

NaCl胁迫对披针叶黄华愈伤组织生理特性的影响

郑秀芳¹, 王桔红^{2*}, 汪小东³, 张超强¹, 王兴龙¹

1. 河西学院农业与生物技术学院, 甘肃 张掖 734000

2. 韩山师范学院生物系, 广东 潮州 521041

3. 石河子大学农学院, 新疆 石河子 832000

摘要: 目的 研究 NaCl 胁迫对披针叶黄华 *Thermopsis laceolata* 愈伤组织生长及生理特性的影响, 拟从细胞水平上探讨其适应盐环境的生理机制。方法 在附加 0.2%~1.2% NaCl 的继代培养基上对愈伤组织进行胁迫培养, 测定其中的可溶性糖、可溶性蛋白质、脯氨酸、丙二醛 (MDA) 量及超氧化物歧化酶 (SOD)、过氧化物酶 (POD) 和过氧化氢酶 (CAT) 的活性, 并对其进行分析。结果 当 NaCl 小于或等于 0.8% 时, 随盐离子质量分数的增加, 愈伤组织生长量下降, 但与对照均无显著差异, 而当 NaCl 大于 0.8% 时, 愈伤组织生长极为缓慢; 可溶性糖和脯氨酸量随 NaCl 质量分数的升高总体呈先上升后下降趋势, 但均高于对照; 可溶性蛋白质、SOD、CAT 和 POD 酶活性随 NaCl 质量分数升高呈先上升后下降趋势; 丙二醛量在 0.8% NaCl 及以下时积累缓慢, 而 NaCl 高于 0.8% 时急剧增加。结论 披针叶黄华愈伤组织具有适应一定质量分数 ($\leq 0.8\%$ NaCl) 盐渍生境的能力, 其在受到盐胁迫时可以通过增加可溶性渗透调节物质如脯氨酸、可溶性糖类以降低渗透势及增强抗氧化酶活性来缓解盐伤害。

关键词: 披针叶黄华; 愈伤组织; 盐胁迫; 抗氧化酶; 渗透调节物质

中图分类号: R282.21 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2013)21-3048-05

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2013.21.020

Effects of NaCl stress on physiological characteristics of *Thermopsis laceolata* callus

ZHENG Xiu-fang¹, WANG Ju-hong², WANG Xiao-dong³, ZHANG Chao-qiang¹, WANG Xing-long¹

1. College of Agriculture and Biotechnology, Hexi University, Zhangye 734000, China

2. Department of Biology, Hanshan Normal University, Chaozhou 521041, China

3. College of Agriculture, Shihezi University, Shihezi 832000, China

Abstract: Objective To investigate the effects of NaCl stress on the growth and physiological characteristics of *Thermopsis laceolata* callus, and to reveal the physiological mechanism of *T. laceolata* under salty environment at the cellular level. **Methods** The callus was cultured on the subculture medium with NaCl (0.2%—1.2%), and the contents of soluble sugar, soluble proteins, proline, and malondialdehyde (MDA) and the activities of superoxide dismutase (SOD), peroxidase (POD), and catalase (CAT) were determined and analyzed. **Results** The callus growth expressed a decreasing trend with NaCl concentration increasing ($\leq 0.8\%$) but had no significant difference to contrast. Nevertheless, the callus grew very slowly with NaCl concentration increasing ($> 0.8\%$); the contents of soluble sugar and free proline increased firstly and then decreased, but were higher than those of the control group; the content of soluble protein and the activities of SOD, CAT, and POD increased firstly and then decreased; MDA accumulated slowly at salinity ($\leq 0.8\%$ NaCl), then increased rapidly at salinity ($> 0.8\%$ NaCl). **Conclusion** *T. laceolata* callus has an adaptability to salty environment ($\leq 0.8\%$ NaCl), and the callus could alleviate the salty injury by increasing the contents of the osmotic regulation substances, such as proline and soluble sugar, decreasing the osmotic potential, and increasing the activities of anti-oxidative enzyme.

Key words: *Thermopsis laceolata* R. Brown; callus; salt stress; anti-oxidase; osmotic regulation substance

披针叶黄华 *Thermopsis laceolata* R. Brown 为 布于内蒙古、甘肃、宁夏和青海等省区的干旱荒漠
豆科 Leguminosae 决明属多年生草本植物, 广泛分 盐碱地, 具有耐寒、耐旱和耐盐碱等特性^[1-2], 在保

收稿日期: 2013-07-13

基金项目: 河西学院科研创新与应用校长基金项目 (hxyxjzj-201003); 广东韩山师范学院 2012 年科研团队项目 (LT201204)

作者简介: 郑秀芳 (1965—), 女, 副教授, 研究方向为植物生理生化与生物技术。Tel: 18793659071 E-mail: xzf2188@163.com

*通信作者 王桔红 Tel: 13671409631 E-mail: wjuh1918@163.com

土固沙、治理土壤盐渍化和荒漠化方面具有重要的生态价值。研究证实^[3], 披针叶黄华种子和全草含多种生物碱, 在医药和农药领域有广阔的应用前景。目前, 对其研究主要集中在化学成分及其活性方面^[3-6], 从细胞水平对披针叶黄华耐盐性及其机制研究还鲜见报道。本研究以不同质量分数的 NaCl 胁迫处理披针叶黄华的愈伤组织, 从细胞水平上研究披针叶黄华对盐胁迫的生理响应, 探讨披针叶黄华耐受 NaCl 胁迫的生理机制, 为培育和保护耐盐植物资源提供基础资料, 为干旱、半干旱区植被恢复和重建提供理论依据。

1 材料

样品采自甘肃省张掖市郊荒漠地带, 经河西学院农业与生物技术学院张勇教授鉴定为披针叶黄华 *Thermopsis laceolata* R.Brown 的成熟种子。

2 方法

2.1 愈伤组织的诱导及胁迫处理

以披针叶黄华无菌苗下胚轴为外植体, 切取 3~5 mm 的小段, 接种在 MS+2, 4-D 0.5 mg/L+BA 1.0 mg/L+NAA 1 mg/L+IAA 0.5 mg/L 的培养基上进行愈伤组织的诱导, 继代 2 次后, 将生长一致的愈伤组织转接到附加 NaCl (0、0.2%、0.4%、0.6%、0.8%、1.0%、1.2%) 的培养基上胁迫培养。试验重复 3 次, 每次每一处理 20 个愈伤组织块, 分别于胁迫 7、14 d 测定愈伤组织培养物的鲜质量, 计算相对生长量, 14 d 时测定相关生理指标。

2.2 愈伤组织生长量的测定

无菌条件下, 用电子天平称每块愈伤组织的鲜质量。

相对生长量=(培养一定时间后愈伤组织鲜质量-转接前愈伤组织鲜质量)/转接前愈伤组织鲜质量

2.3 生理指标的测定

丙二醛量按照硫代巴比妥酸法^[7]; 脯氨酸量按照磺基水杨酸-酸性茚三酮法^[7]; 可溶性糖量采用蒽酮比色法^[7]; 可溶性蛋白质量采用考马斯亮蓝 G-250 染色法^[7]; POD 活性采用愈创木酚比色法^[7]; CAT 活性采用紫外吸收法^[7]; SOD 活性采用 NBT 光化学还原法^[7]。

2.4 数据处理

所有测定均做 3 次重复, 使用 Excel 2003 和 DPS 7.05 进行数据处理和分析, Origin7.5 作图。

3 结果与分析

3.1 NaCl 胁迫对披针叶黄华愈伤组织生长的影响

披针叶黄华愈伤组织在不同质量分数 NaCl 培养基上的生长情况可以反映其对盐渍环境的适应性。从表 1 可知, NaCl 为 0.2% 时, 胁迫初期 (7 d) 愈伤组织的鲜质量较对照有所增加, 随着时间的延长 (14 d) 其鲜质量降低, 但与对照无显著差异。随 NaCl 质量分数的提高, 愈伤组织的相对生长量减小, 但在 0.8% NaCl 以下时均与对照无显著差异, 说明披针叶黄华有一定的耐盐性; NaCl 达到 1.0% 时愈伤组织生长极为缓慢, 继代第 7、14 天的相对生长量分别为 2.61 和 3.75; NaCl 为 1.2% 时, 继代第 7、14 天的相对生长量分别为 1.04 和 1.67, 表明披针叶黄华愈伤组织对 NaCl 胁迫的最大耐受阈值为 1.0%。

形态观察发现, NaCl 为 0.2% 时, 愈伤组织表现与不加盐 (NaCl) 的情况相似, 颜色多为黄绿色, 生长量大, 表面新鲜; 随盐胁迫强度的增大, 愈伤组织逐渐减小, 颜色变深, 出现褐化, 生长受到抑制。

表 1 披针叶黄华愈伤组织在 NaCl 胁迫培养基上的生长情况 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 1 Growth of *T. laceolata* callus in NaCl stress media ($\bar{x} \pm s, n=3$)

NaCl / %	初始鲜质量 / g	培养 7 d		培养 14 d	
		鲜质量 / g	相对生长量	鲜质量 / g	相对生长量
0	0.050 3	0.602 3	10.97±0.55 a	2.135 0	41.44±0.68 a
0.2	0.054 8	0.664 8	11.13±0.24 a	2.065 7	36.69±2.67 a
0.4	0.052 0	0.614 9	10.83±0.69 a	1.946 9	36.44±1.48 a
0.6	0.053 7	0.599 6	10.16±0.34 a	2.010 8	36.44±1.79 a
0.8	0.052 8	0.548 7	9.39±0.14 a	1.992 3	36.73±0.77 a
1.0	0.055 7	0.201 1	2.61±0.20 b	0.264 7	3.75±0.34 b
1.2	0.053 6	0.109 3	1.04±0.23 b	0.143 3	1.67±0.14 b

不同小写字母表示 $P<0.05$, 下图表相同

Different letters are significantly different $P<0.05$, the same as below

3.2 NaCl胁迫对披针叶黄华愈伤组织中抗氧化酶活性的影响

3.2.1 SOD 活性 植物体内的 SOD 能有效地将超氧负离子转变成 H_2O_2 , 避免超氧自由基对膜的伤害, 其活性与植物抗逆性有密切关系^[8-9]。由图 1 可以看出, 随 NaCl 质量分数的升高, SOD 活性呈现先升高后降低的变化趋势, 在 0.8% 时达到峰值。其中, 0.2% 和 1.0% NaCl 胁迫下愈伤组织中 SOD 活性比对照增加约 2%, 差异并不显著 ($P>0.05$); 0.4%、0.6%、0.8% 的 NaCl 胁迫下, SOD 活性较对照显著增加 18%、84% 和 108%; 而 1.2% 的 NaCl 胁迫下 SOD 活性较对照降低了 14%, 差异极显著 ($P<0.01$)。可见, 当 NaCl 质量分数低于 1.0% 时, 胁迫提高了披针叶黄华愈伤组织 SOD 的活性, 可能增强了其清除超氧负离子的能力, 而 NaCl 大于 1.0% 后, SOD 活性受到了抑制, 清除超氧负离子的能力减弱。

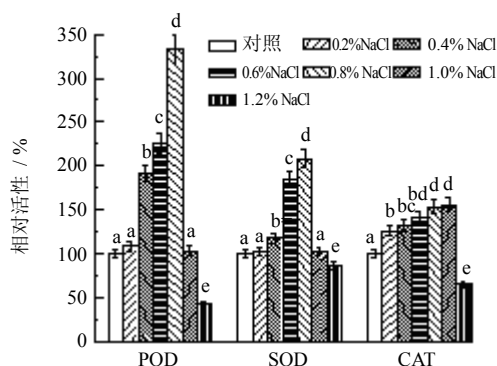


图 1 NaCl 胁迫对披针叶黄华愈伤组织抗氧化酶活性的影响
Fig. 1 Effect of NaCl stress on anti-oxidase activity in *T. lanceolata* callus

3.2.2 POD 和 CAT 活性 POD 和 CAT 活性反映植物体对 H_2O_2 等活性氧的清除能力^[10]。从图 1 结果可以看出, NaCl 胁迫使愈伤组织中 CAT 和 POD 活性均发生了不同程度的变化。其中, POD 活性的变化与 SOD 变化趋势相似, 也是随着盐处理质量分数的增加呈先升高后降低的变化趋势。当 NaCl 为 0.4%、0.6% 和 0.8% 时, POD 活性显著高于对照, 并在 0.8% 下达到最大值, 为对照的 233%。而 1.2% NaCl 胁迫下, POD 活性显著低于对照, 0.2% 和 1.0% 的 NaCl 胁迫下愈伤组织中 POD 活性与对照相比无显著差异 ($P>0.05$)。

CAT 活性在 NaCl 质量分数低于 1.0% 时与对照相比均有不同程度的增加, 其活性分别比对照增加约 26%、33%、41%、53% 和 56%。而 NaCl 胁迫质

量分数为 1.2% 时, 愈伤组织中 CAT 活性比对照降低约 35%, 差异均达到显著水平 ($P<0.05$)。表明披针叶黄华愈伤组织中 CAT 和 POD 对 NaCl 胁迫的反应不同, POD 可能在清除 H_2O_2 中发挥着更加重要的作用。

3.3 NaCl 胁迫对披针叶黄华愈伤组织中有机渗透调节物质的影响

3.3.1 可溶性糖和脯氨酸 可溶性糖和脯氨酸是植物在盐胁迫下的主要渗透调节物质, 参与盐胁迫下细胞水势的调节^[11]。由图 2 可知, 可溶性糖和脯氨酸量随 NaCl 质量分数的升高总体呈先上升后下降趋势, 但均高于对照。其中, 0.6% NaCl 胁迫下, 可溶性糖量最高, 为对照的 5.2 倍; 之后随 NaCl 质量分数增加, 愈伤组织中可溶性糖量逐渐减少, 当培养基中 NaCl 增加到 1.2% 时, 可溶性糖量为对照的 1.84 倍。而脯氨酸量在 0.4% 以下盐胁迫下积累比较平缓, 处理间差异并不显著, 此时愈伤组织中可溶性糖量显著增加 ($P<0.05$), 说明在该胁迫下, 可溶性糖在披针叶黄华愈伤组织抗盐胁迫中起主要作用; 随 NaCl 质量分数的升高, 愈伤组织中脯氨酸量迅速增加, 当 NaCl 达 0.8% 时脯氨酸量最高, 为对照的 9.5 倍, 此时愈伤组织中可溶性糖和脯氨酸增幅都较大, 两者共同作用调节愈伤组织的渗透势; 而当 NaCl 高于 0.8% 时, 脯氨酸量下降, 但仍高于对照, 分别为对照的 9.5、8.5 和 4 倍。

3.3.2 可溶性蛋白 植物在盐胁迫下高量的可溶性蛋白有利于其维持较低的细胞渗透势, 抵抗渗透胁迫带来的伤害^[12]。从图 3 可以看出, 愈伤组织中可

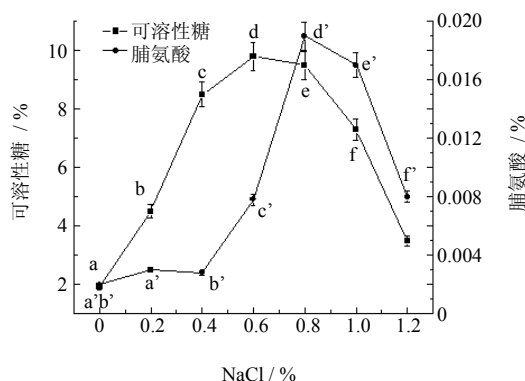


图 2 NaCl 胁迫对披针叶黄华愈伤组织可溶性糖和脯氨酸量的影响

Fig. 2 Effect of NaCl stress on contents of soluble sugar and proline in *T. lanceolata* callus

溶性蛋白量随 NaCl 质量分数增加呈先上升后下降趋势。其中, 0.2%~1.0% NaCl 胁迫下可溶性蛋白量与对照相比分别增加了 7.1%、35%、107%、39.2%、10.7%, 而 1.2% NaCl 胁迫下可溶性蛋白的量较对照降低 28.6%。除 0.2% 的 NaCl 质量分数外, 差异均达到显著水平 ($P < 0.05$)。

3.4 NaCl 胁迫对披针叶黄华愈伤组织中 MDA 量的影响

MDA 是膜脂氧化的主要产物, 其量的多少可反映逆境胁迫对植物造成氧化损害的程度。从图 4 可以看出, 随培养基中 NaCl 质量分数的增加, 愈伤组织中 MDA 量呈上升趋势, 但在 0.8% 以下时 MDA 的增加比较缓慢, 各处理与对照无明显差异; 而 NaCl 高于 0.8% 时, 愈伤组织中 MDA 量急剧增加, 分别增加为对照的 3.75 和 4.83 倍。表明随着胁迫程度的加大, 愈伤组织细胞膜的膜质过氧化程度

加大, 加速了 MDA 的生成。

4 讨论

相对生长量是植物对盐胁迫反应的综合体现, 是植物耐盐能力的重要指标。本实验中, 盐胁迫下披针叶黄华愈伤组织的相对生长量在低质量分数 (0.2%)、短时间 (7 d) 时有所增加, 随时间延长 (14 d) 则开始下降; 在中等 NaCl 质量分数 (0.4~0.8%) 胁迫下愈伤组织的相对生长量随 NaCl 质量分数的增加而减少; 而在相对较高的盐胁迫 (>0.8%) 时, 愈伤组织的生长受到强烈地抑制, 该结果与范晓峰^[13]和刘玉冰等^[14]对唐古特白刺和红砂愈伤组织的研究结果一致。

SOD、CAT 和 POD 等抗氧化酶的协同作用在清除植物体内活性氧方面发挥着重要作用。其中, SOD 在保护酶系中处于核心地位, 它的催化作用使超氧负离子转化为 H_2O_2 , CAT 和 POD 的共同作用可清除植物中产生的过量 H_2O_2 , 最终达到稳定保护膜结构的作用^[15-16]。本实验中, 盐胁迫低于 1.0% 时诱导抗氧化酶活性显著升高, 可及时清除 NaCl 胁迫产生的过量超氧负离子和 H_2O_2 , 因而愈伤组织未造成明显的氧化损伤, MDA 量与对照相比差异不显著。但 NaCl 高于 1.0% 时, 愈伤组织中抗氧化活性明显减弱, 不能及时清除超氧负离子和 H_2O_2 , 诱发较强的膜脂过氧化, 表现为愈伤组织中 MDA 量随胁迫程度增强而升高, 明显对细胞造成了较强的氧化损伤。3 种保护酶中, SOD 和 POD 活性的变化比较一致, 与 MDA 量也比较协调, 在 NaCl 质量分数 0.8% 时活性最强, 1.2% 时最弱, 而 CAT 活性的变化与 MDA 量不够协调。与 CAT 相比, SOD 和 POD 可能在披针叶黄华愈伤组织对盐胁迫下活性氧的清除方面发挥着更为重要的作用, 只有当 NaCl 质量分数较高, SOD 和 POD 的活性都受到抑制时, CAT 的作用才突显出来, 而 NaCl 达到 1.2% 时, 3 种酶活性均被抑制。

有研究表明, 植物在盐胁迫下能积累具有渗透调节功能的物质, 如脯氨酸、可溶性糖、可溶性蛋白等, 增强细胞的渗透性调节作用, 缓解盐害, 进而提高植物的耐盐性^[11,17]。本实验中, 不同质量分数的 NaCl 胁迫 14 d 时, 披针叶黄华愈伤组织中的脯氨酸、可溶性糖及可溶性蛋白量都随 NaCl 质量分数升高呈先增加后降低的变化趋势, 各指标的最大值分别出现在 NaCl 0.6%、0.8% 和 0.6% 处, 在 NaCl 质量分数低于 1.0% 时, 三者的量各处理均显

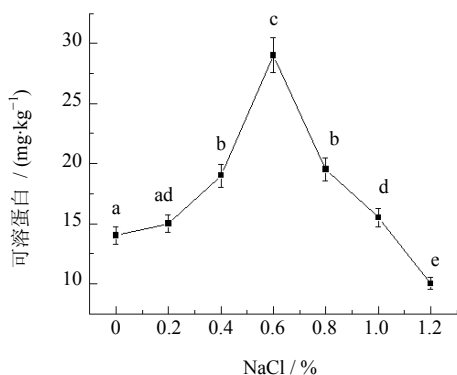


图3 NaCl 胁迫对披针叶黄华愈伤组织可溶性蛋白质量的影响

Fig. 3 Effect of NaCl stress on content of soluble protein in *T. lanceolata* callus

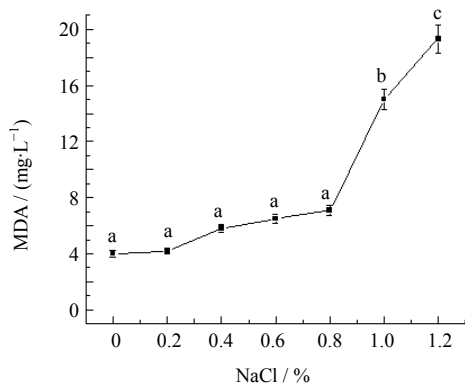


图4 NaCl 胁迫对披针叶黄华愈伤组织 MDA 的影响

Fig. 4 Effect of NaCl stress on content of MDA in *T. lanceolata* callus

著高于对照,但可溶性蛋白量在1.2% NaCl胁迫下则显著低于对照28.6%。该结果说明,NaCl质量分数低于0.6%时,脯氨酸、可溶性糖和蛋白质三者共同作用调节愈伤组织的渗透势,而NaCl质量分数高于0.6%时,脯氨酸和可溶性糖可能在披针叶黄华愈伤组织对盐胁迫反应中发挥着重要的渗透调节作用。盐胁迫下披针叶黄华愈伤组织通过诱导脯氨酸、可溶性糖、可溶性蛋白的累积来适应盐胁迫的机制与王锴^[18]和杨颖丽等^[19]的研究结果一致。

综上所述,披针叶黄华愈伤组织具有适应一定质量分数($\leq 0.8\%$ NaCl)盐渍生境的能力,其在受到盐胁迫时可以通过增加可溶性渗透调节物质如脯氨酸、可溶性糖类以降低渗透势及增强抗氧化酶活性来缓解盐伤害。然而,当超过一定质量分数时($\geq 1.0\%$ NaCl),胁迫导致愈伤组织MDA量大大增加,出现严重的氧化损害,愈伤组织生长严重受阻。

参考文献

- [1] 胡红岩,陈欢,徐环李.毛乌素沙地固沙植物披针叶黄华主要传粉昆虫及其访花行为[J].生物多样性,2012,20(3):354-359.
- [2] 时永杰.披针叶黄华[J].中兽医医药杂志,2003,专辑:134-135.
- [3] 李勇,晁向阳,张永康.披针叶黄华的研究进展[J].农业科学研究,2007,28(1):80-84.
- [4] 李勇,赵晓瑞,张学礼.披针叶黄华的化学成分研究[J].农业科学研究,2008,29(4):68-69.
- [5] 黎萍,杨敏丽.披针叶黄华中金雀花碱类生物碱的提取工艺[J].华西药学杂志,2007,22(1):7-8.
- [6] 李勇,张学礼,许斌.披针叶黄华碱体外细胞毒性的研究[J].黑龙江畜牧兽医,2012(12):118-119.
- [7] 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,2005.
- [8] Elstner E F. Oxygen activation and oxygen toxicity [J]. *Annu Rev Plant Physiol*, 1982(33): 73-96.
- [9] 武维华,张蜀秋.植物生理学[M].北京:科学出版社,2003.
- [10] 刘爱荣,张远兵,陈登科.盐胁迫对盐芥(*Thellungiella halophila*)生长和抗氧化酶活性的影响[J].植物研究,2006,26(2):216-221.
- [11] 王鸣刚,贾敬芬,谢放.小麦耐盐细胞系及后代耐盐稳定性的生化分析[J].西北植物学报,1999,19(2):310-314.
- [12] 张明生,谢波,谭锋,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.
- [13] 范小峰,杨颖丽,程转霞.NaCl胁迫下唐古特白刺愈伤组织生理生化变化研究[J].干旱地区农业研究,2009,27(5):204-207.
- [14] 刘玉冰,谭会娟,鲁艳.红砂愈伤组织耐低温和盐胁迫的适应性[J].兰州大学学报:自然科学版,2010,46(6):68-72.
- [15] 孙建昌,王兴盛,杨生龙.植物耐盐性研究进展[J].干旱地区农业研究,2008,26(1):226-230.
- [16] 高红明,吴晓霞,张彪,等. Na_2CO_3 胁迫下星星草幼苗活性氧及保护酶活性的变化[J].植物研究,2006,26(3):308-312.
- [17] 刘凤荣,陈火英,刘杨,等.盐胁迫下不同基因型番茄可溶性物质含量的变化[J].植物生理与分子生物学报,2004,30(1):99-104.
- [18] 王锴,张立新,高梅,等.盐胁迫对2种苹果属植物愈伤组织及组培苗生长和有机渗透调节物质累积的影响[J].西北农业学报,2013,22(2):112-118.
- [19] 杨颖丽,史如霞,魏学玲,等.NaCl胁迫对唐古特白刺愈伤组织的生理效应[J].西北植物学报,2008,28(11):2238-2243.