植物营养与肥料学报 2012,18(3):689-698
Plant Nutrition and Fertilizer Science

白籽南瓜嫁接对不同盐胁迫下黄瓜幼苗氮代谢和蛋白表达的影响

王丽萍[1,2], 孙 锦[1], 郭世荣[1*], 田 婧[1], 阳燕娟[1]
(1 南京农业大学园艺学院,农业部南方蔬菜遗传改良重点开放实验室,江苏南京 210095;
2 河北工程大学农学院,河北邯郸 056021)

摘要: 采用营养液栽培,以白籽南瓜(*Cucurbita maxima* × *Cucurbita moschata*)为砧木,"津优 3 号"黄瓜为接穗,研究了白籽南瓜嫁接对等渗 $Ca(NO_3)_2$ 和 NaCl 胁迫下黄瓜幼苗生长、氮代谢、渗透调节物质和蛋白表达的影响。结果表明,白籽南瓜嫁接黄瓜可明显促进 $Ca(NO_3)_2$ 和 NaCl 胁迫下黄瓜嫁接苗生长,提高叶片和根系中硝酸还原酶(NR)活性及 NO_3^--N、可溶性糖、脯氨酸和可溶性蛋白含量,抑制 NH_4^+-N 升高;叶片中可溶性蛋白表达量增强,其相对分子质量($\times 10^3$)分别约为 188.4、156.1、120.4、54.0、37.3、32.1、30.6、18.9、17.8 和 17.1,并出现相对分子质量为 64.3×10^3 的一种新蛋白,而 81.0×10^3 的蛋白表达量减弱,这 12 种蛋白可能与白籽南瓜嫁接提高黄瓜耐盐性密切相关。研究还发现,NaCl 胁迫下黄瓜自根嫁接和砧木嫁接植株叶片中相对分子质量($\times 10^3$)约为 86.1、23.4、18.9 和 17.8 的蛋白表达量大于等渗的 $Ca(NO_3)_2$,相对分子质量($\times 10^3$)约为 188.4、156.1、54.0 和 17.1 的蛋白表达量小于等渗的 $Ca(NO_3)_2$;NaCl 胁迫 9 d 后 39.1×10^3、35.4×10^3 和 21.2×10^3 三种蛋白在自根嫁接株中消失,这 11 种蛋白可能与白籽南瓜嫁接株耐 $Ca(NO_3)_2$ 胁迫能力强有关。综上,$Ca(NO_3)_2$ 胁迫对黄瓜幼苗造成的伤害程度显著低于等渗的 NaCl 胁迫,白籽南瓜砧木嫁接可调节黄瓜植株体内氮素代谢,提高渗调能力,有效地缓解 $Ca(NO_3)_2$ 和 NaCl 胁迫对黄瓜植株的伤害,尤其对 $Ca(NO_3)_2$ 胁迫伤害的缓解效果明显,可以作为黄瓜耐盐砧木在生产上应用。

关键词: 嫁接黄瓜; 白籽南瓜; NaCl; $Ca(NO_3)_2$; 氮代谢; 渗透调节物质; SDS-PAGE
中图分类号: S642.2.60　　**文献标识码:** A　　**文章编号:** 1008-505X(2012)03-0689-10

Effects of graft with pumpkin rootstock on nitrogen metabolism and protein expression in the cucumber seedlings under iso-osmotic $Ca(NO_3)_2$ or NaCl stress

WANG Li-ping[1,2], SUN Jin[1], GUO Shi-rong[1*], TIAN Jing[1], YANG Yan-juan[1]
(*1 College of Horticulture, Nanjing Agricultural University/Key Laboratory of Southern Vegetable Crop Genetic Improvement, Ministry of Agriculture, Nanjing 210095, China;*
2 College of Agronomy, Hebei Engineering University, Handan 056000, China)

Abstract: Effects of grafting on the growth, nitrogen metabolism, osmoregulatory substances and soluble protein expression was conducted with pumpkin (*Cucurbita maxima* × *Cucurbita moschata*) as the rootstock and a cultivar cucumber 'Jinyou No. 3' as the scion under iso-osmotic $Ca(NO_3)_2$ or NaCl stress. Results showed that the rootstock-grafted seedlings significantly enhanced the growth, NR activity, NO_3^--N, soluble protein, soluble sugar, proline content and decreased NH_4^+-N content under iso-osmotic $Ca(NO_3)_2$ and NaCl stress. SDS-PAGE profiles

收稿日期: 2011-10-21　　**接受日期:** 2012-03-12
基金项目: 国家重点基础研究发展计划项目(2009CB119000);国家自然科学基金项目(30900995,31071831);现代农业产业技术体系建设专项(CARS-25-C-03);教育部高校博士点基金项目(20100097110001);江苏省高校优势学科建设工程项目;江苏省农业三新工程项目[SX(2011)289]资助。
作者简介: 王丽萍(1969—),女,河北邯郸人,教授,博士研究生,主要从事蔬菜逆境生理研究。E-mail: wlp29@163.com
* 通讯作者 E-mail: srguo@njau.edu.cn

showed that there were twelve differentially-expressed proteins in leaves of rootstock-grafted seedlings in present of salt treatment. Of these twelve proteins, ten proteins were up-regulated including the proteins of relative molecular weight ($\times 10^3$) for 188.4, 156.1, 120.4, 54.0, 37.3, 32.1, 30.6, 18.9, 17.8 and 17.1, while one proteins of 81.0×10^3 were down-regulated and turned a novel protein of 63.4×10^3. And then, these twelve proteins were probably related to enhancement of salt-tolerance of rootstock-grafted cucumber seedlings. Results also showed the expressing of four proteins of relative molecular weight ($\times 10^3$) such as 86.1,23.4, 18.9 and 17.8 were stronger in both self-grafted and rootstock-grafted seedlings under NaCl stress than that under $Ca(NO_3)_2$ stress, whereas the expressing of proteins relative molecular weight ($\times 10^3$) such as 188.4, 156.1, 54.0 and 17.1 were lower under NaCl stress than that under $Ca(NO_3)_2$ stress. And three proteins of 39.1×10^3, 35.4×10^3 and 21.2×10^3 even disappeared in self-grafted seedlings under NaCl stress for 9 days. It was possible that these eleven proteins were related to the high tolerance to $Ca(NO_3)_2$ stress of rootstock-grafted cucumber seedlings. In conclusion, the damages caused by NaCl stress were more serious than that by $Ca(NO_3)_2$ stress, and rootstock-grafting could effectively alleviated the injury by regulating nitrogen metabolism and osmoregulatory substances of cucumber seedlings under salt stress. It seemed that the alleriating effect in rootstock-grafted plants more expressing under $Ca(NO_3)_2$ stress.

Key words: grafted cucumber; *Cucurbita maxima* × *Cucurbita moschata*; NaCl; $Ca(NO_3)_2$; nitrogen metabolism; osmoregulatory substances; SDS – PAGE

盐胁迫是限制作物生长发育和产量的主要环境因素之一。盐碱化土壤的主要盐害离子为 Na^+，而设施内特有的小气候特点以及不当的栽培管理措施，使以 NO_3^- 和 Ca^{2+} 为主要盐分组成的土壤次生盐渍化日趋明显[1]，形成了不同于 NaCl 胁迫的新逆境。盐胁迫导致的渗透胁迫和离子胁迫使植物细胞结构破坏，影响了植物中氮素同化有关酶的活性，甚至氮素同化途径被改变而影响植物对氮素的利用，打破了植物的养分平衡[2]。植物一方面通过积累大量有机物质（如脯氨酸、甜菜碱、可溶性蛋白等）进行渗透调节，另一方面依赖各种跨膜蛋白、离子通道蛋白等进行离子区域化作用，来减轻盐胁迫对植物的伤害，提高其耐盐性[3]。因此，研究盐胁迫对作物的影响及适应机制是合理高效利用盐渍化土地和设施土壤的紧迫任务。

黄瓜（*Cucumis Satiuvs* L.）是设施栽培的主要作物之一，且根系脆弱，对盐胁迫的抗性较弱，采用耐盐砧木嫁接是提高其耐盐性的有效措施[4-7]。盐胁迫下嫁接换根可改变植株养分和水分的主要吸收器官，势必会影响其对矿质元素的吸收和分配规律及对氮素的利用等[8-9]。已有研究表明，嫁接能提高茄子叶片硝酸还原酶活性，促进氮素转化和吸收[10]。黄瓜生产上常用的嫁接砧木包括黑籽南瓜（*Cucurbita ficifolia* Bouché.）和白籽南瓜（*Cucurbita maxima* × *Cucurbita moschata*），但黑籽南瓜作砧木黄瓜果实表面“白霜”（蜡粉）重，从而影响黄瓜的品质，且黄瓜嫁接主要集中在 NaCl 胁迫研究方面[7]，在 $Ca(NO_3)_2$ 胁迫下利用耐盐砧木嫁接提高黄瓜胁迫耐性的生理研究国内外尚无报道。因此，本研究通过比较等渗 $Ca(NO_3)_2$ 和 NaCl 胁迫下本实验室筛选的耐盐白籽南瓜砧木嫁接（*cs/cm*）与自根嫁接（*cs/cs*）黄瓜植株生长、氮代谢以及蛋白表达的变化特性，探讨不同盐胁迫下白籽南瓜嫁接对黄瓜植株氮代谢的调控作用及嫁接黄瓜耐 $Ca(NO_3)_2$ 和 NaCl 胁迫的生理机制差异，为嫁接提高黄瓜植株耐盐性提供理论依据，并完善嫁接提高植物抗逆性的理论。

1 材料与方法

1.1 试验设计

试验于2009年4月至7月在南京农业大学玻璃温室内进行。供试黄瓜品种为“津优3号”，由天津科润黄瓜研究所提供；砧木为耐盐性较强的白籽南瓜品种“青砧1号”（前试验筛选得到），由青岛市农科院提供。

选取饱满、整齐一致的白籽南瓜种子和黄瓜种子，经消毒、浸种、催芽后，播于装有石英砂的50孔穴盘中，昼夜温度25～30℃/15～18℃。种子出苗后浇灌1/2 Hoagland 营养液，待白籽南瓜和黄瓜种子“破土”出苗时播种黄瓜接穗种子。砧木第1片真叶刚展开、接穗2片子叶展平时，插接法进行嫁接，然后置于塑料小拱棚中，前3 d遮光保温保湿，昼夜温度25～30℃/18～20℃，湿度95%以上，3 d后逐渐通风见光，7～10 d嫁接成活后按正常苗管理。

幼苗 2 叶 1 心时，挑选整齐一致的嫁接植株定植于装有 1/2 Hoagland 营养液的 65 L 水槽内进行预培养，每水槽 36 株。调节营养液 pH 为 6.5 ± 0.1，EC 值为 2.2～2.5 mS/cm，气泵间歇通气（40 min/h）。幼苗 3 叶 1 心时开始进行如下处理：1）1/2 营养液栽培自根嫁接苗（对照 1，*cs/cs*）；2）1/2 营养液栽培自根嫁接苗，同时用 90 mmol/L NaCl 处理（*cs/cs* + Na）；3）1/2 营养液栽培自根嫁接苗，同时用 60 mmol/L $Ca(NO_3)_2$ 处理（*cs/cs* + CN）；4）1/2 营养液栽培白籽南瓜嫁接苗（对照 2，*cs/cm*）；5）1/2 营养液栽培白籽南瓜嫁接苗，同时用 90 mmol/L NaCl 处理（*cs/cm* + Na）；6）1/2 营养液栽培白籽南瓜嫁接苗，同时用 60 mmol/L $Ca(NO_3)_2$ 处理（*cs/cm* + CN）。为防止盐刺激，营养液中 NaCl 浓度每天递增 30 mmol/L，$Ca(NO_3)_2$ 浓度每天递增 20 mmol/L，同一天达到终浓度。两种盐均以固体直接加到营养液中。60 mmol/L $Ca(NO_3)_2$ 和 90 mmol/L NaCl 的营养液为等渗溶液，渗透压均为 -56.7 Mpa。处理后每 3 d 更换一次营养液，试验重复 3 次，随机排列。

分别于处理后 0、3、6、9 d 取嫁接黄瓜幼苗生长点下第 2 片完全展开叶及根系，测定各项指标，每处理重复测定 3 次，取平均值。

1.2　测定方法

1.2.1 生长指标的测定　处理第 9 d 时，每处理各取 15 株，将地上部和地下部分别取样，先用自来水冲洗 2～3 次，再用蒸馏水冲洗 2 次，用吸水纸吸干后称量鲜样质量，105 ℃杀青 15 min，75 ℃烘干至恒重，称干样质量。

1.2.2 生理指标的测定　硝态氮和铵态氮含量按陈因[11]的方法测定；硝酸还原酶活性（NR）按照 Tachibana 等[12]的方法；可溶性糖采用蒽酮比色法；脯氨酸含量采用水合茚三酮比色法；可溶性蛋白含量采用考马斯亮蓝染色法测定，标准蛋白质溶液用牛血清白蛋白（Amresco 分装）配制。

1.2.3 叶片可溶性蛋白的 SDS - PAGE　取各处理 3、6、9 d 的黄瓜叶片可溶性蛋白样品进行 SDS - PAGE 电泳分析。参照黄雪梅等[13]的方法制备样品用于电泳。蛋白表达分析采用不连续十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳（SDS - PAGE）方法，T1（凝胶浓度，浓缩胶）= 5%，T2（凝胶浓度，分离胶）= 12.5%，凝胶厚度为 1 mm。每泳道 20 μg 蛋白等量上样。电极缓冲液为 Tris-甘氨酸（pH = 8.3）系统，电泳 5～6 h。凝胶用考马斯亮兰 R - 250 染色过夜，脱色至背景色透明后采用凝胶成像系统（Tanon GIS - 2500，上海）采集电泳图，配套分析软件（Gel Image System 1D version 4.1.2）进行条带强度的分析，根据蛋白质迁移率测定蛋白质的相对分子质量。

1.3　数据分析

所有数据用 SAS 8.0 软件进行方差分析和差异显著性检验（Duncan 法），显著性水平为 $\alpha = 0.05$。

2　结果与分析

2.1　幼苗生长

由表 1 可知，等渗 $Ca(NO_3)_2$ 和 NaCl 胁迫处理 9 d 后，显著抑制了 *cs/cs* 生长，而 *cs/cm* 生长受抑制程度显著降低，表现出较强的耐盐特性。NaCl 胁迫下，*cs/cs* 和 *cs/cm* 地上部鲜重、地上部干重、根系鲜重、根系干重分别比对照降低 75.40%、57.80%、81.45%、60.00% 和 66.04%、52.71%、56.27%、36.84%；$Ca(NO_3)_2$ 胁迫下，*cs/cs* 和 *cs/cm* 地上部鲜重、地上部干重、根系鲜重、根系干重分别比对照降低 51.56%、36.42%、24.64%、20.00% 和 47.33%、26.83%、20.45%、15.79%，均达到显著水平。表明 NaCl 胁迫对黄瓜幼苗生长抑制程度显著高于等渗的 $Ca(NO_3)_2$，而 *cs/cm* 对 $Ca(NO_3)_2$ 和 NaCl 的胁迫耐性不同，能明显提高 $Ca(NO_3)_2$ 胁迫下黄瓜植株的生长。

2.2　氮代谢

从图 1 可以看出，总体上，黄瓜植株叶片中 NR 活性高于根系，NO_3^--N 的含量低于根系，NH_4^+-N 的含量高于根系，说明黄瓜植株硝酸还原代谢主要在叶片中进行，根系吸收的硝酸盐主要运输到叶片中转化为 NH_4^+-N。

NaCl 胁迫下，*cs/cs* 和 *cs/cm* 植株叶片和根系中的 NR 活性、NO_3^--N 含量随着胁迫时间的延长逐渐下降，并显著低于各自对照；$Ca(NO_3)_2$ 胁迫下两种嫁接苗叶片和根系中 NR 活性、NO_3^--N 含量均呈先上升后下降的趋势，并显著高于各自对照，在胁迫第 6 d 时达到峰值。无论是 NaCl 胁迫还是 $Ca(NO_3)_2$ 胁迫，*cs/cm* 叶片和根系中 NR 活性、NO_3^--N 含量始终高于 *cs/cs*。两种盐比较，NaCl 胁迫后两种嫁接苗叶片和根系中 NR 活性、NO_3^--N 含量始终低于等渗的 $Ca(NO_3)_2$ 胁迫处理（图 1）。表明不同盐胁迫对黄瓜植株体内 NR 活性和 NO_3^--N 的还原效应不同，$Ca(NO_3)_2$ 胁迫能明显诱导 NR 活性；*cs/cm* 能使盐胁迫下黄瓜幼苗维持较高的 NR 活性，有利于植株氮素同化效率的提高。

表1 白籽南瓜嫁接对等渗 $Ca(NO_3)_2$ 和 NaCl 胁迫下黄瓜幼苗生长的影响

Table 1 Effects of graft with pumpkin rootstock on growth of cucumber seedlings under iso-osmotic $Ca(NO_3)_2$ or NaCl stress

处理 Treatments	地上部鲜重 Shoot fresh weight (g/plant)	地上部干重 Shoot dry weight (g/plant)	根系鲜重 Root fresh weight (g/plant)	根系干重 Root dry weight (g/plant)
cs/cs	29.27 ±0.96 b	1.73 ±0.22 b	3.45 ±0.34 c	0.15 ±0.01 b
cs/cs + Na	7.12 ±1.36 e	0.73 ±0.07 d	0.64 ±0.19 e	0.06 ±0.01 d
cs/cs + CN	14.18 ±1.00 d	1.10 ±0.29 c	2.60 ±0.09 d	0.12 ±0.01 c
cs/cm	36.13 ±1.56 a	2.46 ±0.19 a	4.94 ±0.26 a	0.19 ±0.02 a
cs/cm + Na	12.27 ±0.91 d	1.06 ±0.07 c	2.16 ±0.15 d	0.12 ±0.02 c
cs/cm + CN	19.03 ±2.12 c	1.80 ±0.12 b	3.93 ±0.07 b	0.16 ±0.02 b

注(Note): *cs/cs*、*cs/cs* + Na、*cs/cs* + CN 分别为黄瓜自根嫁接株 1/2 Hoagland 营养液(CK)、90 mmol/L NaCl 和 60 mmol/L $Ca(NO_3)_2$ 处理 The *cs/cs*、*cs/cs* + Na、*cs/cs* + CN represent self-grafted cucumber plants under 1/2 Hoagland nutrient solution, 90 mmol/L NaCl and 60 mmol/L $Ca(NO_3)_2$ respectively; *cs/cm*、*cs/cm* + Na、*cs/cm* + CN 分别为白籽南瓜砧木嫁接黄瓜株 1/2 Hoagland 营养液(CK)、90 mmol/L NaCl 和 60 mmol/L $Ca(NO_3)_2$ 处理 The *cs/cm*, *cs/cm* + Na, *cs/cm* + CN represent graft of cucumber scions with pumpkin rootstock plants under 1/2 Hoagland nutrient solution, 90 mmol/L NaCl and 60 mmol/L $Ca(NO_3)_2$, respectively. 同列数值不同字母表示差异达 5% 显著水平 Values followed by different letters within the same column indicate significant difference at the 5% level.

等渗 NaCl 和 $Ca(NO_3)_2$ 胁迫下,*cs/cs* 和 *cs/cm* 叶片和根系中 NH_4^+-N 含量均呈先上升后下降的趋势,并显著高于各自对照,*cs/cm* 植株中 NH_4^+-N 含量均低于 *cs/cs* 植株,NaCl 胁迫后两种嫁接苗叶片和根系中 NH_4^+-N 含量始终高于等渗的 $Ca(NO_3)_2$(图1)。表明 *cs/cm* 植株能减少等渗盐胁迫下黄瓜植株体内过多的 NH_4^+-N 的积累,尤其减少了 $Ca(NO_3)_2$ 胁迫下 NH_4^+-N 的积累。

2.3 渗透调节物质

图2 显示,等渗 $Ca(NO_3)_2$ 和 NaCl 胁迫下,*cs/cs*和 *cs/cm* 植株叶片和根系中可溶性糖和脯氨酸含量均显著高于各自对照,并随着处理天数的延长,呈先上升后下降的趋势。*cs/cm* 植株可溶性糖和脯氨酸含量均高于 *cs/cs* 植株,NaCl 胁迫下黄瓜植株中可溶性糖和脯氨酸含量始终低于等渗的$Ca(NO_3)_2$。

在 NaCl 胁迫下,随处理时间的延长 *cs/cs* 和 *cs/cm* 植株叶片和根系中可溶性蛋白含量呈下降趋势,并低于各自对照;而 $Ca(NO_3)_2$ 胁迫下,可溶性蛋白含量呈先上升后下降的趋势,在第6 d 达到最高值,并高于各自对照,第9 d 开始下降。在整个处理期间,$Ca(NO_3)_2$ 胁迫的植株内可溶性蛋白含量始终高于等渗的 NaCl,无论对照还是等渗盐胁迫下,*cs/cm* 植株叶片和根系内可溶性蛋白含量均始终高于 *cs/cs* 植株。

以上结果表明,*cs/cm* 植株能提高黄瓜植株体内可溶性糖、脯氨酸和可溶性蛋白含量,渗透调节能力增强,其含量的增加有利于植株耐盐性的增强,减轻盐胁迫对黄瓜嫁接苗的伤害,尤其能减轻 $Ca(NO_3)_2$胁迫对植株的伤害。

2.4 叶片可溶性蛋白的表达

从图3 可以看出,每个泳道均有将近35 个蛋白条带,其相对分子质量范围在 15×10^3 ~ 240×10^3 之间,有18 种蛋白随处理的不同和处理时间的延长出现明显变化,且大多数条带在处理第3 d 时即表现明显的差异。1)在 $Ca(NO_3)_2$ 和 NaCl 胁迫下,相对分子质量($\times10^3$)约为188.4、156.1、120.4、54.0、37.3、32.1、30.6、18.9、17.8 和17.1 的蛋白在 *cs/cm* 植株中表达量均高于 *cs/cs*, 而相对分子质量约为 81.0×10^3 的蛋白在 *cs/cm* 植株的表达量均低于 *cs/cs*,相对分子质量约为 63.4×10^3 的蛋白只在处理的第9 d 表达,且在 *cs/cs* 植株(对照)中不表达。推测这些蛋白在盐胁迫下主要是受白籽南瓜砧木嫁接诱导。2) $Ca(NO_3)_2$ 胁迫下,相对分子质量($\times10^3$)约为188.4、156.1、54.0 和17.1 的蛋白表达量高于等渗的 NaCl 胁迫,而相对分子质量($\times10^3$)约为86.1、23.4、18.9 和17.8 的蛋白表达量小于等渗的 NaCl 胁迫;NaCl 胁迫下,在处理第9 d 相对分子质量($\times10^3$)约为39.1、35.4 和21.2 的

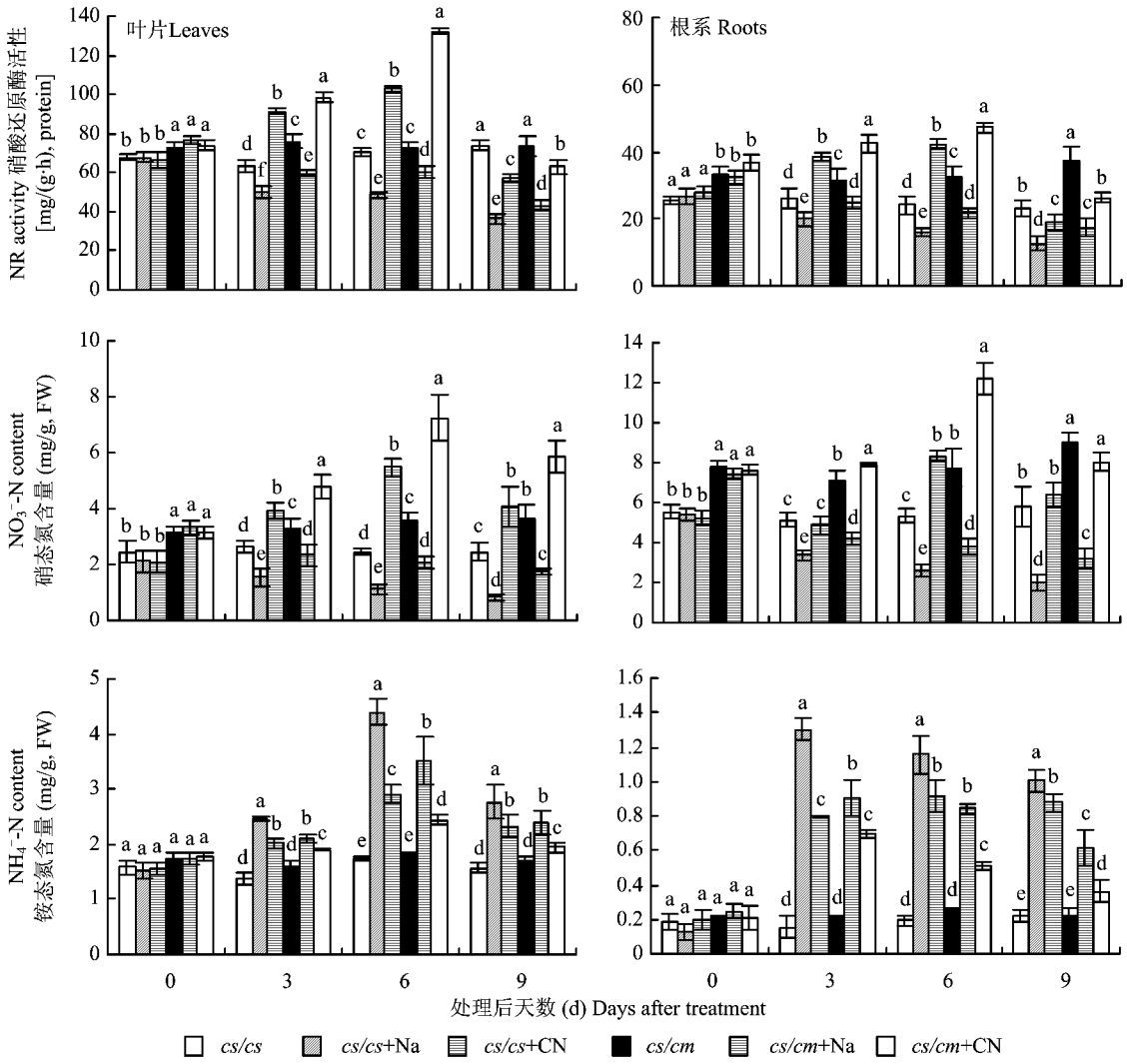

图 1　白籽南瓜嫁接对等渗的 $Ca(NO_3)_2$ 和 NaCl 胁迫下黄瓜幼苗叶片和根系硝酸还原代谢的影响

Fig. 1　Effects of graft with pumpkin rootstock on metabolism of nitrate reduction in the leaves and roots of cucumber seedlings under iso-osmotic $Ca(NO_3)_2$ or NaCl stress

[注(Note)：*cs/cs*、*cs/cs* + Na、*cs/cs* + CN 分别为黄瓜自根嫁接株 1/2 Hoagland 营养液(CK)、90 mmol/L NaCl 和 60 mmol/L $Ca(NO_3)_2$ 处理 The *cs/cs*、*cs/cs* + Na、*cs/cs* + CN represent self-grafted cucumber plants under 1/2 Hoagland nutrient solution, 90 mmol/L NaCl and 60 mmol/L Ca $(NO_3)_2$ respectively; *cs/cm*、*cs/cm* + Na、*cs/cm* + CN 分别为白籽南瓜砧木嫁接黄瓜株 1/2 Hoagland 营养液(CK)、90 mmol/L NaCl 和 60 mmol/L $Ca(NO_3)_2$ 处理 The *cs/cm*, *cs/cm* + Na, *cs/cm* + CN, represent graft of cucumber scions with pumpkin rootstock plants under 1/2 Hoagland nutrient solution, 90 mmol/L NaCl and 60 mmol/L $Ca(NO_3)_2$ respectively. 柱上不同字母表示差异达 5% 显著水平 Different letters above the bars indicate significant difference at the 5% level.]

蛋白在 *cs/cs* 植株中表达微弱或消失。推测这些蛋白可能与 *cs/cm* 植株抗 $Ca(NO_3)_2$ 胁迫能力优于抗 NaCl 胁迫能力有关。3)相对分子质量约为 75.8×10^3 的蛋白在处理第 6 d 表达量最高，在第 3、9 d 表达量减弱，推测其可能是 *cs/cs* 和 *cs/cm* 植株在特定生长发育阶段所具有的特定蛋白，随着生长发育的推进而变化。

3　讨论

当植物根系吸收少量的硝酸盐时，硝酸盐首先在根中被还原，随着外界硝酸盐含量的增加，硝酸盐的吸收和同化将转移到地上部分叶片和茎中进行[14]。即使在同样的硝酸盐供应情况下，根和茎叶中 NR 的代谢平衡也存在物种差异，例如，苍耳属植物(*Xanthium strumarium*)硝酸盐代谢只发生在茎叶

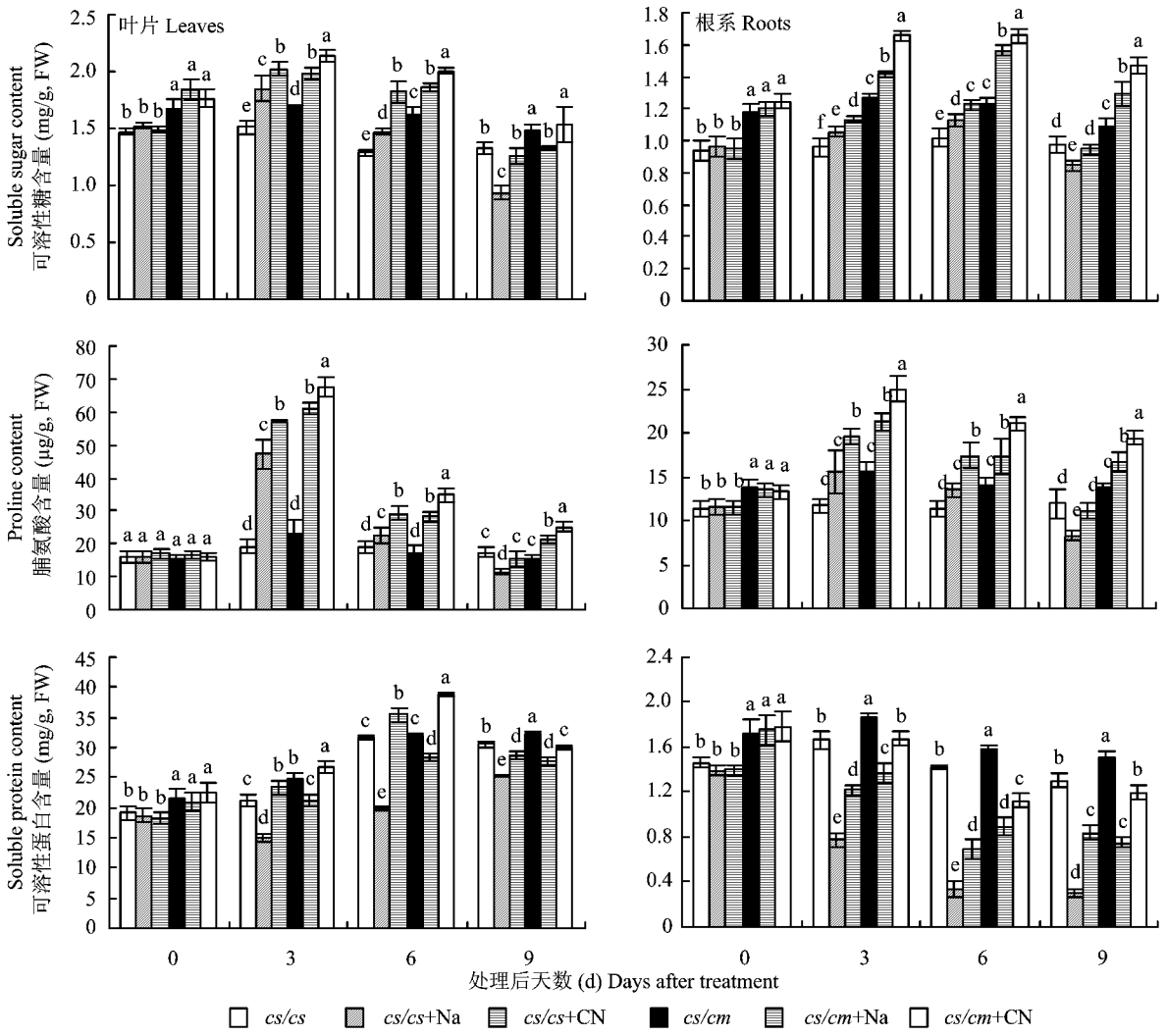

图2 白籽南瓜嫁接对等渗 $Ca(NO_3)_2$ 和 NaCl 胁迫下黄瓜幼苗叶片和根系渗调物质含量的影响

Fig. 2 Effects of graft with pumpkin rootstock on osmoregultory substances contents in the leaves and roots of cucumber seedlings under iso-osmotic $Ca(NO_3)_2$ or NaCl stress

[注(Note):*cs/cs*、*cs/cs*+Na、*cs/cs*+CN 分别为黄瓜自根嫁接株 1/2 Hoagland 营养液(CK)、90 mmol/L NaCl 和 60 mmol/L $Ca(NO_3)_2$ 处理 The *cs/cs*、*cs/cs*+Na、*cs/cs*+CN represent self-grafted cucumber plants under 1/2 Hoagland nutrient solution, 90 mmol/L NaCl and 60 mmol/L $Ca(NO_3)_2$ respectively; *cs/cm*、*cs/cm*+Na、*cs/cm*+CN 分别为白籽南瓜砧木嫁接黄瓜株 1/2 Hoagland 营养液(CK)、90 mmol/L NaCl 和 60 mmol/L $Ca(NO_3)_2$处理 The *cs/cm*, *cs/cm*+Na, *cs/cm*+CN represent graft of cucumber scions with pumpkin rootstock plants under 1/2 Hoagland nutrient solution, 90 mmol/L NaCl and 60 mmol/L $Ca(NO_3)_2$, respectively. 柱上不同字母表示差异达5%显著水平 Different letters above the bars indicate significant difference at the 5% level.]

中,另一些植物如白羽扇豆(*Lupimus albus*)硝酸盐代谢多发生在根系中[15]。本试验中发现,在砧木嫁接(*cs/cm*)和自根嫁接(*cs/cs*)黄瓜幼苗氮代谢过程中,叶片 NR 活性高于根系,促进 NO_3^--N 的还原,致使黄瓜叶片的 NO_3^--N 含量低于根系,转化的 NH_4^+-N 含量高于根系,推测黄瓜幼苗的硝酸盐代谢可能主要发生在叶片中。

研究表明,砧木嫁接植株根系比自根植株根系发达,有更强的吸收水分和矿质营养的能力,因此嫁接植株比自根植株生长势强[7]。本研究发现,不同盐胁迫对黄瓜植株生长表现出明显的抑制效应,NaCl 胁迫的抑制效应显著大于 $Ca(NO_3)_2$ 胁迫;与 *cs/cs* 植株相比,*cs/cm* 植株根系生长量显著升高,说明砧木嫁接换根后可增强黄瓜根系的生长量,提高 NaCl 和 $Ca(NO_3)_2$ 胁迫耐性,表明白籽南瓜嫁接提高黄瓜的耐盐性,主要是南瓜根系比黄瓜根系较为

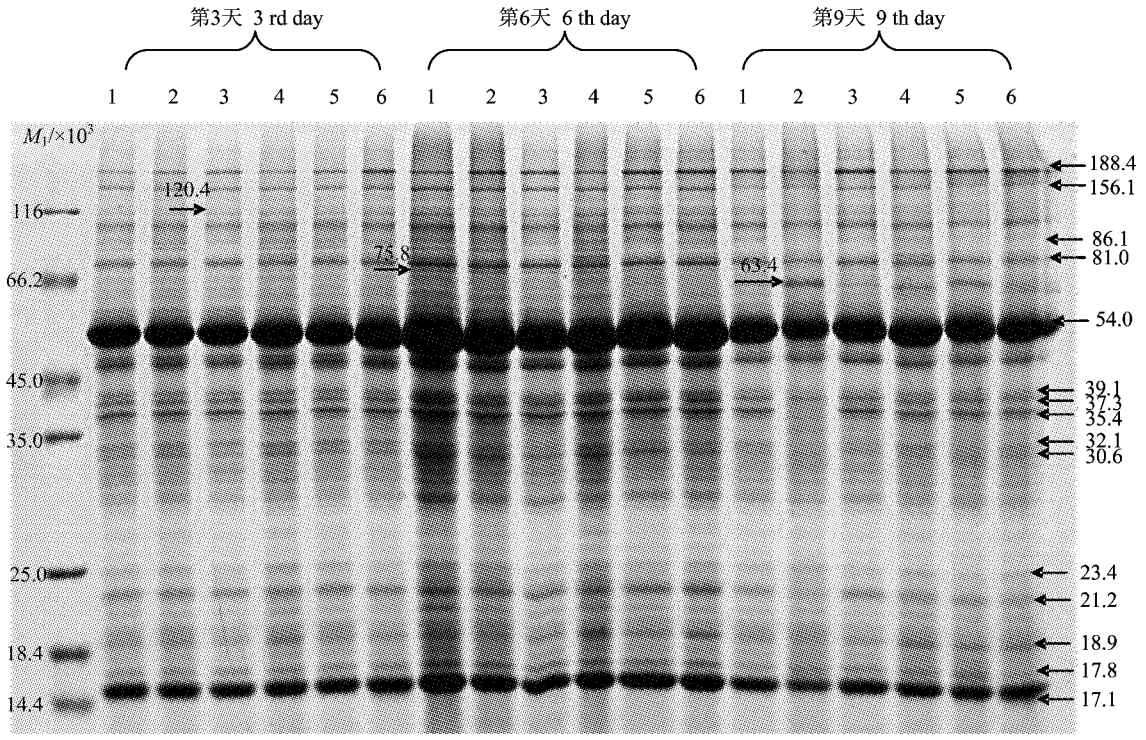

图 3　白籽南瓜嫁接对等渗 $Ca(NO_3)_2$ 和 NaCl 胁迫下黄瓜幼苗叶片可溶性蛋白 SDS－PAGE 图谱的影响

Fig. 3　Effects of graft with pumpkin rootstock on SDS－PAGE soluble protein profiles in the leaves of cucumber seedlings under iso-osmotic $Ca(NO_3)_2$ or NaCl stress

[注(Note)：M—Marker；1. *cs/cs*；2. *cs/cs*＋Na；3. *cs/cs*＋Ca；4. *cs/cm*；5. *cs/cm*＋Na；6. *cs/cm*＋Ca]

发达、吸收能力较强，在甜瓜上也观察到根系具有决定其耐盐性的重要特征[16]。

NR 是高等植物体内控制氮代谢的关键酶和限速酶，植物相对较低的 NR 活性可能限制其利用 NO_3^- 的能力，直接影响到土壤中氮的利用效率[10]。NaCl 胁迫可通过降低植物的蒸腾速率、降低 NO_3^--N 的吸收比率而减少 NO_3^--N 向叶片的流入[17]。本试验中，NaCl 胁迫后黄瓜幼苗叶片的 NO_3^--N 含量明显下降与上述原因有关，而根中 NO_3^--N 含量的下降可能与盐胁迫抑制了 NO_3^--N 的吸收有关。NR 是一种诱导酶，NO_3^- 是诱导 NR 活性的主要信号，在一定范围内，植物体内 NR 活性取决于营养介质 NO_3^- 的浓度，随着营养介质中 NO_3^- 的减少，植物根系中 NR 活性降低[18-19]。同时 Ca^{2+} 对 NR 的诱导也有促进效果[20]。NR 的活性在 NaCl 胁迫下呈下降趋势，主要是因为 NaCl 胁迫抑制了 NO_3^--N 的吸收致使 NR 活性降低。$Ca(NO_3)_2$ 胁迫下黄瓜叶片和根系内 NR 活性呈现先上升后下降趋势，证明 $Ca(NO_3)_2$ 胁迫能诱导 NR 活性的升高，随着胁迫时间的延长，NO_3^- 积累过多超过了植物所能忍受的最大程度，NR 活性开始下降，并且胞质中 Ca^{2+} 浓度过高，对细胞有毒害作用[21]，但 NR 活性仍高于等渗的 NaCl 胁迫处理，这可能是 $Ca(NO_3)_2$ 对黄瓜的胁迫伤害低于 NaCl 的主要原因之一。在整个等渗盐胁迫过程中，*cs/cm* 根系和叶中 NR 活性显著高于 *cs/cs*，表明白籽南瓜砧木嫁接能使黄瓜植株 NR 维持较高的活性，增强 NO_3^--N 的吸收和还原能力，尤其在 $Ca(NO_3)_2$ 胁迫下植株氮素同化效率大于等渗的 NaCl 胁迫。

盐胁迫条件下光呼吸的增加和谷氨酰胺合成酶活性的下降会造成叶片 NH_4^+-N 的积累和同化速率降低，引起 NH_4^+-N 在根系内积累[17, 22]。本研究发现在等渗盐胁迫条件下，*cs/cm* 和 *cs/cs* 植株体内 NH_4^+-N 含量均显著升高，且等渗的 $Ca(NO_3)_2$ 低于 NaCl，表明 $Ca(NO_3)_2$ 胁迫造成的氨中毒较轻，NH_4^+-N 进一步转化、利用、合成氨基酸和蛋白质的能力高于等渗的 NaCl 胁迫。在整个胁迫过程中，*cs/cm* 植株叶片和根系中 NH_4^+-N 含量均显著低于

cs/cs 植株,进一步证实盐胁迫条件下,白籽南瓜嫁接植株有较高的氮同化能力,有利于降低植株体内的 NH_4^+-N 含量,维持植株正常的生理代谢。

盐胁迫下,植物细胞内可积累一些物质如游离脯氨酸、可溶性糖、可溶性蛋白质以及甘氨酸甜菜碱等以调节细胞渗透势,维持水分平衡,渗调物质还可以保护细胞内许多重要代谢活动所需的酶类活性。本试验中,等渗盐胁迫下 *cs/cm* 植株叶片和根系中可溶性糖、脯氨酸和可溶性蛋白含量高于 *cs/cs* 植株,这些渗透调节物质首先能够降低渗透势,保证黄瓜植株可以从外界继续吸水,维持渗透压,使细胞内各种生理活动正常进行,从而表现出 *cs/cm* 耐盐性高于*cs/cs*植株。$Ca(NO_3)_2$ 胁迫下,*cs/cm* 和 *cs/cs* 植株渗透调节物含量明显高于等渗的 NaCl,尤其叶片中可溶性蛋白含量显著升高,说明 $Ca(NO_3)_2$ 胁迫下黄瓜植株代谢作用较强,细胞内渗调物质积累较多,渗透势降低,根系吸收能力增强,受胁迫伤害程度较低。

嫁接过程中砧木与接穗细胞发生识别反应,反应信号转导后能激活某些基因的表达,合成新的蛋白质[23]。研究表明,黄瓜与南瓜的嫁接植株中蛋白带发生改变[24];黄瓜/黄瓜同种异体嫁接组合中也稳定地出现三种新合成的特异蛋白质[23];李跃建等[25]用黑籽南瓜做砧木嫁接黄瓜发现有 5 个蛋白的表达量增强,同时也产生了 5 个新的蛋白,随后又分离到黄瓜嫁接苗叶片中新产生了两类蛋白,分别与植物的抗逆性和叶绿素合成有关[26];阳燕娟等[3]发现西瓜嫁接苗中出现了两种新蛋白;Pina Ana 和 Errea Pilar [27]在杏和李嫁接后也发现同种嫁接和异种嫁接的愈伤组织中蛋白表达不同,并进一步证实在嫁接组合中存在一种相关蛋白。本试验中,等渗的 $Ca(NO_3)_2$ 和 NaCl 胁迫下,*cs/cs* 植株的黄瓜叶片中可溶性蛋白含量降低幅度高于 *cs/cm* 植株,表明盐胁迫抑制了 *cs/cs* 植株叶片蛋白合成,*cs/cm* 植株则活化了某些蛋白基因的表达,引起蛋白合成增加或者合成了新的蛋白(图 2)。黄瓜叶片 SDS - PAGE 图谱进一步显示(图 3),在整个处理期间,相对分子质量($\times 10^3$)约为 188.4、156.1、120.4、54.0、37.3、32.1、30.6、18.9、17.8 和 17.1 的蛋白在砧木嫁接株中表达量上调,81.0×10^3 蛋白表达量下调,63.4×10^3 蛋白甚至在处理第 9 d 在 *cs/cs* 植株中消失。推测自根嫁接和砧木嫁接苗(*cs/cs* 和 *cs/cm*)抗盐能力的不同可能与砧木的基因型有关,*cs/cm* 苗通过换根从而调节植株体内的蛋白合成发生一系列适应性变化,维持盐害逆境下植物体的离子与渗透平衡,从而提高 *cs/cm* 植株的抗盐性。研究证明多种蛋白与植物耐盐性有关,如 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白、水通道蛋白、渗调蛋白、晚期胚胎发生丰富蛋白以及信号转导过程中一些重要的蛋白激酶[3]。本试验中,18 种差异条带中有 17 种蛋白均与盐胁迫有关,且不同程度地受到嫁接诱导,与嫁接和盐胁迫相互作用密切相关。尤其是相对分子质量($\times 10^3$)约为 188.4、156.1、54.0 和 17.1 [$Ca(NO_3)_2$胁迫下上调]及 86.1、23.4、18.9 和 17.8[$Ca(NO_3)_2$ 胁迫下下调]的蛋白在不同盐胁迫下的差异表达,甚至相对分子质量($\times 10^3$)约为 39.1、35.4 和 21.2 的蛋白在 NaCl 胁迫下消失,推测这些蛋白与 $Ca(NO_3)_2$ 胁迫对黄瓜植株伤害程度明显低于 NaCl 关系密切。因此,白籽南瓜砧木嫁接黄瓜对不同盐胁迫的响应程度也不同,导致 NaCl 和 $Ca(NO_3)_2$胁迫下 *cs/cm* 植株蛋白的差异表达,从而使 *cs/cm* 嫁接植株抗 $Ca(NO_3)_2$ 胁迫能力增强。关于耐盐砧木嫁接及等渗 $Ca(NO_3)_2$ 和 NaCl 胁迫诱导的特异蛋白具体功能有待通过双向电泳技术和质谱分析进一步深入研究。

4 结论

$Ca(NO_3)_2$ 胁迫下黄瓜植株生长、氮代谢和渗透调节能力及差异蛋白的表达量均高于等渗的 NaCl 胁迫,对黄瓜植株的胁迫伤害程度相对较低;白籽南瓜嫁接植株(*cs/cm*)在等渗 $Ca(NO_3)_2$ 和 NaCl 胁迫下比自根嫁接植株(*cs/cs*)NR 活性高,对 NO_3^--N 的吸收能力强,NH_4^+-N 转化代谢较快,减少了 NH_4^+-N 的积累,同时可提高植株可溶性糖、脯氨酸、可溶性蛋白含量及表达,渗调能力增强,耐盐性明显提高,尤其对 $Ca(NO_3)_2$ 胁迫具有较强的耐性,是较好的黄瓜嫁接砧木。

参 考 文 献:

[1] 史庆华, 朱祝军, Khalid Al-aghabary, 钱琼秋. 等渗盐胁迫对番茄抗氧化酶和 ATP 酶及焦磷酸酶活性的影响[J]. 植物生理与分子生物学学报, 2004, 30(3): 311-316.
Shi Q H, Zhu Z J, Khalid A, Qian Q Q. Effects of iso-osmotic salt stress on the activities of antioxidative enzymes, H^+-ATPase and H^+-PPase in tomato plants [J]. J. Plant Physiol. Mol. Biol., 2004, 30(3): 311-316.

[2] Surabhi G K, Reddy A M, Kumari G J *et al*. Modulations in key

enzymes of nitrogen metabolism in two high yielding genotypes of mulberry (*Morus alba* L.) with differential sensitivity to salt stress [J]. Environ. Exp. Bot., 2008, 64: 171-179.

[3] 阳燕娟，郭世荣，李晶，等. 嫁接对盐胁迫下西瓜幼苗生长和可溶性蛋白表达的影响[J]. 南京农业大学学报，2011，34(2)：54-60.
Yang Y J, Guo S R, Li J *et al*. Effects of grafting on the soluble protein expression in watermelon seedlings under salt stress[J]. J. Nanjing Agric. Univ., 2011, 34(2): 54-60.

[4] Estañ M T, Martinez-rodriguez M M, Perez-alfocea F *et al*. Grafting raises the salt tolerance of tomato through limiting the transport of sodium and chloride to the shoot[J]. J. Exp. Bot., 2005, 56: 703-712.

[5] Estañ M T, Villalta I, Bolarín M C *et al*. Identification of fruit yield loci controlling the salt tolerance conferred by *Solanum* rootstocks[J]. Theor. Appl. Genet., 2009, 118: 305-312.

[6] Asins M J, Bolarín M C, Pérez-Alfocea F *et al*. Genetic analysis of physiological components of salt tolerance conferred by *Solanum* rootstocks. What is the rootstock doing for the scion? [J]. Theor. Appl. Genet., 2010, 121: 105-115.

[7] 周俊国，扈惠灵. NaCl 胁迫下不同砧木对嫁接黄瓜叶片氮素代谢的影响[J]. 植物营养与肥料学报，2010，16(5)：1217-1223.
Zhou J G, Hu H L. Effect of different rootstocks on nitrogen metabolism of grafted cucumber leaves under NaCl stress [J]. Plant Nutr. Fert. Sci., 2010, 16(5): 1217-1223.

[8] 孙胜，田永生，冷丹丹，等. 不同砧木对嫁接西瓜经济产量及叶片矿质营养含量的影响[J]. 植物营养与肥料学报，2010，16(1)：179-184.
Sun S, Tian Y S, Leng D D *et al*. Effects of different kinds of rootstocks on economic yields and mineral nutrition contents of leaves of grafted watermelon seedlings [J]. Plant Nutr. Fert. Sci., 2010, 16(1): 179-184.

[9] 袁亭亭，宋小艺，王忠宾，等. 嫁接与施肥对番茄产量及氮、磷、钾吸收利用效率的影响[J]. 植物营养与肥料学报，2011，17(1)：131-136.
Yuan T T, Song X Y, Wang Z B *et al*. Effect of grafting cultivation and fertilization on the yield, NPK uptake and utilization of tomatoes[J]. Plant Nutr. Fert. Sci., 2011, 17(1): 131-136.

[10] 周宝利，尹玉玲，徐妍，等. 嫁接对茄子根际土壤微生物和叶片硝酸还原酶的影响[J]. 园艺学报，2010，37(1)：53-58.
Zhou B L, Yin Y L, Xu Y *et al*. Effect of grafting on rhizospheric soil microorganisms and leaf NR activities of eggplants[J]. Acta Hortic. Sin., 2010, 37(1): 53-58.

[11] 陈因. 现代植物生理学实验指南[M]. 北京：科学出版社，1999. 38-140.
Chen Y. Modern plant physiology experimental guide [M]. Beijing: Science Press, 1999. 38-140.

[12] Tachibana S, Konishi N. Diurnal variation of in vivo and in vitro reductase activity in cucumber plants [J]. Jap. Soc. Hortic. Sci., 1991, 60: 593-599.

[13] 黄雪梅，宋松泉，傅家瑞. 在蔗糖预培养诱导耐脱水性过程中黄皮胚轴的水分状态和可溶性蛋白含量的变化[J]. 植物生理与分子生物学学报，2006，32(2)：245-251.
Huang X M, Song S Q, Fu J R. Changes in water state and soluble protein contents of wampee axes during inducing desiccation tolerance by sucrose preculture[J]. J. Plant Physiol. Mol. Biol., 2006, 32(2): 245-251.

[14] Marschner H. Mineral nutrition of higher plants(2nd edn.)[J]. London: Academic Press, 1995.

[15] Taiz Lincoln, Zeiger E(宋纯鹏，王学路，等译). 植物生理学(第四版)[M]. 北京：科学出版社，2009. 238-241.
Taiz L, Zeiger Eduardo. (Translation by Song C P, Wang X L *et al*). Plant physiology (Fourth Edn.) [M]. Beijing: Science Press, 2009. 238-241.

[16] Romero L, Belakbir A, Ragala L, Ruiz J M. Response of plant yield and leaf pigments to saline conditions: effectiveness of different rootstocks in melon plants (*Cucumis melo* L.)[J]. Soil Sci. Plant Nutr., 1997, 43: 855-862.

[17] 樊怀福，郭世荣，杜长霞，等. 外源 NO 对 NaCl 胁迫下黄瓜幼苗氮化合物和硝酸还原酶活性的影响[J]. 西北植物学报，2006，26(10)：2063-2068.
Fan H F, Guo S R, Du C X *et al*. Effects of exogenous NO on NO_3^-/NH_4^+ and soluble protein contents and NR activities in cucumber seedlings under NaCl stress[J]. Acta Bot. Bor-Occid. Sin., 2006, 26(10): 2063-2068.

[18] Malagoli M, Dal Cannal A, Quaggiotti S *et al*. Differences in nitrate and ammonium up take between Scots pine and European larch[J]. Plant Soil, 2000, 221: 1-3.

[19] 张镭，崔晓阳. 生境因子作用下 NO_3^-/NH_4^+ 吸收及硝酸还原酶活性变化[J]. 土壤通报，2010，41(1)：242-247.
Zhang Y, Cui X Y. Effects of some habitat factors on NO_3^-/NH_4^+ uptake and changes of NR activities [J]. Chin. J. Soil Sci., 2010, 41(1): 242-247.

[20] Bergareche C, Ayuso R, Masgran C, Simon E. Nitrate reductase in cotyledon of cucumber seedlings as affected by nitrate, phytochrome and calcium[J]. Physiol. Plant., 1994, 91: 257-262.

[21] Cramer G R, Lauchli A, Polito V S. Displacement of Ca^{2+} by Na^+ from the plasmalemma of root cells [J]. Plant Physiol., 1985, 79: 207-211.

[22] 张润花，郭世荣，樊怀福. 外源亚精胺对盐胁迫下黄瓜植株氮化合物含量和硝酸还原酶活性的影响[J]. 武汉植物学研究，2006，24(4)：381-384.
Zhang R H, Guo S R, Fan H F. Effects of exogenous Spd on NO_3^--N, NH_4^+-N contents and nitrate reductase activity of salt stressed leaves and roots of cucumber seedlings[J]. J. Wuhan Bot. Res., 2006, 24(4): 381-384.

[23] 肖桂山，杨世杰. 黄瓜同种异体嫁接组合形成过程中特异蛋白质的产生[J]. 农业生物技术学报，1995，3(2)：32-37.
Xiao G S, Yang S J. Appearance of specific proteins during development of *Cucumis sativus* homograft [J]. J. Agric. Biotech., 1995, 3(2): 32-37.

[24] Tiedemann R, Carstensbehrens U. Influence of grafting on the phloem protein-patterns in Cucurbitaceae. 1. Additional phloem exudates proteins in *Cucumis sativus* grafted on 2 Cucurbita species[J]. J. Plant Physiol., 1994, 143: 189-194.

[25] 李跃建，刘小俊，刘独臣，等. 黄瓜自根苗、嫁接苗根系活力、净光合速率和蛋白质表达差异研究[J]. 西南农业学报，2007，20(5)：979-981.
Li Y J, Liu X J, Liu D C *et al*. Study on root activity net photosynthetic rate and proteome of none-grafted and grafted cucumber (*Cucumis satiuus* L.)[J]. Southwest China J. Agric. Sci., 2007, 20(5): 979-981.

[26] 李跃建，梁根云，刘小俊，等. 黄瓜嫁接苗和自根苗的蛋白质组学研究[J]. 园艺学报，2009，36(8)：1147-1152.
Li Y J, Liang G Y, Liu X J *et al*. Proteomic study on grafted and non-grafted cucumber (*Cucumis sativus* L.)[J]. Acta Hortic. Sin., 2009, 36(8): 1147-1152.

[27] Pina A, Errea P. Influence of graft incompatibility on gene expression and enzymatic activity of UDP-glucose pyrophosphorylase[J]. Plant Sci., 2008, 174: 502-509.