

外源性 5-氨基乙酰丙酸对盐胁迫下决明子萌发及幼苗生理特性的影响

张春平¹, 何平^{1*}, 刘海英¹, 谢英赞¹, 韦品祥¹, 袁凤刚², 胡世俊³

1. 西南大学生命科学学院, 三峡库区生态环境教育部重点实验室, 重庆市三峡库区植物生态与资源重点实验室, 重庆 400715

2. 徐州医学院 实验中心, 江苏 徐州 221002

3. 西南林业大学资源学院, 云南 昆明 650224

摘要:目的 通过对决明子萌发及幼苗生理特性的研究, 寻找提高决明子及幼苗在盐胁迫条件下抗性能力的途径。方法 测定盐胁迫下决明子在经过不同质量浓度的外源性 5-氨基乙酰丙酸 (ALA) 处理后, 种子的发芽势、发芽率、发芽指数和活力指数, 并对决明幼苗叶片叶绿素量、叶绿素荧光参数、原生质膜透性、叶片丙二醛 (MDA) 量、可溶性糖量、可溶性蛋白量及脯氨酸量及超氧化物歧化酶 (SOD)、过氧化物酶 (POD) 和过氧化氢酶 (CAT) 活性进行测定。结果 100 mmol/L 盐胁迫下的决明子萌发受到显著抑制, 但是经过不同质量浓度的 ALA 处理后, 萌发指标均有升高。结果表明, 外源性 ALA 处理显著提高了决明子发芽势、发芽率、发芽指数和活力指数, 提高了叶片叶绿素 a、叶绿素 b 和总叶绿素量, 显著提高了最大光化学效率 (F_v/F_m), PSII 有效光化学效率 (F_v'/F_m'), PSII 实际光化学效率 (Φ_{PSII}), 光化学淬灭系数 (qP), 降低了原生质膜透性、叶片的 MDA 量及非光化学淬灭系数 (NPQ), 提高了盐胁迫下幼苗叶片可溶性糖、可溶性蛋白和脯氨酸量, 显著提高了叶片 SOD、POD、CAT 活性。结论 外源性 ALA 通过提高决明子的萌发指数, 提高幼苗光合效率、渗透调节物质量及抗氧化酶活性, 有效地减缓盐胁迫对决明子及幼苗产生的伤害, 提高种子及幼苗的抗盐能力。

关键词: 决明子; 5-氨基乙酰丙酸 (ALA); 盐胁迫; 种子萌发; 生理特性

中图分类号: R282.21

文献标志码: A

文章编号: 0253-2670(2012)04-0778-10

Effects of exogenous 5-aminolevulinic acid on seed germination and physiological characteristics of *Cassia obtusifolia* seedlings under NaCl stress

ZHANG Chun-ping¹, HE Ping¹, LIU Hai-ying¹, XIE Ying-zan¹, WEI Pin-xiang¹, YUAN Feng-gang², HU Shi-jun³

1. Chongqing Key Laboratory of Plant Ecology and Resources Research for Three Gorges Reservoir Region, Key Laboratory of Eco-environments of Three Gorges Reservoir Region, Ministry of Education, School of Life Sciences, Southwest University, Chongqing 400715, China

2. Laboratory Center, Xuzhou Medical College, Xuzhou 221002, China

3. School of Resource Management and Engineering, Southwest Forestry University, Kunming 650224, China

Abstract: Objective In order to improve the salt resistance activity of seeds and seedlings for *Cassia obtusifolia* under NaCl stress, seed germination and physiological characteristics of *C. obtusifolia* seedlings were investigated. **Methods** Several physiological indexes of *C. obtusifolia* seeds treated by exogenous 5-aminolevulinic acid (ALA) under NaCl stress, such as germination vigor, germination rate, germination index, and vigor index, were measured. And other indexes, contents of photosynthetic pigment, chlorophyll fluorescence parameters, membrane permeability, contents of malondialdehyde (MDA), soluble sugar, soluble protein and proline, activities of superoxide (SOD), peroxidase (POD), and catalase (CAT) were also measured. **Results** The germination indexes of *C. obtusifolia* seeds under NaCl stress (100 mmol/L) have an obvious inhibition. But after the treatment of ALA, all germination indexes were increased. The results showed that the treatment of exogenous ALA obviously improved the germination vigor, germination rate, germination index, and vigor index, increased the content of chlorophyll a, chlorophyll b, and total chlorophyll, improved the photochemical efficiency of photosystem II (F_v/F_m), photochemical efficiency (F_v'/F_m'), PSII actual photochemical efficiency (Φ_{PSII}), and photochemical quench coefficient (qP), decreased the membrane permeability, the contents of MDA and non-photochemical quenching coefficient (NPQ), increased the content of soluble sugar, soluble protein and proline. Meanwhile, the

收稿日期: 2011-11-13

基金项目: 国家林业公益科研专项项目 (201004064)

作者简介: 张春平 (1982—), 男, 山东潍坊人, 博士, 主要从事药用植物资源学及植物分子生物学等方面的研究。

Tel: 13667652727 E-mail: chunpingzhang520@163.com

*通讯作者 何平 Tel: (023)68254122 E-mail: heping196373@126.com

results also indicated that ALA improved the activities of SOD, POD, and CAT significantly. **Conclusion** Exogenous ALA with appropriate concentration could significantly alleviate the damages to the seeds and seedlings of *C. obtusifolia* under NaCl stress and promote the salt resistance of the seeds and seedlings through improving the germination indexes, the photochemical efficiency, and the antioxidase activities of the seedlings.

Key words: *Cassia obtusifolia* L.; 5-aminolevulinic acid (ALA); salt stress; seed germination; physiological characteristics

决明子为豆科植物决明 *Cassia obtusifolia* L. 或小决明 *Cassia tora* L. 的干燥成熟种子,具有祛风散热、清肝明目、润肠通便等功效^[1],其主要成分为蒽醌类衍生物,具有降血压、调血脂、保肝和调节免疫等疗效^[2-3],早在《神农本草经》中就有“久服能益精光,轻身”等记载。决明子作为一味传统中药,是国家卫生部公布的69种药食同源的物质之一^[4]。因其具有良好的药用价值,药材市场对其需求量逐年增加,目前国内外对决明子的研究多集中在化学成分、药理作用以及种子萌发等方面^[5-8],而有关决明逆境胁迫生理方面的研究未见报道。

5-氨基乙酞丙酸(ALA)是所有卟啉化合物生物合成的关键前体,作为植物叶绿素合成研究的一部分,很早就受到重视。研究表明,ALA不仅是一种植物体代谢中间产物,而且可能参与植物生长发育的调节过程。ALA作为一种新型的植物生长调节剂,可以提高作物的抗逆性,提高作物产量并改善品质^[9]。张春平等^[10]的研究表明,ALA可以显著提高盐胁迫下紫苏幼苗的抗氧化酶活性,增强紫苏幼苗的抗盐性。Watanabe等^[11]提出ALA能够促进高盐(1.5% NaCl)条件下棉花植株的生长,效果明显超过所报道过的任何一种植物激素。Wang等^[12]以白菜为材料,同样观察到外源ALA对盐胁迫下种子萌发的促进效应,并且认为这种效应与ALA转化为卟啉化合物亚铁血红素有关。

土壤盐渍化是农业栽培生产中主要障碍之一,我国的盐渍土地面积不断扩大,对农业生产造成了巨大的经济损失。决明作为一种重要的药用植物,也面临着此类问题,为了能使决明大面积推广种植,提高生产效益,本实验以决明子和幼苗为材料,研究ALA对盐胁迫下决明子萌发及幼苗叶片光合色素量、叶绿素荧光参数、原生质膜透性、丙二醛(MDA)、可溶性蛋白、可溶性糖和脯氨酸量及抗氧化酶活性等一系列生理生化指标的影响,探索缓解盐胁迫的调节机制,为决明在栽培生产中遇到的盐胁迫问题提供理论依据,为决明的大面积推广,规范种植提供依据。

1 材料

决明子由中国医学科学院药用植物研究所提供,经西南大学生命科学学院何平教授鉴定为决明 *Cassia obtusifolia* L. 的干燥成熟种子。ALA为韩国KAIST提供,ALA溶液现用现配。PAM—2100便携式荧光仪(德国Walz公司);LIDA DDS—307W电导仪;UV—2550紫外分光光度计(岛津);岛津AUY—120电子天平。

2 方法

2.1 种子萌发生理指标的测定

挑取籽粒饱满、大小一致和无病虫害的决明子,用1.0%次氯酸钠(NaClO)溶液消毒处理10 min,蒸馏水冲洗3~5次,将种子表面水分用滤纸吸干,以铺有双层滤纸和双层纱布的培养皿为发芽床,进行种子发芽试验。胁迫所用的NaCl浓度为100 mmol/L,试验共设置6个处理:(1)对照(CK1);(2)100 mmol/L NaCl盐对照(CK2);(3)100 mmol/L NaCl+10 mg/L ALA(T1);(4)100 mmol/L NaCl+25 mg/L ALA(T2);(5)120 mmol/L NaCl+50 mg/L ALA(T3);(6)120 mmol/L NaCl+100 mg/L ALA(T4)。在处理决明子时,每天用6种不同的处理液处理种子,处理液浇透培养皿底部,再覆盖浸透处理液的滤纸,然后倾斜培养皿沥去多余处理液,以免种子被处理液掩埋而影响萌发,种子在培养箱中(25±1)℃恒温培养,光照时间设为14 h/10 h(昼/夜),光照强度为2 500 lx。每个培养皿100粒种子,4次重复,每天定时统计发芽数,第4天计算发芽势,第6天计算发芽率、发芽指数和活力指数。计算公式如下,发芽势=4 d内发芽的种子数/供试的所有种子数;发芽率=6 d内发芽的种子/供试的所有种子数;发芽指数=Σ(Gt/Dt);活力指数=S×Σ(Gt/Dt);式中Gt为t日内的发芽数,Dt为相应的发芽天数,S为植株的平均鲜质量。萌发后称取不同处理下幼苗鲜质量,直尺准确测量幼苗的胚根及胚芽长,比较不同处理之间的差异,每个处理15株幼苗,重复3次。

2.2 幼苗相关生理指标的测定

挑选长势一致的4叶期幼苗移入花盆中,每盆

植入一株,盆中基质按河沙-腐殖土-大田土 2:1:2 的比例混合组成。经过 1 周的缓苗期后,进行盐胁迫试验,6 个处理同“2.1”项。ALA 在添加时采用叶面喷施与根部浇灌相结合的方式,叶面喷施时,以叶片背部滴水为限。每个处理 15 株幼苗,3 次重复,每天定期向花盆内补充 Hoagland 营养液。分别于盐胁迫后的第 4、8、12 天进行取样,取样时选取植株中等大小的功能叶片。测量的相关指标包括幼苗叶片叶绿素 a、叶绿素 b 和总叶绿素量、相关叶绿素荧光参数、原生质膜透性、MDA 量、可溶性糖量、游离脯氨酸量、可溶性蛋白量及超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化物酶(POD)和过氧化氢酶(CAT)活性。

2.2.1 叶片光合色素量 光合色素包括叶绿素 a、叶绿素 b 和总叶绿素,采用张志良等^[13]的方法进行测定,用紫外分光光度计测量不同波段下的吸光度,每处理重复 3 次。

2.2.2 叶绿素荧光参数测定 叶绿素荧光参数采用 PAM—2100 便携式荧光仪(德国 Walz 公司)测定^[14],叶片暗适应 30 min 后,先用一束小于 0.05 $\mu\text{mol}/(\text{m}\cdot\text{s})$ 的测量光(频率为 600 Hz)照射叶片,测初始荧光(F_o),随后施加饱和脉冲光[5 000 $\mu\text{mol}/(\text{m}\cdot\text{s})$],脉冲时间 0.8 s,测得最大荧光(F_m)和可变荧光(F_v),并计算暗适应叶片 PSII 最大潜在光化学效率(F_v/F_m)。然后打开测量光[600 $\mu\text{mol}/(\text{m}\cdot\text{s})$],待稳态荧光(F_t)稳定后,然后再打开一个同样强度的饱和脉冲光[5 000 $\mu\text{mol}/(\text{m}\cdot\text{s})$],荧光上升到能化类囊体最大荧光;叶片经过短暂的暗适应后,打开远红光[7 $\mu\text{mol}/(\text{m}\cdot\text{s})$],得到能化类囊体最小荧光。具体荧光参数如下: F_v/F_m 、PSII 有效光化学效率(F_v'/F_m')、光化学猝灭系数(qP)= $(F_m' - F_s) / (F_m' - F_o')$ 、非光化学猝灭系数(NPQ) = $(F_m - F_m') / F_m$ 、PSII 实际光化学效率(ΦPSII) = $(F_m' - F_s) / F_m'$,其中 F_m' 代表类囊体最大荧光, F_o' 代表类囊体最小荧光, $F_v' = F_m' - F_o'$, F_s 代表稳态荧光每处理 3 盆,每盆重复 6 次测定。

2.2.3 原生质膜透性和 MDA 量测定 决明幼苗叶片的原生质膜透性采用电导仪法测定^[15],以相对电导率来表示细胞膜受胁迫伤害的程度。相对电导率 = 未煮之前的电导率/煮沸后的电导率;MDA 量参照 Velikova 等^[16]的硫代巴比妥酸(TBA)法检测。

2.2.4 可溶性糖、蛋白及游离脯氨酸量测定 可溶性糖、可溶性蛋白和游离脯氨酸量均采用张志

良等^[13]的方法进行测量。

2.2.5 抗氧化酶活性的测定 SOD 活性采用张以顺等^[17]的方法进行测量,以抑制 NBT 光化还原 50% 所需的酶量为 1 U,酶活力以 $\text{U}/(\text{g}\cdot\text{h})$ 来表示;POD 活性采用愈创木酚法进行测量^[18],以每分钟吸光度的变化表示酶活力的大小,即以每分钟吸光度值减小 0.01 定义为 1 U;CAT 活性采用紫外吸收法测定^[17],以每分钟吸光度值减少 0.1 定义为 1 U。

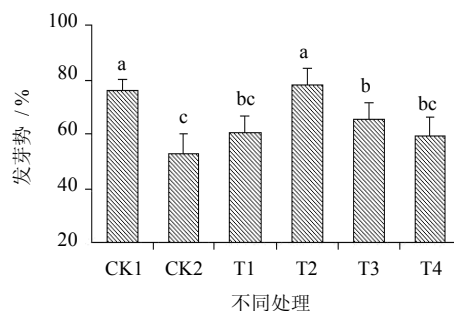
2.3 数据处理

采用 SPSS 12.0 统计软件对数据进行方差分析,以 Duncan's 新复级差法比较不同处理间的差异性。

3 结果与分析

3.1 ALA 对盐胁迫下决明子萌发的影响

由图 1、2 可以看出,决明子在不同的处理下,发芽势和发芽率都有不同程度的变化。与 CK1 的发芽势(76.31%)和发芽率(98.24%)相比可以看出,CK2 的种子发芽势(52.78%)和发芽率(71.29%)显著降低,这表明 NaCl 处理显著抑制了决明子的正常萌发。当用不同质量浓度的 ALA 处理后(T1~T4),



不同小写字母表示处理间在 0.05 水平有显著差异;下同
Different normal letters mean significant differences among treatments at 0.05 level, same as below

图 1 不同处理下决明子的发芽势

Fig. 1 Germination vigor of *C. obtusifolia* seeds under different treatments

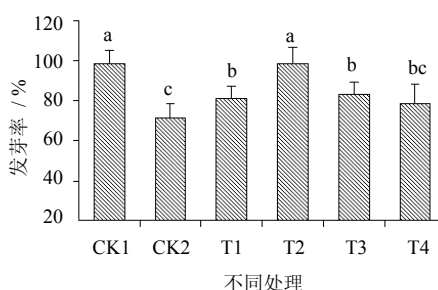


图 2 不同处理下决明子的发芽率

Fig. 2 Germination rate of *C. obtusifolia* seeds under different treatments

决明子的发芽势和发芽率与 CK2 相比均有不同程度的提高, 随 ALA 质量浓度的增大呈上升趋势, 当 ALA 达到 10 mg/L 时, 发芽势和发芽率达到最大, 分别为 78.28% 和 98.16%, 比 CK2 分别提高了 48.31% 和 37.69%, 并与处理 CK1 差异不显著, 这说明经过 ALA 处理后发芽势和发芽率基本恢复到胁迫前的水平。但当质量浓度进一步加大至 20 mg/L 时, 发芽势和发芽率降低至 59.68% 和 78.31%, 低于 CK1, 但仍高于 CK2 处理后的结果。

由图 3、4 可以看出, 发芽指数和活力指数的变化趋势与发芽势和发芽率的变化趋势相似, 并且发

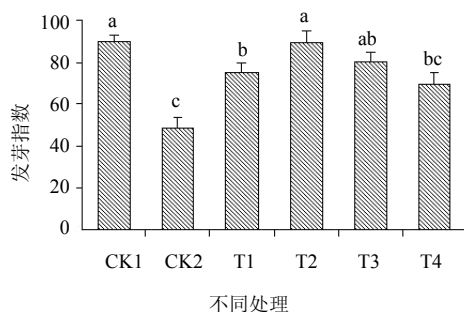


图 3 不同处理下决明子的发芽指数

Fig. 3 Germination indexes of *C. obtusifolia* seeds under different treatments

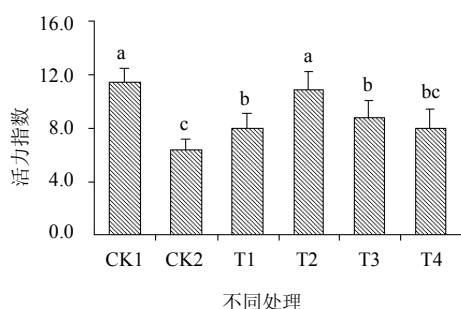


图 4 不同处理下决明子的活力指数

Fig. 4 Vigor indexes of *C. obtusifolia* seeds under different treatments

芽指数和活力指数的变化一致。经过 NaCl 处理后, 发芽指数和活力指数也有显著的降低, 当施加外源 ALA 后, 发芽指数和活力指数都逐渐升高, 达到 89.07 和 10.86, 与对照 CK2 (48.66 和 6.38) 对比差异显著, 为 CK2 的 1.83 和 1.70 倍, 并且与 CK1 (89.94 和 11.37) 相比差异不显著。但当 ALA 达到 20 mg/L 时, 发芽指数和活力指数又降低至 69.89 和 8.02, 但仍高于 CK2, 这说明高质量浓度处理的效果不如低质量浓度 ALA 处理后的效果显著, 但是各处理的结果均高于对照 CK2。

3.2 ALA 对盐胁迫下决明幼苗生长的影响

由表 1 可以看出, 经过 CK2 处理后的决明幼苗胚根长、胚芽长以及鲜质量均显著降低, 与 CK1 相比差异显著。在经过不同质量浓度的 ALA 处理后, 胚根长和胚芽长与 CK2 相比都有一定程度的增加, 并且在 ALA 为 10 mg/L 时, 各指标均达到较好的恢复水平, 且与 CK1 差异不显著。在盐胁迫下, 胚芽生长受到的抑制程度要大于胚根, 胚根长/胚芽长值具有上升的趋势, 这可能是幼苗通过调整不同营养器官的比例, 保证最大程度的幼苗成活的一种生长策略。总的来看, 各质量浓度的 ALA 均对盐胁迫下决明幼苗生长具有一定的促进作用, 中等质量浓度的 ALA (10 mg/L) 效果最佳, 虽然高质量浓度 (20 mg/L) 对盐胁迫伤害的恢复效果不如中等浓度好, 但是其各指标值仍然显著高于 CK2 处理。

3.3 ALA 对盐胁迫下决明光合色素量的影响

由图 5 可以看出, 经过不同质量浓度的 ALA 处理后决明叶片各种不同光合色素量的变化。总的来看, 叶绿素 a、叶绿素 b 和总叶绿素都表现出相似的变化趋势。当经过单一的 100 mmol/L NaCl 处理后, 各种色素的量均大幅度减少, 且与对照 CK1 相比差异显著, 并且随着胁迫时间的延长, 减少幅

表 1 决明幼苗生长的相关指标

Table 1 Related indexes growth of *C. obtusifolia* seedlings

不同处理	胚根长 / cm	胚芽长 / cm	胚根长/胚芽长	鲜质量 / mg
CK1	2.79±0.36 a	4.12±0.65 a	0.67±0.13 c	162.7±5.7 a
CK2	2.33±0.25 c	2.51±0.68 d	0.93±0.16 a	113.6±6.4 d
T1	2.52±0.34 b	3.56±0.75 b	0.71±0.09 bc	140.3±3.5 b
T2	2.78±0.31 a	4.13±0.49 a	0.67±0.21 c	161.5±4.8 a
T3	2.65±0.18 ab	3.74±0.66 ab	0.71±0.6 bc	148.8±3.1 ab
T4	2.60±0.76 ab	3.27±0.53 c	0.79±0.08 b	130.6±4.4 c

不同字母者为差异显著 ($P < 0.05$), 下同

Different letters mean significant difference ($P < 0.05$), same as below

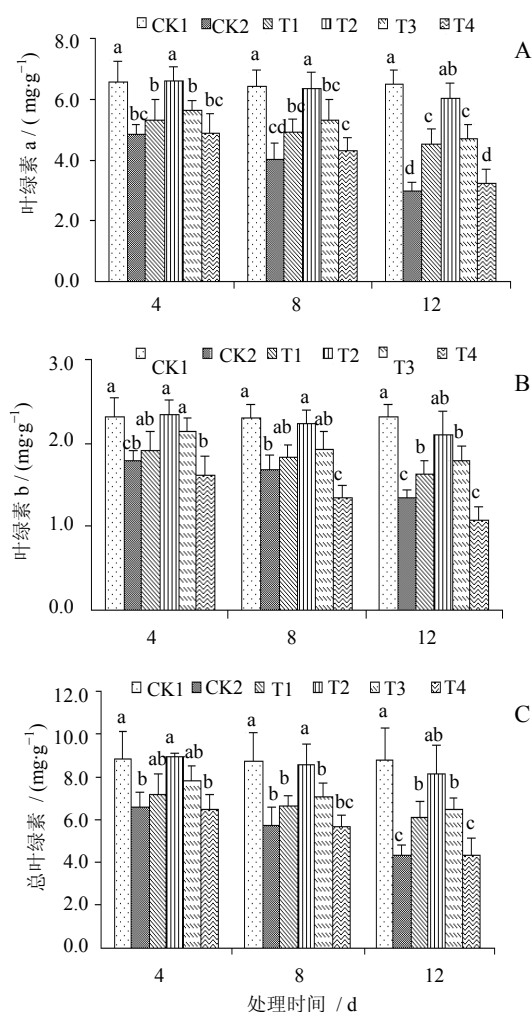


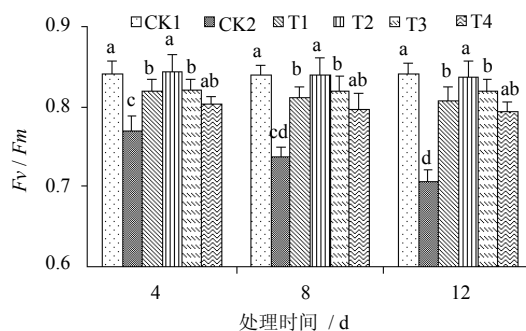
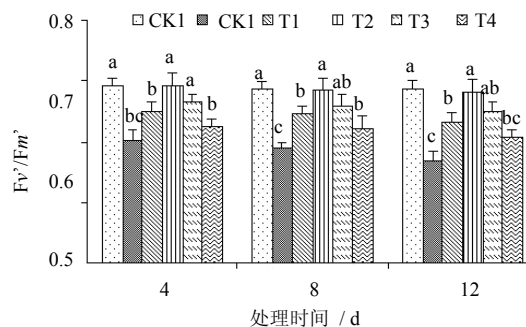
图 5 叶绿素 a (A)、叶绿素 b (B)、总叶绿素 (C) 量的变化

Fig. 5 Changes of chlorophyll a (A), chlorophyll b (B), and total chlorophyll (C)

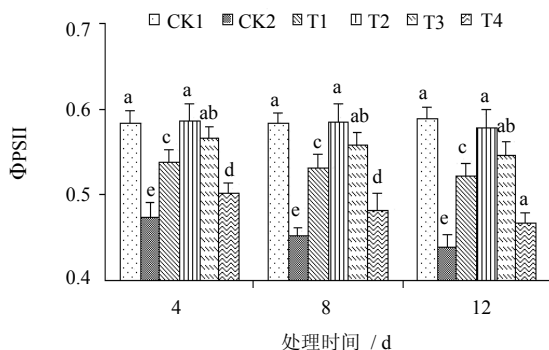
度增加,当处理进行到第 12 天时,各色素量降至最低,同时叶绿素 a/叶绿素 b 的值也呈现出下降的趋势。当用不同质量浓度的 ALA 处理后各当 ALA 达到 10 mg/L 时,发芽指数和活力指数最高,种光合色素量降低幅度显著减缓,并且随着 ALA 处理时间的延长,色素增加的趋势越来越明显,当 ALA 的质量浓度为 25 mg/L,处理时间为 4 d 时增加量最大,使得叶绿素 a、叶绿素 b 和总叶绿素的量分别达到 6.601、2.351、8.952 mg/g,与 CK2 处理(4.824、1.791、6.615 mg/g)相比差异显著,并且与未经处理的 CK1 (6.552、2.315、8.867 mg/g) 差异不显著,并且其他质量浓度的 ALA 处理也使得色素量有不同程度的增加。以上结果均说明外源 ALA 对促进光合色素量的升高具有显著的作用,有效地缓解了盐胁迫对光合色素合成的抑制效应。

3.4 ALA 对盐胁迫下决明幼苗叶绿素荧光参数的影响

由图 6 可以看出,正常条件下,决明幼苗的 Fv/Fm 维持在 0.842 左右,并且不会随着时间的延长有大幅度的变化,但经过 100 mmol/L NaCl 处理后, Fv/Fm 呈现出降低的趋势,且随着胁迫时间的延长,降低幅度增加,与对照 CK1 形成显著差异,并在第 12 天时达到最低值(0.706)。当用 ALA 进行处理后, Fv/Fm 值升高,并且不同质量浓度的升高幅度不同,低质量浓度(25 mg/L)的升高幅度在处理初期较低,但是随着时间的延长,升高幅度越来越明显,25 mg/L 的 ALA 在处理前期就表现出良好的效果,且在处理初期(4 d)就与其他处理相比形成显著差异。图 7 所示盐胁迫下 Fv'/Fm' 的变化趋势与 Fv/Fm 的变化趋势相似。当受到盐胁迫后, Fv'/Fm' 呈下降趋势,并且随着时间的延长,下降幅度升高,到第 12 天时,降到最低值(0.569),与 CK1 (0.688) 相比,差异显著。当用 ALA 处理后,其值呈升高趋势,并且随着处理时间的延长逐渐升高,在第 12 天时达 0.681,与 CK2 相比,提高幅度为 19.67%。其他处理也不同程度的

图 6 Fv/Fm 的变化Fig. 6 Changes of Fv/Fm 图 7 Fv'/Fm' 的变化Fig. 7 Changes of Fv'/Fm'

的提高了 F_v'/F_m' 值。 $\Phi PSII$ 表示的是 PSII 反应中心受到环境胁迫时,存在部分反应中心关闭情况下的实际光化学效率。图 8 所示为决明幼苗在受到盐胁迫时, $\Phi PSII$ 在胁迫初期就显著降低,随着胁迫时间的延长,持续降低。经过 ALA 处理后, $\Phi PSII$ 显著升高,并且当胁迫进行到第 12 天,处理 T2 (0.579) 与 CK2 (0.438) 相比,增加最为显著,提高幅度为 32.19%。ALA 对 $\Phi PSII$ 的提高幅度远远大于对 F_v'/F_m' 的提高幅度,说明 ALA 对盐胁迫下决明有效光化学效率和实际光化学效率都有显著提高,且对实际光化学效率的提高幅度最大。

图 8 $\Phi PSII$ 的变化Fig. 8 Changes of $\Phi PSII$

由图 9、10 可以看出,在受到盐胁迫后,光化学淬灭系数 (qP) 呈下降趋势,并且随着胁迫时间的延长,下降趋势也越来越大,并且不同处理时间之间差异显著,说明胁迫对此项指标的影响较为明显。非光化学淬灭系数 (NPQ) 的变化趋势与 qP 正好相反,在受到盐胁迫时,其数值呈现上升趋势。在经过 ALA 处理后 qP 呈上升趋势,且随着时间的延长,上升幅度增加,在质量浓度为 25 mg/L,处理第 12 天时,达到 0.867,与对照 CK2 (0.577) 相比,上升幅度达到最大值 (50.08%),差异显著。其他处理也具有相似的变化趋势且均与对照 CK2 形成显著差异,说明 ALA 效果较为显著。非光化学淬灭系数 NPQ 在经过 ALA 处理后呈现出下降趋势,并且也是随着时间延长,下降幅度增加,并且与 CK2 相比,不同浓度 ALA 处理后 NPQ 均有显著降低。

3.5 ALA 对盐胁迫下决明幼苗叶片原生质膜透性及 MDA 量的影响

由图 11、12 所示,经过 CK2 处理 12 d 后,决明幼苗的原生质膜透性(以相对电导率表示)比

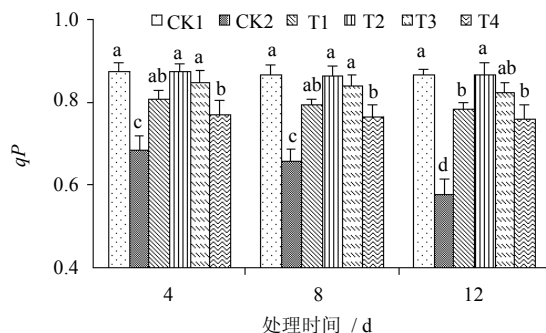
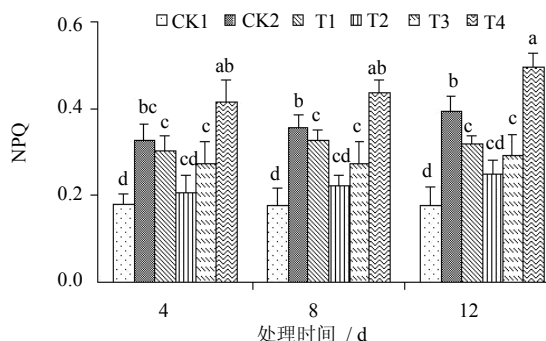
图 9 qP 的变化Fig. 9 Changes of qP 

图 10 NPQ 的变化

Fig. 10 Changes of NPQ

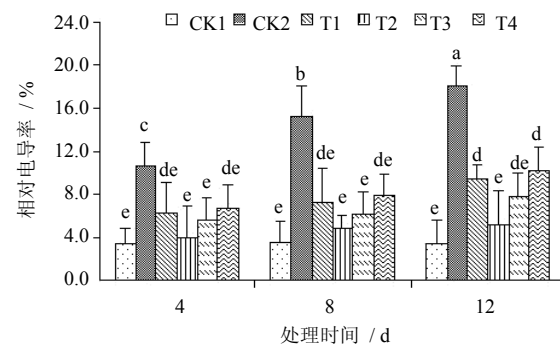


图 11 决明幼苗叶片相对电导率

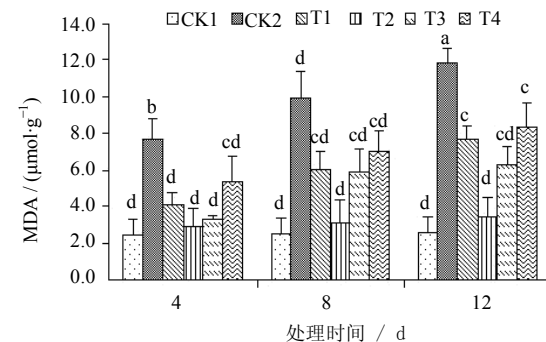
Fig. 11 Relative conductivity in *C. obtusifolia* seedlings leaves

图 12 决明幼苗 MDA 量

Fig. 12 Determination of MDA in *C. obtusifolia* seedlings

CK1 处理显著增加, 相对电导率达到 18.17%, 是 CK1 (3.42%) 的 5.31 倍。但是各 ALA 处理均不同程度降低了决明幼苗的相对电导率水平, 且相对电导率随 ALA 质量浓度的增加呈现先降低后升高的趋势, 并以 25 mg/L ALA 处理 (T2, 5.13%) 的水平最低、降低程度最大, 且与空白对照 CK1 水平无显著性差异。以上结果这说明盐胁迫引起了决明叶片细胞原生质膜透性显著增大, ALA 处理能一定程度缓解这种膜透性增加趋势, 有效减轻盐胁迫对细胞原生质膜造成的伤害。经过各种不同处理后的决明幼苗叶片的 MDA 量也产生了不同的变化, 随着胁迫时间的延长, MDA 量总的呈上升趋势。正常情况下 CK1 处理的 MDA 量最低 (2.47 $\mu\text{mol/g}$), 在 CK2 处理的 MDA 的量迅速升高 (7.69 $\mu\text{mol/g}$), 明显高于其他处理和对照, 为 CK1 的 3.11 倍, 且差异显著。并且随着胁迫时间的延长, MDA 升高的幅度不断增加, 且在处理时间为 12 d 时, MDA 的量达到最大值, 为 11.84 $\mu\text{mol/g}$ 。通过不同质量浓度的 ALA 处理后缓解了 MDA 升高的趋势, 并且在处理 12 d 时, 叶片中 MDA 的量大幅度降低至 3.43 $\mu\text{mol/g}$, 在所有处理中最低, 减缓的效果最为明显, T1 和 T3 处理也不同程度地缓解了盐胁迫而引起的 MDA 量升高的趋势。以上结果说明外源 ALA 处理能够有效地减缓盐胁迫下决明幼苗生长受到的伤害。

3.6 ALA 对盐胁迫下决明幼苗叶片渗透物质的影响

脯氨酸、可溶性糖和可溶性蛋白均属于细胞代谢产生的渗透性调节物质, 对于维护细胞膨压势, 保持细胞行使正常功能具有重要的意义。由图 13~15 可以看出, 在 CK2 处理, 决明叶片可溶性糖量比对照 CK1 显著增加, 并且随着胁迫时间的延长, 增加幅度升高。当用不同质量浓度的 ALA 处理后, 叶片可溶性糖量均比 CK1 有显著增加, 并在 ALA 为 25 mg/L 时达到最大值, 且显著高于 CK2。随着 ALA 质量浓度的继续升高, 叶片可溶性糖量又有所降低, 但是仍然高于 CK2, 这说明不同质量浓度的 ALA 对盐胁迫下决明幼苗叶片内可溶性糖量都有不同程度的提高。CK2 处理后, 决明幼苗叶片脯氨酸量明显升高, 与空白对照 CK1 相比差异显著。在经过不同浓度的 ALA 处理后, 决明幼苗叶片脯氨酸量显著升高, 并且同样是在 ALA 为 25 mg/L 时达到最大值, 且与处理 T1 和 T4 间

差异均达到显著水平。以上试验结果说明, 适宜浓度的 ALA 能够提高盐胁迫下决明叶片可溶性糖和游离脯氨酸的量, 从而提高决明植株的抗旱性。可溶性蛋白在盐胁迫下呈现出持续降低的趋势, 可能是持续的盐胁迫严重抑制了植物体内蛋白质的合成, 并且会引起部分蛋白分解的加速。但是经过 ALA 处理后, 可溶性蛋白量呈现出显著升高的趋势, 与盐胁迫处理 CK2 相比, 差异显著, 外源 ALA 有效地减缓了叶片内可溶性蛋白减少的趋势, 增加了可溶性蛋白的量。

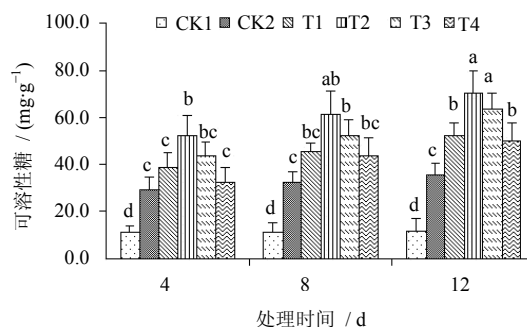


图 13 可溶性糖量的测定

Fig. 13 Determination of soluble sugar

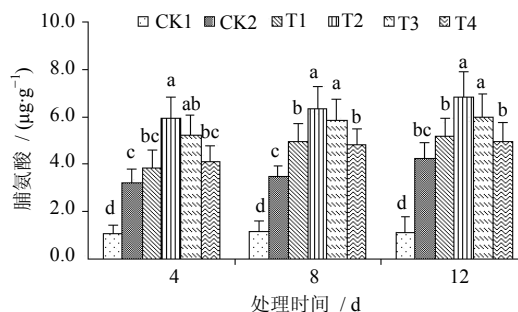


图 14 游离脯氨酸量的测定

Fig. 14 Determination of free proline

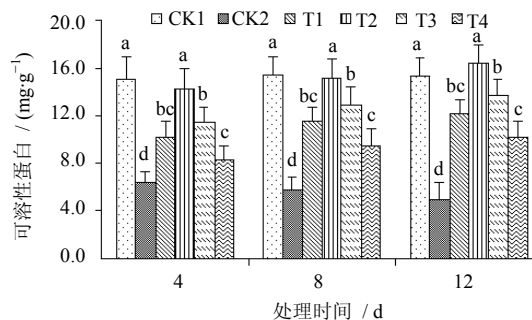


图 15 可溶性蛋白量的测定

Fig. 15 Determination of soluble protein

3.7 ALA 对盐胁迫下决明幼苗叶片 3 种抗氧化酶活性的影响

由图 16~18 可以看出,在经过盐胁迫后,3 种抗氧化酶的活性均有大幅度的提高,与对照 CK1 相比差异显著,这说明决明幼苗对胁迫的反应比较明显。但是 3 种酶的具体变化规律并不完全相同,在受到盐胁迫后,随着胁迫时间的推移,SOD 和 CAT 呈现出先升后降的趋势,而 POD 则呈现出先降后升的趋势。

在经过不同质量浓度的外源 ALA 处理后,3 种抗氧化酶的活性均整体呈现出显著升高的趋势,并

与 CK1 和 CK2 形成显著差异。并且当 ALA 达到 25 mg/L 时,其效果最好。SOD 活性随着时间的推移持续上升,在第 12 天时上升幅度达到最大值,为 1 508.67 U/(g·h),为 CK2 [790.24 U/(g·h)] 的 1.91 倍。而 POD 和 CAT 则是在第 8 天时达到最大值,分别为 138.11、122.04 U/(mg·min),但是与第 12 天时的活性相比差异并不显著,说明 ALA 的作用具有一定的持久性。而其他不同质量浓度的 ALA 处理与 CK1 相比,差异均达到显著水平,与 CK2 相比,均有不同程度的提高。

4 讨论

叶绿素荧光诱导动力学检测技术以植物体内叶绿素为天然探针,包含丰富光合信息,可以快速、灵敏、无损伤探测水分胁迫对植物光合作用的影响^[19]。本研究中,经过盐胁迫后的决明植株叶片叶绿素的量大幅度减少,这说明盐胁迫破坏了光合色素的合成,而外源 ALA 则减缓了光合色素降低的趋势,促进了光合色素的合成。 F_v/F_m 值表示的是 PSII 原初光能转化效率,表明 PSII 利用光能的能力,与植物的光合作用光抑制程度密切相关,又称为最大光化学量子产量。 F_v'/F_m' 表示的是开放的 PSII 反应中心原初光能转化效率^[20],称为 PSII 有效光化学效率或天线色素转化率。 F_v/F_m 是经常采用的叶绿素荧光指标之一,通常在胁迫条件下此指标会降低^[21],同时表明光系统 II 遭受到破坏^[22]。本研究中决明幼苗受到盐胁迫后, F_v/F_m 和 F_v'/F_m' 均呈现出显著的下降,这说明光系统 II 遭受到破坏。实际光化学效率 Φ_{PSII} 反映的是 PSII 反应中心在有部分关闭情况下的实际原初光能捕获效率^[23]。在本实验中盐胁迫引起 Φ_{PSII} 大幅度降低,且随着胁迫时间的延长,降低程度加大。在经过不同浓度的 ALA 处理后,显著地提高了光能捕捉效率。

光化学荧光猝灭系数 qP 数值的大小可以反映 PSII 原初电子受体 QA 的氧化还原状态和 PSII 开放中心的数目^[24]。光化学猝灭系数 NPQ 在一定程度上反映了 PSII 反应中心的开放程度,而 NPQ 是光合机构的一种自我保护机制。NPQ 过程是植物体为了避免光抑制和膜受到伤害,调整过量能量耗散的一套适应机制。光系统通过提高非辐射性热耗散可以消耗 PSII 吸收的过多光能,从而起到保护 PSII 反应中心免受因吸收过多光能而引起的光氧化和光抑制伤害^[25]。本实验结果表明,盐胁迫下决明叶片的 qP 下降,说明盐胁迫导致决明叶片 PSII 反应中

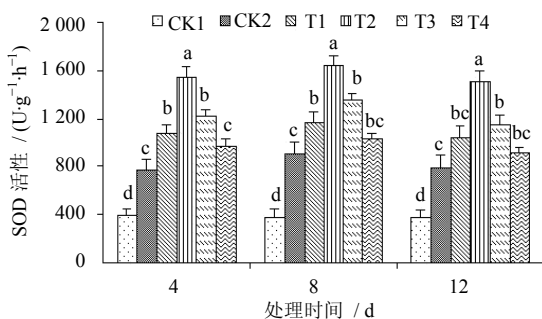


图 16 SOD 的活性

Fig. 16 Activity of SOD

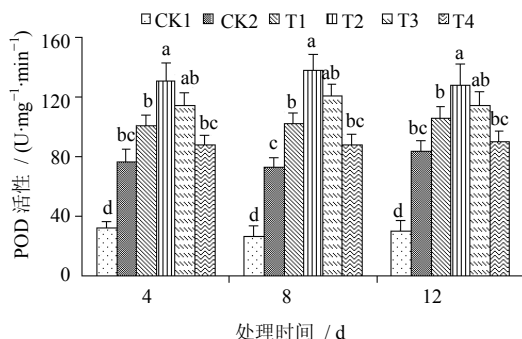


图 17 POD 的活性

Fig. 17 Activity of POD

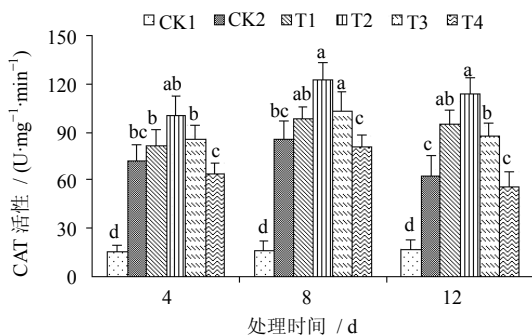


图 18 CAT 活性

Fig. 18 Activity of CAT

心的开放程度降低,从天线色素上捕获的光能用于光化学反应的份额减少,PSII反应中心的光化学活性变弱,使累积在PSII反应中心的光能过剩,决明通过提高NPQ及时耗散了过剩的光能,有效保护了光合机构。

MDA是膜脂过氧化作用的主要产物之一,其量的高低和质膜透性的大小都是膜脂过氧化强弱和质膜破坏程度的重要指标^[26-27]。本实验结果表明,决明受到盐胁迫后,MDA量显著升高,这说明细胞质膜发生了过氧化作用,引起质膜正常的生理功能发生紊乱。但是当用外源ALA处理以后,MDA含量显著降低,说明ALA对减缓盐胁迫所造成的伤害具有积极的缓解作用。可溶性糖和可溶性蛋白既是渗透调节剂,也是合成其他有机溶质的碳架和能量的来源,还可在细胞内无机离子浓度高时起保护酶类的作用^[28],在盐逆境中其量的增加对于植物提高细胞汁液浓度、降低细胞水势、增强吸水等功能起着重要促进作用^[29]。同时,游离脯氨酸还作为一种贮藏形式的氮源,待植物逆境胁迫解除后可参与叶绿素等物质的合成,一般认为当植物受到胁迫时,体内可溶性糖和游离脯氨酸积累增加。本试验中经过ALA处理后,决明幼苗叶片中可溶性糖、可溶性蛋白和游离脯氨酸含量与盐胁迫对照相比显著升高,这可以维持细胞内较低的渗透势,提高细胞内溶质的浓度,降低水势,帮助细胞从外界持续吸水,从而抵抗盐胁迫所带来的伤害。

迄今有关ALA诱导植物抗氧化酶活性提高的原因,目前还未有直接证据,这可能与其转化为亚铁血红素有关。Thomas等^[30]观察到外源ALA处理促进完整黄瓜质体亚铁血红素外流并转化为血红蛋白;有研究显示,在用¹⁴C-ALA处理豌豆16h后,¹⁴C渗入到过氧化物酶和细胞色素分子的卟啉辅基中^[31]。显然,亚铁血红素是过氧化物酶的辅基^[32],ALA处理促进了亚铁血红素的合成,并以辅基的形式导致过氧化物酶活性增加,从而提高抗氧化胁迫能力^[33]。据此看来,ALA促进盐胁迫下植物种子萌发至少有两方面的原因:其一是提高萌发过程中种子呼吸强度;其二是提高抗氧化酶活性。但无论是哪一方面,ALA转化为卟啉化合物都是关键环节。本实验的结果显示25 mg/L的ALA效果较好,多项指标均显示出良好的结果,但是并不代表此浓度的ALA适合所有的植物,不同的植物抗盐途径有所不同,耐盐能力也有所不同,并且处于植物不同的生

长时期效果也有所不同。张春平等^[27]的研究结果表明,在100 mmol/L的NaCl胁迫处理下的紫苏幼苗,经过50 mg/L的ALA效果较好,周贺芳等^[34]对盐胁迫下的甜瓜幼苗的研究也说明了这个问题。以上结果均说明,ALA对多种盐胁迫下的植物具有良好的保护作用,但是具体的浓度对不同的植物来说有所不同。

综上所述,ALA通过提高盐胁迫下决明幼苗的抗氧化酶活性,增加了叶绿素量,提高了光合效率,加强清除活性氧能力,增加膜稳定性,降低细胞渗透势,减少膜质过氧化作用,从而缓解决明幼苗所受的氧化损伤,增强其抗盐性。

参考文献

- [1] 中国药典[S].一部.2010.
- [2] 李续娥,郭宝江,曾志.决明子蛋白质、低聚糖及蒽醌苷降压作用的实验研究[J].中草药,2003,34(9): 842-843.
- [3] Hase K, Kadota S, Basnet P, et al. Hepatoprotective effects of traditional medicines. Isolation of active constituent from seeds of *Celosia argentea* [J]. *Phytother Res*, 1996, 10(5): 387-392.
- [4] 吕翠婷,黎海彬,李续娥,等.中药决明子的研究进展[J].食品科技,2006(8): 295-298.
- [5] Lee G Y, Jang D S, Lee Y M, et al. Naphthopyrone glucosides from the seeds of *Cassia tora* with inhibitory activity on advanced glycation end products (AGEs) formation [J]. *Arch Pharm Res*, 2006, 29(7): 587-590.
- [6] 郝严军,桑育黎,赵余庆.决明子蒽醌类化学成分研究[J].中草药,2003,34(1): 18-19.
- [7] 张春平,何平,杜丹丹,等.药用决明子硬实及萌发特性研究[J].中草药,2010,41(10): 1700-1704.
- [8] 王文燕,赵强,张铁军,等.决明子的HPLC指纹图谱及模式识别研究[J].中草药,2009,40(10): 1638-1641.
- [9] Hotta Y, Tanaka T, Takaoka H, et al. Promotive effects of 5-aminolevulinic acid on the yield of several crops [J]. *Plant Growth Regul*, 1997, 22(2): 109-114.
- [10] 张春平,何平,喻泽莉,等.外源Ca²⁺、ALA、SA和Spd对盐胁迫下紫苏种子萌发及幼苗生理特性的影响[J].中国中药杂志,2010,35(24): 3260-3265.
- [11] Watanabe K, Tanaka T, Hotty A, et al. Improving salt tolerance of cotton seedlings with 5-aminolevulinic acid [J]. *Plant Growth Regul*, 2000, 32(1): 99-101.
- [12] Wang L J, Jiang W B, Liu H, et al. Promotion of 5-aminolevulinic acid (ALA) on germination of pakchoi (*Brassica chinensis*) seeds under salt stress [J]. *Int Plant*

- Biol*, 2005, 47(9): 1084-1091.
- [13] 张志良, 瞿伟菁. 植物生理学实验指导 [M]. 北京: 高等教育出版社, 2003.
- [14] Demmig-Adams B, Adams W W III, Barker D H, *et al*. Using chlorophyll fluorescence to assess the fraction of absorbed light allocated to thermal dissipation of excess excitation [J]. *Physiol Plant*, 1996, 98(2): 253-264.
- [15] 刘 宁, 高玉葆, 贾彩霞, 等. 渗透胁迫下多花黑麦草叶内过氧化物酶活性和脯氨酸含量以及质膜相对透性的变化 [J]. 植物生理学通讯, 2000, 36(1): 11-14.
- [16] Velikova V, Yordanov I, Edreva A. Oxidative stress and some antioxidant systems in acid rain 2-treated bean plants protective role of exogenous polyamines [J]. *Plant Sci*, 2000, 151(2): 59-66.
- [17] 张以顺, 黄 霞, 陈云凤. 植物生理学实验教程 [M]. 北京: 高等教育出版社, 2009.
- [18] 郝再彬, 苍 晶, 徐 仲. 植物生理实验 [M]. 哈尔滨: 哈尔滨工业大学出版社, 2004.
- [19] 惠红霞, 许 兴, 李前荣. 外源甜菜碱对盐胁迫下枸杞光合功能的改善 [J]. 西北植物学报, 2003, 23(12): 2137-2422.
- [20] Zhang S R. A discussion on chlorophyll fluorescence kinetics parameters and their significance [J]. *Chin Bull Bot*, 1999, 16(4): 444-448.
- [21] van Kooten O, Snel J F H. The use of chlorophyll fluorescence nomenclature in plant stress physiology [J]. *Photosyn Res*, 1990, 25(3): 147-150.
- [22] Xu C C, Zhang J H. Effect of drought on chlorophyll fluorescence and xanthophyll cycle components in winter wheat leaves with different ages [J]. *Acta Phytophysiol Sin*, 1999, 25(5): 29-37.
- [23] Carrasco R M, Rodriguez J S, Perez P. Changes in chlorophyll fluorescence during the course of photoperiod and in response to drought in *Casuarina equisetifolia* Forst. and Forst [J]. *Photosynthetica*, 2002, 40(3): 363-368.
- [24] Havaux M, Strasser R J, Greppin H. A theoretical and experimental analysis of the qP and qN coefficients of chlorophyll fluorescence quenching and their relation to photochemical and non photochemical event [J]. *Photosynth Res*, 1991, 27(1): 41-55.
- [25] 王艳茹, 郭巧生, 靳 淼. 光强对药用白菊花生长发育及光合特性的影响 [J]. 中国中药杂志, 2009, 34(13): 1632-1635.
- [26] 张春平, 何 平, 杜丹丹, 等. 外源 Ca^{2+} 及 NO 供体硝普钠 (SNP) 对盐胁迫下紫苏种子萌发及幼苗抗氧化酶活性的影响 [J]. 中国中药杂志, 2010, 35(23): 3114-3119.
- [27] 张春平, 何 平, 韦品祥, 等. 外源 5-氨基乙酰丙酸对盐胁迫下紫苏种子萌发及幼苗抗氧化酶活性的影响 [J]. 中草药, 2011, 42(6): 1194-1200.
- [28] 乔绍俊, 李会珍, 张志军, 等. 盐胁迫对不同基因型紫苏种子萌发、幼苗生长和生理特征的影响 [J]. 中国油料作物学报, 2009, 31(4): 499-502.
- [29] Yokoi S J, Bressan R A, Hadegeawa P M. Salt stress tolerance of plants [R]. *JIRCAS Working Report*, 2002.
- [30] Thomas J, Weinstein J D. Measurement of heme efflux and heme content in isolated developing chloroplasts [J]. *Plant Physiol*, 1990, 94(3): 1414-1423.
- [31] van Huyestee R B. Porphyrin and peroxidase synthesis in cultured peanut cells [J]. *Can J Bot*, 1977, 55(10): 1340-1344.
- [32] Thomas L P, Kraut J. The stereochemistry of peroxidase catalysis [J]. *J Biol Chem*, 1980, 255(9): 8199-8205.
- [33] Hunter A G, Rivera E, Ferreira G C. Supraphysiological concentrations of 5-aminolevulinic acid dimerize in solution to produce superoxide radical anions via a protonated dihydropyrazine intermediate [J]. *Arch Biochem Biophys*, 2005, 437(2): 128-137.
- [34] 周贺芳, 邹志荣, 孟长军, 等. 外源 ALA、 CaCl_2 和水杨酸对盐胁迫下甜瓜幼苗一些生理特性的影响 [J]. 干旱地区农业研究, 2007, 25(4): 212-215.