百喜草耐盐性愈伤组织的生理生化特性研究

孔凡岩,魏凤珍*　(安徽农业大学农学院,安徽合肥 230036)

摘要　[目的]从细胞水平分析比较百喜草耐盐性愈伤组织的生理生化特性。[方法]应用不同浓度(0、5、10、15、20 g/L)的 NaCl 处理百喜草成熟种子,诱导产生耐盐的颗粒状愈伤组织和同种普通愈伤组织,研究其含水量、细胞膜透性、MDA 含量、POD 酶活性、SOD 酶活性的变化。[结果]结果表明:随 NaCl 胁迫浓度的升高,百喜草耐盐组愈伤组织与对照组愈伤组织在多方面存在明显差异,前者含水量、丙二醛含量均高于后者;POD 酶活性、SOD 酶活性亦均高于对照组。在提高愈伤组织耐盐性诸因素中,脯氨酸起着重要作用。[结论]该研究为进一步筛选百喜草耐盐突变细胞系奠定了良好的基础。

关键词　百喜草;愈伤组织;耐盐性;脯氨酸含量
中图分类号　S311　　**文献标识码**　A　　**文章编号**　0517 - 6611(2009)33 - 16320 - 02

Physiological and Biochemical Characteristics Study of Salt Tolerance Bahiagrass Callus

KONG Fan-yan et al　(Agronomy College, Anhui Agricultural University, Hefei, Anhui 230036)

Abstract　[Objective] The research aimed to compare the physiological and biochemical characteristics of salt tolerance bahiagrass callus from the cell level. [Method] Mature seeds of bahiagrass were dealed with different concentrations (0,5,10,15,20 g/L) of NaCl to induce salt tolerance granular callus and the kinds of general callus. And then the changes of water content, membrane permeability, MDA content, POD activity, SOD activity were studied. [Result] The results showed that, with the increase of NaCl concentration, there was an obvious difference in many ways between the salt group bahiagrass callus and callus of the control group. And the water content, MDA content of the former was obviously higher than the latter. The POD activity, SOD activity of the former was also higher than the latter. The proline played an important role in increasing salt-tolerant of bahiagrass callus. [Conclusion] This study laid a good foundation for further screening of salt-tolerant mutant bahiagrass cell line .

Key words　Bahiagrass; Callus; Salt tolerance; Proline content

我国盐渍化土地面积约 3 300 万 hm^2[1]。随着灌溉面积的扩大,因灌溉水质下降及不合理的灌溉方式而引起的土壤次生盐渍化现象日趋严重。因此,选育适应盐渍环境的新品种,就成为最有可能应对的途径。百喜草是一种多用型水土保持植物,具有生长速度快、分蘖能力强、耐割、再生性能好和用途广泛的特点,在水土保持、环境保护与生态恢复方面都能产生良好的效果,并能取得较好的经济效益。它的进一步推广,不仅有助于生态环境问题的解决,而且能为农业的持续发展打下良好的基础[2]。目前对百喜草的研究重点是围绕退耕还林工程及生态环境建设需要,研究百喜草的品种选择、林下百喜草开发技术、百喜草保持水土机理及其效益、百喜草的利用方式及示范等[3]。研究利用植物组织培养技术培育、选育耐盐碱百喜草品种是改良和利用盐渍化土地的一种经济而有效的途径。通过比较百喜草耐盐愈伤组织与普通愈伤组织经盐胁迫后的生理生化特性,可为进一步筛选出稳定的百喜草耐盐突变细胞系提供理论依据。

1　材料与方法

1.1　供试材料　百喜草种子"太阳花"由北京林业大学科技有限公司提供。以百喜草成熟种子诱导产生的颗粒状愈伤组织为受体。

1.2　愈伤组织培养　取成熟的百喜草种子,用浓度 75% 的酒精消毒 30 s,再用浓度 0.1% 的升汞消毒 20 min,用无菌水清洗消毒后的种子 3 次,接种于愈伤组织诱导培养基中。30 d 左右诱导产生愈伤组织。在愈伤组织继代培养基上,选择颗粒状愈伤组织。将继代 3 次以上、生长旺盛的颗粒状愈伤组织接入含浓度 20 g/L NaCl 的继代培养基中诱导,培养 60 d 后,其余愈伤全部死亡,获得一小团生长较快的耐盐愈伤组织。将其以 30 d 为一周期继代,连续继代 4 次后,扩增出一定数量的耐盐愈伤组织。

愈伤组织诱导培养基:改良 MS(MS 大量元素、微量元素,B_5 有机成分。下同) + 2,4-D 2 mg/L + 6-BA 0.1 mg/L + 琼脂 8 g/L。继代培养基:改良 MS + 2,4-D 2 mg/L + 6-BA 0.1 mg/L + 琼脂 8 g/L + NaCl 20 g/L。

1.3　愈伤组织盐胁迫处理　NaCl 分别设置 0、5、10、15、20 g/L 共 5 个浓度处理。挑取生长旺盛的颗粒状百喜草普通愈伤组织(CK)与耐盐性愈伤组织分别接入含有这 5 个盐浓度梯度的培养基(除盐以外的其他条件为改良 MS + 2,4-D 2 mg/L + 6-BA 0.1 mg/L + 琼脂 8 g/L)中,在培养架上随机区组排列,3 次重复。培养条件为培养室温度 26 ~ 28 ℃,光强 2 000 lx,每天光照 16 h,培养 30 d。从形态上看,耐盐性愈伤组织生长扩增良好,对照组愈伤组织在低浓度盐胁迫下有生长,高浓度盐胁迫下褐化。分别取出等量的各组愈伤组织进行下一步试验。

1.4　生理生化指标的测定　硫代巴比妥酸比色法[4]测定 MDA 含量,植物组织含水量的测定参考文献[5]方法 ,愈创木酚氧化比色法[6]测 POD 活性,氮蓝四唑(NBT)比色法[7]测定 SOD 活性,PRO 含量的测定参考酸性茚三酮法[8]。

2　结果与分析

2.1　不同盐浓度处理对愈伤组织丙二醛含量的影响　由图 1 可知,盐胁迫处理后,随盐胁迫浓度增加,各材料丙二醛的含量均随盐浓度增加而逐渐增加,对照组愈伤组织丙二醛含量在盐浓度为 15 g/L 时达到最高点,且变化幅度较大。而各耐盐组愈伤组织丙二醛含量变化幅度不大,维持在一定的水平上,只是在盐浓度为 15 g/L 时达到最高,均比同一盐浓度下的对照组含量高。

2.2　不同盐浓度处理对愈伤组织含水量的影响　由图 2 可

基金项目　国家粮科技支撑计划工程项目(2009BADA6B03)。
作者简介　孔凡岩(1984 -),女,安徽淮南人,硕士研究生,研究方向:草业科学。*通讯作者,硕士生导师,副教授。
收稿日期　2009-07-27

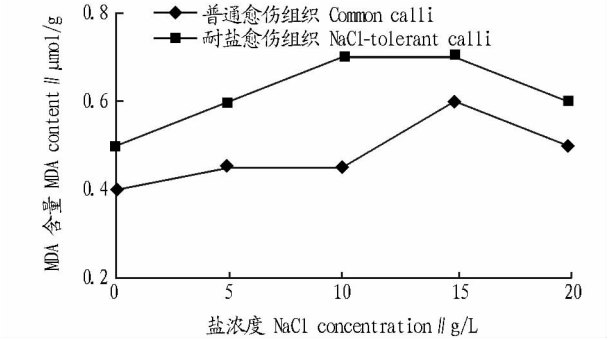

图 1　不同盐浓度处理下愈伤组织 MDA 含量

Fig. 1　The content of MDA in the calli under different NaCl concentration treatments

知,随着盐胁迫浓度的增加,各供试材料的相对含水量均呈下降趋势。从整体上看,各对照组含水量变化幅度较大,由 95% 下降至 87%,下降较明显。而各耐盐组愈伤组织的水分含量由 94.5% 降低到最低点 94.0%,变化幅度不大,较稳定。

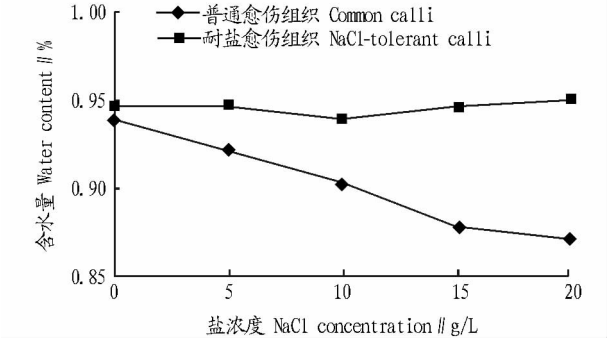

图 2　不同盐浓度处理下愈伤组织含水量

Fig. 2　The water content in the calli under different NaCl concentration treatments

2.3　不同盐浓度处理对愈伤组织 POD 酶活性的影响　由图 3 可以看出,各供试材料的 POD 酶活呈现出先升高后下降的变化趋势,盐浓度在 10 g/L 时,POD 酶活性最高;盐浓度在 10 ~ 20 g/L 时,POD 酶活性均有所降低。随着 NaCl 浓度的增加,耐盐组愈伤组织 POD 活性先下降后升高,在相同盐浓度下,耐盐愈伤组织的 POD 酶活性均高于对照组。

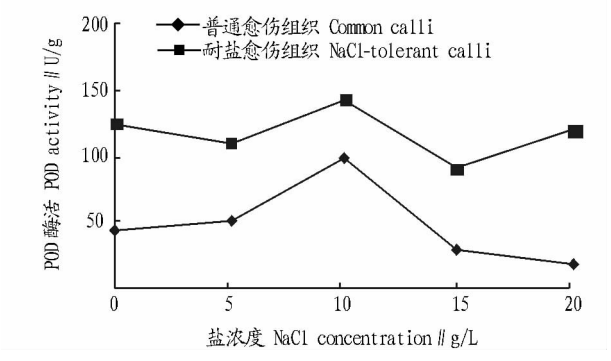

图 3　不同盐浓度处理下愈伤组织酶活

Fig. 3　The enzyme activity of the calli under different NaCl concentration treatments

2.4　不同盐浓度处理对愈伤组织 SOD 酶活性的影响　由图 4 可知,随着盐浓度的增大,耐盐愈伤组织与对照组的 SOD 酶活性均呈先升后降的趋势,耐盐愈伤组织的 SOD 酶活性始终高于对照的 SOD 酶活性。对照组愈伤组织在盐浓度为 0 ~ 10 g/L 时,SOD 酶活性变化不大。盐浓度在 15 g/L 时,SOD 酶活性明显升高。随着盐浓度的增加,耐盐组愈伤组织 SOD 酶活性先下降后升高,在浓度 10 g/L 时达到最大值,均较相同盐浓度下的对照组高,说明耐盐愈伤组织的 SOD 酶活性与普通愈伤组织有明显差异。

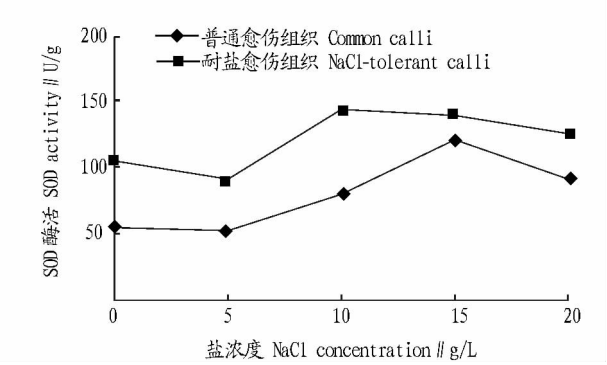

图 4　不同盐浓度处理下愈伤组织 SOD 酶活

Fig. 4　SOD activity of the calli under different NaCl concentration treatments

2.5　不同盐浓度处理对愈伤组织脯氨酸含量的影响　由图 5 可以看出,耐盐愈伤组织的脯氨酸含量在低 NaCl 浓度时(0 ~ 10) g/L 与对照系相差无几,当 NaCl 浓度逐渐升高时,对照脯氨酸含量增加缓慢,而耐盐愈伤组织的脯氨酸含量随 NaCl 浓度升高平稳增加。当 NaCl 浓度达到 20 g/L 时,耐盐愈伤组织的脯氨酸含量达到最大。

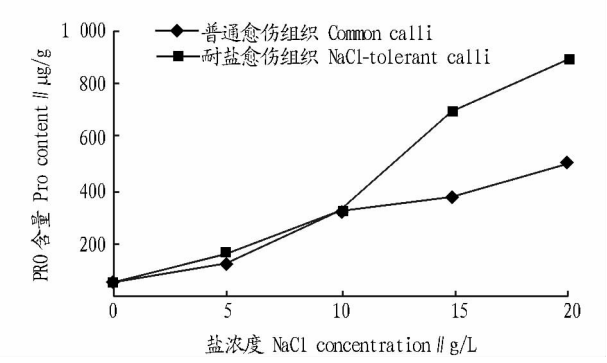

图 5　不同盐浓度处理下愈伤组织脯氨酸含量变化

Fig. 5　The changes of proline content in the calli under different NaCl concentration treatments

3　结论与讨论

获得耐盐愈伤组织的途径一般有 2 种,一是直接筛选[9];二是逐级筛选[10]。该研究采用前一种方式得到了百喜草耐盐愈伤组织,并且经过 5 代继代已经基本稳定。

盐在植物组织的渗透调节中起抑制作用。研究中可以看到,随着盐胁迫强度的加大,对照组愈伤组织含水量逐渐降低,并且变化幅度较大。而耐盐组愈伤组织含水量降低幅度较小,且均高于对照。

在盐胁迫下,植物的光合磷酸化和呼吸代谢被抑制,ROS 大量积累,自由基的产生和消除过程的平衡被破坏,从而诱发细胞的膜脂过氧化,对植物造成次生氧化伤害[11]。

(下转第 16324 页)

大的光合作用速率,这表明光合作用速率的大小在一定程度上反映了生长速率的大小。很多研究者常常用光合作用能力的强弱来估测一种海藻的生长情况[7,11]。该试验结果表明,25 ℃时,龙须菜的相对生长速率比其他的温度高 10% 左右,但其最大光合作用速率却为其他温度下的 2 倍,这主要由于在 25 ℃时龙须菜具有更高的呼吸作用,这种旺盛的代谢在一定程度上耗损了光合作用所积累的干物质,导致生长的增加率不如光合作用明显。光合作用的数据可以反映藻体的重要生理活动能力,但若要精确地估测藻体在海区的真实产量,其最佳的选择还应测定它们的生长速率。

(3)25 ℃条件下生长的龙须菜具有最大的光补偿点,这与藻体在自然条件下的生长情况相对应。而在 20 ℃条件下生长的龙须菜具有最低的呼吸作用、光补偿点以及最高的 *R/P* 值,在该温度下,低的呼吸作用速率说明藻体的代谢水平低,在一定程度上保存了光合作用所积累的干物质,低的光补偿点则说明龙须菜需要很低的光强便可以维持其生命活动,而 *R/P* 值是衡量细胞内物质积累的一个重要参数[12]。*P/R* 值越高,说明光合作用活性越强,这表明 20 ℃时,藻体具有最高的光合作用活性,也说明在该温度下生长的藻体有良好的生理状态,可见 20 ℃是保存龙须菜藻体的最佳温度。在南方可以将龙须菜保存在 20 ℃,这样既达到了保种的目的,又可以使藻体的活性处在最佳状态。

参考文献

[1] 邓志峰,纪明候. 龙须菜和扁江篱多糖的组成及抗肿瘤效果[J]. 海洋与湖沼,1995,26(6):575 – 581.

[2] 黄晓航,温宗存. 间歇施肥对龙须菜的生长和化学组成的影响[J]. 海洋与湖沼,1989,29(6):570 – 574.

[3] 李纫芷. 龙须菜藻体匍匐组织的生理特性与功能研究[J]. 海洋与湖沼,1999,30(1):41 – 44.

[4] 孙雪,隋正红. 几种环境因子对龙须菜 α-半乳糖苷酶活性的影响[J]. 青岛海洋大学学报:自然版,2000,30(3):510 – 514.

[5] HENLEY W J. Measurement and interpretation of photosynthetic light – response curves in algae in the context of photoinhibition and dial changes [J]. J Phycol,1993,29:729 – 739.

[6] XU J T,GAO K S. Growth,pigments,UV – absorbing compounds and agar yield of the economic red seaweed *Gracilaria lemaneiformis* (Rhodophyta) grown at different depths in the coastal water of the South China Sea[J]. Appl J Phycol,2008,20:681 – 686.

[7] GAO K S,XU J T. Effects of solar UV radiation on diurnal photosynthetic performance and growth of *Gracilaria lemaneiformis* (Rhodophyta)[J]. Eur J Phycol,2008,43:297 – 307.

[8] YANG H S,ZHOU Y,MAO Y Z,et al. Growth characters and photosynthetic capacity of *Gracilaria lemaneiformis* as a biofilter in a shellfish farming area in Sanggou Bay,China[J]. App J Phycol,2005,17(3):199 – 206.

[9] YANG Y F,FEI X G,SONG J M,et al. Growth of *Gracilaria lemaneiformis* under different cultivation conditions and its effects on nutrient removal in Chinese coastal waters[J]. Aquaculture,2006,254:248 – 255.

[10] ZOU D H,XIA J R,YANG Y F. Photosynthetic use of exogenous inorganic carbon in the agarophyte *Gracilaria lemaneiformis* (Rhodophyta)[J]. Aquaculture,2004,237:421 – 431.

[11] IKUSIMA I. Ecological studies on the productivity of aquatic plant communities I. Measurement of photosynthetic activity[J]. Bot Mag Tokyo,1965,78:202 – 211.

[12] HUMPHREY G F. The photosynthesis:respiration ratio of some unicellular marine algae [J]. J Exp Mar Biol Ecol,1975,18:111 – 119.

(上接第 16321 页)

SOD、CAT 和 POD 等保护酶类在植物体内协同作用,在逆境胁迫中清除过量的活性氧,维持活性氧的代谢平衡、保护膜结构,从而使植物在一定程度上忍耐、减缓或抵御逆境胁迫伤害[12]。试验表明,在盐胁迫下,百喜草各耐盐组愈伤组织的丙二醛含量均高于对照组,但其变化幅度不大,而对照组愈伤组织表现为丙二醛含量随盐浓度的增加而增加,耐盐愈伤组织的 MDA 含量上升幅度较小,表明耐盐愈伤组织的过氧化过程较慢,细胞膜稳定性较高。在不同浓度盐胁迫下,耐盐愈伤组织的 POD、SOD 的酶活均高于对照组,说明百喜草耐盐性愈伤组织酯酶活动活跃,证明耐盐愈伤组织耐盐性比对照强且具有相对稳定性。百喜草耐盐愈伤组织与对照组在无盐胁迫时,脯氨酸含量差别较小,说明耐盐愈伤组织与对照组本身脯氨酸含量不存在较大差异,耐盐愈伤组织是在盐胁迫后比对照系含有更多的脯氨酸,说明耐盐愈伤组织具有更高的脯氨酸积累能力。这与其他学者做的研究结果相同。这种明显的高脯氨酸积累能力有助于细胞维持在盐胁迫下的生长,这一结果说明脯氨酸的积累与耐盐性是正相关的。

总体来看,该试验筛选的百喜草耐盐性愈伤组织在含水量、MDA 含量、POD 和 SOD 酶活性、PRO 含量等生理生化指标上均较对照组有明显差异,表明通过用 NaCl 对耐盐植物百喜草的培养和筛选,可以进一步提高其耐盐能力,获得抗高含量 NaCl 的遗传变异体。

参考文献

[1] 王遵亲,祝寿泉,俞仁培,等. 中国盐渍土[M]. 北京:科学出版社,1993.

[2] 刘士余,聂明英,彭鸿燕. 百喜草及其应用研究[J]. 安徽农业科学,2007,35(25):7807 – 7808,7810.

[3] 张伟,史玉虎,潘磊. 百喜草研究进展[J]. 湖北林业科技,2004(2):40 – 44.

[4] HEATH R L,PACKER L. Photoperoxidation in isolated chloroplasts Ⅰ Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation[J]. Arch Biochem Biophys,1968,25:189 – 198.

[5] 赵可夫. 植物抗盐生理[M]. 北京:中国科学技术出版社,1993.

[6] 波钦诺克 X H. 植物生物化学分析方法[M]. 荆家海,丁钟荣,译. 北京:科学出版社,1981:197 – 203,205 – 207.

[7] BEYER W F,FRIDOVICH I. Assaying for superoxide dismutase activity:some large consequences of minor changes in conditions[J]. Anal Biochem1,1987,161:559 – 566.

[8] 朱光廉. 植物体内游离脯氨酸的测定[J]. 植物生理学通讯,1983(1):35 – 37.

[9] BASU S,GANGOPADHYAY G,GUPTA S,et al. Screening for cross tolerance against related osmotic stress in adapted calli of salt sensitive and tolerant varieties of rice[J]. Phytomoiphology,1996,46:357 – 364.

[10] HASSON E,POLJAKOFF-MAYBER A. Callus culture from hypocotyls of *Kosteletzhya virginica* (L) seedlings[J]. Plant Cell Tissue Organ Culture,1995,43(3):279 – 285.

[11] FORYER C H,DESCOURVIÉRES P,KUNERT K J. Protection against oxygen radicals:an important defense mechanism studied in transgenic plants[J]. Plant Cell and Environment,1994,17:507 – 523.

[12] LIANG Y C,CHEN Q,LIU Q,et al. Exogenous silicon (Si) increases antioxidant enzyme activity and reduces lipid peroxidation in roots of salt-stressed barley (*Hordeum vulgare* L.)[J]. Journal of Plant Physiology,2003,160(1):157 – 164.