

外源脯氨酸对盐胁迫下大豆离体胚再生植株 生理特征及线粒体结构的影响*

贺 岩 李志岗 陈云昭 王玉国

(山西农业大学农学院 太谷 030801)

摘要 以“晋豆八号”作材料,利用组织培养方法研究盐胁迫下外源脯氨酸对大豆离体胚再生植株的膜脂过氧化水平、保护酶系统、可溶性蛋白质及线粒体超微结构的影响。结果表明:在外源脯氨酸的作用下,大豆再生植株体内MDA含量减少,膜相对透性降低,SOD、POD两种酶活性明显提高,可溶性蛋白质含量增加;电镜观测显示,外源脯氨酸可以有效缓解盐胁迫对大豆离体胚再生植株线粒体结构的损伤。

关键词 外源脯氨酸;大豆;膜脂过氧化;线粒体

世界范围对大豆及其产品的需求不断增大,然而日益严重的土壤盐渍化对其产量和质量影响很大,特别是 Na^+ 盐造成的危害更为严重。目前采用生物技术选育耐盐品种,缓解盐胁迫效应是一种可行的方法。

生物自由基学说作为植物逆境下的一个伤害机制受到普遍重视,该理论认为,植物在逆境(包括盐胁迫)条件下,植物体内自由基含量大量增加,引发脂质过氧化水平提高,其主要产物丙二醛(MDA)积累增加,细胞膜结构及功能受到破坏^[1],细胞内保护酶活性普遍降低;同时抑制蛋白质的合成^[2]。线粒体是植物进行呼吸作用的重要场所,是易受自由基攻击的一种细胞器,逆境条件下其结构遭到破坏^[3]。

逆境条件下,植株体内游离脯氨酸积累是其对逆境的一种适应表现^[4]。已有研究表明,外源脯氨酸确有提高植株抗渗透胁迫的能力^[5,6]。本研究进一步探讨了外源脯氨酸对大豆再生植株的膜脂过氧化水平、保护酶系统、可溶性蛋白质及线粒体超微结构等方面的影响,以对大豆抗盐育种理论提供一些理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

大豆(*Glycine max* (L.) Merr)品种“晋豆八号”。

1.2 处理与培养方法

1.2.1 处理

* 收稿日期 2000-02-23
Received on Feb. 23, 2000

对照为不含有机附加物的 B₅ 培养基;盐胁迫设低盐胁迫(NaCl 50mmol. L⁻¹)、高盐胁迫(NaCl 100mmol. L⁻¹)两种;脯氨酸处理设 0.3、0.6、0.9(mmol. L⁻¹)三种浓度。

1.2.2 培养方法

精选干种子消毒、无菌水冲洗后放入无菌三角瓶。加入适量无菌水置于 25℃ 条件下,暗培养 2 天,使成熟胚长至 1.5 ~ 2cm;无菌条件下剥去子叶,接种于相应培养基上,光照度 3,000 lx、光照 12h/d、温度 25℃/18℃ 培养 10 天后,取材进行形态及生理生化指标测定。

1.3 测定项目

丙二醛(MDA)含量参照朱广廉方法测定^[7],膜相对透性用 DDS-II 型电导仪测定,SOD 活性采用 NBT 方法测定,POD 参照华东师大方法测定^[8],可溶性蛋白质含量采用 Coomassie brilliant blue G-250 方法测定^[9]电镜观测,以不同处理的大豆再生植株根尖为材料,用 4% 戊二酸预固定 2h,1% 锇酸后固定 2h,常规脱水,Epon812 包埋。超薄切片经醋酸铀、柠檬酸铅双染色后,用 JEM-100S 型电镜观察。

2 结果与分析

2.1 外源脯氨酸对盐胁迫下大豆离体胚再生植株 MDA 含量及膜相对透性的影响

盐胁迫条件下植株体内自由基代谢平衡被破坏,过剩的自由基造成膜脂过氧化水平提高,细胞膜系统结构和功能遭到破坏,导致细胞膜透性增加,电解质、可溶性物质大量渗漏。图 1 表明,与对照相比较,盐胁迫下大豆再生植株体 MDA 含量、膜相对透性均显著增加,表现高盐胁迫(NaCl 100mmol. L⁻¹)下再生植株 MDA 含量、膜相对透性均大于低盐胁迫(NaCl 50mmol. L⁻¹)下。说明随盐胁迫加强,大豆再生植株体内脂质过氧化水平提高、细胞膜损伤程度加重。

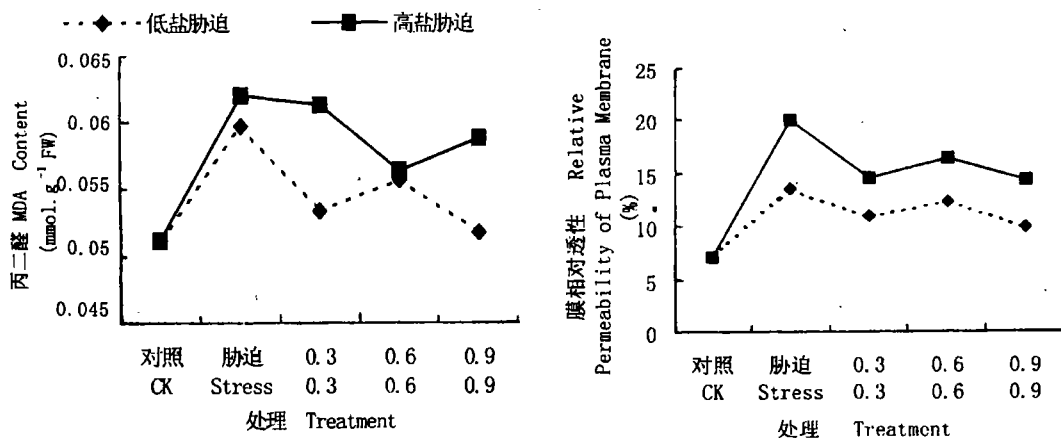


图 1 外源脯氨酸对盐胁迫下大豆再生植株 MDA 含量及膜相对透性的影响

Fig. 1 Effects of exogenous proline on the MDA content and the relative permeability of plasma membrane in soybean regenerated plantlets under NaCl-stress

培养基中添加不同浓度的脯氨酸后,盐胁迫下植株体内的 MDA 含量、质膜相对透性

均有效降低。进一步说明细胞内 MDA 的变化与膜透性的变化有密切关系。

2.2 外源脯氨酸对盐胁迫下大豆离体胚再生植株保护酶活性的影响

逆境条件下脂质过氧化作用加强,破坏了自由基产生和清除的动态平衡关系,导致植物细胞内代谢紊乱,抵御活性氧伤害的保护酶活性明显减弱^[10]。图 2 表明,盐胁迫导致大豆再生植株体内 POD、SOD 两种酶活性均显著下降。可见 POD、SOD 的变化与 MDA 的变化呈负相关性。

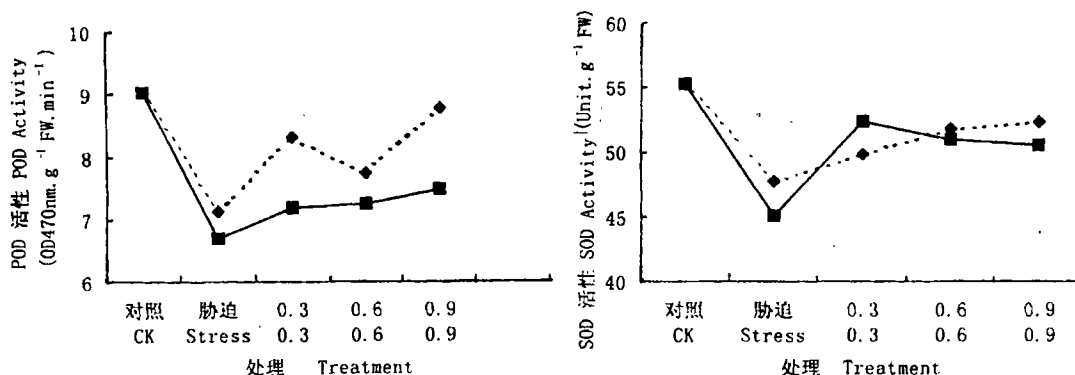


图 2 外源脯氨酸对盐胁迫下大豆再生植株两种保护酶活性的影响

Fig. 2 Effects of exogenous proline on the POD and SOD activities in soybean regenerated plantlets under NaCl-stress

添加脯氨酸后,盐胁迫下大豆再生植株的两种酶活性都有不同程度的提高。两种保护酶协同作用,对于防御和清除自由基积累、降低脂质过氧化水平、缓解盐害对膜系统的损伤有重要作用。

2.3 外源脯氨酸对盐胁迫下大豆离体胚再生植株可溶性蛋白质含量的影响

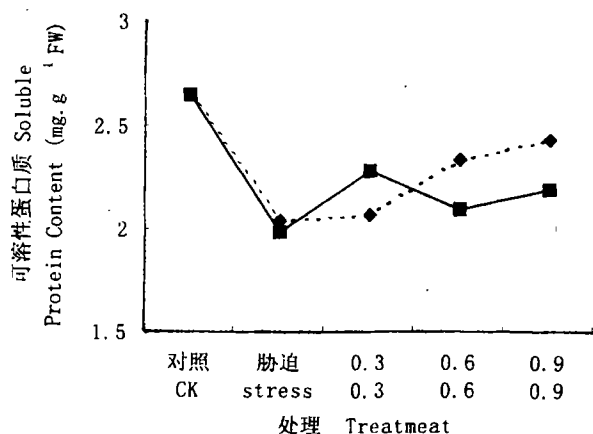


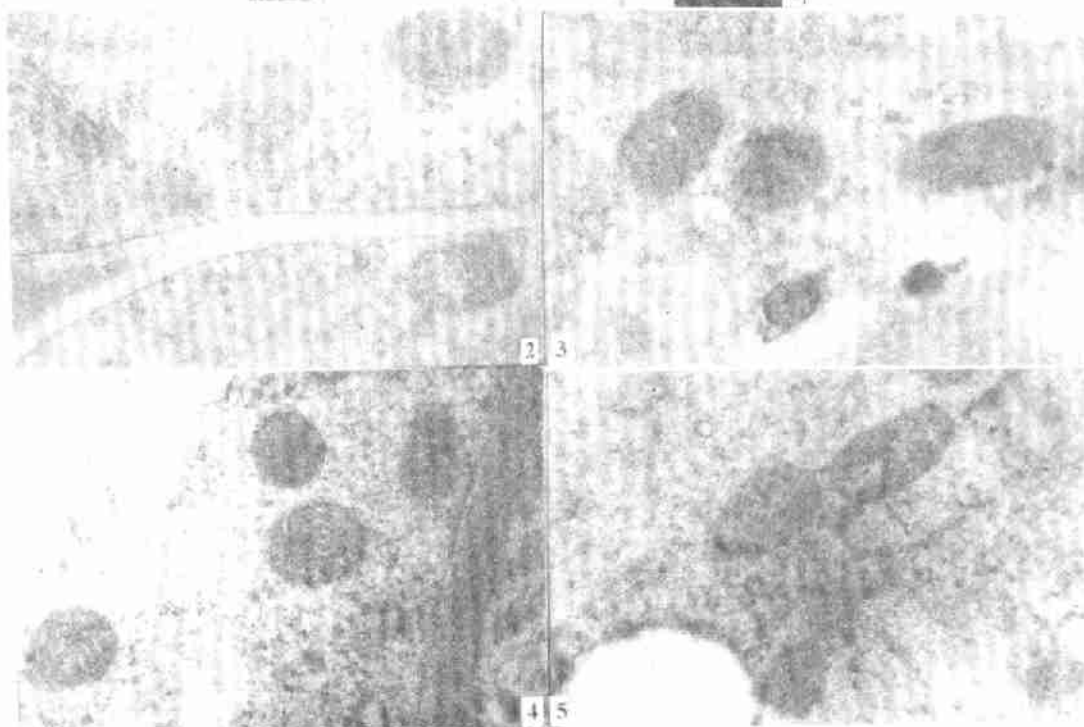
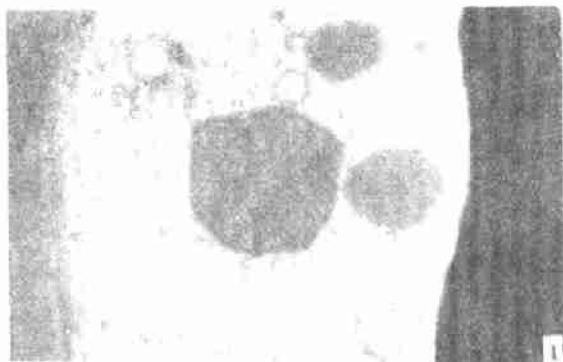
图 3 外源脯氨酸对盐胁迫下大豆再生植株可溶性蛋白质含量的影响

Fig. 3 Effect of exogenous proline on the soluble protein content in soybean regenerated plantlets under NaCl stress

盐胁迫下质膜透性增加、膜质过氧化作用加强。MDA 增加影响蛋白质的正常代谢,

主要表现为抑制蛋白质合成^[2]。图 3 表明,高、低盐胁迫造成大豆再生植株可溶性蛋白质含量比对照植株的含量分别降低 25%、22.73%。而添加脯氨酸后,盐胁迫下大豆再生植株的可溶性蛋白质含量均有提高。这可能与脯氨酸作为蛋白质合成原料有关。

2.1 外源脯氨酸对盐胁迫下大豆离体胚再生植株线粒体超微结构的影响



图版 1 正常条件下大豆再生植株根尖细胞线粒体 ($\times 25,000$)

Plate 1 Mitochondria of the root tip of the normal conditional soybean regenerated plantlets ($\times 25,000$)

图版 2 $\text{NaCl } 50\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 胁迫下大豆再生植株根尖细胞线粒体 ($\times 25,000$)

Plate 2 Mitochondria of the root tip of the soybean regenerated plantlets under $\text{NaCl } 50\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ($\times 25,000$)

图版 3 $\text{NaCl } 100\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 胁迫下大豆再生植株根尖细胞线粒体 ($\times 25,000$)

Plate 3 Mitochondria of the root tip of the soybean regenerated plantlets under $\text{NaCl } 100\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ (\times

25,000)

图版4 NaCl 50mmol. L⁻¹胁迫下 0.3mmol. L⁻¹ 外源脯氨酸处理大豆再生植株根尖细胞线粒体 (×20,000)

Plate 4 Mitochondria of the root tip of the soybean regenerated plantlets under NaCl 50mmol. L⁻¹ containing 0.3mmol. L⁻¹ proline (×20,000)

图版5 NaCl 100mmol. L⁻¹胁迫下 0.9mmol. L⁻¹ 外源脯氨酸处理大豆再生植株根尖细胞线粒体 (×25,000)

Plate 5 Mitochondria of the root tip of the soybean regenerated plantlets under NaCl 100mmol. L⁻¹ containing 0.9mmol. L⁻¹ proline (×25,000)

线粒体进行呼吸作用的过程中产生自由基。逆境条件下过剩自由基增加,因此它是易受膜质过氧化伤害的重要部位之一。电镜观察发现,未受盐胁迫的正常大豆再生植株根尖细胞内线粒体结构完整,双层膜、嵴均清晰(图版1)。盐胁迫使线粒体结构发生较大变化,在低盐胁迫(NaCl 50mmol. L⁻¹)下线粒体的部分嵴、膜发生损伤,同时也观察到该浓度盐胁迫对内质网和细胞膜也有所破坏(图版2)。在高盐胁迫下(NaCl 100mmol. L⁻¹)下线粒体结构模糊、膜破裂或消失,嵴所剩无几,细胞膜破损严重(图版3)。盐胁迫破坏了线粒体的正常结构及功能,严重影响了细胞的正常生理代谢活动。

NaCl 50mmol. L⁻¹下添加 0.3mmol. L⁻¹ 脯氨酸的大豆再生植株根尖线粒体结构保持良好,嵴、膜损伤程度比该浓度盐胁迫下的线粒体损伤程度减小(图版4)。NaCl 100mmol. L⁻¹下添加 0.9mmol. L⁻¹ 脯氨酸的根尖线粒体与该浓度盐胁迫下的线粒体比较还可以保持部分嵴膜结构(图版5)。由此可见,外源脯氨酸有缓解盐胁迫对大豆再生植株线粒体以及部分内膜系统结构破坏的作用。

3 讨论

当土壤中的含盐量超过 0.15(0.20%)时,就能抑制作物生长,使产量下降。当含盐量达 0.4(0.5%)时,多数作物不能生长^[11]。本试验设计了两种浓度的盐胁迫条件 NaCl 50mmol. L⁻¹(相当于 0.3%)和 NaCl 100mmol. L⁻¹(相当于 0.6%),以期用较强的盐胁迫研究对大豆的伤害机理。

试验结果显示,盐胁迫造成大豆再生植株脂质过氧化程度加重,细胞膜透性增加,SOD、POD 两种保护酶活性降低,可溶性蛋白质含量减少,线粒体结构受到严重损伤。

添加脯氨酸后,大豆再生植株脂质过氧化水平降低,其产物丙二醛含量减少。质膜透性降低,表明细胞膜系统损伤程度减小。由于保护酶活性提高,清除自由基的能力得到加强,自由基代谢平衡失调得到有效缓解。蛋白质含量提高。电镜观测显示,外源脯氨酸缓解了盐害对线粒体结构的破坏作用。

参 考 文 献

- 1 刘宛等, NaCl 胁迫及外源自由基对离体小麦叶片 O₂·-和膜脂过氧化的影响, 植物生理学通讯, 1995, 31(1): 26~

- 2 陈少裕等, 膜脂过氧化对植物细胞的伤害, 植物生理学通讯, 1991, 27(2): 84~90
- 3 龚明等, 盐胁迫下大麦和小麦叶片脂质过氧化伤害与超微结构变化关系, 植物学报, 1989, 31(11): 841~846
- 4 汤章城, 逆境条件下植物脯氨酸的积累极其可能的意义, 植物生理学通讯, 1984, (1): 15~21
- 5 汤章城等, 游离脯氨酸与高粱苗的抗旱性, 植物生理学通讯, 1986, (3): 29~31
- 6 贺岩等, 外源脯氨酸盐胁迫下大豆离体胚再生植株生长及渗透调节的影响, 山西农业大学学报, 1999, 19(2): 100~102
- 7 朱广廉等, 植物生理学实验, 北京大学出版社, 1990, 245~248
- 8 华东师大编, 植物生理学实验指导, 人民教育出版社, 1980, 143~144
- 9 Bradford MM. , A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dyeing binding , Anal Biochem, 1976, 72: 248
- 10 林植芳等, 水稻叶片的衰老与超氧化物歧化酶活性与脂质过氧化作用的关系, 植物学报, 1984, 26(6): 605~607
- 11 刘祖琪等, 植物抗性生理学, 中国农业出版社, 1994

EFFECTS OF EXOGENOUS PROLINE ON THE PHYSIOLOGICAL PROPERTIES AND THE MITOCHONDRIA ULTRASTRUCTURE IN SOYBEAN REGENERATED PLANTLETS FROM EMBRYOS IN VITRO UNDER NaCl STRESS

He Yan Li Zhigang Chen Yunzhao Wang Yuguo

(Agronomy College , Shanxi Agricultural University , Taigu , 030801)

Abstract The salt resistance effect of exogenous proline in soybean regenerated plantlets from embryos in vitro were studied by means of tissue culture. The results showed that exogenous proline could reduce the malondialdehyde (MDA) content, product of lipid peroxidation, and the relative permeability of plasma membrane in the soybean plantlets under NaCl stress. The activities of POD and SOD increased, the soluble protein content also was promoted. Exogenous proline alleviated the injury of the mitochondria ultrastructure of the soybean regenerated plantlets.

Key words Exogenous proline; Soybean; Mitochondria; Lipid peroxidation

欢迎订阅《农村实用技术与信息》月刊

欢迎订阅 2001 年度《农村实用技术与信息》杂志, 一次订阅无限回馈。订户可常年免费刊登求货信息。为新订户备有样刊, 来信即赠。

邮发代号: 38-185, 各邮政局(所)均可订阅, 4 封 4 彩 64 页, 月价 1.60 元, 全年订价 19.2 元。本刊常年办理订阅和补订手续(免收邮费)。

通联: 武汉华中农业大学《农村实用技术与信息》杂志社

邮编: 430070 电话: 027-87287369(传真)87287129