

等渗水分与盐分胁迫对烟草种子萌发的影响及外源甜菜碱的保护作用

罗 音¹ 王玉军² 谢胜利² 赵新西¹ 杨兴洪¹ 王 玮^{1,*}

(¹ 山东农业大学生命科学学院; ² 山东农业大学植物保护学院, 山东泰安 271018)

摘 要: 在烟草 (*Nicotiana tabacum* L.) 种子萌发期, 首先用 0.5 mmol/L 甘氨酸甜菜碱浸种, 再用等渗的 25% PEG-6000 和 1.6% NaCl 溶液进行胁迫处理, 研究了两种胁迫对烟草种子萌发的抑制以及外源甜菜碱对该抑制的缓解作用, 并对其生理机制进行了探讨。结果表明, 两种胁迫处理对烟草种子的萌发均产生抑制作用, 均降低其发芽率、发芽势和发芽指数以及萌发期间的抗氧化酶活性。外源甜菜碱浸种促进了烟草种子的萌发, 提高了萌发种子的抗氧化酶活性, 减轻了膜脂过氧化程度, 保护了膜系统的完整性。等渗的 PEG-6000 和 NaCl 溶液比较, 后者使种子萌发时期的外渗电导率增加, 而前者却使外渗电导率降低。

关键词: 甜菜碱; 水分胁迫; 盐分胁迫; 烟草; 种子萌发; 膜脂过氧化

中图分类号: S572

Effects of Isotonic Water and Salt Stress on Seed Germination of Tobacco and Protective Function of Exogenous Glycinebetaine

LUO Yin¹, WANG Yu-Jun², XIE Sheng-Li², ZHAO Xin-Xi¹, YANG Xing-Hong¹, WANG Wei^{1,*}

(¹ College of Life Sciences; ² College of Plant Protective Science, Shandong Agricultural University, Tai'an 271018, Shandong, China)

Abstract: Drought and salt are the two most serious abiotic stresses affecting the yield of crops including tobacco throughout the world. As a good osmolyte and macromolecular-protective substance, there are lots of researches on glycinebetaine (GB). Tobacco can't synthesize glycinebetaine itself and transgenic tobacco is difficult to be extended in the practice, therefore, exogenous GB is necessary to be used to improve the stress tolerance of tobacco. In this study, tobacco seeds were soaked with 0.5 mmol/L GB solution, then the isotonic osmotic stresses were imposed by 25% PEG-6000 and 1.6% NaCl solution during seed germination. The effects of the two kinds of osmotic stresses and exogenous GB on seed germination and their physiological mechanisms were studied. The results showed that seed germination was inhibited by both two kinds of stresses. The lower activities of anti-oxidant enzymes and serious peroxidation of membrane lipid under stress conditions were the important reasons of decreasing the percentage and vigour of germination in tobacco. Exogenous GB could promote seed germination, increase the anti-oxidant enzyme activities, alleviate peroxidation of membrane lipid, and stabilize the plasma membrane. The electric conductivity of the germinating seeds could be decreased by 25% PEG-6000, but increased by 1.6% NaCl.

Key words: Glycinebetaine; Water stress; Salt stress; Tobacco; Seed germination; Peroxidation of membrane lipid

干旱和土壤盐碱化对作物生长与产量产生很大的影响, 这种影响在世界范围内相当普遍。所以, 对干旱/盐渍条件下作物的适应机制进行研究, 以提高干旱/盐渍条件下作物的产量和品质, 一直受到各国政府和科技界的广泛关注。水分胁迫和盐分胁迫对作物的伤害, 一方面与环境渗透势降低, 细胞吸收困

难有关; 另一方面与活性氧引起的膜脂过氧化有关^[1-3]。对于前者, 一些植物可以通过渗透调节作用, 降低渗透势, 在一定程度上增强吸水, 维持细胞的膨压, 从而维持光合作用和一定程度的生长^[1]。而植物对氧化胁迫的适应则主要依赖于抗氧化系统, 包括抗氧化酶和小分子抗氧化剂等^[3]。

*基金项目: 山东省自然科学基金(Y2003D03)和山东农业大学作物生物学国家重点实验室开放基金资助。

作者简介: 罗音(1973-), 女, 山东阳谷人, 讲师, 在读博士, 主要从事植物抗逆性及其分子机制研究。

* 通讯作者: 王玮(1961-), 女, 山东潍坊人, 教授, 博士生导师。Tel: 0538-8242656-8234。

Received(收稿日期): 2004-06-03, Accepted(接受日期): 2004-12-29.

甜菜碱是一种良好的渗透调节和大分子保护剂^[4]。细胞内甜菜碱的积累,一方面可以降低渗透势,增强渗透调节能力;另一方面对生物大分子和细胞膜的结构和功能具有保护作用。近年来,对甜菜碱生理功能的研究已经积累了大量的资料^[5-7],为利用甜菜碱提高植物抗旱/抗盐性提供了理论依据。干旱/盐分胁迫下很多植物自身能够积累甜菜碱^[4],但也有一些植物自身不能积累甜菜碱,如水稻、烟草等^[4]。对于这些植物,可以采取两条途径提高其体内的甜菜碱含量,一是外源施用甜菜碱^[5];二是利用基因工程的手段,将甜菜碱合成途径引入植物体内^[8,9]。

烟草是我国重要的经济作物,主要分布在黄淮海、东北及西北等地区。这些烟区降水量少、水源不足,成为烟草生产的重要限制因素。土壤盐渍化对烟草生产也起着一定的限制作用。烟草自身不能合成甜菜碱,虽然可以应用基因工程技术将合成甜菜碱的途径引入烟草,提高烟草的抗旱/抗盐能力,但这方面的研究结果还不太令人满意^[10]。特别要指出的是,转基因烟草在生产中不被接受,特别是烟叶的出口严禁应用转基因烟草品种。因此,用外源甜菜碱提高烟草的抗旱/抗盐性就成为一种必要的手段。本研究用外源甜菜碱处理种子的方法,研究了甜菜碱对烟草种子萌发的影响,并对甜菜碱提高烟草抗旱/抗盐的机制进行了初步探讨。

1 试验材料与方法

1.1 试验材料及种子处理

烟草(*Nicotiana tabacum* L.)栽培品种红花大金元,由山东农业大学烟草科学系提供,是山东省烤烟生产推广品种;甜菜碱系 Sigma 公司产品。

称取烟草种子 0.5 g 置培养皿中,分别向培养皿中加入 5 mL 蒸馏水(对照)和 0.5 mmol/L 甜菜碱溶液(GB 处理)。浸种 2 d 后,倒掉液体,用滤纸吸干种子表面的水分,再分别向各培养皿中加入 25% PEG-6000 和 1.6% NaCl(与 25% PEG-6000 渗透势相同,渗透势为 -1.27 MPa)溶液 5 mL。实验设对照(CK, 加蒸馏水)、25% PEG-6000、0.5 mmol/L GB + 25% PEG-6000、1.6% NaCl、0.5 mmol/L GB + 1.6% NaCl 5 个处理,每处理 3 次重复。

1.2 烟草种子发芽实验

按常规方法进行。种子处理方法同上。在直径 7 cm 的培养皿内放 2 张滤纸,摆放处理过的 100 粒

烟草种子,培养室温度 25 ~ 28℃,每天光照 8 h。每天更换培养液以保持溶液的渗透压不变。按常规方法,每天记录发芽情况,第 7 天计算发芽势,第 14 天计算发芽率。发芽指数(GI)按公式 $GI = \sum G_t / D_t$ 计算(式中 G_t 为 t 日的发芽数; D_t 为发芽天数),3 次重复。

1.3 生理生化指标的测定

种子“露白”后(第 4 天)取样测定各生理生化指标。其中,过氧化物酶(POD)、过氧化氢酶(CAT)、抗坏血酸过氧化物酶(APX)和超氧化物歧化酶(SOD)活性按 Cakmak I 和 Marschner H 的方法测定^[11]。丙二醛(MDA)、甜菜碱(GB)含量及膜透性(用相对电导率表示)的测定参照文献[12]。

2 结果与分析

2.1 外源甜菜碱处理对胁迫条件下烟草种子萌发及甜菜碱含量的影响

用等渗的 25% PEG-6000 和 1.6% NaCl 溶液进行胁迫处理,对烟草种子萌发状况均造成一定程度的抑制,表现在发芽势、发芽率和发芽指数均降低(图 1-B, C, D)。25% PEG-6000 处理后,三者的降低幅度分别为 19.2%、20.6% 和 24.2%;1.6% NaCl 处理后,三者的降低幅度分别为 12.1%、19.7% 和 17.6%。两种胁迫造成的发芽率降低基本一致,但发芽势和发芽指数有差异,以水分胁迫影响更大。

由图 1-A 可以看出,未用甜菜碱处理的烟草种子中甜菜碱的光吸收值非常低,接近于零,而用外源甜菜碱处理后光吸收值大大升高,说明外源甜菜碱可以被萌发的烟草种子吸收。

外源 GB 改善了胁迫条件下烟草种子的萌发状况。用 GB 处理后,在 25% PEG-6000 胁迫条件下,种子的发芽势、发芽率和发芽指数分别增加 18.8%、13.0% 和 17.9%;在 1.6% NaCl 溶液胁迫条件下,0.5 mmol/L GB 处理后三者的增加幅度分别为 12.1%、16.2% 和 18.0%。但都未达到对照(水浸种)的水平。

2.2 外源甜菜碱处理对膜相对透性及膜脂过氧化的影响

为进一步探讨两种不同的等渗胁迫对烟草种子萌发抑制的原因以及外源甜菜碱改善烟草种子萌发状况的生理机制,对种子萌发过程中质膜透性和膜脂过氧化程度进行了测定(见图 2、图 3)。

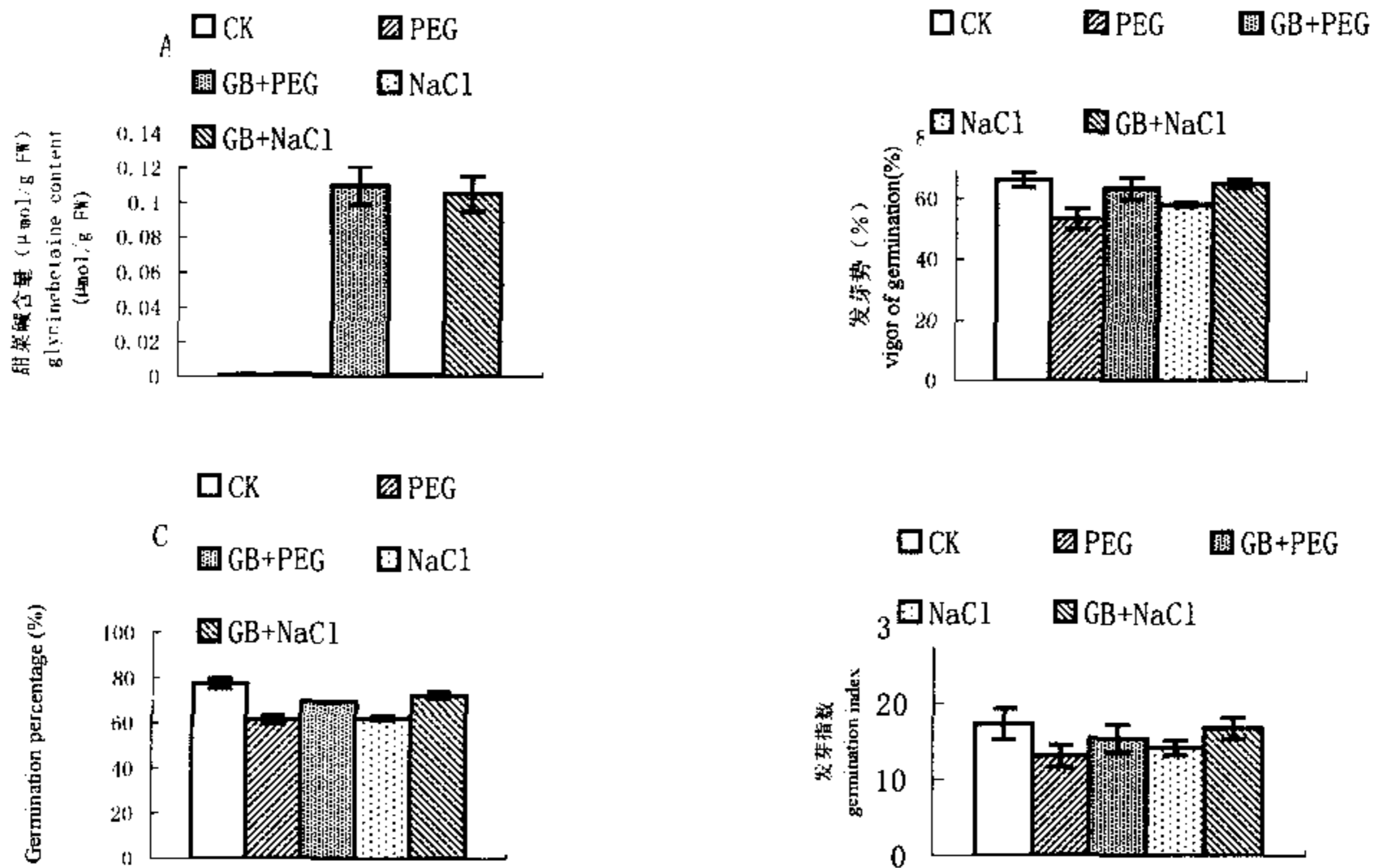


图 1 甜菜碱对烟草种子萌发的影响

Fig.1 Effect of GB on seed germination of tobacco

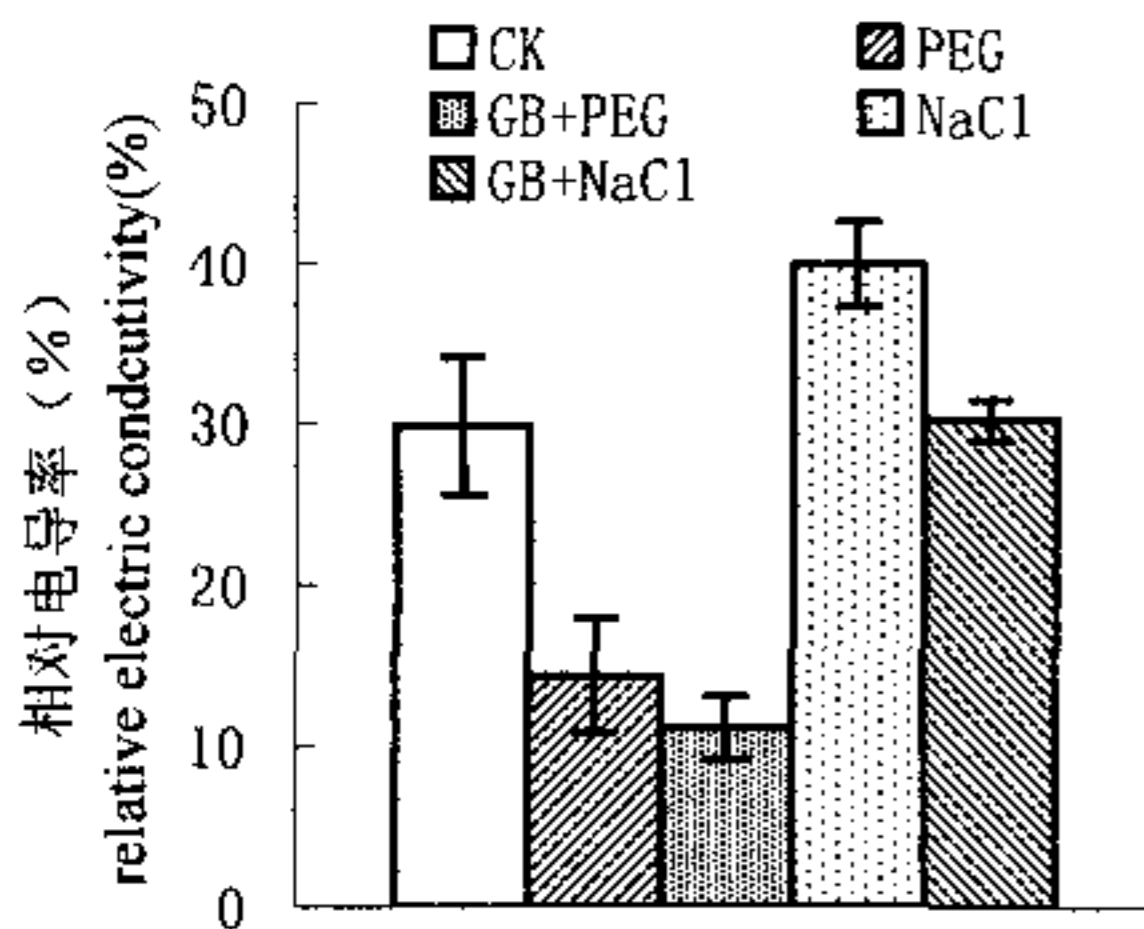


图 2 甜菜碱对膜相对透性的影响

Fig.2 Effect of GB on relative permeability of membrane

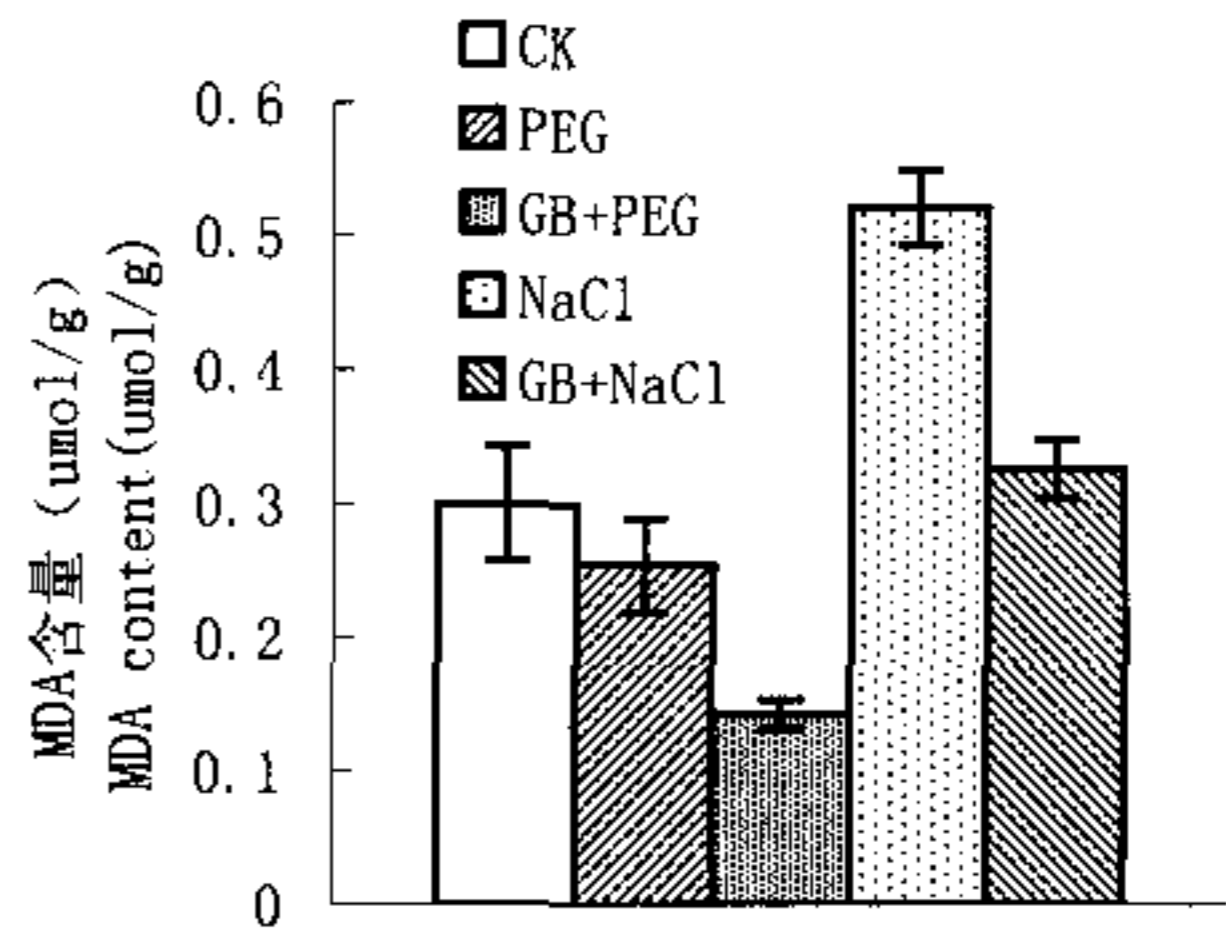


图 3 甜菜碱对 MDA 含量的影响

Fig.3 Effect of GB on MDA content

由图 2 可以看出,在 25% PEG-6000 处理条件下,膜相对透性降低,说明对膜伤害相对较轻,这可能与外液渗透势较低,种子吸水较慢,对膜损伤程度较小有关。但用等渗的 1.6% NaCl 溶液处理,则膜相对透性增加。用外源甜菜碱处理后,再进行同样程度的胁迫处理,膜相对透性均比未进行 GB 处理的降低,降低幅度分别为 22.48% (PEG 处理) 和 24.15% (NaCl 处理)。说明外源 GB 对烟草种子萌发过程中的生物膜损伤具有一定的缓解作用。

MDA 是反映膜脂过氧化程度最为直接的指标。

由图 3 可知,与对照相比,用 25% PEG-6000 处理后,MDA 含量有所降低,但不显著;而用等渗的 1.6% NaCl 处理后,MDA 含量大大增加。外源甜菜碱处理后,在同样的胁迫条件下,MDA 含量均显著降低。等渗的 PEG-6000 与 NaCl 胁迫下,分别比未用 GB 处理的降低了 43.65% 和 37.62%。说明外源 GB 对胁迫造成的膜脂过氧化产生较好的缓解作用。等渗条件下,两种胁迫处理的 MDA 含量(图 2)与膜透性(图 3)的变化趋势基本一致。

2.3 胁迫条件下抗氧化酶活性的变化以及甜菜碱处理对抗氧化酶活性的影响

逆境条件下活性氧的产生会对生物膜以及大分子造成损伤,表现在膜透性的增大和 MDA 含量的升高。但植物进化过程中也形成一系列的适应机制,清除活性氧。其中包括 SOD、POD、CAT 和 APX 等重要酶。

图 4 是水分与盐分等渗胁迫处理及外源 GB 处理对上述 4 种酶活性影响的测定结果。表明水分与盐分胁迫处理均引起 4 种酶活性的下降。两种胁迫

对 CAT 的影响(图 4-C)基本一致,即引起 CAT 活性降低的程度基本一致,外源甜菜碱对 CAT 活性的提高作用也基本一致;对 SOD、POD 和 APX 的影响中,以水分胁迫更为严重。GB 处理后,在同样程度的渗透胁迫条件下,4 种酶活性均有一定程度的提高。特别需注意的是外源甜菜碱对水分胁迫下 SOD 的作用明显,而盐分胁迫下则对 POD 的作用明显。4 种酶中,APX 对 GB 处理敏感性较差;POD 对 GB 处理最敏感。产生这一现象的原因还有待进一步探讨。

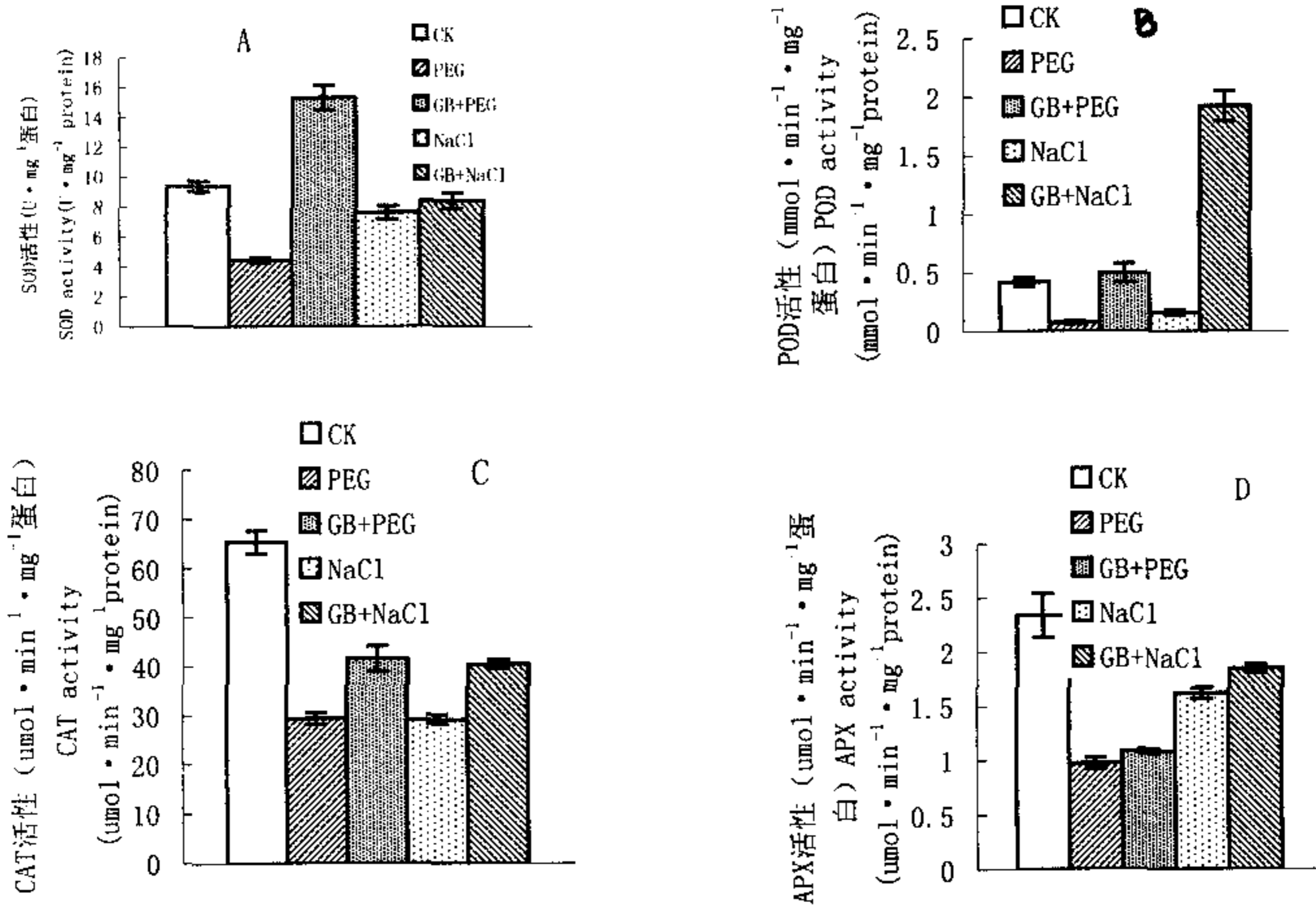


图 4 甜菜碱对抗氧化酶活性的影响

Fig.4 Effect of GB on the anti-oxidant enzyme activities

3 讨论

3.1 等渗水分与盐分胁迫对烟草种子萌发的影响及其原因分析

种子萌发过程中的吸水可分为 3 个阶段。第一阶段是急剧吸水的物理过程;第二阶段是吸水的停滞期;第三阶段是胚根露出后出现的与代谢活性提高有关的另一个迅速吸水过程^[13]。一些研究认为,用适当浓度的 PEG 处理作物种子(PEG 引发种子),可以提高发芽率和幼苗活力,促进种子萌发^[14-16]。

本试验结果表明,用 25% PEG-6000 处理烟草种子,则抑制种子萌发,降低种子的发芽率、发芽势及发芽指数,与上述结果相悖,但与李海云等^[17]的研究结果一致。产生差异的原因可能与种子的种类、处理方式、PEG 的浓度等因素有关。等渗的盐分胁迫同样会抑制种子萌发,但是用 PEG-6000 处理的种子发芽势低于等渗盐溶液处理的。产生这种现象的原因,有人认为可能与高浓度的 PEG-6000 溶液溶氧量较低有关^[18]。然而,在 PEG 处理条件下,细胞膜通透性和膜脂过氧化程度降低,表现为外渗电导率和

MDA 含量降低,这可能与高分子量的 PEG 可以减缓种子萌发期的吸水速度,减轻种子由于快速吸水对膜造成的损伤,以及有利于膜系统损伤的修复有关^[13-16]。但等渗条件下的盐胁迫处理则使膜透性和 MDA 含量增加(图 2, 图 3)。产生这种差异的原因可能与盐胁迫中的离子胁迫有关^[11]。另外,不同的抗氧化酶对水分与盐分胁迫的反应有差异(图 4)。这可能是由于不同类型的胁迫引发不同的信号途径,不同类型的酶对不同类型的信号反应有别;再者,在两种渗透胁迫下积累的相容性物质种类、浓度不同^[19],所起的渗透调节作用及对生物大分子的保护作用也不同。

3.2 甜菜碱对生物膜和抗氧化酶的保护作用及其机理探讨

甜菜碱是一种非毒性的渗透调节剂^[4],具有多种生理功能。由于烟草本身不能合成甜菜碱,因此,用烟草作为模式材料,进行甜菜碱生理功能的研究更具有代表性。业已证明,胁迫条件下膜系统的损伤与活性氧的增多关系密切^[3,15,16]。本实验结果表明,GB 处理能在一定程度上提高萌发种子抗氧化酶的活性(图 4),降低活性氧自由基对质膜的伤害程度和膜脂过氧化作用水平,降低膜透性和 MDA 含量(图 2、图 3),从而维持细胞质膜的稳定性和完整性,使得对同样程度的水分与盐分胁迫的适应性增强。

推测甜菜碱对生物膜和抗氧化酶具有保护作用的可能机制有以下几个方面。(1)外源甜菜碱被烟草种子细胞吸收,作为渗透调节物质,提高了细胞的渗透调节能力,从而对水分胁迫产生适应。另外,外源甜菜碱还可以增强细胞内其他渗透调节物质的积累,如脯氨酸和可溶性糖^[5],从而进一步降低渗透势,维持细胞吸水。笔者对可溶性蛋白质的含量进行了测定,发现 GB 处理后,可溶性蛋白质的含量显著提高(结果待发表)。(2)外源 GB 通过一系列机制减轻了胁迫对细胞内大分子物质(包括酶类)结构和功能的损伤^[20,21]。(3)甜菜碱通过调节膜载体蛋白质或通道的活性^[22],调节水分进入细胞的速度,缓解盐离子大量进入植物体细胞造成的离子失衡和由此产生的其他次生伤害。(4)甜菜碱可能作为一种分子伴侣^[23,24],稳定酶蛋白的构象并维持酶的活化状态,或对失活的酶进行修复,从而维持正常的代谢过程。

值得注意的是,GB 处理对不同种类的抗氧化酶活性影响有差异(图 4)。其中,SOD 在水分胁迫下

活性提高 244.74%,POD 在盐分胁迫下活性提高 1 087.50%,提高幅度最大,产生这一现象的原因还未知。一些研究认为,胁迫条件下积累的甜菜碱可能影响某些基因的表达^[25],还可能加速遭受胁迫损伤蛋白质的从头合成^[26]。不同的抗氧化酶类对 GB 反应的信号途径可能存在差异。

在甜菜碱的测定过程中,对照组(未用甜菜碱处理)的甜菜碱的光吸收值非常低,接近于零,这与理论值相符。微弱的光吸收可能与纯化效果或者仪器误差有关。外源甜菜碱处理后,萌发种子中甜菜碱含量极大提高。说明外源甜菜碱可以被烟草萌发种子吸收,因此,用外源甜菜碱处理的方法提高烟草的抗逆性以及进行甜菜碱生理功能的研究是可行的。

References

- [1] Wang W(王玮), Li D-Q(李德全). 植物盐分胁迫与水分胁迫的异同. *Plant Physiology Commu*(植物生理学通讯), 2003, 39(5): 491 - 492(in Chinese)
- [2] Tang X-X(唐学玺), Jia J-F(贾敬芬), Zheng G-C(郑国■). Damage responses to salt stress in salt-tolerant cell line of wheat. *Acta Botanica Sinica*(植物学报), 1999, 41(7): 757 - 760(in Chinese with English abstract)
- [3] Sun W-Y(孙文越), Wang H(王辉), Huang J-C(黄久常). The effect of external betaine on membrane lipid peroxidation of wheat seedling under water stress. *Acta Bot Boreal-Occident Sin*(西北植物学报), 2001, 21(3): 487 - 491(in Chinese with English abstract)
- [4] Yin X-J(殷晓军), Zhao Y-X(赵彦修), Zhang H(张慧). The biosynthesis of betaine and the genetic engineering of its relative genes. *Plant Physiology Commu*(植物生理学通讯), 2002, 38(3): 299 - 304(in Chinese)
- [5] Ma Q-Q(马千全), Zou Q(邹琦), Li Y-H(李永华), Li D-Q(李德全), Wang W(王玮). Amelioration of the water status and improvement of the anti-oxidant enzyme activities by exogenous glycinebetaine in water-stressed wheat seedlings. *Acta Agronomica Sinica*(作物学报), 2004, 30(4): 321 - 328
- [6] Zhang J-X(张建新), Xu F-L(徐福利), Lu J-L(吕家珑), Li Y-L(李亚兰), Li D(李东). Effect of exogenous betaine on drought resistance of different crops. *Agricultural Research in the Arid Areas*(干旱地区农业研究), 2003, 21(2): 86 - 90(in Chinese)
- [7] Xing W B, Rajashekar C B. Alleviation of water stress in beans by exogenous glycine betaine. *Plant Sci*, 1999, 148: 185 - 185
- [8] Sakamoto A, Murata N. The use of bacterial choline oxidase, a glycinebetaine-synthesizing enzyme, to create stress-resistant transgenic plants. *Plant Physiol*, 2001, 125: 180 - 188
- [9] Jia G-X, Zhu Z-Q, Chang F-Q, Li Y-X. Transformation of tomato with the *BADH* gene from *Atriplex* improves salt tolerance. *Plant Cell Rep*, 2002, 21: 141 - 146
- [10] Jun H, Rozina H, Luc A, Kevin L R, Joe K H, Wilf A K, Gopalan S.

- Genetic engineering of glycinebetaine production toward enhancing stress tolerance in plants: metabolic limitations. *Plant Physiol*, 2000, **122**: 747 - 756
- [11] Cakmak I, Marschner H. Magnesium deficiency and high light intensity enhance activities of superoxide dismutase, ascorbate peroxidase and glutathione reductase in bean leaves. *Plant Physiol*, 1992, **98**: 1 222 - 1 227
- [12] Tang Z-C(汤章城). Modern Experiment Protocol in Plant Physiology (现代植物生理学实验指南). Beijing: Science Press, 1999. 302 - 306(in Chinese)
- [13] Fu J-R(傅家瑞). Seed Physiology(种子生理). Beijing: Science Press, 1985. 81 - 86 (in Chinese)
- [14] Sun W(孙渭), Li B(李斌), Yang J-X(杨建雄), Zhu S-Y(朱淑云). Effect of soaking by polyethyleneglycol on tobacco seed germination. *Seed(种子)*, 2003, **22**(3): 10 - 14(in Chinese)
- [15] Liu J(刘杰), Liu G-S(刘公社), Qi D-M(齐冬梅), Li F-F(李芳芳), Wang E-H(汪恩华). Effect of PEG on germination and active oxygen metabolism in wildrye seeds. *Acta Prataculturae Sinica(草业学报)*, 2002, **11**(1): 59 - 63(in Chinese with English abstract)
- [16] Gu G-P(顾龚平), Wu G-R(吴国荣), Lu C-M(陆长梅), Zhou C-F(周长芳), Zuo Z(左 ■), Wei J-C(魏锦城). Effect of PEG on vigour index and active oxygen metabolism in soybean seeds. *Chinese Journal of Oil Crop Sciences(中国油料作物学报)*, 2000, **22**(2): 26 - 30(in Chinese with English abstract)
- [17] Li H-Y(李海云), Zhao K-F(赵可夫), Wang X-F(王秀峰). The inhibition of salinity on the germination of halophyte seeds. *Journal of Shandong Agricultural University(山东农业大学学报)*, 2002, **33**(2): 170 - 173(in Chinese with English abstract)
- [18] William E Emmerich. Effect of PEG on seed germination. *Seed(种子)*, 1994, **13**(1): 59 - 61(in Chinese)
- [19] Hou C-X(侯彩霞), Tang Z-C(汤章城). The physiological function of compatible solutes in plant cells and their mechanisms. *Plant Physiol Commu(植物生理学通讯)*, 1999, **35**(1): 1 - 7(in Chinese)
- [20] Winzor C L, Winzor D J, Paleg L G, Jones G P, Naidu B P. Rationalization of the effects of compatible solutes on protein stability in terms of thermodynamic nonideality. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 1992, **296**(1): 102 - 107
- [21] Chen W P, Li P H, Chen T H H. Glycinebetaine increase chilling tolerance and reduces chilling-induced lipid peroxidation in *Zea mays* L. *Plant, Cell and Environment*, 2000, **23**: 609 - 618
- [22] Xu W(许雯), Sun M-H(孙梅好), Zhu Y-F(朱亚芳), Su W-A(苏维埃). Protective effects of glycinebetaine on *Brassica chinensis* under salt stress. *Acta Botanica Sinica(植物学报)*, 2001, **43**(8): 809 - 814
- [23] Nomura M, Hibino T, Takabe T, Sugiyama T, Yokota A, Miyake H, Takabe T. Transgenically produced glycinebetaine protects ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/ oxygenase from inactivation in *Synechococcus* sp. PCC7942 under salt stress. *Plant Cell Physiol*, 1998, **39**(4): 425 - 432
- [24] Bourot S, Sire O, Trautwetter A, Touzé T, Wu L F, Blanco C, Bernard T. Glycine betaine—assisted protein folding in a *lysA* mutant of *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry*, 2000, **275**: 1 050 - 1 056
- [25] Rajendrakumar C S V, Suryanarayana T, Reddy A R. DNA helix destabilization by proline and betaine: possible role in the salinity tolerance process. *FEBS Letters*, 1997, **410**: 201 - 209
- [26] Alia Kondo Y, Sakamoto A, Nonaka H, Hayashi H, Pardha Sarashi P, Chen T H H, Murata N. Enhanced tolerance to light stress of transgenic *Arabidopsis* plants that express the *codA* gene for a bacterial choline oxidase. *Plant Molecular Biology*, 1999, **40**: 279 - 288