

黑果枸杞耐盐机理的相关研究

姜霞¹, 任红旭², 马占青³, 郭军战¹

(1. 西北农林科技大学 林学院, 陕西 杨凌 712100; 2. 中国科学院 植物研究所, 北京 100093; 3. 兰州大学 生命科学院, 甘肃 兰州 730000)

摘要:以黑果枸杞幼苗为材料, 分别对其进行不同浓度 NaCl(0、200、400 mM)处理, 以探讨盐胁迫对黑果枸杞幼苗生长及生理特性的影响。结果表明:不同浓度 NaCl 处理下, 根的质膜透性随着处理时间的延长明显增大; 400 mM NaCl 处理 14 d 后, 黑果枸杞幼苗根、茎、叶中 H_2O_2 和 MDA 的含量与对照相比均无明显差别; 不同浓度 NaCl 处理至第 7 天时, 根中的可溶性糖含量明显下降, 而处理至第 14 天时, 根中的可溶性蛋白质含量明显降低。不同浓度 NaCl 处理下, 叶片和茎中的 POD 活性在处理第 7 天与第 14 天均明显降低, 而茎中的 APX 在处理第 14 天亦明显降低。从各生理指标的测定结果来看, 黑果枸杞叶片和茎具有较强的耐盐性, 而其根部则对盐胁迫的耐受能力则相对较弱。

关键词:黑果枸杞; NaCl 胁迫; 生理机制; 耐盐性

中图分类号:S 793.9 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2012)10-0019-05

全世界共有占土地面积 25% 的盐渍化土地, 同时土壤的次生盐渍化也日趋严重, 盐渍化已成为困扰和威胁农业生产的世界性难题。因此, 对植物耐盐性机理及盐渍土的生物学治理和综合开发利用的研究是未来农业领域的两大重要课题。

黑果枸杞 (*Lycium ruthenicum* Murr.) 是我国西北地区特有的多年生耐盐抗旱野生灌木, 具有很强的耐盐性。它可以入药、制茶, 且营养价值高于一般枸杞, 因此是一种集经济价值、盐碱地绿化于一体的野生优良水土保持植物^[1-2], 可作为治理西部荒漠区生态环境的优良植物资源和盐碱化土地恢复植被的备选植物。现通

过分析不同程度盐处理下黑果枸杞幼苗根、茎、叶中生理指标的变化, 对其耐盐机理进行初步的探讨, 以期为进一步耐盐栽培提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试黑果枸杞种子采自青海。

1.2 试验方法

选取饱满的种子, 用 200 mg/L 的赤霉素 (GA_3) 溶液浸泡约 24 h, 然后用 75% 酒精消毒 1 min, 用自来水冲洗 6 次之后用 2% NaClO 溶液消毒 10 min, 再用自来水冲洗 6 次后晾干。晾干的种子播种于装有经高温灭菌土壤的培养盒中^[2]。萌发以后, 每周浇 2 次改良的 Hoagland 营养液, pH 7.0。5 个月后, 选取长势一致的幼苗转入 Hoagland 营养液中进行溶液培养, 培养箱温度为 25℃/20℃, 昼夜光周期 16/8 h, 光强 250 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 。溶液培养 1 周后, 在营养液中分别加入不同浓度的 NaCl 溶液, 为减轻盐冲击效应, 采用每天递增 50 mM 的方式提高盐浓度, 并使处理于同一天达到各自

第一作者简介:姜霞(1986-), 女, 在读硕士, 现主要从事林木遗传育种研究工作。E-mail:jiangxia.396@163.com。

责任作者:郭军战(1962-), 男, 副教授, 现主要从事林木遗传育种研究工作。

基金项目:中国科学院知识创新工程重要方向性资助项目(KSCX2-EW-J-1)。

收稿日期:2012-03-07

the anthocyanin content was significant or most significant lower than in them. For 'Dahongli' and 'Friar', anthocyanin content and soluble sugar content showed a significant and positive correlation, and titratable acid content was significant or very significant negative correlation; carotenoid content and soluble sugar content was a significant positive correlation, and the correlation between that and acid content showed not consistent; chlorophyll content and sugar or acid content no significant correlations were observed. For 'Naili', each kind of pigment content and sugar or acid content showed not significant correlation. These suggested that the fruit color for cultivars 'Dahongli' and 'Friar' may be determined by the concentration of anthocyanin, but for 'Nali' by carotenoid and chlorophyll concentrations.

Key words: plum; pericarp pigment; anthocyanin; chlorophyll; carotenoid; soluble sugar; titratable acid

的预定浓度,然后每 2 d 定时定量更换预定浓度的盐溶液。NaCl 处理浓度分别为 0、200、400 mM。达到该预定浓度后再连续培养 14 d。并分别在第 7 天和第 14 天取其根、茎、叶,放入 -70°C 冰箱中保存备用。

1.3 项目测定

1.3.1 可溶性蛋白及抗氧化酶的提取和活性测定 酶液提取参照 Grace S C 等^[3]的方法,并稍作修改。分别取根、茎、叶各 0.3 g,按照 1:10 的比例加入提取缓冲液 $[0.1\text{ mol/L KH}_2\text{PO}_4\text{-K}_2\text{HPO}_4, \text{pH } 7.6, 1\text{ mmol/L AsA}, 1\text{ mmol/L EDTA}, 1\% (\text{W/V}) \text{ PVPP}, 0.3\% (\text{W/V}) \text{ Triton X-100}]$ 于冰浴中研磨匀浆, 4°C 12 000 r/min 离心 20 min,取上清液用于进行可溶性蛋白含量及抗氧化酶活性的测定。可溶性蛋白含量的测定采用王学奎^[4]的考马斯亮蓝 G-250 染色法,APX 活性测定按照 Nakano Y 等^[5]的方法,GR 活性测定按照 Grace S C 等^[3]的方法,POD 活性测定按照 Chance B 等^[6]的方法。

1.3.2 膜透性及丙二醛(MDA)含量的测定 膜透性采用电导率仪法测定^[7];丙二醛(MDA)含量的测定参照李合生^[7]的方法,略有改动; H_2O_2 含量测定参照程红焱等^[8]的方法,略有改动。

1.3.3 渗透调节物含量的测定 可溶性蛋白和可溶性糖含量的测定参照 Morkunas 等^[9]的方法。

1.3.4 抗坏血酸(AsA)含量测定 AsA 和脱氢抗坏血酸(DAsA)含量测定参照 Hodges 等^[10]的方法测定,DAsA 含量为总抗坏血酸与 AsA 含量的差值。

1.4 数据分析

试验中所有的数据均为 3 次重复的平均值,结果以平均值 \pm 标准差来表示,采用 SPSS 12.0 进行单因素方差分析(ANOVA, one-way analysis of variance),使用最小显著差法(LSD, Least significant difference)进行显著性差异分析($P < 0.05$)。

2 结果与分析

2.1 不同浓度 NaCl 处理对黑果枸杞幼苗膜透性和丙二醛、 H_2O_2 含量的影响

2.1.1 不同浓度 NaCl 处理对黑果枸杞幼苗细胞质膜透性的影响 由图 1 可知,在 200 mM NaCl 胁迫下,植株根、茎、叶中的相对电导率在第 7 天时均明显高于对照,分别为对照的 1.88、1.27、1.93 倍,而在第 14 天时,叶片的电导率明显下降,茎的电导率与对照相比无明显变化,而根的电导率则显著高于对照;在 400 mM NaCl 处理下,叶片和茎的电导率在第 7 天时没有发生明显变化,而根的电导率则显著高于对照,处理至第 14 天时,叶片的电导率明显降低,茎则变化不大,而根的电导率仍显著高于对照。

2.1.2 不同浓度 NaCl 处理对黑果枸杞幼苗丙二醛(MDA)含量的影响 由图 2 可知,200 mM NaCl 处理

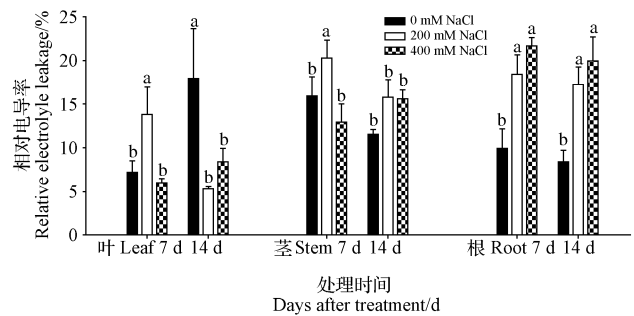


图 1 不同浓度 NaCl 处理下黑果枸杞叶、茎、根中相对电导率的变化

Fig. 1 Changes of relative electrolyte leakage in leaves, stems and roots of *Lycium ruthenicum* Murr. under NaCl stress

14 d 后,根中的 MDA 含量明显降低,较对照降低了 28%。而 400 mM NaCl 处理则未对根中的 MDA 含量造成明显影响。

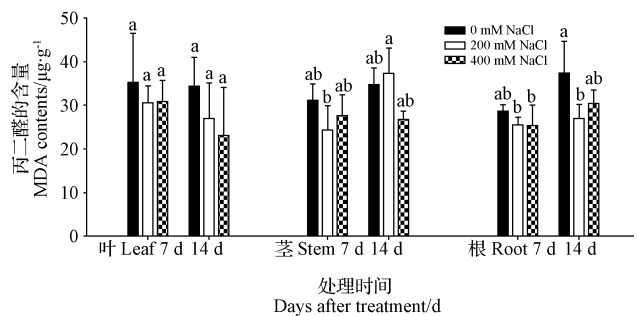


图 2 不同浓度 NaCl 处理下黑果枸杞叶、茎、根中 MDA 含量的变化

Fig. 2 Changes of MDA contents in leaves, stems and roots of *Lycium ruthenicum* Murr. under NaCl stress

2.1.3 不同浓度 NaCl 处理对黑果枸杞幼苗过氧化氢(H_2O_2)含量的影响 由图 3 可知,200 mM NaCl 胁迫下,黑果枸杞幼苗叶片、茎与根中的 H_2O_2 含量在第 7 天时均明显下降,而处理到第 14 天时则出现了不同程度的上升。当培养液中 NaCl 浓度升至 400 mM 时,叶片、茎与根中的 H_2O_2 含量在处理后的第 7 天均明显上升,而在第 14 天时则都有所下降,根中的 H_2O_2 含量甚至低于对照。

2.2 不同浓度 NaCl 处理对黑果枸杞幼苗渗透调节物质的影响

2.2.1 NaCl 胁迫对黑果枸杞幼苗可溶性蛋白质(SP)含量的影响 由图 4 可知,200 mM NaCl 处理后第 7 天,黑果枸杞幼苗叶中的 SP 含量明显上升,较对照升高了 35%,而茎和根中则无明显变化;而处理后的第 14 天,叶片和根中的 SP 含量明显下降,与对照相比,分别降低了 23%、24%,而茎中的 SP 含量变化不显著;400 mM NaCl 胁迫下,叶片和根中的 SP 含量在处理后的第 7 天显著

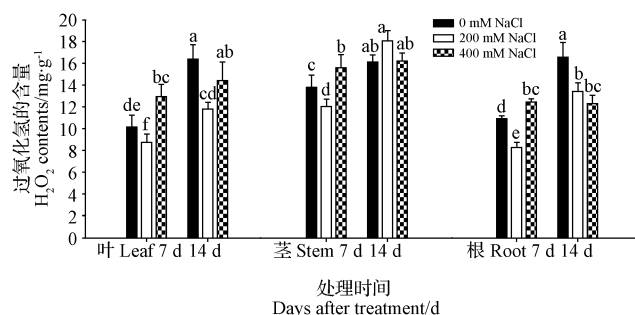


图3 不同浓度 NaCl 处理下黑果枸杞叶、茎、根中 H_2O_2 含量的变化

Fig. 3 Changes of H_2O_2 content in leaves, stems and roots of *Lycium ruthenicum* Murr. under NaCl stress

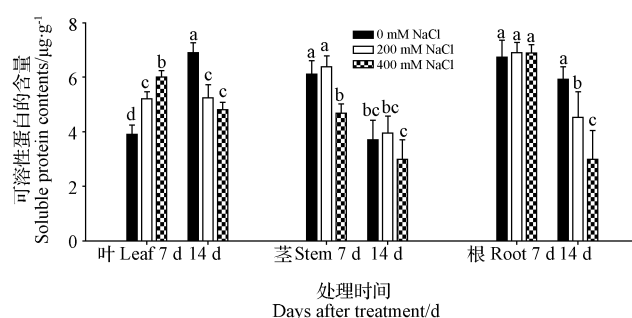


图4 不同浓度 NaCl 处理下黑果枸杞叶、茎、根中可溶性蛋白含量的变化

Fig. 4 Changes of soluble protein contents in leaves, stems and roots of *Lycium ruthenicum* Murr. under NaCl stress.

上升,叶中的增加尤为明显,较对照升高了 55%,而茎中的 SP 含量则明显下降,仅为对照的 77%。而在处理后第 14 天,叶片和根中的 SP 含量明显下降,分别降至对照的 70%和 51%,而茎中的 SP 含量则无明显变化。

2.2.2 不同浓度 NaCl 处理对黑果枸杞幼苗可溶性糖含量的影响 由图 5 可知,200 mM NaCl 处理后第 7 天,黑果枸杞幼苗根、茎、叶中的可溶性糖含量均没有发生明显变化,在处理第 14 天时,茎中的可溶性糖含量明显下降,降至对照的 76%,而根和叶中的可溶性糖含量仍变化不明显;400 mM NaCl 胁迫下,无论是处理后第 7 天还是在第 14 天,叶、茎、根中的可溶性糖含量均没有明显变化。

2.3 不同浓度 NaCl 处理对黑果枸杞幼苗抗氧化酶活性的影响

2.3.1 NaCl 胁迫对黑果枸杞幼苗中抗坏血酸过氧化物酶(APX)活性的影响 由图 6 可知,200 mM NaCl 处理至第 7 天时,黑果枸杞幼苗叶片、茎和根中的 APX 均变化不明显;而处理到第 14 天时,叶片中的 APX 活性明显增强,为对照的 1.56 倍,而茎中的 APX 活性则明显降低,为对照的 48%,根则变化不明显。400 mM NaCl 处理 7 天后,叶片中的 APX 活性明显增强,较对照上升了约 36%,

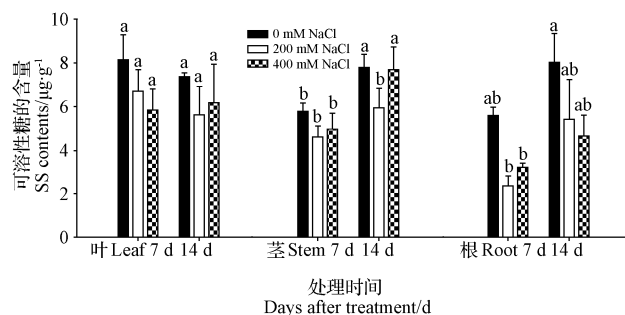


图5 不同浓度 NaCl 处理下黑果枸杞叶、茎、根中可溶性糖含量的变化

Fig. 5 Changes of the contents of soluble sugar in leaves, stems and roots of *Lycium ruthenicum* Murr. under NaCl stress

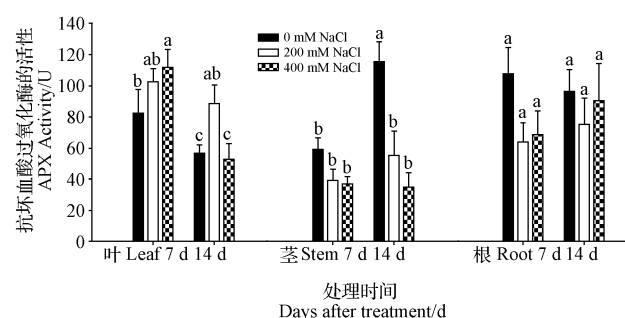


图6 不同浓度 NaCl 处理对黑果枸杞叶、茎、根中 APX 活性的影响

Fig. 6 Changes of the activities of APX in leaves, stems and roots of *Lycium ruthenicum* Murr. under NaCl stress

而茎和根中的 APX 活性则没有发生明显变化。处理 14 d 后,茎中的 APX 活性变化明显,较对照降低了约 70%。

2.3.2 不同浓度 NaCl 处理对黑果枸杞幼苗过氧化物酶(POD)活性的影响 由图 7 可知,200 mM NaCl 处理明显降低了黑果枸杞幼苗叶片和茎中的 POD 活性。处理至第 7 天时,叶片和茎中的 POD 活性分别降至对照的 80%和 49%;处理至第 14 天时,叶片和茎中的 POD

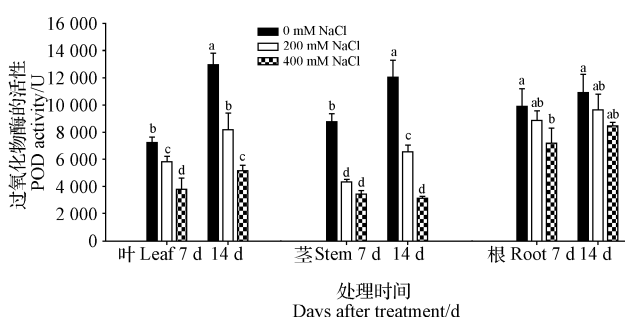


图7 不同浓度 NaCl 处理对黑果枸杞叶、茎、根中 POD 活性的影响

Fig. 7 Changes of the activities of peroxidase in leaves, stems and roots of *Lycium ruthenicum* Murr. under NaCl stress

活性则分别为对照的 63%、54%。当培养液中的 NaCl 浓度升高到 400 mM 时,叶片、茎和根中的 POD 的活性均明显降低。在第 7 天时,分别降为对照的 52%、39% 和 72%,之后茎和叶片中的活性持续降低,至第 14 天时,分别降为对照的 40%、26%,而根中的 POD 活性则略有上升。

2.3.3 不同浓度 NaCl 处理对黑果枸杞幼苗谷胱甘肽还原酶(GR)活性的影响 由图 8 可知,200 mM NaCl 胁迫下,除根中的 GR 的活性在处理第 14 天明显升高外,叶片和茎中的 GR 活性均未发生明显变化。400 mM NaCl 处理也没有对幼苗中的 GR 活性产生明显影响,仅叶片中的 GR 活性在处理第 7 天增大明显,在第 14 天也降至与对照相当的水平。

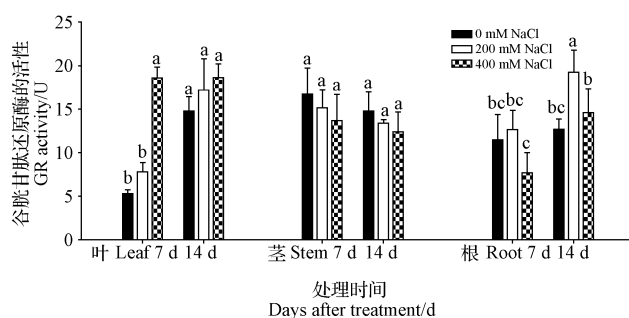


图 8 不同浓度 NaCl 处理下黑果枸杞叶、茎、根中谷胱甘肽还原酶活性的变化

Fig. 8 Changes of the activities of glutathione reductase in leaves, stems and roots of *Lycium ruthenicum* Murr. under NaCl stress

2.4 NaCl 胁迫对黑果枸杞幼苗还原型抗坏血酸(AsA)和氧化型抗坏血酸(DAsA)含量的影响

由图 9 可知,200 mM NaCl 胁迫下,黑果枸杞幼苗在处理第 7 天时,植株叶片、茎、根中总的 AsA 和 AsA 的含量均有所增加,尤其根中总的 AsA 和 AsA 含量均增加显著,分别为对照的 1.46、1.42 倍。而叶中的 DAsA 含量减少,根、茎中的含量增加,差异不显著。处理后的第 14 天,叶中的 DAsA 的含量增加,茎和根中的含量均减少,但差异不显著。叶片和茎中总的 AsA 和 AsA 的含量都增加,而根则减少。400 mM NaCl 胁迫下,植株处理到第 7 天时,叶中总的 AsA 和 DAsA 均有所增加,但不显著,而 AsA 含量有所减少。处理到第 14 天时,植株总的 ASA 与第 7 天时保持相当的水平,差异不显著。

3 讨论与结论

在较低浓度 NaCl 处理下,一定的 Na^+ 摄入在一定程度上有助于增强植物幼苗的渗透调节能力,促进植物幼苗的生长;然而大量的 Na^+ 可以竞争性地替代 Ca^{2+} , 从而破坏质膜的结构,抑制植物器官和组织分化和生长,造成植物发育迟缓甚至死亡^[11-12]。在该研究中,当培养液中 NaCl 浓度达 400 mM 时,黑果枸杞幼苗的根明显不再分化和增长,表明高浓度的 NaCl 处理抑制了幼

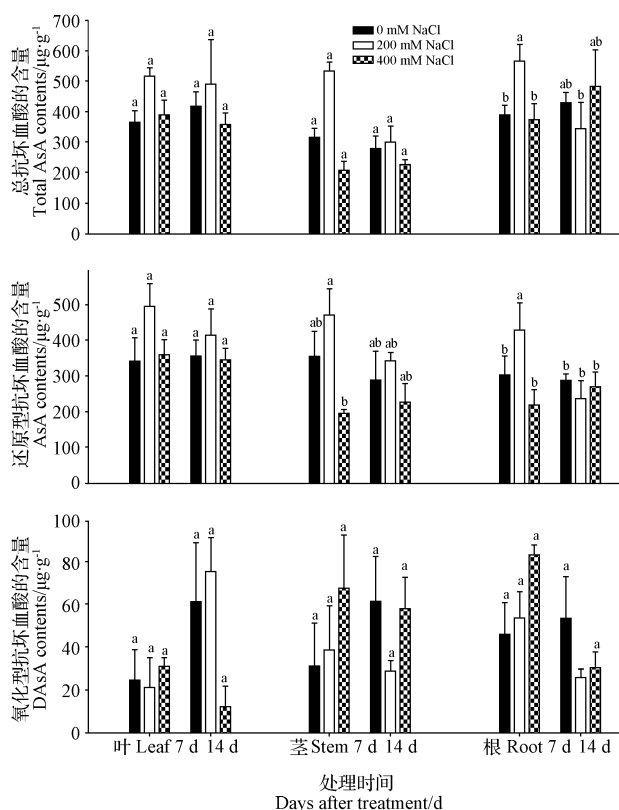


图 9 不同浓度 NaCl 处理对黑果枸杞叶、茎、根中抗坏血酸含量的影响

Fig. 9 Effects of NaCl stress on the contents of AsA in leaves, stems and roots of *Lycium ruthenicum* Murr.

苗的生长。

生物膜是外界盐离子进入细胞的第一道屏障。随着 NaCl 浓度的增加和处理时间的延长,黑果枸杞幼苗根的膜透性明显增大,而叶片和茎的膜透性在处理第 7 天虽有明显上升,但在第 14 天时则下降至对照水平,由此可见,盐胁迫下,不同器官中根所受到的伤害程度较深。在盐胁迫下,植物体可以通过渗透调节物质的积累来缓解盐胁迫对植物的伤害。可溶性糖和可溶性蛋白质均在渗透调节中发挥着重要作用^[13-14]。该研究结果表明,黑果枸杞幼苗叶片中的可溶性糖含量在不同 NaCl 浓度下变化不大,可溶性蛋白质含量在第 7 天时明显上升,在第 14 天时才有所下降;而根中的可溶性糖含量在第 7 天即开始下降,可溶性蛋白含量虽在第 7 天时变化不明显,在第 14 天时亦开始下降。由此可见,在盐胁迫下黑果枸杞叶片具有较强的积累渗透调节物质的能力,从而保护叶片免受由盐胁迫所导致的渗透伤害。

在正常生理条件下,植物体内活性氧的产生和清除处于动态平衡,这是由于植物在长期进化过程中形成了一套行之有效的抗氧化保护系统,包括酶促系统和非酶促系统。酶促系统由 POD、APX 等抗氧化酶组成,而非酶促系统则包括 AsA、GSH 等小分子有机物。POD 在

植物体内主要有两方面的作用,一方面在植物的生长、发育过程中起作用,另一方面则与清除 H_2O_2 有关,是植物保护酶系的重要保护酶之一。在该研究中,黑果枸杞不同器官中 POD 的活性在盐胁迫下均随胁迫时间的延长而出现了不同程度的下降,这可能与盐胁迫下黑果枸杞的生长受到抑制有关。APX 和 GR 是抗坏血酸-谷胱甘肽循环中的关键酶^[15]。AsA 不仅可以直接清除 O_2^- , H_2O_2 等,而且还参与 AsA-GSH 循环,对维持细胞内的氧化还原平衡起着重要作用。在该研究中,盐胁迫下黑果枸杞不同器官中 APX 的活性与对照相比始终未发生明显下降,而叶片中则有上升趋势,如 200 mM NaCl 处理后第 14 天,叶片中的 APX 活性与对照相比明显上升。此外,不同器官中 AsA 的含量以及 AsA/DHA 的比值在盐胁迫下亦没有发生明显变化。由此可见,盐胁迫并未对黑果枸杞幼苗的抗氧化能力造成明显影响。MDA 是膜脂过氧化的产物,在该研究中,黑果枸杞不同器官中 MDA 的含量均未随胁迫程度加深或胁迫时间的延长而发生明显变化,也表明盐生植物黑果枸杞具有较强的抗氧化能力。

综上所述,盐胁迫下黑果枸杞幼苗根的电解质外渗程度较为严重,表明根所受到的伤害程度较深,这可能与根积累渗透调节物质的能力相对较弱有关。关于几种抗氧化酶活性和 AsA 含量的测定结果表明,根、茎、叶等不同器官的抗氧化能力在盐胁迫下并未受到明显影响,表明黑果枸杞作为一种盐生植物,在盐胁迫下仍具有相对较强的抗氧化能力。

参考文献

- [1] 陈海魁,蒲凌奎,曹君迈,等.黑果枸杞的研究现状及其开发利用[J].黑龙江农业科学,2008(5):155-157.
- [2] 陈海魁,蒲林奎,倪志婧,等.黑果枸杞硬实种子处理方法研究[J].安徽农业科学,2009,37(6):2540-2541.
- [3] Grace S C, Logan B A. Acclimation of foliar antioxidant systems to growth irradiance in three broad-leaved evergreen species [J]. Plant Physiol, 1996,112:1631-1640.
- [4] 王学奎.植物生理生化试验原理和技术[M].北京:高等教育出版社,2006.
- [5] Nakano Y, Asada K. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplast [J]. Plant Cell Physiol, 1981,22:867-880.
- [6] Chance B, Maehly A C. Assay of catalase and peroxidases [J]. Methods in enzymology, 1955(2): 764-775.
- [7] 李合生,赵世杰.植物生理生化实验原理和技术[M].北京:高等教育出版社,2000:194-197,260-261.
- [8] 程红焱,宋松泉.种子生物学研究指南[M].北京:科学出版社,2005.
- [9] 姚霞,许利嘉,肖伟,等.不同枸杞子中枸杞多糖的含量分析[J].医药导报,2011,30(4):426-428.
- [10] 肖雯,贾恢先,蒲陆梅.几种盐生植物抗盐生理指标的研究[J].西北植物学报,2000,2(5):818-825.
- [11] 于爽,李春艳.盐胁迫对不同番茄品种生理生化指标的影响[J].北方园艺,2007(4):10-13.
- [12] 宁建凤,郑青松,邹献中,等.罗布麻对不同浓度盐胁迫的生理响应[J].植物学报,2010,45(6):689-697.
- [13] 章英才,张晋宁.两种盐浓度环境中的黑果枸杞叶的形态结构特征研究[J].宁夏大学学报(自然科学版),2004,25(4):365-368.
- [14] 张华新,宋丹,刘正祥.盐胁迫下 11 个树种生理特性及其耐盐性研究[J].林业科学研究,2008,21(2):168-175.
- [15] Noctor G, Foyer C H. Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control [J]. Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol Biol, 1998, 49: 249-279.

Studies on the Physiological Mechanism Underlying Salt Tolerance of *Lycium ruthenicum* Murr.

JIANG Xia¹, REN Hong-xu², MA Zhan-qing³, GUO Jun-zhan¹

(1. College of Forestry, Northwest Agriculture and Forestry University, Yangling, Shaanxi 712100; 2. Institute of Botany, The Chinese Academy of Sciences, Beijing 100093; 3. Department of Life Science, Lanzhou University, Lanzhou, Gansu 730000)

Abstract: *Lycium ruthenicum* seedlings were chosen as test material, effect of different concentration of NaCl (0, 200, 400 mM) on seedling growth and physiological property of *Lycium ruthenicum* were studied. The results showed that the values of relative electrolyte leakage in roots increased significantly during the period of NaCl treatment; After NaCl treatment for 14 days, the contents of H_2O_2 and MDA did not change much as compared with the control; The content of soluble sugars decreased significantly in roots after 7 days of NaCl treatment, while the content of soluble protein declined after 14 days of NaCl exposure; Under different concentrations of NaCl treatment, POD activity in both leaves and stems declined dramatically after 7 and 14 days of treatment. According to the results obtained, the leaves and the stems possess relatively higher salt tolerance, while the root was relatively sensitive to salt stress.

Key words: *Lycium ruthenicum*; NaCl stress; physical index; salt tolerance