

NaCl 胁迫对马铃薯试管苗 POD 酶活性及同工酶的影响

裴怀弟¹, 刘润萍², 林玉红¹, 李淑洁¹, 吕 汰³

(1. 甘肃省农业科学院生物技术研究所, 甘肃 兰州 730070; 2. 甘肃省农业科学院农业经济与信息研究所, 甘肃 兰州 730070; 3. 天水市农业科学研究所, 甘肃 天水 741000)

摘要: 选用 4 个马铃薯品种(系)的试管苗, 在不同 NaCl 浓度的培养基上诱导分化成苗, 对其耐盐性进行初步研究。结果表明, 随着 NaCl 浓度的增加, 大西洋、L03-1、L03-6 的 POD 酶活性与无胁迫处理相比呈现下降趋势, 但 L03-2 与无胁迫处理相比 POD 酶活性呈增加趋势。采用聚丙烯酰胺凝胶电泳对 NaCl 胁迫马铃薯试管苗 POD 同工酶监测表明, 马铃薯盐诱导再生苗 POD 同工酶谱带存在品种(系)间显著差异, 盐胁迫已经不能使 POD 同工酶谱带保持完整, 参试马铃薯品种(系)对盐浓度敏感程度存在差异。

关键词: 马铃薯试管苗; 盐胁迫; POD 酶活性; 同工酶

中图分类号: S513 **文献标志码:** A **文章编号:** 1001-1463(2020)06-0012-04

[doi:10.3969/j.issn.1001-1463.2020.06.004](https://doi.org/10.3969/j.issn.1001-1463.2020.06.004)

Effects of NaCl Stress on POD Enzyme Activity and Isozyme of Potato Tube Plantlets

PEI Huaidi¹, LIU Runping², LIN Yuhong¹, LI Shujie¹, LÜ Tai³

(1. Institute of Biotechnology, Gansu Academy of Agriculture Sciences, Lanzhou Gansu 730070, China; 2. Institute of Agricultural Economic and Information, Gansu Academy of Agriculture Sciences, Lanzhou Gansu 730070, China; 3. Tianshui Institute of Agricultural sciences, Tianshui Gansu 741000, China)

Abstract: In this experiment, the tube plantlets of four potato cultivars (lines) were selected, Directly induce to differentiate into seedlings on medium containing different NaCl concentrations, preliminary identification of its salt tolerance. The results showed that with the increase of NaCl concentration, the POD enzyme activity of Atlantic, L03-1 and L03-6 showed a decreasing trend compared with treatment without stress, but the POD enzyme activity of L03-2 showed an increasing trend compared with the treatment. Monitoring of POD isoenzymes in NaCl stress potato tube plantlets by polyacrylamide gel electrophoresis showed that the potato salt-induced seedling of POD isozyme bands existed significant differences, salt stress could not maintain the integrity of the POD isozymes. In this experiment four potato varieties on the salt sensitivity presented difference.

Key words: Potato tube plantlets; Salt induction; POD enzyme activity; Isozyme

马铃薯(*Solanum tuberosum* L.)是世界上 广为种植的粮菜兼用型作物, 也是我国干旱

收稿日期: 2010-02-11

基金项目: 国家自然科学基金地区基金项目(31960599); 现代农业产业技术体系(CARS-107); 甘肃省农业科学院重点研发计划(2020GAAS13)。

作者简介: 裴怀弟(1979—), 女, 甘肃天水人, 助理研究员, 主要从事生物技术及栽培技术研究工作。Email: phdfeixiang@163.com。

通信作者: 刘润萍(1963—), 女, 甘肃渭源人, 副研究员, 主要从事农业经济研究工作。Email: 492195296@qq.com。

和半干旱地区重要的经济作物,属盐敏感型^[1],盐害不利于其生长,且对产量影响极大,因此,培育符合不同育种目标的耐盐马铃薯新品种就显得十分重要。大量的研究表明,马铃薯的抗盐能力较弱^[1-2],0.2%的盐逆境就可见胁迫效果,使马铃薯出苗迟缓、发芽势降低、植株矮小甚至死亡,严重影响产量和品质。通过常规育种改良品种一直进展缓慢,通过盐胁迫诱导,进行体细胞无性系变异筛选是进行抗性品种选育的有效途径之一^[3],在许多植物品种改良上已取得成功^[4-5]。我们利用马铃薯试管苗再生诱导,对不同品种(系)马铃薯进行耐盐性研究,通过对马铃薯茎段外植体的直接盐胁迫诱导,建立耐盐愈伤组织变异系诱导和筛选技术,分析盐胁迫条件下马铃薯试管苗 POD 酶活性变化,探讨盐胁迫诱导产生新的同工酶,以适应盐胁迫下细胞内的特殊代谢反应,为马铃薯耐盐机理研究提供参考。

1 材料与方 法

1.1 供试材料

供试的马铃薯品种(系)为大西洋、L03-1、L03-2、L03-6,均由甘肃省农业科学院生物技术研究所提供。

1.2 试验方法

根据已有的方法建立马铃薯品种(系)的试管苗扩繁体系^[6-7]。试管苗繁殖采用茎切段法,将试管苗剪成1 cm左右带腋芽的茎段,插入MS固体培养基(pH 5.8)中,每25 d继代繁殖1次,在3 000 lx连续光照、温度(25±1)℃培养备用。将生长25 d左右的试管苗剪成1 cm左右不带腋芽的茎段,将茎段嵌入固体不定芽诱导培养基A(MS+2.0 mg/L 6-BA+0.2 mg/L 2, 4-D)中,pH为5.8,在该培养基中加入不同浓度的NaCl做盐诱

导处理,NaCl浓度分别为0(CK)、1、2、3、4、5 g/kg。在A培养基中培养7 d左右后,将茎段转接到分化培养基B(MS+2.0 mg/L 6-BA+0.2 mg/L NAA)中,pH为5.8;同样在该培养基中加入浓度分别为0(CK)、1、2、3、4、5 g/kg的NaCl,每隔7 d用B培养基继代转接1次,直到分化成苗。

大西洋、L03-1、L03-2分别在1、2 g/kg NaCl浓度下;L03-6分别在1、2、3 g/kg NaCl浓度下分别得到再生试管苗(预备实验中,当NaCl浓度大于2 g/kg时,大西洋、L03-1、L03-2愈伤组织褐化严重,当NaCl浓度大于3 g/kg时,L03-6愈伤组织褐化严重,均没有得到相应的再生苗),将分化得到的试管苗接种到含相应浓度的MS培养基上生长、繁殖,试管苗生长25 d时进行相关指标的测定。

1.3 测定方法

1.3.1 过氧化物(POD)酶活性测定 采用愈创木酚显色法测定POD酶活性,参照王韶唐的方法^[8]。

1.3.2 POD同工酶酶液提取 取0.2 g叶片置于预冷的研钵中,加入5 mL提取介质[pH 5.9, 0.05 mol/L磷酸缓冲液,内含1% PVP(聚乙烯吡咯烷酮)]冰浴研磨成匀浆,于15 000 r/min、4℃离心10 min,上清液为酶提取液,4℃保存备用。

1.3.3 POD同工酶电泳分离和染色 采用聚丙烯酰胺浓度梯度凝胶电泳技术进行POD同工酶电泳分离。聚丙烯酰胺浓缩胶浓度为4%,分离胶浓度为7%,酶液上样量为15 μL,4℃条件下,开始稳压80 V电泳,0.5 h后加到160 V电泳,电泳时间为6 h。将电泳后的凝胶置于染色液(40 mL联苯胺储存液、4% NH₄Cl、5% EDTA-Na₂、0.3% H₂O₂、蒸馏水按体积比1:1:1:1:8配制)中室温

下显色 1~15 min, 酶活性区逐渐出现蓝色, 显色后漂洗凝胶, 最后对凝胶进行扫描。

1.4 数据处理

数据通过 Microsoft Excel 和 SPSS(13.0) 软件进行统计分析。

2 结果分析

2.1 NaCl 胁迫对马铃薯试管苗 POD 酶活性的影响

从图 1 可以看出, NaCl 盐胁迫条件下, 除 L03-6 外马铃薯各品种(系)间 POD 酶活性差异不显著。随着 NaCl 胁迫浓度的增加, 大西洋、L03-1 的 POD 酶活性均较对照降低, 但差异不显著; L03-6 较对照显著降低。L03-2 随着 NaCl 胁迫浓度的增加, POD 酶活性呈现先升高后降低的趋势, 与对照差异均不显著。

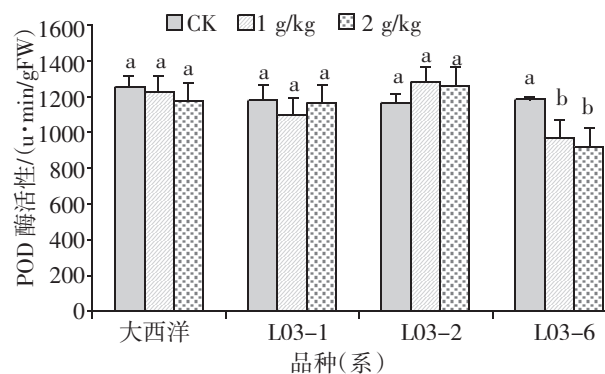
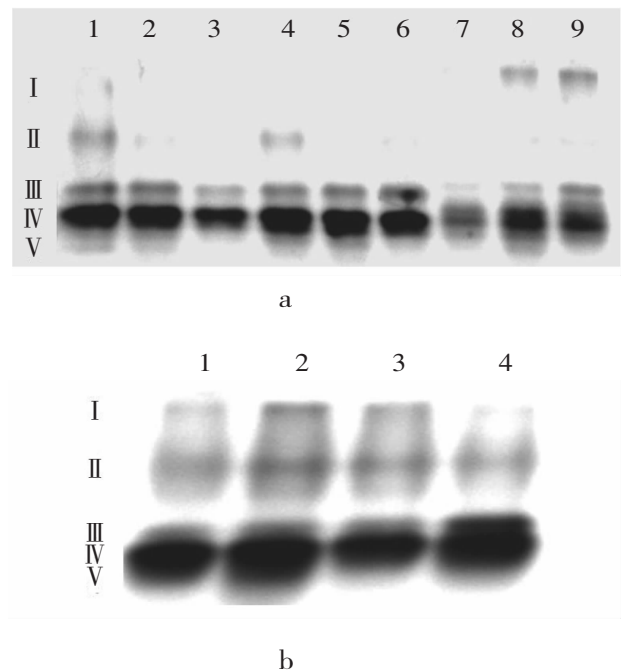


图 1 NaCl 胁迫对马铃薯试管苗 POD 酶活性的影响

2.2 NaCl 盐诱导对马铃薯试管苗 POD 同工酶的影响

POD 是一种对环境条件十分敏感的氧化酶类, 其主要作用是清除氧代谢中产生的 H_2O_2 以及能对各种逆境胁迫作出应答^[9-10]。POD 谱带的变化在一定程度上能反映植物抗盐性的强弱, 而且植物受到盐胁迫时植物组织中的蛋白质也会发生变化^[11]。从图 2 可以看出, 马铃薯盐诱导再生试管苗 POD 同工酶谱带存在品种(系)间显著差异。从图 2 a 可以看出, 盐诱导已经不能使 POD 同工

酶谱带保持完整, L03-1、L03-2 在盐诱导下主要是造成大分子量的缺失; 小分子量在 0.2% 浓度下缺失, 盐浓度的增加使酶量的表达减弱。大西洋正好与 L03-1、L03-2 相反, 与对照相比, 盐诱导大分子量酶蛋白第 I 条带酶量表达的同时, 也使小分子量酶蛋白第 III 条和第 IV 条带酶量增加。从图 2 b 可以看出, L03-6 在大分子量表达上无明显差异, 但是在盐浓度为 3 g/kg 时, 盐诱导加强了第 III 条带酶量的表达, 表明酶蛋白合成可能与作物抗氧化酶的影响有关。



a: 1 是对照 L03-1, 2 是 0.1% 浓度下 L03-1, 3 是 0.2% 浓度下 L03-1, 4 是对照 L03-2, 5 是 0.1% 浓度下 L03-2, 6 是 0.2% 浓度下 L03-2, 7 是对照大西洋, 8 是 0.1% 浓度下大西洋, 9 是 0.2% 浓度下大西洋。b: 1 是对照 L03-6, 2 是 0.1% 浓度下 L03-6, 3 是 0.2% 浓度下 L03-6, 4 是 0.3% 浓度下 L03-6。

I、II、III、IV、V 表示不同分子量同工酶谱带

图 2 NaCl 诱导马铃薯试管苗 POD 同工酶图谱

3 小结与讨论

实验结果表明, 马铃薯 4 个品种(系)的 POD 酶活性随着盐浓度的增加, 大西洋、L03-1、L03-6 与无胁迫处理相比均呈现降

低趋势, 其中大西洋、L03-1 与无胁迫处理差异均不显著, L03-6 显著降低; L03-2 在 1、2 g/kg 时 POD 酶活性均比无胁迫处理增加, 但差异不显著。从实验中可以看出, 马铃薯在遭受到盐胁迫逆境条件后, 具有一定的自我恢复能力, 其抗氧化功能较强。盐诱导马铃薯再生苗 POD 同工酶谱带品种(系)间存在显著差异。盐诱导已经不能使 POD 同工酶谱带保持完整, 马铃薯品系 L03-1、L03-2 在盐诱导下主要是造成大分子量的缺失; 小分子量在 2 g/kg 浓度下缺失, 盐浓度的增加使酶量的表达减弱。大西洋正好与 L03-1、L03-2 相反, 与无胁迫处理相比, 盐诱导使大分子量酶蛋白表达的同时, 也使小分子量酶蛋白的表达量增加。L03-6 在大分子量表达上无明显差异, 但是在盐浓度为 3 g/kg 时, 盐诱导加强了第Ⅲ条带酶量的表达, 表明酶蛋白合成可能与作物抗氧化酶的影响有关。

过氧化物酶(POD)属于植物体内的一类保护酶, 它对逆境的反应非常敏感, 可以清除过氧化物, 在植物的抗性中起着重要的作用。基因决定酶, 酶催化调节细胞代谢。细胞受到盐胁迫会发生一系列特殊的代谢变化, 甚至造成代谢紊乱。在遗传上集中表现为基因表达的改变^[12-13]。通过细胞内代谢产物的诱导或阻遏作用以及信号传导等机制调节基因的表达, 迅速提高或降低原有酶的活性, 或诱导产生新的同工酶, 以适应盐胁迫下细胞内的特殊代谢反应, 使其得以生存。

参考文献:

- [1] 龚家栋. 马铃薯不同品种耐盐性差异初步研究[J]. 中国沙漠, 1996, 16(1): 61-66.
- [2] 裴怀弟, 张敏敏, 刘新星, 等. NaCl 胁迫条件下马铃薯再生苗耐盐性研究[J]. 甘肃农业

科技, 2014(11): 39-41.

- [3] 徐乃瑜. 培养抗性植物的细胞与组织培养途径[J]. 武汉植物研究, 1987, 5(3): 34-36.
- [4] 韦小敏, 季良越, 胡彦民, 等. 玉米耐盐愈伤组织变异体的筛选初报[J]. 河南农业大学学报, 2000, 34(4): 324-328.
- [5] 王长泉, 宋恒. 杜鹃抗盐突变体的筛选[J]. 核农学报, 2003, 17(3): 179-183.
- [6] 裴荣信. 马铃薯茎尖脱毒种薯技术的改进[J]. 马铃薯杂志, 1998(2): 223-227.
- [7] 厚毅清, 张艳萍. 紫色马铃薯陇薯 03-01 试管数诱导体系的优化研究[J]. 甘肃农业科技, 2010(7): 10-11.
- [8] 王韶唐. 植物生理学实验指导[M]. 西安: 陕西科学技术出版社, 1987.
- [9] BARCELOA R. The generation of H₂O₂ In the xylem of zinnia elegans is mediated by an NADPH - oxidase - like enzyme [J]. Planta, 1998, 207: 207-216.
- [10] BELIGNIM V, LAMATTINA L. Nitric oxide counteracts cytotoxic processes mediated by reactive oxygen species in plant tissues [J]. Planta, 1999, 208: 337-344.
- [11] RAMON S, ROBERTOG, GABINORIOS. Salt stress proteins identified by a functional approach in yeast[Z]. Monatshefte Fur-Chemie, 2003.
- [12] SINGH N K, NELSON D E, KUHN D PM, et al. Molecular cloning of osmotin and regulation of expression by ABA and adaption to low water potentials[J]. Plant Physiol., 1989, 90: 1096-1101.
- [13] GALWEZA F, GULICK P J, DVORAK J. Characterization of the early stages of genetic salt stress responses in salt tolerant *Lophopyrum elongatum*, salt sensitive wheat, and their amphiploid[J]. Plant Physiol., 1993, 103: 257-265.

(本文责编: 陈伟)