

常夏石竹耐盐突变体渗透调节的研究

王长泉^{1a}, 刘涛^{1b}

(1. 山东理工大学 a. 基建处 b. 生命科学学院, 山东 淄博 255049)

摘要: 在离体培养条件下利用 γ -射线作诱变剂获得耐0.5%、0.7%、1.0% NaCl的突变系,通过对稳定突变系植株叶片渗透剂含量及对渗透势贡献大小的测定表明:耐盐突变体叶中 K^+ 、游离氨基酸、 Na^+ 、脯氨酸的含量高于对照,其中脯氨酸和 Na^+ 积累最明显。而叶片中可溶性糖的含量、 K^+/Na^+ 低于对照。 Na^+ 对突变体植株叶片渗透势贡献最大,是最主要的渗透调节剂之一。耐盐突变体植株内存在渗透物质的再分配,叶内有吸钾排钠现象。

关键词: 常夏石竹; 离体培养; γ -射线; 耐盐突变体; 渗透调节

中图分类号: Q945 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3142(2006)03-0330-04

Study on the osmotic potential regulation of *Dianthus plumarius* variants

WANG Chang-quan^{1a}, LIU Tao^{1b}

(1. Shandong University of Technology, a. Department of Basic Construction, b. College of Life Sciences, Zibo 255049, China)

Abstract: By the use of γ -rays as mutagens, we obtained 0.5%, 0.7%, 1.0% NaCl-tolerant variants from the adventitious buds of *Dianthus plumarius* in vitro. The measure of osmoregulators of variants leaves and the contribution of each osmoregulator to osmotic potential indicate; the content of Na^+ , K^+ , proline and free amino acid in variant leaves were higher while the soluble sugar and K^+/Na^+ were lower than that of control plants; the accumulation of proline and Na^+ was notable. The Na^+ has the biggest contribution to the cytoplasm osmotic potential, so it is one of the most important osmoregulators. There is osmoregulators re-allocation in the variant plants, and there is assimilating- K^+ and eliminating- Na^+ mechanism in variants leaves.

Key words: *Dianthus plumarius*; γ -rays; salt-tolerant; osmotic potential regulation.

植物渗透调节是植物耐盐机理和耐盐能力的基础。植物耐盐性是一种综合性状表现,不同植物因其耐盐方式和耐盐机理不同,细胞和组织内生理代谢也不同,造成植物耐盐能力差异很大,目前没有一个公认的机制能解释所有植物对盐的适应性(翟凤林等,1989;赵可夫,1993;Slooten,2003)。研究常夏石竹(*Dianthus plumarius*)人工诱导耐盐突变体渗透剂数量和种类的变化,分析渗透调节的机理及生理意义,可为揭示耐盐机理和耐盐育种工作奠定

基础。

1 材料与方 法

1.1 材料

材料由山东理工大学组培室提供常夏石竹(*Dianthus plumarius*)的试管苗。

1.2 方法

耐盐突变系的诱导:采用王长泉等的方法(王长

收稿日期:2004-08-17 修回日期:2005-12-03

基金项目:山东理工大学科研基金资助[Supported by Research Foundation of Shandong University of Technology]

作者简介:王长泉(1970-),男,山东平原人,高级工程师,在读博士,从事植物育种和抗性生理研究,(E-mail)whitewater7006@eyou.com.

泉,2001),取经 5KR 的 γ -射线处理后的试管苗的叶片移入 MS+BA 2.0 mg/L+NAA 0.2 mg/L+NaCl 0.5% 的培养基上作第一轮选择,在第一轮选择末,选取生长良好的不定芽的叶片,转移到同样 NaCl 浓度的培养基上,进行第二轮选择,依次进行到第六轮选择末,选取生长良好的不定芽叶片转移到不含 NaCl 培养基上,清除可能对选择剂“上瘾”的非抗性细胞,一个月后选取不定芽叶片转入含 0.5% NaCl 或不含 NaCl 的 MS+BA 2.0 mg/L+NAA 0.2 mg/L 的培养基上诱导不定芽的分化,再生植株称耐 0.5% NaCl 的变异体。从 0.5% NaCl 选择第三轮开始,挑选生长良好的不定芽叶片,转入 0.7% NaCl、1% NaCl 的培养基上作为第一轮选择,至第六轮止,选取生长良好的不定芽叶片,按上述 0.5% NaCl 选择处理方法移入不含 NaCl 的培养基上诱导不定芽分化,再生植株分别称耐 0.7% NaCl 和耐 1% NaCl 的变异体。将未经 γ -射线辐射处理后的常夏石竹叶片按上述程序筛选得到耐 0.5% NaCl、0.7% NaCl、1% NaCl 变异体做对照。培养基中蔗糖浓度为 30 g/L,琼脂为 6.5 g/L,培养

光照强度为 200 $\mu\text{mol}/\text{m}^2 \cdot \text{s}$,光照时间 12 h/d,室温(20 \pm 2) $^{\circ}\text{C}$ 。取稳定突变体植株的功能叶和嫩枝测定生理指标。

细胞渗透势的测定:采用冰点下降法,采用 FM4 型冰点渗透压计(赵可夫,1993)。

脯氨酸含量测定:采用茚三酮比色法(赵可夫,1993)。

可溶性糖含量测定:80%乙醇提取,蒽酮比色法(赵可夫,1993)。

Na^+ 、 K^+ 含量测定:火焰光度法(赵可夫,1993)。

表 1 γ -射线处理对叶片不定芽变异率的影响
Table 1 Effects of γ -rays on variant frequency

NaCl 浓度 Concentration (%)	接种叶片数 No. of leaves	变异叶片数 Variant leaves	变异率/% Percentage of variant	LSR (0.05)
0.5 CK	900	21	2.33	a
5KR γ -射线处理	900	31	3.44	b
0.7 CK	900	10	1.11	c
5KR γ -射线处理	900	24	2.66	a
1.0 CK	900	4	0.44	d
5KR γ -射线处理	900	20	2.22	a

表 2 耐盐突变体有机渗透剂含量的变化

Table 2 The contents of organic osmoregulant in the variants

处理 Treatments (%)	脯氨酸 Pro. /mg/g · DW		可溶性糖 S. S/mg/g · DW		游离氨基酸 F. A /mg/g · DW	
	茎 Stems LSR 0.05	叶 Leaves LSR 0.05	茎 Stems LSR 0.05	叶 Leaves LSR 0.05	茎 Stems LSR 0.05	叶 Leaves LSR 0.05
CK	3.55 a	2.38 a	124.32 a	98.93 a	0.788 a	0.525 a
0.5	2.15 b	9.35 b	72.63 b	75.23 b	1.008 b	0.744 b
0.7	2.67 c	9.74 c	70.44 b	73.45 b	1.018 b	0.803 c
1.0	2.33 bc	9.47 b	68.67 b	70.33 b	1.123 b	0.814 c

游离氨基酸总量测定:靛氨酸盐法(赵可夫,1993)。

每一指标的测定采取同时取样、同时处理、同时测定的方法。每份样品测定取 3 个平行测定值的平均值,平均误差不大于 5%。

2 结果与分析

2.1 耐盐突变系的快速诱导

如表 1 示,用 γ -射线做诱变剂比不用诱变剂明显提高了变异率,如耐 1.0% 变异率 CK 为 0.44%, γ -射线处理后为 2.22%,处理后为 CK 的近 5 倍。

2.2 渗透剂含量的变化

分别取耐不同盐浓度的常夏石竹试管苗植株叶片和茎段测定渗透剂含量,用在 MS+BA 2.0 mg/L+NAA 0.2 mg/L 培养基上培养的不耐盐常夏石

竹试管苗作对照。所测数据列于表 2、3,耐不同盐浓度的植株渗透剂含量均有差异,但耐盐植株和不耐盐的对照植株比较,有一定的变化规律。

2.2.1 有机渗透剂含量的变化 (1)脯氨酸:从表 2 可以看出,三种耐盐突变体叶片中脯氨酸的含量是对照植株的 4 倍多,而茎内脯氨酸含量比对照植株略有降低,耐不同盐浓度的植株间差异不显著,和对照比较差异显著,说明耐盐植株中保持较高水平的脯氨酸。脯氨酸积累是植物体抵抗渗透胁迫的有效方式之一,大量研究表明,许多植物在盐胁迫下脯氨酸迅速积累,但也有学者认为脯氨酸积累并不代表抗盐能力大小(刘祖棋等,1994;赵可夫,1993;Slooten,2003)。通过本试验中脯氨酸含量分析,发现常夏石竹耐盐突变体植株中脯氨酸含量积累显著,但由表 4 可知即使叶片含量比对照提高了 3 倍多,也

不过占总渗透势的 0.5% 左右,因此脯氨酸不是常夏石竹耐盐突变体的主要渗透调节物质。

(2)可溶性糖含量:本试验结果表明,耐盐植株的可溶性糖含量无论是茎内还是叶内均明显低于对照,差异达到显著水平,而耐不同盐浓度的突变体之间差异不显著。可溶性糖是很多不耐盐植物的主要渗透调节剂,它也是合成别的有机溶质的碳架和能量来源,对细胞膜和原生质胶体亦有稳定作用,还可在细胞内无机离子浓度高时起保护酶类的作用(翟凤林等,1989;刘祖棋等,1994;赵可夫,1993;Slooten,

2003)。耐盐植株含糖量有所下降,是因为在盐胁迫下,植株既要建造躯体,又要合成一些渗透剂及积累矿质离子,很可能是由于呼吸消耗增大所致。

(3)游离氨基酸的含量:由表 2 看出,耐盐突变体植株茎内和叶内的游离氨基酸总量比对照增加,差异显著;耐 0.5%、与 0.7%、1.0% NaCl 耐盐突变体叶片游离氨基酸含量差异显著,耐 0.7% 和 1.0% NaCl 突变体间差异未到达显著水平。耐盐突变体植株内游离氨基酸的增加可能是由于随盐胁迫增大蛋白质合成能力降低,导致游离氨基酸相对积累。

表 3 耐盐突变体无机渗透剂含量的变化

Table 3 The contents of inorganic osmoregulant in the variants

处理 Treatments (%)	K ⁺ /mg/g · DW		Na ⁺ /mg/g · DW		K ⁺ /Na ⁺		渗透势 OP/-Mpa	
	茎 Stems	叶 Leaves	茎 Stems	叶 Leaves	茎 Stems	叶 Leaves	茎 Stems	叶 Leaves
	LSR 0.05	LSR 0.05	LSR 0.05	LSR 0.05	LSR 0.05	LSR 0.05	LSR 0.05	LSR 0.05
CK	29 a	21.33 a	4.34 a	1.23 a	6.68 a	17.34 a	2.23 a	4.34 a
0.5	16.8 b	29.34 b	50.5 b	41.25 b	0.33 b	0.71 b	7.25 b	11.25 b
0.7	14.5 c	35.26 b	52.34 b	43.62 b	0.27 b	0.81 c	10.04 c	14.23 c
1.0	11.2 d	37.34 b	58.44 c	45.46 b	0.19 c	0.82 c	12.33 d	15.48 d

2.2.2 无机渗透剂含量的变化 由表 3 可以看出,耐盐突变体植株内 Na⁺、K⁺、K⁺/Na⁺ 都有显著变化。Na⁺ 在耐盐突变体叶内和茎内含量明显高于对照,而且随着耐盐浓度的升高而增大;而变异植株叶内 K⁺ 含量比对照明显增加,而茎内 K⁺ 含量却比对照有明显降低,差异显著,而且随盐浓度的增加而下降更加明显;突变体茎、叶内 K⁺/Na⁺ 都低于对照,差异达到极显著水平。例如耐 0.5%、0.7%、1.0% NaCl 的突变体叶内 Na⁺ 含量是对照的 33.5、35.4、38.6 倍,K⁺ 含量是对照的 1.37、1.65、1.75 倍,K⁺/Na⁺ 比对照降低 20 多倍。突变体叶内 Na⁺ 含量始终低于茎内,K⁺ 含量高于茎内,说明 Na⁺、K⁺ 在突变体植株内存在再分配。突变体植株叶内 Na⁺、K⁺ 之和接近 80 mg/g · DW,这么高的 Na⁺、K⁺ 含量,很有利于调节细胞的渗透势,维持自身的水分平衡。

2.3 渗透剂和渗透势的相关性

从表 4 可以看出,不同渗透剂对渗透势的贡献大小在耐盐突变体和对照中有明显不同,各种渗透剂对对照植株叶片中渗透势的贡献由大到小顺序分别是 K⁺、游离氨基酸、可溶性糖、Na⁺、脯氨酸,随着植株耐盐性的提高,Na⁺ 对渗透势的贡献越来越大,K⁺ 贡献越来越小,至耐 0.7% NaCl 的突变体,Na⁺ 对渗透势的贡献到达最大,占总渗透势的 42.13%。而耐 1.0% NaCl 的突变体植株尽管几种

物质中 Na⁺ 贡献最大,但是其比例远远小于耐 0.7% NaCl 的突变体。

表 4 几种渗透剂和渗透势的关系

Table 4 The relation between osmoregulants and cytoplasm osmotic potential

处理 Treatments (%)	相对渗透势 Relative osmotic potential (%)					
	可溶性糖 S.S	游离氨基酸 F.A	脯氨酸 Pro.	Na ⁺	K ⁺	总和 Total
CK	8.20	27.41	0.59	2.78	37.63	76.62
0.5	6.18	18.9	0.42	20.81	21.76	68.07
0.7	7.82	17.23	0.43	42.34	14.69	82.15
1.0	7.35	16.28	0.46	29.7	6.00	59.87

耐盐变异体积累 Na⁺ 降低渗透势,这对突变体的渗透调节和维持水分平衡是有益的,但是 Na⁺ 的积累超过一定范围将有盐害甚至导致植株死亡(赵可夫,1993;刘祖棋等,1994),因此,耐低浓度 NaCl 的突变体,Na⁺ 可能是主要的渗透调节物质之一,而耐高浓度 NaCl 的突变体,Na⁺ 虽然也是调节物质之一,但是,主要靠 Na⁺ 贡献往往是不利的。在高浓度 NaCl 条件下突变体的生存还必将有赖于其他更重要的渗透调节物质。从耐 1.0% NaCl 的突变体植株看,上述五种物质对渗透势的贡献只占 60%,远远低于对照及其他浓度的突变体,也充分说明这一问题。在高盐浓度下,突变体植株内除上述五种渗透剂外还产生什么物质,需进一步研究。

随着耐盐性的提高,游离氨基酸、可溶性糖、脯

氨酸对渗透剂的贡献越来越小,这是由于 Na^+ 浓度的增加而使他们在渗透调节中占的比例下降所致。

2.4 植株内渗透物质的再分配和自我调节

在盐胁迫下,植株的叶片是最敏感的部位(翟凤林等,1989;赵可夫,1993;张海燕等,1998;Noble等,2002),突变体为了维持生长代谢过程的正常进行,首先要进行渗透调节维持水分平衡。随着外界盐胁迫的增大,体内可溶性物质及无机离子向叶片运输并积累。

由表 2 和表 3 可以看出,对照植株茎内和叶内 K^+ 、游离氨基酸、可溶性糖、 Na^+ 、脯氨酸五种物质的含量相差不多。只是叶中 K^+/Na^+ 明显高于茎内,其原因是由于叶中 Na^+ 浓度低于茎内。

变异体叶和茎内的物质含量变化是很明显的。首先,叶片内积累的大量的 Na^+ 、 K^+ 、脯氨酸比较显著,其中叶内 K^+ 、脯氨酸是茎内的几倍,而糖的含量也是叶内高于茎内,这些物质的变化是对照植物中所没有的。同时耐盐突变体叶内积累较多的 Na^+ 而茎内排除 K^+ ,导致茎内和叶内 K^+/Na^+ 都显著降低。因此耐盐突变体受到 NaCl 的影响,为了维持叶片的渗透势,将茎内大量的 K^+ 移至叶片,并在叶片积累相对高浓度的可溶性糖、脯氨酸和游离氨基酸,以提高叶片的渗透调节能力。

突变体在盐胁迫下,吸收并积累 Na^+ 降低渗透势,这对维持自身水分平衡很重要,而叶片对 Na^+ 也是相当敏感,当叶片 Na^+ 浓度达到一定值时,叶片则积累 K^+ 代替 Na^+ ,而将过量 Na^+ 的留在茎内,以减少过量 Na^+ 的毒害,此所谓“吸钾排钠”现象。细胞内积累这么高的 Na^+ 而不受毒害并能维持正常的生理功能,另一机制就是 Na^+ 在液泡内的离子区域化作用,避免了过高 Na^+ 对细胞质内细胞器和各种酶的毒害(Braun 等,1988;Davies 等,1994;Flowers 等,1997;Hole 等,1987;Qiu 等,2001)。

3 问题与讨论

耐盐性生理指标对植物适应不同盐度具有不同的指示意义,但植物耐盐机制是错综复杂的,是受植物多基因控制的(赵可夫,1993;刘祖祺等,1994;Hole 等 1987;Liu 等,1987),因此,生理代谢过程不同,表现出的生理指标也不同。从渗透调节的角度出发鉴定耐盐突变体是很重要的一个手段,随着突

变体耐盐性的提高,渗透调节能力增大,渗透调节物质积累。但是仅从个别物质的含量差异去鉴定突变体还是很不够的,例如仅从可溶性糖含量去分析可能得不到正确的结论。因此,在鉴定突变体时,既要注意渗透物质含量的变化,又要考虑这些物质对渗透调节的贡献,找出主要渗透调节物质,确定突变体渗透调节的类型。还必须结合植物的结构特点和盐胁迫下其他各项生理指标的变化趋势,才能较为准确地综合评价植物耐盐能力大小。

参考文献:

- 刘祖祺,张石城. 1994. 植物抗性生理学[M]. 北京:中国农业出版社,222—285,369—371.
- 赵可夫. 1993. 植物抗盐生理[M]. 北京:中国科学技术出版社.
- 翟凤林,曹鸣庆. 1989. 植物的耐盐性及其改良[M]. 北京:农业出版社.
- Braun Y, Hassidim M, Lerner HR, et al. 1988. Evidence for a K^+/Na^+ antiporter in membrane vesicles isolated from roots of halophytes *Atriplex nummularia*[J]. *Plant Physiology*, **87**:104—108.
- Davies JM, Hunt I, Sanders D. 1994. Vacuolar H^+ - pumping ATPases variable transport coupling ratio controlled by pH [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, **91**:8 547—8 551.
- Flowers TJ, Harvey DMR. 1997. Ions relation of salt tolerance Australian[J]. *J Plant Physiology*, **24**:89.
- Hole MG, Orcuff DM. 1987. The physiology of plant under stress[M]. New York, Jon Wiley & Son, 42—50.
- Liu YL, Mao CL, Wang LJ. 1987. Recent progress in stuics on salinity tolerance in plants[J]. *Plant Physiol Commun*, **23** (4):1—7.
- Noble CL, Kogers ME. 2002. Arguments for use of physiological criteria for improving the salt tolerance in crops[J]. *Plant and Soil*, **15**(4):146.
- Qiu NW, Yang HB, Wang BS. 2001. The antiporter and its relation to salt tolerance in plants [J]. *Plant Physiol Commun*, **37**(3):260—263.
- Slooten L. 2003. Improvement of the resistance of high plants against oxidative stress[J]. *Plant Physiol*, **107**:737—741.
- Wang CQ(王长泉), Song H(宋 恒), Wang XF(王希锋), et al. 2001. Slection of salt-tolerance variants from China pink (常夏石竹抗盐突变体的筛选)[J]. *Acta Hort Sin*(园艺学报), **28**(5):469—471.
- Zhang HY(张海燕), Zhang KF(赵可夫). 1998. Effects of salt and water stresses on osmotic adjusment of *Suaeda salsa* seedlings(盐分和水胁迫对盐地碱蓬幼苗渗透调节效应的研究)[J]. *Acta Bot Sin*(植物学报), **40**(1):56—61.