

NaCl胁迫对膜荚黄芪种子萌发和幼苗生理特性的影响

韩多红¹, 晋玲², 张勇^{1*}

1. 河西学院农业与生物技术学院, 甘肃 张掖 734000

2. 甘肃中医学院, 甘肃 兰州 730000

摘要: 目的 通过对不同浓度 NaCl 胁迫下膜荚黄芪种子萌发及幼苗生理特性的研究, 寻找提高膜荚黄芪种子及幼苗在 NaCl 胁迫下抗性能力的途径。方法 测定不同浓度 NaCl 胁迫下膜荚黄芪种子的发芽势 (G_v)、发芽率 (G_r)、相对发芽率、相对 NaCl 害率, 并对幼苗的叶绿素量、可溶性蛋白质量、丙二醛 (MDA) 量、超氧化物歧化酶 (SOD) 和过氧化物酶 (POD) 的活性进行测定。结果 低浓度的 NaCl 胁迫对膜荚黄芪种子的萌发具有促进作用, 当 NaCl 胁迫浓度 > 50 mmol/L 时, 随着 NaCl 浓度的增大, 种子的 G_v 、 G_r 、相对发芽率逐渐降低, 相对 NaCl 害率逐渐增大, 对种子萌发有抑制作用。随着 NaCl 处理浓度的增大, 膜荚黄芪幼苗中叶绿素量逐渐减少, 可溶性蛋白质量也逐渐降低, 二者都与 NaCl 处理浓度呈负相关; 随着 NaCl 处理浓度的增加, 幼苗中 MDA 量呈增加趋势, 呈正相关; SOD、POD 活性均不同程度地表现为先上升后下降的趋势, 在 75 mmol/L 时达到最大值。结论 膜荚黄芪具有一定的抗 NaCl 胁迫能力, 具有向盐碱地引种驯化的潜力。

关键词: 膜荚黄芪; NaCl 胁迫; 种子萌发; 生理特性; 发芽势; 发芽率

中图分类号: R282.21 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2012)10-2045-05

Effects of NaCl stress on seed germination and seedling physiological characteristics of *Astragalus membranaceus*

HAN Duo-hong¹, JIN Ling², ZHANG Yong¹

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

2. Gansu College of Traditional Chinese Medicine, Lanzhou 730000, China

Key words: *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bge.; NaCl stress; seed germination; physiological characteristics; germination vigor (G_v); germination rate (G_r)

膜荚黄芪 *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bge. 为豆科黄芪属多年生草本植物, 以根入药, 味甘、性温, 有补气升阳、固表止汗、托毒排脓和生肌等功效^[1-2]。研究表明, 其主要含三萜皂苷、黄酮类化合物以及多糖, 有增强机体免疫功能、促进抗体合成等作用^[3]。目前, 对膜荚黄芪的研究大多集中于栽培、药用成分、药理作用等方面^[4-6], 对 NaCl 胁迫下膜荚黄芪种子的萌发及幼苗生理特性方面的研究未见报道。

近年来由于环境破坏, 土壤污染与退化的问题日趋严重, 土壤盐渍化成为当今困扰人类的土壤问题之一。盐碱土通常能够抑制植物的发育, 对植物的生长产生负作用。选育耐盐作物, 提高作物对盐

渍环境适应能力, 是减轻土壤盐渍化危害以及开发利用沿海浅滩等盐渍化土地资源的重要途径^[7]。膜荚黄芪作为一种药食同源药材, 以野生为主, 但由于近年来过度采挖, 致使野生膜荚黄芪资源几近枯竭, 不能满足人们的需求。本实验以膜荚黄芪种子和幼苗为材料, 研究 NaCl 胁迫对膜荚黄芪部分生理生化指标的影响, 探索膜荚黄芪在 NaCl 胁迫下的耐受性及自我调节机制, 为膜荚黄芪在河西走廊大片 NaCl 碱化土地上的引种、驯化和大面积种植提供一定的理论依据, 促进膜荚黄芪资源的可持续利用。

1 材料

膜荚黄芪种子购买于定西市种子公司, 经河西

收稿日期: 2012-04-11

基金项目: 国家科技支撑计划项目“当归、黄芪、大黄种质资源可持续利用关键技术研究”(2007BAI37B01); 国家中医药管理局 2012 年中药行业科研专项 (201207002)

作者简介: 韩多红, 男, 甘肃张掖人, 副教授, 主要从事植物资源学及植物逆境生理学等方面的研究。

Tel: (0936)8280648 E-mail: handuohong@163.com

*通讯作者 张勇 Tel: (0936)8285056 E-mail: zhangyong@hxy.edu.cn

学院农业与生物技术学院张勇教授鉴定为膜荚黄芪 *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bge. 的干燥成熟种子。

2 方法

2.1 种子萌发指标的测定

选择籽粒饱满、大小一致的种子用 64% H_2SO_4 处理 4 min 破除硬实, 清水冲洗 30 min 后, 用 2% NaClO 消毒 5 min, 蒸馏水冲洗 6 次。配制处理液, 设定 NaCl 浓度均为 0、20、50、75、100、150、200 mmol/L 7 个处理, 每个处理均设 3 次重复。依照国际种子检验规程, 发芽床采用滤纸法, 将吸胀后的种子置于垫有两层滤纸的培养皿中, 分别加入配制好的处理液, 每个培养皿中放 50 粒种子, 重复 3 次, 置于恒温培养箱中, 设定温度为 25 °C, 光照时间为 10 h, 光照强度为 2 000 lx。每天观察统计萌发数, 第 4 天计算发芽势 (G_v), 第 7 天计算发芽率 (G_r)、相对发芽率和相对 NaCl 害率。

$G_v=4$ d 内发芽种子数/供试所有种子数

$G_r=7$ d 内发芽种子数/供试所有种子数

相对发芽率=处理发芽率/对照发芽率

相对 NaCl 害率=(对照发芽率-处理发芽率)/对照发芽率

2.2 幼苗相关生理指标的测定

选取长势良好幼苗, 将幼苗从培养皿中取出, 根部用蒸馏水洗净, 放入装有蛭石的育苗钵内, 用 Hoagland 培养液进行浇灌, 在幼苗二叶期时定苗, 每钵留生长一致的幼苗 15 株, 3 个重复, 在第 51 天后进行处理。每天每钵分早晚加 5 mL 处理液, 以蒸馏水为对照。处理 7 d 后测定幼苗的叶绿素量、可溶性蛋白质质量、丙二醛 (MDA) 量、过氧化物酶 (POD) 和超氧化物歧化酶 (SOD) 的活性。

2.2.1 叶绿素量的测定^[8] 采用分光光度法对叶绿

素 a 和叶绿素 b 的总量进行测定, 以 mg/kg 来表示。

2.2.2 可溶性蛋白质质量的测定^[8] 可溶性蛋白质量采用考马斯亮蓝 G-250 法测定, 以 mg/g 来表示。

2.2.3 MDA 量的测定^[8] 采用 TBA 法进行测定 MDA 的量, 以 $\mu\text{mol/g}$ 来表示。

2.2.4 POD 活性测定^[8] 采用愈创木酚法测定 POD 的活性, 以 $\text{U}/(\text{g} \cdot \text{min})$ 来表示。

2.2.5 SOD 活性测定^[9] 采用氮兰四唑 (NBT) 显色法测定, 以 U/g 来表示。

2.3 数据处理

采用 Microsoft Excel 2003 软件对数据进行处理和绘图, 采用 SPSS 15.0 统计分析软件对数据进行差异显著性检验 (LSD 法)。

3 结果与分析

3.1 NaCl 胁迫对膜荚黄芪种子萌发指标的影响

NaCl 胁迫对膜荚黄芪种子萌发造成了一定影响。当 NaCl 处理浓度 < 50 mmol/L 时, G_r 、 G_v 、相对发芽率均高于对照, 对种子的萌发有促进作用。当 NaCl 浓度大于 50 mmol/L 时, 种子 G_r 、 G_v 、相对发芽率下降, 相对 NaCl 害率增大, 并随着浓度升高, 种子萌发受抑制程度显著增大 ($P < 0.05$)。 G_v 是表示种子活力的指标, G_v 愈高, 表明种子的活力愈高, 萌发速度愈快。当 NaCl 浓度为 20 mmol/L 时, 膜荚黄芪种子 G_v 最高为 56.67%, 种子的活力最高, 促进作用也最强, 见表 1。

3.2 NaCl 胁迫对膜荚黄芪幼苗相关生理指标的影响

3.2.1 对叶绿素量的影响 叶绿素是重要的光合作用物质, 一定范围内, 其量的多少直接影响光合作用的强度, 不同胁迫因子对叶绿素的合成和分解均有一定程度的影响^[10]。叶绿体是对 NaCl 胁迫最敏感的细胞器, NaCl 胁迫可造成叶绿体的类囊体膨大, 基粒排列不规则, 从而使叶绿体结构破坏, 叶

表 1 NaCl 胁迫对膜荚黄芪种子萌发的影响 ($n=3$)

Table 1 Effect of NaCl stress on seed germination of *A. membranaceus* ($n=3$)

处理 / ($\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)	G_r / %	G_v / %	相对发芽率 / %	相对 NaCl 害率 / %
对照	51.22 ± 1.11 bc	46.67 ± 1.93 bc	100.00 ± 0 e	0 ± 0 de
20	62.22 ± 1.47 a	54.45 ± 1.22 a	119.15 ± 2.03 a	-19.15 ± 2.23 f
50	56.66 ± 1.63 ab	52.22 ± 1.54 ab	108.51 ± 2.17 a	-8.51 ± 2.78 ef
75	46.67 ± 1.93 c	41.11 ± 2.22 c	89.36 ± 1.82 b	10.64 ± 1.52 d
100	35.56 ± 1.44 d	26.67 ± 1.73 d	68.08 ± 2.32 c	31.91 ± 2.27 c
150	22.22 ± 1.11 e	15.56 ± 1.11 e	42.55 ± 1.73 d	57.45 ± 1.32 b
200	4.44 ± 1.07 f	2.22 ± 1.01 f	8.51 ± 1.13 e	91.49 ± 1.27 a

不同字母表示差异显著 ($P < 0.05$), 相同字母表示差异不显著, 下同

Different letters mean significant difference ($P < 0.05$), same letters mean no significant difference, same as below

绿体量下降。由图 1 可以看出,随着 NaCl 处理浓度的增大,膜荚黄芪叶片中叶绿素量逐渐减少,二者呈负相关性。不同浓度 NaCl 处理后,与对照相比,各处理组叶片中叶绿素的量具有显著差异 ($P < 0.05$)。其中 200 mmol/L 的 NaCl 处理后,叶绿素的量急剧减少,较对照组减少了 48.8%。

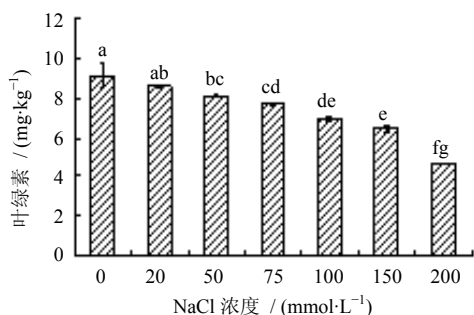


图 1 NaCl 处理对膜荚黄芪幼苗叶片叶绿素量的影响
Fig. 1 Effect of NaCl stress on chlorophyll content in leaves of *A. membranaceus* seedlings

3.2.2 对可溶性蛋白质质量的影响 一般认为,NaCl 胁迫使植物的蛋白质合成受阻,水解加剧,进而导致蛋白质量下降。渗透调节物质质量减少则会使 NaCl 离子对细胞的伤害增强,可溶性蛋白质作为渗透调节物质之一,其量的变化在一定程度上可反映植物受伤害的程度。如图 2 所示,与对照组比较,在 NaCl 处理浓度 ≤ 20 mmol/L 时,可溶性蛋白质的量变化不明显;当 NaCl 处理浓度 ≥ 50 mmol/L 并逐渐增大时,各处理组中的可溶性蛋白质量急剧减少,说明随着 NaCl 浓度的增加,对细胞的伤害逐渐增强。

3.2.3 对 MDA 量的影响 MDA 是膜脂氧化的主要产物,其量与细胞膜系统的伤害程度密切相关^[11]。在正常生长条件下,植物体内高浓度活性氧的产生和清除处于平衡状态,当处于逆境胁迫时平衡被破坏,引发膜脂过氧化产生大量的 MDA^[12]。可用 MDA 量来代表植物膜脂氧化的水平,反映植物受伤害的程度^[13]。由图 3 可见,随着 NaCl 处理浓度的增大,幼苗中 MDA 的量随之增大,呈正相关。与对照组相比,各处理浓度下幼苗中 MDA 的量差异较显著 ($P < 0.05$)。当 NaCl 浓度 ≥ 150 mmol/L 时,MDA 量急剧增加,说明此时膜脂过氧化反应强烈,细胞内酶系统和渗透调节物质的作用已不再明显;当 NaCl 处理浓度为 200 mmol/L 时,幼苗中 MDA 量为对照的 1.130 4 倍。

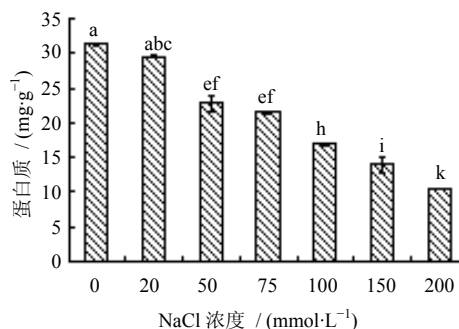


图 2 NaCl 处理对膜荚黄芪幼苗可溶性蛋白质质量的影响
Fig. 2 Effect of NaCl stress on soluble protein content in leaves of *A. membranaceus* seedlings

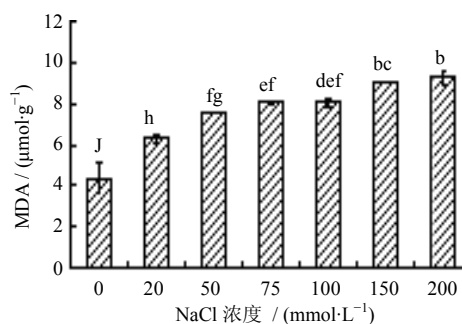


图 3 NaCl 处理对膜荚黄芪幼苗叶片 MDA 量的影响
Fig. 3 Effect of NaCl stress on MDA content in leaves of *A. membranaceus* seedlings

3.2.4 对 POD 活性的影响 POD 也是一种重要的保护性酶,它在植物体内普遍存在,与植物呼吸作用、光合作用及生长素的氧化等有密切关系。在植物生长发育过程中,它的活性不断变化,因此测量此酶可以反映某一时期内植物体内代谢的变化。如图 4 所示,在 NaCl 处理浓度 < 75 mmol/L 时,POD 活性随 NaCl 浓度的增加而增加;当 NaCl 处理浓度达到 75 mmol/L 时,POD 活性最大,说明膜荚黄芪对 75 mmol/L 以下的 NaCl 胁迫有一定的适应调节能力;在 NaCl 处理浓度 > 75 mmol/L 时,POD 活性随 NaCl 浓度的增加而呈下降趋势,说明已超出了其耐受限度,适应调节能力已减弱。

3.2.5 对 SOD 活性的影响 如图 5 所示,0~75 mmol/L NaCl 处理后,SOD 活性随着 NaCl 胁迫浓度的增加而增加。在 NaCl 处理浓度为 75 mmol/L 时达到最大,SOD 活性随着胁迫的继续加深而降低,说明清除活性氧的速度低于自由基的产生速率,导致自由基过度积累,幼苗生理功能开始受到损伤,

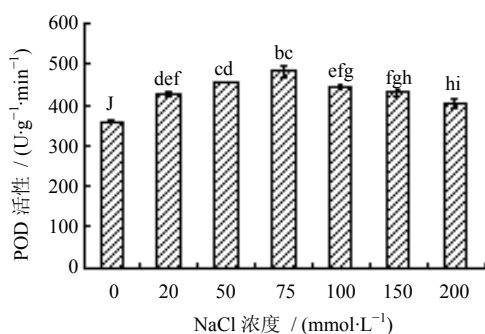


图4 NaCl处理对膜荚黄芪幼苗叶片POD活性的影响

Fig. 4 Effect of NaCl stress on POD activity in leaves of *A. membranaceus* seedlings

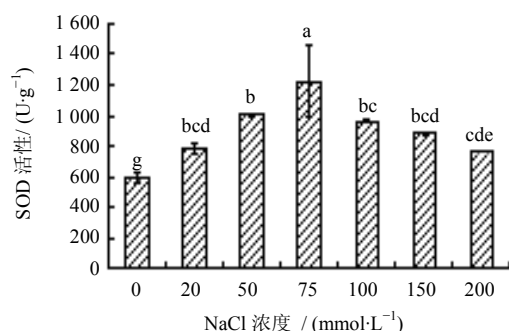


图5 NaCl处理对膜荚黄芪幼苗叶片SOD活性的影响

Fig. 5 Effect of NaCl stress on SOD activity in leaves of *A. membranaceus* seedlings

而在NaCl处理浓度<75 mmol/L时,幼苗能够进行一定的调节适应,在NaCl处理浓度>75 mmol/L时,已超出其耐受限度,SOD活性开始下降,调节能力逐渐减弱。

4 讨论

4.1 NaCl胁迫对膜荚黄芪种子萌发的影响

种子植物的生长是从种子萌发开始的,所以,种子耐NaCl性及其机制的研究是植物耐NaCl性早期鉴定的基础。同时种子的萌发是植物整个生命史的关键,而生活在NaCl渍环境中的植物在萌发过程中的耐NaCl能力又是其幼苗建立的关键。关于膜荚黄芪种子在NaCl胁迫下萌发特性和幼苗生长的研究未见报道。当土壤中的NaCl在0.1%~2%时,一般认为土壤发生了NaCl渍化,成为了NaCl碱土。本实验中设定的最低处理浓度为20 mmol/L,相当于土壤中的NaCl为0.117%,更低浓度的NaCl已不属于土壤NaCl碱化的范围。本研究结果发现,在NaCl处理浓度<50 mmol/L时,对种子萌发有促进作用,当NaCl处理浓度>50 mmol/L时,随着

NaCl浓度的增大,种子的 G_r 、 G_v 、相对发芽率逐渐降低,相对NaCl害率逐渐增大,对种子萌发有抑制作用。认为膜荚黄芪种子萌发时需要一定浓度的离子来激活有关酶活性,所以低浓度NaCl对种子 G_r 、 G_v 、相对发芽率都有促进作用,但高浓度的离子则造成了离子毒害作用。

4.2 NaCl胁迫对膜荚黄芪幼苗中叶绿素、可溶性蛋白质及MDA的影响

有报道指出,外界NaCl胁迫处理能降低植物叶绿素量^[14]。在本实验中,随着NaCl处理浓度的增大,膜荚黄芪叶片中叶绿素量逐渐减少,二者呈负相关性。其中200 mmol/L NaCl处理后,叶绿体色素的量急剧减少,较对照组减少了48.8%。原因可能是NaCl胁迫使叶绿体内的蛋白质合成受到破坏,叶绿体内蛋白质的量减少,叶绿体与蛋白质的结合削弱,叶绿体趋向分解^[15]。植物体内的可溶性蛋白质大多数是参与各种代谢的酶类,其量的高低是了解植物体总代谢的一个重要指标。本试验中,随NaCl浓度的增加,膜荚黄芪幼苗中可溶性蛋白质的量逐渐降低,表明NaCl胁迫可能降低了蛋白质的合成速率,或者是加速了储藏蛋白质的水解。MDA是膜脂过氧化产物,对植物的细胞膜和酶有严重损伤作用,常导致膜结构以及生理完整性的破坏。一般说来,NaCl胁迫处理后,耐NaCl品种细胞膜系统遭受破坏程度小,表现在细胞膜透性小;敏感品种细胞膜系统破坏严重,表现为细胞膜透性大,因此,可以作为反映胁迫情况的重要指标。在本实验中,随着NaCl浓度的增加,膜荚黄芪幼苗中MDA量呈增加趋势,呈正相关性。当NaCl浓度≥150 mmol/L时,MDA量急剧增加,说明此时膜脂过氧化反应强烈,细胞内酶系统和渗透调节物质的作用已不再明显。

4.3 NaCl胁迫对膜荚黄芪幼苗中POD和SOD活性的影响

一般来讲,在NaCl胁迫下,植物体内的SOD等酶活性与植物的抗氧化胁迫能力呈正相关,而且在NaCl胁迫下,NaCl生植物与非NaCl生植物相比,其SOD等的活性更高,因而更能有效地清除活性氧,阻抑膜质过氧化。活性氧也能对细胞内生物大分子如蛋白质和核酸等造成伤害。在不同NaCl浓度胁迫下,SOD、POD活性均不同程度地表现为先上升后下降的趋势。从保护酶活性的变化可以看出,在低浓度NaCl胁迫下,膜荚黄芪可通过提高

保护酶活性加强耐 NaCl 性从而减轻 NaCl 对自身的伤害,但这种能力是有限的,当 NaCl 量超出一定程度后,保护酶的活性就会降低。

综上所述,低浓度 NaCl 胁迫对膜荚黄芪种子的萌发具有促进作用,当 NaCl 胁迫浓度 > 50 mmol/L 时,随着 NaCl 浓度的增大,种子的 G_r 、 G_v 、相对发芽率逐渐降低,相对 NaCl 害率逐渐增大,对种子萌发有抑制作用。随着 NaCl 处理浓度的增大,膜荚黄芪幼苗中叶绿素量逐渐减少,可溶性蛋白质的量也逐渐降低,二者都与 NaCl 处理浓度呈负相关性;随着 NaCl 处理浓度的增加,幼苗中 MDA 量呈增加趋势,呈正相关性;随着 NaCl 处理浓度的增加,SOD、POD 活性均不同程度地表现为先上升后下降的趋势。通过种子萌发与生理指标的分析,表明膜荚黄芪具有一定的抗 NaCl 能力,具有向干旱、NaCl 碱地区引种驯化的潜力。

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2010.
- [2] 肖培根. 新编中药志 [M]. 北京: 化学工业出版社, 2002.
- [3] 刘晓茵. 膜荚黄芪的免疫功能调节作用研究概况 [J]. 长春医学, 2007, 7(3): 64-69.
- [4] 白效令, 朱倪娜, 王湘黄, 等. 膜荚黄芪顺沟平栽技术的研究 [J]. 中草药, 1996, 27(3): 172-175.
- [5] 王志强. 浅谈膜荚黄芪的临床应用 [J]. 中草药, 2000, 31(3): 178.
- [6] 陈志国, 马世震, 陈桂琛, 等. 甘肃陇西道地药材蒙古膜荚黄芪规范化栽培技术规程初步研究 [J]. 中草药, 2004, 35(11): 1289-1293.
- [7] 周三, 韩军丽, 赵可夫. 盐生植物研究进展 [J]. 应用与环境生物学报, 2001, 7(5): 496-501.
- [8] 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.
- [9] 邹琦. 植物生理学实验指导 [M]. 北京: 中国农业出版社, 2000.
- [10] 王邦锡, 黄久常, 王辉. 不同植物在不同水分条件胁迫下脯氨酸积累与抗性的关系 [J]. 植物生理学报, 1992, 15(1): 46-51.
- [11] 侯建华, 云锦凤, 张东晖. 羊草与灰色赖草及其杂交种的耐 NaCl 生理特性比较 [J]. 草业学报, 2005, 14(1): 73-77.
- [12] 王学文, 蔺彩虹, 李小峰. NaHCO_3 胁迫对大叶紫花苜蓿生理特征的影响 [J]. 草业科学, 2007, 24(2): 26-29.
- [13] 周革, 倪福太, 张立娟. 植物在逆境中的形态结构及生理变化 [J]. 吉林师范大学学报, 2004(2): 64-67.
- [14] 刁丰秋. NaCl 碱胁迫对大麦叶片类囊体膜组成和功能的影响 [J]. 植物生理学报, 1997, 23(2): 105-110.
- [15] 杨淑慎, 高俊风, 李学俊. 高等植物叶片的衰老 [J]. 西北植物学报, 2001, 21(6): 271-277.