

唐古特白刺悬浮细胞对盐胁迫的生长与生理响应

倪建伟^{1,2}, 杨秀艳^{1,2}, 张华新^{2*}, 武海雯^{1,2}, 许秀玉³, 刘涛²

(1. 中国林业科学研究院林业研究所,北京 100091; 2. 国家林业局盐碱地研究中心,北京 100091;
3. 广东省林业科学研究院,广东 广州 510520)

摘要:以唐古特白刺悬浮细胞为研究对象,对比分析了不同盐(NaCl)浓度(0、100、150、200、250 mmol·L⁻¹)胁迫下细胞生长状态和可溶性蛋白、可溶性糖、脯氨酸、过氧化物酶(POD)、超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)等生理生化指标随培养时间的动态变化及其相关性。结果表明:(1)盐胁迫对白刺悬浮细胞生长状态影响明显,细胞生长符合 Logistic 生长曲线模型,其中,盐浓度 100 mmol·L⁻¹胁迫下白刺悬浮细胞生长速度最快,之后随着盐浓度的增加细胞生长逐渐受抑。(2)盐胁迫对白刺细胞生理生化指标影响明显,在培养初期,各指标随盐浓度的增加而增加,但随着培养时间的延长这种趋势逐渐减弱,其中,脯氨酸、SOD、MDA 含量在培养过程中逐渐表现为随盐浓度的增加呈先增高后降低的趋势;在相同盐浓度胁迫下,渗透调节指标中,可溶性糖含量随培养时间的延长最先达到最大值,抗氧化酶中的 SOD 较 POD 更早达到最大值,分别是渗透调节和抗氧化酶调节的第一道防线。(3)白刺细胞鲜质量分别与可溶性糖、丙二醛含量呈极显著和显著负相关,各生理指标之间的相关性均达极显著正相关,表明盐胁迫下白刺细胞内生理生化的平衡是通过多种物质的协同作用来调节的。

关键词:唐古特白刺;盐生植物;悬浮细胞;生理指标;盐胁迫;耐盐机理

中图分类号:S718.43

文献标识码:A

Growth and Physiological Response of *Nitraria tangutorum* to Salt Stress

NI Jian-wei^{1,2}, YANG Xiu-yan^{1,2}, ZHANG Hua-xin², WU Hai-wen^{1,2}, XU Xiu-yu³, LIU Tao²

(1. Research Institute of Forestry, Chinese Academy of Forestry, Beijing 100091, China; 2. Research Center of Saline and Alkali Land of State Forestry Administration, Beijing 100091, China; 3. Guangdong Academy of Forestry, Guangzhou 510520, Guangdong, China)

Abstract: Taking *Nitraria tangutorum* suspension cells as material and treated by different salt concentrations (0, 100, 150, 200 and 250 mmol·L⁻¹ NaCl), the growth characteristics of cells and the dynamic changes and correlations of physiological indexes with time, including soluble protein, soluble sugar, proline, peroxidase (POD), superoxide dismutase (SOD) and malondialdehyde (MDA), were analyzed. The results are as follows. (1) Salt treatment could significantly affect the growth of suspension cells, the cells growth conform to the Logistic growth curve model and the growth of suspension cells treated by 100 mmol·L⁻¹ NaCl was the fastest, and with the salt concentration increasing the growth were inhibited. (2) Salt treatment could significantly affect the physiological indexes, and at the early stages of culture all the indexes increased with the salt concentration increasing. While this trend decreased gradually with the extending of incubation time and the Proline, SOD, MDA increased in initial stage and then decreased with the salt concentration increasing in the later period of culture. Under same salt concentration, the soluble sugar got to the maximum at first in the osmotic adjustment index and the SOD got to the maximum in initial stage in the antioxidant enzymes index. And they are the first line of defending the salt stress in osmotic adjust-

收稿日期:2014-06-30

基金项目:中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金项目(CAFYBB2012009;CAFYBB2011005-5)

作者简介:倪建伟,河北邢台人,从事耐盐碱植物资源利用等方面的研究。

* 通讯作者:研究员,博士生导师,从事耐盐碱植物遗传育种方面的研究。

ment and antioxidant enzymes respectively. (3) The fresh weight of suspension cells was significant and fearfully significant negatively correlated with the contents of soluble sugar and MDA. All the physiological indexes showed a significantly positive correlation. It indicated that the balance of cells internal physiological metabolic processes was regulated by various substances synergies under the salt environment.

Key words: *Nitraria tangutorum*; halophytes; suspended cells; physiological index; salt stress; salt-tolerance mechanisms

盐胁迫是抑制植物正常生长发育的主要环境因素之一,主要体现在渗透胁迫、离子毒害以及盐胁迫的次级反应,如氧化胁迫对细胞核、细胞质或细胞膜造成危害。植物通过调节体内的一系列生化反应应激盐分胁迫,如调节细胞代谢的强弱、改变代谢途径来积累或产生渗透调节类、抗氧化酶类和其他适应性物质以抵御环境迫害。通常可以通过检测胁迫下植物的生理生化指标来探索其胁迫响应机理,其中,可溶性蛋白、可溶性糖、脯氨酸、无机离子、甜菜碱等常作为评价植物渗透调节能力的指标,过氧化物酶(POD)、超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)等酶类常做为应答胁迫的重要酶类指标^[1-5],均能体现逆境胁迫的应答水平或胁迫程度。许多研究表明,植物的不同组织器官如根、茎、叶等及不同组织形态如植株、愈伤组织、悬浮细胞等均可作为研究植物抗性的材料,其中,在悬浮细胞培养过程中,从接种到分离再培养细胞的时间为1个培养周期,因此,能在短时间内完成整个细胞培养周期的取材,且植物悬浮细胞具有分散性好、响应敏感、易于操控等诸多特点,已广泛应用于冰叶日中花(*Mesembryanthemum crystallinum* L.)^[6-7]、苜蓿(*Medicago sativa* L.)^[8]、毛白杨(*Populus tomentosa* Carr.)^[9]、烟草(*Nicotiana tabacum* L.)^[10-11]等多种植物的抗性研究中。这从细胞水平研究了植物盐胁迫下的生理生化变化,探讨了耐盐机理;同时,悬浮细胞可作为多种生物细胞学的研究材料,如细胞信号转导、细胞程序化死亡及相关组学的研究^[12-15]。因此,利用悬浮细胞实时检测指标变化,研究植物逆境动态响应及多种检测分析技术的结合使用,对更全面的探讨植物耐盐机理有重要意义。

白刺属(*Nitraria* L.)是蒺藜科(Zygophyllaceae)的一个小属,为多分枝耐盐碱、旱生型低矮灌木,适应干旱、盐碱的能力强,具有耐脱水、抗高温和保水力强的生理特性^[16]。唐古特白刺(*Nitraria tangutorum* Bobr.)是我国特有白刺种,主要分布在我国西北地区的干旱、盐碱化地区,在内蒙古、新疆、宁夏、

甘肃、青海、陕西等地均有分布^[17-18]。前人对其系统学、生物学、营养开发利用、遗传转化等多方面展开了研究,取得了可喜的进展^[17-18]。在耐盐性上,前人研究了唐古特白刺大田植株、盆栽幼苗、组培幼苗和愈伤组织在盐胁迫下的生理效应,均得出唐古特白刺具有一定的耐盐能力^[19-20],但由于对整个生长过程中取材次数较少,指标动态响应目前尚不清晰,且利用唐古特白刺悬浮细胞研究其特性的报道鲜有报道。本研究以唐古特白刺悬浮细胞为试验材料,通过研究不同盐浓度在整个培养周期中细胞的生长及生理指标(可溶性蛋白、可溶性糖、脯氨酸、过氧化物酶(POD)、超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA))的动态变化和各指标间的相关性,探讨了盐分对白刺细胞生长过程和生理代谢的影响,旨在揭示白刺细胞对盐环境的适应能力和适应机制,为盐生植物白刺的突变体筛选、工程育种、细胞遗传转化、良种选育等提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料与试验设计

唐古特白刺悬浮细胞来源于野生唐古特白刺(甘肃省张掖市)茎段的愈伤组织。采用MS液体培养基(MS+6-BA 0.4 mg·L⁻¹+2,4-D 1.5 mg·L⁻¹+NAA 0.2 mg·L⁻¹+肌醇 100 mg·L⁻¹+蔗糖 25 g·L⁻¹),pH值5.8,温度27℃,置于120 r·min⁻¹的摇床上黑暗培养。培养基中加入不同浓度的NaCl(0、143、214、286、357 mmol·L⁻¹,即NaCl含量为0、8.348、12.523、16.697、20.871 g·L⁻¹)的继代培养液,高压灭菌。每瓶接种15 mL同种母液(细胞鲜质量为0.73 mg·mL⁻¹)于150 mL锥形瓶中,分别加入35 mL相应的继代培养液,得到NaCl浓度分别为0、100、150、200、250 mmol·L⁻¹的培养液(即NaCl含量为0、5.844、8.766、11.688、14.610 g·L⁻¹)。初期细胞适应培养环境,自培养第2天开始,每2 d取样1次,每次各处理均取3瓶,分别检测各项指标。用抽滤法将细胞培养液除去,期间用蒸馏

水洗3次以去除多余培养基并称质量,计算细胞的鲜质量($\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$)。将鲜细胞迅速放置于液氮中,细胞冷冻失水后研磨成细胞干粉。以细胞干粉质量为细胞干质量,测定渗透调节类、抗氧化酶类和MDA等各项指标。

1.2 试验方法

1.2.1 细胞生长 Logistic 方程的确定 利用 Logistic 方程模型 $Y = K_m / (1 + ae^{-bt})$ (Y 为细胞累积鲜质量; t 为细胞培养时间; K_m 为生长极限; a 、 b 为待定常数), 对不同盐浓度处理的白刺细胞生长过程进行拟合, 确定拟合参数, 得到拟合方程和拟合度, 分别对 Logistic 方程二阶求导, 并令其等于 0, 解即为细胞生长拐点(快速生长中期)^[21]。

1.2.2 渗透调节类物质的测定 可溶性糖含量采用蒽酮比色法^[22]测定, 可溶性蛋白含量采用考马斯亮蓝 G-250 染色法^[22]测定, 脯氨酸含量采用酸性茚三酮比色法^[23]测定。

1.2.3 抗氧化酶活性的测定 过氧化物酶(POD)活性采用磷酸愈创木酚比色法^[22]测定, 超氧化物歧化酶(SOD)活性采用氮蓝四唑(NBT)比色法^[22]测定。

1.2.4 丙二醛(MDA)含量的测定 丙二醛(MDA)含量采用硫代巴比妥酸(TBA)比色法^[22]测定。

1.2.5 数据处理及分析 利用 SPSS19.0 统计软件和 Excel 2010 对各指标进行统计分析和图形绘制, 其中, 方差分析取 $P < 0.05$ 为差异显著; 多重比较分析方法采用 Duncan 法, 相关分析采用 Pearson 相关系数, 双侧显著性检验。利用 Matlab 拟合曲线工具箱(CFtool)对生长动态进行 Logistic 曲线拟合, 确定拟合参数和方程。

2 结果与分析

2.1 不同盐处理下唐古特白刺悬浮细胞的生长特征

从细胞鲜质量随培养时间变化的折线图(图1)可看到: 盐处理下, 白刺悬浮细胞生长与对照组差异明显; 培养前4d细胞处于生长延迟期, 生长缓慢, 处理间差别不明显; 从第4天开始, 细胞鲜质量迅速增加, 其中, $100 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl 处理下, 细胞鲜质量增长最快; 当盐浓度为 $150 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 或更高时, 细胞生长比对照缓慢; 在 200 、 $250 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 处理下, 细胞由于受到盐离子毒害或较强渗透胁迫, 在整个培养周期中都受到抑制, 生长缓慢, 培养12d后

细胞鲜质量分别为 0.41 、 $0.35 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, 远低于对照(鲜质量 $0.69 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$)和其它处理。 $100 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 盐处理, 在培养第10天细胞进入稳定期, 细胞数量较高且保持稳定(鲜质量 $0.83 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$)。因此, 宜选用第10天的培养周期进行继代培养。

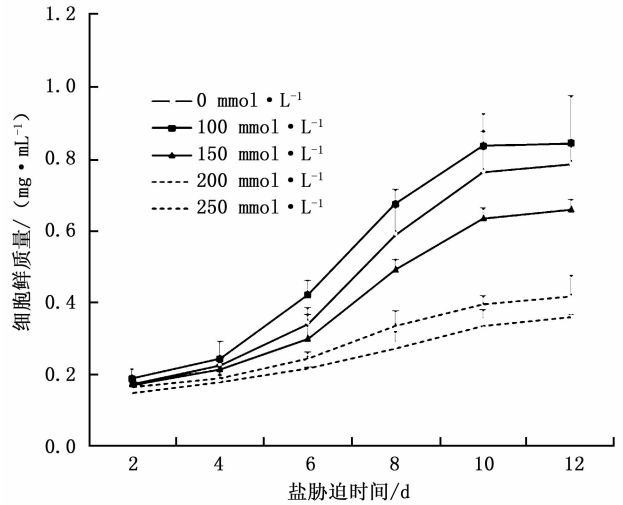


图1 不同浓度盐胁迫下唐古特白刺悬浮细胞鲜质量随培养时间的变化

用 Logistic 方程 $Y = K_m / (1 + ae^{-bt})$ 拟合白刺悬浮细胞生长过程, 由各处理拟合方程结果(表1)可知: 盐处理下细胞生长曲线符合 Logistic 模型, 各拟合度(R^2)均达 0.974 以上, 可用该方程模型估测细胞生长过程的鲜质量变化。由生长极限值(K_m)可知: 盐浓度为 $100 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 处理的细胞能达到的生长极限值最大, 为 $0.9379 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, 且可最先达到快速生长中期, 为培养后的第 6.149 天。对照和盐浓度高于 $100 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的处理, 白刺生长极限值均变小, 快速生长中期时间延后, 表明细胞生长受到一定程度的抑制。

表1 唐古特白刺悬浮细胞生长 Logistic 曲线拟合方程

盐浓度/ ($\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)	Logistic 方程	快速生长 中期/d	拟合度 (R^2)
0	$y = \frac{0.9100}{1 + 14.920e^{-0.401t}}$	6.7483	0.9776
100	$y = \frac{0.9379}{1 + 15.120e^{-0.442t}}$	6.1490	0.9818
150	$y = \frac{0.8037}{1 + 10.310e^{-0.336t}}$	6.9500	0.9749
200	$y = \frac{0.5453}{1 + 4.395e^{-0.228t}}$	6.4933	0.9803
250	$y = \frac{0.5444}{1 + 4.276e^{-0.178t}}$	8.1551	0.9888

2.2 不同盐处理对白刺悬浮细胞有机渗透物质的影响

2.2.1 可溶性糖含量的变化 可溶性糖是植物受胁迫后的主要渗透调节物质之一,也是合成有机溶质的碳骨架和能源物质^[3]。由图2可知:在不同盐浓度下,白刺悬浮细胞的可溶性糖含量均比同期对照的高,且随盐浓度的增高基本呈增加趋势;对照和100 mmol·L⁻¹盐处理下,可溶性糖含量随培养时间的延长呈增加趋势;150、200 mmol·L⁻¹处理下呈先增加后减少的趋势,分别在第4天和第6天达到最大值,分别为68.64和71.25 mg·g⁻¹;250 mmol·L⁻¹处理第2天即达到最大值(82.90 mg·g⁻¹),且整个培养周期中可溶性糖含量与对照差异显著。100 mmol·L⁻¹处理第4天细胞可溶性糖含量略微降低,可能与白刺细胞适应低盐环境有关。盐胁迫促使了细胞内可溶性糖含量的增加,且在高盐浓度(250 mmol·L⁻¹)下其含量增加迅速,随后又逐渐降低趋于平衡,说明白刺细胞可溶性糖响应盐胁迫迅速,自我调节能力较强,这对维持细胞渗透平衡起积极作用。

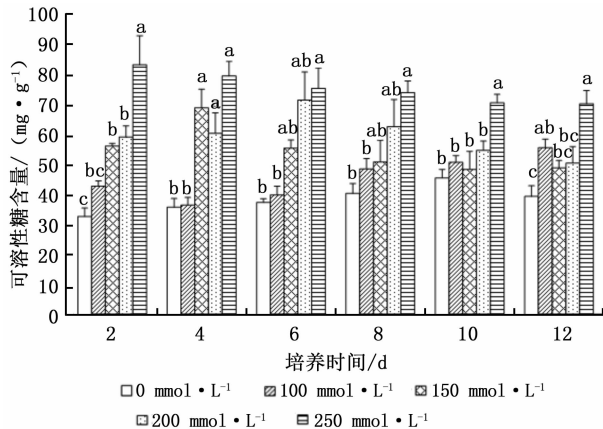


图2 不同浓度盐胁迫对唐古特白刺悬浮细胞可溶性糖含量的影响(相同培养时间的不同字母表示差异显著($P < 0.05$),下同)

2.2.2 可溶性蛋白含量的变化 盐胁迫下,非盐生植物体内蛋白质合成通常会受到抑制,而盐生植物与抗逆有关的盐胁迫蛋白合成通常会加强^[24]。由图3可知:盐胁迫下的白刺悬浮细胞可溶性蛋白含量始终高于同期的对照,且随盐浓度的增高其含量基本呈增加趋势;对照和100 mmol·L⁻¹处理随培养时间的延长其含量逐渐增加,培养12 d后其增加量分别为0.93、2.77 mg·g⁻¹;150、200、250 mmol·L⁻¹处理下,其含量随培养时间的延长呈先增加后降低的趋势,分别在第8、8、4天达到最大值,分别为

9.55、10.07、10.93 mg·g⁻¹,比同期对照的高113.8%、125.5%、160.1%。综上可知,白刺细胞在盐胁迫下通过产生特定的逆境蛋白以增加渗透势或活性酶类物质来抵御逆境,而在高盐浓度(150、200、250 mmol·L⁻¹)下,随培养时间的延长可溶性蛋白含量呈下降趋势,表明细胞通过降低代谢速率来提高对盐胁迫的适应能力。

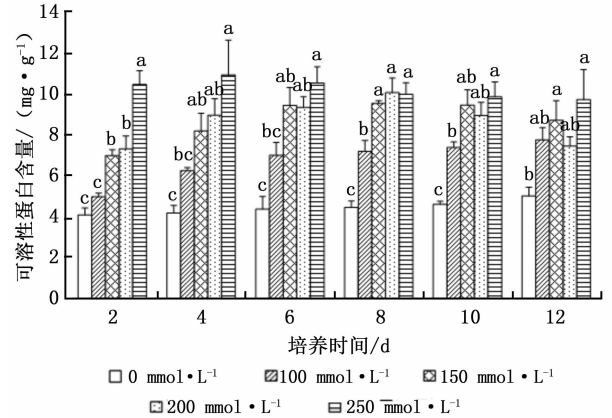


图3 不同浓度盐胁迫对唐古特白刺悬浮细胞可溶性蛋白含量的影响

2.2.3 脯氨酸含量的变化 脯氨酸是植物抵御盐胁迫的主要渗透调节物质之一,能与细胞内一些化合物形成聚合物,保护细胞微环境,同时也参与氮代谢和能量代谢等作用^[25]。由图4可知:在盐胁迫下,白刺悬浮细胞的脯氨酸含量始终高于同期的对照。对照和100 mmol·L⁻¹处理的脯氨酸含量随培养时间的延长呈增加趋势,最高分别达0.38和0.49 μg·g⁻¹,而150、200、250 mmol·L⁻¹处理呈先增加后降低的趋势,且均在培养第8天达最高值(与对照差异显著),分别为0.60、0.71、0.66 μg·g⁻¹,比同期对照高84.6%、118.5%、103.1%。

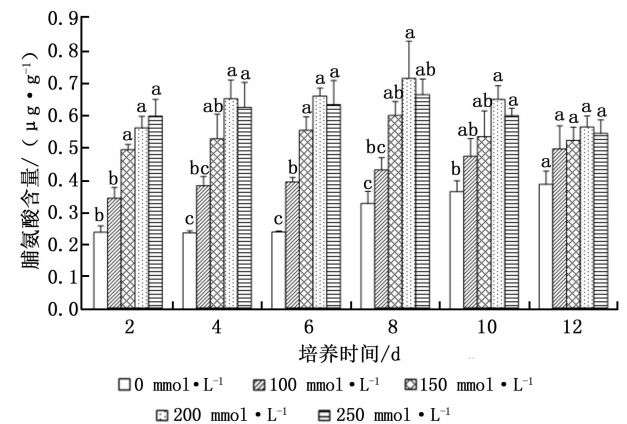


图4 不同浓度盐胁迫对唐古特白刺悬浮细胞脯氨酸含量的影响

2.3 不同盐处理对唐古特白刺悬浮细胞抗氧化酶活性的影响

2.3.1 盐处理对过氧化物酶(POD)活性的影响

POD 和 SOD 2 种活性酶对植物受胁迫后的生物膜系统修复起重要作用。由盐处理唐古特白刺悬浮细胞后 POD 活性发生变化(图 5)可知:盐处理细胞的 POD 活性明显比对照的高,且随盐浓度的增加其活性越强,随培养时间的延长,呈先增加后降低的趋势,其中,100、150 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 处理在培养第 10 天时 POD 活性达到最大值,分别为 13.80、16.62 $\text{U} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$,在 200、250 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 处理下第 8 天达到最大值,为 16.61 和 17.61 $\text{U} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$;培养 8 d 后,处理与对照的 POD 活性差异显著,POD 活性的显著增加对清除细胞内的自由基、维护细胞内代谢平衡有重要作用。

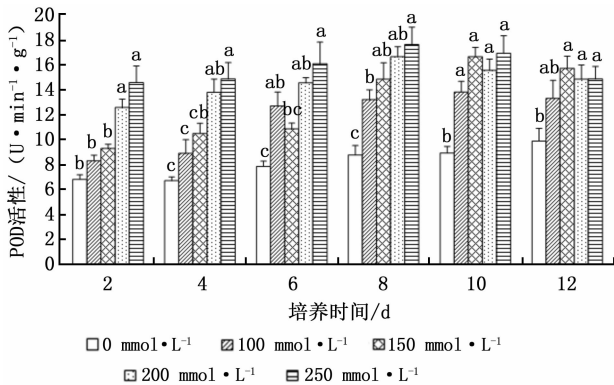


图5 不同浓度盐胁迫对唐古特白刺悬浮细胞 POD 活性的影响

2.3.2 盐处理对超氧化物歧化酶(SOD)活性的影响

SOD 可以催化植物体内超氧自由基的歧化作用,清除超氧负离子自由基,调节活性氧代谢平衡,减轻细胞脂膜过氧化作用^[26]。由图 6 可知:各处理白刺悬浮细胞的 SOD 活性始终比对照的高;对照及 100 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 盐处理的 SOD 活性随培养时间的增加呈增强趋势;150、200 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 处理的 SOD 活性随培养时间的增加呈先增加后降低的趋势,分别在第 6 天和第 4 天达到最大值,分别为 134.72、136.47 $\text{U} \cdot \text{g}^{-1}$;250 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 处理在培养第 2 天时 SOD 活性达到最大值(125.08 $\text{U} \cdot \text{g}^{-1}$),之后逐渐降低。培养前 10 d,对照与 100 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 盐处理的 SOD 活性差异不显著,而与 150、200、250 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 处理的差异显著;培养 12 d,对照与各处理均差异显著,表明细胞通过 SOD 活性的变化来适应盐胁迫环境。

2.4 不同盐处理对白刺悬浮细胞膜损伤的影响

盐胁迫能引起细胞膜的透性增加而使脂膜受

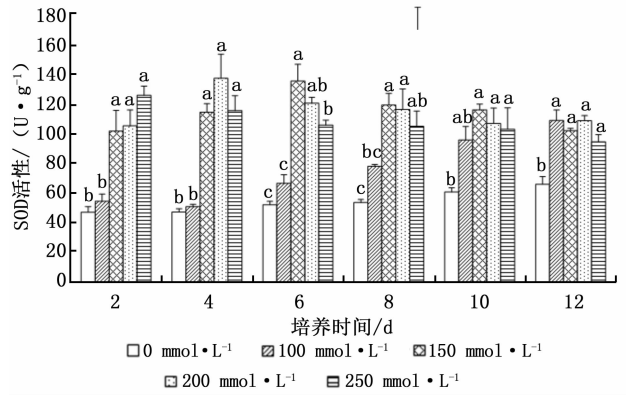


图6 不同浓度盐胁迫对唐古特白刺悬浮细胞 SOD 活性的影响

损,丙二醛(MDA)是细胞脂膜过氧化主要产物之一,能体现细胞质膜损伤或变性程度。由图 7 可知:盐胁迫和培养时间影响细胞的 MDA 积累,其中,对照的 MDA 含量随培养时间的延长变化不大,MDA 含量为 0.29~0.37 $\text{nmol} \cdot \text{g}^{-1}$;培养前 6 d,100 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 盐处理细胞的 MDA 含量比对照和其他处理的低,第 8~12 天,细胞的 MDA 含量迅速增加,最高为 0.84 $\text{nmol} \cdot \text{g}^{-1}$,这可能与白刺细胞适应低盐环境有关;在 150、200、250 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 处理中,MDA 含量均高于同期的对照,且随培养时间的延长基本呈先增加后降低的趋势;盐胁迫加速了白刺细胞膜的过氧化作用,盐浓度越高,膜损伤越严重,导致 MDA 含量越大,但随着培养时间的延长,细胞内膜修复酶类或其他物质的合成和积累使细胞适应盐环境,MDA 含量呈降低或平衡趋势。

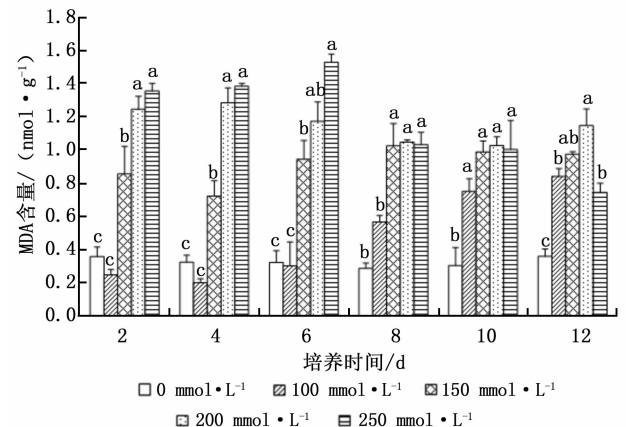


图7 不同浓度盐胁迫对唐古特白刺悬浮细胞丙二醛(MDA)含量的影响

2.5 盐胁迫下白刺悬浮细胞各指标间的相关分析

不同盐浓度胁迫下唐古特白刺悬浮细胞鲜质量、可溶性糖含量、可溶性蛋白含量、脯氨酸含量、POD 活性、SOD 活性、MDA 含量等生理指标间的相

关矩阵关系见表2。盐胁迫后,白刺细胞鲜质量与可溶性糖、MDA 分别呈极显著($P < 0.01$)和显著负相关($P < 0.05$),说明盐胁迫抑制了细胞生长,破坏了细胞膜的完整性,同时以增加可溶性糖的方式抵御胁迫损伤。细胞鲜质量与POD 活性呈正相关,但不显著。MDA 和POD、SOD 分别表示细胞脂膜损伤和修复的指标,呈极显著正相关($P < 0.01$),说明在膜损伤程度增大的同时细胞也加大了修复能力,但细胞膜损伤并未被阻止。可溶性糖、可溶性蛋白、脯氨酸含量间呈极显著正相关($P < 0.01$),说明多种渗透调节物质共同参与了白刺细胞在盐胁迫环境中的渗透调节,维护了其正常的生理活动。渗透调节物质含量和酶类活性之间呈极显著正相关($P < 0.01$),说明白刺细胞通过渗透调节和酶活性调节等方式协同抵御盐胁迫的逆境环境,维持了细胞的正常生长。

表2 盐胁迫下唐古特白刺悬浮细胞各生理指标的相关性分析

	鲜质量	可溶性糖	可溶性蛋白	脯氨酸	POD 活性	SOD 活性	MDA
鲜质量	1						
可溶性糖	-0.299**	1					
可溶性蛋白	-0.178	0.637**	1				
脯氨酸	-0.153	0.577**	0.714**	1			
POD 活性	0.051	0.473**	0.680**	0.689**	1		
SOD 活性	-0.121	0.517**	0.655**	0.742**	0.664**	1	
丙二醛(MDA)	-0.253*	0.615**	0.673**	0.695**	0.611**	0.719**	1

注: **表示在0.01水平(双侧)上极显著相关,*表示在0.05水平(双侧)上显著相关。

3 结论与讨论

植物应激盐胁迫有多种表现形式,如生长速度的改变、形态特征的变化、生理生化及代谢途径的调整等。本试验中,低浓度盐($100 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的NaCl)刺激下白刺悬浮细胞的鲜质量增加,而高浓度盐($\geq 150 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的NaCl)则抑制其增加,白刺细胞生长曲线符合Logistic 生长模型,其中, $100 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的NaCl 处理能达到的细胞生长极限最大,进入快速生长中期的培养时间最短,表明白刺悬浮细胞生长最佳状态需要适当的盐分刺激,这与苜蓿悬浮细胞^[8],毛白杨悬浮细胞^[9],白刺幼苗^[27]在盐胁迫下的生长状态一致。对部分盐生植物来说,适当的盐胁迫能提高水分利用率和有机物的积累,同时,通过快速生长也是降低体内盐分的有效途径^[28],这有利于鲜质量的增加;但盐生植物承受盐

胁迫的能力有限,随着盐浓度的增高,渗透胁迫和离子胁迫加强,同时常常伴随着诸如氧化胁迫的次级胁迫,植物调节能力不足以平衡胁迫损伤,导致生长速度减慢。对非盐生植物,如烟草^[11]、拟南芥(*Arabidopsis thaliana* L.)^[29],低盐分已抑制其生长,与盐生植物生理特性明显不同。

对可溶性糖、可溶性蛋白、脯氨酸等渗透调节物质与抗盐胁迫的关系已有大量研究^[1,3-4],一般认为,盐胁迫能刺激渗透调节类物质的增加,提高细胞液浓度,促进细胞调节渗透平衡。本研究中,白刺悬浮细胞在盐胁迫下的3种渗透调节物含量均比同期对照的高。培养初期(第2天)已出现明显差异,且随盐浓度的增加呈增加趋势,之后(培养第4~12天)3种渗透调节物质的变化随盐浓度的不同而不同,但整体动态变化为随培养时间的延长、随盐浓度的增加($150, 200, 250 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的处理)均呈先增加后降低的趋势,这可能是因为细胞逐渐适应了盐分环境对代谢重新做了调整。不同盐胁迫下,可溶性糖含量较可溶性蛋白和脯氨酸含量最先达到最高值(图2~4),可溶性糖既调节了渗透平衡,又能为其他反应提供能源。可见,可溶性糖是细胞渗透调节的第一道防线。一般来说,盐胁迫抑制植物蛋白质的合成,促进蛋白质分解为氨基酸类,其中,脯氨酸最为突出^[30],而盐生植物会加强逆境蛋白的合成以抵御恶劣环境^[31],可见,可溶性蛋白和脯氨酸含量的增加是植物响应逆境的表现,这在白刺愈伤组织、白刺植株中也均有体现^[20,27,37]。

盐胁迫下植物体内产生的自由基对细胞脂膜、细胞器和细胞内的功能分子均有破坏作用^[32]。POD 和SOD 是清除自由基的主要酶类,SOD 有助于清除细胞内超氧负离子(O_2^-),将 O_2^- 歧化为 H_2O_2 和 O_2 ,在清除 O_2^- 伤害等方面起重要作用;POD 能分解线粒体及胞浆中的 H_2O_2 。盐胁迫下,POD 和SOD 活性的增加可有效降低活性氧等各自由基的积累,降低脂膜损伤程度。本研究中,盐胁迫促进了白刺悬浮细胞POD、SOD 活性的增强,盐浓度高于 $100 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,POD、SOD 活性随培养时间的延长呈先增强后降低的趋势,与盐胁迫对唐古特白刺愈伤组织SOD 活性研究结果一致^[20],而愈伤组织的POD 呈逐渐增强趋势(3~9 d),这种差异可能是因为愈伤组织培养周期长,9 d 未能响应整个周期^[20],应延长取样时间并增加取样次数,这也突出了以悬浮细胞为实验材料的优越性。各盐胁迫中,

白刺细胞 SOD 活性先于 POD 活性达到峰值(图 4、5),说明 SOD 是细胞抗氧化防御系统的第一道防线,且 SOD 和 POD 的协同作用抵抗逆境胁迫自由基对细胞的伤害,这与前人的研究结果一致^[33-34]。

MDA 是脂膜过氧化的产物,其含量的多少反应了细胞脂膜过氧化的程度。正常情况下植物体内的 MDA 含量很少,在盐胁迫过程中,盐浓度的增加和胁迫时间的延长都会引起细胞膜质的损伤,进而引起 MDA 含量的增加^[35-36]。本研究中,低盐浓度(100 mmol · L⁻¹)培养前 6 d 细胞中的 MDA 含量比对照和其他处理的高,与低盐胁迫的唐古特白刺、西伯利亚白刺(*Nitraria sibirica* Pall.) 幼苗^[37]的表现一致,说明低盐浓度刺激了 POD、SOD 活性增强,减轻了脂膜过氧化作用,MDA 含量减少;但 POD、SOD 活性的增加并不能完全阻止 MDA 含量的增加,说明细胞膜受伤害机理复杂,这和卫矛、沙枣及美国白蜡在盐胁迫下的表现一致^[38]。白刺细胞鲜质量与 MDA 呈显著负相关($P < 0.05$),MDA 含量较高时细胞脂膜受损严重,细胞生长减慢。随着盐浓度的增加细胞膜透性增大,膜损伤程度增大,细胞抗氧化酶的活性和清除自由基的能力有限,MDA 含量仍呈增加趋势;但随着培养时间的延长,渗透调节和抗氧化酶类逐步加强,并修复细胞膜,MDA 含量呈下降趋势。也有报道,在高盐浓度下,细胞选择透性体系受损严重引起 MDA 外渗而降低细胞内的含量^[39-40]。

植物应答盐胁迫是一个复杂的生理过程,植物通过多种而非单一的途径响应逆境^[41]。本研究中,盐胁迫下,白刺细胞的 6 种生理指标间呈极显著相关($P < 0.01$),说明白刺细胞调节各代谢途径协同完成对机体的保护,一方面积累渗透调节物质平衡渗透压,另一方面增强 POD、SOD 酶活性清除自由基,修复细胞质膜的损伤。从细胞水平研究不同盐浓度胁迫下各培养阶段的生长和生理动态变化表明:唐古特白刺悬浮细胞的渗透调节能力较强,抗氧化系统发达,有较强的清除自由基的能力,从而具有较强的耐盐能力。本研究所选用的检测指标均为盐生植物常用耐性指标,为获得唐古特白刺悬浮细胞特有的或更全面的耐性机制,增加更多的指标检测,或者组学技术的应用将成为今后的研究方向。

参考文献:

[1] Parida A K, Das A B. Salt tolerance and salinity effects on plants; a review[J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2005, 60(3): 324 - 349.

[2] Navrot N, Rouhier N, Gelhaye E, et al. Reactive oxygen species generation and antioxidant systems in plant mitochondria[J]. *Physiologia Plantarum*, 2007, 129(1): 185 - 195.

[3] 廖岩,彭友贵,陈桂珠. 植物耐盐性机理研究进展[J]. *生态学报*, 2007, 27(5): 2077 - 2089.

[4] 李彦,张英鹏,孙明,等. 盐胁迫对植物的影响及植物耐盐机理研究进展[J]. *中国农学通报*, 2008, 24(1): 258 - 265.

[5] 杨秀艳,张华新,张丽,等. NaCl 胁迫对唐古特白刺幼苗生长及离子吸收、运输与分配的影响[J]. *林业科学*, 2013, 49(9): 165 - 171.

[6] Adams P, Thomas J C, Vernon D M, et al. Distinct cellular and organismic responses to salt stress[J]. *Plant and Cell Physiology*, 1992, 33(8): 1215 - 1223.

[7] Banu M N A, Hoque M A, Watanabe-Sugimoto M, et al. Proline and glycinebetaine induce antioxidant defense gene expression and suppress cell death in cultured tobacco cells under salt stress[J]. *Journal of Plant Physiology*, 2009, 166(2): 146 - 156.

[8] 陈秉初,苏维埃. 苜蓿悬浮细胞对盐胁迫的反应和适应[J]. *实验生物学报*, 1995, 28(4): 349 - 354.

[9] 赵素然,梁宇. 毛白杨愈伤组织悬浮细胞耐盐性研究[J]. *广西植物*, 2000, 20(4): 351 - 355.

[10] 房江育,王贺,张福锁. 硅对盐胁迫烟草悬浮细胞的影响[J]. *作物学报*, 2003, 29(4): 610 - 614.

[11] 周荣仁,邵根福,杨燮荣. 烟草悬浮培养细胞耐盐性的研究[J]. *植物生理学通讯*, 1984(5): 13 - 16.

[12] 刘璞,孟令军,张会霞,等. cAMP 参与烟草悬浮细胞的 ABA 信号转导(英文)[J]. *Acta Botanica Sinica*, 2002, 44(12): 1432 - 1437.

[13] Duval I, Brochu V, Simard M, et al. Thaxtomin A induces programmed cell death in *Arabidopsis thaliana* suspension-cultured cells[J]. *Planta*, 2005, 222(5): 820 - 831.

[14] Kim J K, Bamba T, Harada K, et al. Time-course metabolic profiling in *Arabidopsis thaliana* cell cultures after salt stress treatment[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2007, 58(3): 415 - 424.

[15] Chen J, Cheng T, Wang P, et al. Salinity-induced changes in protein expression in the halophytic plant *Nitraria sphaerocarpa*[J]. *Journal of Proteomics*, 2012, 75(17): 5226 - 5243.

[16] 马启慧. 耐盐碱植物白刺的开发与利用[J]. *黑龙江农业科学*, 2007(5): 116 - 117.

[17] 王尚德,康向阳. 唐古特白刺研究现状与建议[J]. *植物遗传资源学报*, 2005(2): 231 - 235.

[18] 李红,章英才,张鹏. 白刺属植物研究综述[J]. *农业科学研究*, 2006(4): 61 - 64.

[19] 王文,蒋文兰,谢奎奎,等. NaCl 胁迫对唐古特白刺幼苗生理指标的影响[J]. *草地学报*, 2012, 20(5): 907 - 913.

[20] Yang Y, Shi R, Wei X, et al. Effect of salinity on antioxidant enzymes in calli of the halophyte *Nitraria tangutorum* Bobr[J]. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 2010, 102(3): 387 - 395.

[21] 崔永忠,廖声熙,崔凯,等. 贵州山区山苍子苗年生长规律[J]. *林业科学研究*, 2013, 26(4): 501 - 505.

[22] 刘萍,李明军. 植物生理学实验技术[M]. 北京: 科学出版社, 2007.

- [23] 李合生. 植物生理生化实验原理和技术[M]. 北京: 高等教育出版社, 2000.
- [24] 宋纯鹏, 王学路. 植物生理学[M]. 北京: 科学出版社, 2009.
- [25] Hoque A, Okuma E, Banu N A, *et al.* Exogenous proline mitigates the detrimental effects of salt stress more than exogenous betaine by increasing antioxidant enzyme activities[J]. *Journal of Plant Physiology*, 2007, 164(5): 553 - 561.
- [26] Shalata A, Tal M. The effect of salt stress on lipid peroxidation and antioxidants in the leaf of the cultivated tomato and its wild salt-tolerant relative *Lycopersicon pennellii* [J]. *Physiologia Plantarum*, 1998, 104(2): 169 - 174.
- [27] 倪建伟, 武香, 张华新, 等. 3种白刺耐盐性的对比分析[J]. *林业科学研究*, 2012, 25(1): 48 - 53.
- [28] 赵可夫. 盐生植物及其对盐渍生境的适应生理[M]. 北京: 科学出版社, 2005.
- [29] 孙志宾, 齐兴云, 张洪涛, 等. NaCl对拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*) 生长与渗透调节的影响[J]. *山东科学*, 2006, 19(3): 7 - 14.
- [30] Hoque A, Okuma E, Banu N A, *et al.* Exogenous proline mitigates the detrimental effects of salt stress more than exogenous betaine by increasing antioxidant enzyme activities[J]. *Journal of Plant Physiology*, 2007, 164(5): 553 - 561.
- [31] 王宝山, 姚敦义. 盐胁迫对沙枣愈伤组织膜透性, 膜脂过氧化和 SOD 活性的影响[J]. *河北农业大学学报*, 1993, 16(3): 20 - 24.
- [32] 沈静, 杨青川, 曹致中, 等. 低温胁迫对野牛草细胞膜和保护酶活性的影响[J]. *中国草地学报*, 2010(2): 98 - 102.
- [33] Hernández J A, Ferrer M A, Jiménez A, *et al.* Antioxidant Systems and $O_2 \cdot^- / H_2O_2$ Production in the Apoplast of Pea Leaves. Its Relation with Salt-Induced Necrotic Lesions in Minor Veins[J]. *Plant Physiology*, 2001, 127(3): 817 - 831.
- [34] Wang C, Xu C, Wei J, *et al.* Enhanced tonoplast H^+ -ATPase activity and superoxide dismutase activity in the halophyte *Suaeda salsa* containing high level of betacyanin[J]. *Journal of Plant Growth Regulation*, 2008, 27(1): 58 - 67.
- [35] Tang D, Shi S, Li D, *et al.* Physiological and biochemical responses of *Scytonema javanicum* (cyanobacterium) to salt stress[J]. *Journal of Arid Environments*, 2007, 71(3): 312 - 320.
- [36] Chaparzadeh N, D'Amico M L, Khavari-Nejad R, *et al.* Antioxidative responses of *Calendula officinalis* under salinity conditions [J]. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2004, 42(9): 695 - 701.
- [37] 武香, 倪建伟, 张华新, 等. 盐胁迫对3种白刺渗透调节物质的影响[J]. *东北林业大学学报*, 2012, 40(1): 44 - 47.
- [38] 杨升, 刘正祥, 张华新, 等. 3个树种苗期耐盐性综合评价及指标筛选[J]. *林业科学*, 2013, 49(1): 91 - 98.
- [39] Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding[J]. *Analytical Biochemistry*, 1976, 72(1): 248 - 254.
- [40] 代莉慧, 蔡禄, 张鲁刚, 等. NaCl 和 Na_2CO_3 胁迫对盐爪爪种子萌发过程中生理生化变化的研究[J]. *种子*, 2012, 30(11): 53 - 55.
- [41] Xiong L, Zhu J K. Molecular and genetic aspects of plant responses to osmotic stress[J]. *Plant, Cell and Environment*, 2002, 25(2): 131 - 139.