

盐胁迫对地木耳和葛仙米生理生化特性的影响

李运广¹ 高坤山^{1,2}

(1. 中国科学院水生生物研究所, 武汉 430072; 2. 汕头大学海洋生物研究所, 汕头 515063)

摘要:地木耳为一种耐干旱的陆生念珠藻, 葛仙米则是水生念珠藻, 由于对各自生境的适应, 二者在对盐胁迫的反应上可能会有差异。为了阐明这种差异, 研究了不同盐度胁迫下它们的光合活性、可溶性糖、脯氨酸含量及质膜透性的变化。结果表明, 高盐胁迫下地木耳和葛仙米的光合活性均降低; 在 $0.8\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的盐浓度下胁迫 48 和 96h 后, 地木耳仍可检测到微弱的光合活性, 而在葛仙米中已检测不到。地木耳中脯氨酸升高; 可溶性糖含量升高, 增幅为 87%—200%; 质膜透性比对照略有增加, 但不同盐度之间差别不大。葛仙米中脯氨酸含量降低; 可溶性糖含量在 NaCl 小于 $0.4\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时随盐度的升高而升高, 增幅为 100%—1000%, 当高于 $0.4\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时随盐度的升高而降低; 质膜透性随盐度增加而增加, 在盐浓度为 0.6 和 $0.8\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 均达 90% 以上。结果表明, 地木耳比葛仙米更能耐受盐度胁迫; 可溶性糖在地木耳和葛仙米抵抗盐胁迫中有重要作用, 而脯氨酸在葛仙米抗盐胁迫中可能不作为相容溶质起作用。

关键词: 盐胁迫; 葛仙米; 地木耳; 生理生化

中图分类号: Q 945.78 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3207(2003)03-0227-05

念珠藻类在水生和陆生环境都有分布, 很多种类能忍受干旱、冻害甚至极端高温等环境胁迫^[1]。自然条件下, 陆生及水生念珠藻类经历失水所伴随的盐度变化, 对淡水念珠藻类葛仙米^[2]和灰球念珠藻高盐胁迫的研究表明, 它们都能忍受一定程度的盐胁迫。高盐胁迫主要通过降低外界水势并打破细胞内离子平衡, 从而引起膜结构、细胞器及酶结构的破坏; 相应地, 藻类则可通过降低光合活性、积累无机离子和某些小分子有机物如岩藻糖、脯氨酸和甘油等来减低和避免高盐毒害。然而葛仙米^[2]和灰球念珠藻在盐胁迫下脯氨酸含量却降低。本文选择了陆生念珠藻地木耳(*Nostoc commune* Vauch.) 和水生念珠藻葛仙米(*Nostoc sphaeroides* Kütz.) 为材料, 研究并比较了它们在盐胁迫下的光合和呼吸活性、质膜透性、可溶性糖及脯氨酸含量的变化, 以对水生和陆生念珠藻类的耐盐性及对盐胁迫的应答方式做些探讨。

1 材料与方法

1.1 材料的培养、处理和制备 葛仙米由本所藻种库提供。将葛仙米接种于 BG11(无 NaNO_3 BG11) 培养基, 在 $20\pm 2^\circ\text{C}$ 、约 $60\mu\text{mol photons m}^{-2}\text{s}^{-1}$ 光强、24h

照光下充空气培养, 每 10d 更换一次培养基, 一个月后至直径达 3—4mm, 将材料移至新培养基中, 培养 2d 后, 移至含有 0.05、0.1、0.2、0.4、0.6、0.8 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaCl 的培养基中, 于 22°C 、 $60\mu\text{mol photons m}^{-2}\text{s}^{-1}$ 下静置培养, 间歇震荡。地木耳于 2000 年 6 月采集于武汉新洲河堤上, 采后洗净吹干, 在黑暗干燥处室温保存半年。实验前将干燥样品放入 BG11 培养基于 $60\mu\text{mol photons m}^{-2}\text{s}^{-1}$ 、 22°C 下光复活 24h, 以达到光合活性的完全恢复, 盐度处理同葛仙米。间隔 12、48、96h 取样测量光合和呼吸作用, 同时取样品置于 120°C 烘箱中固定 30min, 80°C 下烘干^[3], 保存于干燥器中, 以用于有关生化成份的测定。

1.2 光合作用和暗呼吸的测定 用红外气体分析仪 (CGT-7000, SHIMADAZU), 通过测定密闭系统中 CO_2 浓度的变化速率, 求出藻样单位干重的光合或暗呼吸速率。反应室采用水套微培养器 (Radnoti Glass Technology Inc.), 温度通过循环其水套中的水至 Polystat 水浴 (Cole-Parmer Instrument Co.) 来控制, 测定时样品成单层平展于尼龙网垫并放在反应室的架子上(以避免自我遮光和保证气体交换通畅); 光源为碘钨灯, 测定时光强为 $650\mu\text{mol photons m}^{-2}\text{s}^{-1}$ 。

收稿日期: 2002-02-27; 修订日期: 2002-12-18

基金项目: 国家自然科学基金重点项目 (39830060); 国家杰出青年基金 (39625002) 资助

作者简介: 李运广 (1974—), 男, 山东省临沭县人; 博士; 主要从事藻类生理生态学研究

光合速率和暗呼吸速率用以下公式计算:

$$P_n \text{ or } (R_d) = (C_{t1} - C_{t2}) / (t_2 - t_1) \times V / 22.4 \times 273 / (273 + T) / W_d \times 3600$$

其中 P_n 为净光合作用, R_d 为暗呼吸速率, 单位为 $\mu\text{mol CO}_2 \text{ g}^{-1} \text{ dw h}^{-1}$, C_{t1} 和 C_{t2} 分别表示 t_1 和 t_2 (s) 时刻密闭系统中的 CO_2 浓度 ($\mu\text{L} \cdot \text{L}^{-1}$); V 表示整个密闭系统的体积 (L); T 表示测定时反应室的温度 ($^{\circ}\text{C}$), W_d 表示干重 (g) (85°C , 24h)。

1.3 可溶性糖的测定 采用蒽酮比色法^[3]。取干燥样品 0.05g, 用研钵研碎, 加 80% 乙醇, 置于 80°C 水浴不断搅拌 40min, 离心, 收集上清液, 残渣加 80% 酒精重复抽提 2 次, 合并上清液。在上清液中加入活性炭, 80°C 脱色 40min。定容至 5mL。取 400 μL 待测样品液, 加入 6mL 蒽酮试剂, 摇匀, 沸水浴加热 15min, 流动水冷却后, 测 OD_{620} , 参照标准曲线求出对应糖量。

1.4 脯氨酸测定 采用酸性茚三酮法^[4]。取干样品 0.05g, 加 5mL 3% 磺基水杨酸溶液, 加石英砂后匀浆, 沸水浴抽提 10min, 加入人造沸石 0.5g, 振荡离心; 1mL 抽提物+ 1mL H_2O + 1mL HAc + 2mL 2.5% 酸性茚三酮溶液, 沸水浴显色 60min, 冷却, 加 6mL 甲苯, 于振荡器上充分振荡, 静置分层后取甲苯层, 测 OD_{520} 。

1.5 膜透性的测定 采用紫外吸光法。将地木耳和葛仙米用不同浓度盐处理 12h 后取出, 用蒸馏水冲洗 3 遍, 吸干表面水分后准确称取 0.5g 鲜重的材料, 加入 7.5mL 蒸馏水, 置真空干燥器中用真空泵反复抽放气 3—4 次(直到原植体与水之间无气泡为止), 使水与材料紧密接触, 以便渗出物易于渗出。减压渗透 30min(400—500mmHg), 恢复常压, 在 25°C 下放置 3—4h。另取样品置沸水浴加热 20min, 杀死组织, 用这一对照测定的结果代表质膜完全被破坏时的渗出情况。将渗透液于 3000r/min 下离心 15min, 取上清测 OD_{260} 值。渗透率以下式计算:

$$\text{渗透率}(\%) = \frac{\text{样品渗透液 OD}}{\text{沸水煮 20min 样品渗透液 OD}} \times 100$$

2 结果

2.1 对光合作用与暗呼吸的影响

从图 1 中可见, 地木耳和葛仙米的净光合作用随盐度的增加和处理时间的延长而降低。如在 $0.2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl 胁迫下, 处理 12、48 和 96h 后地木耳和葛仙米光合活性分别为对照的 91%、80%、59% 和 76%、76%、37%; 在 $0.6 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl 下则分别为

对照的 19%、7%、1% 和 17%、9%、1%。葛仙米在 $0.8 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl 胁迫下处理 48 和 96h 后甚至检测不到光合活性。高盐胁迫下地木耳和葛仙米的暗呼吸作用降低, 但相对于光合作用, 不同盐浓度对暗呼吸的影响要小得多, 即使在 $0.8 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl 胁迫 96h 后, 地木耳和葛仙米的呼吸活性仍能达到对照的 35% 和 37%。

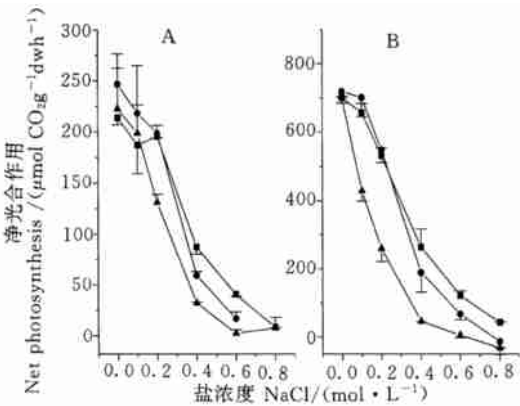


图 1 不同 NaCl 浓度处理 12(●)、48(■)和 96(▲)h 对地木耳(A)和葛仙米(B)光合作用的影响
Fig. 1 Effects of NaCl concentrations on net photosynthesis of *N. commune* and *N. sphaeroides* for 12, 48 and 96h treatments respectively. Error bars represent standard errors (n= 3)

2.2 对质膜透性的影响

盐胁迫使地木耳质膜透性比对照略有增加, 而不同盐浓度处理之间的变化不大(图 2)。葛仙米质膜透性在 NaCl 小于 $0.4 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时增加的幅度较小, 但在 0.6 和 $0.8 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl 胁迫下其外渗率都可达 90% 以上。质膜的透性反映了质膜受破坏程序, 透性越大, 质膜受破坏的程度越严重。结果说明, 在对实验设定的较高盐度(NaCl > $0.4 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$)胁迫的反应上, 地木耳质膜表现出了更高的稳定性。

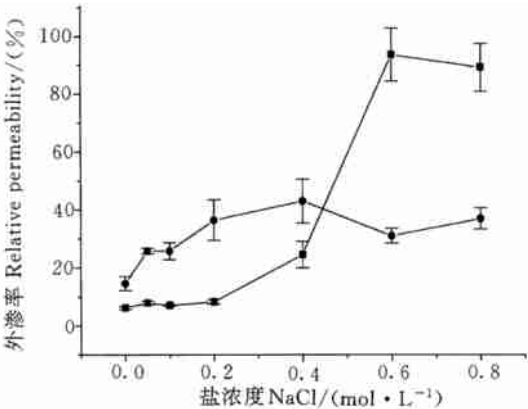


图 2 不同浓度 NaCl 处理 12h 后对地木耳(●)和葛仙米(■)质膜透性的影响
Fig. 2 Effects of NaCl concentrations on plasmalemma permeability of *N. commune* and *N. sphaeroides* after 12h treatment. Error bars represent standard errors (n= 3)

2.3 对可溶性糖和脯氨酸含量的影响

在各浓度 NaCl (0.05—0.8 mol·L⁻¹) 胁迫下, 地木耳可溶性糖含量都明显高于对照 (图 3), 增加幅度在 100%—200% 之间。当 NaCl 浓度小于 0.2 mol·L⁻¹ 时, 葛仙米可溶性糖含量随盐度增加而升高, 增幅在 100%—1100% 之间; 当 NaCl 浓度为 0.4、0.6 和 0.8 mol·L⁻¹ 时, 处理 12 和 48 h 后可溶性糖含量同对照相比则变化不大甚至低于对照, 处理 96 h 后分别变为对照的 10.8、7.6 和 4.9 倍。葛仙米中可溶性糖的这种变化反映了在适应盐胁迫过程中的动态调节过程。

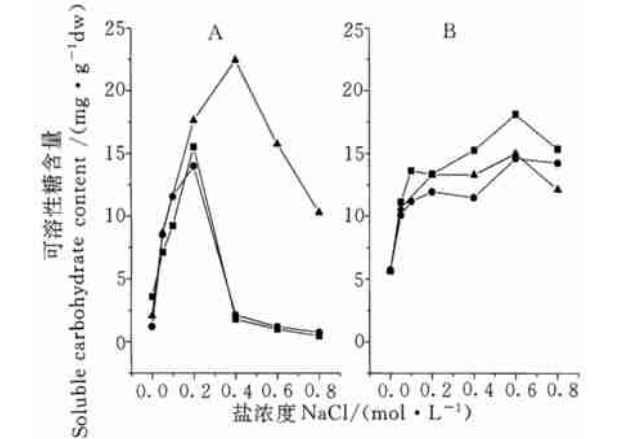


图3 不同NaCl浓度处理12(●)、48(■)和96(▲)h对葛仙米(A)和地木耳(B)可溶性糖含量的影响

Fig.3 Effects of NaCl concentrations on the contents of soluble carbohydrate in *N. phaeoides* and *N. commune* after 12, 48 and 96h treatments respectively

地木耳受盐胁迫后脯氨酸含量具有上升的趋势,而在葛仙米中则具有下降的趋势(图4)。在葛仙米中,脯氨酸最少时减至为对照的58%;在地木耳

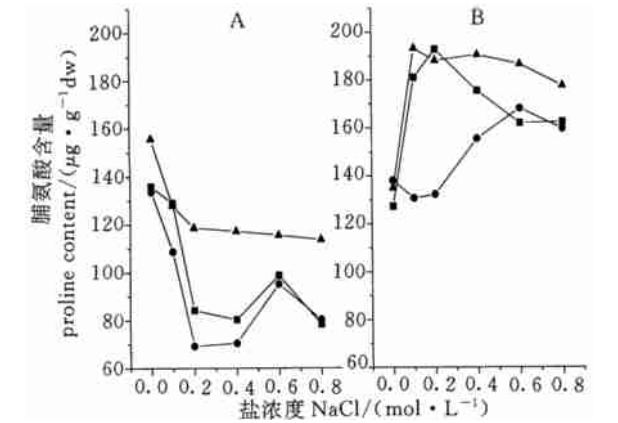


图4 不同NaCl浓度处理12(●)、48(■)和96(▲)h对葛仙米(A)和地木耳(B)脯氨酸含量的影响

Fig.4 Effects of NaCl concentrations on the contents of proline in *N. phaeoides* and *N. commune* after 12, 48 and 96h treatments respectively

中,脯氨酸最大时比对照增加了51%。脯氨酸作为植物抗盐性的一个重要指标,在盐胁迫下一般都显著升高。而在实验中,葛仙米脯氨酸含量却下降。地木耳和葛仙米的这种差异可能同它们适应不同的生境有关,也可能同盐胁迫时氮的供应有关。葛仙米是在BG11(无NaNO₃)条件下培养的,盐胁迫时也在无氮条件下进行;地木耳为野外采集,因不能确定其在天然条件下固氮与否,因此在其光合恢复和盐胁迫时都在BG11(有NaNO₃)培养基中进行,这种不同的处理也可能导致脯氨酸代谢的差异。

3 讨论

高盐胁迫下,由于细胞外离子浓度的增加引起细胞内水分外流,同时外部离子通过简单扩散和主动运输而进入胞内,两者共同作用将导致植物细胞内水分减少、离子浓度升高和离子平衡改变。这些变化可以破坏某些细胞器如叶绿体和细胞膜的结构、细胞质中某些酶的有序排列^[5]及抑制各种代谢中某些酶的活性,从而导致植物的一些生理活性如光合和呼吸活性的下降。

藻在盐胁迫条件下可以积累一些小分子有机物,如可溶性糖、脯氨酸、甘油和胆碱等,它们既可调节渗透压又不至于对酶的活性产生很大抑制。在没有水可利用的情况下,某些糖可以与膜磷脂及膜蛋白的亲水端结合,形成一个似水环境,从而维持膜的完整性。脯氨酸则可作为一种亲水脂性的分子同某些蛋白质的疏水端结合,将疏水端变成亲水端,使疏水端在低水势下不受伤害。本实验表明:在盐胁迫下葛仙米和地木耳中可溶性糖含量升高(图3);脯氨酸含量在地木耳中升高而在葛仙米中则下降。通过比较图2可知,可溶性糖和脯氨酸含量同质膜稳定性确实有一定相关性。如在0.6和0.8 mol·L⁻¹ NaCl胁迫12h后葛仙米中没有可溶性糖和脯氨酸的积累,其质膜透性皆达90%以上;在地木耳中有可溶性糖和脯氨酸的积累,其质膜透性则仍维持在对照水平。当然,质膜透性的差异还可能同它们在受盐度胁迫前所处生活环境有关。本实验中所用葛仙米主要分布于我国一些山区的稻田中,在实验室培养时也是在液体培养基中培养,生活环境相对稳定。地木耳于1999年6月份采集于武汉郊区的河岸上,在自然条件下经受这样的环境变化:下雨时浸在水中,天晴后经受由于雨水的逐渐蒸发而引起的土壤盐度的升高、体内失水而引起的离子浓缩及随之而来的日光暴晒、干旱和地面的高温。地木耳在自然

界中经常经受这种循环往复的变化,必然会产生某些适应机制,而这些机制可能在抗盐胁迫中起作用。因为植物的抗性之间可能有某些关联,如植物在转入抗盐基因后其抗干旱、冷害和高温的能力也增强^[6]。通过对膜脂的分析表明,野生地木耳不饱和脂肪酸(18:3)含量比实验室液体培养的地木耳的要高得多,而不饱和脂肪酸在维持膜结构的稳定中有重要作用。

在一般情况下,盐胁迫均会引起植物体内脯氨酸的积累,在某些种类中可以上百倍的增加。但在葛仙米和地木耳中,脯氨酸无论在绝对和相对含量上变化都相对较小,在葛仙米中脯氨酸含量甚至降低。Blumwald^[7]对灰球念珠藻和李敦海等对葛仙米的研究表明—在盐胁迫下它们的脯氨酸含量也降低。通过分析,发现它们都是在无化合态氮条件下培养的,其各种代谢过程中的氮来自于自身固氮酶的固氮。固氮酶对盐敏感,受盐胁迫时活性降低,引起体内氮源缺乏,而同时又要合成新的水胁迫蛋白和盐胁迫蛋白^[8],因此它们受盐胁迫时脯氨酸含量不仅没有增加反而减少也就不足为怪了。

藻对盐度胁迫的反应是一个复杂的生理生化过程。陆生念珠藻地木耳和水生念珠藻葛仙米对盐胁迫的反应上有共性,也有一些差异,地木耳表现出了对盐度更高的耐受性。对这些差异的生化和分子生

物学机制有待进一步的研究。

参考文献:

[1] Dodds W K, Gudder D A, Mollenhauer D. The ecology of *Nostoc* [J]. *J. Phycol.*, 1995, **31**: 2—18

[2] Li D H, Liu Y D, Song L R. The effects of salt stress on some physiological and biochemical characteristics of *Nostoc Sphaeroides* Kütz [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 1999, **23**(5): 414—419[李敦海, 刘永定, 宋立荣. 盐胁迫对葛仙米生理生化特性的影响. 水生生物学报, 1999, **23**(5): 414—419]

[3] Li R L, Wang Y Z, Zhang C F, *et al.* Biochemical experiments [M]. Wuhan: Wuhan University Press, 1998[李如亮, 王延芝, 张楚富, 等. 生物化学实验. 武汉: 武汉大学出版社, 1998]

[4] Zhang D Z, Wang H P, Zhao H X. Determination of free proline in wheat leaves [J]. *Plant Physiology Communications*, 1990, (4): 62—65[张殿忠, 汪沛洪, 赵汇贤. 测定小麦叶片游离脯氨酸含量的方法. 植物生理通讯, 1990, (4): 62—65]

[5] Wiggins M P. Role of water in some biological processes [J]. *Microbiol. Rev.*, 1990, **54**: 432—449

[6] Zhu J K, Plant salt tolerance. [J]. *Trends in Plant Science*, 2001, **6**: 66—71

[7] Blumwald E, Teř O E. Osmoregulation and cell composition in salt adaptation of *Nostoc muscorum* [J]. *Arch Microbiol.*, 1982, **132**: 168—172

[8] Iyer V, Fernandes T A, Apte S K. A role for osmotic stress induced proteins in the osmitolerance of a nitrogen fixing cyanobacterium, *Anabaena* sp. Strain Lr 31 [J]. *J. Bacteriol.*, 1994, **176**(18): 5868—5870

EFFECTS OF HYPERHALINE STRESS ON THE PHYSIOLOGICAL AND BIOCHEMICAL CHARACTERISTICS OF *NOSTOC COMMUNE* AND *NOSTOC SPHAEROIDES*

LI Yurr Guang¹ and GAO Kurr Shan^{1,2}

(1. Institue of Hydrobiology, The Chinese Acadamy of Sciences, Wuhan 430072;

2. Institue of Marine Biology, Shantou University, Shantou 515063)

Abstract: *Nostoc commune* is a terrestrial *Nostoc* species with high desiccation tolerant ability, while *Nostoc sphaeroides* is an aquatic ones. Their reactions to salt-stress might be different for the adaptation to their habitats. In order to clarify the differences, the effects of hyperhaline stress on their photosynthesis, contents of soluble carbohydrates, proline and plasmalemma permeability were investigated. Photosynthesis was significantly inhibited when the *Nostoc* species were submerged in salty water. Net photosynthesis could still be detected in *N. commune* after incubating in salty water for 48, 96h at the concentrations of 0.6 and 0.8mol•L⁻¹. However, it could not be detected in *N. sphaeroides* at the same conditions. In *Nostoc commune*, the contents of proline and soluble carbohydrates increased when treated with increased NaCl concentrations to 0.8mol•L⁻¹, and the increases of soluble carbohydrate ranged from 87% to 200%, and the plasmalemma permeability increased with increased NaCl levels till 0.4mol•L⁻¹. In *Nostoc sphaeroids*, proline decreased, but soluble carbohydrates showed a straight increase with the elevated level of salt when submersed in NaCl solutions of less than 0.4mol•L⁻¹ and the increases ranged from 100% to 1000%, but decreased with higher NaCl concentrations and plasmalemma permeability showed a straight increase with the elevated level of salt concentration. The plasmalemma permeability could reach above 90% in *N. sphaeroides* when the salt concentrations were 0.6 and 0.8mol•L⁻¹, however, it was only 31% and 37% for *N. commune*. The results indicated that *N. commune* was more tolerant to salt stress compared with *N. sphaeroides*. Soluble carbohydrates might act as an important role in resisting salt-stress in *N. commune* and *N. sphaeroides*, however, it was impossible for proline to be a compatible solute in resisting salt-stress in *N. sphaeroides*.

Key words: Salt stress; *Nostoc sphaeroides*; *Nostoc commune*; Physiology and biochemistry