

盐胁迫对油葵种子萌发及内源激素含量的影响

王 鹏^{1,2}, 马 玲 玲², 陈 雨², 张 振 宇², 李 林 芳², 李 亚^{1,2}

(1. 江苏省盐土生物资源研究重点实验室, 江苏 盐城 224002; 2. 江苏省中国科学院植物研究所, 江苏 南京 210014)

摘 要:油葵是我国重要的油料作物之一,具有耐盐性强的优点。种子萌发期是油葵发育的第一个时期,在其整个生活史中占有重要的地位,而对其耐盐性的研究目前还较少。该研究通过对‘DW2177’、‘DW667’、‘高油1号’和‘新葵10号’等国内外4个油葵品种萌发期耐盐性的评价,发现了耐盐性最高的油葵品种‘新葵10号’;利用HPLC技术对其不同盐浓度下的萌发期内源激素含量进行了分析。结果表明:在内源激素调控油葵耐盐性上,GA₃在低盐浓度时发挥作用而ABA在高盐浓度时发挥作用;IAA在调节油葵耐盐性方面发挥着核心的作用。

关键词:油葵;盐胁迫;激素;高效液相色谱

中图分类号:S 565.5 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2015)03-0012-04

油葵(*Helianthus annuus*)属菊科(Asteraceae)向日葵属(*Helianthus*)集观赏性、油用和药用等经济价值于一体的一种植物。油葵原产北美,目前世界各地都有种植,是我国第四大油料作物。油葵同时还具有抗逆性强、适应性广、生育期短、产量稳定的优点,是用于开发盐碱地和生物治理盐碱地的首选作物之一^[1]。

作为痕量信号的植物内源激素与植物耐盐性的关系一直是植物抗盐机理研究的主要内容。植物的内源激素包括生长素(IAA)、脱落酸(ABA)、赤霉素(GA₃)等,其中ABA是植物抗盐生理机制研究中的热点。在盐胁迫后植物激素反应往往不是一种激素,而是多种激

素通过相互协同和拮抗作用对植物生长发育起调控作用,即激素的平衡效应^[2-5]。吴锡冬等^[6]研究发现NaCl胁迫条件下,外施ABA能降低玉米叶片的净光合速率而导致过刺激发能的增多,但是ABA提高了盐胁迫叶片的光化学猝灭(qP),增强了热耗散(NPQ)能力,减少了过刺激发能的积累,从而减轻了盐胁迫造成的光抑制。此外盐胁迫条件下ABA还能诱导玉米叶片脯氨酸含量增加,提高玉米的渗透调节能力。华春等^[7]研究了外源GA₃对不同浓度的盐胁迫下北美海蓬子种子萌发及幼苗生长的影响,表明在外源GA₃处理下,北美海蓬子幼苗中脯氨酸的含量高于单盐处理,而可溶性蛋白质含量影响不大;抗氧化酶活性、O₂⁻产生速率值和MDA值低于单盐处理,说明外源GA₃可以加强北美海蓬子自身抗胁迫能力,其主要是通过增加体内的脯氨酸含量起作用。Zolla等^[8]研究发现盐胁迫通过调控生长素浓度梯度和再分配影响拟南芥的侧根数、侧根和初生根生长及根的生长方向,而初生根伸长、侧根发育、根的向重力性改变等是植物规避高盐危害的一种较重要的适应策略。

内源激素在植物体内含量甚微,分析时属痕量分析,分离时容易被破坏,给激素的分离测定带来一定的

第一作者简介:王鹏(1981-),男,山东邹平人,博士,助理研究员,研究方向为观赏植物分子遗传学。E-mail:wp280018@163.com.

责任作者:李亚(1969-),男,安徽颍上人,博士,研究员,现主要从事园林植物等研究工作。E-mail:yalicnbg@aliyun.com.

基金项目:江苏省盐土生物资源研究重点实验室开放课题资助项目(JKLBS2013004);江苏省科技公共服务平台资助项目(BM2012058);国家自然科学基金青年基金资助项目(31200509);江苏省自然科学基金青年基金资助项目(BK2012377)。

收稿日期:2014-09-09

effective relative light intensity, yield and quality significantly increased; When the height of stem was >110 cm, with the increasing of stem height that the net photosynthetic efficiency, effective relative light intensity and quality had a slight increase but no significant differences and the yield began to decrease. When the density was 3 m × 4 m, that the stem height of full fruit period apple was 100—110 cm was a good index of cultivation of adult ‘Red Fuji’ apple cultivation in the Longnan mountainous area of Gansu.

Keywords: improving stem; ‘Red Fuji’ apple; photosynthetic efficiency; yield; quality

困难。目前内源激素的测定方法有放射免疫法(PIA)、酶联免疫法(ELISA)、高效液相色谱(HPLC)和高效液相色谱—三重四极杆质谱(LC-MS)。孙丹等^[9]以北五味子不同发育阶段的体细胞胚为材料,利用 HPLC 对其内源 IAA、ABA 和 GA₃ 含量进行了测定,探讨内源激素在体细胞胚正常发育过程中所具有的作用。卢巧梅等^[10]建立了高效液相色谱-离子阱串联质谱高灵敏、快速测定多种内源植物激素的方法,在最佳条件下,IAA、ABA 和 GA₃ 在 5 min 内实现完全分离,最低检测限为 8.0 ng/mL。借助串联质谱技术,解释了 3 种激素的结构碎裂过程。

油葵是世界上重要的油料作物,在我国也占有重要的地位。近年来,随着种植结构调整和沿海开发的需要,油葵的种植面积在我国持续增加。种子萌发期是油葵发育的第一个时期,在其整个生活史中占有重要的地位。但是对其耐盐性的研究目前还较少,因此,该研究以 4 个油葵品种为研究对象,通过对种子萌发期耐盐性评价并结合 HPLC 技术测定不同盐浓度下的生长素、脱落酸和赤霉素的含量,初步揭示内源激素含量变化与油葵耐盐能力之间的关系。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试油葵品种分别为‘DW2177’、‘DW667’、‘高油 1 号’和‘新葵 10 号’。

1.2 试验方法

1.2.1 种子萌发试验 试验选用 NaCl 溶液作为种子发芽的培养液,设 NaCl 溶液浓度分别为 80、160、240 mmol/L 共 3 个处理,以 0 mmol/L 为对照。油葵种子经过 37.5% 的次氯酸钠溶液消毒 15 min 后,用去离子水冲洗并晾干后置于铺有 2 层滤纸的培养皿中,每皿 50 粒分别加入配制好的不同浓度的 NaCl 溶液 2.5 mL,每处理 3 次重复,培养皿每天更换 1 次滤纸。培养皿放入光照培养箱中,温度为 25℃(光照)/20℃(黑暗),光照 12 h。第 7 天从每皿中挑出长势中等的幼苗各 10 株测量胚根长度、发芽率、发芽势及发芽指数。发芽率(GP,%)=第 7 天发芽种子数/供试种子数×100%;发芽势(GR,%)=第 3 天发芽种子数/供试种子数×100%;发芽指数(GI)= $\sum G_t/D_t$ (G_t 指第 t 天发芽种子数,D_t 指相应的发芽天数)。

1.2.2 激素标准溶液的配制 将生长素、脱落酸和赤霉素等 3 种激素标准样用甲醇溶解,分别配置为 100 mg/L 标准溶液,再将上述 3 种溶液配置成混合标准溶液,各种标准样品溶液存放于 10 mL 棕色容量瓶中待测。

1.2.3 内源激素提取 准确称取 2 g 培养第 7 天的‘新葵 10 号’的幼苗,液氮研磨,加入 30 mL 100% 的甲醇,混

匀后 4℃ 避光浸提过夜;浸提混合物 4 000 r/min 离心 15 min,取上清液;沉淀中加 20 mL 80% 甲醇,混匀后置于 4℃ 避光浸提 1~2 h,离心后合并上清液,再重复处理 1 次。上清液于旋转蒸发仪上 40℃ 减压蒸发至没有甲醇残余。剩余水相用 30 mL 石油醚萃取脱色 2 次,弃去醚相水相 pH 调至 2.9,用 30 mL 乙酸乙酯萃取 3 次,合并酯相,40℃ 下减压蒸干。用 5 mL 甲醇溶解,0.22 μm 微孔滤膜过滤,保存于 4℃ 冰箱中。各样品重复 3 次。

1.2.4 色谱柱条件 色谱柱: Hypemil BDS C18 色谱柱;梯度洗脱程序:0~2 min 为甲醇:0.7% 乙酸水溶液=25:75(V/V);2~30 min 是甲醇:0.7% 乙酸水溶液=(25~100):(75~0)(V/V);检测波长:254 nm;标准样品进样量 10 μM,待测样品进样量 20 μM;柱温:30℃。

2 结果与分析

2.1 不同盐浓度对油葵种子萌发的影响

从图 1 可以发现,随着 NaCl 浓度的增加,4 个油葵品种的发芽率、发芽势、发芽指数和胚根长度都降低了。在 NaCl 浓度为 80 mmol/L 时,‘DW667’和‘新葵 10 号’这 2 个品种的发芽率分别高于对照的发芽率,说明低盐浓度促进了这 2 个品种种子萌发。在 NaCl 浓度为 240 mmol/L 时,4 个品种的发芽率变化为‘新葵 10 号’>‘DW2177’=‘DW667’>高油 1 号,发芽势变化为‘新葵 10 号’>‘DW2177’>‘DW667’>‘高油 1 号’,发芽指数的变化为‘新葵 10 号’>‘DW2177’>‘DW667’>‘高油 1 号’,但是胚根长度的变化为‘高油 1 号’>‘DW2177’>‘新葵 10 号’>‘DW667’。

2.2 不同盐浓度对萌发期的油葵内源激素含量的影响

利用 HPLC 测定了不同 NaCl 浓度下‘新葵 10 号’种子萌发期的 IAA、ABA 和 GA₃ 等 3 种内源激素的含量变化。

如表 1 所示,各处理 GA₃ 含量的变化趋势是先增加后降低。在 NaCl 浓度≤160 mmol/L 时,随着盐浓度的增加,GA₃ 的含量从 38.75 ng/g 增加到最大值的 49.00 ng/g,各处理分别为对照的 1.10 倍和 1.27 倍。当 NaCl 浓度增加到最大的 240 mmol/L 时,GA₃ 的含量却减少到 44.50 ng/g,为对照的 1.15 倍。各处理 ABA 含量的变化趋势是先降低后增加,在 NaCl 浓度≤160 mmol/L 时,ABA 的含量从 0.18 ng/g 减少到最低值的 0.13 ng/g,各处理分别为对照的 0.94 倍和 0.72 倍。当 NaCl 浓度增加到最大的 240 mmol/L 时,ABA 的含量突然增加到了 0.54 ng/g,为对照的 2.98 倍。各处理 IAA 含量随着盐浓度的增加而升高,从 5.13 ng/g 增加到 17.70 ng/g,各处理分别为对照的 1.88、2.60、3.45 倍。

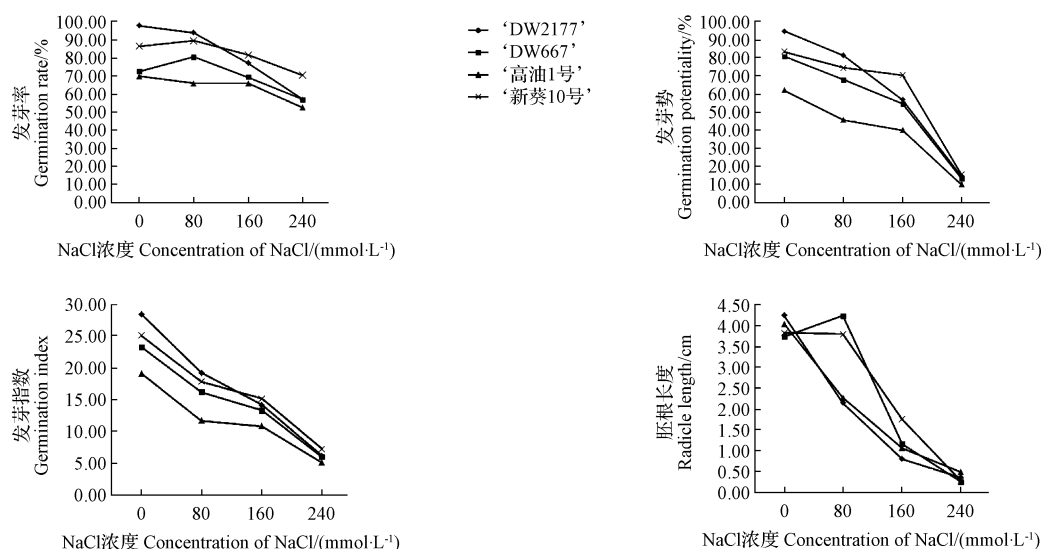


图1 不同盐浓度中油葵种子发芽率、发芽势、发芽指数和胚根长度

Fig. 1 The germination rate, germination potentiality, germination index and radical length of seeds of oil sunflowers under different concentrations of sodium chloride

表1 不同 NaCl 浓度中油葵内源激素含量

Table 1 The hormone content of oil sunflowers under different concentrations of sodium chloride

激素浓度 ($\text{ng} \cdot \text{g}^{-1}$)	0	80	160	240
GA_3	38.75 ± 3.32	42.67 ± 4.15	49.00 ± 3.83	44.50 ± 3.01
IAA	5.13 ± 1.25	9.63 ± 1.63	13.35 ± 1.45	17.70 ± 2.11
ABA	0.18 ± 0.06	0.17 ± 0.09	0.13 ± 0.08	0.54 ± 0.12

3 讨论与结论

盐胁迫下植株生长受抑制的生理机制是多方面的,其中一个重要的原因就是激素含量及其比值的变化。生长素是最早发现的一类植物激素,其合成与代谢、稳态调控、极性运输和信号在植物整个生长发育过程中发挥重要的作用。近年来的诸多证据表明,生长素与逆境胁迫也有着紧密的联系^[11]。Park 等^[12]研究发现,生长素在植物适应逆境胁迫中发挥着核心作用。外源添加适量 IAA 可促进盐胁迫下大豆幼苗的生长,增强幼苗对盐渍环境的抵抗能力^[13]。田聪等^[14]研究发现,外源 NAA 可以促进东方山羊豆幼苗在盐胁迫下的生长。该试验发现 IAA 含量随着盐浓度的增加而一直升高,是测量的 3 种激素中含量唯一的一直升高的激素,表明 IAA 可能在油葵耐盐机制中发挥重要的作用。

ABA 在植物应答逆境胁迫中有至关重要的作用,是重要的应答非生物胁迫的调控因子^[15]。它具有刺激气孔运动、增加脯氨酸的积累和抑制芽的生长等功能^[16-18]。前人研究表明,盐胁迫下植物根系受盐渗透的影响,ABA 含量增加,ABA 在叶片中的大量积累导致叶片扩张速度下降,气孔导度降低,减少了植物蒸腾失水

和盐离子随蒸腾由根部向茎叶的运输和积累,从而减轻盐胁迫对植物的伤害^[19-20]。赤霉素(GA_3)是一类较大的萜类化合物家族,最显著的生理效应就是促进植物的生长发育,主要是通过细胞数目的增加和细胞的伸长来完成^[21]。研究发现,外源 GA_3 在一定程度上可以缓解盐害,提高植物的耐盐性^[22-23]。该研究中发现,ABA 的含量随着 NaCl 浓度的增加表现为先降低后突然增加的趋势,表明其在油葵耐高盐胁迫中发挥重要作用。有趣的是,该研究发现 GA_3 的含量随着 NaCl 浓度的增加表现为先升高后降低的趋势,与 ABA 的含量的变化相反,表明 GA_3 在油葵耐低盐胁迫中发挥重要作用。韩建秋^[24]研究外源 GA_3 处理对 NaCl 胁迫下二月兰种子萌发的影响,发现在较低浓度 NaCl 胁迫下, GA_3 处理对二月兰种子萌发具有促进作用,其发芽势、发芽率、发芽指数和活力指数均显著提高,但是在较高浓度 NaCl 胁迫下, GA_3 处理对二月兰种子萌发促进作用不明显。李萍等^[25]研究发现在一定盐浓度范围内,外源 GA_3 能缓解盐胁迫对盐角草种子萌发及幼苗生长的抑制作用。

综上所述,该研究通过对‘DW2177’、‘DW667’、‘高油1号’和‘新葵10号’等国内外4个油葵品种萌发期耐盐性的评价,发现了耐盐性最高的油葵品种‘新葵10号’。利用 HPLC 技术对其不同盐浓度下的萌发期内源激素含量进行了分析,得到以下2个方面的结论:在内源激素调控油葵耐盐性上, GA_3 在低盐浓度时发挥作用而 ABA 在高盐浓度时发挥作用;IAA 在调节油葵耐盐性方面发挥着核心的作用。该研究可为深入研究内源激素调控油葵耐盐性的机制方面提供参考。

参考文献

- [1] de la Vega A J, de Lacy I H, Chapman S C. Progress over 20 years of sunflower breeding in central Argentina[J]. Field Crops Research, 2007, 100(1): 61-72.
- [2] 周翔, 吴晓岚, 李云, 等. 盐胁迫下玉米幼苗 ABA 和 GABA 的积累及其相互关系[J]. 应用与环境生物学报, 2005, 11(4): 412-415.
- [3] Kefu Z H, Munns R, King R W. Absciscic acid levels in NaCl-treated barley, cotton and saltbush[J]. Functional Plant Biology, 1991, 18(1): 17-24.
- [4] Munns R, Tester M. Mechanisms of salinity tolerance[J]. Annu Rev Plant Biol, 2008, 59: 651-681.
- [5] LaRosa P C, Hasegawa P M, Rhodes D, et al. Absciscic acid stimulated osmotic adjustment and its involvement in adaptation of tobacco cells to NaCl[J]. Plant Physiology, 1987, 85(1): 174-181.
- [6] 吴锡冬, 李子芳, 张乃华, 等. 外源脱落酸对盐胁迫玉米激发能分配和渗透调节的影响[J]. 农业环境科学学报, 2006, 25(2): 312-316.
- [7] 华春, 周泉澄, 王小平, 等. 外源 GA_3 对盐胁迫下北美海蓬子种子萌发及幼苗生长的影响[J]. 南京师大学报(自然科学版), 2007, 30(1): 82-87.
- [8] Zolla G, Heimer Y M, Barak S. Mild salinity stimulates a stress-induced morphogenic response in *Arabidopsis thaliana* roots[J]. Journal of Experimental Botany, 2010, 61(1): 211-224.
- [9] 孙丹, 李宏博, 李千, 等. 北五味子体细胞胚发生过程中内源 IAA, ABA 和 GA_3 含量的动态变化[J]. 植物生理学报, 2013, 49(1): 70-74.
- [10] 卢巧梅, 张兰, 陈天文, 等. 液相色谱-串联质谱分析盐胁迫下植物激素的含量变化[J]. 中国科学(B辑), 2009(8): 785-792.
- [11] 李静, 崔继哲, 弭晓菊. 生长素与植物逆境胁迫关系的研究进展[J]. 生物技术通报, 2012(6): 13-17.
- [12] Park J E, Park J Y, Kim Y S, et al. GH3-mediated auxin homeostasis links growth regulation with stress adaptation response in *Arabidopsis*[J]. Journal of Biological Chemistry, 2007, 282(13): 10036-10046.
- [13] 魏爱丽, 陈云昭. IAA 对盐胁迫下大豆幼苗膜伤害及抗盐力的影响[J]. 西北植物学报, 2000, 20(3): 410-414.
- [14] 田聪, 张清斌, 顾祥, 等. 外源植物激素对东方山羊豆响应盐胁迫的调控效应初探[J]. 草业科学, 2012, 29(12): 1910-1914.
- [15] Chaves M M, Flexas J C, Pinheiro photosynthesis under drought and salt stress; regulation mechanisms from whole plant to cell[J]. Annals of Botany, 2009, 103(4): 551-560.
- [16] Ding L, Wang X C. The role of abscisic acid in stomatal responses to drought stress[J]. Agricultural Research in the Arid Areas, 1993, 11(2): 50-56.
- [17] Handa S, Handa A, Hasegawa P M, et al. Proline accumulation and the adaption of cultured plant cells to water stress[J]. Plant Physiol, 1986, 80(4): 938-945.
- [18] Creelman R A, Mason H S, Bensen R J, et al. Water deficit and abscisic acid cause differential inhibition of shoot versus root growth in soybean seedlings: Analysis of growth, sugar accumulation, and gene expression[J]. Plant Physiol, 1990, 92(1): 205-214.
- [19] 侯振安, 李品芳, 龚元石. 激素对植物耐盐性影响的研究现状与展望[J]. 石河子大学学报(自然科学版), 2000, 4(3): 239-244.
- [20] Cachorro P, Martínez R, Ortiz A, et al. Absciscic acid and osmotic relations in *Phaseolus vulgaris* shoots under salt stress[J]. J Plant Growth Regul, 1995, 14(2): 99-104.
- [21] 杨塞, 肖层林. 赤霉素的生物合成及促进水稻茎伸长机理研究进展[J]. 作物研究, 2004(5): 317-320.
- [22] 蔡蕾, 丁同楼, 王宝山. 外源 GA_3 、ABA 和 $Ca(NO_3)_2$ 缓解盐对小麦种子萌发的抑制作用[J]. 西北植物学报, 2004, 24(4): 583-587.
- [23] 郑平生, 金芳, 燕丽萍. 几种外源激素对盐胁迫下草莓试管苗生长的影响[J]. 甘肃农业大学学报, 2004, 39(3): 277-280.
- [24] 韩建秋. 外源 GA_3 对 NaCl 胁迫下二月兰种子萌发的影响[J]. 上海农业学报, 2012, 28(2): 59-62.
- [25] 李萍, 华春, 周泉澄, 等. 外源赤霉素对盐胁迫下盐角草种子萌发及幼苗生长的影响[J]. 安徽农业科学, 2011, 39(9): 5119-5121, 5237.

Effect of Salt Stress on Seed Germination and Endogenous Hormones of Oil Sunflower

WANG Peng^{1,2}, MA Ling-ling², CHEN Yu², ZHANG Zhen-yu², LI Lin-fang², LI Ya^{1,2}

(1. Jiangsu Key Laboratory for Bioresources of Saline Soils, Yancheng, Jiangsu 224002; 2. Institute of Botany, Jiangsu Province and Chinese Academy of Sciences, Nanjing, Jiangsu 210014)

Abstract: Oil sunflower is one of the important oil crops in China, which has the advantages of strong salt resistance. As the first period of development of oil sunflower, seed germination was important in its whole life history, while the research on salt tolerance was few. In present study, four domestic and foreign oil sunflower varieties including 'DW2177', 'DW667', 'Gaoyou No. 1' and 'Xinkui No. 10' were evaluated at germination stage of salt tolerance, and 'Xinkui No. 10' was found the most salt tolerant varieties. High performance liquid chromatography (HPLC) technique under different salt concentration on the germination of endogenous hormone contents of oil sunflower was conducted. The results showed that, in the hormonal regulation of salt tolerance of oil sunflower, GA_3 played a role in the low salt concentration and ABA played a role in high salt concentration; IAA played a central role in the regulation of salt tolerance of oil sunflower. The results were important for further study on hormonal regulation of salt tolerance of oil sunflower.

Keywords: *Helianthus annuus*; salt stress; hormone; high performance liquid chromatography