

紫花苜蓿幼苗氧化应激防御系统对自毒作用的响应

张晓燕, 师尚礼*, 李小龙, 阿芸

(甘肃农业大学草业学院, 草业生态系统教育部重点实验室, 甘肃省草业工程实验室, 中一美草地畜牧业可持续发展研究中心, 甘肃 兰州 730070)

摘要:【目的】通过研究自毒作用对紫花苜蓿品种种子萌发、幼苗生长及叶片细胞膜氧化防御系统的影响, 明确紫花苜蓿幼苗响应自毒作用的活性氧代谢机理, 为进一步阐明自毒物质对紫花苜蓿的抑制机理和自毒效应防控提供理论基础。【方法】选用紫花苜蓿品种德宝和 WL298HQ 为试验材料, 取开花期叶片制备成 T1(0.0025 g/mL)、T2(0.0125 g/mL)、T3(0.0225 g/mL) 浸提液模拟自毒作用, 研究自毒作用对种子生物活性和化感指数的影响, 以及对幼苗生长、活性氧(H_2O_2 、 OH 和 $O_2^{\cdot-}$)、氧化防御系统中的抗氧化酶和抗氧化剂、渗透调节物质的影响。【结果】不同浓度的叶浸提液抑制德宝和 WL298HQ 苜蓿种子萌发, T3 抑制幼苗生长。与 WL298HQ 相比, 德宝响应自毒作用具有明显的生理差异: 1) 自毒物质作用于细胞膜上, 诱发了氧化应激, 加速活性氧 ROS 代谢, 导致了 MDA、 H_2O_2 和 OH 过量积累; 2) 德宝在 T1 下可通过提高叶片保护酶(SOD、POD、CAT、APX、GR)活性和抗氧化剂(AsA、DHA)含量来响应自毒作用。但在 T3 下, 可溶性糖、可溶性蛋白和游离脯氨酸升高, 自毒作用影响氧化防御系统的稳定性, 导致叶片出现严重的氧化损伤。【结论】WL298HQ 通过激活保护机制增加抗氧化剂的活性, 以及渗透物质的积累, 进而保持细胞膜的相对完整性和氧化清除能力。德宝苜蓿在自毒作用下, ROS 的产生大于抗氧化防御系统的能力, 导致氧化损伤。

关键词: 紫花苜蓿; 自毒作用; 种子萌发; 氧化应激; 氧化损伤

中图分类号: S541.9 **文献标志码:** A **文章编号:** 1009-5500(2024)01-0088-11

DOI: 10.13817/j.cnki.cyycp.2024.01.010



紫花苜蓿(*Medicago sativa*)是世界上种植面积最广泛的豆科牧草, 具有适应性广, 营养价值高和适口性好等优良特点, 在动物饲料和生态环境改良方面具有很多优势^[1]。紫花苜蓿人工栽培主要应用于刈割利用型草地, 可通过轮作方式进行栽培。而化感自毒作用会抑制紫花苜蓿种子萌发和幼苗的胚根、胚芽生长^[2], 致使紫花苜蓿幼苗生长受到抑制, 根系受损、植株矮小^[3], 限制它在生态放牧型草地中的广泛应用。

自毒作用是一种特殊的种内化感作用^[4], 化感自毒物质会通过植物的茎、叶、根部和种子等器官释放到周围环境中来抑制次代幼苗胚轴细胞伸长和胚根生长^[5-6]。紫花苜蓿化感自毒物质作用的主要特点有: 1) 延迟或抑制次代种子发芽; 2) 抑制根系生长引起根的肿胀、卷曲和变色, 根毛减少; 3) 对根的抑制作用高于对种子萌发的; 4) 化感自毒物质是从植物体(主要是叶子)移动到土壤^[7]。研究表明, 不同紫花苜蓿品种植株中的自毒物质含量存在差异, 其叶浸提液相比于根浸提液表现出更高的毒性, 同时生殖期浸提液毒性高于营养期。对紫花苜蓿不同器官组织的自毒效应进行排序, 表现为: 叶>种子>根>花>茎^[8]。

化感自毒物质可能首先作用于植物的细胞质膜, 通过细胞质膜上的靶位点, 产生过多的活性氧

收稿日期: 2022-05-02; **修回日期:** 2022-05-26

基金项目: 国家自然科学基金项目(32160330)

作者简介: 张晓燕(1989-), 女, 甘肃景泰人, 博士研究生。

E-mail: zhangxy@st.gsau.edu.cn

*通信作者。E-mail: shishl@gsau.edu.cn

(ROS),其中超氧阴离子通过歧化反应生成过氧化氢及单线态氧,过氧化氢能穿透细胞膜,通过反应生成羟自由基^[9]。细胞质膜是由脂质和蛋白质组成的流体镶嵌结构,合适的流动性对细胞质膜表现出正常功能具有十分重要的作用。脂质过氧化的直接结果是膜不饱和脂肪酸减少,膜脂的流动性降低^[10-11]。丙二醛(MDA)是膜脂过氧化的产物,逆境下含量的多少可以衡量质膜的稳定性^[12]。丁桔等^[13]研究报道肉桂酸处理能引起黄瓜根系ROS的产生和积累,造成膜脂过氧化,最终导致根系活力的降低,但对黑籽南瓜则无影响。吴凤芝等^[14]研究发现高浓度酚酸类物质会使MDA含量升高,从而影响细胞膜的结构和功能。张恩平等^[15]研究表明,不同浓度的苯甲酸和肉桂酸均促进了番茄幼苗根部MDA的合成。研究表明用苯甲酸和肉桂酸处理大豆幼苗后发现,这两种物质诱导脂质过氧化,主要是因为质膜中自由基的形成^[16]。

植株体内存在着一系列抗氧化酶(SOD、POD、CAT、APX和GR)和抗氧化剂(AsA和GSH)来维持细胞内氧化还原平衡状态。SOD可以将 $O_2^{\cdot-}$ 转化为 H_2O_2 ,而CAT、POD和AsA—GSH循环相关的酶可减少 H_2O_2 的积累。研究表明人参化感自毒物质皂苷Rgl通过抑制抗坏血酸过氧化物酶(APX)和参与抗坏血酸—谷胱甘肽(AsA—GSH)循环酶的活性诱导根细胞中的ROS积累,过度产生或积累ROS可能诱发酶、脂质、DNA、蛋白质和脂质过氧化的损伤^[17]。

因此,为明确不同品种紫花苜蓿叶浸提液自毒作用对种子萌发、幼苗生长及叶片细胞膜氧化防御系统的影响,本试验以2个紫花苜蓿品种为研究材料,采用不同浓度的叶浸提液处理对应紫花苜蓿种子及幼苗,研究不同紫花苜蓿品种的自毒效应,为进一步筛选自毒效应差异品种提供依据。

1 材料和方法

1.1 试验材料

基于前期研究基础选用2个不同自毒效应的紫花苜蓿品种为试验材料^[18],其中德宝苜蓿(*Medicago sativa* cv. Debao)的种子由甘肃农业大学草业生态系统教育部重点实验室提供。WL-298HQ(*Medicago sativa* cv. WL-298HQ)的种子购自北京正道种业有限公司。

1.2 试验设计

1.2.1 紫花苜蓿不同浓度叶浸提液的制备 采用营养土、蛭石、园林土混合培养2个紫花苜蓿品种。选取饱满且大小一致的供试紫花苜蓿品种种子,经0.1% $HgCl_2$ 溶液消毒5 min后,用蒸馏水冲洗干净,再用吸水纸吸干,均匀播种于花盆(外径×高25 cm×20 cm),播种后将花盆埋置于甘肃农业大学牧草训练站(105°41' E和34°05' N),盆口与地面平齐为宜。每天定量浇水(500 mL)保证种子正常发芽出苗。据资料文献,因紫花苜蓿花期叶片中化感自毒物质含量相对较高,于初花期采集紫花苜蓿叶片用于制备浸提液^[18]。2018年8月在甘肃农业大学牧草训练站于初花期收获一年生2个紫花苜蓿品种地上部分。茎叶分离后,将叶(叶和叶柄)在60℃下烘干5 d^[19]。然后用研磨机研磨叶子以通过1 mm的筛网。三角瓶中分别加入磨碎的样品(0.25、0.75、1.25、1.75和2.25 g),再加入100 mL蒸馏水。密封三角瓶在80 r/min和25℃下振荡24 h。真空过滤得到浓度为0.002 5 g/mL(T1),0.007 5 g/mL(T2),0.012 5 g/mL(T3),0.017 5 g/mL(T4)和0.022 5 g/mL(T5)浸提液。将样品储存在4℃冰箱。蒸馏水处理作为对照(CK)。

1.2.2 种子萌发试验 不同浓度的浸提液处理德宝和WL-298HQ苜蓿种子。在直径为9 cm的培养皿底部铺两层无菌滤纸,均匀放置30粒灭菌的紫花苜蓿种子,处理组加入相对应的3.5 mL不同浓度浸提液。对照组加入等量蒸馏水,每次处理重复3次。种子在人工气候箱中萌发,光周期25℃,12 h,暗周期20℃,12 h,种子萌发标准为胚根突破种皮1~2 mm,每天定期记录萌发种子数。第7天测定紫花苜蓿的发芽率、发芽势、胚根长度和芽长。

1.2.3 自毒作用对幼苗的影响试验 采用砂培法培养幼苗,在直径为9 cm的营养钵中装入用自来水冲洗干净的细沙,摆放在长×宽×高(25 cm×15 cm×10 cm)的塑料方盆中,选取德宝和WL298HQ苜蓿种子,供试紫花苜蓿种子用1%的次氯酸钠消毒30 min,用蒸馏水冲洗干净,用吸水纸吸干,均匀播种于营养钵中,出苗后间苗使每钵中保留15株长势一致的幼苗,每隔7天,每钵浇100 mL Hoagland营养液。在出苗后第45天,将不同浓度浸提液100 mL均匀地喷入营养钵中,对照组喷入等量的蒸馏水,每7天处理

1次,3次处理后取紫花苜蓿叶片的液氮快速冷冻保存在-80℃用于测定。

1.3 试验方法

1.3.1 种子发芽指标测定 发芽率 (Germination percentage) =发芽种子数/供试种子数×100%

发芽势 (Germination potential) =发芽初期(3d)发芽的种子数/供试种子数×100%

种子简易活力指数(SVI) =发芽率×苗长×100%

化感效应指数(RI)=(T-C)/T

式中: C 为对照值, T 为处理值。当RI≥0时,为促进作用;当RI≤0时,为抑制作用,RI绝对值的大小表示化感作用强度^[20]。

综合化感指数(SE)是供体对同一受体多个测试

项目的化感效应敏感指数RI的算术平均值,表示化感自毒效应的综合效应^[21]。

1.3.2 丙二醛(MDA)和活性氧(H₂O₂、OH[·]和O₂^{·-})的测定 MDA用硫代巴比妥酸法测定^[22],过氧化氢(H₂O₂)的测定采用KI比色法测定^[23]。羟基自由基浓度(OH[·])测定采用2-脱氧-D-核糖比色法^[24]。用对氨基苯磺酸法测定超氧阴离子自由基(O₂^{·-})的产生速率^[25]。

1.3.3 抗氧化物酶和抗氧化剂含量的测定 称取紫花苜蓿叶片0.2 g,加入4 mL的50 mmol/L磷酸盐缓冲液(PBS,含0.1 mmol/L EDTA,1% PVP,pH=7.8),冰浴充分研磨,匀浆液置于在4℃下12 000 r/min离心20 min。收集上清液并分装,保存在冰箱中用于抗氧化物酶和抗氧化剂的测定。

表1 抗氧化物酶和抗氧化剂的测定方法

指标	Buffer (PBS)	反应体系	波长/nm	文献
SOD	0.1 mM EDTA 1% PVP pH7.8	50 mM PBS;100 μL enzyme solution;100 μL riboflavin	560	Giannopolitis, <i>et al.</i> 1977 ^[26]
POD	0.1 mM EDTA 1% PVP pH7.8	100 mM PBS;20 mM guaiacol;40 mM H ₂ O ₂	470	Chance, <i>et al.</i> 1955 ^[27]
CAT	0.1 mM EDTA 1% PVP pH7.8	50 mM PBS;50 μL enzyme solution;19mM H ₂ O ₂	240	Havir, <i>et al.</i> 1987 ^[28]
APX	—	50 mM PBS;0.25 mM AsA;0.1 mM EDTA;5 mM H ₂ O ₂	290	Murshed, <i>et al.</i> 2008 ^[29-30]
GR	—	50 mM PBS;0.5 mM EDTA;0.25 mM NADPH;0.5 mM GSSG	340	Murshed, <i>et al.</i> 2008 ^[30]
AsA plus DHA	150 mM EDTA;10 mM DTT;0.5% (w/v) N-ethylmaleimide	10% TCA;44% orthophosphoric acid;0.5%	525	Murshed, <i>et al.</i> 2013 ^[30]
AsA	150 mM EDTA;0.3 mL water	BP-ethanol;0.3% (w/v) FeCl ₃	525 nm	Murshed, <i>et al.</i> 2013 ^[30]

1.4 数据统计

数据基于R Studio数据分析和绘图,TOPSIS综合评估方法,随机森林重要性评估分析。采用Excel 2007进行数据处理和图表绘制,并采用SPSS 19.0软件进行统计分析。

2 结果与分析

2.1 不同浸提液浓度对紫花苜蓿种子萌发的影响

不同浓度浸提液对紫花苜蓿种子萌发的影响不

同。其中,德宝的种子发芽率在T4和T5浓度下显著低于对照($P<0.05$)(图1-A),种子发芽势在T3、T4和T5浓度下显著低于对照($P<0.05$)(图1-B)。此外,德宝的胚根长、苗长和SVI均在T4和T5浓度下显著低于对照($P<0.05$)。德宝的胚芽长在T3浓度下显著高于对照,干鲜比在各处理浓度下均显著低于对照($P<0.05$)(图1-D)。WL298HQ的种子发芽率、发芽势、胚根长、胚芽长和SVI在T4和T5浓度下均显著低于对照($P<0.05$),干鲜比在各浓度处理下

差异不显著。在 T4 浓度下, WL298HQ 的发芽率、胚根长、胚芽长、苗长、干鲜比和 SVI 均显著高于德宝,

在 T2, T4 和 T5 浓度下, WL298HQ 的发芽势均显著高于德宝 ($P < 0.05$) (图 1)。

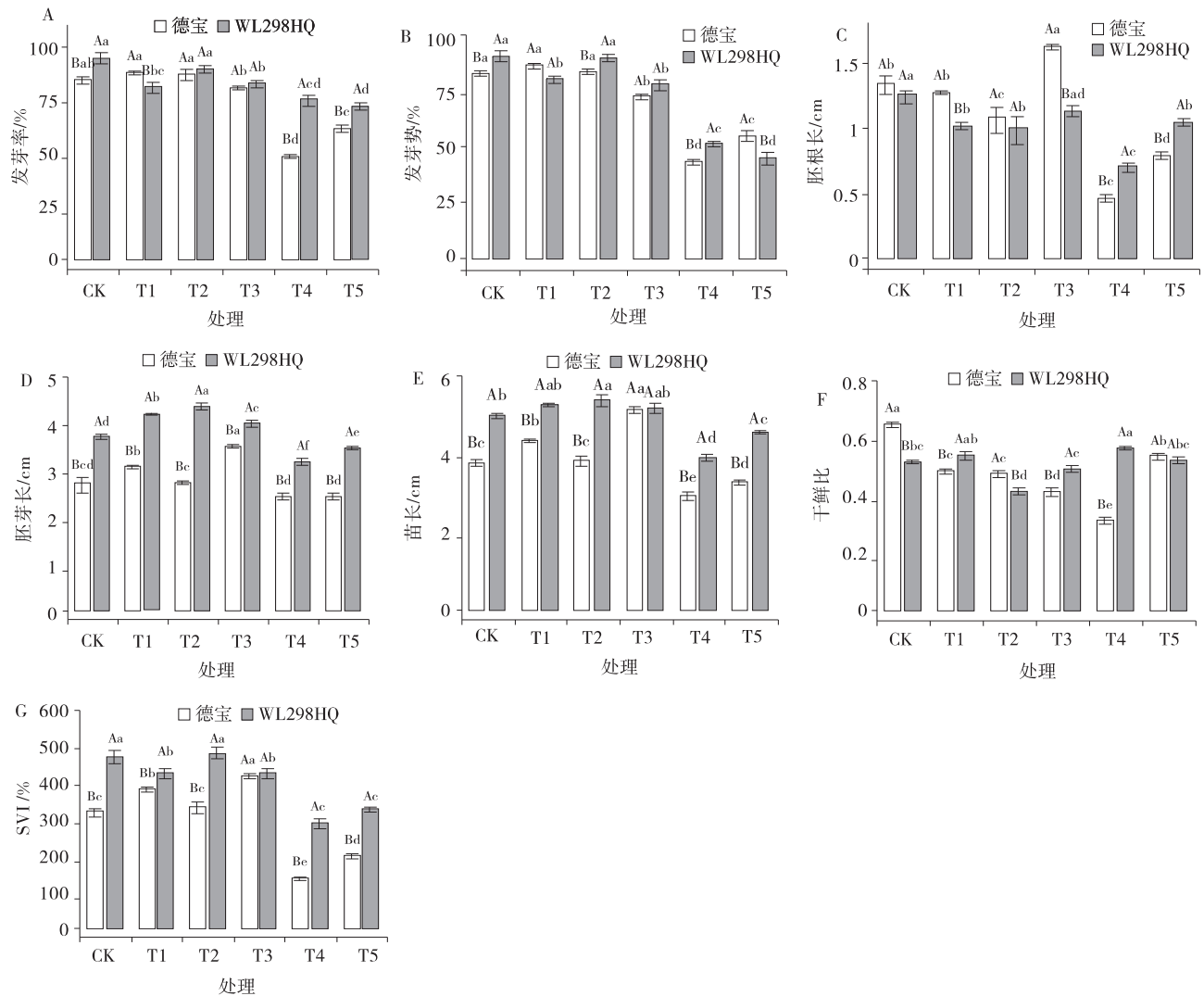


图 1 不同浓度浸提液对紫花苜蓿种子萌发的影响

Fig. 1 Effect of different extract concentrations on Seed Germination of alfalfa

注: 图中不同大小写字母代表不同品种在不同浓度下的显著性。下同

2.2 不同浓度浸提液对紫花苜蓿株高和地上生物量的影响

在 CK 和 T1 浓度下, 紫花苜蓿 WL298HQ 的株高显著低于德宝 ($P < 0.05$); 在 T2 浓度下, WL298HQ 的株高显著高于德宝 ($P < 0.05$), T2 浓度浸提液处理增加了紫花苜蓿 WL298HQ 的株高 (图 2-A)。德宝在 T1 浓度下的地上生物量显著高于对照 ($P < 0.05$)。WL298HQ 和德宝苜蓿在 T2 和 T3 浓度下的地上生物量显著低于对照 ($P < 0.05$) (图 2-B)。

2.3 不同浓度浸提液对紫花苜蓿幼苗叶片渗透调节物质的影响

不同浓度浸提液处理显著增加了 WL298HQ 的脯

氨酸含量 ($P < 0.05$) (图 3-A), 在 T2 浓度下, WL298HQ 的可溶性糖和可溶性蛋白含量显著高于 CK 和其他处理 ($P < 0.05$) (图 3-B)。WL298HQ 在 T2 和 T3 时的脯氨酸、可溶性蛋白的含量显著高于德宝 ($P < 0.05$)。在 T1 和 T3 下, 德宝的可溶性糖含量显著高于 WL298HQ ($P < 0.05$) (图 3-C)。

2.4 不同浓度浸提液对紫花苜蓿幼苗叶片 ROS 和 MDA 的影响

德宝的 $O_2^{\cdot-}$ 在各处理间差异不显著。T2 和 T3 下, WL298HQ 的 $O_2^{\cdot-}$ 均显著高于对照 ($P < 0.05$)。在 T2 和 T3 下, WL298HQ 的 $O_2^{\cdot-}$ 均显著高于德宝 ($P < 0.05$) (图 4-A)。德宝的 $OH^{\cdot}$ 随着浸提液浓度的升高

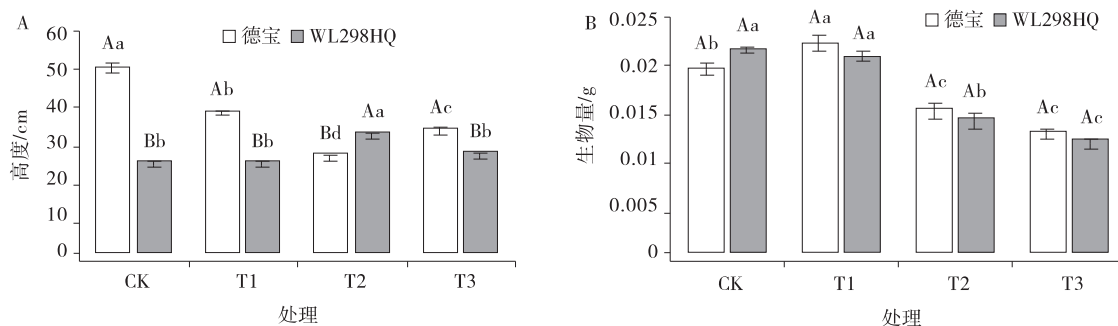


图2 不同浓度浸提液对紫花苜蓿株高和地上生物量的影响

Fig. 2 Effect of different extract concentrations on aboveground biomass and height of alfalfa

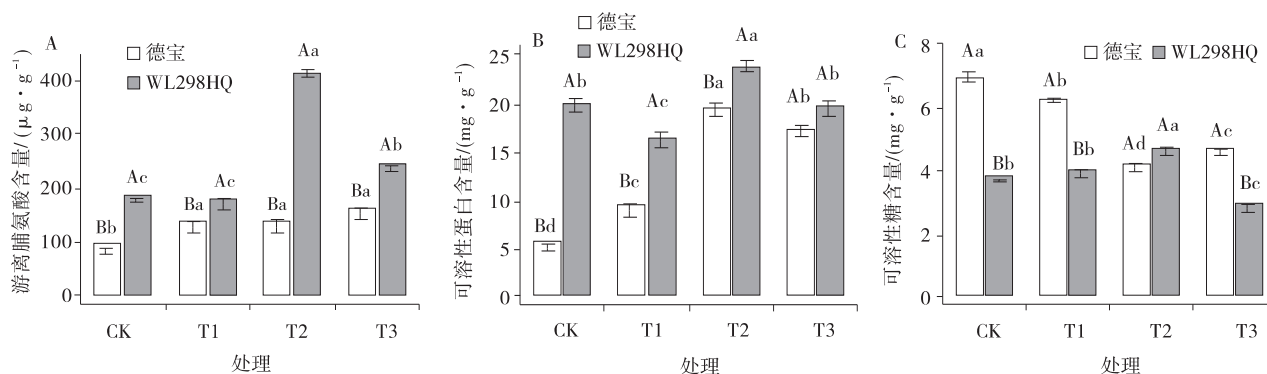


图3 不同浓度浸提液对紫花苜蓿幼苗叶片渗透调节物质的影响

Fig. 3 Effects of different extract concentrations on proline, soluble sugar and soluble protein content of alfalfa

显著下降,在 T1, T2 和 T3 处理下均显著低于 CK ($P < 0.05$)。WL298HQ 的 $\text{OH}^\cdot$ 在各处理间差异不显著,在 T1, T2 和 T3 处理下均显著高于德宝 ($P < 0.05$) (图 4-B)。德宝的 H_2O_2 含量随着浸提液浓度的升高显著上升,在 T1, T2 和 T3 处理下均显著高于 CK,在 T2 处理下均显著高于 WL298HQ ($P < 0.05$)。WL298HQ 的 H_2O_2 含量在 T3 处理下显著高于 CK ($P < 0.05$) (图 4-C)。德宝的 MDA 含量随着浸提液浓度的升高显著下降,在 T1, T2 和 T3 处理下均显著低于 CK ($P < 0.05$)。WL298HQ 的 MDA 含量在 T2 和 T3 处理下显著低于 CK ($P < 0.05$) (图 4-D)。

2.5 不同浓度浸提液对紫花苜蓿幼苗叶片抗氧化酶活性的影响

德宝的 SOD 活性在 T1 和 T2 下显著高于对照 ($P < 0.05$)。WL298HQ 的 SOD 活性在 T3 下显著高于对照 ($P < 0.05$)。WL298HQ 的 SOD 活性在 T1, T2 和 T3 处理下均显著高于德宝 ($P < 0.05$) (图 5-A)。德宝的 POD 活性在 T1, T2 和 T3 处理下和 WL298HQ 差异不显著。德宝的 POD 随着浸提液浓度的升高显著

升高,在 T2 和 T3 处理下均显著高于 CK ($P < 0.05$)。WL298HQ 的 POD 均随着浸提液浓度的升高呈先降低后升高的趋势,均在 T1 处理下显著低于 CK,在 T2 和 T3 处理下显著高于 T1 ($P < 0.05$) (图 5-B)。德宝和 WL298HQ 的 CAT 随着浸提液浓度的升高显著升高,在 T1, T2 和 T3 处理下均显著高于 CK ($P < 0.05$)。在 T2 处理下, WL298HQ 的 CAT 显著高于德宝 ($P < 0.05$) (图 5-C)。

德宝的 APX 活性在 T2 处理下显著低于 WL298HQ,在 T3 处理下显著高于 WL298HQ ($P < 0.05$)。德宝的 APX 随着浸提液浓度的升高显著升高,在 T3 处理下显著高于 CK ($P < 0.05$)。WL298HQ 的 APX 在不同浓度处理间差异不显著 (图 5-D)。德宝的 GR 在不同浓度处理间差异不显著, WL298HQ 的 GR 在 T3 下显著高于对照和 T1 ($P < 0.05$) (图 5-E)。

2.6 不同浓度浸提液对紫花苜蓿幼苗叶片抗氧化剂的影响

WL298HQ 的 ASA 含量在 CK、T1 和 T2 显著高于德宝,德宝的 ASA 含量在 T3 显著高于对照 ($P < 0.05$)。

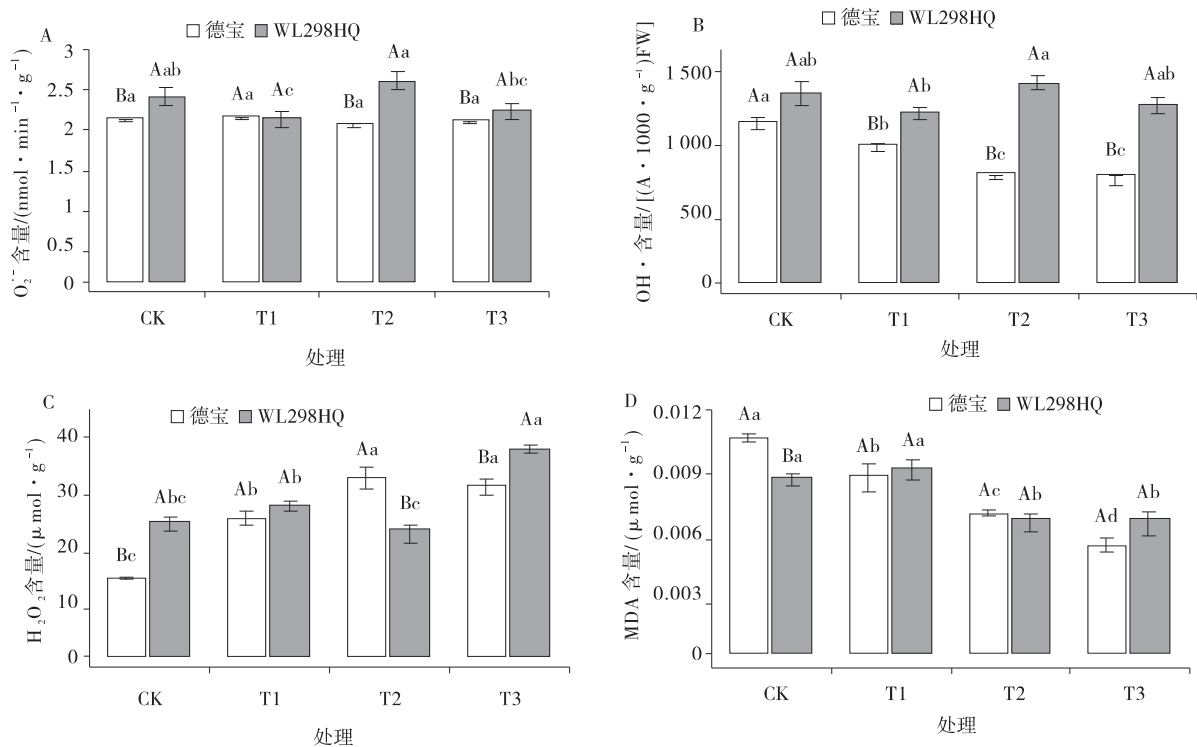
图 4 不同浓度浸提液对紫花苜蓿幼苗叶片 ROS(H_2O_2 、 $\text{OH}\cdot$ 、 $\text{O}_2^{\cdot-}$)和 MDA 的影响

Fig. 4 Effects of different extract concentrations on hydrogen peroxide, hydrogen radical, superoxide anion radical and malondialdehyde content of alfalfa

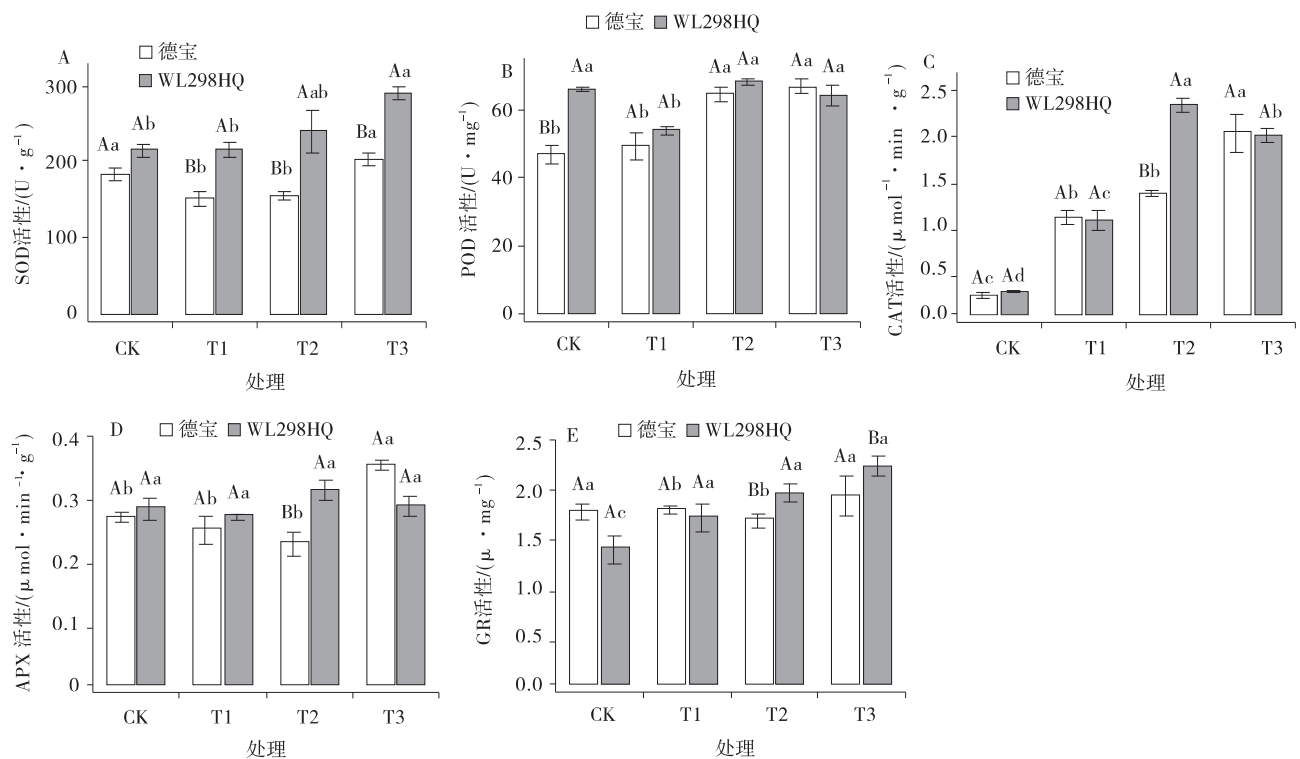


图 5 不同浓度浸提液对紫花苜蓿幼苗叶片抗氧化酶的影响

Fig. 5 Effects of different extract concentrations on Antioxidant Enzyme Activities content of alfalfa

0.05)。随着浸提液浓度的增加, WL298HQ 叶片中 ASA 含量在 T2 显著上升, 显著高于 CK 和 T1 ($P <$

0.05)(图 6-A)。德宝在 T1 的 DHA 含量显著高于 CK, WL298HQ 在 T1 和 T2 的 DHA 含量显著高于

CK, WL298HQ 的 DHA 含量在 CK、T1、T2 和 T3 显著低于德宝 ($P<0.05$) (图 6-B)。对于 WL298HQ, 与 CK 相比, T1 和 T2 下 ASA/DHA 的比率显著降低。

在 T3 处理下, 德宝的 ASA/DHA 的比率显著高于 T2 和 T3, 但德宝的 AsA/DHA 在 T1、T2 和 T3 处理下显著低于 WL298HQ ($P<0.05$) (图 6-C)。

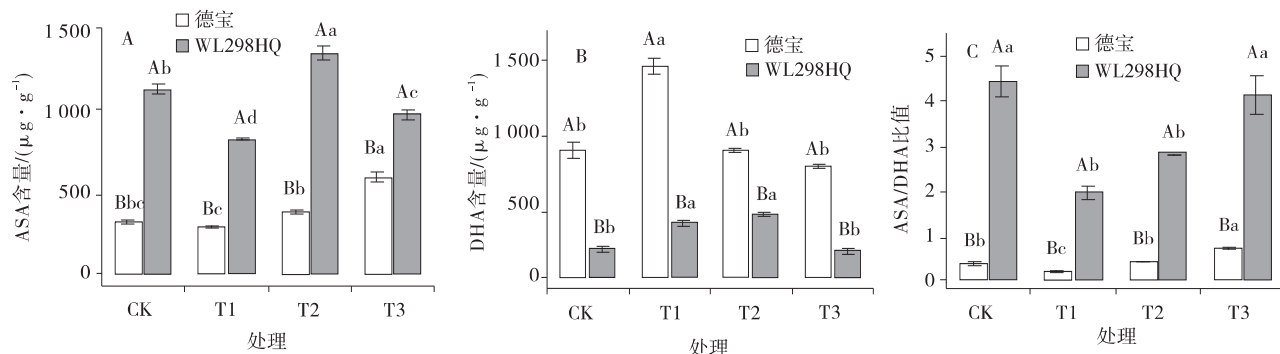


图 6 不同浓度浸提液对紫花苜蓿幼苗叶片抗氧化剂的影响

Fig. 6 Effects of different extract concentrations on ASA, DHA Content, and AsA/DHA of alfalfa

2.7 紫花苜蓿幼苗叶片氧化应激防御系统对自毒作用的响应

德宝苜蓿在 T1 处理下 DHA 和 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 的含量增加, 但 ASA 和 APX 的积累减少; T2 处理 H_2O_2 和可溶性蛋白的含量增加, 但可溶性糖含量的积累减少; T3 处理

ASA/DHA 的比值增加, 但 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 的积累减少。对于 WL298HQ, T1 处理 MDA 的含量增加, 但 CAT 和 APX 的积累减少; T2 处理脯氨酸和 ASA 的含量增加, 但 MDA 的积累减少; T3 处理增加了 H_2O_2 的含量, 但抑制了可溶性糖和 DHA 的积累 (图 7)。

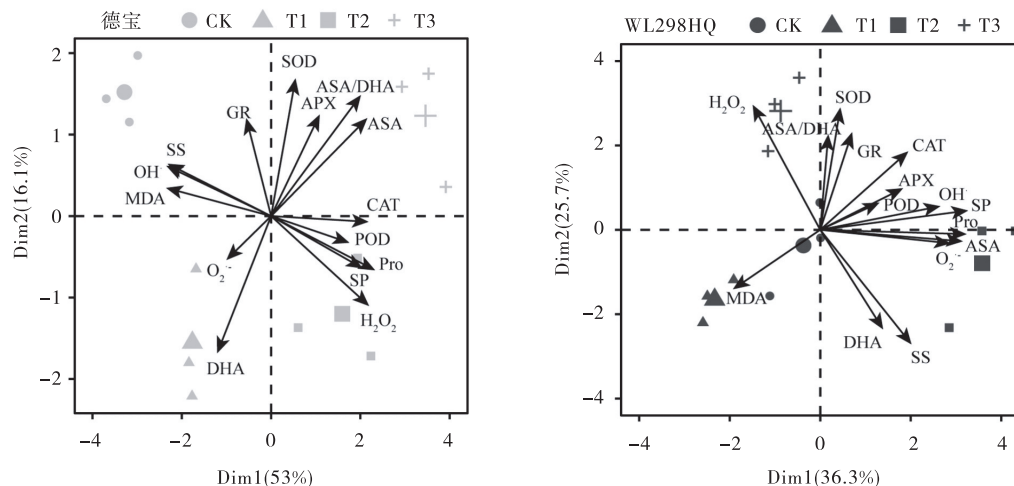


图 7 不同浓度浸提液对紫花苜蓿幼苗氧化应激系统的影响

Fig. 7 Effects of different extract concentrations on oxidative stress system of alfalfa

3 讨论

紫花苜蓿在人工生态系统中表现出严重的自毒作用, 自毒作用主要通过影响幼苗生长来抑制种子萌发和早期根系生长^[31], 导致种子发芽率低、幼苗生长不良以及产量和质量急剧下降^[32]。本研究中, 笔者发现 3 个紫花苜蓿品种的自毒效应对种子萌发的影响不同。WL298HQ 的种子萌发在低浓度 (T1) 下被促进, 但在高浓度 (T4 和 T5) 下被抑制。相比之下, 德宝的

种子萌发在所有浓度下均受到抑制。前人研究发现, 低浓度叶提取物会促进根系生长, 但高浓度叶提取物会抑制根系生长^[7]。我们发现不同的紫花苜蓿品种表现出不同程度的自毒作用。此外, 自毒效应的发生取决于自毒物质的浓度。同样, 不同紫花苜蓿品种的自毒敏感性阈值也不同。因此, WL298HQ 的生长在 T1 阈值以下得到促进, 但在某个阈值 (T4 和 T5) 以上增长放缓。自毒效应的显著差异可能是由于以下原因造成的: 不同品种释放的自毒物质含量不同 (敏感品

种可能是由于提取物中的主效自毒物质含量高);同一种化感自毒物质在不同植物上的发挥作用的最低浓度是不同的(即化感物质的抑制阈值不同)^[33]。

自毒作用抑制植物种子萌发,导致种子发芽率低、幼苗生长不良,最终导致产量和质量急剧下降^[34]。研究报道,自毒物质皂苷影响三七的生长,进而导致其再植失败^[35];而阿魏酸抑制水稻(*Oryza sativa*)幼苗的生长,降低植物的产量和质量^[36]。紫花苜蓿植物提取物显著影响根系生长和易感植物的形态分化,导致生物量减少。本研究发现,不同浓度的浸提液抑制了德宝的生长,T3浓度促进了WL298HQ的生长。

自毒物质会破坏膜系统,影响植物的正常生长发育^[37]。可溶性糖、可溶性蛋白质和脯氨酸为渗透调节物质。脯氨酸是一种重要的渗透剂和有效的羟基自由基清除剂,可以保护植物免受氧化应激^[38]。在本研究中,WL298HQ主要通过增加可溶性糖、可溶性蛋白质含量和脯氨酸含量来保持膜稳定性。德宝苜蓿的渗透调节物质变化差异不显著,不足以维持膜的稳定性。这些结果表明,WL298HQ表现出比德宝有更高的渗透调节能力,以响应自毒作用,而渗透调节物质含量的变化抑制了细胞膜的通透性和相关转化过程的能量。

自毒物质首先作用于植物的细胞质膜,进而影响其生理生化反应,抑制植物的生长发育。细胞质膜是由脂质和蛋白质组成的流体镶嵌结构,合适的流动性对细胞质膜实现其正常功能具有十分重要的作用。而植物自毒作用主要是在自毒物质胁迫下产生过多的活性氧,其中超氧阴离子通过歧化反应生成过氧化氢及单线态氧,过氧化氢能穿透细胞膜,通过反应生成羟自由基。自毒物质作用于细胞质膜后,植物应激系统将信号传递到下游并导致次级信使的产生(Ca^{2+} 、ROS和磷酸肌醇)^[39-40]。MDA含量可用于衡量质膜在压力下的稳定性。如果产生过量的ROS,则超氧阴离子通过歧化产生过氧化氢和单线态氧,使过氧化氢穿透细胞膜并形成羟基自由基^[41]。本研究结果表明,德宝、WL298HQ的ROS响应自毒作用存在显著差异。德宝中ROS对自毒作用的反应不同于WL298HQ,前者在T1和T2时显著积累了 H_2O_2 和 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 。

植物中存在的抗氧化酶(SOD、POD、CAT、APX

和GR)和抗氧化剂(AsA和GSH)维持了细胞内氧化还原平衡。SOD可以将 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 转化为 H_2O_2 ,而CAT、POD可减少 H_2O_2 的积累^[39]。本研究表明,紫花苜蓿WL298HQ幼苗主要通过增加抗氧化酶(SOD、POD、APX)活性和抗氧化剂AsA,保持膜的稳定性。德宝在T1下通过增加紫花苜蓿叶片保护酶(SOD、POD和CAT)活性,抗氧化酶APX和抗氧化剂ASA含量来响应非生物胁迫。在T2和T3时,积累了活性氧($\text{O}_2^{\cdot-}$ 和 H_2O_2),加重了膜脂过氧化程度,造成膜损伤。人参皂苷Rg1是人参(*Panax ginseng* C. A. Mey)的一种自毒物质,可导致根细胞中ROS的积累并抑制APX酶活性和AsA—GSH循环^[17]。

自毒物质诱导植物细胞产生ROS和MDA,进而破坏细胞膜系统的完整性。在本研究中,德宝叶片中ROS过度积累,抑制了抗氧化酶和AsA—GSH循环,导致膜脂过氧化,最终破坏细胞膜的完整性。德宝SOD和CAT活性降低,不能有效清除自毒物质产生的氧自由基。可能是因为 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 的生成率大于抗氧化酶的清除率。 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 的积累导致抗氧化酶失活并导致一系列连锁效应,造成质膜结构破坏,细胞膜系统氧化损伤。相比之下,自毒作用对WL656HQ影响较小,通过激活保护机制来保持其细胞膜的相对完整性,从而增加抗氧化酶的活性,维持细胞中氧自由基的产生和消除之间的动态平衡。由于MDA没有大量积累,细胞膜稳定性得以保持。

德宝苜蓿响应自毒作用,T1和T2处理积累了 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 和 H_2O_2 ,同时抑制可溶性糖的生成,打破了细胞氧化还原的动态平衡,细胞膜的完整性被破坏。WL298HQ响应自毒作用,T2处理积累了AsA和脯氨酸的合成,T3处理增加了 H_2O_2 的含量,但抑制了可溶性糖和DHA的积累,WL298HQ通过激活保护机制增加抗氧化剂的活性,从而保持细胞膜的相对完整性。

4 结论

在本研究中,分析了自毒作用下德宝和WL298HQ的种子萌发和幼苗生理变化,并对指标进行了比较分析。2个紫花苜蓿品种对种子萌发的自毒效应存在差异;德宝和WL298HQ对自毒作用具有不同的触发浓度和反应阈值。通过自毒作用对2个紫花苜蓿品种幼苗生理的影响发现:自毒作用会引起德宝和

WL298HQ氧化应激,进而导致ROS产生与抗氧化防御系统能力之间的不平衡。WL298HQ通过激活保护机制增加抗氧化剂的活性,以及渗透物质的积累,进而保持细胞膜的相对完整性和氧化清除能力。德宝苜蓿在自毒作用下,ROS的产生大于抗氧化防御系统的能力,导致氧化损伤。

参考文献:

- [1] Wang R L, Liu S W, Xin X W, *et al.* Phenolic acids contents and allelopathic potential of 10—cultivars of alfalfa and their bioactivity [J]. *Allelopathy Journal*, 2017, 40(1): 63—70.
- [2] 荣思川,师尚礼,孙灿灿. 苜蓿植株及根际土壤中主要酚酸和香豆素物质含量测定[J]. *土壤*, 2016, 48(5): 931—938.
- [3] 车晋滇,胡彬,王泽民,等. 紫花苜蓿药剂灭茬试验初报[J]. *杂草科学*, 2005(2): 46—48.
- [4] 荣思川,紫花苜蓿自毒物质含量及其效应研究[D]. 兰州:甘肃农业大学,2017.
- [5] 汪呈呈,陈钢,曹兴球,等. 不同光质对杉木幼苗抗氧化酶活性和叶绿素含量的影响[J]. *甘肃农业大学学报*, 2022, 57(4): 137—146.
- [6] Butsat S, Siriamornpun S. Antioxidant capacities and phenolic compounds of the husk, bran and endosperm of Thai rice[J]. *Food Chemistry*, 2010, 119(2): 606—613.
- [7] Chon S U, Jennings J A, Nelson C J. Alfalfa (*Medicago sativa* L.) autotoxicity: Current status [J]. *Allelopathy Journal*, 2006, 18(1): 57—80.
- [8] Chon S U, Choi S K, Jung S, *et al.* Effects of alfalfa leaf extracts and phenolic allelochemicals on early seedling growth and root morphology of alfalfa and barnyard grass [J]. *Crop Protection*, 2002, 21(10): 1070—1082.
- [9] 张晓玲,潘振刚,周晓锋,等. 自毒作用与连作障碍[J]. *土壤通报*, 2007(4): 781—784.
- [10] 徐岩. 广藿香化感自毒作用与根际土壤微生物互作效应研究[D]. 海口:海南大学,2015.
- [11] 张新慧. 当归连作障碍机制及其生物修复措施研究[D]. 兰州:甘肃农业大学,2009.
- [12] 翟志军,李祖毅,黄晓露,等. 外源酚酸对铝处理下桉树幼苗生长及抗氧化系统的影响[J]. *湖北农业科学*, 2016, 55(20): 5286—5290.
- [13] 丁桔. 黄瓜自毒物质和枯萎病的致害及其调控机制研究[D]. 杭州:浙江大学,2008.
- [14] 吴凤芝. 外源酚酸对黄瓜自毒作用的生理生化机制研究[D]. 哈尔滨:东北农业大学,2002.
- [15] 张恩平,张文博,张淑红,等. 苯甲酸和肉桂酸对番茄幼苗根部保护酶及膜质过氧化的影响[J]. *西北农业学报*, 2010, 19(1): 186—190.
- [16] Baziramakenga R, Leroux G D, Simard R R, *et al.* Effects of benzoic and cinnamic acids on membrane permeability of soybean roots [J]. *Journal of Chemical Ecology*, 1994, 21(9): 1271—1283.
- [17] Yang M, Youcong C, Guo C, *et al.* Panax notoginseng Root Cell Death Caused by the Autotoxic Ginsenoside Rg1 Is Due to Over—Accumulation of ROS, as Revealed by Transcriptomic and Cellular Approaches [J]. *Frontiers in Plant Science*, 2018, 9: 264—278.
- [18] Zhang X Y, Shi S L, Li X L, *et al.* Effects of Autotoxicity on Alfalfa (*Medicago sativa*): Seed Germination, Oxidative Damage and Lipid Peroxidation of Seedlings [J]. *Agronomy*. 2021, 11(6): 1027.
- [19] Chon S U, Kim Y M. Herbicidal potential and quantification of suspected allelochemicals from four grass crop extracts [J]. *Journal of Agronomy & Crop Science*, 2010, 190(2): 145—150.
- [20] International Seed Testing Association (ISTA). International Rules for Seed Testing [M]. ISTA Press: Basserdorf, Switzerland, 2012.
- [21] Williamson G B, Richardson D. Bioassays for allelopathy: Measuring treatment responses with independent controls [J]. *J Chem Ecol*, 1988, 14: 181—187.
- [22] Draper H H, Hadley M. Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation [J]. *Methods Enzymol*, 1990, 186: 421—431.
- [23] Willekens H. Catalase is a sink for H₂O₂ and is indispensable for stress defence in C₃ plants [J]. *Eur Mol Biol Organ J*, 1997, 16: 4806—4816.
- [24] Liu Y J, Zhao Z G, Si J, *et al.* Brassinosteroids alleviate chilling—induced oxidative damage by enhancing antioxidant defense system in suspension cultured cells of *Chorispora bungeana* [J]. *Plant Growth Regul*, 2009, 59: 207—214.
- [25] Elstner E F, Heupel A. Formation of hydrogen peroxide by isolated cell walls from horseradish (*Armoracia lapathifolia* Gilib.) [J]. *Planta*, 1976, 130: 175—180.
- [26] Giannopolitis C N, Ries S K. Superoxide dismutases I.

- Occurrence in higher plants[J]. *Plant Physiol*, 1977, 59: 309—314.
- [27] Chance B, Maehly A C. Assay of catalase and peroxidases [J]. *Methods Enzymol*, 1995, 2: 764—775.
- [28] Havir E A, Mchale N A. Biochemical and developmental characterization of multiple forms of catalase in tobacco leaves[J]. *Plant Physiol*, 1987, 84: 450—455.
- [29] Murshed R, Lopezlauri F, Sallanon H. Microplate quantification of enzymes of the plant ascorbate—glutathione cycle[J]. *Anal Biochem*, 2008, 383: 320—322.
- [30] Murshed R, Lopezlauri F, Sallanon H. Effect of water stress on antioxidant systems and oxidative parameters in fruits of tomato (*Solanum lycopersicon* L. cv. Micro—tom) [J]. *Physiol Mol Biol Plants*, 2013, 19: 363—378.
- [31] Ghimire B K, Ghimire B, Yu C Y, *et al.* Allelopathic and Autotoxic Effects of *Medicago sativa*—Derived Allelochemicals[J]. *Plants*, 2019, 8: 233.
- [32] Amado P A, Castro A H F, Zanuncio V S S, *et al.* Assessment of allelopathic, cytotoxic, genotoxic and antigenotoxic potential of *Smilax brasiliensis* Sprengel leaves [J]. *Ecotoxicol Environ Saf*, 2020, 192: 110310.
- [33] Dayan F E, Romagni J G, Duke S O. Investigating the Mode of Action of Natural Phytotoxins[J]. *J Chem Ecol*, 2000, 26: 2079—2094.
- [34] Chon S U, Choi S K, Jung S, *et al.* Effects of alfalfa leaf extracts and phenolic allelochemicals on early seedling growth and root morphology of alfalfa and barnyard grass [J]. *Crop Prot*, 2002, 21: 1077—1082.
- [35] Yang M, Zhang X, Xu Y, *et al.* Autotoxic Ginsenosides in the Rhizosphere Contribute to the Replant Failure of *Panax notoginseng*[J]. *PLOS ONE*, 2015, 10: e0118555.
- [36] Chi W C, Chen Y A, Hsiung Y C, *et al.* Autotoxicity mechanism of *Oryza sativa*: Transcriptome response in rice roots exposed to ferulic acid[J]. *BMC Genom*, 2013, 14: 351.
- [37] 王梓, 李勇, 丁万隆. 人参化感自毒作用与连作障碍机制研究进展[J]. *中国现代中药*, 2017, 19(7): 1040—1044.
- [38] 杨延杰, 王晓伟, 赵康, 等. 邻苯二甲酸对萝卜种子萌发、幼苗叶片膜脂过氧化及渗透调节物质的影响[J]. *生态学报*, 2013, 33(19): 6074—6080.
- [39] 吴凤芝, 潘凯, 周秀艳. 苯丙烯酸对黄瓜幼苗生理特性的影响[J]. *应用生态学报*, 2005, 16(5): 4.
- [40] 陶茸, 尹国丽, 师尚礼. 酚酸类物质对苜蓿种子萌发的化感作用研究[J]. *草原与草坪*, 2018, 38(3): 6.
- [41] 张恩平, 张文博, 张淑红, 等. 苯甲酸和肉桂酸对番茄幼苗根部保护酶及膜质过氧化的影响[J]. *西北农业学报*, 2010, 19(1): 186—190.

Response of the oxidative stress defense system to autotoxicity in alfalfa seedlings

ZHANG Xiao-yan, SHI Shang-li*, LI Xiao-long, Ayun

(College of Grassland Science, Gansu Agricultural University, Key Laboratory for Grassland Ecosystem, Ministry of Education, Grassland Engineering Laboratory of Gansu Province, Sino-U. S. Centers for Grazing Land Ecosystem Sustainability, Lanzhou 730070, China)

Abstract: [Objective] To investigate the effects of autotoxicity on seed germination, seedling growth and leaf cell membrane oxidative defense system of alfalfa varieties. The reactive oxygen metabolism mechanism of alfalfa seedlings in response to autotoxicity was clarified to provide a theoretical basis for the prevention and control of toxic effects. [Method] The alfalfa varieties Debao and WL298HQ were selected as the test materials. Leaves at the flowering stage were prepared into T1 (0.025 g/mL), T2 (0.125 g/mL) and T3 (0.225 g/mL) extracts to simulate autotoxicity effects. The study aimed to investigate the effect of autotoxicity on seed bioactivity and allelopathic index, as well as on seedling growth, reactive oxygen species (H_2O_2 , $\text{OH}\cdot$ and $\text{O}_2^{\cdot-}$), antioxidant enzymes and antioxidants

in the oxidative defense system, osmotic regulatory substances. 【Result】 The results showed that leaf extracts inhibited the germination of Debao and WL298HQ alfalfa seeds at different concentrations, while T3 inhibited the seedling growth. Compared with WL298HQ, Debao exhibited obvious physiological differences in response to autotoxicity. Autotoxic substances acted on the cell membrane, inducing oxidative stress, accelerating the metabolism of reactive oxygen species (ROS), leading to the excessive accumulation of MDA, H_2O_2 and $OH\cdot$, affecting the stability of the cell membrane. Debao responded to autotoxicity by increasing leaf protective enzyme (SOD, POD, CAT, APX, GR) activity and antioxidant system (AsA, DHA) activity under T1 treatment. However, the increase in soluble sugar, soluble protein and free proline content, coupled with autotoxicity, affected the stability of the oxidative defense system, resulting in severe oxidative damage in leaves under T3 treatment. 【Conclusion】 WL298HQ increased the antioxidants activity and the accumulation of permeable substances by activating protective mechanisms, thus maintaining the relative integrity of the cell membrane and oxidative scavenging capacity. Debao responded to autotoxicity by increasing the ROS production greater than the ability of antioxidant defense system, resulting in oxidative damage.

Key words: alfalfa; autotoxicity; seed germination; oxidative stress; oxidative damage

(责任编辑 靳奇峰)