

NaCl 胁迫下促生菌对黄瓜幼苗生长的促生效应

辛树权, 郭菊卉, 赵骥民

(长春师范学院 生命科学院 吉林 长春 130032)

摘要: 用植物促生菌 CS-2 的菌体悬浮液和蒸馏水对黄瓜种子浸泡处理后, 种植于普通土和草炭土均匀混合的基质中, 以 4 个 NaCl 浓度的溶液作为幼苗的浇灌液, 待幼苗真叶长至第 4 片时, 测定各处理黄瓜幼苗的过氧化物酶活性、可溶性蛋白含量和脯氨酸含量。结果表明: NaCl 胁迫存在时, 过氧化物酶活性和可溶性蛋白含量与各组对照相比增长; 在 NaCl 浓度不大于 0.4% 时, 脯氨酸含量与对照相比则下降; 株高则与过氧化物酶活力呈负相关性。

关键词: ACC 脱氨酶细菌; 株高; 可溶性蛋白; 过氧化物酶; 脯氨酸

中图分类号: S 642.204⁺.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0009(2009)12-0046-04

土壤盐渍化是当今全球性的资源环境问题和生态问题^[1]。在自然环境下, 盐胁迫主要是土壤高浓度的 Na⁺ 对植物的伤害, 提高植物的耐盐性, 已成为未来农业发展及环境治理的重大课题。

植物根际促生细菌 (Plant Growth-Promoting Rhizobacteria, PGPR) 对植物生长的促进作用备受关注, 已研究认为 PGPR 可以合成某些植物生长激素或酶等刺激和调节植物生长^[2]。部分 PGPR 可产生 1-氨基环丙烷-1-羧酸 (1-aminocyclopropane-1-carboxylate, ACC) 脱氨酶, 它可将植物体内乙烯直接前体 ACC 分解成 α -丁酮酸和氨, 降低逆境条件下 (高盐、重污染、贫营养、干旱、洪涝等), 大量产生的植物生长抑制剂和植物衰老促进剂——乙烯的浓度, 促进植物生长, 特别是根系的生长发育^[3]。

相对于 PGPR 对盐分的耐受性而言, 没有任何一种主要作物能耐受高盐分, 尤以 NaCl 对植物的生长最具破坏性^[4]。随着现代生物科学技术的进步, 通过生物途径使植物适应盐化环境, 以提高植物在盐化土壤上的生长状态是近年来国内外研究的新方向, 但在盐胁迫下, 通过微生物的作用来促进作物的生长报道较少。

该试验旨在 NaCl 浓度胁迫下, 通过对 ACC 脱氨酶活性细菌菌体悬浮液浸泡处理黄瓜部分生态、生理指标的测定, 进而探讨此种条件下 ACC 脱氨酶促生菌对黄

瓜幼苗植株生长的影响。

1 试验材料

1.1 土样

普通土与草炭土。

1.2 种子与菌种

种子品种: 黄瓜种子 (跨世纪新秀, 购于长春种子批发市场)。促生菌: CS-2 ACC 脱氨酶细菌, 分离于水稻根部 (由长春师范学院生命科学院微生物室保存)。

1.3 主要试剂

0.5 mol/L 磷酸二氢钾、愈创木酚、100 mmol/L 磷酸缓冲液 (pH 6.0)、20 mmol/L 磷酸缓冲液 (pH 6.0)、30% 过氧化氢、纯丙酮、80% 丙酮、碳酸钙、石英砂、茛三酮、20 mmol/L 磷酸缓冲液 (pH 6.0)、考马斯亮蓝 G-250 溶液、85% 磷酸、TSB 培养基。以上试剂均为分析纯。

1.4 主要仪器

T6 新悦-可见分光光度计、LD 4-2 离心机、84-1 型磁力搅拌器、THZ-312 型台式恒温振荡器。

2 试验方法

2.1 种植土壤的制备

草炭土和普通土, 以 2:1 (V/V) 的比例混合均匀。

2.2 菌体悬浮液的制备

取 100 μ L 冻存菌液加到 200 mL 的 TSB 培养基里 160 rpm、28 $^{\circ}$ C 条件下培养 18 h, 后在 4 000 rpm, 室温下离心 15 min, 收集上清液, 并用无菌水悬浮菌体, 使 600 nm 下的 OD 值维持在 0.5 左右。

2.3 种子处理

选取饱满的黄瓜种子, 分别用蒸馏水、CS-2 菌体悬浮液 4 h。

2.4 种植

将浸泡处理后的种子种植于备好的培养钵中, 每钵

第一作者简介: 辛树权 (1970-), 男, 吉林九台人, 硕士, 实验师, 现从事微生物学教学及科研工作。E-mail: xinshuquan@tom.com。

通讯作者: 赵骥民 (1960-), 男, 河北昌黎人, 博士, 教授, 现从事草地生态学方面研究工作。

基金项目: 吉林省教育厅科研计划资助项目 (吉教科合字 (2006) 第自 84 号)。

收稿日期: 2009-06-20

3 粒, 每个处理 20 钵, 于培养室内培养 15 d, 隔天浇水。

2.5 生理指标的测定

2.5.1 过氧化物酶液的制备和酶活力的测定 愈创木酚法^[3], 酶活力的表示方法为: $\Delta OD_{470}/(g \cdot min)$, 测定 6 组数据, 最后求平均值。

2.5.2 可溶性蛋白含量的测定 考马斯亮蓝法^[3], 取过氧化物酶的酶液 1.0 mL, 放入试管中, 加 5 mL 考马斯亮蓝 G-250 溶液, 充分混合, 放置 10 min 后在 595 nm 下比色, 记录吸光值, 并通过标准曲线计算得蛋白质含量。

2.5.3 脯氨酸含量的测定^[3] 称取 0.5 g 样品放入研钵中, 用总量为 10 mL 80% 的乙醇 (少许) 研磨成匀浆, 将匀浆移入大试管, 并用剩余 80% 乙醇洗研钵, 试管加盖, 黑暗中浸提 1 h, 后过滤上述提取液, 并加 1 g 人造沸石振荡 15 min, 室温下 3 000 rpm 离心 5 min。取上清液 2 mL, 加入 2 mL 冰乙酸, 2 mL 茚三酮溶液于大试管中, 充分混匀, 沸水浴加热 20 min, 冷却后 515 nm 处测定光密度。从标准曲线上查出待测样品中脯氨酸含量 (μg)。

3 结果与分析

3.1 株高

生长量是对盐胁迫的综合反应及植物对盐胁迫响应的综合体现。试验中测量的株高的变化情况如图 1。

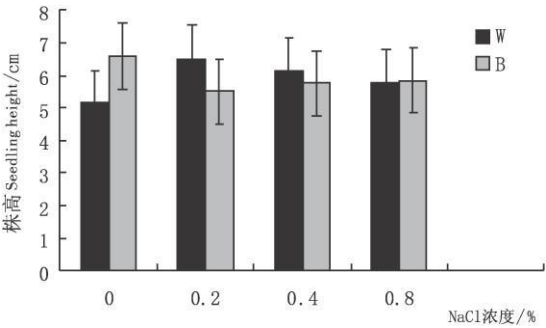


图 1 各处理中幼苗的株高

注: W 代表种子用水浸泡, B 代表种子用 CS-2 菌体悬浮液浸泡
Fig.1 Seedling height of various processing
Note: W representatives of the seeds soaked in water; B representatives of the seeds soaked in CS-2 mycelium suspension.

由图 1 可知, 用蒸馏水浸泡的黄瓜种子, 在 NaCl 浓度为 0.2% 时, 株高增幅较大, 表明低盐处理可刺激黄瓜幼苗植株生长, 是黄瓜植株对盐胁迫的一种适应性反应; 而随着 NaCl 浓度的增高, 株高则逐渐减小。用 CS-2 菌体悬浮液浸泡的黄瓜种子, 当盐胁迫存在时, 株高随 NaCl 浓度的增高呈现增大的趋势。经 *T* 检验, 只有在 NaCl 浓度为 0% 时, 差异是极显著性的, 说明无胁迫存在时, CS-2 能促进幼苗植株的生长, ACC 脱氨酶菌可以发挥作用。

3.2 过氧化物酶活力

过氧化物酶是植物体普遍存在的, 活性较高的一种氧化还原酶, 它与植物的呼吸作用、光合作用及生长素氧化等都有密切的关系。过氧化物酶在植物体内主要有两方面作用, 一方面与植物正常的形态发生和形态建成有关, 在植物生长发育中起作用。另一方面与植物抗逆性和衰老过程有关, 是植物保护酶系的重要保护酶之一, 因此通过研究过氧化物酶的活性及其变化, 可了解植物的生长发育及代谢状况。试验中测量得到的各处理下的过氧化物酶活力变化情况见图 2。

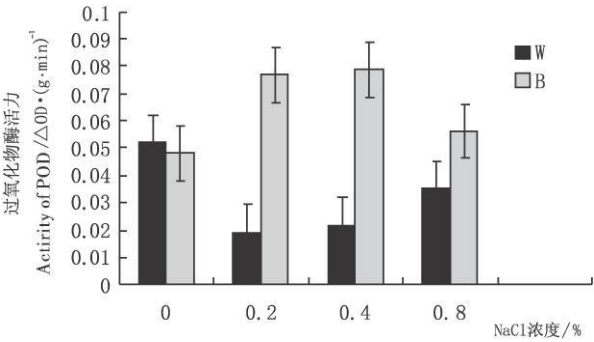


图 2 各处理中黄瓜幼苗叶过氧化物酶活力

注: W 代表种子用水浸泡; B 代表种子用 CS-2 菌体悬浮液浸泡
Fig.2 Peroxidase activity in cucumber seedlings leaves of various processing
Note: W representatives of the seeds soaked in water; B representatives of the seeds soaked in CS-2 mycelium suspension.

由图 2 可知, 用蒸馏水浸泡的黄瓜种子, 虽然加 NaCl 溶液的试验组过氧化物酶活力随 NaCl 的浓度的增高而逐渐增大, 但一直处于对照组之下; 用 CS-2 菌体悬浮液浸泡的黄瓜种子, 其过氧化物酶活力随 NaCl 浓度的增高呈现减小的趋势, 但一直高于对照组; 对于同一浓度的 NaCl 溶液, CS-2 菌体悬浮液浸泡组比蒸馏水浸泡组高的多, 只在空白对照组中前者比后者高。说明当植物的生长环境中存在 NaCl 胁迫时, 接菌可以加强黄瓜幼苗过氧化物酶系统抗过氧化物能力, 改善植物生长的内环境, 增强植物的生存机会。在环境中缺少 NaCl 胁迫时, 接菌在一定程度上降低了过氧化物酶的活力, 减少植物在抗氧化方面的能量和物质损耗。在 NaCl 溶液的浓度分别为 0%、0.2%、0.4%、0.8% 时, 水浸泡组和菌体悬浮液浸泡组进行的独立样本 *T* 检验结果表明, 除了 0% 以外, 这些差异是极显著性的。

3.3 可溶性蛋白含量

蛋白质是决定生物属性的基本物质, 它在生命活动中发挥巨大的作用。植物对盐胁迫的响应表现为在其体内进行渗透调节, 在盐胁迫下, 促生菌在幼苗生长过程中能减缓可溶性蛋白降解, 使可溶性蛋白维持在较高水平, 对细胞内的渗透势的调节有一定作用, 试验中测

定的可溶性蛋白含量变化情况见图 3。

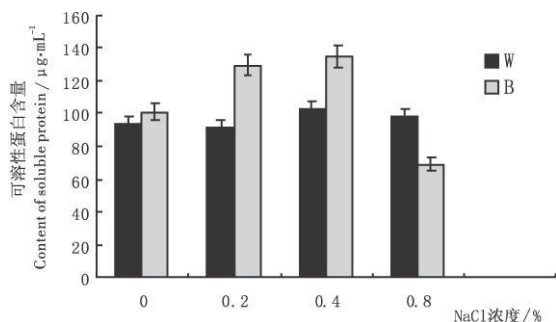


图 3 各处理中黄瓜幼苗叶可溶性蛋白含量

注 W 代表种子用水浸泡 B 代表种子用 CS-2 菌体悬浮液浸泡

Fig.3 Soluble protein content in cucumber seedlings leaves of various processing

Note: W representatives of the seeds soaked in water; B representatives of the seeds soaked in CS-2 mycelium suspension.

由图 3 中可溶性蛋白含量的变化可知,除了 0.8% 的 NaCl 溶液外,其余的处理组中可溶性蛋白含量都呈现出菌体悬浮液浸泡组高于对照组。因为可溶性蛋白含量和植物生长的正相关性^[9],所以可溶性蛋白含量的提高,可以降低渗透势,从而起到促进黄瓜苗生长的作用。

3.4 脯氨酸含量

当植物遭受渗透胁迫,造成生理性缺水时,植物体内脯氨酸含量大量积累,因此植物体内脯氨酸含量在一定程度上反映了植株体内的水分状况,可作为植株缺水的参考指标。脯氨酸在植物体内是一种环境胁迫物,它可以在逆境中产生,从而调节植物体内的渗透平衡。试验中测定的各处理下黄瓜脯氨酸含量见图 4。

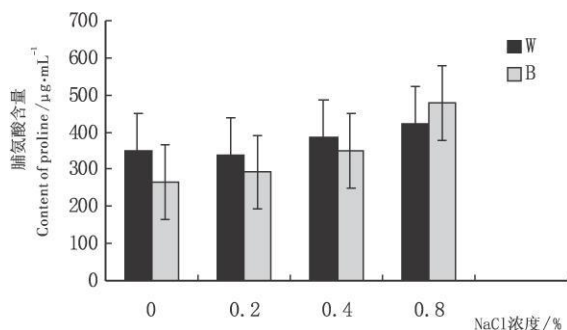


图 4 各处理中脯氨酸含量

注 W 代表种子用水浸泡 B 代表种子用 CS-2 菌体悬浮液浸泡

Fig.4 Proline content of various processing

Note: W representatives of the seeds soaked in water; B representatives of the seeds soaked in CS-2 mycelium suspension.

由图 4 可知 随着 NaCl 浓度的升高,脯氨酸含量逐

渐增大。而在 NaCl 浓度不大于 0.4% 时,接菌可以降低植株叶片组织内脯氨酸含量。从而表明,接菌能减轻 NaCl 胁迫对植株伤害程度,而在 NaCl 浓度达到 0.8% 时,由于植株所受的胁迫伤害较为严重,所以脯氨酸含量异常增加。由 T 检验可知,CS-2 脱氨酶细菌处理后的黄瓜其脯氨酸含量的降低程度与对照达到了极显著性差异,表明这 2 种处理方式可以很好的降低黄瓜幼苗叶片内脯氨酸的含量,从而间接地实现对黄瓜生长的促进作用。

4 讨论

处于 NaCl 胁迫中的植物,能够产生过量的胁迫乙烯,从而加快植物的衰老和凋亡。ACC 脱氨酶通过降低植物体内的 ACC 间接降低乙烯的含量,减轻 NaCl 对植物的伤害作用,提高植物对盐的耐受性。乙烯存在于植物生长的各个时期,特别是在逆境条件下产生大量乙烯对植物本身造成伤害,对农作物来讲是引起产量和品质降低的原因之一,在这种条件下具 ACC 脱氨酶活性的 PGPR 调节功能和调节程度显得尤为重要。

从试验对过氧化物酶活力的测定结果来看,随 NaCl 溶液浓度的提高,过氧化物酶活力在逐渐增强,但都低于对照,似乎 NaCl 胁迫的存在没有使幼苗的过氧化物酶系统协同应答。相反,在对幼苗接菌后,其过氧化物酶的活力都表现的较高,可能是接菌后,植株体内的乙烯含量降低,从而增强了植株对胁迫环境的敏感度,而相应的对照组则因为过量乙烯的生成而延缓了这种反应。试验结果也表明,NaCl 溶液浓度越高的试验组,其叶片变黄的也越快,死亡率越高,生长表现越差。

从渗透调节角度来看,土壤中盐分过多会降低土壤水势,使植物吸水困难,严重时植物组织中水分会外渗,造成生理干旱,使得生长受到抑制^[3];从试验株高的测定结果来看,过氧化物酶确实可以影响到植物的生长发育,过氧化物酶活性高,对生长表现出抑制作用。过氧化物酶活力与植物生长存在负相关性得到证实,这符合关于过氧化物酶具有吡啶乙酸氧化酶某些效应的报道^[7]。

在盐渍条件下,植物细胞可以通过积累在渗透上有活性而对细胞无毒的有机物即脯氨酸来进行渗透调节,脯氨酸含量的变化是由于其合成过程增强而氧化速率下降所造成的。一般认为,脯氨酸的作用是平衡液泡中的高浓度盐分,避免细胞质脱水,但关于脯氨酸与盐胁迫之间的关系仍有争议。有报道,脯氨酸积累与耐盐程度成负相关^[8-9],因而认为脯氨酸积累可能是植物受到盐害的结果^[10]。然而,更多学者认为,脯氨酸积累是植物为了对抗盐胁迫而采取的一种保护性措施^[11]。脯氨酸在盐胁迫下的积累,起到了胞质渗透压调节剂的作用,缓解了胁迫压力。

植物对盐胁迫的响应表现为在其体内进行渗透调节,可溶性蛋白质含量的提高可以降低渗透势^[12]。在植株的生长过程中,CS-2 脱氨酶细菌能够进一步改善胁迫压力并减缓可溶性蛋白降解,使可溶性蛋白维持在较高的水平,对细胞内渗透势的调节有一定作用。这可能是由于黄瓜种子萌发时,贮藏蛋白质迅速分解为溶解状态氨基酸,从而使蛋白质含量降低,而氨基酸被幼胚生长部分吸收,用来合成新的蛋白质。表明蛋白质的分解和合成达到动态平衡。

总之,盐胁迫对植物的损伤是一个综合的过程,而非单因素简单作用的结果。研究盐胁迫下植物的生理生化变化对于判别盐害的程度,植物对盐害的耐受情况,发现耐盐相关基因,进而揭示耐盐机理等方面有着重要意义。

参考文献

[1] 杨月红,孙庄艳.植物的盐害和抗盐性[J].生物学教学,2002,27(11):1-2
[2] Grick B R, Karaturovic D M, Newell P C. A novel procedure for rapid isolation of plant growth-promoting pseudomonads [J]. Can J Microbiol, 1995, 41: 533-536
[3] 吉云秀,黄晓东.植物促生菌对燕麦初生苗盐分胁迫下的促生效应

[J]. 大连海事大学学报, 2007, 8(3): 86-89.
[4] Acilioni, Rodríguez, Morenom, et al. Mitigation of salt stress in wheat seedlings by gfp-tagged Azospirillum lipoferrum[J]. Biol Fertil Soils, 2004, 40: 188-193.
[5] 张志良,瞿伟菁.植物生理学实验指导[M]. 2 版.北京:高等教育出版社,1990,123-124.
[6] 梁艳荣,胡晓红,张颖力,等.植物过氧化物酶生理功能研究进展[J]. 内蒙古农业大学学报,24(2):110-113.
[7] 王同坤,于凤鸣,刘庆香.板栗叶片过氧化物酶活性与树体生长发育的关系[J]. 华北农学报,1993,8(1):52-55.
[8] Haro, Baneulos, Quintero, et al. Genetic basis of sodium exclusion and sodium tolerance in yeast. A model for plants[J]. Physiol Plant, 1993, 89: 868-874.
[9] Petrusalm, Winicoll. Proline status in salt tolerant and salt sensitive alfalfa cell lines and plants in response to NaCl[J]. Plant Physiol Biochem, 1997, 35: 303-310.
[10] Soussim, Ocanaa, Liuche. Effects of salt stress on growth, photosynthesis and nitrogen fixation in chick-pea (*Cicer arietinum* L. [J]. J. Exp Bot, 1998, 49: 1329-1337.
[11] Santa-Cruza, Acostam, Rusa, et al. Short-term salt tolerance mechanisms in differentially salt tolerant tomato species[J]. Plant Physiol Biochem, 1999, 37(1): 65-71.
[12] 王延琴,杨伟华,许红霞,等.棉子萌发过程中营养物质和棉酚的变化状态[J]. 中国棉花,2003,30(4):11-13.

The Promoted Effect of PGPR on the Cucumber Seedling's Growth under The Stress of NaCl

XIN Shu-qian, GUO Ju-hui, ZHAO Ji-min

(College of Life Sciences, Changchun Normal University, Changchun, Jilin 130032, China)

Abstract: Cucumber seeds which were treated by soaking with CS-2 cell suspension, a kind of plant growth-promoting bacteria, and distilled water, planted in the matrix uniformly mixed by common soils and grass carbon ones. Then, irrigation was done with four concentrations of NaCl solution, measure the peroxidase activity, the soluble protein content and proline content when the true leaf number of seedling to be four. The results indicated that peroxidase activity and soluble protein content had a better growth compared with the control respectively at the presence of NaCl stress; Whereas, proline content declined when the proportion less than 0.4% compared with the control; meanwhile, there was a negative correlation between height and the peroxidase activity.

Key words: ACC deaminase bacteria; Plant height; Soluble protein ; Peroxidase; Proline