

外源 5-氨基乙酰丙酸对盐胁迫下黄连种子萌发及幼苗生理特性的影响

张春平^{1,2}, 何平², 胡世俊³, 李岩¹, 么焕开¹, 段静雨¹, 周慧¹

1. 徐州医学院药学院 江苏省新药研究与临床药学重点实验室, 江苏 徐州 221004

2. 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 400715

3. 西南林业大学林学院 国家林业局西南地区生物多样性保育重点实验室, 云南 昆明 650224

摘要: **目的** 本研究通过对黄连种子萌发及幼苗生理特性的研究, 旨在寻找提高黄连种子及幼苗在盐胁迫条件下抗性能力的途径。**方法** 用 100 mmol/L 的 NaCl 模拟盐胁迫, 在外源 5-氨基乙酰丙酸 (ALA) 处理后, 对黄连种子的各萌发指标及黄连幼苗叶片细胞质膜透性、超氧阴离子产生速率, 过氧化氢 (H₂O₂) 量, 可溶性糖、可溶性蛋白、游离脯氨酸及丙二醛 (MDA) 量、超氧化物歧化酶 (SOD)、过氧化物酶 (POD)、过氧化氢酶 (CAT) 和抗坏血酸过氧化物酶 (APX) 活性进行测定。**结果** NaCl 胁迫下的黄连种子萌发受到显著抑制, 但是在经过不同浓度的 ALA 处理后, 发芽势、发芽率、发芽指数和活力指数等萌发指标均有升高。外源 ALA 处理显著提高了盐胁迫下黄连幼苗叶片可溶性糖、可溶性蛋白和脯氨酸量, 不同程度的提高了叶片超 SOD、POD 和 CAT 活性, 显著降低了 MDA 量、质膜透性、超氧阴离子产生速率及 H₂O₂ 量。**结论** 外源 ALA 通过提高黄连种子的萌发指数, 提高渗透调节物质含量及抗氧化酶活性, 降低细胞质膜氧化程度, 有效地减缓 NaCl 胁迫对黄连种子及幼苗产生的伤害, 提高了种子及幼苗的抗盐能力。

关键词: 黄连; 5-氨基乙酰丙酸; 盐胁迫; 种子萌发; 生理特性

中图分类号: R282.2

文献标志码: A

文章编号: 0253-2670(2014)24-3618-09

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2014.24.022

Effect of exogenous 5-aminolevulinic acid on seed germination and seedlings physiological characteristics of *Coptis chinensis* under NaCl stress

ZHANG Chun-ping^{1,2}, HE Ping², HU Shi-jun³, LI Yan¹, YAO Huan-kai¹, DUAN Jing-yu¹, ZHOU Hui¹

1. Jiangsu Key Laboratory of New Drug Research and Clinical Pharmacy, School of Pharmacy, Xuzhou Medical College, Xuzhou 221004, China

2. Key Laboratory of Eco-environments of Three Gorges Reservoir Region, Ministry of Education, School of Life Sciences, Southwest University, Chongqing 400715, China

3. Key Laboratory of Biodiversity Conservation in Southwestern China, State Forestry Administration, School of Forestry, Southwest Forestry University, Kunming 650224, China

Abstract: Objective To find get the method of alleviating salinity damage to *Coptis chinensis* under NaCl stress by studying the seed generation and seedling physiological nature. **Methods** Several physiological indexes such as germination vigor, germination rate, germination index, and vigor parameters of *C. chinensis* were measured after treated by 5-aminolevulinic acid (ALA) under salt stress (NaCl with the concentration of 100 mmol·L⁻¹ NaCl). And other parameters such as memberane permeability, H₂O₂ content, production rate of superoxide anion, contents of soluble surge, soluble protein, free proline, and malondialdehyde (MDA), and activities of superoxide (SOD), peroxidase (POD), catalase (CAT), and ascorbate peroxidase (APX) were also measured. **Results** The seed germination indexes of *C. chinensis* under NaCl stress have an obvious inhibition. But after the treatment of ALA, germination indexes were all increased. The results also showed that the treatment of exogenous ALA obviously increased the contents of soluble sugars, free proline, and soluble protein, decreased the contents of MDA, H₂O₂, and production rate of superoxide anion. Meanwhile, the results also indicated that ALA

收稿日期: 2014-08-16

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (31300222, 81302744); 江苏省自然科学基金 (BK20130214); 江苏省高校自然科学研究项目 (13KJB180025); 徐州医学院优秀人才科研启动基金

作者简介: 张春平, 男, 山东潍坊人, 博士, 讲师, 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: 13775983159 E-mail: chupingzhang520@163.com

could improve the activities of SOD, POD, CAT, and APX. **Conclusion** Exogenous ALA with appropriate concentration could significantly alleviate the damages to the seeds and seedlings of *C. chinensis* under NaCl stress and promote the salt resistance of the seeds and seedlings through improving the germination indexes and activities of anti-oxidase, decreasing the membrane permeability, and so on.

Key words: *Coptis chinensis* Franch.; 5-aminolevulinic acid; NaCl stress; seed germination; physiological characteristics

黄连 *Coptis chinensis* Franch. 又名味连、川黄连、鸡爪连, 为毛茛科黄连属多年生草本植物, 三级渐危种^[1]。野生黄连大多分布于四川、重庆、湖南、湖北、陕西、贵州等省海拔 1 200~1 700 m 的山谷密林之中。黄连性寒、味苦, 根茎入药, 具有清热燥湿、泻火解毒等作用^[2-3], 临床上还用于细菌性痢疾、局部化脓性感染、心律失常、胃炎及十二指肠溃疡等病的治疗^[4]。由于黄连根茎有效成分小檗碱的独特药效, 使得药材市场对其需求量逐年增加, 目前对黄连的研究主要集中在化学成分、药理作用、临床应用及资源保护等方面^[5-9]。对黄连栽培过程中的环境胁迫主要集中在热胁迫、冷胁迫、干旱胁迫等方面, 但是对盐胁迫的报道较少^[10-12], 而且对外源性物质处理缓解胁迫的报道仅见于极少量文献报道^[13]。

土壤盐渍化是农业栽培生产中主要障碍之一, 目前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。5-氨基乙酰丙酸 (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, 它不单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。汪良驹等^[14-15]对西瓜、萝卜叶片研究表明, ALA 处理有利于能量进入 PSII 反应中心, 促进光化学效率提高。ALA 作为一种新型的植物生长调节物质, 经部分研究证实它可以提高作物的抗逆性, 提高作物产量并改善品质^[16]。张春平等^[17]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, 并可提高决明幼苗的光合效率^[18-19]。Watanabe 等^[20]提出 ALA 能够促进高盐 (1.5% NaCl) 条件下棉花植株的生长, 效果明显超过以前所报道过的任何一种植物激素。Wang 等^[21]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。本实验通过研究外源 ALA 对盐胁迫下黄连种子萌发指标, 幼苗叶片细胞氧化程度及抗氧化酶活性, 叶片渗透性物质质量等的变化, 探索外源 ALA 提高黄连幼苗的抗盐机制, 为黄连在实际

栽培中遇到的盐胁迫问题提供新的解决思路。

1 材料

供试的黄连种子由重庆市石柱黄连培育基地提供, 经西南大学生命科学学院何平教授鉴定为 *Coptis chinensis* Franch. 的成熟种子。ALA 为韩国 KAIST 提供, 由于 ALA 在高浓度的水溶液中不稳定, 所以实验中溶液均为现配现用, ALA 处理时间均为 19:00~20:00。

2 方法

2.1 种子萌发生理指标的测定

挑取籽粒饱满、大小一致的黄连种子, 用 1.0% 的次氯酸钠 (NaClO) 溶液消毒处理 5 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, 实验共设置 6 个处理: (1) 水对照 (CK); (2) 100 mmol/L 的 NaCl 盐对照 (S); (3) 100 mmol/L NaCl+1 mg/L ALA (T1); (4) 100 mmol/L NaCl+5 mg/L ALA (T2); (5) 100 mmol/L NaCl+10 mg/L ALA (T3); (6) 100 mmol/L NaCl+20 mg/L ALA。在处理黄连种子时, 处理液浇透培养皿底部, 再覆盖浸透处理液的滤纸, 然后吸取培养皿多余的处理液, 以免种子被处理液掩埋而影响萌发。种子在培养箱中进行 (23±2) °C 或 (15±2) °C 的变温培养, 光照时间设为 12 h/12 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 28 天计算发芽势, 第 40 天计算发芽率、发芽指数和活力指数。按以下公式计算。

发芽势=28 d 发芽的种子数/供试的所有种子数

发芽率=40 d 发芽的种子/供试的所有种子数

发芽指数= $\sum (G_t/D_t)$

活力指数= $S \times \sum (G_t/D_t)$

G_t 为 t 日内的发芽数, D_t 为相应的发芽天数, S 为植株的平均鲜质量

2.2 幼苗相关生理指标的测定

选取长势一致的两年期幼苗移入小花盆中, 每盆植入一株, 盆中基质按松针土-腐殖土-沙土=2:2:1 的混合形成。经过 10 d 的缓苗期后, 进行盐胁

胁迫试验,共设置以下6个处理:(1)Hoagland 营养液空白对照(CK);(2)Hoagland 营养液+100 mmol/L NaCl 盐对照(S);(3)Hoagland 营养液+100 mmol/L NaCl+10 mg/L ALA(T1);(4)Hoagland 营养液+100 mmol/L NaCl+25 mg/L ALA(T2);(5)Hoagland 营养液+100 mmol/L NaCl+50 mg/L ALA(T3);(6)Hoagland 营养液+100 mmol/L NaCl+100 mg/L ALA(T4)。每个处理10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5、10、15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质膜透性、质膜氧化程度[丙二醛(MDA)量、超氧阴离子产生速率及 H_2O_2 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)、过氧化氢酶(CAT)和抗坏血酸过氧化物酶(APX)的活性。

2.2.1 可溶性糖、可溶性蛋白及游离脯氨酸量的测定 可溶性糖、可溶性蛋白和游离脯氨酸量均采用张志良等^[22]的方法进行测量。

2.2.2 质膜透性的测定 黄连幼苗叶片的原生质膜透性采用电导仪法测定^[23],以相对电导率(相对电导率=未煮之前的电导率/煮沸后的电导率)来表示细胞膜受胁迫伤害的程度,测量用电导仪型号为LIDA DDS—307W。

2.2.3 H_2O_2 的测定 取黄连叶片0.5 g于3 mL 100 mmol/L的磷酸缓冲液(pH 6.8)中进行研磨,然后再在匀浆于4℃下10 000×g离心10 min,收集上清液待用。采用Lee等^[24]的方法进行测定,0.5 mL酶液与2.5 mL H_2O_2 (83 mmol/L pH 7.0 磷酸缓冲液,0.005%氧代邻联茴香胺,40 μg/mL过氧化物酶)启动反应,30℃水浴10 min。最后加入0.5 mL高氯酸终止反应,5 000×g离心10 min。由此产生的上清液在436 nm下测定吸光度值,根据标准曲线计算量。

2.2.4 超氧阴离子产生速率的测定 采用张志良等^[25]的方法取待测样品0.5 g于研钵中,加入适量的磷酸缓冲液(pH 7.8)研磨匀浆,定容至10 mL,匀浆于10 000×g离心10 min,取上清液备用。取上清液2 mL,加入磷酸缓冲液(pH 7.8)1.5 mL,盐酸羟胺0.5 mL,混合后25℃恒温水浴保温20 min。然后再加入2.0 mL的17 mmol/L对氨基苯磺酸,2.0 mL的 α -萘胺,30℃恒温水浴中反应30 min,反应后测定530 nm处的吸光度值。根据标准曲线,计算超氧阴离子的量。

2.2.5 MDA的测定 MDA量参照Velikova等^[26]的硫代巴比妥酸(TBA)检测法,分别于532和600 nm处检测吸光度值,计算MDA量(μmol/g)。

2.2.6 抗氧化酶活性的测定 SOD活性的测定采用Xu等^[27]的方法,在560 nm处检测吸光度,单位为U/mg。POD活性的测量方法采用愈创木酚法进行测量^[28],检测波长为465 nm,单位为U/mg。CAT活性的测量方法采用Dhindsa等^[29]的方法,检测波长为240 nm,单位为U/mg。APX活性的测量方法采用Nakano等^[30]的方法,于290 nm处检测吸光度值,单位为U/mg。

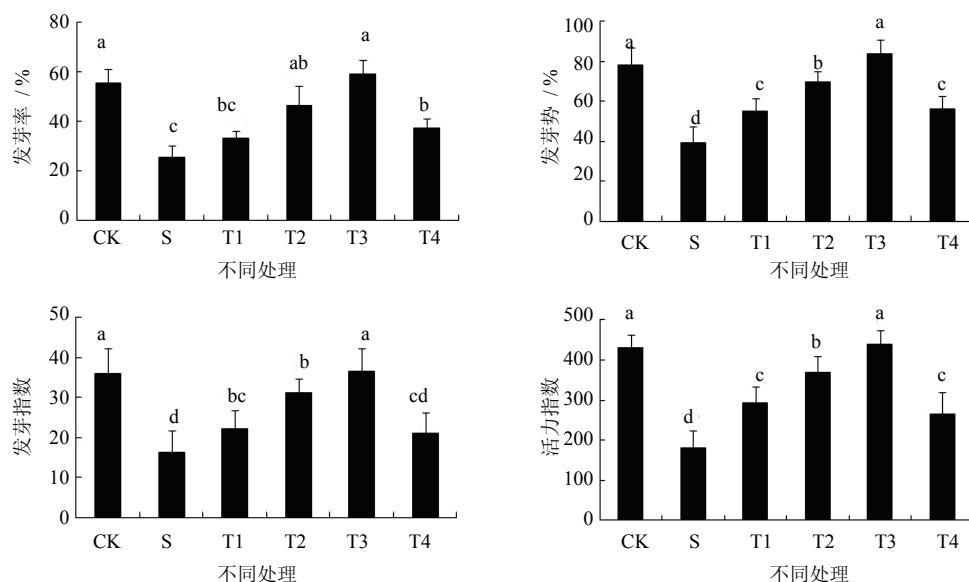
2.3 数据处理

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对盐胁迫下黄连种子萌发的影响

由图1可以看出,黄连种子在不同的处理下,发芽率和发芽势都有不同程度的变化。与未经任何处理(CK)的发芽势(55.36%)和发芽率(78.49%)相比可以看出,100 mmol/L的S处理的种子发芽势(25.17%)和发芽率(39.22%)显著降低,这表明100 mmol/L的NaCl处理显著抑制了黄连种子的正常萌发。当用不同浓度的ALA处理后,黄连种子的发芽势和发芽率与NaCl处理(S)相比均有不同程度的提高,其中经过10 mg/L的ALA处理后(T2)的结果最为显著,发芽势和发芽率达到59.02%和84.00%,与其余各ALA处理相比差异显著,并且与S处理相比差异显著,分别提高了134.49%和114.18%,且与CK差异不显著,这说明恢复效果显著,基本达到了胁迫前的正常萌发水平。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相似。经过NaCl处理后,发芽指数也显著降低,但是经过不同浓度的ALA处理后,发芽指数和活力指数都有明显的升高,并且经过10 mg/L的ALA处理后结果最为显著,发芽指数(36.70)和活力指数(440.01)达到最大,显著高于S处理(16.37和180.39),分别为S处理的2.24和2.44倍,比CK略低,但差异不显著。经过T3处理后的结果与T2相比差异显著,但是仍然高于S处理,说明效果不及T2,但是仍从一定程度缓解了盐胁迫所带来的萌发抑制。这说明适宜浓度的ALA可有效缓解盐胁迫对黄连种子萌发造成的伤害,



不同小写字母表示各处理间在 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 不同处理下黄连种子的萌发指标

Fig. 1 Seed germination indexes of *C. chinensis* with different treatments

但过高质量浓度的 ALA 对种子的萌发效果不明显。以上结果表明, ALA 在提高黄连种子各萌发生理指标中具有显著的促进效应。

3.2 不同质量浓度的 ALA 处理对黄连植株外部形态的影响

黄连植株在处理前生长良好, 当用单一的 100 mmol/L NaCl 进行胁迫后, 截至到第 4 天并无明显的变化, 到第 6 天时, 植株幼嫩叶片边缘开始出现萎缩, 叶柄无明显变化, 到第 10 天时, 幼嫩叶片和叶柄均开始出现枯黄, 较大的成年叶片边缘也开始枯黄。截至到第 15 天时, 幼嫩叶片全部枯黄, 成年叶片边缘枯黄面积加大, 约占 1/2。经过不同质量浓度 ALA 处理后, 植株出现枯黄的现象缓解, 只有部分植株出现轻微枯黄现象, 并且在 4 个不同的处理质量浓度中, 50 mg/L ALA 处理后的植株叶片与对照组相比无明显变化。以上外部形态的变化表明盐胁迫明显的使黄连植株的生长受到抑制, 而 ALA 对于缓解盐胁迫具有一定的积极作用。

3.3 ALA 对盐胁迫下黄连幼苗叶片细胞膜脂过氧化及质膜透性的影响

图 2 所示为盐胁迫下黄连叶片超氧阴离子产生速率及 H_2O_2 量的变化, 结果显示, 未经盐胁迫的对照组在不同时段之间基本无变化, 而经过 NaCl 胁迫后, 两者均有不同程度的升高。在胁迫初期,

两者水平与对照组 CK 相比均发生显著升高, 且随着胁迫时间的延长, 提高幅度不断变大, 当用外源 ALA 进行处理后, 两者均有不同程度的降低。图 2-A 所示, ALA 在处理初期对超氧阴离子产生速率的影响表现为低质量浓度处理效果并不明显, 但是随着质量浓度的升高, 效果越来越明显, 在 50 mg/L 时 (T3) 时达到最小值 [$1.168 \mu\text{mol}/(\text{g} \cdot \text{min})$], 并且低于空白对照 CK [$1.249 \mu\text{mol}/(\text{g} \cdot \text{min})$]。图 2-B 所示, 在 ALA 处理初期, H_2O_2 量有明显的降低, 并且同样在 50 mg/L 时 (T3) 达到最小值 ($1.20 \mu\text{mol}/\text{g}$), 甚至低于空白对照 CK ($1.32 \mu\text{mol}/\text{g}$), 这说明 ALA 显著地缓解了盐胁迫下黄连叶片 H_2O_2 量升高的趋势。随着处理时间的延长, 盐处理 (S) 的 H_2O_2 量及超氧阴离子产生速率呈逐渐升高趋势, ALA 仍然具有显著地持续作用, 在各自的处理阶段均与盐处理 S 达到显著性差异, 并且与 CK 无明显差异。这说明了通过外源 ALA 处理, 使得盐胁迫下的黄连叶片 H_2O_2 量及超氧阴离子产生速率基本恢复到处理前的水平。图 2-C 所示为盐胁迫下 MDA 量的变化, 未经任何处理的黄连叶片 MDA 量随着时间的延长并无显著变化。而经过 NaCl 处理后的黄连叶片 MDA 量自胁迫初期便呈现出显著升高的趋势, 随着胁迫时间的延长, 升高的幅度不断增大。在经过 ALA 处理后,

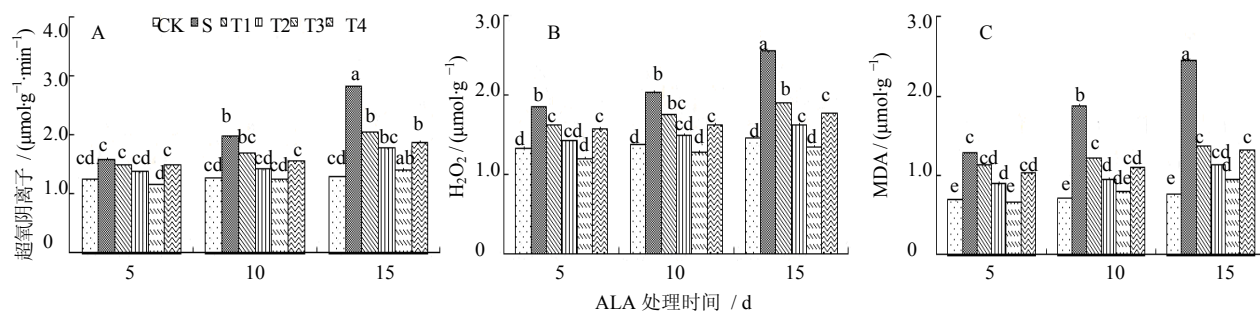


图2 黄连叶片细胞膜氧化指标

Fig. 2 Membrane oxidation indexes of leaves of *C. chinensis* under salt stress

量均有显著的减少, 处理前期 (T3, 5 d) 达到最低值 ($0.066 \mu\text{mol/g}$), 在处理后期 ALA 的作用最为显著, 在后期 (15 d) 盐处理 S 的 MDA 量为 $0.246 \mu\text{mol/g}$, 而同时期 T3 处理的 MDA 量仅为 $0.096 \mu\text{mol/g}$, 在所有处理时间段中降低幅度最大。

图 3 所示为盐胁迫下黄连叶片电导率的变化, 未经盐胁迫的黄连幼苗叶片的相对电导率基本没有变化, 但是在盐胁迫初期电导率就随着胁迫程度的增加而呈现出增大的趋势, 并且随着胁迫时间的延长, 电导率持续增大, 并在胁迫后期 (15 d) 达到最大。以上结果表明在盐胁迫下, 黄连叶片细胞受到了不同程度的伤害, 细胞膜透性发生了改变, 而引起部分离子外流, 导致电导率发生了变化。

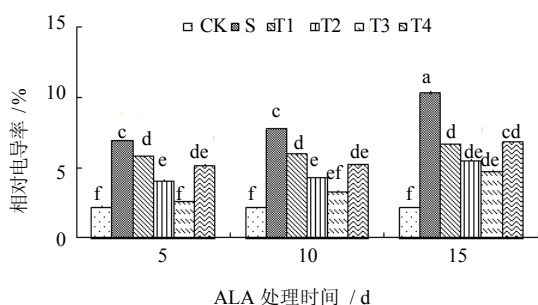


图3 相对电导率的变化

Fig. 3 Changes of relative conductivity

在经过 ALA 处理后, 盐胁迫下的黄连幼苗叶片电导率自处理初期便显著降低, 并且在不同的处理阶段均与盐处理组 S 形成显著差异, 这说明 ALA 能有效降低盐胁迫下黄连幼苗叶片电导率的水平。并且 ALA 处理则具有显著的持续性, 即在不同处理时期通过 ALA 处理所达到的电导率的最小值之间差异不显著, 并且与空白对照 CK 相比差异不显著, 这说明通过 ALA 处理显著地降低了盐胁迫下黄连幼苗叶片的相对电导率水平, 保护了叶片细胞, 维持了细胞膜的相对稳定性。

3.4 ALA 对盐胁迫下黄连幼苗叶片渗透性调节物质质量的影响

图 4 所示为盐胁迫不同处理下黄连幼苗叶片渗透物质量的变化情况, 图 4-A 所示为盐胁迫下黄连幼苗叶片可溶性糖量的变化趋势, 可溶性糖量与对照 CK 相比, 呈现出升高的趋势, 并且差异显著。但是随着 NaCl 处理时间的延长, 可溶性糖量升高的趋势并不明显。当用外源 ALA 进行处理后, 可溶性糖量均有不同程度的变化, ALA 处理随着时间的延长呈现出持续升高的趋势, 并且在处理后期 (10 d), 处理质量浓度为 50 mg/L 时, 达到最大值 18.48 mg/g , 与盐处理 S (13.92 mg/g) 形成显著性差异。图 4-C 所示脯氨酸量的变化与可溶性糖趋势基本一致, 都是在未经处理前量最低, 经过盐胁迫后, 量有所增加。但是经过外源 ALA 处理后, 增加幅度显著提高, 使叶片内积累了大量的渗透性物质, 以抵抗盐胁迫对叶片造成的伤害。随着处理时间的延长, 量呈持续升高状态, 在处理后期 (15 d) 达到最大值 ($183.51 \mu\text{g/g}$), 与同处理时期的 S ($152.31 \mu\text{g/g}$) 对比, 差异显著。图 4-B 所示可溶性蛋白在盐胁迫下呈现出先升高后降低的趋势, 但是经过 ALA 处理后, 呈现出显著升高的趋势, 与盐胁迫处理 S 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。在第 5 天 ALA 处理质量浓度为 50 mg/L 时, 可溶性蛋白量达到最大值 (23.30 mg/g), 与同期的盐处理 S (13.24 mg/g) 对比, 差异显著。随着胁迫时间的延长, 可溶性蛋白的量一直保持着较高的水平。

3.5 ALA 对盐胁迫下黄连幼苗叶片 4 种抗氧化酶活性的影响

由图 5 可以看出, 在经过盐胁迫后, 4 种抗氧化酶的活性都有不同程度的提高, 这说明黄连幼苗对胁迫的反应比较明显。但是 4 种酶的具体变化间的

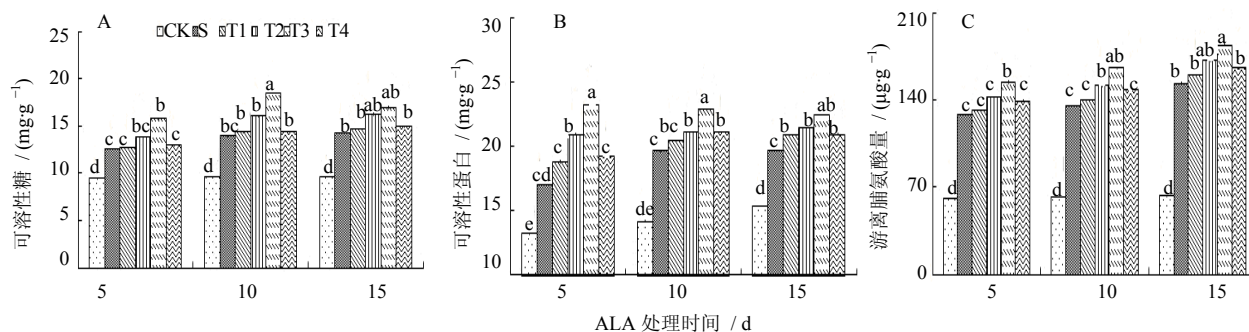


图4 不同处理对盐胁迫下黄连幼苗叶片渗透性调节物质质量的影响

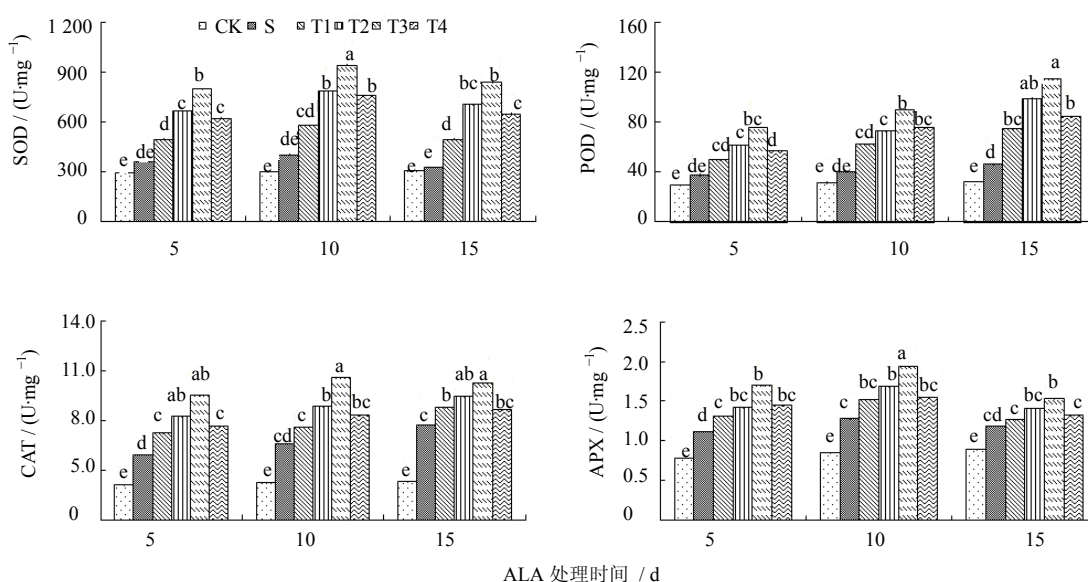
Fig. 4 Effect of different treatments on osmotic adjustment substances of *C. chinensis* under NaCl stress

图5 不同处理对盐胁迫下黄连幼苗叶片4种抗氧化酶活性的影响

Fig. 5 Effect of different treatments on anti-oxidant enzyme activities of *C. chinensis* under NaCl stress

规律并不完全相同,在受到盐胁迫后,随着胁迫时推移,SOD和APX呈现出先升后降的趋势,而POD和CAT则呈现出持续上升的趋势。在经过外源处理ALA后,4种抗氧化酶的活性均呈现出显著升高的趋势,并与CK和盐处理S形成显著差异。并且当ALA质量浓度达到50 mg/L时(T3),其效果最好。SOD和CAT活性均在第10天时达到最大值,分别为945.01和10.64 U/mg,而POD则是在第15天时达到最大值,为114.85 U/mg。APX活性在胁迫初期就显著升高,在第10天时达到了最大值(1.93 U/mg),随后活性增加幅度有所降低,但是仍与同处理时期的盐对照S形成显著性差异。这说明,外源ALA显著地提高了4种抗氧化酶的活性,用于减轻细胞氧化程度,维持细胞正常生理活动。

4 讨论

盐胁迫下活性氧增加导致细胞内大分子物质(如蛋白质、DNA)的损伤,引起膜脂过氧化。活性氧可攻击蛋白质的氨基酸残基,形成碳基衍生物,在此过程中产生的 H_2O_2 能通过Haber Weiss反应产生更具毒性的 $\cdot\text{OH}$,从而导致膜脂过氧化、碱基突变、DNA链的断裂和蛋白质的损伤,膜脂过氧化导致细胞完整性被破坏,细胞功能异常^[31]。大量研究证明,植物一旦遭受盐害,体内自由基大量积累,导致膜脂过氧化等一系列变化,最终使植物遭受伤害。所以植物的抗氧化系统对盐胁迫下的植物起关键作用。越来越多的事实证明,生物膜在植物的抗性方面起着非常重要的作用。在通常情况下,植物体内有自己的清除系统,但是当植物遭受到外界环境的胁迫时,这种平衡受到破坏而活性氧超过阈值

时,首先遭到破坏的是膜系统,盐分胁迫导致细胞膜透性增加,使大量的 Na^+ 流入细胞,影响一些酶的结构和功能,破坏了细胞的新陈代谢,可见盐害的重要屏障是细胞膜。质膜透性可以反映植物细胞膜的破损程度,而 MDA 是植物细胞膜脂过氧化作用的最终产物,对细胞膜具有毒害作用,是衡量植物细胞膜脂过氧化程度大小的最常用指标。本实验中,NaCl 处理造成黄连幼苗叶片质膜透性和 MDA 量均高于对照处理,表明盐胁迫能使植物细胞膜脂过氧化作用增强,膜透性增加,加剧植物的氧化损伤。超氧阴离子和 H_2O_2 是植物细胞代谢过程中的产物,具有很强毒性,可直接造成膜脂过氧化,同时它们也是细胞信号传导和调控的重要组成部分。本研究结果表明,黄连受到盐胁迫后,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 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,通过外源物质的处理,有效地降低了 H_2O_2 量及超氧阴离子的产生速率,缓解了两对细胞膜造成的氧化伤害,从而降低了细胞膜的透性。

相关研究表明,NaCl 胁迫下,叶片气孔导度降低,光合作用所需的 CO_2 向叶绿体细胞的运输受阻,从而使叶绿体内 CO_2 同化受抑制^[32],而光合电子传递受影响相对较小^[33],因而更多电子传递到 O_2 ,导致超氧阴离子形成,进一步产生 H_2O_2 ,叶绿体 H_2O_2 是强氧化剂,会启动膜脂过氧化,产生非脂性超氧化物自由基,从而破坏叶绿体膜结构,伤害光合作用的功能,对细胞产生毒害作用。为防御这些活性氧的毒害作用,植物叶绿体内存在着抗氧化酶和抗氧化剂防御系统,对叶绿体起保护作用。SOD 处于抵御活性氧伤害的“第一道防线”,它将超氧阴离子歧化成 H_2O_2 。 H_2O_2 的积累会启动并加剧膜脂过氧化作用,造成整体膜损伤,而 POD 起的是清除 SOD 歧化产物的作用,也可以说是与 SOD 协同作用,是抗盐机制的必备条件。逆境中保护酶活性增强或维持较高的水平,才能清除活性氧自由基使之保持较低水平,防止自由基对生物膜结构和功能的破坏^[34]。大量研究证明,植物一旦遭受盐碱,其体内自由基积累,导致膜脂过氧化等一系列生理生化变化,最终使植物遭受伤害,所以植物的抗氧化系统在盐胁迫致植物伤害过程中起关键作用。SOD、POD、CAT 和 APX 是植物体内酶

促防御系统的 4 个重要保护酶,SOD 能催化体内的歧化反应,使超氧自由基转化为 H_2O_2 和 O_2 , H_2O_2 再通过 CAT、POD 及 APX 分解成没有毒害的 H_2O 和 O_2 ,这些酶类共同作用维持细胞内活性氧代谢的平衡^[35],从而使需氧生物体免受伤害^[36-37]。并有研究指出,POD 活性受盐胁迫的影响,与抗盐性有关^[38-39],其活性的变化在一定程度上能反映植株抗盐性的强弱。

Nishihara 等^[40]报道,ALA 处理促进盐胁迫中菠菜幼苗 SOD、POD 和 CAT 等几种抗氧化酶活性的提高,并认为是 ALA 提高菠菜耐盐性的重要原因。而对于 SOD 活性来说,本实验表明 ALA 能促进黄连叶片中 SOD 活性提高,这也与刘卫琴等^[41]研究的 ALA 能提高草莓叶片中 SOD 活性相似,且其实验还表明 SOD 的活性与植株的净光合速率有关。因此,ALA 提高 SOD 的活性可能是提高黄连耐盐性的一个重要因素。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,根据相关资料显示,可能与其转化为亚铁血红素有关^[21]。Thomas 等^[42]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 ^{14}C -ALA 处理豌豆 16 h 后 ^{14}C 渗入到过氧化物酶和细胞色素分子的卟啉辅基中^[43]。显然,亚铁血红素是过氧化物酶的辅基^[44],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。本研究中,在经过 ALA 处理后,黄连幼苗叶片中 4 种抗氧化酶都表现出明显的变化,但是变化趋势略有不同,这说明 4 种酶在遇到胁迫时具有不同的分工,在经过外源 ALA 处理以后,4 种酶的活性大幅度升高以抵抗过氧化对细胞带来的伤害,有效地清除因为膜质过氧化积累下来的活性氧,以实现缓解氧化的目标。本实验结果也证明了外源 ALA 通过诱导抗氧化酶活性来降低活性氧水平,减轻氧化胁迫对黄连幼苗造成的伤害。

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^[45],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。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。本实验中经过 ALA 处理后, 黄连幼苗叶片中可溶性糖、可溶性蛋白和游离脯氨酸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。

综上所述, ALA 通过提高盐胁迫下黄连幼苗的抗氧化酶活性, 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, 从而缓解黄连幼苗所受的氧化损伤, 增强了其抗盐性。

参考文献

- [1] 傅立国. 中国植物红皮书—稀有濒危植物 (第一册) [M]. 北京: 科学出版社, 1991.
- [2] 中国药典 [S]. 一部. 2010.
- [3] 赵中振, 肖培根. 当代药用植物典 (第一册) [M]. 上海: 上海世界图书出版社, 2007.
- [4] 马伏英. 黄连等中药抗实验性小鼠柯萨奇 B3 病毒性心肌炎的实验研究 [J]. 武警医学, 1998, 9(4): 187-190.
- [5] 马欣欣, 刘吉华, 余伯阳. 黄连抑菌活性的谱效关系研究 [J]. 药物评价研究, 2013, 36(3): 171-175.
- [6] 郭志刚, 赵琳, 孙瑞强, 等. 利川黄连小檗碱含量 [J]. 中国医学科学院学报, 2004, 26(6): 618-621.
- [7] Chae S H, Jeong I H, Choi D H, et al. Growth-inhibiting effects of *Coptis japonica* root-derived isoquinoline alkaloids on human intestinal bacteria [J]. *J Agric Food Chem*, 1999, 47(3): 934-938.
- [8] Kuo C L, Chi C W, Chan T Y, et al. The anti-inflammatory potential of berberine *in vitro* [J]. *Cancer Lett*, 2004, 109(3): 407-414.
- [9] 薛宝娟, 李志慧, 张玉杰, 等. 吴茱萸次碱对 5 种黄连生物碱大鼠体外肝代谢的抑制作用 [J]. 中草药, 2014, 45(9): 1293-1296.
- [10] 李品明, 孙玉芳, 杨丙贤, 等. 低温胁迫对黄连膜脂过氧化作用和抗氧化酶活性的影响 [J]. 中国农学通报, 2011, 27(15): 117-120.
- [11] 孙玉芳, 王三根, 尹丽, 等. 高温胁迫对黄连生理特性的影响研究 [J]. 植物生理科学, 2006, 22(4): 236-238.
- [12] 李品明, 杨丙贤, 孙玉芳, 等. 高温胁迫对黄连幼苗活性氧代谢及保护酶活性的影响 [J]. 安徽农业科学, 2011, 39(18): 10796-10798.
- [13] 田桂香, 汤绍虎, 武敬亮, 等. 干旱胁迫对黄连生理作用的影响 [J]. 西南师范大学学报: 自然科学版, 2006, 31(2): 133-136.
- [14] 康琅, 汪良驹. ALA 对西瓜叶片叶绿素荧光光响应曲线的影响 [J]. 南京农业大学学报, 2008, 31(1): 31-36.
- [15] 汪良驹, 刘卫琴, 孙国荣, 等. ALA 对萝卜不同叶位叶片光合作用与叶绿素荧光特性的影响 [J]. 西北植物学报, 2005, 25(3): 488-496.
- [16] 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: 109-114.
- [17] 张春平, 何平, 刘海英, 等. 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 [J]. 中草药, 2012, 43(4): 778-787.
- [18] Zhang C P, Li Y C, Yuan F G, et al. The role of 5-aminolevulinic acid in the response to salinity stress in medicinal plant *Cassia obtusifolia* L. seeds and seedlings [J]. *Bot Studies*, 2013, 54(1): 18-31.
- [19] 童金珠, 邹志荣. 外源 ALA 对 NaCl 胁迫下不同品种西葫芦生理特性及产量的影响 [J]. 干旱地区农业研究, 2008, 26(4): 136-140.
- [20] 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.
- [21] 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.
- [22] 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.
- [23] 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.
- [24] Lee D H, Lee C B. Chilling stress-induced changes of antioxidant enzymes in the leaves of cucumber: in gel enzyme activity assays [J]. *Plant Sci*, 2000, 159(1): 75-85.
- [25] 张志良, 瞿伟菁, 李小方. 植物生理学实验指导 [M]. 北京: 高等教育出版社, 2009.
- [26] 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(1): 59-66.
- [27] Xu P L, Guo Y K, Bai J G, et al. Effects of long-term chilling on ultrastructure and antioxidant activity in leaves of two cucumber cultivars under low light [J]. *Physiol Plant*, 2008, 132(4): 467-478.
- [28] 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.
- [29] Dhindsa R S, Plumb D P, Thorpe T A. Leaf senescence: correlated with increased levels of membrane permeability and lipid peroxidation, and decreased levels

- of superoxide dismutase and catalase [J]. *J Exper Bot*, 32(1): 93-101.
- [30] Nakano Y, Asada K. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate specific peroxidase in spinach chloroplasts [J]. *Plant Cell Physiol*, 1981, 22(5): 867-880.
- [31] 张年辉, 韦振泉, 何军贤, 等. 小麦幼苗叶片抗氧呼吸对轻度水分胁迫的响应 [J]. 西北植物学报, 2001, 21(1): 21-25.
- [32] 王素平, 李娟, 郭世荣, 等. NaCl胁迫对黄瓜幼苗植株生长和光合特性的影响 [J]. 西北植物学报, 2006, 26(3): 455-461.
- [33] 魏国强, 朱祝军, 方学智, 等. NaCl胁迫对不同品种黄瓜幼苗生长、叶绿素荧光特性和活性氧代谢的影响 [J]. 中国农业科学, 2004, 37(11): 1754-1759.
- [34] 邹燕, 王瑞雪, 沈亮余, 等. 渗透胁迫下外源茉莉酸甲酯对油菜种子生理特性的影响 [J]. 西北植物学报, 2011, 31(3): 3564-568.
- [35] 汪良驹, 刘友良, 马凯, 等. 无花果细胞系耐盐性与抗氧化酶活性的变化 [J]. 园艺学报, 1999, 26(6): 351-355.
- [36] 翟凤林, 曹鸣庆. 植物的耐盐性及其改良 [M]. 北京: 农业出版社, 1989.
- [37] Stewert R C, Bewley J D. Lipid peroxidation associated with accelerated aging of soybean axes [J]. *Plant Physiol*, 1980, 65(2): 245-248.
- [38] 张士功, 高吉寅, 宋景芝. 硝酸钙对小麦幼苗生长过程中盐害的缓冲作用 [J]. 麦类作物, 1998, 18(5): 60-641.
- [39] 孟学平, 杨恒山, 孙立杰, 等. 盐胁迫对冬小麦叶过氧化物酶同功酶的影响 [J]. 吉林农业大学学报, 2002, 24(1): 25-271.
- [40] Nishihara E, Kondo K, Parvez M M. Role of 5-aminolevulinic acid (ALA) on active oxygen-scavenging system in NaCl-treated spinach (*Spinacia oleracea*) [J]. *J Plant Physiol*, 2003, 160(9): 1085-1091.
- [41] 刘卫琴, 康琅, 汪良驹. ALA对草莓光合作用的影响及其与抗氧化酶的关系 [J]. 西北植物学报, 2006, 26(1): 57-62.
- [42] Thomas J, Weinstein J D. Measurement of heme efflux and heme content in isolated developing chloroplasts [J]. *Plant Physiol*, 1990, 94(3): 1414-1423.
- [43] van Huyestee R B. Porphyrin and peroxidase synthesis in cultured peanut cells [J]. *Canadian J Bot*, 1977, 55(10): 1340-1344.
- [44] Thomas L P, Kraut J. The stereochemistry of peroxidase catalysis [J]. *J Biol Chem*, 1980, 255(17): 8199-8205.
- [45] 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.