

小麦耐水分胁迫突变体生理及 RAPD 特性分析

赵宇玮^{1,2}, 郝建国^{1,2}, 步怀宇^{1,2}, 贾敬芬^{1,2}

(1. 西北大学 生命科学学院, 陕西 西安 710069;

2. 西北大学 西部资源生物与现代生物技术省部共建教育部重点实验室, 陕西 西安 710069)

摘要: 检验小麦耐水分胁迫突变体对渗透胁迫环境的耐受能力并对其生理生化及分子特性进行研究。测定突变体愈伤组织在甘露醇、NaCl 和聚乙二醇(PEG-6000)模拟的渗透胁迫下的相对生长量及其在 20% 甘露醇胁迫下游离脯氨酸含量、可溶性糖含量、可溶性蛋白含量等生理生化指标, 并进一步检测了突变体再生苗的 K^+/Na^+ 含量及可溶性蛋白质组成和基因组 DNA RAPD 多态性等生化和分子特征。突变细胞系可以在对照不能生长的 20% 甘露醇、1.5% NaCl 和 20% PEG-6000 胁迫条件下, 分别表现出 14.5%, 12.8%, 41.8% 的相对生长量; 在 20% 甘露醇胁迫条件下突变细胞系游离脯氨酸积累量为对照的 80%, 可溶性糖积累量为对照的 1.2 倍, 可溶性蛋白含量为对照的 1.3 倍。在相同浓度的甘露醇模拟的渗透胁迫环境中突变体再生植株比对照植株相能维持较高的 K^+/Na^+ 比值。与对照相比, 耐水分胁迫突变体再生植株可溶性蛋白 SDS-PAGE 发生显著变化: 6 条新可溶性蛋白谱带出现在突变体再生植株中, 同时对照系中的 1 条可溶性蛋白谱带在突变株中缺失。突变体植株与对照株 RAPD 带型呈现一定的多态性。所研究的小麦耐水分胁迫突变体是一个具有较强渗透胁迫耐受能力, 可用于进一步育种工作的良好中间材料。

关键词: 小麦; 耐水分胁迫突变体; RAPD

中图分类号: S512.01 文献标识码: A 文章编号: 1000-7091(2007)02-0095-06

Physiology and RAPD Identification of a Water-stress Resistance Mutant of Wheat

ZHAO Yu-wei^{1,2}, HAO Jian-uo^{1,2}, BU Hua-yu^{1,2}, JIA Jin-fen^{1,2}

(1. College of Life Science, Northwest University, Xi'an 710069, China;

2. Key Laboratory of Resource Biology and Biotechnology in Western China,

Ministry of Education, Northwest University, Xi'an 710069, China)

Abstract: To test the tolerance-resistant ability of a water-stress resistance mutant of wheat and study its physiology and molecular identifications. The relative growth rate of the mutant calluses were tested under the stress of mannitol, NaCl and PEG-6000. The accumulation of free proline, soluble sugars and soluble proteins in the mutant calluses also were tested under the stress of 20% mannitol. SDS-PAGE and RAPD were carried out to study the physiology and molecular identifications of the regenerated mutant plants. The result showed that the mutant calluses could retain the relative growth rate at 14.5%, 12.8% and 41.8%, when they were planted on the media contain 20% mannitol, 1.5% NaCl or 20% PEG-6000, while the control calluses could not grow under each of these stress circumstances. The accumulation of free proline in the mutant calluses is about 80% of that of the control under the stress of 20% mannitol. On the contrary, the accumulation of soluble sugars and soluble proteins in the mutant calluses is about 1.2 and 1.3 times of that of the control. Growing in an osmotic-stressed environment treated by same mannitol concentration, the regenerated mutant plants could maintain higher K^+/Na^+ than that of control. 6 new soluble proteins appeared and 1 protein of the control disappeared in the SDS-PAGE map of the mutant. Mutant variations were found at DNA level through the RAPD analysis. The results demonstrated these mutants could be used as new water-stress resistance seedling resources.

Key words: Wheat (*Triticum aestivum*); Water-stress resistance Mutant; RAPD

收稿日期: 2006-10-02

基金项目: 陕西省教育厅科研项目(06JK190); 西北大学科研基金项目(03NW03)

作者简介: 赵宇玮(1977-), 男, 北京人, 在读博士, 主要从事植物生物技术研究

通讯作者: 贾敬芬(1938-), 女, 河北深泽人, 教授, 博士生导师, 主要从事植物细胞工程研究。

土壤荒漠化严重威胁着植物生长, 而培育耐水分胁迫作物品种是解决这一问题的有效生物学措施。应用细胞工程手段通过离体筛选植物耐水分胁迫突变体的研究已经在甘薯^[1]、高粱^[2]、烟草^[3]、小麦^[4]、甘蓝^[5]等农作物中成功获得耐水分胁迫能力显著提高的植株, 为耐水分胁迫作物育种提供了宝贵的中间种质资源。本研究以耐盐小麦为起始材料, 采用一步正筛选法二次离体筛选获得的小麦耐水分胁迫突变体为材料, 通过测定细胞系在胁迫条件下游离脯氨酸、可溶性糖、可溶性蛋白等生理指标并进行植株 Na^+ 、 K^+ 含量测定、可溶性蛋白 SDS-PAGE 电泳和基因组 DNA RAPD 分析, 初步鉴定了一个可用于进一步育种工作的小麦耐水分胁迫突变体。

1 材料和方法

1.1 试验材料

试验材料是由陕西省生物技术实验室提供的以耐盐小麦 850512⁺ 为起始材料, 采用一步正筛选法二次离体筛选获得的小麦耐水分胁迫突变体^[4], 对照为耐盐小麦 850512⁻。

1.2 耐水分胁迫突变细胞系对甘露醇、盐 (NaCl)、聚乙二醇 (PEG-6000) 和羟脯氨酸 (HYP) 的耐受性试验

小麦耐水分胁迫突变体愈伤组织分别接种到含不同浓度甘露醇 (0, 5%, 10%, 15%, 20%), 不同浓度 NaCl (0, 0.5%, 1.0%, 1.5%, 2.0%), 不同浓度的聚乙二醇 PEG-6000 (0, 5%, 10%, 15%, 20%) 的 MS_0 培养基。每组处理 25 块愈伤组织, 并设 3 组重复。在每天 16 h, 120 W/m^2 光照, $(25 \pm 2)^\circ\text{C}$ 条件下培养 21 d, 统计相对生长量。

1.3 游离脯氨酸含量测定

小麦耐水分胁迫突变体愈伤组织分别接种到甘露醇浓度分别为 0, 5%, 10%, 15%, 20% 的 MS_0 培养基。每组处理 25 块愈伤组织, 并设 3 组重复。在每天 16 h, 120 W/m^2 光照, $(25 \pm 2)^\circ\text{C}$ 条件下培养 21 d。取处理后小麦耐水分胁迫突变体愈伤组织 1, 采用磺基水杨酸法^[6]测定游离脯氨酸含量。

1.4 可溶性糖含量测定

同 1.3 处理小麦耐水分胁迫突变体愈伤组织 1, 蒽酮比色法^[7]测定可溶性糖含量。

1.5 可溶性蛋白含量测定

同 1.3 处理小麦耐水分胁迫突变体愈伤组织 1, 考马斯亮蓝 G-250 法测定^[8]可溶性蛋白含量。

1.6 耐水分胁迫突变体再生植株在甘露醇胁迫下

Na^+ 、 K^+ 含量测定

小麦耐水分胁迫突变体再生植株及对照种子苗分别用含不同浓度的甘露醇 (0, 5%, 10%, 15%, 20%) 的 MS_0 液体培养基浇灌 24 h 后, 取 1.0 新鲜叶片, 参照王宝山等^[9]方法, 使用岛津 AA6300 原子吸收分光光度计测定 Na^+ 、 K^+ 含量。

1.7 植株可溶性蛋白 SDS-PAGE 分析

分别称取突变体和对照种子苗叶片 1.0 提取可溶性蛋白, 参照 Sambrook 等^[10]的方法进行 SDS-PAGE。电泳浓缩胶为 3%, 分离胶为 12%。考马斯亮蓝 R-250 染色液染色。经脱色后的凝胶在岛津 Cs-930 薄层扫描仪上扫描。中分子量标准蛋白购自北京鼎国生物技术公司。

1.8 RAPD 分析

采用十六烷基三乙基溴化铵 (CTAB) 微量法^[11]分离突变体植株及对照株基因组 DNA, 选用上海生工公司 2 组 20 对随机引物进行 RAPD 扩增。PCR 反应条件为: 94°C 4 min, 94°C 30 s, 36°C 30 s, 72°C 1 min 30 s, 39 个循环, 72°C 10 min。RAPD 产物经 1.0% 琼脂糖凝胶电泳, 由 BiocaptMW 凝胶成像系统记录结果。

2 结果与分析

2.1 耐水分胁迫突变细胞系对甘露醇、NaCl 和聚乙二醇的耐受试验

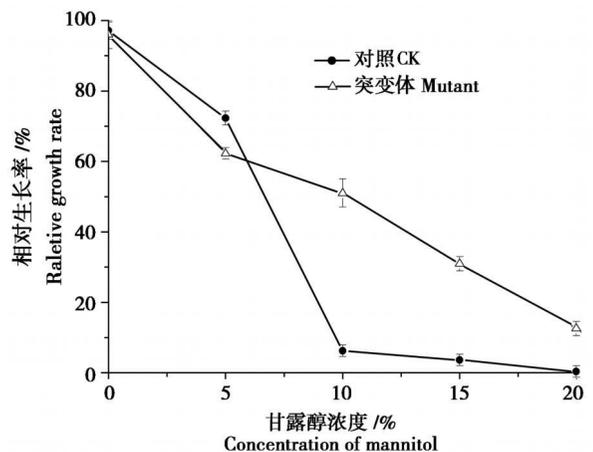


图 1 甘露醇胁迫下突变体愈伤组织及其对照的生长试验
Fig 1 Growth test of the callus of the mutant and control under the stress of mannitol

突变体愈伤组织在含有不同浓度甘露醇的培养基上明显高于对照细胞系的相对生长率, 当培养基中甘露醇浓度为 10% 时, 对照愈伤组织只有 4.4% 的相对生长率而突变体却有 52% 的相对率, 表现出显著的渗透胁迫抗性。当甘露醇浓度达到 20% 时对照细胞系几乎不能生长, 而突变体愈伤组织仍有 14.5% 的相对生长率 (图 1)。统计脱离选择压力生

长2代的突变体愈伤组织在 0~ 2.0% NaCl 胁迫下的相对生长率结果如图 2, 在 0.5%, 1.0%, 1.5% 的 NaCl 胁迫下突变愈伤组织均表现出略高于对照的相对生长, 但这种提高并不显著。突变体愈伤组织及其对照在不同浓度的 PEG-6000 胁迫下的相对生长率统计结果见图 3。突变体和对照愈伤组织随 PEG 浓度升高均表现出生长减慢, 但在各浓度 PEG-6000 胁迫下, 突变体愈伤组织都表现出比对照系高的 PEG 胁迫抗性, 随着 PEG 浓度的上升这种抗性差异也更加显著, 如当 PEG 浓度达到 20% 时, 耐水分胁迫突变体愈伤组织的相对生长率达到对照的 5.9 倍。

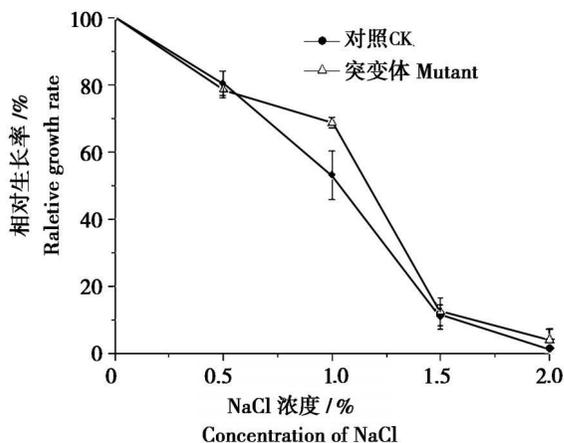


图 2 突变体和对照愈伤组织在 NaCl 胁迫下的生长试验
Fig 2 Growth test of the callus of the mutant and control under the stress of NaCl

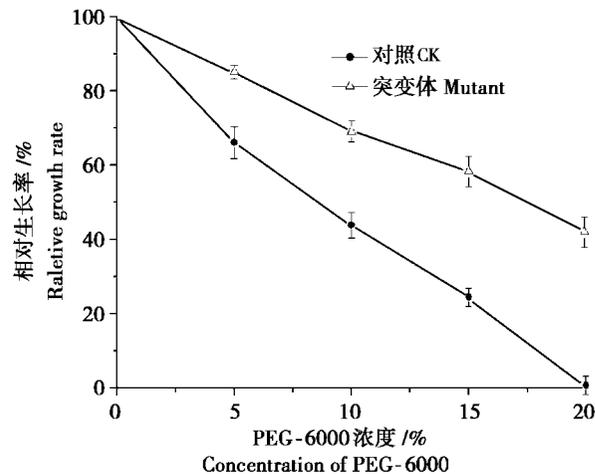


图 3 PEG-6000 胁迫下突变体及其对照愈伤组织生长试验
Fig 3 Growth test of the mutant and control callus the stress of PEG-6000

2.2 耐水分胁迫突变系在甘露醇胁迫下游离脯氨酸、可溶性糖及可溶性蛋白含量

随着培养基中甘露醇浓度的上升, 突变体细胞系的游离脯氨酸积累量持续增加, 但当甘露醇浓度达到 10% 以上时, 突变体积累的游离脯氨酸量显著少于对照系在相同胁迫条件下积累的脯氨酸量(图

4)。与之相反, 随着甘露醇胁迫浓度的升高, 突变体和对照系都可以积累更多的小分子可溶性糖, 但突变体与对照系相比, 在相同甘露醇浓度下可以积累更多的可溶性糖(图 5)。在可溶性蛋白含量方面, 从表 1 可以看出环境中甘露醇胁迫浓度未达到 15% 前, 突变体和对照愈伤组织中可溶性蛋白含量均随甘露醇浓度上升而上升, 而且突变体愈伤组织中可溶性蛋白积累量比对照系高。当甘露醇浓度继续上升, 无论突变体还是对照系愈伤组织中可溶性蛋白含量都下降, 但突变体愈伤组织中的可溶性蛋白含量仍高于对照。

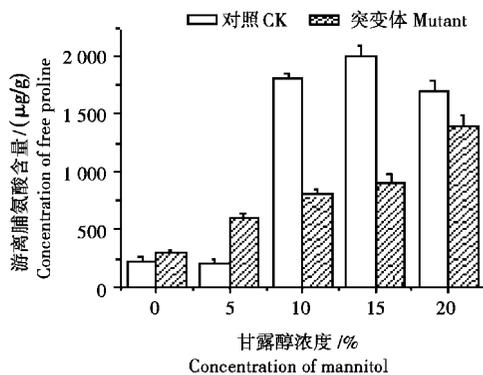


图 4 甘露醇胁迫下突变体与对照愈伤组织游离脯氨酸含量

Fig 4 Concentration of free Proline in the calluses of the mutant and control under the stress of mannitol

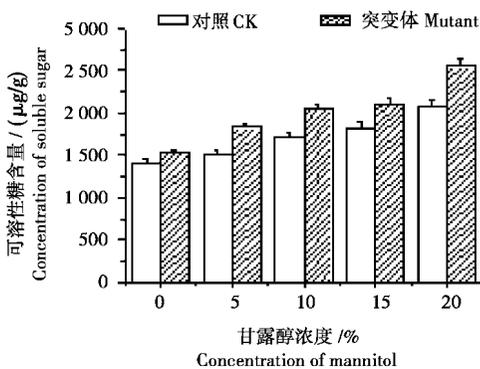


图 5 甘露醇胁迫下突变体与对照愈伤组织可溶性糖含量

Fig 5 Concentration of soluble sugar in the calluses of the mutant and control under the stress of mannitol

表 1 甘露醇胁迫下突变体和对照愈伤组织中可溶性蛋白含量

Tab. 1 Concentration of soluble proteins in the callus of the mutant and the control under the stress of mannitol

甘露醇浓度 / % Concentration of mannitol	对照愈伤组织可溶性蛋白含量 / (m / l) Concentration of soluble proteins of the control calluses	突变体愈伤组织可溶性蛋白含量 / (m / l) Concentration of soluble proteins of the mutant calluses
5	13.2±2.1	15.0±2.2
10	13.5±2.7	33.7±3.1
15	42.9±3.7	49.5±2.6
20	27.2±0.9	35.8±1.1

2.3 耐水分胁迫突变体在甘露醇胁迫下 Na⁺、K⁺ 含量

耐水分胁迫突变体 T0 再生植株及对照植株在甘露醇胁迫下 Na⁺、K⁺ 含量(以鲜质量计)测定结果

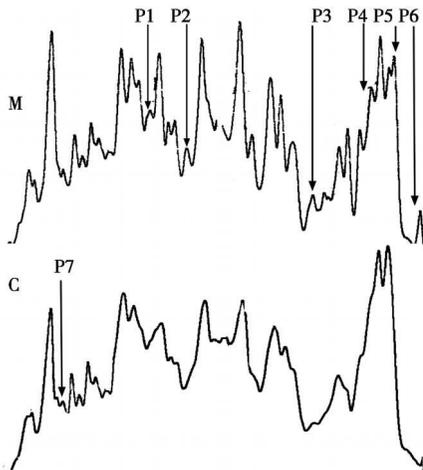
表 2 甘露醇胁迫下突变体和对照植株 Na⁺、K⁺ 含量

Tab. 2 Concentration of Na⁺、K⁺ in the plants of the mutant and the control under the stress of mannitol

甘露醇浓度/ % Concentration of mannitol	突变体 Mutant			对照 CK		
	K ⁺ / (μ /)	Na ⁺ / (μ /)	K ⁺ / Na ⁺	K ⁺ / (μ /)	Na ⁺ / (μ /)	K ⁺ / Na ⁺
0	266.3 ± 2.3	47.1 ± 3.6	5.65	263.7 ± 6.3	46.6 ± 2.8	5.66
5	257.6 ± 2.5	99.3 ± 4.1	2.59	221.1 ± 3.5	89.6 ± 4.1	2.46
10	249.8 ± 3.3	187.7 ± 2.7	1.33	203.4 ± 3.7	163.3 ± 3.4	1.24
15	239.3 ± 4.1	244.6 ± 3.3	0.98	175.3 ± 4.5	211.1 ± 3.7	0.83
20	210.4 ± 3.7	385.5 ± 1.8	0.54	146.8 ± 2.2	363.7 ± 2.7	0.40

2.4 耐水分胁迫突变体再生植株可溶性蛋白 SDS-PAGE

SDS-PAGE 电泳图谱(图 6)显示,耐水分胁迫突变体再生植株及对照种子苗可溶性蛋白有明显差异,突变株产生了对照所没有的 6 条新多肽 P₁(MW ≈ 91 kD), P₂(MW ≈ 73 kD), P₃(MW ≈ 58 kD), P₄(MW ≈ 39 kD), P₅(MW ≈ 32 kD), P₆(MW ≈ 23 kD), 同时比对照缺少了 1 条多肽 P₇(MW ≈ 107 kD)。从图 6 中可以看出, 突变体植株与对照种植苗除了蛋白带的数目上有较明显的差异外, 一些蛋白带在峰的高低(即某些特定蛋白的表达量)也存在变化。



M. 突变体 T0 植株, C: 对照种子苗

M. The T0 plants of the mutant, C. CK seedling

图 6 叶片可溶性蛋白 SDS-PAGE 扫描图谱

Fig 6 SDS-PAGE electrophoresis scanning curves of soluble proteins of plants

2.5 耐水分胁迫突变体植株 RAPD

用 20 对随机引物对突变体植株与对照株进行 RAPD 扩增, 结果所有选用引物均有扩增产物, 片段大小分布在 0.2~ 2 kb 之间。不同引物扩增出的片段数量不同, 少的 1 条, 多则 8 条, 平均 3.9 条, 4 个

见表 2。结果显示: 随环境中甘露醇浓度的提高, 它们各自体内 Na⁺ 含量增加, K⁺ 含量减少, 但突变体再生植株能够保持更高的 K⁺ / Na⁺ 比。

引物扩增出多态性, 占全部引物的 25%。参照刘春宇等^[12]方法, 用公式 $S = 2Nab / (Na + Nb)$ (Na, Nb 分别为材料 RAPD 电泳图谱中各自显性的条带数, Nab 为两材料 RAPD 电泳图谱中相同的条带数) 计算突变体植株与对照株间 RAPD 相似性指数: $S = 0.89$, 表明二者基因组 DNA 存在一定序列差异(表 3, 图 7)。

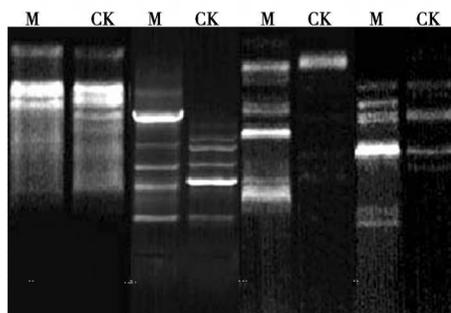
表 3 突变体与对照植株 RAPD 结果比较

Tab. 3 RAPD result of the mutant plant and the control plant

随机引物 Random primer	碱基序列 Base sequence	条代数 Fra ment number	
		突变体 Mutant*	对照 CK
S010	CTGCTGGGAC	3	3(1)
S011	GTAGACCCGT	4	4
S012	CCTTGACGCA	3	3
S013	TTCCCCGCT	6(2)	6(2)
S014	TCCGCTCTGG	2	2
S015	GGAGGCTGIT	4	4
S016	TTTGCCCGGA	8(7)	1
S017	AGGGAACGAG	5	5
S018	CCACAGCAGT	4	4
S019	ACCCCGAAG	3	3
S020	GGACCCTTAC	5	5
S021	CAGGCCCTTC	1	1
S022	TGCCGAGCTG	4	4
S023	AGTCAGCCAC	3	3
S024	AATCGGCTTG	6(3)	4(1)
S025	AGGGTCTTG	3	3
S026	GGTCCCTGAC	4	4
S027	GAAACGGGTG	6	6
S028	GTGACGTAGG	1	1
S029	GGGTAACGCC	6	6

注: 括号中数字为二者差异条带数

Note: The numbers of the different fra ments are in the parentheses



M. 突变体; CK. 对照种子苗

M. The mutant plant; CK. The control plant

图中左起依次为引物 SO10, SO13, SO16, SO24 的扩增产物

图 7 突变体和对照植株 RAPD 引物 SO10, SO13, SO16, SO24 的多态性扩增

Fig 7 RAPD polymorphism between the mutant plant and the control plants with four primers SO10, SO16, SO24

3 讨论

通过细胞工程离体筛选获得的胁迫抗性突变体, 在离开选择压数代以后能否保持胁迫抗性是细胞工程育种工作中至关重要的问题。本研究得到的 6 个小麦耐水分胁迫细胞系中有 4 个在离开选择压数代以后, 在 15% 甘露醇模拟的渗透胁迫下进行复筛时胁迫抗性不能保持; 但有 2 个突变体细胞系仍能表现出明显高于对照系的耐渗透胁迫能力, 突变体在愈伤组织水平上还表现出相当高的 PEG-6000 胁迫抗性及略高于对照的 NaCl 胁迫抗性, 这表明该突变体的耐渗透胁迫特征是稳定的。突变体对 NaCl 胁迫抗性提高不显著可能是由于对照系本身是耐盐突变体, 其细胞水平耐受盐胁迫能力很强, 在其基础上筛选得到的耐渗透胁迫突变体的 NaCl 胁迫抗性提高相对较为有限。

水分胁迫可以诱发高等植物多方面的生理及分子响应, 包括脱落酸 (ABA) 和可溶性有机物质 (如甜菜碱、脯氨酸、可溶性糖及其衍生化合物) 的积累、特定干旱诱导蛋白的合成 (如大分子亲水蛋白, LEA 蛋白、活性氧清除酶系和分子伴侣家族蛋白等), 同时一些基因的表达调控发生改变从而使植物体表现出适应于干旱环境的生理改变^[13]。高等植物体内可溶性有机物质主要是糖类及其衍生化合物^[14]和脯氨酸^[15]等。其中可溶性糖在高等植物对抗逆境胁迫中的贡献大于脯氨酸^[16]。在逆境中, 植物细胞中可溶性糖含量迅速增加, 对细胞具有保护作用^[17]。这种保护作用一方面是使细胞内产生具有固体机械特性的超饱和液体, 避免发生细胞溶液结晶, 限制大分子的混合^[17]。另一方面, 蔗糖等双糖能在水分胁迫状态下稳定酶活性, 保护膜结构^[18]。因此, 可溶性糖含量是植物在胁迫条件下变化较为

稳定的指标, 与植物的渗透胁迫抗性有密切的关系。在所测试的甘露醇浓度范围内, 随着渗透胁迫的增加, 突变体愈伤组织中的可溶性糖含量可溶性糖含量呈上升趋势且显著高于对照系。脯氨酸是渗透胁迫下易于积累的一种氨基酸, 但其积累究竟是渗透胁迫的必然结果, 还是偶然性的事件目前存在两种不同观点^[15]: 有报道认为脯氨酸的积累是植物在逆境胁迫下的一种适应; 逆境胁迫导致细胞代谢紊乱, 抑制脯氨酸参与蛋白质合成, 从而产生大量游离脯氨酸^[19]; 也有报道认为在渗透胁迫下固氮酶活性降低, 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^[20], 脯氨酸的积累不升反降。我们在研究中发现小麦耐水分胁迫突变体与对照在同样的渗透处理下, 游离脯氨酸含量与渗透胁迫抗性呈负相关, 与前人报道的小麦组织中的脯氨酸变化率与其耐渗透胁迫能力成负相关^[21]相吻合, 这说明了脯氨酸的积累与小麦耐渗透胁迫性的关系复杂, 目前只能将其作为一种辅助性的生理指标。小麦耐水分胁迫突变体及对照体内 Na^+ 含量随着环境中渗透胁迫程度的提高而升高, K^+ 含量则与之相反。这可能是由于渗透胁迫下植物光合作用及呼吸作用等基础能量代谢活动减弱从而导致膜结构中 Na^+ / K^+ ATPase 活性受到抑制, 离子选择性吸收被破坏。在较低浓度 (5% ~ 10%) 的甘露醇造成的渗透胁迫环境中 K^+ 优先吸收进细胞基质不受 Na^+ 的抑制, 但 K^+ 总是抑制 Na^+ 进入。在较高浓度 (15% ~ 20%) 的甘露醇造成的渗透胁迫环境中, 离子吸收的选择性进一步下降, K^+ , Na^+ 离子都抑制吸收。但由于突变体已形成了某种保护膜机制, 所以小麦耐盐系幼苗维持着较高的 K^+ / Na^+ 比值。这种膜保护机制的分子机理仍在进一步研究当中。在一定盐浓度范围内, 植株的 K^+ / Na^+ 比率是小麦耐渗透胁迫能力的重要指标^[22]。

水分胁迫下的植物为了减少胁迫造成伤害, 可以通过产生一些抗逆相关蛋白质, 如 LEA 蛋白家族、水分通道蛋白等来对抗胁迫环境, 这些新增加的蛋白质的种类和含量与植物的抗旱能力密切相关^[23]; 同时细胞可溶性蛋白是植物代谢的主要调控和促进物质, 其含量的变化从一方面反映了植物合成和代谢能力^[24-26]。在我们的试验中不仅突变体可溶性蛋白含量始终比对照系更高, 同时与对照植株相比蛋白表达谱发生显著改变产生了 6 条新的可溶性蛋白谱带, 这是小麦耐水分胁迫突变体比对照系更适应于干旱胁迫环境的一种表现。

通过反复筛选得到的耐水分胁迫突变体, 其真

实性往往受到人们的怀疑。本研究用 20 对引物对突变体植株及其对照亲本植株进行了 RAPD 分析,结果显示,突变体与对照相比发生了 DNA 水平的变异,遗传距离的计算也证明了突变体与对照基因组之间存在微小差异,从而为突变体的真实性提供了充分的分子生物学证据,也表明研究中所得到的突变体是一个研究小麦耐渗透胁迫特性的良好材料。

参考文献:

[1] 王玉萍,刘庆昌,李爱贤,等.甘薯耐旱突变体的离体筛选与鉴定[J].中国农业科学,2003,36(9):1000-1005.

[2] Smith R H. Screenin for drou ht tolerance in sor hum usin cell culture[J]. In Vitro, 1986,21(10):541- 545.

[3] Sumayarti S. Characterization and re eneration of salt and water stress mutants from protoplast culture of Nicotiana plumba inifolia(Viviani) [J]. Theoretical and Applied Genetics, 1992, 83 : 613- 619.

[4] 赵宇玮,郝建国,步怀宇,等.小麦耐甘露醇变异细胞系的离体筛选及植株再生 I [J]. 西北大学学报(自然科学版),2005,35(2):184- 186.

[5] 曹必好,雷建军.离体筛选甘蓝抗性变异体及其生化特性研究[J]. 华北农学报,2001,16(2):62- 66.

[6] 张殿忠,汪沛洪,赵会贤.测定小麦叶片游离脯氨酸的方法[J].植物生理学通讯,1990,26(4):62- 65.

[7] 李合生.植物生理生化实验原理和技术[M].北京:高等教育出版社,2003:149- 151.

[8] Bradford M M. A Rapid Sensitive Technique of Detemination Protein concentration [J]. Anal Blochem, 1976, 72: 248 - 254.

[9] 王宝山,赵可夫.小麦叶片中 Na、K 提取方法的比较 [J]. 植物生理学通讯,1995,31(1):50- 52.

[10] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. Molecular Clonin (分子克隆) [M]. 第 2 版.北京:科学出版社,1989:1183- 1187.

[11] Clark MS. 植物分子生物学——实验手册 [M]. 北京:高等教育出版社,1998:6- 7.

[12] 刘春宇,陈元霖,桂慕燕,等.家蚕与蓖麻蚕杂交后代变异机理探讨- 基因组 RAPD 检测[J]. 遗传,1998,20(2):5- 8.

[13] Taishi U, Miki F, Yasunari F, *et al.* En ineerin drou ht tolerance in plants: discoverin and tailorin enes to unlock

the future[J]. Current Opinion in Biotechnolo y,2006, 17(1):113- 122.

[14] Mor an J M. Osmotic components and properties associated with enotypic differences in osmore ulation in wheat [J]. Aust J Plant Physiol,1992,19(1):67- 76.

[15] Shin W, Katsumi K, Yuji I, *et al.* Effects of saline and osmotic stress on proline and su ar accumulation in Populus euphratica in vitro[J]. Plant Cell, Tissue and Or an Culture,2000,63(1):199- 206.

[16] Gebre G M, Brandle J R, Kuhns M R. Influence of rewaterin and time of samplin on solute accumulation of two Populus deltoides clones [J]. Tree Physiol,1997,17(2):341- 346.

[17] Koster K L. Classfomation and desiccation tolerance in seeds[J]. Plant Physiol,1991,96:302- 304.

[18] In ram J, Bartels D. The molecular basis of dehydration tolerance in plants[J]. Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol, 1996,47:377- 403.

[19] 汤章城.逆境条件下植物脯氨酸的积累及可能的意义 [J]. 植物生理学通讯,1984,20(3):51- 54.

[20] Iyer V, Fernands T A, Apte S K. A role for osmotic stress-induced proteins in the osmitolerance of a nitro en-fixin cyanobacterium, Anabaena sp. Strain Lr 31[J]. J Bacteriol, 1994,176(18):5868- 5870.

[21] 吕丽华,胡玉昆,李雁鸣.水分胁迫下不同抗旱性冬小麦脯氨酸积累动态[J]. 华北农学报,2006,21(2):75- 78.

[22] 王鸣刚,贾敬芬,谢 放.小麦耐盐细胞系及后代耐盐稳定性的生化分析[J]. 西北植物学报,1999,19(2):310- 314.

[23] 吴志华,曾富华,马生健,等.ABA 对 PEG 胁迫下狗牙根可溶性蛋白质的影响[J]. 草业学报,2004,13(4):75- 78.

[24] 陈耀锋,贺普超,廖祥儒.不同基因型葡萄愈伤组织脯氨酸累积变异系的抗盐性研究[J]. 农业生物技术学报,1997,5(1):58- 63.

[25] 吴诗光,陈 龙,殷贵鸿.灌浆期干旱对高产小麦某些生理生化特性的影响[J]. 河南农业科学,2001(9):6- 7.

[26] 陈晓远,凌木生,高志红.水分胁迫对水稻叶片可溶性糖和游离脯氨酸含量的影响[J]. 河南农业科学,2006(12):28- 32.