

谷文英,牟莹莹,钱 泽,等. 外源甜菜碱对盐胁迫下菊苣幼苗线粒体膜氧化损伤的缓解作用[J]. 江苏农业科学,2013,41(7):198-201.

外源甜菜碱对盐胁迫下菊苣幼苗线粒体膜氧化损伤的缓解作用

谷文英¹, 牟莹莹¹, 钱 泽¹, 薛 洋¹, 高洪文²

(1. 扬州大学动物科学与技术学院, 江苏扬州 225009; 2. 中国农业科学院北京畜牧兽医研究所, 北京 100193)

摘要:以菊苣为材料,对出苗后 7 d 的幼苗用 280 mmol/L NaCl、280 mmol/L NaCl + 外源 2.5 mmol/L 甜菜碱、2.5 mmol/L 甜菜碱进行处理,另设空白对照组,5 d 后测定幼苗的生长情况,超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化物酶(POD)的活性以及幼苗线粒体内 H₂O₂、丙二醛(MDA)含量和 $D_{550\text{ nm}}/D_{630\text{ nm}}$,以探讨外源甜菜碱对盐胁迫下菊苣幼苗线粒体膜氧化损伤的缓解作用。结果表明:与空白对照相比,盐胁迫能降低菊苣幼苗的鲜重和 $D_{550\text{ nm}}/D_{630\text{ nm}}$ ($P < 0.05$);菊苣幼苗 SOD 和 POD 活性有所上升($P < 0.05$),H₂O₂ 和 MDA 含量增加($P < 0.05$)。与盐胁迫组相比,外源甜菜碱能显著提高幼苗鲜重和 $D_{550\text{ nm}}/D_{630\text{ nm}}$ ($P < 0.05$),并能进一步增强 SOD 和 POD 活性,而降低 H₂O₂ 和 MDA 含量;单独甜菜碱处理组与空白组无明显差异。说明外源甜菜碱可以通过减轻幼苗线粒体膜的氧化损伤而缓解盐害。

关键词:甜菜碱;盐胁迫;菊苣;线粒体

中图分类号: S681.104⁺.1

文献标志码: A

文章编号: 1002-1302(2013)07-0198-03

线粒体既是细胞氧化磷酸化、合成 ATP 的主要场所,也是活性氧(reactive oxygen species)产生的主要细胞器。虽然活性氧对细胞周期、细胞凋亡、细胞壁的形成和发育以及细胞的形态有重要的调控作用,但在逆境条件下,细胞及包括线粒体在内的细胞器也会因大量的活性氧积累而受到氧化伤害,如酶活性降低、膜脂质过氧化等^[1]。甜菜碱(glycine betaine)是植物细胞在胁迫环境下合成的、分子量低、溶解度高且无毒的细胞相容物质,内源或外源甜菜碱具有保护光系统 II、稳定膜结构和缓解氧化损伤的作用^[2],如降低盐胁迫绿豆(*Vigna radiata*)幼苗中 H₂O₂ 和脂质过氧化水平^[3],增强盐胁迫玉米(*Zea mays* L.)抗氧化酶超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化物酶(POD)和过氧化氢酶(CAT)的活性^[4],保护水稻(*Oryza sativa* L.)幼苗线粒体、叶绿体中的类囊体和基粒的结构^[5]。迄今为止,关于外源甜菜碱对盐胁迫亚细胞的作用的研究多见于叶绿体,有关线粒体的则较少且集中在根尖和根冠细胞质中的线粒体数量变化上^[5],对其膜生理生化特性的影响尚未见报道。本研究以适应性强、用途广泛^[6]且具有一定耐盐性^[7-9]的菊科植物菊苣(*Cichorium intybus* L.)为材料,通过外源甜菜碱的施用,研究盐胁迫下外源甜菜碱对其幼苗生长及线粒体氧化伤害的影响,以期阐明外源甜菜碱的作用机制提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料来源与处理

收稿日期:2012-12-03

基金项目:现代农业产业技术体系建设专项(编号:Z09090501040902);江苏高校优势学科建设工程资助(编号:5J2011092506)。

作者简介:谷文英(1969—),女,博士研究生,讲师,主要从事牧草科研工作。E-mail:guwy@yzu.edu.cn。

通信作者:高洪文,研究员,博士生导师,研究方向为牧草种质资源及抗逆机理。Tel:(010)62894560;E-mail:gaohongwenbj@126.com。

菊苣品种为将军[*Cichorium intybus* L. cv. Commander (Commander chicory)],原产于美国俄勒冈州,由百绿(天津)国际草业有限公司提供。

根据预试验所确定的甜菜碱浓度和盐浓度,对种子进行如下处理:2.0% NaClO 浸泡消毒 10 min,用自来水冲洗干净,之后播种于内装黄沙、底部有孔的育苗盘中。自来水浇灌,出苗后间苗使每孔有 10 株幼苗。7 d 后设置 280 mmol/L NaCl(盐处理组, N)、2.5 mmol/L 甜菜碱(甜菜碱处理组, G),同时含有甜菜碱和盐的处理组(NG),以不加 NaCl 和甜菜碱的 1/2 Hoaglands 营养液为对照组(C)^[10]。处理液以 70 mmol/L NaCl 的浓度递增,至最终浓度后,各处理均继续处理 5 d,然后用自来水清洗幼苗根部沙粒,吸水纸擦干水分后按各测定指标的要求取样。

1.2 测定方法

1.2.1 菊苣幼苗生长指标的测定 每组取 15 株幼苗,用分析天平测定其鲜重,然后将幼苗放入 105 ℃ 烘箱杀青 10 min,再用 70 ℃ 烘干 24 h 后称其干重,最后计算各组幼苗单株的鲜重和干重^[11]。

1.2.2 抗氧化酶活性测定 用分析天平称取各组幼苗 0.2 g,用于抗氧化酶的测定。SOD 和 POD 活性的测定按照试剂盒(购于南京建成生物工程研究所)的说明进行。

1.2.3 线粒体的提取 用分析天平称取各组幼苗 1.0 g,置于预冷的研钵中,用 2.5 mL 缓冲液(50 mmol/L Tris-HCl、400 mmol/L 甘露醇、10 mmol/L EDTA、1 mg/mL BSA、0.05% 巯基乙醇, pH 值 7.4)冰浴研磨成浆,4 ℃ 1 000 g 离心 5 min;取上清液,4 ℃ 12 000 g 离心 10 min;弃上清液,沉淀用 3 mL 缓冲液悬浮^[12]。

1.2.4 H₂O₂ 含量的测定 取悬浮线粒体提取液 1 mL,稀释 1 倍,测定 410 nm 波长吸光度^[12]。

1.2.5 MDA 含量测定 取线粒体悬浮液 2.0 mL,加入同体积含 0.5% 硫代巴比妥酸的 2.5% 三氯醋酸,沸水浴 15 min,

测 $D_{532\text{ nm}}$ 和 $D_{600\text{ nm}}$, 以 $D_{532\text{ nm}}/D_{600\text{ nm}}$ 表示线粒体膜 MDA 的含量^[12]。

1.2.6 细胞色素 c/a 测定 将线粒体悬浮液摇匀, 取 0.5 mL, 加入 2.5 mL 2 mg/mL 牛血清白蛋白溶液。用紫外分光光度计检测 $D_{550\text{ nm}}/D_{630\text{ nm}}$, 2 种波长的吸光度之比为细胞色素 c/a^[13]。

1.3 数据分析

除生长指标外, 其余试验均重复 3 次。用 Excel 2003 和 PASW 18.0 软件进行数据处理和分析, 采用单因子方差分析法 (One - Way ANOVA) 和最小显著差异法 (LSD) 进行方差分析和多重比较。

2 结果与分析

2.1 外源甜菜碱对幼苗生长的影响

经过 5 d 的处理, 各组幼苗形态差异较大。从图 1 可以看出, 与对照组相比, 经过盐胁迫的植株生长明显受到抑制, 地上部分比地下部分更明显。盐处理的植株变短, 子叶显得肥厚且颜色较深, 真叶不生长。由图 2 可知, 盐处理组的幼苗鲜重低于对照组 ($P < 0.05$); 而施用外源甜菜碱后, 无论是否存在盐胁迫, 幼苗的鲜重均高于盐处理组 ($P < 0.05$)。幼苗干重的变化趋势与鲜重相似, 只是与盐处理组相比, 外源甜菜碱对菊苣幼苗干重的影响不是很明显。

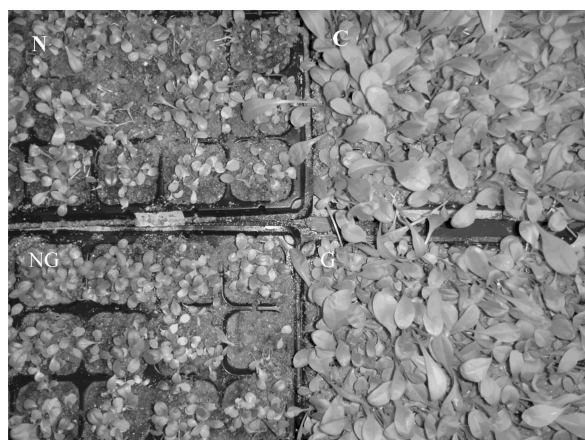


图1 不同处理对菊苣幼苗形态的影响

2.2 外源甜菜碱对 SOD 和 POD 活性的影响

从图 3 可以看出, 盐处理 5 d 后, 菊苣幼苗 SOD 和 POD 活性均有所升高, 高于对照组和甜菜碱组; 而外源甜菜碱的施

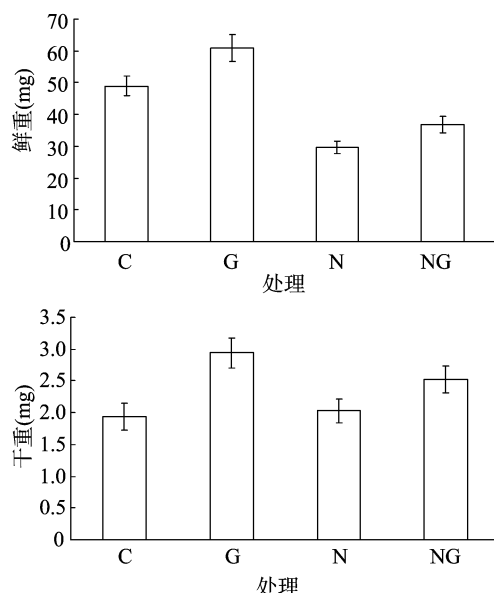


图2 不同处理对菊苣幼苗生物量的影响

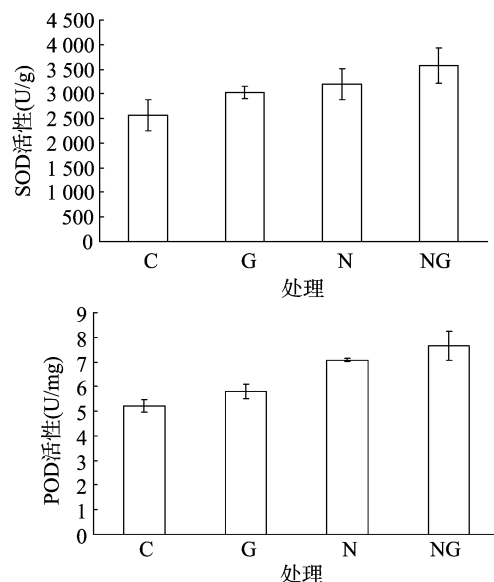


图3 外源甜菜碱对SOD和POD活性的影响

用则进一步增强了 SOD 和 POD 活性, 且高于对照组和甜菜碱组 ($P < 0.05$)。

2.3 外源甜菜碱对线粒体 $D_{550\text{ nm}}/D_{630\text{ nm}}$ 的影响

从图 4 可以看出, 与对照相比, 单独施用外源甜菜碱使 $D_{550\text{ nm}}/D_{630\text{ nm}}$ 略有上升, 而盐处理组则显著降低 ($P < 0.05$), 为对照的 72.80%; 施用外源甜菜碱后, 盐处理组的菊苣线粒体 $D_{550\text{ nm}}/D_{630\text{ nm}}$ 升高至 1.04, 高于盐处理组的 0.91 ($P < 0.05$)。说明盐胁迫下施用外源甜菜碱可以提高 $D_{550\text{ nm}}/D_{630\text{ nm}}$ 。

2.4 外源甜菜碱对线粒体 H_2O_2 含量、脂质过氧化的影响

由图 5 可知, 与对照组相比, 甜菜碱组的 H_2O_2 和 MDA 含量略有下降; 而盐处理组的则升高 ($P < 0.05$), 其 H_2O_2 和 MDA 含量分别为 1.19、0.13, 高于其他各处理组。外源甜菜碱的施用使盐胁迫菊苣线粒体的 H_2O_2 和 MDA 含量略有下降, 但差异不显著。这说明外源甜菜碱虽然在一定程度上可以缓解线粒体膜脂过氧化, 但是效果不显著。

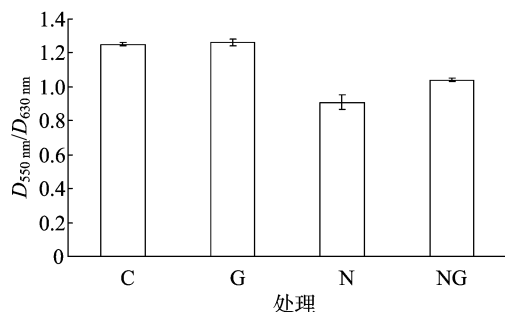


图4 外源甜菜碱对线粒体 $D_{550\text{ nm}}/D_{630\text{ nm}}$ 的影响

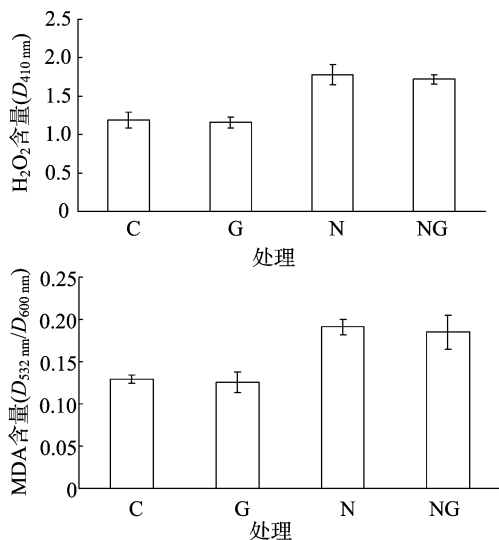


图5 外源甜菜碱对线粒体 H_2O_2 和 MDA 含量的影响

3 结论与讨论

盐分对植物最显著的效应就是抑制生长,表现为植株矮小和产量降低^[14],而外源甜菜碱能够提高许多植物,如对非生物胁迫的耐逆性,增强其生长能力并提高其产量^[15],使盐胁迫玉米^[16]、小麦^[17]、茄子^[18]等作物的产量得以提高,正如本研究中盐胁迫下菊苣幼苗的生长表现。但是,外源甜菜碱对盐胁迫菊苣生长的促进作用在鲜重上表现得非常明显,对干重的影响则不大。

植物响应盐胁迫并在细胞水平上的表现之一是通过氧化还原代谢去除过量的活性氧并重建细胞内的氧化还原平衡^[19]。在正常情况下,植物能调控其产生和移除速率,但是逆境胁迫会导致大量活性氧的生成^[20],而这些过量的活性氧又能激活其内部的某些抗氧化机制^[21],上调 SOD、CAT、抗坏血酸过氧化物酶 (APX)、谷胱甘肽还原酶 (GR) 等抗氧化酶基因的表达^[22]。线粒体是活性氧产生的主要细胞器,其产生的 H_2O_2 是活性氧中存活时间较长且可以跨膜移动的小分子物质,能进一步转化成氧化性更强的羟自由基、氧化膜脂等有机物质,促使线粒体膜脂过氧化产物 MDA 含量增加。通过对线粒体膜相关指标的测定发现,盐处理使线粒体膜 H_2O_2 和 MDA 含量高于对照 ($P < 0.05$), $D_{550\text{ nm}}/D_{630\text{ nm}}$ 下降 ($P < 0.05$),说明膜脂过氧化程度较高,膜结构受损, $D_{550\text{ nm}}$ 从线粒体内膜上脱落,而此时菊苣幼苗的 SOD 和 POD 活性均高于对照,如同盐胁迫下野杏树的酶活性变化一样^[23];当施

加外源甜菜碱后, H_2O_2 和 MDA 含量有所降低,而 $D_{550\text{ nm}}/D_{630\text{ nm}}$ 显著上升;SOD 和 POD 酶的活性进一步增强,且显著高于对照,与中等感盐小麦品种很相似^[24]。说明外源甜菜碱通过提高抗氧化酶的活性尤其是 SOD 和 POD 活性能缓解线粒体膜的脂质过氧化,减少细胞色素 c 的释放,从而保护呼吸链的完整和细胞的功能。结合菊苣的生长表现可知,菊苣在受到盐胁迫时,外源甜菜碱可以使其鲜重显著增加,在一定程度上保护线粒体膜的完整和功能,这可能是其对盐胁迫有所缓解的内在机制。

参考文献:

- [1] 王文斌. 植物活性氧代谢及其利用[M]. 北京:中国农业科学技术出版社,2011:12-19.
- [2] Chen T H H, Murata N. Glycinebetaine protects plants against abiotic stress; mechanisms and biotechnological application space[J]. Plant Cell and Environment, 2011, 34(1): 1-20.
- [3] Hossain M A, Fujita M. Evidence for a role of exogenous glycinebetaine and proline in antioxidant defense and methylglyoxal detoxification systems in mung bean seedlings under salt stress[J]. Physiol Mol Biol Plants, 2010, 16(1): 19-28.
- [4] Nawaz K, Ashraf M. Exogenous application of glycinebetaine modulates activities of antioxidants in maize plants subjected to salt stress[J]. Journal of Agronomy and Crop Science, 2010, 196(1): 28-37.
- [5] Rahman M S, Miyake H, Takeoka Y. Effects of exogenous glycinebetaine on growth and ultrastructure of salt-stressed rice seedlings (*Oryza sativa* L.)[J]. Plant Prod Sci, 2002, 5(1): 33-44.
- [6] 罗燕, 白史旦, 彭燕, 等. 菊苣种质资源研究进展[J]. 草业科学, 2010, 27(7): 123-132.
- [7] Boyd D C, Rogers M E. Effect of salinity on the growth of chicory (*Cichorium intybus* cv. Puna)—a potential dairy forage species for irrigation areas[J]. Australian Journal of Experimental Agriculture, 2004, 44(2): 189-192.
- [8] 孙磊, 隆小华, 李洪燕, 等. 不同浓度海水对菊苣幼苗生长及生理特性的影响[J]. 生态学杂志, 2009, 28(3): 405-410.
- [9] 孙磊, 隆小华, 刘兆普, 等. 海水灌溉欧洲菊苣盐肥耦合效应[J]. 生态学杂志, 2010, 29(1): 36-42.
- [10] 宁建凤, 郑青松, 邹献中, 等. 罗布麻对不同浓度盐胁迫的生理响应[J]. 植物学报, 2010, 45(6): 689-697.
- [11] 王树凤, 胡韵雪, 李志兰, 等. 盐胁迫对弗吉尼亚栎生长及矿物质离子吸收、运输和分配的影响[J]. 生态学报, 2010, 30(17): 4609-4616.
- [12] 钱琼秋, 宰文娜, 何勇, 等. 外源硅和辅酶 Q_{10} 对盐胁迫下黄瓜根系线粒体的保护作用[J]. 中国农业科学, 2006, 39(6): 1208-1214.
- [13] 张兆波, 毛志泉, 朱树华. 6 种酚酸类物质对平邑甜茶幼苗根系线粒体及抗氧化酶活性的影响[J]. 中国农业科学, 2011, 44(15): 3177-3184.
- [14] 王宝山. 逆境植物生物学[M]. 北京:高等教育出版社, 2010:63.
- [15] Chen T H, Murata N. Glycinebetaine: an effective protectant against abiotic stress in plants[J]. Trends in Plant Science, 2008, 13(9): 499-505.
- [16] Nawaz K, Ashraf M. Exogenous application of glycinebetaine modulates activities of antioxidants in maize plants subjected to salt stress[J]. J Agron Crop Sci, 2009, 196(1): 28-37.

胡 辉,黄光中,尧国民,等. 兔感染球虫病继发大肠杆菌病的诊断及病因分析[J]. 江苏农业科学,2013,41(7):201-202.

兔感染球虫病继发大肠杆菌病的诊断及病因分析

胡 辉¹,黄光中¹,尧国民¹,苏五珍¹,罗世民¹,胡 艳²

(1. 怀化职业技术学院,湖南怀化 418000; 2. 江苏省家禽科学研究所/江苏省家禽遗传育种重点实验室,江苏扬州 225125)

摘要:2012 年 11 月湖南省怀化市某县大型兔场发生以腹泻为主的疫情,死亡率达 5.3%。通过对发病情况调查,结合临床症状、剖检变化和实验室诊断,确诊为兔球虫病继发感染大肠杆菌病,经过药物治疗,病情得以控制。

关键词:兔球虫病;大肠杆菌;诊断;防治

中图分类号:S852.729 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2013)07-0201-02

兔球虫病是由艾美尔属的多种球虫引起的一种常见兔体内寄生虫病,各品种的家兔都易感,尤以断奶至 3 月龄的幼兔发病率和死亡率最高。一年四季均可发生,以高温、高湿季节发病最严重。在发生兔球虫病的同时又容易继发大肠杆菌病,常因场地和兔笼的污染而引起大流行,增加了死亡率^[1]。在饲料中全程添加速康散、氯苯胍,效果较好;但是,球虫几乎对所有使用过的抗球虫药物都易产生耐药性,球虫一旦产生耐药性就不可避免地会对养兔业造成很大危害^[2]。2012 年 11 月,湖南省怀化市某县大型兔场发生一起感染兔球虫病继发大肠杆菌病的疫情,损失较大,经药物治疗,病情得以控制。

1 发病情况

怀化市某县一存栏 2 万余只兔的兔场采取分层笼养。2012 年 11 月 2 日,6 000 余只兔子发生以腹泻为主的病情,11 月 5 日开始出现死亡现象,到 11 月 12 日已死亡 320 只,死亡率达 5.3%。兔场自行诊断怀疑是兔球虫病,并作为该病进行治疗,其间曾用地克珠利饮水治疗,磺胺二甲氧嘧啶肌肉

注射,但效果不明显。12 月 19 日来就诊。

2 临床症状

畜主带来 4 只病兔,其中 2 只在途中死亡(路途耗时 3.5 h)。病兔精神沉郁,被毛粗乱,眼角分泌物比较多,腹部膨胀;粪便呈褐色,有腥臭味,排尿频繁(量少),腹围增大,肛门和后肢的被毛沾有黏液或黄色水样稀粪,粪便中带有胶样黏液和一些梭形的干粪。

3 剖检变化

解剖 3 只兔(40 日龄,2 只死兔、1 只活兔),剖解变化如下:盲肠积便;肝肿大,未见明显感染球虫的病灶;肾肿胀;胃膨大,充满多量液体和气体;肠易破,小肠肠壁薄而透明,内充满清亮糊状液体,肠黏膜脱落,内有大量气体;肠有卡他性炎症,结肠内有纤维性凝乳块(2/3);十二指肠充满气体和染有胆汁的黏液状液体(1/3);结肠扩张,有透明胶样黏液(2/3);肠内粪球细长,两头尖,外面包有黏稠液;胆囊扩张,黏膜水肿(1/3)。

4 诊断

从发病情况和病理变化初步诊断为因前期感染兔球虫病继发大肠杆菌病。根据临床症状和剖检变化,笔者首先怀疑球虫感染,直接取肝组织触片见少量球虫卵囊,在典型病变肠

收稿日期:2013-01-06

基金项目:湖南省科学计划(编号:2011NK3162、2012FJ4483);湖南省教育厅科学研究项目(编号:12JC1204)。

作者简介:胡 辉(1970—),女,湖南宁远人,硕士,副教授,从事动物医学教学及技术服务。E-mail:huhui5909@126.com。

通信作者:胡 艳,高级兽医师。E-mail:huyan0128@126.com。

- [17] Mahmood T, Ashraf M, Shahbaz M. Does exogenous application of glycine betaine as a pre-sowing seed treatment improve growth and regulates omekey physiological attributes in wheat plants grown under water deficit conditions [J]. Pak J Bot, 2009, 41 (3): 1291-1302.
- [18] Abbas W, Ashraf M, Akram N A. Alleviation of salt-induced adverse effects in eggplant (*Solanum melongena* L.) by glycinebetaine and sugarbeet extracts [J]. Scientia Horticulturae, 2010, 125 (3): 188-195.
- [19] Julia K, Claudia J. Drought, salt, and temperature stress-induced metabolic rearrangements and regulatory networks [J]. Journal of Experimental Botany, 2012, 63 (4): 1593-1608.
- [20] Banu N A, Hoque A, Watanabe Sugimoto M, et al. Proline and glycinebetaine induce antioxidant defense gene expression and suppress cell death in cultured tobacco cells under salt stress [J].

- Journal of Plant Physiology, 2009, 166 (2): 146-156.
- [21] Mittler R, Vanderauwera S, Gollery M et al. Reactive oxygen gene network of plants [J]. Trends in Plant Science, 2004, 9 (10): 490-498.
- [22] Türkan I, Demiral T. Recent developments in understanding salinity tolerance [J]. Environmental and Experimental Botany, 2009, 67 (1): 2-9.
- [23] Sorkheh K, Shiran B, Rouhi V, et al. Salt stress induction of some key antioxidant enzymes and metabolites in eight Iranian wild almond species [J]. Acta Physiologiae Plantarum, 2012, 34: 203-213.
- [24] Raza S H, Athar H R, Ashraf M, et al. Glycinebetaine induced modulation of antioxidant enzymes activities and ion accumulation in two wheat cultivars differing in salt tolerance [J]. Environmental and Experimental Botany, 2007, 60 (3): 368-376.