

芦苇愈伤组织对渗透胁迫和 ABA 的若干生理响应

吴诗光, 陈 龙, 刘怀攀, 张承烈²

(. 周口师范高等专科学校 生物系, 河南 周口 466000; 2. 兰州大学 生命科学院, 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)对 PEG-6000 的胁迫及外源 ABA 的生理响应。结果显示: 0%~ 30% 的 PEG 胁迫使 2 种愈伤组织的游离脯氨酸(Pro)含量升高、质膜透性增大、提高了保护酶(SOD、CAT、POD)的活性, 降低了细胞相对含水量(RWC), SREC 的游离Pro 含量和保护酶活性的升高幅度大于 WREC, 质膜透性和 RWC 的变化前者小于后者。外源 ABA 对 WREC 的作用大于 SREC。

关键词: 生态型芦苇; 胚性愈伤组织; 渗透胁迫; ABA; 生理生化特性

中图分类号: S564⁺.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 000- 709 (200)03- 0035- 05

国内外学者已从整株水平的形态解剖、生理生化及遗传结构等指标对芦苇适应干旱方面进行了研究^[1~ 2]。建立不同生态型芦苇愈伤组织实验体系, 对其进行抗旱性生理生化研究在国内外颇为少见。为此, 我们以水生沼泽芦苇和由其演化而来的旱生沙丘芦苇种子为材料, 培养诱导出胚性愈伤组织, 在人工模拟干旱条件下, 对其生理生化特性和外源 ABA 的影响进行了研究。以探讨水生和沙生芦苇在细胞水平上抗旱性差异的内在机理, 并比较芦苇在细胞水平和整株水平上抗旱性的异同, 旨在为作物抗旱育种奠定一定的理论和实验基础。

材料和方法

1.1 材料及处理

芦苇种子采自河西走廊中部、巴丹吉林沙漠南缘, 即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 0 m 高的沙丘上, 土壤含水量为 8.8%。种子经消毒、水洗后, 采用改良的 MS 培养基(MS+ mg/L 2,4-D+ mg/L 6-BA+ 0.5 mg/L NAA)诱导愈伤组织, 然后用继代培养基(MS+ mg/L 2,4-D)进行继代, 每 3 周继代 1 次, 从而获得胚性愈伤组织。培养条件: 温度为(25±2)℃, 光照 2 h/d, 光强 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下列 4 种培养基上培养。(1)不含 PEG、不含 ABA 的继代培养基;(2)不含 ABA, 但分别含 0%(- 0.5 MPa), 5%(- 0.3 MPa), 20%(- 0.5 MPa), 25%(- 0.74 MPa), 30%(- 1.05 MPa) PEG-6000 的继

收稿日期: 200 - 05- 5

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(79570075)

作者简介: 吴诗光(1958-), 男, 副教授, 主要从事植物生理生化教学与研究工作。

代培养基; (3) 含 0 $\mu\text{mol/L}$ ABA, 不含 PEG-6000 的继代培养基; (4) 含 0 $\mu\text{mol/L}$ ABA, 且含 0%~30% 不同浓度 PEG-6000 的继代培养基。于培养第 5 d 时取样测定。每种处理 3 批重复, 每批各设 3 次平均, 结果为 9 次的平均值。

1.2 测定方法

酶液提取: 取 0.5 g 愈伤组织加预冷的 Tris- 柠檬酸 (pH 8.2) 缓冲液约 2 mL, 匀浆, 3 500 r/min 低温离心 0~20 min, 取上清液放在 - 0 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱备用, 用时取出加蔗糖至终浓度为 30%。

愈伤组织细胞相对含水量测定、过氧化物酶 (POD) 活力 (从每分钟内吸光度 A_{470} 变化 0.0 为一个活力单位) 和超氧化物歧化酶 (SOD) 活力 (将氮蓝四唑光化还原抑制到对照一半时所需的酶量为一个活力单位) 的测定按龚富生^[3]方法进行; 以电导仪法测定质膜相对透性^[4]; 游离脯氨酸 (Pro) 测定用磺基水杨酸法^[5]; 过氧化氢酶 (CAT) 活力 (每分钟分解 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 为一个酶活力单位) 测定按刘昌玲^[6]方法进行。

2 结果与分析

2.1 PEG-6000 及外源 ABA 对 RWC、质膜相对透性和游离 Pro 含量的影响

表 比较了在不同浓度 PEG 胁迫下以及施加 0 $\mu\text{mol/L}$ ABA 后 2 种愈伤组织中几种生理生化指标的变化。随 PEG 处理浓度由低到高逐渐加大, RWC 降低, 质膜相对透性增大, 游离 Pro 含量 (以干重计) 显著升高, 2 种愈伤组织的各指标变化趋势相似, 但差异显著。其中以 WREC 的相对含水量下降和 SREC 的 Pro 升高变化最为突出。在 30% PEG 胁迫下, WREC 的相对含水量只相当于对照 (材料未经 PEG 处理) 的 5.5%, 而 SREC 为对照的 76.6%; WREC 的游离 Pro 浓度是对照的 5.3 倍, SREC 则为对照的 3.5 倍。质膜相对透性的增幅 SREC 小于 WREC, 而游离 Pro (以干重计) 的升幅 SREC 大于 WREC。说明二者在抗渗透能力上存在一定差异。

外加 ABA 后, 对 2 种愈伤组织的几种反应均有一定影响, 但对 WREC 的作用显著大于 SREC。当 PEG 处理浓度为 25% 时, WREC 施加 ABA 比未加 ABA 的 RWC、质膜透性和 Pro 分别增加: 66.7%, - 38.5%, 3.3%, 而 SREC 则分别增加为: - 8.75%, - 6.7% 和 40.0%。表明外源 ABA 具有增强芦苇愈伤组织抗渗透能力的作用。

表 1 PEG-6000 及外源 ABA 对 RWC、质膜相对透性和游离 Pro 含量的影响

PEG (%)	WREC						SREC					
	Pro(mg/g)		RWC(%)		质膜透性(%)		Pro(mg/g)		RWC(%)		质膜透性(%)	
	无 ABA	有 ABA	无 ABA	有 ABA	无 ABA	有 ABA	无 ABA	有 ABA	无 ABA	有 ABA	无 ABA	有 ABA
0	2.7	6.5	96.8	87.9	5.0	7.9	2.5	6.45	93.9	85.3	4.9	7.8
0	6.5	2.02	64.3	59.	9.7	.8	2.90	22.58	92.8	79.4	8.9	8.0
5	9.	2.90	60.2	57.2	26.8	4.7	7.20	25.80	87.6	82.9	0.8	.0
20	0.85	26.04	25.4	52.	39.7	24.9	8.92	26.88	83.5	67.8	.	4.2
25	.07	25.6	8.2	48.3	4.6	26.3	9.35	27.09	80.3	72.8	8.2	5.3
30	.50	27.3	5.3	35.6	43.5	40.2	29.06	29.3	78.2	7.7	20.	24.2

2.2 PEG-6000 和外源 ABA 对 3 种保护酶活性的影响

愈伤组织 SOD 活性的升高与渗透胁迫强度呈正相关性, 2 种愈伤组织 SOD 活性的变化趋势相似, 但差异显著(表 2)。经 0% ~ 30% PEG 处理后, SREC 和 WREC 的酶活力均升高, 相比之下前者的升幅大于后者。当 PEG 浓度达 30% 时, SREC 的 SOD 活性是对照的 2.0 倍, WREC 则是对照的 1.4 倍。施加外源 ABA 对二者的 SOD 活性基本无影响。

表 2 PEG-6000 和外源 ABA 对 3 种保护酶活性的影响

PEG (%)	WREC						SREC					
	SOD		POD		CAT		SOD		POD		CAT	
	(U/(mg·Pr))		(ΔA _{470nm} /(min·mg·Pr))		(μgH ₂ O ₂ /(min·g))		(U/(mg·Pr))		(ΔA _{470nm} /(min·mg·Pr))		(μgH ₂ O ₂ /(min·g))	
	无 ABA	有 ABA	无 ABA	有 ABA	无 ABA	有 ABA	无 ABA	有 ABA	无 ABA	有 ABA	无 ABA	有 ABA
0	9.3	0	0.06	0.5	2.8	24.9	0	0.8	0.05	0.20	1.6	37.7
0	0	0.4	0.5	0.28	8.7	26.8	3.8	3.5	0.2	0.22	34.5	42.8
5	0.6	1.5	0.25	0.34	23.7	38.6	5.3	6.7	0.29	0.33	45.4	49
20	2.4	3	0.29	0.52	27.6	58.0	8.7	8.9	0.43	0.44	56.2	62.3
25	2.8	3.0	0.3	0.57	31	75.8	9.2	9.0	0.55	0.62	78	80.2
30	3	2.9	0.30	0.6	42.2	75.3	20.3	20.5	0.7	0.73	82.3	86.4

表 2 数据显示, POD 和 CAT 活性(以干重计)随渗透胁迫强度而增高, 2 种酶中以 POD 活性的提高幅度较大, SREC 的 2 种酶活性的升幅均高于 WREC, SREC 的 POD 和 CAT 活性在 0% ~ 30% PEG 浓度下始终保持比 WREC 相应酶活性高 1 倍左右。在渗透胁迫下 POD 和 CAT 活性的提高增强了体内保护酶防御体系抵御膜脂氧化的能力, 是芦苇愈伤组织对渗透胁迫作出的基本反应。在无 PEG 胁迫时施加 0 μmol/L ABA, 可使 2 种愈伤组织的 POD 和 CAT 活性(以干重计)有一定幅度的提高。在 0% ~ 30% PEG 处理下, 施加 0 μmol/L ABA, 使得 2 种酶活性比单独受 PEG 胁迫时又进一步升高, WREC 的升幅大于 SREC, 前者 2 种酶活性保持比单独受相应浓度 PEG 胁迫时上升 1 倍左右, 后者的 2 种酶活性有微幅升高。

3 讨论

芦苇愈伤组织经 PEG 处理后, RWC 随处理浓度的增加而下降, 细胞质膜相对透性随处理浓度的增加而增大, 二者间呈一定的负相关, 2 种生态型芦苇愈伤组织中以 SREC 变化幅度小; 游离 Pro 含量随处理浓度的增大而升高, 其中 SREC 的累积量大于 WREC。抗旱性越强的植物品种细胞失水率越小, 保水性越强, 在渗透(干旱)胁迫下 RWC 下降幅度越小; Pro 是细胞内的渗透调节物质, 主要调节细胞质的渗透势, 同时对酶、蛋白质和生物膜起保护作用。整株水平研究显示, 芦苇 Pro 累积量与其抗旱性呈正相关^[8]。说明 2 种生态型愈伤组织在对渗透胁迫的适应性方面存在明显差异, 这也与整株水平研究结果一致^[6,8,9]。

渗透(干旱)胁迫诱导了植物体产生氧化胁迫, 致使体内活性氧代谢失调, 产生非脂性超氧化物自由基(O₂⁻, ·OH), 对细胞产生毒害作用^[7]。植物体内存在着酶促及非酶促 2 类活性氧清除系统。酶促清除系统主要包括 SOD、POD 和 CAT 等。SOD 处于抵御活性氧伤害的“第一道防线”, 它将活性氧歧化成 H₂O₂, H₂O₂ 的累积会启动并加剧膜脂过氧化作用, 造成整

体膜损伤,而 POD 和 CAT 是细胞内有害物质 H_2O_2 的清除剂。本试验表明, SOD、POD 和 CAT 活性的变化具有明显的生态型差异, 2 种愈伤组织随渗透胁迫强度的加深 3 种酶活性升高,但增幅明显不同。说明芦苇愈伤组织在抗渗透胁迫时 3 种酶的合成调节能力不同。这可能是不同生态型芦苇间存在抗旱适应性强弱差异的重要原因之一。

逆境胁迫下,植物细胞质膜结构上的稳定性是细胞执行新陈代谢生命功能的基础。由于植物细胞膜组分中的不饱和脂肪酸含量很高,极易受到活性氧的攻击而发生均裂^[8]。本试验也证明,随着 PEG 胁迫强度的增大,芦苇愈伤组织的质膜透性也随之增大,2 种生态型在这方面表现出较大的差异。耐旱的 SREC 细胞膜受伤害程度较轻,它的保护酶活性相应也高;不耐旱的 WREC 细胞膜受伤害的程度较重,它的保护酶活性相应也较低。因此,可以认为 SOD、POD 和 CAT 在植物抵抗渗透(干旱)胁迫过程中,可能在防止、中断或终止膜脂过氧化对细胞膜系统的酶性保护中起作用。

干旱期间植物细胞内 ABA 的生物合成受到显著促进作用^[9],而高渗处理往往会使植物愈伤组织 ABA 浓度提高^[20]。芦苇的抗渗透能力与体内的 ABA 水平呈正相关^[]。本试验结果显示,外源 ABA 明显提高了 WREC 对渗透胁迫的适应性。这可能由于沙生芦苇长期适应干旱的环境,体内形成了较完整而独特的内在机制,较易感受干旱(渗透)胁迫的信号,迅速、大量地合成 ABA,进一步促使游离 P_{ro} 大量累积和保护酶活性的大幅度的提高,从而提高其抗渗透能力;相反, WREC 感受胁迫合成 ABA 的机制较弱,需外加 ABA 才能抵抗渗透胁迫。

参考文献:

- [] 陈国仓,张承烈. 不同生态型芦苇形态和茎秆结构的比较研究[J]. 兰州大学学报, 99, 27():9 - 98
- [2] 张承烈,陈国仓. 河西走廊不同生态型芦苇的气体交换特点的分析[J]. 生态学报, 99, (3): 250-254
- [3] 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, 992, 34(9): 698- 704
- [4] 张承烈,周瑞莲. 芦苇耐脱水能力的生理生态学分析[J]. 植物生态学与地植物学学报, 992, 6(4): 3 - 36
- [5] 郑学平,陈国仓,张承烈. 河西走廊芦苇的光合碳同化途径对生境条件的适应[J]. 植物生态学与地植物学学报, 993, 7(): - 8
- [6] 王洪亮,张承烈. 河西走廊不同生态型芦苇质膜特性的比较研究[J]. 植物学报, 993, 35(7): 533- 540
- [7] 赵相山,陈国仓,张承烈. 芦苇叶中 Rubisco 对于干旱生境的响应[J]. 西北植物学报, 994, 4(3): 93 - 97
- [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, 994, 4 (增刊): 56- 60
- [9] 任东涛,张承烈. 河西走廊不同生态型芦苇核酸代谢季节变化研究[J]. 植物学报, 994, 6(5): 385- 392
- [0] 杨海莲,任东涛,张承烈. 不同生态型芦苇 tRNA 的分离纯化及氨酰化特性研究[J]. 西北植物学报, 995, 5(5): 53- 57
- [] Wang Hongliang, Zhang Chenglie Seasonal changes of endogenous ABA and CTKs in environmental adapta-

- tion of different ecotypes of reed plants[J]. Journal of Environmental Sciences, 1995, 7(4): 449– 454.
- [2] Wang L, Zhang C L. Seasonal changes of polyamines inhabit at adaptation of different ecotypes of reed plants [J]. Oecologia, 1995, 0 : 9– 23.
- [3] 龚富生, 张嘉宝. 植物生理学实验[M]. 北京: 气象出版社, 1995.
- [4] 王韶唐. 植物生理学实验指导[M]. 陕西科学技术出版社, 1987. 49– 5 .
- [5] 张殿忠, 汪沛洪, 赵会贤. 测定小麦叶片游离脯氨酸含量的方法[J]. 植物生理学通讯, 1990, 26(4): 62 – 65.
- [6] 刘昌玲. 细菌过氧化氢酶的分离结晶及性质[J]. 生物化学与生物物理进展, 1990, 7(5): 280– 283.
- [7] 蒋明义, 郭绍川. 水分亏缺诱导的氧化胁迫和植物的抗氧化作用[J]. 植物生理学通讯, 1996, 32(2): 44– 50.
- [8] 陈京. 抗旱性不同的甘薯品种对渗透胁迫的生理响应[J]. 作物学报, 1999, 25(2): 232– 236.
- [9] Parry A D. Absciscic acid metabolism[A]. In: Methods in Plant Biochemistry [M]. Vol. (Academic Press Limited): 1993. 38 – 402.
- [20] Ammirato P V. Embryogenesis[A]. In: Evens D A, Sharo W R, Ammirato P V, *et al.* Hand Book of Plant Cell Culture[M]. New York: Mac Millan, 1983, : 82– 23.

Some Physiological Response of the Calluses from Reed Ecotypes to Osmotic Stress and Exogenous ABA

WU Shi-guang , CHEN Long , LIU Hua-pan , ZHANG Cheng-lie²

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

2. College of Life Sciences, Lanzhou Univesity, Lanzhou Gansu 730000, China)

Abstract: We've studied the physiological changes of the embryogenic calluses of sand reed (SREC) and the water reed (WREC) in response to the osmotic stress of PEG-6000 and exogenous ABA. The results showed that the contents of free proline, relative membrane permeability and safeguard enzyme (CAT, POD and SOD) activity of SREC and WREC increased under the PEG osmotic stress treatment from 0% ~ 30%, while the relative water content (RWC) decreased under the same treatment. Still the contents of proline and safeguard enzyme activity of SREC increased higher than these of WREC. While the relative membrane permeability and RWC of SREC decreased less than these of WREC. It also showed the response of WREC to exogenous ABA was much higher than that of SREC.

Key words: Reed ecotypes; Embryogenic callus; Osmotic stress; Exogenous ABA; Physiological and biochemical response