

## NaCl胁迫下宁夏不同地区沙枣种子萌发特性的比较研究

林静<sup>1</sup>, 刘艳<sup>1</sup>, 李金胜<sup>2</sup>, 刘晓娟<sup>1</sup>, 王宇鹏<sup>1</sup>, 王宝山<sup>1</sup>, 陈敏<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>山东师范大学生命科学学院, 逆境植物重点实验室, 济南250014; <sup>2</sup>山东省东营菁华现代林业发展有限公司, 山东东营257000

**摘要:** 对从宁夏平罗、中宁两个地区收集的当年生沙枣种子, 分别用含有不同浓度NaCl (0、0.3%、0.6%、0.9%和1.2%, *m/V*) 的1/5 (*V/V*) Hoagland溶液处理, 以探讨这两个地区沙枣种子在萌发阶段对盐胁迫的响应特性及可能原因。结果表明, 随着NaCl浓度的升高, 中宁和平罗沙枣种子的萌发率均逐渐下降, 与中宁的沙枣种子相比, 平罗的沙枣种子表现出更强的抗盐能力。伊文斯蓝(Evans blue)染色和质膜透性实验结果表明, 随着NaCl浓度的增加, 中宁和平罗沙枣的种子胚的细胞膜透性逐渐增加, 即NaCl胁迫破坏了种子胚的质膜选择透性, 使其增大, 细胞内大量电解质外渗, 破坏了细胞的稳态。通过LiCl溶液和等渗的甘露醇溶液处理两个地区沙枣种子并测定其萌发率表明, NaCl对沙枣种子萌发的抑制既有渗透效应又有离子效应, 但是以渗透效应为主; 平罗的沙枣种子表现出更强的耐盐能力, 是因为它有更高的抗渗透胁迫能力。

**关键词:** 沙枣; NaCl; 种子萌发; 离子效应; 渗透效应

## Comparative Study on Seed Germination Characteristics of *Elaeagnus angustifolia* from Different Areas of Ningxia Province under NaCl Stress

LIN Jing<sup>1</sup>, LIU Yan<sup>1</sup>, LI Jin-Sheng<sup>2</sup>, LIU Xiao-Juan<sup>1</sup>, WANG Yu-Peng<sup>1</sup>, WANG Bao-Shan<sup>1</sup>, CHEN Min<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>Key Laboratory of Plant Stress Research, College of Life Science, Shandong Normal University, Jinan 250014, China; <sup>2</sup>Dongying Jinghua Modern Forestry Development Limited Company, Dongying, Shandong 257000, China

**Abstract:** *Elaeagnus angustifolia* seeds collected from Pingluo and Zhongning Counties of Ningxia Province were treated with different concentrations of NaCl (0, 0.3%, 0.6%, 0.9% and 1.2%, *m/V*) of Hoagland solution (1/5, *V/V*), in order to examine their response characteristics to NaCl stress and possible reasons. The results showed that germination rate of *E. angustifolia* seeds from both counties were decreased with the increase of NaCl concentration, and *E. angustifolia* seeds from Pingluo showed stronger salt resistance than those from Zhongning. Evans blue staining and membrane permeability test revealed that the plasma membrane permeability of *E. angustifolia* seed embryo increased with the increase of NaCl concentration. That was NaCl stress destroyed selective permeability of the seed embryo, resulting in increase of membrane permeability and of intracellular electrolyte leakage, damaging the cell homeostasis. *E. angustifolia* seeds from both counties were treated with LiCl solution and isosmotic mannitol solution to determine germination rate. The results indicated that NaCl-induced decrease of *E. angustifolia* seed germination was mainly due to osmotic stress, and *E. angustifolia* seeds from Pingluo exhibited stronger salt resistance because of its high capability in resistance to osmotic stress compared with the seeds from Zhongning.

**Key words:** *Elaeagnus angustifolia*; NaCl; seed germination; ionic effect; osmotic effect

当前, 我国土壤盐碱化日趋严重。我国盐碱地主要分布在长江以北地区, 其中黄淮海平原、松辽平原、新疆、青海、宁夏等地有大量盐碱地分布。黄河三角洲是我国三大三角洲之一, 土壤盐碱化严重, 地下水位高; 有机质、氮、磷含量低; 营养元素不均衡(代莉慧2013), 这些不利因素限制了主要农作物和主要绿化苗木的生长, 影响了农业生产和造林绿化。滨海城市大多采用客土绿化, 成本高、维持费用大、不能解决根本问题。树木

一旦长大, 根接触到盐碱土, 树木就会死亡。因此, 寻找耐盐的绿化树种, 是解决黄河三角洲绿化问题的关键。

收稿 2015-07-01 修定 2015-10-08

资助 国家重点基础研究发展计划(2012CB114201)、国家自然科学基金(31400239)和山东省科技发展计划项目(2013-GNC11310)。

\* 通讯作者(E-mail: chenminrundong@126.com; Tel: 0531-86180745)。

沙枣的生活力很强,有抗旱、抗风沙、耐盐碱、耐贫瘠等特点,现在已经在宁夏、新疆推广种植。宁夏、新疆地区干旱,风沙大(孙西红等2014),所以沙枣的推广起到了造林、绿化、防风、固沙作用,现已成为西北地区主要造林树种之一。此外,沙枣作为绿化树种已经在河北、天津等地区推广应用,但在黄河三角洲,特别是东营还没有推广应用。将沙枣引进黄河三角洲,不仅能够解决城市绿化问题,而且具有较大的经济和生态效益。而在引种造林时必须选择适合当地盐渍化水平的优质沙枣种子资源以保证其具有较好的出苗率和成活率(白小明等2013)。本课题组从宁夏平罗和中宁两个地区收集沙枣种子进行试验,因为平罗和中宁两地相距较远,土壤特征差别很大,所以两个地区的沙枣种子的耐盐性可能存在差异。为此本文以宁夏平罗和中宁两个地区的沙枣种子为材料,通过探讨两个地区种子在NaCl胁迫下萌发的响应及可能原因,目的在于为筛选具有较高耐盐性的沙枣品种及其在黄河三角洲的推广应用提供理论基础。

## 材料与amp;方法

### 1 实验材料

从宁夏平罗、中宁两个地区收集的沙枣(*Elaeagnus angustifolia* L.)种子。

### 2 实验方法

#### 2.1 种子耐盐性的测定

种子的处理:挑选大小一致且籽粒饱满的中宁和平罗种子,放在湿沙(沙子重:水重=100:23)中层积2 d,然后将剥去外种皮的种子用0.1% ( $m/V$ ,下同)  $HgCl_2$ 表面消毒15 min,去离子水冲洗4~5次,然后均匀排列在铺有双层滤纸的培养皿(直径9 cm)中,每皿25粒种子,3个重复。

实验设5个处理:对上述种子分别用含有0、0.3%、0.6%、0.9%、1.2% NaCl的1/5 ( $V/V$ ) Hoagland溶液处理。

将上述处理的种子放在组培室中进行避光萌发(杨育红和张文辉2006),温度为 $(23\pm 5)^\circ C$ 。处理期间每天更换相应溶液,以保持处理浓度基本不变和维持一定的湿度,种子萌发以胚根长0.5 cm为标志,每天观察其发芽及出苗情况,分别计算种子

萌发率、相对发芽率、发芽势、发芽指数和活力指数:萌发率=正常发芽种子总数/供试种子总数 $\times 100\%$ (韩清芳等2003);相对萌发率=盐处理萌发率/对照萌发率 $\times 100\%$ (刘建平等2004);发芽势=种子发芽数达到峰值时的正常发芽种子的总数/供试种子总数 $\times 100\%$ ;发芽指数 $G_t = \sum(G_t/D_t)$ ,  $G_t$ 为在 $t$ 日的发芽数,  $D_t$ 为相应的发芽日数;活力指数 $V_t = S \times G_t$ ,  $S$ 为萌发后第7天随机取9株幼苗的平均长度(cm),  $G_t$ 为发芽指数(Rubio等2003)。

当各处理的种子连续7 d没有萌发时,将未萌发的种子全部转入蒸馏水中继续观察7 d(鱼小军等2004),并统计种子的最终萌发率,最终萌发率=正常发芽种子总数/供试种子总数 $\times 100\%$ 。

参考Suzuki等(1999)的方法,利用伊文斯蓝(Evans blue)检测不同NaCl处理对宁夏中宁和平罗种子胚的细胞膜透性的影响。参考贺润喜等(1997)的方法,检测不同NaCl处理对宁夏中宁和平罗种子胚的细胞膜透性的破坏程度。

#### 2.2 NaCl胁迫对种子萌发的渗透效应和离子效应的测定

实验设4个处理,分别含有0.9% NaCl的1/5 Hoagland溶液、含有与0.9% NaCl(相当于 $154\text{ mmol}\cdot L^{-1}$  NaCl)等离子效应的LiCl ( $15.4\text{ mmol}\cdot L^{-1}$  LiCl, LiCl的离子毒害是NaCl的10倍,所以 $c_{LiCl} = c_{NaCl}/10$ )的1/5 Hoagland溶液、含有与0.9% NaCl等渗透效应的甘露醇溶液,用1/5 Hoagland作为对照组(CK)。挑选大小一致且籽粒饱满的中宁和平罗种子,放在湿度适宜的沙子里中层积2 d,然后将剥去外种皮(王宝山和赵可夫1997)的种子用0.1%  $HgCl_2$ 表面消毒15 min,去离子水冲洗4~5次,然后均匀排列在铺有双层滤纸的培养皿(直径9 cm)中,每皿25粒种子,3个重复,萌发条件同2.1节。种子萌发以胚根长0.5 cm为标志,每天观察其发芽情况,计算种子萌发率。

#### 2.3 数据分析

采用SPSS 17.0软件对实验数据进行邓肯氏多重比较,其中,以 $P < 0.05$ 为差异显著。

## 实验结果

### 1 NaCl胁迫对沙枣种子萌发的影响

#### 1.1 NaCl胁迫对种子萌发率和发芽势的影响

由图1和2可以看出,随着NaCl浓度的升高,中

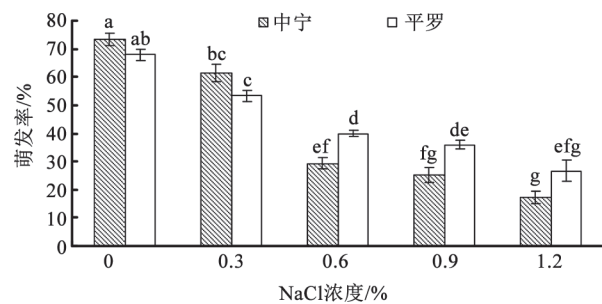


图1 不同浓度NaCl处理对中宁和平罗沙枣种子萌发率的影响

Fig.1 The effects of different NaCl concentrations on the germination rates of *E. angustifolia* seeds from Zhongning and Pingluo

图中数据代表平均值±标准偏差( $n=3$ ), 不同字母表示应用邓肯氏多重比较在 $P<0.05$ 水平上差异显著, 下同。

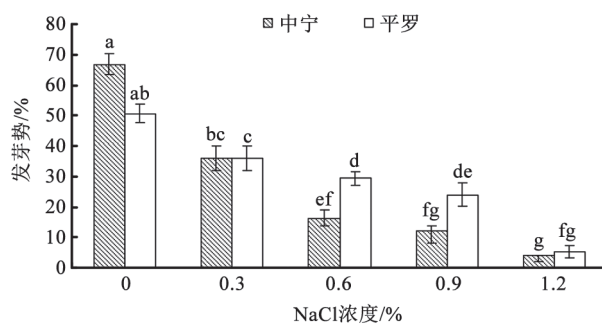


图2 不同浓度NaCl处理对中宁和平罗种子发芽势的影响

Fig.2 The effects of different NaCl concentrations on the germination energies of *E. angustifolia* seeds from Zhongning and Pingluo

宁和平罗的沙枣种子萌发率和发芽势均呈下降趋势。在NaCl浓度为0.3%时, 中宁和平罗沙枣的萌发率和发芽势与CK相比均有显著下降, 且平罗的萌发率和发芽势均比中宁的小。当NaCl浓度为0.6%时, 中宁沙枣种子的萌发受到明显抑制, 萌发率只有对照组的39.98%, 发芽势仅为对照组的24.01%; 在NaCl浓度为0.9%时, 中宁沙枣种子的萌发受到更为明显的抑制, 萌发率只有对照组的34.25%, 发芽势仅为对照组的18.18%, 平罗沙枣种子的萌发虽然也受到了抑制, 但是其萌发率明显高于中宁沙枣种子的萌发率, 其发芽势也明显高于中宁沙枣种子的发芽势。盐胁迫条件下平罗和中宁的种子相对萌发率的变化趋势与萌发率、发芽势基本一致(图3), 但是同一NaCl浓度处理下, 平罗沙枣种子表现出更高的耐盐性。

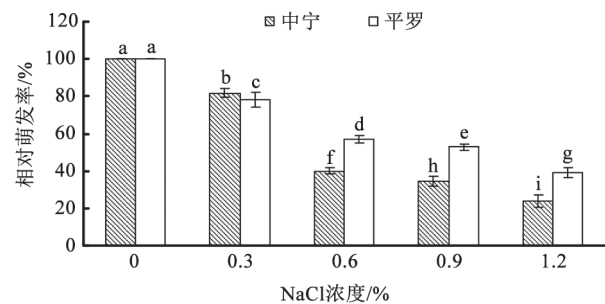


图3 不同浓度NaCl处理对中宁和平罗种子

相对萌发率的影响

Fig.3 The effects of different NaCl concentrations on the relative germination rates of *E. angustifolia* seeds from Zhongning and Pingluo

## 1.2 NaCl胁迫对种子发芽指数的影响

发芽指数体现了种子发芽的快慢和整齐度, 其数值越高表明发芽速度越快、出苗越齐。随着NaCl浓度的升高, 中宁和平罗沙枣种子的发芽指数均呈现显著下降的趋势(图4)。在0.3% NaCl处理下, 中宁和平罗沙枣种子的发芽指数没有显著差异。在浓度大于0.3% NaCl处理下, 中宁和平罗沙枣种子的发芽指数差异显著。其中在0.6% NaCl处理下, 中宁沙枣种子的发芽指数只有对照组的28.11%, 而平罗沙枣种子的发芽指数可以达到对照组的53.35%; 在0.9% NaCl处理下, 中宁沙枣种子的发芽指数只有对照组的16.67%, 而平罗沙枣种子的发芽指数可以达到对照组的42.11%。从以上结果可以看出, 与中宁沙枣种子相比, 平罗沙枣种子具有更高的耐盐性。

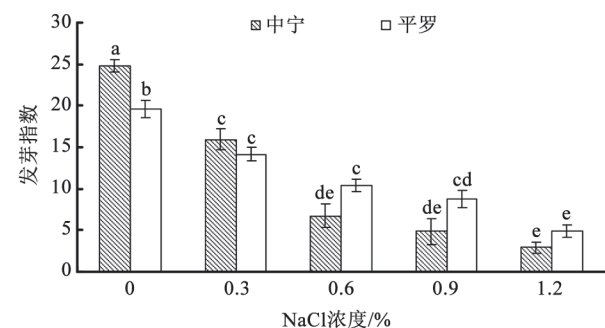


图4 不同浓度NaCl处理对中宁和平罗种子发芽指数的影响

Fig.4 The effects of different NaCl concentrations on the germination indices of *E. angustifolia* seeds from Zhongning and Pingluo



### 1.3 NaCl胁迫对种子活力指数的影响

活力指数代表了种子发芽的能力与幼苗的长势,其数值越高,表示种子的活力越大。随着NaCl浓度的升高,中宁和平罗沙枣种子的活力指数均呈下降的趋势(图5)。在NaCl浓度为0.3%时,中宁沙枣种子的活力指数为对照的49.19%,平罗沙枣种子的活力指数为对照的65.88%;在NaCl浓度为0.6%时,中宁沙枣种子的活力指数为对照的11.93%,平罗沙枣种子的活力指数为对照的42.14%;在NaCl浓度为0.9%时,中宁沙枣种子的活力指数为对照的5.6%,平罗沙枣种子的活力指数为对照的27.9%,说明中宁沙枣种子对NaCl处理的响应比平罗沙枣种子更敏感。

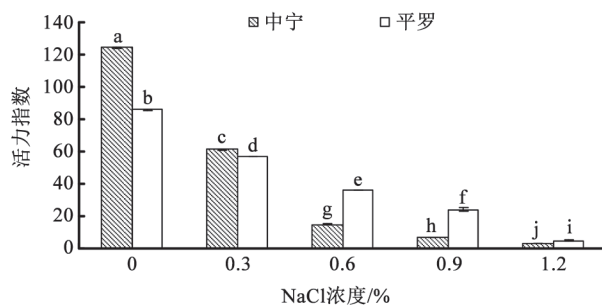


图5 不同浓度NaCl处理对中宁和平罗种子活力指数的影响  
Fig.5 The effects of different NaCl concentrations on the vigor indices of *E. angustifolia* seeds from Zhongning and Pingluo

### 1.4 NaCl胁迫对种子细胞膜透性的影响

我们利用伊文斯蓝染色和质膜透性实验分别检测CK、0.3%、0.6%、0.9%和1.2% NaCl溶液处理的中宁和平罗种子胚细胞膜透性的影响。结果表明,随着NaCl溶液浓度的增加,无论是中宁还是平罗种子,其胚细胞膜透性都在逐渐增加,细胞膜的破坏程度增加(图6和7),其中中宁的种子胚的质膜着色深,说明质膜受破坏程度大。

### 2 NaCl胁迫对种子萌发的渗透效应和离子效应

盐对植物种子萌发的影响主要包括渗透效应和离子效应两个方面。由于Li<sup>+</sup>毒害是Na<sup>+</sup>毒害的10倍,并且LiCl溶液不产生渗透胁迫,因此可以利用0.9% NaCl溶液、与0.9% NaCl等离子效应的LiCl溶液和与0.9% NaCl等渗的甘露醇溶液分别处理中宁和平罗种子(Jia等1992),测定其萌发率,

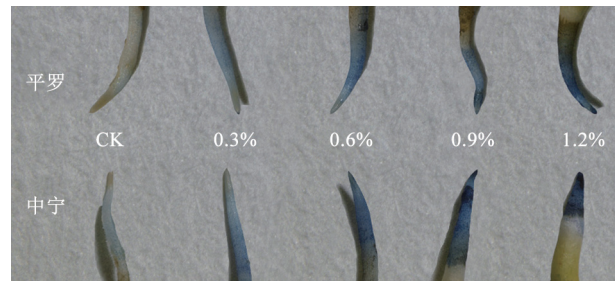


图6 伊文斯蓝染色检测不同NaCl处理对平罗(上排)和中宁沙枣种子胚(下排)的质膜透性的影响

Fig.6 Evans blue was used to test the effects of different NaCl concentrations on plasma membrane permeabilities of *E. angustifolia* seed embryos from Pingluo (up) and Zhongning (down)

图中数字代表NaCl溶液的浓度。

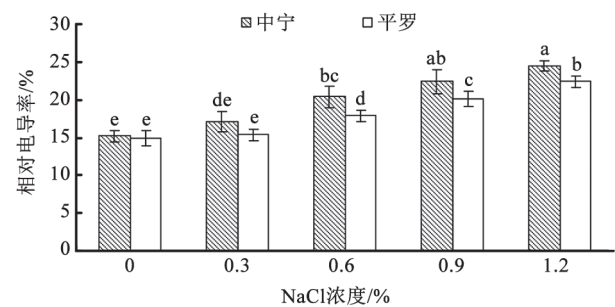


图7 不同浓度NaCl处理对中宁和平罗种子沙枣种子胚相对电导率的影响

Fig.7 The effects of different NaCl concentrations on the relative conductivities of *E. angustifolia* seeds from Zhongning and Pingluo

以探讨NaCl胁迫下种子萌发受到抑制究竟是离子效应还是渗透效应(Zhu等1998;高秀华2006;李珂2011)。由图8可知,与对照组相比,含有0.9% NaCl的1/5 Hoagland溶液、含有与0.9% NaCl等离子效应的LiCl的1/5 Hoagland溶液(等离子效应的LiCl溶液)和含有与0.9% NaCl等渗透效应的甘露醇溶液(等渗的甘露醇溶液)处理下的中宁和平罗种子的萌发率都显著下降。用等渗的甘露醇溶液处理的中宁和平罗种子萌发率要明显低于用等离子效应的LiCl溶液处理的种子的萌发率,说明0.9% NaCl溶液处理对沙枣种子萌发的抑制既有渗透效应又有离子效应,但是以渗透效应为主。并且,在盐胁迫条件下,平罗种子有更高的抗渗透胁迫能力。

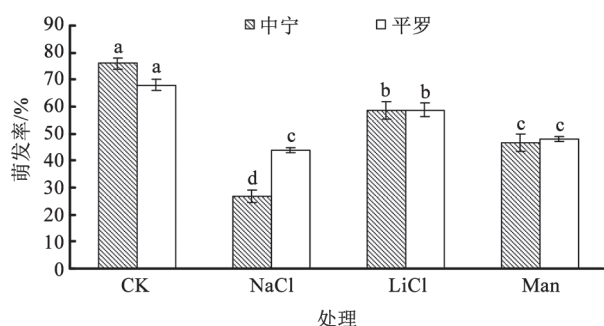


图8 不同处理对中宁和平罗沙枣种子萌发率的影响  
Fig.8 The effects of different treatments on the germination rates of *E. angustifolia* seeds from Zhongning and Pingluo  
NaCl、LiCl、Man分别表示0.9% NaCl溶液、与0.9% NaCl等渗离子效应的LiCl溶液和与0.9% NaCl等渗的甘露醇溶液。

## 讨 论

盐渍环境是一种严峻的胁迫环境,对植物的生长、发育、繁殖以及分布等生理生态特征有着重要的影响(阎顺国和沈禹颖1996)。对于大多数植物来说,种子萌发是植物生长周期的重要阶段,此期间的生长极易受到周围环境的影响。盐胁迫是影响种子萌发的重要因素(AI-Khateeb 2006; 胡宗英2014),而种子是否能耐受住萌发期间的盐胁迫对植物生长和物种分布就显得尤为重要。

发芽率、发芽指数、发芽势和活力指数是评价种子发芽常用的指标,反映了种子发芽速度、发芽整齐度和幼苗健壮的潜势(李秀霞2005)。本实验通过对发芽率等指标的测定发现,在NaCl胁迫下,宁夏中宁和平罗沙枣种子的萌发均受到抑制,并随着NaCl浓度的升高抑制作用不断增加。伊文斯蓝染色和质膜透性实验结果表明,随着NaCl溶液浓度的增加,中宁和平罗沙枣种子胚的细胞膜透性逐渐增加,即NaCl胁迫破坏了种子胚的质膜选择透性,造成质膜透性增大,细胞内大量电解质外渗,破坏了细胞的稳态,且中宁比平罗沙枣种子的质膜所受伤程度更大。但是,在不同浓度NaCl胁迫下(尤其是在NaCl浓度为0.9%时),平罗的沙枣种子表现出比中宁的沙枣种子更高的耐盐性。宁夏中宁的土壤含盐量在0.15%以下(袁宝财等2001),平罗的土壤平均含盐量为0.34%(阿也提古丽·斯迪克2011),宁夏平罗的土壤含盐量远远高于宁夏中宁的土壤含盐量。不同种源地沙枣

种子由于其生长环境不同,长期生长在此生源地沙枣种子的种子质量存在较大差异(左凤月2013; 张学勇等2012)。由此推测,平罗的沙枣种子耐盐性之所以高于中宁的沙枣种子可能是因为平罗的生长环境中土壤含盐量高于中宁所在的环境,沙枣在同一地区长期生长所产生的适应性。

本实验通过NaCl溶液、LiCl溶液和与NaCl等渗的甘露醇溶液分别处理中宁和平罗种子,发现NaCl对中宁和平罗种子萌发的抑制作用既有渗透效应又有离子效应,但是以渗透效应为主,并且在盐胁迫条件下平罗种子有更高的抗渗透胁迫能力。

综上所述,NaCl对宁夏中宁和宁夏平罗沙枣种子萌发的抑制作用主要是由渗透胁迫引起的,宁夏平罗的沙枣种子表现出比中宁的沙枣种子更高的抗盐能力,是因为平罗的沙枣种子有更高的抗渗透胁迫能力。大田实验显示,平罗沙枣与中宁沙枣相比,前者具有更优美的树形(数据未列出)。所以本实验预选用种源地为宁夏平罗的沙枣种子在黄河三角洲引种推广。而有关宁夏平罗的沙枣种子在盐胁迫下是通过何种方式缓解渗透胁迫以减轻盐害,使种子吸水萌发,其机制有待进一步研究。

## 参考文献

- 阿也提古丽·斯迪克(2011). 宁夏平罗土壤含盐量遥感估算方法研究[硕士论文]. 南京: 南京大学
- 白小明, 王靖婷, 贺佳圆, 董沁, 吕优伟, 孙吉雄(2013). 8个野生早熟禾种子萌发期耐盐性研究. 草地学报, 21 (3): 546-555
- 代莉慧(2013). 盐地碱蓬种子萌发过程中耐盐生理指标测定及基因表达分析[硕士论文]. 包头: 内蒙古科技大学
- 高秀华(2006). 盐芥耐盐相关基因的功能研究[博士论文]. 济南: 山东师范大学
- 韩清芳, 李崇巍, 贾志宽(2003). 不同苜蓿品种种子萌发期耐盐性的研究. 西北植物学报, 23 (4): 597-602
- 贺润喜, 王玉国, 张石城(1997). 用电导仪测定植物组织呼吸速率. 山西农业大学学报, 17 (2): 165-167
- 胡宗英(2014). 不同盐碱胁迫对披碱草和紫花苜蓿种子萌发的影响[硕士论文]. 长春: 吉林农业大学
- 李珂(2011). 过量表达盐地碱蓬叶绿体*sAPX*基因对拟南芥抗盐性的影响[硕士论文]. 济南: 山东师范大学
- 李秀霞(2005). 新疆大果沙枣的抗盐性研究[硕士论文]. 乌鲁木齐: 新疆农业大学
- 刘建平, 李志军, 何良荣, 周正立, 徐雅丽(2004). 胡杨、灰叶胡杨种子萌发期抗盐性的研究. 林业科学, 40 (2): 165-169
- 孙西红, 赵凌平, 王占彬(2014).  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ 胁迫对高羊茅种子萌发的

- 影响. 草业科学, 31 (4): 677~682
- 王宝山, 赵可夫, 邹琦(1997). 作物耐盐机理研究进展及提高作物抗盐性的对策. 植物学通报, 14 (S1): 25~30
- 阎顺国, 沈禹颖(1996). 生态因子对碱茅种子萌发期耐盐性影响的数量分析. 植物生态学报, 20 (5): 414~422
- 杨育红, 张文辉(2006). 沙枣组织脱分化培养与快繁体系建立的研究. 植物研究, 26 (4): 435~441
- 鱼小军, 王彦荣, 曾彦军, 苏德(2004). 温度和水分对无芒隐子草和条叶车前种子萌发的影响. 生态学报, 24 (5): 883~887
- 袁宝财, 达海莉, 李晓瑞(2001). 宁夏枸杞的生物学特性及开发利用前景. 河北林果研究, 16 (2): 151~153
- 张学勇, 陈忠林, 刘强, 穆中学(2012). 盐胁迫对结缕草和高羊茅种子萌发的影响. 种子, 31 (9): 4~7
- 左凤月(2013). 盐胁迫对3种白刺生长、生理生化及解剖结构的影响[硕士论文]. 重庆: 西南大学
- Al-Khateeb SA (2006). Effect of salinity and temperature on germination, growth and ion relations of *Panicum turgidum* Forssk. Bioresour Technol, 97: 292~298
- Jia ZP, McCullough N, Martel R, Hemmingsen S, Young PG (1992). Gene amplification at a locus encoding a putative  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  antiporter confers sodium and lithium tolerance in fission yeast. EMBO J, 11 (4): 1631~1640
- Rubio-Casal AE, Castillo JM, Luque CJ, Figueroa ME (2003). Influence of salinity on germination and seeds viability of two primary colonizers of Mediterranean salt pans. J Arid Environ, 53 (3): 145~154
- Suzuki K, Yano A, Shinshi H (1999). Slow and prolonged activation of the p47 protein kinase during hypersensitive cell death in a culture of tobacco cells. Plant Physiol, 119 (4): 1465~1472
- Zhu JK, Liu J, Xiong L (1998). Genetic analysis of salt tolerance in *Arabidopsis*: evidence for a critical role of potassium nutrition. Plant Cell, 10 (7): 1181~1191