

NaCl胁迫对花生种子萌发的影响

郭峰^{1,2}, 万书波^{1,2*}, 李新国^{1,2}, 徐平丽^{1,2}, 孟静静^{1,2}

(1. 山东省农业科学院高新技术研究中心, 山东省作物与畜食品种改良生物技术重点实验室, 山东 济南 250100;

2. 农业部黄淮海作物遗传改良与生物技术重点开放实验室, 山东 济南 250100)

摘 要:以花生品种鲁花14号(LH14)和丰花1号(FH1)为材料,通过对不同NaCl浓度(0、100、200、300、400、500 mmol/L)处理的花生种子研究表明:低浓度NaCl处理(100 mmol/L)对花生种子的萌发影响相对较小;随着NaCl浓度增加,花生种子的发芽势和发芽率逐渐降低,根长、根表面积、根体积、根鲜重和胚根粗逐渐减小,MDA和脯氨酸含量逐渐增加;高浓度NaCl处理情况下,花生根尖DNA凝胶电泳出现明显的连续拖带现象,根尖细胞凋亡相对严重。

关键词:花生;种子萌发;NaCl胁迫;丙二醛;脯氨酸;DNA梯形带

中图分类号:S565.2 **文献标识码:**A **文章编号:**1000-7601(2010)03-0177-05

花生是世界上重要的油料作物之一,也是我国主要的油料作物和经济作物,在油料作物中种植面积仅次于油菜,居于第二位,是国民经济发展的保障。中国是世界花生生产大国,种植面积仅次于印度,总产约占世界的40%,居首位,单产高出世界平均水平。即使如此也不能满足日益增加的需求,特别是入世以来,随着世界贸易的进一步扩大,人们生活水平的提高和膳食结构的变化,人们对花生及其制品需求量持续增加^[1,2],提高花生产量势在必行。但随着人口的增加,耕地面积的不断下降,粮油争地矛盾日益突出,如何开发和利用盐渍化土地资源具有重要的意义。

盐碱地是盐类集积的一个种类,是指土壤里面所含的盐分影响到作物正常生长的土地。根据联合国教科文组织和粮农组织不完全统计,全世界盐碱地的面积为9.5438亿hm²,其中我国盐渍土为0.35~0.37亿hm²,主要集中在华北、西北和东北这些干旱和半干旱的地区,占世界盐碱地的1/28,占我国可耕作土壤的1/4,严重制约着我国农业的发展。盐分是影响植物生长发育的主要环境因子之一。有研究表明,单盐处理下的盐节木种子萌发率随浓度升高而降低^[3]。两种表型盐地碱蓬种子萌发率在高浓度(300 mmol/L)和低浓度(100 mmol/L) NaCl处理下均显著降低^[4]。低浓度NaCl处理可促进黄瓜种子萌发,浓度为≥100 mmol/L时,随着浓度的增加,种子萌发受抑程度越严重^[5]。对碱茅、黑麦草等牧草,马铃薯、番茄等作物研究表明,随盐浓度的升高,

发芽率降低^[6-8]。然而,盐胁迫下花生种子萌发方面的研究甚少,盐渍条件下,花生种子能否正常萌发以及幼苗的质量决定了整株发育的质量,苗齐、苗壮是高产栽培的基础,对花生获得高产至关重要。因此,研究盐胁迫对花生种子萌发的影响,可为盐碱地花生育种和栽培提供理论依据,对农业生产十分重要。

1 材料与方法

1.1 材料及处理

以适合微碱地栽培的大花生品种丰花1号(FH1)和鲁花14号(LH14)为材料,选取大小均一饱满的种子,经0.1%的HgCl₂消毒10 min,然后分别浸泡于0、100、200、300、400、500 mmol/L浓度的NaCl溶液(均灭菌)中4 h。处理后,分别置于灭菌的有两层滤纸的培养皿中,加适量相应浓度的NaCl溶液润湿滤纸,每皿25粒,重复3次,28℃暗培养。

1.2 测定方法

处理4 d后统计种子的发芽数(以种子胚根露出3 mm以上为发芽),计算发芽势;处理10 d后记录种子发芽数,计算发芽率,测定根长、根粗、根鲜重以及根表面积等^[9]。

取0、100、200、300 mmol/L NaCl处理的花生根尖部位,采用硫代巴比妥酸(TAB)法^[10]测定丙二醛(MDA)含量;参照邹琦^[10]的方法测定脯氨酸含量;取0、200、400 mmol/L NaCl处理的LH14根尖提取DNA,DNA梯形带采用宁顺斌^[11]的方法测定。

收稿日期:2009-10-28

基金项目:农业部现代农业产业技术体系建设专项资金资助(ncycytx-19);国家“十一五”科技支撑计划项目“花生优质安全增效关键技术研究与示范”(2006BAD21B04)

作者简介:郭峰(1976—),男,山东费县人,硕士,助理研究员,研究方向为植物生理与分子生物学。E-mail:gf123456gh@126.com。

* 通讯作者:万书波,研究员,主要从事花生栽培生理和安全生产研究。E-mail:wansb@sas.ac.cn。

2 结果与分析

2.1 盐胁迫对花生种子萌发的影响

2.1.1 盐胁迫对花生种子发芽势的影响 由图 1 可以看出,不同浓度 NaCl 处理对两个供试品种发芽势的影响趋势是一致的,即随着 NaCl 浓度的增加,对花生种子发芽势的抑制程度逐渐增加,低浓度 NaCl (100 mmol/L) 对花生种子发芽势的抑制程度相对较小,随着浓度增加(100~200 mmol/L)花生种子发芽势迅速降低,继续增大 NaCl 浓度对种子发芽势的抑制程度趋缓,直至种子不能发芽。所不同的是,各 NaCl 浓度水平对两品种发芽势的抑制程度不同,相同条件下 LH14 受抑制程度较 FH1 小,二者差异显著 ($|t| = 3.065^*$), LH14 比较耐盐。

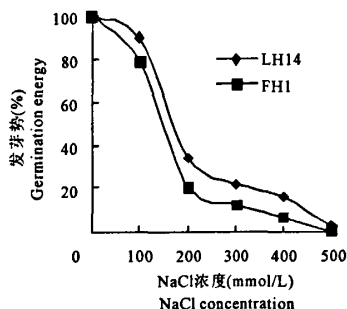


图 1 花生种子发芽势

Fig.1 Germination energy of peanut seeds

2.1.2 盐胁迫对花生种子发芽率的影响 由图 2 可以看出,两个品种发芽率均随着 NaCl 浓度的增加而降低。低浓度 NaCl 溶液对 LH14 发芽率的影响与对照相比没有很大差异,而对 FH1 发芽率的影响相对比较明显。随着 NaCl 浓度的升高,两个品种发芽率显著下降,即 NaCl 含量越高,花生种子萌发越困难。相同浓度条件下 LH14 发芽率较 FH1 高,二者差异显著 ($|t| = 2.660^*$), LH14 比较耐盐,特别是 NaCl 浓度 200 mmol/L 时,二者差异最大。

2.2 盐胁迫对花生幼根的影响

2.2.1 盐胁迫对花生幼根长的影响 由图 3 可以看出,随着 NaCl 浓度的逐步升高,两品种的根长均表现为下降趋势,但二者差异显著 ($|t| = 2.442^*$)。所不同的是,各浓度条件下 LH14 根长均长于 FH1,特别是 NaCl 浓度小于 300 mmol/L 时差别显著;NaCl 浓度在 100~200 mmol/L 时, FH1 根长急剧下降,对根系生长抑制明显,由 100 mmol/L 时的 5.3 cm 减小到 200 mmol/L 时的 1.2 cm,减小了 77% 左右,仅为 LH14 根长的 33%,表现出耐盐性差。

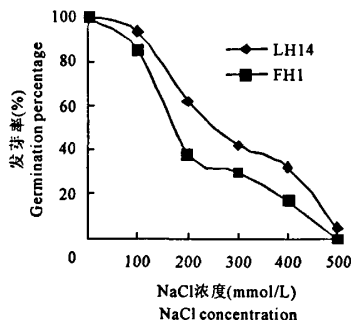


图 2 花生种子发芽率

Fig.2 Germination percentage of peanut seeds

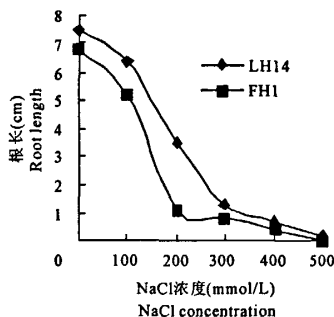


图 3 花生根长

Fig.3 Peanut root length

2.2.2 盐胁迫对花生下胚轴粗的影响 由图 4 可以看出,随着 NaCl 浓度的逐步升高,两品种的下胚轴粗均表现为下降趋势。但二者差异显著 ($|t| = 2.791^*$),表现为:一方面 LH14 几乎是直线下降, FH1 在 NaCl 浓度为 100~200 mmol/L 时,下降最快,由 100 mmol/L 时的 5 mm 左右减小到 200 mmol/L 时的 2 mm 左右,减小了 60% 左右;另一方面除 NaCl 浓度为 500 mmol/L 外,其余各浓度条件下 LH14 的下胚轴粗显著大于 FH1,特别是 NaCl 浓度为 200 mmol/L 时, FH1 仅为 LH14 的 48%。

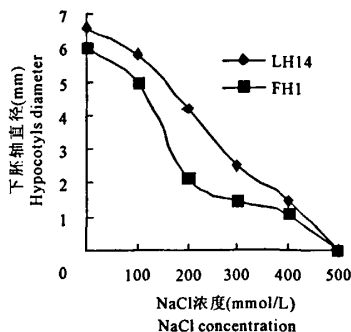


图 4 花生下胚轴直径

Fig.4 Peanut hypocotyls diameter

2.2.3 盐胁迫对花生幼根鲜重的影响 由图 5 可以看出,随着 NaCl 浓度的逐步升高,两品种的根鲜重均表现为下降趋势,且 NaCl 浓度为 100 ~ 200 mmol/L 时二者根长均迅速减小,LH14 减小 64%,FH1 减小 87%。但是 NaCl 浓度为 100 mmol/L 时,LH14 根鲜重与对照相差很小。除 NaCl 浓度为 500 mmol/L 外,其余各浓度条件下 LH14 的根鲜重显著大于 FH1,二者差异显著 ($|t| = 3.162^*$)。

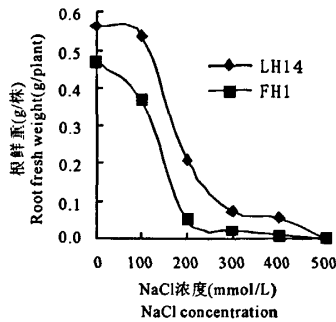


图 5 花生根鲜重

Fig.5 Peanut root fresh weight

2.2.4 盐胁迫对花生幼根体积和根表面积的影响 由图 6 和图 7 可以看出,随着 NaCl 浓度的逐步升高,两品种的根体积 ($|t| = 3.585^*$) 和根表面积均表现出显著差异 ($|t| = 3.467^*$)。NaCl 浓度为 100 ~ 200 mmol/L 时二者的根体积和根表面积均迅速减小。除 NaCl 浓度为 500 mmol/L 外,其余各浓度条件下 LH14 的根体积和根表面积显著大于 FH1。

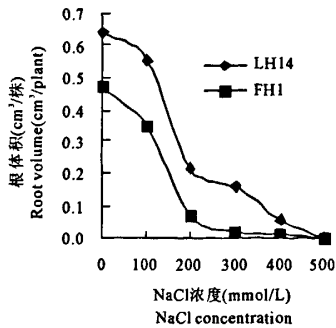


图 6 花生根体积

Fig.6 Peanut root volume

2.3 盐胁迫对花生幼根 MDA 和脯氨酸含量的影响

2.3.1 盐胁迫对花生幼根 MDA 相对含量的影响

由图 8 可以看出,随着 NaCl 浓度的逐步升高,两品种幼根的 MDA 相对含量均逐渐增加。所不同的是二者差异显著 ($|t| = 3.040^*$):各浓度条件下,LH14 幼根的 MDA 相对含量显著高于 FH1,最小差

异 11.1%,最大差异 45.4%;与对照相比,NaCl 浓度为 200 mmol/L 和 300 mmol/L 时,FH1 幼根的 MDA 相对含量较对照分别增加了 3.56 倍和 5.12 倍,而 LH14 分别仅增加了 2 倍和 3.83 倍,增加程度显著小于 FH1。

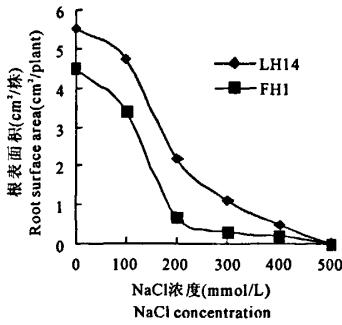


图 7 花生根表面积

Fig.7 Peanut root surface area

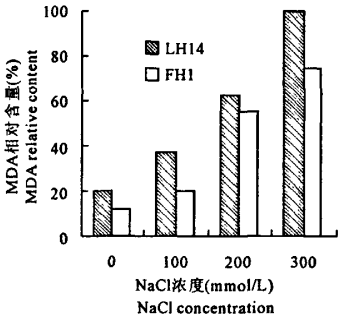


图 8 花生根 MDA 相对含量

Fig.8 MDA relative content in root of peanut

2.3.2 盐胁迫对花生幼根脯氨酸相对含量的影响

由图 9 可知,随着 NaCl 浓度的逐步升高,两品种幼根的脯氨酸相对含量均增加,但二者差异不显著 ($|t| = 1.675$),NaCl 浓度小于 100 mmol/L 时,均与对照差异甚小,NaCl 浓度为 200 mmol/L 时,FH1 与对照依然差异很小,而 LH14 与对照的差异显著增大,当 NaCl 浓度增加为 300 mmol/L 时,LH14 增加为对照的 2.76 倍,而 FH1 仅为对照的 1.91 倍。

2.4 DNA 梯形带

DNA 的特异片段化是细胞凋亡的生化特征,常规琼脂糖电泳是检测 DNA 梯形带最常用的方法,其分辨率为 100 bp ~ 30 kb。我们研究表明,200 mmol/L 和 400 mmol/L NaCl 处理的花生根尖出现明显的连续拖带,其中 400 mmol/L NaCl 处理的现象较 200 mmol/L 处理的现象明显,说明 400 mmol/L NaCl 处理的花生根尖细胞凋亡严重(图 10)。

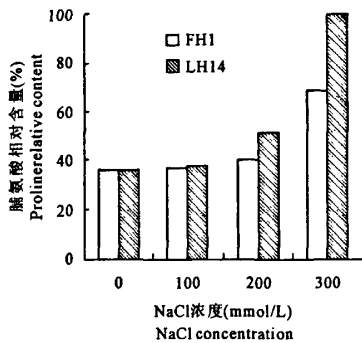


图9 花生根脯氨酸相对含量

Fig.9 Proline relative content in root of peanut

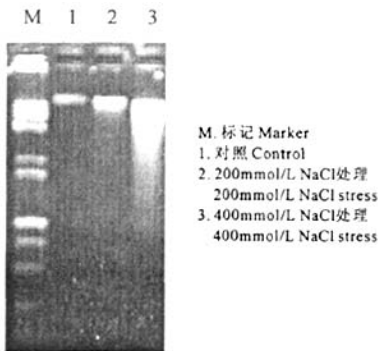


图10 NaCl胁迫引起的DNA片段化

Fig.10 DNA fragmentation after salt stress

3 结论与讨论

一般认为随着盐浓度的增加,种子的发芽率下降^[12]。研究发现低浓度盐对种子发芽率没有影响,一定范围内增加盐浓度还可以刺激发芽率的提高,随着盐浓度增大,发芽率才受到抑制^[13]。盐浓度影响种子的萌发主要有三方面效应,即增效效应、负效效应和完全阻抑效应。低浓度盐分对种子萌发有促进作用,随盐分浓度的升高,种子发芽率、发芽指数和活力指数都减小,盐浓度过高就会抑制种子萌发^[3-8,14]。本研究表明,在NaCl低浓度时,对花生发芽势和发芽率影响相对较小;随着NaCl浓度增加,花生发芽势和发芽率降低;继续增大NaCl浓度,明显抑制花生种子萌发,与上述报道有一定差异,可能是物种不同,盐胁迫下的表现不同。

根系发育的好坏对作物的耐盐性尤其重要,也是花生立苗的基础。本研究结果表明,花生对盐胁迫较为敏感,无论盐浓度高低,都对花生胚根生长产生抑制作用,根长、根粗、根鲜重、根体积和根表面积随盐浓度增加而减小,并且盐浓度越高,抑制越明

显。所不同的是,LH14根长、根粗、根体积和根表面积明显优于FH1,LH14较FH1抗盐。

盐分能增加细胞膜透性,加强脂质过氧化作用,最终导致膜系统的破坏。在植物生命活动中干扰或破坏膜结构和功能的因素很多,脂质过氧化作用是最引人重视的一个因素。MDA作为脂质过氧化作用的产物,其含量的多少可以代表膜损伤程度的大小^[15]。试验表明,无论是LH14还是FH1,各浓度盐处理后,其根系的MDA含量明显高于对照,并且随盐浓度的增加,MDA含量逐渐增加。说明随着盐浓度增加,脂质过氧化增强,膜系统破坏逐渐严重。

脯氨酸是植物在盐胁迫下的主要渗透调节物质之一,它不仅是生物大分子的保护剂和羟基的清除剂,还是植物从胁迫条件恢复正常过程中迅速、有效的氮源、碳源和还原剂。脯氨酸能够防止质膜透性的变化,对质膜的完整性有保护作用,原因可能是脯氨酸与膜磷脂及转运蛋白相互作用,以稳定其结构^[16]。本试验表明,随着NaCl浓度的逐步升高,两品种幼根的脯氨酸相对含量均增加,但NaCl浓度小于100 mmol/L时,均与对照差异甚小。从花生种子萌发的外观表现来看,虽然LH14较FH1耐盐,但各NaCl浓度处理下LH14根尖MDA含量却比FH1高,其原因可能与品种不同有关,除此之外,其体内的渗透调节物质也起到关键作用,LH14根尖内脯氨酸含量较FH1高,一定程度上能够缓解脂质过氧化,LH14表现出一定的耐盐性。除脯氨酸外,其它渗透调节物质(甜菜碱、可溶性糖等)也会起到一定作用^[16]。

细胞凋亡是植物抵抗不良环境的一种能动生理反应。动物细胞死亡在形态和生化特征上因物种和诱导条件不同,会表现出多样性,有些条件下电泳并不一定出现DNA梯形带,植物也是如此^[11,17]。宁顺斌等对盐胁迫条件下水稻、玉米和烟草根尖研究表明,电泳并没有都出现DNA梯形带^[11]。我们的结果也表明,在一定盐浓度的胁迫下并未出现明显的DNA梯形带,分子水平上可能是随物种不同而有一定差异,另外由于多种蛋白酶的参与,细胞死亡也会具有一定的保守性^[11,18-20]。

参考文献:

- [1] 万书波,单世华,李春娟,等.我国花生安全生产现状与策略[J].花生学报,2005,34(1):1-4.
- [2] 王耀波,张艺兵,张鹏,等.入世后中国花生生产发展前景及促进出口的对策[J].花生学报,2003,32(3):24-29.
- [3] 高瑞如,赵瑞华,张双凤,等.盐分和温度对盐生木种子萌发的影响[J].西北植物学报,2007,27(11):2281-2285.

- [4] 同留华,陈敏,王宝山. NaCl胁迫对两种表型盐地碱蓬种子萌发的渗透效应和离子效应研究[J]. 西北植物学报, 2008, 28(4): 718—723.
- [5] 陈淑芳. GA诱导NaCl胁迫下黄瓜种子萌发和幼苗耐盐性效应[J]. 西北植物学报, 2008, 28(7): 1429—1433.
- [6] 康玉林,徐利群,张春震,等. 不同盐浓度对马铃薯实生苗的影响[J]. 马铃薯杂志, 1996, 10(1): 17—19.
- [7] 戴伟明,蔡润,潘俊松,等. 盐胁迫对番茄幼苗生长发育的影响[J]. 上海农业学报, 2002, 18(1): 58—62.
- [8] 李响,沈禹颖,阎顺国. NaCl胁迫下5种牧草种子萌发的比较研究[J]. 草业科学, 1997, 14(2): 50—53.
- [9] 文卿琳,阿曼古丽·肉孜. 盐胁迫对海岛棉种子萌发的影响[J]. 中国种业, 2008, 1: 39—41.
- [10] 邹琦. 植物生理学实验指导[M]. 北京: 中国农业出版社, 2000.
- [11] 宁顺斌,宋运淳,王玲,等. 盐胁迫诱导的植物细胞凋亡—植物抗盐的可能生理机制[J]. 实验生物学报, 2000, 33(3): 245—254.
- [12] Rehman S. The effect of sodium chloride on the Ca^{2+} , K^{+} and Na^{+} concentrations of the seed coat and embryo of *Acacia tortilis* [J]. *Annals of Applied Biology*, 1998, 133: 269—279.
- [13] Al-Hetali A A, Al-Farraj M M, El-Desoki R A, et al. Germination response of *casia senna* L seeds to sodium salts and temperature[J]. *Journal of the University of Kuwait Science*, 1989, 16(2): 281—287.
- [14] 苏永全,吕迎春. 盐分胁迫对植物的影响研究简述[J]. 甘肃农业科技, 2007, 5(3): 23—27.
- [15] 王爱国,邵从本,罗广华. 丙二醛作为植物脂质过氧化指标的探讨[J]. 植物生理学通讯, 1986, 2: 55—57.
- [16] 李彦,张英鹏,孙明,等. 盐分胁迫对植物的影响及植物耐盐机理研究进展[J]. 中国农学通报, 2008, 24(1): 258—265.
- [17] 雷腊梅,宋立荣,韩博平. 微囊藻毒素LR诱导无DNA片断化的细胞凋亡[J]. 热带医学杂志, 2006, 6(7): 749—751, 784.
- [18] D'Silva I, Poirier G G, Heath M C. Activation of cysteine proteases in cowpea plants during the hypersensitive response—A form of programmed cell death[J]. *Exp Cell Res*, 1998, 245: 389—399.
- [19] Solomon M, Belenghi B, Delledonne M, et al. The involvement of cysteine proteases and protease inhibitor genes in the regulation of programmed cell death in plants[J]. *Plant Cell*, 1999, 11: 431—444.
- [20] Xu F X, Chye M L. Expression of cysteine proteinase during developmental events associated with programmed cell death in brinjal[J]. *Plant J*, 1999, 17: 321—327.

Effects of NaCl stress on seed germination of peanut

GUO Feng^{1,2}, WAN Shu-bo^{1,2*}, LI Xin-guo^{1,2}, XU Ping-li^{1,2}, MENG Jing-jing^{1,2}

(1. High-tech Research Center, Shandong Academy of Agricultural Sciences; Key Laboratory for Genetic Improvement of Crop, Animal and Poultry of Shandong Province, Ji'nan, Shandong 250100, China;

2. Key Laboratory of Crop Genetic Improvement and Biotechnology, Huanghuaihai, Ministry of Agriculture, Ji'nan, Shandong 250100, China)

Abstract: Peanut seeds treated with different NaCl concentrations (0, 100, 200, 300, 400 and 500 mmol/L) were studied with peanut cultivar Luhua 14 (LH14) and Fenghua 1 (FH1). The main results were described as follows. The effect of low concentration of NaCl treatment ((100 mmol/L) on peanut seed germination was relatively small. With the increase of NaCl concentration, peanut seed germination energy and germination rate decreased gradually, the same as root length, root surface area, root volume, root fresh weight and radicle diameter. But MDA and proline content increased gradually. DNA gel electrophoresis in the peanut root tip with high concentration of NaCl had obvious continuous band, so the apoptosis of root tip cells was relatively serious.

Keywords: peanut; seed germination; NaCl stress; malondialdehyde; proline; DNA Laddering