

南方型紫花苜蓿叶片响应盐胁迫的代谢组学分析

李佳贇,马 进,王依纯,朱绍华
(浙江农林大学 风景园林与建筑学院,浙江 临安 311300)

摘要:为明确紫花苜蓿叶片对盐胁迫的响应机制,采用比较代谢组学方法与气相色谱和飞行时间质谱联用(GC-TOF/MS)技术分析了盐胁迫下野生型与突变体紫花苜蓿叶片的代谢产物差异。结果表明,盐胁迫对野生型和突变体紫花苜蓿的株高、根长、地上和地下部干质量的生长均有抑制作用,与CK(正常培养)相比,盐胁迫下突变体紫花苜蓿地上和地下部干质量、株高、根长的降幅小于野生型。通过主成分分析(PCA)与正交偏最小二乘法判别分析(OPLS-DA)方法,筛选出野生型与突变体紫花苜蓿叶片中有41种共同表达的差异代谢产物。与CK相比,盐胁迫下野生型紫花苜蓿叶片中甘露糖和葡萄糖等可溶性糖和脂肪酸代谢产物含量下降,参与TCA循环的柠檬酸、富马酸、 α -酮戊二酸和琥珀酸等含量显著增加,而盐胁迫下突变体叶片中脯氨酸、谷氨酸、肌醇和甘露糖等有机化合物含量上升。推测,野生型紫花苜蓿的耐盐机制可能是促进TCA循环产生更多的ATP,而突变体紫花苜蓿的耐盐机制则可能是积累了较多的渗透物质(糖、肌醇、脯氨酸)。

关键词:紫花苜蓿;生长参数;叶片;盐胁迫;代谢组学

中图分类号: S551. +7 **文献标志码:** A **文章编号:** 1004-3268(2019)05-0030-07

Metabolomics Analysis of Leaf Response of Southern Alfalfa under Salt Stress

LI Jiayun, MA Jin, WANG Yichun, ZHU Shaohua
(School of Landscape Architecture, Zhejiang Agriculture and Forestry University, Lin'an 311300, China)

Abstract: In order to clear and definite the reaction mechanism of alfalfa leaves under salt stress, the difference in metabolites between wild and mutant alfalfa leaves under salt stress was analyzed by using comparative metabolomics, and GC/TOF-MS. The results showed that salt stress inhibited the growth of plant height, root length, above-ground and below-ground dry weight of wild-type and mutant alfalfa. Compared with the control (normal culture), the plant height, root length, above-ground and below-ground dry weight of mutant alfalfa under salt stress decreased less than that of wild type. Besides, 41 co-expressed differential metabolites in both wild and mutant alfalfa leaves were screened out by using PCA and OPLS-DA. Compared with the control, the content of soluble sugar such as mannose and glucose and fatty acid metabolites decreased significantly under salt stress while the content of citric acid, fumaric acid, α -ketoglutaric acid and succinic acid involved in the TCA cycle increased significantly in the wild type alfalfa leaves. The content of organic compounds such as proline, glutamic acid, inositol and mannose increased in the leaves of mutants under salt stress. It indicated that the salt-tolerance mechanism of wild alfalfa might be producing more ATP by promoting the TCA cycle, while the salt-tolerance mechanism of mutant alfalfa might be accumulating more osmotic substances (such as sugar, inositol, proline).

Key words: Alfalfa; Growth parameter; Leaves; Salt stress; Metabolomics

收稿日期:2018-12-04
基金项目:浙江省自然科学基金项目(LY16C170003);国家自然科学基金项目(31272494)
作者简介:李佳贇(1992-),女,浙江湖州人,在读硕士研究生,研究方向:园林植物与观赏园艺。E-mail:ljyjdq@163.com
通信作者:马 进(1973-),男,安徽泗县人,副教授,博士,主要从事园林植物与观赏园艺研究。
E-mail:majinzjl@163.com

日益加剧的土壤盐碱化已成为影响农业可持续发展的主要危害因子,预计到2050年,全球将会有1/2的耕地盐碱化^[1-2]。紫花苜蓿(*Medicago sativa* L.)根系发达且具有根瘤菌,固氮能力强,能够快速使海涂覆绿,加快海涂生物治理脱盐,提高土壤肥力,改善海涂生态环境,可作为一种新的围垦海涂的改良先锋绿化植物,开发出更多的土地后备资源,实现耕地占补平衡。从国外引进的高秋眠级紫花苜蓿品种表现出产量高、品质好和再生快等特点,但其耐盐能力有限,无法在南方沿海滩涂盐碱地大规模种植。利用现代生物学技术,创制南方型紫花苜蓿耐盐新种质,是培育耐盐碱海涂种植紫花苜蓿新品种的根本途径,而明确南方型紫花苜蓿盐胁迫应答的调控机制是首要前提。

近年来,植物耐盐有关方面的研究越来越受到重视。据报道,植物在应对盐胁迫时,叶片中的脯氨酸含量明显上升^[3-6]。盐处理下,光叶漆(*Rhus glabra* L.)等树种的树高、生长量和生物量积累均有不同程度的下降,且盐浓度越高,降幅越大^[7]。另外,由于植物耐盐性属于复杂的数量遗传性状,单纯从基因或蛋白质水平上研究具有片面性,因为基因与蛋白质水平上的变化并不一致,而蛋白质合成后的各种修饰往往会带来细胞活性的改变^[8-9]。植物在响应和适应盐胁迫的过程中,需要不断调节自身复杂的代谢网络来维持系统内部的动态平衡。为明确紫花苜蓿响应盐胁迫的代谢途径,以南方型紫花苜蓿野生型和耐盐突变体为材料,测定盐胁迫下野生型与突变体紫花苜蓿的根长、株高、生物量积累以及叶片的代谢产物,绘制紫花苜蓿叶片的代谢通道,分析盐胁迫下野生型与突变体紫花苜蓿叶片的代谢产物差异,从代谢组水平上明确紫花苜蓿叶片对盐胁迫的响应机制。

1 材料和方法

1.1 试验材料 with 处理

以南方型紫花苜蓿品种 Millennium 野生型(Wild type, WT)为材料,通过以NaCl为选择因子对长期继代培养的紫花苜蓿愈伤组织进行选择,筛选出耐1.2% NaCl的耐盐细胞系,经生理检测为体细胞无性系突变体(Mutant, MT)紫花苜蓿^[10],经过3代自交,进行抗盐性鉴定筛选,发现该突变体耐盐性可以稳定遗传,以该突变体的T₄代为材料进行研究。

将紫花苜蓿突变体和野生型种子置于培养皿中,于20℃生长箱内发芽。5 d后,将种子发芽后的

小苗转移至装满细沙和珍珠岩(体积比3:1)的塑料盆中。用1/2Hoagland营养液培养4周后,各取野生型和突变体12盆进行试验。以添加250 mmol/L NaCl的1/2Hoagland营养液进行培养作为盐胁迫处理(NS),以1/2Hoagland营养液继续培养作为对照(CK)。处理72 h后,从每个处理每个材料中随机取3盆测定生长指标;另取每个处理每个材料剩余的3盆,分别采收紫花苜蓿叶片,混合后于液氮中冷冻,-80℃保存备用,用于代谢产物的提取。

1.2 生长指标测定

分别对野生型和突变体紫花苜蓿的株高(cm)进行测量,然后将植株的地上部和地下部分开,用蒸馏水多次冲洗根系直至干净,并将根系水分吸干,测量植株的根长(cm)。最后,将植株的地上部和地下部放入烘箱120℃杀青30 min,然后80℃烘干至恒质量,测量地上部和地下部的干质量(g)。

1.3 代谢产物提取和鉴定

分别取CK和盐处理叶片组织样品(50 mg)转移至1.5 mL EP管(Eppendorf Micro Test Tubes, Eppendorf China Limited, Shanghai City, China),先加入0.5 mL提取液($V_{\text{甲醇}}:V_{\text{氯仿}}=3:1$),再加入60 μL核糖醇(0.2 mg/mL保存于dH₂O)作为内标,漩涡混匀,然后使用热混合仪于4℃、12 000 r/min离心10 min,取出0.4 mL上清液转移到2 mL GC-MS玻璃小瓶中作为新样品。将80 μL甲氧基胺化试剂(20 mg/mL吡啶溶液)加入到新样品中,涡旋10 s,在真空浓缩器中干燥,并置于37℃烘箱2 h。之后,向每个样品中加入0.1 mL BSTFA试剂(含1% TMCS, V/V),70℃振荡1 h。当所有样品的温度降至室温时,通过气相色谱和飞行时间质谱联用进行GC-MS分析。最后,将归一化的数据导入Simca-P软件,采用PLS-DA(Partial least squares-discriminant analysis)模型第一主成分的VIP值(>1)并结合Student's *t*-test检验的*P*值(阈值0.05)寻找差异表达代谢产物,用MST商业数据库鉴定各种代谢产物。

1.4 数据分析和代谢网络的构建

采用多元变量统计分析方法(PCA、PLS-DA、OPLS-DA)对代谢产物进行分析,不同处理代谢产物的差异用*t*检验和ANOVA进行分析。利用Metaboanalyst进行代谢途径检索,选择拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)、水稻(*Oryza sativa*)、百脉根(*Lotus orniculatus*)和蔊菜苜蓿(*Medicago truncatula*)等相关代谢数据库进行比对,并参考KEGG代谢数据库绘制代谢通路。

2 结果与分析

2.1 盐胁迫下野生型和突变体紫花苜蓿的生长变化

表 1 表明,与 CK 相比,盐胁迫下突变体和野生

型紫花苜蓿株高、根长、地上和地下部干质量均下降,其中,野生型紫花苜蓿地上和地下部干质量降幅最大。同时,盐胁迫下突变体紫花苜蓿地上和地下部干质量、株高、根长的降幅小于野生型。

表 1 盐胁迫对野生型和突变体紫花苜蓿生长的影响

Tab.1 Effect of salt stress on the growth of wild type and mutant alfalfa

生长指标 Growth indicator	野生型 Wild type			突变体 Mutant		
	对照 (CK) Control	盐处理 (NS) Salt treatment	NS/CK	对照 (CK) Control	盐处理 (NS) Salt treatment	NS/CK
株高/cm Plant height	11.56 ± 0.26	9.60 ± 0.24	0.83	11.31 ± 0.09	9.70 ± 0.38	0.86
根长/cm Root length	20.30 ± 0.80	18.69 ± 0.51	0.92	19.80 ± 0.22	18.44 ± 0.74	0.93
地上部干质量/g Aboveground dry weight	1.62 ± 0.02	1.25 ± 0.05	0.77	1.85 ± 0.02	1.78 ± 0.01	0.96
地下部干质量/g Underground dry weight	1.66 ± 0.05	1.20 ± 0.02	0.77	1.51 ± 0.01	1.49 ± 0.02	0.99

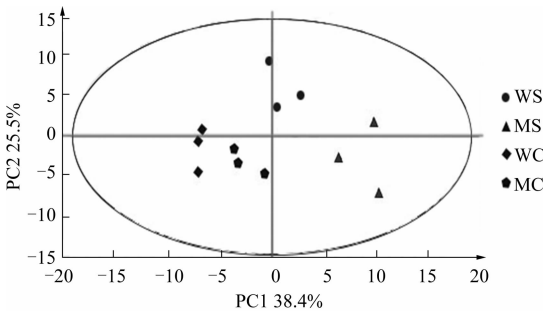
2.2 盐胁迫下野生型和突变体紫花苜蓿叶片代谢图谱的主成分分析 (PCA)

利用 SIMCA - P 软件,将盐胁迫 72 h 处理组和 CK 组紫花苜蓿叶片的代谢产物数据进行对数转换处理,然后进行自动建模,同时利用正交偏最小二乘法 - 判别分析 (OPLS - DA) 的统计方法对结果进行 PCA 分析 (图 1),以反映野生型和突变体紫花苜蓿叶片代谢图谱中的相似性和差异性。

突变体紫花苜蓿叶片的代谢调控不同。因此,对代谢产物进一步分析,构建出代谢通路,可揭示紫花苜蓿叶片的耐盐调控机制。

2.3 盐胁迫下野生型和突变体紫花苜蓿叶片差异代谢产物分析

基于气相色谱 - 飞行时间质谱 (GC - TOF/MS) 代谢组数据的固有特性,使用多元变量统计分析方法对数据进行分析,通过比较野生型和突变体紫花苜蓿叶片在盐胁迫下的差异代谢产物,探讨紫花苜蓿叶片在盐胁迫下代谢途径的变化。通过数学统计分析及筛选 ($P < 0.05$, $VIP > 1$),从极性提取物中筛选出差异代谢产物,野生型和突变体紫花苜蓿叶片中共筛选出 41 种重叠的差异代谢产物。由表 2 可见,41 种共同差异代谢产物中,盐胁迫处理下突变体叶片中有 25 种上调,16 种下调,尤其是氨基酸类代谢产物,上调的有 11 种;而盐胁迫处理下野生型叶片中有 18 种上调,23 种下调,其上调的代谢产物主要是有机酸。与 CK 相比,盐胁迫下野生型叶片中脯氨酸、天冬氨酸、天冬酰胺、丙氨酸、苏氨酸、缬氨酸含量增加,而甘氨酸、丝氨酸、谷氨酸、赖氨酸、亮氨酸、 β - 丙氨酸含量降低;突变体叶片中除赖氨酸含量较 CK 降低外,其他氨基酸的含量均增加。与 CK 相比,盐胁迫下野生型叶片中苹果酸含量显著下降,而柠檬酸、 α - 酮戊二酸、琥珀酸、富马酸、异柠檬酸、马来酸含量显著增加;盐胁迫下突变体叶片中富马酸和异柠檬酸含量较 CK 极显著增加外,其他有机酸含量均下降。与 CK 相比,盐胁迫下野生型叶片中月桂酸、棕榈酸、硬脂酸、亚麻酸和肉豆蔻酸含量均明显下降,突变体叶片中月桂酸和硬脂



WS、MS 分别表示盐处理下野生型、突变体紫花苜蓿叶片, WC、MC 分别表示对照处理下野生型、突变体紫花苜蓿叶片
WS and MS mean the wild type and mutant alfalfa leaf under salt treatment, respectively;
WC and MC mean the wild type and mutant alfalfa leaf under the control treatment, respectively

图 1 盐胁迫下野生型和突变体紫花苜蓿叶片代谢图谱的 PCA 分析

Fig.1 Principal component analysis of leaf metabolic profiles of wild type and mutant alfalfa under salt treatment

由图 1 可知,盐胁迫下野生型与突变体紫花苜蓿叶片在 PC1 上有明显分离,PC1 的贡献率为 38.4%,而 PC2 贡献率则为 25.5%,表明野生型与

酸含量增加,其他脂肪酸含量均下降。与 CK 相比,盐胁迫下野生型叶片中半乳糖、果糖-6-磷酸和磷酸烯醇含量增加,而甘露糖、木糖、海藻糖、肌醇、Myo-肌醇、麦芽糖、6-磷酸葡萄糖和葡萄糖含量下降;盐胁迫下突变体叶片中甘露糖、半乳糖、肌醇、Myo-肌醇和果糖-6-磷酸含量显著或极显著增加,而木糖、海藻糖、麦芽糖、6-磷酸葡萄糖、葡萄糖和磷酸烯醇含量降低。

表 2 盐胁迫下野生型与突变体紫花苜蓿叶片代谢产物的变化
Tab.2 Metabolic profile changes in leaves of wild-type and mutant alfalfa after salt stress

		野生型 Wild type			突变体 Mutant		
代谢产物类别	代谢产物名称	对照 (CK)	盐处理 (NS)	NS/CK	对照 (CK)	盐处理 (NS)	NS/CK
Metabolite	Predicted metabolite						
category		Control	Salt treatment		Control	Salt treatment	
有机酸	柠檬酸 Citric acid	0.583 ± 0.117	2.819 ± 0.634	4.832 *	3.349 ± 0.521	1.489 ± 0.091	0.445
	α-酮戊二酸 α-ketoglutaric acid	1.058 ± 0.076	1.699 ± 0.117	1.605 **	0.481 ± 0.021	0.173 ± 0.009	0.359 **
	琥珀酸 Succinic acid	1.752 ± 0.0569	2.399 ± 0.141	1.369 *	2.488 ± 0.045	1.985 ± 0.070	0.797
	富马酸 Fumaric acid	0.614 ± 0.059	1.267 ± 0.183	2.063 **	0.385 ± 0.013	0.743 ± 0.047	1.931 **
	苹果酸 Malic acid	0.266 ± 0.006	0.201 ± 0.005	0.757 *	0.340 ± 0.013	0.280 ± 0.013	0.823 **
氨基酸	异柠檬酸 Isocitrate	0.430 ± 0.072	2.159 ± 0.502	5.028 *	1.629 ± 0.046	5.372 ± 0.052	3.297 **
	马来酸 Maleic acid	0.961 ± 0.014	1.402 ± 0.504	1.459 *	1.401 ± 0.026	0.836 ± 0.013	0.597 **
	脯氨酸 Proline	0.519 ± 0.014	0.824 ± 0.044	1.589 **	0.422 ± 0.027	1.213 ± 0.128	2.872 *
	天冬氨酸 Aspartic acid	0.001 ± 0.000	0.003 ± 0.000	1.884 **	0.001 ± 0.000	0.004 ± 0.000	4.641 **
	天冬酰胺 Asparagine	0.018 ± 0.000	0.025 ± 0.001	1.354 **	0.023 ± 0.000	0.037 ± 0.000	1.561 **
	甘氨酸 Glycine	0.125 ± 0.010	0.014 ± 0.003	0.113 *	0.046 ± 0.005	0.113 ± 0.007	2.460 *
	丝氨酸 Serine	0.086 ± 0.007	0.012 ± 0.002	0.143 **	0.086 ± 0.006	0.223 ± 0.012	2.594 **
	丙氨酸 Alanine	0.262 ± 0.032	0.829 ± 0.028	3.161 *	1.307 ± 0.069	2.095 ± 0.089	1.603 *
	谷氨酸 Glutamate	0.187 ± 0.008	0.011 ± 0.003	0.061 **	0.116 ± 0.003	2.914 ± 0.077	25.160 **
	苏氨酸 Threonine	0.589 ± 0.152	1.919 ± 0.245	3.256 *	0.988 ± 0.074	4.037 ± 0.744	4.085 *
脂肪酸	缬氨酸 Proline	0.009 ± 0.001	0.015 ± 0.001	1.686	0.015 ± 0.002	0.104 ± 0.005	7.053 **
	赖氨酸 Lysine	0.968 ± 0.088	0.629 ± 0.059	0.650 *	2.369 ± 0.344	1.315 ± 0.045	0.555 *
	亮氨酸 Leucine	1.193 ± 0.129	0.690 ± 0.001	0.578 *	1.266 ± 0.021	1.418 ± 0.019	1.120 *
	β-丙氨酸 β-alanine	0.288 ± 0.012	0.218 ± 0.001	0.760 *	0.411 ± 0.029	1.164 ± 0.164	2.834 *
	月桂酸 Lauric acid	0.898 ± 0.008	0.799 ± 0.005	0.890 *	0.687 ± 0.007	0.778 ± 0.006	1.132 **
	棕榈酸 Palmitic acid	0.049 ± 0.005	0.028 ± 0.004	0.562	0.050 ± 0.001	0.037 ± 0.001	0.741 *
	硬脂酸 Stearic acid	0.009 ± 0.002	0.001 ± 0.000	0.088 **	0.004 ± 0.000	0.007 ± 0.001	1.790
糖及多元醇	亚麻酸 Linolenic acid	0.021 ± 0.001	0.018 ± 0.001	0.813	0.015 ± 0.001	0.013 ± 0.001	0.882
	肉豆蔻酸 Myristic acid	0.750 ± 0.021	0.250 ± 0.054	0.333 *	0.519 ± 0.015	0.217 ± 0.011	0.418 **
	甘露糖 Mannose	0.052 ± 0.002	0.035 ± 0.001	0.668 *	0.028 ± 0.001	0.035 ± 0.001	1.253 *
	木糖 Xylose	0.077 ± 0.004	0.042 ± 0.001	0.545 *	0.115 ± 0.001	0.095 ± 0.001	0.819
	半乳糖 Galactose	0.011 ± 0.001	0.017 ± 0.005	1.582	0.023 ± 0.001	0.034 ± 0.000	1.469 **
	海藻糖 Trehalose	0.077 ± 0.004	0.042 ± 0.001	0.545 **	0.115 ± 0.001	0.095 ± 0.001	0.819 **
	肌醇 Inositol	0.004 ± 0.000	0.002 ± 0.000	0.475 **	0.006 ± 0.001	0.012 ± 0.001	1.850 *
	Myo-肌醇 Myo-inositol	0.002 ± 0.000	0.001 ± 0.000	0.309	0.002 ± 0.000	0.006 ± 0.000	2.573 *
	麦芽糖 Maltose	1.161 ± 0.130	0.518 ± 0.001	0.446 *	1.556 ± 0.034	0.553 ± 0.020	0.356 **
	果糖-6-磷酸 Fructose-6-phosphate	1.550 ± 0.098	1.882 ± 0.058	1.214	0.229 ± 0.028	1.069 ± 0.162	4.675 *
其他	6-磷酸葡萄糖 Glucose-6-phosphate	0.054 ± 0.007	0.031 ± 0.001	0.576	0.054 ± 0.001	0.042 ± 0.002	0.779 **
	葡萄糖 Glucose	0.092 ± 0.018	0.038 ± 0.004	0.415 *	0.102 ± 0.005	0.029 ± 0.003	0.286 *
	磷酸烯醇 Phosphoenol	0.324 ± 0.021	0.518 ± 0.013	1.595 **	0.672 ± 0.006	0.482 ± 0.011	0.718 **
	腺嘌呤 Adenine	0.021 ± 0.002	0.009 ± 0.001	0.456	0.006 ± 0.000	0.009 ± 0.001	1.476
	腺苷 Adenosine	0.078 ± 0.004	0.101 ± 0.005	1.295 *	0.086 ± 0.004	0.387 ± 0.008	4.523 **
	黄嘌呤 Xanthine	1.235 ± 0.033	0.577 ± 0.010	0.467 **	0.259 ± 0.014	0.150 ± 0.008	0.578 **
	尿囊素 Alantan	0.069 ± 0.002	0.087 ± 0.001	1.246 **	0.012 ± 0.001	0.066 ± 0.003	5.300 **
	尿素 Carbamide	0.060 ± 0.001	0.049 ± 0.002	0.826	0.003 ± 0.000	0.090 ± 0.006	30.310 **
	马来酰亚胺 2,5-pyrroledione	0.036 ± 0.003	0.389 ± 0.018	10.705 **	0.113 ± 0.006	7.676 ± 0.687	67.904 **

注: *、** 分别表示盐处理和 CK 差异显著 ($P < 0.05$)、极显著 ($P < 0.01$)。
Note: * and ** indicate that the difference between the salt treatment and the control was significant ($P < 0.05$) and extremely significant ($P < 0.01$).

2.4 盐胁迫下野生型和突变体紫花苜蓿叶片代谢产物的代谢通路分析

对所得代谢产物与 KEGG 数据库进行比对发现,野生型与突变体紫花苜蓿叶片代谢产物主要集中在氨基酸生物合成、氨酰-tRNA 生物合成、三羧酸(TCA)循环、半乳糖代谢过程中(图 2)。有 11 个

氨基酸、7 个糖、2 个糖醇和 5 个有机酸参与了糖酵解、氨基酸合成和 TCA 循环。通过对代谢产物和代谢通路进行整合分析,发现盐胁迫下野生型紫花苜蓿叶片中参与 TCA 循环的柠檬酸、富马酸、 α -酮戊二酸、马来酸、琥珀酸含量与 CK 相比显著上调,甘

露糖、葡萄糖、木糖、海藻糖、麦芽糖显著下调;盐胁迫下突变体紫花苜蓿叶片中丝氨酸、甘氨酸、丙氨酸、亮氨酸、 β -丙氨酸、天冬酰胺、苏氨酸、谷氨酸、脯氨酸和 Myo-肌醇含量显著上调。

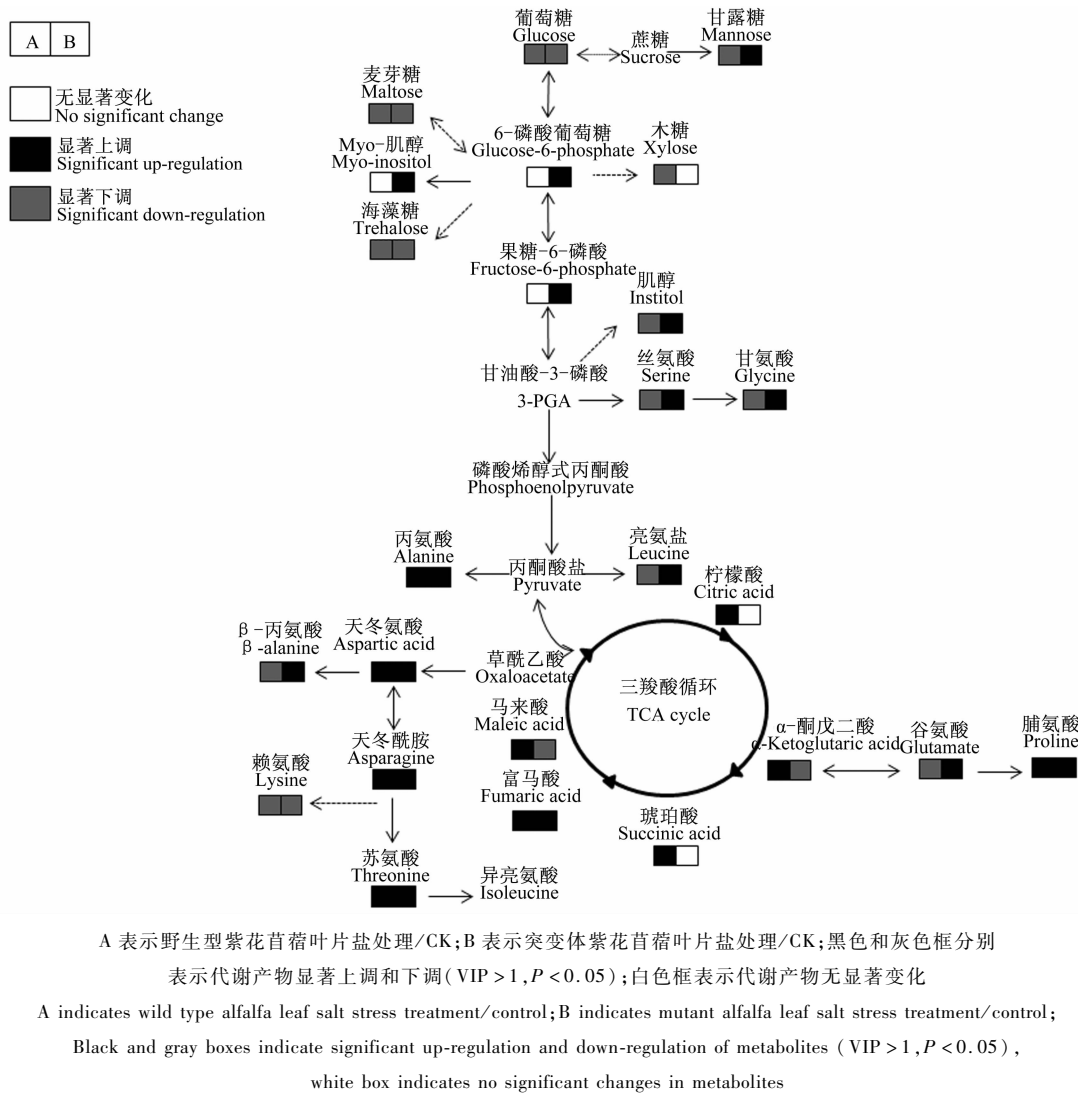


图 2 盐胁迫下野生型与突变体紫花苜蓿叶片的代谢通路

Fig. 2 Metabolic pathways of wild type and mutant alfalfa leaves under salt stress

3 结论与讨论

盐胁迫下植物会受到不同程度的伤害,其生物量变化反映盐胁迫对植物的影响,同时也是衡量植物耐盐性的直接指标。研究表明,随着土壤盐度升高,高粱 (*Sorghum bicolor*) 等植物生长受到抑制^[11-16]。本研究结果显示,与 CK 相比,盐胁迫后野生型和突变体紫花苜蓿的株高、根长、地上和地下部干质量降低,这说明盐胁迫对野生型和突变体紫花苜蓿的生长均有抑制作用,但盐胁迫下,野生型紫花苜蓿的株高、根长及地上地下干质量等生长参数的

降幅大于突变体,说明突变体对盐胁迫具有较好的适应性,表现出较强的耐盐性。

植物在受到盐胁迫时,为了调节细胞质与环境之间的渗透压,体内会积累一些小分子物质来降低水势,这些小分子物质被称为渗透调节物质^[17],主要包括有机酸、氨基酸、脂肪酸、糖及多元醇等代谢产物^[18]。研究表明,盐胁迫下,植物体内的葡萄糖、果糖、蔗糖等可溶性糖含量升高^[19-20],这可能是因为植物通过调节细胞内的渗透势来保护细胞结构完整,从而更好地应对盐胁迫带来的伤害^[21]。此外,多元醇、甲基衍生物松醇和肌醇也被公认为是渗透

调节物,并且在胁迫条件下显著积累,在植物响应逆境胁迫时发挥一定的作用^[22-25]。本研究结果显示,与CK相比,盐胁迫下野生型紫花苜蓿叶片中半乳糖和果糖-6-磷酸含量上升,其他可溶性糖和肌醇含量均有所下降。野生型紫花苜蓿并不是通过增加可溶性糖和肌醇类渗透调节物质来适应盐胁迫。与CK相比,盐胁迫下突变体紫花苜蓿叶片则积累更多的肌醇、甘露糖、半乳糖等渗透调节物质。氨基酸既能合成蛋白质,又是植物应对环境胁迫时产生相关代谢产物的前体^[26]。研究证实,盐胁迫下,脯氨酸、苏氨酸、谷氨酸等氨基酸含量增加可减轻荷花(*Nelumbo nucifera*)受到盐胁迫的伤害^[27]。本研究发现,与CK相比,盐胁迫下野生型和突变体紫花苜蓿叶片中脯氨酸和苏氨酸含量显著上升,但突变体紫花苜蓿叶片中积累的氨基酸总量比野生型积累得更多。可见,突变体紫花苜蓿叶片可通过积累更多的氨基酸、肌醇、甘露糖、半乳糖等渗透调节物质来增强对盐胁迫的适应性。

在应对逆境胁迫时,参与植物体内物质和能量代谢的有机酸含量会发生变化,植物在正常生长环境中,体内有机酸含量很低,而在响应盐胁迫逆境时有机酸含量则会升高,但不会对植物细胞造成伤害^[28]。本研究发现,与CK相比,盐胁迫下野生型紫花苜蓿叶片中参与TCA循环的柠檬酸、富马酸、 α -酮戊二酸和琥珀酸含量显著上调,表明TCA循环增强。而葡萄糖、甘露糖、木糖等含量显著下降,这表明野生型紫花苜蓿叶片中一些糖含量的降低,可能使碳水化合物的合成受到抑制,让更多糖类流入TCA循环中,从而适应盐胁迫。同时,与CK相比,盐胁迫下突变体叶片中参与TCA循环的柠檬酸、 α -酮戊二酸、马来酸和琥珀酸含量减少。表明突变体紫花苜蓿响应盐胁迫时与TCA循环并无明显关系。

脂肪酸是植物细胞膜的重要组成成分,盐胁迫下植物细胞结构受到破坏,细胞内容物大量溢出,造成脂肪酸含量降低^[29]。研究表明,生物通过脂肪酸脱饱和和维持膜的流动性来适应外界环境变化,而脂肪酸和质膜是植物应对盐胁迫响应时的重要物质^[30]。本研究发现,与CK相比,盐胁迫下野生型紫花苜蓿叶片中脂肪酸含量不仅没有增加反而出现下降的现象,而盐胁迫下突变体叶片中除月桂酸、硬脂酸外,其他脂肪酸的含量都有不同程度下降,这说明脂肪酸含量的降低可能是紫花苜蓿响应盐胁迫的一种适应性策略。

综上,盐胁迫对突变体紫花苜蓿生长的抑制作

用明显低于野生型紫花苜蓿,说明突变体紫花苜蓿比野生型紫花苜蓿具有更高的耐盐性。盐胁迫下,野生型紫花苜蓿叶片中的差异代谢产物有18种上调、23种下调,而突变体叶片中则有25种上调、16种下调。与CK相比,盐胁迫下野生型紫花苜蓿叶片中葡萄糖、甘露糖、木糖等可溶性糖和脂肪酸含量下降,而突变体叶片中脯氨酸、谷氨酸、肌醇和甘露糖等有机化合物含量上升,说明野生型与突变体紫花苜蓿叶片的耐盐机制明显不同。野生型紫花苜蓿可能是通过加强TCA循环释放出更多的ATP来应对盐胁迫,而突变体紫花苜蓿则通过减少ATP的消耗,积累较多的渗透物质(脯氨酸、糖、肌醇)来增强其耐盐性。

参考文献:

- [1] YAMAGUCHI T, BLUMWALD E. Developing salt-tolerant crop plants: Challenges and opportunities [J]. Trends in Plant Science, 2005, 10(12): 615-620.
- [2] MUNNS R, TESTER M. Mechanisms of salinity tolerance [J]. Annual Review of Plant Biology, 2008, 59(1): 651-681.
- [3] DEMIRAL T, TÜRKAN I. Exogenous glycinebetaine affects growth and proline accumulation and retards senescence in two rice cultivars under NaCl stress [J]. Environ Exp Bot, 2006, 56(1): 72-79.
- [4] 邸娜, 张耀强, 李旭红, 等. 种子引发对盐胁迫下向日葵种子萌发和幼苗生理特性的影响 [J]. 河南农业科学, 2018, 47(4): 43-48.
- [5] 张冠初, 张智猛, 慈敦伟, 等. 干旱和盐胁迫对花生渗透调节和抗氧化酶活性的影响 [J]. 华北农学报, 2018, 33(3): 176-181.
- [6] 郑州元, 林海荣, 崔辉梅. 外源硫化氢对盐胁迫下加工番茄幼苗生理生化特性的影响 [J]. 华北农学报, 2017, 32(1): 208-214.
- [7] 张华新, 刘正祥, 刘秋芳. 盐胁迫下树种幼苗生长及其耐盐性 [J]. 生态学报, 2009, 29(5): 2263-2271.
- [8] GYGI S P, RIST B, GERBER S A, et al. Quantitative analysis of complex protein mixtures using isotope-coded affinity tags [J]. Nature Biotechnology, 1999, 17(10): 994-999.
- [9] SUMNER L W, MENDES P, DIXON R A. Plant metabolomics: Large-scale phytochemistry in the functional genomics era [J]. Phytochemistry, 2003, 62(6): 817-836.
- [10] 马进, 刘志高, 郑钢. 南方型紫花苜蓿耐盐细胞系的筛选及生理特性分析 [J]. 中国草地学报, 2011, 33(4): 68-72.
- [11] 何磊, 陆兆华, 管博, 等. 盐碱胁迫对甜高粱种子萌发及幼苗生长的影响 [J]. 东北林业大学学报, 2012, 32

- (3):67-71.
- [12] 吕建澎,李金旺,段霞飞,等.高粱重组自交系耐盐性相关性状遗传分析[J].华北农学报,2018,33(4):112-119.
- [13] 穆志新,李萌,秦慧彬.高粱芽期耐盐指标筛选及耐盐性评价[J].山西农业科学,2017,45(7):1075-1079.
- [14] 郭瑞.松嫩平原四种禾本科植物耐盐碱生理生态机制研究[D].长春:东北师范大学,2010.
- [15] 黄相玲,林妃妃,张明月,等.盐胁迫对小叶榄仁幼苗生长和渗透调节物质含量的影响[J].南方农业学报,2018,49(7):1364-1369.
- [16] 孙海博,赵杏锁,司家屹,等.模拟盐胁迫对勿忘草种子萌发及幼苗生长的影响[J].山西农业科学,2018,46(9):1450-1454.
- [17] GAVAGHAN C L,LI J V,HADFIELD S T,*et al.* Application of NMR-based metabolomics to the investigation of salt stress in maize (*Zea mays*) [J]. *Phytochemical Analysis*,2011,22(3):214-224.
- [18] YANG C W,XU H H,WANG L L,*et al.* Comparative effects of salt-stress and alkali-stress on the growth, photosynthesis, solute accumulation, and ion balance of barley plants[J]. *Photosynthetica*,2009,47(1):79-86.
- [19] SULMON C,VAN BAAREN J,CABELLO-HURTADO F,*et al.* Abiotic stressors and stress responses:What commonalities appear between species across biological organization levels? [J]. *Environmental Pollution*,2015,202(23):66-77.
- [20] SAITO K,MATSUDA F. Metabolomics for functional genomics, systems biology, and biotechnology [J]. *Annual Review of Plant Biology*,2010,61(1):463-489.
- [21] SANCHEZ D H,SZYMANSKI J,ERBAN A A,*et al.* Mining for robust transcriptional and metabolic responses to long-term salt stress: A case study on the model legume *Lotus japonicus* [J]. *Plant Cell & Environment*,2010,33(4):468-480.
- [22] GILBERT G A,GADUSH M V,WILSON C,*et al.* Amino acid accumulation in sink and source tissues of *Coleus blumei* Benth. during salinity stress [J]. *Journal of Experimental Botany*,1998,49:107-114.
- [23] WANG X C,CHANG L L,WANG B C,*et al.* Comparative proteomics of *Thellungiella halophila* leaves from plants subjected to salinity reveals the importance of chloroplastic starch and soluble sugars in halophyte salt tolerance [J]. *Molecular & Cellular Proteomics*,2013,12(8):2174-2195.
- [24] SMIRNOFF N. Plant resistance to environmental stress [J]. *Current Opinion in Biotechnology*,1998,9(2):214-219.
- [25] SMIRNOFF N,CUMBES Q J. Hydroxyl radical scavenging activity of compatible solutes [J]. *Phytochemistry*,1989,28(4):1057-1060.
- [26] SANCHEZ D H,PIECKENSTAIN F L,ESCARAY F,*et al.* Comparative ionomics and metabolomics in extremophile and glycophytic lotus species under salt stress challenge the metabolic pre-adaptation hypothesis [J]. *Plant Cell & Environment*,2011,34(4):605-617.
- [27] RYBKA K,NITA Z. Physiological requirements for wheat ideotypes in response to drought threat [J]. *Acta Physiologiae Plantarum*,2015,37(5):97.
- [28] 张婧. 盐胁迫下野大豆 (*Glycine soja*) 和栽培大豆 (*Glycine max*) 幼苗叶片代谢组学比较研究 [D]. 长春:东北师范大学,2017.
- [29] HU L X,ZHANG P P,JIANG Y,*et al.* Metabolomic analysis revealed differential adaptation to salinity and alkalinity stress in Kentucky bluegrass (*Poa pratensis*) [J]. *Plant Molecular Biology Reporter*,2015,33(1):56-68.
- [30] MANSOUR N M,VAN HASSELT R R,KUIPER P J C,*et al.* Plasma membrane lipid alterations induced by NaCl in winter wheat roots [J]. *Physiologia Plantarum*,1994,92(3):473-478.