

低温胁迫对紫花苜蓿根系呼吸作用的影响

刘美君,丁鹿,王丽娜,黄心如

(新疆农业大学 草业与环境科学学院/新疆草地资源与生态实验室,新疆 乌鲁木齐 832005)

摘要:呼吸作用是没有叶绿体的苜蓿根系唯一的能量来源,以新牧4号为试验材料,分别在26℃、12℃和4℃温度处理后,研究了低温对苜蓿根系呼吸作用的影响。结果表明:低温显著抑制苜蓿根系的生长,其中4℃处理后苜蓿根系生长受抑程度最大。随着处理温度的下降,根系细胞脯氨酸含量和电导率显著上升,这表明虽然苜蓿根系通过自身渗透调节作用抵御低温胁迫,但4℃低温仍旧破坏了根系细胞膜结构。与对照相比,12℃和4℃低温处理后,苜蓿根系细胞总呼吸、细胞色素途径(COX)和交替氧化酶途径(AOX)呼吸速率及ATP含量呈现不同程度的下降,4℃处理后下降程度最显著。这表明,低温胁迫显著抑制根系呼吸代谢,导致根系细胞能量供应不足。此外,不同温度低温处理后根系细胞AOX呼吸的比率逐渐增加,但H₂O₂含量也显著增加,这表明4℃低温下根系AOX的上调不足以清除活性氧对细胞的伤害。

关键词:低温胁迫;呼吸电子传递;活性氧;根系;紫花苜蓿

中图分类号:Q945 **文献标志码:**A **文章编号:**1009-5500(2020)04-0022-06

DOI: 10.13817/j.cnki.cyyecp.2020.04.004

苜蓿(*Medicago sativa*)是多年生豆科牧草,具有耐旱、耐寒、耐盐碱、耐贫瘠、耐频繁刈割及经济效益高等特点^[1],其适应性强、根系发达、分枝多、产量高,既可防风固沙,又是优质的高蛋白饲料^[2]。根颈是吸收、运输、储存养分和水分的重要器官,直接影响植物的再生性、耐寒性、耐旱性和抗病虫害性等生产性能和植物的可持续利用^[2],对苜蓿越冬和春季返青时的萌芽发枝至关重要。苜蓿越冬死亡是很多地区苜蓿生产面临的主要问题,苜蓿的耐寒性与其根部密切相关。呼吸作用是没有叶绿体的根部的唯一的能量来源,同时是维持生命活动最主要的生理过程之一,也是衡量生命活动强弱的重要指标。线粒体是细胞物质代谢和能量代谢的枢纽,在植物生长代谢过程中起重要的作用,同时线粒体也是逆境胁迫的主要伤害位点之一,在生物和非生物逆境胁迫下细胞线粒体正常功能的维持对生

物抵抗逆境能力的大小起至关重要的作用^[3]。

王运涛等^[4]以国内外的5个苜蓿品种为试验材料,对其进行低温胁迫,观测比较了缓苗成活率和根系形态指标,罗新义等^[5]以及申晓慧等^[6]通过对低温胁迫下紫花苜蓿叶片SOD、脯氨酸和电导率等生理生化指标的测定,确定了其抗寒生理特性。李莎莎等^[7]对低温胁迫下接种和不接种根瘤菌的紫花苜蓿的地上部分及地下部分的相对电导率、丙二醛(MDA)、超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)、过氧化物酶(POD)、脯氨酸、可溶性蛋白、可溶性糖等指标进行了测定。

目前,国内外有关苜蓿根部的研究主要集中于根系形态发育、根蘖特性与环境的关系等方面,有关苜蓿能量代谢的研究较少。因此,本文采用人工控制温度及光照条件的方法,分析了低温胁迫对苜蓿根系呼吸作用的影响,以阐明根部能量代谢对苜蓿根系低温耐性的影响,为紫花苜蓿的品种选育及栽培提供理论支持,对提高苜蓿的抗寒性具有重要的理论和实际意义。

1 材料和方法

1.1 材料

实验材料为新牧4号紫花苜蓿(*Medicago sativa*)

收稿日期:2019-10-12; 修回日期:2019-11-07

基金项目:新疆农业大学校内前期资助一般课题(XJAU 201604)

作者简介:刘美君(1988-),女,山西五台人,博士,讲师,主要从事牧草生理方面的研究。

E-mail:lebaby7@163.com

cv. Xinmu No. 4), 将供试紫花苜蓿种子先用 98% 浓硫酸处理 25 min, 再用 5% 次氯酸钠溶液消毒 5 min, 最后用去离子水清洗 5 遍。在培养室恒温 26℃ 下进行培养, 每周浇 3 次 Hoagland's 营养液以促进其生长。

1.2 处理

植株生长到幼苗时期(长出两片子叶)时, 将长势一致的完整植株移至人工气候培养箱内, 分别进行 26℃、12℃ 和 4℃ 处理, 处理 72 h 后, 取根系样品, 测定各生理指标。

1.3 测定指标及方法

不同温度处理前, 测定根长, 处理 36 h 和 72 h 后, 分别取出植株, 并测定根长。

利用 Clark 型液相氧电极(Oxygenlab 2, 汉莎), 分别在 26℃、12℃ 和 4℃ 下测量根系组织耗氧量, 测定细胞总呼吸速率、线粒体交替氧化酶(AOX)途径以及细胞色素氧化酶(COX)途径电子传递链速率^[8]。根系活力采用氯化三苯基四氮唑(TTC)法测定^[8]。脯氨酸含量采用水合茚三酮法测定^[8]。

ATP 含量采用 ATP 生物体发光检测试剂盒测定^[9]。取 2 g 根尖于 2 mmol/L MgSO₄ 溶液中裂解, 30℃ 水浴保温 10 min。裂解液于 12 000 × g 离心, 上清液用于 ATP 含量的测定。

采用电导法测定材料的外渗电导率, 蒸馏水的电导率为 S₀, 煮沸前电导率为 S₁, 煮沸后电导率为 S₂, 低温处理叶片的相对电导率为 L_t, 对照叶片的相对电导率为 L_{ck}, 相对电导率为 (S₁ - S₀)/(S₂ - S₀) × 100%, 伤害度为 (L_t - L_{ck})/(1 - L_{ck}) × 100%^[10]。

将 0.5 g 洗干净的根加入到 3 mL 预冷的丙酮中研磨, 研磨液在 4℃ 条件下 2 000 g, 离心 10 min, 取 1 mL 上清液, 加入 0.1 mL 5% 四氯化钛和 0.2 mL 浓氨水, 混匀, 出现沉淀, 4℃, 2 000 g, 离心 10 min, 沉淀用丙酮反复洗涤 3~5 次, 以便去除植物色素, 向洗涤后的沉淀中加入 5 mL 2 mol/L H₂SO₄, 使沉淀完全溶解, 并定容至 10 mL 具塞刻度试管, 415 nm 下检测吸光度, 通过标准曲线求得过氧化氢含量^[10]。

1.4 数据处理

运用 Microsoft Office Excel 2003 进行数据运算, 图表处理。

2 结果与分析

2.1 低温对紫花苜蓿根长的影响

不同温度处理后苜蓿根长出现差异。低温处理 36 h, 12℃ 和 4℃ 处理苜蓿根系生长缓慢, 二者没有显著差异 ($P > 0.05$), 但与 26℃ 差异显著 ($P < 0.05$)。处理 72 h, 苜蓿根长在 12℃ 和 4℃ 处理间也有显著差异 ($P < 0.05$), 与处理前相比, 根长分别增长了 1.193 cm 和 0.687 cm, 苜蓿在 26℃ 下生长 72 h, 根长增长了 2.143 cm (图 1)。

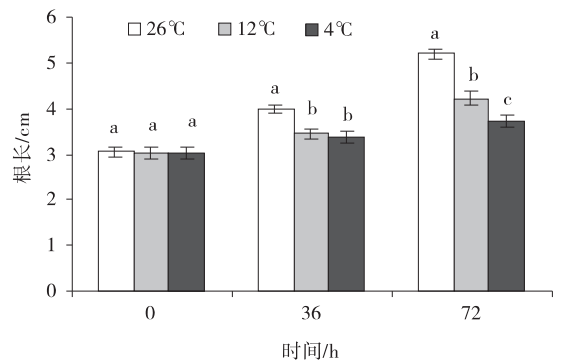


图 1 不同温度处理后苜蓿根的长度

Fig. 1 Root length of alfalfa after different temperature

注: 数据表示为 3 次重复的平均值 ± 标准误差, 不同小写字母表示同一时间不同处理间差异显著 ($P < 0.05$), 下同

2.2 低温对苜蓿根系活力以及细胞 ATP 含量的影响

与 26℃ 相比, 低温处理 72 h 后, 苜蓿根系活力受到显著抑制, 但是并没有全部抑制, 并且 12℃ 和 4℃ 处理间有显著性差异 ($P < 0.05$) (图 2A), 这些结果说明, 低温胁迫显著地抑制了新牧 4 号紫花苜蓿根系活力, 但没有冻死苜蓿根系。这表明苜蓿根系自身会对低温胁迫产生抵御机制。

ATP 是细胞生长所需的最直接的能量。12℃ 和 4℃ 处理下的紫花苜蓿根含 ATP 分别为 24.52×10^{-10} mol/g 和 22.86×10^{-10} mol/g, 显著低于 26℃ 下的 ATP 含量 (31.43×10^{-10} mol/g) (图 2B), 这表明, 低温导致根系细胞内 ATP 含量的减少, 从而影响了根系的生长。

2.3 低温对苜蓿根系细胞不同呼吸途径呼吸速率及细胞总呼吸速率的影响

低温显著影响了苜蓿根细胞总呼吸电子传递速率, 随着温度的降低, 对细胞呼吸电子传递速率的抑制

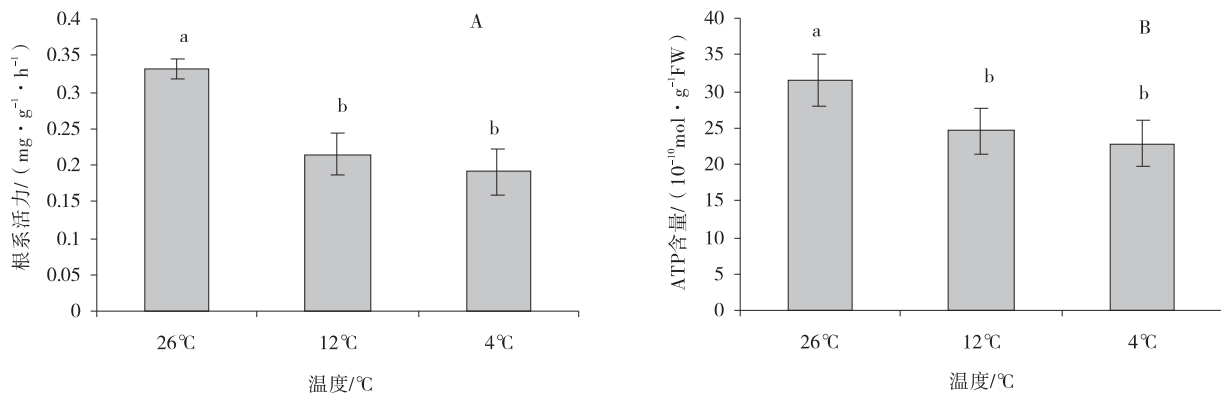


图2 不同温度处理后苜蓿根系活力(A)和根系细胞ATP含量(B)的变化

Fig. 2 The root activity (A) and ATP content (B) of alfalfa root after different temperature

越严重(图3A)。细胞色素氧化酶(COX)呼吸途径是产生跨膜质子梯度的主要电子传递途径,12°C和4°C的低温处理分别抑制了苜蓿根系COX呼吸途径呼吸速率的52.07%和65.32%(图3B)。这表明,低温抑制了苜蓿根系细胞内COX呼吸途径,影响了跨膜质子梯度的产生,从而影响了ATP的产生。

交替氧化酶(AOX)呼吸途径是植物特有的一条耗能电子传递途径,12°C和4°C的低温处理分别抑制了苜

蓿根系AOX呼吸途径呼吸速率的30.7%和41.9%(图3C)。这表明,与AOX呼吸相比,COX呼吸对于低温胁迫更加敏感。在室温26°C下苜蓿根系AOX呼吸占总呼吸的30.8%,12°C和4°C处理后,根系AOX呼吸占总呼吸的百分率增加到39.5%和41.8%(图3D)。

2.4 低温对紫花苜蓿根系细胞膜透性的影响

线粒体呼吸电子传递链是由镶嵌在线粒体内囊体膜上的蛋白复合体组成的,其功能依赖于细胞膜

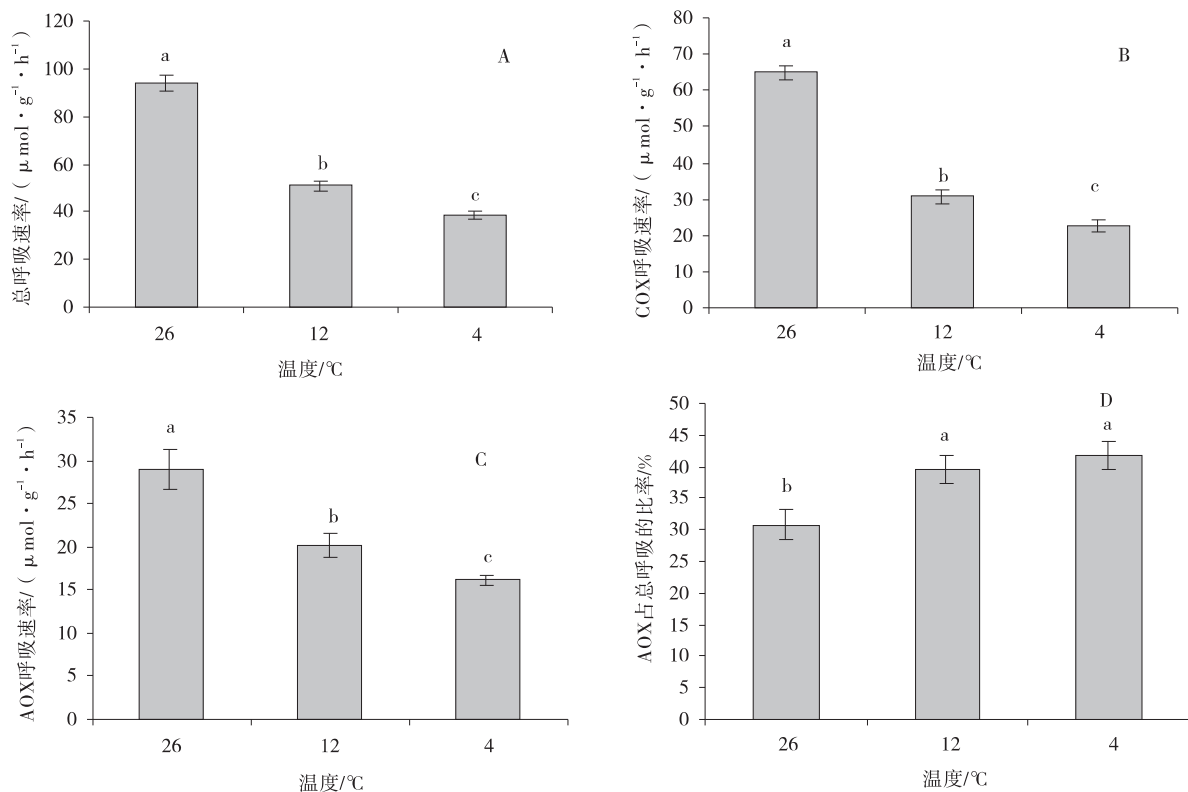
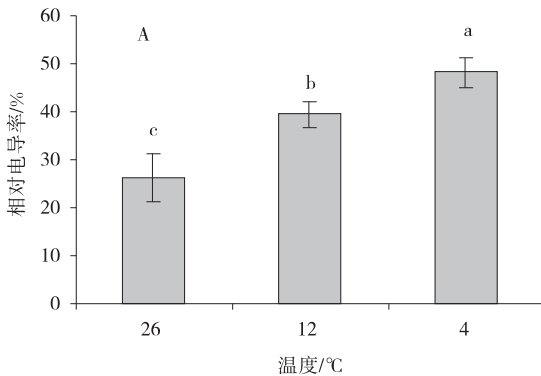


图3 不同温度处理后苜蓿根系细胞总呼吸速率(A)、COX呼吸速率(B)、AOX呼吸速率(C)和AOX占总呼吸的比率(D)

Fig. 3 Total respiratory rate (A), COX respiratory rate (B), AOX respiratory rate (C) and the ratio of AOX to total respiratory rate (D) of alfalfa root after different temperature

结构的完整性和稳定性。与 26℃ 相比,12℃ 和 4℃ 的低温处理后,苜蓿根系细胞相对电导率显著增加,分别增加了 50.1% 和 83.2%(图 4A),12℃ 和 4℃ 的



低温对苜蓿根系的伤害度分别为 17.8% 和 29.3% (图 4B)。这表明,低温胁迫对苜蓿根系细胞膜结构造成严重破坏。

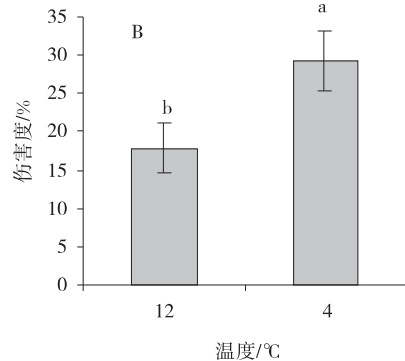


图 4 不同温度处理后苜蓿根系细胞相对电导率(A)和伤害度(B)

Fig. 4 Relative conductivity (A) and the damage degree (B) of alfalfa root after different temperature

2.5 低温对紫花苜蓿根系细胞氧化还原平衡和渗透调节作用的影响

根系线粒体呼吸电子传递链是活性氧产生的主要位点。与 26℃ 对比,12℃ 和 4℃ 低温处理后苜蓿根系细胞内 H_2O_2 含量分别增加了 46.7% 和 64.2%(图 5A),这表明低温胁迫导致根系细胞呼吸电子传递链受到抑制,电子渗漏增加,导致细胞过氧化氢积累,对

根系细胞造成氧化胁迫。

脯氨酸是植物抵御低温胁迫时自身产生的渗透调节物质,能够有效的减少低温对细胞膜的伤害。与 26℃ 对比,12℃ 和 4℃ 低温处理后苜蓿根系细胞内脯氨酸含量显著增加了 45.8% 和 89.4%(图 5B),这表明低温胁迫导致根系细胞脯氨酸含量增加,苜蓿根系细胞通过自身的渗透调节作用以来抵御低温胁迫。

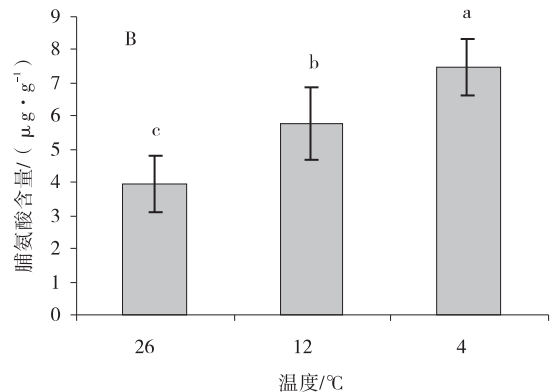
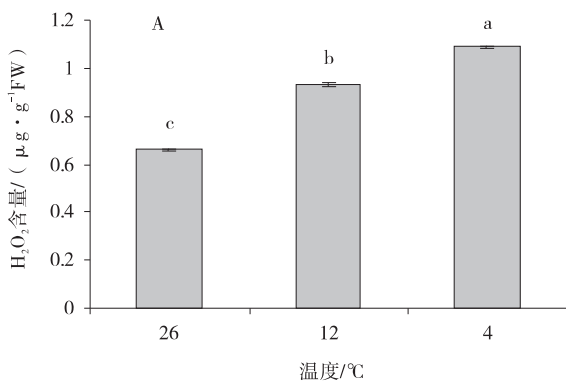


图 5 不同温度处理后苜蓿根系细胞 H_2O_2 的含量(A)和脯氨酸含量(B)

Fig. 5 The content of H_2O_2 (A) and Proline (B) in alfalfa root after different temperature

3 讨论

在没有叶绿体结构、不能进行光合作用的根部,呼吸作用是提供细胞所需能量 ATP 的唯一途径。低温环境会显著影响细胞 ATP 的产生^[11]。植物细胞 ATP 的产生依赖于线粒体呼吸电子传递和氧化磷酸化。无论常温低温,COX 途径呼吸速率均高于 AOX 途径呼吸速率,这表明,苜蓿根系细胞呼吸主要通过 COX 途径推动跨膜质子梯度的产生用以合成 ATP。低温处理后细胞呼吸速率相比室温下显著下降,ATP

含量也显著降低,说明低温胁迫破坏了细胞中的电子呼吸传递链,阻碍了细胞 ATP 的产生,最终影响根系的生长。

根系线粒体呼吸电子传递链是活性氧产生的主要位点^[12]。低温胁迫下破坏了细胞呼吸电子传递,导致电子渗漏,活性氧代谢增强^[13]。AOX 呼吸途径是一条呼吸耗能途径,加速电子的消耗从而有效的减轻活性氧的产生^[14-16]。低温胁迫后,尽管苜蓿根系细胞呼吸速率全部降低,但是 AOX 呼吸途径占总呼吸的比例却比常温下高,紫花苜蓿根系在低温胁迫下启动了

自身应激机制,减少活性氧的产生。但是本实验发现低温胁迫后苜蓿根系活性氧(H_2O_2)发生积累,这可能直接或间接氧化生物大分子,损伤细胞膜,从而加速细胞的死亡和解体^[17]。这表明低温下根系 AOX 的上调不足以清除活性氧对细胞的伤害。

低温可导致植物细胞膜受到伤害^[18],由常温下的液晶态转变为凝胶态,细胞膜脂的相变破坏膜和蛋白质原有的结合方式,或者由活性氧引起的膜脂过氧化导致膜结构的破坏,加速离子等物质渗漏,因而外渗透量可以反映植物细胞膜受到伤害的程度^[19-20]。本研究表明,低温导致紫花苜蓿根系细胞的细胞膜遭受破坏,致使细胞内容物离子扩散,电导率显著上升,植物遭受低温胁迫无法越冬很可能是因为低温破坏了线粒体内膜上电子呼吸传递链,影响细胞正常呼吸和能量供应。

4 结论

在低温条件下,新牧 4 号苜蓿根系大量合成脯氨酸但仍不足以缓解根系细胞膜的破坏。苜蓿根系线粒体内膜由于低温而遭受到破坏,根系线粒体呼吸电子传递总速率明显下降,同时两条呼吸途径电子传递速率也显著下降,电子无法正常传递,导致活性氧含量增加,加剧对膜脂的过氧化,最终导致线粒体所产生的能量大大降低,影响根系的生长,从而影响植物的抗寒性。

参考文献:

- [1] 耿华珠,吴永敷,曹致中,等. 中国苜蓿[M]. 北京:中国农业出版社,1995.
- [2] 王月胜,于林清,张利军. 播种当年苜蓿根系研究初报[J]. 草地学报,2008,16(3):313-315.
- [3] Lee J, Sweetlove, Aaron Fait, Adriano Nunes-Nesi, *et al.* The Mitochondrion: An Integration Point of Cellular Metabolism and Signalling[J]. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 2007, 26(1): 17-43.
- [4] 王运涛,于林清,李景柱,等. 低温胁迫对 5 份苜蓿品种根系形态特征的影响[J]. 草地学报,2016,24(1):101-106.
- [5] 罗新义,冯昌军,李红,等. 低温胁迫下肇东苜蓿 SOD、脯氨酸活性变化初报[J]. 中国草地学报,2004,26(4):79-80.
- [6] 申晓慧,姜成,冯鹏,等. 6 种紫花苜蓿越冬前后几个抗寒生理指标变化研究[J]. 农学报,2015,5(12):94-98.
- [7] 李莎莎,张志强,王亚芳,等. 根瘤菌共生对低温胁迫下紫花苜蓿抗寒生理变化的影响[J]. 草地学报,2016,24(2): 377-383.
- [8] 高俊凤. 植生理学实验指导[M]. 北京:高等教育出版社, 2006.
- [9] 刘美君,孙学娟,张子山,等. 植物线粒体呼吸状态的研究方法及其在植物生物学中的应用[J]. 植物生理学报, 2014,50(1):111-116.
- [10] 郝巧玲,吕斌,周宜开,等. 生物发光法快速检测细胞内三磷酸腺苷[J]. 华中科技大学学报(医学版),2005,34(1):61-64.
- [11] 李美茹,刘鸿先. 植物细胞膜 ATP 酶及其与植物低温生理过程的关系[J]. 热带亚热带植物学报,1997(3):74-82.
- [12] Lam E, Kato N, Lawton M. Programmed cell death, mitochondria and the plant hypersensitive response[J]. *Nature*, 2001, 411: 848-853.
- [13] 张强,李建龙,晏筋,等. 温度胁迫对亚热带常用草坪草活性氧代谢相关酶的影响[J]. 草业科学,2004,21(10): 83-86.
- [14] Fernández Del Saz N, Florez Sarasa I, Mhadhbi H, *et al.* Salinity tolerance is related to cyanide - resistant alternative respiration in *Medicago truncatula* under sudden severe stress[J]. *Plant Cell & Environment*, 2016, 39(11):2361-2399.
- [15] Maxwell D P. The alternative oxidase lowers mitochondrial reactive oxygen production in plant cells[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1999, 96(14): 8271-8276.
- [16] Aken O V, Giraud E, Clifton R, *et al.* Alternative oxidase: A target and regulator of stress responses[J]. *Physiologia Plantarum*, 2009, 137(4): 354-361.
- [17] 周斌. 低温胁迫下番茄类胡萝卜素 ϵ -羟化酶基因的表达和功能研究[D]. 泰安:山东农业大学,2013.
- [18] 滕中华,周党卫,师生波,等. 青藏高原三种高寒植物的质膜透性变化与抗寒性的关系[J]. 中国草地学报, 2001, 23(4): 37-40.
- [19] Anower R, Fennell A, Boe A, *et al.* Physiological and molecular characterisation of lucerne (*Medicago sativa* L.) germplasm with improved seedling freezing tolerance[J]. *Crop & Pasture Science*, 2016, 67(6): 655-665.
- [20] 周庆鑫. 低温下冬小麦活性氧清除物及膜脂组分对质膜稳定性影响的研究[D]. 哈尔滨:东北农业大学,2014.

cantly different between two populations ($P < 0.001$). The results of artificial assisted pollination showed that there was no significant difference in the seed-setting rate between natural pollination and artificial cross-pollination treatment in low-altitude population and high-altitude population ($P > 0.05$), while the seed-setting rate under self-pollination, autonomous self-fertilization and apomixis were significantly different from that under natural pollination and artificial cross-pollination treatment ($P < 0.05$). In conclusion, there was variation in floral traits of two populations of *S. chamaejasme*, the degree of variation in the reproductive organs (except the number of inflorescence per plant and the number of flowers per inflorescence) was less than that of the vegetative organs, and their mating system were self-incompatibility.

Key words: *Stellera chamaejasme*; Floral traits variation; Mating system characteristics

.....
(上接 26 页)

Effect of low temperature stress on respiration of root in *Medicago sativa*

LIU Mei-jun¹, DING Lu¹, WANG Li-na¹, HUANG Xin-ru¹

(College of Grassland and Environment Science, Xinjiang Agricultural University, Key laboratory of Grassland Resources and Ecology of Xinjiang, Urumqi, Xinjiang 830052, China)

Abstract: Respiration is the only source of energy for the alfalfa roots without chloroplasts. In this experiment, Xinmu No. 4 was used to study the effect of low temperature on the respiration in the alfalfa roots after the treatment at different temperature, 26°C, 12°C and 4°C. The results showed that low temperature significantly inhibited the growth of alfalfa roots, and the maximum degree of inhibition occurred under 4°C treatment. With the decline of treatment temperature, the proline content and conductivity of root cells increased significantly, which indicated that although self-osmotic regulation could resist low temperature stress, the membrane structure of root cells was still destroyed by the low temperature, especially under 4°C treatment. ATP content and the respiratory rate of total respiratory, cytochrome C oxidase (COX) pathway, and alternate oxidase (AOX) pathway, in alfalfa root cells decreased significantly in different degrees under both 12°C and 4°C treatment, and the most significant decline was found under 4°C treatment, indicating that low temperature stress significantly inhibited root respiratory metabolism, and resulted in insufficient energy supply to root cells. In addition, the ratio of AOX respiration to total respiratory in root cells increased gradually after different low temperature treatment, but the H₂O₂ content also increased significantly, which indicated that the increase in the ratio of AOX respiration to the total respiration in root cells at 4°C is not enough to eliminate the damage of reactive oxygen species to cells.

Key words: low temperature stress; respiratory electron transfer; reactive oxygen species; root; *Medicago sativa*