

烟草试管苗对盐胁迫的生理响应

杜喜梅¹, 张俊莲^{1,2}, 王 蒂^{1,2}, 黄 鹏¹, 崔炎森¹, 王 丽¹, 张天宇¹

(1. 甘肃农业大学农学院, 甘肃 兰州 730070; 2. 甘肃省作物遗传改良与种质创新重点实验室, 甘肃 兰州 730070)

摘 要: 利用不同浓度的 NaCl 对烟草试管苗进行了 20 d 胁迫, 结果发现: 随着盐浓度的增加, 烟草试管苗的生长明显受阻; 根、茎、叶中 K^+ 的含量呈极显著的下降趋势, Na^+ 的含量大幅度增加; 叶片中叶绿素的含量下降, 但丙二醛的含量增加, 质膜透性增大, 脯氨酸大量积累, 且脯氨酸含量与丙二醛含量和质膜透性间呈极显著的正相关, 表明盐胁迫下脯氨酸积累的多少可反映烟草试管苗的伤害程度。本研究认为离子伤害、膜透性增大和叶绿素含量下降是影响盐胁迫下烟草试管苗生长的原因。

关键词: 烟草试管苗; 盐胁迫; 生理响应

中图分类号: S572.01 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-7601(2007)04-0238-05

土壤盐渍化已成为危害作物生长的重要影响因素之一。盐分胁迫使植物生长受抑, 光合下降, 能耗增加, 衰老加速, 生长量降低, 最终导致植株因饥饿而死亡^[1]。但由于不同植物的组织结构和代谢机理不同, 它们对盐胁迫的反应及适应机理也不同, 致使目前还没有一个统一的机理能够解释所有植物对盐的适应性^[2]。因此, 研究盐胁迫下植物耐盐生理指标的变化是植物耐盐育种和分子标记辅助选择育种的基础。

烟草(*Nicotiana tabacum* L.) 为我国重要的经济作物, 其种植面积目前已达 146.67 万 hm^2 以上^[3]。由于烟草制品有特殊的品质要求, 致使气候、土壤等诸多生态因子制约了烟草的栽培区域^[3], 目前, 人们主要从渗透胁迫^[4]、栽培措施^[5]、营养和激素^[6]、土壤 pH 值^[7]等方面对烟草植株生长发育及盐对烟草种子萌发特性的影响进行了研究, 少见盐分对烟草试管苗生长及生理代谢的影响研究。因此, 本试验对盐胁迫下烟草试管苗生长及相关生理指标的变化进行了研究。

1 材料与方 法

1.1 试验材料及繁殖

烟草(*Nicotiana tabacum* L.) 普通栽培种 T12 试管苗由甘肃省作物遗传改良与种质创新重点实验室保存, 每 25 d 在 MS 基本培养基上继代繁殖一次。

1.2 试验方法

1.2.1 试验处理 在 MS 基本培养基中添加不同浓度的 NaCl 构成胁迫培养基, 设置 0% (CK),

0.5%, 1.0%, 1.5% 和 2.0% 共 5 个浓度。

1.2.2 材料处理 将烟草带有两片叶的茎段接入上述各种培养基上, 每瓶接种 2 株, 每个处理 20 株, 重复 3 次。培养温度为 $25 \pm 2^\circ C$, 光强 3 000 lx, 24 h 连续光照。

1.2.3 生理指标测定 处理 20 d 时测定试管苗新叶数、根数和新叶总叶面积; 同期测定脯氨酸、叶绿素、丙二醛及 Na^+ 、 K^+ 含量和细胞膜透性相对值。

1.2.4 测定方法 叶面积采用方格法^[8]; Na^+ 、 K^+ 提取用硫酸—三氯乙酸消煮法^[9], 6410A 型火焰分光光度计测定, 根中 K^+ 、 Na^+ 向地上部分运输的选择性 $RS_{K,Na} = \text{根}[Na^+]/K^+ / \text{叶}[Na^+]/K^+$, 并以处理占对照的百分数(处理/对照 $\times 100\%$) 作为其指标的增长或下降幅度^[10]; 脯氨酸含量采用茚三酮比色法^[11], 叶绿素含量采用丙酮比色法^[11], 膜透性相对值采用电导仪法^[11], 丙二醛含量参照赵世杰等方法^[12]。

2 结果与分析

2.1 盐胁迫对烟草试管苗生长的影响

NaCl 胁迫下, 烟草试管苗的新叶数、根数和新叶总叶面积较对照均有不同程度的下降, 其中对根的影响最为明显。当 $NaCl \geq 1\%$ 时, 根的发生明显受阻, 许多植株甚至无根的发生, 说明盐对与其直接接触组织—茎段基部有直接的影响, 抑制了根的发生和形成。相反, 尽管盐分通过茎段初生木质部的输送可到达生长点, 但该位点的盐浓度远低于茎基部, 故叶芽可展开, 生长点可形成新的叶原基。但如

收稿日期: 2006-06-16

基金项目: 甘肃省科技攻关课题(2GS054-A41-005-01)

作者简介: 杜喜梅(1980—), 甘肃天水人, 硕士研究生, 研究方向为植物遗传育种。

通讯作者: 张俊莲, E-mail: zhangjunlian99@yahoo.com.cn

果盐浓度过高(2%),生长点受到严重伤害,叶芽则无法展开(表1)。

表1 盐胁迫对烟草试管苗生长的影响

Table 1 Effect of salt stress on growth of tobacco plantlets

NaCl 浓度 NaCl concentration (%)	新叶数 (片/株) No. of new leaf	根数 (条/株) No. of root	总叶面积 (cm ² /株) Total leaves area (cm ² /plant)
CK	4	15	30.70
0.5	3	13	25.43
1.0	3	1	18.51
1.5	3	0	13.71
2.0	0	0	0

2.2 盐分对烟草试管苗 Na⁺、K⁺含量的影响

从表2可以看出,正常情况下,烟草 T12 试管苗的根、茎、叶中 K⁺含量较高,Na⁺含量较低,根中 Na⁺含量是叶中的 2.47 倍、茎中的 2 倍。可见烟草对钾的需求量较大,具有较高的 K⁺运输选择性,使较多的 Na⁺滞留在根中,较多的 K⁺运到地上部。

表2 盐胁迫对烟草试管苗 Na⁺、K⁺含量的影响

Table 2 Effect of salt stress on Na⁺、K⁺ contents of tobacco plantlets

NaCl 浓度(%) NaCl Concentration	组织 Tissue	Na ⁺ (%)	K ⁺ (%)	Na ⁺ /K ⁺	RS _{K,Na}	T/CK×100%		
						Na ⁺	K ⁺	Na ⁺ /K ⁺
CK	叶 Leaf	0.17±0.14*	6.29±0.20	0.027	2.93	1	1	1
	茎 Stem	0.21±0.21	7.14±0.23	0.029		1	1	1
	根 Root	0.42±0.16	5.30±0.25	0.079		1	1	1
0.5	叶 Leaf	3.96±0.26	4.95±0.18	0.80	0.91	23.2941	0.7870	29.5986
	茎 Stem	5.71±0.16	3.91±0.22	1.46		27.1905	0.5476	49.6539
	根 Root	2.75±0.29	3.78±0.13	0.73		16.1765	0.7132	22.6816
1.0	叶 Leaf	7.74±0.23	2.95±0.15	2.63	0	45.5294	0.4690	97.0776
	茎 Stem	6.08±0.17	3.21±0.19	1.89		28.9524	0.4496	64.3959
	根 Root	0	0	0		0	0	0
1.5	叶 Leaf	10.37±0.14	2.49±0.26	4.16	0	61.0000	0.3487	174.94
	茎 Stem	6.04±0.24	2.21±0.18	2.73		28.7619	0.3095	92.9302
	根 Root	0	0	0		0	0	0
2.0	叶 Leaf	0	0	0	0	0	0	0
	茎 Stem	5.95±0.16	1.81±0.14	3.29		28.3333	0.2535	111.77
	根 Root	0	0	0		0	0	0

注: * 平均数±标准差。Note: * means±S·D.

2.3 盐胁迫对烟草试管苗丙二醛(MDA)含量及膜透性的影响

低浓度(0.5%) NaCl 胁迫下,烟草试管苗的 MDA 含量比 CK 略有增加,但与对照间差异不显著($P>0.05$)。当 NaCl 浓度 $\geq 1\%$ 时,MDA 含量大幅升高,各处理间及其与 CK 和 0.5% NaCl 处理间的差异都达到极显著($P<0.001$)水平(图1),表明 \geq

1%的 NaCl 胁迫后,烟草试管苗对 K⁺、Na⁺的吸收和分配发生了变化(表2)。随着 NaCl 浓度的上升, K⁺在根、茎、叶中的含量均呈现极显著($P<0.01$)的下降趋势,而 Na⁺的含量则大幅度增加。在 0.5%的盐浓度下,根、茎、叶中 K⁺含量分别降到对照的 71.32%、54.76%和 78.70%,而 Na⁺含量则分别较对照增加了 16.17 倍、27.19 倍和 23.29 倍,此时根系的 K⁺运输选择性仅为对照的 1/3;当盐浓度达 1.5%时,茎、叶中 K⁺的含量则分别降到对照的 30.95%和 34.87%,而 Na⁺的含量则分别较对照增加了 28.76 倍和 61 倍。与盐浓度 0.5% 比较,1.5% 下叶片中的 Na⁺含量增加幅度明显高于茎段,而 K⁺含量在茎、叶中则差别不大,说明随着盐浓度的上升,Na⁺被大量地运输到地上部并积累在叶片中,抑制 K⁺的运输,造成叶片中离子不均衡和 Na⁺毒害,影响其正常的生理功能,致使其总叶面积下降,盐浓度进一步升高为 2%时,Na⁺的毒害就更为严重,表现为叶的伸展和发生完全受阻(见表1)。

1%的 NaCl 对 T12 烟草试管苗的细胞膜伤害严重,其膜脂发生严重过氧化,致使胞内产生大量的膜脂过氧化产物——MDA。伴随着膜脂过氧化,烟草试管苗的细胞膜相对透性也发生了相应改变,其变化趋势与 MDA 含量的变化趋势基本一致(图2),表明随着膜脂过氧化程度的加重,膜的相对透性也相应增加,膜所具有的选择性功能丧失,胞内内含物大量

外渗。特别是在 2% 盐浓度下,膜基本完全通透(相对值为 98.9%),细胞的功能基本丧失,此时试管苗叶片皱缩、发黄,叶缘周围出现褐色枯死组织,茎段新叶和叶原基的产生受阻。

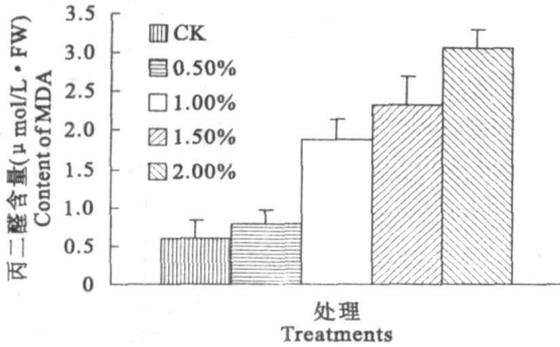


图 1 NaCl 胁迫下烟草试管苗丙二醛含量

Fig.1 MDA content of tobacco plantlet under salt stress

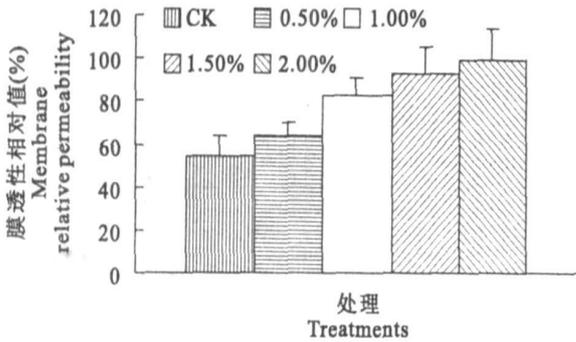


图 2 NaCl 胁迫下烟草试管苗膜透性相对值

Fig.2 Membrane relative permeability of tobacco plantlet under salt stress

2.4 盐胁迫对烟草试管苗脯氨酸含量的影响

从图 3 可以看出,正常条件下,T12 烟草试管苗中的脯氨酸含量很低,仅为 0.126 μg/(g · FW)。而在盐胁迫下,脯氨酸含量增加,并随着盐浓度的增加

呈极显著($P < 0.01$)的上升趋势。在 1% 盐浓度下,脯氨酸的积累量达 0.934 μg/(g · FW),是对照的 7.41 倍,而在 2% 盐浓度下,脯氨酸的积累量最高,达 2.792 μg/(g · FW),是 CK 的 22.15 倍,此时烟草试管苗的生长状态最差,表明盐胁迫下脯氨酸含量的高低反映了植株受伤害的程度。

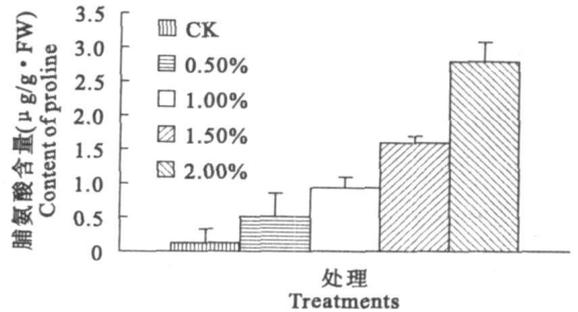


图 3 NaCl 胁迫下烟草试管苗脯氨酸含量

Fig.3 Proline content of tobacco plantlet under salt stress

2.5 盐胁迫下脯氨酸含量与 MDA 含量及质膜透性间的相关性

进一步对盐胁迫下烟草试管苗的脯氨酸含量与 MDA 含量和膜透性相对值进行了相关分析,发现盐胁迫下烟草试管苗体内的脯氨酸含量变化与 MDA 含量变化和质膜相对透性变化间呈极显著($P < 0.01$)的正相关,相关系数分别为 $r = 0.9579$ 和 $r = 0.9193$ (图 4a, b)。表明盐胁迫下随着 MDA 含量和质膜相对透性的增加,试管苗体内脯氨酸含量也相应增加。由于 MDA 含量和质膜相对透性可反映植株受伤害的程度,而脯氨酸含量又与 MDA 含量和质膜相对透性间呈极显著的正相关,进一步说明了盐胁迫下烟草试管苗的脯氨酸积累量可反映其受伤害的程度。

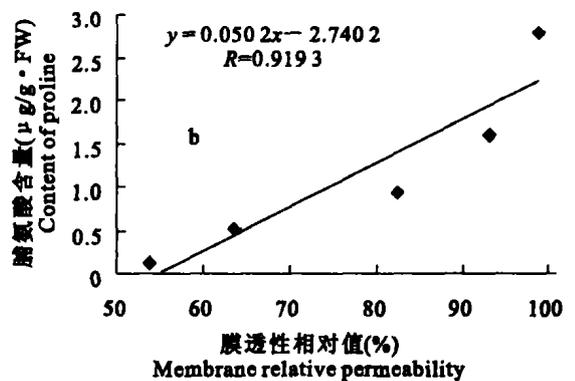
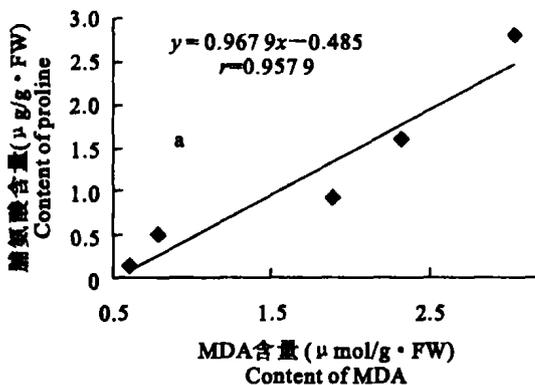


图 4 脯氨酸含量与 MDA 含量(a)和质膜相对透性(b)间的相互关系

Fig.4 Relationship of proline content with MDA content (a) and membrane relative permeability (b)

2.6 盐胁迫对烟草试管苗叶绿素含量的影响

正常情况下, T12 烟草试管苗的叶色浓绿, 叶绿素含量较高[1.176 mg/(g·FW)], 低浓度盐胁迫下, 叶绿素含量虽有一定下降, 但与对照间差异不显著($P>0.05$)。当盐浓度 $\geq 1\%$ 时, 叶绿素含量极显著($P<0.01$)下降, 此时肉眼可见各处理试管苗叶色间及与对照和低盐浓度处理间的差异, 表明盐胁迫破坏了叶绿素的合成或加速了叶绿素的分解, 进而影响光合效率和植株生长。

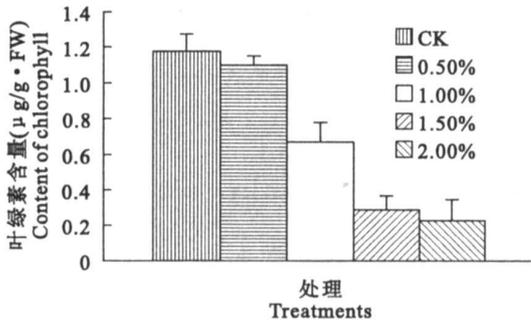


图5 NaCl 胁迫下烟草试管苗叶绿素含量

Fig.5 Chlorophyll contents of tobacco plantlets under salt stress

3 讨论

植物耐盐性是一个受多基因控制的极为复杂的过程, 不同植物的耐盐机理不尽相同。盐胁迫对 T12 烟草试管苗的生长影响明显, 1%盐度下根的发生基本受阻, 随盐浓度的提高, 试管苗新叶总叶面积呈极显著的下降趋势, 这与前人的研究结论盐胁迫降低了小麦叶原基的发生率、减少了叶片数^[13]、大麦叶面积缩小^[14]等结果是一致的。

植物要保持气孔正常功能和代谢正常进行必须维持体内较低的 Na^+/K^+ , 故该比值已成为评价植物受盐离子毒害的指标, 尤其是叶中的比值更能反映植株受伤害的程度^[15,16], 本研究结果也支持了这一结论。盐胁迫后烟草试管苗的 K^+ 、 Na^+ 运输机制被破坏, 大量的 Na^+ 被运输到地上部并积累在叶片中, K^+ 的运输被抑制, 体内 Na^+/K^+ 大幅上升, 试管苗生长明显受阻。这是因为大量的 Na^+ 造成营养亏缺; 抑制需 K^+ 酶的活性^[17]; 取代质膜上的 Ca^{2+} ^[18], 导致膜透性增加, 特别是盐胁迫下试管苗膜脂过氧化产物——MDA 的大幅升高, 更加剧了膜的通透性, 致使细胞内含物大量外渗, 细胞功能基本丧失。

尽管逆境下植物细胞中脯氨酸的积累具有普遍性, 但其积累的生理意义至今仍然存在着截然相反

的结论。有些研究认为逆境下脯氨酸积累的多少可以作为植物抗逆性筛选的指标^[19,20], 有些则认为脯氨酸的积累是伤害的结果, 不能作为抗性筛选的指标, 更适宜作为一个胁迫伤害指标^[21,22]。本研究发现, 烟草试管苗脯氨酸的含量与 MDA 的含量和质膜的相对透性间有极显著的正相关, 而 MDA 含量和质膜相对透性可表示植株受伤害的程度, 所以认为盐胁迫下烟草试管苗脯氨酸的积累量反映的是其受伤害的程度。

叶绿素含量的降低将导致叶绿体类囊体膜上色素蛋白复合体损伤, 从而降低叶绿体对光能的吸收, 影响类囊体膜的垛叠, 使基粒的数量下降^[2,23,24], 从而影响光合活性。本研究结果显示, 随盐胁迫浓度的上升, 叶绿素含量呈极显著的下降趋势, 从而影响试管苗的生长。

因此, 本研究认为离子伤害、膜透性增大和叶绿素含量下降是影响盐胁迫下烟草试管苗生长的原因。

参考文献:

- [1] 余叔文, 汤章城. 植物生理与分子生物学(第二版)[M]. 北京: 科学出版社, 2001. 752—769.
- [2] 许详明, 叶和春, 李国凤. 植物抗盐机理的研究进展[J]. 应用与环境生物学报, 2000, 6(4): 379—387.
- [3] 黄文川, 黄文星. 盐分胁迫对烟草种子发芽的影响[J]. 安徽农业科学, 1999, 27(2): 171—175.
- [4] 郭丽琢. 渗透胁迫对烤烟体内钾素积累的影响[J]. 西北植物学报, 2004, 24(5): 886—889.
- [5] 晁逢春, 张福锁, 杨宇虹, 等. 影响烟草根系发育的几个因素探讨[J]. 中国烟草科学, 2003, (2): 5—8.
- [6] 徐晓燕, 周初跃, 李卫芳, 等. 钾、硼和萘乙酸对烟株生长及钾吸收分配影响的研究[J]. 土壤, 2002, (2): 82—85.
- [7] 崔喜艳, 王思远, 于鸣. 土壤 pH 值对烤烟叶片内超氧化物歧化酶活性及丙二醛含量的影响[J]. 吉林农业大学学报, 2001, 23(3): 13—14, 18.
- [8] 华中农业大学. 果树研究法(第二版)[M]. 北京: 中国农业出版社, 1989. 456—459.
- [9] 王宝山, 赵可夫. 小麦叶片中 Na、K 提取方法的比较[J]. 植物生理学通讯, 1995, 31(1): 50—52.
- [10] 高辉远, 李卫军, 吐尔逊娜依, 等. Na_2SO_4 胁迫对莓状羊茅和芽茅 Na^+ 、 K^+ 吸收与分配的影响[J]. 中国草地, 1995, (5): 43—48.
- [11] 西北农业大学植物生理生化教研室. 植物生理学实验指导[M]. 陕西: 陕西科学技术出版社, 1987. 47—48, 148—151.
- [12] 赵世杰, 许长成. 植物组织中丙二醛测定方法的改进[J]. 植物生理学通讯, 1994, 30(3): 207—210.
- [13] Grieve C M, Lesch S M, Maas E V, et al. Leaf and spikelet primordial initiation in salt-stressed wheat[J]. Crop Sci, 1993, 33: 1286—1289.

- [14] Munns R, Gardner A, Tonnet M L, et al. Growth and development in NaCl treated plants II. Do Na^+ or Cl^- concentrations in dividing or expanding tissues determine growth in barley [J]. *Aust J Plant Physiol*, 1988, 15: 529—540.
- [15] 毛才良, 刘友良. 盐胁迫大麦体内 Na^+ 、 K^+ 分配与叶片耐盐量 [J]. *南京农业大学学报*, 1990, 13(3): 32—26.
- [16] 赵可夫. 植物抗盐生理 [M]. 北京: 中国科学技术出版社, 1993. 10—25.
- [17] Cramer G R. Salt tolerance is not associated with the sodium accumulation of two maize hybrids [J]. *Aust J Plant Physiol*, 1994, 21: 675—692.
- [18] Cramer G R. Kinetics of maize leaf elongation [J]. *J Exp Bot*, 1992, 43: 857—864.
- [19] 汤章城. 逆境条件下植物脯氨酸的积累及其可能的意义 [J]. *植物生理学通讯*, 1984, (1): 15—21.
- [20] 汤章城, 王育启, 吴亚华, 等. 不同抗旱品种高粱苗中脯氨酸积累的差异 [J]. *植物生理学报*, 2002, 12(2): 154—162.
- [21] Moftah A E, Michel B E. The effect of sodium chloride on soluble potential and proline accumulation in soybean leaves [J]. *Physiol Plant*, 1987, 83: 238—240.
- [22] 刘娥娥, 宗会, 郭振飞, 等. 干旱、盐和低温胁迫对水稻幼苗脯氨酸含量的影响 [J]. *热带亚热带植物学报*, 2000, 8(3): 235—238.
- [23] 贾恢先, 赵蔓蓉. 典型盐地植物叶绿体超微结构的研究 [J]. *植物学报*, 1990, 10(1): 70—72.
- [24] 朱宇旌, 张勇, 胡自治, 等. 小花碱茅茎适应盐胁迫的显微结构研究 [J]. *中国草地*, 2000, 5: 6—9.

The physiological responses of tobacco plantlets in vitro by salt stress

DU Xi-mei¹, ZHANG Jun-lian^{1,2*}, WANG Di^{1,2}, HUANG Peng¹,
CUI Yan-sen¹, WANG Li¹, ZHANG Tian-yu¹

(1. College of Agronomy, Gansu Agricultural University, Lanzhou, Gansu 730070, China;

2. Gansu Key Laboratory of Crop Genetics & Germplasm Enhancement, Lanzhou, Gansu 730070, China)

Abstract: The tobacco plantlets in Vitro were treated with different concentrations of NaCl in 20 days. The result indicated that the plant growth was retarded steadily with the increase of salt concentration; In this case, the content of K^+ reduced and the content of Na^+ increased in root, stem and leaf; In leaf, content of chlorophyll reduced, but the content of malonaldehyde(MDA), membrane permeability and proline increased, moreover the content of proline showed significant positive correlation with the content of malonaldehyde(MDA) and membrane permeability. It showed that the accumulative content of praline could reflect the tobacco plantlets' hurt degree. The study indicated that either the hurt of ion, the increase of membrane permeability or the reduction of chlorophyll affected the growth of tobacco plantlets in vitro of salt treatment.

Key words: tobacco plantlets in vitro; salt stress; physiological effect

(上接第 237 页)

Effect of water stress on growth of maize in the bell-mouthed period

YUAN Zuo-qing, ZHANG Jian-yong

(School of Life Sciences, Shandong University of Technology, Zibo, Shandong 255049, China)

Abstract: In this study, the physiological characters and phosphate assimilations of maize inbred lines with different drought resistance were studied under water stress. The results showed that it is an important growth period in the bell-mouthed period of maize, there were obvious relation between changes of fresh/dry of weight of leaves, relative water content, relative electricity conductance ratio, the transpiration rate, Somatal water conservancy, phosphate assimilations and drought resistance. They could be used as appraisal indexes of drought resistance of maize in the bell-mouthed period.

Key words: maize; water stress; index