

王 鑫,孔祥生. 盐胁迫对流苏树愈伤组织生理生化特性的影响[J]. 江苏农业科学,2014,42(11):54-57.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2014.11.015

盐胁迫对流苏树愈伤组织生理生化特性的影响

王 鑫,孔祥生

(河南科技大学农学院,河南洛阳 471003)

摘要:以流苏树愈伤组织为材料,测定其在不同浓度(0、50、100、150、200 mmol/L) NaCl 胁迫下的可溶性糖、可溶性蛋白、脯氨酸、丙二醛(MDA)含量和过氧化物酶(POD)、超氧化物歧化酶(SOD)活性。结果显示:可溶性糖和脯氨酸含量先下降后上升,其中 50 mmol/L NaCl 处理组的流苏树愈伤组织中的可溶性糖和脯氨酸含量均低于对照组;可溶性蛋白含量整体先升高再下降;MDA 含量初期迅速升高,中后期缓慢下降,对照组持续下降;SOD 活性表现为迅速增强后稍有减弱;POD 活性初期明显减弱,中后期明显增强,对照组变化较处理组不明显。

关键词:流苏树;愈伤组织;盐胁迫;生理生化特征

中图分类号: Q945.78 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2014)11-0054-04

流苏树(*Chionanthus retusus*)别称萝卜丝花、茶叶树、四月雪等,是木犀科流苏树属落叶乔木,为国家二级保护植物,主要分布于我国甘肃、陕西、山西、河北、河南以南至云南、四川、广东、福建、台湾等地。流苏树的嫩叶及花可代茶,并具有一定药用价值;材质较好,可制器具和供细木工用;枝叶繁茂,花大而美丽,是优良造林和观赏树种;果实含油率高,是一种重要能源植物^[1]。但是目前关于流苏树的研究很少,关于组织培养的抗性研究还未报道。流苏树用途广泛但却未被开发利用,与其传统的繁殖方式不无关系。迄今为止,还没有关于流苏树快速繁殖的研究,而且流苏树大部分分布于我国盐碱地带,所以选育耐盐品种对其广泛栽培和充分研究利用很有必要。植株和愈伤组织的耐盐性相似,植株的耐盐性可以在组织水平上表达,应用愈伤组织筛选耐盐性是可行的^[2]。渗透胁迫是指环境的低水势对植物体产生的水分胁迫,包括干旱、盐渍胁迫,可见盐胁迫属于渗透胁迫的一种。在渗透胁迫下,植物细胞失水,膨压减小,生理活性减弱,严重时细胞完全丧失膨压,最后导致细胞死亡。在一定范围内,某些植物细胞可通过自身渗透调节作用抵御外界渗透胁迫。渗透调节是植

物适应渗透胁迫的生理生化机制,它通过主动增加细胞内溶质的作用降低渗透势来促进细胞吸水,从而维持细胞膨压。渗透调节是在细胞水平上进行的,即由细胞通过合成和吸收积累对细胞无害的溶质来完成。参与细胞渗透调节的物质主要有 2 类:一类是由外界引入细胞中的无机离子,一类是在细胞内合成的有机溶质,主要是可溶性糖、可溶性蛋白、脯氨酸、甜菜碱等^[3-4]。盐胁迫破坏植物体内的氧化还原平衡,从而导致活性氧积累^[5]、膜脂过氧化水平增高、丙二醛(MDA)含量增加^[6]。MDA 是膜质过氧化的最终产物,它能与膜上的蛋白质、酶等结合,引起蛋白质分子内和分子间的交联,使之失活,加剧膜质过氧化作用,其积累是毒害作用的表现,人们常以其作为判断膜质过氧化作用的一个指标^[7-8]。在 NaCl 胁迫下,细胞内自由基代谢平衡失调而产生过剩的活性氧,会引起或加剧膜脂过氧化,造成细胞膜系统损伤,膜透性增强^[9]。抗氧化胁迫是植物耐盐的一种方式,保护酶系统[过氧化物酶(POD)、超氧化物歧化酶(SOD)]是防御活性氧及其他自由基对细胞膜系统伤害的重要酶^[10]。本研究探讨不同浓度(0、50、100、150、200 mmol/L) NaCl 胁迫下流苏树愈伤组织中可溶性糖、可溶性蛋白、游离脯氨酸、MDA 含量和 POD、SOD 活性的变化,分析流苏树在盐胁迫下的生理生化特点,旨在为关于流苏树的其他研究奠定一定基础。

1 材料与方法

1.1 材料和盐胁迫处理

1.1.1 无菌体系的建立 把采于河南省栾川县狮子庙乡的

Euphytica, 1990, 48(3):269-274.

[7] Mythili P K, Madhavi A, Reddy V D, et al. Efficient regeneration of pearl millet [*Pennisetum glaucum* (L.) R. Br.] from shoot tip cultures [J]. Indian Journal of Experimental Biology, 2001, 39(12):1274-1279.

[8] 伍晓丽,朱 祺,李晚忱,等. 农杆菌介导豇豆胰蛋白酶抑制剂基因(*cpti*)在玉米中的遗传转化[J]. 作物学报,2004(3):297-298.

[9] 季良越,孙晓丽,韦小敏,等. 玉米胚性愈伤组织诱导和植株再生研究[J]. 河南农业大学学报,2002,36(2):101-105.

收稿日期:2014-01-13

基金项目:河南省重点科技攻关(编号:090080021023)。

作者简介:王 鑫(1988—),女,河南开封人,硕士,研究方向为植物学。E-mail:wangxin_kf@163.com。

通信作者:孔祥生,硕士,教授,研究方向为植物生理学与植物细胞工程。E-mail:kxsh55@163.com。

[3] 张 荣,王国英,张晓红,等. 根瘤农杆菌介导的玉米遗传转化体系的建立[J]. 农业生物技术学报,2001,9(1):45-48.

[4] 王国英,张 宏,谢友菊,等. 玉米胚性愈伤组织转化及转 *Bt* 基因植株的抗虫性[J]. 农业生物技术学报,1995(3):49-53.

[5] Zhao Z Y, Gu W, Cai T. Methods for *Agrobacterium*-mediated transformation; United States, 6822144[P]. 1999:598-840.

[6] George L, Eapen S. High frequency plant-regeneration through direct shoot development and somatic embryogenesis from immature inflorescence cultures of finger millet (*Eleusine coracana* Gaertn) [J].

流苏树种子带回实验室,去除果皮和种皮,取出胚放于超净工作台上,用 75% 乙醇表面处理 30 s,无菌水冲洗 3 次,0.1% 氯化汞溶液处理 2 min 后取出,无菌水振荡冲洗 5 次,无菌滤纸吸干表面水分,接种于添加了 0.05 mg/L NAA、1.0 mg/L GA_3 、2.0 mg/L 6-BA、蔗糖 30 g/L、琼脂 6 g/L 的 WPM 培养基(pH 值 5.8)上暗培养 4 d,然后转至光培养,培养温度为 $(25 \pm 2)^\circ\text{C}$,光照时间 12 h/d,光照强度 1 500 ~ 2 000 lx,获得无菌苗。

1.1.2 愈伤组织的获得 将萌发的无菌苗在超净工作台内取出,将萌发变绿的子叶取下,切成 0.5 cm 左右的块状,接种于添加了 0.5 mg/L NAA、0.5 mg/L 2,4-D、0.5 mg/L 6-BA、蔗糖 30 g/L、琼脂 6 g/L 的 WPM 培养基(pH 值 5.8)上光照培养,培养温度 $(25 \pm 2)^\circ\text{C}$,光照时间 12 h/d,光照强度 1 500 ~ 2 000 lx,培养 20 d 后生成较好的愈伤组织。

1.1.3 盐胁迫处理 以 WPM + 0.5 mg/L NAA + 0.5 mg/L 2,4-D + 0.5 mg/L 6-BA + 30 g/L 蔗糖 + 6 g/L 琼脂为基本培养基,分别添加 NaCl 溶液,使其在培养基中的浓度分别达到 50、100、150、200 mmol/L,并以不添加 NaCl 溶液为对照(CK),把生长状态一致的愈伤组织分别接种于对照和含有不同浓度 NaCl 的培养基上培养,在培养 0、3、6、9、12、15 d 时测定各生理指标。

1.2 测定项目及方法

采用蒽酮法测定^[11]可溶性糖含量;采用考马斯亮蓝 G-250 染色法^[11]测定可溶性蛋白含量;采用碘基水杨酸提取法^[11]测定游离脯氨酸含量;采用硫代巴比妥酸(TBA)比色

法^[11]测定 MDA 含量;采用愈创木酚法^[11]测定 POD 活性;采用氮蓝四唑(NBT)光化还原法^[11]测定 SOD 活性。

2 结果与分析

2.1 不同浓度盐胁迫对流苏树愈伤组织形态的影响

由表 1、图 1 可知,50 mmol/L NaCl 浓度对愈伤组织的生长影响很小,培养前 9 d,愈伤组织生长稍慢于对照,12 d 后,愈伤组织生长状态与对照相同;100 ~ 200 mmol/L NaCl 的处理会阻碍愈伤组织的生长,盐浓度越高和培养时间越长,愈伤组织的生长状态越差,培养 15 d 时,100 mmol/L NaCl 处理的愈伤组织生长缓慢,有部分发生褐化;150 mmol/L NaCl 处理的愈伤组织生长大部分发生褐化;200 mmol/L NaCl 会造成愈伤组织的严重褐化、死亡。

表 1 盐胁迫对愈伤组织生长的影响

NaCl 浓度 (mmol/L)	盐胁迫不同时间后愈伤组织的生长情况				
	3 d	6 d	9 d	12 d	15 d
CK	+++++	+++++	+++++	+++++	+++++
50	+++++	++++	++++	+++++	+++++
100	++++	++++	+++	+++	+++
150	++++	+++	+++	++	++
200	+++	+++	++	+	+

注:+++++表示愈伤组织质量最好,体积大,新鲜,绿色;++++表示愈伤组织质量较好,较新鲜,绿色;+++表示愈伤组织质量较差,体积较小,发暗,绿色中有褐点;++表示愈伤组织质量较差,体积小,淡褐色;+表示愈伤组织质量差,体积小,严重褐化。

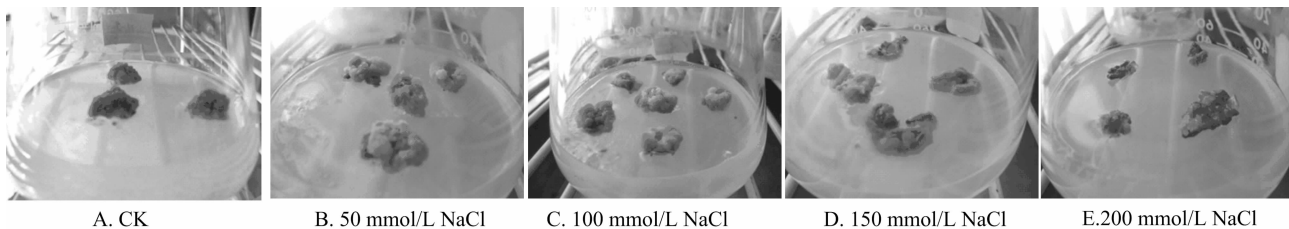


图 1 不同浓度盐胁迫 15 d 后对愈伤组织生长的影响

2.2 不同浓度盐胁迫对流苏树愈伤组织渗透调节物质的影响

2.2.1 不同浓度盐胁迫对流苏树愈伤组织可溶性糖含量的影响 从图 2 可以看出,随胁迫时间的延长,愈伤组织中可溶性糖含量整体呈现先降低后升高的趋势。对照愈伤组织可溶性糖含量在胁迫后 6 d 最低,为 5.59 mg/g;之后开始上升,胁迫后 15 d 最高,为 38.47 mg/g。200 mmol/L NaCl 处理的可溶性糖在胁迫后 3 d 最低,为 6.70 mg/g,仅为对照的 57.01%;之后开始上升,到胁迫后 15 d 最高,比对照高 45.85%。50 mmol/L NaCl 处理在前 6 d 均高于对照,胁迫后 6 d 比对照高 89.42%;胁迫后 9 ~ 15 d 一直低于对照,胁迫后 15 d 为对照的 79.59%。

2.2.2 不同浓度盐胁迫对流苏树愈伤组织游离脯氨酸含量的影响 图 3 显示,胁迫后 3、6、9 d,CK 愈伤组织的游离脯氨酸含量显著高于接种当天,胁迫后 12 ~ 15 d 游离脯氨酸显著低于接种当天;50 mmol/L NaCl 处理的游离脯氨酸含量在培养期间均低于对照,胁迫后 15 d 仅为对照的 71.82%;在胁迫前期,100 ~ 200 mmol/L NaCl 处理组脯氨酸含量均低于对照,

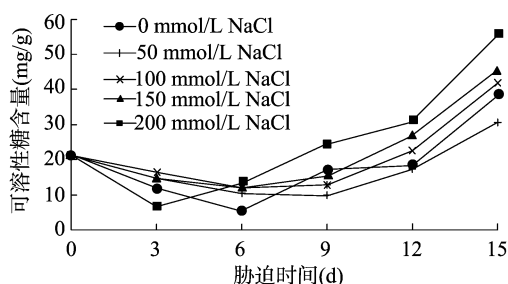


图 2 不同浓度盐胁迫对流苏树愈伤组织可溶性糖含量的影响

在胁迫后期高于对照,并且随着 NaCl 浓度的提高,高于对照的时间提前(100、150、200 mmol/L NaCl 处理分别在胁迫后 15、12、9 d 时高于对照),胁迫后 15 d,100、150、200 mmol/L NaCl 处理的游离脯氨酸含量分别比对照高 62.56%、139.17%、177.22%。

2.2.3 不同浓度盐胁迫对流苏树愈伤组织可溶性蛋白含量的影响 从图 4 可以看出,整个试验过程中,所有处理可溶性蛋白含量均呈现先升高后降低的趋势。对照在胁迫后 3 d 达到最高,比接种当天高 18.89%;之后开始下降,到胁迫后

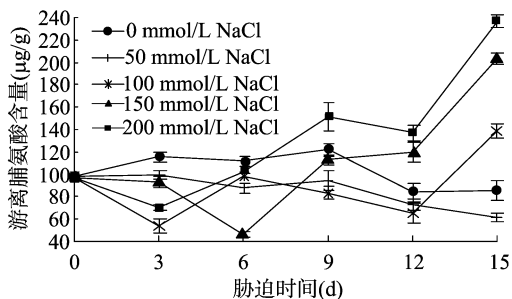


图3 不同浓度盐胁迫对流苏树愈伤组织游离脯氨酸含量的影响

15 d 达到最低,为接种当天的 78.61%。50 mmol/L NaCl 处理的可溶性蛋白含量在胁迫前 9 d 持续升高,在胁迫后 9 d 达到最大,比对照高 16.03%;之后开始下降,胁迫后 15 d 比对照高 9.85%。100 ~ 200 mmol/L NaCl 处理可溶性蛋白含量均表现为先升高后降低的趋势,且胁迫前 6 d 均高于对照,150、200 mmol/L NaCl 处理在胁迫后 9 d 低于对照,100 mmol/L NaCl 处理在胁迫后 12 d 低于对照,胁迫后 15 d 分别为对照的 91.19%、66.22%、56.09%。

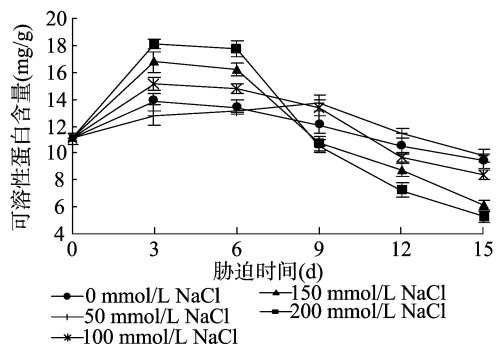


图4 不同浓度盐胁迫对流苏树愈伤组织可溶性蛋白含量的影响

2.3 不同浓度盐胁迫对流苏树愈伤组织 MDA 含量的影响

图 5 显示,胁迫后 3 d,CK 的 MDA 含量稍微有所上升,比接种当天高 5.18%,之后开始下降,胁迫后 15 d 降到最低,仅为接种当天的 66.38%;50 ~ 200 mmol/L NaCl 处理的 MDA 含量均在胁迫后 3 d 升至最高,分别比对照高 30.45%、103.49%、158.11%、194.32%,之后开始下降,胁迫后 15 d 降到最低,但依然高于对照,分别比对照高 13.68%、50.66%、228.13%、276.89%。

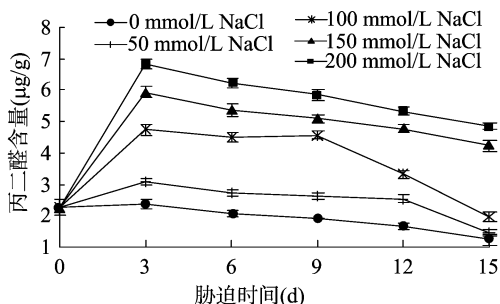


图5 不同浓度盐胁迫对流苏树愈伤组织 MDA 含量的影响

2.4 不同浓度盐胁迫对流苏树愈伤组织保护酶活性的影响

2.4.1 不同浓度盐胁迫对流苏树愈伤组织 SOD 活性的影响

从图 6 可以看出,对照组愈伤组织中 SOD 活性在胁迫前 9 d 持续上升,胁迫后 9 d 达到最高,比接种当天高 128.48%,

之后稍有下降,胁迫后 15 d 比对照高 78.80%;50 mmol/L NaCl 处理组胁迫后 6 d 升至最高,比对照高 76.81%,之后开始下降,胁迫后 15 d 比对照高 26.56%;100 ~ 200 mmol/L NaCl 处理组均在胁迫后 3 d 升到最高,分别比对照高 191.07%、243.68%、259.39%,胁迫后 6、9、12 d 持续下降,胁迫后 15 d 稍有上升,这 3 个盐胁迫处理分别比对照高 175.84%、185.42%、205.32%。

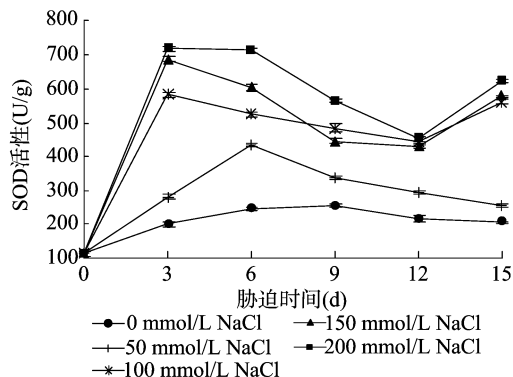


图6 不同浓度盐胁迫对流苏树愈伤组织SOD活性的影响

2.4.2 不同浓度盐胁迫对流苏树愈伤组织 POD 活性的影响

图 7 显示,对照组愈伤组织中 POD 活性在胁迫前 6 d 有所下降,胁迫后 6 d 降到最低,仅为对照的 85.11%,之后开始上升,胁迫后 15 d 比接种当天高 21.28%。50、100、150、200 mmol/L NaCl 处理在胁迫后 3 d 均降到最低,分别为对照的 7.75%、9.30%、19.38%、27.13%;之后开始上升,胁迫后 6 d 比对照高;胁迫后 15 d 均升到最高,比对照高 158.95%、209.12%、215.79%、265.50%。

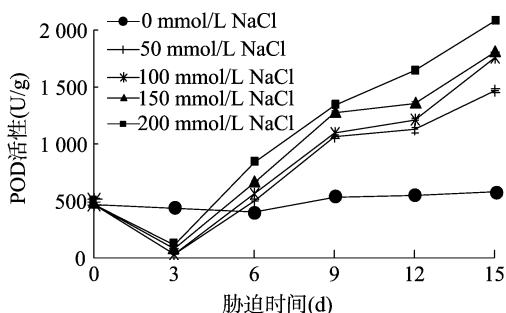


图7 不同浓度盐胁迫对流苏树愈伤组织 POD 活性的影响

3 结论与讨论

3.1 盐胁迫对流苏树愈伤组织渗透调节物质的影响

可溶性糖和脯氨酸都是植物重要的渗透调节物质,参与渗透胁迫下细胞水势的调节^[13-15],可溶性糖主要包括葡萄糖、海藻糖、蔗糖等。这些可溶性糖类参与渗透调节,并可能在维持植物蛋白质稳定方面起重要作用^[16]。关于脯氨酸在抗盐胁迫中作用的研究近年来有许多报道,一般认为脯氨酸在植物体内是一种重要的渗透调节剂,在盐胁迫下脯氨酸在植物细胞中大量积累,这对降低细胞的水势有一定的作用;脯氨酸可以保护细胞中的生物大分子的结构,使之不被 NaCl 破坏,并能维持其完整的水合范围;脯氨酸的高度溶解性以及其对各种酶活性的不抑制性可以扩大细胞的溶解溶积,从而降低细胞质液中盐的浓度,减轻盐的胁迫程度^[17]。

在植物细胞中的可溶性蛋白有相当一部分是具有特异性作用的调节代谢的酶,还有一些可能起脱水保护剂的作用,给细胞内的束缚水提供一个结合衬质以增加束缚水含量,从而使细胞结构在脱水时不致遭受更大的破坏^[18]。

图 2、图 3 显示,在盐胁迫初期,流苏树愈伤组织体内可溶性糖和游离脯氨酸含量都与本试验开始时持平甚至有所下降,而可溶性蛋白含量明显上升,表明在一定程度的渗透胁迫下,细胞内可合成新的蛋白^[7],且这些蛋白在抗逆性上起主要作用。到盐胁迫中后期,可溶性蛋白和游离脯氨酸开始大量合成积累,其中可溶性糖含量最先上升,其次是游离脯氨酸含量。这说明在盐胁迫下可溶性糖在渗透调节中发挥了积极的作用^[19],降低了细胞的渗透势,从而抵御了逆境。游离脯氨酸含量的增加和胁迫时间有关,说明游离脯氨酸作为渗透调节物质,在后期开始大量合成,补充可溶性糖的作用,协同抵御逆境。早在 1964 年 Stroganov 就提出,NaCl 可以影响蛋白质合成过程^[7],本试验中可溶性蛋白含量在盐胁迫中后期下降,可能就是 NaCl 影响的结果。

3.2 盐胁迫对流苏树愈伤组织 MDA 的影响

图 5 显示,重度胁迫(100~200 mmol/L NaCl)的处理组 MDA 含量在盐胁迫初期就开始大量增加,轻度胁迫(50 mmol/L NaCl)处理组的变化较小,相应的 SOD 活性(图 6)在胁迫初期也在下降,说明在胁迫初期,逆境对流苏树愈伤组织的生长有一定影响,由此可初步推测流苏树愈伤组织对于盐胁迫的不良环境需要一定的适应时间,在胁迫初期还没有有效抵御逆境的变化,这与可溶性糖含量变化的推测结果符合,在未作出反应应答前,盐胁迫对膜系统的伤害较大,导致丙二醛大量积累。到盐胁迫中后期,由于 SOD 和 POD 活性已经增强(图 6、图 7),有效清除了代谢过程中产生的活性氧,从而防止了活性氧引起的膜脂过氧化作用,减少了 MDA 的产生^[3]。

3.3 盐胁迫对流苏树愈伤组织保护酶活性的影响

SOD 是植物处于逆境中最主要的一种抗氧化酶,它能及时清除自由基和活性氧,提高植物组织的抗氧化能力^[10,20-21]。图 6 显示,在胁迫初期,所有处理的 SOD 活性均有所升高,其中 50 mmol/L NaCl 处理的 SOD 活性变化趋势与对照相似,均呈现先增强后减弱再趋于稳定,这与姚琳的基于电阻抗图谱法检测流苏抗盐性研究的结果^[10]相似。到盐胁迫中后期,其他处理的 SOD 活性变化趋势基本是先增强后稍减弱,然后基本恢复至最高水平,说明中盐和高盐条件可诱导 SOD 活性增强,这与杨帆等对 SOD 活性的研究结果^[22]一致。

POD 的主要作用是消除由 SOD 作用产生的过量 H_2O_2 ,使 H_2O_2 维持在一个较低的水平^[10]。POD 通过催化其他底物与 H_2O_2 反应以消耗 H_2O_2 ^[23-24]。在本试验中,各胁迫处理的 POD 活性在胁迫初期均有所减弱,说明在盐胁迫初期起主要保护作用的酶不是 POD。到了胁迫中后期,POD 活性的整体上持续增强,说明随着盐胁迫时间的延长,SOD 作用产生的 H_2O_2 越来越多,急需 POD 来清除过多的 H_2O_2 ,从而与 SOD 协同作用,共同抵御活性氧对膜系统的伤害。

另外,可能由于 SOD 和 POD 活性对盐胁迫的应答机理不同,导致它们各自的活性变化并不完全一致,并且流苏体内能够分解 H_2O_2 的酶还有 CAT(过氧化氢酶),该酶是否起到

了重要作用,还需通过试验进一步确定。

参考文献:

- [1] 时军霞. 不同浓度 IBA 和 NAA 处理流苏树茎段对扦插生根的影响[J]. 山东农业科学,2011(9):55-56.
- [2] 翟凤林. 植物的耐盐性及其改良[M]. 北京:农业出版社,1989:217-218.
- [3] 李合生. 现代植物生理学[M]. 北京:高等教育出版社,2002:420-433.
- [4] 张立军,梁宗锁. 植物生理学[M]. 北京:科学出版社,2008:367-368.
- [5] Hernández J A, Olmos E, Corpas F J, et al. Salt-induced oxidative stress in chloroplasts of pea plants[J]. Plant Science, 1995, 105(2): 151-167.
- [6] 武维华. 植物生理学[M]. 北京:科学出版社,2003:430.
- [7] 王兰兰,张立军,陈贵,等. 甘薯愈伤组织对干旱胁迫和盐胁迫的生理反应对比[J]. 生态学杂志,2006,25(12):1508-1514.
- [8] 朱国丽,王雪华,计巧灵,等. 罗布红麻胚性愈伤组织诱导及其对盐胁迫的生理反应[J]. 生物技术,2008,18(1):59-63.
- [9] 石庆华,林嘉鹏,姚正培,等. NaCl 胁迫对小麦生理生化特征的影响[J]. 新疆农业科学,2010,47(7):1479-1484.
- [10] 姚琳. 基于电阻抗图谱法检测研究流苏抗盐性研究[D]. 保定:河北农业大学,2011.
- [11] 孔祥生,易现峰. 植物生理学实验技术[M]. 北京:中国农业出版社,2008:257-261.
- [12] 刘祖祺,张石城. 植物抗性生理学[M]. 北京:中国农业出版社,1994:371-372.
- [13] 余叔文,汤章城. 植物生理与分子生物学[M]. 2 版. 北京:科学出版社,2001:739.
- [14] 钮福祥,华希新,郭小丁,等. 甘薯品种抗旱性生理指标及其综合评价初探[J]. 作物学报,1996,22(4):392-398.
- [15] Paleg L G, Aspinall D. The physiology and biochemistry of drought resistance in plants[M]. Sydney: Academic Press, 1981:145-168.
- [16] 赵江涛,李晓峰,李航,等. 可溶性糖在高等植物代谢调节中的生理作用[J]. 安徽农业科学,2006,34(24):6423-6425,6427.
- [17] 赵可夫,王韶唐. 作物抗性生理[M]. 北京:农业出版社,1990:296.
- [18] 张明生,谢波,谈锋,等. 甘薯可溶性蛋白、叶绿素及 ATP 含量变化与品种抗旱性关系的研究[J]. 中国农业科学,2003,36(1):13-16.
- [19] 武季玲,牛俊义,李胜,等. 盐胁迫对麻黄愈伤组织生理生化指标的影响[J]. 甘肃农业大学学报,2007,42(2):63-66.
- [20] 王志颖,刘鹏. 柠檬酸抑制剂对铅胁迫下油菜抗氧化酶活性的影响[J]. 江苏农业学报,2013,29(5):957-966.
- [21] 郑佳秋,顾闽峰,郭军,等. 涝渍胁迫下辣椒的生理特性[J]. 江苏农业学报,2012,28(3):617-621.
- [22] 杨帆,丁菲,杜天真,等. 构树抗氧化酶系统对盐胁迫的响应[J]. 浙江林业科技,2008,28(1):1-4.
- [23] 王霞,吴霞,马亮,等. 棉花幼苗受铅、镉胁迫的抗氧化酶反应[J]. 江苏农业科学,2012,40(12):105-107.
- [24] 王荣华,石雷,汤庚国,等. 渗透胁迫对蒙古冰草幼苗保护酶系统的影响[J]. 植物学通报,2003,20(3):330-335.