

NaCl 胁迫下唐古特白刺愈伤组织生理生化变化研究

范小峰^{1,2}, 杨颖丽², 程转霞¹

(1. 陇东学院生命科学系, 甘肃 庆阳 745000; 2. 西北师范大学生命科学院, 甘肃 兰州 730070)

摘 要: 以唐古特白刺愈伤组织为材料, 研究 NaCl 胁迫对细胞生长、可溶性蛋白、丙二醛、游离脯氨酸含量、SOD、POD、CAT 活性等的影响, 探讨唐古特白刺抵抗 NaCl 胁迫的生理机制。结果表明: 游离脯氨酸、丙二醛含量随 NaCl 浓度的提高和胁迫时间的延长而增加; 不同浓度 NaCl 胁迫下, 过氧化物酶(POD)活性随处理时间呈先升后降的变化; 超氧化物歧化酶(SOD)活性、过氧化氢酶(CAT)活性、可溶性蛋白含量、愈伤组织生长量在低盐胁迫下, 随着培养时间的延长, 均呈上升趋势, 而在高盐胁迫下, 随着培养时间的延长, 呈先升后降的变化。由此表明, 唐古特白刺具有一定适应盐渍生境的能力, 轻度盐胁迫有利于白刺愈伤组织的生长。

关键词: 盐胁迫; 唐古特白刺; 愈伤组织; 生长; 生理生化指标

中图分类号: Q945.78 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-7601(2009)03-0203-05

土壤盐渍化是影响全球粮食产量及植物生长发育的主要因素之一, 据统计, 世界上存在不同类型盐碱地 $10 \times 10^8 \text{ hm}^2$, 约占全球可耕地面积的 10% ^[1], 我国就有 $2.6 \times 10^7 \text{ hm}^2$, 而且次生盐碱化问题也不断加剧, 给农业生产带来严重威胁^[2]。研究植物的抗盐性, 筛选耐盐农作物, 综合治理盐渍土, 开发利用盐水资源已成为未来农业及环境治理亟待解决的重要课题。一些植物有很强的抗盐性, 能够在高盐环境下良好生长。研究这些植物对高盐的适应性, 揭示其抗盐机理, 对解决世界范围的盐胁迫问题有一定的现实意义。唐古特白刺(*Nitraria tangutorm* Bobr.) 为蒺藜科(*Zygophyllaceae*) 白刺属强旱生灌木, 全世界共 12 种, 我国有 8 种^[3], 主要分布于西北重盐碱地区^[4]。其根系发达, 叶小而肉质化, 具有抗干旱、抗风沙和耐盐碱等特性^[5], 是典型的耐盐碱植物。目前对白刺的研究多集中在其植物化学成分分析^[6]、育苗技术^[7]、防风固沙的生态功能^[8]等方面。本研究以唐古特白刺愈伤组织为材料, 用不同浓度 NaCl 胁迫处理, 通过测定其相关生理指标, 研究唐古特白刺对盐胁迫的生理反应, 从而在细胞水平上探讨唐古特白刺抵御盐胁迫的生理机制, 寻找提高农作物和经济作物抗盐能力的途径。

1 材料与方法

1.1 愈伤组织的获得及胁迫培养

以唐古特白刺无菌苗子叶为外植体, 接种在 MS + 2,4-D 0.5 mg/L 的培养基上诱导产生愈伤组织,

经 2 次继代培养后, 挑选生长均匀、快速且疏松的愈伤组织, 接种于分别含 0、50、100、200、300 mmol/L NaCl 的 MS + 2,4-D 0.5 mg/L 培养基上胁迫培养, 分别于 5、10、15、20、25 d 取样进行相关生理指标测定。

1.2 测定方法

1.2.1 愈伤组织生长量的测定 无菌条件下, 用电子天平在规定时间内分别称每块愈伤组织鲜重。

愈伤组织鲜重增加量 = 培养一定时间后愈伤组织鲜重 - 转接前愈伤组织鲜重

1.2.2 生理指标测定 采用考马斯亮蓝 G-250 染色法测定可溶性蛋白含量^[9]; 采用茚三酮比色法测定游离脯氨酸含量^[9]; 采用硫代巴比妥酸比色法测定丙二醛含量^[10]; 采用愈创木酚比色法测定 POD 活性^[10]; 采用 NBT 光化学还原反应法测定 SOD 活性^[10]; 参照李合生的方法测定 CAT 活性^[10]。

1.3 数据处理

实验中每个处理均设 3 个重复, 原始数据在 Excel 下进行统计、作图。

2 结果与分析

2.1 NaCl 胁迫对白刺愈伤组织生长的影响

从图 1 可见, 不同浓度 NaCl 胁迫后白刺愈伤组织生长情况不同。胁迫初期, 愈伤组织均生长缓慢, 10 d 后, 低盐 ($<100 \text{ mmol/L}$) 处理的愈伤组织生长速度明显超过对照, 其中 50 mmol/L NaCl 处理 15 d, 生长量为对照的 157%, 增重效果明显; 高盐 (>200

mmol/L)处理的愈伤组织生长速度始终低于对照,愈伤组织生长量在第 10 d 达到最大,然后随着时间的延长呈微弱的负增长,其中 300 mmol/L NaCl 处理 15 d,生长量为对照的 78.48%。同时形态学观察,随着 NaCl 浓度的增加和培养时间的延长,愈伤组织表面出现褐色斑点(图 2)。

2.2 NaCl 胁迫对白刺愈伤组织游离脯氨酸(Pro)含量的影响

脯氨酸是渗透胁迫下易于积累的一种氨基酸,是盐生植物调节渗透压的一种溶质,具有渗透调节功能和稳定细胞蛋白质结构等作用。图 3 显示,正常情况下(CK),愈伤组织中游离脯氨酸含量相对比较平稳;NaCl 胁迫下愈伤组织中游离脯氨酸含量均高于对照,且随着 NaCl 浓度的增加而明显上升,并随胁迫时间的延长呈先上升、后平稳的趋势。与对照相比,50、100、200、300 mmol/L NaCl 处理 15 d,愈

伤组织中游离脯氨酸含量分别增加 11.3%,22.6%,48.3%,67.6%。

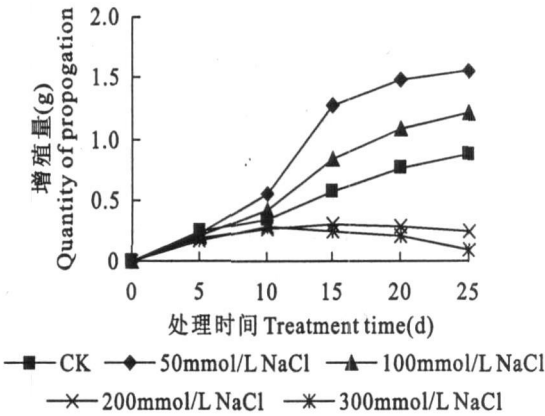


图 1 NaCl 胁迫对白刺愈伤组织生长的影响

Fig.1 Effect of NaCl stress on growth of callus of *Nitraria tangutorum* Boer.

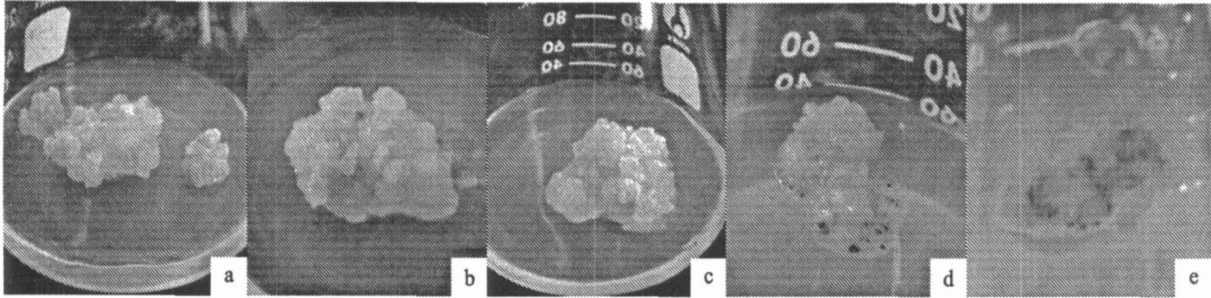


图 2 不同 NaCl 胁迫下白刺愈伤组织生长情况

Fig.2 The growth in callus of *Nitraria tangutorum* Boer. under different NaCl stress

a. 培养在不含 NaCl 的培养基上的愈伤组织; b. 培养在含 50 mmol/L NaCl 培养基上的愈伤组织; c. 培养在含 100 mmol/L NaCl 培养基上的愈伤组织; d. 培养在含 200 mmol/L NaCl 培养基上的愈伤组织; e. 培养在含 300 mmol/L NaCl 培养基上的愈伤组织

a·Callus in medium containing no NaCl; b·Callus in medium containing 50 mmol/L concentration NaCl; c·Callus in medium containing 100 mmol/L concentration NaCl; d·Callus in medium containing 200 mmol/L concentration NaCl; e·Callus in medium containing 300 mmol/L concentration NaCl

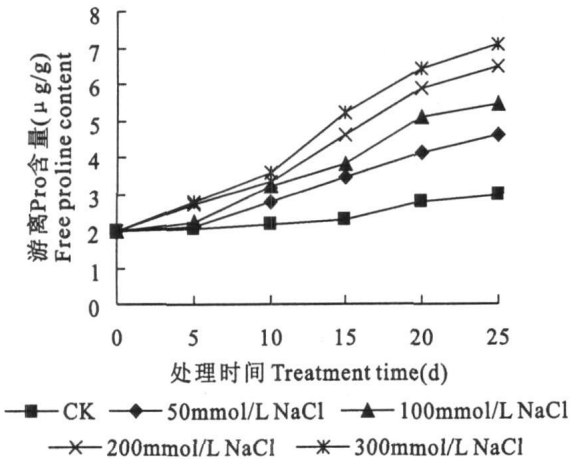


图 3 NaCl 胁迫对白刺愈伤组织游离脯氨酸含量的影响

Fig.3 Effect of NaCl stress on Pro content in callus of *Nitraria tangutorum* Boer.

2.3 NaCl 胁迫对白刺愈伤组织抗氧化酶活性的影响

SOD 催化 $O_2^{\cdot-}$ 发生歧化反应生成 O_2 和 H_2O_2 , H_2O_2 又在 CAT 和 POD 作用下形成 H_2O ^[11], 所以 SOD、CAT 和 POD 活性反映植物体对 $O_2^{\cdot-}$ 和 H_2O_2 等活性氧的清除能力。从图 4 可知, 正常情况下(CK)三种酶活性在第 5 d 均有升高, 然后处于较平稳状态。低盐(50 mmol/L)处理, SOD 和 POD 活性持续上升, 而 CAT 活性在第 15 d 有所升高, 以后呈下降趋势; 高盐(300 mmol/L)处理, SOD 和 POD 活性随处理时间的延长呈先升后降变化, 分别在 10 d 和 15 d 时出现峰值, SOD 和 POD 活性显著高于对照, 而 CAT 活性也呈先升后降趋势, 但早期升高明显, 5 d 后逐渐下降, 且随着处理时间的延长下降幅度较大, 显著低于对照。

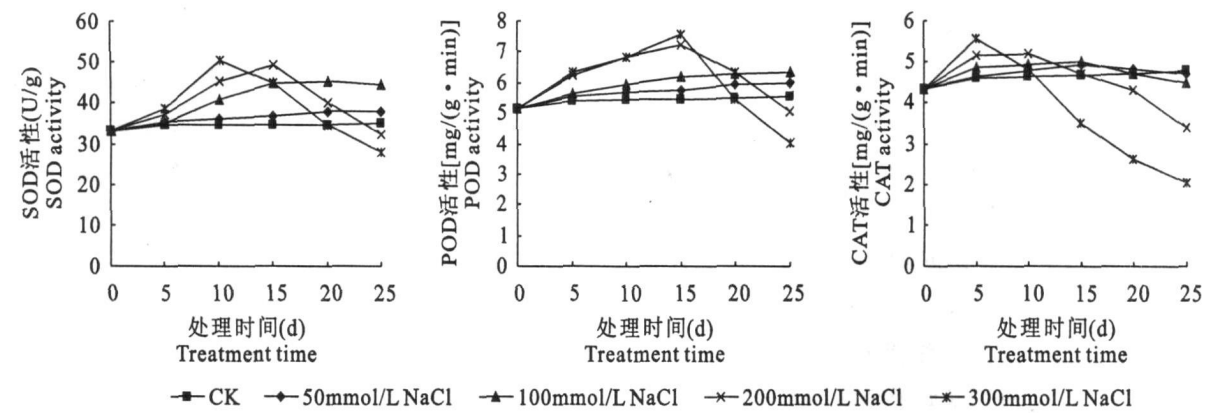


图 4 NaCl 胁迫对白刺愈伤组织 SOD、POD 和 CAT 活性的影响

Fig. 4 Effect of NaCl stress on SOD, POD and CAT activities in callus of *Nitraria tangutorm* Bobr.

2.4 NaCl 胁迫对白刺愈伤组织可溶性蛋白含量的影响

植物体内蛋白质含量增加是植物对逆境的适应性表现,可作为鉴定植物相对抗性的指标^[12]。如图 5 所示,正常情况下(CK),生长前期愈伤组织可溶性蛋白含量比较稳定,后期呈缓慢上升趋势。低盐(<100 mmol/L)处理的愈伤组织中可溶性蛋白含量持续呈上升趋势,第 15 d 最高,以后上升平缓,但均高于对照;高盐(>200 mmol/L)处理后可溶性蛋白含量呈先升后降的趋势,而且盐浓度越高,变化幅度越大,300 mmol/L NaCl 处理,25 d 时,与对照相比可溶性蛋白含量下降 43.65%。

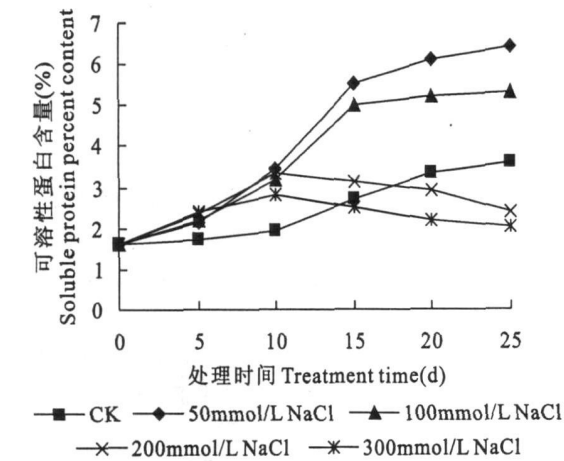


图 5 NaCl 胁迫对白刺愈伤组织可溶性蛋白含量的影响

Fig. 5 Effect of NaCl stress on soluble protein content in callus of *Nitraria tangutorm* Bobr.

2.5 NaCl 胁迫对白刺愈伤组织丙二醛(MDA)含量的影响

MDA 是膜脂过氧化的产物,植物在逆境中,活性氧代谢系统的平衡被破坏,从而诱导植物体内活性氧积累,膜脂过氧化,引发 MDA 积累。如图 6 所

示,正常情况(CK)和低盐(50 mmol/L)处理的愈伤组织中 MDA 含量基本稳定,均表现为相似的变化趋势;而经高盐(>200 mmol/L)胁迫,愈伤组织中 MDA 含量均高于对照,并随着 NaCl 浓度的增加和胁迫时间的延长明显上升。

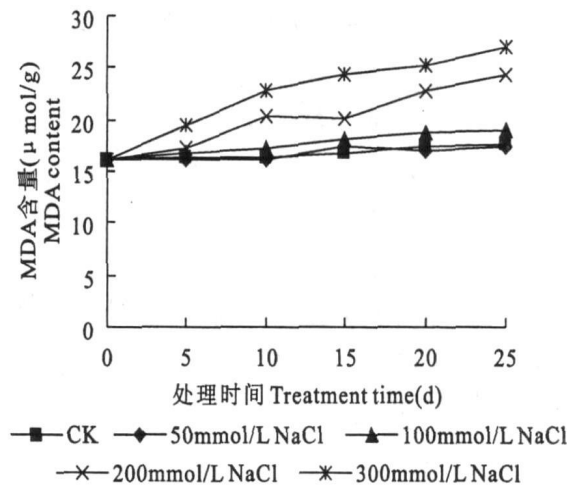


图 6 NaCl 胁迫对白刺愈伤组织丙二醛含量的影响

Fig. 6 Effect of NaCl stress on MDA content in callus of *Nitraria tangutorm* Bobr.

3 讨论

植物一般不能在高盐土壤上正常生长,其原因是盐胁迫诱导植物体活性氧积累,引发氧化胁迫。为了避免活性氧过量对植物产生的伤害,一些植物特别是耐盐植物在长期进化过程中形成一套防御机制,通过酶促保护系统和非酶促保护系统(小分子化合物)两套抗氧化保护体系,调节相关生理过程,以适应不良环境。因此,研究盐胁迫下植物的生理生化变化对于判别盐害程度,植物对盐害的耐受情况,以及揭示植物的抗盐机理意义重大。

盐胁迫引起植物组织中 Na⁺ 的积累,Na⁺ 浓度

的升高不但引起对其它离子吸收的抑制效应,而且对细胞代谢活动产生直接伤害。因此,植物愈伤组织在 NaCl 胁迫下的直接表现是生长减缓^[13]甚至生长量下降^[14]。本实验表明,低盐($<100\text{ mmol/L}$)对白刺愈伤组织的生长有明显的促进作用,其中, 50 mmol/L 的 NaCl 处理增重效果显著;而高盐($>200\text{ mmol/L}$)对愈伤组织生长的抑制作用明显,随着时间的延长呈微弱的负增长。充分地说明荒漠植物白刺对盐胁迫具有一定的耐受能力,它在适度的盐胁迫条件下可通过钠积累或离子交换使离子迅速达到平衡,仍可正常、良好地生长。这与白刺是一种积钠植物^[15]也密切相关。

渗透调节能力是植物耐盐的最基本特征之一^[16],脯氨酸是细胞质中重要的渗透剂和防脱水剂,能降低细胞的渗透势,提高植物组织持水力,保持细胞原生质与环境的渗透平衡,在植物对逆境适应过程中有着很重要作用^[17]。研究表明^[18,19]植物愈伤组织的脯氨酸含量随着 NaCl 浓度的升高而增加。这与本实验结果一致,随着 NaCl 浓度的增加和胁迫时间的延长,白刺愈伤组织中游离脯氨酸含量显著增加。

研究表明^[20],可溶性蛋白与调节植物细胞的渗透势有关,可溶性蛋白含量增加可降低细胞的渗透势,提高植物耐盐性。本实验结果显示:低盐($<100\text{ mmol/L}$)处理的愈伤组织中可溶性蛋白含量呈持续上升趋势,与愈伤组织生长情况表现一致;高盐($>200\text{ mmol/L}$)处理后可溶性蛋白含量随胁迫时间的延长呈先升后降的趋势。前者可能是由于在低盐胁迫下,愈伤组织为适应环境而进行的蛋白质合成反应强于分解反应所致;而在高盐胁迫下,随着胁迫时间的延长蛋白质合成受到不同程度的抑制,逐渐表现出蛋白质分解加强的盐害现象。

植物在逆境条件下保持较高的抗氧化酶活性,能有效地清除活性氧或降低活性氧产生,从而缓解活性氧积累对植物造成伤害,提高抗逆性。研究报道^[21,22],NaCl 胁迫下马铃薯、番茄等的保护酶活性与其品种的耐盐性有关。本实验低盐胁迫下,SOD 和 POD 活性持续增强,而 CAT 活性呈先增强后下降的趋势;高盐胁迫下,三种酶活性均随时间的延长呈先增强后下降的变化,且前期酶活性显著高于对照,但 SOD 和 POD 活性下降较迟,而 CAT 活性下降较早,且随着处理时间的延长下降幅度较大。表明白刺愈伤组织在盐胁迫条件下,可通过提高抗氧化酶活性适应盐害,尤以 SOD 和 POD 为主;随着 NaCl 浓度的增加和胁迫时间的延长,三种酶活性明显受到

抑制。

MDA 是膜脂过氧化产物,其含量反映膜脂过氧化程度的强弱。许兴等^[14]发现,盐胁迫使枸杞愈伤组织中丙二醛(MDA)含量增大。本实验中,低盐胁迫下白刺愈伤组织中 MDA 含量基本稳定,高盐胁迫下愈伤组织中 MDA 含量均高于对照,并随着盐浓度的增加和胁迫时间的延长明显上升,表明白刺愈伤组织具有较强的抵抗膜脂过氧化的能力。

总之,盐胁迫对植物的损伤是一个复杂的过程,而盐生植物对不良环境的抵抗也是一个综合作用的结果。实验表明,唐古特白刺通过提高抗氧化酶活性、可溶性蛋白和游离脯氨酸等渗透调节物质含量来抵抗不良环境的伤害,具有一定适应盐渍生境的能力。

参考文献:

- [1] 张新春,庄炳昌,李自超.植物耐盐研究进展[J].玉米科学,2002,10(1):50—56.
- [2] 李晓燕,宋占午,董志贤.植物的耐盐胁迫生理[J].西北师范大学学报,2004,40(3):10.
- [3] 王宁.白刺资源及开发前景[J].陕西林业科技,2000,(1):17—18.
- [4] 刘瑛心.中国沙漠植物志[M].北京:科学出版社,1987:303—306.
- [5] 王镜泉.白刺属植物的分类分布及其生物生态学特性研究[J].干旱造林研究,1989,(2):47—63.
- [6] 刘惠文,王文芝.白刺果、果核和枝叶中氨基酸、维生素、黄酮、糖等成分的测定[J].中草药,1993,24(7):381.
- [7] 邢尚军,张建锋,鄯金标.白刺造林对重盐碱地的改良效果[J].东北林业大学学报,2003,31(6):18—21.
- [8] 祁迎林,魏窦兴,达海兰,等.柴达木盆地唐古特白刺的抗逆性及其开发利用价值[J].草业科学,2004,21(9):13—15.
- [9] 王学奎.植物生理生化实验原理和技术[M].北京:高等教育出版社,2006.
- [10] 李合生.植物生理生化实验原理和技术[M].北京:高等教育出版社,2002.
- [11] 胡学俭,孙明高,夏阳.NaCl 胁迫对无花果与海棠膜脂过氧化作用及保护酶活性的影响[J].西北植物学报,2005,25(5):937—943.
- [12] 任安之,高玉宝,刘爽.铅胁迫对青菜叶片几种生理生化指标的影响[J].应用与环境生物学报,2000,6(2):112—116.
- [13] 陆卫,贾敬芬.谷子胚性愈伤组织耐盐系的选择及其生理生化特性分析[J].作物学报,1994,20(2):241—247.
- [14] 许兴,毛桂莲,李树华,等.NaCl 胁迫和外源 ABA 对枸杞愈伤组织膜脂过氧化及抗氧化酶活性的影响[J].西北植物学报,2003,23(5):745—749.
- [15] 赵纪东,傅华,吴彩霞.水分胁迫对白刺幼苗生物量和渗透调节物质积累的影响[J].西北植物学报,2006,26(9):1788—1793.
- [16] 余叔文,汤章城.植物生理与分子生物学[M].第二版:北京:

科学出版社, 2000, 752—769.

[17] Aliak V, Prasad S K, Saradhi P P. Effect of zinc on free radicals and proline in *Brassica* and *Cajanus*[J]. *Phytochemistry*, 1995, 39: 45—51.

[18] 周荣仁. 利用组织培养研究植物耐盐机理与筛选耐盐突变体的进展[J]. *植物生理学通讯*, 1989, (5): 11—19.

[19] 陈云昭. 在盐胁迫下获得的大豆愈伤组织及再生植株的生化反应[J]. *大豆科学*, 1992, (11): 70—73.

[20] 汤章诚. *植物生理和分子生物学*[M]. 北京: 科技出版社, 1999: 739—745.

[21] Rahnama H, Ebrahimzadeh H. The effect of NaCl on antioxidant enzyme activities in potato seedling[J]. *Biol Plant*, 2005, 49(1): 93—97.

[22] Shalata A, Mittova V, Volokita M, et al. Response of the cultivated tomato and its wild salt-tolerant relative *Lycopersicon pennellii* to salt-dependent oxidative stress: the root antioxidative system[J]. *Physiol Plant*, 2001, 112: 487—494.

Research on physiological and biochemical index changes of *Nitraria tangutorm* Bobr. callus under NaCl stress

FAN Xiao-feng^{1,2}, YANG Ying-li², CHENG Zhuan-xia¹

(1. Department of Life Sciences, Longdong University, Qingyang, Gansu 745000, China;

2. College of Life Sciences, Northwest Normal University, Lanzhou, Gansu 730070, China)

Abstract: Callus of *Nitraria tangutorm* Bobr. were used to investigate the effects of NaCl stress on growth, content of soluble protein, MDA, proline and activities of SOD, POD and CAT, in order to understand the physiological mechanism of *Nitraria tangutorm* Bobr. callus resistance to NaCl stress at cell level. The results indicated that free Proline and MDA content increased as NaCl concentration enhanced and stress time lengthened; the activities of Peroxidase (POD) first increased and then decreased as time lengthened under different NaCl concentration; the activities of superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), soluble protein and callus growth expressed increasing trend as time lengthened in low NaCl; but in high NaCl, they first increased and then decreased as time lengthened. It follows that *N. tangutorm* had a adaptability to salt environment, light salt stress is favorable for *N. tangutorm* callus to grow.

Keywords: salt stress; *Nitraria tangutorm* Bobr.; callus; growth; physiological and biochemical index