

外源 ALA、SNP 和 Spd 对 NaCl 胁迫下桔梗种子萌发特性的影响

杜丹丹, 何平*, 张春平, 喻泽莉

(1. 西南大学 生命科学学院 三峡库区生态环境教育部重点实验室, 重庆 400715;
2. 重庆市三峡库区植物生态与资源重点实验室, 重庆 400715)

摘要: 以药用植物桔梗为研究对象, 通过测定不同浓度的 ALA、SNP 和 Spd 对 NaCl 胁迫下桔梗种子发芽势、发芽率、萌发指数和平均根长等萌发指标的影响, 寻找提高桔梗种子及幼苗在盐胁迫条件下抗性能力的途径。实验结果表明, 75 mmol · L⁻¹ NaCl 胁迫下的桔梗种子萌发受到显著抑制, 但是用不同浓度的 ALA、SNP 和 Spd 对桔梗种子进行恢复处理后各萌发指标均显著升高。Spd(2.5 mmol · L⁻¹)、ALA(5 mg · L⁻¹)、SNP(0.1 mmol · L⁻¹) 处理能有效缓解盐对种子的胁迫伤害。其中, 经 Spd(2.5 mmol · L⁻¹) 处理下发芽势、发芽率、发芽指数和平均根长均达到最大值, 发芽势为 40.0%, 发芽率为 49.5%, 发芽指数为 9.28、平均根长为 2.80 cm。由此可以得出, 适宜浓度的 ALA、SNP、Spd 可以缓解 NaCl 对桔梗种子的胁迫伤害, 提高种子的抗盐能力, 其中 Spd 效果最好, SNP 次之, 再者是 ALA。

关键词: 桔梗; ALA; SNP; Spd; 盐胁迫; 种子萌发; 萌发特性

中图分类号: Q945 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3142(2011)06-0801-05

Effect of exogenous ALA, SNP and Spd on seed germination characteristics of *Platycodon grandiflorum* under NaCl stress

DU Dan-Dan, HE Ping*, ZHANG Chun-Ping, YU Ze-Li

(1. School of Life Sciences, Southwest University, Key Laboratory(Ministry of Education) of Eco-environments of Three Gorges Reservoir Region, Chongqing 400715, China; 2. Chongqing Key Laboratory of Plant Ecology and Resources Research for Three Gorges Reservoir Region, Chongqing 400715, China)

Abstract: In order to get the method to improve the salt resistance of seeds and seedlings for *Platycodon grandiflorum* under NaCl stress, the different concentration of 5-aminolevulinic acid(ALA), sodium nitroprusside(SNP), spermidine(Spd) effect on *P. grandiflorum* seed germination, seed germination rate, seed germination index, and the average length of root were studied under different concentrations of NaCl stress. The results showed that the seed germination was inhibited under 75 mmol · L⁻¹ concentrations of NaCl stress, but with different concentrations of ALA, SNP and Spd on the *P. grandiflorum* seeds, all germination index were significantly higher. Spd(2.5 mmol · L⁻¹), ALA(5 mg · L⁻¹) and SNP(0.1 mmol · L⁻¹) could obviously alleviate the damage of salt stress to the seeds of *P. grandiflorum*. Spd(2.5 mmol · L⁻¹) significantly increased all indexes. The germination vigor was 40.3%, the germination rate was 49.5%, the germination index was 9.28 and the average length of root was 2.80 cm. So we con-

收稿日期: 2011-03-12 修回日期: 2011-08-27

基金项目: 国家自然科学基金(30070080)[Supported by the National Natural Science Foundation of China(30070080)]

作者简介: 杜丹丹(19-), 女, 山西霍州人, 硕士, 主要从事药用植物资源学等研究, (E-mail) yulianxiner@126.com.

通讯作者: 何平, 男, 博士, 教授, 主要从事系统与进化植物学, 濒危植物保护生物学等研究和教学工作, (E-mail) heping196373@126.com.

clude that, ALA, SNP and Spd with appropriate concentration could significantly alleviate the damages to the *P. grandiflorum* seeds under NaCl stress and promote the salt resistance of the seeds, the best of them was Spd, the second was SNP, furthermore was the ALA.

Key words: *Platycodon grandiflorum*; ALA; SNP; Spd; NaCl stress; seed germination; germination characteristics

桔梗(*Platycodon grandiflorum*)系桔梗科桔梗属,多年生草本植物。根部入药,其性微温,味苦、辛、平,归肺经,有开宣肺气,祛痰排脓之功效(中国药典,2010)。此外桔梗还是一种很好的保健食品。目前对桔梗的研究大多集中在药用成分、药理作用、栽培技术和种子生理生态等方面(李敬蕊等,2008;赵敏等,2008;刘自刚,2009;王志芬等,2009),对桔梗种子胁迫及恢复生理方面的研究未见报道。

5-氨基乙酰丙酸(5-aminolevulinic acid, ALA)、一氧化氮(NO)供体硝普钠(SNP)、亚精胺(Spd)在提高植物抗逆性方面有很大贡献。ALA是一种广泛存在于细菌、真菌、动物及植物等生物机体活细胞中的非蛋白氨基酸(宋士清等,2009)。它可提高植物叶绿素的含量增强光合作用效率,提高植物抗逆性,调节植物生长发育,促进盐胁迫下种子的萌发(Watanabe等,2000; Elliott等,1993; Hotta等,1997)。一氧化氮(NO)是植物体内一种重要的生物活性分子,它在植物抗病防御反应中的作用尤其引人注意(Dumer等,1998)。它能促进种子萌发和植物生长、调节气孔运动、延缓衰老、诱导程序性细胞死亡及防御相关基因的表达,并在逆境中作为一种抗氧化剂起作用(Wojtaszek等,2000; Beligni等,2000)。SNP作为NO供体近年来研究的较多。亚精胺(Spd)是植物是次生代谢过程中产生的一类具有强烈生理活性的多胺(Martin等,2001),多胺广泛作用于植物生长、形态建成、衰老和对环境胁迫的反应,在多种逆境条件下,植物体内多胺含量迅速发生变化(Groppa等,2008; Bouchereau等,1999)。

目前对上述三种物质的研究大都集中在农作物方面,而对药用植物在逆境下的生理方向的研究几乎没有。由于桔梗的药用价值与经济价值,各地大量进行人工栽培。而土壤的盐渍化已经成为国内外农业栽培中普遍存在的问题,严重影响了栽培作物的产量和品质(王志芬等,2009)。本研究中以桔梗种子为材料,研究不同浓度的ALA、SNP和Spd对NaCl胁迫下的桔梗种子萌发若干指标的影响,找到ALA、SNP、Spd对盐胁迫下种子萌发的缓解调节机制,为桔梗在栽培生产中遇到的盐胁迫问题提供理

论依据和解决方法。

1 材料与方 法

1.1 材料

供试的桔梗种子由中国医学研究院药用植物研究所提供,经西南大学生命科学学院何平教授鉴定为成熟的桔梗(*Platycodon Grandiflorum*)种子。实验中所用的ALA、SNP、Spd均为Sigma公司生产。

1.2 方法

1.2.1 种子萌发指标的测定 选取健壮、饱满、大小一致的桔梗种子,用1.0%(W·V⁻¹)NaClO消毒10 min,用蒸馏水冲洗干净,然后用吸水纸吸干。为了缩短种子的萌发时间,对种子进行催芽,将种子置于铺有两层纱布的培养皿中,上面再盖两层纱布置于光照培养箱中催芽。2 d后将种子取出,放于铺有一层滤纸和四层纱布的培养皿中,每皿100粒种子,4次重复。各加入(0 mmol·L⁻¹、25 mmol·L⁻¹、50 mmol·L⁻¹、75 mmol·L⁻¹、100 mmol·L⁻¹)浓度的NaCl溶液20 mL,依次标为处理(A、B、C、D、E)进行NaCl胁迫。将种子放于光照培养箱进行(25±2)/(18±2)℃的变温培养,每天定时添加蒸馏水。光照时间为12 h,光照强度为2 000 lx。每天定时统计萌发数,第12天计算发芽率。种子复合处理则先对种子催芽(同上),取出种子后各加入75 mmol·L⁻¹NaCl溶液浸泡12 h,之后将盐溶液吸出,加入20 mL不同浓度的ALA、SNP、Spd溶液(表1)(培养条件同上)。每天定时统计萌发数,第8天计算发芽势(*Gv*),发芽指数(*Gi*),第12天计算发芽率(*Gr*),计算平均根长,平均下胚轴长。发芽势(*Gv*)=规定天数内发芽的种子/供试的所有种子数×100%;发芽率(*Gr*)=正常情况下发芽的种子/供试的所有种子数×100%;发芽指数(*Gi*)=∑(*Gt*/*Dt*)式中:*Gt*为*t*日内的发芽率,*Dt*为相应的发芽天数。

1.2.2 数据处理方法 采用SPSS 12.0统计软件对数据进行方差分析,以Duncan's新复级差法比较不同处理间的差异性。

表 1 桔梗种子的不同处理组合
Table 1 Different treatment combinations on *P. grandiflorum* seeds

处理 Treatment	dd H ₂ O	NaCl mmol · L ⁻¹	ALA mg · L ⁻¹	SNP mmol · L ⁻¹	Spd mmol · L ⁻¹
CK(空白对照)	+	—	—	—	—
CK1(盐对照)	—	75.00	—	—	—
复合处理 T1	—	75.00	2.50	—	—
复合处理 T2	—	75.00	5.00	—	—
复合处理 T3	—	75.00	10.00	—	—
复合处理 T4	—	75.00	50.00	—	—
复合处理 T5	—	75.00	—	0.05	—
复合处理 T6	—	75.00	—	0.1	—
复合处理 T7	—	75.00	—	0.25	—
复合处理 T8	—	75.00	—	0.50	—
复合处理 T9	—	75.00	—	—	0.10
复合处理 T10	—	75.00	—	—	0.50
复合处理 T11	—	75.00	—	—	2.50
复合处理 T12	—	75.00	—	—	5.00

“+”表示加 ddH₂O; “-”表示不加 ddH₂O。 “+” means plus ddH₂O; “-” means without ddH₂O.

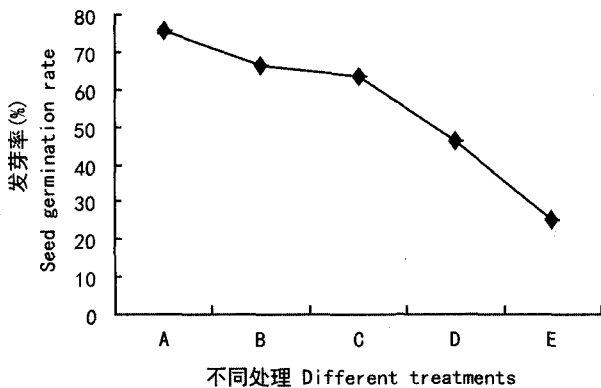


图 1 不同浓度 NaCl 处理下桔梗种子发芽率
Fig. 1 Different concentration of NaCl on seed germination rate

2 结果与分析

2.1 不同浓度 NaCl 溶液处理下桔梗种子发芽率的变化

从图 1 中可以看出,随着 NaCl 浓度的升高,种子发芽率呈现逐渐下降的趋势,且在 NaCl 浓度为 C (50 mmol · L⁻¹)~E(100 mmol · L⁻¹)之间种子发芽率下降迅速,与对照 A (75.3%)处理相比,C 处理 (50 mmol · L⁻¹)种子发芽率降低了 12%,E 处理 (100 mmol · L⁻¹)则降低了 50%,严重影响了桔梗种子的出苗率。

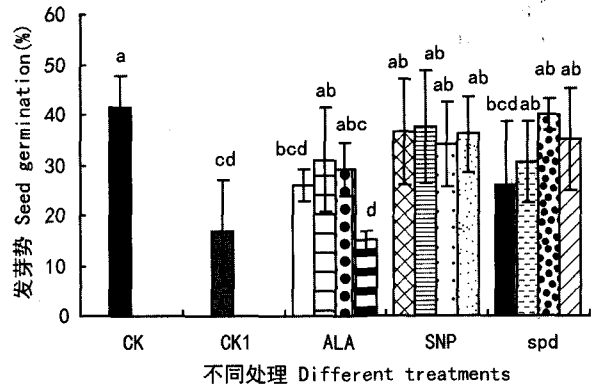


图 2 不同处理下桔梗种子发芽势
Fig. 2 Different treatments on seed germination

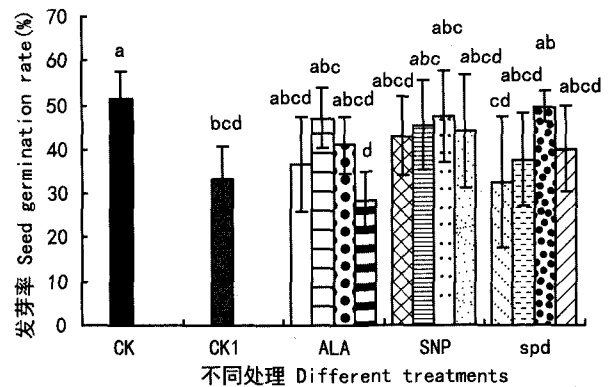


图 3 不同处理下桔梗种子发芽率
Fig. 3 Different treatments on seed germination rate

2.2 不同复合处理下桔梗种子的发芽势和发芽率的变化

在图 2 和图 3 中将 ALA、SNP、Spd 处理组从左到右分别依次标为 (T1、T2、T3、T4)、(T5、T6、T7、T8)、(T9、T10、T11、T12)。由图 1 和图 2 可以看出,桔梗种子在不同的处理下,发芽势和发芽率都有不同程度的变化。与未经任何处理(CK)的发芽势(41.3%)和发芽率(51.3%)相比可以看出,75 mmol · L⁻¹的 NaCl 处理后(CK1)的种子的发芽势(16.7%)降低了 24.6%,发芽率(33.3%)降低了 18.0%,且达显著水平。这表明 NaCl 处理显著抑制了桔梗种子的正常萌发。当用不同浓度的 ALA、SNP、Spd 处理后发芽势和发芽率明显升高。且 T2 (ALA 浓度 5 mg · L⁻¹)、T6(SNP 浓度 0.1 mmol · L⁻¹)、T10(Spd 浓度 2.5 mmol · L⁻¹)处理下发芽势(31.3%、37.5%、40.3%)、发芽率(47.0%、47.5%、49.5%)均达最大值,且明显高于 CK1 处理,其中 Spd 处理组效果最好,但三者差异不显著。ALA、

SNP、Spd 各处理组中低浓度下幼苗子叶长势良好,高浓度下子叶未从种皮中完全脱离出来,各处理组桔梗种子萌发和幼苗生长均呈现出中等浓度促进,高浓度抑制的趋势。

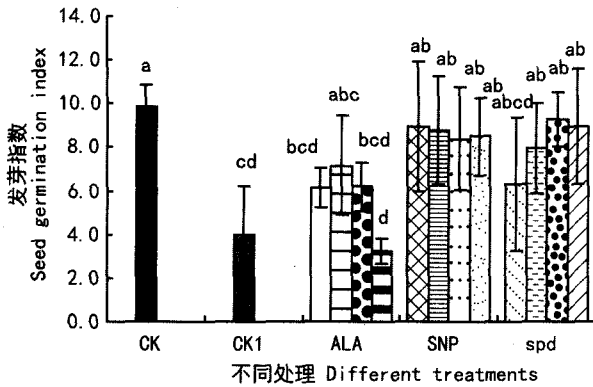


图4 不同处理下桔梗种子发芽指数

Fig. 4 Different treatments on seed germination index

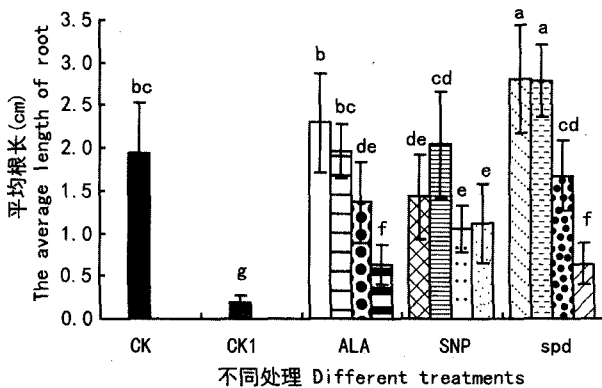


图5 不同处理下桔梗种子平均根长

Fig. 5 Different treatments on the average length of root

2.3 不同复合处理下桔梗种子的发芽指数和幼苗平均根长的变化

在图4和图5中,种子发芽指数和平均根长的变化趋势与发芽势和发芽率的变化趋势相似。经过NaCl处理后,发芽指数和平均根长也有显著的降低,经ALA、SNP、Spd处理后发芽指数和平均根长均升高。T2(ALA浓度 $5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$)、T5(SNP浓度 $0.05\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$)、T11(Spd浓度 $2.5\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$)处理下种子发芽指数达最大值,分别为7.16、8.91、9.28,而CK1处理发芽指数只有3.98。T1(ALA浓度 $2.5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$)、T6(SNP浓度 $0.1\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$)、T9(Spd浓度 $0.1\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$)处理下幼苗平均根长均达最大值,分别为2.29、2.04、2.80 cm,均大于空白对照CK(1.94 cm)。在ALA、SNP、Spd各

组处理中高浓度下幼苗根尖变褐色,生长明显被抑制。以上说明适当浓度的ALA、SNP、Spd可以缓解盐胁迫对种子萌发的伤害。

2.4 不同复合处理下桔梗幼苗下胚轴长的变化

图6中桔梗幼苗平均下胚轴长在NaCl处理后与对照CK相比有显著降低,在加入不同浓度的ALA、Spd、SNP后下胚轴长均有所升高,且呈现出高浓度抑制的趋势,其中ALA整体缓解效果要好于其他两组。T1(ALA浓度 $2.5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$)、T9(Spd浓度 $0.1\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$)和T10(Spd浓度 $0.5\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$)复合处理下,下胚轴长均低于盐对照CK1,说明低浓度的ALA和Spd对NaCl胁迫下,下胚轴长没有缓解作用,反而与NaCl叠加,胁迫下胚轴的生长。T2(ALA浓度 $5.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$)、T3(ALA浓度 $10.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$)、T6(SNP浓度 $0.1\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$)和T11(Spd浓度 $2.5\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$)处理下胚轴长均高于CK和CK1,且差异达显著水平。与图5中不同处理对平均根长影响相比可以看出,NaCl胁迫条件下,下胚轴长和平均根长对于ALA和Spd所需的浓度不同,下胚轴长所需的ALA和Spd浓度要高于平均根长。

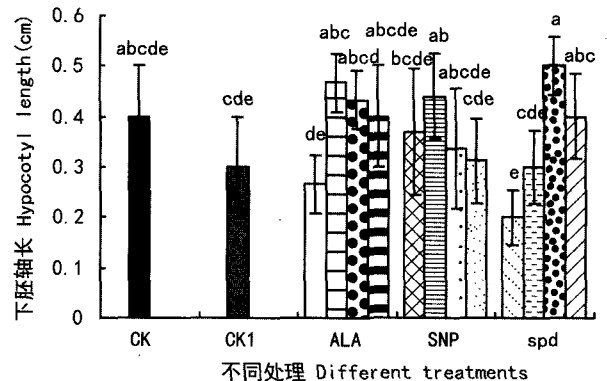


图6 不同处理下桔梗幼苗下胚轴长

Fig. 6 Different treatments on the hypocotyl length

3 讨论

种子萌发是植物体生活史中比较重要的阶段,直接影响到植物体后期的生长发育和形态建成,从而会间接影响到产量的形成,因此种子能够迅速整齐的萌发,是获得高产、稳产的基础(张春平,2010)。在本实验中桔梗种子的各项指标(发芽势、发芽指数、发芽率、平均根长)在盐胁迫条件下,均有不同程度的变化,NaCl处理对种子萌发的各项生理指标均

表现出明显的抑制效应且萌发时间延迟。这是由于高浓度的 Na^+ 可置换质膜和细胞内膜系统所结合的 Ca^{2+} , 膜所结合的离子中 $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 增加, 膜结构破坏及功能改变, 增加了质膜的透性, 致使细胞内钾、磷和有机质外渗 (Tuna 等, 2007), 致使细胞内 ABA 含量急剧增加, 而 ABA 可诱导种子休眠它对细胞内糖代谢速度和 α -淀粉酶的活性均有一定的抑制作用, 进而影响了种子内部营养物质代谢所需要的酶的活性, 致使种子萌发所需要的营养物质得不到及时的供应。

在施加不同浓度的 ALA、SNP、Spd 溶液后, 种子的各萌发指标均有一定程度的升高。这是由于这三种物质均可以提高植物抗逆性, ALA 作为生理活性物质, 可以提高植物抗氧化酶活性进而提高其抗逆性, Nishinara 等, 验证了 ALA 对菠菜耐盐性的缓解效应与叶片抗氧化酶活性上升有关 (Nishihare 等, 2003)。Wang 等以小白菜为材料, 同样观察到外源 ALA 对盐胁迫下种子萌发有促进效应 (Wang 等, 2005)。SNP 可以调节植物体内活性氧代谢来减轻氧化胁迫造成的伤害, 另外 NO 还可以激活激素信号转导途径进而激活种子萌发。Spd 则通过维持细胞膜的完整性, 阻止超氧阴离子产生, 或抑制蛋白酶和 Rnase 的活性来提高植物的抗逆性。

本实验中只是探讨了不同浓度的 ALA、SNP、Spd 对盐胁迫下桔梗种子萌发指标的影响, 对其促进种子萌发的机理未作深入研究, 以后可从对种子内部激素调节水平、营养物质代谢水平、基因调控水平研究, 对其影响种子萌发的机理进行研究阐述。

参考文献:

- 国家药典委员会. 2010. 中国药典. I 部[S]. 北京化学工业出版社: 259
- Beligni MV, Lamattina L. 2000. Nitric oxide stimulates seed germination and de-etiolation and inhibites hypocotylelongation, three light-inducible responses in plants[J]. *Planta*, **210**(2): 215—221
- Bouchereau A, Aziz A, Larher F. 1999. Polyamines and environmental challenges: recent developments[J]. *Plant Sci*, **140**(2): 103—125
- Dumer J, Wendehemme D, Klessing DF. 1998. Defense gene induction in tobacco by nitric oxide, cyclic GMP and cyclic ADP-ribose[J]. *Proc Nat Acad Sci USA*, **95**(17): 10 328—10 333
- Elliott T. 1993. Transport of 5-aminolevulinic acid by the dipeptide permease in *Salmonella typhimurium* [J]. *Bacteriol*, **175**(2): 325—331
- Groppa MD, Benavides MP. 2008. Polyamines and abiotic stress: recent advances[J]. *Amin Acids*, **34**(1): 35—45
- Hotta Y, Tanaka T, Takaoka H, et al. 1997. Promotive effects of 5-aminolevulinic acid on the yield of several crop [J]. *Plant Growth Regul*, **22**(2): 109—144
- Li JR (李敬蕊), Gao HB (高洪波), Wu XL (吴晓蕾). 2008. Effect of several exogenous matter on seed germination of *Platycodon grandiflorum* (几种外源物质对桔梗种子发芽的影响) [J]. *J Shanghai Jiaotong Univ* (上海交通大学学报), **26**(5): 496—498
- Liu ZG (刘自刚). 2009. Studies on seed dynamic physiological maturity of *Platycodon* (桔梗种子的成熟生理动态研究) [J]. *Chin Trad Herb Drug* (中草药), **40**(2): 300—303
- Liu ZG (刘自刚). 2009. Studies on seed dormancy breaking of *Platycodon* (桔梗种子休眠解除方法研究) [J]. *Seed* (种子), **28**(1): 72—76
- Martin-Tanguy J. 2001. Metabolism and function of polyamines in plants: recent development (new approaches) [J]. *Plant Growth Regul*, **34**(1): 135—148
- Nishihare E, Kondo K, Parvezm M. 2003. Role of 5-aminolevulinic acid on active oxygen-scavenging system in NaCl-treated spinach [J]. *Plant Physical*, **160**(9): 1 085—1 091
- Song SQ (宋士清), Guo SR (郭世荣). 2004. Physiological function of 5-aminolevulinic acid and its application in agriculture (5-氨基乙酰丙酸的生理作用及其在农业生产中的应用) [J]. *J Hebei Normal Univ Sci* (河北科技师范学院学报), **18**(2): 54—57
- Tuna AL, Kaya C, Ashraf M, et al. 2007. The effects of calcium sulphate on growth, membrane stability and nutrient uptake of tomato plants grown under salt stress [J]. *Environ Exp Bot*, **59**(2): 173—178
- Watanabe K, Tanaka T, Hotty A. 2000. Improving salt tolerance of cotton seedlings with 5-aminolevulinic acid [J]. *Plant Growth Regul*, **32**(1): 99—103
- Wojtaszek O. 2000. Nitric oxide in plants to NO or not to NO [J]. *Phytochemistry*, **54**(1): 1—4
- Wang LJ, Jiang WB, Liu H. 2005. Promotion of 5-aminolevulinic acid on germination of pakchoi seed under salt stress [J]. *Integr Plant Biol*, **47**(9): 1 084—1 091
- Wang ZF (王志芬), Shan CG (单成钢), Su XH (苏学合). 2009. Comparison differences of growing and developing for different planting years of radix platycodonis (不同年限栽培桔梗生长发育差异的比较研究) [J]. *Res Practice Chin Med* (现代中草药研究与实践), **23**(4): 10—13
- Zhang CP (张春平). 2010. Effect of exogenous Ca^{2+} , ALA, SA, and Spd on seed germination and physiological characteristics of *Perilla frutescens* seedlings under NaCl stress (外源 Ca^{2+} 、ALA、SA 和 Spd 对 NaCl 胁迫下紫苏种子萌发和幼苗生理特性的影响) [J]. *China J Chin Mat Med* (中国中药杂志), **35**(24): 3 260—3 265
- Zhao M (赵敏), Xu ZF (徐兆飞), Wang RH (王荣华). 2000. Preliminary study on the characteristics of inner inhibitory substances for *Platycodon grandiflorum* seed (桔梗种子内源抑制物质特性的初步研究) [J]. *J Northeast Fore Univ* (东北林业大学学报), **28**(1): 51—54