

# 芦苇愈伤组织中蛋白质对渗透胁迫和外源 ABA 的响应

陈 龙<sup>1</sup>, 刘怀攀<sup>1</sup>, 张承烈<sup>2</sup>

(1. 周口师范学院 生物系, 河南 周口 466000; 2. 兰州大学 生命科学学院, 甘肃 兰州 730000)

**摘要:** 研究了沙生芦苇胚性愈伤组织(SREC)和水生芦苇胚性愈伤组织(WREC)在 PEG-6000 的胁迫及外源 ABA 的影响下一些生理生化特性的变化。结果显示: 从相对生长量和细胞活力上看, SREC 的抗渗能力大于 WREC; WREC 的可溶性蛋白质含量下降幅度大于 SREC。外源 ABA 对 WREC 的作用大于 SREC。SDS-PAGE 表明, SREC 在 30% PEG 胁迫下出现了一条 17kD 的特异蛋白带; 在 PEG 胁迫同时施加外源 ABA 后, 二者均出现此蛋白带。

**关键词:** 生态型芦苇; 胚性愈伤组织; 渗透胁迫; ABA; 蛋白质

**中图分类号:** S564<sup>+</sup>.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-7091(2002)03-0041-05

植物在盐渍、干旱、温度和重金属等环境因子的胁迫下, 体内蛋白质代谢发生改变, 一些蛋白质的合成受到抑制, 同时又会合成一些新蛋白, 即逆境蛋白。近年来, 关于逆境蛋白的研究已取得很大进展, 细胞水平抗渗透适应蛋白的研究已有不少报道<sup>[1~3]</sup>。Singh<sup>[4]</sup>报告了烟草培养细胞在 NaCl 和 PEG 胁迫下有 37 kD, 34 kD, 35.5 kD 和 26 kD 蛋白含量显著升高的结果; 他还报告了脱落酸(ABA)可诱导烟草细胞合成盐适应特有的 26 kD 蛋白质, 由此 ABA 在研究渗透调节中的作用愈来愈受到重视。以前关于植物愈伤组织在抗渗透胁迫特异蛋白的研究多在同一品种人工诱导的耐渗变异细胞系和正常细胞系间进行, 在不同生态型细胞系间的比较研究不多, 同时进行外源 ABA 对其影响的研究更为少见。本试验通过 PEG 胁迫两种生态型芦苇愈伤组织, 比较二者的抗渗能力的差异, 着重研究了 PEG 和外源 ABA 对渗透蛋白的影响。

## 1 材料和方法

芦苇(*Phragmites communis*)种子采自巴丹吉林沙漠南缘甘肃省临泽县境内的水生芦苇和沙丘芦苇。水生芦苇生长在终年积水的水塘中; 沙生芦苇生长在 10 m 高的沙丘上, 土壤含水量为 18.8%。

### 1.1 材料培养与处理

芦苇种子经消毒、水洗后用改良的 MS 培养基(MS+1 mg/L 2,4-D+1 mg/L 6-BA+0.5 mg/L NAA)诱导愈伤组织, 然后用继代培养基(MS+1 mg/L 2,4-D)进行继代, 每 3 周继

收稿日期: 2002-01-23

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(79570075)

作者简介: 陈 龙(1961-), 男, 副教授, 主要从事植物生理生化教学与科研工作。

代1次,继代后得到胚性愈伤组织。培养条件:温度为 $(25\pm 2)^{\circ}\text{C}$ ,光照为12 h/d,光强1 300 lx左右。

选取继代3~5代生长良好的胚性愈伤组织分别转移到:(1)不含PEG、不含ABA的继代培养基;(2)不含ABA,但分别含10%(-0.15 MPa),15%(-0.3 MPa),20%(-0.5 MPa),25%(-0.74 MPa)和30%(-1.05 MPa)PEG-6000的继代培养基;(3)含 $10\text{ }\mu\text{mol/L}$  ABA,不含PEG-6000的继代培养基;(4)含 $10\text{ }\mu\text{mol/L}$  ABA,且含10%~30%不同浓度PEG的4种继代培养基。用于生长量测定的材料培养到第20 d(基本停止生长)时取样,其他分析测定均在培养第15 d(此时材料正处于生长旺盛期)时取样。

1.2 测定方法

生长量测定 用称重法测定愈伤组织生长量,以相对生长率表示。

相对生长率(%)=(受不同处理的材料鲜重增长倍数/无ABA无PEG处理的材料鲜重增长倍数)×100

细胞生活力测定 以Tong等<sup>[5]</sup>的TTC法进行,以相对活力(%)表示。

可溶性蛋白含量的测定 称取0.5 g愈伤组织,加入2 mL Tris-甘氨酸缓冲液(含0.6% Tris, 2.88%甘氨酸, pH 8.3),在冰浴中匀浆,然后在TGL-16型低温高速离心机上以15 000 r/min离心10 min,上清液即为蛋白质提取液。按Brodford<sup>[6]</sup>法测定蛋白质含量。

可溶性蛋白的电泳分析 称取0.5 g待测材料,用0.5 mL样品提取液(25 mmol/L Tris, 5 mmol/L EDTA, pH 7.4)冰浴匀浆,经15 000 r/min离心20 min后,取1份上清液加1份样品缓冲液(由4 mL H<sub>2</sub>O, 1.6 mL 10% SDS, 1 mL pH 6.8 Tris-HCl缓冲液, 0.4 mL α-或β-巯基乙醇, 0.8 mL 甘油, 0.2 mL 0.05%溴酚蓝混合而成)混匀制成电泳样品液。按朱广廉、杨中汉<sup>[7]</sup>方法采用夹芯式垂直板槽进行电泳,分离胶浓度为12.5%,浓缩胶浓度为3%,稳流电泳;浓缩胶中电流为10 mA,分离胶中电流为20 mA,电泳4~5 h,上样量50 μL。

每种处理平均分为3组,每组各设3次平均,结果为9次的平均值。

2 结果与分析

2.1 PEG胁迫和外源ABA对芦苇胚性愈伤组织生长及细胞生活力的影响

表1 PEG-6000及外源ABA对WREC、SREC的鲜重增长和细胞活力的影响

PEG 浓度(%)	WREC							SREC						
	0	10	15	20	25	30		0	10	15	20	25	30	
生长量	无 ABA	1.61	1.29	0.96	0.35	0.18	0.10	1.66	1.99	1.67	1.60	1.41	1.35	
	有 ABA	1.45	1.16	0.97	0.92	0.85	0.77	1.49	1.58	1.46	1.49	1.33	1.25	
相对活力	无 ABA	0.316	0.253	0.231	0.167	0.161	0.158	0.317	0.379	0.335	0.316	0.294	0.221	
	有 ABA	0.300	0.298	0.281	0.267	0.205	0.199	0.301	0.379	0.348	0.317	0.310	0.284	

注:生长量指每克鲜重接入材料增加的重量(g);相对活力指0.2 g材料经TTC法测得在485 nm处的吸光值

无ABA的条件下,WREC在不同浓度PEG-6000胁迫下生长变缓,而SREC的生长量呈现先增加后减少的变化趋势,其减少程度也较WREC轻。加入 $10\text{ }\mu\text{mol/L}$  ABA后,对

SREC 的生长有一定的抑制作用，但随 PEG 胁迫程度加强其抑制作用减轻；对 WREC 的生长先是抑制，后随 PEG 浓度的升高，相对于无 ABA 处理又有一定的促进作用。外源 ABA 的作用，在一定程度上缩小了二者在 PEG 胁迫下的生长量差异(表 1)。

在无 ABA 处理时，随 PEG 胁迫强度的加大，WREC 的细胞生活力逐渐降低，SREC 表现出先升高后降低的变化。PEG 胁迫的同时外加 10 μmol/L ABA 时，使得 WREC 的细胞生活力较无 ABA 时有较大幅度的提高，20%PEG 胁迫时相对升高值为 60.4%，但对 SREC 几乎没有影响(表 1)。

2.2 PEG胁迫和外源 ABA 对芦苇胚性愈伤组织可溶性蛋白含量及电泳图谱中蛋白带的影响

表 2 PEG—6000 及外源 ABA 对 WREC、SREC 的可溶性蛋白含量的影响 mg·g<sup>-1</sup>

PEG 浓度(%)		WREC						SREC					
		0	10	15	20	25	30	0	10	15	20	25	30
蛋白含量	无 ABA	20.1	15.1	14.9	10.1	9.0	8.4	20.0	18.0	15.6	16.2	14.6	12.0
	有 ABA	22.1	20.1	19.1	18.5	18.1	17.1	22.0	21.4	21.0	20.0	19.6	19.0

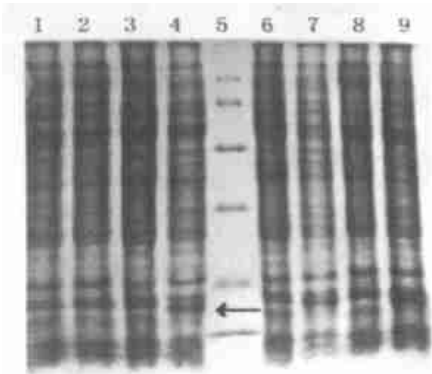
在无 ABA 时，2 种愈伤组织可溶性蛋白含量(以干重计)的变化趋势是随 PEG 胁迫程度的升高而降低，WREC 的降幅较大。加入 ABA 后，它们的这种变化趋势基本保持不变，但各对应值都有所升高，WREC 的相对升高值大于 SREC (表 2)。

从可溶性蛋白 SDS 电泳图谱中蛋白带的变化(图 1)看，SREC 在 30%PEG 胁迫下出现了一条 17 kD 的不同于 WREC 的蛋白带(如图中箭头所示的④、⑦及⑨)；在 30%PEG 胁迫下施加外源 ABA 后，二者均出现 17 kD 的蛋白带。但是，二者在无 PEG 胁迫时，无论是否有 ABA 处理均不出现该蛋白带。

3 讨论

从植株水平<sup>[8]</sup>和细胞水平<sup>[9]</sup>上已经证实，不同生态型芦苇的渗透调节能力不同，沙生和盐生芦苇的耐渗能力大于水生芦苇。本研究表明，PEG 胁迫对 SREC 生长的抑制作用明显小于 WREC，施加外源 ABA 后显著改善了 WREC 的生长状况，二者的生长差异变小。随 PEG 的胁迫强度加大，WREC 的细胞生活力逐渐下降，而 SREC 的细胞生活力则有所升高，只在高浓度 PEG 胁迫下才出现下降；PEG 胁迫的同时外加 ABA，WREC 的细胞生活力明显升高，而对 SREC 影响不大。这进一步证明了 SREC 的抗渗透能力大于 WREC，同时还说明外源 ABA 可以提高 WREC 的抗渗透能力，与我们以前的试验结果<sup>[9,10]</sup>一致。

任东涛<sup>[11]</sup>等证实沙生芦苇在适应干旱环境时出现 11.7 kD 特异蛋白。我们的试验表明，



①WREC，无 PEG 胁迫、无 ABA 处理；②WREC 有 PEG 胁迫、无 ABA 处理；③SREC，无 PEG 胁迫、无 ABA 处理；④SREC，有 PEG 胁迫、无 ABA 处理，出现 17kD 特异蛋白；⑤低分子量标准蛋白；⑥WREC，无 PEG 胁迫、有 ABA 处理；⑦WREC，有 PEG 胁迫、有 ABA 处理，出现 17kD 特异蛋白；⑧SREC，无 PEG 胁迫、有 ABA 处理；⑨SREC，有 PEG 胁迫、有 ABA 处理，出现 17kD 特异蛋白

图 1 可溶性蛋白的 SDS-PAGE 图谱

在 PEG 胁迫下, 虽然 SREC, WREC 总可溶性蛋白含量下降, 但 SREC 的 SDS 电泳图谱出现了一条 17 kD 新蛋白带; 外加 ABA 可减缓 PEG 胁迫下总可溶性蛋白的下降速度, 同时使 2 种生态型芦苇愈伤组织均出现 17 kD 蛋白带。可溶性蛋白含量的降低使细胞代谢降低, 而低的代谢速率使愈伤组织对渗透胁迫适应力增强。新的 17 kD 蛋白可能作为渗透蛋白参与基质的渗透调节, 在耐高渗透胁迫中起作用。

ABA 作为逆境的信号, 在胁迫条件下植物组织能快速而大量地积累 ABA<sup>[12]</sup>。耐旱性强的植物体内 ABA 含量高于耐旱性弱的植物<sup>[13~15]</sup>。外源 ABA 可以引发植物中渗透蛋白的合成, 经 ABA 处理过的烟草细胞渗透蛋白的 mRNA 含量是对照的 15 倍以上, 且在渗透胁迫下其内源 ABA 随之大量增加<sup>[4]</sup>。我们的试验表明, 17 kD 渗透蛋白的产生依赖于渗透胁迫和高浓度 ABA 的协同作用。对芦苇整株水平的研究也有类似的结果<sup>[8, 11, 15]</sup>。SREC 和 WREC 在产生 17 kD 蛋白上的差异可能与其自身的 ABA 水平有关, 从而造成感受渗透(干旱)信号上的不同。SREC 自身 ABA 水平高, 无需外加 ABA 即能感受胁迫信号, 而 WREC 则不同, 需外加 ABA 才能感受胁迫信号。

#### 参考文献:

- [1] Ingram J, Bartels D. The molecular basis of dehydration tolerance in plant[J]. *Ann Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 1996, 47: 377—403.
- [2] 崔大勇, 沈黎明. 逆境胁迫诱导基因的结构、功能与表达调控[J]. *生物化学与生物物理进展*, 1998, 28(3): 216—221.
- [3] 何军贤, 傅家瑞. 种子 lea 蛋白的研究进展[J]. *植物生理学通讯*, 1996, 32(4): 241—246.
- [4] Singh N K, Handa A K, Haseguwa P M, *et al.* Protein associated with adaptation of cultured tobacco cells to NaCl[J]. *Plant Physiol*, 1985, 79: 126—129.
- [5] Tony H H Chen, Lawrence V G. Abscissic acid-induced freezing resistance in cultured plant cells[J]. *Plant Physiol* 1983, 73: 71—74.
- [6] Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of proteindye binding[J]. *Anal Biochem*, 1976, 72: 248—252.
- [7] 朱广廉, 杨中汉. SDS—PAGE 法测蛋白质的分子量[J]. *植物生理学通讯*, 1982, 18(2): 43—47.
- [8] 王洪亮, 张承烈, 陈国仓. 河西走廊芦苇不同生态型生境适应的渗透调节物质[J]. *生态学报*, 1994, 14(增刊): 56—60.
- [9] 吴诗光, 陈 龙, 刘怀攀, 等. 芦苇愈伤组织对渗透胁迫和 ABA 的若干生理响应[J]. *华北农学报*, 2001, 16(3): 35—39.
- [10] 刘怀攀, 陈 龙, 张承烈, 等. 渗透胁迫和外源 ABA 对芦苇愈伤组织中 SOD、CAT、POD 活性的影响[J]. *植物生理学通讯*, 2002, 38(2): 27—29.
- [11] 任东涛, 张承烈. 河西走廊不同生态型芦苇可溶性蛋白、总氨基酸和游离氨基酸分析[J]. *植物学报*, 1992, 34(9): 698—704.
- [12] Davies W J, Zhang J. Roots signal sand the regulation of growth evelopment of plants in drying soil[J]. *Annu Rev Plant Physiol Mol Boil*, 1991, 42: 55—76.
- [13] 崔素霞, 王 尉, 陈国仓, 等. 两种沙生植物内源激素、叶绿体膜脂脂肪酸组成和膜脂抗氧化系统酶类的季节变化[J]. *植物生态学报*, 2000, 24(1): 96—101.

- [14] 王月福, 于振文, 潘庆民, 等. 水分胁迫对小麦小花分化发育和氮磷及激素的影响[J]. 西北植物学报, 2000, 20(1): 38—43.
- [15] Wang H L, Zhang C L. Seasonal changes of endogenous ABA and CTKs in environmental adaptation of different ecotypes of reed plants[J]. Journal of Environmental Sciences, 1995, 7(4): 449—454.

## Response of Protein in Calluses from Reed Ecotypes to Osmotic Stress and Exogenous ABA

CHEN Long<sup>1</sup>, LIU Huai-pan<sup>1</sup>, ZHANG Cheng-lie<sup>2</sup>

(1. Department of Biology, Zhoukou Normal College, Zhoukou 466000 China;

2. College of Life Sciences, Lanzhou University, Lanzhou 730000 China)

**Abstract:** Physiological and biochemical response of the embryogenic calluses of sand reed (SREC) and water reed (WREC) to PEG—6000 osmotic stress and exogenous ABA was studied. The result showed that the ability of osmotic stress resistance of SREC was obviously greater than that of WREC while the decrease of soluble protein in WREC was more than that in SREC. The response of WREC to exogenous ABA ( $10 \mu\text{mol/L}$ ) was much more sensitive than that of SREC. SDS—PAGE analysis showed a new 17 kD protein band when SREC was treated with 30% PEG—6000 osmotic stress or when SREC and WREC was treated with 30% PEG—6000 osmotic stress and exogenous ABA simultaneously.

**Key words:** Reed ecotypes; Embryogenic calluse; Osmotic stress; ABA; Protein

## 《湖北农业科学》2003 年征订启事

《湖北农业科学》杂志于 1955 年创刊, 是湖北省农业厅、华中农业大学、湖北农学院、湖北省农垦总公司、湖北省农业科学院联合主办的综合性农业技术刊物, 设有栽培、育种、土肥、植保、园艺、特产、畜牧、兽医、农畜产品加工、农业产业化等栏目。近年多次获全国优秀期刊一等奖和湖北双十佳期刊称号, 1999 年荣获国家期刊最高奖“国家期刊奖”。现为中文核心期刊和中国科学引文数据库来源期刊, 国内外公开发行。本刊主要适合县(市)、乡(镇)、村农业技术干部、农民技术员和农村专业户、示范户阅读。本刊为双月刊, 逢单月 30 日出版, 期价 5.00 元, 年价 30.00 元, 邮发代号 38—21, 全国各地邮局(所)均可订阅, 亦可随时汇款至武汉市武昌南湖湖北省农科院科技期刊社发行部订阅, 不另加邮费, 邮编: 430064, 电话: (027) 87389001。