

硒对盐胁迫下耐盐常夏石竹生物量和渗透物质含量的影响

王长泉^{1,*} 刘涛²

山东理工大学¹基建处,²生命科学学院, 山东淄博 255049

摘要 培养基中加施适量外源硒能够显著提高能耐盐的常夏石竹生物量, 过氧化物酶(POD)活性, K^+/Na^+ 比值, K^+ 、 Na^+ 、叶绿素和游离脯氨酸含量; 降低质膜透性和可溶性糖含量; 植株叶细胞质膜和液泡膜V-H⁺-ATP酶的活性增加。

关键词 常夏石竹; 硒; 耐盐; 渗透物质; V-H⁺-ATP酶活性

Effects of Selenium on Biomass and Osmoregulator in Salt-tolerant *Dianthus plumarius* Under Salt Stress

WANG Chang-Quan^{1,*}, LIU Tao²

¹Department of Basical Construction, ²College of Life Science, Shandong University of Technology, Zibo, Shandong 255049, China

Abstract Salt-tolerant *Dianthus plumarius* variants were cultured in MS medium added 0.5% NaCl combined with different concentrations of selenium to study the effect of selenium nutrition on biomass and the osmoregulator content and some other physiological indexes. Increase of selenium supply in the medium could significantly enhance the biomass, proline content, peroxidase (POD) activity, ratio of K^+ and Na^+ , absolute contents of K^+ and Na^+ , leaf plasmalemma and tonoplast V-H⁺-ATPase activity, while the cell membrane permeability and soluble sugar content decreased in salt-tolerant *Dianthus plumarius* variants.

Key words *Dianthus plumarius*; selenium; salt-tolerant; osmoregulator; V-H⁺-ATPase activity

硒作为微量营养元素, 特别是作为抗氧化剂, 在植物抗逆中的作用愈来愈受到人们的重视^[1~4]。其生理作用主要表现为: 它是一些酶如谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)、磷脂过氧化物谷胱甘肽过氧化物酶(PHGPX)的辅助因子, 并促进这些酶的活性而起到清除氧自由基的作用; 以原料的形式直接参与蛋白质的合成; 为生物体内一种tRNA链的组成成分, 转运氨基酸以合成蛋白质以及硒本身对不同活性氧的直接非酶促清除作用^[1~5]。本文检测了不同施硒量能耐盐的常夏石竹生物量和渗透物质含量变化, 观察盐分胁迫下施加适量外源硒对耐盐的常夏石竹渗透调节的影响, 以期能为研究硒提高植物抗逆性的机制提供参考。

材料与方法

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

耐盐常夏石竹植株的诱导采用王长泉等^[6]的方法: 取常夏石竹试管苗的叶片经 1.29×10^8 C·kg⁻¹的 γ -射线处理后接种在MS+2.0 mg·L⁻¹ 6-BA+0.2

mg·L⁻¹ NAA+0.5% NaCl的培养基中诱导不定芽, 连续选择6轮, 获得能耐0.5% NaCl的不定芽, 将不定芽转入MS+0.4 mg·L⁻¹ IBA培养基上生根, 获得能耐盐植株。培养基中蔗糖浓度为30 g·L⁻¹, 琼脂为6.5 g·L⁻¹, 培养的光照度为 $16 \sim 24 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, 光照时间 $10 \sim 12 \text{ h} \cdot \text{d}^{-1}$, 于室温[(20±2) °C]中培养。取耐盐的常夏石竹叶片转移到MS+2.0 mg·L⁻¹ 6-BA+0.2 mg·L⁻¹ NAA+0.5% NaCl+0.1、0.2、0.4、0.6 mg·L⁻¹ Se培养基中诱导不定芽及MS+0.4 mg·L⁻¹ IBA+0.5% NaCl+0、0.1、0.2、0.4、0.6 mg·L⁻¹ Se的培养基中再生植株, 培养条件同上。一个月半月后取再生植株及其叶片测定各种生理指标, 每项指标重复3次。游离脯氨酸含量采用茚三酮比色法测定^[7]; K^+ 、 Na^+ 含量采用火焰光度法测定^[7]; 可溶性糖含量采用80%乙醇提取后蒽酮比色法测定^[7]; 叶绿素含量测定用丙酮比色法^[7]; 过氧化物酶

收稿 2004-09-10 修定 2005-01-17

资助 山东理工大学科研基金项目(4040-304037)。

*E-mail: whitewater7006@sina.com

(peroxidase, POD)活性以愈创木酚作底物,721型可见分光光度计上测定反应液在470 nm波长下的消光度^[7]; 细胞质膜透性测定用电导法^[7]。

制备细胞质膜和液泡膜微囊参照文献8和9的方法并加以修改。分别取耐盐的常夏石竹和未经盐处理的植株功能叶片30 g,洗净后置于捣碎器中,加入60 mL预冷的匀浆缓冲液[含有50 mmol·L⁻¹的Hepes-Tris (pH 8.0)、3 mmol·L⁻¹的乙二醇双(2-氨基乙醚)四乙酸(EGTA)、3 mmol·L⁻¹的MgSO₄、0.5% (W/V)聚乙烯吡咯烷酮(PVP)、2 mmol·L⁻¹的二硫苏糖醇(DTT)、0.2 mmol·L⁻¹的苯甲基磺酰氟(PMSF)、5% (V/V)甘油],并加入一定量的甘露醇,使溶液与叶片的渗透势相等,8次高速捣碎(3 s·次⁻¹,2次之间相隔10 s),捣碎后用4层纱布过滤,取滤液以13 000×g离心15 min(Beckman 45 Ti)除去线粒体、叶绿体及其他细胞碎片。取离心后的上清液以80 000×g离心30 min,离心后的沉淀用尖头细毛笔小心搅起并悬浮在18 mL的悬浮液(含0.25 mol·L⁻¹甘露醇的匀浆液)中,匀浆器混合后,小心地把这种浓缩的膜微囊铺在24% (W/W, 3 mL):34% (3 mL):41% (4 mL)蔗糖梯度溶液[含5 mmol·L⁻¹的Hepes-Tris (pH 6.5)、1 mmol·L⁻¹的DTT]的表面,以100 000×g(Beckman SW 40Ti)离心2 h后用吸管小心收集0%与24%界面的白色物质(液泡膜微囊)及34%与41%界面的淡黄色物质(细胞质膜微囊),用含有3 mmol·L⁻¹EGTA、10 mmol·L⁻¹的Hepes-Tris (pH 6.5)、1 mmol·L⁻¹的DTT、30 mmol·L⁻¹的MgSO₄、0.2 mmol·L⁻¹的PMSF的稀释液稀释3~5倍,再以100 000×g(Beckman 65Ti)离心30 min。离心后的沉淀用尖头细毛笔小心搅起并悬浮在储存液[含有40%甘油、2 mmol·L⁻¹的DTT、30 mmol·L⁻¹的MgSO₄、10 mmol·L⁻¹的Hepes-Tris (pH 6.5)]中,用匀浆器混匀后分装于0.5 mL Eppendorf管中,放在液氮中冷冻后,置于-70℃超低温冰箱保存备用。以上操作均在0~4℃条件下完成。

V-H⁺-ATP酶水解活性参照Verstappen等^[10]和Fischer-Schliebs等^[11]的方法测定,质膜V-H⁺-ATP酶的活性用保温介质中有无0.1 mmol·L⁻¹的NaVO₄时酶活性之差表示,液泡膜V-H⁺-ATP酶活性用保温介质中有无50 mmol·L⁻¹的KNO₃时酶活性之差表

示,800 μL反应液中含有30 mmol·L⁻¹的Tris-Mes (pH 7.5)、0.1 mmol·L⁻¹的(NH₄)₂MoO₄、1 mmol·L⁻¹的NaN₃、1 mmol·L⁻¹的MgSO₄、0.03% (V/V) Triton X-100、3 mmol·L⁻¹的ATPNa₂、50 mmol·L⁻¹的KCl,加入含20 μg膜蛋白的膜微囊启动反应,反应温度为37℃,反应时间为30 min,反应结束后加入反应终止液[0.1% SDS、0.35 mol·L⁻¹ H₂SO₄、0.5% (NH₄)₂MoO₄],再加入50 μL 10%维生素C (VC),反应显色40 min后于750 nm处比色。

结果与讨论

1 硒对耐盐的常夏石竹生物量的影响

由图1可知,硒明显促进试管苗的生长,提高试管苗的生物量,差异达显著水平。施硒量超过0.2 mg·L⁻¹时试管苗生长受抑,生物量不再增加,甚至反而下降,表明浓度过高的硒对试管苗生长不利。

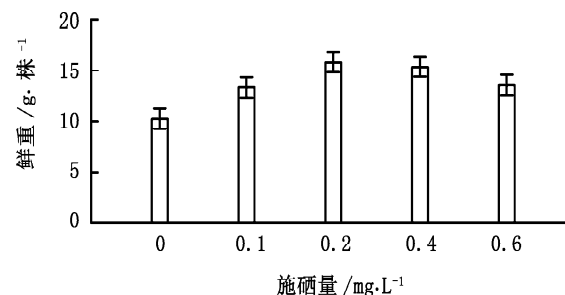


图1 硒对耐盐的常夏石竹生物量的影响

Fig. 1 Effect of Se on the fresh weight of salt-tolerant *Dianthus plumarius* plants

表中数据用双因素方差法分析, $P < 0.05$, 差异达显著水平。

2 硒对耐盐的常夏石竹叶中渗透调节物质和叶绿素含量、POD活性以及质膜透性的影响

表1显示:(1)在施硒培养基上分化的耐盐常夏石竹植株体内游离脯氨酸含量增加,脯氨酸的含量变化趋势和植物生长量的变化趋势一致,而可溶性糖的含量变化趋势恰好相反,说明脯氨酸对耐盐常夏石竹植株生长有一定的渗透调节作用,而可溶性糖则否;(2)培养基加硒后,耐盐的常夏石竹植株内的K⁺/Na⁺比值、K⁺和Na⁺绝对含量都增加;(3)加硒后的耐盐植株叶绿素含量略有增

表1 硒对耐盐的常夏石竹某些生理指标的影响

Table 1 Effects of Se on some physiological indexes of salt-tolerant *Dianthus plumarius*

| 施硒量/ mg·L ⁻¹ | 脯氨酸含量/ μg·g ⁻¹ (DW) | 可溶性糖含量/ mg·g ⁻¹ (DW) | K ⁺ /Na ⁺ 比值 | K ⁺ 含量/ mg·g ⁻¹ (DW) | Na ⁺ 含量/ mg·g ⁻¹ (DW) | 叶绿素含量/ mg·g ⁻¹ (DW) | POD含量/ OD·min ⁻¹ ·g ⁻¹ (DW) | 膜透性/ % |
|----------------------------|-----------------------------------|------------------------------------|---------------------------------------|---|--|-----------------------------------|--|-----------|
| 0 | 11.07** | 84.33* | 0.71* | 29.34* | 41.25* | 17.46* | 0.778* | 38.71* |
| 0.1 | 16.53** | 68.45* | 0.80* | 35.26* | 43.62* | 20.11* | 0.934* | 35.56* |
| 0.2 | 17.52** | 72.28* | 0.82* | 37.34* | 45.46* | 22.37* | 1.167* | 32.58* |
| 0.4 | 18.02** | 70.46* | 0.83* | 39.42* | 47.71* | 24.23* | 1.065* | 34.52* |
| 0.6 | 15.03** | 66.54* | 0.75* | 33.23* | 44.05* | 19.46* | 0.805* | 36.10* |

表中数据用双因素方差法分析。*表示5%水平,即差异显著;**表示1%水平,即差异极显著。表2同此。

加;(4)耐盐的常夏石竹叶中POD活性随着硒浓度的升高而增强,硒浓度高于0.2 mg·L⁻¹时,POD活性即呈下降趋势;(5)盐胁迫下施硒后常夏石竹的细胞质膜透性下降。

3 硒对耐盐的常夏石竹细胞质膜和液泡膜V-H⁺-ATP酶水解活性的影响

从表2可以看出,随着硒浓度的提高,硒处理后的耐盐常夏石竹叶细胞质膜V-H⁺-ATP酶活性一直上升,超过0.4 mg·L⁻¹后增长渐缓;液泡膜V-H⁺-ATP酶活性也随着硒浓度的升高而上升,差异达到极显著水平。这显示常夏石竹对K⁺、Na⁺的选择性吸收能力增强,因而其耐盐性也增强。

表2 硒对耐盐的常夏石竹叶细胞质膜和液泡膜V-H⁺-ATP酶活性的影响

Table 2 Effects of Se on the V-H⁺-ATPase activity of plasmalemma and tonoplast in leaves of salt-tolerant *Dianthus plumarius*

| 施硒量/mg·L ⁻¹ | V-H ⁺ -ATPase活性/μmol(Pi)·mg ⁻¹ (蛋白)·h ⁻¹ | |
|------------------------|---|--------|
| | 细胞质膜 | 液泡膜 |
| 0 | 24.2** | 14.5** |
| 0.1 | 30.4** | 19.6** |
| 0.2 | 32.0** | 22.4** |
| 0.4 | 34.1** | 23.8** |
| 0.6 | 35.3** | 24.2** |

参考文献

- 1 陈铭, 刘里另. 高等植物的硒营养及在食物链中的作用. 土壤通报, 1996, 27(4): 185~188
- 2 刘元英, 罗盛国. 谷胱甘肽过氧化酶活性与连作大豆的抗逆性. 东北农业大学学报, 1998, 29(1): 1~6
- 3 郭静成, 尹顺平. 硒对高等植物中谷胱甘肽过氧化酶活性及谷胱甘肽、丙二醛含量的影响. 见: 中国植物生理学会第七次全国会议学术论文汇编, 1996. 306
- 4 Stadtman TG. Selenium-dependent enzymes. Ann Rev Biochem, 1990, 49: 93~110
- 5 Slooten L. Improvement of the resistance of high plants against oxidative stress. Plant Physiol, 2003, 107: 737~743
- 6 王长泉, 宋恒, 王希锋等. 常夏石竹抗盐突变体的筛选. 园艺学报, 2001, 28(5): 469~471
- 7 赵可夫. 植物抗盐生理. 北京: 中国科学技术出版社, 1993
- 8 邱全胜, 梁厚果, 焦新之等. 小麦根质膜原位膜微囊与翻转膜微囊氧化还原特性的比较. 植物生理学报, 1996, 22(2): 171~176
- 9 Williams LE, Hall JL. ATPase and proton-translocating activities in plasma membrane-enriched fraction from cotyledons of *Ricinus communis*. J Exp Bot, 1989, 40(22): 1205~1213
- 10 Verstappen R, Ranostaj S, Rausch T. The hexose transporters at plasma membrane and the tonoplast of transformed plant cells: Kinetic characterization of two distinct carriers. Biochim Biophys Acta, 1991, 1073: 366~373
- 11 Fischer-Schliebs E, Ball E, Berndt E et al. Differential immunological cross-reaction with antisera against the V-ATPase of *Kalanchoe daigremontiana* reveal structural differences of V-ATPase subunits of different plant species. Biol Chem, 1997, 378: 1131~1139