

静电场对苜蓿幼苗期酶活性的影响

Study on Electrostatic Field on Isoenzyme Activity of *Medicago sativa* Leguminosae in Its Seeding Stage

陶玉华

Tao Yuhua

(广西生态工程职业技术学院, 广西柳州 545004)

(Guangxi Vocational Ecology & Technical College, Liuzhou, Guangxi, 545004, China)

摘要: 为了研究静电对紫花苜蓿 (*Medicago sativa* Leguminosae) 抗旱性的影响, 寻找出提高紫花苜蓿幼苗抗旱性的最佳电场条件。在静电场不同电场强度下处置紫花苜蓿种子 10min 后, 室温下培养 9d, 再测定幼苗的丙二醛 (MDA) 的含量和过氧化物酶 (POD)、超氧化物酶 (SOD) 的活性。实验所用电极电压波形为 50Hz 半波整流, 电场强度共 11 个, 其中 1 个未经电场处理作为对照组。结果表明, 在 11 个电场处理的材料中, 有 6 个 MDA 水平低于对照, 1 个与对照相同, 其余 4 个高于对照, 变化幅度为 22.8% ~ 34.8%。SOD 酶和 POD 酶的活性普遍降低, 降低幅度分别为 7.7% ~ 57.7% 和 0.5% ~ 59.4%。静电场处理可以提高紫花苜蓿幼苗的抗旱性。

关键词: 苜蓿种子 酶活性 抗旱性 静电场

中图分类号: S54 文献标识码: A 文章编号: 1005-9164(2005)01-0073-03

Abstract This paper studies the effects of electrostatic field on drought resistance of *Medicago sativa* Leguminosae and find out the best way of electrostatic field to improve drought resistance of *Medicago sativa* Leguminosae. Alfalfa seeds are treated by electrostatic field with 11 different strength for about 10 minutes. One is the contrast. After culturing for 9 days in the room temperature, the activity of their POD and SOD as well as the contents of MDA (malondialdehyde) can be tested. The results show that in the normal moisture content and room temperature, the electrostatic field treatment is positively related with MDA. The MDA which comes from 6 alfalfa having been treated is lower than that non-treated. The changes of MDA is between 22.8% and 34.8%. However, the activity of POD and SOD decreased compared with the contrast after electrostatic treatment. The changes of SOD is between 7.7% and 57.7%. The changes of POD is between 0.5% and 59.4%. Electrostatic treatment can improve the drought resistance of *Medicago sativa* Leguminosae in its seeding stage.

Key words alfalfa seeds, isoenzyme activity, drought resistance, electrostatic field

紫花苜蓿 (*Medicago sativa* Leguminosae) 为豆科苜蓿属的一种多年生草本植物。它已成为世界上分布最广的多年生优良豆科牧草, 全世界栽培面积已达 2000 亿公顷左右, 也是我国栽培面积最大的牧草^[1]。紫花苜蓿的枝叶丰富柔软, 营养价值高, 刈割的干草粗蛋白含量常达 20% 以上, 富含灰分和多种维生素, 消化率高, 各种家畜均喜食; 它的产草量高, 若以单位面积生产的蛋白质量来衡量, 可为大豆的 3 倍以上; 而且全草可入药, 能开胃、利尿排结石, 主治黄疸、浮肿、尿路结石等; 它为蜜源植物, 也可以用于改良土壤及作为绿肥使用^[2]。

地球表面是一个电场, 这个天然静电场是由电势高达 360kV 的电离层和电势为零的地球形成的, 植物处于大气电场强的地方, 光合作用就进行得快, 如果场强为零, 植物就会停止吸收二氧化碳^[3]。地球表面大气静电场处于无规则变化中, 不可控制, 如果在植物生长环境中, 人工设置一个与自然电场同方向的静电场, 调节该电场的强弱, 必然会促使植物生长出现“人工变异”, 获得丰产效果, 这正是静电生物工程的工作原理和预期目标^[4]。静电研究运用到生物方面已经取得了不少成就^[5-11]。

基于紫花苜蓿的经济价值, 本实验对苜蓿种子作静电处理, 通过测定幼苗期酶活性的变化, 研究静电对其抗旱性的影响, 寻找出提高苜蓿幼苗抗旱性的最佳电场条件, 为生产实践提供理论依据。

收稿日期: 2004-04-05

修回日期: 2004-08-23

作者简介: 陶玉华 (1968-), 女, 大学本科毕业, 生物学专业, 理学学士学位。

1 材料与amp;方法

1.1 材料

紫花苜蓿种子和幼苗

1.2 方法

1.2.1 种子处理

根据所设电场强度条件数 N , 挑选饱满且外形差异较小的一定量种子, 随机分成 $(N + 1)$ 份, 其中 N 份分别置于平行板电极形成的电场中, 用不同强度的电场处理。本实验所用电极电压波形为 50Hz 半波整流, 电场强度共 11 个, 即: $E_n = 0.5n$ (kV/cm), $n = 1, 2, 3, \dots, 11$, 处理时间为 10min。其中 E_0 为未经电场处理的对照组

1.2.2 粗酶提取

取 0.5g 生长到第 9 天的苜蓿幼苗, 沿茎基部剪下, 加入 5ml 含 1% 聚乙烯吡烷酮 (PVP) 和 0.05mol/L 磷酸缓冲液的提取介质 (pH 7), 在冰浴中研磨提取。匀浆于 2~4°C 12000rpm 下离心 10min, 取上清液, 定容至 10ml, 所得溶液即为酶提取液

1.2.3 丙二醛 (MDA) 含量测定

从酶提取液中取 2ml, 先加入 5% 的三氯乙酸 (TCA) 4ml, 再加入 0.67% 的硫代巴比妥酸 (TBA) 2ml, 混合后在 100°C 水浴煮沸 30min, 冷却后再离心 1 次, 取上清液 (用 2ml 蒸馏水加入经以上 2 种试剂作为对照) 分别在 450nm、532nm 和 600nm 处测定其吸光度, 并按公式算出单位鲜量组织中的 MDA 浓度 ($\mu\text{mol/L}$)。计算公式为:

$$C (\mu\text{mol/L}) = 6.45 (A_{532} - A_{600}) - 0.56A_{450}$$

1.2.4 超氧化物歧化酶 (SOD) 活性测定

SOD 活性测定用氮蓝四唑法。取 3 支试管, 编号, 按表 1 加入试剂, 将 2 号管用黑纸包上, 与其他试管一起在荧光灯下, 光强为 3000 lx \times 10min, 到时间后关灯, 用黑布罩上试管; 以 2 号试管为空白对照, 测定样品在 560nm 处的吸光度。(其中, 反应介质为 50 mmol/L pH 值 7.8 的磷酸缓冲液 PBS, 内含 77.12 $\mu\text{mol/L}$ 硝基四唑蓝, 0.1 mmol/L EDTA, 13.37 mmol/L 蛋氨酸); 核黄素溶液 80.2 $\mu\text{mol/L}$ (用含有 0.1 mmol/L pH 值 7.8 的磷酸缓冲液溶解)。

按以下公式计算 SOD 活性

$$\text{酶活力} = (\Delta A \times N \times 60) / (A_0 \times W \times T \times 0.02 \times 50\%)$$

式中酶活力单位为每小时每克鲜重的酶活力的单位数, A_0 为 3 号试管溶液 OD_{560} ; ΔA 为 1 号与 3 号试管 OD_{560} 值之差; N 为酶液总体积; W 为材料鲜重; T 为照光时间 (10 min)

表 1 SOD 活性测定加样

Table 1 Test of activity of SOD

试管编号 Test tube number	试剂类别 Reagent type			
	反应介质 Reaction medium (ml)	酶提取液 Enzyme solution (ml)	核黄素 Riboflavine (ml)	50mmol/L PBS (ml)
1	3.8	0.02	0.2	-
2	3.8	0.02	0.2	-
3	3.8	-	0.2	0.02

1.2.5 过氧化物酶 (POD) 活性测定

酶活性测定用愈创木酚法。反应体系包括: 2.9ml 0.05mol/L 磷酸缓冲液 PBS, 1.0 ml 2% H_2O_2 , 1.0ml 0.05mol/L 愈创木酚和 0.1ml 酶液。用加热煮沸 5min 的酶液为对照, 反应体系加入酶液后, 立即于 34°C 水浴中保温 3 min, 然后迅速稀释 1 倍, 470 nm 波长下比色, 每隔 1 min 记录 1 次吸光度, 共记录 5 次, 然后以每分钟内 A_{470} 变化 0.01 为一个酶活性单位 (u)。

按以下公式计算 POD 活性

$$\text{过氧化物酶活性} = (\Delta A_{470} \times V_T) / (W \times V_S \times 0.01 \times t)$$

式中过氧化物酶活性单位为 $\mu\text{g}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$; ΔA_{470} 为反应时间内吸光度的变化; W 为材料鲜重, 单位为 g; t 为反应时间, 单位为 min; V_T 为提取酶液总体积, ml; V_S 为测定时取用酶液体积, 单位为 ml

MDA 含量及 SOD 和 POD 活性测定实验处理组与对照组各设 3 个平行组, 结果取其平均值

2 结果与分析

经过不同强度的电场处理后, 苜蓿幼苗的 MDA、SOD、POD 的测定结果见表 2。与对照组相比, 各项指标的变化情况分析见图 1 (MDA)、图 2 (SOD) 和图 3 (POD)

2.1 电场处理对 MDA 的影响

从图 1 可见, 在经过 11 个电场处理的材料中, 有 6 个 MDA 水平低于对照, 1 个与对照相同, 其余 4 个高于对照, 其变化幅度为 22.8% ~ 34.8%。

2.2 电场处理对苜蓿幼苗 SOD 酶活性的影响

从图 2 可以看出, 电场处理后, SOD 酶活性普遍降低, 降低幅度为 7.7% ~ 57.7%, 其中, 个别几点的降低幅度较大, 场强为 4.5kV/cm 时达到 57.7%; 场强在 2kV 和 2.5kV 时相对较高, 降低幅度分别为 15.6% 和 7.7%。

2.3 电场处理对苜蓿幼苗 POD 酶活性的影响

从表 2 和图 3 的数据可以看出, 与 SOD 一样, 经处理后的 POD 酶活性也都低于处理前, 降低幅度为

0.5%~59.4%,场强在1.5kV/cm时达到最低点为59.4%,场强在2kV和2.5kV相对较高,降低幅度分别为22.6%、26.3%。

表2 苜蓿幼苗的MDA SOD POD测定结果

Table 2 Analysis results of Alfalfa seedling MDA SOD POD

电场强度 Electric field intensity	MDA ($\mu\text{mol/L}$)	SOD ($\text{U/g} \cdot \text{min}$)	POD ($\text{U/g} \cdot \text{min}$)
E_0	1.25	3481	217
E_1	1.23	2439	142
E_2	1.06	2134	106
E_3	1.18	2240	88
E_4	1.39	2936	127
E_5	1.37	3212	168
E_6	1.22	2176	160
E_7	1.17	2346	115
E_8	1.54	2214	148
E_9	1.54	1475	143
E_{10}	1.38	2168	183
E_{11}	0.82	2296	216

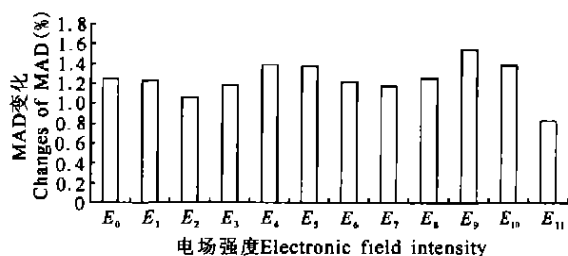


图1 MDA含量的变化情况

Fig. 1 Changes of the MDA contents

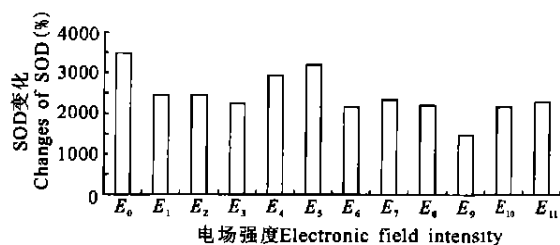


图2 电场对SOD酶活性的影响

Fig. 2 The effects of electronic field on SOD isoenzyme activity

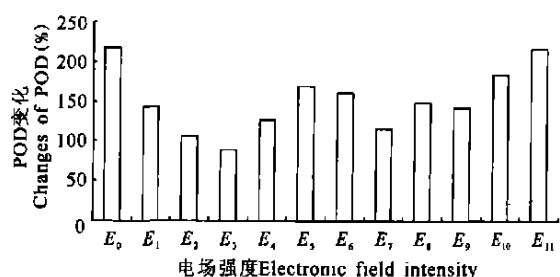


图3 电场对POD酶活性的影响

Fig. 3 The effect of electronic field on POD isoenzyme activity

3 讨论

MDA在高温、酸性条件下与硫代巴妥酸反应,形成在532nm波长处有最大光吸收的有色三甲基复合物,该复合物在600nm波长处有最小光吸收;植物器官衰老时,或在逆境条件下,往往发生膜脂过氧化作用,MDA是其产物之一,MDA积累,增加膜透性^[12]。静电场处理过的材料和未处理过的相比,在这项指标上显示出较大的差异,处理后的MDA含量普遍低于未处理的,说明即使在未发生水分胁迫的情况下,静电处理后也有助于提高膜的稳定性和抗性。

SOD可抑制氮蓝四唑在光下的还原作用来确定酶活性大小,在有氧化物存在下,核黄素可被还原,被还原的核黄素在有氧的条件下极易再氧化而产超氧阴离子自由基,超氧阴离子自由基可将氮蓝四唑还原为蓝色的甲脎,后者在560nm处有最大吸收,SOD可清除超氧阴离子自由基,来抑制甲脎的形成。光还原反应后,反应液蓝色愈深,表明酶活力愈低。在POD的催化下, H_2O_2 将愈创木酚氧化成茶褐色产物,此产物在470nm处有最大光吸收,故可通过测470nm下的吸光度变化测定POD的活性^[13]。过氧化物POD是植物体内普遍存在的,活性较高的酶,它与呼吸作用、光合作用及生长素的氧化等都有密切关系,在植物生长发育过程中,它的活性不断变化,测量这种酶,可以反映某一时期植物体内代谢的变化^[14]。

从本次实验结果可以看出,未发生水分胁迫的苜蓿材料在静电处理后与对照(未处理)相比,其SOD值都低于对照。这个结果与MDA的测定结果没有正相关。在正常情况下,MDA积累就会启动保护酶系统来清除超氧阴离子自由基。静电处理使MDA的含量降低,在这种较为有利的生存环境下,膜没有受到伤害,其保护酶系统不会被启动。因此,SOD、POD的含量降低就很正常了。经过对3种指标做纵向比较,我们发现:场强在0.5~0.3kV范围内,MDA、SOD、POD的整体变化趋势一致,即MDA下降,相应的SOD、POD的也下降;反之,均升高。说明当MDA发生积累(升高)时,SOD、POD也立刻增加,以清除MDA。至于MDA含量下降会促进保护酶含量的下降,还不清楚。

综上所述,在未发生水分胁迫时,静电处理苜蓿种子对其幼苗期酶活性的影响有以下结论:

(1)静电场处理苜蓿种子其幼苗期MDA与对照

(下转第79页 Continue on page 79)

小,相关性也最差,这与养殖池换水量较小、盐度变化不大有关

3 结束语

本研究中,养殖水体中的硝酸盐、亚硝酸盐含量以工厂化养殖水体显著偏高,所有试验池均具有随时间增加而升高的良好规律。但该养殖水体中叶绿素 a 含量却明显偏低,高氮低植物生物量特征极为明显,可能与养殖水体中有机污染物明显积累、水质状况欠佳有关。而普通养殖水体中的硝酸盐、亚硝酸盐含量显著偏低,以致出现零值分布,但与之相应的叶绿素 a 含量却明显偏高,低氮高植物生物量特征极为显著,氮限制状况已极为明显,而且在时间变化上没有明显规律性。

相关分析结果表明,影响养殖水体中硝酸盐和亚硝酸盐含量的主要因素以化学作用的输入和生物吸收的输出为主,前者从与 COD 之间的显著正相关中体现,后者则从与叶绿素 a 的显著负相关中体现。

(上接第 75 页 Continue from page 75)

相比普遍降低,这说明静电处理可以增加膜的稳定性,从而提高其抗性。

(2) SOD、POD 与对照相比普遍降低,说明 SOD、POD 的启动依赖于 MDA 的积累。

(3) 与对照组相比,处理组苜蓿苗的 SOD、POD 值均没有明显变化,从而推断静电处理对未发生胁迫的苜蓿幼苗酶活性的影响不大。

另外,由于根据愈创木酚法测定 POD 的酶活性,要求酶液在 pH 值 5.5 的磷酸缓冲液中提取,但从文献 [13, 14] 中我们发现,POD 的提取对 pH 值的要求不高,所以在粗酶提取时,采取了一次性用 pH 值 7.0 的提取介质提取粗酶。为了进一步了解 pH 值的变化所造成的影响,我们又做了一个对比的实验,即用 pH 值 5.5 和 pH 值 7.0 的不同提取介质进行酶液的提取,分别测定 POD,两组 (3 个平行的) 平均值分别为 367、422,不存在差异,这又验证了 pH 值对 POD 酶活性影响不大这一结论。

参考文献:

- [1] 中国饲用植物志编辑委员会. 中国饲用植物志 [M]. 第 1 卷. 北京: 农业出版社, 1987.
- [2] 内蒙古植物志编辑委员会. 内蒙古植物志 [M]. 第 3 卷. 呼和浩特: 内蒙古人民出版社, 1989.
- [3] 邓鸿模, 虞锦岚, 周艾民, 等. 高压静电植物速成栽培技术的研究 [J]. 现代静电科学技术研究, 2000, 9: 202-205.
- [4] 陈德恩. 生物静电效应的利用与开发 [J]. 氨基酸和生物

参考文献:

- [1] 刘梦霞, 刘岗. 水产养殖生产中水质的监测与控制 [J]. 海水养殖综述, 2000, (55): 41-46.
- [2] 李兰生, 李冰, 林洪, 等. 半封闭虾池中三氮与溶解氧含量关系的数学模型 [J]. 海洋湖沼通报, 2000, (1): 52-59.
- [3] 石强, 陈江麟, 李崇德. 渤海硝酸盐氮和亚硝酸盐氮季节循环分析 [J]. 海洋通报, 2001, 20(6): 32-39.
- [4] 舒廷飞, 温琰茂, 汤叶涛. 养殖水环境中氮的循环与平衡 [J]. 水产科学, 2002, 21(2): 30-34.
- [5] GB17378.4-1998, 海洋监测规范 [S].
- [6] 李兰生, 林洪, 卢敬让, 等. 虾池生态系的氮平衡及氨水平的生物调控虾池中三氮的动态趋势 (I) [J]. 海洋湖沼通报, 1999, (4): 53-57.
- [7] 王宪, 秦爱红, 李文权. 网箱养殖区底层水 N 的硝化作用分析 [J]. 海洋环境科学, 2003, 22(2): 37-39.

(责任编辑: 邓大玉)

资源, 2002, 24(2): 26-30.

- [5] 征荣, 许月英, 杨体强, 等. 电场处理苜蓿种子对其幼苗期生长的影响 [J]. 内蒙古大学学报 (自然科学版), 2002, 33(3): 359-362.
- [6] 杨体强, 侯建华, 苏恩光, 等. 电场对油菜种子苗期干旱胁迫后生长的影响 [J]. 生物物理学报, 2000, 16(4): 780-784.
- [7] 郑林, 朱世威. 高压静电场对马尾松、黑松种子活力的影响 [J]. 生物物理学报, 2000, 3(1): 32-36.
- [8] 王梓, 李肃华, 伟红, 等. 高压静电场对月见草种子萌发的生物学效应 [J]. 生物物理学报, 1997, 13(4): 665-670.
- [9] 赵剑, 杨文杰, 马福荣. 高压电场对苜蓿叶片愈伤组织诱导的影响 [J]. 生物物理学报, 1996, 12(3): 517-521.
- [10] 赵剑, 杨文杰, 马福荣, 等. 静电场对苜蓿愈伤组织抗寒能力的影响 [J]. 生物物理学报, 1997, 13(4): 406-412.
- [11] 范青, 田世平, 汪沂, 等. 高压静电场对柑桔青、绿霉病菌的抑制效果 [J]. 生物物理学报, 2000, 16(3): 634-638.
- [12] 张晓岗, 李洪山. 梭梭幼苗抗旱性与生物自由基、膜伤害关系初探 [J]. 新疆大学学报 (自然科学版), 1994, 11(3): 87-90.
- [13] 李合生, 孙群, 赵世杰, 等. 植物生理生化实验原理和技术 [M]. 北京: 高等教育出版社, 2000.
- [14] 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以及质膜相对透性变化 [J]. 植物生理学通讯, 2000, 36(1): 11.

(责任编辑: 邓大玉)