [3] BRADFORD M M. A rapid and sensitive method for the quantization of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding[J]. *Anal. Bio-chem.*, 1976, 72(1): 248 - 254.
- [4] 张志良. 植物生理学实验指导[M]. 第2版. 北京:人民教育出版社,1990:160 - 165.
- [5] 林栖凤. 耐盐植物研究[M]. 北京:科学出版社,2004:338 - 339.
- [6] 汤章城. 现代植物生理学实验指南[M]. 北京:科学出版社,1999:305.
- [7] 王学奎. 植物生理生化实验原理和技术[M]. 北京:高等教育出版社,2006:267 - 271.
- [8] 彭存智. 红树耐盐相关蛋白的分离和 MALDI-TOF 质谱鉴定[D]. 儋州:华南热带农业大学,2005.
- [9] 马建华,郑海雷,张春光,等. 盐度对秋茄和桐花树幼苗蛋白质、 H_2O_2 及脂质过氧化作用的影响[J]. 厦门大学学报:自然科学版,2002,41(3):354 - 358.

- [10] CLOSE T J. Dehydrins: Emergence of a biochemical role of a family of plant dehydration proteins[J]. *Physiologia Plantarum*, 2006, 97(4): 248 – 254.
- [11] HANIN M, BRINI F, EBEL C, et al. Plant dehydrins and stress tolerance[J]. *Plant Signal Behav*, 2011, 6(10): 1503 – 1509.
- [12] 毛桂莲, 许兴, 徐兆桢. 对盐生理生化研究进展[J]. *中国生态农业学报*, 2004(12): 43 – 46.
- [13] 刘婉, 胡文玉. 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[J]. *植物生理学通讯*, 1997, 33(6): 423.
- [14] PENG M, KUC J. Peroxidase-generated hydrogen peroxide as a source of antifungal-activity in vitro and on tobacco leaf disks [J]. *Phytopathol*, 1992, 82(3): 696 – 699.
- [15] MARTINEZ C, BACCOU J C, BRESSON E, et al. Salicylic acid mediated by the oxidative burst is a key molecule in local and systemic responses of cotton challenged by an avirulent race of *Xanthomonas campestris* pv. *malvacearum*[J]. *Plant Physiol*, 2000, 122(3): 757 – 766.
- [16] 赵丹华. 盐胁迫下盐芥和拟南芥生理响应的比较研究[D]. 北京: 中央民族大学, 2008.
- [17] 谢文华. 盐胁迫下梭梭幼苗生理生态响应机制的研究[D]. 乌鲁木齐: 新疆农业大学, 2007.
- [18] NOCTOR G, FOYER C H. Ascorbic and glutathione keeping active oxygen under control[J]. *Plant Mol Biol*, 1998, 49(6): 249 – 279.
- [19] 韩志平, 郭世荣, 尤秀娜, 等. 盐胁迫对西瓜幼苗活性氧代谢和渗透调节物质含量的影响[J]. *西北植物学报*, 2010, 30(11): 2210 – 221.
- [20] 华春, 王仁雷, 刘友良. 外源 ASA 对盐胁迫下水稻叶绿体活性氧清除系统的影响[J]. *作物学报*, 2004, 30(7): 692 – 696.
- [21] SHALATA A, MEUMANN P M. Exogenous ascorbic acid (vitamin C) increases resistance to salt stress and reduces lipid peroxidation[J]. *J Exp Bot*, 2001, 52(364): 2207 – 2211.
- [22] BOWLER C, MONTAGU M V, INZE Q. Superoxide dismutase and stress tolerance[J]. *Annu. Rev. Plant Physiol.*, 1992, 43(6): 83 – 116.
- [23] 田晓艳, 刘延吉, 张蕾, 等. 盐胁迫对景天三七保护酶系统、MDA、Pro 及可溶性糖的影响[J]. *草原草坪*, 2009(6): 11 – 14.
- [24] EZATOLLAH E, FARIBORZ S, FARID S, et al. The effect of salt stress on antioxidant enzymes activity and lipid peroxidation on the wheat seeding[J]. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, 2007, 35(1): 48 – 56.
- [25] 黄薇, 林栖凤, 李冠一, 等. 盐分对红树植物秋茄某些生理特性的影响[J]. *海南大学学报: 自然科学版*, 2004, 20(4): 328 – 331.

Preliminary Study on the Salt Stress Defense Mechanisms of *Ceriops tagal* Root

ZANG Jian¹, FU Xiumei¹, WANG Heming¹, LIN Daozhe¹, WU Hui¹, CHEN Jianmiao¹, CHEN Yinhu^{1,2}

(1. Hainan Key Laboratory for Sustainable Utilization of Tropical Bioresources, Hainan University, Haikou 570228, China;

2. College of Agronomy, Hainan University, Haikou 570228, China)

Abstract: Mangroves are woody plants that grow along tropical and subtropical coasts and form clumpy stands in intertidal zones. The anatomical and physiological features associated with their salt-tolerant lifestyles have not been well characterized, little is known about the impact of defensive enzymes on their adaptation to these saline environments. In this study, the enzyme activity of superoxide dismutase (SOD), peroxidase (POD), ascorbic acid(ASA) and Malondialdehyde (MDA) in the *C. tagal* roots treated by four concentrations (0, 150, 300, 450 mmol · L⁻¹) of NaCl were studied in a greenhouse of Hainan University, Haikou, China. The results showed that the activity of MDA had a sharp increase at early stressed time, and this signal induces the appearance of antioxidative defensive system, including a certain increase of SOD, POD, ASA. which indicated that cell plasma membrane of *C. tagal* roots had rather strong resistance to the injury of salt ion. These results established a theoretical foundation for salt tolerance mechanism of *C. tagal*.

Key words: mangrove; *Ceriops tagal*; salt stress; antioxidant defense system